

## **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  $K_{\text{diss}}$ ). 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**

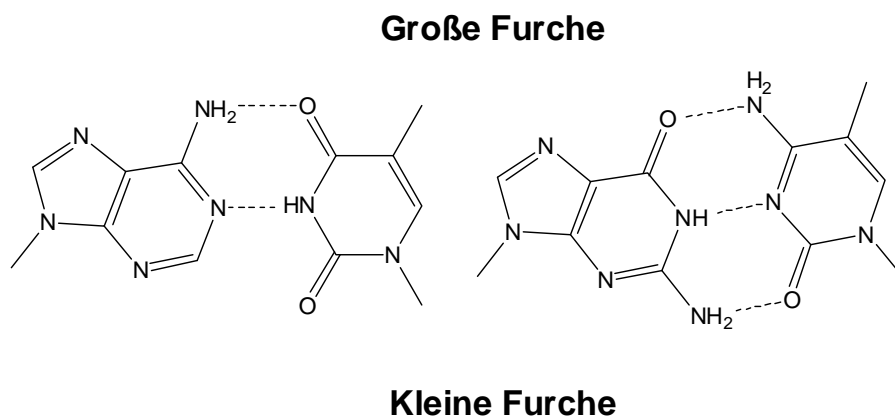
In jede der Furchen ragen spezielle funktionelle Gruppen hinein. Diese dienen allen Molekülen (Proteinen) zur molekularen Erkennung durch H-Brücken.

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-NH<sub>2</sub> und das N7 vom Adenin, der 4-Oxo-Sauerstoff vom Thymin, das N7 vom Guanin, der 6-Oxo-Sauerstoff vom Guanin und die 4-NH<sub>2</sub>-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-NH<sub>2</sub>-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.

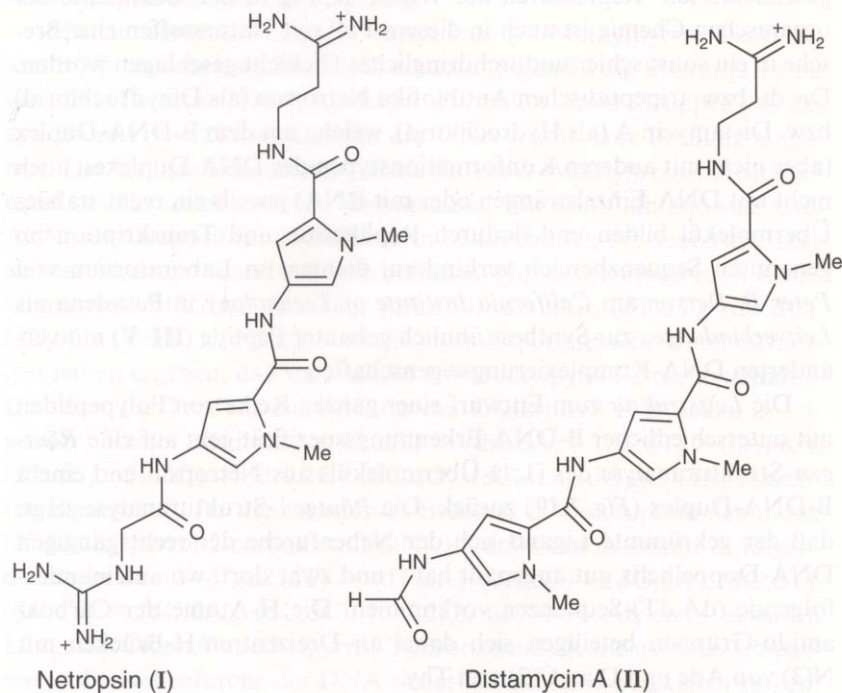
Ausgangspunkt der Forschung sind die Naturstoffe Netropsin und Distamycin, die beide fest in die kleine Furche der DNA binden.



Wasserstoffbrückemuster in den Furchen der DNA

Base pair	Major groove	Minor groove
AT	a d a (CH <sub>3</sub> )	a a
TA	(CH <sub>3</sub> ) a d a	a a
GC	a a d	a d a
CG	d a a	a d a

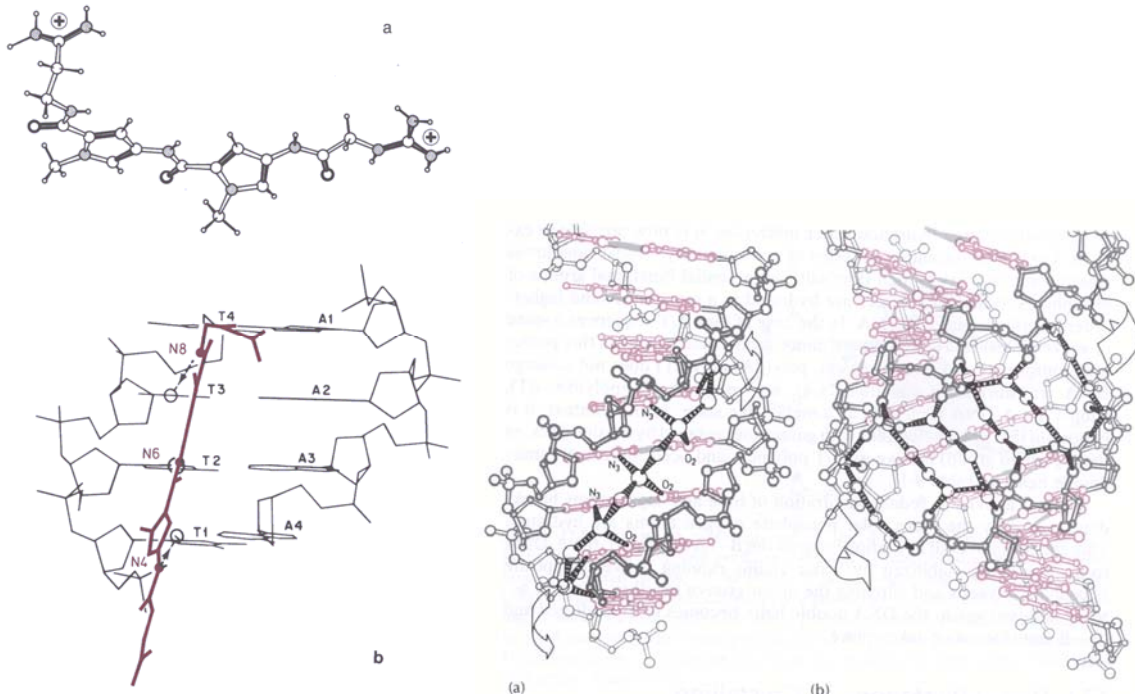
Darstellung der H-Brücken Donor Akzeptor Funktionen in der großen und in der kleinen Furche (a) = H-Akzeptorfunktion, (d) = H-Donorfunktion.



