

Björn Dietrich

**Nukleobasen-funktionalisierte Azatriostine:
Synthese und Studien zur Wechselwirkung
mit DNA**



Cuvillier Verlag Göttingen

**Nukleobasen-funktionalisierte Azatriostine:
Synthese und Studien zur Wechselwirkung mit DNA**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Björn Dietrich
aus Siegen

Göttingen 2005

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2005
Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2005
ISBN 3-86537-516-2

D7

Referent:	Prof. Dr. Ulf Diederichsen
Korreferent:	Prof. Dr. Axel Zeeck
Tag der mündlichen Prüfung:	28. Juni 2005

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2005
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2005
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-516-2

meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2002 bis Juni 2005 am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität zu Göttingen angefertigt.

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die mir in den letzten drei Jahren als stete Helfer und Unterstützer zur Seite standen, während der Arbeit, wie im Privaten. Wer Forschung betreibt kennt die Höhen und Tiefen, die hieran fest geknüpft sind. Gerade in Zeiten, in denen man vor vielen zu lösenden Problemen steht, ist guter Rat teuer und unersetzlich.

Meinem Chef Prof. Dr. Ulf Diederichsen möchte ich dafür danken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe meine Dissertation anfertigen durfte. Im Rahmen meiner interessanten Themenstellung konnte ich meine eigenen Ideen stets umsetzen und immer auf seine konstruktive Diskussionsbereitschaft zählen.

Meinen Laborkollegen Dr. Markus Hoffmann, Dr. Roberto Bravo, Holger Guthmann, Shengwei Wei, Brigitte Worbs, Eduard Liebler und Britta Eickmann danke ich für die angenehme und unterhaltsame Arbeitsatmosphäre. Es hat mir immer Spaß gemacht morgens im Labor 102 mit der Arbeit zu beginnen.

Außerdem möchte ich mich bei Ansgar Stoll für Hilfe jeglicher Art bedanken. Als Schwabe wurde er seiner Herkunft stets gerecht: „Wir können alles. Außer Hochdeutsch“. Und selbst das kann er ziemlich gut.

Allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe möchte ich für die Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit danken.

Viele Ergebnisse dieser Arbeit wurden wissenschaftlich von meinen Praktikanten Melanie Quitschau, Andreas Bögehold und Birgit Krewer begleitet. Die Arbeit in diesen kleinen Teams hat mir immer viel Freude bereitet und war dank des großen Engagements aller sehr produktiv. Außerdem möchte ich mich herzlich bei Miguel

Alvarino Gil für die unterhaltsamen Stunden während unseres Kooperationsprojekts bedanken.

Herrn Prof. Dr. George M. Sheldrick und Jose Cuesta gilt mein Dank für die gute Kooperation im Rahmen des gemeinsamen Projekts im SFB 416.

Eine Schlüsselrolle chemischer Forschung spielt stets das Personal der Analytikabteilungen. Sowohl der Massenabteilung um Dr. Holm Frauendorf, als auch der NMR-Abteilung um Herrn Reinhard Machinek gebührt mein Dank für die stets zügigen Messungen selbst komplizierter Spektren.

Abschließend noch ein großes DANKE an alle, die mich jenseits des Labors immer unterstützt haben. Meinen Eltern Silke und Erwin möchte ich herzlich danken, dass sie mir bis zum heutigen Tag immer den Rücken freigehalten haben. Sie haben mich immer unterstützt, wo immer es ging. Meine Freundin Dorothee stand während der gesamten letzten Jahre stets zu meiner Seite. Dafür danke ich ihr sehr. Meinem gesamten Freundeskreis sei abschließend für die schönen Wochenenden in Würzburg gedankt.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des SFB 416 unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Molekulare Erkennung der DNA durch kleine Moleküle	6
3	DNA-Bisinterkalatoren	15
4	Nukleobasen-funktionalisierte Des-<i>N</i>-Tetramethylazatriostin-Analoga.....	26
4.1	Einleitende Überlegungen	26
4.2	Synthese von Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostin-Analoga	32
4.2.1	Retrosynthetische Überlegungen.....	32
4.2.2	Synthese unterschiedlicher monomeren Rückgratstrukturen.....	35
4.2.2.1	Darstellung von geschützten Diaminopropionsäuren als Bausteine der peptidischen Rückgratstrukturen.....	37
4.2.2.2	Darstellung des Symmetrischen Rückgrats.....	38
4.2.2.3	Darstellung des orthogonal geschützten Rückgrats.....	48
4.2.3	Synthese von Nukleobasen-funktionalisierten Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostin-Analoga	51
4.2.3.1	Synthese von einheitlich substituierten Nukleobasen- funktionalisierten Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostin-Analoga	54
4.2.3.2	Synthese von orthogonal substituierten Nukleobasen- funktionalisierten Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostin Analoga.....	56
4.2.4	Synthese von Vorläufermolekülen zur Bildung dimerer Rückgratstrukturen	59
4.2.4.1	Darstellung von Fmoc-L-Homoallylglycin-OH als potenzielle Metathesebausteine	61
4.2.4.2	Darstellung des Olefin-funktionalisierten monomeren Rückgrats.....	63
4.3	Strukturuntersuchungen von Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostin-Analoga	68
4.4	Wechselwirkungsstudien von Nukleobasen-substituierten Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostin-Derivaten mit DNA	71

4.4.1	Bindungsstudien von Nukleobasen-substituierten Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostin-Derivaten mit DNA durch Gelelektrophorese.....	73
4.4.2	Bindungsstudien von Nukleobasen-substituierten Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostin-Derivaten mit DNA durch UV-Spektroskopie.....	79
4.4.3	Bindungsstudien von Nukleobasen-substituierten Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostin-Derivaten mit DNA durch CD-Spektroskopie	81
4.4.4	Bindungsstudien von Nukleobasen-substituierten Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostin-Derivaten mit DNA durch Fluoreszenz-Spektroskopie	83
4.4.5	Ergebnisse der Bindungsstudien	86
5	Zusammenfassung	87
6	Summary.....	89
7	Experimentalteil.....	91
7.1	Allgemeine Arbeitstechniken	91
7.1.1	Präparative Arbeitstechniken.....	91
7.1.2	Charakterisierung	93
7.2	Synthesen.....	96
7.2.1	Allgemeine Synthesevorschriften ASV.....	96
7.2.2	Synthese nichtnatürlicher Aminosäuren.....	97
7.2.2.1	Synthese von Diaminopropionsäurederivaten.....	97
7.2.2.2	Synthese Olefin-funktionalisierter Aminosäuren	103
7.2.3	Synthese der einheitlich Nukleobasen-substituierten Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostin–Analoga.....	111
7.2.3.1	Synthese des symmetrisch geschützten Des- <i>N</i> -Tetramethyl-azatriostin-Rückgrats.....	111
7.2.3.2	Synthese von einheitlich Chromophor-substituierten Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostinderivaten	120
7.2.4	Synthese der orthogonal Nukleobasen-substituierten Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostin–Analoga.....	126

7.2.4.1	Synthese des orthogonal geschützten Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostin-Rückgrats	126
7.2.4.2	Synthese von orthogonal Chromophor-substituierten Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostinderivaten	132
7.2.5	Synthese von Dimeren aus Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostin-analogen monomeren Rückgratstrukturen	139
7.2.5.1	Synthese des Homoallylglycin enthaltenden geschützten Des- <i>N</i> -Tetramethylazatriostin-Rückgrats	139
7.3	Wechselwirkungsanalysen mit DNA.....	146
7.3.1	Allgemeine Analysevorschriften AAV	146
Abkürzungsverzeichnis		150
Literaturverzeichnis		154

1 Einleitung

Die Basis für die Kontinuität allen Lebens ist die molekulare Reproduktion der DNA (*Desoxyribonukleinsäure*), die lebende Organismen dazu befähigt, ihre komplexe chemische, biologische und physiologische Ausstattung an die folgende Generation weiterzureichen. Das Erbgut ist in der Basensequenz der DNA bzw. RNA (*Ribonukleinsäure*) kodiert. Die Weitergabe der genetischen Informationen erfolgt über die Bildung eines Doppelstrangs aus komplementären DNA-Einzelsträngen.

Die DNA ist ein Makromolekül, welches aus Desoxyribonukleotiden besteht. Jedes Nukleotid setzt sich aus einer Base, einer Zucker- und einer Phosphatgruppe zusammen.^[1] Die Sequenzen der in der DNA vorkommenden Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin kodieren die genetische Information, die alle Zellaktivitäten programmiert.

James Watson und Francis Crick gelang es 1953 durch Analyse von Röntgenbeugungsmustern von DNA-Fasern die dreidimensionale Struktur der DNA zu erschließen: zwei wasserstoffbrückengebundene helikale Polynukleotidstränge winden sich in entgegengesetzter Richtung um eine gemeinsame Achse (Abb. 1-1).^[2] Es resultieren bei dieser axialchiralen Anordnung zwei Furchen, die sich parallel zum Rückgrat um dieselbe Achse winden. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Breite ($\varnothing$ ca. 11.6 Å bzw. 6.0 Å) und Tiefe ($\varnothing$ ca. 8.5 Å bzw. 8.2 Å), unterscheidet man zwischen der großen und der kleinen Furche (Abb. 1-2).

Die Mulden werden bei der großen Furche durch die Hoogsteen-Flanken aller implementierten Basenpaarung und bei der kleinen Furche durch die Innenseite aller Basenpaarungen gebildet.

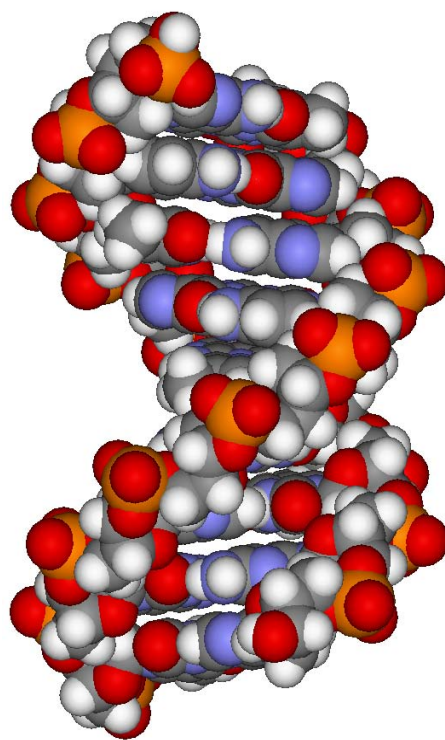


Abb. 1-1 B-DNA-Doppelstrang.

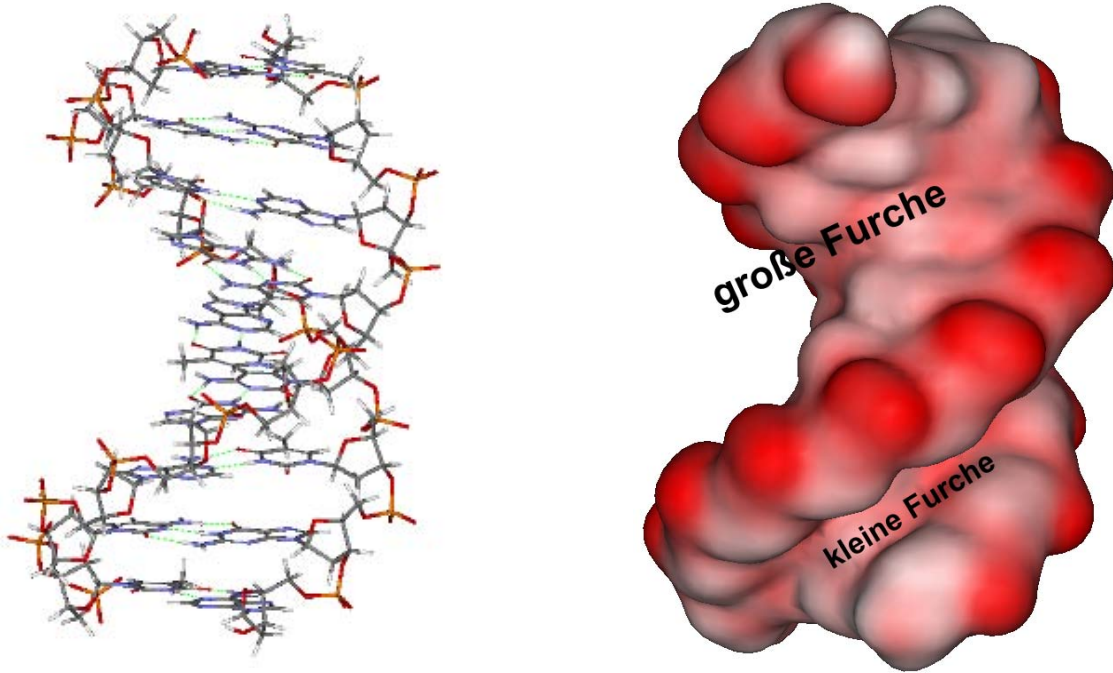


Abb. 1-2 Kleine und große Furche einer DNA-Doppelhelix.

Damit Replikation und Transkription fehlerfrei ablaufen können und somit Mutationen ausgeschlossen sind, muss die Basenpaarung in einer DNA-Doppelhelix hochspezifisch sein.^[3] In der meistens vorliegenden B-DNA ist die Orientierung der Basen und der ihnen zur Verfügung stehende Raum durch den helikalen Aufbau fest vorgegeben: es sind nur Watson-Crick gepaarte Purin-/Pyrimidinbasenpaare mit der Doppelstrangtopologie kompatibel. Dadurch paart in der DNA ausschließlich Guanin mit Cytosin und Adenin mit Thymin (Abb. 1-3).

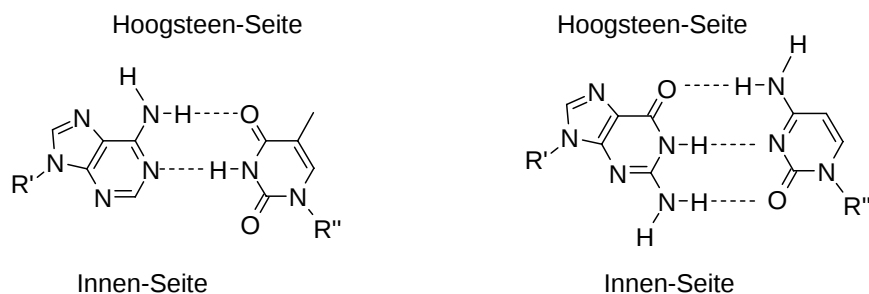


Abb. 1-3 In DNA vorkommende Paarungen im Watson-Crick Modus: Adenin-Thymin (links), Guanin-Cytosin (rechts).

Allein die sequenzielle Abfolge dieser beiden Basenpaarungen kodiert alle genetischen Informationen, die in determinierten Bereichen der DNA in Form von Genen gespeichert sind.^[3] Die Gene bestimmen, welche Proteine in einer Zelle synthetisiert werden. Die Überführung der in einer DNA-Matrix gespeicherten Information in die Synthese des kodierten Proteins wird im Rahmen der Transkription und Translation vollzogen. Die Synthese von Verbindungen, die diese regulatorischen Prozesse beeinflussen und hierdurch die Expression von bestimmten Genen verhindern, ist ein Ansatz zur Behandlung von Krankheiten, die durch Gendefekte verursacht werden.^[4] Diese Ansätze schließen sowohl die Expression mutagener körpereigener DNA als auch die von viraler DNA ein. Mehr als 60 % aller bereits vertriebenen Antikrebswirkstoffe sind Naturstoffe, von denen die meisten ihre Wirkung über eine direkte Wechselwirkung mit DNA entfalten.^[5,6]

Für die Interaktion von Molekülen mit DNA gibt es zahlreiche Wechselwirkungsmechanismen. Zum einen kann unterschieden werden, ob eine Wechselwirkung über die große oder die kleine Furche erfolgt. Zum anderen reichen die Bindungsmechanismen von elektrostatischer Anziehung über van-der-Waals-Wechselwirkungen bis hin zu Wasserstoffbrückenbindungen. Da die Nukleobasen in helikaler DNA zueinander koplanar angeordnet sind, können planare polyzyklische aromatische Systeme zwischen die Basenpaarungen interkalieren. Unter Aufwindung der DNA werden meist sequenz-unspezifische Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Stapelungswechselwirkungen zwischen dem Interkalator und den benachbarten Basenpaarungen ausgebildet. Die Bindungsaffinität kann erhöht werden, wenn in das DNA-bindende Molekül mehrere Interkalatoren implementiert werden.^[7] Darüber hinaus können die Interkalatoren über einen Linker unterschiedlicher konformationeller Flexibilität verbunden werden, der zur Ausbildung von spezifischen Wasserstoffbrückenbindungen in den Furchen der DNA befähigt ist. Hierdurch kann bei zunehmender Bindungsaffinität zusätzlich das Maß an Sequenzselektivität signifikant erhöht werden.

Die Gruppe der Bisinterkalatoren stellt einen prominenten Vertreter von DNA-Bindern dar, weil in diesen Systemen alle Wechselwirkungen miteinander kombiniert werden und hierdurch hohe Bindungsaffinitäten und Bindungsselektivitäten erreicht werden.

Ein polares Rückgrat bindet über selektive Wasserstoffbrückenbindungen über die kleine Furche sequenzspezifisch an DNA, während sich die aromatischen Interkalatoreinheiten zwischen die DNA-Basenpaarungen einschieben und mit den benachbarten Basenpaaren Stapelungswechselwirkungen eingehen. Prominentester Vertreter aller Bisinterkalatoren ist der Naturstoff Triostin A (Abb. 1-4), der seit seiner ersten Isolierung von *Streptomyces* S-2-210, zu dem am umfangreichsten untersuchten Systemen aus der Familie der Chinoxalin-Antitumorantibiotika gehört.^[8-12] Während das depsipetidische Rückgrat über die kleine Furche bindet, können die aromatischen Chinoxalin-Chromophore zwischen die Basenpaare interkalieren und hierdurch zytotoxisch wirken.

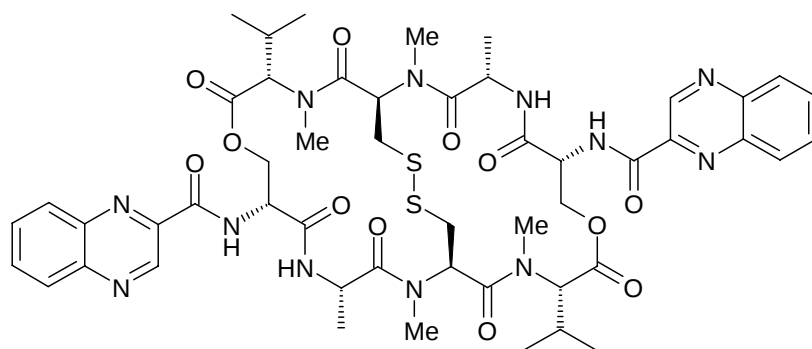


Abb. 1-4 Triostin A (**1**).

Ziel dieser Arbeit war es, aufbauend auf den Wechselwirkungseigenschaften von Triostin A mit DNA das Wechselwirkungspotenzial von Triostin A-analogen Verbindungen zu untersuchen, die Nukleobasen als Erkennungseinheiten enthalten. Die Implementierung von Nukleobasen in Naturstoffe wie Triostin A (**1**) eröffnet ein breites Spektrum an möglichen Wechselwirkungsmechanismen mit DNA, da das komplexe Bindungsverhalten bestehend aus elektrostatischen Bindungen, zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen und veränderten van-der-Waals-Wechselwirkungen signifikant verändert wird. Die veränderte Dipolverteilung in Nukleobasen sowie die Einführung von zusätzlichen Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren erweitern das Spektrum möglicher Interaktionsmechanismen. Die Bindungsaffinität und

Bindungsselektivität kann somit gezielt beeinflusst werden. Hierdurch sind wesentliche Informationen zum Verständnis der Wechselwirkung mit DNA zugänglich. Die Nukleobasen sollten mit einem Triostin A-analogen vollständig peptidischen Rückgrat kovalent verbunden werden, das im Vergleich zum Depsipeptid über zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen verfügt. Da die Ausbildung selektiver Wasserstoffbrückenbindungen ursächlich für Sequenzselektivität ist, sollte hierdurch die Bindungsselektivität bei zusätzlicher Bindungsaffinität beeinflusst werden. Gleichzeitig macht die Synthese eines vollständig peptidischen Rückgrats den Einsatz von Festphasensynthese möglich, wodurch auf eine synthetisch einfache Weise peptidische Rückgratstrukturen zugänglich sind, die in einem konvergenten Ansatz mit verschiedenen Nukleobasen kovalent verbunden werden sollten. Diese Modellsysteme sollten systematisch hinsichtlich ihres Bindungspotenzials mit DNA untersucht werden, um ein tieferes Verständnis über deren Wechselwirkungsmechanismen zu erlangen.

2 Molekulare Erkennung der DNA durch kleine Moleküle

Soll in den regulatorischen Prozess der Proteinsynthese ausgehend von DNA-Doppelsträngen eingegriffen werden, sind zunächst die bei der Transkription und Translation stattfindenden Prozesse zu berücksichtigen. Die DNA-Doppelhelix dient als Matrize für die Synthese von mRNA.^[13] Das Enzym RNA-Polymerase verknüpft die einzelnen Ribonukleotidphosphate zu polymeren RNA-Strängen, die komplementär zur kodierten DNA sind. Dieser Vorgang wird durch das Binden der RNA-Polymerase an determinierten Promoterstellen der DNA induziert. Durch fortlaufende Bewegung entlang der DNA-Matrize wird ein Strang transkribiert, bis eine Terminationsstelle erreicht ist. Die Konvertierung der in der mRNA gespeicherten Informationen zur Proteinsynthese erfolgt durch tRNA. tRNA besitzt neben einer Aminosäurebindungsstelle eine Matrizenerkennungsregion zur Bindung der mRNA. Somit gelingt es, die über Esterfunktionen an die tRNA jeweilig verknüpften Aminosäuren so zu kombinieren, dass diese enzymatisch zum Protein übersetzt werden.

Wird zur Beeinflussung der Transkription die DNA als Target ausgewählt, können im Wesentlichen drei verschiedene Vorgehensweisen unterschieden werden. Zum einen ist es möglich, Verbindungen zu entwickeln, die um die Promoterpositionen der DNA konkurrieren. Hierfür sind Bindungskonstanten nötig, die vergleichbar mit denen der beteiligten Proteine sind. Ein alternativer Ansatz geht von der Synthese von DNA-Bindern aus, die im Fall der Wechselwirkung mit DNA, diese konformationell derartig verändern, dass eine Bindung der an der Transkription beteiligten Enzyme nicht mehr gewährleistet ist. Im Gegensatz hierzu fixieren im dritten Ansatz DNA-bindende Moleküle die DNA in einer Weise, dass die für die Transkription notwendige Strukturänderung der DNA nicht möglich ist.

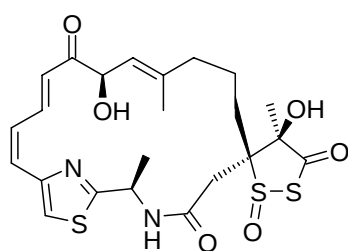
Die DNA-Struktur ist bei der Untersuchung von möglichen Wechselwirkungen von kleinen Molekülen mit DNA von entscheidender Bedeutung. Der helikale doppelsträngige Aufbau ist in wässrigem Medium durch die Basensequenz, die sequenzspezifische Furchenausdehnung und -tiefe, die Solvation und den Grad der Verdrillung bestimmt (Abb. 1-1, Abb. 1-2). Die gegebene Struktur der DNA bedingt

die möglichen Wechselwirkungsoptionen. Neben der kovalenten Bindung an die DNA, die zu Mutationen und cancerogenen Effekten führen kann, werden auch nichtkovalente Wechselwirkungen von kleinen Molekülen mit DNA beobachtet.^[14,15]

Diese können sowohl unspezifisch, als auch spezifisch sein. Zu den unspezifischen Wechselwirkungen gehört neben elektrostatischen Wechselwirkungen von positiv geladenen Molekülen wie Peptiden und Proteinen^[16,17] an das polyanionische Rückgrat auch die Koordination von Metallkationen wie Natrium, Calcium und Magnesium, die an Rückgrat und Nukleobasen koordinieren können. Unter physiologischen Bedingungen liegen deswegen DNA-Ionen-Komplexe vor.^[1]

Spezifische Wechselwirkungen zu DNA werden vor allem durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen erreicht. Diese können in drei verschiedene Klassen eingeordnet werden: Bindung über die große Furche, Bindung über die kleine Furche und Interkalation.

Die große Furche verfügt im Vergleich zur kleinen Furche über mehr Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren. Da hierdurch vergleichsweise mehr Information in der großen Furche kodiert wird als in der kleinen Furche, dient diese für die meisten Proteine als Erkennungsregion der DNA.^[18,19] Für sehr kleine Moleküle ist die große Furche hingegen nicht geeignet, da eine effektive Bindung aufgrund der Größe und der flachen Furche eingeschränkt ist.^[20] Es sind folglich auch nur wenige Naturstoffe bekannt, die selektiv über die große Furche binden. So wechselwirken Leinamycin und Azinomycin B (Abb. 2-1) zwar über die große Furche mit DNA, doch ist die zu beobachtende Bindungsaffinität auf die Interkalation der aromatischen Systeme zurückzuführen.



Problematisch bei der Bindung kleiner Moleküle ist die mangelnde Diskriminierung zwischen verschiedenen Genen. Ausgehend von einer menschlichen Genomlänge von 3 Mrd. Basenpaarungen, kann eine Verbindung, die zum Beispiel acht aufeinander folgende Basenpaarungen erkennt, an etwa 100000 Stellen der DNA binden.^[21] Eine Erkennungsregion von 16-18 Basenpaarungen ist für die Erkennung einer singulären Region eines spezifischen Gens erforderlich.^[22]

Erkennungsregionen dieser Größenordnung weisen neben synthetischen DNA-Analoga auch DNA-Einzelstränge auf, die an die Hoogsteen-Seite des DNA-Doppelstrangs in der großen Furche binden.^[22,23] Hierbei binden die jeweiligen Watson-Crick-Seiten der Nukleobasen des Einzelstrangs über Wasserstoffbrückenbindungen an Donor- und Akzeptorfunktionen der Hoogsteen-Seiten der Basenpaarungen des DNA-Doppelstrangs. Eine derartige Ausbildung eines Tripelstrangs wurde erstmalig 1957 von Rich beschrieben (Abb. 2-2).^[24] Es konnte gezeigt werden, dass derartige Systeme unter physiologisch ähnlichen Bedingungen stabil sind. Hierdurch können DNA-bindende Proteine inhibiert und somit die Transkription beeinflusst werden.^[25-27]

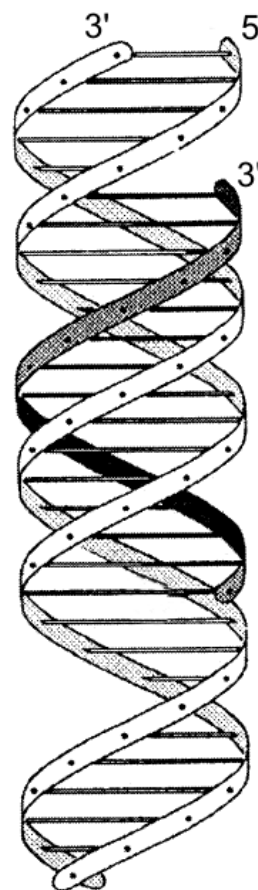


Abb. 2-2 DNA-Tripelstrang.

Problematisch bei diesem Ansatz ist, dass die einzelsträngigen Oligonukleotide aufgrund ihres polyanionischen Charakters schlecht in die Zelle transportiert werden, weshalb Forschung zur Tripelstrangbildung zwar im Rahmen der Antigen-Therapie modern ist, sich jedoch in der klinischen Anwendung noch nicht entscheidend durchgesetzt hat.

Das Design von Verbindungen, die über die kleine Furche wechselwirken, stellt einen alternativen Ansatz dar, in die regulatorischen Prozesse der Proteinsynthese

einzugreifen. Im Vergleich zur Hoogsteen-Seite der DNA-Basenpaarungen, weist die Flanke zwischen den Zuckerresten in der kleinen Furche zwar die kleinere Anzahl an Wasserstoffbrückendonoren und –akzeptoren auf, dennoch stellt die kleine Furche ein geeignetes Target zur sequenzspezifischen Erkennung dar, da ihre lokale Struktur, sowie die lokalen elektrostatischen Potenziale durch die Basenabfolge determiniert werden. In AT-reichen Regionen ist die kleine Furche signifikant kleiner als in GC-reichen Sequenzen, wodurch die anionischen Ladungen des Rückgrats sich in größerer Nähe befinden. Diese strukturelle Anordnung resultiert in einer vergleichsweise engen und tiefen Furche, die sich über die Konformation hinaus auch im elektrostatischen Potenzial von der großen Furche unterscheidet (Abb. 2-3). Somit wird bei Wechselwirkungen von kleinen Molekülen mit der kleinen Furche ein komplexes Interaktionssystem beobachtet, das aus Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen, sowie attraktiven van-der-Waals-Bindungen in Form von Interkalationen besteht. Darüber hinaus scheinen entropische Effekte wegen der hohen Solvation der kleinen Furche bei einer Bindung relevant zu sein. Die relativen Beiträge der einzelnen Komponenten werden heute noch kontrovers diskutiert. Bei der Bindung der „Minor-Groove-Binder“ wird die Struktur der DNA, im Gegensatz zu interkalierenden Verbindungen, nicht signifikant verändert. Stattdessen wird oft in Folge des komplexen Wechselwirkungsumfelds in der kleinen Furche eine Konformationsänderung der Binder festgestellt.

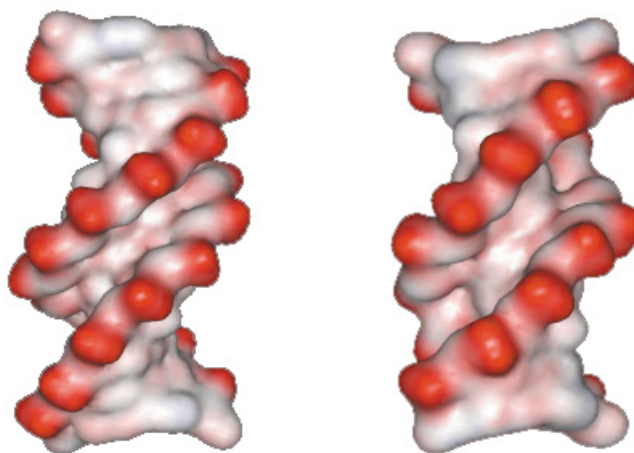


Abb. 2-3 Vergleich von zwei kleinen Furchen: links AT-reiche Sequenz d(CGCAAATTTGCG); rechts GC-reiche Sequenz d(CCAGGCCTGG).

Ausgangspunkt der Entwicklung von verschiedenen „Minor-Groove-Bindern“ waren die Naturstoffe Netropsin und Distamycin die beide aus Pyrrol-Untereinheiten aufgebaut sind (Abb. 2-4).

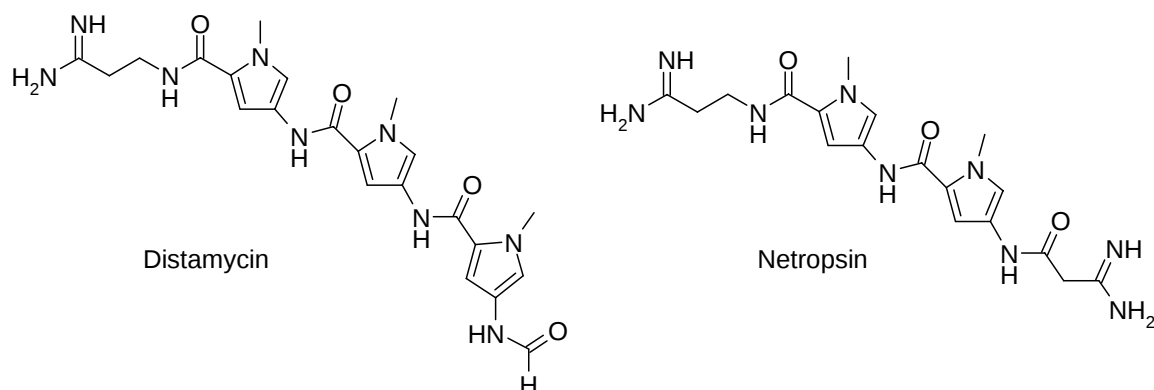


Abb. 2-4 Distamycin und Netropsin.

Sie enthalten wie die meisten Verbindungen, die mit der kleinen Furche wechselwirken, einen unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Terminus, durch den eine attraktive elektrostatische Anziehung zur DNA gewährleistet wird.

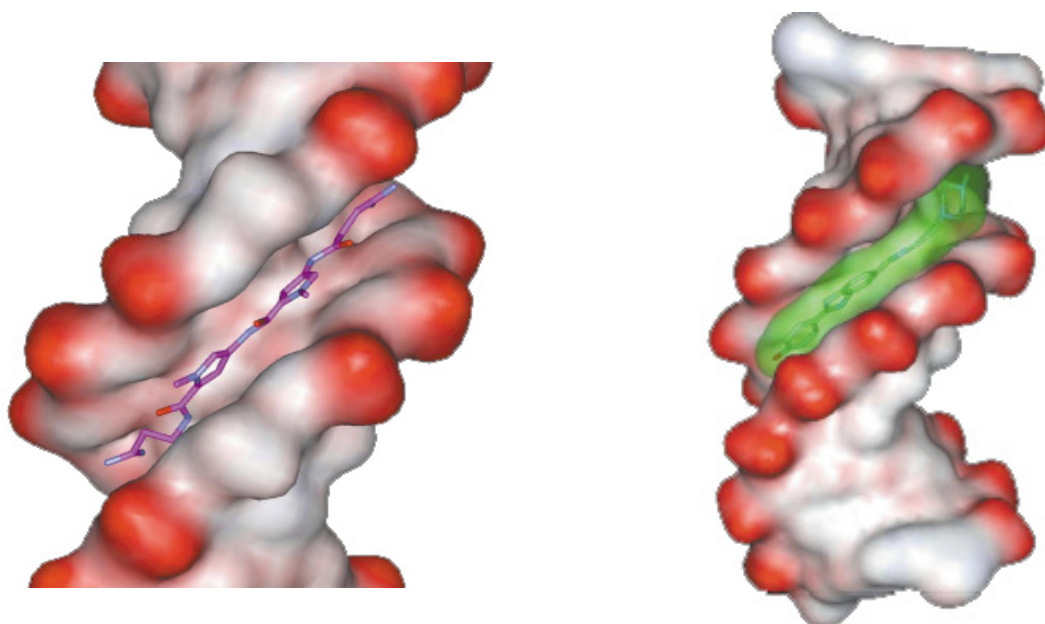


Abb. 2-5 Bindung über die kleine Furche von Netropsin (links) und Höchst 33258 (rechts).^[28]

Durch die lineare Anordnung der planaren aromatischen Pyrrolfragmente können sich beide Struktur motive entlang der kleinen Furche orientieren. Hierbei zeigen die Stickstoffatome der Amidfunktionen in die Furchentasche, während die Pyrroleinheiten van-der-Waals-Bindungen zu den Taschenwänden ausbilden (Abb. 2-5). Ausgehend von der Entdeckung zweier Distamycin-Moleküle, die sich nebeneinander in die kleine Furche einlagern, wurden Systeme entwickelt, die sich unter Aufweitung der kleinen Furche in diese einlagern können.^[29,30] Dervan gelang die Synthese von verschiedenen „Minor-Groove-Bindern“, indem er Distamycin-ähnliche Oligomere über einen Linker variabler Länge miteinander kovalent verknüpft.^[31] Die erhaltenen Polyamid-Hairpin-Strukturen zeigen ein ausgeprägtes Bindungspotenzial in der kleinen Furche. Durch den Einbau von Imidazol und Hydroxypyrroleinheiten in die Polyamide konnten hoch sequenzspezifische Systeme entwickelt werden. Die Hydroxylgruppe der Hydroxypyrroleinheiten können aufgrund von sterischen Wechselwirkungen und der selektiven Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit der O2-Position von Thymin zwischen den Basen Adenin und Thymin unterscheiden, sodass sowohl die Paarungen AT und TA, als auch die Sequenzen ApT und TpA unterschieden werden können. Es ist hiermit möglich, durch gezielte Polyamidsynthese „Minor-Groove-Binder“ zu entwickeln, die eine bestimmte Basensequenz über die kleine Furche erkennen (Abb. 2-6).

Der Wechselwirkungsmechanismus der Interkalation wurde erstmals von Lerman beschrieben.^[32] Es handelt sich hierbei um die Wechselwirkung von aromatischen Verbindungen mit DNA, in denen die aromatischen π -Systeme sich parallel zwischen den Basenpaarungen des DNA-Doppelstrangs orientieren und mit diesen Stapelungswechselwirkungen eingehen. Da die dabei ausgebildeten van-der-Waals-Wechselwirkungen attraktiv sind, steigt mit zunehmender Überlappung die Bindungsenergie an. Bei der Interkalation werden jedoch auch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Dipolen der aromatischen Ringsysteme beobachtet, die maßgeblichen Einfluss auf den Grad der Überlappung haben. So bilden Proflavin und Ethidiumbromid sehr stabile Komplexe mit DNA aus und werden deswegen in der DNA-Analytik als Interkalatoren eingesetzt (Abb. 2-7).

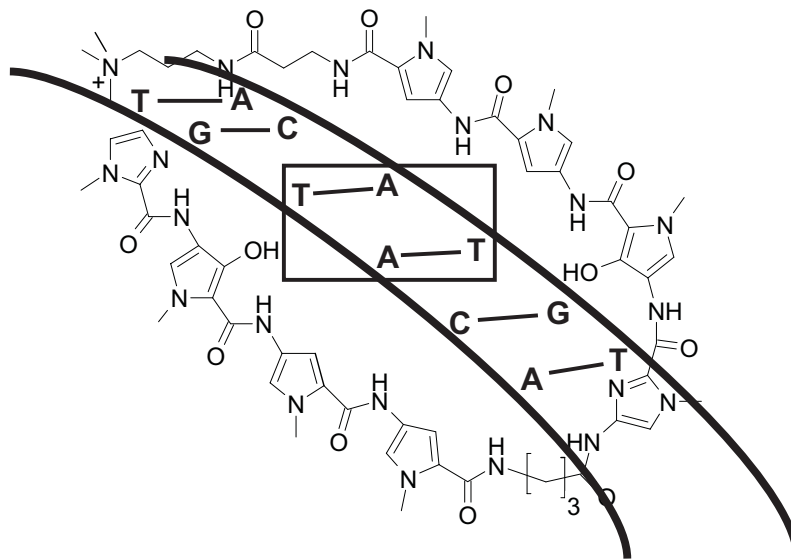
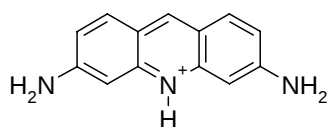
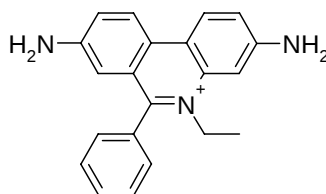


Abb. 2-6 Hairpin-verbrückte Polyamide, aufgebaut aus Pyrrol-, Imidazol- und Hydroxypyrroleinheiten. Die Hydroxylgruppen bilden selektiv Wasserstoffbrückenbindungen zu den gekennzeichneten Thyminbasen aus und können somit die Basensequenz TpA von ApT unterscheiden.

Damit kleine Moleküle zwischen die Basenpaarungen der DNA interkalieren können, muss der Abstand zwischen den DNA-Basepaaren vergrößert werden. Zwar weist das Zuckerphosphatrückgrat ausreichend konformationelle Flexibilität für eine derartige Strukturänderung auf. Jedoch wird im Fall der Interkalation eine signifikante Aufwindung und Verlängerung der Struktur verzeichnet. Der Basenpaarabstand wird von 3.4 Å auf 6.8 Å vergrößert. Die Einlagerung von interkalierenden Verbindungen ist auf jede zweite Basenpaarung beschränkt.^[1] Die Interkalation von Verbindungen in DNA weist aufgrund der induzierten DNA-Konformationsänderung große Wirksamkeit bei der Blockierung der Genexpression auf. Die mangelnde Sequenzselektivität beschränkt jedoch den Anwendungsbereich im Rahmen der Krebstherapie. Sequenzspezifisch interagierende Verbindungen weisen deshalb zur Erkennung von DNA neben dem Interkalationspotenzial auch Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren auf, über die an die kleine oder die große Furche gebunden werden kann.



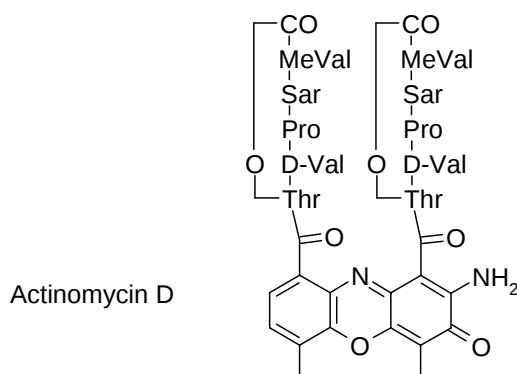
Proflavin



Ethidium

Abb. 2-7 Proflavin- und Ethidium-Kationen.

Ein umfangreich untersuchtes System stellt der Naturstoff Actinomycin D dar, der sich in klinischen Studien als antitumor-aktiv erwiesen hat (Abb. 2-8).^[33] Während das aromatische Fragment ausgeprägte Interkalationsaffinität aufweist, binden die zyklodepsipeptidischen Ringsysteme unter Ausbildung von spezifischen Wasserstoffbrückenbindungen in der kleinen Furche und bilden hierdurch die Grundlage für die beobachtete Sequenzspezifität.^[34]



Actinomycin D

Abb. 2-8 Actinomycin D.

Aufbauend auf den hervorragenden Bindungsaffinitäten von amidischen bzw. peptidischen Erkennungsregionen über die kleine Furche unter gleichzeitiger Interkalation von aromatischen Substituenten hat sich seit der Identifizierung des Bindungsmechanismus von Echinomycin (2) (Abb. 2-9) eine weitere Gruppe von DNA-Bindern etabliert, deren Wechselwirkungspotenzial intensiv erforscht wurde: die Gruppe der Bisinterkalatoren.^[35] Alle Bisinterkalatoren sind strukturell aus zwei zur Interkalation befähigten aromatischen Systemen aufgebaut, die über einen Linker miteinander verknüpft sind. Hierdurch gelingt es, die Erkennungsregion zu erweitern

und gleichzeitig die Bindungsaffinität wegen des zweiten Interkalatorsystems zu erhöhen.

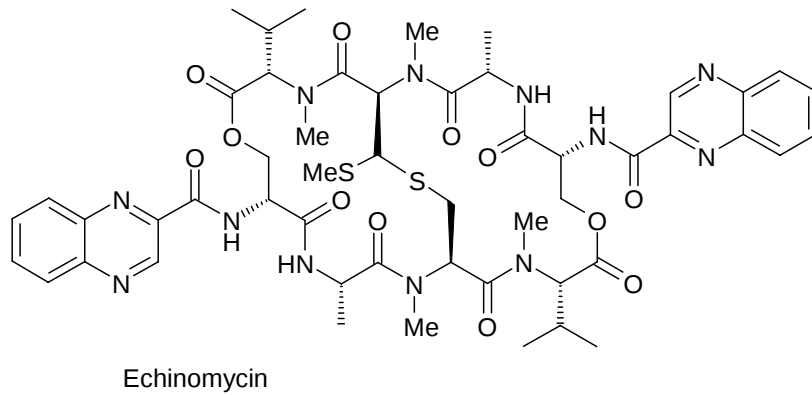


Abb. 2-9 Echinomycin (2).

3 DNA-Bisinterkalatoren

Stabile und sequenzspezifische Bindungen von kleinen Molekülen mit DNA-Doppelsträngen werden nur dann ausgebildet, wenn der unspezifische Interkalationsprozess mit einer spezifischen Erkennung über Wasserstoffbrückenbindungen kombiniert wird. Strukturen, die sowohl aromatische Chromophore als Interkalatoren, als auch amidische Strukturen für die sequenzspezifische Erkennung besitzen, bilden hierfür ideale strukturelle Voraussetzungen. Die Gruppe der Bisinterkalatoren setzt dieses Konzept um, indem zwei interkalierende Einheiten durch Linker miteinander verbunden sind, die einen amidischen Aufbau aufweisen. Durch das Binden an DNA wird eine Konformationsänderung in der DNA induziert, wodurch im Rahmen der Proteinsynthese die Transkription inhibiert wird.^[36]

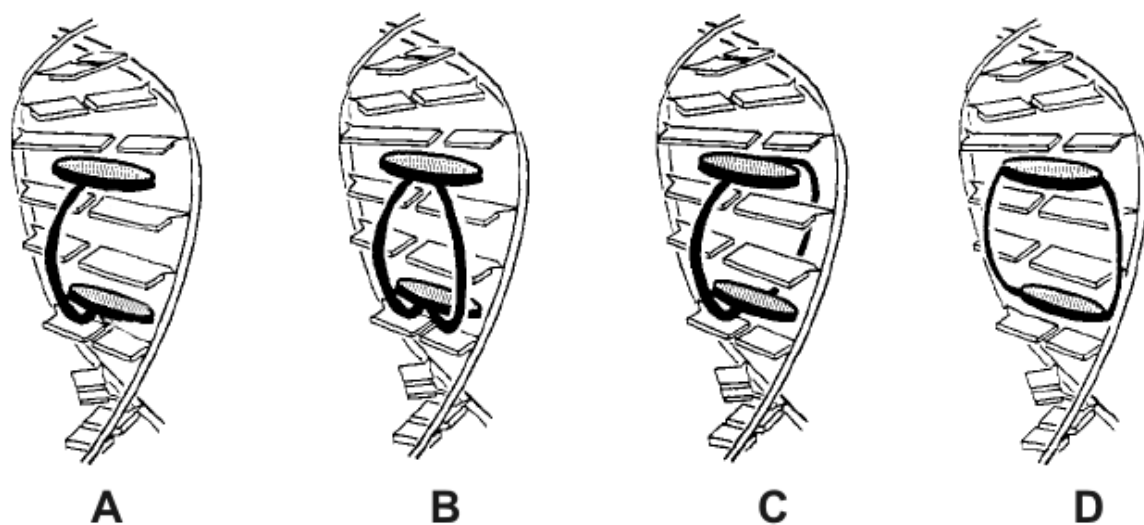


Abb. 3-1 Bisinterkalationsmodi in den DNA-Doppelstrang (A: Bisinterkalation, bei denen die Chromophore über einen Arm miteinander verbunden sind; B: Bisinterkalation, bei denen die Chromophore über zwei Arme miteinander verbunden sind; C: „Catenan“-Komplex; D: *perpendicular Intercalation* (bei der perpendikularen Interkalation sind die Arme des Linkers jeweils in gegenüberliegender Stellung am Chromophor orientiert. Hierdurch kommt es zu einer seitlichen Einlagerung des Interkalators in den DNA-Doppelstrang, wodurch eine vergleichsweise niedrige Überlappung resultiert)).^[37]

Hierbei können vier verschiedene Gruppen klassifiziert werden (Abb. 3-1): Verknüpfung der Interkalatoren über einen Linker (A); über zwei Linker auf derselben Flanke des Interkalators (B); durch Ausbildung eines Catenan-Komplexes (C), über zwei Linker durch *perpendicularare Intercalation*.

Aufgrund ihrer Häufigkeit und biologischen Relevanz sollen an dieser Stelle ausschließlich die Bindungsmodi A und B diskutiert werden. Diese beiden Wechselwirkungsmechanismen unterscheiden sich signifikant in ihrer konformationellen Flexibilität: während ein DNA-Binder mit einem Linker durch die freien Rotationen um die Linkerbindungen ein sehr flexibles System darstellt, resultiert eine Verbrückung von Chromophoren durch zwei Linker in einer zyklischen Struktur, die konformationell deutlich fixiert ist. Modellsysteme, in denen zwei Ethidiumbromid-Moleküle über einen Linker miteinander verbunden werden (Abb. 3-2), zeigen ausgeprägte Bindungsaffinität zu DNA-Doppelsträngen und zugleich eine erhöhte Bindungsspezifität im Vergleich zu isoliertem Ethidiumbromid.^[38]

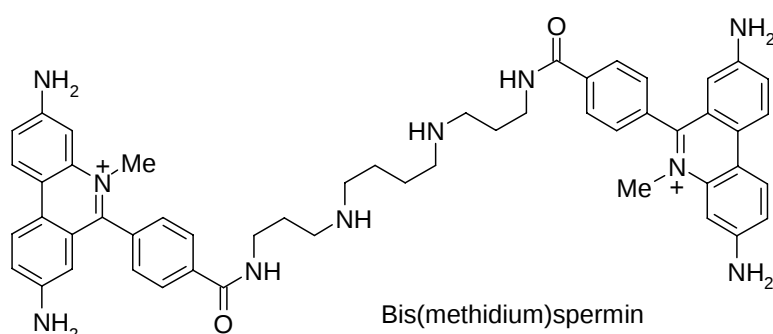


Abb. 3-2 Bisinterkalator auf Basis von Ethidiumbromid: Bis(methidium)spermin.

Die Bindungselektivität kann erhöht werden, wenn der DNA-Binder eine diskrete Vorzugskonformation einnimmt. Durch die Verwendung einer Rückgratstruktur, die eine zyklische Struktur aufweist, wird die konformationelle Flexibilität eingeschränkt, sodass die aromatischen Interkalatoren für eine Interkalation präorganisiert sind. Die Favorsierung einer Vorzugskonformation kann erhöht werden, wenn zusätzliche Fixierungen in das Rückgrat eingebaut werden. Hierbei ist jedoch essentiell, dass die Chromophore derart vororganisiert sind, dass sie in einem zur Interkalation befähigenden Abstand organisiert werden und zueinander koplanar ausgerichtet sind.

Dieses Konzept wird von einer umfangreichen Klasse von zytotoxischen Naturstoffen umgesetzt. Chinoxalin-Antibiotika stellen wegen ihrer ausgeprägten Bindungsaffinität und Bindungsselektivität die prominentesten Vertreter dieser Klasse von Bisinterkalatoren dar. Sie sind potente und selektive Inhibitoren der RNA-Synthese *in vivo* und *in vitro*.^[39,40] Sie können untergliedert werden in Strukturen, deren Interkalatoren entweder an monozyklische Rückgratstrukturen (Sandramycin, Luzopeptin, Chinoxapeptin, Abb. 3-3) oder an bizeyklische Rückgratstrukturen (Echinomycin, Triostin A, Thiocoralin, BE-22179, Abb. 3-4) gebunden sind.^[41-57] Alle Chinoxalin-Bisinterkalatoren setzen sich aus einem peptidischen bzw. depsipeptidischen Rückgrat zusammen, das aus zwei identischen tetrapeptidischen (bei Echinomycin, Triostin A, Thiocoralin, BE-22179) bzw. pentapeptidischen (bei Sandramycin, Luzopeptin, Chinoxapeptin) Einheiten besteht. Darüberhinaus enthalten die zyklischen Oktapeptide zwei gegenüberliegende Cystein-Bausteine, die im Fall von Echinomycin über eine Thioacetal-Bindung bzw. im Fall von Triostin A, Thiocoralin und BE-22179 über eine Disulfidbindung zum Bizeklus zusätzlich fixiert sind. Die Konsequenzen für die Struktur der Bisinterkalatoren und auf den Wechselwirkungsmechanismus mit DNA-Doppelsträngen soll exemplarisch an der am intensivsten erforschten Verbindung, dem Chinoxalin-Antibiotikum Triostin A dargestellt werden.

Triostin A setzt sich aus zwei identischen Tetrapeptid-Einheiten zusammen, die aus D-Serin, L-Alanin, N-Methyl-L-Cystein und N-Methyl-L-Valin über zwei Esterfunktionen kovalent miteinander verknüpft sind. Die gegenüberliegenden Schwefelatome sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden, sodass ein rigides depsipeptidisches Rückgrat entsteht. Über die α -Aminofunktionen der D-Serine sind die Chinoxaline an das konformationell fixierte Grundgerüst angebracht. Die Analyse von Kristall- und NMR-Strukturen in Lösung zeigten, dass die konformationelle Einschränkung des Rückgrats in einer Vorzugskonformation resultiert, in der die Chinoxalin-Interkalatoren zur selben Seite des Rückgrats nahezu koplanar in einem Abstand von 10.5 Å präorganisiert sind (Abb. 3-5).^[58-62] Begünstigt wird diese Geometrie auch durch die Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen sowie von hydrophoben Wechselwirkungen, die auf die Orientierung der hydrophoben

Seitenketten in Richtung der konvexen Innenseite zwischen die Interkalatoren zurückzuführen sind.

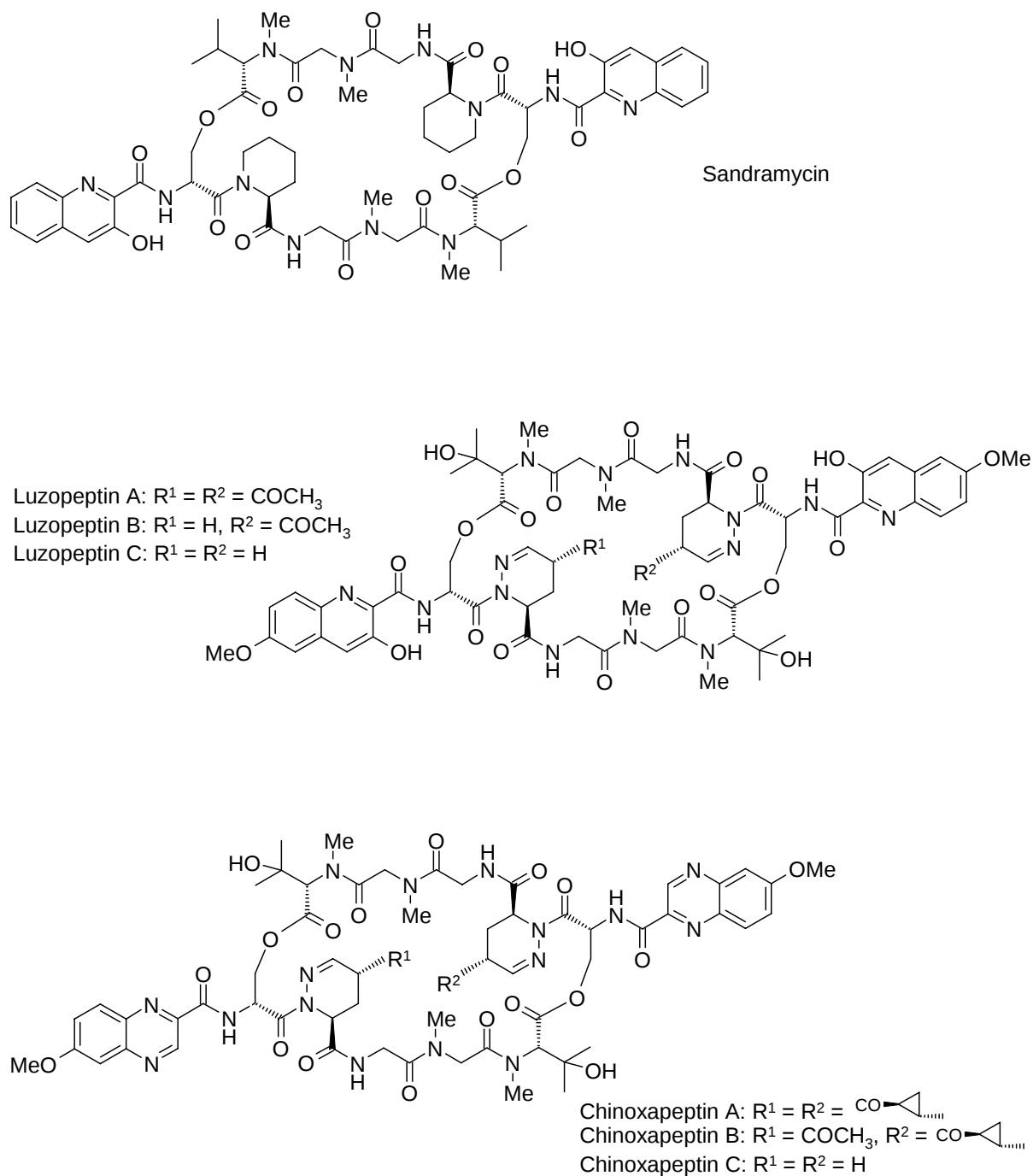


Abb. 3-3 Sandramycin, Luzopeptin A-C, Chinoxapeptin A-C.

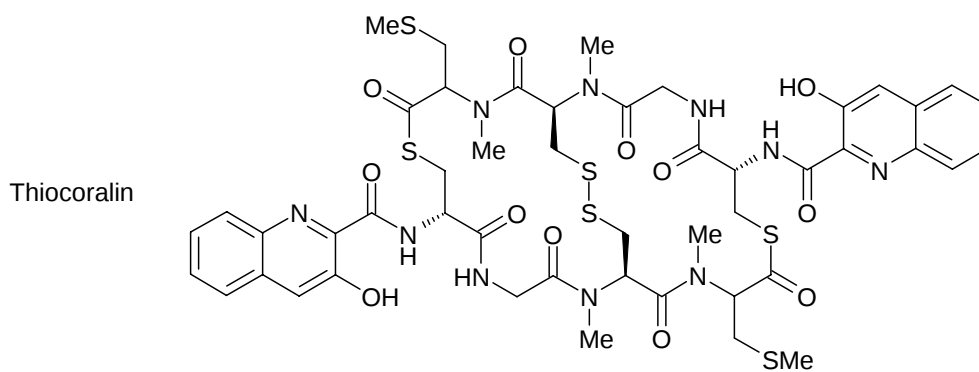
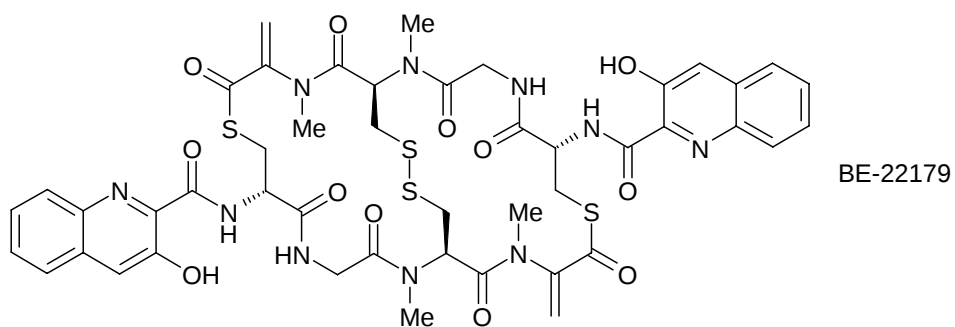
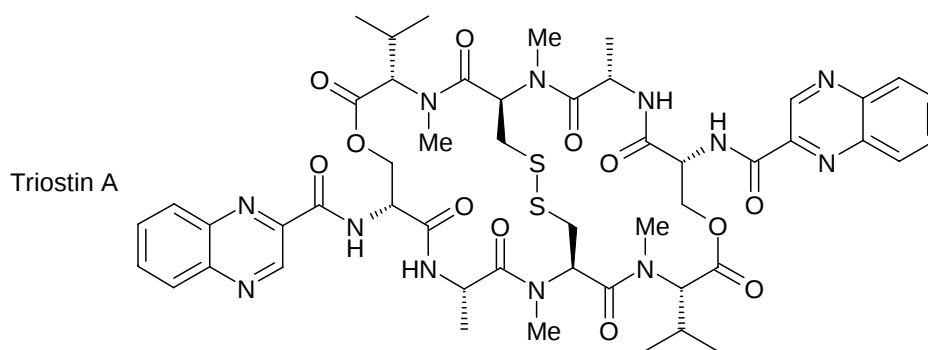
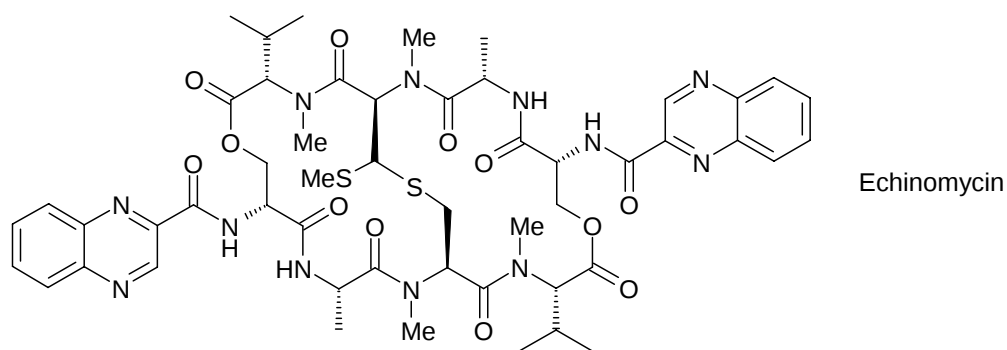


Abb. 3-4: Echinomycin, Triostin A, BE-22179, Thiocoralin.

