

## Kovalente Hämin-DNA-Addukte zur Herstellung einer neuartigen Klasse artifizieller Häm-Enzyme\*\*

Ljiljana Fruk und Christof M. Niemeyer\*

Ein wichtiges Ziel in der Nanobiotechnologie ist es, die Herstellung neuartiger Biomaterialien im Bereich weniger Nanometer präzise zu steuern.<sup>[1]</sup> DNA-Oligomere spielen wegen ihrer Fähigkeit zur hochspezifischen molekularen Erkennung eine herausragende Rolle als strukturdirigierende Agentien für den Bottom-up-Aufbau nanostrukturierter Funktionseinheiten. Die Herstellung halbsynthetischer DNA-Protein-Konjugate ermöglicht es somit, die einzigartigen Eigenschaften von DNA mit der nahezu unbegrenzten Vielfalt funktionaler Proteinkomponenten zu vereinen, die durch natürliche Evolution für hochspezifische katalytische Umsetzungen, Energieumformungen oder Translokationsvorgänge optimiert wurden.<sup>[2]</sup> Will man die Funktionalität solcher DNA-Protein-Konjugate nutzen, muss man allerdings die Aufgabe meistern, Synthesestrategien zu entwickeln, mit denen sowohl die Stöchiometrie als auch die Regioselektivität der DNA-Protein-Kupplung steuerbar sind.

Wir berichten hier über einen neuartigen Zugang zu wohldefinierten und hochgradig funktionalen Konjugaten aus DNA-Oligomeren und Enzymen, die über eine Hämin-Einheit (Eisen-Protoporphyrin-IX-Komplex) als prosthetische Gruppe verfügen. Im ersten Schritt wurden kovalente DNA-Hämin-Addukte (hemD<sub>1</sub> und hemD<sub>2</sub> in Schema 1 a) an der Festphase synthetisiert. Nach der Abspaltung von der Festphase und der Reinigung wurden die hemD-Addukte eingesetzt, um apo-Myoglobin (apo-Mb: Myoglobin mit fehlender prosthetischer Hämin-Gruppe) zu rekonstituieren.<sup>[3]</sup> Die Rekonstitution von apo-Mb mit hemD<sub>1</sub> und hemD<sub>2</sub> lieferte enzymatisch aktives Myoglobin, das ein oder zwei DNA-Oligomer(e) enthielt (MbD<sub>1</sub> bzw. MbD<sub>2</sub> in Schema 1 b), die mit dem Enzym in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums verknüpft sind. Um zu zeigen, dass die DNA-Oligomere als adressierbare Einheiten für selektive DNA-vermittelte Assemblierungsreaktionen fungieren können, wurden die MbD-

[\*] Dr. L. Fruk, Prof. Dr. C. M. Niemeyer  
Fachbereich Chemie  
Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik  
Universität Dortmund  
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)  
Fax: (+49) 231-755-7082  
E-mail: christof.niemeyer@uni-dortmund.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Alexander von Humboldt-Stiftung (Forschungsstipendium für L.F.) und dem Fonds der Chemischen Industrie finanziell unterstützt. Wir danken Joachim Müller für experimentelle Unterstützung bei den Peroxidase-Enzymtests und Jens Müller für die Bereitstellung des DNA-Synthesizers.



