



Frank Sicherl (Autor)

Synthese und Anwendung orthogonal geschützter Zuckerdiaminosäuren

Ein kombinatorischer Ansatz zum Finden von potenziellen RNA-Liganden



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2064>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1 Einleitung

1.1 Tuberkulose – Ein Beispiel

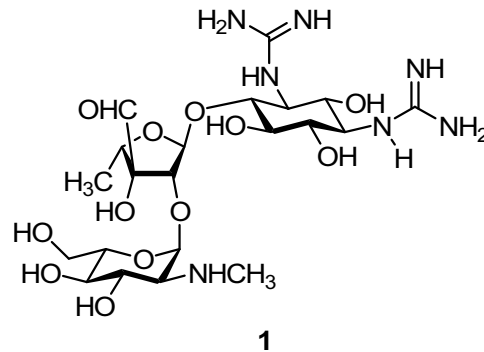
Draußen zeigte sich wieder die Krankenschwester, kurzsichtig und neugierig nach ihnen spähend. Aber im ersten Stockwerk blieb Hans Castorp plötzlich stehen, festgebannt von einem grässlichen Geräusch, das in geringer Entfernung hinter einer Biegung des Korridors vernehmlich wurde, einem Geräusch, nicht laut, aber so ausgemacht abscheulicher Art, dass Hans Castorp eine Grimasse schnitt und seinen Vetter mit erweiterten Augen ansah. Es war Husten, offenbar, - eines Mannes Husten; aber ein Husten, der keinem anderen ähnelte, den Hans Castorp jemals gehört hatte, ja, mit dem verglichen jeder andere ihm bekannte Husten eine prächtige und gesunde Lebensäußerung gewesen war, - ein Husten ganz ohne Lust und Liebe, der nicht in richtigen Stößen geschah, sondern nur wie ein schauerlich kraftloses Wühlen im Brei organischer Auflösung klang.^[1]

Inspiziert durch den Aufenthalt seiner an Tuberkulose erkrankten Frau in einer Lungenklinik in Davos im Jahre 1912 schrieb Thomas Mann „Der Zauberberg“, in dem Hans Castorp während des eigentlich kurz geplanten Besuchs seines kranken Veters in einem Sanatorium selbst erkrankt und sieben Jahre dort verbringt. In diesem Buch spiegelt sich die Krankheitssituation in Europa bis Mitte des letzten Jahrhunderts wider: Tuberkulose war allgegenwärtig, bis Anfang des 20. Jahrhunderts starb jeder fünfte an den Folgen.

Tuberkulose ist eine Infektionskrankheit, ausgelöst durch das Bakterium *Mycobacterium tuberculosis*, welches 1882 von Robert Koch erstmals beschrieben wurde.^[2] Er erhielt 1905 für diese Entdeckung den Nobelpreis in Medizin. Die Krankheit begleitet den Menschen allerdings schon seit langer Zeit, so ist sie seit dem Altertum bekannt. Skelettüberreste von prähistorischen Menschen (4000 v. Chr.) zeigten Spuren der Krankheit. Tuberkulöse Zerstörung wurde auch in Knochen ägyptischer Mumien von 3000-2400 v. Chr. gefunden. Zudem gab es Hinweise auf Tuberkulose in Indien und Amerika um 2000 v. Chr.^[3]

Durch ausgewogene Ernährung und bessere Hygiene konnte die Zahl der Fälle in Europa reduziert werden, ein therapeutischer Erfolg konnte jedoch erst 1943 durch das von Albert Schatz an der Rutgers University entdeckte Aminoglycosid Streptomycin **1** verzeichnet werden,^[4] welches als Antibiotikum ein wirksames Mittel gegen die Krankheit darstellte.

Auch für diese Entdeckung wurde ein Nobelpreis vergeben, allerdings an seinen Professor Selman Abraham Waksman im Jahre 1952. Durch die Anwendung von Streptomycin wurden die seit Mitte des 19. Jahrhunderts speziell für Tuberkulose eingerichteten Sanatorien, wie auch jenes als Schauplatz des „Zauberbergs“, nach und nach geschlossen.



