

Cobalt(III) als stabiles und inertes Vermittlerion zwischen Nitrilotriessigsäure und Proteinen mit His6-Tag**

Seraphine V. Wegner und Joachim P. Spatz*

Die Ni^{2+} -vermittelte Wechselwirkung zwischen der Hexahistidin-Gruppe (Hexahistidin-Tag) und Nitrilotriessigsäure (NTA) hat sich als verlässlicher Ansatz erwiesen, um rekombinante Proteine selektiv an NTA-funktionalisierte Moleküle und Materialien zu binden. Wegen der geringen Größe des His-Tags, der ortsspezifischen Wechselwirkung und der sehr einfachen Bedingungen für diese Wechselwirkung, die keine Auswirkung auf die eigentliche Aktivität des Proteins haben, ist das System vielseitig anwendbar. Daher ist eine große Bibliothek von Proteinen mit His-Tag vorhanden. Obwohl ursprünglich für die Aufreinigung rekombinanter Proteine entwickelt,^[1–4] kommt diese Methode in zahlreichen anderen Anwendungen zum Einsatz. Diese Technik ermöglichte zum Beispiel die spezifische Immobilisierung von Proteinen auf Proteinchips,^[5,6] die Inkorporierung aktiver Proteine in Nanomaterialien^[7,8] und Oberflächen,^[9,10] die Markierung von Proteinen mit Fluorophoren^[11–14] und die spezifische Konjugation von Biomolekülen mit Proteinen.^[15–17]

Im Komplex $[\text{Ni}^{\text{II}}\text{NTA}(\text{His6-Tag})]$ befindet sich das Ni^{2+} -Ion in einer oktaedrischen Koordinationsumgebung mit vier Liganden ausgehend von der NTA und zwei vom His6-Tag. Andere zweiwertige Ionen, wie Co^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} , können in ähnlicher Weise als Vermittlerionen zwischen His6-Tag und NTA mit ähnlicher Affinität eingesetzt werden.^[2] Ein Nachteil dieser Technik besteht allerdings darin, dass sich die durch Ni^{2+} oder die oben genannten Ionen vermittelte Affinität

zwischen NTA und dem His6-Tag-Protein normalerweise im mikromolaren Bereich bewegt und nicht hoch genug für bestimmte Anwendungen ist. Eine weitere Einschränkung ist, dass diese Komplexe kinetisch labil sind und somit eine rasche Ligandensubstitution eingehen. Als Folge wird der Komplex schnell von Chelatoren wie Imidazol und EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) aufgelöst. So positiv diese Reversibilität für Anwendungen wie die Proteinaufreinigung ist, so problematisch ist sie für eine dauerhafte Wechselwirkung. Wegen ihrer besseren Bindung werden längere His-Tags, z.B. His10-Tags, für die Immobilisierung von Proteinen bevorzugt. Um dauerhafte Wechselwirkungen zu erzielen, wurde bislang auch die Anbindung von multiplen NTA-Gruppen zur Erhöhung der Affinität^[18–20] sowie die Bildung kovalenter Bindungen durch photochemische^[21,22] (oder weniger spezifische)^[23,24] Reaktionen diskutiert. Allerdings erfordern diese Ansätze üblicherweise komplexe Synthesen und sind häufig unspezifisch.

