

Untersuchung der molekularen Erkennung von Aminosäuren durch Cyclopeptide mit reflektometrischer Interferenzspektroskopie**

Dietmar Leipert, Dirk Nopper, Marcus Bauser, Günter Gauglitz und Günther Jung*

Molekulare Erkennung spielt bei vielen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle, wobei Gastmoleküle von ihrem Wirt sehr selektiv und reversibel gebunden werden. Diese meist enantioselektiven Erkennungsprozesse, bei denen chirale Liganden mit ihren Rezeptoren wechselwirken, können mit synthetischen Molekülen imitiert werden.^[1] Synthetische Rezeptoren haben zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten im medizinischen und pharmazeutischen Bereich, als neues Trennphasenmaterial oder in der Sensorik.^[2] In der Grundlagenforschung erhält man wichtige Aussagen über die Art der Wechselwirkung von Wirt-Gast-Komplexen.^[3] Eine Vielzahl von unterschiedlichen makrocyclischen Rezeptoren wie Kronenether, Cyclophane, Cyclodextrine, Calixarene und Cyclopeptide wurde bereits synthetisiert.^[4] Mit den Cyclopeptiden Cyclo(Pro-Gly)₃ und Cyclo(Pro-Gly)₄ war eine Unterscheidung zwischen D- und L-Aminosäuresalzen in CDCl₃ mit NMR-spektroskopischen Methoden möglich.^[5] Mit makrocyclischen Peptiden gelang die Unterscheidung chiraler Amine,^[6] und mit chiralen Kronenethern konnten zwitterionische Aminosäuren komplexiert werden.^[7] Diese Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Cyclopeptiden und Analyten wurden mit aufwendigen Meßmethoden durchgeführt.

Wir berichten hier über neuartige Sensormodule mit oberflächengebundenen Cyclopeptiden als molekulare Rezeptoren. In früheren Arbeiten konnten wir nachweisen, daß Cyclohexapeptid-Bibliotheken als chirale Selektoren in der Kapillarelektrophorese einsetzbar sind.^[8] Mit der kombinatorischen Festphasensynthese läßt sich eine Vielzahl solcher Erkennungsmoleküle herstellen.^[9] Gegenüber den singulären Ansätzen, wie bei Calixarenen und Cyclodextrinen, bietet unsere Strategie eine um Größenordnungen höhere Diversität (virtuelle Bibliothek: 10¹⁶ Cyclohexapeptide aus käuflichen Edukten) und damit eine bessere Chance für das Auffinden einer Rezeptorleitstruktur. Cyclohexapeptide sind in ihrer Konformation eingeschränkt,^[10] und durch Seitenkettenmodifikationen können viele korbatige Strukturen synthetisiert werden. Ausgehend von diesen Erkenntnissen immobilisierten wir die Cyclopeptide **1–3** (Abb. 1)

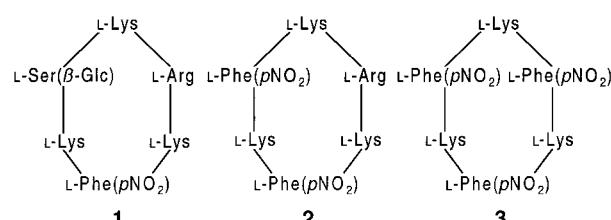


Abb. 1. Aminosäuresequenzen der als Chemorezeptoren eingesetzten Cyclohexapeptide **1–3**.

auf Glasoberflächen, die als Transducer fungieren. Die Wechselwirkung zwischen dem Cyclopeptid und dem Analyten wird mit der reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIFS) untersucht.^[11] Bei dieser optischen Detektionsmethode wird das Phänomen der Reflexion und Interferenz von Licht an Phasengrenzen genutzt, um aus dem resultierenden Interferenzmuster zeitaufgelöst Änderungen der optischen Schichtdicke (Produkt aus Brechungsindex *n* und physikalischer Schichtdicke *d*) dünner transparenter Filme zu bestimmen.^[12] Adsorptions- oder Bindungsvorgänge an dünnen Cyclopeptidschichten können so direkt registriert werden, und innerhalb kurzer Zeit kann eine Vielzahl von Analyten und Rezeptoren untersucht werden.