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-Rückrat 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	$\Delta G^\circ$	$\Delta H^\circ$	$\Delta S^\circ$
	(kcal mol <sup>-1</sup> )	(kcal mol <sup>-1</sup> )	(kcal mol <sup>-1</sup> )
polyd(AT) · polyd(AT)	-12.7	-11.2	+5.0
polyd(A) · polyd(T)	-12.2	-2.2	<b>+33.0</b>
polyd(GC) · polyd(GC)	-7.1	-4.3	+9.3
d(GCGAATTCGC) <sub>2</sub>	-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-NH<sub>2</sub>-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.

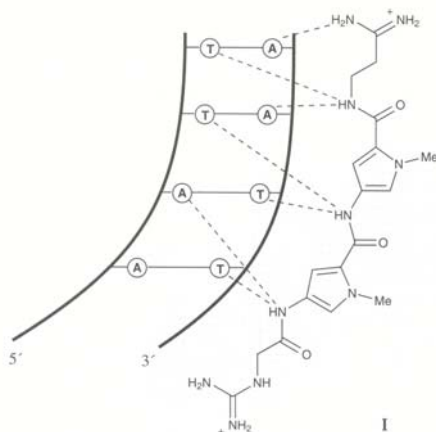
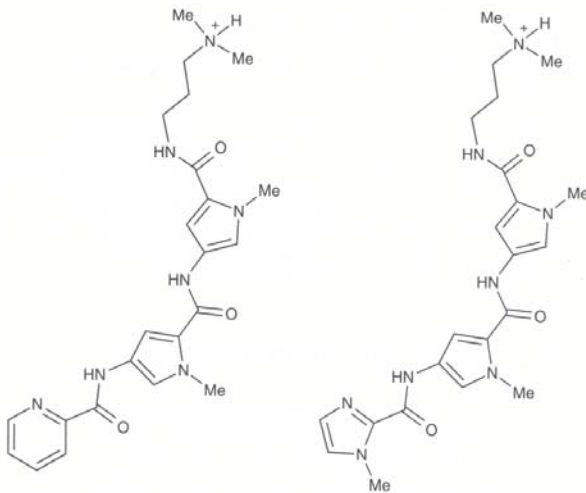


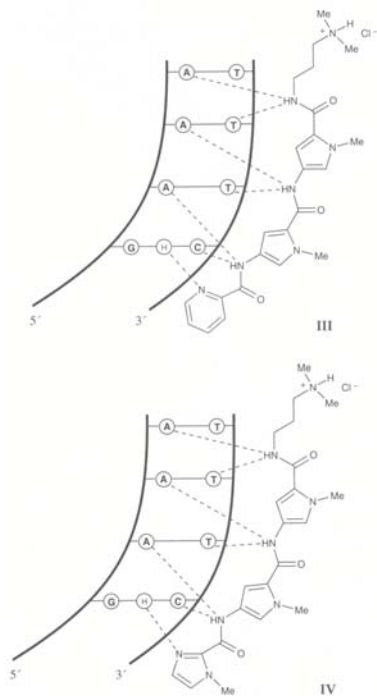
Abbildung der gegabelten H-Brücken im 1:1 K.

### 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-NH<sub>2</sub>-Gruppe des Guanins.



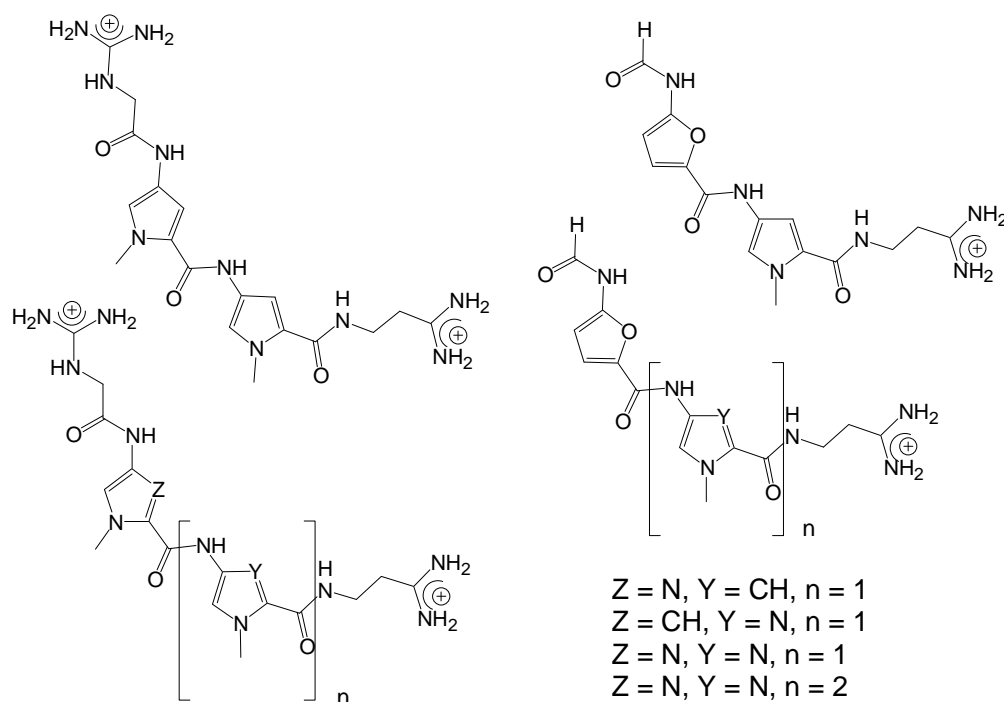
Pyridin-2-carboxamidonetropsin 2-PyN und N-Methylimidazol-2-carboxamidonetropsin 2-ImN.



