

DNA und Proteine schneiden – so geht es mit Metallkomplexen

Jan Hormann, Chrischani Perera, Nora Kulak

Spezialisierte Enzyme spalten im Körper Nucleinsäuren und Proteine. Doch im Labor gelingt dies auch kleinen Metallkomplexen – beispielsweise Verbindungen mit dem makrocyclischen Liganden Cyclen.

Solche DNA- und Protein-Scheren könnten etwa in der Molekularbiologie und für therapeutische Zwecke nützlich sein.



◆ Nucleasen und Proteasen spalten Phosphatester- bzw. Peptidbindungen hydrolytisch. Diese zu den Hydrolasen zählenden Enzyme übernehmen in unserem Körper viele Funktionen, werden aber auch im Labor eingesetzt – etwa die Restriktionsenzyme zur sequenzspezifischen DNA-Spaltung oder Trypsin für die Proteinanalytik. Eigens für solche Zwecke designte kleine Metallkomplexe wären jedoch stabiler sowie über größere Temperatur- und pH-Bereiche aktiv. Sie könnten zudem – je nach verwendetem Metallion – hydrolytisch oder oxidativ spalten und damit neue Anwendungen zulassen.

Bereits im Jahr 1986 wurde das erste künstliche Restriktionsenzym vorgestellt, in dem ein redoxaktiver Cu^{II} -Phenanthrolin-Komplex mit einem Oligonucleotid verknüpft war. Damit war es erstmals möglich, auf Basis eines einfachen Metallkomplexes – in Anlehnung an natürliche Vorbilder – DNA sequenzspezifisch zu spalten.¹⁾ Nach einer oxidativen Spaltung lassen sich die DNA-Bruchstücke allerdings nicht wieder zusammenfügen, was eine Anwendung in der Molekularbiologie und Gentechnik erschwert. Gerade aus diesem Grund ist hingegen ein Zugang zu DNA-zielgerichteten Chemotherapeutika denkbar.²⁾

Für Ligandensysteme von künstlichen DNA- und Proteinspaltern dienen neben aromatischen *N*-Heterocyclen wie Phenanthrolin bereits unterschiedliche Bausteine: von Aminosäuren über Hydrazone bis zu *N*- und *O*-Makrocyclen. Am eindrucksvollsten ist die Palette der Anwendungen für den makrocyclischen Liganden Cyclen (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan): Er ist neben seiner Bedeutung als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie in Form von Gd-DOTA (Gadoliniumkomplex der 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) vielfach Ausgangspunkt für die Synthese künstlicher Nucleasen und Proteasen.

DNA-Spaltung

◆ Künstliche Metallnucleasen spalten DNA nach einem hydrolytischen oder oxidativen Mechanismus. Bei der hydrolytischen Spaltung wird das Phosphatrückgrat der DNA über eine nukleophile Substitutionsreaktion durch metallgebundene Hydroxidionen gebrochen (Abbildung 1 links, S. 1004). Dagegen generiert der Metallkomplex bei der oxidativen Spaltung reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die eher die Zuckerketten und Basen der DNA schädigen

(Abbildung 1 rechts, S. 1004). Komplexe redoxinerter Übergangsmetalle wie Zn^{II} spalten gewöhnlich nach dem hydrolytischen Mechanismus, der hauptsächlich durch die Lewis-Acidität des Metalls bedingt ist.³⁾ Übergangsmetalle wie Cu^{II} und Fe^{III} werden aufgrund ihrer Redoxeigenschaften hingegen oft für oxidativ spaltende Komplexe genutzt.

Hydrolytisch spaltende künstliche Nucleasen könnten als Restriktionsagenzien in der Molekularbiologie eingesetzt und zur DNA-Sequenzierung genutzt werden.⁴⁾ Für medizinische Anwendungen relevant ist zudem die Entwicklung neuartiger Chemotherapeutika auf Basis oxidativ spaltender Nucleasen.

Eine Methode, um die Spaltaktivität eines Metallkomplexes zu un-

◆ QUERGELESEN

- » Künstliche Nucleasen und Proteasen bieten vielfältige potenzielle Anwendungen in Molekularbiologie und Medizin.
- » Metallkomplexe des makrocyclischen Liganden Cyclen haben zahlreiche Ansatzpunkte für Funktionalisierungen und eignen sich deshalb besonders gut für Optimierungen.
- » Neuere Ansätze verbinden künstliche Nucleasen und Proteasen mit Targeting- und Nanostrategien.