Trotz der Eindämmung in Europa erkranken pro Jahr etwa neun Millionen Menschen an Tuberkulose (2004), zumeist in Dritte-Welt-Ländern, wobei etwa zwei Millionen pro Jahr häufig aufgrund unzureichender Behandlungsmöglichkeiten an der Erkrankung sterben.^[5] Hoffnungen, dass die Krankheit vollständig beseitigt werden könnte, sind seit dem Auftreten von antibiotikaresistenten (*multi-drug-resistant*, MDR) Stämmen in den achtziger Jahren zerstört worden. Das Auftreten von Antibiotikaresistenzen beschränkt sich nicht nur auf Tuberkulose, sondern ist ein auf viele Krankheiten zutreffendes Phänomen. Bekannte Stämme sind unter anderen Penicilin-resistente *Streptococcus pneumoniae*, Vancomycin-resistente *Enterococci*, Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* und multiresistente *Salmonellae*.^[6] Es besteht deshalb ein dringender Bedarf an neuen Antibiotika im therapeutischen Kampf gegen solche Bakterienstämme. Die vorliegende Arbeit zeigt einen möglichen Ansatz zur Überwindung dieser neuzeitlichen medizinischen Problematik.

1.2 Aminoglycoside, Struktur und Funktion

Die natürlichen Aminoglycoside sind wasserlösliche, strukturell ähnliche bakterizide Breitspektrum-Antibiotika, die weitläufig in der Behandlung von Infektionen durch aerobe Gram-negative Bakterien Anwendung finden, vor allem in Fällen von Bakteriämie und Sepsis (Blutvergiftung).^[7] Sie besitzen vorhersagbare pharmakokinetische Eigenschaften und wirken oft in Synergie mit anderen Antibiotika, wie z. B. Vancomycin. Zudem zeigen sie einen

signifikanten postantibiotischen Effekt, d. h. auch nachdem der Wirkstoff im Blut nicht mehr nachweisbar ist, existiert noch antibiotische Aktivität. Diese Eigenschaften machen sie im Bezug auf klinische Anwendungen sehr wichtig.^[7,8]

Die Namensgebung für Aminoglycoside resultiert aus deren Struktur, welche aus einem zentralen Aminocyclitol besteht, an das mehrere Zucker und Aminozucker glycosidisch verknüpft sind. In Streptomycin handelt es sich bei dem Aminocyclitol um Streptamin, während in den anderen Aminoglycosiden 2-Desoxystreptamin (Ring II) der zentrale Bestandteil ist. Die 2-Desoxystreptamin enthaltenden Aminoglycoside lassen sich in zwei Unterklassen einteilen, zum einen in 4,5-disubstituierte wie Neomycin, Paromomycin und Ribostamycin (Abbildung 1.1) und in 4,6-disubstituierte wie Tobramycin, Kanamycine A und B, Amikacin, Geneticin und die Gentamicine (Abbildung 1.2). Sie enthalten typischerweise drei bis sechs Aminogruppen.^[9,10] Die Aminoglycoside treten unter physiologischen Bedingungen mit berichteten pK_S -Werten zwischen 5.7 und 10.1 als Polykationen auf.^[11-15]