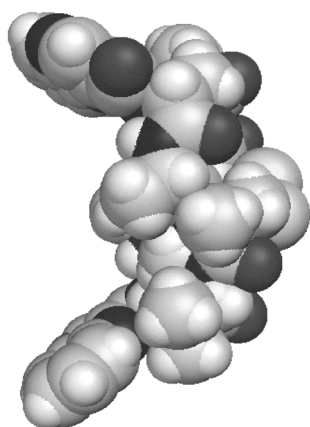
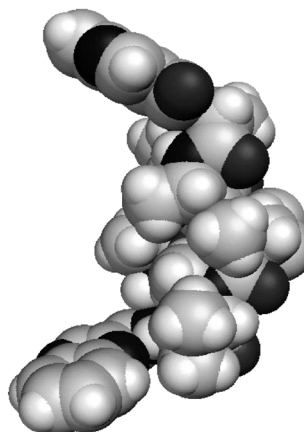
Form $P2_12_12_1$ Form $C222_1$

Abb. 3-5 Kristallstrukturen von Triostin A (es werden abhängig vom Lösungsmittel etwas unterschiedliche Strukturen erhalten)^[59].

Auf der Basis eines Basenpaar-Abstands in DNA-Doppelsträngen von 3.4 Å können die beiden Chromophore genau zwei Basenpaarungen überspannen. Die Insertion in den Doppelstrang erfolgt hierbei über die kleine Furche (Abb. 3-6), wodurch eine Aufwindung der helikalen Struktur induziert wird.

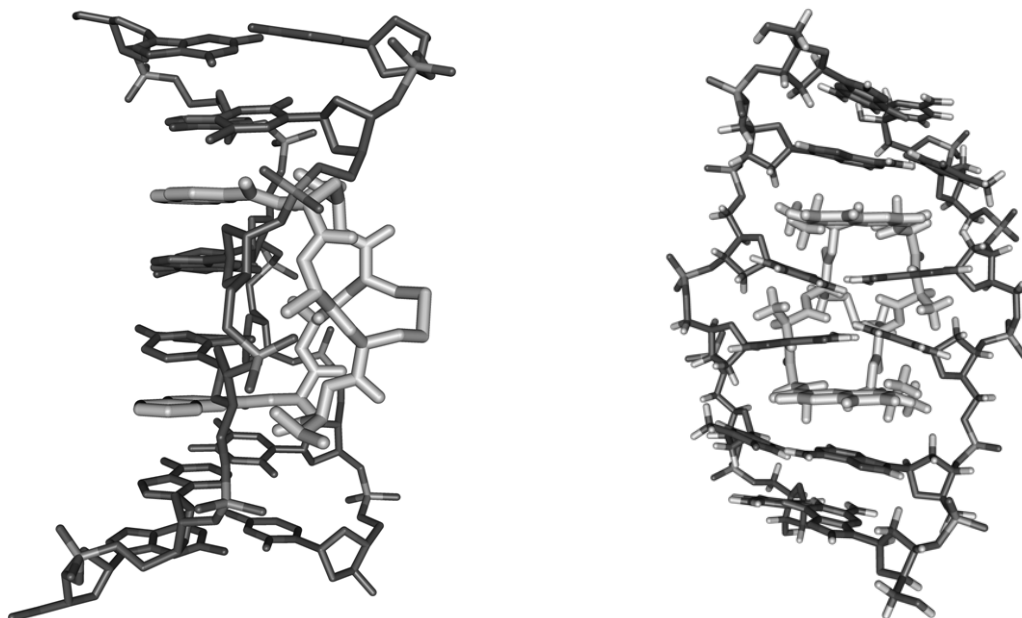


Abb. 3-6 Triostin A-DNA-Komplex.

Als Schlüsselbaustein von Triostin A konnten die Alanyl-Aminosäuren bestimmt werden.^[63-67] Die Seitenkettenmethylgruppen zeigen im DNA-Strang in eine Tasche des Zuckerphosphatrückgrats und können hierdurch optimal van-der-Waals Wechselwirkungen eingehen. Außerdem wird die Bildung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Alanyl-NH-Funktionen und den 2-Aminofunktionen der DNA-Guanine und N3-Guanin-Positionen beobachtet. Studien zum Bindungsverhalten von analogen Verbindungen, die statt Alanin Milchsäure (2-Hydroxypropansäure) enthalten, zeigen keine Bindungsaffinität zu DNA, was auf die Relevanz der NH-Funktion von Alanin bei der DNA-Erkennung hinweist.^[68] Die essenzielle Ausrichtung der NH-Funktion von Alanin in Richtung Guanin ist durch die N-Methyl-Gruppe des Cysteins möglich. Aus sterischen Gründen weicht die Alanin-NH-Gruppe des Alanins der N-Methyl-Gruppe des Cysteins aus und nimmt hierdurch eine Konformation ein, in der die für eine Bindung mit DNA wichtige Wasserstoffbrückenbindung zu den DNA-Guaninen ausgebildet werden kann. Der Methylierungsgrad des Triostin A-Rückgrats hat folglich weitreichenden Einfluss auf die Bindungsaffinität, wie auch Sequenzselektivität. Zum einen wird durch einen hohen Methylierungsgrad die Ausbildung diskreter Wasserstoffbrückenbindungen verhindert und stattdessen van-der-Waals-Bindungen zum Zucker-Phosphat-Rückgrat ausgebildet. Zum anderen, werden diskrete Molekülfragmente aus geometrischen Gründen hierdurch in einer Konformation fixiert, in der zusätzliche Wechselwirkungen möglich sind. Durch die Bindung von Triostin A orientieren sich die benachbarten Basenpaarungen dichter zueinander. Abhängig von der DNA-Basensequenz wechseln deswegen diese benachbarten Basenpaarungen vom Watson-Crick-Paarungsmodus in die Hoogsteen-Paarung.^[69] Die hierfür nötige Rotation von benachbarten Adeninbasen um die glykosidische Bindung von der *trans* in die *syn*-Konformation resultiert in einer energetisch wie elektronisch besseren Anordnung der Basenpaarungen über den Hoogsteen-Modus, wodurch das Gesamtsystem zusätzlich stabilisiert wird. Durch die selektive Ausbildung diskreter Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Wechselwirkungen wird bei Triostin A eine CpG-Sequenzselektivität beobachtet.

Es ergeben sich folglich weitreichende Manipulationsansätze, um auf das Bindungsverhalten von Triostin A-Analoga Einfluss zu nehmen. Es wurden zahlreiche analoge Verbindungen mit variierendem Methylierungsgrad synthetisiert und deren Sequenzselektivität mittels NMR- und Footprintingtechniken analysiert.^[70-72] Hierbei sind insbesondere Verbindungen von Interesse, die vollständig aus unmethylierten Aminosäuren aufgebaut sind. Hierdurch wird signifikant in das Potenzial zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen eingegriffen und lässt somit eine veränderte Sequenzselektivität erwarten.

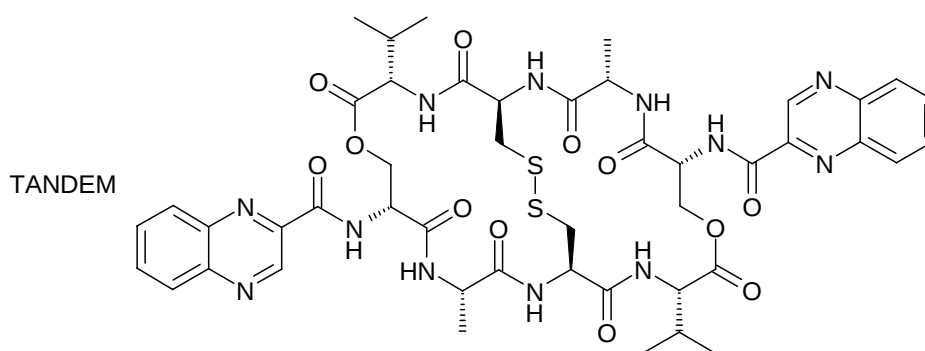


Abb. 3-7 Des-*N*-Tetramethyltriostin A (**3**) (TANDEM).

Das unmethylierte Triostin A-Analogon TANDEM (**3**) (Akronym für Des-*N*-Tetramethyltriostin A) weist im Gegensatz zu Triostin A eine TpA-Selektivität bei der Bindung über die kleine Furche und eine hohe Bindungsaffinität zu alternierenden AT-Basensequenzen auf (Abb. 3-7).^[73,74] Interkalationen in GC-Paarungen werden nicht beobachtet. Ursache für die veränderte Spezifität ist die fehlende *N*-Methylgruppe der Valin-Bausteine. Die freie NH-Funktion der Valine bildet intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zu den Carbonyl-Gruppen der Alanine aus. In der resultierenden Konformation können nur noch die NH-Funktionen der Alanine Wasserstoffbrückenbindungen mit der Adenin-N3-Position der DNA ausbilden.^[75-78] Zusätzlich werden die Chromophore aus der koplanaren Anordnung herausgedreht, wodurch die Interkalation erschwert wird (Abb. 3-8). Beides führt zu einer geringeren Bindungsaffinität im Vergleich zu Triostin A. Bindungsstudien zu TANDEM-analogen Verbindungen, die methylierte Cystein-Aminosäuren enthalten, zeigen

identische Bindungsselektivität bei etwas verminderter Bindungsaffinität im Vergleich zu TANDEM.^[79,80] Im Gegensatz zur Methylgruppe der Valine, hat die Methylgruppe des Cysteins keinen signifikanten Einfluss auf die Wechselwirkung mit DNA. Sowohl für eine TpA-, als auch für die CpG-Erkennung ist die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung von der NH-Funktionalität des Alanins essentiell. Bindungsstudien von analogen Verbindungen mit methylierten Alaninen sind aufgrund der schlechten Löslichkeit der Verbindung nicht durchführbar.^[81]

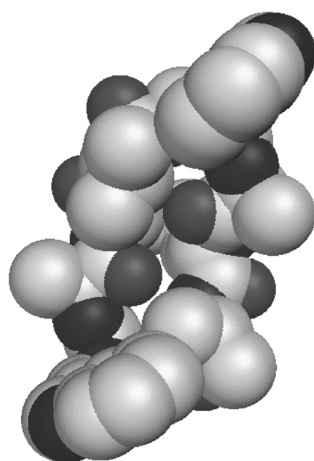
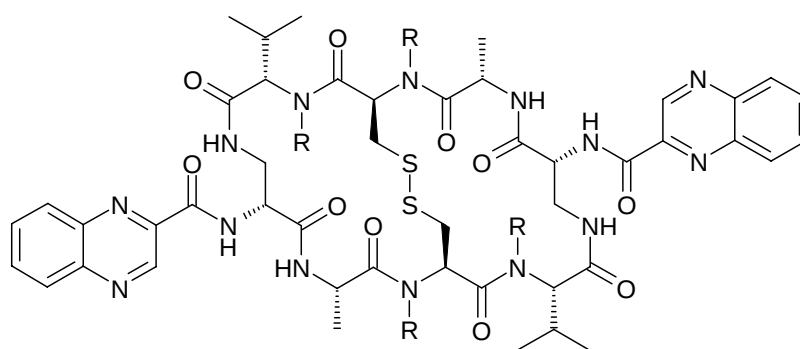


Abb. 3-8 Kristallstruktur von Des-*N*-Tetramethyltrioestin A (**3**) (TANDEM).^[60]

Da Chinoxalin-Chromophore nur in DNA interkalieren, wenn sie an ein Trioestin A-analoges Rückgrat gebunden sind, kann die Wechselwirkung des peptidischen Rückgrats als die energetische Triebkraft einer Bindung mit DNA identifiziert werden.^[82] Hinsichtlich der Wahl der aromatischen Substituenten scheint es somit einen Spielraum zu geben. Die Interkalation von aromatischen, planaren Systemen in DNA erscheint möglich, solange sie an ein DNA-Rückgrat-bindendes Grundgerüst gebunden sind. Der Ersatz der Chinoxalin-Substituenten durch aromatische Systeme, die als gute Interkalatoren bekannt sind, sollte die Bindungsaffinität zusätzlich erhöhen.^[83] Eine Substitution der Chinoxaline gegen 9-Aminoacridin führt aufgrund des ausgeprägten π -Elektronensystems von Acridin zu stabilisierenden van-der-Waals-Wechselwirkungen, die in einer signifikant erhöhten Bindungsaffinität im Vergleich zum isolierten Acridin resultieren.^[84] Der Ersatz durch Halogen- und Amino-

substituierte Chinoxalin-Basen hingegen zeigten keine erheblichen Abweichungen hinsichtlich der Bindungskonstanten im Vergleich zu Triostin A.^[85]

Als weiteren Modifikationsansatz ausgehend von Triostin A wurde die depsipeptidische Esterfunktion durch den Einsatz von Diaminopropionsäure statt Serin durch eine Amidfunktion ersetzt (Abb. 3-9).^[86] Zwar sind noch keine Bindungsstudien von dieser Klasse der Azatriostine bekannt, jedoch ist der Wechselwirkungsmechanismus interessant, weil durch die eingebauten Amidfunktionen zusätzliche Wasserstoffbrückendonoren vorhanden sind, die entscheidend auf die Sequenzselektivität Einfluss nehmen könnten. Darüber hinaus ist aufgrund der starren Amidbindung eine stärkere konformationelle Rigidität des Zyklopeptids und damit eine veränderte Ausrichtung der Chromophore zu erwarten.



Azatriostin : R = Me

Des-*N*-Tetramethylazatriostin : R = H

Abb. 3-9 Azatriostin (4) und Des-*N*-Tetramethylazatriostin.

Die Entwicklung derartiger Systeme ist aus synthetischer Sicht sinnvoll, da ein vollständig peptidisches Rückgrat an fester Phase aufgebaut werden kann. Hierdurch wird eine Vielzahl von Azatriostin-Analoga zugänglich, die sich sowohl im Methylierungsgrad, als auch in der Konstitution unterscheiden. Zum Austausch einer Aminosäure in TANDEM unter Beibehaltung der für eine Bindung nötigen Konformation bietet sich Valin an. Die Valine tragen zur Bindung mit DNA insofern bei, als nur eine Methylgruppe van-der-Waals-Bindungen ausbildet. Andere Wechselwirkungen werden nicht beobachtet. Es scheint also eine Toleranz bezüglich der Konstitution an der Stelle des Valins vorzuliegen. Insofern ist es nicht erstaunlich,

dass die meisten dargestellten Naturstoffe vielseitige Modifikationen bei diesem Baustein aufweisen, ohne die Bindungsaffinität signifikant zu beeinflussen.

4 Nukleobasen-funktionalisierte Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Analoga

4.1 Einleitende Überlegungen

Die Wechselwirkung aller Chinoxalin-Antibiotika mit DNA ist auf eine Überlagerung verschiedener Wechselwirkungen des DNA-Binders mit DNA zurückzuführen.^[73] Erst die Kombination aller relevanten und spezifischen Wechselwirkungen bedingt die hohen Bindungsaffinitäten und -selektivitäten, die bei verschiedenen Chinoxalin-Bisinterkalatoren nachgewiesen werden können. Das rigide, bizyklische Rückgrat des depsipeptidischen Triostin A (**1**) einerseits, und das vollständig peptidische Rückgrat von Azatriostin (**4**) andererseits, verfügt über zahlreiche Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren, die zu einer sequenzspezifischen Ausbildung zu den Funktionalitäten der DNA-Basen befähigt sind. Diese selektive Erkennung erfolgt über die Bindung in der kleinen Furche der DNA. Die aromatischen Chinoxalin-Interkalatoren weisen ein ausgeprägtes π -Elektronensystem auf, welches bei Interkalation in DNA-Doppelstränge van-der-Waals-Bindungen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zu den benachbarten DNA-Basenpaaren ausbilden kann, die stabilisierend sind. Umfangreiche theoretische Studien an DNA haben ergeben, dass der Anteil, den derartige Interkalationswechselwirkungen zur Stabilisierung von DNA unter physiologischen Bedingungen beitragen, vergleichbar ist mit der Wechselwirkungsenergie von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Einzelsträngen.^[87,88] Darüber hinaus ist bei der Bindung von Chinoxalin-Antibiotika zu beachten, dass sich bei der Interkalation der unpolaren Chinoxalin-Chromophore in DNA hydrophobe Wechselwirkungen im wässrigen Medium eines Puffers ausbilden. Insofern ist auch die Interaktion mit dem umgebenden Medium von entscheidender Bedeutung.^[89]

Grundlage dieser Arbeit war die Idee, durch Modifikation des Rückgrats und durch Variation der Chromophore als Erkennungseinheiten Einfluss auf die Bindungsspezifität und den Bindungsmodus zu nehmen. Der selektive Aufbau von peptidischen Rückgratstrukturen, die an diskreten Positionen methylierte amidische Funktionalitäten enthalten bzw. nicht enthalten, sollte einen Zugang zu diversen

Rückgratstrukturen ermöglichen, die durch ihre variierende Konstitution maximale Einflussnahme auf die Bindungsspezifität ermöglichen sollten. Durch die Analyse der Wechselwirkung dieser Verbindungen mit unterschiedlichen DNA-Sequenzen sollten detaillierte Erkenntnisse bezüglich der Sequenzselektivität erzielt werden.

Über die Variation des Rückgrats hinaus wurden im Rahmen dieser Arbeit die Chinoxalin-Interkalatoren durch natürliche Nukleobasen ersetzt. Diese verfügen durch die heterozyklischen Stickstoffatome und exozyklischen Sauerstoffatome und Aminfunktionen über zusätzliche Erkennungseinheiten zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Gleichzeitig wird hierdurch die Fähigkeit zur Ausbildung von Interkalationswechselwirkungen beibehalten. Da die Konfiguration der im Rückgrat implementierten Aminosäuren nicht verändert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass der jeweilige Austausch von methylierten zu unmethylierten Aminosäuren einerseits, bzw. der Ersatz der Chinoxalin-Substituenten durch natürliche Nukleobasen andererseits, keinen signifikanten Einfluss auf die Vorzugskonformationen des Bisinterkalators hat. Durch einfache MD-Rechnungen konnte gezeigt werden, dass im Fall von Guanin-substituiertem Triostin A die Guanin-Substituenten parallel zueinander ausgerichtet sind (Abb. 4-1).^[90] Insofern können die dargestellten modifizierten Triostin A-Derivate als strukturelle Analoga von Triostin A (**1**) angesehen werden.

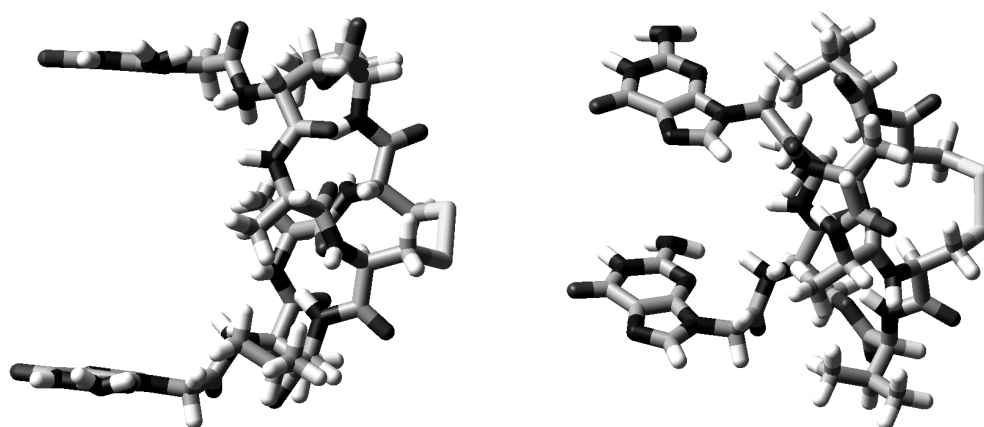


Abb. 4-1 MD-Berechnungen der Konformation des Guanin-substituierten Triostin A-Analogons (Kraftfeld: AMBER)^[90].

Jedoch eröffnen vor allem die zusätzlichen Erkennungseinheiten der eingebrachten Nukleobasen neue Perspektiven bezüglich der Erkennung von DNA. Hierbei sind im Wesentlichen drei unterschiedliche potenzielle Wechselwirkungsmodi denkbar (Abb. 4-2).

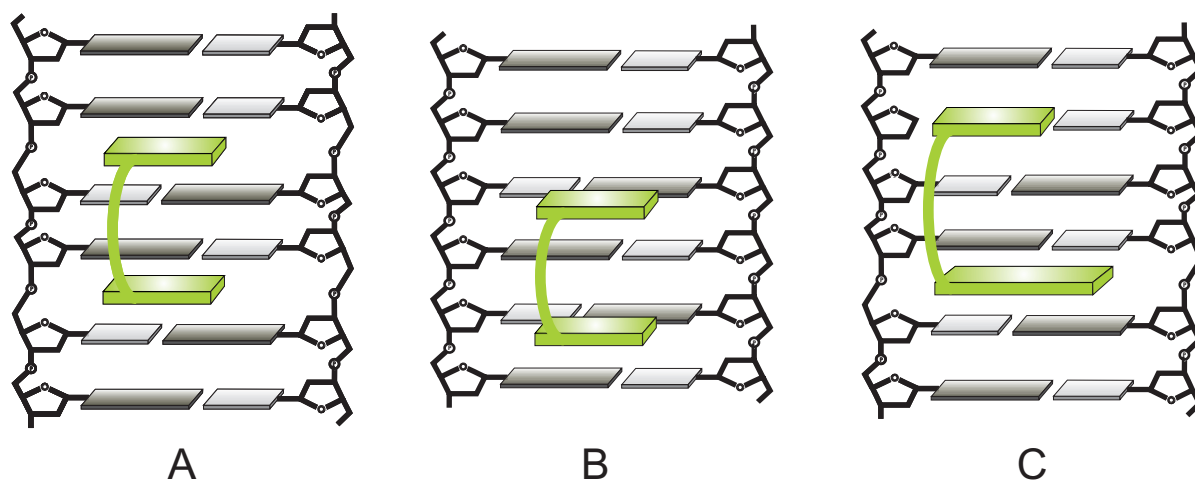


Abb. 4-2 Mögliche Bindungsmodi von Nukleobasen-modifizierten Triostin A-Analoga mit DNA (A = Interkalation, B = Hoogsten-Bindung über die große Furche, C = Kombination aus Interkalation eines Interkalators bei gleichzeitiger Watson-Crick-Bindung in einer abasischen Stelle).

Analog zur Bindung von Triostin A (**1**) mit DNA ist eine Bindung in der kleinen Furche denkbar (Bindungsmodus A, Abb. 4-2). Die rigiden bizyklischen Rückgratstrukturen aller Triostin A-Analoga richten die Chromophore in optimaler Entfernung parallel aus. Durch eine Bindung des Triostin A-analogenen Rückgrats an DNA werden die Nukleobasen in die räumliche Umgebung des DNA-Basenstapels des Doppelstrangs gebracht. Die heterozyklischen Chromophore können jetzt aufgrund ihres ausgeprägten π -Elektronensystems so interkalieren, dass genau ein Dinukleotid des Doppelstrangs überbrückt wird. Zwar wurde bis jetzt eine Interkalation von isolierten Nukleobasen in DNA nicht beobachtet. Jedoch zeigen Untersuchungen des i-Motivs, dass eine Interkalation von Nukleobasen in DNA möglich ist, wenn die geometrischen und elektronischen Voraussetzungen anderer Molekülfragmente eine derartige Interkalation erzwingen.^[91-95] Kraftfeldrechnungen einer Bindung von Naturstoff **1** und eines DNA-Oligomers, bestehend aus sechs Basenpaarungen,

ergaben stabile Konformationen, die durch eine Bindung über die kleine Furche gekennzeichnet sind (Abb. 4-3). Jedoch deutet der hierbei fehlende Einsatz des *Simulated-Annealing*s und verwendeten AMBER-Kraftfelds darauf hin, dass es sich bei der ermittelten Struktur nur um eine stark idealisierte Betrachtungsweise handelt.

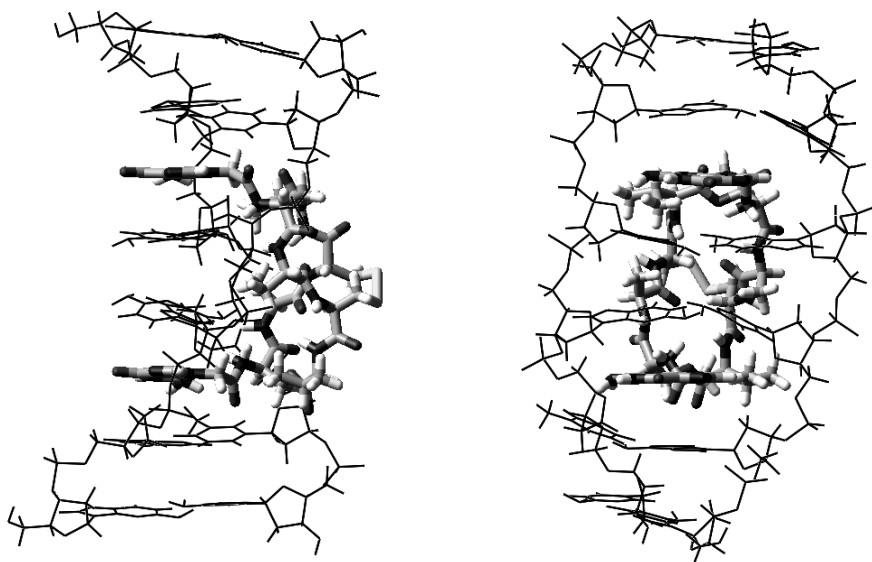


Abb. 4-3 MD- Berechnungen der Konformation von stabilen Komplexen des Guanin-substituierten Triostin A-Analogons mit einem DNA-Doppelstrang d(GACGTC) (Kraftfeld: AMBER)^[90].

Bei allen bekannten Triostin A-Analoga beträgt der Abstand zwischen den Chromophoren je nach Methylierungsgrad 10-12 Å. Basierend auf einem Basenpaarabstand in DNA von 3.4 Å, ist neben dem Interkalationsmodus auch eine Wechselwirkung mit DNA über die Hoogsteen-Seite der Basenpaarungen in der großen Furche denkbar (Bindungsmodus B, Abb. 4-2). Für Oligonukleotide ist bekannt, dass sie sich entlang der großen Furche in den Doppelstrang einlagern und ihre Nukleobasen so orientieren, dass eine Erkennung der Hoogsteen-Seite der Basenpaarung mittels der Watson-Crick-Seite des Einzelstrangs erfolgt.^[22,23] Hierbei kann zwischen Bindungen im *reverse*-Hoogsteen-Modus (Abb. 4-4) und einer Bindung im Hoogsteen-Modus (Abb. 4-5) unterschieden werden.

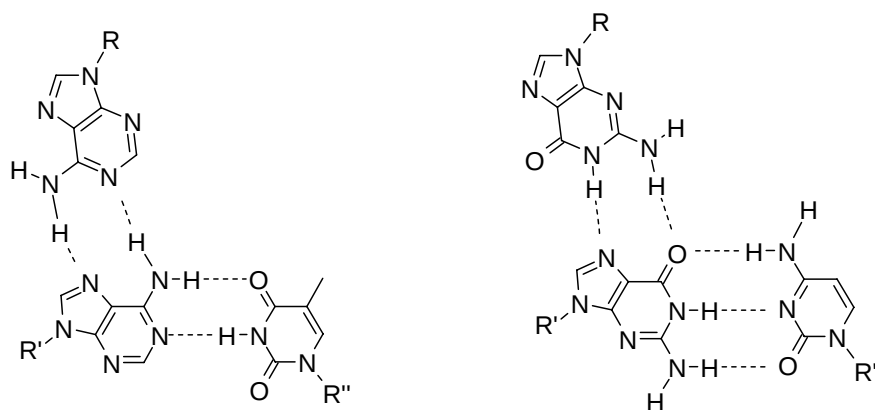


Abb. 4-4 reverse-Hoogsteen-Bindungsmodus von Purinen aus DNA-Einzelsträngen an DNA-Doppelstränge (links: Adenin an AT-Paarung; rechts: Guanin an GC-Paarung; R, R', R'': Zucker des DNA-Rückgrats).

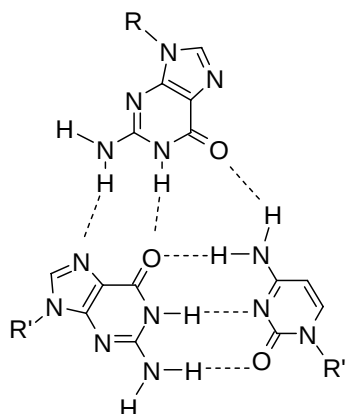


Abb. 4-5 Hoogsteen-Bindungsmodus von Guanin aus DNA-Einzelsträngen an GC-Paarungen von DNA-Doppelsträngen (R, R', R'': Zucker des DNA-Rückgrats).

Beide Bindungsmodi unterscheiden sich insofern, als im *reverse*-Hoogsteen-Bindungsmodus zur Erkennung der Hoogsteen-Seite lediglich eine zweizählige Wasserstoffbrückenbindung zur Purinbase der Basenpaarung ausgebildet wird, während im Hoogsteen-Modus eine dreizählige Wasserstoffbrückenbindung über die Hoogsteen-Flanke der gesamten Basenpaarung gebunden wird.^[22,23]

Einen dritten möglichen Wechselwirkungsmodus (Bindungsmodus C, Abb. 4-2) stellt die Kombination einer Interkalation eines Chromophors unter gleichzeitiger Watson-Crick-Erkennung einer abasischen Stelle dar. Bei einer abasischen Stelle handelt es sich um Positionen im DNA-Strang, deren Zucker nicht mit einer Nukleobase

verknüpft sind.^[96] Solche Fehlstellen treten bei DNA-Schädigungen bzw. bilden Zwischenprodukte bei DNA-Reparaturprozessen, in denen mutierte DNA-Basen durch Endonukleasen abgespalten werden.^[97] Das Erkennungskonzept von abasischen Stellen machten sich Lhomme *et al.* zunutze, indem sie einen Acridin-Substituenten als Intercalatoreinheit über einen Polyaminlinker mit kanonischen Purinbasen kovalent verknüpften (Abb. 4-6).^[96,98-100]

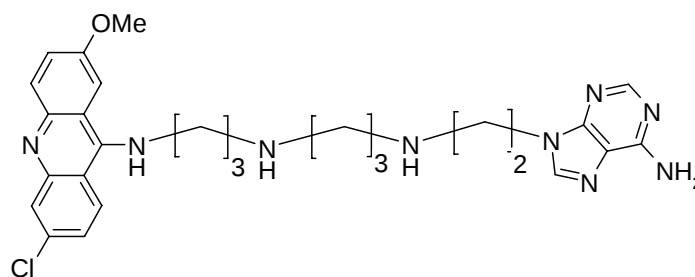


Abb. 4-6 Heterodimeres Erkennungssystem von DNA-Fehlstellen.

Acridin kann als unselektiver Interkalator die Purinbase in räumliche Nähe der abasischen Stelle des DNA-Doppelstrangs transportieren.^[99] Die Bindungsaffinität wird erhöht durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen der sekundären Linker-Aminfunktionen zum DNA-Rückgrat. Die Purinbase kann nun die Funktion der fehlenden Nukleobase übernehmen und über die Watson-Crick-Seite eine stabile Basenpaarung ausbilden. Analog hierzu ist bei Trionstin A-Analoga vorstellbar, dass das peptidische Rückgrat über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zum DNA-Doppelstrang die natürlichen Basen in die Nähe der abasischen Stelle bringt. Die eingebrachte Nukleobase kann nun eine Watson-Crick-Basenpaarung mit der ungepaarten Nukleobase eingehen. Dieser Effekt kann zusätzlich verstärkt werden, wenn eine Nukleobase des Triostin A-Derivats durch einen unselektiven und stark bindenden Interkalator, wie etwa ein Acridin, ausgetauscht wird. In einem solchen Fall würden sich die von uns entwickelten Systeme nur bezüglich des Linkers von denen von Lhomme unterscheiden. Die von uns beabsichtigten Linker in Form von bizyklischen Peptiden und Depsipeptiden sind konformativ rigider und unflexibler und bieten deswegen die Möglichkeit einer höheren Spezifität. Darüber hinaus ist eine

höhere Bindungsaffinität aufgrund der zahlreichen möglichen Wasserstoffbrückenbindungen denkbar.

4.2 Synthese von Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Analoga

4.2.1 Retrosynthetische Überlegungen

Triostin A (**1**) weist aufgrund seiner Konstitution und seiner Konfiguration eine C_2 -Symmetrie auf (Abb. 4-7). Das Rückgrat besteht aus zwei identischen tetrapeptidischen Einheiten, bestehend aus *N*-Methyl-L-valin, *N*-Methyl-L-cystein, L-Alanin und D-Serin, die miteinander über Esterfunktionen zu einem Oktadepsipeptid verbunden sind. Hierbei sind die beiden Cysteine über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verknüpft, sodass sich ein rigides rotationssymmetrisches bizyklisches Rückgrat ergibt. An die exozyklischen α -Aminofunktionen des Serins sind Chromophore in Form von Chinoxalin-Substituenten amidisch angebracht.

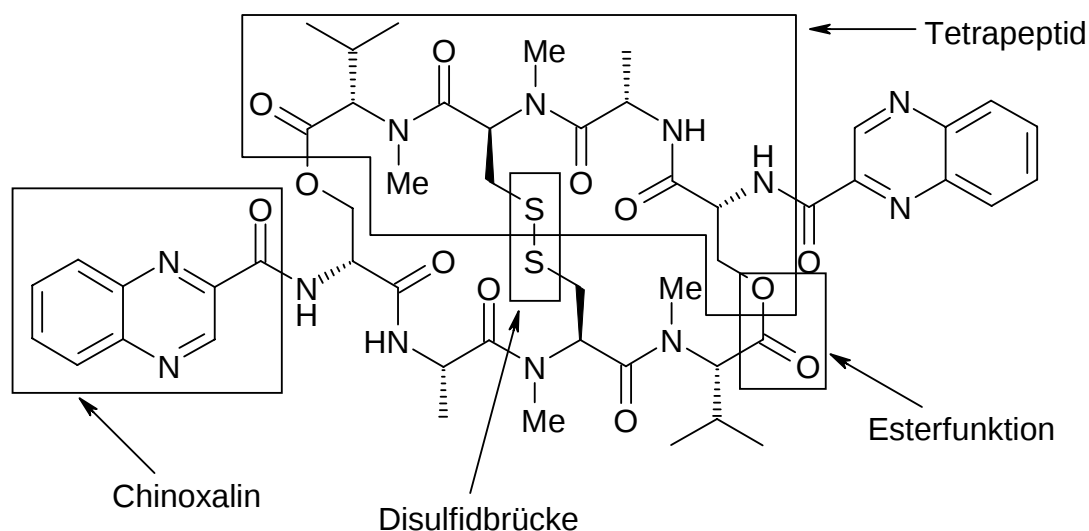


Abb. 4-7 Struktureller Aufbau von Triostin A (**1**).

In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits zahlreiche Nukleobasen-substituierte TANDEM-Analoga synthetisiert und auf ihr Wechselwirkungspotenzial mit DNA untersucht.^[101] Die Synthese der TANDEM-Derivate wurde in Lösung durchgeführt und erwies sich als synthetisch aufwändig und anspruchsvoll.

Wechselwirkungsstudien mit DNA deuten auf vielversprechende Bindungen hin, deren Bindungsstärke in Folgearbeiten systematisch erhöht werden soll. Basierend auf den vielseitigen möglichen Wechselwirkungsmechanismen mit DNA, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Triostin A-analoges Modellsystem entwickelt werden, das ein vollständig peptidisches Rückgrat enthält.^[86] Der Einfluss der hierdurch gewonnenen Rigidität einerseits, sowie der Einbau der zusätzlichen Wasserstoffbrückenakzeptoren andererseits, sollte durch Wechselwirkungsanalysen mit DNA untersucht werden. Da bei methylierten Aminosäuren unbefriedigenden Kupplungsausbeuten beim Aufbau von Peptiden beobachtet werden, sollten vollständig unmethylierte Rückgratstrukturen dargestellt werden.^[102-106] Als Nukleobasen sollten alle kanonischen Nukleobasen dienen. Folglich sollte als erstes Modellsystem Nukleobasen-substituiertes Des-*N*-Tetramethylazatriostin (**4**) synthetisiert werden.

Da die Wechselwirkung zwischen DNA und DNA-Binder bei allen Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Analoga nicht auf kovalenten Bindungen, sondern auf Wasserstoffbrückenbindungen bzw. Interkalationswechselwirkungen beruht, kann die Bindungsaffinität erhöht werden, wenn die Anzahl an potenziell auszubildenden Wechselwirkungen erhöht wird. Durch den Aufbau von dimeren oder oligomeren Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Derivaten sollten Vorläufer zu Verbindungen generiert werden, die ein Vielfaches an Wechselwirkungen mit DNA im Vergleich zur monomeren Einheit eingehen können. Darüber hinaus wird durch das kovalente Verknüpfen von Bisinterkalator-Einheiten die Erkennungsregion des DNA-Binders deutlich vergrößert, was einen signifikanten Einfluss auf die Sequenzspezifität haben sollte. Die Substitution eines Valins durch eine Aminosäure, die über eine lange Seitenkette mit terminalem Olefin verfügt, eröffnet ein weitreichendes Spektrum zur chemischen Verknüpfung zweier Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Monomere in Form von Kreuzmetathesen, Additions- und Substitutionsreaktionen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden grundlegende Arbeiten zur Erschließung dieser Verknüpfungsmöglichkeit erarbeitet.

Um eine Vielzahl von Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Derivaten mit unterschiedlichen Nukleobasen darzustellen, ist es wichtig, dass die Nukleobasen möglichst spät

kovalent mit dem Rückgrat verbunden werden um maximale Variabilität beim Einsatz der Nukleobasen zu bewahren. Zusätzlich wird oft beim Einsatz von Guaninbasen Aggregationen beobachtet, die die Löslichkeit der Verbindungen reduzieren und sich deswegen problematisch auf die Synthese auswirken. Ein weiterer Vorteil der späten Einführung der Nukleobasen ist die dafür nötige Kupplung mit dem Zyklopeptid. Das Zyklopeptid enthält neben der Disulfidbrücke lediglich amidische Bindungen und kann deswegen als vollständig geschützt angesehen werden. Werden die exozyklischen Aminofunktionen der D-Aminopropionsäurebausteine mit orthogonalen Schutzgruppen versehen, so ist zusätzlich ein Rückgrat zugänglich, das sequenziell mit unterschiedlichen Chromophoren versehen werden kann. Besonders im Hinblick auf den dargestellten Bindungsmodus C (Abb. 4-2) stellt diese Strategie einen Schlüsselschritt dar. Hier soll das Rückgrat mit zwei unterschiedlichen Substituenten versehen werden.

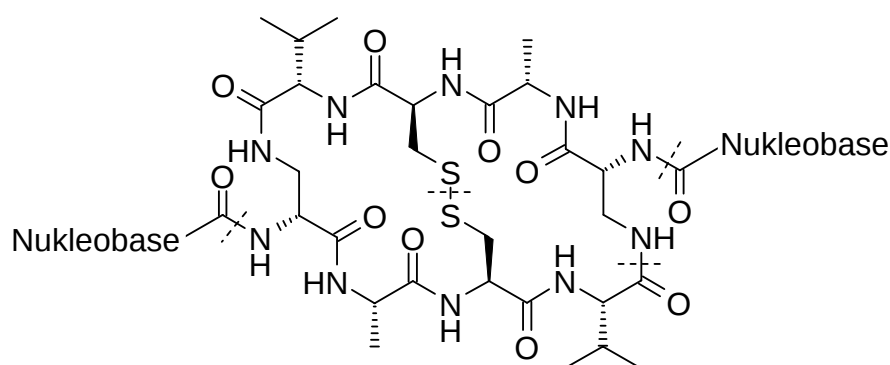


Abb. 4-8 Retrosynthetische Analyse von Nukleobasen-substituiertem Des-*N*-Tetramethylazatriostin (4)

Sowohl das einheitlich als auch das orthogonal geschützte Rückgrat konnte durch doppelte Zyklisierung aus dem linearen Oktapeptid generiert werden. Hierbei erwies es sich als sinnvoll, die disulfidische Zyklisierung vor der peptidischen Zyklisierung durchzuführen, obwohl in den literaturbekannten analogen Synthesen zum Teil auch die peptidische Bindung vor der disulfidischen Bindung geknüpft wird. Durch die Bildung der Disulfidbindung wurde das monozyklische Peptid konformationell fixiert, sodass C- und N-Terminus präorganisiert werden und die anschließende Peptid-

kupplung von C- und N-Terminus in guten Ausbeuten durchgeführt werden konnte. Die Entscheidung, welche Aminosäure des Peptids den C-Terminus und welche den N-Terminus bilden sollte, ist nicht eindeutig auszumachen. Jedoch scheint ein Aufbau des linearen Peptids, ausgehend von L-Valin sinnvoll zu sein. Dies ist die einzige Möglichkeit am N-Terminus eine freie Aminofunktion zu generieren, die an eine Methylengruppe gebunden ist. Im Vergleich zu den alternativen α -Aminofunktionen, die an sekundäre Kohlenstoffatome gebunden sind, sollte eine Zyklisierung über die Aminofunktion der Seitenkette von D-Diaminopropionsäure sowohl sterisch, als auch elektronisch begünstigt sein.

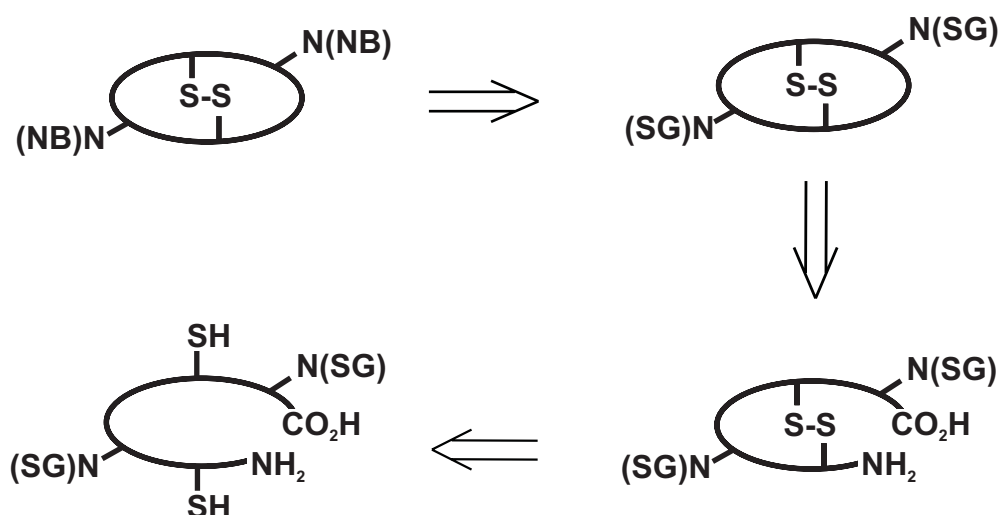


Abb. 4-9 Schematische Darstellung der Retrosynthese von Des-*N*-Tetramethylazatriostin (**4**) (SG: Schutzgruppe; NB:Nukleobase).

4.2.2 Synthese unterschiedlicher monomeren Rückgratstrukturen

Für den Aufbau von Peptiden an fester Phase sind zwei unterschiedliche Schutzgruppenstrategien etabliert. Auf der einen Seite können Peptide im sauren Milieu, basierend auf der *tert*-Butoxycarbonyl (Boc) Schutzgruppe aufgebaut werden.^[107,108] Säurelabile Seitenkettenfunktionen von Aminosäuren schränken den Anwendungsbereich der Boc-Schutzgruppe ein. Zusätzlich werden oft Defunktionalisierungen (capping) von freien Aminen und unzureichende Kupplungsausbeuten erzielt, die Doppelkupplungen nötig machen. Alternativ zur Boc-

Strategie steht in der Peptidchemie die 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) Schutzgruppe zur Verfügung.^[109] Die Reaktionsbedingungen sind vergleichbar mild. Unter basischen Bedingungen kann die Fmoc-Gruppe selektiv durch sekundäre Amine abgespalten werden. Die Kupplungsausbeuten sind im Vergleich zur Boc-Strategie meistens höher. Basenlabile Funktionalitäten schränken die Verwendung der Fmoc-Strategie ein.

Nukleobasen-substituiertes Des-*N*-Tetramethylazatriostin besteht aus den unpolaren unfunktionalisierten Aminosäuren Alanin und Valin. Cystein und Diaminopropionsäuren enthalten in den Seitenketten funktionelle Gruppen, die durch geeignete Schutzgruppen geschützt werden können. Somit sind bei abgestimmter Auswahl der Schutzgruppenorthogonalität alle verwendeten Aminosäuren kompatibel mit der Fmoc-Strategie. Für die Synthese des symmetrisch geschützten Rückgrats ergaben sich bezüglich der ausgewählten Schutzgruppen andere Anforderungen als bei der Synthese eines unsymmetrischen Rückgrats. Die im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Schutzgruppen beschränken sich auf *tert*-Butoxycarbonyl (Boc), 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc), Acetamidomethyl (Acm), Trityl (Trt) und Benzyloxycarbonyl (Z). Es wurden die in Tabelle (Tab. 4-1) eingesetzten Aminosäuren verwendet. Bezüglich des jeweiligen Einsatzes der unterschiedlich geschützten Aminosäuren bei der Synthese der Rückgratstrukturen wird auf die vorgesehenen Abschnitte verwiesen.

Im Rückgrat implementierte Aminosäuren	Verwendete geschützte Aminosäuren
Alanin	Fmoc-L-Ala-OH
Valin	Fmoc-L-Val-OH
Cystein	Fmoc-L-Cys(Acm)-OH Fmoc-L-Cys(Trt)-OH
Diaminopropionsäure	Boc-D-Dap(Fmoc)-OH (5) Z-D-Dap(Fmoc)-OH (6)

Tab. 4-1 Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Aminosäuren.

4.2.2.1 Darstellung von geschützten Diaminopropionsäuren als Bausteine der peptidischen Rückgratstrukturen

Die Aminosäuren Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Cys(Acm)-OH und Fmoc-L-Cys(Trt)-OH sind käuflich erhältlich. Diaminopropionsäure ist eine nichtnatürliche Aminosäure. Derivate von Diaminopropionsäure sind in der Literatur weit verbreitet, da die beiden Aminofunktionen in α - und β -Position den Aufbau von peptidischen Strukturen erlauben, die sich durch den Einbau von Diaminopropionsäure beliebig zu baumartigen Strukturen verzweigen lassen. Zur Darstellung enantiomerenreiner Diaminopropionsäurederivate wurde von Boc-D-Asn-OH (**7**) bzw. Z-D-Asn-OH (**8**) ausgegangen, die Homologe der Diaminopropionsäure darstellen (Abb. 4-10).

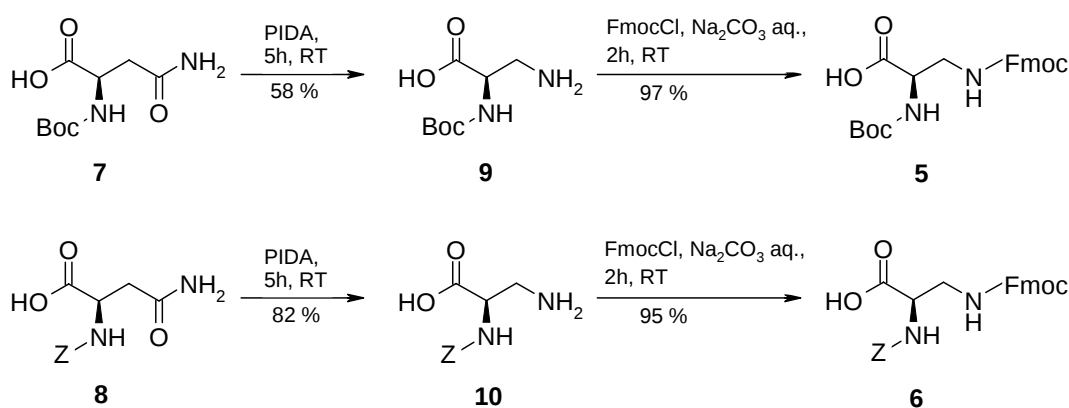


Abb. 4-10 Synthese von Boc-D-Dap(Fmoc)-OH (**5**) und Z-D-Dap(Fmoc)-OH (**6**).

Durch einen Hoffmann-Abbau wurden die in α -Position geschützten Diaminopropionsäurederivate Boc-D-Dap-OH (**9**) und Z-D-Dap-OH (**10**) erhalten.^[110] Das in der Literatur am meisten verbreitete Umlagerungsreagenz PIFA (Abb. 4-11) lieferte die Diaminopropionsäurederivate in mäßigen Ausbeuten. Außerdem war eine säulenchromatographische Trennung des komplexen Produktgemisches notwendig. Durch den Einsatz des Acetyl-Analogons PIDA konnten die gewünschten Produkte in hoher Reinheit in befriedigenden bis guten Ausbeuten erhalten werden. Die Bildung von Nebenprodukten wurde nicht beobachtet. Somit konnten die Diaminopropionsäurederivate direkt ohne Reinigungsschritte in der Folgereaktion

eingesetzt werden. Die Aufbringung der Fmoc-Schutzgruppe verlief in sehr guten Ausbeuten von 97 % bzw. 95 % zu den orthogonal geschützten Produkten (5) und (6).^[111]

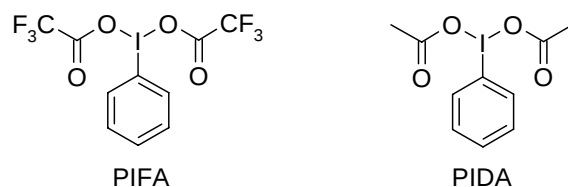


Abb. 4-11 Umlagerungsreagenzien PIFA und PIDA.

4.2.2.2 Darstellung des Symmetrischen Rückgrats

Der Aufbau des linearen peptidischen Rückgrats an festem Träger erfordert gemäß Synthesebedingungen, bei denen alle eingesetzten Schutzgruppen stabil gegenüber den Reaktionsbedingungen beim Peptidaufbau sind. Der Einsatz der Fmoc-Strategie erfordert zusätzlich, dass alle Schutzgruppen basenstabil sind, da nur so ein selektives Entschützen der Fmoc-Gruppe nach jedem Kupplungsschritt gewährleistet ist. Darüber hinaus ist von entscheidender Bedeutung, dass die Abspaltbedingungen, bei denen das lineare Peptid von der festen Phase abgespalten wird, nicht zu einem Entschützen der eingesetzten Aminosäuren führt. Es ergibt sich folglich ein komplexes Anforderungsprofil an das verwendete Harz. 2-Chlorotriethylharze sind für den Aufbau von komplexen Peptidstrukturen unter Fmoc-Bedingungen sehr nützlich, da sie eine Vielzahl von funktionellen Gruppen tolerieren.^[112] Die Triethyl-Gruppe, die als Linker an dem Polystyrolträger gebunden ist, kann mit unterschiedlichen Funktionalitäten kovalent verknüpft werden, wodurch sich weitreichende Möglichkeiten in der Variation der Funktionalität am C-Terminus ergeben. Die aufgebauten Peptide können unter schwach sauren Bedingungen selektiv abgespalten werden, ohne die Aminosäure-Bausteine zu entschützen. 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP) hat sich für eine quantitative Abspaltung bewährt. Als Schutzgruppen für die Aminosäure-Bausteine wurden neben der Fmoc-Gruppe nur basenstabile Systeme eingesetzt (Tab. 4-2).

Schutzgruppen	Abspaltbedingungen
Fmoc	20 % Piperidin in DMF
Boc	50 % TFA in DCM
Acm	I ₂ in DCM

Tab. 4-2 Abspaltbedingungen für die verwendeten Schutzgruppen.

Während die Cystein-tragende Acm-Schutzgruppe bei der Behandlung mit Iod unter gleichzeitiger Ausbildung einer Disulfidbindung entfernt werden konnte, ist die Boc-Gruppe unter Abspaltbedingungen stabil und konnte zu einem späteren Zeitpunkt durch die Zugabe von TFA quantitativ abgespalten werden. Es wurden folglich für den Aufbau des linearen Rückgrat-Vorläufers Boc-D-Dap-L-Ala-L-Cys(Acm)-L-Val-β-D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys(Acm)-L-Val-OH (**11**) folgende Aminosäuren eingesetzt: Fmoc-L-Valin-OH, Fmoc-L-Alanin-OH, Fmoc-L-Cys(Acm)-OH und Diaminopropionsäure 5.

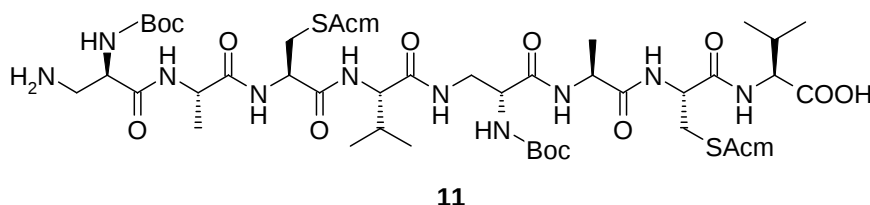


Abb. 4-12 linearer Rückgrat-Vorläufer: Boc-D-Dap-L-Ala-L-Cys(Acm)-L-Val-β-D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys(Acm)-L-Val-OH (**11**).

Die Kupplung der ersten C-terminalen Aminosäure an den Trityllinker des Harzes stellt einen entscheidenden Schritt für eine erfolgreiche Synthese dar. Das Ausmaß der Kupplung der Aminosäure an den Linker korreliert mit der zu erwartenden Ausbeute bei der Synthese des linearen Peptids. Darüber hinaus stellen ungesättigte freie Linkerpositionen Angriffspositionen bei der Kupplung aller folgenden Aminosäuren dar. Eine unvollständige Beladung des Harzes führt somit zwangsläufig zur Bildung einer komplexen Mischung von Nebenprodukten. Ein zusätzliches Cappen nach der

Beladung des Harzes ist erforderlich. Um diese Probleme auszuschließen, wurde von einem 2-Chlorotriptylharz ausgegangen, das mit L-Valin als C-Terminus beladen war.

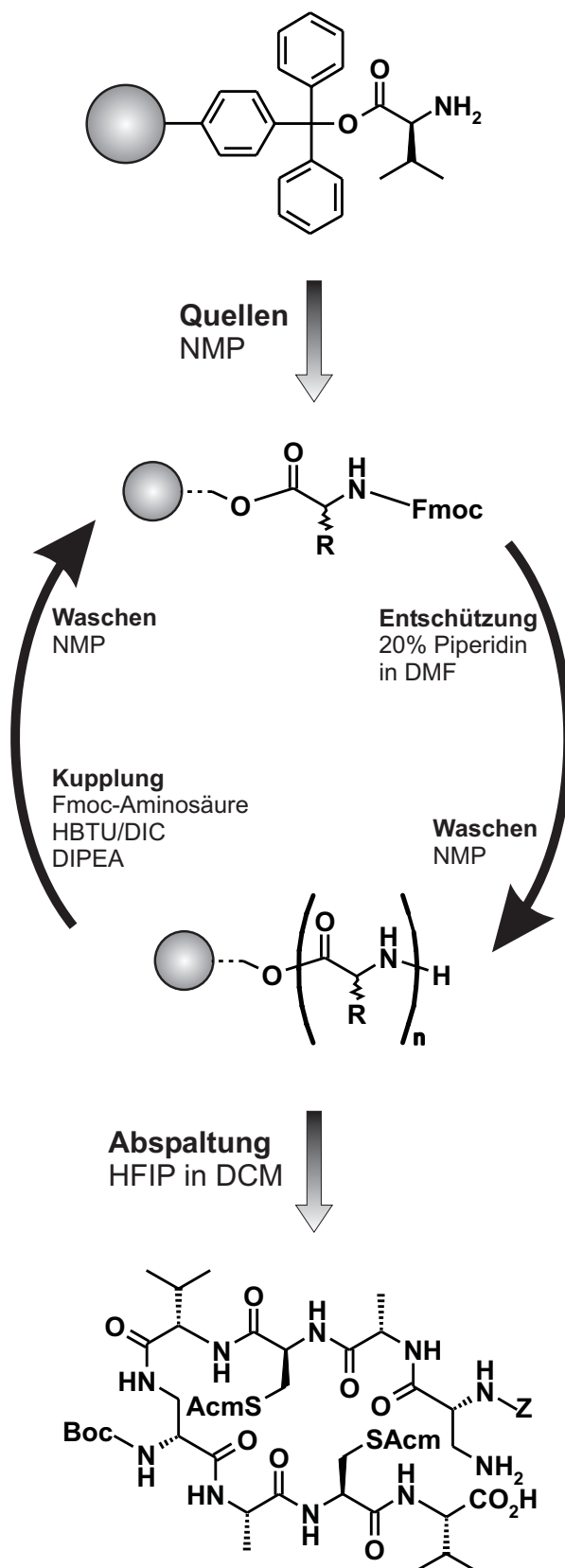


Abb. 4-13 Schematische Darstellung der Festphasensynthese.

Die Aminosäuren Fmoc-L-Valin-OH, Fmoc-L-Alanin-OH und Diaminopropionsäure 5 wurden in den folgenden Kupplungsreaktionen jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem entschützten Peptidylharz zur Reaktion gebracht. Als Kupplungsreagenz wurde 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) eingesetzt.^[113,114] HBTU stellt aufgrund seiner Reaktivität selbst bei sterisch gehinderten Kupplungen ein gängiges *in situ* Aktivierungsreagenz dar. Die Reaktionen verlaufen meistens schnell und razemisierungsfrei. Nebenreaktionen werden in der Regel nicht beobachtet. In Gegenwart von Diisopropylethylamin (DIPEA) als Base überführt HBTU die Carboxylfunktion der zu kuppelnden Aminosäure in den entsprechenden HOBt-Ester, der nun vom terminalen Amin des Peptids nukleophil in einem Additions-Eliminierungsmechanismus angegriffen werden kann (Abb. 4-14).

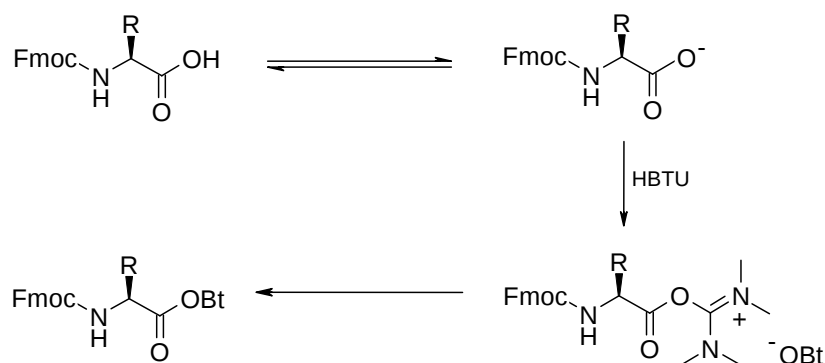


Abb. 4-14 *in situ* Aktivierungsmechanismus von HBTU.

Alternativ wurde auch 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU) als Kupplungsreagenz eingesetzt. TBTU unterscheidet sich von HBTU lediglich im korrespondierenden Anion. Erwartungsgemäß wurden bei der Reaktion keine Unterschiede bezüglich Ausbeute und Reaktivität festgestellt.

Als Lösungsmittel wurde *N*-Methyl-pyrrolidon (NMP) gewählt. NMP verfügt über exzellente Lösungseigenschaften von Aminosäuren und unterdrückt die für Kupplungen problematische Faltung und Aggregationen, die durch hydrophobe Wechselwirkungen bzw. inter- und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den mit dem Harz verbundenen Peptiden verursacht werden.^[115] Derartige

Aggregationen wurden vor allem bei Alanin- und Valin-reichen Peptiden ab einer Länge von fünf Aminosäuren vorgefunden.^[116] Durch die Vermeidung solcher Wechselwirkungen wurden im Vergleich zu Dimethylformamid (DMF) erhöhte Kupplungsausbeuten erhalten. Probeabsaltungen und Kaisertest ergaben unter diesen Reaktionsbedingungen quantitative Kupplungen.

Die Aminosäure Fmoc-L-Cys(Acm)-OH wurde jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem entschützten Peptidylharz zur Reaktion gebracht. Die Kupplung mit Uronium-aktivierenden Reagenzien ist bei Cysteinen nicht zielführend, da in diesem Fall oft Epimerisierung vorgefunden wird.^[117-119] Durch die Bildung des sehr elektrophilen Esters steigt die Gefahr von Razemisierung durch Enolisierung signifikant an. Epimerisierung bis zu 33 % können bei der Preaktivierung der zu kuppelnden Cysteine bei der Verwendung von Phosphoniumsalzen ermittelt werden.^[119,120] Alternativ zur direkten Enolisierung wird ein Enantiomerisierungsmechanismus über ein Oxazolone diskutiert (Abb. 4-15).

