

## Dynamische Peptide als biomimetische Kohlenhydratrezeptoren\*\*

Melanie Rauschenberg, Susanne Bomke, Uwe Karst und Bart Jan Ravoo\*

An der Zelloberfläche befinden sich viele Kohlenhydrate, die als Erkennungsstellen für Proteine in Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen dienen. Die menschlichen Blutgruppen zum Beispiel werden durch die Anwesenheit verschiedener Oligosaccharide an der Erythrozytenoberfläche definiert. Auch das Immunsystem basiert auf Proteinen (Antikörpern), die Kohlenhydrate auf „fremden“ Zellen, Viren und Bakterien erkennen. Darüber hinaus werden Kohlenhydrate von der Bindungtasche bakterieller Proteine erkannt, die an der Chemotaxis beteiligt sind. Aufgrund der großen Zahl an Kohlenhydratisomeren ist eine fast unbegrenzte Vielfalt an Liganden denkbar. Die strukturelle Basis für die Kohlenhydraterkennung durch Proteine wurde mit Hilfe der Röntgenkristallographie untersucht.<sup>[1]</sup> Proteine wechselwirken mit Kohlenhydraten primär über Wasserstoffbrücken. Des Weiteren wird der Protein-Kohlenhydrat-Komplex oft durch hydrophobe Wechselwirkungen, C–H/π-Wechselwirkungen und/oder die Koordination von Metallionen wie Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> stabilisiert.

Die Entwicklung künstlicher Kohlenhydratrezeptoren oder „synthetischer Lektine“ – die als Medikamente, in der Diagnostik und in der Sensorik sehr wertvoll wären – stellt eine gewaltige Herausforderung für die supramolekulare Chemie dar. Ein verwendbarer Kohlenhydratrezeptor muss mit der starken Hydratisierung der Kohlenhydrate in Wasser konkurrieren und darüber hinaus eng miteinander verwandte Isomere unterscheiden. In der Vergangenheit haben Chemiker synthetische Rezeptoren für Kohlenhydrate entworfen, die in organischen Lösungsmitteln (wo die Konkurrenz mit dem Wasser umgangen wird) sehr ähnliche Kohlenhydrate, einschließlich Epimere, unterscheiden können.<sup>[2]</sup> Leider versagen fast alle diese Rezeptoren in polaren Lösungsmitteln und sie sind generell nutzlos in Wasser. Ein geschickter Ansatz zur Erkennung von Kohlenhydraten in Wasser basiert auf der Koordination von Kohlenhydraten durch Boronsäure-

ren,<sup>[3]</sup> wobei auch mit Boronsäure funktionalisierte Peptide verwendet wurden.<sup>[4]</sup> Allerdings binden diese innovativen Moleküle Kohlenhydrate kovalent und sind deshalb keine nichtkovalenten biomimetischen Rezeptoren. Ein synthetisches Lektin de novo zu entwickeln ist sehr schwierig, wie durch die Arbeit von Davis und Mitarbeiter gezeigt wurde, die kürzlich einen käfigartigen Rezeptor mit zwei aromatischen Untereinheiten synthetisiert haben. Dieser Rezeptor erkennt β-O-Methyl-GlcNAc ( $K = 630 \text{ M}^{-1}$ ) in einer Mischung von Kohlenhydraten in Wasser.<sup>[5]</sup>

Im Folgenden beschreiben wir einen dynamischen kombinatorischen Ansatz zur Identifizierung von biomimetischen Kohlenhydratrezeptoren.<sup>[6]</sup> Wir verwenden eine dynamische kombinatorische Bibliothek (dynamic combinatorial library, DCL) von cyclischen Peptiden, um Rezeptoren auszuwählen, die aus Tripeptiden im thermodynamischen Gleichgewicht gebildet werden. Obwohl Kohlenhydrate<sup>[7]</sup> und Peptide<sup>[8]</sup> bereits als Bausteine in dynamischen kombinatorischen Bibliotheken verwendet wurden, gibt es keine Berichte über die Auswahl von Kohlenhydratrezeptoren mit dieser Methode. Wir nutzten den reversiblen Disulfidaustausch, der durch die Gruppen von Otto und Sanders<sup>[9]</sup> eingeführt worden ist, um DCLs aus einem Satz von Tripeptiden unter physiologischen Bedingungen zu erzeugen (Schema 1). Die Tripeptide wurden durch inverse Peptidkupplung synthetisiert (siehe Hintergrundinformationen). Ihre N- und C-terminalen Cys-Reste steuern die Disulfidaustauschreaktion; Arg, Asp, Glu, Gln, His, Ser und Thr wurden wegen ihres Potenzials zur Bildung von Wasserstoffbrücken zu Kohlenhydraten ausgewählt; GABA, Phe, Trp und Tyr stellen hydrophobe und/oder aromatische Reste zur Verfügung; Gly dient als inerter Rest.

Entsprechend dem bewährten Prinzip der dynamischen kombinatorischen Chemie sollte die Zugabe eines Kohlenhydrats die Gleichgewichtszusammensetzung der DCL zu Gunsten desjenigen Oligopeptids verschieben, das mit dem Kohlenhydrat wechselwirkt, da dieses durch nichtkovalente Wechselwirkungen besser stabilisiert wird („thermodynamic templating“).<sup>[6]</sup> Auf diese Art kann der beste Kohlenhydratrezeptor aus einer großen Zahl linearer und cyclischer Oligopeptide ermittelt werden. Wir verwendeten eine Reihe an Mono- und Disacchariden als Template für die Tripeptid-DCLs, und zwar die in Schema 2 gezeigten isomeren Methylglycoside und Disaccharide sowie den Neurotransmitter N-Acetylneuraminsäure (NANA).

