

Quantifizierung der Zellaufnahme metallierter Peptide und Peptid-nucleinsäuren durch Atomabsorptionsspektroskopie**

Srecko I. Kirin, Ingo Ott, Ronald Gust, Walter Mier, Thomas Weyhermüller und Nils Metzler-Nolte*

Molekularbiologische Methoden ermöglichen die rationale Synthese von Biopolymeren wie Proteinen und Antikörpern, die zielgerichtet ihren Wirkort erreichen. Die Erforschung von Zellaufnahme und Gewebeselektivität derartiger Makromoleküle ist eines der wichtigsten Felder der modernen Wirkstoffentwicklung, z.B. für das Design tumorspezifischer wachstumshemmender Substanzen. Interessanterweise gelten ähnliche Prinzipien wie für die Zellaufnahme auch für die intrazelluläre Verteilung exogener Substanzen.^[1] Beispielsweise sollte eine Verbindung, die gegen DNA oder RNA prozessierende Enzyme wirkt, idealerweise ausschließlich im Zellkern lokalisiert sein. Eine solche korrekte Lokalisierung verringert unerwünschte Nebeneffekte, die von einer Wechselwirkung mit anderen Zielstrukturen in der Zelle herrühren könnten. Wir benötigen daher Techniken, die Einblick in die intrazelluläre Verteilung von Wirkstoffen zu geben vermögen. In der Natur werden die Aufnahme und der Transport von Metallionen streng durch Metallochaperone kontrolliert und reguliert.^[2] Besonders der zelluläre Verkehr von Kupferionen, die z.B. mit der Menkeschen oder Wilsonschen Krankheit in Verbindung gebracht werden, ist mittlerweile sehr gut verstanden.^[3] Dagegen ist die intrazelluläre Lokalisierung exogener Metallkomplexe, vielleicht mit Ausnahme antitumorwirksamer Platinkomplexe, noch sehr wenig erforscht. So wurde über die Entwicklung künstlicher Metallochaperone für die gerichtete intrazelluläre Verteilung von

Metallkomplexen erst vor wenigen Jahren berichtet.^[4,5] Für toxische Metallionen wäre die DNA im Zellkern eine besonders empfindliche Zielstruktur, da sie die genetische Information der gesamten Zelle enthält.

Der Zellkern von Eukaryoten ist durch die Zellmembran geschützt. Ihre Poren sind jedoch groß genug, um die passive Diffusion kleiner Moleküle zu ermöglichen. Alberto und Mitarbeiter konnten zeigen, dass ^{99m}Tc-Ionen in einem Konjugat mit Pyren als Interkalator selektiv an der zellulären DNA gebunden werden und diese durch Abgabe von Auger-Elektronen mit kurzer Reichweite spalten können.^[6] Im Rahmen eines rationalen Ansatzes bietet es sich auch an, die zelluläre Maschinerie für den Transport von Metallionen in den Zellkern zu nutzen. Zelluläre Lokalisationssignale (nuclear localisation signals, NLS) sind kleine Peptide, die als Teil größerer Proteine von dieser Maschinerie in den Zellkern transportiert werden.^[7] Vor allem das SV40-Antigen-NLS wurde ausgiebig studiert. Es hat die primäre Aminosäuresequenz Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val und wurde in Zellkernlokalisierungsstudien zusammen mit einer Vielzahl von Zielmolekülen, unter anderem Proteinen, DNA, RNA, Peptidnucleinsäuren (PNAs) und sogar Goldnanopartikeln eingesetzt.^[8]

Wir haben vor kurzem über Biokonjugate aus dem Cobaltoceniumkation und NLS sowie deren Kernlokalisierung mit Fluoreszenzmikroskopie berichtet.^[9] Eine mögliche Kritik an dieser (und ähnlichen) Arbeiten ist, dass der Fluoreszenzfarbstoff, der einerseits für die Detektion notwendig ist, auf der anderen Seite die Zellaufnahme und auch die intrazelluläre Lokalisierung des Konjugats beeinflusst. Es wäre sicherlich eleganter, direkt den Metallkomplex innerhalb der Zelle zu detektieren. Zu diesem Zweck wurde der Einsatz von Atomabsorptionsspektroskopie (AAS),^[10,11] induktiv gekoppelter Plasmamassenspektrometrie (ICP-MS),^[12,13] Röntgenfluoreszenz,^[14,15] und optischer Fluoreszenzmikroskopie für nichtradioaktive Metallionen und ihre Komplexe vorgeschlagen.^[16,17] Die letztgenannte Methode ist sicherlich nicht allgemein anwendbar, setzt sie doch einen fluoreszierenden Metallkomplex voraus. Um Röntgenfluoreszenz mit der geforderten räumlichen Auflösung messen zu können, sind eine leistungsstarke Synchrotonquelle und eine entsprechende Messanordnung notwendig.^[15] Darüber hinaus müssen die zu untersuchenden Zellen fixiert werden, was möglicherweise zu einer unerwünschten intrazellulären Umverteilung der Verbindungen führen kann, wie für die Klasse der kleinen kationischen Zellaufnahmeproteide (cell penetrating peptides, CPPs) gezeigt wurde.^[18] Diese Überlegungen lassen AAS und ICP-MS als die praktikabelsten und am breitesten anwendbaren Methoden zur direkten Untersu-

