

1 Einleitung

1.1 Natürliche und künstliche Nucleasen

Natürliche Nucleasen sind Enzyme, die Nucleinsäuren wie DNA und RNA hydrolytisch spalten. Es handelt sich hierbei oft um Metalloproteine, die in den aktiven Zentren Zn^{2+} - oder Mg^{2+} -Ionen enthalten. In der letzten Zeit hat die Entwicklung künstlicher Nucleasen an Bedeutung gewonnen, da man sich von ihnen zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin und der Biotechnologie verspricht.

1.1.1 Aufbau der Nucleinsäuren DNA und RNA

Die DNA ist ein unverzweigtes Polymer, das aus Nucleotiden aufgebaut ist. Die Nucleotide selbst bestehen aus einer Purin- oder Pyrimidinbase, einer Phosphatgruppe und aus einem Zucker - bei der DNA handelt es sich hierbei um 2'-Desoxyribose. Die Zucker- und Phosphatgruppen erfüllen eine strukturelle Aufgabe, sie bilden das Rückgrat der DNA. Dabei ist die 3'-Hydroxygruppe jedes Zuckers über eine Phosphodiesterbrücke mit der 5'-Hydroxylgruppe der nächsten Zuckereinheit verbunden. Die Basen tragen die genetische Information, in der DNA liegen die Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) sowie die Pyrimidinbasen Thymin (T) und Cytosin (C) vor.

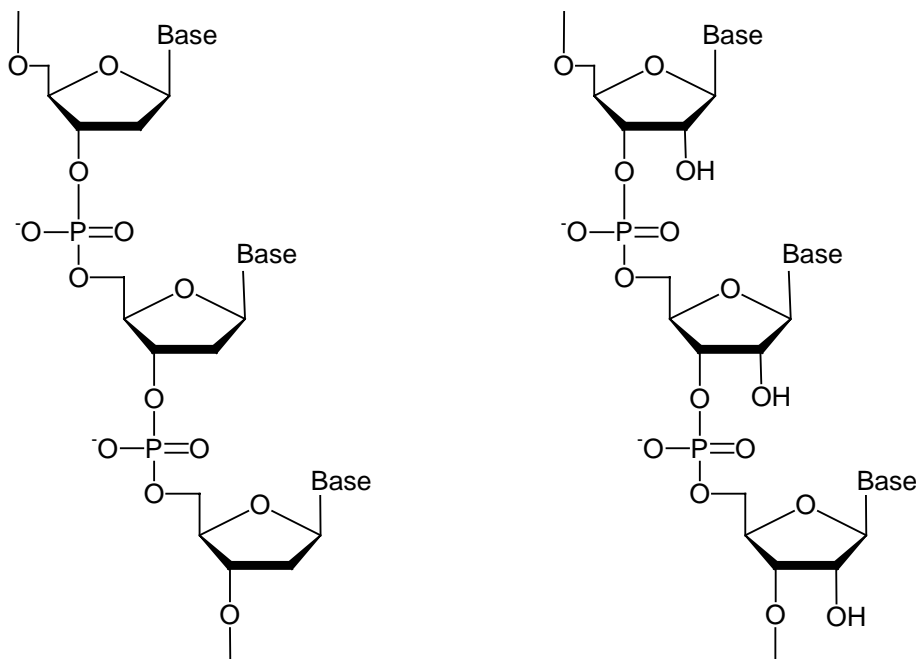


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines kurzen Stückes aus der DNA (links) bzw. RNA (rechts)

Die RNA besteht ebenfalls aus Nucleotiden, die durch Phosphodiesterbrücken in 3'-5'-Richtung verknüpft sind. Als Zuckereinheit dient hierbei jedoch die Ribose, die im Gegensatz zur Desoxyribose eine zusätzliche 2'-Hydroxygruppe enthält. Ein weiterer Unterschied zur DNA besteht darin, daß an Stelle des Thymins die Pyrimidinbase Uracil verwendet wird.^[1]

Die Phosphodiesterbindung ist viel stabiler gegenüber einer hydrolytischen Spaltung als beispielsweise Amid- oder Esterbindungen. Die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung für die basenkatalysierte Hydrolyse betragen bei 25 °C $6,8 \times 10^{-12}$, 5×10^{-6} bzw. $1,5 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.^[2] Bei physiologischem pH-Wert liegt der Phosphorsäurediester außerdem als Anion vor, dadurch ist er für einen nucleophilen Angriff schwer zugänglich.^[3] Aufgrund dieser hohen Stabilität eignen sich die Phosphodiesterbindungen besonders zur Speicherung der genetischen Information.

1.1.2 Die Rolle von Metallionen in Enzymen

Metallionen übernehmen in Enzymen sowohl strukturelle als auch funktionelle Aufgaben.

Als strukturelle Metalle bestimmen sie die Faltung des Proteins und damit die Struktur des Enzyms. Ein bekanntes Beispiel hierfür sind die sogenannten „Zinkfinger“.^[4]

Funktionelle Metallionen können mehrere Aufgaben übernehmen. So sind redoxaktive Metallionen am Transport und der Speicherung von Elektronen beteiligt.