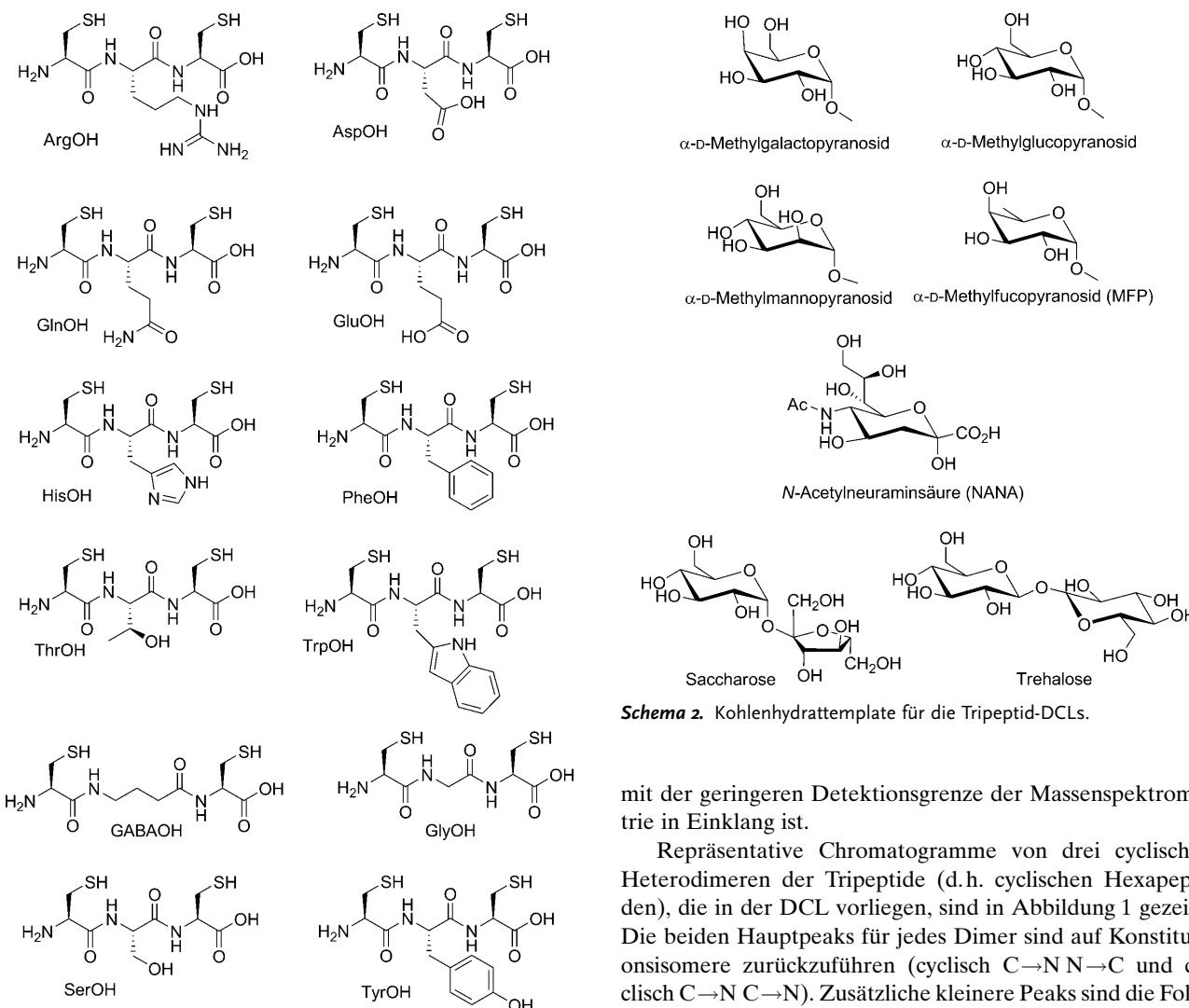
Als Erstes wurde überprüft, ob aus dem Disulfidaustausch eine Gleichgewichtszusammensetzung der Oligopeptide resultiert. Drei methylestergeschützte Tripeptide (HisOMe, GlyOMe und GluOMe) wurden dazu im NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Puffer bei pH 7.8 in unterschiedlicher Reihenfolge gemischt und die Bildung von Oligomeren mit HPLC/MS unter Verwendung der Kombination aus hydrophiler Interaktionschromatographie und Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie

[\*] M. Rauschenberg, Prof. Dr. B. J. Ravoo  
Organisch-Chemisches Institut  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster  
Corrensstraße 40, 48149 Münster (Deutschland)  
Fax: (+49) 251-83-36557  
E-Mail: b.j.ravoo@uni-muenster.de

Dr. S. Bomke, Prof. Dr. U. Karst  
Institut für Anorganische und Analytische Chemie  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster (Deutschland)

[\*\*] Wir bedanken uns bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 858 und IRTG 1143) und dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung. Bei T. Welsch und Prof. Dr. H. U. Humpf (Institut für Lebensmittelchemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster) bedanken wir uns für die Unterstützung bei den HPLC/MS-Messungen.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201002847> zu finden.



**Schema 1.** Tripeptidbausteine für die DCLs. ArgOH = Cys-Arg-Cys, AspOH = Cys-Asp-Cys, GABA OH = Cys-GABA-Cys (GABA = γ-Aminobuttersäure), GlnOH = Cys-Gln-Cys, GluOH = Cys-Glu-Cys, GlyOH = Cys-Gly-Cys, HisOH = Cys-His-Cys, PheOH = Cys-Phe-Cys, SerOH = Cys-Ser-Cys, ThrOH = Cys-Thr-Cys, TrpOH = Cys-Trp-Cys, TyrOH = Cys-Tyr-Cys.

