

Ionenkanalsteuerung in Transmembranrezeptorproteinen: funktionelle Aktivität in Träger-fixierten Lipidmembranen**

Thierry Stora, Jeremy H. Lakey und Horst Vogel*

In memoriam Fritz Jähnig

Das Öffnen und Schließen, also die Steuerung von Ionenkanälen über die Bindung eines Liganden oder durch Änderungen des elektrischen Transmembranpotentials, bildet die Grundlage vieler zellulärer Signaltransduktionsprozesse.^[1] Es ist außerdem von großer pharmazeutischer Bedeutung, daß die Aktivität von Membrankanälen durch die Bindung therapeutisch wirksamer Verbindungen moduliert werden kann; damit stellt das Verständnis dieser molekularen Wechselwirkungen einen bedeutenden Aspekt bei der Wirkstoff-Findung und beim rationalen Wirkstoffdesign dar. Von zahlreichen Membrankanälen ist bekannt, daß sie als Zielmoleküle für Arzneistoffe fungieren. Da die Zahl kombinatorischer Bibliotheken von Verbindungen mit potentiell therapeutischer Wirkung rasch wächst, werden schnelle und hochempfindliche Methoden für ein funktionelles Wirkstoff-Screening benötigt.^[2] Herkömmliche Methoden zur Untersuchung der Funktion von Kanalproteinen wie die Patch-clamp-Methode eignen sich kaum für das Hochdurchsatz-Screening. Alternativ dazu bieten in diesem Zusammenhang Träger-fixierte Lipidmembranen^[3-6] attraktive Möglichkeiten zur Detektion und Modulation der Kanalaktivität, wie am Beispiel des kleinen antibiotischen Peptids Gramicidin gezeigt wurde.^[7]

Wir überprüfen hier die Funktion eines gut charakterisierten, kanalbildenden Transmembranrezeptorproteins durch In-situ-Messungen der Ligandenbindung über Oberflächenplasmonenresonanz (surface plasmon resonance, SPR) sowie der darauf folgenden Änderungen der Kanalaktivität durch Impedanzspektroskopie (IS).^[8, 9]

Das Rezeptorprotein OmpF wurde in einer flüssig-kristallinen Lipiddoppelschicht rekonstituiert. Diese Doppelschicht war über die Sulfanylgruppen von Thiolipiden,^[4] die sich in der Lipidschicht in definiertem molaren Verhältnis befinden, mit einer Goldoberfläche verknüpft (Abbildung 1). OmpF gehört zur Familie der Porine der äußeren Membran von *Escherichia coli*. Dieses Transmembranprotein, das die Fal-

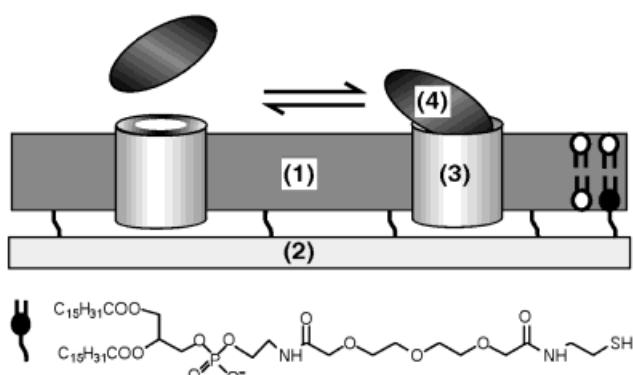


Abbildung 1. Schematische Darstellung einer OmpF-enthaltenden Lipiddoppelschicht, die über das synthetische Thiolipid *N*-[14'-Sulfanyl-1',11'-dioxa-3',6',9'-trioxa-12'-azatetradecyl]-1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (siehe unten) an einer Goldoberfläche fixiert wurde. Das Thiolipid wurde so entworfen, daß es eine geeignete Träger-fixierte Lipiddoppelschicht bildet und damit die korrekte Funktionsweise der rekonstituierten Transmembranproteine gewährleistet.^[4] Die erforderliche Fluidität und Zusammensetzung der Doppelschicht läßt sich einstellen, und auf beiden Seiten grenzt die Membran an eine wäßrige Umgebung, so daß sich die außerhalb der Membran befindlichen Teile des Proteins optimal ausrichten können; eine über einen Selbstorganisationsprozeß auf der Goldoberfläche gebildete Monoschicht aus Sulfanylpropionsäure (nicht gezeigt) verhindert schließlich alle ungünstigen Wechselwirkungen zwischen dem Goldträger und dem Protein. (1) = fixierte Lipiddoppelschicht, (2) = Goldträger, (3) = OmpF, (4) = R-Proteinfragment von Colicin N.

