

- [5] a) G. Gilli, F. Bellucci, V. Ferretti, V. Bertolasi, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1023–1028; b) T. Steiner, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 7041–7052.
- [6] F. Hibbert, J. Emsley, *J. Adv. Phys. Org. Chem.* **1990**, *26*, 255–379.
- [7] a) E. D. Stevens, M. S. Lehmann, P. Coppens, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2829–2831; b) G. K. H. Madsen, B. B. Iversen, F. K. Larsen, M. Kapon, G. M. Reisner, F. H. Herbst, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10040–10045.
- [8] R. F. W. Bader, *Atoms in molecules. A quantum theory*, Oxford University Press, Oxford, **1990**.
- [9] A. J. Schultz, K. Srinivasan, R. G. Teller, J. M. Williams, C. M. Lukehart, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 999–1003.
- [10] a) N. K. Hansen, P. Coppens, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1978**, *34*, 909–921; b) T. Koritsanszky, S. T. Howard, P. R. Mallinson, Z. Su, T. Richter, N. K. Hansen, *Program X D, ein Computerprogramm zur Multipol-Verfeinerung und Analyse von Ladungsdichten aus Diffraktionsdaten*, Institut für Kristallographie der Freien Universität, Berlin, **1995**.
- [11] E. Espinosa, E. Molins, C. Lecomte, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *285*, 170–173.
- [12] B. B. Iversen, F. K. Larsen, B. N. Figgis, P. A. Reynolds, A. J. Schultz, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1996**, *52*, 923–931.

Tripodale, „supergeladene“ Analoga von Adenosinnucleotiden: Inhibitoren des Fhit-Proteins, einer Ap_3A -Hydrolase**

Xiaohai Liu, Charles Brenner, Andrzej Guranowski, Elzbieta Starzynska und G. Michael Blackburn*

Die vor mehr als dreißig Jahren entdeckten Diadenosinpolyphosphate^[1] sind ubiquitäre Bestandteile aller Zellen. Vor kurzem wurde erkannt, daß Diadenosintriphosphat und -tetraphosphat – Ap_3A bzw. Ap_4A – als Liganden des Tumorsuppressorproteins Fhit große Bedeutung haben.^[2a] Fhit ist eine Ap_3A -Hydrolase,^[2b] deren Signalfunktion über das Binden von Ap_nA gesteuert wird.^[3] Wir interessieren uns für spezifische Enzyme des Dinucleosidpolyphosphat-Katabolismus,^[2a, 4, 5] für die Chemie^[6] dieser Verbindungen und für Disubstratanaloga von Phosphoglycerat^[7] und anderen Kinasen und stellen hier die Synthese neuartiger Disubstratanaloga vor, die mit dem Übergangszustand der Ap_4A -Hydrolyse isopolar^[8] sind.

Ein Kernproblem bei derartigen Bemühungen ist, daß die negative Ladung eines linearen Disubstrat-Nucleotidanalogons unvermeidlich geringer ist als die im Übergangszustand der entsprechenden Phosphoryltransferreaktion. So wandelt Adenylat-Kinase (AK) zwei ADP-Moleküle (Nettoladung –6) über einen trigonal-bipyramidalen Übergangszustand der Ladung –6 in AMP und ATP um. Das Disubstratanalogon für diese Reaktion, Ap_4A , hat eine Ladung von lediglich –4. Daher ist es nicht überraschend, daß Ap_5A ($K_i = 30 \text{ nM}$) ein viel besserer Inhibitor von AK ist als Ap_4A ($K_i = 10 \text{ } \mu\text{M}$),^[9] wobei allerdings zu bedenken ist, daß die Konformation der Phosphatkette ebenfalls zu diesem Unterschied beitragen könnte. Analog spaltet Lupinen- Ap_4A -Hydrolase Ap_4A in AMP und ATP über einen trigonal-bipyramidalen In-line-Übergangszustand^[10] der Ladung –5. Daher sollte ein erfolgversprechender Zugang zu besseren auf Disubstratanaloga basierenden Inhibitoren für viele Phosphoryltransferenzyme die Nutzung von Pyrophosphatmimetika sein, die zusätzliche negative Ladungen durch Verzweigungen statt durch eine Verlängerung der Phosph(on)atkette integrieren. Vor kurzem beschrieben wir die Synthese einiger derartiger supergeladener Analoga von Pyrophosphorsäure (**1**, **5**) und ihren Einbau in ATP-Analoga^[11] und berichten nun über ihren Einbau in ADP- und Diadenosinpolyphosphat-Analoga und insbesondere über die neuartige Verwendung der C_3 -symmetrischen Verzweigungsstelle von Methantrisphosphonsäuren zur Erzeugung tripodaler Adenosinnucleotid-Analoga.