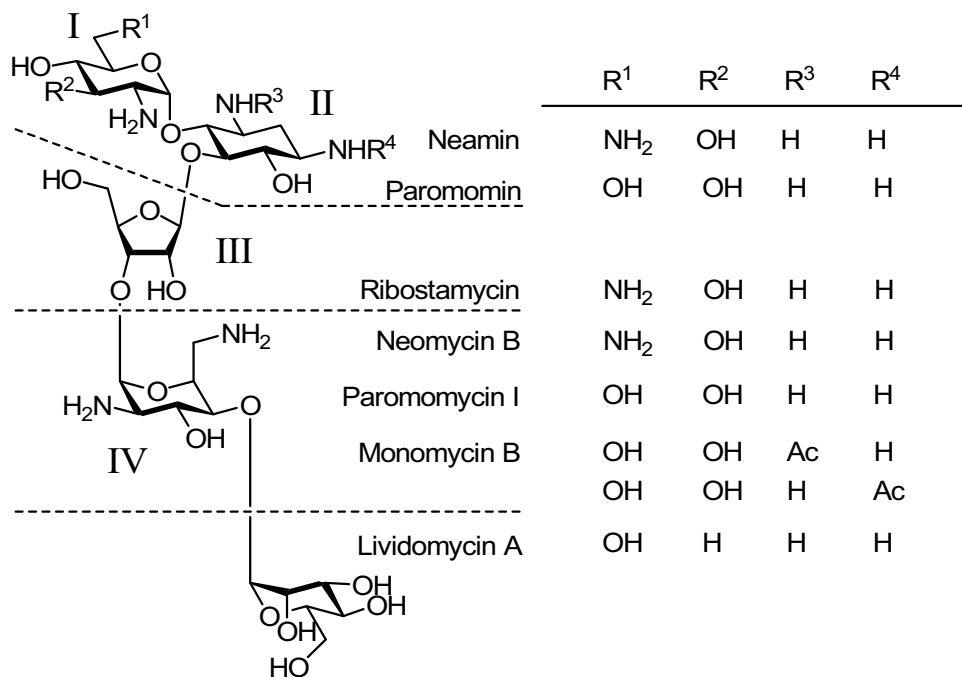


Abb. 1.1: Aminoglycoside der 4,5-2-Desoxystreptaminsubklasse.

Wie man den Abbildungen 1.1 und 1.2 entnehmen kann, ist Ring I immer glycosidisch an die 4-Hydroxygruppe von 2-Desoxystreptamin (Ring II) gebunden, allerdings unterscheiden sich diese Substituenten in ihrer Art. Weitere Ringe sind entweder an der 5- oder 6-OH-Gruppe

verbunden. Die Kombination aus Ring I und II ist die übliche Kernstruktur, welche man als Neamin bzw. Paromomin bezeichnet.^[16]

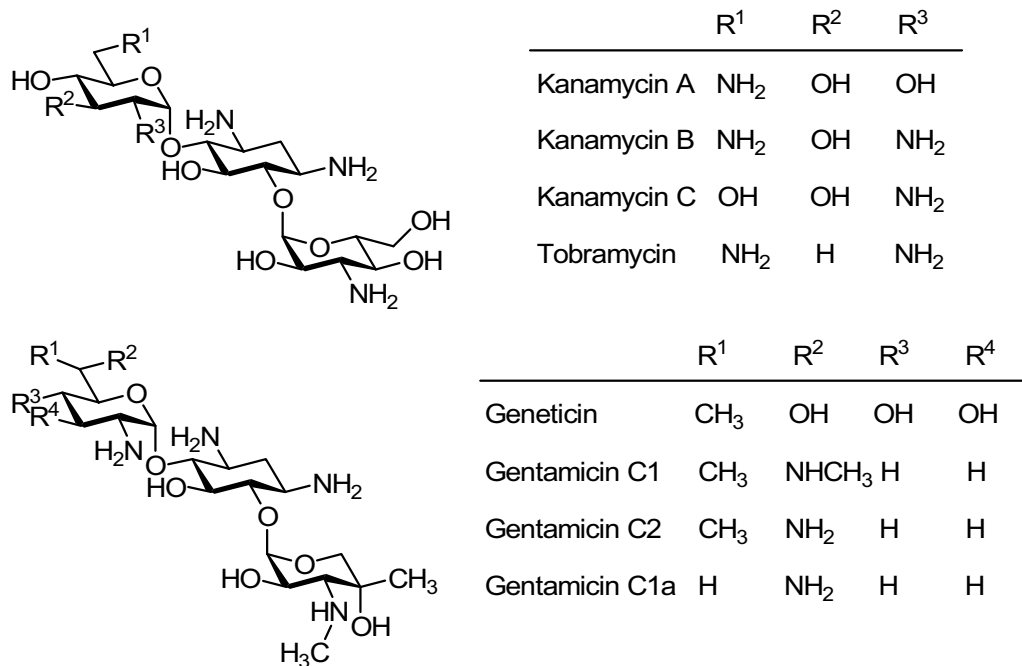


Abb. 1.2: Aminoglycoside der 4,6-2-Desoxystreptaminsubklasse.

