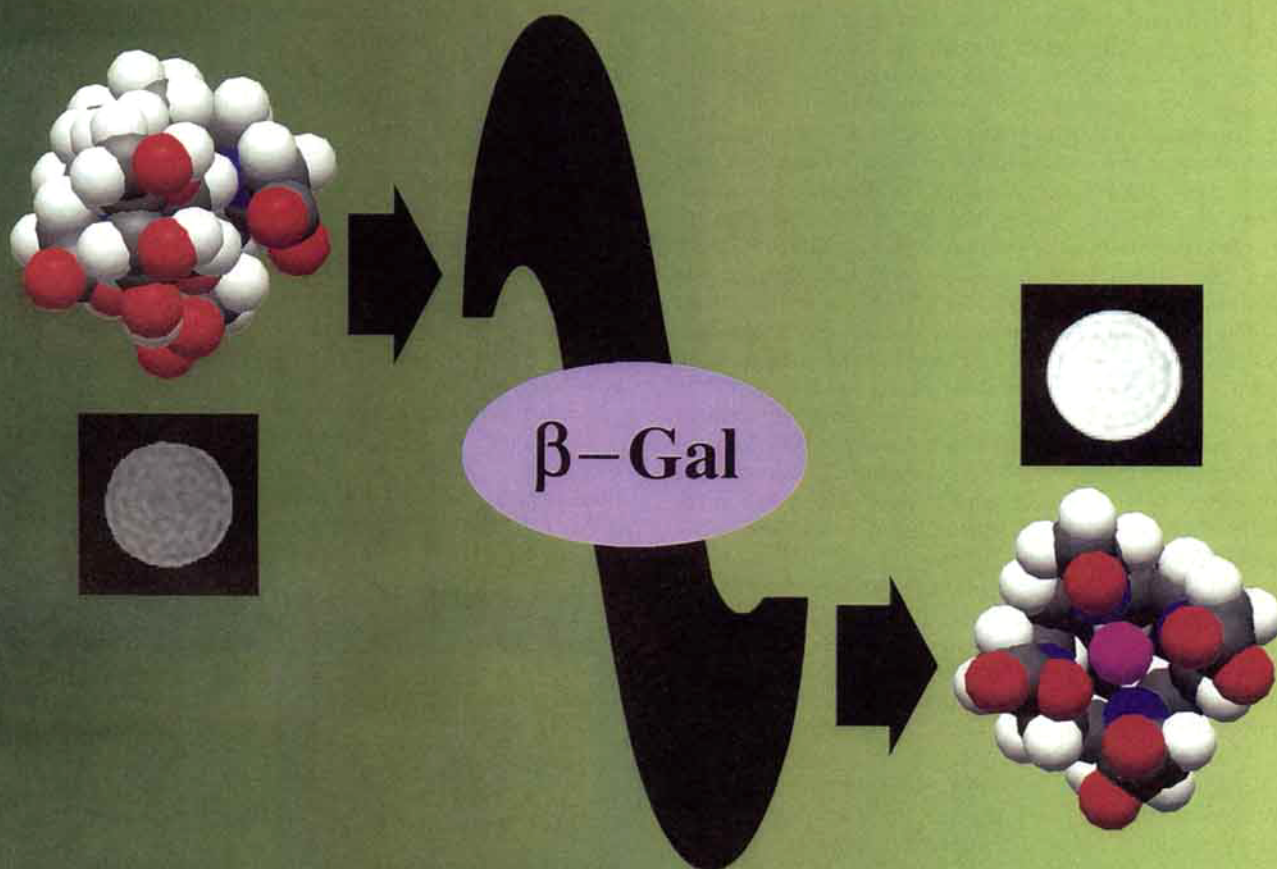


Spezifisch „anschalten“ lässt sich das NMR-Relaxationsvermögen eines Galactopyranose-substituierten, Gd^{3+} -Ion-koordinierenden Tetraazamakrocyclus durch Abspaltung des Zuckers mit β -Galactosidase.