Diese Produkte unterscheiden sich bei der kompetitiven Inhibierung von zwei Diadenosintriphosphat-Hydrolasen. Ap_nA -Hydrolasen scheinen zumindest zwei evolutionäre Gruppen zu umfassen. Das Produkt des menschlichen fhit-Gens gehört zur Histidinriaden-Überfamilie^[12a] der nucleotidbindenden Proteine, zu der Homologe in Tieren und Pilzen existieren. Andere Ap_nA -Hydrolasen sind mit mutT^[12b] verwandt und werden in allen Lebensformen gefunden. Da das Fhit-Protein ein Tumorsuppressorprotein ist, das in der Frühphase der Entwicklung von Epithelkarzinomen deaktiviert wird,^[12c] es aber nicht das einzige Enzym ist, das Ap_3A spalten kann, besitzen neue chemische Bausteine, die zwischen dem Fhit-Protein und anderen Ap_nA -Hydrolasen differenzieren, ein großes Potential in der Krebsdiagnostik.

Methantrisphosphonsäure **1** wurde von Gross et al. 1993 beschrieben.^[13] Wesentliche Verbesserungen der damaligen Synthesemethode ermöglichten uns inzwischen, auch Chlor- und Fluormethantrisphosphonsäuren in brauchbaren Mengen herzustellen.^[14] Verbindung **1** wurde nach Poulter et al.^[15] leicht in das ADP-Analogon **2** und mit der Phosphormorpholidatprozedur von Khorana und Moffatt^[16] in das ATP-Analogon **3** überführt (Schema 1). Bei der Synthese von **3** wurde AMP-Morpholidat im Unterschuß eingesetzt, bei der des Diadenosintetraphosphatanalogons **4** – aus Chlormethantrisphosphonat **5** – dagegen im Überschuß. Die beiden primären Phosphonsäurefunktionen in **2** und **3** waren die Angriffspunkte für eine doppelte Adenylierung mit einer modifizierten Khorana-Moffatt-Prozedur in der Synthese von zwei neuartigen tripodalen Nucleotidanaloga (**7** bzw. **6** in Schema 1). Die Reaktion des Tris-tri-*n*-butylammoniumsalzes

[*] Prof. G. M. Blackburn, X. Liu
Krebs Institute, Department of Chemistry
Sheffield University
Sheffield, S3 7HF (Großbritannien)
Fax: (+44) 114-273-8673
E-mail: g.m.blackburn@sheffield.ac.uk

Prof. C. Brenner
Kimmel Cancer Institute, Thomas Jefferson University
Philadelphia (USA)

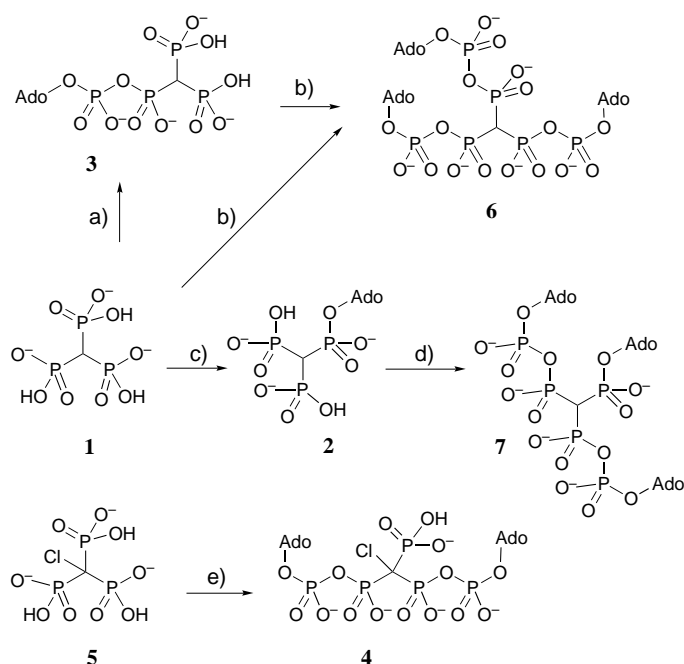
Prof. A. Guranowski, E. Starzynska
Akademia Rolnicza, Poznan (Polen)