1.3 Moden der Bindung an RNA

Das intrazelluläre Target der Aminoglycoside ist die 16 S-rRNA enthalten in der 30 S-Untereinheit prokaryontischer Ribosomen. Das Ribosom ist ein fundamentaler, cytosolischer Zellbestandteil, welcher als molekulare Maschine den zweiten Schritt der Genexpression katalysiert.^[17,18] Während der so genannten Translation werden die durch einen äußeren Reiz aus der DNA erzeugten mRNA-Transkripte in für das Überleben wichtige Proteine übersetzt. In Bakterien haben Ribosomen einen Sedimentationskoeffizienten von 70 S, wobei mit 30 S eine kleine und mit 50 S eine große Untereinheit enthalten ist. Die Substrate der Translation sind die Aminoacyl-tRNAs, welche über ein zur mRNA komplementäres Basentriplett die entsprechende Aminosäure für die Peptidsynthese liefern. Die Ribosomen bestehen zu zwei Dritteln aus RNA, wobei alle katalytischen Einheiten durch diese gebildet werden. Der Rest sind Proteine, die für Strukturgebung und Stützung verantwortlich sind. Neben einer Peptidyltransferase in der 50 S-Untereinheit enthalten sie drei Bindungstaschen - eine

Aminoacyl-tRNA-(A-), eine Peptidyl-tRNA-(P-) und eine Exit-(E-)Bindungstasche, welche sich zwischen 30 S- und 50 S-Untereinheit befinden. Die große Untereinheit ist eher rigide, die kleine hingegen flexibel.

Prinzipiell lässt sich die Translation in drei Schritte unterteilen, die Initiation, die Elongation sowie die Termination. Die Aminoglycoside greifen in den Elongationsprozess durch spezifische Bindung an die hochkonservierte Dekodierungsregion in der A-Bindungstasche ein. Dieses führt zu Fehlern bei der Codon-Anticodon-Erkennung (Misstranslation) sowie zur Inhibierung des Translokationsschrittes, woraus letztlich fehlerhafte bzw. abgebrochene Peptidsequenzen resultieren.^[19,20] Die Fähigkeit der Aminoglycoside, eine spezifische Subdomäne eines großen RNA-Moleküls, wie dem Ribosom, zu erkennen, macht diese Verbindungen zu archetypischen Modellen für an RNA angreifende Wirkstoffe.

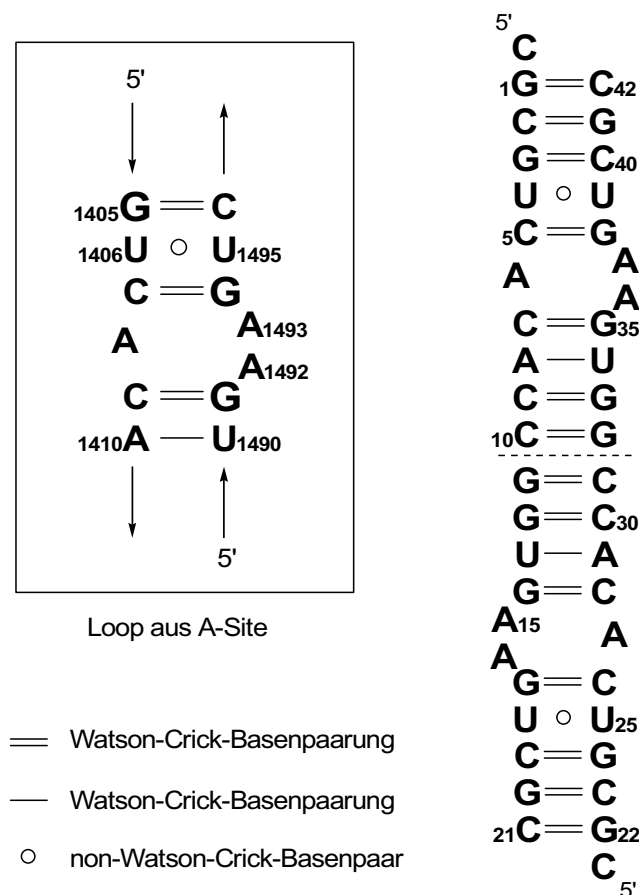


Abb. 1.2: Interne Schleife (*loop*) aus der A-Bindungstasche (links) und die von Westhof und Mitarbeitern verwendete Modell-RNA (rechts) zur Röntgenstrukturanalyse von Aminoglycosiden im Komplex mit der A-Bindungstasche.

