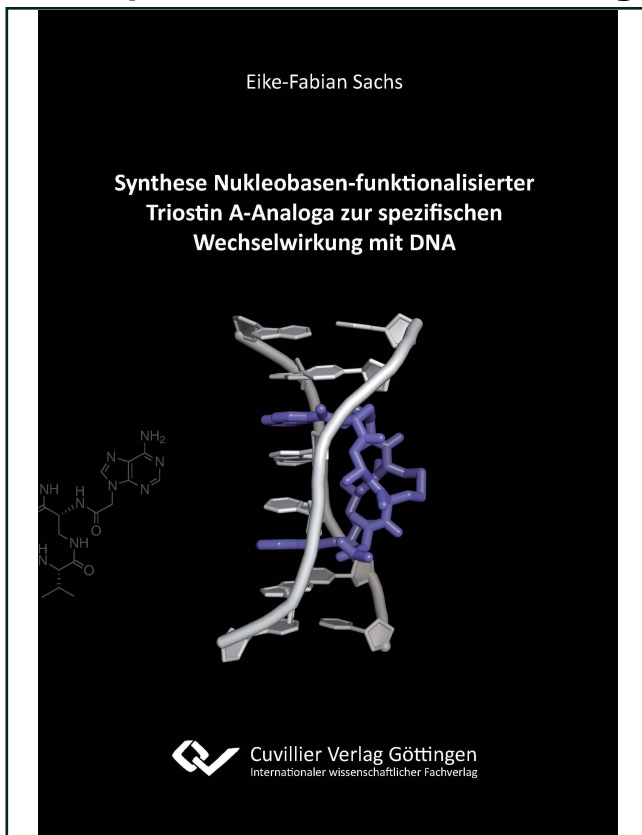




Eike-Fabian Sachs (Autor)

Synthese Nucleobasen-funktionalisierter Triostin A-Analoga zur spezifischen Wechselwirkung mit DNA



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6151>

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 UND ZIELSETZUNG

Proteine stellen aufgrund der Vielseitigkeit ihrer Struktur und Funktion eine der wichtigsten Molekülklassen der Biochemie dar. In Form von Enzymen sind sie an fast allen in Organismen ablaufenden Prozessen als essentielle Katalysatoren biochemischer Reaktionen beteiligt. Ihre Primärstruktur ist bemerkenswert einfach: Sie bestehen aus einer genetisch codierten Abfolge der 22 proteinogenen α -Aminosäuren, die über Amidbindungen verknüpft sind.^[1] Die jeweiligen Sequenzen dieser Aminosäuren prägen Struktur und Funktion der Peptide. Abhängig von der gebildeten Sekundärstruktur werden die Seitenketten der Aminosäuren auf der Oberfläche dieser Strukturelemente angeordnet und können so diverse Funktionen erfüllen. Durch Faltung und intramolekulare Wechselwirkungen zwischen benachbarten Sekundärstrukturen entstehen Tertiärstrukturen, durch die spezifische Bindungstaschen geformt oder kooperative Effekte zwischen den Resten der Aminosäuren unterschiedlicher Sekundärstrukturen hervorgerufen werden können.^[2,3] Die enorme Diversität von Proteinen und Enzymen wird durch die Bildung von Quartärstrukturen erweitert. So können hochkomplizierte Proteinkomplexe wie die transmembranen Adenosintriphosphasen entstehen.^[4-7]

Die engen wechselseitigen Beziehungen zwischen Struktur und Funktion natürlicher Proteine wird deutlich, wenn biologische Prozesse betrachtet werden, an denen diese beteiligt sind. Proteine, die mit DNA interagieren, ermöglichen zum Beispiel eine spezifische Erkennung bestimmter DNA-Sequenzen über α -Helices, auf deren Oberfläche Erkennungseinheiten ausgerichtet sind. Aufgrund der räumlichen Fixierung der Helices können diese an bestimmte Regionen der DNA binden und so im Rahmen diverser Prozesse wie beispielsweise der Transkription ihre spezifischen Funktionen erfüllen.^[8]

Die DNA als Speicher der genetischen Information stellt ein interessantes *Target* für Pharmazie und Biochemie dar. Durch eine Adressierung der DNA kann in unterschiedliche Stadien der Genexpression, dem Prozess der Protein- und RNA-Biosynthese, eingegriffen werden. Dadurch wird es möglich diverse Prozesse bis

hin zur Apoptose zu induzieren oder zu regulieren.^[9–11] Aufgrund der hohen Komplexität vieler der natürlich vorkommenden Proteine und Enzyme, die mit DNA interagieren, eignen sich diese nur bedingt zur Entwicklung synthetischer DNA-Binder oder zur Untersuchung der Wechselwirkungen, die der Bindung an DNA zugrundeliegen. Kleine natürliche molekulare DNA-Binder und kleine Peptide, die mit DNA interagieren, stellen dagegen vielversprechende Leitstrukturen dar.^[12]

Bei dem erstmals 1961 aus *Streptomyces* isolierten Triostin A (**1**), handelt es sich um ein bitykisches Octadepsipeptid, das in der Lage ist, selektiv an DNA durch Bisinterkalation zu binden (Abb. 1.1).^[13–15] Diese Fähigkeit an eine spezifische Sequenz der DNA zu binden, resultiert aus der rigiden bitykischen Struktur des Peptides, die zwei Chinoxaline als Erkennungseinheiten in einem für Bisinterkalation optimalen Abstand präorganisiert.^[15,16] Aufgrund dieser Eigenschaft und der – verglichen mit Proteinen – kurzen Aminosäuresequenz erfüllt Triostin A die Anforderungen, die an eine potente Leitstruktur zur Entwicklung von artifiziellen und funktionellen Peptiden gestellt werden.