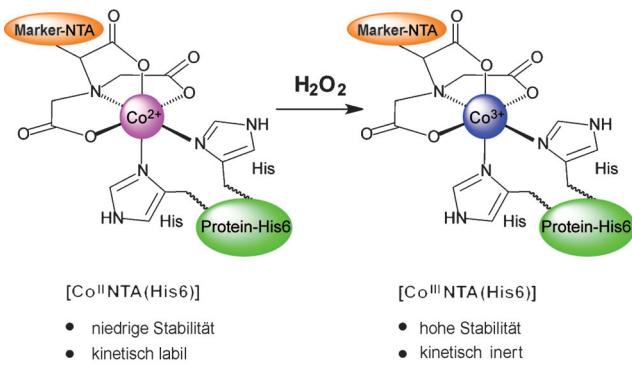
Eine spezifische, stabilere und kinetisch inerte Wechselwirkung zwischen His6-Tag und der NTA-Gruppe wäre wünschenswert, um diese Einschränkungen zu überwinden. Daher schlagen wir vor, Co^{3+} als Vermittlerion für diese Wechselwirkung einzusetzen. Als d^6 -Ion bildet es oktaedrische paramagnetische Komplexe ($e_g^6 t_{2g}^0$) mit niedrigem Spin, die zwei Vorteile bieten: 1) Co^{3+} -Komplexe verfügen über wesentlich höhere Bildungskonstanten als Co^{2+} und Ni^{2+} in ähnlichen Koordinationsumgebungen. Besonders die Bildungskonstanten von Co^{3+} -Komplexen mit den üblichen Aminopolycarbonsäuren sind 20 Größenordnungen höher als bei Co^{2+} -Komplexen.^[25,26] 2) Co^{3+} -Komplexe sind substitutionsinert, da sie nur eine sehr langsame Ligandensubstitution in ihrer primären Koordinationssphäre eingehen. So hat beispielsweise der Wasserkomplex von Co^{2+} eine Substitutionsrate von $3 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, der Co^{3+} -Komplex dagegen eine von $< 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ (Schema 1).^[27] Die Idee, Co^{3+} als Vermittlerion zwischen NTA und His6-Tag einzusetzen, geht zurück auf Untersuchungen mit Metalloenzymen, wo es mithilfe der Substitution des nativen Metallzentrums durch substitutionsinerte Metallionen wie Co^{3+} und Cr^{3+} gelang, enzymatische Mechanismen zu erklären, multiple Metallbindungsstellen in einem Enzym zu unterscheiden und Erkenntnisse bezüglich der lokalen Umgebung von Metallbindungstaschen sowie der Gesamtstruktur zu gewinnen.^[28,29] Außerdem werden Komplexe von bioaktiven Liganden mit substitutionsinerten Metallen als Prodrug eingesetzt, die erst nach dem Eindringen in die Zelle aktiviert werden.^[30,31] Wegen der sehr langsamen Bildung der Co^{3+} -Komplexe wird eine indirekte Präparation bevorzugt, wobei erst der Komplex mit dem substitutionslabilen zweiwertigen Ion gebildet und an-

[*] Dr. S. V. Wegner, Prof. Dr. J. P. Spatz
Abt. Neue Materialien und Biosysteme
Max-Planck-Institut für Intelligente Systeme
Heisenbergstraße 3, 70596, Stuttgart (Deutschland)
und
Abt. Biophysikalische Chemie
Universität Heidelberg (Deutschland)
E-Mail: spatz@is.mpg.de

[**] Wir danken der Max-Planck-Gesellschaft für die finanzielle Unterstützung, V. Sakin und M. Sünbul für technische Unterstützung und C. M. Cobley für die Redaktion des Manuskripts. S. V. Wegner dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für ein Postdoktorandenstipendium. J. P. Spatz ist Weston Gastprofessor am Weizmann Institute of Science. Die Gruppe ist Teil des Exzellenzclusters Cell-Networks an der Universität Heidelberg. Wir danken Elisabeth Pfeilmeier für die deutsche Übersetzung des Artikels.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201210317> zu finden.

© 2013 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.



Schema 1. Der Einsatz von Co³⁺ als Vermittlerion zwischen NTA und Proteinen mit His6-Tag statt des üblichen Co²⁺ und Ni²⁺ führt zur Bildung eines Komplexes, der in einer solchen Koordinationsumgebung wesentlich stabiler und inert gegen Ligandensubstitutionsreaktionen ist. Der Komplex lässt sich über die Oxidation des Co²⁺-Komplexes durch H₂O₂ herstellen.

schließend das Metallzentrum *in situ* oxidiert wird (Schema 1).