In Enzymen, die Hydrolysereaktionen katalysieren, binden und aktivieren Metallionen die Reaktanden, stabilisieren den Übergangszustand und die Abgangsgruppe und führen so zu einer starken Beschleunigung der Reaktion. Hierfür sind besonders Zn^{2+} -Ionen geeignet, die nicht redoxaktiv sind und über eine hohe Lewissäure-Aktivität verfügen. Der pK_s -Wert von Wassermolekülen kann durch Koordination an Zn^{2+} auf bis zu 6 gesenkt werden^[4]. Dadurch werden bei neutralem pH-Wert Hydroxidionen als nucleophile Reaktionspartner zur Verfügung gestellt.

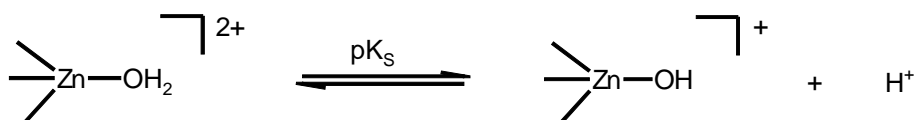


Abb. 1.2: Aktivierung von Wasser durch Zn^{2+}

1.1.3 Allosterische Effekte

Ein wesentlicher Mechanismus zur Steuerung von Enzymaktivitäten ist die sogenannte allosterische Regulation.

Mit Allosterie bezeichnet man dabei die Tatsache, daß die Konformation des aktiven Zentrums und damit die katalytische Aktivität von Enzymen durch Wechselwirkung mit Drittsubstanzen an einem sogenannten allosterischen Zentrum reversibel verändert werden kann. Dabei kann die Reaktion z. B. durch Bindung eines Metallions oder eines Produktes der Reaktion sowohl verlangsamt als auch beschleunigt werden.

Ein Beispiel für die allosterische Hemmung durch ein Endprodukt ist das Enzym Phosphofruktokinase, welches eine Funktion bei der Regulation der Glykolyse hat. Durch ATP, das bei der Reaktion entsteht, wird das Enzym inhibiert und so die Reaktion unterbunden. Dieser Vorgang ist reversibel, wenn ATP verbraucht wird, wird die Inhibierung aufgehoben und die Reaktion kann wieder ablaufen.^[1,5]

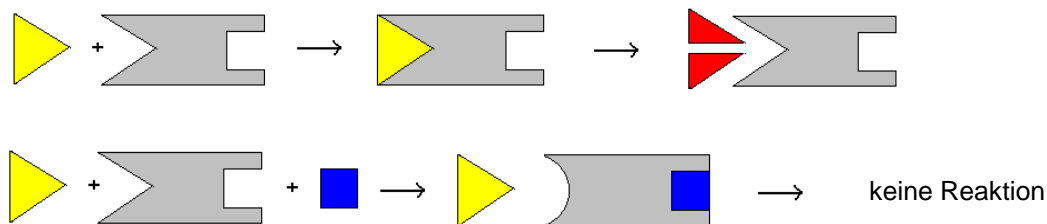


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der allosterischen Inhibierung; oben: Reaktion ohne Inhibitor, unten: mit Inhibitor. (Enzym – grau, Edukt – gelb, Inhibitor – blau, Produkte – rot)

Bei manchen Enzymen ist die Reaktionsgeschwindigkeit von der Anwesenheit eines nicht direkt an der Reaktion beteiligten allosterischen Effektors abhängig, ohne diesen wird das Substrat nicht oder nur sehr langsam umgesetzt.

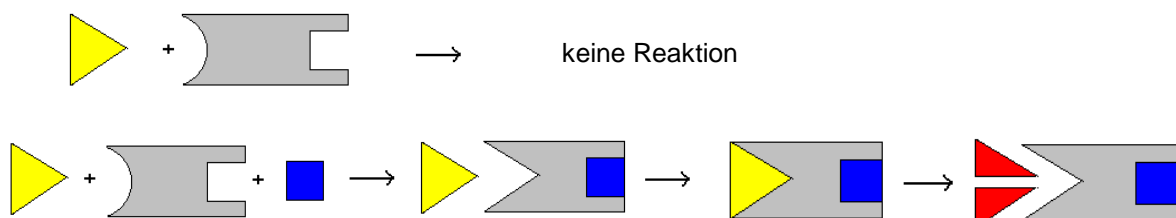


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der allosterischen Aktivierung; oben: Reaktion ohne Aktivator, unten: mit Aktivator. (Enzym – grau, Edukt – gelb, Aktivator – blau, Produkte – rot)

Die Alkalische Phosphatase ist ein Beispiel für ein Enzym, das ohne die Bindung eines Mg^{2+} als strukturelles Metallion inaktiv ist. (s. Kapitel 1.1.4).^[6]

1.1.4 Beispiele für natürliche Nucleasen und andere Phosphoesterasen

Im aktiven Zentrum der meisten natürlichen Nucleasen befinden sich Metallionen, besonders häufig Zn^{2+} . So liegen in den Nucleasen P1 und S1 sowie in der Phospholipase C jeweils drei Zn^{2+} -Ionen vor, in der Alkalischen Phosphatase sind zwei Zn^{2+} und ein Mg^{2+} -Ion enthalten.