[*] Dr. S. I. Kirin, Prof. Dr. N. Metzler-Nolte
Fakultät für Chemie und Biochemie, Universität Bochum
Universitätsstraße 150, 44801 Bochum (Deutschland)
Fax: (+49) 234-321-4378
E-Mail: nils.metzler-nolte@ruhr-uni-bochum.de
Homepage: <http://www.rub.de/ac1>
Dr. I. Ott, Prof. Dr. R. Gust
Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Straße 2+4, 14195 Berlin (Deutschland)
Dr. W. Mier
Abteilung für Nuklearmedizin, Universitätsklinik Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 400, 69120 Heidelberg (Deutschland)
Dr. T. Weyhermüller
Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie
Stiftstraße 34–36, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)

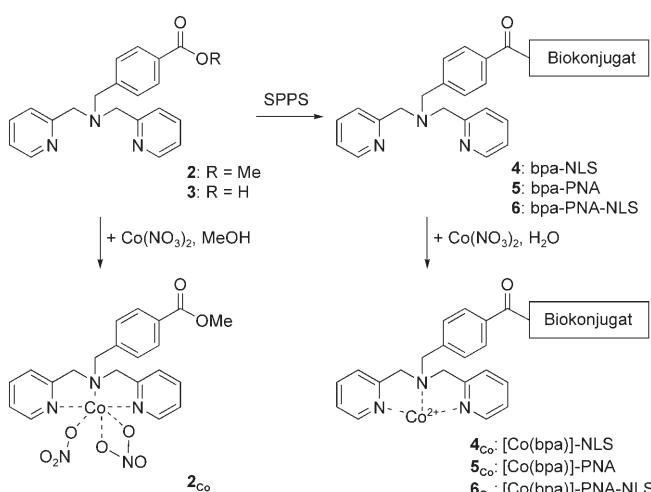
[**] Diese Arbeit wurde von der DFG im Rahmen der Forschergruppe „Biologische Funktion von Organometallverbindungen“ (FOR 630) unterstützt. Die Synthese und ein Teil der chemischen Charakterisierung der Konjugate wurde am IPMB der Universität Heidelberg durchgeführt. Wir danken Dr. Ulrich Schatzschneider für die Aufnahme der ESI-Massenspektren.

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

chung der Verteilung von Metallionen innerhalb lebender Zellen erscheinen.

Hier beschreiben wir, wie Peptide und PNAs als biologische Vektoren zur Zellaufnahme und Kernlokalisierung von Cobaltkomplexen genutzt werden können. AAS ist die Methode der Wahl zur direkten Quantifizierung der Aufnahme und zellulären Lokalisierung der Konjugate. Als Metall für diese Studie wurde Cobalt ausgewählt, da es nur wenig toxisch ist,^[19] der natürliche Cobalthintergrund gering ist und außerdem in Form von Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂) eine gut geeignete Vergleichsverbindung zur Verfügung steht. Schließlich wurde der Bis(picoly)amin-Ligand (bpa, **1**) gewählt, da er stabile Komplexe mit vielen Metallionen bildet, deren Eigenschaften schon ausführlich dokumentiert sind.^[20,21] Darüber hinaus sind Carboxylat-funktionalisierte bpa-Liganden wie **2** (Ester) und **3** (freie Säure) sehr gut zugänglich.^[5,22]

Die Synthese der in dieser Arbeit untersuchten Biokonjugate ist in Schema 1 gezeigt. Die Oligomere bpa-NLS (**4**),



Schema 1. Synthese der verwendeten Verbindungen; siehe Tabelle 1 für die Sequenzen der Biokonjugate **4–6**. SPPS = Festphasensynthese (solid phase peptide synthesis), Ahx = ω -Aminohexansäure, NLS = Pro-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-NH₂, PNA = tgttatcc. Alle Metallkomplexe sind mit dem tiefgestellten Index „Co“ gekennzeichnet.

bpa-PNA (**5**) und bpa-PNA-NLS (**6**) wurden durch Fmoc-Festphasenpeptidsynthese (solid phase peptide synthesis, SPPS; Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl) ausgehend von der bpa-Säure **3** hergestellt. Alle neuen Konjugate wurden mit HPLC an reverser Phase und MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert.^[5,9,23] Die Sequenzen der Oligomere sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Zusätzlich wurde die Wechselwirkung der PNA enthaltenden Oligomere **5** und **6** mit dem komplementären DNA-18mer **7** durch UV-Schmelzexperimente charakterisiert.^[24] Die Resultate zeigen wie erwartet eine Duplexbildung von **5·7** (Schmelztemperatur $T_m = 29.7^\circ\text{C}$) und **6·7** ($T_m = 36.1^\circ\text{C}$, siehe auch Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Die Differenz $\Delta T_m = 6.3^\circ\text{C}$ schreiben wir einer anziehenden elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem positiv ge-