Entsprechend übernahmen wir diese indirekte Präparationsmethode, um den Co³⁺-Komplex mit NTA und dem His6-Protein [Co^{III}NTA(His6-GFP)] herzustellen. Um diesen Ansatz zu testen, wurde His6-GFP (grün fluoreszierendes Protein mit N-terminalem His6-Tag) auf mit Co²⁺ beladenen Agarosekugeln immobilisiert, und Aliquote dieser Kugeln wurden mit verschiedenen Mengen von H₂O₂ jeweils eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurde jede Probe mit 250 mM Imidazol versetzt und die GFP-Fluoreszenz im Überstand gemessen (Abbildung 1). Ähnlich wie die Proteine mit His6-Tag auf den Ni²⁺-NTA-Kugeln eluiert das an das Co²⁺-Zentrum gebundene His6-GFP schnell bei Zugabe von 250 mM Imidazol,^[2] im Gegensatz zu dem an das substitutionsinerte Co³⁺-Zentrum gebundenen Protein. Bei zuneh-

menden H₂O₂-Konzentrationen eluiert immer weniger Protein, und bei mehr als 10 mM H₂O₂ wird fast kein Protein mehr eluiert. Die Oxidation von Co²⁺ zu Co³⁺ an den Kugeln durch H₂O₂ lässt sich auch an der Farbveränderung der Kugeln von Pink nach Violett ablesen (Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Bei Oxidation des Modellkomplexes [Co^{II}NTA(His6-Peptid)] mit H₂O₂ in Lösung lässt sich auch ein charakteristisches d-d-Übergangssignal im UV/Vis-Spektrum bei 542 nm beobachten (Hintergrundinformationen, Abbildung S2). Wie erwartet ist das Signal wegen der erhöhten Zahl von Stickstoffdonorliganden gegenüber dem von [Co^{III}NTA] ($\lambda_{\text{max}} = 554 \text{ nm}$) blauverschoben. Eine ähnliche Verschiebung lässt sich für [Co^{III}NTA(Imidazol)] ($\lambda_{\text{max}} = 543 \text{ nm}$) beobachten. Die Bildung des [Co^{III}NTA(His6-Peptid)]-Komplexes wurde außerdem mithilfe von ESI-MS bestätigt. Ebenso konnten vier andere Proteine mit His6-Tag auf den Co³⁺-NTA-Agarosekugeln mit 20 mM H₂O₂ immobilisiert werden, was die Allgemeingültigkeit dieses Ansatzes zeigt (Hintergrundinformationen, Abbildung S3).

Als nächstes wurde die kinetische Inertheit der Co³⁺-vermittelten Wechselwirkung zwischen NTA und His6-Tag ermittelt. Dazu wurde die Menge von His6-GFP, die von den Kugeln eluiert, wie oben beschrieben durch die Ligandensubstitutionsreaktion mit Imidazol 16 Tage lang gemessen (Hintergrundinformationen, Abbildung S4). Die anfängliche Dissoziationsgeschwindigkeit wurde anhand der Reaktionskinetik erster Ordnung approximiert, und die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation wurde bei 25 °C zu $(1.12 \pm 0.14) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ berechnet. Zum Vergleich wurde die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante für [Ni^{II}NTA(His6-Peptid)] als 1.8 s^{-1} bestimmt.^[20] Somit hat [Co^{III}NTA(His6-Peptid)] bei Versetzen mit 250 mM Imidazol eine Halbwertszeit von 7.1 Tagen bei Raumtemperatur, wohingegen die homologen Co²⁺- und Ni²⁺-Komplexe kurzlebig sind.