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-NH<sub>2</sub>-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  $3 \times 10^9$  statistisch verteilten Basenpaaren nur einmal vor. Eine solche Erkennungslänge reicht also aus, um nur

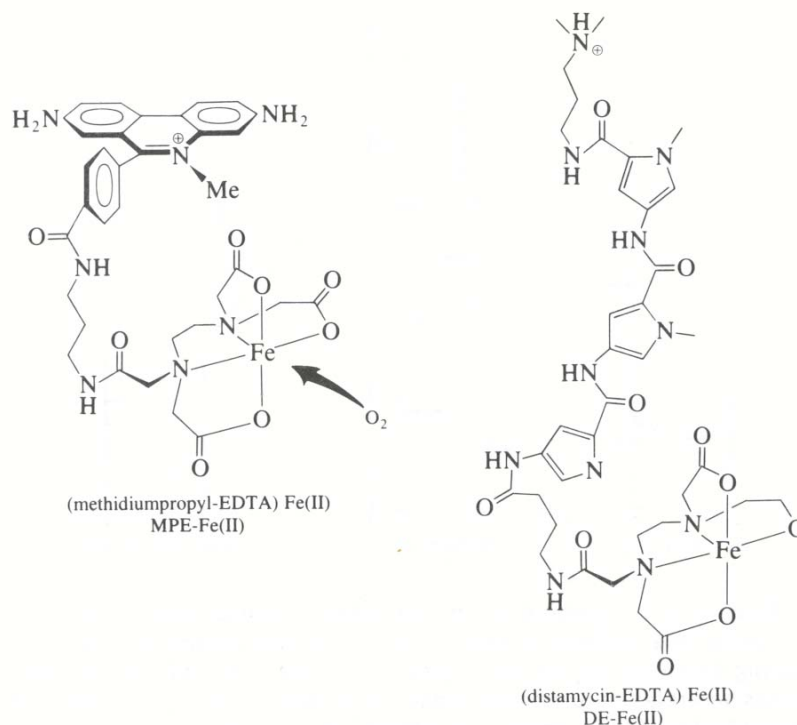
ein bestimmtes Motiv im gesamten Genom zu erkennen. Zur Darstellung von Verbindungen die derart lange Sequenzen erkennen, werden zwei Strategien verfolgt. A. Die Verlängerung des Naturstoffes und B. das Aneinanderhängen der Naturstoffe.

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.

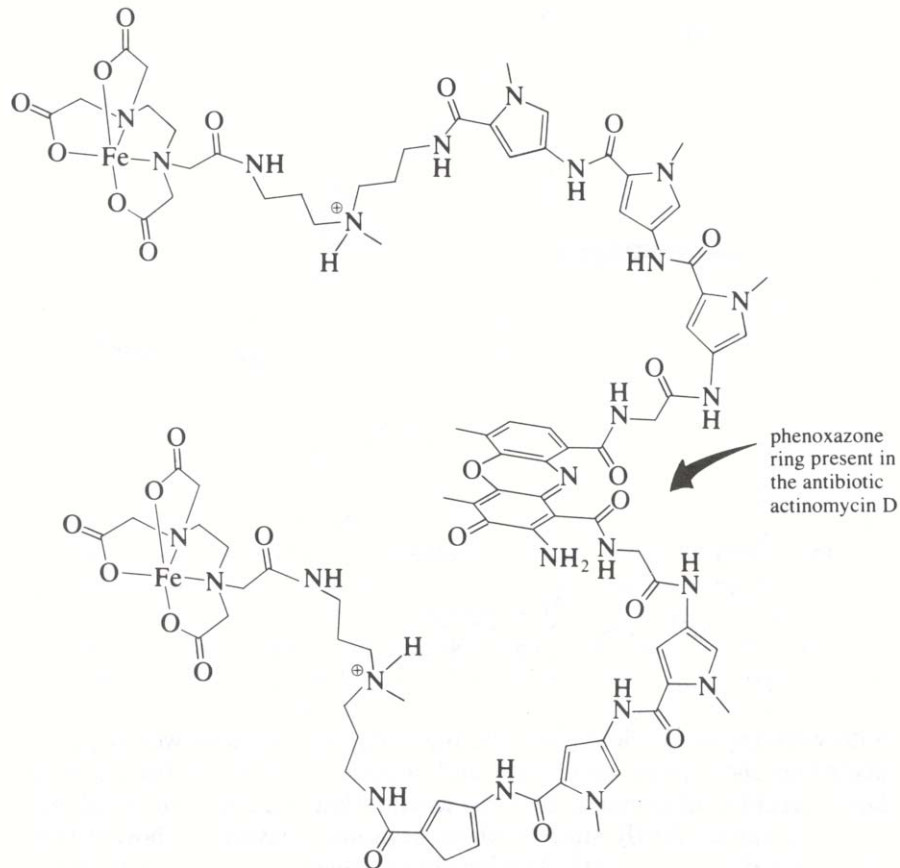
In weiteren aktuellen Projekten, werden die Distamycine mit Gruppen ausgestattet, die z. B. DNA spaltende Eigenschaften besitzen. Hierdurch gelingt es, künstliche Nukleasen darzustellen.

