



**Design, Synthese und molekularbiologische Evaluierung  
synthetischer Ribonucleasen mit Cyclen-Grundgerüst**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
**Doktor der Naturwissenschaften**  
- Dr. rer. nat. -

genehmigte  
**Dissertation**  
von

**Dipl. Chem. Katrin Michaelis**  
geboren am 7. Juli 1970 in Hannover

1999

Referent: Priv.-Doz. Dr. M. Kalesse

Koreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. E. Winterfeldt

Tag der Promotion: 14. Dezember 1999

## Kurzfassung

Katrin Michaelis

### **Design, Synthese und molekularbiologische Evaluierung synthetischer Ribonucleasen mit Cyclen-Grundgerüst**

Thema der vorgelegten Dissertation ist die Darstellung verschiedener synthetischer Ribonucleasen, die zur sequenzspezifischen Spaltung der TAR-RNA des HIV-1 führen. Eine solche Spaltung könnte die Transkription von HIV-1 mRNA unterbinden, so daß die für diesen Prozeß essentielle Bindung des regulativen Tat-Proteins mit der TAR-RNA nicht mehr erfolgt und die Proliferation neuer Viruspartikel ausbleiben würde.

Alle in dieser Arbeit vorgestellten synthetischen Ribonucleasen besitzen eine gemeinsame hydrolytische Einheit als aktives Zentrum, das 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan (Cyclen). Es ist bekannt, daß Metallionen wie z.B.  $Zn^{II}$ ,  $Co^{III}$  und  $Ln^{III}$ , die von einer hydrolytischen Einheit komplexiert werden, die Hydrolyse von Phosphorsäurediestern beschleunigen können. Diese Fähigkeit, RNA-Substrate zu hydrolysieren, sollte deshalb an RNA-Modellen getestet werden. In Abhängigkeit vom pH-Wert ergab sich für die Komplexe eine unterschiedliche Beschleunigung, was an den RNA-Modellsubstanzen HPNPP und UpU in kinetischen Experimenten verdeutlicht werden konnte.

Überraschenderweise zeigten die untersuchten Cyclen-Derivate im neutralen pH-Bereich nach Bildung einer Ammonium- bzw. einer Bis(ammonium)spezies ohne Beteiligung von Metallkationen an der TAR-RNA eine überragende hydrolytische Aktivität. Während die Metall-Cyclen-Spezies beim Übergang von Modellsystemen zur tatsächlichen TAR-RNA in Elektrophorese-Experimenten wirkungslos war, stellte sich die Bis(ammonium)spezies als neuartiges und effizientes, hydrolytisches Spaltwerkzeug heraus.

In konsequenter Umsetzung des zugrunde liegenden Konzeptes wurde der gezielte Aufbau einer synthetischen Ribonuclease mit Erkennungseinheit vorgenommen, die neben der hydrolytischen Einheit ein Neunmer-Peptid trägt, dessen Aminosäureabfolge den essentiellen basischen Bereich des Tat-Proteins des HIV-1 widerspiegelt. Dieses Peptid-Cyclen-Konjugat spaltete selektiv und hocheffizient bei neutralem pH-Wert und Raumtemperatur in der *loop*-Region die TAR-RNA. Somit sollte die Verwendung dieser synthetischen Ribonuclease zur vollständigen Unterdrückung der Tat-TAR-Interaktion bzw. der Transkription des HI-Virus führen können.

Desweiteren konnten durch die Kupplung von Tyrosin mit der Cycleneinheit, zwei synthetische Ribonucleasen ohne strukturspezifische Erkennungseinheit synthetisiert werden. Sie zeigten neben der TAR-RNA und leicht veränderten TAR-RNA-Varianten auch noch an der RRE-RNA, einer Bindungseinheit des Rev-Proteins von HIV-1, das ebenfalls zur Transkription beiträgt, sehr selektive, pyrimidinspezifische Spaltungen. Diese Verbindungen qualifizieren sich besonders durch die selektive Erkennung von Pyrimidinbasen insbesondere dem Nucleotid Uracil in ungepaarten Regionen. Die bislang bei synthetischen Ribonucleasen noch nicht bekannte Spezifität für das Nucleotid Uracil kann in RNA-Sequenzierungen Verwendung finden.

RNA, Ribonucleasen, Spaltung

## Abstract

Katrin Michaelis

### **Design, synthesis and biological-molecular evaluation of synthetic ribonucleases with cyclen derivatives**

This thesis focuses on the synthesis of different synthetic ribonucleases, which are able to specifically cleave the TAR-RNA of the HIV-1. This cleavage could prevent the transcription of HIV-1 mRNA. The essential binding of the regulation protein Tat to the TAR-RNA would not occur and the proliferation of new virus particles is stopped.

Every synthetic ribonuclease presented in this thesis incorporate the same hydrolytic active center, the 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen). It is known that metal ions like Zn(II), Co(III) and Ln(III), complexed by the hydrolytic active ligands (cyclen), are able to accelerate the hydrolysis of phosphodiester. The hydrolysing behaviour of these complexes was investigated by the cleavage of RNA-model systems. The pH-dependence of the hydrolytic activity is demonstrated on the RNA-model systems HPNPP and UpU by kinetic experiments.

Surprisingly we could observe an outstanding hydrolytic activity in absence of metal ions in neutral medium. This result can be explained by an ammonium, presumably even a bis(ammonium)-species in the hydrolytic reaction. In electrophoresis experiments with the TAR-RNA the metal cyclen complexes did not show any hydrolytic activity. But the bis(ammonium)-cyclen-species has shown to be a powerful new tool in hydrolysing the TAR-RNA.

Based on these results, the 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen) was combined with the arginine-rich region of the Tat protein (sequence of nine amino acids) to build a synthetic ribonuclease with a recognition subunit. In neutral medium and at ambient temperature this peptide-cyclen conjugate cleaves selectively and highly efficient the *loop*-region of the TAR-RNA. It is possible that the use of this synthetic ribonuclease could suppress the Tat-TAR-interaction or the transcription of the HI-virus completely.

Furthermore, two synthetic ribonucleases without structure specific recognition residue were synthesized by the coupling of tyrosine with the cyclen residue. These compounds are cleaving uridine selective TAR- and the RRE-RNA, a binding site of the Rev protein of HIV-1, which is also responsible for transcription. These compounds are very powerful in the selective recognition of uridine in particular in non paired regions. The high specificity of these synthetic ribonucleases for the nucleotide uracil will be very useful in RNA sequencing.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juli 1996 bis Oktober 1999 am Institut für Organische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. M. Kalesse angefertigt.

Für die interessante Themenstellung, die gewährte Freiheit bei der Ausgestaltung des Projektes, die wertvollen Ratschläge und die jederzeit freundliche Unterstützung danke ich Priv.-Doz. Dr. M. Kalesse sehr herzlich.

Allen Kolleginnen und Kollegen, insbesondere meinen Laborkollegen Monika Quitschalle, Eckhard Claus, Sven H. Lange, Olaf Schrake, Mathias Christmann, Ulhas Bhatt, Thorsten Oost und Andrea Loos danke ich für das angenehme Arbeitsklima sowie eine Menge Spaß.

Für die Unterstützung bei den präparativen Arbeiten möchte ich mich bei Jes Johanson, Timo Stellfeld, Arnd Meyer und der Schwerpunktspraktikantin Verena Ludwig bedanken.

Bei den Arbeitskreisen Hoffmann, Winterfeldt, Butenschön und Duddeck möchte ich mich für die schöne Zeit, die lustigen Partys und die netten Abende sowie die stets freundliche Hilfsbereitschaft bedanken.

Für die sorgfältige Korrektur dieser Arbeit danke ich Christopher Sabater, Jeannette Heyn und vor allem Ingo Rose, der neben der Korrektur stets hilfsbereit zur Seite stand.

Vielen Dank an Frau G. Haß und Frau E. Mettig für die freundliche Betreuung.

Der Spektroskopieabteilung, insbesondere Dr. E. Hofer, D. Körtje und M. Rettstadt danke ich für die Aufnahme der Spektren und der Flexibilität in dringenden Fällen.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Herre, der mir durch seine handwerklerischen Fähigkeiten eine große Hilfe war.

Bei Sven, Lars, Henning und Bianca möchte ich mich für die geduldige Hilfe in Computerdingen bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Susi und Dr. Knut Adermann vom Institut für Peptid-Forschung, Christine und Dr. Jochen Meens aus der Mikrobiologie, wie auch Ulf und Jeannette aus der MHH für die Messungen und Synthesen der Peptide, sowie die Hilfsbereitschaft in biochemischen Fragen.

Bei Norbert bedanke ich mich für die seelische Unterstützung und das ständige Aufbauen in der Endphase. Desweiteren möchte ich mich bei den Damen von SG Seelze-Dedensen und Hannover 96 für die lustige Zeit außerhalb der Chemie bedanken.

Meinen Eltern danke ich für die finanzielle Unterstützung und Geduld durch das gesamte Studium. Besonderer Dank gilt meiner Mutter für ihr stets offenes Ohr und die vielen kleinen Dinge nebenbei.

*Meiner Oma*

Hiermit versichere ich an Eides Statt, die vorliegende Dissertation selbständig durchgeführt und keine unerlaubte Hilfe in Anspruch genommen zu haben. Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Hannover, im November 1999

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Stand der Forschung</b>	<b>4</b>
2.1 Lebenszyklus des HIV-1 Virus	4
2.2 Funktion des Virus	8
2.3 Tat-TAR Erkennung	10
2.4 Therapie	15
2.5 Therapeutische Ansätze	17
2.6 Zusammenfassung, Strategien der therapeutischen Impfung	19
2.7 Ein alternativer therapeutischer Angriffspunkt als Ansatzpunkt dieser Arbeit	20
2.8 Hydrolytische Spaltung von RNA	21
2.8.1 Enzymatische Hydrolyse von Nucleinsäuren	21
2.8.2 Künstliche Nucleasen	25
2.8.3 Metallhaltige künstliche Nucleasen	27
2.8.4 TAR-spezifische synthetische Ribonucleasen und Binder	30
<b>3. Aufgabenstellung</b>	<b>32</b>
<b>4. Theoretischer Teil</b>	<b>35</b>
4.1 Teil I, Synthese der Cyclenderivate, Zugang zur hydrolytischen Einheit	35
4.1.1 Darstellung des 1,4,7,10-Tetraazacyclododecans (Cyclen)	35
4.1.2 Dreifache Schützung mit der Cbz-Gruppe (Benzyloxycarbonyl)	35
4.1.3 Dreifache Schützung mit der N-tert-Butyloxycarbonyl (Boc) Gruppe	36
4.2 Serin und Tyrosin als erfolgversprechende Bausteine für die Synthesen künstlicher Ribonucleasen ohne Erkennungseinheit	37
4.2.1 Synthesestrategie monosubstituierter Cyclenverbindungen	37
4.2.2 Retrosynthetische Betrachtung und Einblick in die Synthese der geplanten Tyrosincyclenderivate	38

4.2.3 Darstellung der N-tert.-butoxycarbonyl (Boc) geschützten Aminosäuren (L-Tyrosin; D,L-Serin; $\beta$ -Alanin; Glycin)	41
4.2.4 Benzylschützung des N-tert.-butoxycarbonyl-L-tyrosins (4) und des N-tert.-butoxycarbonyl-D,L-serins (6)	42
4.2.5 Die Kupplungsreaktionen mit dem dreifach Cbz-geschützten-Cyclenderivat (2)	42
4.2.6 Darstellung der Aktivester als Intermediat in Kupplungsreaktionen	43
4.2.7 Syntheseweg zu den Cyclenderivaten (15) und (16)	43
4.2.8 Darstellung des Tyrosinderivats (20) mit einer um eine $\beta$ -Alanin-Einheit kettenverlängerten Guanidiniumgruppe	46
4.2.9 Darstellung des Tyrosinderivats (24) mit kettenverlängerter Tyrosineinheit	49
4.2.10 Darstellung des Tyrosinderivates (28) mit kettenverlängerter Guanidiniumgruppe	52
4.3 Synthese der Serin- und Glycinderivate	55
4.3.2 Darstellung des Glycinendproduktes (35)	57
4.3.3 Darstellung des Serinderivates (37)	57
<b>4.4 Darstellung der Verbindung (43) als direkter Vorläufer für das Neunmer-Peptid-Cyclen-Konjugat I</b>	<b>59</b>
<b>4.5 Teil II, synthetische Ribonucleasen mit spezieller Erkennungseinheit;</b>	<b>61</b>
<b>Darstellung des Cyclen-Peptid-Konjugats (I) und seiner Derivate</b>	<b>61</b>
4.5.1 Festphasenpeptidsynthese und Kupplung mit dem Cyclenvorläufer (45)	61
4.5.2 Vorstufe für die Peptidkupplung	62
4.5.3 Festphasenpeptidsynthese und Kupplung der hydrolytischen Einheit	62
<b>4.6 Darstellung des 1,4,7-Triazacyclononans</b>	<b>65</b>
4.6.1 Synthese des Tosyl-geschützten Nonans (48) als Vorläufer	66
<b>4.7 Darstellung des Dimers</b>	<b>68</b>
<b>5.1 Bestimmung der Protolyse- und Komplexstabilitätskonstanten des Peptid-Cyclen-Konjugat I Vorläufers (43)</b>	<b>70</b>
5.1.1 Bestimmung der Konstanten über das Computerprogramm Best	72

<b>5.2 Umesterung der RNA-Modellverbindung HPNPP - der photometrische Schnelltest</b>	<b>75</b>
5.2.1 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten	75
5.2.2 Mathematischer Hintergrund	76
5.2.3 Ergebnisse der Umesterung von HPNPP durch den Zn(II)-Cyclen-Komplex	78
<b>5.3 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>80</b>
<b>5.4 Spaltung des Dinucleotids UpU mit dem Zn(II)-Komplex (43) und Analyse der Spaltungsprodukte durch HPLC</b>	<b>83</b>
<b>5.5 Spaltung von HPNPP durch verschiedene Zink-Cyclen-Komplexe</b>	<b>85</b>
5.5.1 Spaltung von HPNPP durch die Zn(II)-Cyclenkomplexe 15, 20 und 24 in Wasser	86
<b>6. Die Gelelektrophorese</b>	<b>90</b>
<b>I. Einführung</b>	<b>90</b>
<b>6.1 Denaturierende Polyacrylamidgele</b>	<b>90</b>
6.1.1 Die RNA	91
<b>II Detektion</b>	<b>92</b>
6.1.2 Das Northern Elektrophoretogram-Verfahren	92
6.1.3 Nicht-radioaktive Markierung; enzymatisch aktivierte Chemolumineszenz	92
6.1.4 Filter-binding Assays (Dot-Blot) zur Bestimmung der Komplexkonstante	94
<b>6.2 Material und Methoden</b>	<b>94</b>
<b>III. Ergebnis-Teil</b>	<b>95</b>
<b>6.3 Selektive Spaltung der HIV-1-TAR-RNA durch ein Peptid-Cyclen-Konjugat.</b>	<b>95</b>
6.3.1 pH-abhängige Spaltung des Peptid-Cyclen-Konjugats (I)	98
6.3.2 Spaltungsversuche mit unterschiedlichen Metallkonzentrationen von Zn(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> und Eu(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	99
6.3.3 Cyclen als Bis(ammonium)-Spezies	102
6.3.4 Austausch von U <sub>31</sub> gegen A <sub>31</sub> in der TAR-RNA (2)	105
6.3.5 Umstrukturierung der <i>loop</i> -Region	107
6.3.6 Verdauungs-Experimente, Footprints	110

6.3.7 Filter-binding assays (Dot-Blot), Bestimmung der Komplexkonstante des Peptid-Cyclen-Konjugats (I)	114
<b>6.4 Spaltung der HIV-1-TAR-RNA durch synthetische Ribonucleasen</b>	<b>117</b>
<b>6.5 Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>129</b>
<b>6.6 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>132</b>
<b>7. Experimenteller Teil</b>	<b>134</b>
<b>7.2 Beschreibung der Versuche</b>	<b>136</b>
<b>7.3 Festphasenpeptidsynthese der Peptide</b>	<b>181</b>
<b>7.4 Kinetische Messungen</b>	<b>183</b>
7.4.1 Durchführung der Titration	183
7.4.2 Umesterung von HPNPP durch Zn(II)-Cyclenkomplexe in Wasser	184
7.4.3 Umesterung von HPNPP durch den Zn(II)-Cyclen-Komplex (43)	185
7.4.4 Umesterung von HPNPP durch die Zn(II)-Cyclenkomplexe 15, 20 und 24 in Wasser	186
<b>7.5 Spaltung des Dinucleotids UpU durch das Cyclenderivat (43)</b>	<b>187</b>
<b>8. Experimenteller Teil, Gelelektrophorese</b>	<b>188</b>
<b>8.1 Allgemeiner Teil</b>	<b>188</b>
8.1.1 Inaktivierung von RNAsen	188
8.1.2 Quantifizierung von RNA	188
8.1.3 Behandlung der RNA	188
8.1.4 Die Elektrophorese mit einem 20 %-igem denaturierenden Polyacrylamidgel	189
8.1.5 Darstellung der Puffer	190
8.1.6 Das Northern Blot Verfahren	190
8.1.7 Detektionsprotokoll für Biotin-markierte RNA auf Nylon-Membran	191
8.1.8 Herstellung der Puffer für das Detektionsprotokoll	192
8.1.9 Die Ribonucleasen	192
<b>8.2 Durchführung der Gelelektrophorese, die einzelnen Versuche</b>	<b>193-206</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

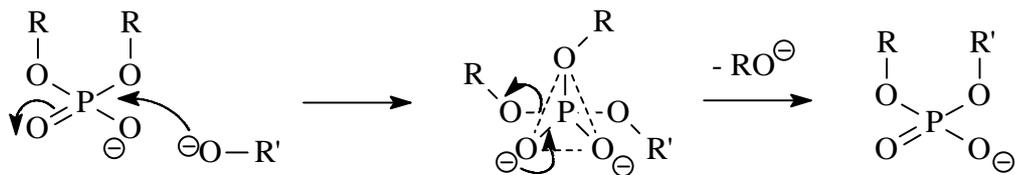
A	Adenin
abs.	absolut
APS	Ammoniumpersulfat
APT	Attached Proton Test
Arg	Arginin
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl-
<i>bulge</i>	Ausbuchtung
C	Cytosin
Cbz	Benzyloxycarbonyl-
Cyclen	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan
d	Tag(e)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DEPT	Distortionsless Enhancement by Polarisation Transfer
dest.	destilliert
DCM	Dichlormethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIEA	Diisopropylethylamin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eq	Äquivalente
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
EtOH	Ethanol
FAB	Fast Atom Bombardement
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
G	Guanin
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
Gln	Glutamin
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPNPP	2-Hydroxypropyl- <i>para</i> -nitrophenylphosphat
Hz	Hertz
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	im Leben
IR	Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	Kopplungskonstante

konz.	konzentriert
Lit.	Literatur
<i>loop</i>	Schleife
Lsg.	Lösung
LTR	Long Terminal Repeat
Lys	Lysin
M	Molar
MeOH	Methanol
min.	Minuten
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MS	Massenspektroskopie
Mtr	4-Methoxy-2.3.6-trimethyl-benzensulfonyl-
NMR	magnetische Kernresonanz
Nucleosid	Nucleinbase und Pentose
Nucleotid	Baustein aus Nucleosid und Phosphorsäure
Opfp	Pentafluorphenoxy-
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
Schmp.	Schmelzpunkt
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Spacer	Zwischenstück
<i>tert.</i>	tertiär
TAR	<i>trans</i> -Aktivator Response
Tat	<i>trans</i> -Aktivator Protein
tat	Tat-codierendes Gen
TBE	TRIS-Bor-EDTA-Puffer
TEAOH	Tetraethylammoniumhydroxid
TEAP	Tetraethylammoniumperchlorat
TFA	Trifluoressigsäure
TMEDA	N,N,N',N''-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ts	<i>para</i> -Toluolsulfonyl-
U	Uracil
Uridin	Nucleosid des Uracils
Wang-Resin	<i>para</i> -Benzyloxobenzylalkohol-Resin
W	Watt

## 1. Einleitung

Den Phosphorsäurediestern kommt als verknüpfenden Strukturelementen der Nucleinsäuren RNA und DNA eine große biologische Bedeutung zu. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Weitergabe und Speicherung genetischer Informationen. Während die DNA der Träger der genetischen Informationen ist, beteiligt sich die RNA an der Realisierung dieser Informationen. Von besonderer Bedeutung innerhalb der verschiedenen RNA-Arten sind die für die Proteine codierenden Messenger-RNA-Moleküle (mRNA), die als Adapter bei der Protein-Biosynthese benötigten Transfer-RNA-Moleküle (tRNA) sowie die als Bauteile der Ribosomen verwendeten ribosomalen RNA-Moleküle (rRNA).

In der Regel verläuft die Umesterung eines Phosphodiesters nach einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus über eine dianionische trigonalbipyramidale Zwischenstufe.<sup>1</sup>



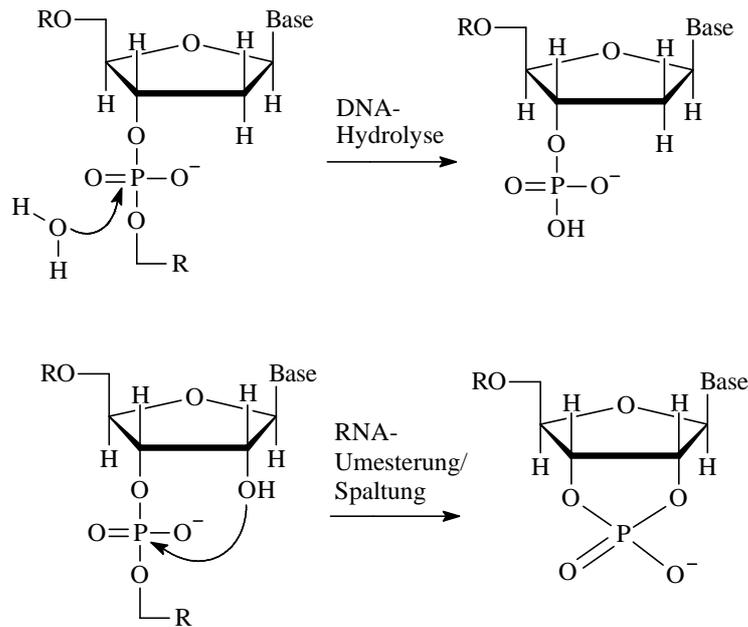
**Abb. 1.1:** Darstellung der Umesterung eines Phosphodiesters nach dem Additions-Eliminierungs-Mechanismus über eine trigonale Bipyramide

Entscheidend für den Ablauf der Biosynthese ist die Stabilität der Phosphorsäurediesterbindungen aber auch die Fähigkeit, diese in wenigen Sekunden zu knüpfen oder zu lösen. Die hydrolytische Stabilität der Phosphordiesterbindungen ist außerordentlich hoch. Die auf 24 °C und pH 7 extrapolierte Geschwindigkeitskonstante *pseudo*-erster Ordnung für die Hydrolyse von DNA beträgt  $5.7 \times 10^{-14} \text{ s}^{-1}$ , das entspricht einer Halbwertszeit von  $3.8 \times 10^5$  Jahren.<sup>2</sup>

Die Spaltung von RNA ist aufgrund der 2'-OH-Gruppe, die in einer intramolekularen Umesterung als internes Nucleophil wirkt, um Größenordnungen schneller. Sie wird deshalb als Umesterung/Spaltung und nicht als Hydrolyse beschrieben.

<sup>1</sup> H. Dugas, *Bioorganic Chemistry*, 2. Aufl., Springer-Verlag, New York **1989**, 123-140.

<sup>2</sup> K. Kurz, *Chemie in unserer Zeit* **1998**, 32, 96.



**Abb. 1.2: Unterschiedliche Spaltungsmuster von RNA und DNA**

RNA zeigt eine ausgeprägte tertiäre Struktur, die viele Möglichkeiten der Erkennung wie z.B. von *Antisense*-Oligonucleotiden, Peptiden und *major*- oder *minor-groove*-Bindern, bietet.

Der Entwurf von synthetischen Katalysatoren für die Hydrolyse von Phosphorsäurediestern ist von beträchtlichem Interesse, da solche künstlichen Nucleasen potentielle antivirale oder Antikrebstherapeutika sind. Die Ursachen vieler Krankheiten finden sich im Erbgut, weshalb die gezielte Hydrolyse von Messenger-RNA ein interessanter Therapieansatz ist. Als Werkzeuge der Zukunft könnten daher neben *Antisense*-Oligonucleotiden künstliche Phosphodiesterasen eingesetzt werden.

Die antivirale Therapie stellt einen Anwendungsbereich für derartige synthetische Ribonucleasen dar. Dabei geht es speziell um den HI-Virus (*human immunodeficiency virus*), der ein Vertreter der sogenannten Retroviren ist, die ihr genetisches Material in Form von RNA in die Wirtszelle einschleusen.

1981 wurden die ersten Fälle einer neuen Krankheit, dem *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS), bekannt. Die Opfer starben an seltenen opportunistischen Infektionen, deren Ausbruch auf einer Schwächung des Immunsystems beruhte. Zwei Jahre später entdeckten Luc Montagnier und Robert Gallo die Ursache: AIDS wird vom *human*

*immunodeficiency virus* (HIV) verursacht. Eine HIV-Infektion ist eine meist über Jahre fortschreitende Erkrankung, die zunächst relativ symptomlos verläuft und schließlich in AIDS, dem erworbenen Immunschwäche-Syndrom, mündet. Die längst weltweite HIV-Pandemie setzt sich aus Tausenden von Einzelepidemien unterschiedlicher Vehemenz zusammen. Besonders rasch breitet sie sich in den Entwicklungsländern aus, wo die Mehrheit der Weltbevölkerung lebt. Nach Angaben des AIDS-Programms der Vereinten Nationen (UNAIDS) haben sich seit den frühen achtziger Jahren schätzungsweise mehr als 40 Millionen Menschen infiziert, fast 12 Millionen sind an den Folgen schon gestorben, und mindestens 8 Millionen Kinder verloren dadurch ihre Eltern. Allein 1997 haben sich knapp 6 Millionen Menschen angesteckt, das sind fast 16 000 täglich. Außerdem erlagen rund 2.3 Millionen der Immunschwäche, darunter 460 000 Kinder.<sup>3</sup>

Um die Ausbreitung von HIV einzudämmen, müssen die Präventionsprogramme erheblich erweitert werden. Angesichts der Schwierigkeit, so viele Menschen zu wirksamen Verhaltensänderungen zu bewegen, muß aber gleichzeitig noch intensiver an der Entwicklung eines Impfstoffes gearbeitet werden. Öffentliche und private Forschungsinstitutionen sowie internationale Organisationen sollten daher der Entwicklung eines HIV-Impfstoffes höchste Priorität einräumen

---

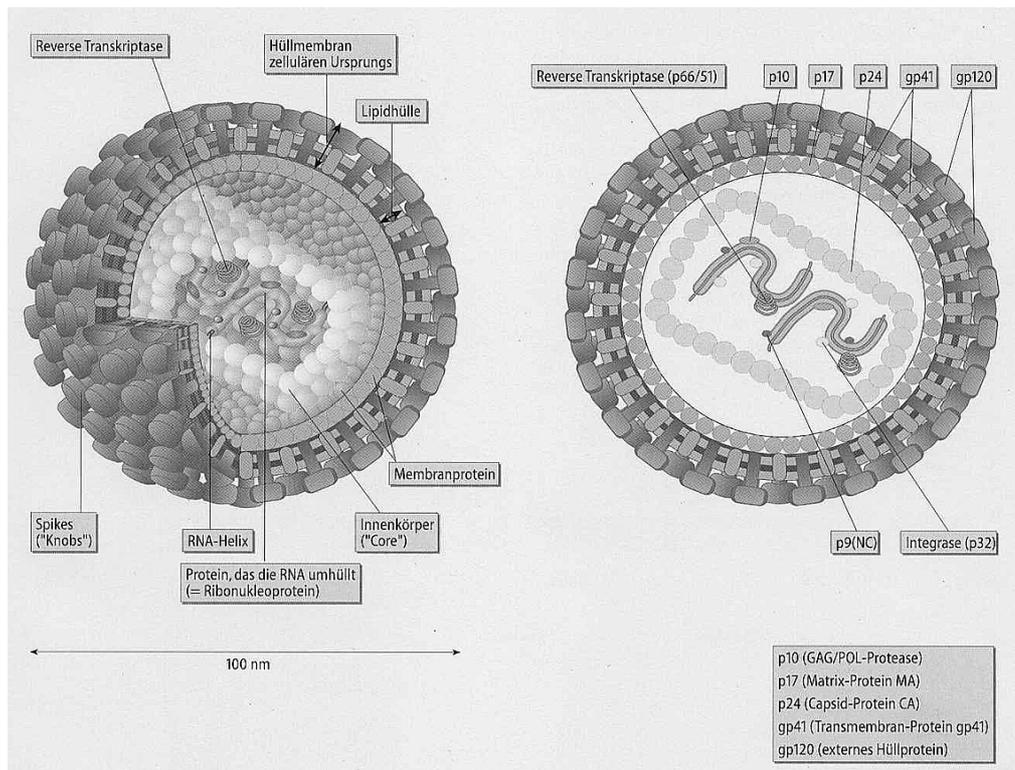
<sup>3</sup> a) Daten aus: Report on the Global HIV/AIDS Epidemic. UNAIDS and WHO, Dec. **1997**, Internet-Adresse: <http://www.unaids.org/unaidsgraphics/1997/report97/index.html>.

b) J. M. Mann, D. J. M. Tarantola, *Spektrum der Wissenschaft* **1998**, 34-35.

## 2. Stand der Forschung

### 2.1 Lebenszyklus des HIV-1 Virus

Das annähernd kugelförmige HI-Virion hat einen Durchmesser von etwa einem zehntausendstel Millimeter. Seine äußere Hülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die von den Membranen menschlicher Zellen stammt. An der Oberfläche sitzen zahlreiche Hüllproteine.



**Abb. 2.1: Links: Räumliches Modell; Rechts: Querschnitt durch das HI-Virus-1<sup>4</sup>**

Diese Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von rund 160 000 (gp160), setzen sich aus zwei Einheiten zusammen, gp120 und gp41. Die außen sitzende Einheit gp120 ist mit vielen Zuckerseitenketten bestückt. Sie dockt an bestimmte Rezeptormoleküle auf der Oberfläche von T-Lymphozyten an. Die kleinere, innere Einheit gp41 hingegen verankert die größere in die Virusmembran.

<sup>4</sup> Löffler, Petrides, *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, 6. Auflage, 1998, Springer-Verlag, S. 293.

Der Raum zwischen dem genetischen Material und der Hülle wird vom p17 Matrixprotein ausgefüllt, während die Wandung des Kerns vom Capsid<sup>5</sup>-Protein p24 gebildet wird. Im Inneren befindet sich außer zwei RNA-Stränge (jeweils 9200 Nucleotide lang), der Erbsubstanz des Virus, noch das Enzym reverse Transkriptase. Weiterhin enthält das Capsid eine Integrase, eine Protease und eine Ribonuclease.

Seit langem ist bekannt, daß das Virus vor allem deshalb eine Immunschwäche hervorruft, weil es letztlich eine Sorte von T-Lymphozyten zerstört, die auf ihrer Oberfläche das CD4 Protein tragen. T-Zellen sind weiße Blutkörperchen, die im Thymus reifen. Als sogenannte Helferzellen koordinieren sie normalerweise viele Teilprozesse antiviraler Immunreaktionen. Außerdem kann der HI-Virus Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems (Langerhans'sche-Zellen der Epidermis, dendritische Zellen, antigen-präsentierende Zellen, Gehirnmikroglia sowie CD4-Zellen des Darms) infizieren, eine andere Gruppe von Abwehrzellen mit CD4-Molekülen. Diese zerstört es aber nicht, sondern findet darin sichere Zuflucht, so daß es jahrelang überdauern kann.

Die CD4-Moleküle auf T-Zellen und Makrophagen sind in der Regel an der Signalübertragung zur Immunzelle beteiligt und binden normalerweise MHC-Klasse-II-Moleküle.<sup>6</sup> HIV bindet über das Glykoprotein gp120 seiner Hüllmembran an das CD4-Protein. Die Internalisierung erfolgt über eine Fusion der Virus- mit der Zellmembran, die durch Domänen auf dem gp41/gp120 und einem Membranprotein vermittelt wird.

Schon seit mehreren Jahren besteht die Vermutung, daß das Protein CD4 zwar eine notwendige, aber nicht hinreichende Voraussetzung für einen Befall ist. Die Zellen müssen noch mindestens ein weiteres Oberflächenprotein tragen, an dem das Virus andocken kann.<sup>7,8</sup> Alle HIV-Stämme, die bis heute getestet wurden, benutzen die Chemokinrezeptoren<sup>9</sup> CCR5 oder CXCR4<sup>10</sup> (früher Fusin) als Corezeptoren<sup>11</sup> zum Zelleintritt. CCR5 ist dabei der prädominante Corezeptor für monozytrophe HIV-Isolate, und CXCR4 stellt den

---

<sup>5</sup> Das Capsid ist die Proteinhülle um den Viruskern.

<sup>6</sup> Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC).

<sup>7</sup> R. Wyatt, J. Sodroski, *Science* **1998**, 280, 1884-1888.

<sup>8</sup> S. J. O'Brian, M. Dean, *Spektrum der Wissenschaft* Febr. **1998**, 38-99.

<sup>9</sup> Chemokine sind proinflammatorische Immunmediatoren mit chemotaktischen Eigenschaften und gehören somit zu einer Cytokin-Klasse.

<sup>10</sup> Chemokine werden aufgrund ihrer vier konservierten Cysteine in zwei Subfamilien aufgeteilt: CXC-Chemokine, wo die ersten beiden Cysteine durch eine Aminosäure getrennt werden, und CC-Chemokine, bei denen diese direkt benachbart vorliegen.

<sup>11</sup> a) G. Simmons, P. R. Clapham, L. Picard, R. E. Oxford, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, R. Buser, T. N. C. Wells, A. E. I. Proudfoot, *Science* **1997**, 276, 276-279.

b) T. N. C. Wells, A. E. Proudfoot, C. A. Power, M. Marsh, *Chemistry & Biology* **1996**, 3, 603-609.

hauptsächlich genutzten Corezeptor T-zelltroper Isolate dar. Diese beiden gehören höchstwahrscheinlich zu den entscheidenden Faktoren der HIV-Infektion und -Pathogenese. Daneben gibt es allerdings viele HIV-Stämme, die nebst CCR5 und CXCR4 in der Lage sind, weitere Corezeptoren wie beispielsweise CCR3, CCR2, sowie die erst im Sommer 1997 entdeckten Rezeptoren BOB, Bonzo und GPR1 zu benutzen.<sup>12</sup>

Die Arbeitsgruppe von Steve O'Brien<sup>7,13</sup> identifizierte einen genetischen Polymorphismus, der einen Einfluß auf den individuellen Verlauf der HIV-Erkrankung hat. Sie konnten zeigen, daß ein bestimmtes Allel der regulatorischen Region von CCR5, genannt CCR5P1, mit einer raschen Progression der HIV-Erkrankung, insbesondere in den ersten Jahren nach der Infektion, assoziiert ist. Studien zum CCR5-Rezeptor in der Bevölkerung haben ergeben, daß gewisse Individuen Träger von Mutanten dieses Rezeptors sind. Wie für jede genetische Information besitzt der Mensch zwei Kopien des Gens, das für diesen Rezeptor kodiert ist. Deshalb können Individuen heterozygot (ein mutiertes und ein normales Gen) oder homozygot (zwei normale bzw. zwei mutierte Gene) sein. HIV-Positive, die eine Kombination von mutierten und normalen (heterozygot) Rezeptoren besitzen, sind vor einer Infektion nicht geschützt. Hingegen schreitet bei ihnen die Krankheit langsamer voran. Eine gewisse Anzahl Infizierter, die HIV-negativ sind, erwiesen sich bezüglich der Mutationen als homozygot. Diese doppelte Mutation des CCR5 Gens zeigt offenbar Resistenz gegen den Virus und liefert so für die Forschung neue Anhaltspunkte.