Zur Vorbereitung unserer Chemosensoren wurde eine Monoschicht der Cyclohexapeptide **1–3** über die Aminofunktionen dreier Lysin-Seitenketten kovalent an einen mit Epoxysilan vorbehandelten Glasträger gebunden (Abb. 2).

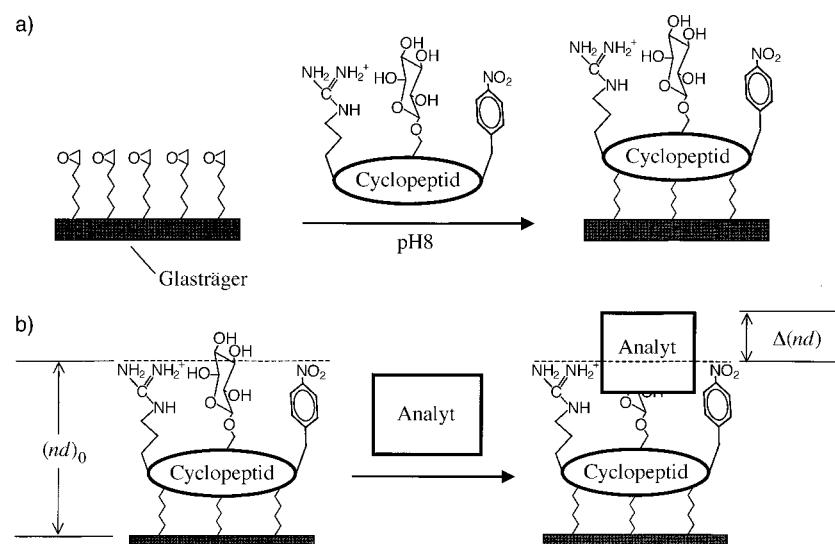


Abb. 2. a) Anbindung der Cyclohexapeptide an die Transduceroberfläche. b) Änderung der optischen Schichtdicke ($\Delta(nd)$) bei Wechselwirkung mit den Analyten.

[*] Prof. Dr. G. Jung, Dipl.-Chem. D. Leipert, Dipl.-Chem. M. Bauser
Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen
Fax: (+49) 7071-29-6925
E-mail: guenther.jung@uni-tuebingen.de

Dipl.-Chem. D. Nopper, Prof. Dr. G. Gauglitz
Institut für Physikalische Chemie der Universität Tübingen

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Projekt „Molekulare Mustererkennung mit supramolekularen Strukturen und Polymeren“) für die finanzielle Unterstützung (GO 301/23-3).

Dabei wurden die Sequenzpositionen 1, 3 und 5 als Ankerplätze ausgewählt. In den Sequenzpositionen 2, 4 und 6 wurden L-Arginin, 4-Nitro-L-phenylalanin und O-glykosidisch modifiziertes Serin verwendet. L-Arginin hat sich in den Cyclopeptid-Bibliotheken als eine wichtige Aminosäure erwiesen. Beim tricyclischen Peptidantibiotikum Vancomycin, das als chirales Trennphasenmaterial eingesetzt wird, spielen Zuckerbausteine und aromatische Reste eine wichtige Rol-

le.^[13] Die Eigenschaften der Cyclopeptide wurden durch Sequenzänderungen wie folgt modifiziert: Im Cyclopeptid **2** ist das O-glycosidisch modifizierte Serin von **1** durch 4-Nitro-L-phenylalanin ersetzt. Außerdem ist im Cyclopeptid **3** noch L-Arginin gegen 4-Nitro-L-phenylalanin ausgetauscht. Zur Untersuchung der Aminosäure/Cyclopeptid-Wechselwirkung wurden Lösungen verschiedener Aminosäuren in neutralem, pufferfreiem Wasser über die sensiven Schichten gepumpt und nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes die resultierende optische Schichtdicke bestimmt. Ein entsprechender, zeitlich aufgelöster Verlauf der Schichtdicke für verschiedene Aminosäuren ist in Abbildung 3 zu sehen; dabei ist die Peakhöhe das genutzte Signal.