Tabelle 1: Die Sequenzen der in dieser Studie verwendeten Verbindungen und Oligomere.^[a]

Nr.	Abkürzung	Verbindung/Sequenz
1	bpa	Bis(picoly)amin
2		bpa-CH ₂ -(<i>p</i> -C ₆ H ₄)-C(O)-OMe
3		bpa-CH ₂ -(<i>p</i> -C ₆ H ₄)-C(O)-OH
4	bpa-NLS	bpa-CH ₂ -(<i>p</i> -C ₆ H ₄)-C(O)-Ahx-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-NH ₂
5	bpa-PNA	bpa-CH ₂ -(<i>p</i> -C ₆ H ₄)-C(O)-Ahx-tgttatcc-Lys-NH ₂
6	bpa-PNA-NLS	bpa-CH ₂ -(<i>p</i> -C ₆ H ₄)-C(O)-Ahx-tgttatcc-Gly-Gly-Pro-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-NH ₂
7	DNA ₁₈	5'-TAGGGATAACAGGGTAAT-3'

[a] Kleine Buchstaben (a, c, t, g) kennzeichnen PNA- und große Buchstaben DNA-Monomere (A, C, G, T). Für Aminosäuren wurde der übliche Drei-Buchstaben-Code verwendet. Alle Peptidsequenzen wurden vom N-zum C-Terminus geschrieben (von links nach rechts). Der zu PNA **5** und **6** komplementäre Teil der DNA **7** ist fett gedruckt.

ladenen NLS-Peptid und dem überhängenden, negativ geladenen 5'-Ende der DNA im Duplex **6·7** zu.

Der bpa-Ligand bildet mit vielen zweiwertigen Metallionen stabile Komplexe. Die in dieser Arbeit untersuchten [Co(bpa)]-Komplexe wurden in situ durch Mischen äquimolarer Mengen der bpa-Ligandkonjugate und Co(NO₃)₂ erhalten. Um Einblick in die Koordinationsweise und die Strukturparameter dieser Komplexe zu erhalten, wurde der Co^{II}-Komplex des bpa-Esters, **2_{Co}**, isoliert (siehe auch Schema 1) und röntgenkristallographisch charakterisiert. Die Molekülstruktur von **2_{Co}** ist in Abbildung 1 gezeigt. **2_{Co}** ent-

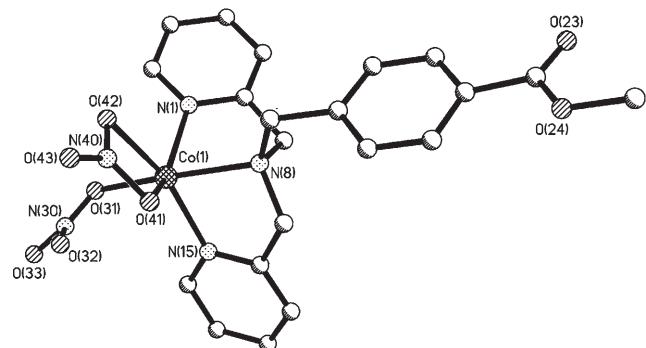


Abbildung 1. Molekülstruktur von **2_{Co}**. Die Wasserstoffatome sind nicht abgebildet. Ausgewählte Bindungsabstände [\AA] und -winkel [$^\circ$]: Co(1)-N(1) 2.074(6), Co(1)-N(8) 2.197(5), Co(1)-N(15) 2.109(5), Co(1)-O(31) 2.140(6), Co(1)-O(41) 2.120(5), Co(1)-O(42) 2.208(5), N(1)-Co(1)-N(15) 111.7(2), N(8)-Co(1)-N(1) 77.6(2), N(8)-Co(1)-N(15) 76.54(19), N(8)-Co(1)-O(41) 85.87(18), N(8)-Co(1)-O(31) 157.7(2), N(8)-Co(1)-O(42) 108.20(18), O(31)-Co(1)-O(42) 89.69(19), O(41)-Co(1)-O(42) 59.22(19).

hält im Festkörper diskrete, einkernige Komplexe mit einem sechsfach koordinierten Cobaltatom. Die N₃O₃-Koordinationsphäre des Metallzentrums wird von drei Stickstoffatomen des bpa-Liganden und drei Sauerstoffatomen zweier Nitrat-Ionen gebildet. Der Winkel zwischen den beiden Ebenen der Pyridinringe des bpa-Liganden, der facial koordiniert ist, beträgt 72.4°.