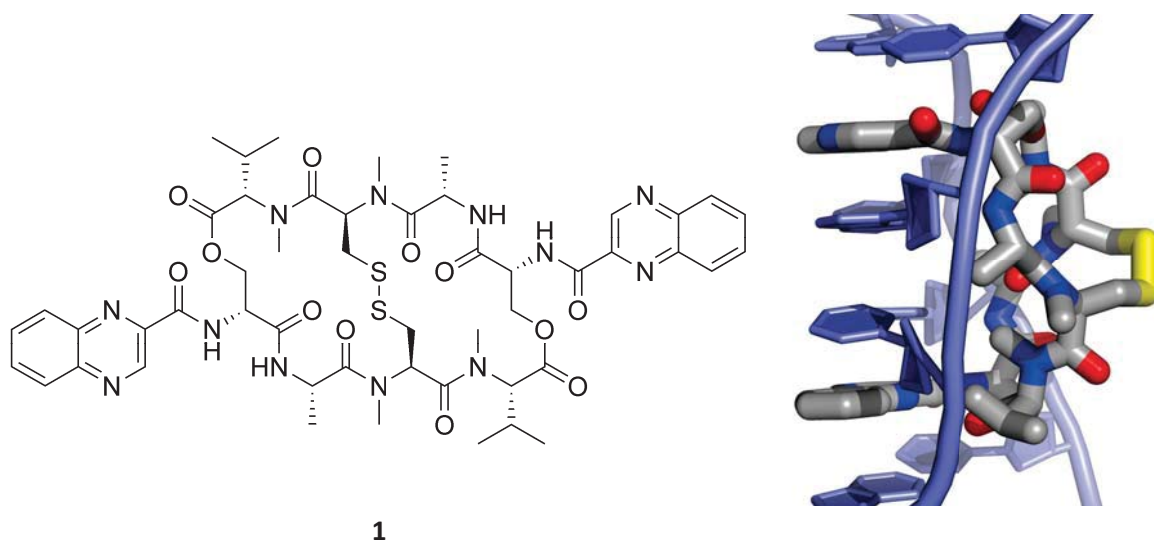


Abbildung 1.1: Strukturformel von Triostin A (**1**) sowie ein Ausschnitt der NMR-Struktur eines Triostin A-DNA-Komplexes (die DNA ist hellblau dargestellt, pdbID:185D).^[15]

Auf Basis der Struktur des Triostin A wurden bereits Nukleobasen-funktionalisierte Triostin A-Analoga synthetisiert, für die eine Bindung an DNA nachgewiesen werden kann.^[17–20] Aufgrund der Funktionalisierung mit Nukleobasen sollten derartige Derivate über einen anderen Bindungsmodus als Bisinterkalation mit DNA interagieren. Eine Möglichkeit wäre zum Beispiel die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Basenpaaren der DNA in der großen Furche, die eine sequenzspezifische Bindung an DNA ermöglichen würden.



Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein synthetisches von Triostin A abgeleitetes bicyklisches Peptidrückgrat zur Präorganisation von Funktionalitäten zu verwenden, um einerseits eine Bindung an DNA zu realisieren, und andererseits Peptide räumlich zu organisieren.

Zur Realisation dieser Vorhaben sollte die Festphasensynthese von Nukleobasen-funktionalisierten Triostin A-Analoga überarbeitet und optimiert werden. Mit Hilfe dieser modifizierten Synthesestrategie sollten anschließend verschiedene Derivate mit unterschiedlich modifizierten Peptidrückgraten dargestellt werden, um deren Struktur und Interaktion mit DNA zu untersuchen. Weiterhin sollte ein Nukleobasen-funktionalisiertes Derivat dargestellt werden, das zusätzliche Erkennungseinheiten trägt um so eine höhere Selektivität der Bindung an DNA zu erreichen.

In einem weiteren Projekt sollte das Potential des bicyklischen Peptidrückgrates zur Synthese von Templat-assoziierten synthetischen Proteinen (TASP) untersucht werden.^[21] Die Funktionalisierung des Peptidrückgrates wurde dabei nicht mit kleinen Erkennungseinheiten, sondern mit synthetischen Peptiden, die eine definierte Sekundärstruktur einnehmen, angestrebt. Das Peptidrückgrat der Triostin A-Analoga soll diese Peptide durch seine rigide Struktur räumlich ausrichten und so eine definierte Topologie schaffen, mit der sich zukünftig funktionelle synthetische Proteine oder Enzyme synthetisieren lassen.



