



Ursula Kotyrba (Autor)

## Synthese und DNA-Wechselwirkungsstudien von modifizierten Analoga des Triostins A



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6903>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-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 und Zielsetzung

Echinomycin, Triostin A und Thiocoralin sind die bekanntesten Vertreter der Chinoxalin-Antibiotika. Diese Moleküle wurden aus *Streptomyces* isoliert und stellen eine wichtige Klasse der DNA-Bisinterkalatoren dar, die zusätzlich ein großes Potential in der Krebstherapie besitzen.<sup>[1]</sup> Das zyklische Rückgrat ist bei Triostin A durch eine Disulfidbrücke und bei Echinomycin durch ein Thioacetal verbrückt. Trotz der Unterschiede in der Verbrückung besitzen diese zwei Chinoxaline, die in einem Abstand von 10.5 Å organisiert sind. Durch diese aromatischen Einheiten binden sie auf die gleiche Wechselwirkungsweise an DNA, und zwar durch Interkalation. Hierbei wird die DNA teilweise aufgewunden, wobei die Chinoxalin-Reste zwei Basenpaare der DNA überspannen. Aufgrund der Art des Rückgrats binden zum Beispiel Triostin A und Echinomycin überwiegend an GC-reiche DNA-Doppelstränge, während Thiocoralin eine geringe Bevorzugung von GC-reichen DNA-Strängen aufweist.<sup>[2]</sup> Durch kleine Veränderungen im Rückgrat können veränderte Bindungseigenschaften erreicht werden. Somit binden das TANDEM (Triostin A *N*-demethyliert)-Derivat sowie das aza-TANDEM-Derivat des Triostins A an AT-reiche DNA.<sup>[3]</sup>

Ziel dieser Arbeit war es, die Wechselwirkungsmechanismen zwischen Peptiden und DNA besser zu verstehen. In dieser Arbeit sollte das besser lösliche aza-TANDEM-Rückgrat als Grundgerüst verwendet werden. Darauf basierend sollten sowohl das Rückgrat durch den Einbau unterschiedlicher Aminosäure-Bausteine als auch das Erkennungsmotiv verändert werden. Zu diesem Zweck wurden Nukleobasen anstelle der Chinoxalin-Reste als Erkennungseinheiten eingebaut. Die Erkennungseinheiten sollten auf bis zu vier Nukleobasen erweitert werden. Die Ersetzung der Erkennungseinheiten durch Nukleobasen sollte genauso wie die Veränderungen im Rückgrat zu einem veränderten Bindungsverhalten führen. Zusätzlich sollte eine allgemeine Synthesestrategie zur Modifizierung mit beispielsweise einem Fluorophor entwickelt werden. Auf diese Weise ergaben sich vielfältige Möglichkeiten zur Untersuchung der Bindungseigenschaften. Weiterhin sollte der Einfluss der Flexibilität des Moleküls untersucht werden, indem ein genaueres Augenmerk auf die Verknüpfung der Nukleobasen gelegt wurde. Analog zum Naturstoff Triostin A sollten die Nukleobasen durch eine Amidbindung mit dem Rückgrat verbunden werden. Die Art



## 1 Einleitung und Zielsetzung

---

der Bindung sollte im Vergleich zum Naturstoff Echinomycin durch unterschiedliche Bindungsexperimente, beispielsweise der *MicroScale* Thermophorese, der CD-Spektroskopie sowie der temperaturabhängigen UV-Spektroskopie, untersucht werden. Durch den zusätzlichen Einbau eines *cis-trans*-Schalters bestand die Möglichkeit, dass die Bindung photochemisch kontrolliert werden kann. Hierfür sollten schaltbare kleine Bausteine synthetisiert werden, die in einem Bereich größerer Wellenlängen geschaltet werden können.

Durch all diese Modifikationen könnten neue Erkenntnisse in den spezifischen Bindungseigenschaften von Peptiden an DNA erhalten werden. Dieses Verständnis kann langfristig zur Entwicklung neuer Medikamente beitragen, die Auswirkungen auf die Expression von Genen haben.

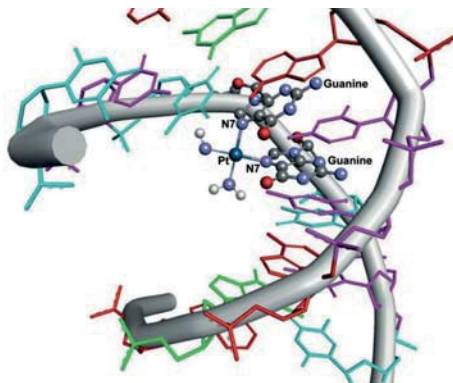
## 2 Theorie

### 2.1 DNA-Binder

Das Wissen über die Bindungsweise kleiner Moleküle an DNA ist essentiell in Bezug auf die erfolgreiche Herstellung von Substanzen für spezifische Diagnose- und Therapie-Anwendungen. Aufgrund der Größe und Komplexität der DNA-Struktur bietet diese eine Vielzahl von Bindungsmöglichkeiten. Die Bindung an DNA kann sowohl irreversibel als auch reversibel erfolgen, wobei zwischen der elektrostatischen Wechselwirkung, der Bindung in den Furchen und der Interkalation unterschieden wird.

