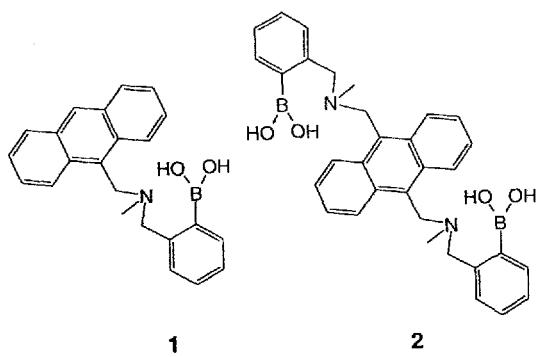


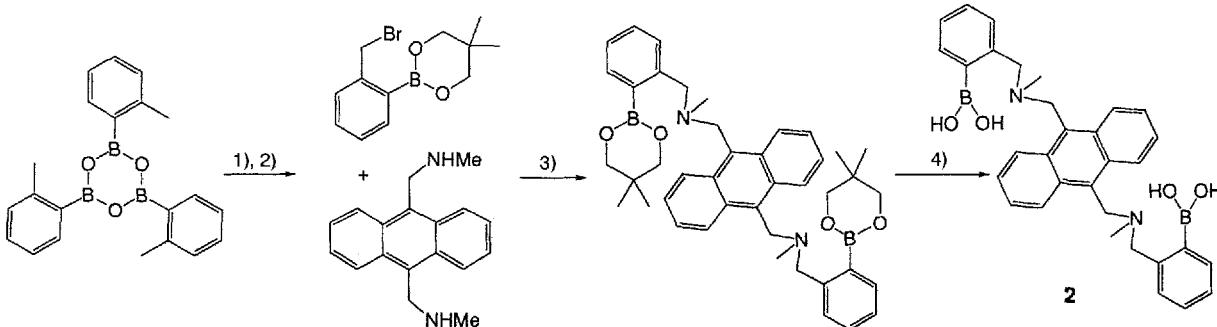
Ein glucosespezifischer molekularer Fluoreszenzsensor**

Tony D. James, K. R. A. Samankumara Sandanayake und Seiji Shinkai*

Der photoinduzierte Elektronentransfer (PET) ist bereits bei fluoreszierenden molekularen Sensoren für Protonen und Metall-Ionen angewendet worden^[1]. Für kleine, neutrale Moleküle gibt es hingegen relativ wenige fluoreszierende molekulare Sensoren. Unsere^[2-11] und andere Arbeitsgruppen^[12-17] haben begonnen, die Wechselwirkungen zwischen Boronsäuren und Kohlenhydraten^[18] zu erforschen, um künstliche Rezeptoren für Kohlenhydrate und letztlich Sensoren zu entwickeln. Unser Ziel ist es, Kohlenhydrate selektiv nachzuweisen. Dafür müssen wir die Eigenschaften der Boronsäure verändern. Mit zwei Erkennungsstellen an einer Diboronsäure gelangt man am zügigsten zum selektiven Nachweis von Kohlenhydraten^[4-7]. Die räumliche Anordnung der beiden Boronsäuregruppen bestimmt, welches Kohlenhydrat bevorzugt gebunden wird. Mit Hilfe von Molekülmodellen und in Kenntnis des PET-Sensors **1**^[11] fanden wir, daß ein Glucosemolekül perfekt von dem spaltenförmigen 9,10-Bisaminomethylanthracenderivat **2** gebunden werden sollte^[19]. Die beiden nach innen stehenden Boronsäuregruppen sind ideal auf die 1,2- und 4,6-Hydroxygruppen der Glucose ausgerichtet.



Die Diboronsäure konnte in Form des Diesters ohne Schwierigkeiten synthetisiert werden (Schema 1)^[11, 20]. Abbildung 1



Schema 1. Synthese des Boronsäurederivats **2**. Reagentien (Ausbeute): 1 *N*-Bromsuccinimid, Azobisisobutyronitril, CCl_4 , Rückfluß (60 %); 2 1.1 Äquiv. 2,2-Dimethyl-1,3-propandiol, Toluol, azeotrope Destillation (Dean-Stark) (quant.); 3 0.4 Äquiv. Diamin, 1.1 Äquiv. K_2CO_3 , THF (5 %); 4 33.3 % $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ -Puffer bei pH 7.77 (quant.).

