

Proteinähnliche Oligomerisierung von Kohlenhydraten

Thomas Heinze,* Melanie Nikolajski, Stephan Daus, Tabot M. D. Besong, Nico Michaelis, Peter Berlin, Gordon A. Morris, Arthur J. Rowe und Stephen E. Harding*

Viele Proteine bilden thermodynamisch reversibel Oligomere durch nichtkovalente Wechselwirkungen, eine Form der Selbstorganisation, die essenziell für die Proteinfunktion ist. Beispielsweise liegen DNA-Bindeproteine oft als Dimere, andere Proteine sogar als Trimere (z.B. Chloramphenicol-Transacetylase), Tetramere (Hämoglobin) oder größere reversible Assoziationsprodukte (Tubulin, virale Capsidproteine, Sichelzellenhämoglobin) vor. Polysaccharide und ihre Derivate bilden hingegen zwar schwach verknüpfte, undefinierte Aggregate,^[1] eine definierte Selbstorganisation war allerdings bisher nicht bekannt. Hier wird nun erstmals über den Nachweis der Bildung definierter Oligomere einer ganzen Polysaccharidklasse – der 6-Desoxy-6-aminocellulosen – mithilfe der analytischen Ultrazentrifugation berichtet.

Wasserlösliche Aminocellulosen wurden durch Reaktion von Tosylcellulose mit einem Überschuss an di- oder trifunktionellen Aminen erhalten. Im Einzelnen setzt man Tris(2-aminoethyl)amin, 1,2-Diaminoethan und 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin unter Bildung von 6-Desoxy-6-(2-(bis(2-aminoethyl)aminoethyl-amino)(BAEA)-Cellulose (**1–3**), 6-Desoxy-6-(2-aminoethyl)amino(AEA)-Cellulose (**4**) bzw. 6-Desoxy-6-(13-amino-4,7,10-trioxa-tridecane-amino)-(ATOTA)-Cellulose (**5**) ein (Abbildung 1 der Hintergrundinformationen). Die untersuchten Produkte haben einen durchschnittlichen Substitutionsgrad (DS) der Amine von 0.60 bis 0.85 (Tabelle 1 der Hintergrundinformationen). NMR-spektroskopische Untersuchungen belegen, dass die nucleophile Substitution ausschließlich an der Methylen-Gruppe der Anhydroglucoseeinheit (AGE) stattfand.^[2]

Durch Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit für die fünf genannten 6-Desoxy-6-aminocellulosen in 0.1M Phosphatpuffer (pH 6.8) mithilfe einer analytischen Ultrazentrifuge konnten die Verteilungen der Sedimentationskoeffizienten über einen Konzentrationsbereich von 0.125 bis 2.0 mg mL⁻¹ bestimmt werden. Überraschenderweise wurden

dabei für alle untersuchten Aminocellulosen vier bis fünf diskrete Spezies mit schrittweise zunehmenden Sedimentationskoeffizienten gefunden. Für BAEA-Cellulose **1** (durchschnittlicher Polymerisationsgrad DP = 450 der Ausgangscellulose) wurde beispielsweise der kleinste Sedimentationskoeffizient bei 1.8 Svedberg (S) ermittelt. Weitere Spezies äußern sich durch Maxima bei ca. 2.8, 4.0, 5.1 und 6.5 S (Abbildung 1), die durch den SEDFIT-Algorithmus von Dam und Schuck bestimmt wurden.^[3]

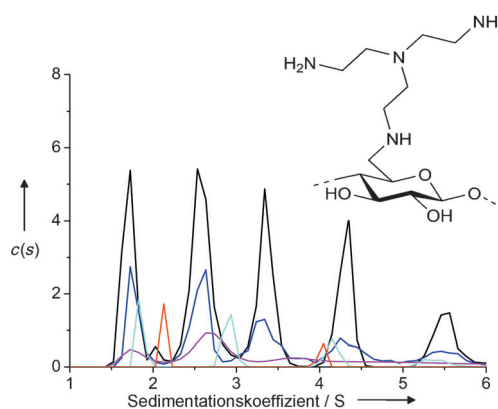


Abbildung 1. Charakteristische Verteilung der Sedimentationskoeffizienten der 6-Desoxy-6-aminocellulosen. Verteilung der BAEA-Cellulose **1** mit $DS_{\text{Amin}} = 0.60$ bei verschiedenen Konzentrationen: 2.0 (schwarz), 1.0 (blau), 0.5 (rosa), 0.25 (cyan) und 0.125 mg mL⁻¹ (orange).

