

# Synthese artifizierter Aminoglykoside und Entwicklung von Testsystemen zur Untersuchung von Bindungsstellen an RNA

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Zur Erlangung des Grades  
**Doktor der Naturwissenschaften**  
- **Dr. rer. nat.** -  
genehmigte Dissertation

von  
Diplom-Biochemiker Patrick Bröker  
geboren am 12.07.1976 in Rheine

*Hannover 2006*

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Quellen angefertigt habe. Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. A. Kirschning in der Zeit von Juni 2003 bis Mai 2006 am Institut für Organische Chemie der Universität Hannover angefertigt. Die aus fremden Quellen übernommen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde nicht bereits als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, 27.Juni 2006

Referent: Prof. Dr. A. Kirschning

Koreferent: Prof. Dr. J. Alves

Tag der mündlichen Prüfung: 15. August 2006

„Wenn Du keinen Baum erschaffen kannst, dann pflanze einen Samen.“

Autor unbekannt

Meinen Eltern gewidmet

# **Zusammenfassung:**

Patrick Bröker

## **Synthese artifizierlicher Aminoglykoside und Entwicklung von Testsystemen zur Untersuchung von Bindungsstellen an RNA**

Schlagworte: RNA-Affinität, TAR-RNA, Tat-Peptid, HIV, Hairpin-Ribozym, Aminoglykoside, Bindungskonstanten, Festphasenunterstützung Guanidierung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene natürliche und artifizierliche, biogene Substanzen auf ihre Affinität zu RNA untersucht. Dieses geschah sowohl auf Basis der Interaktion zwischen Tat-Peptid und TAR-RNA des HI-Virus als auch auf der Substrat-Spaltung des Hairpin-Ribozyms. Dabei wurden die Testsysteme zur Bestimmung der Bindungskonstanten der zu untersuchenden Substanzen zur TAR-RNA auf Basis von ELISA und Fluoreszenz-Titration entwickelt und evaluiert. Anschließend wurden verschiedene natürliche Aminoglykoside im ELISA-TEST auf die Inhibition des Tat-TAR-Komplexes und in der Fluoreszenz-Titration auf die Bindung an die TAR-RNA untersucht. Aus der Fluoreszenz-Titration konnte die Dissoziationskonstante der Bindung von Aminoglykosiden und TAR-RNA berechnet werden. Diese Effekte wurden mit-einander verglichen und ließen Schlussfolgerungen auf die an der Bindung zur TAR-RNA beteiligten Substituenten zu. Die Aminoglykoside wurden an den Aminogruppen in positiv geladene Guanidine umfunktionalisiert und die Bindungseigenschaften der so erhaltenen Substanzen wurden mit den natürlichen Aminosukzern verglichen. Um eine negative Ladung der Aminosukzer zu simulieren, wurden Sulfonamidate eingefügt und deren Bindungsparameter bestimmt. Nicht-glykosidische Substanzen wurden ebenfalls guanidiert und auf das Bindungsverhalten zur TAR-RNA untersucht. Zur schnellen und einfachen Carboxyamidierung konnte auf eine Festphasen-unterstützte Synthesemethode zurückgegriffen werden, die in dieser Arbeit weiter optimiert wurde. Dabei wurde erstmals eine Regeneration des festphasengebundenen Guanidierungsreagenzes realisiert. Zur Validierung der RNA-Bindungsergebnisse am Beispiel der TAR-RNA wurde die Affinität der natürlichen und artifizierlichen Substanzen an einer weiteren prominenten RNA, dem Hairpin-Ribozym, verfolgt. In diesem Testsystem wurde die Affinität indirekt durch die Abnahme der Umsatzgeschwindigkeit bei der Spaltung des Hairpin-Ribozym-Substrates bestimmt. Anhand dieses Vergleiches konnte auf eine spezifische Bindung an eine dieser beiden RNAs oder die allgemeine Affinität an RNA geschlossen werden.

## **Abstract:**

Patrick Bröker

### **Synthesis of artificial aminoglycosides and development of bindingsassays to investigate bindingconstants of RNA**

keywords: RNA-affinity, TAR-RNA, Tat-peptide, HIV, Hairpin-Ribozyme, Aminoglycosides, bindingconstants, solidphase based amidation

In this Ph.D. thesis different natural and artificial, biologically active substances were tested regarding their affinity to RNA. This happened either on the basis of the interaction of Tat-peptide of the HI-Virus and also on the splitting of the substrate of the hairpin-ribozyme. Therefore testing-systems were developed to determine the bindingconstants of the substances to the TAR-RNA on the basis of ELISA and fluorescence-titration.

Subsequently, different natural aminoglycosides were tested in the inhibition of the Tat-TAR-complex by ELISA and in binding to the TAR-RNA by fluorescence-titration. The dissociation-constant could be determined through fluorescence-titration. By comparing these effects we were able to draw conclusions regarding the functional groups binding to TAR-RNA. The aminogroups of these aminoglycosides were changed into guanidines and the effects of this exchange were compared with the natural aminoglycosides. The aminogroups were also converted into sulfoamidates to analyse the contrary effects on the binding behaviour. Non-glycosidic substances are changed into guanidines and the binding behaviour to the TAR-RNA was analysed. A fast and simple carboxyamidation could be realized by a solid-phase based synthesis, which was optimized. The regeneration of the functionalized resin was realized for the first time.

The affinities of the natural and artificial substances were further tested on another interesting RNA, the hairpin-ribozyme, to validate the results of the RNA-binding of the TAR-RNA. The affinities were indirectly determined by the decrease of the turnover rate in the splitting of the hairpin-substrate. By comparing these results, it was possible to differentiate a specific binding to one of these RNAs and a general affinity to RNA.

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis. Die finanzielle Unterstützung dieses Projektes erlaubte zudem die Kooperation mit Frau Prof. Dr. Sabine Müller. Des Weiteren möchte ich mich für den „kreativen Freiraum“, der mir in dieser Dissertation gewährleistet wurde, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Alves danke ich dafür, dass er mir Mentor, Lehrer und Kooperationspartner während des gesamten Inhibitions-Projektes mit der TAR-RNA und dem Tat-Peptid war.

Frau Prof. Dr. Sabine Müller möchte ich für die freundliche Aufnahme in ihrem Arbeitskreis in dem „Hairpin-Ribozym-Projekt“ danken. In diesem Sinne möchte ich mich auch bei dem ganzen Arbeitskreis von Prof. S. Müller bedanken, der mit mir stets hilfsbereit und freundlich jede Frage, Unverständlichkeit und Problemstellung diskutierte. Danke auch für die schönen Unternehmungen in Bochum.

Gerald Dräger danke ich dafür, dass er mir meine vielen kleinen Fragen immer wieder beantwortete.

Eike Kunst möchte ich ebenfalls für die vielen geduldigen Antworten auf meine vielen Fragen und seine stete Hilfsbereitschaft, die er mir zukommen ließ, danken.

Frau Dr. Ute Kurt möchte ich für die Bereitstellung des Fluorometers und die Einführung in die Fluoreszenz-Titration danken. Ebenfalls danke ich ihr für die Leihgabe der Fluoreszenz-Küvette.

Allen Mitbewohnern des „Lachlabors“ - Christof Kujat, Thomas Jöge und Martin Bock - möchte ich sowohl für ihre stets kompetente Hilfe bei chemischen Fragestellungen als auch dafür danken, dass sie es immer verstanden, mich aufzumuntern. Christofs fürsorgliche Versorgung mit gutem Essen und Thomas' leckerer Kuchen trugen entscheidend zum Gelingen dieser Dissertation bei. Ein großes Dankeschön gebührt auch Martin, der mit mir das üppige Essen und den Stress beim Squash abbaute.

Thomas Jöge und Benjamin Oelze möchte ich für die mir überlassenen Proben zur Bestimmung der Bindungskonstanten danken.

Christoph Brochwitz danke ich für die freundliche Aufnahme in das Labor131 nach dem „Umzug“. Außerdem danke ich ihm dafür, dass er mir immer während dieser Zeit ein treuer Freund war.

Für die experimentellen Arbeiten im Rahmen des Fortgeschrittenenpraktikums danke ich Stefanie Dräger, Mathias Lueckmann, Thomas Burckhard, Jessica Heine, Timo Quante, Tobias Minuth, Linn Sommer und Alain Graf.

Rechtherzlichen Dank gebührt auch der ganzen NMR-Abteilung mit Dagmar Körtje, Monika Rettstadt, Edgar Hofer und Dieter Albert, ohne deren Hilfe die reibungslosen Messungen und Analyse der NMR-Daten nicht gewährleistet wären.

Großer Dank gebührt auch Nina Lorenzen, die mich während der letzten Phase der Dissertation immer wieder aufbaute, mich mit allem Nötigsten versorgte und meine Launen bewundernswert ertrug.

Besonders großer Dank gebührt meinen Eltern, ohne die diese Dissertation niemals möglich gewesen wäre. Ihnen danke ich für ihre immer währende Unterstützung in allen Bereichen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>1</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2. THEORIE .....</b>	<b>4</b>
2.1 RNA-STUKTUREN .....	4
2.1.1 Haarnadelstrukturen („hairpins“ oder „stemloops“)	4
2.1.2 Ausstülpungen aus der RNA-Sequenz („bulges“)	5
2.1.3 Interne Schleifen.....	6
2.1.4 Pseudoknoten .....	6
2.2 RNA-BINDEMOTIVE .....	7
2.3 HUMAN-IMMUNSUPPRESSIV-VIRUS (HIV) .....	8
2.4 HAIRPIN-RIBOZYM .....	16
2.5 AMINOGLYKOSID-ANTIBIOTIKA .....	18
<b>3. ZIELSETZUNG .....</b>	<b>22</b>
<b>4. DISKUSSION DER CHEMISCHEN EXPERIMENTE .....</b>	<b>25</b>
4.1 UMFUNKTIONALISIERUNG DER AMINOGLYKOSIDE .....	25
4.1.1 Synthese der Reagenzien .....	25
4.1.2.Synthese der guanidierten Aminoglykoside durch das Di-Boc-Guanidin-Triflat 14.....	28
4.2 SYNTHESE DER SULFONAMIDATE .....	31
4.3 FESTPHASEN-UNTERSTÜTZTE SYNTHESE .....	32
4.3.1 Guanidierungsreaktionen an der festen Phase .....	32
4.3.2 Regeneration .....	39
4.4. SULFONAMYLIERUNGSREAKTION AN DER FESTEN PHASE .....	46
<b>5. BIOCHEMISCHE MATERIALIEN.....</b>	<b>47</b>
<b>6. BIOCHEMISCHE METHODEN .....</b>	<b>50</b>
6.1 ANALYTISCHE METHODEN .....	50
6.2 BIOCHEMISCHE METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER RNA-AFFINITÄT .....	51
6.2.1 Affinitätsbestimmung am Hairpin-Ribozym .....	51
6.2.2 ELISA Affinitätsbestimmung des TAR-Tat-Komplexes .....	52
6.2.3 Fluoreszenztitration .....	54
6.3 ERGEBNISSE DER AFFINITÄTSBESTIMMUNG.....	59
6.3.1 ELISA-Schnelltestverfahren .....	59
6.3.1 Fluoreszenztitration .....	68
6.3.1.1 Fluoreszenzverhalten des F-Tat-Peptides.....	68
6.4 INHIBITIONS-UND SPALTUNGS-EXPERIMENTE NATÜRLICHER UND ARTIFIZIELLER SUBSTANZEN AN RNA.....	76
<b>7. DISKUSSION DER BIOCHEMISCHEN ERGEBNISSE .....</b>	<b>135</b>
7.1 ELISA-TEST.....	136
7.2 FLUORESCENZ-TITRATION .....	137
7.3 INHIBITIONS- UND SPALTEXPERIMENTE NATÜRLICHER UND ARTIFIZIELLER SUBSTANZEN AN RNA.....	139

7.3.1 Natürliche Aminoglykoside mit Cyclitolgrundgerüst.....	139
7.3.2 Aminoglykoside ohne Cyclitolgrundgerüst .....	142
7.3.3 Artificielle Inhibitoren .....	143
7.3.4 Guanidierte Aminoglykoside und guanidierte, artifizielle, biogene Substanzen.....	144
7.3.5 Glykoside mit Sulfonamidatgruppen .....	149
<b>8. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>151</b>
8.1 METHODENEVALUATION .....	151
8.2 CHEMISCHE STRUKTUREN UND DIE AFFINITÄT AN RNA .....	153
<b>9. AUSBLICK .....</b>	<b>156</b>
<b>10. CHEMISCHER EXPERIMENTER TEIL .....</b>	<b>159</b>
10.1 SYNTHESE DER GUANIDIERTEN AMINOGLYKOSIDE.....	159
10.1.1. Synthese des Di-Boc-Guanidin-Triflats 14 .....	159
10.1.2 Guanidierung der Substanzen mit Di-Boc-Guanidin-Triflat 14 .....	161
10.1.4. Entschützung der Boc-geschützten Guanidine.....	169
10.1.5 Syntheseprodukte über die Festphasen-unterstützte Synthese .....	174
10.2. SYNTHESE DER SULFONAMIDIERTEN AMINOGLYKOSIDE .....	177
10.2.1 Synthese des Sulfonamidierungs-Reagenzes N-tert-Butoxycarbonyl)-N- [4-dimethylazaniumylidene)-1,4-dihydropyridin-ylsulfonyl]azanid 16.....	177
10.2.1 TMS-Schützung der Substanzen vor Umsetzung zu den Sulfonamidaten.....	178
10.2.2 Sulfonamidierungs-Reaktionen .....	179
10.2.3 Entschützung der Sulfonamide .....	181
10.2.4 Festphasen-unterstützte Sulfonamidierungsreaktion .....	182
<b>11. ANHANG .....</b>	<b>184</b>

## Verwendete Abkürzungen

$\delta$	chemische Verschiebung in ppm
2-DOS	2-Desoxystreptamin
Å	Ångström; Längeneinheit; 1 Å = 10 nm
A	Adenin
Arg	Arginin
ARM	Argininreiche Regionen
abs.	absolut
aq	wässrig
Äq	Äquivalente
BSA	Rinderalbumin ( <i>bovines serum albumine</i> )
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
C	Cytosin
CycT1	Cyclin T1
CDK9	Cyclinabhängige Kinase 9
cDNA	zirkuläre DNA ( <i>circular DNA</i> )
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlormethan
CTD	carboxyterminalen Domäne
d	duplett
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMF	Dimethylformamin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC-Wert	Effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<b>E</b> nzyme- <b>L</b> inked- <b>I</b> mmuno <b>S</b> orbent- <b>A</b> ssay
EE	Ethylacetat
ESI	Elektrospray-Ionisation
h	Stunde
HIV	Humanes Immunsuppressiv-Virus
HMDS	Hexamethyldisilazid
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie
TEA	Triethylamin
G	Guanin
g	Gramm
J	Kopplungskonstante
LTR	<b>l</b> ong- <b>t</b> erminal- <b>r</b> epeat; lange endständige Wiederholungssequenzen von lentiviraler RNA bzw. DNA
M	Molar
m	multilett
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
mmol	Millimol
MS	Massenspektrometrie
nmol	Nanomolar
NMR	<b>N</b> uclear <b>M</b> agnetic <b>R</b> esonance
NMP	N-Methyl-pyrrolidon

PB	Primerbindungsstelle
pmol	Pikomolar
PP	Polypurintrakt
P-TEFb	positiven Transkriptions-Elongationsfaktor-Komplex b
ppm	<b>parts per million</b>
q	quartett
R	organischer Rest
Rev	<i>regualtor of expression of virion protein</i> ; HIV-Protein
RISC	<i>RNA-induced silencing-complex</i> , Genkontrollelement
RRM	RNA-Erkennungs-Motiv
RNP	Ribonuklein-Protein
RRE	<i>Rev-responce element</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	mikroRNA
rRNA	ribosomaler RNA
µmol	Mikromolar
SNP	kleine nukleäre Protein (small nuclear proteins)
t	triplett
tRNA	transfer RNA
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
RNA RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
s	Singulett
T	Thymin
TAR	<i>trans-actication-responce-element</i> ; nascierende RNA aus dem HIV dessen Replikation über das Tat-Peptid gesteuert wird
Tat	<i>transactivator of transcription</i> ; HIV-Replikationskontroll-Protein
THF	Tetrahydrofuran
TMSCI	Trimethylsilylchlorid
U	Uracil

## 1. Einleitung

Mit der Entdeckung der DNA als Erbsubstanz und der Entschlüsselung des Codierungssystems durch die vier Basen Thymin, Adenin, Cytosin und Guanidin wurde das Dogma der ein-Gen-ein-Protein Hypothese aufgestellt. Das Weltbild der Naturwissenschaften zur Zelle war sehr klar strukturiert.<sup>[1]</sup> Die DNA kodiert für die notwendigen Proteine in der Zelle, die dann alle anderen Funktionen übernehmen und erfüllen. Zuerst musste diese These durch die Entdeckung der *messenger*-RNA (mRNA) korrigiert werden, die als Kopie der DNA zwischen dem Ort der Biosynthese im Cytosol und der DNA im Zellkern benutzt wird. Auch die transfer-RNA (tRNA) wurde als Ausnahme wie die ribosomale RNA (rRNA) gesehen.<sup>[2]</sup> Die tRNA übernimmt bei der Protein-Synthese die Aufgabe des Trägers einer Aminosäure, besitzt für diese Aminosäure eine entsprechende Kodierung und transferiert diese auf die wachsende Aminosäure-Kette in der rRNA. Denn wenn mit Nucleinsäuren in Form von RNA als „Datenträger“ kodiert wird, muss auch mit Nucleinsäuren die Information entschlüsselt werden.

Trotz sich häufender Hinweise, dass RNA nicht nur als Shuttle zwischen DNA und Proteinbiosynthese dient, wurde die Aufgabenverteilung in der Zelle weiter streng reglementarisch betrachtet. Die DNA kodiert für Proteine und die Proteine sind für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Katabolismus und Anabolismus zuständig. Die Regulation der ganzen Zelle übernimmt nach dieser These die DNA, in dem diese der entsprechenden Proteinbiosynthese in Gang setzt.<sup>[2,3]</sup> Dass einige Viren als Träger ihres Genoms RNA nutzen, war zwar bekannt, aber erst der Beginn der Pandemie des berühmtesten Retrovirus, das Humane-Immundefizienz-Virus (HIV) und durch den Abschluss des „*Human-Genome-Projekt*“ durch *Craig Venter* und *Francis Collins* rückte die RNA ins Zentrum der damaligen Forschungsbemühungen.<sup>[4]</sup>

Das Dogma der „ein-Gen-ein-Protein-Hypothese“ musste dabei verworfen werden. Seitdem wurden umfangreiche wissenschaftliche Erkenntnisse über die RNA gewonnen, wobei ein großer Bereich auf der HIV-Forschung fußt. So wurde am Beispiel des HIV-Virus die Möglichkeit der Gen-Regulation durch RNA entdeckt. Diese Genregulation ist gerade beim HIV von fundamentaler Bedeutung, weil RNA-Peptidwechselwirkungen von

---

<sup>1</sup> Ernst Peter Fischer: *Am Anfang war die Doppelhelix*. Ullstein, Berlin 2004. ISBN 3548366732

<sup>2</sup> D.Voet, G.Voet; *Biochemie*, VCH-Verlag, **1994**, 1.Auflage, ISBN 3-527-29249-7.

<sup>3</sup> B.Alberts, D.Bray, J.Lewis, M.Raff, K.Roberts, J.Watson; *Molekularbiologie der Zelle*, VHC-Verlag **1995**, 2.Auflage, ISBN 3-527-30055-4.

<sup>4</sup> S.Gregory, K. Barlow, K.McLay; *Nature* **2006**, 441, 315-321.

TAR-RNA (*transactivation response*) mit dem Tat-Peptid (*transactivator of transcription*) eine Schlüsselrolle bei der Replikation besitzt.<sup>[5]</sup> Wie andere Forschungsbereiche zeigen, benötigt die DNA-Replikation selbst zu Beginn des semikonservativen Replikationsprozess einen Start-Primer, der aus RNA besteht. Die RNA-Kopien der DNA in der Ruhephase der Zelle erfahren bei der regulären Proteinbiosynthese direkt nach der Transkription regulative Modifizierungen an der mRNA. Dazu gehören das Anfügen der Poly-A-Schwänze an das 3'-Ende oder die CAP-Struktur am 5'-Ende, was zu einer längeren Halbwertszeit der RNA führt.<sup>[2,3]</sup> Die Geninformation an der mRNA nach der Transkription kann ebenfalls modifiziert werden. Dazu werden gerade bei den höher entwickelten Zellen so genannte Spleißvorgänge durchgeführt. Dieses RNA-Prozessing, die durch Spleißosomen, - kleine RNA-Moleküle, die mit genauso kleinen Peptiden zu den sogenannten SNP („snurps“) zu katalytischen Komplexen aggregieren, bei der die prä-mRNA zu den codierenden mRNA-Strängen zurechtgeschnitten werden, zeigt bereits die Vielfältigkeit der RNA.<sup>[2]</sup> Einige prä-mRNA-Stränge sind zudem autokatalytisch und schneiden die nicht benötigten Exone selbst heraus.<sup>[2]</sup> Die dominante Rolle der RNA in der Proteinbiosynthese, die viele Funktionen wie Informationsträger, enzymatische Funktionen und auch autokatalytische Eigenschaften zeigte, führte zu der Theorie der „RNA-Welt“ in der eine *prä-vitae-Welt* postuliert wird, in der am Anfang vor allen beginnendem Leben die RNA stand.<sup>[6]</sup>

Diese These gilt es weiter zu prüfen. Durch Gewinn dieser Erkenntnisse wurden Mechanismen der Einflussnahme auf die RNA-kontrollierten Zellbereiche untersucht. Es konnten molekulare Mechanismen der Inhibition der Translation durch Aminoglykoside an den Ribosomen entschlüsselt werden. Es wurden kleine RNA-Fragmente entdeckt, die durch selektive Bindung an Schlüsselsequenzen anderer Ribonukleinsäuren, deren Funktion inhibieren. So wird die *antisense*-RNA-Strategie, bei der die experimentelle Manipulation von Zellen zum gezielten Abschalten von Gen-Funktionen durch Anlagern dieser *antisense*-RNA an die komplementäre mRNA vorgenommen wird, bereits in der Forschung eingesetzt. Diese Regulation hat einen natürlichen Mechanismus zum Vorbild.<sup>[7]</sup> Dabei werden circa 21 Nukleotid lange Doppelstrang-RNA-Moleküle benutzt, deren *antisense*-Strang zur Spaltung, zur Translationsblockade der Ziel-mRNA oder zum Methylieren des Gens führt.<sup>[7]</sup> Somit wird die Produktion bestimmter Proteine gestoppt,

---

<sup>5</sup> S.Modrow, D.Falke, U.Truyen; *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag **2003**, 2.Auflage, ISBN 3-8274-1086-X, 390-445.

<sup>6</sup> Prebiotic chemistry and the origin of the RNA-World; Leslie E.Orgel; *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, 39, 99-123.

<sup>7</sup> J. Marx; *Science* **2005**, 4, 764 - 765

welches bei Eukaryonten in der Genregulation, aber auch in der Abwehr von Viren eine bedeutende Rolle spielt. Dabei kann man zwischen mikroRNA und siRNA differenzieren. Gerade diese Bereiche des Abschaltens der Genbereiche die durch siRNA im Protein-Komplex RISC (*RNA- induced silencing complex*) und der post-transkriptionellen Regulation der Proteinbiosynthese durch mikroRNA sind zur Zeit stark umforscht.<sup>[8]</sup>

---

<sup>8</sup> C.Wahlestedt; *Drug. Discov. Today*. **2006**, (11), 503-508.

## 2. Theorie

### 2.1 RNA-Strukturen

Da die Thematik im Folgenden zum größten Teil RNA-Wechselwirkungen mit Proteinen oder artifiziellen und natürlichen Aminoglykosiden sind, werden zum besseren Verständnis dieser RNA-Wechselwirkungen kurz die möglichen RNA-Strukturen erklärt. Die RNA-Bindung durch Proteine erfolgt meist sequenzspezifisch. Charakteristische Sekundärstrukturelemente und Tertiärstrukturen ermöglichen die spezifischen Interaktionen von RNA-bindenden Proteinen mit RNA. Doppelsträngige RNA-Bereiche bilden aus sterischen Gründen eine A-Form-Helix, die eine viel engere 3 Å und tiefere Furche 13.5 Å als die der B-DNA bildet.<sup>[9]</sup> Damit ist die große Furche für eine basenspezifische Interaktion mit RNA-bindenden Proteinen kaum zugänglich. Die kleine Furche ist zwar 11 Å breit und 3 Å flach, aber ebenso wenig zur sequenzspezifischen Wechselwirkung zugänglich. Die Interaktion von Proteinen mit dsRNA ist daher auf die sequenzunspezifische Ausbildung von Wasserstoffbrücken und van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Proteinseitenketten und exponierten Basen an den Rändern der Furche, den Enden der helikalen Bereiche oder speziellen RNA-Strukturelementen beschränkt. Tatsächlich erkennen die meisten RNA-bindenden Proteine nicht die helikalen, doppelsträngigen Bereiche der RNA, sondern binden an andere RNA-Strukturelemente, die im Folgenden kurz beschrieben werden.

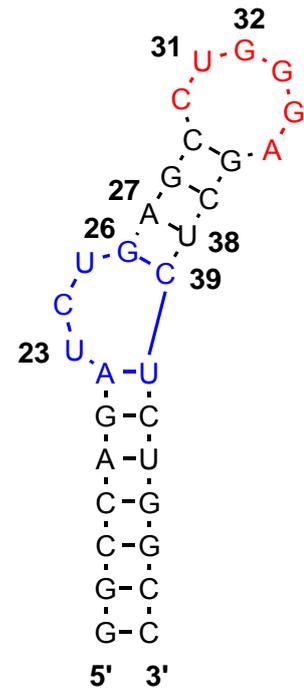
#### 2.1.1 Haarnadelstrukturen („*hairpins*“ oder „*stemloops*“)

Die Haarnadelstruktur ist eine häufige RNA-Struktur, bei der durch intramolekulare Paarung komplementärer Sequenzen eine einzelsträngige Schleife mit einem doppelsträngigen Stamm, der als A-Form Helix vorliegt, gebildet wird. Die Basen der Schleife sind für sequenzspezifische Interaktionen mit Proteinen zugänglich. Als Beispiel ist hier die TAR-RNA dargestellt (Abbildung 1), die im oberen Bereich zwischen den Basen G26 und C39 eine Haarnadelstruktur besitzt.

---

<sup>9</sup> S.A.White, M.Nilges, A.Huang, A-Brunger, P.B.Moore; *Biochemistry* **1992**, *31*, 1610-1621.

Die Basen seiner Schleife (C30-A35) sind in der ansonsten doppelsträngigen RNA-Struktur nicht mit komplementären Basen verbunden. In dieser Region „wendet“ die RNA, um innerhalb eines einzelnen RNA-Stranges die Bindung komplementärer Basen in die Gegenrichtung der RNA zu erreichen und damit einen doppelsträngigen RNA-Stamm (G26-C29 und G36-C39) auszubilden. In diesen Schleifen kommt es sowohl zur Bildung von Wasserstoffbrücken als auch zur Basenstapelung („stacking“) mit Aminosäureresten von Proteinen.<sup>[10]</sup> Eine besonders stabile Form ist eine Haarnadel mit einem „Tetra-loop“(hier nicht dargestellt), d.h. mit vier Nukleotiden in der Schleife. Dieser „Tetra-loop“ zeichnet sich durch eine besonders hohe thermodynamische Stabilität aus und wird durch Basenstapelung und Wasserstoffbrücken zwischen den Basen und den Phosphaten sowie den Basen und der Ribose erreicht.<sup>[11]</sup>



**Abbildung 1:** Haarnadelschleife („Hairpins“) der TAR-RNA zwischen den Basen C29-A35 (rot markiert). Ausstülpung („bulges“) in der TAR-RNA von den Basen A22-G27 und C39-U40 (blau markiert).

### 2.1.2 Ausstülpungen aus der RNA-Sequenz („bulges“)

Durch eine oder mehrere nicht basen-gepaarte Nukleotide eines Stranges in einem doppelsträngigen RNA-Bereich wird die typische A-Form der dsRNA unterbrochen.<sup>[11]</sup> Je nach Anzahl und Art der Ausstülpungen ragen die ungepaarten Basen aus der Helix heraus oder werden in ihr gestapelt.<sup>[12]</sup> Diese Ausstülpung in der RNA-Struktur ist im Beispiel der TAR-RNA (Abbildung 1) ebenfalls zwischen den Basen C39-U40 erkennbar, denen A22-G26 gegenüber steht. Die herausragenden Basen stellen Interaktionsmöglichkeiten für RNA-bindende Proteine dar. Bei der TAR-RNA ist diese „Bulge“ ebenfalls ein Angriffspunkt; in diesem Falle bindet das Tat-Peptid über einen Arginin-Rest an die Ausstülpung. Ebenso wird die Helix im Allgemeinen durch diese Ausstülpungen verdreht, so dass die große Furche geweitet oder die Gesamtstruktur der Nukleinsäure beeinflusst wird.<sup>[13]</sup> Dadurch ist nun eine sequenzspezifische Bindung an die große Furche möglich.

<sup>10</sup> P.B.Moore; *Curr.Opin.Struct.Biol.* **1993**, 3, 340-344 .

<sup>11</sup> G.Varani, A.Pardi; *Structure of RNA*, Oxford University Press **1994**, S.1-24, ISBN: 0199635048.

<sup>12</sup> J.D.Puglisi, R.Tan, B.J.Calnan, A.D.Frankel, J.R.Williamson; *Science* **1992**, 257, 76-80.

<sup>13</sup> D.M.Lilley; *Proc.Natl.Acad.Sci USA* **1995**, 92, 7140-7142.

### 2.1.3 Interne Schleifen

Interne Schleifen entstehen durch nicht-komplementäre Basen einer doppelsträngigen RNA-Helix. Oft werden Nicht-Watson-Crick-Basenpaarungen ausgebildet, um die Helix-Konformation und die Stabilität der RNA zu erhalten.<sup>[11]</sup> Meist wird dadurch die Helix so stark verdreht, dass die große Furche für Proteininteraktionen zugänglich wird. Zu einer basen-spezifischen Interaktion kommt es zum Beispiel zwischen dem Rev-Protein aus dem HIV und einer internen Schleife der RRE-RNA.<sup>[16]</sup>

### 2.1.4 Pseudoknoten

Pseudoknoten entstehen durch ungepaarte Nukleotide einer Haarnadelschleife und einer nicht benachbarten, komplementären Sequenz in doppelsträngigen RNA-Bereichen. Dadurch entsteht ein helikaler Bereich, der sich in vielen Fällen coaxial auf die Helix der Haarnadelschleife stapelt.<sup>[11]</sup>

Pseudoknoten ermöglichen die Faltung in eine kompakte dreidimensionale Struktur. Dieses wird im Beispiel der humanen Telomerase ersichtlich, in deren RNA-Anteil sich zwei gegenläufige, komplementäre RNA-Stränge mit einer nicht benachbarten RNA-Region in einer internen Schleife zu einem Pseudoknoten verbinden.



**Abbildung 2:** <sup>[14]</sup> Beispiel eines Pseudoknotens am Beispiel der humanen Telomerase (hTR) (1YMO).

<sup>14</sup> <http://biology.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document&doi=10.1371/journal.pbio.0030213>.

## 2.2 RNA-Bindemotive

Um die spezielle Wechselwirkung zwischen RNA-Molekülen und Proteinen zu verstehen, wird im Folgenden eine kurze Erklärung der RNA-Bindungsmotive gegeben. Die RNA-Moleküle werden je nach ihrer Funktion in verschiedenen Klassen unterteilt [*messenger RNA (mRNA)*, *transfer RNA (tRNA)*, *ribosomale RNA (rRNA)*, *virale RNA (vRNA)*, *small nuclear RNA (snRNA)*] und besitzen entsprechend eine Vielzahl an RNA-bindenden Proteinen. Diese haben stabilisierende, schützende, verpackende, transportierende und auch katalytische Funktionen. Dazu gehören die RRM-Proteine (*RNA recognition motif*), welche die am besten charakterisierten RNA-Bindungsproteine sind.<sup>[15]</sup> Die RRMs bestehen aus den beiden hochkonservativen Regionen, dem RNP1 und dem RNP2 sowie einer variablen Region und binden bevorzugt Einzelstrang-RNA.<sup>[16]</sup> Die RNA-Erkennung geschieht aber durch die variablen Bereiche.<sup>[17]</sup> Eine weitere Bindungs-Domäne ist die K-Homologie-Domäne (KH) und das doppelsträngige RNA-Bindemotiv (dsRBM). Bei der KH-Domäne sind das Phosphatrückgrat und die Zucker die Kontaktstellen zwischen RNA und den Aminogruppen des Peptids.<sup>[18]</sup> Das dsRBM spielt in biologischen Prozessen wie der RNA-Interferenz oder dem RNA-Editing eine Rolle. Da die Basen der A-Form RNA-Helix aus sterischen Gründen keine spezifischen Interaktionen mit Proteinen eingehen können, erfolgt die Erkennung und Bindung von dsRNA strukturabhängig und nicht sequenzspezifisch.<sup>[19]</sup> Die Familie der dsRBM kann man in zwei Klassen unterteilen: denen, die an katalytischen Prozessen beteiligt sind und andere, die an der Lokalisierung von RNP-Komplexen beteiligt sind.<sup>[20]</sup> Die RGG-Box ist ein RNA-Bindemotiv, das seinen Namen den multiplen Kopien der Aminosäuresequenz Arg-Gly-Gly verdankt. Die Aminosäuresequenz lässt bereits auf eine unrigide Struktur schließen. Die Spezifität der RNA-Erkennung wird von anderen Elementen vermittelt werden.<sup>[16]</sup> Der Zinkfinger ist ein Motiv, das bereits aus der Familie der DNA-bindenden Proteine bekannt ist. Hier wird ein Zinkatom von Cystein oder Histidinen koordiniert. TFIIA besitzt neun dieser Motive und bindet mit einigen davon an die 5s RNA.<sup>[21]</sup> Der OB-Fold (oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold) ist ein weiteres, aber kein reines Nukleinsäuren-Bindendes Motiv. Der größte Teil der OB-fold-Proteine sind ssDNA- oder ssRNA-bindende Proteine. Die Aspartyl-tRNA-Synthetase ist ein bekannter Vertreter der OB-folds.

<sup>15</sup> K.Nagai, C.Oubridge, T.H.Jessen, J.Li, P.R.Evans; *Nature* **1990**, 348, 515-520.

<sup>16</sup> C.G.Burd, G.Dreyfuss; *Science* **1994**, 265, 615-621.

<sup>17</sup> F.H.Allain, P.W.Howe, D.Neuhaus, G.Variani; *J.EMBO* **1997**, 16, 5764-5772.

<sup>18</sup> H.Siomi, G.Dreyfuss; *Curr.Opi.Genet.Dev.* **1997**, 7, 345-353.

<sup>19</sup> D.St.Johnston, N.H.Brown, J.G.Gall, M.Jantsch; *Proc.Natl.Acad.Sci USA* **1992**, 89, 10979-10983.

<sup>20</sup> K.Y.Chang, A.Ramos; *J.FEBS* **2005**, 272, 2109-2117.

<sup>21</sup> D.Lu, ; A.Searles, A.Klug; *Nature* **2003**, 426, 96-100.

Das argininreiche Motiv (ARM) ist ein sehr wichtiges Bindungsmotiv, da es in vielen viralen und ribosomalen Proteinen die RNA-Bindung vermittelt. Die ARM-Motive spielen außerdem eine zentrale Rolle bei den Translation-, Transkriptions-, RNA-Adressierungs- und –Verpackungs-Mechanismen<sup>[22]</sup> und zeigen keine gemeinsame Struktur sondern eine kurze Region basischer Aminosäuren (8-20 Aminosäuren in Länge) die zum großen Teil aus Argininen bestehen. Auch wenn die Strukturen der ARM-Regionen der näher charakterisierten Beispiele wie HIV Tat, - Rev und BIV Tat divers sind, scheint eine  $\alpha$ -helikale Konformation charakteristisch zu sein. Alle bekannten ARM-Proteine sind in der Lage, RNA mit hoher Affinität zu binden.<sup>[23]</sup> Die Homologien beruhen alle auf der Häufung von Argininen. Der Vorteil von Argininen gegenüber Lysin oder anderen Aminosäuren besteht darin, dass die basischen Arginine mehr Wasserstoffbrücken ausbilden können. Durch die Bindung der Proteine Tat und Rev aus dem HIV an die RNA wird die große Furche der RNA so verdreht, dass die Basen für Interaktionen zugänglich werden. Für die Bindung von ARM-Motiven scheint eine Schleifenstruktur der RNA notwendig zu sein, denn die RNA-Bindestellen, wie zum Beispiel „stemloops“ im Falle der N-Proteine bei Bakteriophagen, interne Schleifen bei HIV Rev oder Ausstülpungen („bulges“) bei HIV Tat, zeigen solche Schleifen.<sup>[16]</sup>

### 2.3 Human-Immunsuppressiv-Virus (HIV)

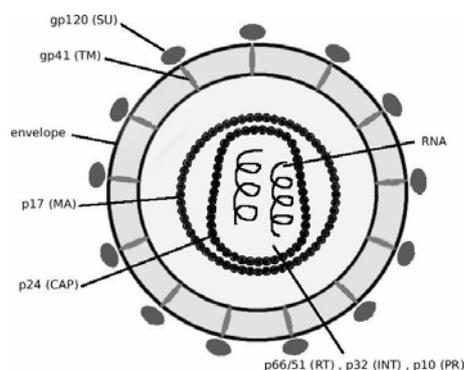


Abbildung 3: HI-Virion.

Seit den ersten Fällen des Immundefizienz-Syndroms 1981 sind über 40 Millionen Menschen weltweit an dieser viralen Infektion erkrankt.<sup>[24]</sup> Aufgrund der enormen globalen Epidemie und der Geschwindigkeit mit der sich das HIV ausbreitet, wurden intensive Bemühungen unternommen, die Biochemie des Virus zu verstehen. Diese Bemühungen führten zu schnellen Fortschritten des Verständnisses des viralen Lebens- und Vermehrungszyklus. So ist bekannt, dass in der ersten Phase der Infektion eine sehr

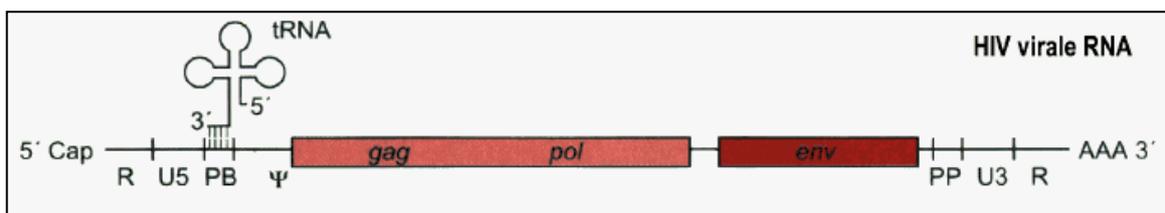
<sup>22</sup> R:Austin, T.Xia, T.T.Takahashi, R.W.Roberts; *J.Am.Chem.Soc.* **2002**, *18*, 10966-10967.

<sup>23</sup> R.Tan, A.D.Frankel; *Proc.Natl.Acad.Sci USA* **1995**, *92*, 5282-5286.

<sup>24</sup> www.aids.com; Mai 2006.

schnelle Vermehrungsrate beginnt, die täglich 1-10 Milliarden Virionen freisetzt, die genauso viele T-Lymphozyten befallen und diese letztendlich töten.<sup>[25]</sup>

Der Replikations-Zyklus des Humanen Immunsuppressions-Virus, der zur Familie der Retroviren gehört, beginnt mit der Bindung des gp120-Peptids (gp=Glykoprotein) an den CD4-Rezeptor der CD4-Lymphozyten der T-Zellklasse.<sup>[25,26]</sup> Es können aber auch Monozyten bzw. Makrophagen, Astrozyten und Zellen des zentralen Nervensystems befallen werden.<sup>[1]</sup> Das Hüll-Protein gp41 fusioniert dann mit der Zellmembran am zellulären Co-Rezeptor CCR-5 und CXCR-4.<sup>[25,27]</sup> Nach der Fusion der viralen Hülle mit der Zellmembran wird das Viruscapsid in das Cytoplasma transferiert. Dort wird sofort mit dem Umschreiben der viralen RNA in dsDNA durch das Enzym Reverse-Transkriptase (RT) begonnen. Dazu besitzt die mit 5'-CAP und 3'-Polyadenylierung versehene RNA verschiedene Regionen auf der RNA. An der U5-Region befindet sich die Primerbindungsstelle (PB) die mit dem 3'-Ende eines tRNA-Moleküls über die Basenpaarung komplexiert ist. Hinter den Genabschnitten findet sich ein Polypurintrakt (PP), dieser ist für die Initiation der Synthese des DNA-Doppelstranges bei der Reversen Transkription wichtig. Direkt daneben findet sich der U3-Abschnitt, der auch für die Genexpression essentiell ist, da sie Promotoren und cis-aktive Elemente enthält, an die sich transaktive, zelluläre Proteine binden und so die virale Transkription und Genexpression regulieren.<sup>[5]</sup> Die R5-Region ist essentiell für die Integration des Provirus in das Zellgenom. Der  $\psi$ -Abschnitt dient als Bindungsstelle für die Nucleocapsidproteinabschnitte.



**Abbildung 4<sup>[5]</sup>:** Genomorganisation retroviraler RNA. Nach der 5'-Cap-Struktur schließt sich die R-Region (redundant) an, mit den Abschnitten U5 am Anfang und U3 am Ende des RNA-Stranges. PB ist die Primer-Bindungsstelle mit gebundener tRNA.  $\Psi$  gibt die Sequenzfolge an, über welche die RNA mit den Nucleocapsidproteinen während der Morphogenese wechselwirkt. PP ist die Abkürzung für Polypurintrakt.

Die RT, ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die aber auch DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität besitzt. So kann sie aus der RNA-Matrize den DNA-Einzelstrang synthetisieren, danach aber auch diese DNA zu Doppelstrang komplementieren.

<sup>25</sup> M.Gottfredsson, P.Bohjanen; *Frontiers in Bioscience* **1997**, 2, 619-634.

<sup>26</sup> P.J.Maddon, A.G.Dalgleish, J.S.McGougal, P.R.Clapham, R.A.Weiss, R.Axel; *Cell* **1986**, 47, 333-348.

<sup>27</sup> H-Choe, M.Farzan, Y.Sun, N.Sullivan, B.Rollins, P.D.Ponath, L.Wu, C.R.Mackay, G.LaRosa, W.Newman, N.Gerad, C.Gerad, J.Sodorski; *Cell* **1996**, 85, 1135-1148.

Eine dritte Aktivität der RT ist die RNaseH-Aktivität, die das benachbarte RNA-Template in der RNA-DNA-Hybridform abbaut.<sup>[25, 28]</sup>

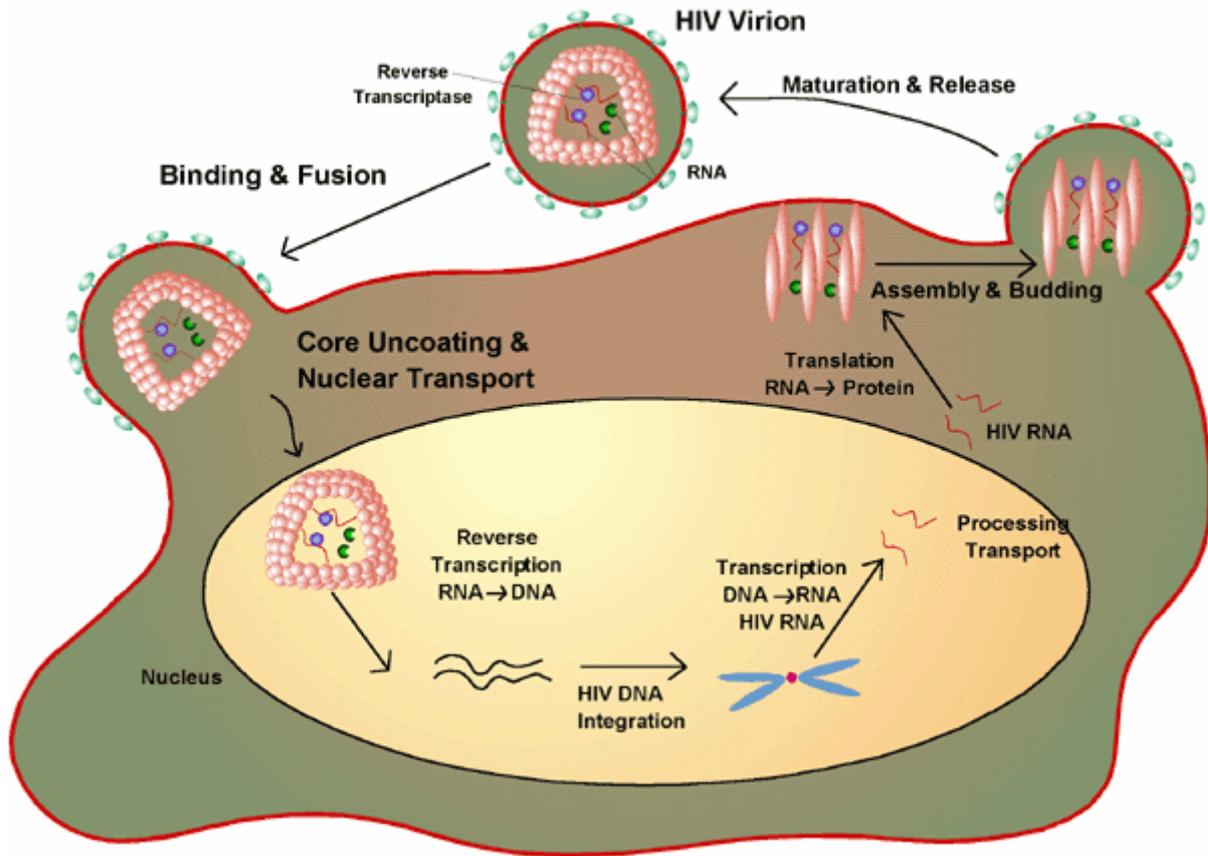


Abbildung 5: Lebenszyklus des HIV.

Die frisch gebildete cDNA ist im Nucleoproteinkomplex gebunden. Diese cDNA enthält das Matrix-Protein, die Integrase und noch einige andere virale Proteine und wird in den Zellkern transportiert.<sup>[25,28]</sup> Das Vpr- Protein vermittelt den Transfer des Pre-Integrations-Komplex in den Zellkern, so dass das HIV auch in der Lage ist, nichtzellteilungsaktive Zellen zu befallen<sup>[29]</sup>. Die provirale DNA wird nach Ankunft im Zellkern durch die Integrase effizient in das Zielgenom eingebaut.<sup>[5,30]</sup>

Das integrierte Provirus ist von beiden Seiten von den LTRs (*long-terminal-repeats*) identischer Sequenzfolgen am 5'- als auch 3'-Ende flankiert, die im Verlauf des Umschreibens der ssRNA in dsDNA doppelt kopiert und jeweils an den Anfang und an das Ende angehängt wurde. Diese Wiederholungseinheiten bestehen aus den Regionen U3, R und U5, die an den Genom-Enden in gleicher Orientierung vorliegen. Das LTR enthält alle *cis*-aktiven Sequenzen, die Promotor- und Enhancer-Elemente, welche die retrovirale Genexpression kontrollieren.<sup>[5]</sup>

<sup>28</sup> D.Trono; *Cell* **1995**, 82, 189-192.

<sup>29</sup> R.H.Miller, N.Sarver; *Nature.Med.* **1997**, 4, 389.394.

<sup>30</sup> C.M.Farnet, F.D.Bushman; *Cell* **1997**, 88, 483-492.

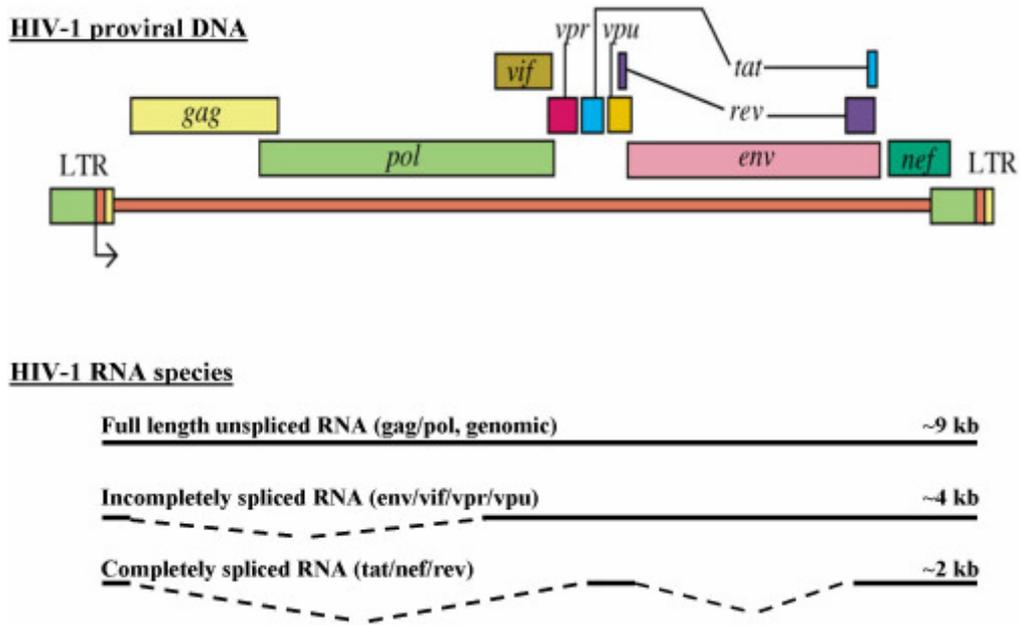


Abbildung 6 <sup>[5]</sup>: HI-Provirus.

Zelluläre, transaktive Proteine binden vor allem an die U3-Sequenzen und induzieren die Transkription der integrierten Viruskomponenten. Im U3-Bereich der humanen Retroviren findet man mehrere unterschiedliche cis-aktive Kontrollelemente, die mit bestimmten zellulären DNA-bindenden Proteinen interagieren. So stellt die wichtige Sequenzabfolge im HIV für den Nuklearfaktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) die Promoterbindungsstelle dar und kontrolliert die virale Genexpression. Diese NF $\kappa$ B-abhängige Genexpression ist sehr wichtig für die Pathogenese, da jede Stimulierung des Immunsystems durch andere Infektionen die HIV-Expression induziert.<sup>[5]</sup> Für die Reproduktion bedient sich das Virus der Transkriptions-Maschinerie. Dafür sind die Proteine Tat (*transactivator of transcription*) und Rev (*regulator of expression of virion proteins*) nötig.<sup>[5]</sup> Das Tat-Protein wird in zwei Exons codiert (Abbildung 6) und als erstes Virusprotein während des Infektionszykluses synthetisiert. Das Tat-Peptid wird zur Kettenelongation durch die RNA-Polymerase II benötigt. Die RNA-Polymerase II beginnt nach Bindung an den LTR-Promotor mit der Bildung der viralen RNA.<sup>[5]</sup> Das gebildete RNA-Fragment ist kurz und enthält die 5'-terminalen Sequenzen der TAR-RNA.<sup>[31]</sup> Die TAR-RNA erstreckt sich direkt von der Start-Position bis zu Nukleotid 59 und bildet eine stabile Haarnadel-Struktur aus.<sup>[32]</sup> Am Anfang der

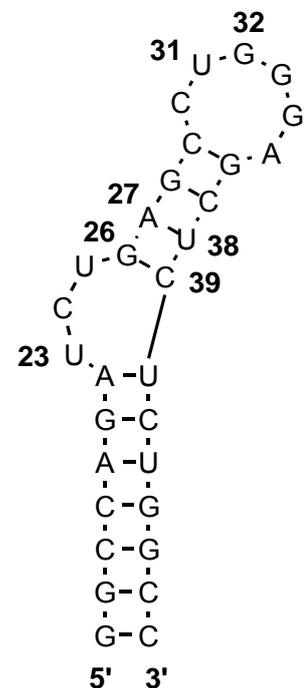
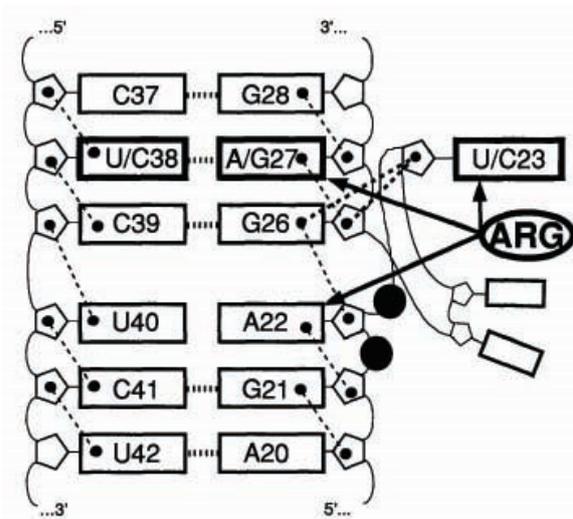


Abbildung 7: Haarnadel-schleife der TAR-RNA.

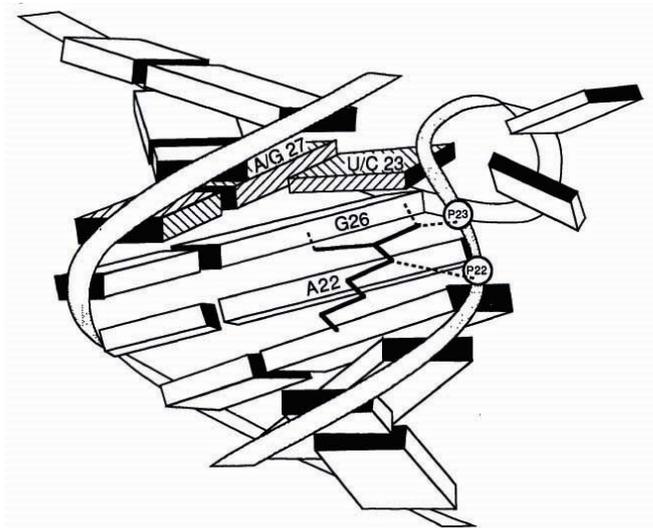
<sup>31</sup> C.Zhou, T.M.Rana; *J.Mol.Biol* **2002**, 320, 925-942.

TAR-Sequenz befindet sich eine Bulge-Region, an die das zelluläre TRP-Protein (TAR-RNA-bindende Protein) oder das Tat-Peptid binden können. Mit dem TRP-Protein stoppt die RNA-Polymerase II und bricht die Elongation ab.<sup>[5]</sup> Ist Tat-Protein vorhanden, so bindet dieses an die Bulge-Region. An dieser spezifischen Bindung ist die ARM-Region (ARM-Motiv im Tat) beteiligt.<sup>[33]</sup> *Tao* und *Frankel* konnten zeigen, dass selbst die freie Aminosäure Arginin spezifisch an TAR bindet.<sup>[34]</sup> Die Bindung des Tat-Proteins an die TAR-RNA erfolgt hauptsächlich durch die neun Aminosäuren der ARM-Region RKKRRQRRR (49-57) des Tat-Proteins mit der Ausbuchtung UCU bzw. UUU (23-25) der TAR-RNA.<sup>[22]</sup> Die Positionen der Phosphatgruppen werden aber auch erkannt.<sup>[32]</sup>

Dabei sind verschiedene Arginine der ARM-Regionen im Tat-Protein an der Interaktion beteiligt: Arg 52 bindet am UCU-Basentriplet der Schleife 23-25<sup>[35,36]</sup>, Arg 70 bindet an G<sup>14</sup><sup>[33]</sup>, Arg 73 an G<sup>11</sup> und die Phosphordiesterbindungen von G<sup>9</sup> und U<sup>10</sup>.<sup>[37]</sup> Die



**Abbildung 8**<sup>[42]</sup>: Bindung des Arg-52 an das Basentriplett AUA des *Bulges*.



**Abbildung 9**<sup>[42,33]</sup>: Schematische Representation der Interaktion zwischen Arginin 52 und TAR-RNA. Das Arginin ist schwarz eingezeichnet und bildet Wasserstoffbrücken zu G<sup>26</sup> und den Phosphatgruppen P22 und P23.

Bindungskonstante dieser selektiven Bindung wurde von vielen Arbeitsgruppen bestimmt, wobei sich dabei immer noch keine Einigkeit gebildet hat, denn die Bindungskonstanten variieren von 1.0 nM<sup>[38]</sup> über 1-3 nM<sup>[39]</sup> und 13.3 nM<sup>[40]</sup> bis 130  $\mu$ M<sup>[41]</sup>, je nach Arbeitsgruppe und Methodik.

<sup>32</sup> F.Aboul-ela, J.Karn, G.Varani; *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 3974-3981.

<sup>33</sup> M.A.Weiss, N.Narayana; *Biopolymers* **1999**, Vol.48, 167-180.

<sup>34</sup> J.Tao, A.D.Frankel; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1992**, 89, 2723-2726.

<sup>35</sup> H.Mei, D.P.Mack, A.A.Galan, N.S.Halim, A.Heldsinger, J.A.Loo, D.W.Moreland, K.A.Sannes-Lowery, L.Sharmeen, H.N.Truong, A.W.Czarnik; *Bioorg.Med. Chem.* **1997**, 6, 1173-1184.

<sup>36</sup> M.A.Poss, E.Iwanowicz, J.A.Reid, J.Lin, Z.Gu; *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5933-5936.

<sup>37</sup> F.Aboul-ela, J.Karn, G.Varani; *J.Mol.Biol.* **1995**, 253, 313-32.

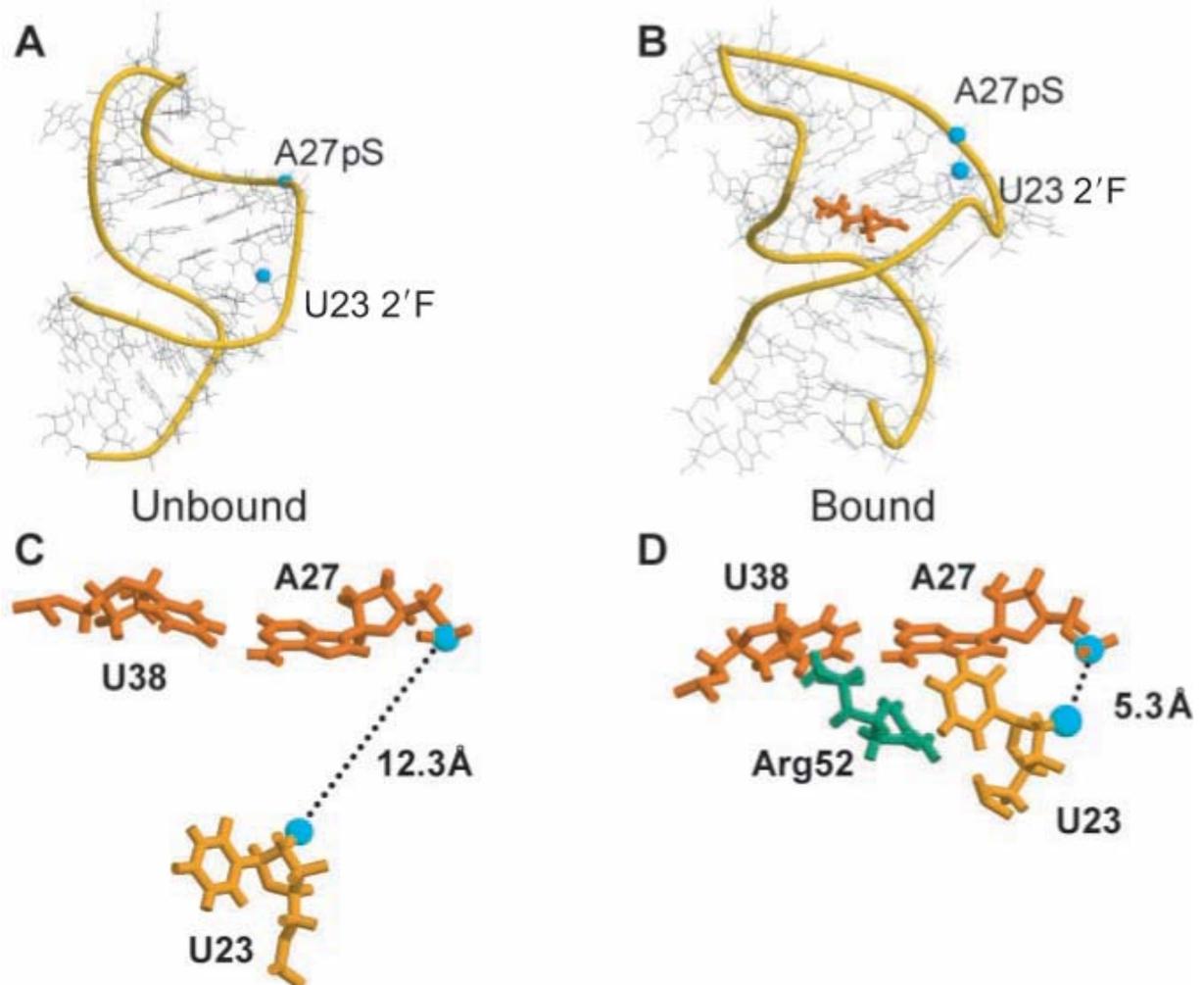
<sup>38</sup> H.-Y. Mei, D.P. Mack; *Bioorg.&Med.Chem.* **1997**, 5, 1173-1184.

<sup>39</sup> A.Garbesi, F.Hamy, M.Maffini, G.Albrecht, T.klimkait; *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 2886-2890.

<sup>40</sup> H.Zhao, J.Li, L.Jiang; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 320, 95-99.

<sup>41</sup> A.Krebs, V.Ludwig, O.Boden, M.W.Göbel; *ChemBioChem* **2003**, 4, 972-978.

Dabei konnten NMR-Studien von *Puglisi et al* und *Drobny et al* zeigen, dass das Arg 52 zwar im Bulge an den drei hervorstehenden Basen UCU bindet, aber das Basentriplett A<sup>27</sup>U<sup>23</sup>A<sup>22</sup> koordiniert.<sup>[42, 43]</sup> Dort steckt das Argininamid zwischen A22 und U23. Die Basen C24 und U25 dienen hauptsächlich als Platzhalter und sind ohne Aktivitätsverlust austauschbar.<sup>[32]</sup> Dieser Argininamid-Sandwich führt zur Öffnung der großen Furche und



**Abbildung 10** <sup>[32]</sup>: Freie TAR (A) und gebundene TAR (B) aus der Sicht der großen Furche. Strukturaufklärung wurde über NMR-Experimente erhalten. Blaue Markierungen stellen <sup>19</sup>F-U23- und pS-A27-markierte Positionen dar und zeigen die Abstände zwischen den beiden Basen an (C und D). Das Tat-Peptid ist dabei orange dargestellt.

erhöht die Verfügbarkeit der G26-Base zur Wasserstoffbrückenbindung mit der Guanidingruppe.<sup>[44]</sup> Dadurch geht eine starken Konformationsänderung des TAR-Moleküls einher. Der gebildete Tat-TAR-Komplex kann nun Domänen des P-TEFb (positiver Transkription- Elongations-Faktor) binden.<sup>[45]</sup>

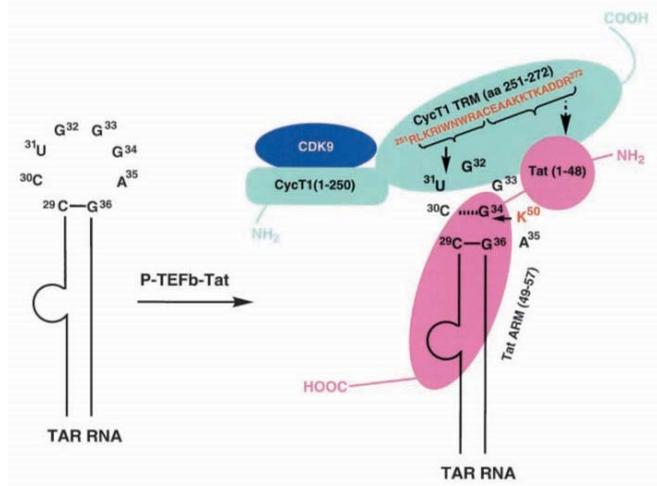
<sup>42</sup> J.D.Puglisi, L.Chen, A.L.Frankel, J.R.Williamson; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1993**, *90*, 3680-3684.

<sup>43</sup> L.G.Olsen, T.E.Edwards, P.Deka, G.Varani, S. Th. Sigurdsson, G.P. Drobny; *Nucleic Acids Res.***2005**, *33*, 113447–3454.

<sup>44</sup> A.S.Brodsky, J.R.Williamson, *J.Mol.Biol.* **1997**, *267*, 624-39.

<sup>45</sup> M.E.Garber, P.Weil, V.N.Kewal-Ramani, T.P.Mayall, Ch.H.Herrmann, A.P.Rice, D.R.Littman, K.A.Jones; *Genes Dev.* **1998**, *12*, 3512-3527.

Diese Domänen sind die Kinase CDK9 und CyclinT1 (CycT1), die beide unersetzlich für die Aktivierung des HIV-1-LTR-Promotors sind. *Fluoreszenz-Revcovery-Emission-Transmission-(FRET)* Versuche konnten zeigen, dass die Bindung zwischen Tat, CycT1 und TAR hoch kooperativ sind. CycT1 erhöht die Affinität des Tat zur TAR und TAR verbessert die Bindung zwischen Tat und CycT1.<sup>[31,46]</sup> Dabei bindet die CycT1-Box (Abbildung 11), die aus



**Abbildung 11**<sup>[47]</sup>: Ausbildung des tertiären Komplexes zwischen TAR, Tat und den Domänen CycT1 und CDK9 des P-TEFb-Komplexes. CDK9 bindet an die CycT1-Box (Aminosäuren 1-250), das Tat-TAR-Erkennungs-Motiv (TRM) erstreckt sich von 251-272. Die Aminosäuresequenz 252-260 des TRM koordinieren die Basen U31 des TAR-Loops, die Aminosäuren 261-272 interagieren mit der Tat-Kern-Domäne (1-48). Weder CycT1 noch der P-TEFb-Komplex bindet TAR in der Abwesenheit von Tat.<sup>[46]</sup>

Das P-TEFb kann nun, im Komplex stabilisiert, die CTD (Carboxy-Terminale-Domäne) der RNA-Polymerase II in der Serin- und Threonin-haltigen Heptasequenz phosphorylieren.<sup>[31,48]</sup> Diese Phosphorylierung aktiviert die RNA-Polymerase II. Damit hat der Tat-TAR-P-TEFb-Komplex die gleiche Funktion erfüllt wie das TFIIF, das sonst die CTD phosphoryliert<sup>[31]</sup>. Diese Promoteraktivierung macht es aufgrund der Schlüsselrolle des Tat-TAR-Komplexes, zu einem besonderen Angriffspunkt zukünftiger Therapien, zumal es der einzige Promoter des HIV ist. Als natürlich vorkommende Antagonisten des Komplexes sind die Aminoglykoside identifiziert worden. Die außerordentlich kompakte Genomorganisation des HIV mit nur einem Promotor im LTR, bedingt eine Kontrolle der Synthese der Genprodukte auch nach der Transkription. Neben der Verschiebung des ribosomalen Leserasters bei der Translation der Gag/Pol-Proteine und alternative

<sup>46</sup> J.Zhang, N.Tamilarasu, S.Hwang, M.E.Garber, I.Huq, K.A.Jones, T.M.Rana; *J.Biol.Chem.* **2000**, 275, 34314-34319.

<sup>47</sup> S.Richter, Y.Ping, T.M.Rana; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **2002**, **99**, 7928-7933.

<sup>48</sup> M.E.Isel, J.Karn; *J.Mol.Biol.* **1999**, 290, 929-941.

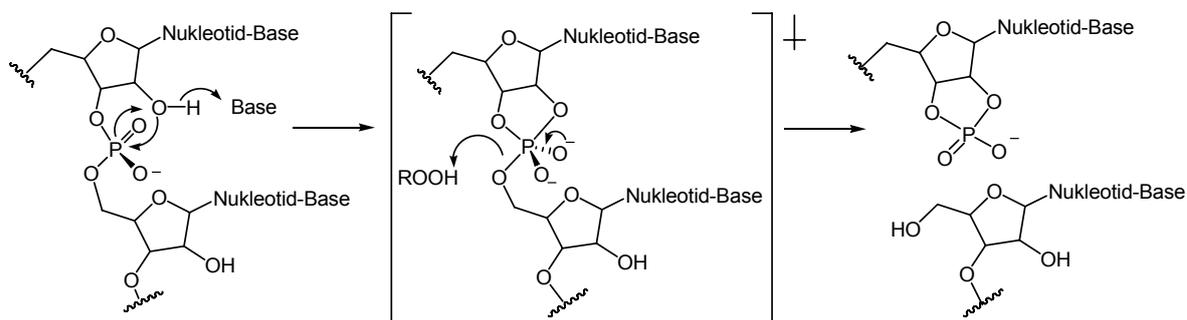
Spleißvorgängen zur Generierung der mRNA-Spezies für die Regulator- und Membranproteine erfüllen auch die Rev-Proteine (*regulator of expression of virion proteins*) dabei eine wichtige Rolle. Diese Klasse von posttranskriptionell wirkenden Transaktivatoren wurde das erste Mal beim HIV entdeckt. Mit Ausnahme des Rev selbst und der Tat-, Tev- und Nef-Proteine ist die Translation aller anderen viralen Proteine vom Rev abhängig. Das Rev-Protein wird in zwei Exons kodiert, die sich mit denen des Tats überlappen.<sup>[5]</sup> Das Rev-Protein bindet an eine RRE-RNA-Sequenz (*Rev-Response-Element*), die sich in allen einfach gespleißten oder ungespleißten mRNA-Molekülen findet, die für die entsprechenden Vorläufer-Proteine kodieren. Die Interaktion bewirkt den bevorzugten Transport dieser mRNA-Spezies ins Cytoplasma. Bei den mehrfach gespleißten RNA-Molekülen, von denen die Moleküle Tat, Tev, Rev und Nef abgelesen werden, wird das RRE durch die Spleißvorgänge entfernt.<sup>[5]</sup> Die Bindung des Rev an das RRE erfolgt ebenfalls durch eine argininreiche Domäne der Aminosäuren 35-50.<sup>[5]</sup> Das Kernlokalisierungssignal wurde den Resten 40-45 zugeordnet. In der carboxyterminalen Hälfte des Rev wurden die Aminosäuren 73-84 als essentiell identifiziert, die für den Kernexport der mRNAs unerlässlich sind. Diese Effektorregionen (oder auch NES) werden vom Exportin-1 oder auch CRM1 (*chromosomal maintenance gene*) gebunden, die dann ihrerseits an die GTP-Form des Ran-Proteins binden. Nach dem Durchtritt lösen sich Exportin-1 und Ran unter GTP-Hydrolyse, und die argininreiche Domäne wird zugänglich für das zelluläre Protein Importin- $\beta$ , das mit Ran-GDP wechselwirkt und den Rücktransport in den Zellkern bewirkt.<sup>[5]</sup>

Die Synthese der Env-Proteine, die für die Hülle des Virus verantwortlich sind, verläuft an der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Die Translation aller anderen Proteine erfolgt an freien Ribosomen im Cytoplasma. Die Gag- und Pol-Vorläuferproteine werden myristiliert und zur Zellmembran transportiert, an der sie sich anlagern. An der Zellmembran findet die Morphogenese zu infektiösen Virionen statt. Die genomischen RNA-Moleküle enthalten als ungespleißte RNA-Spezies in der Leader-Region das  $\psi$ -Element. Die RNA-Genome binden über die Zinkfinger motive der Nucleocapsidproteinanteile der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferprodukten. Dadurch ist gewährleistet, dass nur vollständige RNA-Moleküle eingebaut werden. Bei Kontakt mit den RNA-Molekülen stülpen sich die betroffenen Membranbereiche aus und bilden Vesikel, die sich abschnüren. Die hohen lokalen Konzentrationen der sauren Gag/Pol-Vorläuferproteine führen zu einer Überlagerung der Protease-Domänen, was zu einer Autoproteolyse führt. Die Gag- und Gag/Pol-Vorläufermoleküle werden anschließend in die Matrix-, Capsid- Nucleocapsid- und Link-Proteine sowie die Reverse

Transkriptase und Integrase prozessiert. Strukturelle Umlagerungsprozesse führen zur Ausbildung des konischen Capsids. Die Aktivierung der Protease im abgespaltenen Virion stellt die korrekte Morphogenese und Assoziation mit den RNA-Molekülen vor der Abspaltung sicher.<sup>[5]</sup>

## 2.4 Hairpin-Ribozym

Das erste natürliche Hairpin-Ribozym-Motiv wurde im negativen Strang der Satelliten-RNA des Tobacco-Ringspot Virus ([ $-$ ]sTRSV) gefunden<sup>[49]</sup> und führte zum Umkippen des biologischen Dogmas, dass nur Enzyme auf Basis der Aminosäuren zur Katalyse fähig wären. In der Zwischenzeit sind weitere natürliche Hairpin-Ribozyme entdeckt worden und zwar das Hammerhead-Ribozym, das Hepatitis-Delta-Virus (HDV) und das Varkud Satelliten-Ribozym.<sup>[50]</sup> Das Tobacco-Ringspot-Virus ist bisher am eingehendsten untersucht. Nachdem das Virion in die Wirtszelle eingedrungen ist, wird die Replikation der viralen (+)-Strangmatrize durch die Wirtspolymerase durchgeführt. Der sich bildende, lineare (-)-Strang besitzt die Hairpin-Motiv-Sequenzen und spaltet sich selbst an spezifischen Stellen, wobei das Ribozym Teil des Replikationszyklusses ist, der nach dem „rolling-circle“-Mechanismus funktioniert.<sup>[50]</sup> Dabei findet eine Umesterung durch das Hairpin-Ribozym an der RNA statt, so dass diese Reaktion reversibel gestaltet werden kann. Diese reversible Reaktion findet durch eine Ligation der Fragmente zum zirkulären (-)-Strang statt. Durch eine erneute Replikation, Spaltung, Neufaltung und anschließender Ligation bildet sich ein neuer (+)-Strang der viralen RNA.<sup>[51]</sup> Die Spaltung und Ligation der RNA-Synthese ist eine intramolekulare Reaktion.<sup>[52,53]</sup>



**Abbildung 12** <sup>[52]</sup>: Postulierter basenkatalysierter Nucleotid-Spaltungs-Mechanismus durch das Hairpin-Ribozym. Die Ligation ist der reverse Reaktions-Mechanismus.

<sup>49</sup> N.K.Tanner; *FEMS Microbiol.Rev.* **1999**, 23, 257-275.

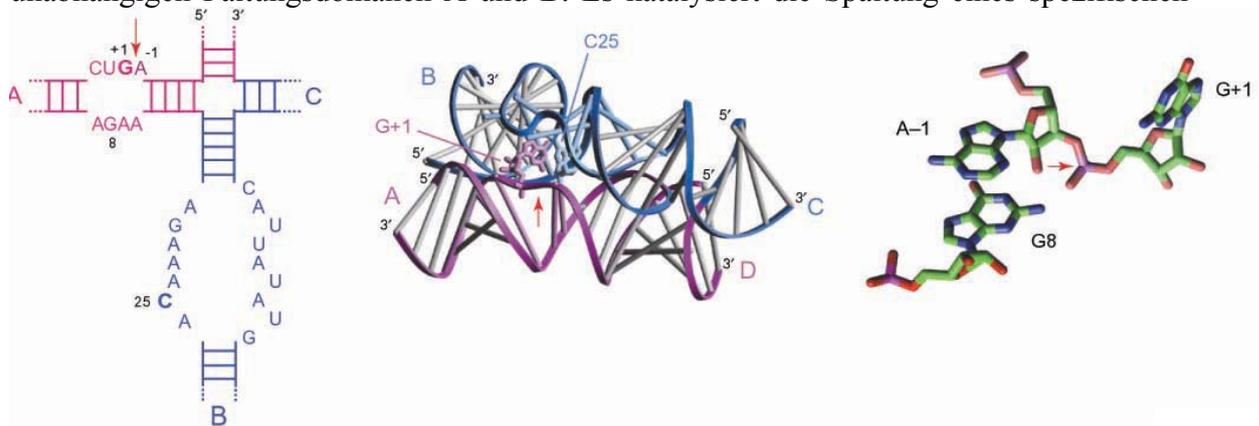
<sup>50</sup> A.R.Ferré-D'Amaré, P.B.Rupert; *Biochemical Society* **2002**, 1105-1109.

<sup>51</sup> A.Hampel, R.Tritz; *Biochemistry* **1989**, 28, 4929.

<sup>52</sup> D.M.J.Lilley; *Trends Biochem.Sci.* **2003**; 9, 495-501.

<sup>53</sup> M.J.Fedor; *Biochemical Soc.* **2002**; 1109-1115.

Die minimal benötigte Sequenz, die für die katalytische Aktivität des Hairpin-Ribozyms essentiell ist, konnte in Mutagenese und Nukleotid-Insertions- bzw. Deletions-Experimenten ermittelt werden. Aus diesen Erkenntnissen war eine Synthese des Hairpin-Ribozyms und einiger Derivate möglich.<sup>[53]</sup> Das *trans*-aktive Hairpin-Ribozym hat eine Länge von 50 Nukleotiden und bildet mit dem Substrat einen Komplex mit den unabhängigen Faltungsdomänen A und B. Es katalysiert die Spaltung eines spezifischen



**Abbildung 13:** Das Hairpin-Ribozym in der Sekundärstruktur mit den Ausstülpungen A und B (links) und der Tertiärstruktur (mitte). In der Tertiärstruktur sind die Ausstülpungen in direkter Nähe. Die aktiv an der Spaltungsreaktion beteiligten Basen G+1 und C25 sind markiert. Dabei greift A-1 aktiv seine Phosphordiesterverbindung zu G+1 an (rechts). Dazu wird der tertiäre Komplex so verdreht, dass die 2'-OH Gruppe des A-1 in einer Ebene mit dem Phosphatrest an G+1 ist. Dadurch wird der nukleophile Angriff nach dem  $S_N2$ -Mechanismus ermöglicht.<sup>[52, 53]</sup>

Substrates mit einer 14 Nukleotide langen Erkennungs-Sequenz. Dabei spielen die meisten essentiellen Interaktionen mit den Nukleotiden der Ausstülpungen ab. Diese Nukleotide bilden einen tertiären Komplex, in dem sich die Loops A und B an einigen Punkten überlappen. In dieser aktiv-spaltenden Konformation bindet das zu G+1 komplementäre C-25 mit der G+1-Base.

Bei der Spaltung ist die Aktivität grundsätzlich abhängig von Metall-Ionen, diese sind aber nicht essentiell. Dabei können sie folgende Rollen übernehmen. Die Metallionen koordinieren Wassermoleküle, die dann in einer generellen Säure-Base-Reaktion reagieren können. Auch die Ionen können einen *Inner-Sphere*-Komplex mit der RNA ausbilden und dabei als Lewis-Säuren der Deprotonierung und dem Angriff der Nukleobasen assistieren. Eine dritte Möglichkeit ist die Stabilisierung der geladenen Phosphatrückgrate der Ribonukleinsäure.<sup>[52]</sup> Dass das Hairpin-Ribozym in Anwesenheit des Polyamins Spermidin und Abwesenheit von Magnesium-Ionen die gleichen Spaltungsraten aufweist wie mit Magnesium-Ionen allein, zeigt, dass die Stabilisierung der Phosphatrückgrate auch von organischen Molekülen übernommen werden kann.<sup>[54]</sup> Da Aminoglykoside wie Neomycin

<sup>54</sup> D.J.Earnshaw, M.J.Gait; *Nucleic Acids Res.* **1998**, Vol.26, 24; 5551-5561.

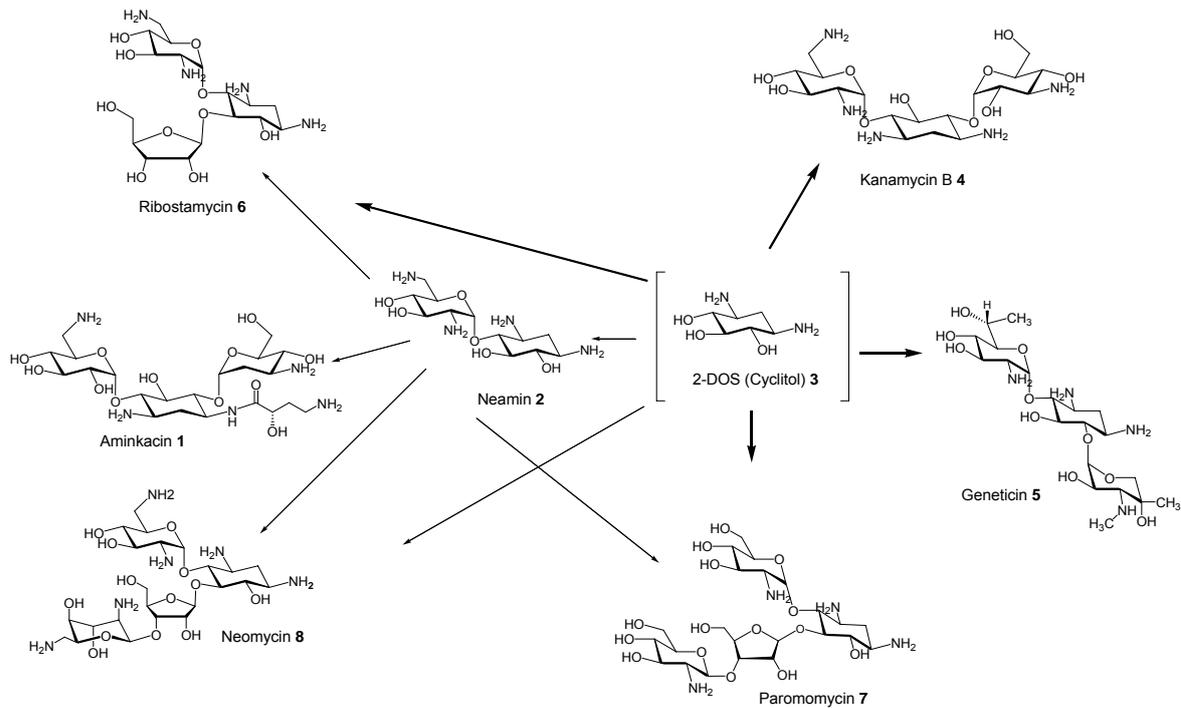
Mg<sup>2+</sup>-Ionen komplexieren und damit aus der freien Lösung entfernen, stellt sich die Frage, ob die Inhibierung der Spaltaktivität durch die Aminoglykoside nicht auch zum großen Teil durch die Reduktion der Konzentrationen stabilisierender Mg<sup>2+</sup>-Ionen hervorgerufen wird.<sup>[54]</sup> Interessanterweise wurde ebenfalls entdeckt, dass Spermidin das Hairpin-Ribozym mit einer  $k_{\text{obs}}$  von 0.008 min<sup>-1</sup> allein spalten kann.<sup>[54]</sup>

## 2.5 Aminoglykosid-Antibiotika

Das erste bekannte Aminoglykosid-Antibiotikum war das Streptomycin, das 1943 aus *Streptomyces griseus* isoliert wurde. Die Aminoglykosid-Antibiotika sind bakteriozid. Unerwünschte Wirkungen am Menschen sind Nephro- und Ototoxizität, da sie die Haarzellen im Gehörgang dauerhaft schädigen. Sie haben ein weites Wirkungsspektrum gerade im Bereich der gramnegativen Bakterien, wobei allerdings intrazelluläre Erreger nicht erreicht werden können, da Aminoglykoside aufgrund ihrer sehr guten Wasserlöslichkeit nicht in der Lage sind, Zellmembranen zu passieren. Die Aminoglykoside werden in vier Gruppen unterteilt: die Streptomycin-, Kanamycin/Gentamycin-, Neomycin 8- und Spectinomycin-Gruppe. Seit den 60er Jahren ist bekannt, dass die Aminoglykoside an die ribosomale RNA binden. Dazu wurden Bindungsstellen an der 16S-RNA und der 23 S-rRNA gefunden, wobei im Besonderen die Aminogruppen des Desoxystreptamin-Ringes (2-DOS) an dieser Bindung beteiligt sind.<sup>[55]</sup> Streptomycin und Neomycin 8 sind als aktivste Vertreter der Aminoglykoside mit der funktionellen 2-DOS-Gruppe besonders untersucht worden, wobei bei den Ribosomen, Ribozymen und Spleißosomen zuerst keine gemeinsame Bindungs-Sequenz gefunden werden konnte.<sup>[55]</sup> Spätere NMR-Untersuchungen von *Recht* und *Fourmy et al* zeigten, dass spezifische Bindungen zwischen dem Paromomycin 7 und den Basenpaaren U1492-U1495 und A1408-A1493 existieren. Dabei wird eine Ausstülpung durch das A1492 gebildet. Das Aminoglykosid bindet in der Hauptfurche der RNA in dieser Region und führt dadurch zu Konformationsänderungen. Die Entdeckung, dass Prokaryonten wesentlich empfindlicher reagieren als Eukaryonten, bei denen an der signifikanten Stelle 1408 das Adenin durch ein Guanidin ersetzt ist, zeigte die Spezifität der Bindung genauso wie die Resistenzentwicklung durch eine Methylierung an der Position 1408 am Adenin.<sup>[55]</sup> Durch diese Resistenzentwicklung sind Neomycinresistente rRNAs gleichzeitig gegen Kanamycin 4, Apramycin und Gentamycin resistent. Andere Aminoglykoside nutzen die gleichen Regionen oder zumindest benachbarte Regionen, wie Methylierungsmutationen an Hand von Resistenzen zeigen. So zeigt die 16S rRNA

---

<sup>55</sup> C.S.Chow, F.M.Bogdan; *Chem.Rev.* **1997**, 97, 1489-1513.



**Abbildung 14:** Strukturformeln der an die 16S-rRNA bindenden Aminoglykoside mit 2-DOS tragenden Kernelement.

an U1400 Resistenz gegen Hygromycin 9, an G1405 Resistenz gegen Kanamycin 4 und Gentamycin, während A1408 dagegen bei Kanamycin 4 und Apramycin Resistenz zeigt. Bei Paromomycin 7 konnte eine Resistenz durch eine Transversion von C nach G an Position 1409 erreicht werden.<sup>[56]</sup> Kristallstrukturen von den Aminoglykosiden Gentamycin, Kanamycin 4, Neomycin 8, Lividomycin, Ribostamycin 6 und den beiden Strukturelementen Neamin 2 bzw. 2-Desoxystreptamin (2-DOS) 3 an die A-Stelle der 16S-rRNA konnten die Bindungsplätze lokalisieren.

Bei den untersuchten Aminoglykosiden beinhaltet alle das 2-DOS 3 als Strukturelement mit der Zuordnung als Ring II. Bei Gentamycin insertierte Ring I zwischen dem Guanidin (1491) und dem Adenin (1408) über die Ausbildung eines Pseudopaars durch Verbrückung der Basen mit Wasserstoffbrücken. Dadurch können die Adenine 1492 und 1493 in der Ausstülpung stabil verbleiben und gleichzeitig Wasserstoffbrücken zur kleinen Furche ausbilden.<sup>[57]</sup> Diese Bindung ist die Basis für das Fehlleseraster der Ribosomen durch Bindung an Aminoglykoside. Die anderen Ringe bilden Kontakte zu verschiedenen Nucleotiden in Abhängigkeit von den Substituenten am Ring II. Ein Drittel der Substituenten der Aminoglykoside wird durch Wasser solvatisiert, wobei die Wassermoleküle selbst als Brückenmoleküle die beiden anderen Moleküle verbinden.<sup>[57]</sup>

<sup>56</sup> E.A.De Stasion, D.Moazed, H.F.Noller, A.E.Dahlberg; *J.EMBO* **1989**, *4*, 1213-1216.

<sup>57</sup> B.François, R.J.M.Russell, J.B.Murray, F.Aboul-ela, B.Masquida, Q.Vicens, E.Westhof; *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5677-5690.

