

Dynamisches Oberflächen-Imprinting: hochaffine Peptid-Bindungsstellen durch induzierte Organisation von synthetischen Membranrezeptoren**

Benjamin Gruber, Stefan Balk, Stefan Stadlbauer und Burkhard König*

Eine Vielfalt biologischer Stoffwechselprozesse wird durch molekulare Erkennungsvorgänge zwischen Membranrezeptoren und externen Ligandmolekülen kontrolliert.^[1] Bei der Signalübertragung an Zellmembranen beispielsweise spielt die dynamische Bildung von Rezeptor-Clustern eine entscheidende Rolle, um die hochselektive Bindung eines Signalmoleküls in der Gegenwart konkurrierender Liganden zu ermöglichen.^[2]

Zahlreiche Modellsysteme für biologische Membranen wurden für Anwendungen im Wirkstofftransport, der Sensorik und der Katalyse^[3] sowie zur Untersuchung multivalenter Interaktionen an Grenzflächen^[4] entwickelt. Das Prinzip der Templat-gesteuerten Selbstorganisation wurde weiterhin bereits in der Entwicklung von molekular geprägten Materialien genutzt.^[5] Allerdings stellt die Anordnung nicht-kovalent verknüpfter Bindungsstellen in definierten Abständen immer noch eine Herausforderung dar. Wir stellen hier ein Konzept vor, das an die Funktion einer immunologischen Synapse angelehnt ist: Dabei werden Rezeptoren an einer Membrangrenzfläche durch einen Bindungspartner rekrutiert, und durch die daraus resultierende räumliche Anordnung wird ein spezifisches Signal erzeugt.^[6] Für unser Modell verwenden wir unilamellare Vesikelmembranen, die mit künstlichen, lumineszierenden Rezeptoren dotiert sind. Als externe Liganden fungieren kleine Peptide, deren funktionelle Seitenketten komplementäre Rezeptormoleküle innerhalb der fluiden Membranen zueinander ausrichten, sodass durch resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET) ein charakteristisches optisches Signal entsteht.

In einer früheren Studie konnten wir bereits die selektive Erkennung kleiner Biomoleküle und phosphorylierter Proteine durch Wechselwirkungen an Membran-Wasser-Grenzflächen demonstrieren.^[7] Dazu wurden synthetische Vesikelmembranen mit eingebetteten amphiphilen Übergangsmetallkomplexen des 1,4,7,10-Tetraazacyclododecans (Cyclen) und der Nitrilotriessigsäure (NTA) eingesetzt. Wir haben dieses Konzept nun um die dynamische Anordnung von synthetischen Rezeptoren erweitert, sodass die multivalente

Erkennung von phosphorylierten Peptiden möglich ist. Die selektive Erkennung von O-Phosphoserin (pSer) und Histidin (His) des Modellpeptids **P1** (siehe Schema 1) durch Metallkomplexe wurde ebenfalls bereits in einer früheren Arbeit beschrieben.^[8] Dabei wurde gezeigt, dass in gepufferter wässriger Lösung der Zn^{II}-Cyclen-Rezeptor Zn₂**6** das Peptid **P1** mit einer Affinitätskonstante von lg *K* = 4.8 bindet, wohingegen sein Dimer Zn₄**6**, das eine gleichzeitige Interaktion mit pSer und His erlaubt, Affinitäten von lg *K* = 7.5 erreicht (Tabelle 1, Einträge 1 und 2, sowie Hintergrundinformationen). Anstatt wie in Zn₄**6** zwei Rezeptoreinheiten kovalent zu

Tabelle 1: Zusammenfassung der Bindungskonstanten für Peptid **P1** der synthetische Rezeptoren in homogener wässriger Lösung (Einträge 1 und 2) und in Vesikelmembranen (HEPES-Puffer, pH 7.4, 25 °C).