[**] Diese Arbeit wurde durch das BBSRC (ROPA/MOLO4558 und B08013), das KBN (Projekt 6P04A06215) und das US National Cancer Institute (CA75954) gefördert. Wir danken Dr. K. R. Gayler (Melbourne University, Australien) und Dr. A. G. McLennan (Liverpool University, Großbritannien) für die überexprimierten (asymmetrischen) Ap_nA -Hydrolasen aus Lupinen bzw. dem Menschen sowie Peter Ashton (Birmingham University) für seine Hilfe bei den hochauflösenden massenspektrometrischen Analysen.

Tabelle 1. pK_a -Werte, Inhibierungskonstanten und berechnete Nettoladungen für die Inhibierung des Human-Fhit-Proteins und der Ap_3A -Hydrolase aus gelben Lupinen durch eine Reihe von Methantriphosphonaten und ihre Adenosinnucleotidanaloga.^[a]

Inhibitor	pK_a	Human-Fhit-Protein		Lupinen- Ap_3A -Hydrolase		δ_p in D_2O , pD 7
		K_i [μM]	Nettoladung bei pH 6.9	K_i [μM]	Nettoladung bei pH 8.2	
PCF(P)P 5 , F statt Cl	$pK_{a's}$ 5.77, 8.86	n.b.	3.93	1.0	4.18	8.89; s
PCCl(P)P 5	$pK_{a's}$ 5.92, 9.08	n.b.	3.91	1.0	4.12	11.42; s
PCH(P)P 1	$pK_{a's}$ 6.46, 9.90	n.b.	3.74	1.3	3.98	13.17; s
AdoPCH(P)P 2	$pK_{a'}$ 7.48	18.3	3.21	6.1	3.84	15.15, 12.94; ABB'
AdoPPCH(P)P 3	$pK_{a's}$ 7.50	4.0	4.20	2.8	4.83	13.23, 7.85, – 9.41; AA'MX ^[11]
AdoPPCCl(P)PPAdo 4	$pK_{a's}$ 8.86	1.9	5.01	16.2	5.18	8.18, 3.75, 1.36, – 9.33; AA'MM'X
AdoPCH(PPAdo) ₂ 7	k.Ä.	1.2	5.00	3.0	5.00	13.48, 5.08, – 9.78; AA'MM'X
(AdoPP) ₃ CH 6	k.Ä.	0.4	6.00	5.4	6.00	5.22, – 9.46; AA'A,,XX'X"

[a] Die pK_a -Werte wurden im Bereich $3.5 < pH < 10.5$ gemessen. k.Ä.: keine Änderung der Ionisierung in diesem pH-Bereich; n.b.: keine Inhibierung bestimmbar bei einer Inhibitorkonzentration von $200 \mu M$ oder weniger. Jedes Enzym wurde bei dem pH-Wert untersucht, bei dem es seine größte Aktivität zeigte.



Schema 1. Synthese der Nucleotidanaloga **2–7**. a) AMP-Morpholidat (0.8 Äquiv.), Tetrazol, Pyridin; b) AMP-Morpholidat (5 Äquiv.), Tetrazol, Pyridin; c) 5'-O-Tosyladenosin, MeCN; d) Überschuß an AMP-Morpholidat, Pyridin; e) AMP-Morpholidat (2.2 Äquiv.), Tetrazol, Pyridin. Gegenion ist immer Tri-*n*-butylammonium. Ado = 5'-Adenosyl.