Mehr zu dieser Möglichkeit, physiologische Zustände mit Magnetic-Resonance-Imaging-Verfahren direkt abzubilden, erfahren Sie auf den folgenden Seiten.

Ein „intelligentes“ Reagens für die NMR-Bildgebung zur Bestimmung spezifischer enzymatischer Aktivität**

Rex A. Moats, Scott E. Fraser und Thomas J. Meade*

Moderne Techniken der optischen Mikroskopie haben in Kombination mit Fluoreszenzindikatoren die Untersuchung biologischer Strukturen, Funktionen und Entwicklungen revolutioniert, indem sie eine genaue Analyse der Physiologie intakter Zellen und Gewebe ermöglichen.^[1] So werden Fluoreszenzfarbstoffe in Zellen transparenter Embryos injiziert, um das Schicksal ihrer Nachkommen zu verfolgen. Fluoreszenzfarbstoffe, deren Absorptionsintensität oder -wellenlänge sich bei der Bindung von Ca^{2+} ändern, lieferten Einblicke in die Zellphysiologie. Weiterhin können fluoreszierende Substratfarbstoffe verwendet werden, um die Aktivierung eines speziellen Gens zu verfolgen; dabei verknüpft man das β -Galactosidase-Gen mit dem regulatorischen Bereich des untersuchten Gens. Optische Methoden, von der Video-Mikroskopie bis zur konfokalen Laser-Rastermikroskopie, liefern aber aufgrund von Lichtstreuung und unkorrigierten optischen Aberrationen gute Ergebnisse nur in den äußersten 100 μm eines biologischen Gewebes.^[2] Das MRI-Verfahren (MRI = magnetic resonance imaging) zur Abbildung biologischer Strukturen mit magnetischer Resonanz bietet eine Alternative zur Lichtmikroskopie, mit dem diese Einschränkungen vermieden werden können, und es konnten bereits dreidimensionale MR-Bilder mit zellulärer Auflösung (ca. 10 μm) erhalten werden.^[3] Um die Möglichkeiten des MRI-Verfahrens für biologische Untersuchungen auszuschöpfen, müssen Kontrastmittel entwickelt werden, die den in der Lichtmikroskopie verwendeten Fluoreszenzindikatoren analog sind. Wir berichten hier über das erste Beispiel einer bemerkenswerten neuen Klasse enzymatisch steuerbarer, „intelligenter“ MRI-Kontrastmittel, mit dem MR-Bilder erhalten werden können, die Aufschluß über den Stoffwechselzustand von Zellen und Organen geben.

Im MRI-Verfahren werden typischerweise ein oder mehrere Magnetfeldgradienten an eine Probe gelegt, und die Kernspins werden durch Radiofrequenzpulse angeregt. Die Verarbeitung der mit einer Vielzahl von Feldgradienten erhaltenen Daten mit dem Computer liefert ein ein-, zwei- oder dreidimensionales Bild der Probe. Es beruht auf dem NMR-Signal der Protonen des Wassers in einem Volumenelement. Die Signalintensität in einem Volumenelement (Voxel) des 3D-Bildes ist eine Funktion der Wasserkonzentration und der Relaxationszeiten T_1 und T_2 . Lokale Variationen dieser drei Parameter ergeben den Kontrast der In-vivo-MR-Bilder. MRI-Kontrastmittel können die intrinsischen Unterschiede zwischen den Relaxationszeiten T_1 (Spin-Gitter-Relaxation) und T_2 (Spin-Spin-Relaxation) verstärken. So beschleunigen T_1 -Reagentien die T_1 -Relaxation, wodurch sie die Intensität der Signale von benachbarten Wasserprotonen erhöhen und das Voxel im resultierenden Bild „heller“ wird. Diese Abnahme von T_1 wird zum Teil durch die direkte Wechselwirkung von Wassermolekülen mit den unge-

paarten Elektronen eines paramagnetischen Metallions vermittelt.^[4, 5]

