

Bioorganische Chemie

Räumliches Screening cyclischer Neoglycopeptide: Identifizierung von polyvalenten Weizenkeimagglutinin-Liganden**

Valentin Wittmann* und Sonja Seeberger

Natürliche und synthetische polyvalente Liganden sind in der Lage, biologische Prozesse zu inhibieren oder durch Signaltransduktion zu regulieren.^[1,2] Besonders bei Kohlenhydrat-Lectin-Wechselwirkungen spielt Polyvalenz eine große Rolle, da individuelle Kohlenhydratepitope in der Regel nur mit niedriger Affinität und oft auch geringer Spezifität gebunden werden.^[3,4] Die Potenz eines polyvalenten Inhibitors hängt entscheidend von der sterischen Präsentation der Kohlenhydrate ab und der damit verbundenen Möglichkeit, mehrere Bindungsstellen simultan zu besetzen. Bei bekannter 3D-

[*] Dr. V. Wittmann,[†] Dipl.-Chem. S. Seeberger
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Marie-Curie-Straße 11, 60439 Frankfurt (Deutschland)
E-mail: mail@valentin-wittmann.de

[†] Neue Adresse:
Universität Konstanz, Fachbereich Chemie
Fach M 709, 78457 Konstanz (Deutschland)
Fax: (+49) 7531-88-4573

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Adolf-Messer-Stiftung gefördert (Adolf-Messer-Stiftungspreis 2000 für interdisziplinäre Grundlagenforschung an V.W.). Wir danken Prof. Joachim W. Engels für seine Unterstützung, Prof. Hermann Schägger für die Durchführung der Mikrosequenzierungen, der Degussa AG für Aminosäurespenden und der Aventis AG für die Überlassung einer HPLC-Anlage.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Synthese von **1**, **3** und **9**, Durchführung des Festphasen-Enzymimmuno-Lectinbindungs-Tests) sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Struktur des Proteins lassen sich passende polyvalente Liganden durch rationales Design entwerfen, wie eindrucks- voll am Beispiel der bakteriellen AB₅-Toxine,^[5] aber auch an Nicht-Kohlenhydrat-Systemen^[6] gezeigt wurde („gezielte“ Polyvalenz). Ist die dreidimensionale Anordnung der Bindungsstellen eines polyvalenten Lectins jedoch unbekannt, muss eine große Zahl an potenziellen Liganden synthetisiert und getestet werden, um die erforderliche Anordnung der Kohlenhydrate zu ermitteln.^[4,7] Dies gilt vor allem für konformativ eingeschränkte Glycocluster, die in derartigen Systemen zu besonders affinen Liganden führen können.^[1,6,8] Das Screening einer Bibliothek von räumlich diversen Glycoclustern könnte diesen Prozess entscheidend beschleu- nigen. St. Hilaire und Meldal et al. stellten Split-Mix-Biblio- theken aus linearen Glycopeptiden vor.^[9] Erste Studien über das Verhalten dynamischer kombinatorischer Kohlenhydrat- Bibliotheken aus vier^[10] und 21^[11] Verbindungen in Gegen- wart von Lectinen wurden ebenfalls publiziert.