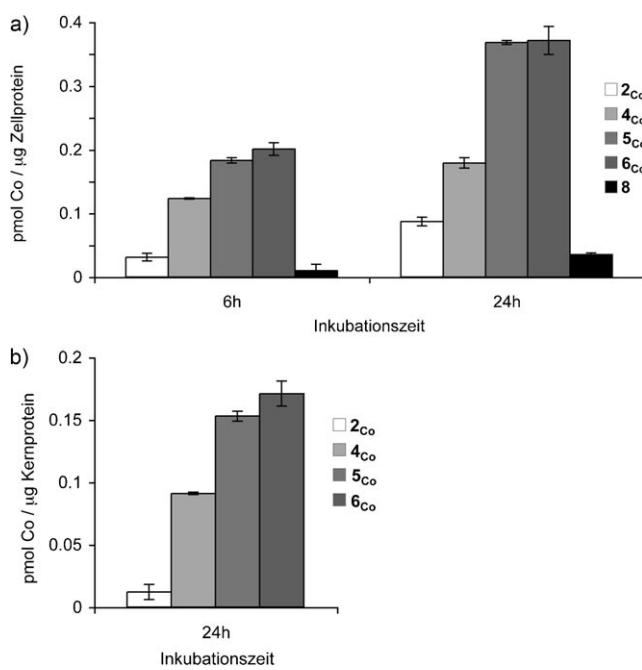


Abbildung 2. a) Zellaufnahme in HT-29-Zellen nach 6 und 24 h Inkubation mit 50 μM Lösungen von 2_{Co} , 4_{Co} , 5_{Co} , 6_{Co} und 8 ; b) Aufnahme in die Kerne der HT-29-Zellen nach 24 h Inkubation mit 50 μM Lösungen von 2_{Co} , 4_{Co} , 5_{Co} und 6_{Co} . Zu beachten ist die unterschiedliche Einheit der y -Achse, die auf die Masse der Zellproteine in (a), jedoch auf den Zellkernproteingehalt in (b) normiert ist. Siehe Text und *Experimentelles* für eine detaillierte Beschreibung.

Die Zellaufnahmeexperimente der Cobalt-Konjugate wurden an HT-29-Dickdarm-Karzinomzellen nach einer Inkubationszeit von 6 und 24 Stunden mit 50 μM Lösungen der Verbindungen durchgeführt (Abbildung 2a). Der Gehalt der Verbindungen in den Zellen und Zellkernen wurde durch Messung der absoluten Cobaltdichten an ganzen Zellen oder isolierten Zellkernen durch Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Der Cobaltgehalt ganzer Zellen wurde auf den Gesamtproteingehalt der Zellen normalisiert (pmol Cobalt pro μg Zellprotein, Abbildung 2a). In diesen Zellaufnahmestudien wurde Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂, **8**) als stabile, nichttoxische Referenzsubstanz eingesetzt. In separaten Experimenten wurden die Zellkerne durch Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt, und der Cobaltgehalt der Kerne wurde ebenfalls durch AAS nach 24 Stunden bestimmt. In diesem Fall wurde die Cobaltdichte auf den Proteingehalt der Zellkerne normalisiert (pmol Cobalt pro μg Zellkernprotein, Abbildung 2b). In Abhängigkeit von der Zellpräparation schwankt das Verhältnis von Kern- zu Zellproteingehalt. Obwohl das Verhältnis von Cobalt zu Proteinen in jeder Bestimmung zuverlässig bestimmbar und gut reproduzierbar war, kann kein allgemein gültiger Konversionsfaktor zwischen dem Cobaltgehalt in den Abbildungen 2a und 2b angegeben werden. Größenordnungsmäßig beträgt die Menge an Proteinen im Zellkern etwa 10–20 % der gesamten Proteinmasse einer Zelle.

Das Detektionslimit von Cobalt in unseren AAS-Experimenten beträgt 0.014 μM (0.82 $\mu\text{g L}^{-1}$) für eine typische Zellsuspension, wie sie in unseren Zellaufnahmestudien ein-

gesetzt wurde, und 0.023 μM (1.35 $\mu\text{g L}^{-1}$) für eine Suspension der Zellkerne. Die Ergebnisse in Abbildung 2 entsprechen jeweils dem Mittelwert zweier unabhängiger Experimente, die an unterschiedlichen Tagen mit jeweils frisch zubereiteten Lösungen der Verbindungen an unterschiedlichen Zellgeneratoren durchgeführt wurden. Das höhere Detektionslimit für Cobalt in den Kernfraktionen ist auf einen höheren systematischen Hintergrund in allen Messungen zurückzuführen, der wahrscheinlich von dem relativ hohen Phosphatgehalt der DNA herröhrt, der naturgemäß nur in den Zellkernpräparationen gefunden wird.

Als metallorganische Referenzverbindung ist **8** sicher besser geeignet als einfache Metallsalze. In der Tat wird $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ von den HT-29-Zellen in wesentlich größerer Menge als alle anderen untersuchten Verbindungen aufgenommen, möglicherweise nach Bindung an Transferrin oder über die Aufnahme durch Ionenkanäle (keine Daten gezeigt). Diese beiden Mechanismen stehen unseren Metall-Biokonjugaten jedoch nicht zur Verfügung. Wie Abbildung 2 zeigt, verdoppelt sich die Menge von Cobalt in den Zellen zwischen 6 und 24 Stunden in etwa, unabhängig von der Natur der eingesetzten Cobaltverbindungen. Interessanterweise werden alle bpa enthaltenden Verbindungen in deutlich höheren Mengen als Vitamin B₁₂ in die Zellen aufgenommen. Die zelluläre Aufnahme der [Co(bpa)]-Komplexe steigt in der Reihenfolge $2_{\text{Co}} < 4_{\text{Co}} < 5_{\text{Co}} \approx 6_{\text{Co}}$. Die absoluten Unterschiede treten bei Aufnahme in die Zellkerne noch deutlicher hervor: So ist die Konzentration von 5_{Co} in den Zellkernen etwa 14-mal höher als die von 2_{Co} , in der gesamten Zelle hingegen nur etwa 4-mal.