tung eines β-Barrel^[10] aufweist, bildet einzelne Ionenkanäle^[11] und ist in Form von Trimeren aktiv. Es fungiert außerdem als Rezeptor für das antibakterielle Toxin Colicin N.^[12] Colicine bilden eine Proteinfamilie, deren Mitglieder alle über die zentrale R-Domäne an ihren Rezeptor binden und so ihre Toxizität entfalten.^[13] Es wurde berichtet, daß das isolierte R-Domänen-Fragment mit einer Dissoziationskonstante K_d von $> 100 \mu\text{M}$ an OmpF bindet, das durch ein Detergens in Lösung gebracht wurde, während Colicin N einen K_d -Wert von $1 \mu\text{M}$ aufweist.^[14] Dieses Ergebnis korreliert jedoch nicht besonders gut mit der *in vivo* beobachteten Affinität. Außerdem zeigten Vorversuche an schwarzen Lipidmembranen (black lipid membranes, BLM), daß das lösliche R-Domänen-Fragment eine Schließung des Porinkanals in Lipiddoppelschichten auslösen kann. Um physiologisch aussagekräftige Daten zu erhalten, verwendeten wir eine Träger-fixierte Lipiddoppelschicht, die SPR- und IS-Messungen der Wechselwirkungen zwischen R-Fragment und OmpF ermöglichte.

Die Träger-fixierten Lipiddoppelschichten wurden in zwei Schritten hergestellt: Zunächst wurden durch Selbstorganisation von Thiolipiden und Sulfanylpropionsäure Carbonsäure beschichtete Goldoberflächen hergestellt, die eine definierte Zahl von Thiolipid-Ankern aufweisen. Die Oberflächenbeschichtung mit Sulfanylpropionsäure verhindert den direkten Kontakt des Rezeptorproteins mit reinem Gold und somit seine Denaturierung. Die so modifizierte Oberfläche wurde dann mit einer Doppelschicht bedeckt, die natürliche Phospholipide und Membranrezeptoren enthielt.^[15] Der gesamte Prozeß wurde fortlaufend *in situ* mit SPR verfolgt, wobei über die optische Schichtdicke die Menge der auf der Oberfläche immobilisierten Lipide und Proteine bestimmt wurde.^[16] Außerdem wurden die elektrischen Eigenschaften der Trä-

[*] Prof. H. Vogel, Dr. T. Stora

Laboratoire de Chimie Physique des Polymères et des Membranes
Département de Chimie
Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne
CH-1015 Lausanne (Schweiz)
Fax: (+41) 21-693-61-90
E-mail: horst.vogel@epfl.ch

Dr. J. H. Lakey
School of Biochemistry and Genetics
The Medical School, Newcastle upon Tyne, NE24HH (Großbritannien)

[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Prioritätsprogramm Biotechnologie, Projekt 5002-35180; H.V.), vom BBSRC und vom Wellcome Trust (J.H.L.) gefördert. Wir danken M. Liley und S. Terrettaz für die kritische Durchsicht des Manuskripts, Z. Dienes für die Synthese der Thiolipide und T. Keller, L. Evans und E. Raggett für ihre Hilfe bei der Expression und Reinigung der Proteine.

ger-fixierten Membran mit IS untersucht.^[17, 18] Die berechnete elektrische Kapazität und der Widerstand der Membran stimmen mit Literaturdaten überein.^[4-7] Diese Ergebnisse bestätigen, daß der Komplex aus Proteinen und Lipiden auf der Goldoberfläche die Doppelschichtstruktur einer Membran bildet. Die Leitfähigkeit der Membran $1/R_{\text{lay}}$ konnte auch direkt durch Messung des Stromes bei einer bestimmten Frequenz ν_0 bestimmt werden (Abbildung 2), was für die Entwicklung des unten beschriebenen Testsystems (on-line bioassay) wichtig ist.

