

Die jeweils kürzesten Fe-F-Abstände liegen für die überdachenden BF_4^- -Ionen zwischen 4.76 und 5.55 Å für **1a** und zwischen 4.68 und 5.57 Å für **1b**. Sie sind deutlich größer als die Fe-F-Abstände des im Tetraeder eingeschlossenen BF_4^- -Ions^[10] (Abb. 1). Die schwächere Koordination der äußeren BF_4^- -Ionen wird dadurch deutlich, daß sie im Unterschied zu dem im Tetraeder eingeschlossenen BF_4^- -Ion in Lösung rasch gegen die Gegenionen ausgetauscht werden. Entsprechend der vergleichsweise isometrischen Gestalt der Assoziat **1a**- $[\text{BF}_4]^{3+}$ und **1b**- $[\text{BF}_4]^{3+}$ läßt sich ihre Packung im Kristall in guter Näherung als kubisch flächenzentriert beschreiben^[11] (Abb. 4).



Abb. 4. Kalottendarstellung des Assoziats **1b** $[\text{BF}_4]^{3+}$ (hell: Wirt-Gast-Komplex **1b**, dunkel: die Tetraederflächen überdachende BF_4^- -Ionen).

Die verbleibenden drei BF_4^- -Ionen je Assoziat besetzen die Tetraeder- und Oktaederlücken dieser idealisiert dichtesten Packung. Dabei sind sie in den größeren Oktaederlücken auf zwei Positionen zu je 50% verteilt. Laut NMR-Daten ist die im Kristall vorliegende Packung eine Folge der supramolekularen Organisation der Bausteine.

Die Tatsache, daß die tetraedrischen Wirt-Gast-Komplexe **1** trotz der unterschiedlichen Struktur der bifunktionellen Brückenliganden jeweils selektiv entstehen, läßt auf die Variationsbreite des vorgestellten Synthesekonzeptes schließen.

Die Tatsache, daß die tetraedrischen Wirt-Gast-Komplexe **1** trotz der unterschiedlichen Struktur der bifunktionellen Brückenliganden jeweils selektiv entstehen, läßt auf die Variationsbreite des vorgestellten Synthesekonzeptes schließen.

Experimentelles

Eine Lösung von 624 mg 1,1,1-Tris(diphenylphosphinomethyl)ethan **7** (1 mmol) in 20 mL CH_2Cl_2 wurde unter Rühren zu einer Lösung von 338 mg (1 mmol) $\text{Fe}(\text{BF}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ **12** in 10 mL EtOH getropft. Nach 20 min Rühren bei 20°C wurden 117 mg (1.5 mmol) Fumarsäuredinitril (im Falle von **1a**) oder 120 mg (1.5 mmol) Bernsteinsäuredinitril (im Falle von **1b**) in fester Form auf einmal zugegeben, wobei zunächst keine Farbänderung eintrat. Nach 15 h Rühren bei 20°C bildete sich eine leicht trübe – im Falle von **1a** tief orangefarbene, im Falle von **1b** rote – Lösung, die bis zur Trockene eingedunstet wurde. Der Rückstand wurde dreimal mit je 20 mL Et_2O gewaschen und anschließend im Ölpumpenvakuum bei 10^{-2} mbar getrocknet. Geeignete Kristalle zur Röntgenstrukturanalyse wurden durch Auflösen der mikrokristallinen Pulver in $\text{CH}_3\text{NO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (4/1) mit anschließender Gasphasendiffusion von Et_2O bei Raumtemperatur erhalten.

1a: Ausbeute: 92%; $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 7.5 - 7.3$ (br., 120 H, H_{Ar}), 7.1 (br., 12 H, CN-CH), 2.9 (br., 24 H, $\text{CH}_2\text{-PPh}_2$), 1.95 (br., 12 H, $\text{CH}_3\text{-C}$); $^{31}\text{P-NMR}$: $\delta = 28.5$ (s); $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 133.6$ (d, $^2J(\text{CP}_{\text{trans}}) = 10$ Hz, P-C_(para)), 133.2 (m, C_(ortho)), 131.9 (br., C_(para)), 130.1 (m, C_(meta)), 129.2 (m, C \equiv N), 122.8 (s, CH-C \equiv N), 37.3 ($\text{CH}_3\text{-C}$), 36.5 ($\text{CH}_3\text{-C}$), 31.0 (m, $\text{CH}_2\text{-P}$); $^{11}\text{B-NMR}$: $\delta = 0.25$ (s); $^{19}\text{F-NMR}$ ($T = -30^\circ\text{C}$): $\delta = -202.5$ (s, 28 F, BF_4 -außen), -197.0 (s, 4 F, BF_4 -innen); MS (FAB): m/z (%) = 699 (100, TripodFeF), 547 (66, Tripod-Ph), 1416 (6, Tripod₂Fe₂F₃); IR (CsI): $\tilde{\nu}[\text{cm}^{-1}] = 2254$ (w, C \equiv N), 1437 (m), 1062 (s, br., B-F), 833 (w, P-C-Alkyl), 742 (m), 696 (m), 520 (m); Elementaranalyse ber. für $\text{C}_{188}\text{H}_{168}\text{P}_{12}\text{N}_{12}\text{Fe}_4\text{B}_8\text{F}_{32}$: C 58.12, H 4.36, P 9.57, N 4.33, B 2.23, F 15.65, Fe 5.75; gef.: C 56.38, H 4.34, P 6.37, N 4.04, B 4.05, F 16.4, Fe 6.25.

