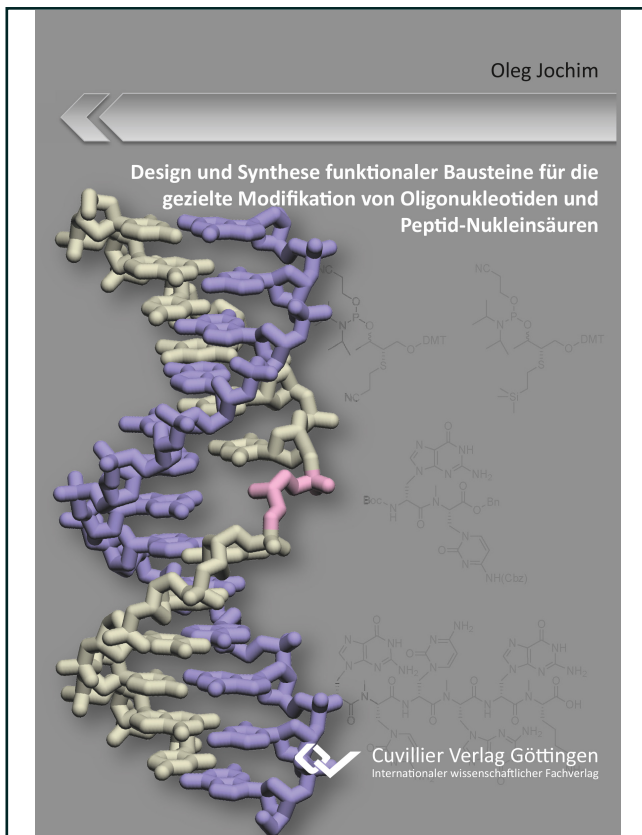




Oleg Jochim (Autor)

## Design und Synthese funktionaler Bausteine für die gezielte Modifikation von Oligonukleotiden und Peptid\_Nukleinsäuren



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6974>

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

Alle lebensnotwendigen Prozesse eines jeden Lebewesens basieren auf Interaktionen von Makromolekülen, die durch ihre chemische Beschaffenheit und Struktur die Prozesse steuern und möglich machen. Nucleinsäuren und Proteine sind zwei der wichtigsten Makromoleküle, die eine zentrale Rolle als Bausteine des Lebens spielen.<sup>[1]</sup> Die Strukturaufklärung dieser Oligomere in den frühen 50er Jahren führte zu vielen revolutionären Erkenntnissen, die bis zum heutigen Tage für die Forschung und Entwicklung in den Feldern der Physik, Biologie und Chemie grundlegend und bestimmend sind.<sup>[2-5]</sup> Der enge Zusammenhang zwischen Funktion, Struktur und chemischem Aufbau ermöglicht durch Modifikationen auf molekularer Ebene ein gezieltes Design von funktionalen Oligomeren, die nicht nur ein unerschöpfliches Repertoire an Anwendungen bieten, sondern auch interdisziplinär einsetzbar sind. Die daraus resultierende unaufhaltsame Entwicklung dringt dabei in Felder vor, die weitab von der natürlichen biologischen Bestimmung der Makromoleküle liegen und schafft neue Disziplinen und Anwendungen.

Die DNA (*deoxyribonucleic acid*), die als Träger und Speicher der Erbinformationen bekannt ist und deren Eigenschaften für die Genexpression unerlässlich sind, kann abseits ihrer biologischen Funktion als ein supramolekulares Gerüst in der Nanotechnologie und den Materialwissenschaften verwendet werden.<sup>[6-8]</sup> Ihre klar definierte starre Duplex-Struktur, mit der Fähigkeit der molekularen Erkennung und Selbstaggregation bietet zudem ein großes Potenzial für *bottom-up*-Verfahren zur Generierung von hochstrukturierten Materialien mit spezifischen Eigenschaften im Nanobereich.<sup>[6]</sup> Die Anwendungsbereiche der DNA sind jedoch nicht nur auf ihre natürliche Duplex-Struktur beschränkt, sondern sind durch gezielte Modifikation der Oligonukleotide um ein Vielfaches erweiterbar.<sup>[9,10]</sup> Mit der rasanten Entwicklung der Oligonukleotid-Synthese an fester Phase ist es heutzutage möglich, aufbauend auf modifizierten Nucleosid-Bausteinen und artifiziellen Nucleobasen, funktionale Oligonukleotide mit beliebiger



Sequenz, Funktion und Eigenschaften zu synthetisieren. Auf diese Weise können Aptamere entwickelt werden, die eine komplexe dreidimensionale Struktur einnehmen und selektiv an Zielverbindungen binden. Diese Eigenschaften sind nicht nur bei der Entwicklung von neuen Arzneimitteln und Therapeutika von großer Bedeutung, sondern ermöglichen auch die Verwendung von Aptameren als Katalysatoren für eine Vielzahl chemischer Reaktionen.<sup>[11–13]</sup> Unter Erhalt ihrer Integrität wird die DNA aufgrund der wachsenden Vielfalt an Modifikationen und Anwendungen zu einem der vielseitigsten Makromoleküle, die gezielt modelliert werden können.