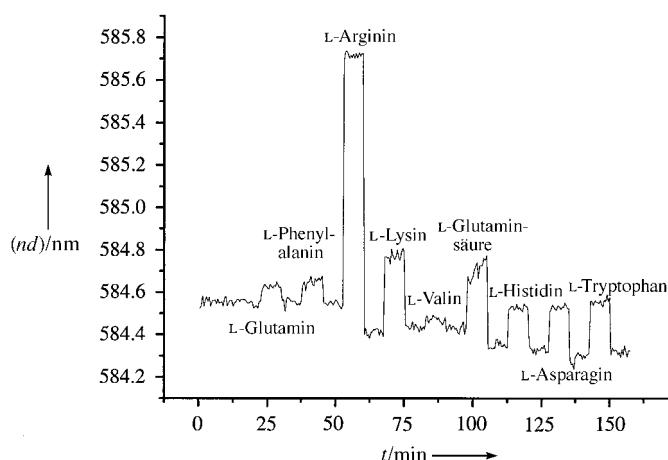


Abb. 3. Schichtdickenverlauf am optischen Transducer für die Wechselwirkung von **1** nach Einspritzen verschiedener L-Aminosäuren (jeweils 1000 ppm) in neutralem, pufferfreiem Wasser. Die Einheit ppm entspricht hier 1 mg Aminosäure pro Liter Wasser.

Weiterhin wurde ein Testsatz von zwölf L-Aminosäuren mit allen drei oberflächengebundenen Cyclopeptiden in neutralem, pufferfreiem Wasser untersucht. Die dabei erhaltenen Sensorsignale machen deutlich, daß alle drei Cyclopeptide L-Arginin stark bevorzugt binden, nicht aber das ebenfalls zwei Aminogruppen enthaltende Lysin (Abb. 4). Die RIfS-Signale sind für alle Aminosäuren bei der Cyclopeptid-1-Schicht viel intensiver als bei den Belegungen mit **2** oder **3**. Somit muß der Einfluß der Glucose-Gruppe erheblich sein. Das Sensorsignal

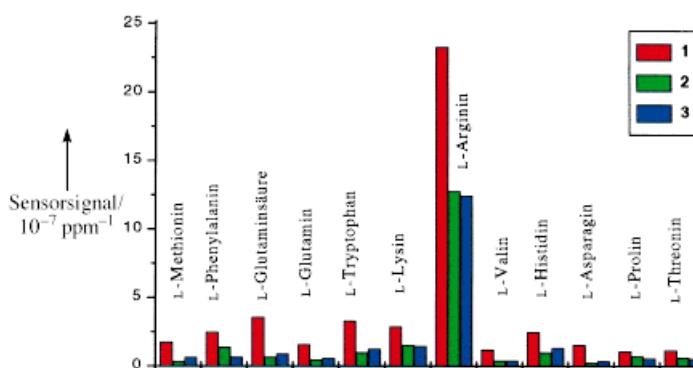


Abb. 4. Vergleich der Sensorsignale aller drei sensiven Schichten für verschiedene Aminosäuren in Wasser.

für L-Arginin ist beim Cyclopeptid **1** fast doppelt so groß wie bei den Cyclopeptiden **2** und **3**, ein Beweis für die selektive Wechselwirkung.