Durch die Alkalische Phosphatase werden Phosphomonoester im leicht alkalischen Bereich (pH 8) gespalten. Das Substrat wird dabei an die beiden funktionellen Zn^{2+} -Ionen gebunden und so aktiviert. Durch den Angriff eines Serin-Alkoholat-Nucleophils kommt es zur Bildung eines Phosphoseryl-Intermediates, dieses wird anschließend durch ein metallkoordiniertes Wassermolekül hydrolysiert.^[7,8] Das Mg^{2+} -Ion nimmt nicht direkt an der Reaktion teil, wirkt aber als starker allosterischer Aktivator. Durch Austausch gegen andere zweiwertige Metallionen wird die Aktivität des Enzyms verringert oder völlig gehemmt.^[6]

Die DNA-Polymerase I aus *Escherichia coli* katalysiert die Synthese von DNA. Sie enthält außerdem mit dem sogenannten *Klenow*-Fragment eine 3'-5'-Exonuclease, die fehlerhaft eingebaute Nucleotide durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung wieder entfernt. Diese Reparaturfunktion ist allerdings auf Nucleotide beschränkt, die ein freies 3'-OH-Ende besitzen und nicht Bestandteil einer Doppelhelix sind.^[1,9]

Im aktiven Zentrum des *Klenow*-Fragments befinden sich zwei Metallionen. Hierbei handelt es sich *in vivo* wahrscheinlich um Zn^{2+} und Mg^{2+} , aber auch mit anderen zweiwertigen Metallionen wie Mn^{2+} oder Co^{2+} läuft die Nucleasereaktion ab.

In dem für die Hydrolysereaktion vorgeschlagenen Übergangszustand verbrückt ein nicht verestertes Sauerstoffatom der Phosphatgruppe die beiden Metallionen. Der nucleophile Angriff erfolgt durch ein metallkoordiniertes Wasser- oder Hydroxidmolekül.

Das Hydroxidion wird dabei durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Aminosäureseitenketten des Enzyms stabilisiert und in eine für die Reaktion günstige Position gebracht.^[9]

Bei der Nuclease P1 aus *Penicillium citrinum* handelt es sich um eine Phosphodiesterase, die die Bindung zwischen 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatgruppe unter Inversion der Konfiguration am Phosphoratom spaltet. Bevorzugt werden dabei Phosphodiesterbindungen in einzel-strängiger DNA und RNA hydrolysiert. Die Nuclease P1 ist auch eine Phosphomonoesterase, die die 3'-terminale Phosphatgruppe eines Nucleotids abspaltet, so daß als endgültige Hydrolyseprodukte 5'-Mononucleotide entstehen.^[9]

Die drei Zinkionen im aktiven Zentrum sind jeweils trigonal-bipyramidal von drei Sauerstoff- und zwei Stickstoff-Liganden umgeben (Abb. 1.5).^[9,10]

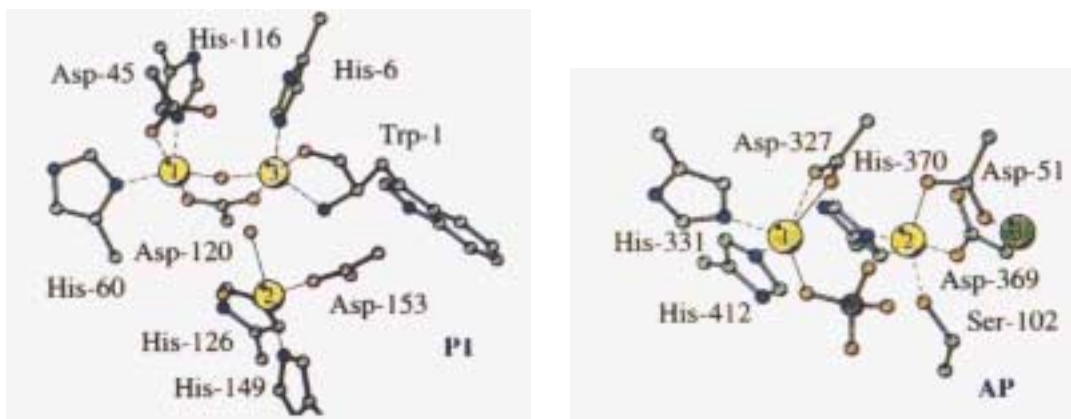


Abb. 1.5: Aktives Zentrum der Nuclease P1 (links)^[9,10] und der alkalischen Phosphatase^[8,9]
gelb: Zn^{2+} , grün: Mg^{2+} , grau: Kohlenstoffatome, rot: Sauerstoffatome, blau: Stickstoffatome

Es wurde ein Hydrolysemechanismus vorgeschlagen, bei dem ein nucleophiler Angriff eines Wassermoleküls erfolgt, das Zn1 und Zn3 verbrückt. Durch Zn2 wird der Übergangszustand stabilisiert bzw. die Abgangsgruppe aktiviert.