Wir beschreiben hier die erste Split-Mix-Bibliothek aus konformativ eingeschränkten, räumlich diversen Glycoclus- tern und deren Screening auf Bindungsverhalten an das N-Acetylglucosamin(GlcNAc)-bindende Pflanzenlectin Weizenkeimagglutinin (WGA). Als Gerüstmoleküle (Template) zur Präsentation der Kohlenhydratreste wählten wir seiten- kettencyclisierte Peptide.^[12] Abbildung 1 zeigt die Zusam- mensetzung der Bibliothek **1**, die durch konvergente Fest- phasensynthese an TentaGel ohne Verwendung eines Linkers nach einer von uns beschriebenen Synthesestrategie^[13] erhal- ten wurde. An den kombinatorisch variierten Positionen (grau unterlegt) wurden L- und D-Aminosäuren ohne weitere Seitenkettenfunktionalität eingesetzt sowie L- und D-Diamino- säuren wie L-2,3-Diaminopropionsäure (Dpr), D-2,4-Diamino- buttersäure (D-Dab) und D-Lysin. Letztere dienten als Anknüpfungspunkte für GlcNAc-Reste unter Urethanbil- dung mit einem zu diesem Zweck entwickelten, auf der Aloc- Schutzgruppe basierenden Linker. Mit diesem Bibliotheks- design lässt sich räumliche Diversität in zwei Dimensionen erzeugen: Positionsdiversität führt zu unterschiedlichen Kohlenhydratmustern auf den Peptidgerüsten, während Variation der Konfiguration der Aminosäuren (Stereodiversität)^[14] die räumliche Diversität durch Modulation der Peptidfaltung erhöht. Außerdem ermöglicht das Bibliotheksdesign eine Analyse der Neoglycopeptide an einzelnen Harzkugeln.^[15] Die Zahl der GlcNAc-Reste pro Verbindung reicht von 0 (bei

2.6 % aller in **1** enthaltenen 19440 Verbindungen) über 1 (14.5 %), 2 (30.3 %), 3 (30.9 %), 4 (16.6 %) und 5 (4.5 %) bis zu 6 (0.5 %).

WGA ist ein 36-kDa-Lectin aus zwei identischen glycin- und cysteinreichen Untereinheiten. Das WGA-Dimer enthält insgesamt acht Bindungsstellen für GlcNAc und dessen Oligomere.^[16] Daher war WGA ein aussichtsreicher Kandidat für eine polyvalente Wechselwirkung. Zum Screening auf Bindung an WGA entwickelten wir den in Abbildung 2 gezeigten Festphasen-Enzymimmuno-Lectinbindungs- test.

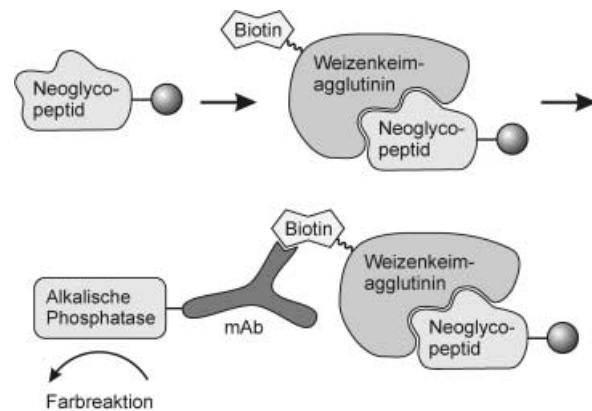


Abbildung 2. Festphasen-Enzymimmuno-Lectinbindungs- test zum Screening von **1** auf WGA-Liganden. mAb = monoklonaler Antikörper.

Etwa 100 mg der Bibliothek **1** (entsprechend annähernd 100 000 Harzkugeln oder fünf Kopien jeder Bibliothekskom- ponente) wurden mit biotinyliertem WGA inkubiert und nach Waschen mit einem Konjugat aus einem monoklonalen Anti-Biotin-Antikörper und alkalischer Phosphatase (AP) versetzt. Nach weiterem Waschen wurden die WGA-Ligan- den tragenden Harzkugeln durch eine durch AP katalysierte Reaktion, die einen wasserunlöslichen Farbstoff lieferte, sichtbar gemacht. Wie in Abbildung 3a gezeigt, waren zunächst ca. 97–98 % aller Harzkugeln gefärbt. Dieses Ergebnis war nicht unerwartet, da dieser Anteil dem aller in **1** enthaltenen Verbindungen mit mindestens einem GlcNAc- Rest entspricht. Um nur die besten der in **1** enthaltenen WGA-Liganden zu identifizieren, setzten wir bei der Inkuba- tion mit WGA und allen folgenden Waschschritten mono- meres GlcNAc in unterschiedlichen Konzentrationen als Konkurrenzli- gand zu (Abbildung 3b und c).^[17] So gelang es, den färbbaren Anteil auf etwa 0.1 % der Harzkugeln (Abbil- dung 3c) zu verringern; im Extrem- fall konnte keine Wechselwirkung mehr mit dem Antikörper nachge- wiesen werden. Auch das Screening der nichtglycosylierten Bibliothek **2** sowie ein Kontrollexperiment, bei dem auf die Zugabe des biotinylier- ten WGA verzichtet wurde, lieferten keine gefärbten Harzkugeln. Daraus schließen wir, dass der Bindungstest