Eintrag	Lipid	Rezeptor	Mol %	lg <i>K</i>
1	–	Zn ₂ 6	–	4.8 ^[a]
2	–	Zn ₄ 6	–	7.5 ^[a]
3	DSPC	Zn ₂ 5	1	5.9
4	DSPC	Zn ₂ 5	10	8.1
5	DOPC	Zn ₂ 5	1	8.6
6	DSPC	Zn ₂ 2	1	6.2
7	DSPC	Cu ₄	1	5.0
8	DSPC	Zn ₂ 2 + Cu ₄	1 + 1	6.3
9	DOPC	Zn ₂ 2	1	5.5
10	DOPC	Cu ₄	1	5.8
11	DOPC	Zn ₂ 2 + Cu ₄	1 + 1	8.8

[a] Siehe Lit. [9].

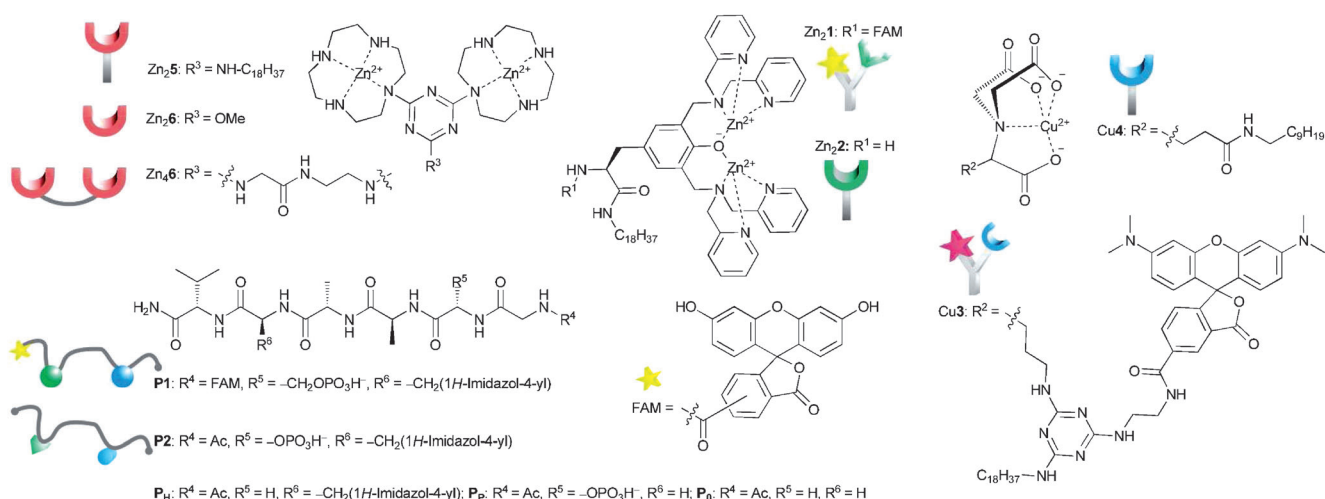
verknüpfen, haben wir nun einzelne Bindungsstellen in synthetische Lipiddoppelschichten eingebettet. Die Selbstorganisation dieser Einheiten an der Membrangrenzfläche erlaubt hier eine dynamische multivalente Bindung von **P1** über die pSer- und His-Reste.

Zuerst wurden Vesikelmembranen aus 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DSPC) mithilfe bereits beschriebener Methoden (Hintergrundinformationen) mit 1 Mol-% des Rezeptors Zn₂**5** dotiert (Schema 1). Die Fluoreszenzemission des Peptids **P1** wird durch Bindung an die Oberflächenrezeptoren deutlich gelöscht, wodurch bei Raumtemperatur eine Bindungskonstante von lg *K* = 5.9 (Tabelle 1, Eintrag 3) bestimmt werden konnte. Dieser Wert stimmt gut überein mit der bereits beschriebenen Bindung von pSer an einen einzelnen Zn₂**5**-Rezeptor^[7a] und reflektiert die physikalischen Eigenschaften dieser Membran, denn die hohe Hauptphasenübergangstemperatur^[9] des DSPC-Lipids (54 °C) behindert die laterale Diffusion einzelner Metallkomplexe und damit eine kooperative Peptidbindung über