2 DNA-BINDENDE MOLEKÜLE

Die DNA stellt eines der essentiellen Biomoleküle von Lebewesen dar, da in ihr die gesamte genetische Information eines Organismus in der Abfolge der vier kanonischen Nukleobasen gespeichert ist. Während der Transkription werden diese Inhalte ausgelesen und in mRNA (*messenger RNA*) umgeschrieben. Die Information auf der mRNA wird im Rahmen der Translation, der Biosynthese von Peptiden, verarbeitet, wobei jede proteinogene Aminosäure durch die Abfolge von drei Basen (Codon) codiert wird.^[22] Zur Peptidbiosynthese wird die mRNA im Ribosom gebunden. Dort wird die passende, mit einer Aminosäure funktionalisierte, tRNA (*transfer RNA*), anhand der komplementären Basenpaarung (Anticodon) mit hoher Präzision erkannt und die aktivierte Aminosäure wird auf die wachsende Peptidkette übertragen.^[1] Soll in diesen komplexen Mechanismus der Peptidbiosynthese eingegriffen werden, so stellen DNA und RNA mögliche Angriffspunkte dar. Zur korrekten Durchführung der Transkription müssen spezifische Sequenzen der DNA von Enzymen erkannt werden. Wird die Sekundärstruktur der DNA durch ein gebundenes Molekül stark verändert, kann die nötige Erkennung nicht mehr stattfinden. Auch eine Stabilisation der Tertiärstruktur kann zur Inhibition der Transkription führen, da diese im Prozess unter anderem entwunden werden muss. Eine weitere Möglichkeit in die ablaufenden Prozesse einzugreifen, ist das Maskieren von bestimmten Sequenzen. Binden Moleküle mit hoher Affinität zum Beispiel an Promotersequenzen oder an das Initiationscodon, können Transkription und Translation nicht mehr korrekt erfolgen. Um die Möglichkeiten der Bindung an DNA zu verstehen, ist primär die Kenntnis der DNA-Struktur von Bedeutung.

2.1 Strukturelle Eigenschaften der DNA

DNA ist ein Biopolymer, das aus Nukleotiden als monomere Bausteine aufgebaut ist. Nukleotide bestehen aus Desoxyribosen, die jeweils eine der vier kanonischen Nukleobasen Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) oder Cytosin (C) N-glycosidisch an



C1' tragen. Ein polyanionisches Phosphatrückgrat verbindet die Desoxyribosen über O3' und O5' als Phosphodiester. Die Tertiärstruktur der DNA wurde von WATSON und CRICK im Jahr 1953 aufgeklärt.^[23] Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin bilden durch Wasserstoffbrückenbindungen Basenpaare, sodass zwei DNA-Stränge einen antiparallelen Duplex bilden. Unter physiologischen Bedingungen nimmt ein solcher Doppelstrang vor allem die sogenannte B-Form an (Abb. 2.1). Hierbei handelt es sich um eine rechtsgängige Doppelhelix mit einem Nukleotid als Wiederholungseinheit. Die Basenpaare liegen im Zentrum der DNA und stabilisieren die Struktur durch π - π -Stapelwechselwirkungen. Durch das dem Lösungsmittel zugewandte anionische Zucker-Phosphat-Rückgrat werden zwei Furchen auf der Oberfläche der DNA gebildet, die kleine und große Furche (Abb. 2.1).^[1]

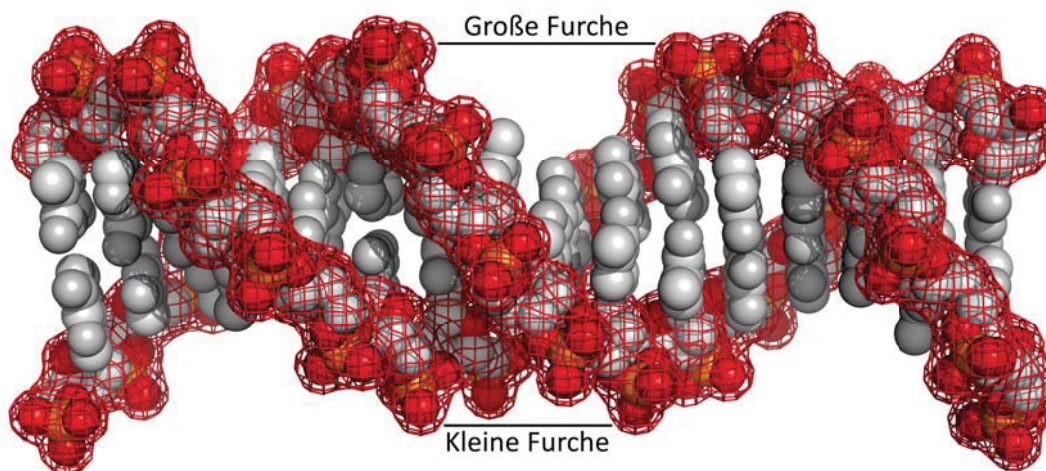


Abbildung 2.1: B-Form der DNA. Die Phosphatgruppen sind in Rot und Orange dargestellt, das Zucker-Phosphat-Rückgrat ist in Rot ummantelt (pdbID: 3BSE).^[24]