Das gesunde CCR5 Protein trägt im Falle einer Infektion entscheidend zum Ausbruch der Krankheit bei. Wenn sich das virale Hüllprotein gp120 an das Protein CD4 heftet, tritt im Protein gp120 eine konformative Änderung ein, die den chemokinen Rezeptoren wie CCR5 eine Andockstelle bietet. Die Membran von Virus und Wirtszelle verschmelzen und der Virusinhalt entleert sich in das Cytoplasma. Das mitimportierte Enzym reverse Transkriptase kopiert die virale RNA in die DNA um. Anschließend wird doppelsträngige DNA gebildet, die unter dem Einfluß des Enzyms Integrase als Provirus-DNA in das Wirtschromosom eingebaut wird. Die integrierte DNA trägt nun die genetische Information zur Produktion viraler RNA und Proteine. Durch die Bindung des zellulären Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der an die LTR<sup>14</sup>-Regionen (Kap. 2.2) des Virusgenomes

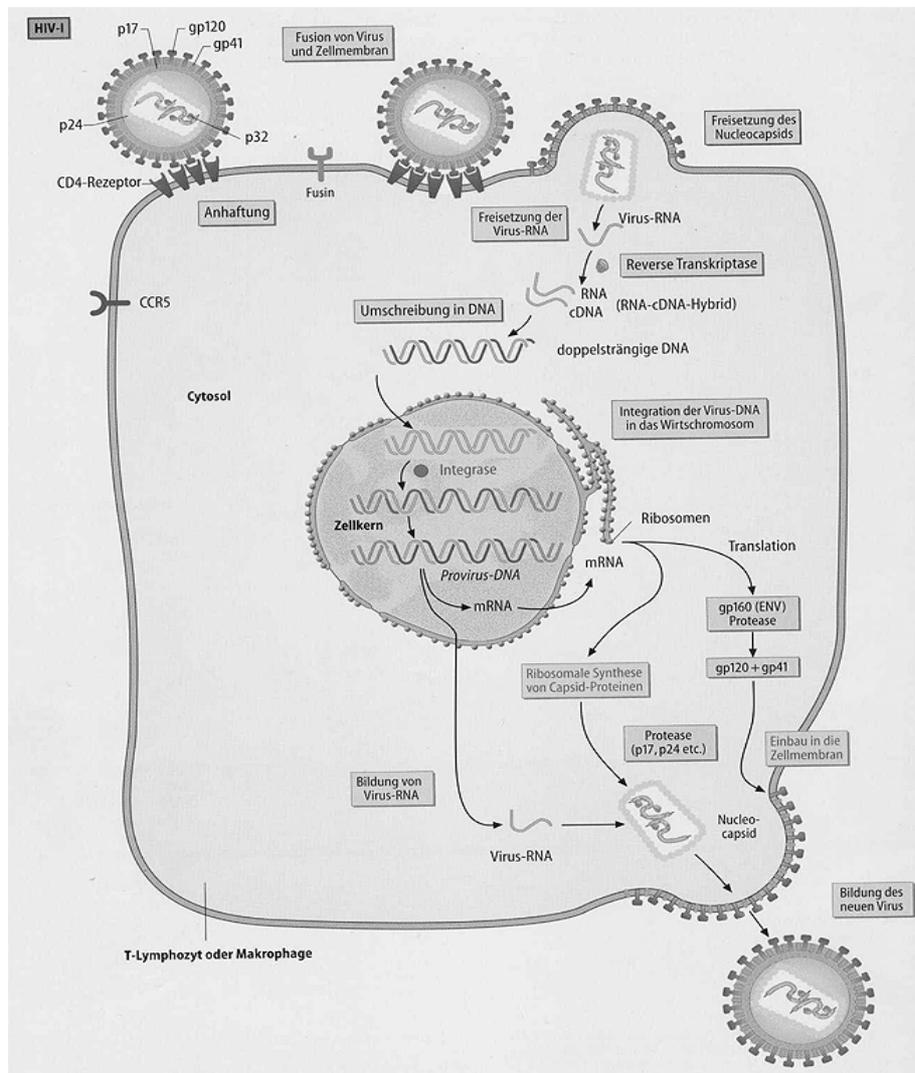
---

<sup>12</sup> Glaxo Wellcome: *HIV/AIDS-Medici* **3/97**, R. W. Conen, K. Mölling, J. Schüpbach, M. Opravil.

<sup>13</sup> R. Liu, *Cell* **1996**, *86*, 3, 367-377.

<sup>14</sup> LTR-(long terminal repeat), Bindungsregion für Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle.

bindet, wird die Transkription der HIV-1-DNA gestartet. Ein drittes Enzym, die HIV Protease, schneidet die dann frisch synthetisierten Proteine in funktionsgerechte Teile.



**Abb. 2.2: Infektionszyklus des HIV-1.** Für die Aufnahme des Virus in die Zelle sind außer dem CD4 Rezeptor zwei Corezeptoren, d.h. der  $\alpha$ -Chemokinrezeptor (CXCR4 oder Fusin) und der  $\beta$ -Chemokinrezeptor (CCR5) erforderlich<sup>15</sup>

Nach der Assoziation der von der Wirtszelle gebildeten viralen Struktur- und Enzymproteine und RNA zu neuen infektiösen Viren erfolgt in der Spätphase die Ausschleusung in den Extrazellulärraum. Dabei tritt das Nucleocapsid im halbfertigen Zustand von innen an die Zellmembran heran, stülpt diese nach außen aus und wird,

<sup>15</sup> Löffler, Petrides, *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, 6. Auflage, 1998, Springer-Verlag, S. 296.

nachdem es vollständig umschlossen ist, von der Zellmembran abgeschnürt. Der neu generierte Virus ist nun befähigt, gesunde Zellen zu infizieren.

Während HIV-1 befallene T4-Lymphocyten nach Wochen bis Monaten sterben, dienen Makrophagen als Virusreservoir, da sie nicht zugrunde gehen. Der zytopathische Effekt von HIV-1 kommt möglicherweise durch die Aktivierung einer Apoptose durch intrazelluläre gp160-CD4-Komplexe zustande. Damit der Pool an infizierten Zellen im Organismus unverändert bleibt, müssen ständig neue CD4-Zellen mit HIV-1 infiziert werden.<sup>16</sup>

## 2.2 Funktion des Virus

Der HIV-1 Virus ist ein komplexer Retrovirus.<sup>17</sup> Den Großteil des Virusgenoms bilden drei Strukturgene: *gag*, *pol* und *env*. Diese werden ergänzt durch diverse Regulatorgene (*tat*, *ref*, *nef*, *vif*, *vpu*, *vpr*), die für die Kontrolle der Virusreplikation wichtig sind (Abb. 2.3). Die viralen Regulatorproteine werden in der frühen Phase, die nach der Infektion ca. 24h dauert, produziert.

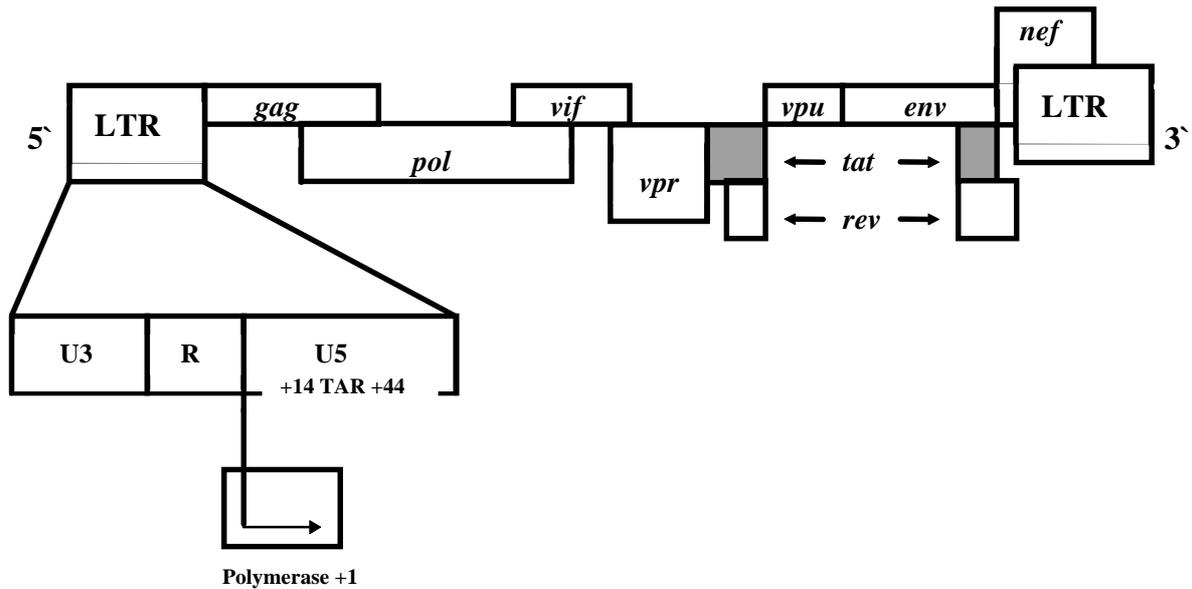
Eines der ersten Virusgene, das transkribiert wird, trägt die Bezeichnung *tat* (*trans*-Aktivator). Bei seiner Translation entsteht das Regulatorprotein Tat. Durch Interaktion des Tat-Peptids an die TAR-Region (für *trans*-Aktivator-Reaktionssequenz) im *long terminal repeat* (LTR), einer strukturellen Einheit an den Enden des Genoms, stabilisiert das Tat-Peptid den Komplex aus DNA, der RNA-Polymerase II und der sich bildenden mRNA. Das 14 kD schwere Protein Tat hat so eine dramatische Wirkung.<sup>18</sup> Unter seinem Einfluß werden die Virus-Gene bis zu tausendmal schneller exprimiert als in HIV-Mutanten, denen das *tat*-Gen fehlt. Eine Stimulation betrifft neben den Genen für Struktur- und Regulatorproteine auch *tat*, was zu einer positiven Rückkopplung führt und somit bei Aktivierung von *tat* eine schnelle Proliferation von Viruspartikeln folgt. Die Wirkung von Tat ist von der kurzen Nucleotidsequenz namens TAR abhängig. Diese liegt in der Untereinheit (U5) der *long terminal repeats* (Abb. 2.3).

---

<sup>16</sup> Löffler, Petrides, *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, 6. Auflage, **1998**, Springer-Verlag, 290-312.

<sup>17</sup> W. A. Haseltine, *FASEB J.* **1991**, 5, 2349-2360.

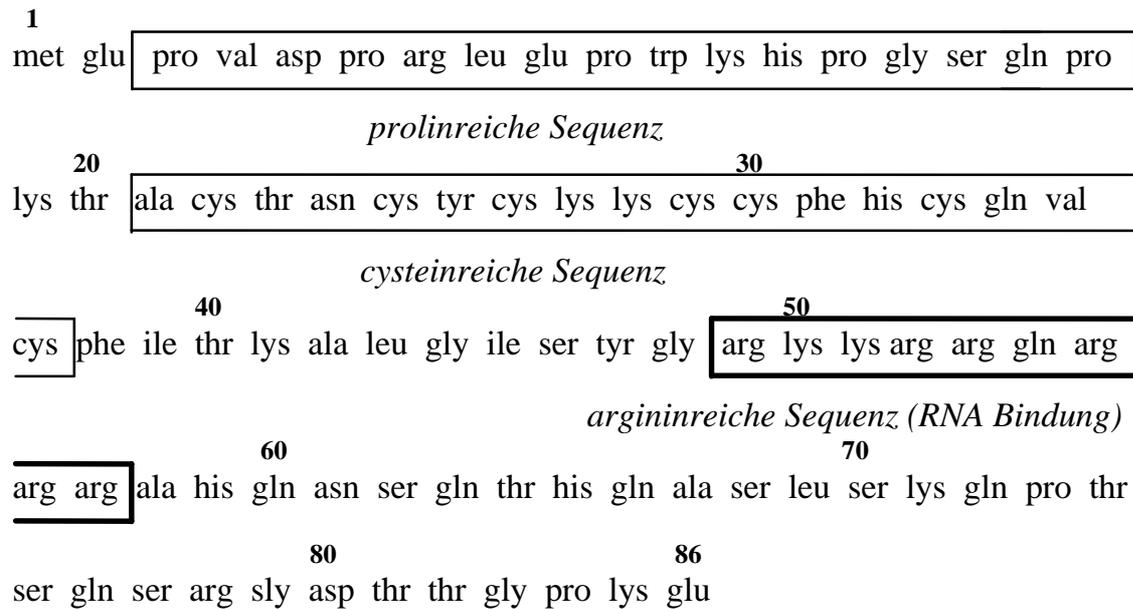
<sup>18</sup> M. Emerman, M. H. Malim, *Science* **1998**, 280, 1880-1884.



**Abb 2.3: Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms<sup>16,19</sup> mit seinen Regulatorgenen *tat*, *rev* und *nef*.** Die Gene für die Strukturproteine und Enzyme sind: *gag* - Nucleocapsid Kernproteine; *pol* - Reverse Transkriptase, Protease, Integrase, Ribonuclease; *env* - virale Hüllproteine, die CD-4 Bindung und Membranfusion vermitteln; *vif* und *vpu* - fördert die Infektiösität bzw. das Ausknospen des Virions, *vpr* - schwacher Aktivator der Transkription, *LTR* - Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle. Wo sich Gene überlappen, belegen sie den selben DNA-Abschnitt, werden aber vom Proteinsyntheseapparat der Zelle unterschiedlich abgelesen.

Das Tat-Protein ist ein 86 Aminosäuren großes Protein (Abb. 2.4). Für eine optimale Interaktion *in vivo* sind die Aminosäuren 1-72 notwendig. Neben einer prolin- und cysteinreichen Sequenz besitzt Tat eine basische Region aus neun Aminosäuren (6 Arg, 2 Lys, 1 Gln), die für die spezifische Bindung an der TAR-RNA zuständig ist.

<sup>19</sup> W. C. Green, *Spektrum der Wissenschaft*, Spezial 2, 1993, 92-100.



**Abb. 2.4: Das Tat Protein mit seinen 86 Aminosäuren.** Es setzt sich aus einer prolinreichen-, cysteinreichen- und einer kurzen basischen Region zusammen. Die Arginin-reiche Sequenz (Region 49-57) ist für die effektive Bindung von Tat an TAR zuständig.

### 2.3 Tat-TAR Erkennung

Ein grundlegender Unterschied zwischen Protein-DNA- und Protein-RNA-Wechselwirkungen besteht darin, daß Proteine RNA-Abschnitte an bestimmten räumlichen Strukturelementen erkennen können, anstatt lediglich die Sequenz zu analysieren.<sup>20</sup>

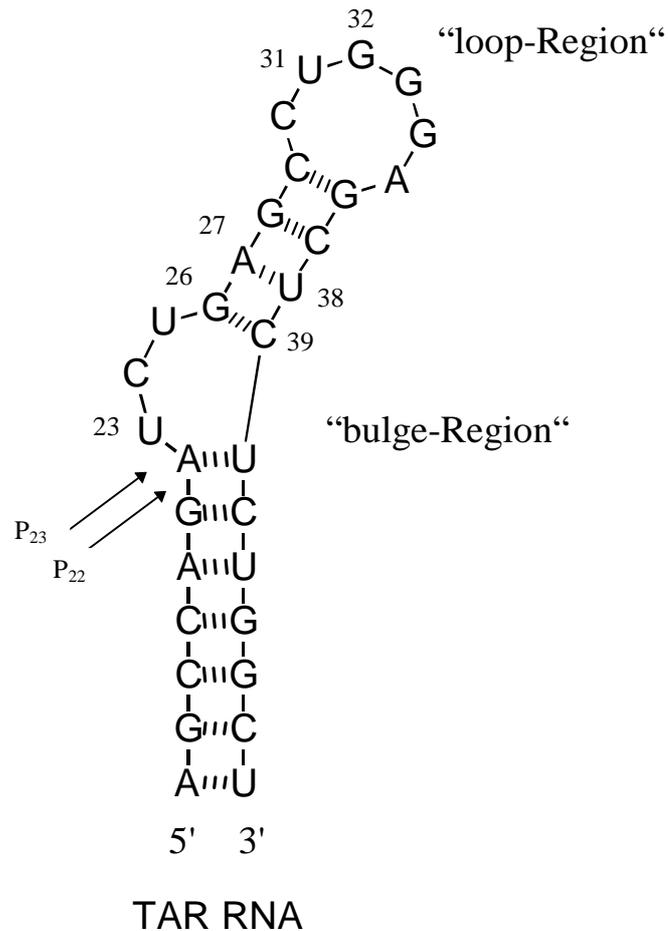
Wichtig für die Erkennung von TAR ist daher ihre räumliche Struktur. Die Tertiärstruktur der TAR-RNA enthält neben einem 59 Nucleotide enthaltendem Stamm aus gepaarten Basen eine drei Nucleotide große Ausbuchtung (*bulge*) und eine sechs Nucleotide lange Schleife (*loop*) (Abb. 2.5).<sup>21</sup>

*In vivo* ist die Region +14 bis +44 der TAR-RNA und somit die Schleife und die Pyrimidin-Ausbuchtung, die beide Stamm-Regionen voneinander trennt, ausschlaggebend für die Transaktivierung.<sup>22</sup>

<sup>20</sup> M. Egli, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 494-497.

<sup>21</sup> E. P. Loret, P. Georgel, W. C. Johnson, P. S. Ho, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, 89, 9734-9738.

<sup>22</sup> C. Dingwall, I. Ernberg, M. J. Gait, S. M. Green, S. Heaphy, J. Karn, A. D. Lowe, M. Singh, M. A. Skinner, *EMBO J.* **1990**, 9, 4145-4153.



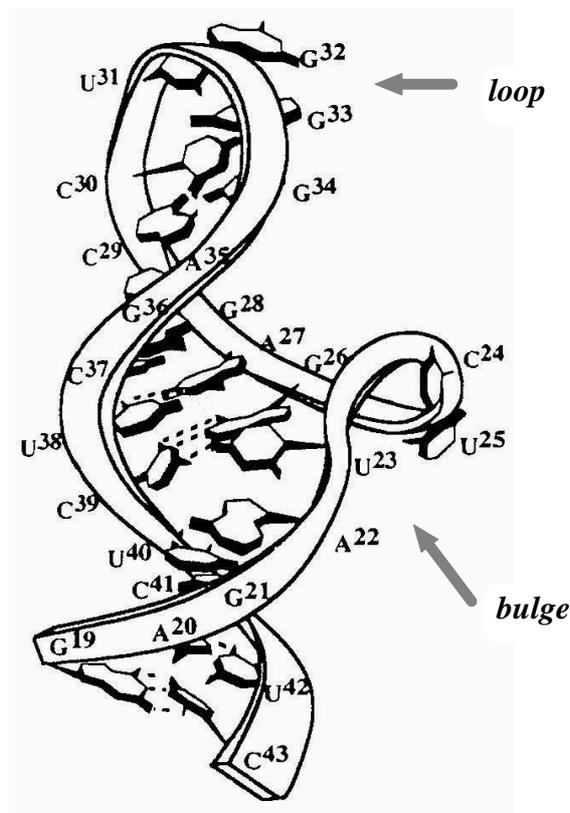
**Abb. 2.5:** Die TAR-RNA mit der *bulge*- und *loop*-Region sowie die für die Erkennung notwendigen Phosphate P22 und P23 und Nucleotide

Einzelne oder mehrere Substitutionen in der *loop*-Region reduzieren die Tat-Aktivierung dramatisch, weshalb dem *loop in vivo* eine essentielle Wirkung zugesprochen wird. Ihre strukturelle Flexibilität *in vitro* spricht für Kontakte mit anderen Regionen von TAR. Zelluläre Cofaktoren, die in der *loop*-Region binden, scheinen bei der Regulation der Transkription mitzuwirken. Einige Proteine, die dort binden, wurden bereits identifiziert (siehe Ende des Kapitels).<sup>23</sup> Die *loop*-Region ist für die Tat-Bindung jedoch nicht essentiell. Dagegen ist eine Bindung ohne *bulge*-Region nicht möglich. Wie wichtig die *bulge*-Einheit für die Aktivierung ist, ergaben Versuche mit TAR Mutanten, die keine

<sup>23</sup> a) R. A. Marciniak, M. A. Gacia-Blanco & P. A. Sharp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 3624-3628.  
b) B. Baker, M. Muckenthaler, E. Vives, A. Blanchard, M. Braddock, W. Nacken, A. J. Kingsman, S. M. Kingsman, *Nucleic Acids Research* **1994**, 22, No 16, 3365-3372.

*bulge*-Region oder Mutationen in dieser vorweisen konnten.<sup>24</sup> Sie zeigten verminderte Affinität von Tat und Peptidfragmenten und somit einen Verlust der viralen Genexpression.<sup>25</sup>

NMR Studien<sup>26</sup> haben gezeigt, daß die *bulge*-Region und die angrenzenden Basenpaare, die von Tat erkannt werden, sich in einer außerordentlich weiten und gut erreichbaren großen Furche (*major groove*) der TAR-RNA befinden. Für Tat wird somit eine perfekte Bindungstasche generiert.



**Abb. 2.6: Modell der TAR-RNA.<sup>27</sup> Die Pfeile zeigen den Zugang zur *bulge*- (U<sub>23</sub>CU) und *loop*-Region (C<sub>30</sub>UGGGA) an**

<sup>24</sup> M. J. Churcher, C. Lamont, F. Hamy, C. Dingwall, S. M. Green, A. D. Lowe, P. J. G. Butler, M. J. Gait, J. Karn, *J. Mol. Biol.* **1993**, 230, 90-110.

<sup>25</sup> a) K. M. Weeks, D. M. Crothers, *Cell* **1991**, 66, 577.

b) K. M. Weeks, C. Ampe, S. C. Schultz, T. A. Seitz, D. M. Crothers, *Science* **1990**, 249, 1281-1285.

<sup>26</sup> a) L. Dassaonneville, F. Hamy, P. Colson, C. Houssier, C. Bailly, *Nucleic Acids Research* **1997**, 25, 22, 4487-4492;

b) F. Hamy, U. Asseline, J. Grasby, S. Iwai, C. Pritchard, G. Slim, P. J. G. Butler, J. Karn, M. J. Gait, *J. Mol. Biol.* **1993**, 230, 111-123;

c) F. Aboul-ela, J. Karn, G. Varani, *J. Mol. Biol.* **1995**, 253, 313-332.

<sup>27</sup> E. P. Loret, P. Georgel, W. C. Johnson, P. S. Ho, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 9734-9738.

Untersuchungen von Frankel<sup>28</sup> und anderen Arbeitskreisen<sup>22b,24b,29</sup> haben gezeigt, daß innerhalb der Arginin-reichen Sequenz des Tat-Peptides (Abb. 2.4) lediglich ein Arginin in Position 52 essentiell für die Erkennung der TAR-RNA ist. Eine leicht verminderte *in vivo*-Aktivität kommt der Arginin-Einheit in der Position 53 zu.

Zu dieser Erkenntnis kamen Frankel *et al.*, als sie Versuche mit der basischen Arginin-reichen Sequenz von neun Aminosäuren durchführten. Durch Messungen der Transaktivierung von Neunmer-Peptiden aus Lysin und Arginin und systematisch ausgetauschten Variationen dieser wurde auf die effektivste Bindung des Peptid-TAR-Komplexes geschlossen.<sup>30</sup> Arginin stellte sich durch seine positive Ladung der Guanidiniumgruppe, der planaren Wasserstoffbrückenbindungen, die denen der Nucleotid-Basen stark ähneln, und seinem  $\pi$ -System, das sich für Interaktionen mit den Basen gut eignet, als ideales RNA-Bindungsmolekül heraus. Lysin und Glutamin erwiesen sich daher als nicht essentiell. Weiter konnte Frankel durch Ethylierung der Phosphate zeigen, daß zwei spezifische Phosphate in der *bulge*-Region mit dem Arg 52 eine bestimmte Konformation eingehen.

An der Bindung von Tat sind die Basen Uridin 23, Guanidin 26 und Adenosin 27 beteiligt, sowie die Phosphate P22 und P23, die für eine Chelatisierung der Guanidinium-Seitenkette besonders geeignet sind. Während Arginin 52 bindet, ändert die *bulge* ihre Konformation und U23, A27 und U38 bilden eine Basentriple-Interaktion.<sup>27b,31</sup> Diese Konformationsänderung bewirkt eine Stabilisierung der Arginin-Wasserstoffbrückenbindungen zu G26 und den beiden Phosphaten (*arginine fork*) (Abb. 2.7).

---

<sup>28</sup> a) B. J. Calnan, B. Tidor, S. Biancalana, D. Hudson, A. D. Frankel, *Science* **1991**, 252, 1167-1171;

b) J. D. Puglisi, R. Tan, B. J. Calnan, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Science* **1992**, 257, 76-80;

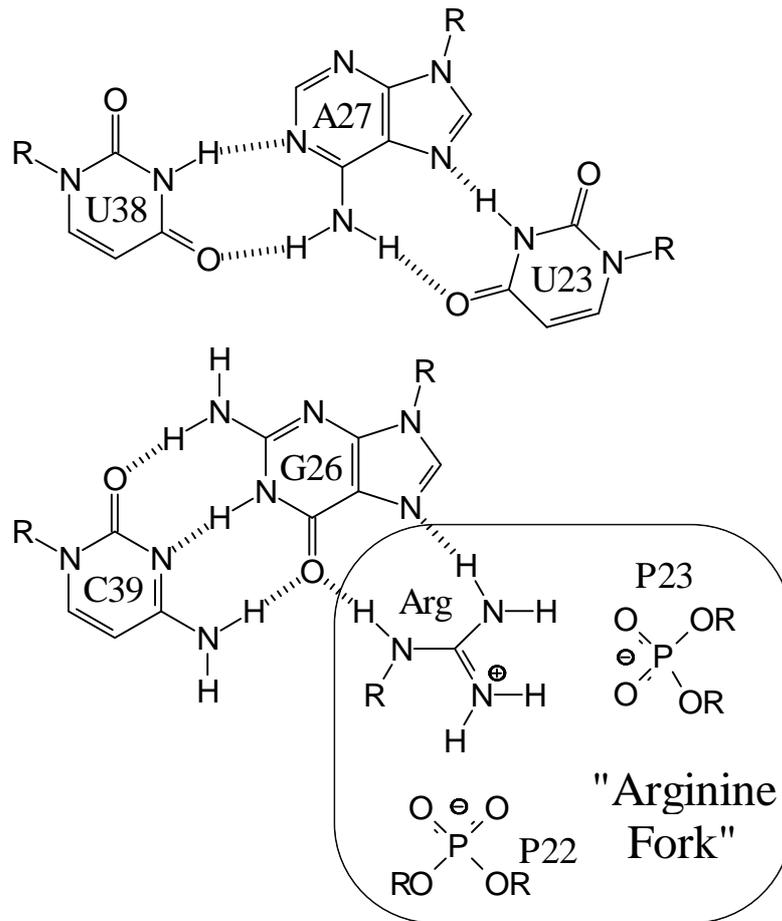
c) J. Tao, A. D. Frankel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 1571-1575.

<sup>29</sup> a) Tuerk, S. MacDougal-Waugh, *Gene* **1993**, 137, 33-39;

b) J. Kjems, B. J. Calnan, A. D. Frankel, P. A. Sharp, *EMBO J.* **1992**, 11, 1119-1129.

<sup>30</sup> K. S. Long, D. M. Crothers, *Biochemistry* **1995**, 34, 8885-8895.

<sup>31</sup> C. S. Chow, F. M. Bogdan, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1489-1513.



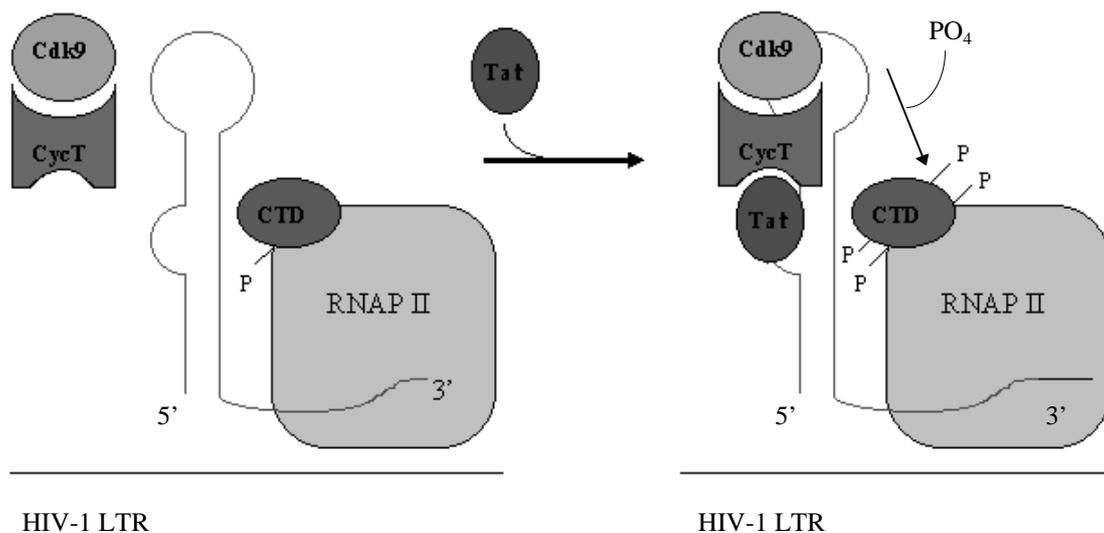
**Abb. 2.7:** Schematische Repräsentation des vorgeschlagenen Basentriplets zwischen U23 und A27-U38 der TAR-RNA und der Interaktion der Guanidiniumseitenkette des Argininamids mit G26 und den Phosphaten 22 und 23

Welche zellulären Faktoren bei der Stabilisierung des Tat-TAR-Komplexes eine Rolle spielen, zeigten M. Emerman und M. H. Malim.<sup>18</sup> Sie entdeckten weitere Protein-Kinasen, deren Existenz bewies, daß Tat nicht allein für die Stabilisierung des Komplexes Tat-TAR-Polymerase II und damit resultierend die naszierende mRNA zuständig ist.

Ein zellulärer Protein-Kinase-Komplex namens TAK (*Tat-associated kinase*) bindet spezifisch die Aktivierungsdomäne von Tat und kann die COOH-Endregion (CTD) der RNA-Polymerase II phosphorylieren und somit aktivieren. Dieser Komplex steigert vor allem die Spezifität und Affinität von Tat zu TAR. Er setzt sich aus Cdk9 (*cyclin-dependent kinases*) und dem Protein Cyclin T (CycT) zusammen, wobei die Bindung an

der Aktivierungsseite von Tat über CycT erfolgt. Das über das CycT gebundene Cdk9 hyperphosphoryliert die CTD-Einheit, die wiederum die Transkription der viralen naszierenden mRNA stimuliert (Abb. 2.8).

Diese Annahme des zellulären Protein-Kinase-Komplexes würde letztlich erklären, weshalb die *loop*-Region *in vivo* an der Aktivierung des Tat-TAR-Komplexes beteiligt ist.



**Abb. 2.8: Vereinfachtes Modell der Tat-Interaktion.** Links: RNA Polymerase II Holoenzym-Komplex (RNAP II); durch Abwesenheit von Tat kommt es zur Hypophosphorelierung der CTD des RNAP II; keine Aktivierung. Rechts: Das Tat-Protein im Komplex mit CycT und Cdk9 bindet an TAR nahe am RNAP II. Cdk9 hyperphosphoreliert die CTD, was wiederum die Transkription der naszierenden viralen mRNA stimuliert.

## 2.4 Therapie

Trotz der bedeutenden Erfolge der antiretroviralen Kombinationstherapie ist die derzeitige medikamentöse Behandlung der HIV-Infektion noch mit einer Reihe von Problemen assoziiert. Die Therapie ist teuer, der Einnahmemodus der Medikamente oft belastend und mit schweren Nebenwirkungen verbunden. Häufig ist auch ein durch diese Umstände mit begünstigtes mangelhaftes Einnahmeverhalten (“Compliance“) der Patienten zu beobachten. Durch die Selektion von resistenten Virusvarianten wird der Therapieerfolg häufig wieder gefährdet. Eine Eradizierung von HIV durch die derzeitigen Therapien erscheint angesichts der Fähigkeit von HIV zur Latenz in längerlebigen Zellen

unrealistisch. Daher werden zusätzlich zur medikamentösen Therapie neue immunologische Therapiestrategien dringend benötigt, um eine bessere langfristige Kontrolle der HIV-Infektion durch das Immunsystem zu erreichen.<sup>32</sup>

Hier sollte noch die fehlerhafte Arbeit der reversen Transkriptase erwähnt werden, die aufgrund des Fehlens eines Reparaturenzyms nicht kompensiert werden kann. Es wird vermutet, daß pro Synthese eines Virusgenoms eine Mutation auftritt, die auch die genetische Information für das Enzym reverse Transkriptase betreffen kann. Diese hohe Mutationsrate führt dazu, daß bei HIV-infizierten Patienten ständig neue Virusmutanten entstehen. Dies ist auch ein weiterer Grund, weshalb die HIV-1-Infektion bisher nicht effektiv behandelt werden kann.

Mittlerweile stehen jedoch ein Dutzend wirksamer Medikamente für die HIV-Therapie zur Verfügung. Zusätzlich befinden sich 15 Substanzen in der Forschung, wovon fünf völlig neue Wirkmechanismen aufweisen. Sie lassen sich in drei pharmakologisch unterschiedliche Gruppen einteilen: 1. die **Nucleosid-Analoga** (Reverse Transkriptase-Inhibitoren, RTI) wie z.B. Zidovudin (AZT), Zalcitabin (ddC), Didanosin (ddI), Stavudin (d4T); 2. die **Protease-Inhibitoren** (PI), Saquinavir, Indinavir, Ritonavir, Nelfinavir und 3. die **Nicht-Nucleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren** (NNRTI), Delavirdrin, Nevirapin, Lovirid u.a.<sup>33</sup>

Die Substanzen haben unterschiedliche Angriffspunkte. Die RTI und NNRTI wirken über eine Hemmung der reversen Transkriptase. Ihre Wirkmechanismen sind jedoch unterschiedlich. Erstere müssen nach der Aufnahme zum Triphosphat phosphoryliert werden, und die entstehenden Triphosphate konkurrieren mit den Wirtszelltriphosphaten um die Bindung an der reversen Transkriptase. Der Einbau der Metaboliten führt zu einem vorzeitigen Kettenabbruch. Die NNRTI hingegen hemmen die Aktivität der reversen Transkriptase durch eine nichtkompetitive Bindung. Protease-Inhibitoren wirken über eine Hemmung der HIV-Protease, deren Aufgabe es ist, die Polyproteine, die während der Replikation durch das Ablesen des Virusgenoms entstehen, in die funktionsfähigen Endprodukte zu spalten. Dieser Vorgang läuft vermutlich während oder kurz nach dem

---

<sup>32</sup> *Bulletin 1 1999*, Retrovirus, Institut für Klinische und Molekulare Virologie der Universität Erlangen-Nürnberg.