Bis heute sind acht Strukturen von Aminoglycosid-rRNA-Komplexen in der Protein-Datenbank (PDB) zu finden, die entweder über Röntgenbeugung oder NMR-spektroskopische Methoden aufgeklärt wurden. Sechs dieser Strukturen entstanden unter Verwendung von Modell-RNAs, welche die asymmetrische interne Schleife der Dekodierungsregion widerspiegeln.

In der Gruppe von Westhof wurden kürzlich Kristallstrukturen der Aminoglycoside Paromomycin^[21], Tobramycin^[22] und Geneticin^[23] im Komplex mit der in Abbildung 1.2 gezeigten Modell-RNA aufgeklärt. Dieses Modell stellt die Minimal-Struktur der A-Bindungstasche dar, in dem die durch die drei Adenine A1408, A1492 und A1493 gebildete Schleife aus *Escherichia coli* zweimal enthalten ist. Footprinting-Versuche zeigten, dass dieser Teil der 16 S-rRNA frei von Kontakten mit ribosomalen Proteinen vorliegt.^[24] Die Prinzipien der Bindung eines Aminoglycosides werden am Beispiel von Paromomycin mit der gezeigten RNA dargestellt. Die Nummerierung der Basen erfolgt dabei in Analogie zur ribosomalen A-Bindungstasche.

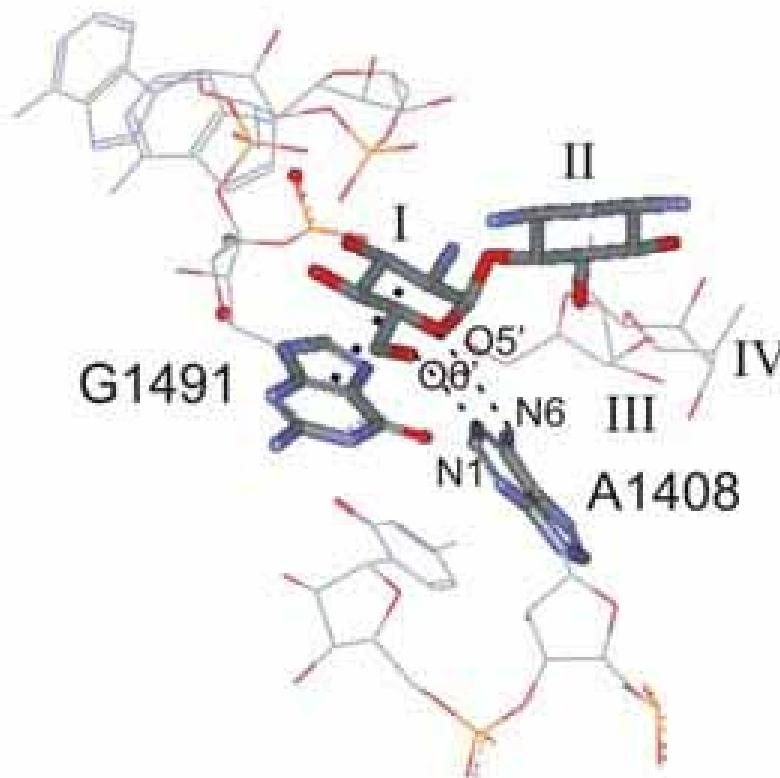


Abb. 1.3: Kontakte zwischen Ring I von Paromomycin und den Basen A1408 und G1491 aus der A-Bindungstasche. Koordinaten entnommen aus der PDB, 1J7T[1].pdb, Bild erstellt mit WebLabViewerPro.