Analoge Messungen an den BAEA-Cellulosen **2** und **3**, deren Ausgangsmaterial einen DP von 250 aufwies, lieferten ähnliche Ergebnisse (Abbildung 2b,c). Für AEA-Cellulose (**4**), hergestellt aus einer Cellulose mit einem DP von 450, wurden Sedimentationskoeffizienten von ca. 1.6, 2.3, 3.1, 4.3 und 5.3 S bestimmt. Aus den Sedimentationsexperimenten mit ATOTA-Cellulose (**5**) ergaben sich Sedimentationskoeffizienten von ca. 1.7, 2.9, 4.3 und 5.5 S (Abbildung 2e; Tabelle 2 der Hintergrundinformationen). Artefakte, die durch die Analysenprozedur verursacht werden könnten, wurden durch eine Anpassung mithilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ($g(s)$ gegen den Sedimentationskoeffizient s) der Verteilungsdaten ausgeschlossen (Abbildung 3a der Hintergrundinformationen).^[3] Diese Anpassung mehrerer Gauß-Profile an die experimentellen Daten zeigt separate Peaks (Abbildung 3b der Hintergrundinformationen), die denen in den Darstellungen der Verteilung der Sedimentationskoeffizienten, $c(s)$, gegen s ähnlich sind.

Um zu belegen, dass es sich bei den Spezies höherer Ordnung um diskrete Oligomere handelt, kann eine einfache

[*] Prof. Dr. T. Heinze, Dipl.-Chem. M. Nikolajski, Dr. S. Daus, Dipl.-Chem. N. Michaelis, Dr. P. Berlin
Kompetenzzentrum Polysaccharidforschung
Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Humboldtstraße 10, 07743 Jena (Deutschland)
E-Mail: Thomas.heinze@uni-jena.de

MSc. T. M. D. Besong, Dr. G. A. Morris, Prof. Dr. A. J. Rowe,
Prof. Dr. S. E. Harding
National Centre for Macromolecular Hydrodynamics
School of Biosciences, University of Nottingham
Sutton Bonington, LE12 5RD (Großbritannien)
E-Mail: Steve.harding@nottingham.ac.uk



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201103026> zu finden.