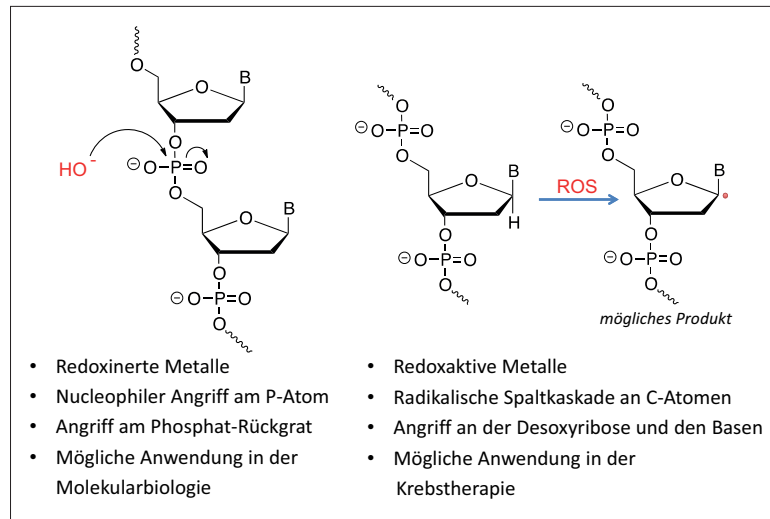


Abb. 1. Vergleich von hydrolytischer (links) und oxidativer (rechts) DNA-Spaltung.

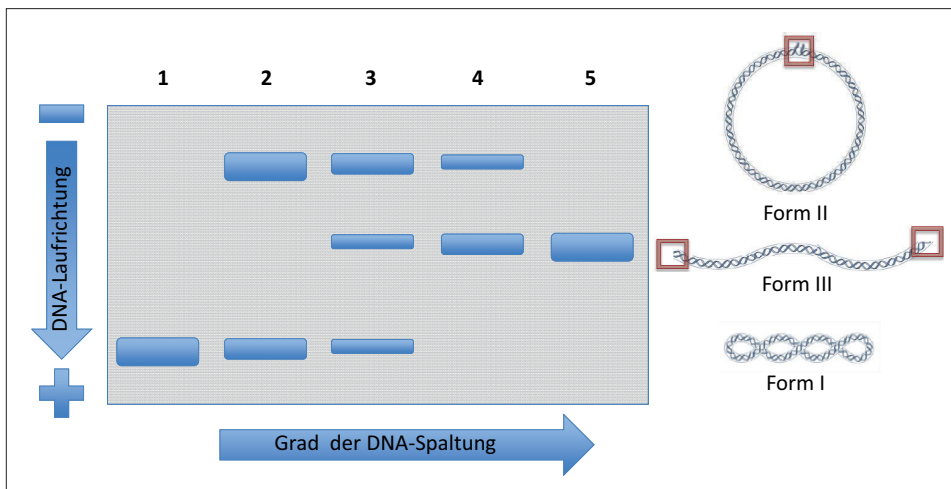


Abb. 2. Darstellung eines Agarosegels für die Spaltung von Plasmid-DNA.