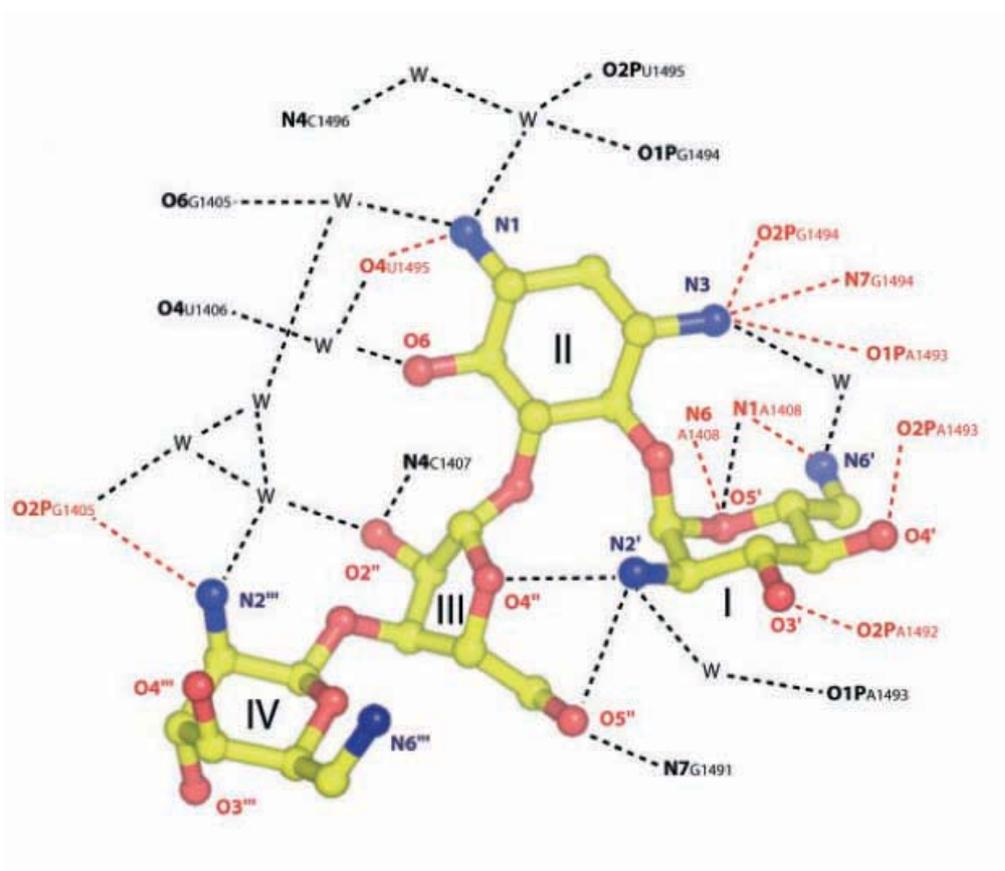
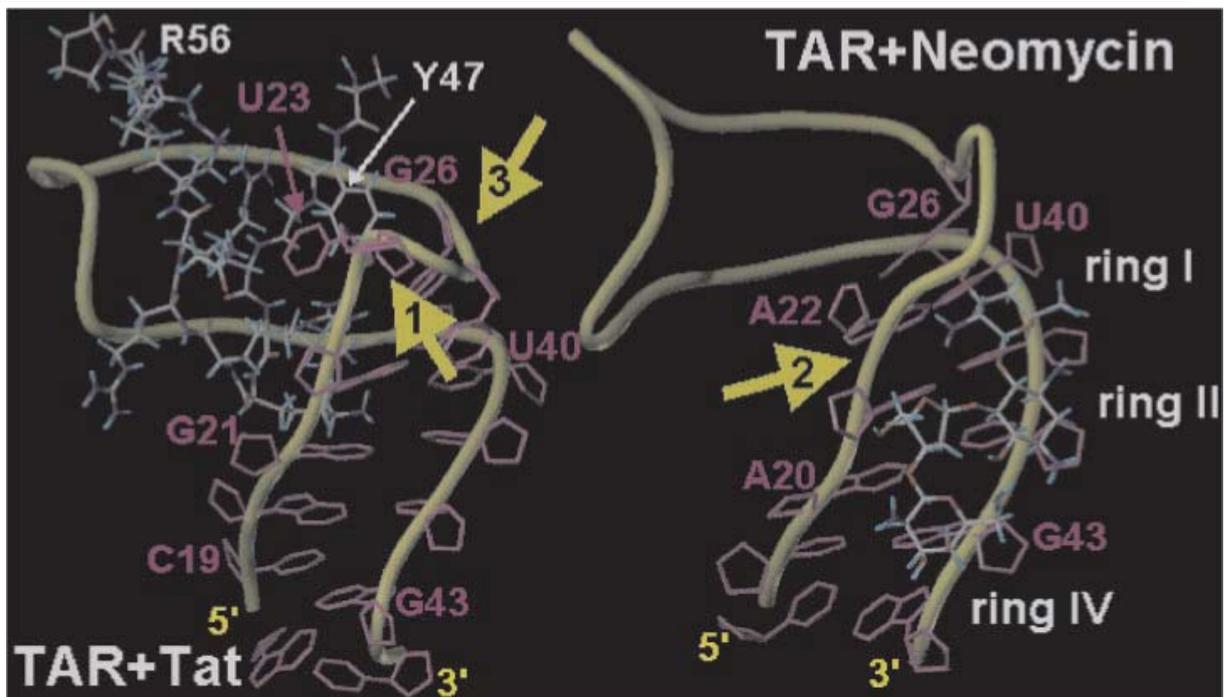


Abbildung 15 <sup>[57]</sup>: Bindungskoordination von Neomycin **8** an 16S-RNA.

Neomycin **8** und Paromomycin **7** bilden die gleiche Anzahl an Verbindungen zur 16S-rRNA aus, wobei das Neomycin **8** der stärkere Inhibitor mit seinen sechs Aminogruppen ist. Außer der 16S-RNA wurden auch weitere Angriffsziele der Aminoglykoside gefunden. So binden die Aminoglykoside die TAR-RNA aus dem HIV und inhibieren selektiv die Komplexierung mit dem Tat-Protein. Aus dieser kompetitiven Inhibierung erhofft man sich Therapieansätze, da das Tat-Peptid eine Schlüsselfunktion in der Replikation der Viren besitzt. Die verlässlichsten Daten in Stärke und Ort der Bindung jedoch sind aus NMR-Untersuchungen erhalten worden.

Die Gruppe von *Paul Rösch* konnte an Hand von NMR-Daten und anschließender Computersimulation zeigen, dass Neomycin **8** mit dem Ring I und II die TAR-RNA in der kleinen Furche direkt unter der UCA-Auswölbung bindet. Der Ring III des Neomycins **8** konnte in der kleinen Furche in der Nähe zu G<sup>21</sup> lokalisiert werden. A<sup>20</sup> und G<sup>43</sup> werden von Ring IV über die kleine Furche hinweg beide gebunden.<sup>[58]</sup> Diese Wechselwirkungen der Zuckerringe des Neomycins **8** bei der Bindung an die TAR-RNA führen zu einigen Konformationsveränderungen. So werden die Basen G21 und

<sup>58</sup> C.Faber, H.Sticht, K.Schweimer, P.Rösch; *J.Bio.Chem.* **2000**, 27, 20660-20666.



**Abbildung 16** <sup>[58]</sup>: Vergleich des Tat-TAR-Komplexes (links) mit dem Neomycin **8**-TAR-Komplex (rechts). Die gelben Röhren symbolisieren das Zucker-Phosphat-Rückgrad der RNA. Basen und Ribosen der Neomycin **8**-bindende Region von TAR, Tat (46-58) und Neomycin **8** sind als Stangen markiert. Die gelben Pfeile deuten auf die Unterschiede in den beiden Graphiken hin; Pfeil 1 in der Gegenwart von Tat, in der das Phosphat von U23 sich in die große Furche weist, welches in der Anwesenheit von Neomycin **8** in die kleine Furche weist; Pfeil 2 zeigt auf den Bereich direkt unter der Ausstülpung durch das Basentriplett UCU, in dem Neomycin **8** bindet. Diese Bindung verursacht die Dislokation von G<sup>21</sup> und A<sup>22</sup> und dadurch eine Reduzierung des Volumens der Tat-Bindungstasche. U<sup>25</sup> wird von Pfeil 3 hervorgehoben.

A22 aus der Ausbuchtung herausgedreht, was insgesamt zu einer Volumenreduktion der Tat-Bindungstasche führt.<sup>[58]</sup>

Bei der Bindung an Tat dreht sich U23 aus der Ausbuchtung heraus und erlaubt eine bessere Bindung an das ACA-Basentriplett, an der das Tat seine stabilisierende Wirkung hat.<sup>[32]</sup> Die Entdeckung, dass die freie Aminosäure Arginin selbst schon aktiv an die TAR bindet und eine Konformationsänderung<sup>[34]</sup> hervorruft, führte dazu, dass durch Anbringen von Argininsubstituenten an ein Neomycin **8**-Molekül die Affinität des Neomycins **8** mit einer  $K_{\text{Diss}}$  von 0.94  $\mu\text{M}$  an die TAR signifikant gesteigert werden konnte.<sup>[59]</sup> Diese als Neor **10** benannte Struktur zeigte einen [EC]-Wert von 0.9-5.4  $\mu\text{M}$ .

Ob diese Modifizierung jetzt noch zu selektiver Bindung führt, muss noch untersucht werden. Bekannt ist jedoch, dass die Aminogruppen der Aminoglykoside unter physiologischen Bedingungen immer protoniert sind. Bei Vorhandensein von Aminogruppen, die einen  $\text{pK}_a$ -Wert von 7 besitzen, ist die RNA-Bindefähigkeit stark pH-Wert-abhängig.<sup>[60]</sup>

<sup>59</sup> A.Litovchick, A.Lapidot, M.Eisenstein, A.Kalinkovich, G.Borkow; *Biochemistry* **2001**, *40*, 15612-15623.

<sup>60</sup> Y.Tor; *ChemBioChem* **2003**, *4*, 998-1007.

### 3. Zielsetzung

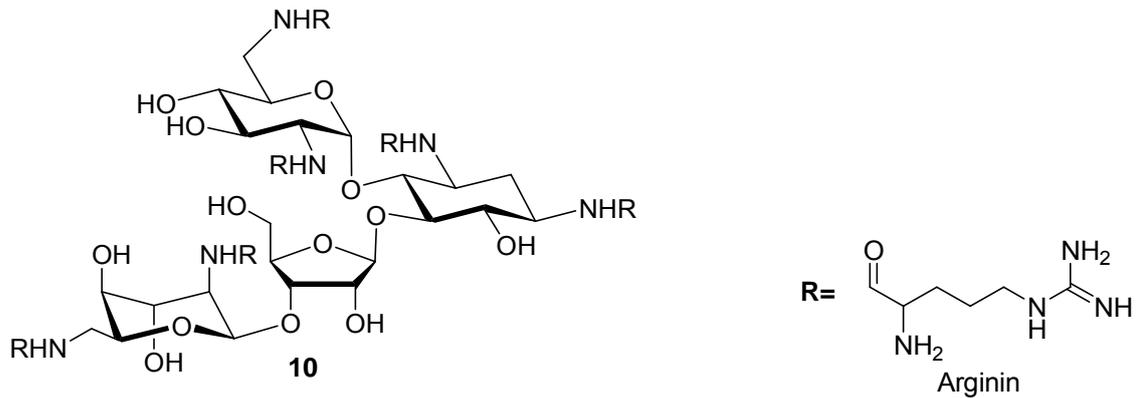
Seit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms durch *Craig Venter* und *Francis Collins* ist bekannt, dass nicht für jedes Protein ein Gen vorhanden ist und die Kontrollmechanismen der Zelle sehr viel komplexer, vielseitiger und anpassungsfähiger sind, als es bis dahin vermutet wurde. Die Zellregulation ist ein komplexer Vorgang der von der DNA, RNA und Proteine in wechselseitigen Rückkopplungsmechanismen stattfindet. Dabei konnte in jüngster Vergangenheit gerade bei der RNA ein enormes Verständnis bei dem Wechselspiel zwischen Proteinen, Nukleinsäuren (2.2 RNA-Bindemotive) und auch bei den Antagonisten gewonnen werden (2.5 Aminoglykosid). Die meisten Erkenntnisse im RNA-Bereich wurden bei der prokaryontischer rRNA und den RNA-Strukturen des HIV erreicht. Die erhaltenen Erkenntnisse konnten im Besonderen über die natürlichen Antagonisten und artifiziellen Derivate erreicht und erweitert werden. Zu diesen Antagonisten zählt die ganze Bandbreite der Aminoglykoside, die zwar schon seit langem in der pharmazeutischen Medizin bekannt sind, aber deren Wirkungsmechanismen erst durch die Untersuchungen des Wechselspiels von RNA und den Aminoglykosiden erhalten werden konnte (2.5 Aminoglykosid). Die Wechselwirkung zwischen RNA und Aminoglykosiden findet überwiegend über die basischen Aminosubstituenten und die Basen und das Phosphatrückgrat der Nukleinsäure statt (2.5 Aminoglykosid-Antibiotika, Abbildung 15, Abbildung 16). So konnte für eine Vielzahl basischer, aminogruppenhaltiger Substanzen die Bindung an RNA gezeigt werden, wie zum Beispiel die Bindung an die TAR-RNA aus dem HIV durch Polyacrylsäure<sup>[40]</sup> und der Substanz Hoechst 33258.<sup>[61]</sup> Durch die Modifizierung der Aminoglykoside durch Anfügen basischer Substituenten konnte bereits eine Steigerung der Affinität zu RNA nachgewiesen werden.<sup>[62,63,64]</sup> Die zellulären Mechanismen zur RNA-Erkennung und Bindung erfolgen häufig durch ARM-Regionen mit einem großen Teil der Aminosäure Arginin (2.2 RNA-Bindemotive), so dass sogar eine Modifizierung von Neomycin **8** durch Anbringung von 6 Arginylgruppen an die vorhandenen Aminogruppen des Zuckers durchgeführt wurde. Diese neue Substanz mit dem Namen NeoR hatte eine höhere Bindungsaffinität an der TAR-RNA des HIV als die Ausgangssubstanz.<sup>[59]</sup>

<sup>61</sup> L.Dassonneville, F.Hamy, P.Colson, C.Houssier, C.Bailly; *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 4487-4492.

<sup>62</sup> F.Walter, Q. Vicens, E.Westhof; *Curr.Opin.Chem.Biol.* **1999**, 3, 694-704.

<sup>63</sup> P.H.Seeberger, M.Baumann, G.Zhang, T.Kanemitsu, E.E.Swayze, S.A.Hofstadler, R.H.Griffey; *Synlett* **2003**, 9, 567-589.

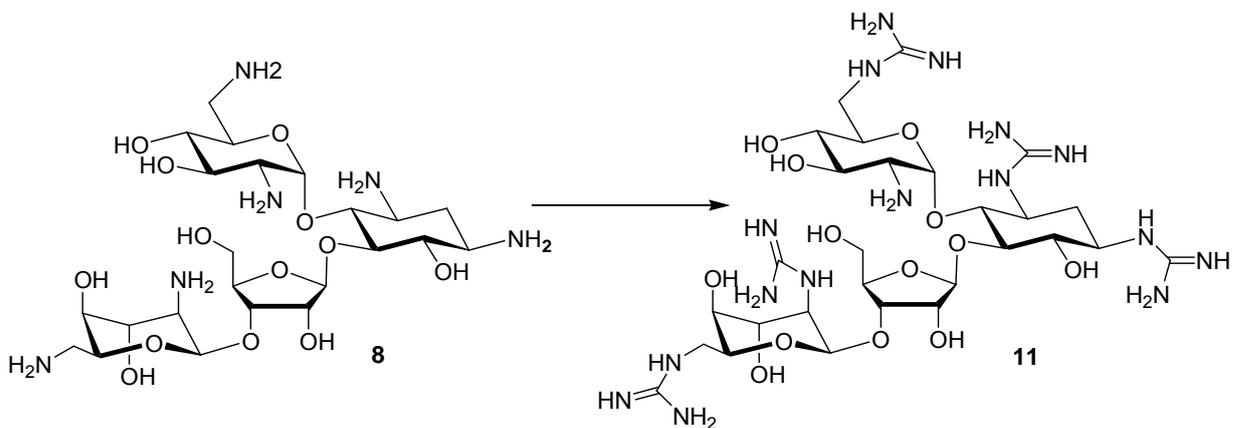
<sup>64</sup> K.B.Simonsen, B.K.Ayida, D.Vourloumis, M.Takahashi, G.C.Winters, S.Barlienga, S.Qamar, S.Shandrick, Q.Zhao, T.Hermann; *ChemBioChem* **2002**, 3, 1223-1228.



**Abbildung 17:** Affinitätssteigerung des Neomycins **8** durch Umfunktionalisieren der Aminogruppen zu Arginylgruppen (NeoR **10**) zur TAR-RNA aus dem HIV.

Die Arbeiten von *Tor* und *Goodman* stellten die Synthese von guanidierten Aminoglykosiden wie das guanidierte Tobramycin und deren Wechselwirkung von RRE-RNA (*Rev response element*) mit diesen neuen Substanzen vor. Dabei konnten sie die Affinität vom mikromolaren in den nanomolaren Bereich steigern.<sup>[65]</sup>

Das Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung von Guanidierungsmethoden für Naturstoffe, im Besonderen Aminoglykosiden. Dazu soll aufbauend auf den Arbeiten von *Kirschning et al.*<sup>[66]</sup> die Festphasen-unterstützte Guanidierung verbessert und für die Synthese der Naturstoffsynthese nutzbar gemacht werden.



**Abbildung 18:** Umfunktionalisierung von Aminoglykosiden zu den entsprechenden Guanidinen am Beispiel von Neomycin **8**.

Schließlich sollten dann die guanidierten und andere biogene Substanzen in biochemischen Testverfahren auf ihre Interaktion mit RNA getestet werden. Dabei schien die Nutzung der TAR-RNA und des Tat-Peptides aus dem HIV sinnvoll, denn diese Substanzen zeigen

<sup>65</sup> N.W.Luedtke, T.J.Baker, M.Goodman, Y.Tor; *J.Am.Chem.Soc.* **2000**, *122*, 12035-12036.

<sup>66</sup> G.Dräger, W.Solodenko, J.Messinger, U.Schön, A.Kirschning; *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1401-1403.

nanomolare Affinität zueinander. Diese Bindung sollte an Hand von Substanzen, die mit der RNA interagieren, die Bindung zwischen TAR-RNA und Tat-Peptid kompetitiv hemmen, was detektierbar sein sollte. Dazu sollte ein Schnelltest-Verfahren auf Basis dieser TAR-RNA aufgebaut werden. Für dieses Schnelltest-Verfahren sollte ein einfaches ELISA-Testsystem aufgebaut werden und zusammen mit einer weiteren Methode die kompetitive Hemmung des Tat-TAR-Komplexes durch auszutestende Substanzen bestimmen. Die andere Methodik sollte in der Bestimmung der Bindungskonstante zwischen der TAR-RNA und den modifizieren Naturstoffen etabliert werden. Um die daraus erhaltenen Ergebnisse auf die Spezifität der Affinität zur TAR-RNA oder zu RNA allgemein zu testen, wurde als weitere Methode der Beobachtung der Interaktion zwischen RNA-bindenden Substanzen und RNA das Hairpin-Ribozym aus dem Tabacco-Mosaik-Virus gewählt. Durch diese Vergleiche soll eine spezifische Bindung an eine dieser beiden RNAs oder die allgemeine Affinität an RNA gezeigt werden.

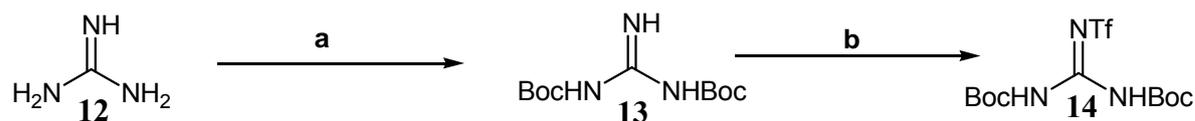
## 4. Diskussion der chemischen Experimente

### 4.1 Umfunktionalisierung der Aminoglykoside

#### 4.1.1 Synthese der Reagenzien

##### 4.1.1.1 Synthese von Di-Boc-Guanidin-Triflat **14**

Die Synthese der carboxyamidierten Aminoglykoside konnte per Festphasen-unterstützter Synthese über das Guanidierungsharz **48** nicht realisiert werden. Da in den biochemischen Versuchen jedoch die Wechselwirkungen der modifizierten Aminoglykoside mit dem Komplex aus Tat-Peptid und TAR-RNA als auch die Wirkung auf das Hairpin-Ribozym und dessen Substrat untersucht werden sollte, mussten Alternativsynthesen gefunden werden. Die Arbeiten von *Feichtinger* und *Goodman* stellen eine neue Methode vor, in dem auch schwer guanidierbare Aminogruppen, insbesondere die in Aminoglykosiden vorhandenen, zu den entsprechenden Guanidinen umgesetzt werden können.<sup>[67,68]</sup> In der Veröffentlichung wurde dafür das Di-Boc-guanidin-triflat **14** eingesetzt. Dieses Triflat **14** wurde in den Arbeitsgruppen von *Feichtinger* und *Goodman* gut untersucht und dokumentiert, wobei die Hauptschwierigkeit darin besteht, in der ersten Stufe, das Di-Boc-guanidin **13** in reiner Form zu erhalten und nicht auch das Tri-Boc-guanidin zu erhalten.



a)  $\text{Boc}_2\text{O}$ , NaOH, Wasser/Dioxan 2:1, 24 h, RT; 46 %

b)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , TEA (2 Äq),  $\text{Tf}_2\text{O}$  (1,1 Äq), 4 h,  $-78^\circ\text{C}$ ; 58 %

**Schema 1:** Synthese des Di-Boc-guanidin-triflat **14**.

Die Synthese des Guanidierungs-Reagenzes **14** beginnt mit dem kommerziell erhältlichen Guanidin-HCl **12**, das in zwei Reaktionsschritten zum Produkt in einer Gesamtausbeute von 27 % umgesetzt wird. Der Vorteil dieses Reagenzes ist, dass mit ihm sowohl einfache primäre als auch sekundäre Amine zu den entsprechenden Guanidinen umgesetzt werden können. Die Umsetzung von Alkoholen zu Guanidinen ist ebenfalls unter Misunobedingungen bekannt.<sup>[67]</sup>

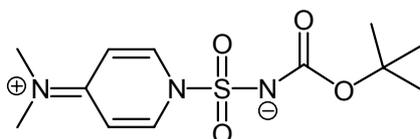
<sup>67</sup> K. Feichtinger, H.L.Sings, T.J.Baker, K.Matthews, M. Goodman; *J.Org.Chem* **1998**, *63*, 8432-8439.

<sup>68</sup> N.W.Luedke, T.J.Baker, M.Baker, Y.Tor, *J.Am.Chem.Soc* **2000**, *122*, 12035-12036.

#### 4.1.1.2 Synthese des Sulfonamidierungs-Reagenzes 16

Die Sulfonamide sind in der pharmazeutischen Anwendung -besonders bei den Tumorrepressoren- von Bedeutung.<sup>[69]</sup> Ebenso sind *O*- und *N*-substituierte sowie di- und tri-substituierte Sulfamate synthetisiert worden, die als Inhibitoren der Aminoacyl-tRNA-Synthetase oder als antivirale Agentien als Nucleosid/Nucleotid Human Immunodefizienz Virus (HIV) Reverse Transkriptase Inhibitoren und der HIV Protease Inhibitoren (PIs) eingesetzt werden.<sup>[70]</sup> Dabei werden Sulfanilamide, Homosulfanilamide oder 4-Aminoethylphenylsulfonamid mit 4-Acetamidophenylsulfonyl-chlorid umgesetzt, wobei mit Thiophosgen nachbehandelt wird.<sup>[70]</sup> Die Stoffklasse der Glykosid-Sulfonamide ist bisher nicht literaturbeschrieben.

Die Arbeitsgruppe von *Montero* hat eine Methode entwickelt, selektiv Aminogruppen mit den Sulfonamiden ohne komplizierte weiterführende Chemie zu substituieren. Dabei nutzen sie die Eigenschaften des Dimethylaminopyridins **18** aus, welches durch Addition am Heteroaromaten Stickstoff durch Delokalisation der freigewordenen Elektronen sowohl stabilisierend als auch durch die Rückreaktion in den Aromatenzustand destabilisierend wirkt. *Montero et al* synthetisierte *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*-[4-dimethylazaniumyliden)-1,4-dihydropyridin-1-ylsulfonyl]azanid (abgekürzt hier als Sulfamyl-Reagenz **16**), welches in einer Substitutionsreaktion selektiv an Aminogruppen addiert, bei der das Dimethylaminopyridin **56** frei wird.<sup>[71]</sup>



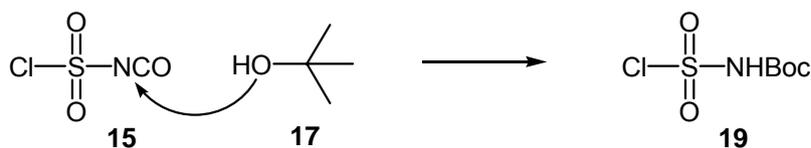
**16**

Die Synthese dieses Sulfamyl-Reagenzes ist in einer Ein-Topf-Reaktion aus den Grundbausteinen Dimethylaminopyridin **18**, Chlor-Sulfonsäure-Isocyanid (CSI) **15** und Butanol **17** gelungen. Dabei wird *ab initio* das wenig stabile *N*-(Boc)-Sulfamoylchlorid **19** gebildet.

<sup>69</sup> L.Puccetti, G.Fasolis, A.Cecchi, J.Y. Winum, A.Gamberi, J.-L. Montero, A.Scozzafava, C.T.Supuran; *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **2005**, 2(15), 2359-2364.

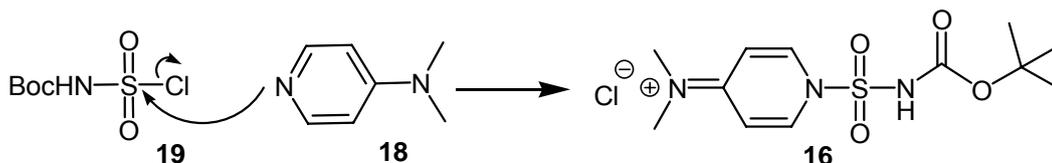
<sup>70</sup> J.Y.Winum, A.Scozzafava, J.L.Montero, C.T.Supuran; *Med.Res.Rev.* **2005**, 25, 186-228..

<sup>71</sup> J.Y.Winum, L.Toupet, V.Barragan, G.Dewynter, J.L.Montero; *Org.Lett.* **2001**, 3, 14, 2241-2243.



**Schema 2:** Mechanismus der Bildung des instabilen *N*-(Boc)-Sulfamoylchlorids **19**.

Dieses reaktive Intermediat **19** kann mit einem Amin direkt weiter zu einem Sulfonamidat umgesetzt werden. Mit Dimethylaminopyridin **18** wird dieses Intermediat stabilisiert und ist schon als gutes Acyl-<sup>[72]</sup> oder Sulfonyl-<sup>[73]</sup> Transfermolekül bekannt.



**Schema 3:** Bildung des Sulfamylierungs-Reagenzes **16**.

*Montera et al.* konnten an Aminen wie dem Benzylamin, *n*-Butylamin, Cyclohexylamin, Di-*iso*-Butylamin und ähnlichen aliphatischen Aminoverbindungen zeigen, dass die Übertragung der Sulfamoyl-Gruppe durch das Sulfamoylierungs-Reagenz **16** bei Raumtemperatur in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> innerhalb von zwei bis vier Stunden in 70-100 % Ausbeute gelingt.<sup>[72]</sup> Bei der Umsetzung hat nicht nur der sterische Anspruch Auswirkung auf die Ausbeute, sondern auch die Nukleophilie des Amins. Bei abnehmender Nukleophilie nimmt die Ausbeute ab.<sup>[73]</sup>

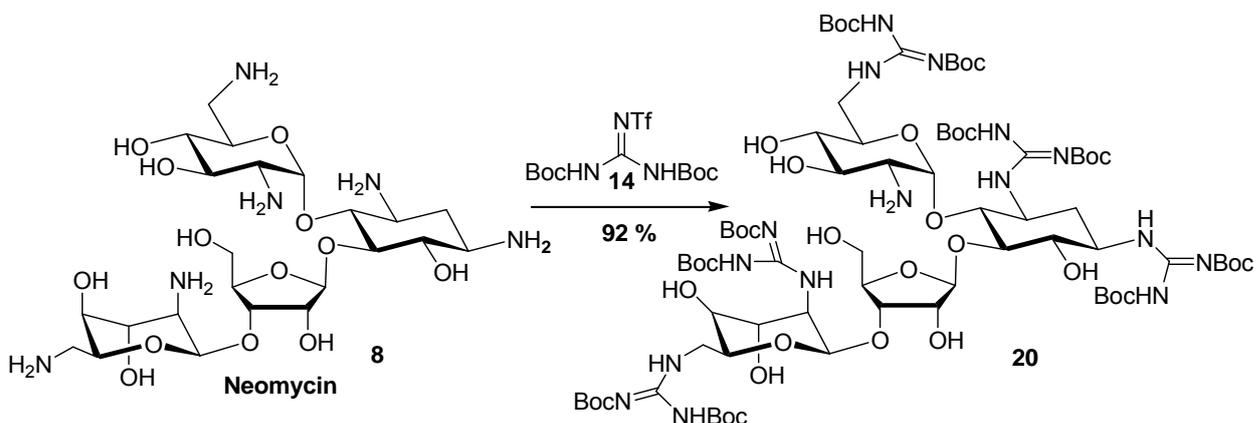
Diese Reaktion konnte an verschiedenen Aminoglykosiden optimiert werden. Dabei zeigte sich, dass diese Reaktion nicht in Dioxan, DMSO, Dioxan-Wassergemische oder DMF funktionierten. Bisher konnten CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und Pyridin als einzige Lösungsmittel erfolgreich eingesetzt werden. Um die Reaktion für Aminoglykoside nutzbar zu machen, mussten die Hydroxygruppen der Zucker zuvor geschützt werden, wobei die Moleküle auch löslich für organische Lösungsmittel werden. Außerdem ist bekannt, dass Wechselwirkungen von Wasserstoffbrücken zwischen den Hydroxygruppen und den Aminogruppen Reaktionen an diesen funktionellen Gruppen behindern.<sup>[68]</sup> Es wurde die Trimethylsilylgruppe als Schutzgruppe gewählt, da diese eine hohe Affinität zu Sauerstoff besitzt. Die meisten anderen Schutzgruppen besitzen den Nachteil, eine höhere Affinität zu den Aminogruppen aufgrund der höhere Nukleophilie zu haben.

<sup>72</sup> E.F.V.Sciven; *Chem.Soc.Rev.* **1983**, 12, 129-161.

<sup>73</sup> E.Guibe-Jampel, M.J.Waxselmann; *Chem.Soc.Chem.Commun.* **1980**, 993-993.

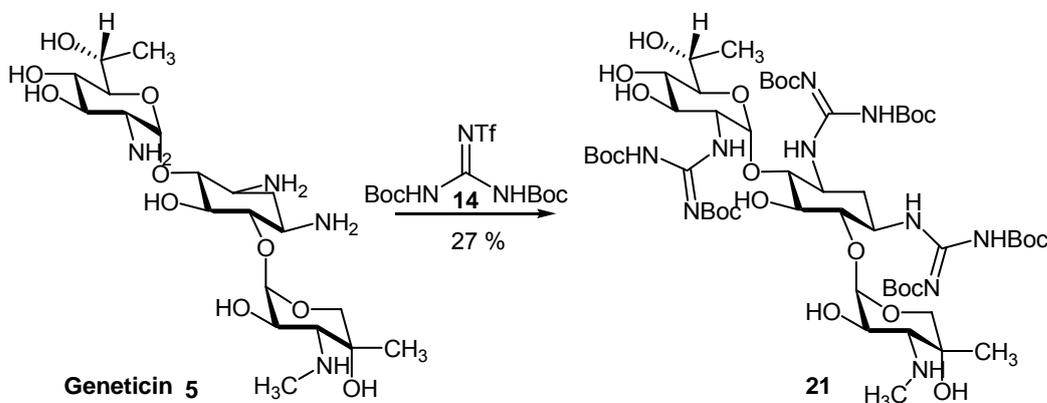
### 4.1.2. Synthese der guanidierten Aminoglykoside durch das Di-Boc-Guanidin-Triflat **14**

Die Synthese der guanidierten Aminoglykoside Cyclitol **3**, Neamin **2**, Kanamycin **4**, Geneticin **5** und Neomycin **8** gelang nicht über die in Kapitel 4.3 beschriebene Festphasen-unterstützte Synthese erfolgen. Deshalb wurde das von *Feichtinger* und *Goodman* beschriebene Syntheseverfahren durch das Guanidierungsreagenz Di-Boc-Guanidin-Triflat **14** genutzt. Über diese Methode konnten die Aminosubstituenten der wasserlöslichen Aminoglykoside im wässrigen Medium in die entsprechenden Guanidierungsgruppen umfunktionalisiert werden. Dazu wurde aus dem kommerziell erhältlichen Neomycin<sup>[132]</sup> **8** mit seinen 6 Aminogruppen in einem Dioxan-Wasser-Gemisch von (5:1) mit dem Guanidierungs-Reagenz **14** innerhalb von sieben Tagen das guanidierte Neomycin **18** in einer Ausbeute von 92 % hergestellt.

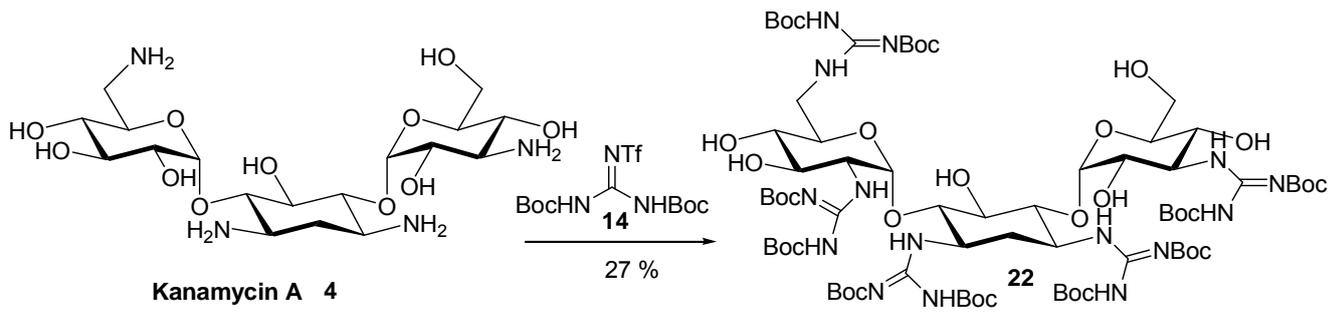


**Schema 4:** Synthese von Neomycin-carboxyamidat **20** (NeoG).

Die gleiche Versuchsdurchführung lieferte auch das guanidierte Geneticin **21** in einer Ausbeute von 14 % und das guanidierte Kanamycin **22** mit einer Ausbeute in 27 %.

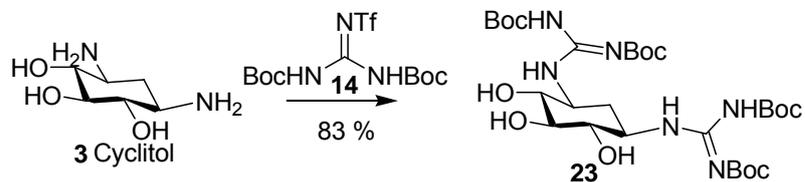


**Schema 5:** Synthese des Boc-geschützten Geneticin-carboxyamidats **21**.



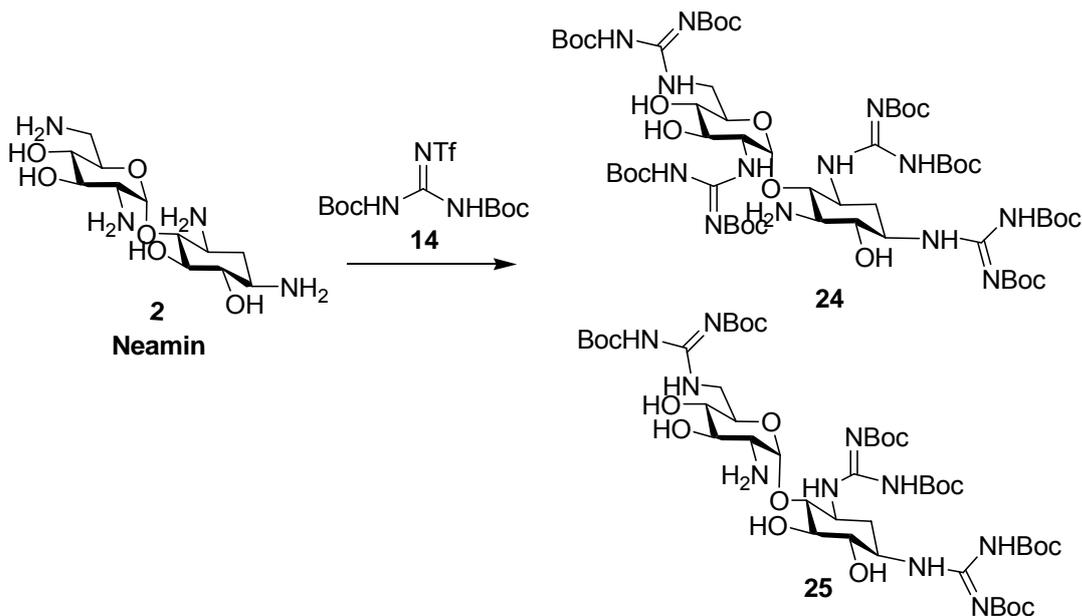
**Schema 6:** Synthese des Kanamycin A-carboxyamidats **22**.

Das 2-Desoxystreptamin (2-DOS) **3** wurde nach der Versuchsvorschrift von *Tödter* aus Neomycin **8** hergestellt<sup>[74]</sup> und konnte in einer Ausbeute von 83 % zum gewünschten Guanidin **23** umgesetzt werden.



**Schema 7:** Synthese des 2-Desoxystreptamidin-di-carboxyamidates **23**.

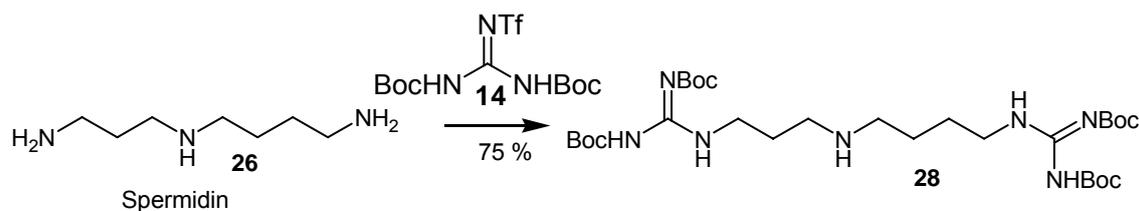
Bei der Synthese des vollständig guanidierten Neamins **24**, konnte das Nebenprodukt, das dreifach umgesetzte Neamin **25**, durch chromatographische Reinigung isoliert werden. Die Ausbeute betrug für das vollständig umgesetzte Neamin **24** 28 % und für das dreifach guanidierte Neamin **25** 23 %.



**Schema 8:** Synthese des tetra-Carboxyamidats **24** und tri-Carboxyamidats **25** des Neamins.

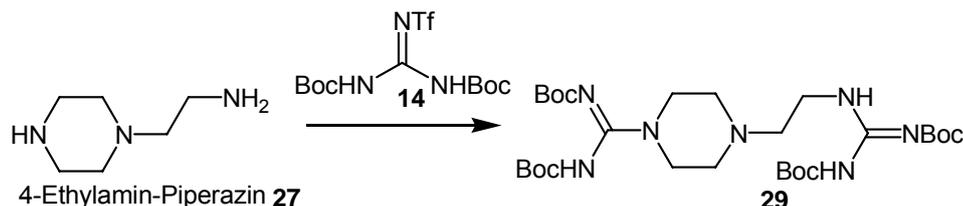
<sup>74</sup> F.Tödter; „Die Synthese von Pseudodi- und Pseudotrisacchariden aus Neomycin und Streptomycin“; *Dissertationsarbeit* 1978; Hamburg.

Die Substanzen Spermidin **26** als auch 4-Aminoethyl-piperazin **27** konnten zwar mit Hilfe des Guanidierungsharzes **48** (Kapitel 4.3.1) synthetisiert werden, jedoch bildeten sich Gemische aus einfach- und zweifach umfunktionalisierten Produkten. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Reinigung wurden diese Substanzen ebenfalls mit dem Guanidierungs-Reagenz **14** umgesetzt und dabei konnten die primären Aminogruppen vollständig umfunktionalisiert werden, was per NMR-Spektroskopie bestätigt werden konnte. Dabei wurde das carboxyamidierte Spermidin zu 75 % vollständig guanidiert.



**Schema 9:** Synthese des Boc-geschützten Spermidin-di-carboxamidats **28**.

Die Synthese mit 4-Amino-piperazin konnte mit weniger guten Ausbeuten zum Di-Guanidin **29** realisiert werden. Die Ausbeute des reinen Produktes betrug 13 %.



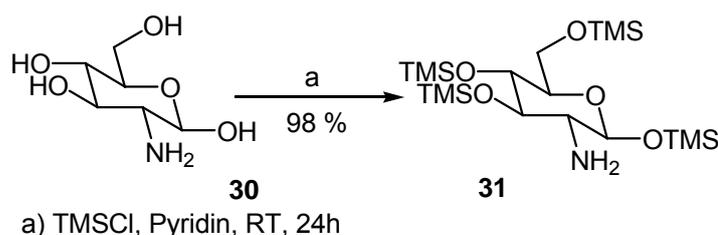
**Schema 10:** Synthese des Boc-geschützten Di-Guanidin- 4-Aminoethyl-piperazins **29**.

Diese guanidierten, aber mit Schutzgruppen versehenen Substanzen mussten vor dem Einsatz in den biochemischen Inhibitions-Assays in 10 %-iger TFA-Lösung in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  entschützt werden. Anschließend wurde das in den Assays störende TFA über den Ionenaustauscher IRA-400 gegen Chlorid ausgetauscht. Die Ausbeuten waren quantitativ. Es konnten das guanidierte Neomycin **11**, das guanidierte Cyclitol **66**, das guanidierte Geneticin **74**, das guanidierte Kanamycin **75**, das vierfach (**83**) und das dreifach guanidierte Neamin **84**, das guanidierte Spermidin **64** und das guanidierte Amino-piperazin **65** erhalten werden.

## 4.2 Synthese der Sulfonamide

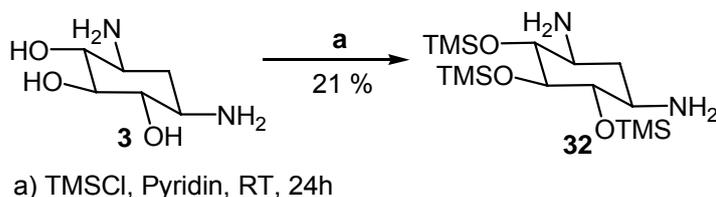
Die Guanidgruppen der umfunktionalisierten Aminoglykoside liegen in wässrigen Lösungen bei neutralem pH-Wert in protonierter Form vor. Damit sind diese Substanzen positiv geladen und Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrad der Ribonukleinsäuren in den biochemischen Inhibitions-Versuchen sind wahrscheinlich. Als Ionisches Gegenkonzept zu den Guanidin-Gruppen an den Aminoglykosiden wurden die Sulfonamide synthetisiert. Aufgrund der Unlöslichkeit der Aminoglykoside in organischen Lösungsmitteln mussten zunächst die Hydroxygruppen als Silylether geschützt werden.

Ein weiterer Grund für die Schützung der Aminogruppen ist mit den zahlreichen intramolekularen Van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken-Bindungen verbunden, die ihre Basizität stark herabgesetzten. So würde ein nukleophiler Angriff auf das Sulfonamidierungs-Reagenz durch die Aminogruppen gehemmt sein.<sup>[75]</sup>



**Schema 11:** Silylierung von 2-Aminoglucose **31**.

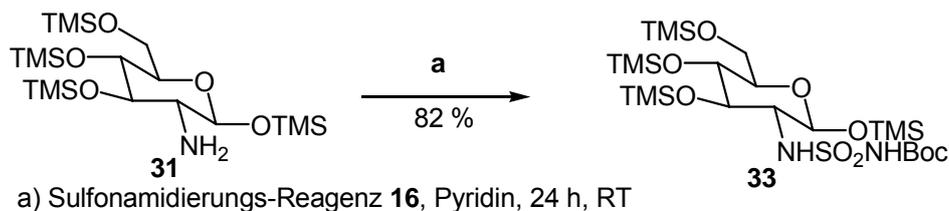
Diese Reaktion verlief mit 2-Glucosamin **30** quantitativ. Die Reaktion an dem Cyclitol **3** dagegen verlief mit deutlich geringerer Ausbeute von 21 %.



**Schema 12:** Silylierung von 2-Desoxystreptamin **3** (Cyclitol, 2-DOS).

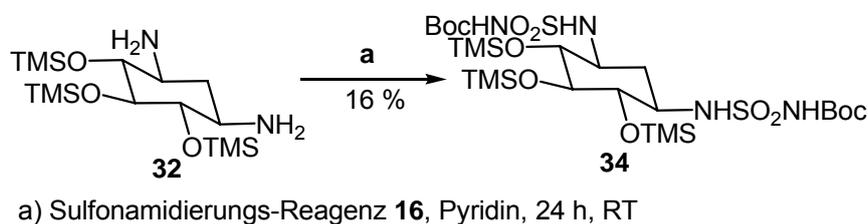
Bei Aminoglykosiden mit einer größeren Anzahl an Aminogruppen gelang diese Schützung mit TMSCl allerdings nicht. Die TMS-geschützten, öligen Substanzen **31** und **32** konnten in der nächsten Reaktion direkt mit dem Sulfonamidierungs-Reagenz **16** in Pyridin umgesetzt werden. Diese 24 stündige Reaktion verlief in 82%-iger Ausbeute.

<sup>75</sup> H.Wang, Y.Tor; *Angew.Chem.* **1998**, *110*, 117-120.



**Schema 13:** Umsetzung von TMS-geschützter 2-Aminoglucose **31** zum Sulfonamidatprodukt **33**.

Die TMS-geschützte 2-Aminoglucose **31** konnte in einer Ausbeute von 82% zum Sulfonamidat **33** umgesetzt werden. Das TMS-geschützte Cyclitol **32** konnte mit einer Ausbeute von 16 % umgesetzt werden.



**Schema 14:** Umsetzung von TMS-geschützten Cyclitol **32** zum Sulfonamidierungsprodukt **34**.

Die erhaltenen Sulfonamide konnten in dieser geschützten Form nicht in die biochemischen Inhibitionsversuche eingesetzt werden. Daher wurden diese Substanzen in 50%-iger TFA-Lösung in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  entschützt und lieferten das 2-Glucose-sulfonamidat **35** in 98 % und das Cyclitol-sulfonamid **36** in 95 % Ausbeute. Anschließend wurde das in den Assays störende TFA über den Ionenaustauscher IRA-400 gegen Chlorid ausgetauscht.

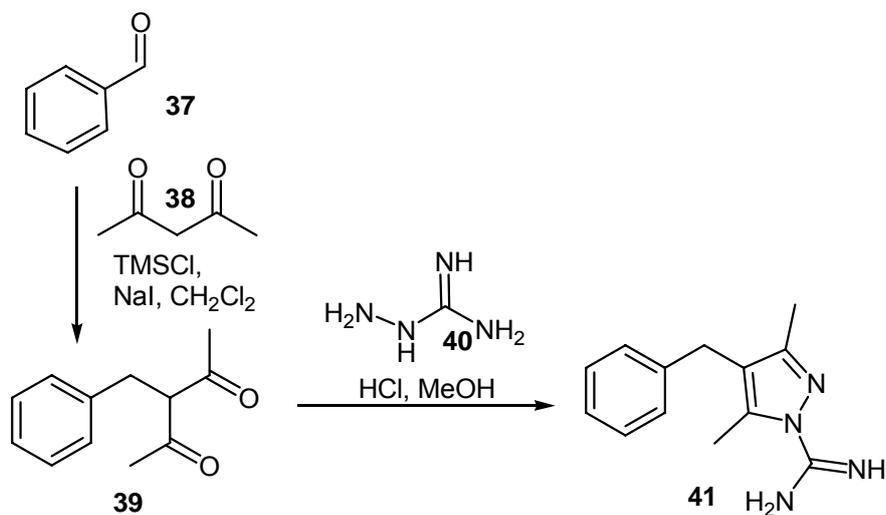
### 4.3 Festphasen-unterstützte Synthese

#### 4.3.1 Guanidierungsreaktionen an der festen Phase

Für die Festphasen-unterstützte Synthese von Guanidinen wurde auf Vorarbeiten von *Dräger* und *Solodenko*<sup>[66]</sup> als auch auf meine eigene Diplomarbeit zurückgegriffen.<sup>[76]</sup> In diesen Arbeiten wurde zuerst die 3,5-Dimethyl-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin-Gruppe mit einer Benzylgruppe zum Benzylpyrazolguanidin **41** als Testsubstanz realisiert, um Optimierungsversuche aufgrund der besseren Analysemethoden, die mit Benzylpyrazolguanidin **41** durch NMR- und Massenspektrometrie im Gegensatz zum Merrifield-Polymer möglich sind, durchzuführen. Das Benzylpyrazolguanidin **41** wird in

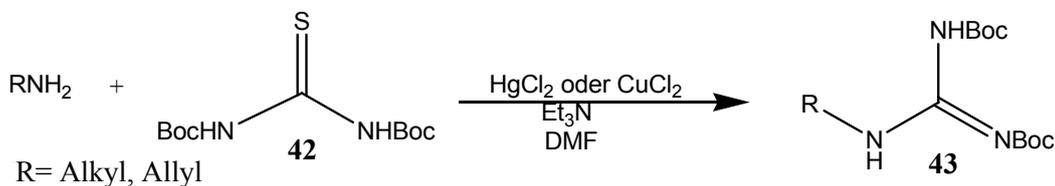
<sup>76</sup> Diplomarbeit von Patrick Bröker „Synthese von RNA-affinen artifiziellen Aminoglykosiden“ 2003, Arbeitsgruppe Kirschning, Universität Hannover.

drei Stufen synthetisiert. Die erste Stufe geht vom Benzaldehyd **37** aus, bildet mit Acetylaceton **38** das Diketon **39**, welches durch Aminoguanidin **40** zum Benzylpyrazolguanidin **41** <sup>[66]</sup> geschlossen wird.



**Schema 15:** Vorarbeiten am Benzylpyrazol zur Festphasen-unterstützte Synthese.

Das Produkt **41** reagiert mit aktiven Aminen zu den entsprechenden Guanidinen, wobei der Pyrazolring **44** entsteht. Mit diesem Produkt **41** können eine Vielzahl unterschiedlicher Amine zu den entsprechenden Guanidinen umgesetzt werden. Der Vorteil dieser Reaktion zu den bisher üblichen liegt in der Aufarbeitung. Die Aufarbeitung konnte auf den bis dato bekannten Synthesewegen wesentlich vereinfacht werden. Die ursprünglichen Synthesewege mit Aminosulfonsäuren<sup>[77]</sup>, Ammoniak-Derivaten<sup>[78]</sup>, Cyanoamiden<sup>[78,79]</sup> und Chloroformamiden<sup>[78,80]</sup> sind ineffektiv, mit geringen Ausbeuten verbunden oder benötigten Bedingungen, die für sensitive Substanzen unvereinbar sind.<sup>[78]</sup> Die Verfahren mit Thioharnstoff-Derivaten **42** als Guanidierungs-Reagenzen benötigten Kupfer- oder Quecksilbersalze.<sup>[81,82]</sup>



**Schema 16:** Synthesemethoden zur Funktionalisierung von Aminen zu Carboxyamidaten **43**.

<sup>77</sup> A.E.Miller, J.J. Bischoff, *Synthesis* **1986**, 777-779.

<sup>78</sup> M.A.Poss, E.Iwanowicz, J.A.Reid, J.Lin, Z.Gu, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5933-5936.

<sup>79</sup> T.L.Davis, *Org.Synth.* **1927**, 7, 46.

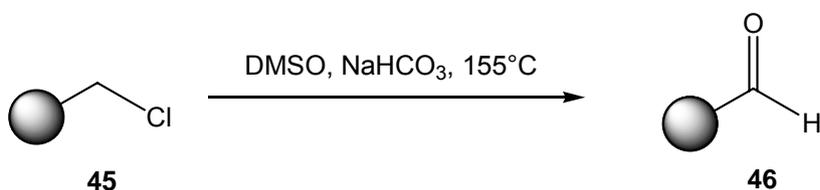
<sup>80</sup> M.M.Mikolajczyk, P.Kielbasinski, *Tetrahedron* **1981**, 37, 233.

<sup>81</sup> K.S.Kim, L.Qian, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7677-7680.

<sup>82</sup> C.Levallet, J.Lerpiniere, S.Y.Ko, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 53, 5291-5304.

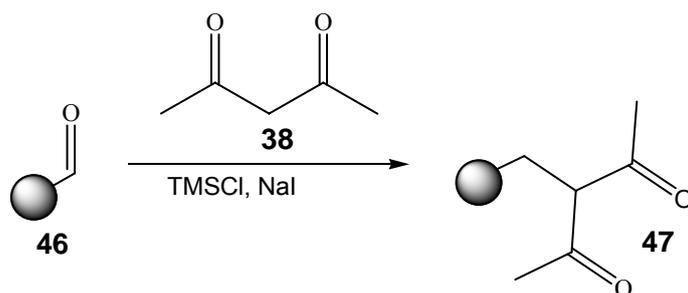
Diese literaturbekannten Methoden benötigen toxische Salze oder Schwefelverbindungen und umständliche Aufarbeitungsmethoden wie Kieselgelchromatographie. Durch Entwicklung der Synthese des Benzylpyrazolguanidins **41** wurde die Aufarbeitung stark vereinfacht, da sowohl die Entsorgung der Salze als auch chromatographische Aufreinigungsmethoden entfallen. Das „leere“ Benzylpyrazol **44** wird durch einfaches Abfiltrieren der meist in Wasser löslichen Guanidine entfernt.<sup>[66]</sup>

Im Folgenden war die Übertragung der Synthesesequenz auf die polymere Phase, so dass auch nicht-wasserlösliche Substanzen umgesetzt werden können und die aufwendige Reinigung des Produktes nahezu entfällt. Dazu konnte das kommerziell erhältliche Merrifield-Polymer **45** benutzt werden, welches man in einer Swern-Oxidation zum Aldehyd **46** oxidiert.<sup>[66, 76]</sup>



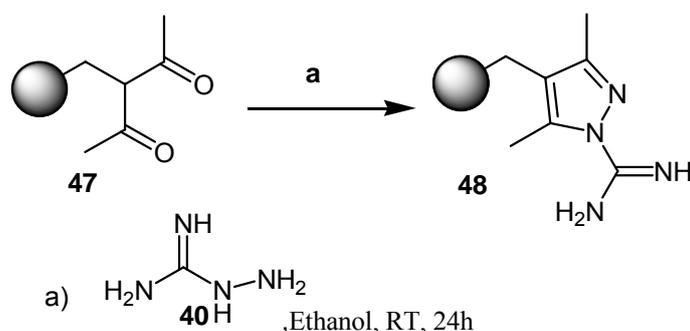
**Schema 17:** Synthese des polymeren Aldehyds **46**.

Der weitere Aufbau erfolgte analog zum Benzylpyrazolguanidin **41**. Das dabei benutzte Acetylaceton **38** wurde dabei mit Trimethylsilylchlorid in den Silylether überführt und für die anschließende Aldolreaktion aktiviert. Nach der Substitution zum Diketon **47** reduzierte das Iodid den Silylether.



**Schema 18:** Aufbau des Diketo-Harzes **47** durch reduktive Knoevenagel-Reaktion.

Das Diketonharz **47** wurde in einem weiteren Reaktionsschritt mit Aminoguanidin **40** und Salzsäure ebenfalls zum Guanidin-Pyrazolharz **48** mit einer Beladung von 1.7 mmol/g umgesetzt. Die Beladung konnte durch CHN-Analyse und Testreaktionen mit Piperidin **49** bestimmt werden.



**Schema 19:** Aufbau des Pyrazolcarboxyamidat-Ringes als funktionelle Gruppe am Harz.

Mit diesem Harz **48** kann eine Vielzahl von Verbindungen zu den entsprechenden Guanidinen umgesetzt werden, wobei Benzylamin **50** und Piperidin **49** als Standard-Reagenzien benutzt wurden, um die Aktivität des Harzes **48** zu untersuchen.<sup>[76,83]</sup> Schwach nukleophile Amine und Aminoglykoside wurden in der Arbeitsgruppe *Kirschning et al.* untersucht und konnten als eine der wenigen Substanzen nicht in die entsprechenden Guanidine überführt werden.<sup>[76]</sup> Zentraler Untersuchungsgegenstand der biochemischen Arbeiten waren aber die guanidierten Aminoglykoside. Daher wurde weiter an einer Methode gearbeitet, diese speziellen Glykoside über die sonst sehr einfache Festphasen-unterstützte Methode zu guanidieren.

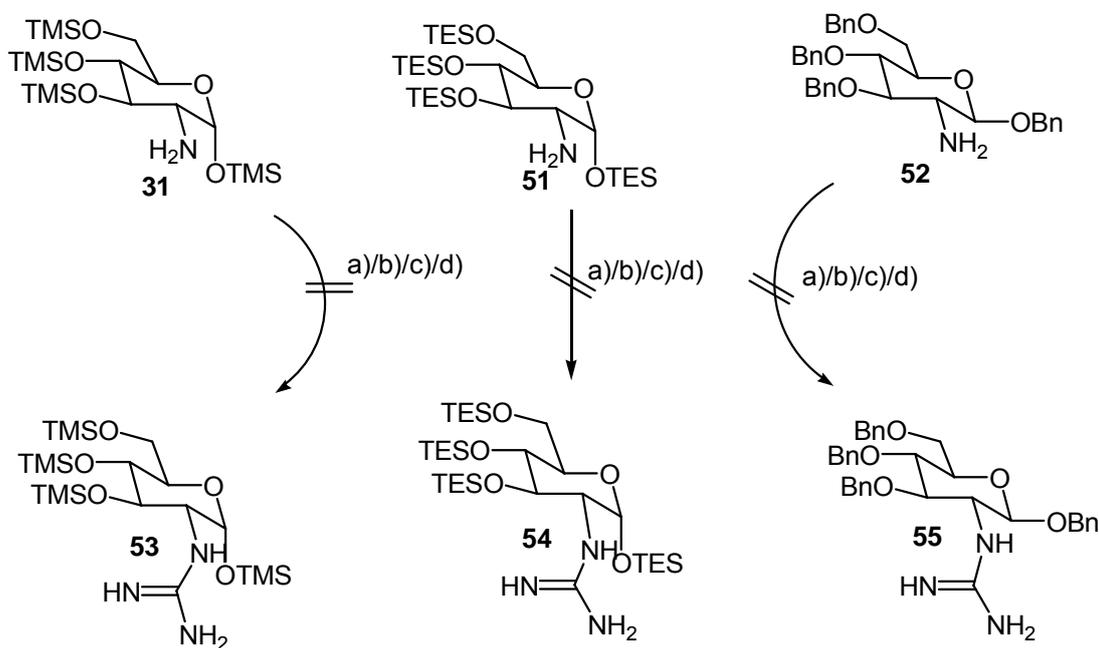
Dazu wurden verschiedene Lösungsmittel am Beispiel des Neamins **2**, dem Grundgerüst der Aminoglykoside, erprobt, um den gegenteiligen Bedürfnissen des modifizierten Merrifield-Harzes **48** und der Aminoglykoside gerecht zu werden. Das Harz quillt in polaren Lösungsmitteln und bietet die aktiven Reaktionszentren der umgebenden Lösung besonders gut in Dichlormethan an, während die Aminoglykoside aufgrund der vielen Hydroxy- und Aminogruppen fast ausschließlich nur in Wasser löslich sind. Ausgetestete Lösungsmittel waren Pyridin, Dioxan, DMSO, Acetonitril und N,N-Dimethylformamid, in denen das Harz mit dem Zuckeramin mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur und auch unter Rückfluss reagieren konnte. Jedoch konnte kein Reaktionserfolg unter diesen Bedingungen beobachtet werden.

Scheinbar sind die Aminogruppen aufgrund zahlreicher intramolekularer Van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken-Bindungen in ihrer Basizität zu stark herabgesetzt, um einen nukleophilen Angriff auf die Guanidiningruppe des Pyrazolharzes zu realisieren.<sup>[84]</sup> Aus diesem Grund wurden verschiedene Schutzgruppen an den Hydroxygruppen angebracht. Am Beispiel des silylgeschützten Glucosamines **31**

<sup>83</sup> W.Solodenko, P.Bröker, J. Messinger, U.Schön, A.Kirschning, *Synthesis* **2006**, 30, 461-467.

<sup>84</sup> H.Wang und Y.Tor, *Angew.Chem.* **1998**, 110, 117-120.

(Synthese Seite 34; Kapitel 5.2.2.1.1), **51** (Synthese nach Simmons)<sup>[85]</sup> und des benzylgeschützten Glucosamins **52** (Synthese nach Nicolau)<sup>[86]</sup> nach wurde dann die Guanidierung ein weiteres Mal durchgeführt, aber wiederum ohne Erfolg.



Harz **48** (3 Äq)

a) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TEA (5 Äq), 60°C, 24h

b) in Dioxan, TEA (5 Äq), 60°C, 24h

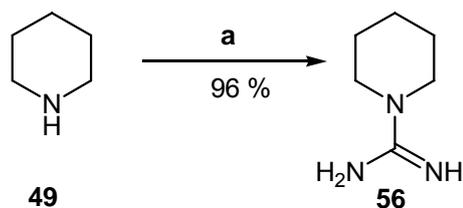
c) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TEA (5 Äq), 60°C, Mikrowelle, 250 W, 20 min

d) in Dioxan, TEA (5 Äq), 140°C, Mikrowelle, 300 W, 20 min

**Schema 20:** Durchführung verschiedener Reaktionsbedingungen zur Optimierung der Carboxyamidat-Übertragung auf Aminogruppen von Aminoglykosiden am Beispiel von Glucosaminderivaten **31**, **51**, **52**.

Die für die biochemischen Versuche nötigen guanidierten Aminoglykoside wurden nun auf anderem Wege synthetisiert.<sup>[67,68]</sup>

Die Übertragung einer Carboxyamidat-Gruppe auf ein Amin durch das neue Reagenz wurde trotzdem weiterentwickelt. Dazu wurden aber neue Techniken und Lösungsmittel erprobt, um die Syntheseleistung des Harzes zu optimieren. Die thermische Reaktion dauert 24 Stunden und liefert mit Piperidin **49** eine Ausbeute des Guanidins **56** von 96 %.



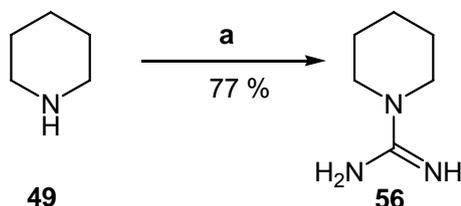
a) Harz **48** (3 Äq) in THF, TEA (5 Äq), 24 h, 80°C

**Schema 21:** Thermische Carboxyamidierung mit dem Guanidierungs-Harz **48** am Beispiel des Piperidins **49**.

<sup>85</sup> W.Oppolzer, R.Snowden, D.Simmons; *Helv.Chim.Acta* **1981**, *64*, 2002-2021

<sup>86</sup> K.Nicolau, M.Bunnage, D.McGarny, S.Shi, Z.yang; *ChemEur.J.* **1999**, *5*, 11393-11409

Zuerst wurde die Reaktion des Harzes **48** mit Piperidin **49** in THF im Mikrowellenfeld durchgeführt. Die Zeiten wurden variiert, um die optimale Reaktionszeit zu finden. Um den Effekt des Lösungsmittels auf die Ausbeuten vergleichen zu können, wurde Piperidin immer in deutlichem Überschuss eingesetzt. In dem 2.5 mL- Reaktionsansatz wurde immer dasselbe Harz verwendet und mit 100  $\mu$ L Triethylamin versetzt.



a) Harz **48** (3 Äq) in THF, TEA (5 Äq), 300 W, 10 min, 90°C

**Schema 22:** Etablierung von Mikrowellen-unterstützter Carboxyamidierung am Beispiel von Piperidin **49**.

Lösungsmittel	Leistung	Temp.	Rkt.-Zeit	Ausbeute
THF	300 W	90°C	2,5 min	32 %
THF	300 W	100°C	5 min	47 %
THF	300 W	90°C	10 min	77 %

**Tabelle 1:** Optimierung der Reaktionszeit in der Mikrowellen-unterstützten Synthese mit Piperidin **49** als Standard

Die Ausbeuten steigen mit längerer Reaktionszeit in der Mikrowelle und erreichen nach 10 Minuten den Wert der unter konventionell thermischen Bedingungen nach 24 h erreicht wird. Weitere Versuche mit verschiedenen Lösungsmitteln lieferten folgende Ergebnisse:

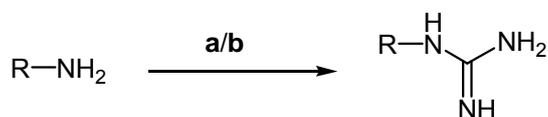
Lösungsmittel	Leistung	Temp.	Rkt.-Zeit	Ausbeute
DMSO	300 W	120 °C	5 min	88 %
DMSO	300 W	120 °C	10 min	-*
DMSO	300 W	120 °C	20 min	-*
Dioxan (abs.)	300 W	120 °C	5 min	46 %
Dioxan (abs.)	300 W	120 °C	20 min	82 %
Dioxan/H <sub>2</sub> O (2:1)	300 W	120 °C	5 min	58 %
H <sub>2</sub> O	300 W	100 °C	5 min	25 %
H <sub>2</sub> O	300 W	100 °C	10 min	64 %
H <sub>2</sub> O	300 W	100 °C	20 min	60 %
TEA	300 W	100 °C	5 min	-
DMF (abs.)	300W	120 °C	5 min	63%
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	250 W	60°C	5 min	86 %

\* Nach längeren Reaktionszeiten entstehen Zersetzungsprodukte und es kann Produkt isoliert werden.

**Tabelle 2:** Lösungsmitteltest zur Carboxyamidierung in der Mikrowelle mit Piperidin **49** als Standardamin.

Die Tests zeigen, dass eine Guanidierung in der Mikrowelle unter erhebliche Verkürzung der Reaktionszeit gelingt. Die Reaktionsdauer konnte von 24 Stunden auf 20 Minuten reduziert werden. Außerdem ist die Reaktion auf sehr viele Lösungsmittel erweitert worden. Selbst Wasser als Lösungsmittel liefert moderate Ausbeuten des Guanidins **56** von 64 %. Allerdings erweist sich Dichlormethan als bestes Lösungsmittel. Ein besonderer Vorteil von Dichlormethan ist sicherlich die Fähigkeit das Harz **48** sehr gut quellen zu lassen, was auch von Bedeutung bei höheren Temperaturen und Drücken ist. Das einzige Lösungsmittel, in dem keine Reaktion feststellbar war, ist Triethylamin.

Danach wurde die Mikrowellen-unterstützte Reaktion des Harzes **48** unter den gleichen Bedingungen auf andere Amine ausgeweitet.



R= Benzyl **50**, Histamin **57**, Morpholin **58** L-Prolin **59**

a) Mikrowelle: Harz **48**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TEA (5 Äq), 250 W, 60°C

b) Thermisch: Harz **48**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TEA (5 Äq), 40°C

**Schema 23:** Reaktion verschiedener Substanzen mit dem Harz **48** im Vergleich.

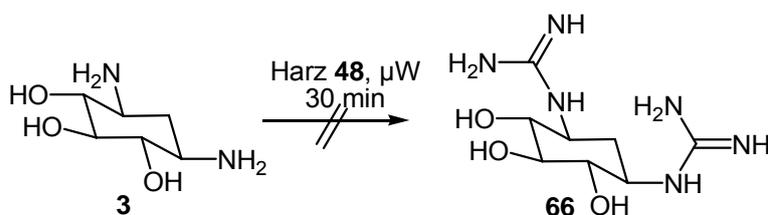
Die Substanzen Benzylamin **50**, Histamin **57**, Morpholin **58** und L-Prolin **59** konnten dabei in guten Ausbeuten zu den entsprechenden Guanidinen umgesetzt werden.

	Mikrowelle	Thermisch
Benzylcarboxyamidat <b>60</b>	67 %	90 %
Histamincarboxyamidat <b>61</b>	86 %	89 %
Morpholincarboxyamidat <b>62</b>	90 %	99 %
L-Prolincarboxyamidat <b>63</b>	33 %	31 %

**Tabelle 3:** Ausbeutenvergleich zwischen thermischer und Mikrowellen-unterstützter Reaktion.

Guanidiertes Spermidin **64** und guanidiertes 4-Aminoethyl-piperazin **65** konnten in der mikrowellen-unterstützten Synthese präpariert werden. Das 4-Guanidinethyl-piperazin **65** konnte in einer Ausbeute von 91 % erhalten werden. Das Spermidin **26** lieferte ein Isomerengemisch von einfach-, zweifach- und dreifach-guanidiertem Spermidin. Das Gemisch ließ sich chromatographisch nicht trennen.

Das Cyclitol **3** und das Glucosamin **30** konnten allerdings auch nicht mit Hilfe des Guanidierungsharzes **48** im Mikrowellenfeld umgesetzt werden.

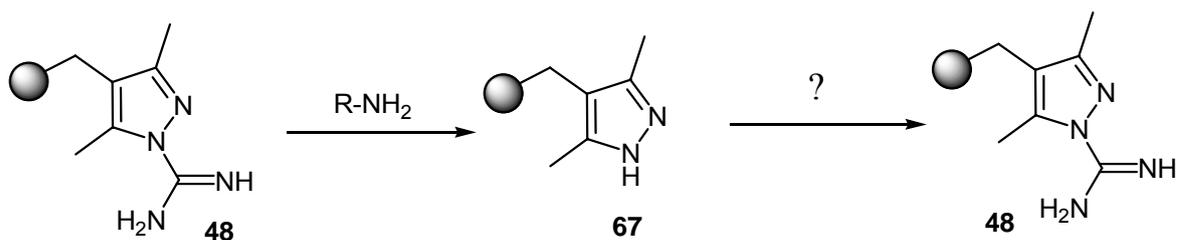


**Schema 24:** Carboxyamidierung am 2-DOS **3** als Beispiel für Aminoglycoside mit Harz **48** im Mikrowellenfeld.

Es wurden Dioxan, Dioxan:Wasser (4:1) und Wasser als Lösungsmittel erprobt bei Reaktionszeiten von bis zu 30 Minuten.

### 4.3.2 Regeneration

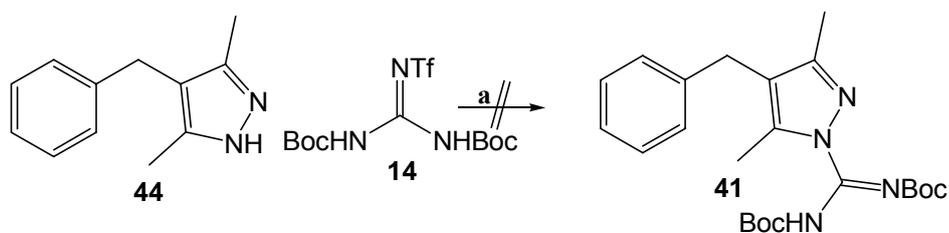
Das Harz **48** zeigt sich somit als ideales Reagenz, um schnell zu reinen Substanzen zu gelangen. Allerdings erweist sich die notwendige Neusynthese des Harzes **48** als Nachteil. Daher wurde eine Regeneration des entladenen Guanidierungsharzes **48** angestrebt.



R= Alkyl, Allyl

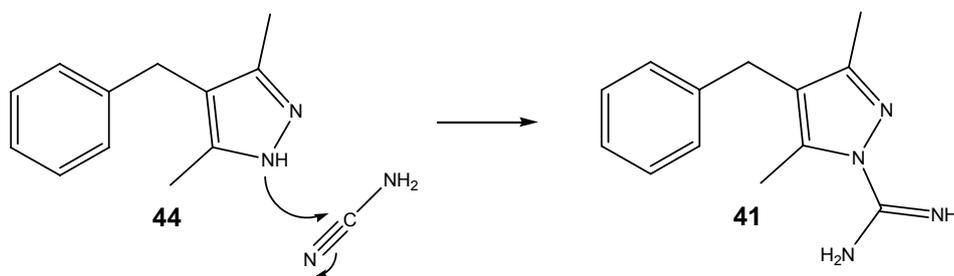
**Schema 25:** Entladungs- und Wiederbeladungszyklen am Guanidierungsharz **48**.

Um zu prüfen, ob eine Regeneration grundsätzlich möglich ist, wurde die Regeneration zuerst am Benzylpyrazol **44** durchgeführt und anschließend optimiert. Anschließend wurde die Regeneration des Benzylpyrazols **44** zum Benzylguanidin **41** auf das Pyrazol-Harz **67** übertragen. Es wurde versucht, das Benzylpyrazol **41** mit dem Guanidierungsreagenz Di-Boc-guanidin-triflat **14**<sup>[67]</sup> zu regenerieren. Dazu wurden andere Basen als Triethylamin erprobt: NaH, DABCO, DIPEA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und Natriummethanolat in Methanol bei einer Reaktionszeit von 22 h, wobei keine dieser Reaktionen zum gewünschten, regenerierten Benzylpyrazol führte.



**Schema 26:** Regenerations-Versuch mit Reagenz 14.

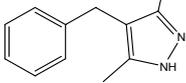
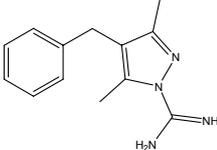
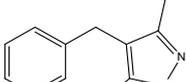
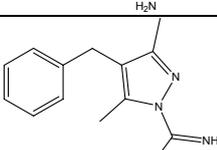
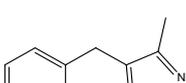
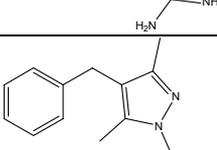
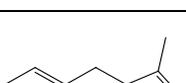
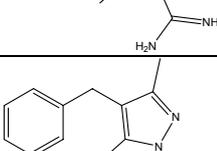
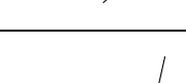
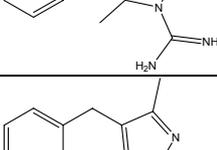
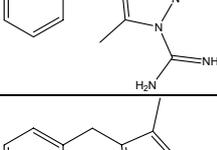
Aus diesem Grund wurde ein alternativer Weg eingeschlagen, wobei auf Arbeiten der Arbeitsgruppe *Matsueda* zurückgegriffen wurde.<sup>[87]</sup> In dieser Veröffentlichung wurde der Aufbau einer Carboxamidat-Funktion an Pyrazol unter Nutzung von Cyanamid beschrieben. *Matsueda* beschreibt die Reaktion mit 4 N HCl in Dioxan unter siedender Hitze und unter Absolutbedingungen.



**Schema 27:** Aufbau einer Guanidingruppe nach *Matsueda*.

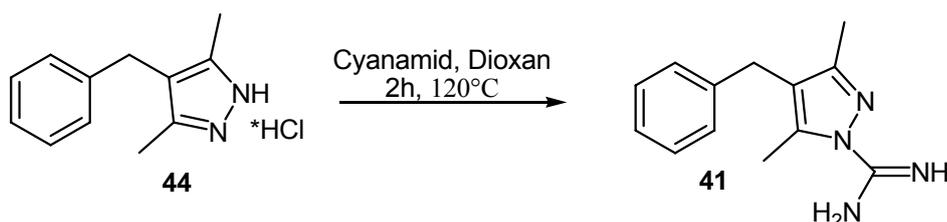
Diese Reaktion konnte nach einigen Optimierungsschritten fast ganz übernommen werden. Ein wichtiger Optimierungsschritt war, dass das Pyrazol mit Salzsäure ausgeschüttelt und lyophilisiert wurde. Das Einleiten von trockenem HCl in die Dioxan-Lösung wie von *Matsueda* beschrieben, führte nicht zum Erfolg. Durch die oben beschriebene Behandlung konnte die äquimolare Menge an HCl zum Pyrazolring sichergestellt werden. Anschließend wurden verschiedene Reaktionsbedingungen ausgetestet.

<sup>87</sup> M.S.Bernatowicz, Y.Wu, G.R.Matsueda,; *J.Org.Chem*, **1992**, *57*, 2497-2502.

Edukt	Produkt	Ausbeute	Versuchsbedingungen
		56 %	wenig HCl Zufuhr, nachdem bereits 1 h gerührt wurde, Dioxan (120°C)
		78 %	als Pyrazol-HCl eingesetzt, 2 h, Dioxan (120°C)
		91 %	als Pyrazol-HCl eingesetzt, 4 h, Dioxan(120°C)
		52 %	als Pyrazol-HCl eingesetzt, 24 h, Dioxan (120°C)
		10 %	als Pyrazol-HCl eingesetzt, 2 h, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 40°C
		37-44 %	als Pyrazol-HCl eingesetzt, 24 h CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (40°C)

**Tabelle 4:** Optimierung der Regeneration des Benzylpyrazols **44**.

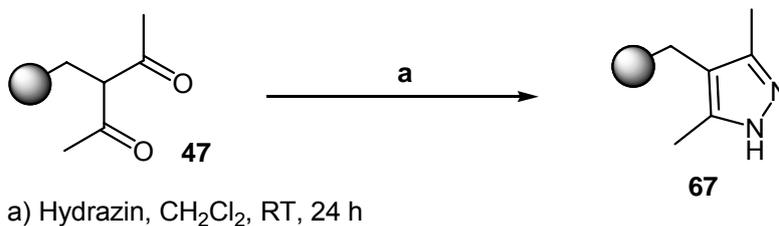
Mit 2 Äquivalenten Cyanamid in abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> konnte das Benzylpyrazol **44** in 2 h unter Rückfluss in das Guanidin **41** in einer Ausbeute von 91% überführt werden.



**Schema 28:** Regeneration von Benzylpyrazolguanidin **41** aus Benzylpyrazol **44**.

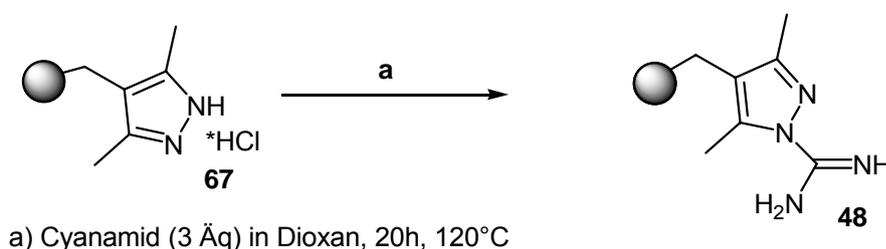
Die Regeneration des Benzylpyrazolguanidins **41** konnte auf das Harz-gebundene Pyrazol **67** übertragen werden. Um zu beweisen, dass die Guanidingruppe durch Transfer vom regenerierten, funktionalisierten Harz stammt und nicht durch absorptiv gebundene Reagenzienreste aus vorangegangenen Versuchen, wurde das „leere“ Pyrazol-Harz **67** ohne Beladung synthetisiert.

Dazu wurde das Diketo-Harz **47** anstelle von Aminoguanidin **40** mit Hydrazin unter Bildung des Guanidin-freien Pyrazolring **48** umgesetzt.<sup>[88]</sup>



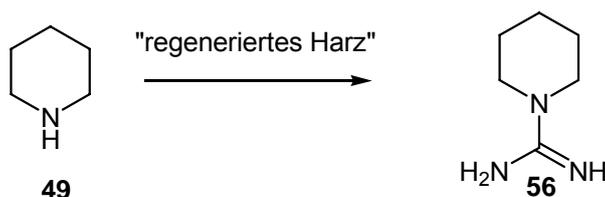
**Schema 29:** Darstellung von unbeladenem Carboxyamidat-Pyrazolharz **67**.

Im Anschluss wurde die Regenerationsfähigkeit der funktionalisierten Harzes **48** unter den oben genannten optimierten Bedingungen am Piperidin **49** erprobt.



**Schema 30:** Umsetzung von Pyrazol **67** mit Cyanamid zum Guanidierungs-Harz **48**.

Die Umsetzung von Pyrazol **67** mit Cyanamid zum Guanidierungs-Harz **48** lieferte ein Polymer, das Piperidin **49** in das Guanidin **56** transformierte. Der polymere Rückstand konnte erneut, gemäß Schema 30 in das Harz **48** überführt werden.



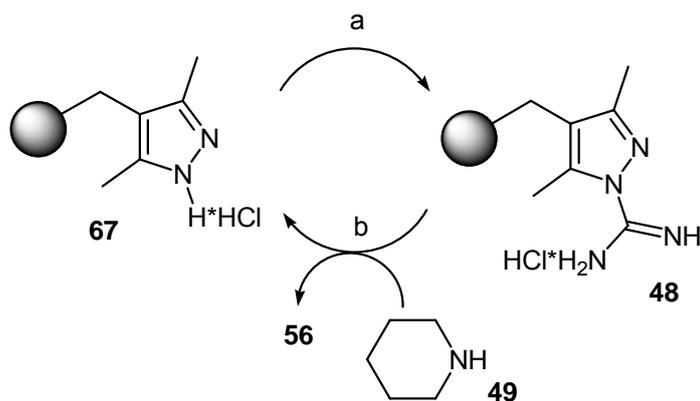
**Schema 31:** Testreaktion mit Piperidin **49** unter Standard-Bedingungen [Harz **48**, THF, TEA (5 Äq), 24h, 66°C]. Dazu wurde Piperidin **49** im deutlichen Überschuss eingesetzt, um die Beladung des Harzes **48** mit Carboxyamidingruppen abzuschätzen.

Über die Testreaktion mit Piperidin **49** kann Anhand der Ausbeute von guanidiertem Piperidin **56** die Beladung des Polymers mit aktiven Carboxyamidat-Gruppen abgeschätzt werden. Dazu wurde Piperidin **49** im deutlichen Überschuss eingesetzt, um möglichst alle an das Harz vorhandenen Carboxyamidingruppen zur Reaktion zu bringen. Über das

<sup>88</sup> *Polymerunterstützte Heterocyclen-Synthesen und oxidative Modifizierung von Steroiden;* Dissertationsarbeit von Nuria Merayo; **2003**.

Verhältnis der Integrale in den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Edukt und Produkt konnte die tatsächliche Menge an umgesetzten Piperidin **56** ermittelt und somit die Beladung errechnet werden. Die CHN-Analyse wurde ebenfalls zur Abschätzung der Beladung herangezogen. Das hier etablierte System stellt eine Alternative zum Aufbau des Guanidierungsharzes **48** zur oben beschriebenen Synthese mit Aminoguanidin **40** dar.

Die Häufigkeit der Wiederbeladbarkeit ist damit aber noch nicht bewiesen. Daher wurde eine für mehrere Zyklen ausreichende Menge unbeladenes Harz fortlaufenden Be- und Entladungszyklen unterworfen.



a) Harz **67** (1 Äq),  $\text{H}_2\text{NCN}$  (3 Äq), Dioxan, siedend, 24 h;  
b) Piperidin **49** (5 Äq),  $\text{Et}_3\text{N}$  (5 Äq), THF,  $66^\circ\text{C}$ , 24 h.

**Schema 32:** Regeneration und Entladungskreislauf des Harzes.

Das Harz konnte unter den evaluierten Bedingungen mit 3 Äq Cyanamid in Dioxan nach 24 h unter siedener Hitze regeneriert werden. Es wurde durch 5 Äq Piperidin **49**, TEA (5 Äq) in THF bei  $66^\circ\text{C}$  innerhalb von 24 h entladen. Nach jeder Reaktion wurde ein Teil des Harzes für eine CHN-Analyse entnommen und nach der Entladungsreaktion wurde die Reaktion aufgearbeitet und das Produkt auf Reinheit und Ausbeute untersucht. Aus beiden Parametern konnte die Beladung gut bestimmt werden.

**1. Zyklus:**

48) CHN: C: 78.6 %, H: 7.0 %, N: 6.2 % Beladung: 1.1 mmol/g

67) CHN: C: 79.4 %, H: 7.0 %, N: 5.8 % Beladung: 1.0 mmol/g

Piperidin: Beladung: 0.54 mmol/g

**2. Zyklus:**

48) CHN: C: 78.8 %, H: 7.0 %, N: 6.4 % Beladung: 1.1 mmol/g

67) CHN: C: 79.3 %, H: 7.0 %, N: 6.0 % Beladung: 1.1 mmol/g

Piperidin: Beladung: 0.5 mmol/g

**3. Zyklus**

48) CHN: C: 85.5 %, H: 7.0 %, N: 7.4 % Beladung: 1.3 mmol/g

67) CHN: C: 75.0 %, H: 7.0 %, N: 6.3 % Beladung: 1.1 mmol/g

Piperidin: Beladung: 0.28 mmol/g

**4. Zyklus:**

48) CHN: C: 72.7 %, H: 6.7 %, N: 8.9 % Beladung: 1.6 mmol/g

67) CHN: C: 75.4 %, H: 6.9 %, N: 8.3 % Beladung: 1.5 mmol/g

Piperidin: Beladung: 0.57 mmol/g

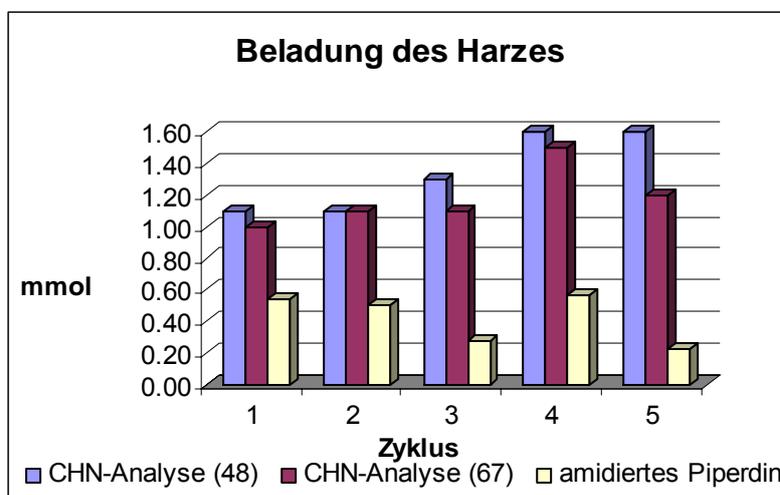
**5. Zyklus:**

48) CHN: C: 70.4 %, H: 6.6 %, N: 8.9 % Beladung: 1.6 mmol

67) CHN: C: 73.1 %, H: 6.8 %, N: 6.8 % Beladung: 1.2 mmol/g

Piperidin: Beladung: 0.23 mmol/g

Deutlich zu erkennen ist in der CHN-Analyse, dass der Stickstoffgehalt nach einer Entladungsphase abnimmt und die Übertragung der Guanidingruppe auf das Piperidin **49** stattgefunden hat. Deutlich geringer ist die Beladungsdichte bei der Abschätzung über das



**Abbildung 19:** Beladung des Harzes nach verschiedenen Zyklen der Regeneration. Bestimmung der Beladung durch CHN-Analyse und anschließender Reaktion mit Piperidin.

umgesetzte Piperidin **56**. Die Beladung schwankt um den Faktor 2, zeigt aber keine abnehmende Tendenz. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass das Harz selbst nach 5 Zyklen gleichbleibend gut regeneriert und einsetzbar ist.

Um den Umsatz zu beschleunigen wurde die bereits erprobte Mikrowellen-unterstützte Synthese auf die Festphasen-unterstützte Guanidierung übertragen. So wurde auch die Regeneration im Mikrowellenfeld durchgeführt. Die Reaktion wurde für 30 Minuten in Dioxan bei 135 °C (300 W) durchgeführt.