Das Lanthanoid-Ion Gd^{3+} ist das bei weitem am häufigsten gewählte Metallatom für MRI-Kontrastmittel, da es ein sehr hohes magnetisches Moment ($\mu^2 = 63 \mu_B^2$) und einen symmetrischen elektronischen Grundzustand (S^8) aufweist. Das Gd^{3+} -Aqua-Ion ist sehr toxisch und muß an einen Chelatliganden gebunden werden, um die Toxizität zu verringern. Typischerweise sind acht der neun verfügbaren Koordinationsstellen des Gd^{3+} -Ions vom Chelatliganden besetzt, und es bleibt somit nur eine Stelle für ein Wassermolekül in der inneren Koordinations-sphäre verfügbar.^[6] Wenn die Zahl der Wassermoleküle (q) gleich 1 ist, geht die Hälfte des gemessenen Relaxationsvermögens des Reagens auf Wassermoleküle der zweiten Koordinations-sphäre zurück. Die andere Hälfte stammt von direkt am Gd^{3+} -Ion gebundenen Wassermolekülen, die schnell ausgetauscht werden.

Der Innensphärenmechanismus für T_1 -Relaxationsphänomene bietet eine Möglichkeit, zu einem Kontrastmittel zu gelangen, das in zwei Zuständen mit unterschiedlich starkem Relaxationsvermögen vorliegen kann. Wenn man die unbesetzte Koordinationsstelle blockierte, würden Wasserprotonen von der inneren Sphäre ausgeschlossen, und die Wirkung des Gd^{3+} -Ions auf die Relaxationszeit T_1 würde verringert.^[7, 8] Dies läßt sich erreichen, indem man den Chelatliganden mit einer koordinierenden Gruppe so modifiziert, daß die verbleibende Stelle der inneren Sphäre sterisch blockiert wird. Beim hier beschriebenen Reagens kann diese Blockierungsgruppe von einem Enzym abgespalten werden. Die T_1 -Relaxation benachbarter Wassermoleküle kann also durch Abspaltung der blockierenden Gruppe erhöht werden.

Bei dem ersten dieser neuartigen MRI-Kontrastmittel, [4,7,10-Triessigsäure-1-(2- β -galactopyranosylethoxy)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan]gadolinium (EGad), ist die neunte Koordinationsstelle des Gd^{3+} -Ions mit einem Galactopyranoseresest besetzt (Abb. 1).^[9] Durch das gebräuchliche Markerenzym β -Galacto-

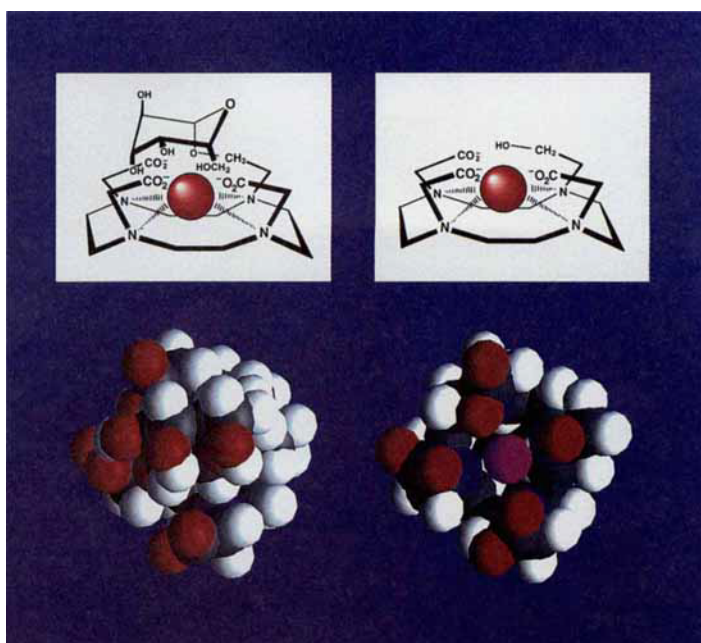


Abb. 1. Die beiden Zustände des beschriebenen MRI-Kontrastmittels mit schwachem bzw. starkem Relaxationsvermögen. Oben: Struktur von EGad (links), das die Verknüpfung des Galactopyranoserings mit dem Tetraazamacrocyclus zeigt, sowie von Gad (rechts). Unten: Molecular-Modeling-Darstellungen der Komplexe mit bzw. ohne den Galactopyranoseresest (das Gd^{3+} -Ion ist in magenta dargestellt).