<sup>33</sup> a) F. Hamy, V. Brondani, A. Flörsheimer, W. Stark, M. J. J. Blommers, T. Klimkeit, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5086-5095;

b) Internetadresse über Therapiemöglichkeiten: <http://www.du.nw.schule.de/geds/hiv/therapie.htm>.

Ausknospen des Virus von der Wirtszellmembran ab. Anders als die Reverse-Transkriptase-Hemmer unterdrücken Protease-Inhibitoren daher den viralen Reifungsprozeß auch in bereits infizierten Zellen. Unter dem Einfluß von Protease-Inhibitoren können nur unreife, nicht infektiöse Virushüllen exprimiert werden.

Antiretrovirale Medikamente müssen miteinander kombiniert werden, weil nur auf diese Weise die Resistenzentwicklung von HIV verhindert bzw. hinausgezögert werden kann. Die meisten Kombinationen wirken additiv, und nur von wenigen ist bekannt, daß sie antagonistisch wirken (wie AZT + D4T).

## 2.5 Therapeutische Ansätze

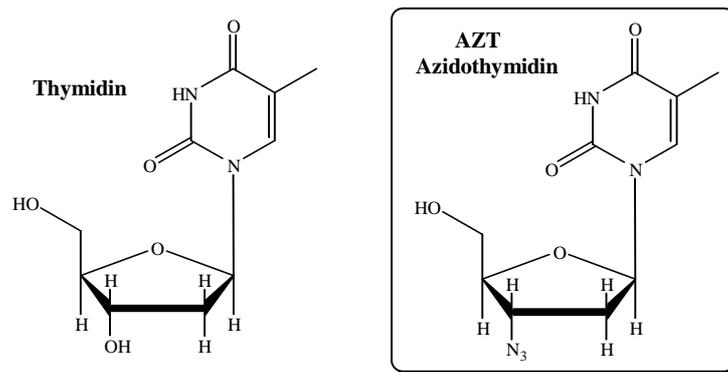
Die Kenntnis der genauen Biologie des Virus ermöglicht die gezielte Entwicklung therapeutischer Strategien zur Hemmung der Virusvermehrung, wodurch auch die bereits genannten Therapeutika entdeckt wurden. Sechs charakteristische Schritte kennzeichnen die relativ komplexe HIV-Vermehrung und damit die Chance zu einer effektiven Virusbekämpfung. Jeder dieser sechs Schritte bietet bestimmte Ansatzmöglichkeiten, wobei teilweise erst Anfangserfolge existieren.

1. **Andocken:** Nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip legt sich der HI-Virus mit seinen Glykoproteinen an die Rezeptoren der CD4-Zellen. Das Andocken kann durch die Blockade der Corezeptoren verhindert werden. Aus der Entdeckung der Corezeptoren ergeben sich Implikationen für die Entwicklung neuer Therapeutika. Bekanntlich sind modifizierte Chemokine in der Lage, HIV kompetitiv von einem spezifischen Corezeptor zu verdrängen. Allerdings läßt die wachsende Zahl von neu entdeckten Corezeptoren vermuten, daß durch die Blockade von bestimmten Rezeptoren HIV auf andere Corezeptoren ausweichen könnte. Verschiedenen Arbeitsgruppen<sup>8,11b,34</sup> gelang es, CXCR4 *in vitro* durch den natürlichen Liganden SDF-1 und CCR5 mittels der Liganden MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES zu blockieren. Der modifizierte chemokine Rezeptor Antagonist AOP-RANTES wurde bereits erfolgreich *in vitro* für die Blockade von CCR5 verwendet.

---

<sup>34</sup> G. Simmons, P. R. Clapham, L. Picard, R. E. Offord, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, R. Buser, T. N. C. Wells, A. E. I. Proudfoot, *Science* **1997**, 276, 276-279.

2. **Eindringen:** Nach dem Eindringen in die Wirtszelle, also in den T-Lymphozyten, verliert das Virus seine Hülle und seine Kernmembran. Für diesen Vorgang (uncoating) gibt es bisher noch keinen wirksamen therapeutischen Ansatz.
3. **Reverse-Transkriptase-Inhibitoren:** Das Umschreiben der viralen RNA in DNA geschieht mit Hilfe der bereits erwähnten reversen Transkriptase. Viele der bisher erfolgversprechenden Substanzen setzen bei diesem Replikationsschritt an. Dies geschieht dadurch, daß in die neu entstehende DNA, die aus Nucleosiden aufgebaut wird, sogenannte Nucleosidanaloga eingebaut werden, denen aber bestimmte biochemische Eigenschaften fehlen (Abb. 2.9, Austausch der 3'OH-Gruppe gegen N<sub>3</sub>), um die Synthese der DNA mit Hilfe der reversen Transkriptase fortzuführen.



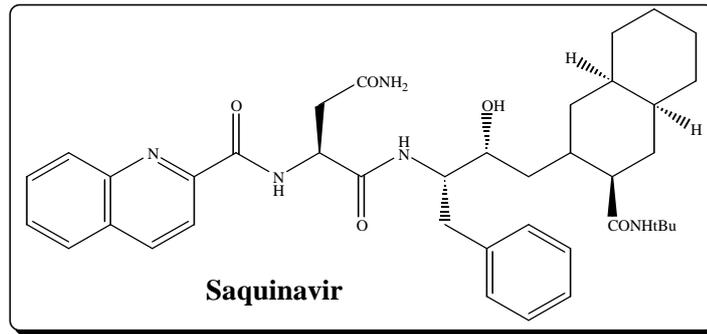
**Abb. 2.9: Nucleosidischer Inhibitor der HIV-reversen Transkriptase (rechts)**

Die häufigsten verwendeten Nucleosidanaloga sind wie oben schon erwähnt AZT, ddC, ddt, d4T und 3TC.<sup>35</sup> AZT war das erste in den USA zugelassene Medikament. Entscheidend für seine Wirkung ist die Ähnlichkeit mit dem Nucleosid Thymidin (Abb. 2.9).

**4. Protease-Inhibitoren:** Unter Protease-Inhibitoren können nur unreife, nicht infektiöse Virushüllen produziert werden. Die bereits oben genannten Substanzen Saquinavir, Ritonavir etc.<sup>34</sup> sind zur Zeit verbreitet. Die Kristallstruktur zeigt, daß die HIV-1 Protease als C<sub>2</sub>-symmetrisches Dimer vorliegt. Dieses bietet nicht nur der Industrie sondern auch vielen universitären Arbeitskreisen<sup>36</sup> einen guten Zugang zu Protease-Inhibitoren.

<sup>35</sup> <http://www.medicine-worldwide.de/infektionskrankheiten/aids.html>.

<sup>36</sup> M. Alterman, M. Björnsne, A. Mühlman, B. Classon, I. Kvarnström, H. Danielson, P-O. Markgren, U.



**Abb. 2.10: Saquinavir, ein HIV-1 Protease Inhibitor. Im Handel seit 1996**

**5. Transkription und Translation:** Dies sind weitere Verarbeitungsschritte der viralen DNA in der Wirtszelle. Eventuell wirkt die Substanz Ribavarin auf diese Syntheseschritte ein.<sup>34</sup>

**6. Assembling und Budding:** Darunter versteht man das Zusammenfügen der einzelnen Proteine zum kompletten Virus und das nachfolgende Ausschleusen der Viruspartikel aus der Wirtszelle. Es existiert noch kein effektiver therapeutischer Ansatz.

## 2.6 Zusammenfassung, Strategien der therapeutischen Impfung

Ideale antivirale Substanzen müssen neben ihrer grundsätzlich hemmenden Wirkung auf die HIV-Replikation die Virusvermehrung vollkommen unterdrücken, damit jegliche Resistenz vermieden wird. Weiter sollten sie die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, da HIV neben Lymphozyten auch Nervenzellen befällt. Orale Verfügbarkeit, geringe Toxizität und möglichst wenige Nebenwirkungen sollten dem Patienten die Therapie der Krankheit so verträglich wie möglich machen. Die beste Vorbeugung gegen AIDS wäre sicherlich ein Impfstoff, der den Erreger erst gar nicht im Organismus Fuß fassen ließe. Kein Präparat erfüllt bisher diese Forderungen und keiner der zur Prävention gedachten Impfstoffe hat bislang die klinische Prüfung der Phase III erreicht. Die neueren Entwicklungen von Kombinationstherapien stellen jedoch einen deutlichen Fortschritt dar.

## 2.7 Ein alternativer therapeutischer Angriffspunkt als Ansatzpunkt dieser Arbeit

Die Regulatorproteine des HI-Virus, insbesondere das Tat-Protein, sind für die enorme Intensivierung der Genexpression zuständig. Ein möglicher Ansatzpunkt für die Entwicklung eines Therapeutikums liegt in der gezielten Unterdrückung der Interaktion des Regulatorproteins Tat mit der TAR-RNA.

Die grundlegende Idee ist, die Arginin-reiche Sequenz des Tat-Peptides, die zur spezifischen Erkennung der TAR-RNA notwendig ist, zu synthetisieren und daran eine hydrolytisch aktive Einheit zu koppeln. Ziel der synthetischen Ribonuclease sollte nach der selektiven Erkennung, die Interaktion zwischen Peptid und RNA und die anschließende effektive Spaltung der RNA sein. Ferner dient die Arginin-reiche Sequenz des Tat-Proteins als "shuttle"-Molekül, da es sich auszeichnet für den Transport von Tat-Protein-Konjugaten in den Zellkern eignet.<sup>37</sup> Die Erkennungssequenz ist variabel, so daß auch andere Peptide, *Antisense*-Oligonucleotide oder Intercalatoren an die hydrolytische Einheit gekoppelt werden und somit ein anderes Ziel anvisieren können.

Wie bereits erwähnt, erweist sich die Arginin-reiche Sequenz als notwendig aber auch ausreichend für die Erkennung und Wechselwirkung mit der TAR-Region. Für die Verwirklichung einer befriedigenden Selektivität, die eine Ribonuclease auszeichnen sollte, ist nach Karn *et al.* eine Bindungskonstante im Bereich von  $K = 10-100$  nM erforderlich.<sup>38</sup> Tat und auch kürzere Peptide, die die basische Sequenz (Tat<sub>49-57</sub>) beinhalten, gelangen durch nicht spezifische Endocytose erst in das Cytoplasma der Zelle und dann mittels zelleigener Transportmoleküle in den Zellkern. Die bemerkenswerte Membrangängigkeit der basischen Tat-Region in Abwesenheit der Cystein-reichen (Tat<sub>22-36</sub>) und der Carboxylat-terminalen Region (Tat<sub>73-86</sub>) läßt sie als einen aussichtsreichen Kandidaten für den Transport von hydrolytischen Einheiten erscheinen.<sup>39</sup>

---

<sup>37</sup> a) A. Frankel, C. Pabo, *PCT Patent Appl.* **1991**, WO 9109958 (Appl. 454450, Filed 21 Dec. 1989);

b) I. G. Barsoum, S. E. Fawell, R. B. Pepinsky, *PCT Patent Appl.* **1994**, WO 9404686 (Appl. US 07/934375, Filed 21 Aug. 1992).

<sup>38</sup> M. J. Churcher, C. Lamont, F. Hamy, C. Dingwall, S. M. Green, A. D. Lowe, P. J. G. Butler, M. J. Gait, J. Karn, *J. Mol. Biol.* **1993**, *230*, 90-110.

<sup>39</sup> D. A. Mann, A. D. Frankel, *EMBO J.* **1991**, *10*, 1733-1739.

## 2.8 Hydrolytische Spaltung von RNA

Bevor nun das Design und die Synthese künstlicher Ribonucleasen angegangen wird, ist es von großer Wichtigkeit, sich die Hydrolyse der Phosphodiester in der Natur anzuschauen.

### 2.8.1 Enzymatische Hydrolyse von Nucleinsäuren

Es existiert eine Vielzahl unterschiedlichster Enzyme, die Nucleinsäuren hydrolysieren können. Neben Restriktionsendonucleasen, die sequenzspezifisch nach einer bestimmten Basenkombination schneiden, arbeiten manche Nucleasen unabhängig von der Sequenzinformation. RNase A (Verdauungsenzym im Sekret des Pankreas) ist eines der bestuntersuchten Enzyme, die RNA zwar basenselektiv, aber sequenzunspezifisch hydrolysieren. Abb. 2.11 gibt den Wirkmechanismus der durch Ribonuclease A<sup>2</sup> katalysierten Hydrolyse von RNA wieder.

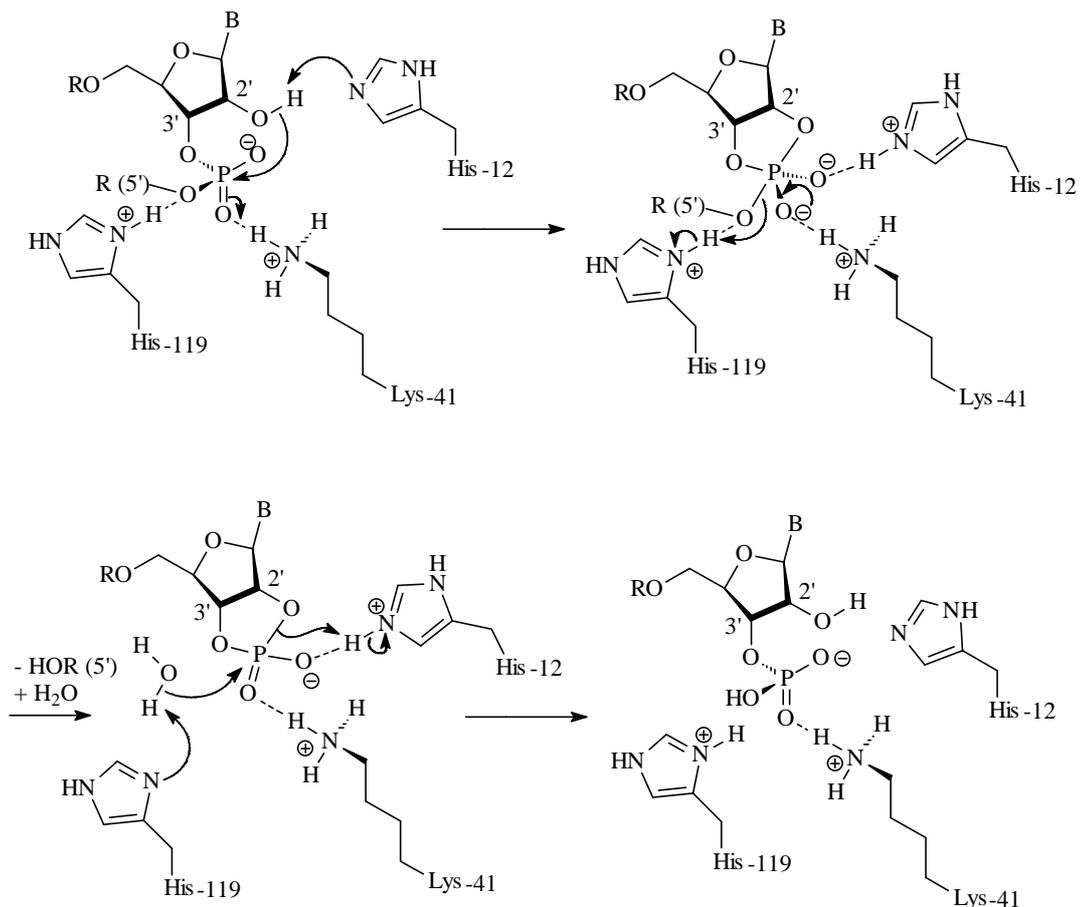


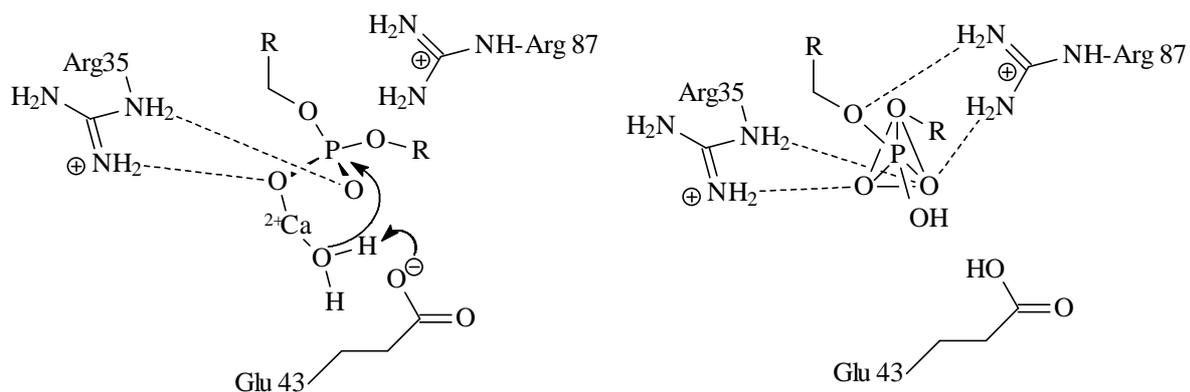
Abb. 2.11: Mechanismus der Hydrolyse von RNA durch die Ribonuclease A

Im aktiven Zentrum befinden sich zwei Histidinreste und ein Lysinrest, die so angeordnet sind, daß His-12 als Base die 2'-Hydroxygruppe der Ribose deprotonieren kann. Das nun protonierte His-12 wirkt zusammen mit der Ammoniumfunktion der Seitenkette von Lys-41 als elektrophiler Katalysator. Durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Sauerstoffatomen des Phosphodiesters und den beiden Kationen wird die Elektronendichte am Phosphatzentrum reduziert. Dies erhöht seine Elektrophilie und erleichtert den Angriff des 2'-Sauerstoff-Anions. Der Austritt der 5'-Hydroxygruppe wird durch Protonierung mittels His-119 erleichtert. Anschließend wird das zunächst entstandene Cyclophosphat durch nucleophilen Angriff eines durch His-119 aktivierten Wassermoleküls unter selektivem Austritt der 2'-Hydroxygruppe geöffnet.

Beim zweiten Schritt der Reaktion, der Hydrolyse des cyclischen Phosphat-Zwischenprodukts, werden vereinfacht betrachtet die Vorgänge des ersten Schrittes in umgekehrter Abfolge durchlaufen.

Ein Unterschied besteht darin, daß Wasser die abgespaltene 5'-O-Komponente ersetzt. Das Histidin 12 dient jetzt als Protonendonator und das Histidin 119 als Protonenakzeptor. Die Fähigkeit des Histidins, bei physiologischen pH-Werten als Säure oder als Base zu fungieren, erklärt sein Vorkommen in den aktiven Zentren vieler Enzyme.

Basenunspezifisch ist die Staphylokokkennuclease.<sup>40</sup> Sie kann durch Verwendung eines externen Nucleophils RNA und DNA-Moleküle an der 5'-Position spalten.<sup>20</sup>



**Abb. 2.12: Mechanismus der DNA-Hydrolyse durch die Staphylokokkennuclease**

<sup>40</sup> F. A. Cotton, E. E. Hazen, M. J. Legg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, 76, 2551-2555.

Im aktiven Zentrum der Staphylokokkennuclease befindet sich ein Calcium-Ion, das durch zwei Asparaginsäurereste in Position gehalten wird. Zusammen mit den Guanidiniumfunktionen der Argininreste 35 und 87 sorgt es für eine Kompensation der negativen Ladungen im Übergangszustand. Ein in unmittelbarer Nähe befindliches Wassermolekül wird durch den Glutaminsäurerest 43 zunächst deprotoniert und kann dann nucleophil angreifen.

Kernpunkt beider Katalysen (RNase A und Staphylokokkennuclease) ist die Kompensation der negativen Ladung des Phosphodiesters. Im Übergangszustand wird diese Notwendigkeit besonders auffällig. Der Additions-Eliminierungsprozeß gipfelt in einer trigonal-bipyramidalen Ligandenanordnung an das Phosphorzentrum. Die eintretende 2'-Hydroxygruppe nimmt nach dem nucleophilen Angriff am Phosphoratom eine axiale Position ein, wobei der Angriff *in line* (Abb. 2.13) zur 5'-Fluchtgruppe erfolgt. Das Phosphoran zerfällt unter Ausstoßung der in apikaler Position stehenden Fluchtgruppe R-5'-OH. Arginin 87 übernimmt mit seiner Guanidiniumgruppe die Stabilisierung des dianionischen Phosphorans durch ionische Wechselwirkung.

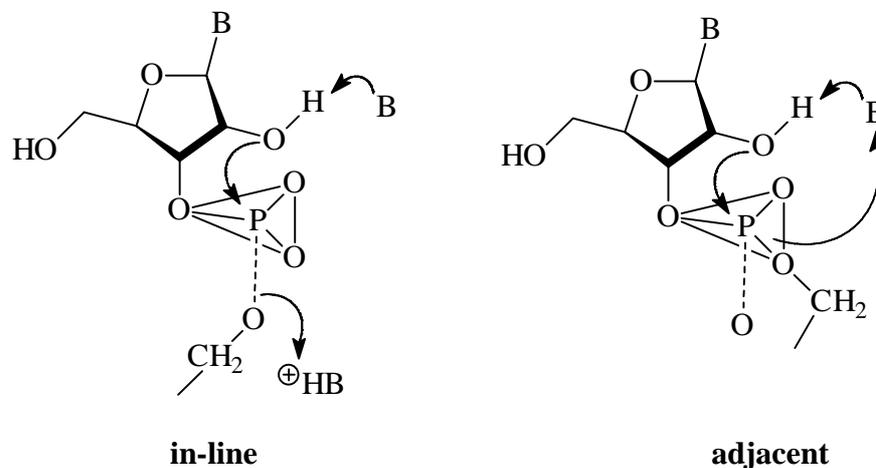
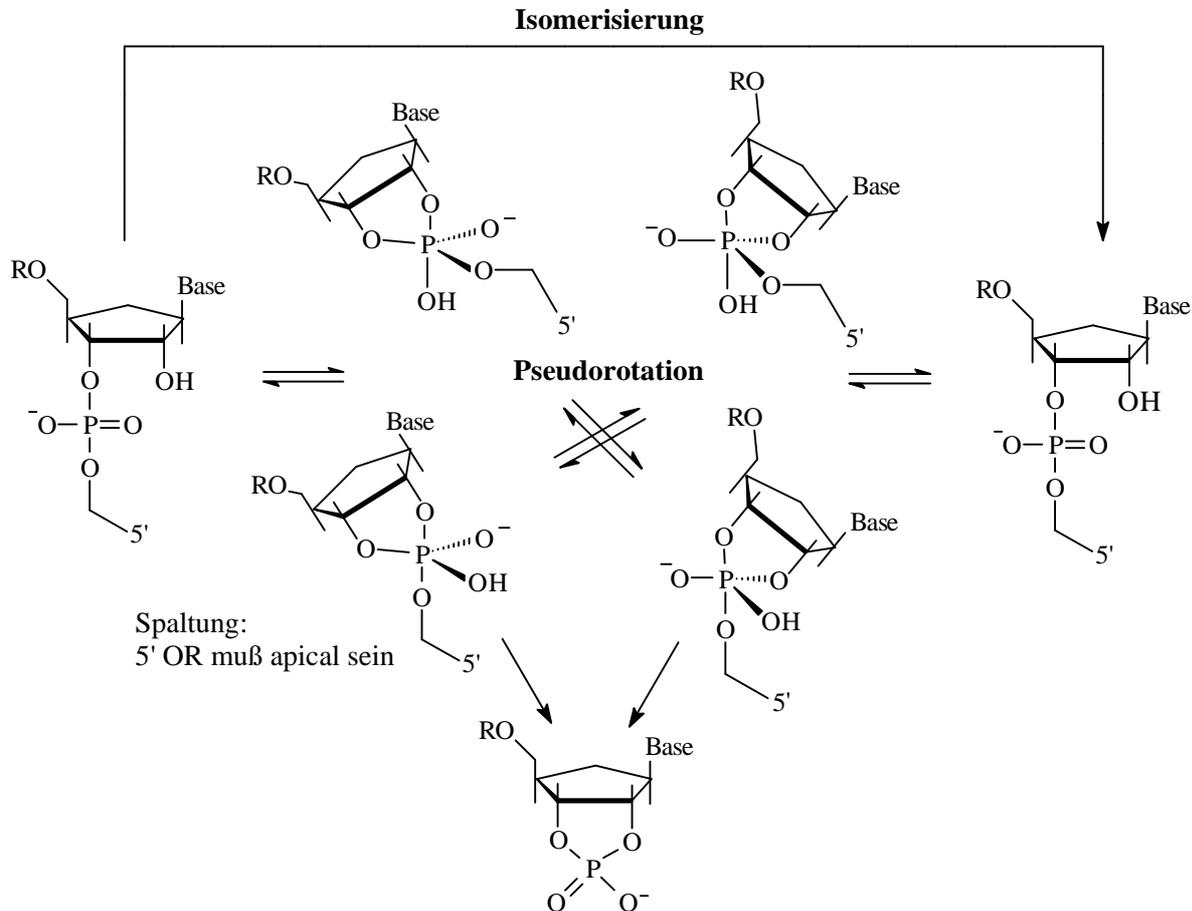


Abb. 2.13: Bevorzugter *in-line*-Mechanismus bei der Umesterung<sup>41</sup>

Im Prinzip können sowohl die 5'-O-Gruppe (Spaltung des Phosphodiester-Rückgrates) als auch die 3'-Hydroxygruppe (Isomerisierung) als Abgangsgruppe dienen, sobald sie durch Pseudorotation um das P-Atom eine axiale Position eingenommen haben. Im Fall der

<sup>41</sup> C. Walsh, *Enzymatic Reaction Mechanisms*, W. H. Freeman and Company, 1979, 205.

Umesterung von RNA ist die Pseudorotation der Liganden jedoch eingeschränkt, da die Konformation des Phosphodiesters im doppelsträngigen Substrat fixiert ist.



**Abb. 2.14: Einschlagen des Spaltungsweges über Pseudorotation und Isomerisierung**

Die Phosphodiesterspaltung kann also nur dann erfolgreich verlaufen, wenn das 2'-O-Atom der 5'-O-Gruppe während der Reaktion gegenüber angeordnet ist (*in-line*-Mechanismus). Konzentriert man sich auf die Hydrolyse von RNA, so ist eine solche Anordnung nur im Einzelstrang möglich. Die Konformation der Zuckerreste im Doppelstrang ist dafür nicht geeignet, sofern es sich um 3'-5'-verknüpfte Nucleotide handelt. Daß 2'-5'-verknüpfte Ribonucleotide im Doppelstrang hydrolyselabil sind, konnten Usher und McHale<sup>42</sup> zeigen. So werden Nucleotide, die sich in einer *bulge*- oder *loop*-Region befinden aufgrund ihrer Konformation schneller hydrolysiert, als doppelsträngig angeordnete Nucleinsäuren.

<sup>42</sup> D. A. Usher, A. H. Mc Hale, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, 73, 1149-1153.

### 2.8.2 Künstliche Nucleasen

Die mechanistischen Gemeinsamkeiten der Ribonucleasen beschränken sich nicht nur auf die oben genannten Beispiele. Vielmehr positionieren und aktivieren alle Nucleasen ihre Phosphodiestersubstrate durch basische Aminosäuren wie z.B. Lysin (RNase) oder Arginin (Staphylokokkennuclease), zweiwertige Metall-Ionen (meistens  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  oder  $Zn^{2+}$ ) oder eine Kombination aus beiden Möglichkeiten (alkalische Phosphatase). Als externe Nucleophile dienen oft Wassermoleküle, aber auch Aminosäureseitenketten von Serin (alkalische Phosphatase) oder Tyrosin (Topoisomerasen).

Seitdem die Röntgenstrukturen der RNase A<sup>43</sup> und der Staphylokokkennuclease<sup>40</sup> bekannt waren, entstanden durch verschiedene Studien gefestigte Vorstellungen, wie synthetische Ribonucleasen beschaffen sein sollten. Wichtig ist die Auswahl und Präorganisation funktioneller Gruppen. So dienen z.B. die Guanidiniumgruppen zur Kompensation der negativen Ladung an den nichtverbrückenden Sauerstoffliganden des Phosphodiesters im Übergangszustand und erleichtern durch elektrophile Katalyse die Reaktion. Unter Berücksichtigung der Anordnung der drei Aminosäuren His-12, His-119 und Lys-31 im katalytischen Zentrum der RNase A, konnten Stein *et al.*<sup>44</sup> eine künstliche Ribonuclease konstruieren. Sie hydrolysierten erfolgreich einzelsträngige Regionen von tRNA.

In Anlehnung an das aktive Zentrum der Staphylokokken-Nuclease konnte im Arbeitskreis<sup>45</sup> unter Verwendung synthetischer steroidalster Guanidinium-Imidazol-Konjugate erfolgreich eine neuartige hydrolytische Einheit zur Spaltung von RNA entwickelt werden (Abb. 2.15).

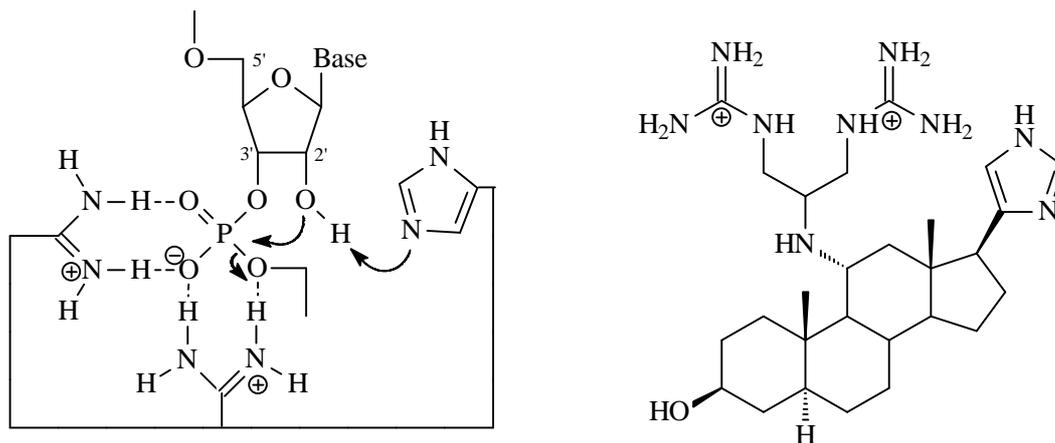
---

<sup>43</sup> B. Borah, C. W. Chen, W. Egan, M. Miller, A. Wlodawer, J. S. Cohen, *Biochemistry* **1985**, *24*, 2058-2067.

<sup>44</sup> C. H. Tung, Z. Wie, M. Leibowitz, M. S. Stein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7114-7118.

<sup>45</sup> a) T. Oost, A. Filippazzi, M. Kalesse, *Liebigs Ann./ Recueil* **1997**, 1005-1011.

b) T. Oost, M. Kalesse, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 8421-8438.



**Abb. 2.15 :** Darstellung der nach dem Konzept eines Mimetikums (links), analog der Staphylokokkennuclease, synthetisierten hydrolytisch aktiven steroidal Verbindung (rechts)

Die steroidale Bis(guanidinium)-imidazol-Verbindung in Abb. 2.15 zeigte in den Versuchen zur Spaltung der RNA-Modellverbindung HPNPP sehr gute hydrolytische Aktivität und beschleunigt die Spaltung des Dinucleotids UpU in Wasser um das 2.6-fache. Vermutlich führt hier die Beteiligung der Imidazolgruppe als interne Base zur Steigerung der Aktivität.

Mit die wichtigste Strategie zur Entwicklung künstlicher Enzyme ist der Einbau von funktionellen Gruppen in das synthetische Gerüst, die auch im aktiven Zentrum des natürlichen Enzyms vorkommen und essentiell für dessen katalytische Aktivität sind. Von den natürlichen Katalysemechanismen gelenkt, strebten verschiedene Arbeitsgruppen<sup>45,46</sup> durch Einführung von Bis(aminoimidazol)- und Bisguanidinium-Verbindungen die Beschleunigung der Umesterung von Phosphodiestern an. Die Verwendung von Guanidiniumgruppen führt vermutlich durch Lewisäure-artige Koordination am Phosphodiester zu einer Aktivierung, gleichzeitig tragen sie durch Ladungsneutralisation zur Stabilisation des entstandenen dianionischen pentakoordinierten Phosphorans bei.

<sup>46</sup> a) F. P. Schmidtchen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 4493-4496;

b) K. Ariga, E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 417-419;

c) R. P. Dixon, S. J. Geib, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 365-366;

d) J. Smith, K. Ariga, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 362-364;

e) D. M. Kneeland, K. Ariga, V. M. Lynch, C.-Y. Huang, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 10042-10055;

f) P. Schiessl, F. P. Schmidtchen, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 509-511;

g) V. Jubian, A. Veronese, R. P. Dixon, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 11, 1343-1345;

h) M.-S. Muche, M. W. Göbel, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 18, 2263-2265.

### 2.8.3 Metallhaltige künstliche Nucleasen

Metallionen werden als Cofaktoren von nahezu zwei Dritteln aller Enzyme benötigt. Dabei enthalten die sogenannten Metalloenzyme Metallionen, die im stöchiometrischen Verhältnis sehr fest an das Enzymprotein gebunden sind. Die Entfernung dieser Ionen führt zum Verlust der katalytischen Aktivität.

Metallionen schalten sich in den Katalyseprozeß ein, indem sie 1. an Substrate binden, um diese in die entsprechende Konformation zu bringen und 2. durch reversible Änderung ihres Oxidationszustandes an Redoxreaktionen teilnehmen oder Ladungsverteilungen stabilisieren und so die Reaktionsfähigkeiten bestimmter Atome durch Polarisierung erhöhen.