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



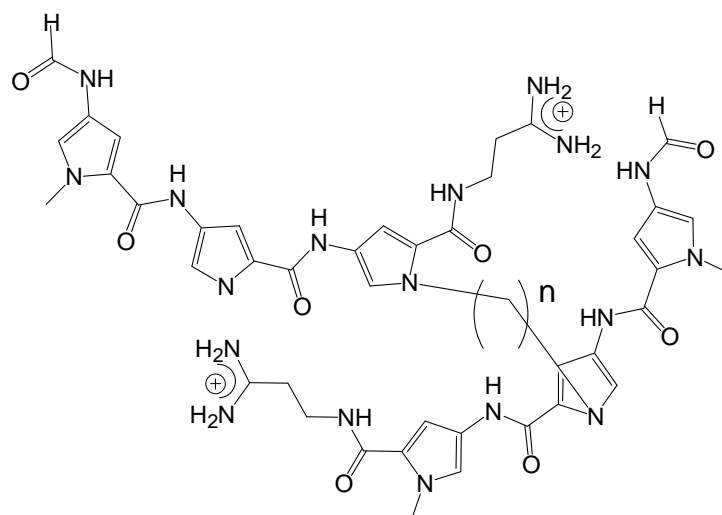
Darstellung synthetischer Lexitropsine mit zusätzlichen funktionellen Gruppen.





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

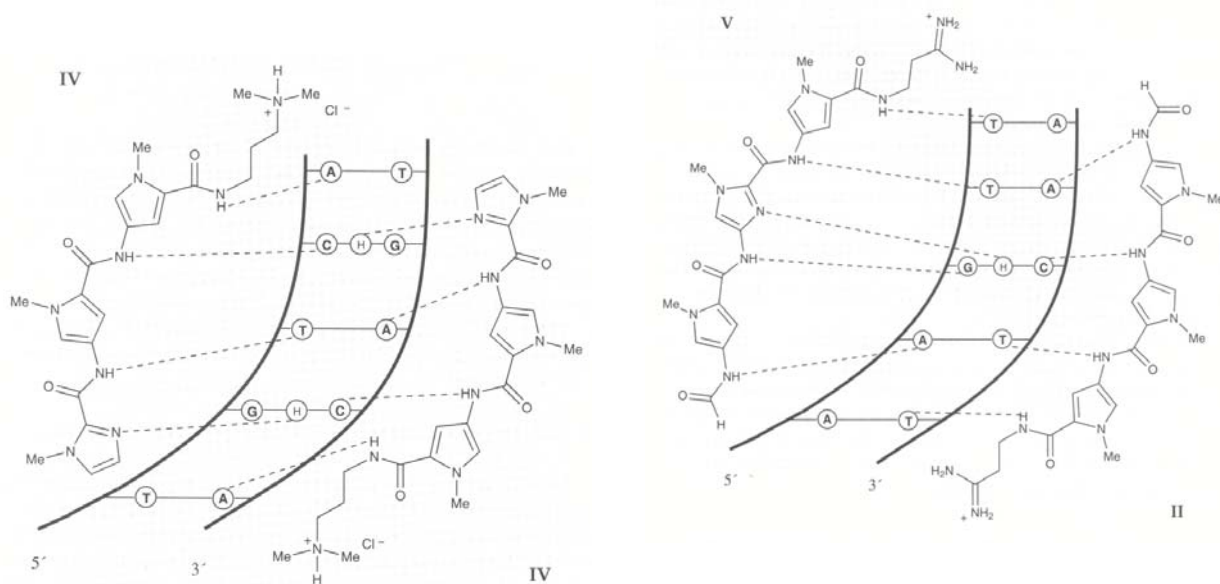
Intensive NMR-Untersuchungen der Komplexe aus Distamycin/Netropsin und DNA in der Gruppe von Prof. Wemmer in Berkley haben gezeigt, dass nicht nur ein Distamycin in die kleine Furche bindet. Oft bildet sich ein 2:1 Komplex mit zwei Distamycinen in antiparalleler Anordnung in der kleinen Furche. Man beobachtet 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	<b>8</b>	<b>1a</b>	<b>1b</b>	<b>1c</b>	<b>1d</b>
$C_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	2.08	1.41	2.05	0.87	0.098
$C_{25}$ ( $\mu\text{M}$ )	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

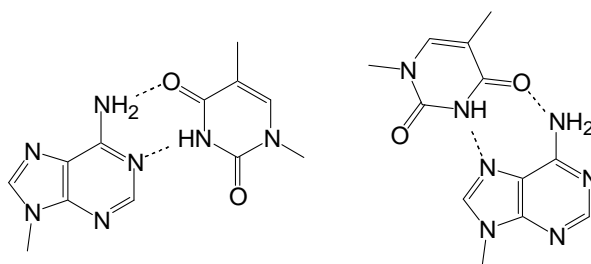
Die molekulare Erkennung von DNA in der Hauptfurche ist eine der wichtigsten modernen Strategien zur Behandlung von Krankheiten. Wichtig ist die Differenzierung von drei Begriffen. Der Gen-Therapie, der Antigen-Strategie und der Antisense-Strategie.