Die Nuclease S1 aus *Aspergillus oryzae* besitzt eine ähnliche Struktur wie die Nuclease P1. Sie enthält ebenfalls drei Zn^{2+} -Ionen im aktiven Zentrum, und die Hydrolyse erfolgt wie bei P1 unter Inversion der Konfiguration am Phosphoratom. Vermutlich verläuft die Reaktion mit diesen beiden Nucleasen nach einem ähnlichen Mechanismus.^[8]

Die Phosphodiesterbindungen in der DNA und RNA können nicht nur durch Metallionen Lewisäure-aktiviert werden, sondern auch durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu Aminoäureseitenketten der Enzyme. So erfolgt in der Nuclease S1 eine zusätzliche Aktivierung des Substrats durch das Zusammenwirken einer Lysin-Ammoniumgruppe mit $Zn(II)$.^[11]

1.2 Spaltung von DNA und DNA-Modellverbindungen durch Metallkomplexe

1.2.1 Spaltung von aktivierten Phosphodiestern durch Metallkomplexe

Es gibt eine Reihe von Untersuchungen zur Hydrolyse des DNA-Analogons Bis-*p*-nitrophenylphosphat (BNPP) durch Metallkomplexe. BNPP verfügt mit *p*-Nitrophenolat über eine gute Abgangsgruppe, die sich leicht durch die UV-Absorption bei 320 nm bzw. bei 400 nm detektieren läßt, so daß die Hydrolysereaktion einfach verfolgt werden kann (s. auch Kapitel 3.1).

Die Spaltungsgeschwindigkeit von BNPP kann durch Übergangsmetall-Komplexe, vor allem von Cu^{2+} [12-17], Zn^{2+} [18-20] und Co^{3+} [21-24], stark gesteigert werden. Besonders Co^{3+} -Verbindungen zeigen hohe Aktivitäten, durch sie kann die Reaktion bei pH 7 und 50°C bis zu 10^{10} -fach beschleunigt werden.^[21] Auch nicht-aktivierte Phosphodiester wie Dimethylphosphat werden durch Cobalt(III)-Komplexe gespalten.^[2]

Eine weitere Gruppe von Metallionen, die die Reaktionsgeschwindigkeit der Phosphodiesterhydrolyse erhöhen kann, sind die Lanthanoid-Ionen. Schon seit 1938 ist bekannt, daß die Spaltung von Phosphorsäureestern in Gegenwart von Lanthanhydroxid deutlich schneller abläuft als die unkatalysierte Reaktion.^[25] La(III), Pr(III), Nd(III) und Eu(III) beschleunigen die Spaltung von BNPP bei pH 7 und 25°C um das 10^4 - bis 10^6 -fache.^[26-34] Durch Zugabe von H_2O_2 zu La(III)-Lösungen kann die Aktivität bis zu 10^9 -fach gesteigert werden. Es bildet sich dabei $[\text{La}(\text{O}-\text{O})_2\text{La}]^{2+}$, der Phosphodiester kann an beide Metallionen gleichzeitig koordinieren. Durch diese doppelt Lewis-saure Aktivierung und durch die Beteiligung des Peroxidions als nucleophilem Reaktionpartner wird die Reaktion stark beschleunigt.^[35]

Die bisher größte Aktivität gegenüber BNPP wurde mit Ce(IV) in mizellaren Lösungen beschrieben. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde dabei bei pH 7 und 37°C bis zu 2×10^9 -fach erhöht.^[36]

Erst seit kurzem ist bekannt, daß Zirkonium(IV)-Ionen und -Komplexe die Spaltung von BNPP stark beschleunigen können.^[37-40] So wird mit ZrCl_4 bei pH 5 und 20°C eine Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit um Faktor 5×10^8 erreicht.^[37]

Betrachtet man die pH-Abhängigkeit der Hydrolysereaktion, so deuten die experimentellen Befunde darauf hin, daß bei der hydrolytischen Spaltung ein nucleophiler Angriff durch ein metallgebundenes Hydroxidion erfolgt, da die Reaktionsgeschwindigkeit am höchsten ist, wenn der pH-Wert im Bereich des pKs-Wertes für ein am Metallion koordiniertes Wassermolekül liegt.

Bei sehr hohen pH-Werten geht die Reaktivität aufgrund der Bildung von inaktiven, hydroxyverbrückten Komplexen wieder zurück.