Vor allem aber können Metallionen frei oder mit Liganden komplexiert die Hydrolyse von Phosphorsäureestern beschleunigen und halten so ein großes Katalysepotential bereit. Erstmals wurde dieses 1938 von Bamann<sup>47</sup> beobachtet, wobei erst 1971 die gezielte Untersuchung der Spaltungen durch Metallionen begann. Zu den aktivsten Spezies gehören  $\text{Zn}^{\text{II}}$ <sup>48</sup>,  $\text{Cu}^{\text{II}}$ <sup>49</sup>,  $\text{Co}^{\text{III}}$ <sup>50</sup> und Lanthanidkomplexe.<sup>51</sup> Umfangreiche Versuche zur Spaltung der RNA-Modellsubstanz HPNPP (2-Hydroxy-propyl-*para*-nitrophenylphosphat)<sup>52</sup> (Abb. 2.17), sowie des Dinucleotids Uridylyl-(3', 5')uridin wurden von Morrow *et al.*<sup>53</sup> und Breslow *et al.*<sup>48,54</sup> mit verschiedenen Metallionen durchgeführt. Die von Morrow *et al.* beschriebenen Cyclenderivate **56** (Abb. 2.16) unterscheiden sich lediglich in den Metallionen (La, Eu,

<sup>47</sup> E. Bamann, M. Meisenheimer, *Berichte d. D. Chem. Gesellschaft* **1938**, 71, 1711-1720.

<sup>48</sup>  $\text{Zn}^{\text{II}}$ : R. Breslow, D.-L. Huang, E. Anslyn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 1746-1750;  
J. R. Morrow, V. M. Shelton, *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 4295-4299;

E. Kimura, Y. Kodama, T. Koike, M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8304-8311;

F. H. Chapman, Jr., R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5462-5469;

T. Koike, S. Kajitani, I. Nakamura, E. Kimura, M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 1210-1219;

T. Koike, M. Inoue, E. Kimura, M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3091-3099.

<sup>49</sup>  $\text{Cu}^{\text{II}}$ : K. A. Deal, J. N. Burstyn, *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 2792-2798.

<sup>50</sup>  $\text{Co}^{\text{III}}$ : M. Komiyama, Y. Matsumoto, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1050-1051;

J. H. Kim, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9792-9795;

K. Wahnou, A.-M. Lebus, J. Chin, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2594-2597;

L. R. Hettich, H.-J. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5638-5647;

M. Komiyama, Y. Matsumoto, H. Takahashi, T. Shiiba, H. Tsuzuki, H. Yajima, M. Yashiro, J. Sumaoka, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1998**, 691-695.

<sup>51</sup>  $\text{Ln}^{\text{III}}$ : J. Rammo, R. Hettich, H.-J. Schneider, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1773-1776;

S. Amin, J. R. Morrow, C. H. Lake, M. R. Churchill, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 824-826;

K. Tsubouchi, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7399-7411;

J. Hall, D. Hüskén, R. Häner, *Nucl. Acids Res.* **1996**, 24, 3522-3526.

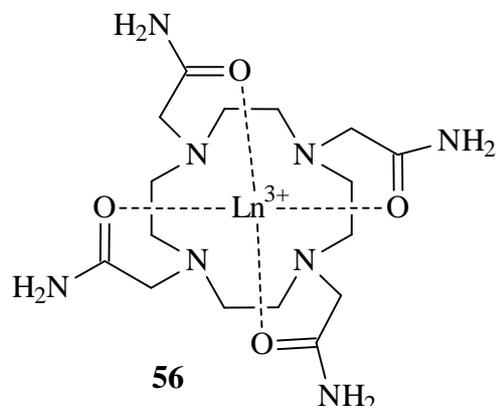
J. Sumaoka, A. Kajimura, M. Ohno, M. Komiyama, *Chem. Lett.* **1997**, 507-508;

<sup>52</sup> D. M. Brown, D. A. Usher, *J. Chem. Soc.* **1965**, 6558-6564.

<sup>53</sup> J. R. Morrow, L. A. Buttrey, K. A. Berback, *Inorg. Chem.* **1992**, 31, 16-20.

<sup>54</sup> R. Breslow, D.-L. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 4080-4083.

Dy). Lanthanidionen benötigen als Liganden zur Bildung kinetisch und thermodynamisch stabiler Komplexe jedoch höher substituierte Cyclenderivate.

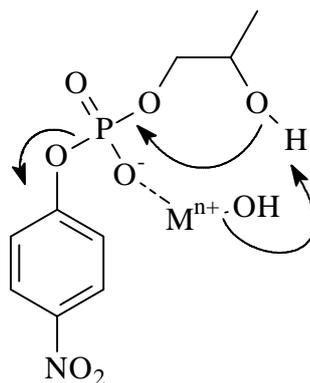


**Abb. 2.16: Morrows synthetische Ribonuclease mit Lanthanidion**

Während alle Metallionen ohne Liganden in der Lage sind, Phosphodiester zu hydrolysieren, zeigt der Cyclenkomplex **56** nur mit  $\text{La}^{3+}$  hydrolytische Aktivität. Mit Abnahme des Ionenradius nimmt auch zugleich die Fähigkeit ab, neben dem achtzähligen Liganden auch noch das RNA-Substrat zu binden.  $\text{La}^{3+}$  ist aufgrund seiner Größe ideal geeignet, auch den Phosphodiester zu komplexieren und dessen Hydrolyse zu katalysieren. Schon hier macht sich die unterschiedliche Fähigkeit der verschiedenen Metallionen, RNA-Substrate zu hydrolysieren, stark bemerkbar.

Neben dem oben auftretendem Effekt wird die Umesterung offenbar von diversen Faktoren beeinflusst. Metallionen können als Lewis-Säure sowohl durch Neutralisation der negativen Ladung eines geladenen Phosphatsauerstoffatoms als auch durch Koordination an das 5'-Sauerstoffatom die Spaltung des Phosphorsäureesters beschleunigen. Zusätzlich besitzen Metallionen die Eigenschaft, den  $\text{pK}_a$ -Wert koordinierten Wassers zu senken und nach einer Erzeugung einer Metall-Hydroxid Spezies  $\text{OH}^-$  als Base zur Deprotonierung des Nucleophils oder zum direkten Angriff auf das Phosphat bereitzustellen. Der  $\text{pK}_a$ -Wert des koordinierten Wassers hängt dabei in starkem Maße von der Struktur des komplexierten Liganden ab.<sup>55</sup>

<sup>55</sup> E. Kimura, T.Koike, *Comments Inorg. Chem.* **1991**, *11*, 295-301.



**Abb. 2.17: Mechanismus<sup>48</sup> der Phosphodiestererspaltung durch Metallionen in wässriger Lösung.** Das am Kation koordinierte Hydroxid deprotoniert die Hydroxygruppe des HPNPP; das entstehende Alkoholat greift dann nucleophil das durch Koordination an das Metallkation polarisierte Phosphat an und bewirkt den Abgang des Nitrophenolats.

Einige Enzyme, wie die 3'-5'-Exonuclease des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I<sup>56</sup>, die RNase H der reversen Transkriptase<sup>57</sup> aus HIV, die Phospholipase C<sup>58</sup>, violette saure Phosphatase<sup>59</sup> und die alkalische Phosphatase<sup>60</sup> werden durch zwei oder mehr Metallionen aktiviert. An diesen Vorbildern orientieren sich zweikernige Metallkomplexe. Chin *et al.* konnte mit dem Zusammenwirken von zwei Kupfer-<sup>61</sup> oder Cobalt-Ionen<sup>50</sup> eine enorme Hydrolysegeschwindigkeitssteigerung zeigen.

Kimura<sup>48</sup> orientierte sich am Vorbild, der alkalischen Phosphatase und versuchte durch die Verbindungen (*S*)-1-(2-Hydroxy-2-phenylethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan **58** und (1-(2-Hydroxyethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan **57** die Rolle des Serin-102 und Zn(II) in der alkalischen Phosphatase zu erklären (Abb. 2.18).

<sup>56</sup> L. S. Bees, T. A. Steitz, *EMBO J.* **1991**, *10*, 25.

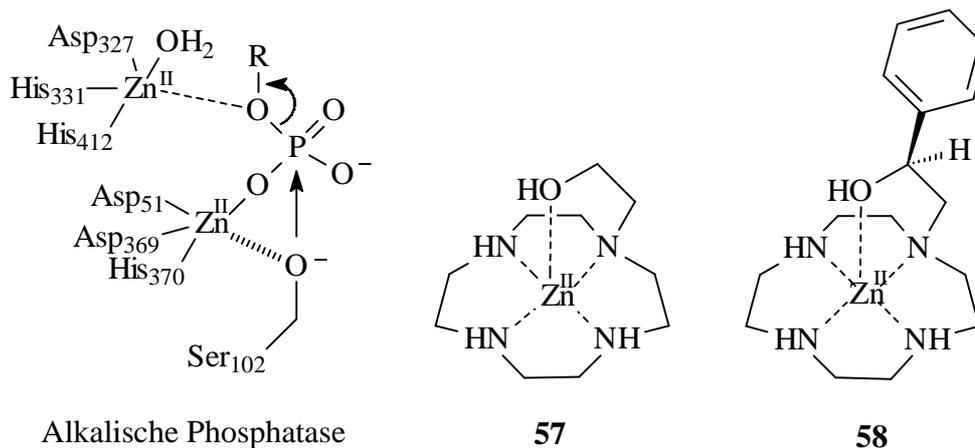
<sup>57</sup> J. F. Davies, Z. Hostomska, Z. Hostomsky, S. R. Jordan, D. A. Mathews, *Science* **1991**, *252*, 88.

<sup>58</sup> E. Hough, L. K. Hansen, B. Birknes, K. Jynge, S. Hansen, A. Hordirk, C. Little, E. J. Dodson, Z. Derenwenda, *Nature* **1989**, *338*, 357.

<sup>59</sup> T. Klabunde, N. Sträter, P. Tucker, H. Witzel, B. Krebs, *Science* **1995**, *268*, 1489.

<sup>60</sup> E. E. Kim, H. W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 449.

<sup>61</sup> M. Young, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10577-10578.



**Abb. 2.18: Reproduktion der alkalischen Phosphatase durch Kimuras Cyclenderivate (57) und (58)**

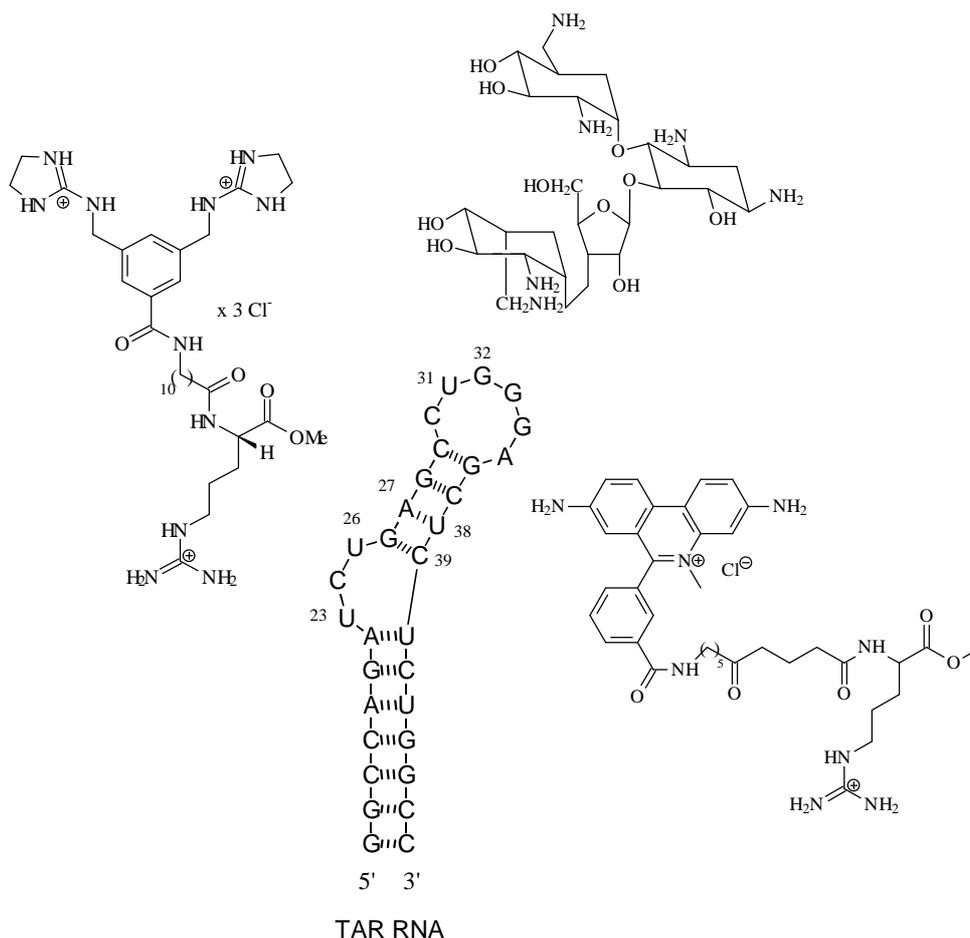
### 2.8.4 TAR-spezifische synthetische Ribonucleasen und Binder

Mit Enzymen läßt sich RNA am effizientesten hydrolysieren. Durch Modifikation mit *Antisense*-Oligonucleotiden wird die Hydrolyse sequenzspezifisch. Dieses Konzept ist in seiner Anwendung aber auf *in-vitro*-Experimente beschränkt, da die Chance, solche Konjugate unbeschadet an ihren Zielort zu transportieren und durch eine Zellmembran zu schleusen, sehr gering ist.

Viren verfügen häufig über RNA-Regionen mit wohldefinierten Sekundär- und Tertiärstrukturen, die Prozesse des viralen Lebenszyklus regulieren. Wie schon in Kapitel 2.1-2.3 erwähnt wurde, ist die TAR-Region des HIV Typ-1, die die Transkription steuert, besonders interessant.

Kurz und Göbel<sup>62</sup> nutzten die Fähigkeit eines L-Argininamidmethylesters mit katalytisch aktiver Kopfgruppe (11-Aminoundecansäurelinker), als Ligand für TAR-RNA zu fungieren, zur Konstruktion einer TAR-bindenden künstlichen Ribonuclease (Abb. 2.19).

<sup>62</sup> K. Kurz, M. W. Göbel, *Helv. Chim. Acta.* **1996**, 79, 1967-1979.



**Abb. 2.19: Künstliche Ribonuclease von Kurz und Göbel (links) und zwei verschiedene Binder mit der TAR-RNA**

Der Spacer wurde so gewählt, daß die Bisguanidinium-Kopfgruppe Zugang zu den einzelsträngigen Regionen des RNA-Substrats erhält, wobei die Verbindung nach dem Vorbild der Staphylokokkennuclease synthetisiert wurde. Cabrol-Bass *et al.*<sup>63</sup> synthetisierten drei verschiedene Ethidiumderivate, die sich durch die Interaktion der Arginin-Seitenkette mit der TAR-RNA und der Intercalation des Ethidiums hervorragend zur Unterdrückung der Tat-TAR-Wechselwirkung eignen (Abb. 2.19 rechts unten).

Auf Grund der ausgeprägten dreidimensionalen Struktur und der Anwesenheit von Aminogruppen, die unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegen, gelten Aminoglykoside als vielversprechende Moleküle zur selektiven Wechselwirkung mit RNA.

<sup>63</sup> R. Terreux, D. Cabrol-Bass, V. Peytoux, R. Condom, R. Guedj, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, 39, 413-419.

In diesem Zusammenhang untersuchten Czarnik *et al.*<sup>64</sup> die Inhibierung der Tat-TAR-Wechselwirkung durch das Aminoglykosid Neomycin (Abb. 2.19). Dieses unterdrückt die Bindung von kurzen Tat-Fragmenten als nichtkompetitiver Inhibitor. Die Autoren vermuten eine Konformationsänderung durch die Bindung in der *bulge*-Region und dadurch resultierend eine Beeinflussung der Tat-TAR-Wechselwirkung. Bei den Aminoglykosiden, sowie den Ethidiumderivaten handelt es sich nur um Binder, die lediglich an der RNA binden, um eine Interaktion von Protein und RNA zu vermeiden, sie aber nicht spalten.

### 3. Aufgabenstellung

Basierend auf den zuvor beschriebenen Sachverhalten soll eine künstliche Ribonuclease entworfen, synthetisiert und getestet werden. Aufgrund der vielen Möglichkeiten zur Darstellung synthetischer Ribonucleasen erfolgt eine Zweiteilung des Themas.

Beide Ansätze beruhen auf der Verwendung des 1,4,7,10-Tetraazacyclododecans (Cyclen) als aktives Zentrum der künstlichen Ribonucleasen. Es zeichnet sich durch seine gute Komplexbildung mit Metallen, insbesondere Zn(II) [ $\log K(\text{ZnL}) = 15.3$ ]<sup>48</sup> und Co(III),<sup>50</sup> welches als kinetisch inert gilt, aus. Der Metall-Cyclenkomplex soll im folgenden die hydrolytische Untereinheit der Ribonuclease imitieren.

Der erste Teil beschäftigt sich mit synthetischen Ribonucleasen, die keine ausgeprägte Erkennungseinheit besitzen und daher nur relativ unspezifisch wirken können. In Anlehnung an die Cyclenderivate Kimuras (Abb. 2.18), der durch die Einführung einer Hydroxyfunktion ein effektives Nucleophil für die Hydrolyse der Phosphodiester-spaltung generiert, sollen  $\alpha$ -Aminosäuren wie Tyrosin und Serin mit interner Hydroxyfunktion an das Cyclengerüst gekoppelt werden. Durch verschiedene Spacer soll die Seitenkette Beweglichkeit erhalten. Kimura konnte anhand von Kristallstrukturen beweisen, daß die durch das Zink aktivierte Alkoxy-Gruppe für die effektive Hydrolyse zuständig ist und nicht die aktivierte Zink-Wasser-Spezies (Kapitel 5).

---

<sup>64</sup> S. Wang, P. W. Huber, M. Cui, A. W. Czarnik, H.-Y. Mei, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5549-5557.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Effizienz des Hydroxy-Nucleophils als effektive synthetische Ribonuclease anhand verschiedener Cyclenderivate getestet werden.

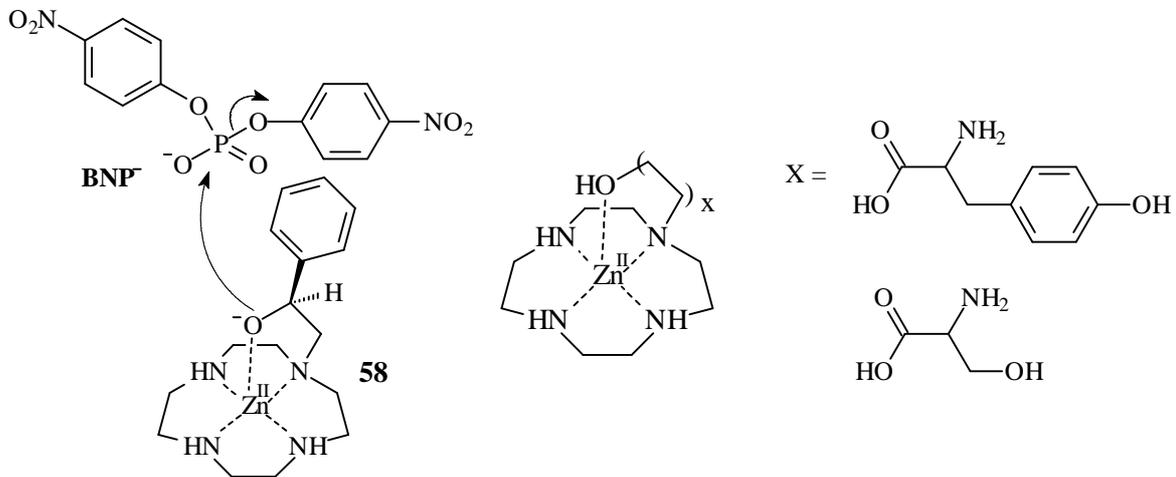
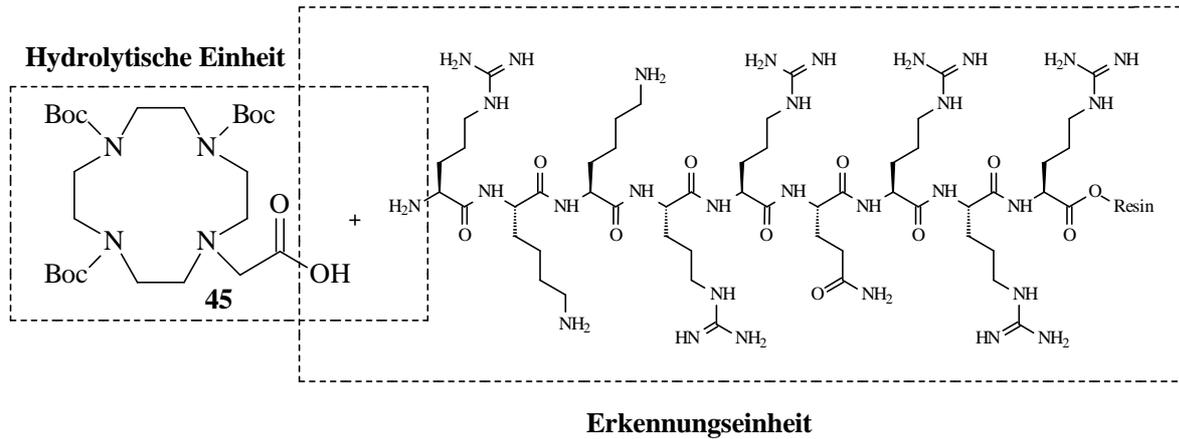


Abb. 3.1: Konzept der synthetischen Ribonucleasen nach dem Modell Kimuras (58)<sup>65</sup>

Inwiefern sich die Hydroxyfunktionen der Aminosäuren positiv auf die Beschleunigung der Hydrolyse von RNA auswirken, wird an der Modell-RNA 2-Hydroxypropyl-*para*-nitrophenylphosphat (HPNPP) in wässrigem Puffer getestet (Kapitel 5), bevor die Spaltungsexperimente mit der eigentlichen TAR-RNA durchgeführt werden (Kapitel 6). Der Reaktionsverlauf kann anhand der Bildung des gelben *para*-Nitrophenolats leicht photometrisch ( $\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$ ) verfolgt werden (Kapitel 5.2). Die Bildung des cyclischen Phosphates lässt sich <sup>31</sup>P-NMR-spektroskopisch nachweisen.<sup>53</sup>

2. Der zweite Teil sieht die Synthese und Untersuchung einer synthetischen Ribonuclease mit Erkennungssequenz vor. Neben dem hydrolytischen Teil, dem Cyclen, soll die basische Region des Tat-Peptides (Tat<sub>49-57</sub>) eingebaut werden. Diese wird durch Festphasenpeptidsynthese erhalten und über das um eine Essigsäureeinheit erweiterte Cyclenderivat **45** eingeführt.

<sup>65</sup> Kimura bedient sich dem RNA-Modell BNP<sup>-</sup> (Bis(4-nitrophenyl) Phosphat).



**Abb. 3.2: Darstellung der synthetischen Ribonuclease mit Erkennungseinheit**

Die Verknüpfung der beiden Einheiten sollte im folgenden auch Spaltungsexperimente mit verschiedenen Metallionen erlauben. Die Erkennungseinheit, das Arginin-reiche Nonamer sollte spezifisch an die Ziel-RNA binden und die hydrolytische Einheit, den Metall-Cyclen-Komplex, in die Nähe der Phosphodiesterbindungen bringen. Als Konsequenz dieses Vorgangs sollte ein RNA-Strangbruch erfolgen, der mittels gelelektrophoretischer Experimente nachgewiesen werden könnte (Kapitel 6). Ferner soll die Bindungsaffinität der synthetischen Ribonuclease zur TAR-RNA mit einem filter-binding Assay überprüft und mit der basischen Einheit des Tat-Peptides verglichen werden.

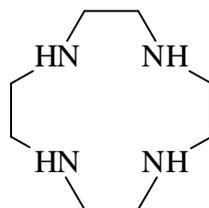
## 4. Theoretischer Teil

### 4.1 Teil I, Synthese der Cyclenderivate, Zugang zur hydrolytischen Einheit

#### 4.1.1 Darstellung des 1,4,7,10-Tetraazacyclododecans (Cyclen)<sup>66</sup>

Als Startmaterial diente das 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan, das sich als hydrolytische Einheit in Verbindung mit verschiedenen Metallkationen längst bewährt hat (Kapitel 2.8.3). Im folgenden werden die verschiedenen Substitutionsmuster am Cyclen vorgestellt, wobei in dieser Arbeit nur Monosubstitutionen am Cyclen eine Rolle spielen.

Ausgehend vom Cyclensulfat konnte durch Ausfällen des Sulfates und anschließender Umkristallisation das Cyclen **1** mit 70 % Ausbeute erhalten werden.



**1**

#### 4.1.2 Dreifache Schützung mit der Cbz-Gruppe (Benzyloxycarbonyl)

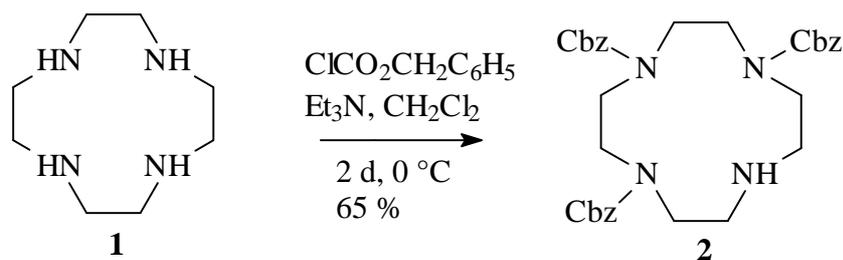
Für die Darstellung der monosubstituierten Cyclenderivate ist die Dreifachschützung des Cyclens notwendig. Die Cbz-Gruppe eignet sich hervorragend für die Darstellung einiger Cyclenderivate, da sie weder säuren- noch basenlabil ist. Ihre Entfernung erfolgte unter Standardbedingungen durch Hydrierung mit Palladium auf Kohle oder Bromwasserstoff in Essigsäure, wobei erstere Methode aufgrund der leichten Handhabung und effektiveren Reinigung der Produkte bevorzugt wurde.<sup>67</sup>

Die Darstellung des Cyclenderivates **2** wurde analog der Literaturvorschrift<sup>68</sup> durchgeführt. Durch Reaktionszeitverlängerung konnte die Ausbeute auf 65 % angehoben werden. Als Nebenprodukte entstanden die vierfach und zweifach geschützten Cyclene, die säulenchromatographisch voneinander getrennt werden konnten.

<sup>66</sup> Im folgenden wird die Verbindung 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan nur noch als Cyclen bezeichnet.

<sup>67</sup> P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1994**, 192-199.

<sup>68</sup> J. S. Prasad, F. J. Okuniewics, E. J. Delaney, D. D. Dischino, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 3329-3332.

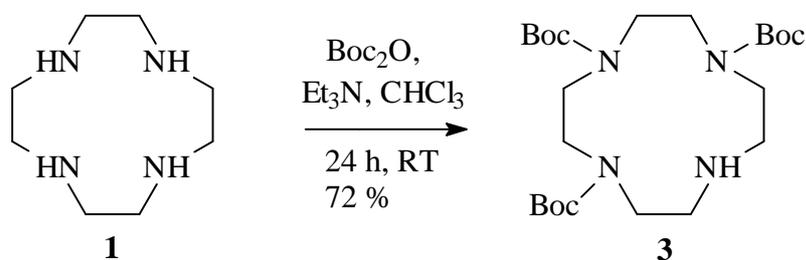


**Abb. 4.1:** Darstellung des dreifach Cbz-geschützten-Cyclenderivates (2) ausgehend vom Cyclen (1)

#### 4.1.3 Dreifache Schützung mit der N-tert-Butyloxycarbonyl (Boc) Gruppe

Vorarbeiten zur Kupplung des Cyclenderivates **2** mit dem Neunmer-Peptid zeigten, daß sich die Cbz-Gruppe nicht hydrogenolytisch entfernen ließ.<sup>69</sup> Aufgrund der Boc- und Mtr-geschützten Aminosäuren des Peptides zeigte sich die Dreifachschützung des Cyclens mit der Boc-Schutzgruppe als viel effektiver, da alle Schutzgruppen im letzten Schritt durch die Verwendung von TFA entfernt werden konnten (Abb. 4.26).

Die Darstellung der Verbindung **3** wurde entsprechend der Literaturvorschrift<sup>70</sup> von Kimura durchgeführt und ergab das Produkt in 72 %-iger Ausbeute.



**Abb. 4.2:** Darstellung des dreifach Boc-geschützten-Cyclenderivates (3) ausgehend vom Cyclen (1)

Wie bei der Cbz-geschützten Verbindung entstanden neben der Dreifach-Schützung auch die unerwünschten zweifach und vierfach geschützten Cyclenderivate, die säulenchromatographisch abgetrennt werden konnten.

<sup>69</sup> A. Loos, *Dissertation* **1996**, Institut für Organische Chemie, Universität Hannover.

<sup>70</sup> E. Kimura, S. Aoki, T. Koike, M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3068-3076.

Nachdem nun der Zugang zu selektiv Cbz- bzw. Boc-geschützten Cyclen-Einheiten gesichert ist, soll im folgenden das Design und die Ausarbeitung einer Synthesestrategie für synthetische Ribonucleasen auf Cyclenbasis diskutiert werden.

#### **4.2 Serin und Tyrosin als erfolgversprechende Bausteine für die Synthesen künstlicher Ribonucleasen ohne Erkennungseinheit**

Die Vorgehensweise für das Design und die Synthese der synthetischen Ribonucleasen ohne Erkennungseinheit erfolgt ähnlich der Cyclenderivate Kimuras, bei denen die Hydroxygruppe die Funktion des Serins in der alkalischen Phosphatase übernimmt. Durch Einführung einer Hydroxyfunktion an die Cycleneinheit soll ein effektives Nucleophil für die Hydrolyse der Phosphodiester generiert werden. Aufgrund der bekannten Serinproteasen (Trypsin, Chymotrypsin), der bereits erwähnten alkalischen Phosphatase und den zahlreichen Nucleasen sowie Tyrosinkinasen scheint die Anwendung der  $\alpha$ -Aminosäuren Serin und Tyrosin für die Synthese künstlicher Ribonucleasen mit interner Hydroxyfunktion nahezu geeignet zu sein.

Desweiteren bieten diese Aminosäuren eine zusätzliche Koordinationsmöglichkeit für die komplexierten Metalle bei der Durchführung der Hydrolyse mit der Modell-RNA HPNPP.

##### **4.2.1 Synthesestrategie monosubstituierter Cyclenverbindungen**

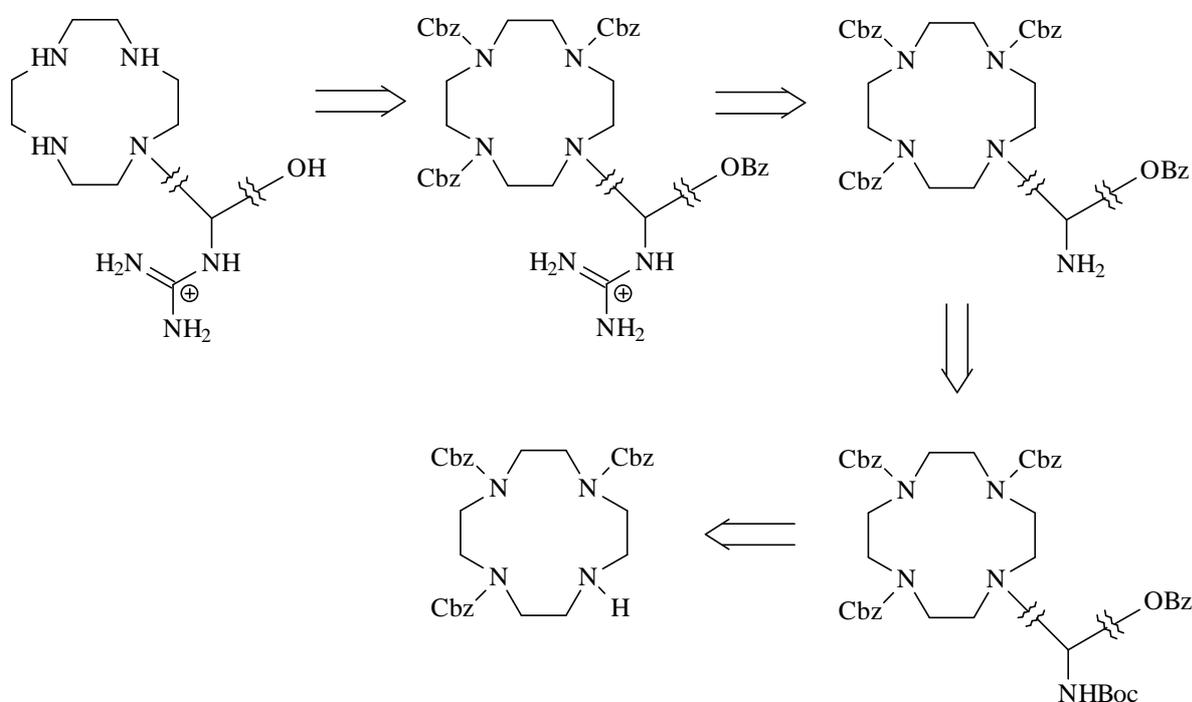
Ausgehend von dem dreifach Cbz-geschützten Cyclenderivat **2** sollen über verschiedene Substitutionsmuster monosubstituierte Cyclenverbindungen mit verknüpfter Tyrosin- oder Serineinheit generiert werden. Die Aminosäuren werden durch verschiedene Spacer wie das  $\beta$ -Alanin **5** oder die Seitenkette **39** in unterschiedlicher Entfernung vom Cyclen, der hydrolytischen Einheit, über Peptidbindungen gekoppelt. Durch Variation der Seitenkette soll nicht nur die nucleophil wirkende Hydroxyfunktion Flexibilität erlangen, sondern auch die Guanidiniumgruppe, die durch ihren Einbau für stabilisierende Effekte bei der Phosphodiestererspaltung sorgen soll.

Zunächst wird die Retrosynthese der geplanten Cyclenderivate geschildert. In Kapitel 5 wird der Test dreier ausgesuchter Verbindungen auf ihre hydrolytische Aktivität mit der RNA-Modellsubstanz HPNPP beschrieben. Kapitel 6 schließlich stellt den Test aller monosubstituierten Cyclenverbindungen mit der tatsächlichen TAR-RNA dar.

#### 4.2.2 Retrosynthetische Betrachtung und Einblick in die Synthese der geplanten Tyrosincyclenderivate

Die Retrosynthese aller betrachteten Verbindungen (Abb. 4.4) sieht einen abschließenden Entschützungsprozess vor. Hierzu wäre eine Hydrierung mit Pd/C-Katalyse denkbar. Anschließend könnte mittels basischem Ionenaustauscher und Reversed Phase-Chromatographie gereinigt werden. Vor der Hydrierung ist eine Guanidierung mit 3,5-Dimethylpyrazol-1-formamidinium-nitrat geplant. Die Guanidiniumgruppe kann nur am freien Amin etabliert werden, daher muß zuvor die Boc-Gruppe entfernt werden.

Das Seitenkettengerüst kann durch den Einbau der geplanten Aminosäuren unterschiedlich aufgebaut werden. So ist die direkte Verknüpfung des Serins oder Tyrosins an die Ausgangsverbindung, das dreifach Cbz-geschützte-Cyclenderivat **2**, oder auch über einen Spacer, möglich. Aminosäuren sind als Spacer besonders geeignet, da sie über Peptidbindungen verknüpft werden und somit sehr einfache Variationen der Seitenkettenlänge erlauben. Das retrosynthetische Schema zeigt die Reaktionssequenz anhand vereinfachter Verbindungen.