### 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).

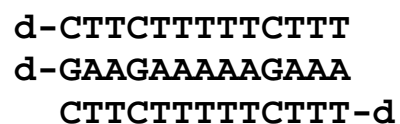
Es gibt zwei wesentliche Motive:

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

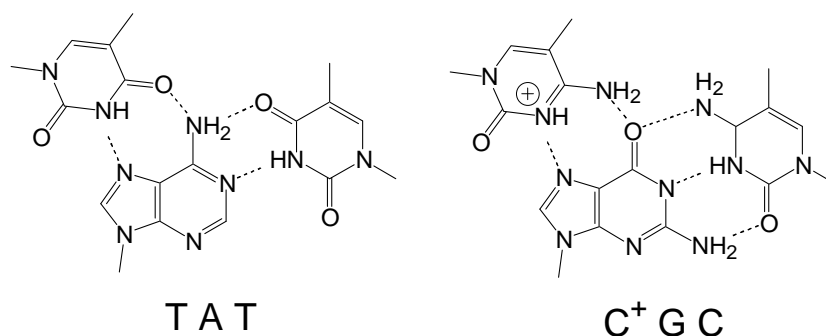
### 5.2.2.1 Das Pyr-Pur-Pyr Motiv

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



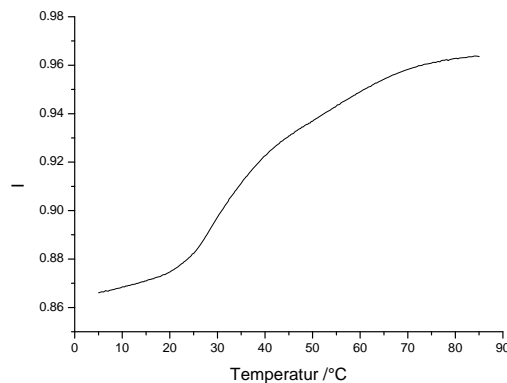
Bei pH 7 mit 28 ° um 11 ° höher als bei pH 8 (17°).



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

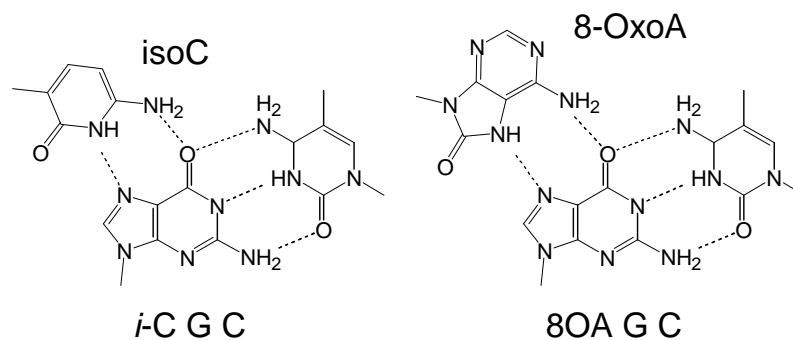
Gemessen werden die Stabilitäten von Doppel- und Tripel-Helices durch die Aufnahme sogenannter Schmelzkurven. Hierbei beobachtet man die Absorption der Probe bei 260nm in Abhängigkeit von der Temperatur. Durch das Aufschmelzen der

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.



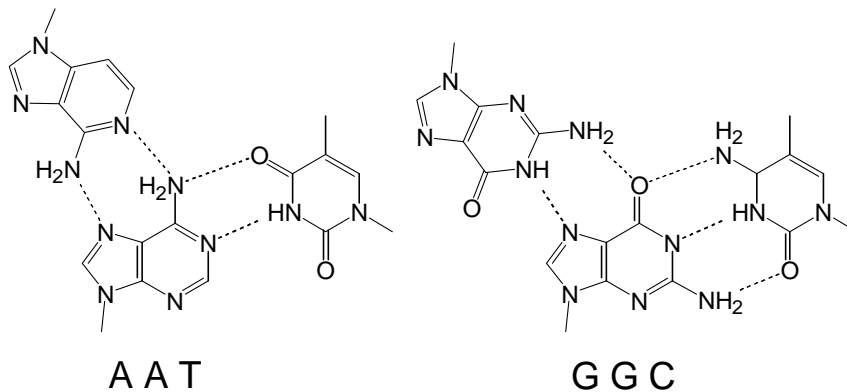
Temperaturabhängige UV-Absorption von DNA. Deutlich sichtbar sind zwei ineinander übergehende sigmoidalen Kurve, die jeweils für einen Schmelzpunkt stehen (ca. 30°C und 50°C).

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.

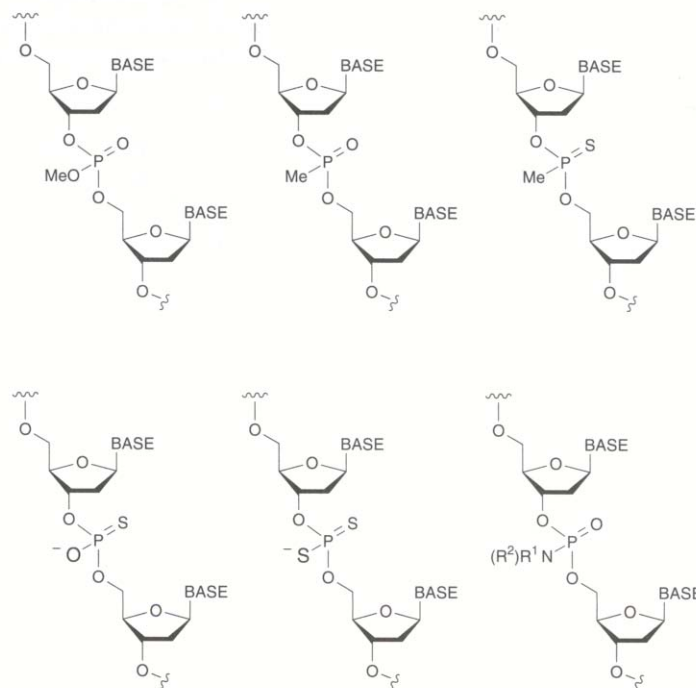
Die messenger-RNA ist ein sehr kompliziertes Molekül, das nach dem Ablesen der Information von der DNA noch stark verändert wird. So wird an beide Enden der RNA ein Oligonukleotid –die *cap-region*- angehängt. Diese Bereiche sind wichtig für das Einfädeln der RNA ins Ribosom. Außerdem werden bestimmte 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  $\alpha$ -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.