Auch die Koordinationsgeometrie des Metallions hat einen Einfluß auf die Hydrolysegeschwindigkeit, wobei die Reaktion durch zwei cis-orientierte Koordinationsstellen stark beschleunigt wird.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Mechanismus mit metallkoordinierter, pentagonal-bipyramidaler Phosphoran-Zwischenstufe vorgeschlagen.^[41]

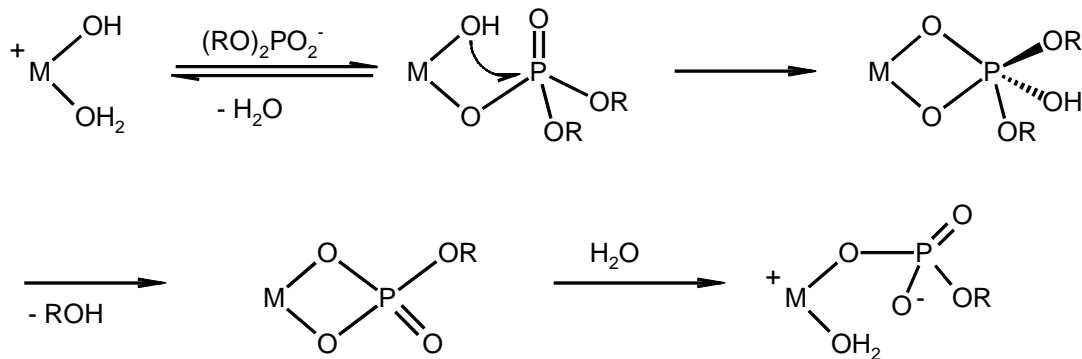


Abb. 1.6: Mechanismus der Phosphodiesterhydrolyse an einkernigen Metallkomplexen

Durch das Metallion werden folgende Aufgaben übernommen:

1. Ein metallkoordiniertes Hydroxidion wird als nucleophiler Reaktionspartner zur Verfügung gestellt.
2. Die Reaktionspartner werden durch zwei cis-ständige Koordinationsstellen in eine günstige Position zueinander gebracht.
3. Der Phosphatester wird durch die Lewis-saure Wirkung des Metallions aktiviert.
4. Die Phosphoran-Zwischenstufe wird stabilisiert.

Da in natürlichen Enzymen, die Phosphodiester hydrolysieren, häufig zwei Metallionen vorliegen, wurden auch die Aktivität zweikerniger Metallkomplexe von Co³⁺ und Zn²⁺ untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Spaltung durch den zweikernigen Komplex deutlich schneller ist als die durch den entsprechenden einkernigen, wenn der Phosphodiester an beide Metallionen koordiniert. Dadurch wird das Substrat stark aktiviert.^[42-45]

1.2.2 Hydrolyse von DNA-Dinucleotiden und von DNA

Mit Ce(IV), das für die Phosphodiesterhydrolyse am aktivsten ist, wurden mehrere Studien zur Spaltung von DNA-Dinucleotiden durchgeführt. Als Substrat wurde hierbei meist Thymidylyl(3'-5')thymidin (TpT)^[46,47], aber auch andere Dinucleotide wie dApdA^[48] verwendet.

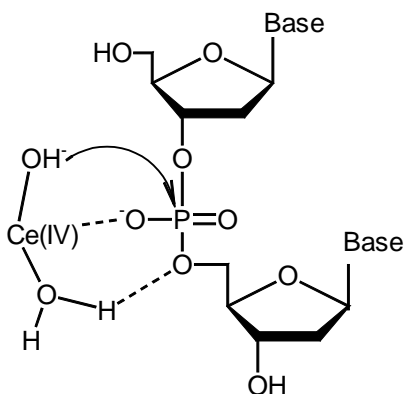


Abb. 1.7: Vorgeschlagener Mechanismus der Spaltung von DNA-Dinucleotiden durch Ce(IV)^[47]

Die Hydrolyse der DNA-Dinucleotide durch Ce(IV)-Hydroxid-Gele ist nicht pH-abhängig, die Spaltungsgeschwindigkeit wird bei pH 7 und 50°C bis zu 10¹¹-fach erhöht. Unter diesen Bedingungen wird die Reaktion durch andere Lanthanoidionen, sowie durch ZrCl₄ und HfCl₄ nur sehr wenig beschleunigt.^[46,47]

Durch die Zugabe von Pr(III) oder Nd(III) zu den Ce(IV)-Lösungen kann die Hydrolysegeschwindigkeit von TpT noch zusätzlich gesteigert werden^[49].

In diesen Untersuchungen liegen bei pH 7 heterogene Cer-Hydroxid-Gele vor. Die ersten homogenen Lösungen mit Ce(IV) bei neutralem pH-Wert wurden mit Glucamin als Ligand erhalten. Dieser Ce(IV)-Komplex beschleunigt die Hydrolyse von TpT ebenfalls, k_{obs} beträgt $1,4 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ bei pH 7 und 50°C^[50], das entspricht einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit um Faktor 10¹⁰. Durch den Ce(IV)-Komplex von EDTA kann das Oligonucleotid T₁₂ bei pH 7 und 50°C gespalten werden, gegenüber TpT ist der Komplex jedoch inaktiv.^[51]

Durch Eu³⁺ wird TpT bei 70°C nur sehr langsam gespalten.^[52] Im Gegensatz dazu zeigen Zr(IV)-Ionen und -Komplexe eine mit Ce(IV)-Verbindungen vergleichbare Aktivität, z.B. beschleunigt der Komplex aus ZrCl₄ und TRIS bei pH 7 und 37°C die Spaltung von TpT um Faktor 10⁹.^[37]