**Abb. 4.3: Retrosynthetische Betrachtung der Grundstrukturen der Cyclenderivate; Eröffnung einer kleinen Bibliothek für einen kombinatorischen Ansatz**

Die Seitenkette soll, hier dargestellt durch die Platzhalter, variabel gestaltet werden. Der Einbau der Aminosäuren oder der Spacer an das Cyclengerüst erfolgt über Peptidkupplungen.

Wie bereits gesagt, sollen die Cyclenderivate verschieden lange Seitenketten vorweisen können, so daß der für die gewünschte molekularbiologische Wirkung optimale Abstand zwischen Cyclen (hydrolytische Einheit) und Guanidiniumgruppe (Koordinationseinheit) ermittelt werden kann. Durch das Fehlen einer Erkennungseinheit wird der Ort der Koordination schwer zu ermitteln sein. Es läßt sich jedoch vermuten, daß gut bewegliche Guanidiniumgruppen mit längerer Kette, ähnlich dem Arginin, in der *bulge*-Region binden. Durch die große Anzahl der zur Verfügung stehenden Phosphodiester ist jedoch auch an anderen gut zugänglichen Stellen eine Koordination möglich. Genauso wenig vorhersagbar ist die hydrolytische Wirkung. Durch Variation der Verbindungen soll eine optimale synthetische Ribonuclease ermittelt werden, die aufgrund der fehlenden Erkennungseinheit nicht gezielt wirken kann, aber durchaus in der Lage ist, die TAR-RNA hydrolytisch zu spalten.

Aufgrund der leichteren Durchführung wurden zunächst die Tyrosinderivate dargestellt. Die Zielmoleküle sind in Abb. 4.4 wiedergegeben. Die Synthese der Serinderivate wird später beschrieben ( Kap. 4.3).

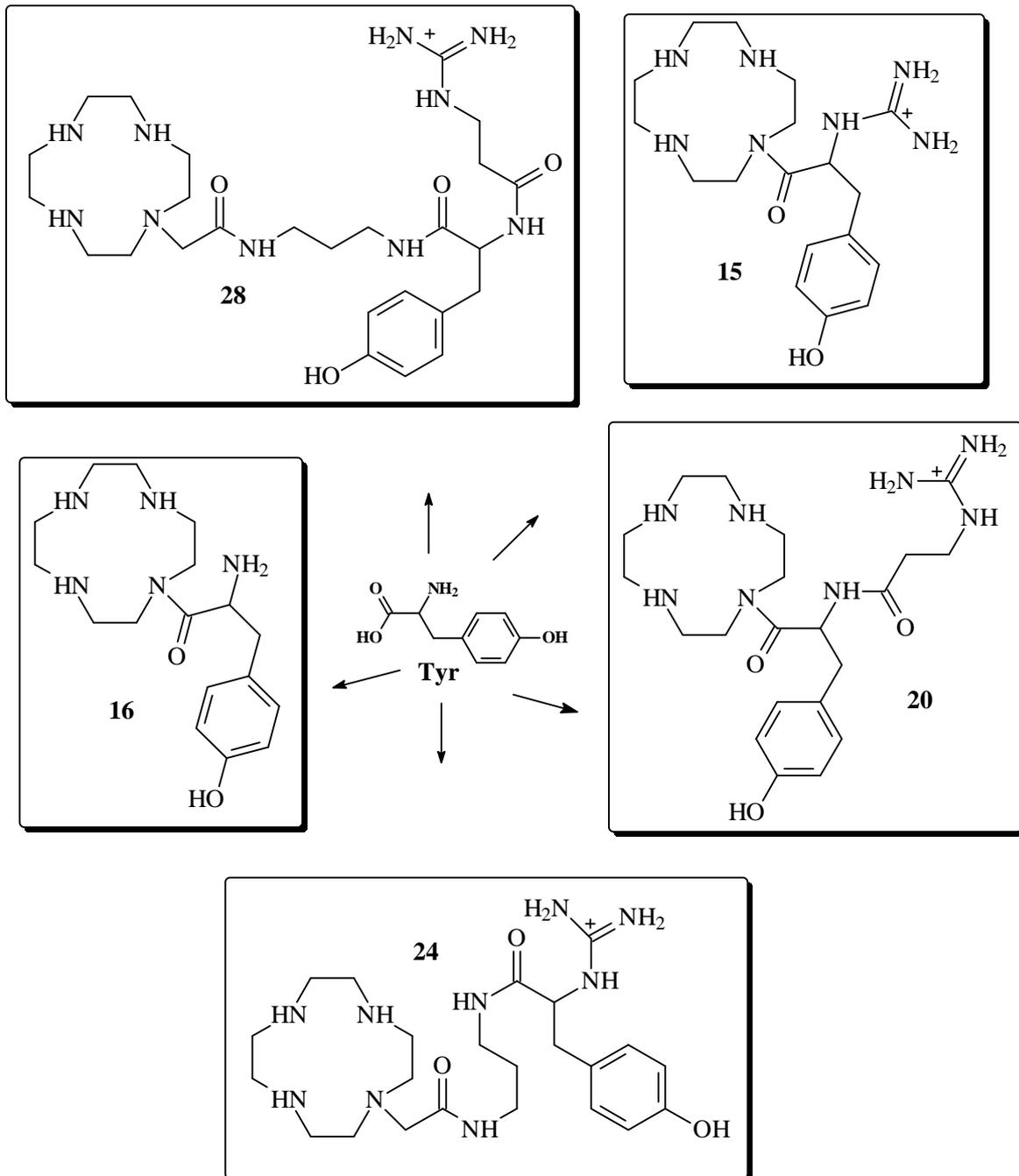


Abb. 4.4: Überblick über die geplanten Tyrosinderivate

Die verschiedenen Verbindungen besitzen genügend Flexibilität in der Seitenkette, so daß eine gute Koordination an die RNA gewährleistet sein sollte.

Bevor auf die Synthesen der Tyrosinderivate eingegangen wird, erfolgt eine kurze Beschreibung der Schützung der funktionellen Gruppen der Aminosäuren, die für eine selektive Peptidkupplung unumgänglich ist.

### 4.2.3 Darstellung der N-tert.-butoxycarbonyl (Boc) geschützten Aminosäuren (L-Tyrosin; D,L-Serin; $\beta$ -Alanin; Glycin)

Zunächst wurden die Aminogruppen der Aminosäuren Tyrosin, Serin,  $\beta$ -Alanin und Glycin nach der Literaturvorschrift<sup>71</sup> mit Boc-Anhydrid umgesetzt. Die geschützten Aminosäuren konnten in 55 %-iger bis 97 %-iger Ausbeute erhalten werden.

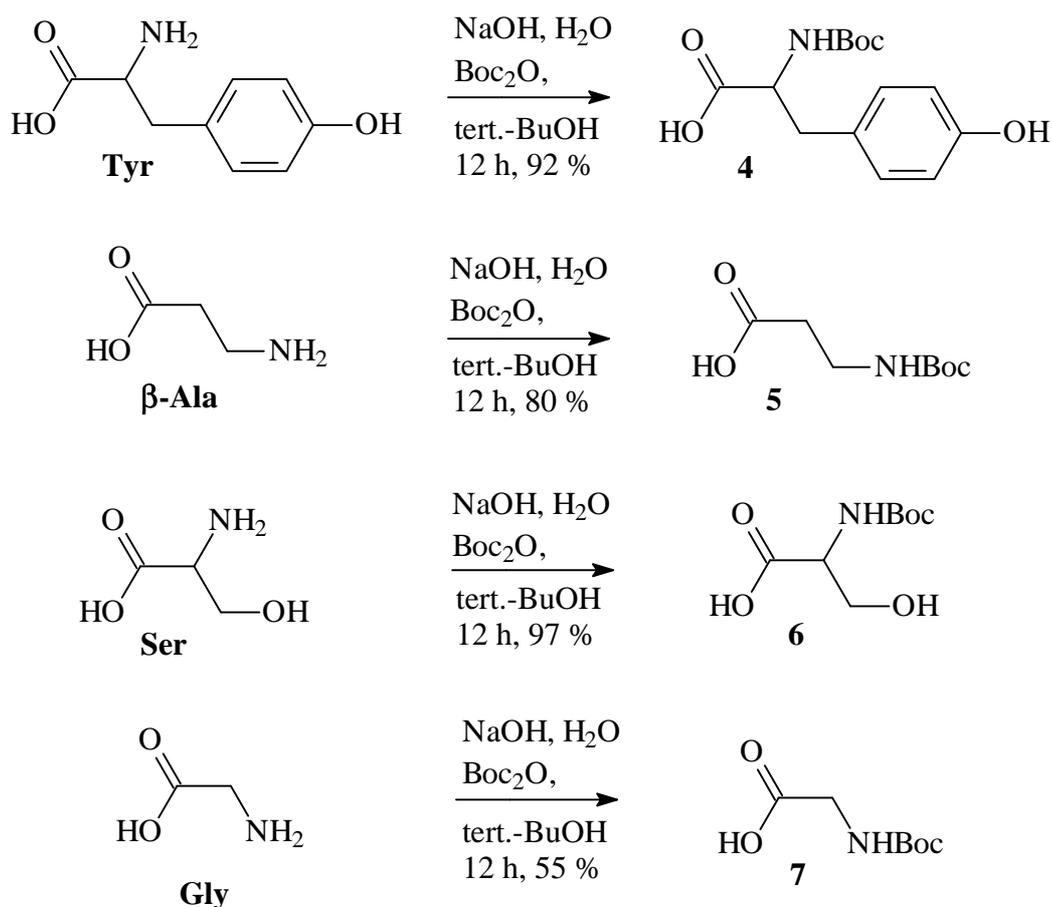


Abb. 4.5: Darstellung des N-tert.-butoxycarbonyl-L-Tyrosin (4), des N-tert.-butoxycarbonyl- $\beta$ -Alanins (5), des N-tert.-butoxycarbonyl-D,L-Serins (6) und des N-tert.-butoxycarbonyl-glycins (7)

In der Literatur wird meist die Benzylschützung vor der Boc-Schützung vorgenommen. Hier jedoch konnte die umgekehrte Reihenfolge ohne Nachteile eingehalten werden.

<sup>71</sup> O. Keller, W. E. Keller, G. van Look, G. Wersin, *Org. Syn.* **1990**, 160-183.

#### 4.2.4 Benzylschützung des N-tert.-butoxycarbonyl-L-tyrosins (4) und des

##### N-tert.-butoxycarbonyl-D,L-serins (6)

Die Schützung der Verbindungen **4** und **6** erfolgten analog der Bodanszky-Vorschrift.<sup>72</sup> Durch Deprotonierung der Alkoholfunktion und anschließende Alkylierung mit Benzylchlorid wurden die gewünschten Produkte erhalten.

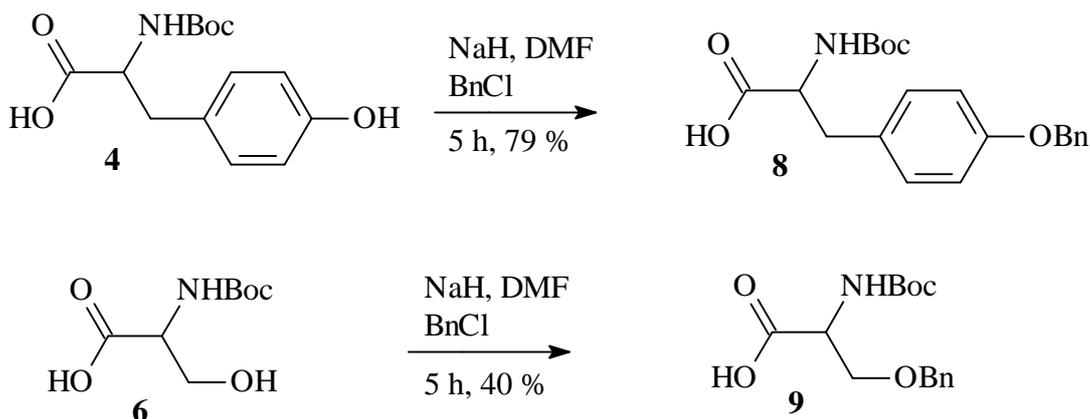


Abb. 4.6: Darstellung des O-benzyl-N-tert.-butoxycarbonyl-L-tyrosins (8) und des O-benzyl-N-tert.-butoxycarbonyl-D,L-serins (9)

Die geschützten Aminosäuren **8** und **9** können mit freien Aminen eine Peptidbindung eingehen. Im folgenden werden verschiedene Methoden zur Kupplung vorgestellt.

#### 4.2.5 Die Kupplungsreaktionen mit dem dreifach Cbz-geschützten-Cyclenderivat (2)

Einfache Peptidbindungen werden unter Verwendung von N, N'-Dicyclohexylcarbodiimid mit einem Hilfsnucleophil wie DMAP, 1-Hydroxybenzotriazol oder N-Hydroxysuccinimid geknüpft. Aktivierte Aminosäuren racemisieren leicht, was einem Verlust der biologischen Aktivität gleichkommen kann. Der Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol oder N-Hydroxysuccinimid sorgt sogar für eine racemisierungsfreie Verknüpfung<sup>73</sup>, wobei die Racemisierung unter 1 % gesenkt wird.

Bei der Kupplung der geschützten Aminosäuren mit dem dreifach Cbz-geschützten-Cyclenderivat **2** hat sich diese Methode als nicht sehr erfolgreich erwiesen. Die Ausbeuten

<sup>72</sup> M. Bodanszky, A. Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis* **1994**, Springer-Verlag, 47.

<sup>73</sup> W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788-798.

waren schlecht und die Reaktionszeiten lagen bei 20 Tagen. Erst die Verwendung des Pentafluorphenol-Aktivesters in Gegenwart von 1-Hydroxy-benzotriazol oder N-Hydroxysuccinimid ergab sehr gute Ausbeuten in der Kupplungsreaktion.

#### 4.2.6 Darstellung der Aktivester als Intermediat in Kupplungsreaktionen

Die Säure wurde nach der Veresterung mit Pentafluorphenol als aktivierte Spezies eingesetzt.<sup>74</sup> Die Reaktion erfolgte in Gegenwart von N, N'-Dicyclohexylcarbodiimid als Kupplungsreagenz und lieferte gute Ausbeuten.

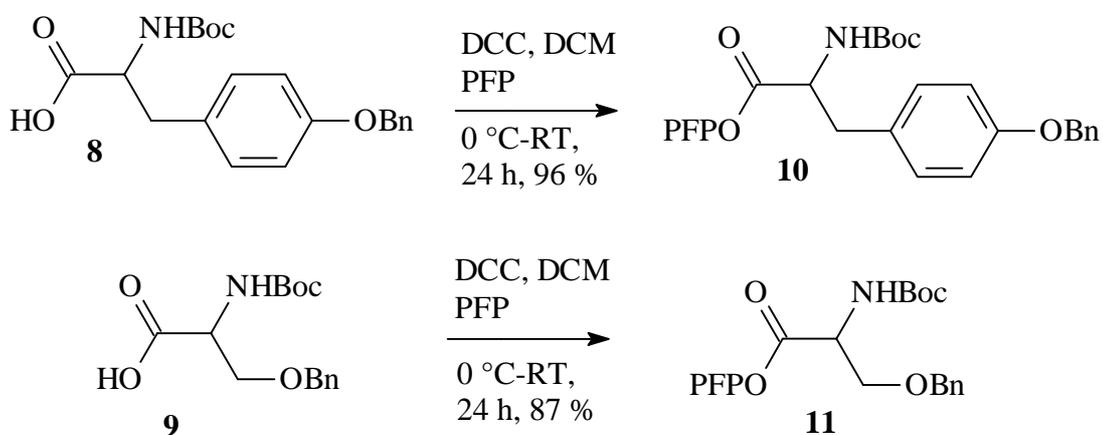


Abb. 4.7: Darstellung des Tyrosinaktivesters (10) und des Serinaktivesters (11)

#### 4.2.7 Syntheseweg zu den Cyclenderivaten (15) und (16)

Die Aktivester **10** und **11** wurden ohne weitere Aktivierung mit dem freien Amin umgesetzt. Für die Kupplung mit dem Cyclenderivat hatte sich jedoch die Zugabe von 1-Hydroxybenzotriazol oder N-Hydroxysuccinimid bewährt. Die Ausbeuten konnten so enorm gesteigert und die Reaktionszeiten herabgesetzt werden. DMAP lieferte in allen Fällen eine schlechte Ausbeute.

<sup>74</sup> a) P. R. Ashton, S. E. Boyd, C. L. Brown, N. Jayaraman, S. A. Nepogodiev, J. F. Stoddart, *Chem. Eur. J.*, **1996**, 2, 1115-1127.

b) L. Kisfaludy, J. E. Roberts, R. H. Johnson, G. L. Mayers, J. Kovacs, *J. Org. Chem.* **1970**, 35, 3563-3565.

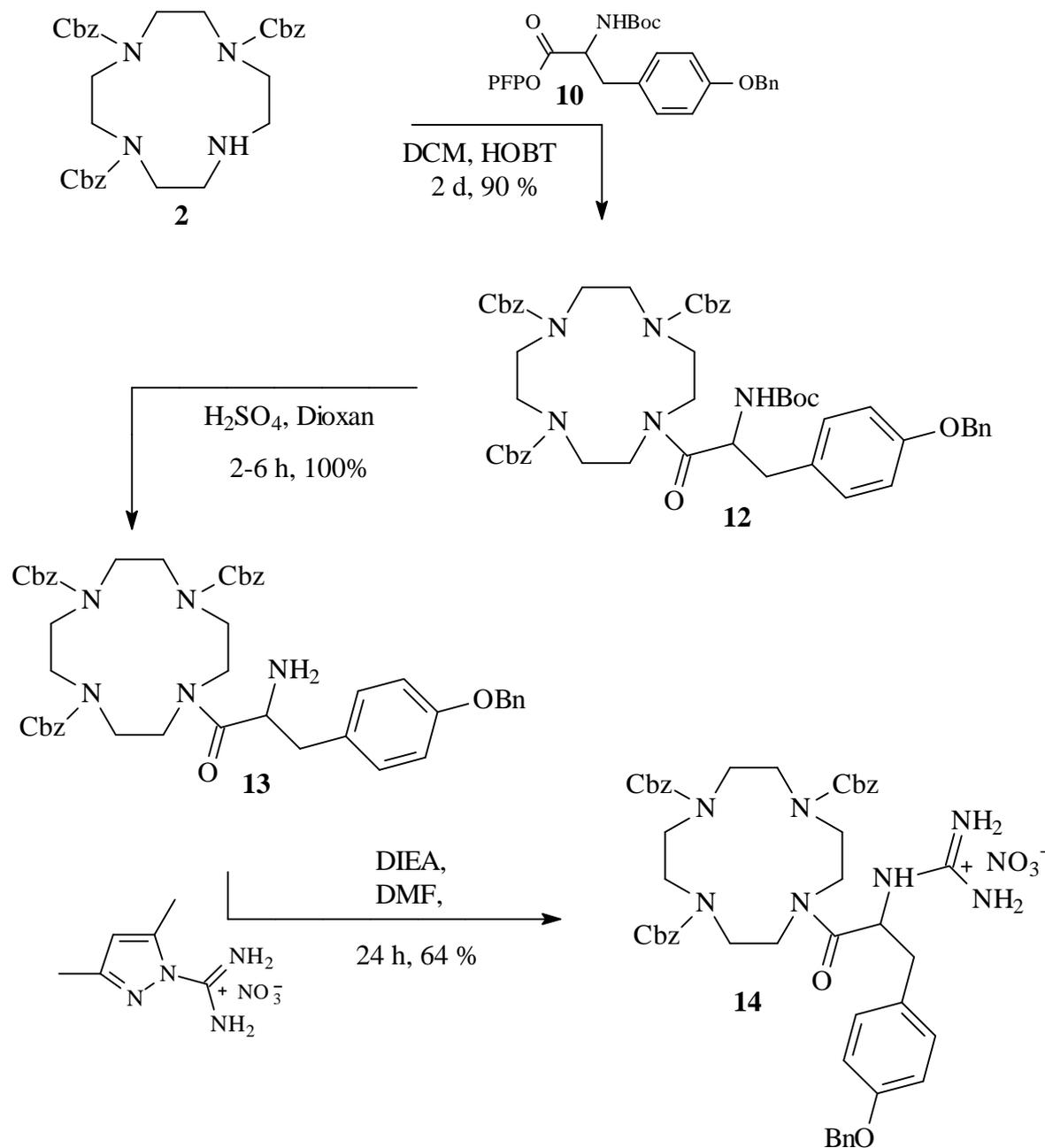


Abb. 4.8: Darstellung des Cyclenderivates (**14**)

Vergleicht man die Reaktionszeiten vor und nach der Aktivierung durch das Pentafluorphenol, so resultiert eine deutliche Geschwindigkeitssteigerung von 20 Tagen auf 2 Tage. Die Ausbeuten stiegen im Fall des Tyrosins von 18 % auf 88 %.

Nach effektiver Kupplung, die nach 2 Stufen (Synthese des Aktivesters mit eingeschlossen) 88 % Ausbeute des Cyclenderivates **12** lieferte, erfolgte die quantitative Entschützung der tert.-Butyloxycarbonylgruppe zum freien Amin **13**. Die Methode wurde ähnlich der von

R.A. Houghten für Peptidfestphasensynthese beschriebenen Entschützung durchgeführt.<sup>75</sup> Die anschließende Guanidierung<sup>76</sup> mit 3,5-Dimethylpyrazol-1-formamidinium-nitrat<sup>77</sup> führte unter den in Abb. 4.8 genannten Bedingungen zu befriedigenden Ausbeuten.

Die vollständige Entschützung des Cyclenderivates **14** bereitete einige Schwierigkeiten. Erst eine MALDI-TOF Massenbestimmung konnte nach zwei Tagen Hydrierung klären, wie weit die Verbindung entschützt wurde, da die DC-Kontrolle aufgrund der Polarität der Verbindung versagte. Die bisherigen Methoden der Reinigung über basischen Ionenaustauscher und durch Reversed Phase-Chromatographie zeigten keinen Erfolg bei der Reinigung der Verbindung **15**. Durch säulenchromatographische Reinigung mit MeOH/NH<sub>3</sub> wurde das Produkt schließlich rein erhalten.

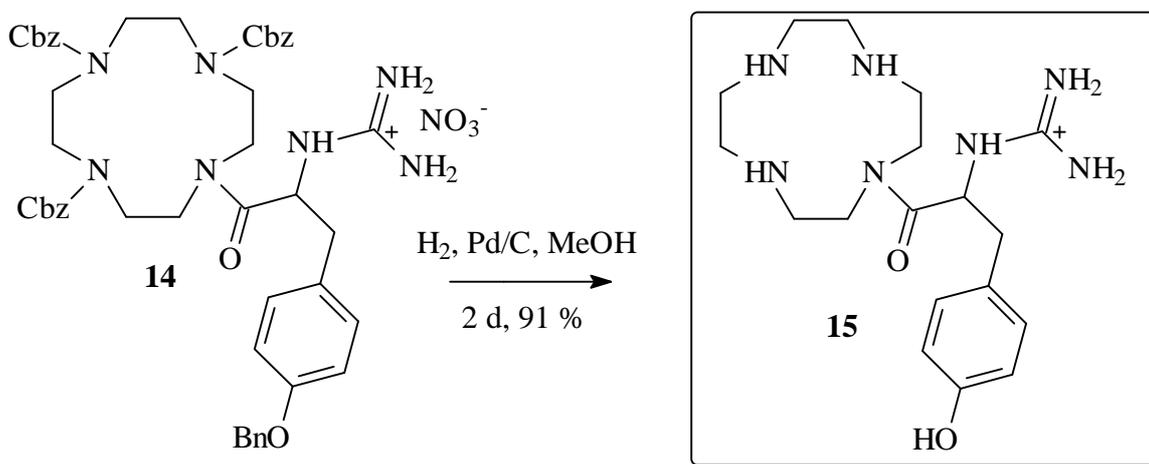


Abb. 4.9: Darstellung des Cyclenderivates (**15**)

Die gleichen Schwierigkeiten ergaben sich auch für Verbindung **16**, so daß hier die Reinigung über die Säulenchromatographie mit MeOH/NH<sub>3</sub> als Laufmittel durchgeführt wurde (Abb. 4.10). Die Verbindung wurde vor der Hydrierung nicht guanidiert und wurde deshalb als Vergleichssubstanz zur guanidierten Form herangezogen. Die Aufarbeitung und Reinigung erfolgte analog der Verbindung **15**.

<sup>75</sup> R. A. Houghten, A. Beckman, J. M. Ostresh, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1986**, 27, 653-658.

<sup>76</sup> K. Feichtinger, C. Zapf, H. L. Sings, M. Goodman, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 3804-3805.

<sup>77</sup> M. S. Bernatowicz, Y. Wu, G. R. Matseueda, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2497-2502.

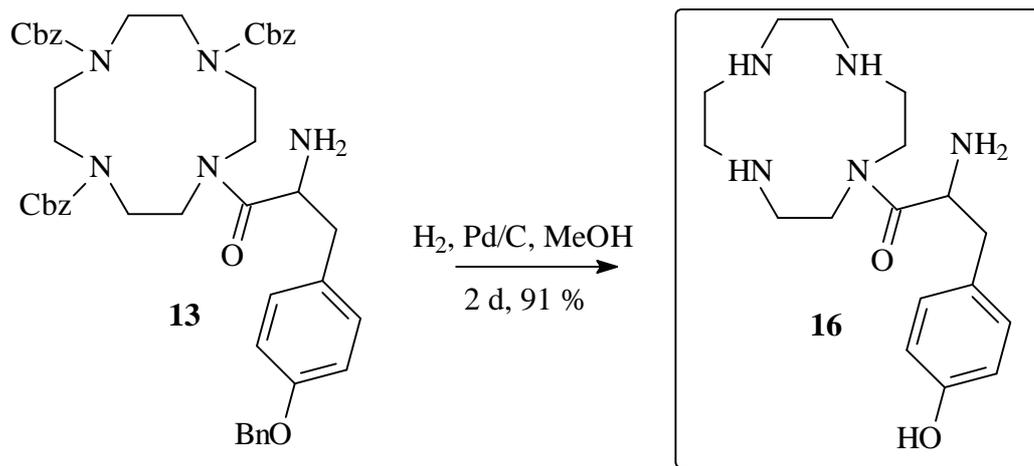


Abb. 4.10: Darstellung des Cyclenderivates (16)

#### 4.2.8 Darstellung des Tyrosinderivats (20) mit einer um eine $\beta$ -Alanin-Einheit kettenverlängerten Guanidiniumgruppe

Inwiefern sich bei der Hydrolyse die Nähe der Guanidiniumgruppe auf die Cycleneinheit auswirkt, kann erst durch die anschließenden Tests gezeigt werden. Diese Verbindungen geben der Guanidiniumgruppe durch die Einführung einer Seitenkette mehr Beweglichkeit. Ausgehend von dem Cyclenderivat **13** wurde das Boc-geschützte  $\beta$ -Alanin durch einfache Peptidkupplung eingeführt. Das prim. Amin **13** schien sterisch weniger gehindert zu sein als das Cyclenderivat **2**, da hier bereits die Verwendung von DMAP und DCC zu einer erfolgreichen Kupplung führte (74 % Ausbeute). Durch Optimierungsmethoden wie z.B. der Verwendung von HOBT oder eines Pentafluorphenolaktivesters, könnten die Ausbeuten gesteigert werden. Auf eine Optimierung der Gesamtausbeute wurde hier allerdings aus Zeitgründen verzichtet.

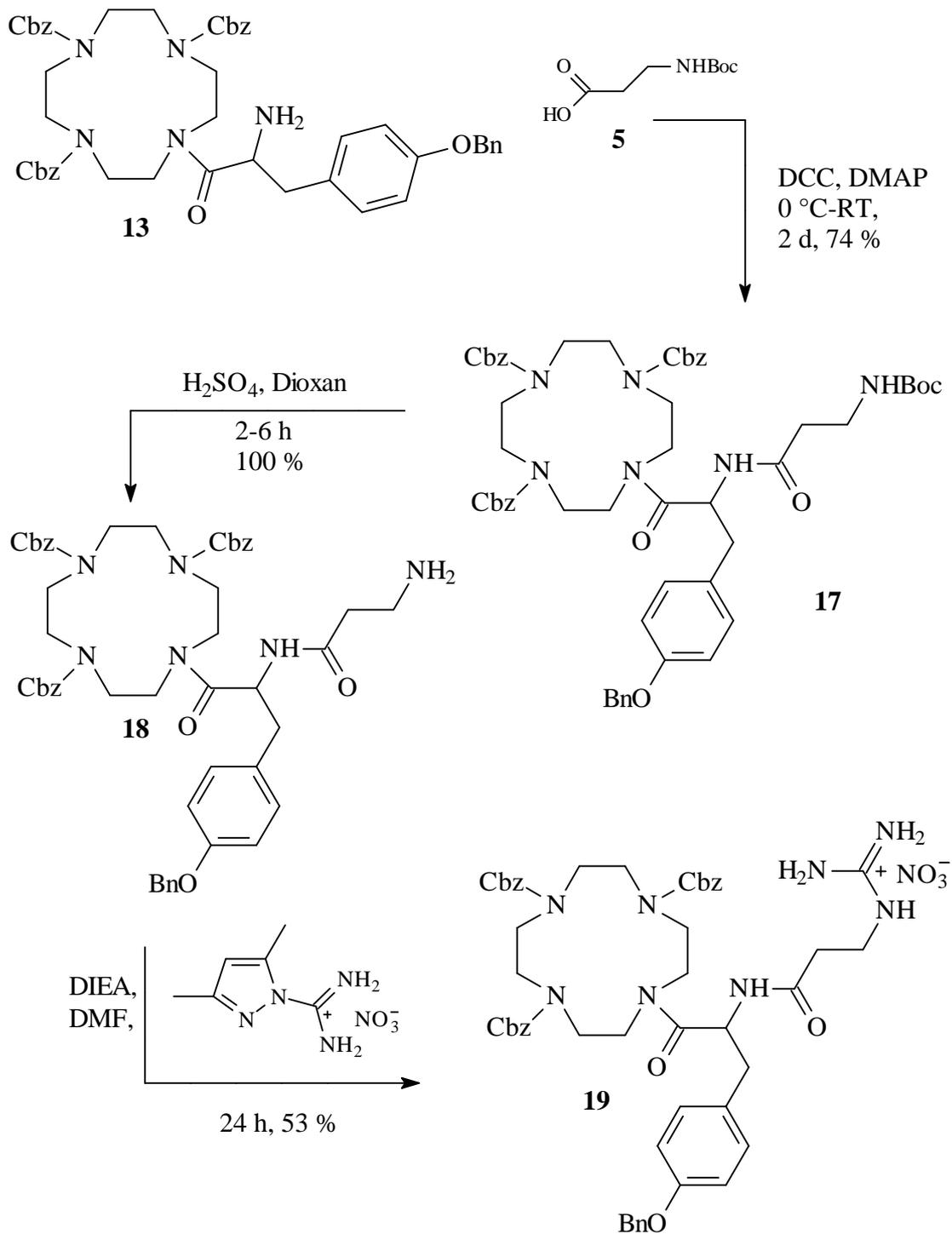


Abb. 4.11: Darstellung des Tyrosinderivates (19) über eine weitere Peptidkupplung

Die Syntheseschritte sind analog denen der anderen Cyclenderivate (vgl. Abb. 4.8). Der schnelle und gute Zugang zu der Verbindung **19** lieferte genug Produkt, so daß durch die einmalige Synthese auf eine weitere Optimierung verzichtet wurde.

Die schlechte Ausbeute bei der Guanidierung war auf die nicht vollständige Reaktion zurückzuführen. Das Reaktionsende war über die Dünnschichtkontrolle aufgrund der Polarität und des hohen basischen Anteils der Reagenzien schwer zu kontrollieren. Bei kleineren Ansätzen kam es aufgrund schlechter Löslichkeit zu Verdünnungseffekten mit dem Resultat, daß sich die Reaktionszeit verlängerte (vgl. mit folgenden Guanidierungen, Kapitel 4).

Die geringe Ausbeute der letzten Stufe war auf große Verluste bei der aufwendigen säulenchromatographischen Reinigung zurückzuführen.

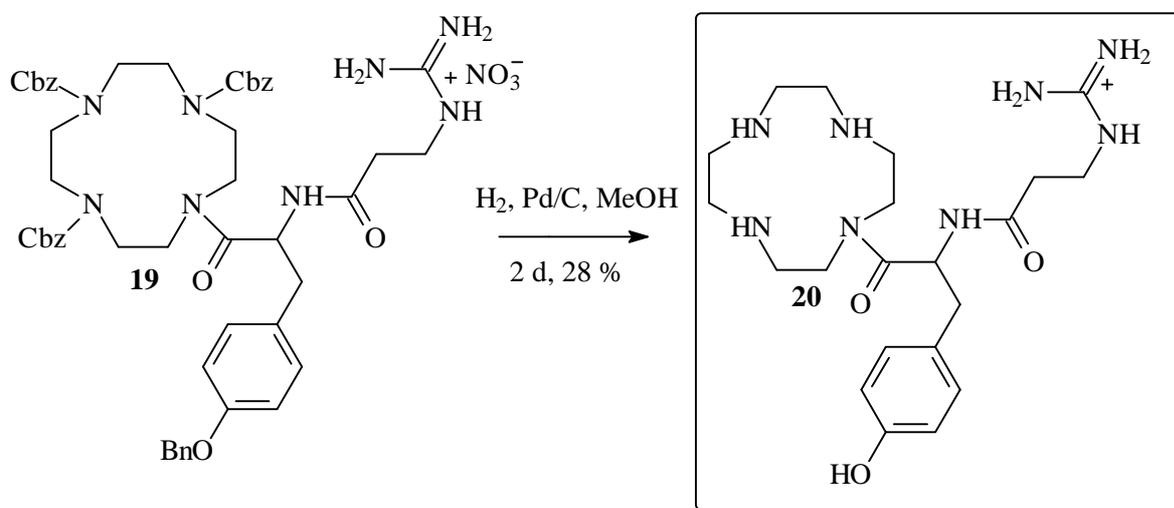


Abb. 4.12: Darstellung des Cyclenderivates (**20**)

Die gleichen Schwierigkeiten wie bei der vollständigen Entschützung des Cyclenderivates **14** zeigten sich auch hier. Somit erfolgte gleich nach der Reinigung über den basischen Ionenaustauscher und der Reversed Phase-Chromatographie die säulenchromatographische Reinigung mit MeOH/NH<sub>3</sub>, damit das Produkt schließlich rein generiert werden konnte.

Als nächstes wurde die Synthese des Tyrosinderivates **24** angestrebt, bei der die Ausgangsverbindung **41** schon mit einer Seitenkette ausgestattet war. Die Synthese der Verbindung **41** wird erst später beschrieben. Gemäß Kapitel 4.4.2 wird sie nach der Guanidierung als Analogon für die Aminosäure Arginin eingesetzt, wobei sie um eine Methylengruppe verkürzt ist. In diesem Kapitel dient sie lediglich als Spacer.