(HILIC/ESI-MS) verfolgt. Falls sich die resultierende DCL im thermodynamischen Gleichgewicht befindet, sollte die Reihenfolge der Zugabe der Tripeptide nicht von Bedeutung sein. Wegen der geringen UV-Absorption der meisten Tripeptide wurde der Einzelmassenregistrierungsmodus (SIM) für die Analyse der DCLs verwendet. Da in diesem Modus nur vorher definierte Peptidmassen detektiert werden, erhält man als Ergebnis ein Chromatogramm pro Peptid. Der Disulfidaustausch endet, wenn nicht mehr ausreichend Thiolat zur Verfügung steht. Mithilfe des Ellman-Reagens wurde die Konzentration an freiem Thiolat in der DCL bestimmt (siehe Hintergrundinformationen). Nach 24 Stunden konnte mit diesem Reagens kein freies Thiolat mehr bestimmt werden. Zusätzlich wurde die Anwesenheit von Thiolat im Massenspektrum verfolgt, und hier konnte nach 48 Stunden kein freies Thiolat mehr detektiert werden, was

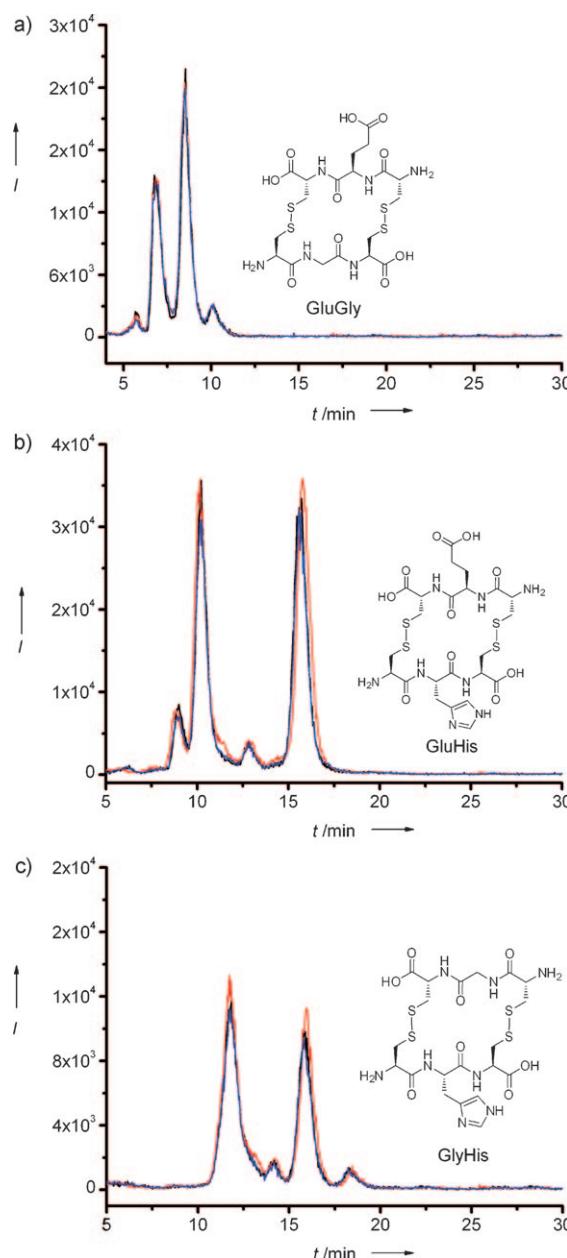
**Schema 2.** Kohlenhydrattemplate für die Tripeptid-DCLs.

mit der geringeren Detektionsgrenze der Massenspektrometrie in Einklang ist.

Repräsentative Chromatogramme von drei cyclischen Heterodimeren der Tripeptide (d.h. cyclischen Hexapeptiden), die in der DCL vorliegen, sind in Abbildung 1 gezeigt. Die beiden Hauptpeaks für jedes Dimer sind auf Konstitutionsomere zurückzuführen (cyclisch C→N N→C und cyclisch C→N C→N). Zusätzliche kleinere Peaks sind die Folge von Racemisierungen während der Äquilibrierung. Wesentlich ist jedoch, wie aus Abbildung 1 ersichtlich, dass in allen drei Fällen die Menge an gebildetem Tripeptiddimer unabhängig von der Reihenfolge der Zugabe der Tripeptide zur DCL war. Die Methylester der Peptide wurden wegen der leicht basischen Bedingungen und der katalytischen Aktivität der Thiolate hydrolysiert, sodass nach 48 h nur Peptide mit entschützttem C-Terminus erhalten wurden.