[*] Dr. T. J. Meade, R. A. Moats, S. E. Fraser
The Beckman Institute, 139-74
California Institute of Technology
Pasadena, CA 91125 (USA)
Telefax. Int. + 818/449-5163
E-mail: tmeade@caltech.edu

[**] Diese Arbeit wurde von der Baxter Foundation, vom Beckman Institute und von den NIH (AR42671) gefördert. Wir danken Eric Ahrens und Russell Jacobs für hilfreiche Diskussionen und Unterstützung bei der Aufnahme der MR-Bilder.

sidase (β -gal) wird dieser abgespalten, was einen irreversiblen Übergang von einem Komplex mit schwachem zu einem mit starkem Relaxationsvermögen bewirkt. Durch Kristallstrukturanalyse, Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie wurden die Konfiguration und die Struktur der Zwischenprodukte und des Endprodukts bestimmt.

Die Abspaltung der Galactopyranosegruppe von EGad durch β -gal wurde mit HPLC anhand der unterschiedlichen Retentionszeiten von EGad und Gad (EGad ohne den Galactopyranose-Rest) verfolgt (Abb. 2). Wurde EGad mit nativer β -gal inkubiert, trat ein Peak mit einer Elutionszeit von 15 min auf, der Gad entspricht. Mit hitzeinaktivierter β -gal oder α -Galactosidase statt β -gal (negative Kontrollexperimente) war dagegen chromatographisch keine Veränderung festzustellen. Die blockierende Gruppe von EGad kann also tatsächlich nur durch das richtige, aktive Enzym abgespalten werden.

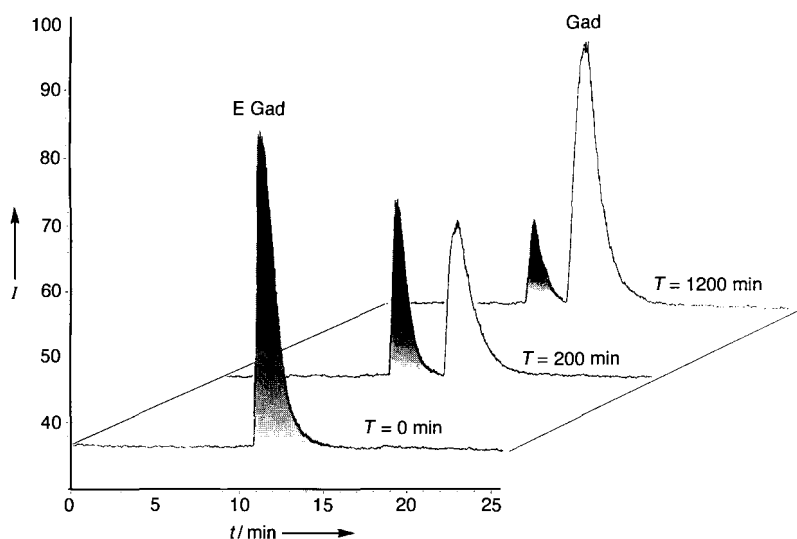


Abb. 2. HPLC-Spuren der zeitabhängigen Abspaltung des Galactopyranoserestes vom EGad-Komplex durch β -gal ($T = 0, 200$ und 1200 min). Der Gd-Komplex (2 mM) wurde bei pH 7.3 und 37°C in 25 mM Phosphatpuffer mit β -gal ($10\ \mu\text{M}$) inkubiert. Die verwendeten Konzentrationen ähneln denen, die für eine MR-Bildverstärkung in vivo erforderlich sind.