#### 2.1.1 Kovalente DNA-Binder

*Cis*-Diamin-dichlorplatin(II), besser bekannt als *cis*-Platin, zählt zu den bekanntesten DNA-Bindern. Die Bindung erfolgt durch eine Guanin-Guanin (GG) Intrastrang- oder Interstrang-Quervernetzung, bei der Platin durch einen nukleophilen Angriff an das elektronenreiche *N7* des Guanins koordiniert wird (Abb. 2.1). Einhergehend mit der Bindung in der großen Furche wird die Stapelung der Nucleobasen aufgehoben und aufgrund dessen ein Knick in der DNA induziert.<sup>[4–6]</sup>

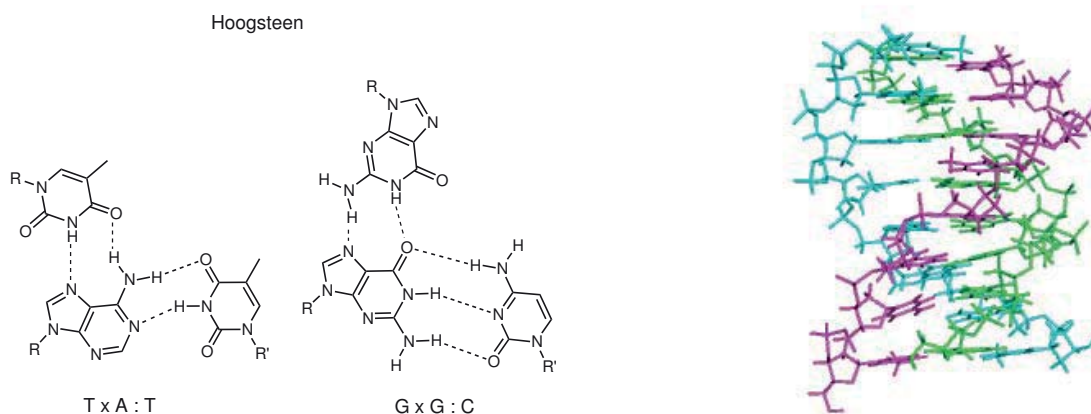


**Abbildung 2.1:** Bindung von *cis*-Platin an DNA (pdbID: 3LPV).<sup>[7]</sup>

Die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Amin des *cis*-Platins und dem O6 eines benachbarten Guanins weist zusätzlich einen großen Einfluss auf die Konformation, Stabilität und zytotoxische Aktivität des gebildeten Komplexes auf.<sup>[8,9]</sup> Anzumerken ist, dass nur das *cis*-Isomer eine Antikrebs-Aktivität besitzt.<sup>[10,11]</sup> Somit wird deutlich wie spezifisch Wechselwirkungen mit DNA sind und welche biologischen Effekte sie besitzen.

### 2.1.2 Bindung in der großen Furche

Moleküle, die an die Furchen der DNA binden, reagieren entweder mit dem Rückgrat oder mit den Nukleobasen. Die elektrostatische Bindung eines Kations an das negativ-geladene Phosphat-Rückgrat der DNA gehört hierbei zu den reversiblen Wechselwirkungen. DNA-bindende Proteine und Oligonukleotide wechselwirken aufgrund ihrer Größe meistens mit der großen Furche. Ein einzelner DNA-Strang kann an DNA unter Ausbildung von HOOGSTEEN- sowie *reverse*-HOOGSTEEN-Basenpaarungen binden. Durch diese Bindung in der großen Furche kommt es zur Ausbildung sogenannter Triplex-DNAs (Abb. 2.2).<sup>[12–14]</sup> Diese schirmen die große Furche der DNA gegenüber anderen Molekülen und Proteinen ab, sodass die Transkription verhindert wird.<sup>[15]</sup> Insgesamt bleibt allerdings bei Bindung des Einzelstrangs die B-Form der DNA erhalten.



**Abbildung 2.2:** HOOGSTEEN-Bindungsmodus (links) und Struktur einer Tripel-Helix (pdbID: 1D3X) (rechts).<sup>[16]</sup>

### 2.1.3 Bindung in der kleinen Furche

Eine Vielzahl kleiner Moleküle bindet an die kleine Furche der DNA.<sup>[17]</sup> Aufgrund ihrer Größe, Flexibilität, Wasser-bindenden Eigenschaften und ihres elektrostatischen Potentials ist die Bindung in der kleinen Furche begünstigt.<sup>[18]</sup> GOODSSELL und DICKERSON haben festgestellt, dass die an die kleine Furche bindenden Moleküle nicht nur klein, ziemlich flach und positiv geladen vorliegen, sondern meistens eine charakteristische Struktur aufweisen. Diese zeichnet sich durch zwei bis fünf Heteroaromaten aus, die über Amid- oder Vinyl-Gruppen an beiden Enden mit kationischen Gruppen verbunden sind.<sup>[19]</sup> Derartige Binder sind die in Abbildung 2.3 gezeigten Moleküle Hoechst 33258 und Distamycin.

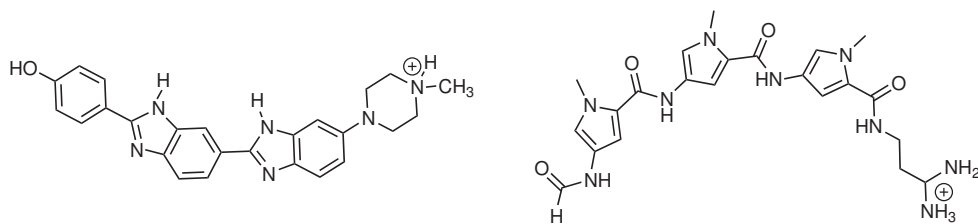


Abbildung 2.3: Struktur von Hoechst 33258 (links) und Distamycin (rechts).

Die Bindung wird in beiden Fällen über VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen mit der DNA-Furche stabilisiert. Derartige Moleküle weisen eine Selektivität für AT-reiche Sequenzen auf. Insgesamt haben Binder, die über die kleine Furche wechselwirken, nur einen kleinen Effekt auf die DNA-Struktur und -Orientierung.