#### 1. Zyklus:

48) CHN: C: 81.5 %, H: 6.8 %, N: 6.7 % Beladung: 1.2 mmol/g

67) CHN: C: 79.9 %, H: 6.9 %, N: 6.3% Beladung: 1.1 mmol/g

**Piperidin:** Beladung 0.2 mmol/g

#### 2. Zyklus:

48) CHN: C: 80.0 %, H: 7.1 %, N: 6.8 % Beladung: 1.2 mmol/g

67) CHN: C: 79.6 %, H: 6.9 %, N: 6.7 % Beladung: 1.3 mmol/g

**Piperidin:** Beladung: 0.35 mmol/g

#### 3. Zyklus

48) CHN: C: 79.7 %, H: 6.9 %, N: 7.4 % Beladung: 1.3 mmol/g

67) CHN: C: 79.8 %, H: 6.9 %, N: 6.7 % Beladung: 1.2 mmol/g

**Piperidin:** Beladung: 0.47 mmol/g

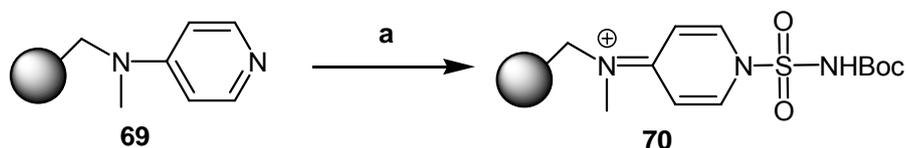
Die Guanidierungs-Reaktion im Mikrowellenfeld stellt eine weitere Option dar. Durch diese Reaktion wird die Reaktionsdauer von 24 Stunden auf 30 Minuten verkürzt, ohne dass Einbußen in der Beladung in Kauf genommen werden mussten.

Andere biogene und nicht-biogene, guanidierte Substanzen konnten über das Harz **48** hergestellt werden. So konnten Histamin **57**, Aminoethyl-Piperazin **68**, Prolin **59** und Morpholin **62** mit dem Harz **48** zu den entsprechenden Guanidinen umgesetzt werden (Schema 23).

#### 4.4. Sulfonamylierungsreaktion an der festen Phase

Diese Reaktion sollte ebenso auf Polystyrol zu übertragen sein, wie die Carboxyamidat-Reaktion auf das Merryfield-Harz. Dazu würde nur eine an Polystyrol gebundene DMAP-Gruppe benötigt werden.

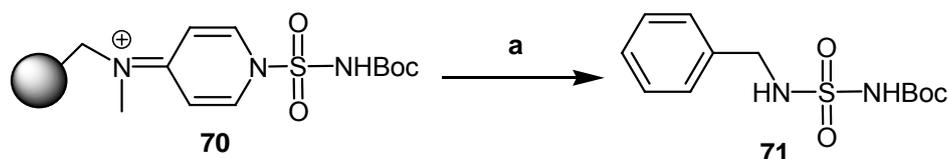
Diese Festphasen-unterstützte Sulfonamidat-Reaktion konnte auch durchgeführt werden.



a) Chlorsulfonsäure-Isocyanat, *tert*-BuOH **17**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 24h, 0-→RT

**Schema 33:** Synthese des festphasengebundenen Sulfonamylierungs-Reagenzes **70**.

Zur Synthese mussten Chlorsulfonsäure-Isocyanat **15** und *tert*-BuOH **17** in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bei 0°C vorgelegt werden. Nach Zugabe des Polystyrol-gebundenen DMAP konnte die Reaktionslösung auf RT erwärmt werden. Die erfolgreiche Beladung der Reaktion wurde durch eine Testreaktion mit Benzylamin geprüft.



a) Benzylamin (0,25 Äq), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

**Schema 34:** Testreaktion zur Überprüfung der erfolgreichen Beladung des Harzes **70**.

Das DMAP-Polystyrol **69** konnte erfolgreich beladen werden und es konnte Benzylamin **50** in 35 % Ausbeute zum Benzylsulfonamidat **71** umgesetzt werden. Die Regeneration dieses Harzes wurde wie unter Schema 32 gezeigt versucht, aber es konnte kein Erfolg erzielt werden. Anschließende Test-Reaktionen mit Benzylamin verliefen ohne Umsatz.

## 5. Biochemische Materialien

### 5.1 Geräte:

Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4	Christ
200-/400-NMR-Anlage	Bruker
Massenspektrometer (LC-ESI-MS)	Micromass
Mikrotiterplatten	Nunc
FP-6500 Spektralphotometer	Jasco
Sequenzierautomaten LiCor TJ6200	LiCor
V-560 UV-VIS-Photometer	Jasco
GeneSequencer	Promega
Multiskan Spectrum Thermo Labsystem	Multiskan Spectrum
V1.10	

### 5.2 Chemikalien:

Streptavidin		Roche
Bromphenolblau		Merck
DNA-DIG		IBA
TAR-DIG	Dioxygenin (DIG)-markiert	IBA
F-Tat		NMI-Peptides
BSA ( <i>bovines serum albumin</i> )		Roche
POD-Substrat ( <b>Peroxidase</b> )	Enthält 3',3',5',5'-Tetramethylbenzidin und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Roche
Anti-DIG-Antikörper	Fab-Fragment	Roche
Amikacin-Sulfat		Sigma-Aldrich
Netropsin		Sigma-Aldrich
Sisomycin-Sulfat		Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogencarbonat		Fluka
Kaliumhydrogencarbonat		Fluka
Hygromycin B Hydrochlorid		Sigma-Aldrich
Ribostamycin Sulfat		Sigma-Aldrich
Paromomycin		Sigma-Aldrich
Neomycin		Merck
Methanol		Fluka
Merrifield-Harz		Fluka
Harnstoff		Fluka
Histamin		Fluka
Glucosamin		Fluka
Polyacrylamid		Roth
Abs.Methanol		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Fluka

### Lösungsmittel und Reagenzien:

Absolutes THF wurde über Natrium mit Benzophenon als Indikator frisch destilliert. Absolutes Methanol wurde von der Firma Fluka erworben. Chemikalien, deren Herstellung nicht beschrieben ist, stammen von den Firmen ABCR, Acros, Aldrich, Fluka oder Merck.

**5.3 Puffer:****PBS-Lösung (Phosphat-Buffer-Solution):**

Es wurde für biochemische Analytiken eine PBS-Lösung mit folgenden Mengen pro Liter angesetzt.

Salz	Menge [mM]
NaCl	68,90
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,38

pH 7.0

Ion	Menge [mM]
Na <sup>+</sup>	150,0
K <sup>+</sup>	4,4
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	44,9
Cl <sup>-</sup>	68,4

**Tris-HCl:**

Tris 100 mM  
pH 8.0

**TBE-Puffer:**

	Menge [mM]:
Tris	100
Borsäure	0,085
EDTA	0,001

pH 8,3

**Stopp-Lösung für den Hairpin-Ribozym-Assay:**

Harnstoff 7 M  
EDTA 50 mM  
Bromphenolblau 0,04%

**5.4 Verwendete Proteine und Nukleotide :****TAR (trans-activation-response)-Fragment:**

Für die Fluoreszenz-Titration wurde ein einfaches, unmarkiertes, 31 Nukleotide langes TAR-Fragment der Sequenz 5'-GGC CAG AUC UGA GCC UGG GAG CUC GGC C-3' benötigt. Diese Substanz wurde bei der Firma Purimex synthetisiert und aufgereinigt erworben. Der Extinktions-Koeffizient beträgt 192300 L/(mol\*cm) bei 260 nm.

**TAR-DIG-RNA-Fragment:**

Für den ELISA-Inhibitions-Versuch wurde DIG-gelabelte (Digoxigenin) TAR-RNA benötigt, damit ein anti-DIG-Antikörper an die RNA binden und damit ein Nachweis der RNA erfolgen kann.

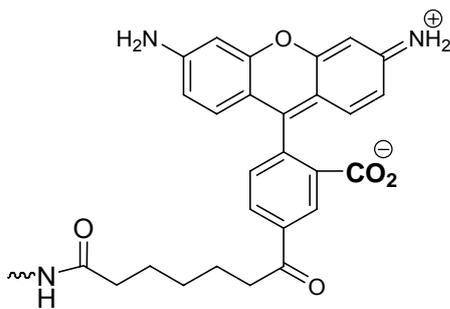
Diese RNA hatte die Sequenz (DIG)-5'-GGC CAG AUC UGA GCC UGG GAG CUC GGC C-3'. Diese RNA wurde von IBA (BioTAGnology) erworben. Darüber hinaus hat

diese RNA ein Molekulargewicht von 11355 g/mol und einen Extinktions-Koeffizienten von 192300 L/(mol·cm) bei 260 nm.

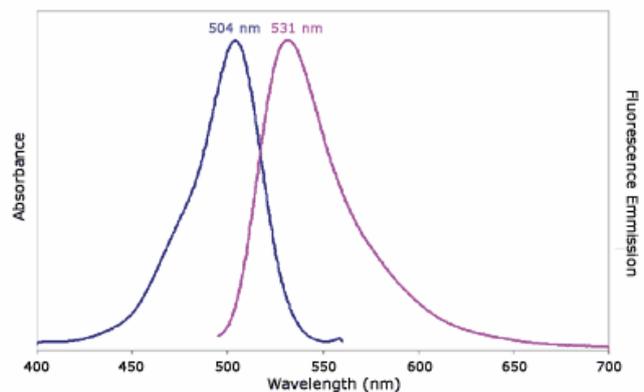
### **F-Tat (transactivator of transcription)-Peptid:**

Für die Fluoreszenz-Titration wurde ein Fluoreszenz-gelabeltes Tat-Peptid benötigt. Dieses Peptid hatte die Sequenz: RhoG-DOA-RKKR RQRRR-COOH, wobei das Fluorophor Rhodaminegrün (RhoG) über einen Linker (DOA) mit dem Peptid verbunden ist. Es hatte eine HPLC-Reinheit von 95 % und wurde von NMI-Peptides in der Hydrochlorid-Form erworben. Das Peptid hatte ein Molekulargewicht von 1840 g/mol und einen Extinktionskoeffizienten von 74000 L/(mol·cm) bei 530 nm.

Das Fluorophor war Rhodamine Green (RhoG) mit einer Excitations-Wellenlänge von 504 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 530 nm.



**Abbildung 20:** Rhodamine Green



**Abbildung 21:** Absorptions-Fluoreszenz-Emissions-Spektrum

### **Tat-Biotin- Fragment:**

Zur Kopplung des Tat-Peptides an eine mit Streptavidin beschichtete ELISA-Platte wurde Biotin-gelabeltes Tat-Peptid verwendet. Das Biotin wurde über einen Linker (Aca) an das Peptid mit der Sequenz Biotin-Aca-RKKR RQRRR-COOH gebunden und hatte ein Molekulargewicht von 1339.61 g/mol. Diese Substanz wurde HPLC-rein von der Firma NMI-Peptides erworben.

### **Hairpin-Ribozym:**

Das Hairpin-Ribozym wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Sabine Müller am GeneAssembler synthetisiert. Das verwendete Substrat S1-NH<sub>2</sub>-Atto war mit dem Atto-Farbstoff versehen, welcher durch den Sequenzierautomaten bei 680 nm detektiert werden konnte. Die Sequenz des S1-NH<sub>2</sub>-Atto-Substrates ist: 5'-Atto680-CONH-C6-UCA-CAG-UCC-UCU-UdT-3'

## 6. Biochemische Methoden

### 6.1 Analytische Methoden

#### <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie:

Die Aufnahmen von <sup>1</sup>H-NMR-Spektren erfolgten mit dem Gerät AM-400 (400 MHz) der Firma Bruker bei Raumtemperatur. Tetramethylsilan diente als interner Standard ( $\delta = 0$  ppm). Die Kopplungskonstanten ( $J$ ) werden in Hertz ( $Hz$ ) angegeben, die Multiplizitäten wie folgt abgekürzt: s = singulett, d = dublett, t = triplet, q = quarett, m = multipliett. Vor der Multiplizitätsangabe stehende Abkürzung geben an: d = doppelt, b = breites Signal. Die chemische Verschiebung wird in ppm angegeben.

#### <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie:

<sup>13</sup>C-NMR-Spektren wurden mit dem Gerät AM-400 (100 MHz) der Firma Bruker aufgenommen. Die Spektren wurden auf das jeweilige Lösungsmittel außer D<sub>2</sub>O kalibriert. C-Atome von Guanidingruppen werden durch C-G gekennzeichnet. Weitere Abkürzungen sind: s = quartäres C-Atom, d = tertiäres C-Atom, t = sekundäres C-Atom, q = primäres C-Atom.

#### Liquid-Chromatography-Electrospray-Ionisation-Mass-Spectrometry (LC-ESI-MS):

Massenspektrometrische Analysen wurden mit einem Gerät vom Typ LCT der Firma Micromass durchgeführt. Die Proben wurden im „loop“-Modus ohne Trennung direkt in das Massenspektrometer injiziert. Als Injektionsmittel wurde ein 1:1 Gemisch von Acetonitril und Wasser eingesetzt.

#### Chromatographie:

Zur Aufreinigung der chemisch synthetisierten Substanzen wurde die Säulenchromatographie mit Kieselgel der Firma Baker (Korngröße: 0,03-0,06 mm) durchgeführt. Die Laufmittel wurden den Substanzen angepasst; sie sind separat im Ergebnisteil aufgeführt.

#### Ionenaustauscher:

Der mit OH-Ionen beladene Ionenaustauscher Amberlite IRA-400 von Merck kann zum Austauschen von Anionen angewendet werden und wurde in dieser Arbeit zum Entfernen von Chlorid-Ionen aus dem Reaktionsgemisch oder zum Austausch von TFA (Trifluoressigsäure) benutzt. Dazu wurde der Ionenaustauscher mit Natronlauge (1 N)

equilibriert und anschließend bis zum neutralen pH-Wert gewaschen. Danach wurden die synthetisierten Produkte mit Wasser oder Methanol von dem IRA-400 gespült. Nach beendeter Chloridentfernung des Reaktionsgemisches wurde der Austauscher mit 1 N Salzsäure gewaschen und in dieser Form gelagert.

### **Konzentrationsbestimmungen:**

Die Konzentrationen aller Aminoglykoside, artifizieller und vollsynthetischer Substanzen wurden per Auswaage und anschließender Verdünnungsberechnung bestimmt. Die Konzentrationen vom F-Tat, der TAR-RNA und der TAR-DIG-RNA erfolgte durch spektroskopische Bestimmung und Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes ( $A = \epsilon \cdot c \cdot d$ ). Der Extinktions-Koeffizient für das F-Tat ist 74000 L/(mol·cm) bei 504 nm und für die beiden TAR-RNA-Moleküle 192300 L/(mol·cm) bei 260 nm.

## **6.2 Biochemische Methoden zur Bestimmung der RNA-Affinität**

### **6.2.1 Affinitätsbestimmung am Hairpin-Ribozym**

Das Hairpin-Ribozym und das Substrat wurden im AK Sabine Müller mit einem GeneAssembler (Promega) synthetisiert. Es wurden das HP-WTTLH4 Ribozym und S1-NH<sub>2</sub>-Atto als Substrat verwendet. Das verwendete Substrat S1-NH<sub>2</sub>-Atto war mit dem Atto-Farbstoff versehen, welcher durch den Sequenzierautomaten bei 680 nm detektiert werden konnte. Die Aktivität der synthetisierten Ribozyme, die das RNA-Fragment in je ein 5- und 9- Nukleotid langes Fragment spalten, wurde anhand von analytischen Spalttests untersucht. Dabei wurden die Spalttests unter *multiple turnover*-Bedingungen durchgeführt. In diesen *multiple turnover*-Bedingungen wurden 10 nmol Hairpin-Ribozym mit 200 nmol Substrat versetzt und in Tris-Puffer (100 mM), MgCl<sub>2</sub> (10mM) bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der Spaltaktivität wurden zu definierten Zeiten Proben entnommen und die Spaltreaktion mit einer Stopp-Lösung abgebrochen. Die Proben wurden auf ein 15%iges, denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Substrat-Fragmente durch Anlegen einer elektrischen Spannung von 1500 V und 40 mA (45 W) bei 45°C ihrer Größe nach aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 0,6 x TBE. Dabei wurde über einen Laserstrahl die Zeit ermittelt, die das Fluorophor zum Durchlaufen des Gels benötigte. Zusätzlich konnte über die Intensität des Signals auch eine Konzentrationsbestimmung erfolgen. Der Sequenzierautomat maß die Zeit, bis der Fluorophor am unteren

Ende des Gels angelangt war. Je weiter die Reaktion fortgeschritten war, desto mehr Spaltprodukt (5 Nukleotid langes Fragment) wurde gebildet und desto intensiver war das Signal, während das Signal des Substrates abnahm. Die Summe der Intensitäten aus Edukt- und Produktpeak innerhalb einer Bahn konnte somit auf 100% standardisiert werden. Die Bestimmung des prozentualen Anteils des Produkt- bzw. Edukt-Peaks zum jeweiligen Zeitpunkt der Probenentnahme wurde mit dem Computerprogramm GeneImager durchgeführt. Mit Hilfe der Gleichung (2) ließ sich eine Spaltkurve erstellen.

$$[E] + [P] = 100 \% \quad (1) \quad \begin{array}{l} [E] \equiv \text{Fläche des Eduktpeaks} \\ [P] \equiv \text{Fläche des Produktpeaks} \end{array}$$

$$(([E] + [P])/[P])100 \% = [P] \% \quad (2)$$

Nach Michaelis-Menten ist die Umsatzgeschwindigkeit:

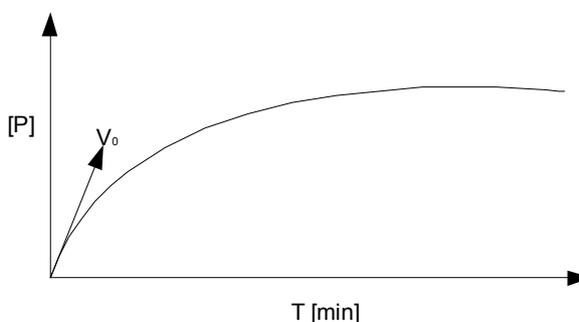
$$V_0 = \frac{k_{cat} * [Sub]}{K_M + [Sub]} \quad (3) \quad \begin{array}{l} [Sub] \equiv \text{Konzentration des Substrates} \\ [Rib] \equiv \text{Konzentration des Ribozyms} \end{array}$$

Die Enzymaktivität ist definiert als:

$$V_0 = K_{obs} * [Rib] \quad (4)$$

Daraus folgt:

$$K_{obs} = \frac{V_0}{[Rib]} \quad (5)$$

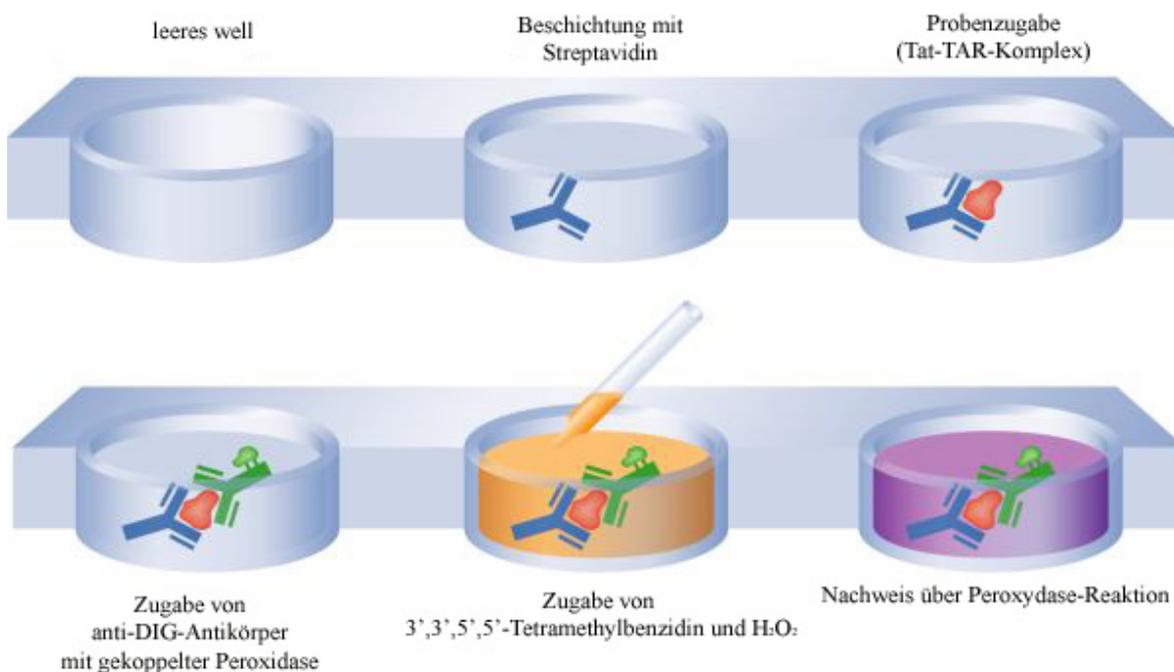


Da die Umsatzgeschwindigkeit von der Substratkonzentration abhängig ist, wird die Aktivität aus der Berechnung der Steigung im linearen Anfangsbereich bestimmt.

### 6.2.2 ELISA Affinitätsbestimmung des TAR-Tat-Komplexes

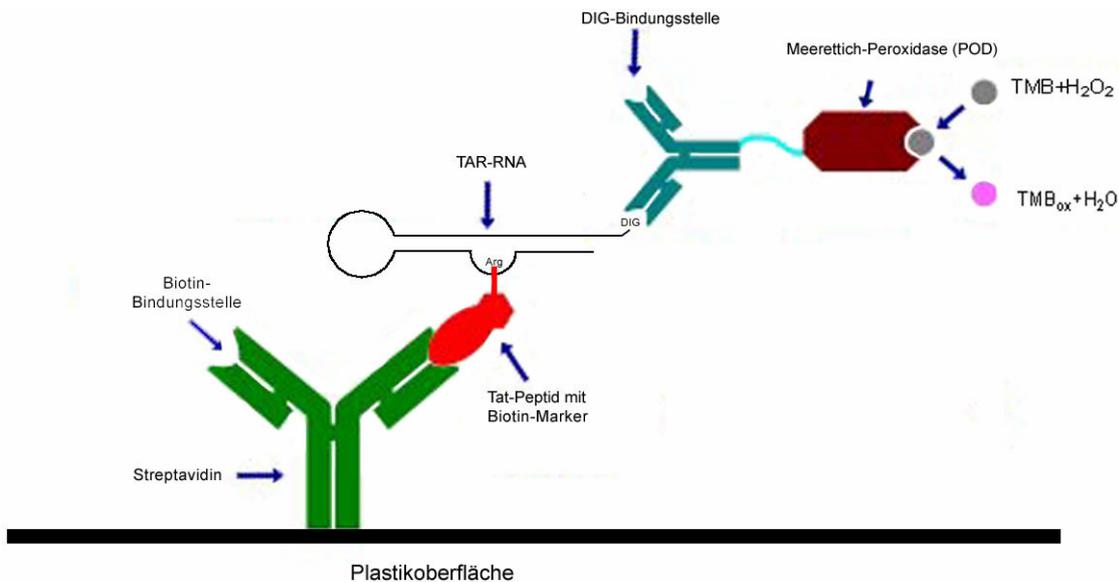
Zur Austestung der Inhibition des Komplexes diente ein Schnelltest-Verfahren auf Grundlage des ELISA (*Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay*). Dazu wurde das Tat-Peptid mit Biotin-Marker und die TAR-RNA mit DIG-Markierung, benutzt. Die

Mikrotiter-Platten wurden über Nacht mit 100  $\mu\text{L}$  einer Streptavidin-Lösung mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bei Raumtemperatur inkubiert.



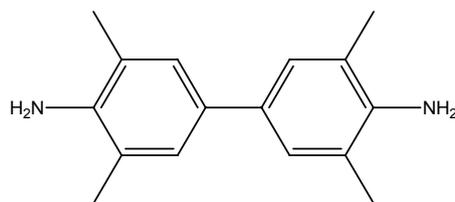
**Abbildung 22:** Graphische, vereinfachte Darstellung des ELISA-Prinzips. Beschichtung der Wells wird über Streptavidin realisiert. Bei der Probenzugabe kann der Tat-TAR-Komplex über die Biotinmarkierung an das Streptavidin binden. Der Probenachweis geschieht durch Bindung eines Antikörpers gegen Digoxigenin (DIG) mit dem die TAR-RNA markiert ist. Durch Zugabe von 3',3',5',5'-Tetramethylbenzidin und  $\text{H}_2\text{O}_2$  findet eine Farbreaktion statt, die photometrisch bestimmt werden kann und den Komplexnachweis visualisiert.

Es wurde eine Stammlösung mit einer Tat-Peptid-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ , einer TAR-RNA-Konzentration von 0.50  $\mu\text{M}$  und einer anti-DIG-Antikörper-Konzentration von 0.75 U pipettiert und 30 min in 1.5 mL-Reaktionsgefäßen vorinkubiert. Diese Lösung wurde mit den entsprechenden Test-Substanzen verschiedener Konzentrationen in 1x PBS 1:10 verdünnt und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Vor Inkubation mit dem Protein-RNA-Gemisch wurde die Mikrotiterplatte mit 1% BSA-Lösung gewaschen. 100  $\mu\text{L}$  der Reaktionslösung pro Well wurden anschließend für 45 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Platten 3mal mit PBS gewaschen. Die Wells wurden danach 6 Minuten mit den Proben inkubiert, dabei wurde dreimal mit der Pipette gründlich durchgemischt. Danach wurden die Proben durch Absaugen mit einer feinen Spritzennadel mit Vakuumschluss entfernt und die Platte direkt mit dem 100  $\mu\text{L}$  POD-Substrat (Peroxidase-Substrat) versetzt. Die an den anti-DIG-Antikörper gekoppelte Meerettich-Peroxidase oxidiert das in der POD-Substrat-Lösung vorhandene TMB (Abbildung 24) durch



**Abbildung 23:** Prinzip des beschriebenen *Sandwich*-ELISA-Testsystems. Streptavidin die an der Plastikoberfläche gebunden ist bindet das Tat-Peptid über einen Biotinmarker. Der Nachweis der TAR-RNA erfolgt über einen anti-DIG-Antikörper mit gekoppelter Meerrettich-Peroxidase (POD). Diese POD oxidiert Tetramethylbenzidin (TMB) über Wasserstoffperoxid.

das ebenfalls in der Lösung vorhandene Wasserstoffperoxid. Dadurch verfärbt sich die Lösung blau. Nach 6 Minuten wurde die Reaktion mit 0.1 M Schwefelsäure abgestoppt. Die Extinktionsbestimmung der Proben erfolgte am Photometer bei 490 nm gegen 690 nm als Referenzwert.

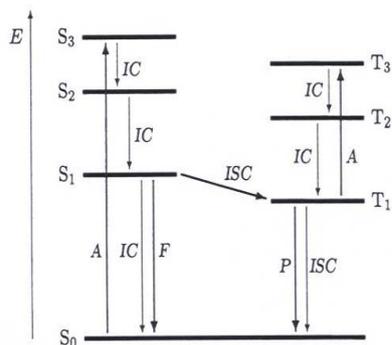


**Abbildung 24:** 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in der POD-Lösung.

## 6.2.3 Fluoreszenztitration

### 6.2.3.1 Theorie

Die Fluoreszenz-Titration beruht auf dem Prinzip, dass sich durch Zugabe einer Substanz das Fluoreszenzverhalten des Fluorophors ändert. Die Grundlage der Fluoreszenz ist die Anregung eines Elektrons durch einen elektromagnetischen Impuls. Dabei wird das



**Abbildung 25:** Jablonski-Diagramm der elektronischen Zustände in einem organischen Molekül.  $S_0$ : elektronischer Grundzustand

Elektron von seinem ursprünglichen Orbital in ein nicht-bindendes ( $n$ ) oder anti-bindendes Orbital ( $\sigma^*$  oder  $\pi^*$ ) gehoben. Bei Raumtemperatur beträgt die Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand  $S_0$  und dem ersten angeregten Zustand  $S_1$  typischerweise  $1\text{eV}^{[89]}$ . Die Energielücke zwischen dem niedrigsten ( $v = 0$ ) und dem nächst höheren Schwingungsniveau ( $v = 0$ ) liegt typischerweise bei  $0.1\text{-}0.5\text{ eV}$ . Die thermische Energie bei Raumtemperatur beträgt jedoch nur  $0.05\text{ eV}$ , so dass im thermischen Gleichgewicht alle Moleküle im elektronischen Grundzustand und fast immer auch im Schwingungsgrundzustand vorliegen. Die einzig besetzten Energiezustände sind die Rotationszustände, so dass der Gesamtenergiezustand ( $E_{\text{Ges}} = E_{\text{Rotation}} + E_{\text{magn}} + E_{\text{Schwingungsenergie}} + E_{\text{Elektronen}}$ ) des Moleküls als  $S_0, (v=0, r_1, \dots, r_2)$  beschrieben werden kann. Bei der Aufnahme elektromagnetischer Energie ist der Übergangswahrscheinlichsten, deren Grundzustand und angeregter Zustand am ähnlichsten sind (Frank-Condon-Prinzip). Dabei kann der Spin des Elektrons gleich bleiben ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) oder sich umkehren und den Triplett-Zustand einnehmen (verbotener Zustand nach dem Frank-Condon-Prinzip). Phosphoreszenz ist die Abreaktion über diese verbotenen Übergangszustände ( $T_1 \rightarrow S_0$ ), und ist damit langlebiger als die Fluoreszenz ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) für die keine Spinumkehr erfolgt.<sup>[89]</sup>

Ein Teil der durch das Photon aufgenommenen Energie wird in Schwingungsenergie umgewandelt, so dass nicht die gesamte aufgenommene Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung wieder abgegeben wird. Dieser Prozess wird interne Konversion genannt. Das abgestrahlte Licht hat deshalb stets eine geringere Energie und somit auch eine längere Wellenlänge als das absorbierte Licht (Stokes Shift) und ist diesem gegenüber damit rotverschoben. Die spontane Emission eines Photons erfolgt nach einigen Nanosekunden. Finden keine anderen Prozesse außer der Emission statt, so wird diese Wechselwirkung als intrinsische Lebensdauer der Fluoreszenz bezeichnet, die definiert ist als  $\tau$ .

$$\frac{1}{\tau} = \frac{8n^2\pi\nu^3 \ln 10}{c^2 N_A} \int \frac{\epsilon}{\nu} d\nu$$

<sup>89</sup> F.Lottspeich, H.Zorbas; *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag 1998, ISBN 3-8274-0041-4.

Die Energie kann aber auch strahlungslos durch Stöße mit anderen Molekülen übertragen werden (Quench, q). Wird die Quencherkonzentration so groß gewählt, dass im Mittel der Abstand zwischen Fluorophor und Quencher so gering ist, dass sie durch die Fick'sche Diffusion schneller zusammenstoßen als sie der Lebensdauer des Fluorophors entspricht, so wird die Fluoreszenz gelöscht.

Eine weitere Möglichkeit der Energieübertragung ist der Singulett-Singulett-Energie-Transfer, der auch Förster-Transfer genannt wird. Bei diesem Prozess wird die Energie von dem angeregten Fluorophor auf ein anderes Teilchen übertragen. Dadurch kann der Abstand zwischen Chromophoren bestimmt werden.

Wenn ein Fluorophor mit einem Quencher einen Komplex ausbildet, der dann nicht mehr in der Lage ist zu fluoreszieren, so ist eine Bestimmung der Gleichgewichtskonstante  $K_{FQ}$  möglich.

$$K_{FQ} = \frac{c_{FQ}}{c_F c_Q}$$

$c_F$  = Konzentration Fluorophor

$c_Q$  = Konzentration Quencher

Durch die Abnahme des Fluoreszenzsignals kann die Menge an freiem und damit auch des in dem Komplex gebundenen Fluorophors, hier das Tat-Peptid, berechnet werden.

$$F_{Ges} = F_P + F_{PK} = f_P(P_{Ges} - RP) + f_K(P_{Ges} - P) \quad (1)$$

$F_{Ges}$  = Gesamtfluoreszenz

$F_{PK}$  = Fluoreszenz des Peptids im Komplex

$F_P$  = Fluoreszenz von freiem Peptid

$P_{Ges}$  = Gesamt-Konzentration an Tat-Peptid

$R$  = Konzentration an TAR-RNA

$P$  = Konzentration an Tat-Peptid

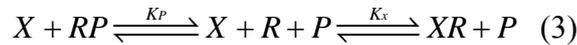
$RP$  = Konzentration an Komplex

Die Fluoreszenzfaktoren für den Komplex ( $f_K$ ) und das freie Peptid ( $f_P$ ) sind durch die Titration gegeben.  $F_P$  ist die Fluoreszenz zu Anfang mit die Maximalfluoreszenz, da  $R = 0$  M ist. Ebenso ist die Konzentration an P am Ende der Titration gleich null, denn P liegt gebunden im Komplex vor. Damit ist:

$$f_P = \text{Fluoreszenz-Signal (Anfang)} / P_{Ges} \quad (2)$$

$$f_K = \text{Fluoreszenz-Signal (Ende)} / P_{\text{Ges}} \quad (3)$$

Nach dem Massenwirkungsgesetz liegen das Tat-Peptid und die TAR-RNA im Gleichgewicht:



$X$ =Konzentration an Inhibitor,  $R$ =Konzentration an TAR,  $P$ = Konzentration an Tat-Peptid,  $RP$ =  
Konzentration an TAR-Tat-Komplex,  $XR$  =Konzentration TAR-Inhibitor-Komplex

$$K_X = \frac{[XR]}{[X][R]} \quad (4)$$

$$K_R = \frac{[RP]}{[P][R]}$$

Die Gesamtkonzentrationen sind bekannte Größen und über diese können die anderen berechnet werden. Freie und im Komplex gebundene Mengen an R, X und P stehen über folgende Formeln in Beziehung.

$$[R_{\text{Ges}}] = [R] + [XR] + [RP] \quad (5)$$

$$[X_{\text{Ges}}] = [X] + [XP] \quad (6)$$

$$[P_{\text{Ges}}] = [P] + [RP] \quad (7)$$

Durch Einsetzen der Formeln (5)-(7) und Umstellen ergibt sich nun folgender Zusammenhang:

$$[XR] = [X_{\text{Ges}}] \frac{K_X [R]}{K_X [R] + 1} \quad (8)$$

$$[RP] = [P_{\text{Ges}}] \frac{K_P [R]}{K_P [R] + 1} \quad (9)$$

Setzt man die neuen Formeln (8) und (9) in (5) ein und formt nach  $K_X$  um, so erhält man die nun berechenbare Assoziations-Konstante.

$$K_X = \frac{P_{\text{Ges}} K_P - R_{\text{Ges}} K_P - \frac{R_{\text{Ges}}}{R}}{R_{\text{Ges}} K_P R - K_P R^2 - X_{\text{Ges}} R K_P + R_{\text{Ges}} - R X_{\text{Ges}} - K_P P_{\text{Ges}} R} \quad (10)$$

Durch Einsetzen der im Experiment bestimmten Fluoreszenzsignale und den eingesetzten, bekannten Konzentrationen von P, R und X in die Formel (10) kann die Assoziations-Konstante berechnet werden.

### **6.2.3.2 Methode der Fluoreszenz-Titration**

Bei den Titrationsexperimenten wurden silanisierte Küvetten benutzt. Die Silanisierung erfolgte über Nacht bei 80°C mit Dimethyldichlorsilan in Toluol und anschließendem ausgiebigen Waschen mit Methanol.

Um Konzentrationsschwankungen zwischen verschiedenen Proben zu vermeiden, wurden alle Proben aus einer Tat-Stammlösung (8  $\mu\text{M}$ ) pipettiert. Für Bindungskonstantenbestimmung des Tat-TAR-Komplexes wurde in der Küvette 600  $\mu\text{L}$  einer definierten Tat-Lösung vorgelegt. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden 100  $\mu\text{L}$  einer Titrationslösung in kleinen, definierten Titrationsschritten in die Küvette pipettiert. Zur Bestimmung der Bindungskonstanten zwischen dem Tat-Peptid und der TAR-RNA wurde mit einer insgesamt 21-fach konzentrierteren Lösung an TAR-RNA gegentitriert. Zur Bestimmung der Inhibitionseffekte im TAR-Tat-Komplex der auszutestenden Substanzen wurden die Testsubstanzen in verschiedenen, aber genau definierten Konzentrationen titriert. Für diese Inhibitionsexperimente wurde eine TAR-Tat-Lösung mit einer Konzentration von 200 nM TAR und 100 nM F-Tat vorgelegt, so dass der Komplex zu 90 % ausgebildet war. Die Detektion erfolgte im Fluorimeter. Die Auswertung wurde mit BPC-FIT und den erweiterten mathematischen Zusammenhängen für ein Komplexgleichgewicht durchgeführt (siehe Formel 10).

## 6.3 Ergebnisse der Affinitätsbestimmung

### 6.3.1 ELISA-Schnelltestverfahren

#### 6.3.1.1 Etablierung eines ELISA-Test zur Affinitätsbestimmung des TAR-Tat Komplexes

Für den ELISA-Test wurde als RNA-bindendes System das Tat-Peptid aus dem HI-Virus benutzt, welches mit der TAR-RNA einen sehr stabilen Komplex ausbildet. Dieser Komplex aktiviert *in vivo* durch weitere Co-Faktoren die RNA-Polymerase II, so dass die vollständige RNA des Virus gebildet werden kann.<sup>[90]</sup>

Das TAR-bindene, aktive Tat-Peptid mit einer Größe von 9 Aminosäuren besitzt leicht höhere Affinität zu der TAR-RNA als das gesamte Tat-Protein<sup>[91]</sup>. Die Dissoziationskonstante  $K_D$  ist von 0.01 pM bis 130  $\mu$ M beschrieben.<sup>[38,40,41,92]</sup> Die Variante, in der die Platten mit anti-DIG-Antikörper beschichtet worden waren und die DIG-markierte TAR binden sollte, führte zu keinem Ergebnis.

Die Beschichtung mit Streptavidin, an das das Biotin-gelabelte Tat-Peptid bindet und der anti-DIG-Antikörper als Detektionsmittel der TAR-RNA eingesetzt wurde, zeigte Erfolg. Die Bindung über den Tat-TAR-Komplex erbrachte eine stärkere Signalintensität als die Positiv-Kontrolle über Biotin-gebundene Antikörper (Abbildung 26).

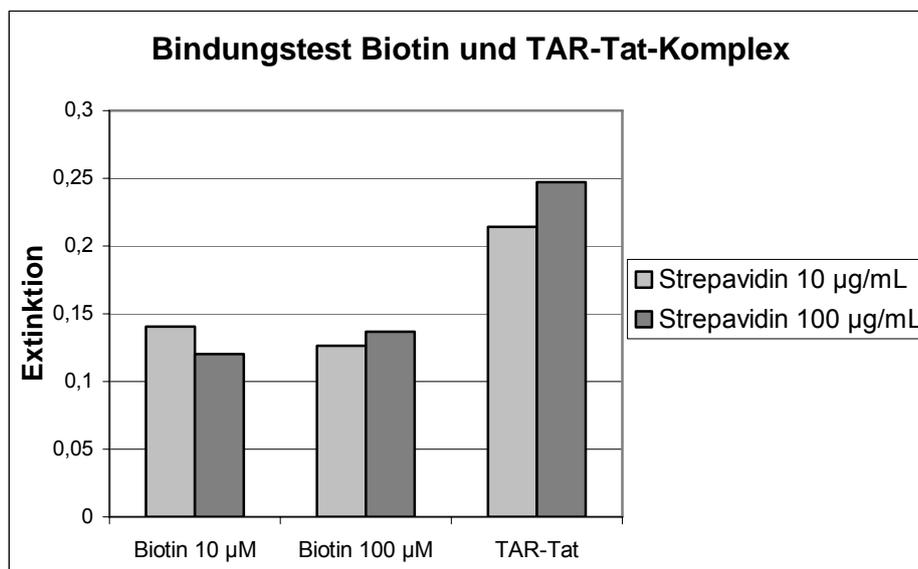


Abbildung 26: Bindungstest Streptavidin-beschichteter Oberflächen mit Biotin und TAR-Tat-Komplex.

<sup>90</sup> J.Zhang, N.Tamilarasu, S.Hwang, M.E.Garber, I.Huq, K.A.Jones, T.M.Rana; *J.Biol.Chem.* **2000**, 275, 34314-34319.

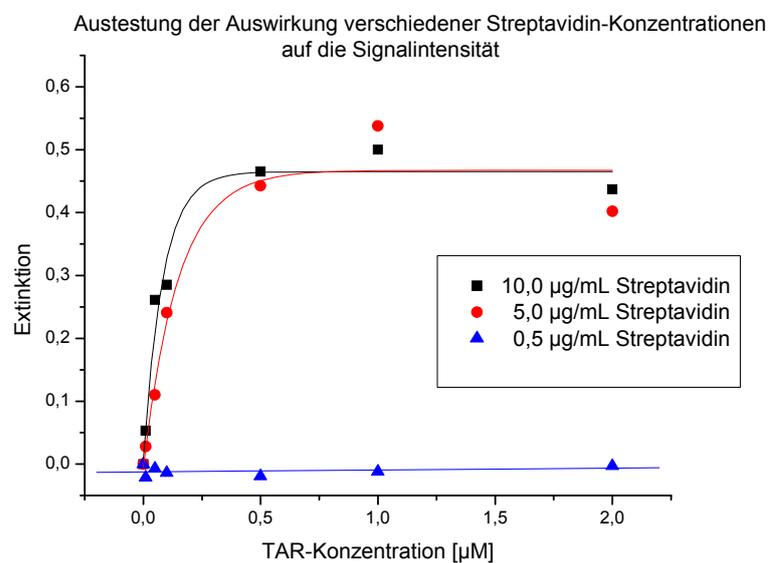
<sup>91</sup> A.Litovchick, G.Artem, A.Lapidot; *Biochemistry* **2000**, 39, 2838-2852.

<sup>92</sup> A.Garbesi, F.Hamy, M.Maffini, G.Albrecht, T.Klimkait; *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26 2886-2890.

Bindungsexperimente in denen die Menge an Streptavidin variiert wurde, zeigten, dass bei einer Menge von 100  $\mu\text{L}$  einer 5  $\mu\text{g/mL}$  Streptavidin die *wells* abgesättigt sind. Eine Erhöhung der Streptavidin-Konzentration führte zu keiner signifikanten Signalerhöhung. Da sich trotz der hohen Bindungsstärke des Streptavidin-Biotin-Komplexes eine höhere Signalstärke bei dem Tat/TAR-Komplex gleicher Konzentration ergibt, wird vermutet, dass es aufgrund der dichten Packung der sehr kleinen Biotinmoleküle zu sterischer Hinderung der großen Antikörper kommt.

TAR [ $\mu\text{M}$ ]	Streptavidin		
	10 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	0,5 $\mu\text{g/mL}$
0	0.000	0.000	0.000
0.01	0.053	0.028	0.021
0.05	0.261	0.110	0.007
0.10	0.285	0.241	0.014
0.50	0.465	0.443	0.019
1.00	0.500	0.538	0.012
2.00	0.437	0.402	0.003

**Tabelle 5:** Ergebnisse der Auftragung verschiedener Streptavidin-Konzentrationen. Die Zahlen geben die erhaltenen Signalintensitäten nach Auftragung des Tat-TAR-Komplexes in verschiedenen Konzentrationen wieder.

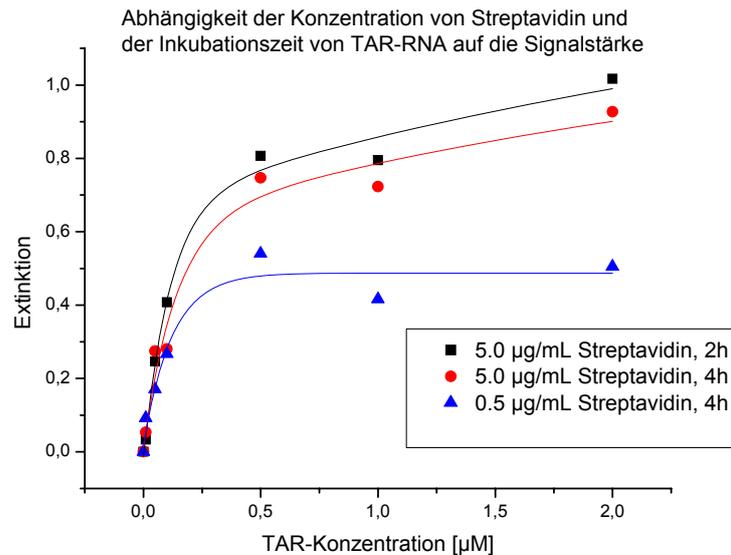


**Abbildung 27:** Auswirkung verschiedener Streptavidin-Konzentrationen auf die Extinktionsstärke.

Von entscheidender Bedeutung ist die Inkubationszeit der Proben auf der beschichteten Platte, die ebenfalls überprüft wurde und im Folgenden in den Diagrammen ersichtlich ist.

TAR [pmol]	5 µg/mL 2h	5 µg/mL 4h	0,5 µg/mL 4h
0.0000	0.000	0.000	0.000
0.0100	0.034	0.053	0.092
0.0500	0.246	0.275	0.171
0.1000	0.408	0.280	0.267
0.5000	0.807	0.747	0.541
1.0000	0.795	0.723	0.416
2.0000	1.017	0.927	0.505

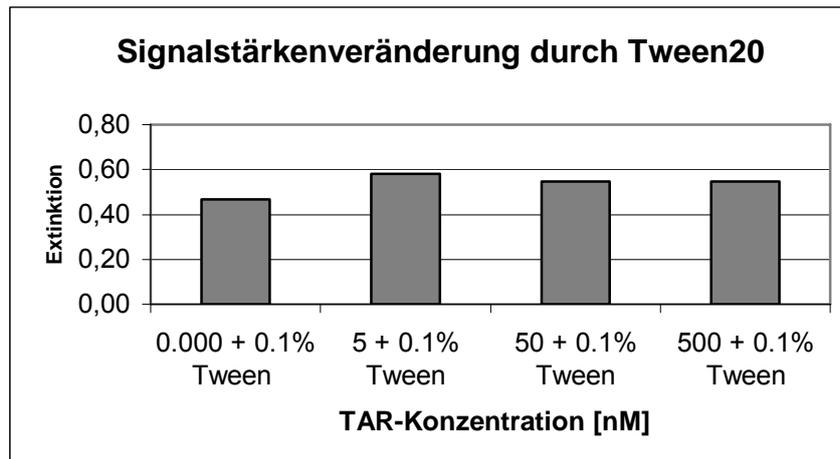
**Tabelle 6:** Erhaltene Extinktionswerte des ELISA-TEST in Abhängigkeit von Streptavidin-Konzentration und Inkubationszeit.



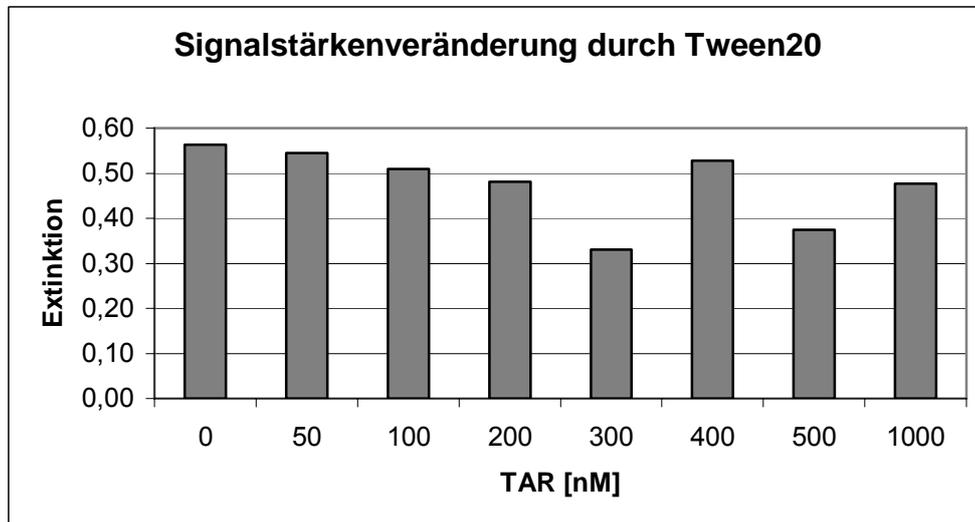
**Abbildung 28:** Auswirkung der Konzentration von Streptavidin und der Inkubationszeit von TAR-RNA auf die Signalstärke.

Nach 4 Stunden Inkubationszeit ist auch bei Proben von 0.5 µg/mL Streptavidin ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erkennen. Die Sättigung der Beschichtungsprobe bei 5 µg/mL konnte reproduziert werden, da bei dieser Konzentration auch eine längere Inkubationszeit keinen Einfluss auf die Signalstärke hat. Aufgrund dieser Erkenntnis wurden alle folgenden Versuche mit 100 µL einer 5 µg/mL Streptavidin-Lösung über Nacht inkubiert.

Da eine hohe, punktuelle Konzentration an dem Beschichtungsmolekül zu schlechteren Signalstärken aufgrund sterischer Hinderung der Zielbindungsmoleküle vermutet wurde, wurden Detergenzien, die bekanntermaßen eine Koagulation geladener Moleküle verhindern, erprobt. Dazu wurde eine Tween20-Lösung mit einer Zusammensetzung von PBS und 0.1 % Tween20 gewählt. Dieser Zusatz führte zu einem Ansteigen der Signalstärke, jedoch ließen sich keine Extinktionsunterschiede mehr in den einzelnen Konzentrationen von Streptavidin oder des Komplexes unterscheiden. Es wurde ein gleich bleibend starkes Signal erhalten.



**Abbildung 29:** Austestung des Nachweises der Tat-TAR-Komplexbildung in Gegenwart von Tween20 in Abhängigkeit von der Streptavidin-Konzentration.



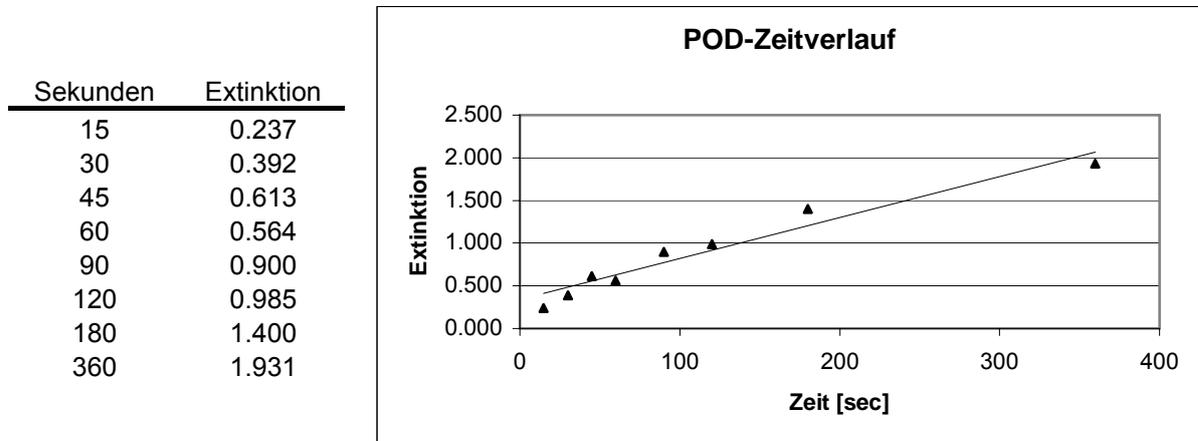
**Abbildung 30:** Austestung des Nachweises der Tat-TAR-Komplexbildung in Gegenwart von 0.1 % Tween20 in Abhängigkeit von der TAR-Konzentration.

Es wurde ebenfalls eine Testreihe mit BSA durchgeführt. Diese zeigte das gleiche Ergebnis, nämlich dass unter diesen Bedingungen keine Korrelation zwischen Signalstärke und Konzentration der TAR-RNA gefunden werden konnte.

Eine weitere Komponente, die ausgetestet wurde, war, ab wann das Substrat (Wasserstoffperoxid, TMB) soweit aufgebraucht ist, dass die Abhängigkeit von Signalintensität und Zeit den linearen Bereich verlässt. Dazu wurde die Detektionslösung unterschiedlich lange mit der POD-Lösung inkubiert.

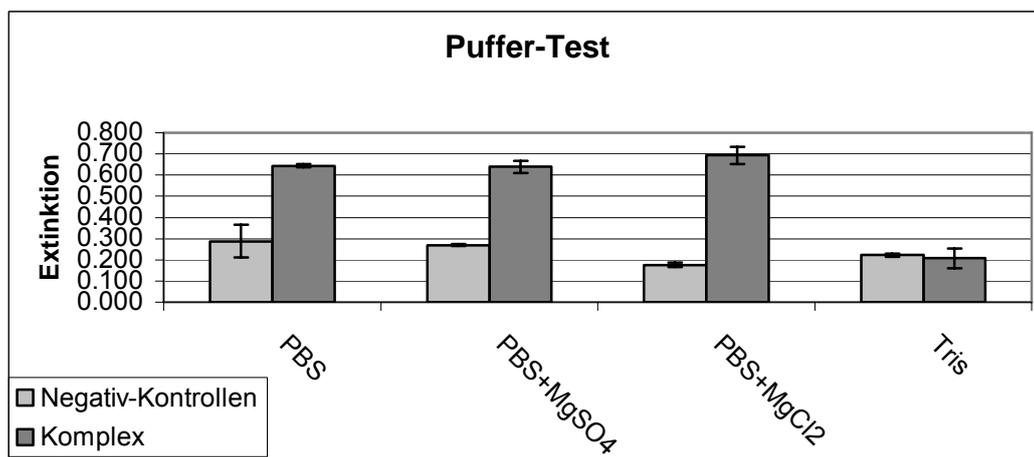
Nach 6 Minuten ist das Peroxidasesubstrat TMB immer noch im Sättigungsbereich der an den anti-DIG-Antikörper gebundenen Peroxidase (POD). Die Signalstärke korreliert nahezu linear mit der Zeit. Daher kann eine Beeinflussung der Ergebnisse durch das

Peroxidasegleichgewicht durch Inkubationen bis 6 Minuten mit dem POD-Substrat ausgeschlossen werden.



**Abbildung 31:** Umsatz des TMB durch das POD und die daraus resultierende Farbreaktion.

Ein Einfluss der Puffer-Zusammensetzung -insbesondere der Zusatz an Magnesiumionen - auf das Bindungs- und Nachweis-Verhalten wurde auch untersucht. Dabei wurde der Natrium-Phosphat-Puffer pH 7.0 ohne und mit Magnesiumion-Zusatz eingesetzt. Dazu wurden jeweils 10 mM Magnesiumchlorid und 10 mM Magnesiumsulfat zugesetzt. Tris-Puffer (100 mM) wurde ebenfalls getestet.



**Abbildung 32:** Auswirkung der Pufferzusammensetzung.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Proben sind bis auf die Tris-Puffer-Austestung nicht signifikant und liegen innerhalb der Fehlertoleranz. Daher wurde weiter mit der bereits vorher eingesetzten PBS-Lösung gearbeitet. Besonders im Hinblick darauf, dass

eine Konzentration von über 10 mM  $MgCl_2$  bereits selbst inhibierend auf die Komplexbildung wirkt.<sup>[96]</sup>

Anschließend wurde eine Titration der TAR-RNA gegen das Tat-Peptid im ELISA-Test durchgeführt. Erwartungsgemäß korreliert die Signalstärke mit der Konzentration und zeigt dabei die bei einer Titration erwartete Kurve an. Bei einer 1:1-Bindung des Tat-Peptids würde bei einer eingesetzten Konzentration von 50 nM Peptid erst bei mindestens 50 nM TAR-RNA-Konzentration der Sättigungsbereich erwartet werden. Daher wurde eine maximale Nachweisgrenze von 5 pmol (100  $\mu$ L der 50 nM-Peptid-Lösung) Substanz vermutet.

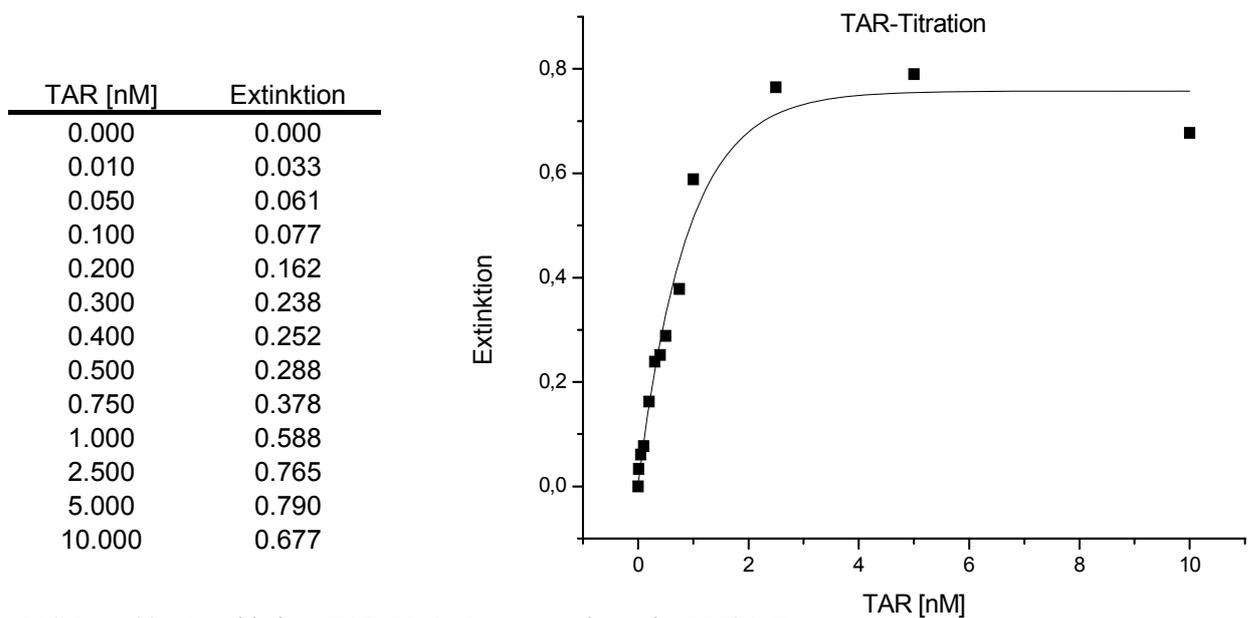


Abbildung 33: Verschiedene TAR-RNA –Konzentrationen im ELISA-Test.

In einem weiteren Experiment, in dem im Überschuss TAR-RNA titriert wurde, konnte die frühe Absättigung in dem ELISA-Test-System bestätigt werden.

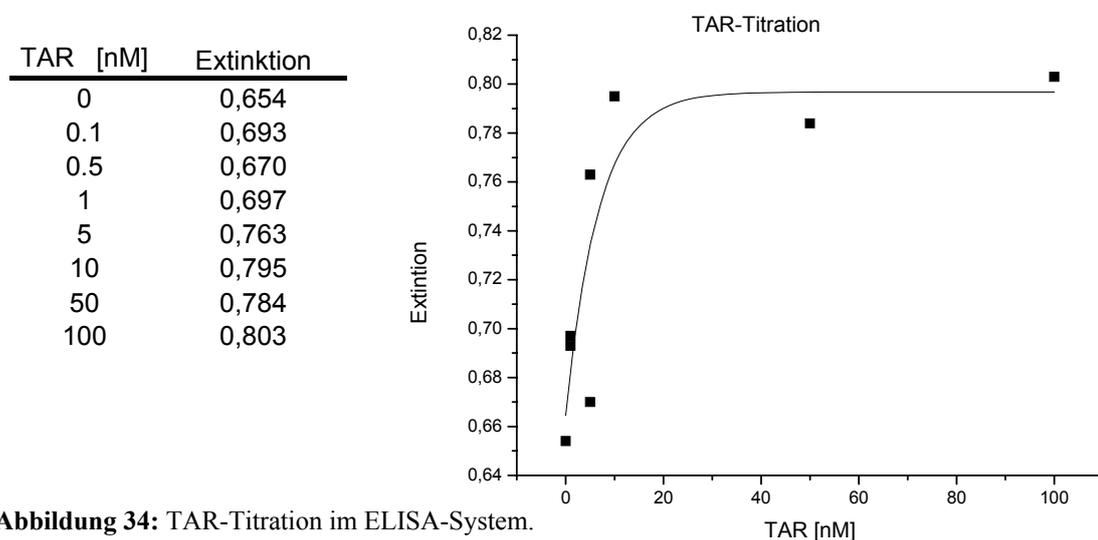
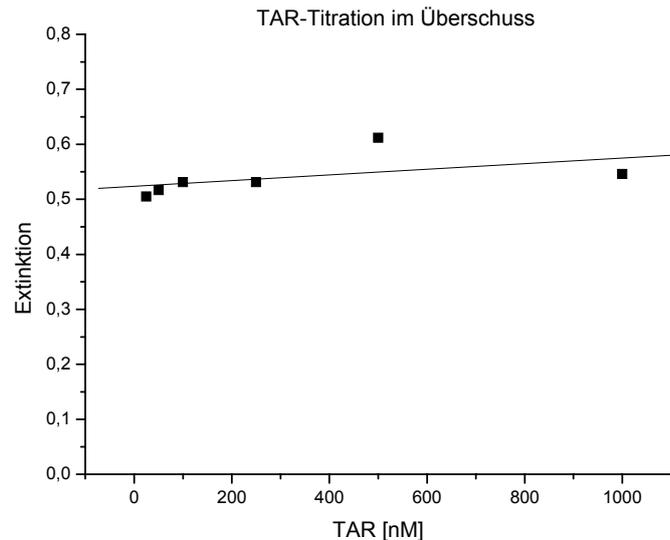


Abbildung 34: TAR-Titration im ELISA-System.

TAR [nM]	Extinktion
1000.00	0.546
500.00	0.612
250.00	0.531
100.00	0.531
50.00	0.517
25.00	0.505



**Abbildung 35:** Effekt der TAR-Zugabe im Überschuss im ELISA-System.

Daher wurde die Molarität der Beschichtung mit Streptavidin berechnet. Es wurde mit 100  $\mu\text{L}$  einer 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Streptavidin-Lösung beschichtet. Mit einem Molgewicht von 60.000 KDa ist das eine Molarität von 83  $\mu\text{M}$  oder eine Gesamtmenge von 8.3 nmol. Bei den Vortests konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Inkubation mit einer größeren Menge von Streptavidin keinen weiteren Effekt mehr zeigt und daher das Verhältnis von Streptavidin auf der Oberfläche zur Signalstärke seinen Sättigungspunkt aufweist. Daher ist das System zur Bestimmung der Dissoziationskonstante in einem sehr engen Rahmen geeignet. Aufgrund der Einfachheit und Schnelligkeit des ELISA-Systems ist es jedoch sehr wohl als Schnelltest zur Aussage geeignet, ob eine Bindung oder Inhibition prinzipiell stattfindet.

Die ersten Kompetitionsexperimente wurden mit dem in der Literatur beschriebenen Neomycin mit einer  $K_D$  von 1  $\mu\text{M}$ <sup>[93]</sup> durchgeführt. Die Methodik des Inhibitionsnachweises des TAR-Tat-Komplexes im ELISA-Test wurde nach dem unten beschriebenen Verfahren durchgeführt. Über Nacht wurde mit 100  $\mu\text{L}$  einer 5  $\mu\text{M}$  Streptavidin-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung wurde entfernt, und die einzelnen Probenvertiefungen wurden mit einer 1% igen BSA-Lösung in PBS für 45 min inkubiert. Vor Inkubation der Proben wurden die *wells* dreimal mit PBS gewaschen. In dieser Zeit wurden die Proben pipettiert. Es wurde eine 10-fach konzentrierte Stammlösung mit einer Konzentration an 5  $\mu\text{M}$  Tat-Peptid, 0.5  $\mu\text{M}$  TAR-RNA und 1.5 mU an anti-DIG-Antikörper mit Peroxidase in PBS pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 1.5 mL-Reaktionsgefäßen vorinkubiert. Diese Stammlösung wurde

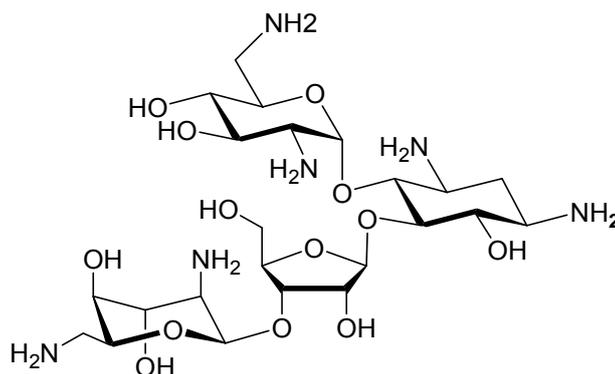
<sup>93</sup> C.Faber, H.Sticht, K.Schweimer, P.Rösch; *J.Biol.Chem.* **2000**, 27, 20660-20666.

1:10 mit den Inhibitoren und PBS verdünnt und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die *wells* wurden 6 Minuten mit den Proben gewaschen. Nach der Probeninkubation auf der Probenplatte wurden die Probenlösungen entfernt. Direkt im Anschluss wurde die Detektionslösung, welche TMB (3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidine) und Wasserstoffperoxid enthält, aufgetragen. Die anfänglich farblose Lösung verfärbte sich durch die Peroxidase nach blau. Diese Reaktion wurde durch 0.1 M Schwefelsäure gestoppt. Die Detektionslösung färbte sich dabei gelb. Detektiert wurde photometrisch bei 450 nm gegen 690 nm als Referenzwert.

Alle Werte wurden zweifach bestimmt, wobei die Differenzen der Messungen als Fehler und diese im Diagramm als Fehlertoleranz angegeben werden.

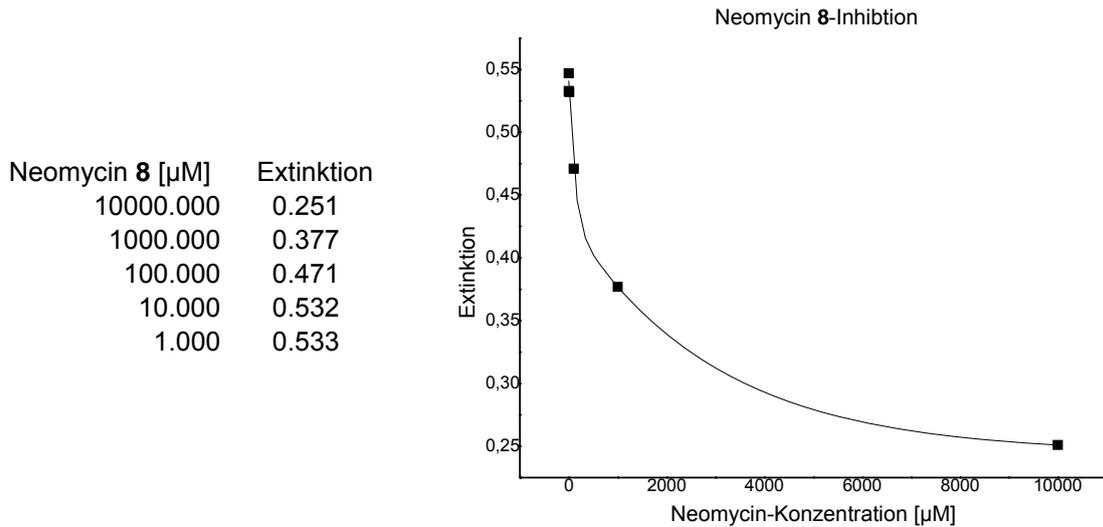
### 6.3.1.2 ELISA-Inhibitions-Experimente mit Referenz-Substanzen

#### Neomycin 8:



Neomycin **8** ist als Inhibitor sowohl für das Hairpin-Ribozym als auch für den TAR-Tat-Komplex in der Literatur beschrieben.<sup>[94,33,102]</sup> Da Fluoreszenz-Titrationsversuche mit Pyren-markierter TAR-RNA bekannt sind, in denen mit Neomycin **8** titriert wurde<sup>[103]</sup> und da es ebenfalls ein starker Inhibitor des Hairpin-Ribozym ist, macht es Neomycin **8** zu einer idealen Referenzprobe für andere, unbekannte Substanzen. Im ELISA-Test wurden verschiedene Neomycin **8**-Konzentrationen zu einer Konzentration von 500 nM Tat-Peptid und 50 nM TAR-RNA gegeben.

<sup>94</sup> B.Wu, J.Y.He, E.E.Swayze, *Org.Lett.* **2002**, 4(20), 3455-3458.

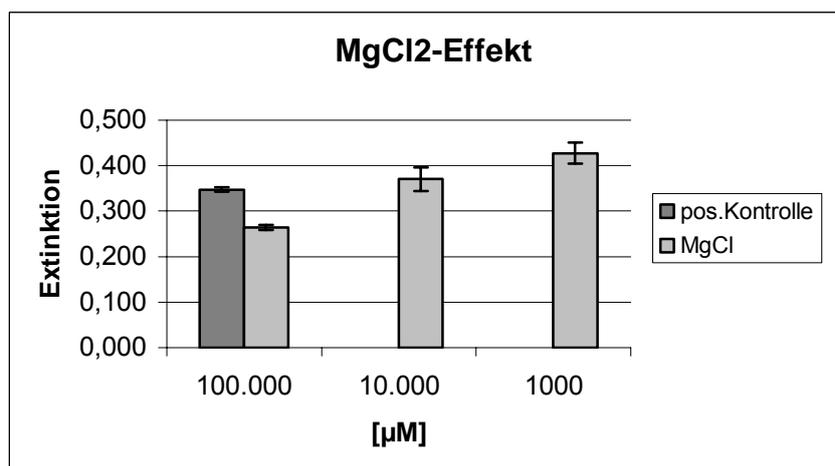


**Abbildung 36:** Auftragung der Extinktionen der ELISA-Versuche bei verschiedenen Neomycin 8-Konzentrationen.

Bei den ELISA-Vortests zeigte sich Neomycin 8 als starker Inhibitor, so wie es auch über andere Verfahren wie der NMR, literaturbeschrieben wurde.

### Magnesiumdichlorid:

Der Einfluss der Magnesiumionen wurde untersucht, um den Vergleich mit einem für DNA und RNA stabilisierenden Kation zu haben. Damit zeigt sich dann der Einfluss der Magnesiumionen auf den TAR-Tat-Komplex.



**Abbildung 37:** Effekt des Guanidins auf den Tat-TAR-Komplex

Der Magnesiumeffekt ist deutlich erkennbar, so dass sich bei einer Konzentration von 10 mM MgCl<sub>2</sub> der stabilisierende Effekt umkehrt und die Magnesiumionen selbst einen inhibierenden Effekt ausüben. Bei einer Konzentration geringer als 10 mM üben die Magnesium-Kationen einen positiven, stabilisierenden Effekt auf die Komplexbildung von

TAR und Tat aus. Diese Beobachtung deckt sich mit der Literatur, in der ebenfalls inhibitorische Effekte auf den TAR-Tat-Komplex durch Magnesium-Ionen ab einer Konzentration von 10 mM beschrieben sind.<sup>[96]</sup>

### Guanidin 12:

Da eine Vielzahl der Aminoglykoside durch Guanidierung modifiziert wurde, wurde freies Guanidin **12** im ELISA-Test untersucht, um den Effekt von freiem Guanidin **12** mit denen der modifizierten Aminoglykosiden zu vergleichen.

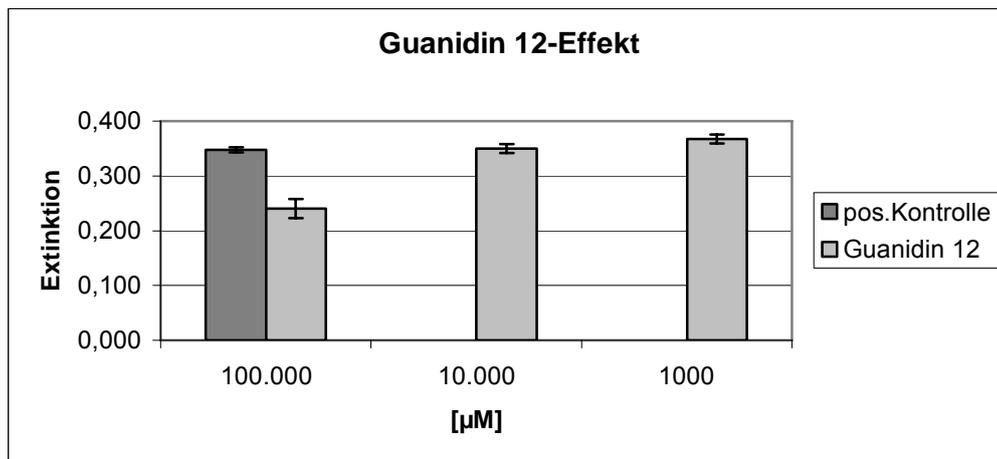


Abbildung 38: Effekt des Guanidins **12** auf den Tat-TAR-Komplex

Der Effekt beim Guanidin **12** ist leicht stärker als der beim Magnesium. Der größte Unterschied ist aber, dass das Guanidin **12** bei einer geringen Konzentration keinen stabilisierenden Einfluss auf den Komplex ausübt. Die Konzentration der Kationen beträgt in der PBS-Lösung 6.84 mM Na<sup>+</sup>-Ionen und 0.44 mM K<sup>+</sup>-Ionen.

## 6.3.1 Fluoreszenztitration

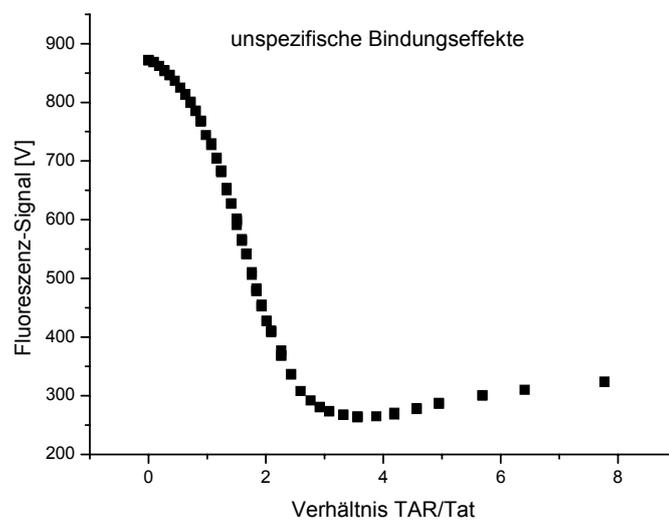
### 6.3.1.1 Fluoreszenzverhalten des F-Tat-Peptides

Vor den ersten Titrationsexperimenten wurde das Fluoreszenzverhalten des Tat-Peptides in der Lösung bestimmt. Dazu wurden sowohl eine Kinetik- als auch eine Bleichungsmessung durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass das Fluoreszenzsignal stetig abnimmt, weshalb eine Wechselwirkung des Peptids mit der Glasoberfläche vermutet wird. Postuliert wird eine Wechselwirkung der in Lösung potentiell geladenen Aminosäure-Kationen, die im Tat-Peptid vorhanden sind. Deshalb wurde die Glas-

oberfläche silanisiert. Der Effekt verschwand dadurch. Der Fluorophor zeigte auch nach 30 Minuten Dauerbestrahlung noch kein Ausbleichen („Bleaching-Effekt“).

### 6.3.1.2 Bestimmung der Bindungskonstanten des TAR-Tat Komplexes

Die Bindungskonstante für den Tat-TAR-Komplex wurde bestimmt, indem das Tat-Peptid in verschiedenen Konzentrationen vorgelegt und mit der TAR gegentitriert wurde. Unspezifische Bindungseffekte konnten bei der Zugabe der TAR-RNA registriert werden, wobei höhere Tat-Konzentrationen größere Effekte zeigten. Bei 50 nM Tat-Konzentration verschwindet der Effekt.

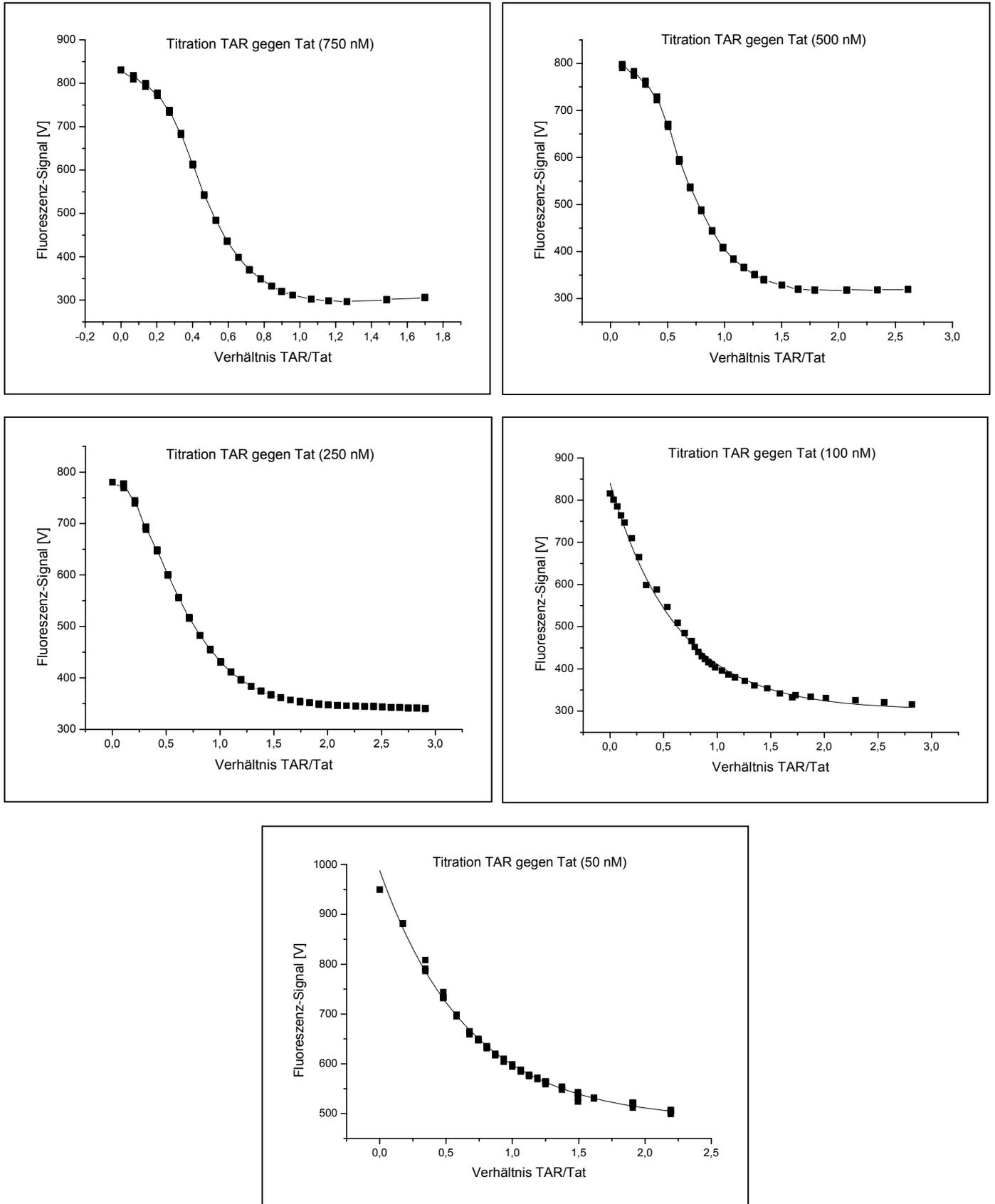


**Abbildung 39:** unspezifische Bindungseffekte am Anfang und Ende der TAR-Zugabe.

Diese unspezifischen Effekte konnten mit Tween20 bei geringen TAR-Konzentrationen ganz und bei der Zugabe von hohen TAR-Konzentrationen teilweise unterdrückt werden. Es wurden sowohl Titrationensreihen verschiedener Konzentrationen an Tat-Peptid und TAR-RNA mit und ohne Tween20 gemessen.

Tat-Konzentration	n	Fehlerfaktor	$K_{\text{Ass}}$	Fehler	$K_{\text{Diss}}$
50	0.79	1.0786	$9.95 \cdot 10^7$	1.3559	$1.00 \cdot 10^{-8}$
100	0.85	1.0384	$1.04 \cdot 10^8$	1.2187	$9.66 \cdot 10^{-9}$
250	1.05	1.0335	$9.69 \cdot 10^7$	1.2801	$1.03 \cdot 10^{-8}$
500	1.10	1.0909	$1.61 \cdot 10^8$	4.3101	$6.21 \cdot 10^{-9}$
750	0.71	1.0593	$9.50 \cdot 10^7$	2.2994	$1.05 \cdot 10^{-8}$
<b>Gesamt</b>	<b>0.91</b>	<b>1.21</b>	<b><math>7.68 \cdot 10^7</math></b>	<b>3.7868</b>	<b><math>1.30 \cdot 10^{-8}</math></b>

**Tabelle 7:** Berechnete Werte n (Bindungsplätze),  $K_{\text{Ass}}$  und  $K_{\text{Diss}}$  über BPC-Fit mit Tween20.



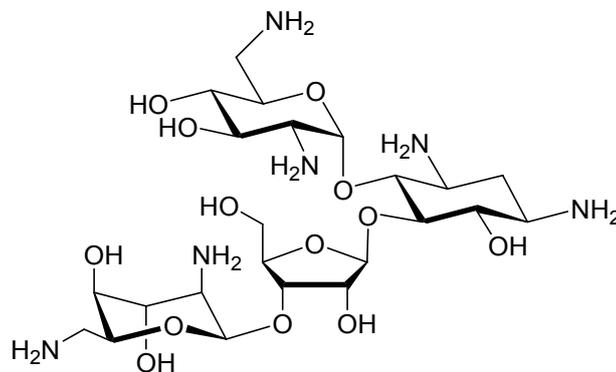
**Abbildung 40:** Titrations TAR-RNA gegen verschiedene Tat-Konzentrationen mit Tween20-Zusatz. Die Messdaten für die Titrations ohne Tween20-Zusatz wurden ebenfalls ausgewertet. Es wurden dafür  $n=1.08$  (Fehler: 1.17) und eine  $K_{Ass}=4.17 \cdot 10^8$  ( $K_{Diss}=2.4 \cdot 10^{-9}$ ) erhalten.

### 6.3.1.3 Inhibitionsexperimente mit Referenz-Substanzen

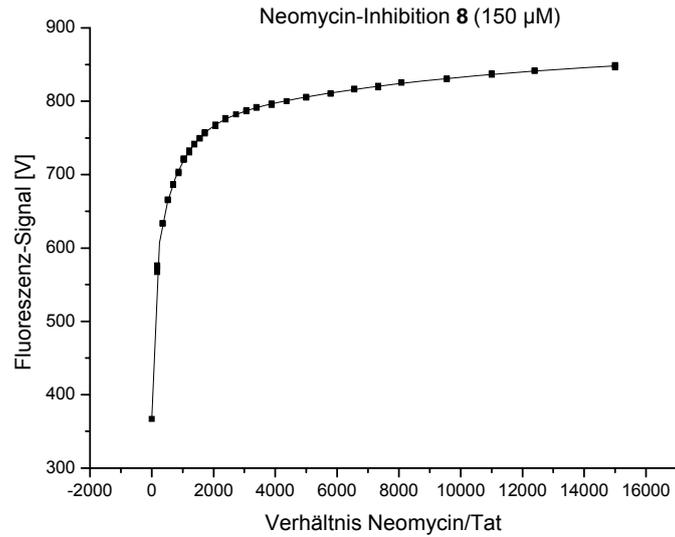
Für die Auswertung späterer Kompetitions-Experimente wurden die erhaltenen Ergebnisse der Experimente mit Tween20-Zusatz genommen. Die dabei erhaltene, über BPC-Fit berechnete Dissoziationskonstante betrug 13.02 nM. In diesen Inhibitions-Experimenten wurde eine Tat-Konzentration von 100 nM und eine TAR-Konzentration von 200 nM vorgelegt und mit definierten Mengen des Inhibitors gegentitriert. Bei diesen Konzentrationen in der Titrationsvorlage sind 89.5 % des Peptids an TAR-RNA gebunden. Alle Messungen wurden bei 20°C durchgeführt

Zur Testung des Titrations-Systems wurde Neomycin **8** als bekannter Inhibitor mit einer  $K_D$  von 1  $\mu\text{M}$  beschrieben<sup>[94,102]</sup>. Weiter wurde der Effekt von  $\text{MgCl}_2$  und Guanidin überprüft, um Rückschlüsse auf die Inhibition aufgrund der veränderten Ionenstärke ziehen zu können.

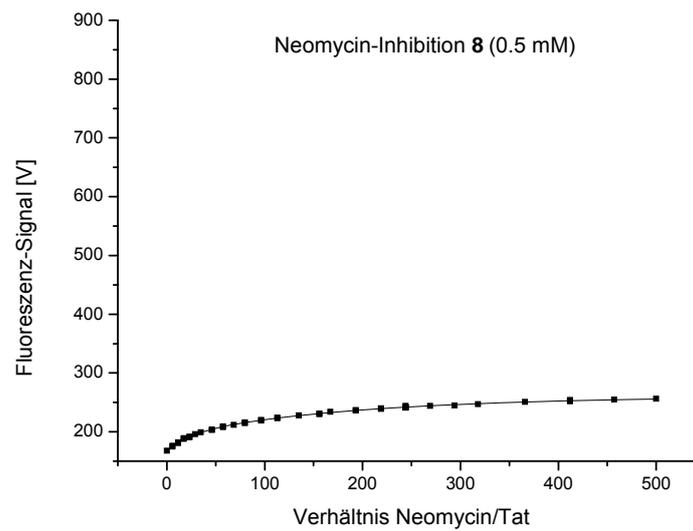
#### **Neomycin 8:**



Fluoreszenz-Titrationsversuche mit Pyren-markierter TAR-RNA sind bekannt<sup>[103]</sup>. Die ersten Inhibitions-Versuche wurden erst mit dem Neomycin **8** untersucht und bereits im ELISA-System gemessen. Neomycin **8** ist als bekannter Inhibitor der TAR-Tat-Wechselwirkung mit einer  $K_D$  von 1  $\mu\text{M}$  beschrieben<sup>[94,33,102]</sup> und eignet sich daher als Referenz-Substanz. Auch im ELISA-Test zeigte es sich als starker Inhibitor. In der Fluoreszenz-Titration mit Neomycin **8** wurden zwei Messungen mit unterschiedlichen Neomycin **8**-Konzentrationen durchgeführt. Dabei wurde die bereits bestimmte Dissoziationskonstante des Tat-Peptids zur TAR-RNA in die Berechnung eingefügt und mit dem Programm BPC-Fit ausgewertet.



**Abbildung 41:** Auftragung der Fluoreszenz-Intensität gegen das Verhältnis von Neomycin 8 zum Tat-Peptid bis zur maximalen Neomycin-Konzentration von 150 µM.



**Abbildung 42:** Auftragung der Fluoreszenz-Intensität gegen das Verhältnis von Neomycin 8 zum Tat-Peptid bis maximaler Neomycin 8-Konzentration von 50 µM.

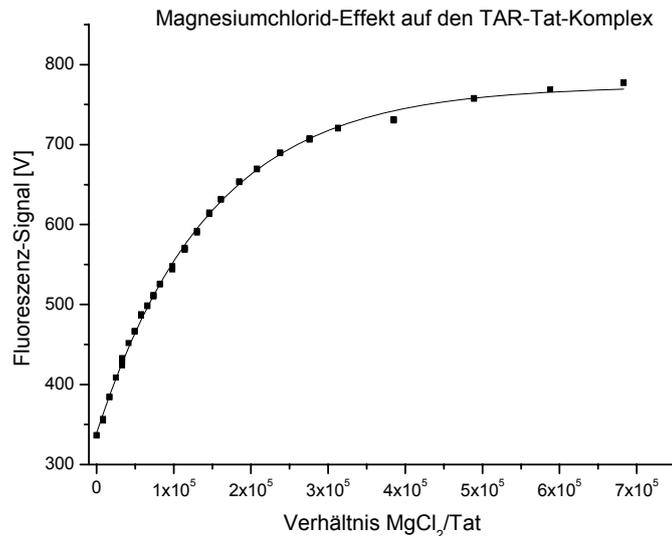
Konzentration [µM]	$K_{Ass}$	$K_{Diss}$	Fehler
150	$4.50 \cdot 10^5$	$2.22 \cdot 10^{-6}$	1.15
50	$1.26 \cdot 10^6$	$0.79 \cdot 10^{-6}$	1.05
Gesamt	$8.55 \cdot 10^5$	$1.17 \cdot 10^{-6}$	2.39

**Tabelle 8:** Berechnung der  $K_{ass}$  und  $K_{Diss}$  über BPC-Fit.

**Magnesiumchlorid:**

Magnesiumdichlorid wurde ausgetestet, um den Vergleich mit einem für DNA und RNA bekannten und stabilisierenden Kationen zu erhalten. Damit zeigt sich dann der Einfluss der Ionenstärke auf den TAR-Tat-Komplex.