Die große Furche hat eine Breite von 11.6 Å und eine Tiefe von etwa 8.5 Å. Die kleine ist mit einer mittleren Breite von 6.0 Å etwa halb so groß wie die große Furche, in der Tiefe unterscheidet sie sich mit 8.2 Å nicht deutlich von der großen Furche. Die Dimensionen dieser Furchen sind allerdings stark von der Basensequenz der DNA abhängig; so wird eine deutlich schmalere kleine Furche (3-4 Å) bei AT-reichen Sequenzen gefunden.^[25] Aufgrund der niedrigen Breite der kleinen Furche lagern sich hier Wassermoleküle mit sehr hoher Ordnung an, die Hydratation innerhalb der großen Furche ist dagegen eher ungeordnet.^[25,26] Zusätzlich zur B-DNA werden in Abhängigkeit der Ionenstärke und Polarität des Lösungsmittels andere Tertiärstrukturen beobachtet: Die A-DNA ist eine rechtsgängige Doppelhelix mit einer verglichen mit der B-DNA kleineren großen und breiteren kleinen Furche, die Z-DNA ist eine linksgängige Doppelhelix mit extrem



geweiteter großer Furche. Inzwischen wurden weitere DNA Strukturen aufgeklärt, die von diesen drei beschriebenen Strukturen abweichen. Das verdeutlicht, dass DNA als ein dynamisches Molekül betrachtet werden muss, das durch die mit ihm interagierenden Proteine sowie anderen Molekülen unter anderem geknickt, entwunden oder aufgewunden werden kann.^[27–32]

Zusätzlich zu der genetischen Information in Form der Basenabfolge trägt die DNA weitere Informationsquellen. DNA-bindende Proteine lesen zum Beispiel die Topographie der DNA aus, also lokale Abweichungen der DNA von ihrer idealen Form, um bestimmte Sequenzen zu lokalisieren. Dieser Vorgang wird als indirektes Auslesen der DNA bezeichnet.^[32] Zusätzlich liegen die Paarungskanten der Nukleobasen in den Furchen frei und können abgelesen werden. Über die große Furche können Moleküle an die sogenannte HOOGSTEEEN-Seite der Basenpaare binden und dabei Wasserstoffbrücken mit den dort liegenden Akzeptoren und Donoren ausbilden sowie VAN DER WAALS-Kontakte eingehen (Abb. 2.2).^[33]

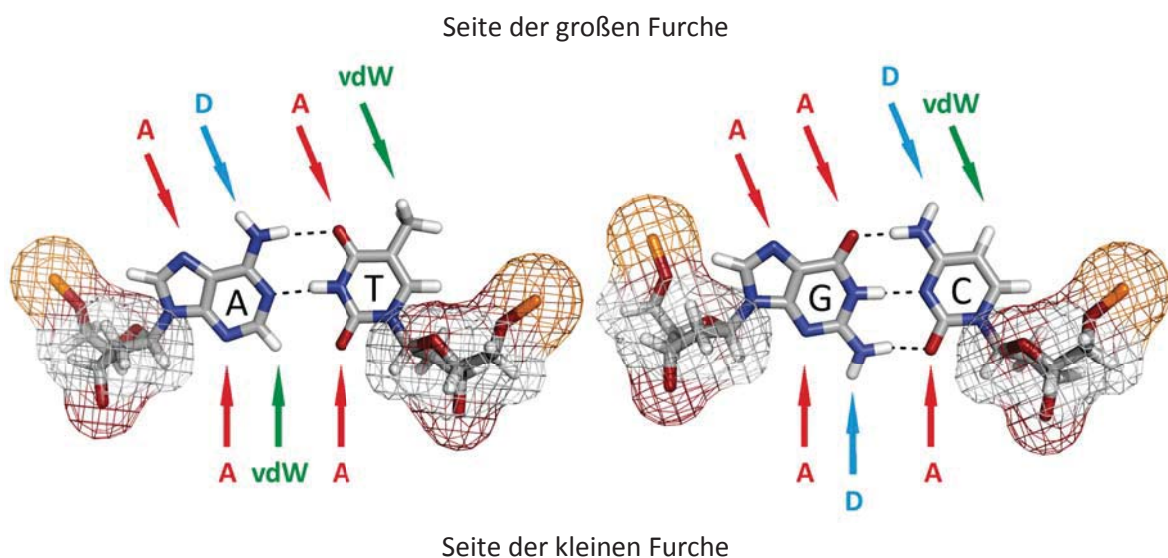


Abbildung 2.2: Die Basenpaarung in der DNA (pdbID: 1BNA).^[34] Die möglichen Kontakte, die in den Furchen ausgebildet werden können (Wasserstoffbrücken-Donoren (D), -Akzeptoren (A) und VAN DER WAALS-Kontakte (vdW)), sind eingezeichnet. In der großen Furche (oben) sind jeweils vier Interaktionen möglich. In der kleinen Furche (unten) sind drei Interaktionen möglich.

Mit diesen vier vorhandenen Kontakten kann jede der vier möglichen Basenkombinationen differenziert werden. Erfolgt die Erkennung einer Sequenz über die große Furche, spricht man vom direkten Auslesen der DNA. In der kleinen Furche können drei Kontakte ausgebildet werden, damit kann zwar zwischen einem AT- oder GC-Paar unterschieden werden, nicht aber zwischen den entsprechenden Permutationen (Abb. 2.2). Sequenzspezifisch DNA-bindende Proteine erreichen ihre Spezifität meist über eine Kombination von indirektem und



direktem Auslesen der DNA.^[32] Das Genom des Menschen besteht aus etwa drei Milliarden Basenpaaren, sodass zwischen 15 und 16 Basenpaare erkannt werden müssen, um eine spezifische Bindungsstelle im Genom zu erkennen.^[35]