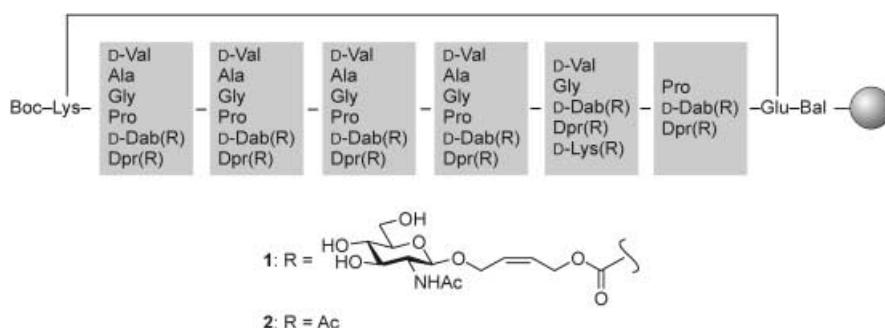


Abbildung 1. Aus 19440 Verbindungen bestehende Neoglycopeptidbibliothek **1** und Kontrollbiblio- thek **2** zum räumlichen Screening von WGA-Liganden.

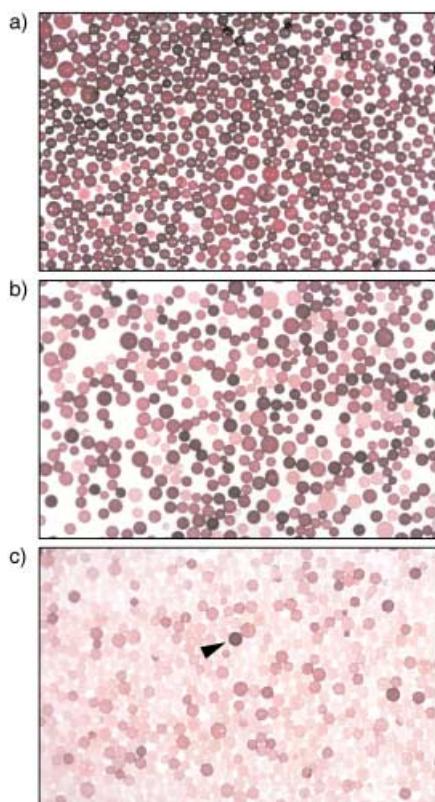


Abbildung 3. Harzkugeln von 1, die nach dem in Abbildung 2 gezeigten WGA-Bindungstest angefärbt wurden. a) Durchführung des Tests ohne Zusatz von GlcNAc; b) WGA-Inkubation in Gegenwart von 225 mM GlcNAc, alle weiteren Schritte in Gegenwart von 16 mM GlcNAc; c) WGA-Inkubation: 680 mM GlcNAc, alle weitere Schritte: 167 mM GlcNAc. Die gekennzeichnete Harzkugel wurde als Hit identifiziert. Mittlerer Durchmesser der Harzkugeln: 130 µm.

tatsächlich auf einer Kohlenhydrat-Lectin-Wechselwirkung beruht. Der anfänglich eingesetzte, von Kahne et al. zum Screening einer Oligosaccharid-Bibliothek entwickelte Bindungstest,^[18] bei dem anstelle des AP-Antikörper-Konjugats ein AP-Streptavidin-Konjugat verwendet wird, erwies sich demgegenüber als ungeeignet, da Bibliothek 1 offensichtlich einen geringen Anteil an Streptavidin-Liganden enthält.