Der ELISA-Test zeigte Inhibitionseffekte bei einer Konzentration von 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , so dass der stabilisierende Effekt des Magnesiumchlorids sich umkehrt.



**Abbildung 43:** Gemessener Effekt der Wechselwirkung zwischen Magnesiumchlorid mit einer maximalen Konzentration von 71 mM auf den TAR-Tat-Komplex.

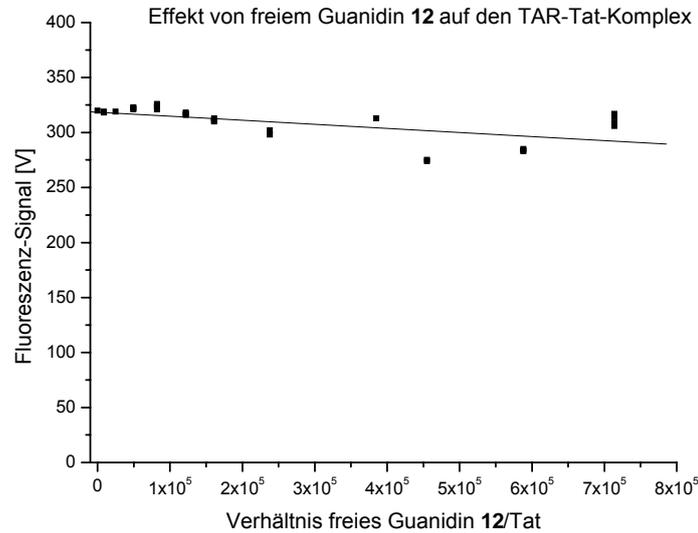
Der berechnete Effekt von Magnesiumchlorid zeigt eine Dissoziationskonstante von 1.2 mM (Fehlerfaktor 1.09). Die Bildung des Komplexes von TAR und Tat ist stark abhängig von der Gesamt-Ionenstärke. Laut Literatur gibt es keine Relevanz, ob es sich um mono- oder divalente Ionen handelt.<sup>[95]</sup> Daher ist die Konzentration von bereits vorhandenen Natrium- und Kalium-Ionen zu berücksichtigen.<sup>[95]</sup> Durch den PBS-Puffer ist die Gesamtkationenkonzentration  $0.15 \text{ M (Na}^+) + 0.0044 \text{ M (K}^+) = 0.1544 \text{ M}$ . Dieser Wert stimmt gut mit den Literaturwerten überein, in denen bei adäquaten Konzentrationen an Magnesium-Ionen eingesetzt wurden und inhibitorischen Effekt auf das Bindungsverhalten von Tat und TAR zeigten.<sup>[96]</sup>

<sup>95</sup> G.Bokinsky, D.Rueda, V.K.Misra, M.M.Rhodes, A.Gordus, H.P.Babcock, N.G.Walter, X.Zhuang, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **2003**, *100*, 9302-9307.

<sup>96</sup> F.Darfeuille, A.Arzumanov, S.Gryaznov, M.J.Gait, C.Di Primo, J.-J. Toulme, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **2002**, *99*, 9709-9714.

**Guanidin 12:**

Da eine Vielzahl der modifizierten Aminoglykoside guanidiert wurden, wurde auch freies Guanidin **12** eingesetzt, um den Effekt von freiem Guanidin **12** mit denen der modifizierten Aminoglykosiden zu vergleichen und den Effekt der Kationenstärke zu berücksichtigen.



**Abbildung 44:** Messung des Effektes von freiem Guanidin **12** auf den TAR-Tat-Komplex bei einer maximalen Konzentration von 70 mM Guanidin **12**.

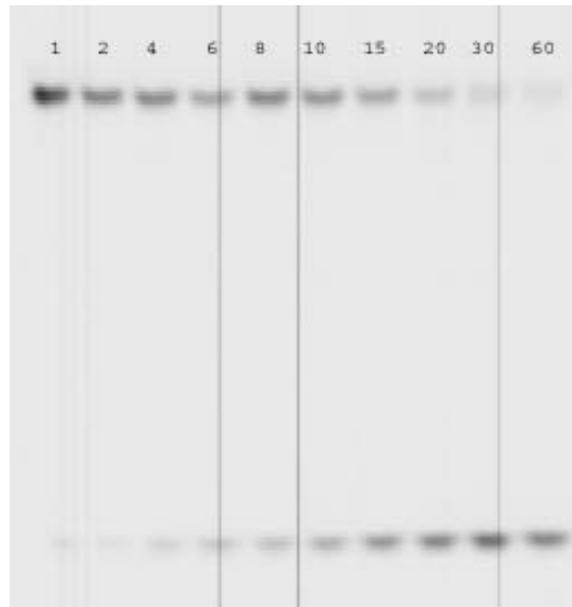
Freies Guanidin **12** hatte keinen Effekt auf die Bindung des Tat-Peptids an die TAR-RNA in der Fluoreszenz-Titration. Allerdings zeigten größere Konzentrationen dieses Moleküls einen Quenching-Effekt.

**6.3.1.4 Die Spaltaktivität des Hairpin-Ribozyms (Kontrollwerte)**

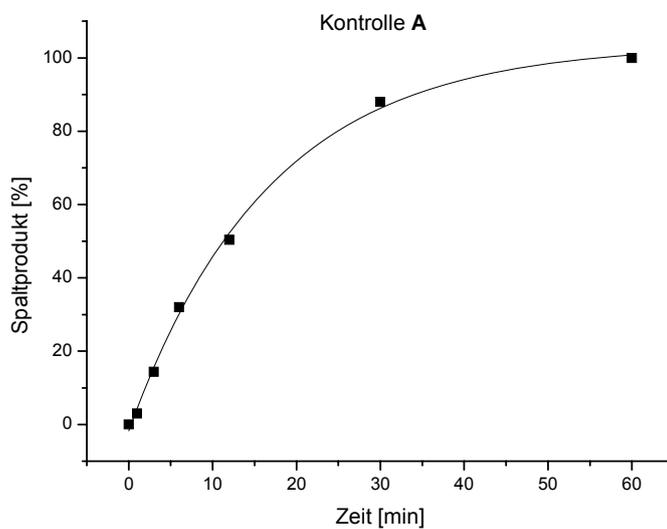
Es wurden mehrere Kontroll-Spaltungsreaktionen durchgeführt, um die Spaltaktivität des Hairpin-Ribozyms am Substrat zu bestimmen. Es sind zwei Repräsentative aufgezeigt. Diese und die anderen Kontroll-Spaltreaktionen zeigen eine Spaltrate des Substrates von 1.0 bis 0.87 min<sup>-1</sup> und werden als 100 %-ige Aktivität des Hairpin-Ribozyms gesetzt. Der Effekt von freiem Guanidin auf die Aktivität des Hairpin-Ribozyms wurde ebenfalls bestimmt. Es reduziert die Umsatzgeschwindigkeit auf 0.5 min<sup>-1</sup> bei einer Konzentration von 1 mM.

Kontroll-Reaktion A

:



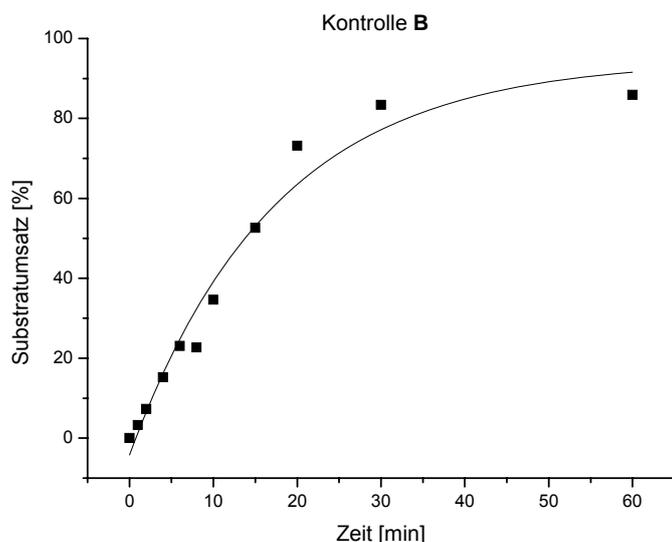
**Abbildung 45:** Probenauftragung des Substratumsatzes nach verschiedenen Zeit (1 bis 60 Minuten).



Zeit	Substrat [%]	Spaltprodukt [%]
0	100	0
1	96.7	3.3
2	92.7	7.3
4	84.8	15.2
6	76.9	23.1
8	77.3	22.7
10	65.4	34.6
15	47.4	52.6
20	26.8	73.2
30	16.6	83.4
$K_{obs} [min^{-1}]$		
		1.00

**Tabelle 9:** Substratspaltung des Hairpin-Ribozyms in der Kontroll-Reaktion A.

**Abbildung 46:** Auftragung des Substratumsatzes nach der Zeit für Kontrolle A.

Kontroll-Reaktion B:

Zeit	Substrat [%]	Spaltprodukt [%]
0	100	0.0
1	97.0	3.0
3	85.6	14.4
6	68.0	32.0
12	49.6	50.4
30	12.0	88.0
60	0.0	100.0
$K_{obs} [min^{-1}]$		
0.867		

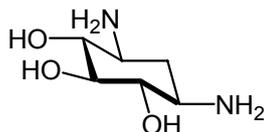
**Tabelle 10:** Substratspaltung des Hairpin-Ribozyms in der Kontroll-Reaktion B.

**Abbildung 47:** Auftragung des Substratumsatzes nach der Zeit der Kontrolle B.

#### 6.4 Inhibitions- und Spaltungs-Experimente natürlicher und artifizierlicher Substanzen an RNA

Im Folgenden werden verschiedene Substanzen auf ihre Interaktion mit RNA untersucht. Dazu wurde die Wirkung der Substanzen auf den Komplex von TAR-RNA und Tat-Peptid im ELISA-Test und in der Fluoreszenz-Titration untersucht. Auch wurde die Inhibition der verschiedenen Substanzen auf die Spaltaktivität des Hairpin-Ribozym, welches ein 14 Nukleotid langes Substrat in ein 9- und 5-Nukleotid langes Fragment spaltet, untersucht. Auch die Spaltaktivität der Substanzen selbst auf das Substrat wurde untersucht. Diese Spaltaktivität ist bisher für das Spermidin **26** Neomycin B **8**, Neamin **2**, Kanamycin **4**, Amikacin **1** und Sisomycin bei je einer Konzentration von 10 mM literaturbeschrieben.<sup>[97]</sup>

##### Inhibitions-Experimente mit Cyclitol 3 (2-DOS):

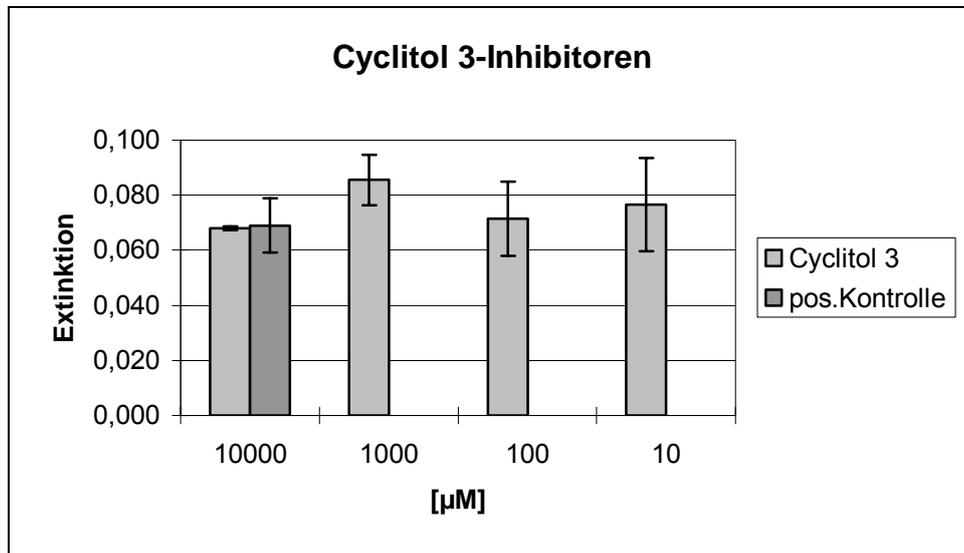


Die Mehrzahl der Aminoglykoside ist mit dem 2-Desoxystreptamin (2-DOS) -oder auch Cyclitol **3** genannt-, welcher Teil des Neamingrundgerüsts ist, substituiert.<sup>[98, 116]</sup> Cyclitol

<sup>97</sup> D.J.Earnshaw, M.J.Gait; *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 5551-5561.

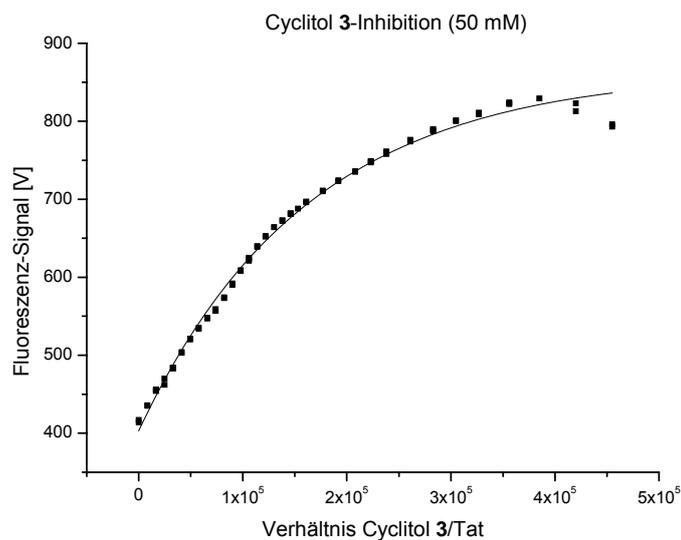
<sup>98</sup> S.H.L.Verhelst, P.J.A.Michiels, G.A.van der Marel, C.A.A.van Boeckel, J.H.van Boom; *ChemBioChem* **2004**, 5, 937-942.

**3** ist selbst an der selektiven Bindung an der TAR-RNA beteiligt.<sup>[99]</sup> Der Einfluss des Cyclitols **3** auf den Komplex von TAR-RNA und Tat-Peptid wurde im ELISA-Test untersucht.



**Abbildung 48:** Effekt von Cyclitol **3** verschiedener Konzentrationen auf die Tat-TAR-Bindung im ELISA-Test.

Im ELISA-System konnte keine Inhibition des Tat-Peptides durch das Cyclitol **3** nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wird in der Fluoreszenztitration überprüft, indem die Fluoreszenzintensität des Rhodaminegrün-markierten Tat-Peptids bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt wird.



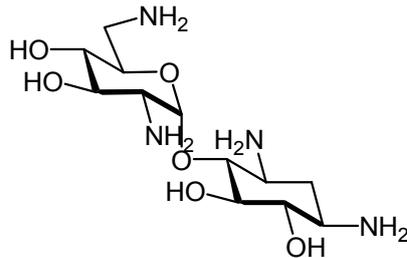
**Abbildung 49:** Effekt von Cyclitol **3** auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 50 mM.

<sup>99</sup> D.Fourmy, M.I.Recht, J.D.Puglisi; *J.Mol.Biol.* **1998**, 277, 347-362.

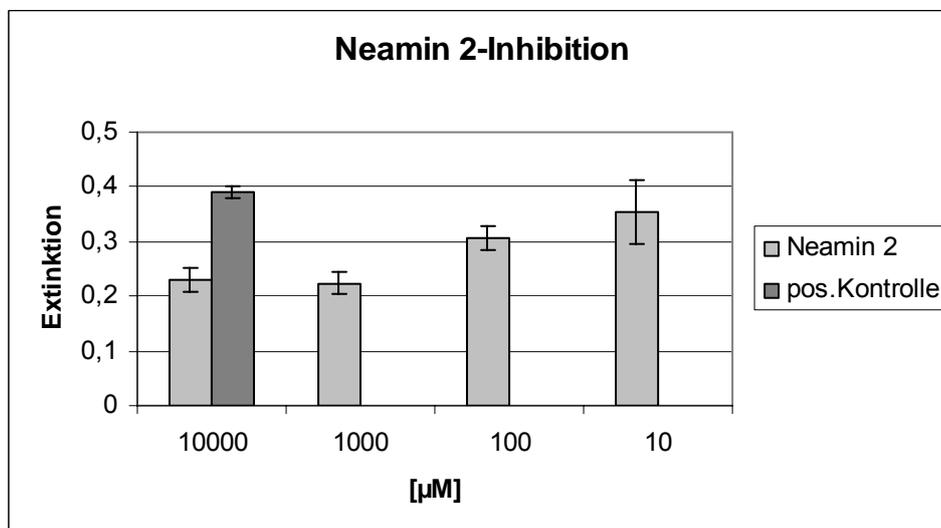
Im Titrations-Inhibitions-Experiment konnte ein inhibierender Effekt des Cyclitols **3** auf den Tat-TAR-Komplex gemessen werden. Die Dissoziationskonstante von  $2.23 \cdot 10^{-3}$  M wurde aus diesem Experiment mit dem Programm BPC-Fit bestimmt.

In einem Spalttest, in dem das Substrat des Hairpin-Ribozym umgesetzt wird, zeigte das Cyclitol **3** keinen Effekt.

### Inhibitionsexperimente mit Neamin **2**:



Neamin **2** besitzt das Cyclitolgrundgerüst und ist selbst Grundgerüst der meisten Aminoglykoside wie die des Neomycins **8**, Kanamycins **4**, Ribostamycins **6** und Gentamycins.<sup>[116]</sup> Da Neamin **2** als Grundgerüst für die beschriebenen Aminoglykoside dient, wurde der Effekt auf den TAR-Tat-Komplex im ELISA-Test untersucht.

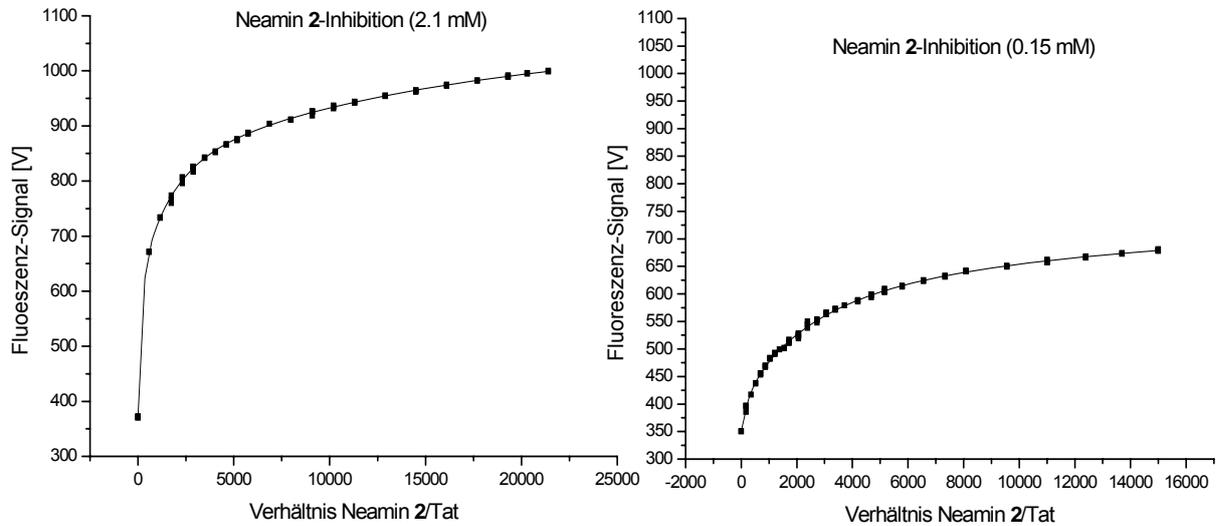


**Abbildung 50:** Effekt von Neamin **2** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

Durch Auftragung der Extinktionswerte der verschiedenen Neamin **2**-Konzentrationen im ELISA-Test gegen die Positiv-Kontrolle zeigte sich der inhibitorische Effekt auf den TAR-Tat-Komplex.

Die Daten aus dem ELISA-Test werden im Folgenden durch die Fluoreszenz-Titrationsmessungen überprüft. Dabei wird die Änderung der Fluoreszenzintensität des mit

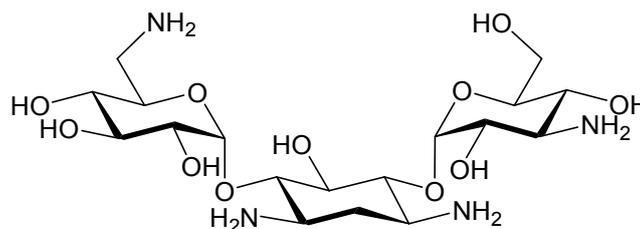
Rhodaminegrün-markierten Tat-Peptids bei verschiedenen Neamin 2-Konzentrationen verfolgt.



**Abbildung 51:** Effekt von Neamin 2 auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 2.1 und 0.15 mM

Durch Auswertung der Fluoreszenzveränderung mit dem Programm BPC-Fit zeigte sich eine Dissoziationskonstante von 38.5  $\mu\text{M}$ , die mit einem Fehlerfaktor von 2.8 behaftet ist. Sowohl der ELISA-Test, als auch die Fluoreszenz-Titration zeigten beide einen deutlichen inhibitorischen Effekt des Neamins 2 auf den TAR-Tat-Komplex.

#### Inhibitions-Experimente mit Kanamycin A 4:



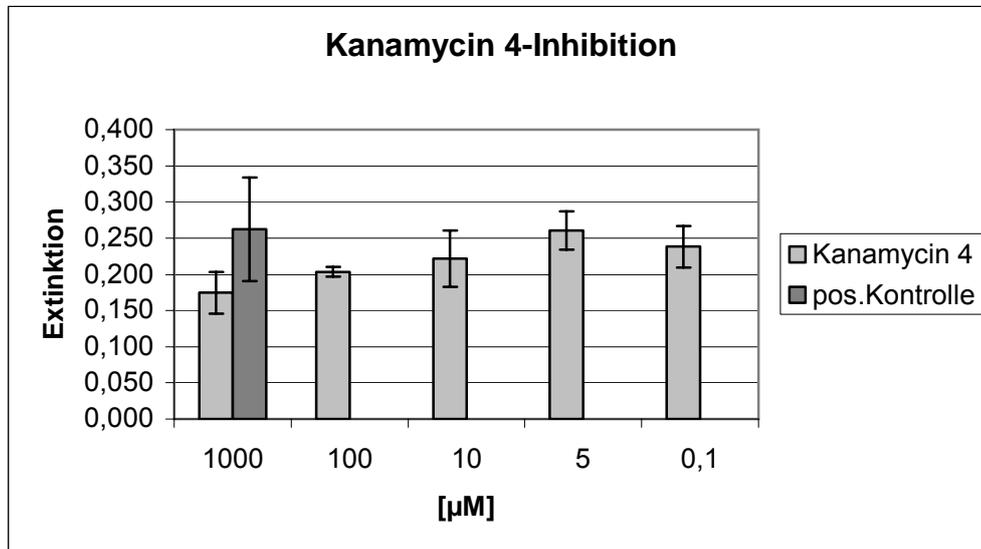
Kanamycin A 4 gehört zu der Kanamycin-Gentamycin-Gruppe, wie auch Gentamycin, Tobramycin, Netilmycin, Geneticin 5 und Amikacin 1.<sup>[100]</sup> Kanamycin A und B unterscheiden sich durch eine Aminogruppe in 2-Position. Kanamycin A 4 besitzt anstelle der Aminogruppe eine Hydroxygruppe. Kanamycin 4 ist als Inhibitor des TAR-Tat-Systems<sup>[101,102]</sup> und der Proteinbiosynthese bekannt, da es die 16-S-RNA bindet.<sup>[104]</sup> Kanamycin B besitzt laut Literatur eine Dissoziationskonstante von 45  $\mu\text{M}$  für die TAR-

<sup>100</sup> Medicine-Wold; <http://m-ww.de/pharmakologie/arzneimittel/antiinfektiva/antibiotika/aminoglykoside>

<sup>101</sup> Synthesis and anti-HIV activity of guanidinoglycosides; T.J.Baker, N.W.Luedtke, Y.Tor, M.Goodman, *J.Org Chem.* **2000**; 65; S.9054-9058.

<sup>102</sup> Aminoglycoside-RNA-Interactions; F.Walter, Q.Vicens, E.Westhof, *Biopolymers* **1999**, S. 694-704.

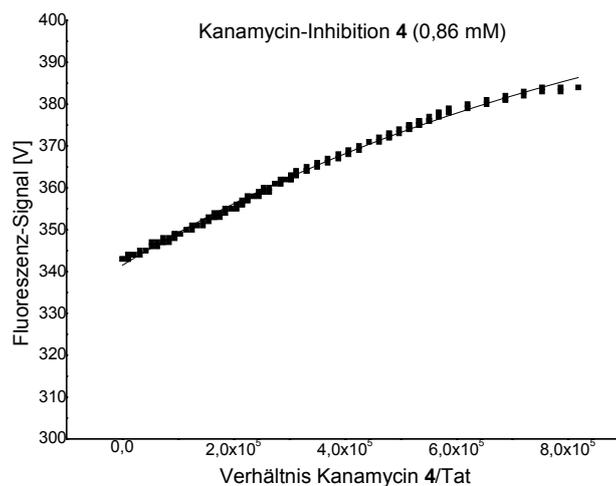
RNA<sup>[103]</sup>. Kanamycin A **4** hemmt das Hairpin-Ribozym mit einer Dissoziations-Konstante ( $K_D$ ) von  $400 \mu\text{M}$ <sup>[102,97]</sup>. Der Effekt des Kanamycin A **4** auf die Inhibition des Tat-Peptids mit der TAR-RNA wurde im ELISA-Test untersucht.



**Abbildung 52:** Effekt von Kanamycin **4** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

Kanamycin zeigte nach Auftragung der erhaltenen Extinktionswerte gegen die Positivkontrolle im ELISA-Test einen schwachen, inhibitorischen Effekt. Diese gemessenen Effekte lagen im Fehlertoleranzbereich dieses ELISA-Versuches.

Dieser schwach inhibitorische Effekt, der durch den ELISA-Test ermittelt wurde, wurde in der Fluoreszenz-Titration überprüft. Der Effekt wurde durch die Änderung der Fluoreszenzintensität des Fluorophors am ELISA-Test bestimmt.



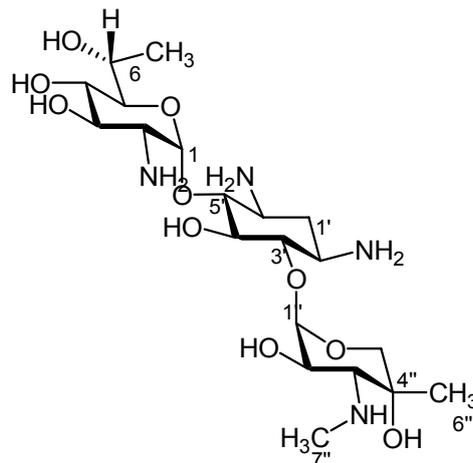
**Abbildung 53:** Effekt von Kanamycin **4** auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 86 mM.

<sup>103</sup> K.F.Blount, Y.Tor; *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 19, 5490-5500.

Die Auswertung der durch die Fluoreszenz-Titration erhaltenen Ergebnisse mit dem Programm BPC-Fit zeigte eine Dissoziationskonstante ( $K_{\text{Diss}}$ ) von 9.1 mM und bestätigt damit das Ergebnis, welches im ELISA-Test erhalten wurde.

In einem Spalttest, in dem das Substrat des Hairpin-Ribozym umgesetzt wird, zeigte das Kanamycin A **4** keinen Effekt.

### Inhibitions-Experimente mit Geneticin 5:



Geneticin **5** gehört ebenfalls zur Klasse der Aminoglykoside mit der Unterklasse der Gentamicine. Diese besitzen nicht das Neamin **2** als Grundgerüst. Geneticin **5** bindet an die 16S-RNA und blockiert die Proteinbiosynthese.<sup>[104]</sup> Am Hairpin-Ribozym bindet es mit einer  $K_D$  von 3 mM und hemmt dadurch die Aktivität<sup>[102]</sup>. Im ELISA-Test wurde ebenfalls die Wirkung des Geneticins **5** auf RNA studiert, indem die Wirkung auf den Komplex des Tat-TAR-Peptides untersucht wurde.

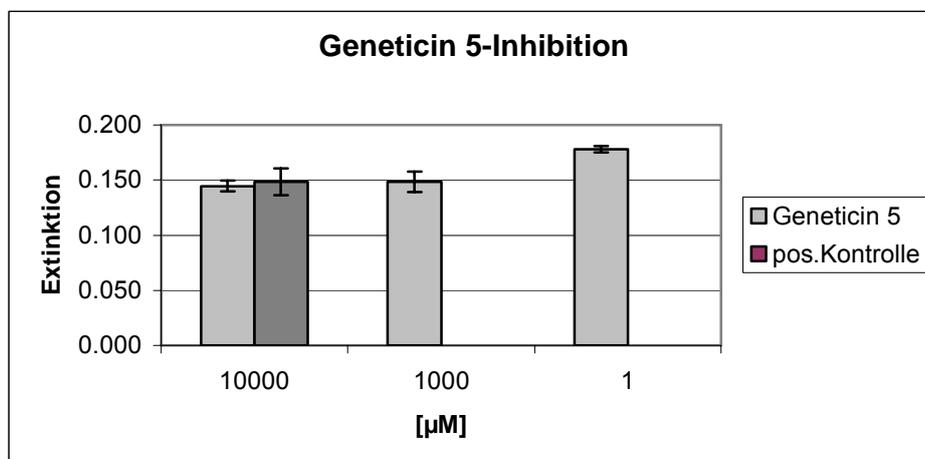
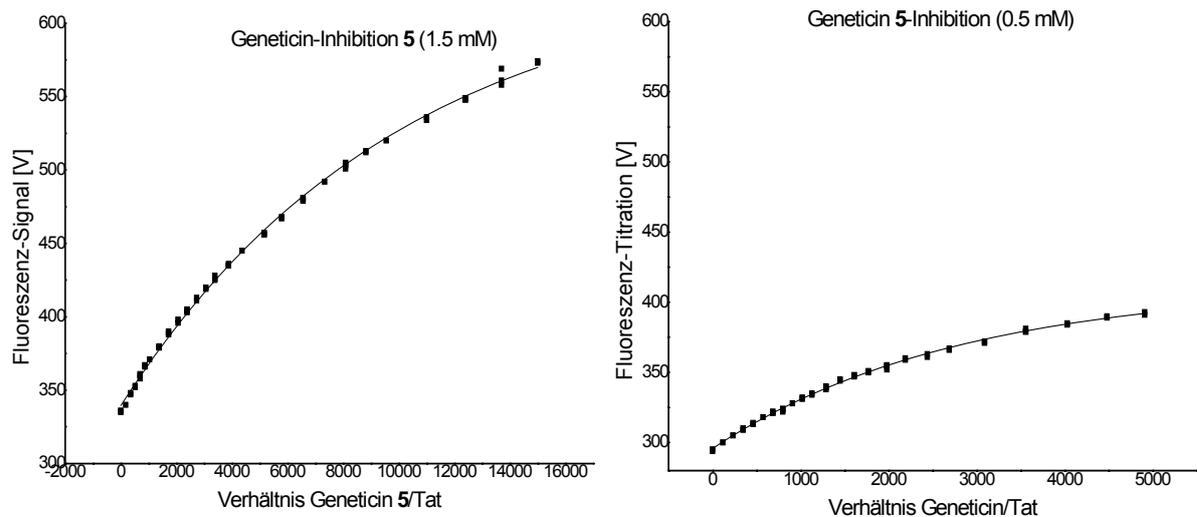


Abbildung 54: Effekt von Geneticin **5** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

<sup>104</sup> E.A.De Stasio, D.Moazed, H.F.Noller, A.E.Dahlberg; *The EMBO Journal* **1989**, 4, 1213-1216.

Durch Auftragung der im ELISA-Test erhaltenen Werte gegen die Positiv-Kontrolle konnte kein inhibitorischer Effekt auf den TAR-Tat-Komplex festgestellt werden. Die Werte lassen zwar aufgrund der tendenziellen Abnahme des Extinktionswertes einen leichten Wettbewerbseffekt vermuten, allerdings liegen diese Werte innerhalb der Fehlertoleranzen.

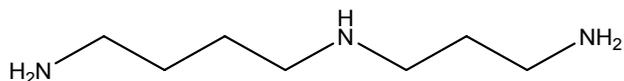
Zur Überprüfung der im ELISA-Test erhaltenen Daten, wurde der Effekt des Geneticins **5** auf die Wechselwirkung von Tat-Peptid und TAR-RNA in der Fluoreszenz-Titration untersucht.



**Abbildung 55:** Effekt von Geneticin **5** auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 1.5 mM und 0.5 mM.

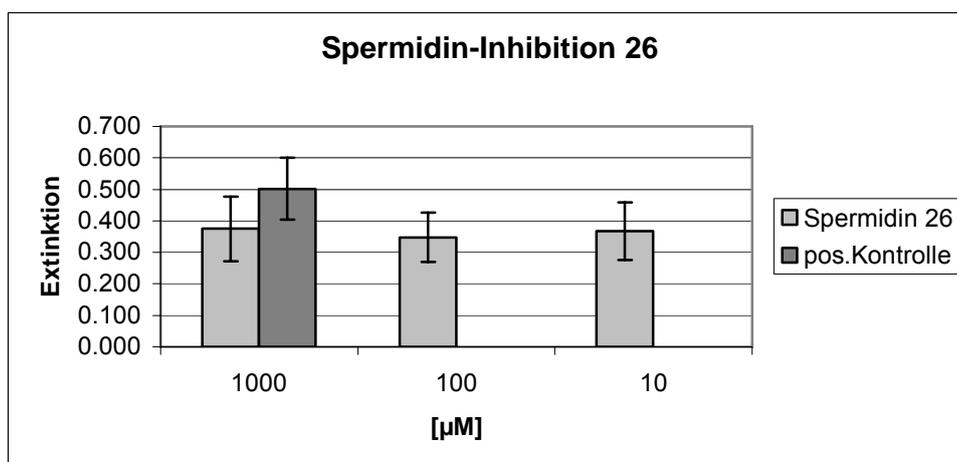
Durch die mit dem Programm BPC-Fit ausgewerteten Daten der Fluoreszenz-Titration konnte eine Dissoziationskonstante ( $K_{\text{Diss}}$ ) des Geneticins **5**-TAR-Komplexes von 225.8  $\mu\text{M}$  mit einem Fehlerfaktor von 1.3 berechnet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Geneticin **5** ein schwacher Inhibitor des TAR-Tat-Komplexes ist.

In Spalttests, in dem das Substrat des Hairpin-Ribozyms umgesetzt wird, zeigte das Geneticin **5** keinen Effekt.

**Inhibitions-Experimente mit Spermidin 26:**

Spermidin **26** ist eine körpereigene Substanz, welche insbesondere bei Zellteilungen vorhanden ist und dabei eine stabilisierende Rolle auf die DNA ausübt. Die Assoziationskonstante für Spermidin an DNA ist  $6 \cdot 10^6$  in 1 mM NaCl-Lösung<sup>[105]</sup>. Auf das Hairpin-Ribozym hat das Spermidin **26** ebenfalls eine stabilisierende Wirkung<sup>[106]</sup>. In Abwesenheit von Magnesium-Ionen ist das Spermidin **26** allein dazu befähigt, das Hairpin-Ribozym zu stabilisieren und somit das Substrat zwar mit reduzierter Geschwindigkeit, aber ohne Schnittpunktverschiebung zu spalten.<sup>[97]</sup>

Daher wird der Effekt des Spermidins **26** auf die Wechselwirkung des Tat-TAR-Komplexes im ELISA-Test untersucht.



**Abbildung 56:** Effekt von Spermidin **26** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

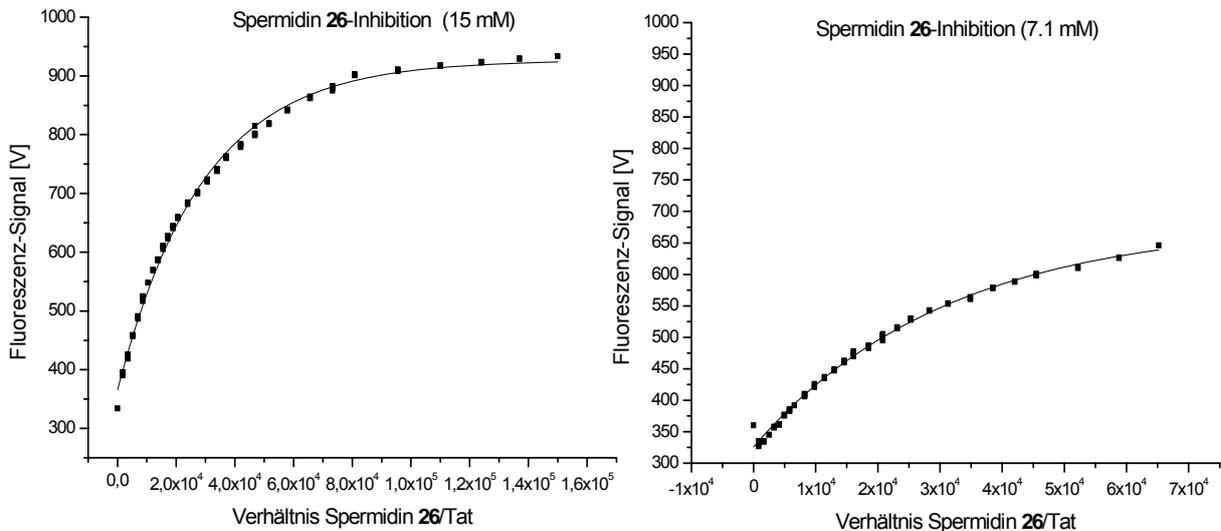
Durch den Vergleich der im ELISA-Test erhaltenen Werte mit der Positiv-Kontrolle konnte bei der Bindung des Tat-Peptides an die TAR-RNA bis zu einer Konzentration von 1mM kein Komplex-störendem Effekt nachgewiesen werden. Alle Werte liegen innerhalb der Fehlertoleranzbereiche.

Die Wechselwirkung zwischen Spermidin **26**, TAR-RNA und Tat-Peptid wurde in der Fluoreszenz-Titration untersucht. Dabei wurde die Änderung der Fluoreszenz-Intensität

<sup>105</sup> R.L.Rubin, *J. Bacteriol.* **1977**, Vol. 129, No. 2, 916-925.

<sup>106</sup> Diplomarbeit von Valeska Dombos an der Humbolt-Universität **2003** in Berlin.

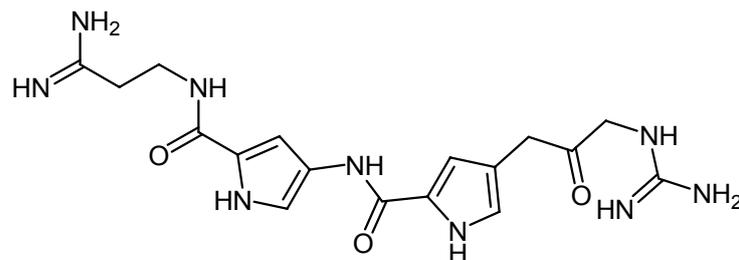
des Rhodaminegrün-markierten Tat-Peptides bei verschiedenen Spermidin **26**-Konzentrationen untersucht.



**Abbildung 57:** Effekt von Spermidin **26** auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 15 mM und 7.1 mM.

Die Daten aus der Fluoreszenz-Titration wurden mit dem Programm BPC-Fit ausgewertet und ergaben eine Dissoziations-Konstante von  $530 \mu\text{M}$  mit einem Fehlerfaktor von 1.55. Bei sehr geringen Spermidin **26**-Konzentrationen konnte eine Fluoreszenzquenchung bemerkt werden (Abbildung 55, rechts).

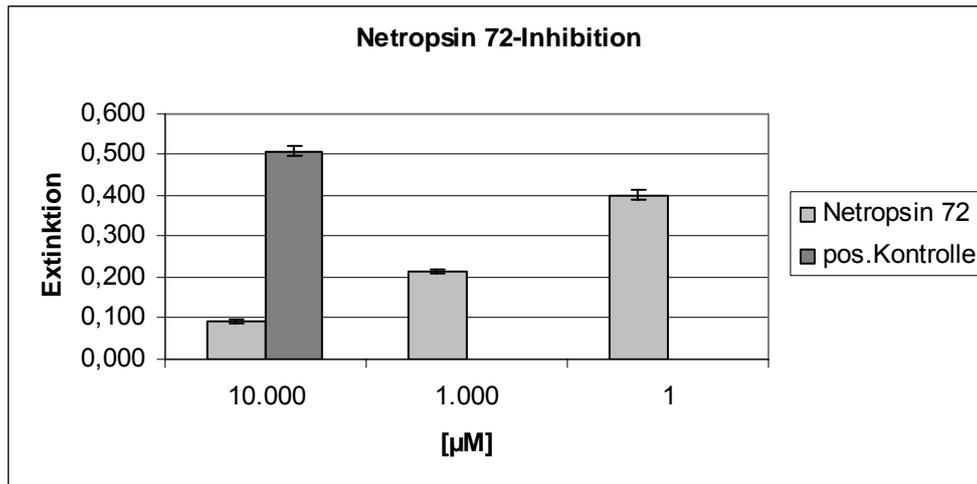
### Inhibitions-Experimente mit Netropsin **72**:



Netropsin **72** ist ein DNA-bindendes Molekül, das DNA-haltige Viren in ihrem Replikationszyklus hemmt, indem es durch die Bindung an die DNA die Helikase in ihrer Aufgabe hemmt.<sup>[107]</sup> Netropsin **72** bindet an die kleine Furche<sup>[108]</sup> und wurde daher auf die Wechselwirkung des TAR-Tat-Komplexes im ELISA-Test untersucht.

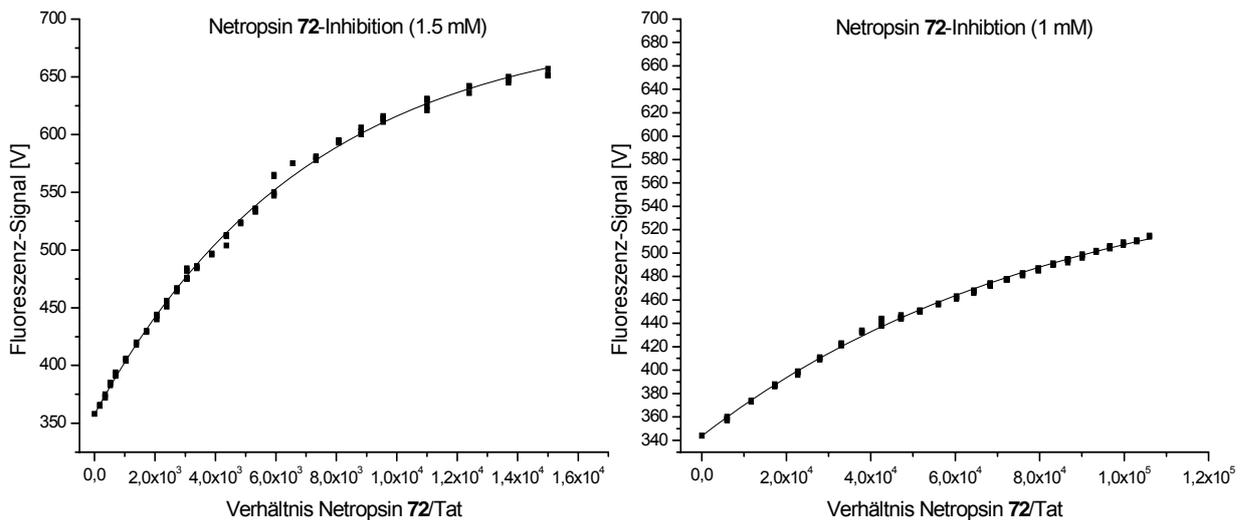
<sup>107</sup> G.Snounou, A.D.Malcolm, *J. Mol. Biol.* **1983**, 167, 211-216.

<sup>108</sup> Dissertationsarbeit von Rupert Krautbauer an der Ludwig-Maximilians-Universität München **2003**.



**Abbildung 58:** Effekt von Netropsin 72 auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

Durch den Vergleich der Extinktionswerte der verschiedenen Konzentrationen des Netropsins 72 mit der Positiv-Kontrolle konnte für Netropsin 72 eine sehr starke Hemm-Aktivität auf den TAR-Tat-Komplex erhalten werden. Diese starke Hemmung des TAR-Tat-Komplexes, die im ELISA-Test gezeigt werden konnte, wurde in der Fluoreszenz-Titration überprüft. Durch die Änderung der Fluoreszenzintensität des Rhodaminegrün-markierten Tat-Peptides kann die Wechselwirkung zwischen Tat-Peptid, TAR-RNA und Netropsin 72 berechnet werden.

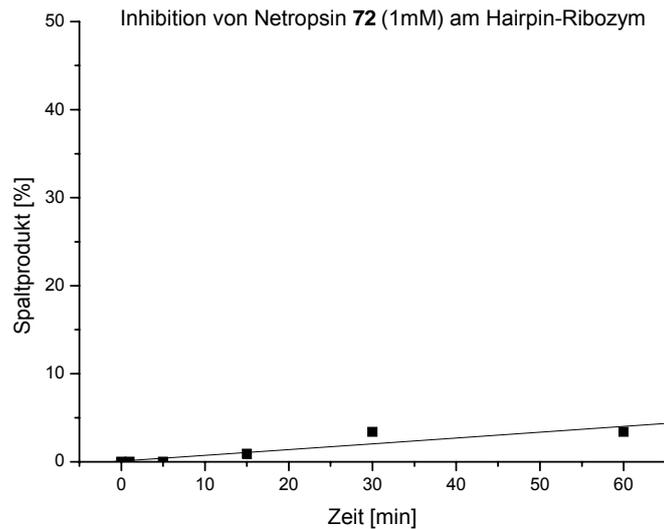


**Abbildung 59:** Effekt von Netropsin 72 auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 1.5 mM und 1.0 mM.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Titrations-Ergebnisse mit dem Programm BPC-Fit zeigt eine Dissoziationskonstante ( $K_{Diss}$ ) von 92.4 µM (Fehlerfaktor 1.06). Damit konnte die

starke Inhibition des TAR-Tat-Komplexes durch das Netropsin **72** im ELISA-Test nicht durch die Fluoreszenz-Titration bestätigt werden.

In Spalttests, in denen das Substrat des Hairpin-Ribozyms umgesetzt wird, können inhibitorische Effekte untersucht werden. Das Netropsin **72** wurde auf Inhibition im Hairpin-Ribozym hin untersucht. Es wurden verschiedene Konzentrationen des Inhibitors in den Versuch eingesetzt.

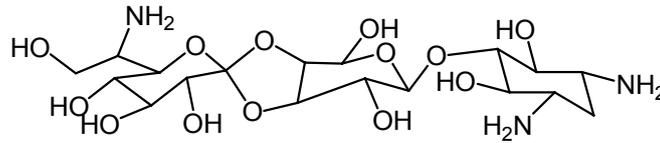


**Abbildung 60:** Graphische Darstellung der Spaltung des Substrates im Hairpin-Ribozym in Gegenwart von 1 mM Netropsin **72** im Schnelltest mit wenigen entnommenen Reaktionszeiten.

Dabei wurde bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Netropsin **72** eine Aktivität des Ribozyms von 0.477  $[\text{min}^{-1}]$  bestimmt, was bedeutet, dass die Aktivität mit Netropsin **72** um 50% gegenüber der Aktivität ohne Inhibitor reduziert werden konnte.

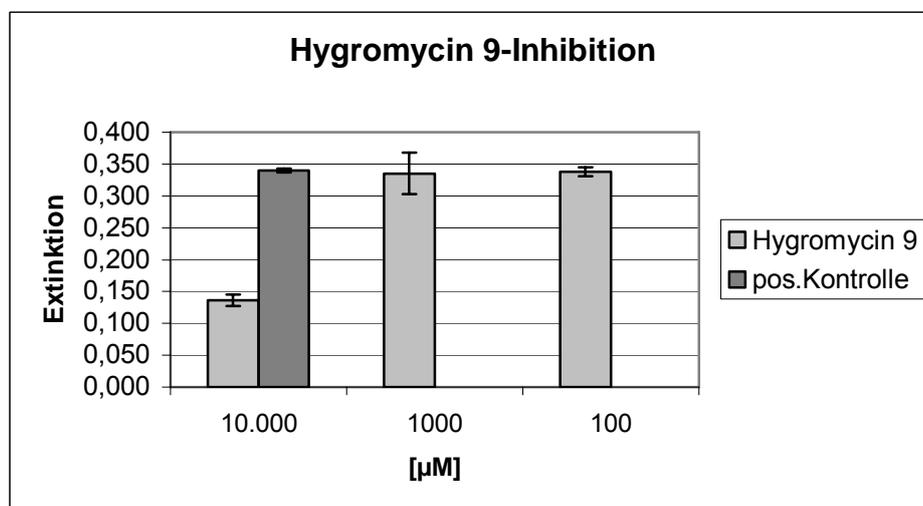
Netropsin <b>72</b>	1 $\mu\text{M}$	1000 $\mu\text{M}$
$k_{\text{obs}} [\text{min}^{-1}]$	0.477	0.2272

**Tabelle 11:** Aktivität des Hairpin-Ribozyms mit Netropsin **72** in verschiedenen Konzentrationen.

**Inhibitions-Experimente mit Hygromycin 9:**

Hygromycin **9** ist ein 2-Desoxystreptamine-substituiertes Aminoglykosid. Es bindet an die 30S-Untereinheit von Ribosomen und hemmt somit die Proteinbiosynthese.<sup>[104,109,110]</sup>

Aufgrund der bekannten Wechselwirkung mit RNA wurde das Hygromycin **9** im ELISA-Test auf die Wechselwirkung mit TAR-RNA im Tat-Komplex untersucht.



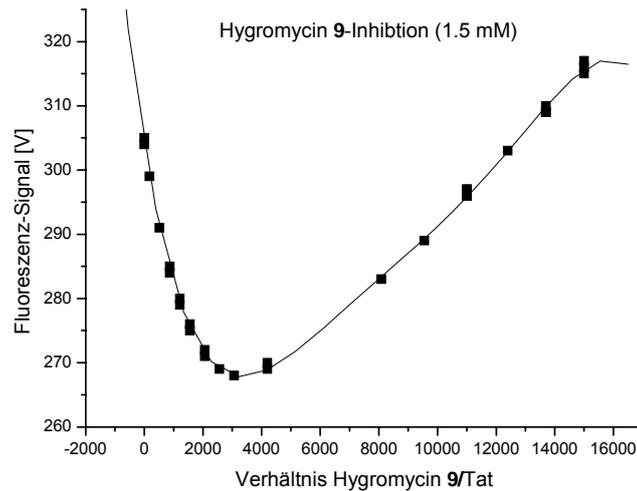
**Abbildung 61:** Effekt von Hygromycin **9** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

Durch den Vergleich der Ergebnisse des ELISA-Tests bei verschiedenen Hygromycin **9**-Konzentrationen mit der Positiv-Kontrolle konnte eine Inhibition des Tat-TAR-Komplexes erhalten werden.

Diese aus dem ELISA-Test erhaltenen Daten wurden in der Fluoreszenz-Titration überprüft. Dazu wurde das Hygromycin **9** in verschiedenen Konzentrationen zu dem Tat-TAR-Komplex gegeben und die Änderung der Fluoreszenzintensität des mit Rhodaminegrün-markierten Tat-Peptides verfolgt.

<sup>109</sup> <http://applichem.de>.

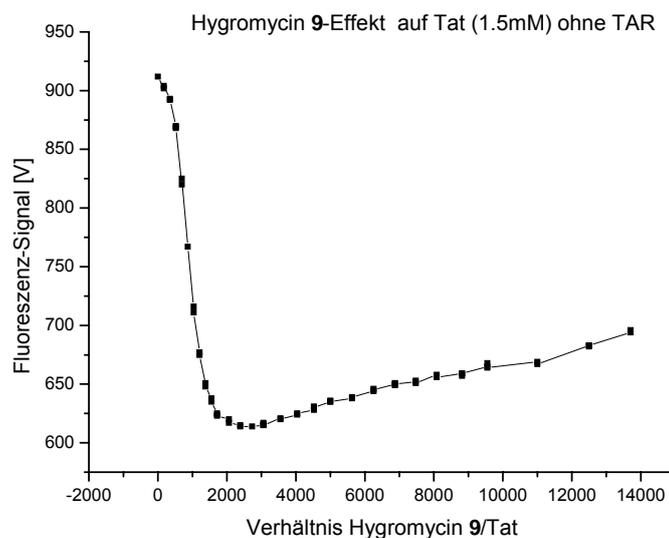
<sup>110</sup> Daniel N. Wilson, Knud H. Nierhaus; *Angew.Chem.* **2003**, *115*, 3586 – 3610.



**Abbildung 62:** Effekt von Hygromycin 9 auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 1.5 mM.

Die aus der Fluoreszenz-Titration erhaltenen Ergebnisse zeigten einen Effekt auf die Fluoreszenz-Intensität, welcher mit der Konzentration des Hygromycins 9 variiert. Bis zu einem Verhältnis des Tat-Peptides zum Hygromycin 9 von 3000:1 Tat-Peptid, nimmt die Fluoreszenz ab. Das ist durch ein Quenching-Effekt des Fluorophor-Signals zu erklären. Das Ansteigen des Fluoreszenz-Signals mit einem Verhältnis von Hygromycin 9 zu Tat-Peptid, das größer als 3000:1 ist, zeigt dann die Inhibition des Tat-TAR-Komplexes durch das Hygromycin 9.

Die Titration von Hygromycin 9 gegen das Tat-Peptid ohne TAR-RNA überprüft das Quenching der Fluoreszenz-Intensität.

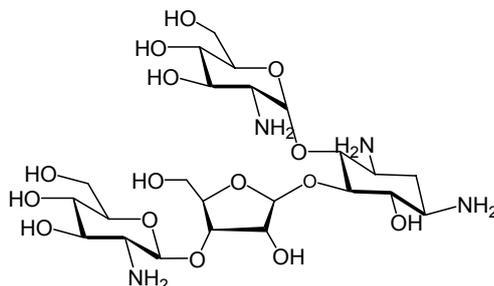


**Abbildung 63** Effekt von Hygromycin 9 auf das Tat-Peptid in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 1.5 mM.

In dieser Fluoreszenz-Titration, in der Hygromycin **9** gegen das Rhodaminegrün-markierte Tat-Peptid titriert wurde, bestätigte sich die Vermutung, dass das Fluoreszenz-Signal bis zu einem Verhältnis von 2000-3000:1 von Hygromycin **9** zu Tat-Peptid seinen maximalen Quench-Effekt erreicht hatte. Daher ist bei der ersten Titration mit Hygromycin **9** gegen den Komplex von Tat-Peptid und TAR-RNA von den zwei gegenläufigen, parallel ablaufenden Effekten des Quenching- und der Inhibition bis zu einem Verhältnis Hygromycin **9** zu Tat-Peptid von 2000-3000:1 auszugehen. Aus der Steigung, die bei der Titration von Hygromycin **9** gegen den Tat-TAR-Komplex erhalten wurde, konnte dann eine Dissoziationskonstante des Hygromycins **9** zur TAR-RNA berechnet werden. Diese Dissoziationskonstante ( $K_{\text{Diss}}$ ) wurde mit 18.9 mM bestimmt.

In Spalttests, in denen das Substrat des Hairpin-Ribozyms umgesetzt wird, können inhibitorische Effekte untersucht werden. Das Hygromycin **9** wurde auf die Inhibition im Hairpin-Ribozym studiert. Es zeigte hierbei aber keinen Effekt.

#### Inhibitions-Experimente mit Paromomycin **7**:



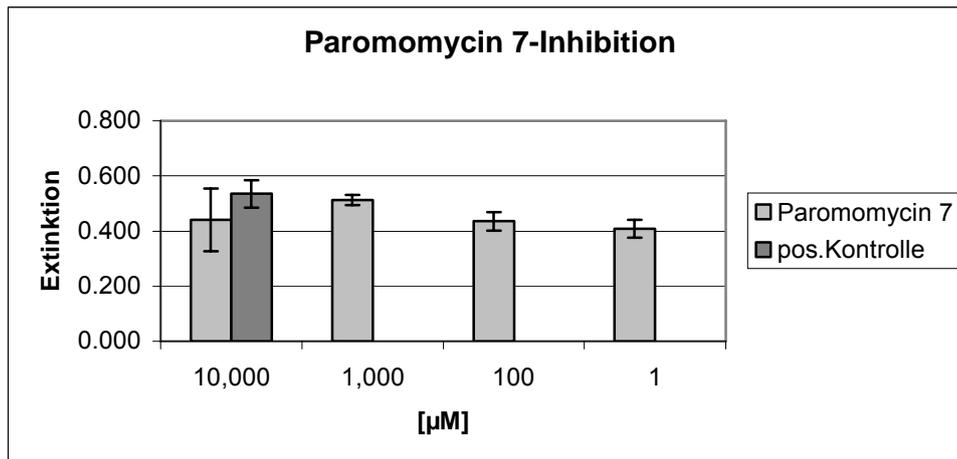
Paromomycin **7** gehört wie Geneticin **5** zur Gentamicin-Unterklasse der Aminoglykoside. Dieses Streptamin-Derivat zeigt eine Affinität zur 16S-RNA und hemmt durch diese Bindung die Proteinbiosynthese.<sup>[104,111,112,113]</sup> Es zeigt weitere Affinitäten zu anderen RNA-Elementen wie zum Rev-Response-Element (REV) des HIV, zur Intron-Gruppe I, zum Hairpin-Ribozym<sup>[97]</sup> und zum Hammerhead-Ribozym wie es in der Literatur beschrieben ist.<sup>[113,114]</sup> Aufgrund der bekannten Wechselwirkungen des Paromomycins **7** mit RNA wurde es im ELISA-Test auf die Wechselwirkung mit der TAR-RNA hin untersucht.

<sup>111</sup> R.J.M.Russel, J.B.Murray, G.Lentzen, J.Haddad, S.Mobashery; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3410-3411.

<sup>112</sup> M.Kaul, C.M.Barbieri, J.E.Kerrigan, D.S.Pilch; *J. Mol. Biol.* **2003**, 326, 1373.

<sup>113</sup> P.B.Alper, M.Hendrix, P.Sears, C-H.Wong; *J.Am.Chem.Soc.* **1998**, 120, 1965-1978.

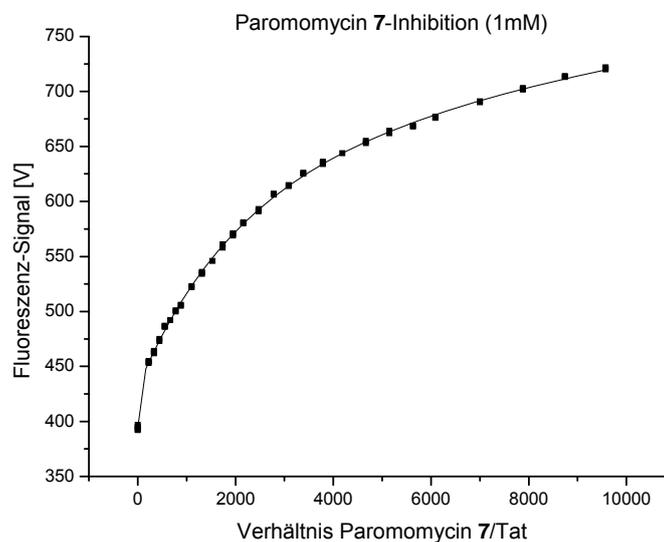
<sup>114</sup> H-X.Mei, A.A.Galan, N.S.Halim, D.P.Mack, A.W.Czarnik; *Bioorg.Med.Chem.Letters* **1995**, 5, 2755.



**Abbildung 64:** Effekt von Paromomycin 7 auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

Durch den Vergleich der Extinktionswerte der verschiedenen Konzentrationen des Paromomycins 7 mit der Positiv-Kontrolle konnte keine Hemm-Aktivität auf den TAR-Tat-Komplex gezeigt werden.

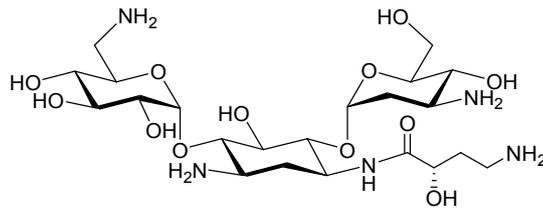
Durch die Änderung der Fluoreszenzintensität des Rhodaminegrün-markierten Tat-Peptides wurden die Wechselwirkungen zwischen Tat-Peptid, TAR-RNA und Paromomycin 7 untersucht und die Daten des ELISA-Test kontrolliert.



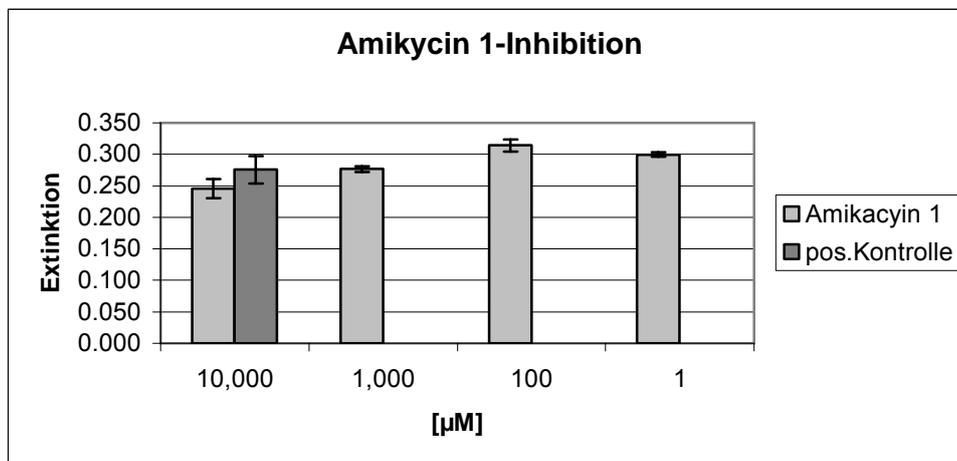
**Abbildung 65:** Effekt von Paromomycin 7 auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 1.0 mM.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Titrations-Ergebnisse mit dem Programm BPC-Fit ergab gegenüber der TAR-RNA eine Dissoziations-Konstante ( $K_{Diss}$ ) des Paromomycins 7 von 24.3 µM (Fehlerfaktor: 1.06).

In Spalttests, in denen das Substrat des Hairpin-Ribozyms umgesetzt wird, zeigte das Paromomycin 7 keinen Effekt.

**Inhibitions-Experimente mit Amikacin 1:**

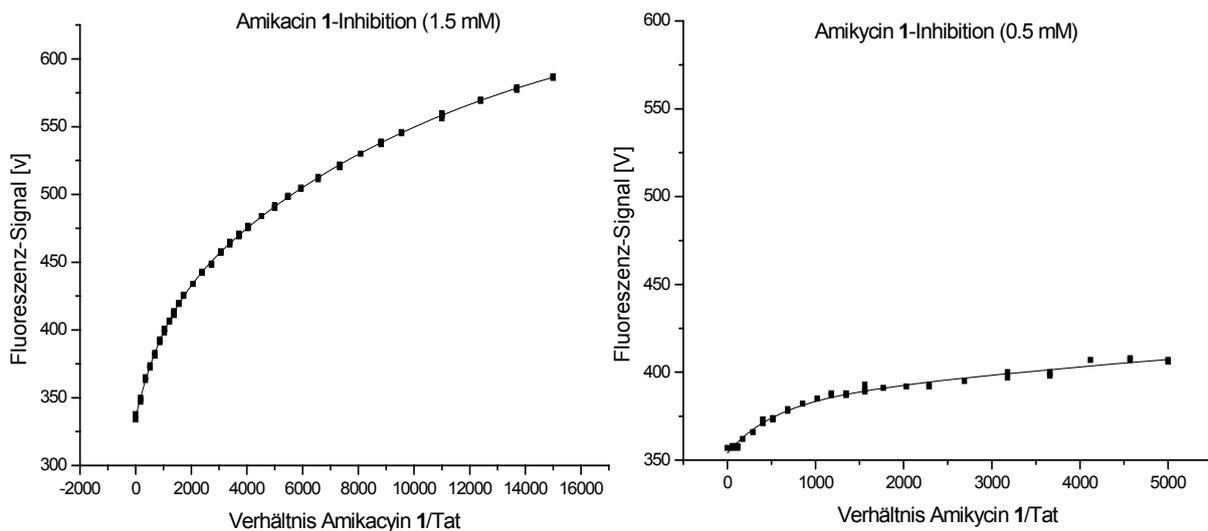
Amikacin **1** ist ebenfalls ein Streptamin-Derivat mit 2-DOS-Komponente und bindet wie das Paromomycin **7** an der 16S-RNA.<sup>[109,110]</sup> Amikacin ist als Inhibitor des Hairpin-Ribozyms bekannt.<sup>[98]</sup> Im ELISA-Test wurde die Wechselwirkung zwischen Amikacin **1** und dem Tat-TAR-Komplex untersucht.



**Abbildung 66:** Effekt von Amikacin **1** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

Durch den Vergleich der Werte bei verschiedenen Amikacin **1**-Konzentrationen mit der Positivkontrolle zeigte das Amikacin **1** einen geringen inhibitorischen Effekt auf den Tat-TAR-Komplex. Dieser Inhibitions-Effekt liegt innerhalb der Fehlertoleranzen, zeigte aber eine Tendenz.

Diese Daten wurden in der Fluoreszenz-Titration überprüft. Dabei wurde die Änderung der Fluoreszenz-Intensität des Tat-Peptides bei verschiedenen Amikacin **1**-Konzentrationen verfolgt.

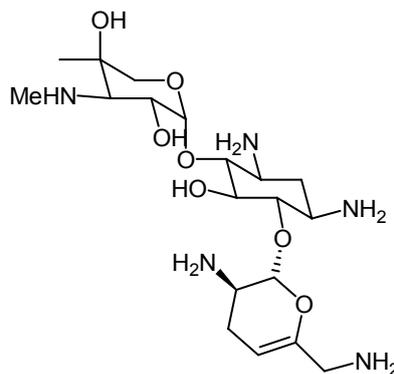


**Abbildung 67:** Effekt von Amikacin **1** auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 1.5 mM und 0.5 mM.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Titration-Ergebnisse mit dem Programm BPC-Fit lieferte eine Dissoziationskonstante von 54.3  $\mu\text{M}$  (Fehlerfaktor: 1.05). Damit konnte das ELISA-Ergebnis bestätigt werden und beide Messmethoden zeigen, dass Amikacin **1** den Tat-TAR-Komplex schwach inhibiert.

In Spalttests, in denen das Substrat des Hairpin-Ribozyms umgesetzt wird, zeigte das Amikacin **1** keinen Effekt.

### Inhibitions-Experimente mit Sisomycin **73**:



Sisomycin **73** ist ein Aminoglykosid mit einem 2-DOS-Substituenten und ist als Inhibitor des Hairpin-Ribozyms bekannt.<sup>[97, 102]</sup> Es dient als Ausgangsstoff für die Semisynthese von Netilmycin (entwickelt von Schering).<sup>[115]</sup> Aufgrund dieser bekannten Wechselwirkungen mit RNA wurde das Sisomycin **73** auf seine Wechselwirkung mit TAR-RNA im ELISA-Test untersucht.

<sup>115</sup> S.A.Kabins, C.Nathan, S.Cohen; *Antimicrob.Agents Chemother.* **1976**, 139-145.

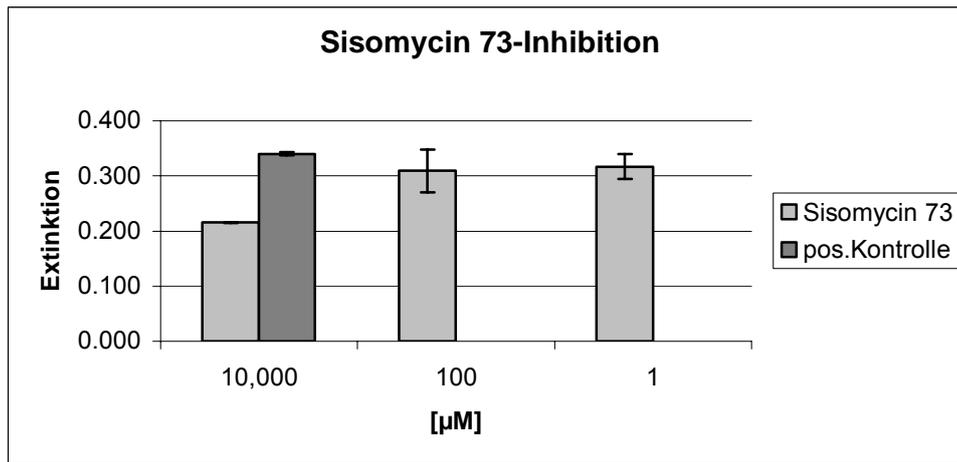


Abbildung 68: Effekt von Sisomycin 73 auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test

Die im ELISA-Test erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass Sisomycin 73 eindeutig einen hemmenden Effekt auf den Tat-TAR-Komplex ausübt. Dieser messbare Effekt liegt außerhalb der Fehlertoleranzen. Durch die Fluoreszenz-Titration wurden die im ELISA-Test erhaltenen Ergebnisse überprüft.

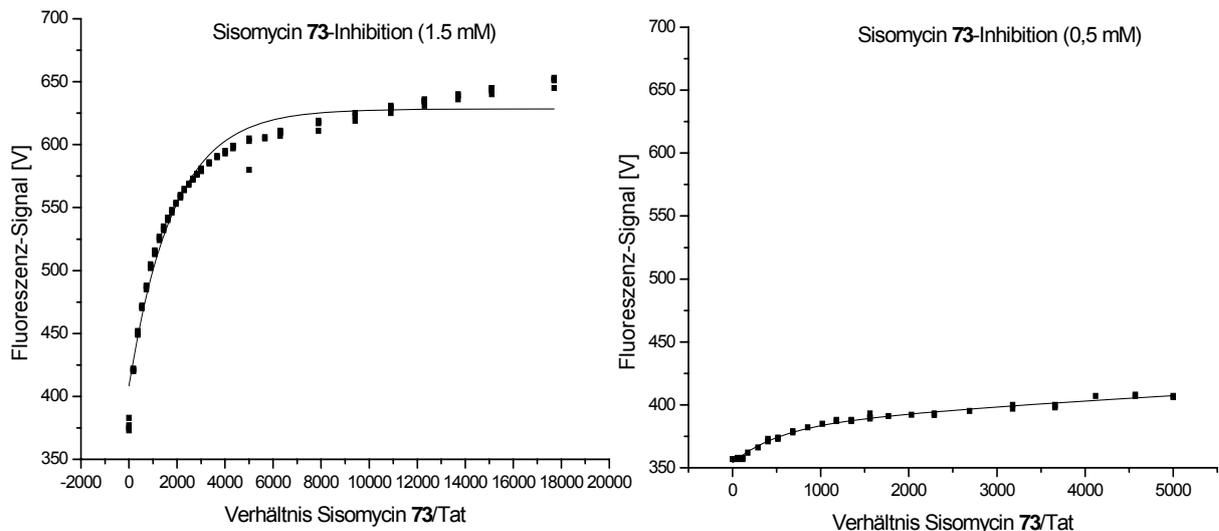
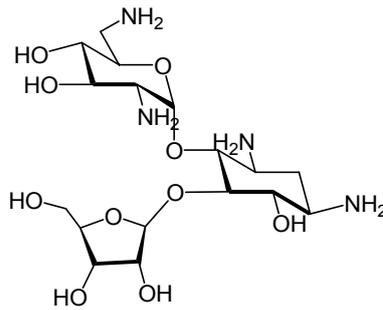


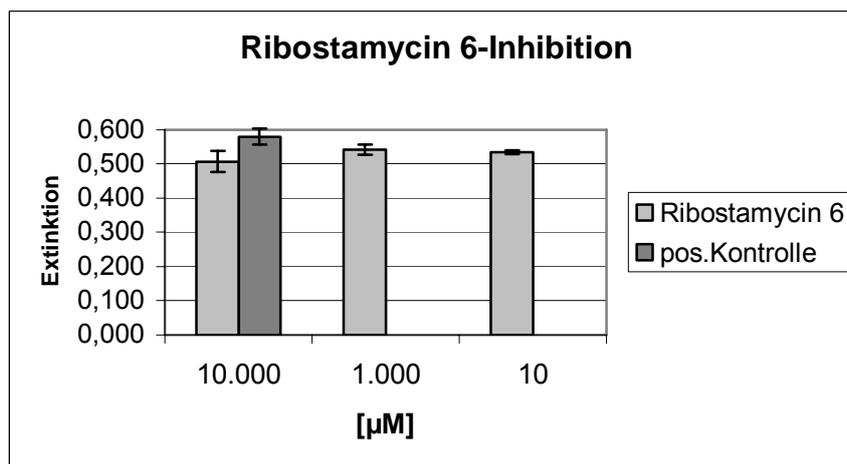
Abbildung 69: Effekt von Sisomycin 73 auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration mit einer maximalen Konzentration von 1.5 mM und 0.5 mM.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Titration-Ergebnisse mit dem Programm BPC-Fit zeigte eine Dissoziations-Konstante von 7.6 µM (Fehlerfaktor: 1.24). Die Fluoreszenz-Titration und der ELISA-Test zeigen beide eine Inhibition des Tat-TAR-Komplexes, wobei die Fluoreszenz-Titration eine starke Inhibition des Komplexes aufzeigt.

In Spalttestss, in denen das Substrat des Hairpin-Ribozyms umgesetzt wird, zeigte das Sisomycin 73 keinen Effekt.

**Inhibitions-Experimente mit Ribostamycin 6:**

Das Ribostamycin **6** ist ein Aminoglykosid mit Neamin-Grundgerüst. Es hemmt das Bakterienwachstum durch Bindung an die 16S-RNA und blockiert dadurch die prokaryotische Proteinbiosynthese.<sup>[104, 116]</sup> Ebenfalls literaturbekannt ist das Ribostamycin **6** als Inhibitor des Hairpin-Ribozyms.<sup>[97]</sup> Aufgrund dieser bekannten Wechselwirkungen mit RNA wurde das Ribostamycin **6** auf seine Wechselwirkung mit der TAR-RNA im ELISA-Test untersucht.

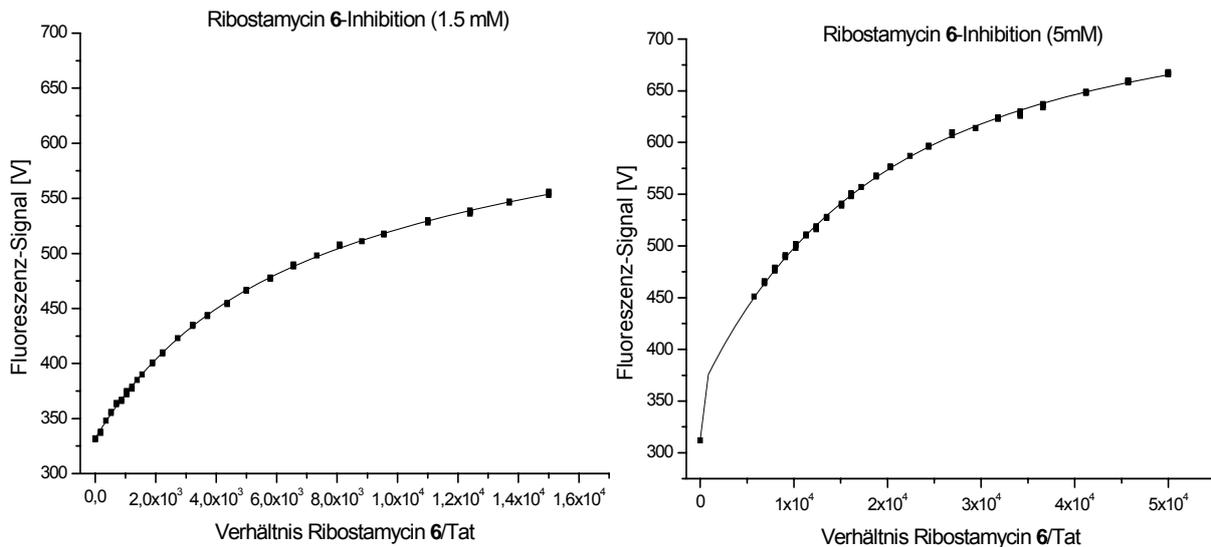


**Abbildung 70:** Effekt von Ribostamycin **6** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

Die im ELISA-Test erhaltenen Ergebnisse lassen eine äußerst schwache Inhibition des Tat-TAR-Komplexes durch Ribostamycin **6** vermuten.

Durch die Fluoreszenz-Titration wurden die im ELISA-Test erhaltenen Ergebnisse überprüft, wobei die Änderung der Fluoreszenz-Intensität bei verschiedenen Ribostamycin **6**-Konzentrationen verfolgt wurde.

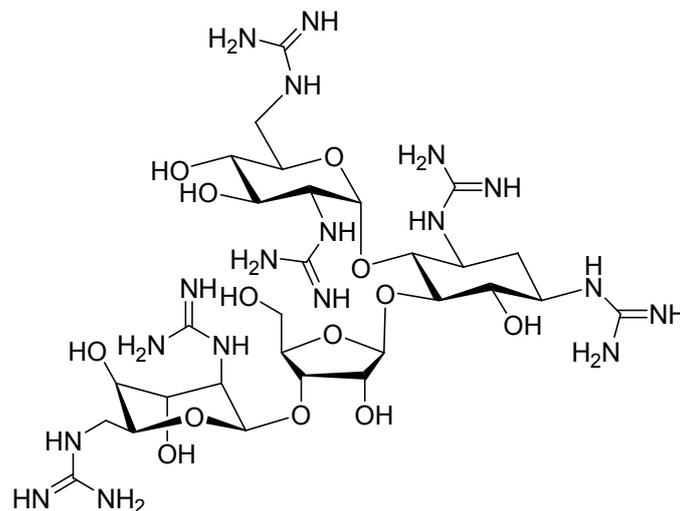
<sup>116</sup> B.François, R.J.M.Russel, J.B.Murray, R.Aboul-ela, B.Masquida, Q.Vicens, E.Westhof; *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 173, 5677-5690.



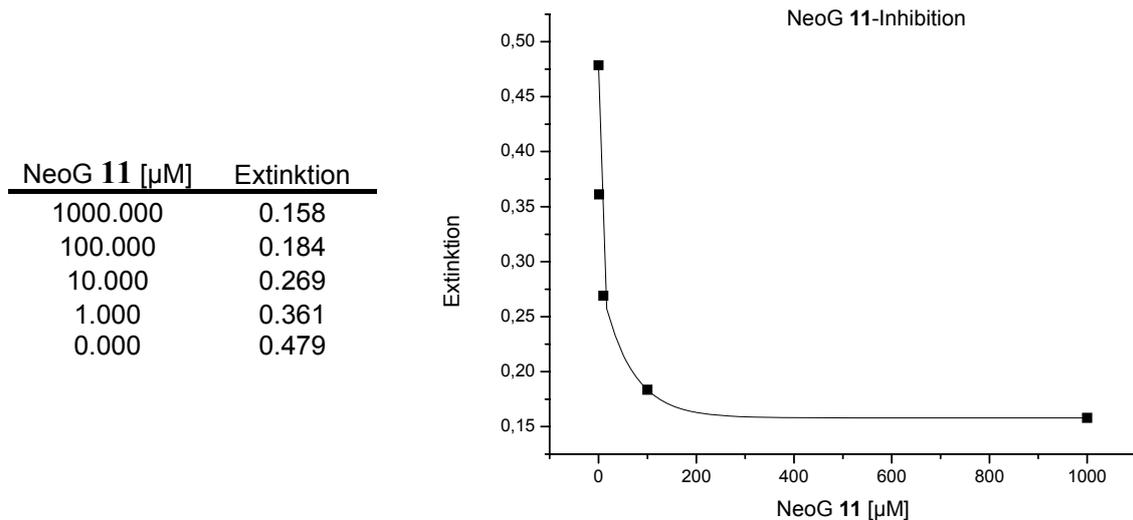
**Abbildung 71:** Effekt von Ribostamycin **6** auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 5.0 mM und 1.5 mM.

Die Fluoreszenz-Titration bestätigt in der Auswertung den ELISA-Versuch, in dem Ribostamycin **6** als schwacher Inhibitor des Tat-TAR-Komplexes bestimmt wurde. Das Ribostamycin **6** besitzt nach der Auswertung durch das Programm BPC-Fit eine Dissoziationskonstante ( $K_{Diss}$ ) von 0.11 mM mit einem Fehlerfaktor von 1.13. In Spalttestss, in denen das Substrat des Hairpin-Ribozyms umgesetzt wird, zeigte das Ribostamycin **6** keinen Effekt.

#### Inhibitions-Experimente mit NeoG **11**:

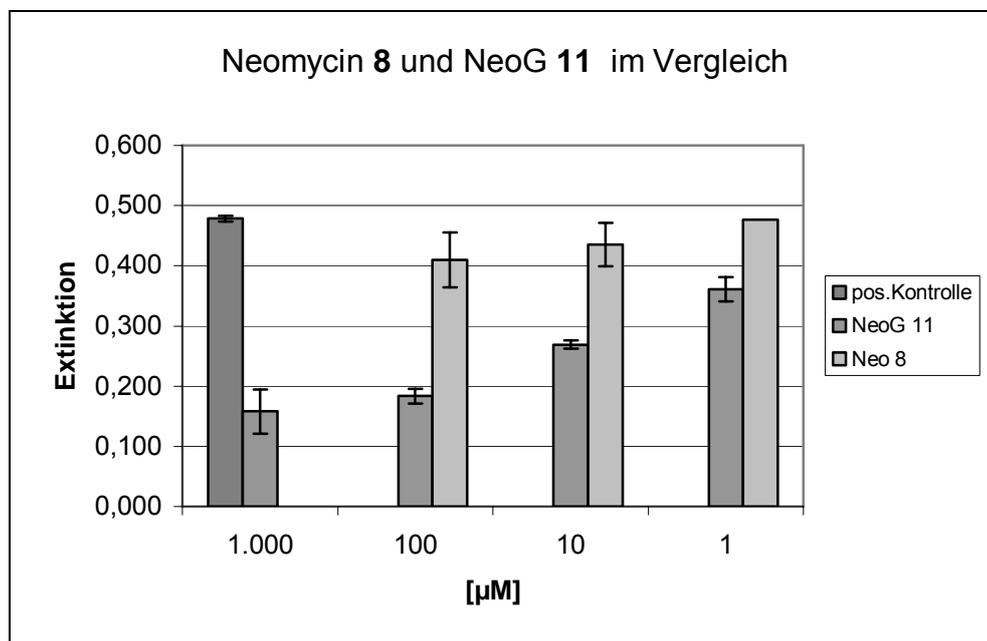


Im ELISA-Test wurde der Einfluss von NeoG **11** auf die Wechselwirkung mit dem Tat-TAR-Komplex untersucht. Durch die Auftragung der Extinktionswerte aus dem ELISA-Test gegen verschiedene Konzentrationen des NeoGs **11** zeigt sich, dass das NeoG **11** schnell den Sättigungsbereich erreicht und somit effizient die TAR-RNA an der Bindung zum Tat-Peptid hemmt.



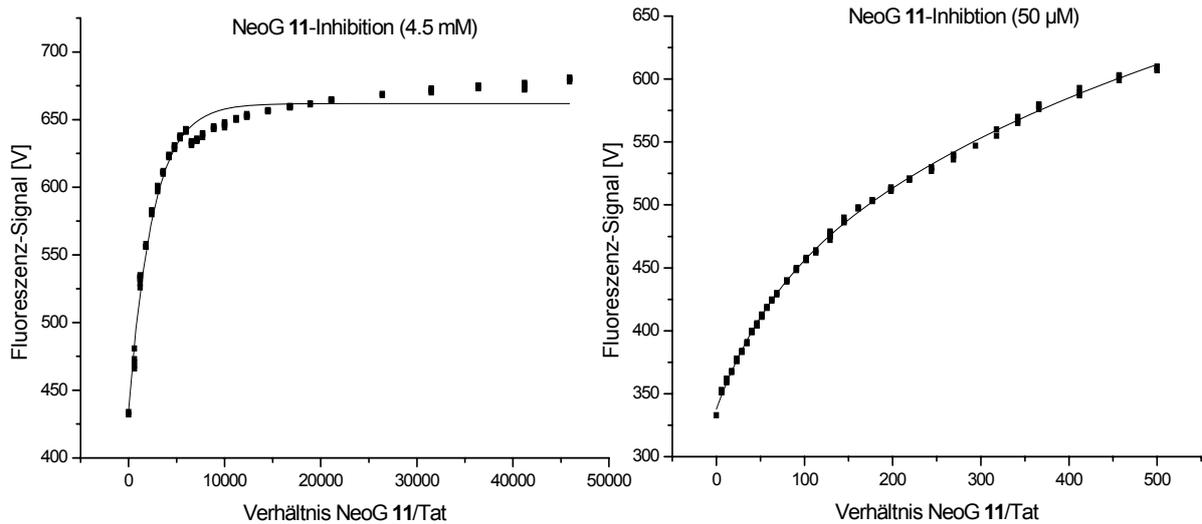
**Abbildung 72:** Auftragung der Extinktionssignale des ELISA-Tests gegen die NeoG 11-Konzentration.

Durch den direkten Vergleich des NeoG 11 mit Neomycin 8 ist erkennbar, dass ein deutlicher Anstieg der inhibitorischen Wirkung durch die Guanidierung stattgefunden hat. Selbst bei einer Konzentration von einem Mikromol pro Liter zeigt es weiterhin deutliche Inhibition.



**Abbildung 73:** Direkter Vergleich zwischen Positiv-Kontrolle, Neomycin 8 und NeoG 11.

Die Daten aus dem ELISA-Test werden im Folgenden durch Fluoreszenz-Titrationmessungen überprüft. Dabei wird die Änderung der Fluoreszenzintensität des mit Rhodaminegrün-markierten Tat-Peptids bei verschiedenen NeoG 11-Konzentrationen verfolgt.



**Abbildung 74:** Effekt von NeoG 11 auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen NeoG 11-Konzentration von 4.5 mM und 50 µM.

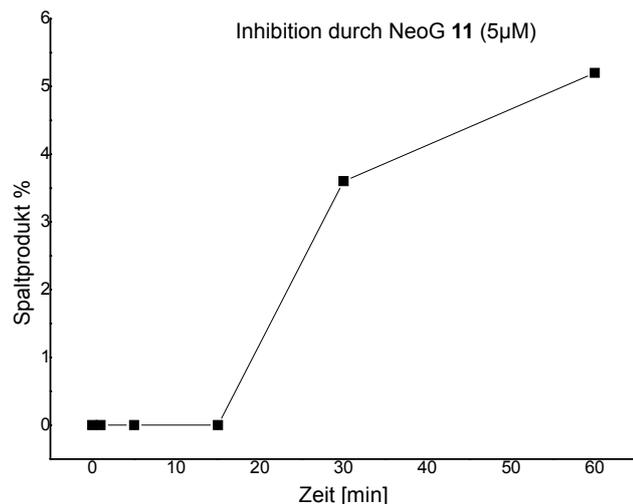
Die Auswertung der Fluoreszenz-Titrations-Ergebnisse mit dem Programm BPC-Fit zeigt eine Dissoziationskonstante ( $K_{\text{Diss}}$ ) von 1.4 µM, die mit einem Fehlerfaktor von 2.05 behaftet ist. Der ELISA-Test und die Fluoreszenz-Titration zeigen beide, dass NeoG 11 ein starker Inhibitor des Tat-TAR-Komplexes ist.

