

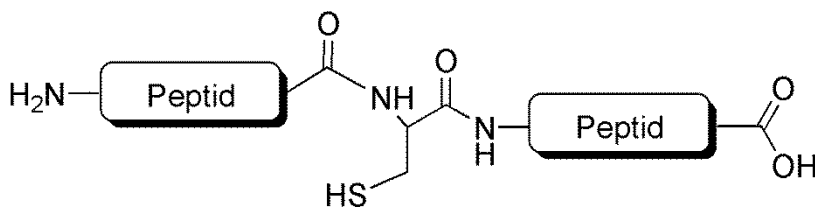
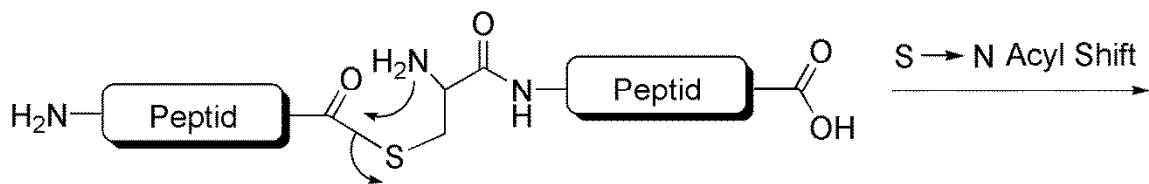
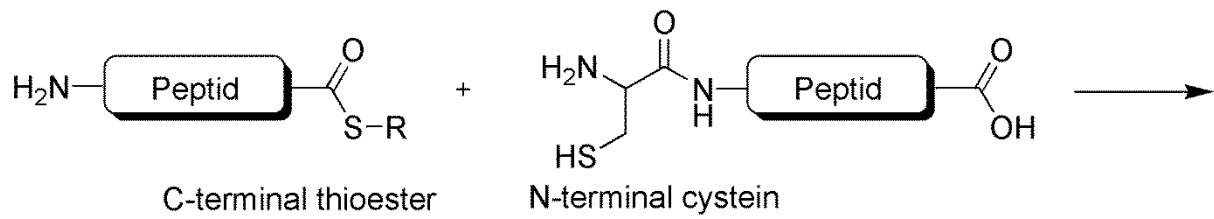
Zusatzskripte OC III

Bioorganische Chemie

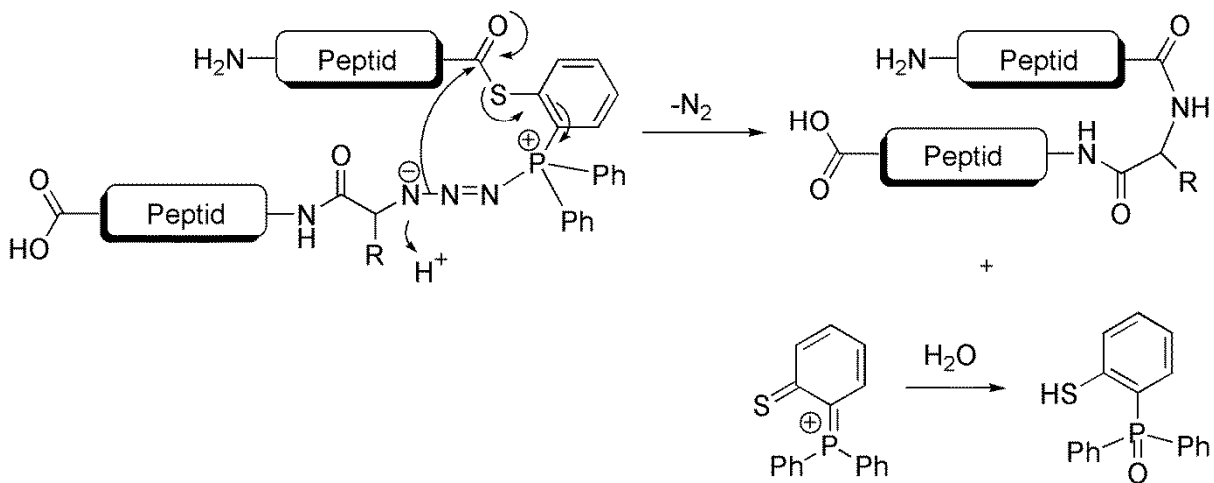
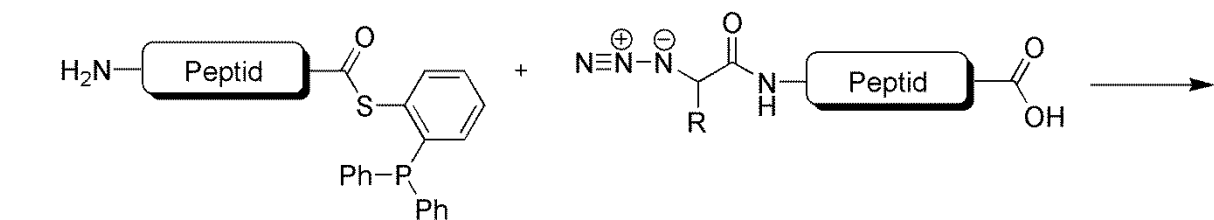
- **Bioorthogonale Reaktionen**
 - Chemische Ligation
 - Click-Reaktionen
- **Cyclohexan**
- **Der gauche Effekt**
- **Meso Verbindungen**
- **Zimmermann-Traxler Modell**
- **Moderne Methoden**
 - Polymerase Kettenreaktion
 - Aptamere
 - FRET-Sonden
 - DNA-Chips
- **Molekulare Erkennung von DNA**

Chemical Ligations:

Native / "Expressed" chemical ligation:



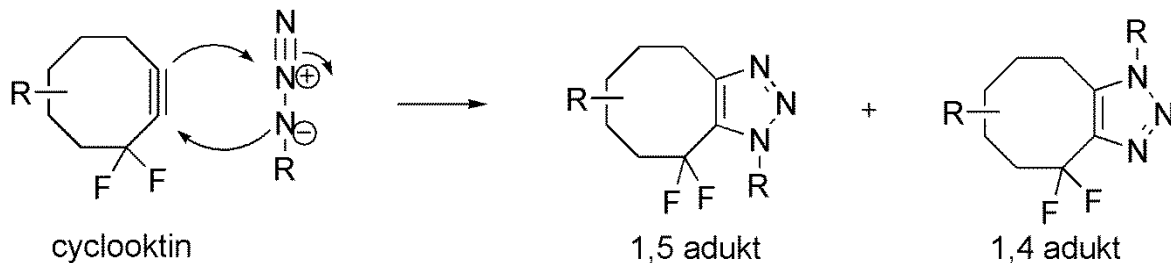
Staudinger ligation:



Click reactions:

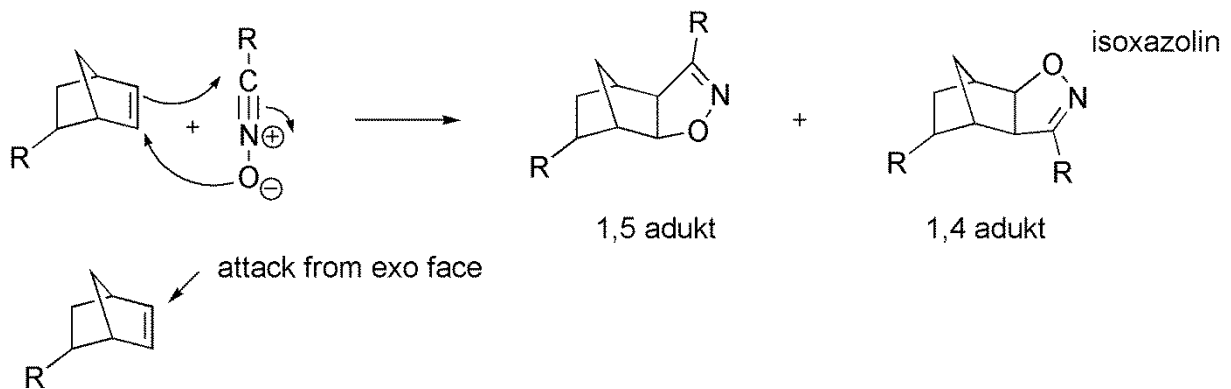
Cu-free cycloadditions (1,3-dipolar cycloadditions):

[2_s+4_s] cycloadditions where 2 π-electrons of the dipolarophile and 4 electrons of the dipolar compound participate in a concerted, pericyclic reaction.

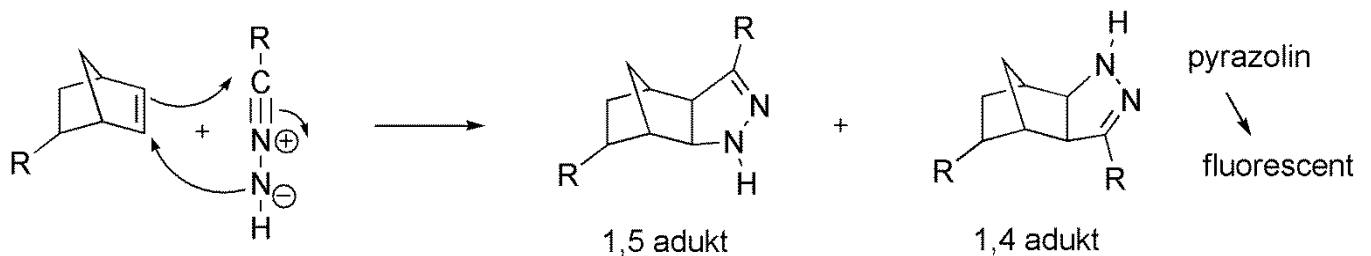


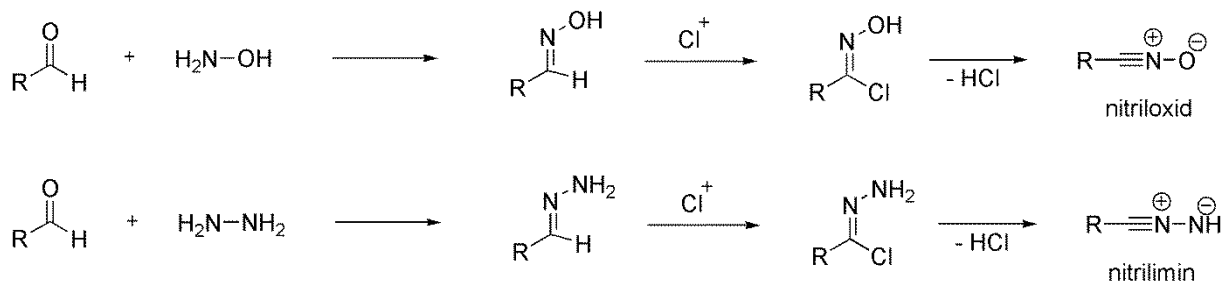
Norbornene as Dipolarophils:

Nitriloxide



Nitrilimine

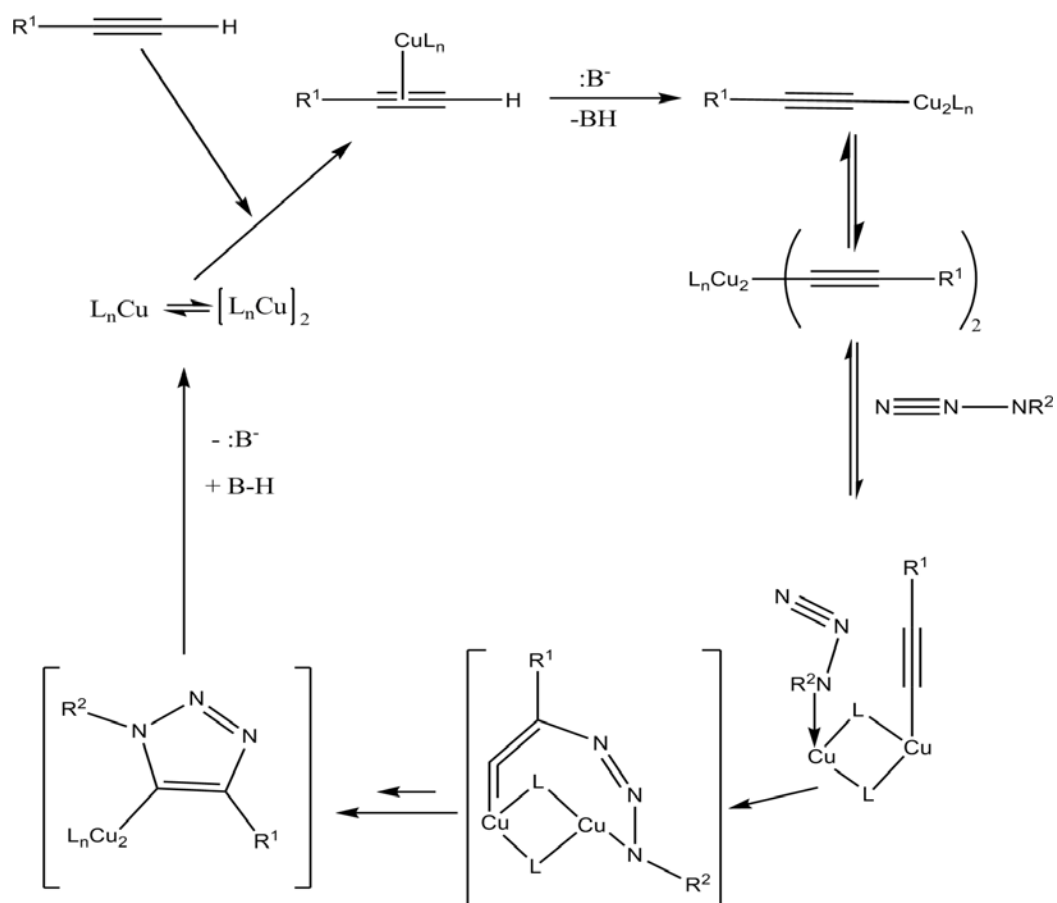




Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC):

Mechanism:

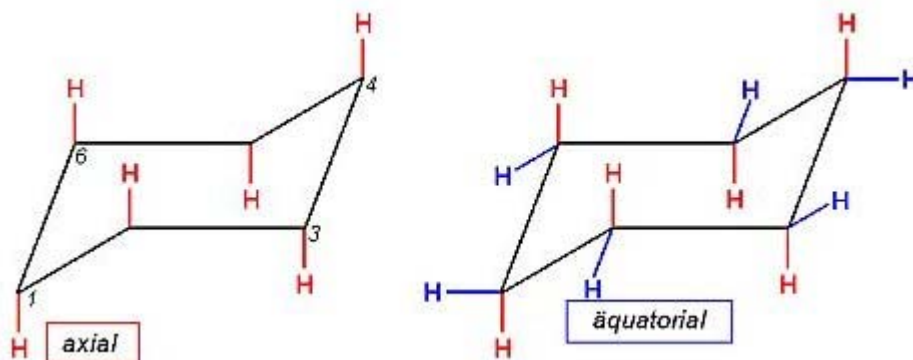
No longer a concerted cycloaddition but a stepwise process. 1,4-isomer of 1,2,3-triazoles is formed as the only regioisomer.



Im Cyclohexan (C_6H_{12}) findet man die erste spannungsfreie Ringstruktur in der Gruppe der [Cycloalkane](#). Ein Cyclohexanmolekül kann in verschiedenen Konformationen vorliegen, wobei die **Sesselform** als einzige Konformation tatsächlich spannungsfrei ist.

Die Orbitale der Kohlenstoffatome sind sp^3 -hybridisiert. Alle C-C-Winkel entsprechen in der Sesselform mit 111° fast dem Tetraederwinkel ($109,5^\circ$). Auch die gebundenen Wasserstoffatome stehen im "Cyclohexansessel" in gestaffelter Konformation und nicht wie beim Cyclopropan und Cyclobutan verdeckt in Reihe. Hierdurch wird ebenfalls eine Ringspannung vermieden.

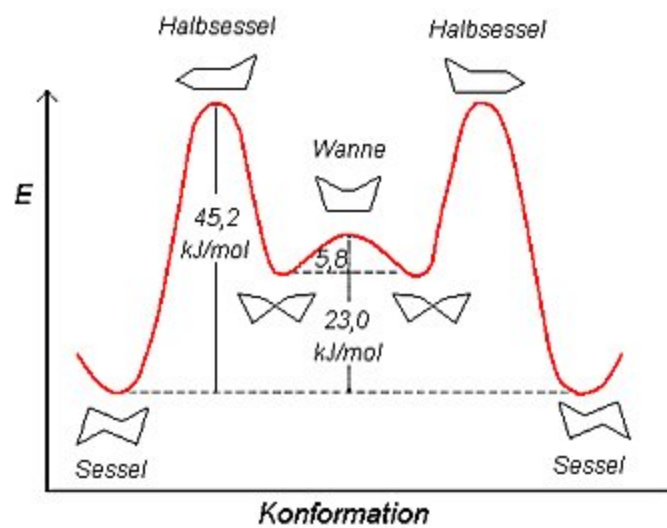
Das Zeichnen eines Cyclohexanmoleküls scheint nach all diesen Angaben sehr kompliziert. Am besten beginnt man mit zwei parallelen Linien. Dann malt man die Spitzen - eine nach oben, eine nach unten. Alle gegenüberliegenden Seiten sind paarweise parallel. Dann malt man an jedes C-Atom ein H-Atom mit einem Bindungsstrich, der senkrecht nach unten bzw. nach oben zeigt. Wir haben dabei im Blick, dass sich an den C-Atomen wegen der sp^3 -Orbitale Tetraeder-Konfiguration einstellen muss. Deshalb zeichnen wir noch die anderen sechs H-Atome entsprechend ein - schräg nach oben oder schräg nach unten.



6 H-Atome (rot gezeichnet) stehen senkrecht zur Molekülachse und werden deshalb als **axial** bezeichnet. Die anderen 6 H-Atome (blau gezeichnet) liegen in der Molekülebene und werden deshalb auch **äquatorial** genannt.

Neben der Sesselform besitzt das Cyclohexan weitere, weniger stabile Konformationen. In der **Boot- oder Wannenform** stehen das C1- und das C4-Atom aus der Ebene des Ringes in eine gemeinsame Richtung heraus. Hierbei können sich allerdings die Wasserstoffatome ins Gehege kommen, da sie sich räumlich annähern. Das führt zu einer Steigerung des Energieinhalts - wie das folgende Diagramm zeigt. Dazu gibt es noch zwei **Halbsessel** mit erzwungener Planarität sowie zwei **verdrehte Formen**.

Die Energiebarrieren zur Umwandlung von einer Konformation in eine andere sind so gering ($45,5$ kJ/mol), dass schon bei Zimmertemperatur die Umwandlung von einer Sesselform in die andere mit der unglaublichen Zahl von ca. **100 000 Mal pro Sekunde** stattfindet. Die Moleküle schwingen also förmlich.

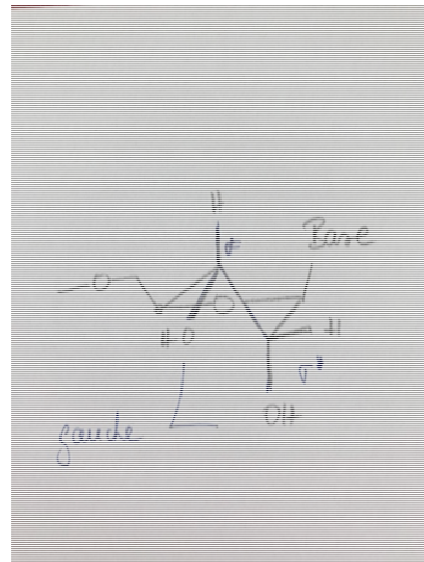
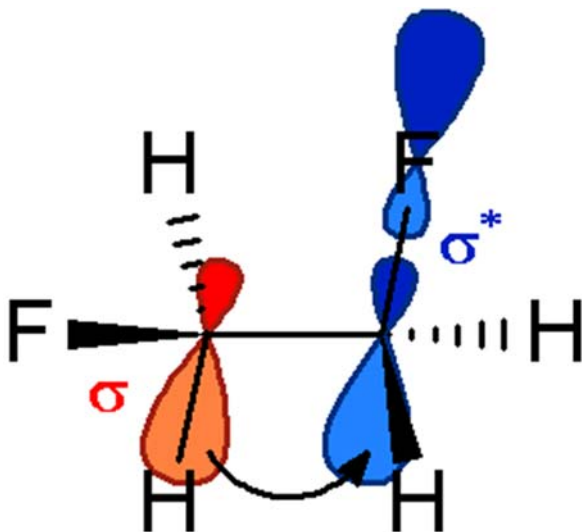


Der gauche Effekt

Liegen zwei Substituenten mit großem sterischen Anspruch (also einer großen räumlichen Ausdehnung) an benachbarten C-Atomen vor, so ordnen sie sich bevorzugt antiperiplanar an. Um dies deutlich darzustellen wird die [Newman-Projektion](#) verwendet.

Bei bestimmten Verbindungen ist dagegen eine synclinale (auch gauche) Anordnung der Substituenten bevorzugt. Dies tritt vor allen Dingen dann auf, wenn Substituenten mit hoher Elektronegativität und damit einer starken σ^* -Akzeptorbinding beteiligt sind.

So liegt 1,2-Difluorethan immer in der synclinalen oder (gauche)-Anordnung vor. Die größte Überlappung zwischen einem elektronisch hoch-liegendem σ -Orbital (C-H) und einem elektronisch tiefliegenden σ^* -Orbital (C-F) liegt bei einer antiperiplanaren Anordnung der Bindungen vor (siehe Abb. 1). Da die C-F Bindung ein sehr guter Akzeptor ist, ist die antiperiplanare Anordnung zu besseren C-H-Donorbindung wesentlich günstiger. Die beiden Fluor-Atome ordnen sich dementsprechend synclinal an.



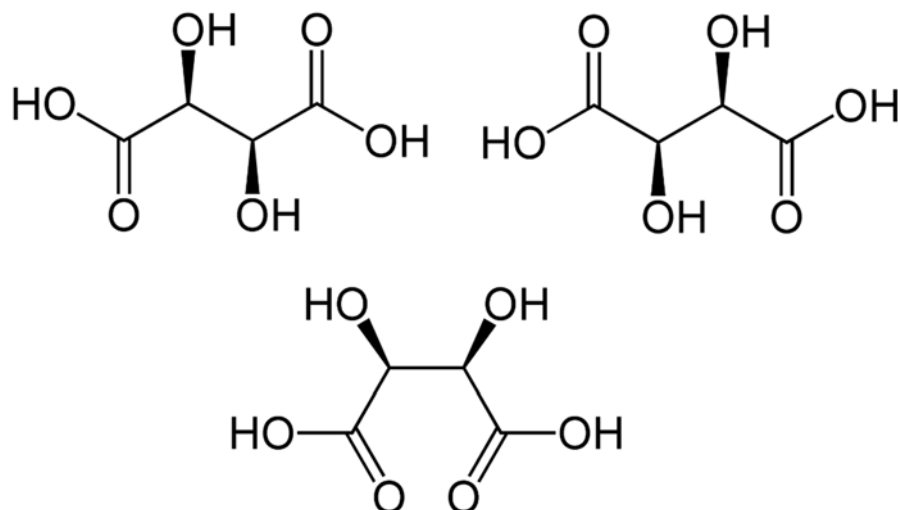
Dieser gauche-Effekt zwingt die Ribose in die C3'endo Konformation.

Meso-Verbindungen

Meso-Verbindung ist ein Begriff aus der Stereochemie und bezeichnet den Sonderfall eines Moleküls, das Stereozentren besitzt, aber dennoch achiral ist.^[1] Die genaue Definition lautet „*meso-Formen haben zwei (oder mehr geradzahlige) stereogene Zentren; und sie können in mindestens einer Konformation vorliegen, die eine C_s -Symmetrie hat (Drehspiegelachse oder Spiegelebene oder Punktsymmetrie).*“

Das Präfix *meso-* wird der Definition entsprechend auch als Deskriptor in halbsystematischen Substanznamen verwendet.