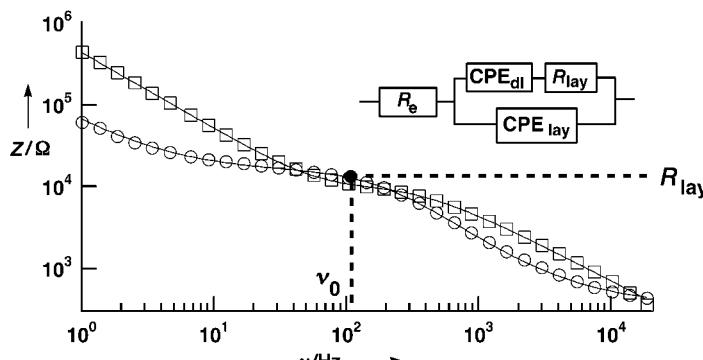


Abbildung 2. Realteil (○) und Imaginärteil (□) des elektrischen Impedanzspektrums einer Goldplattenelektrode (3.14 mm^2), die mit einer Lipiddoppelschicht überzogen wurde: 166 auf der logarithmischen Skala gleich weit voneinander entfernte Datenpunkte wurden im Bereich zwischen 1 Hz und 20 kHz aufgenommen, nur jeder fünfte Punkt ist gezeigt. Durchgezogene Linien zeigen die Anpassung des rechts oben gezeigten Ersatzschaltkreises an die experimentellen Werte: R_e steht für den Ohmschen Beitrag des Puffers und der Gegenelektrode; die Trägerfixierte Membran wird durch das konstante Phasenelement CPE_{lay} (hier als verallgemeinerte Kapazität) beschrieben, parallel dazu hat man einen Widerstand R_{lay} , zu dem man in Reihe geschaltet die verallgemeinerte Kapazität CPE_{dl} findet.^[9, 18] Die letzten beiden Bestandteile beschreiben den Gesamtbeitrag in die Membran eingebauten Porine und der Membrandefekte. Ein konstantes Phasenelement ist definiert als $1/(j\omega)^n S$, $j^2 = -1$, wobei ω die Kreisfrequenz ist, S die Amplitude und n die Phase; $0 \leq n \leq 1$, $n = 0$ entspricht einem idealen Ohmschen Widerstand, während $n = 1$ einem idealen Kondensator entspricht. CPE_{lay} und CPE_{dl} verhalten sich annähernd wie ein Kondensator, wie man an den angepaßten Werten von n_{lay} und n_{dl} erkennen kann. Der kapazitive Beitrag der Trägerfixierten Membran kann aus dem kapazitiven, um 90° phasenverschobenen Strom berechnet werden, der durch CPE_{lay} entsteht; bei der Frequenz, bei der die Phasenverschiebung der gesamten elektrochemischen Zelle ihr Maximum hat, erhält man Werte von $0.9 \pm 0.1 \mu\text{F cm}^{-2}$. Hieraus kann direkt, ohne Anpassung, ein spezifischer Membranwiderstand (●) von $0.5 - 5 \text{ k}\Omega \text{ cm}^{-2}$ abgeleitet werden, indem der Realteil der Impedanz Z bei einer Frequenz ν_0 gemessen wurde, bei der sich die Impedanz am empfindlichsten gegenüber Ohmschen Beiträgen (Minimum der Phasenverschiebung) verhält; der relative Unterschied zwischen dem Wert, den wir mit diesem Verfahren erhielten, und dem Wert, der aus der Anpassung an die experimentellen Daten über den gesamten Frequenzbereich resultierte, betrug weniger als 2 %. Typische Werte für die bei der Anpassung verwendeten Parameter sind: $R_e = 300 - 500 \Omega$; $S_{\text{lay}} = 1.0 \times 10^{-7} \Omega^{-1} \text{ s}^{n_{\text{lay}}}$; $n_{\text{lay}} = 0.90 \pm 0.05$; $S_{\text{dl}} = 3.0 \times 10^{-7} \Omega^{-1} \text{ s}^{n_{\text{dl}}}$; $n_{\text{dl}} = 0.95 \pm 0.05$; $R_{\text{lay}} = 16 - 160 \text{ k}\Omega$.

Die Funktion von OmpF, a) ColicinN zu binden und b) Kanäle zu bilden, die durch Ligandenbindung moduliert werden können, wurde durch unabhängige Messungen bestimmt. Die spezifische Bindung des TR-Fragments^[19] von ColicinN an den OmpF-Rezeptor wurde mit SPR gemessen (Abbildung 3). Aus einer Anpassung an die experimentellen