von **1** mit AMP-Morpholidat verlief äußerst zäh, und es wurde nach sieben Tagen nur eine geringe Menge des erwünschten trisadenylierten Produkts **6** erhalten. Offensichtlich vollzog sich der Einbau der dritten Adenylatgruppe extrem langsam, da das intermediäre ATP-Analogon **3** und das Ap_4A -Analogon **4** mit H statt Cl als Hauptprodukte isoliert wurden. Tetrazol erwies sich jedoch als ausgezeichnete Katalysator,^[17] und die Reaktion war nach zwei Tagen unter Bildung von **6** in 59 % Ausbeute beendet. Analog wurde das Trisphosphonat **2** mit AMP-Morpholidat im Überschuß unter Tetrazolkatalyse zum tripodalen Nucleotidanalogen **7** in 58 % Ausbeute umgesetzt. Dies sind die ersten Verbindungen mit drei über einen Methantriphosphonatkern verknüpften Adenylatgruppen.^[18] Ihre pK_a -Werte wurden bestimmt und zeigen deutlich den positiven Einfluß der α -Halogenierung auf die Acidität der bereits einfach deprotonierten Phosphonsäuren (Tabelle 1).

Wir nahmen an, daß diese neuartigen Nucleotidanaloga Substrate für Ap_nA -Hydrolasen sein könnten, die die P^1, P^2 -Pyrophosphatbindung in Ap_nA -Molekülen spalten.^[5, 19] Assays mit zwei asymmetrischen Ap_4A -Hydrolasen – einer aus Lupinen^[4] und einer rekombinanten Human- Ap_4A -Hydrolase^[20] – zeigten, daß keines der Nucleotidanaloga als Substrat fungierte, alle aber starke, nichtdiskriminierende Inhibitoren dieser Ap_4A -Hydrolasen waren (Daten nicht aufgeführt). Allerdings inhibierten diese Analoga die Aktivität einer Adenosin-5'-tetraphosphat-Hydrolase aus Lupinen nicht.^[21] Daraufhin untersuchten wir Mitglieder zweier verschiedener Klassen von Ap_3A -Hydrolasen (EC 3.6.1.29), das Fhit-Protein und eine Ap_3A -Hydrolase aus den Samen gelber Lupinen.^[22] Die Testnucleotide wurden nicht hydrolysiert und inhibierten diese zwei Enzyme in sehr unterschiedlicher Weise (Abbildung 1).

Methantriphosphonat **1** sowie seine Chlor- **5** und Fluor- **5** mit F statt Cl) inhibieren das Human-Fhit-Protein nicht meßbar, sind aber starke Inhibitoren des Lupinen-Enzyms: Die K_i -Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie der K_m -Wert für Ap_3A ($1.2 \mu M$, Tabelle 1).^[23] Im Gegensatz dazu inhibieren die meisten adenylierten Polyphosph(on)ate das Fhit-Protein stark und kompetitiv mit K_i -Werten ähnlich^[3b] dem K_m -Wert für Ap_3A ($1.9 \mu M$), während sie als Inhibitoren für das Lupinen-Enzym weniger wirksam sind (Tabelle 1). Der größte Anteil am Unterschied der Inhibierungskonstanten für diese zwei Hydrolasen entstammt offenbar einer gegenläufigen Ladungsabhängigkeit bei der Ligandenbindung. Die kompetitive Hemmung des Fhit-Proteins zeigt eine ziemlich gute Gibbs-Energie-Beziehung mit der negativen Ladung von fünf Adenosinphosphonatanaloga, solange mindestens eine Adenosingruppe für die Bindung zur Verfügung steht (Abbildung 1a). Diese Bedingung entspricht den Ergebnissen von Röntgenstrukturanalysen zweier Diastereomere von 5',5'''-Diadenosyl- P^1 -thio- P^2, P^3 -methylentrisphosphat, die jeweils mit dem Wildtyp und mit einem an der Bindungsstelle mutierten Fhit-Protein-Typ komplexiert waren. In beiden Fällen befindet sich ein Adenosinrest in einer tiefen Spalte, während der zweite Oberflächenkontakt mit dem umgebenden Lösungsmittel hat.^[3b] Im Gegensatz dazu sind die stärksten Inhibitoren des Lupinen-Enzyms jene drei Methantriphosphonsäuren, die keinen Adenosinrest tragen. Darüber hinaus läßt sich eine wenn auch wenig ausgeprägte Korrelation zwischen einer steigenden Ladung am Inhibitor