Um den Einfluß des Galactopyranoserestes auf die Wasseraustauschgeschwindigkeit von EGad zu bewerten, maßen wir die Fluoreszenzspektren des Tb^{3+} -Derivats (EGad-Tb) in Wasser/Deuteriumoxid-Gemischen ($\lambda_{\text{em}} = 545\ \text{nm}$).^[8, 10, 11] Die Fluoreszenz des Terbiumkomplexes wird durch H_2O gelöscht, durch D_2O jedoch nicht, da der angeregte Zustand des Terbiumions stark mit dem OH^- , nicht aber mit dem OD-Oszillator gekoppelt ist. Daher ist die Lebensdauer des Fluoreszenzsignals in D_2O größer als die in H_2O . Diese Größe wurde verwendet, um die Zahl q der Wassermoleküle zu bestimmen, die in schnellem Austausch mit dem Komplex stehen.^[12] Die q -Werte für EGad-Tb und Gad-Tb wurden zu 0.7 bzw. 1.2 bestimmt, was die erhebliche Änderung (ca. 40%) der Zahl der Wassermoleküle in der inneren Sphäre belegt.

Der Einfluß der enzymatischen Abspaltung des Galactopyranoserestes von EGad auf die T_1 -Relaxation des Komplexes, die nach den Befunden der Spektrofluorimetrie-Experimente abnehmen sollte, wurde NMR-spektroskopisch untersucht (Abb. 3).^[13] Die Abnahme der gemessenen T_1 -Werte einer Lösung des Reagens in Gegenwart von β -gal um 20% bestätigt diese Voraussage. Mit β -gal in zwei unterschiedlichen Konzentrationen wurden identische und signifikante Abnahmen des T_1 -Wertes in Lösung gemessen. Die Änderung des T_1 -Wertes um

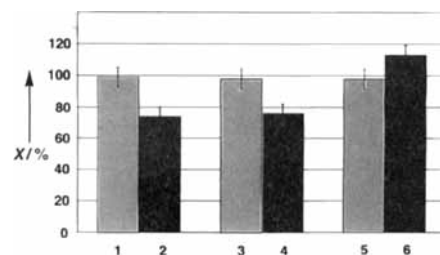


Abb. 3. Säulendiagramm der Änderung von T_1 (aufgetragen ist das Verhältnis $X(T_1) = T_1(\text{Probe})/T_1(\text{EGad ohne } \beta\text{-gal})$) bei der β -gal-katalysierten Abspaltung des Galactopyranoserestes ($n = 3$). Die erste Säule jeder Gruppe (1, 3 und 5) gibt T_1 von EGad mit β -gal unmittelbar nach dem Mischen wieder, die zweite den T_1 -Wert der Lösung nach der Inkubation in Gegenwart von β -gal. 1 und 2: 2.0 mM Gd-Komplex + $1.7\ \mu\text{M}$ β -gal; 3 und 4: 2.0 mM Gd-Komplex + $5.1\ \mu\text{M}$ β -gal; 5 und 6: 2.0 mM Gd-Komplex + $5.1\ \mu\text{M}$ hitzeinaktiviertes β -gal.

20% infolge der Abspaltung des Galactopyranoserestes ist mit der aus Fluoreszenzmessungen erhaltenen Änderung der Hydrationszahl q im Einklang. In Kontrollreaktionen, bei denen EGad mit hitzeinaktiviertem Enzym inkubiert wurde, nahm T_1 nicht ab; tatsächlich schien der T_1 -Wert sogar leicht zuzunehmen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß T_1 von EGad infolge der enzymatischen Spaltung des Komplexes abnimmt.

Mit einer Standard-Inversions-Recovery-Sequenz wurden MR-Bilder erhalten, die die durch die enzymatische Umsetzung von EGad zu Gad hervorgerufene Änderung von T_1 zeigen (Abb. 4). EGad wurde mit und ohne β -gal in 1.5 -mm-Kapillaren gegeben. Der T_1 -vermittelte Kontrast von EGad wurde durch die Wirkung von β -gal verändert, was zur erwarteten Helligkeitserhöhung führte.

