

# Synthetische Lectine

Stefan Kubik\*

Kohlenhydrate · Kohlenhydratrezeptoren · Lectine ·

Molekulare Erkennung · Supramolekulare Chemie

Die Membranen pflanzlicher und tierischer Zellen sind extrazellulär mit einer dichten, bis zu 140 nm dicken Kohlenhydratschicht umgeben, der sogenannten Glycocalix. Diese Schicht besteht aus Oligosacchariden, die kovalent an Lipide oder an in die Membran eingebettete Proteine gebunden sind. Sie unterscheidet sich von Zelltyp zu Zelltyp und verleiht jeder Zelle dadurch eine charakteristisch strukturierte Oberfläche. So wird die Blutgruppenzugehörigkeit eines Menschen durch die An- oder Abwesenheit bestimmter Oligosaccharide auf der Oberfläche seiner Erythrozyten bestimmt. Daneben haben pathologische Veränderungen oder der Lebenszyklus einer Zelle, z.B. das Wachstum oder die Teilung, einen zum Teil signifikanten Einfluss auf die Kohlenhydratbelegung ihrer Oberfläche.

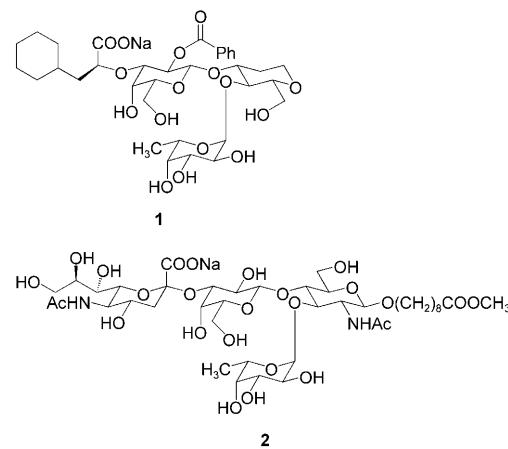
Die Glycocalix ist also (unter anderem) ein Informationsträger, der über Art und Zustand einer Zelle Aufschluss gibt. Sie ist dementsprechend an einer Reihe von biologischen Erkennungsvorgängen beteiligt, denen die spezifische Wechselwirkung zweier Zellen gemeinsam ist.<sup>[1]</sup> Beispiele sind der Befruchtungsvorgang, bei dem Rezeptoren auf der Oberfläche der Spermien den Oligosaccharidrest eines Glycoproteins auf der Oberfläche von Eizellen erkennen, Infektionen, bei denen sich Krankheitserreger wie Mikroben, Bakterien oder Viren an die zu infizierende Zelle eines Wirtes anheften oder Entzündungsvorgänge, die durch die Wechselwirkung von Leukozyten mit den Endothelzellen der Blutgefäße in der Nähe eines geschädigten Gewebes eingeleitet werden. Die Fehlsteuerung dieser Leukozytenrekrutierung führt zu akuten oder chronischen Entzündungserkrankungen wie Rheumatismus, Psoriasis oder Dermatitis.

Bei allen diesen Vorgängen sind für den primären Schritt, die eigentliche Zell-Zell-Erkennung, membrangebundene Proteine auf der Oberfläche der einen Zelle verantwortlich, die an die äußeren Kohlenhydratreste in der Glycocalix der zweiten Zelle binden. Diese Proteine werden Lectine genannt.<sup>[2]</sup>

Ein vielversprechender Ansatz zur Vermeidung von schädlichen Infektionen oder zur Behandlung von Entzündungserkrankungen ist der gezielte Eingriff in Kohlenhydrat-

vermittelte Zell-Zell-Erkennungsvorgänge. Dabei ist die Bedeutung dieses Konzepts weitreichender, als die obigen Beispiele andeuten. So werden Gewebedefekte in einem Organ, die nach der zeitweiligen Unterbrechung der Blutzufuhr, z.B. während einer Operation oder einem Herzinfarkt, auftreten, oder die Metastasierung von Krebszellen ebenfalls von Zelladhäsionsprozessen ausgelöst.<sup>[1]</sup> Wirksame Therapeutika zur Vermeidung oder Behandlung dieser Gesundheitsrisiken wären in der Wirkstoffforschung also von großem Interesse.