Die Struktur des Komplexes mit Paromomycin wurde mit einer Auflösung von 2.5 Å gelöst. Das Aminoglycosid bindet in der erweiterten großen Furche mit kleineren Störungen der helikalen Struktur. Dafür sind zum einen das non-Watson-Crick-Basenpaar zwischen den Uracilen U1406 und U1495 sowie die beiden Adenine A1492 und A1493 verantwortlich, die komplett aus der Helix herausgedreht vorliegen. Aus der Struktur konnten zahlreiche Kontakte über Wasserstoffbrücken ausgemacht werden, es treten aber auch hydrophobe Wechselwirkungen auf. So ist Ring I mit seiner Unterseite zu G1491 gestapelt und an A1408 über dessen Watson-Crick-Seite gebunden (Abbildung 1.3).

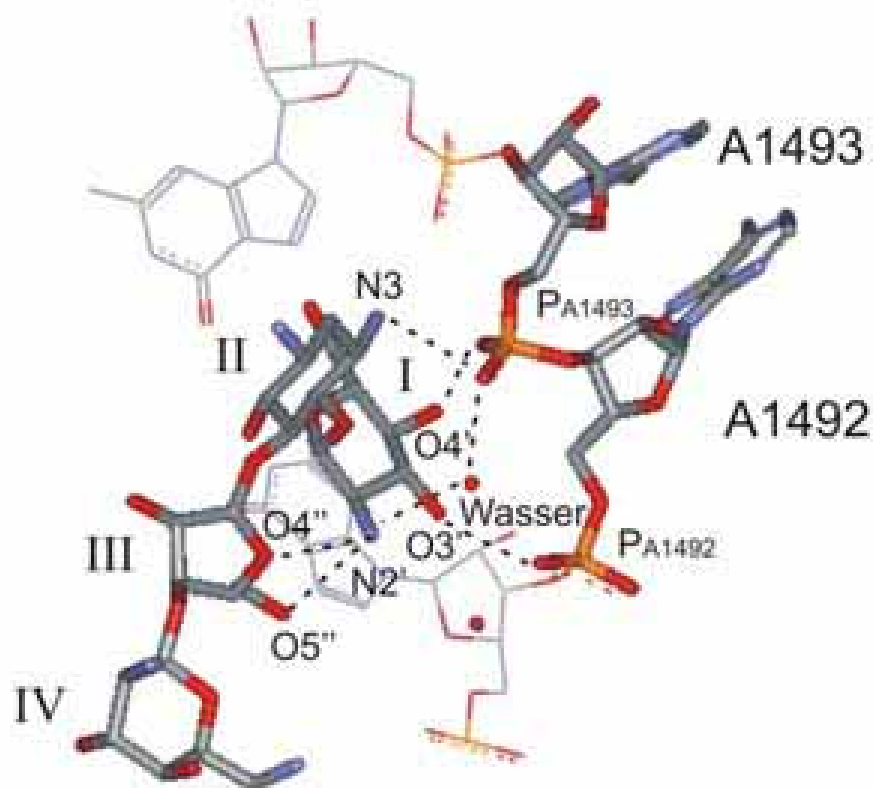


Abb. 1.4: Intramolekulare Kontakte zwischen Ring I und Ring III von Paromomycin sowie direkte und Wasser vermittelte Wasserstoffbrücken zum Phosphatrückgrat an der Position der Adenine A1492 und A1493 in der A-Bindungstasche. Koordinaten entnommen aus der PDB, 1J7T[1].pdb, Bild erstellt mit WebLabViewerPro.

Des Weiteren bestehen intramolekulare Wasserstoffbrücken zu Ring III von N2' zu O4'' und O5'', welche vermutlich zur Stabilisierung der Konformation des Aminoglycosids einen wichtigen Beitrag leisten. Die Ringe I und II treten mit dem Ribose-Phosphat-Rückgrat an der Position der beiden aus der Helix herausgestülpten Adenine A1492 und A1493 in

Wechselwirkung. Dabei kommt es zu direkten und Wasser vermittelten Kontakten von O3', O4', N2' und N3 (Abbildung 1.4).