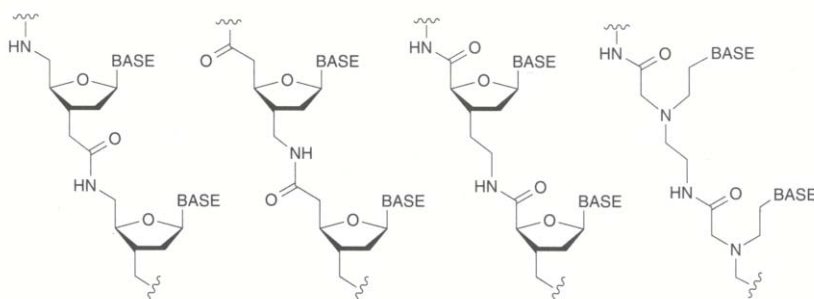
#### 5.2.4.2 $\alpha$ -Anomere Oligonukleotide

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



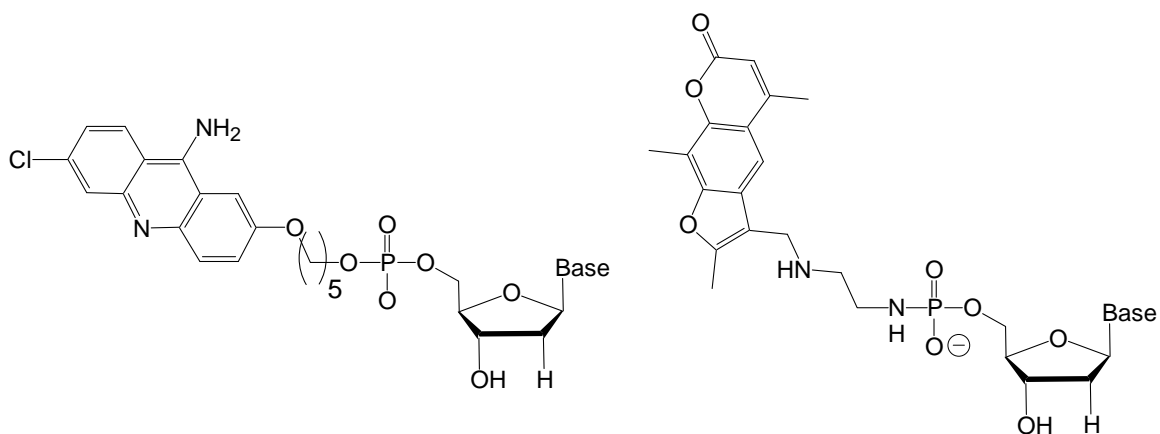
Darstellung von Oligonukleotiden ohne Phosphatrückgrat. Ganz links gezeigt sind die heute sehr wichtigen Peptidnukleinsäuren auch PNA genannt.



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

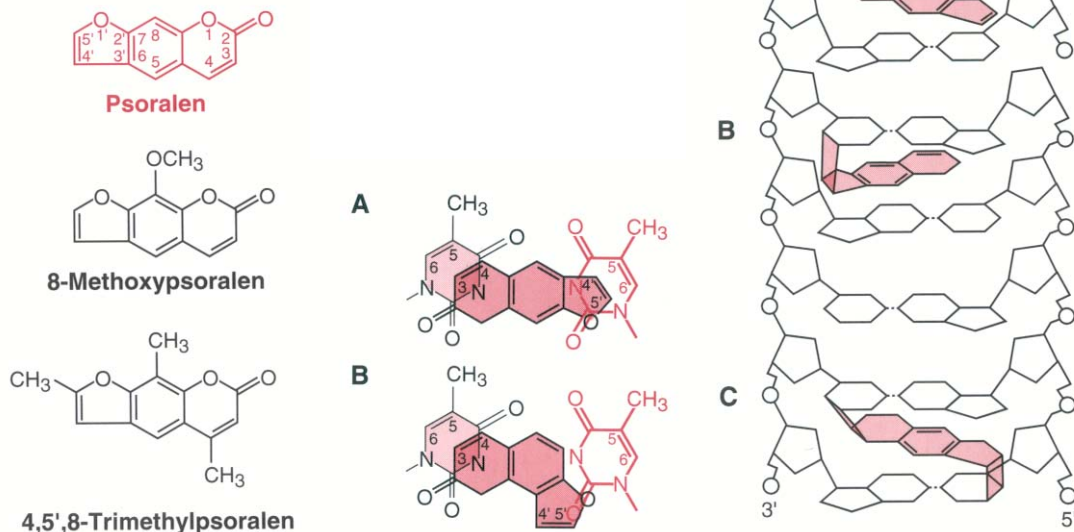
Wie schon im Fall der Distamycine und Netropsine wird versucht die Oligonukleotide mit anderen DNA-bindenden Verbindungen zu Hybridmolekülen zu vereinigen. Diese Strategie wird vor allem bei der Darstellung von Antigen-Verbindungen vorangetrieben.



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.