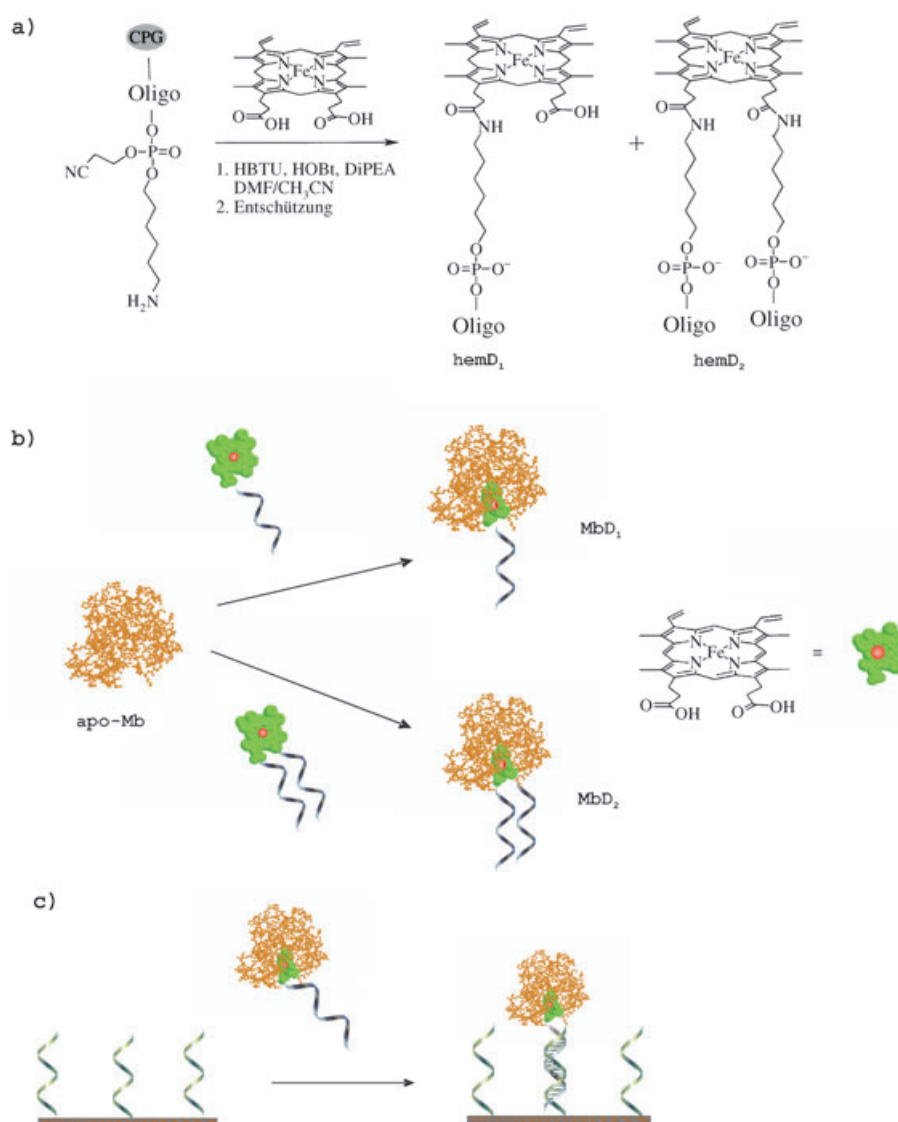
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Konjugate mit komplementären Fänger-Oligomeren hybridisiert, die zuvor an einer Festphase immobilisiert wurden (Schema 1c). Die nachfolgende Untersuchung der enzymatischen Peroxidase-Aktivität zeigte, dass die MbD-Konjugate deutlich höhere Aktivitäten aufwiesen als natives Mb.

Das Sauerstoff-Speicherprotein Mb (Molekulargewicht: 17.6 kDa), das eine nicht-kovalent gebundene Hämin-Einheit enthält, fungierte in den vergangenen dreißig Jahren als Modellsystem für die Untersuchung der funktionalen Rolle des Eisenzentrums im Hämin,<sup>[4,5]</sup> weitreichender Elektronentransferprozesse<sup>[6]</sup> sowie der Auswirkungen von Metallaustausch oder Modifizierungen der Porphyrinseitenketten auf die Proteineigenschaften.<sup>[7,8]</sup> Artificielle Mbs sind zwar auch durch ortsgerichtete Mutagenese zugänglich,<sup>[9]</sup> allerdings ermöglicht die relativ einfache Entfernung von Hämin und anschließende Rekonstitution von apo-Mb mit funktionalen Porphyrin-Derivaten eine effiziente Nutzung dieses Systems zum Studium artifizierlicher Häm-Enzyme.<sup>[6]</sup> So konnten Hayashi et al. zeigen, dass Hämin, dessen Propionatketten mit anionischen Gruppen modifiziert waren, eine erhöhte Peroxidase-Aktivität von Mb in Bezug auf kationische Substrate induziert.<sup>[10]</sup>