Jede der beschriebenen Anwendungen der Oligonukleotide basiert auf der Möglichkeit mit Hilfe kleiner modifizierter Bausteine komplexe oligomere Strukturen mit einer definierten Funktion zu designen. Der Ansatz der hier präsentierten Untersuchungen baut auf der Synthese eines neuen azyklischen Bausteins auf, der als Thiol-tragende Rückgratmodifikation von Oligonukleotiden verwendet werden soll. Mit Hilfe dieser Modifikation soll unter Verwendung der dynamischen kombinatorischen Chemie eine Templat-gesteuerte reversible Funktionalisierung des Oligonukleotids untersucht werden. Im Vordergrund der Untersuchungen stehen die Synthese und Anpassung des Bausteins an die Oligonukleotid-Synthese an fester Phase sowie die Entwicklung eines auf dem Thiol-Thioester-Austausch basierenden dynamischen Assays. Die daraus resultierenden Erkenntnisse sollen unter anderem zur Generierung neuer funktionaler selbstorganisierender Oligonukleotide genutzt werden.

Die Anwendungen und Funktionen der natürlichen DNA sind auf die Variation in der Abfolge der vier kanonischen Nucleobasen limitiert und sind in der geringen Anzahl an möglichen Sekundärstrukturen begründet. Proteine dagegen können aufgrund der zwanzig proteinogenen Aminosäuren eine wesentlich größere Vielfalt an Sekundärstrukturelementen ausbilden, die zu komplexen Tertiär- und Quartärstrukturen führen.<sup>[1]</sup> Die sich daraus ergebende Variation an Strukturen ermöglicht es den Proteinen, sehr spezielle und vielfältige Funktionen im Organismus auszuführen (Enzyme, Antikörper, Toxine, Kollagene etc.).<sup>[14]</sup> Doch nicht nur die Funktion der Proteine ist stark von ihrer Struktur abhängig, auch viele Erkrankungen wie Alzheimer sind auf fehlerhaft gefaltete Proteine zurück zu führen.<sup>[15]</sup> Die Veränderung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins ist ein essentieller Vorgang, der auch bei der Proteinerkennung durch kleine Moleküle sowie bei Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen

eine wichtige Rolle spielt. Eine kontrollierbare Änderung der Konformation würde ein wichtiges Werkzeug zur Steuerung der Proteinfunktion und deren Eigenschaft darstellen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, modifizierte kleine Peptid-Hexamere mit Erkennungseinheiten darzustellen, welche mit komplementären Molekülen in Wechselwirkung treten und somit eine Konformationsänderung innerhalb eines Proteins induzieren können. Im gepaarten Zustand liegt das Rückgrat des Hexamers in einer  $\beta$ -Faltblatt-Konformation vor, während der Einzelstrang eine zufällig ausgebildete Anordnung aufweist. Durch Paaren bzw. Entpaaren kann auf diese Weise ein „Schalten“ zwischen den Konformationen ermöglicht werden. Als molekulare Schalter für  $\beta$ -Faltblatt-Sekundärstrukturen sollen Alanyl-Peptidnucleinsäuren (Alanyl-PNAs) dienen. Dazu werden auf der Aminosäure Serin aufbauende *N*-methylierte-Bausteine synthetisiert, die Nucleobasen als Erkennungseinheiten tragen und abwechselnd mit nicht methylierten Bausteinen zum Alanyl-PNA-Hexamer verknüpft werden. Dabei liegt der Fokus auf der Synthese von Dipeptiden, welche über die *N*-methylierte Amin verknüpft sind und in der Peptid-Synthese an feste Phase über das nicht methylierte Amin gekuppelt werden können. Der Einsatz von *N*-methylierten Bausteinen dient der Vermeidung von eventuell auftretenden Rückgrataggregationen. Desweiteren sollen auf diese Weise NMR-spektroskopische Untersuchungen eines solchen Alanyl-PNA Doppelstranges und seines Paarungsverhaltens ermöglicht werden.<sup>[16]</sup>

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollen deutlich machen, dass komplexe Makromoleküle wie die Oligonucleotide und Peptide in ihrer Struktur und Funktion durch kleinere Untereinheiten (Nucleoside, Aminosäuren) bestimmt werden. Durch gezieltes synthetisches Design dieser Bausteine können größere übergeordnete Strukturen modifiziert, funktionalisiert und gesteuert werden. Unter Ausnutzung der Synthese an fester Phase und Anpassung der Synthesebedingungen ist das Potential kleiner Bausteine größer als je zuvor.

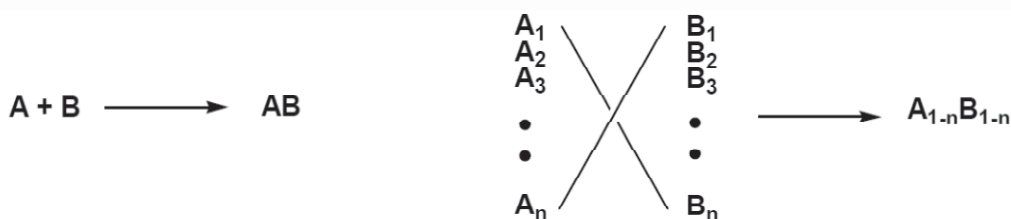


## 2 Dynamische Modifikation von Oligomeren

Auf der Suche nach neuen bioaktiven und funktionalen Molekülen eröffnet die dynamische kombinatorische Chemie noch nie dagewesene Möglichkeiten zur Generierung von Inhibitoren und dynamischen Werkstoffen.<sup>[17,18]</sup> Die dynamische Chemie nutzt dabei reversible Wechselwirkungen, die einen kontinuierlichen Austausch und die daraus resultierende selektionsgesteuerte Reorganisation der Komponenten ermöglichen. Die selektive, reversible Funktionalisierung von Oligomeren ist somit fundamental für ein adaptives und reaktives Design von Makromolekülen und Materialien mit hohem Anspruchsverhalten.<sup>[19]</sup> Auf diese Weise wird eine Änderung der klassischen Ansätze möglich, die weg von riesigen vorgefertigten Substanzbibliotheken hin zu kleineren selbstorganisierten dynamischen Bibliotheken führt. Somit wird ein Umschalten von Fabrikation zur Selbst-Fabrikation vollzogen.<sup>[20,21]</sup>

