

# Ein selbstorganisierter supramolekularer ternärer Komplex zur magnetischen Trennung von Proteinen\*\*

Avik Samanta und Bart Jan Ravoo\*

**Abstract:** Für die Proteomik ist die einfache und effiziente Isolierung von Proteinen aus einer Mischung essenziell. Wir beschreiben hier einen supramolekularen Ansatz, um selektiv Proteine aus einer Proteinmischung einzufangen und mithilfe eines Magnetfeldes auszufällen. Dies geschieht durch die Bildung eines multivalenten selbstorganisierten Komplexes aus einer verdünnten Lösung der folgenden drei Komponenten: Cyclodextrin-beschichtete magnetische Nanopartikel, Adamantan- und Kohlenhydrat-funktionalisierte nichtkovalente Vernetzer und Lectine. Der selbstorganisierte ternäre Komplex wird im Magnetfeld ausgefällt und kann durch die Zugabe eines konkurrierenden Bindungspartners leicht wieder in Lösung gebracht werden. Wir zeigen, dass dieser supramolekulare Ansatz zur Aufreinigung von Proteinen mithilfe magnetischer Extraktion hoch selektiv und effizient erfolgt.

Magnetische Nanopartikel (MNPs) aus Eisenoxid ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) erhalten aufgrund ihrer Anwendungsmöglichkeiten in der Biomedizin und im therapeutischen Bereich große Aufmerksamkeit.<sup>[1]</sup> Besonders ihr Superparamagnetismus, ihre chemische Stabilität und ihre Biokompatibilität machen MNPs einzigartig für den Einsatz in dem ausgesprochen vielfältigen Gebiet der Biomedizin. Sie finden bereits Anwendung als Kontrastmittel für magnetische Kernspinresonanztomographie,<sup>[2]</sup> zum Trennen von Bakterien,<sup>[3]</sup> beim Wirkstofftransport,<sup>[4]</sup> für die biofunktionale molekulare Bildgebung<sup>[5]</sup> und zum Auftrennen von Zellen.<sup>[6]</sup> Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Trennung und Aufreinigung von Zellen und Biomolekülen in Bioprozessen.<sup>[7]</sup> Verglichen mit konventionellen Partikeln oder Harzen im Mikrometerbereich zeigen MNPs wegen ihres kleinen Durchmessers und ihrer großen Oberfläche herausragende Eigenschaften, wie schnelle und effektive Bindung von Biomolekülen, gute Löslichkeit sowie rasche und reversible Ausfällung, die sie für die Anwendung in biotechnologischen Trennprozessen be-

sonders geeignet machen. In den letzten Jahrzehnten konnten verschiedene Studien die Eignung von magnetischen Nanopartikeln zur Aufreinigung von Proteinen demonstrieren. Vor kurzem zeigten Xu und Mitarbeiter, dass mit einem Ni-Nitritotriessigsäure(Ni-NTA)-Komplex modifizierte MNPs ausgezeichnete Materialien zur Abtrennung von Histidin(His)-markierten Proteinen sind.<sup>[8]</sup> Mirkin et al. entwickelten eine effiziente und selektive Methode zur Extraktion von His-markierten Proteinen durch die Verwendung von Ni-haltigen Nanostäbchen mit einem Durchmesser von 300 nm.<sup>[9]</sup> Des Weiteren nutzt das Philips Magnotech System die dynamischen Eigenschaften von MNPs in einem magnetischen Feld für Immuntests in Blut, Serum und Speichel.<sup>[10]</sup>

Supramolekulare Ansätze zur Immobilisierung von Proteinen auf Oberflächen und Nanopartikeln mithilfe der Wirt-Gast-Wechselwirkung von  $\beta$ -Cyclodextrin( $\beta$ -CD)- und Adamantanderivaten wurden bereits von mehreren Gruppen beschrieben.<sup>[11]</sup> 2012 gelang uns die Entwicklung eines lichtschaltbaren supramolekularen Systems zur Bindung von Lectinen unter Zuhilfenahme von Cyclodextrinvesikeln und Azobenzolgästen.<sup>[12]</sup> Entscheidende Vorteile der Verwendung eines supramolekularen Ansatzes zur Abtrennung von Proteinen sind:

- 1) die einfache Modifizierung des gleichen CD-Grundgerüsts mithilfe orthogonaler nichtkovaler Wechselwirkungen, die den Einsatz in einer Vielzahl biologischer Prozesse ermöglicht;
- 2) die Vermeidung von denaturierenden Wechselwirkungen zwischen Protein und Trägermaterial durch Bildung einer abschirmenden hydrophilen Mikroumgebung um das Protein durch die CD-Einheiten;
- 3) multivalente Anbindung der Proteine durch nichtkovalente supramolekulare Wechselwirkungen.