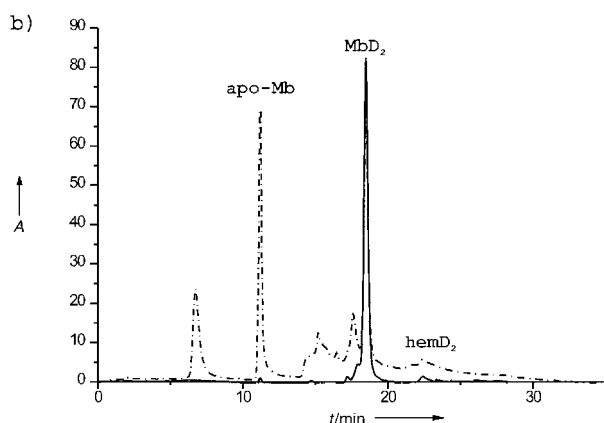
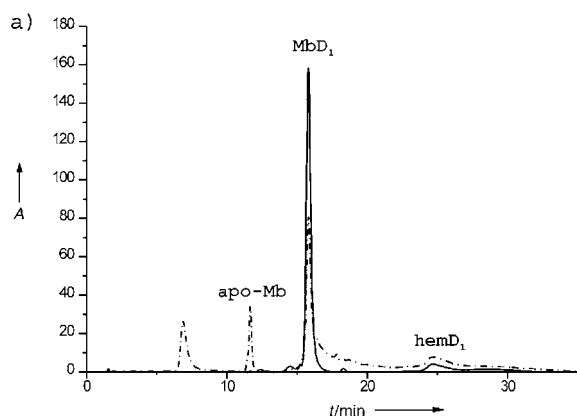
Aufgrund dieser umfangreichen Kenntnisse über artifizielle Mbs wählten wir dieses Protein als erstes Modellsystem zur Untersuchung des in Schema 1 dargestellten Konzepts der DNA-Konjugation.

Zu diesem Zweck wurde ein 5'-Alkylamino-modifiziertes 12-mer-Oligonucleotid (5'-Amino-TCTCAACTCGTA) mittels konventioneller Phosphoramidit-Chemie synthetisiert. Hämin wurde mit *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) und *N,N*-Diisopropylethylamin (DiPEA) in DMF/CH<sub>3</sub>CN aktiviert und anschließend die so erhaltene Lösung in den DNA-Synthesizer injiziert, um die Kupplung mit der Aminogruppe des Oligomers durchzuführen. Nach 30-minütiger Inkubation und nachfolgender Entschützung unter milden Bedingungen (*tert*-Butylamin, MeOH, H<sub>2</sub>O) wurde das Oligonucleotid durch Reversed-Phase-HPLC gereinigt.<sup>[11]</sup> Die zwei Hauptprodukte wurden durch MALDI-MS als Hämin-Konjugate identifiziert, die entweder ein oder zwei DNA-Oligomer(e) enthalten (hemD<sub>1</sub> bzw. hemD<sub>2</sub> in Schema 1 a).



**Schema 1.** Schematische Darstellung der Synthese und Assemblierung von Konjugaten aus DNA und Häm-Enzym; a) Festphasen-basierte Synthese der kovalenten DNA-Hämin-Addukte hemD<sub>1</sub> und hemD<sub>2</sub>, die ein bzw. zwei DNA-Oligomer(e) enthalten; b) die Rekonstitution von apo-Myoglobin (apo-Mb) mit den DNA-Hämin-Addukten führt zur Bildung der DNA-Mb-Konjugate MbD<sub>1</sub> und MbD<sub>2</sub>; c) DNA-vermittelte Immobilisierung der DNA-Mb-Konjugate. CPG = controlled porous glass; HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol.

