

Molekulare Stäbe mit Oligospiroketal-Rückgrat als Anker in Biomembranen**

Peter Müller, Jörg Nikolaus, Sabine Schiller, Andreas Herrmann,* Kristian Möllnitz, Sylvia Czapla und Pablo Wessig*

Phospholipiddoppelschichten, die als gestützte Doppelschichten (supported bilayers) oder Vesikel organisiert sind, finden vielfältige Anwendungen als biokompatible Komponenten in der Biotechnologie und Medizin.^[1] Gestützte Lipiddoppelschichten werden beispielsweise als inerte Oberflächen genutzt, auf denen Enzymreaktionen effizient im Nanometermaßstab ablaufen.^[2] Des Weiteren verwendet man Liposomen als Transporter für bioaktive Substanzen wie Medikamente, die den Stoffwechsel und/oder Signalübertragungswege der Zelle beeinflussen, nachdem sie in das Zytosol ausgeschüttet wurden.^[1a,3] Um Lipiddoppelschichten mit Enzymen zu funktionalisieren oder mit Liganden zu bedecken, die spezielle Zielzellen erkennen, müssen die entsprechenden Moleküle stabil an der Oberfläche der Lipiddoppelschicht verankert werden. Dies kann durch eine kovalente Bindung der Moleküle an Lipide geschehen.^[4] Allerdings würde eine Verankerung durch ein Lipid im Falle einer großen, eher hydrophilen funktionellen Gruppe wahrscheinlich keine stabile Verbindung mit der Membran gewährleisten.

Hydrophobe Strukturen, welche die gesamte Membran durchspannen, sollten sich besser dafür eignen, funktionelle Gruppen stabil an der Membran zu verankern. Kandidaten für solche Strukturen sind Peptidsequenzen, die von Transmembrandomänen integraler Membranproteine abgeleitet sind. Eine Alternative könnten hydrophobe molekulare Stäbe bieten, die in verschiedenen Längen und starrer Konformation synthetisierbar sind und zugleich über terminale reaktive Gruppen oder Liganden eine kovalente oder nicht-kovalente Anbindung der gewünschten funktionellen Gruppe ermöglichen. Die Entwicklung molekulärer Stäbe, d. h. relativ steifer Moleküle mit einem großen Länge/Breite-Verhältnis, wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht.^[5] Insbesondere

die Verankerung von Oligo(*p*-phenylen)-Stäben in Membranen wurde intensiv von Matile und Mitarbeitern untersucht.^[6]

Hier beschreiben wir die Synthese eines hydrophoben molekularen Stabes, der terminal mit fluoreszierenden Gruppen funktionalisiert ist. Zum ersten Mal wurde eine kürzlich entwickelte Klasse von molekularen Stäben als hydrophober Membrananker genutzt.^[7] Als Basis dieser Stäbe fungieren die in Abbildung 1 gezeigten, spirocyclisch ver-

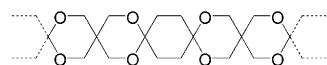


Abbildung 1. Struktur des Oligospiroketal(OSK)-Stabes.