Aus bekannten Zellparametern wie dem mittleren Proteingehalt der Zellen und dem mittleren Zellvolumen kann die intrazelluläre molare Konzentration der Testverbindungen aus dem bestimmten Metallgehalt (pmol Metall pro μg Protein) berechnet werden.^[25] Für die Verbindungen mit den höchsten Aufnahmeraten (5_{Co} und 6_{Co} nach 24 h) werden intrazelluläre Konzentrationen von > 70 μM gefunden, wohingegen nur ca. 6 μM bei den Verbindungen mit der niedrigsten Zellaufnahme nach 6 h erreicht werden (2_{Co} nach 6 h). Auch alle anderen Verbindungen erreichen intrazelluläre Konzentrationen < 50 μM , die somit geringer sind als die extrazelluläre Konzentration während der Inkubationszeit. Die Tatsache, dass die Konjugate 5_{Co} und 6_{Co} in Konzentrationen > 50 μM in den Zellen angereichert werden, könnte ein Hinweis auf einen aktiven Zellaufnahmeprozess sein. Dieser Befund ist insofern von Interesse, als die intrazellulären Konzentrationen selbst sehr aktiver Wirkstoffe, z.B. Cisplatin, üblicherweise deutlich unterhalb der extrazellulären Konzentration liegen.^[13,26] Wie wir bereits früher berichteten, wird die Zellaufnahme von metallhaltigen Wirkstoffen erheblich durch die Eigenschaften des Liganden und die Ladung des Zentralatoms beeinflusst.^[27] Wir interpretieren die relativ niedrige Aufnahme der hier untersuchten Verbindungen als eine Folge der hydrophilen Natur der Peptide. Andererseits kann erwartet werden, dass die Cobaltkomplexe nach Verdrängung der Nitratliganden durch Wasser positiv geladen vorliegen. Interessanterweise erhöht die Gegenwart von PNA die Aufnahme der Konjugate erheblich. Dies ist erstaunlich, da in früheren Arbeiten generell eine relativ

schlechte Aufnahme von PNA-Oligomeren in Sägerzellen beobachtet wurde, und wird noch zu diskutieren sein.

Um auszuschließen, dass die beobachtete erhöhte Aufnahme von zelltoxischen Eigenschaften der Konjugate herröhren, wurde die Cytotoxität von **2_{Co}** und **4_{Co}** bestimmt. Selbst bei Konzentrationen bis zu 100 µM wurden keine toxischen Effekte beobachtet (Daten nicht gezeigt). Damit kann eine Schädigung der Zell- oder Kernmembranen durch apoptotische oder nekrotische Prozesse und damit einhergehend eine erhöhte Aufnahme der Metallkomplexe in die Zellen und Zellkerne ausgeschlossen werden.

Aus den oben beschriebenen Experimenten ziehen wir eine Reihe von Schlussfolgerungen: Die Atomabsorptionspektroskopie ist als metallselektive Detektionsmethode für derartige Untersuchungen gut geeignet und ausreichend empfindlich. Typische experimentelle Werte lagen im Bereich von 0.2 bis 0.6 µM Co und damit wenigstens 10-mal höher als das Detektionslimit der Methode. Die eingesetzten Biokonjugate führen zu signifikant verschiedenen Metallkonzentrationen. Wir werten dies als Hinweis darauf, dass die Peptide zumindest während der Zeit der Zellaufnahme an die Cobaltionen koordiniert bleiben. Im direkten Vergleich zeigen die NLS-Konjugate eine deutlich bessere Aufnahme als das unsubstituierte [Co(bpa)]. Dies ist ein unerwarteter Befund, da das NLS-Peptid alleine kein guter Vektor für die Zellaufnahme von Biokonjugaten ist.^[28] Andererseits haben wir bereits demonstriert, dass ein kovalent an den N-Terminus von NLS gebundener, kationischer metallorganischer Komplex zu einer erheblich verbesserten Aufnahme dieser NLS-Konjugate führt.^[9] Zusätzlich zeigen wir hier nun, dass die Eigenschaft der Kernlokalisierung von NLS-Peptiden durch den kovalent gebundenen Metallkomplex nicht wesentlich beeinflusst wird.