### 2.1.4 Interkalatoren

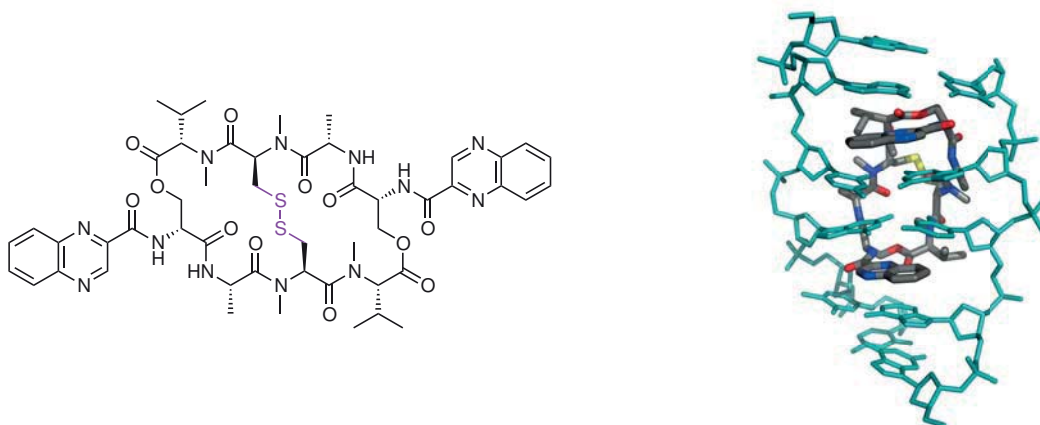
Die Interkalation ist charakterisiert durch die Insertion von planaren, polyzyklischen, aromatischen Systemen zwischen den gestapelten Basenpaaren der DNA. Diese, sowohl über die große als auch über die kleine Furche auftretende Interaktion, wird durch die überlappenden  $\pi$ -Systeme der Aromaten und der Nukleobasen stabilisiert.<sup>[20]</sup> Durch die Interkalation wird der Abstand der nebenstehenden Nukleobasen vergrößert, sodass eine Verzerrung der Helix auftritt. Diese

resultiert in einem Aufwinden des DNA-Doppelstrangs unter Anpassung des Zucker-Phosphat-Rückgrats. Die Bindung von Interkalatoren an DNA wird durch das Zusammenspiel mehrerer Kräfte, und zwar hydrophober, ionischer Wasserstoffbrückenbindungen und VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen, hervorgerufen.<sup>[21]</sup> Die aromatischen  $\pi$ -Systeme werden aufgrund von elektronischen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen beim Interkalieren zwischen die Basenpaare der DNA gestapelt. Auch das Rückgrat kann Wasserstoffbrückenbindungen zur DNA ausbilden, wodurch eine gewisse Selektivität und Affinität erreicht wird.<sup>[22,23]</sup>

### Chinoxalin-Antibiotika

Zu den Interkalatoren gehören die Chinoxalin-Antibiotika. Diese zeichnen sich durch ihre antiviralen, antimikrobiellen sowie cytostatischen Aktivitäten aus, die auf die Fähigkeit an doppelsträngige DNA zu binden, zurückzuführen sind.<sup>[24]</sup> Sie bestehen aus einem zyklischen Octadepeptid, das mit zwei Chinoxalin-Einheiten in einem Abstand von 10.5 Å funktionalisiert ist. Durch die intramolekulare Verknüpfung der *N*-Methylcystein-Reste über eine Disulfid- oder eine Thioacetal-Brücke erhalten die Moleküle ihre starre Struktur und können in die Triostine und die Chinomycine unterteilt werden.<sup>[25–30]</sup>

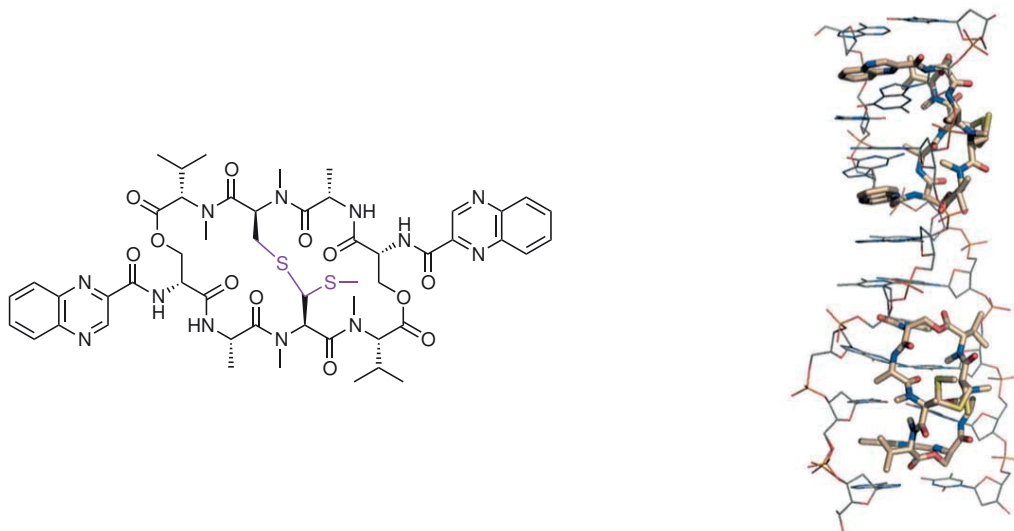
Triostin A, das aus *Streptomyces aureus* isoliert wurde, stellt den bekanntesten Vertreter der Triostine dar.<sup>[31,32]</sup> Die zyklische Struktur besteht aus zwei identischen Tetrapeptidsequenzen, die aus *D*-Serin, *L*-*N*-Methylvalin, *L*-*N*-Methylcystein und *L*-Alanin zusammengesetzt sind (Abb. 2.4).