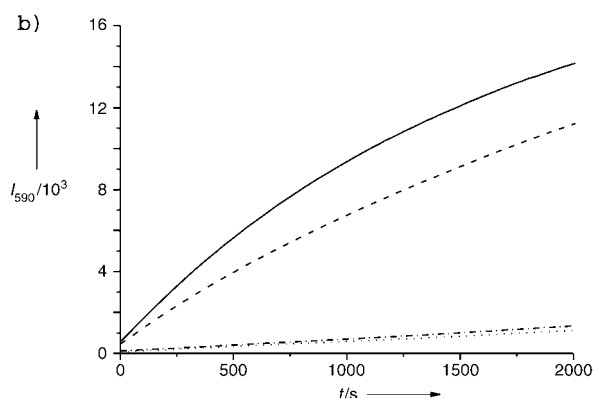
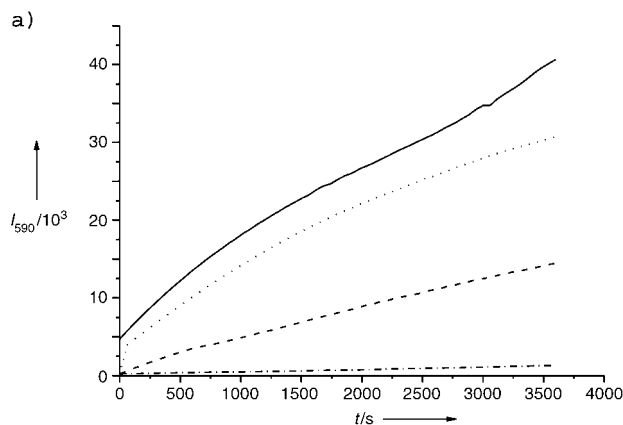
Sowohl hemD<sub>1</sub> als auch hemD<sub>2</sub> wurden für die Rekonstitution von apo-Mb eingesetzt, um hierdurch die Konjugate MbD<sub>1</sub> bzw. MbD<sub>2</sub> zu erhalten (Schema 1 b). Die chromatographische Analyse der Rekonstitution mittels Anionenaustausch-FPLC zeigte, dass die Aufnahme von hemD<sub>2</sub> deutlich langsamer verlief als die von hemD<sub>1</sub> (36 bzw. 24 h). Dies könnte auf den höheren sterischen Anspruch von hemD<sub>2</sub> zurückzuführen sein, der die Diffusion und den Einschluss von hemD<sub>2</sub> in die Hämin-Bindungstasche von apo-Mb behindert. Gemäß den in Abbildung 1 dargestellten repräsentativen Chromatogrammen der hemD-Reinigung unterscheiden sich die Retentionszeit von apo-Mb deutlich von jenen der entsprechenden hemD- und MbD-Konjugate, was eine rasche und effiziente Trennung der Komponenten ermöglichte. Die UV/Vis-Spektren von MbD<sub>1</sub> und MbD<sub>2</sub> zeigen ein



**Abbildung 1.** Chromatogramme (FPLC) zur Rekonstitution von apo-Mb mit hemD<sub>1</sub> (a) oder hemD<sub>2</sub> (b). Die gepunkteten und durchgezogenen Linien zeigen die Absorption bei 280 bzw. 405 nm.

Absorptionsmaximum bei 408 nm (scharfe Soret-Bande) sowie schwache Banden bei 502, 543 und 632 nm (Q-Banden), die in Übereinstimmung mit Literaturwerten sind, sowie einen verbreiterten Peak bei 276 nm, der durch die Absorption von Protein und DNA zustande kommt.<sup>[11]</sup>

Zur weiteren Charakterisierung der halbsynthetischen MbD-Konjugate verglichen wir die Peroxidase-Aktivität von MbD<sub>1</sub> und MbD<sub>2</sub> mit der von nativem Mb.<sup>[12]</sup> Um eine maximale Nachweisempfindlichkeit zu erreichen, wählten wir Amplex UltraRed (Molecular Probes) als Substrat, das in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Peroxidasen zu einem fluoreszenten Farbstoff umgesetzt wird.<sup>[13]</sup> In Abbildung 2a ist die Zunahme der Fluoreszenz aufgrund der enzymatischen Umsetzung von Amplex UltraRed durch 5 pmol natives Mb, MbD<sub>1</sub> oder MbD<sub>2</sub> dargestellt. Es ist klar ersichtlich, dass die Aktivität von MbD<sub>1</sub> und MbD<sub>2</sub> deutlich höher ist als die von nativem Mb. Interessanterweise zeigt MbD<sub>2</sub> eine noch höhere Aktivität als MbD<sub>1</sub>, obwohl bei MbD<sub>2</sub> das aktive Zentrum vermutlich durch die zwei DNA-Oligomere sterisch stärker abgeschirmt ist. Dieser Aktivitätszuwachs, dessen Ursache noch unklar ist, ermöglichte den Nachweis von nur sehr geringen Mengen MbD<sub>2</sub> (ca. 0.1 pmol im Vergleich zu ca. 2 pmol bei nativem Mb). Weitere Untersuchungen der Peroxidase-Aktivität, besonders unter Verwendung anderer Substrate, finden derzeit statt.



**Abbildung 2.** a) Peroxidase-Aktivität von 5 pmol nativem Mb (----), MbD<sub>1</sub> (.....) und MbD<sub>2</sub> (—). Die Umsätze wurden in Lösung mit dem Substrat Amplex UltraRed gemessen. Die gestrichelt-gepunktete Linie (---) zeigt eine Kontrollreaktion in Abwesenheit einer Peroxidase; b) Peroxidase-Aktivität von MbD<sub>1</sub> (----) und MbD<sub>2</sub> (—) nach DNA-vermittelter Immobilisierung in Kavitäten von Mikrotiterplatten, die komplementäre Fänger-Oligomere enthielten. Die Kontrollreaktionen mit nicht-komplementären Fängern (..... und ---) zeigen die Spezifität der Immobilisierungsreaktion.