Anhand der erfolgreichen Synthese und Erprobung von EGad wird deutlich, daß es mit spezifisch ansprechbaren MRI-Kontrastmitteln möglich ist, physiologische Zustände von Zellen oder Organen abzubilden. Die beiden Zustände dieses Reagens mit schwachem bzw. starkem Relaxationsvermögen lassen es möglich erscheinen, Genexpressionsmuster durch MRI-Verfahren direkt

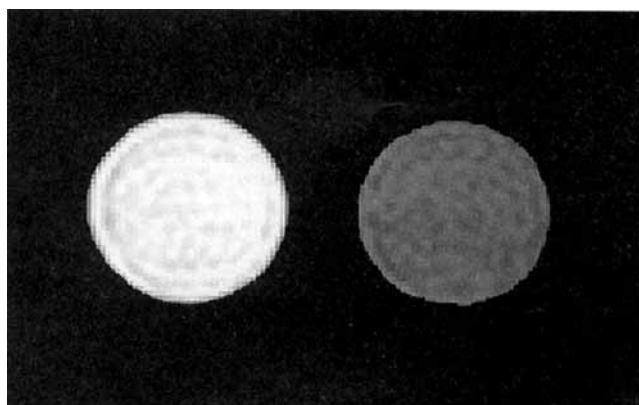


Abb. 4. MRI-Kontrastverstärkung als Ergebnis der enzymatischen Spaltung von EGad. Die Bilder ($256 \times 256 \times 3$) wurden von einer Lösung von EGad mit (links) und ohne β -gal (rechts; 2.0 mM Gd-Komplex + $5.1\ \mu\text{M}$ β -gal) erhalten; sie wurden horizontal durch 1.5 -mm-Kapillarröhrchen mit einem modifizierten Bruker-AMX-Spektrometer und einer Standard-Inversions-Recovery-Sequenz gemessen. Die Inversionsverzögerung wurde auf den Mittelwert der T_1 -Werte ($0.280\ \text{s}$) eingestellt; die Verzögerung zwischen den Scans betrug $0.2\ \text{s}$.

dreidimensional sichtbar zu machen. Da die Verwendung von β -gal als Markerenzym in Maus-Modell-Untersuchungen weit verbreitet ist, sollte es mit diesen neuartigen Reagentien möglich werden, Genexpressionsmuster in normalen und in genetisch veränderten Tiermodellen zu verfolgen.

Während die Frage, wie sich MRI-Kontrastmittel anders als durch Mikroinjektion in spezifische Zelltypen bringen lassen, zur Zeit untersucht wird,^[14] ist das hier beschriebene Reagens der erste Schritt zur Entwicklung einer neuen Klasse von bildverstärkenden Verbindungen; es wird zur Zeit in vivo getestet. Die Anwendung dieser Kontrastmittel zur Detektion physiologischer Prozesse und neuronaler Aktivitäten eröffnet nun die Möglichkeit, biologische Fragestellungen durch MRI zu untersuchen, die bislang durch lichtmikroskopische Methoden unzugänglich waren.

Experimentelles

Synthese von 2,3,4,6-Tetraacetyl-1-(2-bromethoxy)- β -galactose: 2-Bromethan-1-ol wurde mit 2,3,4,6-Tetraacetyl-1- α -bromgalactose zu einem Gemisch aus dem α - und dem β -Anomer von 2,3,4,6-Tetraacetyl-1-(2-bromethoxy)-galactose (10/90) in 68% Ausbeute (8.3 g) umgesetzt. Das gereinigte β -Anomer wurde durch Flash-Chromatographie erhalten. Die stereochemischen Zuordnungen wurden anhand einer Röntgenstrukturanalyse des β -Anomers vorgenommen.