2.2 Ionische Interaktionen mit DNA

Durch ionische Wechselwirkungen können positiv geladene Moleküle an das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA binden und den Duplex stabilisieren. So ist bekannt, dass der Schmelzpunkt eines DNA-Doppelstranges stark von der Konzentration der biologisch relevanten Metallkationen Na^+ , K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} des sie umgebenden Mediums abhängig ist. Kristallstrukturen und Berechnungen haben gezeigt, dass besonders divalente Metallkationen neben unspezifischen COULOMB-Wechselwirkungen auch selektive Bindungen mit den Nukleobasen in den Furchen eingehen können.^[36,37] TERESHKO *et al.* konnten in einer Kristallstruktur des DICKERSON-DREW-Dodecamers drei geordnete divalente Magnesium-Kationen nachweisen, von denen zwei an das Phosphat-Rückgrat binden und dabei die kleine Furche überbrücken. Das dritte Magnesium-Kation liegt in der großen Furche und bindet an N7 und O6 der dort liegenden Guanine sowie an die Phosphate.^[34,38] Der Einfluss dieser Kation-DNA-Interaktion auf die Struktur der DNA ist dabei noch nicht vollständig geklärt. CHIU und DICKERSON konnten zeigen, dass divalente Calcium und Magnesium Kationen, die in die große Furche der DNA binden, zu einem Knicken der DNA führen.^[39] Weiterhin wird vermutet, dass ein Zusammenhang zwischen besonders kleinen Furchen und den hier gebundenen divalenten Kationen besteht, wobei kontrovers diskutiert wird, ob Kationen bevorzugt an solche verkleinerten Furchen binden oder ob erst durch die Bindung der Kationen die Phosphate zusammengezogen werden und die Furche verengt wird.^[37]

Auch Aminosäuren, die unter physiologischen Bedingungen kationisch vorliegen, wie Histidin, Arginin und Lysin, können durch COULOMB-Wechselwirkungen an das DNA-Phosphatrückgrat binden und so den Doppelstrang stabilisieren. Weiterhin sind viele Aminosäuren in der Lage, über ihre Seitenkette Wasserstoffbrückenbindungen mit den Nukleobasen in den Furchen auszubilden.^[40]



2.3 Molekulare Erkennung in der kleinen und großen Furche

Moleküle, die über die Furchen der DNA binden, haben das Potential auf Grund der hier vorhandenen Funktionalitäten (siehe Abb. 2.2) bestimmte Basensequenzen auszulesen und somit Sequenzspezifität zu erreichen. Der Informationsgehalt ist wie bereits erwähnt in der großen Furche deutlich höher, allerdings binden viele kleine Moleküle eher in der kleinen Furche der DNA. Der Grund dafür ist die hohe Ordnung der sich dort befindenden Wassermoleküle.^[41] Durch den Bindungsvorgang eines Moleküls wird diese Hydrathülle verdrängt, was einen deutlichen Beitrag zur Entropiezunahme leistet und die hohe Affinität vieler Moleküle zur kleinen Furche erklärt. Auch die Tatsache, dass die Mehrheit der Moleküle, die an die kleine Furche binden, AT-reiche Sequenzen bevorzugt, lässt sich so erklären. Durch die lokal schmalere Furche wird die Ordnung der Wassermoleküle erhöht und somit auch der Beitrag der Entropiezunahme bei der Verdrängung durch ein bindendes Molekül.^[26]

In Abbildung 2.3 sind zwei sehr gut untersuchte Kleine-Furchen-Binder dargestellt. Distamycin A (**2**) und Hoechst 33258 (**3**) besitzen eine annähernd planare, leicht gewölbte Struktur, die genau der Krümmung in der kleinen Furche entspricht.^[42,43] Beide Moleküle können unter physiologischen Bedingungen protoniert werden und haben somit eine hohe Affinität zum Phosphatrückgrat der DNA.

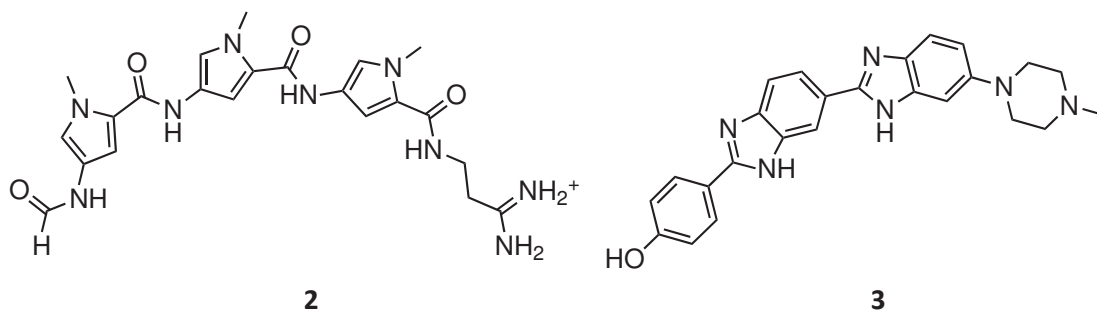


Abbildung 2.3: Struktur der Kleinen-Furchen-Binder Distamycin A (**2**) und Hoechst 33258 (**3**).

