



Schaltung bakterieller Adhäsion auf glycosylierten Oberflächen durch reversible Reorientierung der Kohlenhydratliganden**

Theresa Weber, Vijayanand Chandrasekaran, Insa Stamer, Mikkel B. Thygesen, Andreas Terfort* und Thisbe K. Lindhorst*

Abstract: In vielen biologischen Systemen wird die Erkennung von Oberflächen durch die Wechselwirkung von Kohlenhydrat-spezifischen Proteinen (Lektinen) mit den Kohlenhydratepitopen (Liganden) der ungeordneten Glykokonjugatschicht (Glykokalyx) der Zellen gesteuert. Damit es zu einer erfolgreichen Anbindung kommt, müssen sich diese Liganden geeignet im Raum orientieren. Wir stellen zum ersten Mal ein Modellsystem vor, in dem die Orientierung der Liganden auf einer Oberfläche kontrolliert variiert wird, ohne dabei ihre strukturelle Qualität in irgendeiner Weise zu verändern. Der Schlüssel für die Kontrolle der Ligandorientierung liegt in der Konjugation an photoschaltbare Azobenzoleinheiten.

Die Adhäsion von Zellen an Oberflächen ist mit dem physischen Leben grundlegend verbunden. Sie ist maßgeblich für die Entwicklung von Geweben und Organen und steht auch im Zusammenhang mit vielen medizinischen und technischen Anwendungen.^[1] Zelluläre Adhäsion ist aber auch an Infektionen und der Entstehung von Biofilmen beteiligt. Dementsprechend ist die Entschlüsselung der Mechanismen von Zelladhäsion notwendig, um die verschiedenen Krankheitsstadien von Organismen beurteilen und bakteriellen Infektionen begegnen zu können. Ein wichtiger Mechanismus für die Regulierung bakterieller Zelladhäsion beruht auf der spezifischen Bindung an Kohlenhydratstrukturen auf der Wirtszelloberfläche. Diese Bindung wird von adhäsiven Organellen der Bakterien, sogenannten Fimbrien, vermittelt.^[2] Fimbrien enthalten spezielle Proteinabschnitte des Lektin-Typs, die Kohlenhydratliganden spezifisch erkennen.^[3] Einige sehr virulente Bakterien besitzen sogenannte Typ-1-Fimbrien, welche ein α -D-Mannose-spezifisches Lektin namens

FimH tragen.^[4] Einige hundert dieser Typ-1-Fimbrien werden auf der bakteriellen Zelloberfläche exprimiert und ermöglichen so die Adhäsion an die Wirtszelle durch multivalente Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen. Im Fall der uropathogenen *Escherichia coli* (UPEC) wird die bakterielle Adhäsion an die Oberfläche urothelialer Zellen durch die Bindung von FimH an Oligomannosid-Verzweigungen des Glycoproteins Uroplakin Ia vermittelt.^[5] Infolge dieser Adhäsionsprozesse kommt es in der Regel zu schwerwiegenden Infektionen im Wirtsorganismus.

Die Kohlenhydratspezifität des Lektins FimH wurde bereits ausführlich untersucht.^[2,6] Wie bei allen Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen ist die Bindung abhängig von der Konstitution und der Konfiguration des Kohlenhydratliganden. Die Kohlenhydraterkennung auf der Zelloberfläche erfolgt allerdings im Kontext der Glykokalyx, einer hochkomplexen Glykokonjugatschicht, die gesunde Zellen mit einer Dicke von 100 nm und mehr umgibt. Im Gegensatz zu vielen anderen biologischen Strukturen zeichnet sich die Glykokalyx durch keine offensichtliche supramolekulare Ordnung oder Faltung aus. Aus diesem Grund fehlt bis heute ein vollständiges Verständnis dafür, wie Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen in einer derart ungeordneten Umgebung kontrolliert werden.