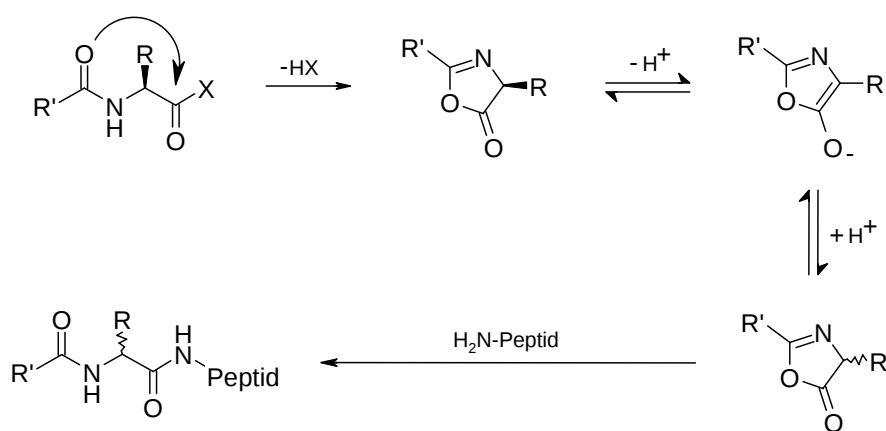


Abb. 4-15 Razemisierungsmechanismus bei der Kupplung von Cystein-Aminosäuren.

Der intramolekulare nukleophile Angriff auf den HOBt-Ester resultiert unter Abspaltung von HOBt in der Bildung eines Oxazolons, das nach Deprotonierung die Stereoinformation durch Razemisierung verliert. Die reversible Ringöffnung bildet zwei diastereomere Peptide. Die beobachtete Razemisierung konnte bei den hier durchgeführten Synthesen durch den Einsatz von Diisopropylcarbodiimid (DIC) als Kupplungsreagenz vermieden werden. Carbodiimide sind als Kupplungsreagenzien

etabliert.^[121] Durch einen nukleophilen Angriff des Carboxylatanions der zu kuppelnden Aminosäure an das Carbodiimid entsteht *in situ* in Form eines symmetrischen Anhydrids ein *O*-Acylisoharnstoffderivat, das nun von einer Aminfunktion unter Abspaltung von einem Harnstoffderivat angegriffen werden kann (Abb. 4-16).

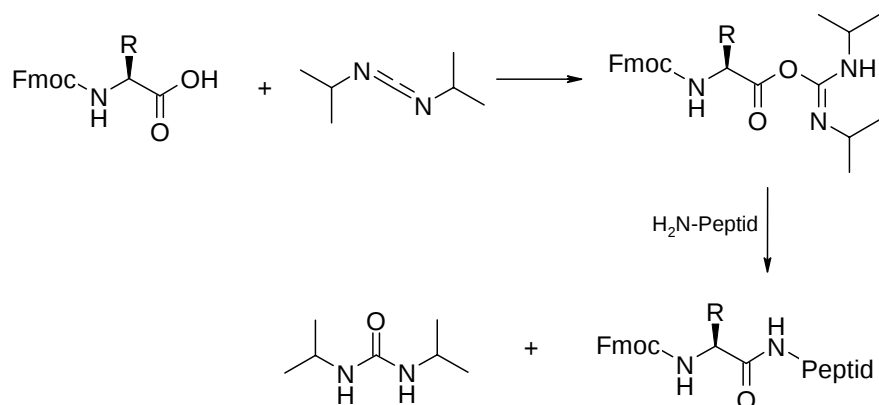


Abb. 4-16 Aktivierungsmechanismus von Diisopropylcarbodiimid (DIC).

Die Bildung des thermodynamisch stabilen Harnstoffs stellt die Triebkraft der Reaktion dar. Da die Reaktionsgeschwindigkeit von Peptidkupplungen mit Carbodiimiden in DMF und NMP sehr langsam ist, wurden die Reaktionen im unpolaren DCM durchgeführt, wodurch die Reaktionszeit deutlich verkürzt werden konnte.^[122] Darüber hinaus besitzt DCM hervorragende Quelleigenschaften, die für eine erfolgreiche Synthese von entscheidender Bedeutung sind. Fmoc-geschützte Cysteine sind in DCM nur mäßig löslich.^[123] Außerdem sind die bei der Aktivierung entstehenden Harnstoffderivate schwer löslich in DCM, wobei Isopropyl-substituierte Derivate die besten Löslichkeitseigenschaften aufweisen.^[124] Aus diesen Gründen wurde bei der Kupplung ein Lösungsmittelgemisch aus DCM/NMP 9/1 verwendet. Nach jeder Kupplung wurde das Peptidylharz mehrmals mit reinem NMP gewaschen, um alle Harnstoffderivate quantitativ zu entfernen.

Nach jeder Kupplung musste die Fmoc-Gruppe des N-Terminus mit Piperidin entfernt werden. Die Abspaltung erfolgt bei Raumtemperatur innerhalb weniger Minuten quantitativ. Erst bei Peptiden, die aus mehr als zehn Aminosäuren bestehen wird

teilweise unvollständiges Entschützen beobachtet und macht den Einsatz von 1,8-Diazabicyklo-[5.4.0]-undec-7-en (DBU) nötig.^[125,126] Testabsaltungen haben bei der Synthese des geplanten linearen Rückgrats ergeben, dass die Abspaltung der Fmoc-Gruppe bei jeder Kettenlänge quantitativ verlief.

Nach Aufbau des linearen Peptids wurde das Harz mehrmals sorgfältig gewaschen und anschließend getrocknet, um Nebenreaktionen bei der folgenden Abspaltung auszuschließen. Die Abspaltung erfolgte in einer Mischung aus HFIP in DCM.^[127] Unter diesen milden, schwach sauren Bedingungen gelang eine quantitative Abspaltung innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur, bei der alle verwendeten Schutzgruppen erhalten blieben. Nach Fällung des linearen Peptids **11** in kaltem Diethylether konnte das Rohprodukt durch Gefriertrocknung in 87 % Ausbeute isoliert werden. HPLC-analytische Untersuchungen ergaben, dass kaum Nebenprodukte entstanden waren und das Rohpeptid somit direkt für den nächsten Reaktionsschritt eingesetzt werden konnte (Abb. 4-17).

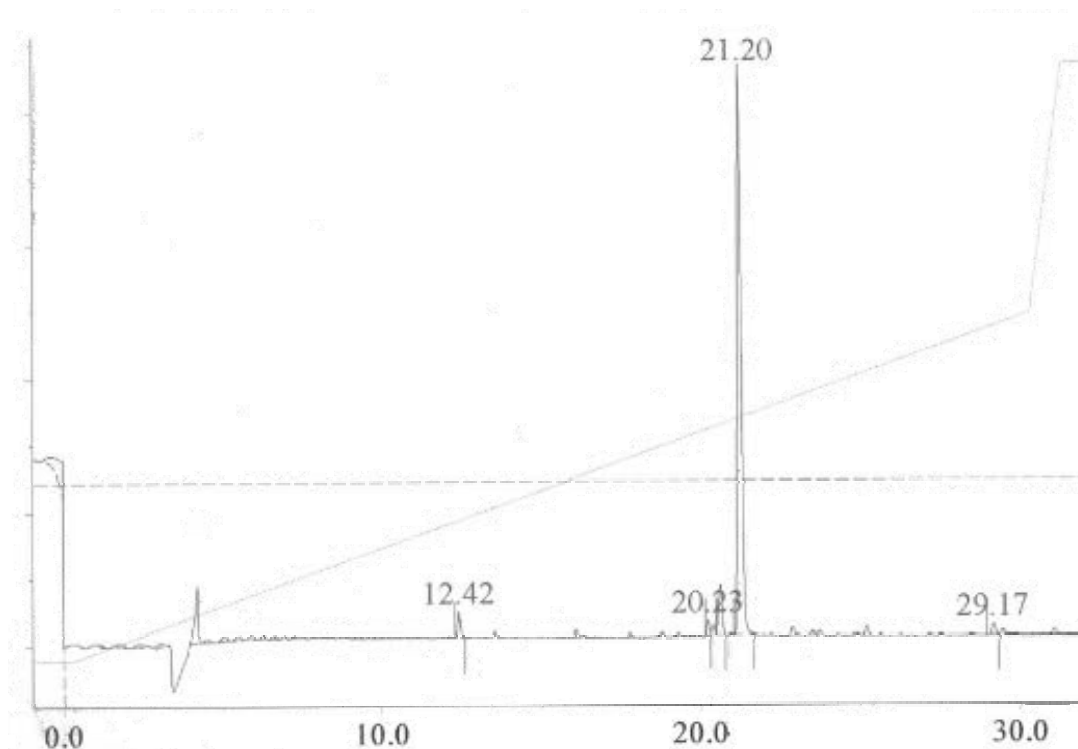


Abb. 4-17 Analytische HPLC des Rohprodukts von Boc-D-Dap-L-Ala-L-Cys(Acm)-L-Val-β-D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys(Acm)-L-Val-OH (**11**).

eindeutig nachgewiesen werden. Die nach der Reaktion folgende Reduktion von überschüssigem Iod erwies sich als problematisch. Zum einen war die gebildete Disulfidbrücke empfindlich gegenüber einem Überschuss an Reduktionsreagenz. Zum anderen war eine Extraktion des Peptids in Essigsäureethylester nach erfolgter Reduktion nicht möglich, da die Löslichkeit von dem monozyklischen Peptid **11** in wässriger Phase zu hoch war. Um die aufwändige Entsalzung im Rahmen der Isolierung aus der wässrigen Phase zu umgehen, wurde das überschüssige Iod nicht reduziert, sondern in Tetrachlorkohlenstoff extrahiert. Es gelang hierdurch, eine Synthesemethode zu entwickeln, die das gewünschte monozyklische Peptid **11** in 53 % Ausbeute lieferte.

Die Ausbildung von Disulfidbrücken am Harz hat den Vorteil, dass sich das Produkt leicht von den Reagenzien und entstehenden Nebenprodukten durch Filtration trennen lässt. Andererseits ist eine Zyklisierungsreaktion an fester Phase problematisch, da alle für die Reaktion benötigten Reagenzien in den polymeren Träger eindringen müssen. Außerdem sind unter Umständen Nebenreaktionen mit dem Linker des Harzes möglich. Durch die vorgegebene Beladungsdichte des Harzes ist es auch nicht möglich, die Konzentration des Peptids in Lösung gezielt einzustellen. Dies ist allerdings bei der Synthese von intramolekularen Disulfidbindungen von entscheidender Bedeutung. Die Einstellung einer niedrigen Konzentration ist essentiell, um die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbindungen auszuschließen. Zyklisierungen auf dem Harz haben sich somit nur in solchen Fällen etabliert, in denen eine Aminosäure über deren Seitenkette ans Harz gebunden ist und eine peptidische Zyklisierung, resultierend in einem Zyklopeptid, auf festem Träger erfolgt.^[130] Bei einem Zyklisierungsversuch am Harz in DMF unter analogen Reaktionsbedingungen konnte kein Produkt isoliert werden.^[131]

Durch die starre Disulfidbrücke und den ausgebildeten Monozyklus sind nun der C- und der N-Terminus in räumlicher Nähe so präorganisiert, dass die zweite peptidische Zyklisierung in befriedigenden Ausbeuten selektiv intramolekular erfolgen konnte (Abb. 4-19).

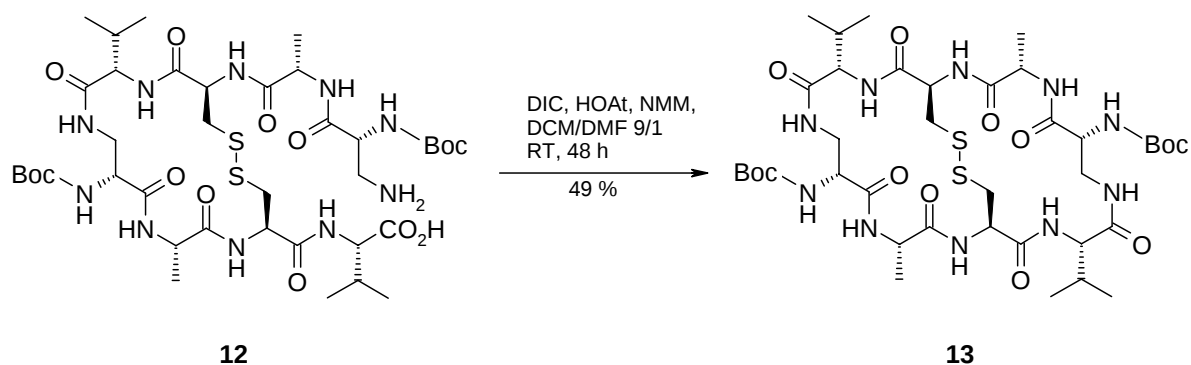


Abb. 4-19 Darstellung von Zylo(β -D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**13**).

Kupplung des Peptids **12** entsprechenden Depsipeptids mit HOAt/DIC lieferten bessere Ergebnisse hinsichtlich Nebenproduktbildung, Ausbeute und Razemisierung als die EDCI-aktivierte Kupplung.^[90] So gelang es, Monozyklus **12** in stark verdünnter Lösung in 49 % Ausbeute zum Zylo(β -D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**13**) zu zyklisieren. Als Base wurde anstelle von DIPEA die mildere Base *N*-Methyl-morpholin (NMM) eingesetzt, wodurch die Razemisierungsgefahr reduziert wurde. Die Konzentration erwies sich in doppelter Hinsicht als entscheidend: einerseits wurde durch die niedrige Konzentration die Bildung oligomerer Strukturen eingeschränkt; andererseits erhöhte sich hierdurch die Reaktionsdauer signifikant. Erst nach 48 Stunden konnte kein weiterer Umsatz festgestellt werden.

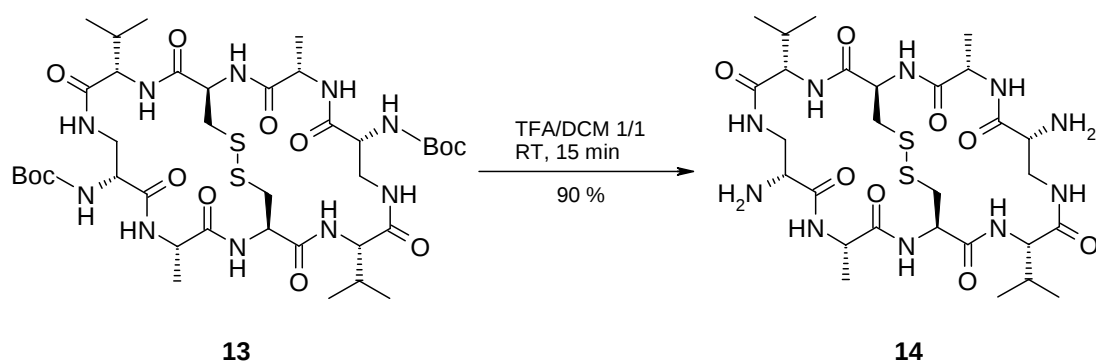


Abb. 4-20 Darstellung von Zylo(β -D-Dap-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**14**).

In einem abschließenden Schritt konnten die Boc-Schutzgruppen schnell und quantitativ durch die Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA) entfernt werden. Das ungeschützte Rückgrat Zyκλο(β-D-Dap-L-Ala-L-Cys-L-Val-β-D-Dap-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**14**) mit zwei exozyklischen Aminofunktionen konnte in 90 % Ausbeute aus Verbindung **13** erhalten werden (Abb. 4-20).

4.2.2.3 Darstellung des orthogonal geschützten Rückgrats

Neben der Synthese von einheitlich substituierten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Derivaten waren auch Analoga von Interesse, deren Rückgratstrukturen mit unterschiedlichen Chromophoren substituiert sind. Dies ist insbesondere dann nötig, wenn es sich bei einem Substituenten um einen guten Interkalator und bei dem anderen um eine Nukleobase handelt (Abb. 4-2, Bindungsmodus C). Bei der Synthese des Rückgrats müssen die beiden exozyklischen Aminofunktionen orthogonal geschützt sein. Es musste eine Synthesestrategie verfolgt werden, die vier unterschiedliche und selektiv anzusteuern Schutzgruppen berücksichtigt.^[132] Es lassen verschiedene Schutzgruppen miteinander kombinieren (Tab. 4-3).

Schutzgruppen	Abspaltbedingungen
Fmoc	20 % Piperidin in DMF
Boc	50 % TFA in DCM
Z	TFA/Thioanisol 9/1
Acm	I ₂ in DCM

Tab. 4-3 Abspaltbedingungen der vier verwendeten Schutzgruppen.

Hierbei war darauf zu achten, dass das Entfernen der Z-Gruppe nach dem Entschützen der Boc-Gruppe erfolgt, da im umgekehrten Fall die Z-Gruppe nicht selektiv abgespalten werden kann.

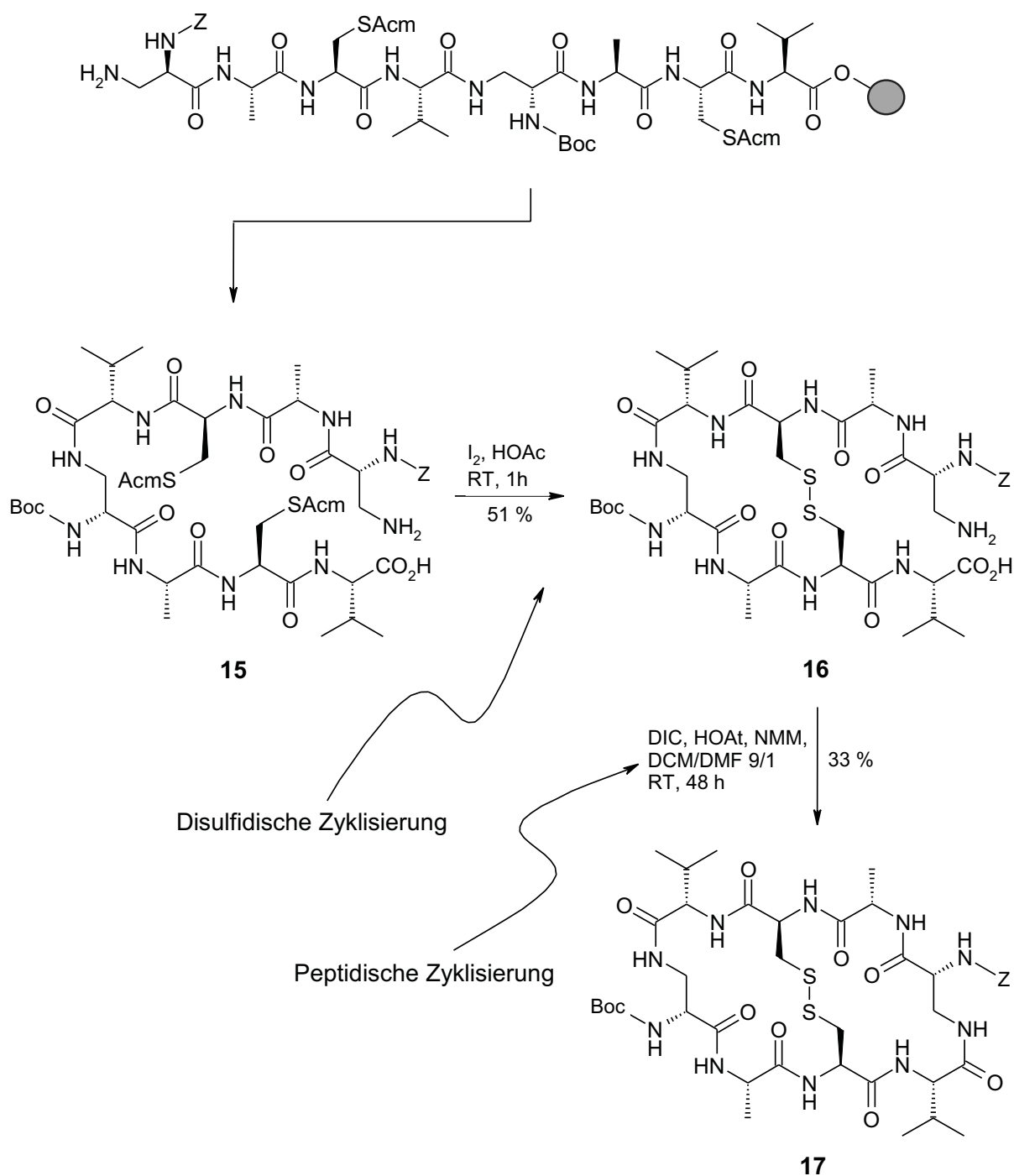


Abb. 4-21 Darstellung von Zyklo(β -D-Dap(Z)-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**17**).

Die Synthese von Zyklo(β -D-Dap(Z)-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**17**) sollte analog zu Rückgrat **14** dargestellt werden (Abb. 4-21), indem an fester Phase ein linearer Vorläufer aufgebaut wurde, der anschließend sequenziell über eine Disulfidbrücke und eine Amidbindung doppelt zyklisiert werden

konnte. Im Gegensatz zur bityklischen Verbindung **14** ist das Rückgrat von Bityklus **17** aufgrund der zwei unterschiedlichen Schutzgruppen an den beiden α -Aminofunktionen der Diaminopropionsäure-Aminosäuren nicht C_2 -symmetrisch. Da die Schutzgruppen jeweils an exozyklische Aminfunktionen gebunden sind, die zueinander homotop sind, ist eine Differenzierung der beiden Aminfunktionen bei dem bityklischen Rückgrat nicht möglich. Im Gegensatz hierzu ist eine Differenzierung jedoch bei den offenkettigen linearen und monozyklischen Strukturen möglich. Während eine Diaminopropionsäure den N-Terminus des Peptids darstellt, ist die andere in das Peptid inkorporiert. Diese Differenzierungsmöglichkeit, die nach der zweiten Zyklisierungsreaktion nicht mehr vorhanden ist, eröffnete die Möglichkeit, ausgehend von zwei unterschiedlichen linearen Peptiden zum selben doppelt zyklisierten Bityklus zu gelangen (Abb. 4-22).

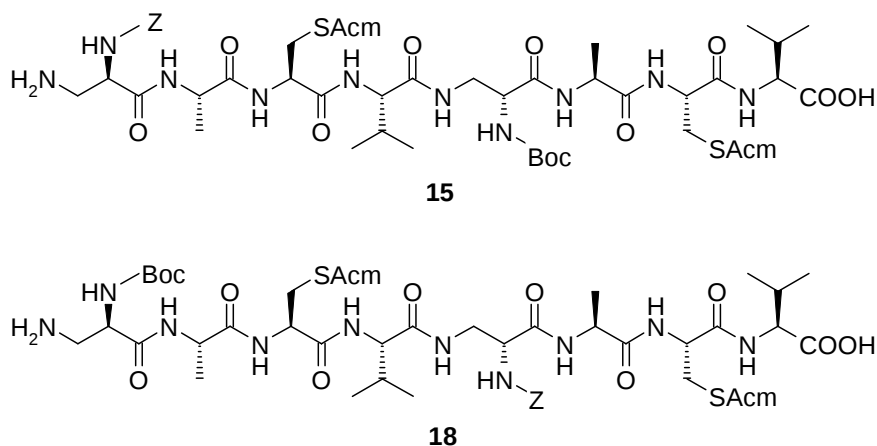


Abb. 4-22 Potenzielle Ausgangsverbindungen zur Synthese von **17**.

Bei dem in dieser Arbeit verfolgten Ansatz wurde vom linearen Peptid Z-D-Dap-L-Ala-L-Cys(Acm)-L-Val- β -D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys(Acm)-L-Val-OH (**15**) ausgegangen, da sich die linearen Peptide **15** von **11** lediglich in der verwendeten Schutzgruppe des N-Terminus unterscheiden. Somit konnte bei der Synthese am festen Träger analog zur Synthese von Verbindung **11** vorgegangen werden.

Ausgehend von L-Valin belegtem 2-Chlorotriethylharz wurden die Aminosäuren Fmoc-L-Valin-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Boc-D-Dap(Fmoc)-OH und Z-D-Dap(Fmoc)-OH in NMP mit HBTU gekuppelt. Fmoc-L-Cys(Acm)-OH konnte erfolgreich in DCM mit

DIC gekuppelt werden. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte in einem Gemisch aus Piperidin in DMF. Nach dem Abspalten des linearen Peptids **15** vom Harz mit HFIP konnte das gewünschte Produkt in 82 % Ausbeute isoliert werden. Es wurde keine Razemisierung beobachtet, sodass **15** direkt für die Folgereaktion eingesetzt werden konnte.

Die Darstellung vom disulfidischen Monozyklus Z-D-Dap-L-Ala-L-Cys-L-Val-β-D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys-L-Val-OH disulfid (**16**) erfolgte analog zur Darstellung von Verbindung **12** mit Iod in Essigsäure und anschließender Extraktion überschüssigen Jods mit Tetrachlorkohlenstoff. Es wurden hierbei vergleichbare Ausbeuten von 51 % erzielt.

Die peptidische Zyklisierung von Monozyklus **16** zum bizyklischen Rückgrat **17** wurde entsprechend der Reaktion zu Verbindung **13** mit DIC/HOAt in DCM/DMF 9/1 unter Zugabe von NMM als Base durchgeführt. Die Ausbeute für die Synthese von Peptid **17** (33 %) lag signifikant unter der von der Synthese von Peptid **13**, was auf eine zusätzliche sterische Hinderung der Z-Gruppe im Vergleich zur Boc-Gruppe zurückgeführt werden könnte. Sowohl eine Verlängerung der Reaktionszeit, als auch die Reaktion bei leicht erhöhter Temperatur zeigten keinen Einfluss auf die erzielbare Ausbeute.

In den folgenden Reaktionsschritten wurden die Boc- bzw. Z-Gruppen entfernt und die freien entschützten Aminofunktionen mit Nukleobasen gekuppelt. Da diese Reaktionssequenzen in Eintopfreaktionen durchgeführt wurden, wird bezüglich einer Diskussion auf den entsprechenden Abschnitt 4.2.3 zur Kupplung von Chromophoren an die Rückgratstrukturen verwiesen.

4.2.3 Synthese von Nukleobasen-funktionalisierten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Analoga

Die Substitution der Nukleobasen an die jeweiligen Rückgratstrukturen führt bei exakter Analogie zum Triostin A zu Harnstoff-ähnlichen Funktionalitäten, bei denen ein Stickstoffatom in das aromatische System der Nukleobase inkorporiert ist. Diese Systeme weisen jedoch keine ausreichende Stabilität auf, sodass andere

Modellsysteme gefunden werden mussten, die vergleichsweise stabil, gleichzeitig jedoch elektronisch und sterisch mit Triostin A vergleichbar sind. Man kann hier zwischen unterschiedlichen Varianten unterscheiden (Abb. 4-23).

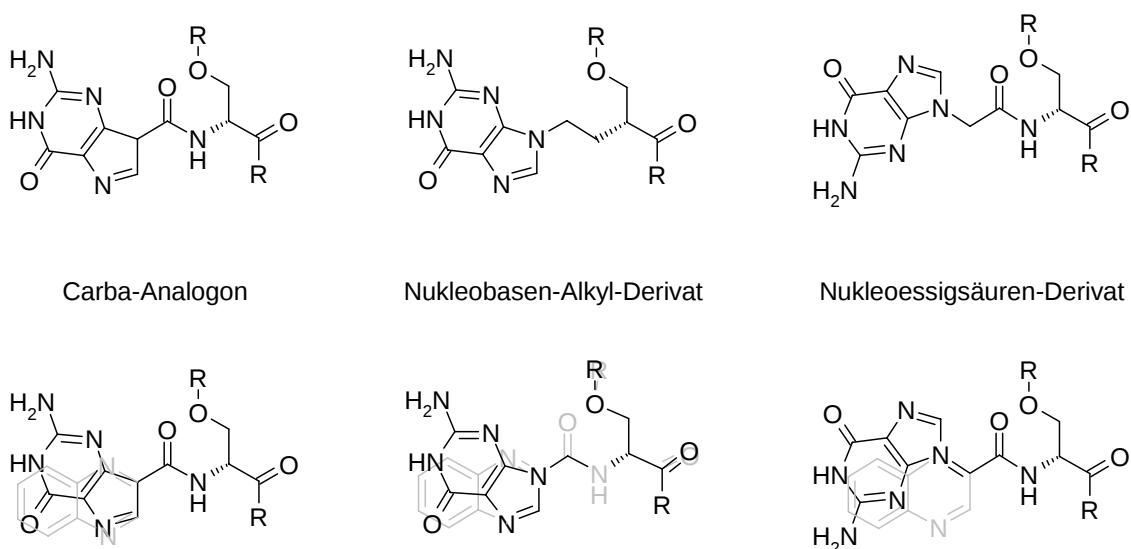


Abb. 4-23 Superpositionen möglicher Nukleobasen-Interkalator-Einheiten und Triostin A-Chinoxalin-Systeme am Beispiel des Guanins.

Die isosteren Carbapurine weisen mit den Chinoxalin-Substituenten eine sehr gute Übereinstimmung auf. Durch das zusätzliche Chiralitätszentrum ist jedoch eine signifikante Verzerrung gegenüber dem Chinoxalin-System zu erwarten. Um die mit der Einführung eines neuen Stereozentrums verbundenen Probleme zu vermeiden, ist es ebenfalls möglich, bei gleicher Kettenlänge die Nukleobasen über einen Alkyllinker mit dem Rückgrat zu verbinden. Als problematisch könnte sich jedoch die hiermit einhergehende Flexibilität der Nukleobasen-Verknüpfung erweisen, da die Präorganisation der Chinoxalin-Substituenten bei Triostin A entscheidend für das Bindungsverhalten ist. Der Einsatz einer Methylengruppe zwischen Carboxyfunktion und Nukleobase resultiert in der Struktur von Nukleobasen-substituierten Essigsäuren. Zwar ist die räumliche Übereinstimmung der Nukleobasen mit den Chinoxalin-Chromophoren etwas geringer, jedoch ist die Synthese derartiger Verbindungen leicht möglich und eine Präorganisation weiterhin gegeben, ohne dass neue Chiralitätszentren entstehen. Im Rahmen der Nielsen-PNA ist die Darstellung von

Nukleobasen-substituierter Essigsäurederivaten in der Literatur beschrieben.^[133-135] Die Kupplung dieser modifizierten Essigsäuren unter Peptidkuppelungsbedingungen erfordert den Einsatz von Schutzgruppen aus zwei Gründen: einerseits werden hierdurch unerwünschte Nebenreaktion verhindert, andererseits wird die mangelhafte Löslichkeit dieser Verbindungen erhöht und die Reaktion damit erst ermöglicht. Die Synthese der geschützten Nukleobasen-modifizierten Essigsäurederivate wurde von Nielsen beschrieben (Abb. 4-24).^[136-139]

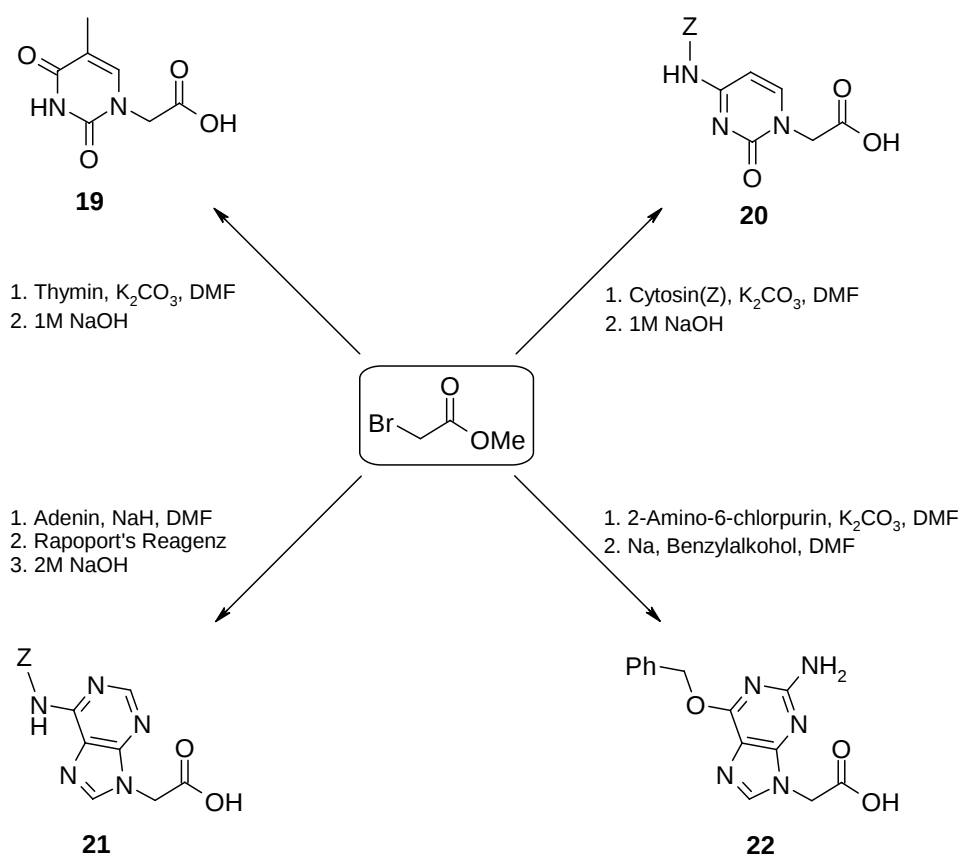


Abb. 4-24 Darstellung von Nukleobasen-substituierten Essigsäurederivaten.¹

Ausgehend von Bromessigsäuremethylester sind die Substitutionsderivate mit allen kanonischen Nukleobasen zugänglich. Die Thymin- und Cytosin-substituierten Verbindungen **19** und **20** können durch einfache nukleophile Substitutionsreaktionen mit anschließender Verseifung unter identischen Bedingungen erhalten werden. Im

¹ Rapoport's Reagent: (Benzyloxycarbonyl)-*N'*-ethylimidazol Tetrafluoroborat

Fall des Guanin-Derivats muss man aufgrund von Regioselektivitätsproblemen zwischen N7- und N9-Substitution auf 2-Amino-6-chlorpurin zurückgreifen, das anschließend durch Benzylalkoholat zur Guanin-substituierten Essigsäure **22** umgesetzt werden kann. Das analoge Adenin-Derivat **21** ist unter basischen Bedingungen aus der Reaktion mit Adenin und anschließender Hydrolyse zugänglich. Die dargestellten Nukleobasen-substituierten Essigsäurederivate konnten nun mit den exozyklischen Aminofunktionen der Rückgratstrukturen **14** und **17** kovalent verknüpft werden. Hierdurch konnten eine Vielzahl verschiedener Nukleobasen-modifizierter Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Analoga synthetisiert werden.

4.2.3.1 Synthese von einheitlich substituierten Nukleobasen-funktionalisierten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Analoga

Die Synthese von Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Analoga, die zwei identische Nukleobasen tragen, konnte durch Kupplung der Nukleobasen-funktionalisierten Essigsäurederivate mit Rückgrat **14** erzielt werden. Hierfür wurden verschiedene Peptidkupplungsreagenzien auf der Basis von Carbodiimiden in einer Mischung aus DCM und DMF eingesetzt und miteinander verglichen. Eine Kupplung mit *N*-Ethyl-*N*',*N*'-(dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDCI) bietet den Vorteil, dass die dabei entstehenden Nebenprodukte besser löslich sind als im Fall von DIC und hiermit leichter entfernt werden konnten.^[140-142] Beide Methoden lieferten die gewünschten Produkte in vergleichbarer Ausbeute (Abb. 4-25). Die Thymin-substituierte Verbindung Zyklo(β -D-Dap(thymin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap(thymin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**24**) konnte durch den Einsatz von EDCI mit 35 % Ausbeute erhalten werden. Für den Fall der Chinoxalin- und Cytosin-substituierten Verbindungen Des-*N*-Tetramethylazatriostin (**23**) bzw. Zyklo(β -D-Dap(cytosin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap(cytosin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**25**) lieferte die Kombination aus DIC/HOAt und NMM als Base mit 33 % bzw. 42 % die besseren Ausbeuten.

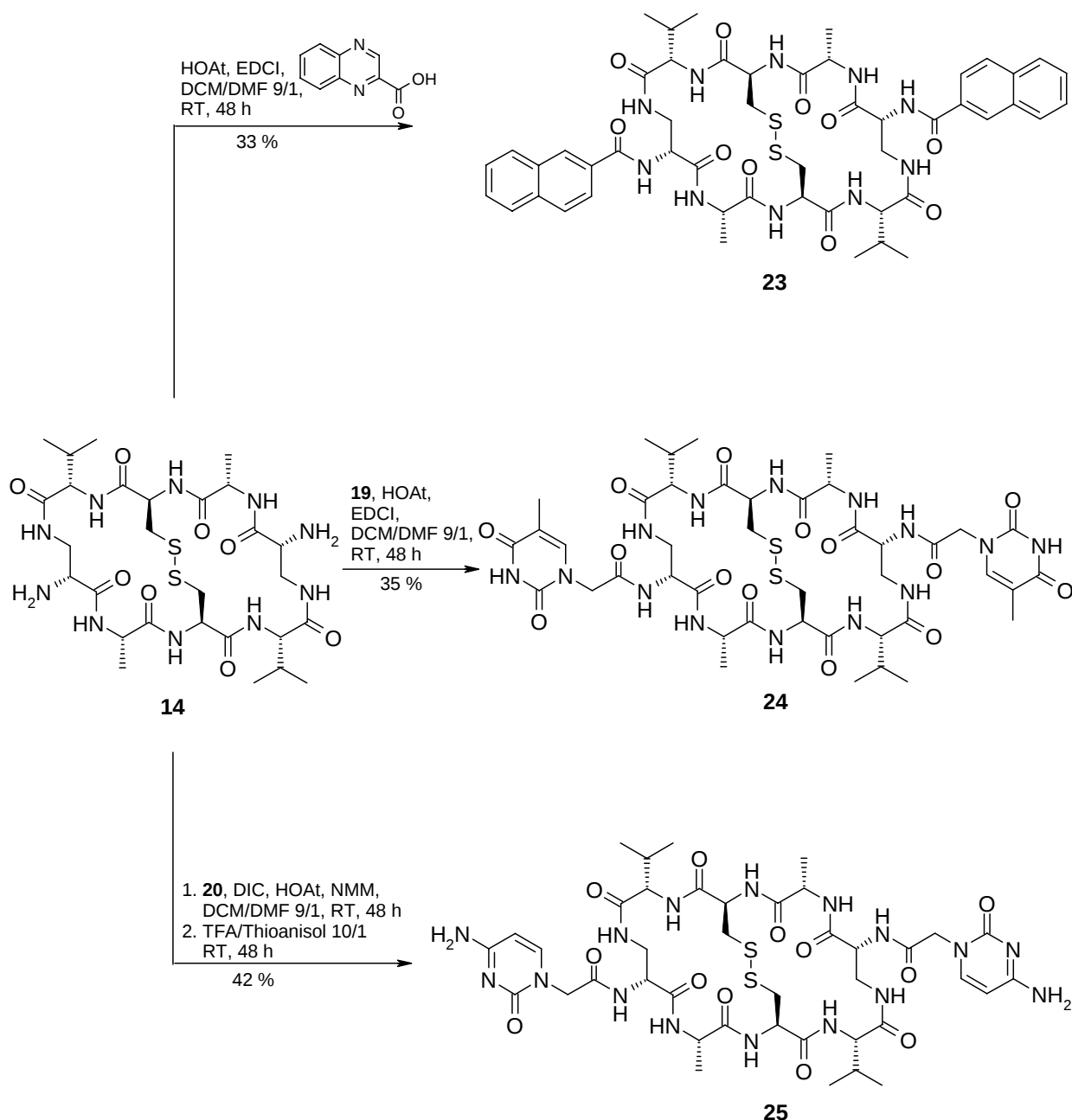


Abb. 4-25 Darstellung von einheitlich Nukleobasen-substituierten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Analoga: Des-*N*-Tetramethylazatriostin (**23**), Zyko(β-D-Dap(thymin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val-β-D-Dap(thymin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**24**) und Zyko(β-D-Dap(cytosin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val-β-D-Dap(cytosin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**25**).

Die unter basischen und sauren Bedingungen stabile Z-Schutzgruppe kann anschließend mit einem Gemisch aus TFA und Thioanisol entfernt werden. Die

Abspaltung erfolgt hierbei über einen nukleophilen „push-pull“-Mechanismus (Abb. 4-26).^[143] Die hierbei *in situ* entstehenden Benzylkationen werden von Thioanisol als Nukleophil abgefangen und so dem Gleichgewicht entzogen. Die thermodynamische Triebkraft stellt die Decarboxylierung des intermediär entstehenden Urethans dar. Somit ist es möglich, die Z-Gruppe irreversibel quantitativ zu entfernen.

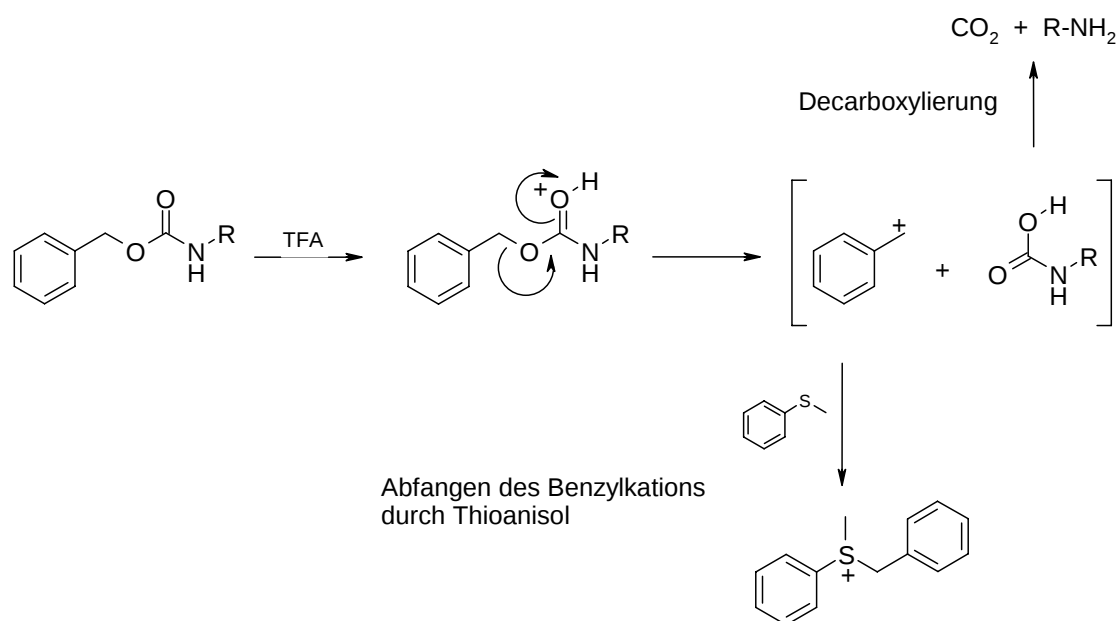


Abb. 4-26 „Push-pull“-Mechanismus beim Entschützen der Z-Gruppe mit TFA und Thioanisol.

4.2.3.2 Synthese von orthogonal substituierten Nukleobasen-funktionalisierten Des-*N*-Tetramethylazatriostin Analoga

Für die Synthese von orthogonal substituierten Nukleobasen-funktionalisierten Analoga können zwei unterschiedliche Konzepte angewendet werden: einerseits ist eine statistische Synthese ausgehend von Rückgrat **14** möglich; andererseits können sequenziell an Rückgrat **17** die jeweiligen Substituenten angehängt werden. Im statistischen Ansatz wurde Bizyklus **14** in einer Eintopfreaktion mit den Nukleobasen-substituierten Essigsäuren **19** und **20** gleichzeitig zur Reaktion gebracht (Abb. 4-27). Aufgrund der homotopen Beziehung der beiden α -Aminofunktionen der Diaminopropionsäuren im Rückgrat betrug unter Vernachlässigung von marginalen

Reaktivitätsunterschieden zwischen **19** und **20** das zu erwartende Produktverhältnis aus T/T:C/C:T/C 1:1:2.²

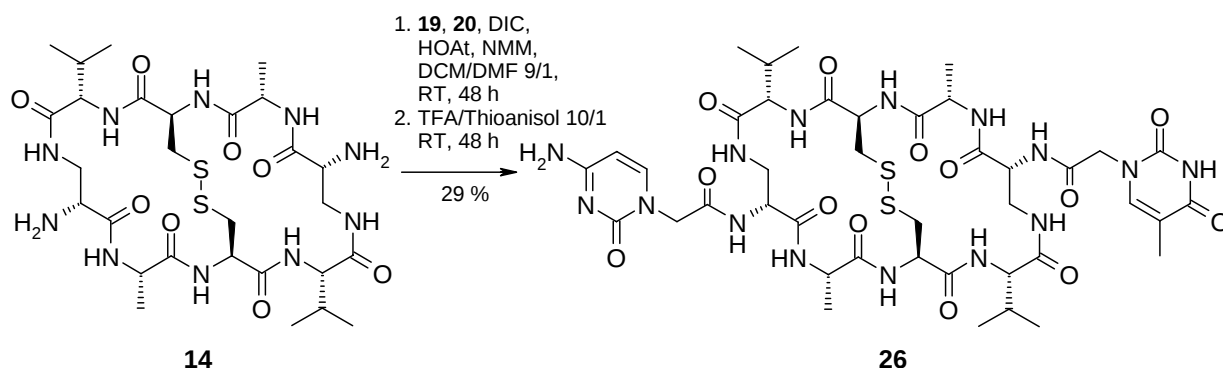


Abb. 4-27 Darstellung von Zyκλο(β-D-Dap(thymin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val-β-D-Dap(cytosin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**26**).

Die Synthese wurde unter analogen Reaktionsbedingungen wie bei der Darstellung von einheitlich substituierten Derivaten (vgl. 4.2.3.1) in DCM/DMF 9/1 unter DIC/HOAt-Kupplung durchgeführt. Auch hier wurde nach 48 h kein weiterer Umsatz mehr beobachtet. Nach Abspalten der Z-Gruppe mit einem Gemisch aus TFA und Thioanisol konnte das gewünschte orthogonal substituierte Des-*N*-Tetramethylazatriostin **26** in 29 % Ausbeute als Hauptprodukt isoliert werden. Erwartungsgemäß liegt die Ausbeute unter der von den Synthesen der Verbindungen **24** und **25** unter analogen Kupplungsbedingungen, da wegen des statistischen Ansatzes auch die einheitlich substituierten Derivate **24** und **25** bei der Reaktion als Nebenprodukte generiert wurden. Diese konnten in HPLC-MS analytischen Untersuchungen identifiziert werden.

Während diese Synthesestrategie bei derartigen Eintopfreaktionen die Synthese von vielen unterschiedlichen Verbindungen innerhalb einer kurzen Reaktionssequenz

² zur Nomenklatur: T/T (Cyclo(β-D-Dap(**thymin**-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val-β-D-Dap(**thymin**-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid) (**24**); C/C (Cyclo(β-D-Dap(**cytosin**-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val-β-D-Dap(**cytosin**-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid) (**25**); T/C (Cyclo(β-D-Dap(**thymin**-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val-β-D-Dap(**cytosin**-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid) (**26**).

ermöglicht, weist dieses Konzept immer dann ein Problem auf, wenn gezielt nur eine diskrete Verbindung synthetisiert werden soll. Die aus der Bildung verschiedener Produkte resultierende Erniedrigung der Ausbeute einzelner Verbindungen kann umgangen werden, wenn die exozyklischen Aminofunktionen des Rückgrats mit Schutzgruppen versehen sind, die selektiv angesteuert und entfernt werden können. Rückgrat **17** enthält als orthogonale Schutzgruppen eine Boc- und eine Z-Gruppe (Abb. 4-28).

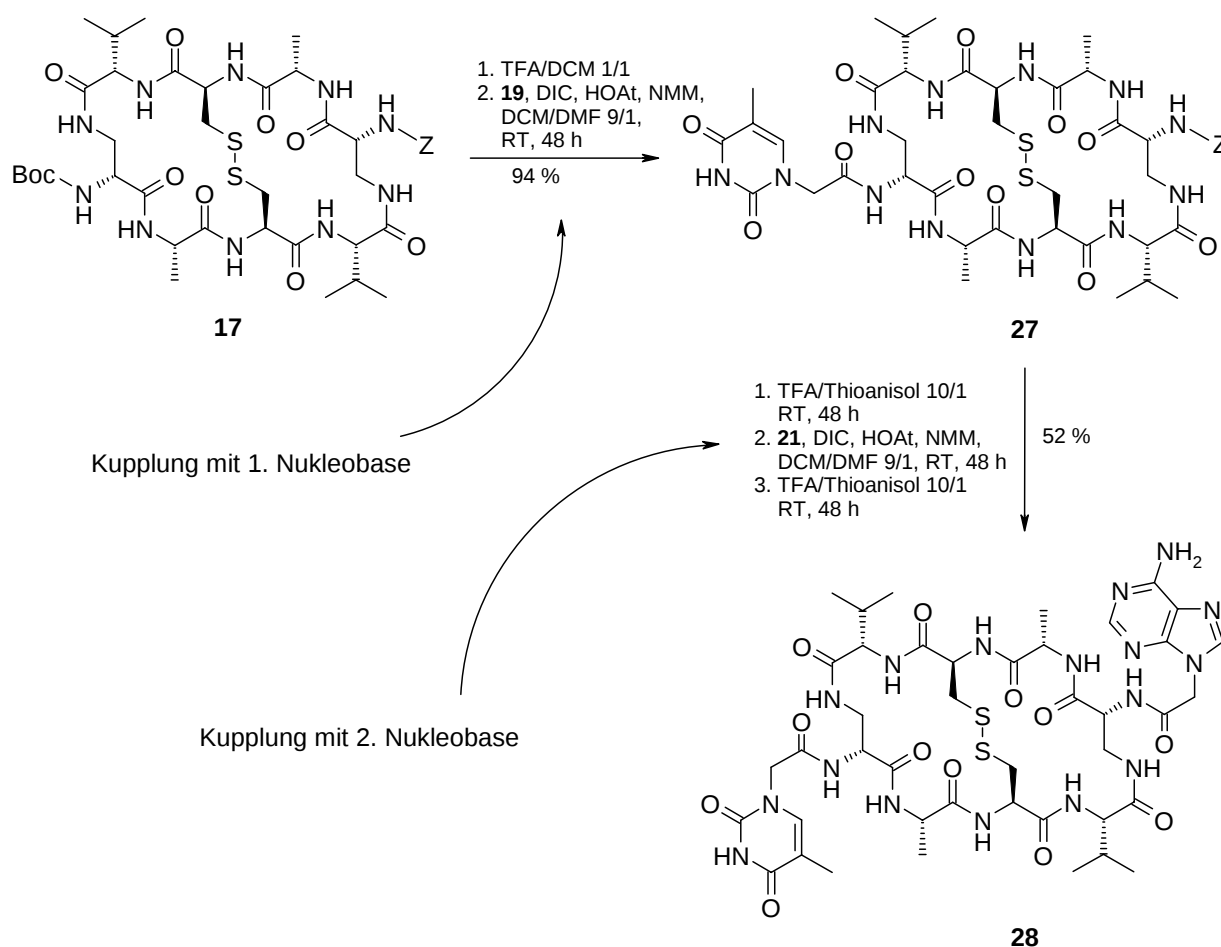


Abb. 4-28 Darstellung von Zyko(β -D-Dap(thymin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap(adenin-9-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**28**).

Die Nukleobasen konnten nach sequenziellem Entschützen der α -Aminofunktionen der Diaminopropionsäuren mit dem Rückgrat kovalent verknüpft werden. Unter Rückgriff auf Tab. 4-3 muss zunächst die Boc-Gruppe entschützt werden, da diese

unter den Reaktionsbedingungen zur Entfernung der Z-Gruppe instabil ist. Da der Einbau von Purinen im Vergleich zu Pyrimidinen eine erhöhte Tendenz zur Interkalation in DNA-Doppelstränge erwarten ließ, sollten Systeme entwickelt werden, die mindestens eine Purinbase enthalten. Aufgrund der Aggregationsprobleme und den damit einhergehenden Löslichkeitsproblemen von Guaninverbindungen wurde Adenin als Purinbase in das System integriert. Als Pyrimidinbase wurde wegen der fehlenden Aminofunktion Thymin eingesetzt. Die Kupplung der Thymin-substituierten Essigsäure **19** mit einer Kombination aus DIC/HOAt mit NMM als Base in einem Gemisch aus DCM und DMF gelang mit 94 % in sehr guten Ausbeuten. Nach dem Entfernen der Z-Gruppe wurde die Adenin-substituierte Essigsäure **21** unter analogen Bedingungen kovalent an das Rückgrat gebunden. Ein erneutes Entschützen der Z-Gruppe des Adenins lieferte das orthogonal Purin/Pyrimidin-substituierte Zyko(β -D-Dap(thymin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap(adenin-9-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**28**) in 52 % Ausbeute.

4.2.4 Synthese von Vorläufermolekülen zur Bildung dimerer Rückgratstrukturen

Zur Erhöhung der Bindungsaffinität von Azatriostin-analogen Verbindungen sollte die Anzahl der potenziell auszubildenden Wechselwirkungen erhöht und hiermit die Erkennungsregion des DNA-Binders vergrößert werden. Durch kovalentes Verknüpfen von Bisinterkalator-Einheiten sollten dimere oder oligomere Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Derivaten generiert werden, die ein Vielfaches an Wechselwirkungen mit DNA im Vergleich zur monomeren Einheit eingehen können. Zur kovalenten Verknüpfung von peptidischen präorganisierten Monomeren hat sich neben der Ausbildung von Disulfidbrücken auch die Koordination von natürlichen und nichtnatürlichen Aminosäuren mit Metallionen etabliert.^[144-147] Hierbei sind vor allem solche Reaktionen von Bedeutung, die selektiv trotz der Anwesenheit zahlreicher in der Peptidchemie verwendeter Schutzgruppen selektiv durchführbar sind. Aufgrund der milden Reaktionsbedingungen und der weitreichenden Einsatzmöglichkeiten ist

die Metathesereaktion sowohl in der intramolekularen (RCM/ROMP)³ als auch der intermolekularen Variante (Kreuzmetathese) von überragender Bedeutung.^[148] Das umfassende Anwendungsumfeld hat zu der Entwicklung zahlreicher Katalysatoren geführt, die sich hinsichtlich ihrer Reaktivität und Tolerierung verschiedener funktionellen Gruppen unterscheiden. Neben den sehr reaktiven Molybdän-basierenden Schrock-Katalysatoren haben sich vor allem die von Grubbs entwickelten Ruthenium-Katalysatoren durchgesetzt, von denen Grubbs 1. Generation und Grubbs 2. Generation hervorgehoben werden müssen (Abb. 4-29).^[149-150]



Abb. 4-29 Grubbs 1. Generation und Grubbs 2. Generation.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten dimere Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Analoga synthetisiert werden, die über einen Alkyl linker miteinander verbunden sind. Der Linker sollte durch eine Kreuzmetathese aus zwei terminalen Olefinen gebildet werden. Hierfür war es notwendig, die jeweilige Rückgratstruktur von Des-*N*-Tetramethylazatriostin so zu modifizieren, dass eine Aminosäure des peptidischen Rückgrats durch eine unnatürliche Aminosäure, die in der Seitenkette eine terminale Doppelbindung enthält, substituiert wird. Konformationsanalysen legen nahe, dass die Isopropyl-Gruppen der L-Valine keinen der diskutierten Wechselwirkungsmechanismen entscheidend beeinträchtigen sollte (Abb. 4-2). Außerdem sollte aufgrund der bizyklischen Eigenschaften, das Peptidrückgrat ausreichend strukturell fixiert sein, sodass keine signifikanten Konformationsänderungen zu befürchten sind. Es wurde folglich ein L-Valin-Baustein durch eine unnatürliche Aminosäure ersetzt. Bei der Auswahl der zu ersetzenden Aminosäure ist zu beachten, dass die Seitenkette

³ Zur Nomenklatur: RCM ring-closing-metathesis; ROMP ring-opening-metathesis polymerization

eine Mindestlänge aufweisen muss, so dass der Katalysator während der Reaktion mit seinen sterisch anspruchsvollen Substituenten zwischen die beiden zu kuppelnden Rückgrats passt und somit die Kreuzkupplung vermitteln kann. Vergleichsexperimente zur Kupplung von olefinischen Aminosäurederivaten ergaben, dass Homoallylglycine gegenüber deren homologen Allylglycinen deutlich reaktiver sind und bessere Kupplungsausbeuten liefern (Abb. 4-30).^[151] Vinylglycin führt erwartungsgemäß zu keinem Kreuzkupplungsprodukt. Da die Reaktivität gegenüber Kreuzmetathesereaktionen mit zunehmender Seitenkettenlänge von Vinylglycin über Allylglycin zu Homoallylglycin zunimmt, wurde zugunsten der Inkorporation der Homoallylglycin-Aminosäure (Hag) entschieden.

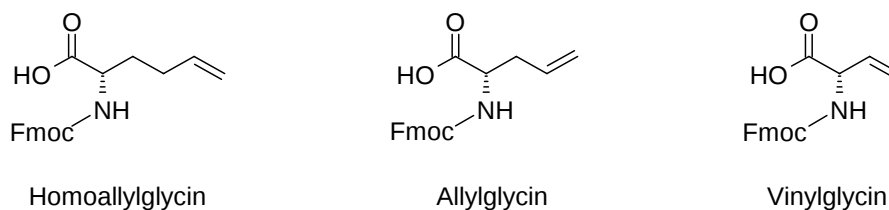


Abb. 4-30 Fmoc-L-Homoallylglycin (**29**), Fmoc-L-Allylglycin und Fmoc-L-Vinylglycin.

Da durch den Ersatz nur eines Valins im Rückgrat die homotope Beziehung der beiden exozyklischen Aminofunktionen der Diaminopropionsäuren aufgehoben wird, sollte zunächst ein Modellsystem entwickelt werden, das einheitlich mit nur einer Nukleobasen-substituierten Essigsäure (Abb. 4-24) verknüpft wird.

4.2.4.1 Darstellung von Fmoc-L-Homoallylglycin-OH als potenzielle Metathesebausteine

Da der Aufbau des linearen Rückgrats auf Fmoc-Basis erfolgen sollte, musste eine stereoselektive Synthese für Fmoc-L-Hag-OH (**29**) entwickelt werden. Als Ausgangsverbindung diente L-Glutaminsäure (**30**) (Abb. 4-31). Nach Veresterung der beiden Carbonsäurefunktionen mit Trimethylsilylchlorid und Methanol konnte in einer Eintopfreaktion das Amin mit Boc-Anhydrid geschützt werden.^[152,153] Boc-L-Glu(OMe)-OMe (**31**) konnte mit 81 % in guten Ausbeuten säulenchromatographisch

isoliert werden. Unter diesen Reaktionsbedingungen war eine doppelte Schützung des Amins nicht möglich, konnte jedoch in 90 % Ausbeute in Methanol in Kombination mit Dimethylaminopyridin (DMAP) erreicht werden. Die Einführung der zweiten Boc-Gruppe war wegen der Nukleophilie des Stickstoffs nötig, sodass die anschließende Reduktion des δ -Esters erfolgreich verlaufen konnte.^[154] Bei der Reaktion von *N,N*-bis-Boc-L-Glu(OMe)-OMe (**32**) mit DIBAL bei -78°C war die Reaktionsdauer genau einzuhalten, da sonst der Anteil an Nebenproduktbildung signifikant stieg. Einerseits war eine partielle Reduktion zum Alkohol, andererseits eine Reduktion des α -Esters möglich. Nach fünf Minuten musste die Reaktion deswegen gequenchet werden, so dass Methyl-(*S*)-2-*N,N*-bis-*tert*-butoxycarbonylamino-5-oxopentanoat (**33**) mit 39 % nur in mäßigen Ausbeuten erhalten werden konnte.

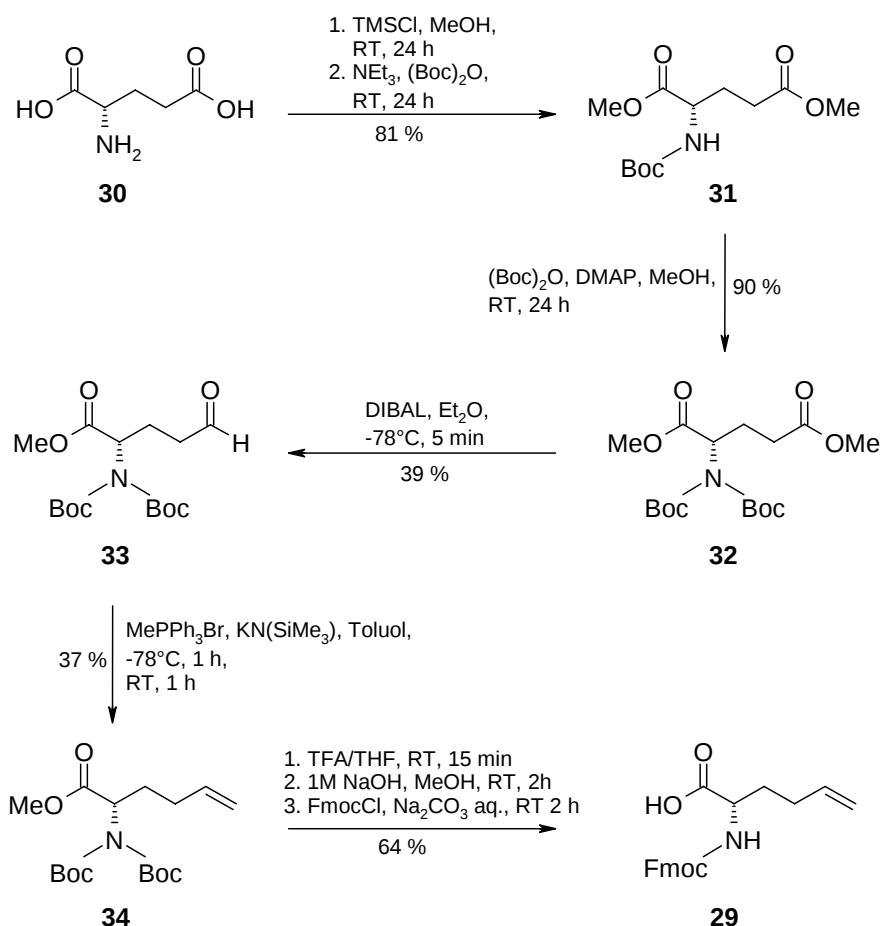


Abb. 4-31 Darstellung von Fmoc-L-Hag-OH (**29**).