### 2.1 Kombinatorische Chemie

Der Grundgedanke der kombinatorischen Chemie basiert auf der gleichzeitigen Darstellung einer Vielzahl von chemisch ähnlichen Verbindungen, die eine Substanzbibliothek bilden.<sup>[22]</sup> Die Substanzbibliotheken können dabei aus Verbindungsgemischen oder einer Ansammlung von Einzelverbindungen bestehen. Durch die Fähigkeit der Generierung einer Vielzahl chemischer Komponenten innerhalb kürzester Zeit beschreibt die kombinatorische Chemie eine neue Herangehensweise an die traditionelle Chemie, bei der zwei Komponenten **A** und **B** zu einem klar definierten Produkt **AB** reagieren (Abb. 1).<sup>[23]</sup>



**Abb. 1:** Darstellung der Unterschiede zwischen traditioneller Synthesechemie (links) und kombinatorischer Chemie (rechts).

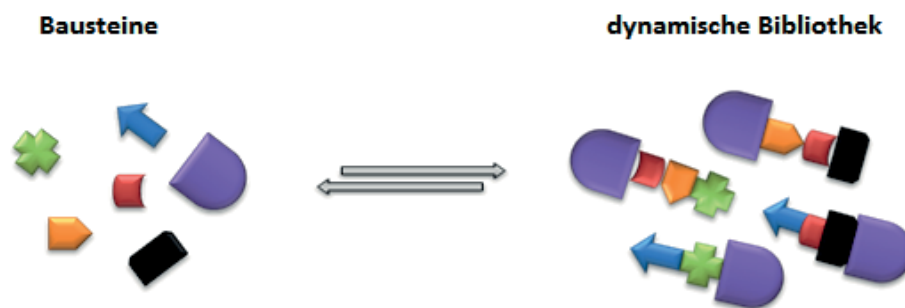


Im Kontrast dazu ist die Kombinatorische Chemie durch die Reaktion mehrerer Synthesebausteine  $A_1$  bis  $A_n$  mit mehreren Bausteinen des Typs  $B_1$  bis  $B_n$  gekennzeichnet und erfasst alle Produktmöglichkeiten.<sup>[24]</sup> Die Reichweite an kombinatorischen Techniken ist sehr divers und die Produkte können parallel in getrennten Gefäßen, simultan in einer Mischung an fester Phase oder in Lösung hergestellt werden. Der wichtigste Faktor dabei ist die Produktivitätssteigerung, die durch Anwendung kombinatorischer Chemie erzielt wird und die bisher bekannten Routinemethoden bei weitem übertrifft. Spätestens seit der von *R. B. Merrifield* 1963 vorgestellten Peptid-Festphasensynthese verbreiteten sich die darauf aufbauenden Methoden rasant in fast jedem Feld der organischen Synthesechemie.<sup>[25]</sup> Auch wenn die Automatisierung und die Verwendung von Hochdurchsatzmethoden die Synthese und Charakterisierung großer Mengen an Komponenten stark beschleunigt haben, stellen die Nachweis- und Trennmethoden immer noch den limitierenden Faktor der kombinatorischen Chemie dar. Bei der kombinatorischen Synthese von Substanzbibliotheken ist nicht die überaus große Anzahl an Verbindungen wichtig, sondern vielmehr die Qualität der Bibliothek. Dabei steht die Diversität im Vordergrund, die sich in der Heterogenität der Verbindungen niederschlägt und die durch die räumliche Anordnung der funktionellen Gruppen bestimmt wird. Diese Voraussetzungen ermöglichen eine Vielfalt an Designansätzen, die riesige Substanzbibliotheken generieren können. Somit hat sich die kombinatorische Chemie in Verbindung mit dem Hochdurchsatz-Screening als ein unverzichtbares Werkzeug bei der Wirkstoffentwicklung etabliert.<sup>[26]</sup> Der größte limitierende Faktor bleibt jedoch die Tatsache, dass jede Komponente der Bibliothek in jeglicher Diversität synthetisiert werden muss und eine zielgesteuerte Reorganisation der Bibliothek sehr aufwendig wird.

## 2.2 Dynamische kombinatorische Chemie (DCC)

Die dynamische kombinatorische Chemie (*dynamic combinatorial chemistry*, DCC) ist als kombinatorische Chemie unter thermodynamischer Kontrolle definiert.<sup>[27]</sup> Sie beruht auf der Selektion des thermodynamisch stabilsten Produktes aus einer sich im Gleichgewicht befindlichen Mischung von potenziellen Produkten. Die Mischung beschreibt ein dynamisches System mit hoher Diversität und Komplexität, die aus den

einzelnen strategisch designten Reaktanden (Bausteine) besteht. Im Gleichgewicht bilden diese eine dynamische Bibliothek von reversiblen Verbindungen (*dynamic combinatorial library*, DCL). Der Grundsatz der DCC beschreibt eine selektive Adaption der DCL, wenn ein Selektionsdruck auf das sich im Gleichgewicht befindliche System ausgeübt wird. Dies wird durch eine Umwandlung der einzelnen Bibliotheksbestandteile ineinander ermöglicht. Die Umwandlung wird durch einen chemisch reversiblen Prozess beschrieben, der auf nichtkovalenten und kovalenten Bindungen sowie auf Metall-Ligand-Interaktionen aufgebaut sein kann.