Es mag weiterhin erstaunen, dass die PNA-Konjugate noch besser als die [Co(bpa-NLS)]-Konjugate von den HT-29-Zellen internalisiert werden. Die Kombination aus NLS-Peptid und PNA-Oligomer bringt hingegen keine weitere Verbesserung gegenüber PNA alleine. Zumindest im Hinblick auf die Zellaufnahme scheinen die Eigenschaften der Konjugate somit von der PNA, und nicht vom NLS-Peptid, dominiert zu werden. Bisher stand eine generell niedrige Zellaufnahme dem Einsatz von PNA-Oligomeren als Antisense-Wirkstoffen entgegen. Zur Lösung dieses Problems wurde eine Vielzahl von Vorschlägen gemacht.^[28,29] So berichteten Krämer und Mitarbeiter über eine erhöhte zelluläre Aufnahme von PNA-Oligomeren, an die N-terminal ein Zn²⁺-Terpyridin-Komplex gebunden ist.^[17] Diese Resultate wurden jedoch mit Durchfluszcytometrie und Fluoreszenzmikroskopie von organischen Farbstoffen erhalten und können somit nur als indirekter, nicht quantitativer Nachweis gelten. In einer umfassenden Studie untersuchten Nielsen und Mitarbeiter kürzlich die Zellaufnahme-Effizienz von PNA-Peptid-Konjugaten mit einer Vielzahl verschiedener Peptide in einem Splice-Korrektur-Assay.^[28] Dieser Assay ist sicherlich am besten zur Bewertung der Antisense-Aktivität derartiger Konjugate geeignet, da hierbei direkt ein biologischer Effekt quantitativ ausgelesen wird. Andererseits hängt in diesem System der beobachtete Antisense-Effekt außer von der Zellaufnahme der PNA-Peptidkonjugate noch von einer

Vielzahl weiterer Faktoren ab, z.B. RNA-Bindung und allgemein der Antwort der zellulären Maschinerie. Auch mit diesem System kann daher nicht direkt auf die Zahl der in einer Zelle internalisierten Konjugatmoleküle geschlossen werden.

Wir beobachten weiterhin erhebliche Unterschiede in der Kernlokalisierung der untersuchten Konjugate. Unsere Daten zeigen, dass ein erhöhter Transport von Metallen in den Zellkernen durch die Wahl geeigneter Peptide als Vektoren möglich ist. Während die Verhältnisse von **4_{Co}/6_{Co}** und **5_{Co}/6_{Co}** in Zellen und Zellkernen in etwa ähnlich sind, stellt sich die Situation für das nichtpeptidische [Co(bpa)] erheblich anders dar: Das Verhältnis **2_{Co}/6_{Co}** beträgt in den ganzen Zellen 23 %, jedoch nur 7 % in den Zellkernen. Die Bildung eines Biokonjugates aus diesem Komplex mit PNA und/oder NLS führt also eindeutig zu einer erhöhten Kernlokalisierung. Dieser Befund ist in Einklang mit neueren Studien, bei denen eine Kernlokalisierung von NLS-Konjugaten mit Cobaltoceniumkationen, Nucleotiden und Platinverbindungen gefunden wurde.^[9,30] Bei der Kernaufnahme wird kein wesentlicher Unterschied zwischen den DNA-Konjugaten **5_{Co}** und **6_{Co}** beobachtet, jedoch zeigen beide eine höhere Tendenz zur Kernlokalisierung als das NLS-Konjugat **4_{Co}**. Beachtet werden sollte schließlich, dass nur ein relativ geringer Anteil (<10 %) der gesamten Menge an Konjugaten den Zellkern erreicht. Dies ist jedoch in Übereinstimmung mit den Befunden für andere Metallkomplexe wie Cisplatin, von denen auch nur ca. 5 % in den Kernen der behandelten Zellen gefunden werden.

Wir haben den Einsatz von Peptiden und Peptidnuklein-säure-Oligomeren als Vektoren für die Zellaufnahme und den Kerentransport von Metallkomplexen untersucht. Die Atomabsorptionsspektroskopie bewährt sich in diesen Experimenten als empfindliche, metallspezifische Detektionsmethode. Im Vergleich mit in früheren Studien eingesetzten, indirekten Methoden wie Fluoreszenzmikroskopie oder Splice-Korrektur-Assays erweist sich die AAS als eine Methode, mit der die intrazelluläre Konzentration der Konjugate direkt und akkurat bestimmt werden kann. Sie eignet sich somit hervorragend zur Bestimmung der Aufnahmeeffizienz jedweder metallhaltiger Biokonjugate und wird von uns in dieser Arbeit zum ersten Mal zur Untersuchung der zellulären Aufnahme von Peptiden und PNA-Oligomeren eingesetzt. Wir finden für die besten Systeme in dieser Studie eine Akkumulation von über 150 % gegenüber dem Zellkulturmedium.

Wir haben bereits über den Einsatz von Metall-bpa-Komplexen zur Spaltung von DNA berichtet.^[20] Zusammen mit den hier vorgestellten Ergebnissen sollte es möglich sein, solche Metallkomplexe, für die eine biologische Aktivität (z.B. DNA-Spaltung ex vivo) nachgewiesen wurde, selektiv in den Kern von lebenden Zellen zu steuern, wo sie dann ihre Aktivität auch gegenüber zellulärer DNA in vivo ausüben könnten.