Hier wird ein simples und dynamisches supramolekulares System zur selektiven Bindung und Abtrennung eines gewünschten Proteins aus einer Proteinmischung in einem Magnetfeld beschrieben. In diesem System finden gleichzeitig zwei orthogonale nichtkovalente Bindungsmotive Anwendung:  $\beta$ -CD-Adamantan-Wirt-Gast-Einschluss und Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Da diese nichtkovalenten Wechselwirkungen von Natur aus schwach sind (Bindungskonstanten einer einzelnen Wechselwirkung  $K_a \approx 10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1}$ ), sind für einen stabilen Komplex in wässrigem Medium multivalente Bindungen notwendig ( $K_a \approx 10^6 \text{ M}^{-1}$  für eine divalente,  $K_a \approx 10^9 \text{ M}^{-1}$  für eine trivale,  $K_a \approx 10^{12} \text{ M}^{-1}$  für eine tetravale Wechselwirkung usw.).<sup>[13]</sup> Hier stellen wir eine neue Klasse hydrophiler,  $\beta$ -CD-beschichteter MNPs vor und beschreiben ihren Einsatz zur selektiven supramolekularen Bindung von Lectinen. Dies nutzen wir für einen neuartigen

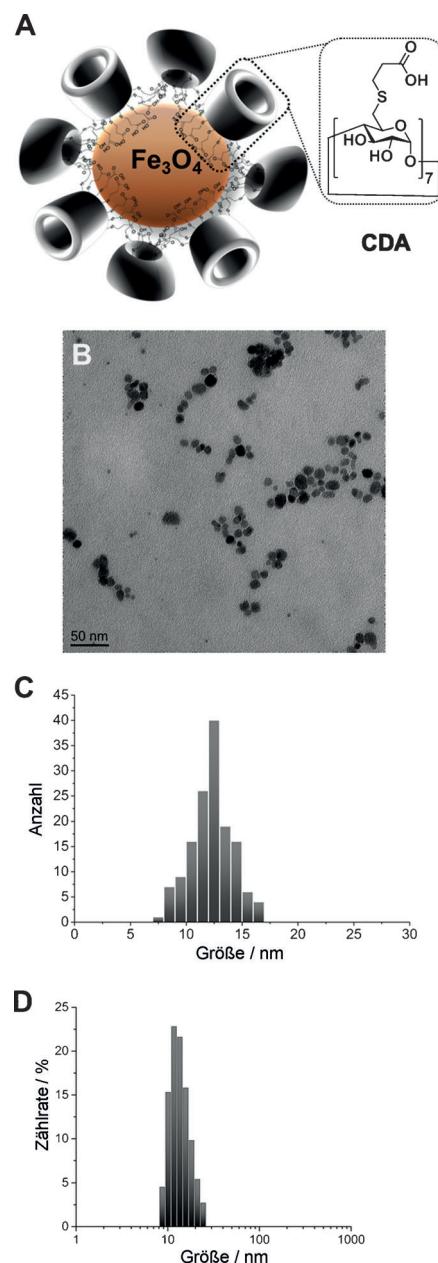
[\*] M. Sc. A. Samanta, Prof. Dr. B. J. Ravoo  
Organisch Chemisches Institut und  
Graduate School Chemistry  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster  
Correnstraße 40, 48149 Münster (Deutschland)  
E-Mail: b.j.ravoo@uni-muenster.de

[\*\*] TEM-Aufnahmen wurden von Dr. Martin Peterlechner (Institut für Materialphysik der WWU Münster) durchgeführt, TGA-Messungen von Jessica Hüsker aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Winter (MEET, WWU Münster). A.S. dankt der Graduate School of Chemistry für ein Stipendium. Wir bedanken uns bei Kira Schaepe für die deutsche Übersetzung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201405849> zu finden.

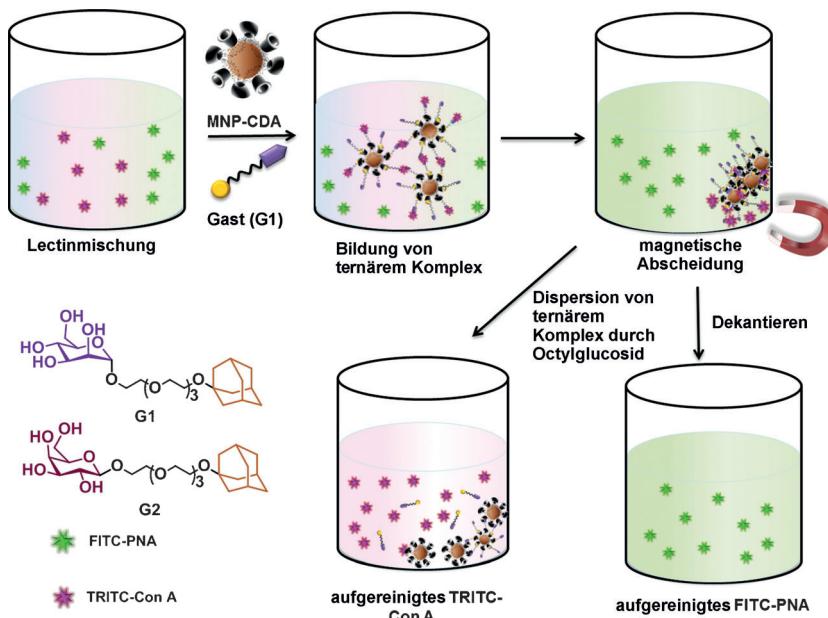
und hoch effektiven Ansatz zur magnetischen Aufreinigung von Proteinen in wässrigem Medium.