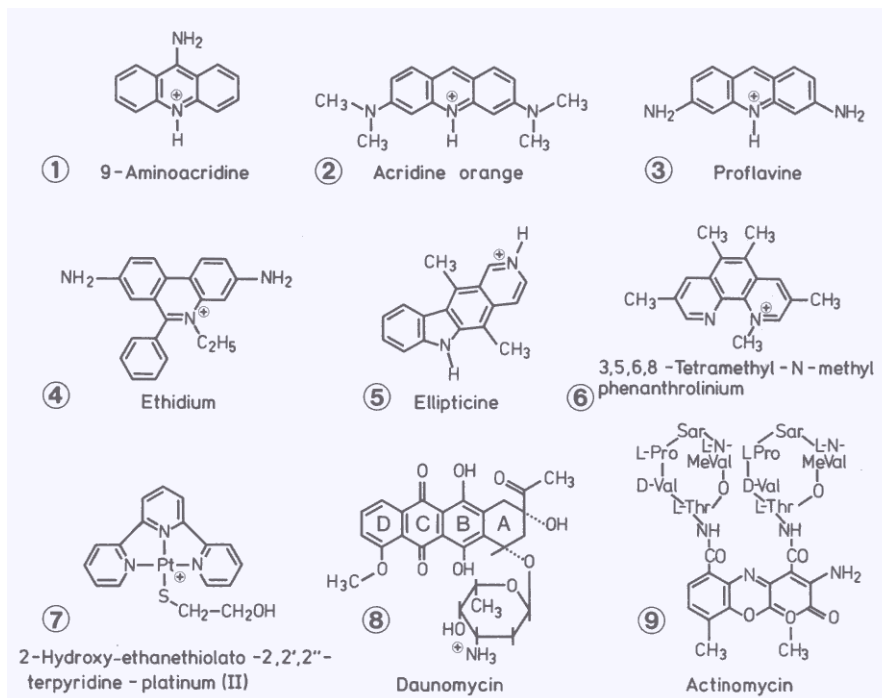
Mit der Antisense-Strategie wird versucht Oligonukleotide zu synthetisieren, die mit der Boten-RNA einen festen Doppelstrang ausbilden. Für die Bindung werden die normalen Watson-Crick-Wasserstoffbrücken verwendet. Problematisch ist vor allem, die heftige Veränderung der *messenger*-RNA nach der Synthese 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

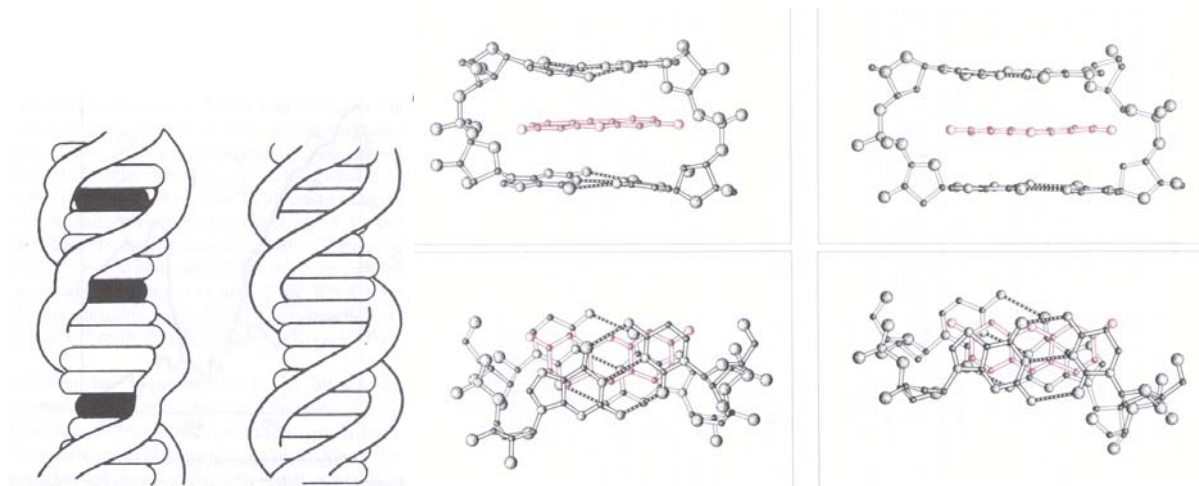
Interkalatoren sind flache aromatische Ringsysteme, die sich zwischen die Basen der DNA einschleusen können. Die sich bildenden Komplexe sind oft sehr stabil und zusätzlich durch ionische Wechselwirkungen durch eine positiv geladene Gruppe am Interkalator und das negativ geladene Phosphatrückgrat stabilisiert. 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.

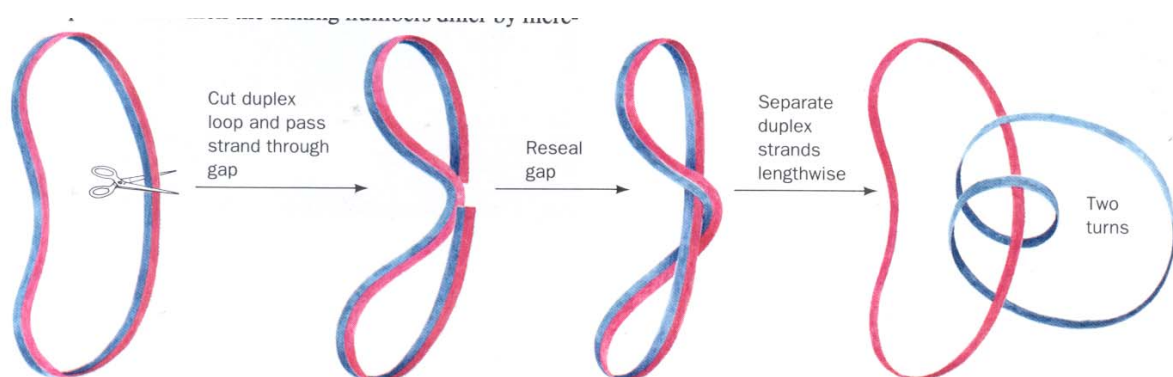
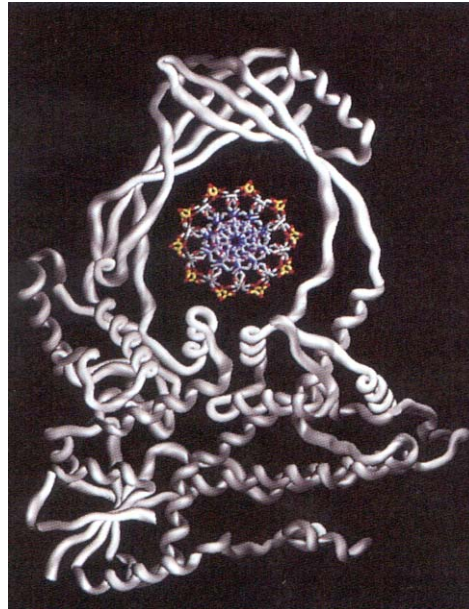
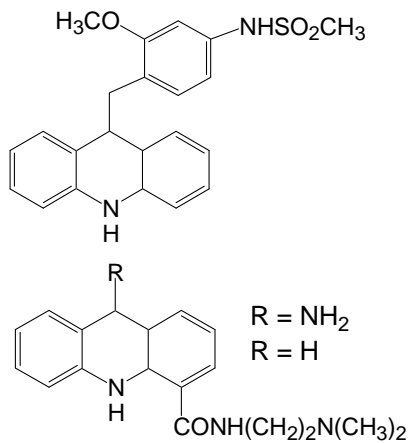