[*] Dr. B. Gruber, M. Sc. S. Balk, Prof. Dr. B. König
Institut für Organische Chemie, Universität Regensburg
Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg (Deutschland)
E-Mail: Burkhard.koenig@chemie.uni-regensburg.de
Homepage: <http://www-oc.chemie.uni-regensburg.de/koenig/>

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201205701> zu finden.



Schema 1. Strukturen aller synthetischer Rezeptoren und Liganden (ohne Gegenionen).

mehrerer Rezeptorbindungsstellen (Abbildung 1a). Nur eine drastische Erhöhung der Rezeptorkonzentration innerhalb der Lipiddoppelschichten (auf 10 Mol-%, Tabelle 1, Eintrag 4) konnte hier zu erhöhten Affinitäten durch die Bildung von dicht gepackten Metallkomplex-Domänen führen. Durch den Ersatz des gesättigten DSPC-Lipids durch das ungesättigte 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) konnte die Affinität für das Peptid **P1** um über zwei Größenordnungen gesteigert werden (Tabelle 1, Eintrag 5). Die eingebetteten Rezeptormoleküle können sich hier bei Raumtemperatur frei innerhalb der Membran bewegen und erlauben somit eine dynamische Komplexierung von **P1** über zwei Zn_{25} -Einheiten (Abbildung 1a). Die Größenbestimmung der Vesikel durch Lichtstreuung konnte die Bindung des Peptids an Rezeptoren eines einzelnen Vesikels bestätigen (Intramembran-Interaktion) und eine Vernetzung mehrerer Partikel (Intermembran-Interaktion) ausschließen (Hintergrundinformationen, Abbildung S11).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Analyt-induzierte Anordnung von Bindungsstellen in fluiden Membranen durch Mehrfachwechselwirkungen deutliche Affinitätssteigerungen ermöglicht. Im nächsten Schritt wurden Vesikel mit zwei verschiedenen Membranrezeptoren eingesetzt, die **P1** jeweils nur selektiv am pSer- oder His-Rest binden können. Die Synthese des amphiphilen Cu^{II} -NTA-Komplexes **Cu4** für die His-Erkennung wurde bereits beschrieben,^[7a] Details zur Synthese des amphiphilen Zn^{II} -DPA-Komplexes Zn_{22} (DPA = 3,5-Bis[(bispyridin-2-ylmethylamino)methyl]-4-hydroxyphenyl) für die selektive Phosphaterkennung sind in den Hintergrundinformationen enthalten.^[10] Aus Zn_{22} und **Cu4** (Schema 1) sowie aus Mischungen beider Komponenten (zu jeweils 1 Mol-%) konnten stabile DOPC- und DSPC-Vesikel erhalten werden. DSPC-Vesikel mit nur einem Rezeptortyp zeigten lediglich eine monovalente Bindung von **P1** – entweder durch Zn-DPA- oder durch Cu-NTA-Koordination^[11] – mit $\lg K$ -Werten von 5.0 bzw. 6.2 (Tabelle 1, Einträge 6 und 7). Eine 1:1-Stöchiometrie konnte außerdem durch einen Job-Plot (mit **P1** als limitierender Komponente) bestätigt werden (Abbildung S18). Eine Kombination beider