**Abb. 2:** Generierung einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek (DCL). Im Gleichgewicht besteht die dynamische Bibliothek aus einer bestimmten Anzahl an diversen Molekülen, die sich durch einen reversiblen Reaktionsprozess an einen Selektionsdruck anpassen können.

Da sich das System unter thermodynamischer Kontrolle befindet, bedeutet jedoch auch, dass jegliche Veränderung der Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH, Konzentration) eine Veränderung innerhalb der Bibliothek hervorrufen kann. Die sensible Reaktion der DCL auf externe Einflüsse ist eine wichtige Besonderheit der dynamischen kombinatorischen Chemie, denn die Komposition der Bibliothek wird durch die thermodynamische Stabilität jeder einzelnen Komponente der Bibliothek unter den entsprechenden Reaktionsbedingungen bestimmt. Diese selbst-adaptiven Eigenschaften machen die dynamische kombinatorische Bibliothek zu einem effektiven Werkzeug zur Bestimmung thermodynamischer Minima.<sup>[28,29]</sup>

### 2.2.1 Grundlagen der DCC

Das Grundprinzip der Dynamik in der kombinatorischen Chemie basiert, wie zuvor erwähnt, auf der geeigneten reversiblen Reaktion, die den Austausch der Bausteine zwischen den einzelnen Bestandteilen der Bibliothek möglich macht und die Adaption der



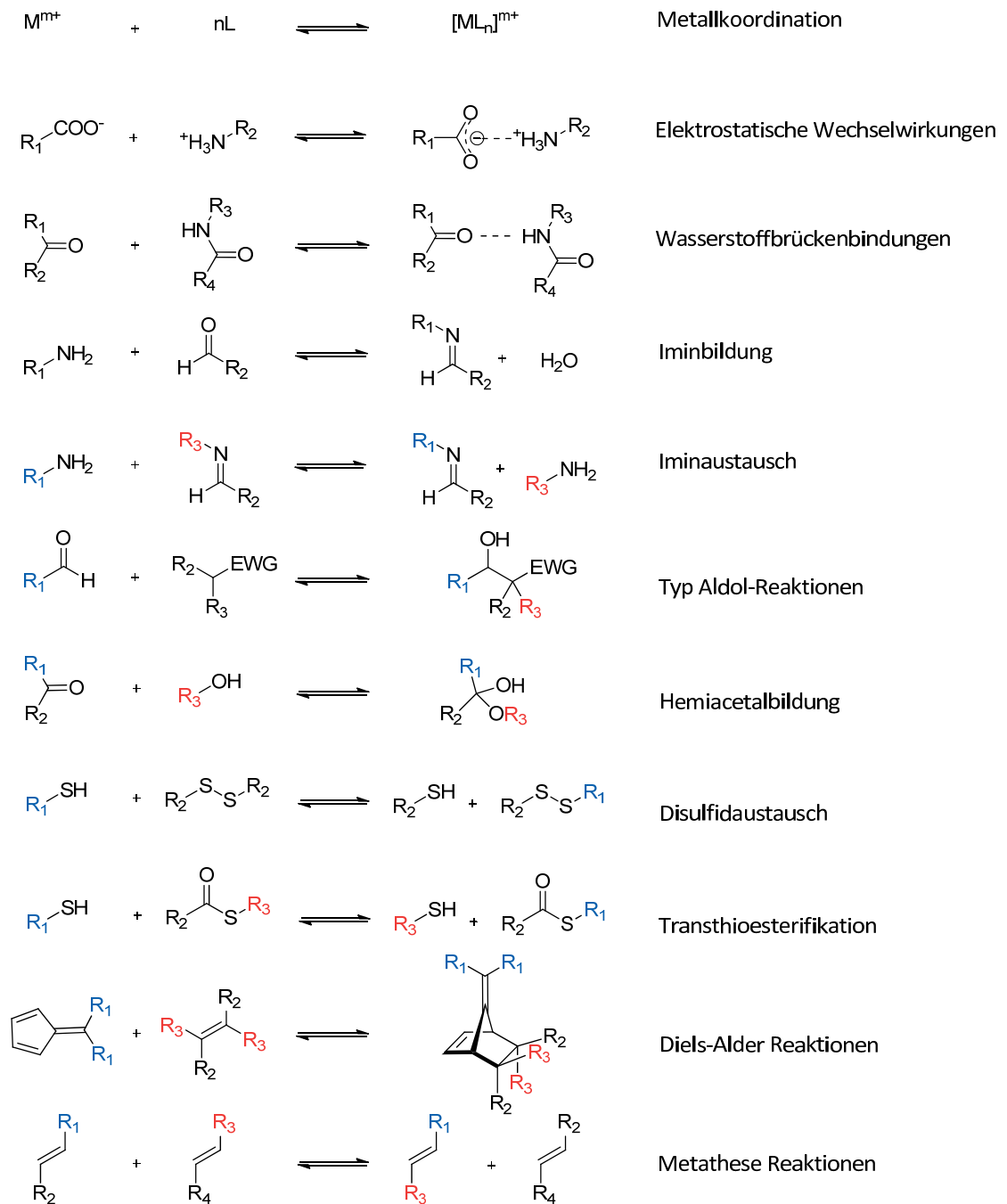


Bibliothek an den Selektionsdruck ermöglicht.<sup>[30,31]</sup> Dabei müssen folgende Bedingungen erfüllt werden, um eine geeignete Reaktion zu bestimmen.<sup>[32]</sup>