**Abbildung 2.4:** Struktur von Triostin A (links) und Kristallstruktur der Interkalation des Triostins A in DNA (pdbID: 185D) (rechts).<sup>[3]</sup>

Beide Tetrapeptidsequenzen sind durch Esterverlinkungen miteinander verknüpft und die Chinoxalin-Einheiten sind über das D-Serin mit dem Rückgrat verbunden. Die Bindung an DNA erfolgt über die Interkalation der Chinoxaline an GC-reiche Sequenzen.<sup>[33–36]</sup> Hierbei konnte anhand von Kristallstrukturen die Überspannung von zwei Basenpaaren sowie das Aufwinden der DNA um 40-50° bestimmt werden. Das Rückgrat des Triostins A ist dabei für die Sequenzspezifität verantwortlich, indem bei Bindung in der kleinen Furche viele VAN-DER-WAALS-Kontakte und Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden. So gehen beispielsweise die Amid-Protonen beider Alanin-Reste Wasserstoffbrückenbindungen mit dem N3 zweier Guanine ein, während die Carbonyl-Sauerstoffatome Wasserstoffbrückenbindungen mit den C2 Amino-Gruppen der Guanine ausbilden.<sup>[30,31,37]</sup>

Echinomycin ist ein weiterer Vertreter der Chinomycine der Chinoxalin-Antibiotika, der durch Interkalation mit DNA sowohl die Replikation als auch die Transkription verhindert und somit ein potenzielles Antitumor-Medikament darstellt.<sup>[38]</sup> Dieses Antibiotikum wurde aus *Streptomyces echinatus* isoliert und unterscheidet sich vom Triostin A nur in der Thioacetalverbrückung (Abb. 2.5).



**Abbildung 2.5:** Struktur von Echinomycin (links) und Kristallstruktur der Interkalation des Echinomycins in DNA (pdbID: 3GO3) (rechts).<sup>[39]</sup>

Die Bindung von Echinomycin an GC-reiche DNA-Doppelstränge wurde analog zum Triostin A mittels NMR-Studien und Co-Kristallisationsexperimenten aufgeklärt.<sup>[40–43]</sup> Hierbei wurde von





SHELDRIK und Mitarbeitern in Kristallstrukturen des Komplexes gezeigt, dass die von den Chinoxalin-Einheiten eingeschlossenen Nukleobasen mittels WATSON-CRICK-Basenpaarung und die benachbarten Nukleobasen mittels HOOGSTEEN-Basenpaarung verbunden waren.<sup>[44,45]</sup>

In der Literatur sind viele synthetische Analoga des Triostins A beschrieben. So besitzt das vollständig *N*-demethylierte Derivat TANDEM (Triostin A *N*-**dem**ethyliert) im Gegensatz zum Triostin A und Echinomycin eine Bindungsspezifität für AT-reiche Sequenzen.<sup>[46–52]</sup> Dieses kann auf das Fehlen der Methyl-Gruppen der Valine zurückgeführt werden, weil nun intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amid-Gruppen der Valine und den Carbonyl-Gruppen der Alanine ausgebildet werden können und somit keine Bindung der Alanin-Reste mehr an DNA erfolgt. Desweiteren wurden die Chinoxalin-Einheiten durch Acridine ausgetauscht.<sup>[53,54]</sup> Dieses hat eine stärkere Interkalation zur Folge. Zusätzliche Veränderungen im Rückgrat durch den Ersatz der Valine durch Lysine führte auch zu gesteigerten Löslichkeiten sowie höheren Affinitäten zur DNA.<sup>[55]</sup> Aufgrund dessen wurden die Positionen der nativen Valine bevorzugt für Modifikationen verwendet.

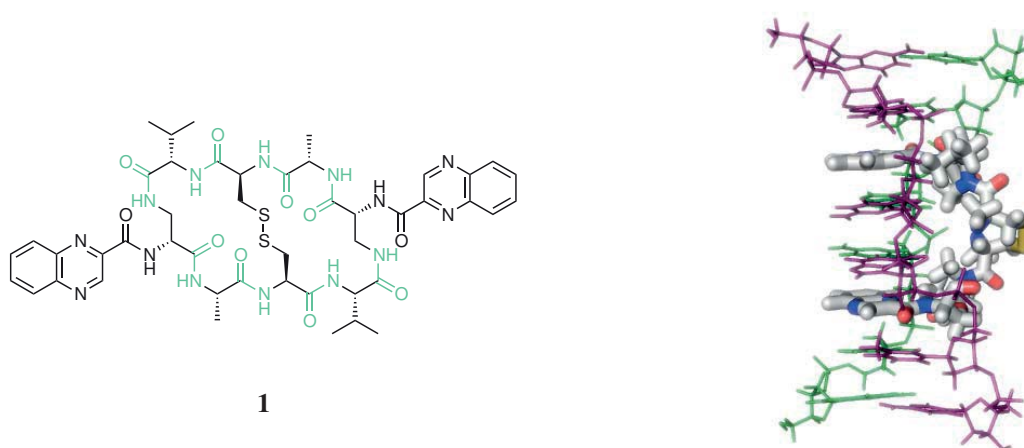
Die strukturbasierte Erforschung dieser DNA-Substanzklasse ist nicht nur für biochemische und biophysikalische Untersuchungen von Bedeutung, sondern auch um Aufschluss über weitere Design- und Optimierungsmöglichkeiten von neuen Derivaten mit einer besseren Spezifität und geringeren Toxizität zu geben.