In Spalttestss, in denen das Substrat des Hairpin-Ribozyms umgesetzt wird, können inhibitorische Effekte bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde NeoG 11 bei verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors in dem Versuch eingesetzt.

Zeit	Substrat	Endprodukt
0	100	0
1	100	0
5	100	0
15	100	0
30	96.4	3.6
60	94.8	5.2

$K_{\text{obs}} [\text{min}^{-1}]$   
 0.0226

**Tabelle 12:** Ergebnisse der Inhibition im Hairpin-Ribozym mit 10 µM NeoG 11.

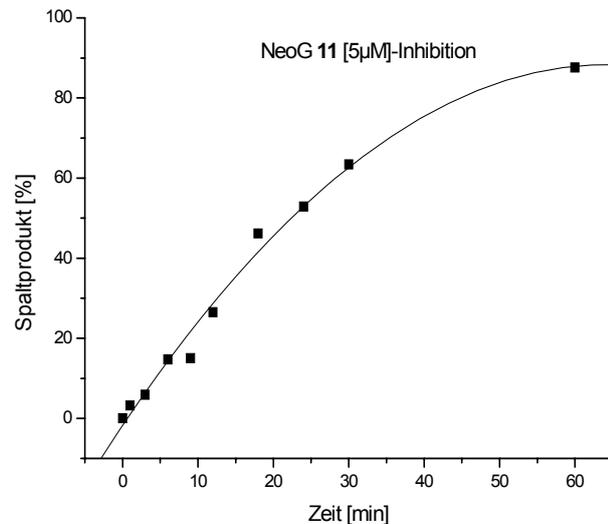


**Abbildung 75:** Graphische Darstellung der Spaltung des Substrates im Hairpin-Ribozym in Gegenwart von 10 µM NeoG 11.

Da bei 10µM NeoG 11-Konzentration das Hairpin-Ribozym nahezu vollständig inhibiert wurde, konnte das erste Spaltprodukt nach 30 min lediglich zu 3.5 % nachgewiesen

werden. Es wurden weitere Messungen mit 5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  NeoG **11**-Konzentrationen durchgeführt.

Zeit [min]	Substrat [%]	Spaltprodukt [%]
0	100	0
1	96.8	3.2
3	94.1	5.9
6	85.3	14.7
9	85.0	15.0
12	73.5	26.5
18	53.8	46.2
24	47.1	52.9
30	36.6	63.4
60	12.4	87.6
		$K_{\text{obs}}$
		0.461

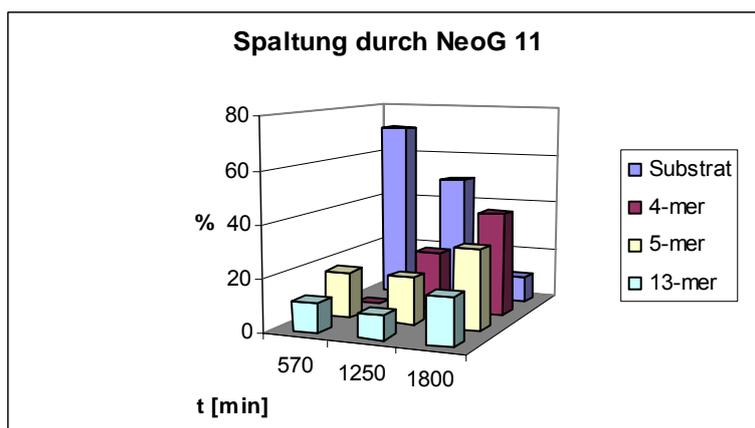


**Tabelle 13:** Ergebnisse der Inhibition im Hairpin-Ribozym mit 5  $\mu\text{M}$  NeoG **11**.

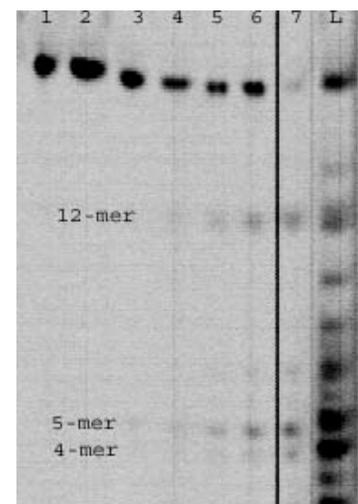
**Abbildung 76:** Graphische Darstellung der Spaltung des Substrates im Hairpin-Ribozym in Gegenwart von 5  $\mu\text{M}$  NeoG **11**.

Nach Zugabe von 5  $\mu\text{M}$  NeoG **11** zeigte das Hairpin-Ribozym eine immer noch deutlich reduzierte Spaltaktivität mit einer Umsatzzahl von  $0.461 \text{ min}^{-1}$ . Bei 1  $\mu\text{M}$  NeoG **11** konnte eine Umsatzzahl von  $0.724 \text{ min}^{-1}$  bestimmt werden und es zeigte sich weiterhin ein inhibitorischer Effekt.

In weiteren Spalttests wurde das NeoG **11** ausschließlich mit dem Substrat inkubiert, um die Spaltaktivität des NeoGs **11** zu testen, wie es bereits von einigen Aminoglykosiden wie dem Sisomycin **73**, Neomycin B **8** und Spermidin **26** beschrieben ist.<sup>[97]</sup>



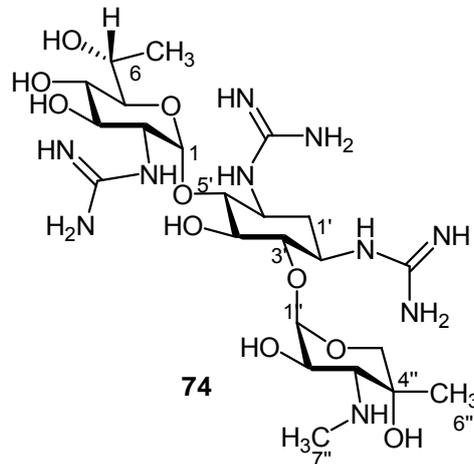
**Abbildung 77:** Darstellung der Spaltproduktverteilung nach verschiedenen Inkubationszeiten.



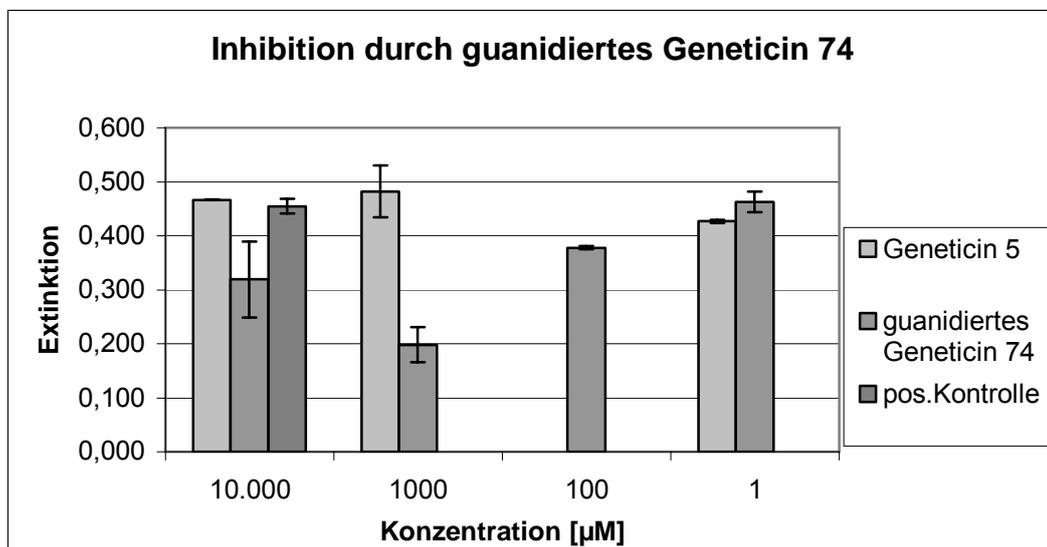
**Abbildung 78:** Spaltbanden im Gel hervorgerufen durch NeoG **11** nach verschiedenen Zeiten (1=60, 2=150, 3=300, 4=450, 5=570, 6=1350 und 7=1800 min).

Es konnte Spaltaktivität durch das NeoG **11** festgestellt werden, wobei drei Spaltprodukte auftraten: das 5-Nukleotid lange Fragment (normales Spaltprodukt des Ribozyms und hier Hauptprodukt), das 4- und das 12- Nukleotid lange Spaltfragment.

#### Inhibitions-Experimente mit dem guanidierten Geneticin **74**:



Die Veränderung der Wechselwirkung des guanidierten Geneticins **74** zum Tat-TAR-Komplex durch Modifizierung der Aminogruppen zu Guanidiningruppen wurde im ELISA-Test untersucht.

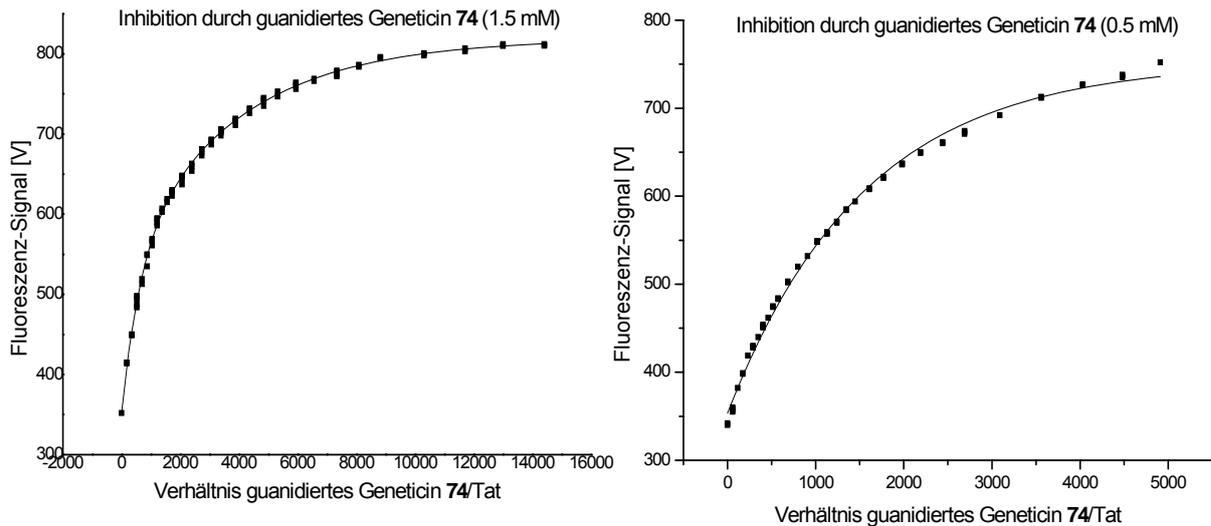


**Abbildung 79:** Direkter Vergleich zwischen Positiv-Kontrolle, Geneticin **5** und guanidiertem Geneticin **74**.

Durch die Auftragung der Extinktionswerte gegen verschiedene Konzentrationen des guanidierten Geneticins **74** gegen Geneticin **5** und der Positiv-Kontrolle aus dem ELISA-Test zeigte sich, dass das modifizierte Geneticin **74** ein Inhibitor des Tat-TAR-Komplexes

ist. Durch die Modifizierung konnte eine Verstärkung der inhibitorischen Wirkung erreicht werden.

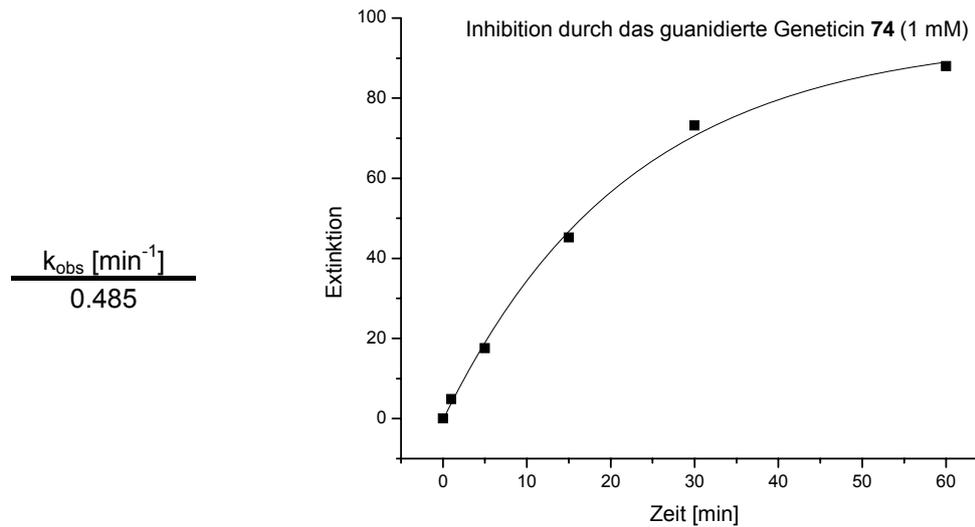
Durch die Fluoreszenz-Titration wurden die Daten des ELISA-Assays überprüft, indem die Veränderung der Fluoreszenz-Intensität durch Variation der Konzentration an guanidiertem Geneticin **74** untersucht wurde.



**Abbildung 80:** Effekt des modifizierten Geneticins **74** auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 1.5 mM und 0.5 mM.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Titrations-Ergebnisse durch das Programm BPC-Fit zeigte eine Dissoziations-Konstante des synthetischen, guanidierten Geneticins **74** von 11.5  $\mu\text{M}$  (Fehlerfaktor 1.07). Damit zeigten sowohl der ELISA-Test als auch die Fluoreszenz-Titration, dass das guanidierte Geneticin **74** ein starker Inhibitor des Tat-TAR-Komplexes ist. Im Vergleich zu dem unmodifizierten Geneticin **5** konnte die Inhibitionsfähigkeit des modifizierten Geneticins **74** von 225.8  $\mu\text{M}$  auf 11.5  $\mu\text{M}$  gesteigert werden.

In Spalttests, in denen das Substrat des Hairpin-Ribozym umgesetzt wird, wurde das guanidierte Geneticin **74** in verschiedenen Konzentrationen ausgetestet.



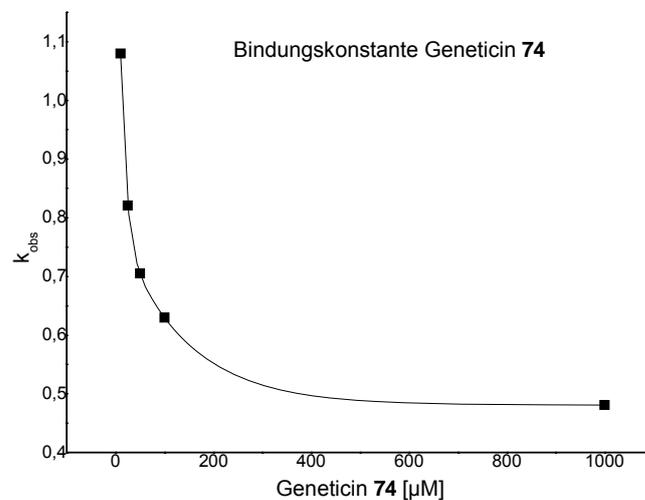
**Abbildung 81:** Graphische Darstellung der Spaltung des Substrates im Hairpin-Ribozym in Gegenwart von 1 mM des modifizierten Geneticins 74 im Schnelltest mit wenigen entnommenen Reaktionszeiten

Hierbei zeigte das Hairpin-Ribozym in Gegenwart von 1mM des guanidierten Geneticins 74 einen Umsatz von  $0.485 [\text{min}^{-1}]$ . Weitere Spalttests mit dem Hairpin-Ribozym ergaben, dass dieses guanidierte Geneticin 74 ebenfalls ein moderater Inhibitor des Hairpin-Substrat-Komplexes ist.

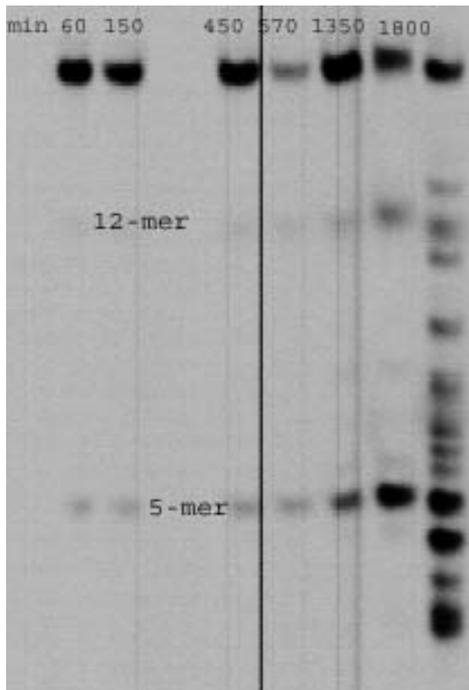
100,00	50,00	25,00	10,00	$\mu\text{M}$
0.630	0.705	0.821	1.08	$k_{\text{obs}} [\text{min}^{-1}]$

**Tabelle 14:** Aktivität des Hairpin-Ribozyms mit guanidierten Geneticin 74 in verschiedenen Konzentrationen.

Im Bereich von 50-25  $\mu\text{M}$  guanidierten Geneticin 74-Konzentration ist immer noch leichte Hemmwirkung feststellbar.



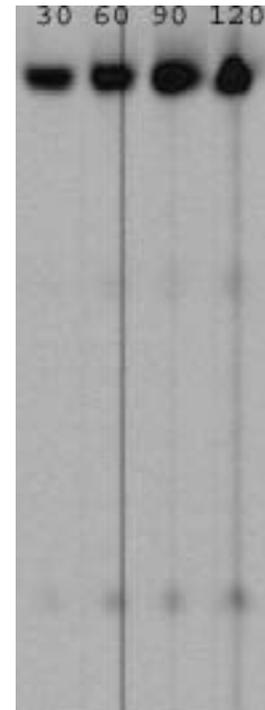
**Abbildung 82:** Auftragung der Aktivität des Hairpin-Ribozyms bei verschiedenen guanidierten Geneticin 74-Konzentrationen.



**Abbildung 83:** Spaltmuster nach Inkubation mit guanidierten Geneticin 74 ohne  $MgCl_2$  nach verschiedenen Zeiten (in Abbildung angegeben).

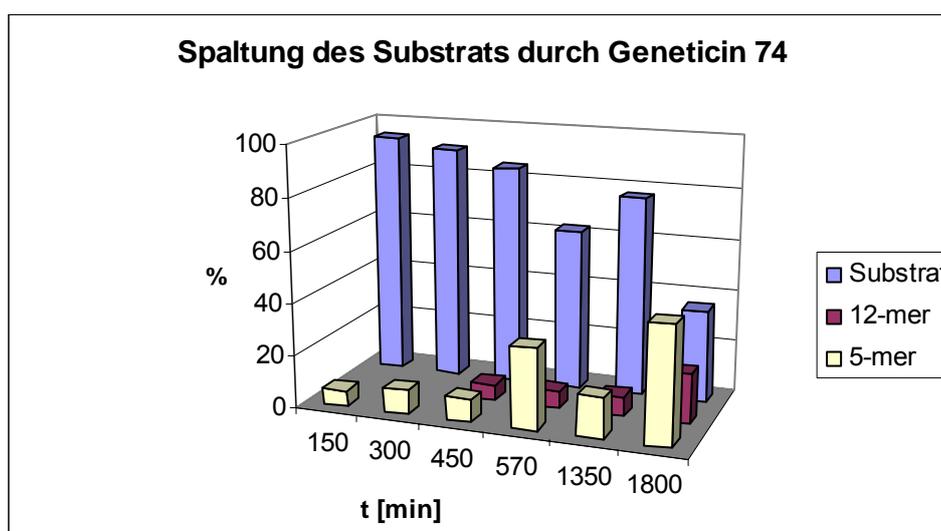
In verschiedenen Spalt-Versuchen mit Substrat und dem guanidierten Geneticin 74 zeigte das modifizierte Geneticin 74 Spaltaktivität, wobei ein 12- und ein 5-Nukleotid langes Fragment gebildet werden.

Bei längerer Inkubationsdauer können dann auch nach 3 h Spaltprodukte von 6-er und 10-er Nukleotiden nachgewiesen werden.



**Abbildung 84:** Spaltmuster nach Inkubation mit Ribozym, aber ohne  $MgCl_2$ .

Die zeitliche Abhängigkeit der Spaltaktivität durch die Substanz Geneticin 74 wurde gegen die Konzentration der gebildeten Spaltprodukte aufgetragen. Eine Spaltaktivität konnte danach berechnet werden, die für das 5 Nukleotid lange Spaltprodukt bei einer  $k_{obs}$  von  $3.59 \cdot 10^{-9} \text{ min}^{-1}$  und für das 12 Nukleotid lange Spaltprodukt bei  $1.6 \cdot 10^{-9} \text{ min}^{-1}$  liegt.



**Abbildung 85:** Darstellung der Spaltproduktverteilung nach verschiedenen Inkubationszeiten.

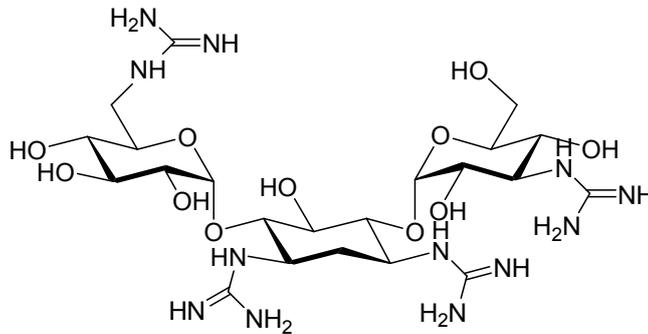
Zeit	150	300	450	570	1350	1800	$k_{\text{obs}}$ [min <sup>-1</sup> ]
Substrat	94	90.8	84.9	62.4	77	35.8	-
5-er Spaltfragment	-	-	6.2	6.6	7.4	19.1	$0.359 \cdot 10^{-9}$
12-er Spaltfragment	6	9.2	8.8	31	15.6	45.2	$0.160 \cdot 10^{-9}$

**Tabelle 15:** Spaltproduktverteilung nach verschiedenen Inkubationszeiten.

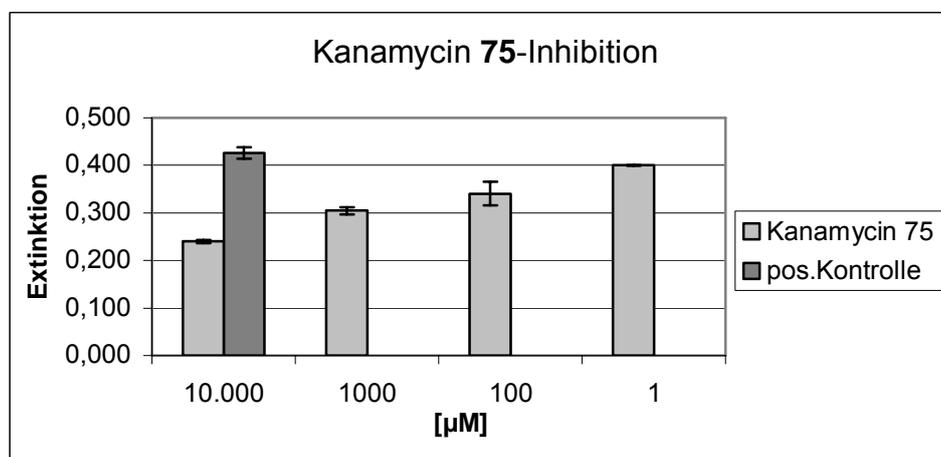
Es wird das gleiche Spaltmuster in der Spaltungsreaktion durch das guanidierte Geneticin **74** in Anwesenheit von Ribozym aber  $\text{MgCl}_2$ -Abwesenheit erhalten.

Im *Single-Turnover*-Versuch, in dem Substrat und Hairpin-Ribozym im Verhältnis 1:1 vorliegen, konnte kein Umsatz nachgewiesen werden.

### Inhibitions-Experimente mit guanidiertem Kanamycin **75**:

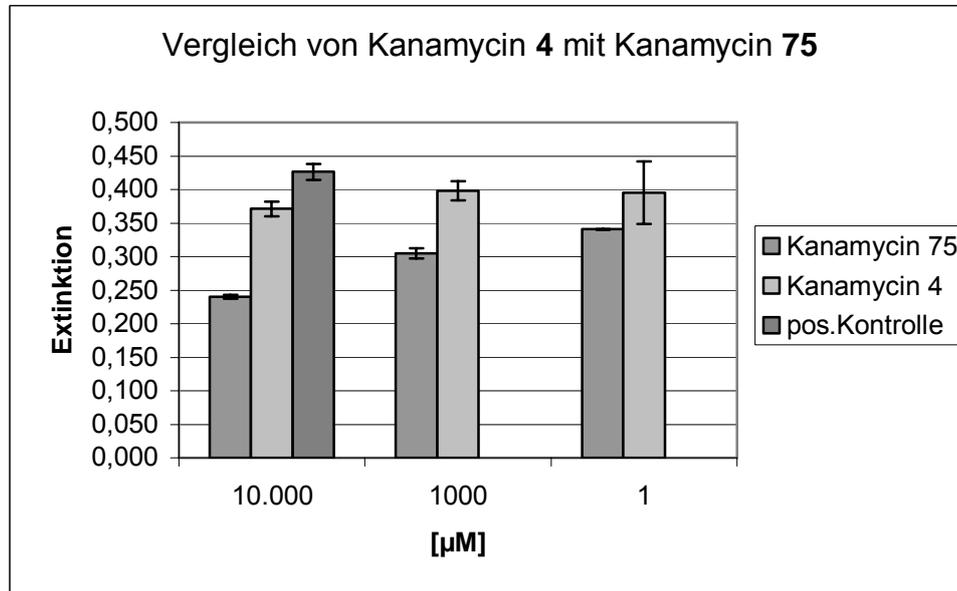


Das guanidierte Kanamycin **75** wurde zur Überprüfung der Interaktion mit RNA mittels Konkurrenzexperimenten im ELISA-Assay und im Hairpin-Ribozym-Assay mit TAR-RNA durchgeführt. In dem ELISA-Test wurde guanidierte Kanamycin **75** in verschiedenen Konzentrationen mit dem Tat-TAR-Komplex inkubiert. Je geringer die Konzentration des modifizierten Kanamycin **75** war, desto stärker dominierte der ungehemmte Zustand so wie in der Positiv-Kontrolle.



**Abbildung 86:** Effekt von guanidierten Kanamycin **75** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

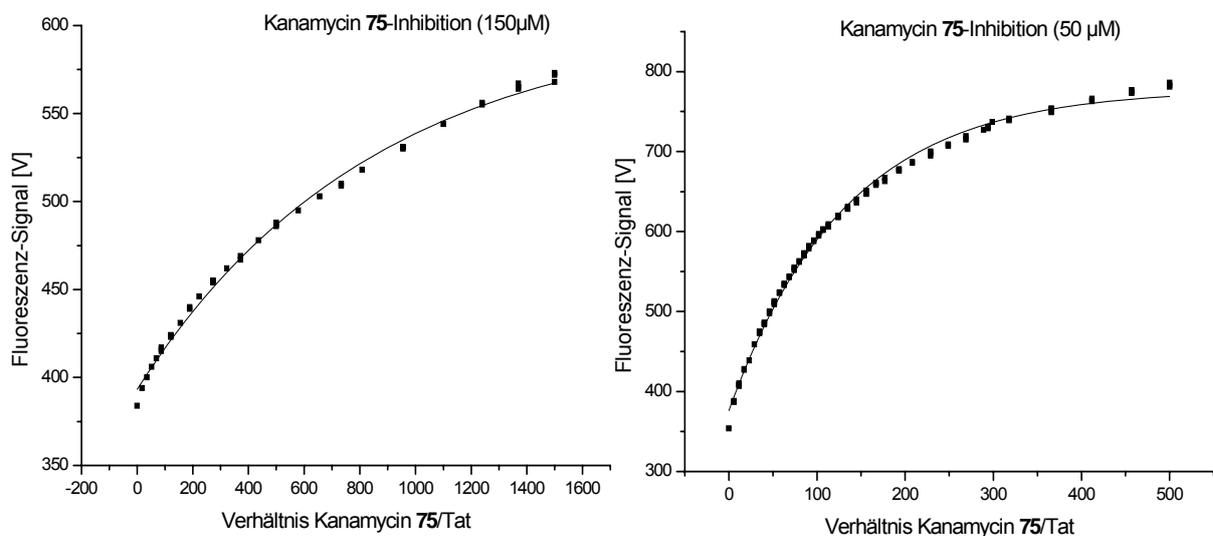
Um den Effekt der Modifizierung des Kanamycins auf den Tat-TAR-Komplex zu untersuchen, wurden in einem ELISA-Test Kanamycin **4** selbst und guanidiertes Kanamycin **75** direkt nebeneinander aufgetragen und die Extinktion der beiden Proben bei verschiedenen Konzentrationen verglichen.



**Abbildung 87:** Direkter Tat-TAR-Vergleich zwischen Positiv-Kontrolle, Kanamycin **4** und guanidierten Kanamycin **75**.

Im Vergleich von guanidierten Kanamycin **75** zu Kanamycin **4** zeigte sich ein Inhibitionszuwachs des Tat-TAR-Komplexes.

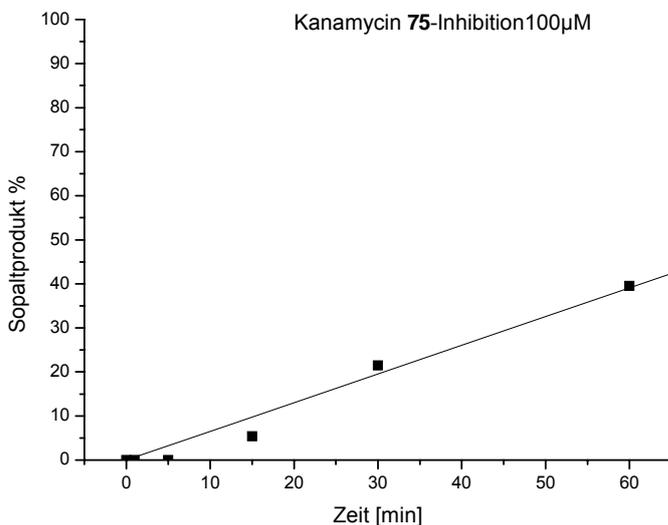
Die ELISA-Ergebnisse auf den Tat-TAR-Komplex wurden in der Fluoreszenz-Titration überprüft, in dem die Fluoreszenz-Intensität bei verschiedenen Kanamycin **75**-Konzentrationen bestimmt wurde.



**Abbildung 88:** Effekt von guanidierten Kanamycin **75** auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 150 µM und 50 µM Kanamycin **75**.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Titration bestätigte den ELISA-Test, in dem guanidiertes Kanamycin **75** als starker Kompetitor des Tat-TAR-Komplexes bestimmt wurde. Mit dem Programm BPC-Fit konnte die Dissoziationskonstante des sich bildenden Kanamycin **75**-TAR-Komplexes auf 22.5  $\mu\text{M}$  mit einem Fehlerfaktor von 7.19 bestimmt werden. Durch die Modifikation der Aminogruppen zu Guanidinen am Kanamycin **4** konnte der schwache Tat-TAR-Inhibitor zu einem starken Inhibitor von 9.1 mM auf 22.5  $\mu\text{M}$  verändert werden.

Im Hairpin-Ribozym-Assay, in dem die Spaltaktivität von einem 15 Nukleotid großen Substrat des Hairpin-Ribozyms in Gegenwart von Inhibitoren bestimmt wird, zeigte das guanidierte Kanamycin **75** ebenfalls einen starken inhibitorischen Effekt. 100  $\mu\text{M}$  Kanamycin **75** konnten die Aktivität des Hairpin-Ribozyms auf 10 % der Gesamtaktivität senken.



Zeit	Substrat	Spaltprodukt
0	100	0
1	100	0
5	100	0
15	94.6	5.4
30	78.5	21.5
60	60.5	39.5
		$k_{\text{obs}} [\text{min}^{-1}]$
		0.143

**Tabelle 16:** Ergebnisse der Inhibition im Hairpin-Ribozym mit 100  $\mu\text{M}$  guanidierten Kanamycin **75**.

**Abbildung 89:** graphische Darstellung der Spaltung des Substrates im Hairpin-Ribozym in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  guanidierten Kanamycin **75** im Schnelltest mit wenigen entnommenen Reaktionszeiten.

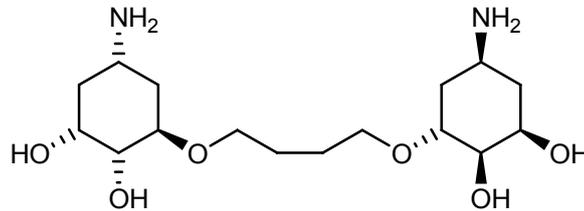
Es wurden mehrere Spalttests des Substrates durch das Hairpin-Ribozym in Gegenwart verschiedener Konzentrationen durchgeführt. Bis zu einem Mikromol pro Liter an guanidierten Kanamycin **75** konnte die Inhibition der Spaltung des Substrates durch das Hairpin-Ribozym nachgewiesen werden. Bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Kanamycin **75** hatte das Ribozym 50 % der maximalen Spaltaktivität.

100,00	50,00	10,00	5,00	1,00	$\mu\text{M}$
0.075	0.574	0.608	0.782	0.824	$k_{\text{obs}} [\text{min}^{-1}]$

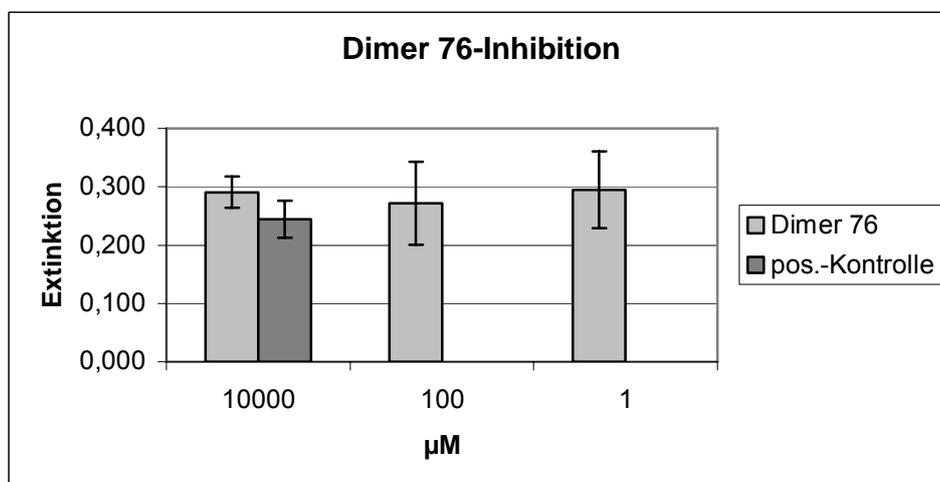
**Tabelle 17:** Aktivität des Hairpin-Ribozyms mit guanidierten Kanamycin **75** in verschiedenen Konzentrationen.

Bei der Inkubation des Substrates mit dem modifizierten Kanamycin **75** konnte keine Spaltaktivität des Kanamycin **75** festgestellt werden.

### Inhibitions-Experimente mit 1-Hydroxyethyl-5-amino-2,3-hydroxy-Cyclohexan-Dimer **76**:



Aufgrund der beschriebener Inhibitionseffekte von Makrozyklen, ist diese Substanzklasse als Vorstufe von Makrozyklen von Interesse für das Studium von Wechselwirkungen mit RNA.<sup>[117]</sup> Das Dimer **76** trägt zwei freie Aminogruppen und ist daher eine schwach basische Substanz. In dem ELISA-Test wurde das Dimer **76** auf inhibitorische Wirkung am Tat-TAR-Komplex untersucht.

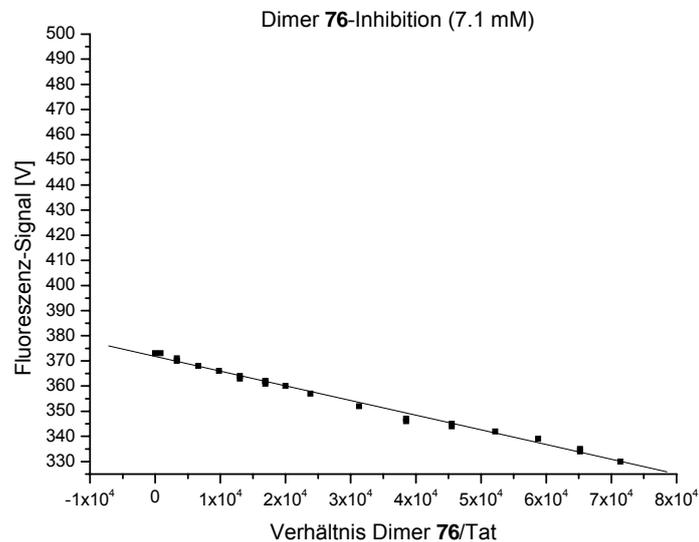


**Abbildung 90:** Effekt des Dimers **76** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

In dem ELISA-Test konnte keine Wechselwirkung zwischen dem Dimer **76** und TAR-RNA nachgewiesen werden, wie der Vergleich der Ergebnisse des Dimers **76** und der Positiv-Kontrolle zeigt.

<sup>117</sup> A.Kirschning, G.Chen, S.Müller, M.Lindner, M.Kalesse; *Tetrahedron* **2004**, *60*, 3505-3509.

Die Daten des ELISA-Versuches wurden im Folgenden durch Fluoreszenz-Titrations-Messungen überprüft. Dabei wird die Abnahme der Fluoreszenz-Intensität des Rhodaminegrün-markierten Tat-Peptides bei verschiedenen Dimer **76**-Konzentrationen verfolgt.



**Abbildung 91:** Effekt des Dimers **76** auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 7.1 mM.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Titration zeigte bis auf einen leichten Quench-Effekt des Fluorophors bei sehr hohen Konzentrationen keinen Einfluss auf das Tat-Peptid und die TAR-RNA.

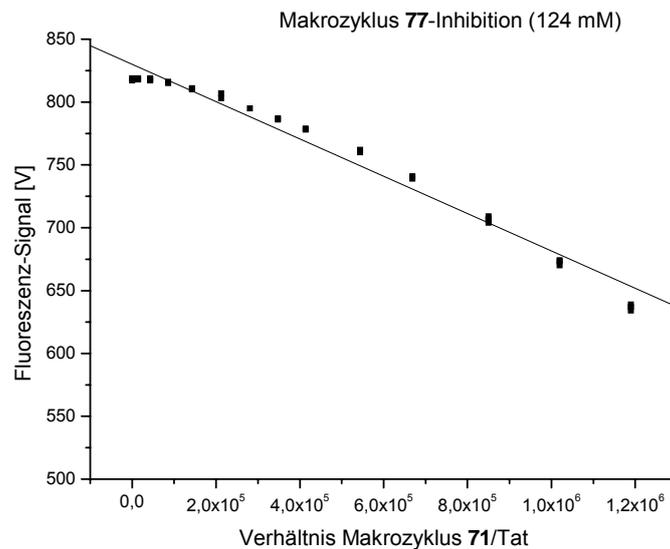
In Spalttest in dem ein 15 Nukleotide langes Substrat durch das Hairpin-Ribozym in ein 5-er und 9-er Fragment gespalten wird, zeigte das Dimer **76** Aktivität. Diese Inhibition war mit einer Hairpin-Ribozym-Aktivität von  $0.591 \text{ min}^{-1}$  bei einer Dimer **76**-Konzentration von 1 mM allerdings nicht besonders stark ausgeprägt.

1000	500	100	$\mu\text{M}$
0.591	0.822	1.050	$k_{\text{obs}} [\text{min}^{-1}]$

**Tabelle 18:** Aktivität des Hairpin-Ribozyms mit dem Dimer **76** in verschiedenen Konzentrationen.

In Spalttests in dem das Substrat des Hairpin-Ribozyms umgesetzt wird, zeigte das Dimer **76** keinen Effekt.





**Abbildung 93:** Effekt von Makrozyklus 77 auf das Tat-Peptid in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 124 mM.

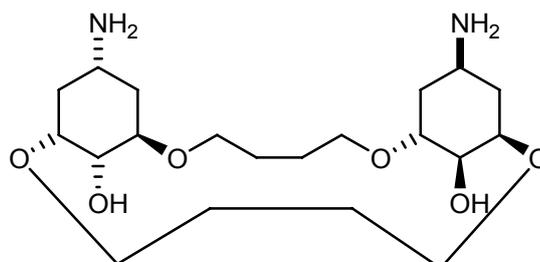
Aus der Fluoreszenz-Titration bei der gegen das Tat-Peptid titriert wurde, geht hervor, dass diese Substanz ein deutliches Quenchen des Fluorophor-Signals zeigt. Aufgrund der Linearität der Wechselwirkung zwischen Quencheffekt und Makrozyklus 77-Konzentration, wird eine unspezifische Wechselwirkung vermutet.

Beim Spalttest des Substrates des Hairpin-Ribozyms, zeigte der Makrozyklus 77 einen leichten inhibitorischen Effekt auf die Aktivität des Ribozyms. Die Aktivität des Ribozyms mit Makrozyklus 77 beträgt  $0.5 \text{ min}^{-1}$  bei einer Substanzkonzentration von 1 mM.

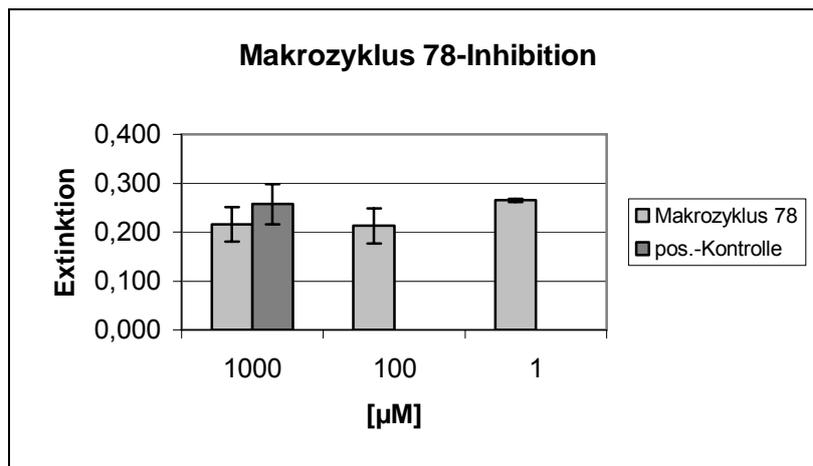
1000	100	$\mu\text{M}$
0.566	1.05	$k_{\text{obs}} [\text{min}^{-1}]$

**Tabelle 19:** Aktivität des Hairpin-Ribozyms mit Makrozyklus 77 in verschiedenen Konzentrationen.

### Inhibitions-Experimente mit Makrozyklus 78:



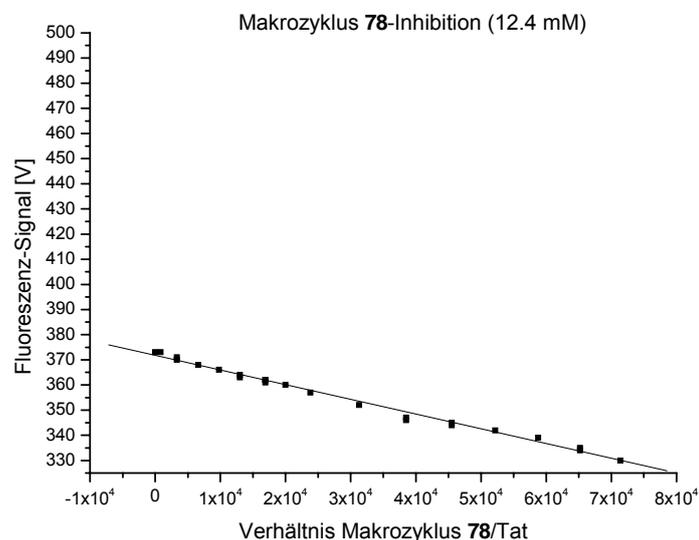
Dieses makrozyklische Derivat von Makrozyklus 76 wurde im ELISA-Test auf Wechselwirkung mit der TAR-RNA untersucht.



**Abbildung 94:** Effekt von Makrozyklus 78 auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

Im ELISA-Test konnte durch den Vergleich der Extinktionswerte bei verschiedenen Makrozyklus 78-Konzentrationen mit der Positiv-Kontrolle ein leichter inhibitorische Effekt des Komplexes nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis wurde in der Fluoreszenz-Titration überprüft. Dazu wurde die Änderung der Fluoreszenz-Intensität des Tat-Peptids bei verschiedenen Makrozyklus 78-Konzentrationen untersucht.



**Abbildung 95:** Effekt von Makrozyklus 78 auf das Tat-Peptid in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 12.4 mM.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Titration zeigte eine leichte Wechselwirkung von Makrozyklus 78 mit dem Tat-Peptid durch die Reduktion des Fluoreszenz-Signals. Die Linearität des Quencheffektes weist auf unspezifische Wechselwirkungen hin.

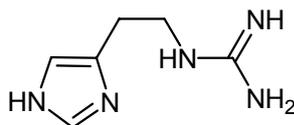
Der Spalttest des Hairpin-Ribozyms, bei dem das Ribozym sein Substrat, ein 14 Nukleotid langes Fragment in ein 5 und 9 Nukleotid langes Fragment spaltet, wies der Makrozyklus **78** als schwache Inhibitor der Spaltaktivität aus. Ab einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  von Makrozyklus **78** konnte eine Inhibition durch Rückgang der Spaltaktivität des Ribozyms nachgewiesen werden. Bei einer Konkretorkonzentration von 1 mM besaß das Hairpin-Ribozym nur noch eine Umsatzgeschwindigkeit von  $0.59 \text{ min}^{-1}$  und damit 50 % des Ausgangswertes.

1000	500	100	$\mu\text{M}$
0.589	0.796	0.908	$k_{\text{obs}} [\text{min}^{-1}]$

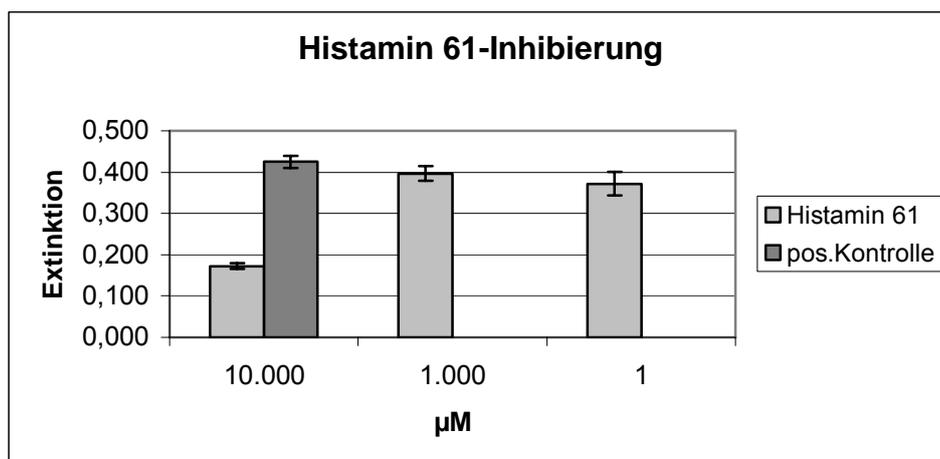
**Tabelle 20:** Aktivität des Hairpin-Ribozyms mit Makrozyklus **78** in verschiedenen Konzentrationen.

In Spalttests mit dem Substrat und Makrozyklus **78** ohne Ribozym konnte keine Spaltaktivität nachgewiesen werden.

### Inhibitions-Experimente mit guanidiertem Histamin **61**:



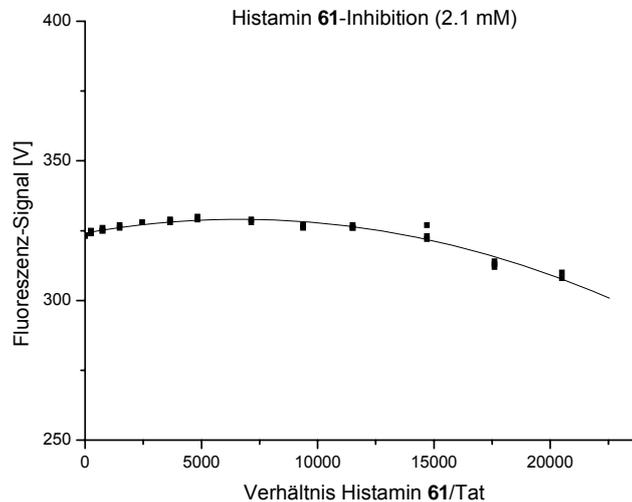
Das guanidierte Histamin **61** wurde als Testsubstanz gewählt, da Wechselwirkungseffekte des Imidazolringes oder der Guanidgruppe mit der Ausstülpung der TAR-RNA vermutet wurde. Eine Beteiligung von Histidin in der RNase A bei Spaltung von RNA ist beschrieben.<sup>[53]</sup> Freies Imidazol ist ebenfalls in der Lage, wie auch für Spermidin **26** und guanidiertes Spermidin **64** für tRNA beschrieben, diese zu spalten.<sup>[118]</sup>



**Abbildung 96:** Effekt von guanidiertem Histamin **61** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

<sup>118</sup> S.Fouace, C.Gaudin, S.Picard, S.Corvaisier, J.Renault, B.Carboni, B.Felden; *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 151–157.

Die Inhibitions-Ergebnisse im ELISA-Test mit guanidiertem Histamin **61** offenbarten einen leichten Effekt im Vergleich der Extinktionswerte mit der Positiv-Kontrolle. Dieses Ergebnis wurde in der Fluoreszenz-Titration überprüft, bei der bei verschiedenen Histamin **61**-Konzentrationen die Fluoreszenz-Intensität des Tat-Peptides verfolgt wurde.



**Abbildung 97:** Effekt von guanidiertem Histamin **61** auf das Tat-Peptid in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 2.1 mM.

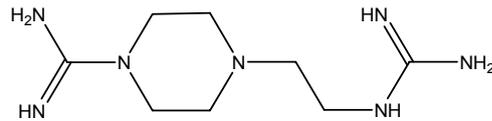
Die Auswertung der Fluoreszenz-Titrations-Messungen ergab zunächst eine scheinbare Zunahme des freien Peptids. Nach dem leichten Anstieg der Fluoreszenz-Intensität erfolgt ein ebenso leichtes Abfallen der Intensität. Daher scheint wie beim Hygromycin **9** ein Inhibitions- und ein Quencheffekt nebeneinander zu konkurrieren. Deshalb kann in der Fluoreszenz-Titration keine eindeutige Aussage über die Wirkung von dem guanidierten Histamin **61** gemacht werden.

In Spalttests im Hairpin-Ribozym-System zeigte sich diese Substanz als Inhibitor des Hairpin-Ribozyms. Dabei bewirkten erst Konzentrationen über 1 mM kompetitorische Effekte.

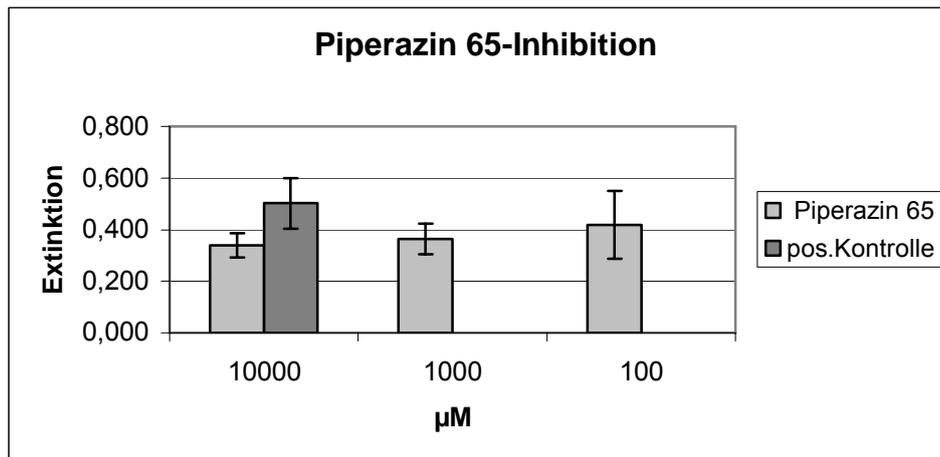
1000	100	10	$\mu\text{M}$
0.484	0.728	0.611	$k_{\text{obs}} [\text{min}^{-1}]$

**Tabelle 21:** Aktivität des Hairpin-Ribozyms mit guanidierten Histamin **61** in verschiedenen Konzentrationen

In Spalttests mit Substrat und dem modifizierten Histamin **61** konnte keine Spaltaktivität durch dieses Histamin **61** festgestellt werden.

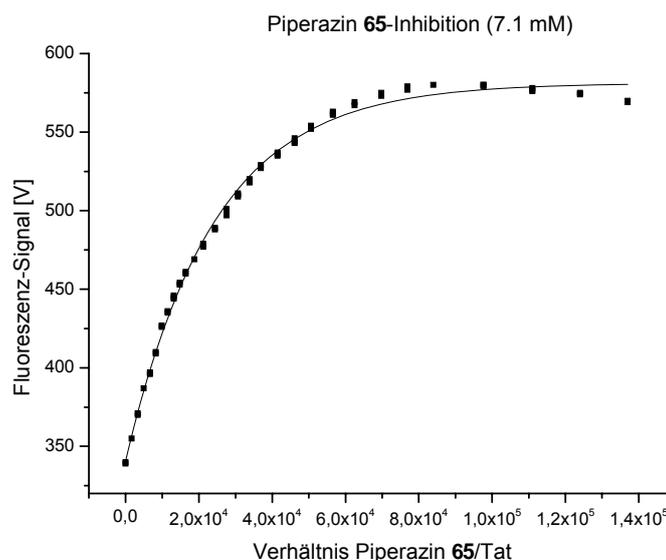
**Inhibitions-Experimente mit guanidiertem Piperazin 65:**

Das pharmakologisch relevante Piperazin **27** wurde als Basismolekül eingesetzt, in das Carboxyamidat-Derivat **65** überführt und anschließend im ELISA-Test auf die Wechselwirkung mit der TAR-RNA und dem Tat-Peptid untersucht.



**Abbildung 98:** Effekt von guanidiertem Piperazin **65** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

Im ELISA-Test zeigte sich, dass das guanidierte Piperazin **65** einen inhibitorischen Effekt auf den Tat-TAR-Komplex ausübt, die per Fluoreszenz-Titration-Messung überprüft wurde.



**Abbildung 99:** Effekt von guanidiertem Piperazin **65** auf das Tat-Peptid in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 7.1 mM.

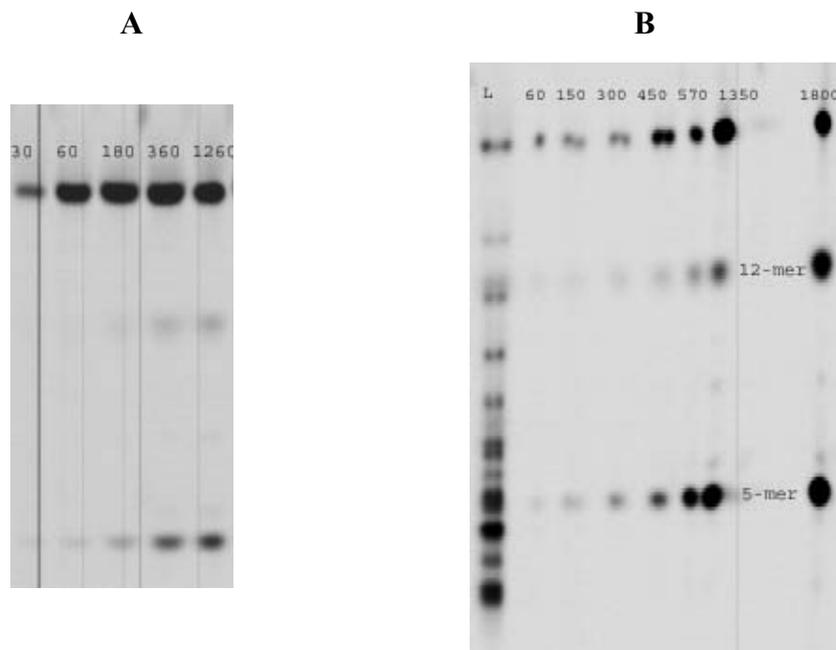
In der Fluoreszenz-Titrations-Auswertung konnte mit Hilfe des Programms BPC-Fit eine Dissoziationskonstante ( $K_{\text{Diss}}$ ) von 449  $\mu\text{M}$  mit einem Fehlerfaktor 1.03 berechnet werden. Damit konnte die Fluoreszenz-Titration das Ergebnis des ELISA-Tests bestätigen. Beide Messmethoden zeigten einen sehr schwachen, inhibitorischen Einfluss von guanidiertem Piperazin **65** auf den Tat-TAR-Komplex.

In Spalttests, bei denen das Hairpin-Ribozym sein Substrat von 14 Nukleotiden Länge in ein 5- und 9-Nukleotid großes Fragment spaltet, konnte bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  guanidierten Piperazin **65** bereits eine deutliche Reduzierung der Umsatzgeschwindigkeit nachgewiesen werden.

1000	100	10	$\mu\text{M}$
0.401	0.589	0.639	$k_{\text{obs}} [\text{min}^{-1}]$

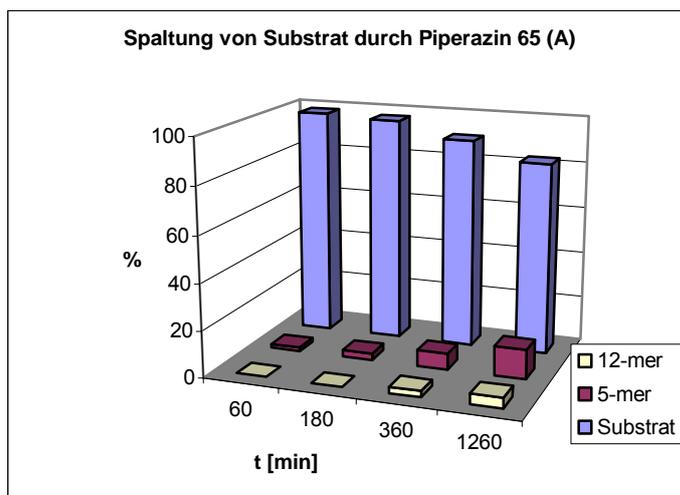
**Tabelle 22:** Aktivität des Hairpin-Ribozyms mit guanidierten Piperazin **65** bei verschiedenen Konzentrationen.

Die Spalttests von guanidierten Piperazin **65** und dem Substrat des Hairpin-Ribozyms zeigten starke und spezifische Spaltaktivität. Dabei spaltete das guanidierte Piperazin **65** zwischen dem 5. und 6. als auch zwischen dem 12. und 13. Nukleotid des Substrats. Die Aktivität ist so ausgeprägt, dass nach bereits 60 Minuten Inkubationsdauer das Hauptprodukt, das fünf Nukleotid lange Fragment detektiert werden konnte.



**Abbildung 100:** Inkubation von guanidierten Piperazin **65** mit Substrat in Abwesenheit von Ribozym und Magnesium-Ionen. Es bilden sich ausschließlich das 5- und das 12-Nukleotid lange Spaltfragment. Links (A) erster Versuch, Zeiten bis 1260; rechts (B) zweiter Versuch mit weiteren Zwischenzeiten und einer Zeitspanne bis 1800 Minuten.

Die Verhältnisse der einzelnen Spaltprodukte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ließen sich reproduzieren. So ist im ersten Versuch (A) die Zeitabhängigkeit der Spaltprodukte des 15-mer-Substrates klar erkennbar, in der Reproduktion (B) bei der nach verschiedenen Zeitpunkten die Reaktion gestoppt wurde, ist die Spaltaktivität nicht gut detektierbar. Bei beiden Versuchsreihen sind die Abnahme des Substrates und die Zunahme des 5- und des 12-Nukleotid langen Spaltproduktes erkennbar. Es konnte eine Umsatzrate von  $0.0018 \text{ min}^{-1}$  für das guanidierte Piperazin **65** berechnet werden.



Zeit [min]	Substrat	12-mer	5-mer
60	98.3	1.7	0.0
180	97.0	3.0	0.0
360	90.5	6.9	2.7
1260	82.8	12.8	4.4

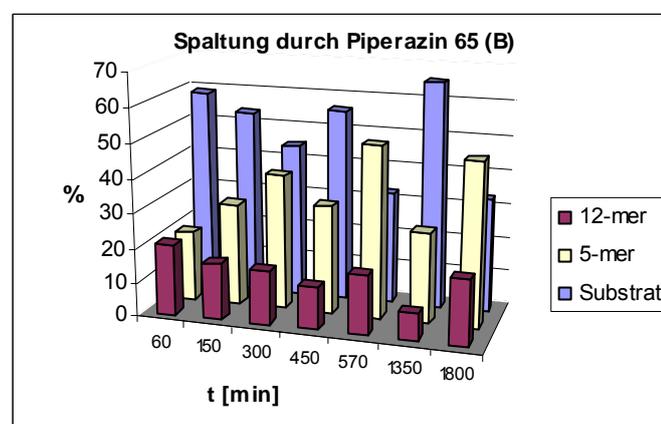
**Tabelle 23:** Substratverteilung nach Spaltung durch guanidiertes Piperazin **65** nach verschiedenen Zeitpunkten in Versuch A.

**Abbildung 101:** Darstellung der Spaltproduktverteilung nach verschiedenen Inkubationszeiten im Versuch A.

Der primäre Unterschied zwischen den beiden Versuchsreihen liegt in der unterschiedlichen Verteilung der Spaltprodukte. Im ersten Versuch (A) erreicht das 12- und das 5-Nukleotide lange Spaltfragment nicht die Konzentrationen, die bei Versuch B gebildet wurde. Außerdem schwanken die Werte in Versuchsreihe B stark und zeigen lediglich eine Tendenz auf.

Zeit [min]	Substrat	12-mer	5-mer
60	58.9	20.6	20.4
150	53.7	16.4	29.9
300	44.8	15.8	39.4
450	56	12.3	31.7
570	32.9	17.1	50
1350	65.7	8	26.3
1800	33.3	19.1	47.6

**Tabelle 24:** Substratverteilung nach Spaltung durch guanidiertes Piperazin **65** nach verschiedenen Zeitpunkten in Versuchsreihe B.



**Abbildung 102:** Darstellung der Spaltproduktverteilung nach verschiedenen Inkubationszeiten in Versuchsreihe B.

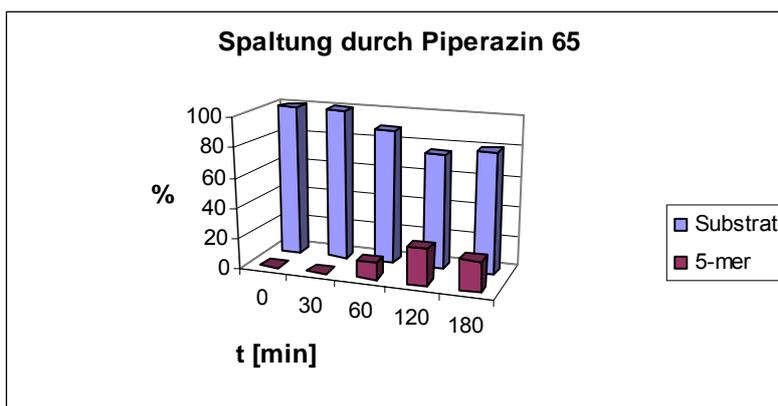


**Abbildung 103:** Multiple-Turn-Over-Versuch ohne  $MgCl_2$ -Zusatz mit guanidiertem Piperazin **65**.

Im *Single-* als auch im *Multiple-Turn-Over-*Versuch kann bereits nach 30 Minuten das erste Spaltprodukt nachgewiesen werden. Damit scheint guanidiertes Piperazin **65** trotz Ausbildung des RNA-Doppelstranges Spaltaktivität beizubehalten. Da auch bei diesen Versuchen bereits nach 30 Minuten die ersten Spaltprodukte auftreten, scheint die Aktivität dadurch nicht deutlich herabgesetzt worden zu sein. Auch das Spaltmuster ist dabei nicht verschoben worden. Es bildet sich nachweislich weiterhin das 5-mer, was aber auch durch schwache Aktivität des Ribozym erklärt werden kann. Das 12-mer kann nicht nachgewiesen werden; allerdings ist die Inkubationszeit mit 180 Minuten etwas zu kurz oder die Auftragsmenge in den Gelen etwas zu gering gewesen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich das 12-mer auch gebildet hat.



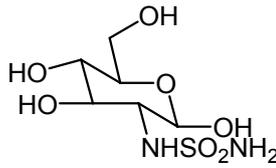
**Abbildung 104:** *Single-Turn-Over-*Versuch ohne  $MgCl_2$ -Zusatz mit Piperazin **65**.



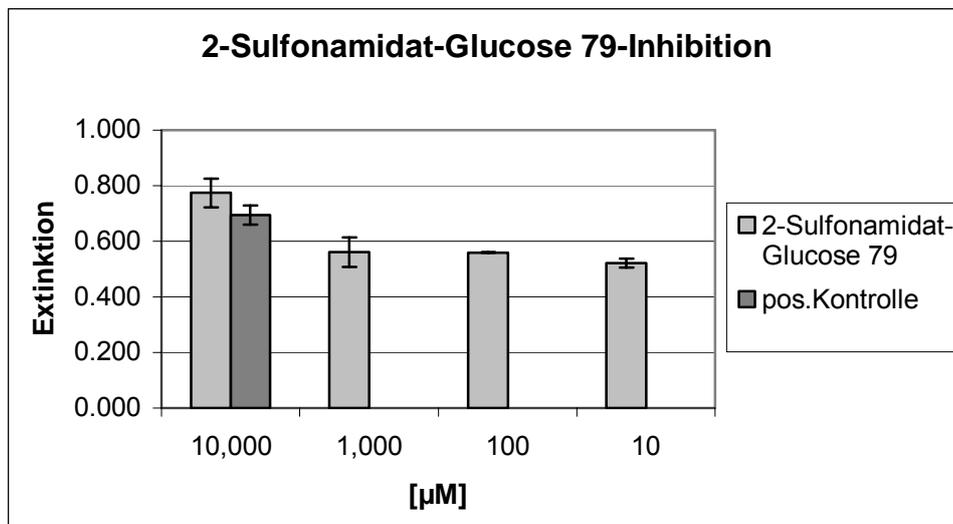
**Abbildung 105:** Zeitabhängige Darstellung der Bildung des 5 Nukleotid langen Spaltproduktes im *Single-Turn-Over-*Versuch.

Die Zeitabhängigkeit der Bildung des 5-Nukleotid langen Spaltproduktes ist im Gegensatz zur oben gezeigten Graphik im *Multiple-Turnover-*Versuch auswertbar. Die Menge des gebildeten 5-Nukleotid langen Fragmentes korreliert mit der

Zeit. Die Umsatzgeschwindigkeit konnte mit  $2.74 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  berechnet werden. Nur kann die Frage nicht geklärt werden, ob es an der Restaktivität des Hairpin-Ribozym liegt, das auch noch ohne  $MgCl_2$  Spaltaktivität besitzt, oder durch eine Spaltung vom guanidierten Piperazin **65** hervorgerufen wird.

**Inhibitions-Experimente mit 2-Sulfonamidat-Glucose 79:**

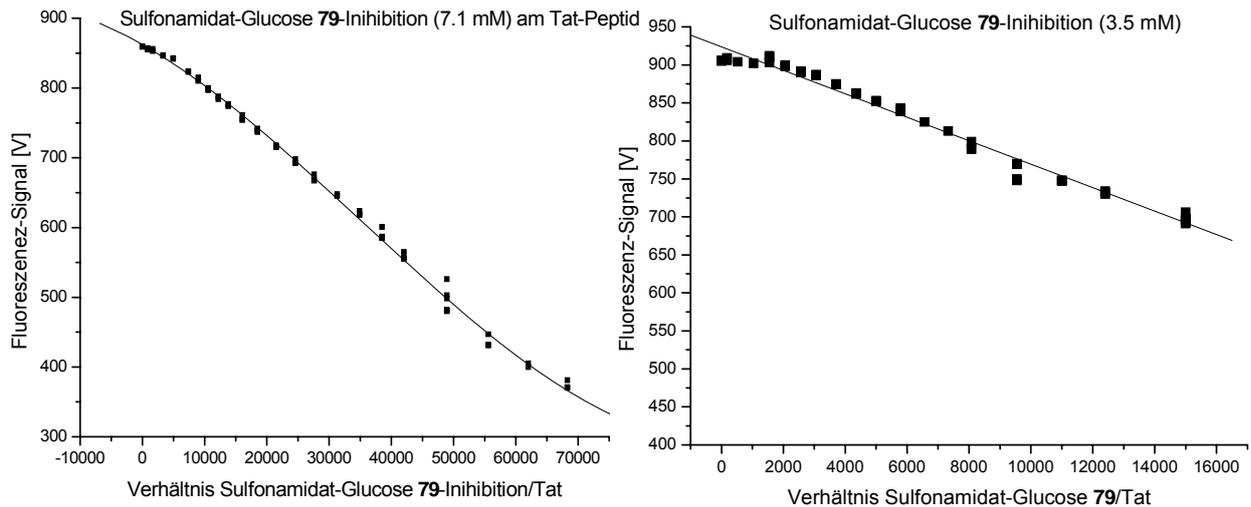
Die 2-Sulfonamidat-Glucose **79** ist zusammen mit dem 1,3-Di-sulfonamidat-Cyclitol **80** das einzige Molekül, das eine acide funktionelle Gruppe trägt. Es wurde auf die Wechselwirkung mit dem Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test untersucht.



**Abbildung 106:** Effekt von 2-Sulfonamidat-Glucose **79** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

Im ELISA-Test konnte durch Vergleich der Proben mit der Positiv-Kontrolle kein inhibitorischer Effekt nachgewiesen werden.

Die 2-Sulfonamidat-Glucose **79** wurde ebenfalls in der Fluoreszenz-Titration auf die Bindung an das Tat-Peptid untersucht. Dazu wurde die Fluoreszenz-Intensität des mit Rhodaminegrün-markierten Tat-Peptids bei verschiedenen 2-Sulfonamidat-Glucose **79**-Konzentrationen verfolgt.

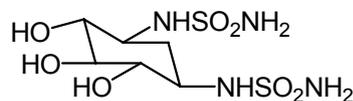


**Abbildung 107:** Effekt von 2-Sulfonamidat-Glucose **79** auf das Tat-Peptid in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 7.1 mM und 3.5 mM.

Die Fluoreszenz-Titrations-Messung ergab eine sehr schwache Bindung von 2-Sulfonamidat-Glucose **79** an das Peptid, nachgewiesen durch die Fluoreszenz-Intensitäts-Reduzierung. Eine Bestimmung der Dissoziationskonstante durch das Programm BPC-Fit konnte nicht erfolgen, weil keine Sättigung des Peptids mit der 2-Sulfonamidat-Glucose **79** erreicht werden konnte, aber der Kurvenverlauf auf eine Sättigungsgrenze hindeutet.

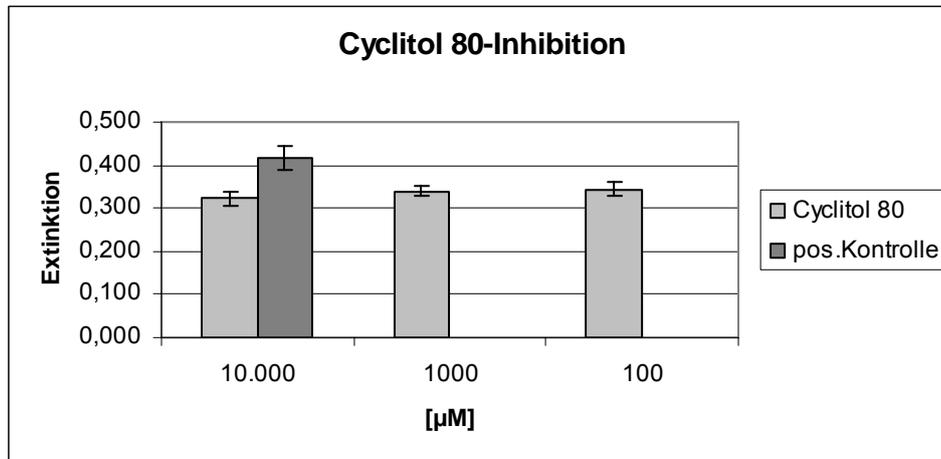
In Spalttests, bei dem das Substrat des Hairpin-Ribozyms umgesetzt wird, zeigte die 2-Sulfonamidat-Glucose **79** keinen Effekt. In Spalttests ohne Ribozym und in Anwesenheit als auch Abwesenheit von Magnesium-Ionen und sowohl auch in *Multiple-* und *Single-Turn-Over*-Versuchen zeigte 2-Sulfonamidat-Glucose **79** ebenfalls keine Aktivität.

#### **Inhibitions-Experimente mit 1,3-Di-sulfonamidat-Cyclitol **80**:**



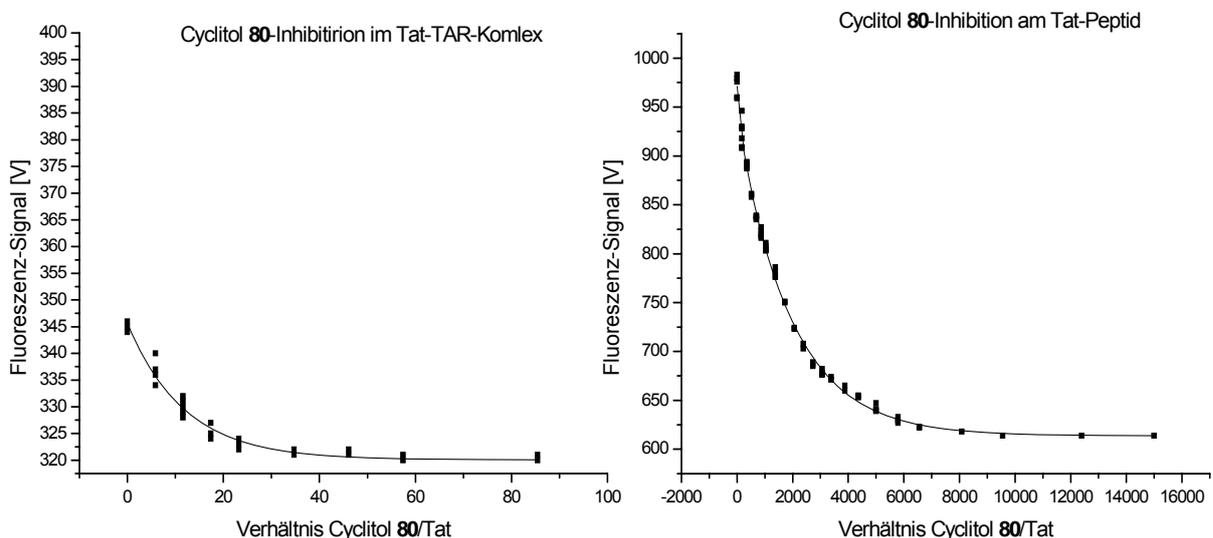
1,3-Di-sulfonamidat-Cyclitol **80** besitzt wie die 2-Sulfonamidat-Glucose **79** acide funktionelle Substituenten. Dabei bilden beide den polaren Gegensatz zu den anderen Substanzen, die potentiell positiv geladen sind. Da bisher die Erhöhung der positiven Ladungen durch Verwendung von Carboxamidat-Gruppen den inhibitorische Effekt im TAR-Tat-Komplex gesteigert hatten und eine ionische Wechselwirkung dieser Moleküle mit dem Phosphatrückgrad der RNA oder in der „*Bulge*“-Region postuliert wird, wurde, wie bereits bei 2-Sulfonamidat-Glucose **79** gezeigt, nur eine leichte inhibitorische Wirkung

erwartet. Zur Überprüfung der Wechselwirkung von 1,3-Di-sulfonamidat-Cyclitol **80** mit der TAR-RNA wurde ein ELISA-Test durchgeführt.



**Abbildung 108:** Effekt von 1,3-Di-sulfonamidat-Cyclitol **80** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

Die Auswertung des ELISA-Tests durch einen Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Konzentrationen von 1,3-Di-sulfonamidat-Cyclitol **80** mit der Positiv-Kontrolle wiesen eine eindeutige Inhibition des Tat-TAR-Komplexes auf. Diese Inhibition wurde in der Fluoreszenz-Titration überprüft. Dazu wurde die Veränderung der Fluoreszenz-Intensität bei verschiedenen 1,3-Di-sulfonamidat-Cyclitol **80**-Konzentrationen verfolgt.

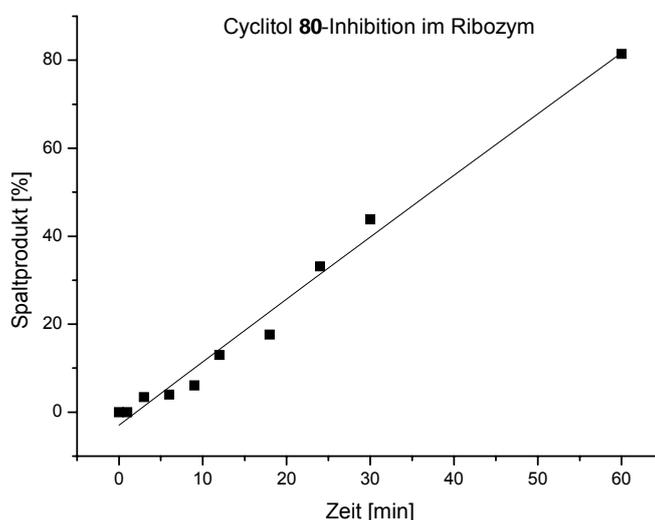


**Abbildung 109:** Effekt von Cyclitol **80** auf den Tat-TAR-Komplex (links) und auf das Tat-Peptid in der Fluoreszenz-Titration bei je einer maximalen Konzentration von 1.5 mM.

Bei der Auswertung der Titration von 1,3-Di-sulfonamidat-Cyclitol **80** gegen den Tat-TAR-Komplex zeigte sich ein Quencheffekt, der bereits durch einen Sättigungsbereich auf eine selektive Bindung am Tat-Peptid zurück schließen läßt. In einem Folgeexperiment, in

dem 1,3-Di-sulfonamidat-Cyclitol **80** gegen das Tat-Peptid titriert wurde, konnte die Bindung an das Tat-Peptid bestätigt und die Bindungskonstante berechnet werden. Die Dissoziationskonstante beträgt 23.4  $\mu\text{M}$  (Fehlerfaktor 1.1).

Die Inhibitions-Experimente in den Spalt-Tests des Hairpin-Ribozyms, in dem das Substrat des Hairpin-Ribozyms in seine Fragmente gespalten wird, wiesen ebenfalls einen Effekt auf. Die ersten Tests mit einer Konzentration von 1 mM 1,3-Di-sulfonamidat-Cyclitol **80** zeigten, dass diese Substanz sehr aktiv ist, da nach 60 Minuten Inkubationsdauer keine Sättigung der Spaltprodukte erreicht werden konnte. Bei 100  $\mu\text{M}$  1,3-Di-sulfonamidat-Cyclitol **80** ist eine Inhibition mit einer Spaltaktivität des Ribozyms von 0.765  $\text{min}^{-1}$  immer noch gut detektierbar.

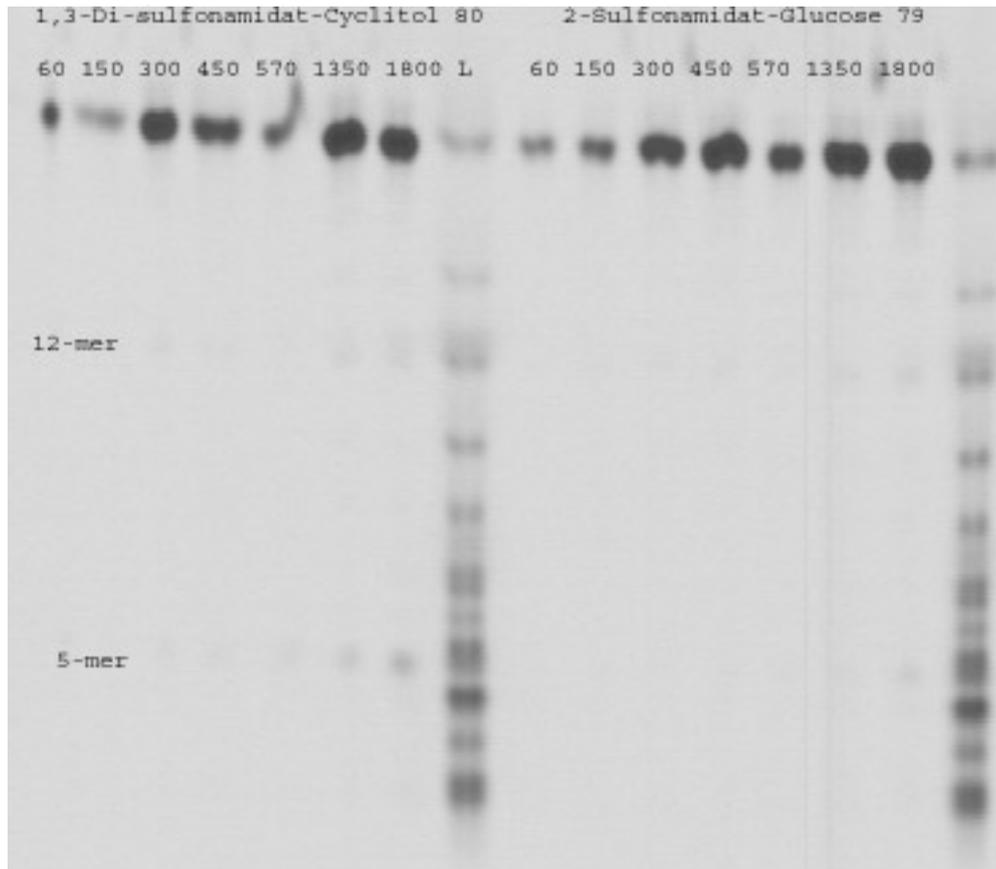


**Abbildung 110:** Aktivität des Hairpin-Ribozyms in Anwesenheit von 500  $\mu\text{M}$  Cyclitol **80**.

1000	500	100	10	$\mu\text{M}$
0.029	0.258	0.765	1.000	$k_{\text{obs}} [\text{min}^{-1}]$

**Tabelle 25:** Aktivität des Hairpin-Ribozyms in Anwesenheit von 1,3-Di-sulfonamidat-Cyclitol **80** bei verschiedenen Konzentrationen.

In den Spalttests, in denen das Substrat des Hairpin-Ribozyms gespalten wurde, wurde 1,3-Di-sulfonamidat-Cyclitol **80** mit diesem Substrat inkubiert. 1,3-Di-sulfonamidat-Cyclitol **80** wirkte als schwach aktive Substanz. Es spaltete das 15 Nukleotid lange Substrat in gleicher Weise wie guanidiertes Piperazin **65** und zwar in das 12- und das 5-Nukleotid lange Fragment. Die Substanz 2-Sulfonamidat-Glucose **79** zeigt dagegen als Referenzwert keine Aktivität.

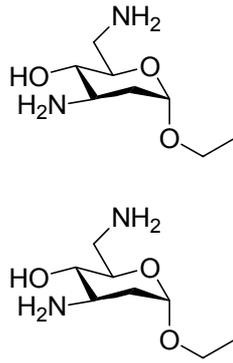


**Abbildung 111:** Inkubation des Substrates ohne Ribozym und ohne Magnesium-Ionen mit 1,3-Di-sulfonamidat-Cyclitol **80** (links) und 2-Sulfonamidat-Glucose **79** (rechts) als Vergleich. Nur 1,3-Di-sulfonamidat-Cyclitol **80** zeigt dabei Spaltaktivität, die nach 1350 Minuten erkennbar wird.

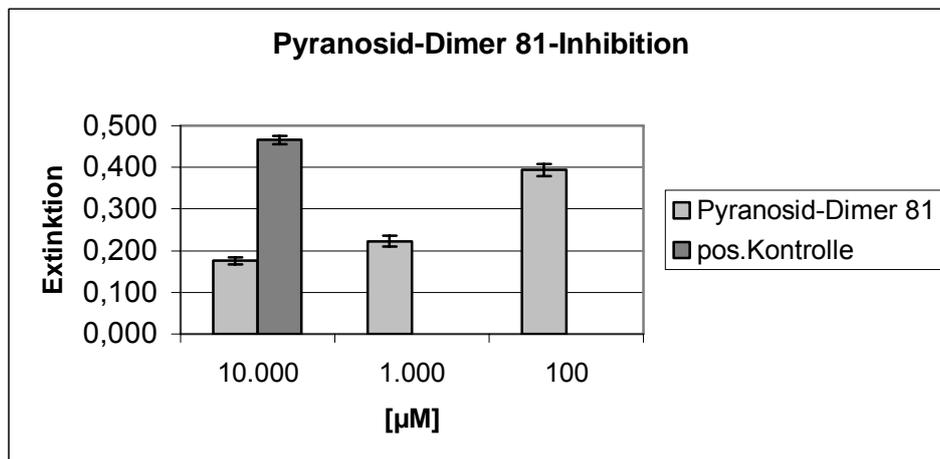
Die Vergleichssubstanz 2-Sulfonamidat-Glucose **79** wies keine Aktivität in dem Hairpin-Ribozym-System als auch wenig inhibitive Aktivität in dem Tat-TAR-Komplex auf. Da beide Substanzen einfache Hexosen sind, wäre ein tieferes Verständnis über die molekularen Mechanismen der Wechselwirkung von Di-sulfonamidat-Cyclitol **36** mit der RNA sehr wünschenswert.

Zeit	Substrat	Spaltprodukt
1350	97.8	2.2
1800	97.4	2.6

**Tabelle 26:** Bildung des Spaltproduktes durch Di-sulfonamidat-Cyclitol **36** in Abhängigkeit von der Zeit.

**Inhibitions-Experimente mit Ethyl-2,3,6-trodesoxy-3,6-amino- $\alpha$ -D-ribohexopyranosid-Dimer **81**:**

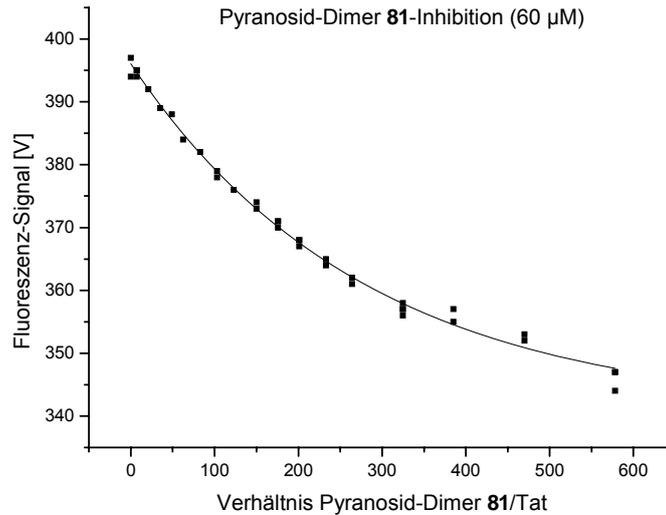
Das Pyranosid-Dimer **81** wurde im ELISA-Test auf inhibitorische Wirkung des Tat-TAR-Komplexes untersucht.



**Abbildung 112:** Effekt von Pyranosid-Dimer **81** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

Im ELISA-Test weist Pyranosid-Dimer **81** im Vergleich zur Positiv-Kontrolle einen starken inhibitorischen Effekt auf.

Dieses Ergebnis wurde in der Fluoreszenz-Titration bestätigt. Dazu wurde die Fluoreszenz-Intensität des mit Rhodaminegrün-markierten Tat-Peptids bei verschiedenen Pyranosid-Dimer **81**-Konzentrationen verfolgt.



**Abbildung 113:** Effekt von Pyranosid-Dimer **81** auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei je einer maximalen Konzentration von 60  $\mu\text{M}$ .

Aus der Fluoreszenz-Titrations-Messung konnte ein deutlicher Effekt der Signalreduzierung durch Pyranosid-Dimer **81** nachgewiesen werden. Durch die nicht lineare Fluoreszenzabnahme wird eine selektive Bindung von Pyranosid-Dimers **81** an das Tat-Peptid vermutet.