1b: Ausbeute: 85%; $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 7.5 - 7.4$ (m, 120 H, H_{Ar}), 3.5 (br., 24 H, CN-CH_2), 2.8 (br., 24 H, $\text{CH}_2\text{-PPh}_2$), 1.9 (br., 12 H, $\text{CH}_3\text{-C}$); $^{31}\text{P-NMR}$: $\delta = 30.9$ (s); $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 134.1$ (dd, $^2J(\text{CP}) = 13.1$, $^3J(\text{CP}_{\text{trans}}) = 25.5$ Hz, P-C_(para)), 133.4 (m, C_(ortho)), 131.7 (br., C_(para)), 129.9 (m, C_(meta)), 36.9 (m, $\text{CH}_3\text{-C}$), 36.5 (m, $\text{CH}_3\text{-C}$), 31.6 (m, $\text{CH}_2\text{-P}$), 17.1 (s, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{N}$); $^{11}\text{B-NMR}$: $\delta = 0.21$ (s); $^{19}\text{F-NMR}$ ($T = -30^\circ\text{C}$): $\delta = -198.3$ (br.); $^{19}\text{F-NMR}$ ($T = -30^\circ\text{C}$): $\delta = -201.4$ (s, BF_4 -außen), -199.6 (s, BF_4 -innen); MS (FAB): m/z (%) = 699 (100, TripodFeF), 547 (54, Tripod-Ph), 1417 (15, Tripod₂Fe₂F₃); IR (CsI): $\tilde{\nu}[\text{cm}^{-1}] = 1484$ (m), 1436 (m), 1060 (s, br., B-F), 837 (m, P-C-Alkyl), 742 (m), 700 (m), 521 (m); Elementaranalyse ber. für $\text{C}_{188}\text{H}_{160}\text{P}_{12}\text{N}_{12}\text{Fe}_4\text{B}_8\text{F}_{32}$: C 57.94, H 4.66, P 9.54, N 4.31, B 2.22, F 15.6, Fe 5.73; gef.: C 56.67, H 4.75, P 7.27, N 5.04, B 2.12, F 16.7, Fe 4.91.

Eingegangen am 22. Juli 1996 [Z 9358]

Stichworte: Eisenverbindungen · Käfigverbindungen · Supramolekulare Chemie · Templatsynthesen · Wirt-Gast-Chemie

- [1] H. A. Mayer, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 1239; M. Di Vaira, M. Sacconi, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 338; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 330; M. Di Vaira, F. Mani, S. Moneti, M. Peruzzini, L. Sacconi, P. Stopponi, *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 2230; C. Bianchini, C. Mealli, A. Meli, M. Sabat, P. Zanello, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 185.
- [2] M. Di Vaira, S. Midollini, L. Sacconi, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 1757; C. Mealli, S. Midollini, L. Sacconi, *Inorg. Chem.* **1975**, *14*, 2513; A. Barth, G. Huttner, M. Fritz, L. Zsolnai, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 956; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 929; S. Vogel, A. Barth, G. Huttner, L. Zsolnai, R. Kremer, *ibid.* **1991**, *103*, 325 bzw. **1991**, *30*, 303.
- [3] C. A. Ghilardi, F. Laschi, S. Midollini, A. Orlandini, G. Scapacci, P. Zanello, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1995**, *4*, 531.
- [4] P. Dapporto, S. Midollini, L. Sacconi, *Inorg. Chem.* **1975**, *14*, 1643.
- [5] V. Körner, A. Asam, G. Huttner, L. Zsolnai, M. Büchner, *Z. Naturforsch. B* **1994**, *49*, 1183.
- [6] A. Asam, B. Janssen, G. Huttner, L. Zsolnai, O. Walter, *Z. Naturforsch. B* **1994**, *48*, 1707.
- [7] A. Muth, O. Walter, G. Huttner, A. Asam, L. Zsolnai, C. Emmerich, *J. Organomet. Chem.* **1994**, *468*, 149.
- [8] R. W. Saalfrank, R. Burak, A. Breit, D. Stalke, R. Herbst-Irmer, J. Daub, M. Porsch, E. Bill, M. Mütter, A. X. Trautwein, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1697; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1621; R. W. Saalfrank, *ibid.* **1995**, *107*, 1085 bzw. **1995**, *34*, 993; B. Dietrich, *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 1457; M. Fujita, S. Nagao, K. Ogura, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1649; P. Baxter, J. M. Lehn, A. DeCian, J. Fischer, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 92; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 69; K. Worm, F. P. Schmidtchen, A. Schier, A. Schäfer, M. Hesse, *ibid.* **1994**, *106*, 360 bzw. **1994**, *33*, 327; F. P. Schmidtchen, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1988**, *36*, 8; A. Müller, H. Reuter, S. Dillinger, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2505; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2328; X. Yang, C. B. Knobler, M. F. Hawthorne, *ibid.* **1991**, *103*, 1519 bzw. **1991**, *30*, 1507; M. Newcomb, J. H. Horner, M. T. Blanda, P. J. Squattrito, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6294; T. Beissel, R. E. Powers, K. N. Raymond, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1166; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1084.
- [9] **1a**- $[\text{BF}_4]^-$: $0.20 \times 0.30 \times 0.30$ mm; orthorhombisch, Raumgruppe *Aba2*; $Z = 4$; $a = 2766$ (1), $b = 3007$ (1), $c = 2908$ (2) pm; $V = 24190 \times 10^6$ pm³; $\rho_{\text{ber}} = 1.127$ g cm⁻³; Meßbereich $2.7 \leq 2\theta \leq 54.0^\circ$; 13481 gemessene Reflexe, davon 13481 unabhängig; 5583 beobachtet ($I \geq 2\sigma(I)$); $R = 0.138$, $R_w = 0.434$, Restelektrendichte 1.23×10^{-6} e pm⁻³; **1b**- $[\text{BF}_4]^-$: $0.30 \times 0.30 \times 0.30$ mm; orthorhombisch; Raumgruppe *Aba2*; $Z = 4$; $a = 2743.2$ (6), $b = 2975$ (2), $c = 2866.9$ (8) pm; $V = 23396 \times 10^6$ pm³; $\rho_{\text{ber}} = 1.215$ g cm⁻³; Meßbereich $4.1 \leq 2\theta \leq 47.0^\circ$; 8751 gemessene Reflexe, davon 8751 unabhängig; 6932 beobachtet ($I \geq 2\sigma(I)$); $R = 0.094$; $R_w = 0.278$; Restelektrendichte 1.21×10^{-6} e pm⁻³. Für **1a** und **1b**: Siemens (Nicolet Syntex)-R3m/V-Diffraktometer, Mo $\text{K}\alpha$, Graphit-Monochromator, Lorentz- und Polarisationsfaktor; experimentelle Absorptionskorrektur; ψ -Scan; Direkte Methoden; SHELXL93 [1], SHELXS-86 [2] (G. M. Sheldrick, Universität Cambridge, 1976); Methode der kleinsten Fehlerquadratsummen. Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturanalyse können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, D-76344 Eggenstein-Leopoldsdorfen, unter der Hinterlegungsnummer CSD-405687 (**1a**) und CSD-405686 (**1b**) angefordert werden.
- [10] Bindungslängen [Å] und -winkel [°] für **1b** (vgl. Abb. 1): Fe-N 1.91–1.97, Fe-P 2.25–2.29, N-Fe-N 81.7–85.2, P-Fe-P 88.4–91.0, Fe1-F1 (Fe1-F1A) 4.27, Fe2-F2 (Fe2A-F2A) 4.66, B1-F1 (B1-F1A) 1.39, B1-F2 (B1-F2A) 1.40.
- [11] Eine idealisiert orthorhombisch flächenzentrierte Einheitszelle entsteht durch die Translation entlang der z-Achse um ca. $1/4$ c.
- [12] H. Funk, F. Binder, *Z. Anorg. Chem.* **1926**, *166*, 327.