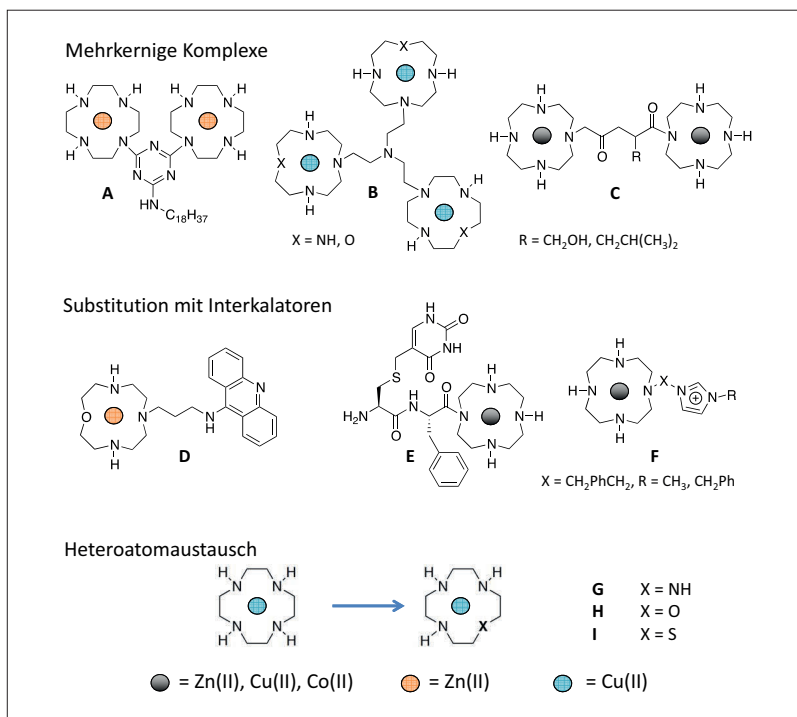


Abb. 3. Strategien für cyclenbasierte Metallonukleasen.

tersuchen, ist die Detektion von Plasmid-DNA und deren Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese.⁵⁾ Hierbei wird Plasmid-DNA zunächst mit dem zu untersuchenden Metallkomplex inkubiert und dann auf ein Gel aus Agarose geladen. Es wird detektiert, wie schnell die DNA durch das Agarosegel wandert, sobald eine Spannung anliegt. Die DNA-Fragmente lassen sich schließlich mit Ethidiumbromid sichtbar machen, das zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert und unter UV-Bestrahlung fluoresziert. Nicht geschnittene Plasmid-DNA liegt in der supercoiled Form I vor. Wird das Plasmid oxidativ oder hydrolytisch gespalten, so nimmt es die Form II an (in der Literatur sind auch die Bezeichnungen nicked, relaxed und open circular gebräuchlich). Ein weiterer Schnitt in räumlicher Nähe zum ersten Strangbruch führt zu Form III, der linearen DNA (Abbildung 2).

Es gibt verschiedene Konzepte, um ausgehend vom Cyclenliganden DNA-Spalter zu synthetisieren (Abbildung 3). Dabei wurden sowohl hydrolytisch spaltende Komplexe mit Zn^{II}- und Co^{II}-Zentren sowie oxidativ spaltende Cu^{II}-Komplexe hergestellt.⁶⁾ Eines dieser Konzepte versucht, die Aktivität der cyclenbasierten Metallkomplexe zu erhöhen, indem es analog zu den natürlich vorkommenden Nukleasen mehrkernige Systeme nutzt. So haben König et al. zweikernige Zn^{II}-Cyclen-Komplexe hergestellt (Abbildung 3 A), die aufgrund ihres amphiphilen Charakters in wässriger Lösung zu Micellenbildung neigen.^{6a)} Bencini et al. konzentrieren sich auf die Entwicklung von dreikernigen Cu^{II}-Cyclen- und Cu^{II}-Oxacyclen-Komplexen, welche die Hydrolyse von Bis-*p*-nitrophenylphosphatestern (Modellverbindungen für DNA) katalysieren (Abbildung 3 B). Bisher zeigte jedoch keiner dieser Komplexe große Aktivität bei der Spaltung von Plasmid-DNA.⁷⁾

Effizientere zweikernige DNA-Spalter entwickelten Fang et al. Sie

verbunden zwei Cyclenfunktionen über eine kurze Peptidkette. Die entsprechenden Metallkomplexe spalten Plasmid-DNA; als Erklärung wurden synergistische Effekte der katalytischen Zentren postuliert (Abbildung 3 C).^{6b)}

Ein weiterer Ansatz, um die Aktivität von DNA-Spaltern zu steigern, ist die Erhöhung ihrer Affinität zu DNA. Hierfür eignen sich DNA-Interkalatoren, die sich durch N-Funktionalisierung an das Cyclengerüst anbringen lassen. Acridinsubstituierte Zn^{II}-Cyclen-Komplexe binden aufgrund ihrer Wechselwirkung mit den Thyminbasen an DNA (Abbildung 3 D);⁸⁾ deren analoge Oxacyclenkomplexe können RNA-Modellverbindungen spalten.⁹⁾ RNA ist allerdings aufgrund ihrer geringeren Stabilität leichter zu spalten als DNA.²⁾