Die Co³⁺-vermittelte Wechselwirkung zwischen NTA und His6-Tag verhält sich auch äußerst inert hinsichtlich der Ligandensubstitution mit starken Chelatoren und Reaktionen mit Reduktionsmitteln. Um dies zu demonstrieren, inkubierten wir Aliquote von Agarosekugeln mit immobilisiertem [Co^{II}NTA(His6-GFP)] und [Co^{III}NTA(His6-GFP)] entweder mit starken Chelatoren wie EDTA und NTA (25 mM) oder mit Standardreduktionsmitteln der Proteinchemie wie DTT (Dithiothreitol), TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin), Cysteamin und Ascorbat (1 mM) in Kombination mit 250 mM Imidazol. Nach einer Inkubationszeit von 1 und 24 Stunden wurde jeweils die Menge an von den Kugeln eluiertem His6-GFP gemessen (Abbildung 2, Hintergrundinformationen, Abbildung S5). Wenn His6-GFP an Co³⁺-Zentren gebunden ist, lässt sich kein wesentlicher Anstieg des eluierten His6-GFP nach der Inkubation mit den getesteten Chelatoren oder Reduktionsmitteln beobachten. Dagegen wird, ähnlich wie in der Literatur zur Ni²⁺-NTA-Wechselwirkung mit Proteinen mit His6-Tag berichtet,^[2] sämtliches an die Co²⁺-Kugeln gebundene His6-GFP bei gleichen Bedingungen eluiert, und die starken Chelatoren entfernen das Co²⁺ von den Kugeln, wie an der Farbveränderung der Kugeln von Pink nach Weiß erkennbar ist. Die Co³⁺-vermittelte Wechselwirkung zwischen His6-GFP und den NTA-Kugeln wurde auch bei sauren Bedingungen (pH 3.5) nicht zerstört,

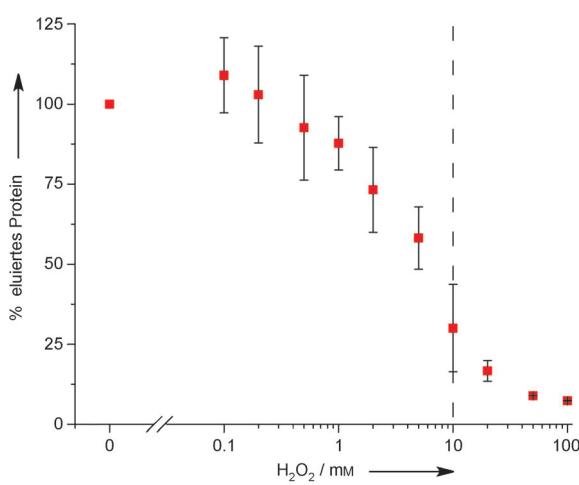


Abbildung 1. Co²⁺-NTA-Agarosekugeln mit immobilisiertem His6-GFP wurden mit verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen eine Stunde lang inkubiert. Dann wurden die Kugeln mit 250 mM Imidazol behandelt, und das eluierte His6-GFP wurde quantifiziert. An ein Co²⁺-Zentrum gebundenes His6-GFP wurde eluiert, an ein Co³⁺-Zentrum gebundenes His6-GFP hingegen nicht.

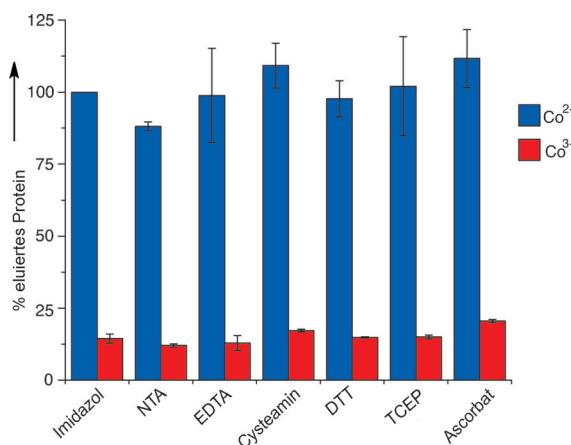


Abbildung 2. Chemische Reaktivität von $[\text{Co}^{\text{III}}\text{NTA}(\text{His6-GFP})]$. NTA-Kugeln mit immobilisiertem His6-GFP an Co^{2+} - und Co^{3+} -Zentren wurden jeweils mit Imidazol (250 mM), den Chelatoren NTA und EDTA (25 mM) sowie den Reduktionsmitteln Cysteamin, DTT, TCEP und Ascorbat (1 mM), kombiniert mit 250 mM Imidazol, eine Stunde lang inkubiert, und die eluierte Menge an His6-GFP wurde gemessen. Wegen der kinetischen Inertheit der Co^{3+} -Zentren eluiert His6-GFP nicht, wenn es als $[\text{Co}^{\text{III}}\text{NTA}(\text{His6-GFP})]$ an die Kugeln gebunden ist.