Wechselwirkungen zwischen Lectinen und Kohlenhydraten können auf zwei komplementären Wegen inhibiert werden: durch Blockierung des aktiven Zentrums im Lectin mit einem geeigneten Antagonisten oder durch Maskierung der Kohlenhydrate mit einem Rezeptor. Ein Beispiel für die erste Strategie<sup>[3a]</sup> ist Verbindung **1**, die mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 1–2 µm um etwa drei Größenordnungen besser an E-Selectin bindet als das natürliche Substrat Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (**2**; IC<sub>50</sub> = 1 mM)<sup>[3b]</sup> und dadurch potenziell einen frühen Schritt der Leukozytenrekrutierung inhibiert, der auf der Wechselwirkung von E-Selectin auf Endothelplasmamembranen mit Sialyl-Lewis<sup>x</sup> auf Leukozytenmembranen beruht.



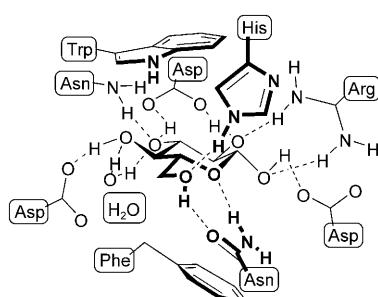
Die zweite Strategie – die Suche nach synthetischen Kohlenhydratrezeptoren – fällt in das Gebiet der supramolekularen Chemie. Hier hat es in den letzten Jahren große Fortschritte gegeben, dennoch ist die Entwicklung effizienter und selektiver Rezeptoren für Kohlenhydrate, vor allem solcher, die in kompetitiven Lösungsmitteln wirksam sind, nach wie vor eine anspruchsvolle Aufgabe.<sup>[4]</sup> Gründe hierfür sind

[\*] Prof. S. Kubik

Fachbereich Chemie – Organische Chemie  
Technische Universität Kaiserslautern  
Erwin-Schrödinger-Straße, 67663 Kaiserslautern (Deutschland)  
Fax: (+49) 631-205-3921  
E-Mail: kubik@chemie.uni-kl.de  
Homepage: <http://www.chemie.uni-kl.de/fachrichtungen/oc/kubik/>

die geringen Unterschiede zwischen den Wechselwirkungen eines Rezeptors mit Kohlenhydrat-OH-Gruppen und solchen mit Wassermolekülen sowie die Strukturähnlichkeit vieler Kohlenhydrate; D-Glucose und D-Mannose unterscheiden sich z.B. nur in der Konfiguration einer einzigen OH-Gruppe am Ring.

Inspirierungen zum Aufbau künstlicher Kohlenhydratrezeptoren wurden vor allem aus Kristallstrukturen von Protein-Kohlenhydrat-Komplexen erhalten.<sup>[5]</sup> Diese zeigen, dass das Substrat im aktiven Zentrum des Proteins üblicherweise durch ein dichtes Netzwerk von Wasserstoffbrücken gebunden wird. Als Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren spielen im Protein vor allem Amidgruppen in den Seitenketten von Asparaginuntereinheiten, Carboxylatgruppen aus Aspartat, OH-Gruppen aus Serin und NH-Gruppen aus Lysin, Imidazol oder Tryptophan eine Rolle. Bei der Bindung geladener Substrate findet man außerdem ionische Wechselwirkungen, in einigen Proteinen wird auch die Koordination des Substrats an ein Metallzentrum genutzt. Aufällig ist außerdem, dass in Protein-Kohlenhydrat-Komplexen häufig aromatische Seitenketten ober- und unterhalb der Ringebene des Substrats angeordnet sind, zwischen die dieses sandwichartig eingelagert wird, was auf eine Beteiligung von C-H···π-Wechselwirkungen an der Substratbindung hindeutet. Als Beispiel ist in Abbildung 1 der Bindungsmodus gezeigt, mit dem D-Glucose im aktiven Zentrum des D-Galactose bindenden Proteins gebunden wird.<sup>[5b]</sup>