Die Hydrolyse von einzelsträngigen DNA-Oligomeren durch Ce(IV) zeigte, daß die Spaltung nicht sequenzspezifisch ist.^[47,53] Es wurden jedoch auch schon erfolgreiche Versuche zur sequenzspezifischen Hydrolyse größerer DNA-Abschnitte durch Ce(IV)-antisense-Oligonucleotid-Konjugate durchgeführt.^[54]

„Supercoiled“ Plasmid-DNA ist durch intrinsische Spannung aktiviert und kann durch Übergangsmetall-^[55-59] und Lanthanoid-Ionen^[27,60-62] gespalten werden. Durch die Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung entsteht dabei eine entspannte, cyclische Form der DNA. Besonders effektiv für diese Reaktion sind Co(III)- und Ce(IV)-Komplexe. Ein weiterer Abbau zu linearer DNA und zu kürzeren DNA-Fragmenten findet nur mit den Ce(IV)-^[61,62] und mit einigen Cu(II)-Verbindungen^[58,59] statt.

1.2.3 Spaltung von 2-Hydroxypropyl-*p*-nitrophenylphosphat (HPNP) und Diribonucleotiden durch Metallkomplexe

Bei der Spaltung der RNA läuft ein anderer Mechanismus ab als bei der Hydrolyse der DNA. Die 2'-Hydroxygruppe des Riboserings greift dabei intramolekular am Phosphat an, es kommt somit zu einer Umesterung und zur Bildung eines cyclischen Phosphodiesters. Dieser wird im zweiten Schritt der Reaktion zum 2'- und 3'-Monophosphat hydrolysiert.^[3]

Als Modellsubstrat für die RNA wird häufig 2-Hydroxypropyl-*p*-nitrophenylphosphat (HPNP) verwendet, das ebenfalls eine 2-Hydroxygruppe enthält. Diese dient beim intramolekularen Angriff als Nucleophil. Unter Abspaltung von *p*-Nitrophenol bildet sich ein cyclischer Phosphodiester, der zu den Monoestern weiterreagieren kann.^[63]

Weitere mögliche Substrate zur Untersuchung der RNA-Spaltung sind Diribonucleotide wie ApA (Adenylyl(3',5')adenosin), ApUp (Adenylyl(3',5')uridin-3'-monophosphat) oder UpU (Uridinyl(3'-5')uridin). Im ersten Schritt der Reaktion entsteht das jeweilige cyclische Monophosphat (2',3'-cAMP bzw. 2'3'-cUMP) und Adenosin bzw. Uridin. Die Hydrolysereaktion läuft nach dem für RNA vorgeschlagenen Umesterungsmechanismus ab.

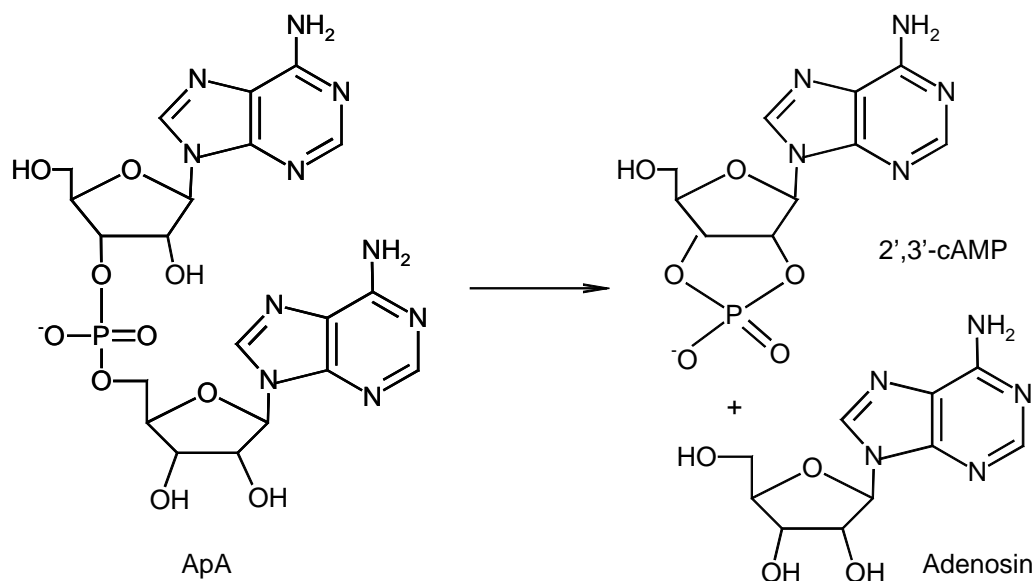


Abb. 1.8: Erster Schritt der Hydrolyse von ApA

Um die Beschleunigung der Hydrolysereaktion durch Metallionen zu untersuchen, wurden ein- und zweikernige Komplexe mit Zn^{2+} [63-68], Co^{3+} [63,69], Cu^{2+} [63,70-74] und Ln^{3+} [63,65,75-79] verwendet. Dabei zeigten die Lanthanoidverbindungen die größte Aktivität.