konnte aber mit 100 mM Ascorbat nach einem Tag durch die Reduktion zu Co^{2+} größtenteils aufgehoben werden (Hintergrundinformationen, Abbildung S6). Darüber hinaus blieben die Agarosekugeln mit dem an Co^{3+} -Zentren gebundenen His6-GFP auch in der Zellkultur 24 Stunden stabil (Hintergrundinformationen, Abbildung S7). Dies belegt, dass der $[\text{Co}^{\text{III}}\text{NTA}(\text{His6-GFP})]$ -Komplex sehr inert hinsichtlich der Auflösung durch starke Chelatoren und Reduktion zurück zu Co^{2+} ist.

Die $[\text{Co}^{\text{III}}\text{NTA}(\text{His6-GFP})]$ -Komplexe sind so inert gegen Ligandensubstitution, dass sie sogar über eine Ni-NTA-Säule geführt werden können, ohne die Komplexe zu zersetzen. Wir konnten beobachten, dass diese Komplexe eine geringere Affinität für diese Säule aufweisen als das Protein mit His6-Tag allein. Das lässt sich damit erklären, dass einige der Histidinreste im His6-Tag dauerhaft an das Co^{3+} -Zentrum koordiniert sind und für eine Wechselwirkung mit dem Ni-NTA in der Säule nicht mehr zur Verfügung stehen. Diese Stabilität löst ein verbreitetes Problem bei der Proteinmarkierung. Da die Markierungsreaktion meistens nicht hundertprozentig ist, ist es entscheidend, umgesetzte und nicht umgesetzte Spezies trennen zu können. Während es leicht ist, das nicht umgesetzte kleine Markierungsmolekül mithilfe von Größenausschluss-Chromatographie oder Dialyse vom Protein zu trennen, ist die Trennung des markierten Proteins vom unmarkierten wesentlich schwieriger und oft gar unmöglich. Um dies zu demonstrieren, wurden Proben mit 20 μM His6-GFP und verschiedenen Mengen von $[\text{Co}^{\text{II}}\text{NTA}]$ eine Stunde lang mit 10 mM H_2O_2 behandelt und nachfolgend auf eine Ni-NTA-Säule aufgebracht, worauf das Protein mit einem linearen Imidazolgradienten eluiert wurde. Wir beobachteten drei gut voneinander getrennte Proteinsignale mit unterschiedlichen Affinitäten zur Säule (Abbildung 3); Signal (a) und (b) mit multiplen bzw. einer an das His6-Tag gebundenen $\text{Co}^{\text{III}}\text{NTA}$ -Einheit hatten jeweils eine geringere Affinität zur

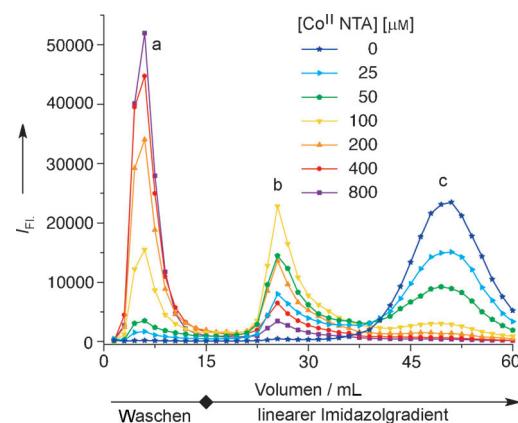


Abbildung 3. His6-GFP (20 μM), eine Stunde lang behandelt mit verschiedenen Mengen $[\text{Co}^{\text{II}}\text{NTA}]$ und 10 mM H_2O_2 , wurde über eine Ni-NTA-Säule geführt und mit einem linearen Imidazolgradienten eluiert. Anschließend wurde die GFP-Fluoreszenz in jedem Abschnitt gemessen. His6-GFP-Konjugate mit einer (b) oder multiplen (a) $[\text{Co}^{\text{II}}\text{NTA}]$ -Einheiten konnten von His6-GFP (c) getrennt werden.