## 3 Nukleobasen-funktionalisierte aza-TANDEM-Derivate mit Modifikationen im Rückgrat

### 3.1 Synthese

#### 3.1.1 Synthesestrategie

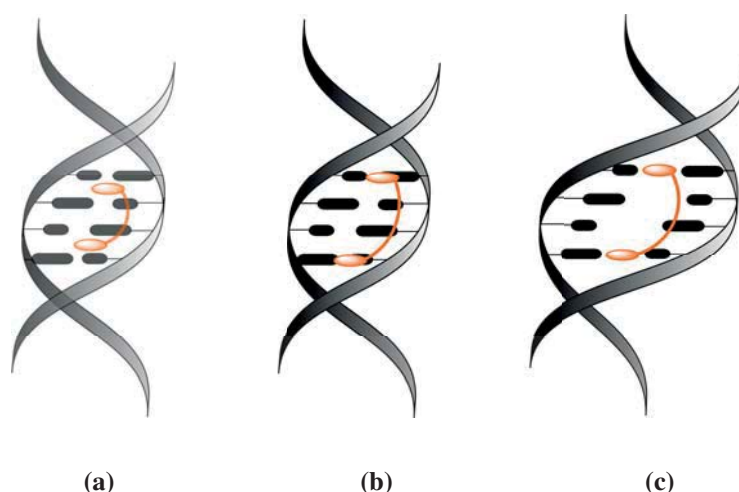
Die Interkalatoren Triostin A und das Strukturanalogon, das *N*-Tetradesmethyl-Derivat TANDEM binden direkt an doppelsträngige DNA, indem zwei DNA-Basenpaare mit ihren planaren Chinoxalinresten umspannt werden (Abb. 3.1, rechts).<sup>[3]</sup> Die Chinoxalinreste sind für die biologische Aktivität verantwortlich und sind aufgrund des starren, bizyklischen Rückgrats in einem Abstand von 10.5 Å präorganisiert. Im Rückgrat beider Interkalatoren ist eine Disulfidbrücke als Verlinkung enthalten. Basierend auf dem Naturstoff Triostin A bzw. dem TANDEM-Derivat sollten im Rahmen dieser Arbeit aza-TANDEM-Derivate synthetisiert werden, in denen die Esterfunktionalitäten im Rückgrat durch Amid-Bindungen, die im gesamten Rückgrat demethyliert vorliegen, ersetzt sind (Abb. 3.1, links).



**Abbildung 3.1:** Struktur des aza-TANDEM-Derivats (links) und Kristallstruktur der Interkalation des aza-TANDEM-Derivats in DNA (pdbID: 185D) (rechts).<sup>[3]</sup>

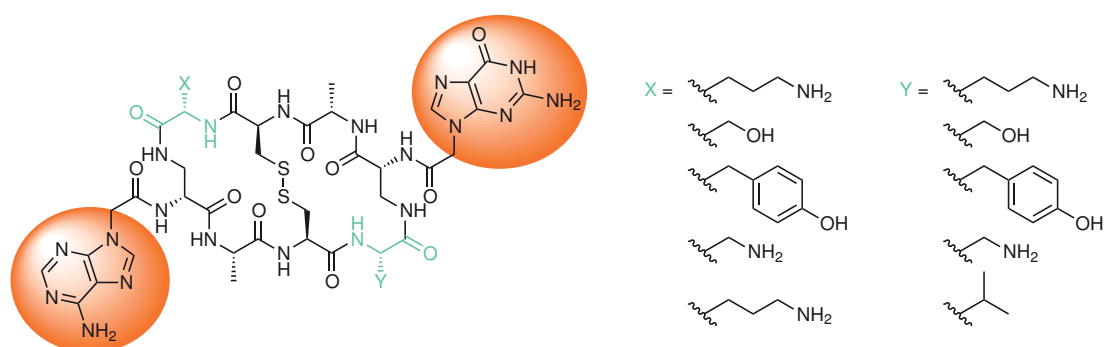
### 3 Nukleobasen-funktionalisierte aza-TANDEM-Derivate mit Modifikationen im Rückgrat

Die interkalierenden Chinoxalinreste im aza-TANDEM-Grundgerüst (**1**) sollten zudem durch Nukleobasen substituiert werden. Die Veränderung der Erkennungseinheiten soll einen neuen Bindungsmodus zur Folge haben, da bisher eine Interkalation von Purin- und Pyrimidinbasen im neutralen pH-Bereich nicht beschrieben wurde. In niedrigen pH-Bereichen ( $\text{pH} = 4.5$ ) wurde dagegen die Bildung von G-Quadruplex- und *i-Motif*-Strukturen<sup>[56–66]</sup> beobachtet (Abb. 3.2 (a)). Jedoch ist eine Interkalation der Nukleobasen-substituierten aza-TANDEM-Derivate unter neutralen Bedingungen sehr unwahrscheinlich. Eine Möglichkeit zur Interaktion unter physiologischen Bedingungen wäre die Bindung in der großen Furche, die beim Auftreten von DNA-Triplexstrukturen beobachtet wurde.<sup>[67–69]</sup> Hierbei würden die Nukleobasen analog zu den Chinoxalin-einheiten präorganisiert vorliegen und durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den HOOGSTEEN-Flanken sequenzspezifisch an die DNA binden (Abb. 3.2 (b)). Eine weitere Bindungsalternative wäre die partielle DNA-Öffnung, beschrieben von NIELSEN.<sup>[70,71]</sup> In diesem Fall würden die Nukleobasen auch in einem präorganisierten Abstand durch WATSON-CRICK-Basenpaarung an einen komplementären DNA-Strang binden, wobei der nicht-komplementäre DNA-Strang aufgrund fehlender elektrostatischer Abstoßung teilweise geöffnet und nicht vollständig gelöst vorliegt (Abb. 3.2 (c)). Da neben den beschriebenen Bindungsoptionen zusätzlich eine Sequenzspezifität möglich wäre, besteht ein großes Interesse an der Erforschung von Nukleobasen-substituierten aza-TANDEM-Derivaten.



**Abbildung 3.2:** Bindungsmöglichkeiten der aza-TANDEM-Derivate: (a) Interkalation ähnlich dem *i-Motif*, (b) Bindung in der großen Furche über die HOOGSTEEN-Flanken, (c) WATSON-CRICK-Basenpaarung unter partieller Öffnung des Doppelstrangs.