Die experimentellen Befunde lassen sich so deuten, daß das Metallion in der Reaktion zwei Aufgaben erfüllt. Einerseits erfolgt eine Lewis-saure Aktivierung des Phosphatesters durch die Bindung an das Metallion. Außerdem kann die 2-Hydroxygruppe von HPNP durch ein metallkoordiniertes Hydroxid deprotoniert werden, wodurch der intramolekulare, nucleophile Angriff vereinfacht wird.

Ein weiterer Aspekt bei nicht-aktivierten Substraten wie im Fall der RNA ist die Stabilisierung der Abgangsgruppe durch eine Protonierung durch metallkoordiniertes Wasser. Dadurch wird die Abspaltung des Produktes unterstützt und die Reaktion zusätzlich beschleunigt. [68,80,81]

Es zeigte sich außerdem, daß HPNP und Diribonucleotide durch zweikernige Metallkomplexe schneller gespalten werden, wenn der Phosphodiester an beide Metallionen gebunden wird. Dies führt zu einer doppelt Lewis-sauren Aktivierung, durch die ein nucleophiler Angriff der 2- bzw. 2'-Hydroxygruppe erleichtert wird.

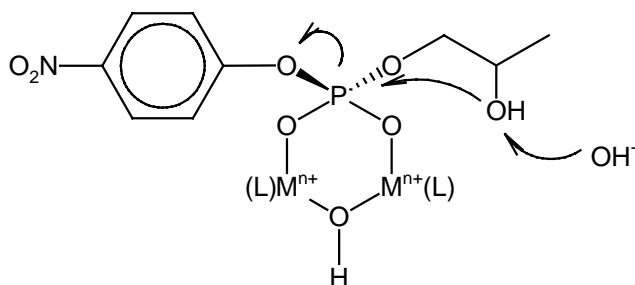


Abb. 1.9: Postulierter Mechanismus für die Spaltung von HPNP durch zweikernige Metallkomplexe

Auch die Hydrolyse von 2',3'-cAMP bzw. 2',3'-cUMP, der Zwischenprodukte der RNA-Spaltung, wurde kinetisch untersucht. Hierfür wurden häufig Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Verbindungen eingesetzt.^[82-86] Die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung sind ca. 1000 mal so hoch wie die der Dinucleotidspaltung durch den jeweiligen Metallkomplex.

1.3 Anwendung künstlicher Nucleasen

In der Medizin und in der Biotechnologie gibt es zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten für künstliche Restriktionsenzyme. So erwartet man durch die Verwendung sogenannter antisense-Verbindungen, durch die pathogene messenger-RNA selektiv zerstört werden soll, neue Möglichkeiten in der Bekämpfung von Viruserkrankungen oder Krebs. Durch die Unterdrückung der Genexpression auf DNA-Ebene könnten solche Krankheiten noch effektiver bekämpft werden.

Durch Kombination von synthetischen antisense-Oligonucleotiden mit einer DNA-spaltenden Komponente werden künstliche Restriktionsenzyme zugänglich. Die Oligonucleotide können mit der gewünschten Basensequenz hergestellt werden und binden durch Watson-Crick-Basenpaarung an bestimmte, komplementäre Abschnitte der DNA.

Dabei können auch Biokonjugate von PNA-Oligonucleotiden mit hydrolytisch aktiven Verbindungen eingesetzt werden. Peptidnucleinsäuren (PNAs) unterscheiden sich von DNA durch Ersatz des Phosphat-Zucker-Rückgrats durch eine auf N-Aminoethylglycineinheiten basierende Polyamidstruktur, mit der DNA haben sie nur noch die Nucleobasen gemeinsam (Abb.1.10).^[87-89]

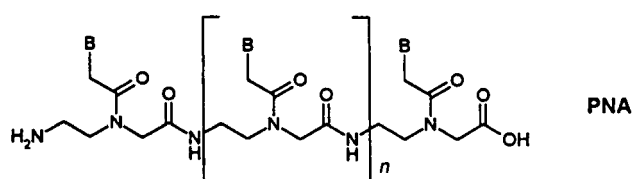


Abb. 1.10: Aufbau von PNA

Da es sich bei PNAs um ungeladene Moleküle handelt, binden sie stärker an komplementäre Nucleinsäuren als die entsprechende DNA, da es zu keiner elektrostatischen Abstoßung kommt. Dabei ist die Tendenz zur Ausbildung von tripelhelicalen Strukturen sehr hoch. Häufig kommt es auch zu einer Strangverdrängung in doppelsträngiger DNA (Abb.1.11).

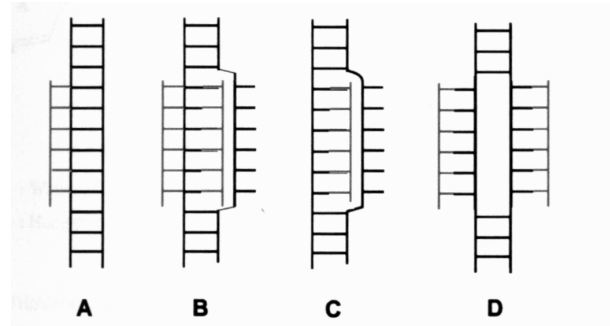


Abb. 1.11: Verschiedene Bindungsmöglichkeiten zwischen PNA und DNA, A: Triplexbildung, B: Triplex-Invasion, C: Duplex-Invasion, D: Doppelduplex-Invasion.

