

# Von künstlichen Nukleasen und Proteasen

## DNA und Proteine mit Metallen spalten

In unserem Körper haben Nuklease- und Protease-Enzyme die Aufgabe, DNA bzw. Proteine zu spalten. Dies kann dem Abbau dieser Biomoleküle dienen oder für Signalübertragungswege eine Rolle spielen. Die hocheffizienten Enzyme nutzen meist Metallionen, um Phosphodiester- und Amidbindungen zu spalten.

Auch Metallkomplexe – mit kleinen organischen Liganden anstelle der großen Proteinmatrix – können solche Bindungen spalten und können damit als Mimetika der biologischen Vorbilder angesehen werden, jedoch oft mit verbesserten Eigenschaften wie z.B. höhere Stabilität gegenüber pH-Wert- und Temperaturschwankungen. Damit ist ein Einsatz in der Molekularbiologie sowie für medizinische Anwendungen denkbar.

Das Spektrum der eingesetzten Metalle reicht von den Übergangsmetallen wie Eisen (Fe), Nickel (Ni) und Kupfer (Cu) bis zu den Lanthanoiden wie Europium (Eu). Als Ligandensysteme für die künstlichen Nukleasen und Proteasen werden u.a. Heteroaromaten, Aminosäuren, Hydrazone sowie N- und O-Macrocyclen eingesetzt.

### DNA-Spaltung

Metallonukleasen spalten DNA hydrolytisch über eine  $S_N2$ -Reaktion am Phosphatrückgrat mit metallgebundenen Wasser- oder Hydroxid-Liganden als Nucleophile oder oxidativ an den Zucker- und Basenfunktionen durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Abb. 1). Der erstgenannte Mechanismus liegt hierbei häufig für redoxinerte Metalle wie Zn(II), der letztgenannte für redoxaktive Metalle wie Cu(II) vor [1,2].

Hydrolytisch spaltende künstliche Nukleasen könnten als Restriktionsagenzien in der Molekularbiologie verwendet und zur DNA-Sequenzierung genutzt werden [3]. Für medizinische An-

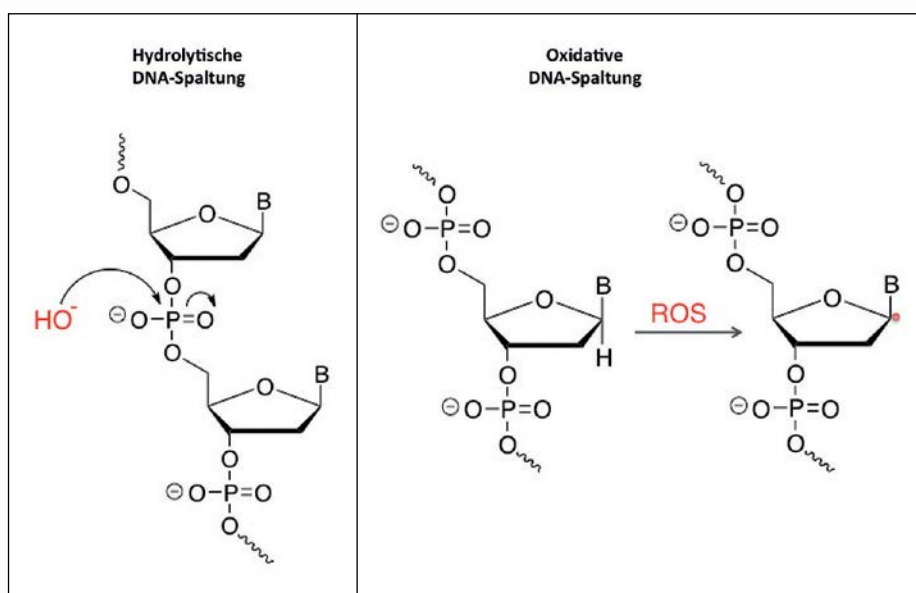


Abb. 1: Vergleich von hydrolytischer und oxidativer DNA-Spaltung (ROS = reactive oxygen species)

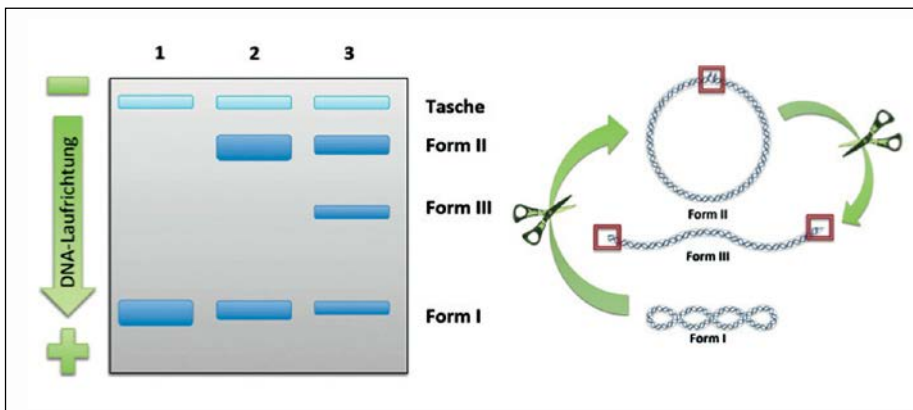


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Agarosegels für die Verfolgung der Spaltung von Plasmid-DNA

wendungen hingegen ist auf der anderen Seite die Entwicklung neuartiger Chemotherapeutika auf Basis oxidativ spaltender Nukleasen relevant.