Ca²⁺-Ionen als Cofaktoren für ein neuartiges RNA-spaltendes Desoxyribozym**

Dirk Faulhammer und Michael Famulok*

Struktur und Reaktivität von Ribozymen und Proteinen hängen von den Wechselwirkungen zwischen ihren Einzelbausteinen ab, ihre Sequenz ist also letztendlich Grundlage für Sekun-

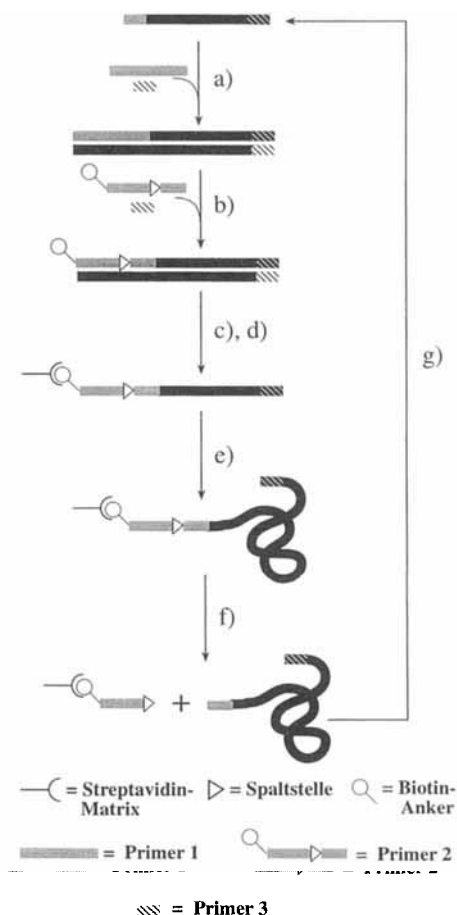
[*] Priv.-Doz. Dr. M. Famulok, Dipl.-Chem. D. Faulhammer
Institut für Biochemie der Universität
Feodor-Lynen-Straße 25, D-81377 München
Telefax: Int. + 89/74017-448
E-mail: Famulok@lmb.uni-muenchen.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Europäischen Union (Projekt-Nr. Biot-CT93-0345) gefördert. Wir danken E.-L. Winnacker für seine Unterstützung und P. Burgstaller sowie H. Büning für hilfreiche Diskussionen.

där- und Tertiärstruktur. Für die Bildung stabiler und aktiver Strukturen spielen vor allem bei den Ribozymen neben der Ionenstärke der Lösung auch zweiwertige Metallionen eine Rolle^[1]. Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen werden von allen bisher bekannten Ribozymen als Cofaktoren verwendet. Die Metallionen sind durch die Aktivierung funktioneller Gruppen oder von Wasser aktiv an den Reaktionen beteiligt und lassen sich nicht durch andere Polykationen ersetzen. Somit sind Ribozyme Metalloenzyme; keines der bekannten Ribozyme ist ohne zweiwertige Metallionen aktiv, so daß diesen eine überragende Bedeutung in der Chemie der Ribozyme zukommt. Die RNA kann man sich als Gerüst für eine ortsspezifische Reaktion des Metallions vorstellen.

Für uns stellte sich die Frage: Läßt sich die In-vitro-Selektion kombinatorischer Nucleinsäurebibliotheken zur Isolierung eines Desoxyribosyms einsetzen, das unabhängig von Metallionen RNA spezifisch schneidet? Und welcher Cofaktor könnte dabei das Metallion ersetzen? Eine interessante Möglichkeit bietet sich mit Histidin, das eine zentrale Rolle bei der Hydrolyse von RNA durch die Ribonuclease A spielt^[2]: Zwei Histidinreste im katalytischen Zentrum des Enzyms, His 12 und His 119, bilden über ihre Imidazolringe ein Säure-Base-Paar und sind dadurch direkt an der hydrolytischen Spaltung der Phosphodiesterbindung von RNA beteiligt. Außerdem ist bekannt, daß Imidazol auch in Lösung als Säure-Base-Paar RNA hydrolysieren kann^[3], und das aktive Zentrum der Ribonuclease A wurde mit Modellverbindungen nachgeahmt^[4]. Unserem Experiment lag daher die Modellvorstellung zugrunde, daß ein Molekül Histidin in unmittelbarer Nachbarschaft der Spaltstelle komplexiert wird und in Lösung mit einem zweiten Histidin-Molekül ein Säure-Base-Paar bildet. Die Nucleinsäure würde dann für eine günstige Positionierung der Imidazolreste sorgen und so die RNA-Spaltung katalysieren.

Die Selektion wurde in Anlehnung an ein von Breaker und Joyce^[5] beschriebenes Experiment konzipiert, in dem die Selektion RNA-spaltender, Pb^{2+} - und Mg^{2+} -abhängiger DNA-Enzyme durchgeführt wurde. Wir stellten eine Bibliothek aus etwa 5×10^{14} unterschiedlichen Einzelstrang-DNAs her. Das 5'-Ende der DNA war mit einem Biotin-Rest verknüpft und bestand aus einer konstanten Region mit einem einzelnen Ribonucleotid (rA) als definierter Spaltstelle. Dieser Region folgte ein 74 Nucleotide langer randomisierter Bereich, der am 3'-Ende von einer zweiten konstanten Region abgeschlossen wurde. Die Bibliothek wurde aus synthetischer DNA hergestellt. Nach zwei sukzessiven Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs), in denen zunächst der Pool amplifiziert und anschließend die 5'-biotinylierte Region mit der Ribonucleotid-Spaltstelle eingeführt wurde, wurde die erhaltene doppelsträngige DNA an eine Streptavidin-Matrix gebunden. Durch Erhöhung des pH-Werts entfernte man den nichtbiotinylierten Gegenstrang und inkubierte die verbleibende immobilisierte einzelsträngige DNA in gepufferter Salzlösung mit 20 mM Histidin bei pH 7.0 und 37 °C. Die Magnesiumionenkonzentration war mit 0.5 mM um den Faktor 40 kleiner als die des Histidins (Schema 1), wodurch eine Bevorzugung der Aminosäure gegenüber dem Metallion als Cofaktor erreicht werden sollte. Um die Wirkung von Schwermetallionen weitgehend auszuschließen, enthielt der Puffer zusätzlich 20 μ M EDTA. Sequenzen, die an rA gespalten worden waren, wurden eluiert und nach erneuter Amplifizierung unter den gleichen Bedingungen wie oben in den nachfolgenden Selektionsschritten eingesetzt (Schema 1). Nach sieben Selektions- und Amplifizierungszyklen war ein markanter Anstieg der Hydrolysegeschwindigkeit zu verzeichnen. Ersetzte man das Ribonucleotid rA durch das entsprechende Desoxyribonucleotid, wurde unter den gleichen Bedingungen keine Hydrolyse-