In den Spalttests, in denen das Substrat des Hairpin-Ribozym umgesetzt wird, können inhibitorische Effekte erprobt werden. Hier wird das Hairpin-Ribozym in Gegenwart von 1 mM Pyranosid-Dimer **81** auf einen Umsatz von  $0.587 \text{ min}^{-1}$  reduziert.

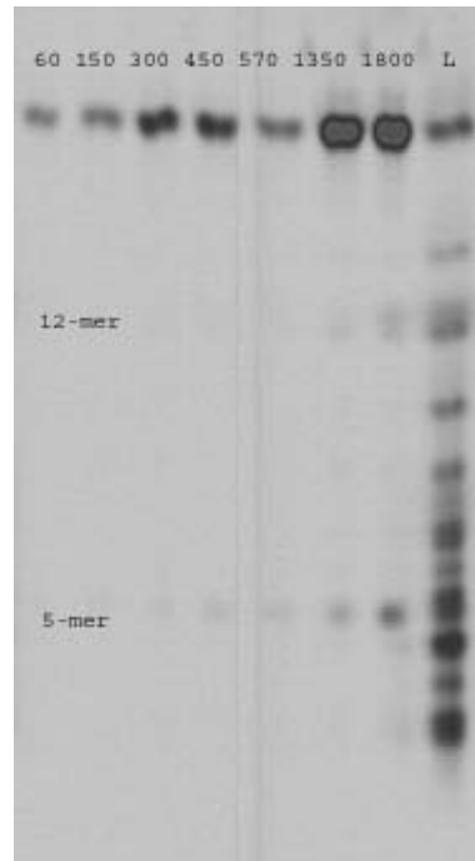
1000	500	$\mu\text{M}$
0.587	0.977	$[\text{k}_{\text{obs}} \text{ min}^{-1}]$

**Tabelle 27:** Aktivität des Hairpin-Ribozyms in Anwesenheit von Pyranosid-Dimer **81** bei verschiedenen Konzentrationen.

Bei den Spalttests mit Substrat und Pyranosid-Dimer **81** ohne Magnesium-Ionen konnte Spaltaktivität und Bildung von 12- und 5-Nukleotid langen Fragmenten beobachtet werden.

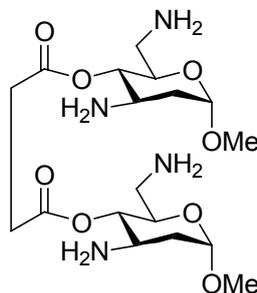
Zeit	Substrat	5-er Produkt
150	95.7	4.3
300	97.9	2.1
1200	91.1	8.9

**Tabelle 28:** Werte der Spaltung des Substrates durch Pyranosid-Dimer **81** ohne Ribozym und ohne  $MgCl_2$ .

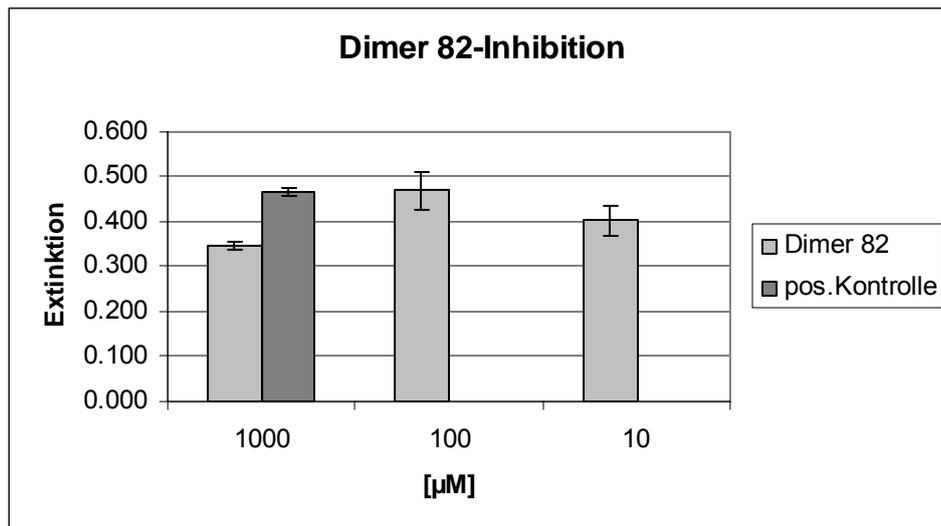


**Abbildung 114:** Inkubation von Pyranosid-Dimer **81** mit Substrat in Abwesenheit von Ribozym und Magnesium-Ionen. Es bilden sich ausschließlich das 5- und das 12-nukleotid lange Spaltprodukt.

### Inhibitions-Experimente mit Bernsteinsäure-di-Methyl-3,6-Diamino-2,3,6-desoxy- $\alpha$ -D-arabino-hexopyranosid-Dimer **82**:



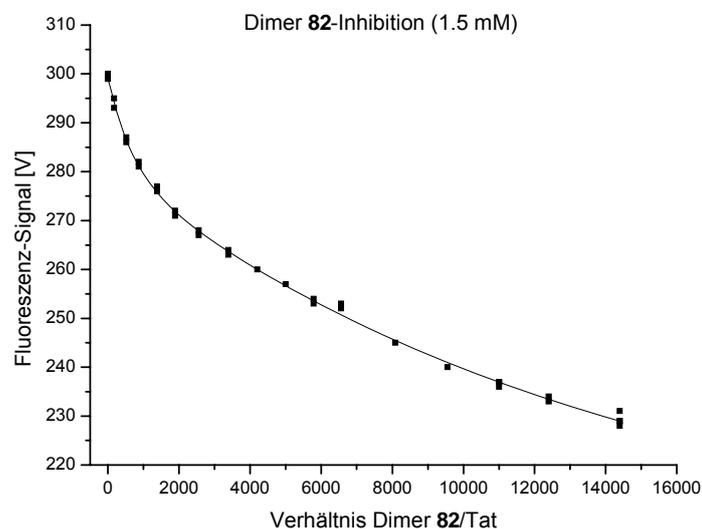
Das Dimer **82** wurde im ELISA-Test aufgrund der chemischen Ähnlichkeit zu Pyranosid-Dimer **81** auf eine Wechselwirkung mit dem Tat-TAR-Komplex untersucht. Aufgrund der dieser Ähnlichkeit von Dimer **82** zu Pyranosid-Dimer **81** wurde eine Bindung an das Tat-Peptid vermutet.



**Abbildung 115:** Effekt von Dimer **82** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

Im ELISA-Versuch konnte eine leichte Inhibition des Tat-TAR-Komplexes bei unterschiedlichen Konzentrationen von Dimer **82** zur Positiv-Kontrolle beobachtet werden.

In der Fluoreszenz-Titration wurde zur Verifizierung der Ergebnisse die Wechselwirkung von Dimer **82** mit dem Tat-Peptid untersucht. Dazu wurde die Fluoreszenz-Intensität des Tat-Peptids bei verschiedenen Dimer-**82**-Konzentrationen verfolgt.



**Abbildung 116:** Effekt von Dimer **82** auf das Tat-Peptid in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 1.5 mM.

Durch das Programm BPC-Fit konnte über die Fluoreszenz-Titration eine Dissoziationskonstante von 2.3 mM (Fehlerfaktor 1.12) für Dimer **82** gegen das Tat-Peptid ermittelt werden. Somit konnte durch die Fluoreszenz-Titration die im ELISA-Test

detektierte Inhibition des Tat-TAR-Komplexes durch eine Bindung von Dimer **82** an das Peptid bestätigt werden.

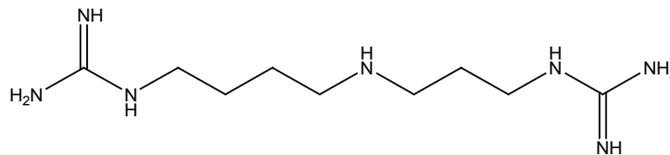
In Spalttests, in denen das Substrat des Hairpin-Ribozyms umgesetzt wurde, konnten inhibitorische Effekte studiert werden. Durch die Zugabe von 1 mM Dimer **82** zu dem Hairpin-Ribozym konnte ein Rückgang der Umsatzrate von  $0.587 \text{ min}^{-1}$  bestimmt werden.

1000	500	100	$\mu\text{M}$
0.570	0.626	0.806	$k_{\text{obs}} [\text{min}^{-1}]$

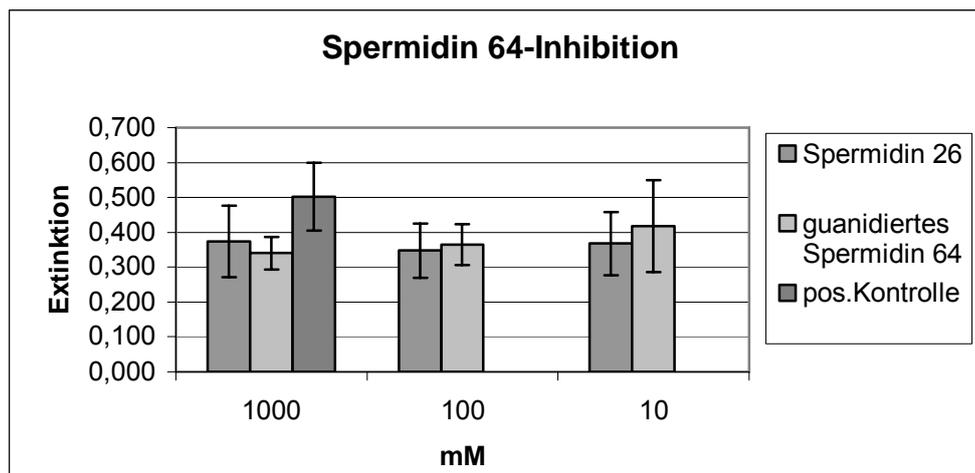
**Tabelle 29:** Aktivität des Hairpin-Ribozyms mit Pyranosid-Dimer **82** in verschiedenen Konzentrationen.

Bei Spalttests mit Substrat und Dimer **82** konnte keine Spaltaktivität beobachtet werden.

#### Inhibitions-Experimente mit guanidierten Spermidin **64**:



Spermidin **26** bindet mit seinen Aminogruppen an den Phosphatgruppen des RNA-Rückgrades.<sup>[119]</sup> Der Abstand zwischen den Aminogruppen des Spermidins **26** ist nahezu so groß wie die Abstände der Phosphate im RNA-Rückgrad.<sup>[120]</sup> Aufgrund dieser Erkenntnis wurde das Guanidin-modifizierte Spermidin **64** im ELISA-Test auf Wechselwirkung mit TAR-RNA studiert.

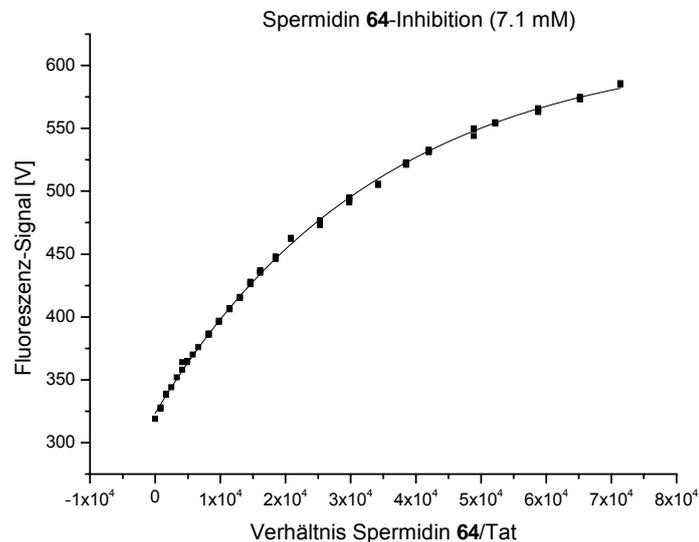


**Abbildung 117:** Effekt von guanidierten Spermidin **64** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

<sup>119</sup> M.Panicot, E.G.Minguet, A.Ferrando, A.Tiburcio; *The plant cell* **2002**, *14*, 2539-2551.

<sup>120</sup> S.Fouace, C.Gaudin<sup>1</sup>, S.Picard<sup>2</sup>, S.Corvaisier<sup>1</sup>, J.Renault, B.Carboni B.Felden; *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1, 151-157.

Es wurden verschiedene Konzentrationen von guanidierten Spermidin **64** und Spermidin **26** eingesetzt. Im Vergleich zur Positiv-Kontrolle ist für beide Substanzen eine leichte Inhibition erkennbar. Beim direkten Vergleich des modifizierten zum unmodifizierten Spermidin **26** ist keine Verstärkung der Inhibition des Tat-TAR-Komplexes ersichtlich.



**Abbildung 118:** Effekt von guanidierten Spermidin **64** auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 7.1 mM.

Die über BPC-Fit ausgewerteten Fluoreszenz-Titrations-Daten zeigten für guanidiertes Spermidin **64** eine Dissoziationskonstante ( $K_{\text{Diss}}$ ) von 159  $\mu\text{M}$  mit einem Fehlerfaktor von 1.16. Durch die Carboxyamidierung konnte damit eine 3-fache Inhibitionssteigerung gegen den Komplex im Vergleich zum Spermidin **26** erreicht werden (Spermidin,  $K_{\text{Diss}} = 0.53$  mM, Fehlerfaktor 1.55).

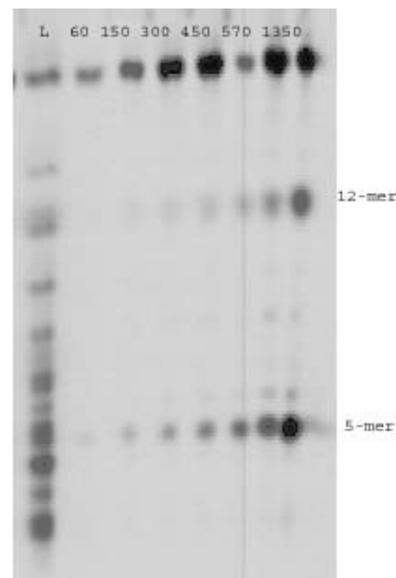
In Spalttests, in denen das Substrat des Hairpin-Ribozyms umgesetzt wird, können inhibitorische Effekte studiert werden. Guanidiertes Spermidin **64** wurde auf Inhibition des Hairpin-Ribozyms hin untersucht.



**Abbildung 119:** *Single-Turnover-* Spaltests mit Spermidin **64** ohne Ribozym (links) und mit Ribozym (rechts). Hauptprodukt ist 5 Nucleotid lange Fragment, aber auch das 12 Nucleotid lange Fragment wird mit Ribozym unter *Single-Turnover-Bedingungen* gebildet.

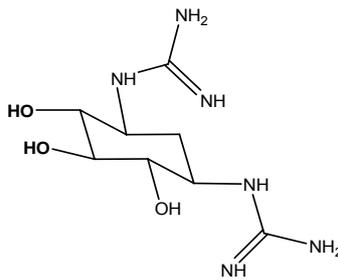
Dabei weist das in den Spalttests eingesetzte, guanidierte Spermidin **64** nur eine schwache Hemmaktivität gegenüber dem Ribozym mit einer Aktivität von  $0.193 \text{ min}^{-1}$  auf. In den Spalttests in denen guanidiertes Spermidin **64** mit dem Substrat des Hairpin-Ribozyms inkubiert wurde, zeigte es eine selbstständige Spaltaktivität. Guanidiertes Spermidin **64**

spaltete bevorzugt zwischen dem 12. und dem 13. als auch zwischen dem 5. und 6. Nucleotid. Allerdings sind auch andere Spaltfragmente erkennbar, wie die 6-, 8- und das 10 Nucleotide lange Spaltfragmente zeigen. Vom Spermidin **26** ist diese Spaltaktivität bekannt.<sup>[97]</sup>

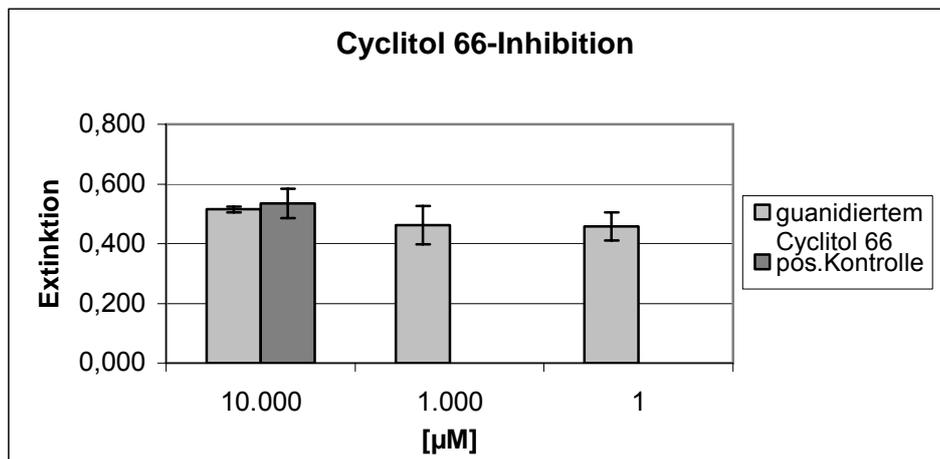


**Abbildung 120:** *Multi-Turnover-* Versuch mit Spermidin **64** ohne Ribozym und ohne Magnesium-Ionen. Hauptprodukt ist das 5er Fragment, aber auch das 12er Fragment wird gebildet.

Im *Single-Turnover*-Versuch wurde getestet, ob guanidiertes Spermidin **64** auch einen RNA-Doppelstrang spalten kann. Dabei bildet sich im Versuch das 5 Nucleotid lange Fragment, dessen Bildung aber auch durch Restaktivität des Ribozyms erklärt werden könnte. Die 12-er Bande ist aber verschwunden, was auf eine Hemmung durch das Ribozym hinweisen könnte, welches mit dem Substrat einen RNA-Doppelstrang ausgebildet haben könnte. Andererseits ist die Bildung der 12 Nucleotide langen Spaltprodukte weniger stark ausgebildet als die des 5-er Fragmentes. Dadurch hebt sich das 12-er Fragment noch weniger stark vom Hintergrund ab und verwischt Detektionsgrenzen.

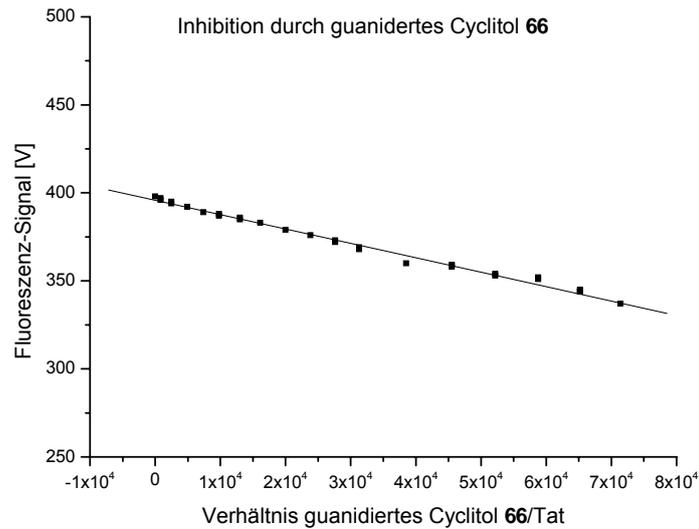
**Inhibitions-Experimente mit guanidiertem Cyclitol 66:**

Das Cyclitol **3** ist als Bestandteil der meisten Aminoglykoside bei der Wechselwirkung mit der RNA beteiligt. Daher wurde guanidierte Cyclitol **66** auf Wechselwirkung mit dem Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test untersucht.



**Abbildung 121:** Effekt von guanidiertem Cyclitol **66** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

Im ELISA-Test konnte für das guanidierte Cyclitol **66** kein inhibitorischer Effekt festgestellt werden. Die Fluoreszenz-Titration verifizierte das im ELISA-Test erhaltene Ergebnis und verfolgte die Änderung der Fluoreszenz-Intensität bei verschiedenen Cyclitol **66**-Konzentrationen.



**Abbildung 122:** Effekt von guanidiertem Cyclitol **66** auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 7.1 mM.

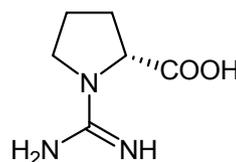
In der Auswertung der Fluoreszenz-Titration konnte ein Quencheffekt bei sehr hohen Konzentrationen an guanidiertem Cyclitol **66** nachgewiesen werden. Aufgrund der Linearität zwischen Quencheffekt und guanidiertem Cyclitol **66** konnte keine spezifische Bindung an einer der Komponenten des Tat-TAR-Komplexes nachgewiesen werden.

In Spalttests, in dem das Substrat des Hairpin-Ribozyms durch das Hairpin-Ribozym umgesetzt wird, zeigte das guanidierte Cyclitol **66** eine sehr schwache Inhibitoraktivität.

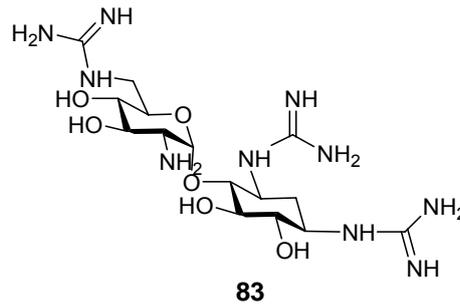
1000	100	$\mu\text{M}$
0.603	0.949	$k_{\text{obs}} [\text{min}^{-1}]$

**Tabelle 30:** Aktivität des Hairpin-Ribozyms mit guanidiertem Cyclitol **66** bei verschiedenen

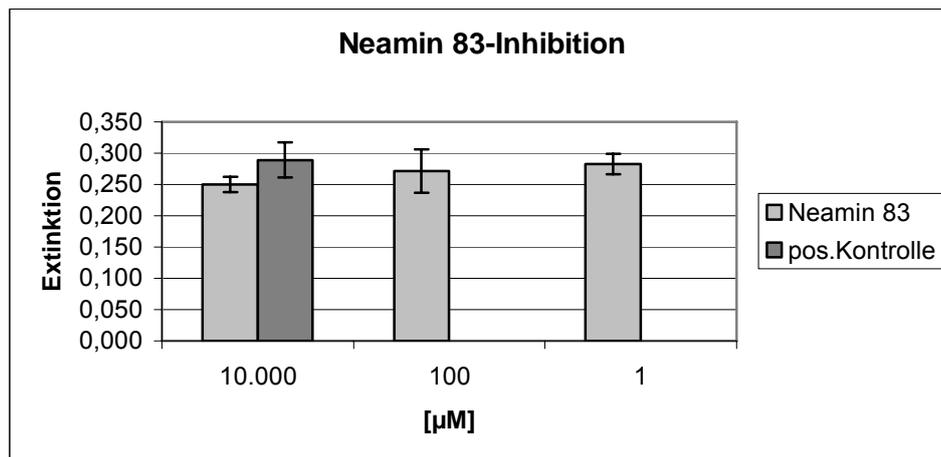
### Inhibitions-Experimente mit guanidiertem Prolin **63**:



Das aus den Guanidierungsreaktionen erhaltene Prolin **63** wurde auch auf inhibitive Wirkung auf den Tat-TAR-Komplex und auf den Hairpin-Ribozym-Assay untersucht, wobei es in beiden Fällen keinerlei Aktivität zeigte.

**Inhibitions-Experimente mit dreifach guanidiertem Neamin 83:**

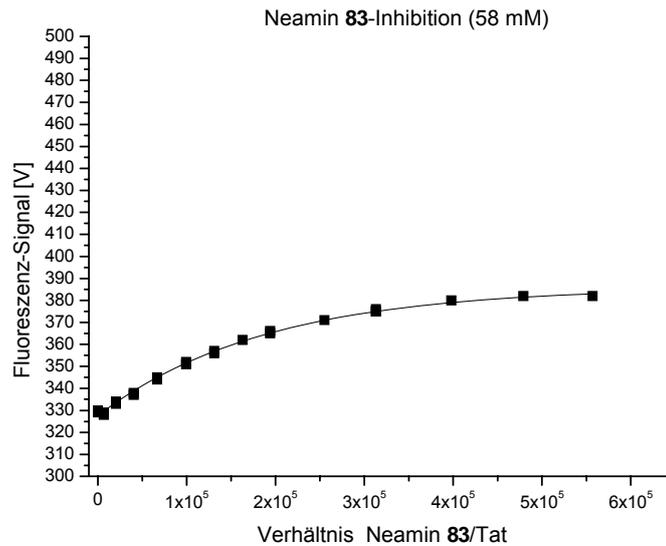
Das in den Guanidierungsreaktionen erhaltenen Derivat des Neamins **2** wurde in allen Inhibitions-Experimenten erprobt. Durch die Substitution von Carboxyamidatgruppen an das in anderen Inhibitionsexperimenten aktive Neamin **2** wurde eine Erniedrigung der Dissoziationskonstante erwartet. Zur Überprüfung wurde guanidiertes Neamin **83** im ELISA-Test auf die Wechselwirkung mit dem Tat-TAR-Komplex hin untersucht.



**Abbildung 123:** Effekt von dreifach-guanidiertem Neamin **83** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

Im ELISA-Test konnte durch den Vergleich mit der Positiv-Kontrolle kein Inhibitions-Effekt gefunden werden.

Die Wechselwirkung von dreifach-guanidiertem Neamin **83** mit dem Tat-TAR-Komplex wurde ebenfalls in der Fluoreszenz-Titration studiert. Dazu wurde die Änderung der Fluoreszenz-Intensität des mit Rhodaminegrün-markierten Tat-Peptides bei verschiedenen Neamin **83**-Konzentrationen untersucht.

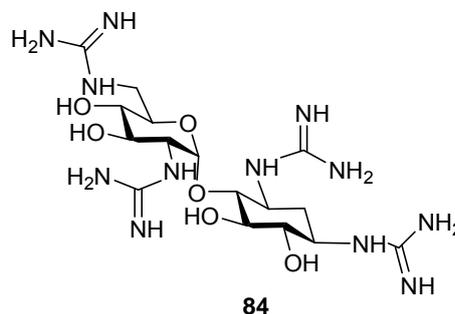


**Abbildung 124:** Effekt von dreifach-guanidiertem Neamin **83** auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 58 mM.

In der Auswertung der Fluoreszenz-Titration konnte durch das Programm BPC-Fit die Dissoziationskonstante von 2.1 mM berechnet werden.

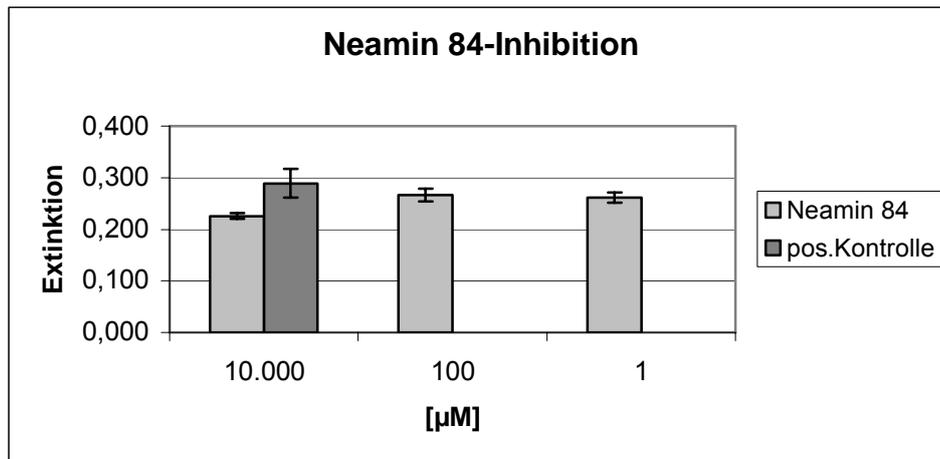
In den Spalttests in dem das Hairpin-Ribozym sein Substrat spaltet, zeigte das dreifach-guanidierte Neamin **83** eine Inhibition gegen die Spaltung durch das Hairpin-Ribozym. Bei Konzentration von 1 mM Neamin **83** konnte die Aktivität auf 50% mit einer  $k_{\text{obs}}$  von  $0.46 \text{ min}^{-1}$  reduziert werden.

#### Inhibitions-Experimente mit vierfach guanidiertem Neamin **84**:



Das Neomycin **8**, dessen Grundgerüst das Neamin **2** ist, konnte durch die Guanidierung der funktionellen Aminogruppen in der Hemmwirkung des Tat-TAR-Komplexes gesteigert werden. Daher ist die Beobachtung der Wirkung der Modifizierung der Aminogruppen am Neamin **2** ebenfalls von Interesse. Deshalb wurde das in den Guanidierungsreaktionen

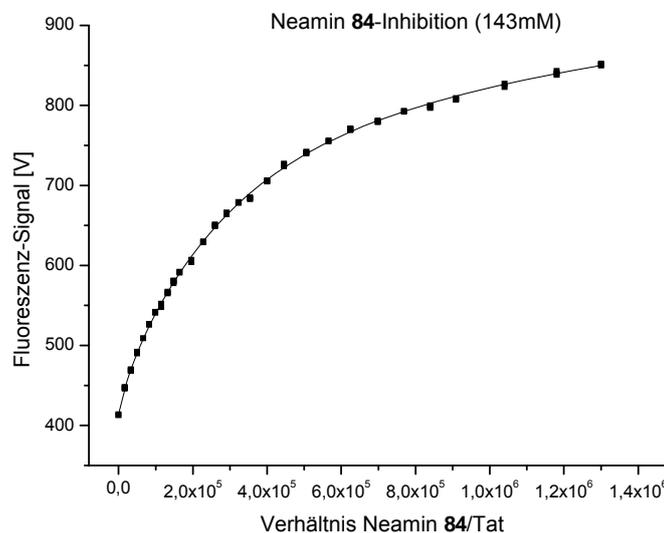
erhaltene Derivat des Neamins **2**, das vierfach guanidiertem Neamin **84** in allen Inhibitions-Experimenten studiert.



**Abbildung 125:** Effekt von vierfach guanidiertem Neamin **84** auf den Tat-TAR-Komplex im ELISA-Test.

Im ELISA-Test konnte durch Vergleich der Probenextinktion mit der Positiv-Kontrolle nur eine sehr schwache Inhibition des Tat-TAR-Komplexes gefunden werden.

In der Fluoreszenz-Titration wurde das Ergebnis überprüft, in dem die Fluoreszenz-Intensität bei verschiedenen Konzentrationen von vierfach guanidiertem Neamin **84** verfolgt wurde.



**Abbildung 126:** Effekt von vierfach guanidiertem Neamin **84** auf den Tat-TAR-Komplex in der Fluoreszenz-Titration bei einer maximalen Konzentration von 143 mM.

Aus der Fluoreszenz-Titration konnte durch das Programm BPC-Fit eine Dissoziationskonstante von 3.1 mM für vierfach guanidiertes Neamin **84** berechnet werden.

In den Spalttests mit dem Hairpin-Ribozym, in dem das Substrat des Hairpin-Ribozyms gespalten wird, zeigte vierfach guanidiertes Neamin **84** einen inhibtiven Effekt gegen die Spaltung durch das Hairpin-Ribozym. Bei einer Konzentration von 1 mM vierfach guanidiertem Neamin **84** konnte die Aktivität auf 50% mit einer  $k_{\text{obs}}$  von  $0,50 \text{ min}^{-1}$  reduziert werden.

Auch bei Spalttests, in denen das Substrat des Hairpin-Ribozyms umgesetzt wurde und das vierfach guanidiertem Neamin **84** in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt wurde, konnte keine Aktivität beobachtet werden.

## 7. Diskussion der biochemischen Ergebnisse

In dieser Arbeit konnten Messmethoden zur Bestimmung der Wechselwirkung von natürlichen und artifiziellen Aminoglykosiden als auch vollsynthetischen Substanzen an RNA evaluiert werden. Dazu wurde zum einen ein Schnelltest auf ELISA-Basis und zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten die Fluoreszenz-Titration mit der TAR-RNA aus dem HIV als Methoden validiert. Ebenso wurde zur Austestung einer weiteren RNA-Variante aus dem Hairpin-Ribozym des Tabacco-Ringspot-Virus benutzt. Dieses aus dem Hairpin-Ribozym benutzte Fragment spaltet ein 14 Nukleotide langes Substrat in ein 5- und ein 9 Nukleotide langes Fragment. Die Inhibition konnte an dieser RNA durch eine Reduzierung der Umsatzgeschwindigkeit bestimmt werden. Mit diesen drei Test-Methoden an den zwei RNA-Varianten wurden anschließend natürliche und artifizielle Substanzen auf die Interaktion mit diesen beiden RNA-Varianten ausgetestet. Daraus wird sich ein weiteres Verständnis der RNA-Aminoglykosid-Wechselwirkung erhofft.

Dabei wurden im Vorfeld einige weitere Methoden ausgetestet, wie zum Beispiel die Circular dichroismus-Spektroskopie (CD), die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) und auch die Ultrazentrifugation (UZ). Die Ultrazentrifugation war dabei behilflich, die Dissoziationskonstante des Tat-TAR-Komplexes einzugrenzen. Dabei zeigte sich ein sehr empfindliches Gleichgewicht zwischen dem Komplex und der Ionenstärke in der Lösung. In Auftragssynthese hergestellte TAR-RNA-Chargen, die mittels HPLC gereinigt wurden, eigneten sich grundsätzlich nicht für die empfindlichen Messmethoden der FCS oder der Fluoreszenz-Titration. Die UZ half, die Dissoziationskonstante der HPLC-gereinigten -TAR-RNA-Chargen auf etwa 3-6  $\mu\text{M}$  einzugrenzen. Neue TAR-RNA-Chargen, die über Gelelektrophorese und nach Angaben des Herstellers über zwei unterschiedliche Methoden gereinigt wurden, zeigten die entsprechende Reinheit, um die gewünschten Versuche durchzuführen. Dabei zeigte sich die CD zwar als geeignet für hohe TAR- und Tat-Konzentrationen, aber für Messungen unter dem Mikromolaren Bereich als ungeeignet. Die FCS zeigte dagegen die entsprechende Messempfindlichkeit, jedoch war das Masseverhältnis von Tat-Peptid zu TAR-RNA mit 1:5.5 zu gering, um eine Diffusionsgradientenveränderung durch die an das Tat-Peptid gebundene TAR-RNA zu registrieren. Das ELISA-Testverfahren und die Fluoreszenz-Titration schließlich zeigten sich in allen Punkten als geeignet, um die Inhibition des Komplexes und damit die Bindungskonstanten von natürlichen wie auch artifiziellen RNA-affinen Substanzen zu bestimmen.

## 7.1 ELISA-Test

Um die Interaktion von sowohl natürlichen als auch modifizierten Aminoglykosiden und anderen Substanzen mit RNA zu testen, wurde das ELISA-Testsystem aufgebaut. Dieses Testsystem auf Basis des *Enzyme-linked-immunosorbent-assay* wurde zuerst so gewählt, dass ein Antikörper gegen Digoxigenin (DIG) an die Oberfläche der Mikrotiterplatten gebunden wurde, an der dann die DIG-markierte TAR-RNA komplexiert werden konnte. An diese RNA sollte das Tat-Peptid binden, das über die Biotinmarkierung mit Streptavidin nachgewiesen werden sollte. Dieser Aufbau des Nachweissystems funktionierte nicht. Wahrscheinlich konnten aufgrund der Größe der Antikörper zu wenige Antikörper mit frei präsentierenden anti-DIG-Bindungspartnern gebunden werden.

Daher wurde das System invers aufgebaut, d.h. das biotinylierte Tat-Peptid wurde und konnte an die Mikrotiterplatte durch die Beschichtung mit Streptavidin über Nacht gebunden werden. Denn im Gegensatz zu Antikörpern besitzt Streptavidin vier bindene funktionelle Gruppen, so dass immer mindest eine freie funktionelle Gruppe zum Binden an Biotin präsentiert werden kann (Abbildung 23).

Dass die Absättigung der Bindung von TAR-RNA an Tat-Peptid bei einer Tat-Konzentration von 50 nM (5 pmol) nicht erreicht wurde, wurde mit der Absättigung der Bindungsplätze für den anti-DIG-Antikörper bei 3 nM TAR-Konzentration erklärt. Andere nicht studierte Effekte könnten sein, dass bei dem Beschichten der Platten mit Streptavidin der benutzte PBS-Puffer eine zu hohe Ionenstärke aufwies. Denn die unspezifischen Wechselwirkungen an der Plastikoberfläche sind auch von der Ionenstärke abhängig, wobei die Bindung niedrige Ionen-Konzentrationen präferiert.<sup>[121]</sup> Wahrscheinlich kann aber aufgrund der sterisch anspruchsvollen RNA und auch großer Antikörper –auch wenn nur das Fab-Fragment benutzt wurde– nicht jeder potentiell mögliche Bindungsplatz besetzt werden. Da bei geringeren Tat-Konzentrationen kein gutes Signalverhältnis zwischen Negativ- und Messprobe mehr erreicht werden konnte, eignet sich dieses Inhibitionsverfahren nicht zu Bestimmung der Dissoziationskonstanten. Zur Überprüfung, ob es sich als Schnelltestverfahren eignet und ob Inhibitionseffekte genügende Sensibilität zeigten, wurden weitere Versuche durchgeführt.

---

<sup>121</sup> *Nunc-Guide to Solid-Phase*, von NUNC, Zweite Ausgabe 2001, 8-20.

Aufgrund seiner beschriebenen Dissoziationskonstante von  $0.92 \mu\text{M}$  zur TAR-RNA<sup>[94,102,33]</sup> eignete sich Neomycin **8** als gute Referenzsubstanz. Zur Validierung des ELISA-Tests wurde Neomycin **8** in einer Konzentration von 0-10 mM ausgetestet und zeigte seine maximale Inhibition bei 2 mM. Die Abnahme der Extinktion und damit der Menge an gebundenem TAR-RNA korrelierte mit der Abnahme der Inhibitorkonzentration und zeigte damit, dass sich das System zur Überprüfung der Inhibition auf den Komplex eignet.

Die Versuche, in denen mit Magnesium gegen den Komplex titriert wurde, zeigt die starke Abhängigkeit der Bindung zwischen TAR-RNA und Tat-Peptid von der Ionenstärke. Dieser Effekt ist in der Literatur für Natrium<sup>[103,122]</sup>, Magnesium<sup>[123,122]</sup> sowie Lithium, Kalium, Calcium, Strontium, Nickel, Zink und Cobalt<sup>[122]</sup> beschrieben, wobei keine Relevanz der Valenz der Ionen vorhanden sein soll.<sup>[124]</sup> Adamiak *et al.* konnte über NMR-Spektroskopische Untersuchungen zeigen, dass  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  nicht nur das negativ-geladene Phosphatrückgrad stabilisieren, sondern auch in der Ausbuchtung („bulge“) mit den Basen interagieren und eine sehr schwache, aber spezifische Bindung eingehen.<sup>[122]</sup> Auch  $\text{Pb}^{2+}$  bindet an die TAR-RNA in der Ausbuchtung, führt aber zu Spaltung des RNA-Stranges.<sup>[122]</sup> Aufgrund dieser beschriebenen Effekte wurde die Wirkung von freiem Guanidin **12** als organischem Anion auf den Komplex untersucht. Guanidin **12** zeigte keinen stabilisierenden, aber ebenfalls einen leichten kompetitiven Effekt auf die Tat-TAR-Bindung. Schon allein wegen der bekannten Bindung von freiem Arginin mit seiner Guanidgruppe an das Basentriplett UCU wurde eine Inhibition des Komplexes durch freies Guanidin **12** erwartet. Im ELISA-Test konnte zwar ein schwacher Effekt gezeigt werden, aber die Bindungsaffinität des freien Guanidins **12** scheint zu schwach für eine Inhibition des Tat-TAR-Komplex zu sein. Zum Beweis, dass Guanidin **12** an TAR bindet, müsste man ein Test-Verfahren nutzen, das nicht auf einer Verdrängung des Tat-Peptids beruht.

## 7.2 Fluoreszenz-Titration

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten eignet sich die Fluoreszenz-Titration, da die direkte Bindung eines Inhibitors an das Tat-Peptid zu einem Quencheffekt des gekoppelten

---

<sup>122</sup> M.Olejniczak, Z.Gdaniec, A.Fischer, T.Grabarkiewicz, L.Bielecki, R.W.Adamiak; *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 4241-4249.

<sup>123</sup> G.Bokinsky, D.Rueda, V.K.Misra, M.M.Rhodes, A.Gordus, H.P.Babcock, N.G.Walter, X.Zhuang; *Proc.Natl.Acad.Sci.* **2003**, 100, 9302-9307.

<sup>124</sup> T.E.Edwards, S.T.Sigurdsson; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 303, 721-725.

Fluorophors führt. Der Unterschied zwischen einem Quencheffekt, der durch eine spezifische Bindung an das Tat-Peptid oder durch eine andere nicht-spezifische Interaktion mit dem Fluorophor erfolgte, kann der Form der Titrationskurve entnommen werden. Bei einer spezifischen Bindung kann ein Sättigungseffekt registriert werden. Sollte ein anderer Effekt zur Reduktion des Fluoreszenz-Signals führen, so ist ein linearer Zusammenhang erkennbar. Die beschriebenen Effekte, dass in der Titration bei geringen Zugaben kein sofortiges Abfallen und bei großen Zugaben sogar wieder ein leichtes Ansteigen der Werte erkennbar war, zeigten weitere Wechselwirkungen des Tat-Peptides mit anderen Substanzen als der TAR-RNA oder anderen Strukturvarianten der TAR-RNA zum Beispiel Faltungsvarianten oder Domänen an. Durch Gleichgewichtseinstellungszeiten von 15 Minuten pro Zugabe kann ein Nichterreichen des Bindungsgleichgewichtes ausgeschlossen werden. Das Detergenz Tween20 bewirkte, dass zumindest das Ansteigen des Fluoreszenz-Signals nach Erreichen des Sättigungsbereiches des Tat-Peptids ausblieb, was auf eine unspezifische Wechselwirkung als Ursache schließen lässt. Der beobachtete Effekt zu Titrationsbeginn, dass das Fluoreszenz-Signal erst nach einer gewissen TAR-RNA-Zugabe sank, konnte nicht beseitigt werden. Er trat aber bei hohen Konzentrationen von TAR-RNA in der Titrierlösung verstärkt auf, was auf eine Dimer- bzw. Multimerbildung der RNA schließen lässt. *Tor* und *Blount* beschreiben in ihren Versuchen der Fluoreszenz-Titration mit Pyren-markierter TAR-RNA unterschiedliche Fluoreszenz-Signal-Ausbeuten, die man bei verschiedenen TAR-Pyren-Konzentrationen mit gleich bleibender Ionenstärke oder bei gleichen Konzentrationen mit variierender Ionenstärke erhält. Sie erklären diese Beobachtung mit unterschiedlichen Konformationszuständen, die auftreten können und von der Ionenstärke oder Gesamtkonzentration der RNA abhängig sind.<sup>[103]</sup>

Die Bestimmung der Bindungskonstante des Tat-TAR-Komplexes erfolgte unter Verwendung des PBS-Tween20-Puffers. Dabei wurden hohe Konzentrationen der TAR-RNA gemieden, weil höhere TAR-RNA-Konzentrationen zu größeren der oben beschriebenen, unspezifischen Effekten führten. Die Berechnung der Bindungskonstante über das Programm BPC-Fit zeigte dann einen Unterschied von einem Faktor 5 zwischen den Messungen mit Tween20-Zusatz und ohne an (Formel 10; Methoden Fluoreszenztitration).

$$K_x = \frac{(P_{Ges}K_p - R_{Ges}K_p - \frac{R_{Ges}}{R}}}{R_{Ges} K_p R) - K_p R^2 - X_{Ges} R K_p + R_{Ges} - R X_{Ges} - K_p P_{Ges} R}$$

Die Dissoziationskonstante mit Tween20-Zusatz betrug  $1.3 \cdot 10^{-8}$  M und ohne den Zusatz an Tween 20 von  $2.4 \cdot 10^{-9}$  M. Die berechnete Bindungszahl (n) betrug 0.91 mit und 1.08 ohne

Tween20-Zusatz. Beide besitzen den gleichen Fehlerfaktor von 1.17. Für die späteren Inhibitionsversuche wurde die berechnete Dissoziationskonstante mit dem Tween20-Zusatz benutzt, da die Fehler dadurch verringert werden konnten.

Als Referenzwert wurde Neomycin **8** mit der bekannten Dissoziationskonstante von  $1.0 \mu\text{M}$ <sup>[125, 33, 102]</sup> in der Fluoreszenz-Titration gemessen und berechnet. Mit dem Programm BPC-Fit wurde eine Dissoziationskonstante von  $1.17 \mu\text{M}$  erhalten. Damit weicht dieser Wert um 17 % von dem Literaturwert ab und zeigt dadurch deutlich, dass die Fluoreszenz-Titration zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten der TAR-RNA und seinen Komplexbildnern genutzt werden kann.

### 7.3 Inhibitions- und Spaltexperimente natürlicher und artifiziieller Substanzen an RNA

Zur Bestimmung der Wechselwirkung der verschiedenen natürlichen und artifiziiellen, biogenen Substanzen mit RNA wurden der ELISA-Test und die Fluoreszenz-Titration zur Verifizierung der Dissoziationskonstante der TAR-RNA sowie das Hairpin-Ribozym zur Beobachtung inhibierender Interaktionen mit dieser Ribonukleinsäure und seinem Substrat genutzt. Im Vorfeld wurde die Dissoziationskonstante der TAR-RNA zum Tat-Peptid mit  $13 \mu\text{M}$  bestimmt. Die Umsatzrate des Hairpin-Ribozyms bei der Spaltung seines 15 Nukleotide langen Substrates wurde mit  $0.9 \text{ min}^{-1}$  bestimmt. Unter Einbeziehung der Dissoziationskonstanten des Tat-TAR-Komplexes kann die Dissoziationskonstante der auszutestenden Substanzen zur TAR-RNA und beim Hairpin-Ribozym die Stärke des inhibierenden Effektes bestimmt werden.

#### 7.3.1 Natürliche Aminoglykoside mit Cyclitolgrundgerüst

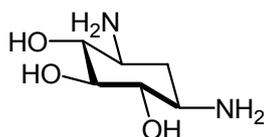


Abbildung 127: Strukturformel des Cyclitols **3** (2-DOS).

Das Cyclitol **3** zeigte in dem ELISA-Test und im Hairpin-Ribozym-Assay keine inhibitorischen Eigenschaften. In der Fluoreszenz-Titration zeigte die Verbindung eine

<sup>125</sup> B.Wu, J.Y.He, E.E.Swayze, *Org.Lett.* **2002**, *4*, 3455-3458.

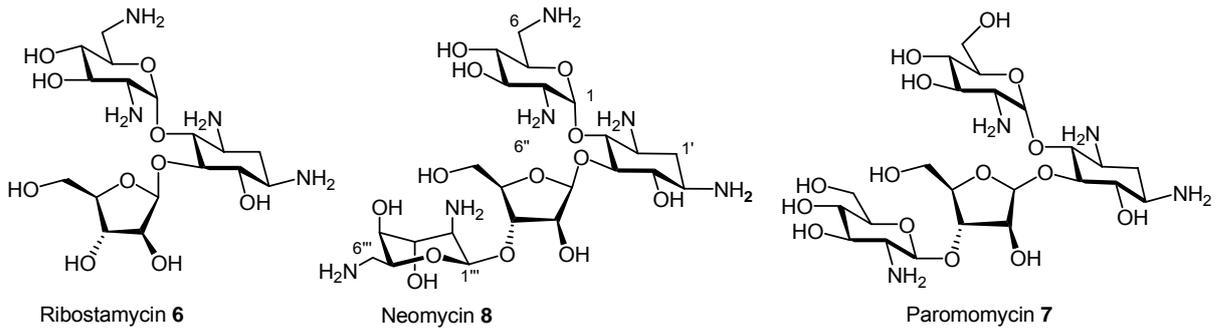
schwache Dissoziationskonstante von 2.3 mM zur TAR-RNA. Zwar ist in dem Bindungsmechanismus des Neomycins **8** das Grundgerüst des Cyclitols **3** eindeutig beschrieben, welches in der kleinen Furche bindet.<sup>[126]</sup> Alleine hat das Cyclitol **3** jedoch keine große Affinität an die RNA. Wahrscheinlich fehlt die Interaktion mit den anderen Zuckerresten des Neomycins **8**, um die kleine Furche leicht aufzuwinden und für das Cyclitol **3** Bindungspartner freizugeben. Dagegen zeigte das Neamin **2** als Disaccharid erhöhte Aktivität gegenüber dem Cyclitol **3**, sowohl im ELISA-Test als auch in der Fluoreszenz-Titration mit einer Dissoziationskonstante von 38.5 µM. Das Neamin **2** ist ebenfalls im Bindemechanismus an die TAR-RNA beschrieben, in dem beide Zucker an der Bindung in der kleinen Furche beteiligt sind.<sup>[126]</sup> Diese Kombination des 2-Desoxystreptamins **3** und der 2,6-Diaminoglucose bewirken durch synerge Bindung einen inhibitorischen Effekt, der 60 mal stärker als die des Cyclitols **3** alleine ist. Neomycin **8** dagegen mit seinen zusätzlichen Zuckerresten drei und vier zeigt eine weitere Abnahme der Dissoziationskonstante um den Faktor 30 auf 1 µM.

Dabei scheint der dritte Zuckerring die Bindung an die TAR-RNA eher zu behindern, solange keine Aminogruppen als funktionelle Gruppen vorhanden sind, so wie das Ribostamycin **6** es zeigt. Das Gerüst des Ribostamycins **6** ist bis auf den vierten Zucker gleich dem des Neomycins **8**, der beim Ribostamycin **6** fehlt. Die Bindungskonstante ist aber mit 110 µM sehr viel geringer als die des Neomycins **8** und auch als die des Neamins **2**. Dieses Ergebnis überrascht aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit dem Neomycin **8**.

Das Paromomycin **7** mit dem Ribostamycingerüst (**6**) unterscheidet sich durch die Substitution der 6-Aminogruppe durch eine Hydroxyfunktion und durch den vierten Zuckerrest mit einer 2-Aminoglucose chemisch kaum von Ribostamycin **6** und Neomycin **8**, jedoch signifikant in den Bindungskonstanten. Die ist mit 24.3 µM viermal höher als die des Ribostamycins **6**, aber um den Faktor 24 geringer als bei Neomycin **8**. Dieses Ergebnis deutet auf die Bedeutung der 6- und der 6''-Aminogruppe hin.

---

<sup>126</sup> C.Faber, H.Sticht, K.Schweimer, P.Rösch; *J.Bio.Chem* **2000**, 27, 20660-20666.



**Abbildung 128:** Struktureller Vergleich zwischen Ribostamycin 6, Neomycin 8 und Paromomycin 7.

Der Vergleich von Ribostamycin 6 und Amikacin 1 zeigt, dass der dritte Zucker nicht mehr störend auf die Bindung zur TAR-RNA wirken muss, sobald Aminogruppen an diesem substituiert sind. Zwar wurde eine Reduktion des inhibitorischen Effekts von Amikacin 1 aufgrund der Amidbindung mit der Buttersäure an das Amin 2' und des einhergehenden sterischen Störfaktors erwartet, jedoch verwundert die Größe der Bindungsaffinität des Amikacins 1 mit einer Dissoziationskonstanten von 54.3  $\mu\text{M}$  an TAR-RNA. Denkbar wäre eine verbesserte Bindung an die TAR-RNA über die Aminogruppe des Buttersäureamids oder die vorhandene Aminofunktion im Ring III. Dieser letztere Unterschied scheint essentiell für die Erhöhung der Bindungskonstanten zu sein, denn Paromomycin 7 besitzt sowohl ebenfalls eine aminogruppentragende Pyranose als auch eine ähnliche Dissoziationskonstante. Ribostamycin 6 trägt als Ring III eine Ribose ohne Aminofunktion und bindet mit 110  $\mu\text{M}$  wesentlich schlechter an die TAR-RNA.

Das Sisomycin 73 besitzt als dritten Substituenten kein Zuckergerüst, sondern einen Lactolring mit zwei Aminofunktionen. Diese Struktur ist vermutlich mit für die hohe Bindungskonstante an die TAR-RNA mit einem Wert von 12.5  $\mu\text{M}$  verantwortlich, denn das erste Zuckergerüst besitzt kaum Möglichkeiten zur Interaktion mit RNA. Die Aminogruppen im Amikacin 1 ließen ebenfalls schon auf eine verbesserte TAR-RNA-Bindung durch funktionelle Aminogruppen im dritten Ringsubstituenten schließen.

Dagegen war die Bindung des Kanamycins B 4 an die TAR-RNA sehr schwach und aufgrund der großen chemischen Ähnlichkeit zu Amikacin 1 unerwartet. Die Bindungskonstante ist mit 9.1 mM um den Faktor 200 geringer als die von Amikacin 1. Der chemische Unterschied besteht in der Amidbindung der Buttersäure in der 2'-Position und der Desoxygenierung an der 3''-Position des Amikacins 1.

Das Hygromycin **9** ist ein 2-DOS-substituiertes Aminoglykosid mit der ungewöhnlichen Struktur der 1,1-5,6-Disubstitution der Ringe eins und zwei. Ebenso interessant war das Ergebnis der Inhibitionsversuche. Im ELISA-Test zeigte es bei 10 mM eine Halbierung des Extinktionssignals zur Positivkontrolle und damit eine Wechselwirkung mit dem Tat-TAR-Komplex. In der Fluoreszenz-Titration konnte ein Inhibitionseffekt und dazu in Konkurrenz ein Fluoreszenz-Quench beobachtet werden. Der Fluoreszenz-Quench ging bis zu einem Verhältnis von 3000:1 Hygromycin **9** zu Tat-Peptid. Danach konnte ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals registriert werden. In dem Folgeversuch, in dem Hygromycin **9** gegen das Tat-Peptid ohne TAR-RNA titriert wurde, konnte ein Quencheffekt durch Interaktion des Aminoglykosids mit dem Fluorophor-beladenen Tat-Peptid bis zu einem Hygromycin **9**-Tat-Peptid-Verhältnis von 2000:1 registriert werden. Anschließend blieb der Quencheffekt konstant. Das Abfallen der Fluoreszenz-Intensität in der Titration Hygromycin **9** gegen den Tat-TAR-Komplex deutet auf eine Bindung des Hygromycins **9** an das Tat-Peptid und/oder den gebundenen Tat-TAR-Komplex, das damit einen Quencheffekt verursacht, hin. Der Quencheffekt ist dabei geringer als der durch die TAR-RNA hervorgerufene und lässt daher eine Bindung an den Tat-TAR-Komplex vermuten. Der spätere Anstieg des Fluorophor-Signals in dieser Fluoreszenz-Titration lässt eine Bindung des Hygromycins **9** sowohl an die TAR-RNA als auch an das freie Tat-Peptid vermuten, was die letzte These unterstützt. Diese Annahme wird durch die größere Menge an Hygromycin **9**, die nötig ist, um den gleichen Quencheffekt in Anwesenheit von TAR-RNA hervorzurufen, unterstützt. Da die Effekte parallel auftreten, konnte keine Dissoziationskonstante bestimmt werden.

### 7.3.2 Aminoglykoside ohne Cyclitolgrundgerüst

Das Geneticin **5** besitzt im Gegensatz zu den anderen Aminoglykosiden kein Cyclitolgrundgerüst und hat mehrere Methylgruppen, die sterische, störende Einflüsse auf die Bindung an die RNA haben können. Das zeigte sich dann auch in der Inhibierung des Tat-TAR-Komplexes, die im ELISA-Test nicht nachgewiesen werden konnte und die in der Fluoreszenz-Titration mit Affinität zur TAR-RNA mit einer Dissoziationskonstante von 225.8  $\mu\text{M}$  bestimmt werden konnte. Diese Dissoziationskonstante ist damit bis auf die des Kanamycin A **4**, die, mit der geringsten TAR-Affinität.

Das Netropsin **72** besitzt kein Zuckergrundgerüst, aber eine Vielzahl von Aminogruppen im Molekül, mit denen potentielle Interaktionen an RNA eingegangen werden können. Netropsin **72** ist als Helikase-Hemmer durch Bindung an die kleine Furche der DNA bekannt. Aufgrund dieser Bindung und der Vielzahl an Aminogruppen im Molekül wurde das Netropsin **72** auf die Inhibitionswirkung des Tat-TAR-Komplexes untersucht. Im ELISA-Test konnte auch eine starke Inhibition des Komplexes beobachtet werden. In der Fluoreszenz-Titration jedoch konnte dieser Effekt mit einer berechneten Dissoziationskonstanten von 92.4 M nicht bestätigt werden. Diese Diskrepanz der Werte kann nicht erklärt werden. Möglich wären aber die parallelen Effekte der Fluoreszenz-Quenchung und der Inhibition des Tat-TAR-Komplexes. Bei den Substanzen Cyclohexan-Dimer **51**, Makrozyklus **77** und Makrozyklus **78** wurde ebenfalls ein solcher Effekt vermutet, konnte aber nicht nachgewiesen werden. Um weitere Indizien dieses Effektes zu erhalten, müssten noch Fluoreszenz-Titrations-Messungen des Netropsin **72** gegen das Tat-Peptid alleine durchgeführt werden. Damit zeigt sich, dass die Aminoglykoside ohne Cyclitolgerüst die geringeren Bindungskonstanten besitzen als die Cyclitol-Tragenden Aminoglykoside.

### 7.3.3 Artificielle Inhibitoren:

Aufgrund der beschriebener Inhibitionseffekte an dem Tat-TAR-Komplex durch Makrozyklen wurde diese Substanzklasse als auch die Substanzen Pyranosid-Dimer **81** und Dimer **82** in diesen Inhibitionsversuchen am Tat-TAR-Komplex als auch im Hairpin-Ribozym untersucht.<sup>[127]</sup> Im ELISA-Test zeigten die Substanzen Cyclohexan-Dimer **76** und Makrozyklus **77** keine signifikante Inhibition des RNA-Peptid-Komplexes. Bei Makrozyklus **78** und Dimer **82** konnte einen sehr leichter und bei Pyranosid-Dimer **81** ein starker inhibitorischen Effekt im ELISA-Test festgestellt werden, wobei alle drei Substanzen in der Fluoreszenz-Titration einen sehr geringen Effekt auf die Tat-TAR-Bindung zeigten. Die beiden Substanzen Dimer **82** und Pyranosid-Dimer **81** zeigten in der Fluoreszenz-Titration gegen das Tat-Peptid einen Bindungseffekt, der jedoch zu klein war, um daraus eine Bindungskonstante zu bestimmen. Daher muss von einer völligen Inaktivität der Wechselwirkung zwischen TAR-RNA und diesen hier untersuchten Substanzen ausgegangen werden. Bei den Makrocyclen **77** und **78** werden in der Fluoreszenz-Titration konkurrierende, gegenteilige Effekte aufgrund leichter Quencheffekte vermutet.

<sup>127</sup> A.Kirschning, G.Chen, S.Müller, M.Lindner, M.Kalesse; *Tetrahedron* **2004**, *60*, 3505-3509.

In den Spalt-Tests mit dem Hairpin-Ribozym zeigten alle fünf Substanzen eine leichte Inhibition in der Substratspaltung des Hairpin-Ribozyms. Alle Substanzen konnten die Aktivität des Hairpin-Ribozyms bei einer Konzentration von 1 mM um 50% reduzieren. Wahrscheinlich gehen die vorhandenen Aminosubstituenten Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit dem Hairpin-Ribozym oder dem Substrat ein. Dabei spielt wahrscheinlich die Art der Verknüpfung der beiden Glykoside keine Rolle, sondern vielmehr der Abstand, der bei allen ungefähr gleich groß ist, denn es ist in den Spalttests kein signifikanter Unterschied in der Inhibitionsstärke nachweisbar.

Nur das Pyranosid-Dimer **81** zeigte Spaltaktivität an dem Substrat des Hairpin-Ribozyms, wobei bevorzugt das 5 Nukleotide und das 12 Nukleotide lange Fragment gebildet wurde. Diese Spaltaktivität wird ebenfalls durch die hohe Anzahl an Aminogruppen in dem kleinen Molekül erklärt. Vermutlich bindet das Dimer **82** wie auch das Derivat das Pyranosid-Dimer **81** über seine Aminogruppen am Phosphatrückgrat und erschwert dadurch das Binden des Hairpin-Ribozyms. Die Bindung ist wahrscheinlich wegen der sterischen Estergruppen geringer als beim Pyranosid-Dimer **81**.

#### **7.3.4 Guanidierte Aminoglykoside und guanidierte, artifizielle, biogene Substanzen**

Die Affinität von NeoG **11** zur TAR-RNA wurde im ELISA-Test studiert und mit der des Neomycins **8** direkt verglichen. Dabei konnte im ELISA-Test eine sehr starke Affinität des NeoG **11** zur TAR-RNA beobachtet werden, und der Direktvergleich konnte außerdem eine deutliche Affinitätssteigerung zu Neomycin **8** aufzeigen. NeoG **11** hatte selbst bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M einen beobachtbaren Inhibitionseffekt im ELISA-Test gezeigt. In der Fluoreszenz-Titration jedoch wurde die Bindungskonstante mit 1.39  $\mu$ M berechnet, die die gleiche Affinität wie das Neomycin **8** aufzeigt, beide jedoch auch mit einem Fehlerfaktor von zwei. In jedem Fall ist das NeoG **11** ein starker Inhibitor des TAR-TAR-Komplexes durch kompetitive Bindung an die TAR-RNA, wobei nicht sicher ist, ob das NeoG **11** ein stärkerer Inhibitor als das Neomycins **8** ist, da im ELISA-Test eine signifikante, stärkere Inhibition durch das NeoG **11** in allen Proben stattfand, die Fluoreszenz-Titration dieses Ergebnis aber nicht bestätigen konnte.

In den Spalttests, in denen das Hairpin-Ribozym sein 15 Nukleotide langes Substrat umsetzt, zeigte das NeoG **11** ebenfalls einen starken inhibitorischen Effekt. Bei einer

NeoG **11**-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  konnte das Hairpin-Ribozym mit einem Umsatz von  $0.46 \text{ min}^{-1}$  auf eine 50 %ige Aktivität reduziert werden. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  reduzierte sich die Spaltaktivität auf  $0.022 \text{ min}^{-1}$ . In Inkubationen von Substrat mit NeoG **11** zeigte NeoG **11** selbständige Spaltaktivität, wobei das durch das Ribozym ebenfalls gebildete 5 Nukleotide lange Fragment entsteht, aber auch das 4- und das 13-Nukleotide lange Fragment konnten nachgewiesen werden. Diese Spaltaktivität ist bisher für das Spermidin **26**, Neomycin B **8**, Neamin **2**, Kanamycin **4**, Amikacin **1** und Sisomycin **73** bei je einer Konzentration von 10 mM beschrieben worden.<sup>[97]</sup> Beschrieben wurde aber nur die Bildung des normalen Spaltproduktes und keine Spaltproduktverschiebung.

Zu beiden RNA-Varianten, dem Hairpin-Ribozym, als auch der TAR-RNA, konnte große Affinität des NeoG **11** gezeigt werden, wobei nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, dass das NeoG **11** eine größere Affinität zur TAR-RNA besitzt als das Neomycin **8**. Außerdem besitzt das NeoG **11** eine Spaltaktivität bei dem Substrat des Hairpin-Ribozyms mit Bildung verschiedener Spaltprodukte. Das Anfügen der basischen Guanidingruppen an das Neomycin **8** und durch die Bindung des modifizierten Neomycin **11** an das Substrat des Hairpin-Ribozyms könnte ein basischer Spaltmechanismus, ähnlich wie dieser auch von Hairpin-Ribozym bekannt ist, stattfinden.

Ebenso konnte das Bindungsverhalten von guanidiertem Geneticin **74** an TAR-RNA durch die Modifizierung der Guanidierung gesteigert werden. Dabei zeigte der direkte Vergleich im ELISA-Test mit unmodifiziertem Geneticin ebenfalls eine deutliche Affinitätssteigerung. Die Fluoreszenz-Titration bestätigte diese Affinitätssteigerung mit einer berechneten Dissoziationskonstanten von 11.6  $\mu\text{M}$ , während die des Geneticins **5** 225.8  $\mu\text{M}$  betrug. Durch die Guanidierung der Aminogruppen im Geneticin **74** konnte eine Affinitätssteigerung um den Faktor 20 erreicht werden. Auch bei den Spalttests mit dem Hairpin-Ribozym konnte eine Erhöhung der RNA-Affinität beobachtet werden, denn mit einer Geneticin **74**-Konzentration von 1 mM konnte die Aktivität des Hairpin-Ribozyms auf 50 % reduziert werden. Ebenso zeigte das guanidierte Geneticin **74** eine Spaltaktivität auf das Substrat, wobei bevorzugt das 5 Nukleotide lange Spaltfragment gebildet wurde, aber auch das 4- und 13-Nukleotid lange Fragment konnte in Spuren nachgewiesen werden. Die Spaltaktivität für die Bildung des 13 Nukleotid langen Fragments wurde mit  $0.16 \cdot 10^{-9} \text{ min}^{-1}$  und für das 5 Nukleotide lange Fragment mit  $0.36 \cdot 10^{-9} \text{ min}^{-1}$  berechnet. Ebenfalls wird hier ein durch die Guanidingruppen hervorgerufener basischer Spaltmechanismus postuliert.<sup>[53]</sup>

Das Kanamycin **4** wurde sowohl in dem ELISA-Test, als auch in der Fluoreszenz-Titration auf die Affinität mit der TAR-RNA untersucht. Dadurch konnte ein Vergleich mit dem literaturbeschriebenen Kanamycin **4** stattfinden. Es zeigte sich, dass die Besetzung der Position 2 im Zuckerring I mit einer Aminogruppe (Kanamycin B) die Affinität drastisch erhöht, denn die beschriebene Bindungsstärke beträgt für Kanamycin B  $45 \mu\text{M}$ <sup>[101,102,103]</sup> und die für Kanamycin A **4** wurde mit  $9.1 \text{ mM}$  in der Fluoreszenz-Titration bestimmt.

Die Aminogruppen des Kanamycins **4** wurden auch zu Guanidinen umfunktionalisiert. Durch die Veränderung des Bindungsverhaltens an die TAR-RNA durch diese Umfunktionalisierung konnte eine erhebliche Affinitätssteigerung zur TAR-RNA sowohl im ELISA-Test-, als auch über Fluoreszenz-Titration gezeigt werden. Im ELISA-Test wurden Kanamycin **4** und guanidiertes Kanamycin **75** direkt verglichen. Der ELISA-Test zeigte im Vergleich Kanamycin **4** zu guanidierten Kanamycin **75** eine Affinitätssteigerung zur TAR-RNA. Die Fluoreszenz-Titration bestätigte diese Steigerung und zeigte eine Dissoziationskonstante von  $22.5 \mu\text{M}$ . Durch die Guanidierung konnte die Affinität zur TAR-RNA des unmodifizierten Kanamycins **4** so um den Faktor 400 gesteigert werden. Ebenfalls konnte in den Spalt-Tests, in denen das Hairpin-Ribozym sein Substrat spaltet, ein Inhibitionseffekt durch das guanidierte Kanamycin **75** festgestellt werden. Dabei konnte bereits eine Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  guanidiertem Kanamycin **75** die Umsatzgeschwindigkeit des Hairpin-Ribozyms auf 50 % und  $100 \mu\text{M}$  Kanamycin **75** die Aktivität auf 10 % der normalen Spaltrate senken.

Die Modifizierung des Kanamycins **4** durch Umfunktionalisierung der Aminogruppen zu Guanidingruppen konnte die Affinität des Kanamycins **75** zur TAR-RNA und zum Hairpin-Ribozym deutlich steigern. Eine Affinität zum Substrat schien das guanidierte Kanamycin **75** nicht zu besitzen, denn es zeigte im Gegensatz zu den anderen beiden guanidierten Aminoglykosiden keine Spaltaktivität.

Die beiden guanidierten Derivate des Neamins **83** und **84** wurden auch auf die Affinitätssteigerung zur TAR-RNA durch die Modifizierung untersucht. Dabei zeigte sich im ELISA-Test keine signifikante Affinität zur TAR-RNA durch Inhibition des Tat-TAR-Komplexes. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den beim Neamin **2** erhaltenen Ergebnissen. Die Dissoziationskonstante konnte für beide berechnet werden. Diese betrug

für das vierfach guanidierte Neamin **84** 2.1 mM und für das dreifach guanidierte Neamin **83** 3.1 mM. Damit konnte keine Verbesserung, sondern eine Verschlechterung der Affinität zur TAR-RNA festgestellt werden, wobei das vollständig guanidierte Neamin **84** eine größere Affinität zur TAR-RNA zeigt als das dreifach-guanidierte Neamin **83**. Dieses Ergebnis ist verwunderlich, denn bisher hatte die Guandierung entweder eine verbesserte Affinität zur TAR-RNA oder gar keinen Effekt gezeigt. Die Affinität sollte sowohl aufgrund der Basizität als auch durch Bindung der Guanidgruppe in die Ausstülpung („*bulge*“) der TAR-RNA zu einer verbesserten Bindung und damit zu einer höheren Affinität führen. Die gesunkene Affinität der beiden Substanzen des vierfach guanidierten Neamin **84** und des dreifach guanidierten Neamin **83** kann nicht erklärt werden.

In den Spalttests mit dem Hairpin-Ribozym zeigten beide Substanzen die gleiche Inhibition des Hairpin-Ribozyms mit einer Reduktion der Umsatzrate auf  $0.5 \text{ min}^{-1}$  und bei einer Konzentration von 1 mM Substanz, was dem Effekt von freiem Guanidin **12** entspricht.

Bei dem guanidierten Cyclitol **66** konnte als einziges Aminoglykosid keine Affinitätssteigerung zur TAR-RNA und des Hairpin-Ribozyms durch die Guanidierung der Aminogruppen beobachtet werden. Die Inhibitionsversuche mit freiem Guanidin **12** zeigten, dass Guanidin nicht automatisch zu einer Hemmung des Tat-TAR-Komplexes führt. Dass das guanidierte Cyclitol **66** keinen inhibitorischen Effekt zeigt, lässt spezifische Bindungen der anderen Guanidine an den modifizierten Aminoglykosiden aufgrund der Aktivitätssteigerungen vermuten.

Die Inhibitionseffekte des modifizierten Cyclitols **66** am Hairpin-Ribozym waren ebenfalls sehr schwach. Es konnte die Umsatzgeschwindigkeit des Hairpin-Ribozyms um 30 % bei einer Konzentration von 1 mM reduzieren. Dieses entspricht dem Effekt, den freies Guanidin **12** auf das Hairpin-Ribozym ausübt.

Das diguanidierte 4-Amino-Piperazin **65** zeigte einen Inhibitionseffekt des Tat-TAR-Komplexes mit einer schwachen Bindungskonstante von 449 mM des **65** zur TAR-RNA an. Bei den Spalttests, in denen das Substrat des Hairpin-Ribozyms durch das Hairpin-Ribozym gespalten wird, konnte es die Aktivität des Hairpin-Ribozyms um 50 % auf  $0.4 \text{ min}^{-1}$  bei einer Konzentration von 1 mM reduzieren. In den Inkubationstests mit dem

Substrat des Hairpin-Ribozyms und dem 4-Amino-Piperazin **65** zeigte das Substrat Spaltaktivität. Es spaltete das Substrat in ein 5-Nukleotide langes und ein 12-Nukleotide langes Spaltfragment. Das 5-Nukleotide große Fragment wird auch von dem Hairpin-Ribozym gebildet. Dabei zeigte sich eindeutig auch die zeitliche Abhängigkeit in der Bildung der Spaltprodukte, wobei bevorzugt das 5-Nukleotid lange Spaltfragment gebildet wird. Die Umsatzgeschwindigkeit des guanidierten 4-Amino-Piperazin **65** betrug bei der Spaltung des 12-Nukleotide langen Spaltfragmentes  $0.18 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . Aufgrund dieser starken Spaltaktivität wurde mit 4-Amino-Piperazin **65** ein *Single-Turn-Over*-Versuch durchgeführt, in dem Substrat und Hairpin-Ribozym in äquimolaren Konzentrationen vorliegen. In diesem *Single-Turn-Over*-Versuch konnte ausschließlich das 5-Nukleotid lange Spaltfragment nachgewiesen werden. Die Umsatzgeschwindigkeit konnte mit  $2.74 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  berechnet werden.

Wie es scheint, haben die basischen Guanidingruppen im 4-Aminoethyl-Piperazin **27** den entsprechenden Abstand zu einander, so dass wahrscheinlich ein Guanidinsubstituent eine an das Substrat bindende Wechselwirkung erfährt, während die zweite Guanidin-Gruppe basisch katalysierte Nukleotidspaltung durchführen kann. Die Aktivität im *Single-Turn-Over*-Versuch ist fast doppelt so groß wie die mit guanidierten 4-Amino-Piperazin **65** und Substrat alleine, jedoch besteht die Möglichkeit, dass die Aktivität vom Hairpin-Ribozym herrührt, welches unter magnesiumfreien Bedingungen sowie unter *Single-Turn-Over*-Bedingungen in der Aktivität stark herabgesetzt ist. Zur Austestung, ob das guanidierte 4-Amino-Piperazin **65** nur Einzelstrang-RNA spalten kann, eignet sich das *Single-Turn-Over*-Verfahren nicht. Dazu müsste ein komplementärer RNA-Strang mit inkubiert werden.

Das guanidierte Spermidin **64** zeigte durch die Modifizierung der Guanidierung eine leichte Steigerung der Affinität zur TAR-RNA. Das guanidierte Spermidin **64** hatte eine berechnete Dissoziationskonstante von 0.159 mM, was eine um den Faktor drei stärkere Affinität durch die Guanidierung aufdeckt. In den Inkubationstests, in denen das Substrat des Hairpin-Ribozyms mit guanidiertem Spermidin **64** inkubiert wurde, konnte eine Spaltaktivität durch das guanidiertem Spermidin **64** nachgewiesen werden. Dabei wurde bevorzugt das 5-Nukleotid lange Spaltfragment gebildet, aber auch das 12-Nukleotid lange Spaltfragment konnte nachgewiesen werden. Spuren von 6-, 8- und 10-Nukleotid langen Spaltfragmenten konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Die Spaltaktivität des

Spermidins **26** ist beschrieben und daher verwundert eine Spaltaktivität durch das guanidierte Spermidin **64** nicht.<sup>[119,120]</sup> Da die Basizität durch diese Modifizierung erhöht wurde, wurde ebenso eine Erhöhung der Spaltaktivität erwartet. Im *Single-Turn-Over*-Versuch konnte die Bildung der anderen Spaltfragmente unterdrückt werden, was allerdings auch durch die Aktivität des Hairpin-Ribozyms erklärt werden kann. Das guanidierte Spermidin **64** besitzt wahrscheinlich ähnlich stabilisierende Wirkung auf das Hairpin-Ribozym in Abwesenheit von Magnesium-Ionen, wie das bereits schon für das Spermidin **26** beschrieben ist.<sup>[105]</sup>

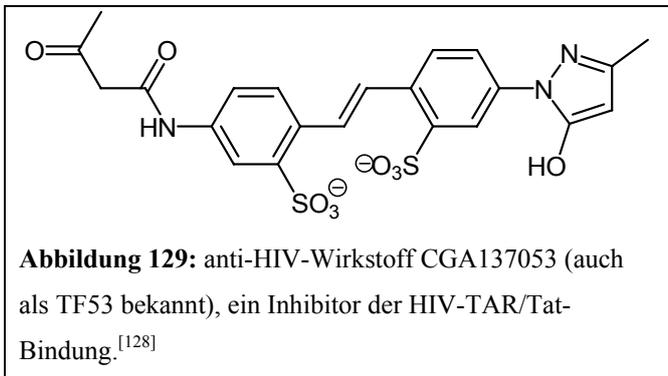
Für das guanidierte Histamin **61** konnte im ELISA-Test eine Inhibition des Tat-TAR-Komplexes nachgewiesen werden. Diese Inhibition konnte in der Fluoreszenz-Titration nicht bestätigt werden, wobei eine interessante Beobachtung in der Fluoreszenz-Titration gemacht werden konnte. Bei der Zugabe des guanidierten Histamins **61** konnte bei einer geringen Histamin **61**-Konzentration ein leichter Anstieg der Fluoreszenz-Signal-Ausbeute erhalten werden, der sich aber später umdrehte und einen Fluoreszenz-Quench zeigte. Daher sind von zwei gegenläufigen Effekten - zum einen die Inhibition des Tat-TAR-Komplexes und zum anderen das Quenchen des Fluorophors durch das guanidierte Histamin **61** auszugehen. Beide Effekte heben sich fast in ihrer Wirkung auf, wobei das ELISA-Ergebnis das einzige Indiz für eine Inhibition des Tat-TAR-Komplexes ist. Die vermuteten Interaktionen des Imidazolringes des Histamins **61** mit der TAR-RNA blieben aus. Ein Effekt ist bei der Hemmung der Spaltung des Substrates des Hairpin-Ribozyms zu erkennen. Bei einer Konzentration von 1 mM ist die Aktivität des Hairpin-Ribozyms um 50% auf eine Aktivität von  $0.48 \text{ min}^{-1}$  reduziert worden. Eine erwartete durch das Imidazol hervorgerufene Spaltaktivität des guanidierten Histamins **61** bei der Inkubation mit dem Substrat des Hairpin-Ribozyms konnte nicht bestätigt werden.

### 7.3.5 Glykoside mit Sulfonamidatgruppen

Das sulfonamidierte Glucos-2-amin **35** und Di-sulfonamidierte Cyclitol **36** wurden als azide Substanzen und damit Gegenpart der sonst basischen Guanidine ausgetestet. Beide Substanzen wurden auf Inhibition des Tat-TAR-Komplexes und auf Inhibition in den Spalttests des Hairpin-Ribozyms untersucht. Das sulfonamidierte Glucosamin **35** zeigte in diesen Versuchen keinerlei Effekt auf die RNA. Die einzige beobachtete Interaktion war in der Fluoreszenz-Titration die Bindung an das Tat-Peptid. Bei dieser sehr schwachen Bindung konnte keine Bindungskonstante bestimmt werden. Aus diesen und den vorigen

Ergebnissen, in dem das sulfonamidierte Glucos-2-amin **35** sehr schwache Bindungsaffinität zum- Tat-Peptid hatte, wurde daher ebenfalls eine sehr schwache Wechselwirkung durch das Di-sulfonamidierte Cyclitol **36** an das Tat-Peptid und keine an RNA vermutet.

In dem ELISA-Versuch konnte allerdings mäßige Inhibition durch das Di-sulfonamidierte Cyclitol **36** nachgewiesen werden. Es wurde aufgrund der potentiell negativen Sulfonamidatgruppen auf eine Bindung an das durch die vielen Arginine positiv geladene Tat-Peptid vermutet. Diese Vermutung bestätigte sich in der Fluoreszenz-Titration, in der mit Di-sulfonamidierten Cyclitol **36** gegen das Tat-Peptid titriert worden ist. Die Dissoziationskonstante konnte mit 23.4  $\mu\text{M}$  berechnet werden und war unerwartet hoch. Vielleicht erklärt sich seine hohe Bindungskonstante mit der strukturellen Ähnlichkeit mit dem anti-HIV-Medikament GA137053.<sup>[128]</sup>



In den Spalttests, in denen das Substrat des Hairpin-Ribozyms gespalten wird, zeigte es ebenfalls starke Inhibitionseffekte. Diese Inhibition des Hairpin-Ribozyms ist ziemlich hoch gewesen. Bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  konnte das Ribozym auf 25 % seiner maximalen Aktivität mit einer Umsatzgeschwindigkeit von 0.29  $\text{min}^{-1}$  reduziert werden. Das modifizierte Cyclitol **36** zeigte sich ebenfalls bei der Inkubation mit Substrat aktiv. Dabei konnte nach 22 Stunden Inkubationsdauer das 5-Nukleotid lange Spaltfragment beobachtet werden. Die Inhibition am Hairpin-Ribozym konnte nicht erklärt werden.

<sup>128</sup>F.Hamy, N.Gelus, M.Zeller, J.Lazdins, C.Bailly, T.Klimkait; *Cell* **2000**, 7, 669-76.

## 8. Zusammenfassung

### 8.1 Methodenevaluation

Der ELISA-Test ist durchaus zur Überprüfung der Inhibition des Tat-TAR-Komplexes geeignet, wie die Bestätigungen der Ergebnisse der Fluoreszenz-Titration zeigen. Aufgrund der begrenzten Bindungsplätze für den nachweisenden Antikörper kann leider keine Bindungskonstante für den Tat-TAR-Komplex bestimmt werden. Jedoch hätte sich der ELISA-Test für Bindungskonstantenberechnung für die biogenen Substanzen an die TAR-RNA schlecht geeignet, da eine Bestimmung der Menge an Tat-Peptid und TAR-RNA nach den Inkubations- und Waschschritten nicht mehr möglich gewesen wäre. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante ist eine sehr genaue Kenntnis der vorhandenen, eingesetzten Konzentrationen an Tat-Peptid, an TAR-RNA sowie an Inhibitor nötig. Diese Bestimmung ist nach dem Entfernen der Inkubationslösung nicht mehr gegeben, da nicht davon ausgegangen werden darf, dass alle Moleküle freie Bindungsplätze finden und belegen können. Zur Abschätzung einer Inhibition und zur Eingrenzung des IC-50-Wertes (*inhibitory concentration*), welcher aussagt, wann 50% der Hemmung auftreten, ist diese Messmethode geeignet. Außerdem eignet sich die Methode zur Bestätigung der Werte, die in der Fluoreszenz-Titration gemessen wurden, da nicht alle dort erhaltenen Ergebnisse eindeutig waren. So konnten die Ergebnisse des Hygromycins **9** am besten durch den ELISA-Test bestimmt werden. Bei dem Hygromycin **9** konnten eindeutig Quencheffekte nachgewiesen werden, die gegenteilige Effekte auf das Fluoreszenz-Verhalten des Fluorophors ausübten. Bei Netropsin **72** wurde ebenfalls ein solcher Effekt vermutet, konnte aber nicht nachgewiesen werden. Der ELISA-Test konnte bei dieser Substanz einen sehr starken Effekt zeigen, während der beobachtete Effekt in der Fluoreszenz-Titration sehr gering war. Um weitere Indizien dieser zwei parallel auftretenden Konkurrenzreaktionen zu erhalten, müssten noch Fluoreszenz-Titrations-Messungen des Netropsin **72** gegen das Tat-Peptid alleine durchgeführt werden. Bei den Inhibitionsmessungen des NeoGs **11** konnte der ELISA-Test ebenfalls unterstützend wirken, da dieser im direkten Inhibitionsvergleich mit Neomycin **8** aufzeigen konnte, dass NeoG **11** eindeutig stärker inhibierend auf den Tat-TAR-Komplex wirkt als Neomycin **8**. Dieses redundant erhaltene signifikante Ergebnis konnte jedoch nicht in der Fluoreszenz-Titration bestätigt werden, wobei die Fehlerfaktoren von zwei groß genug sind, als dass NeoG **8** mit einer vermuteten höheren Bindungskonstanten in diesem Bereich liegen könnte. Die direkten Vergleiche

zwischen den unmodifizierten und modifizierten Substanzen waren immer nur direkt im ELISA-Test durchführbar. Ein weiterer unbestreitbarer Vorteil ist die schnelle Durchführbarkeit, ohne große, weitere Apparaturen zu benötigen.

Die Fluoreszenz-Titration hingegen bietet den Vorteil der hohen Messempfindlichkeit und daher Genauigkeit der Messungen. Außerdem ist die Bestimmung der eingesetzten Konzentrationen möglich, da keine Waschschriffe durchgeführt werden. Die Bindung des Tat-Peptids oder der RNA-affinen Substanz werden direkt in der Lösung gemessen und daher sind keine störenden Effekte wie der Besetzung aller Bindungsplätze auf einer Oberfläche zu berücksichtigen. Ein weiterer Vorteil ist, dass bei einer vorhandenen Inhibition die Art der Inhibierung häufig bestimmt werden kann. So kann bei Bindung an das Tat-Peptid in vielen Fällen die Dissoziationskonstante der Substanz zum Tat-Peptid durch Titration gegen das Tat-Peptid bestimmt werden. Auf diese Art und Weise kann nicht nur die Quantität, sondern auch die Qualität der Bindung bestimmt werden. Durch das Programm BPC-Fit konnten die erhaltenen Daten der Fluoreszenz-Titration direkt benutzt werden, um die Bindungskonstanten zu berechnen. Die Grenzen der Fluoreszenz-Titration sind jedoch durch unspezifische Quench- oder Löscheffekte des Fluoreszenz-Signals durch die titrierten Substanzen gegeben. Dieses konnte sicher bei der durchgeführten Fluoreszenz-Titration am Hygromycin **9** gezeigt werden, aber bei Netropsin **72** und den Makrozyklen-Substanzen **77** und **78** wurde ebenfalls ein Effekt der unspezifischen Quenchung vermutet. Aber auf diese Fehler wirkt der ELISA-Test ausgleichend. Er kann eine Inhibition aufzeigen, da in diesem Assay keine Fluoreszenz-Löschung stattfinden kann. Ebenfalls ergänzend kann der ELISA-Test bei der Berechnung der Dissoziationskonstanten durch die Fluoreszenz-Titration sein, bei der neben den Dissoziationskonstanten auch ein Fehlerfaktor angegeben ist, um den der Wert abweichen kann.

Das Hairpin-Ribozym eignet sich als eine weitere Überprüfungsmöglichkeit des Affinitätsnachweises von Substanzen an RNA dadurch, dass durch die Umsatzgeschwindigkeit der Substratspaltung durch das Hairpin-Ribozym eine RNA-Affinität durch Inhibition gezeigt werden kann. Bei einer Reduktion der Umsatzgeschwindigkeit durch Interaktion der Substanz mit der RNA des Hairpin-Ribozyms oder des ebenfalls aus Nucleinsäuren bestehenden Substrates ist eine Wechselwirkung durch die auszutestende Substanz offensichtlich. Eine Möglichkeit der Überprüfung, ob die zu untersuchende Substanz mit dem

Hairpin-Ribozym oder mit dem Substrat interagiert, ist die Inkubation der Substanz mit dem Substrat. Dabei ist für diese Interaktion eine Spaltaktivität für das Spermidin **26**, Neomycin B **8**, Neamin **2**, Kanamycin **4**, Amikacin **1** und Sisomycin **73** bei Konzentrationen von 10 mM literaturbeschrieben.<sup>[129]</sup> Daher wurden diese Inkubationstest mit dem Substrat ebenfalls ausgetestet und zeigten bei den Substanzen **11**, **36**, **64**, **65**, **74** und **81** Spaltaktivität. Der Schwachpunkt ist, dass keine Affinitätsbestimmung durchgeführt werden kann.

## 8.2 Chemische Strukturen und die Affinität an RNA

Die Ergebnisse der Inhibitionsversuche im ELISA-Test und in der Fluoreszenz-Titration zeigten, dass das Cyclitol **3**, trotz des Strukturanteils des Neomycinmoleküls an die kleine Furche der TAR-RNA gebunden wird<sup>[126]</sup>, aber als freie Substanz keine nachweisbare Affinität besitzt. Da ist das Neamin **2** als Grundgerüst wesentlich RNA-affiner. Mit einer Dissoziationskonstanten von 39  $\mu\text{M}$  bildet es die Grundstütze in der Inhibition der meisten Aminoglykoside, insbesondere die des Neomycins **8** mit einer Dissoziationskonstante von 1  $\mu\text{M}$ .<sup>[130,33,102]</sup> Dabei zeigte der Versuch mit Ribostamycin **6**, dass die 2-DOS 5,1-substituierte Glucose und damit der dritte Zuckerring im Molekül eher einen störenden Einfluss auf die Bindung zur TAR-RNA aufweist. Im Neomycin **8** dient er vermutlich als „Linker“, um den vierten Zuckerring und das Neamin-Grundgerüst zu verbinden. Durch diese drei Zuckerringe scheint die Bindung des Neomycins **8** zur TAR-RNA zu erfolgen. Diese Vermutung wird durch die Arbeiten von *Westhof et al* in seinen NMR-Bindungs-Untersuchungen mit der TAR-RNA und dem Neomycin **8** unterstützt.<sup>[131]</sup> Das Kanamycin **4** besitzt im Gegensatz zum Ribostamycin **6** an der 2-Position eine Hydroxygruppe anstelle der Aminofunktion und eine 4',1''substituierte 3-Aminoglucose, was deutlich in der TAR-RNA-Affinität ersichtlich ist. Diese Effekte der unterschiedlichen Cyclitolsubstitution und die Verschiebung der Aminogruppe von der 2-Position nach 6''-Position führt zu einem eindeutigen Verlust der TAR-RNA-Affinität (Faktor  $\geq 200$ ). Das Amikacin **1** hat eine ähnliche Struktur wie Kanamycin **4** und Ribostamycin **6**, aber die 1'-Aminogruppe ist zu einem Amid umfunktionalisiert, und anstelle der Glucose im Ribostamycin **6** ist eine

<sup>129</sup> D.J.Earnshaw, M.J.Gait; *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 5551-5561.