Die Spaltaktivität eines Metallkomplexes kann am einfachsten an plasmidischer DNA als Modell überprüft werden. Die Detektion von Plasmid-DNA-Fragmenten erfolgt dann mithilfe der Gelelektrophorese [4]. Nach Inkubation des Metallkomplexes mit Plasmid-DNA wird verfolgt, wie schnell die DNA durch ein Agarosegel wandert, sobald eine Spannung angelegt wird. Schließlich werden die DNA-Fragmente durch die UV-Fluoreszenz von interkalierendem Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Plasmid-DNA liegt in der *supercoiled* Form I vor. Sobald der Metallkomplex einen Strangbruch verursacht, nimmt die DNA die *nicked* (auch *relaxed* oder *open circular*) Form II an. Ein weiterer Schnitt in räumlicher Nähe zum ersten Strangbruch führt zu linearer DNA (Form III) (Abb. 2).

Es finden sich verschiedene Ansätze, die Aktivität von künstlichen hydrolytischen sowie oxidativen DNA-Schneidern zu erhöhen [5]. Schaut man auf die natürlichen Vorbilder, so beruht die hohe Spalteffizienz meist auf kooperativ wirkenden Metallzentren. Zum einen aktivieren Metallionen aufgrund ihrer Lewis-Acidität den Phosphatester oder das Nucleophil. Zum anderen führt eine Stabilisierung der Abgangsgruppe zu einer Begünstigung der nucleophilen Substitutionsreaktion. Durch das kooperative Zusammenspiel räumlich naher Metallzentren können die oben genannten Aktivierungsschritte simultan erfolgen und die Nukleaseaktivität kann um ein Vielfaches verstärkt werden.

Die DNA-Spaltaktivität verbessert sich außerdem mit steigender DNA-Affinität. Empirisch ließ sich nachweisen, dass zusätzliche positive

Ladungen oder das Anbringen von DNA-Interkalatoren zu einer Erhöhung der DNA-Affinität von Nukleasen führen. Ursache sind elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen funktionellen Gruppen und dem negativ geladenen Phosphat-Rückgrat der DNA bzw. die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Basenpaaren und Interkalatoren [6].

Interessant ist zudem die Steigerung der DNA-Affinität von Komplexen durch die Konjugation mit Nucleobasen oder Peptidnucleinsäuren (PNA); dies ermöglicht aufgrund von Watson-Crick-Basenpaarungen eine Erkennung von bestimmten DNA-Bereichen [7,8].

Einen Einfluss auf die Redoxaktivität von Metallkomplexen und damit die oxidative Spaltaktivität von künstlichen Metallonucleasen mit redoxaktiven Metallen hat insbesondere das Ligandensystem selbst. Bereits der Austausch einzelner Donoratome des Liganden wirkt sich erheblich auf die Spaltaktivität aus, so z. B. der Ersatz eines Stickstoffatoms durch ein Sauerstoffatom in einem Tetraazacyclodecan (Cyclen)[9].

### Protein-Spaltung

Für die Funktionalität von Proteinen ist nicht nur die Abfolge der Aminosäuren entscheidend, sondern auch deren räumliche Orientierung zueinander, die Proteinfaltung. Werden Proteine falsch gefaltet, so können sie ihre eigentliche Funktion oft nicht mehr ausführen und können sogar pathogen wirken. Bei Amyloidose lagern sich bestimmte fehlgefaltete Peptide zusammen und bilden Oligomere und Fibrillen, die degenerative neurologische Anomalien wie die Alzheimer- und Parkinson-Krankheit oder auch *Diabetes mellitus* auslösen können.



Es gibt bereits zahlreiche Medikamente auf dem Markt, die unerwünschte Funktionen bestimmter Proteine inhibieren können. Dazu binden sie an das aktive Zentrum, den Bereich des Proteins, der für seine Funktionalität verantwortlich ist, und unterdrücken dadurch die Wechselwirkung mit anderen Spezies (Abb. 3a).

Da amyloidogene und viele andere Proteine und Peptide kein aktives Zentrum besitzen, muss hier eine andere Methode gefunden werden, um ihre Aktivität zu unterdrücken.

Würden die fehlgefalteten Peptide gespalten werden, könnte möglicherweise die Bildung der Oligomeren und Fibrillen unterbunden werden [10]. Diese Strategie stellt demnach einen therapeutischen Ansatz zur Heilung entsprechender Krankheiten dar.