Schema 1. Selektionsschema; schwarz: randomisierte Region, grau oder gestreift: konstante Regionen (Primer-Bindungsstellen), ∇ in Primer 2: rA-Spaltstelle. a) In der ersten PCR wird die DNA-Bibliothek mit den Primern 1 und 3 amplifiziert, während der Selektion sind es die eluierten Hydrolyseprodukte (siehe Experimentelles). b) In der zweiten PCR mit den Primern 2 und 3 wird mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ markiert. c) Die erhaltene doppelsträngige DNA wird in 1 M NaCl und 50 mM 2-[4-(Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure (HEPES) (pH = 7.4) auf 50–100 μ L Streptavidin-Agarose gegeben und mit 5 \times 500 μ L HEPES gewaschen. d) Mit 5 \times 500 μ L 200 mM NaOH wird zum Einzelstrang denaturiert. e) Die einzelsträngige DNA wird mit 5 \times 500 μ L 125 mM NaCl, 125 mM KCl, 0.5 mM $MgCl_2$, 20 μ M EDTA und 50 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 (pH = 7.0, $T = 37^\circ\text{C}$) äquilibriert. f) Mit 50 mM Histidin wird im Phosphatpuffer (pH = 7.0) bei 37 °C inkubiert. Inkubationszeiten in den Selektionszyklen 1–8: 12 h, in den Selektionszyklen 9 und 10: 1 h. g) Die eluierten Hydrolyseprodukte wurden im nächsten Selektions-/Amplifizierungszyklus eingesetzt.

aktivität erzielt. Laut Kontrolleexperimenten ohne Histidin übernahm das Metallion trotz des Überschusses an Aminosäure aber auch hier die Rolle des Cofaktors^[6].

Die nach drei weiteren Selektions-/Amplifizierungszyklen analysierten Sequenzen von 44 Klonen können hinsichtlich Punktmutationen und Deletionen in acht Klassen unterteilt werden (Tabelle 1). Vier Klassen weisen einen homologen Abschnitt von 23 Nucleotiden Länge auf, dessen Lage innerhalb der Sequenzen von Klasse zu Klasse stark unterschiedlich ist. Ob diese homologe Region zwischen helicalen Bereichen liegt, also z. B. von Watson-Crick-Helices oder anderen Strukturelementen flankiert ist, konnte nicht festgestellt werden. Daher kann für diesen Abschnitt keine allgemeine Sekundärstruktur gefunden werden. Des weiteren wurden keine Übereinstimmungen mit einem kürzlich selektierten, Mg^{2+} -abhängigen DNA-Enzym gefunden^[5b].

Ausgewählte Einzelklone aus den unterschiedlichen Klassen wurden auf katalytische Selbstspaltung in Lösung – unter Selektionsbedingungen, aber ohne Histidin – sowie auf Abhängigkeit

Tabelle 1. Sequenzklassen der selektierten Klone; dargestellt ist die randomisierte Region ohne die konstanten Primer-Bindungsstellen; die in vier Klassen auftretende homologe Region ist grau unterlegt; der Klon Mg 5 gehört zur Klasse 2.

Klassen	Sequenzen	Anzahl
1	AAGCTCTCTCAGCCGACGAAATAGGGAGTTAGCAGCACGAGGTTACACTTTTATCCTCTCCCAAAGTAGGGAC	19
2	AGCACGCATGACTTTGATGCCACGTAAAGTGAAAGAGCTGTTGATCTCTCAGCCGACGAAATGGTGAATGCCCT	12
3	GGCATGTACCCAAGAAGGGGTGGAGCCGGCAGTGACCCCTGCCGAGTAGGGAAGCCCAAGAACGAAGAGTTAAGC	5
4	ATGCTGTTGCTCTCTCAGCCGACGAAATAGTGGGTCGCGATGCTGAATAATCACGGCGAAAGTGGTTCCTATA	3
5	CAGATGTGAAGTTAGAGCTTTGCCAGCnTCGTTAGTAGAGTCAGCGCACAGGGGAAGATTGTATGTCTATAG	2
6	TAGGAAGTAGGGACCTACAAGTTGTCTATTGTAAGTGAAGTTCTGCCAGCTGACGAAATAGTCAGGAGTTAG	1
7	CGTCATGCGAAAAGAAATGGTGAGATTGGCCAGCsgTCGAGTAGTAGTCCAGGGAACATTGCCCGGGGATT	1
8	AGAACGGTAGAGTGCNGGGGTGCAGTTGAGCTTTGTTCAGCsACACGAATAAGAGTCTCGTAGGATTACCAAG	1

Tabelle 2. Selbstspaltung von Klon Mg 5 in Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen M^{2+} (0.5 mM). Ausbeute an Spaltprodukt und pK_a -Werte [1 b, 8] der hydratisierten Metallionen.