Die Verbindungen lagern sich mit ihren positiv geladenen Funktionen tief in der kleinen Furche ein, wo das elektrostatische Potential der Furche am größten ist. Zusätzlich wird der Komplex durch VAN DER WAALS-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen der stickstoffgebundenen Protonen mit Akzeptoren der Nucleobasen stabilisiert, vor allem mit N3 des Adenins und O2 des Thymins. Beide Moleküle binden somit an AT-reiche Sequenzen mit mindestens vier aufeinanderfolgenden AT-Paaren; GC-Paare werden vollständig diskriminiert.^[44]



Für Distamycin wurden neben äquimolaren Komplexen mit DNA auch 2/1-Komplexe gefunden. In diesen Komplexen lagern sich zwei Distamycine nebeneinander antiparallel in der kleinen Furche an, daher werden fünf aufeinanderfolgende AT-Paare zur Bindung benötigt. Durch den zusätzlichen Binder wird die lokal schmalere kleine Furche auf die Größe idealer B-DNA geweitet.^[44] Um eine Bindung an GC-Paare zu erreichen wurden Distamycin-Derivate synthetisiert, die nicht nur aus Pyrrol-Einheiten bestehen, sondern auch Imidazol enthalten. Durch das zusätzliche Stickstoffatom wird so ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor in der kleinen Furche positioniert, der an das exozyklische Amin von Guanin binden kann. Tatsächlich können derartige Derivate so konzipiert werden, dass eine gezielte Bindung an eine ausgewählte Sequenz möglich ist. In der Arbeitsgruppe von DERVAN wurden Pyrrol-Imidazol-Polyamide zusätzlich *Hairpin*-verbrückt oder zyklisiert, um eine höhere Sequenzspezifität durch einen forcierten 2/1-Komplex mit DNA zu erreichen (Abb. 2.4).^[45-47]

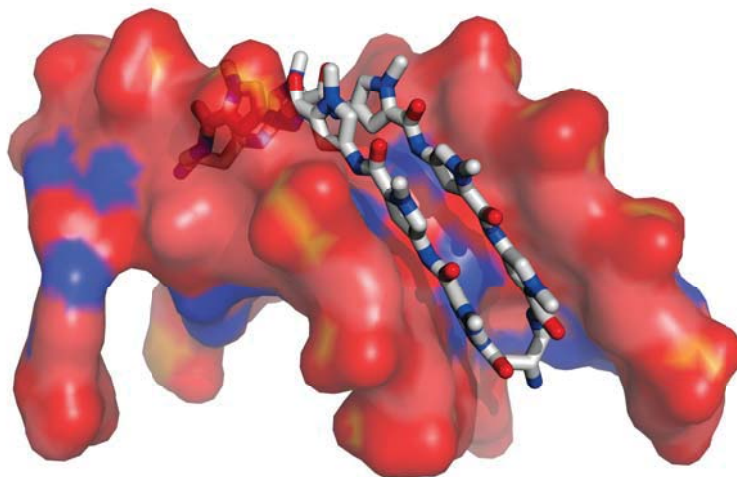


Abbildung 2.4: Kristallstruktur eines zyklischen Pyrrol-Imidazol-Polyamids gebunden an DNA (pdbID: 3OMJ).^[47]

Kleine Moleküle, die in der großen Furche binden, sind in der Literatur deutlich weniger häufig beschrieben als Binder der kleinen Furche. Das ist vor allem auf den bereits erwähnten Entropie-Effekt zurückzuführen, der die Bindung an die kleine Furche energetisch günstiger macht. Eines der häufigsten Bindungsmotive in der großen Furche ist die Bildung von Triplexen. Hierbei bindet ein DNA-, RNA- oder PNA-Strang an einen bereits bestehenden Duplex an die HOOGSTEEN-Flanke der Basenpaare in der großen Furche. Die Bindung erfolgt an Purin-reiche Stränge unter Bildung von zwei Wasserstoffbrückenbindungen. Zwei Motive der Bindung werden dabei beobachtet, denn der dritte Strang kann bezogen auf den Purin-reichen Strang antiparallel oder parallel binden. Vor allem Pyrimidin-reiche Stränge bilden



parallele Triplexen, wobei Thymin und protoniertes Cytosin (C^+) im HOOGSTEEN-Modus an die entsprechenden Purine binden (es werden die Triplexen T:AT und C^+ :GC gebildet). Purin-reiche Stränge bilden antiparallele Triplexen im *reverse*-HOOGSTEEN-Modus (Bildung von A:AT und G:GC). Adenin kann nur über den *reverse*-Hoogsteen-Modus Basentriplets bilden; für Thymin, Guanin und protoniertes Cystein wurden sowohl der *reverse* als auch der normale Modus gefunden.^[48–50] In Abbildung 2.5 ist die NMR-Struktur einer Tripel-Helix von RADHAKRISHNAN und PATEL abgebildet.^[51] Ein Purin-reicher Strang (orange) bindet antiparallel an den Purin-reichen Strang des Duplexes (rot). Es werden G:GC- und T:AT-Triplexen im *reverse*-HOOGSTEEN-Modus ausgebildet. Der Duplex wird durch die Bildung des Triplexes deutlich verformt, es kommt zu einer Weitung der großen Furche und zu einer deutlichen Entwindung des Duplexes. Mithilfe von Triplex-bildenden Oligonukleotiden können hoch sequenzspezifische Binder geschaffen werden, da eine sehr gute Vorhersage der Zielsequenz möglich ist und je nach Länge des Nukleotids die Anzahl an möglichen Bindungsstellen gut variiert werden kann.