Obwohl die Präsenz von Stereozentren (z. B. asymmetrisch substituiertes Kohlenstoffatom) eine häufige Ursache für die Chiralität eines Moleküls ist, muss dies nicht zwingend der Fall sein: Verfügt das Molekül trotzdem in einer energetisch möglichen Konformation über eine Spiegelebene (oder Drehspiegelachse) verhält es sich makroskopisch wie eine achirale Verbindung. Die *meso*-Weinsäure enthält zwei Stereozentren entgegengesetzter Konfiguration mit den gleichen Substituenten an jedem Stereozentrum:

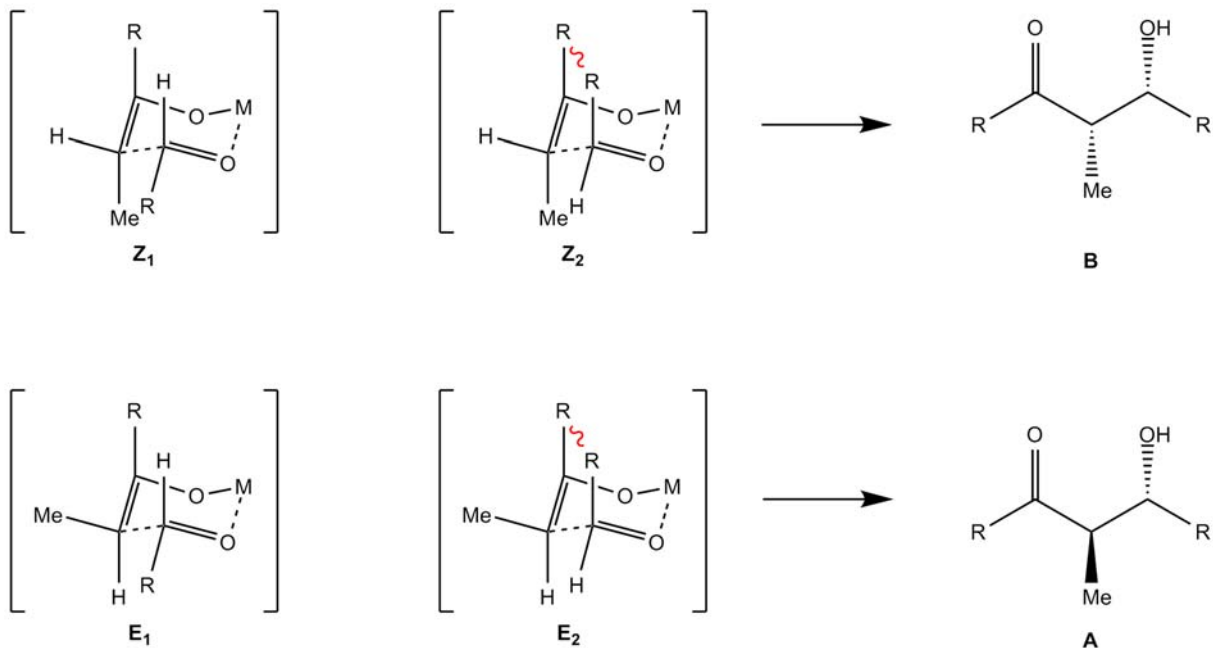


Es sind alle drei Isomere dargestellt, mehr gibt es nicht. Oben stehen die (S,S)- und die (R,R)-Form. Diese Isomere sind chiral und verhalten sich wie Gegenstand und Spiegelbild; sind also enantiomer zueinander. Die unten abgebildete *meso*-Form besitzt eine intramolekulare Symmetrieebene zwischen den Kohlenstoffatomen 2 und 3, sie ist somit achiral. Insgesamt gibt es also nur drei Isomere der Weinsäure, die beiden Enantiomere und die *meso*-Form. In der *meso*-Form ist eines der Stereozentren (R)- das andere (S)-konfiguriert.

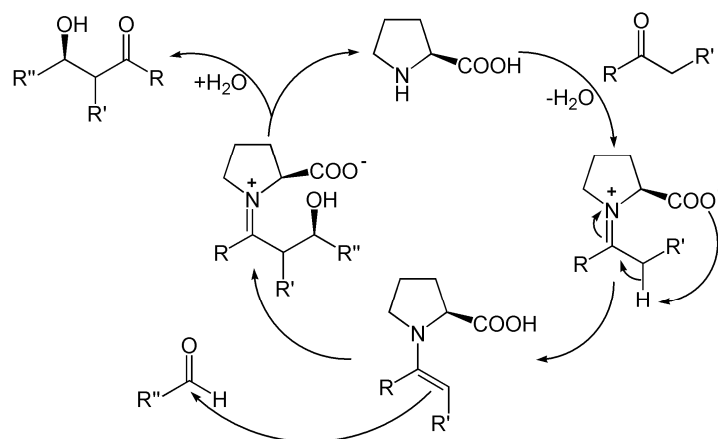
Zimmermann-Traxler Modell

Das Zimmermann-Traxler Modell erläutert wie der Übergangszustand einer Aldolreaktion aussieht. Entscheidend für die Diastereo-Selektivität ist ob ein E- oder Z-Enolat in die Reaktion eingesetzt wird. Für die gezielte Erzeugung gibt es unterschiedliche Methoden.

Für eine etwaige Enantioselektivität benötigt man einen chiralen Katalysator, der den Übergangszustand komplexiert oder ein chirales Auxilliär. Diese chiralen Substanzen regeln aus welchem Halbraum heraus sich die Carbonylverbindung dem Enolat nähert.



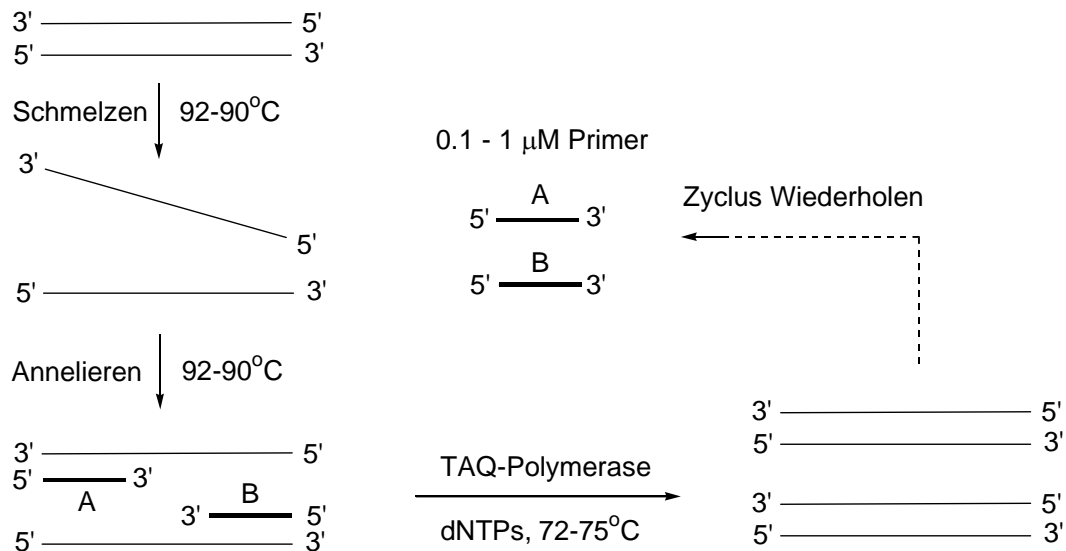
So kann man die Carbonylverbindung mit Prolin umsetzen. Man erhält ein chirales Iminiumion, welches die Halbraumannäherung durch Vorkomplexierung der Carbonylverbindung steuert. So erfolgt die Annäherung so, dass die C=O Gruppe mit der -COOH Gruppe des Prolins wechselwirken kann.



3. Moderne Methoden

3.1 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist wohl die wichtigste neue molekularbiologische Methode der letzten 10 Jahre. Heute ist die PCR eine fundamentale Technik mit ständig neuen Anwendungen. Zentral für die PCR ist die Wechselwirkung von Polymerasen mit DNA. Die Details dieser Wechselwirkung, vor allem deren Abhängigkeiten von: Puffer, Temperatur oder Primersequenz sind leider bis heute nur unvollständig verstanden. Die Ausarbeitung der richtigen Reaktionsbedingungen ist daher schwierig und mit viel *trial and error* verbunden.



Im PCR Protokoll wird zunächst ein Doppelstrang aufgeschmolzen. In Gegenwart einer großen Menge an passenden Primersträngen wird die Reaktionslösung langsam abgekühlt. Bedingt durch die sehr hohe Primärkonzentration wird eine Annelierung der DNA-Stränge mit den Primersträngen erreicht. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf ca. 72°C erhitzt. Das ist die optimale Arbeitstemperatur für die thermostabilen Polymerasen (TAQ-Polymerase). Die Primerstränge werden von der Polymerase mit Hilfe der Triphosphate verlängert. Man hat so die Menge an DNA verdoppelt. Der Zyklus beginnt nun von vorne. Insgesamt wird so ein exponentielles Wachstum (Vermehrung) der DNA erreicht. Die replizierte DNA nennt man Amplikon.

In die PCR kann auch eine Mischung verschiedener DNA-Stränge eingesetzt werden. Durch die Wahl der Primärsequenzen kann so aus einem solchen DNA-Mix die gewünschte Sequenz herausvervielfältigt werden. Die Basis ist die hochselektive Vermehrung der von den Primersträngen erkannten DNA-Stränge.

Eine Vermehrung ist bis maximal ca. 10-100 nM möglich, ab dann tritt oft Zersetzung der Polymerase ein, die ständig zwischen den verschiedenen z.T. hohen Temperaturen rezykliert wird. Gleichzeitig nimmt die Primärkonzentration ab, so dass die Konkurrenzreaktion, nämlich die Bildung von Doppelsträngen stärker in den Vordergrund tritt.

Was kann heute mit PCR erreicht werden:

1. Mit PCR können sehr kleine DNA-Mengen (1 Molekül reicht) gereinigt und vermehrt werden
2. Für die Vermehrung ist nur ein partielles Wissen der Gesamtsequenz notwendig.
3. Die Technik ist sehr schnelle. Thermostabile Polymerasen und Temperaturzykler sind kommerziell erhältlich.
4. Die Anwendung der PCR auf cDNA Bibliotheken ermöglicht Genexpressionstudien. Reverse Transkription und PCR lassen sich miteinander koppeln. Dies gelingt z. B. mit Polymerasen die auch RT-Aktivität besitzen.
5. Mit PCR lässt sich die Menge einer bestimmten mRNA im Cytoplasma ermitteln. Hierzu ist es notwendig die sogenannte *copy number* zu bestimmen. Das ist die Zahl der durchgeführten Amplifikationsschritte.

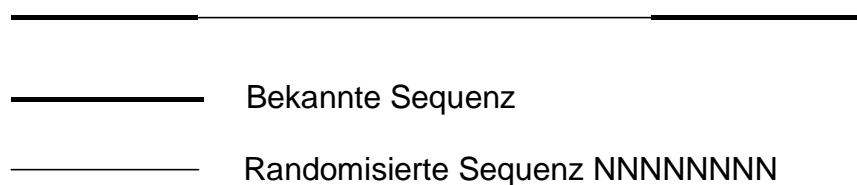
3.2 Anwendung der PCR in der *in vitro* random selection

Das Design von Biomolekülen mit definierten Strukturen und Funktionen ist bis heute ein unerreichtes Ziel. Wir verstehen weder die Proteinfaltung noch die katalytischen Funktionen vieler Biomoleküle. Statt eines rationalen Design wurden in den letzten Jahren vor allem evolutive Methoden in die Chemie eingeführt. Diese Methoden erlauben die Herstellung einer großen Zahl unterschiedlicher Moleküle auf einen Streich. Aus diesem Molekülpool, man spricht auch von einer Molekülbibliothek, werden dann die Moleküle mit den gewünschten Eigenschaften durch gezielte Vermehrung herausisoliert. Moleküle konkurrieren also miteinander. Diejenigen, die die Aufgabe am Besten erfüllen werden herausvermehrt, d.h. selektioniert. Die

besten Moleküle werden vermehrt und erneut einer Selektion, jetzt unter verschärften Bedingungen unterzogen. Nur die besten werden erneut gezielt vermehrt. Dieser evolutive Prozess wird z. T. bis zu 10 mal wiederholt. Am Ende werden maßgeschneiderte Moleküle erhalten. Evolutive Methoden gelingen natürlich nur mit Molekülen wie DNA oder RNA, die mit Hilfe der PCR vermehrbar sind.

Seit der Entdeckung katalytisch aktiver RNA, also von RNA, die in spezifische dreidimensionale Formen faltet und ähnlich einem Protein Reaktionen katalysieren kann, ist vor allem die Selektion neuer Enzyme auf RNA und DNA Basis, sogenannte Robozyme in den Fordergrund der Forschung gerückt. DNA und RNA Moleküle können auch, ähnlich Antikörpern hochspezifisch kleine Moleküle oder Proteine molekular binden. Ein zweites Ziel der evolutiven Methoden ist die Erzeugung hochspezifischer Rezeptoren auf DNA oder RNA Basis, die zum Beispiel medizinisch relevante Proteine (*Targets*) binden können. Diese Rezeptoren nennt man Aptamere. Das Verfahren der Aptamerentwicklung nennt sich SELEX = *systematic evolution of ligands by experimental enrichment*.

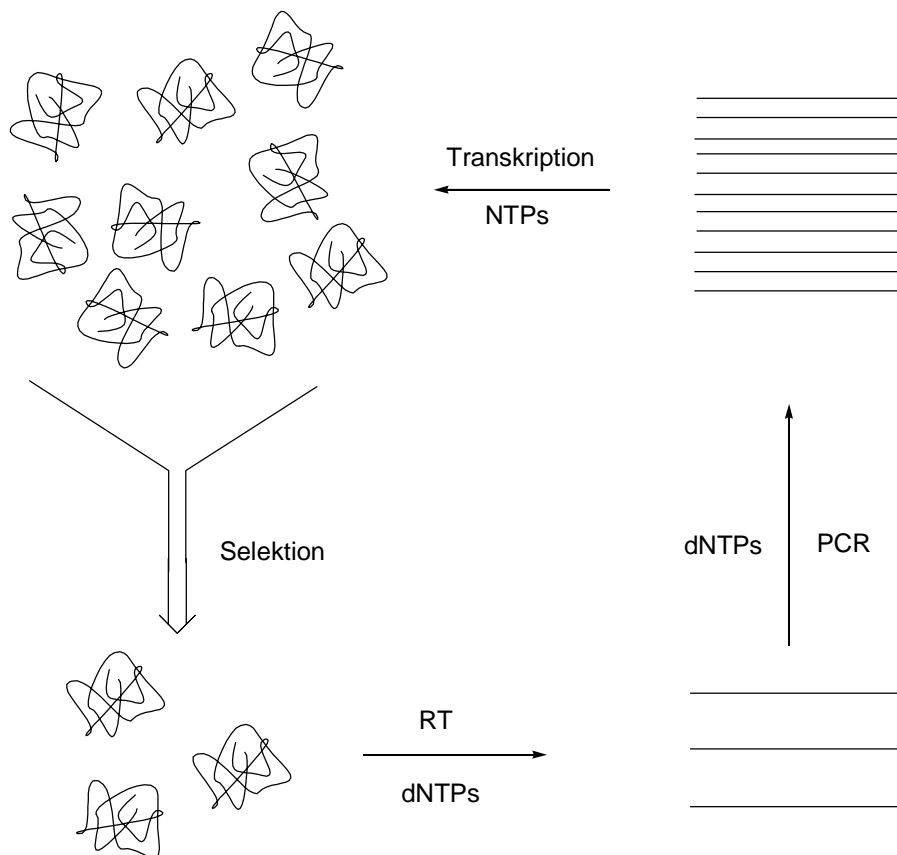
Der erste Schritt beinhaltet die Erzeugung einer Bibliothek, hierzu wird ein DNA-Synthesizer angewiesen nicht ein Nukleotid zu kuppeln, sondern eine Mischung aus allen vier Phosphoramiditbausteinen. Die randomisierte Sequenz wird in der Mitte zwischen bekannten Sequenzen hergestellt, die für die Primererkennung notwendig sind.



Anschließend wird die Mischung aus bis zu 10^{15} – 10^{16} „Individuen“ z. B. auf eine Affinitätssäule gegeben. (Eine Säule die mit einem Material gefüllt ist, an das kovalent das zu bindende Molekül angeknüpft ist) Die Mischung läuft durch die Säule. Die Moleküle, die die angeknüpfte Substanz binden, werden leicht zurückgehalten. Der letzte Rest, der von der Säule gespült wird, wird aufgefangen und durch PCR vermehrt. Man erhält einen ersten angereicherten Pool an Substanzen. Dieser Pool wird erneut über die Affinitätssäule einer Selektion unterzogen. Hierbei können die Selektionskriterien verschärft werden, in dem z. B.

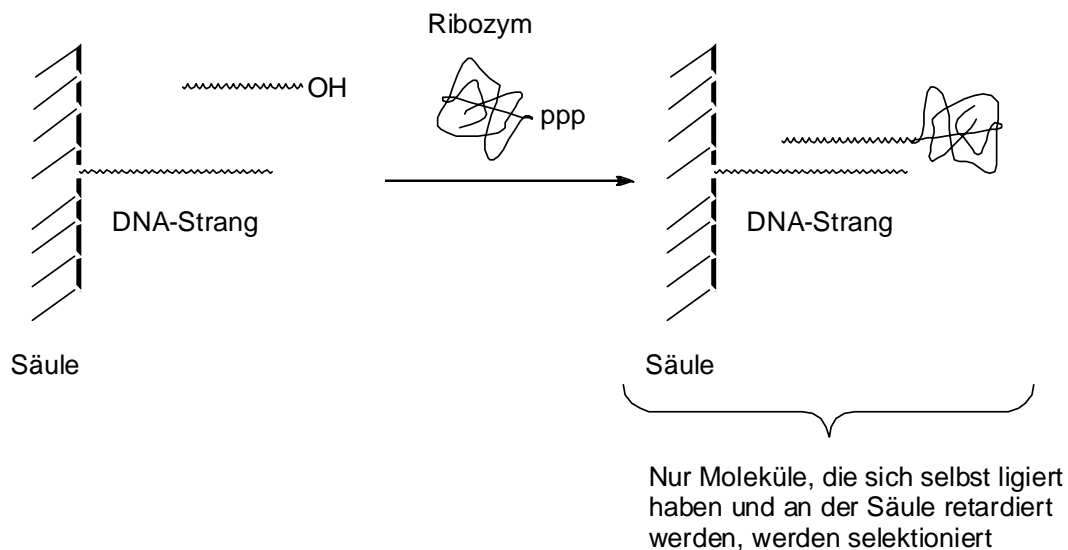
der Lösung mehr Salz zugesetzt wird, was die Bindung schwächt. Nur die stärksten, aktivsten DNA oder RNA Moleküle werden so isoliert und gezielt vermehrt.

Verwendet man RNA, so muss diese Natürlich vor der Vermehrung in DNA umgeschrieben werden. Hierzu sind die Reversen Transkriptasen notwendig. Ganz am Ende, wenn keine weitere Aktivitätssteigerung mehr erreicht wird, wird die RNA in eine cDNA umgeschrieben und sequenziert. Erst dann ist die Sequenz des Gewinners bekannt.



Neben der Selektion von DNA oder RNA Molekülen, die kleine organische Moleküle oder Proteine binden, können auch Oligonukleotide generiert werden, die katalytische Funktionen besitzen. Unten z. B. ein Selektionsschema, das es gestattet Oligonukleotide mit selbstmodifizierenden Eigenschaften zu generieren. Im unteren Beispiel werden aus einer RNA-Bibliothek nur die Moleküle herausgefiltert, die schaffen sich mit dem in Lösung angebotenen komplementären DNA, oder RNA Strang zu ligieren. Diese RNA Moleküle werden mit dem an der Säule befindlichen Oligonukleotid hybridisieren und so zurückgehalten.

RNA-Bibliothek mit selbstligierender RNA



In diesem Beispiel wurden schon nach nur 3 Runden aktive RNA Moleküle isoliert.

Ein besonderer Trick ist es, die Oligonukleotide, die in den Runden isoliert werden während der Amplifikation erneut leicht zu verändern. So kann der Pool an aktiven Verbindungen nachrandomisiert werden. Das gelingt mit Hilfe der mutagenen PCR. Hier werden die PCR Bedingungen so eingestellt, dass die Polymerase während des Kopiervorganges Fehler macht. Die Fehlerrate z. B. 1 pro 20 Basenpaare kann durch die Wahl der Bedingungen eingestellt werden. Im obigen Beispiel wurde nach jeder Runde der Selektionsdruck, durch Verkürzung der Ligationszeiten erhöht.

Was bringt die Nachrandomisierung?

Die komplette Randomisierung eines 220meren Oligonukleotid würde 10^{132} Varianten (4^{220}) ergeben. Diese Zahl ist nicht realisierbar, da man Tonnen an RNA bräuchte um von jeder möglichen Variante eine Spezies vorliegen zu haben. Man kann „nur“ 10^{15} „Individuen“ produzieren. Aus diesem limitierten Pool werden die aktivsten isoliert, dann werden die aktivsten durch mutagene PCR erneut leicht verändert. Man sagt, der Pool evolviert oder man sucht dann in einem lokal begrenzten Sequenzraum.

Diese Art der Auffindung aktiver Oligonukleotide ist vor allem bei Forschern, die sich für Präbiotische Chemie interessieren auf großes Interesse gestoßen. Man geht heute davon aus, dass die ersten Lebensformen auf der Erde kleine selbstreplizierende RNA-Sequenzen waren. Mit der Methode gelingt es nun möglicherweise solche RNA-Moleküle zu erzeugen um sie dann studieren zu

können. Evolution im Reagenzglas könnte uns helfen die Entwicklung des Lebens auf der Erde nachzustellen, so der Traum einiger Forschergruppen.

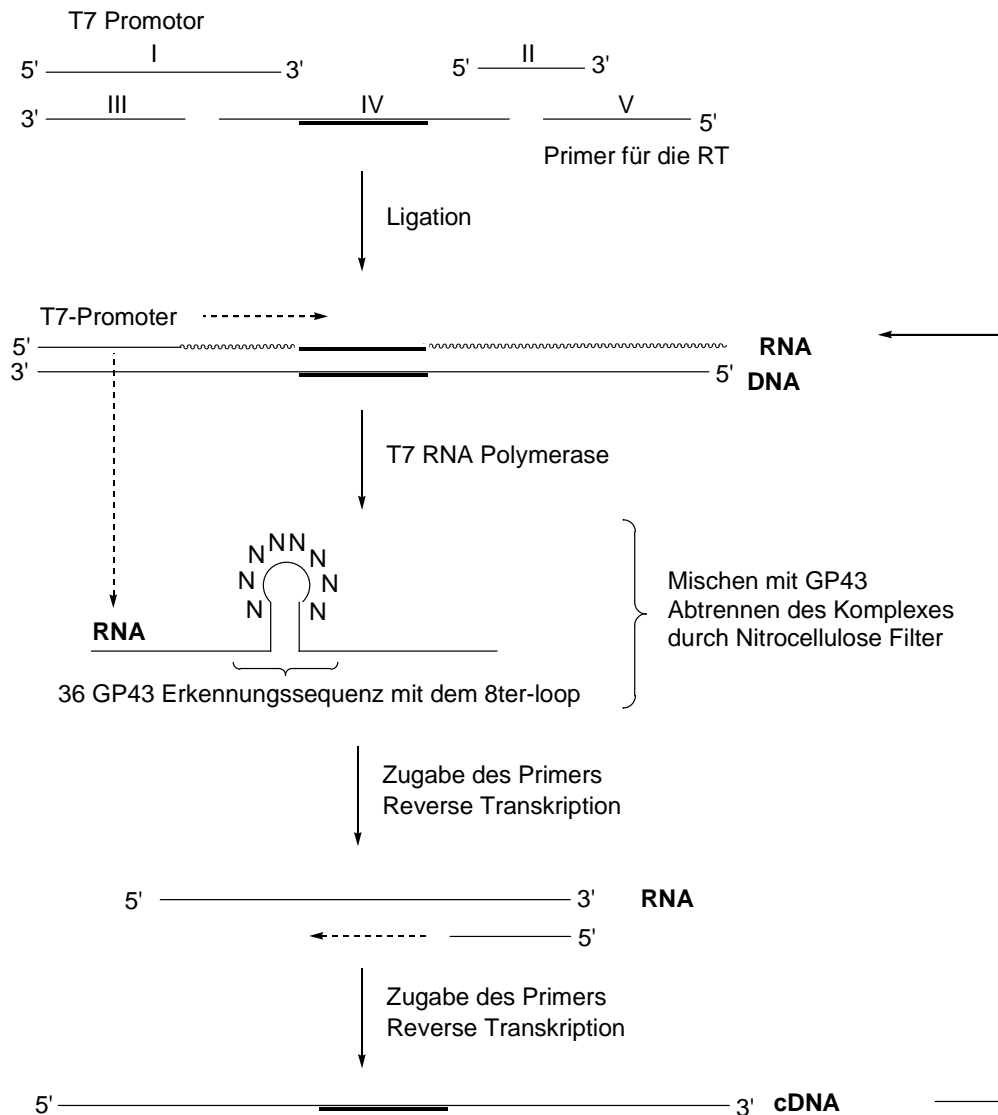
3.2.1 Ein komplizierteres SELEX Beispiel

Isoliert wurde ein Protein mit dem Namen GP43. Es handelt sich um eine T4-DNA Polymerase, die eine *m*-RNA mit einer Haarnadelstruktur erkennt und dann bindet.- Durch diese Bindung wird die Translation am Ribosom gestört. Der Prozess ist eine Autoregulation. Die Bindung der Polymerase an einen 36-Teilbereich der *m*-RNA mit dem 8 Nukleotid enthaltenden Loop ist allerdings nur relativ schwach. Ziel der Forschungsarbeiten ist es ein Motiv zu finden, an das die Polymerase wesentlich stärker bindet. Hierzu sollten evolutive Methoden verwendet werden.