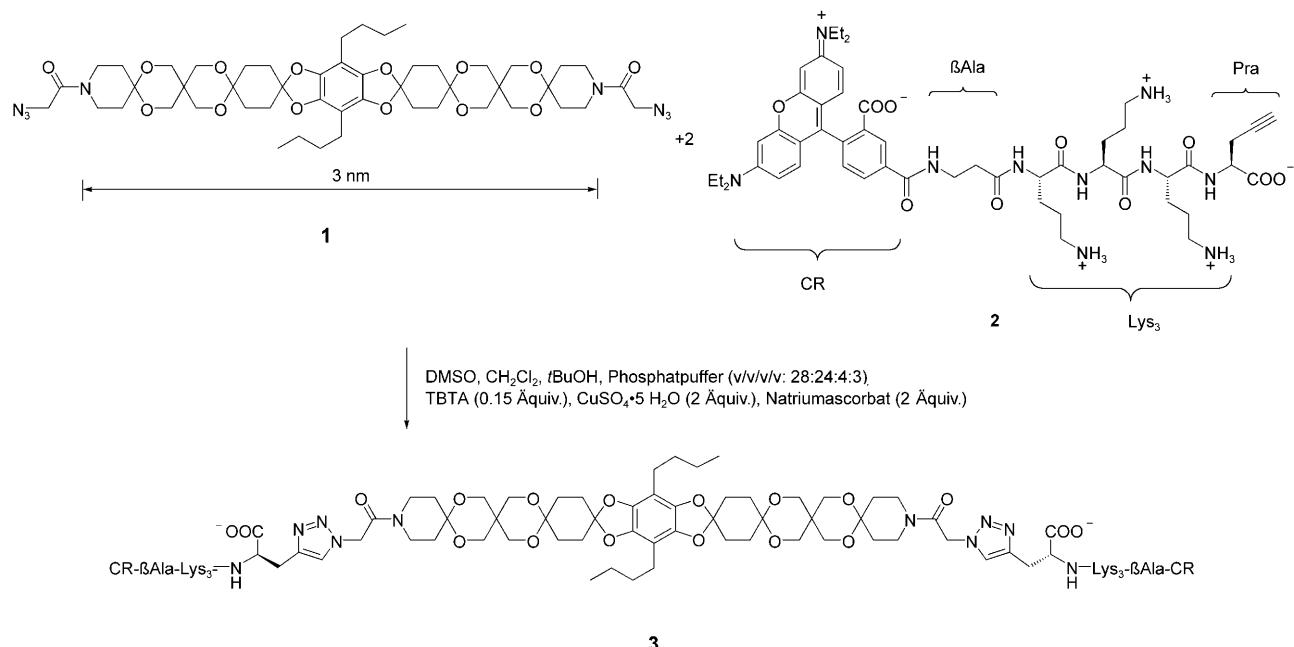
bundenen, gesättigten sechsgliedrigen Ringe. Dieser Typ von molekularem Stab wird wegen seiner periodischen Ketalsgruppen als Oligospiroketal(OSK)-Stab bezeichnet. Die wesentlichen Vorteile dieser Stäbe gegenüber Peptidsequenzen sind ihre unkomplizierte und flexible Synthese, ihre große konformativ Rigidität und ihre Proteolysestabilität. Durch die Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften weisen wir nach, dass der Einbau der Stäbe in Membranen sowohl während als auch nach der Bildung der Lipiddoppelschicht möglich ist. Darüber hinaus belegen wir, dass sich der OSK-Stab in intakte biologische Membranen, z. B. in die Plasmamembran von Säugetieren, einbauen lässt.

Kürzlich berichteten wir über eine effiziente Synthese von OSK-Stäben mit lateralen Alkylgruppen, die die Löslichkeit der Stäbe in organischen Lösungsmitteln erhöhen.^[8] Diese Gruppen (in diesem Fall handelt es sich um Butylgruppen) stellen sicher, dass auch relativ lange OSK-Stäbe mit einer Länge von 3 nm noch ausreichend löslich sind und so leicht an den terminalen Positionen funktionalisiert werden können. Im aktuellen Projekt nutzen wir das vorher beschriebene Bisazid **1** als zentralen Baustein für den Membrananker (Schema 1). Um den Einbau der eher hydrophoben OSK-Stäbe in biologische Membranen zu erleichtern, mussten hydrophile Gruppen an den terminalen Positionen des Stabes angebracht werden, sodass der Stab bolaamphiphile Eigenschaften erhält. Außerdem wurden Fluoreszenzfarbstoffe in die hydrophilen Bereiche eingeführt, um den Einbau der Stäbe in die biologische Membran fluoreszenzspektroskopisch untersuchen zu können.

Als hydrophile Gruppe wählten wir das Tripeptid Lys₃, das sich auch in ähnlichen Fällen als günstig erwiesen hatte.^[9] Für die Kupplung des Peptids mit dem OSK-Stab **1** durch Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (Klickreaktion)^[10] benötigten wir eine terminale Alkingruppe und führten

[*] Dr. P. Müller, J. Nikolaus, S. Schiller, Prof. Dr. A. Herrmann
Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin
Invalidenstraße 42, 10115 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-2093-8585
E-Mail: andreas.herrmann@rz.hu-berlin.de
K. Möllnitz, Dr. S. Czapla, Prof. Dr. P. Wessig
Institut für Chemie, Universität Potsdam
Karl-Liebknecht-Straße 24–25, 14476 Potsdam (Deutschland)
Fax: (+49) 331-977-5065
E-Mail: wessig@uni-potsdam.de
Homepage: <http://ag-wessig.chem.uni-potsdam.de>

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (P.W.: We1850-3/7-1, A.H.: SFB 765) finanziell unterstützt.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200901133> zu finden.