Wenn die Hydroxyfunktion des Tyrosins irgendeine hydrolysesteigernde Wirkung zeigt, würde sie voraussichtlich diesen Effekt durch die Kettenverlängerung verlieren. Dieser Einfluß läßt sich am schnellsten mit der RNA-Modellsubstanz HPNPP nachweisen (Kapitel 5). Zunächst erfolgt die Synthese der Verbindung **24** nach dem schon vorgestellten Schema.

#### **4.2.9 Darstellung des Tyrosinderivats (24) mit kettenverlängerter Tyrosineinheit**

Die Kupplung des freien Amins **41** (Darstellung siehe Kapitel 4.4.2) mit der Tyrosineinheit **8** konnte unter den einfachen Bedingungen (DCC, DMAP) durchgeführt werden. Das Amin war gut zugänglich und benötigte deshalb für eine Kupplung mit guten Ausbeuten keine weitere Aktivierung. Die dennoch durchgeführte Variante unter Verwendung des Aktivesters **10** und HOBT zeigte wiederum sehr gute Ausbeuten innerhalb weniger Stunden, was erheblich zur Optimierung der Reaktion führte.

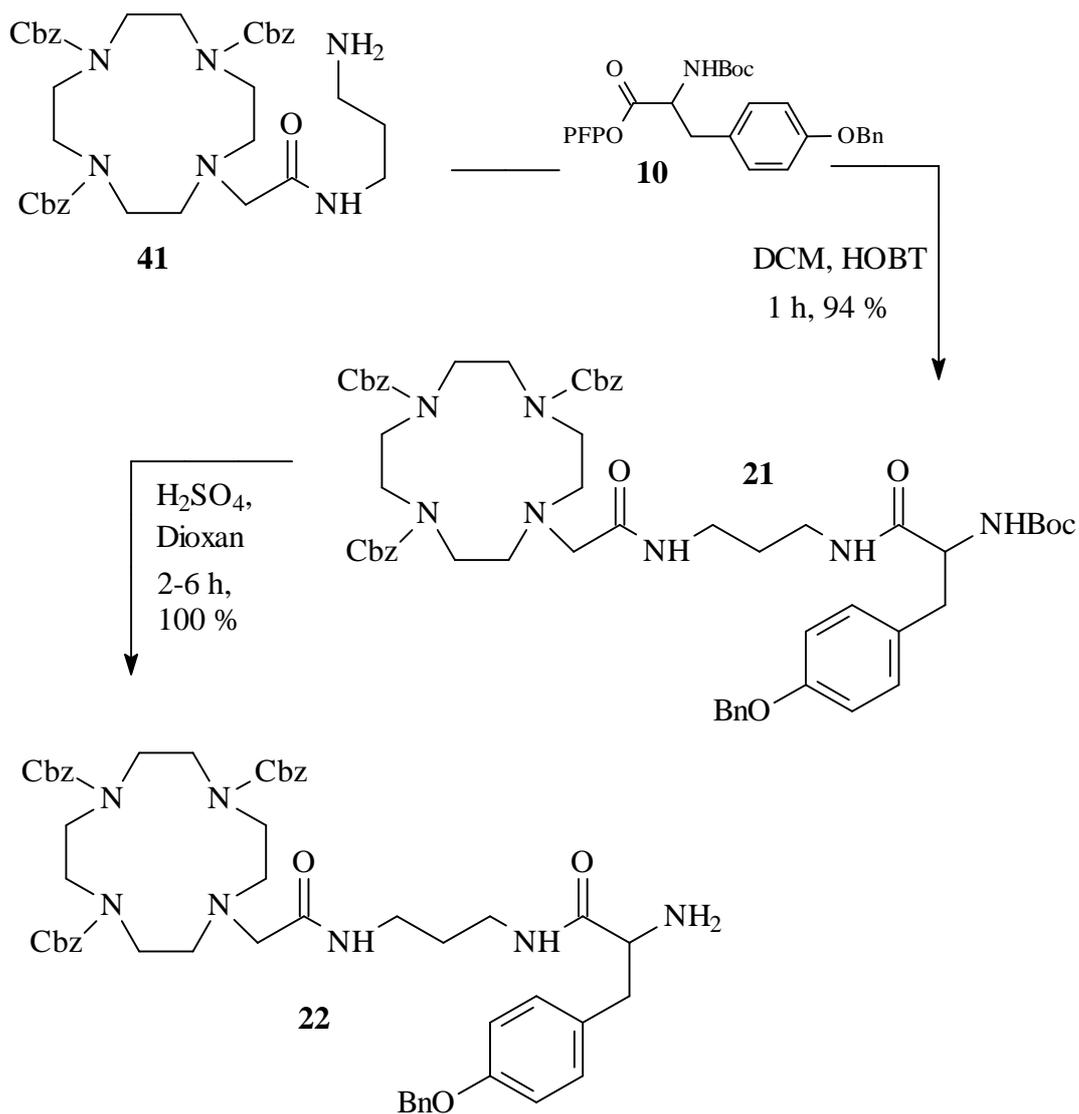


Abb. 4.13: Darstellung des Cyclenderivates (22)

Die übliche Entschützung der Boc-Gruppe mit konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  lieferte quantitative Ausbeuten und auch die Guanidierung verlief unter den gewohnten Bedingungen mit 90 % Ausbeute (Abb. 4.14).

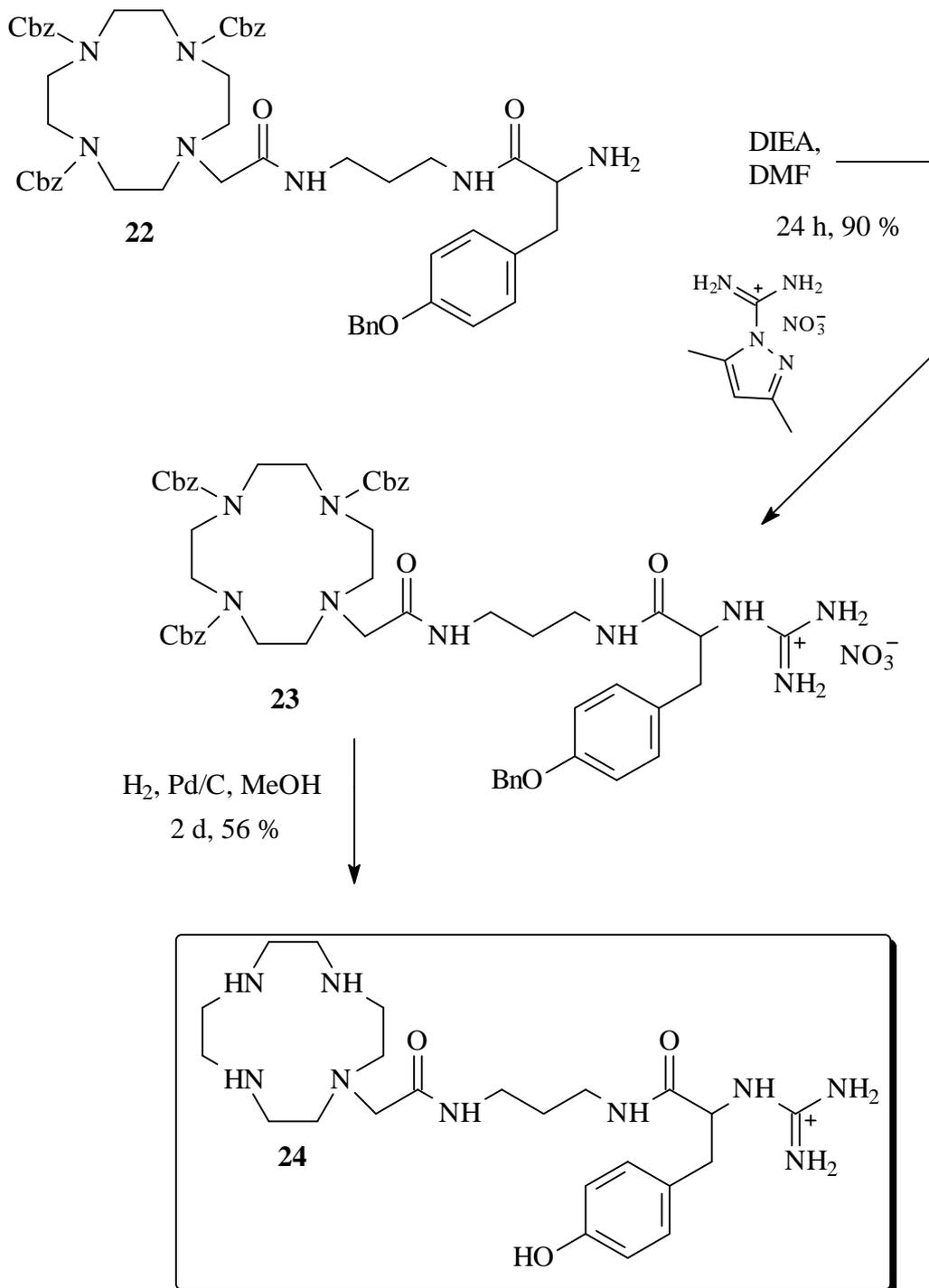


Abb. 4.14: Darstellung des Cyclenderivates (24)

Wie bei den vorherigen Verbindungen verlief die Hydrierung in mittelmäßiger Ausbeute, was viele Ursachen haben kann. Die Dünnschichtkontrolle versagte aufgrund der Polarität hier total, so daß nach dem basischen Ionenaustauscher und der Reversed Phase-Chromatographie noch die säulenchromatographische Aufreinigung (MeOH/NH<sub>3</sub>)

durchgeführt wurde. Durch die diversen Reinigungsschritte konnte die Ausbeute in der letzten Stufe nicht über 56 % gesteigert werden.

#### 4.2.10 Darstellung des Tyrosinderivates (28) mit kettenverlängerter Guanidinium-gruppe

Zur Vervollständigung der geplanten Auswahl von Tyrosinderivaten gemäß Abb. 4.4 wurde schließlich die Synthese des Cyclenderivates **28** angegangen.

Ausgehend vom Tyrosinderivat **22**, dem freien Amin, wurde unter einfachsten Kupplungsmethoden (DCC, DMAP) eine Peptidkupplung mit dem Boc-geschützten  $\beta$ -Alanin **5** mit sehr guten Ausbeuten durchgeführt. Die Darstellung des Tyrosinderivates **25** in Abb. 4.16 erfolgte innerhalb eines Tages mit 99 % Ausbeute.

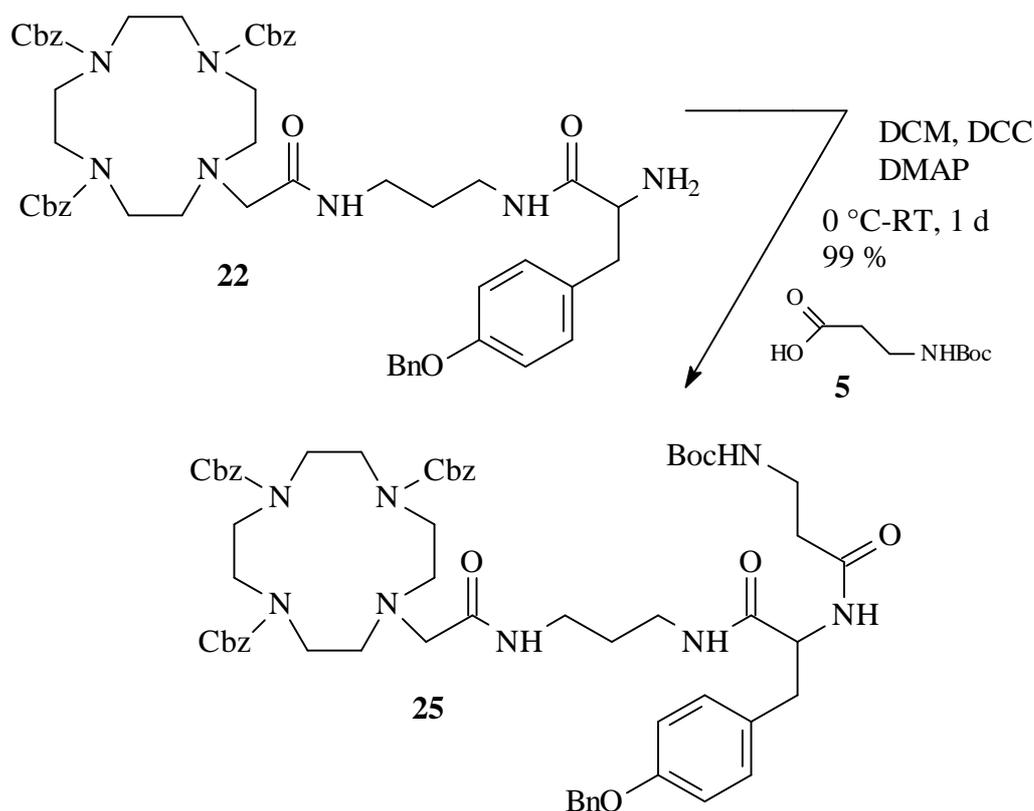


Abb. 4.15: Peptidkupplung zum Tyrosinvorläufer (25)

Wie zuvor, wurde Verbindung **27** in zwei Schritten über eine quantitative Entschützung und einer anschließenden Guanidierung mit 62 % Ausbeute aus Verbindung **25** generiert.

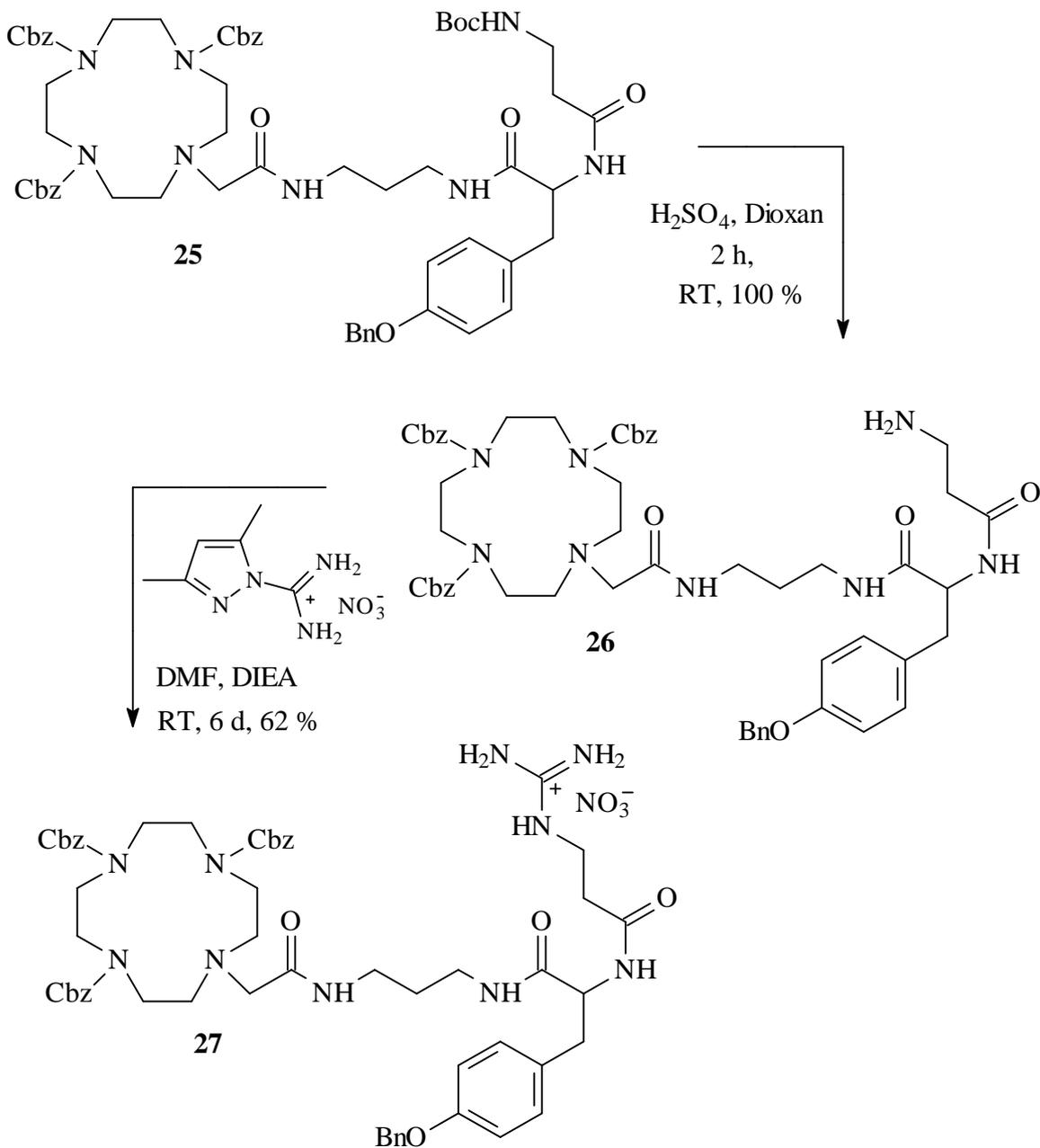


Abb. 4.16: Darstellung des Cyclenderivates (27)

Reaktionszeit und Ausbeute der Guanidierung deuten auf hohe Verdünnungseffekte hin. Bei kleinen Ansätzen wurde aufgrund der geringen Lösungsmittelmenge der DMF-Anteil erhöht. Diese Verdünnung schlägt sich auf die Reaktionszeit nieder, da die Reaktion auf eine bestimmte Konzentration des Guanidierungsreagenz 3,5-Dimethylpyrazol-1-formamidiniumnitrat angewiesen ist. Unter der üblichen Entschützungs-methode wurde schließlich die gewünschte Verbindung **28** erhalten.

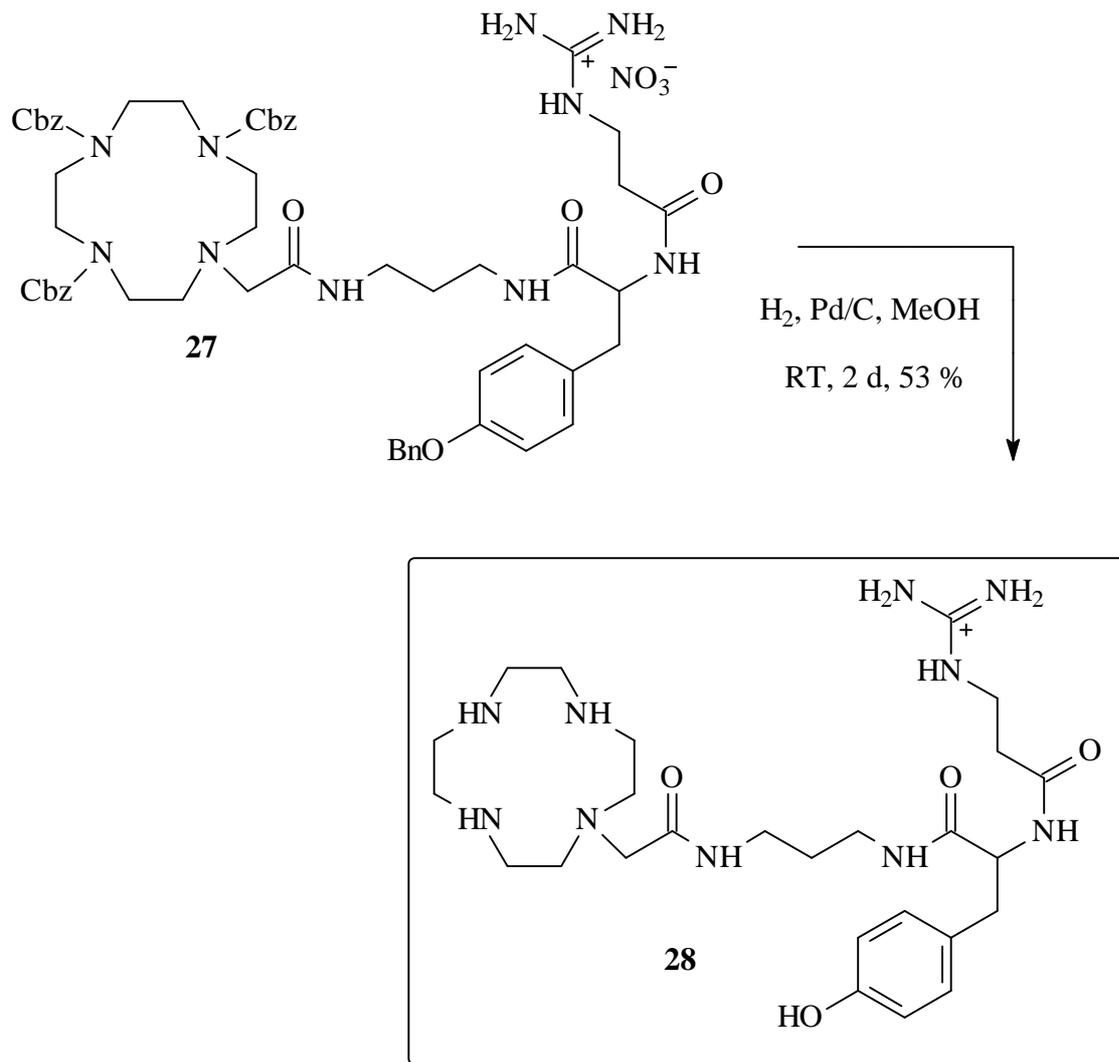


Abb. 4.17: Darstellung des Cyclenderivates (28)

Welche der fünf verschiedenen Tyrosinderivate **15**, **16**, **20**, **24** und **28** des nunmehr kompletten Sets die effektivste synthetische Ribonuclease ist, wird im Theoretischen Teil anhand kinetischer Studien hinsichtlich der hydrolytischen Aktivität an der RNA-Modellverbindung HPNPP gezeigt. Ebenso werden die Spaltungsfähigkeiten der Verbindungen direkt an der TAR-RNA im Elektrophorese-Kapitel 6 überprüft. Abschließend folgt eine Diskussion über die Wirkung dieser synthetisierten Verbindungen. Zunächst soll aber noch einmal auf die Synthese von Serin- und Glycinderivaten eingegangen werden.

### 4.3 Synthese der Serin- und Glycinderivate

Die anfangs erläuterte Idee, Serin- und Tyrosin-Cyclenderivate zu synthetisieren, wurde bisher nur für den Fall des Tyrosins verwirklicht. Erste Vorversuche mit der Aminosäure Serin scheiterten jedesmal beim Schritt der totalen Entschützung. Nicht nur die Synthese der angestrebten Serinderivate sollte auf der Grundlage der mit den Tyrosinderivaten gesammelten präparativen Erfahrungen noch einmal angegangen werden. Auch eine Ausweitung auf analoge Glycinderivate schien jetzt wünschenswert.

Die Einführung der Glycinderivate erfordert hier eine kurze Vorwegnahme eines Spaltergebnisses aus dem Kapitel 6. Die Tyrosinderivate **15** und **16** mit der kürzesten Seitenkette zeigten eine pyrimidinspezifische Spalteigenschaft an verschiedenen RNA's, die insbesondere das Nucleotid Uracil betrifft. Es stellt sich natürlich die Frage, warum gerade diese beiden Verbindungen so selektiv schneiden und wovon die Spaltung abhängig ist. Durch die Einführung des Glycins an das Cyclengerüst wird eine Verbindung generiert, die wie das Cyclenderivat **15** den gleichen Abstand der Guanidiniumgruppe vom Cyclengerüst besitzt, jedoch keine Hydroxyfunktion aufweisen kann. Ein Ausbleiben der Spaltung im Falle der Glycinverbindung spricht für eine effiziente Wirkung der Hydroxyfunktion. Auch das Serinderivat, das bis auf die Anwesenheit des aromatischen Ringes identisch mit Verbindung **15** ist, kann entscheidend zur Aufklärung der effektiven Spalteigenschaften der Verbindungen **15** und **16** beitragen. Das Ausbleiben der Spaltung würde die Bestätigung für die Effizienz des Phenolsystems liefern. Eine auftretende Spaltung würde wiederum auf die Wichtigkeit der Hydroxyfunktion schließen. Im folgenden wird kurz auf die Synthese der beiden Verbindungen eingegangen.

#### 4.3.1 Darstellung der Serinverbindung (31) und Glycinverbindung (34)

Die Darstellung der Derivate **31** und **34** erfolgte analog der Synthese des Tyrosinderivates **14**. Im Falle des Glycins konnten die Ausbeuten nicht optimiert werden, so daß sich hier eine deutliche Schwankung zu den Serin- und Tyrosinderivaten bemerkbar gemacht hat.

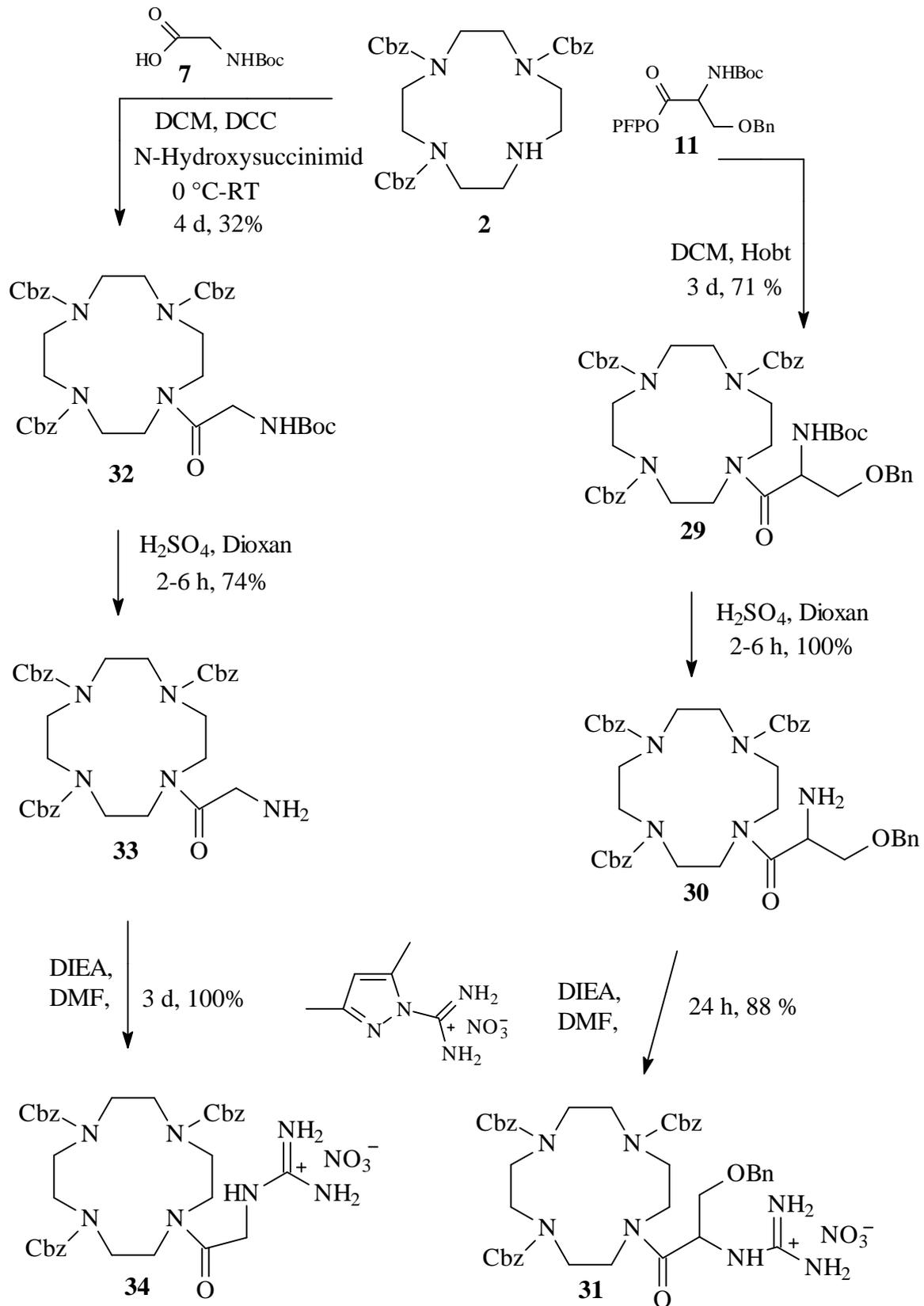


Abb. 4.18: Darstellung der Serin- und Glycinderivate (31) und (34)

### 4.3.2 Darstellung des Glycinderivates (35)

Die den Tyrosinderivaten analoge Aufarbeitung der letzten Stufe, die totale Entschützung, verlief nicht ohne Schwierigkeiten. Eine MALDI-TOF Bestimmung der Masse zeigte in beiden Fällen neben dem Zielmolekül immer Zerfallsprodukt an. Im Fall des Serinderivates konnte nur die Masse des Cyclens detektiert werden, so daß die eigentlich starke Peptidbindung hydrolysiert worden sein muß. Im Fall des Glycinderivates konnte zwar die Verbindung **35** als Hauptprodukt isoliert werden, jedoch lagen neben diesem Spaltprodukte vor. Eine erneute Aufreinigung über den basischen Ionenaustauscher und einen Millipore-Filter lieferte nach der MALDI-TOF-Untersuchung die Erklärung für den Zerfall der Produkte. Das Glycinderivat lag nach der zweiten Reinigung vollständig hydrolysiert vor, so daß auch hier wieder nur Cyclen nachgewiesen wurde. Somit wurde die Vermutung bestätigt, daß die Peptidbindungen durch den zu alkalischen Ionenaustauscher leicht hydrolysiert werden.

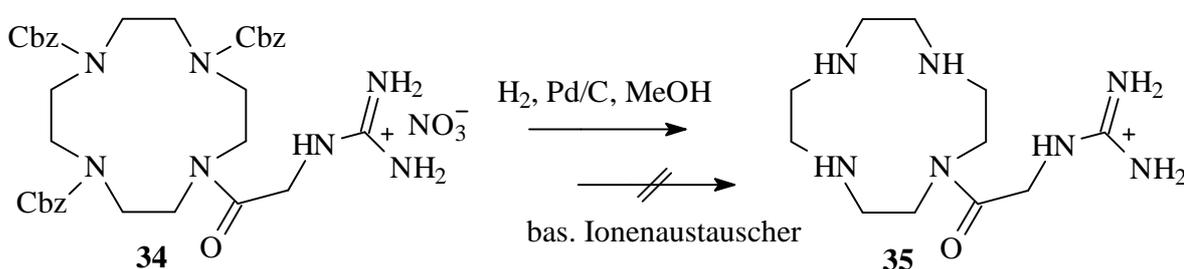
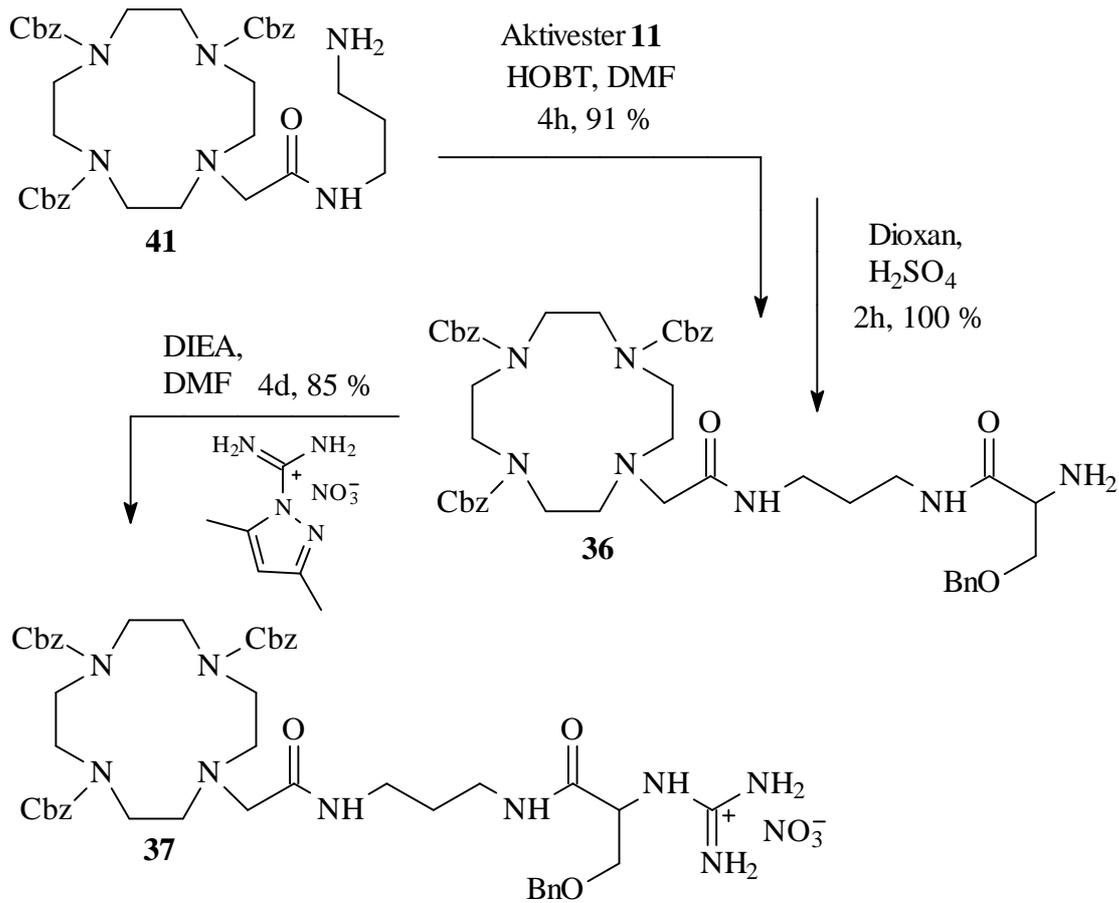


Abb. 4.19: Darstellung des Glycinderivates (35)

Auch bei der nachfolgend geschilderten totalen Entschützung des Serinderivates **37** warf die Verwendung des basischen Ionenaustauschers Probleme auf.

### 4.3.3 Darstellung des Serinderivates (37)

Die gleiche Syntheseroute wie die zum Tyrosinderivat **24** wurde mit der Aminosäure Serin durchgeführt. Die Ausbeuten lagen bei gleichen Bedingungen etwas unter denen der Tyrosinderivate (Kupplung 91 %, Boc-Abspaltung 100 % und anschließende Guanidierung 85 %).



**Abb. 4.20: Darstellung des Serinderivates (37)**

Als schwierig erwies sich wieder die vollständige Entschützung, da kein reines Produkt erhalten werden konnte. Das MALDI-TOF bestätigte wieder den Zerfall der Verbindung in das Edukt **41**. Neben den Zerfallsprodukten lag auch noch die Cbz-entschützte, aber benzylierte Verbindung vor. Ein weiterer Versuch, die Verbindung hydrogenolytisch umzusetzen, scheiterte erneut. Die dargestellten Serin- und Glycinderivate zeigten nach dem Gebrauch des basischen Ionenaustauschers sowie der Durchführung der alkalischen säulenchromatographischen Reinigung mit MeOH/NH<sub>3</sub> eindeutig einen hydrolytischen Zerfall der Produkte an. Warum jedoch unter den gewählten Bedingungen die Tyrosinderivate stabilere Peptidbindungen als die Serin- und Glycinderivate vorweisen konnten, bleibt ungeklärt. Durch die noch offenstehende Beweisführung der Uracil-Spezifität der Verbindungen **15** und **16** an verschiedenen RNA's, wurden die Synthesen der Serin- und Glycinderivate erstmal eingestellt und somit auch der Versuch der anschließenden Reinigung durch RPHPLC.