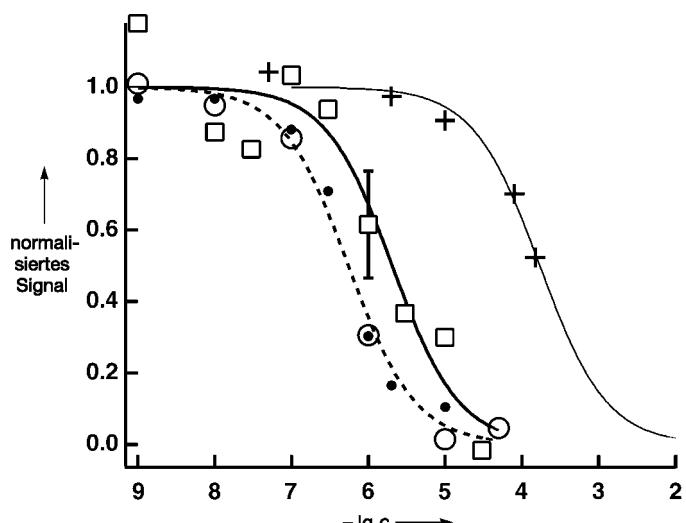


Abbildung 3. Wechselwirkung zwischen Colicin N und OmpF. ○: SPR-Messung der Bindung des Colicin-TR-Fragments an seinen Rezeptor OmpF, der sich in einer Trägerfixierten Doppelschicht befindet. Aufgetragen ist $(\Gamma_{\max} - \Gamma)/\Gamma_{\max}$; Γ und Γ_{\max} bezeichnen die Masse des gebundenen TR-Fragments bei der entsprechenden bzw. bei der höchsten Konzentration (d.h. unter Sättigungsbedingungen) in Lösung; $\Gamma_{\max} = 274 \text{ ng cm}^{-2}$. □: Steuerung der OmpF-Kanalaktivität in der Trägerfixierten Lipiddoppelschicht durch Bindung der R-Domäne, gemessen durch IS. Anfangswert: 1.54 mS cm^{-2} ; Endwert: 1.35 mS cm^{-2} . Ein repräsentativer Fehlerbereich ist eingezeichnet. ●: Steuerung der OmpF-Kanalaktivität in einer freistehenden Doppelschicht (BLM) durch Inkubation mit dem Colicin-R-Fragment. Anfängliche BLM-Leitfähigkeit: 538 nS ; nach Titration: 0.1 nS . +: Bindung von Detergens-solubilisiertem OmpF an auf Oberflächen immobilisierte Colicin-N-Fragmente, gemessen mit SPR.^[9, 18] Aufgetragen ist $(\Gamma_{\max} - \Gamma)/\Gamma_{\max}$; Γ und Γ_{\max} geben die Masse an gebundenem OmpF bei der entsprechenden Konzentration bzw. bei Sättigung wider, die durch Anpassung der Kurve an die experimentellen Werte gegeben ist. Eine Sättigung kann aufgrund der erforderlichen hohen Porinkonzentrationen experimentell nicht erreicht werden. Der durch Extrapolation erhaltene Wert für Γ_{\max} , 808 ng cm^{-2} , entspricht einem OmpF-Trimer pro zugänglicher R-Domäne. Die Daten wurden mit einer Langmuir-Adsorptionsisotherme angepaßt. Aus SPR- (○) und IS-Messungen (□) erhält man K_d -Werte von 0.6 bzw. $2 \mu\text{M}$ für Trägerfixierte Doppelschichten und $0.5 \mu\text{M}$ für freistehende Doppelschichten (●). Die gestrichelte Linie gilt sowohl für die SPR- als auch für die BLM-Messungen, die dicke durchgezogene Linie für die IS-Messungen. Man erhält einen K_d -Wert von $170 \mu\text{M}$ für das Detergens-solubilisierte OmpF. Alle gezeigten Datensätze sind normalisiert, so daß die angepaßten Anfangswerte 1 und die Endwerte 0 betragen; die Werte für die molare Konzentration c des Liganden in der umgebenden Lösung sind als negativer dekadischer Logarithmus angegeben.

Werte erhielt man eine Dissoziationskonstante K_d von $0.6 \mu\text{M}$. Die Kanalaktivität von OmpF wurde aus der Membranleitfähigkeit abgeleitet, die durch IS verfolgt wurde. Da Ströme ($10^8 \text{ Ionen s}^{-1}$) bei Liganden-induzierten Ionenkanälen eine beträchtliche intrinsische Verstärkung der Ligandenbindung verursachen,^[20] konnten Impedanzmessungen bei einer im Vergleich zu SPR-Messungen viel geringeren Konzentration von Rezeptoren in den Membranen durchgeführt werden. Die in Abbildung 3 wiedergegebenen Werte verdeutlichen, daß ein Konzentrationsanstieg der R-Fragmente in der Lösung die Leitfähigkeit der OmpF-Kanäle in der Membran verändert; das entspricht den funktionellen Änderungen des Rezeptors während der Ligandenbindung.^[21] Aus diesen Messungen wurde ein K_d -Wert von $2 \mu\text{M}$ errechnet. Die relative Leitfähigkeit ändert sich um 15 %, was ungefähr 10^6

funktionellen Porinen in der Schicht entspricht; dieser Wert ergibt sich aus dem Vergleich mit bekannten Leitfähigkeitswerten eines einzelnen OmpF-Porinkanals.^[11] Die Ergebnisse der IS zeigen zum ersten Mal, daß OmpF als Liganden-gesteuerter Ionenkanal fungiert: Die Bindung der isolierten R-Domäne des Toxins an seinen OmpF-Rezeptor schließt den Ionenkanal vollständig.