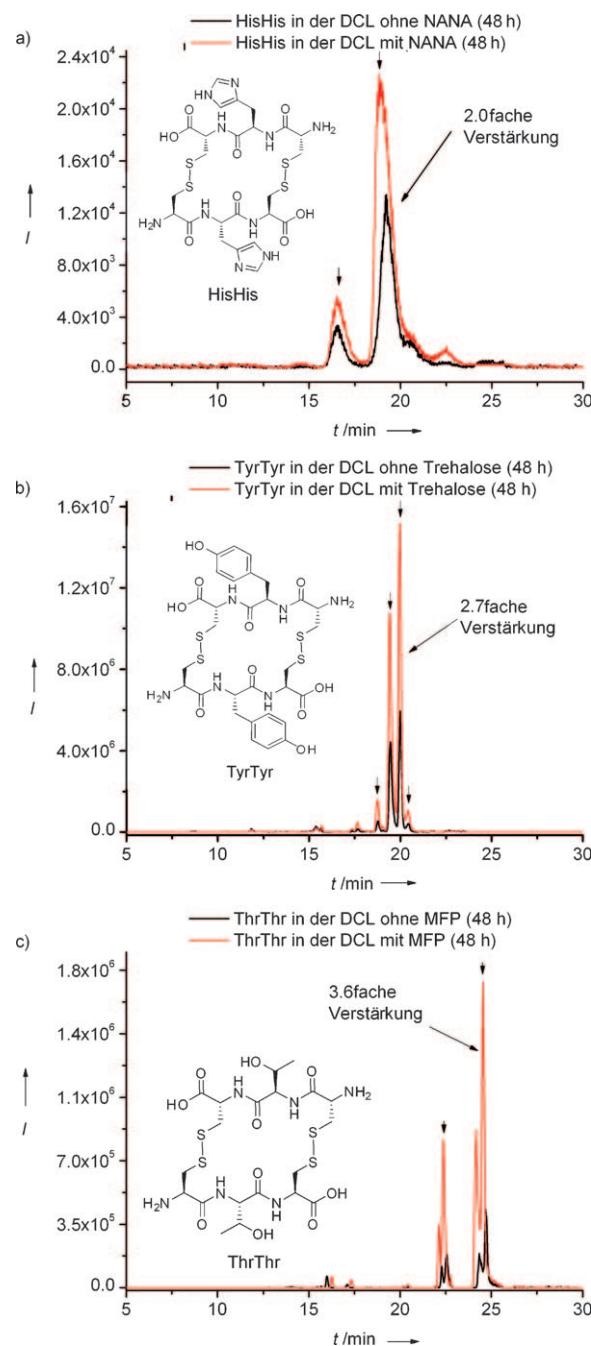
Alle möglichen cyclischen Homo- und Heterodimere der Tripeptide, aber keine linearen oder höheren Oligomere konnten nach 48 h bei pH 7.8 in der DCL mit HILIC/ESI-MS detektiert werden. Die verbleibende Menge an Tripeptiden (als cyclische Disulfide detektiert) betrug nur 5.5 % der Gesamtsumme der integrierten Peakflächen aller gebildeten Bibliotheksmitglieder. Im Gegensatz dazu wurden in einer Mischung aus Tripeptiden bei pH 2 keine Dimere oder Oligomere gebildet, da bei diesem pH-Wert kein Disulfidaustausch stattfindet.

Um mögliche Wechselwirkungen zwischen den Tripeptiddimeren und einem Kohlenhydrat zu bestimmen, wurde der Neurotransmitter NANA zu einer Mischung aus HisOMe, AspOMe und GlnOMe gegeben. Nach 48 h wurde die Zusammensetzung der DCL mit und ohne NANA unter Verwendung von HILIC/ESI-MS im SIM-Modus verglichen



**Abbildung 1.** Chromatogramme für drei cyclische Peptide, die in DCLs mit unterschiedlichen Startpunkten gebildet wurden: schwarz: (HisOMe + GlyOMe) + GluOMe, rot: (HisOMe + GluOMe) + GlyOMe, blau: (GluOMe + GlyOMe) + HisOMe. HPLC-Bedingungen: ZiC-HILIC-Säule, Mischung aus wässrigem NH<sub>4</sub>OAc (20 mM, pH 3.2) und Acetonitril, 32 °C, Flussgeschwindigkeit 0.15 mL min<sup>-1</sup>. Nur eines der beiden möglichen Isomere ist jeweils abgebildet.

(Abbildung 2a und Tabelle 1). Alle möglichen cyclischen Tripeptidhomo- und -heterodimere, aber keine linearen oder höheren Oligomere konnten detektiert werden. Die verbleibende Menge an Tripeptiden (als cyclische Disulfide detektiert) betrug nur 7.0 %. Auch in diesem Fall wurden die Methylester der Peptide während der Äquilibrierung der DCL hydrolysiert. Die Zugabe von NANA bewirkte einige signifikante Änderungen in der Zusammensetzung der DCL.



**Abbildung 2.** Verstärkung von cyclischen Peptiden durch die Kohlenhydrattemplate NANA (a), Trehalose (b) und MFP (c). HPLC-Bedingungen: ZiC-HILIC-Säule, Mischung aus wässrigem NH<sub>4</sub>OAc (20 mM, pH 3.2 (für a) bzw. 6.8 (für b und c)) und Acetonitril, 32 °C, Flussgeschwindigkeit 0.15 mL min<sup>-1</sup>. Nur eines der beiden möglichen Isomere ist jeweils abgebildet.

Besonders auffällig war die Vergrößerung der Peakfläche des cyclischen Homodimers HisHis um den Faktor 2.0.

Die ermutigende Verstärkung des cyclischen HisHis in Gegenwart von NANA veranlasste uns, die Wechselwirkungen detaillierter zu untersuchen (Abbildung 3). HisHis konnte einfach durch zwei Tage Rühren des Tripeptids HisOMe in 100 mM Phosphatpuffer bei pH 7.4 erhalten werden. Der Anteil an cyclischem Dimer wurde mit HPLC