In vorangegangenen Arbeiten wurden mehrere Derivate synthetisiert und Schritte zur Syntheseoptimierung durchgeführt. So wurden Reagenzien zur Baustein-Kupplung und Disulfidbrückenbildung variiert.<sup>[72–80]</sup> Der Einsatz von Mikrowellen-unterstützter Festphasen-Peptidsynthese sowie der Einbau von Pseudoprolinen, um die Zyklisierungsreaktion zu verbessern, zielen auf eine Erhöhung der Ausbeute ab.<sup>[81]</sup> All diese Versuche führten jedoch nur zu einer geringfügig höheren Ausbeute. Aufgrund dessen liegt ein Fokus dieser Arbeit auf der Verknüpfung der Nukleobasen mit dem bicyklischen Rückgrat. Die Nukleobasen sollten im Unterschied zu vorangegangenen Arbeiten als Dipeptide direkt in der Festphasen-Peptidsynthese eingebaut werden. In Hinblick auf diese Vorüberlegungen sollten mehrere aza-TANDEM-Derivate mit den Nukleobasen Adenin und Guanin synthetisiert werden (Abb. 3.3).



2

**Abbildung 3.3:** Struktur der aza-TANDEM-Derivate mit den Nukleobasen Adenin und Guanin und den Modifikationen am Rückgrat an den Positionen X und Y.

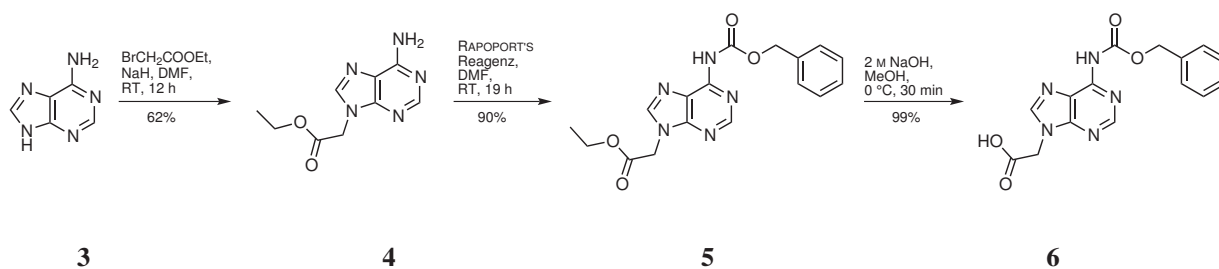
Das vollständig peptidische Rückgrat ermöglicht die Synthese des aza-TANDEM-Derivats an fester Phase. Im Falle von Esterbindungen wäre eine solche Synthese mit deutlich niedrigeren Ausbeuten verbunden.<sup>[82]</sup> Weitere Modifikationen am Rückgrat durch den Einbau verschiedener polarer und basischer Aminosäuren, wie beispielsweise zwei Lysinreste, sollten zum Einen die Löslichkeit der Derivate erhöhen und zum Anderen zu einer Veränderung im Bindungsverhalten führen. Der Einfluss des Rückgrats auf die Bindung an doppelsträngige DNA wurde anhand von Kristallstrukturen sowie NMR-spektroskopischen Untersuchungen der inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen beim Triostin A und beim aza-TANDEM-Derivat

beschrieben,<sup>[30,37]</sup> ist jedoch im Falle eines mit Nukleobasen-funktionalisierten Derivats noch nicht erforscht. Basierend auf diesen Ergebnissen sollten jeweils die Positionen der im Naturstoff Triostin A vorkommenden Valin-Reste durch Serine, Tyrosine und Lysine ersetzt werden. Zusätzlich sollten auch Derivate mit nur einem Lysin- und einem Valin-Rest und mit zwei Diaminopropionsäure-Resten synthetisiert werden. Als Kontroll-Derivate für die anschließenden Bindungsstudien mit DNA sollten außerdem zwei Analoga ohne Nukleobasen, mit jeweils zwei Serin- und zwei Lysin-Resten am Rückgrat, hergestellt werden.

#### 3.1.2 Synthese der Bausteine

Für die Darstellung der Triostin A-Derivate wurden durch den Einbau unterschiedlicher Aminosäuren Modifikationen am Rückgrat durchgeführt. Eine Gemeinsamkeit der verschiedenen Triostin A-Derivate stellen die einheitlichen Nukleobasen Adenin und Guanin dar. Beide Nukleobasen wurden während der Festphasen-Peptidsynthese als Essigsäure-Bausteine direkt an das Rückgrat gekuppelt. Die Synthese der Nukleobasen-Bausteine ist aus der Darstellung von PNA (Peptid-Nukleinsäure) nach NIELSEN bekannt.<sup>[71,83]</sup> Die Bausteine wurden für den direkten Einsatz in der Festphasen-Peptidsynthese mit orthogonalen Schutzgruppen versehen.

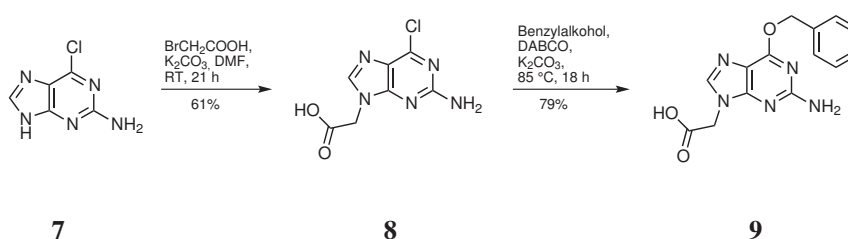
Die Synthese von (*N*<sup>6</sup>-Z-Adenin-9-yl)-essigsäure (**6**) konnte ausgehend von Adenin (**3**) erfolgen (Abb. 3.4).<sup>[84]</sup> Im ersten Schritt wurde unter basischen Bedingungen das Essigsäureethylester-Derivat **4** durch einen nukleophilen Angriff an die Ethylbromessigsäure hergestellt. Anschließend wurde die exozyklische Amin-Gruppe mit einer Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Cbz bzw. Z) versehen.