Da Zell-Zell-Wechselwirkungen zum einen durch zelluläre Lektine und zum anderen durch Kohlenhydratepitope auf der Zelloberfläche gesteuert und reguliert werden, eignen sich synthetische glycosylierte Oberflächen, sogenannte Glycoarrays, gut für die detaillierte Erforschung der Kohlenhydrat-spezifischen Zelladhäsion.^[7] Bisher wurden Glycoarrays hauptsächlich für die Untersuchung der Kohlenhydratspezifität von Lektinen eingesetzt. Allerdings kann angenommen werden, dass neben der Identität auch die Orientierung der Kohlenhydrate an der Zelloberfläche für die Anhaftung von Zellen entscheidend ist. Um diesen Effekt zu untersuchen, haben wir vor kurzem ein System vorgestellt, welches die Kontrolle der Orientierung von Oberflächengebundenen Kohlenhydratliganden ermöglicht.^[8] Dazu werden Azobenzolglycoside auf einer Goldoberfläche immobilisiert, um eine photoschaltbare Glyco-SAM (selbstanordnende Monoschicht) zu erzeugen. Derartige Systeme ermöglichen die Unterscheidung der Schalteffekte von anderen, möglicherweise irreversiblen Nebeneffekten, wie beispielsweise der photolytischen Schädigung der Monoschicht.^[9] Azobenzolderivate sind für ihre hervorragenden Photoisomerisierung der N=N-Doppelbindung der Azobenzoleinheit selbst in biologischer Umgebung erlauben.^[10] Die strukturellen Änderungen, die mit der E/Z-Isomerisierung

[*] T. Weber,^[+] Prof. Dr. A. Terfort
Institut für Biochemie, Chemie und Pharmazie
Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt/M. (Deutschland)
E-Mail: aterfort@chemie.uni-frankfurt.de

Dr. V. Chandrasekaran,^[+] I. Stamer, Prof. Dr. T. K. Lindhorst
Otto Diels-Institut für Organische Chemie
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Otto-Hahn-Platz 3–4, 24118 Kiel (Deutschland)
E-Mail: tkind@oc.uni-kiel.de

Prof. Dr. M. B. Thygesen
CARB Centre, Department of Chemistry, University of Copenhagen
Thorvaldsensvej 40, 1871 Frederiksberg C (Dänemark)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu diesem Projekt beigetragen.

[**] Wir danken der DFG für die Unterstützung im Rahmen des SFB 677.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201409808> zu finden.

einhergehen, wurden bereits oft verwendet, um die Form von Liganden (Erkennungsstellen) im Sinne eines Ein/Aus-Schaltens biologischer Funktion sowohl in Lösung als auch an Oberflächen zu manipulieren.^[11] Wenn Azobenzolderivate an eine Oberfläche gebunden sind, ändert sich dagegen vor allem die Orientierung der äußeren Phenylringe und aller daran gebundenen Liganden bei der Isomerisierung drastisch.

Hier zeigen wir zum ersten Mal, dass eine derartige unterschiedliche Orientierung von Liganden in einer ansonsten inerten Umgebung die Zellerkennung verändern kann, ohne dass sich der Ligand selbst ändert. Dafür haben wir die spezifische Adhäsion eines mit Typ-1-Fimbrien dekorierten *E. coli*-Stammes an α -D-Mannosyl-Liganden untersucht, deren Orientierung auf einer Oberfläche durch die Konfiguration einer Azobenzol-Monolage vorgegeben ist.

Es konnte schon früher gezeigt werden, dass mannosylierte Azobenzolderivate gute Liganden für das Typ-1-fimbriale Lektin FimH sind.^[12] Die für dieses Projekt durchgeführten, computergestützten Docking-Experimente (vgl. Hintergrundinformationen) zeigen, dass beide Isomere des mit α -D-Mannose modifizierten Azobenzolderivats gleich gut von FimH erkannt werden (Scoring-Werte von -9.7 bzw. -9.3 für die *E*- und *Z*-Form). Diese Berechnungen werden durch experimentelle Studien gestützt, die zeigen, dass die *E*- wie die *Z*-Form von Azobenzolmannosiden in Lösung die gleiche inhibitorische Potenz bei der Unterdrückung der *E. coli*-Adhäsion an Mannan-beschichtete Oberflächen haben.^[12] Somit bildet die FimH-vermittelte Bakterienadhäsion an eine mannosylierte Azobenzol-Monolage ein gut definiertes System zur Untersuchung des Effekts der Orientierung von oberflächengebundenen Kohlenhydratligenanden auf die zelluläre Adhäsion. Für die Herstellung einer derartigen Glyco-SAM wurde ein mannosyliertes Azobenzolderivat synthetisiert, welches aus einer Thiol-Ankergruppe für die Anbindung an die Goldoberfläche, einer Alkylkette für die

Ausbildung einer hochgeordneten Monolage,^[13] einer Oligoethylenglycol(OEG)-Kette für die Unterdrückung der unspezifischen Zelladhäsion, einer photoschaltbaren Azobenzolgruppe und schließlich einem α -D-Mannose-Liganden besteht (siehe Abbildung 1, Mitte).

