

Stabilitätskonstanten**Zwei Metallionen behindern sich kaum bei der Koordination an ein Purin****

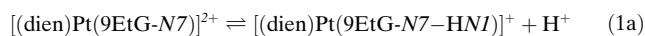
Bernd Knobloch, Roland K. O. Sigel,* Bernhard Lippert und Helmut Sigel

In biologischen Systemen sind häufig zwei (oder mehr) Metallionen in unmittelbarer Nähe zueinander koordiniert.^[1] So sind zum Beispiel im aktiven Zentrum der Cu,Zn-Superoxid-Dismutase die beiden Metallionen durch das Imidazolat eines Histidinrestes verbrückt, während in bestimmten Eisenzuständen Sulfidionen oder Cysteinreste Metallzentren verbrücken. Nicht nur Proteine, sondern auch RNA-Moleküle benötigen ein- und zweiwertige Metallionen (meist Mg²⁺) zum Aufbau ihrer korrekten, aktiven Struktur.^[2a-f] So sind mehrere Fälle bekannt, in denen bis zu fünf Mg²⁺-Ionen einander direkt benachbart sind,^[2g-m] um entweder spezielle Strukturen und Tertiärkontakte zu stabilisieren^[2g-j] oder direkt bei der Katalyse mitzuwirken.^[2k-m] Die Koordination von Mg²⁺ (manchmal eine Outer-Sphere-Koordination über Wassermoleküle)^[2c,j] erfolgt dabei häufig an den Atomen N7 und/oder (C6)O einer Guaninbase.^[2h,i,l] Außer diesen beiden Acceptorstellen ist auch die N1-Position von Guanin von Interesse: Es gibt Hinweise, dass das deprotonierte N1-Ringstickstoffatom direkt an der Katalyse des Hairpin(Haarnadelschleifen)-Ribozyme beteiligt ist.^[2n] In Proteinen und RNA werden die Metallionen durch die Bindung an weitere Koordinationsstellen innerhalb der Moleküle genau positioniert. Was geschieht nun aber in Abwesenheit solcher zusätzlichen Bindungsstellen? Aus Studien mit kinetisch inerten Metallionen wie Pt²⁺ ist bekannt, dass zwei solche Metallionen gleichzeitig an N1 und N7 von Adenin^[3a,b] und Guanin^[3c,d] koordinieren können. Dennoch gibt es außer für Pd²⁺^[4] keine weiteren Daten über die gleichzeitige Bindung zweier biologisch relevanter oder

kinetisch labiler Metallionen an eine Nucleobase in Lösung. Entsprechende Untersuchungen sind jedoch zum Verständnis der Struktur und Funktionsweise von Ribozymen von entscheidender Bedeutung.

Um den gegenseitigen Einfluss, den zwei an dasselbe Purin koordinierte Metallionen aufeinander und auf ihre Bindungsstabilität ausüben, zu quantifizieren, untersuchten wir die Metallionenbindungs-eigenschaften eines Guanins mit einem bereits an die N7-Position koordinierten Metallion. Das Komplex-

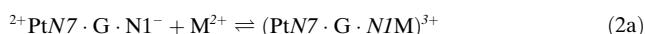
[(dien)Pt(9EtG-N7)]²⁺ (Schema 1), das aus einem 9-Ethylguanin (9EtG) mit einer kinetisch inerten (dien)Pt²⁺-Gruppe an N7 besteht, ist für diese Untersuchung besonders geeignet, da nach der Deprotonierung von H(N1) die Koordination eines zusätzlichen Metallions stattfinden kann. Mithilfe potentiometrischer pH-Titrationen (25 °C; I = 0.1M, NaNO₃)^[5a,b] bestimmten wir die Säurekonstante $K_{\text{H(dien)Pt(9EtG-N7)}}^{\text{H}}$ für das Gleichgewicht (1a):



$$K_{\text{H(dien)Pt(9EtG-N7)}}^{\text{H}} = \frac{[(\text{dien})\text{Pt}(9\text{EtG-N7-HNI})]^+ [\text{H}^+]}{[(\text{dien})\text{Pt}(9\text{EtG-N7})]^{2+}} \quad (1b)$$

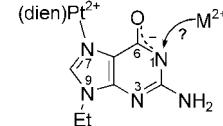
Wir erhielten $\text{p}K_{\text{H(dien)Pt(9EtG-N7)}}^{\text{H}} = 8.17 \pm 0.03$. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit dem früher NMR-spektroskopisch ermittelten Wert von 8.14 ± 0.06 überein.^[5c] Der Vergleich mit der Säurekonstanten von freiem 9EtG, $\text{p}K_{\text{9EtG}}^{\text{H}} = 9.57 \pm 0.05$,^[5a] zeigt, dass die Koordination einer (dien)Pt²⁺-Einheit an N7 von Guanin die Acidität von H(N1) um $\Delta pK_{\text{s,Pl,H}} = 1.40 \pm 0.06$ erhöht.