Die DNA-Affinität von cyclenbasierten Komplexen lässt sich zudem durch die Konjugation mit Nukleobasen (Abbildung 3 E)^{10a)} oder Peptidnukleinsäuren erhöhen, die durch Watson-Crick-Basenpaarung selektiv DNA-Bereiche erkennen.¹⁰⁾ Auch eine positive Ladung am Komplex erhöht die Affinität. So wurden Cyclen-Metallkomplexe mit einer Imidazoliumfunktion an einem der Stickstoffatome des Cyclens funktionalisiert (Abbildung 3 F). Diese Komplexe zeigten eine gute oxidative sowie hydrolytische DNA-Spaltaktivität, möglicherweise wegen elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den Phosphatgruppen und der Imidazoliumgruppe.^{6c)}

Wir untersuchten den sukzessiven Austausch der Stickstoffatome durch andere Heteroatome und ihren Einfluss auf die oxidative DNA-Spaltaktivität.¹¹⁾ Im Vergleich zu den erwähnten cyclenbasierten Systemen ließ sich die DNA-Spaltaktivität allein durch den Austausch eines der vier Donoratome steigern. Hierbei ist Cu^{II}-Oxacyclen (Abbildung 3 H) der effizienteste Komplex. Er übertrifft sein Schwefelanalogon, das Cu^{II}-Thiacyclen (Abbildung 3 I), um das Dreifache, die Stammverbindung Cu^{II}-Cyclen (Abbildung 3 G) je nach Konzentration sogar um das Zehnfache. Die hohe Aktivität der heterosubstituierten Cyclenkomplexe ist ein guter Ansatzpunkt für effizientere oxidative DNA-Spalter in der Medizin.

Proteinspaltung

◆ Proteine können Krankheiten auslösen oder an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sein. So gibt es viele virale und bakterielle Enzyme mit pathogener Wirkung sowie Proteine, die durch Fehlfaltung Krankheiten verursachen können. Bei Amyloidosen aggregieren Proteine durch Fehlfaltung im extrazellulären Raum und werden folglich nicht von der intrazellulären Proteinqualitätskontrolle erkannt.¹²⁾ Diese Aggregate können so Krankheiten wie Alzheimer-Demenz oder Diabetes mellitus Typ 2 auslösen. Solche fehlgefalteten Proteine durch synthetische Proteasen zu spalten, könnte die entsprechenden Symptome lindern oder die Krankheiten sogar heilen. →

 **SHIMADZU**
Excellence in Science



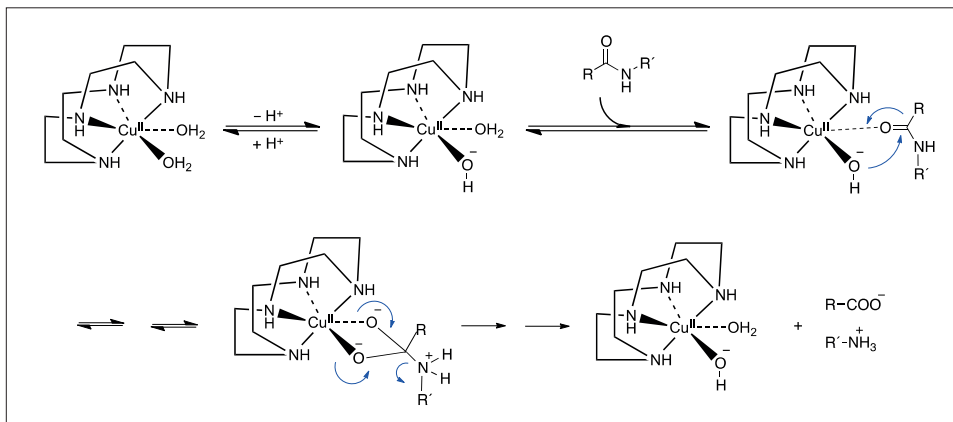
Pacesetter

Das GCMS-QP2010 Ultra setzt Maßstäbe hinsichtlich Geschwindigkeit, Empfindlichkeit und Zukunftssicherheit.