Bindungsstellen in den Gelphasen-Membranen der DSPC-Vesikel (Abbildung 1b,c) führte hier nicht zu einer Erhöhung der Affinitäten ($\lg K = 6.3$; siehe Tabelle 1, Einträge 6–8). Die Bindungsisothermen dieser Vesikel stellen lediglich einen Mittelwert der Kurven für die Einzelrezeptor-Partikel dar (siehe Hintergrundinformationen). Dies kann durch eine zufällige, aber invariable Anordnung einzelner, verankerter Metallkomplexe erklärt werden, die keine Bildung eines ternären Zn_{22} -**P1**-**Cu4**-Komplexes zulässt (siehe auch zugehörige Job-Plots in den Hintergrundinformationen). DOPC-Membranen hingegen zeigen hier ein deutlich unterschiedliches Verhalten: Die Einzelrezeptor-dotierten Vesikel mit Zn_{22} oder **Cu4** ergeben wieder ähnliche Resultate ($\lg K = 5.5$ und 5.8; Tabelle 1, Einträge 9 und 10), wohingegen die flüssig-kristallinen Vesikelmembranen mit beiden Rezeptoren deutlich höhere Affinitäten für **P1** im nanomolaren Bereich ($\lg K = 8.8$; Tabelle 1, Eintrag 11, und Abbildung 1b,c) aufweisen. Dies kann durch die Peptid-induzierte Bildung einer heterodimeren Zn_{22} - und Cu-Rezeptoreinheit in der fluiden Lipiddoppelschicht erklärt werden, die eine divalente Bindung ermöglicht. Auch dies konnte durch Job-Plots bestätigt werden (Abbildung S19).

Für bioanalytische Anwendungen werden bevorzugt native, nicht-markierte Analyte eingesetzt. Wir haben deshalb weiterhin amphiphile Rezeptoreinheiten entwickelt, die die Anwesenheit der Zielmoleküle durch einen induzierten Energietransfer (FRET) anzeigen: Zn_{21} trägt eine Carboxy-fluorescein-Markierung (FAM), während **Cu4** mit einem Rhodamin-Farbstoff (TMR) funktionalisiert ist. In der Molekularbiologie dienen FRET-Experimente als weitverbreitete Methoden zur Abstandsmessung in Biomolekülen oder zur Aufklärung von Membranstrukturen.^[12] Wir nutzen ein FRET-Signal, das durch die räumliche Nähe von markierten Membranrezeptoren entsteht, hier für den Nachweis des Peptids **P2**, das im Unterschied zu **P1** selbst keine Fluoreszenzmarkierung trägt. Die divalente Bindung von **P2** ordnet Zn_{21} und **Cu3** innerhalb des Förster-Radius von 5.5 nm^[13] an, wodurch eine charakteristische FRET-Signatur entsteht (Abbildung 2a).^[14]