Die Koordinationseigenschaften des deprotonierten Ringstickstoffatoms N1 von $[(\text{dien})\text{Pt}(9\text{EtG-N7-HNI})]^+$ wurden nun mit Cu²⁺ und Mg²⁺ für das Gleichgewicht (2a) untersucht, wobei ${}^{2+}\text{PtN7-G-N1}^-$ den Komplex $[(\text{dien})\text{Pt}(9\text{EtG-N7-HNI})]^+$ und $(\text{PtN7-G-NIM})^{3+}$ den zweikernigen Komplex aus $[(\text{dien})\text{Pt}(9\text{EtG-N7-HNI})]^+$ und M²⁺ darstellen:



$$K_{\text{PtN7-G-NIM}}^{\text{M}} = \frac{[(\text{PtN7-G-NIM})^{3+}]}{{}^{2+}\text{PtN7-G-N1}^- [\text{M}^{2+}]} \quad (2b)$$

Cu²⁺ wurde wegen seiner bekannten großen Affinität für Stickstoffliganden^[6] und Mg²⁺ wegen seiner biologisch wichtigen Rolle in Ribozymen gewählt.^[2] Die für Gleichung (2b) erhaltenen Stabilitätskonstanten betragen $\lg K_{\text{PtN7-G-N1Cu}}^{\text{Cu}} = 3.45 \pm 0.25$ bzw. $\lg K_{\text{PtN7-G-N1Mg}}^{\text{Mg}} = 0.65 \pm 0.3$. Vergleicht man nun unsere Resultate mit der Affinität dieser Metallionen zu an der N1-Position deprotoniertem 9EtG ($\lg K_{\text{Cu(9EtG-HNI)}}^{\text{Cu}} = 4.45 \pm 0.25$ für $[\text{Cu}(9\text{EtG-HNI})]^+$ ^[7a] bzw. $\lg K_{\text{Mg(9EtG-HNI)}}^{\text{Mg}} =$



Schema 1. Welchen Effekt hat ein an N7 gebundenes Metallion auf die Koordination eines weiteren M²⁺ an N1 im Komplexkation $[(\text{dien})\text{Pt}(9\text{EtG-N7-HNI})]^+$? (dien = Diethyltriamin = 1,4,7-Triazaheptan; 9EtG = 9-Ethylguanin).

[*] Dr. B. Knobloch, Prof. Dr. R. K. O. Sigel

Universität Zürich
Anorganisch-chemisches Institut
Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 1-635-6802
E-mail: roland.sigel@aci.unizh.ch

Prof. Dr. B. Lippert
Universität Dortmund
Fachbereich Chemie
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)

Dr. B. Knobloch, Prof. Dr. H. Sigel
Universität Basel
Departement Chemie
Anorganische Chemie
Spitalstrasse 51, 4056 Basel (Schweiz)

** Diese Arbeit wurde unterstützt durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung über die Projekte PP002-68733/1 (R.K.O.S., Förderungsprofessur) und 20-66647.01 (H.S.), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (B.L.), den Fonds der Chemischen Industrie (B.L.) sowie durch das Schweizerische Bundesamt für Bildung und Wissenschaft im Rahmen des COST-D20-Programms (H.S.).