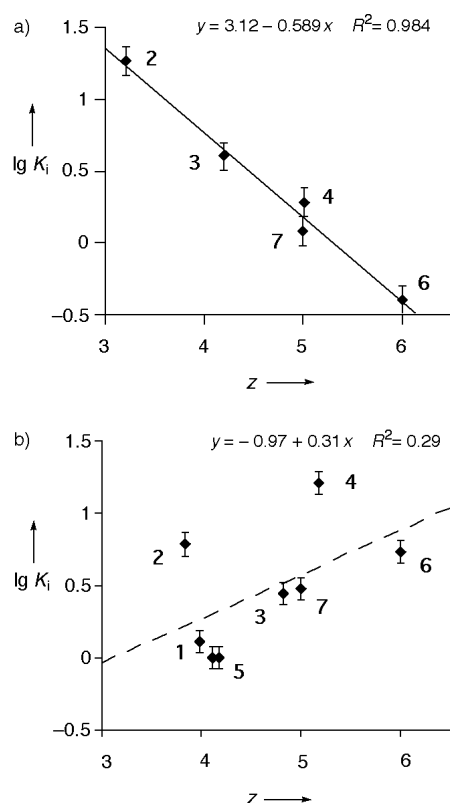


Abbildung 1. Gibbs-Energie-Beziehungen von $\lg K_i$ gegen die Ladung z des Inhibitors für die Bindung einer Reihe von Triphosphonaten und ihren Nucleotidanaloga an Ap₃A-Hydrolasen. a) Human-Fhit-Protein, b) Ap₃A-Hydrolase aus den Samen gelber Lupinen. Die K_i -Werte sind in μM angegeben. Die Ladungen wurden aus den $\text{p}K_a$ -Werten (Tabelle 1) beim pH-Optimum der Enzymaktivität (Fhit-Protein: pH 6.9; Ap₃A-Hydrolase aus Lupinen: pH 8.2) berechnet. Die Funktionen der Ausgleichsgeraden mit den R^2 -Werten sind ebenfalls angegeben.

und einer abnehmenden Affinität für das Lupinen-Enzym erkennen (Abbildung 1b).

Mit diesen neuartigen tripodalen Adeninnucleotiden gelang es erstmals, das Human-Fhit-Protein neben einer alternativen Ap₃A-Hydrolase mit einer mehr als zehnfachen Selektivität zu inhibieren (Tabelle 1). Die Bestimmung des Fhit-Protein-Spiegels ist ein wichtiges Problem der Krebsforschung, das gegenwärtig durch die Aktivität von Enzymen anderer Klassen, die Ap₃A spalten, erschwert wird. Aus diesem Grund werden Fhit-selektive Inhibitoren wie **4** und **6** wertvoll für die Fhit-Diagnose sein, während die Nicht-nucleotid-Spezies **1** und **5** wegen ihrer mehr als tausendfachen Selektivität bei der kompetitiven Inhibition des Lupinen-Enzyms eine komplementäre Rolle bei der Inhibition verwandter Ap₃A-Hydrolasen in menschlichen Zellen spielen könnten. Diese differenzierende Selektivität sollte die Verbindungen zu wertvollen Werkzeugen für die weitere Untersuchung von Ap₃A-Hydrolasen und ihrer Beziehung zur Tumorsuppression machen.

Experimentelles

Enzymassays: Die Inhibitoreigenschaften der supergeladenen Phosphonate wurden in einer Inkubierungsmischung bestimmt (Endvolumen 0.050 mL), die entweder 50 mM Mes/KOH, pH 6.9 (pH-Optimum des

Human-Fhit-Proteins) oder 50 mM Hepes/KOH, pH 8.2 (pH-Optimum der Lupinen-Ap₃A-Hydrolase) sowie 0.1 mM Dithiothreitol, 0.1 mM [³H]-Ap₃A (etwa 400 000 cpm), 1 mM MgCl₂, 1 % Glycerin, 0.1 mg Rinderserumalbumin pro mL, das Inhibitorphosphonat in unterschiedlichen Konzentrationen und das Enzym im Überschuss enthält. Inkubiert wurde bei 30 °C. Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit wurden 0.005-mL-Aliquote zu festgelegten Zeiten (5, 10, 15 und 20 min) entnommen und auf Aluminium-DC-Platten mit Kieselgel und Fluoreszenzindikator (Merck) aufgetragen. Danach wurde ein ADP-Standard zugefügt und die Chromatogramme in Dioxan/Ammoniak/Wasser (6/1/4) entwickelt. Die ADP-Höfe wurden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität gemessen. Die K_i -Werte wurden aus Dixon-Auftragungen berechnet.