Experimentelles

Ausführliche experimentelle Daten sind in den Hintergrundinformationen dokumentiert.

4: $C_{66}H_{107}N_{19}O_9$, $M = 1310.68 \text{ g mol}^{-1}$, MS (ESI-pos.): $m/z = 655.7$ [$M+2H$] $^{2+}$, 437.26 [$M+3H$] $^{3+}$; **5:** $C_{118}H_{151}N_{47}O_{30}$, $M = 2707.76 \text{ g mol}^{-1}$, MS (MALDI): $m/z = 2707.1$ [$M+H$] $^+$; **6:** $C_{156}H_{221}N_{61}O_{38}$, $M = 3558.81 \text{ g mol}^{-1}$, MS (MALDI): $m/z = 3558.2$ [$M+H$] $^+$.

Röntgenstrukturanalyse: Kristalldaten für **2_{Co}**: Rosarote Kristalle von **2_{Co}**, $C_{21}H_{21}CoN_5O_8$, $M = 530.36 \text{ g mol}^{-1}$, $0.12 \times 0.12 \times 0.06 \text{ mm}^3$, $a = 9.8665(6)$, $b = 14.2680(7)$, $c = 16.7896(8) \text{ \AA}$, $\beta = 106.13(1)^\circ$, $V = 2270.5(2) \text{ \AA}^3$, Mo_{Kα}-Strahlung ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$), $\mu(\text{MoK}\alpha) = 6.45 \text{ mm}^{-1}$, $\rho = 1.551 \text{ g cm}^{-3}$, monoklin, Raumgruppe $P2_1/c$, $Z = 4$, $T = 100(2) \text{ K}$, 11041 Reflexe gemessen, 3386 davon unabhängig ($R_{\text{int}} = 0.043$), 3212 beobachtete Reflexe ($F_o > 4\sigma(F_o)$), $2\Theta_{\text{max}} = 62.85^\circ$, $R = 0.0897$ ($F_o > 4\sigma(F_o)$), $R = 0.0946$ (alle Daten), $wR = 0.1661$ ($F_o > 4\sigma(F_o)$), 311 Parameter, Verfeinerung gegen F^2 , ShelXTL-6.14-Bruker-AXS-Programmpaket. CCDC 648421 enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos beim Cambridge Crystallographic Data Centre über www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif erhältlich.

Aufnahme in HT-29-Zellen und -Zellkerne: Menschliche HT-29-Dickdarm-Karzinomzellen wurden in Eagle's-MEM-Zellkulturmedium (Sigma) unter Zusatz von NaHCO_3 (2.2 g L $^{-1}$), Natriumpyruvat (110 mg L $^{-1}$), Gentamycin (50 mg L $^{-1}$) und 10% (v/v) fötalem Kälberserum nach Standardverfahren kultiviert. Für die Aufnahmuntersuchungen wurden die Zellen in 75-cm 2 -Zellkulturgefäße bei 37°C bei einer Atmosphärenzusammensetzung von 5% CO_2 und 95% Luft bis mindestens 70% Konfluenz gezüchtet. Das Medium wurde durch 10 mL Medium mit den frisch vorbereiteten Komplexen in einer Konzentration von 50 μM ersetzt. Die Lösungen der Metallkomplexe wurden in situ durch Mischen äquimolarer wässriger Lösungen von **4–6** und $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ (je 50 mM) hergestellt. Es wurden 10 μL dieser Lösung mit 10 mL ME-Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Nach weiterer Inkubation über 6 oder 24 h wurden die Zellen durch Trypsinierung abgelöst, in 10 mL Phosphat-gepufferter Salzlösung mit pH 7.4 (PBS) resuspendiert, durch Zentrifugieren pelletiert (2000 rpm, 5 min) und zweimal mit PBS gewaschen. Für die Aufnahmuntersuchungen wurden die isolierten Pellets in 1.0 mL bidestillierten Wasser resuspendiert und mithilfe einer Sonotrode (Bandelin Sonoplus GM 70) lysiert. Der Cobaltgehalt und der Proteingehalt der Lyssate wurden mit bekannten Methoden bestimmt.^[10] Die molare Zellkonzentration wurde wie in der Literatur beschrieben berechnet.^[25] Zur Quantifizierung der Aufnahme in die Zellkerne wurden die Pellets ebenfalls wie beschrieben bearbeitet.^[11]

Cytotoxitätsexperimente: Die Effekte der Zellwachstumshemmung wurden wie bereits beschrieben untersucht und ausgewertet.^[25]

Eingegangen am 30. August 2007,
veränderte Fassung am 9. Oktober 2007
Online veröffentlicht am 18. Dezember 2007

Stichwörter: Cobalt · Medizinische Chemie · N-Liganden · Peptide · Peptidnucleinsäuren

- [1] G. Schatz, B. Dobberstein, *Science* **1996**, *271*, 1519.
- [2] T. V. O'Halloran, V. C. Culotta, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 25057; A. C. Rosenzweig, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 119; A. C. Rosenzweig, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 673; S. Tottey, D. R. Harvie, N. J. Robinson, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 775.
- [3] E. Gaggelli, H. Kozlowski, D. Valensin, G. Valensin, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1995; T. Wang, Z. Guo, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 525; P. Zatta, A. Frank, *Brain Res. Rev.* **2007**, *54*, 19.
- [4] Y. Lu, S. M. Berry, T. D. Pfister, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3047.
- [5] S. I. Kirin, P. Dübon, T. Weyhermüller, E. Bill, N. Metzler-Nolte, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 5405.
- [6] P. Häfliger, N. Agorastos, A. Renard, G. Giambonini-Brugnoli, C. Marty, R. Alberto, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 582; P.