Schema 1. Synthese des Membranankers **3** aus dem Bisazidbaustein **1** und dem fluoreszenzmarkierten Pentapeptid CR- β Ala-Lys₃-Pra (**2**). TBTA = Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin.

deshalb L-Propargylglycin (Pra) an der C-terminalen Position des Peptids ein. Nach der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) des Tetrapeptids Lys₃-Pra fanden wir, dass eine direkte Kupplung des Fluoreszenzfarbstoffes 5-Carboxytetraethylrhodamin (CR) an das terminale Lysin nur unvollständig erfolgt. Diese Hürde konnte durch die Einführung einer β Ala-Gruppe als Abstandhalter überwunden werden. Eine Entschützung mit nachfolgender Abspaltung vom Harz und Reinigung durch HPLC ergab Baustein **2** (Schema 1; Details siehe Hintergrundinformationen). Zum Schluss wurde das Peptid **2** durch eine Klickreaktion mit Bisazid **1** zum fertigen Membrananker **3** gekuppelt (Schema 1).

Die Untersuchung des Membraneinbaus von **3** erfolgte mit einer Reihe komplementärer Methoden. Erstens wurden multilamellare Vesikel (MLVs) präpariert, bei deren Herstellung **3** mit dem Phospholipid 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC) gemischt wurde. Die Messung der Fluoreszeigenschaften der MLVs ergab die charakteristischen Anregungs- und Emissionsspektren von Rhodamin mit einem Maximum der Anregungswellenlänge bei ca. 560 nm und einem Maximum der Emissionswellenlänge bei ca. 580 nm (siehe Hintergrundinformationen).

Zweitens wurde der resonante Fluoreszenzenergietransfer (FRET) zwischen einer an ein Phospholipid gekuppelten NBD-Gruppe [*N*-(7-Nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)-1,2-di-palmitoyl-*sn*-phosphoethanolamin (N-NBD-PE) als Donor] und dem Rhodaminfluorophor von **3** (Akzeptor) gemessen (Abbildung 2). Hierfür wurden Fluoreszenzspektren von POPC/N-NBD-PE/3-MLVs und POPC/N-NBD-PE-MLVs aufgenommen. Beim Vergleich der beiden Spektren zeigt sich ein Energietransfer durch die Abnahme der NBD-Fluoreszenz bei 535 nm und die Zunahme der Rhodaminfluoreszenz bei 580 nm (Abbildung 2, Pfeile), was auf den Einbau des Stabes in die Membran schließen lässt. Ein FRET zwischen

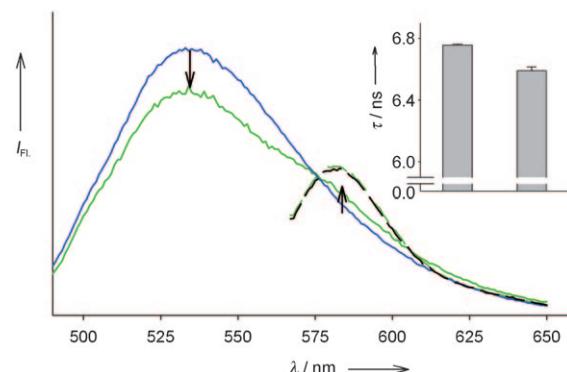


Abbildung 2. FRET von N-NBD-PE zu **3**. 0.5 mM POPC-MLVs wurden mit N-NBD-PE (10 μM) und **3** (50 μM) markiert. Fluoreszenzspektren von POPC/N-NBD-PE/3-MLVs wurden mit Anregung bei 470 nm (—) und bei 560 nm (----) bei 37°C aufgenommen. Als Kontrolle wurden die Spektren von POPC/N-NBD-PE-MLVs (Anregung bei 470 nm; —) und von POPC/3-MLVs (Anregung bei 560 nm; ----) aufgenommen. Einschub: Fluoreszenzlebensdauer τ von N-NBD-PE in POPC/N-NBD-PE-MLVs (links) und in POPC/N-NBD-PE/3-MLVs (rechts), gemessen bei 37°C. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler von zwei Proben, die jeweils dreimal gemessen wurden. (I_{FL} = Fluoreszenzintensität).

beiden Fluorophoren wurde durch die Messung der Fluoreszenzlebensdauer des Donors NBD (τ) in beiden Vesikelpräparationen bestätigt (Abbildung 2, Einschub). In Gegenwart von **3** ist τ signifikant reduziert, wie es für FRET charakteristisch ist.