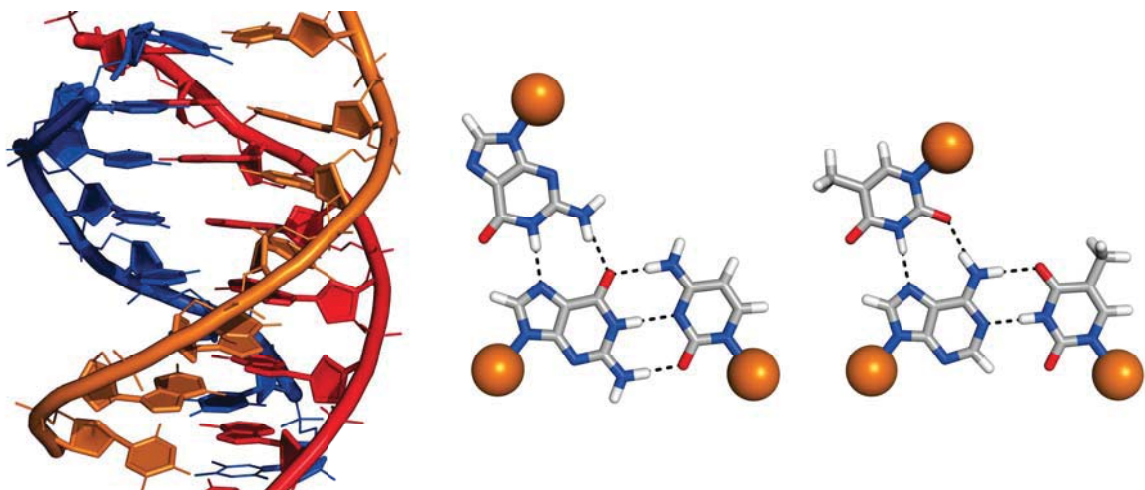


Abbildung 2.5: NMR-Struktur einer Tripel-Helix (links, pdbID: 135D).^[51] In Rot ist ein Purin-reicher Strang dargestellt, der mit seinem Gegenstrang (blau) einen Duplex bildet. Ein dritter Strang (orange) bindet antiparallel an den Purin-reichen Strang unter Bildung einer Tripel-Helix. Rechts sind die in der Struktur vorhandenen Triplex-Codes dargestellt. Guanin und Thymin des dritten Stranges bilden Wasserstoffbrücken zu Guanin und Adenin des Purin-reichen Stranges aus. Es handelt sich hier um den *reverse*-HOOGSTEEN-Bindungsmodus.

Neben Oligonukleotiden interagieren auch Proteine und Enzyme mit DNA, zum Beispiel zur Reparatur von DNA-Schäden oder im Rahmen der Transkription. Dazu müssen sie DNA-Sequenzen erkennen und spezifisch an sie binden. Diese Bindung erfolgt unter anderem in der großen Furche der DNA. Peptide können über die Seitenketten der Aminosäuren Wasserstoffbrückenbindungen mit den



Basenpaaren eingehen und durch die Kombination mehrerer Kontakte Sequenzspezifität erreichen.^[40] In einem Großteil der DNA-bindenden Proteine sind die zur Erkennung benötigten Aminosäuren in α -Helices eingebettet. Durch die Helix-Struktur können die Seitenketten auf einer Seite der Helix präorganisiert und strukturell fixiert werden. Ein prominentes Beispiel ist das Helix-Turn-Helix-Motiv, welches in Transkriptions-Regulatoren von Bakterien zu finden ist. Es bindet mit einer der beiden α -Helices sequenzspezifisch in der große Furche der DNA, die zweite Helix stabilisiert diesen Komplex.^[52] Ein weiteres Bindungsmotiv sind die *basic Leucine Zipper* (bZIP) die in Transkriptionsfaktoren fast aller Lebewesen vorkommen (Abb. 2.6 links).^[53] Zwei α -Helices bilden an einem Ende mit Leucin-Seitenketten durch hydrophobe Wechselwirkungen ein *Coiled-Coil*. Am gegenüberliegenden Ende der Helices befindet sich eine basische Region, in der Aminosäuren wie Asparagin und Arginin für alle bZIP-Proteine konserviert vorkommen. Diese Region der Helix stellt in der großen Furche der DNA direkte Kontakte zu den Nukleobasen her. In Abbildung 2.6 ist rechts ein Zink-Finger-Protein, gebunden an DNA, gezeigt.^[54] Auch hier erfolgen Erkennung und Bindung über eine α -Helix. Die Struktur der Zink-Finger wird durch bivalentes Zink, koordiniert in zwei kleinen β -Faltblättern und einer Helix, stabilisiert. Das Zinkkation besitzt keinerlei katalytische Funktion, sondern dient ausschließlich zur Stabilisierung der Tertiärstruktur. Mehrere dieser $\beta\beta\alpha$ -Strukturmodule können hintereinander vorkommen um eine erhöhte Sequenzspezifität zu erreichen. Das in Abbildung 2.6 gezeigte ZIF268 besteht aus einem Tandem-Repeat von drei Zink-Fingern.^[54,55]