Diese neue, mit einer neuartigen Meßtechnik gefundene Kanalfunktion des Porins wurde außerdem mit der etablierten BLM-Technik bestätigt. OmpF wurde unter Verwendung von Standardvorschriften in freistehenden Lipiddoppelschichten rekonstituiert.^[22] Die elektrische Leitfähigkeit über die BLM verringerte sich mit steigender Konzentration der R-Domäne in der umgebenden Pufferlösung (Abbildung 3): Bei Ligandenkonzentrationen von $>10\text{ }\mu\text{M}$ wurden die OmpF-Kanäle vollständig blockiert. Aus diesem Titrationsexperiment ergibt sich ein K_d -Wert von $0.5\text{ }\mu\text{M}$. Dieser Wert bestätigt die Daten aus IS- und SPR-Messungen an Trägerfixierten Doppelschichten. Schließlich haben wir mit SPR bestimmt, daß die Bindungsaffinität von durch Detergens solubilisiertem OmpF zu Colicin-TR-Fragmenten, die an Oberflächen immobilisiert sind, um zwei Zehnerpotenzen niedriger ist als die von OmpF, das in Lipiddoppelschichten rekonstituiert wurde (Abbildung 3).^[23] Wiederum stimmt dieses Ergebnis völlig mit Literaturdaten^[14] überein und unterstreicht im Zusammenhang mit unseren BLM- und kombinierten SPR/IS-Messungen die Bedeutung einer Lipiddoppelschicht für die vollständige Rekonstitution der nativen Bindungsaktivität des Rezeptors.

Im Hinblick auf das Screening therapeutisch wirksamer Verbindungen liefern klassische Bindungsexperimente nur begrenzt Informationen, während wir mit der Kombination aus SPR und IS eine schnelle Testmöglichkeit vorgestellt haben, die sowohl die Ligandenbindung als auch deren funktionelle Konsequenzen unabhängig voneinander meßtechnisch zugänglich macht. Mit nanotechnologischen Fabrikationsmethoden und mikrofluiden Funktionseinheiten^[24] eröffnet die Miniaturisierung und Vollautomatisierung dieser Technik breitgefächerte Anwendungsmöglichkeiten für funktionelles Hochdurchsatz-Screening von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen.

Eingegangen am 21. Juli 1998 [Z12190]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 389–392

Stichwörter: Analytische Methoden • Dünne Filme • Ionenkanäle • Membranen • Proteine

- [1] B. Hille, *Ionic channels of excitable membranes*, Sinauer, Sunderland, MA, **1992**.
- [2] J. Knowles, *Odyssey* **1997**, *3*(1), 18–24.
- [3] Übersichtsartikel: E. Sackmann, *Science* **1996**, *271*, 43–48.
- [4] a) H. Lang, C. Duschl, H. Vogel, *Langmuir* **1994**, *10*, 197–210; b) S. Heyse, O. P. Ernst, Z. Dienes, K. P. Hofmann, H. Vogel, *Biochemistry* **1998**, *37*, 507–522.
- [5] a) M. Stelzle, G. Weismüller, E. Sackmann, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 2974–2981; b) E.-L. Florin, H. E. Gaub, *Biophys. J.* **1993**, *64*, 375–383; c) A. L. Plant, M. Gueguetchkeri, W. Yap, *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1126–1133; d) C. Steinem, A. Janshoff, W. P. Ulrich, M. Sieber, H. J. Galla, *Biophys. Acta* **1996**, *1279*, 169–180.
- [6] a) Z. Salamon, J. T. Hazzard, G. Tollin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6420–6423; b) R. Naumann, A. Jonczyk, R. Kopp, J.