Um eine mögliche Enantiomerenerkennung durch die Cyclohexapeptidschichten zu untersuchen, wurden Kalibriermessungen mit L- und D-Arginin im Bereich von 0 bis 880 mg L⁻¹ durchgeführt (Abb. 5). Die beiden Kalibrierkur-

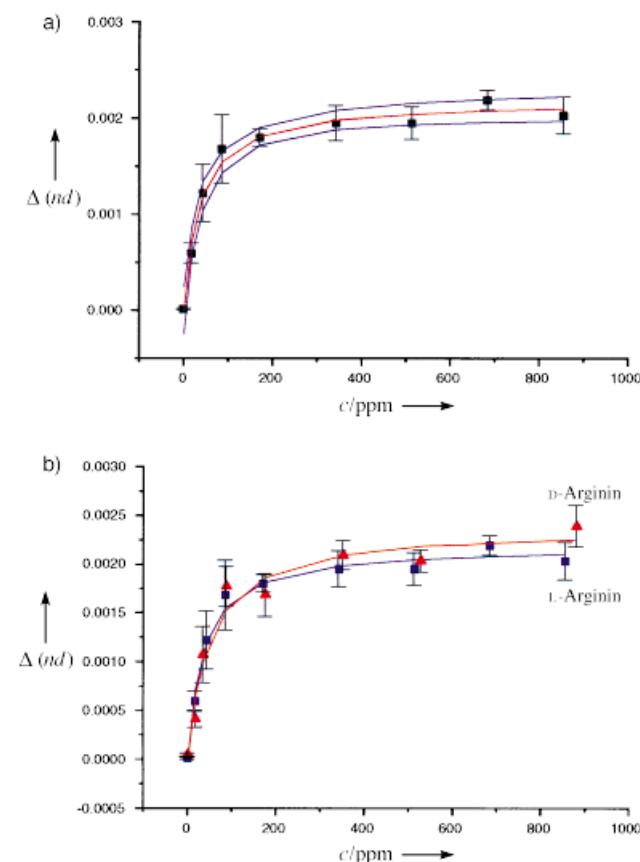


Abb. 5. Kalibrierkurven für beide Arginin-Enantiomere (▲: D-Arginin, ■: L-Arginin), ermittelt für immobilisiertes **1**. a) Verlauf der Kalibrierung mit L-Arginin (Schicht 1), Verlauf der Langmuir-Funktion und Vertrauensbereich der Kalibrierung. b) Vergleich der Kalibrierungen beider Isomere.

ven unterscheiden sich nicht signifikant; im höheren Konzentrationsbereich deutet sich eine Unterscheidungsmöglichkeit für die Enantiomere an. Zur Quantifizierung wurde aus den Meßwerten nach Gleichung (1) durch nichtlineare Regression eine Langmuir-Adsorptionskurve berechnet.^[14]

$$Y = A + \frac{b \cdot c \cdot x}{1 + b \cdot x} \quad (1)$$

Hierbei beschreibt Y das Meßsignal, x die Konzentration, A den Achsenabschnitt, b das Verhältnis der Konstanten für Adsorption und Desorption und c das Sättigungssignal. Mit dieser Funktion kann die Nachweisgrenze für Arginin ermittelt werden, wenn als Y -Wert das dreifache Schichtdickenrauschen der Basislinie eingesetzt wird. Die so erhaltenen Nachweisgrenzen (x -Werte) von L- und D-Arginin für alle drei Chemorezeptoren sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Mit dem Cyclopeptid **1** kann schon eine Konzentration von ca.

Tabelle 1. Nachweisgrenzen für L- und D-Arginin.^[a]

Cyclohexapeptid	L-Arginin [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	D-Arginin [$\mu\text{mol L}^{-1}$]
1	14.4	17.2
2	40.2	31.6
3	20.1	20.1

[a] 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Arginin entspricht 0.174 mg L^{-1} .

15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Arginin in neutralem, pufferfreiem Wasser nachgewiesen werden.