Einer der wohl interessantesten Kontakte geht von O6 des Ringes II aus - hier besteht eine einzelne Wasserstoffbrücke von O6 zu einem Wassermolekül, welches seinerseits an das Basenpaar U1406-U1495 als auch an das Basenpaar G1405-C1496 über das O6 des Guanins im oberen Bereich der A-Bindungstasche gebunden ist (Abbildung 1.5). Die beiden Uracile nehmen dadurch zueinander eine fast 90 ° ständige Position ein. Vergleichbare Strukturen dieser Art treten z. B. auch an den Positionen 32-38 von tRNA^{Gln} aus *E. coli* im Komplex mit ihrer Synthetase^[25] sowie in der Struktur des Spleißosomalen U2B''-U2A' Proteinkomplexes an das U2-RNA-Fragment^[26] auf.

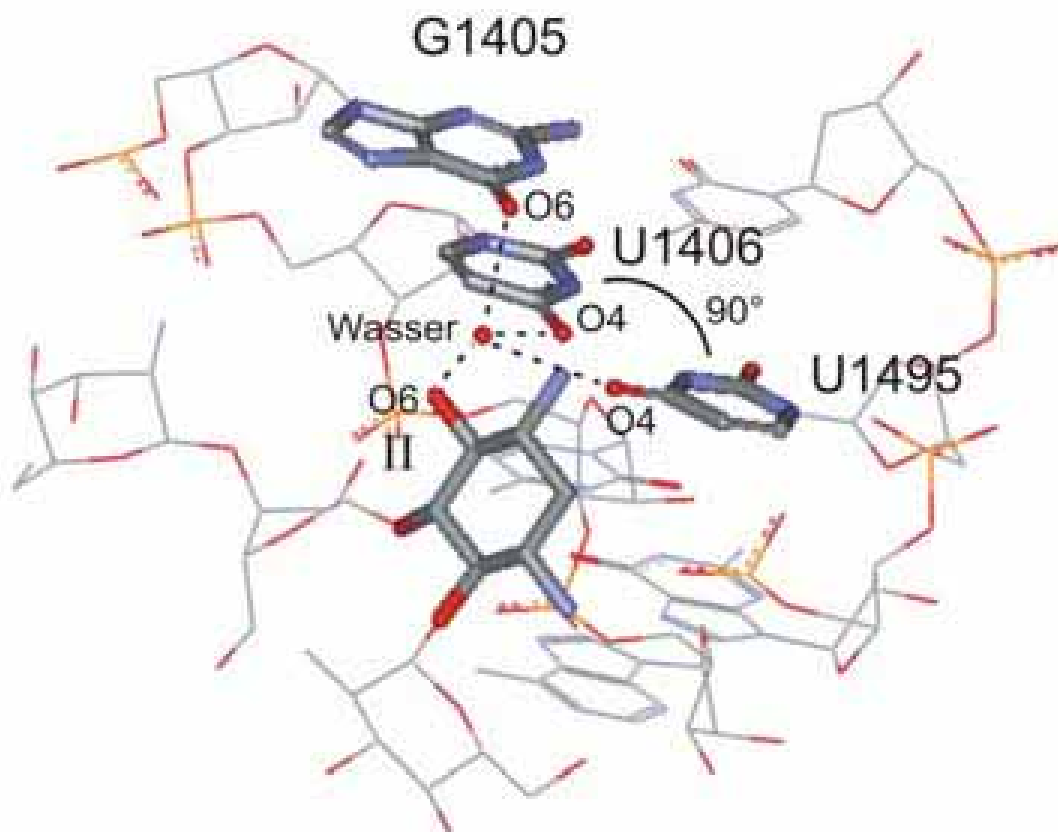


Abb. 1.5: Wasser vermittelte Wechselwirkungen von Ring II von Paromomycin mit den Basenpaaren U1406-U1495 und G1405-C1496 im oberen Teil der A-Bindungstasche. Koordinaten entnommen aus der PDB, 1J7T[1].pdb, Bild erstellt mit WebLabViewerPro.