#### 4.4 Darstellung der Verbindung (43) als direkter Vorläufer für das Neunmer-Peptid-Cyclen-Konjugat I

In Kapitel 4.2.9 wurde bereits die Verwendung der Verbindung **41** im Rahmen von Peptidkupplungen beschrieben. Diese Verbindung dient auch als direkter Vorläufer für die nun beabsichtigte Darstellung der Cyclenverbindung **43** mit Arginin-ähnlicher Seitenkette. Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle der bereits im Arbeitskreis etablierte Syntheseweg zu **41** mit aufgeführt.<sup>69</sup>

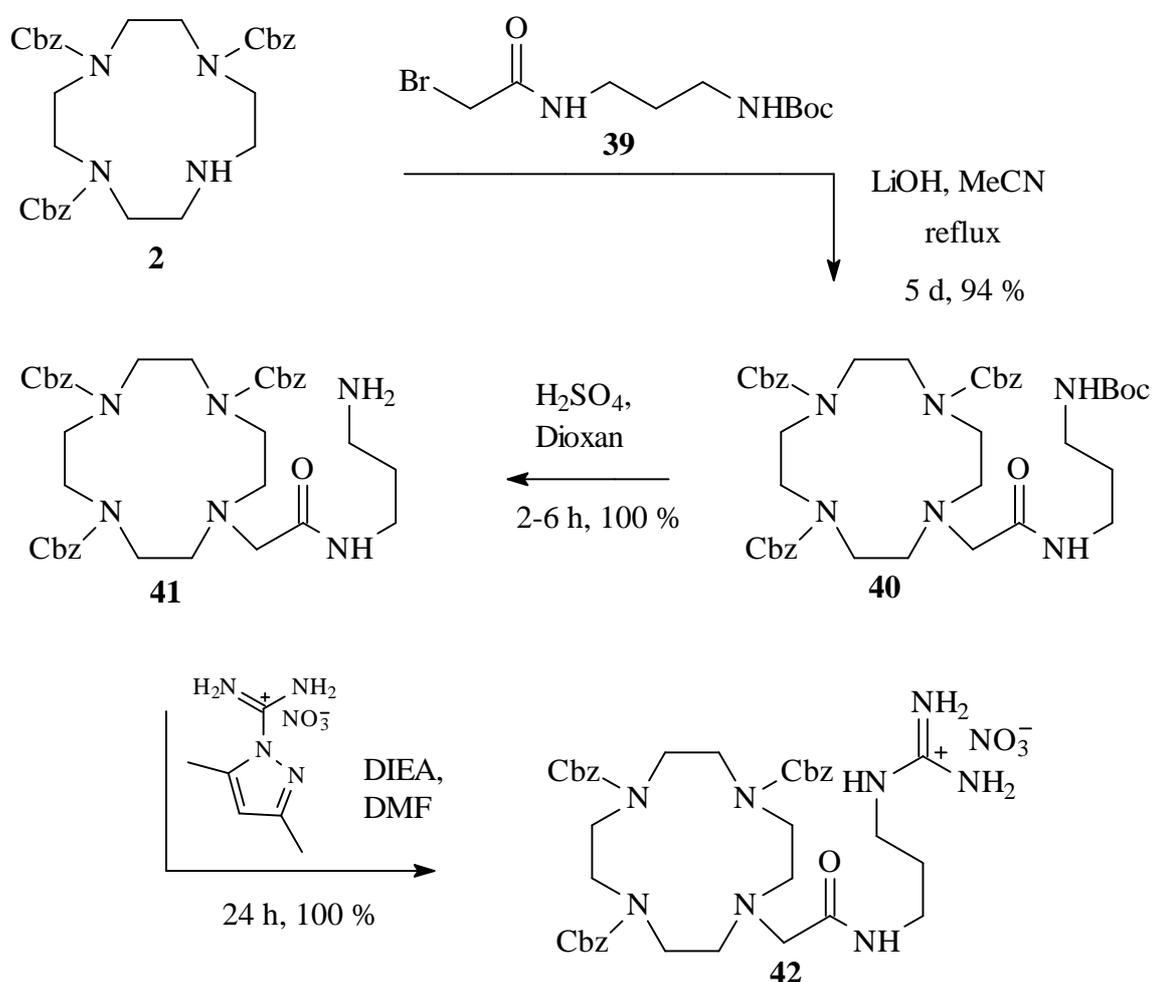
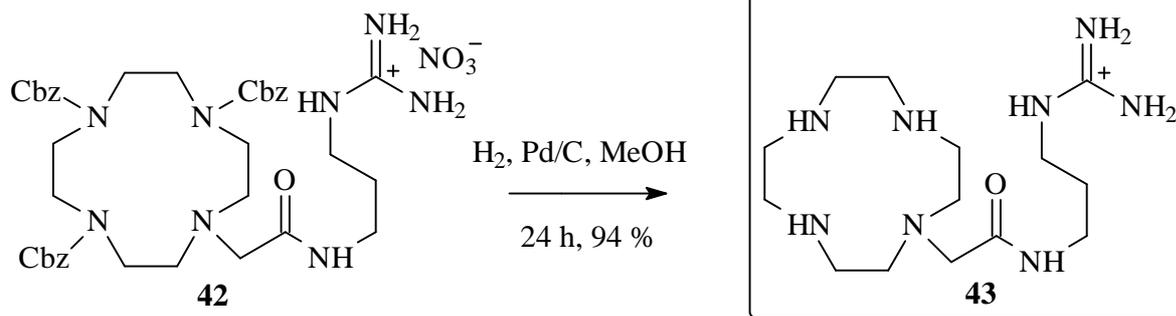


Abb 4.21: Darstellung des Cyclenderivates (**42**) ausgehend von dem dreifach-geschütztem Cyclen (**2**)

Zuerst erfolgte die Einführung der Seitenkette **39** durch einfache Substitution an das Cbz-geschützte Cyclen **2** mit 94 %-iger Ausbeute. Die folgende quantitative Entschützung mit

konz. Schwefelsäure lieferte das freie Amin **41**, das mit 3,5-Dimethylpyrazol-1-formamidiniumnitrat in 100 % Ausbeute zur Guanidiniumgruppe reagierte. Nach der Guanidierung wurden die Cbz-Gruppen durch Hydrierung in 94 % Ausbeute entfernt. Das entschützte Cyclenderivat **43** wurde durch einen basischen Ionenaustauscher und durch Reversed Phase-Chromatographie gereinigt.



**Abb. 4.22: Darstellung Cyclenderivates (43)**

Die Syntheseroute lieferte mit einer Gesamtausbeute von 88 % über vier Stufen einen einfachen Zugang zu der Verbindung **43**. Wichtig für die Hydrolyse und Spaltungsexperimente ist die Reinheit der Verbindung. Desweiteren ist sie sehr hygroskopisch und sollte deshalb entweder in die HCl-Salzform umgesetzt werden oder vor jedem weiteren Einsatz an der Vakuumpumpe getrocknet werden.

Die nunmehr vorliegende Verbindung **43** soll als 1:1 Zn(II)-Cyclen-Komplex auf ihre Hydrolysefähigkeit getestet werden (Kapitel 5). Die hydrolytische Wirkung von **43** bzw. die Auswirkungen der Guanidiniumgruppe werden anschließend mit der nicht guanidierten Verbindung **AL**<sup>69</sup> verglichen und diskutiert.

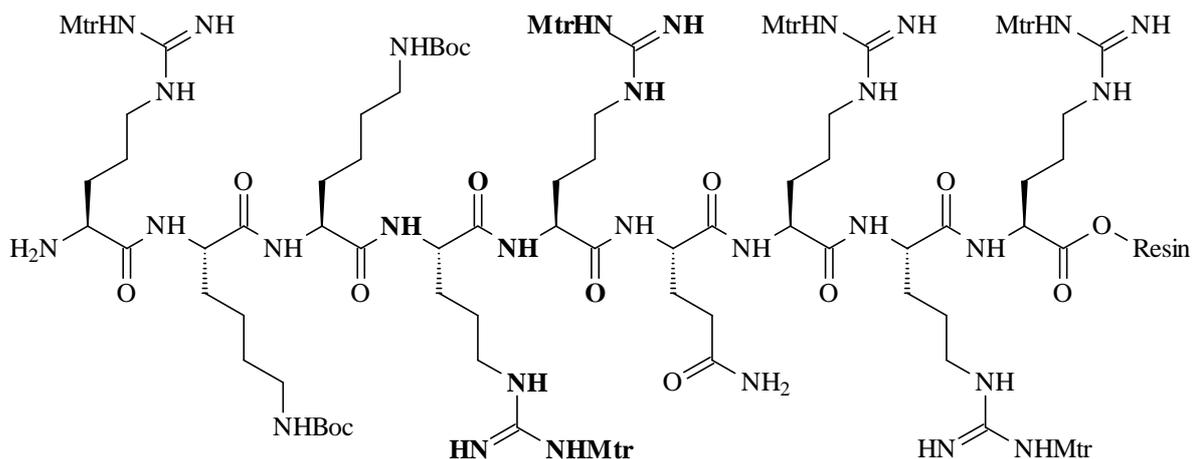
#### 4.5 Teil II, synthetische Ribonucleasen mit spezieller Erkennungseinheit; Darstellung des Cyclen-Peptid-Konjugats (I) und seiner Derivate

##### 4.5.1 Festphasenpeptidsynthese und Kupplung mit dem Cyclenvorläufer (45)

Wie eingangs schon erwähnt wurde, benötigt die synthetische Ribonuclease eine Erkennungseinheit (Tat-Peptid), wenn sie spezifisch an einem Ort (TAR-RNA) hydrolytisch aktiv werden soll.

Die hohe Vermehrungsrate des HI-Virus beruht auf dem guten Zusammenspiel von Tat und TAR. Das Ziel ist daher, diesen Effekt effizient zu unterbinden.

Als Erkennungseinheit dient die Arginin-reiche Sequenz des Tat-Proteins, die für die effektive Tat-TAR-Bindung zuständig ist.



**Abb. 4.23:** Das geschützte neunmer Peptid [NH<sub>2</sub>Arg(Mtr)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Mtr)-Arg(Mtr)-Gln-Arg(Mtr)-Arg(Mtr)-Arg(Mtr)] an der Festphase. Die für die effektive Bindung zur TAR-RNA beteiligten Arginine sind dick gezeichnet

Neben der Erkennungseinheit soll die hydrolytische Cyclen-Einheit für die effektive Spaltung an der TAR-RNA sorgen. Es war daher geplant, in einer Festphasenpeptidsynthese das neunmer-Peptid an das Cyclen zu koppeln. Hierzu mußte zunächst eine Säurefunktion etabliert werden.

### 4.5.2 Vorstufe für die Peptidkupplung

Die für die Peptidkupplung an das Cyclenderivat **3** benötigte Säurefunktion wurde durch eine einfache Substitution mit Bromessigsäuremethylester eingeführt. Anschließend fand mit sehr guten Ausbeuten die Verseifung des Esters statt.

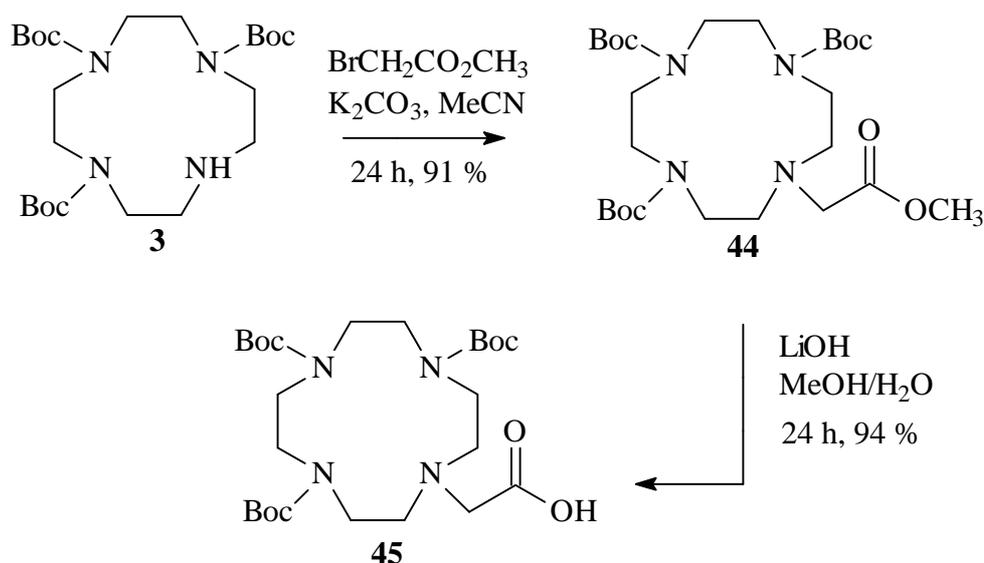


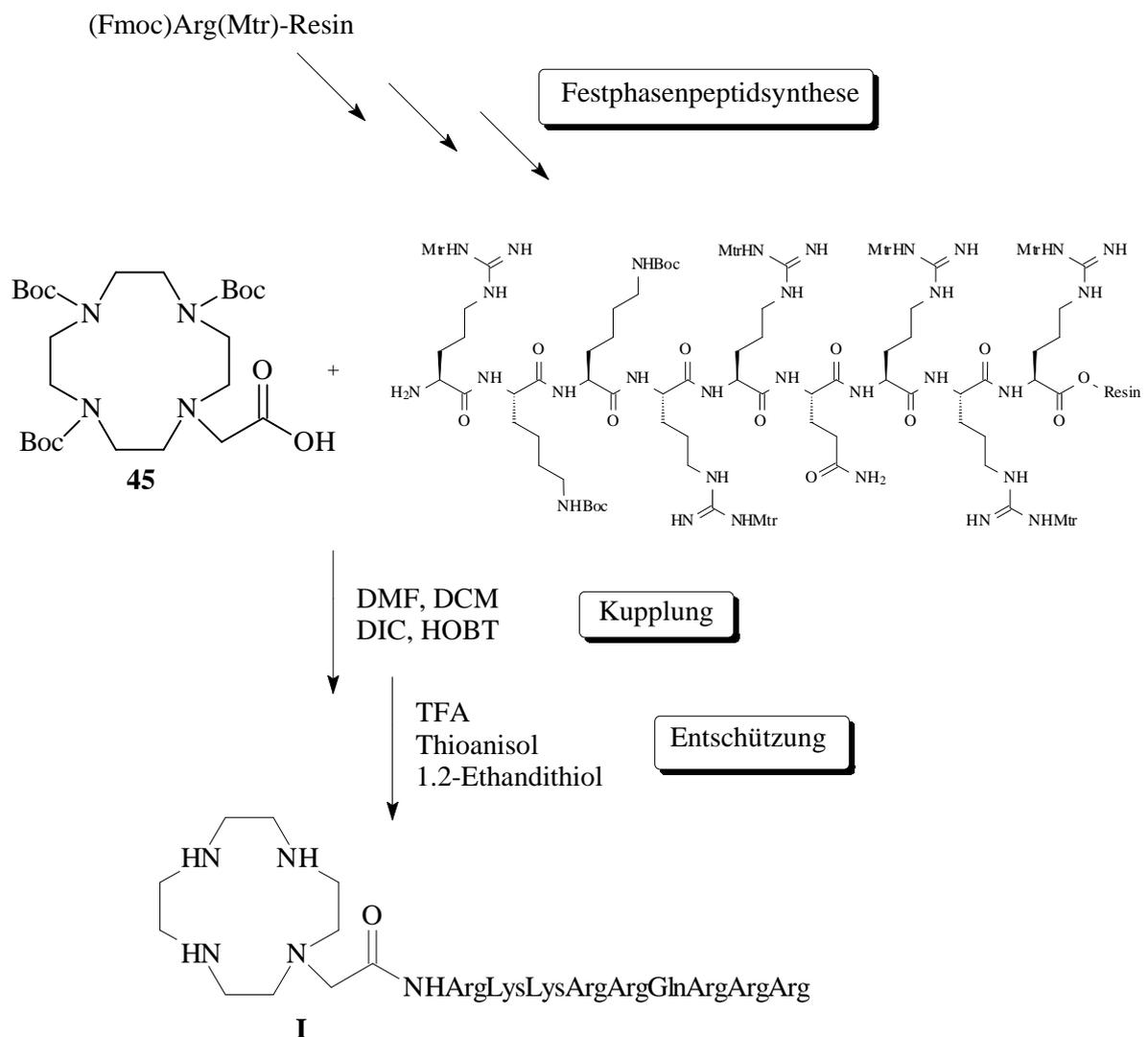
Abb. 4.24: Darstellung des Cyclenderivates (**45**) mit etablierter Säurefunktion

### 4.5.3 Festphasenpeptidsynthese und Kupplung der hydrolytischen Einheit

Die Peptidfestphasensynthese wurde nach der Standard Peptidfestphasensynthese (Fmoc) durchgeführt.

Ausgehend vom Wang-Resin, an das bereits die erste Aminosäure (Arginin) gekuppelt war, wurde mit einer Ansatzgröße von 0.2 mmol begonnen. Die Synthese wurde in einem Scheidetrichter mit eingebauter Glasfritte durchgeführt, wobei die flüssigen Phasen jedesmal aus dem Reaktionsgefäß mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt werden konnten. Zu Beginn wurde die Fmoc-geschützte  $\alpha$ -Aminofunktion der terminalen Aminosäure mit 50 % (v/v) Piperidin/DMF entschützt und mit der nächsten auch an der Aminofunktion Fmoc-geschützten Aminosäure gekuppelt. Diese Aminosäure wurde jedoch als Aktivester (Pentafluorphenyl- bzw. 1-Hydroxybenzotriazol-Ester) in 2.5-fachem Überschuß eingesetzt. Der 1-Hydroxybenzotriazol-Ester wurde bereits vor der Kupplung

unter Verwendung des Kupplungsreagenzes N, N'-Diisopropylcarbodiimid gebildet. Die Vollständigkeit jeder Kupplung wurde mit dem Kaiser (Ninhydrin)-Test überprüft.<sup>78</sup> Zwischendurch wurde das Resin immer wieder mit DMF und Methanol gewaschen. Die Cycleneinheit **45** wurde unter den gleichen Bedingungen als HOBT-Ester mit 2.5-fachem Überschuß eingeführt. Die Abspaltung des Resins und der Schutzgruppen erfolgte in einem Schritt, wobei das Peptid über 6 Stunden in TFA, Thioanisol und 1.2-Ethandithiol gerührt wurde.



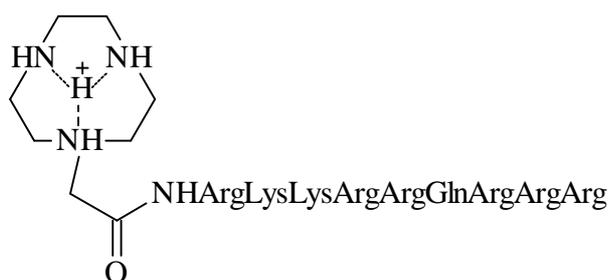
**Abb. 4.25:** Darstellung des Neunmer-Peptides (**I**) über Festphasenpeptidsynthese und anschließender Kupplung mit dem Cyclenderivat (**45**)

<sup>78</sup> E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595



#### 4.6 Darstellung des 1,4,7-Triazacyclononans

Mit Blick auf die heute vorliegenden Erkenntnisse über Metalloenzyme liegt die Vermutung nahe, daß den im Cyclen zentral komplexierten Metallkationen (vgl. z.B. Kimuras Verbindungen) eine entscheidende Rolle bei der Spaltung der TAR-RNA zukommt (vgl. Ergebnisse der Hydrolysen mit den RNA-Modellen im kinetischen Teil). Wie noch in Kapitel 6 gezeigt werden wird, ist dies jedoch nicht der Fall. Durch Abwesenheit von Metallkationen erfolgt eine effektive Spaltung an der TAR-RNA durch das Peptid-Cyclen-Konjugat **I**. Vielmehr kann nun spekuliert werden, daß durch das Vorhandensein einer Bis(ammonium)spezies<sup>79</sup> im Cyclen bei pH 7 ein Bis-Kation-Mechanismus vorliegt, der die Spaltung der Phosphodiester katalysiert. Zur Überprüfung dieser Hypothese ist daher die Darstellung des 1,4,7-Triazacyclononans **50** sinnvoll. Diese Einheit wird wie das Cyclen mit dem Bromessigsäureester umgesetzt, anschließend verseift und an das Neunmer-Peptid gekuppelt. Im protonierten Fall besitzt das Nonan nur eine positive Ladung im Zentrum des Moleküls, so daß der für die Cyclenderivate postulierte katalytische Bis-Kationen-Mechanismus nicht stattfinden kann. Die Spaltung würde so ausbleiben, womit eine Erklärung für den Mechanismus der katalytisch wirksamen Bis(ammonium)spezies gefunden wäre.



**Abb. 4.27:** Schlüsselverbindung zur Überprüfung der Hypothese eines Bis-Kationen-Mechanismus bei Cyclenderivaten

<sup>79</sup> K. C. Chang, E. Grunwald, L. R. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3794-3796.

#### 4.6.1 Synthese des Tosyl-geschützten Nonans (48) als Vorläufer

Das Tosyl-geschützte Nonan **48** wurde über eine Richman-Atkins Cyclisierung<sup>80</sup> dargestellt. Die Vorläufer, das N, N', N''-Tri(*p*-tosyl)diethylentriamin **46** und das 1,2-Di(*p*-tosyl)ethan **47** wurden nach einer literaturbekannten Vorschrift<sup>81</sup> dargestellt und anschließend cyclisiert. Für die Cyclisierung kann auch 1,2-Dibromethan oder 1,2-Di(mesyl)ethan<sup>82</sup> anstatt des Vorläufers **47** verwendet werden.

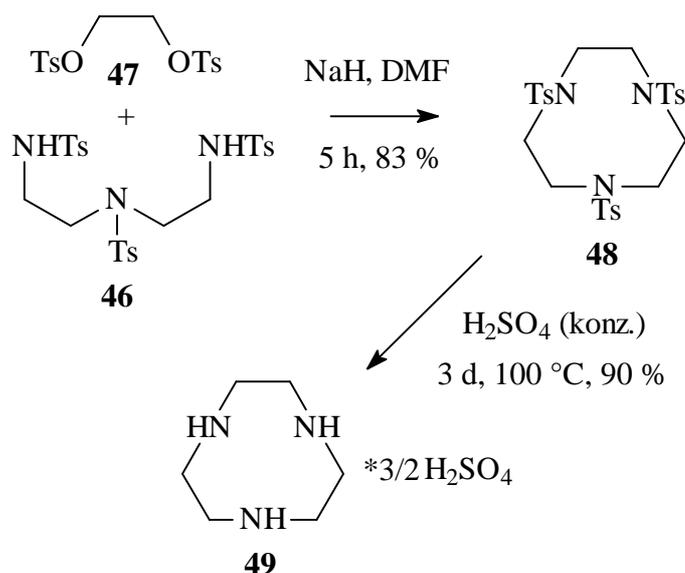


Abb. 4.28: Darstellung des 1,4,7-Triazacyclononan sulfats (**49**)

Zur vollständigen Entschützung der Tosylgruppen mußte die Verbindung bei mindestens 180 °C mit konzentrierter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> einige Minuten<sup>83</sup> gekocht werden. Die Überführung aus der Salz- in die reine Form erfolgte analog dem Cyclensulfat durch Kochen in KOH und Isopropanol und anschließendem Abfiltrieren des Kaliumsulfates.

<sup>80</sup> T. J. Atkins, J.E. Richman, W. F. Oettle, *Org. Synth.* **1978**, 58, 86.

<sup>81</sup> G. H. Searle, R. J. Geue, *Aust. J. Chem.* **1984**, 37, 959-970.

<sup>82</sup> F. Chavez, A. D. Sherry, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 2990-2992.

<sup>83</sup> I. Lazar, *Syn. Comm.* **1995**, 25, 3181-3185.

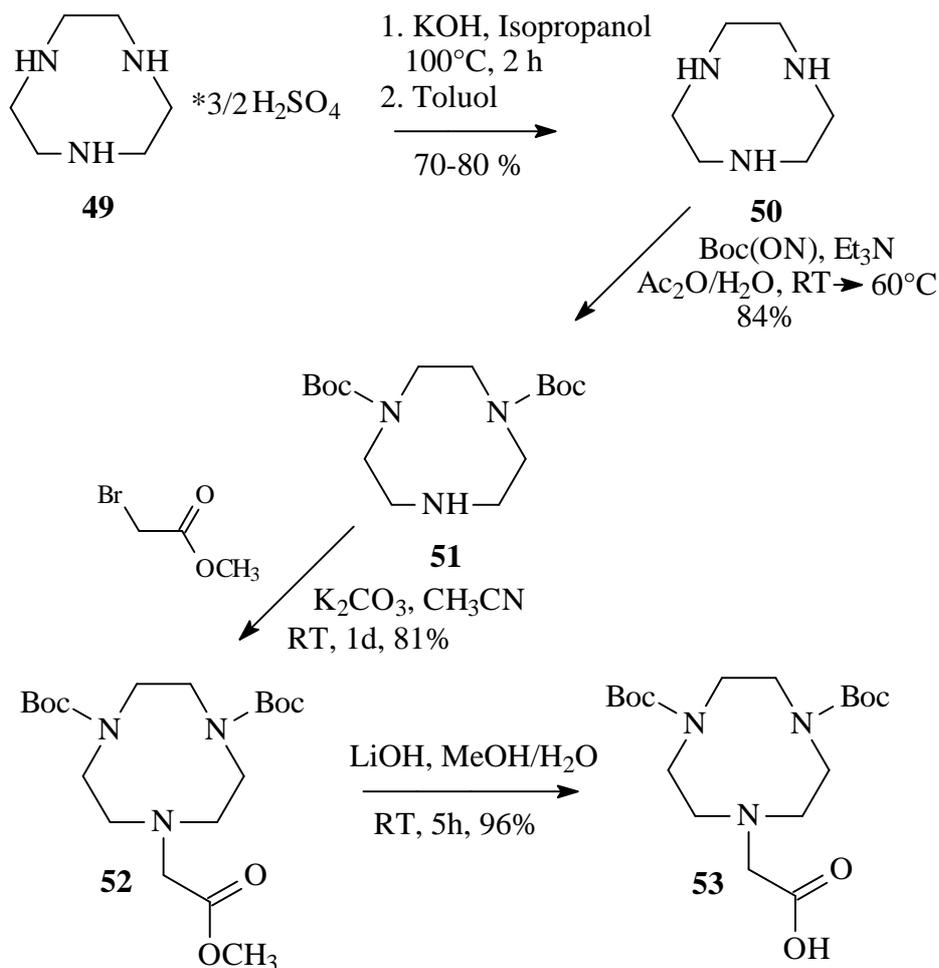


Abb. 4.29: Darstellung des Nonanderivates (53)

Nach dem Scheitern der zweifachen Boc-Schützung des reinen Nonans mit  $\text{Boc}_2\text{O}$  wurde das 2-(tert.-butoxycarbonyloxyimino)-2-phenylacetonitril ( $\text{Boc-ON}$ )<sup>84</sup> erfolgreich eingesetzt.

Durch einfache Substitution mit Bromessigsäuremethylester und anschließender Verseifung des Esters wurde das Nonanderivat **53** generiert. Dieses diente, wie das in Kapitel 4.5.1 hergestellte Cyclenderivat **45** als Vorläufer zur Peptidkupplung. Die Kupplung mit dem Neunmer-Peptid am Resin und die anschließende Reinigung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie beim Cyclen.

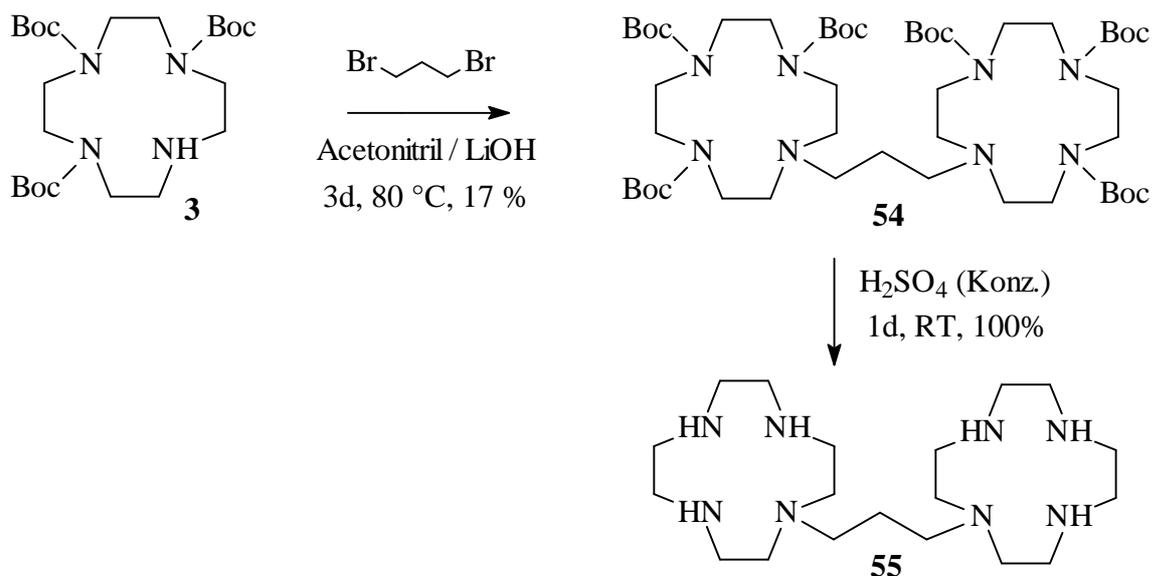
<sup>84</sup> M. Itoh, D. Hagiwara, T. Kamiya, *Tetrahedron Letters* **1975**, 49, 4393-4394.  
Z. Kovacs, A. D. Sherry, *Tetrahedron Letters* **1995**, 36, 9269-9272.

#### 4.7 Darstellung des Dimers

Durch die hohe kinetische Stabilität wurde immer mehr Aufmerksamkeit auf die Metall-Azamakrocyclen gelenkt. Verschiedene Arbeitsgruppen<sup>85</sup> synthetisierten symmetrische und unsymmetrische Cyclameinheiten, die durch einen Linker getrennt wurden. Einige dieser Biscyclameinheiten stellten sich als vielversprechende neue Anti-HIV Kandidaten heraus. Die Dimere JM3100 (mit Phenylen-Bismethylen Linker)<sup>86</sup> und JM2763 (mit Propyl-Linker)<sup>87</sup> zeigten schon hochpotente Anti-HIV Eigenschaften mit geringer Toxizität, wobei der Wirkmechanismus noch nicht geklärt ist.

Diese Resultate legten eine schnelle, kurze Synthese einiger Dimere nahe, deren hydrolytische Aktivität mittels Elektrophorese an der TAR-RNA getestet werden sollte.

Erfolgreich war nur die Synthese des Dimers **55**, daß aus dem dreifach Boc-geschützten Cyclen **3** und 1.3-Dibrompropan unter Rückfluß hergestellt wurde.



**Abb. 4.30: Darstellung des Dimers (55) über das Boc-geschützte Cyclen (3) und 1,3-Dibrompropan**

<sup>85</sup> a) I. Gardinier, A. Roignant, N. Oget, H. Bernard, J. J. Yaouane, H. Handel, *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 7711-7714;

b) G. Bridger, R. T. Skerlj, S. Padmanabhan, D. Thorton, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1519-1522;

c) J. Dessolin, G. Quelever, M. Camplo, J. L. Kraus, *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 853-856.

<sup>86</sup> D. Guillaume, G. R. Marshall, *Synthetic Communications* **1998**, *28*, 2903-2906.

<sup>87</sup> E. De Clercq, N. Yamamoto, R. Pauwels, M. Baba, D. Schols, H. Nakashima, J. Balzarini, Z. Debyser, B. A. Murrer, D. Schwartz, D. Thorton, G. Bridger, S. Fricker, G. Henson, M. Abrams, D. Picker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 5286.

Die Verbindung wurde im zweiten und somit letzten Schritt mit konzentrierter Schwefelsäure quantitativ entschützt. Die Reinigung erfolgte wieder über einen basischen Ionenaustauscher und durch Reversed Phase-Chromatographie.

Eine lange Reaktionszeit für die Kupplung der beiden Cycleneinheiten über den Spacer schien sich eher negativ auf die Ausbeute auszuwirken, da gleichzeitig die Bildung eines unpolaren Nebenproduktes mit der Zeit zunahm. Auf eine Optimierung der Synthese wurde aus Zeitgründen verzichtet, zumal die erhaltene Produkt-Menge ausreichend für die Elektrophorese-Versuche in Kapitel 6 war. Die Reaktionssequenz ist in Abb. 4.30 wiedergegeben.

## 5. Kinetische Studien - Bestimmung von Protolyse- und Komplexstabilitätskonstanten durch potentiometrische Titration

Im Rahmen der durchgeführten potentiometrischen Titration (Säure/Base-Titration) können neben den Protolysekonstanten ( $pK_s$ ) auch die Komplexstabilitätskonstanten ( $pK_{ML}$ ) bestimmt werden. Nur so können Aussagen über die Stabilität und den Wirkungsbereich (pH-Bereich) des Komplexes gemacht werden. Genauere Angaben zur Durchführung der Hydrolysen werden im Experimentellen Teil (Kapitel 7) gemacht.

### 5.1 Bestimmung der Protolyse- und Komplexstabilitätskonstanten des Peptid-Cyclen-Konjugat I Vorläufers (43)

Bevor die hydrolytische Wirkung des Peptid-Cyclen-Konjugats **I** an der TAR-RNA des HIV-1 getestet werden kann, muß das Cyclenderivat **43** als Modellsubstanz überzeugende Ergebnisse liefern.

Im folgenden wird die Ermittlung der Protolysekonstanten und der Komplexstabilitätskonstante des Zink(II)-Cyclen-Komplexes beschrieben. Anschließend werden verschiedene Zink-Cyclenderivate miteinander verglichen.