[*] Prof. S. Shinkai, Dr. T. D. James, Dr. K. R. A. S. Sandanayake

Shinkai Chemirecognics Project, ERATO

Aikawa 2432-3, Kurume

Fukuoka 830 (Japan)

Telefax: Int. + 942/37-6125

[**] T. D. J. und K. R. A. S. S. danken Dr. F. Ohscoto und Dr. M. Mikami (Research Development Corporation of Japan, Chemirecognics Project) für Ratschläge und R. Iguchi für technische Unterstützung.

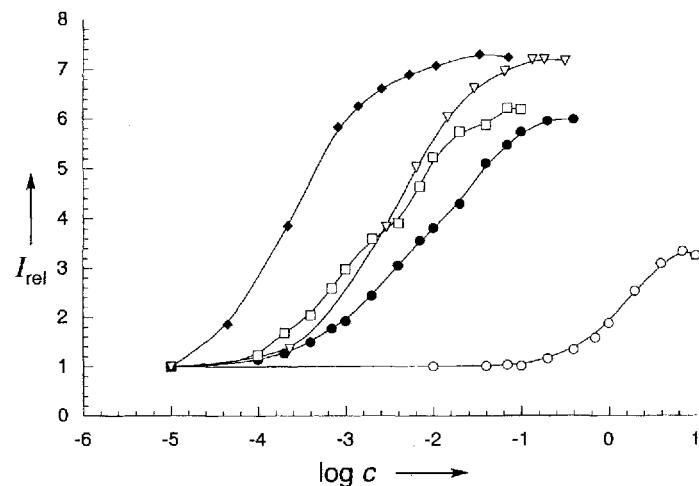


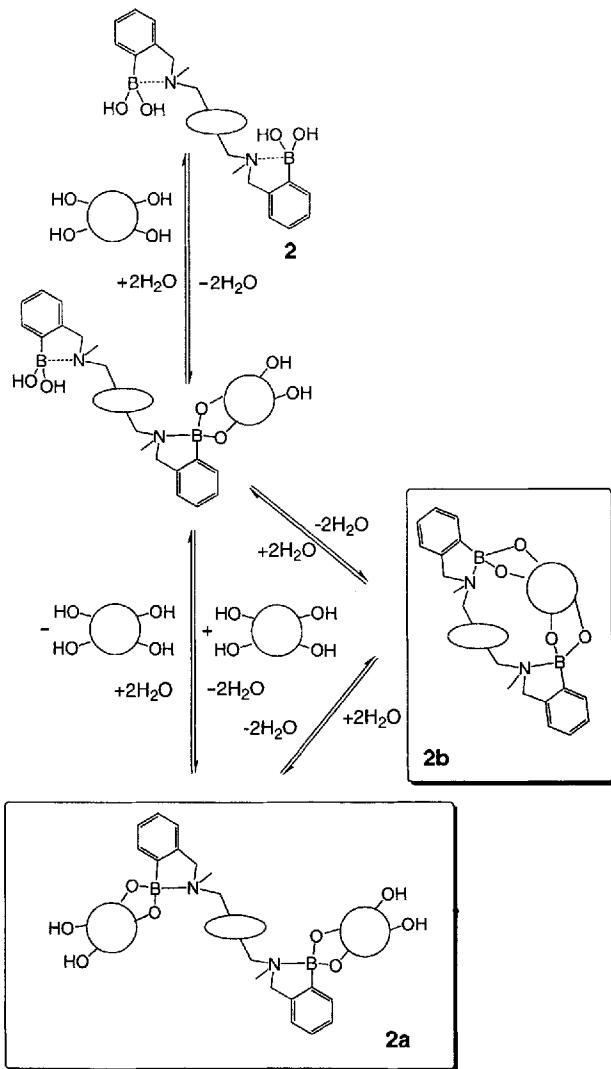
Abb. 1. Relative Fluoreszenzintensität I_{rel} von **2** in Abhängigkeit von der Kohlenhydrat- oder Glykolkonzentration $\log c$ bei 25 °C; $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ von **2** in 33.3 % $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ -Puffer bei pH 7.77, $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 423 \text{ nm}$. ♦ D-Glucose, □ D-Allose, △ D-Fructose, ● D-Galactose, ○ Glykol.

zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von **2** von der Konzentration der Kohlenhydrate („Titrationskurven“) bei pH 7.77 (33.3 % Methanolpuffer). Die Stabilitätskonstanten betragen: D-Glucose ($\log K_a = 3.6$), D-Allose ($\log K_a = 2.8$), D-Fructose ($\log K_a = 2.5$), D-Galactose ($\log K_a = 2.2$) und Glykol ($\log K_a = -0.20$).

Schema 2 stellt die wichtigsten hierbei auftretenden Teilchen vor. Mit **2** ergeben sich unter den experimentellen Bedingungen hauptsächlich vier Produkte, von denen **2a** (ein nicht cyclischer 2:1-Komplex) und **2b** (ein cyclischer 1:1-Komplex) fluoreszieren. Mit Glykol kann das fluoreszierende Teilchen nur der 2:1-Komplex **2a** sein. Bei D-Glucose zeigt die hohe Stabilität an, daß das Gleichgewicht zu dem intramolekularen 1:1-Komplex **2b** hin verschoben ist.

Die Existenz des 1:1-Komplexes **2b** aus **2** und D-Glucose wurde durch ^1H - und 2D-COSY90-NMR-Messungen bestätigt. Abbildung 2 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum des D-Glucose-Komplexes **2b** (siehe auch Tabelle 1). Die starke Verschiebung des Signals von H3 nach hohem Feld ($\delta = -0.3$) zeigt, daß das

Proton direkt auf die π -Elektronen des Anthracens gerichtet ist. Die Aufspaltung in anthrylische und benzylische Protonen weist auch auf die starre Struktur eines 1:1-Komplexes hin. Mit D-Allose, D-Fructose und D-Galactose konnte ^1H -NMR-spektroskopisch kein 1:1-Komplex nachgewiesen werden. Durch Sekundärionen-Massenspektrometrie (positive Ionen) einer



Schema 2. Das Anthracengerüst ist durch eine Ellipse symbolisiert, die Zuckermoleküle durch Kreise mit vier OH-Gruppen.

Tabelle 1. Zuordnung der ^1H -NMR-Signale des D-Glucosekomplexes **2b** (siehe auch Abb. 2).

Zuordnung	δ -Wert
Komplex	
H1	5.18
H2	3.01
H3	-0.30
H4	2.68 (verdeckt)
H5	3.43
H6 und H6'	3.73
Ha1 und Ha2 oder Ha3 und Ha4	3.93 und 4.85 (verdeckt)
Ha1 und Ha2 oder Ha3 und Ha4	4.10 und 4.60
Hb1 und Hb2 oder Hb3 und Hb4	5.66 und 6.80
Hb1 und Hb2 oder Hb3 und Hb4	6.13 und 6.78
NCH ₃ oder H ₃ CN	2.42
NCH ₃ oder H ₃ CN	2.68
Lösungsmittel	
CH ₃ OH	3.30
CH ₃ OH	4.89
Schutzgruppe [a]	
(CH ₃) ₂ C(CH ₂ OH) ₂	0.85
(CH ₃) ₂ C(CH ₂ OH) ₂	3.40
(CH ₃) ₂ C(CH ₂ OH) ₂	4.89

[a] Die Schutzgruppe wurde unter den Bedingungen der NMR-Messungen abgespalten.