Die Reaktion des Aldehyds (**33**) mit *n*-BuLi in THF unter normalen Wittig-Bedingungen führte nicht zum Erfolg, weshalb als Base Kalium-bis-trimethylsilylamid

in Toluol verwendet werden musste.^[155]^{Fehler! Textmarke nicht definiert.} Die Reaktion mit Methyltriphenylphosphoniumbromid lieferte das terminale Olefin in 37 % Ausbeute. Anschließend wurden nacheinander die Boc-Gruppen durch die Zugabe von TFA in THF entfernt, die beiden Esterfunktionalitäten mit 1M Natronlauge verseift und die α -Aminofunktion mit FmocCl unter Standardbedingungen geschützt. Die gewünschte Aminosäure Fmoc-L-Hag-OH (**29**) konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in 64 % Ausbeute erhalten werden.

4.2.4.2 Darstellung des Olefin-funktionalisierten monomeren Rückgrats

Der Aufbau eines Modellsystems, das mit identischen Nukleobasen ausgestattet werden sollte, schränkt die Anforderungen an die verwendeten Schutzgruppen ein. Die beiden α -Aminofunktionen von Diaminopropionsäure konnten folglich einheitlich geschützt werden. Der analoge Ansatz zu Zyklopeptid **13**, bei dem Cystein mit der Acm-Gruppe und Diaminopropionsäure mit der Boc-Gruppe versehen waren, führte nicht zum Erfolg. Zwar konnte das entsprechende lineare Peptid erfolgreich an fester Phase auf Fmoc-Basis aufgebaut werden, jedoch führte der disulfidische Ringschluss zu einem komplexen Produktgemisch, das das gewünschte monozyklische Produkt nicht enthielt. Offensichtlich kommt es bei Anwesenheit einer terminalen olefinischen Doppelbindung zu elektrophilen Additionsreaktionen von Iod bzw. zu hierdurch möglichen nukleophilen Additionen der Acetat-Gruppen. Alternative Reaktionsbedingungen zur Entfernung der Acm-Gruppe sehen die Reaktion mit Trifluoroacetat mit Anisol als Zusatz vor.^[155,156] Da unter diesen Bedingungen die Boc-Gruppe nicht stabil ist und man somit beim anschließenden peptidischen zweiten Ringschluss nicht selektiv über die Seitenkette des N-Terminus zyklisieren kann, musste die peptidische Zyklisierung der Entschützung der Acm-Gruppe vorgezogen werden. Die anschließende Knüpfung der Disulfidbrücke unter gleichzeitigem Entfernen der Boc-Gruppen gelang jedoch nicht. Es wurde folglich eine andere Schutzgruppenstrategie gewählt (Tab. 4-4).

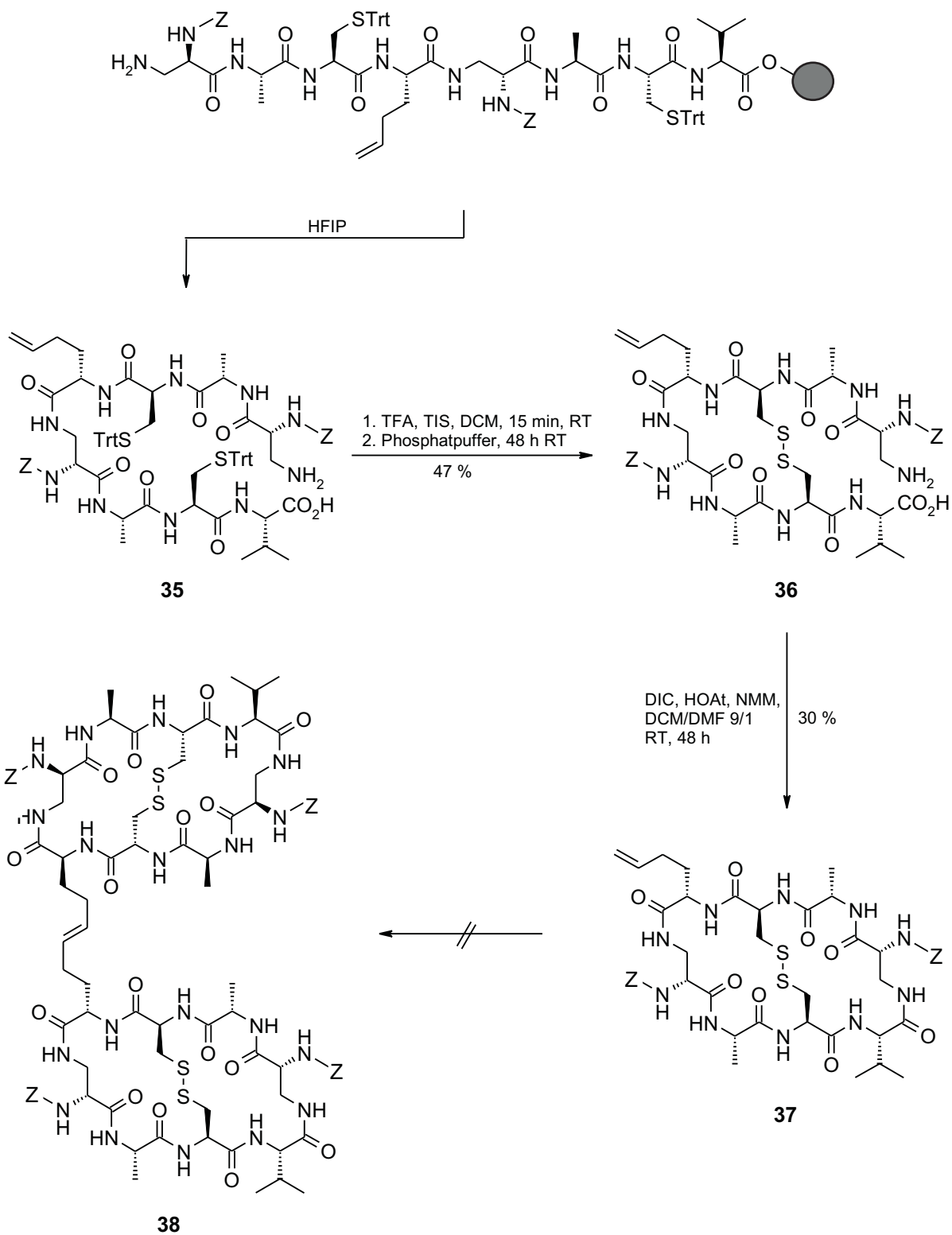


Abb. 4-32 Syntheseroute zur Darstellung des dimeren Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Rückgrats **38**.

Schutzgruppen	Abspaltbedingungen
Fmoc	20 % Piperidin in DMF
Z	TFA/Thioanisol 9/1
Trt	5 % TFA in DCM

Tab. 4-4. Abspaltbedingungen der drei verwendeten Schutzgruppen.

Durch den Einsatz der Trityl-Schutzgruppe, konnte Cystein unter Bedingungen entschützt werden, bei denen die olefinische Doppelbindung stabil ist. Der Einsatz von TFA erforderte jedoch die Verwendung der Z-Gruppe anstelle der Boc-Gruppe zum Schützen der α -Aminofunktionen der Diaminopropionsäuren.

Ausgehend von L-Valin belegtem 2-Chlorotritylharz wurden die Aminosäuren **29**, Fmoc-L-Ala-OH und Z-D-Dap(Fmoc)-OH in NMP mit HBTU gekuppelt. Fmoc-L-Cys(Acm)-OH wurde in DCM mit DIC gekuppelt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte in einem Gemisch aus Piperidin in DMF. Nach dem Abspalten des linearen Peptids Z-D-Dap-L-Ala-L-Cys(Trt)-L-Hag- β -D-Dap(Z)-L-Ala-L-Cys(Trt)-L-Val-OH (**35**) vom Harz mit HFIP konnte das gewünschte Produkt in 72 % Ausbeute isoliert werden. Es wurde keine Razemisierung beobachtet, sodass **35** direkt für die Folgereaktion eingesetzt werden konnte.

Die Darstellung vom disulfidischen Monozyklus Z-D-Dap-L-Ala-L-Cys-L-Hag- β -D-Dap(Z)-L-Ala-L-Cys-L-Val-OH disulfid (**36**) erfolgte im Gegensatz zur Iod-vermittelten simultanen Entfernen der Acm-Gruppe und anschließenden Kupplung zur Disulfidbindung, in diesem Fall sequenziell. Durch die Zugabe von 5 % TFA in DCM unter Zugabe von Triisopropylsilan (TIS) als Abfangreagenz konnten die Tritylgruppen quantitativ entfernt werden.^[157] Die Zugabe von TIS ist nötig, da aufgrund der hohen Stabilität des Tritylkations und der hohen Nukleophilie der freien Thiofunktionen die Entschützungsreaktion reversibel ist. Die Oxidation des Dithiols **35** zum Disulfid **36** konnte mit Luftsauerstoff in einem Phosphatpuffer nach fünf Tagen Reaktionszeit in 47 % Ausbeute erreicht werden.^[158] Hierbei war darauf zu achten, dass eine niedrige Konzentration eingehalten wurde, damit die Bildung von

intermolekularen Disulfidbindungen zu dimeren und oligomeren Verbindungen vermieden wurde.

Die peptidische Zyklisierung von Monozyklus **36** zum bizyklischen Rückgrat Zyko(β -D-Dap(Z)-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap(Z)-L-Ala-L-Cys-L-Hag) disulfid (**37**) wurde analog der Reaktion zu Verbindung **13** mit DIC/HOAt in DCM/DMF 9/1 unter Zugabe von NMM als Base durchgeführt. Der Makrozyklus **37** konnte in 30 % Ausbeute erhalten werden.

Erste Versuche zur Dimersisierung von Bizyklus **37** wurden als Ruthenium katalysierte Kreuzkupplungen durchgeführt. Die Standardbedingungen sahen 0.25 molare Lösungen von Verbindung **37** in 1,2-Dichlorethan und 5 mol % Grubbs-Katalysator der 1. Generation vor. Nach fünf Tagen Reaktionszeit bei Raumtemperatur konnte durch Dünnschichtchromatographie und HPLC keine Produktbildung nachgewiesen werden. Der Einsatz von Dichlormethan als Lösungsmittel war ebenso erfolglos, wie die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 40°C. Ursache hierfür können die voluminösen Zyklohexylgruppen des Grubbs-Katalysators sein. Aufgrund sterischer Wechselwirkungen können die terminalen Olefinfunktionen zweier Bizyklen **37** nicht in räumlicher Nähe zum aktiven Katalysatorzentrum orientiert werden, wodurch die Metathesereaktion verhindert wird. Die Verwendung von dem Grubbs-Katalysator der 2. Generation scheint insofern nicht vielversprechender zu sein, als die Mesitylgruppen ebenfalls sterisch sehr anspruchsvoll sind. Problematisch ist außerdem, dass mit einer Mischung aus cis- und trans-Isomer zu rechnen ist, was die Ausbeute der Reaktion zusätzlich

Alternativ zur Kreuzmetathese bietet Verbindung **37** zusätzlich die Möglichkeit über die terminale Doppelbindung funktionalisiert zu werden. Beispielsweise kann durch Anti-Markovnikov-Addition von Wasser und anschließender Tosylierung in einem Click-Mechanismus ein dimerer Ether generiert werden (Abb. 4-33). Alternativ hierzu kann die olefinische Doppelbindung einerseits zum Alkin reduziert und andererseits zum terminalen Azid funktionalisiert werden. Nach einer 1,3-diploaren Zykloaddition kann unter milden Bedingungen irreversibel das 1,2,3-Triazol in einem Click-Mechanismus dargestellt.^[159]

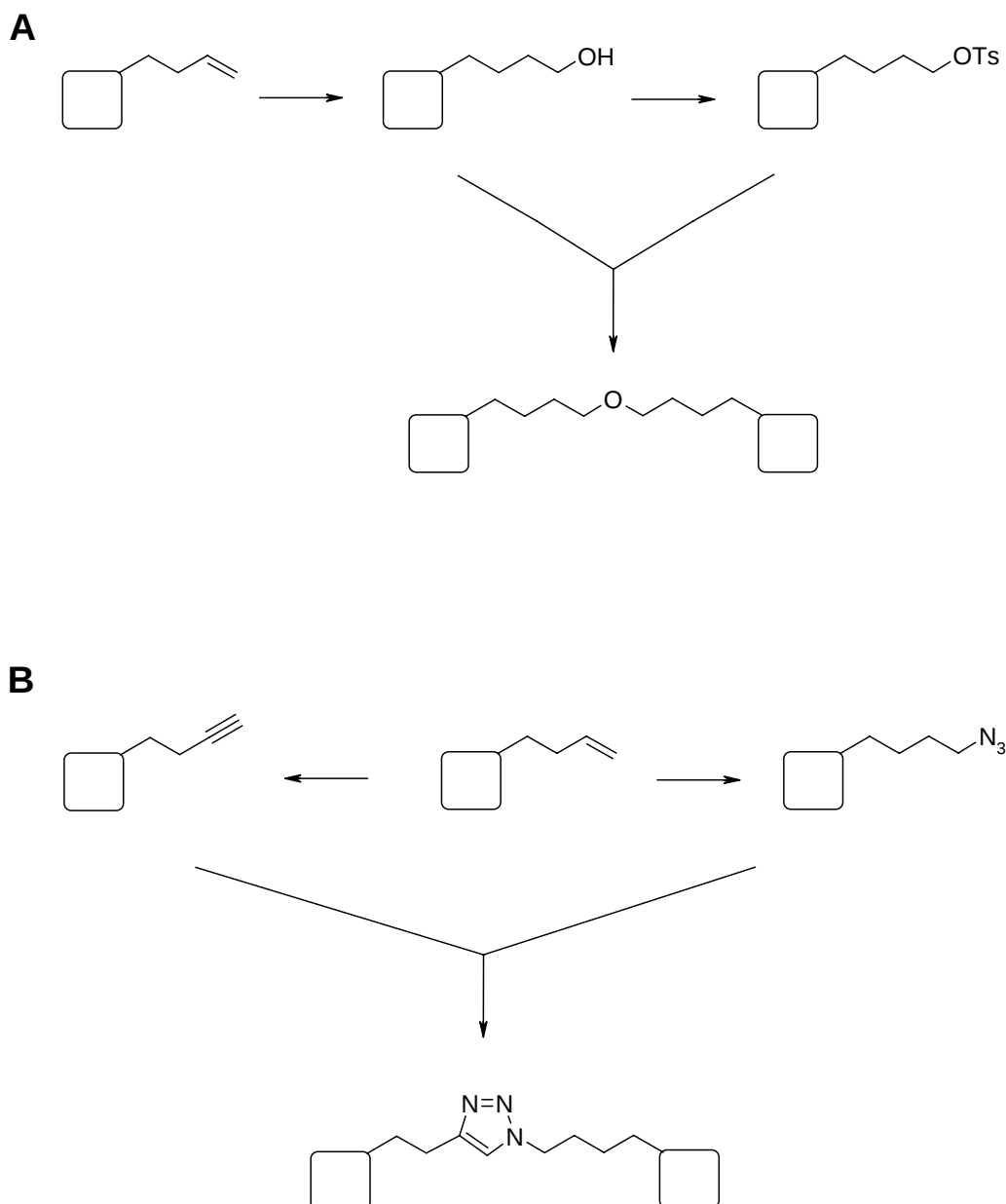


Abb. 4-33 Mögliche Dimerisierungsreaktionen von Verbindung **37**: Williams-Ether-Synthese (A), Zyклоaddition zum Triazol (B) (die Quadrate deuten das peptidische zyklische Rückgrat an).

4.3 Strukturuntersuchungen von Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Analoga

Repräsentativ für alle dargestellten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Analoga, werden die Struktureigenschaften der Verbindungen **23**, **24** und **26** diskutiert.

Für die Untersuchung der Konstitution der dargestellten Verbindungen in Lösung wurden die ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie eingesetzt. Aufgrund des rotationssymmetrischen Rückgrats unterscheiden sich die ^1H -NMR-Signale zwischen einheitlich und orthogonal substituierten Rückgratstrukturen.

Die Verbindungen **23** und **24** weisen eine C_2 -Symmetrie auf. Somit sind alle Protonen, die sich durch eine Drehung des Moleküls ineinander überführen lassen homotop zueinander und weisen deswegen einheitliche NMR-Signale auf. Anhand der Methylgruppen der Valine ist im ^1H -NMR-Spektrum ersichtlich, dass jeweils eine Methylgruppe eines Valins mit einer des anderen Valins homotop ist. Es ergeben sich folglich zwei Dubletts mit unterschiedlichen chemischen Verschiebungen (Abb. 4-34).

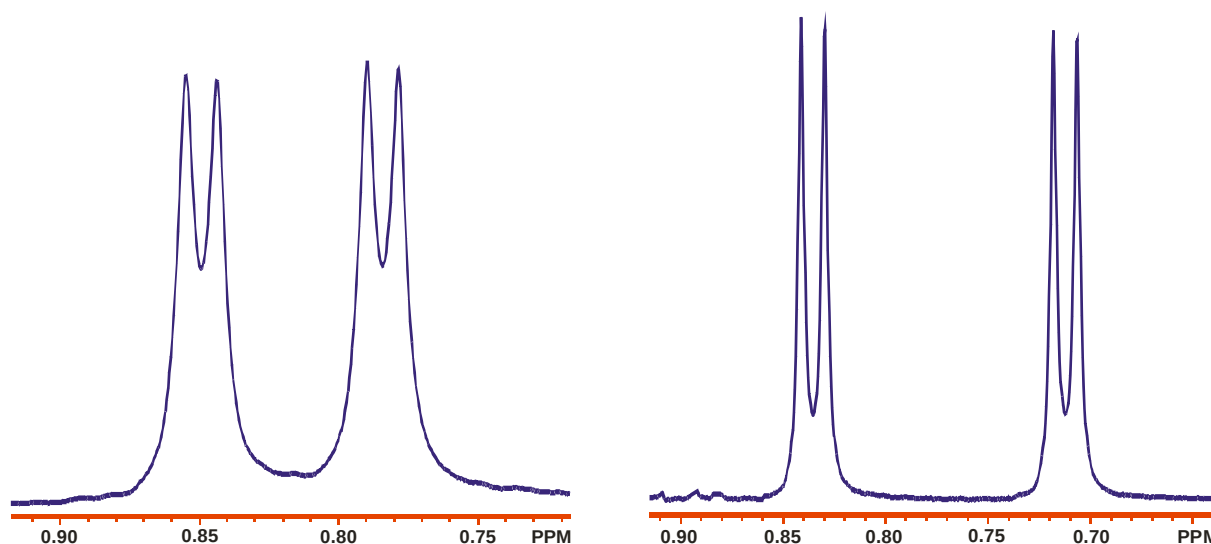


Abb. 4-34 ^1H -NMR-Signale der Valin- β -Methylgruppen (links: **24**; rechts: **23**).

Im Gegensatz hierzu zeigt das ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **26** vier Dublettsignale mit unterschiedlichen chemischen Verschiebungen, die jeweils von den

konstitutionell verschiedenen Methylgruppen der Valine verursacht werden (Abb. 4-35). Somit enthalten wie erwartet die orthogonal Nukleobasen-substituierten Verbindungen kein rotationssymmetrisches Symmetrieelement. Analoge Signalsätze werden bei den Acetylgruppen der Nukleobasen-modifizierten Essigsäuren und bei den Methylgruppen der Alanine beobachtet.

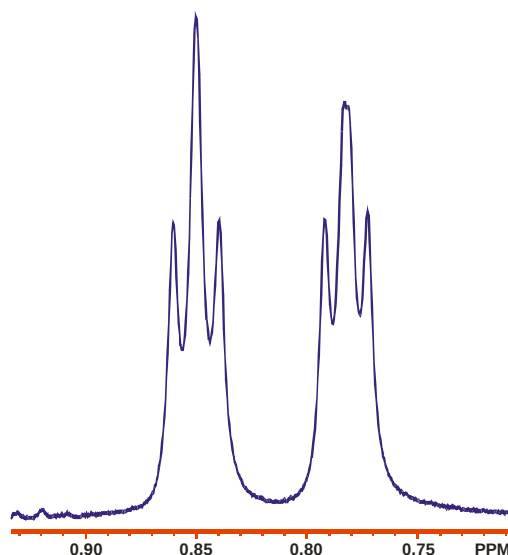


Abb. 4-35 ^1H -NMR-Signale der Valin- β -Methylgruppen von Verbindung **26**.

Konformationsuntersuchungen der dargestellten Verbindungen sind durch spektroskopische Methoden zugänglich. Da die heteroaromatischen Chromophore UV-Licht im Wellenlängenbereich von 220 bis 280 nm absorbieren, kann die CD-Spektroskopie zur Analyse der Struktur eingesetzt werden. CD-Messungen dienen in erster Linie der Konfigurations- und Konformationsanalyse chiraler Moleküle.^[160] Darüber hinaus können damit intermolekulare Wechselwirkungen untersucht werden. Anhand der Wechselwirkung chiraler Verbindungen mit zirkular polarisiertem Licht ist zwar nicht immer ein Abbild der Struktur zugänglich, jedoch sind Aussagen über das Vorhandensein einer höher geordneten Struktur möglich.

Untersuchungen von K. B. Lorenz zeigten im Fall von Adenin/Guanin-substituierten TANDEM-Derivaten schwache Absorptionsmaxima bei 225 nm sowie eine negative Elliptizität bei 200 nm, was auf eine deutliche Präorganisation schließen lässt. Im Gegensatz hierzu ergaben die CD-Spektren der hier vermessenen Cytosin/Cytosin-

bzw. Cytosin/Thymin-substituierten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Analoga nur sehr schwache Maxima und negative Elliptizitäten (Abb. 4-36). Da ein Wechsel vom Depsipeptid zum Peptid in einer zunehmenden Rigidität des Rückgrats resultiert, wäre eine zunehmende Präorganisation zu erwarten. Da die CD-Spektren dies jedoch nicht belegen, scheint der Einsatz von Pyrimidinbasen anstelle von Purinbasen einen Verlust an Vorfixierung zu induzieren, was durch eine erleichterte Rotation um die Bindungen zwischen Rückgrat und Chromophor zu erklären ist. Im Einklang hiermit zeigt das CD-Spektrum von **23** ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 238 nm, sowie eine negative Elliptizität bei 248 nm. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass der Ersatz von zwei Esterfunktionen im Rückgrat durch Amidfunktionalitäten keine Auswirkungen auf eine potenzielle Präorganisation der Chromophore in wässriger Lösung hat.

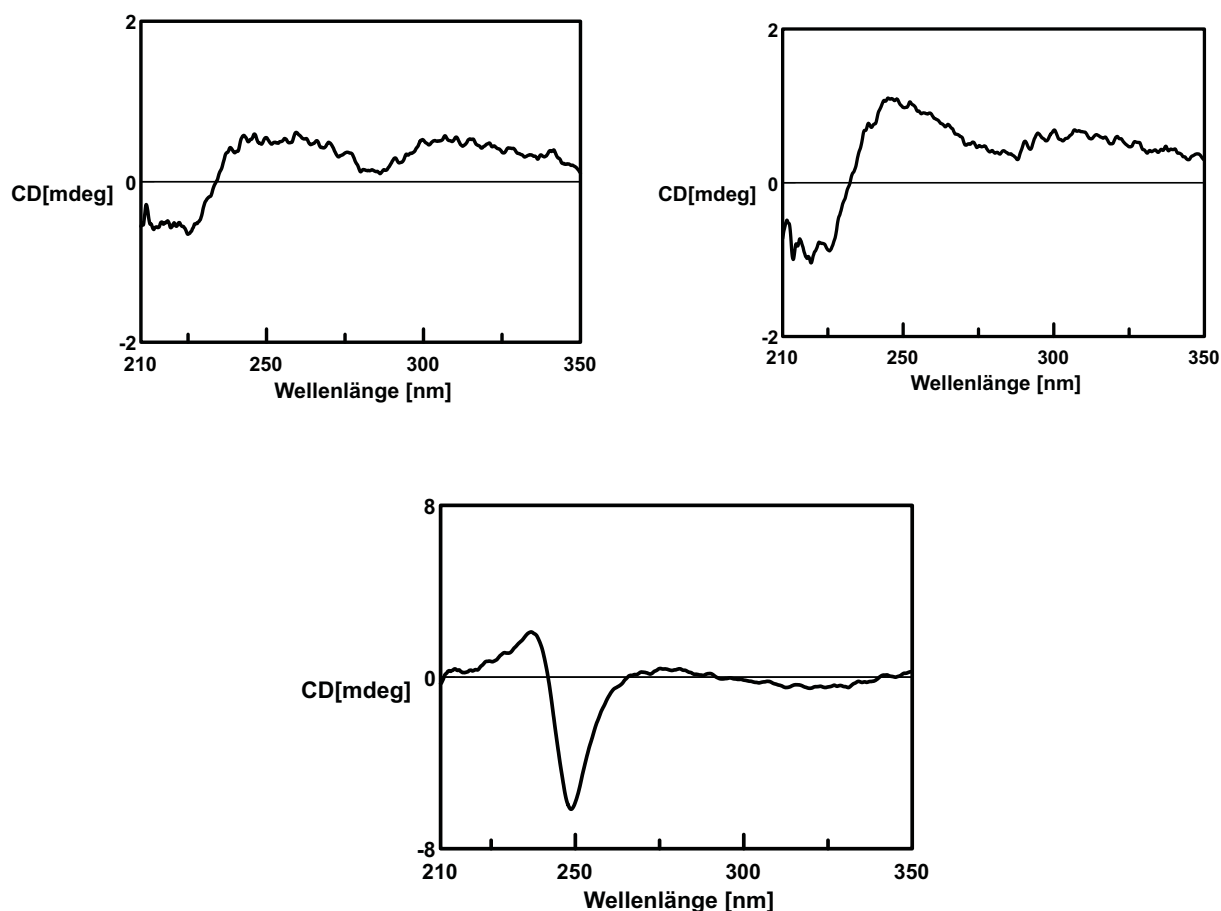


Abb. 4-36 CD-Spektren in wässriger Lösung (13 μmol) (linksoben: **24**; rechtsoben: **26**; unten: **23**).

Parallel zu den spektroskopischen Methoden in Lösung wurde versucht, die verschiedenen synthetisierten Verbindungen zu kristallisieren, um mit einer Röntgenstrukturanalyse die dreidimensionale Struktur zu ermitteln. Es wurden verschiedene Kristallisationsversuche im Rahmen von Screening-Methoden in wässrigen und organischen Medien unternommen und die Bedingungen bezüglich des pH-Werts, Salzkonzentrationen, Fällungsreagenzien und Temperatur optimiert.^[161] Hierbei wurden das Gasdiffusionsverfahren, die Hanging-Drop-Methode, die Sitting-Drop-Methode und Vial-Techniken eingesetzt. Alle Versuche waren bis heute nicht erfolgreich, nicht zuletzt wegen der schlechten Löslichkeit aller getesteten Verbindungen. Um die für eine Kristallisation optimale Konzentration einzustellen, musste stets TFA zugegeben werden, was zwar die Löslichkeit erhöhte, sich jedoch negativ auf den Kristallisationsprozess auswirkte. Von den bereits bekannten Chinoxalin-Antibiotika ist die schlechte Löslichkeit bekannt. Die Löslichkeit kann mit der Zugabe von DNA signifikant vergrößert werden. Durch eine Bindung an DNA können schlecht solvatisierte hydrophobe Molekülfragmente Wechselwirkungen mit DNA ausbilden und somit als Addukt mit DNA in Lösung gehen. Es wurden folglich auch die Wechselwirkungen der dargestellten Verbindungen in Anwesenheit von verschiedenen DNA-Sequenzen systematisch untersucht.

4.4 Wechselwirkungsstudien von Nukleobasen-substituierten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Derivaten mit DNA

Durch die Bindung von kleinen Molekülen an DNA werden die physikalischen Eigenschaften beider Bindungspartner signifikant verändert. Aufbauend hierauf ist ein weites Spektrum an Untersuchungsmethoden derartiger Wechselwirkungen etabliert: Neben der Bestimmung der Viskosität und des Sedimentationskoeffizienten, können auch die Schmelztemperatur von DNA, massenspektrometrische Daten, NMR-Techniken, sowie Absorptions- und Emmissionseigenschaften bestimmt werden.^[162] Bindungskonstanten und Bindungselektivitäten können darüber hinaus durch DNA-Footprinting-Experimente, Elektrophoresen und Verdrängung von fluoreszierenden

Interkalatoren untersucht werden.^[163-165] Keine Methode allein vermag sichere Aussagen über den Bindungsmechanismus zu liefern, sodass stets eine Kombination verschiedener Analytikmethoden zur Untersuchung angewendet werden muss. Die Substitution der Chinoxalin-Substituenten durch nicht-fluoreszierende kanonische Nukleobasen schränkt die Methodenauswahl bezüglich Absorptions- und Emmissionsmethoden ein und erschwert hierdurch eine systematische Untersuchung des Bindungsverhaltens.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wechselwirkungen mit DNA anhand temperaturabhängiger UV- und CD-Spektroskopie, Agarose- und Polyacrylamidelektrophoresen, sowie Fluoreszenz-Titrationsspektroskopie untersucht. Da noch keine Information über das Bindungsverhalten von demethylierten Azatriostin-Derivaten bekannt war, wurden als DNA-Doppelstränge zunächst Sequenzen ausgewählt, bei denen starke Bindungen zwischen Triostin A (GACGTC) und TANDEM (GATATC) beobachtet werden konnten. Es handelt sich hierbei um selbstkomplementäre DNA-Sequenzen, sodass keine stöchiometrischen Fehler bei der Zusammenfügung von Strang- und Gegenstrang erfolgen kann. Da langfristig jedoch ein systematischer Zugang zur Untersuchung der Sequenzselektivität beabsichtigt wurde, mussten auf nicht selbstkomplementäre DNA-Sequenzen verwendet werden. Hierfür wurden die gewünschten DNA-Sequenzen um terminale G-C-Paarungen verlängert. Durch die Ausbildung von stabilen Basenpaarungen dieser Nukleobasen wird die Ausbildung eines stabilen DNA-Doppelstrangs gewährleistet. Strang und Gegenstrang wurden ferner durch einen Loop, bestehend aus fünf Adeninen miteinander verbunden, sodass die Doppelstrangpaarung intramolekular verläuft (Abb. 4-37). Die Stöchiometrie von Strang und Gegenstrang beträgt somit stets 1:1. Gleichzeitig kann jede beliebige Basensequenz in das System eingebaut werden.



Abb. 4-37 Verwendete DNA-Sequenzen (**DNA1**: CGG ACG TCC AAA AAG GAC GTC CG; **DNA2**: CGG ATA TCC AAA AAG GAT ATC CG).

Die Anwendung aller oben aufgeführten Untersuchungsmethoden erforderte wässrige Pufferlösungen von DNA und DNA-Binder. Bei den verwendeten Puffern war darauf zu achten, dass Salzkonzentrationen deutlich unter 100 mM eingehalten werden, da sonst die intermolekularen nicht-kovalenten Wechselwirkungen von Bisinterkalator und DNA nicht ausgebildet werden können. Eine zu hohe Salzkonzentration sättigt die negativen Ladungen des DNA-Rückgrats ab und stabilisiert hierdurch die DNA.^[166-167] Eine zusätzliche Bindung durch nicht-kovalente Wechselwirkungen von kleinen Molekülen an diesen abgesättigten DNA-Komplex ruft somit keine signifikanten und messbaren Veränderungen hervor. Es wurde deswegen für die spektroskopischen Untersuchungen 2mM HEPES/NaOH-Puffer (10mM NaCl, pH 7.0) verwendet.^[35]

4.4.1 Bindungsstudien von Nukleobasen-substituierten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Derivaten mit DNA durch Gelelektrophorese

Moleküle mit mindestens einer Nettoladung bewegen sich im elektrischen Feld. Dieser Effekt wird bei der Elektrophorese zur Trennung von Makromolekülen wie Proteinen, RNA und DNA ausgenutzt. Die zu trennenden Verbindungen werden zwischen zwei Elektroden einer elektrischen Spannung ausgesetzt. Als Medium werden Gele eingesetzt, da diese im Gegensatz zu Flüssigkeiten keine Konvektionsströme aufweisen und hierdurch kein signifikanter Temperaturgradient im Medium beobachtet wird. Dies ist insofern von entscheidender Bedeutung, als die Temperatur direkt die Wanderungsgeschwindigkeiten der Verbindungen beeinflusst. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Verbindungen aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen durch das Gel. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt neben der elektrischen Feldstärke und der Nettoladung des Makromoleküls auch von der strukturellen Größe des Moleküls im Verhältnis zur Porengröße des Gels ab. Moleküle, die im Verhältnis zur Porengröße klein sind, wandern schneller durch das Gel als große Moleküle. Als Gele sind Polyacrylamid- und Agarosegele etabliert, da sie chemisch inert sind und sich leicht aus den polymertragenden Komponenten herstellen lassen.^[168] Die Sensitivität der Elektrophorese ist ausreichend hoch um strukturelle

Veränderungen durch unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten nachweisen zu können. Binden die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Analoga an DNA, sollte hierdurch unabhängig vom Bindungsmodus die Struktur des Komplexes verändert werden und somit eine von der isolierten DNA verschiedene Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld resultieren. Diese Veränderung würde bei einer Elektrophorese zur Bildung einer neuen Bande bei gleichzeitiger Abnahme der Bandenintensität von isolierter DNA führen.

Um qualitative Aussagen unabhängig von der DNA-Sequenz über das Bindungspotenzial der dargestellten Verbindungen mit doppelsträngiger DNA zu machen, wurde eine ausreichend lange DNA-Sequenz gewählt, die sehr viele unterschiedliche Bindungsstellen enthält. Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass bei potenzieller Bindungsaffinität, eine Bindung mit DNA beobachtet werden kann und diese nicht aufgrund einer einseitigen und eingeschränkten Auswahl von Bindungsregionen unterdrückt wird. Es wurde eine DNA-Sequenz aus dem Genom der λ -Bakteriophage, bestehend aus 200 Basenpaaren, für die Untersuchungen eingesetzt (Abb. 4-38).⁴

5' - CAT GCA TCT GTC GCA GTA GGA CTC ACG ACT GAT CTA GTC
GAC GTA GGT TTC TCG TTC AGC TTT TTT ATA CTA AGT TGG CAT
TAT AAA AAA GCA TTG CTT ATC AAT TTG TTG CAA CGA ACA GGT
CAC TAT CAG TCA AAA TAA AAT CAT TAT TTG ATT TCA ATT TTG
TCC CAC TCC CTG CCG CTG TCA TCA CGA TAC TGT GA -3'

Abb. 4-38 Verwendete DNA (**DNA3**), bestehend aus 200 Basenpaaren.

Die 200 Basenpaar lange doppelsträngige DNA wurde von Eduard Liebler im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Hans-Joachim Fritz durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die Polymerase-

⁴ Die DNA wurde dankenswerter Weise von Prof. Dr. Hans-Joachim Fritz, Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen, zur Verfügung gestellt.

Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine Methode, um DNA zu vervielfältigen, ohne dafür lebende Organismen zu verwenden.^[169] Während der Kettenreaktion wird die DNA durch das Enzym DNA-Polymerase kopiert. Normalerweise wird nur ein kleiner Teil eines langen DNA-Strangs durch PCR verdoppelt. Dieser Teil wird durch die Primer, kurze, künstliche DNA-Stücke von etwa 20-40 Basenpaaren Länge festgelegt, welche genau mit dem Anfang bzw. dem Ende des zu kopierenden Strangs übereinstimmen. PCR benötigt sehr wenig Ausgangsmaterial; in manchen Fällen genügt ein einziger DNA-Strang.

Für Untersuchungen von DNA-Sequenzen, die aus mehr als 100 Basenpaaren bestehen, lieferte der Einsatz von Agarose-Gelen die besten Ergebnisse (Abb. 4-39).

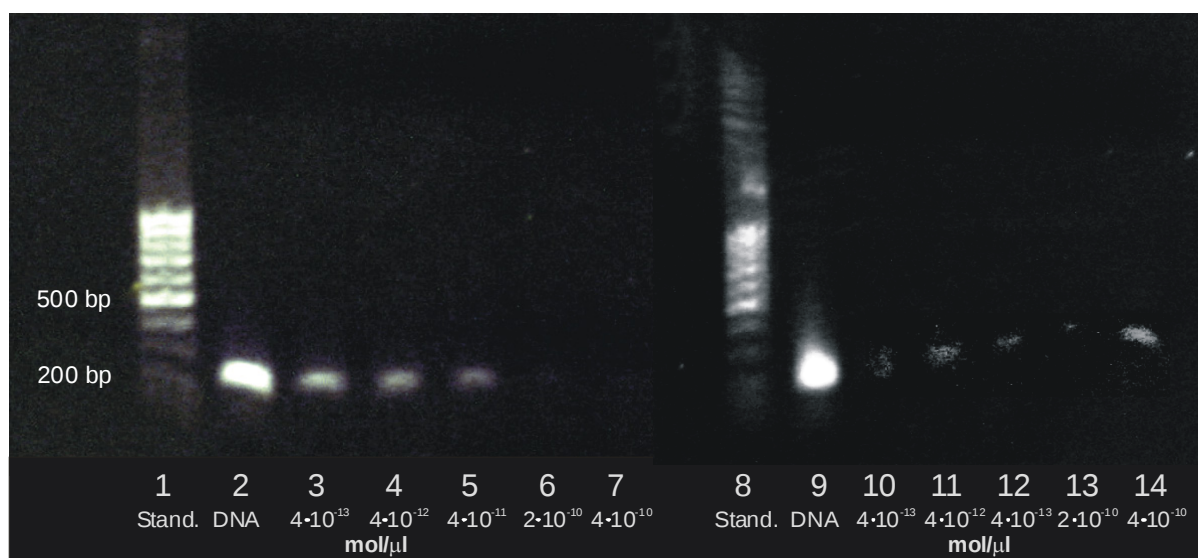


Abb. 4-39 Agarosegelelektrophoresen von **23** (links) und **24** (rechts) mit **DNA3**.

Die Spalten 1 und 8 bilden jeweils die Marker ab, deren Banden jeweils in 100er Basenpaarschritten DNA-Stränge von 200 bis 1000 Basenpaaren kennzeichnen. Beide Elektrophoresen zeigen die **DNA3** in den Taschen 2 und 9 als intensivste Banden. In den Taschen 3 bis 7 bzw. 10 bis 14 wurden die Konzentrationen von Des-*N*-Tetramethylazatriostin (**23**) (links) und Zweifach Cytosin-substituiertes Des-*N*-Tetramethylazatriostin (**24**) (rechts) zunehmend erhöht, wobei in den Taschen 3 und 10 die DNA-Binder im Verhältnis 1:1 zur DNA zugegeben wurden. Die Intensität der isolierten DNA-Bande ist im Fall von Verbindung **23** schon bei einer Stöchiometrie

von 1:1 signifikant gesunken. Mit zunehmender Konzentration des DNA-Binders wurde immer mehr DNA gebunden, wodurch die Intensität der Bande der isolierten DNA zunehmend sank. Ab einem Verhältnis von 1:500 kann keine **DNA3** nachgewiesen werden. Die Abnahme der Bandenintensität von **DNA3** lässt auf eine Bindung von Des-*N*-Tetramethylazatriostin an die DNA schließen. Die Bildung einer neuen Bindung wurde nicht beobachtet. Aufgrund vielfältiger Bindungsorte werden offensichtlich derart viele Produkte gebildet, dass ein Nachweis der gebildeten Komplexe nicht erfolgreich ist. Darüber hinaus kann davon ausgegangen werden, dass gleichzeitig mehrere Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Moleküle an einen DNA-Doppelstrang binden. Hierdurch wird die Anzahl der potenziell entstandenen Komplexe erhöht und somit deren Konzentration und Intensität erniedrigt. Beides kann den benötigten Überschuss von DNA-Binder zu DNA erklären. Im Fall von Cytosin-substituiertem Des-*N*-Tetramethylazatriostin (**24**) wurden analoge Beobachtungen gemacht, wenngleich die Abnahme der Bandenintensität von isolierter DNA schon bei einer Stöchiometrie von 1:1 noch größer war und sich mit zunehmendem Überschuss von DNA-Binder nicht mehr signifikant veränderte. Die zunehmende Bindungsaffinität kann möglicherweise auf die zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen oder einen veränderten Bindungsmodus zurückgeführt werden. Die Wechselwirkung mit DNA scheint auch hier unspezifisch zu sein, da die Bildung neuer Banden nicht nachgewiesen werden konnte.

Um Aussagen darüber zu machen, ob es eine DNA-Sequenzspezifität für die Bindung von Triostin A-Analoga gibt, wären Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen DNA-Bindern und kurzen DNA-Strängen nötig. Diese enthalten gut definierte Bindungsregionen, wodurch eine eindeutigere Zuordnung der Wechselwirkungen möglich wird. Es musste für kurze doppelsträngige DNA-Sequenzen auf die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) zurückgegriffen werden. Als DNA wurden die Loop-DNA's **DNA1** und **DNA2** verwendet (Abb. 4-37). Die durchgeführten Elektrophoresen zeigten sowohl im Fall für **DNA1** (Abb. 4-40), als auch bei der Verwendung von **DNA2** (Abb. 4-41) keine nachweisbaren Bindungen zwischen den getesteten Verbindungen Des-*N*-Tetramethylazatriostin (**23**) (links), Cytosin/Thymin-substituiertes Des-*N*-Tetramethylazatriostin (**26**) (Mitte) und Cytosin-substituiertes

Des-*N*-Tetramethylazatriostin (**24**) (rechts). Es wurde weder eine Reduzierung der Bandenintensität von isolierter DNA, noch die Bildung neuer Banden beobachtet.

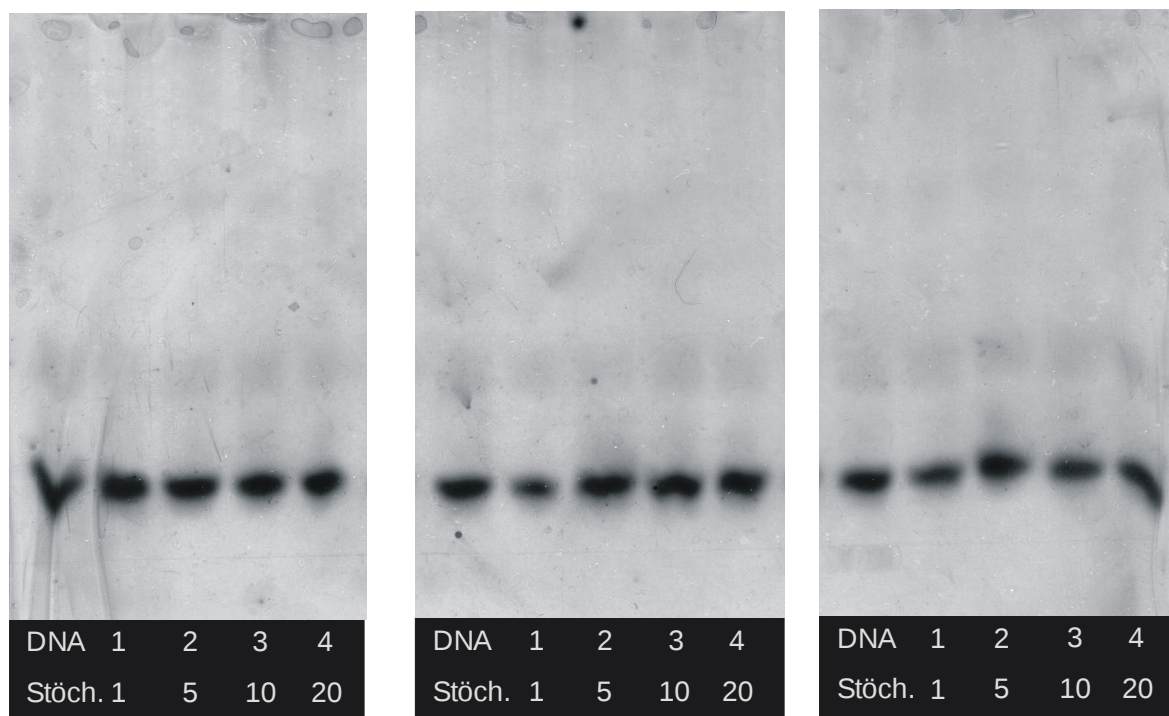


Abb. 4-40 Polyacrylamidgelelektrophoresen von **23** (links), **26** (Mitte) und **24** (rechts) mit **DNA1**.

Problematisch im Vergleich zur empfindlicheren Agarosegelelektrophorese erwies sich, dass alle zu testenden Verbindungen keine ausreichende Löslichkeit in wässrigen Puffersystemen aufwiesen. Es konnten lediglich 20fache Überschüsse der DNA-Binder im Vergleich zur DNA gelöst werden. Aufgrund der schwachen Wechselwirkung ist diese Konzentration unter Umständen nicht ausreichend, um genügend DNA zu binden, sodass dies analog zur Agarosegelelektrophorese in Form einer reduzierten Bandenintensität sichtbar würde.

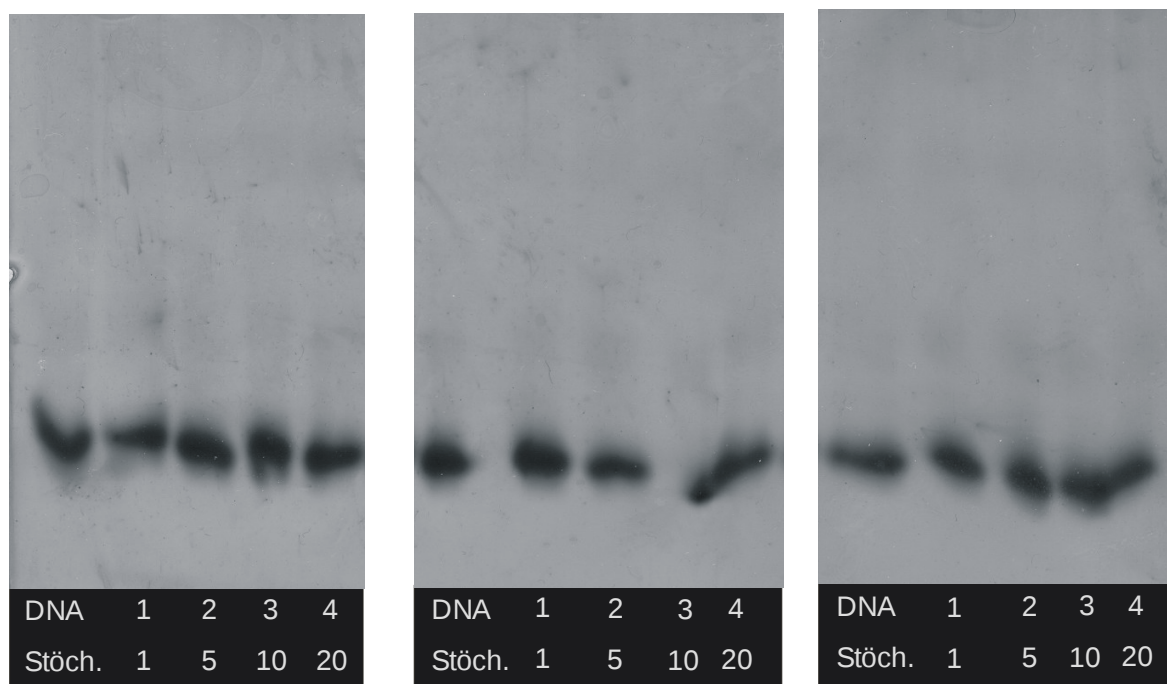


Abb. 4-41 Polyacrylamidgelelektrophoresen von **23** (links), **26** (Mitte) und **24** (rechts) mit **DNA2**.

Die DNA-Systeme **DNA1** und **DNA2** unterscheiden sich neben der Länge von **DNA3** auch in der Turn-Struktur, die aus der Sequenz aus fünf Adenin-Nukleotiden gebildet wird. Möglicherweise beeinflusst ein DNA-Turn in direkter Nachbarschaft zur Erkennungsregion die Struktur der helikalen DNA, wodurch die für eine Bindung erforderliche Konformation der DNA nicht ausgebildet werden kann.

Untersuchungen zur Bindungsaffinität aller Chinoxalin-Bisinterkalatoren zeigen neben der zu beobachteten Bindungselektivität, dass die Bindungsaffinität von den benachbarten Basenpaarungen signifikant beeinflusst wird. Dieses Ergebnis erhöht die Anforderungen, die eine Bindung an die Basensequenz stellt. Somit ist es möglich, dass die gewählte Basensequenz von **DNA1** und **DNA2** einen Bindungsnachweis durch Gelelektrophorese verhinderte.

Die Ergebnisse der Polyacrylamid- und der Agaroseelektrophorese legen nahe, dass die getesteten Verbindungen an DNA binden, wenngleich ein Nachweis an kurzen DNA-Doppelsträngen nicht erbracht werden konnte. Dies kann jedoch neben praktischen Gründen wie mangelnder Löslichkeit der DNA-Binder, falsche Basensequenz und Einfluss des Loops auch als Indiz für übergeordnete Strukturen

gewertet werden, die sich erst mit zunehmender DNA-Länge ausbilden können und Einfluss auf das Bindungsverhalten der getesteten Systeme haben. Diese zu quantifizieren und zu spezifizieren gelang bisher durch Untersuchungen durch Gelelektrophorese nicht.

4.4.2 Bindungsstudien von Nukleobasen-substituierten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Derivaten mit DNA durch UV-Spektroskopie

Die Nukleobasen von DNA-Doppelsträngen absorbieren UV-Licht und können somit durch UV-Spektroskopie untersucht werden. Die Bindung von zwei DNA-Einzelsträngen durch Wasserstoffbrückenbindungen und auftretende Basenstapelungen haben direkten Einfluss auf den elektronischen Zustand der beteiligten Nukleobasen. Diese elektronische Veränderung kann durch die Aufnahme von UV-Spektren nachgewiesen werden.^[170] Zur Bestimmung von Doppelstrangstabilitäten und Strukturveränderungen von DNA ist die temperaturabhängige UV-VIS-Spektroskopie etabliert. Bei dem Aufwinden des Doppelstrangs, also dem Übergang vom Doppel- zum Einzelstrang, steigt die gemessene Extinktion sigmoid an (Hyperchromie), sodass der Wendepunkt der Kurve als Schmelztemperatur definiert werden kann. Bei der Schmelztemperatur bilden die Stränge ein thermodynamisches Gleichgewicht, indem 50 % dissoziierte und 50 % nichtdissoziierte Stränge vorliegen. Die Schmelztemperatur ist somit ein direktes Maß für die Stabilität des gepaarten Duplexes^[171,172] Eine Wechselwirkung eines DNA-bindenden Moleküls mit DNA kann die Doppelstrangstabilität beeinflussen, was durch temperaturabhängige UV-Spektren nachgewiesen werden kann. Es wurden temperaturabhängige UV-Messungen der Verbindungen **23**, **24** und **26** jeweils in Gegenwart der DNA-Sequenzen **DNA1** und **DNA2** durchgeführt.

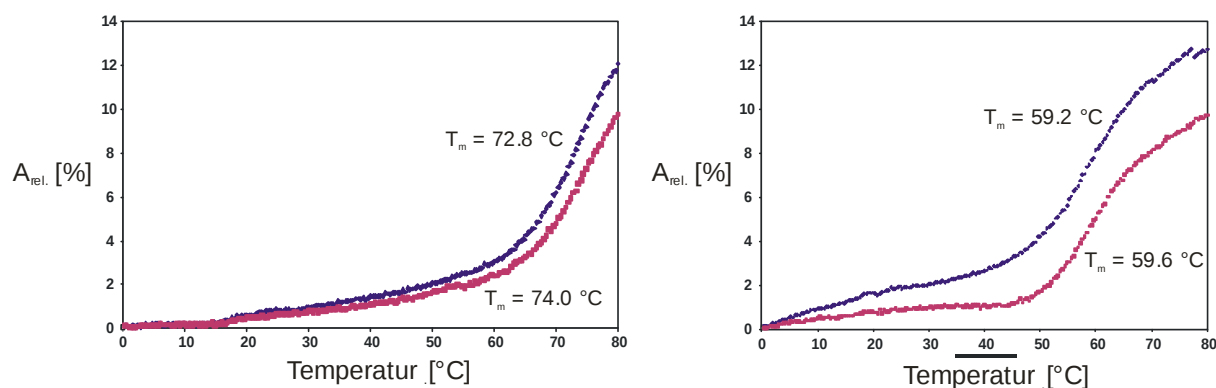


Abb. 4-42 UV-Schmelzkurve von Verbindung **23** in 2mM HEPES/NaOH-Puffer (10mM NaCl, pH 7.0) in Kombination mit **DNA1** (links) und **DNA2** (rechts). Dargestellt sind jeweils die Schmelzkurven der DNA-Oligomere und die Schmelzkurve aus DNA und DNA-Binder (Stöchiometrie DNA:DNA-Binder = 1:5).

Es wurden für Mischungen aus Verbindung **23** und den DNA-Sequenzen **DNA1** und **DNA2** selbst bei fünffachem Überschuss von DNA-Binder nur Schmelztemperaturerhöhungen von 1.2 °C bzw. 0.4 °C gemessen (Abb. 4-42). Dies weist auf eine schwache stabilisierende Wechselwirkung zwischen den dargestellten Verbindungen und den DNA-Doppelsträngen hin. Die hiermit einhergehende leichte Abnahme der Absorption wird bereits bei temperaturabhängigen UV-Messungen von TANDEM und Triostin A beobachtet.^[62,80] Die Interkalation in den DNA-Doppelstrang bedingt eine Zunahme an van-der-Waals-Wechselwirkungen bei gleichzeitiger Abnahme der Absorption. Der repräsentative Vergleich der Schmelzkurven der Verbindungen **23**, **24** und **26** in Kombination mit **DNA1** zeigt, dass sich die Schmelztemperaturen aller getesteten Systeme weitgehend entsprechen (Abb. 4-43).

Genaue Aussagen über den Wechselwirkungsmechanismus lassen die UV-Messungen nicht zu. Die schwache Erhöhung der Schmelztemperatur, die Abnahme der Hyperchromizität, sowie der identische Schmelzkurvenverlauf aller getesteten Systeme legen jedoch eine schwache unspezifische stabilisierende Wechselwirkung mit DNA nah.

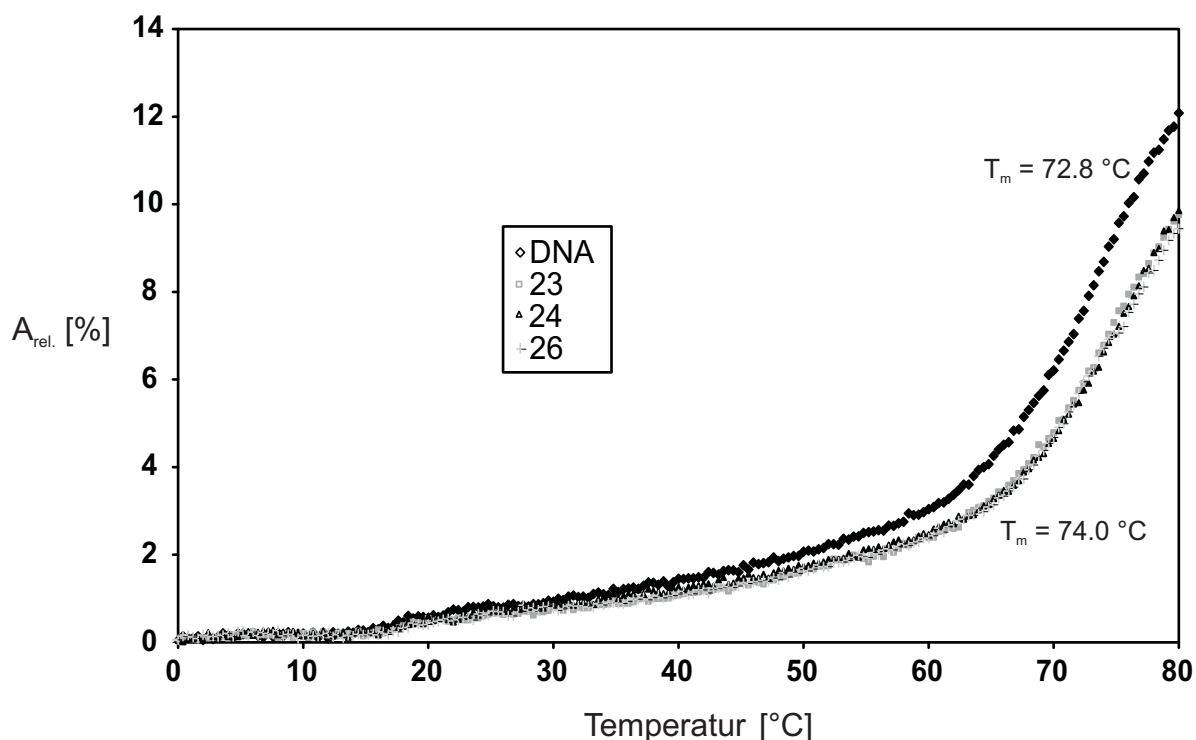


Abb. 4-43 UV-Schmelzkurven DNA1 in 2mM HEPES/NaOH-Puffer (10mM NaCl, pH 7.0) in Kombination mit Des-*N*-Tetramethylazatriostin (**23**), Cytosin-substituiertes Des-*N*-Tetramethylazatriostin (**24**), und Cytosin/Thymin-substituiertes Des-*N*-Tetramethylazatriostin (**26**). Dargestellt sind jeweils die Schmelzkurven isolierter DNA und die Schmelzkurve aus DNA und DNA-Binder (Stöchiometrie DNA:DNA-Binder = 1:5).

4.4.3 Bindungsstudien von Nukleobasen-substituierten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Derivaten mit DNA durch CD-Spektroskopie

Die Zirkulardichroismus-Spektroskopie stellt ein wichtiges Verfahren dar, mit dem sich sekundäre Strukturen und ihre Beteiligung am Aufbau der räumlichen Gestalt von Makromolekülen bestimmen lassen.^[173] Es basiert auf der Veränderung polarisierten Lichts an chiralen Verbindungen. Die CD-Spektroskopie nutzt dabei die unterschiedliche Interaktion der links- und der rechtspolarisierten Komponente des Lichts mit Chiralitätszentren und axialchiralen Symmetrieeinheiten aus. Das elliptisch polarisierte Licht, das die Probe verlässt, kann in Abhängigkeit von dessen Wellenlänge gemessen werden. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie können

Informationen zur relativen Verteilung von Sekundärstrukturen sowie Veränderungen bei der Bindung eines Liganden bestimmt werden. Es wurden temperaturabhängige CD-Spektren für Des-*N*-Tetramethylazatriostin (**23**), Cytosin-substituiertes Des-*N*-Tetramethylazatriostin (**24**) und Cytosin/Thymin-substituiertes Des-*N*-Tetramethylazatriostin (**26**) jeweils mit den DNA-Sequenzen **DNA1** und **DNA2** aufgenommen. Es wurden CD-Spektren jeweils von isolierter DNA, nur vom DNA-Binder und einer Kombination von DNA und DNA-Binder in der Stöchiometrie 1:5 gemessen und miteinander verglichen. Verbindung **23** weist positive Maxima bei 240 nm und 278 nm und eine negative Elliptizität bei 249 nm auf (Abb. 4-44). Es kann somit auf eine signifikante Präorganisation in wässriger Lösung geschlossen werden. Die Verbindungen **24** und **26** weisen hingegen kaum CD-Effekte auf (Abb. 4-45). Die CD-Kurvenverläufe der Kombinationen aus DNA und DNA-Bindern unterscheiden sich signifikant von denen der DNA, was auf eine Konformationsänderung der DNA durch Bindung mit den DNA-Bindern schließen lässt. Zwar unterscheiden sich die Maxima nicht bezüglich der Wellenlänge (220 nm und 276 nm), jedoch setzen sich die CD-Kurven der Kombinationen aus DNA und DNA-Binder nicht additiv aus den einzelnen Komponenten zusammen. Die gemessenen Absorptionen der Komplexe aus DNA und DNA-Bindern weisen stets niedrigere Werte als die von DNA auf (Abb. 4-44, Abb. 4-45).