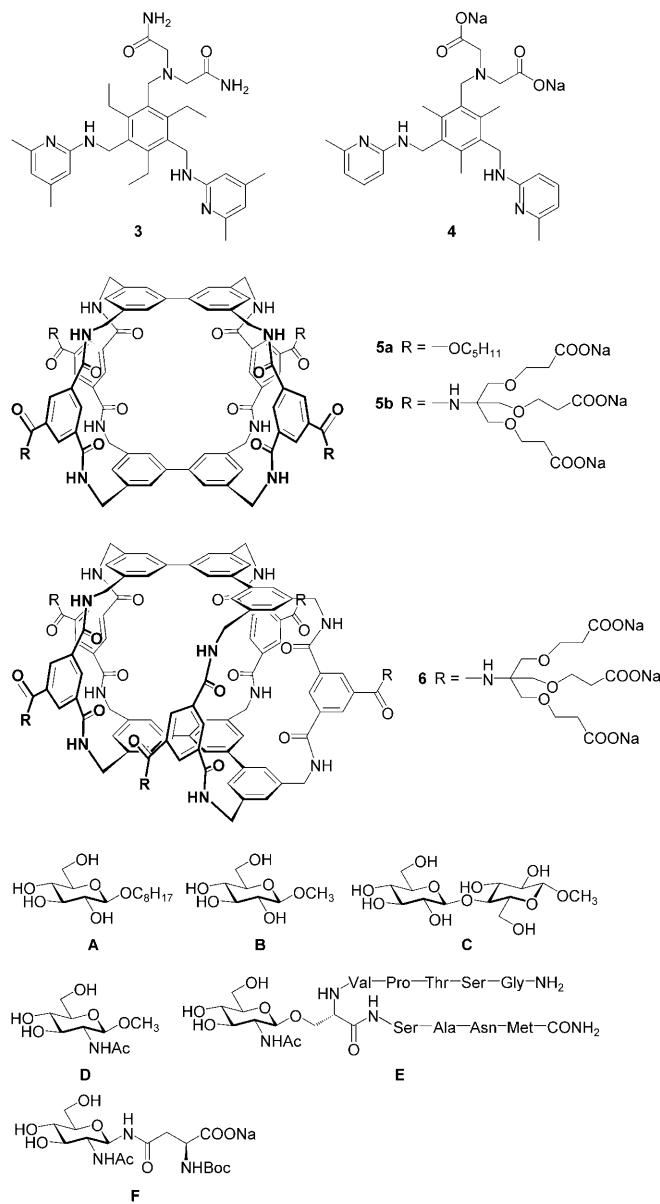


**Abbildung 1.** Wechselwirkungen von D-Glucose mit funktionellen Gruppen innerhalb des aktiven Zentrums des D-Galactose bindenden Proteins.

Aktuellere Arbeiten aus der Gruppe von Waters belegen, dass C-H···π-Wechselwirkungen zwischen einem Kohlenhydrat und einem Aren tatsächlich einen positiven Beitrag zur Gesamtstabilität eines Komplexes leisten.<sup>[6]</sup> Darüber hinaus konnte die von Lemieux<sup>[7]</sup> formulierte Annahme, dass die Triebkraft für die Bindung von Kohlenhydraten in Wasser unter anderem auf Lösungsmittelreorganisation zurückzuführen ist (insbesondere auf die Freisetzung der Wassermoleküle, die sich in der Nähe der hydrophoben Regionen des hydratisierten Kohlenhydratmoleküls befinden), kürzlich durch experimentelle Befunde der Gruppe von Davis gestützt werden.<sup>[8]</sup> Diese Lösungsmittelreorganisation liefert einen entropisch, möglicherweise sogar einen enthalpisch günstigen Beitrag zur Komplexbildung.