Durch die Abscheidung dieses mannosylierten Azobenzolderivats auf Goldoberflächen aus ethanolischer Lösung konnten dichtgepackte Filme erzeugt werden, wie Ellipsometrie und Oberflächen-IR-Spektroskopie (infrared reflection absorption spectroscopy, IRRAS) zeigen (vgl. Hintergrundinformationen). Aus der ellipsometrisch gemessenen Schichtdicke von 3.91 nm und der Länge des Moleküls (4.07 nm) kann ein Kippwinkel von 16° abgeschätzt werden. Im IRRAS-Spektrum (Abbildung 2) kann das Signal bei 2919 cm^{-1} (asymmetrische CH_2 -Schwingung) einer *all-trans*-Konformation der Alkylkette und somit einer hohen Ordnung in diesem Teil zugeordnet werden.^[14] Das Signal bei 1350 cm^{-1} kann der Wagging-Mode der *gauche*-Konformation um die $-\text{CH}_2\text{CH}_2$ -Bindung in der Ethylenglycolkette zugeordnet werden und ist typisch für diese bioresistente Konformation.^[15]

Mittels IRRAS kann auch die reversible Photoschaltung der Kohlenhydratorientierung innerhalb der SAM verfolgt werden, wie es bereits früher für ähnliche Systeme beschrieben wurde.^[8] Gemäß der Auswahlregeln der IR-Spektroskopie hängt die Intensität der Schwingungsbanden in der Umgebung von Metalloberflächen stark von der relativen Orientierung des Übergangsdipolmomentes ab. Somit kann im IRRAS-Spektrum die *E* \rightarrow *Z*-Isomerisierung bei der Bestrahlung mit UV-Licht (365 nm , 2 J cm^{-2}) durch die Intensitätsänderung verschiedener Signale belegt werden (Abbildung 2). Vor allem das Signal bei 1240 cm^{-1} , welches der Aryl-O-(Mannosyl)-Schwingung und somit auch der Orientierung des Liganden zugeordnet werden kann, wird deutlich beeinflusst (vgl. Bildeinschub in Abbildung 2). Werden die

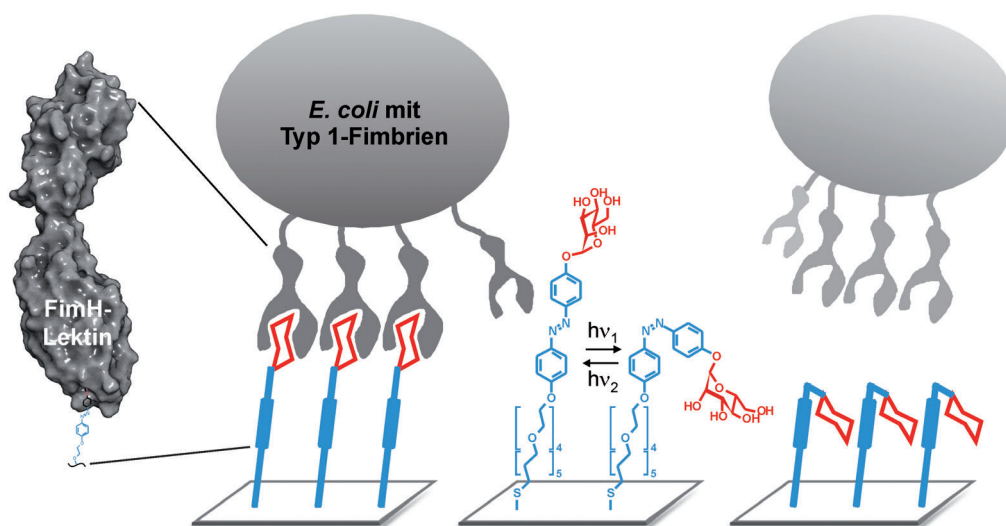


Abbildung 1. Die Adhäsion Typ-1-fimbrierter *E. coli*-Zellen wird durch das Protein FimH vermittelt, einem Zwei-Domänen-Lektin, das sich an der Fimbrienspitze befindet. Die orientierungsabhängige Erkennung von immobilisierten α -D-Mannosid-Liganden mittels FimH bestimmt die Adhäsion von *E. coli*. Für die Kontrolle der Orientierung werden die Liganden in Form einer Azobenzol-basierten SAM auf eine Oberfläche angebunden. Eine kurze OEG-Einheit sorgt für eine hydrophile Umgebung und unterdrückt die unspezifische Zelladhäsion. Die reversible *E/Z*-Photoisomerisierung erfolgt mittels Licht zweier verschiedener Wellenlängen.