Drittens wurde der Einbau von **3** in Membranen mit konfokaler Laserrastermikroskopie nachgewiesen. Dazu wurde **3** entweder während der Herstellung von riesigen unilamellaren Vesikeln (giant unilamellar vesicles, GUVs) in deren 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin(DOPC)-

Membranen eingebaut (nicht gezeigt) oder nachträglich zu bereits gebildeten GUVs gegeben (Abbildung 3a). In beiden Fällen konnte eine helle gleichförmige Fluoreszenz beobachtet werden, die eine homogene laterale Verteilung von **3** in der Membran widerspiegelt.

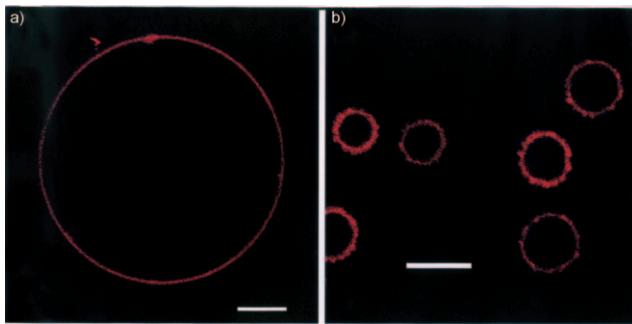


Abbildung 3. Einbau von **3** in GUVs und Erythrozytenmembranen. **3** wurde zu bereits gebildeten DOPC-GUVs (a) oder zu so genannten Erythrozyten-Ghosts (siehe Text; b) gegeben. Balken = 5 µm. Die gleichmäßige Rhodaminfluoreszenz lässt auf eine homogene laterale Verteilung von **3** in Membranen schließen.

Viertens wurden, angeregt durch den erfolgreichen Einbau von **3** in bereits bestehende GUVs, menschliche Erythrozyten (red blood cells, RBCs) mit **3** inkubiert. Wir fanden einen effizienten Einbau der Stäbe in die Plasmamembran von Erythrozyten-Ghosts (RBC-Ghosts: Erythrozyten, deren Zytoplasma durch osmotische Hämolyse entfernt wurde) (Abbildung 3b) und von intakten RBCs (nicht gezeigt). Dabei wurde ebenfalls eine homogene Fluoreszenz in der Membran beobachtet.

Wir konnten also zeigen, dass sich hydrophobe Stäbe effizient und ohne weitere Unterstützung (z.B. durch Anwendung von Detergentien oder Cyclodextrinen) nicht nur in Modellmembranen, sondern auch in intakte biologische Membranen einbauen lassen. Folglich könnten solche Stäbe als stabile membranassoziierte Anker zur Funktionalisierung von Membranoberflächen genutzt werden. Diese Funktionalisierung kann vor ebenso wie nach dem Einbau der Stäbe in die Membran erfolgen. Zum Beispiel können Rezeptoren, Enzyme oder bioaktive Moleküle kovalent an exponierte reaktive Gruppen des Stabes an der Oberfläche der Membran gebunden werden. Alternativ kann eine reversible Funktionalisierung durch an den Stab gebundene Oligonukleotide (DNA, PNAs (Peptidnukleinsäuren)) erreicht werden, die wiederum Moleküle mit komplementären Oligonukleotiden binden.^[11]

Gegenstand zukünftiger Forschung wird sein, den Einfluss der Struktur sowie der chemischen und physikalischen Eigenschaften solcher molekularen Stäbe auf die spezifischen Wechselwirkungen mit Lipiden zu untersuchen. Es ist bekannt, dass biologische Membranen, wie die Plasmamembranen von Säugetierzellen, kleine Lipiddomänen im Nanometermaßstab bilden, die sich in ihrer Lipidzusammensetzung unterscheiden.^[12] Membranproteine können spezifisch in solchen Domänen angereichert werden, was unter anderem durch ihren Membrananker beeinflusst werden kann. Aus

diesem Grunde werden solche Domänen als Plattform für eine effiziente Signalweiterleitung in Zellen und/oder zur Bildung von mit Proteinen angereicherten Membranbereichen betrachtet, die durch Vesikel gezielt zu bestimmten intrazellulären Bereichen transportiert werden können. In Eukaryotenzellen, vor allem in Säugetierzellen, könnten neben der Plasmamembran auch intrazelluläre Membranen Ziele für funktionalisierte Stäbe sein. Nach Endozytose können aufgenommene Stäbe durch vesikulären Transport zu membranumschlossenen Organellen der Zelle befördert werden. Eine gezielte Anreicherung der Stäbe in unterschiedlichen Domänen der Plasmamembran bietet die Möglichkeit, die Aufnahme von funktionalisierten Stäben zu regulieren. Weitere Studien sollten sich daher mit dem Mechanismus der Aufnahme von funktionalisierten Stäben und dem anschließenden Transport in der Zelle befassen.