Darstellung einer Interkalation.

### 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.

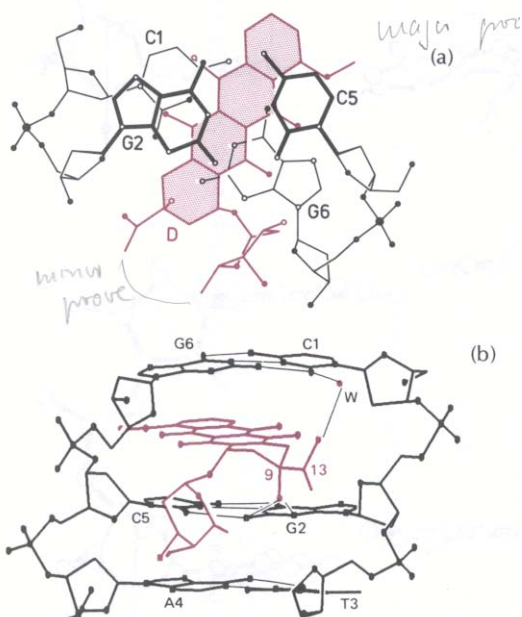


Darstellung von Amsacrin, einem Topoisomerase Komplex und schematische Darstellung der Aktivität von Topoisomerasen.

### 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.

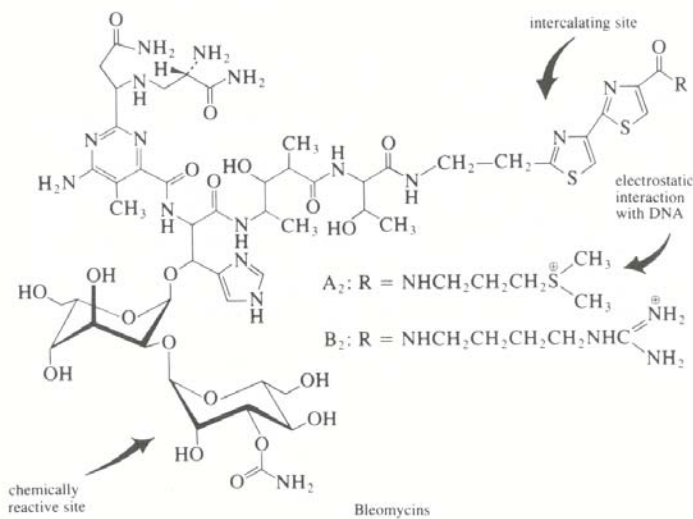
Die Aromaten stehen auf Grund des rigiden Cyclopeptidgerüsts parallel zueinander in einem Abstand von ca. 10 Å. Dieses ermöglicht die Bisinterkalation. Diese Cytostatika bevorzugen als Bindungsregion das Dinukleotid GC mit AT als flankierender Sequenz. An dieser Sequenzspezifität sind vor allem H-Brücken 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

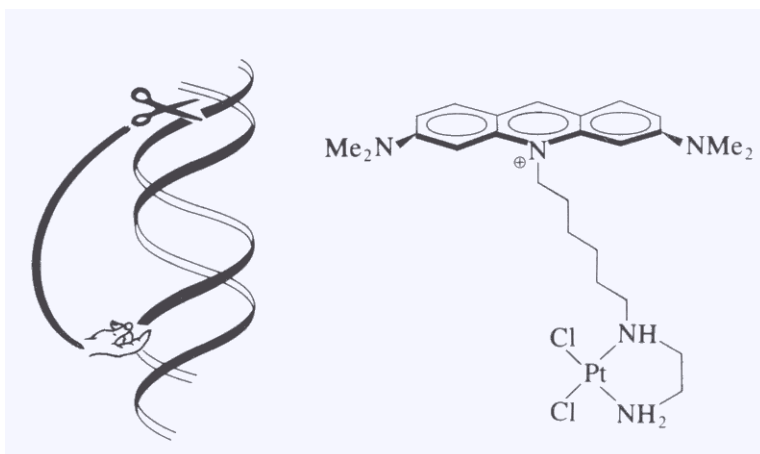
Viele Arbeitsgruppen haben sich in den letzten Jahren mit der Untersuchung von Verbindungen beschäftigt, die neben einem Interkalator eine Gruppe tragen, mit der die DNA geschädigt werden kann. Der Dichloroplatin-Komplex, angeknüpft an den Acridin-Orange Interkalator führt zur Spaltung der DNA, wenn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