Enzympräparation: Das Human-Fhit-Protein wurde in *Escherichia coli* wie beschrieben^[3a] überexprimiert. Die Reinigung aus dem bakteriellen Rohextrakt bestand aus Ammoniumsulfat-Fraktionierung, Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel, Gelfiltration an Sephadex G-100 und Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metallionen an TALON-Harz (Clontech), von dem das adsorbierte Protein mit Imidazol (50 mM) eluiert wurde. Homogene Dinucleosidtriphosphat-Hydrolase aus den Samen gelber Lupinen wurde wie beschrieben^[22] erhalten.

Eingegangen am 12. November 1998 [Z12656]
 International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1244–1247

Stichwörter: Bioorganische Chemie • Enzyminhibitoren • Molekulare Erkennung • Nucleotide • Triphosphonsäuren

- [1] A. G. McLennan, P. C. Zamecnik in *Ap₄A and Other Dinucleoside Polyphosphates* (Hrsg.: A. G. McLennan), CRC Press, Boca Raton, FL, **1992**, S. 1–7.
- [2] a) Z. Siprashvili, G. Sozzi, L. D. Barnes, P. McCue, A. K. Robinson, V. Eryomin, L. Sard, E. Ragliabue, A. Graco, L. Fusetti, G. Schwartz, M. A. Pierotti, C. M. Croce, K. Huebner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 13771–13776; b) L. D. Barnes, P. N. Garrison, Z. Siprashvili, A. Guranowski, A. K. Robinson, S. W. Ingram, C. M. Croce, M. Ohta, K. Huebner, *Biochemistry* **1996**, 35, 11529–11535.
- [3] a) C. Brenner, H. C. Pace, P. N. Garrison, A. K. Robinson, A. Rösler, A. Liu, G. M. Blackburn, C. M. Croce, K. Huebner, L. D. Barnes, *Protein Eng.* **1997**, 10, 1461–1463; b) H. C. Pace, P. N. Garrison, A. K. Robinson, L. D. Barnes, A. Draganescu, A. Rösler, G. M. Blackburn, Z. Siprashvili, C. M. Croce, K. Huebner, C. Brenner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 5484–5489.
- [4] D. M. Maksel, A. Guranowski, S. C. Ilgoutz, A. Moir, G. M. Blackburn, K. R. Gayler, *Biochem. J.* **1998**, 329, 313–319, zit. Lit.
- [5] A. Guranowski, P. Brown, P. A. Ashton, G. M. Blackburn, *Biochemistry* **1994**, 33, 235–240.
- [6] G. M. Blackburn, M.-J. Guo, A. G. McLennan in *Ap₄A and Other Dinucleoside Polyphosphates* (Hrsg.: A. G. McLennan), CRC Press, Boca Raton, FL, **1992**, S. 305–342.
- [7] D. M. Williams, D. L. Jakeman, J. S. Vyle, M. P. Williamson, G. M. Blackburn, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1996**, 31, 88–91; D. M. Williams, D. L. Jakeman, J. S. Vyle, M. P. Williamson, G. M. Blackburn, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 2603–2608.
- [8] G. M. Blackburn, *Chem. Ind. (London)* **1981** (5), 134–138.
- [9] G. E. Lienhard, I. I. Secemski, *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 1121–1127.
- [10] R. M. Dixon, G. Lowe, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 2069–2074.
- [11] X. Liu, X.-R. Zhang, G. M. Blackburn, *Chem. Commun.* **1997**, 52, 87–88.
- [12] a) C. Brenner, P. Garrison, J. Gilmour, D. Peisach, D. Ringe, G. A. Petsko, J. M. Lowenstein, *Nature Struct. Biol.* **1997**, 4, 231–238; b) M. J. Bessman, D. N. Frick, S. F. O'Handley, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 25059–25062; c) G. Sozzi, K. Huebner, C. M. Croce, *Adv. Cancer Res.* **1998**, 74, 141–166.
- [13] H. Gross, B. Costisella, I. Keitel, S. Ozegowski, *Phosphorus Sulfur Silicon* **1993**, 83, 203–207.
- [14] X. Liu, H. Adams, G. M. Blackburn, *Chem. Commun.* **1998**, 2619–2620.
- [15] V. J. Davisson, D. R. Davis, V. M. Dixit, C. D. Poulter, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 1794–1801.