M^{2+}	Spaltprodukt [%] [a]	$pK_a([M(H_2O)_n]^{2+})$ [b]	M^{2+}	Spaltprodukt [%] [a]	$pK_a([M(H_2O)_n]^{2+})$ [b]
Pb^{2+}	91.3 ± 1.2	7.7	Mg^{2+}	24.3 ± 2.9	11.4
Zn^{2+}	89.0 ± 0.5	9.0	Ca^{2+}	62.9 ± 10.1	12.9
Cd^{2+}	81.1 ± 0.2	9.6	Sr^{2+}	8.8 ± 0.1	13.3
Mn^{2+}	76.2 ± 4.2	10.6	Ba^{2+}	4.4 ± 1.2	13.5
–	1.7 ± 0.2	–			

[a] Der 5'-endmarkierte, einzelsträngige Klon Mg 5 wurde in 125 mM NaCl, 125 mM KCl, 20 μ M EDTA und 50 mM MOPS (pH = 7.0 bei 37 °C) in Gegenwart von M^{2+} 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Produkte wurden an 10%-PAGE getrennt und die Produktbanden am Phosphorimager quantifiziert. Es wurden zwei Messungen unabhängig voneinander durchgeführt, deren absolute Fehler ebenfalls angegeben sind. [b] K_a bezogen auf die Gleichung: $[M(H_2O)_n]^{2+} \rightleftharpoons [M(H_2O)_{n-1}(OH)]^+ + H^+$. Der pK_a -Wert ist somit ein Maß für die Acidität eines metallkoordinierten Wassermoleküls (und für die Basizität eines metallkoordinierten Hydroxidions, die mit steigendem pK_a -Wert abnimmt), weshalb wir statt M^{2+} hier $[M(H_2O)_n]^{2+}$ angeben.

der Selbstspaltung von anderen zweiwertigen Metallionen (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) untersucht. Für Klon Mg 5 (Abb. 1) ist der Grad der Hydrolyse mit 500 μ M Ca^{2+} (63 %) deutlich höher als der mit Mg^{2+} (25 %). Dies ist insofern bemerkenswert, als die Selektion ohne Ca^{2+} durchgeführt wurde und der pK_a -Wert von Mg^{2+} niedriger ist als der von Ca^{2+} (Tabelle 2), und spräche zunächst gegen eine direkte Beteiligung der Metallhydroxide, wie es z. B. für das Hammerhead-Ribozym beschrieben wurde^[7]. Wie aber Tabelle 2 entnommen werden kann, folgen die Hydrolysegeschwindigkeiten in Gegenwart der übrigen Metallionen dem Trend, der durch die pK_a -Werte vorgegeben und der bei direkter Beteiligung der Metallhydroxide an der Reaktion zu erwarten ist. Analysen chemischer Modifikationen haben allerdings ergeben, daß keine Mg^{2+} - oder Ca^{2+} -abhängigen Unterschiede in der Sekundärstruktur des DNA-Enzyms vorliegen.

Die Katalyseeffizienz von Klon Mg 5 ist stark von den Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Konzentrationen abhängig; in beiden Fällen streben die Geschwindigkeitskonstanten mit steigender Metallionenkonzentration einem Sättigungswert entgegen. Aus Abbildung 2a wird nicht nur deutlich, daß weit unterhalb einer optimalen Metallionenkonzentration selektiert worden war, sondern auch, daß Ca^{2+} -Ionen die Strukturbildung dieses Katalysators eher begünstigt als Mg^{2+} -Ionen, da der Sättigungswert bei einer niedrigeren Ca^{2+} -Konzentration erreicht wird.

Basierend auf der Sekundärstruktur des selektierten Mg 5 (siehe Abb. 1) wurde der unimolekulare in einen bimolekularen Katalysator überführt: Die 47 Nucleotide lange, definierte 5'-Region mit der rA-Spaltstelle bildet bei diesem Katalysator das Substrat; dieses wird mit dem Enzym inkubiert, das die 94 Nucleotide des Restmoleküls umfaßt und aus dem randomisierten Bereich und der definierten 3'-Region besteht. Wie der intramolekulare weist auch der intermolekulare Katalysator eine stark

von der Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Konzentration abhängige Katalyseeffizienz auf (Abb. 2b). Analog wie bei anderen derartigen Katalysatoren^[9] liegt hier das Optimum bei weitaus höheren Metallionenkonzentrationen als bei der intramolekularen Reaktion. Auffällig ist, daß im untersuchten Konzentrationsbereich die Werte der Geschwindigkeitskonstanten der Mg^{2+} -abhängigen Substratspaltung stets deutlich unter denen der Ca^{2+} -abhängigen liegen. Ein steigender pH-Wert des Reaktionsmediums führt bei sonst gleichen Bedingungen (10 mM Mg^{2+} bzw. Ca^{2+}) zu einem Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten der katalysierten Hydrolyse (Abb. 3). Daraus läßt sich eindeutig eine Beteiligung der Metallhydroxide an der Reaktion ableiten, zumal eine Zunahme der Geschwindigkeit bei unkatalysierter Hydrolyse unter den gleichen Bedingungen nicht festgestellt werden konnte. Es wird angenommen, daß die Katalyse in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen durch eine günstigere Positionierung des Metallions an der Spaltstelle effizienter wird, wie dies auch für das Gruppe-I-Intron aus *Tetrahymena* der Fall ist^[10]. Somit bestand das Selektionskriterium lediglich darin, eine günstige Positionierung der Abgangsgruppe und des angreifenden Nucleophils am zu spaltenden Phosphodiester herbeizuführen^[11], ohne daß dabei das zweiwertige Metallion zunächst eine Rolle spielte. Das Metallion kann dann als Lewis-Säure oder Metallhydroxid die Spaltung beschleunigen. Man weiß, daß Ca^{2+} -Ionen direkt an die Hydroxygruppen der Ribose koordinieren^[12] und so zur Aktivierung der 2'-Hydroxygruppe beitragen könnten.

Unter Substratsättigung sind die Eigenschaften ähnlich denen eines echten Enzym-Substrat-Komplexes (Tabelle 3). Die Werte für die Michaelis-Menten-Konstante K_M liegen mit 5.7 μ M für die Mg^{2+} -abhängige und 6.4 μ M für die Ca^{2+} -abhängige Reaktion bei einer Metallionenkonzentration von jeweils 10 mM in ähnlicher Größenordnung. Die katalytischen Konstanten k_{cat} für die