1. Das Gleichgewicht sollte sich in einer für die Reaktionsbedingungen annehmbaren Zeit einstellen und bestmöglich schneller ablaufen als die auftretenden Nebenreaktionen, die die Substrate dem Gleichgewicht entziehen.
2. Die Reaktion sollte unter milden Reaktionsbedingungen ablaufen, um nicht mit den empfindlichen, nichtkovalenten Wechselwirkungen zu interferieren, die für die molekulare Erkennung notwendig sind.
3. Die Reaktion sollte gegenüber möglichst vielen funktionellen Gruppen tolerant sein und chemoselektiv ablaufen. So kann gezielt eine dynamische Bibliothek designt und die Komplexität eingeschränkt werden.
4. Die Gleichgewichtsreaktion sollte kontrolliert beendet werden können, um somit die Kinetik einzufrieren und die selektierten Bibliotheksbestandteile isolieren und nachweisen zu können.
5. Im Idealfall sollten alle Bestandteile der Bibliothek isoenergetisch sein, um einerseits den Energieaufwand für die kontinuierliche Adaption zu minimieren und um andererseits Einflüsse auf das Gleichgewicht möglichst gering zu halten.

Bis heute wurde eine Vielzahl von reversiblen Reaktionen, die eine große Bandbreite an Reaktionstypen abdecken, untersucht und publiziert (Abb. 3).<sup>[30,32]</sup> Dabei ist es wichtig, dass die zuvor beschriebenen Bedingungen bestmöglich erfüllt werden. Gerade wenn biologisch relevante Systeme untersucht werden sollen, muss gewährleistet sein, dass diese Reaktionen im wässrigen Medium ablaufen können.

Abbildung 3 zeigt die Bandbreite der Reaktionen, die viele der Anforderungen erfüllen und eine Vielfalt an Reaktionstypen abdecken. Die drei häufigsten Bindungsarten (nichtkovalente, kovalente und koordinative Bindungen), die für reversible Reaktionen in dynamischer kombinatorischer Chemie verwendet werden, haben ihre Vor- und Nachteile und müssen selektiv an den Anwendungsbereich angepasst werden. Bei den meist schwachen und labilen nichtkovalenten Bindungen stellt sich das Gleichgewicht zwar sehr schnell ein, jedoch sind die gebildeten thermodynamischen Produkte nicht sehr stabil.<sup>[32]</sup>



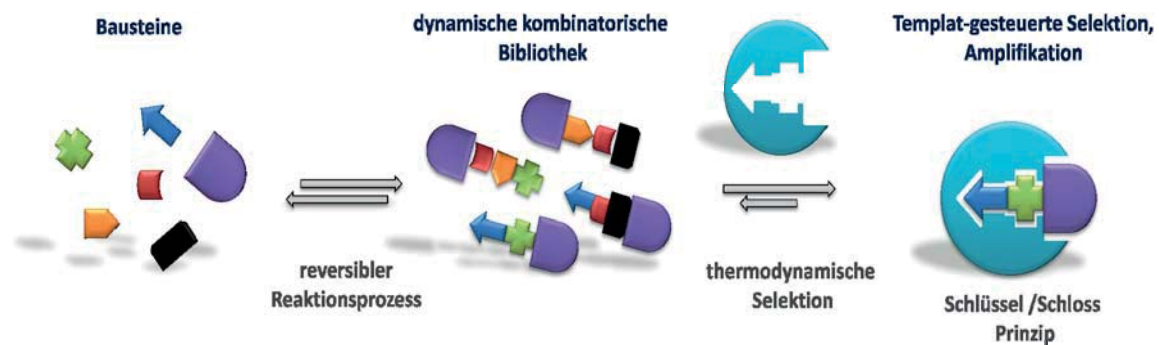
**Abb. 3:** Beispiele für reversible, kovalente und nichtkovalente Reaktionen, die bereits untersucht worden sind und Verwendung in der DCC finden. Alle aufgeführten Reaktionen laufen unter milden Bedingungen ab. (EWG = elektronenziehende Gruppe)

Dadurch wird es sehr schwer diese zu isolieren und zu charakterisieren. Im Gegensatz dazu sind die Kinetiken für das Ausbilden und Lösen der kovalenten Bindungen langsam und haben lange Reaktionszeiten zufolge. Andererseits sind diese Bindungen sehr stabil und können ohne weiteres isoliert, charakterisiert und für weitere Anwendungen verwendet werden. Die resultierenden selbst-adaptiven Eigenschaften der dynamischen

schen kombinatorischen Chemie, die unter anderem durch die Verwendung reversibler und kovalenter Bindungen erzielt werden, unterstreichen die Vorzüge dieser Methode gegenüber der konventionellen kombinatorischen Chemie. Mit Hilfe der gezielten Selektion kann sich somit die Zusammensetzung der gesamten Bibliothek selbstorganisiert an die erforderlichen Gegebenheiten anpassen.