Zuerst wird ein 110mer langes DNA Templat durch Ligation dreier Fragmente (III, IV und V) erzeugt. Das Fragment IV enthält eine randomisierte 8-ter Sequenz innerhalb des 36-mers, das für die Bindung benötigt wird. Das heißt, es wurde eine relativ kleine Bibliothek aus $4^8 = 65'536$ Molekülen erzeugt. Das für die Ligation benötigte Oligonukleotid I enthält den T7-Promotor. Nach der Ligation, wird mit Hilfe des Oligos I und der T7 RNA Polymerase ein 92-mer RNA Stück erzeugt. Nach dem Mischen der Bibliothek mit dem Protein GP43, werden die gebundenen RNAs durch Filtration durch Nitrocellulose abgetrennt (der Komplex bleibt haften). Umschreiben der RNA in cDNA, gelingt nach Zusatz von Oligo V, welches als Primer für die Reverse Transkriptase dient. Dann folgt PCR, umschreiben der cDNA in RNA und erneute Selektion. Schon nach vier Runden wurde eine RNA isoliert die mit $K_d = 5 \times 10^{-9}$ an das Protein bindet. Die Sequenz dieser erzeugten RNA wird nach umschreiben in cDNA durch Dideoxysequenzierung ermittelt (s. u).

Wildtyp: 5'-CAAG-AGCCUAAUAACUCGGGCU-AUAAACUAAGGAAU-3'

Variante: 5'-CAAG-AGCCUAGCAACCUGGGCU-AUAAACUAAGGAAU-3'



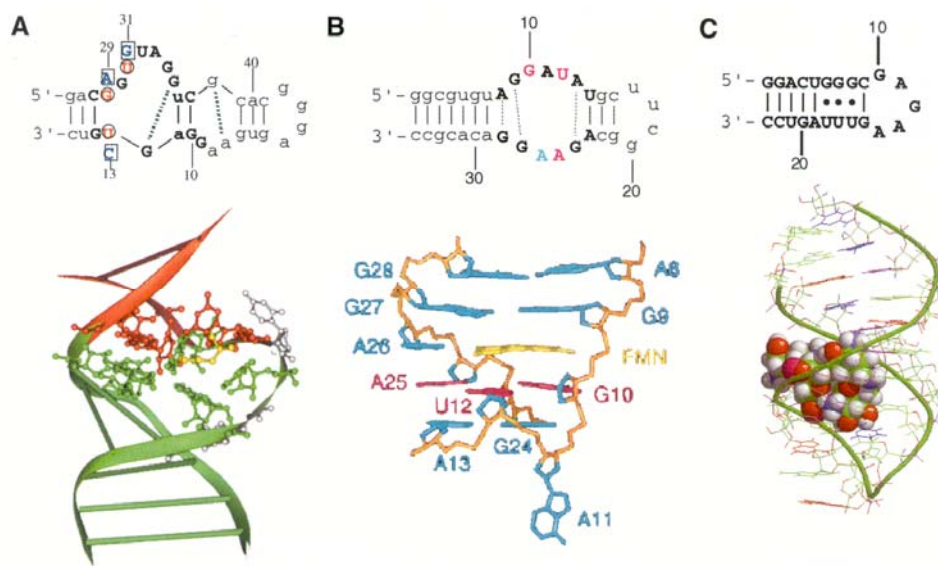
3.3 Aptamere und Intramere

RNA und auch DNA kann ähnlich wie ein Protein in eine definierte dreidimensionale Struktur falten. Im Unteren Bild sind Aptamere dargestellt, die durch das SELEX Verfahren entwickelt wurde. Diese Aptamere erkennen hochspezifisch kleine organische Moleküle wie A: Citrullin, B: Flavinmononucleotid und C: Neomycin B. Die Strukturen der RNAs wurden mit Hilfe der NMR Spektroskopie (B und C) bestimmt.

Heute lassen sich mit Hilfe der SELEX Prozedur RNA-Moleküle generieren, die jedes beliebige Molekül molekular erkennen und hochspezifisch binden. Hierbei wird nicht nur ein RNA Molekül generiert sondern eine ganze Vielzahl. Durch vergleichen der „aktiven“ RNAs erhält man Motive, die für die selektive Bindung verantwortlich sind. Z. B. das Citrullin bindende Aptamer in Abbildung A. Die großgeschriebenen

Buchstaben zeigen Positionen an, die hochkonserviert in allen aktiven, selektierten RNAs gefunden wurden. Variable Positionen werden durch kleingeschriebene Buchstaben repräsentiert. Durch „Mutationsstudien, können die für die Selektivität Arginin vs. Citrullin verantwortlichen Bausteine ermittelt werden. Es sind die roten, eingezirkelten Positionen.

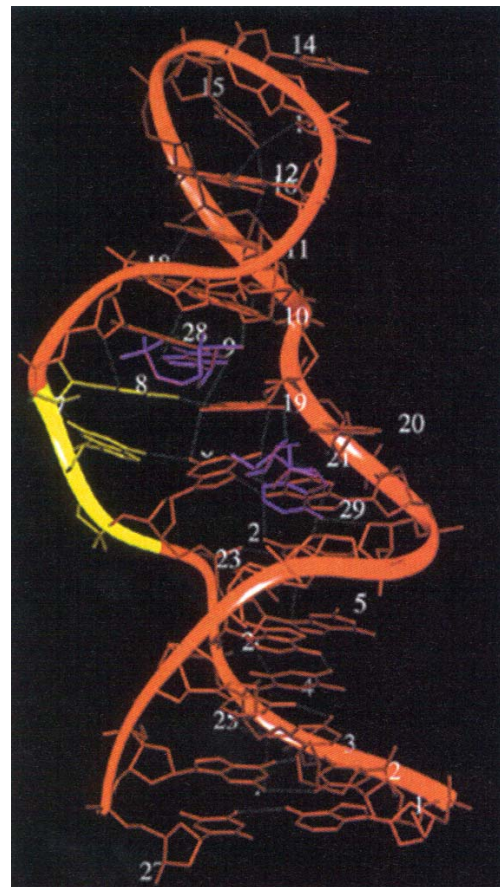
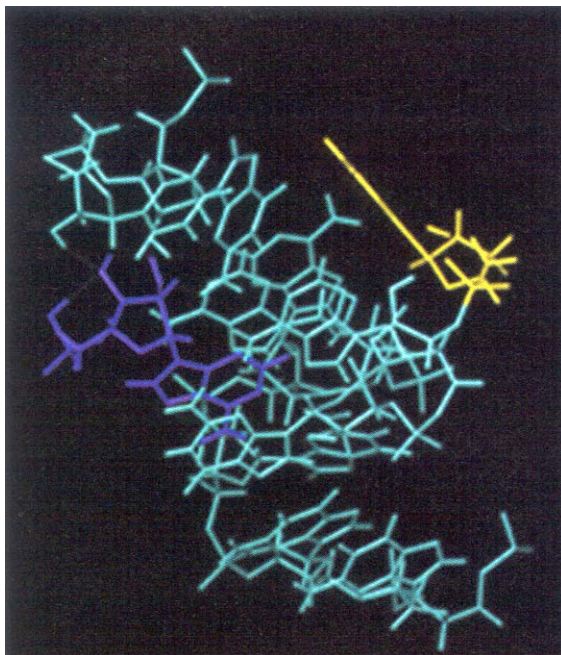
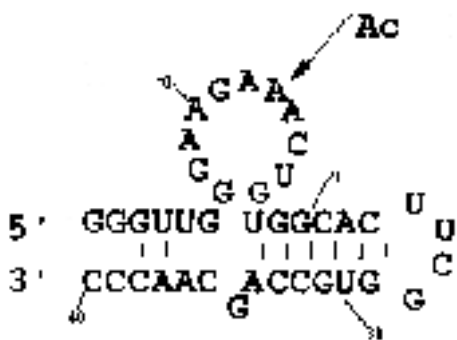
Die Fähigkeit Aptamere zu erzeugen, die hochspezifisch bestimmte Moleküle erkennen können, stößt zunehmend in der Diagnostik auf Interesse. Alle RNA-Moleküle scheinen Ihre Substrate mit Hilfe eines *induced fit* Mechanismus zu binden.



Zurzeit werden vor allem Aptamere selektiert, die ein bestimmtes Protein selektiv binden und dessen Funktion inhibieren. Nach der Bestimmung der bindenden Domänen, können weitere RNA-Sequenzen eingebaut werden die den zellulären Abbau der RNAs in der Zelle behindern. Das ganze RNA Konstrukt wurde anschließend in cDNA umgeschrieben und in eine Zelle transportiert. In der Zelle wird die DNA abgelesen und in die RNA umgeschrieben. Man hat nun die aktive RNA in der Zelle vorliegen. Findet diese ihr Target und bindet, so lässt sich studieren, welche Funktion ein Protein in der lebenden Zelle wirklich hat. Solche in der Zelle aktiven Apatamere nennt man neuerdings Intramere (M. Famulok).

Für den Einsatz von Apatmeren in der Diagnostik wird zurzeit versucht, die bindenden Aptamere mit Fluoreszenzsonden auszustatten. Diese Moleküle fluoreszieren nach der Lichtanregung. Es wird versucht, RNA-Moleküle zu entwickeln, die nach der Bindung des Substrates eine Veränderung der Fluoreszenz

erzeugen. Die Gruppe von A. D. Ellington, hat kürzlich (JACS, 2000, 122, 2469-2473) ein Adenosin bindendes Aptamer mit mehreren verschiedenen Fluoreszenzsonden an verschiedenen Stellen ausgerüstet und die Fluoreszenz vor und nach der Bindung von Adenosin studiert. Tatsächlich zeigte ein RNA-Derivat (APTR-R-Ac13) eine starke Verstärkung der Fluoreszenz nach der Substratbindung. Die Abbildung zeigt die durch NMR ermittelte Struktur des Adenosin-bindenden Aptamers. Das Nukleotid in der blau gekennzeichneten Position wurde durch die Ellington Gruppe durch ein Acridin ersetzt (APTR-R-Ac13).



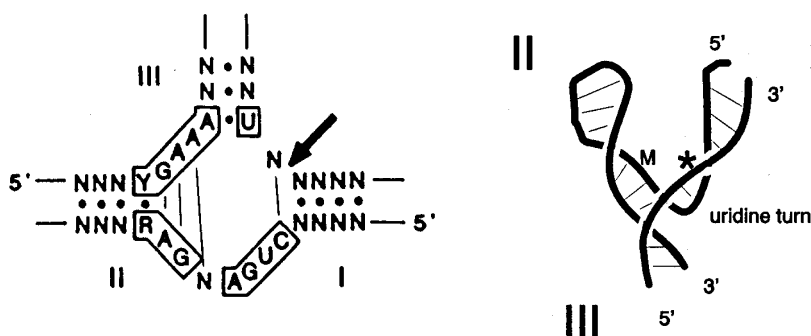
Die an Position 13 Acridin-modifizierte RNA zeigte nach Zugabe von ATP eine Fluoreszenzzunahme von 80%. GTP führt nicht zur Verstärkung der Fluoreszenz (Selektivität). Die Fluoreszenzzunahme im Fall von ATP ist abhängig von der Konzentration an ATP (JACS 2000, 122, 2469).

Die Bindung des ATP an das Aptamer, verändert demnach dessen Struktur (*induced fit*). Da die Fluoreszenz des Acridins stark von dessen Umgebung abhängt, lässt sich diese Strukturänderung als Änderung des Fluoreszenzverhaltens detektieren. Es ist entscheidend, dass der Fluorophor so angebracht wird, dass er die Bindung nicht stört und dennoch maximal von der konformativen Änderung des Aptamers beeinflusst wird.

3.4 Aptamere und Ribozyme

Als Ribozyme wird eine Klasse von RNA-Molekülen bezeichnet, die in der Lage ist die Phosphordiesterbindung in RNA zu spalten. Es handelt sich entweder um ein Intron, das sich selber aus der prä-mRNA herauspleißt oder um freie RNA Moleküle, die RNA-Stränge schneiden. Ein bekanntes Beispiel für ein Ribozym ist das Hammerhead-Ribozym. Beim Hammerhead Ribozym greift die 2'OH-Gruppe die Phosphordiester-Bindung an unter Bildung eines pentakoordinierten Phosphors. Dann findet die Spaltung statt.

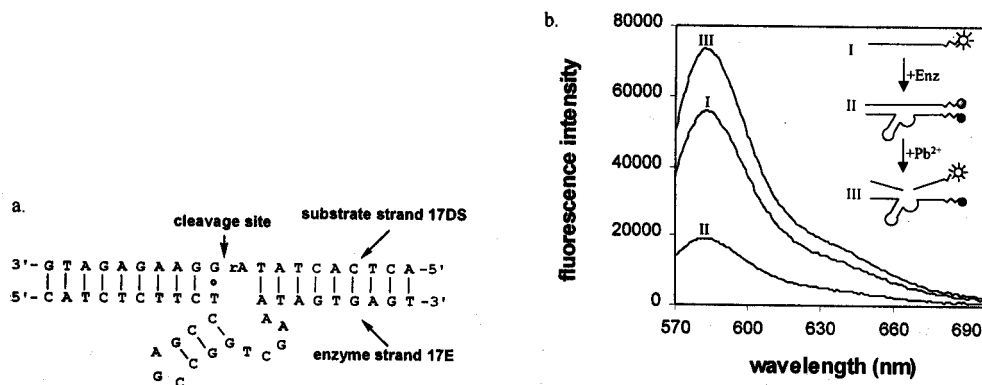
Die Hammerhead-Ribozyme sind in der Regel relativ kleine Y-förmige RNA-Moleküle. Die Basen sind involviert in zum Teil nicht-Watson-Crick artigen H-Brücken. Die Abbildung zeigt ein Hammerhead Ribozym. Indiziert sind die für die katalytische Aktivität essentiellen Positionen. Die Linien in der Abbildung repräsentieren die H-Brücken.



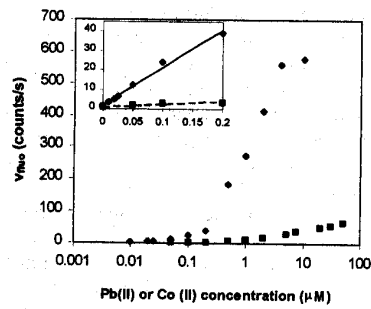
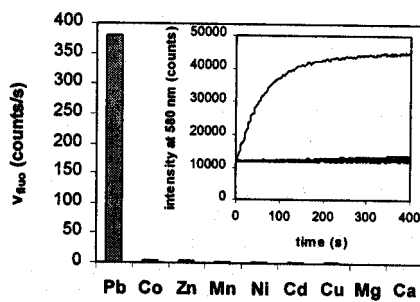
Eine neue Entwicklung ist die Kombination eines Aptamers, das eine kleine Verbindung erkennt mit einem Hammerhead Ribozym. Durch die Konformationsänderung des Aptamers soll die katalytische Funktion des Ribozyms geschaltet werden. Kleine Moleküle modulieren die katalytische Funktion. Das nennt man allosterische Regulation. Das Fernziel ist die Entwicklung von allosterisch geschalteten Intrameren. Man hätte dann zelluläre Schalter mit denen je nach Zellstatus (An- oder Abwesenheit eines bestimmten kleinen Moleküls, die Funktion des Intramers geschaltet werden könnte (Stichwort: Conditionale Mutagenese).

Weitere moderne Entwicklungen:

1. Durch den Einbau unnatürlicher Bausteine in die RNA sollen Verbindungen mit größerer Stabilität erzeugt werden.
2. Ribozyme werden selektioniert, deren katalytische Aktivität durch Metallionen gesteuert wird. Derartige Verbindungen wären Sensoren für z. B. Ca^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} . Ein sehr schönes Beispiel für derartige Arbeiten wurde kürzlich publiziert JACS 2000, 122 (42) 10467.



Es handelt sich um ein DNA-Ribozym, welches sich aus zwei Strängen zusammensetzt. Der erste Strang enthält einen Fluorophor (TAMRA) und einen einzigen RNAs-Baustein, der eine Spaltung erlaubt. Der zweite Strang enthält einen Fluoreszenzlöcher (DABCYL). Liegen beide Stränge im Komplex vor, so wird die Fluoreszenz des TAMRA gelöscht. In Gegenwart von Pb^{2+} , wird die spaltende Aktivität des Ribozyms entfaltet. Der TAMRA enthaltende Strang wird gespalten. Das TAMRA Bruchstück wird freigesetzt. Der Fluorophor beginnt zu fluoreszieren (580 nm). Hochselektiv wird Pb^{2+} von diesem Ribozym erkannt. Das Detektionslimit beträgt ca. 10 nM.

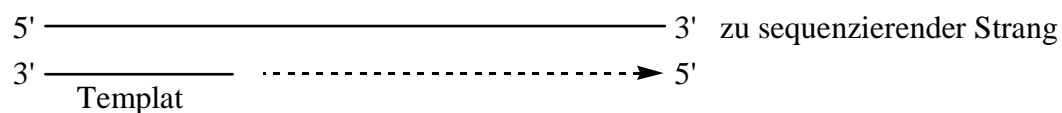


Die erste Abbildung zeigt wie spezifisch das DNA-Aptamer das Pb^{2+} im Vergleich zu anderen Metallionen erkennt. Die zweite Grafik zeigt die Response-Kurve. Zunehmende Konzentrationen an Pb^{2+} führen zu einer stärkeren Fluoreszenz über die Zeit. Deutlich wird vor allem das niedrige Detektionslimit.

Exkurs: Didesoxysequenzierung

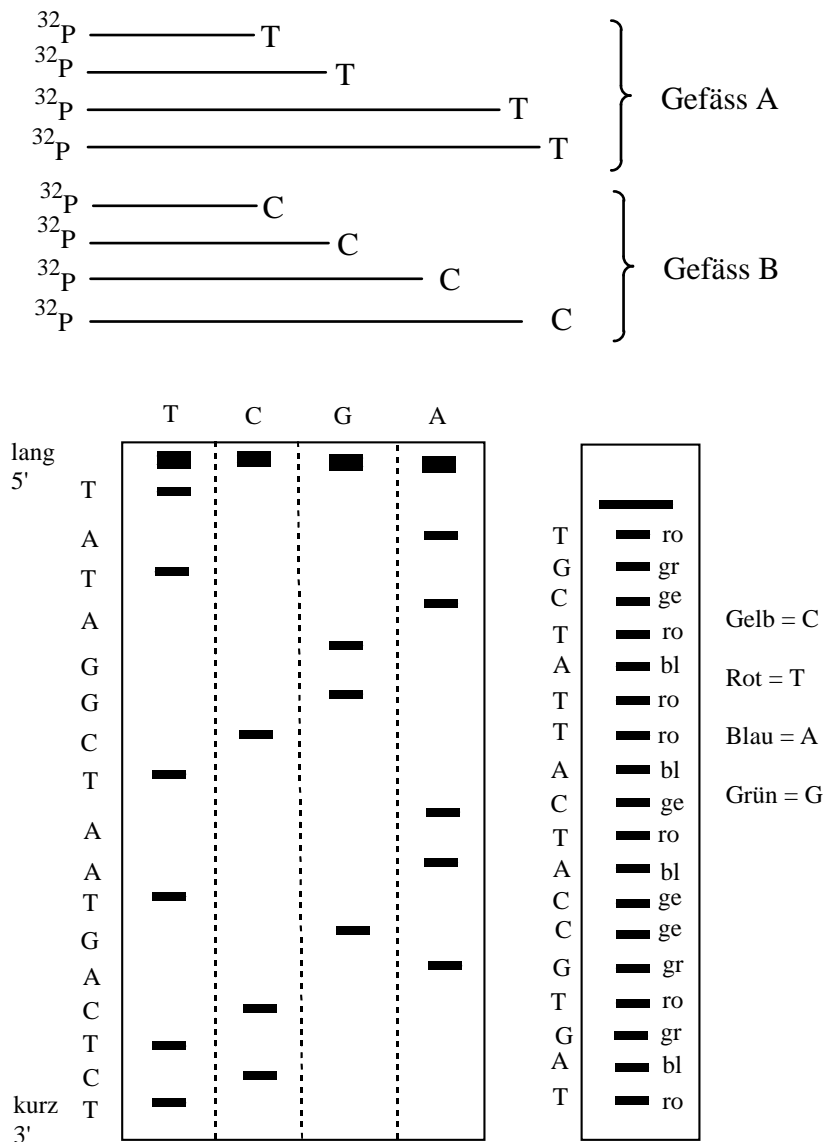
Der Erhalt von DNA oder RNA Sequenzinformationen gehört zu den wichtigsten molekularbiologischen Arbeiten. Heute sind bereits die kompletten Gensequenzen einer Reihe ganzer Organismen (z. Z. 40) bekannt. Hierzu gehören viele Bakterien wie *E. coli* oder *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Aber auch das komplette Genom der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist bald komplett bekannt. Das menschliche Genom wurde von der Firma Celera, die Craig Venter gehört, zu ca. 97% aufgeklärt.

Heute wird eigentlich nur noch mit Hilfe von Polymerasen und Didesoxynucleotiden sequenziert.



Der zu sequenzierende Strang wird zunächst, wenn nötig mit Hilfe der PCR, vermehrt. Abschließend wird die Menge an DNA auf vier Reaktionsgefäße verteilt. In jedes Gefäß wird der radioaktiv markierte (^{32}P) Templatstrang zugegeben. Es wird kurz erhitzt und dann abgekühlt um das Annelieren zu ermöglichen. In jedes Reaktionsgefäß wird anschließend eine Mischung der vier dNTP Bausteine gegeben. Dann wird je eine sehr kleine Menge eines 2', 3'-Didesoxybausteins zugegeben. Also

entweder Didesoxythymidin-5'-triphosphat, Didesoxycytidin-5'-triphosphat, Didesoxyadenosin-5'-triphosphat oder Didesoxyguanidin-5'-triphosphat. In jedem Reaktionsgefäß wird nach Zugabe der Polymerase enzymatisch der zu analysierende Strang transkribiert. In jedem Reaktionsgefäß entstehen nun Kopien des Stranges. Immer dann, wenn die Polymerase zufällig einen Didesoxybaustein einbaut, entsteht jedoch eine kürzere Abbruchsequenz, da der Strang nicht verlängert werden kann. Im Reaktionsgefäß 1 kann das nur an den Positionen erfolgen in denen sich ein T befindet, im Gefäß 2 nur an jeder Position mit einem C etc.. Anschließend werden die Oligonukleotide durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Man erhält vier sogenannte Oligonukleotideleitern.

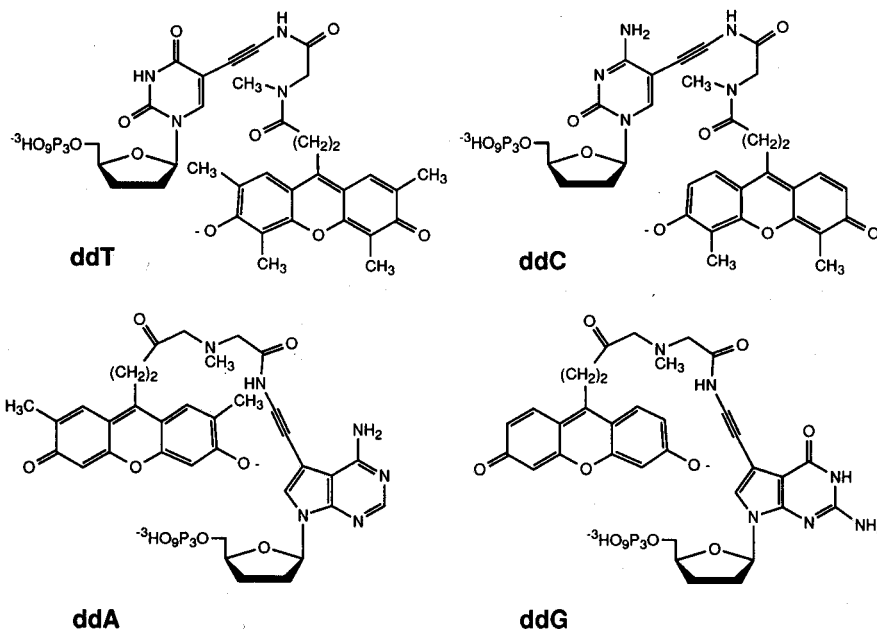


Auf der linken Seite ist ein Beispiel für ein Sequenzigel schematisch dargestellt. In jeder Spur finden sich die jeweiligen Abbruchsequenzen. Ganz oben läuft der unverkürzte Strang. Geht man von unten nach oben durch das Gel und hüpft dabei die „Balkenleiter“ nach oben, so ergibt sich die Sequenz.