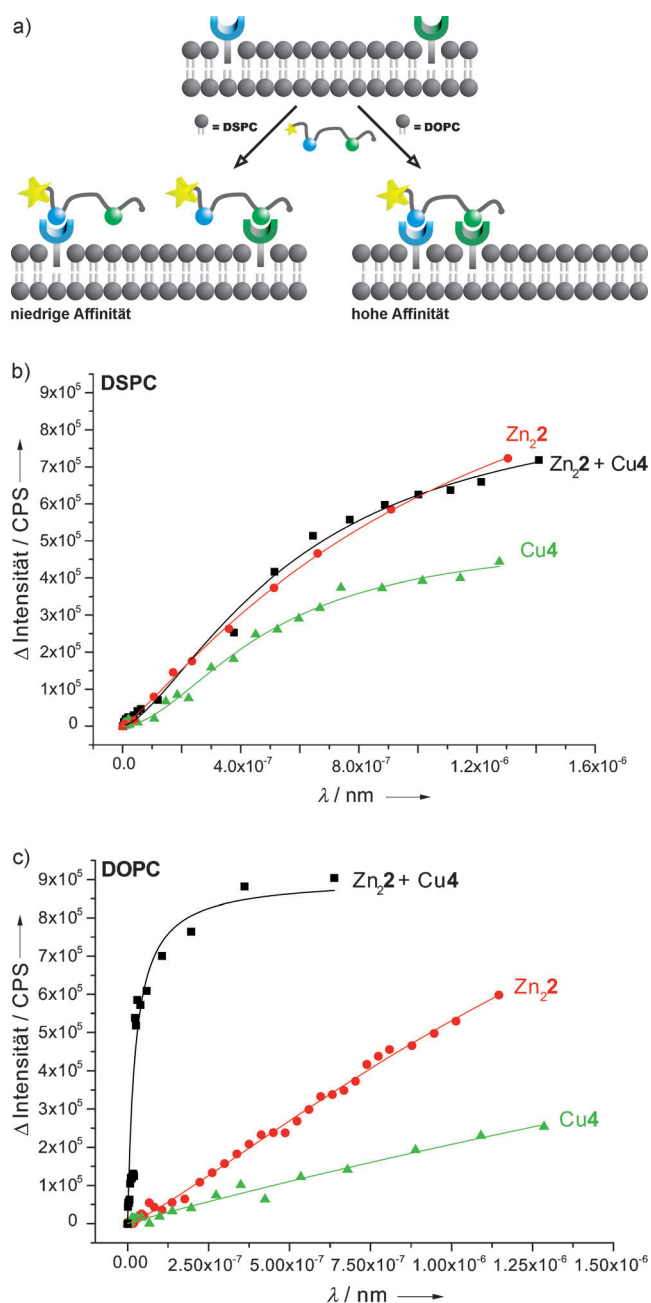


Abbildung 1. a) Schematische Bindung von **P1** an DSPC- und DOPC-Vesikel: invariable Gelphasen-Rezeptoren und Analyt-induzierte Rezeptoranordnung in fluiden Membranen. b,c) Fluoreszenztitrations von **P1** gegen DSPC- (b) und DOPC-Vesikel (c), dotiert mit Zn₂1, Cu3 oder beiden Bindungsstellen.

Entsprechend dotierte DOPC-Vesikel erlauben somit die Bildung von ternären Zn₂1-**P2**-Cu3-Komplexen und zeigen in Gegenwart von **P2** einen Energietransfer von FAM ($\lambda_{em} = 490$ nm) zu TMR ($\lambda_{em} = 580$ nm; Abbildung 2b und S22). Für den maximalen Energieübertrag ist hier zwar ein Überschuss an Peptid nötig, Kontrollexperimente mit monovalenten Peptidliganden (**P_B**, **P_H** und **P₀**; Schema 1) erzeugten jedoch wie erwartet keine signifikante Änderung der Emissionsspektren (Abbildung S23). Ein intervesikulärer FRET durch Vernetzung einzelner Vesikelmembranen konnte erneut

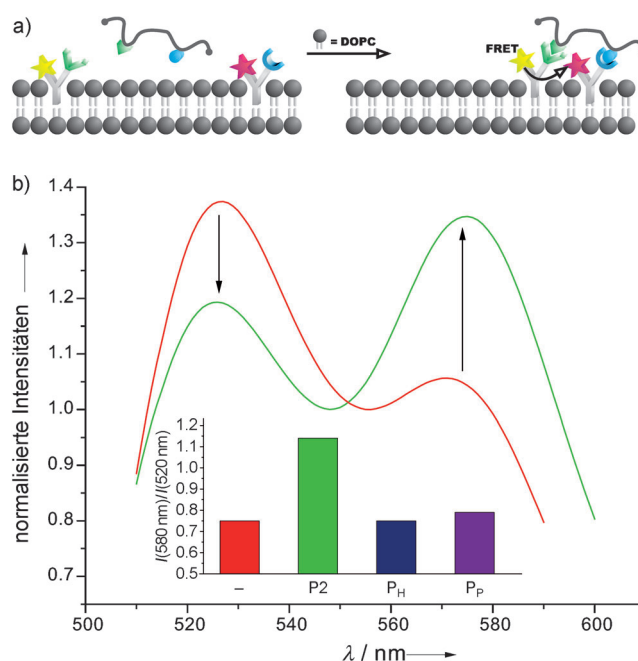


Abbildung 2. a) Erzeugung eines FRET-Signals durch Rekrutierung von fluoreszierenden Membranrezeptoren. b) Fluoreszenzspektren von DOPC-Vesikeln mit Zn₂1 + Cu3 (je 0.5 Mol-%) vor (rot) und nach (grün) der Zugabe von Peptid **P2**. Einschub: relative Änderung der FRET-Emission ($I_{580\text{ nm}}/I_{520\text{ nm}}$) in Gegenwart von **P2** sowie **P_H** und **P_B** als Kontrolle.