### 2.2.2 Selektion

Das adaptive Verhalten der dynamischen Bibliotheken ist das Resultat eines Selektionsprozesses. Dieser wird durch die Präsenz eines artifiziellen oder natürlichen Rezeptors (Templat), der die Selektion steuert, bestimmt. Das sogenannte *templating* beschreibt einen weiteren Eckpfeiler der dynamischen kombinatorischen Chemie. Die Zugabe eines Templats (Enzym, Rezeptor oder Substrat), welches mit einem Bestandteil der Bibliothek wechselwirkt, verschiebt gemäß dem *Prinzip von Le Chatelier* die Zusammensetzung der Bibliothek im Idealfall zugunsten der Verbindung mit der besten Wechselwirkung (Abb. 4).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung des dynamischen kombinatorischen Prozesses. Das dynamische System bildet durch die gewählten Bausteine und die reversible Reaktion eine dynamische Bibliothek, die sich durch die Vorgabe des Templates dem Selektionsdruck anpasst und durch thermodynamische Selektion verstärkt das präferierte Produkt bildet.

Durch das Templat wird also ein Selektionsdruck auf das dynamische System ausgeübt, der sich in einer verstärkten Generierung des bevorzugten Produktes äußert.<sup>[24]</sup> In diesem Fall wird durch thermodynamische Selektion das dynamische System reorganisiert, um bevorzugt das Substrat mit der stärksten Wechselwirkung zum Templat zu bilden. Somit wird nicht nur eine molekulare Erkennung des besten Substrates möglich, sondern auch die verstärkte Anreicherung dessen. Die Selektion und die Koordina-

tion der dynamischen kombinatorischen Chemie kann aber auch dazu genutzt werden, ein Templat für einen Rezeptor zu generieren. Nach *J.-M. Lehn* wird die Strategie zur Identifizierung eines Substrates mit Hilfe der dynamischen kombinatorischen Chemie als *casting* (Gießen) und die komplementäre Identifizierung eines Rezeptors als *moulding* (Formen) bezeichnet.<sup>[26,30,33]</sup> Auf diese Weise kann die dynamische kombinatorische Chemie durch Templat gesteuerte Selektion dirigiert und kontrolliert werden. Diese Eigenschaften ermöglichen eine Vielzahl an biologisch und chemisch relevanten Anwendungsbereichen, in denen durch ein gezieltes Templat-Design das gewünschte Produkt durch Selbstorganisation erhalten werden kann.

### 2.2.3 Ansätze der dynamischen kombinatorischen Chemie

Aufbauend auf den verschiedenen Reaktionstypen, die in der dynamischen kombinatorischen Chemie Verwendung finden und den Arten diese selektiv zu kontrollieren, wurden unterschiedliche Konzepte der DCC entwickelt. Diese beinhalten eine Vielfalt an Ansätzen, die es erlauben, an das System angepasst vorzugehen. Das Vorgehen wird durch den adaptiven Ansatz, den Ansatz des voreingestellten Gleichgewichts, den wiederholenden und den pseudo dynamischen Ansatz bestimmt. Alle diese Ansätze haben die reversible Generierung der dynamischen Bibliothek gemein, unterscheiden sich jedoch in ihrem Selektionsschritt.

Der adaptive Ansatz ist der am weitesten verbreitete Ansatz unter den zuvor genannten. Die Generierung der Bestandteile der Bibliothek wird in Gegenwart des Target (Rezeptor)-Moleküls durchgeführt.<sup>[34,35]</sup> Das führt zu einer verstärkten Bildung der am besten gebundenen Spezies, so dass das Screening im selben Kompartiment stattfinden kann. Hierbei werden alle Charakteristika der dynamischen adaptiven Bibliothek genutzt. Durch die dynamische Adaption kommt es zu einer verstärkten gerichteten Selektion des besten Binders.

Der Ansatz des voreingestellten Gleichgewichtes bezieht sich auf Reaktionen, die nicht im wässrigen Medium ablaufen können.<sup>[36,37]</sup> Die Generierung der dynamischen Bibliothek findet unter reversiblen Bedingungen analog zum adaptiven Ansatz im geeigneten Lösungsmittel statt und erst wenn sich das Gleichgewicht eingestellt hat, wird das Screening separat in einem wässrigen Puffersystem durchgeführt. Aufgrund des



Mediumwechsels kann keine adaptive Reorganisation stattfinden, die eine Verschiebung des Gleichgewichtes zur Folge hätte und somit ist auch keine verstärkte Bildung des besten Binders möglich. Dieser Ansatz wird meist bei empfindlichen biologischen Proben oder bei nicht kompatiblen Reaktionsbedingungen mit dem Target-Molekül verwendet. Auch wenn das Screening traditionell kombinatorisch verläuft, wird die Bibliothek immer noch nach dem schnell ablaufenden dynamischen Prozess generiert.

Der wiederholende-Ansatz basiert auf einer mehrfachen Anwendung des Ansatzes mit dem voreingestellten Gleichgewicht.<sup>[38]</sup> Die Bibliothek wird in einem separaten Kompartiment unter definierten Bedingungen generiert und erst im Anschluss wird die Interaktion mit dem Target-Molekül im selben oder in einem anderen Kompartiment herbeigeführt. In diesem Fall wird die ungebundene Spezies der Kammer entnommen und reorganisiert. Nach einigen Wiederholungen stellt sich eine Akkumulation des besten Binders ein, der analysiert werden kann.