Heute werden kaum noch radioaktiv markierte Stränge für die Sequenzierung eingesetzt. Zeitaufwendig ist in dieser Methode nämlich vor allem die Notwendigkeit jede Sequenzierung viermal durchführen zu müssen. Ökonomischer ist die Verwendung von fluoreszierenden Didesoxynukleotiden. Wird jedes Didesoxynukleotid mit einem anderen Fluorophor ausgestattet, so reicht eine einzelne Sequenzierreaktion mit jeweils allen vier ddNTP's für die vollständige Analyse aus. Man erhält dann nicht mehr einfarbige Spots und einfarbige Gele sondern ein vierfarbiges Bild. Eine Spur enthält durch die Farbdimension nun alle Informationen.

Zur Auftrennung lässt sich dann auch die Kapillaronenelektrophorese verwenden. Hier erhält man ein richtiges Chromatogramm mit Peaks in vier verschiedenen Farben. Jede Farbe steht für eines der vier Nukleotide.

Häufig verwendet werden die Bausteine die unten gezeigt werden.



Exkurs: Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Die FRET Methode erlaubt es Distanzen in Biomolekülen zu bestimmen. Hierzu müssen in die Biomoleküle zwei Sonden eingeführt werden. Entweder wird die Distanz zwischen den Sondenmolekülen in einem Biomolekül gemessen und so der Abstand z. B. zwischen den Enden bestimmt, oder es wird die Distanz zwischen zwei Molekülen gemessen. Dann muss jedes Molekül mit einer Sonde ausgestattet werden. Damit lässt sich die Methode vor allem in der Assay-Entwicklung einsetzen. Wird ein Molekül während eines Prozesses durchgeschnitten und enthält es an jedem Ende, so kann der Schneidprozess zum Teil sogar in Echtzeit verfolgt werden. Die FRET Methode wird oft als molecular ruler bezeichnet und wird zur Zeit sehr intensiv überall angewendet.

Die FRET Method eignet sich vor allem zum Ausloten großer Abstände. Sie ist relativ ungenau und ermöglicht keine hochpräzisen Distanzaussagen. Der Fehler liegt je nach System bei $\pm 5\text{\AA}$.

In einem typischen FRET Experiment werden die interessierenden Stellen mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren verknüpft. Ein Fluorophor wird als Donor, der andere als Akzeptor bezeichnet. Die Absorption des Donors (z. B. 350 nm) erfolgt bei höherer Frequenz als die des Akzeptors (z. B. 450 nm). FRET bedeutet nun, dass die Singulett-Singulett Übergänge in Resonanz stehen. Gekoppelt sind die Absorptions-Übergangsdipolmomente des Donors und die Emissions Übergangsdipolmomente des Akzeptors. Die Anregungsenergie wird so nach einem walki-talki-Mechanismus vom Donor auf den Akzeptor übertragen. Wird die Anregungsenergie des Donor normalerweise über Fluoreszenz abgegeben so erfolgt nun die Übertragung der Energie auf den Akzeptor. Die Fluoreszenz des Donor ist trotz gleich starker Anregung deutlich schwächer, man sagt sie ist gelöscht oder gequenchet. Die Löschung ist umso stärker je besser der Energietransfer ist. Die Energie führt zur elektronischen Anregung des Akzeptor. Fluoresziert dieser nicht, so, wird die Energie über andere akzeptortypische Kanäle wie z. B. einen Singulett-Triplett Übergang oder einfach *internal conversion* verloren. Gibt der Akzeptor seine Anregungsenergie in Form von Fluoreszenzlicht ab, so beginnt die Verbindung nach dem FRET zu fluoreszieren.

Die Effizienz des Energietransfers E_{FRET} wird durch die Formel unten beschrieben:

$$E_{\text{FRET}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}$$

R ist der Abstand zwischen den Fluorophoren. R_0 ist der sogenannte Förster Radius. Dieser Parameter ist Abhängig von der Wahl der Fluorophore. Der Förster Radius ergibt sich aus der Fomel

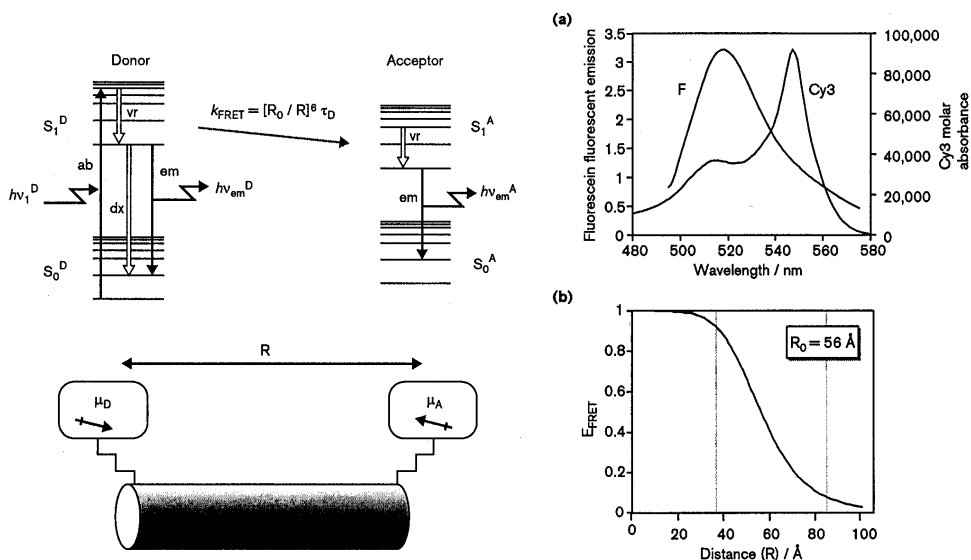
$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-23} \Phi_D \kappa^2 \eta^{-4} J(\lambda)$$

Φ_D ist die Fluoreszenzquantenausbeute (Beschreibt wieviel Anregungsenergie über Fluoreszenz abgegeben wird).

κ ist ein Orientierungsparameter, der die Anordnung der Übergangsdipolmomente beschreibt. Im Fall frei rotierender Fluorophore wird angenommen dass $\kappa = 2/3$ ist. κ kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen.

η ist der Refraktionsindex und beschreibt wie das Medium zwischen den Fluorophoren den Energietransfer beeinflusst. Hier wird für Wasser der Wert 1.33 bestimmt. Sind die Fluorophore z. B. in die DNA interkaliert so ändert sich der Wert auf 1.75.

$J(\lambda)$ beschreibt den spektralen Überlapp zwischen der Fluoreszenz des Donors und der Absorption des Akzeptors. Besonders gut ist der Energietransfer, wenn die das Fluoreszenzspektrum des Donors total mit der langwelligsten Bande des Absorptionsspektrums des Akzeptors übereinstimmt. Die Abbildung zeigt schematisch den FRET Vorgang. Die Abbildung rechts beschreibt die Situation des Überlappintegrals für ein typisches Donor Akzeptor Paar (Fluorescein/Cyanin3).



FRET Experimente werden am einfachsten mit Hilfe eines normalen Fluoreszenzspektrometers durchgeführt. Man beobachtet die Fluoreszenzintensität des Donors oder wenn möglich auch die Fluoreszenzintensität des Akzeptors. Komplizierter aber aussagekräftiger ist das Messen der Fluoreszenzabklingzeit. Hier erhält man eine Kurve die exponentiell gefittet werden kann. Monoexponentialität zeigt dann Energietransfer aus einer Konformation heraus. Multiexponentielles Fitting ermöglicht die Bestimmung aus wie vielen unterschiedlichen Konformationen heraus ein Energietransfer erfolgt. Natürlich wird auch der Fluorophor mit dem Biomolekül in Wechselwirkung treten und z. B. in die DNA interkalieren. Das hat dramatische Effekte. Wichtig ist also wo und wie der Fluorophor angeknüpft wird.

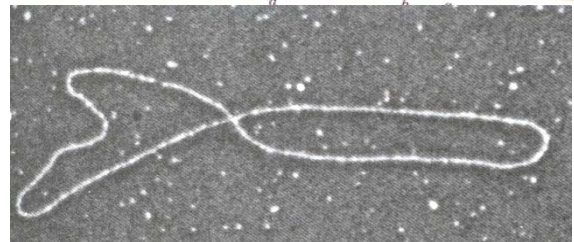
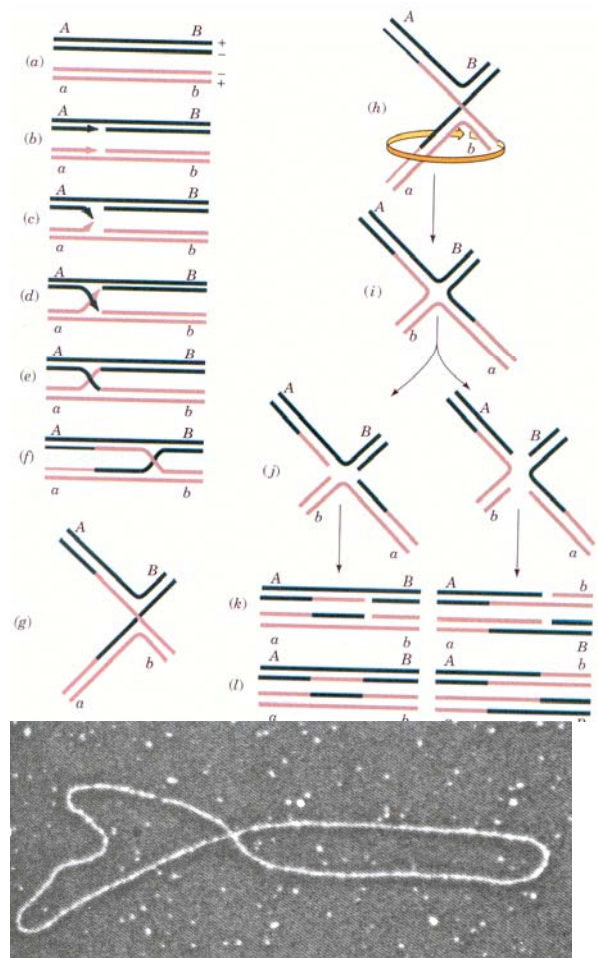
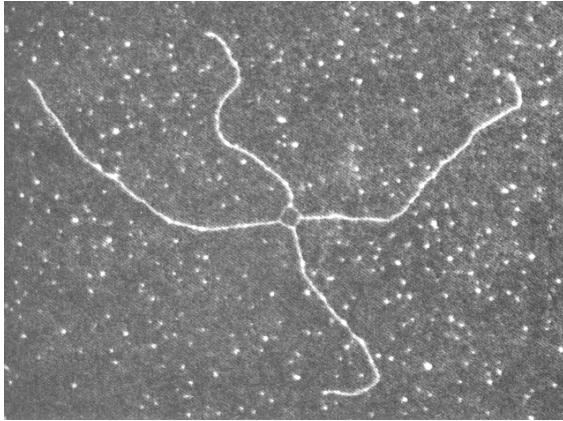
Für das Paar Fluorescein-Cyanin3 wurde die Energietransfereffizienz für jeden Abstand berechnet. Die Kurve ist oben (b) abgebildet. Aus dieser Kurve ergibt sich ein R_0 -Wert von 56Å. Geht man davon aus, dass gute Messungen der Fluoreszenz im Messbereich 0.1% Fluoreszenz – 0.9% Fluoreszenz durchgeführt werden können, so ergeben sich Distanzen zwischen 35Å - 85Å die gut mit diesem speziellen Paar vermessen werden können.

Am einfachsten sind immer sogenannte steady state Experimente in denen eine kleine Familie ähnlicher Verbindungen studiert werden. Diskutiert wird dann nur der Effekt innerhalb der Familie. Hier ist die Umgebung der Fluorophore jeweils identisch. Viel komplizierter sind Experimente in denen das nicht gegeben ist. Die Fluoreszenzintensität ändert sich nämlich auch mit der Umgebung, so dass Ergebnisse durch derartige Einflüsse sehr ungenau werden können. Verschiedene Fluorophore verhalten sich hier sehr unterschiedlich. Manche kleben richtig am Biomolekül.

3.5 Struktur-Untersuchungen mittels FRET-Studien

Chromosomen sind nicht nur einfach die Speicher für die genetische Erbinformation. Unsere Erbsubstanz muss als ein in Bewegung befindlicher Informationsspeicher angesehen werden. Zwischen den einzelnen Chromosomen findet z. B. ein Austausch genetischer Information statt. Informationen auf einem Chromosom können in ein zweites integriert werden. Das ist besonders wichtig, wenn Doppelstrangschäden aufgetreten sind, die zu einem Informationsverlust an einer Chromosomenstelle geführt haben. In einem solchen Fall hilft es Organismen eine doppelten Chromosomensatz zu besitzen. Ist die Information auf einem Chromosom verloren gegangen, so gibt es noch eine Kopie auf dem zweiten, homologen Chromosom. Doch wie gelangt nun die noch intakte Information auf Chromosom A in das geschädigte Chromosom B?. Notwendig ist offensichtlich ein DNA Austausch zwischen den Chromosomen. Diesen Prozess nennt man Homologe Rekombination.

Genetisches Material wird über Holliday-Junctions (Robin Holliday 1964) zwischen Genabschnitten ausgetauscht. Der Prozess ist schematisch unten gezeigt. Zuerst wird jeweils ein Strang der homologen Partner geschnitten. Die geschnittenen Stränge führen anschließend einen *cross-over* durch und paaren dann mit dem komplementären Strang im Nachbar-Gen. Nach der Bildung der Heteroduplexe, werden die Stränge ligiert. Der gebildete *cross-over* point kann dann wandern. Man nennt das branch-migration. Durch nachfolgende Umlagerung der Stränge am *cross-over* point, erneutes schneiden und ligieren, lassen sich DNA-Stücke zwischen Chromosomen austauschen. Die Untersuchungen der mit diesem Prozess verbundenen konformationellen Umlagerungen ließ sich hervorragend mit der FRET Methode durchführen. Hierzu wurden Fluoreszenzsonden an den Enden der DNA-Stränge befestigt. Anschließend wurde durch Zugabe von Zellextrakten oder aufgereinigten Proteinen der Rekombinationsprozess gestartet.



Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang das Protein RecA (352 Aminosäuren). Es ist ein in E.coli für die homologe Rekombination essentielles Protein. RecA bildet mit einzelsträngiger DNA ein Filament indem sich viele RecA Proteine wie Perlen um den DNA-Strang winden. Trifft ein homologer DNA-Doppelstrang auf das Filament so wird ein Strangaustausch unter Hydrolyse von ATP ermöglicht (RecA ist deshalb eine ATPase). Ein schneiden und ligieren der DNA ist hier nicht nötig.

Zur Untersuchung des RecA unterstützten Prozesses wurden Oligonukleotide hergestellt, die mit Fluorescein (Donor) und Hexachlorfluorescein (Akzeptor) ausgestattet wurden (Biochemistry 1998, 37 (33), 11692):

5'-GCACCAGATTCAGCAATTAAGCTCTAAGCC-F-3'
 3'-CGTGGTCTAAGTCGTTAATTCGAGATTCGG-H-5'

Die Fluoreszenz des F-Donor wird durch die Nachbarschaft zum H-Akzeptor stark gelöscht.

Anschließend wurde ein homologes 50-mer hergestellt und mit RecA vor-inkubiert. Es bildet sich dann das Filament. Zu diesem wurde der obige Doppelstrang gegeben. Findet Stranginvasion des 50-meren in den 30-er Doppelstrang statt, so werden der Donor und der Akzeptor getrennt. Man beobachtet dann zunehmende F-Fluoreszenz.

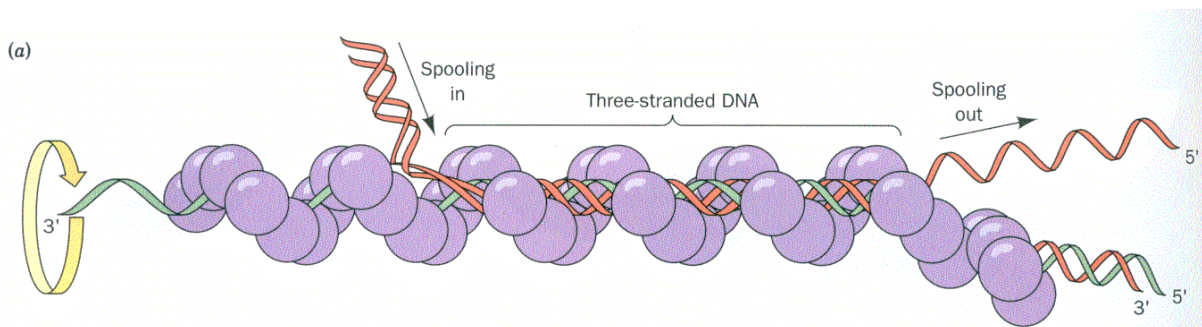
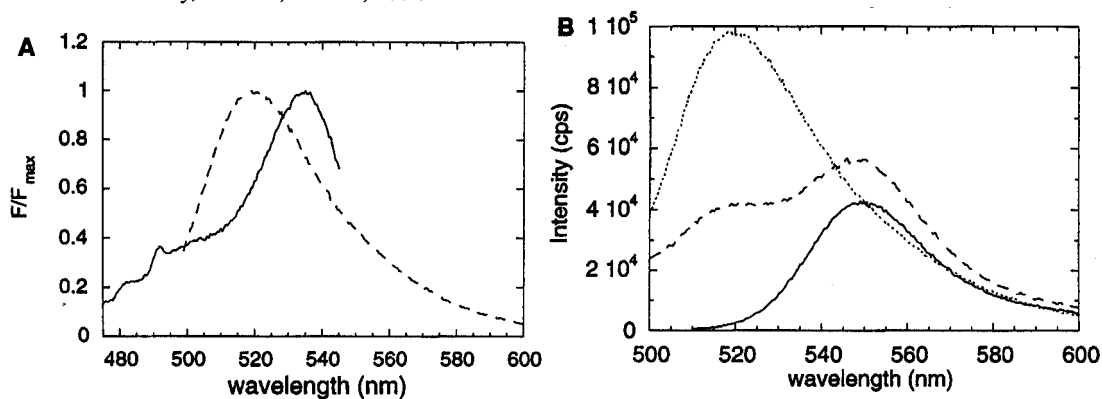


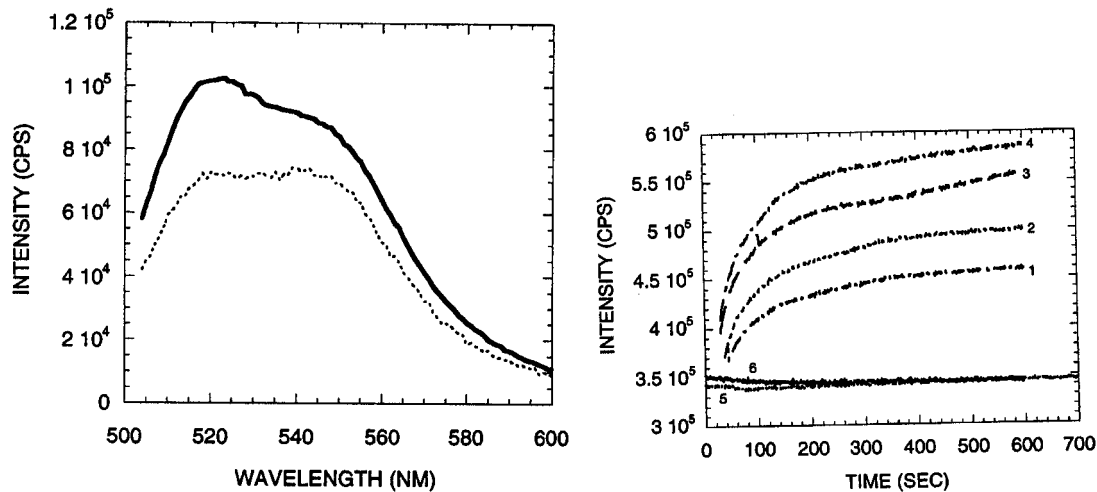
Abbildung a zeigt das Emissionsspektrum des Donors F (gestrichelte Linien, Anregung bei 492 nm) und das Absorptionsspektrum des Akzeptors H (durchgezogene Linie). Deutlich zu sehen ist die gute Überlappung beider BANDEN; die einen effizienten Energietransfer erwarten lässt. Abbildung B zeigt das Emissionsspektrum des Doppelstranges mit jeweils nur dem Donor (dotted, F) und dem Akzeptor (solid, H). Das 30-mer mit beiden Sondenmolekülen liefert das gestrichelte Spektrum. Deutlich zu sehen ist die gelöschte Donorfluoreszenz und die leicht gestiegene Akzeptorfluoreszenz.

11696 *Biochemistry*, Vol. 37, No. 33, 1998



Betrachtet man das Emissionsspektrum des 30-mer Doppelstranges alleine und nach Zugabe des 50-mer RecA Filaments so ergeben sich die Spektren der unten links

gezeigten Abbildung. Gepunktet, vor der Zugabe, durchgezogen nach der Zugabe. Deutlich zu sehen ist die leichte Zunahme der Donorfluoreszenz. Das ist der FRET Effekt. Wenn auch schwach in diesem Fall, so lässt sich die Stranginvasion doch gut beobachten. Unten rechts sind Spektren gezeigt, die nach Zugabe von steigenden Mengen des 50-mer Filamentes zum 30-mer Doppelstrang erhalten wurden.



1 μM 30-mer, 50-mer Filament: 0.1 μM , 0.25 μM , 0.3 μM und 0.5 μM). Die unteren Kurven zeigen Kontrollmessungen mit poly(dT). $\lambda_{\text{ex}} = 492 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$.

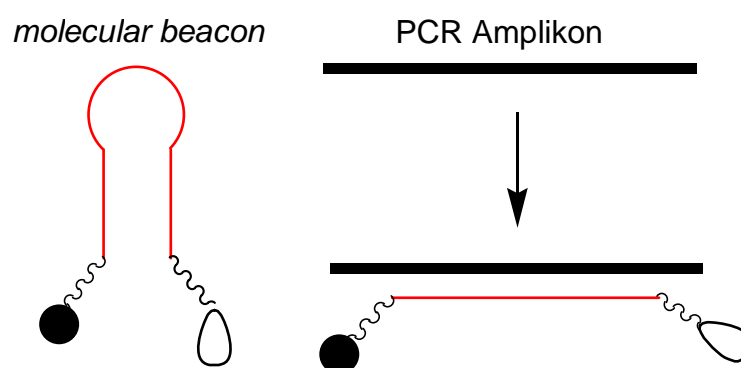
3.6 Genomanalysen mit Hilfe von FRET-Sonden

Nach der nahezu kompletten Entschlüsselung des menschlichen Genoms ist es zukünftig von besonderem Interesse schnelle Methoden zur Hand zu haben mit denen einzelne Personen auf Genvariationen hin untersucht werden können. Individuelle genetische Varianzen, bei denen es sich oft nur um den Austausch einer einzelnen Base handelt müssen detektierbar werden, da diese Genvarianzen für Krankheitsdispositionen verantwortlich gemacht werden. Man spricht von *single nucleotide polymorphisms* (SNP). Gewünscht ist eine schnelle detektion einzelner SNP's im Genom der Patienten. SNP Detektion könnte der Beginn einer individualisierten Therapie im Krankheitsfall sein, so die hochfliegenden Hoffnungen. Neueste Entwicklungen schlagen zur Lösung des Analytikproblems die sogenannte Spektrale Genotypierung (*spectral genotyping*) vor.

Bei dieser Method wird Patienten-DNA in Gegenwart fluoreszierender Analyse DNA durch PCR amplifiziert. Der Trick bei der SNP Detektion während der Vervielfältigung besteht im Design einer kleinen Analyse-DNA-Sequenz sogenannter molekularer

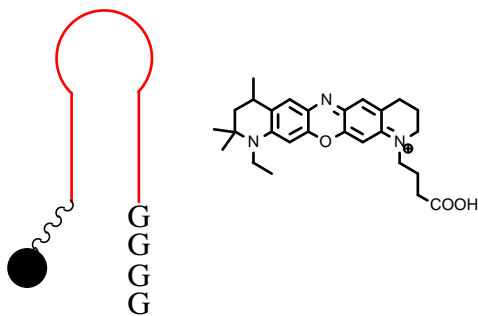
Leuchtsignale (*molecular beacons*). Ziel es, die Anwesenheit bestimmter DNA-Sequenzen durch ein Fluoreszenzsignal detektierbar zu machen. Diese *molecular beacons* sind Haarnadel-artige DNA-Strukturen. Haarnadel-förmige DNA besteht aus einem selbtskomplementären Stamm und einer Loop-Region. In Lösung faltet sich der DNA-Strang auf Grund der selbstkomplementären Stammsequenz zu einer Haarnadelstruktur auf. Bei den *molecular beacons* handelt es sich um Haarnadel-förmige DNA, welche an ihren Enden jeweils zwei Fluorophore trägt. Der eine ist ein fluoreszierender Baustein, der wenn er in die Nähe des zweiten Chromophors kommt, seine Anregungsenergie durch FRET an den zweiten Chromophor abgibt. Die derzeit gebräuchlichsten *molecular beacons* werden zum einen mit Fluorescein, oder Tetramethylrhodamin als Donor und mit Dabcyl als Akzeptor ausgestattet. Dabcyl fluoresziert selber nicht, so dass der Akzeptor in diesem Fall als Fluoreszenzlöcher fungiert (Die Löschung der Fluoreszenz beruht wohl auf einem Elektronentransfer zwischen dem Fluorophor und dem Dabcyl). In der Haarnadelstruktur sind die beiden Chromophore eng benachbart angeordnet. Die Fluoreszenz des Donor ist vollständig gelöscht. Entsteht nun während der PCR ein DNA-Strang, der vollständig komplementär zur Haarnadel-DNA ist, so wird die Haarnadelstruktur aufgefalted und es bildet sich der Doppelstrang, in dem nun auch die Basen der Haarnadel-Schleife Basenpaarungen eingehen können. Dadurch werden die beiden Chromophore voneinander getrennt. Die Fluoreszenzlöschung wird aufgehoben. Der Fluorophor beginnt zu fluoreszieren, was dem Experimentator anzeigt, dass sich die gewünschte komplementäre DNA des Patienten vorhanden ist.