**Abbildung 3.4:** Synthese des Nukleobasen-Bausteins (*N*<sup>6</sup>-Z-Adenin-9-yl)-essigsäure (**6**).

Unter Verwendung von RAPOPORT'S Reagenz, *N*-(Benzyloxycarbonyl)-*N'*-ethylimidazol-tetrafluorborat, erfolgte die Schützung in zufriedenstellender Ausbeute.<sup>[85,86]</sup> Die Abspaltung dieser Schutzgruppe kann durch eine neutrale Hydrogenolyse oder unter sehr sauren Bedingungen erreicht werden. Im letzten Reaktionsschritt wurde der Ethylester hydrolysiert und lieferte den Adenin-Baustein **6**.

Der Guanin-Baustein **9** wurde in nur zwei Schritten ausgehend von 2-Amino-6-chlorpurin (**7**) aufgebaut (Abb. 3.5). 2-Amino-6-chlorpurin ermöglicht unter basischen Bedingungen eine gute regioselektive Alkylierung an der *N*9-Position mit Bromessigsäure. Im Gegensatz zu Adenin kann die exozyklische Amin-Gruppe des Guanins aufgrund der geringen Reaktivität ungeschützt bleiben. An Position *O*6 wurde eine Benzyl-Schutzgruppe eingeführt, damit eine verbesserte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln durch diese lipophile Gruppe erhalten wurde. Hierzu wurde das quartäre 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]-octan-(DABCO)-Salz in Gegenwart von Kaliumcarbonat zusammen mit Benzylalkohol verwendet. Im Vergleich zur Verwendung von Natriumbenzyloxid führten diese Bedingungen zu einer verbesserten Reaktivität.<sup>[84,87]</sup> Die Benzyl-Gruppe ist im Vergleich zur *Z*-Schutzgruppe säurelabiler und kann schon mit 50% Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan (DCM) abgespalten werden.

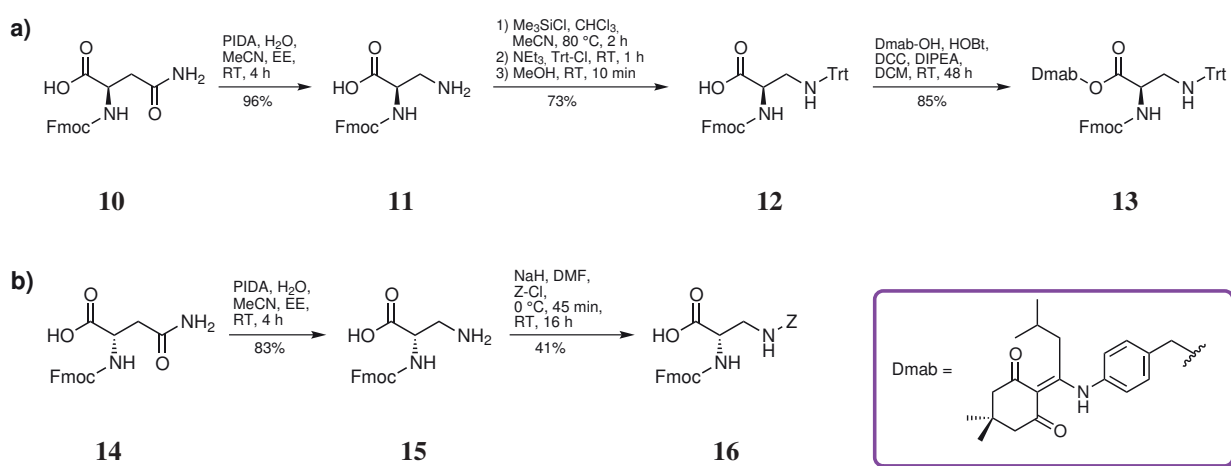


**Abbildung 3.5:** Synthese des Nukleobasen-Bausteins (2-Amino-6-benzyloxyypurin-9-yl)-essigsäure (**9**).

Der Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc)- und Trityl-(Trt)-geschützte Diaminopropionsäure-(Dap)-Baustein **12** wurde in zwei Stufen ausgehend von den  $N_\alpha$ -Fmoc-geschützten *D*-Asparagin **10** synthetisiert (Abb. 3.6 (a)). Im ersten Schritt wurde eine HOFMANN-Umlagerung mit (Diacetoxyiod)-benzol (PIDA) durchgeführt. Der Einsatz von PIDA ermöglicht hier eine schnelle, leicht aufzuarbeitende Reaktion mit moderaten Ausbeuten unter leicht sauren Reaktionsbedingungen, ohne die Verwendung von Pyridin als Katalysator.<sup>[88]</sup> Nach Überführung des Amids zum Amin

### 3 Nukleobasen-funktionalisierte aza-TANDEM-Derivate mit Modifikationen im Rückgrat

wurde das freie Amin mit der Trt-Schutzgruppe versehen. Diese Schutzgruppe kann selektiv unter leicht sauren Bedingungen in Gegenwart anderer säurelabiler Schutzgruppen, wie z. B. der eingesetzten Z- und Benzyl-Schutzgruppen, entfernt werden. Zuerst wurde die Carboxyfunktion mittels eines Trimethylsilylrestes geschützt, um eine Tritylierung dieser zu verhindern. Fmoc-D-Dap-OH (**11**) wurde bei Raumtemperatur mit Triethylamin und Tritylchlorid versetzt und anschließend mit Methanol zu Fmoc-D-Dap(Trt)-OH (**12**) desilyliert.<sup>[89,90]</sup> Diese orthogonal geschützte, unnatürliche Aminosäure ermöglicht die Kupplung der Nukleobasen-Bausteine des Adenins und Guanins während der Festphasen-Peptidsynthese am Harz, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben.