- [16] J. G. Moffatt, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 649–658.
 [17] Siehe V. Wittmann, C. H. Wong, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2144–2147.
 [18] Alle neuen Verbindungen wurden NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch charakterisiert. Hochaufgelöstes Positiv-Ionen-MS: **2**: m/z 571.971, ber. für $[C_{11}H_{15}N_5O_{12}P_3Na_3+H]^+$: 571.970; **4**: m/z 1080.898, ber. für $[C_{21}H_{24}ClN_{10}O_{21}P_5Na_6+H]^+$: 1080.896 (^{35}Cl); **6**: m/z 1398.985, ber. für $[C_{31}H_{38}N_{15}O_{27}P_6Na_6+Na]^+$: 1398.977; **8**: 1296.023, ber. für $[C_{31}H_{37}N_{15}O_{24}P_5Na_5+H]^+$: 1296.021. Ihre Reinheit wurde durch HPLC (BioRad-MA70-Anionenaustauschersäule, Gradientenelution mit 50 mM \rightarrow 700 mM $NH_4^+HCO_3^-$) zu mehr als 98 % bestimmt.
 [19] A. Guranowski, A. Sillero in *Ap₄A and Other Dinucleoside Polyphosphates* (Hrsg.: A. G. McLennan), CRC Press, Boca Raton, FL, **1992**, S. 81–133.
 [20] N. M. H. Thorne, S. Hankin, M. C. Wilkinson, C. Nunez, R. Barraclough, A. G. McLennan, *Biochem. J.* **1995**, *311*, 717–721.
 [21] A. Guranowski, E. Starzynska, P. Brown, G. M. Blackburn, *Biochem. J.* **1997**, *328*, 257–262.
 [22] A. Guranowski, E. Starzynska, E. Bojarska, J. Stepinski, E. Darzynkiewicz, *Protein Expression Purif.* **1996**, *8*, 416–422.
 [23] H. Jakubowski, A. Guranowski, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 9982–9989.

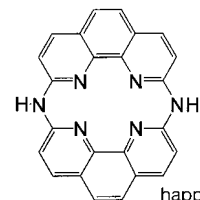
Ein neuartiger Co^{II}-Komplex als spezifisches Reagens für DNA-Ausbuchtungen**

Chien-Chung Cheng,* Yen-Ning Kuo, Kuo-Shen Chuang, Chi-Fong Luo und Wen Jwu Wang*

Ausbuchtungen („bulges“) in Nucleinsäuren sind entscheidende Strukturmerkmale für deren Erkennung durch Nucleinsäure-bindende Proteine in biologischen Systemen.^[1] Trotz der Bedeutung von DNA-Ausbuchtungen sind nur von wenigen detaillierte Strukturinformationen verfügbar;^[2] vermutlich deswegen, weil derartige Strukturen weniger stabil sind. Die Schmelztemperatur von DNA mit einer Ausbuchtung, die von einer einzigen zusätzlichen Base verursacht wird, ist gegenüber der einer entsprechenden DNA, deren Struktur ausschließlich Watson-Crick-Basenpaare enthält, um 2.0–3.6 °C verringert.^[3]

Zwar wurden zahlreiche synthetische chemische Nucleasen entwickelt, um DNA/RNA-Strukturen zu untersuchen.^[4] Dennoch gibt es immer noch sehr wenige spezifische Reagentien für Ausbuchtungen in DNA. Bei zwei Arten von auf