Die am stärksten gefärbten Harzkugeln wurden manuell unter einer Stereolupe aussortiert und nach Palladium-katalysierter Abspaltung der Zucker nach einer von uns beschriebenen Strategie^[15] durch Mikrosequenzierung (Edman-Abbau) analysiert. Es konnten zwei tetravalente (**3**, **4**), eine pentavalente (**5**) und vier hexavalente (**6-9**) Neoglycopeptide identifiziert werden. Sollte der durchgeführte Bindungstest auf Polyvalenz ansprechen, so ist zu erwarten, dass viele Verbindungen mit einer hohen Zahl an GlcNAc-Resten gefunden werden. Für **3-9** trifft dies eindeutig zu. Interessanterweise führten aber nicht alle in der Bibliothek **1** enthaltenen hexavalenten Neoglycopeptide (0.5%) zu einer vergleichbaren Anfärbung. Stattdessen befanden sich eine pentavalente und zwei tetravalente Verbindungen unter den Liganden an den am stärksten gefärbten Harzkugeln.

3: Boc-Lys-d-Dab(R)-d-Val-d-Dab(R)-d-Dab(R)-d-Val-d-Dab(R)-Glu-Bal-NH₂

4: Boc-Lys-Ala-Ala-Dpr(R)-d-Dab(R)-d-Dab(R)-Dpr(R)-Glu-Bal-NH₂

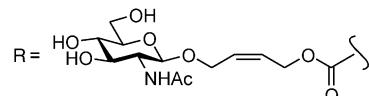
5: Boc-Lys-d-Dab(R)-Pro-Dpr(R)-d-Dab(R)-d-Lys(R)-Dpr(R)-Glu-Bal-NH₂

6: Boc-Lys-Dpr(R)-d-Dab(R)-d-Dab(R)-d-Dab(R)-d-Lys(R)-Dpr(R)-Glu-Bal-NH₂

7: Boc-Lys-d-Dab(R)-Dpr(R)-d-Dab(R)-d-Dab(R)-d-Dab(R)-d-Dab(R)-Glu-Bal-NH₂

8: Boc-Lys-d-Dab(R)-d-Dab(R)-d-Dab(R)-d-Dab(R)-d-Dab(R)-Dpr(R)-Glu-Bal-NH₂

9: Boc-Lys-d-Dab(R)-d-Dab(R)-d-Dab(R)-d-Dab(R)-d-Lys(R)-d-Dab(R)-Glu-Bal-NH₂



Um zu überprüfen, ob das Ergebnis des Bindungstests auch in Lösung reproduzierbar ist, synthetisierten wir exemplarisch die Neoglycopeptide **3**, **5** und **9** einzeln nach. IC₅₀-Werte für die Inhibition der Bindung von Schweinemagenmucin an Peroxidase-markiertes WGA (Abbildung 4,