- Maximale Flexibilität: routinemäßiger Hochdurchsatz, F&E oder zweidimensionale Gas-Chromatographie
- Höchste Präzision bei 20.000 amu/s durch das patentierte Advanced Scanning Speed Protocol (ASSP)
- Spezielles Modell für die Qualitätskontrolle: das GCMS-QP2010 SE
- Software-integrierter Ecology-Modus schont Ressourcen und senkt Kosten

www.shimadzu.de



Abb. 4. Mechanismus der Proteinspaltung mit Cu^{II} -Cyclen.¹⁶⁾

Bei der Inhibierung pathogener Enzyme wird lediglich das aktive Zentrum blockiert. Beispiele sind die Phosphodiesterase-Inhibierung durch Sildenafil und Vardenafil¹³⁾ oder die Inhibierung von Xanthinhydrogenase durch Allopurinol.¹⁴⁾ Im Gegensatz dazu muss bei Proteinen ohne aktives Zentrum der Angriff dem gesamten Molekül gelten. Dabei soll das Protein in eine nichtpathogene Form überführt oder gespalten werden.

Die Proteaseaktivität der Cu^{II} -Komplexe des Cyclens und Oxacyclens (Abbildung 3G, H) sowie der analogen Co^{III} -Komplexe ist bereits seit einigen Jahren bekannt.¹⁵⁾ Die Proteaseaktivität der Oxacyclenkomplexe ist je nach Reaktionsbedingungen 4- bis 76-fach höher als die der entsprechenden Cyclenkomplexe.^{15c,d)}

Die Co^{III} -Komplexe haben gegenüber den Cu^{II} -Komplexen den Vorteil, dass sie austauschbar sind. Das Cu^{II} -Ion wird dagegen unter physiologischen Bedingungen leicht von biologischen Liganden komplexiert. Es ist zwar schwächer Lewisauer, kann jedoch das tetraedrische Intermediat, das als Übergangszustand beim Spaltmechanismus postuliert wird (Abbildung 4), besser stabilisieren.²⁾

Den vorgeschlagenen Mechanismus für die Peptidhydrolyse zeigt

Abbildung 4 exemplarisch für Cu^{II} -Cyclen.¹⁶⁾ Das Metallion polarisiert die Carbonylfunktion der Peptidbindung, daraufhin greift der am Metallion gebundene, aus Wasser entstandene Hydroxidligand nukleophil am Carbonylkohlenstoff an. Unter Spaltung der Peptidbindung entstehen ein Carboxylation und ein Amin; der Komplex bildet sich dabei zurück. Somit kann ein Molekül des Komplexes katalytisch viele Proteinmoleküle spalten – bei pharmazeutischer Anwendung hätte er also den Vorteil, gering dosierbar zu sein.

Die Spaltaktivität des Oxacyclens ist moderat und selbst bei einem pH-Wert von 9 und einer Temperatur von 50 °C sind lange Inkubationszeiten notwendig. Deswegen ist es für pharmazeutische Anwendungen unumgänglich, die katalytische Aktivität der Komplexe zu erhöhen. Modifikationen des Chelatliganden sind hier eine Option.

Schon eine lange Alkylkette im Cyclengrundgerüst (10, 12 oder 16 Kohlenstoffatome, Abbildung 6 A) steigert die Spaltaktivität gegenüber den Modellproteinen BSA (bovine serum albumin), Lysozym und Myoglobin signifikant. Damit lässt sich sogar die Spaltaktivität des Oxacyclens deutlich übertreffen, so dass schon nach wenigen Stunden eine Spaltung beobachtbar

ist.¹⁷⁾ Die Einführung der Alkylkette erlaubt vermutlich eine gezielte Annäherung an hydrophobe Regionen von Proteinen. Dynamische Lichtstreuexperimente mit wässrigen Lösungen der alkylierten Cyclene zeigten zudem, wie sich durch supramolekulare Aggregation Nanopartikel bildeten. Diese Partikelbildung könnte mit der dadurch lokal erhöhten Konzentration in Proteinnähe auch ein Grund für die hohe Spaltaktivität sein.

Die Proteaseaktivität ist mit der Natriumdodecylsulfat - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nachweisbar. Bei dieser Methode wandern Proteine entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld durch ein poröses Acrylamidgel. Der Intensitätsverlust der Proteinbande bei steigenden Komplexkonzentrationen und Inkubationszeiten weist dann auf die Spaltung des Proteins hin (Abbildung 5, am Beispiel von Abbildung 6 A, $n = 14$). Die entstandenen Proteinfragmente sind massenspektrometrisch nachweis- und identifizierbar.