- van Esch, H. Ringsdorf, W. Knoll, P. Graeber, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2168–2171; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2056–2058.
- [7] B. A. Cornell, V. L. B. Braach-Maksvytis, L. G. King, P. D. J. Osman, B. Raguse, L. Wiczorek, R. J. Pace, *Nature* **1997**, *387*, 580–583.
- [8] W. Knoll, *MRS Bull.* **1991**, *16*, 29–39.
- [9] S. Terrettaz, T. Stora, C. Duschl, H. Vogel, *Langmuir* **1993**, *9*, 1361–1369.
- [10] a) M. S. Weiss, U. Abele, J. Weckesser, W. Welte, E. Schiltz, G. E. Schulz, *Science* **1991**, *254*, 1627–1630; b) S. W. Cowan, T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R. A. Paupitz, J. N. Jansonius, J. P. Rosenbusch, *Nature* **1992**, *358*, 727–733.
- [11] a) H. Schindler, J. P. Rosenbusch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 3751–3755; b) R. Benz, K. Janko, W. Boos, P. Läuger, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *511*, 305–319.
- [12] I. R. Vetter, M. W. Parker, A. D. Tucker, J. H. Lakey, F. Pattus, D. Tsernoglou, *Structure* **1998**, *6*, 863–874.
- [13] H. Nikaido, M. Vaara, *Microbiol. Rev.* **1985**, *49*, 1–32.
- [14] a) L. J. A. Evans, A. Cooper, J. H. Lakey, *J. Mol. Biol.* **1996**, *255*, 559–563; b) L. J. A. Evans, S. Labeit, A. Cooper, L. H. Bond, J. H. Lakey, *Biochemistry* **1996**, *35*, 15143–15148.
- [15] Der frisch präparierte Goldträger wurde in einer Vakuumkammer mit Entladungs-Argonplasma gereinigt und sofort 15 h mit einer Lösung der Thiolipide und Sulfanylpropionsäure (Gesamtkonzentration 0.5 mg mL^{-1} in 48 mM Octylglucosid) in einem Molverhältnis von 1:4 für SPR- und 2:1 für IS-Messungen inkubiert. Die durch Selbstorganisation gebildete Monoschicht wurde dann gründlich mit einer 1proz. Octylglucosid-Lösung gewaschen. Durch schrittweise Verdünnung einer Lösung aus 48 mM Octylglucosid, 0.5 mg mL^{-1} Dioleyoleithin und OmpF ($230\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ für SPR- und $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ für IS-Messungen) wurde die Bildung der Doppelschicht durch Selbstdorganisation vervollständigt. Bei den SPR-Experimenten war die Goldoberfläche in der Regel zu 10–25 % mit Thiolipiden bedeckt.
- [16] Bei den SPR-Messungen wurde ein He-Ne-Laserstrahl durch ein Prisma auf eine 40 nm dicke Goldoberfläche gerichtet und die Intensität des reflektierten Lichts als Funktion des Einfallswinkels detektiert (siehe Lit. [9]). Die Proteinoberflächenbeladung Γ erhält man aus der Änderung des SPR-Resonanzwinkels $\Delta\theta$ über die Beziehung $\Delta\theta = \alpha dn/dc \Gamma$ [Gl. (1)], mit $\alpha = 1.3 \times 10^7\text{ cm}^{-1}$ und einem Brechungsindex-Inkrement $dn/dc = 0.18\text{ g}^{-1}\text{ cm}^3$ (*Handbook of Biochemistry*, CRC Press, Boca Raton, **1973**). Aus der Kristallstruktur von OmpF^[10b] und Gleichung (1) ermittelten wir für eine vollständige OmpF-Monoschicht eine Oberflächenbeladung von 714 ng cm^{-2} ($\Delta\theta_{\text{OmpF}} = 1.7^\circ$). Dieser Wert liegt deutlich über dem für eine aus reinen Phosphatidylcholinen zusammengesetzte Lipiddoppelschicht ($\Delta\theta_{\text{Lipid}} = 0.6^\circ$). Deshalb kann die eingegebene Menge an OmpF direkt aus der Resonanzwinkeländerung der Schicht $\Delta\theta_{\text{Schicht}}$ abgeleitet werden, so daß gilt: $\Gamma_{\text{OmpF}} = (\Delta\theta_{\text{Schicht}} - \Delta\theta_{\text{Lipid}})/(\Delta\theta_{\text{OmpF}} - \Delta\theta_{\text{Lipid}})$; dabei wird die geringe Oberflächenbeladung durch die Thiolipide vernachlässigt. Typische Werte für $\Delta\theta_{\text{Schicht}}$ liegen bei 0.9° , was einer Oberflächenbeladung durch eingebautes OmpF von ca. 30 % entspricht.
- [17] IS-Messungen wurden mit einer Membran-überzogenen Goldelektrode als Arbeitselektrode und einer Ag/AgCl-Elektrode als Gegen- und Bezugselektrode in 0.3 M NaCl/ 20 mM Natriumphosphat (pH 7.4) durchgeführt. Wechselspannung (10 mV Amplitude) wurde angelegt und dann mit einem phasensensitiven Lock-in-Verstärker der Strom gemessen, um die komplexe Impedanz Z wie in Lit. [9, 18] beschrieben zu bestimmen.
- [18] T. Stora, R. Hovius, Z. Dienes, M. Pachoud, H. Vogel, *Langmuir* **1997**, *13*, 5211–5214.
- [19] Die T-Domäne besteht aus dem N-Terminus von Colicin N (Aminosäuren 1–67) und bildet zusammen mit der R-Domäne (68–190) die Hälfte des gesamten Colicin-N-Moleküls (1–387), die als TR-Fragment bezeichnet wird. Sie dient als natürlicher Massenindikator zur Verstärkung des SPR-Signals, ohne die Bindungsaffinität der isolierten R-Domäne an die OmpF-Rezeptoren in den Träger-fixierten Membranen zu beeinträchtigen. Die Menge an gebundenem TR im Sättigungszustand war höher als die Menge, die anhand von Schätzungen des eingebauten OmpF zu erwarten war.^[11, 18] Dies könnte entweder auf eine günstige Anordnung der Membranrezeptoren zurückgeführt werden, die aus deren asymmetrischer Struktur resultiert, oder auf eine Unterbestimmung des Rezeptorgehalts in der