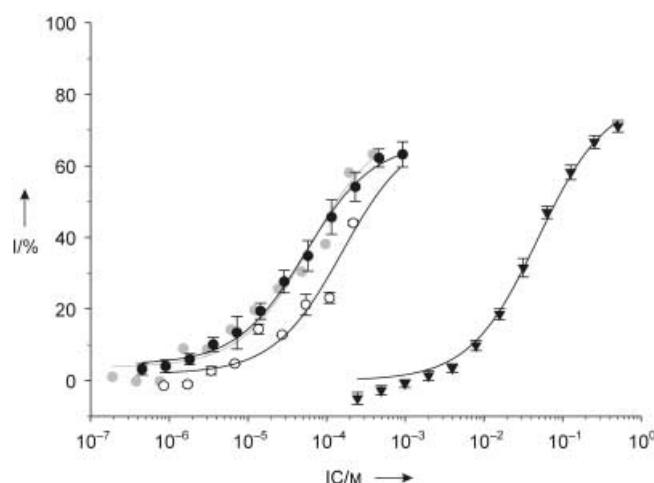


Abbildung 4. Dosis-Wirkungs-Kurven für die Inhibition der Bindung von Schweinemagenmucin an Peroxidase-markiertes WGA, bestimmt durch einen enzymgekoppelten Lectinbindungstest (ELLA). Dreiecke: GlcNAc, weiße Kreise: 3, graue Kreise: 5, schwarze Kreise: 9. (I = Inhibition, IC = Inhibitorkonzentration)

Tabelle 1) wurden durch einen enzymgekoppelten Lectinbindungstest (ELLA), wie von Zanini und Roy beschrieben,^[19] ermittelt. Dieser ergab für das tetra- (**3**), penta- (**5**) und hexavalente (**9**) Neoglycopeptid eine 218-, 619- bzw. 568-fach erhöhte Affinität zu WGA gegenüber monovalentem GlcNAc als Referenz (β -Werte^[11]). Demnach korreliert das Ergebnis des Festphasen-Lectinbindungstests mit dem Bindungsverhalten von **3**, **5** und **9** in Lösung und wird nicht von einem Oberflächeneffekt an den Harzkugeln dominiert. Dies ist bemerkenswert im Vergleich zu Beobachtungen von

Tabelle 1: Aus den in Abbildung 4 gezeigten Dosis-Wirkungs-Kurven bestimmte IC_{50} -Werte für die Inhibition der Bindung von Schweinemagenmucin an Peroxidase-markiertes WGA durch **3**, **5** und **9**.

Verbindung	IC_{50} [mM]	β
GlcNAc	83	1
3	0.381	218
5	0.134	619
9	0.146	568

Kahne et al., die beim Screening einer Bibliothek von immobilisierten monovalenten Oligosacchariden gegen das Lectin aus *Bauhinia purpurea* keine Korrelation zwischen den Lösungssaffinitäten der monovalenten Liganden und den entsprechenden Aviditäten auf der Oberfläche von Harzgeln fanden.^[18] Dass **5** und **9** eine vergleichbare Affinität besitzen, verdeutlicht, dass nicht allein die Zahl der GlcNAc-Reste die Bindungsstärke bestimmt, sondern auch die Ligandenarchitektur von großer Bedeutung ist, was sich mit Beobachtungen an anderen Systemen deckt.^[20]

Wir haben die erste Split-Mix-Bibliothek aus konformativ eingeschränkten, räumlich diversen Glycoclustern und ihr Screening durch einen neuen Festphasen-Lectinbindungstest vorgestellt. Der Test führt nicht zu falsch-positiven Ergebnissen aufgrund einer Interaktion mit Streptavidin. Die Bindungsverstärkung der identifizierten polyvalenten Liganden **3**, **5** und **9** gegenüber monovalentem GlcNAc ist die höchste bisher für GlcNAc-Cluster dieser Größe gegenüber WGA gefundene.^[19,21] Da die Bibliothek nichtglycosylierter Cyclopeptide **2** keine WGA-Liganden enthält, gehen wir davon aus, dass die räumliche Präsentation der GlcNAc-Reste auf den Cyclopeptid-Templaten für die hohe Affinität zu WGA verantwortlich ist. Das von uns beschriebene Verfahren des räumlichen Screenings^[22] von polyvalenten Lectinliganden lässt sich leicht auf andere Lectine übertragen, da die Kohlenhydrate bei der Synthese der Neoglycopeptid-Bibliothek im letzten Schritt angekuppelt werden und somit leicht ersetzt werden können.