Die Paarungseigenschaften der *molecular beacons* können so eingestellt werden, dass bereits eine einzelne Fehlpaarung nicht zur Öffnung der Haarnadelstruktur führt. Auf diese Art-und-Weise lassen sich sogar einzelne Basenunterschiede detektieren.



Alternativ zur zweifachen Modifizierung des Hairpins können auch Donorfarbstoffe verwendet werden, die in Anwesenheit von G-Basen nicht mehr fluoreszieren. Die Basis dieser Fluoreszenzlöschung ist ein Elektronentransfer vom G (unter Bildung des G-Radikalkations) auf den lichtangeregten Fluorophor, der zum Fluorophor-Radikalanion reagiert und als solcher nicht mehr fluoresziert. Viele heute bekannten Farbstoffe reagieren selektiv mit dem G, da es sich um die Base mit dem niedrigsten Oxidationspotential handelt.

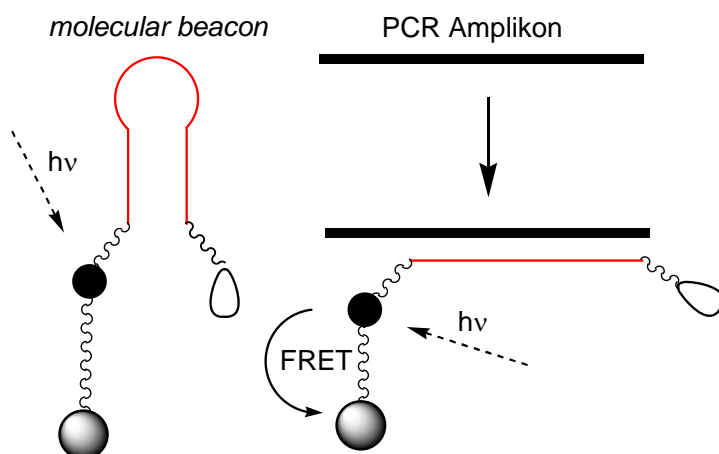
Ein solcher zur Löschung der Fluoreszenz führender Elektronentransfer ist natürlich *molecular beacon*



nur möglich, wenn der Fluorophor in Nachbarschaft zu den G's zu liegen kommt. Das ist im Hairpin der Fall. In der aufgefalteten Konformation, also wenn dieser *molecular beacon* mit dem vollständig komplementären DNA-Strang in der PCR-Reaktion reagiert, vergrößert sich der Abstand so sehr, dass ein

Elektronentransfer von den G's nicht mehr erfolgen kann. Nun erst beginnt der Chromophor zu fluoreszieren.

Problematisch bei dieser Analysemethode ist die sogenannte Hintergrund-Fluoreszenz. Auch wenn die Fluoreszenz nahezu vollständig gelöscht, so besteht doch ein Resfluoreszenz, die den Nachweis vor allem kleiner Mengen an Proben-DNA sehr erschwert. Kürzlich wurden, zur Lösung dieses Problems die sogenannten wellenlängenverschobenen *molecular beacons* entwickelt.



Im Hairpin wird die Anregungsenergie auf den Löscher übertragen, der die Energie in Wärme umsetzt. In der offenen Form, wird die Energie nicht mehr auf den Löscher sondern einen zweiten Fluorophor übertragen, der dann nach dem FRET

fluoresziert. Experimenta haben gezeigt, dass in solchen molecular beacon, die Nachweisgrenze wesentlich verbessert werden kann, da die Restfluoreszenz bei der Wellenlänge des FRET Akzeptors deutlich geringer ist.

Ein Beispiel für ein derartiges Sonden-Oligonukleotid: Als Quencher wird, wie oft, Dabcyl verwendet. Als Lichtabsorber fungiert Fluorescein. Als Emitter kann dann Tetramethylrhodamin ($\lambda_{\max,em} = 575 \text{ nm}$), 6-Carboxyrhodamin ($\lambda_{\max,em} = 556 \text{ nm}$) oder Texas Rot ($\lambda_{\max,em} = 609 \text{ nm}$) verwendet werden. Um einen hocheffizienten Energietransfer zwischen beiden zu gewährleisten, müssen beide Fluorophore durch ein paar Nukleotide getrennt werden. Hier hat sich ein sieben Nukleotid langer Abstand als optimal herausgestellt. Anregungswellenlänge für das Fluorescein ist 488 nm (das liegt auch im Bereich des blauen Argonionenlaser oder Blaulicht emittierenden Leuchtdioden, die am häufigsten verwendeten Lichtquellen).

Ein Beispiel für die Bestimmung von Genotypen

Das menschliche Gen, das für den Chemokine Rezeptor 5 kodiert besitzt an Position 627 entweder ein T oder ein C. Auch an Position 630 befindet sich entweder ein C oder ein T. Daraus folgen vier Haplotypen --627--630--, nämlich -T-C-, -C-C-, -T-T- und -C-T-. Jede Person hat zwei Chromosomen, so dass 10 unterschiedlich Basen Kombinationen möglich sind. Ziel ist es in jedem Individuum die jeweilig vorliegende Genkombination zu bestimmen.

Zur Unterscheidung werden 4 Allel-diskriminierende *molecular beacons* konstruiert. Jedes kann nur mit einem Haplotyp hybridisieren und jedes hat einen anderen Fluoreszenzemitter. es wurden verwendet: 2 normale molecular beacons mit Fluorescein und Tetrachlorfluorescein und 2 FRET molecular beacons mit Fluorescein als Sammelchromophor und Tetramethylrhodamin bzw. Texas Rot als Emitter Fluorophore.

Nun wird die DNA von verschiedenen Individuen per multiplex DNA in Gegenwart der *molecular beacons* vervielfältigt. Nur einer der beacons fluoresziert im Fall des Vorliegens eines der vier homozygoten Genotyps. Im Fall des Vorliegens von einem der sechs heterozygoten Fälle sind zwei der vier *beacons* am fluoreszieren.

Mit dieser Methode gelingt die Detektion von bis zu 10 unterschiedlichen Genotyps in einem einzelnen Multiplex Assay.

Genotyp	Fluorescein	Tetrachloro-fluorescein	Tetramethyl-rhodamin	Texas Rot	Number of human DNA samples matching this pattern
--T-C--/--T-C-	0.95	0	0.05	0	6
--C-T--/--C-T-	0	1.00	0	0	0
--C-C--/--C-C-	0	0	1.00	0	4
--T-T--/--T-T-	0	0	0	1.00	0
--T-C--/--C-T-	0.51	0.49	0	0	0
--T-C--/--C-C-	0.77	0	0.23	0	11
--T-C--/--T-T-	0.73	0	0	0.27	1
--C-T--/--C-C-	0	0.68	0.32	0	0
--C-T--/--T-T-	0	0.56	0	0.44	0
--C-C--/--T-T-	0	0	0.45	0.55	2

Aus Fred Russell Kramer *Nature Biotechnol.* **2000**, 18, 1191-1196.

Weitere Anwendungen: Nachweis einer homozygoten 32-Nukleotid langen Deletion im β -Chemokin Rezeptor 5 Gen (*CCR5*), welches für eine gewisse HIV Resistenz verantwortlich ist. Die schnelle Nachweismöglichkeit des *CCR5* Δ 32 Allels erlaubt das schnelle testen auch grosser Populationen.

Messung der Verteilung des *CCR2-64I* Allels welches eine G nach A Substitution aufweist. Benötigt wird lediglich ein PCR Gerät, das auch Fluoreszenz beobachten kann. (F. R.Kramer, *Science*, **1998**, 279, 1228-1229)

Nimmt man eine einzelstängiges 7 Basenpaar langes Oligonukleotid, welches z.B. mit einem Fluoreszenzlabel versehen ist, so kommt es zur selektiven Markierung nur des komplett komplementären DNA-Gegenstücks in einem z. B. bis zu 10 kBp langen DNA Fragment (C. Lieber, *Nature Biotechnol.* **2000**, 18, 760-763).

3.7 DNA Chips

In der Zeit nach der Entschlüsselung des menschlichen Genoms ist das vordringliche Ziel die Nutzbarmachung der Information. Hierzu müssen, wie oben beschrieben,

Techniken entwickelt werden mit denen Gensequenzen schnell und zuverlässig entschlüsselt werden können.

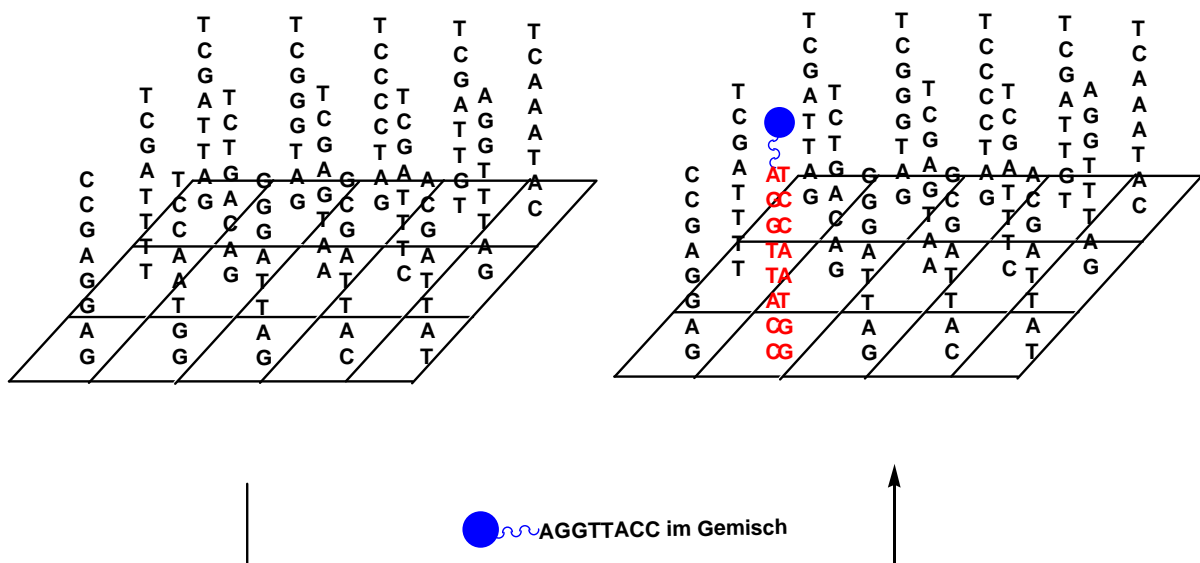
- Ein Ziel ist die schnelle Entschlüsselung bestimmter Genombereiche eines jeden Individuums. Hierzu ist es notwendig sehr viele Genomabschnitte auf einmal analysieren zu können. Das Ziel wird nur mit massiv parallel arbeitenden Techniken zur Genomanalyse zu erreichen sein.
- Ein zweites Ziel ist es den Genstatus von Zellen zu ermitteln. Durch Vergleich des Genstatus von gesunden Zellen mit dem von kranken Zellen sollen Unterschiede ermittelt werden, die es zukünftig gestatten sollen neue kausal agierende Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. Nur durch den direkten Vergleich z. B. gesunder Nervenzellen mit Nervenzellen von Alzheimer Patienten kann es gelingen derartig komplexe Krankheiten zu verstehen. Das ist aber die Basis für die Entwicklung der angestrebten neuartigen Therapien. Zur Ermittlung des Genstatus muss die gesamte in der Zelle vorhandene RNA in DNA umgeschrieben werden. Anschliessend muss von jedem cDNA-Stück die Menge ermittelt werden. Auch dieses Problem ist nur mit massiv parallel arbeitenden Techniken zur Genomanalyse zu bewerkstelligen.

Vor einigen Jahren wurde zur massiven parallelen Bestimmung von Gensequenzen die DNA-Chiptechnik entwickelt. Glasplättchen werden hierzu in Segmente eingeteilt. In jedem Segment wird eine bestimmte Oligonukleotidsequenz an die Oberfläche angeknüpft. Auf einem kleinen vielleicht 2.5 x 2.5 cm grossen Glassplättchen werden bis zu 50'000 unterschiedliche Oligonukleotid-Sequenzen abgelegt. Diese Glasplättchen nennt man DNA-Chips.

Die DNA die analysiert werden soll, wird mit Hilfe der PCR vermehrt und anschliessend durch die Einwirkung von hydrolytisch aktiven Enzymen in kleine Fragmente geschnitten. An diese Fragmente wird mit Hilfe einer Ligase, z. B. der RNA-Ligase, die sehr unspezifisch ist, eine Fluorophor angeknüpft. Die so präparierte Analyse DNA wird anschliessend auf den Chip gegeben. Finden einer der fluoreszenzmarkierten Analyse-DNA Sequenzen das passende Gegenstück auf dem Chip so kommt es zur Hybridisierung, d.h. zur Ausbildung eines Doppelstranges. Die Bedingungen der Analyse werden so eingestellt, dass nur total komplementäre

Stränge gebildet werden. Schon eine Fehlpaarung (mismatch) führt zum Ausbleiben der Doppelstrangbildung.

Bildet sich der Doppelstrang aus, so ist das entsprechende Segment auf dem Chip durch fluoreszierende Moleküle markiert. Ein entsprechendes Gerät bestimmt nun die Menge Fluoreszenz auf jedem Segment. Auf die Art-und-Weise können in einem einzelnen Experiment bis zu 50'000 unterschiedliche Gensequenzen überprüft werden.



Die Kunst bei der Herstellung der Chips ist die Belegung der Chips. Wie schafft man es 50'000 unterschiedliche Oligos in definierte Segmente auf den Chip zu bekommen. Zur Lösung des Problems gibt es derzeit zwei Wege:

- A) Synthese von 50'000 Oligo, die mittels eines Tintenstrahldrucker auf dem Chip positioniert werden.
- B) Photolithographische Synthese von Oligonukleotiden auf den Glasplättchen.

3.7.1 Moderne Medikamentenentwicklung

DNA-Chips oder DNA-Microarrays sind auf dem besten Weg unverzichtbare Hilfsmittel in der Pharmaforschung zu werden. Das Problem in der Pharmaforschung ist heute vor allem die Identifikation von Proteinen, die auf Grund eines Krankheitsstatus einer Zelle fehlen, oder stark vermehrt gebildet werden. Derartige Proteine sind für die Pharmaindustrie potentiell relevante Targets, deren Funktion man

im Rahmen medizinalchemischer Projekte durch Wechselwirkung mit kleinen organischen Verbindungen -als neue Medikamente- gezielt beeinflussen möchte.

Heute ist die Targetsuche, das heisst das Aufinden krankheitsrelevanter Proteine, eines der strategisch wichtigsten Gebiete in der Pharmaforschung. Neben der Targetsuche kommt natürlich nachfolgend vor allem der Targetvalidierung besonderes Gewicht zu. Es muss geprüft werden, ob die Wechselwirkung mit einem mutmasslich krankheitsrelevantem Protein tatsächlich günstige Behandlungschancen eröffnet. Zur Targetvalidierung bedient man sich heute gerne der *knock-out* Maus Technologie. Hier wird eine transgene Maus erzeugt, der das Gen für das zuvor als krankheitsrelevant eingestufte Protein fehlt. Durch die Untersuchung dieser transgenen Maus lässt sich ermitteln welchen Effekt ein Medikament hätte, dere Ziel es wäre durch Wechselwirkung mit dem Protein dessen Funktion zu blockieren.

Die Medikamentenentwicklung von Morgen könnte also wie folgt aussehen. Zunächst wird durch ein Vergleich den Genstatus einer gesunden mit einer kranken Zelle krankheitsrelevante Proteine identifiziert, die in der kranken Zelle signifikant über- oder unterexprimiert vorliegen. Es werden Mäuse erzeugt, die das Krankheitsbild simulieren sogenannte Krankheitsmodelle. Von diesen werden *knock-out* Mäus erzeugt, denen die identifizierten Proteine fehlen, oder die die Proteine in jeder Zelle in grosser Menge produzieren. Durch das Studium dieser *knock-out* Mäuse werden die neuen Targets validiert. Zeigt sich, dass z .B. das Ausschalten eines der identifizierten Proteine sich günstig au das Krankheitsbild auswirkt, so kann bereits das Gen für das Protein zusammen mit der Relevanz für die Krankheit patentiert werden. Erst dann beginnt die Untersuchung der Frage um was für ein Protein es sich eigentlich handelt, denn alle diese Studien sind ohne die genaue Kenntnis des relevanten Proteins durchführbar. Bei dieser Frage hilft die Bioinformatik weiter. Die Gensequenz wird hier mit Gensequenzen bekannter Proteine verglichen. Basierend auf einer starken Sequenzhomologie schlägt der Computer vor, um was für ein Protein es sich handelt (Protease, Rezeptor etc). Erst jetzt beginnt die medizinalchemische Arbeit. Das Protein wird isoliert, charakterisiert und kristallisiert. Ein Assay (*high throughput* wenn möglich) wird aufgebaut. Erst jetzt werden Verbindungen getestet. Neue Verbindungen werden z. T unter zu Hilfenahme von Computermodel-Studien synthetisiert und anschliessend getestet.

Dieses Beispiel zeigt, wie sehr heute die Biologie die moderne Medikamentenforschung beeinflusst. Die Synthese von Verbindungen ist in diesem Konzert der Disziplinen nur ein sehr kleiner Teil. Für die Verbindungen ist vor allem die Toxikologie entscheidend. Sobald eine Verbindung im Assay aktiv ist entscheidet die Toxikologie ob die Verbindung ein Kandidat für die Weiterentwicklung ist oder nicht. Eine hochaktive Substanz mit „guten Toxikologischen“ Eigenschaften (das muss auch für Metaboliten gelten) wird dann in den drei klinischen Phasen (I, II und III) bis zu Ihrer Wirksamkeit am Menschen gründlich geprüft. Insgesamt kostet heute die Entwicklung eines neuen Medikaments bis zu 800 Mio DM. Hier wird deutlich, dass nur die grössten und stärksten Firmen sich derartige Investitionen leisten können. Schliesslich handelt es sich um sehr stark risikobehaftete Investitionen. Ein neues Medikament kann jeder Zeit, manchmal sogar erst nach der Markteinführung, Nebenwirkungen offenbaren, die das schnelle Aus bedeuten. Hohes Risiko bedeutet immer auch eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass das Geld verloren geht. Hier liegt der Grund für die vielen Firmenzusammenschlüsse.

Natürlich brauchen wir die gründliche und damit sehr teure Prüfung jedes neuen Arzneistoffes. Leider gibt es aber auch eine Schattenseite. Medikamente müssen heute nach rein marktwirtschaftlichen Gesichtspunkten entwickelt werden. Bei den Planungen in der Pharmaindustrie spielen die Zivilisationserkrankungen in den reichen Industrieländern entsprechend die Hauptrolle. Viagra lohnt sich. Ein neues Malaria-Medikament leider nicht, obwohl hier die Neuinfektionsrate (vor allem Kinder) bei 300 Mio pro Jahr liegt und ca. 3 Mio. Menschen (vor allem Kinder) jährlich an Malaria sterben. Malariamedikamente werden daher kaum entwickelt.

5. Die molekulare Erkennung von DNA

5.1 Peptid-Antibiotika in der DNA-Nebenfurche

5.1.1 Allgemeines

Das Ziel der Forschung ist die Synthese von Verbindungen, die an regulatorische Sequenzen innerhalb des Genoms binden können. Hierdurch kann die Expression bestimmter Gene verhindert werden. Besonders weitreichende Folgen hätte die Möglichkeit, die Expression von Virus-DNA im menschlichen Genom zu unterbinden. Man hätte dann neuartige Medikamente zur Behandlung vieler Viruserkrankungen in der Hand. An Verbindungen, die DNA erkennen, werden aus chemischer Sicht zwei wichtige Anforderungen gestellt. 1. Die Substanzen müssen mit der DNA einen stabilen Komplex bilden, der fest genug ist, damit eine dauerhafte Blockade des Genabschnittes gewährleistet wird (hohes $K_{\text{ass.}}$, geringe K_{diss}). 2. Die Verbindungen müssen sequenzspezifisch, d. h. sehr selektiv, binden, um nur die Expression der angestrebten Gene zu verhindern.

Um die Bindung von Naturstoffen an die DNA zu verstehen ist es wichtig, die Art der funktionellen Gruppen in den Furchen zu kennen. Daraus ergeben sich dann die Bindungsmotive. Durch die systematische Synthese modifizierter Naturstoffe lassen sich dann Verbindungen mit neuen Bindungsmotiven darstellen, die eine andere Sequenzspezifität aufweisen oder die eine festere und selektivere Bindung an die DNA zeigen, als die natürlichen Substanzen.

5.1.2 Funktionelle Gruppen in den verschiedenen Furchen

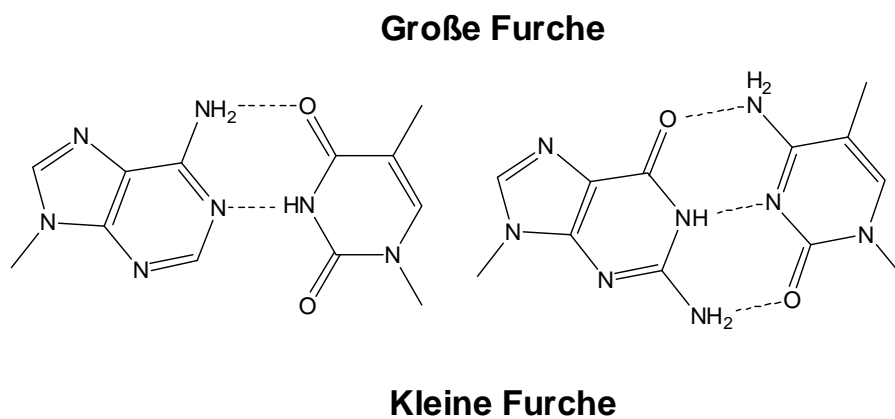
In jede der Furchen ragen spezielle funktionelle Gruppen hinein. Diese dienen allen Molekülen (Proteinen) zur molekularen Erkennung durch H-Brücken.

Soll eine sehr gute Sequenzspezifität erzielt werden, so muss die große Furche als Target anvisiert werden. Hier liegen viele funktionelle Gruppen der Basen. Die 6-NH₂ und das N7 vom Adenin, der 4-Oxo-Sauerstoff vom Thymin, das N7 vom Guanin, der 6-Oxo-Sauerstoff vom Guanin und die 4-NH₂-Gruppe vom Cytosin. Zusammen mit der Methylgruppe des Thymins ergibt sich ein vier Buchstabencode in der großen Furche.

In der kleinen Furche gibt es nur zwei Buchstabencodes !! N3 vom Adenin, 2-Oxo-Sauerstoff vom Thymin, das N3 und die 2-NH₂-Gruppe vom Guainin und den 2-Oxo-Sauerstoff vom Cytosin. Viele Sequenzen können daher in der kleinen Furche nicht wirkungsvoll unterschieden werden.

Kleine organische Verbindungen binden vor allem in die kleine Furche. Trotz des Informationsdefizits in der kleinen Furche hat man daher versucht, Verbindungen darzustellen, die hier sequenzspezifisch binden können.