Ein anderes Ergebnis lieferte die Untersuchung der Einflüsse verschiedener Matrices auf die Wechselwirkungen zwischen Cyclopeptid und Aminosäure, wenn PBS-Puffer (phosphate buffered saline, pH 7.4) als Lösungsmittel verwendet wurde. In PBS-Puffer liegen die α -Aminosäuren hauptsächlich als Zwitterionen vor. Durch den Wechsel des Mediums ergibt sich eine völlig andere Selektivität (Abb. 6): Aus einem Testsatz von 14 Aminosäuren wird jetzt – und zwar

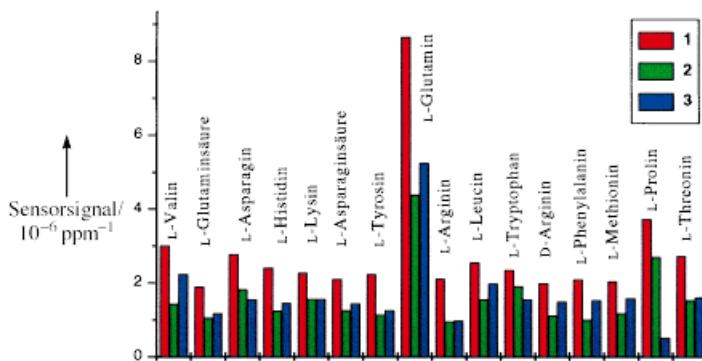


Abb. 6. Signale der drei Cyclopeptid-Sensoren für verschiedene Aminosäuren bei Messung in PBS-Puffer.

von allen drei Sensoren – L-Glutamin am besten erkannt und auch vom nahe verwandten L-Asparagin unterschieden. Der signalverstärkende Einfluß des Zuckerbausteins ist auch hier sichtbar. Obwohl sich die beiden Cyclopeptide **2** und **3** nur in einem Erkennungselement unterscheiden, wechselt die Signalhöhe bei verschiedenen Aminosäuren. Dies spricht dafür, daß durch Variation der Cyclopeptide und der Pufferzusammensetzung gezielt nach weiteren Selektivitäten für andere Aminosäuren geforscht werden kann.

Optische Transducer mit oberflächengebundenen Cyclohexapeptiden ermöglichen in Verbindung mit der reflektometrischen Interferenzspektroskopie, niedrigkonzentrierte Aminosäuren in wäßrigen Lösungen selektiv und schnell zu detektieren. Die Detektion kann ohne Derivatisierung erfolgen. Mit der kombinatorischen Festphasenchemie läßt sich eine Vielzahl neuer Rezeptoren synthetisieren. Es können nicht nur Einzelrezeptoren, sondern auch Rezeptorbibliotheken immobilisiert werden, die dekonvolutiv angepaßt werden können. Derzeit suchen wir mit Sensor-Arrays gezielt nach Rezeptoren für bestimmte Analyte. Durch den niedrigen Konzentrationsbereich und die erzielte Selektivität ist ein breites Anwendungsspektrum dieser Methode in der medizinischen Diagnostik und biotechnologischen Sensorik möglich.

Experimentelles

1–3: Multiple parallele Peptidsynthesen (je 15 μmol) werden an 2-Chlortriptylchlorid-Harz mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Aminosäuren und Diisopropylcarbodiimid-Aktivierung durchgeführt. Die seitenketten geschützten Hexapeptide werden mit Hexafluor-2-propanol (30% in Dichlormethan) abgespalten und in Lösung (1 mm in DMF) cyclisiert. Die Cyclisierungsreagentien werden extrahiert und die Seitenketten schutzgruppen mit Trifluoressigsäure/Wasser/Triisopropylsilan (95/2.5/2.5; 3 h) abgespalten. Danach werden die Peptide mit Diethylether gefällt, abzentrifugiert, in *tert*-Butylalkohol/Wasser (4/1) gelöst und lyophilisiert. Das Peptid **1** wird in wasserfreiem Methanol aufgenommen, und mit Natrium-methanolat (0.5 M in Methanol) wird pH 10–11 eingestellt. Nach 3 h wird mit Essigsäure neutralisiert, zur Trockene eingeengt, der Rückstand in *tert*-Butylalkohol/Wasser (4/1) gelöst und lyophilisiert. **1:** ESI-MS: $[M+H]^+$: 979.0. – **2:** ESI-MS: $[M+H]^+$: 925.5. – **3:** ESI-MS: $[M+H]^+$: 962.0; HPLC-Reinheit > 90% (RP-18, Acetonitril/H₂O, 214 nm).