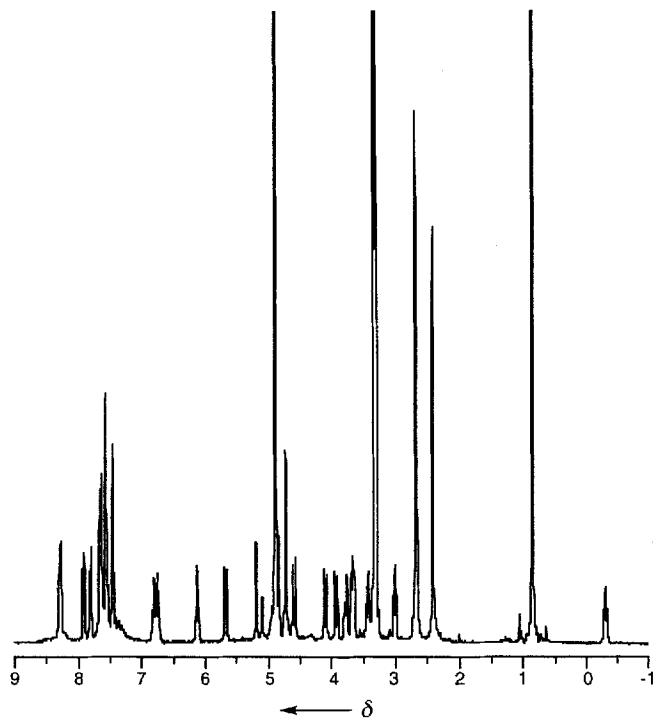
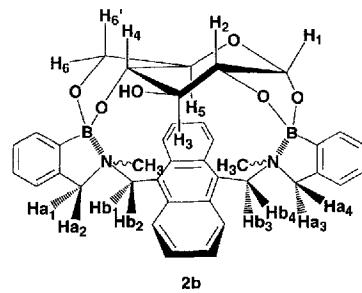


Abb. 2. ^1H -NMR-Spektrum des 1:1-Komplexes **2b** aus D-Glucose und **2**. Die Formel von **2b** zeigt die Pyranoseform von D-Glucose, die Furanoseform existiert möglicherweise auch.

1:1-Mischung von **2** mit D-Glucose, D-Allose, D-Fructose und D-Galactose konnte jeweils das M^+ -Ion von **2b** nachgewiesen werden; bei D-Fructose war dieses Signal schwach, und das Spektrum enthielt außerdem noch ein Signal des M^+ -Ions von **2a**.

Nach Kalottenmodellen nimmt die Stabilität des 1:1-Komplexes **2b** in der Reihenfolge D-Glucose \approx D-Allose > D-Galactose > D-Fructose ab. Die Konfiguration von D-Glucose und D-Allose unterscheidet sich an C3. Im D-Glucose-1:1-Komplex **2b** ist das C3-Proton auf die π -Elektronen des Anthracenteils gerichtet (siehe oben). Im entsprechenden D-Allose-Komplex muß die C3-Hydroxygruppe auf das π -System des Anthracens gerichtet sein. Da der D-Allose-Komplex deutlich instabiler ist ($\log K_a$) als der D-Glucose-Komplex muß die Wechselwirkung zwischen den π -Elektronen und der Hydroxygruppe ungünstig sein. Der Unterschied zwischen vorhergesagter und beobachteter Reihenfolge bei D-Galactose und D-Fructose wird wahrscheinlich eher durch die unterschiedliche Stabilität der 2:1-Komplexe **2a** als durch die der 1:1-Komplexe **2b** verursacht. Die massenspektrometrischen Daten bestätigen diese Vermutung, da im Falle der D-Fructose auch das M^+ -Ion des 2:1-Komplexes **2a**, bei der D-Galactose aber nur das M^+ -Ion des 1:1-Komplexes **2b** nachgewiesen werden kann.

Die maximale Änderung der Fluoreszenz, die man bei der Verbindung **2** beobachten kann, liegt in einem Bereich, der zur Erfassung physiologischer Glucosespiegel geeignet ist. Drei Monosaccharide sind im wesentlichen in Blut vorhanden: D-Glucose (0.3–1.0 mM), D-Fructose (≤ 0.1 mM) und D-Galactose (≤ 0.1 mM). Titriert man D-Glucose in Anwesenheit von 0.1 mM D-Fructose oder D-Galactose, dann beobachtet man hierbei die gleiche Stabilität wie mit D-Glucose allein (Abb. 3).