Häfliger, N. Agorastos, B. Spangler, O. Georgiev, G. Viola, R. Alberto, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 414.

- [7] D. Görlich, I. W. Mattaj, *Science* **1996**, *271*, 1513; E. Conti, M. Uy, L. Leighton, G. Blobel, J. Kuriyan, *Cell* **1998**, *94*, 193; D. Görlich, U. Kutay, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1999**, *15*, 607.
- [8] L. J. Brandén, A. J. Mohamed, C. I. E. Smith, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 784; S. Nakielny, G. Dreyfuss, *Cell* **1999**, *99*, 677; M. A. Zanta, P. Belguise-Valladier, J.-P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 91; R. Cartier, R. Reszka, *Gene Ther.* **2002**, *9*, 157; A. G. Tkachenko, H. Xie, D. Coleman, W. Glomm, J. Ryan, M. F. Anderson, S. Franzen, D. L. Feldheim, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4700.
- [9] F. Noor, A. Wüstholtz, R. Kinscherf, N. Metzler-Nolte, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2481; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2429.
- [10] I. Ott, B. Kircher, R. Gust, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 485.
- [11] I. Ott, K. Schmidt, B. Kircher, P. Schumacher, T. Wiglenda, R. Gust, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 622.
- [12] J. S. Becker, M. Zoriy, J. S. Becker, J. Dobrowolska, A. Matusch, *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *22*, 736.
- [13] A. R. Ghezzi, M. Aceto, C. Cassino, E. Gabano, D. Osella, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 73.
- [14] J. B. Waern, H. H. Harris, B. Lai, Z. Cai, M. M. Harding, C. T. Dillon, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 443; K. S. Campbell, A. J. Foster, C. T. Dillon, M. M. Harding, *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 1194.
- [15] C. J. Fahrni, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 121.
- [16] A. R. Cowley, J. Davis, J. R. Dilworth, P. S. Donnelly, R. Dobson, A. Nightingale, J. M. Peach, B. Shore, D. Kerr, L. Seymour, *Chem. Commun.* **2005**, 845.
- [17] A. Fussl, A. Schleifenbaum, M. Goeritz, A. Riddell, C. Schultz, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5986.
- [18] J. P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.* **2002**, *278*, 585; M. Lundberg, M. Johansson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *291*, 367.
- [19] M. Bragadin, A. Toninello, M. Mancon, S. Manente, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 631.
- [20] S. I. Kirin, C. M. Happel, S. Hrabanova, T. Weyhermüller, C. Klein, N. Metzler-Nolte, *Dalton Trans.* **2004**, 1201.
- [21] J. Glerup, P. A. Goodson, D. J. Hodgson, K. Michelsen, K. M. Nielsen, H. Weihe, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 4611.
- [22] S. I. Kirin, T. Weyhermüller, K. Merz, N. Metzler-Nolte, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2007**, *633*, 2706.
- [23] S. I. Kirin, F. Noor, N. Metzler-Nolte, W. Mier, *J. Chem. Educ.* **2007**, *84*, 108; S. Pfander, R. Fiammengo, S. I. Kirin, N. Metzler-Nolte, A. Jäschke, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e25.
- [24] T. Kersebohm, S. I. Kirin, N. Metzler-Nolte, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2964; A. Maurer, H.-B. Kraatz, N. Metzler-Nolte, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 3207; J. C. Verheijen, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, N. Metzler-Nolte, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 741.
- [25] I. Ott, H. Scheffler, R. Gust, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 702.
- [26] M. Ravera, C. Cassino, E. Monti, M. Gariboldi, D. Osella, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 2264.
- [27] S. Schäfer, I. Ott, R. Gust, W. S. Sheldrick, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *3034*.
- [28] N. Bendifallah, F. W. Rasmussen, V. Zachar, P. Ebbesen, P. E. Nielsen, U. Koppelhus, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 750.
- [29] U. Koppelhus, P. E. Nielsen, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 267; P. E. Nielsen, *Gene Ther.* **2005**, *12*, 956; U. Koppelhus, S. K. Awasthi, V. Zachar, H. U. Holst, P. Ebbesen, P. E. Nielsen, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2002**, *12*, 51.
- [30] O. Aronov, A. T. Horowitz, A. Gabizon, M. A. Fuertes, J. M. Perez, D. Gibson, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 814; T. Kubo, Z. Zhelev, B. Rumiana, H. Ohba, K. Doi, M. Fujii, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3257.