DNA-Ebene wirkenden Antitumor-Wirkstoffen, dem Neocarzinostatin-Chromophor (NCS-C) und Bleomycin (BLM), wurde kürzlich nachgewiesen, daß sie einen DNA-Strangbruch in der Nähe der Ausbuchtung bevorzugt erkennen.^[5] Ebenso ist von DNA-Intercalatoren wie Ethidiumbromid^[6] und $[Pt(terpy)(het)]^+$ (het = „2-Hydroxyethanthiol“ = 2-Sulfanylethanol, terpy = 2,2':6',2'':-Terpyridin)^[7] bekannt, daß sie spezifisch an Ausbuchtungen von Nucleinsäuren binden.^[6] Diese Verbindungen binden allerdings so stark an die doppelsträngigen Domänen der DNA, daß sie eine Änderung der DNA-Konformation an der Bindungsstelle hervorrufen. Wir berichten hier über den neuartigen, oktaedrischen Co^{II}-Komplex $[Co^{II}(tfa)_2(happ)]$ (tfa = Trifluoressigsäure), der ein spezifisches Reagens für DNA-Ausbuchtungen ist, da er solche Strukturen gezielt oxidativ spalten kann. Dieser Komplex bietet auch den Vorteil einer nur geringen Affinität für doppelsträngige DNA. Außerdem weist er keine Spaltungsaktivität bezüglich einzelsträngiger DNA auf.



Die Herstellung des happ-Liganden erfolgte nach einer abgewandelten Vorschrift^[8] zur Kondensation zweier Moleküle 2,9-Dichlor-1,10-phenanthrolin unterhalb von 200 °C im Ammoniakstrom.^[9] Die Co^{II}-Komplexe des happ-Liganden wurden durch dessen Umsetzung mit Cobalt(II)-acetat in Trifluoressigsäure (TFA)/MeOH hergestellt. Aus der Struktur des Komplexes $[Co^{II}(tfa)_2(happ)]$ im Kristall (Abbildung 1) wird deutlich, daß der Komplex zwei verknüpfte 1,10-Phenanthrolin-Einheiten enthält. Dabei kommen alle vier Pyridin-Stickstoffatome auf derselben Koordinationsebene zu liegen, und die beiden labilen tfa-Liganden sind axial angeordnet.^[10] Die durchschnittliche Co-N-Bindungslänge beträgt ca. 1.86 Å. Aus dem EPR-Spektrum des Co^{II}-Komplexes wurde ein durchschnittlicher g-Wert von 2.005–2.331 in Methanol ermittelt, ein Hinweis auf einen oktaedrischen Co^{II}-Komplex. Die Zugabe eines Äquivalents Pyridin führt zu einem schnellen Austausch eines der axialen TFA-Liganden unter Standard-Laborbedingungen, wie sich EPR-spektroskopisch verfolgen ließ. Die tfa-Liganden sind demzufolge labil bezüglich einer Substitution durch Nucleophile.

Vom 1,10-Phenanthrolin(phen)-Liganden des tetraedrischen Komplexes $[Cu^{II}(phen)_2]$ ist bekannt, daß er in die DNA intercaliert. Daher kann diese Eigenschaft auch von $[Co^{II}(tfa)_2(happ)]$ erwartet werden, der ebenfalls diesen planaren, makrocyclischen Liganden enthält. In Anwesenheit von H₂O₂ und unter Bedingungen, die nicht zur Spaltung führen (siehe unten), gab es aber weder beim Topoisomerase-I-Assay^[11] Anzeichen für eine Entwindung der DNA, die durch eine Intercalation in die DNA verursacht wird, noch wurden beim Mobilitätsänderungs-Assay unter nichtdenaturierenden Bedingungen Hinweise auf hochmolekulare Banden in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) gefunden, die den $[Co^{II}(happ)]^{2+}$ -DNA-Addukten zuzuordnen wären. Ferner wies die Schmelztemperatur T_m von Kalbsthymus-DNA (60 µM bezogen auf ein einzelnes Nucleotid), die mit $[Co^{II}(happ)]^{2+}$ (8 µM) inkubiert worden war, nur eine mäßige Änderung von 0.5–1.0 °C auf. Unter ähnlichen

[*] Prof. C.-C. Cheng, Y.-N. Kuo
 Institute of Chemistry
 Academia Sinica
 Taipei 11529 (Taiwan)
 Fax: (+886) 2-27831237
 E-mail: cccheng@chem.sinica.edu.tw

Prof. W. J. Wang, K.-S. Chuang, C.-F. Luo
 Department of Chemistry
 Tangkang University
 Taipei (Taiwan)

[**] Diese Arbeit wurde von der Academia Sinica und vom National Science Council, Taiwan, gefördert. Wir danken den Professoren Sunney I. Chan und Daniel W. J. Kwong für hilfreiche Diskussionen.

Weitere Informationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.