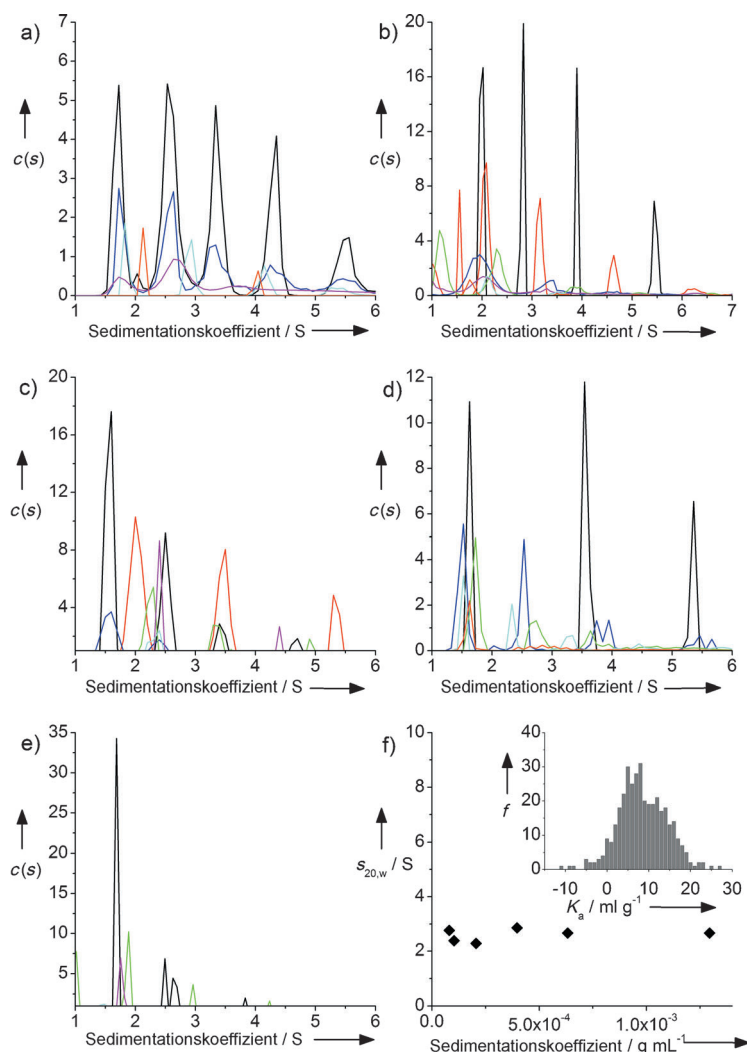


Abbildung 2. Repräsentative Verteilung der Sedimentationskoeffizienten, $c(s)$, von a) BAEA-Cellulose 1 ($DS_{Amin}=0.60$), b) 2 ($DS_{Amin}=0.77$) und c) 3 ($DS_{Amin}=0.72$), d) AEA-Cellulose 4 ($DS_{Amin}=0.83$) und e) ATOTA-Cellulose 5 ($DS_{Amin}=0.85$) bei verschiedenen Konzentrationen: 2.0 (schwarz), 1.5 (rot), 1.0 (blau), 0.75 (grün), 0.5 (rosa), 0.25 (cyan) und 0.125 mg mL⁻¹ (orange). f) Gewichsmittlerer Sedimentationskoeffizient $s_{20,w}$ (umgerechnet auf Standardbedingungen: Wasser, 20 °C) in Abhängigkeit von der Konzentration von BAEA-Cellulose 1. Die Analyse dieser Verteilung mithilfe der Monomer-Dimer-Funktion ergab eine genäherte Dissoziationskonstante von $K_d \approx 2$ mM, die für eine sehr schwache Selbstorganisation typisch ist. Die statistische Verteilung von 500 Einzelwerten für den Parameter K_a (in mL g⁻¹) ist klein, aber ungleich null (siehe Einschub in f); f =Frequenz).

logarithmische Beziehung zwischen dem Sedimentationskoeffizienten s und dem Molekulargewicht M genutzt werden. Es gilt: $s \approx M^b$ und $s_i/s_1 \approx (M_i/M_1)^b$, wobei 1 das Monomer und i die i -te Spezies definiert. Der konformationsabhängige Exponentalkoeffizient b beträgt für Stäbchen ca. 0.2, für Knäuel ca. 0.5 und für Kugeln ca. 0.7.^[4] Unter der Annahme, dass es sich bei der ersten detektierten Spezies um das Monomer handelt, kann für alle fünf 6-Desoxy-6-aminocellulosen ein Exponentalkoeffizient b von ca. 0.7 ermittelt werden. Typischerweise liegt der Exponentalkoeffizient für Polysaccharide im Bereich von 0.2 bis 0.5. Der gefundene Wert hingegen stimmt eher mit dem globulärer Proteine überein (Abbildung 4 der Hintergrundinformationen). Diese Abweichung

resultiert möglicherweise aus den Näherungen zur hydrodynamischen Nichtidealität und der Annahme, dass die erste Spezies dem Monomer entspricht.

Zur Abschätzung der molaren Masse M_1 wurde die Abhängigkeit von $c(s)$ wie auch von $c(M)$ durch Rechnungen mit SEDFIT analysiert. Die zweite Variante beruht auf der Untersuchung des mittleren Reibungsanteils aller Spezies in der Lösung. Da dieser Ansatz wegen der Oligomerenbildung und der damit verbundenen Inhomogenität der Probe mit Schwierigkeiten behaftet ist, wurden für die Auswertung die letzten Scans der Messungen herangezogen. Unter der Annahme, dass die schweren Spezies bereits sedimentiert sind, wurde die molare Masse M_1 des Monomers berechnet. Abhängig von der Probe und der Zahl der für die Rechnung verwendeten Messungen ergaben sich Werte zwischen 12000 und 18000 g mol⁻¹. Darüber hinaus wurde für BAEA-Cellulose 2 durch Sedimentationsgleichgewichtsmessungen eine molare Masse des Monomers von $M_1 \approx 13000$ g mol⁻¹ erhalten (siehe Hintergrundinformationen).