Die  $\beta$ -CD-beschichteten magnetischen Nanopartikel (MNP-CDAs) wurden in einer zweistufigen Synthese erhalten: Zunächst wurden MNPs durch die basische Kopräzipitation von  $\text{Fe}^{\text{II}}$ - und  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Salzen synthetisiert und anschließend mit Per-6-desoxy(carboxypropyl)thio- $\beta$ -cyclodextrin (CDA)-Liganden modifiziert. Die Stärke der Bindung typischer funktioneller Gruppen an eine Magnetitoberfläche sinkt gemäß: Phosphonat > Carboxylat > Hydroxy > Sulfonylat.<sup>[14]</sup> Unser Ligandendesign stellt sieben Carbonsäuregruppen zur multivalenten Bindung an die MNP-Oberfläche zur Verfügung, ohne dabei die superparamagnetischen Eigenschaften der Partikel zu beeinträchtigen (Abbildung 1 A). Die zweistufige Synthese der CDA-Liganden selbst wird in den Hintergrundinformationen beschrieben. Eine Charakterisierung der MNP-CDAs bezüglich ihrer Größe und Form erfolgte mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Die TEM-Aufnahmen und die daraus hervorgehende Größenverteilung (Abbildung 1 B,C) bestätigten, dass die erhaltenen Nanopartikel monodispers und einheitlich geformt sind. Der Durchmesser der MNP-CDAs beträgt  $(12 \pm 5)$  nm und stimmt mit der durch dynamische Lichtstreuung (DLS) erhaltenen mittleren Größe überein (Abbildung 1 D). Das  $\zeta$ -Potenzial der MNP-CDAs ist  $-43$  mV aufgrund der sekundären Hydroxygruppen und überschüssigen nichtkomplexierten Carboxygruppen der immobilisierten CDA-Liganden (siehe Abbildung S1; S: Hintergrundinformationen). Die Banden im FTIR-Spektrum der MNP-CDAs können den Hauptschwingungsmodi der CDAs wie folgt zugeordnet werden: C-H-Schwingung bei  $\tilde{\nu} = 2916 \text{ cm}^{-1}$  ( $\tilde{\nu} = 2924 \text{ cm}^{-1}$  für das freie CDA),  $\text{CH}_2$ -Deformationsschwingung bei  $\tilde{\nu} = 1400 \text{ cm}^{-1}$  ( $\tilde{\nu} = 1398 \text{ cm}^{-1}$  für das freie CDA), eine charakteristisch starke  $\text{C}=\text{O}(\text{Carboxylat})$ -Streckschwingung bei  $\tilde{\nu} = 1557 \text{ cm}^{-1}$  ( $\tilde{\nu} = 1564 \text{ cm}^{-1}$  für das freie CDA) und eine breite, schwache Bande bei  $\tilde{\nu} \approx 3263 \text{ cm}^{-1}$  ( $\tilde{\nu} = 3274 \text{ cm}^{-1}$  für das freie CDA) aufgrund der Schwingung der Hydroxygruppen (siehe Abbildung S2). Die detektierten charakteristischen Schwingungen belegen die Immobilisierung der CDA-Liganden an der Oberfläche der MNPs und wurden im Falle der nichtfunktionalisierten MNPs nicht gefunden. Des Weiteren wurden thermogravimetrische Analysen (TGA) der nichtfunktionalisierten sowie der beschichteten MNPs durchgeführt (Abbildung S3). Aufgrund von Wasserrückständen konnte im Falle der nichtfunktionalisierten MNPs ein Massenverlust von 1.0% innerhalb des Messbereiches von 100 bis  $600^\circ\text{C}$  nachgewiesen werden. Bei den MNP-CDAs wurde eine zusätzliche Massendifferenz von 17.1% detektiert, die auf den Verlust der CDA-Ligandenhülle der MNPs zurückzuführen ist. Für MNP-CDAs und CDAs lag der Hauptmassenverlust in einem Temperaturbereich von 150 bis  $400^\circ\text{C}$  (siehe Abbildung S3). Basierend auf den TEM- und TGA-Befunden ist eine Berechnung der Zahl an CDA-Liganden pro MNP durch die Multiplikation des Volumens mit der Dichte von Magnetit ( $\rho = 2.64 \text{ g cm}^{-3}$ ) möglich. Aus der daraus resultierenden molaren Masse lässt sich eine Zahl von ca.  $1.97 \times 10^3$  CDAs pro MNP bestimmen. Die ausführliche Berechnung findet sich in den Hintergrundinformationen. Die experimentellen Werte können mit theoretischen Werten



**Abbildung 1.** Schematische Darstellung und Charakterisierung der hydrophilen  $\beta$ -CD-beschichteten magnetischen Nanopartikel (MNP-CDAs). A) Schematische Abbildung der MNP-CDAs und Molekülstruktur der CDA-Liganden (Auszug). B) TEM-Bilder der MNP-CDAs. C) Größenhistogramm der Partikel nach Auswertung der TEM-Bilder. D) Größenhistogramm der Partikel ausgehend von DLS-Messungen.