Ein eingegangen am 27. Februar 2009
Online veröffentlicht am 8. Mai 2009

Stichwörter: Fluoreszenzspektroskopie · Membranen · Molekulare Stäbe · Phospholipide · Spiroverbindungen

- [1] a) L. Linderoth, G. H. Peters, R. Madsen, T. L. Andresen, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1855–1858; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1823–1826; b) E. T. Castellana, P. S. Cremer, *Surf. Sci. Rep.* **2006**, *61*, 429–444; c) S. Majd, M. Mayer, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6855–6858; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6697–6700; d) A. D. Miller, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1862–1880; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1768–1785; e) W. Müller, H. Ringsdorf, E. Rump, G. Wildburg, X. Zhang, L. Angermaier, W. Knoll, M. Liley, J. Spinke, *Science* **1993**, *262*, 1706–1708.
- [2] a) O. G. Mouritsen, T. L. Andresen, A. Halperin, P. L. Hansen, A. F. Jakobsen, U. B. Jensen, M. Ø. Jensen, K. Jørgensen, T. Kaasgaard, C. Leidy, A. C. Simonsen, G. H. Peters, M. Weiss, *J. Phys. Condens. Matter* **2006**, *18*, S1293–S1304; b) Y.-L. Zhang, C.-X. Zhang, H.-X. Shen, *Electroanalysis* **2001**, *13*, 1431–1435.
- [3] a) V. P. Torchilin, N. A. Lukyanov, Z. Gao, B. Papahadjopoulos-Sternberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6039–6044; b) Y. Barenholz, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2001**, *6*, 66–77; c) G. Storm, D. J. A. Crommelin, *Pharm. Sci. Technol. Today* **1998**, *1*, 19–31.
- [4] a) M. D. Smith, D. Gong, C. G. Sudhahar, J. C. Reno, R. V. Stahelin, M. D. Best, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1855–1863; b) G. Stengel, L. Simonsson, R. A. Campbell, F. Höök, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 8264–8274; c) S. W. Reulen, W. W. Brusseelaars, S. Langereis, W. J. Mulder, M. Breurken, M. Merkx, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 590–596; d) C. Vermehren, T. Kniebler, I. Hylander, T. H. Callisen, K. Jørgensen, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1998**, *1373*, 27–36; e) T. M. Allen, *Trends Pharmacol. Sci.* **1994**, *15*, 215–220.
- [5] a) J. M. Tour, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 537–553; b) P. F. H. Schwab, M. D. Levin, J. Michl, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1863–1933; c) M. D. Levin, P. Kaszynski, J. Michl, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 169–234; d) J. M. Tour, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 791–804; e) P. F. H. Schwab, J. R. Smith, J. Michl, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1197–1279.
- [6] a) A. Perez-Velasco, V. Gorteau, S. Matile, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 935–937; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 921–923; b) V. Gorteau, G. Bollot, J. Mareda, A. Perez-Velasco, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14788–14789; c) N. Sakai, D. Gerard, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2517–2524; d) L. A. Weiss, N. Sakai, B. Ghebremariam, C. Ni, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12142–12149; e) N. Sakai, J. Mareda, S. Matile,

- Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 79–87; f) B. Ghebremariam, V. Sidorov, S. Matile, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1445–1448.
- [7] P. Wessig, K. Möllnitz, C. Eiserbeck, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4859–4872.
- [8] P. Wessig, K. Möllnitz, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4452–4457.
- [9] P. Hoogerhout, K. J. Stittelaar, H. F. Brugghe, J. A. M. Timmermans, G. J. ten Hove, W. Jiskoot, J. H. G. Hoekman, P. J. M. Roholl, *J. Peptide Res.* **1999**, *54*, 436–443.
- [10] a) P. Wu, V. V. Fokin, *Aldrichimica Acta* **2007**, *40*, 7–16; b) H. C. Kolb, H. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
-
- [11] a) A. Kurz, A. Bunge, A. K. Windeck, M. Rost, W. Flasche, A. Arbuzova, D. Strohbach, S. Müller, J. Liebscher, D. Huster, A. Herrmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4550–4554; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4440–4444; b) I. Pfeiffer, F. Höök, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10224–10225; c) C. Yoshina-Ishii, S. G. Boxer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3696–3697.
- [12] a) W. H. Binder, V. Barragan, F. M. Menger, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5980–6007; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5802–5827; b) R. G. Anderson, K. Jacobson, *Science* **2002**, *296*, 1821–1825; c) K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, *387*, 569–572.