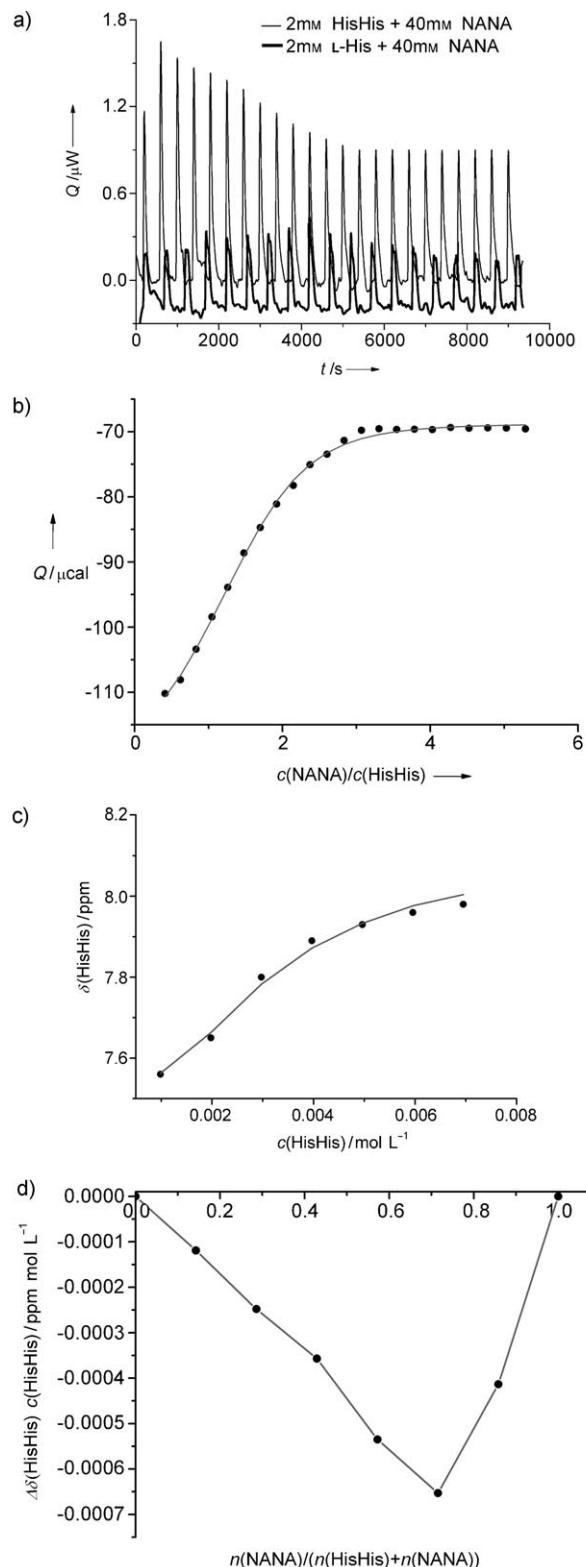
**Tabelle 1:** Integrierte SIM-Peakintensitäten  $I$  (in Zähler  $\times 10^6$ ; Standardabweichung  $< 10\%$  ( $n=2$ )) der DCL aus AspOMe, GlnOMe und HisOMe mit und ohne NANA im Gleichgewicht.

Oligomer	$M$ [g mol $^{-1}$ ]	$I$ (DCL)	$I$ (DCL+NANA)	Verstärkung
HisHis	719.6	0.84	1.65	2.0
HisGln	710.6	2.60	3.10	1.2
HisAsp	697.5	4.57	2.28	0.5
GlnAsp	688.5	4.54	5.35	1.2
GlnGln	701.4	2.88	1.39	0.5
AspAsp	674.8	2.26	2.86	1.3
AspOH	351.4	0.46	0.39	0.9
HisOH	374.1	0.22	0.16	0.7
GlnOH	364.4	0.65	0.49	0.8

bestimmt und betrug 99.5 %, wobei jedoch nicht versucht wurde, die beiden Konstitutionsisomere zu trennen. Eine ITC-Titration von 2.0 mm HisHis mit 40 mm NANA bei pH 7.4 (Abbildung 3a) deutet auf eine exotherme Wechselwirkung mit einer Stöchiometrie von 1:2 hin, d.h. ein Molekül des cyclischen HisHis komplexiert zwei Moleküle NANA. Die Wechselwirkung zwischen HisHis und NANA ist auch entropisch begünstigt. Aus der Modellierung der ITC-Titration (Abbildung 3b) wurden zwei unabhängige Bindungskonstanten,  $K_1 = 72.7 \text{ M}^{-1}$  und  $K_2 = 7.76 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , erhalten, d.h., HisHis bindet die beiden NANA-Moleküle kooperativ, da das zweite Molekül viel fester gebunden wird als das erste.

Die Interpretation der ITC-Daten wurde durch eine  $^1\text{H}$ -NMR-Titration (Abbildung 3c) bestätigt. Diese ergab eine starke Verschiebung der Signale der HisHis-Imidazolprotonen bei der Zugabe von NANA bei pH 7.6. Das Minimum des Job-Plots, der aus den NMR-Daten erhalten wurde (Abbildung 3d), weist ebenfalls auf eine Komplexstöchiometrie von 1:2 hin. Die Modellierung lieferte hier die beiden unabhängigen Bindungskonstanten  $K_1 = 70.4 \text{ M}^{-1}$  und  $K_2 = 5.52 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Die thermodynamischen Daten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Wir halten fest, dass an der Komplexierung von NANA durch HisHis eine starke Wechselwirkung zwischen einem kleinen Peptid und einem Monosaccharid in Wasser beteiligt ist. Tatsächlich erreichen die Stabilitätskonstanten diejenigen, die für die besten synthetischen Lektine für NANA in DMSO/Wasser (9/1) berichtet wurden.<sup>[10]</sup> Diese synthetischen Lektine sind Tripoden aus (kationischen) N-Heterocyclen, und wahrscheinlich bindet HisHis NANA mit einer ähnlichen Kombination aus Wasserstoffbrückenbindungen und C–H/ $\pi$ -Wechselwirkungen.<sup>[11]</sup> Es muss betont werden, dass eine ITC-Titration von HisHis mit Essigsäure und mit dem Methylester von NANA sowie eine ITC-Titration von L-Histidin mit NANA keine signifikante Wechselwirkung ergaben. Ebenso konnten bei der NMR-Titration von HisHis mit dem Methylester von NANA keine signifikanten Verschiebungen beobachtet werden. Diese negativen Kontrollexperimente belegen, dass für eine Komplexierung von NANA durch HisHis die kooperative Wechselwirkung zwischen dem Peptidrezeptor und dem Kohlenhydratliganden nötig ist und nicht nur additive Wechselwirkungen der einzelnen Bestandteile eine Rolle spielen.