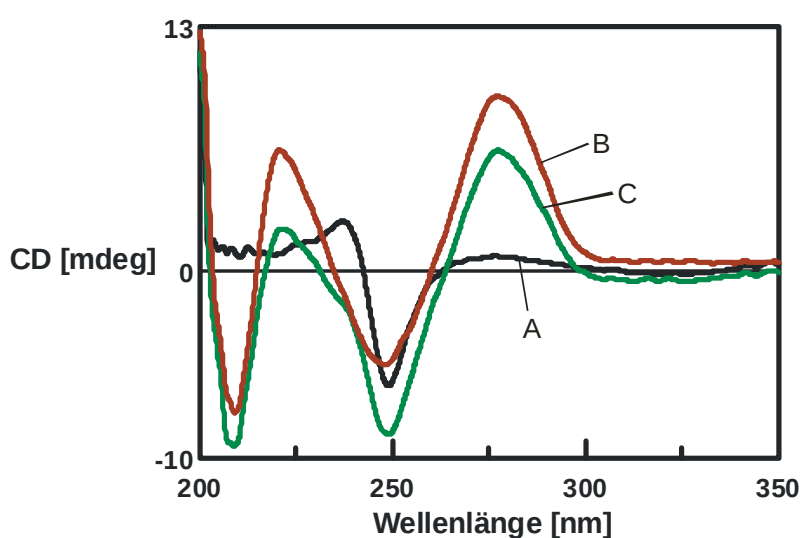


Abb. 4-44 CD-Spektren von Verbindung **23** (A), DNA1 (B) und einer Kombination von **23** und **DNA1** (C) bei 0°C.

Die CD-spektroskopischen Untersuchungen legen folglich eine schwache Bindung mit DNA nahe, die die Konformation der DNA nur unwesentlich beeinflusst. Über Sequenzspezifitäten und Bindungsmechanismen mit DNA können aufbauend auf den erhobenen Daten keine Aussagen getroffen werden.

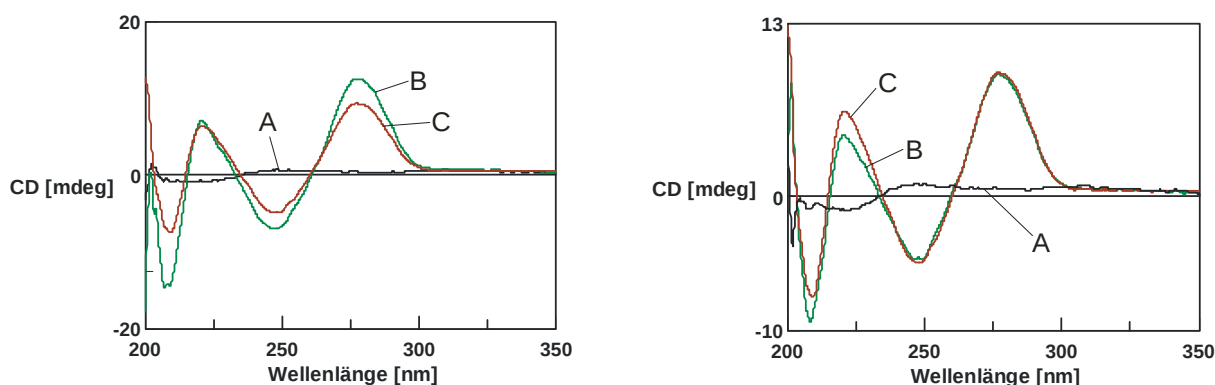


Abb. 4-45 links: CD-Spektren von Verbindung **24** (A) , **DNA1** (B) und einer Kombination von Verbindung **24** und **DNA1** (C); rechts: CD-Spektren von Verbindung **26** (A), **DNA1** (B) und einer Kombination von Verbindung **26** und **DNA1** (C). Alle Spektren wurden bei 0°C aufgenommen.

4.4.4 Bindungsstudien von Nukleobasen-substituierten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Derivaten mit DNA durch Fluoreszenz-Spektroskopie

Ethidiumbromid kann als exzellenter Interkalator sequenzunabhängig in DNA interkalieren.^[174] Hierbei wird in jede zweite Basenpaarung ein Ethidiumbromidmolekül eingelagert, sodass das Verhältnis von Anzahl der Basenpaarungen und Ethidiumbromid 2:1 beträgt. Ethidiumbromid weist in Lösung keine fluoreszierenden Eigenschaften auf. Im Fall der Interkalation wird Fluoreszenz beobachtet. Die FID-Technik (*fluorescent intercalator displacement*) nutzt diesen Effekt bei der Bestimmung von Bindungsaffinitäten, Sequenzselektivitäten und Bindungsstöchiometrien aus.^[165,175] Durch die Absättigung von DNA mit Ethidiumbromid wird eine maximale Fluoreszenz gemessen, da maximale Interkalation erreicht wird. Durch sukzessive Zugabe von einem potenziellen DNA-

Binder werden zunehmend interkalierende Ethidiumbromidmoleküle aus der DNA verdrängt, wodurch die gemessene Fluoreszenz sinkt. Die Verdrängung von Ethidiumbromid kann sowohl auf eine konkurrierende Interkalation des DNA-Binders, als auch auf eine Konformationsänderung der DNA zurückgeführt werden, in der lokal keine Interkalation von Ethidiumbromid möglich ist. Wird die Abnahme der gemessenen Fluoreszenz in Abhängigkeit zur zugegebenen Menge an DNA-Binder in Relation gesetzt können hierdurch Bindungsaffinitäten von verschiedenen DNA-Bindern quantifiziert und verglichen werden.

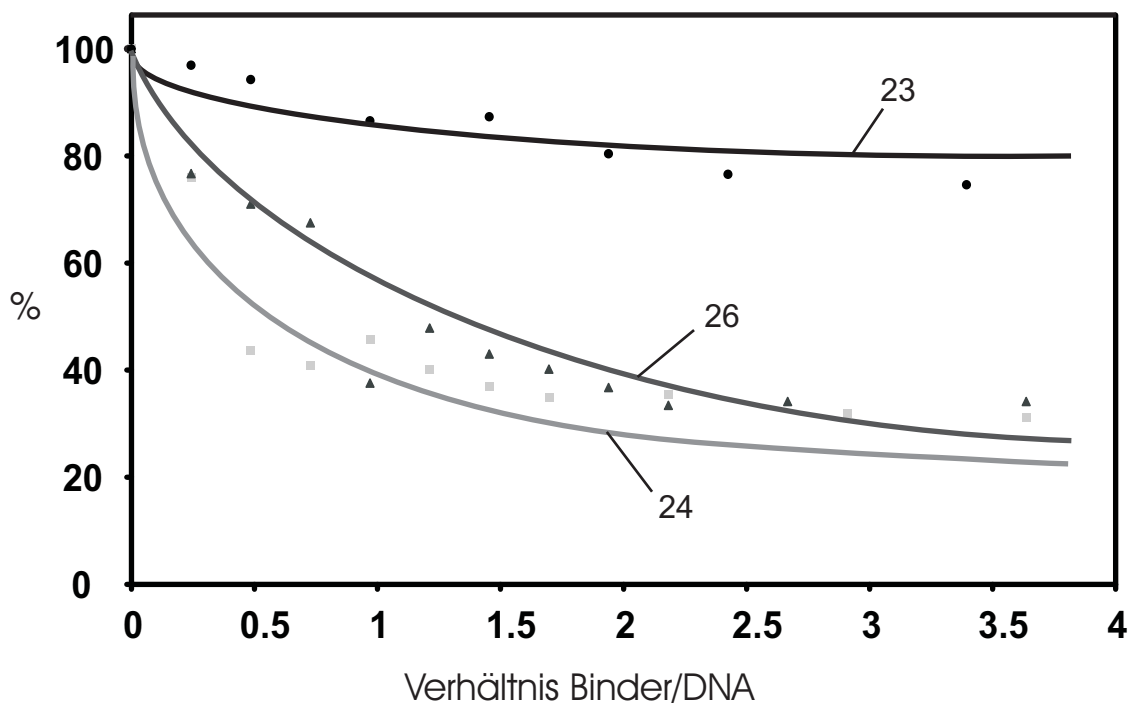


Abb. 4-46 Fluoreszenzabnahme bei Titration von **DNA1** durch Zugabe der DNA-Binder **23**, **24** und **26**.

Representativ für die Wechselwirkungen der synthetisierten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Derivate wird die gemessene Fluoreszenz in Abhängigkeit der zugegebenen Mengen der Verbindungen **23**, **24** und **26** zu **DNA1** dargestellt (Abb. 4-46). Zwar weisen alle Verbindungen bei sukzessiver Zugabe von DNA-Bindern eine Abnahme in der Fluoreszenz auf, jedoch unterscheiden sich die getesteten Systeme signifikant im Ausmaß der Fluoreszenzreduktion. Während bei Verbindung **23** nur

eine Abnahme der Fluoreszenz von bis zu 20 % beobachtet wird, sinkt die Fluoreszenz bei den Nukleobasen-funktionalisierten Verbindungen **24** und **26** um etwa 70 %. Da die Abnahme der Fluoreszenz linear mit dem prozentualen Anteil von substituierten Ethidiumbromid-Molekülen aus der DNA korreliert, kann aus den Grenzwerten, denen sich die dargestellten Kurvenverläufe asymptotisch annähern, auf die Bindungsaffinität geschlossen werden. Verbindung **23** weist folglich im Vergleich zu den Verbindungen **24** und **26** eine erheblich geringere Bindungsaffinität auf. Aufgrund der begrenzten Interkalationskapazität von DNA – Verhältnis DNA/Interkalator 2/1 – stellt sich ein Gleichgewicht zwischen DNA-Komplexen mit Ethidiumbromid bzw. Azatriostin-Derivat ein, das im Fall von **23** deutlich auf der Seite des Ethidiumbromid/DNA-Komplexes liegt. Die Verbindungen **24** und **26** unterscheiden sich hinsichtlich des asymptotischen Grenzwerts nicht signifikant. Jedoch reduziert Verbindung **24** die Ausgangsfluoreszenz um 50 % schon bei der Zugabe von ca. 0.5 Äquivalenten DNA-Binder im Verhältnis zur DNA. Eine Halbierung der Fluoreszenz erfolgt bei **26** erst nach Zugabe von ca. 1.3 Äquivalenten. Die Wahl der an das Azatriostinrückgrat angehängten Nukleobasen scheint keinen entscheidenden thermodynamischen Einfluss bei der Zugabe eines Überschusses von DNA-Binder zu haben. Bei Stöchiometrien unter zwei Äquivalenten weist hingegen Verbindung **24** eine etwas höhere Bindungsaffinität als Verbindung **26** auf. Ursache hierfür könnte das unterschiedliche Wasserstoffbrückenbindungsmuster sein, das beide Moleküle ausbilden können.

Problematisch bei der Interpretation von Messungen Fluoreszenzspektroskopischer Titrations sind die strukturell veränderten DNA-Systeme, mit denen die zu testenden Verbindungen wechselwirken und hierdurch eingelagerte Ethidiumbromid-Interkalatoren aus der DNA substituieren. DNA wird durch die Interkalation von Ethidiumbromid aufgewunden und verändert hierdurch die dreidimensionale Struktur. Die veränderte Oberfläche beeinflusst direkt die Struktur von Bindungsregionen, wodurch die Ergebnisse vor dem Hintergrund zu beobachtender Sequenzselektivitäten sorgfältig zu prüfen sind. Insofern können die Ergebnisse aus derartigen Messungen nur Indizien auf eine Wechselwirkung mit DNA liefern und folglich nur die Ergebnisse anderer analytischer Techniken ergänzen.

4.4.5 Ergebnisse der Bindungsstudien

Alle durchgeführten Bindungsstudien weisen auf eine schwache Bindung von Nukleobasen-substituierten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Derivaten, sowie von Des-*N*-Tetramethylazatriostin mit DNA hin. Agarosegelelektrophoresen belegten Bindungsaffinitäten bei doppelsträngiger DNA, die aus 200 Basenpaaren besteht. Da bei kurzen DNA-Strängen keine Wechselwirkungen mit Polyacrylamidgelelektrophoresen nachgewiesen werden konnten, korreliert die Bindungsaffinität möglicherweise mit der Länge der DNA. CD-spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass Bindungen mit DNA die Konformation der DNA nur unwesentlich verändern. Diese Beobachtung wurde in temperaturabhängigen UV-Messungen bestätigt. Fluoreszenz-Messungen unterstrichen die beobachtenden Bindungsaffinitäten.

5 Zusammenfassung

Spezifische Wechselwirkungen von kleinen Molekülen mit DNA spielen in der Natur eine wichtige Rolle. Durch die Synthese von Verbindungen, die sequenzspezifisch mit DNA interagieren, können die regulatorischen Prozesse der Proteinsynthese entscheidend gestört und beeinflusst werden.

Eine wichtige Klasse von DNA-bindenden Naturstoffen stellen die Vertreter der Chinoxalin-Antibiotika dar. Ursache für deren zytotoxische Aktivität ist der strukturell identische Aufbau, der in hoher Bindungsaffinität und Sequenzspezifität resultiert. Ein peptidisches starres Grundgerüst, bestehend aus 8-10 Aminosäuren, präorganisiert zwei aromatische Chinoxalin-Systeme parallel in einem Abstand von 10.5 Å. Die Wechselwirkung mit DNA erfolgt über die kleine Furche: während das peptidische Rückgrat sequenzspezifisch Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Bindungen mit dem DNA-Rückgrat und den Basenpaarungen ausbildet, interkalieren die beiden Chromophore in die DNA, indem sie zwei Basenpaare überbrücken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausgehend von Triostin A Modellsysteme entwickelt, deren aromatische Chinoxalin-Systeme durch kanonische Nukleobasen substituiert sind. Diese Systeme weisen neben einer veränderten Bindungsaffinität auch eine potenziell veränderte Bindungsselektivität auf und können dadurch wertvolle Informationen zum Verständnis des Wechselwirkungsmechanismus mit DNA liefern. Darüber hinaus können Nukleobasen durch ihre zahlreichen Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren neben der kleinen Furche auch über die große Furche, durch Interkalation oder an Basenfehlstellen binden.

Umfangreiche Untersuchungen zur Synthese und Wechselwirkung mit DNA wurden zu Triostin A-analogen Systemen durchgeführt, die im Methylierungsgrad und der Auswahl der Chromophore variieren. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde mit der Klasse der Azatriostine eine neue Gruppe von Triostin A-analogen Bisinterkalatoren erschlossen. Diese verfügen über ein vollständig peptidisches Rückgrat, das zusätzliche Bindungseinheiten gegenüber dem Depsipeptid aufweist. Um den Zugang zu einer Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen zu gewährleisten, wurde in einem konvergenten Ansatz zunächst das Rückgrat mittels moderner

Festphasensynthese als linearer Vorläufer aufgebaut. Durch nachfolgende Zyklisierungsreaktionen konnte das bizyklische Rückgrat sowohl mit einheitlichen Schutzgruppen als auch in einem orthogonalen Ansatz mit unterschiedlichen Schutzgruppen erhalten werden. Nach selektiver Entschützung des Rückgrats konnten verschiedene Nukleobasen-substituierte Essigsäure-Derivate über Amidfunktionen mit den α -Aminofunktionen der Diaminopropionsäuren des Rückgrats kovalent verknüpft werden.

Die Strukturen aller dargestellten Nukleobasen-substituierter Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Derivate wurden durch NMR- und CD-Spektroskopie untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Vororganisation der Nukleobasen, wodurch die Systeme zur Wechselwirkung mit DNA befähigt sein sollten. Untersuchungen zur Bindungsaffinität und –selektivität wurden mit langer (200 Basenpaare) und kurzer (9 Basenpaare) doppelsträngiger DNA durchgeführt. Da nur die Kombination verschiedener Analytikmethoden Informationen zum Bindungsverhalten von kleinen Molekülen mit DNA liefern, wurden neben Kokristallisationsversuchen auch Polyacrylamid- und Agarosegelelektrophoresen, sowie CD-, UV- und Fluoreszenzspektroskopische Methoden eingesetzt und auf ihre Temperaturabhängigkeit überprüft. Hierbei wurden für alle Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Derivate schwache Bindungsaffinitäten mit DNA nachgewiesen.

Um die Bindungsaffinität zu erhöhen, sollte die Bindungsregion der Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Derivate vergrößert werden. Hierfür wurde eine Synthese von Homoallylglycin entwickelt, das eine Seitenkette mit terminalem Olefin aufweist. Durch Inkorporation dieser Aminosäure in das Azatriostin-Rückgrat und folgender doppelter Zyklisierung konnte ein Rückgrat synthetisiert werden, das über die Doppelbindung chemisch dimerisiert werden sollte. Erste Versuche zur Dimerisierung mittels Kreuzmetathese waren nicht erfolgreich. Vielseitige Möglichkeiten, wie eine Funktionalisierung des Olefins zum terminalen Alkohol und anschließender Dimerisierung zum symmetrischen Ether stehen noch aus.

6 Summary

Specific interactions of small molecules with DNA play a major role in nature. The sequence-specific interaction of natural products with DNA can affect the regulatory processes, by blocking both transcription and translation resulting in antibiotic and cytotoxic activity.

One of the most widely studied members of DNA binding natural products is the family of quinoxalin antibiotics. The cytostatic effect originates in the sequence-specific binding to double-stranded DNA. Sequence specificity is derived from hydrogen bonding of the peptide scaffold within the DNA minor groove as well as from stacking interaction with nucleobases. The rigid peptidic backbone, consisting of 8-10 amino acids, preorganizes the attached quinoxalin intercalators in a parallel orientation with a distance of approximately 10.5 Å, which favors the binding of double-stranded DNA via bisintercalation in the minor groove spanning a dinucleotide. The complex interplay of hydrogen bonds, van-der-Waals- and stacking interactions results in a high binding affinity and sequence selectivity.

In this work for the first time the bicyclic peptidic core structure of des-*N*-tetramethylazatriostin was prepared by solid-phase peptide synthesis (SPPS). Furthermore, in addition to the modification of the backbone variations of the quinoxaline chromophores were addressed. By covalently linking nucleobases instead of quinoxalines to the bicyclic scaffold, analogs of the natural product triostin A have been developed, bearing additional hydrogen bonding donor/acceptor-functionalities. This modification paves the way to different binding affinities as well as various binding selectivities and allows deep insight into the mechanisms of interaction methodology with DNA.

Extensive studies on the synthesis and interaction modes of triostin A analogs with DNA have been conducted so far, diversifying the rate of methylation of incorporated amino acids and the variety of attached chromophores. Here, a new branch of triostin A analogues, the group of azatriostins, has been developed. Azatriostins consist of a complete peptidic backbone, containing additional possibilities to form hydrogen bonds in comparison to the depsipeptide triostin A. For assuring an access to

the synthesis of various des-*N*-tetramethylazatriostin-analogues, a bicyclic scaffold was synthesized that can be modified with diverse nucleobase-bearing moieties at late stage. The linear precursor of the peptidic backbone was built up by solid-phase peptide synthesis. The bicyclic scaffold was generated by successive cyclization reactions in solution. By using an orthogonal protecting group strategy, backbone structures bearing identical as well as different protecting groups have been accessible. After selective deprotection various nucleobase-modified acetic acids have been covalently attached to the exocyclic α -aminogroups of diaminopropionic acids of the peptidic backbone via amid functionalities.

The structures the developed nucleobase-substituted des-*N*-tetramethylazatriostin-analogues were studied by NMR- and CD-spectroscopy. Spectra proved a significant preorganization of the nucleobases enabling the model systems to interact with DNA. Studies on binding affinities and binding selectivities have been accomplished by long double-stranded DNA (200 basepairs), as well as short double-stranded DNA (9 basepairs). For analyzing the interaction mode of small molecules with DNA only a combination of different analytical techniques reveals information about binding properties. Cocrystallization of triostin A analogues with DNA were investigated next to CD-, UV- spectroscopy and fluorescence spectroscopical methods. Additionally, DNA binding studies were performed via agarose and polyacrylamid gel electrophoresis. The influence of temperature was systematically examined. The nucleobase-substituted des-*N*-tetramethylazatriostin-analogues showed various binding affinities to double-stranded DNA. So far binding studies did not reveal the exact mechanism of DNA-binding.

For increasing binding affinity the recognition site of des-*N*-tetramethylazatriostin-analogs should be extended. A synthesis of homoallylglycin was developed, containing a side chain with a terminal double bond. By incorporation of this unnatural amino acid into the azatriostin-backbone followed by successive cyclization steps, a backbone structure was developed, which might be dimerized. First attempts of cross metathesis have not been successful. A variety of alternatives, e.g. dimerization by Williamson-ether-synthesis of the corresponding alcohol are still under investigation.

7 Experimentaltteil

7.1 Allgemeine Arbeitstechniken

7.1.1 Präparative Arbeitstechniken

Reagenzien

Die verwendeten Polystyrolharze wurden von der Firma *Novabiochem* erworben, die Peptidkupplungsreagenzien von *IRIS Biotech* und *Applied Biosystems*. Die Aminosäurederivate wurden von den Firmen *Advanced ChemTech*, *Bachem*, *Fluka*, *Novabiochem* oder *Senn Chemicals* bezogen. Alle anderen Reagenzien stammen von den Firmen *Fluka*, *Sigma-Aldrich*, *Lancaster* und *Merck* und entsprachen der Qualität „zur Synthese“. Die für die Elektrophorese benötigten Lösungen und Reagenzien wurden von der Firma *Roth* bezogen. Die DNA-Oligomere wurden bei der Firma *Roth* oder *Sigma-Ark* im Mikromol-Maßstab synthetisiert und HPLC-gereinigt geliefert.

Lösungsmittel

Alle technischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. Trockenes Dimethylformamid wurde in der Qualität ‚*sure sealed*‘ von der Firma *Aldrich* bezogen. Pyridin und Dichlormethan wurden für alle Reaktionen über CaH_2 getrocknet und destilliert.

Reaktionen

Für Reaktionen unter Feuchtigkeitsausschluss wurde Argon (> 99.996%) als Inertgas eingesetzt. Das Gas wurde mittels eines Trockenturmes, beschickt mit P_2O_5 /Bimsstein, weiter getrocknet. Die für die Umsetzungen benötigten Glasgeräte wurden zuvor mit Hilfe eines Heißluftgebläses ausgeheizt, im Hochvakuum abgekühlt und anschließend mit Inertgas beschickt. Die manuellen Festphasensynthesen wurden in einer auf einem mechanischen Schüttler montierten, mit einer PE-Fritte ausgestatteten Spritze oder einer kleinen Flash-Chromatographiesäule durchgeführt.

Gefriertrocknung

Die wässrigen oder Dioxan-haltigen Lösungen wurden in einem Kolben mit flüssigem Stickstoff eingefroren und an einem *Christ*-Alpha-2-4-Lyophilisator gefriergetrocknet. Analog wurde der Inhalt von Eppendorf-Röhrchen in einer Vakuumzentrifuge RVC 2-18 der Firma *Christ* lyophilisiert.

Chromatographie

a) Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden Dünnschichtfertigplatten mit Aluminiumfolie als Trägermaterial der Firmen *Merck* oder *Macherey-Nagel* verwendet (Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.25 mm). Zum Nachweis der Substanzonen dienten die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm sowie die Tauchfärbung mit Ninhydrin-Lösung (500 ml Ethanol, 3.00 ml Essigsäure, 1.00 g Ninhydrin) unter anschließendem Erhitzen mit einem Heißluftfön.

b) Flash-Säulenchromatographie

Als Säulenfüllmaterial wurde Kieselgel 60 der Firma *Merck* mit einer Korngröße von 40–62 µm verwendet. Die Säulen wurden mit 50–100fachem Überschuss an Kieselgel befüllt und das Substanzgemisch entweder als konzentrierte Lösung (in Laufmittel) oder adsorbiert an Kieselgel aufgetragen. Im letzteren Fall wurde das Substanzgemisch in Methanol gelöst und mit der fünffachen Menge Kieselgel (Korngröße 40–62 µm) versetzt. Das Lösungsmittel wurde i. Rot. entfernt und das präparierte Kieselgel im Hochvakuum getrocknet.

c) Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Analytische und präparative HPLC wurde an Geräten der Firma *Pharmacia* (Äkta basic, Hochdruckpumpenmodul 900, UV-Detektor 900) durchgeführt. Folgende Säulen wurden verwendet:

Analytik: YMC J'sphere ODS-A (150 × 4.6 mm, 4 µm, 80 Å, C-18) oder
 YMC J'sphere ODS-A (250 × 4.6 mm, 5 µm, 120 Å, C-18)

Präparation: YMC J'sphere ODS-A (150 × 10 mm, 4 µm, 80 Å, C-18) oder YMC J'sphere ODS-A (250 × 20 mm, 5 µm, 120 Å, C-18)

Die analytischen Proben wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min, die präparativen mit 3 ml/min (150 × 10 mm) oder 10 ml/min (250 × 20 mm) im Gradientenbetrieb eluiert. Eluent A bestand aus Wasser (Wasseraufbereitungsanlage ‚Simplicity‘ der Firma *Millipore*), Eluent B aus einem Gemisch von Acetonitril (*Acros Organics*, HPLC-Qualität) und Wasser im Verhältnis 9:1, jeweils unter Zusatz von 0.1% Trifluoressigsäure. Die UV-Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 220 nm, 260 nm und 280 nm.

7.1.2 Charakterisierung

Circulardichroismus-Spektroskopie (CD)

Die Messungen wurden mit dem *JASCO J-800A* Spectropolarimeter, ausgerüstet mit einer *JASCO* Temperiereinheit, aufgenommen. Messparameter: *Data mode*: CD, *band width*: 1.0 nm, *response*: 2 s, *sensitivity*: 50 – 100 mdeg, *data pitch*: 0.2 nm, *scanning speed*: 50 nm/min, Länge der Quarzglasküvetten: 1 cm, 5 Akkumulationen. Der Probenraum wurde permanent mit Stickstoff gespült. Angegeben sind Probenkonzentration und Temperatur. Die Konzentration der Messlösung wurde aus der UV-Absorption bei 20 °C berechnet. Die Temperaturen wurden im Temperierblock direkt neben der Küvette gemessen.

Elektrophorese

Die Polyacrylamid-Elektrophorese-Studien wurden in einem gekühlten Zweikammersystem der Hoefer SE 600 Series von *Amersham Pharmacia Biotech* durchgeführt. Als Spannungsquelle diente ein Power Supply-EPS 3501-Gerät. Die Acrylamid-Gele wurden manuell hergestellt und vor der Verwendung einer Präelektrophorese unterzogen. Die Agarosegelelektrophoresen wurde in einer horizontalen MIDI 1 Apparatur der Firma Roth durchgeführt.

Infrarot-Spektroskopie (IR)

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte an einem Gerät der Firma *Perkin Elmer* Typ 1600 Series FT-IR unter Benutzung von KBr-Presslingen.

Massenspektrometrie (MS)

Die ESI-Massenspektren wurden an einem Gerät der Firma *Finnigan* (Typ LCQ oder TSQ 7000) aufgenommen. Die Angaben erfolgen in m/z mit in Klammern aufgeführten Intensitäten in % des Basispeaks. Die Aufnahme hochaufgelöster ESI-Spektren (HR-MS) erfolgte an einem Instrument der Firma *Bruker* (Typ APEX-Q III 7T).

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden an *Varian* Mercury 200, *Varian* Unity 300, *Varian* INOVA-500 oder *Varian* INOVA-600 Spektrometern aufgenommen. Die Proben temperatur betrug im Falle von CDCl_3 -Lösungen 300 K, im Falle von $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ 308 K. Die chemischen Verschiebungen der Signale sind in Einheiten der δ -Skala registriert (TMS = 0 ppm). Als interner Standard dienten die Resonanzsignale der Restprotonen der verwendeten deuterierten Lösungsmittel CDCl_3 : 7.24 ppm (^1H -NMR) und 77.0 ppm (^{13}C -NMR), $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ 2.49 ppm (^1H -NMR) und 39.5 ppm (^{13}C -NMR). Die Multiplizitäten der Signale werden durch die Abkürzungen s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett oder m = Multiplett charakterisiert. Die Kopplungskonstanten $^nJ_{\text{X,Y}}$ sind in Hertz (Hz) angegeben, wobei n die Zahl der Bindungen angibt, über die Kopplung der Kerne X und Y erfolgt. ^{13}C -NMR-Spektren wurden ^1H -breitbandentkoppelt oder als APT-Spektren aufgenommen. Die Signalzuordnung erfolgte mithilfe von $[\text{H}, \text{H}]$ -COSY- und HMQC-Experimenten.

Optische Drehungen

Die optische Aktivität wurde mit dem Polarimeter 241 der Firma *Perkin-Elmer* gemessen. Dabei wurde der Drehwert jeweils über 10 Messungen gemittelt. Der spezifische Drehwert errechnet sich nach folgender Formel:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 100}{c \cdot l}$$

Hierbei sind α der gemessene Drehwert bei 20 °C und der Wellenlänge 589 nm (Natrium-D-Linie), c die Konzentration in [g/100 ml] und l die Küvettenlänge in [dm]. Zur Bestätigung des Drehsinns wurden die Messungen bei halber Konzentration wiederholt.

Temperaturabhängige UV-Spektroskopie

Die temperaturabhängigen Absorptionsspektren wurden mit einem JASCO V-550 UV/VIS Spectrophotometer, ausgerüstet mit einer programmierbaren JASCO ETC-505S/ETC-505T Peltier-Temperiereinheit, aufgenommen. Falls nicht anderweitig vermerkt, fand die Detektion bei einer Wellenlänge von 265 nm statt (Quarzglasküvette: 1 cm). Der Probenraum wurde permanent mit Stickstoff gespült. Die Konzentration der Messlösung wurde aus der UV-Absorption bei 20 °C berechnet. Die Temperaturen wurden im Temperierblock direkt neben der Küvette gemessen. Es wurde folgendes Temperaturprogramm gewählt: 20 °C → 80 °C (10 min) → 80 °C (3 min) → -2 °C (26 min) → -2 °C (60 min) → 60 °C (120 min) → -2 °C (120 min) → 28 °C (5 min). Die Hyperchromizität ($A_{\text{rel.}}$ [%]) ist definiert als

$$A_{\text{rel.}}(T) = \frac{(A(T) - A_0) \cdot 100}{A_0},$$

wobei A_0 der kleinste Absorptionswert im UV eines Entpaarungsexperimentes ist.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Glaskapillaren mit einer Büchi 501 Dr. Tottoli Schmelzpunktapparatur bestimmt und sind nicht korrigiert.

Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Messungen wurden mit dem JASCO FP-6200 Spectrofluorometer aufgenommen. Messparameter: *Measurement mode*: Emission, *Excitation Band Width*: 5.0 nm, *Emission Band Width*: 5.0 nm, *Response*: auto, *Excitation Wavelength*: 545.0 nm,

Start: 540 nm, *End:* 700 nm, *Data Pitch:* 1 nm, *Scanning Speed:* 500 nm/min, *Sensitivity:* Medium.

7.2 Synthesen

7.2.1 Allgemeine Synthesevorschriften ASV

ASV 1: Manuelle Synthese der Peptide nach Fmoc-Protokoll^[109]

Als festes Trägermaterial wurden mit 1% Divinylbenzol vernetzte Polystyrolharze verwendet, die als Linker eine Aminosäure-substituierte 2-Chlorotrityl-Gruppe trugen. Das Volumen der Reagenzien betrug 1 ml pro 100 mg Harz.

Das belegte Harz wurde in NMP suspendiert und 30 min geschüttelt. Vor der Kupplung eines Cysteins, wurde daran anschließend für 30 min mit einer DCM/NMP 4:1 geschüttelt.

Die Oligomerisierung wurde entsprechend folgender Skripte durchgeführt:

1. Kupplungen

HBTU-Kupplung: Eine Lösung aus *N*-Fmoc-Aminosäure (5.0 equiv.) und HBTU (5.0 equiv.) in NMP wurde mit DIEA (5.0 equiv.) versetzt und für 10 Minuten bei RT geschüttelt. Diese Mischung wurde zum entschützten Harz gegeben und die Suspension für 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit NMP jeweils 2 min gewaschen.

DIC-Kupplung: Eine Lösung aus *N*-Fmoc-Aminosäure (5.0 equiv.) in DCM/NMP 4:1 wurde mit DIC (5.0 equiv.) versetzt und für 15 Minuten bei RT geschüttelt. Diese Mischung wurde zum entschützten Harz gegeben und die Suspension für 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Harz sukzessiv jeweils fünfmal mit DCM und NMP 2 min gewaschen.

2. Entschützung

Eine Lösung aus Piperidin/DMF 4:1 wurde zum Fmoc-geschützten Peptidyl-Harz gegeben und die Suspension für 15 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurde fünfmal mit NMP jeweils 2 min gewaschen.

3. Abspaltung

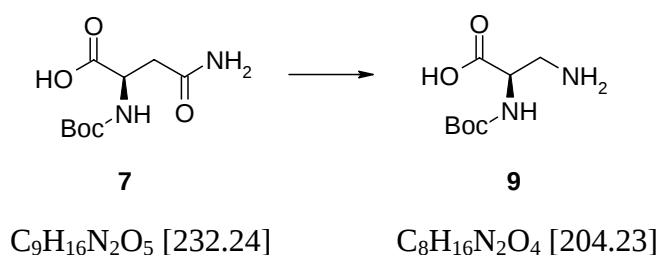
Nach Entschützen der terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurde das Harz zu einer Lösung aus HFIP/DCM 1:4 gegeben und 45 min geschüttelt. Der Harz wurde anschließend dreimal mit HFIP/DCM 1:4 gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum konzentriert und der entstehende Rückstand in kaltem Diethylether (-20°C) aufgenommen. Das ausgefallene Peptid wurde abzentrifugiert und aus Wasser lyophilisiert.

Die Schritte 1 und 2 wurden abwechselnd solange wiederholt, bis die gewünschte Peptidsequenz vollständig aufgebaut war. Nach der Kupplung der letzten Aminosäure wurde die terminale Fmoc-Schutzgruppe gemäß Schritt 2 abgespalten und anschließend das Harz fünfmal mit DCM für jeweils 2 Minuten gewaschen. Das Harz wurde im Vakuum über Nacht getrocknet. Die anschließende Abspaltung wurde entsprechend Schritt 3 durchgeführt.

7.2.2 Synthese nichtnatürlicher Aminosäuren

7.2.2.1 Synthese von Diaminopropionsäurederivaten

7.2.2.1.1 Boc-D-Dap-OH (9)[110]



Eine Suspension aus 5.0 g (21.5 mmol) Boc-D-Asn-OH (7) in 24 ml Acetonitril, 24 ml Essigsäureethylester und 12 ml Wasser wurde mit 8.32 g (25.8 mmol) (Diacetoxiod)benzol versetzt und 30 min bei 16 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung weitere 4 h bei RT gerührt. Nach Abkühlung auf 0°C wurde der weiße Niederschlag abfiltriert, mit 10 ml Essigsäureethylester gewaschen und im Vakuum über Nacht getrocknet. Es konnten 2.55 g (12.5 mmol, 58%) eines weißen Feststoffs **9** isoliert werden.

Analytische Daten:

DC (Methanol) $R_f = 0.50$

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3428, 3350, 2974, 1687, 1618, 1533, 1370, 1286, 1176 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): $\delta = 1.38$ (s, 9H, Boc- CH_3), 2.73 (dd, $^3J = 9 \text{ Hz}$, $^2J = 12 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}\beta$), 3.02 (dd, $^3J = 5 \text{ Hz}$, $^2J = 12 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}\beta$), 3.58-3.67 (m, 1H, $\text{CH}\alpha$), 6.15 (s, br., 2H, NH_2) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): $\delta = 28.1$ (Boc), 40.6 ($\text{CH}_2\beta$), 51.1 ($\text{CH}\alpha$), 78.1 (Boc), 155.0 (Boc-CO), 171.0 (CO_2H) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 204.9 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$.

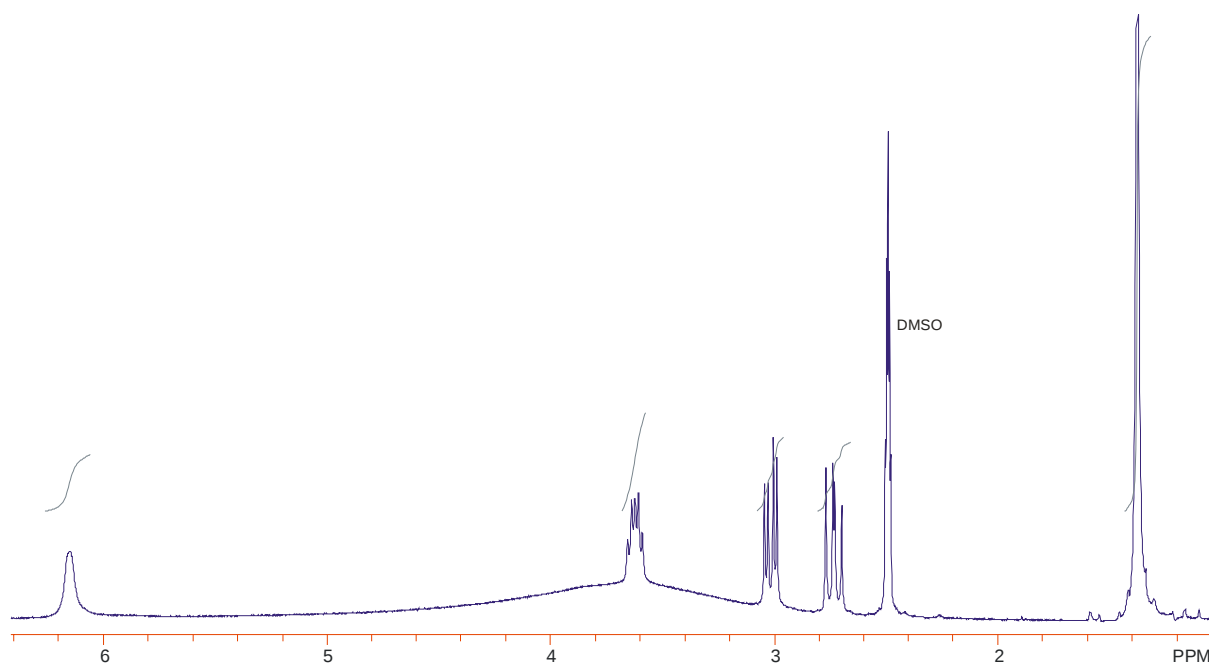
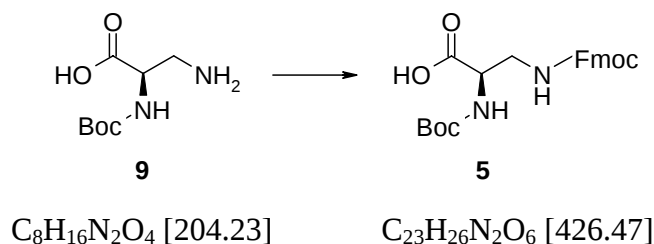


Abb. 7-1: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **9**.

7.2.2.1.2 Boc-D-Dap(Fmoc)-OH (**5**)^[111]

Zu einer Lösung aus 2.50 g (12.2 mmol) Boc-D-Dap-OH (**9**) in 35 ml 10% wässriger Natriumcarbonatlösung wurde bei 0°C eine Lösung aus 3.82 g (14.6 mmol) FmocCl in 35 ml Dioxan getropft und die Suspension 1 h bei 0°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung 1 h bei RT gerührt. Es wurden 350 ml Wasser zugegeben und zweimal mit jeweils 150 ml Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit konz. Salzsäure auf pH = 1 angesäuert und umgehend dreimal mit jeweils 150 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden abdestilliert und verbliebene Feststoff im Vakuum getrocknet. Es konnten 5.06 g (11.9 mmol, 97%) eines weißen Feststoffs **5** isoliert werden.

Analytische Daten:

DC (Essigsäureethylester/Methanol 4:1) R_f = 0.51

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3409, 2925, 2855, 1712, 1523, 1453, 1253, 1163 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 35 °C): δ = 1.37 (s, 9H, Boc-CH₃), 3.20-3.40 (m, 2H, CH₂β), 4.00-4.10 (m, 2H, CHα), 4.17-4.30 (m, 3H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 6.89 (d, 3J = 8 Hz, 1H, NH), 7.32 (t, 3J = 8 Hz, 2H, Fmoc-C2), 7.40 (t, 3J = 8 Hz, 2H, Fmoc-C3), 7.67 (d, 3J = 8 Hz, 2H, Fmoc-C1), 7.87 (d, 3J = 8 Hz, 2H, Fmoc-C4), 12.59 (s, br., 1H, CO₂H) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 35 °C): δ = 28.1 (Boc), 41.5 (CH₂β), 46.6 (Fmoc-CH), 53.6 (CHα), 65.5 (Fmoc-CH₂), 78.2 (Boc), 120.0 (Fmoc-C4), 125.0 (Fmoc-C1), 127.0 (Fmoc-C2), 127.5 (Fmoc-C3), 140.6 (Fmoc-C4a), 143.8 (Fmoc-C8a), 155.3, 156.1 (Fmoc-CO, Boc-CO), 172.1 (CO₂H) ppm.

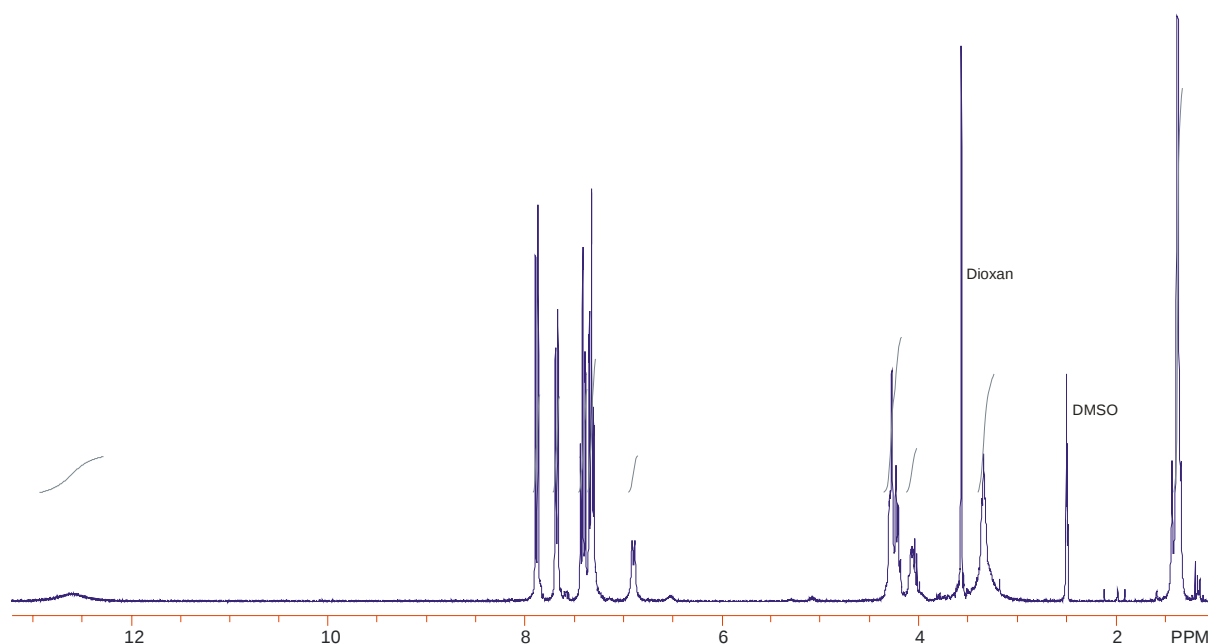
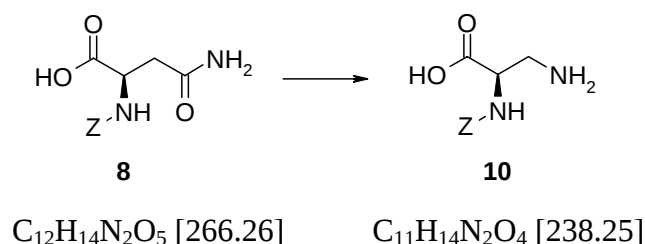


Abb. 7-2: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **5**.

7.2.2.1.3 Z-D-Dap-OH (**10**)^[110]



Eine Suspension aus 5.00 g (18.8 mmol) Z-D-Asn-OH (**8**) in 24 ml Acetonitril, 24 ml Essigsäureethylester und 12 ml Wasser wird mit 7.26 g (22.5 mmol) (Diacetoxiod)benzol versetzt und 30 min bei 16 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung weitere 4 h bei RT gerührt. Nach Abkühlung auf 0°C wurde der weiße Niederschlag abfiltriert, mit 10 ml Essigsäureethylester gewaschen und im Vakuum über Nacht getrocknet. Es konnten 3.67 g (15.4 mmol, 82%) eines weißen Feststoffs **10** isoliert werden.

Analytische Daten:

DC (Methanol) $R_f = 0.50$

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3431, 3305, 2925, 2361, 1695, 1625, 1540, 1382, 1270 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}/\text{TFA}$, 35 °C): $\delta = 2.98\text{--}3.10$ (m, 1H, $\text{CH}\beta$), 3.19–3.30 (m, 1H, $\text{CH}\beta$), 4.26–4.36 (m, 1H, $\text{CH}\alpha$), 5.04–5.09 (m, 2H, Z- CH_2), 7.29–7.40 (m, 5H, Z-Ph), 7.68 (d, $^3J = 9 \text{ Hz}$, 1H, NH), 8.02 (s, br., 2H, NH_2), 13.78 (s, br., 1H, CO_2H) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}/\text{TFA}$, 35 °C): $\delta = 39.9$ ($\text{CH}_2\beta$), 51.7 ($\text{CH}\alpha$), 65.9 (Z- CH_2), 127.8, 127.9, 128.3 (Z-Ph), 136.7 (Z- Ph_{ipso}), 156.2 (Z-CO), 170.7 (CO_2H) ppm.

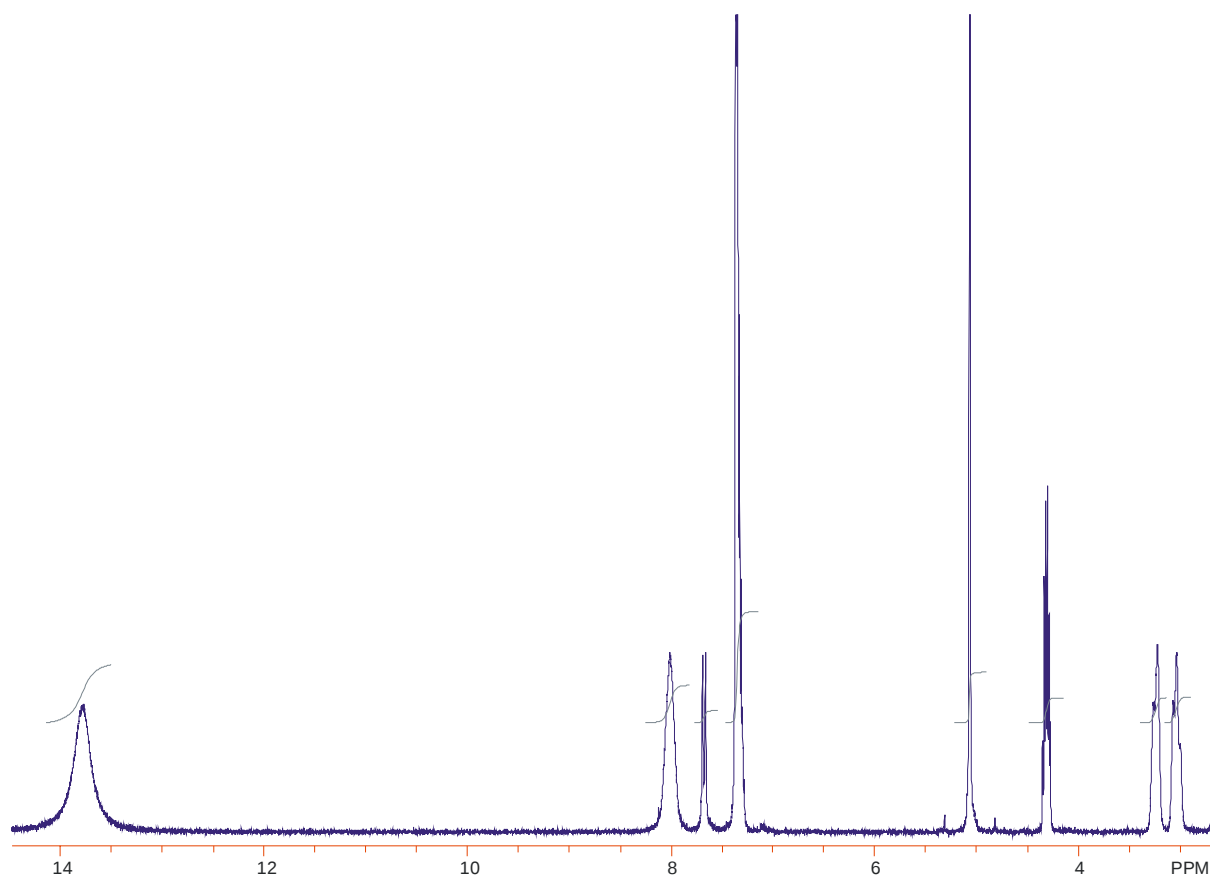
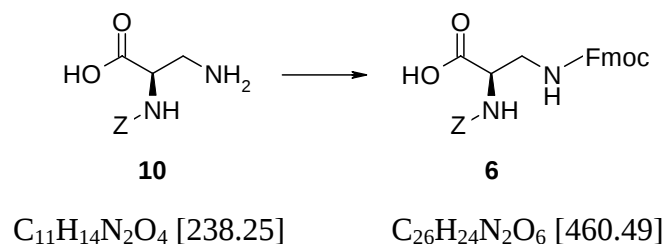


Abb. 7-3: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}/\text{TFA}$) von **10**.

7.2.2.1.4 Z-D-Dap(Fmoc)-OH (**6**)^[111]

Zu einer Lösung aus 1.00 g (4.20 mmol) Z-D-Dap-OH (**10**) in 12 ml 10% wässriger Natriumcarbonatlösung wurde bei 0°C eine Lösung aus 1.28 g (4.90 mmol) FmocCl in 12 ml Dioxan getropft und die Suspension 1 h bei 0°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung 1 h bei RT gerührt. Es wurden 120 ml Wasser zugegeben und zweimal mit jeweils 60 ml Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit konz. Salzsäure auf pH = 1 angesäuert und umgehend dreimal mit jeweils 60 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden abdestilliert und verbliebene Feststoff im Vakuum getrocknet. Es konnten 1.84 g (4.00 mmol, 95%) eines weißen Feststoffs **6** isoliert werden.

Analytische Daten:

DC (Essigsäureethylester/Methanol 4:1) R_f = 0.40

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3417, 2924, 2853, 2367, 1712, 1524, 1457, 1252 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): δ = 3.30-3.50 (m, 2H, CH_β), 4.15-4.36 (m, 4H, CH_α , Fmoc-CH, Fmoc- CH_2), 5.06-5.10 (m, 2H, Z- CH_2), 7.33-7.50 (m, 9H, Fmoc-C2, Fmoc-C3, Z-Ph), 7.72 (d, 3J = 8 Hz, 2H, Fmoc-C1), 7.93 (d, 3J = 8 Hz, 2H, Fmoc-C4), 12.80 (s, br., 1H, CO_2H) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): δ = 41.5 ($\text{CH}_2\beta$), 46.6 (Fmoc-CH), 54.0 (CH_α), 65.5 (Z- CH_2), 65.6 (Fmoc- CH_2), 120.0 (Fmoc-C4), 125.1 (Fmoc-C1), 127.0 (Fmoc-C2), 127.5, 127.6, 127.7, 128.2 (Fmoc-C3, Z-Ph), 136.8 (Z- Ph_{ipso}), 140.6 (Fmoc-C4a), 143.7 (Fmoc-C8a), 155.9, 156.1 (Fmoc-CO, Z-CO), 171.8 (CO_2H) ppm.

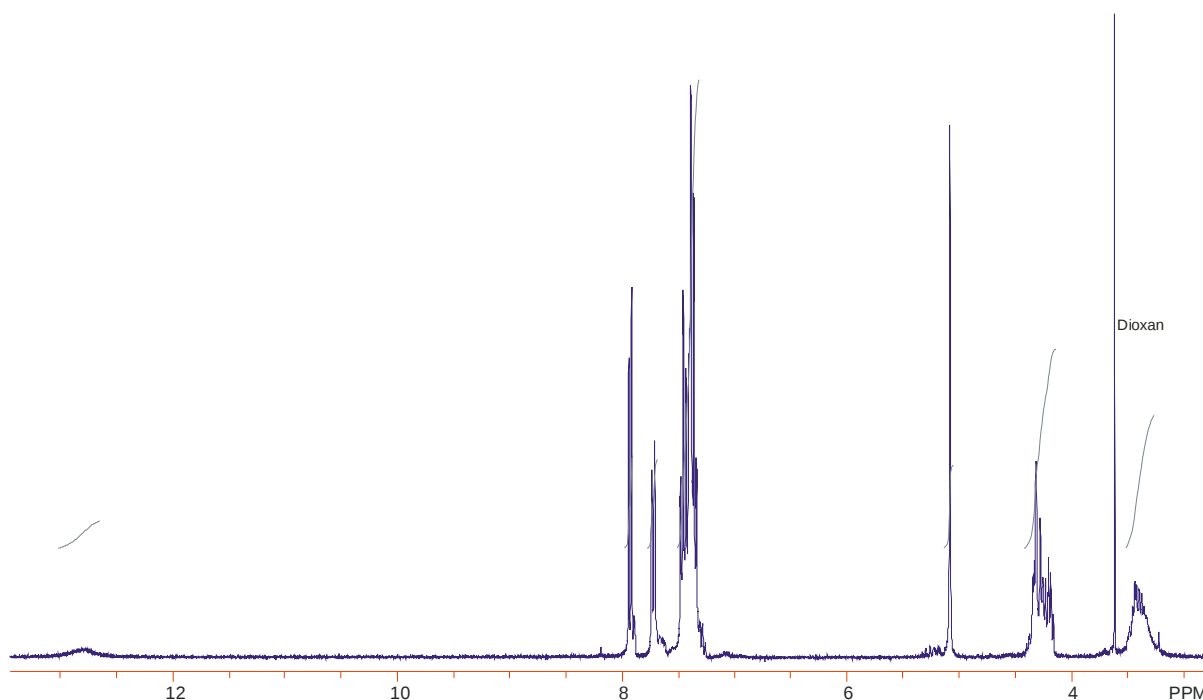
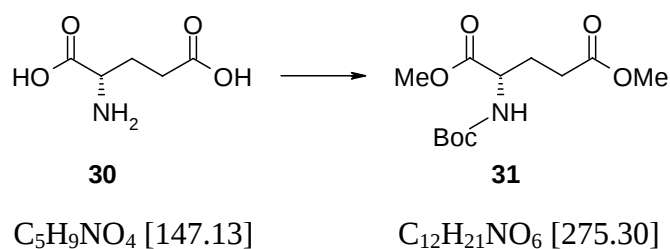


Abb. 7-4: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **6**.

7.2.2.2 Synthese Olefin-funktionalisierter Aminosäuren

7.2.2.2.1 Boc-L-Glu(OMe)-OMe (**31**)^[154]



Zu einer Lösung aus 14.7 g (100 mmol, 1 equiv.) H-L-Glu-OH (**30**) in 330 ml trockenem Methanol wurden bei 0°C vorsichtig 56.0 ml (440 mmol, 4.4 equiv.) Trimethylsilylchlorid zugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionslösung über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurden nacheinander 90 ml (650 mmol, 6.5 equiv.) Triethylamin und 24.0 g (110 mmol, 1.1 equiv.) $(\text{Boc})_2\text{O}$ zu der Lösung gegeben und wiederum über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert und der verbliebene weiße Rückstand dreimal mit jeweils 500 ml Diethylether gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden abrotiert und das

Rohprodukt durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Ethylacetat als Eluent gereinigt. Es konnten 15.4 g (81.4 mmol, 81%) eines farblosen Öls isoliert **31** werden.

Analytische Daten:

DC (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 1:1) $R_f = 0.66$

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3377, 2978, 1743, 1717, 1520, 1438, 1377, 1253, 1213, 1169 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 35 °C): $\delta = 1.41$ (s, 9H, Boc- CH_3), 1.84-1.99 (m, 1H, H_β), 2.09-2.23 (m, 1H, H_β), 2.33-2.43 (m, 2H, H_γ), 3.65 (s, 3H, OCH_3), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 4.26-4.36 (m, 1H, H_α), 5.09 (d, $^3J = 8 \text{ Hz}$, 1H, NH) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3 , 35 °C): $\delta = 27.7$ ($\text{CH}_2\beta$), 28.2 (Boc), 30.0 ($\text{CH}_2\gamma$), 51.8 (OCH_3), 52.4 (OCH_3), 52.8 (CH_α), 80.0 (Boc), 155.3 (Boc-CO), 172.6 (CO_2Me), 173.1 (CO_2Me) ppm.

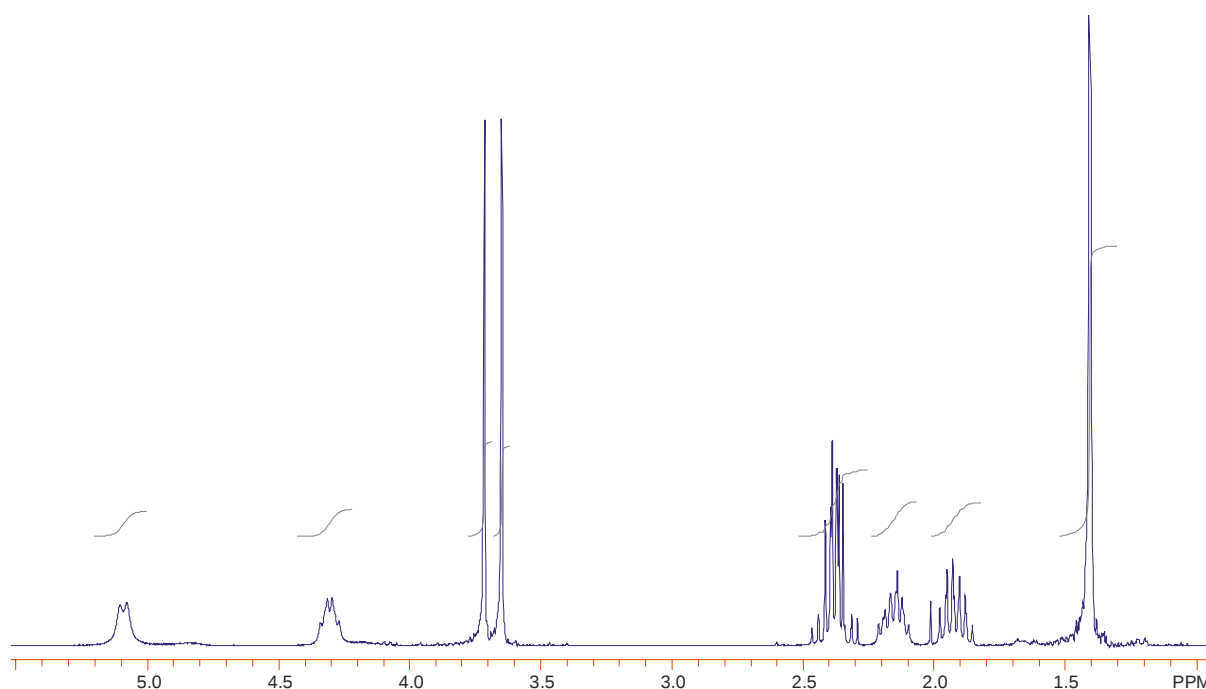
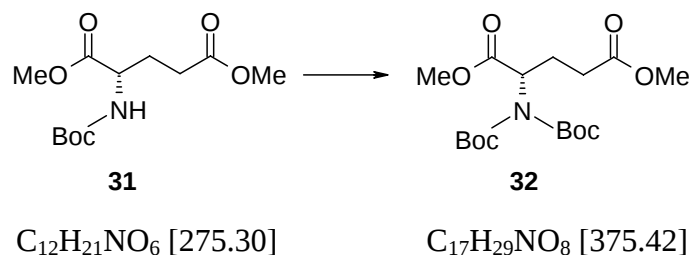


Abb. 7-5: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl_3) von **31**.

7.2.2.2 *N,N*-bis-Boc-L-Glu(OMe)-OMe (**32**)^[154]

Eine Lösung aus 15.0 g (54.5 mmol, 1 equiv.) **31** und 1.33 g (10.9 mmol, 0.2 equiv.) DMAP in 180 ml trockenem Methanol wurde bei RT mit 13.3 g (59.9 mmol, 1.1 equiv.) (Boc)₂O versetzt und 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurden weitere 6.66 g (29.7 mmol, 0.55 equiv.) (Boc)₂O zu der Reaktionslösung gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde abrotiert und das verbliebene rote Öl säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/Essigsäureethylester 3:1 gereinigt. Es konnten 18.4 g (49.0 mmol, 90%) eines farblosen Öls **32** isoliert werden.