2,3,4,6-Tetraacetyl-1-(2-bromethoxy)- β -galactose wurde mit Cyclen monosubstituiert. Die Acetat-Schutzgruppen wurden abgespalten und die drei Carbonsäuresubstituenten durch Umsetzung mit Bromessigsäure bei pH 10.5 eingeführt. Das Produkt, 4,7,10-Triessigsäure 1-(2- β -galactopyranosylethoxy)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan, wurde durch Anionenaustausch-FPLC (fast performance liquid chromatography; Detektion bei 218 nm) in 37% Gesamtausbeute isoliert. Gd^{3+} oder Tb^{3+} wurden in die Komplexe eingebaut, und EGad-Gd bzw. EGad-Tb wurden durch wiederholte Umkehrphasen-HPLC mit einer analytischen C_{18} -Säule und einem Wasser/Acetonitril-Gradienten (0–10%); Fluoreszenzdetektor λ_{ex} = 274 nm, λ_{em} = 315 nm) in 70% Ausbeute isoliert. Ein hochauflösendes Massenspektrum des isolierten Feststoffs gab für das Signal des Moleküls ($M + Na$)⁺ die richtige exakte Masse und das erwartete Isotopenverhältnis.

Kristallstruktur von $C_{16}H_{23}O_{10}Br$: CAD-4-Diffraktometer; farblose Plättchen, monoklin, Raumgruppe $P2_1$ (Nr. 4); insgesamt 5603 Reflexe gemessen, davon 2981 für die Verfeinerung verwendet.

Fluoreszenzexperimente [5, 6] mit EGad: Die Zerfallsgeschwindigkeit (umgekehrt proportional zur Lebensdauer) wurde bei λ_{em} = 545 nm (λ_{ex} = 460 nm) mit einem Hitachi-F4500-Fluoreszenz-Spektrophotometer (2 s Verzögerung, 64 Scans) in H_2O , H_2O/D_2O (1/1) und D_2O gemessen (exponentielle Kurvenanpassung mit dem Programm DeltaGraph 3, Delta Point Inc., Monterey, CA). Die Steigung der gegen die D_2O -Konzentration aufgetragenen Zerfallsgeschwindigkeiten wurde mit dem Literaturwert für die Steigung von 0.239/q verglichen, um q zu erhalten.

Bei identischen Durchführungen der hochauflösenden Inversion-Recovery-NMR-Experimente (Bruker AMX 500, 26 °C) wurde EGad (2 mM) bei 37 °C mit β -gal in zwei Konzentrationen (1.7 μ M und 5.1 μ M), mit hitzeinaktiviertem β -gal (10 min, 80 °C, 5.1 μ M) sowie ohne β -gal in Phosphatpuffer (25 mM, pH 7.3) inkubiert. Es wurden minimale Enzymkonzentrationen verwendet, um potentielle Wechselwirkungen zwischen Kontrastmittel und Enzym zu verringern. Die Lösungen wurden in einem 40- μ L-Rundboden-NMR-Röhrcheneinsatz (Wilma-Glas) in ein 5-mm-NMR-Röhrchen eingesetzt, das $[D_3]CHCl_3$ enthielt. Die Messungen von T_1 wurden unmittelbar nach dem Mischen sowie nach vollständiger Abspaltung der Galactopyranose (> 95% nach 7 d Inkubation) durchgeführt. Die Daten wurden mit dem Programm Felix (BIOSYM/Molecular Simulations, San Diego, CA) verarbeitet, und an die Peakhöhen wurde eine exponentiell ansteigende Kurve angepaßt, so daß man T_1 erhielt (Regressionsfaktor $r > 0.999$).