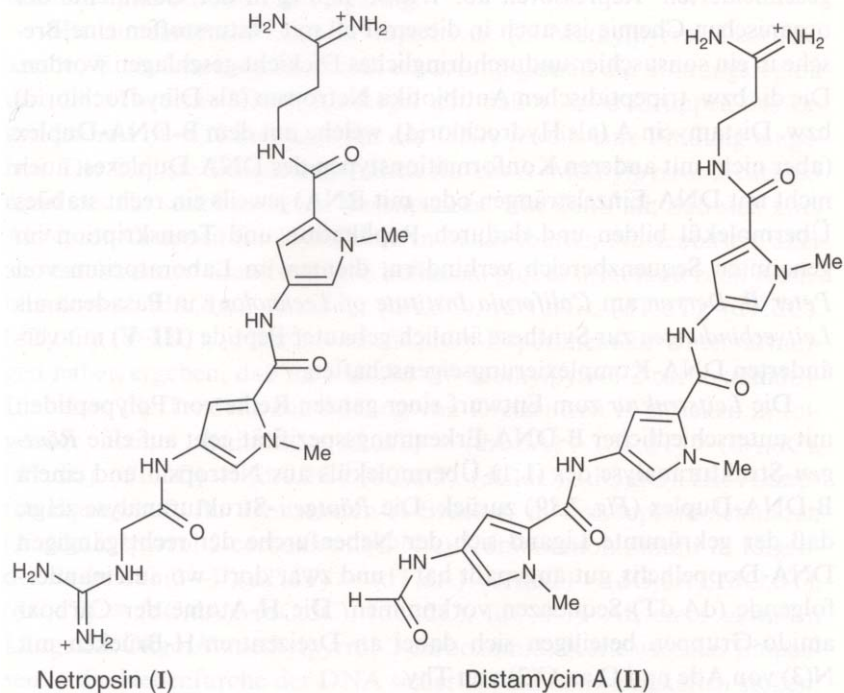
Ausgangspunkt der Forschung sind die Naturstoffe Netropsin und Distamycin, die beide fest in die kleine Furche der DNA binden.



Wasserstoffbrückemuster in den Furchen der DNA

Base pair	Major groove	Minor groove
AT	a d a (CH ₃)	a a
TA	(CH ₃) a d a	a a
GC	a a d	a d a
CG	d a a	a d a

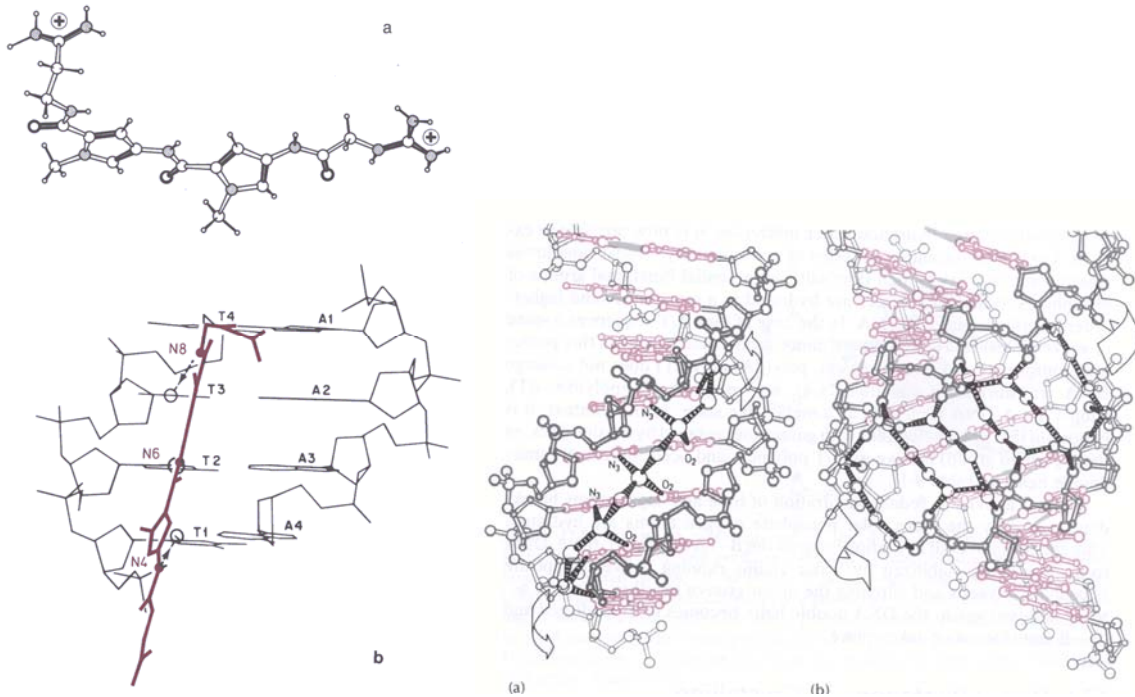
Darstellung der H-Brücken Donor Akzeptor Funktionen in der großen und in der kleinen Furche (a) = H-Akzeptorfunktion, (d) = H-Donorfunktion.



Darstellung der Naturstoffe Netropsin und Distamycin

5.1.3 Das Bindungsmotiv der Naturstoffe Netropsin und Distamycin in der kleinen Furche.

Einen genauen Einblick, wie diese Verbindungen in die kleine Furche binden, gibt die Röntgenstrukturanalyse. Hier zeigt sich, dass die kleine Furche stark solvatisiert ist (spine of hydration). Durch die Bindung des Naturstoffes werden diese Wassermoleküle wieder freigesetzt. Hieraus ergibt sich die positive Bindungsentropie. Zwei weitere wichtige Faktoren tragen zur Bindung in der kleinen Furche bei. So werden spezifische H-Brücken zwischen den funktionellen Gruppen in der kleinen Furche und dem Naturstoff ausgebildet. Diese H-Brücken tragen auch entscheidend zur Positionierung des Moleküls in der kleinen Furche bei. Elektrostatische Wechselwirkungen spielen ebenfalls eine große Rolle. Es bilden sich Salzbrücken zwischen der/den positiven Ladungen/en am Naturstoff und dem negativen Phosphat-Rückgrat der DNA. Diese Wechselwirkungen führen zu einer negativen Bindungsenthalpie, so dass sich insgesamt eine sehr gute freie Bindungsenthalpie für diese Naturstoffe ergibt.



Röntgenstruktur eines DNA-Netropsin Komplexes (A). Darstellung *der spine of hydration* (B).

Thermodynamik der Bindung von Netropsin an DNA

DNA Duplex	ΔG°	ΔH°	ΔS°
	(kcal mol ⁻¹)	(kcal mol ⁻¹)	(kcal mol ⁻¹)
polyd(AT) · polyd(AT)	-12.7	-11.2	+5.0
polyd(A) · polyd(T)	-12.2	-2.2	+33.0
polyd(GC) · polyd(GC)	-7.1	-4.3	+9.3
d(GCGAATTCGC) ₂	-11.5	-9.3	+7.5

Tabelle der thermodynamischen Daten.

Netropsin und Distamycin haben eine starke Präferenz für AT-reiche Regionen. Besonders stark ist die Bindung an Sequenzabschnitte, in denen sich A und T abwechseln. Hier findet man eine große Bindungsenthalpie. Lediglich im Fall des Komplexes mit polyd(A)·polyd(T) ist die Bindungsentropie entscheidend. Diese Anomalie wird zur Zeit mit einer starken Solvatisierung dieser Sequenz erklärt. Die

Bindung des Netropsins verändert sich nicht. Einige Punkte sind von entscheidender Bedeutung für die Naturstoffe in der kleinen Furche der DNA:

- Die Naturstoffe zeigen insgesamt eine gute Diskriminierung zwischen AT- und GC-Regionen von $\Delta\Delta G = 5.6 \text{ kcal mol}^{-1}$
- Jede Carboxamid-Einheit trägt mit ca. 2.0 kcal/mol zur gesamten Bindungsstärke bei. Das ist die Energie die bei der Ausbildung einer H-Brücke gewonnen wird. Für eine GC Sequenz beträgt die Bindungsenergie nur a. 0.05 kcal/mol.
- Die 2-NH₂-Gruppe des Guanins stört den Komplex sterisch und destabilisiert so die Bindung der Naturstoffe.
- Netropsin und Distamycin besitzen eine Assoziationskonstante $K_{\text{ass}} = 10^7 \text{ M}^{-1}$ für AT Regionen und nur $K_a = 10^4 \text{ M}^{-1}$ für GC Regionen.
- Wichtigstes Merkmal der Bindung ist die Ausbildung von gegabelten H-Brücken. Jede Carboxamideinheit ist involviert in zwei H-Brücken mit den H-Akzeptorfunktionen N3 vom Adenin und O2-Thymin.

An der Bindung des Distamycins sind lediglich vier Basenpaare beteiligt. Bei einer rein statistischen Verteilung der Basen im Genom, käme eine solche Viererkombination alle 136 mal vor. Die Spezifität dieser Verbindungen reicht deshalb für eine Anwendung als Antigen-Medikament bei weitem nicht aus. Faustregel: n Amidgruppen erkennen (n+1) Basenpaare.

Ein wichtiges Forschungsziel der Gruppe von Prof. Dervan am Caltech in Pasadena, Californien, USA, ist die Synthese von Netropsin- und Destamycin-Analoga mit einer veränderten Bindungsspezifität und mit einem größeren Bindungsmotiv zur Steigerung der Spezifität.

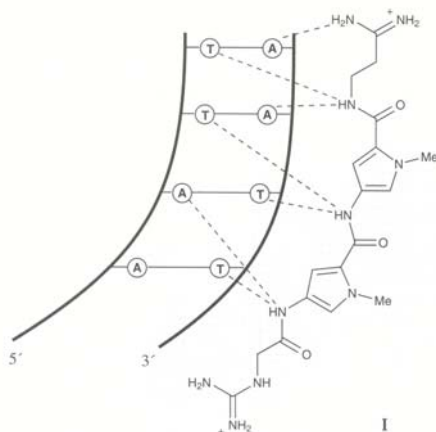
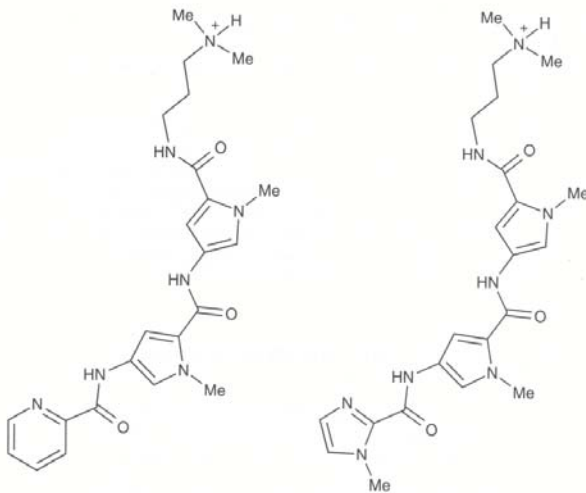


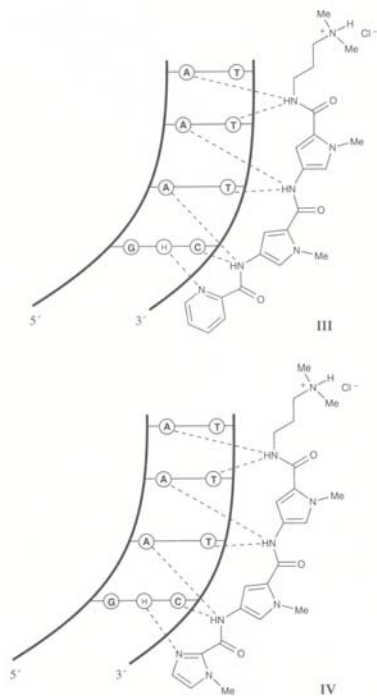
Abbildung der gegabelten H-Brücken im 1:1 K.

5.1.4 Synthetische Distamycin- und Netropsin-Derivate mit veränderter Bindungsspezifität

Die natürlichen Naturstoffe verfügen lediglich über H-Brücken Donoren, die in die kleine Furche gerichtet sind. Durch den Einbau von Pyrimidin- oder Imidazolbausteinen können synthetische Verbindungen geschaffen werden die zusätzlich über H-Brücken Akzeptoren verfügen. Mit diesen Verbindungen gelingt dann auch die molekulare Erkennung der 2-NH₂-Gruppe des Guanins.



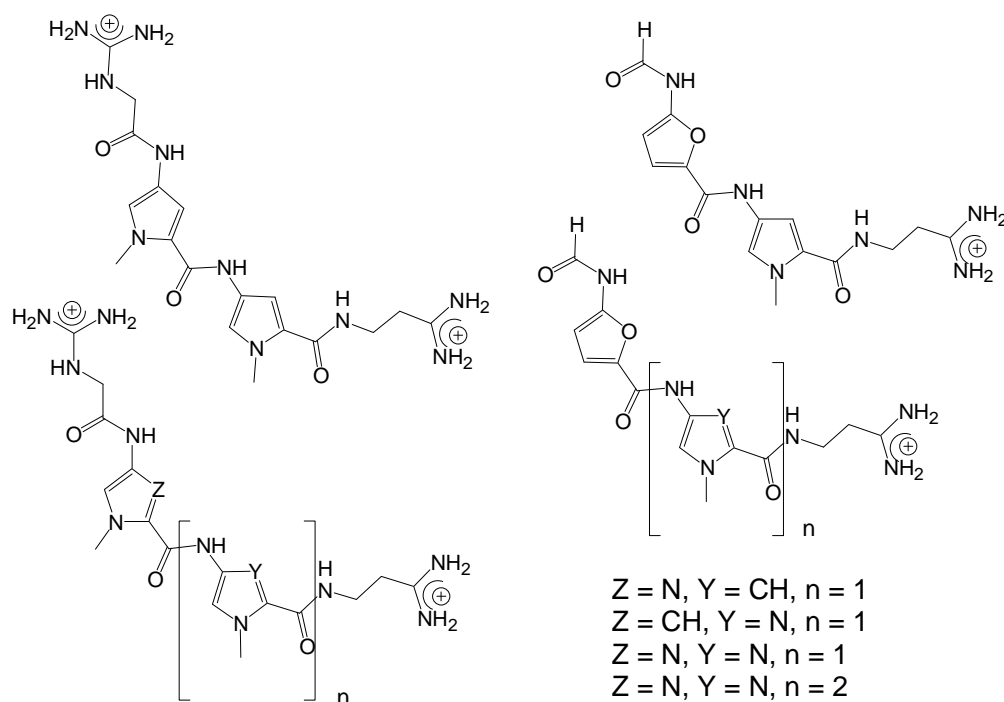
Pyridin-2-carboxamidonetropsin 2-PyN und N-Methylimidazol-2-carboxamidonetropsin 2-ImN.



Bindungsmotiv von 2-PyN und von 2-ImN.

Diese modifizierten Verbindungen tolerieren G/C-Sequenzen am Terminus des Bindungsmotivs. Hier befindet sich der H-Brückenakzeptor der modifizierten Verbindungen.

Weitere Substanzen wurden von der Gruppe von Prof. Lown dargestellt. Auch diese Furanyl-Lexitropsine und Thiazol-Lexitropsine verfügen über H-Brückenakzeptoren und tolerieren GC-Basenpaare. Diese S-Netropsine und S-Distamycine binden mit der gleichen Stärke ($K_a = 10^6$) an AT- und GC-Regionen. Der größere sterische Anspruch der Aminogruppe in der kleinen Furche lässt sich nicht so leicht kompensieren. Daher binden alle diese S-Verbindungen mit einer um den Faktor zehn geringeren Bindungsaffinität (10^6 statt 10^7). Vermutlich bindet diese Verbindung das Motiv GCCA. Das A muss vorhanden sein. Wichtigstes Bindungselement ist die Ausbildung einer H-Brücke zwischen dem Furan-O und der 2-NH₂-Gruppe des Guanins.



Darstellung einer Serie von chemisch veränderten Lexitropsinen.

5.1.5 Strategien zur Erhöhung der Sequenzspezifität und der Bindungsstärke

Einer der wichtigsten Ansätze zur Steigerung der Spezifität ist die Verlängerung der Bindungsregion von 4 Nukleotiden auf 15 Nukleotide. Eine bestimmte Sequenz von 15-18 Nukleotiden kommt im menschlichen Genom mit 3×10^9 statistisch verteilten Basenpaaren nur einmal vor. Eine solche Erkennungslänge reicht also aus, um nur

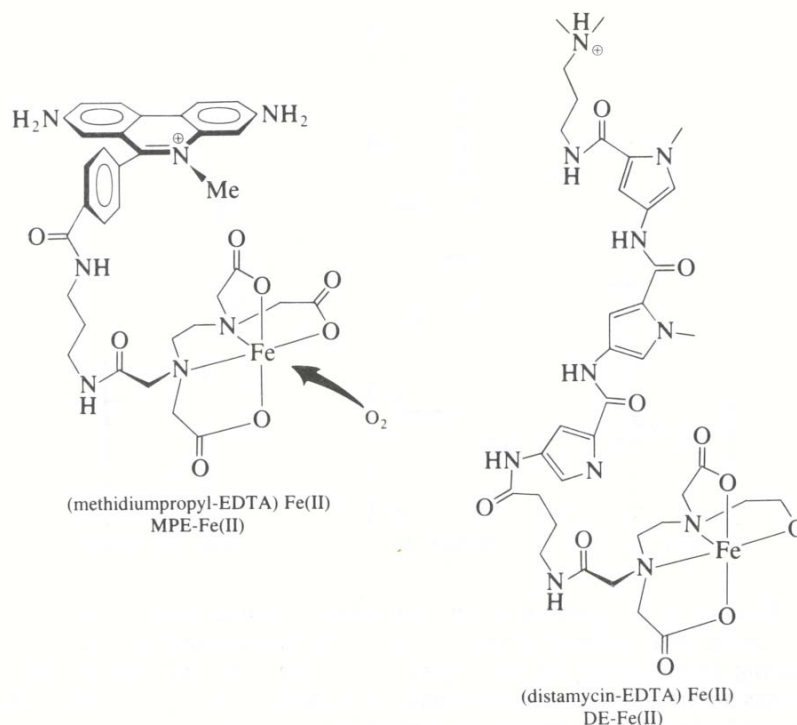
ein bestimmtes Motiv im gesamten Genom zu erkennen. Zur Darstellung von Verbindungen die derart lange Sequenzen erkennen, werden zwei Strategien verfolgt. A. Die Verlängerung des Naturstoffes und B. das Aneinanderhängen der Naturstoffe.

A. Mehr Carboxamid-Einheiten. Durch eine Verlängerung der Distamycine um weitere Pyrrolcarboxamid-Einheiten, kann das Bindungsmotiv vergrößert werden. Jede Carboxamid-Einheit ist allerdings für den optimalen Fit um ca. 20 % zu groß. Nach sieben Einheiten nimmt daher die Bindungsaffinität wieder ab. Die Verbindung gerät aus dem „Tritt“.

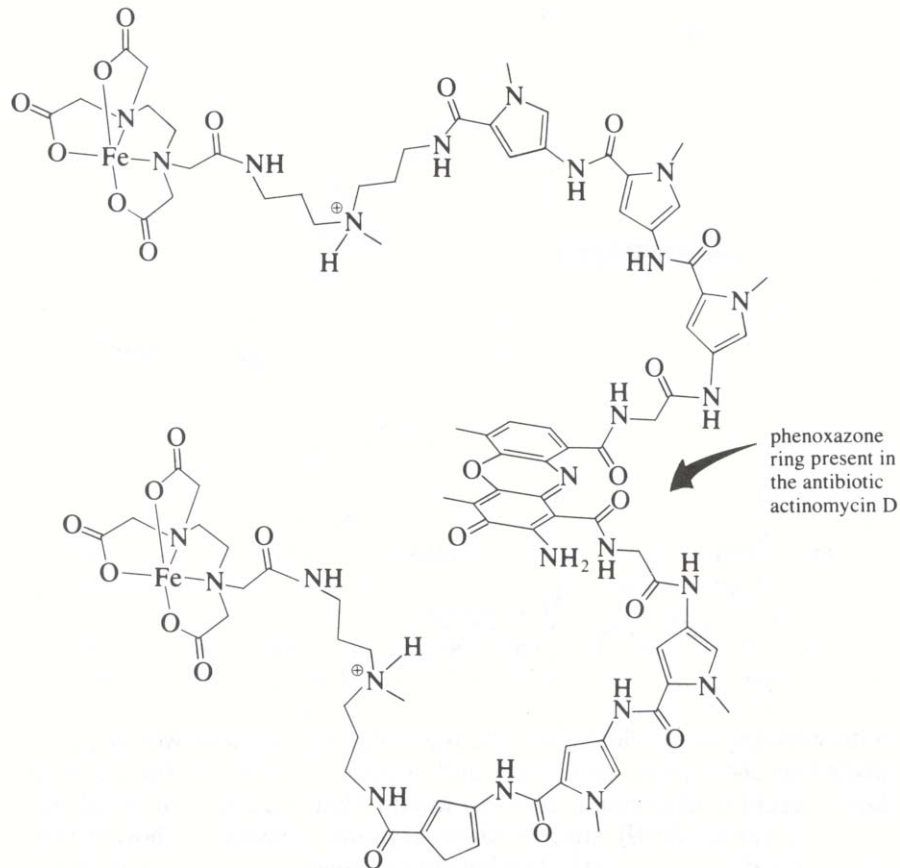
B. Um dieses „aus dem Tritt geraten“ zu vermeiden wird versucht, einzelne Distamycine über kleine Spacer aneinander zuhängen. Hierdurch gelingt es, Motive mit bis zu 16 Basenpaaren gezielt anzusteuern.

In weiteren aktuellen Projekten, werden die Distamycine mit Gruppen ausgestattet, die z. B. DNA spaltende Eigenschaften besitzen. Hierdurch gelingt es, künstliche Nukleasen darzustellen.

Ein weiterer Ansatz ist die Synthese von Hybrid Molekülen. In diesen wird eine Distamycin-Einheit mit einem Interkalator verknüpft.



Darstellung synthetischer Lexitropsine mit zusätzlichen funktionellen Gruppen.



Darstellung eines Lexitropsins mit einem Interkalator in der Mitte. Die Verbindung erkennt ein 10 Basenpaar langes Motiv $(AT)_4(GC)_2(AT)_4$.

Intensive NMR-Untersuchungen der Komplexe aus Distamycin/Netropsin und DNA in der Gruppe von Prof. Wemmer in Berkley haben gezeigt, dass nicht nur ein Distamycin in die kleine Furche bindet. Oft bildet sich ein 2:1 Komplex mit zwei Distamycinen in antiparalleler Anordnung in der kleinen Furche. Man beobachtet kooperatives Bindungsverhalten. Die Art wie die einzelnen Distamycine in die Furche binden ändert sich hierbei. Gegabelte H-Brücken werden nicht mehr gefunden. Jedes Distamycin ist lediglich in Kontakt mit nur einem Strang. Dieses Bindungsverhalten kann man ausnutzen. So wurde von Lown et al. Kürzlich ein Dimer dargestellt, indem zwei Distamycine über die Pyrrol-Einheiten miteinander verknüpft wurden. Dieses Dimer bindet ca. 1000 mal stärker an DNA, als die Monomeren alleine.

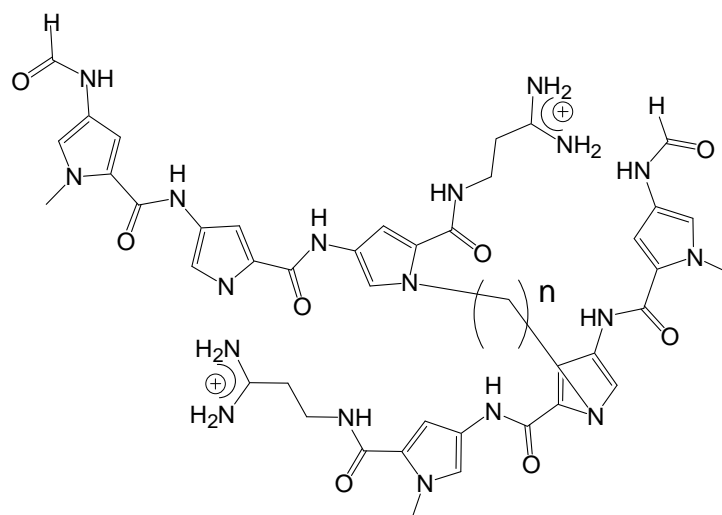
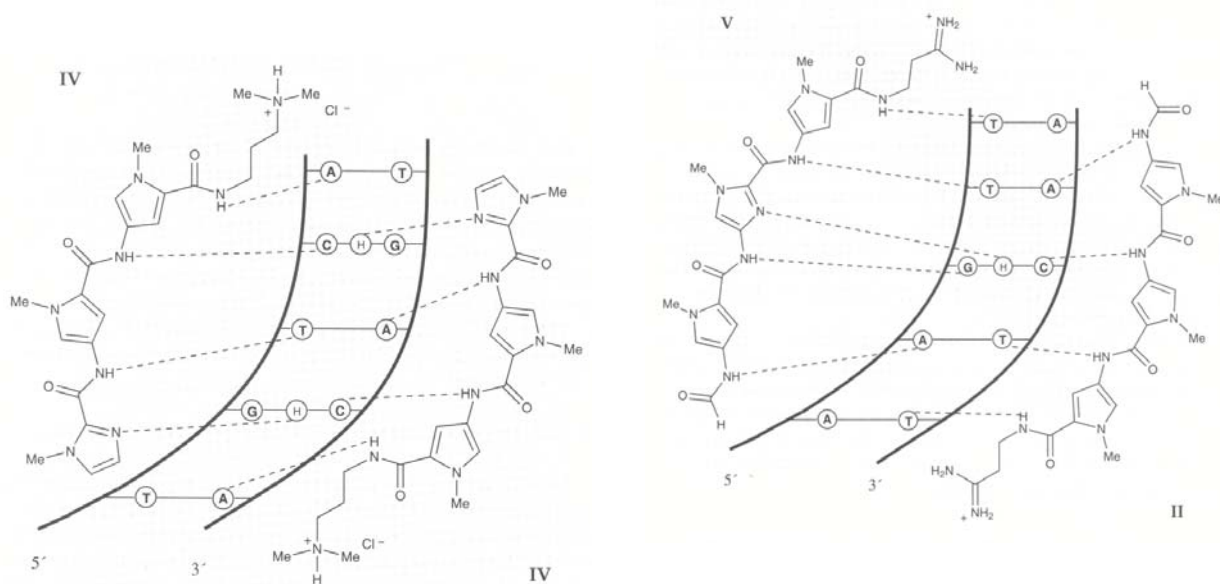


Table 2. Constants of Bindung to poly(dA-dT)-poly(dA-dT)

compd	8	1a	1b	1c	1d
C_{50} (μM)	2.08	1.41	2.05	0.87	0.098
C_{25} (μM)	1.05	0.69	0.93	0.26	0.048
$K_{1:1}$ ($\times 10^6$)	2.00	3.19	48.7	113	1842
$K_{2:1}$ ($\times 10^6$)	10.4	16.6	1.09	0.46	0.029

Darstellung der von Lown et al. dargestellten Verbindung und deren Assoziationskonstanten.