Analytische Daten:

DC (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 5:1) $R_f = 0.25$

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3443, 2988, 2368, 1757, 1628, 1377, 1267, 1140, 1087 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 35 °C): $\delta = 1.47$ (s, 18H, Boc-CH₃), 2.10-2.22 (m, 1H, H β), 2.34-2.52 (m, 3H, H β , H γ), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 4.91 (dd, ³ $J = 5 \text{ Hz}$, ³ $J = 10 \text{ Hz}$, 1H, CH α) ppm.

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃, 35 °C): $\delta = 25.1$ (CH₂ β), 27.9 (Boc), 30.6 (CH₂ γ), 51.7 (OCH₃), 52.2 (OCH₃), 57.3 (CH α), 83.3 (Boc), 151.9 (Boc-CO), 170.8 (CO₂Me), 173.1 (CO₂Me) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 398.1 (100) [M + Na]⁺.

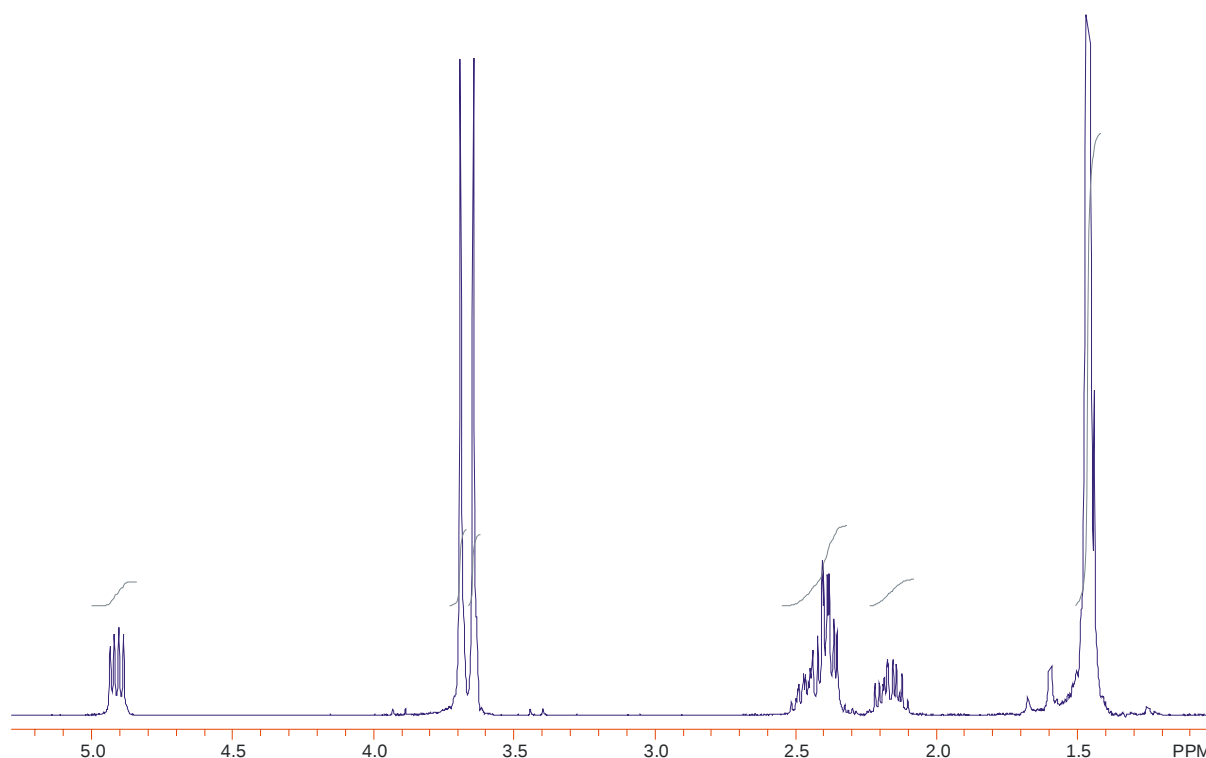
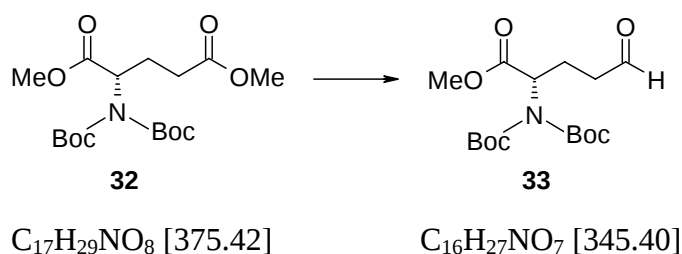


Abb. 7-6: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl_3) von **32**.

7.2.2.2.3 Methyl-(S)-2-*N,N*-bis-*tert*-butoxycarbonylamino-5-oxopentanoat (**33**)^[154]



Zu einer Lösung aus 8.22 g (21.9 mmol, 1 equiv.) **32** in 220 ml trockenem Diethylether wurde bei -78°C tropfenweise 24.7 ml DIBAL (1.0 M in Hexan, 1.1 equiv.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 5 min bei -78°C und anschließend mit 3.29 ml Wasser gequencht. Nach 30 min rühren bei RT wurde die dabei entstandene Suspension filtriert und das Filtrat über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und das ölige Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/Essigsäureethylester 4:1 gereinigt. Es konnten 2.95 g (8.54 mmol, 39%) eines farblosen Öls isoliert **33** werden.

Analytische Daten:

DC (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 5:1) $R_f = 0.27$

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3433, 2926, 2363, 1745, 1633, 1456, 1369, 1456, 1369, 1143 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 35 °C): $\delta = 1.47$ (s, 18H, Boc- CH_3), 2.06-2.19 (m, 1H, H_β), 2.41-2.62 (m, 3H, H_β , H_γ), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 4.83-4.89 (m, 1H, CH_α), 9.75 (t, $^3J = 1 \text{ Hz}$, 1H, CHO) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3 , 35 °C): $\delta = 22.5$ ($\text{CH}_2\beta$), 27.9 (Boc), 40.5 ($\text{CH}_2\gamma$), 52.3 (OCH_3), 57.3 (CH_α), 83.5 (Boc), 151.9 (Boc-CO), 170.7 (CO_2Me), 201.0 (CHO) ppm.

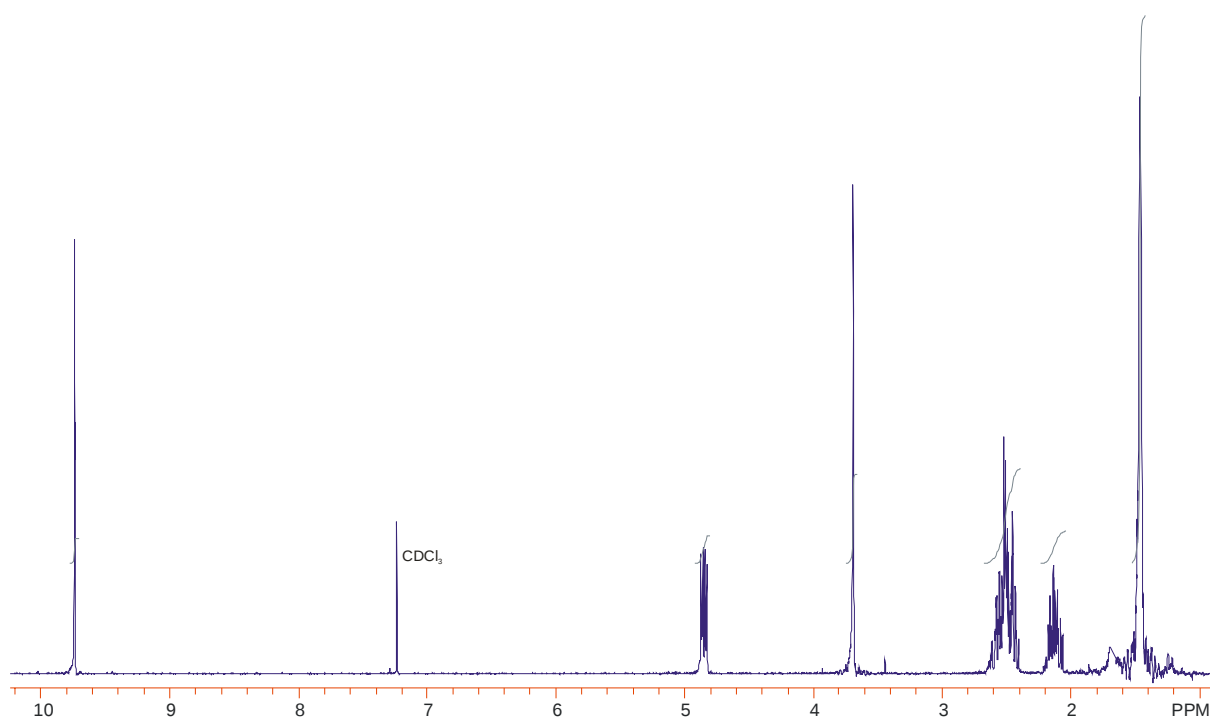
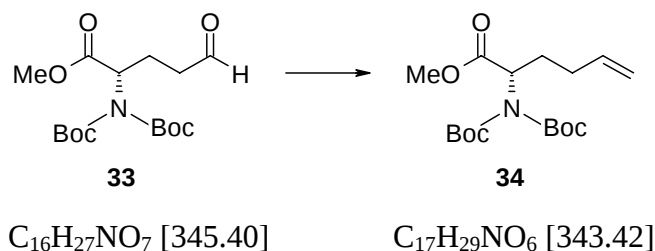


Abb. 7-7: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl_3) von **33**.

7.2.2.2.4 *N,N*-bis-Boc-L-Hag-OMe (**34**)

Zu einer Lösung aus 3.48 g (9.73 mmol, 1.2 equiv.) Methyltriphenylphosphoniumbromid in 65 ml trockenem Toluol wurde unter Argon eine Lösung aus 1.24 g (8.90 mmol, 1.1 equiv.) Kalium-bis-trimethylsilylamid in 18 ml Toluol bei 0°C zugetropft. Nach 15 min wurde die gelbe Suspension auf -78°C abgekühlt und tropfenweise mit 2.80 g (8.11 mmol, 1 equiv.) **33** in 15 ml Toluol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 1 h bei -78°C und anschließend 1 h bei RT gerührt, wobei sich die Suspension entfärbte. Nach Zugabe von 75 ml gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung wurde dreimal mit jeweils 30 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 30 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und anschließend eingengt. Der verbliebene ölige Rückstand wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit *n*-Hexan/Essigsäureethylester 5:1 als Eluent gereinigt. Es konnten 1.03 g (3.00 mmol, 37%) eines farblosen Öls **34** isoliert werden.

Analytische Daten:

DC (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 5:1) $R_f = 0.43$

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3432, 2982, 2366, 1749, 1371, 1252, 1143 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 35 °C): $\delta = 1.47$ (s, 18H, Boc-CH₃), 1.90-2.00 (m, 1H, CHβ), 2.04-2.26 (m, 3H, CHβ, CHγ), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 4.85 (dd, ³*J* = 9 Hz, ³*J* = 5 Hz, 1H, CHα), 4.97 (d, ³*J* = 10 Hz, 1H, CHε), 5.02 (d, ³*J* = 17 Hz, 1H, CHε), 5.70-5.85 (m, 1H, CHδ), ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3 , 35 °C): δ = 28.0 (Boc), 29.3 ($\text{CH}_2\beta$), 30.3 ($\text{CH}_2\gamma$), 52.1 (OCH_3), 57.5 ($\text{CH}\alpha$), 83.0 (Boc), 115.4 ($\text{CH}_2\epsilon$), 137.4 ($\text{CH}\delta$), 152.0 (Boc), 171.3 (CO_2Me) ppm.

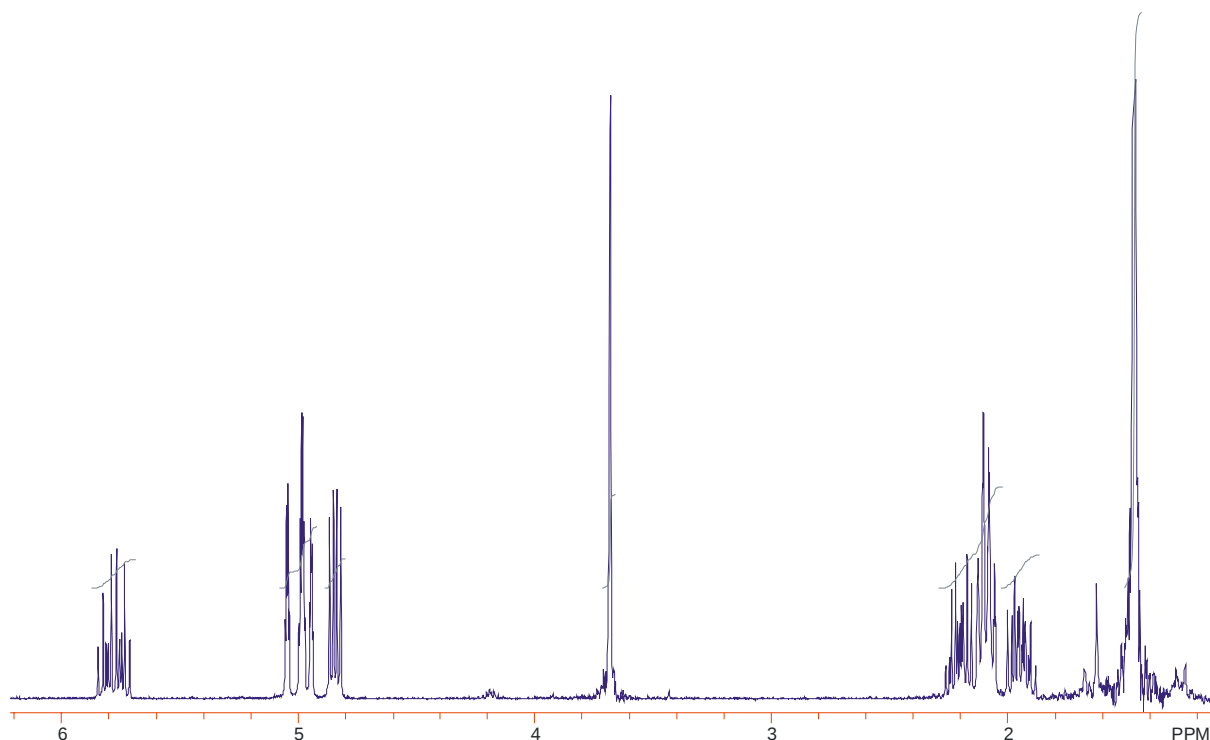
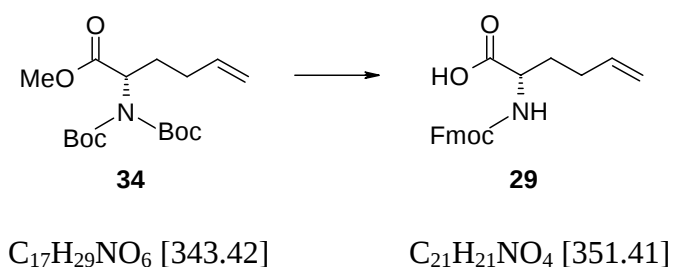


Abb. 7-8: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl_3) von **34**.

7.2.2.2.5 Fmoc-L-Hag-OH (**29**)



Eine Lösung aus 2.21 g (6.44 mmol, 1 equiv.) **34** in 20 ml TFA/THF (1:1) wurde 30 min bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend bis zur Trockene eingengt und der verbliebene ölige Rückstand zweimal mit jeweils 10 ml THF versetzt und erneut jeweils abrotiert. Der Rückstand wurde in 10 ml Methanol gelöst

und vorsichtig unter Eiskühlung mit 12 ml 1 M NaOH versetzt. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei RT gerührt, anschließend mit 1 M HCl neutralisiert und das Reaktionsgemisch bis zur Trockene eingengt. Der milchige Rückstand wurde in 20 ml 10% wässriger Natriumcarbonatlösung aufgenommen und bei 0°C tropfenweise mit einer Lösung aus 1.96 g (7.47 mmol, 1.16 equiv.) FmocCl in 20 ml Dioxan versetzt und die Suspension 1 h bei 0°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung 1 h bei RT gerührt. Es wurden 180 ml Wasser zugegeben und zweimal mit jeweils 100 ml Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit konz. Salzsäure auf pH = 1 angesäuert und umgehend dreimal mit jeweils 100 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden abdestilliert und der verbliebene Feststoff säulenchromatographisch an Kieselgel mit Essigsäureethylester/Methanol 9:1 gereinigt. Es konnten 1.45 g (4.13 mmol, 64%) eines weißen Feststoffs isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 70 °C (Zersetzung)

DC (Essigsäureethylester/Methanol 9:1) R_f = 0.45

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3422, 2926, 2367, 1704, 1448, 1247, 1052, 739 cm⁻¹.

¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO, 35 °C): δ = 1.66-1.74 (m, 1H, CH β), 1.75-1.83 (m, 1H, CH β), 2.02-2.13 (m, 2H, CH γ), 3.92-3.98 (m, 1H, CH α), 4.22 (t, ³ J = 7 Hz, 1H, Fmoc-CH), 4.25-4.33 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.97 (d, ³ J = 10 Hz, 1H, CH ϵ), 5.01 (d, ³ J = 17 Hz, 1H, CH ϵ), 5.75-5.84 (m, 1H, CH δ), 7.32 (t, ³ J = 7 Hz, 2H, Fmoc-C2), 7.41 (t, ³ J = 7 Hz, 2H, Fmoc-C3), 7.58 (d, 1H, NH), 7.72 (dd, ³ J = 7 Hz, ³ J = 5 Hz, 2H, Fmoc-C1), 7.88 (d, ³ J = 7 Hz, 2H, Fmoc-C4), 12.50 (s, br., 1H, CO₂H) ppm.

¹³C NMR (150 MHz, [D₆]DMSO, 35 °C): δ = 29.5 (CH₂ β), 29.9 (CH₂ γ), 46.6 (Fmoc-CH), 53.1 (CH α), 65.5 (Fmoc-CH₂), 115.4 (CH₂ ϵ), 120.0 (Fmoc-C4), 125.2 (Fmoc-C1), 126.9 (Fmoc-C2), 127.5 (Fmoc-C3), 137.4 (CH δ), 140.6 (Fmoc-C4a), 143.7 (Fmoc-C8a), 151.7 (Fmoc-CO), 156.0 (CO₂H) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 374.1 (50) $[M + Na]^+$, 724.8 (100) $[2M + Na + H]^{2+}$

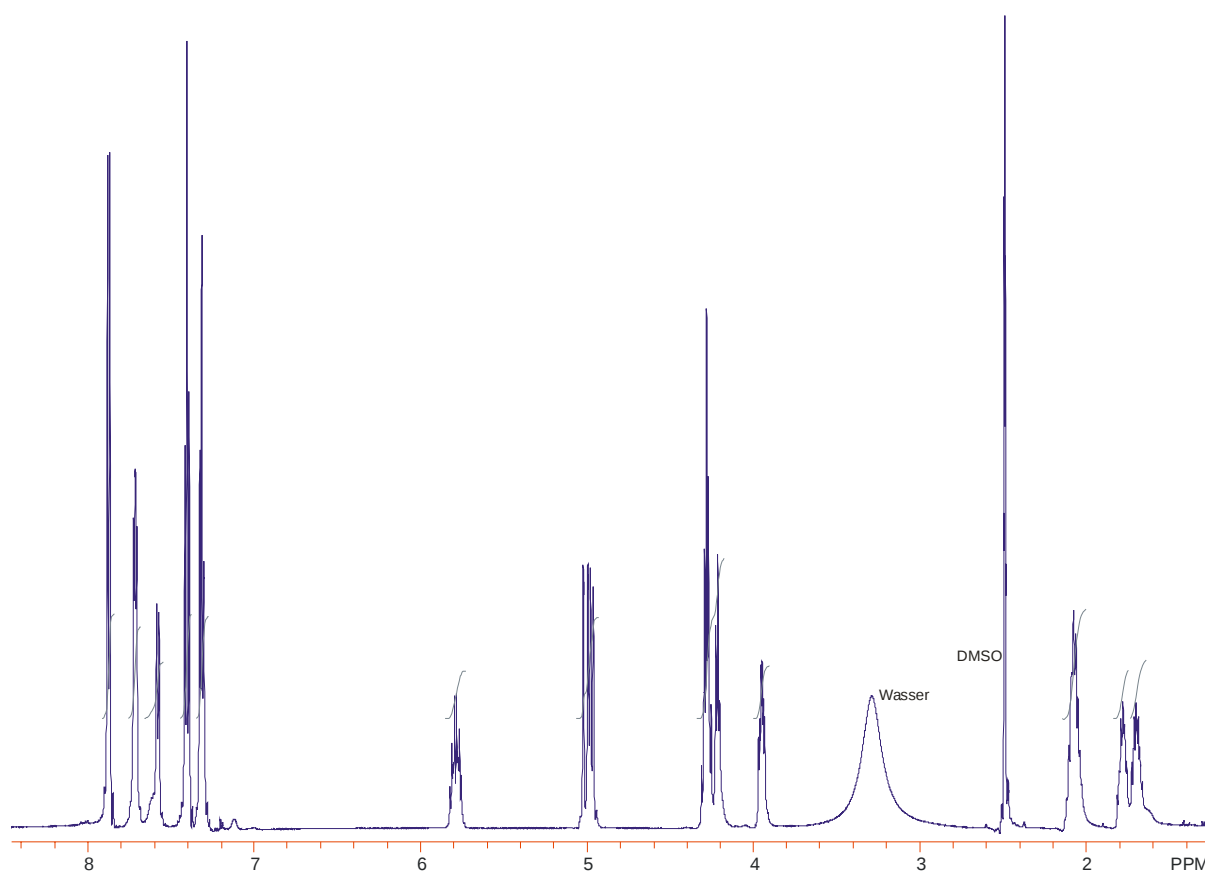
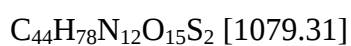
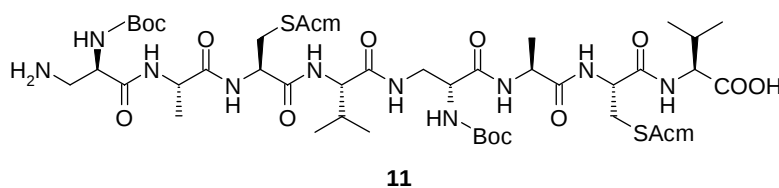


Abb. 7-9: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **29**.

7.2.3 Synthese der einheitlich Nukleobasen-substituierten Des-*N*-Tetramethylazatriostin –Analoga

7.2.3.1 Synthese des symmetrisch geschützten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Rückgrats

7.2.3.1.1 Boc-D-Dap-L-Ala-L-Cys(Acm)-L-Val- β -D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys(Acm)-L-Val-OH (**11**)



Die Synthese von **1** wurde gemäß ASV 1 unter Verwendung von 594 mg (0.85 mmol/g, 505 mmol, 1 equiv.) L-Valin belegten 2-Chlorotritylharz durchgeführt. Als Aminosäuren wurden Fmoc-L-Cys(Acm)-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Boc-D-Dap(Fmoc)-OH und Fmoc-L-Val-OH eingesetzt. Fmoc-L-Ala-OH, Boc-D-Dap(Fmoc)-OH und Fmoc-L-Val-OH wurden mit der HBTU-Kupplung gekuppelt, Fmoc-L-Cys(Acm)-OH wurde gemäß der DIC-Kupplung gekuppelt. Die HPLC-Analyse (5–60% in 30 min, $R_t = 21.2$ min) ergab, dass keine signifikanten Nebenprodukte entstanden und hiermit keine zusätzlichen Reinigungsschritte nötig waren. Es konnten 440 mg (474 mmol, 87%) eines weißen Feststoffs **11** isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 200 °C (Zersetzung)

DC (Chloroform/Methanol 7:2) $R_f = 0.52$

$[\alpha]_D^{25} = -14.0$ (MeOH, $c = 0.0125$)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3430, 2968, 2368, 1636, 1540, 1368, 1251, 1164, 590 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): $\delta = 0.80$ (d, $^3J = 7 \text{ Hz}$, 6H, Val- CH_3), 0.83 (d, $^3J = 5 \text{ Hz}$, 6H, Val- CH_3), 0.84 (d, $^3J = 5 \text{ Hz}$, 3H, Val- CH_3), 1.20 (d, $^3J = 6 \text{ Hz}$, 3H, Ala- CH_3), 1.21 (d, $^3J = 6 \text{ Hz}$, 3H, Ala- CH_3), 1.36 (s, 9H, Boc- CH_3), 1.37 (s, 9H, Boc- CH_3), 1.84 (s, 3H, Acm- CH_3), 1.85 (s, 3H, Acm- CH_3), 1.98-2.10 (m, 2H, Val- $\text{H}\beta$), 2.67-2.76 (m, 2H, Cys- $\text{H}\beta$), 2.84-2.98 (m, 4H, Cys- $\text{H}\beta$, Dap- $\text{H}\beta$), 3.31-3.42 (m, 2H, Dap- $\text{H}\beta$), 4.00 (dd, $^3J = 9 \text{ Hz}$, $^3J = 5 \text{ Hz}$, 1H, Val- $\text{H}\alpha$), 4.02-4.07 (m, 1H, Dap- $\text{H}\alpha$), 4.12-4.19 (m, 4H, Val- $\text{H}\alpha$, Dap- $\text{H}\alpha$, Acm- CH_2), 4.24-4.36 (m, 4H, Acm- CH_2 , Ala- $\text{H}\alpha$), 4.55-4.60 (m, 1H, Cys- $\text{H}\alpha$), 4.60-4.66 (m, 1H, Cys- $\text{H}\alpha$), 6.72 (d, $^3J = 7 \text{ Hz}$, 1H, Dap- $\text{NH}\alpha$), 7.14 (d, $^3J = 7 \text{ Hz}$, 1H, Dap- $\text{NH}\alpha$), 7.60 (d, $^3J = 7 \text{ Hz}$, 1H, Val- NH), 7.74-7.82 (m, 2H, Val- NH , Ala- NH), 7.88-7.93 (m, 1H, Dap- $\text{NH}\beta$), 8.20-8.29 (m, 3H, Cys- NH , Dap- NH_2), 8.37-8.42 (m, 1H, Cys- NH), 8.47-8.56 (m, 3H, Ala- NH , Acm- NH) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): δ = 17.5, 17.9 (Val- CH_3), 18.4, 18.6 (Ala- CH_3), 19.1, 19.2 (Val- CH_3), 22.5 (Acm- CH_3), 28.0, 28.1 (Boc), 30.3, 30.5 (Val- $\text{CH}_2\beta$), 31.8, 32.2 (Cys- $\text{CH}_2\beta$), 40.0, 40.1 (Acm- CH_2), 40.5, 41.6 (Dap- $\text{CH}_2\beta$), 48.2 (Ala- $\text{CH}\alpha$), 52.5, 52.6 (Cys- $\text{CH}\alpha$), 54.3, 54.8 (Dap- $\text{CH}\alpha$), 57.5, 58.2 (Val- $\text{CH}\alpha$), 78.5 (Boc), 154.9, 155.3 (Boc-CO), 169.4, 169.5, 169.8, 169.9, 170.0, 171.3, 172.1, 173.7 (Acm-CO, Dap-CO, Cys-CO, Val-CO, Ala-CO) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 1101.5 (100) $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

HRMS (ESI): ber. für $\text{C}_{44}\text{H}_{78}\text{N}_{12}\text{O}_{15}\text{S}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$) 1079.5224 gef. 1079.5230.

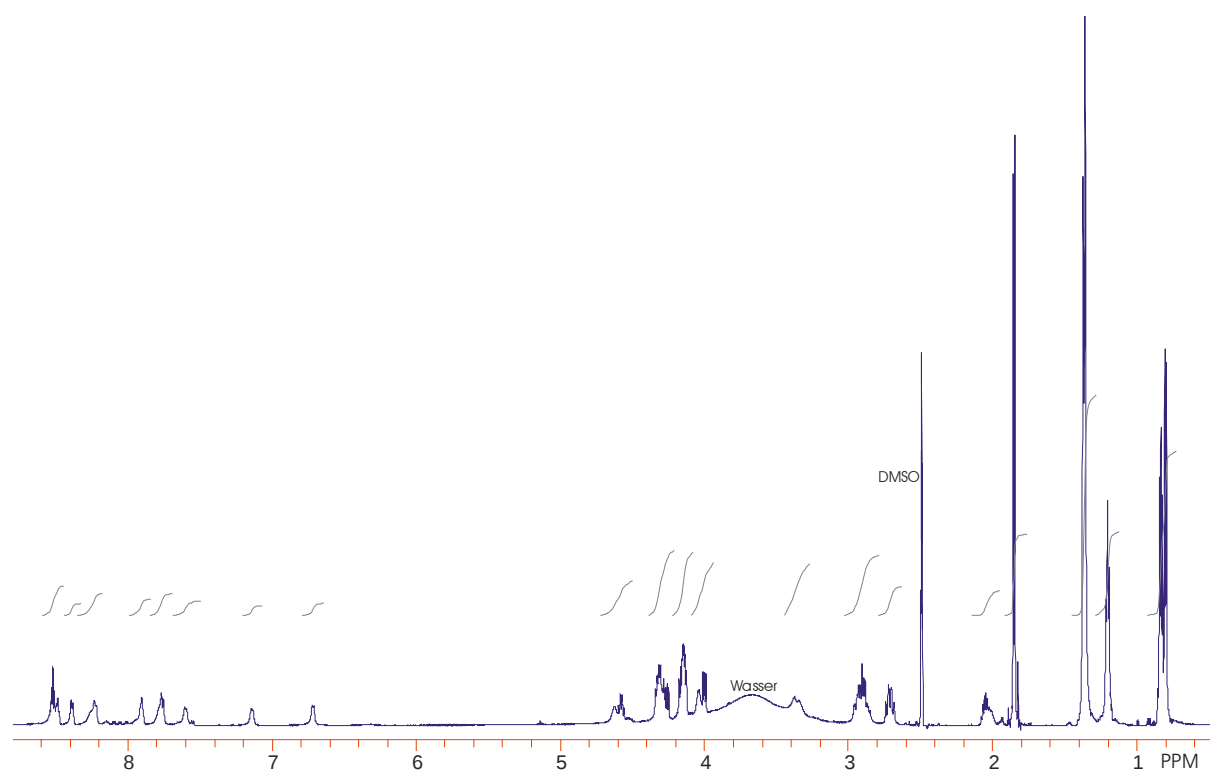
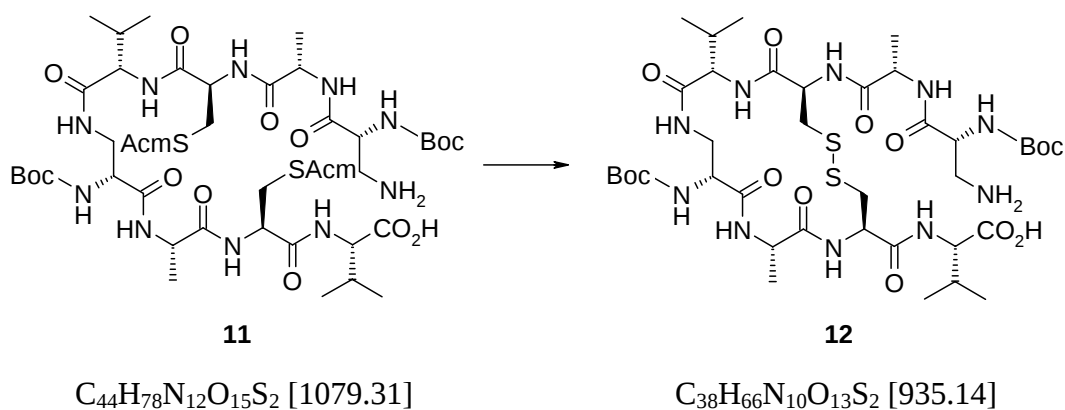


Abb. 7-10: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **11**.

7.2.3.1.2 Boc-D-Dap-L-Ala-L-Cys-L-Val-β-D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys-L-Val-OH disulfid (**12**)



Eine Lösung aus 52.8 mg (48.9 μmol , 1 equiv.) **11** in 25 ml wässriger Essigsäure (80%) wurde unter Argonatmosphäre mit 124 mg (489 μmol , 10 equiv.) Iod versetzt und anschließend 1 h bei RT gerührt. Die tiefrote Lösung wurde mit 25 ml Wasser gequench und anschließend siebenmal mit jeweils 20 ml Tetrachlorkohlenstoff extrahiert, bis die wässrige Phase farblos war. Das Lösungsmittel wurde azeotrop unter mehrmaligem Zusatz von Toluol abdestilliert. Der braune Rückstand wurde in wenigen ml Methanol aufgenommen, filtriert und durch präparative HPLC (30-60% in 30 min, $R_t = 19.2$ min) gereinigt. Es konnten 24.1 mg (25.8 μmol , 53%) eines weißen Feststoffs **12** isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 175-180 °C (Zersetzung)

DC (Chloroform/Methanol 6:1) $R_f = 0.34$

$[\alpha]_D^{25} = -10.0$ (MeOH, $c = 0.0075$)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3447, 2369, 1653, 669 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): $\delta = 0.80$ (d, $^3J = 7 \text{ Hz}$, 3H, Val- CH_3), 0.82 (d, $^3J = 7 \text{ Hz}$, 3H, Val- CH_3), 0.85 (d, $^3J = 6 \text{ Hz}$, 3H, Val- CH_3), 0.86 (d, $^3J = 6 \text{ Hz}$, 3H, Val- CH_3), 1.20 (d, $^3J = 7 \text{ Hz}$, 3H, Ala- CH_3), 1.25 (d, $^3J = 7 \text{ Hz}$, 3H, Ala- CH_3), 1.38 (s,

9H, Boc-CH₃), 1.39 (s, 9H, Boc-CH₃), 2.03-2.14 (m, 2H, Val-H β), 2.89-3.02 (m, 3H, Cys-H β , Dap-H β), 3.10-3.16 (m, 2H, Cys-H β , Dap-H β), 3.20-3.25 (m, 1H, Cys-H β), 3.30-3.35 (m, 1H, Dap-H β), 3.39-3.46 (m, 1H, Dap-H β), 3.99-4.06 (m, 2H, Val-H α , Dap-H α), 4.14-4.18 (m, 1H, Val-H α), 4.18-4.22 (m, 1H, Ala-H α), 4.22-4.28 (m, 1H, Cys-H α), 4.31-4.37 (m, 1H, Ala-H α), 4.62-4.69 (m, 1H, Dap-H α), 4.74-4.82 (m, 1H, Cys-H α), 6.91-6.96 (m, 1H, Dap-NH α), 7.08-7.13 (m, 1H, Cys-NH), 7.58-7.66 (m, 2H, Ala-NH, Dap-NH β), 7.82-8.07 (m, 5H, Val-NH, Ala-NH, DapNH₂), 8.33-8.39 (m, 1H, Dap-NH α), 8.43-8.48 (m, 1H, Cys-NH) ppm.

¹³C NMR (150 MHz, [D₆]DMSO, 35 °C): δ = 17.6 (Val-CH₃), 18.0, 18.5 (Ala-CH₃), 18.9, 19.0 (Val-CH₃), 28.0 (Boc), 29.4, 30.0 (Val-CH β), 40.0 (Cys-CH₂ β), 40.7, 41.6 (Dap-CH₂ β), 42.5 (Cys-CH₂ β), 48.2, 48.4 (Ala-CH α), 52.1 (2×Cys-CH α , Dap-CH α), 54.7 (Dap-CH α), 57.0, 58.4 (Val-CH α), 78.7, 79.0 (Boc), 154.6, 155.2, (Boc-CO), 168.4, 169.3, 169.7, 169.8, 171.5, 172.0, 172.5, 172.6 (Dap-CO, Cys-CO, Val-CO, Ala-CO) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 957.4 (100) [M + Na]⁺.

HRMS (ESI): *ber.* für C₃₈H₆₆N₁₀O₁₃S₂ ([M + H]⁺) 935.4325 *gef.* 935.4326.

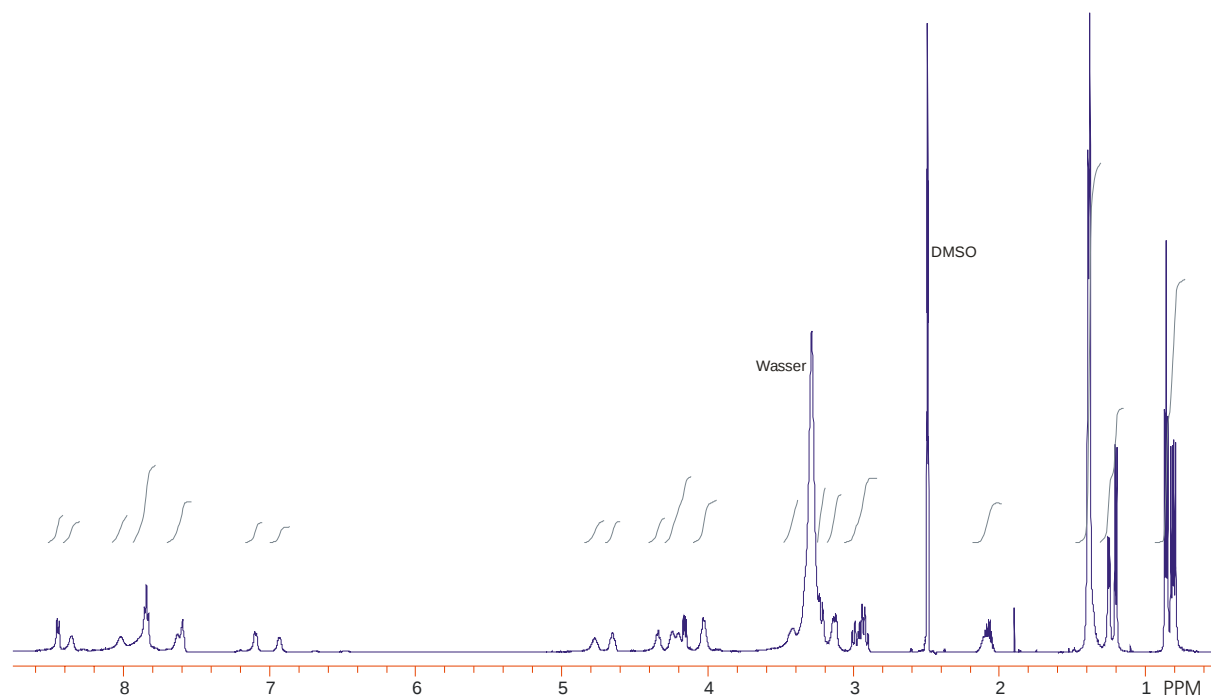
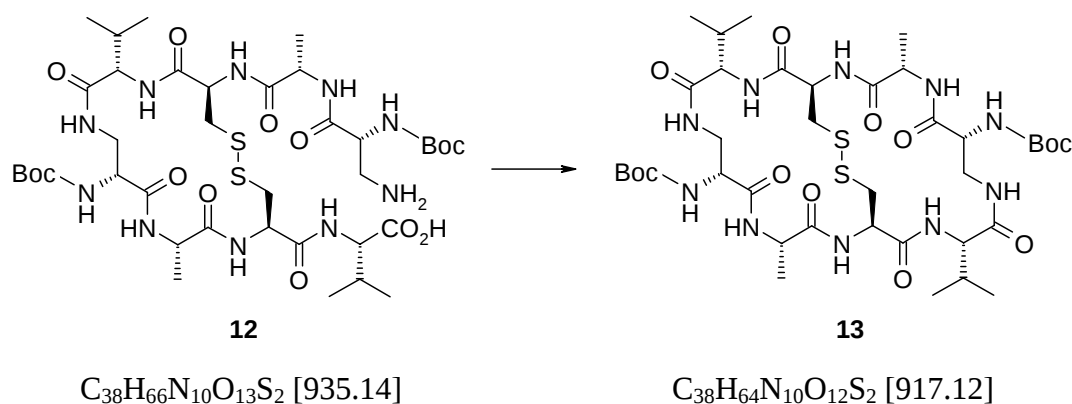


Abb. 7-11: ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, [D₆]DMSO) von **12**.

7.2.3.1.3 Zyklo(β -D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**13**)



Eine Lösung aus 41.7 mg (44.6 μ mol, 1 equiv.) **12** in 25 ml trockenem DCM/DMF 9:1 wurde bei 0°C unter Argon nacheinander unter Rühren mit 6.06 mg (44.6 μ mol, 1 equiv.) HOAt, 14.7 μ l (134 μ mol, 3 equiv.) NMM und 69.8 μ l (446 μ mol, 10 equiv.) DIC versetzt. Nach 1 h wurde das auf RT erwärmt und weitere 48 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der verbliebene Rückstand in wenigen ml Methanol aufgenommen, filtriert und durch präparative HPLC (30-80% in 30 min, R_t = 24.6 min) gereinigt. Es konnten 19.9 mg (21.7 μ mol, 49%) eines weißen Feststoffs **13** isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 210-215 °C

DC (Chloroform/Methanol 10:1) R_f = 0.54

$[\alpha]_D^{25}$ = -43.3 (MeOH, c = 0.0075)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3431, 2364, 1653, 1507, 1166, 669 cm^{-1} .

1H NMR (600 MHz, $[D_6]$ DMSO, 35 °C): δ = 0.72 (d, 3J = 7 Hz, 6H, Val-CH₃), 0.91 (d, 3J = 7 Hz, 6H, Val-CH₃), 1.09-1.15 (m, 6H, Ala-CH₃), 1.34 (s, 18H, Boc-CH₃), 2.46-2.53 (m, 2H, Val-H β), 2.92 (dd, 3J = 14 Hz, 3J = 16 Hz, 2H, Cys-H β), 3.03 (d, 3J = 12 Hz, 2H, Dap-H β), 3.18 (d, 3J = 14 Hz, 2H, Cys-H β), 3.81-3.85 (m, 2H, Dap-H α), 3.86-3.91 (m, 2H, Dap-H β), 4.32 (d, 3J = 11 Hz, 2H, Val-H α), 4.49-4.57 (m, 2H, Ala-

H α), 4.84-4.92 (m, 2H, Cys-H α), 6.44-6.50 (m, 2H, Dap-NH α), 6.84 (d, $^3J = 8$ Hz, 2H, Ala-NH), 7.64 (d, $^3J = 10$ Hz, 2H, Val-NH), 7.92-7.97 (m, 2H, Dap-NH β), 8.96 (d, $^3J = 9$ Hz, 2H, Cys-NH) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): $\delta = 15.1, 18.6$ (Val-CH $_3$), 19.5 (Ala-CH $_3$), 27.8 (Boc), 29.3 (Val-CH β), 39.4 (Dap-CH $_2\beta$), 40.1 (Cys-CH $_2\beta$), 46.5 (Ala-CH α), 53.8 (Cys-CH α), 56.6 (Val-CH α), 57.8 (Dap-CH α), 78.9 (Boc), 154.5 (Boc-CO), 170.1, 170.6, 172.9, 173.1 (Dap-CO, Cys-CO, Val-CO, Ala-CO) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 939.4 (100) $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

HRMS (ESI): ber. für $\text{C}_{38}\text{H}_{64}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{S}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$) 917.4219 gef. 917.4218.

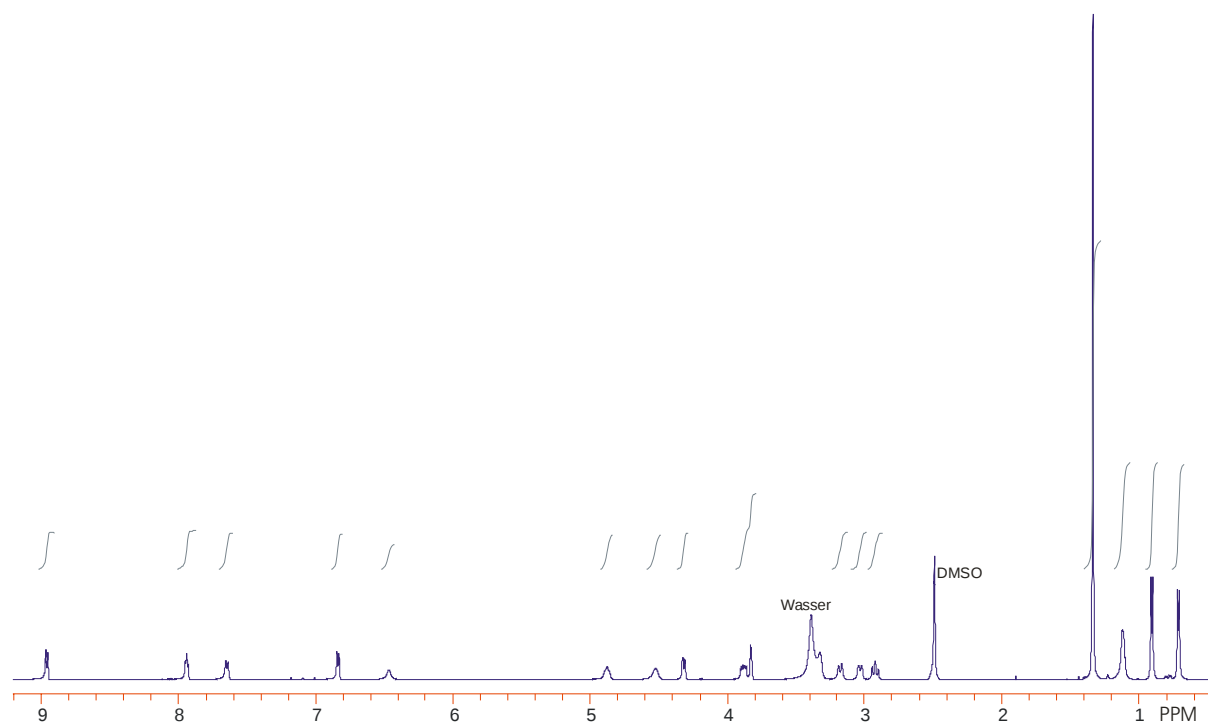
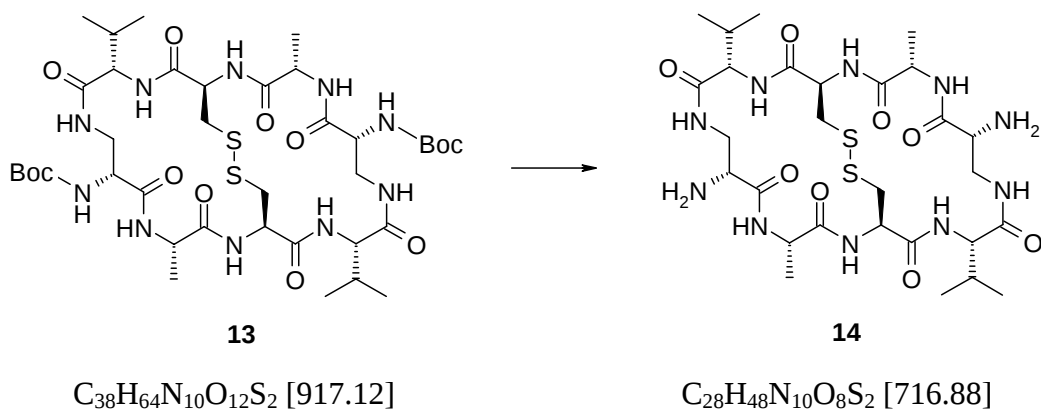


Abb. 7-12: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **13**.

7.2.3.1.4 Zyklo(β -D-Dap-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (14)



Eine Lösung aus 8.10 mg (8.83 μ mol) **13** in 10 ml DCM/TFA 1:1 wurde bei RT 15 min gerührt. Anschließend wurde das Gemisch bis zur Trockene eingengt, der verbliebene Rückstand in wenigen ml Methanol aufgenommen, filtriert und durch präparative HPLC (5-80% in 40 min, R_t = 19.1 min) gereinigt. Es konnten 5.68 mg (7.92 μ mol, 90%) eines weißen Feststoffs **14** isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 220-225 °C (Zersetzung)

DC (Chloroform/Methanol 8:1) R_f = 0.40

$[\alpha]_D^{25}$ = 12.5 (MeOH, c = 0.03)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3431, 2344, 1654, 1540, 1203, 1136, 838, 800, 723 cm^{-1} .

1H NMR (600 MHz, $[D_6]DMSO$, 35 °C): δ = 0.82 (d, 3J = 7 Hz, 12 H, Val- CH_3), 1.38 (d, 3J = 7 Hz, 6H, Ala- CH_3), 2.19-2.26 (m, 2H, Val-H β), 2.90 (m, 2H, Cys-H β), 2.95-3.05 (m, 2H, Cys-H β), 3.46 (m, 2H, Dap-H β), 3.74-3.81 (m, 2H, Dap-H β), 3.83-3.87 (m, 2H, Dap-H α), 4.15-4.19 (m, 2H, Val-H α), 4.22-4.28 (m, 2H, Ala-H α), 5.04-5.14 (m, 2H, Cys-H α), 7.70-7.78 (m, 2H, Val-NH), 7.95-8.02 (m, 2H, Dap-NH β), 8.11-8.15 (m, 2H, Ala-NH), 8.15-8.30 (m, 4H, Dap-NH 2α), 8.80-8.95 (m, 2H, Cys-NH) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): δ = 16.9 (Val- CH_3), 18.0 (Ala- CH_3), 19.4 (Val- CH_3), 29.6 (Val- CH_β), 39.2 (Dap- $\text{CH}_2\beta$), 42.2 (Cys- $\text{CH}_2\beta$), 49.1 (Ala- CH_α), 53.2 (Dap- CH_α , Cys- CH_α), 57.8 (Val- CH_α), 166.0, 169.6, 171.8, 172.6 (Dap-CO, Cys-CO, Val-CO, Ala-CO) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 717.3 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$.

HRMS (ESI): ber. für $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{N}_{10}\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 717.3171 gef. 717.3173.

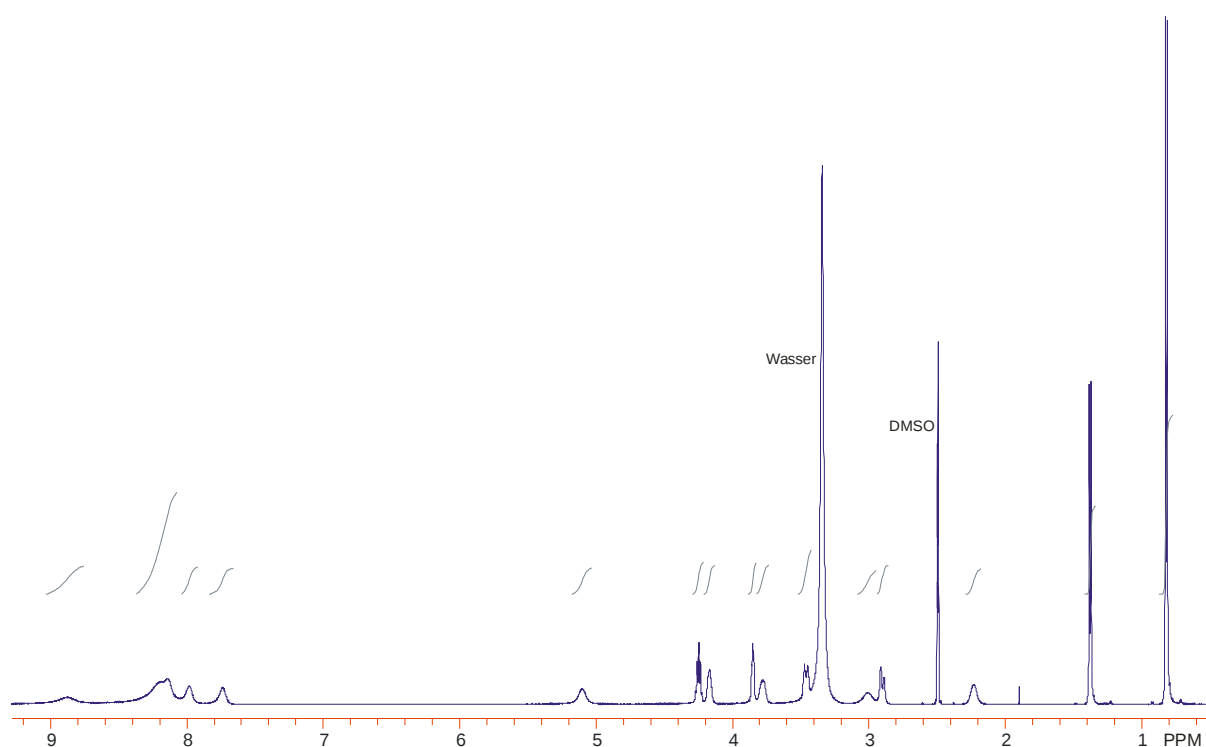
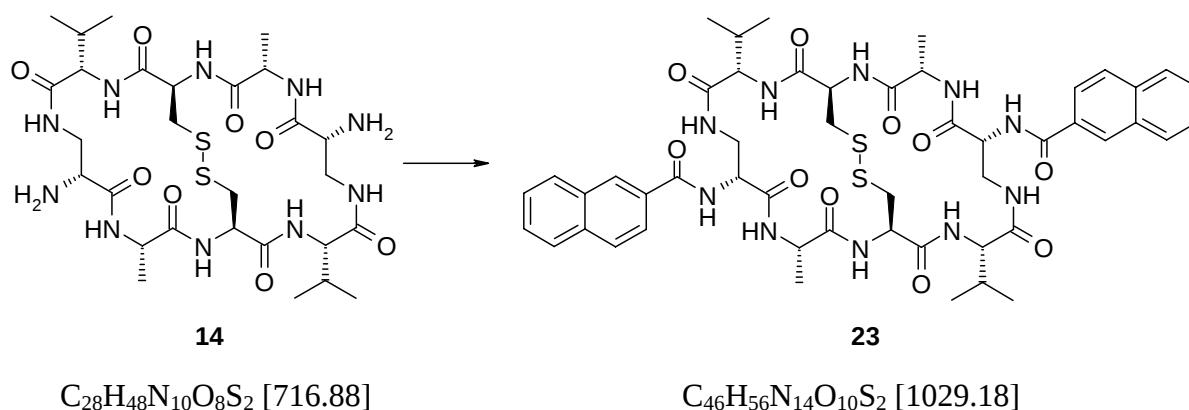


Abb. 7-13: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **14**.

7.2.3.2 Synthese von einheitlich Chromophor-substituierten Des-*N*-Tetramethylazatriostinderivaten

7.2.3.2.1 Des-*N*-Tetramethylazatriostin (23)



Eine Lösung aus 9.02 mg (12.6 μmol , 1 equiv.) **14** in 15 ml DCM/DMF 9:1 wurde unter Argon auf 0°C abgekühlt und nacheinander mit 6.85 mg (50.3 μmol , 4 equiv.) HOAt, 16.6 μl (151 μmol , 12 equiv.) NMM, 78.4 μl (503 μmol , 40 equiv.) DIC und 8.77 mg (50.3 μmol , 4 equiv.) 2-Chinoxalincarbonsäure versetzt. Nach 1 h Rühren bei 0°C, wurde die Reaktionsmischung weitere 48 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der verbliebene Rückstand in wenigen ml Methanol aufgenommen, filtriert und durch präparative HPLC (30-80% in 30 min, R_t = 18.6 min) gereinigt. Es konnten 4.27 mg (4.15 μmol , 33%) eines weißen Feststoffs **23** isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 225-230 °C

DC (Chloroform/Methanol 10:1) R_f = 0.42

$[\alpha]_D^{25} = -137$ (DMSO, $c = 0.075$)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3443, 2930, 2363, 1652, 1536 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): δ = 0.71 (d, 3J = 7 Hz, 6H, Val- CH_3), 0.84 (d, 3J = 7 Hz, 6H, Val- CH_3), 1.14 (d, 3J = 7 Hz, 6H, Ala- CH_3), 2.56-2.62 (m, 2H, Val- $\text{H}\beta$), 2.93 (dd, 3J = 12 Hz, 3J = 15 Hz, 2H, Cys- $\text{H}\beta$), 3.23 (dd, 3J = 3 Hz, 3J = 15 Hz, 2H, Cys- $\text{H}\beta$), 3.32-3.37 (m, 2H, Dap- $\text{H}\beta$), 4.03-4.08 (m, 2H, Dap- $\text{H}\beta$), 4.37-4.39 (m, 2H, Cys- $\text{H}\alpha$), 4.39-4.41 (m, 2H, Val- $\text{H}\alpha$), 4.54-4.61 (m, 2H, Ala- $\text{H}\alpha$), 5.01-5.07 (m, 2H, Cys- $\text{H}\alpha$), 7.20 (d, 3J = 8 Hz, 2H, Ala-NH), 7.77-7.81 (m, 2H, Dap-NH β), 7.87 (d, 3J = 10 Hz, 2H, Val-NH), 7.94-8.00 (m, 4H, Chinoxalin-H6, Chinoxalin-H7), 8.05 (d, 3J = 8 Hz, 2H, Chinoxalin-H5), 8.19 (d, 3J = 8 Hz, 2H, Chinoxalin-H8), 8.90 (d, 3J = 9 Hz, 2H, Cys-NH), 9.28 (d, 3J = 6 Hz, 2H, Dap-NH α), 9.45 (s, 2H, Chinoxalin-H3) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): δ = 16.0 (Val- CH_3), 19.0 (Val- CH_3), 19.1 (Ala- CH_3), 29.7 (Val- $\text{CH}\beta$), 40.0 (Dap- $\text{CH}_2\beta$), 41.4 (Cys- $\text{CH}_2\beta$), 47.1 (Ala- $\text{CH}\alpha$), 54.0 (Cys- $\text{CH}\alpha$), 56.5 (Dap- $\text{CH}\alpha$), 56.8 (Val- $\text{CH}\alpha$), 129.0 (Chinoxalin-C5), 129.1 (Chinoxalin-C8), 131.4 (Chinoxalin-C6), 132.0 (Chinoxalin-C7), 139.6 (Chinoxalin-C2, C4a, C8a), 143.0 (Chinoxalin-C2, C4a, C8a), 143.2 (Chinoxalin-C3), 143.3 (Chinoxalin-C2, C4a, C8a), 163.6, 168.1, 170.1, 172.4, 173.4 (Dap-CO, Cys-CO, Val-CO, Ala-CO, Chinoxalin-CO) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 1029.4 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$.

HRMS (ESI): ber. für $\text{C}_{46}\text{H}_{56}\text{N}_{14}\text{O}_{10}\text{S}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$) 1029.3818 gef. 1029.3818.

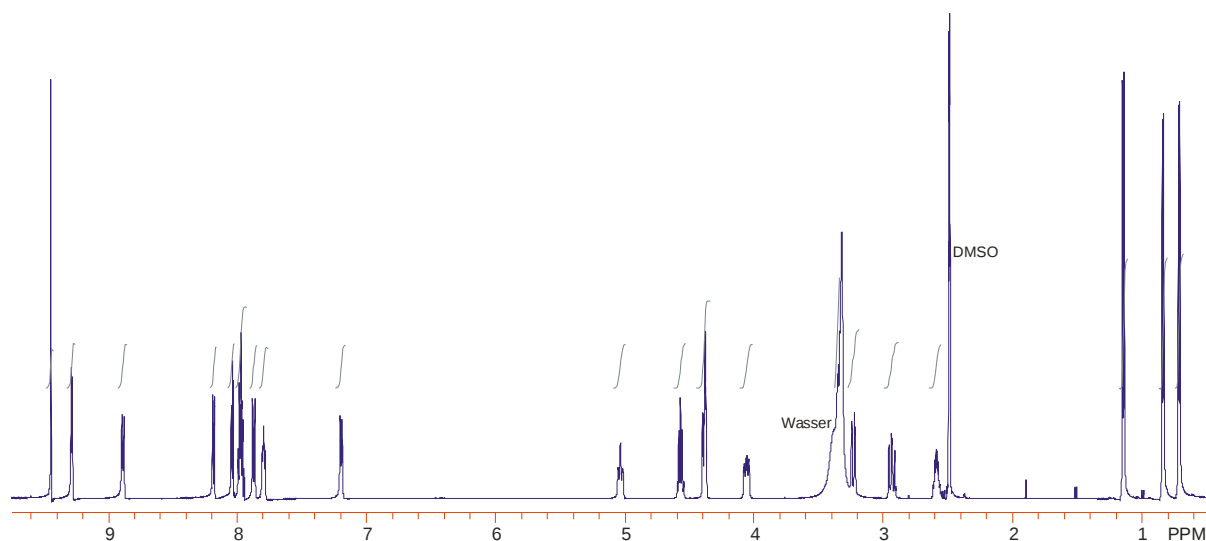
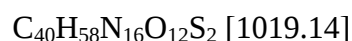
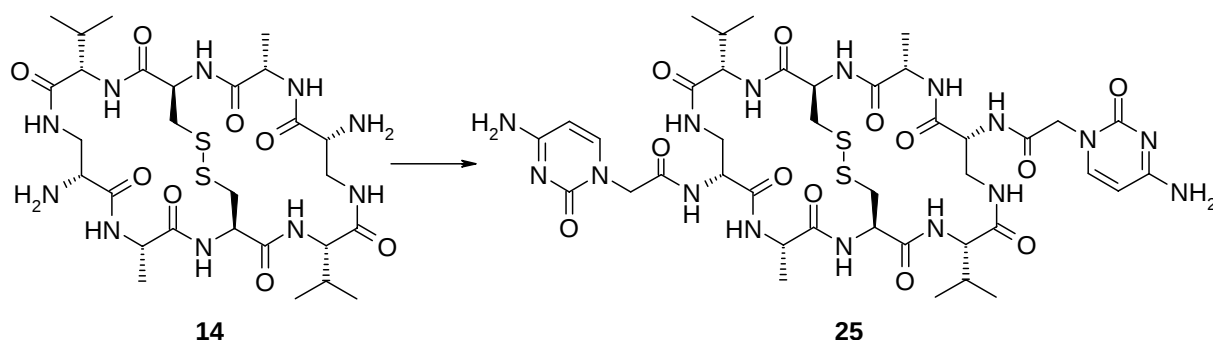


Abb. 7-14: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **23**.