verglichen werden, die aus einfachen geometrischen Überlegungen hervorgehen. In diesem Fall werden die auf der Oberfläche immobilisierten CDA-Liganden als flache Scheiben mit einem Durchmesser von 1.53 nm betrachtet, die die MNP-Oberfläche in einer hexagonal-dichten Kugelpackung besetzen. Gemäß diesen theoretischen Annahmen werden ca.  $0.94 \times 10^3$  CDAs benötigt, um ein einzelnes MNP zu bedecken. Unsere experimentellen Befunde zeigen, dass die Zahl an CDAs pro MNP in der Größenordnung des theoretisch berechneten Wertes liegt, aber erheblich höher ist. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die MNPs nicht



**Abbildung 2.** Schematische Darstellung der Aufreinigung von Proteinen durch die nichtkovalente Bindung und magnetische Abscheidung mit MNP-CDAs und G1. Molekülstrukturen von G1 und G2.

perfekt kugelförmig sind und effektiv eine größere Oberfläche zur Verfügung steht. Auch besteht die Möglichkeit, dass CDAs in einem „senkrechten“ anstelle eines „waagerechten“ Modus binden, sodass der Raumbedarf des Liganden an der MNP-Oberfläche sinkt.

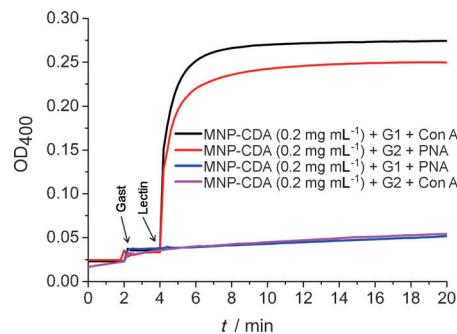
Wie in Abbildung 2 gezeigt, wurde die selektive Abtrennung von Proteinen aus einer Proteinmischung durch die Verwendung der MNP-CDAs mit einem Adamantan-Kohlenhydrat-Konjugat untersucht. Dabei wurden zwei Lectine ausgewählt: Erdnuss-Agglutinin (PNA) und Concanavalin A (ConA). Beide Lectine bilden im neutralen pH-Bereich Tetramere und haben vier Kohlenhydratbindungsstellen.<sup>[15]</sup> ConA bindet ausschließlich  $\alpha$ -D-Glucose,  $\alpha$ -D-Mannose und deren Glycoside, PNA hingegen ausschließlich  $\beta$ -D-Galactose und dessen Glycoside. Für die multivalente Selbstorganisation von Kohlenhydraten auf CD-Vesikeln wurde von uns der Begriff „künstliche Glycocalix“ eingeführt.<sup>[16]</sup> Die Gastmoleküle G1 und G2 enthalten jeweils zwei orthogonale molekulare Erkennungseinheiten: eine Adamantan- und eine Kohlenhydratfunktion. Das Adamantan dient der Bildung einer 1:1-Einschlusverbindung mit  $\beta$ -CD ( $K_a \approx 10^4 \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[16]</sup> Die Kohlenhydratfunktion, die zur Erkennung des Proteins dient, ist über einen Tetraethylenglycol-Linker mit der Adamantanfunktion verknüpft. Die Oberfläche der MNP-CDAs kann über die einfache Zugabe dieser Adamantan-Kohlenhydrat-Konjugate mit den spezifischen Kohlenhydraten modifiziert werden. Die Eigenschaften der mit Adamantan-Kohlenhydrat-Konjugaten modifizierten MNP-CDAs wurden in Gegenwart von Lectinen untersucht.

Eine 25  $\mu\text{M}$  Lösung von entweder G1 oder G2 wurde zu einer verdünnten gepufferten Lösung der MNP-CDAs (0.2 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) gegeben. Die optische Dichte ( $\text{OD}_{400}$ ) der MNP-CDA Lösung beträgt < 0.05 und bleibt auch nach Zugabe von G1 unverändert (Zugabe nach 2 min, gekennzeichnet durch den ersten Pfeil in Abbildung 3). Wird hin-

gegen ConA zu der Mischung aus MNP-CDA und dem Konjugat G1 hinzugefügt (Zugabe nach 4 min, gekennzeichnet durch den zweiten Pfeil in Abbildung 3), erhöht sich der  $\text{OD}_{400}$ -Wert innerhalb von 10 min von ca. 0.05 auf 0.25. Diese Beobachtung lässt auf die rasche und spontane Bildung des ternären Komplexes aus MNP-CDAs, G1 und ConA schließen. Wegen der multivalenten orthogonalen Vernetzung von MNP-CDAs und ConA durch den Gast G1 aggregieren die MNP-CDAs zu mikroskaligen Clustern. Diese Aggregation konnte ebenfalls durch DLS nachgewiesen werden (siehe Abbildung S5). Identische Phänomene können auch im Falle von MNP-CDAs, G2 und PNA nachgewiesen werden (Abbildung 3, rote Kurve). Bei einer „falschen“ Kombination von Gast und Lectin (z.B. G1 und PNA oder G2 und ConA) wurde keine Aggregation beobachtet. Aus diesen Befunden schließen wir, dass die Bildung des ternären Komplexes hoch selektiv ist und