Bei vielen der in jüngerer Zeit beschriebenen Kohlenhydratrezeptoren werden mindestens zwei der in Protein-Koh-

lenhydrat-Komplexen identifizierten Wechselwirkungsarten realisiert, meist sind dies Wasserstoffbrücken und eine coplanare Anordnung der Substrate zu aromatischen Rezeptoruntereinheiten, die C-H···π-Wechselwirkungen ermöglicht. So wurde eine Reihe von effizienten Kohlenhydratrezeptoren identifiziert, die eine cyclische Anordnung von Bindungsstellen entlang geeignet trisubstituierter Benzol-Derivate oder anderer Arene enthalten. Rezeptor **3** bildet z.B. mit 1-O-n-Octyl-β-D-glucopyranosid (**A**) sehr stabile Komplexe in Chloroform ( $K_a$ -Wert des 1:1-Komplexes:  $144\,520\text{ M}^{-1}$ ).<sup>[9a]</sup>



Untersuchungen der Bindungseigenschaften solcher Kohlenhydratrezeptoren in organischen Lösungsmitteln liefern wichtige Erkenntnisse über den Einfluss, den die Art und die Anordnung von Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren auf die Rezeptoraffinität und -selektivität ausüben.

Darüber hinaus führen sie zu einem besseren Verständnis der Bindungsverhältnisse in natürlichen Systemen, da das Lösungsmittel Chloroform ein gutes Modell für die Verhältnisse im aktiven Zentrum eines Proteins darstellt. Im Hinblick auf Anwendungen muss es aber gelingen, Rezeptoren zu identifizieren, die auch in wässriger Umgebung wirksam sind. Dies kann man erreichen, indem man stärkere Wechselwirkungen zur Substratbindung nutzt. Rezeptor **4**, in dem Carboxylatgruppen analog zu Aspartatgruppen in aktiven Zentren von Kohlenhydrat bindenden Proteinen ladungsverstärkte Wasserstoffbrücken zum Substrat bilden können, bindet 1-*O*-Methyl-β-D-glucopyranosid (**B**) z.B. auch in Wasser; die Stabilitätskonstante  $K_a$  des 1:1-Komplexes ist mit  $2\text{ M}^{-1}$  aber sehr klein.<sup>[9b]</sup>

Einen alternativen Weg schlugen Davis et al. ein: Die von ihnen entwickelten Kohlenhydratrezeptoren bestehen aus zwei aromatischen Untereinheiten, zwischen die das Substrat eingelagert werden kann.<sup>[10]</sup> Vier Brückeneinheiten induzieren eine parallele Anordnung dieser Arene und stellen gleichzeitig in das Innere des Rezeptorhohlraums ragende Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren zur Verfügung, die mit den OH-Gruppen in der Peripherie eines eingelagerten Substrats wechselwirken können. Auf diese Weise werden die Bindungsverhältnisse in Kohlenhydrat bindenden Proteinen ausgezeichnet imitiert.

Das erste Mitglied dieser Rezeptorklasse, **5a**, bindet **A** in 5% CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub> mit einer NMR-spektroskopisch bestimmten Bindungskonstante von  $980\text{ M}^{-1}$ .<sup>[10a]</sup> In reinem Chloroform wurde für diesen Komplex mithilfe einer Fluoreszenztitration ein  $K_a$ -Wert von immerhin  $3 \times 10^5\text{ M}^{-1}$  bestimmt. Die Affinität von **5a** für das entsprechende α-Anomer oder für 1-*O*-n-Octyl-β-D-mannopyranosid ist deutlich geringer, wahrscheinlich weil die axialen Substituenten in diesen Monosacchariden eine effiziente Einlagerung in den Rezeptorhohlraum erschweren.

Das wasserlösliche Analogon von **5a**, Rezeptor **5b**, ermöglichte Bindungsstudien in Wasser. Diese ergaben für den Komplex von **5b** mit **B** eine Stabilitätskonstante von  $27\text{ M}^{-1}$ .<sup>[10b]</sup> Im Einklang mit den Bindungsstudien in organischen Lösungsmitteln werden Kohlenhydrate mit axialen Substituenten weniger stark gebunden. Somit konnte gezeigt werden, dass ein neutraler Rezeptor durchaus eine nennenswerte Kohlenhydrataffinität in dem außerordentlich kompetitiven Medium Wasser aufweisen kann, auch wenn keine ladungsverstärkten Wasserstoffbrücken für die Substratbindung genutzt werden.<sup>[11]</sup> Ursache hierfür sind wahrscheinlich thermodynamisch günstige Beiträge der Lösungsmittelreorganisation bei der Komplexbildung.<sup>[8]</sup> Die Kohlenhydrataffinität von **5b** in Wasser ist deutlich höher als die von **4**, bleibt aber hinter jener von natürlichen Systemen, die üblicherweise im millimolaren Bereich liegt,<sup>[2c]</sup> deutlich zurück.