**Abbildung 3:** ITC-Daten und NMR-Daten für die Komplexierung von HisHis und NANA. a) ITC-Daten. b) ITC-Anpassung. c) NMR-Daten. d) Job-Plot der NMR-Titration. Die ITC-Titration von L-Histidin mit NANA ist als Vergleich gezeigt (fette schwarze Linie in (a)). In der ITC-Anpassung (c) wurde der erste Datenpunkt nicht berücksichtigt.

**Tabelle 2:** Thermodynamische Daten für die Komplexierung von Kohlenhydraten durch cyclische Peptide in Wasser.

Peptid	Kohlenhydrat	n <sup>[a]</sup>	K [M <sup>-1</sup> ]	ΔG [kJ mol <sup>-1</sup> ]	ΔH [kJ mol <sup>-1</sup> ]	ΔS [J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]	Methode
HisHis	NANA	2	$K_1 = 72.7$ , $K_2 = 7.76 \times 10^3$	$\Delta G_1 = -10.6$ , $\Delta G_2 = -22.2$	$\Delta H_1 = -6.27$ , $\Delta H_2 = -1.54$	$\Delta S_1 = 14.6$ , $\Delta S_2 = 69.4$	ITC
		2	$K_1 = 70.4$ , $K_2 = 5.22 \times 10^3$	$\Delta G_1 = -10.6$ , $\Delta G_2 = -21.2$	–, –	–, –	NMR
TyrTyr	Trehalose	1	$2.85 \times 10^3$	-19.7	-2.89	56.5	ITC
		1	$2.00 \times 10^3$	-18.4	–	–	NMR
		1	$1.67 \times 10^3$	-18.8	–	–	Fluoreszenz
ThrThr	MFP	1	$4.00 \times 10^3$	-20.6	–	–	NMR

[a] n: Stöchiometrie.

Um die Möglichkeiten zur Identifizierung von Kohlenhydratrezeptoren mithilfe einer Peptid-DCL zu untersuchen, wurden die in Schema 2 gezeigten eng verwandte Methylglycoside und isomeren Disaccharide jeweils zu einer DCL aus sechs Tripeptiden (GlnOH, GluOH, HisOH, PheOH, TrpOH und TyrOH) und zu einer aus fünf Tripeptiden (ArgOH, AspOH, GABA OH, SerOH und ThrOH) gegeben. Nach 48 h wurde die Zusammensetzung jeder DCL mit und ohne Kohlenhydrat verglichen, wobei zur Detektion HILIC/ESI-MS verwendet wurde. Beide DCLs wurden durch cyclische Dimere der Tripeptide dominiert. Die Zugabe einiger Kohlenhydrate – aber nicht aller! – führte zu signifikanten Änderungen in der Zusammensetzung der DCL, die sich für jedes Kohlenhydrat und jedes Peptid unterschieden. Auf zwei auffällige Verstärkungen wird im Folgenden eingegangen.

In der DCL aus sechs Tripeptiden wurde das cyclische Homodimer TyrTyr in Gegenwart von Trehalose um den Faktor 2.7 verstärkt (Abbildung 2b), während Saccharose keinen Effekt hatte. Die Wechselwirkung des cyclischen TyrTyr mit Trehalose wurde mit ITC-, NMR- und Fluoreszenztitration näher untersucht (siehe Tabelle 2 und Hintergrundinformationen). TyrTyr wurde durch zwei Tage Röhren des Tripeptids TyrOH bei pH 7.4 erhalten. Der Anteil an cyclischem Dimer (zwei Isomere) wurde mit HPLC/MS zu 99.9% bestimmt. Eine ITC-Titration von 1.0 mm TyrTyr mit 12 mm Trehalose deutete auf eine exotherme Wechselwirkung mit einer Stöchiometrie von 1:1 hin und lieferte bei der Modellierung eine Bindungskonstante  $K$  von  $2.85 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Die Wechselwirkung ist zudem entropisch begünstigt.

Die Interpretation der ITC-Daten wurde durch eine NMR-Titration von TyrTyr mit Trehalose bestätigt, die eine Verschiebung der Signale der aromatischen Protonen der Tyrosinreste ergab. Das Maximum des Job-Plots liegt bei 0.50, was die 1:1-Stöchiometrie des Komplexes bestätigt. Das Modellieren der NMR-Daten mit einem 1:1-Modell lieferte die Bindungskonstante  $K = 2.00 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ . In Einklang damit trat bei einer Fluoreszenztitration eine signifikante Abnahme der TyrTyr-Fluoreszenz bei Zugabe von Trehalose auf. Auch die Fluoreszenztitration kann am besten mit einem 1:1-Modell beschrieben werden, wobei die Bindungskonstante  $K = 1.67 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  beträgt. Damit sind ITC-, NMR- und Fluoreszenzmessungen völlig konsistent und demonstrieren eine ziemlich starke Wechselwirkung zwischen einem Peptid und einem Disaccharid in Wasser. Der Komplex muss das

Ergebnis aus der Kombination von Wasserstoffbrückenbindungen und C=H/π-Wechselwirkungen sein.<sup>[2,5,11]</sup> Zudem sei darauf hingewiesen, dass die Wechselwirkung hochselektiv ist, da nur Trehalose und nicht Saccharose (oder ein beliebiges Methylglucosid) TyrTyr verstärkt und (umgekehrt) Trehalose nur TyrTyr, nicht jedoch PhePhe verstärkt.