<sup>130</sup> B.Wu, J.Y.He, E.E.Swayze, *Org.Lett.* **2002**, 4(20), 3455-3458.

<sup>131</sup> B.François, R.J.M.Russell, J.B.Murray, F.Aboul-ela, B.Masquida, Q.Vicens, E.Westhof; *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 5677-5690.

2''-Desoxy-3-aminoglucose mit einem Cyclitol substituiert und auch die 2-Aminofunktion ist durch eine Hydroxygruppe ersetzt. Das Amikacin **1** zeigt eine um den Faktor 2 höhere Affinität zur TAR-RNA gegenüber dem Ribostamycin **6**. Dieser Effekt führt zu der Annahme, dass die Aminogruppe in der 3''-Position verbesserte Bindungseigenschaften zur TAR-RNA aufzeigt. Ebenfalls wäre eine verbesserte Bindung an die TAR-RNA über die Aminogruppe des Aminobutanamids denkbar.

Das Paromomycin **7** unterscheidet sich vom Neomycin **8** nur durch den vierten Zuckerring, der im Paromomycin **7** eine 2-Aminoglucose anstelle einer 2,6-Diaminoglucose ist. Trotzdem besitzt dieses Aminoglykosid eine geringere Affinität zur TAR-RNA als Neomycin **8**, was auf eine essentielle Funktion der 6'''-Aminogruppe hinweist, die dem Paromomycin **7** im Gegensatz zum Neomycin **8** fehlt.

Das Sisomycin **73**, das als einzige Ähnlichkeit das Cyclitol **3** als Grundgerüst aufweist, zeigt eine hohe Dissoziationskonstante, die mit 7.6  $\mu\text{M}$  größer als die des Neamins **2** und als die des Ribostamycins **6** ist. Vermutlich übt das 3-Amino-6-aminomethylpyran eine stabilisierende Funktion aus, die eventuell sogar über den Pyranring bzw. über die Aminogruppen am Pyranring mit den Basen wechselwirken kann.

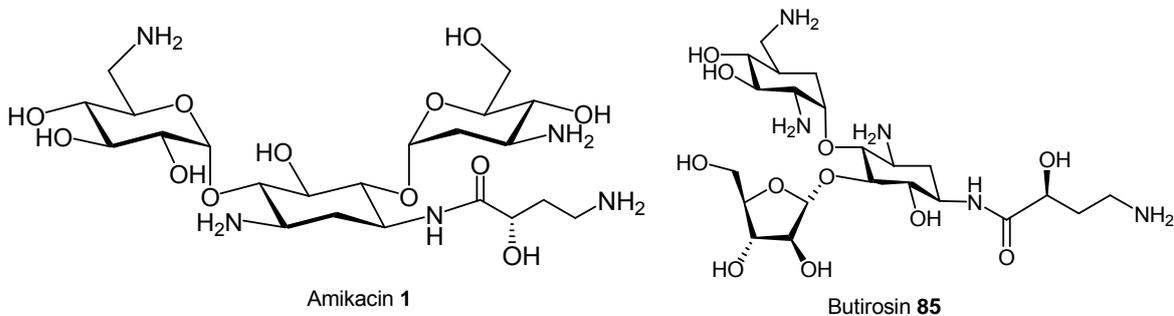
Dass das Geneticin **5** mit seiner Struktur, die keinerlei Ähnlichkeit mehr mit dem Neamingrundgerüst aufweisen kann, eine vergleichsweise schwache Affinität zur TAR-RNA aufzeigt, verwundert nicht. Die im ELISA-Test gezeigte, aber in der Fluoreszenz-Titration nicht in dieser Stärke bestätigte TAR-RNA-Affinität durch das Netropsin **72** wird mit der hohen Anzahl an Aminogruppen im Molekül begründet. Diese Erhöhung der basischen Funktionen durch Guanidierung zeigte bis auf die Modifikation des Neamins **2** eine eindeutige Affinitätssteigerung. Das Neomycin **8** konnte dadurch in der Affinität gesteigert werden. Ebenso wurde die Bindungsstärke des Kanamycins **4** von 9.1 mM auf 22.5  $\mu\text{M}$  um den Faktor 400, beim Geneticin **5** um den Faktor 20 von 225.8  $\mu\text{M}$  auf 11.6  $\mu\text{M}$  gesteigert. Das guanidierte Spermidin **64** zeigte ebenfalls eine um den Faktor drei gesteigerte Affinität. Die anderen Substanzen mit dem relativ geringen Anteil an Aminogruppen zeigten eine insgesamt schwache bis gar keine Affinität zur TAR-RNA. Ebenso verhielt es sich auch bei den Versuchen am Hairpin-Ribozym, in denen die guanidierten Aminoglykoside den größten Inhibitionseffekt auf das Hairpin-Ribozym

ausübten. Auch zeigten die guanidierten Substanzen die höchste Spaltaktivität beim Substrat des Hairpin-Ribozyms.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass das Neamingrundgerüst eine der höchsten Affinitäten zu der TAR-RNA besitzt und jeder Verlust einer Aminogruppe zur Reduktion der TAR-RNA-Affinität nach sich zieht. Ebenso essentiell ist die 6''-Aminoposition im Neomycin, welches ebenfalls bei Verlust eine deutlich Senkung der Bindungsfähigkeit verursacht. Die dritte Zuckereinheit besitzt vorwiegend eine Verbindungsfunktion zwischen dem Neamingerüst **2** und der 2'',6''-Diaminoglucose. Bis auf die Guanidierung des Neamins **2** hat jede Umfunktionalisierung zu einer Erhöhung der Affinität zu der RNA, inklusive des Hairpin-Ribozyms, mit sich gebracht. Die weitere Ausnahme ist das Disulfonamidat-cyclitol **36**, das als Cyclitol **3** durch eine Umfunktionalisierung der Aminogruppen zu Sulfonamidaten eine Affinitätssteigerung erfuhr. Dieser Mechanismus kann nicht erklärt werden, während die Guanidierung durch Wechselwirkungen sowohl mit der Ausstülpung des Basentriplets UCU in der TAR-RNA als auch durch Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrad erklärt werden kann.

## 9. Ausblick

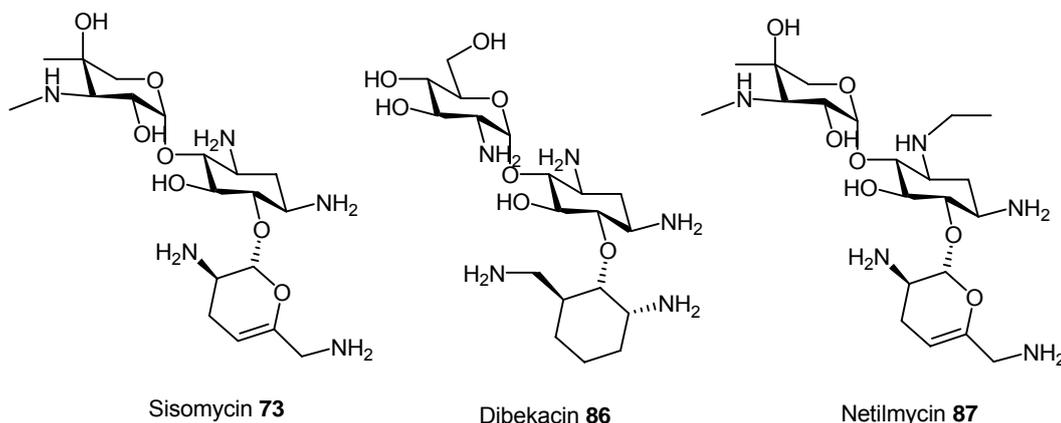
Die beiden Methoden ELISA-Test und Fluoreszenz-Titration ergänzten sich und ließen bereits eine Menge Schlussfolgerungen der molekularen Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Gruppen der ausgewählten Aminoglykosiden und der TAR-RNA bzw. des Tat-Peptids zu. Um zu einem detaillierteren Verständnis dieser molekularen Wechselwirkung zu gelangen, bedarf es weiterer Studien. So wäre es sicherlich hilfreich mit weiteren natürlichen Aminoglykosiden, wie zum Beispiel dem Butirosin **85**, weitere Bindungsstudien durchzuführen. Das Butirosin **85** besitzt den gleichen Aufbau der ersten beiden Zuckerringe inklusive der Amidbindung an der Position 1' des Cyclitolgrundgerüsts wie das Amikacin **1**.



**Abbildung 130:** Vergleich der Strukturen zwischen Amikacin **1** und Butirosin **85**.

Der Unterschied des dritten Zuckerringes in dem die 3-Amino-2,3-Desoxy- $\alpha$ -Glucose durch eine Ribose im Butirosin **85** ausgetauscht ist, ist daher von großem Interesse, da die Funktion der dritten Zuckerrestes als Linker zum vierten und zur Bindung wichtigen Zuckerring, wie im Beispiel Neomycin **8** beschrieben, postuliert wird.<sup>[54]</sup> Aus dem gleichen Grund sollten daher auch Versuche mit dem Aminoglykosid Debikacin **86** durchgeführt werden, um den Unterschied in der Stärke der Bindung an die TAR zwischen Sisomycin **73** und Debikacin **86** vergleichen zu können.

Durch den Einsatz von Netilmycin **87**, welches sich vom Sisomycin **73** durch die Ethylierung der 3'-Aminogruppe im Cyclitol **3** unterscheidet, kann und sollte der Einfluss der 3'-Aminogruppe des Cyclitols **3** studiert werden.



**Abbildung 131:** Struktureller Vergleich zwischen Sisomycin **73**, Dibekacin **86** und Netilmycin **87**.

Die erhaltenen Ergebnisse von Kanamycin A **4** sollten mit zukünftigen Messungen von Kanamycin B komplettiert werden, um so einen direkten Vergleich des Einflusses der 2-Aminogruppe im Kanamycin-molekül und für die Wechselwirkungen zwischen TAR-RNA und Aminoglykoside im Allgemeinen zu erlangen. Ebenso sollten die bisher untersuchten Aminoglykoside ebenfalls zu den guanidierten Derivaten umgesetzt und der Effekt in beiden TAR-RNA-Bindungs-Verfahren untersucht werden. Zur detaillierten Untersuchung des Einflusses der Carboxyamidatgruppe an den Aminoglykosiden sollten an verschiedenen Positionen guanidierte Aminoglykoside erzeugt werden. Das dieses möglich ist, zeigt die Umsetzung des Neamin **2** aus dem sowohl das vierfach **84**, als auch das dreifach guanidierte Neamin **83** synthetisiert werden konnte. Durch geringeren Einsatz des Guanidierungsreagenz Di-Boc-Guanidin-Triflat **14** sollten verschieden umgesetzte Derivate wie bei Neamin **2** beispielhaft gezeigt werden konnte, erzeugt werden können.

Die Synthese der glykosidischen Sulfonamide sollte weiter verfolgt werden und auf höhere Aminoglykoside ausgedehnt werden. Die Synthese stellt in der Schutzgruppenchemie eine Herausforderung dar, da freie Aminogruppen neben geschützten Hydroxygruppen im Glykosidmolekül zur Umsetzung zu den Sulfonamidaten benötigt werden. Durch diese Synthese wäre eine weitere Substanzbibliothek mit sehr interessanten, noch nicht beschriebenen Aminoglykosiden die anstelle der sonst basischen Amine oder Guanidingruppen eine azide funktionelle Sulfonamidat-gruppe tragen, verfügbar. Insbesondere die Wechselwirkung dieser Substanzklasse mit RNA ist aufgrund der überraschenden Ergebnisse mit dem Disulfonamidat-cyclitol **36** und der TAR-RNA von besonderem Interesse.

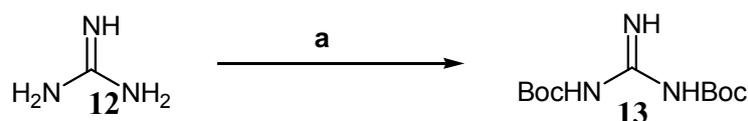
In den Versuchen, in denen die RNA-Affinität über die Hemmwirkung des Hairpin-Ribozyms indirekt bestimmt werden konnte, sollte weiter verfolgt werden, um die Spezifität der RNA-Affinität zu bestimmen. Die dabei durchgeführten Spaltexperimente des Hairpin-Ribozym-Substrates durch diese artifiziellen Substanzen, sollte auch weiter studiert werden. Diese bisher nur bei einigen wenigen Aminoglykosiden wie dem Spermidin **26**, Neomycin B **8**, Neamin **2**, Kanamycin, Amikacin **1** und Sisomycin **73** bei je einer Konzentration von 10 mM beschriebene<sup>[97]</sup> Spaltaktivität, konnte bereits durch diese Arbeit durch die Substanzen des Disulfonamidat-Cyclitol **36**, guanidierten Geneticin **74**, Dimer **48**, guanidiertes Piperazin **47** und guanidiertes Spermidin **46** erweitert werden.

## 10. Chemischer Experimentier Teil

### 10.1 Synthese der guanidierten Aminoglykoside

#### 10.1.1. Synthese des Di-Boc-Guanidin-Triflats 14

##### 10.1.1.1 Synthese des N,N'-di-tert-butoxycarbonyl-N''-guanidins 13 <sup>[65,67]</sup>



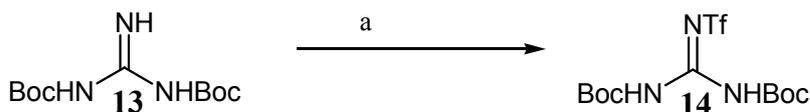
a)  $\text{Boc}_2\text{O}$ , NaOH, Wasser/Dioxane 2:1

**Schema 35:** Synthese des N,N'-di-tert-butoxycarbonyl-N''-guanidins **13**.

Das Guanidin-hydrochlorid **12** (2.4 g, 2.5 mmol) wurde mit Natriumhydroxid (4 g, 0.1 mol) versetzt, in 40 mL Wasser/Dioxan (1:2) gelöst und auf 0°C heruntergekühlt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Boc-Anhydrid (12 g, 0.1 mol) versetzt. Es wurde auf RT erwärmt und 20 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum auf 1/3 des ursprünglichen Volumens reduziert, mit Wasser versetzt und mit Essigester dreimal extrahiert. Alle organischen Phasen wurden vereint, mit 10 %-iger Citrat- und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend die Lösung eingengt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch [Dichlormethan/Methanol (98:2)] über Kieselgel gereinigt, und das reine Produkt konnte zu 46 % (2.994 g / 11.5 mmol [ $M=259.3$  g/mol]) erhalten werden.

HRMS (ESI): m/z für positive Ionen: berechnet: 260.1532 (**13**+H<sup>+</sup>); gefunden: 260.1635 (**13**+H<sup>+</sup>);

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CHCl<sub>3</sub>= 7.26 ppm):  $\delta$ = 8.5 (bs, 2H, NH), 1.49 (s, 18H, Boc) ppm.

**10.1.1.2 Synthese des N,N'-di-*tert*-butoxycarbonyl-N''-guanidintriflats 14** <sup>[65,67]</sup>

a) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TEA (2 Äq), -78°C, Tf<sub>2</sub>O (1.1 Äq), 4 h; 58 %

**Schema 36:** Synthese des N,N'-di-*tert*-butoxycarbonyl-N''-guanidintriflats **14**.

Das Di-Boc-guanidin **13** (1.99 g, 7.7 mmol) wurde in abs. Dichlormethan (30 mL) und TEA (1.35 mL, 12.6 mmol) gelöst und auf -80°C gekühlt. 1.35 mL (8.1 mmol) des Triflat-Anhydrids wurden langsam dazugetropft, so dass die Temperatur nicht über -70°C steigt. Danach wurde vier Stunden weitergerührt, wobei die Lösung auf RT erwärmt wurde. Nach der Reaktion wurde die Reaktionslösung mit gesättigter Natriumsulfat-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel eingeeengt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch [Dichlormethan/Methanol (98:2)] über Kieselgel gereinigt und das reine Produkt konnte mit einer Ausbeute von 58 % (1.73 g / 4.43 mmol [M=359.42 g/mol]) erhalten werden.

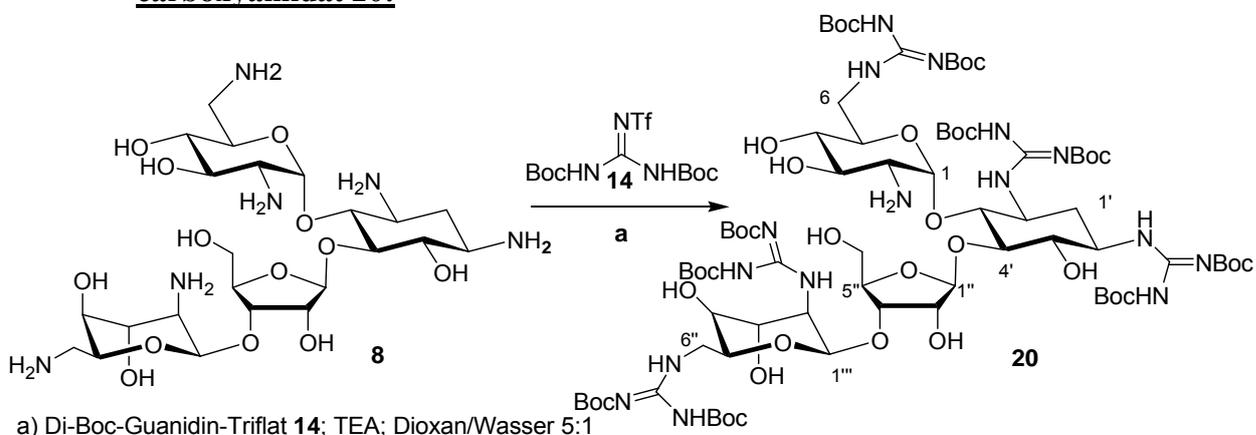
HRMS (ESI): m/z für positive Ionen: berechnet: 392.1125 (**14**+H<sup>+</sup>); gefunden: 392.1183 (**14**+H<sup>+</sup>).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO = 2.50 ppm): δ= 11.23 (s, 2H, NH), 1.49 (s, 18 H, Boc) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO= 49 ppm): δ= 153.2 (s, CN<sub>3</sub>), 150.9 (s, Boc), 84.3 (s, Boc), 28.4 (q, Boc) ppm.

## 10.1.2 Guanidierung der Substanzen mit Di-Boc-Guanidin-Triflat 14

### 10.1.2.1 Synthese des Neomycin-2,6,1',3',2''',6'''-hexa-[bis-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-carboxyamidat 20:



**Schema 37:** Synthese von Neomycin-2,6,1',3',2''',6'''-hexa-[bis-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-carboxyamidat **20**, (NeoG).

Das kommerziell erhältliche Neomycin-Sulfat<sup>[132]</sup> **8** wurde über den Ionentauscher IRA-400 (OH<sup>-</sup>) entsalzt und anschließend lyophilisiert. 209 mg (0.341 mmol) dieses sulfatfreien Neomycins **8** wurde in Dioxan/Wasser (4:1) gelöst und mit 1.019 g (2.605 mol) Di-Boc-guanidin-triflat **14** und 45  $\mu$ L (0.33 mmol) TEA versetzt. Es wurde 7 Tage bei RT gerührt. Nach dem Entfernen des Dioxans im Vakuum wurde das Produkt mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert, mit Wasser und gesättigter Kochsalz-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Produkt **20** konnte säulenchromatographisch [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98:2)] über Kieselgel mit einer Ausbeute von 93 % (649.7 mg (weißer Feststoff), 0.314 mmol [2067.07 g/mol] rein erhalten werden.

**HRMS (ESI):** m/z für positive Ionen: berechnet: 1056.5192 [(**20**+2Na<sup>+</sup>)/2]; gefunden: 1056.5216 [(**20**+2Na<sup>+</sup>)/2]

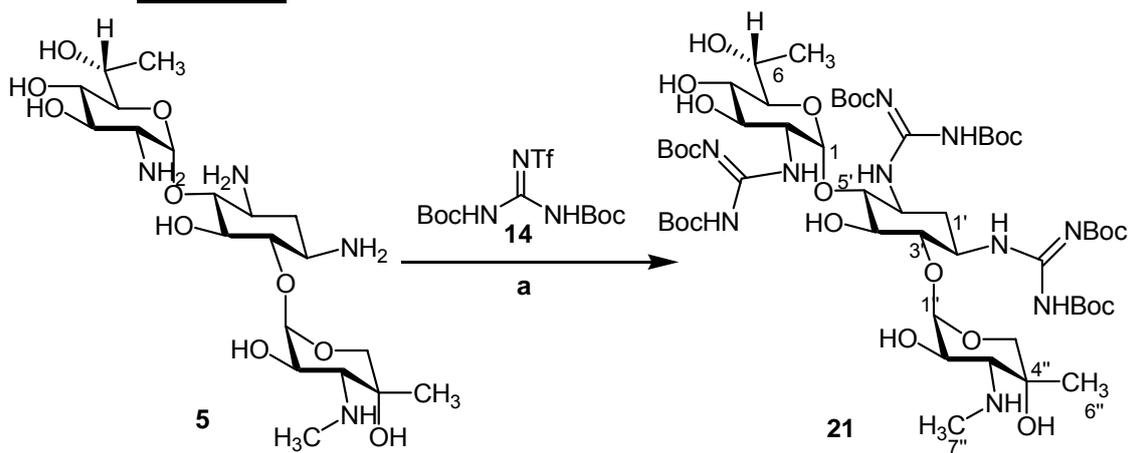
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm):**  $\delta$  = 11.30 [bs, 6H, (NHBoc)], 9.29 [s, 1H, (NH-C(NH))], 8.87 [s, 1H (NH-C(NH))], 8.85 [s, 3H, (NH-C(NH))], 8.29 [s, 1H, (NH-C(NH))], 5.54 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz, H-1), 5.12 (s, 2H, H-1'', H-1'''), 5.12 (s, 2H, H-3'', H-2''), 4.97 (s, 1H, H-4''), 4.29-4.43 (m, 3H, H-4, H-3'''), 3.88-3.94 (m, 5H, H-5''b, H-5, H-5', H-3, H-5'''), 3.51-3.77 (m, 8H, H-4, H-3, H-4''', H6', H6''', H-5'a', H-2'''), 3.25-3.29 (m, 3H,

<sup>132</sup> Hessler et al.; *J. Antibiot.*; **1970**, *23*, 464.

H-6, H-1'), 2.42 (ddd, 1H,  $J = 12.4, 4.0, 4.0$  Hz, H-1'<sub>ax</sub>), 1.49 (s, 18H, Boc), 1.47 (s, 54H, Boc), 1.45 (s, 36H, Boc) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>= 77,0 ppm):  $\delta =$  162.1 [s, (N=C-(NH)<sub>2</sub>], 161.55 [s, (N=C-(NH)<sub>2</sub>], 161.6 [s, (N=C-(NH)<sub>2</sub>], 161.2 [s, (N=C-(NH)<sub>2</sub>], 161.1 [s, (N=C-(NH)<sub>2</sub>], 156.5 [s, (N=C-(NH)<sub>2</sub>], 156.4 (s, Boc), 156.2 (s, Boc), 155.9 (s, Boc), 155.7 (s, Boc), 155.6 (s, Boc), 155.1 (s, Boc), 152.3 (s, Boc), 152.0 (s, Boc), 151.9 (s, Boc), 151.8 (s, Boc), 151.7 (s, Boc), 151.1 (s, Boc), 150.9 (s, Boc), 120.0 (d, C-1''), 116.9 (d, C-1'''), 82.9 (d, C-1), 82.9 (d, C-5'), 82.8 (d, C-4''), 82,7 (d, C-5'''), 82.3 (d, C-4'), 79.3 (d, C-3''), 79.0 (d, C-2''), 78.9 (d, C-6'), 78.9 (d, C-4), 75.7 (d, C-3'''), 73.9 (d, C-5), 71.9 (t, C-6'''), 65.9 (d, C-3), 60.1 (d, C-4'''), 52.7 (d, C-5''), 48.9 (d, C-2), 48.0 (d, C-1'), 39.9 (d, C-3'), 38.9(t, C-6), 29.9 (d, C-2') ppm.

### 10.1.2.2 Synthese des Geneticin-2,2',6'-tri-[bis-(tert.-Butoxycarbonyl)-] carboxyamidats 21



a) Di-Boc-Guanidin-Triflat **14**; TEA; Dioxan/Wasser 5:1

**Schema 38:** Synthese des Boc-geschützten Geneticin-2,2',6'-tri-carboxyamidats **21**.

Das kommerziell erhältliche Geneticin **5** (104.5 mg, 0.201 mmol) wurde in Dioxan/Wasser (4:1) gelöst und mit 1.19 g (3.05 mmol) Di-Boc-guanidin-triflat **14** und 440  $\mu$ L (3.2 mmol) TEA versetzt. Es wurde 7 Tage bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Lösung mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ausgeschüttelt, die organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen. Als Rohprodukt wurde ein weißer Feststoff erhalten. Das Produkt **21** konnte säulenchromatographisch [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98:2)] über

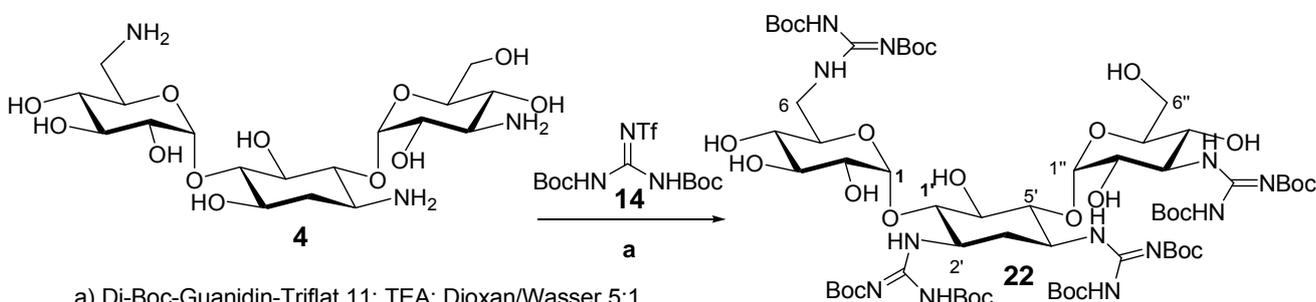
Kieselgel mit einer Ausbeute von 14 % (41 mg (weißer Feststoff), 27.9  $\mu\text{M}$  [1467.8 g/mol]) rein erhalten werden.

HRMS (ESI): m/z für positive Ionen: berechnet: 1064.5570 ( $\mathbf{21}+\text{H}^+$ ); gefunden: 1064.1299 ( $\mathbf{21}+\text{H}^+$ ).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CHCl}_3=7.26$  ppm):  $\delta=$  11.47 [d, 1H, (-NH-(CN) $_2$ )], 11.40 [d, 1H, (-NH-(CN) $_2$ )], 11.37 [d, 1H, (-NH-(CN) $_2$ )], 8.81 (d, 1H,  $J=6.7$  Hz, NH-C(NH)), 8.47 (d, 1H,  $J=6.7$  Hz, NH-C(NH)), 8.25 (d, 2H,  $J=6.7$  Hz, NH-C(NH)), 5.76 (d, 1H,  $J=3.5$  Hz, H-1), 4.45 (ddd, 1H,  $J=22.6, 8.2, 4.3$  Hz, H-2), 4.41 (m, 2H, H-6', H-2'), 4.29 (s, 2H, H-1''), 3.89 (t, 1H,  $J=9.2$  Hz, H-4), 3.74 (m, 3H, H-3', H-5''), 3.63 (t, 1H,  $J=9.6$  Hz, H-4), 3.51-3.58 (m, 2H, H5''), 3.28 (t, 1H,  $J=9.6$  Hz, H-5), 2.85 (s, 1H, H-4''), 2.51 (ddd, 1H,  $J=12.5, 4.4, 4.4$  Hz, H-1'ax), 1.52 (s, 9H, Boc), 1.51 (9H, Boc), 1.49 (s, 18H, Boc), 1.45 (s, 18H, Boc), 1.27 (d, 3H,  $J=6.5$  Hz, H-7'') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3=77.0$  ppm):  $\delta=$  163.6 [s, (N=C-(NH) $_2$ )], 162.6 [s, (N=C-(NH) $_2$ )], 162.4 [s, (N=C-(NH) $_2$ )], 157.8 (s, Boc), 156.7 (s, Boc), 156.5 (s, Boc), 153.5 (s, Boc), 153.1 (s, Boc), 152.7 (s, Boc), 97.1 (d, C-1), 84.1 (s, Boc), 84.0 (s, Boc), 79.7 (s, Boc), 79.5 (d, C-3), 78.6 (q, C-6), 77.9 (d, C-4), 77.4 (d, C-5'), 77.2 (d, C-5''), 76.9 (d, C-5), 74.3 (d, C-3''), 73.8 (d, C-4''), 68.2 (d, C-2'), 55.4 (t, C-6'), 50.9 (d, C-2), 49.2 (d, C-1'), 28.5 (q, Boc), 28.3 (q, Boc), 28.2 (q, Boc), 8.6 (t, C-7'') ppm.

### 10.1.2.3 Synthese von Kanamycin A-6,2',4',4''-tetra-[bis-(tert.-Butoxycarbonyl)-carboxyamidat 22



**Schema 39:** Synthese des Kanamycin A-6,2',4',4''-tetra-carboxyamidats **22**.

Das kommerziell erhältliche Kanamycin-sulfat<sup>[132]</sup> **4** (100 mg, 0.21 mmol) wurde in Dioxan/Wasser (4:1) gelöst und mit 1.236 g (3.143 mmol) Di-Boc-guanidin-triflat **14** und 460  $\mu\text{L}$  (3.34 mmol) TEA versetzt. Es wurde 7 Tage bei RT gerührt. Nach dem Entfernen

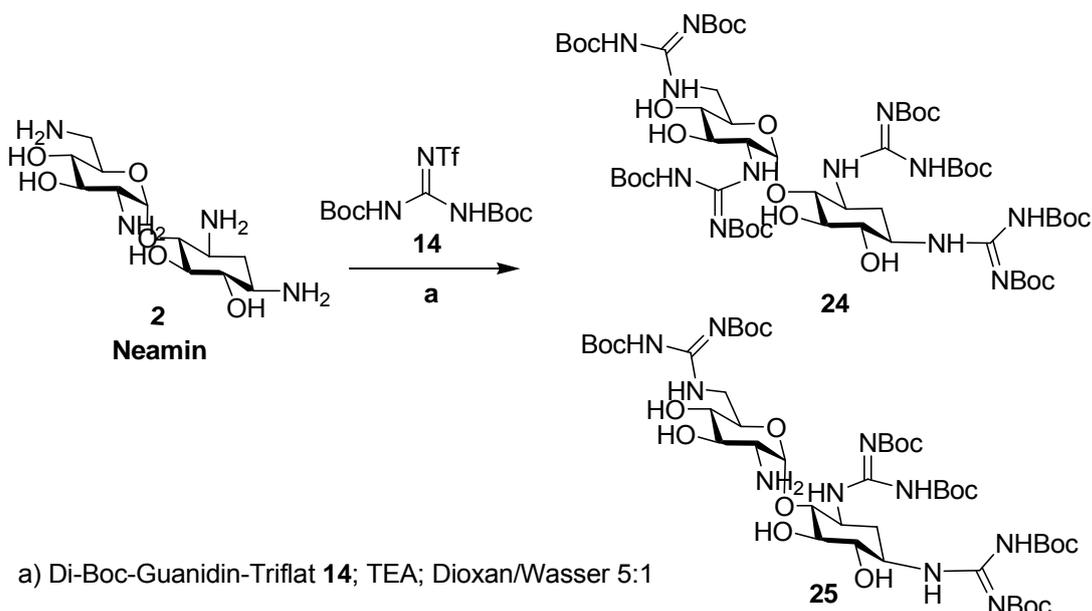
des Dioxans im Vakuum wurde das Produkt mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert, mit Wasser und gesättigter Kochsalz-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Produkt **22** konnte säulenchromatographisch [ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (98:2)] über Kieselgel mit einer Ausbeute von 27 % (83 mg (Farbloses Öl), 68  $\mu\text{M}$  [1222.4 g/mol]) rein erhalten werden.

HRMS (ESI):  $m/z$  für positive Ionen: berechnet: 1452.7447 (**22**+ $\text{H}^+$ ); gefunden: 1450.9624 (**22**+ $\text{H}^+$ ).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CHCl}_3=7.26$  ppm):  $\delta=$  11.50 (s, 1H, NH-Boc), 11.44 (s, 2H, NH-Boc), 11.34 (s, 1H, NH-Boc), 8.79 (d, 1H,  $J=4.6$  Hz, NH-C(NH)), 8.41 (d, 2H,  $J=8.5$  Hz, NH-C(NH)), 8.29 (d, 1H,  $J=8.6$  Hz, NH-C(NH)), 5.28 (d, 1H,  $J=3.5$  Hz, H-1), 5.06 (d, 1H,  $J=3.8$  Hz, H-1''), 4.42 (m, 1H, H-1'), 4.28 (m, 1H, H-4), 4.17 (m, 1H, H-3), 4.05 (m, 2H, H-6), 3.96 (d, 1H,  $J=9.1$  Hz, H-2), 3.75 (m, 3H, H-5, H-5', H-2''), 3.65 (m, 3H, H-2', H3'H-5), 3.57 (dd, 2H,  $J=9.5, 3.6$  Hz, H-6''), 3.33 (dd, 2H,  $J=9.6, 9.6$  Hz, H-3'', H-4'), 3.10 (dd, 1H,  $J=9.5, 9.5$ , H-3), 3.00 (m, 1H, H-6'), 2.31 (ddd, 1H,  $J=12.4, 4.0, 4.0$  Hz, H-3'), 1.48 (s, 18H, Boc), 1.46 (s, 36H, Boc), 1.44 (s, 18H, Boc) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3=77,0$  ppm):  $\delta=$  163.5 [s, (N=C-(NH) $_2$ ], 163.4 [s, (N=C-(NH) $_2$ ], 162.2 [s, (N=C-(NH) $_2$ ], 162.3 [s, (N=C-(NH) $_2$ ], 158.4 (s, Boc), 157.5 (s, Boc), 159.6 (s, Boc), 155.8 (s, Boc), 153.3 (s, Boc), 153.2 (s, Boc), 152.7 (s, Boc), 152.6 (s, Boc), 102.0 (d, C-1), 98.9 (d, C-1''), 85.6 (d, C-1), 84.4 (d, C-4''), 83.7 (d, C-4'''), 83.6 (d, C-6'), 83.4 (d, C-4'), 77.1 (d, C5''), 76.7 (d, C-5'), 75.1 (d, C-2''), 73.1 (d, C-3'), 72.8 (d, C-5'), 72.4 (d, C-4), 71.9 (d, C-3), 71.8 (d, C-4''), 70.0 (d, C-4), 69.1 (d, C-3''), 62.4 (d, C-6''), 57.9 (d, C-2), 53.4 (d, C-2'), 49.6 (d, C-1'), 48.8 (t, C-6), 40.9 (t, C-6), 31.2 (d, C-2'), 28.3 (q, Boc), 28.1 (q, Boc), 28.0 (q, Boc), 27.9 (q, Boc) ppm.

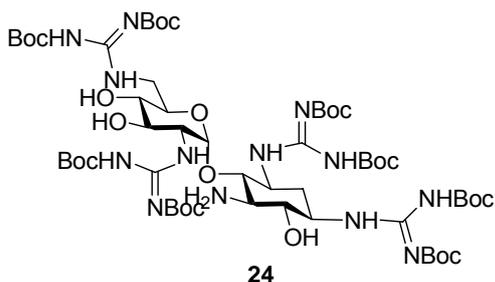
### 10.1.2.4 Synthese von Neamin-6,2',6'tri- und 2,6,2',6'-tetra-[bis-(tert.-Butoxycarbonyl)-carboxyamidat 25 und 24



**Schema 40:** Synthese des tetra –Carboxyamidats **24** und tri-Carboxyamidats **25** des Neamins.

Neamin **2**<sup>[133]</sup> (72 mg, 0.62 mmol) wurde in Dioxan/Wasser (4:1) gelöst und mit Di-Boc-guanidin-triflat **14** (1.941 g, 4.96 mmol) und TEA (86  $\mu$ L, 0.62 mmol) versetzt. Es wurde 7 Tage bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Lösung mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ausgeschüttelt, die organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde als farbloses Öl erhalten. Die Produkte **25** und **24** konnten säulenchromatographisch [ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (98:2)] über Kieselgel rein erhalten werden. Dabei konnten das 3-fach guanidiertes Neamin **25** mit 29 % [0.230g (=0.141 mmol)] und das 4-fach guanidierte Neamin **24** mit 23 % [0.148g (=0.178 mmol)] Ausbeute erhalten werden.

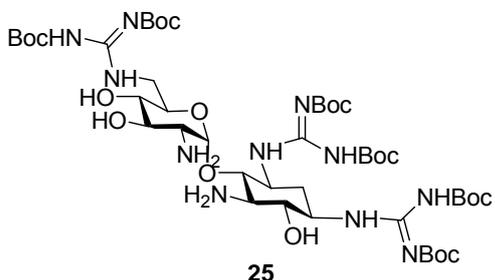
<sup>133</sup> W.K.C.Park, M.Auer, H.Jaksche, C.H.Wong; *J.Am.Chem.Soc.* **1996**, *118*, 10150-10155.

**Boc-geschütztes Neamin-2,6,2',6'-tetra-[bis-(tert.-Butoxycarbonyl)-carboxyamidat 24**

**HRMS (ESI):** m/z für positive Ionen: berechnet: 1291.6997 (**24**+H<sup>+</sup>); gefunden: 1291.7687 (**24**+H<sup>+</sup>).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CHCl<sub>3</sub>= 7.26 ppm):** δ= 5.49 (d, 1H, *J* = 3.8 Hz, H-1), 3.92-4.33 (m, 4H, H-6, H-5, H-3), 3.83-3.91 (m, 4H, H-6, H-3, H-2), 3.34-3.41 (m, 5H, H-5', H-6', H-2', H-5', H-4'), 2.91 (ddd, 1H, *J*=12.0, 4.5 Hz, H-1'<sub>ax</sub>), 2.19 (ddd, 1H, *J*=12.0, 11.7, 11.7 Hz, H-1'<sub>äq</sub>), 1.52 (s, 18H), 1.55 (s, 18H) 1.46 (s, 36H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>= 77.0 ppm):** δ= 163.3 (s, N=C-(NH)<sub>2</sub>), 162.6 (s, N=C-(NH)<sub>2</sub>), 162.5 (s, N=C-(NH)<sub>2</sub>), 162.4 (s, N=C-(NH)<sub>2</sub>), 157.6 (s, Boc), 157.3 (s, Boc), 157.2 (s, Boc), 156.2 (s, Boc), 153.3 (s, Boc), 153.1 (s, Boc), 153.0 (s, Boc), 98.1 (d, C-1), 84.1 (s, Boc) 84.1 (s, Boc), 80.4 (s, Boc), 80.0 (s, Boc), 77.5 (d, C-4), 72.4 (d, C-3'), 71.5 (d, C-3), 70.1 (d, C-4'), 67.1 (d, C-5), 54.6 (d, C-6'), 54.6 (d, C-2), 51.1 (d, C-5'), 51.0 (d, C-2'), 45.7 (d, C-1') 4·28.3 (q, Boc), 8.5 (t, C-6) ppm.

**Boc-geschütztes Neamin-6,2',6'-tri-[bis-(tert.-Butoxycarbonyl)-carboxyamidat 25**

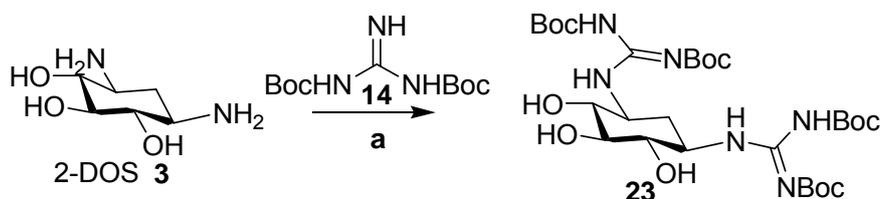
**HRMS (ESI):** m/z für positive Ionen: berechnet: 1049.5652 (**25**+H<sup>+</sup>); gefunden: 1049.5601 (**25**+H<sup>+</sup>).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CHCl<sub>3</sub>= 7.26 ppm):** δ= 5.49 (d, 1H, *J*=3.8, H-1), 4.31 (dd, 1H, *J* = 10.4, 3.8 Hz; H-2), 4.05 (m, 2H, H-4, H-5), 3.86 (m, 3H, H-3, H-6), 3.31-3.42 (m, 5H, H-

5', H-6', H-2', H-4'), 2.96 (ddd, 1H,  $J = 12.6, 4.5, 4.5$  Hz, H-1'<sub>ax</sub>), 2.19 (ddd, 1 H,  $J = 12.0$  Hz, 11.7, 11.7 Hz, H-1'<sub>äq</sub>), 1.52 (s, 18H), 1.5 (s, 18H) 1.46 (s, 18H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>= 77.0 ppm):  $\delta =$  162.6 (s, N=C-(NH)<sub>2</sub>), 162.4 (s, N=C-(NH)<sub>2</sub>), 162.4 (s, N=C-(NH)<sub>2</sub>), 157.6 (s, Boc), 157.5 (s, Boc), 157.4 (s, Boc), 153.3 (s, Boc), 153.1 (s, Boc), 153.0 (s, Boc), 97.8 (d, C-1) 84.1 (s, Boc), 83.9 (s, Boc) 80.4 (s, Boc), 77.6 (d, C-4), 77.4 (d, C-3'), 77.2 (d, C-3), 70.8 (d, C-4'), 54.58 (d, C-6'), 51.00 (d, C-2), 51.14 (d, C-5'), 50.1 (d, C-2'), 41.3 (d, C-1'), 28.2 (s, Boc), 28.2 (s, Boc), 28.1 (s, Boc), 8.5 (t, C-6) ppm.

### 10.1.2.5 Synthese des 1,3-Di-[bis-(tert.-Butoxycarbonyl)-carboxyamidat-desoxystreptavidin 23



a) Di-Boc-Guanidin-Triflat **14**; TEA; Dioxan/Wasser 5:1

**Schema 41:** Synthese des 1,6-Diguainidincarboxyamidat-desoxystreptavidin **23**.

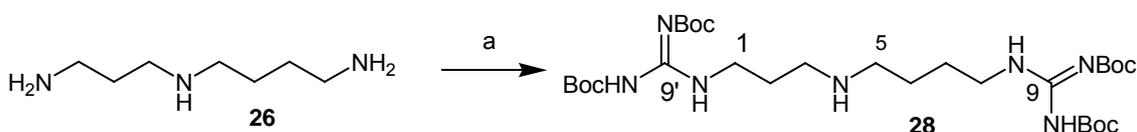
2-Desoxystreptamin **3** (209 mg, 1.7 mmol) wurden mit Di-Boc-guanidin-triflat **14** (666 mg, 1.702 mmol) und TEA (235  $\mu$ L, 1.7 mmol) versetzt und in Dioxan/ Wasser (5:1) 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Lösung mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ausgeschüttelt, die organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen. Als Rohprodukt erhielt man ein farbloses Öl. Das Produkt **23** konnte säulenchromatographisch [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98:2)] über Kieselgel mit einer Ausbeute von 97 % (530 mg (weißer Feststoff), 0.820 mmol [646.4 g/mol]) rein erhalten werden.

**HRMS (ESI):** m/z für positive Ionen: berechnet: 647.3538 (**23**+H<sup>+</sup>); gefunden: 647.3624 (**23**+H<sup>+</sup>).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CHCl}_3=7.26$  ppm):  $\delta=$  11.31 (s, 2H, NHBoc), 8.41 (s, 2H, NHBoc), 4.03 (m, 2H, H-2, H-6), 3.34-3.58 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 2.41 (ddd, 2H,  $J=12.7, 4.4$  Hz, H-1<sub>ax</sub>), 2.02 (ddd, 1H,  $J=12.7, 4.4$  Hz, H-1<sub>äq</sub>), 1.41 (s, 18H), 1.40 (s, 18H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3=77.0$  ppm):  $\delta=$  162.5 (s, (N-C-(NH)<sub>2</sub>)), 156.6 (s, Boc), 152.8 (s, (Boc)), 83.5 (s, Boc), 75.0 (d, C-5, d, C-3), 76.7 (d, C-4), 50.5 (d, C-2, d, C-6), 33.4 (s, C-1), 28.0 (s, Boc) ppm.

### 10.1.2.6 Synthese des Spermidin-di-[bis-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-carboxyamidats **28**



a) Di-Boc-guanidin-triflat **14**, TEA, Dioxan/Wasser 5:1, 24 h, RT

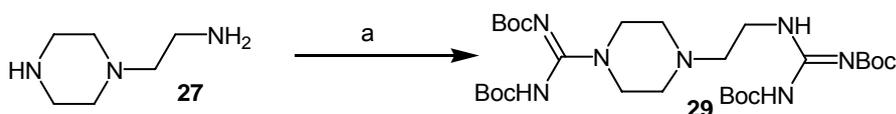
**Schema 42:** Synthese des Boc-geschützten Spermidin-di-carboxyamidats **28**.

Das Boc-geschützte Spermidin-di-carboxyamidat **28** wurde durch Umsatz des kommerziell erhältlichen Spermidins **26** (50 mg / 0.21 mmol) mit Di-Boc-guanidin-triflat **14** (0.691 g, 1.78 mmol) und TEA (250  $\mu\text{L}$ , 0.73 mmol) in Dioxan/ Wasser (9:1) erhalten. Nach dem Entfernen des Dioxans im Vakuum wurde das Produkt mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert, mit Wasser und gesättigter Kochsalz-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen. Als Rohprodukt erhielt man ein farbloses Öl. Das Produkt **28** konnte säulenchromatographisch [ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (98:2)] über Kieselgel mit einer Ausbeute von 75 % (91.6 mg (Farbloses Öl), 0.145 mmol) [629.8 g/mol] rein erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CHCl}_3=7.26$  ppm):  $\delta=$  11.41 (m, 2H, NH-Boc), 8.65 (t,  $J=5.5$  Hz, 1H,  $\text{NH}'\text{-(CN)}_2$ ), 8.32 (1H,  $J=5.5$  Hz, 1H,  $\text{NH-(CN)}_2$ ), 3.51 (t,  $J=5.9$  Hz, 2H, H-1), 3.39 (m, 2H, H-8), 2.89 (m, 4H, H-5, H-3), 2.13 (m, 2H, H-2), 1.88 (m, 2H, H-6), 1.62 (m, 2H, H-7), 1.44 (s, 36H, Boc) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3=77.0$  ppm):  $\delta=$  163.5 (s, C-9'), 162.0 (s, C-9), 158.0 (s, Boc), 156.3 (s, Boc), 153.2 (s, Boc), 152.3 (s, Boc), 84.3 (s, Boc), 46.9 (t, C-5), 43.2 (t, C-3), 39.9 (C-8), 37.0 (t, C-1), 28.1 (q, Boc), 24.7 (t, C-7), 22.7 (t, C-2), 21.0 (t, C-6) ppm.

### 10.1.2.7 Synthese des 4-Aminoethyl-[bis-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-carboxamidat-piperazinguanidincarboxamidat 29



a) Di-Boc-guanidin-triflat **14** TEA, Dioxan/Wasser 5:1, 24 h, RT

**Schema 43:** Synthese des 4-Aminoethyl-[di-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-carboxamidat-piperazinguanidincarboxamidat **29**.

Das kommerziell erwerbliche 4-Aminoethyl-piperazin **27** (50 mg, 0.388 mmol) wurde mit Di-Boc-guanidin-triflat **14** (0.91 g, 2.32 mmol) und TEA (330  $\mu$ L, 2.32 mmol) in Dioxan/Wasser (9:1) umgesetzt. Nach dem Entfernen des Dioxans im Vakuum wurde das Produkt mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert, mit Wasser und gesättigter Kochsalz-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Produkt **29** konnte säulenchromatographisch [( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (98:2)] über Kieselgel als Reinstoff mit einer Ausbeute von 13 % (32.8 mg; 53.4  $\mu$ mol [613.7 g/mol]) erhalten werden.

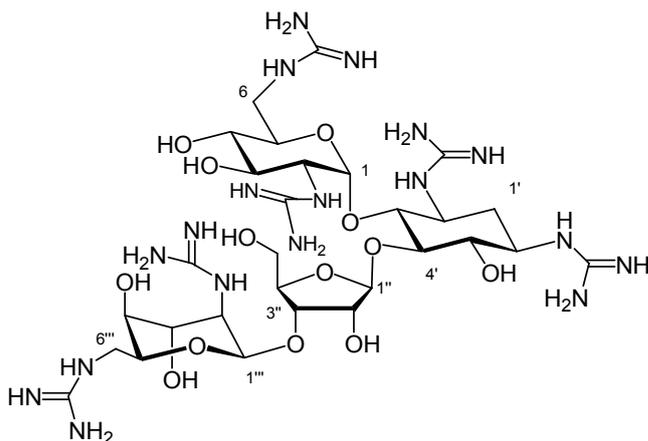
HRMS (ESI): m/z für positive Ionen: berechnet: 213.1702 (**29**+ $\text{H}^+$ ), gefunden: 213.1795 (**29**+ $\text{H}^+$ ).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO= 2.50 ppm):  $\delta$ = 3.61 (s, 2H, H-4), 3.51 (m, 2H, H-1), 2.53 (m, 4H, H-3, H2), 1.53 (s, 36H, Boc) 1.49 (s, 36H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 77.0 ppm):  $\delta$ = 156.6 (q,  $(\text{NH})_2\text{C}=\text{NH}$ ), 156.3 [q,  $(\text{NH})_2\text{C}=\text{NH}$ ], 155.2, (q, Boc), 153.0 (q, Boc), 151.7 (q, Boc), 151.6 (q, Boc), 80.1 (q, Boc), 83.1 ((q, Boc), 67.2 (t, C-4), 55.6 (t, C-3), 52.4 (C-2), 37.8 (C-1), 28.2 (s, Boc) ppm

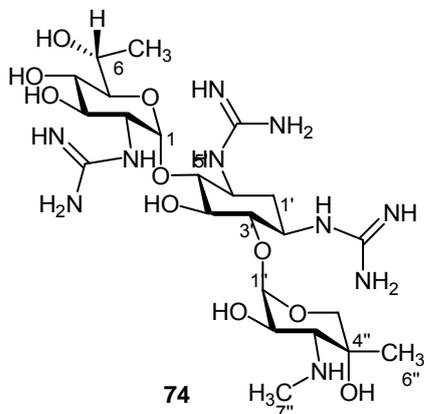
#### 10.1.4. Entschützung der Boc-geschützten Guanidine

Die synthetisierten Substanzen mussten für die biochemischen Versuche entschützt werden. Die Entfernung der Boc-Schutzgruppe konnte bei allen Substanzen mit der gleichen Versuchsvorschrift durchgeführt werden. Dazu wurde die zu entschützende Substanz 2 Stunden bei RT in einem Gemisch aus TFA und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1) gerührt. Das TFA wurde über den Ionenaustauscher gegen Chlorid-Ionen getauscht. In dieser Form wurden die Substanzen in den Inhibitions-Versuchen eingesetzt.

**10.1.4.1. Neomycin-2,6,1',3',2''',6'''-hexa-Carboxyamidat 11 (NeoG)**

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CHCl}_3$ , 7.26 ppm):  $\delta$ = 5.92 (d, 1H,  $J$  = 3.3 Hz, H-1), 5.46 (m, 1H, H-1''), 4.97-5.13 (m, 1H, H-1'''), 4.46-4.70 (m, 1H, H-3''), 4.03-4.19 (m, 3H, H-2'', H-4'', H3'''), 3.31-3.78 (m, 20H), 2.12 (ddd, 1H,  $J$  = 12.4, 3.3, 3.3 Hz, H-1'<sub>ax</sub>), 1.58 (ddd, 1H,  $J$  = 12.4, 12.3, 12.3 Hz, H-1'<sub>äq</sub>) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 77.0 ppm):  $\delta$ = 162.6 (s, NH-CH-NH), 159.3 (s, NH-CH-NH), 158.8 (s, NH-CH-NH), 158.5 (s, NH-CH-NH), 158.0 (s, NH-CH-NH), 157.4 (s, NH-CH-NH), 118.2 (d, C-1''), 99.3 (d, C-1'''), 83.5 (d, C-1), 76.6 (d, C-5'), 75.6 (d, C-4''), 73.9 (d, C-5'''), 73.9 (d, C-4'), 73.4 (d, C-3''), 72.4 (d, C-2''), 71.4 (d, C-6'), 71.2 (d, C-4), 70.7 (d, C-3'''), 70.6 (d, C-5), 70.5 (d, C-6'''), 69.0 (d, C-3), 68.8 (d, C-4'''), 57.6 (d, C-5''), 54.9 (d, C-2), 52.6 (d, C-1'), 50.9 (d, C-3'), 44.5 (d, C-6'), 42.2 (t, C-6), 33.9 (d, C-2') ppm.

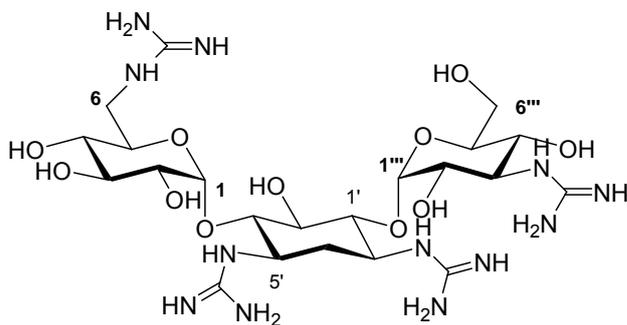
**10.1.4.2 Synthese von Geneticin-2,2',6'-tri-carboxyamidats 74**

$\text{HRMS (ESI)}$ :  $m/z$  für positive Ionen: berechnet: 464.2581 ( $74+\text{H}^+$ ); gefunden: 463.2381 ( $74+\text{H}^+$ ).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=$  5.52 (d,  $J=3.7$  Hz, H-1), 5.51 (d,  $J=3.5$ , H-1''), 4.99 (d,  $J=4.1$ , H-5), 4.0 (m, 4H, H-2'', H-2, H-3', H-5'), 3.59-3.51 ppm.

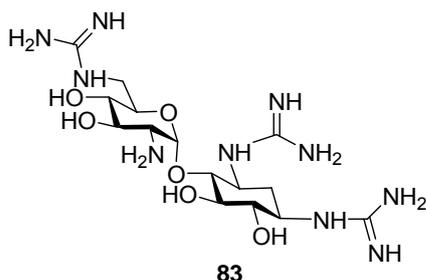
$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=$  164.9 (s, (N=C-(NH)<sub>2</sub>), 158.9 (s, (N=C-(NH)<sub>2</sub>), 158.3 (s, (N=C-(NH)<sub>2</sub>), 100.7 (d, C-1) 98.8 (d, C-1'') 2·80.9 (d, C-2',C-3'), 78.1 (d, C-3), 75.9 (t, C-6), 73.6 (d, C-4), 72.3 (d, C-5'), 68.7 (d, C-5''), 57.7 (d, C-5), 2·51.5(d, C-3'', C-4''), 53.6 (d, C-6'), 38.5 (d, C-2), 23.6 (d, C-2''), 23.6 (q, C-7''), 17.8 (q, C-6'') ppm.

### 10.1.4.3 Kanamycin A-6,2',4',4''-tetra-Carboxyamidat 75



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=$  5.29 (d, 1H,  $J=3.9$  Hz, H-1), 5.10 (d, 1H,  $J=3.4$  Hz, H-1''), 3.91 (ddd, 2H,  $J=9.9, 3.3, 3.3$  Hz, H-6), 3.55-3.68 (m, 5H, H-2', H-3', H-5), 3.53 (d, 2H,  $J=3.1$  Hz, H-6''), 3.36-3.65 (m, 11H), 3.21 (dd, 1H,  $J=9.6, 9.6$  Hz), 1.99 (ddd, 1H,  $J=12.5, 3.7, 3.7$  Hz, H-3'\_{ax}), 1.39 (ddd, 1H,  $J=12.5, 11.7, 11.7$  Hz, H-3'\_{aq}) ppm.

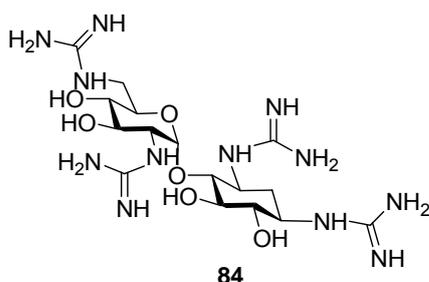
$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta=$  158.6 (s, (N=C-(NH)<sub>2</sub>), 158.5 (s, (N=C-(NH)<sub>2</sub>), 157.1 (s, (N=C-(NH)<sub>2</sub>), 157.0 (s, (N=C-(NH)<sub>2</sub>), 102.0 (d, C-1), 98.9 (d, C-1''), 83.1 (d, C-6'), 81.7 (d, C-4'), 73.1 (d, C-5'), 72.8 (d, C-5), 72.4 (d, C-2), 71.9 (d, C-5''), 71.8 (d, C-4''), 70.0 (d, C-3''), 69.9 (d, C-4), 62.4 (t, C-6), 57.9 (d, C-3), 53.4 (d, C-2''), 49.6 (d, C-1'), 45.8 (d, C-3'), 40.9 (d, C-6''), 31.2 (C-4') ppm.

**10.1.4.4 Neamin-6,2',6'-tri-carboxyamidat 83**

HRMS (ESI): m/z für positive Ionen: berechnet: 225.2506 [**83**+H<sup>+</sup>]/2]; gefunden: 225.1359 [**83**+H<sup>+</sup>]/2].

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ= 5.30 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz, H-1), 3.74 (m, 3H, H-3, H-6), 3.31-3.62 (m, 8H, H-2, H-2', H-3', H-4, H-4', H-5, H-5', H-6'), 2.72 (m, 1H), 1.9 (ddd, 1H, *J* = 12.0, 3.5, 3.5 Hz, H-1'<sub>ax</sub>), 1.12 (ddd, 1 H, *J* = 12.0, 11.7, 11.7 Hz, H-1'<sub>äq</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ= 158.3 (s, N=C-(NH)<sub>2</sub>), 157.7 (s, N=C-(NH)<sub>2</sub>), 157.6 (s, N=C-(NH)<sub>2</sub>), 97.9 (d, C-1), 88.3 (d, C-4), 78.7 (d, C-3'), 76.0 (d, C-3), 75.7 (d, C-4'), 71.9 (d, C-5), 71.1 (d, C-5'), 56.1 (d, C-6'), 51.9 (d, C-2), 49.6 (d, C-2'), 42.2 (t, C-6), 30.6 (t, C-1') ppm.

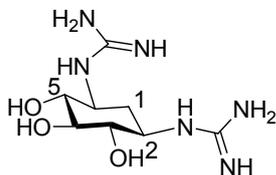
**10.1.4.5 Neamin-2,6,2',6'-tetra-carboxyamidat 84**

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ= 5.65 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz, H-1'), 3.85 (m, 1H, H-3), 3.55-3.6 (m, 2H, C-6), 3.45 (m, 4H, H-2, H-2', H-5', H-6') 3.30-3.44 (m, 4H, H-3', H-4, H-4', H-5), 2.25 (ddd, 1H, *J* = 12.5, 3.7, 3.7 Hz, H-1'<sub>ax</sub>), 1.65 (ddd, 1 H, *J* = 12.5, 11.0, 11.0 Hz, H-1'<sub>äq</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ= 158.3 (s, N=C-(NH)<sub>2</sub>), 157.7 (s, N=C-(NH)<sub>2</sub>), 157.6 (s, N=C-(NH)<sub>2</sub>), 157.5 (s, N=C-(NH)<sub>2</sub>), 100.1 (d, C-1), 88.3 (d, C-4), 76.8 (d, C-3'), 72.5 (d, C-3), 72.4 (d, C-4'), 71.3 (d,

C-5'), 71.2 (d, C-5) 57.8 (d, C-6'), 51.9 (d, C-2), 49.6 (d, C-2'), 42.2 (t, C-6), 34.6 (s, C-1') ppm.

#### 10.1.4.6 2-Desoxystreptavidin-carboxyamidat 66

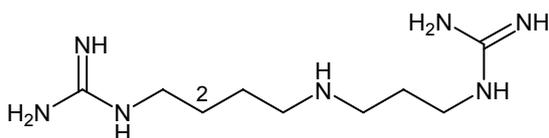


HRMS (ESI): m/z für positive Ionen: berechnet: 247.1440 (**66**+H<sup>+</sup>); gefunden: 247.1502 (**66**+H<sup>+</sup>).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ= 3.29 (m, 1H, H-4), 3.29-3.35 (m, 2H, H-2, H-6), 2.5-2.53 (m, 2H, H-2, H-5) 1.82 (ddd, 1H, J =12.5, 4.4 Hz, H-1<sub>ax</sub>), 1.04 (ddd, 1H, J =12.5, 4.4 Hz, H-1<sub>äq</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ= 160.3 (s, N=C-(NH)<sub>2</sub>), 79.4 (d, C-4), 77.0 (d, C-5, C-2), 52,7 (d, C-6, C-2), 41.2 (t, C-1) ppm.

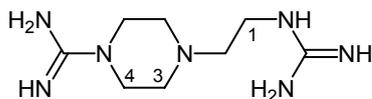
#### 10.1.4.7 Spermidin-carboxyamidat 64



HRMS (ESI): m/z für positive Ionen: berechnet: 271.1814 (**64**+Acetonitril+H<sup>+</sup>); gefunden: 271.1796 (**64**+ Acetonitril+H<sup>+</sup>).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; DMSO= 2,5 ppm): δ= 3.02-2.84 (m, 8H), 1.45-1.75 (m, 6H) ppm.

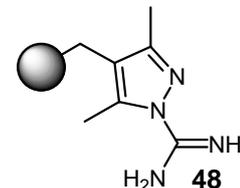
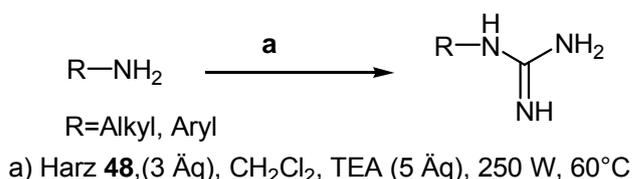
<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO= 39.5 ppm): δ= 164.7 (s, (NH-)<sub>2</sub>C=NH)), 162.2 (s, (NH-)<sub>2</sub>C=NH)), 46.9 (t, C-5), 43.2 (t, C-3), 39.8 (t, C-8), 37.0 (t, C-1), 24.7 (t, C-7), 22.7 (t, C-2), 21.0 (t, C-6) ppm.

**10.1.4.8 4-Aminoethyl-piperazin-dicarboxyamidat 65**

**HRMS (ESI):** m/z für positive Ionen: berechnet: 213.1702 (**65**+H<sup>+</sup>); gefunden: 213.1795 (**65**+H<sup>+</sup>).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO= 2.50 ppm):**  $\delta$ =3.39 (t, *J*= 5.3 Hz, 4H, H-4), 3.26 (t, *J*=6.3, 2H, H-1), 2.57 (t, *J*=5.3, 4H, H-3), 2.54 (t, *J*=6.3 Hz, 2H, H-2) ppm.

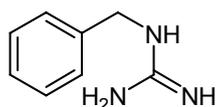
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO=39.0 ppm):**  $\delta$ =158.8 (s, (NH-)<sub>2</sub>C=NH), 158.6 (s, (NH-)C=NH), 56.7 (t, C-4), 52.9 (t, C-2), 48.6 (t, C-2), 37.6 (t, C-1) ppm.

**10.1.5 Syntheseprodukte über die Festphasen-unterstützte Synthese**Guanidierungs-Harz **48**

**Schema 44:** Umsetzung von Aminen zu Guanidinen über die Festphasen-unterstützte Guanidierung.

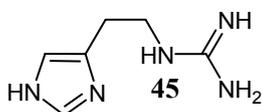
Die umzusetzenden Substanzen wurden mit dem Guanidierungsharz **48** (3 Äq) in CH<sub>2</sub>H<sub>2</sub> und TEA (5 Äq) aufgenommen und für 20 min in einem Mikrowellenfeld (300 W) auf 60°C erhitzt. Das Harz wurde anschließend abfiltriert, entstandenes HCl im Ionenaustauscher IRA-400 (OH<sup>-</sup>) durch H<sub>2</sub>O ausgetauscht und das restliche Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Produkte konnten in unterschiedlicher Ausbeute als Reinstoffe erhalten werden.

Benzylcarboxyamidat <b>60</b>	67 %
Histamin-carboxyamidat <b>61</b>	86 %
Morpholin-carboxyamidat <b>62</b>	90 %
L-Prolin-carboxyamidat <b>63</b>	33 %

**10.1.5.1 Benzylamin-carboxyamidat 60**

HRMS (ESI): m/z für positive Ionen: berechnet: 150.0864 (**60**+H<sup>+</sup>); gefunden: 150.0953 (**60**+H<sup>+</sup>)

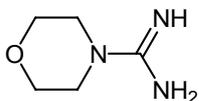
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO= 2.5 ppm):  $\delta$ = 7.26-7.30 (m, 5H), 4.25 (s, 2H) ppm.

**10.2.5.2 Histamin-carboxyamidat 61**

HRMS (ESI): m/z für positive Ionen: berechnet: 154.1211 (**61**+H<sup>+</sup>); gefunden: 154.1204 (**61**+H<sup>+</sup>).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO= 2.5 ppm):  $\delta$ = 7.52 (s, 2H, 5-H), 6.71 (s, 1H, 4-H), 2.71 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H, 2-H), 2.64 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H, 1-H) ppm.

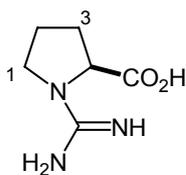
<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO= 39.5 ppm):  $\delta$ = 163.0 (s, C-6), 134.5 (s, C-5, d, C-4), 118.6 (s, C-3), 48.6 (t, C-2), 30.6 (t, C-1) ppm.

**10.1.5.3 Morpholin-carboxyamidat 62**

HRMS (ESI): m/z für positive Ionen: berechnet: 130.0805 (**62**+H<sup>+</sup>); gefunden: 130.098 (**62**+H<sup>+</sup>).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO= 2.5 ppm):  $\delta$ = 5.23 (s, 3H, N-H), 3.56 (dd,  $J$  = 4.8, 4.8 Hz, 4H, 1-H), 3.18 (dd,  $J$  = 4.8, 4.8 Hz, 2H, 1-H) ppm.

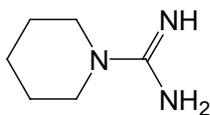
<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO= 39.5 ppm):  $\delta$ = 159.5 (C-3), 65.9 (C-1), 45.5 (C-2) ppm.

**10.1.5.4 Prolin-carboxyamidat 63**

HRMS (ESI): m/z für positive Ionen: berechnet: 158.0922 (**63**+H<sup>+</sup>); gefunden: 130.098 (**63**+H<sup>+</sup>).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO= 2.5 ppm):  $\delta$ = 8.19 (bs, 1H, COOH), 7.45 (bs, 1H, NH), 3.96 (d,  $J$ = 7.7 Hz, 1H, H-4), 2.40 (ddd,  $J$ = 12.0, 9.2, 4.0 Hz, 2H, H-1), 2.23 (m, 4H, H-2, H-3) 1.72 (ddd,  $J$ =12.0, 4.1, 4.1, 1H, H-1) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO= 39.5 ppm):  $\delta$ = 172.4 (s, C-5), 156.2 (s, C-6), 63.6 (t, C-5), 47.2 (t, C-1), 29.1 (t, C-3), 23.7 (t, C-2) ppm.

**10.1.5.5 guanidiertes Piperidin 56**

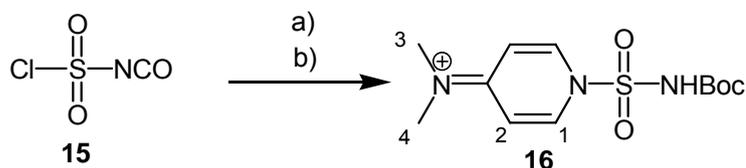
HRMS (ESI): m/z für positive Ionen: berechnet: 128.4612 (**56**+H<sup>+</sup>); gefunden: 128.4697 (**56**+H<sup>+</sup>).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, TMS=0 ppm)=  $\delta$ :  
3.34 (m, 4H, 2-H, 2'-H), 1.49 (m, 6H, 3-H, 3'-H, 4-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O)=  $\delta$ :  
157.4 (s, C-G), 47.1 (t, C-2, C-2'), 25.2 (t, C-3, C-3'), 23.7 (t, C-4) ppm.

## 10.2. Synthese der Sulfonamidierten Aminoglykoside

### 10.2.1 Synthese des Sulfonamidierungs-Reagenzes *N*-*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*-[4-dimethylazaniumylidene)-1,4-dihydropyridin-1ylsulfonyl]azamid **16**



- a) *tert*-BuOH **17**, abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78°C, 1h  
 b) DMAP, -78°C → 0°C, 2h

**Schema 45:** Synthese des Sulfonamidierungs- Reagenzes *N*-*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*-[4-dimethylazaniumylidene)-1,4-dihydropyridin-1ylsulfonyl]azamid **16**.

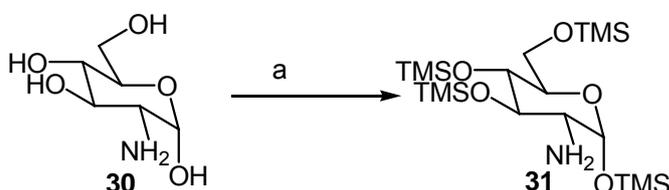
30 µL (0.32 mmol) Chlorsulfonsäure-isocyanat (CSI) **15** wurde zu einer Lösung aus CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (~4 mL) und *tert*-BuOH **17** (30 µL, 0.32 mmol) bei -78°C unter Argon gegeben. Diese Reaktionslösung wurde bei -78°C eine Stunde gerührt und anschließend 80 mg DMAP (0.64 mmol) in die Lösung gegeben. Es wurde weitere zwei Stunden gerührt, wobei die Lösung auf RT erwärmt wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser gestoppt, das Reaktionsgemisch mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das restliche Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es konnte das Produkt in 99 % (96 mg (weißer Feststoff), 0.32 mmol, [301.4 g/mol]) Ausbeute erhalten werden.

**HRMS (ESI):** m/z für positive Ionen: berechnet: 302.1178 (**16**+H<sup>+</sup>); gefunden: 302.1188 (**16**+H<sup>+</sup>).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm):** δ = 8.48 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, H-1), 7.00 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, H-2), 3.35 (s, 3H, H-3), 3.24 (s, 3H, H-4), 1.26 (s, 9H, Boc) ppm.

## 10.2.1 TMS-Schützung der Substanzen vor Umsetzung zu den Sulfonamidaten

### 10.2.1.1 Synthese von 2-Amino-1,3,4,6-tetra-O-trimethylsilyl- $\alpha$ -glucosid **31**



a) 6.5 Äq TMSCl, 5 Äq HMDS, in Pyridin, RT, 24 h

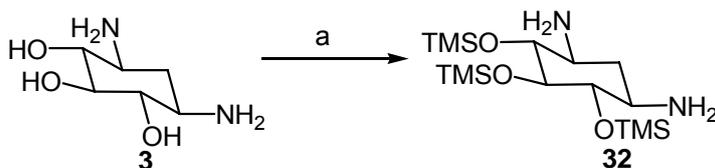
**Schema 46:** Silylierung von 2-Aminoglucose **30**.

Die kommerziell erhältliche 2-Aminoglucose **30** (648 mg / 3.0 mmol) wurde in abs. Pyridin gelöst und unter Argon mit 2.89 mL (20.5 mmol) TMSCl und 3.0 mL (14.4 mmol) HMDS versetzt und für 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von MeOH beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (PE/EE = 4:1) über Kieselgel gereinigt, und das reine Produkt **31** konnte mit einer Ausbeute von 98 % (1.37 g (ölige, farblose Substanz)/ 2.93 mmol [ $M = 467.9$  g/mol]) erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm):  $\delta = 5.21$  (d, 1H,  $J = 3.4$  Hz, H-1), 3.72 (m, 1H, H-2), 3.58 (m, 1H, H-3), 3.51 (m, 2H, H-4, H-6), 3.29 (ddd, 1H,  $J = 9.2, 9.2, 3.1$  Hz, H-5), 0.20 (s, 9H, TMS), 0.19 (s, 9H, TMS), 0.17 (s, 9H, TMS), 0.10 (s, 9H, TMS) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3 = 77.0$  ppm):  $\delta = 92.3$  (d, C-1), 77.6 (d, C-5), 73.2 (d, C-2), 72.3 (d, C-4), 61.2 (t, C-6), 57.5 (d, C-3), 1.2 (q, TMS), 1.0 (q, TMS), 0.1 (q, TMS), 0.1 (q, TMS) ppm.

### 10.2.1.2 Synthese von 4,5,6-tri-O-trimethylsilyl-2-Desoxystreptavidin (2-DOS) **32**



a) 1.5 Äq TMSCl / OH-Gruppe, HMDS, abs. Pyridin, 24 h, RT

**Schema 47:** Silylierung von Cyclitol **3**.

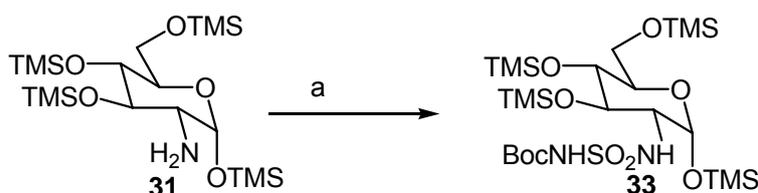
Das 2-DOS **3** (203 mg / 1.28 mmol) wurde in abs. Pyridin aufgenommen, unter Argon mit 140  $\mu$ L (1.0 mmol) TMSCl und 400  $\mu$ L (1.9 mmol) HMDS versetzt und für 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von MeOH beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt **32** wurde säulenchromatographisch [Dichlormethan/Methanol (1:3)] über Kieselgel gereinigt, und das reine Produkt konnte in einer Ausbeute von 21 % (103.8 mg (ölige, farblose Substanz), 0.27 mmol [ $M = 378.8$  g/mol]) erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO= 2.5 ppm):  $\delta = 3.69\text{-}3.64$  (m, 2H, H-3, H-5), 3.42 (m, 1H, H-4), 3.31-3.26 (m, 2H, H-2, H-6), 2.45 (ddd, 1H,  $J = 12.5, 3.5, 3.5$  Hz, H-1<sub>ax</sub>), 2.00 (ddd, 1H,  $J = 12.5, 11.7, 11.7$  Hz, H-1<sub>äq</sub>), 0.26 (s, 18H, TMS), 0.21 (s, 9H, TMS) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO= 39.5 ppm)  $\delta$ : 76.7 (d, C-4), 2·75.2 (d, C-3, C-5), 2·52.6 (d, C-2, C-6) 29.8 (t, C-1), 1.4 (q, TMS), 0.9 (q, TMS) ppm.

## 10.2.2 Sulfonamidierungs-Reaktionen

### 10.2.2.1 Synthese von 1,3,4,6-tetra-O-trimethylsilyl-2-desoxy-2-(tert-Butoxycarbonyl)-sulfonamidat- $\alpha$ -glucosid **33**



a) 2 Äq Sulfonamidierungs-Reagenz **16**/  $\text{NH}_2$ -Gruppe, abs. Pyridin, 24 h, RT

**Schema 48:** Umsetzung der 1,3,4,6-Tetrasilyl-glucosamin **31** zum Sulfonamidierungsprodukt **33**.

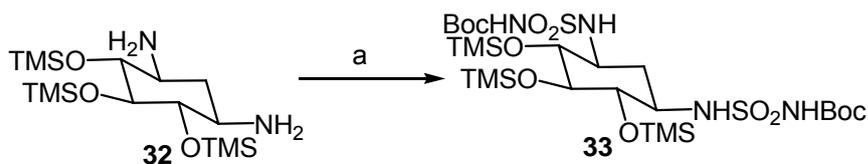
Die TMS-geschützte 2-Aminoglucose **31** (136 mg, 0.29 mmol) wurde in 25 mL abs. Pyridin aufgenommen und mit 295 mg (0.75 mmol) Sulfonamidat-Reagenz **16** versetzt. Die Reaktion wurde 24 h bei RT gerührt. Nach abgeschlossener Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt **33** wurde säulenchromatographisch [Petrolether/Essigester (4:1)] über Kieselgel gereinigt, und das reine Produkt konnte mit einer Ausbeute von 82 % (150 mg (weißer Feststoff) / 0.24 mmol [647.1 g/mol]) erhalten werden.

**HRMS (ESI):** m/z für positive Ionen: berechnet: 597.2130 (**33**+H<sup>+</sup>); gefunden: 597.1616 (**33**+H<sup>+</sup>).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CHCl<sub>3</sub>= 7.26 ppm):** δ= 7.47 (bs, 1H, NH), 5.31 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz, H-1), 3.73-3.36 (m, 3H, H-4, H-6', H-3), 3.27 (m, 2H, H-6', H-5), 3.29 (ddd, 1H, *J* = 9.2, 9.2, 3.1 Hz, H-2), 1.51 (s, Boc), 0.20 (s, 9H, TMS), 0.19 (s, 9H, TMS), 0.17 (s, 9H, TMS), 0.10 (s, 9H, TMS) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>= 77.0 ppm):** δ= 153.4 (s, Boc), 92.3 (d, C-1), 84.6 (d, Boc), 77.6 (d, C-5), 73.2 (d, C-2), 72.3 (d, C-4), 61.2 (t, C-6), 57.5 (d, C-3), 28.6 (Boc), 1.2 (q, TMS), 1.0 (q, TMS), 0.1 (q, TMS), 0.1 (q, TMS) ppm.

#### 10.2.2.2 Synthese von 4,5,6-tri-O-trimethylsilyl-1,6-(*tert*-Butoxycarbonyl)-disulfonamidat-Cyclitol **34**



a) 4 Äq Sulfonamidat-Reagenz **16**, abs.Pyridin, 24 h, RT

**Schema 49:** Umsetzung von TMS-geschütztem Cyclitol **32** zum Sulfonamidierungsprodukt **33**.

Das TMS-geschützte 2-DOS **32** (36.3 mg, 96 µmol) wurde in 10 mL abs. Pyridin aufgenommen und mit 162 mg (414 µmol) Sulfonamidat-Reagenzens **16** versetzt. Die Reaktion wurde 24 h bei RT gerührt. Nach abgeschlossener Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt **33** wurde säulenchromatographisch [Petrolether/Essigester (4:1)] über Kieselgel gereinigt, und das reine Produkt **33** konnte mit einer Ausbeute von 16 % (8.3 mg (weißer Feststoff), 15.5·10 mmol [737.1 g/mol]) erhalten werden.

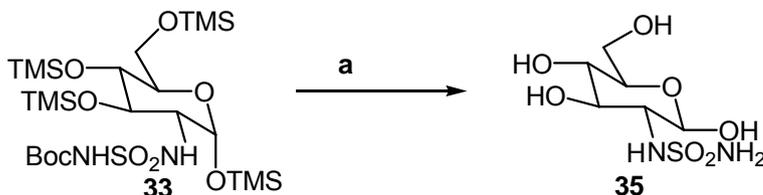
**HRMS (ESI):** m/z für positive Ionen: berechnet: 759.2593 (**34** + H<sup>+</sup>); gefunden: 759.2601 (**34** + H<sup>+</sup>).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; CHCl<sub>3</sub>= 7,26 ppm):** δ= 5.58 (d, 2H, *J* = 4.8 Hz, NHSO<sub>2</sub>R), 3.44 (m, 3H, H-3, H-4, H-5), 3.25 (m, 2H, H-2, H-6), 2.74 (ddd, 1H, *J* = 13.8, 4.3, 4.3 Hz, H-1<sub>ax</sub>), 1.49 (s, 18H), 0.19 (s, 18H), 0.17 (s, 9H) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ = 150.2 (s, Boc), 84.2 (s, Boc), 75.5 (d, C-4), 74.0 (d, C-3, C-5), 54.8 (d,d, C-6, C-2), 28.3 (s, Boc), 2.0-6 (q, TMS), 0.5 (q, TMS) ppm.

### 10.2.3 Entschützung der Sulfonamide

#### 5.2.3.1 Synthese der 2-Sulfonamidat-2-desoxyglucose **35**



a) TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:1, RT, 2h

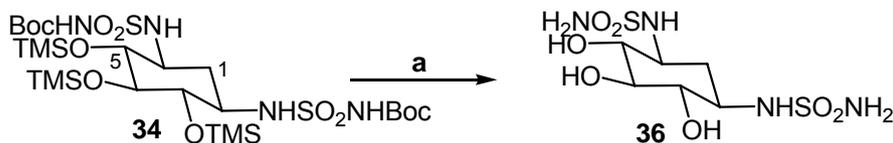
**Schema 50:** Entschützung des 2-Sulfonamidat-Glucosamins **35**.

Die Entschützung der TMS- und Boc-Gruppen wurde mit 150 mg (0,24 mmol) des TMS-geschützten Glucosamins **33** in 50 %iger TFA-Lösung in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  durchgeführt und lieferte das entschützte 2-Glucose-sulfonamid **35**. Das TFA wurde über den Ionenaustauscher IRA-400 ( $\text{Cl}^-$ ) durch Chloridionen ausgetauscht, und das Produkt **35** konnte in 98 % Ausbeute (60.7 mg, 0.24 mmol) erhalten werden.

**HRMS (ESI):** m/z für positive Ionen: berechnet: 259.9867 (**35**+ $\text{H}^+$ ); gefunden: 259.9937 (**35**+ $\text{H}^+$ ).

$^1\text{H}$ -NMR (100 MHz;  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$ = 5.22 (d, 1H,  $J = 5.5$  Hz, H-1), 4.21 (m, 1H, H-2), 3.61-3.68 (m, 4H, H-6, H-5, H-4, H-3) ppm.

#### 10.2.3.2 Synthese von 1,3-Disulfonamidat-2-desoxystreptamidin **36**



a) TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:1, RT, 2h

**Schema 51:** Entschützung des Sulfonamidat-Cyclitols **32**.

Die Entfernung der TMS- und Boc-Gruppen wurde mit 8.3 mg (15.5  $\mu\text{mol}$ ) des Cyclitols **32** in 50 %-iger TFA-Lösung in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  durchgeführt und lieferte das entschützte 2-

Cyclitolsulfonamid **36**. Das TFA wurde über den Ionenaustauscher IRA-400 (Cl<sup>-</sup>) durch Chloridionen ausgetauscht, und das Produkt **36** konnte in 98 % Ausbeute (5.47 mg, 15.2  $\mu$ mol) erhalten werden.

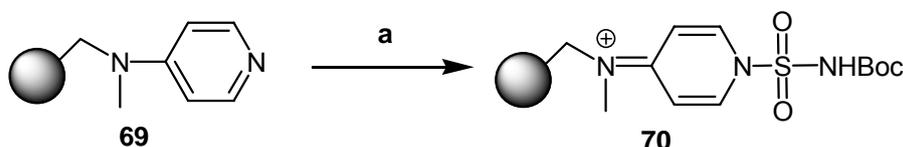
HRMS (ESI): m/z für positive Ionen: berechnet: 319.0382 (**36**-H<sup>+</sup>), gefunden: 319.0112 (**36**-H<sup>+</sup>).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$ = 3.23 (m, 1H, H-4), 3.16 (m, 2H, H-3, H-5), 2.42 (m, 1H, H-1<sub>ax</sub>), 1.39(m, 1H, H-1<sub>äq</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$ = 73.4 (d, C-4), 2·72.6 (d, C-3, C-5), 2·51.9 (d, C-2, C-6), 32.5 (t, C-1) ppm.

## 10.2.4 Festphasen-unterstützte Sulfonamidierungsreaktion

### 10.2.4.1 Synthese des Sulfonamidierungsharzes **70**

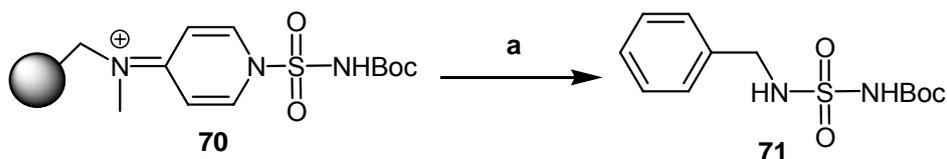


a) Chlorsulfonsäure-Isocyanat, *tert*-BuOH **17**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 24h, 0->RT

**Schema 52:** Aufbau des Sulfonamidierungs-Harzes **70**

75  $\mu$ L (7.9 mmol) abs. *tert*-Butanol **17** wurde in CH<sub>2</sub>H<sub>2</sub> unter Argonatmosphäre und bei 0°C mit 65  $\mu$ L (7.5 mmol) Chlorsulfonisocyanid versetzt. Nach 5 Minuten wurden 540 mg (Beladungsdichte: 1.48 mmol/g; 0.8 mmol) Polystyrol-gebundenes DMAP **69** in die Reaktionslösung gegeben und innerhalb von zwei Stunden auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wird das Harz **70** abfiltriert und mit CH<sub>2</sub>H<sub>2</sub> gewaschen und im Vakuum getrocknet.

IR: 3025 cm<sup>-1</sup> (aromatische C-H), 1492 cm<sup>-1</sup> (S=O Banden), 1406 cm<sup>-1</sup> (SO-NH Banden)

**10.2.4.2 Synthese des Benzylsulfonamidat 71<sup>[134]</sup>**

a) Benzylamin (0,25 Äq), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

**Schema 53:** Überprüfung der Beladung des Sulfonamidierungs-Harzes **70** anhand einer Testreaktion mit Benzylamin **50**.