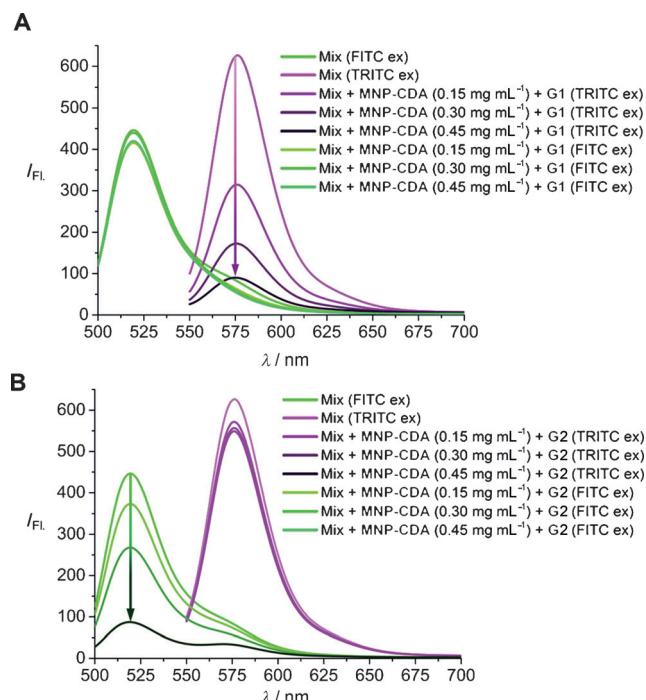
die entsprechende Kombination aus Lectin und Adamantan-Kohlenhydrat-Konjugat voraussetzt.

Aufgrund der Gegenwart der MNPs zeigt der ternäre Komplex aus vernetztem MNP-CDA, Gast und Lectin superparamagnetisches Verhalten und kann durch einfache magnetische Präzipitation abgetrennt werden. Somit kann ein Lectin, das spezifisch an die Kohlenhydrat-funktionalisierten MNPs bindet, durch magnetische Abscheidung aus einer Mischung von Proteinen entfernt werden. Zur Quantifizierung der Effizienz der Proteinabtrennung wurden Fluoreszenzmessungen von Fluoresceinisothiocyanat(FITC)- und Tetramethylrhodaminisothiocyanat(TRITC)-markierten Proteinen vor und nach der Komplexierung durchgeführt. Sowohl die Anregungswellenlänge der jeweiligen markierten Lectine ( $\lambda_{\text{ex}} = 490$  und 540 nm) als auch die beobachtete Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{em}} = 520$  und 576 nm) zeigen bei den gewählten Konzentrationen keine Überlagerung mit den anderen in der Mischung vorliegenden markierten Lectinen (siehe Abbil-



**Abbildung 3.** Bildung vernetzter ternärer Aggregate aus MNP-CDAs, Adamantan-Kohlenhydrat-Konjugaten und Lectinen. Zeitabhängige Messung der optischen Dichte bei  $\lambda = 400 \text{ nm}$ . Bedingungen: [MNP-CDA] = 0.2 mg  $\text{mL}^{-1}$ , [G1] = [G2] = 25  $\mu\text{M}$ , [ConA] = [PNA] = 0.05 mg  $\text{mL}^{-1}$ ; 20 mM HEPES-Puffer (1.0 mM MnCl<sub>2</sub>, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.15 M NaCl, pH 7.4);  $T = 23^\circ\text{C}$ .

dung S6). Wie erwartet zeigt das Fluoreszenzspektrum Emissionsmaxima bei 520 und 576 nm, was auf FITC-PNA und TRITC-ConA zurückzuführen ist. Eine Mischung dieser Lectine (jeweils  $0.05 \text{ mg mL}^{-1}$ ) wurde mit einer Lösung aus MNP-CDA ( $0.45 \text{ mg mL}^{-1}$ ) und dem Adamantan-Mannose-Konjugat (G1;  $40 \mu\text{M}$ ) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min und magnetischer Abscheidung des Komplexes wurde ein 88-prozentiger Abfall in der Fluoreszenzintensität von TRITC-ConA gemessen (bei  $\lambda = 576 \text{ nm}$ ), während für FITC-PNA nur ein 8-prozentiger Intensitätsabfall (bei  $\lambda = 520 \text{ nm}$ ) festzustellen war (Abbildung 4 A). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Mannose-funktionalisierten MNP-CDAs mit TRITC-ConA einen ternären Komplex bilden, der aus der Lösung ausfällt. Wie in Abbildung 4 A gezeigt, ist das Ausmaß der Extraktion von der Konzentration an MNP-CDAs abhängig. Dementsprechend zeigen weitere Fluoreszenzmessungen, dass bei Zugabe von MNP-CDAs und des Adamantan-Galactose-Konjugates (G2) zur Proteinmischung die Ausfällung des ternären Komplexes von FITC-PNA zu einem 86-prozentigen Intensitätsabfall (bei  $\lambda = 520 \text{ nm}$ ) führt, während nur ein 6-prozentiger Abfall für das nichtbindende TRITC-ConA (bei  $\lambda = 576 \text{ nm}$ ) beobachtet wird. Die Konzentration der Lectine wurde jeweils über eine Kalibrationsmessreihe bestimmt (siehe Abbil-