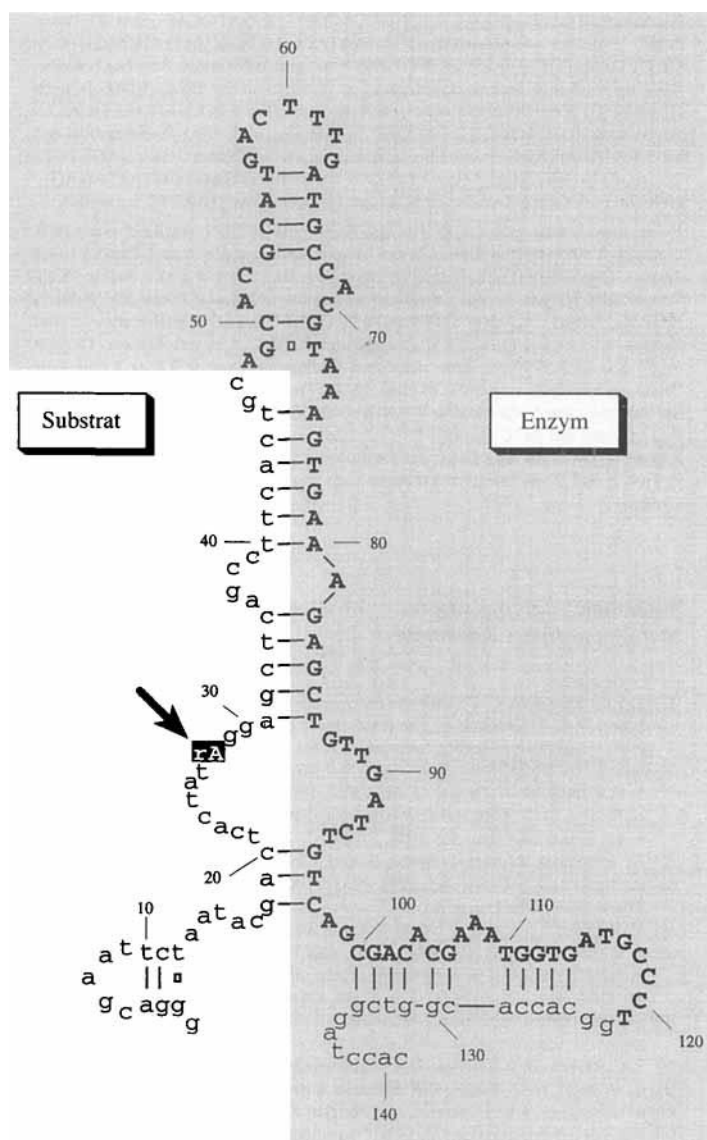


Abb. 1. Sekundärstruktur von Klon Mg5; die Struktur konnte durch Analysen chemischer Modifikationen bestätigt werden (Daten nicht abgebildet). Die konstante Region (in kleinen Buchstaben) des 5'-Endes entspricht dem Substrat. Die definierte rA-Spalstelle (rA: Ribonucleotid) in dieser Region ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Der randomisierte Bereich (große Buchstaben in Fettdruck), der zusammen mit der konstanten Region (in kleinen Buchstaben) des 3'-Endes das Enzym bildet, ist grau unterlegt.

Tabelle 3. Michaelis-Menten-Parameter des Enzym-Substrat-Komplexes aus Klon Mg5 (gleiche Versuchsbedingungen unter [a] und [b]).

M^{2+}	k_{cat} [min^{-1}]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$] [a]	k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$] [b]
Mg^{2+}	0.01	5.7	1.8×10^3	4.4×10^3
Ca^{2+}	0.1	6.4	1.6×10^4	3.4×10^4

[a] Bei Substratsättigung. [b] Bei Substratunterschuss; k_{cat}/K_M entspricht bei Substratunterschuss einer Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung, die sich aus der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung durch Teilen durch die jeweilige Enzymkonzentration und Mittelwertbildung der Einzelergebnisse ergibt. Substratkonzentration: 1 nM, Enzymkonzentrationen: 10, 20, 50, 100, 200, 500 und 1000 nM.

Mg^{2+} -abhängige und für die Ca^{2+} -abhängige Spaltung unterscheiden sich bemerkenswerterweise um eine Zehnerpotenz (0.01 min^{-1} bzw. 0.1 min^{-1}); allerdings ist k_{cat} in der Michaelis-Menten-Gleichung nicht nur Ausdruck der Geschwindigkeit des chemischen Schrittes, sondern es gehen auch Größen wie die