1.0 ± 0.2 für $[\text{Mg}(\text{9EtG}-\text{HNI})]^+$ ^[7b]), so wird ihre Bedeutung klar: Die Stabilitätsdifferenzen, die durch die Koordination der (dien)Pt²⁺-Gruppe an die N7-Position erhalten werden, betragen $\Delta \lg K_{\text{Pt,Cu}} = (4.45 \pm 0.25) - (3.45 \pm 0.25) = 1.0 \pm 0.35$ (3σ) für das Cu²⁺- bzw. $\Delta \lg K_{\text{Pt,Mg}} = (1.0 \pm 0.2) - (0.65 \pm 0.3) = 0.35 \pm 0.35$ (3σ) für das Mg²⁺-System. Dies bedeutet, dass sich zwar die beiden gleichzeitig an N1 und N7 koordinierten zweiwertigen Metallionen abstoßen, dass diese Abstoßung aber erstaunlicherweise relativ gering ist. Der abstoßende Effekt ist bei der Koordination von Mg²⁺ erwartungsgemäß kleiner, da dieses Metallion normalerweise über ein Wassermolekül durch eine Outer-Sphere-Wechselwirkung an derartige Stickstoffliganden koordiniert.^[7c-e] Diese reduzierte Abstoßung stimmt mit Erwartungen aus theoretischen Rechnungen überein.^[8] Es ist auch wichtig, die eigentlich geringe Stabilität des Mg²⁺-Komplexes nicht zu unterschätzen: Die relativ fest gebundenen Wassermoleküle der Hydratsphäre eines Mg²⁺-Ions sind in einer RNA-Struktur stark über Wasserstoffbrücken mit einer Vielzahl weiterer Atome verbunden,^[2g-j,m] wodurch die geringe Stabilität einer isolierten Koordination kompensiert wird.

Wie groß ist nun die Metall-Metall- und Metall-Proton-Abstoßung im Vergleich zur Proton-Proton-Abstoßung zwischen den N1- und N7-Positionen? Die Mikrosäurekonstante^[9a] $pK_{\text{H-N7-N1-H}}^{\text{H-N7-N1}}$ = 7.22 ± 0.01 beschreibt die Deprotonierung von H(N1) bei Gegenwart eines Protons an N7 von H(9EtG)⁺, was zum zwitterionischen ($^+\text{HN7-9EtG}-\text{HNI}^-$)[±]-Tautomer führt. Folglich beträgt die Proton-Proton-Wechselwirkung $\Delta pK_{\text{s/H,H}} = (9.57 \pm 0.05) - (7.22 \pm 0.01) = 2.35 \pm 0.05$ (3σ). Diese Abstoßung ist beträchtlich stärker als die Pt²⁺-Proton- ($\Delta pK_{\text{s/Pt,H}} = 1.40 \pm 0.06$) wie auch die Pt²⁺-M²⁺-Wechselwirkung ($\Delta \lg K_{\text{Pt,Cu}} = 1.0 \pm 0.35$ (3σ) und $\Delta \lg K_{\text{Pt,Mg}} = 0.35 \pm 0.35$ (3σ); siehe oben). Daraus folgt, dass die Clusterbildung von Metallionen in RNA, besonders von Mg²⁺, erstaunlich leicht geschehen kann. Es ist also zu erwarten, dass noch weitere Metallionencluster in RNA-Strukturen identifiziert werden. Solche Cluster eignen sich besonders dazu, bestimmte Faltungen in Tertiärstrukturen zu stabilisieren sowie Reaktionen zu beschleunigen oder Katalyse überhaupt erst zu ermöglichen. Tatsächlich wurde bereits vorgeschlagen, dass in Ribozymen wie RNase P mehrere Metallionen miteinander kooperieren.^[2f]

Die Ergebnisse zeigen, dass bei zweiwertigen Metallionen die Metall-Metall-Abstoßung kleiner als die Metall-Proton-Abstoßung ist^[9b] und dass diese wiederum kleiner als die Proton-Proton-Wechselwirkung ist. Dies stimmt mit Beobachtungen überein,^[4a] die auf Gleichgewichtsstudien an Pd²⁺-Purin-Systemen mithilfe von ¹H-NMR-Experimenten beruhen.^[4b] Es ist zudem bemerkenswert, dass bei Purinbasen der Effekt von Ladungen an N1 und N7 sowohl wechselseitig als auch von gleicher Größe ist; d.h., der Effekt einer Ladung an N1 auf eine Ladung an N7 ist der gleiche wie der einer Ladung an N7 auf eine Ladung an N1; diese Äquivalenz der Effekte ist für M²⁺-H⁺-Wechselwirkungen gezeigt worden.^[9b]

Die Säurekonstante $pK_{\text{(dien)Pt(9EtG-N7)}}^{\text{H}} = 8.17$ liegt nahe beim physiologischen pH-Bereich, für Guanosin- und 2'-Desoxyguanosinreste liegen die pK_s -Werte sogar nochmals um ca. 0.3 pK-Einheiten tiefer.^[5a,b] Zusätzlich zur Erhöhung der Acidität von H(N1) durch Koordination eines Metallions

an N7 erleichtert auch die Koordination eines weiteren Metallions an N1 die gleichzeitige Deprotonierung von H(N1) infolge des Wettbewerbs zwischen Metallion und Proton um die Koordination. Dies bedeutet, dass bei einem physiologischen pH-Wert von ca. 7.5 problemlos zwei Metallionen gleichzeitig an die N7- und die N1-Position von Purinbasen in Ribozymen koordinieren können.