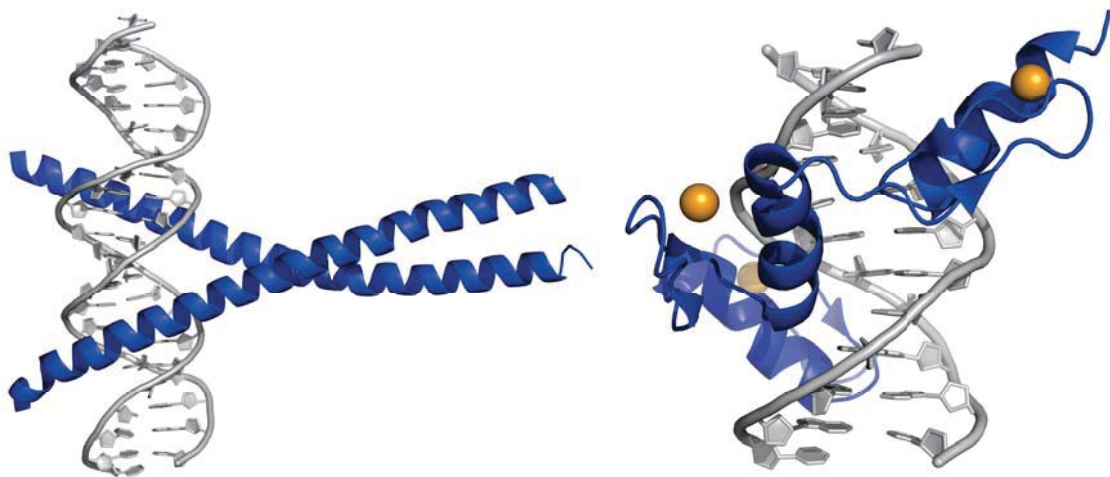


Abbildung 2.6: Kristallstrukturen eines bZip DNA Komplexes (links, pdbID: 1NWO) und eines Zink-Finger-DNA-Komplexes (rechts, pdbID: 1A1L).^[53,54] Die DNA ist in Grau, die interagierenden Peptide in Blau dargestellt. Auf der rechten Seite sind die drei vorhandenen Zinkionen orange eingefärbt.



Neben diesen natürlich vorkommenden Verbindungen sind auch einige synthetische Moleküle bekannt, die an die große Furche binden. So konnten ZADMARD und SCHRADER für dimere Calix[4]arene eine hohe Affinität zu DNA und Bindung an diese nachweisen. Aufgrund der Größe der Calix[4]arene ist eine Bindung in der kleinen Furche nicht möglich, was über Experimente bestätigt werden konnte. Stattdessen wird, gestützt auf Molekular-Dynamik sowie NOE-Experimente, eine Bindung an Nukleobasen in der großen Furche angenommen.^[56,57]

Basierend auf den bereits beschriebenen Bindern der großen und kleinen Furche wurden Hybride geschaffen, die Bindungen in beide Furchen ermöglichen und so zum Beispiel sequenzspezifisch einen Triplex ausbilden, der zusätzlich durch einen Kleinen-Furchen-Binder stabilisiert wird. ROBLES *et al.* konnten ein Hoechst 33258 (**3**) Derivat, kovalent gebunden an einen Pyrimidin-reichen DNA-Strang, darstellen.^[58] Der Schmelzpunkt des entstehenden Triplex wird durch den Kleinen-Furchen-Binder je nach pH Wert um bis zu 18 °C angehoben, wobei Gemische aus Purin-reicher DNA und freiem Hoechst 33258 maximale Unterschiede im Schmelzpunkt von 2 °C zeigen. ARYA und WILLIS konnten zeigen, dass die kovalente Verknüpfung von Hoechst 33258 mit Neomycin, einem Aminoglycosid, das vornehmlich an RNA aber auch an DNA/RNA-Hybride in der großen Furche bindet, zu einer Stabilisierung von Duplex-DNA führt.^[59] Bei den Bestimmungen der Schmelzpunkte wurden DNA-Triplexe verwendet, deren Triplex-Schmelzpunkt durch Neomycin und Duplex-Schmelzpunkt durch **3** erhöht wird. Das kovalente Konjugat aus beiden stabilisiert Duplexe deutlich besser (T_m -Erhöhung um etwa 10 °C verglichen mit **3**) und verhindert die Bildung von Triplexen durch die Einlagerung von Neomycin in der großen Furche.

2.4 Bindung durch Interkalation

Interkalatoren sind Moleküle, die über ein aromatisches π -System verfügen. Sie sind in der Lage, dieses π -System zwischen die Basenstapel der DNA zu schieben und π - π -Wechselwirkungen einzugehen. In Abbildung 2.7 sind die Interkalatoren Ethidium (**4**), Proflavin (**5**) und ein Indolchinoxalin-Derivat (**6**) dargestellt.^[60–62] Die Triebkraft der Interkalation ist in erster Linie auf die resultierenden π - π -Wechselwirkungen zurückzuführen. Oft tragen Interkalatoren funktionelle Gruppen, die unter physiologischen Bedingungen positiv geladen sind und mit dem Phosphatrückgrat COULOMB-Wechselwirkungen eingehen können. Dies führt zu einer zusätzlichen Stabilisierung der gebildeten Komplexe. Durch die Interkalation