Der pseudo dynamische Ansatz macht Gebrauch von zwei Reaktionskammern, die durch eine semipermeable Membran getrennt sind.<sup>[39]</sup> Die eine Kammer enthält das Target-Molekül, die andere ein Enzym. Die am besten bindende Spezies zeigt eine geringere Hydrolyse und macht den besten Binder zum letzten verbleibenden Reaktanden innerhalb der Bibliothek, da der Rest der Bibliothek vom Enzym zerstört wird.

Mit den Erkenntnissen und dem Wissen über die erforderlichen Reaktionsbedingungen, die benötigte reversible Reaktion, die selektive Steuerung durch das Templat und die möglichen Ansätze kann eine Vielzahl an dynamischen Systemen entwickelt und angepasst werden. Das gezielte Design dynamischer Systeme ermöglicht ein effizientes *self screening* von großen Bibliotheken und das gezielte Selektieren von Komponenten mit hohem Durchsatz.

## 2.2.4 Analysemethoden

Die Trennung und der Nachweis von Bibliotheken und deren Bestandteilen stellen die limitierenden Schritte der konventionellen kombinatorischen Chemie dar. Eine effiziente Analyse ist aufgrund der schieren Größe der Bibliotheken sehr schwierig. Dennoch sind für die Analyse und das Screening von dynamischen Bibliotheken einige ana-

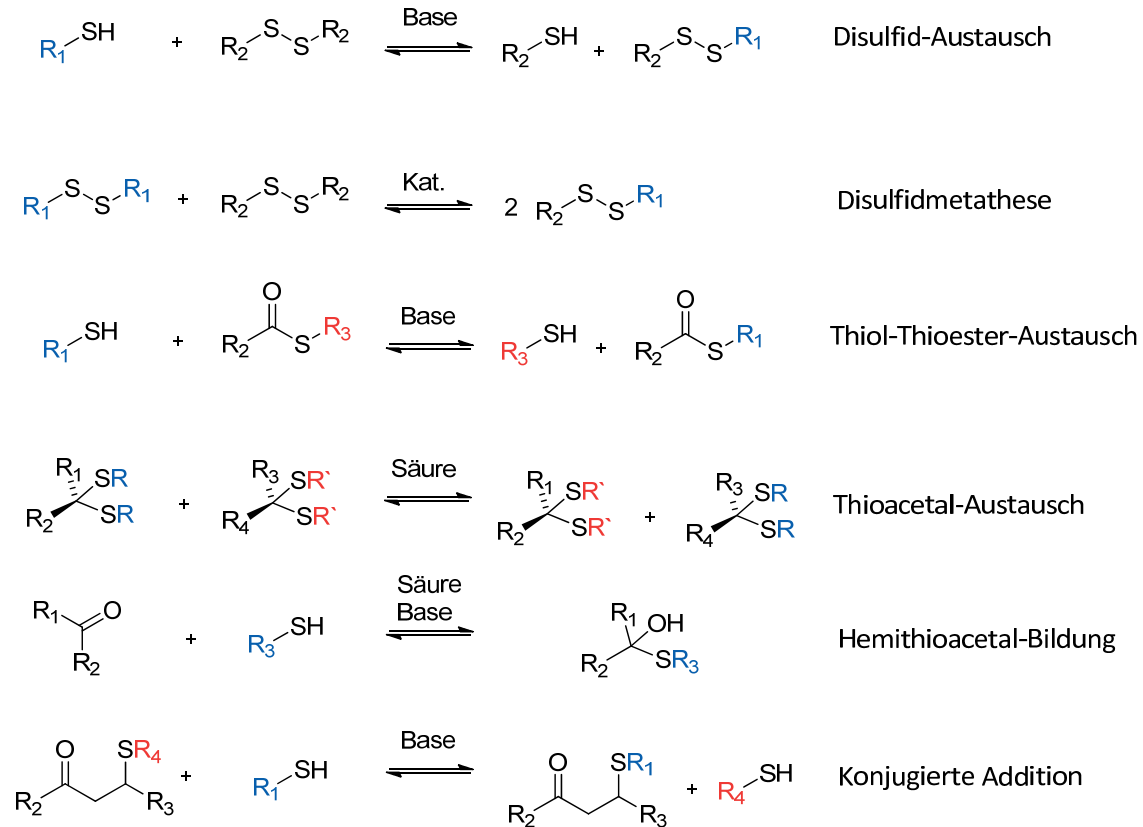
lytische Methoden denkbar und anwendbar. Für kleine Bibliotheken können Methoden wie die eindimensionale Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie, *nuclear magnetic resonance*), die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, *high-performance liquid chromatographie*), die Hochleistungskapillarelektrophorese (HPCE, *high-performance capillary electrophoresis*) und die Gaschromatographie (GC) zur quantitativen Bestimmung der Bibliotheksbestandteile herangezogen werden. Bei Bestandteilen mit einer konkreten Masse kann zum Screening auch die Massenspektrometrie (MS) effektiv genutzt werden. Bei großen Bibliotheken ist zwar die Differenzierung und Identifizierung zunehmend erschwert, die selektive Verstärkung und Anreicherung des besten Binders innerhalb der dynamischen Bibliothek führt jedoch zu einem Anstieg der Konzentration dessen und hilft somit diese Spezies zu identifizieren. Um eine effiziente Analyse des dynamischen Prozesses zu gewährleisten, hat sich die Kombination aus HPLC und Massenspektrometrie bewährt. Auf diese Weise ist es möglich, durch gezielte Probeentnahme zu einem beliebigen Zeitpunkt die Zusammensetzung der dynamischen Bibliothek aufzulösen und nachzuweisen.