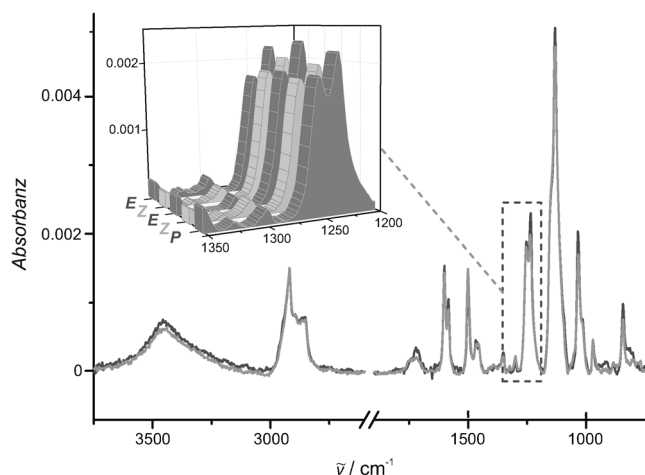


Abbildung 2. IRRA-Spektren der glycosylierten Azobenzol-Monolagen auf Gold. Bei der Schaltung variieren die Intensitäten vieler IR-Signale; besonders deutlich zeigt sich dies am Signal bei 1240 cm^{-1} (siehe Bildeinschub). P: unbestrahlte SAM, Z: SAM nach Bestrahlung mit 365-nm-Licht (2 J cm^{-2}), E: SAM nach der Bestrahlung mit 450-nm-Licht (100 J cm^{-2}).

Schichten erneut bestrahlt, diesmal allerdings mit Licht einer Wellenlänge von 450 nm , wandelt sich das IR-Spektrum langsam zurück, bis die Signale bei einer Strahlungsdosis von 100 J cm^{-2} wieder ihre ursprüngliche Intensität erreichen. Dieser Schaltprozess kann mehrfach wiederholt werden, ohne das System zu schädigen.

Um den Einfluss der Orientierungsänderung auf die bakterielle Zelladhäsion zu ermitteln, wurden die photo-schaltbaren Glyco-SAMs in einem Adhäsionstest untersucht. Hierfür wurde ein Typ-1-fimbrierter und GFP-markierter *E. coli*-Stamm (Stamm pPKL1162)^[16] in seiner exponentiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte von 0.5 verwendet. Um zwischen Primärerkenntnis (α -D-Mannose/FimH) und anderen, sekundären Erkennungsmechanismen (z.B. Proteinfilmbildung oder „pinhole etching“) differenzieren zu können, wurde die Adhäsionszeit auf 30 min begrenzt. Bei diesen Experimenten konnte eine besonders starke Adhäsion auf den E-konfigurierten Oberflächen nachgewiesen werden. Die durch die Kohlenhydratligenanden vermittelte Adhäsion liegt dabei ca. 13-mal höher (etwa $100\,000\text{ Zellen cm}^{-2}$, Abbildung 3) als auf unbeschichteten Goldsubstraten, auf denen es lediglich zu unspezifischer Adhäsion kommt (vgl. Hintergrundinformationen).^[13]

Nach der Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 365 nm wurde die Adhäsivität der Oberfläche mehr als fünffach reduziert (auf etwa $18\,000\text{ Zellen cm}^{-2}$). Diese Ergebnisse zeigen einen Zusammenhang zwischen der Orientierung der immobilisierten α -D-Mannosid-Liganden und den Adhäsionseigenschaften der entsprechenden Oberfläche. Wie Abbildung 3 zeigt, korreliert die Adhäsion für beide Isomere mit der Intensität der IR-Schwingung bei 1240 cm^{-1} . Dieses Ergebnis kann als Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Orientierung eines Liganden und seiner Bindung in biologischen Systemen angesehen werden, da sich, wie oben gezeigt, die Konfiguration der Azobenzol-N=N-Doppelbindung nicht auf die Affinität des FimH-Lektins für diesen Liganden aus-