Rezeptor **6**, der einen größeren Hohlraum als **5b** hat, bindet Disaccharide in Wasser.<sup>[10c]</sup> 1-*O*-Methyl-β-D-cellobiose (**C**) wird von **6** z.B. mit einer Bindungskonstanten von ca.  $900\text{ M}^{-1}$  gebunden. Die Affinität von **6** zu Lactose, einem Epimer von Cellobiose mit einer einzigen axialständigen OH-Gruppe, ist um fast zwei Größenordnungen geringer. Damit kommt **6** in Bezug auf Affinität und Selektivität den Eigenschaften natürlicher Lectine schon nahe; es ist aber zu be-

rücksichtigen, dass bei Einlagerung von Cellobiose in den Hohlraum von **6** größere hydrophobe Oberflächen in Kontakt kommen und mehr direkte Rezeptor-Substrat-Wechselwirkungen gebildet werden können als bei der Bindung eines Monosaccharids an **5b**.

Jüngste Untersuchungen in der Gruppe von Davis zeigen nun, dass die Affinität von **5b** für bestimmte Monosaccharidderivate in Wasser signifikant höher ist als die für Glucose.<sup>[10d]</sup> So wird *N*-Acetyl-1-*O*-methyl-β-D-glucosamin (**D**) mit einer Bindungskonstante von  $630\text{ M}^{-1}$  gebunden, der Komplex ist also um mehr als eine Größenordnung stabiler als der von **5b** mit **B** oder Glucose. Dabei ist die Bindung hochselektiv: Von 21 anderen untersuchten Monosaccharidderivaten binden nur vier mit Bindungskonstanten von  $> 10\text{ M}^{-1}$  an diesen Rezeptor, wobei die Stabilität keines dieser vier Komplexe  $60\text{ M}^{-1}$  überschreitet. Zum Vergleich: Das natürliche Lectin Weizenkeimagglutinin (WGA) hat mit einer Bindungskonstanten von  $730\text{ M}^{-1}$  eine ähnliche Affinität für **B** wie **5b**, und seine Selektivität ist sogar geringer. *N*-Acetyl-1-*O*-methyl-α-D-glucosamin bindet an WGA beispielsweise mit einem  $K_a$ -Wert von  $480\text{ M}^{-1}$ , während der entsprechende Komplex von **5b** nur einen  $K_a$ -Wert von  $24\text{ M}^{-1}$  aufweist.

Angesichts dieser vielversprechenden Ergebnisse lag es nahe, zu untersuchen, ob **5b** auch eine Affinität für Glycoproteide aufweist, die *O*-glykosidisch gebundene *N*-Acetylglucosaminreste tragen. Als Modellsubstrat wurde Peptid **E** verwendet, das einen Ausschnitt aus Casein Kinase II (CKII) nach Glycosylierung des Serinrests in Position 6 durch *O*-GlcNAc-Transferase darstellt. NMR-spektroskopisch wurde für den Komplex von **5b** mit **E** eine beachtliche Stabilitätskonstante von  $1040\text{ M}^{-1}$  ermittelt. Vergleichende Untersuchungen mit einem Peptid ohne *N*-Acetylglucosaminsubstituenten zeigten, dass die Wechselwirkung auf spezifische Bindung von **5b** an das Monosaccharid zurückzuführen ist. Interessanterweise bindet das Asparaginderivat **F** mit einem *N*-glykosidisch gebundenen *N*-Acetylglucosaminrest praktisch nicht an **5b** ( $K_a = 4\text{ M}^{-1}$ ), was ein weiteres Indiz für die hohe Bindungsselektivität dieses Rezeptors ist.