Eingegangen am 18. September 1996 [Z 9568]

Stichworte: Analytische Methoden • β -Galactosidase • Lanthanoide • NMR-Spektroskopie

- [4] I. Bertini, C. Luchinat, *NMR of Paramagnetic Molecules in Biological Systems*, Benjamin/Cummings, 1986.
- [5] S. H. Koenig, K. E. Kellar, *Magn. Res. Med.* **1995**, *34*, 227–233.
- [6] V. Alexander, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 273–242; K. Kumar, C. A. Chang, M. F. Tweedle, *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 587–593.
- [7] L. S. Szczepaniak, A. Sargeson, I. I. Creasey, R. J. Geue, M. F. Tweedle, R. G. Bryant, *Bioconjugate* **1992**, *3*, 27–31.
- [8] K. Kumar, M. F. Tweedle, *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 515–520.
- [9] S. I. Kang, R. S. Ranganathan, J. E. Emswiler, K. Kumar, J. Z. Gougoutas, M. F. Malley, M. F. Tweedle, *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 2912–2918; S. Aime, M. Botta, G. Ermondi, *ibid.* **1992**, *31*, 4291–4299.
- [10] M. Li, P. R. Selvin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8132–8138.
- [11] W. D. Horrocks, D. R. Sudnick, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 334–339.
- [12] X. Zhang, C. A. Chang, H. G. Brittain, J. M. Garrison, J. M. Telsner, M. F. Tweedle, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 5597–5600.
- [13] Die molare Größe, die mit diesen T_1 -Werten zusammenhängt, ist das Relaxationsvermögen R. Für EGad (1800 $mm s^{-1}$) und Gad (2400 $mm s^{-1}$) wurden die R-Werte bei 500 MHz bestimmt und mit denen einer verwandten Verbindung, DO3a (2700 $mm s^{-1}$), verglichen.
- [14] J. F. Kayyem, R. M. Kumar, S. E. Fraser, T. J. Meade, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 615–620.

Glycylglycin-Rotaxane – Wasserstoffbrücken-vermittelte Selbstorganisation synthetischer Peptid-Rotaxane

David A. Leigh,* Aden Murphy, John P. Smart und Alexandra M. Z. Slawin

Zwar weist DNA topologisch unterschiedliche Strukturen auf, die auf Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen beruhen,^[1–4] doch wurden verknottete,^[5–7] Catenane^[5, 6, 8, 9] und Rotaxan-Substrukturen^[5, 6, 10–12] in Polypeptiden und Proteinen erst in den letzten Jahren identifiziert. Nichtnatürliche DNA-Knoten wurden ebenso synthetisiert wie komplexe Catenane^[13–15] und als vielversprechende Vorläufer für neue Typen von Wirkstoffdepots, für mechanische Werkzeuge im Nanomaßstab oder sogar für „Biochips“ angesehen.^[16, 17] Wir berichten hier, daß geschickt an den Enden geschützte Glycylglycine als Matrizen für die Synthese von Benzylamid-Makrocyclen dienen können. Dieser Synthese liegt ein durch Wasserstoffbrücken gelenkter „Schnappmechanismus“ unter Beteiligung von fünf Molekülen zugrunde. Peptid-[2]rotaxane wurden so in 62% Ausbeute erhalten. Beim Pyridin-2,6-dicarbamidobenzyl-Makrocyclen bleiben die vier Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Komponenten, die die Rotaxanbildung steuern, auch im festen Zustand, in unpolaren Lösungsmitteln wie Chloroform und sogar in polaren Lösungsmitteln wie DMSO und DMSO-Wasser-Gemischen erhalten. Dabei hüllt der Makrocyclen einen Teil des Peptidrückgrats so ein, daß dieses sogar für so kleine Reagentien wie D_2O von außen unzugänglich ist.

Benzylamid-[2]catenane wie 1 sind strukturell heterogen und am einfachsten durch Kondensation von acht Molekülen aromatischer 1,3-Dicarbonsäurechloride und Xylylendi-

[*] Dr. D. A. Leigh, A. Murphy, Dr. J. P. Smart
Department of Chemistry
University of Manchester Institute of Science and Technology
Sackville Street, GB-Manchester M60 1QD (Großbritannien)
Telefax: Int. + 44/161-200-4539
E-mail: David.leigh@Umist.ac.uk
A. M. Z. Slawin
Molecular Structure Laboratory
Department of Chemistry, University of Loughborough
GB-Loughborough, Leicestershire LE11 3TU (Großbritannien)