Experimentelles

9-Ethylguanin wurde von Sigma Chemical Co., St. Louis (MO) bezogen. Der Komplex [(dien)Pt(9EtG-N7)][ClO₄]₂·2H₂O wurde über das Zwischenprodukt [(dien)PtI] hergestellt.^[3c,10a] Für die übrigen Chemikalien siehe Lit. [5a,b]. Die potentiometrischen pH-Titrationen in wässriger Lösung und ihre Auswertung wurden wie bereits beschrieben durchgeführt.^[5b] Zur Bestimmung der Säurekonstanten $pK_{\text{(dien)Pt(9EtG-N7)}}^{\text{H}}$ [Gl. (1b)] wurden 25 mL einer wässrigen 0.2 mM HNO₃-Lösung (25 °C; $I = 0.1\text{M}$, NaNO₃) sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von 0.29 bis 0.41 mM [(dien)Pt(9EtG-N7)]²⁺ unter N₂ mit 0.8 mL einer 0.03 M NaOH-Lösung titriert. Die Stabilitätskonstanten $K_{\text{PLN7-G-NM}}^{\text{M}}$ [Gl. (2b)] der Mg²⁺- und Cu²⁺-Komplexe wurden unter den gleichen Bedingungen bestimmt,^[10b] wobei NaNO₃ teilweise oder vollständig durch M(NO₃)₂ ersetzt wurde. Die Verhältnisse [(dien)Pt(9EtG-N7)]²⁺/M²⁺ betragen 1:90 für Mg²⁺ und 1:58, 1:45 oder 1:36 für Cu²⁺. Wegen der geringen Puffersenkung im Mg²⁺-System (d.h. der kleinen Differenz zwischen dem pK_s -Wert des Liganden und der scheinbaren Aciditätskonstanten pK_s' , die in Gegenwart von M²⁺ gemessen wird^[10b]) und der Bildung von Hydroxokomplexen im Falle des Cu²⁺-Systems sind die Fehlergrenzen der gemessenen Stabilitätskonstanten relativ groß. Der Wert für $K_{\text{(dien)Pt(9EtG-N7)}}^{\text{H}}$ [Gl. (1b)] ergibt sich aus dem Durchschnitt von fünf unabhängigen Titrationspaaren; im Falle der Stabilitätskonstanten [Gl. (2b)] für die Cu²⁺- und Mg²⁺-Systeme ergibt er sich aus dem Durchschnitt von drei bzw. vier unabhängigen Titrationspaaren. Die angegebenen Fehlergrenzen entsprechen dem dreifachen Standardfehler des Mittelwertes (3σ) oder der Summe der wahrscheinlichen systematischen Fehler – je nachdem, welcher Betrag größer ist.

Eingegangen am 10. Februar 2004 [Z53987]

Stichwörter: Magnesium · Metall-Metall-Wechselwirkungen · Ribozyme · RNA · Stabilitätskonstanten

- [1] *Handbook on Metalloproteins* (Hrsg.: I. Bertini, A. Sigel, H. Sigel), Dekker, New York, **2001**, S. 1–1182.
- [2] a) R. K. O. Sigel, A. M. Pyle, *Met. Ions Biol. Syst.* **2003**, *40*, 477–512; b) A. M. Pyle, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2002**, *7*, 679–690; c) S. E. Butcher, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 315–320; d) R. K. O. Sigel, D. G. Sashital, D. L. Abramovitz, A. G. Palmer III, S. E. Butcher, A. M. Pyle, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 187–192; e) R. K. O. Sigel, A. Vaidya, A. M. Pyle, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 1111–1116; f) M. Bränvall, L. A. Kirsebom, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 12943–12947; g) C. C. Correll, B. Freeborn, P. B. Moore, J. A. Steitz, *Cell* **1997**, *91*, 705–712; h) P. Auffinger, L. Bielecki, E. Westhof, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 551–561; i) J. H. Cate, R. L. Hanna, J. A. Doudna, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 553–558; j) L. Jovine, S. Djordjevic, D. Rhodes, *J. Mol. Biol.* **2000**, *301*, 401–414; k) L. B. Weinstein, B. C. N. M. Jones, R. Cosstick, T. R. Cech, *Nature* **1997**, *388*, 805–808; l) S.-O. Shan, A. Yoshida, S. Sun, J. A. Piccirilli, D. Herschlag, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12299–12304; m) S.-O. Shan, A. V. Kravchuk, J. A. Piccirilli, D. Herschlag,

Biochemistry **2001**, *40*, 5161–5171; n) P. C. Bevilacqua, *Biochemistry* **2003**, *42*, 2259–2265.