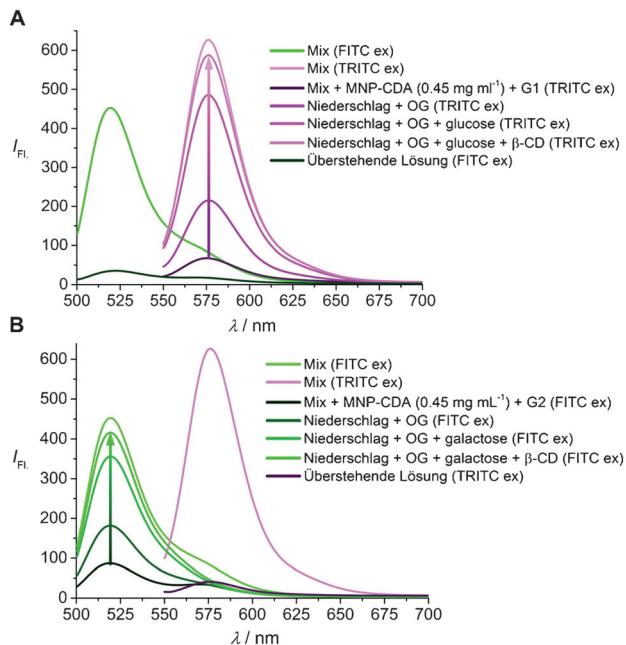


**Abbildung 4.** Fluoreszenzspektren vor und nach der magnetischen Abscheidung aus der Lectinmischung (Mix). A) Schrittweiser Abfall der Intensität der Emission bei  $\lambda = 576 \text{ nm}$  nach Abscheidung des Komplexes aus MNP-CDA, G1 und TRITC-ConA (pinkfarbene bis violette Linien), wobei die Emission bei  $\lambda = 520 \text{ nm}$  unverändert bleibt (hellgrüne Linien). B) Schrittweiser Abfall der Intensität der Emission bei  $\lambda = 520 \text{ nm}$  nach Abscheidung des Komplexes aus MNP-CDA, G2 und FITC-PNA (hellgrüne bis dunkelgrüne Linien), wobei die Emission bei  $\lambda = 576 \text{ nm}$  unverändert bleibt (pinkfarbene Linien). Bedingungen:  $[\text{TRITC-ConA}]_0 = [\text{FITC-PNA}]_0 = 0.05 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $[\text{G1}] = [\text{G2}] = 40 \mu\text{M}$ ,  $[\text{Ad-teg}] = 10 \mu\text{M}$ ,  $[\text{MNP-CDA}] = 0.15\text{--}0.45 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $20 \text{ mM HEPES-Puffer}$  ( $1.0 \text{ mM MnCl}_2$ ,  $1.0 \text{ mM CaCl}_2$ ,  $0.15 \text{ M NaCl}$ , pH 7.4);  $T = 23^\circ\text{C}$ .  $\lambda_{\text{ex}} = 490$  und  $540 \text{ nm}$ .

dung S6 und Tabelle S1). Kontrollexperimente ergaben, dass sich die Intensität der Fluoreszenz-markierten Lectine weder nach Zugabe von MNP-CDAs noch nach Zugabe des Adamantan-Kohlenhydrat-Konjugates verändert (siehe Abbildung S7). Dies belegt, dass der zuvor beobachtete Intensitätsabfall auf die spezifische Ausfällung des gewünschten Lectins aus der Proteinmischung zurückzuführen ist. Nichtspezifische Wechselwirkungen können vernachlässigt werden, da zu deren Minimierung alle Experimente mit  $10 \mu\text{M}$  Adamantyltetraethylenglycol (Ad-teg) durchgeführt wurden (siehe Abbildung S8).