Immobilisierung von **1–3** auf der Transducer-Oberfläche: Die Glasoberfläche wird mit einer frisch angesetzten Piranha-Lösung (H₂SO₄/H₂O 2/1) gereinigt (1 h), mit Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Die Silanisierung erfolgt mit einer Lösung von Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (20% in Toluol) (4 h bei 110 °C). Zur Anbindung der Cyclopeptide wird eine Lösung von **1** oder **3** (0.1 mg mL^{-1}) in Phosphatpuffer (50 mM, pH 8) zugegeben (24 h, RT). Anschließend wird mit Kochsalzlösung (1 M) und Wasser gewaschen. Zur Charakterisierung der Cyclopeptid-funktionalisierten Glasträger wurden statische Kontaktwinkelmessungen mit sechs verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt und der polare (σ^p) und disperse Anteil (σ^D) der Oberflächenenergie bestimmt. Immobilisiertes Cyclopeptid **1**: $\sigma^D = 23.51 \text{ mN m}^{-1}$, $\sigma^p = 21.37 \text{ mN m}^{-1}$. – Immobilisiertes Cyclopeptid **2**: $\sigma^D = 23.18 \text{ mN m}^{-1}$, $\sigma^p = 23.49 \text{ mN m}^{-1}$. – Immobilisiertes Cyclopeptid **3**: $\sigma^D = 23.27 \text{ mN m}^{-1}$, $\sigma^p = 25.63 \text{ mN m}^{-1}$.

Eingegangen am 24. Juni 1998 [Z12041]

Stichwörter: Chemosensoren • Cyclopeptide • Interferenzspektroskopie • Kombinatorische Chemie • Molekulare Erkennung

- [1] M. F. Cristofaro, A. R. Chamberlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5089–5098.
- [2] X. X. Zhang, J. S. Bradshaw, R. M. Izatt, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 3313–3361.
- [3] W. C. Still, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 155–163.
- [4] M. M. Conn, J. Rebek, Jr., *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1647–1668.
- [5] C. M. Deber, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 7566–7568.
- [6] a) H. Miyake, Y. Kojima, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *148*, 301–314; b) H. Kataoka, T. Hanawa, T. Katagi, *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 570–574.
- [7] F. Wudl, F. J. Gaeta, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1972**, 107.
- [8] G. Jung, H. Hofstetter, S. Feiertag, D. Stoll, O. Hofstetter, K.-H. Wiesmüller, V. Schurig, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2261–2262; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2148–2150.
- [9] *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries* (Hrsg.: G. Jung), VCH, Weinheim, **1996**.
- [10] H. Kessler, R. Gratias, G. Hessler, M. Gurrath, G. Müller, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1201–1205.
- [11] G. Gauglitz, A. Brecht, G. Kraus, W. Nahm, *Sens. Actuators B* **1993**, *11*, 21–27.
- [12] A. Brecht, J. Piehler, G. Lang, G. Gauglitz, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *311*, 289–300.
- [13] D. W. Armstrong, D. Rundlett, J.-R. Chen, *Chirality* **1994**, *6*, 496–509.
- [14] *Comprehensive Polymer Science, Polymer Properties*, Pergamon, Oxford, **1989**.