- Schicht aufgrund der Verwendung von Näherungswerten für den Brechungsindex der Proteine. An eine Träger-fixierte reine Lipidmembran adsorbiert nur sehr wenig TR, wie sich aus der gemessenen Proteinoberflächenbeladung von weniger als 12 ng cm^{-2} ergibt.
- [20] Da die Einzelkanalbeitfähigkeit von OmpF ca. 0.8 nS beträgt,^[11] fließen bei einem Transmembranpotential von 10 mV durch ein Porin Ströme von 8 pA , entsprechend $10^8 \text{ Ionen s}^{-1}$.
- [21] Der berechnete kapazitive Widerstand der Schicht bleibt innerhalb der experimentellen Fehlergrenze konstant. Es wurden keine Leitfähigkeitsänderungen beobachtet, wenn man eine Träger-fixierte reine Lipidmembran mit dem R-Fragment inkubierte.
- [22] Der Einbau von OmpF in BLMs wurde nach einer Literaturmethode durchgeführt: R. Benz, *Crit. Rev. Biochem.* **1985**, *19*, 145–190. Schwarze Lipidmembranen wurden über ein Loch von 0.6 mm Durchmesser in einer Teflonfolie aus einer Lösung von 10 mg mL^{-1} Sojabohnen-Lecithin in Decan gespreitet. OmpF wurde anschließend eingebaut, indem $1 \mu\text{L}$ einer Lösung aus OmpF (0.125 mg mL^{-1}) in 1proz. Octylglucosid in der Meßzelle verdünnt und eine konstante Spannung von 250 mV angelegt wurde. Die Messungen der Stromstärke erfolgten bei einem Transmembranpotential von 50 mV (Gleichstrom). Die Titration wurde in $0.3 \text{ M NaCl}/20 \text{ mM Natriumphosphat}$ (pH 7.4) durchgeführt.
- [23] R- und TR-Proteinfragmente wurden auf mit Nitritotriessigsäure funktionalisierten Goldoberflächen über Hexahistidin-Spacer an ihren N-Termini immobilisiert: T. A. Keller, C. Duschl, D. Kröger, A.-F. Sévin-Landais, H. Vogel, S. E. Cervigni, P. Dumy, *Supramol. Sci.* **1995**, *2*, 155–160. Man erhielt SPR-Resonanzwinkeländerungen von 0.72° bzw. 1.00° ($308 \text{ bzw. } 427 \text{ ng cm}^{-2}$). Nach Zugabe von durch Detergens solubilisiertem OmpF (das auch an anderer Stelle schon verwendet wurde)^[14] wurde bei Konzentrationen von bis zu $100 \mu\text{M}$ nur eine geringe Bindung des Proteins gemessen. Um die Packungsdichte des R-Fragments an der Phasengrenze zu verringern, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem 15 % der Proteine auf der Oberfläche aus TR-Fragmenten bestanden; sie waren über Histidin-Spacer in der ungeordneten T-Domäne immobilisiert.^[14] Als Folge dessen ragen die R-Segmente der TR-Fragmente aus der dichtgepackten Schicht von T-Segmenten heraus. Auf diese Weise konnten wir eine Wechselwirkung zwischen OmpF und der R-Domäne in Detergenslösung messen.
- [24] *Proceedings of the 2nd International Symposium on Miniaturized Total Analysis Systems* (Hrsg.: H. M. Widmer, E. Verpoorte, S. Barnard), AMI, Basel, **1996**.