Um zu demonstrieren, dass die DNA-Oligomere tatsächlich als Erkennungsstellen für die selektive Bindung an komplementäre Oligonucleotide genutzt werden können, führten wir eine DNA-vermittelte Immobilisierung von MbD<sub>1</sub> und MbD<sub>2</sub> an der Festphase durch (Schema 1c). Aus früheren Untersuchungen zur DNA-vermittelten Immobilisierung ging hervor, dass diese Methode vorzüglich für die reversible und ortsspezifische Funktionalisierung von festen Substraten mit Proteinen und anderen Komponenten geeignet ist.<sup>[14]</sup> Nach erfolgter Immobilisierung von MbD<sub>1</sub> und MbD<sub>2</sub> in Streptavidin-beschichteten Kavitäten einer Mikrotiterplatte, die mit komplementären biotinylierten Fänger-Oligomeren (5'Biotin-TACGAGTTGAGA) funktionalisiert waren, wurde die Peroxidase-Aktivität gemessen (Abbildung 2b). Wiederum war das MbD<sub>2</sub>-Konjugat deutlich aktiver als das MbD<sub>1</sub>-Konjugat. Kontrollmessungen in Kavitäten, die nicht-komplementäre Fänger-Oligomere enthielten, zeigten keine nennenswerte Enzymaktivität – dies belegt eindeutig, dass die Immobilisierung tatsächlich auf einer spezifi-

schen Watson-Crick-Basenpaarung zwischen den Mb-gebundenen DNA-Einheiten und den Fänger-Sequenzen beruht.

Wir haben hier gezeigt, dass neuartige artifizielle Myoglobine durch Rekonstitution von apo-Mb mit kovalenten DNA-Hämin-Addukten herstellbar sind. Wir konnten die chemische Zusammensetzung und die chromatographischen Eigenschaften dieser neuen DNA-Mb-Konjugate analysieren, allerdings steht die Aufklärung ihrer speziellen katalytischen Eigenschaften erst am Anfang. Zukünftige Arbeiten werden sich nicht nur mit der Peroxidase-Aktivität, sondern auch mit der Charakterisierung der Redox- und Elektronentransfer-Eigenschaften der neuen DNA-Mb-Konjugate befassen.<sup>[17]</sup> Des Weiteren sollen die hoch spezifischen Bindungseigenschaften der DNA-Einheit genauer untersucht werden, indem die DNA-Mb-Konjugate sowohl im Mikrometer- wie auch im Nanometer-Maßstab assembliert werden. Konjugate im Mikrometermaßstab sind für die Herstellung von Enzym-Mikroarrays nutzbar und solche im Nanometermaßstab für die Herstellung multifunktionaler Protein-Konstrukte für Anwendungen in der Materialforschung<sup>[15]</sup> und den Life-Sciences.<sup>[2,16]</sup>

Mb fungierte in dieser Arbeit als Modellsystem für die erstmalige Demonstration unseres Konzepts zur Herstellung wohldefinierter DNA-Häm-Enzym-Konjugate durch Rekonstitution der apo-Enzyme mit kovalenten DNA-Hämin-Addukten. Dieser Ansatz sollte auch auf andere Häm-Enzyme übertragbar sein und folgerichtig den Weg zu einer Vielzahl neuartiger Redox-Biokatalysatoren bahnen. Wegen der guten Programmierbarkeit der auf der DNA-Einheit basierenden Bindungseigenschaften dürften solche halbsynthetischen DNA-Protein-Konjugate für eine breite Palette von Anwendungen in Frage kommen – von der Biokatalyse über Sensor- und Transducer-Elemente bis hin zu Bausteinen für mikro- und nanostrukturierte Funktionseinheiten.

Eingegangen am 10. November 2004

Online veröffentlicht am 18. März 2005

**Stichwörter:** DNA · Enzyme · Hämproteine · Immobilisierung · Selbstorganisation

- [1] C. M. Niemeyer, C. A. Mirkin, *Nanobiotechnology: Concepts, Methods and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [2] C. M. Niemeyer, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 395–401.
- [3] Die Rekonstitution von apo-Enzymen, besonders von Glucose-Oxidase, mit chemisch modifizierten Flavin-adenin-dinucleotid-(FAD)-Cofaktoren wurde bereits genutzt, um artifizielle Enzym-Konjugate herzustellen oder um solche Enzyme an Elektrodenoberflächen zu immobilisieren. Für Beispiele siehe: a) A. Riklin, E. Katz, I. Willner, A. Stocker, A. F. Buckmann, *Nature* **1995**, *376*, 672–675; b) M. Zayats, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2120–2121; c) M. Zayats, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14724–14735; d) Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J. F. Hainfeld, I. Willner, *Science* **2003**, *299*, 1877–1881; e) E. Katz, L. Sheeney-Haj-Idia, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3354–3362; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3292–3300, zit. Lit.