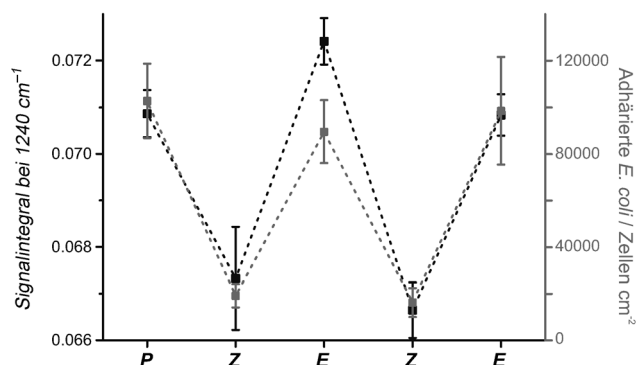


Abbildung 3. Bakterienadhäsion an einer glycosidischen Azobenzol-SAM auf Gold während zweier $E \rightarrow Z \rightarrow E$ -Isomerisierungszyklen (P bezeichnet das unbestrahlte E-Isomer). Die alternierende Zahl der adhärenierten *E. coli*-Zellen ist grau dargestellt (Fehlerbalken stellen das Vertrauensintervall bei 95 % dar), wogegen das Integral des IR-Signals bei 1240 cm^{-1} (vgl. Abbildung 2) schwarz ist. Für beide Messgrößen wird der gleiche alternierende Trend sichtbar. Dies weist darauf hin, dass die Bakterienadhäsion mittels Orientierungsänderung der Kohlenhydratligenanden geschaltet werden kann.

wirkt. Erwähnenswert ist, dass kein ausgeprägtes molekulares Schalten beobachtet werden konnte, wenn ähnliche Moleküle ohne OEG-Einheit eingesetzt wurden, was die Wichtigkeit dieser Einheit nochmals unterstreicht.

Die Anbindung der Mannosidliganden an eine OEG-Matrix in *gauche*-Konformation macht die Glyco-SAM zu einem sehr guten Modellsystem für die Glycokalyx auf Zelloberflächen, wo vor dem eigentlichen molekularen Erkennungsereignis eine gewisse Reorganisation des offensichtlich ungeordneten Kompartiments nötig ist. Die Einführung einer Azobenzolgruppe in das Modellsystem erlaubt es, diese Reorganisation durch einen externen Stimulus (Licht) zu schalten und ermöglicht so den Vergleich von Bindungs-/Erkennungs-Effizienzen in verschiedenen Zuständen. Zukünftige Arbeiten sollen aufklären, ob die Bakterienzellen, die nach der $E \rightarrow Z$ -Isomerisierung noch adhären, an verbliebene E-konfigurierte Azobenzol-Mannosid-Einheiten (aufgrund des photodynamischen Gleichgewichts) binden oder sogar die Z-konfigurierten Glycoside zu einem gewissen Ausmaß erkennen. Außerdem soll geklärt werden, ob Defekte in der SAM entstehen und Einfluss auf die Zelladhäsion nehmen.

Experimentelles

Die Synthese des mannosylierten Azobenzolderivats wurde in drei Schritten ausgehend von 4'-Hydroxyazobenzolmannosid^[8] und einem kommerziell erhältlichen Tetraethylenglycol-Derivat durchgeführt (vgl. Hintergrundinformationen für Einzelheiten). Diese Moleküle wurden nach etablierten Techniken^[17] auf gereinigten Goldsubstraten abgeschieden.^[18] IRRA-Spektren wurden auf einem Nicolet 6700 FT-IR-Spektrometer (Thermo, ausgestattet mit einem stickstoffgekühlten Quecksilbercadmiumtellurid-Detektor), welches mit trockener und CO_2 -freier Luft gespült wurde, aufgenommen. Die Schaltung der Azobenzoleinheiten in der Monolage wurde durch kontrollierte Belichtung mit einer gefilterten Quecksilber-Dampflampe (365 nm) oder einer Hochleistungs-LED (450 nm) durchgeführt. Für die Bakterientests wurde der GFP-markierte *E. coli*-Stamm pPKL1162 in

CASO-Boullion vermehrt und auf die Oberflächen gegeben, sobald die optische Dichte der Suspension einen Wert von 0.5 erreicht hatte. In dieser Suspension wurden die E/Z-konfigurierten Glyco-SAMs für 30 min inkubiert, und die Abscheidungsichte adhärenter Bakterien wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop gemessen. Eine detaillierte Beschreibung der Prozedur ist in den Hintergrundinformationen zu finden.

Computerunterstützte Docking-Experimente wurden unter der Verwendung der FimH-Struktur (pdb-Code 1KLF) und der Schrödinger Glide Software, Version 3.1, durchgeführt (Details sind in den Hintergrundinformationen enthalten).