durch Lichtstreuung ausgeschlossen werden, da die Partikelgröße in Gegenwart von **P2** unverändert blieb (Abbildung S24, S25). Alle Vesikel wurden außerdem über Größenausschlusschromatographie gereinigt, um nicht-membrangebundene Rezeptoren oder kleine micellare Aggregate von den Bindungsstudien auszuschließen. Die entsprechenden Rezeptorkonzentrationen wurden über den Zn- bzw. Cu-Gehalt der Proben per ICP-AES bestimmt (siehe Hintergrundinformationen).^[15]

Als zusätzliche Kontrollexperimente wurden DOPC- und DSPC-Vesikel mit den jeweils einzelnen Rezeptoreinheiten dotiert und mit den entsprechenden Liganden titriert (pSer/**P_B** für Zn₂1 und His/**P_H** für Cu3). Wie zu erwarten war, konnte hier keine nennenswerte Änderung der FRET-Signatur beobachtet werden (Abbildung S21). DSPC-Vesikel dotiert mit Zn₂1 und Cu3 (jeweils 0.1 Mol-%) zeigen bereits im Ausgangszustand einen geringen Energietransfer der beiden Fluoreszenzmarker, der sich durch die partielle Bildung von Zn₂1/Cu3-Heterodimeren erklären lässt. Die Zugabe von mono- oder divalenten Liganden erzeugt hier jedoch keine Emissionsänderung, da die laterale Diffusion der einzelnen Komponenten in der Gelphasen-Membran bei Raumtemperatur eingeschränkt ist (Abbildung S22).

Zusammenfassend konnten wir somit die spezifische Erkennung von Peptidliganden durch ein dynamisches Oberflächen-Imprinting von synthetischen Bindungsstellen in fluiden Vesikelmembranen zeigen. Amphiphile Metallkomplexe als Rezeptoren werden durch das Zielpolipeptid innerhalb der Membran angeordnet, wodurch über Mehrfachwechselwirkungen nanomolare Affinitäten erreicht werden können. Der

Einsatz amphiphiler Bindungsstellen mit FRET-kompatiblen Fluoreszenzmarkern ermöglicht nicht nur die selbstorganisierte Bildung von spezifischen Analyt-Epitopen an der Membran-Wasser-Grenzfläche, sondern auch einen optischen Nachweis über eine induzierte spezifische FRET-Signatur. Durch eine größere Zahl verschiedener Bindungsstellen in der Membran, sollten sich die Sensitivität und die Selektivität funktionalisierter Vesikel für bioanalytische Anwendungen, beispielsweise für die Erkennung größerer Peptide oder die Interaktion mit Proteinoberflächen, weiter steigern lassen. Der kombinierte Einsatz mehrerer Chromophore in der Membran erzeugt dabei abstandsabhängig ein spezifisches spektroskopisches Signal. Für bestimmte Anwendungen könnten derart funktionalisierte, lumineszierende Vesikel zukünftig Antikörper-basierte Methoden ersetzen.