Darstellung des Bindungsmotives im 2:1 Komplex in einem 1:1:1 Komplex.

5.2 Molekulare Erkennung in der DNA-Hauptfurche

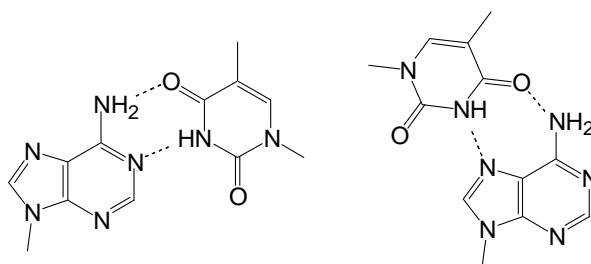
Die molekulare Erkennung von DNA in der Hauptfurche ist eine der wichtigsten modernen Strategien zur Behandlung von Krankheiten. Wichtig ist die Differenzierung von drei Begriffen. Der Gen-Therapie, der Antigen-Strategie und der Antisense-Strategie.

5.2.1 Gen Therapie

In der Genterapie wird versucht, Menschen, denen ein wichtiges Gen fehlt, oder bei denen nur eine fehlerhafte Kopie des Gens vorhanden ist, mit dem richtigen Gen zu versorgen. Hierbei wird zur Zeit versucht Retroviren als Genboten zu verwenden. Das Ziel ist, harmlose, nicht vermehrbare, Retroviren zu erzeugen, die bestimmte Zellen im Organismus befallen und diese dann mit dem richtigen Gen versorgen.

5.2.2 Antigen-Strategie

Mit Antigen Projekten versucht man die Expression bestimmter Gene zu verhindern. Durch die Synthese eines Oligonukleotides, dass mit DNA einen stabilen Triplehelix-Strang bildet, soll auf der Ebene der DNA die Expression des Proteins verhindert werden. Die Taktik ist hierbei die gleiche wie im Fall der Distamycine und Netropsine. Die zum Ablesen der Information nötigen Proteine können nicht an die entsprechenden DNA-Bereiche „andocken“. Antigen-Verbindungen sind meist modifizierte Oligonukleotide, die sich fest in die Hauptfurche der DNA einlagern. Die Spezifität dieser Bindung wird durch die Ausbildung von Hoogsteen-Wasserstoffbrücken erreicht.



Darstellung der Watson-Crick- und der Hoogsteen-Basenpaarung.

Der Antigen-Strang paart mit der DNA-Doppelhelix über Hoogsteen H-Brücken. Dabei legt er sich fest in die große Furche und bildet mit der DNA einen Triplex. Paarung tritt nur mit einem Homopurin-Strang auf (ein Strang der nur Purin-Basen enthält).

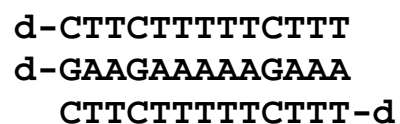
Es gibt zwei wesentliche Motive:

- a) Pyr-Pur-Pyr Motiv
- b) Pur-Pur-Pyr Motiv

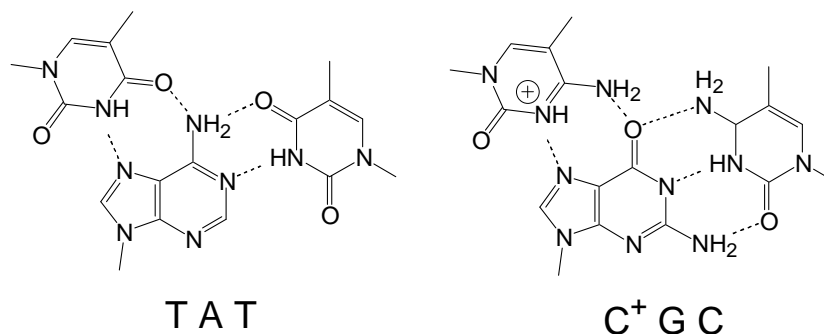
5.2.2.1 Das Pyr-Pur-Pyr Motiv

Hier binden Thymin- und Cytosin enthaltende Oligonukleotide an eine Homopurin-Homopyrimidin Doppelhelix. Die Paarung erfolgt mit dem Homopurin-Strang.

Die Bindung des dritten Stranges erfolgt so, dass das Zucker-Phosphat Rückgrat die gleiche Polarität wie der Homopurin-Strang hat (parallele Bindung). In diesem Motiv muss das Cytosin protoniert sein. Nur so kann das N3 des Cytosins in einen H-Donor umgewandelt werden. Die Bindung des dritten Stranges an die DNA ist daher stark pH-abhängig und bei niedrigen pH-Werten deutlich stärker. So ist Schmelztemperatur ($T_{1/2}$) des Triplexes



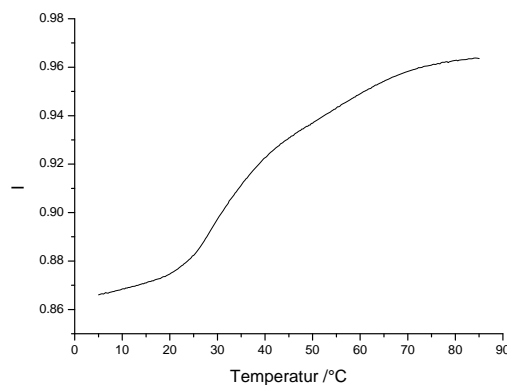
Bei pH 7 mit 28 ° um 11 ° höher als bei pH 8 (17°).



Darstellung der H-Brückenbindungen mit Pyr-Pur-Pyr Motiv.

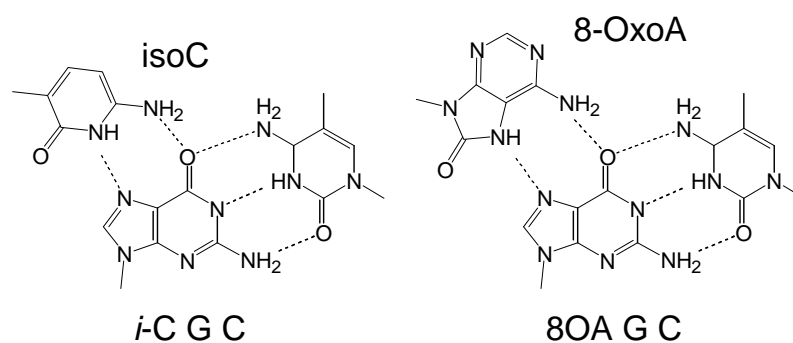
Gemessen werden die Stabilitäten von Doppel- und Tripel-Helices durch die Aufnahme sogenannter Schmelzkurven. Hierbei beobachtet man die Absorption der Probe bei 260nm in Abhängigkeit von der Temperatur. Durch das Aufschmelzen der

geordneten Strangstruktur nimmt die Absorption bei dieser Wellenlänge deutlich zu. Beobachtet man die Absorptionsänderung bei steigender Temperatur, so erhält man eine sigmoidale Kurve. Die Temperatur am Wendepunkt ist die Schmelztemperatur. Diese ist ein Mass für die Stabilität des Organisates. Doippelstränge ergeben einen Schmelzpunkt, bei der Temperatur, bei der sich die Einzelstränge trennen. Tripelhelix-Stränge ergeben zwei Schmelzkurven. Erst bildet sich aus dem Triplexstrang ein Duplex, dann schmilzt der Duplex zu den Einzelsträngen auf. Eine typische Schmelzkurve, die zwei Übergänge zeigt ist unten dargestellt.



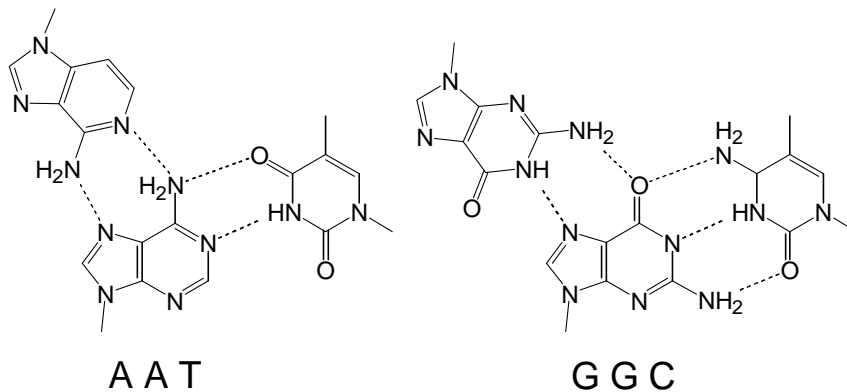
Temperaturabhängige UV-Absorption von DNA. Deutlich sichtbar sind zwei ineinander übergehende sigmoidalen Kurve, die jeweils für einen Schmelzpunkt stehen (ca. 30°C und 50°C).

Die Triplexbildung kann bei physiologischen Bindungen stark verbessert werden, wenn statt Cytosin unnatürliche Basen wie das 5-Methylcytosin verwendet werden. Untersucht wurde in diesem Zusammenhang die Verwendung von Pseudoisocytosin (C*), das nicht protoniert werden muss, um als H-Donor zu fungieren. Des Weiteren wurde mit 8-Oxoadenin und 6-Methyl-8-oxoadenine gearbeitet, die beide zur Ausbildung der geforderten Hoogsteen Basenpaarungen befähigt sind. Diese beiden Basen nehmen am Zucker die *syn*-Konformation ein.



Darstellung von Pseudoisocytosin und 8-Oxoadenin im Basentriplex.

5.2.2.2 Das Pur-Pur-Pyr Motiv



Darstellung der H-Brücken im Pur-Pur-Pyr Motiv.

Die Bindung des dritten Stranges erfolgt erneut in der DNA-Hauptfurche. Wiederum wird zur Ausbildung der Tripelhelix ein Homopurin-Strang benötigt. Die Bindung erfolgt nun jedoch nicht mehr parallel, sondern antiparallel. Die Bildung dieser Tripelhelix ist nicht mehr stark pH-abhängig, da keine Protonierung erfolgen muss.

5.2.3 Antisense-Strategie

Messenger-RNA (Boten-RNA, m-RNA) ist die Botenverbindung, die die von der DNA abgelesene Information zum Ribosom, für die Translation in den Peptidstrang, transportiert. Da die messenger RNA „einzelsträngig“ ist, lassen sich Oligonukleotide darstellen, die mit der RNA einen stabilen Duplex bilden. Die Bildung von doppelhelikalen Bereichen in der RNA führt zur Blockade der Translation am Ribosom. Durch die Synthese spezifischer Antisense-Verbindungen gegen messenger-RNA lässt sich die Expression schädlicher Gene in Proteinen unterbinden.

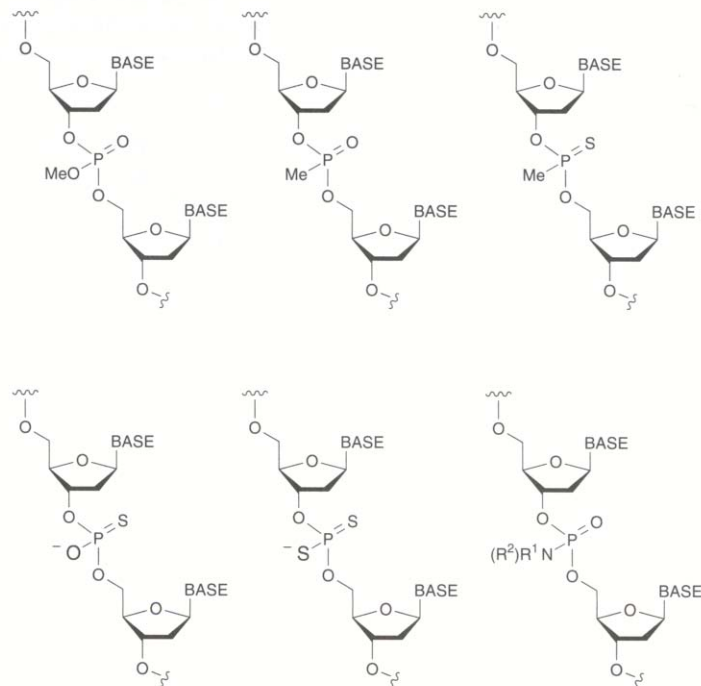
Die messenger-RNA ist ein sehr kompliziertes Molekül, das nach dem Ablesen der Information von der DNA noch stark verändert wird. So wird an beide Enden der RNA ein Oligonukleotid –die *cap-region*- angehängt. Diese Bereiche sind wichtig für das Einfädeln der RNA ins Ribosom. Außerdem werden bestimmte Teile in der Mitte (sogenannte Introns) herausgeschnitten. Die messenger-RNA ist auch kein lineares strangförmiges Molekül, sondern faltet sich in eine dreidimensionale Struktur. Alle diese strukturellen Besonderheiten verkomplizieren die Antisense-Strategie. Es gibt

jedoch bestimmte Bereiche, die mit großer Wahrscheinlichkeit einzelsträngig vorliegen. Diese wählt man als Targets.

Um eine geeignete Spezifität zu erreichen, muss das Antisense oder Antigen-Oligonukleotid mindestens 15 Nukleotide lang sein.

5.2.4 Oligonukleotid-Analoga mit einer Veränderung an der Phosphordiester Bindung

Viele der Oligonukleotide sind nicht als Medikamente einsetzbar. Als Polyanionen sind sie nicht in der Lage, die hydrophobe Zellmembran zu überwinden. Darüber hinaus werden die natürlichen Oligonukleotide von verschiedenen Enzymen im Organismus schnell abgebaut (Nukleasen). Weltweit werden deshalb große Anstrengungen unternommen modifizierte Oligonukleotide darzustellen, die stabil sind gegenüber Nukleasen und die Zellmembran überwinden können. Hierzu gehören die Phosphorthionate, die α -anomeren Oligonukleotide, die Methylphosphonate und andere nichtphosphat-verbrückte Oligonukleotide. Darüber hinaus versucht man Oligonukleotide mit stärkeren Bindungsaffinitäten durch Verknüpfung mit anderen, sehr fest bindenden Verbindungen, darzustellen.



Darstellung einiger modifizierter Oligonukleotide.

5.2.4.1 Phosphothioate und Phosphordithioate

Eine der ersten Veränderungen die vorgenommen wurde, war der Ersatz eines Sauerstoffs durch ein Schwefel an der Phosphordiester Bindung. Hierdurch wird ein neues chirales Zentrum gebildet. Das führt dazu, dass 2^n Diastereomere entstehen. Leider besitzen diese Diastereomeren unterschiedliche Paarungseigenschaften. Durch die Verwendung der entsprechenden Phosphodithionate kann dieses Problem umgangen werden. Diese Veränderung hat dazu geführt, dass die Oligonukleotide wesentlich stabiler sind gegenüber hydrolytisch aktiven Proteinen. Auch die Aufnahme in die Zelle konnte verbessert werden, obwohl es sich immer noch um Polyanionen handelt.

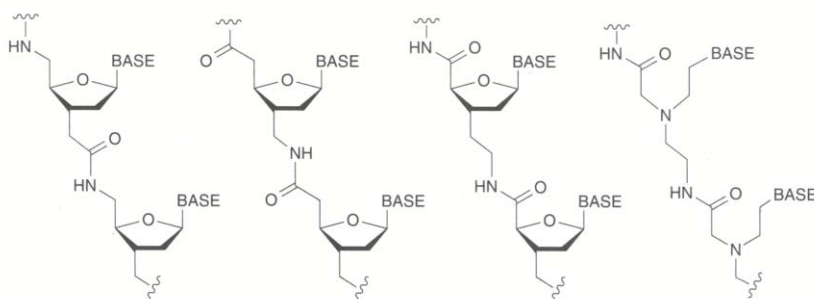
5.2.4.2 α -Anomere Oligonukleotide

Auch diese Oligonukleotide mit umgekehrter Konfiguration an C1', werden mit Hilfe der Festphasensynthese aufgebaut. Sie sind sehr hydrolysebeständig und sie bilden stabile Duplexe mit DNA und RNA. Die Stränge sind parallel ausgerichtet.

5.2.4.3 Methylphosphonate

Diese komplett nichtionischen Verbindungen gelangen gut durch die Zellmembran. Sie sind zwar relativ basenlabil aber ausgesprochen hydrolysestabil in Gegenwart von Nukleasen (DNA spaltende Enzyme). Leider tritt erneut das Diastereomeren-Problem auf. Die Verbindungen bilden sehr stabile Duplexe und Triplexen. Da die Abstoßung der negativen Ladungen im Rückgrat aufgehoben ist.

5.2.4.4 Nichtphosphat verbrückte Oligonukleotide

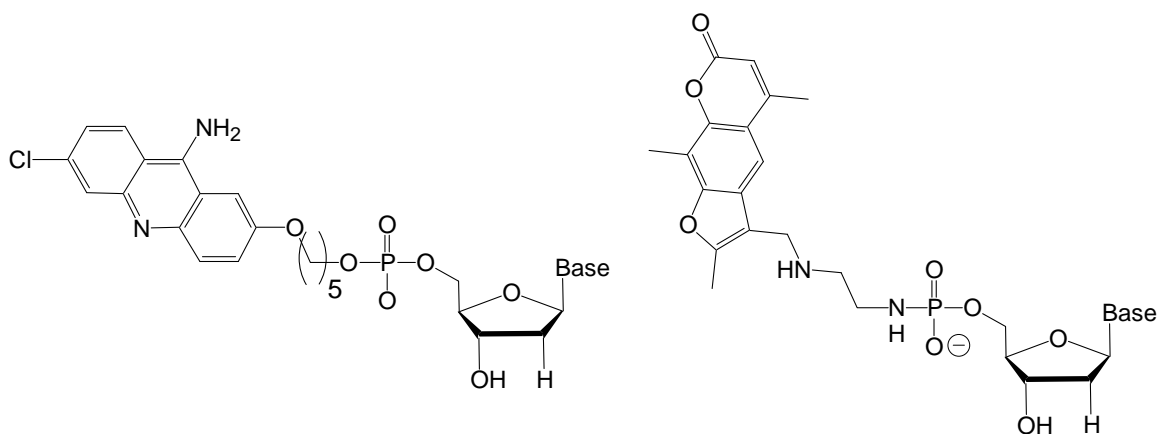


Darstellung von Oligonukleotiden ohne Phosphatrückgrat. Ganz links gezeigt sind die heute sehr wichtigen Peptidnukleinsäuren auch PNA genannt.

In jüngster Zeit wurde eine Reihe von Oligonukleotiden dargestellt, in denen die Phosphordiester Bindungen komplett ersetzt worden sind. Hierzu gehören die Carbonat und Carbamat verknüpften Nucleoside sowie die durch Formacetale verbrückten Verbindungen. Für viel Aufregung hat die Entdeckung gesorgt, dass auch Oligonukleotide stabile Duplexe und Triplexen bilden können, in denen auch die Ribose- oder Deoxyribose -also die Zuckereinheit- ersetzt worden ist. Diese als PNA bezeichneten Verbindungen sind momentan große Hoffnungsträger, da sie sich sehr vorteilhaft mit Hilfe der Fesphasenmethode von Merrified darstellen lassen.

5.2.4 Weitere Strategien zur Erhöhung der Bindungsstärke

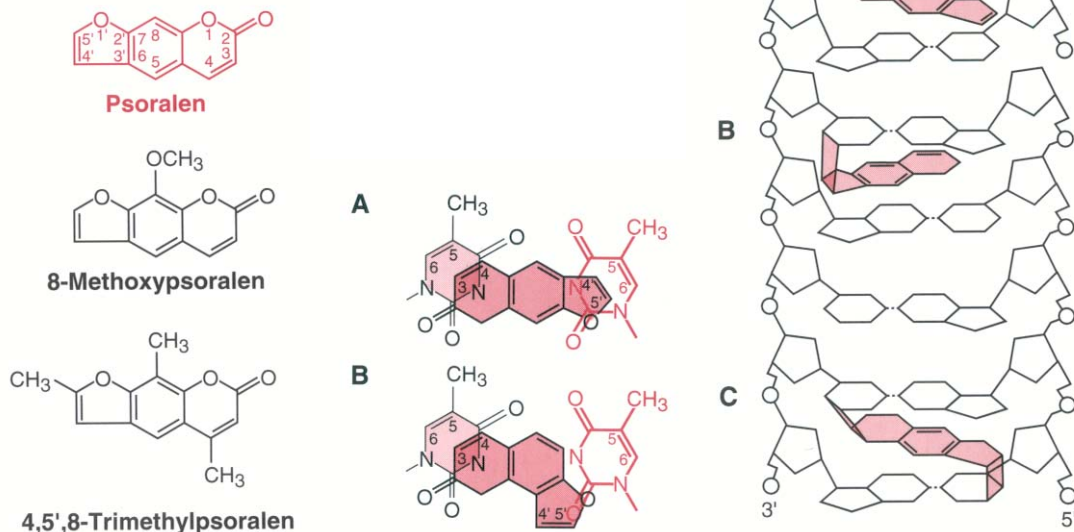
Wie schon im Fall der Distamycine und Netropsine wird versucht die Oligonukleotide mit anderen DNA-bindenden Verbindungen zu Hybridmolekülen zu vereinigen. Diese Strategie wird vor allem bei der Darstellung von Antigen-Verbindungen vorangetrieben.



Darstellung von Acridin und Psoralen verknüpften Nucleotiden.

Hierzu werden, vor allem in den Laboratorien von C. Hélène in Paris, die Oligonukleotide mit Interkalatoren verknüpft. Hierzu dient das Acridin, das sehr gut in die DNA interkaliert (s. u.). Die sich bildenden Triplexen sind wesentlich stabiler als die entsprechenden Triplexen ohne den Interkalator. Die beste Verknüpfung wäre mit einer Substanz, die nach der Bindung des Oligonukleotids an die DNA, eine kovalente Verbindung mit der DNA eingeht und so das entsprechende Gen auf Dauer schädigt. Eine Möglichkeit ist die Verknüpfung des Antigen-Stranges mit Psoralen. Psoralene bilden nach der Bestrahlung eines Psoralen-DNA Komplexes mit Licht der Wellenlänge 365 nm ein kovalentes Addukt. Basis dieser Reaktion ist

eine $[2\pi_s+2\pi_s]$ Cycloaddition zwischen dem Psoralen und den Pyrimidinen in der DNA.



Darstellung von Psoralen, 8-Methoxypsoralen und 4,5'-H-Trimethylpsoralen. Schematische Darstellung der DNA-Komplexe und Addukte.

Fazit:

Es gibt drei wichtige neue Strategien, wie Krankheiten auf der Ebene des genetischen Materials bekämpft werden sollen. Mit der Gentherapie wird versucht, dem Organismus eine funktionierende Kopie eines krankhaft veränderten Gens zu geben. Hierzu werden Retroviren als Genboten eingesetzt.

Die Antigen-Strategie beruht auf der Synthese modifizierter Nukleinsäuren von mindestens 15 Nukleinsäuren Länge, die in die große Furche der DNA binden. Diese Substanzen binden nur Homopurin-Bereiche der DNA. Dabei bilden sich spezifische Hoogsteen-Wasserstoffbrücken mit dem Doppelstrang aus. Hierdurch wird das Ablesen der Informationen durch den Transkriptionsapparat der Zelle gestört. Das Gen wird nicht abgelesen. Es gibt zwei wesentliche Bindungsmotive. 1. Das Pyr-Pur-Pur Motiv unter Verwendung von Thymin und Cytosin. Die Stabilitäten dieser Komplexe sind stark pH-abhängig. Durch Verwendung modifizierter Basen, wie von

Pseudoisocytosin kann dieser Umstand überwunden werden. 2. Das zweite Bindungsmotiv, Pur-Pur-Pyr zeigt pH-unabhängige Komplexstabilitäten.