Neben der Bildung von supramolekularen Aggregaten im Nanometerbereich kann die Immobilisierung des Proteinspalters die Proteaseaktivität steigern, etwa durch Verankerung an quervernetztem Polystyrol (Abbildung 6 B). So stieg die Proteaseaktivität von Cu^{II} -Cyclen signifikant.¹⁸⁾

Darüber hinaus steht vor allem das Targeting im Vordergrund: Um pathogene Peptide zu spalten, ermittelten Suh et al. mit kombinatorischen Ansätzen ein Cyclenderivat, das spezifisch menschliches Amylin (h-IAPP) spaltet (Abbildung 6 C).¹⁶⁾

Literatur

- 1) C.-H. B. Chen, D. S. Sigman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83, 7147.
- 2) S. I. Kirin, R. Krämer, N. Metzler-Nolte, in Concepts and Models in Bioinorganic Chemistry [Hrsg.: H.-B. Kraatz, N. Metzler-Nolte], Wiley-VCH, Weinheim, 2006, pp. 159–175.
- 3) N. H. Williams, B. Takasaki, M. Wall, J. Chin, Acc. Chem. Res. 1999, 32, 485.
- 4) F. Mancini, P. Scrimin, P. Tecilla, Chem. Commun. 2012, 48, 5545.

Abb. 5. SDS-PAGE, Spaltung von Myoglobin durch 0,5 mM Co^{III} -1-Hexadecyl-Cyclen. 0 – 8 h Inkubation bei 50 °C und pH 9 (Tris/HCl-Puffer, 50 mM). M = Marker.

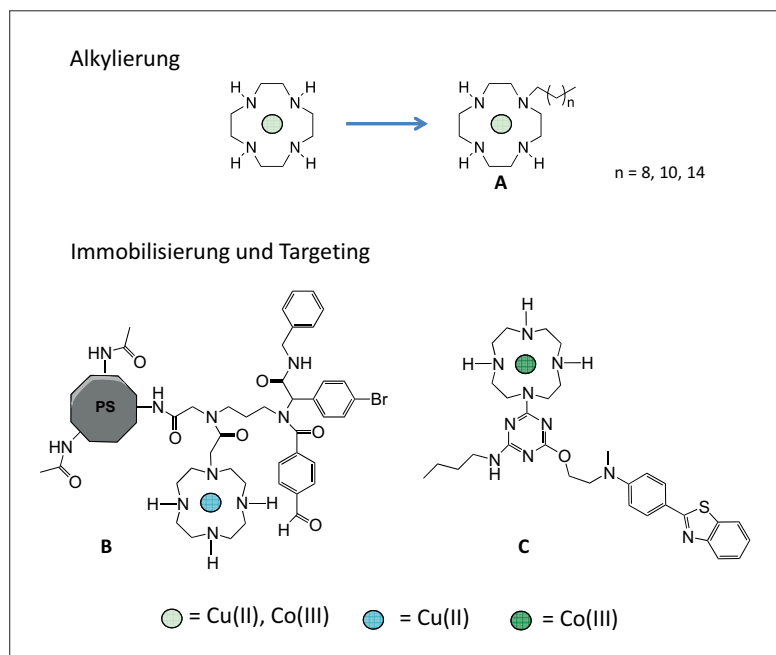


Abb. 6. Steigerung der Proteinspaltaktivität durch Derivatisierung.