Der Einsatz von katalytisch wirkenden Spaltreagenzien bietet dabei einen entscheidenden Vorteil: Da sie die Spaltung zwar einleiten, selbst aber nicht verbraucht werden, kann ein Wirkstoffmolekül eine Vielzahl an Proteinmolekülen spalten (Abb. 3b). Dadurch könnten die benötigte Dosis und folglich auch Nebenwirkungen deutlich verringert werden. So ist beispielsweise bekannt, dass der Stickstoffmacrocyclus Cyclen mit den koordinierten Metallen Kupfer oder Cobalt in der Lage ist, Proteine katalytisch zu spalten [11].

Um die Proteaseaktivität zu testen, kann nach Inkubation des Komplexes mit Proteinen auch hier eine Gelelektrophorese durchgeführt werden, die sich allerdings in einigen Punkten von der Methode für die DNA-Analytik unterscheidet. Bei der sogenannten SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) besteht das Gel nicht aus Agarose, sondern aus Polyacrylamid. Die Proteine wandern nach Anlegen eines elektrischen Feldes entsprechend ihrer Größe durch das Gel. Die Spaltung eines Proteins zeigt sich im Intensitätsverlust der für das eingesetzte Protein charakteristischen Bande. Wenn die Proteinfragmente groß genug sind, zeigen sich auch deutlich sichtbare Fragmentbanden auf dem Gel. Eine Identifikation der entstehenden Prote-

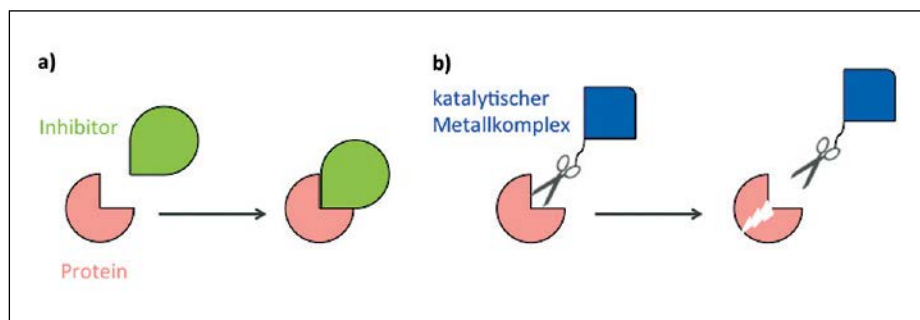


Abb. 3: Wechselwirkung von Proteinen mit Inhibitoren (a) bzw. künstlichen Metalloproteasen (b)

infragmente ist beispielsweise mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie (*matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight*) möglich; eine eindeutige Zuordnung der Fragmente erlaubt so auch eine Ermittlung der Spaltstelle innerhalb des Proteins.

Es ist entscheidend, dass nur die Proteine gespalten werden, die zu Erkrankungen führen können und nicht auch solche, die für den Organismus wichtige Funktionen erfüllen. In die spaltaktiven Metallkomplexe müssen dafür Motive eingeführt werden, die eine gezielte Annäherung an die pathogenen Proteine ermöglichen. Mittels kombinatorischer Methoden wurden bereits einige solcher Bindungsmotive ermittelt [10,12].

Statt man also kleine Metallkomplexe mit den entsprechenden Funktionalitäten zur Erhöhung von Affinität und Selektivität für die zu spaltenden Biomoleküle aus, ist der Weg offen für breite therapeutische Anwendungen. Darüber hinaus ist eine ausreichende *in vivo*-Stabilität der Komplexe notwendig, um toxische Nebenreaktionen durch freie Metallionen beim Zerfall der Komplexe zu vermeiden.

#### Literatur

- [1] Chin J. *et al.*: Acc. Chem. Res. 32, 485–493 (1999).
- [2] Heffeter P. *et al.*: Antioxid. Redox Signal. 15, 1085–1127 (2011).
- [3] Mancin F. *et al.*: Chem. Commun. 48, 5545–5559 (2012).

- [4] Dabrowiak J. C., Metals in Medicine, John Wiley & Sons, New York (2009).
- [5] Mancin F. *et al.*: Chem. Commun. 2540–2548 (2005).
- [6] Guo Z. *et al.*: Coord. Chem. Rev. 251, 1951–1972 (2007).
- [7] Yu X.-Q. *et al.*: Bioorg. Med. Chem. 14, 6745–6751 (2006).
- [8] Yu X.-Q. *et al.*: Bioorg. Med. Chem. Lett. 21, 5866–5869 (2011).
- [9] Kulak N. *et al.*: Dalton Trans. 42, 4357–4360 (2013).
- [10] Suh J. *et al.*: J. Biol. Inorg. Chem. 13, 693–701 (2008).
- [11] Suh J. *et al.*: J. Biol. Inorg. Chem. 14, 151–157 (2009).
- [12] Suh J. *et al.*: Bull. Korean Chem. Soc. 29, 882–884 (2008).

#### Autoren

Chrischani Perera (MSc),  
Jan Hormann (MSc),  
Prof. Dr. Nora Kulak,  
Freie Universität Berlin

#### ► KONTAKT

Prof. Dr. Nora Kulak  
Institut für Chemie und Biochemie  
Freie Universität Berlin  
nora.kulak@fu-berlin.de