

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Phosphatester-Spaltung in Nucleinsäuren und Nucleinsäure-Analoga durch Metallkomplexe reaktionskinetisch untersucht.

Die enzymatische Spaltung der Phosphodiesterbindung ist von fundamentaler Bedeutung sowohl in biologischen Systemen als auch in der Molekularbiologie und Gentechnik. Viele Nucleinsäure-spaltende Enzyme enthalten in ihrem aktiven Zentrum Metallionen, ihre Reaktivität kann durch Wechselwirkungen mit den Aminosäureseitenketten erhöht werden. Die Entwicklung sogenannter „künstlicher Nucleasen“ auf der Grundlage von hydrolytisch aktiven Metallkomplexen hat immer mehr an Interesse gewonnen, diese künstlichen Restriktionsenzyme können u. a. in der Medizin und der Biotechnologie eingesetzt werden.

Zirconium(IV)-Verbindungen zählen zu den aktivsten nicht-enzymatischen Reagentien für die Phosphodiester-Spaltung, daher wurde die Spaltung verschiedener Nucleinsäure-Substrate durch $ZrCl_4$ und durch Zirconium-Komplexe untersucht. Dabei wurden verschiedene Liganden eingesetzt, die die Bildung von Zirconium-Hydroxid-Niederschlägen unter physiologischen Bedingungen verhindern sollten.

Die aktivierten Substrate Bis(*p*-nitrophenyl)phosphat (BNPP) und 2-Hydroxypropyl-*p*-nitrophenylphosphat (HPNP) werden durch Zirconium(IV) in schwach saurer Lösung mit hoher Geschwindigkeit gespalten. Unter optimalen Bedingungen läuft die Reaktion etwa 10^9 -mal schneller ab als die Spontanhydrolyse. Das RNA-Modell HPNP wird dabei direkt hydrolysiert, eine Umesterung zu einem cyclischen Phosphodiester, wie sie mit anderen Metallionen beobachtet wird, findet nur als Nebenreaktion statt.

Während Zr(IV)-Salze bei neutralem pH-Wert Hydroxid-Niederschläge bilden, werden in Gegenwart bestimmter Chelatliganden homogene Lösungen erhalten. Mit carboxylathaltigen Liganden nimmt die Spaltungsgeschwindigkeit stark ab. Im Gegensatz dazu bleibt die Aktivität mit Aminoalkoholen wie TDCI, TACI, Bis-TRIS, Cl-BHP und BTMP annähernd erhalten. So wird die Spaltung von BNPP mit dem Zirconium-Komplex von TDCI bei pH 4,0 ca. 3×10^8 -fach und bei pH 7,0 ca. 3×10^7 -fach beschleunigt.

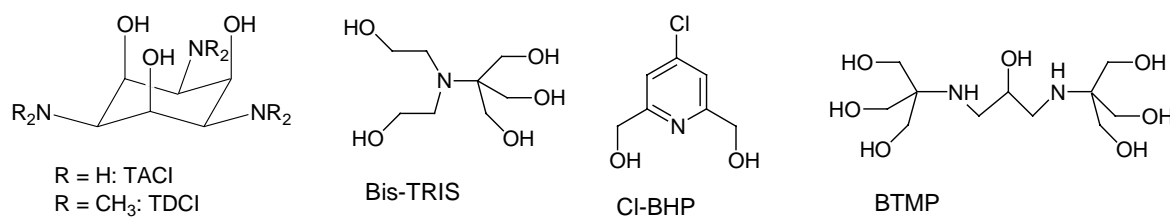


Abb. 6.1: Liganden, deren Zr(IV)-Komplexe Phosphataseaktivität zeigen

Auch das DNA-Dinucleotid Thymidylyl(3'-5')thymidin (TpT) und das RNA-Dinucleotid Uridinyl(3'-5')uridin (UpU) werden durch Zr(IV)-Verbindungen hydrolytisch gespalten. Die Hydrolysegeschwindigkeit von TpT durch Zr/TDCI wird unter physiologischen Bedingungen (pH 7, 37°C) um den Faktor 7×10^8 gesteigert. Die Spaltung von UpU läuft ca. 100-mal schneller ab als diejenige von TpT, was darauf hindeutet, daß die Reaktion nach dem für RNA vorgeschlagenen Umesterungsmechanismus abläuft. Die Spaltung des cyclischen Phosphodiesters 2',3'-cAMP wird durch Zr(IV) ca. 1000-mal stärker beschleunigt als die des RNA-Dinucleotids UpU.

Für die hydrolytische Spaltung linearer DNA ist das nicht-redoxaktive Zr(IV) bisher die einzige Alternative zu Ce(IV), dessen Reduktionsempfindlichkeit in Hinblick auf biochemische Anwendungen problematisch ist.

Ein wichtiger Aspekt bei der Steuerung von Enzymaktivitäten ist die sogenannte allosterische Regulation. An den mehrkernigen Metallkomplexen $[(L-H)M_SCu_2]^{5+}$ wurde ein mögliches Regulierungsprinzip, der Einfluß eines strukturellen, nicht direkt an der Reaktion beteiligten Metallions M_S , genauer untersucht.

Die Bildung der dreikernigen Komplexe $[(L-H)M_SCu_2]^{5+}$ konnte spektrophotometrisch nachgewiesen werden, ein Austausch des strukturellen Metallions gegen Cu^{2+} konnte durch MALDI-massenspektrometrische Messungen ausgeschlossen werden.

Mit $[(L-H)M_SCu_2]^{5+}$ wurden kinetische Untersuchungen zur HPNP-Spaltung durchgeführt.

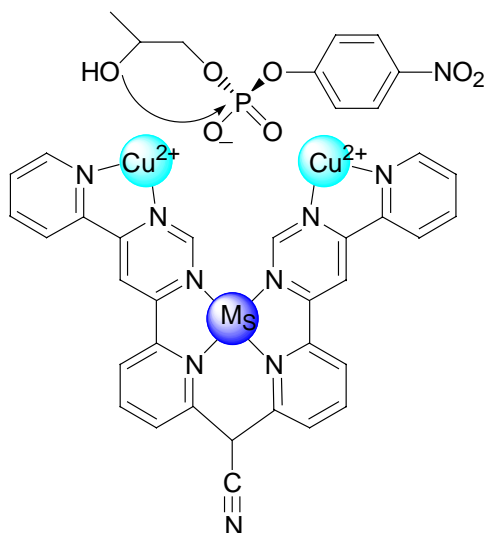


Abb. 6.2: Spaltung von HPNP durch $[(L-H)M_SCu_2]^{5+}$

Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit erhält man mit $M_S = \text{Cu}^{2+}$, dagegen ist mit $M_S = \text{Ni}^{2+}$ und Pd^{2+} die Geschwindigkeit der Phosphodiester-Spaltung 3- bzw. 10-mal geringer. Auch das RNA-Dinucleotid UpU wird durch $[(\text{L-H})M_S\text{Cu}_2]^{5+}$ gespalten, in diesem Fall ist der Effekt durch das strukturelle Metallion nicht mehr so deutlich wie mit HPNP als Substrat.

Das Prinzip der allosterischen Regulierung von Enzymaktivitäten kann durch $[(\text{L-H})M_S\text{Cu}_2]^{5+}$ nachgeahmt werden. Die Geschwindigkeit der HPNP-Spaltung hängt stark von M_S ab, dessen Größe und Koordinationsgeometrie die Konformation des Katalysator-Komplexes und die Präorganisation der beiden funktionellen Metallionen beeinflusst, was offenbar starken Einfluß auf die Reaktivität hat.