Nach der magnetischen Ausfällung blieb hauptsächlich nur noch ein Lectin in Lösung. Um das ausgefällte Lectin aus dem ternären Komplex zurückzugewinnen, wurde, wie in Abbildung 2 gezeigt, eine Lösung aus  $\beta$ -Octylglucosid (OG),  $\beta$ -CD und Kohlenhydratligand verwendet. Das nichtionische Tensid OG wurde ausgewählt, da es in der Lage ist, Proteine ohne Denaturierung zu lösen.<sup>[17]</sup> Dabei wurde eine  $50 \text{ mM}$  Tensidkonzentration verwendet, die deutlich über der kritischen Micellenbildungskonzentration von  $25 \text{ mM}$  liegt. Dies gewährleistet, dass die MNPs durch eine schützende Micelle in Lösung gehalten werden. Wie in Abbildung 2 dargestellt, wurde die überstehende Lösung (FITC-PNA:  $0.046 \text{ mg mL}^{-1}$ ) nach der magnetischen Abscheidung des Komplexes dekantiert. Der Niederschlag enthält MNP-CDA, G1, Ad-teg und den Hauptanteil an TRITC-ConA. Die Intensität der Fluoreszenz bei  $\lambda = 576 \text{ nm}$  steigt nach der Inkubation des Rückstandes mit  $50 \text{ mM}$  OG-Lösung um 36 %, was die begrenzte Löslichkeit des ternären Komplexes und Freisetzung von TRITC-ConA nur durch OG zeigt. Bei der Verwendung einer Mischung aus  $50 \text{ mM}$  OG,  $100 \text{ mM}$  D-Glucose und  $100 \mu\text{M}$   $\beta$ -CD konnte ein Anstieg von 85 % beobachtet werden (Abbildung 5 A). Demnach kann durch die Verwendung von überschüssigen konkurrierenden Bindungspartnern wie D-Glucose und  $\beta$ -CD der ternäre Komplex vollständig zerstört werden. Aus der Intensität der Fluoreszenz bei  $\lambda = 520 \text{ nm}$  kann errechnet werden, dass nur 6 % der FITC-PNAs in Lösung verbleiben (Abbildung 5 A und Tabelle S1). Die entsprechenden Experimente mit dem ternären Komplex aus MNP-CDA, G2 und FITC-PNA zeigen, dass nach Inkubation mit der Mischung aus OG, D-Galactose und  $\beta$ -CD ebenfalls eine Freisetzung von 77 % erreicht werden konnte (Abbildung 5 B und Tabelle S1). Diese Befunde belegen, dass die Trennung von zwei Lectinen durch einen einzigen Ausfällungsschritt mit einem supramolekularen magnetischen Komplex und die folgende Dissoziation des Komplexes durch konkurrierende Bindungspartner hoch effizient und selektiv sind.

Das identische Trennverfahren wurde auch auf eine Mischung von TRITC-ConA und FITC-markierte Meerrettichperoxidase (FITC-HRP) angewendet. HRP zeigt keine Bindungsaffinität zu den beiden verwendeten Kohlenhydraten (D-Mannose oder D-Galactose). Durch den Einsatz von MNP-CDAs und G1 war es möglich, selektiv 93 % des TRITC-ConA aus der Lösung zu extrahieren, ohne dabei die Konzentration von FITC-HRP zu beeinflussen (siehe Abbildung S9). Nach dem Dekantieren der überstehenden, FITC-HRP enthaltenden Lösung war es möglich, 74 % des komplexierten TRITC-ConA durch den Zusatz von OG, D-Glu-



**Abbildung 5.** Fluoreszenzspektren vor und nach der Auflösung des Lectinniederschlags. A) Anstieg der Intensität der Emission bei  $\lambda = 576$  nm nach Auflösung des Komplexes aus MNP-CDA, G1 und TRITC-ConA (violette bis pinkfarbene Linien). Die Intensität bei  $\lambda = 520$  nm zeigt Rückstände von FITC-PNA an. B) Anstieg der Intensität der Emission bei  $\lambda = 520$  nm nach der Auflösung des Komplexes bei MNP-CDA, G2 und FITC-PNA (dunkelgrüne bis hellgrüne Linien). Die Intensität bei  $\lambda = 576$  nm deutet auf Rückstände von TRITC-ConA hin. Bedingungen:  $[OG] = 50$  mM,  $[D\text{-Glucose}] = [D\text{-Galactose}] = 100$  mM,  $[\beta\text{-CD}] = 100$   $\mu$ M; 20 mM HEPES-Puffer (1.0 mM  $MnCl_2$ , 1.0 mM  $CaCl_2$ , 0.15 M NaCl, pH 7.4);  $T = 23$  °C.  $\lambda_{ex} = 490$  und 540 nm.

cose und  $\beta$ -CD wieder freizusetzen. Zur Demonstration der möglichen Anwendung dieses Trennverfahrens auch unter annähernd physiologischen Bedingungen wurde TRITC-ConA aus einer 5-prozentigen Lösung des fetalen Kälberserums extrahiert (siehe Abbildung S10). Auch in diesem Fall verlief die Extraktion sehr effizient.

Zusammenfassend konnten eine effektive Methode für die Funktionalisierung von MNPs mit CD sowie deren Einsatz zur effizienten magnetischen Proteintrennung durch Kombination zweier orthogonaler supramolekulärer Wechselwirkungen (Adamantan- $\beta$ -CD-Einschluss und Kohlenhydrat-Lectin-Wechselwirkung) entwickelt werden. Die Kohlenhydrat-beschichteten MNPs stellen eine sehr große aktive Oberfläche zur selektiven Adsorption von Proteinen zu Verfügung, während der magnetische Kern die gezielte Abtrennung der Partikel durch den Einfluss eines äußeren Magnetfeldes ermöglicht. In einem einzelnen Extraktionsschritt erreicht die selektive Bindung und Freisetzung der Proteine eine Effizienz von 85 %. Nach unserem Kenntnisstand gab es zuvor noch kein dynamisches und multivalentes System zur Trennung eines spezifischen Proteins aus einer Mischung von Proteinen.