- [3] a) R. K. O. Sigel, S. M. Thompson, E. Freisinger, B. Lippert, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1968–1980; b) R. K. O. Sigel, S. M. Thompson, E. Freisinger, B. Lippert, *Chem. Commun.* **1999**, 19–20; c) G. Frommer, H. Schoellhorn, U. Thewalt, B. Lippert, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 1417–1422; d) B. Longato, G. Bandoli, G. Trovo, E. Marasciulo, G. Valle, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 1745–1750.
- [4] a) R. B. Martin, *Met. Ions Biol. Syst.* **1996**, *32*, 61–89, siehe Seite 84; b) K. H. Scheller, V. Scheller-Krattiger, R. B. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6833–6839.
- [5] a) B. Song, J. Zhao, R. Griesser, C. Meiser, H. Sigel, B. Lippert, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2374–2387; b) C. P. Da Costa, H. Sigel, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 3475–3482; c) R. K. O. Sigel, E. Freisinger, B. Lippert, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 287–299.
- [6] a) R. B. Martin, *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *339*, 27–33; b) H. Sigel, D. B. McCormick, *Acc. Chem. Res.* **1970**, *3*, 201–208.
- [7] a) Da die Säurekonstanten $pK_{9EtG}^H = 9.57 \pm 0.05$ und $pK_{9MeG}^H = 9.56 \pm 0.02$ ($9MeG = 9\text{-Methylguanin}$) identisch sind, wurde hier für den Vergleich der Mittelwert der Stabilitätskonstanten der Cu^{2+} -Komplexe von 9MeG und 9EtG verwendet;^[5a] b) die Stabilitätskonstante des Mg^{2+} -Komplexes mit an N1-Position deprotoniertem 2'-Desoxyguanosin, ($d\text{Guo}-\text{HN}^+$), beträgt $\lg K_{\text{Mg}(d\text{Guo}-\text{HN}^+)}^M = 0.94 \pm 0.14$ ^[5b] Da zum einen die Säurekonstante $pK_{d\text{Guo}}^H = 9.25 \pm 0.02$ ^[5b] von $d\text{Guo}$ nur geringfügig kleiner ist als die von 9EtG ($pK_{9EtG}^H = 9.57 \pm 0.05$)^[5a] und zum anderen die Stabilität der Mg^{2+} -Komplexe mit N-Donorliganden praktisch unabhängig von der Basizität des involvierten Stickstoffatoms ist,^[7c–e] liegt die Stabilitätskonstante für den $[\text{Mg}(9\text{EtG}-\text{HN}^+)]^+$ -Komplex wahrscheinlich sehr nahe bei $\lg K_{\text{Mg}(9\text{EtG}-\text{HN}^+)}^M = 1.0 \pm 0.2$ und somit innerhalb der angegebenen Fehlergrenze; c) L. E. Kapinos, H. Sigel, *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *337*, 131–142; d) L. E. Kapinos, B. Song, H. Sigel, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1794–1802; e) L. E. Kapinos, B. Song, H. Sigel, *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *280*, 50–56.
- [8] a) J. Šponer, M. Sabat, L. Gorb, J. Leszczynski, B. Lippert, P. Hobza, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 7535–7544; b) J. E. Šponer, J. Leszczynski, F. Glahé, B. Lippert, J. Šponer, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 3269–3278.
- [9] a) G. Kampf, L. E. Kapinos, R. Griesser, B. Lippert, H. Sigel, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2002**, 1320–1327; b) R. Griesser, G. Kampf, L. E. Kapinos, S. Komeda, B. Lippert, J. Reedijk, H. Sigel, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 32–41.
- [10] a) G. W. Watt, W. A. Cude, *Inorg. Chem.* **1968**, *7*, 335–338; b) R. K. O. Sigel, B. Song, H. Sigel, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 744–755.