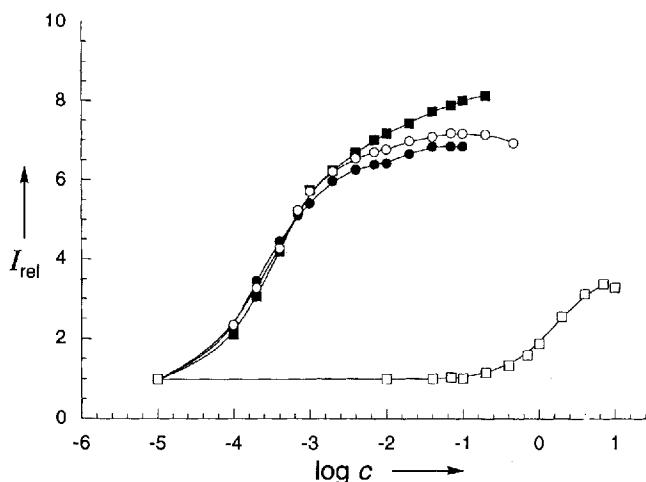


Abb. 3. Relative Fluoreszenzintensität I_{rel} von **2** in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration $\log c$ mit und ohne 0.1 mM D-Galactose oder D-Fructose bei 25 °C; 1.0×10^{-5} M von **2** in 33.3% MeOH/H₂O-Puffer bei pH 7.77, $\lambda_{\text{ex}} = 370$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 423$ nm. • D-Galactose/D-Glucose, ■ D-Fructose/D-Glucose, ○ D-Glucose, □ Glykol.

Es ist also möglich, einen PET-Sensor zu konstruieren, der für Glucose spezifisch ist. Wir sind der Ansicht, daß man andere kohlenhydratspezifische Sensoren entwickeln kann, wenn man die beiden Boronsäuregruppen passend für die Hydroxygruppen der Zielverbindungen anordnet.

Eingegangen am 5. April,
veränderte Fassung am 2. Juli 1994 [Z 6823]

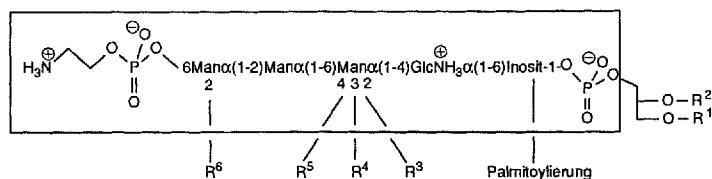
- [1] Übersichtsartikel: A. J. Bryan, A. P. de Silva, S. A. de Silva, R. A. D. Rupasingha, K. R. A. S. Sandanayake, *Biosensors* **1989**, *4*, 169; R. Bissel, A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratna, P. L. M. Lynch, G. E. M. Maguire, K. R. A. S. Sandanayake, *Chem. Soc. Rev.*, **1992**, *21*, 187.
- [2] S. Shinkai, K. Tsukagoshi, Y. Ishikawa, T. Kunitake, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1039.
- [3] K. Tsukagoshi, S. Shinkai, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4089.
- [4] K. Kondo, Y. Shiomi, M. Saisho, T. Harada, S. Shinkai, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8239.
- [5] Y. Shiomi, K. Kondo, M. Saisho, T. Harada, K. Tsukagoshi, S. Shinkai, *Supramol. Chem.* **1993**, *2*, 11.
- [6] Y. Shiomi, M. Saisho, K. Tsukagoshi, S. Shinkai, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 2111.
- [7] G. Deng, T. D. James, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4567–4572.
- [8] T. D. James, T. Harada, S. Shinkai, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 857, 1176 (Corrigendum).
- [9] T. D. James, K. Murata, T. Harada, K. Ueda, S. Shinkai, *Chem. Lett.* **1994**, 273.
- [10] R. Ludwig, T. Harada, K. Ueda, T. D. James, S. Shinkai, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, *4*, 697.
- [11] T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, S. Shinkai, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 477.
- [12] J. Yoon, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5874.
- [13] L. K. Mohler, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7037.
- [14] L. K. Mohler, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2998.
- [15] G. Wulff, B. Heide, G. Helfmeier, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *108*, 1089.
- [16] G. Wulff, H.-G. Poll, *Makromol. Chem.* **1987**, *188*, 741.