**Abbildung 3.6:** Synthese der orthogonal geschützten Diaminopropionsäure-Verbindungen.

Außerdem wurde von Verbindung **14** ein am primären Amin mit einer Z-Schutzgruppe versehenes Derivat synthetisiert (Abb. 3.6 (b)). Derivat **16** wurde analog zu der Aminosäure Serin anstelle der natürlichen Valine, wie im Triostin A vorhanden, am Rückgrat des aza-TANDEM-Derivats eingebaut. Analog zu den Hydroxy-Gruppen des Serins sind die Amin-Gruppen des Dap-Bausteins durch eine Methyleninheit am Rückgrat verknüpft. Hergestellt wurde Fmoc-L-Dap(Z)-OH (**16**) durch die Umsetzung von Fmoc-L-Dap-OH (**15**) mittels Z-Chlorid.

Zusätzlich zur Darstellung der Nukleobasen als Essigsäure-Derivate wurden Dipeptide der Nukleobasen synthetisiert. Die Dipeptide, die aus einer direkten Verknüpfung der Nukleobasen an den Dap-Baustein bestehen, können unmittelbar in der Synthese des linearen aza-TANDEM-Derivats eingesetzt werden. Dadurch sind im Vergleich weniger Reaktionsschritte zur Darstellung

erforderlich. Für die Verknüpfung der Nukleobasen in Lösung wurde daher eine weitere Diaminopropionsäure synthetisiert. Diese wurde mit einer dritten Schutzgruppe ausgehend von Fmoc-D-Dap(Trt)-OH (**12**) versehen (Abb. 3.6 (a)). Als Schutzgruppe wurde die 4-[*N*-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl]amino]benzyl-Gruppe (Dmab) gewählt, weil diese orthogonal zu den bereits vorhandenen Schutzgruppen Trt und Fmoc ist.<sup>[91–94]</sup> Die Allyl- und Benzyl-Schutzgruppen wurden auch getestet, wobei sich die Dmab-Schutzgruppe als die am besten geeignete herausstellte. Die Säure-Gruppe von Verbindung **12** wurde durch Kupplung von Dmab-OH mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT), *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) sowie Diisopropylethylamin (DIPEA) in DCM geschützt. Die vollständig geschützte Verbindung **13** wurde anschließend in Lösung mit Piperidin in Acetonitril (MeCN) Fmoc-entschützt (Abb. 3.7).

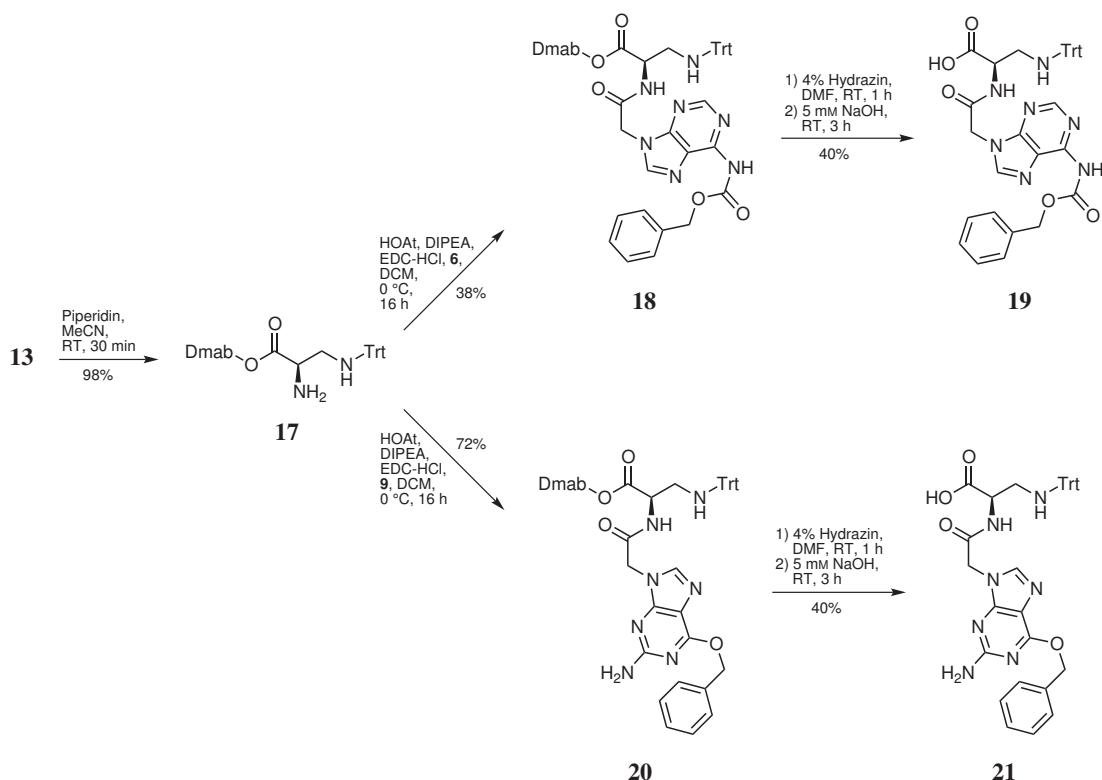


Abbildung 3.7: Darstellung der Nukleobasen-Dipeptide **19** und **21**.

H-D-Dap(Trt)-ODmab (**17**) diente als Ausgangsverbindung für die Kupplung der Nukleobasen. Diese wurden mittels 1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol (HOAt), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC-HCl) und DIPEA in DCM an das freie Amin gekuppelt. Nach der Ent-