Säule; Signal (c) stammte von unmodifiziertem His6-GFP. Die Verteilung der Signale änderte sich in Abhängigkeit von der anfangs verwendeten $[\text{Co}^{\text{II}}\text{NTA}]$ -Konzentration; je höher die Konzentration, desto intensiver war das Signal (a) mit multipler NTA (Hintergrundinformationen, Abbildung S8). In Kontrollexperimenten konnten wir zeigen, dass die alleinige Zugabe von 10 mM H_2O_2 oder 800 μM $[\text{Co}^{\text{II}}\text{NTA}]$ zu His6-GFP keine Auswirkung auf das Elutionsprofil hat (Hintergrundinformationen, Abbildung S9). Mit ähnlichen Resultaten wurde His6-GFP mithilfe von Co^{3+} -Wechselwirkung auch mit dem NTA-konjugierten Fluorophor Cumarin markiert (Hintergrundinformationen, Abbildung S10). Eine Analyse von Signal(b) mit UV/Vis-Spektroskopie ergab, dass bei diesem Signal der 1:1-Komplex zwischen Cumarin-NTA und His6-GFP vorliegt. Die Analyse von Signal (b) ergab bei Größenausschluss-Chromatographie ein einzelnes Signal (Hintergrundinformationen, Abbildung S11). Somit lassen sich markierte und unmarkierte Proteine mit His6-Tag dank der langsamen Ligandensubstitution des Co^{3+} -Zentrums voneinander trennen. Die Verwendung von Metallionen in H_2O_2 kann Fenton-Reaktionen auslösen, die zur Bildung von Radikalen führen und das Proteinrückgrat spalten können.^[32,33] Unter unseren Reaktionsbedingungen konnte jedoch keine Spaltung des Rückgrats durch MALDI-TOF beobachtet werden (Hintergrundinformationen, Abbildung S12).

Wir konnten hier demonstrieren, dass Co^{3+} die Wechselwirkung zwischen His6-Tag und NTA vermitteln kann und einen Komplex bildet, der gegen Ligandensubstitution inert ist, thermodynamisch stabil ist und nicht mit Chelatoren oder Reduktionsmitteln reagiert. Außerdem haben die $[\text{Co}^{\text{III}}\text{NTA}(\text{His6-Protein})]$ -Komplexe eine geringere Affinität für Ni-NTA-Säulen, was eine Trennung der Komplexe vom unmodifizierten Protein ermöglicht. Wegen der Beliebtheit der His6-Tag-Aufreinigung und der Verfügbarkeit von zahlreichen NTA-modifizierten Materialien und Molekülen ist die hier vorgestellte Methode sehr vielseitig anwendbar. Daraus ergeben sich viele mögliche Anwendungen dieses

Systems, wie die stabile Immobilisierung von Proteinen auf Nanomaterialien und Oberflächen sowie die Markierung von Proteinen mit fluoreszierenden oder anderen spektroskopisch aktiven Molekülen. Dadurch, dass zur Bildung des Co³⁺-Zentrums ein Oxidationsmittel benötigt wird, ist die Anwendbarkeit auf Proteine beschränkt, die oxidationsunempfindlich sind, z.B. extrazelluläre Proteine. Ziel zukünftiger Studien wäre es, die Liganden rund um das Cobaltzentrum so zu optimieren, dass die Oxidation erleichtert wird.