In der oben genannten DCL aus fünf Tripeptiden ist das cyclische Homodimer ThrThr in Gegenwart von MFP um den Faktor 3.6 ver-

stärkt (Abbildung 2c), während die ähnlichen Methylglycoside α-D-Methylglucopyranosid, α-D-Methylmannopyranosid und α-D-Methylgalactopyranosid keine Wirkung zeigten. Die Wechselwirkung zwischen dem cyclischen ThrThr und MFP wurde detaillierter untersucht (siehe Tabelle 2 und Hintergrundinformationen). ThrThr wurde durch zwei Tage Röhren des Tripeptids ThrOH bei pH 7.4 erhalten. Der Anteil an cyclischem Dimer (zwei Isomere) wurde mit HPLC-MS zu 99.9% bestimmt. Eine NMR-Titration von ThrThr mit MFP zeigte eine signifikante Verschiebung des Signals des anomeren Protons des Kohlenhydrats. Die Daten konnten am besten mit einem 1:1-Modell beschrieben werden, wobei als Bindungskonstante  $K = 4.00 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  erhalten wurde. Das Maximum des Job-Plots von 0.50 bestätigt die 1:1-Komplexstöchiometrie.

Eine ITC-Titration von ThrThr mit MFP war aufgrund der sehr geringen Hitzeeffekte nicht aussagekräftig. Allerdings impliziert auch dieses Ergebnis, dass die Wechselwirkung zwischen ThrThr und MFP entropisch bedingt ist. Damit haben wir ein weiteres Beispiel für eine ziemlich starke Wechselwirkung zwischen einem Peptid und einem Kohlenhydrat in Wasser gefunden. Der Komplex muss das Ergebnis von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen sein.<sup>[2,5,11]</sup> Die Methylgruppe von MFP ist essenziell, da keines der anderen Methylglycoside (oder Disaccharide) ThrThr verstärkt. Darüber hinaus verstärkt MFP nur ThrThr und nicht auch SerSer.

Wir haben hier die Erzeugung äquilibrierter DCLs aus Tripeptiden durch Disulfidaustauschreaktion unter physiologischen Bedingungen beschrieben. In diesen DCLs sind alle möglichen cyclischen Dimere (Hexapeptide) vorhanden. In drei Fällen ändert sich die Zusammensetzung der DCL signifikant, wenn ein Kohlenhydrattemplat zugegeben wird. In einer DCL aus drei Tripeptiden wurde eine Wechselwirkung zwischen dem cyclischen Dimer HisHis und dem Neurotransmitter NANA identifiziert: HisHis und NANA bilden einen kooperativen 1:2-Komplex. In einer aus sechs Tripeptiden bestehenden DCL wurde eine selektive 1:1-Wechselwirkung zwischen dem cyclischen Dimer TyrTyr und Trehalose gefunden, während in einer DCL aus fünf Tripeptiden ThrThr selektiv einen 1:1-Komplex mit α-D-Methylfucopyranosid bildet. Diese Ergebnisse belegen das hohe Potenzial der kombinatorischen Auswahl von synthetischen Lektinen aus DCLs von Peptiden. Weiterhin gehören die hier identi-

fizierten Rezeptoren zu den stärksten biomimetischen Kohlenhydratrezeptoren, die bis heute vorgestellt wurden.

## Experimentelles

Die DCLs wurden durch Mischen der Peptide (5 mM pro Peptid bei Verwendung von drei Peptiden bzw. 2.5 mM pro Peptid, wenn fünf oder sechs Peptide verwendet wurden) in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Puffer (Gesamtvolumen: 1.25 mL, 100 mM, pH 7.8) und Röhren dieser Lösung in einem offenen Glasfläschchen bei Raumtemperatur erzeugt. 750 µL einer 15 mM Kohlenhydratstammlösung in Puffer wurden direkt im Anschluss zu der gerührten Lösung gegeben. Für die HPLC/MS-Messungen wurden 200-µL-Proben nach 48 h mit Ameisensäure auf pH 3 angesäuert, um den Disulfidaustausch zu beenden. Anschließend wurden 110-µL-Proben mit 90 µL Acetonitril (für die DCLs mit drei Tripeptiden) bzw. 40-µL-Proben mit 160 µL Acetonitril (für die DCLs mit fünf oder sechs Tripeptiden) versetzt.