Eingegangen am 17. Juli 2012

Online veröffentlicht am 11. September 2012

Stichwörter: Fluoreszenz · Imprinting · Metallkomplexe · Molekulare Erkennung · Vesikelmembranen

- [1] a) B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed., Garland Science, New York, **2002**; b) M. Luckey, *Membrane Structural Biology*, Cambridge University Press, Cambridge, **2008**; c) S. Singer, *Science* **1992**, 255, 1671–1677.
- [2] a) A. Grakoui, S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, M. L. Dustin, *Science* **1999**, 285, 221–227; b) M. Renner, C. G. Specht, A. Triller, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2008**, 18, 532–540; c) P. Tolar, J. Hanna, P. D. Krueger, S. K. Pierce, *Immunity* **2009**, 30, 44–55.
- [3] a) P. Scrimin, P. Tecilla, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 730–735; b) P. Tecilla, F. Mancin, P. Scrimin, U. Tonellato, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253, 2150–2165; c) J. Voskuhl, B. J. Ravoo, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 495–505; d) B. Gruber, E. Kataev, J. Aschenbrenner, S. Stadlbauer, B. König, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 20704–20707; e) D. A. Jose, S. Stadlbauer, B. König, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 7404–7412; f) E. Mahon, T. Aastrup, M. Barboiu, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 2441–2443.
- [4] a) S. Tomas, L. Milanese, *Nat. Chem.* **2010**, 2, 1077–1083; b) X. Wang, R. J. Mart, S. J. Webb, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 2498–2505; c) T. Schrader, M. Maue, M. Ellermann, *J. Recept. Signal Transduction Res.* **2006**, 26, 473–485; d) K. Bernitzki, T. Schrader, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 8145–8149; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 8001–8005; e) A. I. Elegbede, M. K. Haldar, S. Manokaran, J. Kooren, B. C. Roy, S. Mallik, D. K. Srivastava, *Chem. Commun.* **2007**, 3377–3379; f) A. Perl, A. Gomez-Casado, D. Thompson, H. H. Dam, P. Jonkheijm, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *Nat. Chem.* **2011**, 3, 317–322.
- [5] a) L. Chen, S. Xu, J. Li, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 2922–2942; b) M. Komiyama, T. Takeuchi, T. Mukawa, H. Asanuma, *Molecular Imprinting*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [6] a) J. T. Groves, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 3590–3605; b) S. Shinkai, M. Takeuchi, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 20, 1250–1259; c) N. W. Turner, B. E. Wright, V. Hlady, D. W. Britt, *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, 308, 71–80.
- [7] a) B. Gruber, S. Stadlbauer, A. Späth, S. Weiss, M. Kalinina, B. König, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 7280–7284; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 7125–7128; b) B. Gruber, S. Stadlbauer, K. Woinaroschy, B. König, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 3704–3714.
- [8] A. Grauer, A. Riechers, S. Ritter, B. König, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 8922–8927.
- [9] Für Übergangstemperaturen und andere physikalische Eigenschaften siehe die LIPIDAT-Datenbank (<http://www.lipidat.tcd.ie/homeLIPIDAT.asp>).
- [10] S.-i. Tamaru, I. Hamachi in *Recognition of Anions*, Vol. 129 (Hrsg.: R. Vilar), Springer, Berlin, **2008**, S. 95–125.
- [11] Der Zn-DPA-Komplex koordiniert an den Phosphatrest von pSer, während Cu⁴ an die Imidazol-Seitenkette von His koordiniert.
- [12] L. M. Loura, M. J. Prieto, *Front. Physiol.* **2011**, 2, 82.
- [13] Integrated DNA Technologies – Technical Bulletins, Fluorescence Resonance Energy Transfer, 2000, <http://www.idtdna.com>.
- [14] In Abwesenheit des Peptidliganden wird keine FRET-Emission beobachtet, da der mittlere Abstand beider Fluoreszenzfarbstoffe in der fluiden Membran zu groß ist (Abbildung S20).
- [15] Die Herstellung und Reinigung der Vesikelproben erzeugt hier einen Verlust von bis zu 25 % funktioneller Amphiphile. Da alle bestimmten Bindungskonstanten bezüglich dieser verringerten, effektiven Rezeptorkonzentration nicht korrigiert wurden, stellen sie lediglich Mindestwerte dar.