Nach dem Prinzip von Le Chatelier sollte bei einer reversiblen Assoziation der Anteil der Monomerspezies relativ zu den Oligomerspezies mit zunehmender Konzentration abnehmen. Dieses Verhalten wird auch bei der reversiblen Assoziation von Proteinen beobachtet. Hämoglobin liegt unterhalb einer Konzentration von ca. 0.1 mg mL⁻¹ als diskretes Monomer, unter physiologischen Bedingungen jedoch als Tetramer vor.^[5] Dagegen wird bei irreversiblen Assoziationen keine Veränderung des Aggregationszahl in Abhängigkeit von der Konzentration beobachtet. Für alle untersuchten 6-Desoxy-6-aminocellulosen konnte eine partiell reversible Assoziation nachgewiesen werden. Das Verhältnis von Monomer zu Oligomer verändert sich in Abhängigkeit von der Konzentration (Abbildung 2; Abbildung 2 und Tabelle 3 der Hintergrundinformationen).

Bei der BAEA-Cellulose 1 ändert sich mit abnehmender Probenkonzentration die relative Fläche des kleinsten Peaks (1.8 S) von ca. 20 % (2.0 mg mL⁻¹) auf 30 % (0.25 mg mL⁻¹; vgl. Abbildung 1). Im Unterschied dazu steigt die relative Fläche des zweiten Peaks (ca. 2.8 S) von 28 % (2.0 mg mL⁻¹) auf 34 % (0.25 mg mL⁻¹) mit abnehmender Konzentration. Die des dritten bleibt mit ca. 18 % unverändert, wenn die Konzentration von 2.0 mg mL⁻¹ auf 0.25 mg mL⁻¹ sinkt. Während bei hohen Konzentrationen bis zu sieben Spezies gefunden werden, konnten für die niedrigste Konzentration (0.125 mg mL⁻¹) lediglich vier Peaks mit den folgenden relativen Flächen detektiert werden: 59 % für den ersten (2.1 S), 26 % für den zweiten (4.0 S), 9.5 % für den dritten (6.3 S) und 4.1 % für den vierten Peak (7.8 S).

Die Veränderung der relativen Peakflächen in Abhängigkeit von der Konzentration belegt, dass eine Dissoziation der Oligomeren in Probe 1 unterhalb einer Konzentration von 0.25 mg mL⁻¹ auftritt. Eine vergleichbare Flächenzunahme

me des Monomerpeaks konnte auch bei allen anderen 6-Desoxy-6-aminocellulosen mit abnehmender Probenkonzentration beobachtet werden. Die relative Fläche des Monomerpeaks beträgt für die BAEA-Cellulose **2** bei einer Konzentration von 2.0 mg mL^{-1} 36 %. Mit abnehmender Konzentration nimmt sie auf 70 % zu ($1.0\text{--}0.25 \text{ mg mL}^{-1}$) und ist für 0.125 mg mL^{-1} mit 77 % am größten. Für die BAEA-Cellulose **3** wurde eine geringere Zunahme des ersten Peaks von 51 % (2.0 mg mL^{-1}) auf 60 % (0.25 mg mL^{-1}) detektiert. Die relative Fläche des ersten Peaks steigt für AEA-Cellulose (**4**) ebenfalls mit abnehmender Konzentration: Sie beträgt bei 2.0 mg mL^{-1} 29 % und bei 0.125 mg mL^{-1} 65 %. Bei ATOTA-Cellulose (**5**) wurde für den ersten Peak bei 1.7 S eine relative Peakfläche von 67 % ermittelt. Diese nimmt ebenfalls mit abnehmender Konzentration zu und erreicht bei 0.50 mg mL^{-1} 76 %. Für die 6-Desoxy-6-aminocellulosen **2** und **4** wurde ein Pentamer nur bei einer Konzentration von 2.0 mg mL^{-1} gefunden. Bei zwei der 6-Desoxy-6-aminocellulosen wurde der Einfluss des pH-Werts und der Temperatur auf das Assoziationsverhalten untersucht. Eine Temperaturerhöhung von 10 auf 30°C führt bei ATOTA-Cellulose (**5**) zu einer signifikanten Abnahme des Monomeranteils von 70 auf 50 %. Dieser Befund lässt auf hydrophobe Wechselwirkungen schließen. Im Unterschied dazu konnte für die BAEA-Cellulose **2** keine wesentliche Änderung beobachtet werden. Beide Proben zeigen im pH-Bereich zwischen 4 und 6 den größten Oligomerenanteil.