Erst kürzlich wurde die sequenz-spezifische Spaltung von RNA durch ein Diethylentriamin (DETA)-PNA-Konjugat beschrieben.^[90]

Für die Verwendung von Konjugaten aus antisense-DNA-Oligonucleotiden und Metallkomplexen für die Hydrolyse von RNA gibt einige Beispiele.^[91-98]

Im Gegensatz dazu wurde bisher nur ein Beispiel für die sequenzspezifische Spaltung der hydrolysestabileren DNA beschrieben.

In einer Untersuchung von Komiyama et al. wurde ein Ce(IV)-antisense-Oligonucleotid-Konjugat eingesetzt. Dazu wurde ein DNA-Oligomer (19-mer) mit Iminodiessigsäure umgesetzt.

Mit dem Ce(IV)-Komplex dieses Oligonucleotids wurde ein 40-mer-DNA-Oligomer selektiv an einer Stelle zu 60 mol% gespalten.^[54]

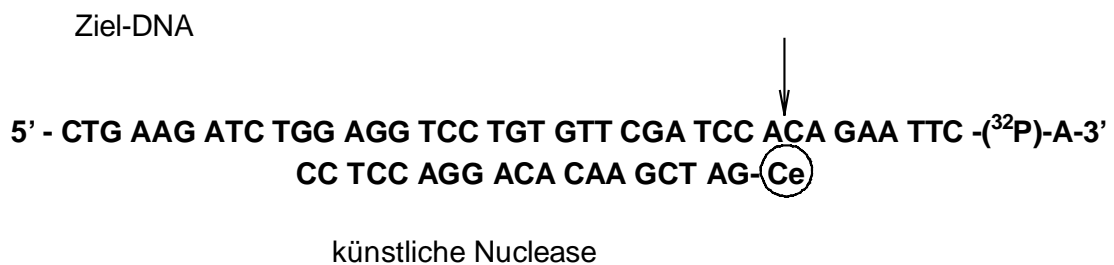


Abb. 1.12: Sequenzspezifische Spaltung eines DNA-Oligomers durch durch einen Ce(IV)-Oligonucleotid-Komplex^[54]

Dieses Ergebnis ist ein erster Schritt zur Entwicklung von künstlichen Restriktionsenzymen. Eine Anwendung des reduktionsempfindlichen Ce(IV) könnte in biologischen Systemen jedoch zu Schwierigkeiten führen.

1.4 Die wäßrige Chemie des Zr⁴⁺-Ions

Einfache Zirconium-Salze wie ZrCl₄ ergeben in millimolarer Konzentration klare, wäßrige Lösungen bis ca. pH 5. Schon bei pH < 1 liegen [Zr(OH)]³⁺-Spezies vor. Bei höheren pH-Werten bilden sich kationische, zum Teil mehrkernige Polyhydroxyspezies wie [Zr₃(OH)₄]⁸⁺ und [Zr₄(OH)₈]⁸⁺. Solche vierkernigen Hydroxokomplexe sind auch Bestandteil von ZrOCl₂·8 H₂O und ZrOBr₂·8 H₂O. Aus den Röntgenstrukturen von ZrOX₂·8 H₂O (X = Cl oder Br) ist bekannt, daß diese Verbindungen [Zr₄(OH)₈(H₂O)₁₆]⁸⁺ enthalten.^[99]

In diesem Kation liegen die vier Zr(IV)-Ionen in den Ecken eines Quadrats. Sie sind durch jeweils zwei Hydroxogruppen mit den beiden benachbarten Metallionen verbunden. Zusätzlich sind noch vier Wassermoleküle an jedes Zr-Ion koordiniert (Abb. 1.15). Das ergibt insgesamt eine Koordinationszahl von 8.

Spektroskopische Untersuchungen an konzentrierten, wäßrigen Lösungen von Zr(IV) bei kleinen pH-Werten zeigen, daß auch dort das Kation [Zr₄(OH)₈(H₂O)₁₆]⁸⁺ die vorherrschende Spezies ist.^[99]

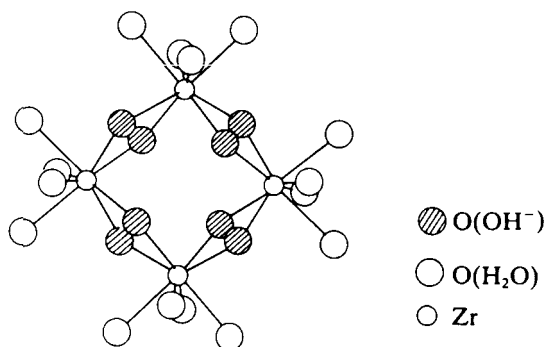


Abb. 1.13: Struktur des Kations [Zr₄(OH)₈(H₂O)₁₆]⁸⁺ ^[99]