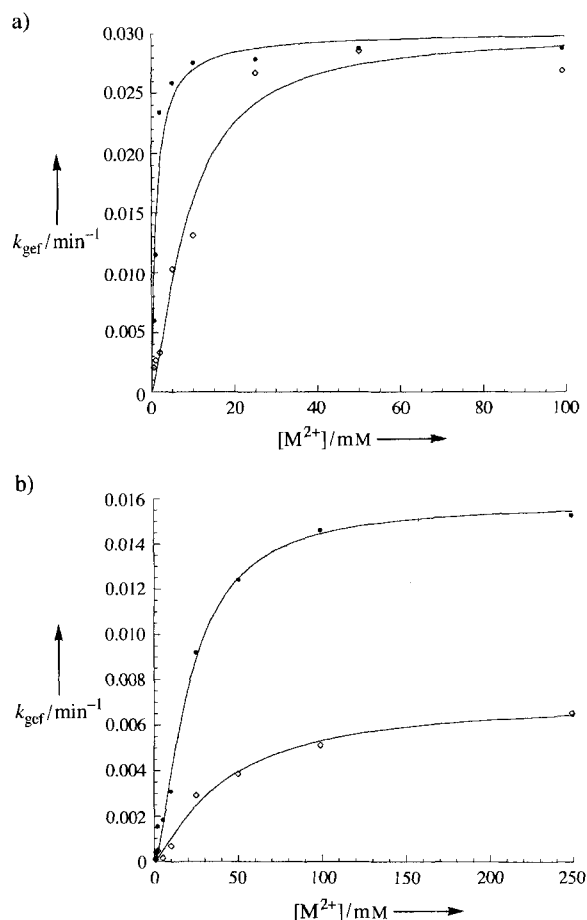


Abb. 2. Abhängigkeit der Katalyseeffizienz von den Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Konzentrationen: a) Intramolekulare Reaktion: In einer PCR wurde Klon Mg5 mit den Primern **2a** und **3a** (siehe Experimentelles) amplifiziert. 10 pmol des gereinigten PCR-Produktes wurden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (30 μCi) in 70 mM Tris-HCl (pH = 7.6), 10 mM MgCl_2 und 5 mM Dithiothreitol (DTT) mit T4-Polynucleotid-Kinase (NEB) am 5'-Ende markiert und anschließend an Streptavidin-Agarose immobilisiert. Auf die Elution des markierten Einzelstrangs mit 300 μL 200 mM NaOH folgte Fällung mit Ethanol aus 0.3 M NaOAc. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert, gewaschen und in H_2O aufgenommen. Der markierte Einzelstrang mit der Aktivität 150–200 cps wurden in 250 mM NaCl, 250 mM KCl, 1 mM EDTA, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Rinderserum-Albumin (BSA) und 50 mM 2-(N-Morpholino)propanesulfonsäure(MOPS)/KOH (pH = 7.0 bei 37°C) mit 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50 und 100 mM MgCl_2 (\circ) bzw. CaCl_2 (\bullet) bei 37°C inkubiert. Nach 0, 30, 60, 120 und 240 min wurden Proben genommen. Die Reaktion wurde durch Fällung mit Ethanol abgebrochen. Die Hydrolyseprodukte wurden an einem 10%-Polyacrylamidgel (PAGE) analysiert und an einem STORM-860-Phosphorimager (Molecular Dynamics) quantifiziert. Die Geschwindigkeitskonstanten k_{gef} ergaben sich aus der Steigung der Geraden aus der Auftragung des Logarithmus der Substratabnahme gegen die Zeit. k_{gef} ist im Diagramm gegen die Metallionenkonzentration $[\text{M}^{2+}]$ aufgetragen. b) Intermolekulare Reaktion: 1 nM mit $[\text{P}^{32}]\text{-5'}$ -endmarkiertes Substrat (analog zu a) wurde mit 100 nM Enzym unter gleichen Pufferbedingungen wie unter a) beschrieben mit 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250 mM MgCl_2 (\circ) bzw. CaCl_2 (\bullet) bei 37°C inkubiert. Probenahme erfolgte nach 0, 30, 60, 120 und 240 min. Die Reaktion wurde durch Fällung mit Ethanol abgebrochen. Zur Analyse und Quantifizierung der Hydrolysebanden siehe Tabelle 2. Die Geschwindigkeitskonstanten k_{gef} ergaben sich aus den Anfangssteigungen der Geraden aus der Auftragung der Substratabnahme gegen die Metallionenkonzentration. k_{gef} ist im Diagramm gegen die Metallionenkonzentration aufgetragen.

Geschwindigkeit des Zerfalls des Enzym-Produkt-Komplexes in diese Konstante ein. Inwieweit k_{cat} durch die Geschwindigkeit des chemischen Schrittes (der Hydrolyse der Phosphodiesterbindung) beeinflusst wird, bleibt somit dahingestellt. Durch Experimente mit dem Substrat im Unterschuss wurden die Werte für k_{cat}/K_M ($4400 \text{ M}^{-1} \text{min}^{-1}$ für die Mg^{2+} -abhängige und $34000 \text{ M}^{-1} \text{min}^{-1}$ für die Ca^{2+} -abhängige Reaktion) bestätigt (Tabelle 3). Ein reines RNA-Substrat mit analoger Sequenz wird unter diesen Bedingungen nicht gespalten.

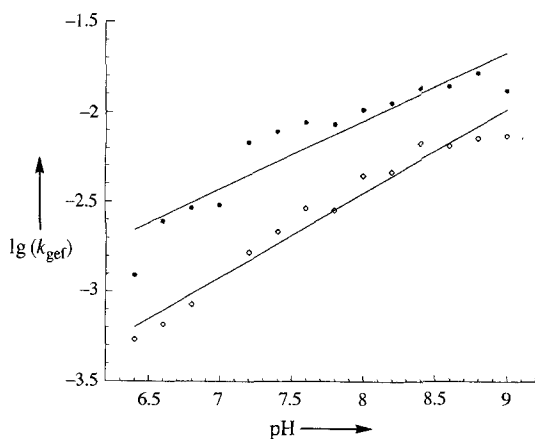


Abb. 3. Abhängigkeit der Katalyseeffizienz der intermolekularen Reaktion vom pH-Wert: 1 nM 5'-endmarkiertes Substrat (siehe Abb. 2a) wurde mit 100 nM Enzym in 250 mM NaCl, 250 mM KCl, 1 mM EDTA, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ BSA und 50 mM Puffer des jeweiligen pH-Wertes bei 37 °C inkubiert: 2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure(MES)/KOH (pH = 6,4, 6,6 bei 37 °C), MOPS/KOH (pH = 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8 bei 37 °C), 3-[Tris(hydroxymethyl)methylamino]-2-hydroxypropansulfonsäure(TAPS)/KOH (pH = 8,0, 8,2, 8,4, 8,6, 8,8, 9,0 bei 37 °C). Der Gehalt an zweiwertigen Metallionen war 10 mM MgCl_2 (○) bzw. CaCl_2 (●). Probenahme erfolgte nach 0, 30, 60, 120 und 240 min. Die Reaktion wurde durch Fällung mit Ethanol abgebrochen (zur Analyse und Quantifizierung der Hydrolysebanden siehe Abb. 2a). Die Geschwindigkeitskonstanten k_{cat} ergaben sich aus den Anfangssteigungen der Geraden aus der Auftragung der Substratabnahme gegen den pH-Wert. $\lg(k_{\text{cat}})$ ist im Diagramm gegen den pH-Wert der Reaktionsmedien aufgetragen.

Das Ergebnis der beschriebenen Selektion ist völlig unerwartet: Obwohl die Sequenzen der Bibliothek während der Selektion nicht mit Ca^{2+} -Ionen Kontakt hatten, ist dieser Cofaktor günstiger als Mg^{2+} , das während der Selektion (wenn auch in einer niedrigeren Konzentration, als es der optimalen entspricht) vorhanden war und zudem einen niedrigeren pK_a -Wert aufweist (siehe Tabelle 2). Daß trotz des großen Überschusses an Aminosäure keine Histidin-abhängige Spaltung stattfand, ist wohl darauf zurückzuführen, daß Nucleinsäuren ein viel größeres Potential zur Komplexierung von Metallionen aufweisen als zur Komplexierung nicht-metallischer Cofaktoren. Selektionen für Spaltungen, die von nicht-metallabhängigen Cofaktoren induziert werden, könnten daher besser verlaufen, wenn Bindungstaschen für den Cofaktor vorhanden sind, um erfolgreich mit den zahlreichen Bindungsstellen für Metallionen konkurrieren zu können. Auch bleibt die Frage, inwieweit eine Aminosäure in Anbetracht elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen der negativen Ladung der Carboxylatgruppe und dem Phosphatrückgrat der Nucleinsäure geeignet ist, als Cofaktor für einen derartigen Katalysator zu dienen. Allerdings ergaben zahlreiche In-vitro-Selektionen für die Bindung von RNA und Einzelstrang-DNA an so unterschiedliche Aminosäuren wie Arginin, Citrullin, Tryptophan und sogar an das unpolare Valin, daß Nucleinsäuren Aminosäuren mit hoher Affinität und Spezifität erkennen können^[13]. Es wäre interessant, die beschriebenen Ergebnisse mit denen einer Selektion zu vergleichen, bei der das neutrale Imidazol oder das positiv geladene Histamin statt des zwitterionischen Histidins als Cofaktor verwendet wird.