Eingegangen am 27. Dezember 2012,

veränderte Fassung am 7. März 2013

Online veröffentlicht am 6. Juni 2013

Stichwörter: His-Tag · Cobalt · Nitrilotriessigsäure · Proteinmodifikationen · Reaktionskinetik

-
- [1] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature* **1975**, 258, 598–599.
 - [2] H. Block, B. Maertens, A. Spietersbach, N. Brinker, J. Kubicek, R. Fabis, J. Labahn, F. Schäfer, *Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): a Review*, Aufl. 463, Elsevier, Amsterdam, **2009**, Kap. 27, S. 439–473.
 - [3] E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Döbeli, R. Gentz, D. Stüber, *Nat. Biotechnol.* **1988**, 6, 1321–1325.
 - [4] E. Hochuli, H. Döbeli, A. Schacher, *J. Chromatogr.* **1987**, 411, 177–184.
 - [5] F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, *Biomacromolecules* **2007**, 8, 1775–1789.
 - [6] R. Valiokas, G. Klenkar, A. Tinazli, R. Tampé, B. Liedberg, J. Piehler, *ChemBioChem* **2006**, 7, 1325–1329.
 - [7] K. Boeneman, J. B. Delehaney, K. Susumu, M. H. Stewart, I. L. Medintz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 5975–5977.
 - [8] M. J. Kim, H.-Y. Park, J. Kim, J. Ryu, S. Hong, S.-J. Han, R. Song, *Anal. Biochem.* **2008**, 379, 124–126.
 - [9] C. Grunwald, K. Schulze, A. Reichel, V. U. Weiss, D. Blaas, J. Piehler, K. H. Wiesmüller, R. Tampé, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 6146–6151.
 - [10] E. Kang, J.-W. Park, S. J. McClellan, J.-M. Kim, D. P. Holland, G. U. Lee, E. I. Franses, K. Park, D. H. Thompson, *Langmuir* **2007**, 23, 6281–6288.
 - [11] E. G. Guignet, R. Hovius, H. Vogel, *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 440–444.
 - [12] C. R. Goldsmith, J. Jaworski, M. Sheng, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 418–419.
 - [13] N. Soh, *Sensors* **2008**, 8, 1004–1024.
 - [14] M. Kamoto, N. Umezawa, N. Kato, T. Higuchi, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 8004–8012.
 - [15] M. Gavutis, S. Lata, J. Piehler, *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 2091–2103.
 - [16] L. Schmitt, C. Dietrich, R. Tampé, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 8485–8491.
 - [17] M. M. Pires, D. Ernenwein, J. Chmielewski, *Biomacromolecules* **2011**, 12, 2429–2433.
 - [18] S. Lata, M. Gavutis, R. Tampé, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2365–2372.
 - [19] A. N. Kapanidis, Y. W. Ebright, R. H. Ebright, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12123–12125.
 - [20] S. Lata, A. Reichel, R. Brock, R. Tampé, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10205–10215.
 - [21] M. Hintersteiner, T. Weidemann, T. Kimmerlin, N. Filiz, C. Buehler, M. Auer, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1391–1395.
 - [22] G. D. Meredith, H. Y. Wu, N. L. Allbritton, *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 969–982.
 - [23] S. Chevalier, C. Cuestas-Ayllon, V. Grazu, M. Luna, H. Feracci, J. M. de La Fuente, *Langmuir* **2010**, 26, 14707–14715.
 - [24] C. Mateo, G. Fernández-Lorente, E. Cortés, J. L. Garcia, R. Fernández-Lafuente, J. M. Guisan, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 76, 269–276.
 - [25] H. Ogino, K. Ogino, *Inorg. Chem.* **1983**, 22, 2208–2211.
 - [26] J. Bond, D. B. Hobson, *J. Chem. Soc. A* **1969**, 2155–2157.
 - [27] S. J. Lippard, J. M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley CA, **1994**.
 - [28] H. E. Van Wart, *Meth. Enzymol.* **1988**, 158, 95–110.
 - [29] W. Maret, B. L. Vallee, *Methods Enzymol.* **1993**, 226, 52–71.
 - [30] M. D. Hall, T. W. Failes, N. Yamamoto, T. W. Hambley, *Dalton Trans.* **2007**, 3983–3990.
 - [31] N. Graf, S. J. Lippard, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, 64, 993–1004.
 - [32] M. Andberg, J. Jäntti, S. Heilimo, P. Pihkala, A. Paananen, A. M. P. Koskinen, H. Söderlund, M. B. Linder, *Protein Sci.* **2007**, 16, 1751–1761.
 - [33] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, *Chem.-Biol. Interact.* **2006**, 160, 1–40.