- 5) J. C. Dabrowiak, *Metals in Medicine*, John Wiley & Sons, New York, 2009, pp. 94–95.
- 6) a) B. Gruber, E. Kataev, J. Aschenbrenner, S. Stadlbauer, B. König, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 20704;
 b) Y.-G. Fang, J. Zhang, S.-Y. Chen, N. Jiang, H.-H. Lin, Y. Zhang, X.-Q. Yu, *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 696;
 c) Q.-L. Li, J. Huang, Q. Wang, N. Jiang, C.-Q. Xia, H.-H. Lin, J. Wu, X.-Q. Yu, *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 4151;
 d) M. Subat, K. Woinaroschy, C. Gerstl, B. Sarkar, W. Kaim, B. König, *Inorg. Chem.* 2008, 47, 4661.
- 7) A. Bencini, E. Berni, A. Bianchi, C. Giorgi, B. Valtancoli, D. Kumar Chand, H.-J. Schneider, *Dalton Trans.* 2003, 793.
- 8) E. Kikuta, M. Murata, N. Katsube, T. Koike, E. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 5426.
- 9) C. S. Rossiter, R. A. Mathews, J. R. Morrow, *J. Inorg. Biochem.* 2007, 101, 925.
- 10) a) X.-Y. Wang, J. Zhang, K. Li, N. Jiang, S.-Y. Chen, H.-H. Lin, Y. Huang, L.-J. Ma, X.-Q. Yu, *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 6745;
 b) Y. Zhang, Y. Huang, J. Zhang, D. Zhang, J. Liu, Q. Liu, H. Lin, X. Yu, *Sci. China Chem.* 2011, 54, 129.
- 11) J. Hormann, C. Perera, N. Deibel, D. Lentz, B. Sarkar, N. Kulak, *Dalton Trans.* 2013, 42, 4357.
- 12) F. E. Cohen, J. W. Kelly, *Nature* 2003, 426, 905.
- 13) B.-J. Sung, K. Y. Hwang, Y. H. Jeon, J. I. Lee, Y.-S. Heo, J. H. Kim, J. Moon, J. M. Yoon, Y.-L. Hyun, E. Kim, S. J. Eum, S.-Y. Park, J.-O. Lee, T. G. Lee, S. Ro, J. M. Cho, *Nature* 2003, 425, 98.
- 14) J. J. Truglio, K. Theis, S. Leimkühler, R. Rappa, K. V. Rajagopalan, C. Kisker, *Structure* 2002, 10, 115.
- 15) a) B.-B. Jang, K.-P. Lee, D.-H. Min, J. Suh, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 12008;
 b) B. Jang, J. Suh, *Bull. Korean Chem. Soc.* 2008, 29, 202;
 c) H. M. Kim, B. Jang, Y. E. Cheon, M. P. Suh, J. Suh, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2009, 14, 151;
 d) S. W. Jang, J. Suh, *Org. Lett.* 2008, 10, 481.
- 16) W. S. Chei, H. Ju, J. Suh, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2011, 16, 511.
- 17) C. Perera, J. Hormann, C. Weise, S. Wedepohl, J. Dornedde, N. Kulak, *unveröffentlicht.*
- 18) M. G. Kim, S. H. Yoo, W. S. Chei, T. Y. Lee, H. M. Kim, J. Suh, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2010, 15, 1023.

Nora Kulak, Jahrgang 1979,

ist seit dem Jahr 2011 Juniorprofessorin an der Freien Universität Berlin. Ihre Forschungsinteressen liegen in der bioanorganischen Chemie und insbesondere in der Synthese von Metallkomplexen und deren Bio-konjugaten für potenzielle therapeutische und diagnostische Anwendungen.

nora.kulak@fu-berlin.de

Jan Hormann, Jahrgang 1986,

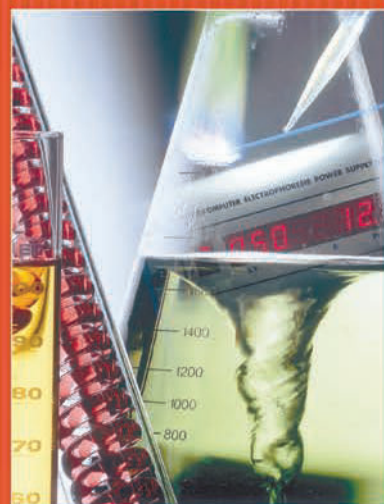
ist seit Oktober 2012 Doktorand in der Arbeitsgruppe Kulak. Schwerpunkt seiner Forschung ist die Entwicklung von cyclen- und pyrrolbasierten Metallkomplexen zur DNA-Spaltung.

Chrischani Perera, Jahrgang 1986,

promoviert seit August 2012 in der Arbeitsgruppe Kulak. Sie arbeitet an der Synthese von Komplexen neuartiger Cyclen-Derivate als Proteasemimetika.



Sie brauchen
dringend
Pipettenspitzen?



Wir liefern sie
**von heute
auf morgen**

... und weitere
19 999 Artikel.



0800/5699 000 gebührenfrei

www.carlroth.de
mit Neuheiten & Sonderangeboten

Laborbedarf - Life Science - Chemikalien

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 - 76185 Karlsruhe
Tel: 0721/5606 0 - Fax: 0721/5606 149
info@carlroth.de - www.carlroth.de