Die Strukturcharakterisierung des Komplexes von **5b** mit **D** mithilfe von NMR-Spektroskopie in Kombination mit Molecular Modeling ergab, dass sich das Substrat im Komplex (wie auch bei Komplexen der Rezeptoren **5a** oder **6**)<sup>[10a-c]</sup> zwischen den beiden parallel angeordneten Arenen befindet. Zahlreiche Wasserstoffbrücken und C-H···π-Wechselwirkungen sorgen für eine effiziente und definierte Bindung. Die *N*-Acetylgruppe in Position 2 des Substrats befindet sich zwischen zwei Isophthalimidbrücken an einem der engeren Portale des Rezeptors. Dort wird sie durch hydrophobe Kontakte, zwei Wasserstoffbrücken zum Carbonylsauerstoffatom sowie eine NH···π-Wechselwirkung stabilisiert. Diese multiplen Wechselwirkungen erklären wahrscheinlich die höhere Stabilität des *N*-Acetyl-1-*O*-methyl-β-D-glucosaminkomplexes von **5b** gegenüber dem Komplex mit Glucose.

**5b** und **6** sind somit die ersten Kohlenhydratrezeptoren, für die die Bezeichnung „synthetische Lectine“ wirklich gerechtfertigt ist. Sie demonstrieren, dass die effiziente und selektive Erkennung von Kohlenhydraten in Wasser durch synthetische Rezeptoren durchaus realisierbar ist, und sie geben Hinweise darauf, welche Prinzipien bei einem zu-

künftigen Rezeptordesign beachtet werden müssen. So scheint die Interkalation der Substrate zwischen zwei aromatische Einheiten eines Rezeptors eine wichtige Triebkraft für die Bindung in Wasser zu liefern. Für die Zukunft stellt sich nun die spannende Frage, ob solche Rezeptoren auch einen Einfluss auf Zelladhäsionsphänomene ausüben können.

Online veröffentlicht am 29. Dezember 2008

- 
- [1] Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321–327; T. K. Lindhorst, *Chem. Unserer Zeit* **2000**, *34*, 38–52; Ausgabe von *Chem. Rev.* zum Thema Glycobiology **2002**, *102*, 283–602; M. E. Taylor, K. Drickamer, *Introduction to Glycobiology*, Oxford University Press, Oxford, **2006**; T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
  - [2] a) H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637–674; b) H. Lis, N. Sharon, *Lectins*, Kluwer, Dordrecht, **2003**; c) T. K. Dam, C. F. Brewer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 387–430.
  - [3] a) P. Sears, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2446–2471; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2300–2324; b) G. Thoma, R. Bänteli, W. Jahnke, J. L. Magnani, J. T. Patton, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3756–3759; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3644–3647.
  - [4] A. P. Davis, R. S. Wareham, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3160–3179; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2978–2996; A. P. Davis, T. D. James in *Functional Synthetic Receptors* (Hrsg.: T. Schrader, A. D. Hamilton), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 45–109.
  - [5] a) F. A. Quiocio, *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 287–315; b) F. A. Quiocio, *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1293–1306; c) W. I. Weis, K. Drickamer, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 441–473.
  - [6] Z. R. Laughrey, S. E. Kiehna, A. J. Riemen, M. L. Waters, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14625–14633.
  - [7] R. U. Lemieux, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 373–380.
  - [8] E. Klein, Y. Ferrand, N. P. Barwell, A. P. Davis, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2733–2736; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2693–2696.
  - [9] a) M. Mazik, M. Kuschel, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1517–1526; b) M. Mazik, H. Cavga, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2957–2963.
  - [10] a) A. P. Davis, R. S. Wareham, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2397–2401; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2270–2273; b) E. Klein, M. P. Crump, A. P. Davis, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 302–306; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 298–302; c) Y. Ferrand, M. P. Crump, A. P. Davis, *Science* **2007**, *318*, 619–622; d) Y. Ferrand, E. Klein, N. P. Barwell, M. P. Crump, J. Jiménez-Barbero, C. Vicent, G.-J. Boons, S. Ingale, A. P. Davis, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1807–1811; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1775–1779.
  - [11] Andere Beispiele von Rezeptoren, die Kohlenhydrate in Wasser binden: R. Yanagihara, Y. Aoyama, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9725–9728; V. Král, O. Rusin, F. P. Schmidtchen, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 873–876; O. Rusin, K. Lang, V. Král, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 655–663.
-