7.2.3.2.2 Zyklo(β -D-Dap(cytosin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap(cytosin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**25**)



Eine Lösung aus 10.0 mg (13.9 μmol , 1 equiv.) **14** in 15 ml DCM/DMF 9:1 wurde unter Argon auf 0°C abgekühlt und nacheinander mit 7.57 mg (55.6 μmol , 4 equiv.) HOAt, 18.4 μl (167 μmol , 12 equiv.) NMM, 87.4 μl (556 μmol , 40 equiv.) DIC und 16.9 mg (55.6 μmol , 4 equiv.) (N^4 -Z-Cytosin-1-yl)-essigsäure versetzt. Nach 1 h Rühren bei 0°C, wurde die Reaktionsmischung weitere 48 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der verbliebene Rückstand mit 5 ml TFA/Thioanisol 10:1 versetzt. Die Lösung wurde 48 h bei RT gerührt und anschließend im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Der milchig braune Rückstand wurde in wenigen ml Methanol aufgenommen, filtriert und durch präparative HPLC (5-50% in 30 min, $R_t = 17.1$ min) gereinigt. Es konnten 6.00 mg (5.89 μmol , 42%) eines weißen Feststoffs **25** isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 265-270°C (Zersetzung)

DC (Chloroform/Methanol 2:1) $R_f = 0.53$

$[\alpha]_D^{25} = 32.5$ (DMSO, $c = 0.033$)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3432, 2367, 1654, 1540, 1458, 1203, 1139, 669 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): δ = 0.78 (d, 3J = 7 Hz, 6H, Val- CH_3), 0.85 (d, 3J = 7 Hz, 6H, Val- CH_3), 1.21 (d, 3J = 7 Hz, 6H, Ala- CH_3), 2.30-2.36 (m, 2H, Val- $\text{H}\beta$), 2.91 (dd, 3J = 12 Hz, 3J = 15 Hz, 2H, Cys- $\text{H}\beta$), 3.06 (d, 3J = 12 Hz, 2H, Cys- $\text{H}\beta$), 3.31-3.36 (m, 2H, Dap- $\text{H}\beta$), 3.64-3.69 (m, 2H, Dap- $\text{H}\beta$), 4.18-4.22 (m, 2H, Dap- $\text{H}\alpha$), 4.26 (dd, 3J = 10 Hz, 3J = 4 Hz, 2H, Val- $\text{H}\alpha$), 4.36-4.42 (m, 2H, Ala- $\text{H}\alpha$), 4.48-4.52 (m, 4H, acetyl- CH_2), 5.08 (m, 2H, Cys- $\text{H}\alpha$), 6.09 (d, 3J = 7 Hz, 2H, Cytosin- $\text{H}5$), 7.16 (d, 3J = 6 Hz, 2H, Ala- NH), 7.51-7.56 (m, 2H, Dap- $\text{NH}\beta$), 7.93 (d, 3J = 7 Hz, 2H, Cytosin- $\text{H}6$), 7.99 (d, 3J = 10 Hz, 2H, Val- NH), 8.34-8.39 (m, 2H, Dap- $\text{NH}\alpha$), 8.85 (s, br., 2H, Cytosin- NH), 8.89 (d, 3J = 9 Hz, 2H, Cys- NH), 9.44 (s, br., 2H, Cytosin- NH) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): δ = 16.5 (Val- CH_3), 18.3 (Ala- CH_3), 19.3 (Val- CH_3), 29.4 (Val- $\text{CH}\beta$), 40.6 (Dap- $\text{CH}_2\beta$), 42.2 (Cys- $\text{CH}_2\beta$), 47.7 (Ala- $\text{CH}\alpha$), 51.4 (acetyl- CH_2), 53.9 (Cys- $\text{CH}\alpha$), 55.7 (Dap- $\text{CH}\alpha$), 56.9 (Val- $\text{CH}\alpha$), 93.5 (Cytosin- $\text{C}5$), 148.6 (Cytosin- $\text{C}4$), 150.0 (Cytosin- $\text{C}6$), 160.5, 166.5, 168.0, 169.8, 172.5, 173.5 (Dap-CO, Cys-CO, Val-CO, Ala-CO, acetyl-CO, Cytosin- $\text{C}2$) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 1019.5 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$.

HRMS (ESI): ber. für $\text{C}_{40}\text{H}_{58}\text{N}_{16}\text{O}_{12}\text{S}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$) 1019.3934 gef. 1019.3941.

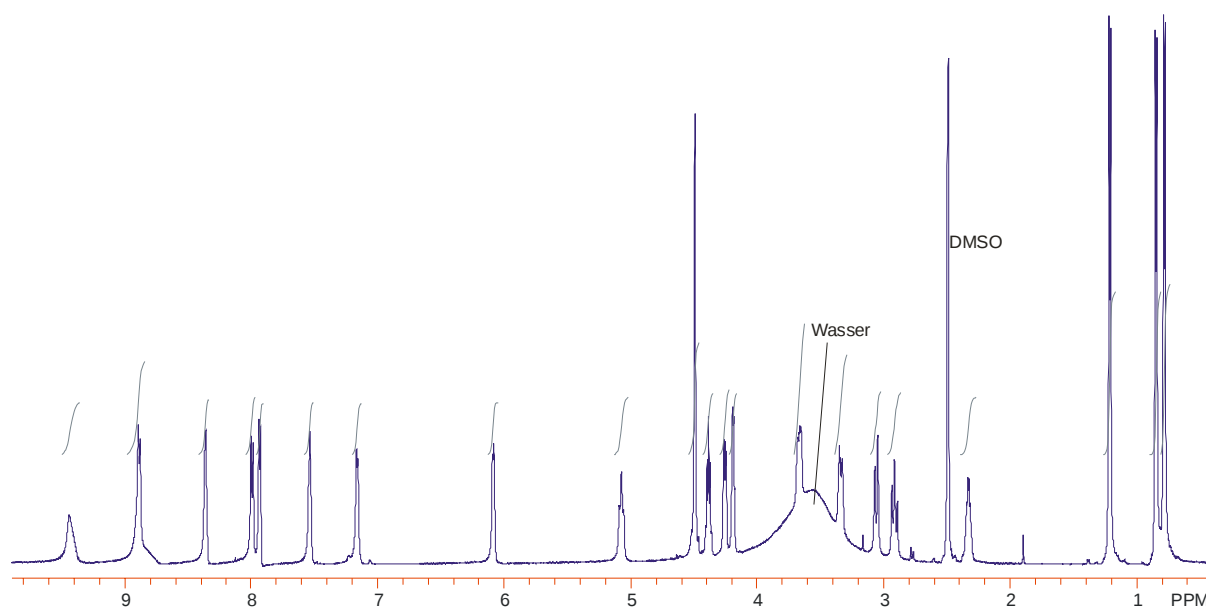
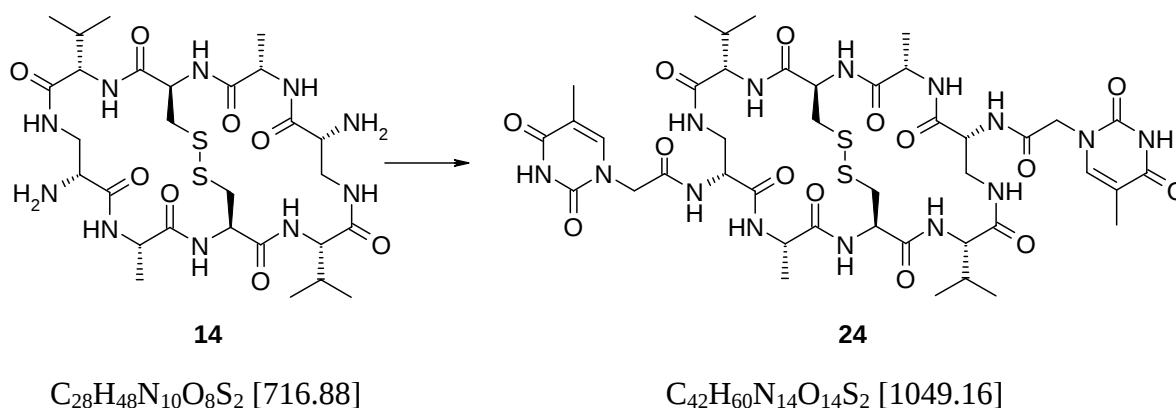


Abb. 7-15: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **25**.

7.2.3.2.3 Zyκλο(β -D-Dap(thymin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap(thymin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**24**)



Eine Lösung aus 22.1 mg (30.8 μ mol, 1 equiv.) **14** in 15 ml DCM/DMF 9:1 wurde unter Argon auf 0°C abgekühlt und nacheinander mit 16.8 mg (123 μ mol, 4 equiv.) HOAt, 23.6 mg (123 μ mol, 4 equiv.) EDCI und 22.7 mg (123 μ mol, 4 equiv.) (Thyminyl-1-yl)-essigsäure versetzt. Nach 1 h Rühren bei 0°C, wurde die Reaktionsmischung weitere 48 h bei RT gerührt und anschließend im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in wenigen ml Methanol aufgenommen, filtriert und durch präparative HPLC (5-50% in 30 min, R_t = 22.4 min) gereinigt. Es konnten 11.4 mg (10.9 μ mol, 35%) eines weißen Feststoffs **24** isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 255-260°C (Zersetzung)

DC (Chloroform/Methanol 5:1) R_f = 0.47

$[\alpha]_D^{25}$ = 26.0 (MeOH, c = 0.013)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3442, 2368, 1654, 1521, 1458, 670 cm^{-1} .

1H NMR (600 MHz, $[D_6]DMSO$, 35 °C): δ = 0.78 (d, 3J = 5 Hz, 6H, Val-CH₃), 0.85 (d, 3J = 5 Hz, 6H, Val-CH₃), 1.21 (d, 3J = 6 Hz, 6H, Ala-CH₃), 1.76 (s, 6H, Thymin-CH₃), 2.30-2.36 (m, 2H, Val-H β), 2.90 (dd, 3J = 13 Hz, 3J = 16 Hz, 2H, Cys-H β), 3.08 (d, 3J = 13 Hz, 2H, Cys-H β), 3.32 (m, 2H, Dap-H β), 3.64-3.70 (m, 2H, Dap-H β), 4.16-

4.21 (m, 2H, Dap-H α), 4.27 (d, $^3J = 9$ Hz, 2H, Val-H α), 4.32 (m, 4H, acetyl-CH $_2$), 4.37-4.42 (m, 2H Ala-H α), 5.06-5.12 (m, 2H Cys-H α), 7.04-7.10 (m, 2H Ala-NH), 7.47 (s, 2H, Thymin-H6), 7.49-7.54 (m, 2H, Dap-NH β), 8.04 (d, $^3J = 9$ Hz, 2H, Val-NH), 8.20-8.24 (m, 2H, Dap-NH α), 8.87 (m, 2H, Cys-NH), 11.24 (s, 2H, Thymin-NH) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): $\delta = 11.9$ (Thymin-CH $_3$), 16.5 (Val-CH $_3$), 18.4 (Ala-CH $_3$), 19.4 (Val-CH $_3$), 29.3 (Val-CH β), 40.6 (Dap-CH $_2\beta$), 42.3 (Cys-CH $_2\beta$), 47.6 (Ala-CH α), 50.5 (acetyl-CH $_2$), 53.9 (Cys-CH α), 55.9 (Dap-CH α), 56.8 (Val-CH α), 108.5 (Thymin-C5), 141.7 (Thymin-C6), 151.1 (Thymin-C2), 164.3 (Thymin-C4), 167.5, 168.1, 169.8, 172.5, 173.5 (Dap-CO, Cys-CO, Val-CO, Ala-CO, acetyl-CO) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 1071.6 (100) $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

HRMS (ESI): ber. für $\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{N}_{14}\text{O}_{14}\text{S}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$) 1049.3928 gef. 1049.3941.

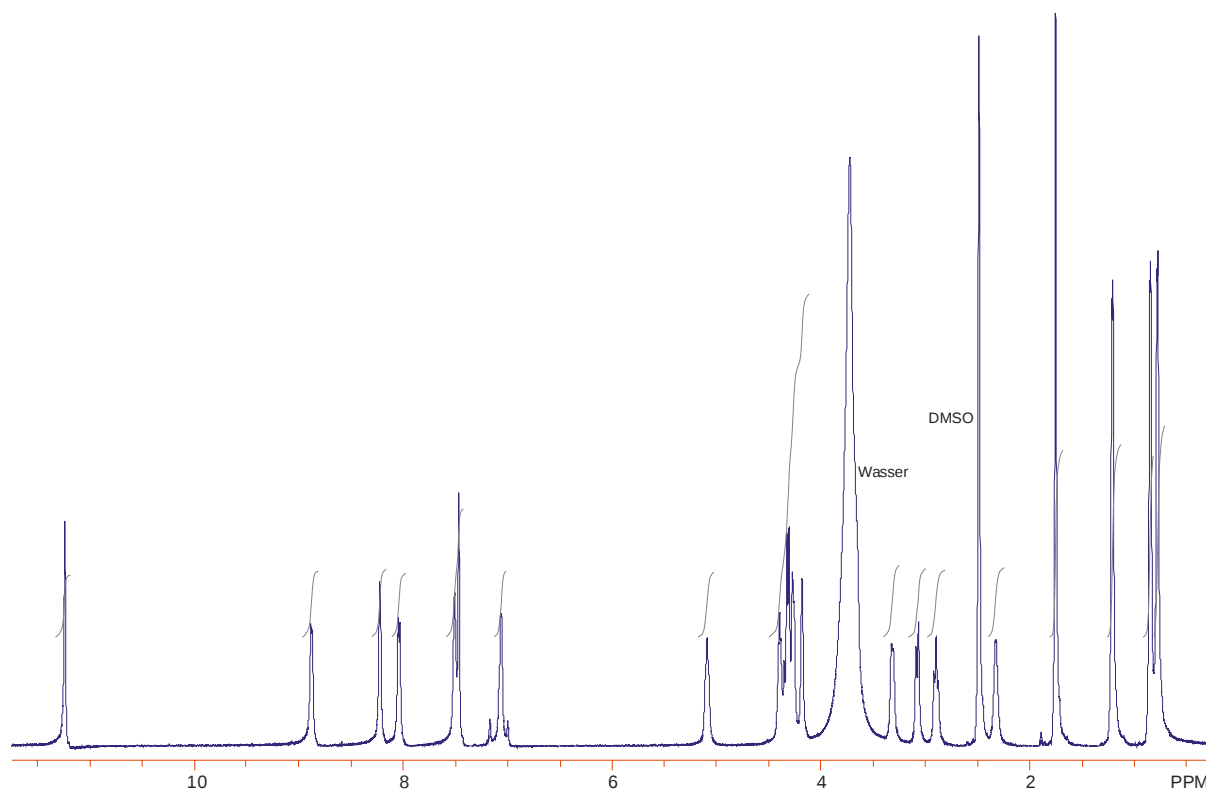
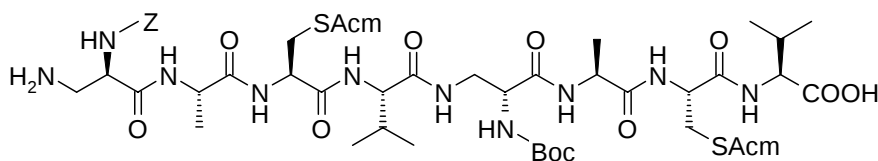


Abb. 7-16: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **24**.

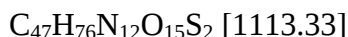
7.2.4 Synthese der orthogonal Nukleobasen-substituierten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Analoga

7.2.4.1 Synthese des orthogonal geschützten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Rückgrats

7.2.4.1.1 Z-D-Dap-L-Ala-L-Cys(Acm)-L-Val-β-D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys(Acm)-L-Val-OH (15)



15



Die Synthese von 1 wurde gemäß ASV 1 unter Verwendung von 513 mg (0.94 mmol¹, 482 mmol, 1 equiv.) L-Valin belegten 2-Chlorotriethylharz durchgeführt. Als Aminosäuren wurden Fmoc-L-Cys(Acm)-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Boc-D-Dap(Fmoc)-OH, Z-D-Dap(Fmoc)-OH und Fmoc-L-Val-OH eingesetzt. Fmoc-L-Ala-OH, Boc-D-Dap(Fmoc)-OH, Z-D-Dap(Fmoc)-OH und Fmoc-L-Val-OH wurden mit der HBTU-Kupplung gekuppelt, Fmoc-L-Cys(Acm)-OH wurde gemäß der DIC-Kupplung gekuppelt. Die HPLC-Analyse (5–60 % in 30 min, $R_t = 21.2$ min) ergab, dass keine signifikanten Nebenprodukte entstanden und hiermit keine zusätzlichen Reinigungsschritte nötig waren. Es konnten 440 mg (395 mmol, 82%) eines weißen Feststoffs 15 isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 205-210 °C

DC (Chloroform/Methanol 3:1) $R_f = 0.54$

$[\alpha]_D^{25} = -8.3$ (MeOH, $c = 0.024$)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3428, 2932, 1650, 1540, 1258, 560 \text{ cm}^{-1}$.

^1H (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): δ = 0.79-0.87 (m, 12H, Val- CH_3), 1.18-1.23 (m, 6H, Ala- CH_3), 1.36 (s, 9H, Boc- CH_3), 1.84 (s, 3H, Acm- CH_3), 1.85 (s, 3H, Acm- CH_3), 2.00-2.08 (m, 2H, Val- $\text{H}\beta$), 2.68-2.75 (m, 2H, Cys- $\text{H}\beta$), 2.84-2.98 (m, 2H, Cys- $\text{H}\beta$), 3.28-3.32 (m, 2H, Dap- $\text{H}\beta$), 3.35-3.39 (m, 2H, Dap- $\text{H}\beta$), 3.99-4.02 (m, 1H, Val- $\text{H}\alpha$), 4.02-4.07 (m, 1H, Dap- $\text{H}\alpha$), 4.12-4.35 (m, 8H, Ala- $\text{H}\alpha$, Val- $\text{H}\alpha$, Dap- $\text{H}\alpha$, Acm- CH_2), 4.56-4.61 (m, 1H, Cys- $\text{H}\alpha$), 4.61-4.67 (m, 1H, Cys- $\text{H}\alpha$), 5.03 (s, 2H, Z- CH_2), 6.70-6.75 (m, 1H, Dap-NH α), 7.28-7.38 (m, 5H, Z-Ph), 7.60 (d, 3J = 7 Hz, 1H, Dap-NH α), 7.63 (d, 3J = 8 Hz, 1H, Val-NH), 7.73-7.80 (m, 1H, Val-NH), 7.87-7.92 (m, 2H, Dap-NH β), 8.21-8.25 (m, 1H, Cys-NH), 8.36-8.39 (m, 1H, Cys-NH), 8.46-8.55 (m, 4H, Ala-NH, Acm-NH) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): δ = 17.5, 17.8 (Val- CH_3), 18.3, 18.5 (Ala- CH_3), 19.1, 19.2 (Val- CH_3), 22.4 (Acm- CH_3), 28.0 (Boc), 30.2, 30.5 (Val- $\text{CH}\beta$), 31.8, 32.1 (Cys- $\text{CH}_2\beta$), 39.9, 40.0 (Acm- CH_2), 40.4, 42.0 (Dap- $\text{CH}_2\beta$), 48.1, 48.2 (Ala- $\text{CH}\alpha$), 52.5, 52.6 (Cys- $\text{CH}\alpha$), 54.9, 55.1 (Dap- $\text{CH}\alpha$), 57.5, 58.1 (Val- $\text{CH}\alpha$), 65.6 (Z- CH_2), 78.5 (Boc), 127.6, 127.7, 128.2 (Z-Ph), 136.7 (Z-Ph $_{\text{ipso}}$), 154.9, 156.0 (Boc-CO, Z-CO), 169.4, 169.5, 169.8, 170.0, 171.3, 172.0, 172.1 (Acm-CO, Dap-CO, Cys-CO, Val-CO, Ala-CO) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 1113.3 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$.

HRMS (ESI): ber. für $\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{N}_{12}\text{O}_{15}\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1113.5067 gef. 1113.5063.

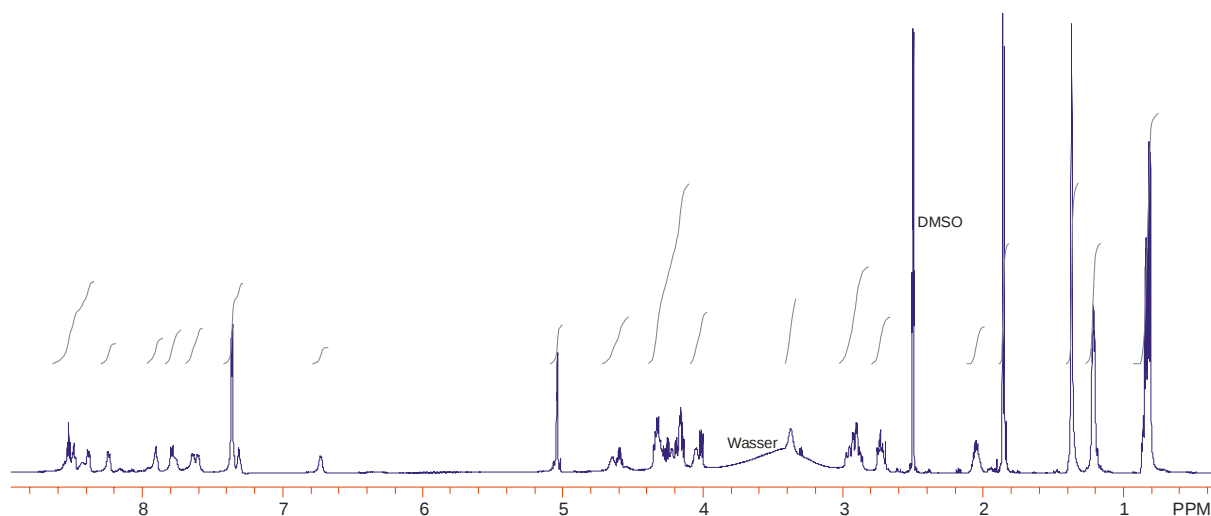
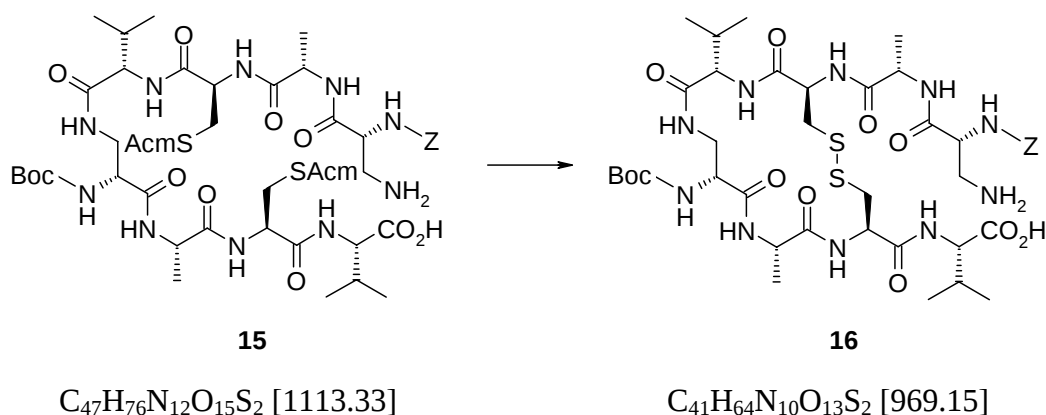


Abb. 7-17: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **15**.

7.2.4.1.2 Z-D-Dap-L-Ala-L-Cys-L-Val-β-D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys-L-Val-OH disulfid (**16**)



Eine Lösung aus 19.5 mg (17.5 μmol, 1 equiv.) **15** in 25 ml wässriger Essigsäure (80%) wurde unter Argonatmosphäre mit 44.5 mg (175 μmol, 10 equiv.) Iod versetzt und anschließend 1 h bei RT gerührt. Die tiefrote Lösung wurde mit 25 ml Wasser gequench und anschließend sechsmal mit jeweils 15 ml Tetrachlorkohlenstoff extrahiert, bis die wässrige Phase farblos war. Das Lösungsmittel wurde azeotrop unter mehrmaligem Zusatz von Toluol abdestilliert. Der braune Rückstand wurde in wenigen ml Methanol aufgenommen, filtriert und durch präparative HPLC (10-60% in 30 min, $R_t = 28.0$ min) gereinigt. Es konnten 8.66 mg (8.93 μmol, 51%) eines weißen Feststoffs **16** isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 170-175 °C

DC (Chloroform/Methanol 4:1) $R_f = 0.58$

$[\alpha]_D^{25} = -14.8$ (MeOH, $c = 0.0135$)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3430, 2927, 1653, 1531, 1459, 1260, 1172$ cm⁻¹.

¹H NMR NMR (600 MHz, [D₆]DMSO, 35 °C): $\delta = 0.81$ -0.88 (m, 12H, Val-CH₃), 1.21 (d, ³ $J = 7$ Hz, 3H, Ala-CH₃), 1.25 (d, ³ $J = 7$ Hz, 3H, Ala-CH₃), 1.38 (s, 9H, Boc-CH₃), 2.04-2.10 (m, 1H, Val-Hβ), 2.10-2.19 (m, 1H, Val-Hβ), 2.89-3.00 (m, 4H, Cys-Hβ,

Dap-H β), 3.14-3.22 (m, 4H, Cys-H β , Dap-H β), 3.96-4.18 (m, 3H, Dap-H α , Val-H α), 4.20-4.28 (m, 1H, Ala-H α), 4.31-4.40 (m, 2H, Dap-H α , Ala-H α), 4.66-4.75 (m, 2H, Cys-H α), 5.06 (s, 2H, Z-CH $_2$), 6.86-6.94 (m, 1H, Dap-NH α), 7.28-7.40 (m, 5H, Z-Ph), 7.56 (d, $^3J = 8$ Hz, 1H, Ala-NH/Dap-NH α), 7.59-7.64 (m, 1H, Dap-NH β), 7.82-7.95 (m, 3H, Val-NH, Ala-NH/Dap-NH α /Dap-NH β), 8.25-8.55 (m, 3H, Cys-NH, Ala-NH/Dap-NH α /Dap-NH β) ppm.

^{13}C (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): $\delta = 17.6$, (Val-CH $_3$), 18.2, 18.5 (Ala-CH $_3$), 18.9, 19.0 (Val-CH $_3$), 28.0 (Boc), 29.4, 30.2 (Val-CH β), 40.7, 41.6, 42.7 (Cys-CH $_2\beta$, Dap-CH $_2\beta$), 48.3 52.2, 52.5 (Ala-CH α , Val-CH α , Cys-CH α , Dap-CH α), 65.9 (Z-CH $_2$), 78.7 (Boc), 127.7, 127.8, 128.3 (Z-Ph), 136.5 (Z-Ph $_{\text{ipso}}$), 154.6, 155.9 (Boc-CO, Z-CO), 168.1, 169.6, 169.7, 172.1, 172.6 (Dap-CO, Cys-CO, Val-CO, Ala-CO) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 969.2 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$.

HRMS (ESI): ber. für $\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{S}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$) 969.4169 gef. 969.4169.

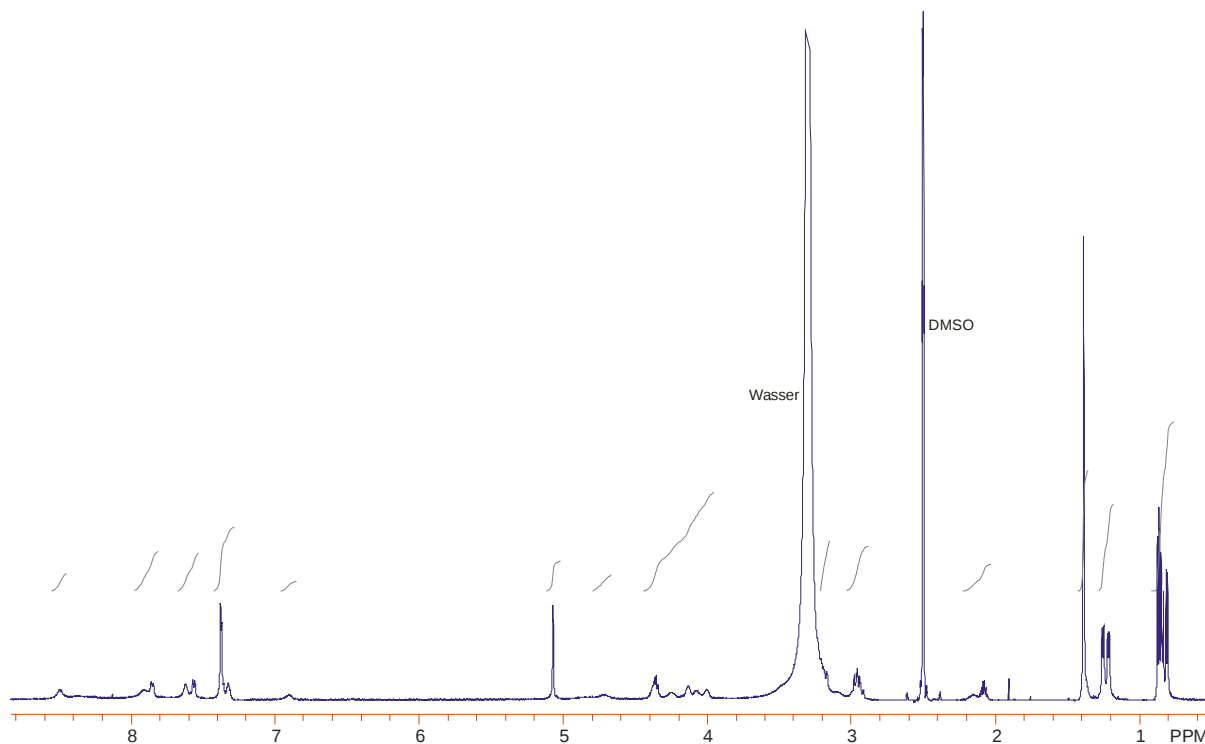
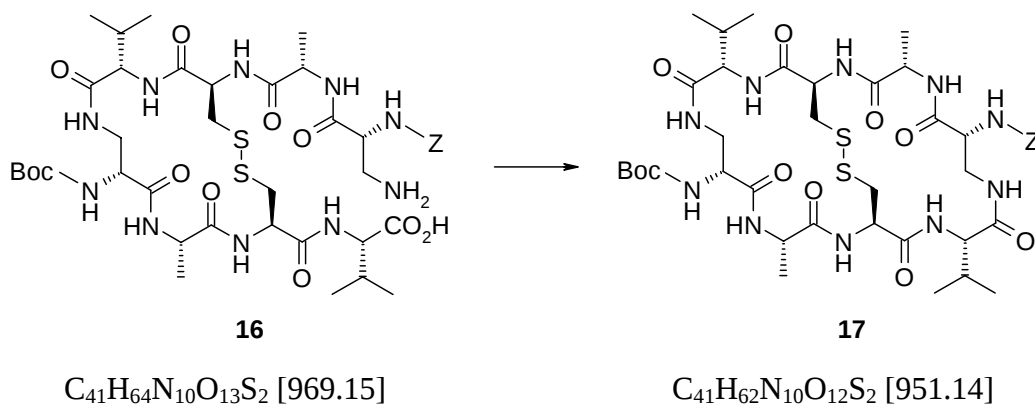


Abb. 7-18: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **16**.

7.2.4.1.3 Zyklo(β -D-Dap(Z)-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap(Boc)-L-Ala-L-Cys-L-Val)disulfid (**17**)



Eine Lösung aus 10.3 mg (10.6 μ mol, 1 equiv.) **16** in 25 ml trockenem DCM/DMF 9:1 wurde bei 0°C unter Argon nacheinander unter Rühren mit 1.45 mg (10.6 μ mol, 1 equiv.) HOAt, 3.51 μ l (31.9 μ mol, 3 equiv.) NMM und 16.6 μ l (106 μ mol, 10 equiv.) DIC versetzt. Nach 1 h wurde das auf RT erwärmt und weitere 48 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der verbliebene Rückstand in wenigen ml Methanol aufgenommen, filtriert und durch präparative HPLC (30-80% in 30 min, R_t = 24.6 min) gereinigt. Es konnten 3.34 mg (3.51 μ mol, 33%) eines weißen Feststoffs **17** isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 250-255 °C

DC (Chloroform/Methanol 5:1) R_f = 0.52

$[\alpha]_D^{25}$ = -6.25 (MeOH, c = 0.016)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3430, 2927, 1652, 1524, 1375, 1258, 1167 cm^{-1} .

^1H NMR (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): δ = 0.72 (d, 3J = 7 Hz, 3H, Val-CH₃), 0.75 (d, 3J = 7 Hz, 3H, Val-CH₃), 0.86 (d, 3J = 7 Hz, 3H, Val-CH₃), 0.90 (d, 3J = 7 Hz, 3H, Val-CH₃), 1.05-1.10 (m, 3H, Ala-CH₃), 1.10-1.15 (m, 3H, Ala-CH₃), 1.34 (s, 9H, Boc-CH₃), 2.40-2.52 (m, 2H, Val-H β), 2.87-2.95 (m, 2H, Cys-H β), 3.02-3.07 (m, 1H, Dap-

H β), 3.13-3.20 (m, 3H, Cys-H β , Dap-H β), 3.82-3.91 (m, 3H, Dap-H β , Dap-H α), 3.94-3.99 (m, 1H, Dap-H α), 4.26-4.31 (m, 1H, Val-H α), 4.31-4.35 (m, 1H, Val-H α), 4.46-4.56 (m, 2H, Ala-H α), 4.89-4.96 (m, 2H, Cys-H α), 4.98-5.12 (m, 2H, Z-CH $_2$), 6.48-6.54 (m, 1H, Dap-NH α), 6.85 (d, $^3J = 8$ Hz, 1H, Ala-NH), 6.96-7.04 (m, 2H, Ala-NH, Dap-NH α), 7.28-7.36 (m, 5H, Z-Ph), 7.68 (d, $^3J = 10$ Hz, 1H, Val-NH), 7.72-7.80 (m, 2H, Val-NH, Dap-NH β), 7.88-7.93 (m, 1H, Dap-NH β), 8.91 (d, $^3J = 9$ Hz, 1H, Cys-NH), 8.98 (d, $^3J = 9$ Hz, 1H, Cys-NH) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): $\delta = 15.4, 15.6, 18.8$ (Val-CH $_3$), 19.2, 19.6 (Ala-CH $_3$), 27.8 (Boc), 29.0, 29.3, (Val-CH β), 39.2 (Dap-CH $_2\beta$), 40.1 (Cys-CH $_2\beta$, Dap-CH $_2\beta$), 40.2 (Cys-CH $_2\beta$), 46.6 (Ala-CH α), 53.9 (Cys-CH α), 56.7 (Val-CH α), 57.5 (Dap-CH α), 65.7 (Z-CH $_2$), 127.3, 127.8, 128.2 (Z-Ph), 154.5 (Boc-CO, Z-CO), 169.9, 172.8, 173.2 (Dap-CO, Cys-CO, Val-CO, Ala-CO) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 973.4 (100) $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

HRMS (ESI): ber. für $\text{C}_{41}\text{H}_{62}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{S}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$) 951.4063 gef. 951.4061.

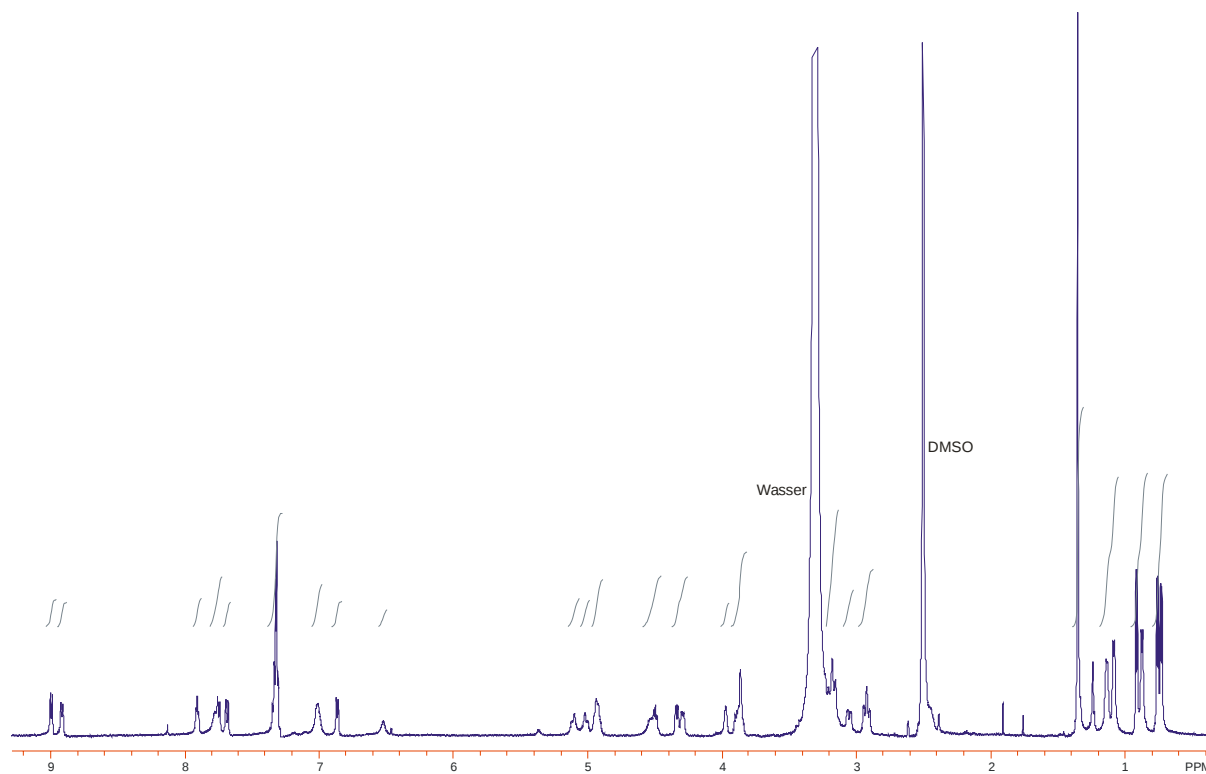
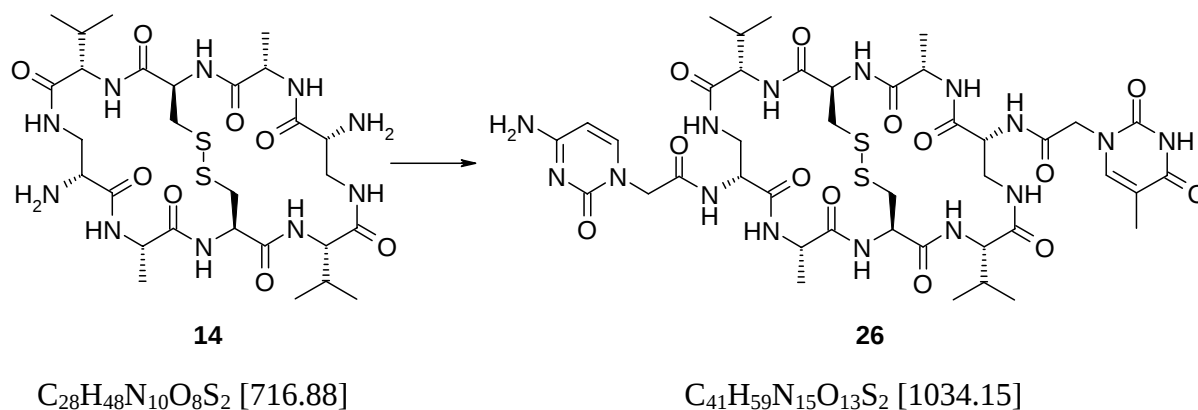


Abb. 7-19: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **17**.

7.2.4.2 Synthese von orthogonal Chromophor-substituierten Des-*N*-Tetramethylzatriostinderivaten

7.2.4.2.1 Zyklus(β -D-Dap(thymin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap(cytosin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**26**)



Eine Lösung aus 8.12 mg (11.3 μmol , 1 equiv.) **14** in 15 ml DCM/DMF 9:1 wurde unter Argon auf 0°C abgekühlt und nacheinander mit 6.17 mg (45.3 μmol , 4 equiv.) HOAt, 14.9 μl (136 μmol , 12 equiv.) NMM, 70.6 μl (453 μmol , 40 equiv.) DIC, 7.00 mg (22.7 μmol , 2 equiv.) (*N*⁴-Z-Cytosin-1-yl)-essigsäure und 4.17 mg (22.7 μmol , 2 equiv.) (Thyminyl-1-yl)-essigsäure versetzt. Nach 1 h Rühren bei 0°C, wurde die Reaktionsmischung weitere 48 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der verbliebene Rückstand mit 5 ml TFA/Thioanisol 10:1 versetzt. Die Lösung wurde 48 h bei RT gerührt und anschließend im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Der milchig braune Rückstand wurde in wenigen ml Methanol aufgenommen, filtriert und durch präparative HPLC (5-50% in 30 min, R_t = 19.4 min) gereinigt. Es konnten 3.39 mg (3.28 μmol , 29%) eines weißen Feststoffs **26** isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 236-242°C (Zersetzung)

DC (Chloroform/Methanol 3:1) R_f = 0.47

$[\alpha]_D^{25}$ = 43.3 (MeOH, c = 0.005)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3433, 2922, 2372, 1654, 1541, 1385, 1205, 1140, 669 cm⁻¹.

¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO, 35 °C): δ = 0.78 (d, ³J = 6 Hz, 3H, Val-CH₃), 0.79 (d, ³J = 6 Hz, 3H, Val-CH₃), 0.85 (d, ³J = 6 Hz, 3H, Val-CH₃), 0.86 (d, ³J = 6 Hz, 3H, Val-CH₃), 1.21 (d, ³J = 3 Hz, 3H, Ala-CH₃), 1.22 (d, ³J = 3 Hz, 3H, Ala-CH₃), 1.76 (s, 3H, Thymin-CH₃), 2.30-2.38 (m, 2H, Val-H β), 2.90 (dd, ³J = 13 Hz, ³J = 15 Hz, 2H, Cys-H β), 3.07 (dd, ³J = 10 Hz, ³J = 15 Hz, 2H, Cys-H β), 3.33-3.39 (m, 2H, Dap-H β), 3.64-3.69 (m, 2H, Dap-H β), 4.17-4.21 (m, 2H, Dap-H α), 4.26 (m, 2H, Val-H α), 4.30-4.47 (m, 6H, Ala-H α , acetyl-CH₂), 5.06-5.13 (m, 2H, Cys-H α), 5.98 (s, br., Cytosin-H5), 7.07 (m, 1H, Ala-NH), 7.20 (m, 1H, Ala-NH), 7.47 (s, 1H, Thymin-H6), 7.47-7.53 (m, 2H, Dap-NH β), 7.83 (d, ³J = 7 Hz, 1H, Cytosin-H6), 8.03 (d, ³J = 10 Hz, 1H, Val-NH), 8.06 (d, ³J = 10 Hz, 1H, Val-NH), 8.23 (d, ³J = 6 Hz, 1H, Dap-NH α), 8.29 (d, ³J = 6 Hz, 1H, Dap-NH α), 8.85-8.90 (m, 2H, Cys-NH), 11.24 (s, 1H, Thymin-NH) ppm.

¹³C NMR (150 MHz, [D₆]DMSO, 35 °C): δ = 11.8 (Thymin-CH₃), 16.5, 16.6 (Val-CH₃), 18.2, 18.3 (Ala-CH₃), 19.3, 19.4 (Val-CH₃), 29.3 (Val-CH β), 40.6 (Dap-CH₂ β), 42.3 (Cys-CH₂ β), 47.7 (Ala-CH α), 50.5 (acetyl-CH₂), 51.9 (acetyl-CH₂), 53.9 (Cys-CH α), 55.7 (Dap-CH α), 56.8 (Val-CH α), 93.6 (Cytosin-C5), 108.5 (Thymin-C5), 141.7 (Thymin-C6), 151.2 (Thymin-C2), 164.2, 167.4, 168.0, 168.1, 169.8, 172.4, 172.5, 173.5 (Dap-CO, Cys-CO, Val-CO, Ala-CO, acetyl-CO, Thymin-C4, Cytosin-C2, Cytosin-C4, Cytosin-C6) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 1056.4 (100) [M + Na]⁺.

HRMS (ESI): ber. für C₄₁H₅₉N₁₅O₁₃S₂ ([M + H]⁺) 1034.3931 gef. 1034.3933.

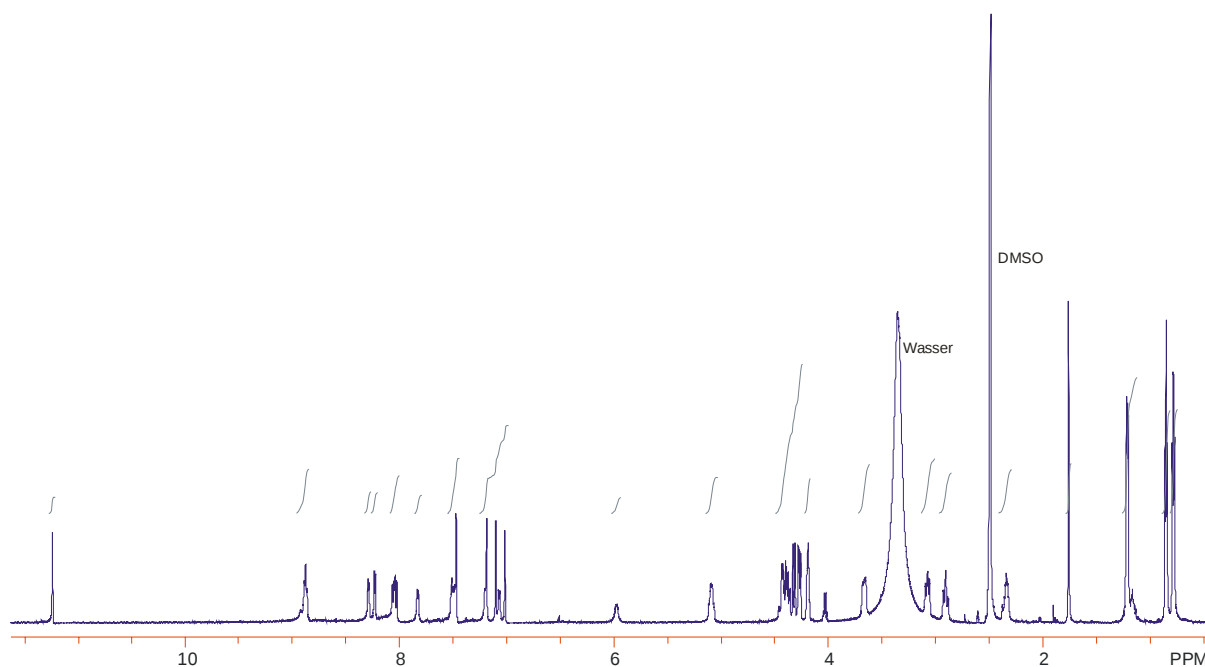
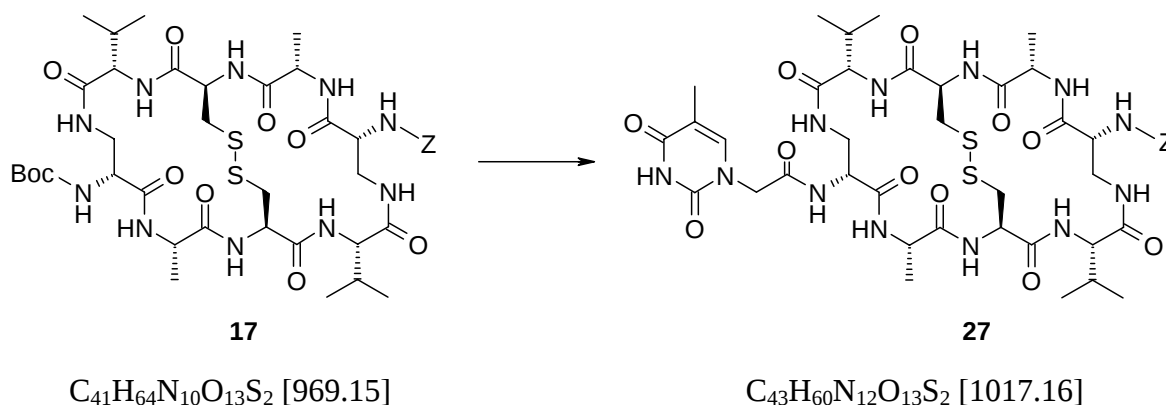


Abb. 7-20: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **26**.

7.2.4.2.2 Zyκλο(β -D-Dap(thymin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap(Z)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**27**)



Eine Lösung aus 10.7 mg (11.0 μmol , 1 equiv.) **17** in TFA/DCM 1:1 wurde 15 min bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt und der verbliebene Rückstand unter Argon in 15 ml DCM/DMF 9:1 aufgenommen und auf 0°C abgekühlt. Nach sukzessiver Zugabe von 3.01 mg (22.1 μmol , 2 equiv.) HOAt, 7.28 μl (66.2 μmol , 6 equiv.) NMM, 34.4 μl (221 μmol , 20 equiv.) DIC und 4.06 mg (22.1 μmol , 2 equiv.) (Thyminyl-1-yl)-essigsäure wurde 1h bei 0°C und 48 h

bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der verbliebene Rückstand in wenigen ml Methanol aufgenommen, filtriert und durch präparative HPLC (10-70% in 30 min, $R_t = 22.0$ min) gereinigt. Es konnten 10.8 mg (10.6 μ mol, 94%) eines weißen Feststoffs **27** isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 240-245°C

DC (Chloroform/Methanol 6:1) $R_f = 0.49$

$[\alpha]_D^{25} = 11.8$ (MeOH, $c = 0.017$)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3445, 2926, 1652, 1542$ cm^{-1} .

^1H NMR (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): $\delta = 0.75\text{-}0.79$ (m, 6H, Val- CH_3), 0.86 (d, $^3J = 7$ Hz, 6H, Val- CH_3), 1.09 (d, $^3J = 7$ Hz, 3H, Ala- CH_3), 1.19 (d, $^3J = 7$ Hz, 3H, Ala- CH_3), 1.76 (s, 3H, Thymin- CH_3), 2.32-2.38 (m, 1H, Val- $\text{H}\beta$), 2.39-2.45 (m, 1H, Val- $\text{H}\beta$), 2.86-2.94 (m, 2H, Cys- $\text{H}\beta$), 3.06-3.11 (m, 1H, Cys- $\text{H}\beta$), 3.12-3.18 (m, 2H, Cys- $\text{H}\beta$, Dap- $\text{H}\beta$), 3.30-3.38 (m, 1H, Dap- $\text{H}\beta$), 3.64-3.69 (m, 1H, Dap- $\text{H}\beta$), 3.82-3.89 (m, 1H, Dap- $\text{H}\beta$), 3.98-4.02 (m, 1H, Dap- $\text{H}\alpha$), 4.15-4.19 (m, 1H, Dap- $\text{H}\alpha$), 4.24-4.36 (m, 4H, Val- $\text{H}\alpha$, acetyl- CH_2), 4.37-4.42 (m, 1H, Ala- $\text{H}\alpha$), 4.46-4.53 (m, 1H, Ala- $\text{H}\alpha$), 4.98-5.13 (m, 4H, Cys- $\text{H}\alpha$, Z- CH_2), 7.01-7.08 (m, 3H, Dap- $\text{NH}\alpha$, Ala-NH), 7.27-7.35 (m, 5H, Z-Ph), 7.47 (s, 1H, Thymin- H_6), 7.49-7.53 (m, 1H, Dap- $\text{NH}\beta$), 7.71-7.76 (m, 1H, Dap- $\text{NH}\beta$), 7.79 (d, $^3J = 10$ Hz, 1H, Val-NH), 7.99 (d, $^3J = 10$ Hz, 1H, Val-NH), 8.18 (d, $^3J = 6$ Hz, 1H, Dap- $\text{NH}\alpha$), 8.87 (d, $^3J = 10$ Hz, 1H, Cys-NH), 8.93 (d, $^3J = 9$ Hz, 1H, Cys-NH), 11.24 (s, 1H, Thymin-NH) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): $\delta = 11.8$ (Thymin- CH_3), 16.0, 16.3 (Val- CH_3), 18.5 (Ala- CH_3), 19.0 (Ala- CH_3 , Val- CH_3), 19.3 (Val- CH_3), 29.2, 29.5, (Val- $\text{CH}\beta$), 40.0, 40.5 (Dap- $\text{CH}_2\beta$), 41.5 (Cys- $\text{CH}_2\beta$), 46.9, 47.5 (Ala- $\text{CH}\alpha$), 50.4 (acetyl- CH_2), 53.9 (Cys- $\text{CH}\alpha$), 55.9 (Dap- $\text{CH}\alpha$), 56.8 (Val- $\text{CH}\alpha$), 57.8 (Dap- $\text{CH}\alpha$), 65.7 (Z- CH_2), 108.5 (Thymin-C5), 127.4, 127.7, 128.2 (Z-Ph), 136.7 (Z- Ph_{ipso}), 141.7

(Thymin-C6), 151.1 (Thymin-C2), 164.3 (Thymin-C4), 155.4 (Z-CO), 167.5, 168.1, 169.8, 170.0, 172.4, 173.4 (Dap-CO, Cys-CO, Val-CO, Ala-CO, acetyl-CO) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 1039.5 (100) $[M + Na]^+$.

HRMS (ESI): ber. für $C_{43}H_{60}N_{12}O_{13}S_2$ ($[M + H]^+$) 1017.3917 gef. 1017.3918.

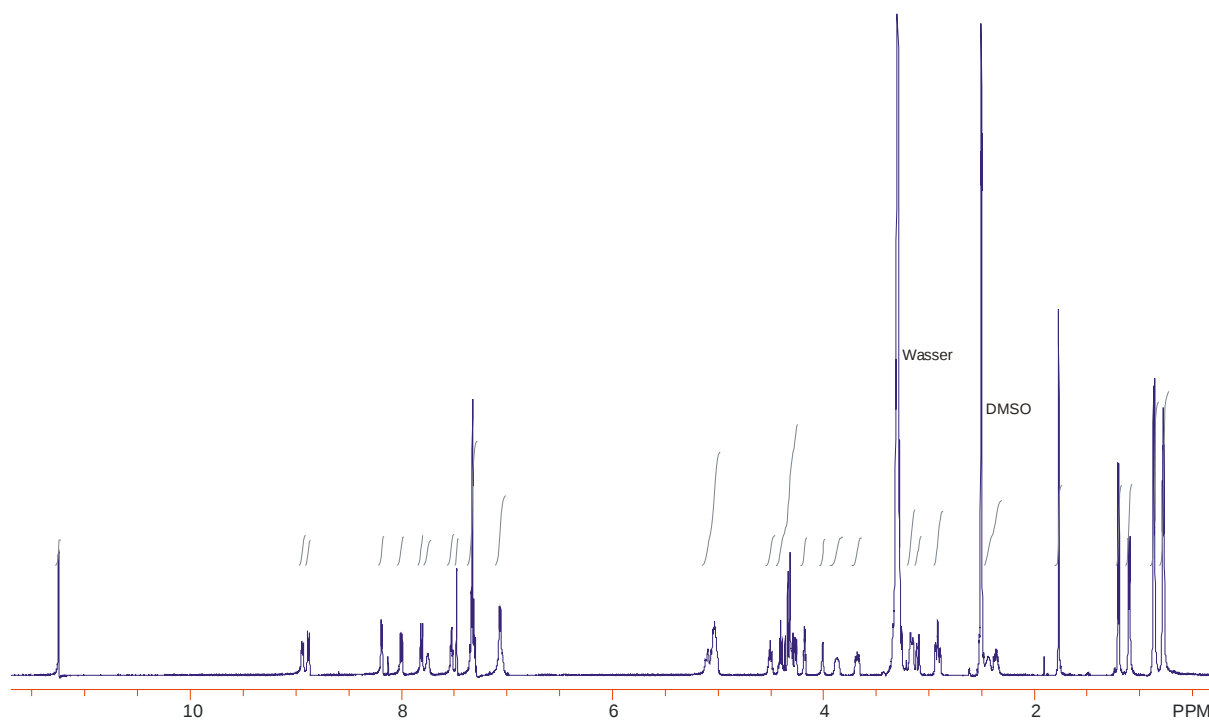
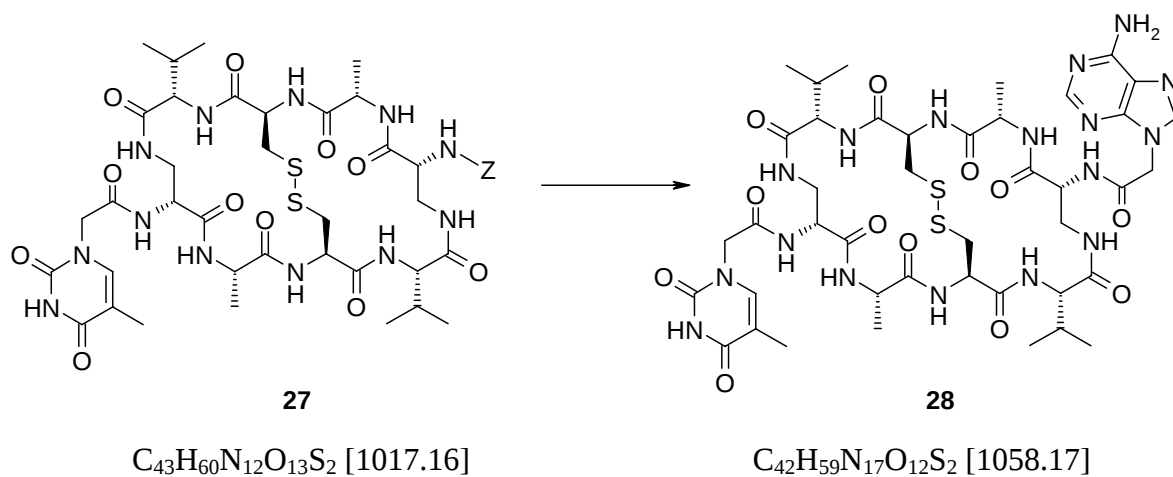


Abb. 7-21: 1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[D_6]DMSO$) von **27**.