- [17] Übersicht G. Wulff, *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 2093.
- [18] Von unseren und anderen Arbeiten [2–17] her ist bekannt, daß sich der Boronsäureester schnell und reversibel im basischen Milieu bildet. Bei den *ortho*-Aminoboronsäuren stellt sich das Gleichgewicht bei neutralem pH-Wert ebenso schnell ein [11, 16]. Nichtkovalente Wechselwirkungen werden mit Hilfe der Ausdrücke „Erkennung“, „Komplex“ und „Bindungskonstanten“ gekennzeichnet. Diese Ausdrücke werden benutzt, um das Gleichgewicht zwischen dem kovalenten Boronsäureester und der freien Boronsäure unter diesen Bedingungen zu beschreiben.
- [19] Spaltenförmige Rezeptoren wurden unter anderem von J. Rebek, Jr., et al. ausführlich untersucht: J. Rebek, Jr., *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 399, zit. Lit.
- [20] R. T. Hawkins, H. R. Snyder, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3863; H. R. Snyder, R. T. Hawkins, W. J. Lennarz, *ibid.* **1960**, *82*, 3053; H. R. Snyder, M. S. Koneky, W. J. Lennarz, *ibid.* **1958**, *80*, 3611.

Synthese eines GPI-Ankers der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)**

Thomas G. Mayer, Bernd Kratzer und Richard R. Schmidt*

Glycosylphosphatidylinositol (GPIs) sind eine vor ca. zehn Jahren^[1] entdeckte Naturstoffklasse von Glycophospholipiden, die Proteine und Glycoproteine C-terminal in den Membranen eukaryontischer Zellen verankern^[1]. Analysen der GPI-Anker des *Trypanosoma-brucei*-, „Variant-surface“-Glycoproteins (VSG)^[1, 2], von „Rat-brain“-Thy-1^[3], der *Leishmania-major*-, „Promastigote-surface“-Protease^[4], des *Trypanosoma-cruzi*-1G7-Antigens^[5] und der menschlichen Erythrocyten-Acetylcholinesterase^[6] lieferten die in Schema 1 gezeigte allgemeine Struktur (eingeklammert).



Schema 1. Struktur von GPI-Ankern.

Das Auftreten von zusätzlichen Kohlenhydrat- (R^4 – R^6) oder Ethanolaminphosphat-Seitenketten (R^3) ist artspezifisch^[7], und die Membran-verankernden Lipidstrukturen unterscheiden sich je nach Spezies und Zelltyp deutlich. Sie bestehen bei Glycerinlipiden (Variation von R^1 und R^2) aus *sn*-1,2-Dimyristoylglycerin in *T. brucei*-VSGs^[8], *sn*-1-Stearoyl-2-*lyso*-glycerin beim *T. brucei*-, „Proyclic-acidic-repetitive“-Protein^[9], *sn*-1-Alkyl-2-acylglycerin in Rinder- und Menschen-Erythrocyten-Acetylcholinesterase^[10] und in menschlichem Folat-Bindeprotein^[11] sowie aus *sn*-1,2-Diacylglycerin in der Torpedo-Acetylcholinesterase^[12]. Des weiteren kann der Inositrest zusätzlich palmitoyliert sein. Statt Glycerinlipiden wurden bei GPI-Ankern von Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) auch Ceramide aus Phytosphingosin als Membrananker gefunden^[13, 14]. Die typische Struktur eines solchen GPI-Ankers ist in Schema 2 dargestellt (**1**).

[*] Prof. Dr. R. R. Schmidt, Dipl.-Chem. T. G. Mayer, Dipl.-Chem. B. Kratzer
Fakultät Chemie der Universität
Postfach 5560 M 725, D-78434 Konstanz
Telefax: Int. +7531/88-3135

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.