Eingegangen am 2. Juni 2014,  
veränderte Fassung am 18. Juli 2014  
Online veröffentlicht am 22. September 2014

## Stichwörter:

Cyclodextrine · Lectine · Magnetische Aufreinigung · Nanopartikel · Selbstorganisation

- [1] A. H. Lu, E. L. Salabas, F. Schüth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1222–1244; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1242–1266.
- [2] a) Y. R. Chemla, H. L. Crossman, Y. Poon, R. McDermott, M. D. Alper, J. Clarke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 14268–14272; b) J. W. Bulte, D. L. Kraitchman, *NMR Biomed.* **2004**, *17*, 484–499; c) W. J. M. Mulder, G. J. Strijkers, G. A. F. van Tilborg, A. W. Griffioen, K. Nicolay, *NMR Biomed.* **2006**, *19*, 142–164; d) L. Yao, A. C. Jamison, S. Xu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7493–7496; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7655–7658.
- [3] a) H. W. Gu, P. L. Ho, K. W. T. Tsang, C. W. Yu, B. Xu, *Chem. Commun.* **2003**, 1966–1967; b) H. W. Gu, P. L. Ho, K. W. T. Tsang, L. Wang, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15702–15703.
- [4] A. K. Gupta, M. Gupta, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995–4021.
- [5] a) M. G. Harisinghani, J. Barentsz, P. F. Hahn, W. M. Deserno, S. Tabatabaei, C. H. van de Kaa, J. de La Rosette, R. Weissleder, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 2491–2495; b) H. T. Song, J. S. Choi, Y. M. Huh, S. Kim, Y. W. Jun, J. S. Suh, J. Cheon, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9992–9993; c) M. K. So, C. J. Xu, A. M. Loening, S. S. Gambhir, J. H. Rao, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 339–343; d) N. Lee, H. Kim, S. H. Choi, M. Park, D. Kim, H.-C. Kim, Y. Choi, S. Lin, B. H. Kim, H. S. Jung, H. Kim, K. S. Park, W. K. Moon, T. Hyeon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 2662–2667.
- [6] a) N. Pamme, C. Wilhelm, *Lab Chip* **2006**, *6*, 974–980; b) J. Chatterjee, Y. Haik, C. J. Chen, *J. Magn. Magn. Mater.* **2001**, *225*, 21–29.
- [7] a) H. Gu, K. Xu, C. Xu, B. Xu, *Chem. Commun.* **2006**, 941–949; b) S. G. Penn, L. He, M. J. Natan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 609615; c) A. Hultgren, M. Tanase, C. S. Chen, G. J. Meyer, D. H. Reich, *J. Appl. Phys.* **2003**, *93*, 7554–7556.
- [8] a) C. Xu, K. Xu, H. Gu, X. Zhong, Z. Guo, R. Zheng, X. Zhang, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3392–3393; b) C. Xu, K. Xu, H. Gu, R. Zheng, H. Liu, X. Zhang, Z. Guo, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9938–9939.
- [9] K. B. Lee, S. Park, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3048–3050; *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3110–3112.
- [10] a) T. Viegers, E. Pelssers, E. Lenders, *Med. Device Technol.* **2008**, *19*, 23–25; b) D. M. Bruls, T. H. Evers, J. A. H. Kahlman, P. J. W. van Lankveld, M. Ovsyanko, E. G. M. Pelssers, J. J. H. B. Schleipen, F. K. de Theije, C. A. Verschuren, T. van der Wijk, J. B. A. van Zon, W. U. Dittmer, A. H. J. Immink, J. H. Nieuwenhuis, M. W. J. Prins, *Lab Chip* **2009**, *9*, 3504–3510.
- [11] a) A. Fragoso, J. Caballero, E. Almirall, R. Villalonga, R. Cao, *Langmuir* **2002**, *18*, 5051–5054; b) M. J. W. Ludden, A. Mulder, R. Tampe, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4104–4107; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4182–4185; c) M. J. W. Ludden, X. Li, J. Greve, A. van Amerongen, M. Escalante, V. Subramaniam, D. N. Reinhoudt, J. Huskens, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6964–6973.
- [12] A. Samanta, M. C. A. Stuart, B. J. Ravoo, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19909–19914.
- [13] A. Mulder, J. Huskens, D. N. Reinhoudt, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3409–3424.
- [14] Y. Sahoo, H. Pizem, T. Fried, D. Golodnitsky, L. Burstein, C. N. Sukenik, G. Markovich, *Langmuir* **2001**, *17*, 7907–7911.
- [15] H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637–674.
- [16] J. Voskuhl, M. C. A. Stuart, B. J. Ravoo, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 2790–2796.
- [17] a) M. T. Paternostre, M. Roux, J. L. Rigaud, *Biochemistry* **1988**, *27*, 2668–2677; b) L. T. Mimms, G. Zampighi, Y. Nozaki, C. Tanford, J. A. Reynolds, *Biochemistry* **1981**, *20*, 833–840.