Diese Befunde zeigen ein neues und unerwartetes Phänomen der definierten Selbstorganisation von Polysaccharidderivaten. Die partiell reversible Wechselwirkung von 6-Desoxy-6-aminocellulosen kann auf Interaktionen mit anderen biologischen Makromolekülen übertragen werden. Dementsprechend binden Aminocellulosen bevorzugt an Glycoproteine und Proteoglycane. Die Aminocellulosen können wie Laminin, Poly-L-lysin und Polyornithin als Rezeptorstrukturen und potenziell als extrazelluläre Matrix fungieren. Sie ermöglichen damit das Strukturdesign von Grenzflächenmaterialien mit biologischen Erkennungsfunktionen auf molekularer und zellulärer Ebene, wobei über die NH_2 -Gruppen biologische Makromoleküle wie Proteine^[6] und Aptamere^[7] kovalent immobilisiert werden können. Die

hier beschriebenen Ergebnisse werden die bisherigen Ansichten über die supramolekularen Wechselwirkungen von Polysacchariden grundlegend verändern.

Experimentelles

Die Synthese der Tosylcellulose erfolgte entsprechend der Vorschrift von Rahn et al.^[8] Die Aminocellulosen wurden typischerweise ausgehend von 4.2 g Tosylcellulose ($\text{DS} = 1.02$; 13.2 mmol derivatisierte AGE) in 40 mL DMSO unter Zugabe von 22 mL (406.7 mmol) 1,2-Diaminoethan hergestellt. Diese Mischung wurde 6 h auf 100°C erhitzt und das Produkt in 600 mL Aceton gefällt. Anschließend wurde mit Isopropylalkohol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Erhalten wurde ein weißes Pulver (Probe **4**). Ausbeute: 2.6 g (92 %), N: 10.3 %, S: 2.8 % ($\text{DS}_{\text{Amin}}: 0.83$; $\text{DS}_{\text{Tos}}: 0.20$).

Die Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente wurden mit einer analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-I (Beckman Instruments) mit optischem Rayleigh-Interferenzsystem durchgeführt. Die Daten konnten mithilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ($c(s)$) des SEDFIT-Programms von Dam und Schuck analysiert werden.^[3] Die Sedimentationskoeffizienten extrapoliert man gegen die Nullkonzentration, um Effekte auszuschließen, die aus Abweichungen vom idealen Verhalten resultieren.

Eingegangen am 2. Mai 2011

Online veröffentlicht am 22. Juli 2011

Stichwörter: Aminocellulose · Analytische Ultrazentrifuge · Kohlenhydrate · Nanobiotechnologie · Selbstorganisation

- [1] T. R. Patel, S. E. Harding, A. Ebringerova, M. Deszczynski, Z. Hromadkova, A. Togola, B. S. Paulsen, G. A. Morris, A. J. Rowe, *Biophys. J.* **2007**, 93, 741–749.
- [2] A. Jung, P. Berlin, *Cellulose* **2005**, 12, 67–84.
- [3] J. Dam, P. Schuck, *Biophys. J.* **2005**, 89, 651–666.
- [4] O. Smidsrød, I. Andresen, H. Grasdalen, B. Larsen, T. Painter, *Carbohydr. Res.* **1980**, 80, C11–C16.
- [5] R. Valdes, G. K. Ackers, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 74–81.
- [6] A. Jung, P. Berlin, B. Wolters, *IEE Proc. Nanobiotechnol.* **2004**, 151, 87–94.
- [7] A. Jung, T. M. Gronewold, M. Tewes, E. Quandt, P. Berlin, *Sens. Actuators B* **2007**, 124, 46–52.
- [8] K. Rahn, M. Diamantoglou, H. Berghmans, D. Klemm, T. Heinze, *Angew. Makromol. Chem.* **1996**, 238, 143–163.