7.2.4.2.3 Zyko(β -D-Dap(thymin-1-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val- β -D-Dap(adenin-9-yl-acetyl)-L-Ala-L-Cys-L-Val) disulfid (**28**)



Eine Lösung aus 9.34 mg (9.18 μ mol, 1 equiv.) **27** in 5 ml TFA/Thioanisol 10:1 wurde 48 h bei RT gerührt und anschließend im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Der braune Rückstand wurde unter Argon mit 15 ml DCM/DMF 9:1 versetzt und auf 0°C abgekühlt. Nach sukzessiver Zugabe von 2.50 mg (18.4 μ mol, 2 equiv.) HOAt, 6.06 μ l (55.1 μ mol, 6 equiv.) NMM, 28.6 μ l (184 μ mol, 20 equiv.) DIC, 6.01 (18.4 μ mol, 2 equiv.) (N^6 -Z-Adenin-9-yl)-essigsäure versetzt. Nach 1 h Rühren bei 0°C, wurde die Reaktionsmischung weitere 48 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der verbliebene Rückstand mit 5 ml TFA/Thioanisol 10:1 versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei RT 48 h gerührt und anschließend im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Der braune Rückstand wurde in wenigen ml Methanol aufgenommen, filtriert und durch präparative HPLC (5-60% in 30 min, R_t = 16.9 min) gereinigt. Es konnten 5.05 mg (4.77 μ mol, 52%) eines weißen Feststoffs **28** isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 250-255°C (Zersetzung)

DC (Chloroform/Methanol 4:1) R_f = 0.46

$[\alpha]_D^{25}$ = -150 (DMSO, c = 0.007)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3444, 2368, 1652 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): $\delta = 0.77$ (d, $^3J = 7 \text{ Hz}$, 3H, Val- CH_3), 0.81 (d, $^3J = 3 \text{ Hz}$, 3H, Val- CH_3), 0.82 (d, $^3J = 3 \text{ Hz}$, 3H, Val- CH_3), 0.88 (d, $^3J = 7 \text{ Hz}$, 3H, Val- CH_3), 1.16 (d, $^3J = 8 \text{ Hz}$, 3H, Ala- CH_3), 1.20 (d, $^3J = 8 \text{ Hz}$, 3H, Ala- CH_3), 1.76 (s, 3H, Thymin- CH_3), 2.24-2.31 (m, 1H, Val- $\text{H}\beta$), 2.33-2.38 (m, 1H, Val- $\text{H}\beta$), 2.87-2.95 (m, 2H, Cys- $\text{H}\beta$), 3.05-3.10 (m, 2H, Cys- $\text{H}\beta$), 3.29-3.39 (m, 2H, Dap- $\text{H}\beta$), 3.64-3.74 (m, 2H, Dap- $\text{H}\beta$), 4.16-4.22 (m, 2H, Dap- $\text{H}\alpha$), 4.22-4.25 (m, 1H, Val- $\text{H}\alpha$), 4.25-4.29 (m, 1H, Val- $\text{H}\alpha$), 4.30-4.34 (m, 2H, acetyl- CH_2), 4.38-4.42 (m, 1H, Ala- $\text{H}\alpha$), 4.44-4.48 (m, 1H, Ala- $\text{H}\alpha$), 4.89-4.93 (m, 2H, acetyl- CH_2), 5.01-5.10 (m, 2H, Cys- $\text{H}\alpha$), 7.06 (d, $^3J = 7 \text{ Hz}$, 3H, Ala-NH), 7.27 (d, $^3J = 8 \text{ Hz}$, 3H, Ala-NH), 7.47 (s, 1H, Thymin- H_6), 7.49-7.55 (m, 3H, Adenin- NH_2 , Dap- $\text{NH}\beta$), 7.58-7.62 (m, 1H, Dap- $\text{NH}\beta$), 7.87 (d, $^3J = 10 \text{ Hz}$, 1H, Val-NH), 8.04 (d, $^3J = 10 \text{ Hz}$, 1H, Val-NH), 8.11 (s, 1H, Adenin- $\text{H}_{2/8}$), 8.14 (s, 1H, Adenin- $\text{H}_{2/8}$), 8.21 (d, $^3J = 6 \text{ Hz}$, 1H, Dap- $\text{NH}\alpha$), 8.28 (d, $^3J = 6 \text{ Hz}$, 1H, Dap- $\text{NH}\alpha$), 8.87 (d, $^3J = 6 \text{ Hz}$, 1H, Cys-NH), 11.25 (s, 1H, Thymin-NH) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): $\delta = 11.9$ (Thymin- CH_3), 16.4, 16.5 (Val- CH_3), 18.4, 18.5 (Ala- CH_3), 19.4 (Val- CH_3), 29.3, 29.4 (Val- $\text{CH}\beta$), 40.7 (Dap- $\text{CH}_2\beta$), 41.7 (Cys- $\text{CH}_2\beta$), 45.8 (acetyl- CH_2), 47.4, 47.6 (Ala- $\text{CH}\alpha$), 50.4 (acetyl- CH_2), 53.9 (Cys- $\text{CH}\alpha$), 55.9 (Dap- $\text{CH}\alpha$), 56.8, 56.9 (Val- $\text{CH}\alpha$), 108.5 (Thymin- C_5), 111.8 (Adenin- C_5), 141.7 (Thymin- C_6), 141.7 (Adenin- C_8), 149.5 (Adenin- $\text{C}_{2/4}$), 151.1 (Thymin- C_2 , Adenin- $\text{C}_{2/4}$), 157.7 (Adenin- C_6), 164.3 (Thymin- C_4), 167.5, 167.9, 168.1, 169.8, 172.3, 172.5, 173.4 (Dap-CO, Cys-CO, Val-CO, Ala-CO, acetyl-CO) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 1058.5 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$.

HRMS (ESI): ber. für $\text{C}_{41}\text{H}_{59}\text{N}_{15}\text{O}_{13}\text{S}_2$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$) 1058.4043 gef. 1058.4044.

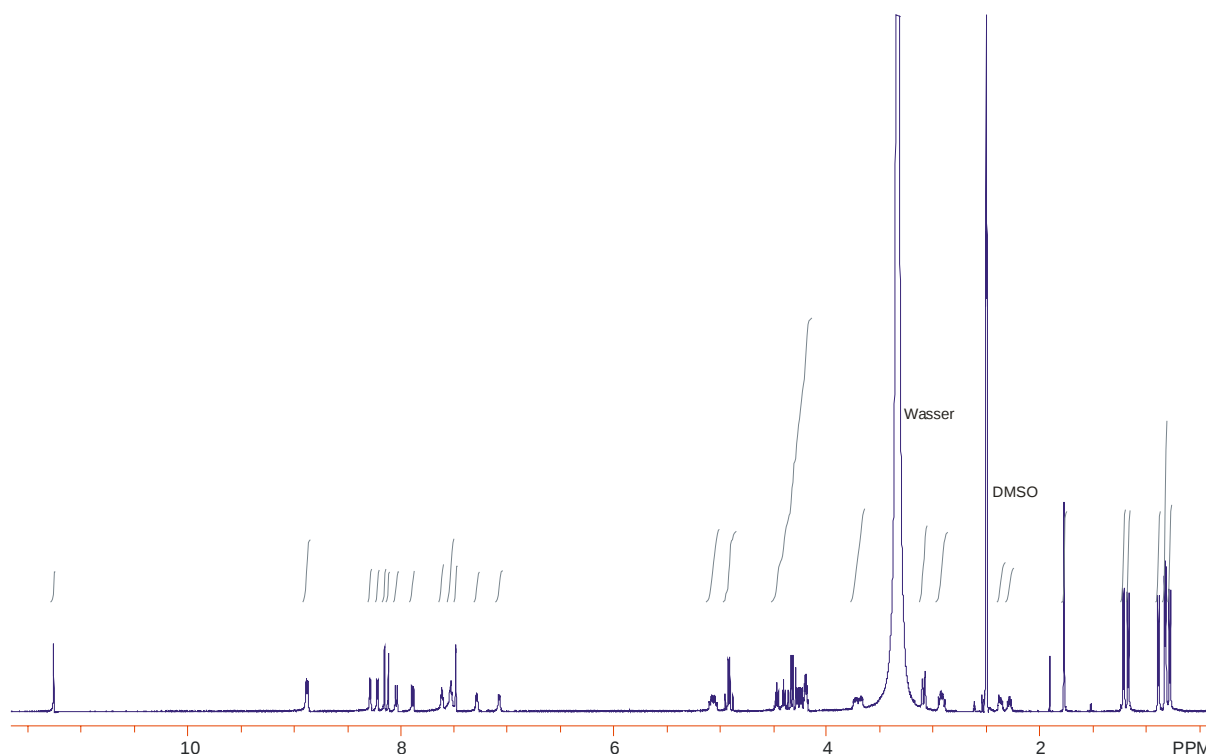
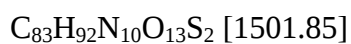
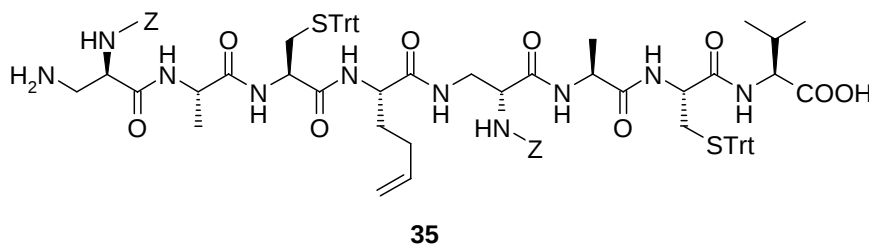


Abb. 7-22: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **28**.

7.2.5 Synthese von Dimeren aus Des-*N*-Tetramethylazatriostin-analogen monomeren Rückgratstrukturen

7.2.5.1 Synthese des Homoallylglycin enthaltenden geschützten Des-*N*-Tetramethylazatriostin-Rückgrats

7.2.5.1.1 Z-D-Dap-L-Ala-L-Cys(Trt)-L-Hag-β-D-Dap(Z)-L-Ala-L-Cys(Trt)-L-Val-OH (**35**)



Die Synthese von **1** wurde gemäß ASV 1 unter Verwendung von 490 mg (0.94 mmol⁻¹, 461 mmol, 1 equiv.) L-Valin belegten 2-Chlorotriethylharz durchgeführt. Als Aminosäuren wurden Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Z-D-Dap(Fmoc)-OH und Fmoc-L-Hag-OH eingesetzt. Fmoc-L-Ala-OH, Z-D-Dap(Fmoc)-OH und Fmoc-L-Hag-OH wurden mit der HBTU-Kupplung gekuppelt, Fmoc-L-Cys(Acm)-OH wurde gemäß der DIC-Kupplung gekuppelt.

Die HPLC-Analyse (40–90 % in 30 min, $R_t = 28.1$ min) ergab, dass keine signifikanten Nebenprodukte entstanden und hiermit keine zusätzlichen Reinigungsschritte nötig waren. Es konnten 498 mg (331 mmol, 72%) eines weißen Feststoffs **35** isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 175-185 °C (Zersetzung)

DC (Chloroform/Methanol 8:1) $R_f = 0.26$

$[\alpha]_D^{25} = -10.6$ (MeOH, $c = 0.030$)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3433, 2926, 2365, 1636 \text{ cm}^{-1}$.

¹H (600 MHz, [D₆]DMSO, 35 °C): $\delta = 0.73\text{-}0.76$ (m, 3H, Val-CH₃), $0.77\text{-}0.80$ (m, 3H, Val-CH₃), $1.15\text{-}1.22$ (m, 6H, Ala-CH₃), $1.53\text{-}1.60$ (m, 1H, Hag-H β), $1.65\text{-}1.73$ (m, 1H, Hag-H β), $1.83\text{-}2.01$ (m, 3H, Hag-H γ , Val-H β), $2.82\text{-}2.87$ (m, 1H, Cys-H β), $2.91\text{-}2.97$ (m, 1H, Cys-H β), $3.32\text{-}3.38$ (m, 6H, Dap-H β , Cys-H β), $3.88\text{-}3.92$ (m, 1H, Val-H α), $3.97\text{-}4.02$ (m, 1H, Hag-H α), $4.08\text{-}4.35$ (m, 6H, Dap-H α , Ala-H α , Cys-H α), 4.87 (d, 1H, $^3J = 10 \text{ Hz}$, Hag-H ϵ), 4.90 (d, 1H, $^3J = 17 \text{ Hz}$, Hag-H ϵ), $4.95\text{-}5.04$ (m, 4H, Z-CH₂), $5.64\text{-}5.71$ (m, 1H, Hag-H δ), $7.17\text{-}7.38$ (m, 40H, Z-Ph, Trt-Ph), 7.45 (d, $^3J = 8 \text{ Hz}$, 1H, Hag-NH), $7.58\text{-}7.62$ (m, 1H, Dap-NH α), $7.63\text{-}7.67$ (m, 1H, Dap-NH α), $7.77\text{-}7.81$ (m, 1H, Dap-NH β), $7.82\text{-}7.86$ (m, 1H, Dap-NH β), $7.97\text{-}8.02$ (m, 1H, Ala-NH), 8.09 (d, $^3J = 8 \text{ Hz}$, 1H, Val-NH), 8.13 (d, $^3J = 8 \text{ Hz}$, 1H, Ala-NH), 8.26 (d, $^3J = 8 \text{ Hz}$, 1H, Cys-NH), 8.34 (d, $^3J = 8 \text{ Hz}$, 1H, Cys-NH) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): δ = 17.9 (Val- CH_3 , Ala- CH_3), 18.9 (Val- CH_3), 29.0, 31.2 (Hag- CH_γ , Val- CH_β), 33.1 (Hag- $\text{CH}_2\beta$), 40.4 (Dap- $\text{CH}_2\beta$, Cys- $\text{CH}_2\beta$), 48.3, 52.1, 54.7 (Dap- CH_α , Ala- CH_α , Cys- CH_α), 57.4 (Hag- CH_α), 58.0 (Val- H_α), 65.6, 65.9 (Z- CH_2), 115.0 (Hag- CH_ϵ), 126.6, 127.9, 128.3, 129.0 (Z-Ph, TrT-Ph), 136.7, 137.7 (Hag- CH_δ , Z- Ph_{ipso}) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 1501.2 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$.

HRMS (ESI): ber. für $\text{C}_{83}\text{H}_{92}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1501.6360 gef. 1501.6366.

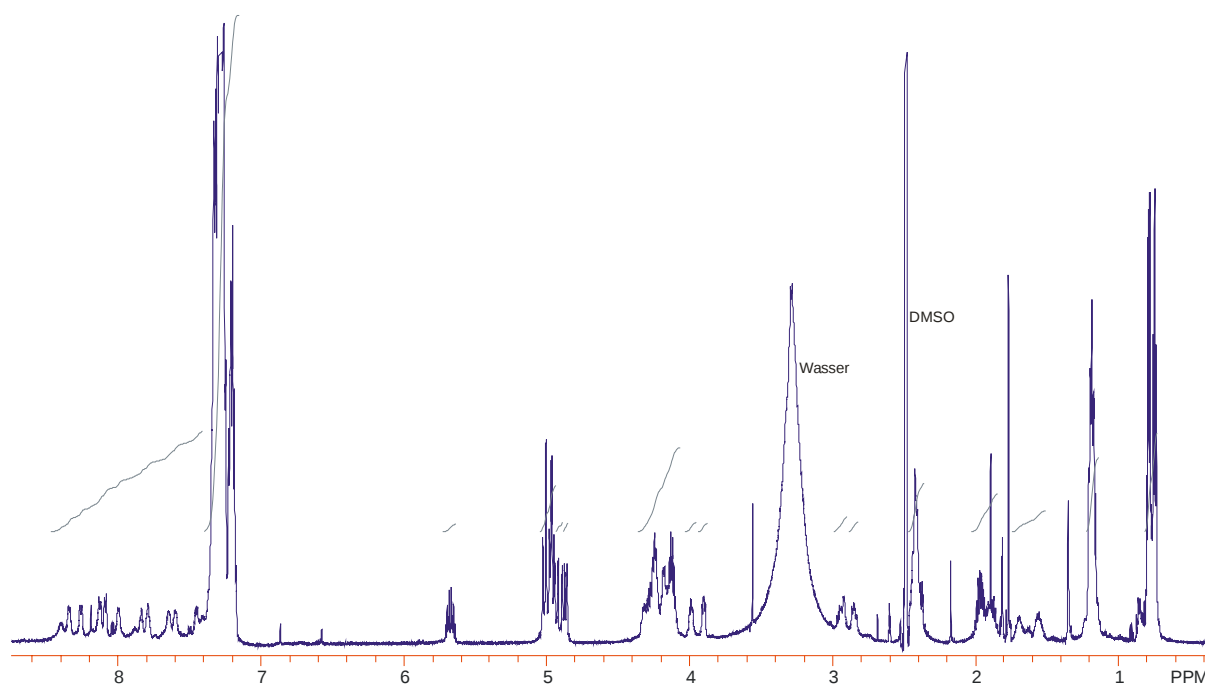
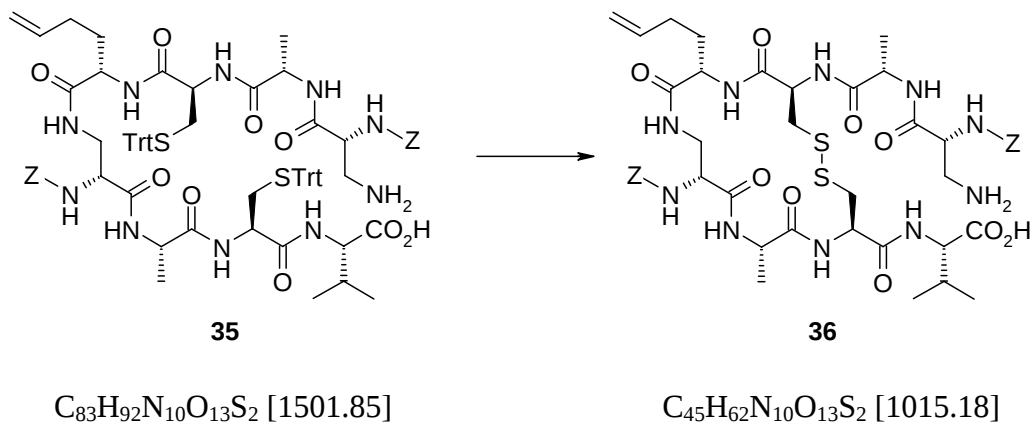


Abb. 7-23: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **35**.

7.2.5.1.2 Z-D-Dap-L-Ala-L-Cys-L-Hag-β-D-Dap(Z)-L-Ala-L-Cys-L-Val-OH disulfid (36)



Eine Lösung aus 85.0 mg (56.6 μmol , 1 equiv.) **35** in 10 ml TFA/DCM/TIS (49/49/2) wurde 30 min bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde eingengt und der verbliebene Rückstand in 85 ml 0.01 M Phosphatpuffer pH=7) aufgenommen. Es wurde anschließend mit einer Lösung aus Ammoniumcarbonat ein pH = 8 eingestellt und die Lösung mit 5 ml DMSO versetzt. Die Reaktionslösung wurde fünf Tage bei RT an offener Luft gerührt. Das Lösungsmittel wurde abrotiert und der verbliebene Rückstand in wenigen ml Methanol aufgenommen, filtriert und durch präparative HPLC (40-80% in 30 min, $R_t = 16.3$ min) gereinigt. Es konnten 27.0 mg (26.6 μmol , 47%) eines weißen Feststoffs **36** isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 195-200 °C

DC (Chloroform/Methanol 4:1) $R_f = 0.55$

$[\alpha]_D^{25} = -17.0$ (MeOH, $c = 0.041$)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3435, 2925, 2366, 1636 \text{ cm}^{-1}$.

^1H (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): $\delta = 0.83\text{-}0.89$ (m, 6H, Val- CH_3), 1.19-1.28 (m, 6H, Ala- CH_3), 1.65-1.72 (m, 1H, Hag-H β), 1.82-1.91 (m, 1H, Hag-H β), 1.93-2.11 (m, 3H,

Hag-H γ , Val-H β), 2.89-2.99 (m, 3H, Cys-H β , Dap-H β), 3.14-3.23 (m, 4H, Cys-H β , Dap-H β), 3.50-3.59 (m, 1H, Dap-H β), 4.04-4.44 (m, 6H, Dap-H α , Ala-H α , Val-H α , Hag-H α), 4.71-4.80 (m, 1H, Cys-H α), 4.92 (d, 1H, $^3J = 10$ Hz, Hag-H ϵ), 4.97 (d, 1H, $^3J = 17$ Hz, Hag-H ϵ), 5.02-5.08 (m, 5H, Cys-H α , Z-CH $_2$), 5.71-5.79 (m, 1H, Hag-H δ), 7.28-7.39 (m, 10H, Z-Ph), 7.43-7.95 (m, 9H, Dap-NH α , Dap-NH β , Ala-NH, Val-NH, Hag-NH), 7.98 (d, $^3J = 8$ Hz, 1H, Cys-NH), 8.47 (d, $^3J = 9$ Hz, 1H, Cys-NH) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): $\delta = 17.7$ (Val-CH $_3$), 18.1 (Ala-CH $_3$), 19.0 (Val-CH $_3$), 29.3 (Hag-CH $_2\gamma$), 30.6 (Val-CH β , Hag-CH $_2\beta$), 40.4, 40.6 (Dap-CH $_2\beta$, Cys-CH $_2\beta$), 52.4 (Ala-CH α , Cys-CH α , Dap-CH α , Val-CH α , Hag-CH α), 65.8 (Z-CH $_2$), 115.2 (Hag-CH ϵ), 127.8, 128.3 (Z-Ph), 137.7 (Z-Ph $_{\text{ipso}}$, Hag-CH δ) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 1015.3 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$.

HRMS (ESI): ber. für $\text{C}_{45}\text{H}_{62}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1015.4012 gef. 1015.4015.

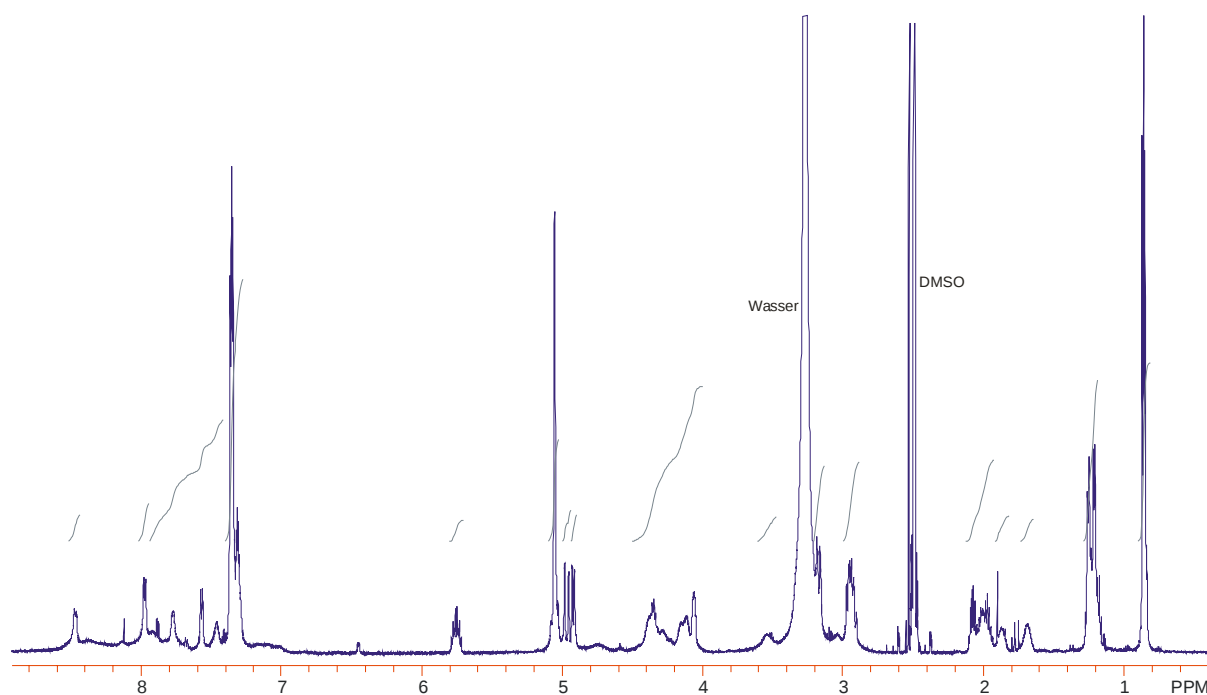
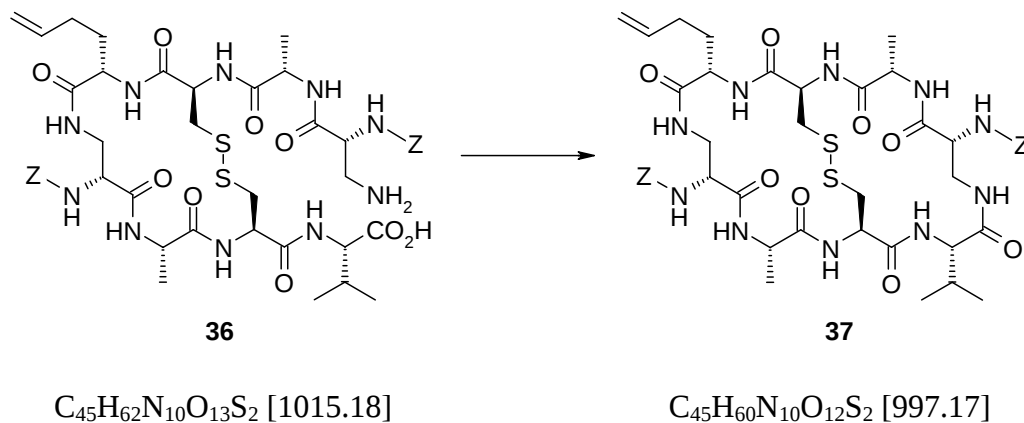


Abb. 7-24: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **36**.

7.2.5.1.3 Zyκλο(β-D-Dap(Z)-L-Ala-L-Cys-L-Val-β-D-Dap(Z)-L-Ala-L-Cys-L-Hag) disulfid (37)



Eine Lösung aus 12.0 mg (11.8 μmol , 1 equiv.) **36** in 25 ml trockenem DCM/DMF 9:1 wurde bei 0°C unter Argon nacheinander unter Rühren mit 1.61 mg (11.8 μmol , 1 equiv.) HOAt, 3.91 μl (35.5 μmol , 3 equiv.) NMM und 18.5 μl (118 μmol , 10 equiv.) DIC versetzt. Nach 1 h wurde das auf RT erwärmt und weitere 48 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der verbliebene Rückstand in wenigen ml Methanol aufgenommen, filtriert und durch präparative HPLC (30-80% in 30 min, R_t = 29.8 min) gereinigt. Es konnten 3.53 mg (3.54 μmol , 30%) eines weißen Feststoffs isoliert werden.

Analytische Daten:

Schmp. 200-205°C (Zersetzung)

DC (Chloroform/Methanol 8:1) R_f = 0.68

$[\alpha]_D^{25} = 18.1$ (MeOH, $c = 0.010$)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3433, 2925, 2367, 1646 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): $\delta = 0.77$ (d, $^3J = 7 \text{ Hz}$, 3H, Val-CH₃), 0.84 (d, $^3J = 3 \text{ Hz}$, 3H, Val-CH₃), 1.12 (d, $^3J = 7 \text{ Hz}$, 3H, Ala-CH₃), 1.16 (d, $^3J = 8 \text{ Hz}$, 3H, Ala-CH₃), 1.73-1.80 (m, 1H, Hag-H β), 1.90-2.00 (m, 3H, Hag-H β , Hag-H γ), 2.36-2.43

(m, 1H, Val-H β), 2.85-2.92 (m, 2H, Cys-H β), 3.10-3.21 (m, 4H, Cys-H β , Dap-H β), 3.76-3.88 (m, 2H, Dap-H β), 3.99-4.03 (m, 1H, Dap-H α), 4.04-4.08 (m, 1H, Dap-H α), 4.27-4.35 (m, 2H, Val-H α , Hag-H α), 4.44-4.54 (m, 2H, Ala-H α), 4.88 (d, 1H, $^3J = 10$ Hz, Hag-H ϵ), 4.93 (d, 1H, $^3J = 17$ Hz, Hag-H ϵ), 4.99-5.09 (m, 6H, Cys-H α , Z-CH $_2$), 5.71-5.79 (m, 1H, Hag-H δ), 6.99-7.04 (m, 1H, Dap-NH α), 7.08-7.14 (m, 1H, Ala-NH), 7.17-7.22 (m, 1H, Dap-NH α), 7.27-7.37 (m, 11H, Z-Ph, Val-NH), 7.54-7.63 (m, 2H, Ala-NH, Dap-NH β), 7.65-7.71 (m, 1H, Dap-NH β), 7.80-7.84 (m, 1H, Hag-NH), 8.87 (d, $^3J = 9$ Hz, 1H, Cys-NH), 8.90 (d, $^3J = 9$ Hz, 1H, Cys-NH) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 35 °C): $\delta = 16.3$ (Val-CH $_3$), 18.9 (Ala-CH $_3$), 19.0 (Val-CH $_3$), 29.0 (Hag-CH $_2\gamma$), 29.5 (Val-CH β), 31.2 (Hag-CH $_2\beta$), 40.3, 40.5 (Dap-CH $_2\beta$), 41.4, 41.7 (Cys-CH $_2\beta$), 47.1 (Ala-CH α), 51.5 (Hag-CH α), 53.7, 56.9 (Cys-CH α), 57.4 (Dap-CH α), 65.7 (Z-CH $_2$), 115.0 (Hag-CH ϵ), 127.5, 127.7, 128.2 (Z-Ph), 136.7 (Z-Ph $_{\text{ipso}}$), 137.8 (Hag-CH δ), 155.4 (Z-CO), 169.7, 170.0, 172.4, 173.4, 173.5 (Dap-CO, Cys-CO, Val-CO, Ala-CO, Hag-CO) ppm.

ESI-MS (MeOH): m/z 1019.4 (100) $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

HRMS (ESI): ber. für $\text{C}_{45}\text{H}_{60}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 997.3906 gef. 997.3909.

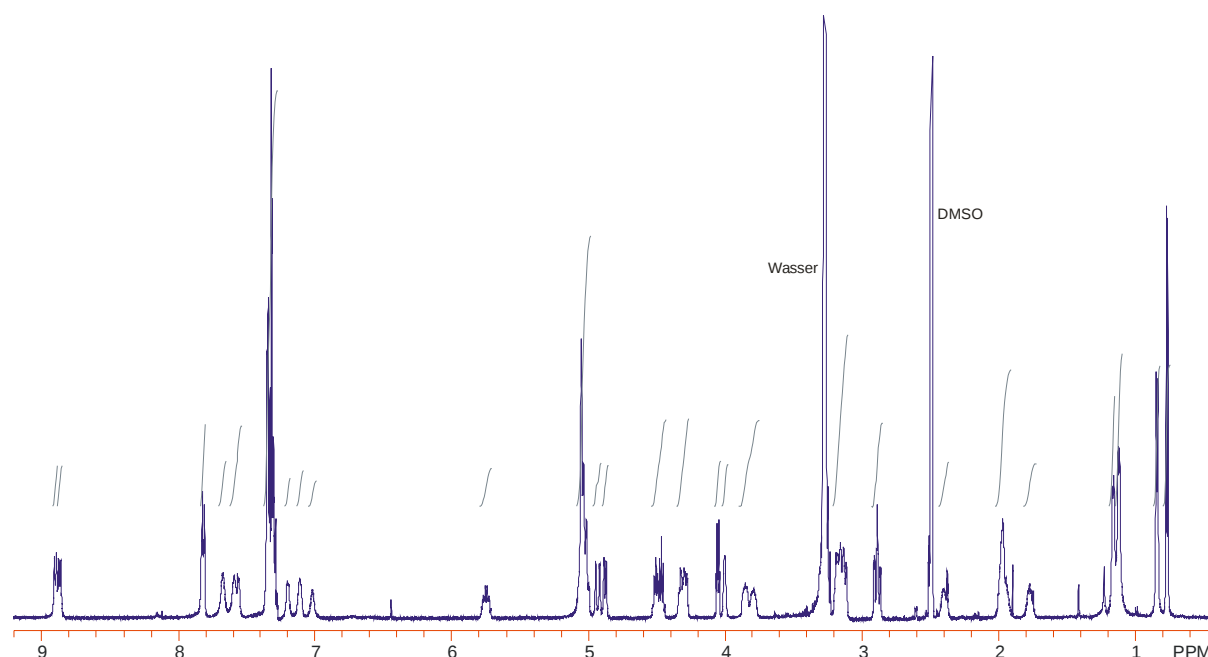


Abb. 7-25: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$) von **37**.

7.3 Wechselwirkungsanalysen mit DNA

7.3.1 Allgemeine Analysevorschriften AAV

AAV 1: Fluoreszenz-Titration

Die Titration wurde in einer 1.50 ml Quarzküvette durchgeführt. Die Küvette wurde mit 1.50 mL einer Lösung aus Ethidiumbromid (4.95 μM) in einem Puffer HEPES/NaOH (2mM HEPES, 10 mM NaCl, pH 7.0) versetzt. Die Fluoreszenz wurde gemessen ($\lambda_{\text{ex}} = 545 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 595 \text{ nm}$), über die Wellenlängen 566-602 nm integriert und auf 0% der relativen Fluoreszenz normiert. Anschließend wurde das Hairpin-DNA-Oligonukleotid zugegeben, sodass die DNA-Konzentration 1.10 μM betrug. Nach 1 h Äquilibration bei RT und einer 1 h bei 5°C, wurde die Fluoreszenz gemessen ($\lambda_{\text{ex}} = 545 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 595 \text{ nm}$), über die Wellenlängen 566-602 nm integriert und auf 100% der relativen Fluoreszenz normiert. Jetzt wurden jeweils 2 μl einer Lösung aus DNA-Binder in DMSO (100 μM) zu der Mischung gegeben, geschüttelt, 1 h äquilibriert und wiederum die Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 545 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 595 \text{ nm}$) gemessen, über die Wellenlängen 556-655 nm integriert und die relative Absorption berechnet. Diese Zugabe wurde solange wiederholt, bis das stöchiometrische Verhältnis von DNA-Binder zu DNA 4:1 betrug. Die relative Fluoreszenz wurde in Abhängigkeit zur Stöchiometrie aufgetragen.

AAV 2: Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Eine Lösung aus 25.5 ml Acrylamid, 4.50 ml Bisacrylamid, 6.00 ml TBE-Puffer, 60.0 μl TEMED und 24 ml Wasser wurde mit einer Spatelspitze Ammoniumperoxodisulfat versetzt und eine Minute vorsichtig geschüttelt. Nach erfolgter Polymerisation zwischen zwei Glasplatten wurde das Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und für eine Stunde zum Entfernen von Salzen einer Präelektrophorese unterzogen (220-250 V, 25 mA). Lösungen aus 200 pmol DNA in 2 μl Wasser und jeweils einer gewünschten Menge von DNA-Binder in 5 μl Puffer HEPES/NaOH (2mM HEPES, 10 mM NaCl, pH 7.0) wurden 1 h bei RT und 1 h bei 5°C aufbewahrt und anschließend mit 5 μl Beladungspuffer versetzt.

Anschließend wurden diese Proben in die Taschen des Gels gefüllt und die Elektrophorese für ca. 90 min gestartet (180-220 V, 18-25 mA). Das Gel wurde vorsichtig entnommen und dem folgenden Entwicklungsprotokoll unterzogen.

Entwicklungsprotokoll	
1. Fixierung	Gel 40 min in <i>Fixierlösung</i> schütteln
2. Waschen	Gel dreimal 10 min in <i>Waschlösung</i> schütteln
3. Versilberung	Gel 40 min in <i>Silberlösung</i> schütteln
4. Waschen	Gel 2 min in 200 ml Wasser schütteln
5. Entwicklung	Gel 7 min in <i>Entwicklerlösung</i> schütteln
6. Stoppen	Gel dreimal 10 min in <i>Stopplösung</i> schütteln
Es wurden jeweils die u.a. gebrauchsfertigen Lösungen verwendet.	

Gebrauchsfertige Lösungen	
<i>Fixierlösung</i>	Lösung aus 40 ml <i>Fixierkonzentrat</i> und 160 ml <i>Fixierverdünner</i>
<i>Waschlösung</i>	Lösung aus 100 ml <i>Waschkonzentrat</i> und 500 ml Wasser
<i>Silberlösung</i>	Lösung aus 40 ml <i>Silberkonzentrat</i> , 160 ml Wasser und 260 µl Formaldehyd
<i>Entwicklerlösung</i>	Lösung aus 40 ml <i>Entwicklerkonzentrat</i> , 160 ml Wasser und 260 µl Formaldehyd
Die gebrauchsfertigen Lösungen wurden jeweils aus den u.a. Stammlösungen generiert.	

Stammlösungen	
<i>Fixierkonzentrat (5x)</i>	15.0 g Benzoesäure in 120 ml Ethanol, aufgefüllt auf 500 ml in Wasser
<i>Fixierverdünner</i>	150 ml Ethanol, aufgefüllt auf 500 ml in Wasser
<i>Waschkonzentrat (6x)</i>	1.75 g Benzolsulfonsäure, gelöst in 500 ml Wasser
<i>Silberkonzentrat (5x)</i>	5.00 g AgNO ₃ und 1.75 g Benzolsulfonsäure, gelöst in 500 ml Wasser
<i>Entwicklerkonzentrat (5x)</i>	62.5 g Na ₂ CO ₃ , gelöst in 500 ml Wasser

AAV 3: Agarose-Elektrophorese

Für alle Agarose-Elektrophorese wurden 1%ige Agarose Gele verwendet (Agarose II med EEO Sigma Aldrich). Die Suspension aus 450 mg Agarose, 4.5 ml TBE Puffer (10x Roth) und 40.5 ml Wasser wurden kurz erwärmt bis eine klare Lösung entstand. Es wurden 7 µl einer Ethidiumbromidlösung ($c = 1 \text{ mg/ml}$ TBE Puffer) zugegeben, die Lösung auf RT abgekühlt und vorsichtig in die mit einem Kamm versehene Reaktionsapparatur eingegossen. Nach erfolgter Polymerisation wurde nach 20 min der Kamm entfernt und das Gel mit 280 ml 1x TBE Puffer überschichtet. Die Proben wurden in die Taschen gefüllt und die Elektrophorese bei 100 V und 55 mA ca. 30 min durchgeführt. Die DNA-Banden wurden auf einem UV-Leuchttisch (360 nm) sichtbar gemacht und fotografiert. Die Taschen wurden mit folgenden Proben versehen: *Tasche 1* 10 µl DNA-Marker (Roth); *Tasche 2* 1 µl **DNA3**-Blindprobe ($c = 5 \text{ pmol } \mu\text{l}$), 2 µl 2mM HEPES/NaOH-Puffer (10mM NaCl, pH 7.0), 5 µl 1:6 verdünnten Auftragspuffer für DNA (Roth) 6x konzentriert (Zusammensetzung: 240 mM Tris-Acetat, 6mM EDTA, 0.12% Bromphenolblau, 40% Saccharose, pH 8.2); *Taschen 1-n* 1 µl **DNA3** ($c = 5 \text{ pmol } \mu\text{l}$), DNA-Binder unterschiedlicher Konzentration in 2 µl 2mM HEPES/NaOH-Puffer (10mM NaCl, pH 7.0), 5 µl 1:6 verdünnten Auftragspuffer für DNA (Roth) 6x konzentriert (Zusammensetzung: 240 mM Tris-Acetat, 6mM EDTA, 0.12% Bromphenolblau, 40% Saccharose, pH 8.2).

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Å	Angström
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
Acm	Acetamidomethyl
ACN	Acetonitril
APT	<i>attached proton test</i>
aq.	wässrig
$A_{\text{rel.}}$	Hyperchromizität
ASV	Allgemeine Synthesevorschrift
ber.	berechnet
Boc	<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl
br.	breit
C	Cytosin
c	Konzentration
° C	Grad Celsius
CD	Zirkulardichroismus
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CTD	<i>carboxy terminal domain</i>
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
d	Tage
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	(Ethyl)diisopropylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

[D ₆]DMSO	Hexadeuterodimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPPA	Diphenylphosphorylazid
ϵ	Absorptionskoeffizient
EDCI	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> , <i>N'</i> -(dimethylaminopropyl)carbodiimid
equiv.	Äquivalent
ESI	Elektrosprayionisation
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
G	Guanin
gef.	gefunden
h	Stunden
HATU	<i>O</i> -(7-Aza-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorphosphat (IUPAC: 1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridiniumhexafluorophosphat-3-oxid)
HBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorphosphat (IUPAC: 1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> -benzotriazolium-hexafluorophosphat-3-oxid)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HOAc	Essigsäure
HOAt	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	Hochauflösung (<i>high resolution</i>)
Hz	Hertz
IR	Infrarotspektroskopie
i. Rot.	im Rotationsverdampfer

J	skalare Kopplungskonstante
K	Kelvin
λ	Wellenlänge
l	Länge
LD	Lineardichroismus
M	Molekül
M	molar
m	Multiplett
m	<i>meta</i>
M	Molmasse
mdeg	Milligrad
Me	Methyl
MeOH	Methanol
min	Minuten
MHz	Megahertz
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
N	normal
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidin-2-on
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
Ph	Phenyl
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
PNA	Peptidnucleinsäure
ppm	<i>parts per million</i>
q	Quartett
rel.	relativ
R_f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure

RP	reverse Phase
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
s	Sekunde
Schmp.	Schmelzpunkt
T	Thymin
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluor- phosphat (IUPAC: 1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> -benzo- triazolium-tetrafluorophosphat-3-oxid)
<i>t</i> Bu	<i>tert.</i> -Butyl
<i>tert.</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
T_m	Schmelztemperatur
TMS	Tetramethylsilan
t_R	Retentionszeit
UV	Ultraviolettspektroskopie
V	Volt
VIS	<i>visible</i>
W	Watt
Z	Benzyloxycarbonyl
Zers.	Zersetzung

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den von der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) empfohlenen Richtlinien.^[176] Firmennamen und Fachausdrücke, die aus dem Englischen übernommen wurden, sind kursiv geschrieben.

Literaturverzeichnis

- [1] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer Verlag, New York, **1984**.
 - [2] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737.
 - [3] F. H. C. Crick, L. Barnett, S. Brenner, R. J. Watts-Tobin, *Nature* **1961**, 192, 1227.
 - [4] L. A. Dickinson, R. J. Gulizia, J. W. Trauger, E. E. Baird, D. E. Mosier, J. M. Gottesfeld, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12890-12895.
 - [5] G. M. Cragg, D. J. Newman, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 52.
 - [6] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022.
 - [7] J. B. Le Pecq, M. Le Bret, J. Barbet, B. Roques, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1975**, 72, 2915.
 - [8] T. Yoshida, K. Katagiri, *Biochemistry* **1969**, 8, 2645-2651.
 - [9] J. Shoji, K. Katagiri, *J. Antibiot.* **1961**, A14, 335-339.
 - [10] H. Otsuka, J. Shoji, *Tetrahedron* **1967**, 23, 1535-1542.
 - [11] K. Katagiri, T. Yoshida, K. Sato, *Antibiotics* (Eds.: J. W. Corcoran, F. E. Hahn), Springer, Heidelberg, **1975**, Vol. 3, 234-251.
 - [12] F. J. Takusagawa, *J. Antibiot.* **1985**, 38, 1596-1604.
 - [13] L. Stryer in *Biochemie*, Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin, 1996.
 - [14] R. A. Luce, P. B. Hopkins, *Methods in Enzymology* **2001**, 340, 396-412.
 - [15] D. E. Graves, *Methods in Enzymology* **2001**, 340, 377-395.
 - [16] N. J. Zondlo, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6938-6939.
 - [17] N. M. Luscombe, R. A. Laskowski, J. M. Thornton, *Nuc. Acids Res.* **2001**, 29, 2860-2874.
 - [18] N. C. Seeman, J. M. Rosenberg, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, 73, 804-808.
 - [19] A. Goldmann in *Nucleic Acids in Chemistry and Biology* (Hrsg.: G. M. Blackburn, M. J. Gait), Oxford University Press, New York, **1996**, S. 376-441.
-

-
- [20] D. S. Johnson, D. L. Boger in *DNA-binding agents in Comprehensive Supramolecular Chemistry* (Hrsg. Y. Murakami), Oxford-Elsevier, **1996**, S. 73-176.
- [21] P. B. Dervan, *Science* **1986**, 232, 464.
- [22] S. K. Kim, P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, R. H. Berg, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6477-6481.
- [23] P. E. Nielsen, G. Haaima, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 73-78; c) E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2954-2983; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, 37, 2796-2823.
- [24] G. Felsenfeld, D. R. Davies, A. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 2023.
- [25] H. Moser, P. B. Dervan, *Science* **1987**, 238, 645.
- [26] L. J. Maher, B. J. Wold, P. B. Dervan, *Science* **1989**, 245, 725.
- [27] L. J. Maher, P. B. Dervan, J. Wold, *Biochemistry* **1992**, 31, 70.
- [28] M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* **1985**, 183, 553.
- [29] J. G. Pelton, D. E. Wemmer, *Biochemistry* **1988**, 27, 8088.
- [30] J. G. Pelton, D. E. Wemmer, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1393.
- [31] M. Mrksich, M. E. Parka, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7983.
- [32] L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.* **1961**, 3, 18-30.
- [33] J. M. Kirk, *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, 42, 167.
- [34] W. Muller, D. M. Crothers, *J. Mol. Biol.* **1968**, 35, 251.
- [35] M. J. Waring, L. P. G. Wakelin, *Nature* **1974**, 252, 653.
- [36] L. P. G. Wakelin, *Med. Res. Rev.* **1986**, 6, 275-340.
- [37] S. C. Zimmerman, C. R. Lamberson, M. Cory, T. A. Fairley, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6805-6809.
- [38] M. McClellan Becker, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 3664-3666.
- [39] M. Waring, A. Makoff, *Mol. Pharmacol.* **1974**, 10, 214-224.
- [40] G. G. Gauze, Jr., N. P. Loshkareva, I. B. Zbarsky, *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, 166, 752-754.
- [41] D. L. Boger, S. Ichikawa, W. C. Tce, M. P. Hedrick, Q. Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 561-568.
-

- [42] H. Okada, H. Suzuki, T. Yoshinari, H. Arakawa, A. Okura, H. Suda, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 129.
 - [43] J. Shiji, K. Tori, H. Otsuka, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2772.
 - [44] H. Otsuka, J. Shoji, K. Kawano, Y. Kyogoku, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 107.
 - [45] F. Romeo, F. Espliego, J. P. Baz, T. G. De Quesada, D. Gravalos, F. de la Calle, J. L. Fernandez-Puentes, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 734.
 - [46] J. P. Baz, L. M. Canedo, J. L. Fernandez-Puentes, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 738.
 - [47] J. A. Matson, J. A. Bush, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1763.
 - [48] D. L. Boger, J.-H. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11624.
 - [49] D. L. Boger, J.-H. Chen, K. W. Saionz, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1629.
 - [50] D. L. Boger, K. W. Saionz, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 315.
 - [51] D. L. Boger, J.-H. Chen, K. W. Saionz, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 85.
 - [52] M. Konishi, H. Ohkuma, F. Skai, T. Tsuno, H. Koshiyama, T. Naito, H. Kawaguchi, *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 148.
 - [53] E. Arnold, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1243.
 - [54] D. L. Boger, M. W. Ledebøer, M. Kume, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1098.
 - [55] D. L. Boger, M. W. Ledebøer, M. Kume, M. Searcey, Q. Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11375.
 - [56] R. B. Lingham, A. H. M. Hsu, J. A. O'Brien, J. M. Siemund, M. Sanchez, M. M. Gagliardi, B. K. Heimbuch, O. Genilloud, I. Martin, M. T. Diez, C. F. Hirsch, D. L. Zink, J. M. Liesch, G. E. Koch, S. E. Garter, G. M. Garrity, N. N. Tsou, G. M. Salituro, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 253.
 - [57] D. L. Boger, M. W. Ledebøer, M. Kume, Q. Jin, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 2424.
 - [58] G. M. Sheldrick, A. Heine, K. Schmidt-Bäse, E. Pohl, P. G. Jones, E. Paulus, M. J. Waring, *Acta Cryst.* **1995**, *B51*, 987-999.
 - [59] M. B. Hossain, D. Van der Helm, R. K. Olsen, P. G. Jones, G. M. Sheldrick, E. Egert, O. Kennard, M. J. Waring, M. A. Viswamitra, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3401-3408.
 - [60] N. Higuchi, Y. Kyogoku, M. Shin, K. Inouye, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1983**, *21*, 541-545.
-

-
- [61] J. R. Kalman, T. J. Blake, D. H. Williams, J. Feeney, G. C. K. Roberts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1979**, 1313-1321.
- [62] J. S. Lee, M. J. Waring, *Biochem. J.* **1978**, 173, 115-128.
- [63] A. H.-J. Wang, G. Ughetto, G. J. Quigley, T. Hakoshima, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, *Science* **1984**, 225, 1115-1121.
- [64] G. J. Quigley, G. Ughetto, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. H.-J. Wang, A. Rich, *Science* **1986**, 232, 1255-1258.
- [65] A. H.-J. Wang, G. Ughetto, G. J. Quigley, A. Rich, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1986**, 4, 319-342.
- [66] K. J. Address, J. Feigon, *Biochemistry* **1994**, 33, 12386-12396.
- [67] K. J. Address, J. Feigon, *Biochemistry* **1994**, 33, 12397-12404.
- [68] R. K. Olsen, K. Ramasamy, K. L. Bhat, C. M. L. Low, M. J. Waring, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6032-6036.
- [69] J. S. Lee, M. J. Waring, *Biochem. J.* **1978**, 173, 115-128.
- [70] C. M. L. Low, R. K. Olsen, M. J. Waring, *FEBS Lett.* **1984**, 176, 414-420.
- [71] C. M. L. Low, K. R. Fox, R. K. Olsen, M. J. Waring, *Nucleic Acids Res.* **1986**, 14, 2015-2033.
- [72] M. Lavesa, R. K. Olsen, K. R. Fox, *Biochem. J.* **1993**, 289, 605-607.
- [73] M. Shin, K. Inouye, N. Higuchi, Y. Kyogoku, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1984**, 57, 2211-2215.
- [74] M. C. Fletcher, R. K. Olsen, K. R. Fox, *Biochem. J.* **1995**, 306, 15-19.
- [75] K. J. Address, D. E. Gilbert, R. K. Olsen, K. J. Feigon, *Biochemistry* **1992**, 31, 339-350.
- [76] K. J. Address, J. S. Sinsheimer, J. Feigon, *Biochemistry* **1993**, 32, 2498-2508.
- [77] J. Gallego, A. R. Ortiz, F. Gago, *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 1548-1561.
- [78] C. Bailly, M. J. Waring, *Biochem. J.* **1998**, 330, 81-87.
- [79] K. R. Fox, R. K. Olsen, M. J. Waring, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, 696, 315-322.
- [80] J. S. Lee, M. J. Waring, *Biochem. J.* **1978**, 173, 129-144.
- [81] M. K. Dhaon, R. K. Olsen, *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 3436-3440.
- [82] M. M. Harding, *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 4658-4664.
-

- [83] D. H. Appella, J. J. Barchi Jr., S. R. Durell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2309-2310.
 - [84] N. Helbecque, J.-L. Bernier, J.-P. Hénichart, *Biochem. J.* **1985**, *225*, 829-832.
 - [85] A. Cornish, K. R. Fox, M. J. Waring, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1983**, *23*, 221-231.
 - [86] D. L. Boger, J. K. Lee, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5996-6000.
 - [87] D. H. Turner, N. Sugimoto, R. Kierzek, S. D. Dreiker, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3783.
 - [88] B. L. Gaffney, L. A. Marky, R. A. Jones, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 3.
 - [89] M. Kabelac, P. Hobza, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 2067.
 - [90] K. B. Lorenz, *Nucleobasen-funktionalisierte Analoga des Chinoxalin-Antibiotikums Triostin A zur selektiven Erkennung von DNA*, Cuvillier Verlag Göttingen, Göttingen, **2004**.
 - [91] K. Gehring, J. L. Leroy, M. Guéron, *Nature* **1993**, *363*, 561–565.
 - [92] J. L. Leroy, M. Guéron, J. L. Mergny, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 1600–1606.
 - [93] J. L. Mergny, L. Lacroix, X. Han, J. L. Leroy, C. Hélène, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8887–8898.
 - [94] A. T. Phan, J. L. Leroy, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2000**, *S2*, 245–252.
 - [95] A. T. Phan, J.-L. Mergny, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4618–4625.
 - [96] J. Lhomme, J.-F. Constant, M. Demeunynck, *Biopolymers* **1999**, *52*, 65-83.
 - [97] J.-F. Constant, M. Demeunynck in *Small Molecule DNA and RNA Binders: From Small Molecules to Drugs* (Hrsg.: M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, S. 247-277.
 - [98] A. Fkyerat, M. Demeunynck, J.-F. Constant, J. Lhomme, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 11237-11252.
 - [99] A. Fkyerat, M. Demeunynck, J.-F. Constant, P. Michon, J. Lhomme, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9952-9959.
 - [100] K. Alarcon, M. Demeunynck, J. Lhomme, D. Carrez, A. Croisy, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1901-1910.
 - [101] K. B. Lorenz, U. Diederichsen, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3917.
-

-
- [102] J. Coste, M.-N. Dufour, A. Pantaloni, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 669.
- [103] J. Coste, E. Frérot, P. Jouin, B. Castro, . Bertrand, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1967.
- [104] N. Sewald, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 4855; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, 41, 4661.
- [105] B. Thern, J. Rudolph, G. Jung, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 5013.
- [106] B. Thern, J. Rudolph, G. Jung, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2401; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, 41, 2307.
- [107] M. Kusonoki, S. Nakagawa, K. Seo, T. Hamara, T. Fukuda, *Int. J. Peptide Prot. Res.* **1990**, 36, 381.
- [108] J.-C. Gesquière, E. Diosis, A. Tartar, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1990**, 1402.
- [109] W. C. Chan, P. D. White in *Fmoc solid phase synthesis: a practical approach*, Oxford University Press, Oxford, **2000**.
- [110] L. Zhang, G. S. Kauffman, J. A. Pesti, J. Yin, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6918.
- [111] F. Ruan, Y. Chen, K. Itoh, T. Sasaki, P. B. Hopkins, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 4347.
- [112] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1994**, 2559.
- [113] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927.
- [114] C. G. Fields, D. H. Lloyd, R. L. Macdonald, K. M. Otteson, R. L. Noble, *Pept. Res.* **1991**, 4, 95.
- [115] C. J. Bagley, K. M. Otteson, B. L. May, S. N. McCurdy, L. Pierce, F. J. Ballard, J. C. Wallace, *Int. J. Peptide Proteine Res.* **1990**, 36, 356.
- [116] S. A. Kates, A. Nuria, M. Solé, M. Beyermann, G. Barany, F. Albericio, *Peptide Res.* **1996**, 9, 106.
- [117] J. Musiol, F. Siedler, D. Quarzago, L. Moroder, *Biopolymers* **1994**, 34, 1553-1562.
- [118] T. Kaiser, G. J. Nicholson, H. J. Kohlbau, W. Voelter, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 1187-1190.
-

- [119] Y. Han, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4307-4312.
 - [120] F. Albericio, L. A. Carpino, *Methods in Enzymology* **1997**, 289, 104.
 - [121] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 77, 1067.
 - [122] M. Beyermann, P. Henklein, A. Klose, R. Sohr, M. Bienert, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, 37, 25.
 - [123] M. Carlquist, *Acta Chem. Scand.* **1987**, 41, 494.
 - [124] D. Sarantakis, J. Teichman, E. L. Lien, R. L. Fenichel, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1976**, 73, 336.
 - [125] J. D. Fontenot, J. M. Ball, M. A. Miller, C. M. David, R. C. Montelaro, *Pept. Res.* **1991**, 4, 19.
 - [126] J. D. Wade, J. Bedford, R. C. Sheppard, G. W. Tregear, *Pept. Res.* **1991**, 4, 194.
 - [127] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 22, 2559.
 - [128] B. Kamber, A. Hartmann, K. Eisler, B. Riniker, H. Rink, P. Sieber, W. Rittel, *Helv. Chim. Acta*, **1980**, 63, 899.
 - [129] L. Chen, H. Bauerová, J. Slaninová, G. Barany, *Pept. Res.* **1996**, 9, 114.
 - [130] A. Trzeciak, W. Bannwarth, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 4557.
 - [131] Y. Han, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 3841.
 - [132] G. Barany, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 7363-7365.
 - [133] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Anti-Cancer Drug Des.* **1993**, 8, 53-63.
 - [134] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, 254, 1497-1500.
 - [135] K. E. Nelson, M. Levy, S. L. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 3868-3871.
 - [136] K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 5767-5773.
 - [137] S. A. Thomsen, J. A. Josey, R. Cadilla, M. D. Gaul, C. F. Hassman, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L. Reed, D. J. Ricca, R. W. Wiethe, S. A. Noble, *Tetrahedron* **1995**, 51, 6179-6194.
-

-
- [138] A. J. H. Nollet, C. M. Huting, U. K. Pandit, *Tetrahedron* **1969**, 25, 5971–5981.
- [139] P. C. Meltzer, A. Y. Liang, P. Matsudaira, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 4305–4308.
- [140] J. C. Sheehan, S. L. Ledis, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 875–879.
- [141] M. K. Dhaon, R. K. Olsen, K. Ramasamy, *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 1962–1965.
- [142] J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank, G. L. Boshart, *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 2525–2528.
- [143] Y. Kiso, K. Ukawa, T. J. Akita, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, 101–102.
- [144] D. Y. Jackson, D. S. King, J. Chmielewski, S. Singh, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9391.
- [145] M. R. Ghadiri, A. K. Fernholz, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 9633.
- [146] S. R. Gilberton, X. Wang, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 434.
- [147] F. Ruan, Y. Chen, P. B. Hopkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 9403.
- [148] H. E. Blackwell, R. H. Grubbs, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 3469; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, 37, 3281.
- [149] P. Schwab, M. B. France, J. W. Ziller, R. H. Grubbs, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2179; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1995**, 34, 2039.
- [150] M. Scholl, S. Ding, C. W. Lee, R. H. Grubbs, *Org. Lett.* **1999**, 1, 953.
- [151] S. C. G. Biagini, S. E. Gibson, S. P. Keen, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1* **1998**, 2485.
- [152] M. A. Brook, T. H. Chan, *Synthesis* **1983**, 201.
- [153] E. Ponnusamy, U. Fotadar, A. Spisni, D. Fiat, *Synthesis* **1986**, 48.
- [154] J. M. Padrón, G. Kokotos, T. Martin, T. Markidis, W. A. Gibbons, V. S. Martin, *Tetrahedron: Assym.* **1998**, 9, 3381.
- [155] H. Tamamura, A. Otaka, J. Nakamura, K. Okube, T. Koide, K. Ikeda, T. Ibuka, N. Fujii, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1995**, 45, 312.
- [156] H. Tamamura, F. Matsumoto, K. Sakano, T. Ibuka, N. Fujii, *Chem. Comm.* **1998**, 151.
- [157] D. A. Pearson, M. Blancette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2739.
- [158] B. Kamber, A. Hartmann, K. Eisler, B. Riniker, H. Rink, P. Sieber, W. Rittel, *Helv. Chim. Acta* **1980**, 63, 899.
-

- [159] R. Manetsch, A. Krasinski, Z. Radic, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, H. C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12809.
 - [160] N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody, *Circular Dichroism, Principles and Application*, Wiley-VCH, New York, **2000**.
 - [161] J. Cuesta, Dissertation, Universität Göttingen, in Vorbereitung.
 - [162] V. Gabelica, E. De Pauw, F. Rosu, *J. Mass Spectrom.* **1999**, 34, 1328.
 - [163] P. Hardenbol, J. C. Wang, M. W. van Dyke, *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8, 617.
 - [164] C. Bailly, M. J. Waring, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1995**, 12, 869.
 - [165] W. T. Tse, D. L. Boger, *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 61.
 - [166] N. Berthet, J.-F. Constant, M. Demeunynck, P. Michon, J. Lhomme, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3346-3352.
 - [167] C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry*, Teil III, W. H. Freeman & Co., San Francisco, **1980**, 1109-1181.
 - [168] M. Deutscher in *Guide to Protein Purification*, Academic Press, London, **1990**.
 - [169] J. W. Zyskind, S. I. Bernstein, in *Recombinant DNA Laboratory Manual*., Academic Press, London, **1992**.
 - [170] H. J. Galla, *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*, Thieme Verlag, Stuttgart, **1988**.
 - [171] C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry*, Teil III, W. H. Freeman & Co., San Francisco, **1980**, 1109-1181.
 - [172] D. Pörschke, *Biopolymers* **1971**, 10, 1989.
 - [173] W. C. Johnson Jr., *Proteins*, **1990**, 7, 205.
 - [174] J.-B. LePecq, C. Paoletti, *J. Mol. Biol.* **1967**, 27, 87.
 - [175] D. L. Boger, B. E. Fink, S. R. Brunette, W. C. Tse, M. P. Hedrick, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5878.
 - [176] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), G. Kruse, *Nomenklatur der Organischen Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **1997**.
-

Lebenslauf

1976	Geboren am 30.04.1976 in Siegen
Sept. 1982 – Juli 1986	Grundschule am Fischbacherberg, Siegen
Sept. 1986 – Juni 1995	Gymnasium Am Löhrtor, Siegen Abschluss Abitur
Sept. 1995 – Sept. 1996	Ersatzdienst beim Diakonischen Werk Siegen
Okt. 1996 – Mai 2002	Studium der Chemie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit dem Vordiplom im Okt. 1998, Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr. Bernd Engels: <i>„Wechselwirkungen in Xanthin-Alanyl-PNA-Doppelsträngen unter Berücksichtigung von Solvationseffekten – ein theoretischer Ansatz“</i>
März 2000 – Juli 2000	Fortgeschrittenenpraktikum in Organischer Chemie an der Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique de Lyon (CPE) (Frankreich) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Denis Sinou
Juni 2002 – Mai 2002	Dissertation bei Prof. Dr. Ulf Diederichsen am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen: <i>„Nukleobasen-funktionalisierte Azatriostine: Synthese und Studien zur Wechselwirkung mit DNA“</i>
Okt. 2002 – Sept. 2004	Assistent im Organischen Grundpraktikum für Chemiker an der Universität Göttingen