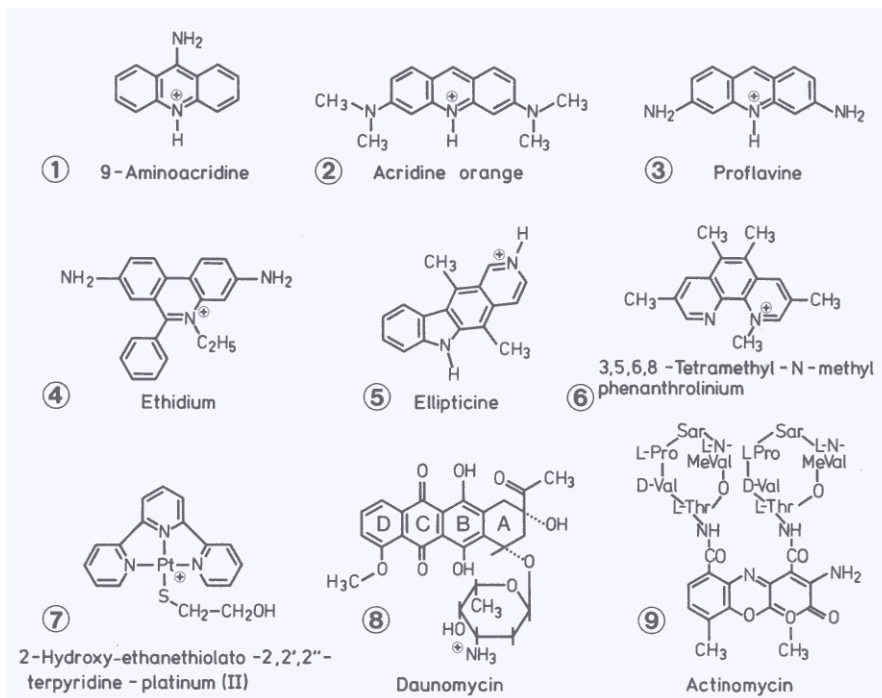
Mit der Antisense-Strategie wird versucht Oligonukleotide zu synthetisieren, die mit der Boten-RNA einen festen Doppelstrang ausbilden. Für die Bindung werden die normalen Watson-Crick-Wasserstoffbrücken verwendet. Problematisch ist vor allem, die heftige Veränderung der *messenger*-RNA nach der Synthese an der DNA und die Neigung der Boten-RNA zur Ausbildung einer Sekundärstruktur. Hierdurch werden viele Abschnitte der RNA verändert oder maskiert und sind damit dem Antisense Oligonukleotid nur schwer zugänglich.

Zurzeit richtet sich das Augenmerk auf die Synthese von Oligonukleotid Analoga mit einer veränderten Struktur. Hierdurch soll die Lebensdauer der Verbindungen *in vivo* gesteigert werden. Außerdem soll die Membran Durchgängigkeit der Verbindungen gesteigert werden. Besonders aufregend sind Substanzen, in denen die Phosphordiester-Bindung, z. B. durch Carbamat-, Carbonat- oder Formacetalgruppen ersetzt worden sind. Ein besonders interessanter Verbindungstyp ist die PNA. Hier ist sogar der Zucker ersetzt.

5.3 Die Erkennung von DNA durch Interkalation

5.3.1 Allgemeines

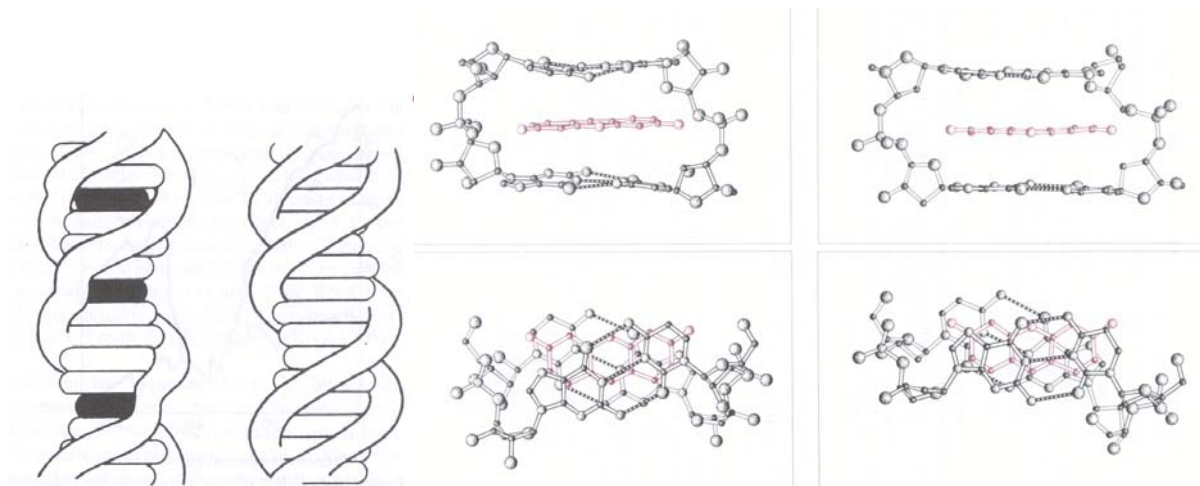
Interkalatoren sind flache aromatische Ringsysteme, die sich zwischen die Basen der DNA einschleusen können. Die sich bildenden Komplexe sind oft sehr stabil und zusätzlich durch ionische Wechselwirkungen durch eine positiv geladene Gruppe am Interkalator und das negativ geladene Phosphatrückgrat stabilisiert. Viele Verbindungen, die mit DNA durch Interkalation wechselwirken, sind heute gebräuchliche Chemotherapeutika im Kampf gegen Krebs. Herausragende Bedeutung haben vor allem die Verbindungen Daunomycin, Adriamycin, Amsacrin und die Bisinterkalatoren Tristin A und Echinomycin. Neben diesen reinen Interkalatoren gibt es eine Reihe von Verbindungen, die über zusätzlich vorhandene Molekülgruppen Strangbrüche der DNA induzieren und so die DNA zusätzlich schädigen.



Beispiele für Interkalatoren.

Durch die positive Ladung der Verbindungen erfolgt zunächst eine sehr schnelle Assoziation mit dem DNA-Rückgrat. Anschließend erfolgt im zweiten Schritt der Bindung, die Interkalation.

Die DNA lässt sich mit Interkalatoren sättigen wobei man beobachtet, dass nur jede zweite mögliche Interkalationsstelle besetzt wird. Diese nearest-neighbor exclusion Regel gilt streng. Die Verzerrung des DNA-Stranges ist zu groß um zwei Interkalatoren nebeneinander gute Wechselwirkungsmöglichkeiten bieten zu können. So wird durch die Interkalation die DNA sehr stark entwunden. Dadurch weitet sich der Basenabstand von 3.4 Å auf 6.8 Å auf. Dieser Abstand ist notwendig um den Interkalator einlagern zu können.

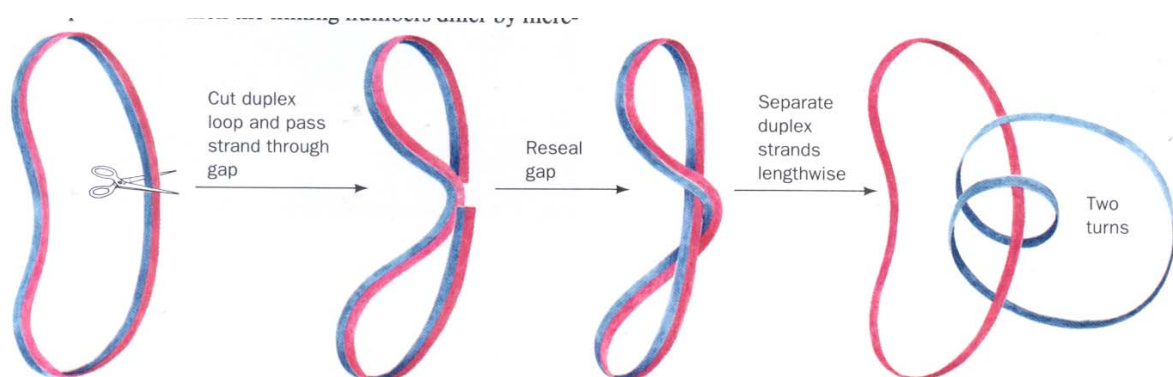
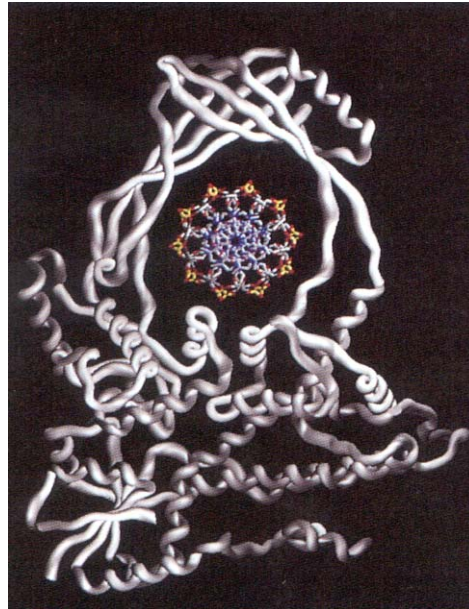
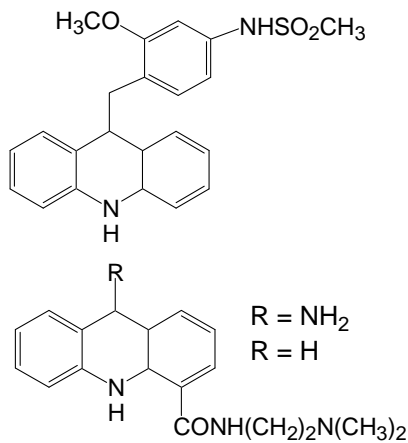


Darstellung einer Interkalation.

5.3.2 Amsacrin. Ein Beispiel für die Komplexität der Biologie

Klinisch ist vor allem das Amsacrin zur Behandlung von Leukämie von Bedeutung. Unter physiologischen Bedingungen ist der Ringstickstoff protoniert ($pK_a = 8.3$) und ermöglicht so den DNA-Drug Kontakt durch elektrostatische Anziehung. In diesen Verbindungen beobachtet man allerdings eine starke Diskrepanz zwischen der Fähigkeit zur Interkalation und der Cytotoxizität. Eine zusätzliche positive Ladung wie sie im 9-Aminoacridin vorhanden ist, fördert zwar die Stabilität des DNA-Komplexes, doch zeigt das 9-Aminoacridin-4-carboxamid trotz starker DNA-Interkalation nur eine schwache cytotoxische Aktivität. Eine hohe Komplexstabilität zieht daher keine große cytotoxische Wirkung mit sich. Die starke Bindung an die DNA ist also notwendig, aber nicht hinreichend für eine starke Cytotoxizität. Intensive systematische Studien haben ferner gezeigt, dass es eine Korrelation gibt zwischen der kinetischen Stabilität des Komplexes und der cytotoxischen Wirkung. Der Ligandenaustausch muss also langsam sein. Amsacrine inhibieren die DNA-Synthese durch Inhibition von der Replikation beteiligter Enzyme. Darüber hinaus inhibieren sie teilweise DNA-Topoisomerasen. Diese entwenden und verwinden DNA und schneiden dabei

temporär den Doppelstrang auf. An der DNA-Interkalator Stelle schneiden die Topoisomerasen zwar noch den Doppelstrang, das Zusammenfügen ist jedoch nicht mehr möglich. Die Folge sind gefährliche Doppelstrangbrüche.

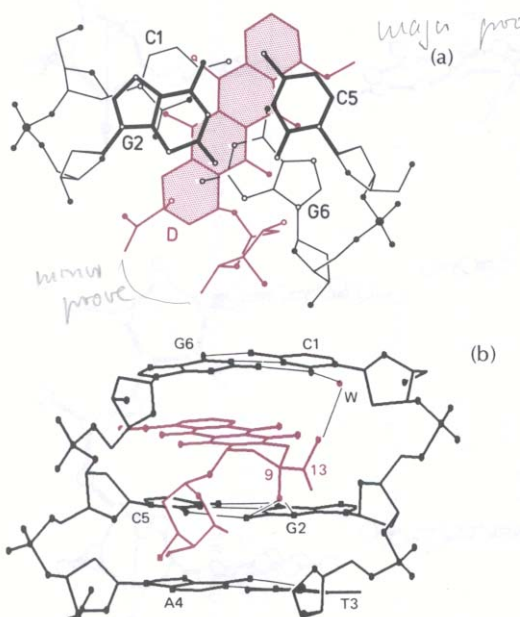


Darstellung von Amsacrin, einem Topoisomerase Komplex und schematische Darstellung der Aktivität von Topoisomerasen.

5.3.3 Daunomycin

Ein weiteres Beispiel für das Interkalation-Phänomen ist der Komplex aus Daunomycin und dem selbstkomplementären Strang d(CpGpTpApCpG). Hier erfolgt die Einlagerung zwischen die Sequenz CpG.

Das flache aromatische Gerüst hat sich komplett zwischen die Basen eingelagert. Der Ring D zeigt in die große Furche. Der Zucker mit der positiven Ladung zeigt in die kleine Furche und füllt diese aus. Hier gibt es eine elektrostatische Wechselwirkung mit dem Phosphat-Rückgrat. Die Bindungsstärke resultiert aus den stacking Wechselwirkungen mit den Basen und zusätzlichen H-Brücken. Hierzu dient die essentielle OH-Gruppe am C6 als H-Donor zum Guanin-N3. Darüber hinaus gibt es eine H-Brücke über ein Wasser Molekül zum Oxosauerstoff am Cytosin C2. Die DNA wird um ca. 8 ° entwunden. Trotz dieser H-Brücken ist das Daunomycin nicht sequenzspezifisch, da sich in der DNA nahezu überall ähnliche H-Brückenmöglichkeiten finden würden.



Daunomycin-DNA Komplex.

5.3.1 Bisinterkalatoren

Eine Reihe von cytotoxischen Bisinterkalatoren sind aus der Natur bekannt. Hierzu gehört auch das gut untersuchte Triostin A und das Echinomycin. Dieses sind Oktadepsipeptide mit zwei Quinoxalinen.

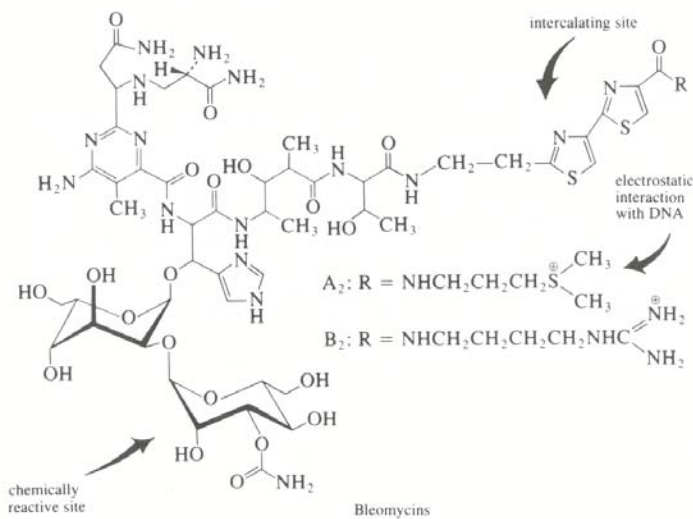
Die Aromaten stehen auf Grund des rigiden Cyclopeptidgerüsts parallel zueinander in einem Abstand von ca. 10 Å. Dieses ermöglicht die Bisinterkalation. Diese Cytostatika bevorzugen als Bindungsregion das Dinukleotid GC mit AT als flankierender Sequenz. An dieser Sequenzspezifität sind vor allem H-Brücken zwischen dem Ala-C=O und der 2-Aminogruppe des Guanins beteiligt. Eines der interessantesten Merkmale der Bindung an DNA ist, dass einige Basen den Watson-Crick Paarungsmodus aufgeben und in den Hoogsteen Modus überwechseln.

5.3.2 Inerkalatoren die DNA-Strangbrücke herbeiführen

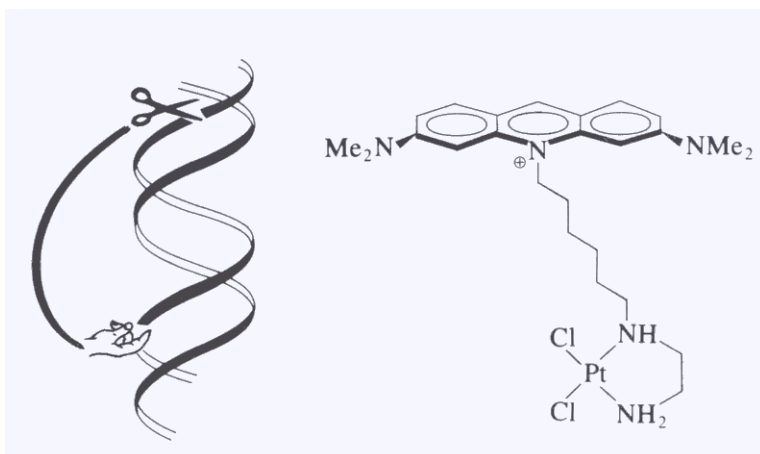
Viele Arbeitsgruppen haben sich in den letzten Jahren mit der Untersuchung von Verbindungen beschäftigt, die neben einem Interkalator eine Gruppe tragen, mit der die DNA geschädigt werden kann. Der Dichloroplatin-Komplex, angeknüpft an den Acridin-Orange Interkalator führt zur Spaltung der DNA, wenn Sauerstoff oder Licht anwesend ist.

Im Fall des Eisen-EDTA Komplexes, werden in Gegenwart von Sauerstoff OH-Radikale gebildet, die die DNA unter H- Abstraktion spalten.

Vorbild dieser synthetischen Verbindungen sind erneut Naturstoffe, die genau diesen Wirkungsmechanismus haben. Ein Beispiel für einen solchen Naturstoff, ist das medizinisch wichtige Bleomycin.



Bleomycin



Darstellung einer synthetisch dargestellten Verbindung, die nach der Interkalation die DNA spaltet.

Das Bleomycin ist ein Metalloglycopeptid. Es verfügt über zwei unterschiedliche Domänen. Zum einen die DNA bindende Einheit, die aus einem Bisthiazol-Interkalator und der positiv geladenen Guanidinium- oder Sulfoniumgruppe besteht. An diese Einheit schließt sich die metallbindende Region an, die aus der Imidiazol- und Pyrimidinsubstruktur aufgebaut wird. Beide Regionen werden durch eine Tripeptidkette miteinander verknüpft.

Fazit:

Verbindungen, die zwischen die Basen in der DNA interkalieren können, sind wichtige Chemotherapeutika im Kampf gegen den Krebs. Die Verbindungen verfügen über ein flaches, meist aromatisches Ringsystem, das sich zwischen zwei Basen einlagert. Hierbei wird maximal jede zweite mögliche Interkalationsstelle besetzt. Die DNA wird durch die Interkalation entwunden und der Basenabstand weitet sich von 3.4 Å auf 6.8 Å.

In der Natur finden sich auch Bisinterkalatoren, wie das Echinomycin und das Triston A, in denen zwei flache aromatische Ringsysteme, mit Hilfe eines starren Cyclopeptidrückgrats, in einer für die Bisinterkalation günstigen parallelen Anordnung gehalten werden. Viele Naturstoffe, wie das medizinisch wichtige Bleomycin, besitzen neben der Interkalationskomponente weitere Bauelemente, deren Funktion es ist, die DNA zusätzlich zur Interkalation zu schädigen und so den Zelltod herbeizuführen.

5.3.3 Endiin-Zytostatika

Diese hochinteressante Klasse von Naturstoffen wurde erst vor wenigen Jahren gefunden. Auch sie sind Interkalatoren, die zusätzlich zur Interkalation den DNA-Doppelstrang durch das Herbeiführen von Strangbrüchen schädigen. Die Gruppe enthält u. a. die Verbindungen: Neocarcinostatin, Calicheamycin, Esperamycin und Dynemycin. Alle Verbindungen besitzen ein gemeinsames Wirkungsprinzip. Sie binden an doppelsträngige DNA durch Interkalation an und führen anschließend, wie im Fall des Bleomycins, schwere DNA-Schäden herbei. Ausgangspunkt der schädigenden Wirkung ist der Angriff eines Thios an einer elektrophilen Stelle des Naturstoffs im Endiin-DNA-Komplex. Hierdurch wird ein Cyclisierungsmechanismus der Endiin-Einheit eingeleitet (Bergman Cyclisierung) der zur Generierung eines Biradikals führt, welches dann die DNA durch H· Abstraktion angreift. Da die

Naturstoffe sehr instabil sind, treten sie in der Natur nicht isoliert auf, sondern sind an ein Protein, das Apoprotein, gebunden. Dieses Protein umschließt die Chromophore und schützt sie vor der sonst schnellen Zersetzung. Alle Endiin-Naturstoffe sind ohne die Proteinhülle sehr labil.

5.3.3.1 Neocarcinostatin

Das Neocarcinostatin kommt ebenfalls nicht frei, sondern nur in Verbindung mit dem Apoprotein in der Natur auf. Das Apoprotein ist ca. 11 kDa schwer und wird aus 113 Aminosäuren aufgebaut. Der Chromophor selbst, besteht aus vier Untereinheiten:

1. Dem Endiin-Teil, der für die DNA-schädigenden Wirkung verantwortlich ist.
2. Dem Naphthalin-Teil, der für die feste Bindung des Chromophors an die DNA durch Interkalation verantwortlich ist.
3. Dem Aminozucker, der in der kleinen Furche zum Liegen kommt und den Neocarcinostatin-DNA Komplex durch eine Salzbrücke weiter verstärkt.
4. Dem cyclischen Carbonat, das für die Membranpermeabilität verantwortlich ist.

Der wesentliche Schritt bei der DNA-Schädigung ist die Ausbildung eines Biradikals, das dann H-Radikale von verschiedenen Stellen der DNA abstrahieren kann.

Alle Endiine besitzen kaum Sequenzspezifität. Hauptangriffspunkt ist das C5' am Nukleotid. Hierbei folgt die H-Abstraktion in der Reihenfolge T > A >> C > G. Nach der Cyclisierung des Endiin-Chromophors am Naturstoff findet zunächst die 5'-H Abstraktion statt. Das entstehende Radikal reagiert dann mit Sauerstoff zu einem Peroxidradikal, welches durch Thiol zum 5'-Aldehyd reduziert wird. Dieser Reaktionsweg ist mit bis zu 80 % der wichtigste schadenserzeugende Prozess. Hauptprodukt des Endiin-Angriffs auf DNA ist entsprechend der 5'-Aldehyd. Darüber hinaus bildet sich etwas Formylphosphat. Wichtig für die schädigende Wirkung ist das Vorhandensein von Sauerstoff und Thiol.

Endiin-Cytostatika führen hauptsächlich Einzelstrangbrüche herbei. Darüber hinaus kommt es auch zur Bildung von Doppelstrangbrüchen. Diese sind zwar zahlenmäßig geringer, doch von entscheidender biologischer Relevanz, da Doppelstrangbrüche von den Zellen nur schwer repariert werden können.

Ein wichtiger Mechanismus, wie es zur Ausbildung von Doppelstrangschäden kommt ist der Angriff des Endiins auf AGT-ACT Stellen. Hierdurch wird an den gegenüberliegenden Thyminen je ein Wasserstoff vom C5' abstrahiert. Anschließender Angriff von Sauerstoff führt zu Bildung des Peroxids an jeder Stelle, das durch Reduktion mit Glutathion zum Nukleosid-5'aldehyd reduziert wird.

Das Thiol ist für die schädigende Wirkung der Endiine also von zweifacher Bedeutung. Zum Einen lässt das nukleophile Thiol durch den Angriff am Chromophor die Cyclisierung ein, zum Anderen, reduziert das Thiols das sich bildende Peroxid. Biologisch ist vor allem das Tripeptid γ -Gluamyl-cysteinyltylcin (Glutathion), das in den Zellen in Konzentrationen von $c = 1 - 5 \text{ mM}$ vorliegt, als Thiol von Bedeutung.

Die biologischen Auswirkungen des Angriffs von Neocarcinostatin an die DNA sind fatal. Durch die Strangbrüche wird die DNA-Reparatur Maschinerie stark aktiviert. Diese entsprechenden Enzyme können jedoch nur die Einzelstrangbrüche effizient beseitigen. Verursacht werden deshalb massive Genomschäden, die zum Zelltod führen. Die große Giftigkeit der Endiine verhindert deshalb zur Zeit den breiten Einsatz in der Chemotherapie von Krebs.