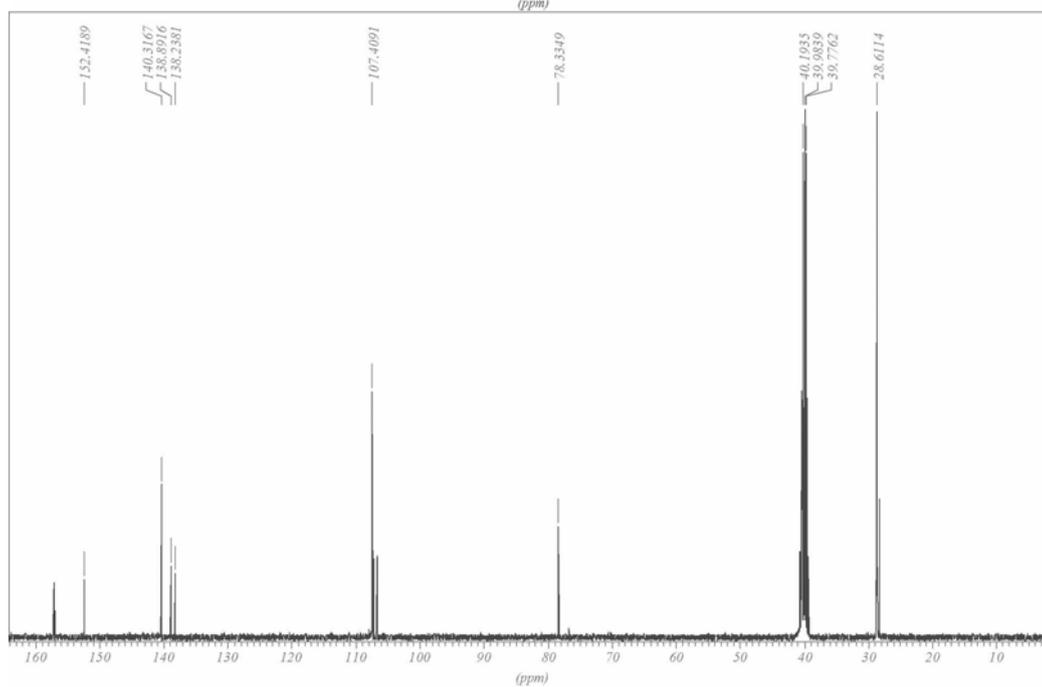
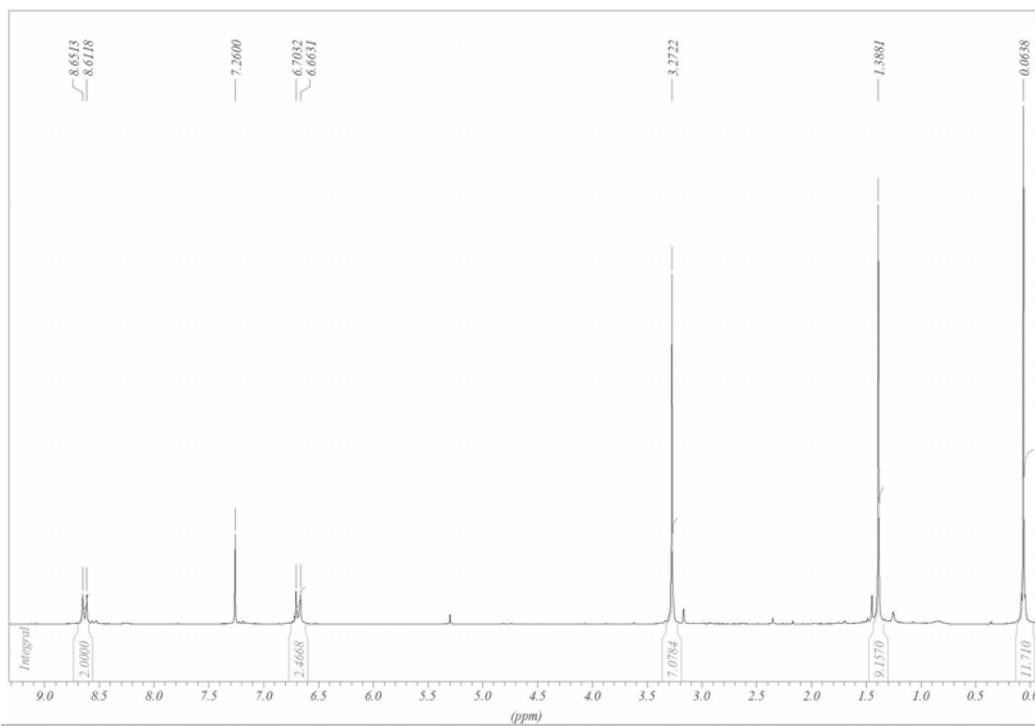
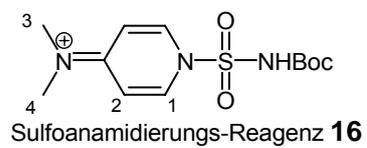
Zur Synthese des Benzylsulfonamidates **71** wurden 22 mg ( 0.2 mmol) Benzylamin **50** mit 540 mg Sulfonamidierungsharzes **70** versetzt und in CH<sub>2</sub>H<sub>2</sub> bei RT 2 h gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Harz abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel im Eluat wurde im Vakuum entfernt. Das Produkt **71** konnte rein erhalten werden.

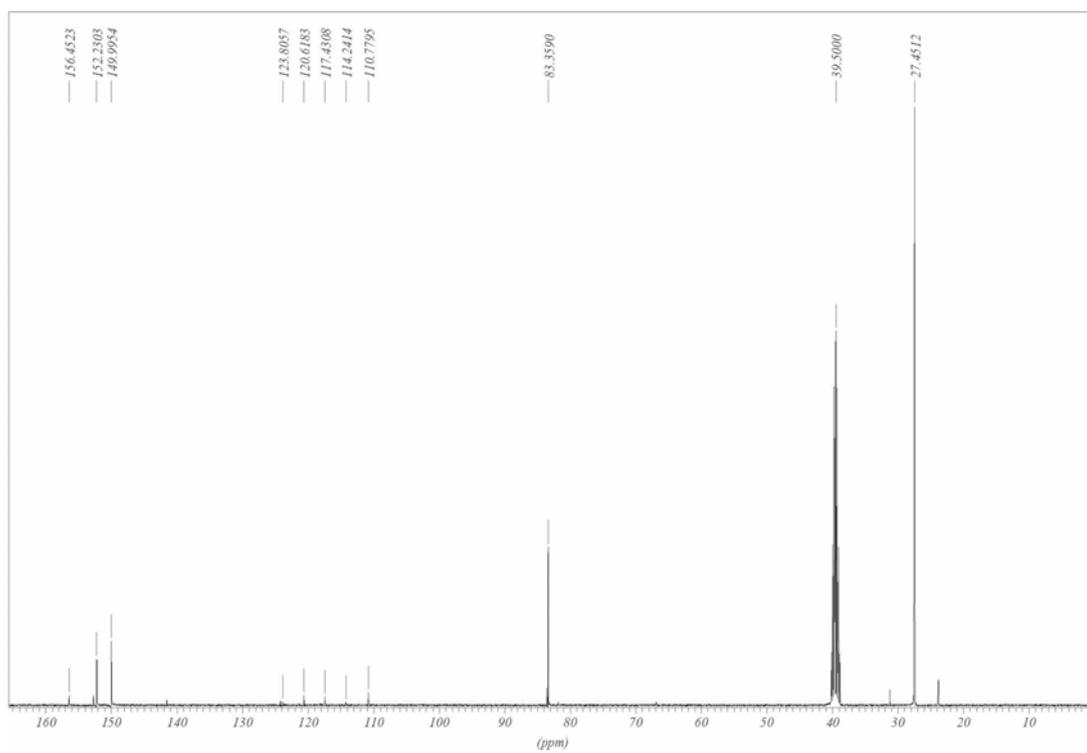
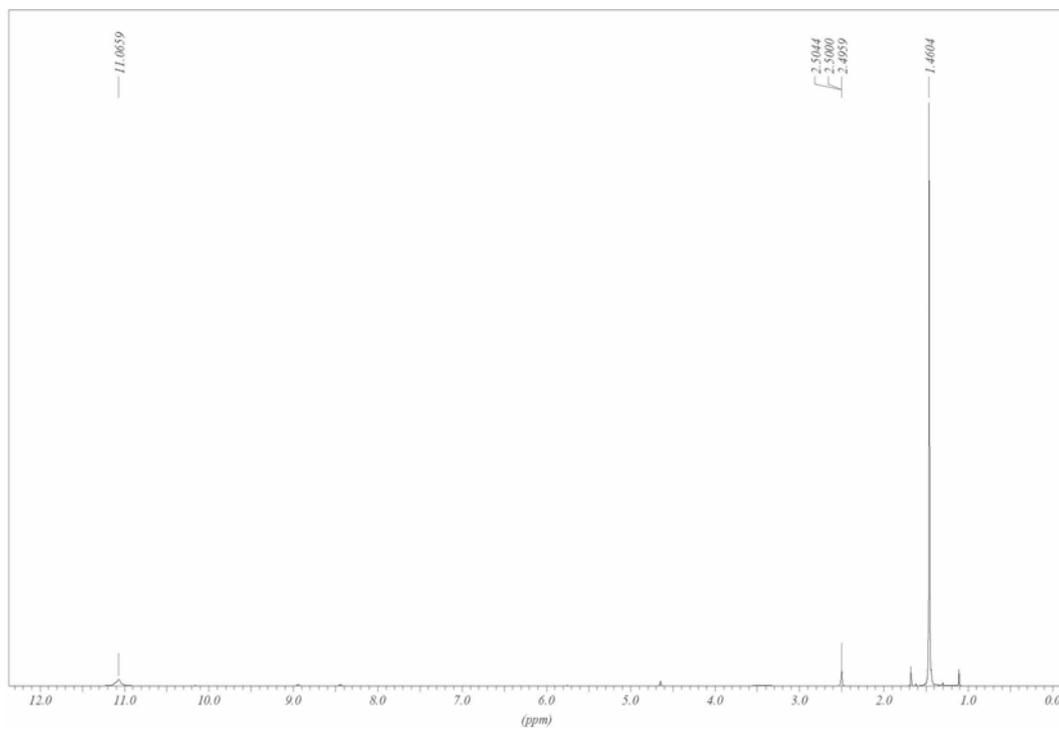
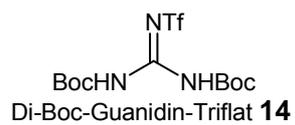
HRMS (ESI): m/z für positive Ionen: berechnet: 285.0801 (**71**+H<sup>+</sup>); gefunden: 285.0909 (**71**+H<sup>+</sup>).

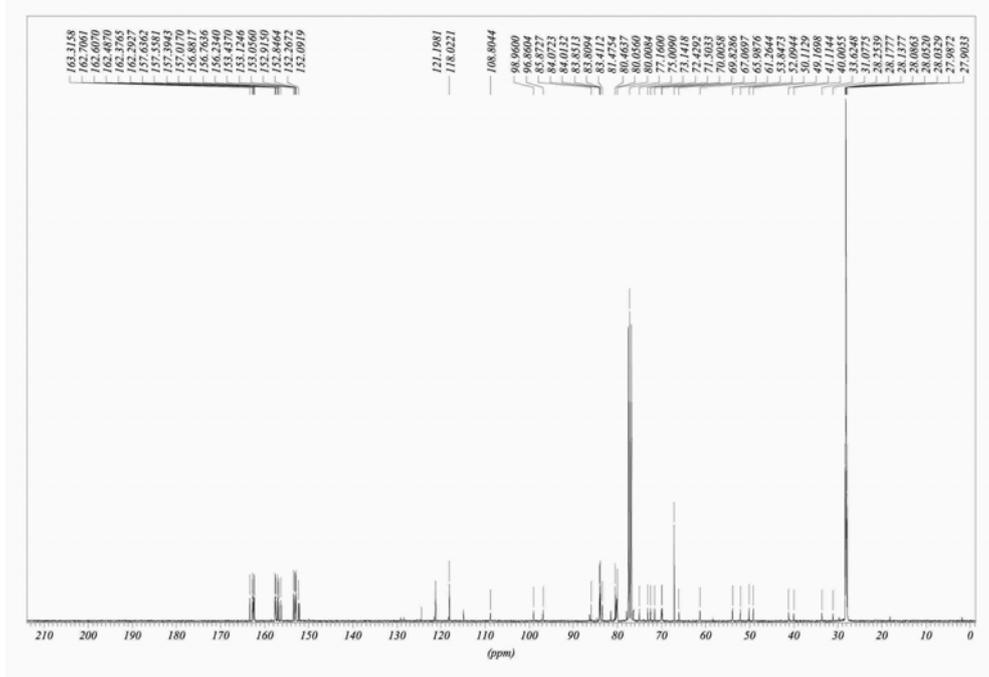
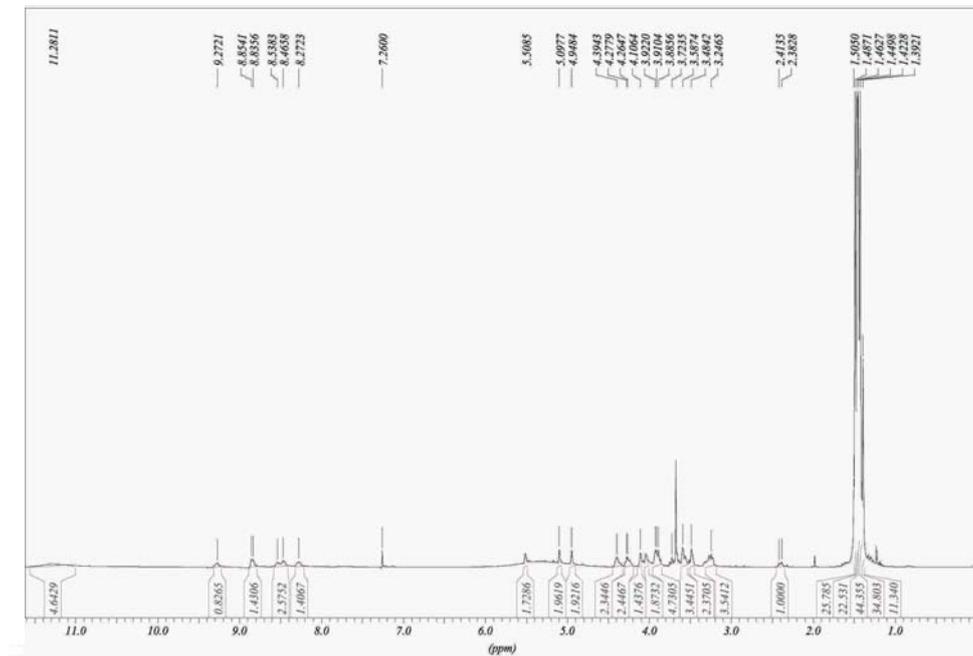
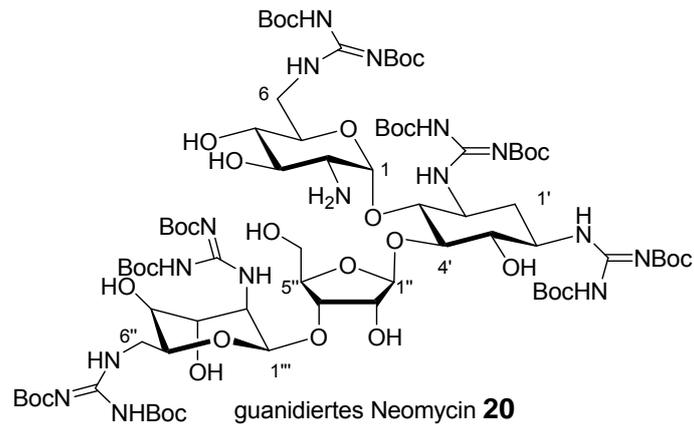
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS=7.26 ppm)= δ:  
7.31-7.52 (m, 5H, Benzyl), 4.02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.38 (s, 9H, CH<sub>3</sub>) ppm.

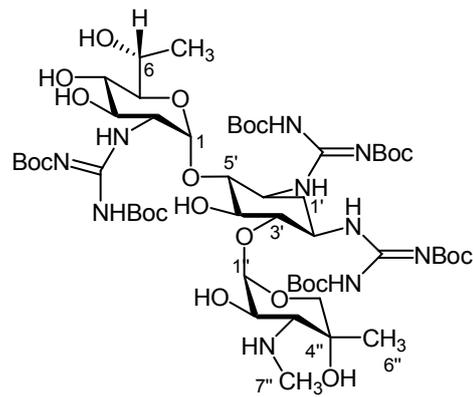
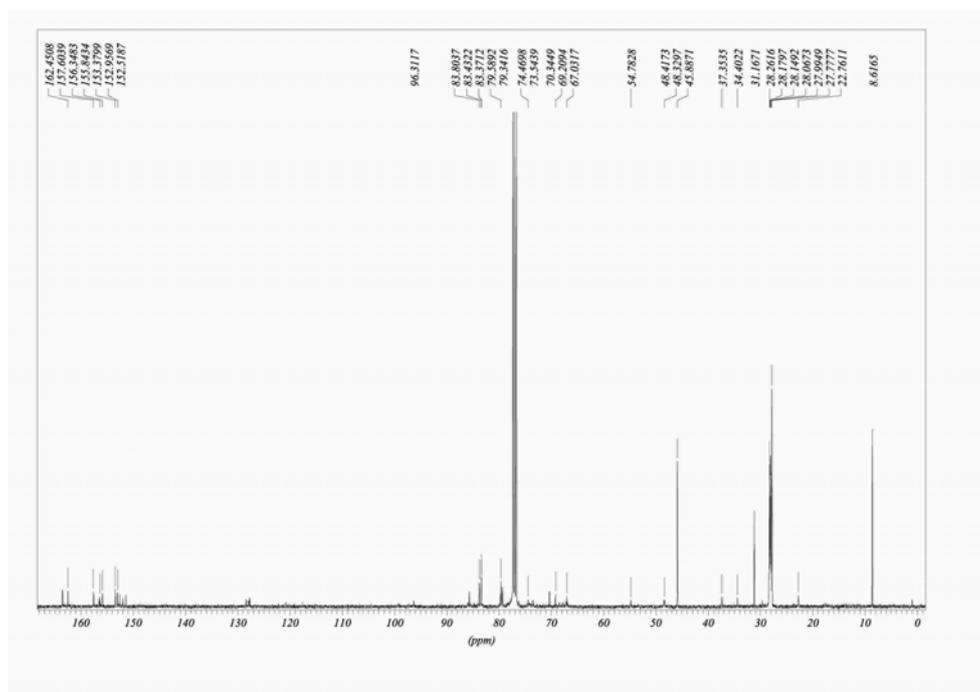
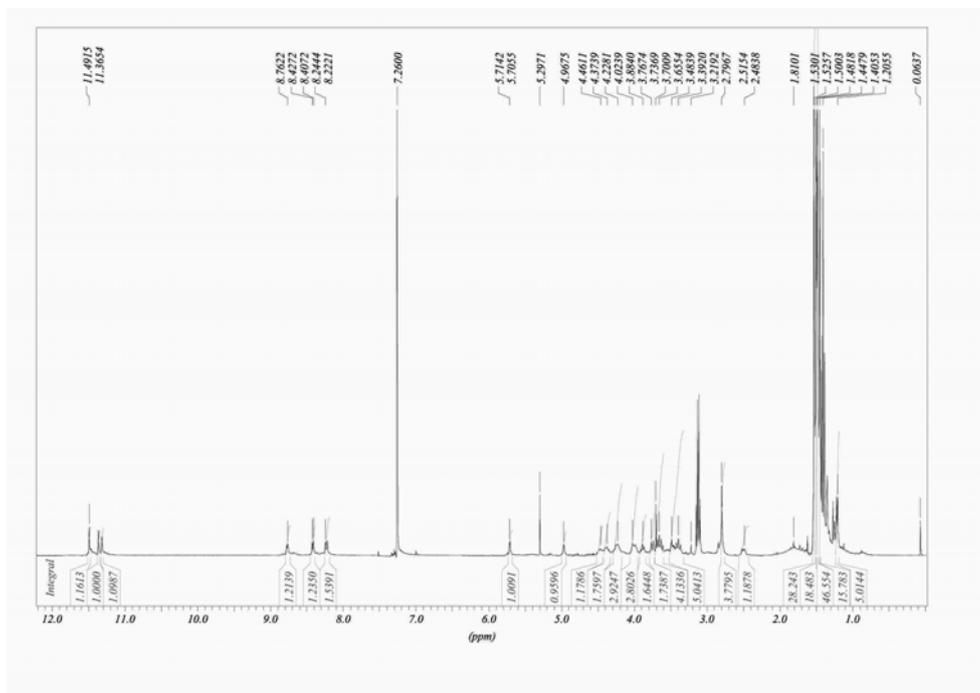
<sup>134</sup> G.Dewynter, J.Montero; *Acad.Sci.Paris* **1992**, 315, 1675-1682

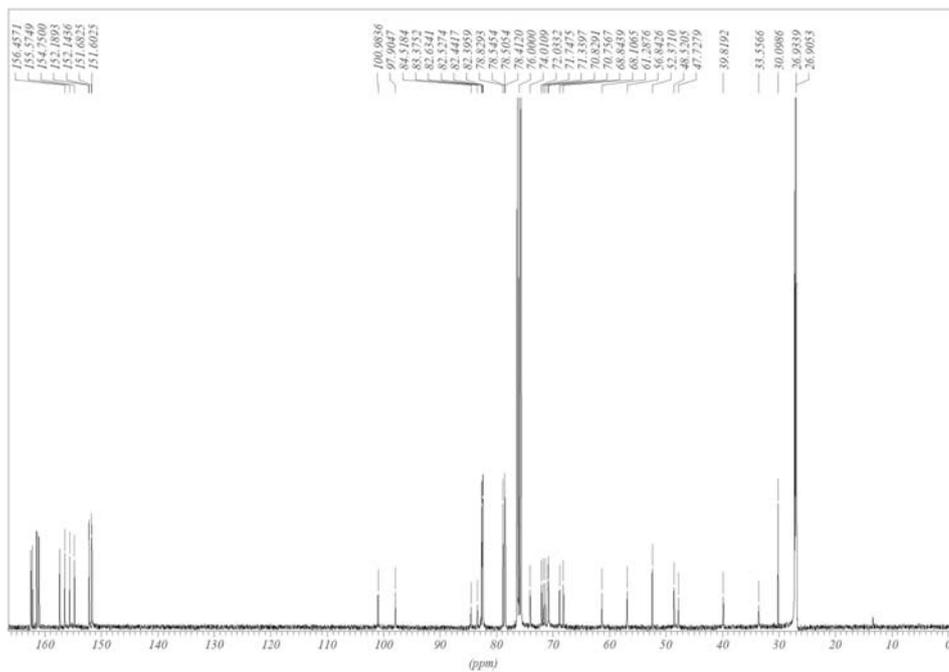
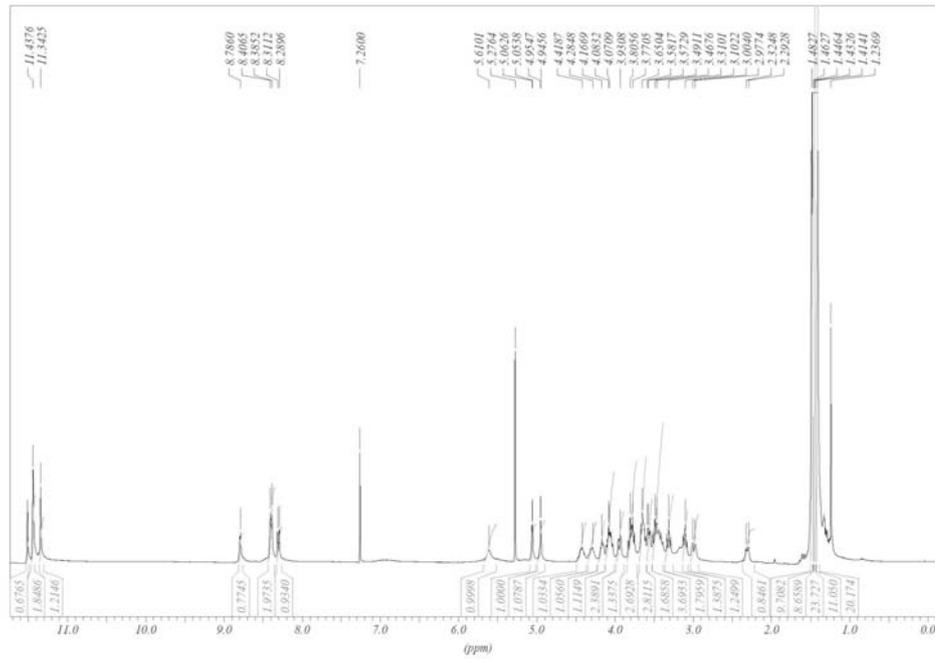
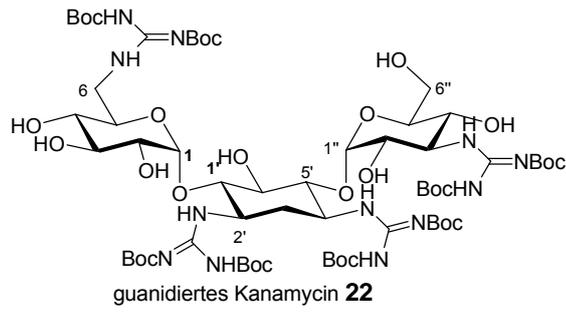
## 11. Anhang

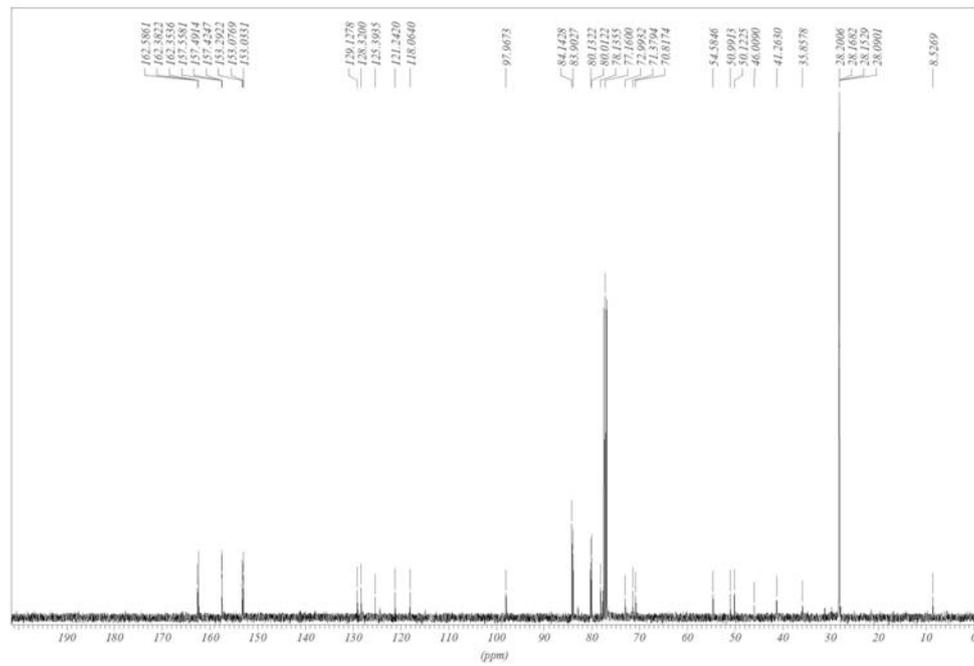
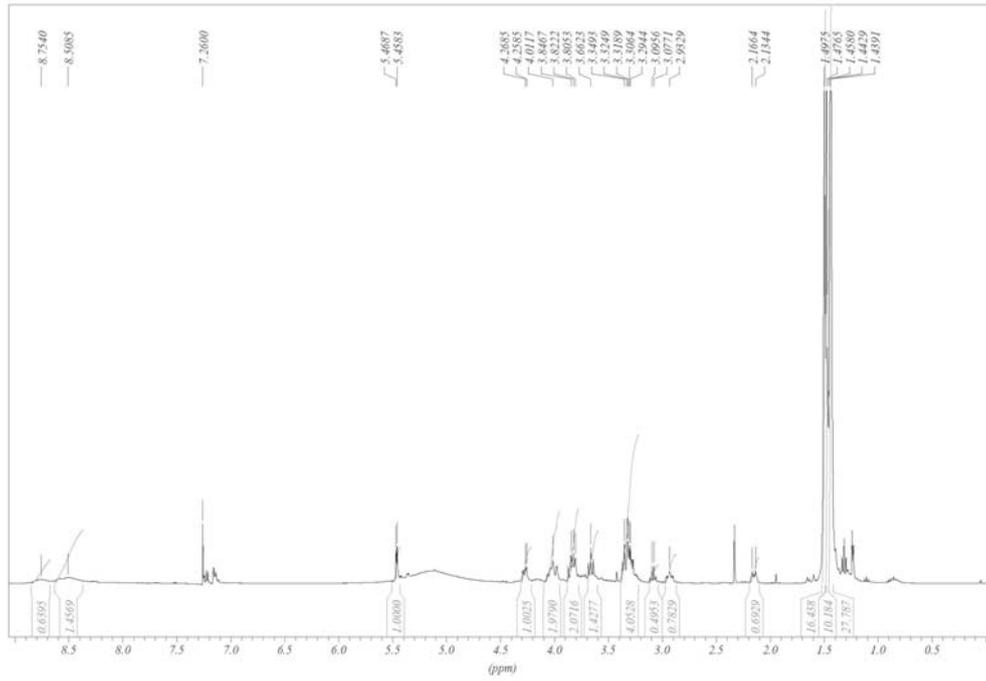
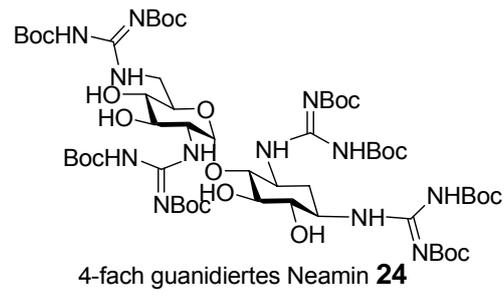


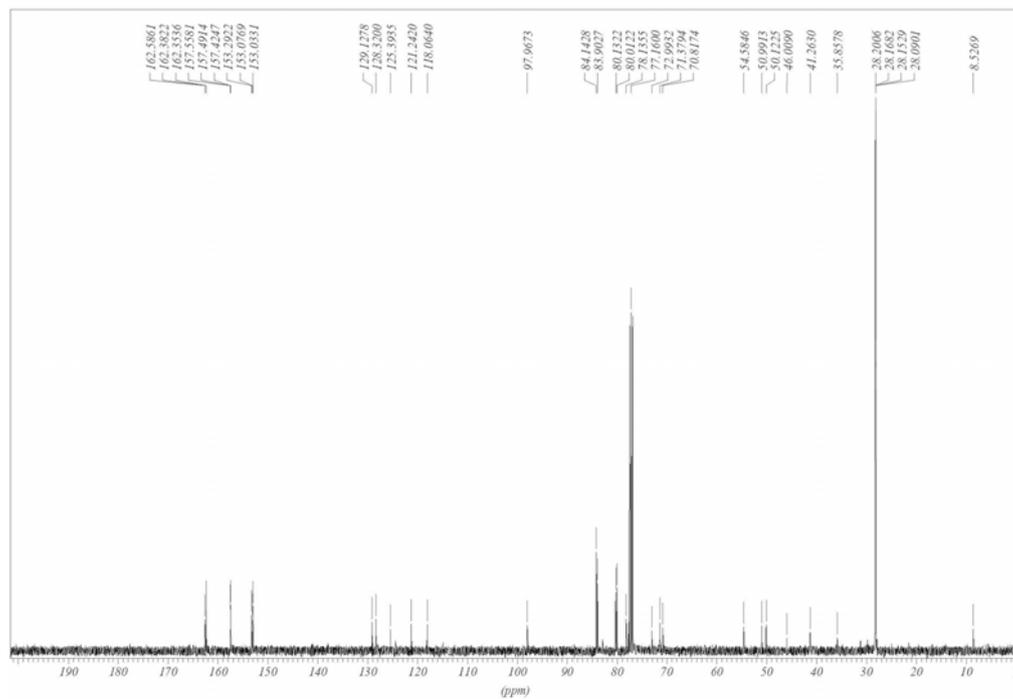
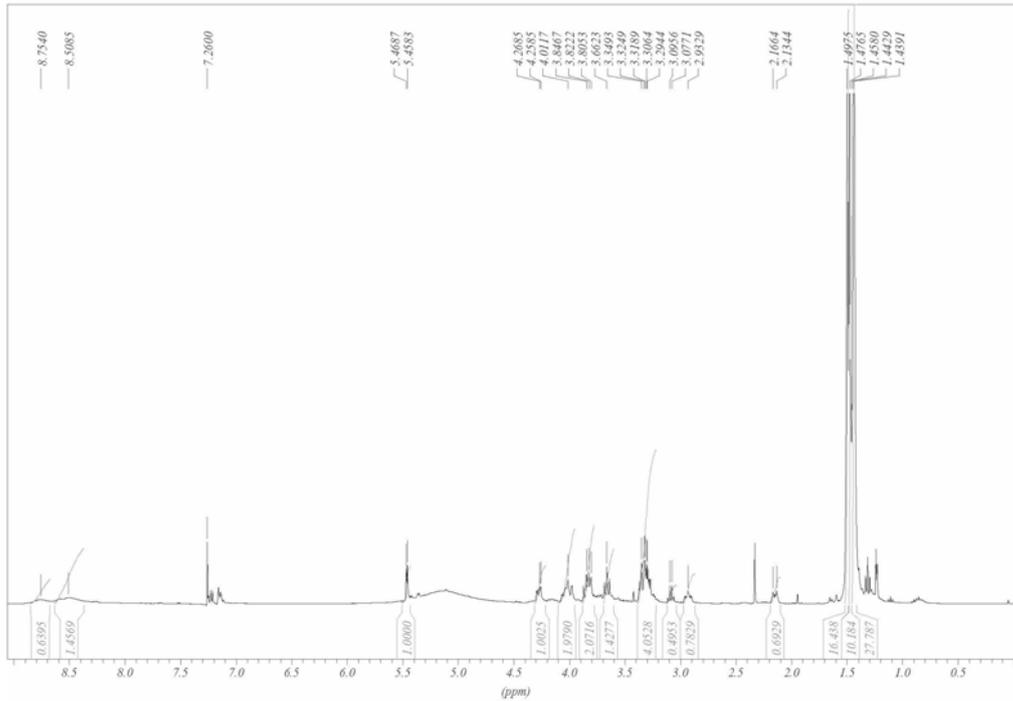
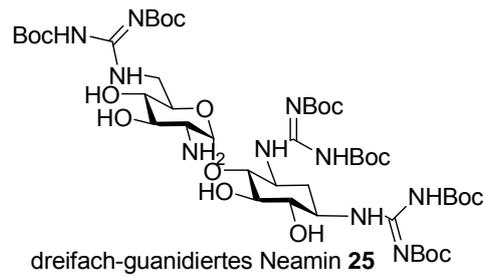


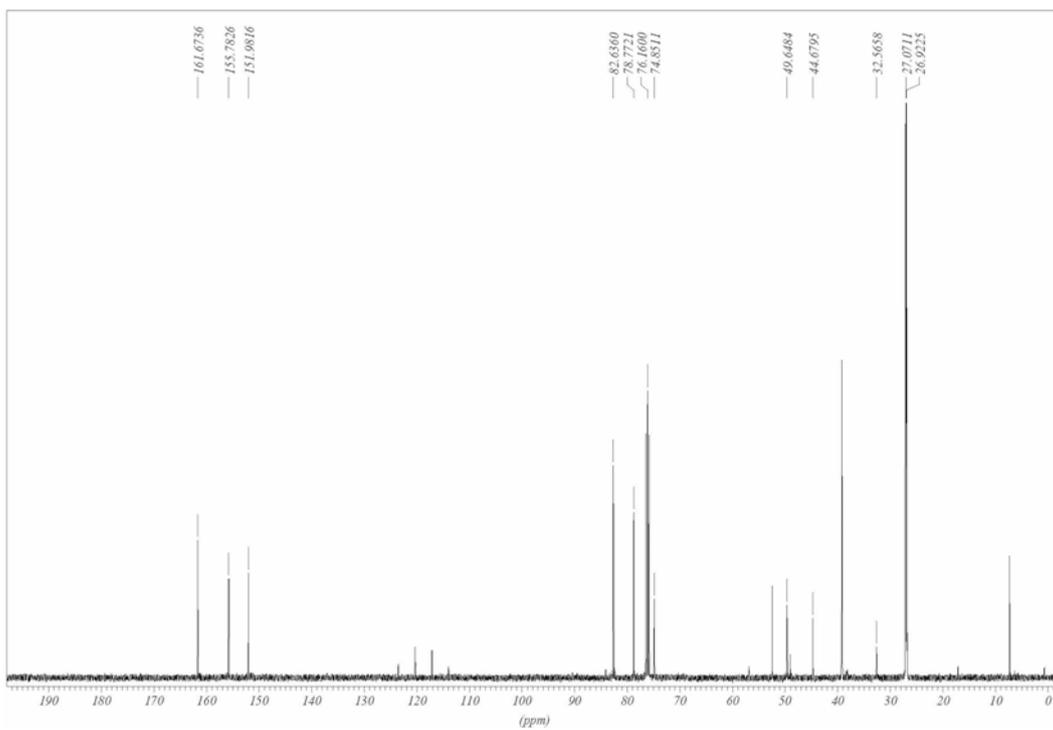
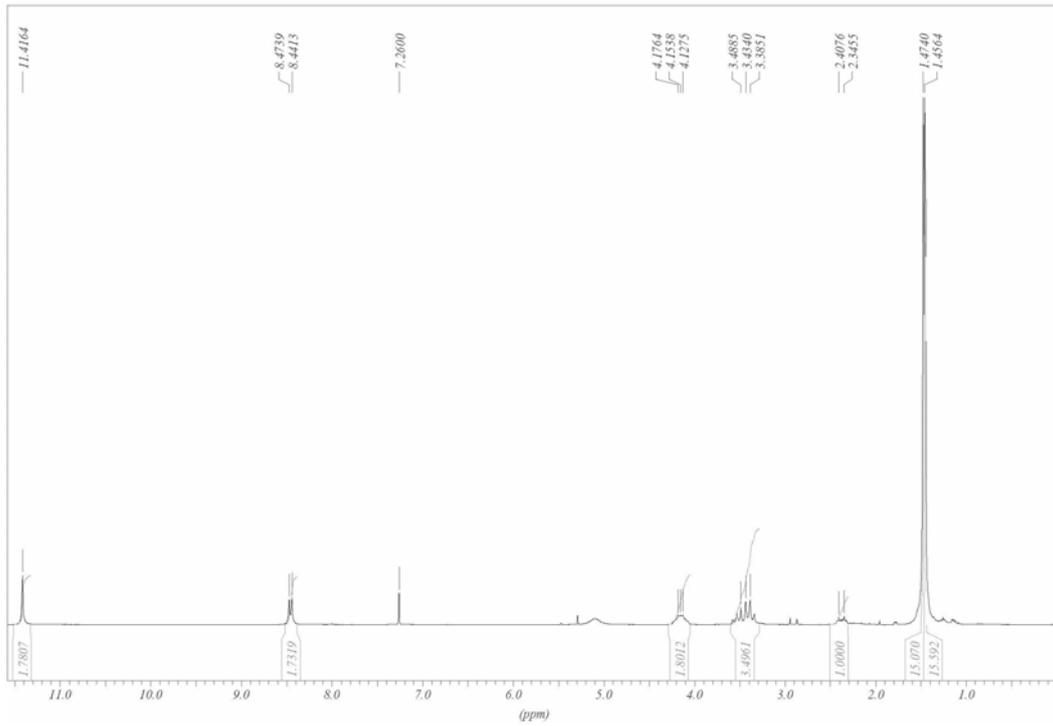
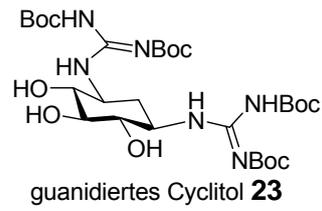


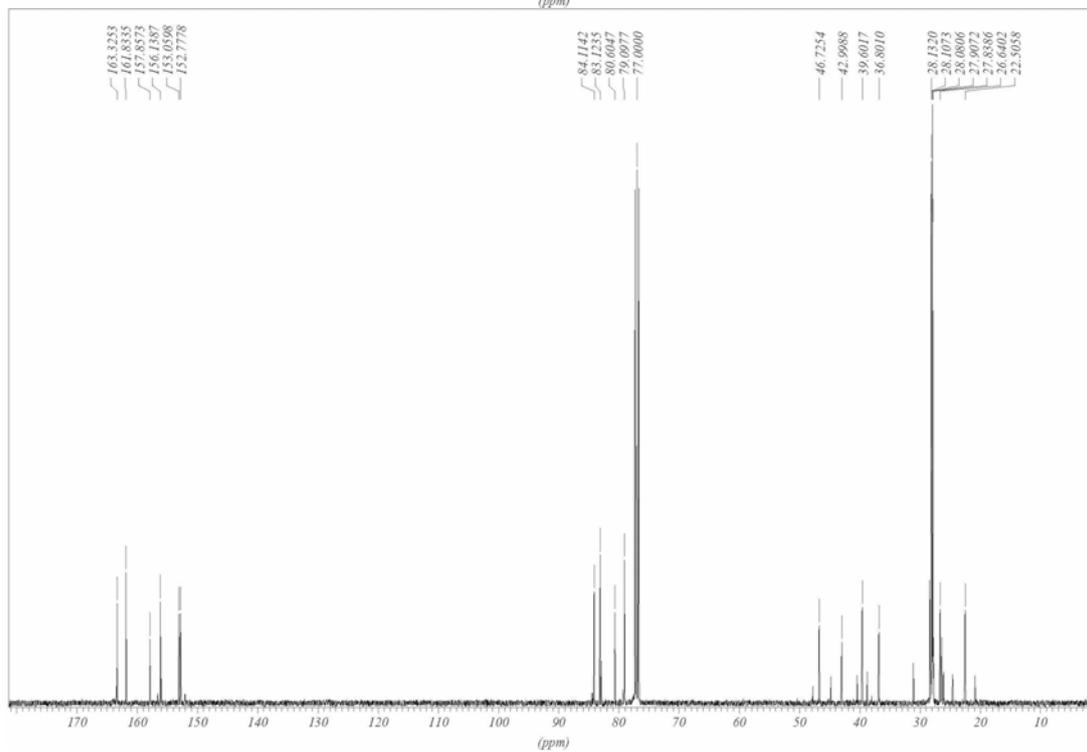
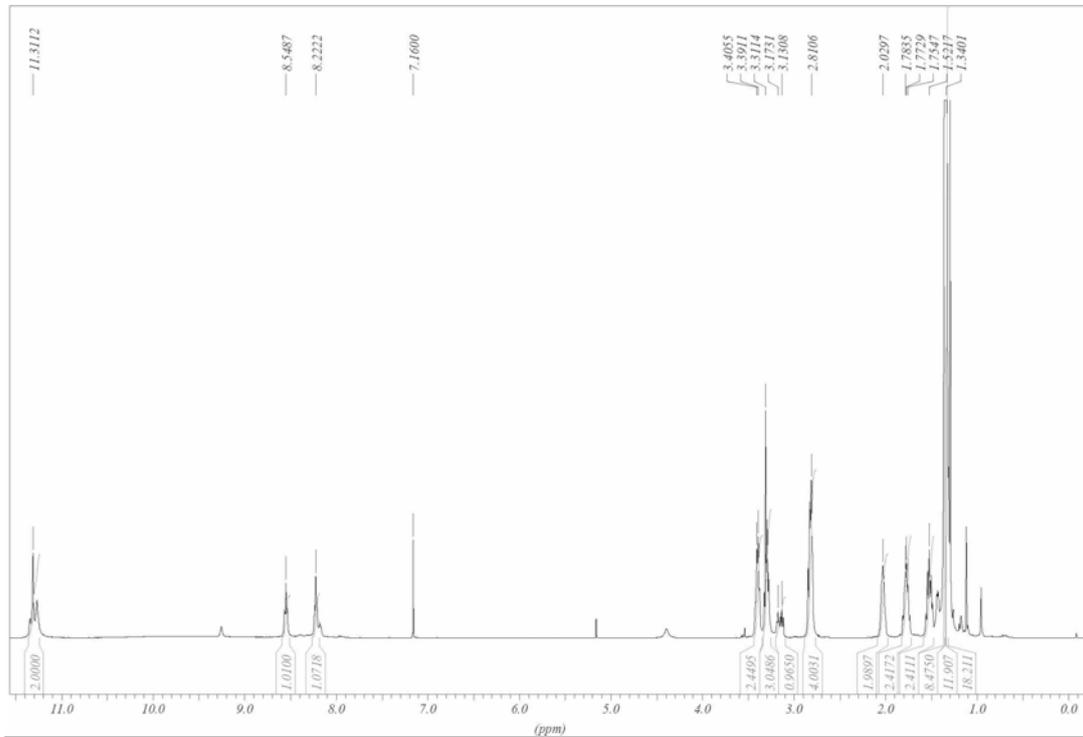
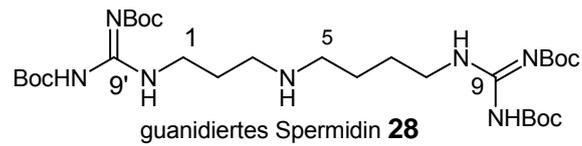
guanidiertes Geneticin **21**

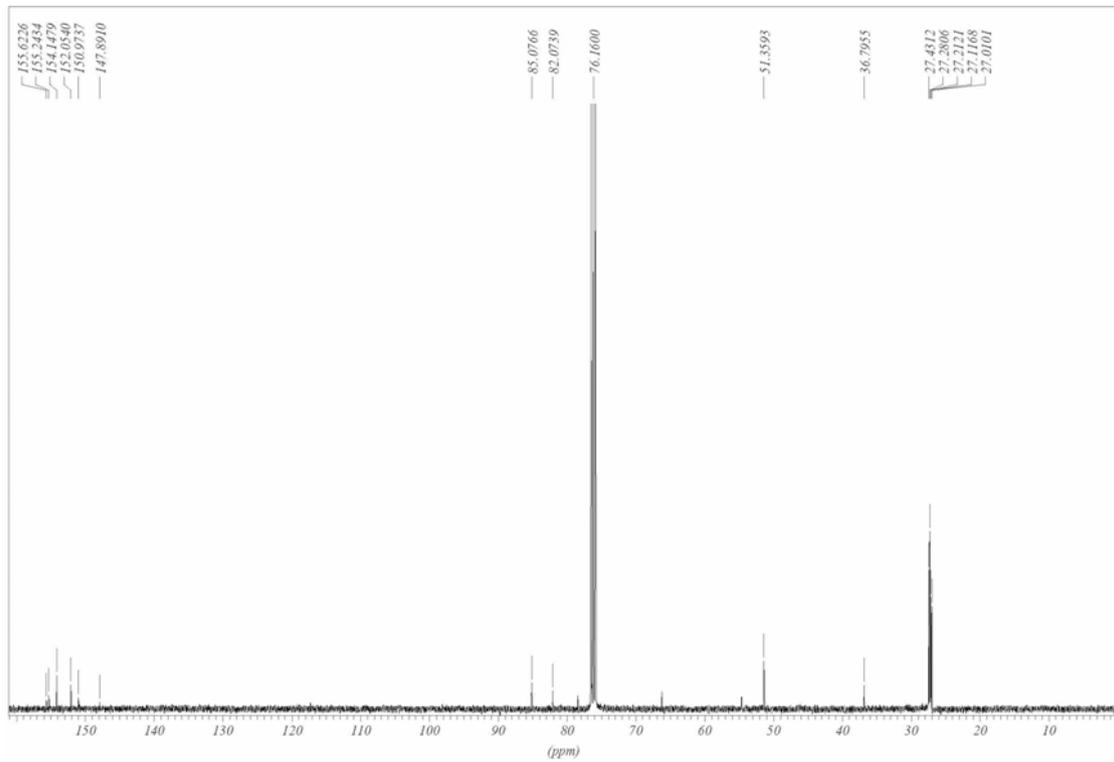
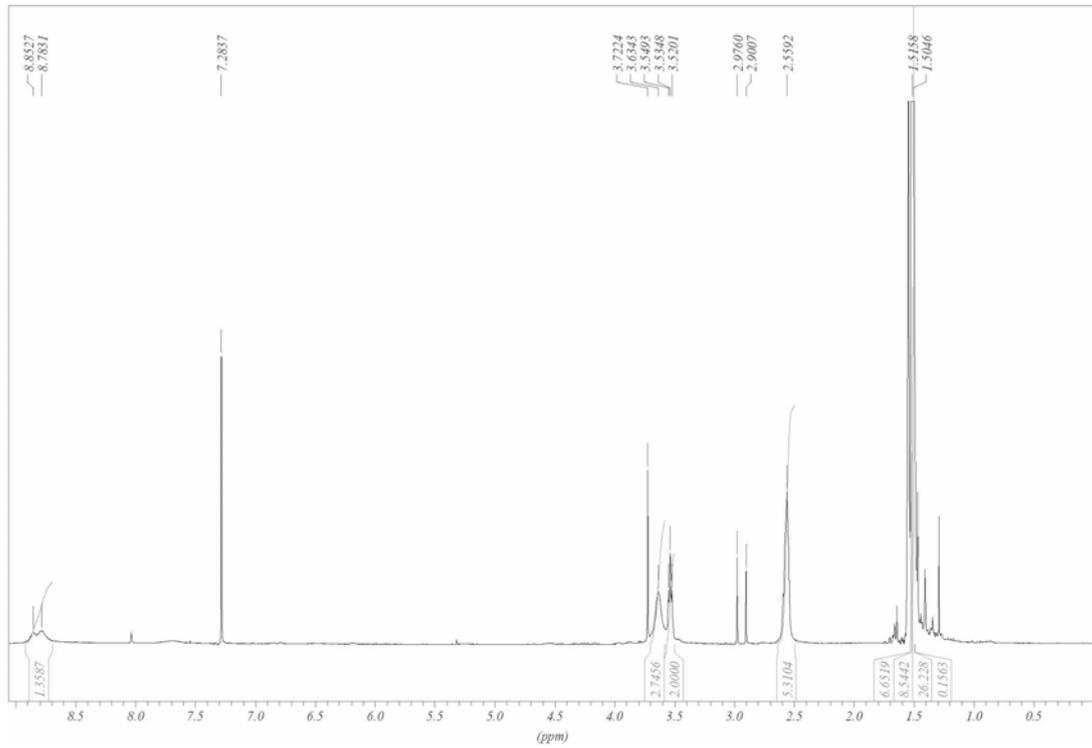
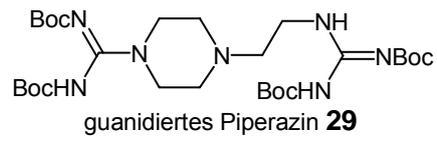


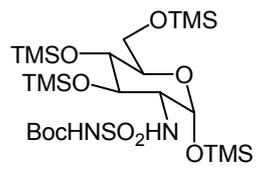




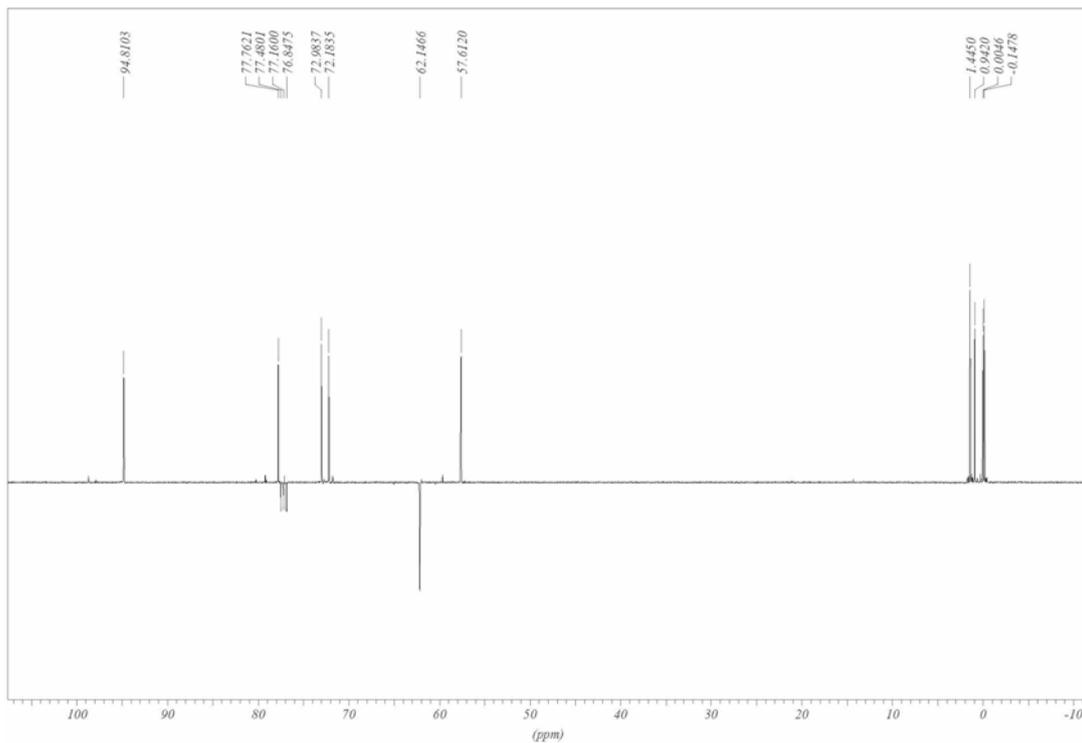
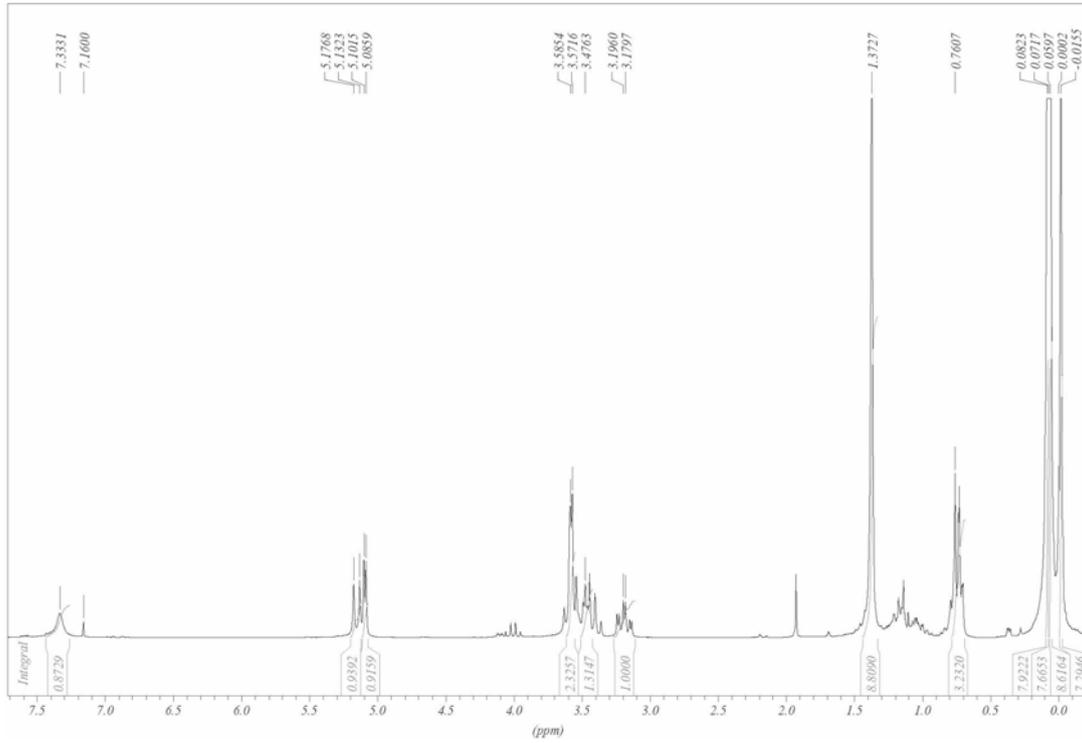


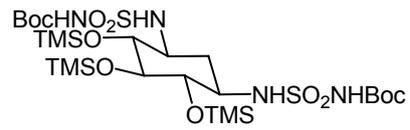
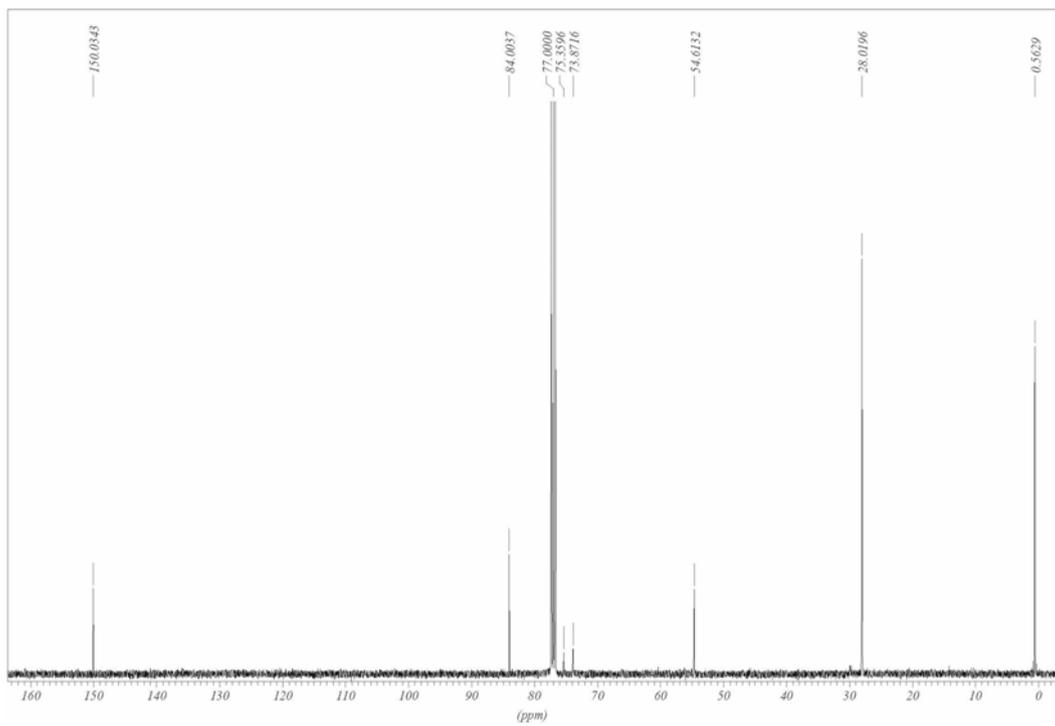
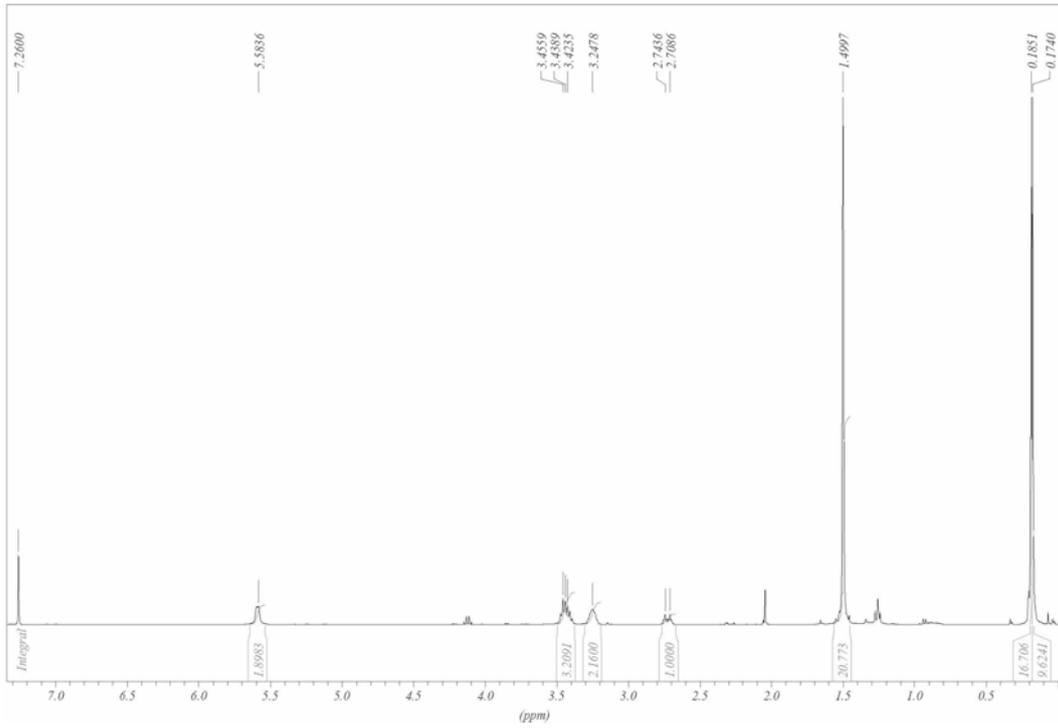


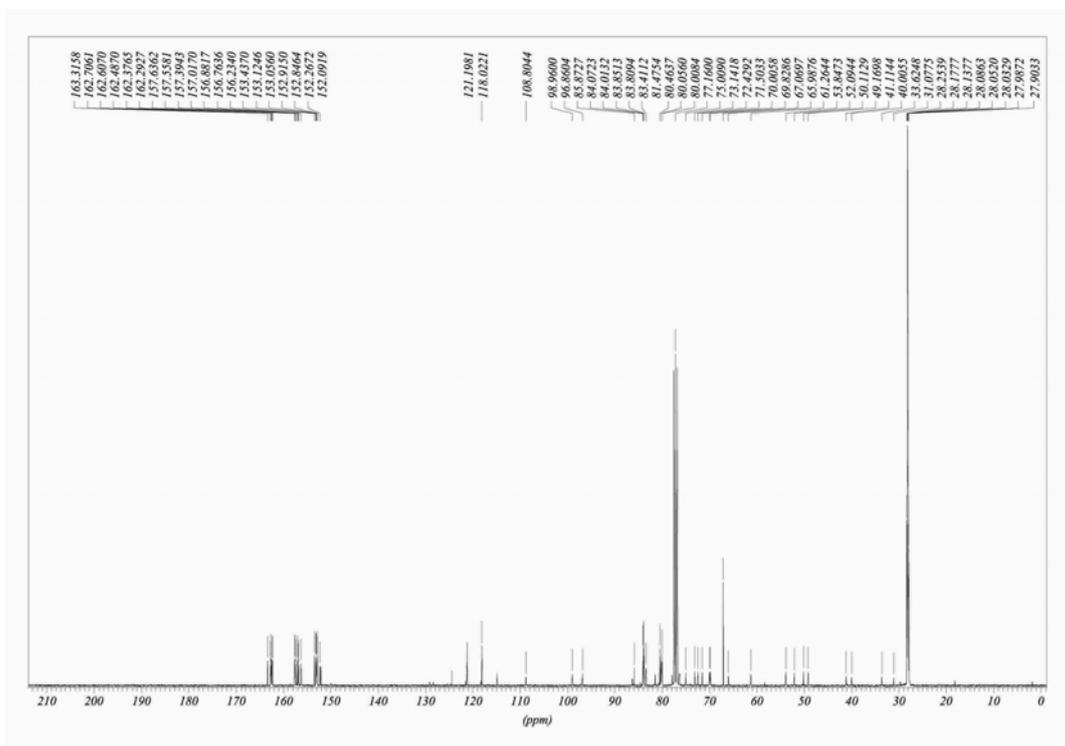
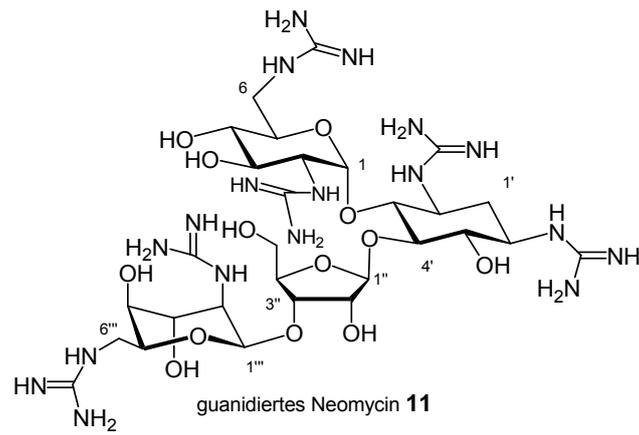


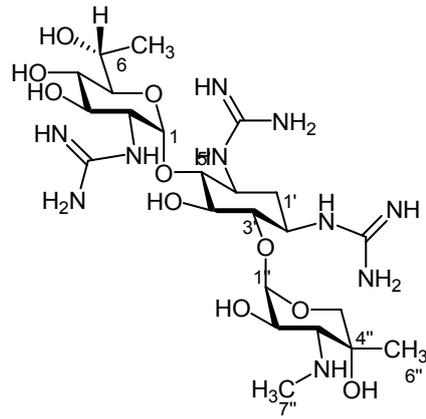
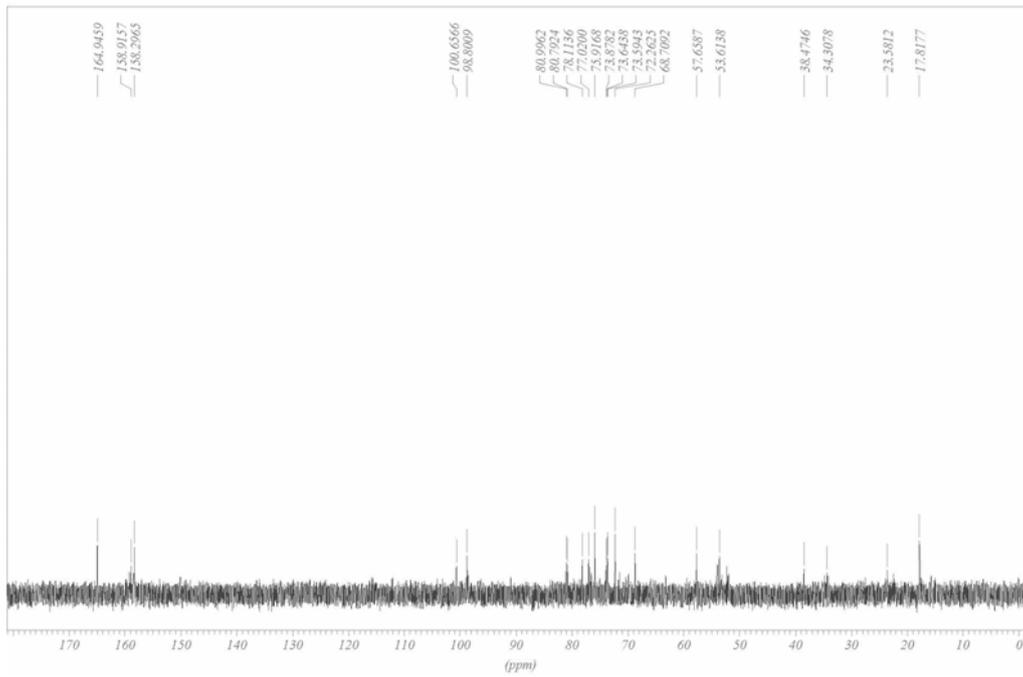


Sulfonamidat-Glucose **33**

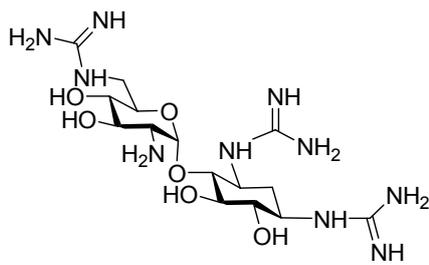
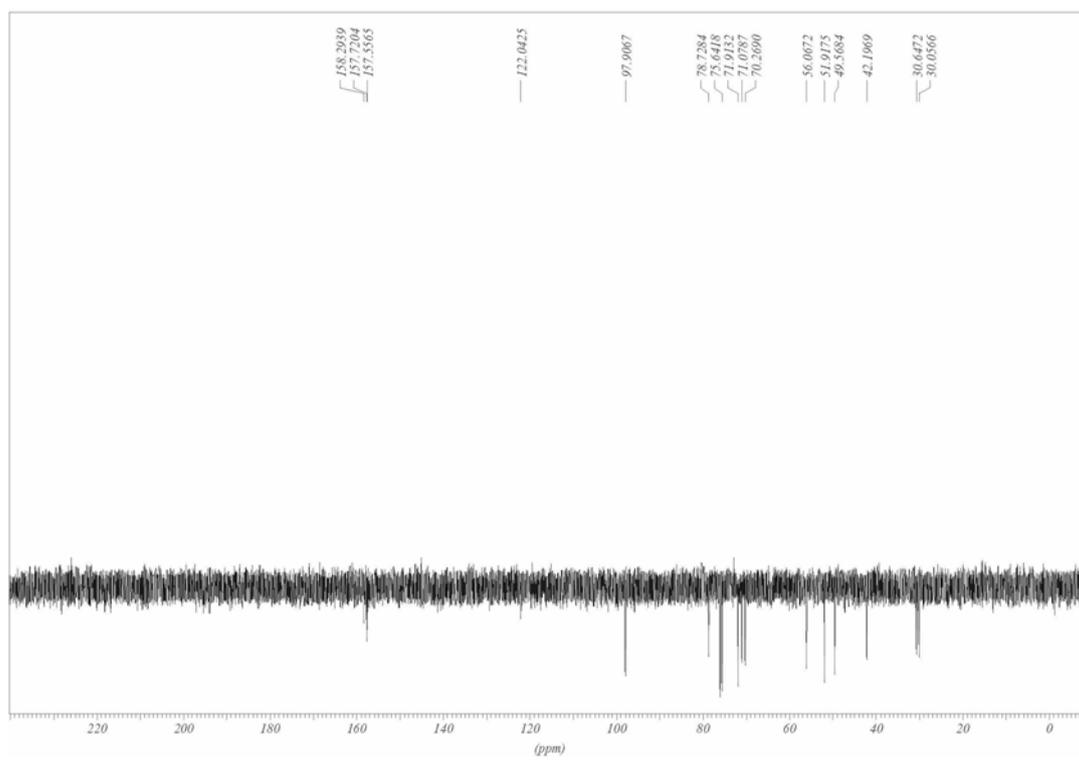


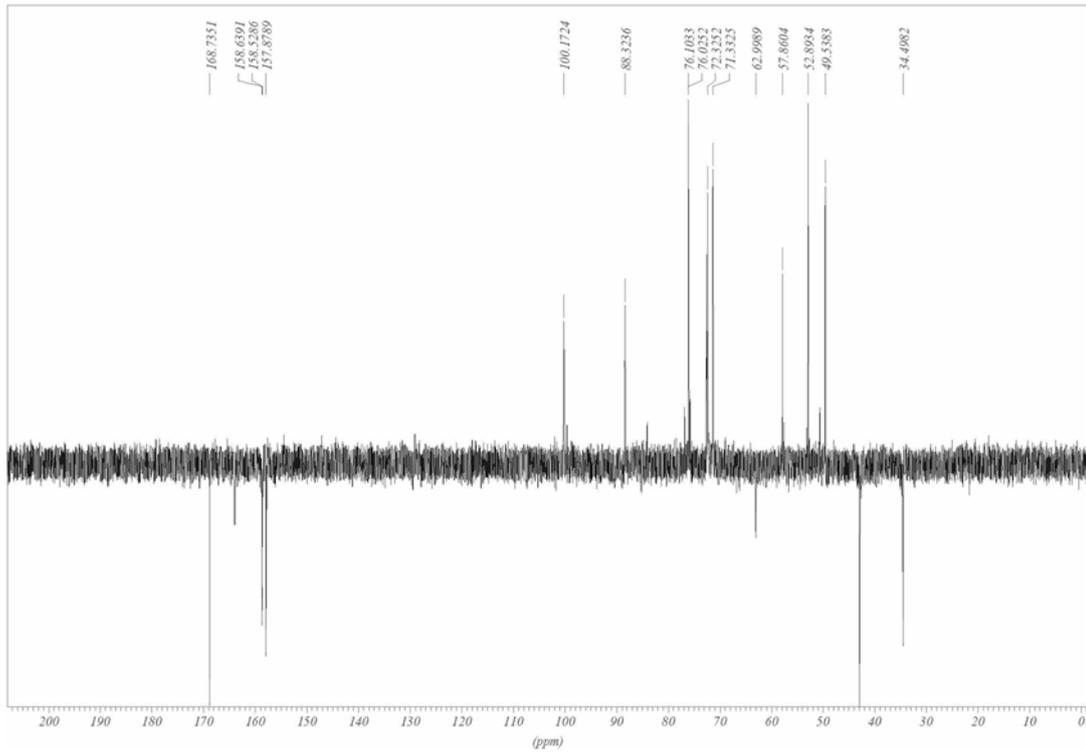
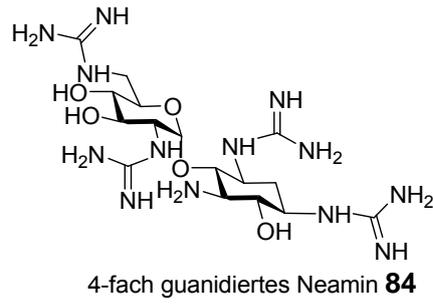
Di-Sulfonamidatcyclitol **33**



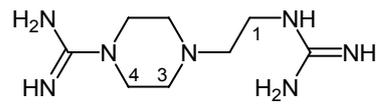
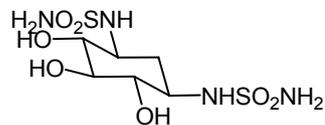
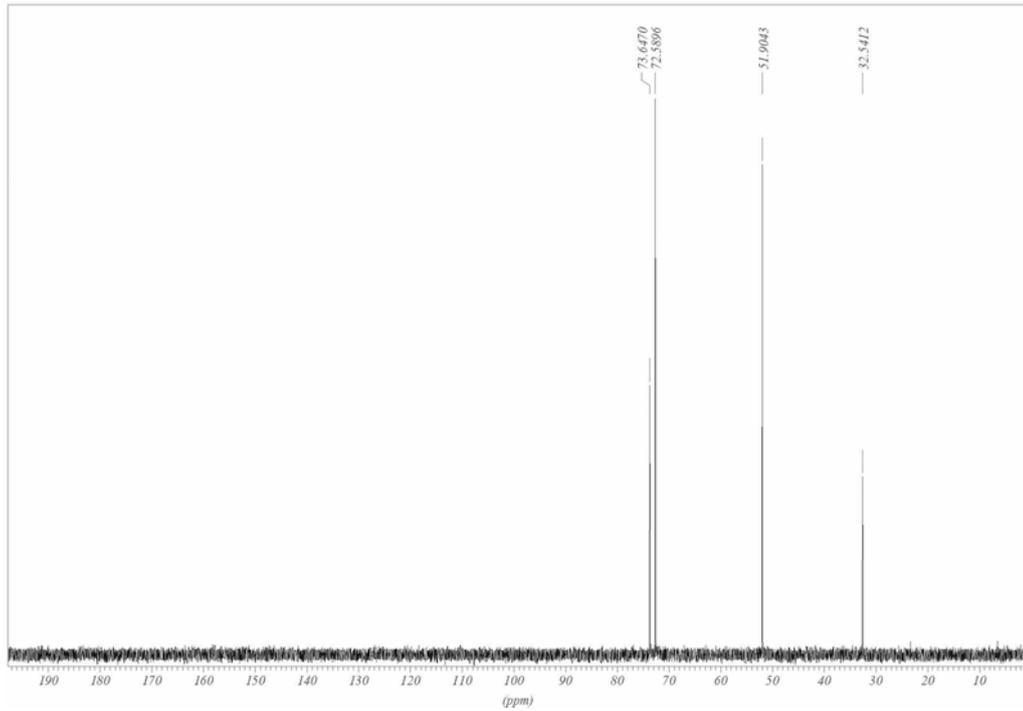
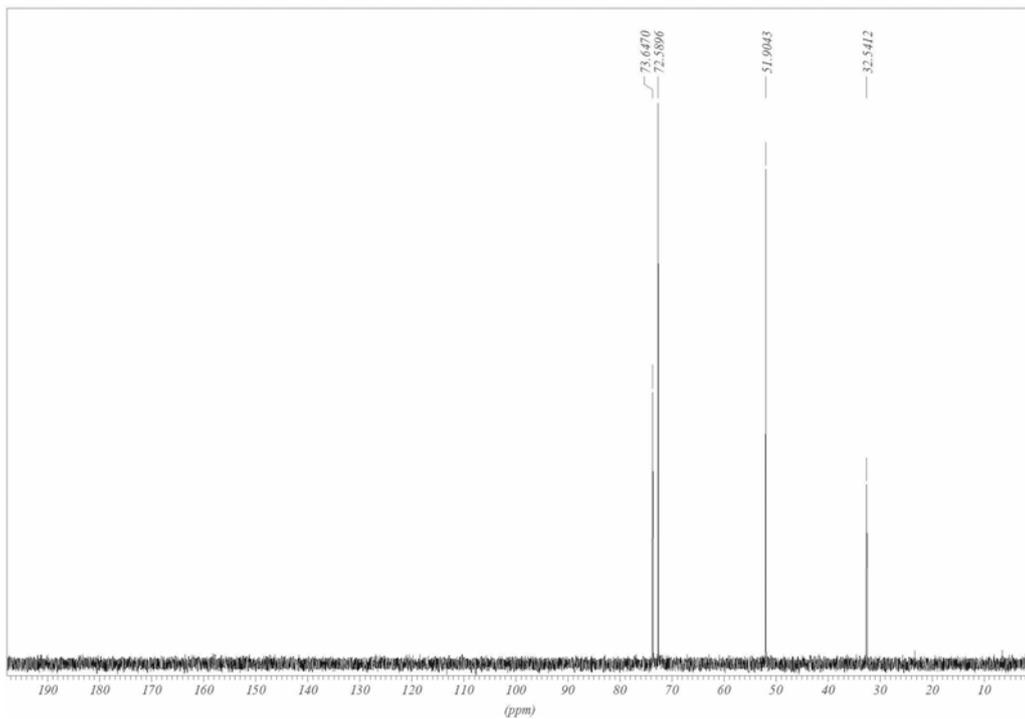
guanidiertes Geneticin **74**

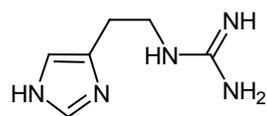
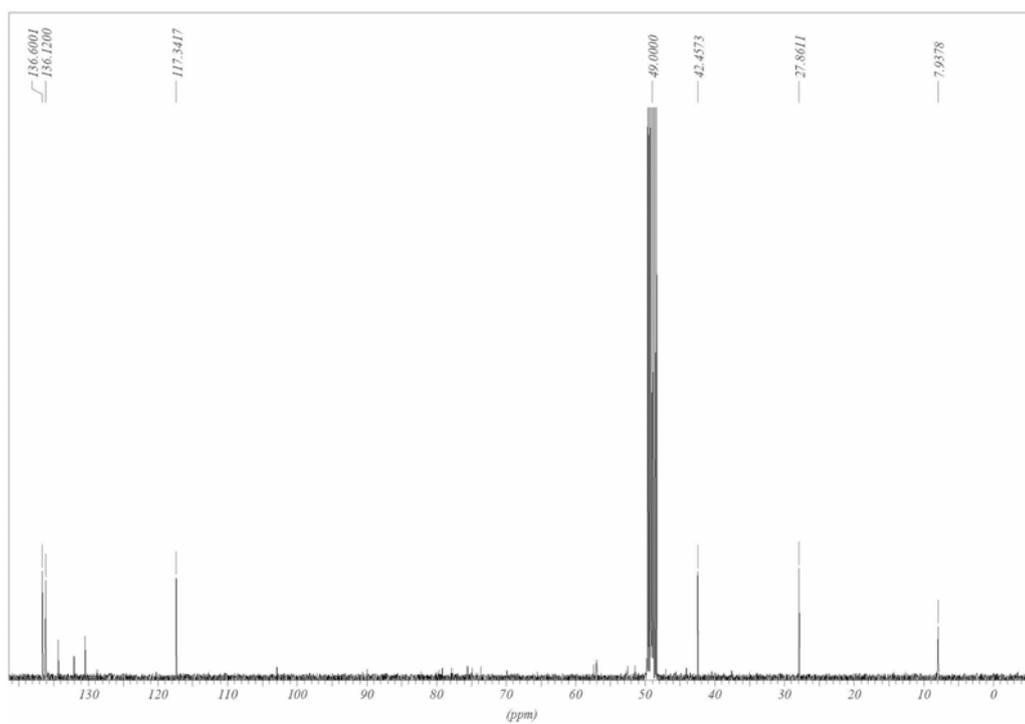


3-fach guanidiertes Neamin **83**

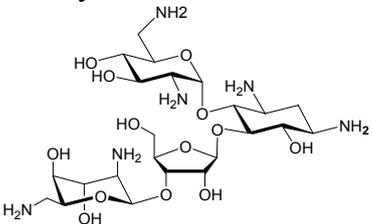
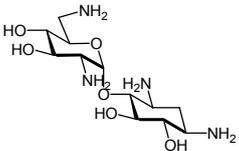
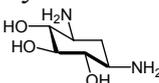
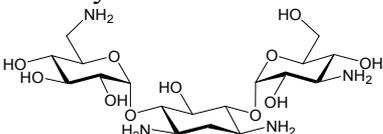
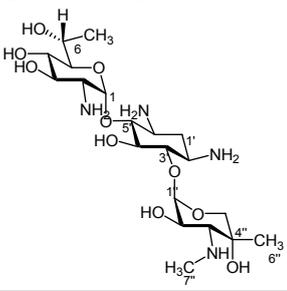
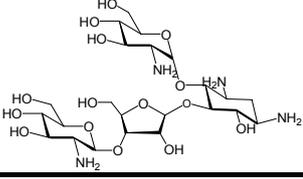
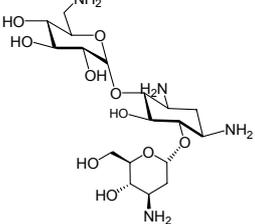


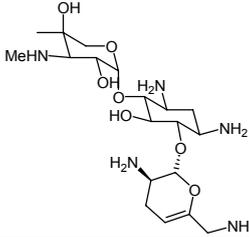
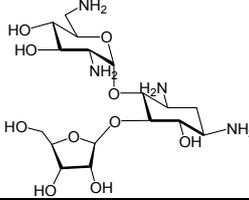
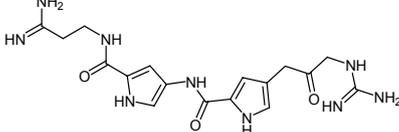
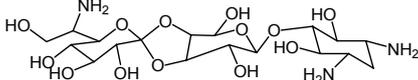
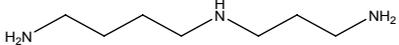
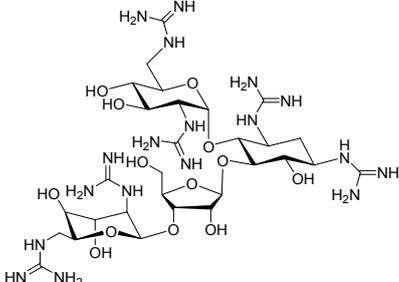
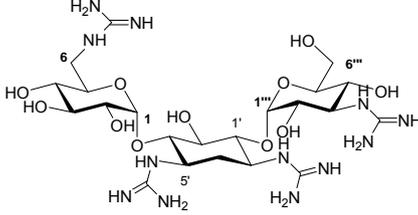


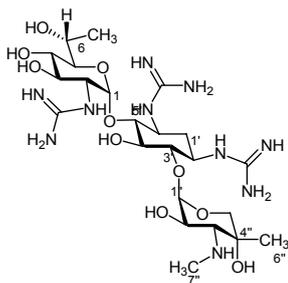
guanidiertes Piperazin **65**Di-Sulfonamidat-Glucose **36**

guanidiertes Histamin **61**

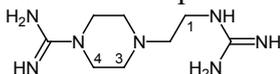
**Dissoziationskonstante an RNA:**

	TAR-RNA		Aktivität des Hairpin-Ribozyms [ $\text{min}^{-1}$ ] bei 1 mM Substanz-Konzentration
	$\mu\text{M}$	Fehler	
<b>Neomycin 8</b> 	1.17	2.3900	$K_i = 500 \mu\text{M}$ [62], [97]
<b>Neamin 2</b> 	38.5	2.7920	$K_i = 500 \mu\text{M}$ [62], [97]
<b>MgCl</b>	1200.00	1.0948	
<b>Cyclitol 3</b> 	2333.00	1.0639	
<b>Kanamycin 4</b> 	9087.00	1.1550	$K_i = 400 \mu\text{M}$ [62 ], [97]
<b>Geneticin 5</b> 	225.80	1.2935	-
<b>Paromomycin 7</b> 	24.31	1.0601	$K_i = 600 \mu\text{M}$ [62 ], [97]
<b>Amikacin 1</b> 	54.30	1.0513	$K_i = 2000 \mu\text{M}$ [62 ], [97]

<p><b>Sisomycin 73</b></p> 	7.60	1.2464	$K_i = 500 \mu\text{M}$ <sup>[97]</sup>
<p><b>Ribostamycin 6</b></p> 	110.00	1.1321	$K_i = 1000 \mu\text{M}$ <sup>[62]</sup>
<p><b>Netropsin 72</b></p> 	92.40	1.0624	-
<p><b>Hygromycin 9</b></p> 	18870.00	1.0424	-
<p><b>Spermidin 26</b></p> 	530.00	1.5550	$K_i = 200 \mu\text{M}$ <sup>[97]</sup>
<p><b>NeoG 11</b></p> 	1.39	2.0556	0.724 bei 1 $\mu\text{M}$
<p><b>Guanidiertes Kanamycin 75</b></p> 	22.5	7.1976	0.075 bei 100 $\mu\text{M}$

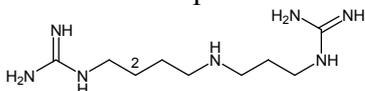
Guanidiertes Geneticin **74**

11.58 1.0739

0.485  
bei 100  $\mu$ MGuanidiertes Piperazin **65**

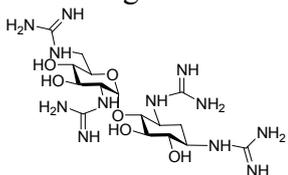
449.00 1.0301

0.401

Guanidiertes Sperimidin **64**

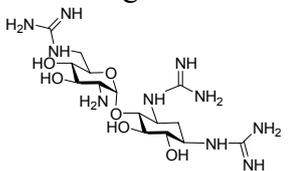
159.00 1.1672

0.292

Vierfach guanidiertes Neamin **84**

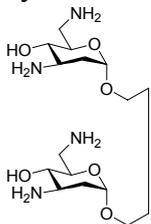
2068.00 1.1241

0.500

Dreifach guanidiertes Neamin **83**

3150.00 1.0326

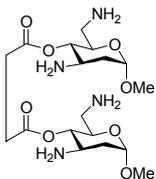
0.460

**Dissoziationskonstante an Tat-Peptid:**Pyranosid-Dimer **81**

-

-

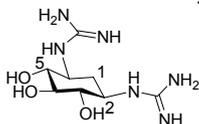
0.587

Dimer **82**

2300

1.12

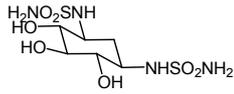
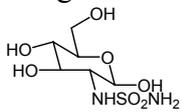
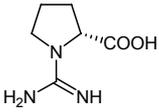
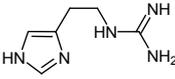
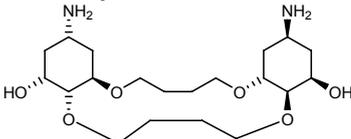
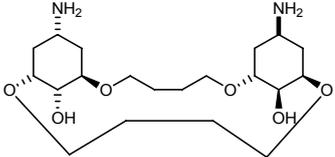
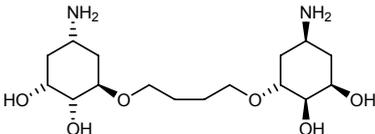
0.570

Guanidiertes Cyclitol **66**

-

-

0.603

<p><b>Disulfonamidat-Cyclitol 36</b></p> 	-	-	0.029
<p><b>Sulfonamidatglucose 35</b></p> 	-	-	-
<p><b>Guanidiertes L-Prolin 63</b></p> 	-	-	-
<p><b>Guanidiertes Histamin 61</b></p> 	-	-	0.484
<p><b>Makrozyklus 77</b></p> 	-	-	0.591
<p><b>Makrozyklus 78</b></p> 	-	-	0.566
<p><b>Dimer 76</b></p> 	-	-	0.589

# Lebenslauf

---

## Persönliches

---

Geburtsdatum 12.07.1976, Rheine  
Nationalität Deutsch

## Schule

---

Aug. 1983 – Juni 1987 Marienschule Grundschule Hauenhorst  
Aug. 1987 – Juni 1996 Emsland-Gymnasium, Rheine  
Juni 1996 Abitur

## Hochschule

---

Okt. 1996 Beginn des Biochemiestudiums in Halle-Wittenberg  
Okt. 1997 Weiterführung des Biochemiestudiums in Hannover  
Sep. 2002 – Mär. 2003 Diplomarbeit bei Prof. Dr. A.Kirschning, Hannover  
*“Synthese von RNA-affinen artifiziellen Aminoglykosiden”*  
  
Juni 2003 Diplom-Biochemiker (Note: sehr gut)  
  
Seit Juni 2003 Promotionsarbeit bei Prof. Dr. A. Kirschning, Hannover  
*“Synthese artifizierlicher Aminoglykoside und Entwicklung von Testsystemen zur Untersuchung von Bindungsstellen an RNA”*

## Sonstiges:

---

Sep. 2000 – Okt. 2000 Erwerb der Fachkunde „Strahlenschutz“  
Mai 2001 – Sep. 2002 Tätigkeit im stud. Fachschaftsrat Chemie/Biochemie  
Okt. 2002 Abschluss des Fortbildungslehrgangs  
*“Gentechnische Sicherheit”*

## Veröffentlichungen:

---

„Amidation of Amines under Microwave Conditions Using Recyclable Polymer-Bound 1H-Pyrazole-1-Carboxamidine“, *Synthesis* **2006**, 03, 461-467

## Vorträge:

---

„Novel Aminoglycosides and –cyclitols; Synthesis and Biological Properties“ SFB 417 Treffen, **2004**, Göttingen