Enantioselektive Einschlußkomplexierung von N-Nitrosopiperidinen durch Gallensäuren**

Maria Gdaniec,* Maria J. Milewska und
Tadeusz Połoński*

Gegenwärtig herrscht ein großes Interesse an kristallinen Einschlußverbindungen chiraler Wirtmoleküle zur chiralen Erkennung und Enantiomerentrennung von Racematen.^[1] Aufgrund ihrer Fähigkeit, verschiedene Arten von organi-

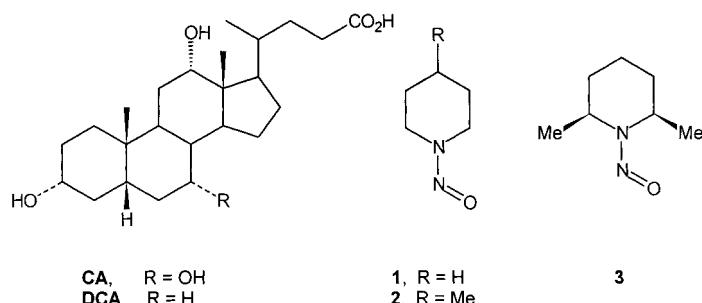
[*] Prof. Dr. M. Gdaniec
Faculty of Chemistry, A. Mickiewicz University
PL-60-780 Poznań (Polen)
Fax: (+48) 61-8658-008
E-mail: mg31@krystal.amu.edu.pl

Prof. Dr. T. Połoński, Dr. M. J. Milewska
Faculty of Chemistry, Technical University Gdańsk
PL-80-952 Gdańsk (Polen)
Fax: (+48) 58-3472-694
E-mail: tadpol@chem.pg.gda.pl

[**] Diese Arbeit wurde vom polnischen Ausschuß für wissenschaftliche Forschung unterstützt (Förder-Nr. 3T09A 09014).

schen Gastmolekülen in ihrem Kristallgitter aufnehmen zu können,^[2] scheinen die natürlich vorkommende Cholsäure (**CA**) und Desoxycholsäure (**DCA**) hierfür sehr vielversprechende Wirtmoleküle zu sein. Jedoch wurde nur von sehr wenigen erfolgreichen chiralen Trennungen durch Clathratbildung mit **CA** berichtet,^[3] und mehrere Versuche mit **DCA** als Reagens zur Racematspaltung sind fehlgeschlagen.^[3,4] Hingegen haben wir kürzlich anhand von Circular dichroismus(CD)-Messungen festgestellt, daß die **CA**- und **DCA**-Gitter konformativ flexible Moleküle, die in dem Kristall eingeschlossen sind, dazu zwingen, chirale Konformationen anzunehmen.^[5]

Im folgenden beschreiben wir die Effizienz von Gallensäuren als Reagentien zur Racematspaltung von niedermolekularen *N*-Nitrosaminen. Die Chiralität der *N*-Nitrosopiperidine **1–3** ist einzig und allein durch die gehinderte Rotation der Nitrosogruppe bedingt.^[6] Aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der Bindung zwischen den beiden Stickstoffatomen der NNO-Gruppe ist die Barriere der Rotation um die N-N-Bindung recht hoch (23–25 kcal mol⁻¹).^[7] Deshalb ist davon auszugehen, daß die beiden Enantiomere **2** und **3** bei Raumtemperatur für eine kurze Zeit stabil sind, sogar nach ihrer Freisetzung aus dem Wirtkristallgitter. Die Verbindungen **1–3** in optisch aktiver



Form erhalten zu können ist vom experimentellen Gesichtspunkt aus eine Herausforderung und würde sehr einfache Modelle für die Untersuchung der chiroptischen Eigenschaften von *N*-Nitrosamin-Chromophoren liefern.^[8]

Die farblosen Kristalle des 1:1-Komplexes der Verbindungen **1–3** mit **CA** wurden durch Kristallisation von **CA** mit dem entsprechenden Nitrosamin erhalten. Die 2:1-**DCA**-Einschlußverbindungen wurden durch langsames Verdampfen einer Lösung von **DCA** und dem entsprechenden *N*-Nitrosopiperidin in Methanol hergestellt. Die Röntgenstrukturanalyse der **CA**-Komplexe^[9a–c,f] ergab, daß die Wirtmoleküle durch Wasserstoffbrückenbindungen zu typisch gewellten Doppelschichten angeordnet sind. Im Falle von **1-CA** befinden sich die Gastmoleküle in Kanälen vom α -Typ, wohingegen die Kanäle bei **2-CA** und **3-CA** vom β -Typ sind (Abbildung 1). Die Gastmoleküle sind in schraubenförmigen Säulen angeordnet, die sich durch den gesamten Kristall ziehen (Abbildung 2). Die Untersuchung der Daten ergab, daß entweder nur ein Enantiomer selektiv in den Wirt/Gast-Kristall eingebaut wird (**1-CA** und **2-CA**) oder ein Enantiomer bevorzugt komplexiert wird (**3-CA**) (Abbildung 3). Die absolute Konfiguration der Nitrosamin-Gastmoleküle kann aus den Kristallstrukturen der Komplexe abgeleitet werden.