- [4] T. Yonetani, H. R. Drott, J. S. Leigh, Jr., G. H. Reed, M. R. Waterman, T. Asakura, *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 2998–3003.
- [5] T. Yonetani, H. Yamamoto, G. V. Woodrow, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 682–690.
- [6] a) T. Hayashi, Y. Hisaeda, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 35–43; b) T. Hayashi, H. Dejima, T. Matsuo, H. Sato, D. Murata, Y. Hisaeda, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11226–11227; c) H. Sato, T. Hayashi, T. Ando, Y. Hisaeda, T. Ueno, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 436–437, zit. Lit.
- [7] T. Hayashi, T. Takimura, H. Ogoshi, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11606–11607.
- [8] Y. Hitomi, T. Hayashi, K. Wada, T. Mizutani, Y. Hisaeda, H. Ogoshi, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1132–1135; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1098–1101.
- [9] L. Wan, M. B. Twitchett, L. D. Eltis, A. G. Mauk, M. Smith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12825–12831.
- [10] T. Hayashi, Y. Hitomi, T. M. Ando, Y. Hisaeda, S. Kitagawa, H. Ogoshi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7747–7750.
- [11] UV/Vis-Daten für hemD<sub>1</sub>, hemD<sub>2</sub>, MbD<sub>1</sub> und MbD<sub>2</sub> sowie MALDI-Massenspektren und Details zur Festphasenkupplung der DNA mit Hämin, zur Rekonstitution von apo-Mb und zu den Enzym-Aktivitätstests sind in den Hintergrundinformationen zu finden.
- [12] Es ist bekannt, dass Mb mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter Bildung einer Ferryl-Spezies reagiert, die der Komponente II gewöhnlicher Peroxidasen entspricht.<sup>[10]</sup> Daher kann Mb die Oxidation verschiedenster Substrate in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysieren. Es ist jedoch zu betonen, dass die Peroxidase-Aktivität von Mb sehr viel niedriger ist als die anderer Peroxidasen, z. B. der Meerrettich-Peroxidase.
- [13] Die Struktur von Amplex UltraRed (Invitrogen A36006) ist nicht offen gelegt. Nach Angaben des Herstellers reagiert das nicht-fluoreszente Amplex UltraRed jedoch wie das Reagens Amplex Red (10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin, Molecular Probes) mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 zu einem stark fluoreszierenden und absorbierenden Produkt. Strukturformel und Reaktionspfad von Amplex Red sind in den Hintergrundinformationen (Abbildung S4) gezeigt.
- [14] a) C. M. Niemeyer, T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 5530–5539; b) C. M. Niemeyer, L. Boldt, B. Ceyhan, D. Blohm, *Anal. Biochem.* **1999**, *268*, 54–63; c) C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3798–3801; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3685–3688; d) M. Lovrinovic, R. Seidel, R. Wacker, H. Schroeder, O. Seitz, M. Engelhard, R. Goody, C. M. Niemeyer, *Chem. Commun.* **2003**, 822–823; e) U. Feldkamp, R. Wacker, W. Banzhaf, C. M. Niemeyer, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 367–372; f) R. Wacker, C. M. Niemeyer, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 453–459; g) R. Wacker, H. Schroeder, C. M. Niemeyer, *Anal. Biochem.* **2004**, *330*, 281–287; h) F. Kukolka, C. M. Niemeyer, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2203–2206.
- [15] C. M. Niemeyer, W. Bürger, J. Peplies, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2391–2395; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2265–2268.
- [16] C. M. Niemeyer, J. Koehler, C. Wuerdemann, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 242–245.
- [17] Eine ältere Arbeit beschäftigte sich mit Elektronentransferprozessen in einem Kompositmaterial aus Myoglobin, das Doppelstrang-DNA-modifiziertes Hämin enthielt, und Poly(ethylenoxid), ohne das DNA-Protein-Konjugat näher zu charakterisieren: K. Muneyasu, N. Y. Kawahara, H. Ohno, *Solid State Ionics* **1998**, *113–115*, 167–171.