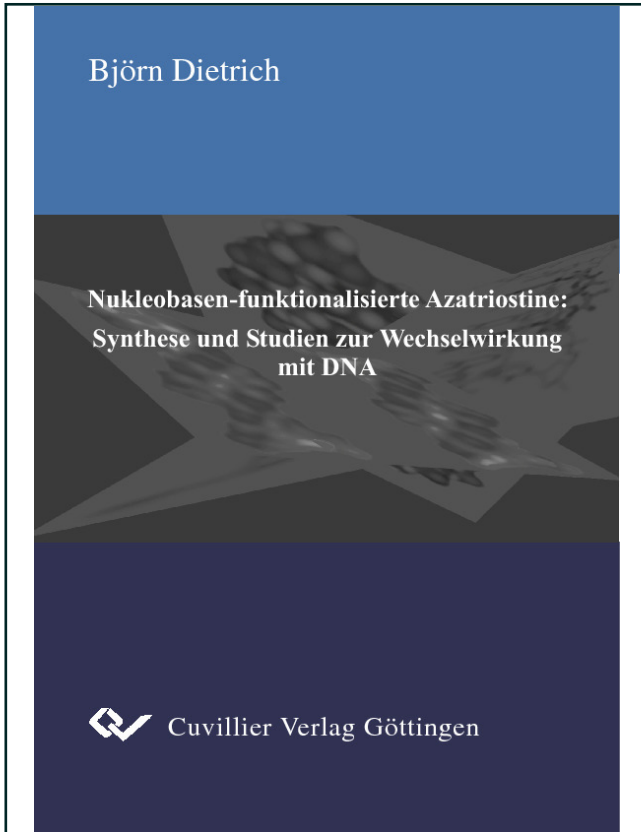




Björn Dietrich (Autor)

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



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2314>

Copyright:

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

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

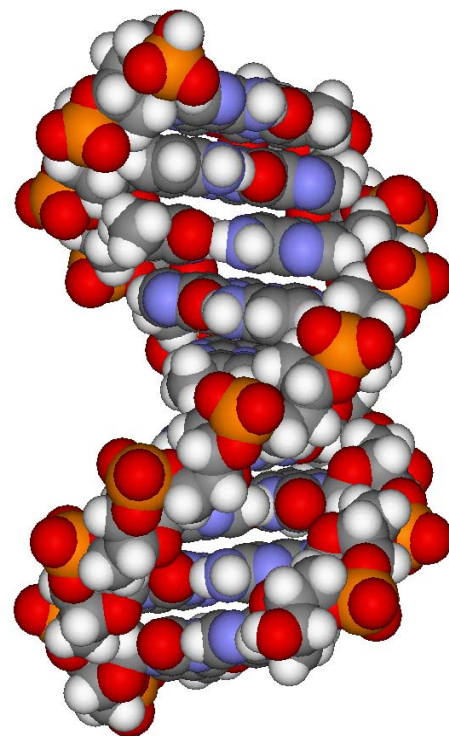
# 1 Einleitung

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.