Ein eingegangen am 4. Juni 2003 [Z52055]

Stichwörter: Bioorganische Chemie · Glycopeptide · Kohlenhydrate · Lectine · Polyvalenz

- [1] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794.
- [2] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 696–703.
- [3] a) T. K. Dam, C. F. Brewer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 387–429; b) J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555–578; c) B. T. Houseman, M. Mrksich, *Top. Curr. Chem.* **2002**, *218*, 1–44; d) T. K. Lindhorst, *Top. Curr. Chem.* **2002**, *218*, 201–235; e) L. L. Kiessling, T. Young, K. H. Mortell in *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*, Bd. II (Hrsg.: B. Fraser-Reid,

- K. Tatsuta, J. Thiem), Springer, Heidelberg, **2001**, S. 1817–1861; f) R. Roy, *Top. Curr. Chem.* **1997**, *187*, 241–274.
- [4] R. T. Lee, Y. C. Lee, *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 543–551.
- [5] a) P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvery, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, *403*, 669–672; b) E. Fan, Z. Zhang, W. E. Minke, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2663–2664.
- [6] N. Schaschke, G. Matschiner, F. Zettl, U. Marquardt, A. Bergner, W. Bode, C. P. Sommerhoff, L. Moroder, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 313–327.
- [7] a) Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321–327; b) *Neoglycoconjugates. Preparation and Applications* (Hrsg.: Y. C. Lee, R. T. Lee), Academic Press, San Diego, **1994**.
- [8] J. Rao, J. Lahiri, R. M. Weis, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2698–2710.
- [9] a) P. M. St. Hilaire, T. L. Lowary, M. Meldal, K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13312–13320; b) K. M. Halkes, P. M. St. Hilaire, P. R. Crocker, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 18–27.
- [10] S. Sakai, Y. Shigemasa, T. Sasaki, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8145–8148.
- [11] O. Ramström, J.-M. Lehn, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 41–48.
- [12] Zur Verwendung cyclischer Peptide als Template siehe: a) U. Sprengard, M. Schudok, W. Schmidt, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 359–362; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 321–324; b) H. Franzky, M. K. Christensen, R. M. Jørgensen, M. Meldal, H. Cordes, S. Mouritsen, K. Bock, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 21–40; c) G. Tuchscherer, M. Mutter, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 2153–2162; d) J. Eichler, A. W. Lucka, R. A. Houghten, *Peptides* **1994**, *7*, 300–307.
- [13] V. Wittmann, S. Seeberger, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4508–4512; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4348–4352.
- [14] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1440–1456; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1374–1389.
- [15] V. Wittmann, S. Seeberger, H. Schägger, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9243–9246.
- [16] C. S. Wright, G. E. Kellogg, *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1466–1476.
- [17] Andere Versuche, die Selektivität des Tests zu erhöhen, etwa durch Verringerung der Lectinkonzentration, waren nicht erfolgreich.
- [18] a) R. Liang, L. Yan, J. Loebach, M. Ge, Y. Uozumi, K. Sekanina, N. Horan, J. Gildersleeve, C. Thompson, A. Smith, K. Biswas, W. C. Still, D. Kahne, *Science* **1996**, *274*, 1520–1522; b) R. Liang, J. Loebach, N. Horan, M. Ge, C. Thompson, L. Yan, D. Kahne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10554–10559.
- [19] D. Zanini, R. Roy, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 187–192.
- [20] a) J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922–14933; b) S. André, R. J. Pieters, I. Vrasidas, H. Kaltner, I. Kuwabara, F.-T. Liu, R. M. J. Liskamp, H.-J. Gabius, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 822–830.
- [21] T. Furuike, S. Aiba, S.-I. Nishimura, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9909–9915.
- [22] Der Begriff des räumlichen Screenings („spatial screening“) wurde erstmals von Kessler et al. im Zusammenhang mit dem Screening von Bibliotheken stereoisomerer Peptide verwendet: H. Kessler, B. Diefenbach, D. Finsinger, A. Geyer, M. Gurrath, S. L. Goodman, G. Hoelzemann, R. Haubner, A. Jonczyk, G. Müller, E. Graf von Roedern, J. Wermuth, *Lett. Pept. Sci.* **1995**, *2*, 155–160.