Zur HPLC-Analyse der Peptid-DCLs diente ein LC/MS-Aufbau aus einem Shimadzu-HPLC-System und einem Massenspektrometer mit einer Quadrupolionenfalle (Q-TRAP) (Applied Biosystems), das mit einer Turbo-Ionensprayquelle (pneumatisch unterstützte ESI) ausgestattet war. Das LC-System bestand aus zwei LC10-AD<sub>VP</sub>-Pumpen, einem DGC-14A-Degasser, einem SIL-HT<sub>A</sub>-Autosampler, einem CTO-10AV<sub>VP</sub>-Säulenofen und einem SPD-10AV<sub>VP</sub>-UV-Detektor. Zur Steuerung von LC und MS wurde Analyst 1.4.1 (Applied BioSystems) verwendet. Die Trennung erfolgte mit einer ZIC-HILIC-Säule (SeQuant GmbH) mit folgenden Abmessungen: 150 mm Länge, 2.1 mm Innendurchmesser, 3.5 µm Partikelgröße und 200 Å Porengröße. Eine ZIC-HILIC-Vorsäule (20 mm × 2.1 mm, 5 µm Partikelgröße, 200 Å Porengröße, SeQuant) wurde verwendet, um die analytische Säule vor Verunreinigungen zu schützen. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0.15 mL min<sup>-1</sup>, die Ofentemperatur wurde auf 32°C eingestellt, und die UV-Absorption wurde bei 220 nm mit einer Messfrequenz von 10 Hz aufgenommen. Das Injektionsvolumen betrug 10 µL. Als mobile Phase dienten Acetonitril und NH<sub>4</sub>OAc (20 mM, pH 3.2) mit folgendem Gradienten (% Acetonitril, t [min]): 55, 0.01; 45, 15.00; 55, 19.00.

Massenspektren wurden unter Verwendung von ESI(+) -MS im SIM-Modus mit einer Ionensprayspannung von 4200 V, 30-psi-Zerstäubergas, 30-psi-Trockengas, einem Declustering-Potential von 30 V, einem Eingangspotential von 10 V und einer ESI-Quellentemperatur von 300°C aufgenommen.

Die DCLs aus fünf oder sechs Tripeptiden wurden an einem LC/MS-System von Thermo Fischer Scientific bestehend aus einem Accela-HPLC-System und einem LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer gemessen. Zur Steuerung der LC und MS wurde Xcalibur (Version 2.0.7, Thermo Fischer Scientific) verwendet. Für die Trennung wurde die oben beschriebene ZIC-HILIC-Säule verwendet. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0.15 mL min<sup>-1</sup>, die Ofentemperatur 32°C und das Injektionsvolumen 10 µL. Als mobile Phase dienten Acetonitril und NH<sub>4</sub>OAc (20 mM, pH 6.8) mit folgendem Gradienten (% Acetonitril, t [min]): 70, 0.00; 55, 2.00; 45, 15.00; 55, 19.00.

Massenspektren wurden im ESI(+) -Modus mit einer Ionensprayspannung von 3970 V, 25-psi-Schutzgas, 10-psi-„Aux“-Gas, 5-psi-„Sweep“-Gas, einer Tubuslinsenspannung von 145 V und einer Kapillartemperatur von 275°C aufgenommen.

Eingegangen am 11. Mai 2010  
Online veröffentlicht am 26. August 2010

**Stichwörter:** Dynamische kombinatorische Chemie · Kohlenhydrate · Molekulare Erkennung · Peptide

- [1] a) F. A. Quiocho, *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1293–1306; b) H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637–674; c) W. I. Weis, K. Drickamer, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 441–473.
- [2] a) A. P. Davis, R. S. Wareham, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3160–3179; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2978–2996; b) S. Kubik, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1750–1753; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1722–1725; c) M. Mazik, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 935–956.
- [3] a) G. Wulff, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1958–1979; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1812–1832; b) S. Striegler, *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7*, 81–102.
- [4] A. Pal, M. Bérubé, D. Hall, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1534–1537; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1492–1495.
- [5] a) E. Klein, M. P. Crump, A. P. Davis, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 302–306; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 298–302; b) Y. Ferrand, M. P. Crump, A. P. Davis, *Science* **2007**, *318*, 619–622; c) 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; d) N. P. Barwell, M. P. Crump, A. P. Davis, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7809–7812; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7673–7676.
- [6] Übersichten über das Konzept der dynamischen kombinatorischen Chemie: a) J. M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2455–2463; b) S. J. Rowan, S. J. Cantrill, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders, J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 938–993; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 898–952; c) P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J. L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3652–3711; d) S. Otto, K. Severin, *Top. Curr. Chem.* **2007**, *277*, 267–288.
- [7] a) S. Sakai, Y. Shigemasa, T. Sasaki, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8145–8148; b) O. Ramström, J. M. Lehn, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 41–48; c) S. Sando, A. Narita, Y. Aoyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2835–2838; d) O. Ramström, S. Lohmann, T. Bunyapaiboon, J. M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1711–1715; e) R. Caraballo, H. Dong, J. P. Ribeiro, J. Jiménez-Barbero, O. Ramström, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 599–603; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 589–593; f) Y. Ruff, E. Buhler, S. J. Candau, E. Kesselman, Y. Talmon, J. M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2573–2584.
- [8] a) Z. Rodriguez-Docampo, S. I. Pascu, S. Kubik, S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11206–11210; b) J. M. A. Carnall, C. A. Waudby, A. M. Belenguer, M. C. A. Stuart, J. J. P. Peyralans, S. Otto, *Science* **2010**, *327*, 1502–1506; c) S. Ghosh, L. A. Ingerman, A. G. Frye, S. J. Lee, M. R. Gagne, M. L. Waters, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1860–1863.
- [9] a) S. Otto, R. L. E. Furlan, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12063–12064; b) S. Otto, R. L. E. Furlan, J. K. M. Sanders, *Science* **2002**, *297*, 590–593; c) J. Leclaire, L. Vial, S. Otto, J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.* **2005**, 1959–1961; d) P. T. Corbett, L. H. Tong, J. K. M. Sanders, S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8902–8903.
- [10] a) M. Mazik, H. Cavga, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 831–838; b) M. Mazik, H. Cavga, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 3633–3638.
- [11] K. Ramirez-Gualito, R. Alonso-Rios, B. Quiroz-Garcia, A. Rojas-Aguilar, D. Diaz, J. Jimenez-Barbero, G. Cuevas, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18128–18138.