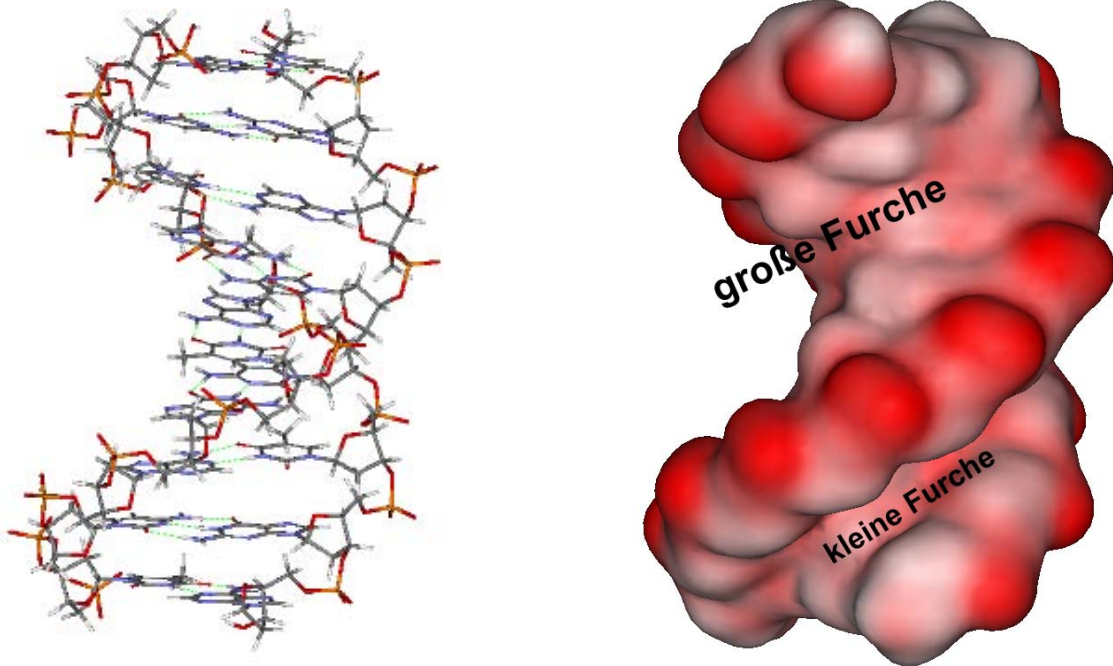
Die DNA ist ein Makromolekül, welches aus Desoxyribonukleotiden besteht. Jedes Nukleotid setzt sich aus einer Base, einer Zucker- und einer Phosphatgruppe zusammen.<sup>[1]</sup> Die Sequenzen der in der DNA vorkommenden Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin kodieren die genetische Information, die 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).<sup>[2]</sup> 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.

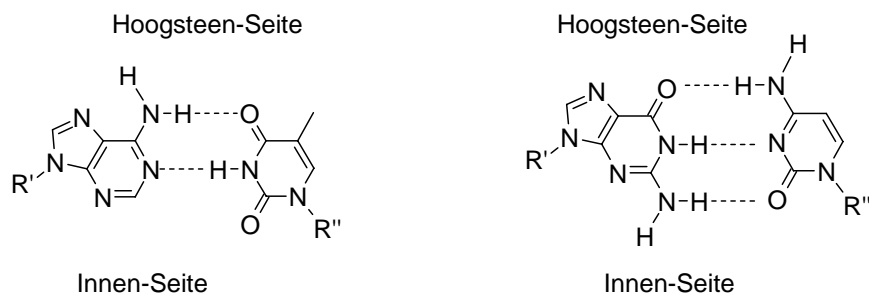


**Abb. 1-1** B-DNA-Doppelstrang.



**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.<sup>[3]</sup> 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).

---

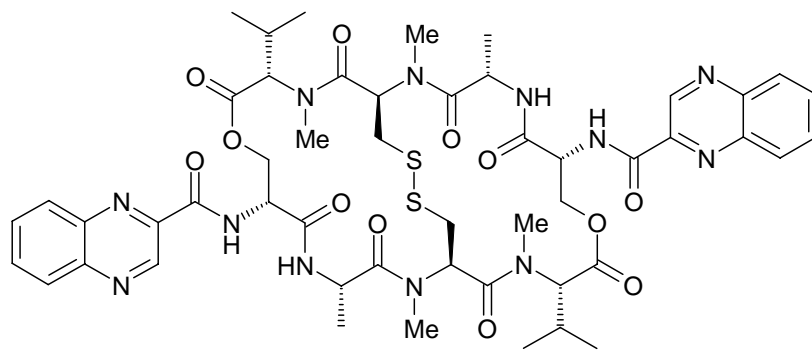
Allein die sequenzielle Abfolge dieser beiden Basenpaarungen kodiert alle genetischen Informationen, die in determinierten Bereichen der DNA in Form von Genen gespeichert sind.<sup>[3]</sup> Die Gene bestimmen, welche Proteine in einer Zelle synthetisiert werden. Die Überführung der in einer DNA-Matrix 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.<sup>[4]</sup> 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.<sup>[5,6]</sup>