Experimentelles

DNA-Bibliothek und Oligonucleotide: Die DNA-Bibliothek mit der Sequenz GGAGCTCAGCCTTCACTGC-(N)₇₄-GGCACCACGGTCGGATCC (N = Nucleotid) und die Oligonucleotide GGGACGAATTCATACTGACTACTATAGGAGCTCAGCCTTCACTGC 1, Biotin-GGGACGAATTCATACTGACTACTATAGGAGCTCAGCCTTCACTGC 2, GTGGATCCGACCGTGGTGCC 3 und Biotin-3 (3a) wurden durch Standard-Oligonucleotidchemie mit einem Millipore-Expedite-Oligonucleotid-Synthesepapparat hergestellt, ebenso das DNA-Enzym AGCAGCATGACTTTGATGCCACGTAAGTGAAAGAGCTGTTGATCTGTCA GCG-

ACACGAATGGTGATCCCTGGCACCACGGTCGGATCCAC. Das 47 Basen lange Substrat GGGACGAATTCATACTGACTACTATAGGAGCTCAGCCTTCACTGC wurde von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen, das Oligonucleotid 2a (wie 2, jedoch ohne Biotin) von der Firma MWG Biotech (Ebersberg). Das RNA-Substrat GGGACGAUUUCUAAUACGACUCACU-AUAGGAGCUCAGCCUUCACUGC wurde durch In-vitro-Transkription mit T7-RNA-Polymerase aus den Oligonucleotiden CGAGTGAAGGCTGAGCTCC-TATAGTGAAGTCGTATTAGATTCGTCCTATAGTGAGTCGTATTAGAG-CGC und GCGCTCTAATACGACTCACTATAGGGACGAATTC hergestellt.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Die Ausgangsbibliothek wurde in einer PCR (2 mL) mit 800 pmol einzelsträngigem Templat und 2 μM der Primer 1 und 3 sowie 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)/HCl (pH = 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 0,03 % Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween-20), 0,001 % Gelatine, 200 μM von jedem dNTP und 0,02 U μL^{-1} Taq-DNA-Polymerase in fünf Cyclen mit 94 °C (1 min), 55 °C (1 min) und 72 °C (2 min) amplifiziert. Danach folgte eine PCR (20 mL) unter denselben Bedingungen mit je 0,4 μM 2 und 3 als Primer in drei Cyclen mit 94 °C (4 min), 55 °C (7 min) und 72 °C (7 min). Im Verlauf der Selektion wurde die eluierte DNA in einer PCR (100 μL) mit 0,2 μM 1 und 3 in 7–12 Cyclen mit 94 °C (1 min), 55 °C (1 min) und 72 °C (2 min) amplifiziert. Anschließend entnahm man 10 μL des Reaktionsansatzes; in einer PCR (200 μL) mit je 1 μM 2 und 3 als Primern markierte man mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (10 μCi) in 7–10 Cyclen.

Eingegangen am 17. Juli 1996 [Z9339]

Stichworte: DNA-Enzyme · In-vitro-Selektion · Katalyse · Metalloenzyme · Ribozyme

- [1] a) S. C. Dahm, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1991**, *30*, 9464; b) T. Pan, D. M. Long, O. C. Uhlenbeck in *The RNA-World* (Hrsg.: R. F. Gesteland, J. F. Atkins), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1993**, S. 271; c) T. A. Steitz, J. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6498; d) L. G. Laing, T. C. Gluick, D. E. Draper, *J. Mol. Biol.* **1994**, *237*, 577; e) D. M. Long, F. J. LaRiviere, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1995**, *34*, 14435; f) W. G. Scott, A. Klug, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 220.
- [2] A. Wlodawer, R. Bott, L. Sjölin, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 1325.
- [3] R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 317; A. J. Kirby, R. E. Marriott, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 833.
- [4] M. A. Podymonogin, V. V. Vlassov, R. Giegé, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5960.
- [5] a) R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 223; P. Burgstaller, M. Famulok, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1303; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1189; b) R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 655.
- [6] Eine parallel durchgeführte Selektion, in der Spermin statt Mg^{2+} zur Stabilisierung von Tertiärstrukturen eingesetzt wurde, erbrachte dasselbe Resultat.
- [7] S. C. Dahm, W. B. Derrick, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1993**, *32*, 13040.
- [8] R. Rohatgi, D. P. Bartel, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3332.
- [9] S. E. Butcher, J. E. Heckman, J. M. Burke, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 29648.
- [10] Für das Gruppe-I-Intron führt Ca^{2+} zu einem anderen Spaltprodukt als Mg^{2+} (bei pH = 9 ohne Guanidin-Cofaktor). a) B. Streicher, E. Westhof, R. Schroeder, *EMBO J.* **1996**, *15*, 2556; b) ein Analogon des Gruppe-I-Introns, in dem Mg^{2+} durch Ca^{2+} ersetzt werden kann, wurde durch In-vitro-Entwicklung isoliert. N. Lehman, G. F. Joyce, *Nature* **1993**, *361*, 182.
- [11] Dies ist beispielsweise anhand der Kristallstruktur einer RNA-Helix mit einem einzelnen ausgestülpten Adenosinrest belegt: S. Portmann, S. Grimm, C. Workman, N. Usman, M. Egli, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 173.
- [12] E. A. Brown, C. E. Bugg, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1980**, *36*, 2597.
- [13] a) M. Famulok, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3990; b) G. J. Connell, M. Illangsekere, M. Yarus, *Biochemistry* **1993**, *32*, 5497; c) M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1698; d) I. Majerfeld, M. Yarus, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 267; e) K. Harada, A. D. Frankel, *EMBO J.* **1995**, *14*, 5798; f) A. Geiger, P. Burgstaller, H. von der Eltz, A. Roeder, M. Famulok, *Nucleic Acid Res.* **1996**, *24*, 1029; g) Y. Yang, M. Kochoyan, P. Burgstaller, E. Westhof, M. Famulok, *Science* **1996**, *274*, 1343.