### 2.3 Dynamische Schwefelchemie

Neben den zuvor in Kapitel 2.2.1 (Abb. 3) aufgeführten reversiblen Reaktionen sind vor allem Schwefelverbindungen aufgrund ihrer Reaktivität und der Vielfalt an möglichen reversiblen Reaktionen von großem Interesse und grundlegend für das hier vorgestellte Design eines dynamischen Systems. Die dynamische Schwefelchemie stellt eine wichtige Unterkategorie der dynamischen kombinatorischen Chemie dar. Der große Vorteil an Verbindungen, die Schwefelatome beinhalten, ist ihre Kompatibilität und Stabilität gegenüber anderen funktionellen Gruppen sowie vielen biologischen Systemen.<sup>[40]</sup> Seit den Anfängen der dynamischen kombinatorischen Chemie Mitte der 90er Jahre wurde die dynamische Schwefelchemie immer bedeutender für die Generierung dynamischer Systeme unter milden biologischen Bedingungen.<sup>[41]</sup> Der Grund hierfür ist neben dem Vorkommen des Schwefels in Proteinen und der Beteiligung an wichtigen biochemischen Prozessen im Metabolismus die große Bandbreite an reversiblen Reaktionen, die Schwefel zur Ausbildung von dynamischen Systemen zur Verfügung stellt (Abb. 5). Die Vielfalt der Reaktionen reicht von dem Thiol-Disulfid-Austausch, der

Disulfidmetathese, dem Thiol-Thioester-Austausch, dem Thioacetal-Austausch bis hin zu dem Hemithioacetal-Austausch und den konjugierten Additionsreaktionen.<sup>[42–44]</sup>

Diese Reaktionen wurden bis zum heutigen Tage erfolgreich an unterschiedlichen Systemen getestet und decken eine große Bandbreite an Anwendungen ab.<sup>[45]</sup>



**Abb. 5:** Darstellung der auf Schwefel basierenden, reversiblen Reaktionen, die bis heute untersucht worden sind.

### 2.3.1 Thiol-Thioester-Austausch

Die Allgegenwärtigkeit des Thiols in biologischen Systemen unterstreicht die Wichtigkeit und Bedeutung dieser Spezies für den Ursprung allen Lebens. Es wird davon ausgegangen, dass diese Verbindungsklasse eine wichtige Rolle im frühen Metabolismus als chemisches Energiereservoir gespielt hat.<sup>[46]</sup> Ein Beispiel für den synthetischen Nutzen des Thiol-Thioester-Austausches ist ihre Rolle in dem ersten Schritt der *Native Chemical Ligation* (NCL).<sup>[47]</sup> Bei der NCL wird ein Peptid aus einem kleineren Fragment mit einem C-terminalen Thioester und einem weiteren Fragment mit einem N-terminalen Cystein-Rest geknüpft und durch die darauffolgende S-N Acyl-Umlagerung das natürliche Peptidrückgrat generiert. Dank des Thiol-Thioester-Austausches können

auf diese Weise unterschiedliche Peptidfragmente effektiv ligiert werden. Als eine Reaktion, die reversibel in Wasser unter biologisch relevanten pH-Bedingungen ablaufen kann, hat der Thiol-Thioester-Austausch außerdem das große Potenzial unter Beteiligung von Bio-Oligomeren in selbstorganisierenden Prozessen eingesetzt zu werden.<sup>[48-51]</sup>

Der Thiol-Thioester-Austausch bezieht sich auf die Reaktion der Umesterung und weist gute reversible Eigenschaften auf, die es zulassen, schnelle und ausreichend stabile DCLs zu generieren. Im Kontrast zu der Standard-Umesterung, die meist unter sehr harschen Bedingungen im organischen Medium abläuft, verlaufen die Reaktionen des Schwefel-Analogons unter milden, leicht basischen Bedingungen in wässrigem Medium. Dieser Reaktionstyp ist auch relativ kompatibel mit vielen üblichen Target-Proteinen, da auftretende Nebenreaktionen wesentlich langsamer verlaufen und somit die Thioester DCLs mit einfachen Mitteln rapide zu größeren Bibliotheken ausgeweitet werden können.<sup>[52]</sup> Somit ist der Thiol-Thioester-Austausch gerade für biologische Systeme sehr gut geeignet und wurde bereits effizient und erfolgreich in vielen dynamischen Systemen integriert.<sup>[53]</sup> Des Weiteren bietet dieser eine gute Alternative zu der weitverbreiteten dynamischen Disulfidchemie, deren Umsetzung für die Oligonukleotid-Synthese an fester Phase wesentlich umständlicher ist. Mechanistisch beschreibt der Thiol-Thioester-Austausch eine basenkatalysierte Reaktion eines Thiol-Nukleophils mit einem Thioester-Derivat.<sup>[54]</sup> Verläuft der reversible Austausch im wässrigen Medium, ist die Hydrolyse des Thioesters eine störende Nebenreaktion, die unvermeidbar ist und eine Weiterreaktion des Thioesters verhindert (Abb. 6). Dabei ist das Maß des Thiol-Thioester-Austausches und der Hydrolyse von Reaktionsbedingungen wie Temperatur, pH-Wert und dem  $pK_a$ -Wert des Thiols abhängig.<sup>[49,54]</sup> Bei angepassten und gut gewählten Bedingungen kann die Thiol-Thioester-Austauschrate die der Hydrolyse um mehrere Größenordnungen übertreffen und dadurch kontrolliert minimiert werden.