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.<sup>[7]</sup> 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.<sup>[8-12]</sup> 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

---

Bindungselektivität 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 Bindungselektivität 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.<sup>[13]</sup> 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 Matrizerkennungsregion 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.

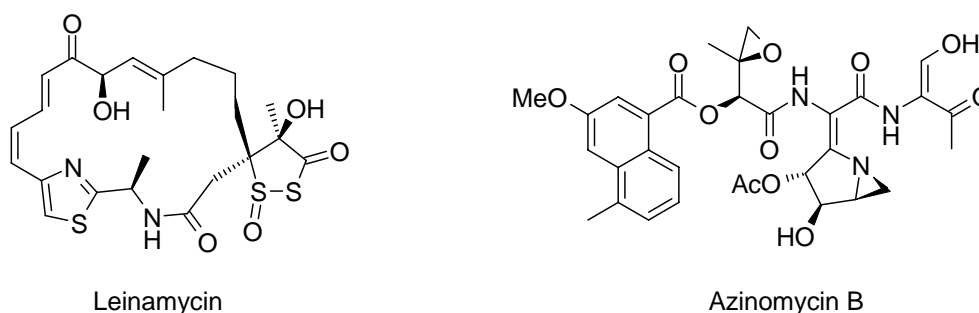
Die DNA-Struktur ist bei der Untersuchung von möglichen Wechselwirkungen von kleinen Molekülen mit DNA von entscheidender Bedeutung. Der helikale doppelsträngige Aufbau ist in wässrigem Medium durch die Basensequenz, die sequenzspezifische Furchenausdehnung und -tiefe, die Solvatation und den Grad der 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.<sup>[14,15]</sup> Diese können sowohl unspezifisch, als auch spezifisch sein. Zu den unspezifischen Wechselwirkungen gehört neben elektrostatischen Wechselwirkungen von positiv geladenen Molekülen wie Peptiden und Proteinen<sup>[16,17]</sup> 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.<sup>[1]</sup>

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.<sup>[18,19]</sup> Für sehr kleine Moleküle ist die große Furche hingegen nicht geeignet, da eine effektive Bindung aufgrund der Größe und der flachen Furche eingeschränkt ist.<sup>[20]</sup> 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.

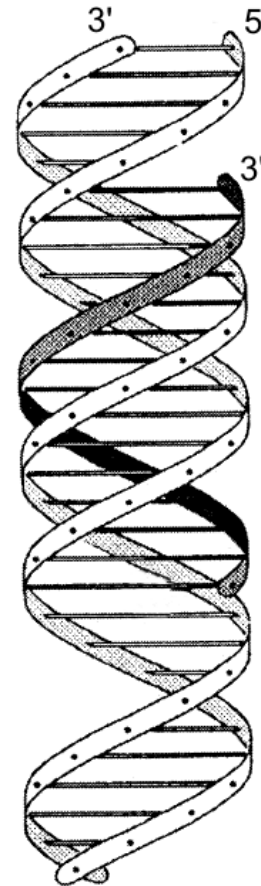


**Abb. 2-1** DNA-Binder über die große Furche: Leinamycin und Azinomycin B.



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.<sup>[21]</sup> Eine Erkennungsregion von 16-18 Basenpaarungen ist für die Erkennung einer singulären Region eines spezifischen Gens erforderlich.<sup>[22]</sup>

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.<sup>[22,23]</sup> 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).<sup>[24]</sup> 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.<sup>[25-27]</sup>



**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

---