Eingegangen am 6. Oktober 2014

Online veröffentlicht am 27. November 2014

Stichwörter: Azobenzol · Glycokalyx · Kohlenhydraterkennung · Lektin · Lichtinduzierte Schaltung

- [1] M. D. Mager, V. LaPointe, M. M. Stevens, *Nat. Chem.* **2011**, 3, 582–589.
- [2] a) P. Klemm, M. A. Schembri, *Int. J. Med. Microbiol.* **2000**, 290, 27–35; b) S. D. Knight, J. Bouckaert, *Top. Curr. Chem.* **2009**, 288, 67–107.
- [3] K. Ohlsen, T. A. Oelschlaeger, J. Hacker, A. S. Khan, *Top. Curr. Chem.* **2009**, 288, 109–120.
- [4] G. Waksman, S. J. Hultgren, *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, 7, 765–774.
- [5] a) A. L. Kau, D. A. Hunstad, S. J. Hultgren, *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, 8, 54–59; b) J. J. Martinez, M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. S. Pinkner, S. J. Hultgren, *EMBO J.* **2000**, 19, 2803–2812.
- [6] a) M. Hartmann, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3583–3609; b) B. Ernst, J. L. Magnani, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, 8, 661–677.
- [7] a) Y. Liu, A. S. Palma, T. Feizi, *Biol. Chem.* **2009**, 390, 647–656; b) N. Laurent, J. Voglmeir, S. L. Flitsch, *Chem. Commun.* **2008**, 4400–4412; c) T. Horlacher, P. H. Seeberger, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1414–1422; d) J. E. Turnbull, R. A. Field, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 74–77; e) M. Kleinert, T. Winkler, A. Terfort, T. K. Lindhorst, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 2118–2132.
- [8] V. Chandrasekaran, H. Jacob, F. Petersen, K. Kathirvel, F. Tuzcek, T. K. Lindhorst, *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 8744–8752.
- [9] a) Y. L. Jeyachandran, T. Weber, A. Terfort, M. Zharnikov, *J. Phys. Chem. C* **2013**, 117, 5824–5830; b) T. Weber, N. Meyerbröcker, N. K. Hira, M. Zharnikov, A. Terfort, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 4325–4327.
- [10] a) J. Robertus, W. R. Browne, B. L. Feringa, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 354–378; b) W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema, B. L. Feringa, *Chem. Rev.* **2013**, 113, 6114–6178; c) M. M. Russew, S. Hecht, *Adv. Mater.* **2010**, 22, 3348–3360.
- [11] a) J. Auernheimer, C. Dahmen, U. Hersel, A. Bausch, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 16107–16110; b) D. Pearson, A. J. Downard, A. Muscroft-Taylor, A. D. Abell, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 14862–14863; c) G. Hayashi, M. Hagihara, C. Dohno, K. Nakatani, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 8678–8679; d) P. M. Mendes, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 9207–9218.
- [12] a) V. Chandrasekaran, K. Kolbe, F. Beiroth, T. K. Lindhorst, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9, 223–233; b) M. Hartmann, H. Papavlassopoulos, V. Chandrasekaran, C. Grabosch, F. Beiroth, T. K. Lindhorst, C. Röhl, *FEBS Lett.* **2012**, 586, 1459–1465.
- [13] C. Grabosch, M. Kind, Y. Gies, F. Schweighöfer, A. Terfort, T. K. Lindhorst, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 4006–4015.
- [14] a) R. G. Snyder, H. L. Strauss, C. A. Elliger, *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 5145–5150; b) R. A. MacPhail, H. L. Strauss, R. G. Snyder, C. A. Elliger, *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 334–341.
- [15] P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G. M. Whitesides, P. E. Laihinis, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 426–436.
- [16] A. Reisner, J. A. J. Haagensen, M. A. Schembri, E. L. Zechner, S. Molin, *Mol. Microbiol.* **2003**, 48, 933–946.
- [17] Z.-L. Zhi, N. Laurent, A. K. Powell, R. Karamanska, M. Fais, J. Voglmeir, A. Wright, J. M. Blackburn, P. R. Crocker, D. A. Russell, S. Flitsch, R. A. Field, J. E. Turnbull, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1568–1575.
- [18] K. Raiber, A. Terfort, C. Benndorf, N. Krings, H. H. Strehblow, *Surf. Sci.* **2005**, 595, 56–63.