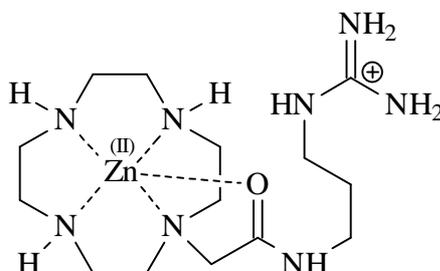
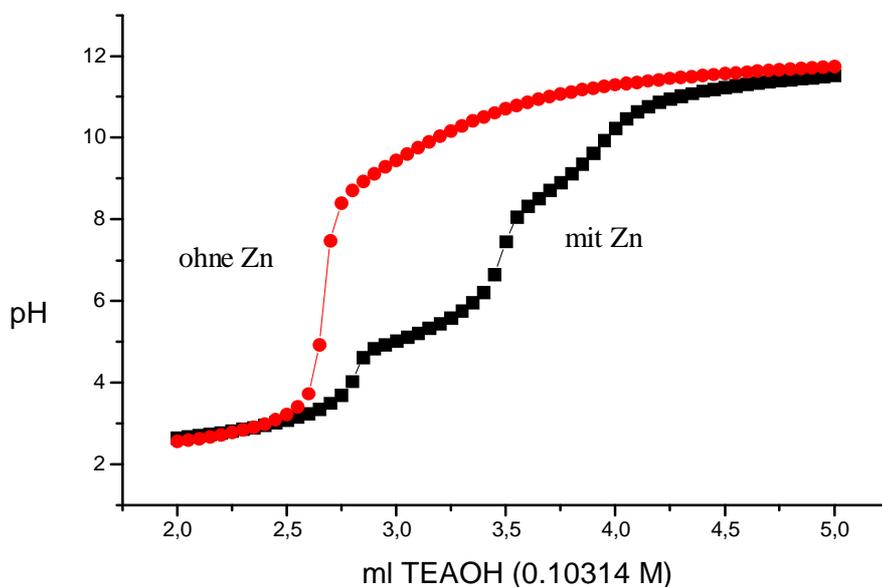


Abb. 5.1 Darstellung des Zink(II)-Cyclen-Komplexes aus dem Cyclenderivat (43)

Durch eine Säure/Base-Titration im Bereich pH 2 bis 11 wurden zunächst die  $pK_s$ -Werte des Cyclenderivates **43**, welches als entsprechendes Hydrochlorid eingesetzt wurde, berechnet. Dazu wurde die Verbindung **43** (0.002 M) zusammen mit Perchlorsäure (0.01 M) und Tetraethylammoniumperchlorat (0.09 M) gegen eine 0.1 N Tetraethylammoniumhydroxidlösung titriert. Gemessen wurde bei einer Ionenstärke von 0.1 mit einer kombinierten pH-Glaselektrode. Desweiteren wurde die angesetzte Lösung mit einer

äquimolaren Menge an Zink(II)-perchlorat versetzt und unter gleichen Bedingungen die Komplexstabilitätskonstante bestimmt. Der Meßbereich beschränkte sich auf die angegebenen Werte (pH 2-11), da die pH-Glaselektrode nur in diesem abgesteckten Bereich arbeiten konnte. Die Auswertung erfolgte durch das Computerprogramm BEST.<sup>88</sup> Eine typische Titrationskurve der Verbindung **43** ist in Abbildung 5.2 dargestellt, wobei die erste Kurve die Titration der reinen Verbindung und die zweite Kurve die Titration der Verbindung in Gegenwart von Zink(II)-perchlorat wiedergibt. Der Bereich ab pH 4.7 bis pH 7 in der zweiten Kurve kennzeichnet die Komplexbildung und die damit verbundene Freisetzung von H<sup>+</sup>-Ionen.



**Abb. 5.2:** Titration des Cyclenderivates (**43**) gegen eine 0.10314 M Tetraethylammoniumhydroxidlösung in Gegenwart von Zink(II)-perchlorat und ohne

Aus der ersten Kurve wurden die  $pK_s$ -Werte der Verbindung **43** bestimmt, die bei der Berechnung der Komplexstabilitätskonstante  $pK_{(ZnL)}$  aus der zweiten Kurve zugrunde gelegt wurden.

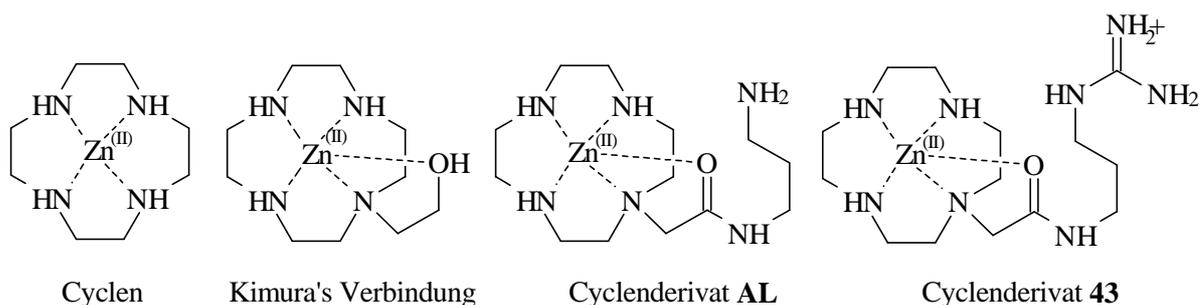
<sup>88</sup> A. E. Martell, R. J. Motekaitis, *Determination and Use of Stability Constants* **1992**, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

### 5.1.1 Bestimmung der Konstanten über das Computerprogramm Best

Der Bestimmung der  $pK_s$ -Werte liegen folgende Gleichgewichte zugrunde, denen die verschiedenen Protolysekonstanten  $K_1$ - $K_4$  zugeordnet sind ( $a_{H^+}$  ist die Aktivität der  $H^+$ -Ionenkonzentration).



Einen Überblick über die vom Computerprogramm BEST berechneten Protolysekonstanten verschiedener Cyclenderivate und Komplexstabilitätskonstanten verschafft die Tabelle in Abb. 5.3. Die Cyclenverbindungen unterscheiden sich lediglich in ihrer Seitenkette, wobei das Cyclenderivat **43** im Gegensatz zur Verbindung **AL** guanidiert vorliegt und nicht als freies Amin. Neben diesen sind das Cyclen ohne Seitenkette sowie ein einfaches Cyclenderivat von Kimura<sup>48</sup> aufgeführt. Durch einen Vergleich der erhaltenen  $pK_s$ -Werte kann eine Aussage über die Effektivität der Seitenkette getroffen werden. Die  $\log K$ -Werte für die Cyclenverbindung **43** entsprechen denen der anderen Verbindungen. Zwar ist die Komplexstabilitätskonstante von  $Zn(II)L$  (Gln. 6;  $\log K [Zn(II)L] = 13.78$ ) kleiner als die für Cyclen, liegt aber in der gleichen Größenordnung wie Kimuras Verbindung und das Cyclenderivat **AL**.<sup>69</sup>



	Cyclen	Kimuras Verbindung	Cyclenderivat <b>AL</b>	Cyclenderivat <b>43</b>
log K	11.04 ± 0.05	10.72 ± 0.05	10.95 ± 0.2	10.70 ± 0.5
log K <sub>2</sub>	9.86 ± 0.03	9.28 ± 0.03	9.77 ± 0.2	9.26 ± 0.5
log K <sub>3</sub>	< 2	< 2	8.16 ± 0.2	< 2
log K <sub>4</sub>	< 2	< 2	< 2	< 2
log K <sub>5</sub>			< 2	
log K <sub>ZnL</sub>	15.3 ± 0.1	13.8 ± 0.1	13.7 ± 0.1	13.78 ± 0.5
pK <sub>a</sub> (25 °C)	7.86	7.86 ± 0.02	9.6 ± 0.2	6.9 ± 0.5

**Abb. 5.3:** Auflistung der Protolysekonstanten und Komplexstabilitätskonstanten verschiedener Cyclenderivate mit dem Metallkation Zn(II)

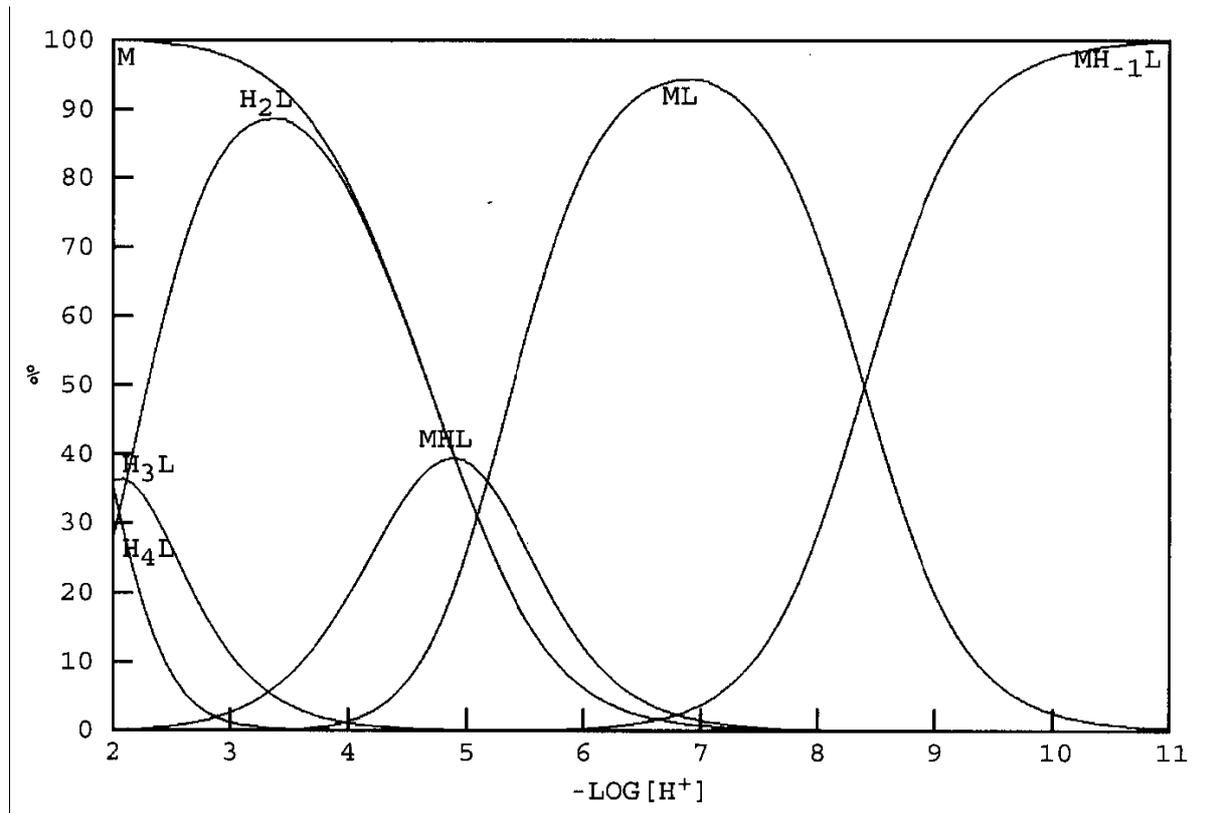
Die pK<sub>s</sub>-Werte der Verbindung **43** lagen in dem erwarteten Bereich. Wie bei dem Cyclen und Kimuras Verbindung sind zwei Protonen im Ring aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung sehr acide (pK<sub>3</sub> und pK<sub>4</sub> < 2).<sup>89</sup>

Die Stabilitätskonstante der Verbindung **43** ist kleiner als die des Cyclens und somit durch die Monosubstitution etwas weniger stabil. Diesen Effekt zeigt ein großer Teil monosubstituierter Cyclenverbindungen, was durch einige weitere, von Kimura<sup>48</sup> synthetisierte monosubstituierte Verbindungen, bestätigt wird.

<sup>89</sup> Diese pH-Abhängigkeit kann bei der zweifachen Schützung, sowie der Acylierung als auch der Alkylierung ausgenutzt werden.

Eine graphische Auswertung der berechneten Werte durch das Programm BEST erfolgt durch die sogenannte Speziesverteilungskurve. Das Diagramm gibt bei gegebenem pH-Wert die Anwesenheit der verschiedenen Spezies anteilig an.

Die Verbindung **43** besitzt für die Zink-Ligandspezies ein Maximum bei pH 7, womit sie unter physiologischen Bedingungen besonders interessant ist.



**Abb. 5.4:** Speziesverteilungskurve für Verbindung (43) mit  $Zn^{2+}$ . M ist in diesem Fall  $Zn^{2+}$ ; L ist der Cyclenligand und  $MH_{-1}L$  stellt die Metall-Hydroxid-Spezies dar

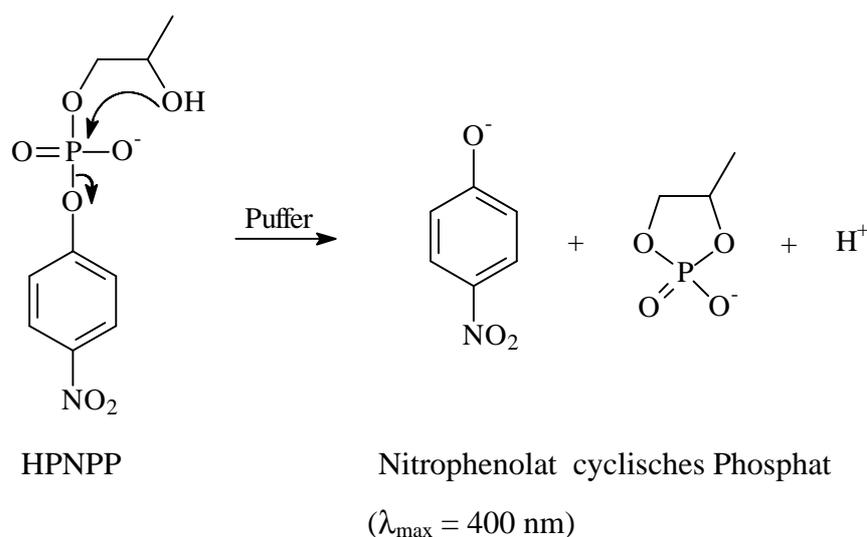
Im Hinblick auf eine *in vivo* Anwendung ist die Stabilität der monosubstituierten Komplexe äußerst wichtig. Weiter spielt der pH-Wert für den Einsatz unter physiologischen Bedingungen eine zentrale Rolle. Mit einer Stabilitätskonstante von  $\log K = 13.78$  ist der Zinkkomplex thermodynamisch recht stabil und stellt mit dem Maximum bei pH 7 einen gut einsetzbaren Komplex dar, wobei die relativ hohe Toleranz für Zink(II) als Spurenelement erwähnt werden sollte (Tagesbedarf des Menschen: 0.4-0.6 mg/Tag).<sup>90</sup>

<sup>90</sup> W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, K. Starke, *BI-Wiss.-Verl.* **1992** (korr.Nachdruck 1993), 597.

## 5.2 Umesterung der RNA-Modellverbindung HPNPP - der photometrische Schnelltest

Vor der Verwendung der eigentlichen TAR-RNA wurden erste Spaltungsexperimente an RNA-Modellverbindungen in wässrigem Puffer durchgeführt. Ein Modell stellt das HPNPP (2-Hydroxypropyl-*para*-nitrophenylphosphat) dar, der Phosphodiester von *para*-Nitrophenol und 1.2-Propandiol. Das HPNPP wurde nach einer Vorschrift von Brown und Usher<sup>52</sup> durch regioselektive Öffnung von Propylenoxid mit Ammonium-*para*-nitrophenylphosphat hergestellt.

Die HPNPP-Spaltung kann anhand der Bildung des gelben *para*-Nitrophenolats leicht photometrisch ( $\lambda_{\max} = 400 \text{ nm}$ ) verfolgt werden (Abb. 5.5). Die Bildung des cyclischen Phosphates läßt sich  $^{31}\text{P}$ -NMR-spektroskopisch nachweisen.<sup>53</sup> Dieses wird in einer intramolekularen Umesterung mit der 2-Hydroxygruppe gebildet.



**Abb. 5.5:** Umesterung der RNA-Modellverbindung HPNPP. Ein schneller Test zur Überprüfung der hydrolytischen Aktivität der synthetisierten Metallkomplexe

### 5.2.1 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten

Die Geschwindigkeitskonstanten der HPNPP-Spaltung wurden über die Absorption des entstehenden *para*-Nitrophenolates bei 400 nm gegen eine Referenzprobe ermittelt und in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Die Referenzprobe ist in Bezug auf Puffer (Konzentration und pH-Wert), HPNPP-Konzentration und Ionenstärke mit der Meßlösung

identisch, enthält aber keinen Metallkomplex. Die Messungen wurden bei 55 °C durchgeführt. Je nach pH-Wert wurden als Puffer TRIS oder HEPES verwendet, die in den Bereichen pH 7-8.5 gute Pufferkapazitäten vorweisen können (pK<sub>s</sub>-Werte: 7.55 HEPES; 8.3 Tris).

### 5.2.2 Mathematischer Hintergrund

Für die Auswertung wurde ein Geschwindigkeitsgesetz jeweils zweiter Ordnung<sup>91</sup> bezüglich der Konzentration des HPNPP bzw. des Metall-Cyclenkomplexes (MC) angenommen. Die Umesterung des HPNPP mit dem Zink-Cyclenkomplex, also die Bildung des gelben Nitrophenolates (NP<sup>-</sup>)<sup>92</sup> folgt ebenfalls einem Geschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung (Gl. 1):

$$(d [NP^-]) / (dt) = k_2 [HPNPP] [MC] \quad (1)$$

$$k_2 = \text{Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung [M}^{-1} \text{s}^{-1}\text{]}$$

Für die Auswertung wurde nur die Anfangsphase der Reaktion berücksichtigt, da HPNPP im Vergleich zum cyclischen Phosphat im großen Überschuß vorlag und somit eine Produktinhibierung ausgeschlossen werden konnte. Zudem änderte sich am Anfang der Reaktion die Konzentration des HPNPP praktisch nicht. Da der Metall-Cyclenkomplex im großen Überschuß vorliegt, ändert sich seine Konzentration während der Reaktion nicht, weshalb der Differentialquotient in Gleichung 1 als Differenzenquotient geschrieben werden kann (Gl. 2).

$$(\Delta [NP^-]) / (\Delta t) = k_2 [HPNPP]_{t=0} [MC] \quad (2)$$

Somit liefert die Konzentration des Metallcyclenkomplexes eine Konstante, die mit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_2$  zu  $k_1$ , der Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung (Einheit s<sup>-1</sup>), zusammengefaßt werden kann (Gl. 3).

<sup>91</sup> G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, 3. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, **1987**, 153ff.

<sup>92</sup> Im neutralen pH-Bereich liegt ein Gleichgewicht von *para*-Nitrophenol und *para*-Nitrophenolat vor. [NP<sup>-</sup>] steht für die Summe der Konzentrationen beider Spezies.

$$k_1 = k_2 [MC] \quad (3)$$

Die Konzentration des entstehenden *para*-Nitrophenolates kann über das Lambert-Beersche Gesetz aus der Absorption A der Lösung berechnet werden (Gl. 4).

$$[NP^-] = A / (\varepsilon^* l) \quad (4)$$

A : Absorption

$\varepsilon^*$  : scheinbarer molarer dekadischer Absorptionskoeffizient [ $l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]

l : durchstrahlte Schichtdicke [cm]

Die Verhältnisse von (gelbem) *para*-Nitrophenolat und (farblosem) *para*-Nitrophenol variieren je nach pH-Wert. Für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstante war jedoch die Kenntnis der Gesamtkonzentration notwendig. Ausgehend von diesem Resultat wurde ein scheinbarer Absorptionskoeffizient  $\varepsilon^*$  bestimmt, der das Verhältnis der Konzentrationen von *para*-Nitrophenolat und *para*-Nitrophenol berücksichtigte. Dazu wurde die Absorption einer Lösung mit einer bekannten Gesamtkonzentration an *para*-Nitrophenol(at) bei verschiedenen pH-Werten unter den Meßbedingungen (55 °C, 100 mM, HEPES, I = 0.5) gemessen, womit sich folgende sigmoidale pH-Abhängigkeit für  $\varepsilon^*$  mit den Konstanten a bis d ergibt.<sup>93</sup>

$$\varepsilon^* = \frac{a-b}{1+e^{\frac{pH-c}{d}}} + b \quad (5)$$

$$a = 332.41$$

$$b = 17921$$

$$c = 7.1427$$

$$d = 0.42662$$

Anhand der gemessenen Absorption konnte nun die Gesamtkonzentration an *para*-Nitrophenol(at) berechnet werden.

<sup>93</sup> T. Oost, *Dissertation*, Institut für Organische Chemie, Universität Hannover, 1997

Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von ca. 90 Minuten, wobei die Absorption der Meß- gegen die der Referenzlösung ermittelt wurde. Die lineare Regression zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit wurde nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate durchgeführt.

Zunächst wurde aus dem Geschwindigkeitsgesetz einer Reaktion pseudo-erster Ordnung (Gl. 6) erhalten.

$$(d [\text{HPNPP}]) / (dt) = k_1 [\text{HPNPP}] \quad (6)$$

und nach Integration unter Berücksichtigung der Anfangsbedingungen (Gl. 7)

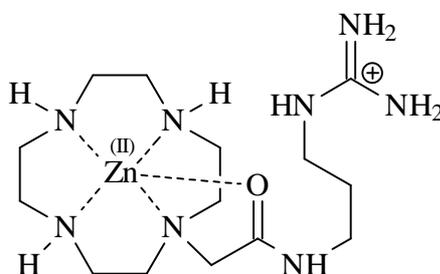
$$\ln [\text{HPNPP}] = - k_1 t + \ln [\text{HPNPP}]_{t=0} \quad (7)$$

Das Auftragen von  $\ln [\text{HPNPP}]$  gegen die Zeit  $t$  lieferte eine Gerade mit der Steigung  $- k_1$ . Die HPNPP-Konzentration zu einem gegebenen Zeitpunkt  $t$  läßt sich aus der *para*-Nitrophenol-Konzentration berechnen (Gln. 8).

$$[\text{HPNPP}] = [\text{HPNPP}]_{t=0} - [\text{NP}] \quad (8)$$

Die Konzentration des *para*-Nitrophenols erhält man aus Gleichung 4.

### 5.2.3 Ergebnisse der Umesterung von HPNPP durch den Zn(II)-Cyclen-Komplex



Die Hydrolyseergebnisse (Abb. 5.6) des Cyclen-Komplexes boten zunächst keine einfache Interpretationsmöglichkeit an. Die gute hydrolytische Aktivität bei pH 7 zeichnete die

Verbindung **43** aus, was sie aus physiologischer Sicht interessant macht. Nicht eindeutig sind aber die Bereiche um diesen pH-Wert herum.

Die eingestellten pH-Werte in der Meß- und Referenzlösung und die daraus resultierenden Geschwindigkeitskonstanten sind der Tabelle in Abb. 5.6 zu entnehmen.

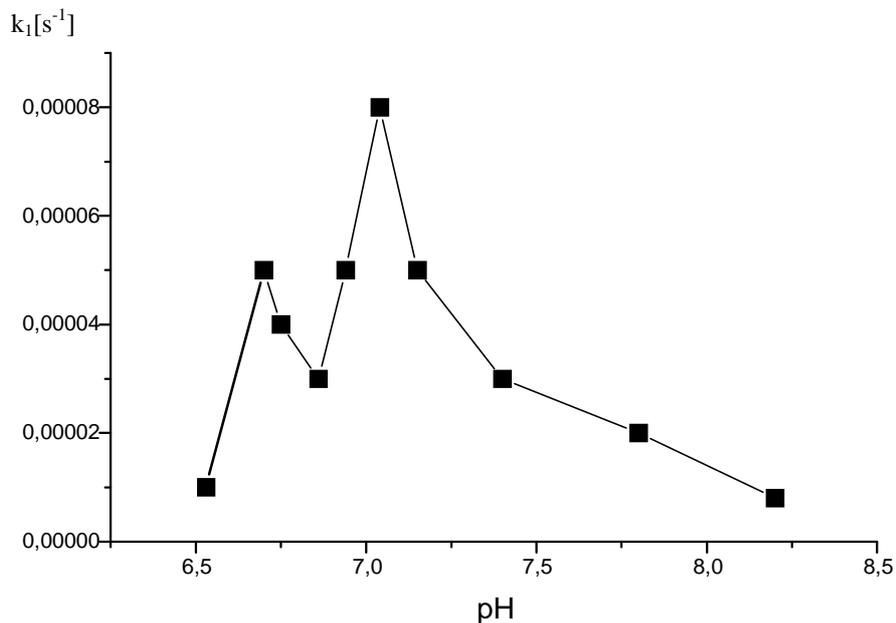
pH	$k_1$ [ $s^{-1}$ ]
6.53	$1.0 \cdot 10^{-5}$
6.7	$5.0 \cdot 10^{-5}$
6.75	$4.0 \cdot 10^{-5}$
6.86	$3.0 \cdot 10^{-5}$
6.94	$5.0 \cdot 10^{-5}$
7.04	$8.0 \cdot 10^{-5}$
7.15	$5.0 \cdot 10^{-5}$
7.4	$3.0 \cdot 10^{-5}$
7.8	$2.0 \cdot 10^{-5}$
8.2	$0.8 \cdot 10^{-5}$

**Abb 5.6: Tabelle über die Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse bei verschiedenen pH-Werten**

Die HPNPP-Spaltungen wurden für jeden pH-Wert dreimal durchgeführt, damit keine Artefakte entstehen, womit gleichzeitig die Werte zwischen pH 6.5 - 7.0 bestätigt und nicht als Ausreißer gewertet wurden.

Wieso gerade Verbindung **43** einen solchen Hydrolyseverlauf mit Maximum bei pH 7 und fallender hydrolytischer Aktivität zu den pH-Werten 6.5 und 8.2 zeigt, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt werden. Genauso wenig können die hydrolytischen Schwankungen in dem pH-Bereich 6.7-6.94 gedeutet werden.

Zur Verdeutlichung der Hydrolyseergebnisse wurden die Werte aus der Tabelle in Abb. 5.6 noch einmal in ein pH-Diagramm eingetragen (Abb. 5.7).



**Abb. 5.7:** Darstellung des Hydrolyseverlaufs des Zn(II)-Cyclen-Komplexes mit HPNPP bei verschiedenen pH-Werten

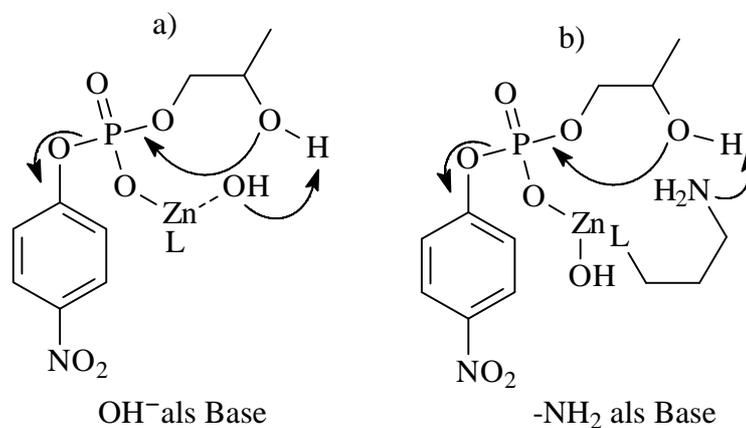
### 5.3 Ergebnisse und Diskussion

Für eine Klärung des Hydrolyseverlaufes werden zunächst die Ergebnisse der Umesterung und der Titration mit den Ergebnissen der Verbindung **AL**, dem freien Amin, verglichen und diskutiert. Danach soll geklärt werden, inwiefern die Einführung einer Guanidiniumgruppe sich positiv auf die hydrolytische Aktivität auswirkt und wie effektiv Verbindung **43** wirklich ist.

Das freie Amin zeigte kaum hydrolytische Aktivität in dem Bereich pH 6-8. Erst ab pH 8.3 stieg die Geschwindigkeitskonstante stark an. Dieser Effekt lässt sich leicht erklären, wenn man die Speziesverteilungskurve dieser Verbindung mit einbezieht. Dem Kurvenverlauf kann das Vorliegen einer charakteristischen Spezies zugeordnet werden. Konzentriert man sich auf den Bereich um pH 8, so befindet man sich im Existenzbereich des Zink-Cyclen-Komplexes, aber auch zu Beginn der Metall-Hydroxid-Spezies, die mit steigendem pH-Wert wächst. Diese Metall-Hydroxid-Spezies wirkt als Base. Sie stellt sogar eine effektivere Base dar als das freie Amin der Seitenkette (Abb. 5.8). Im pH-Bereich der

auftretenden ZnL-Spezies findet keine nennenswerte Beschleunigung der Hydrolyse statt. Erst bei der Bildung der Metall-Hydroxid-Spezies (ab pH 8), wo durch Koordination des Metalls an das Phosphatanion das Hydroxid in die Nähe der 2'-OH-Gruppe gebracht wird, deprotoniert die interne Hydroxygruppe die Hydroxygruppe des HPNPP. Diese attackiert nucleophil das Phosphoratom im Phosphat, wobei das Nitrophenolat als gute Fluchtgruppe den Molekülverband verläßt.

Der erwähnte intramolekulare Schritt der Deprotonierung erfolgt dann schneller als durch die Deprotonierung einer externen Base oder basischen Gruppe, die sich nicht in unmittelbarer Nähe des Phosphorsäurediesters befindet.



**Abb. 5.8:** (a) Intramolekulare OH-Gruppe als Base; (b) freies Amin als Base

Der beschriebene Mechanismus deckt sich mit dem bereits von Satu Kuusela *et al.*<sup>94</sup> zur Metallionen-katalysierten Spaltung von RNA vorgeschlagenen. Unterhalb von pH 8 wird zur Deprotonierung der Hydroxygruppe des HPNPP ein externes Nucleophil wie z.B. Wasser oder Puffer notwendig. Dieses zeichnet sich durch die kleineren Geschwindigkeitskonstanten aus.

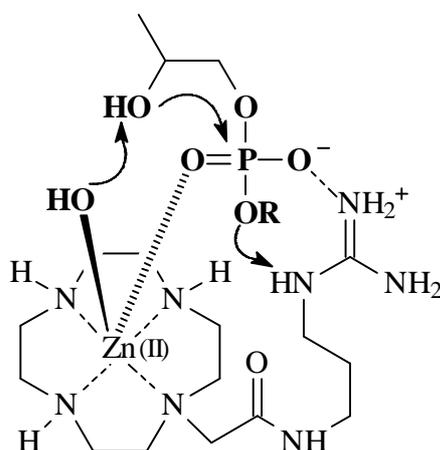
Der aktivierende Einfluß bei der Spaltung des HPNPP beruht auf der Kombination der Lewis-Acidität des Metallions mit der Intramolekularisierung durch eine Base. Das Metallion aktiviert den Phosphorsäurediester dadurch, daß die negative Ladung am Phosphatsauerstoffatom neutralisiert wird. Durch die Koordination des Metallions an das

<sup>94</sup> S. Kuusela, M. Rantanen, H. Lönnberg, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.2* **1995**, 2269-2273.

Phosphat wird im Komplex gebundenes  $\text{OH}^-$  mitgeführt und ermöglicht als intramolekulare Base die Deprotonierung der 2'-OH-Funktion.

Für den bereits oben erwähnten Zn(II)-Guanidinium-Komplex ergab sich jedoch eine genau entgegengesetzte pH-Abhängigkeit.

Bisher sind in der Literatur keine kooperativen Effekte von Guanidiniumgruppen mit Metallionen in Nuclease-Modellen beschrieben worden. Sie spielen eher eine zentrale Rolle bei der Phosphodiestererspaltung, indem sie die negative Ladung der Phosphodiester neutralisieren. Genau dieser Effekt scheint sich bei der Umesterung mit HPNPP bemerkbar zu machen.



**Abb 5.9: Zweifache Aktivierung durch die Guanidiniumgruppe und dem Zink-Komplex**

Anhand der Spezies-Verteilungskurve (Abb. 5.4) ist zu erkennen, daß der Metall-Ligand-Komplex sein Maximum bei pH 7 hat. Die Hydroxid-Spezies entfaltet sich langsam bei pH 6 und steigt dann ab pH 8 sehr stark an. Es läßt sich nun vermuten, daß eine interne Neutralisation der Zink-Hydroxid-Spezies durch die Guanidiniumgruppe erfolgt, was den starken Abfall der hydrolytischen Aktivität von pH 7 in den basischen Bereich aufsteigend, erklärt. Der Hydrolyseverlauf der Verbindung **43** kann nur eingeschätzt werden. Für eine exakte Erklärung wären weitere Versuche notwendig, die zugunsten der wichtigen Spaltungsreaktionen an der TAR-RNA zurückgestellt wurden. Die beobachtete Bildung der aktiven Spezies und das Geschwindigkeitsmaximums bei pH 7 reichen als Grund, um nun die Spaltungen an der TAR-RNA zu untersuchen.

#### 5.4 Spaltung des Dinucleotids UpU mit dem Zn(II)-Komplex (43) und Analyse der Spaltungsprodukte durch HPLC

Vor dem Einsatz der tatsächlichen TAR-RNA wurde die Verbindung **43** zunächst noch mit einem anderen Modell-RNA-Derivat getestet. Um die hydrolytische Aktivität an nicht-aktivierten Phosphorsäurediestern zu untersuchen, wurde das Hydrolyseexperiment mit einer kurzen RNA-Einheit wie UpU als leicht zu analysierendem RNA-Fragment durchgeführt.

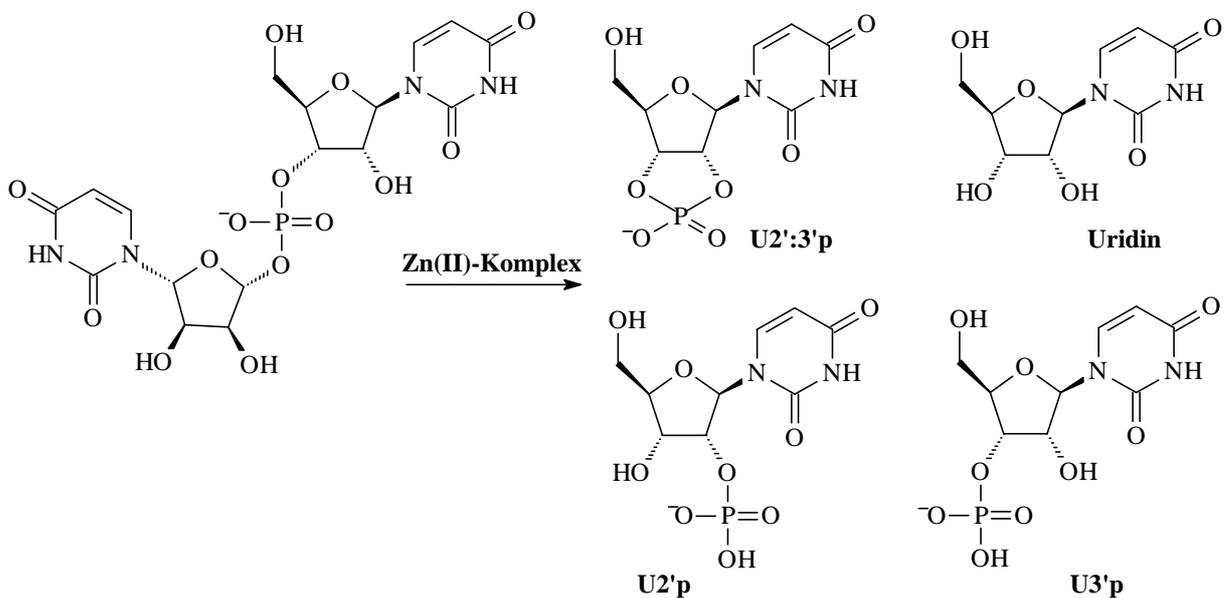


Abb. 5.10: Die Spaltung von UpU mit dem Zink-Cyclen-Komplex in seine Spaltfragmente

Die qualitative und quantitative Analyse der Spaltungsprodukte erfolgte durch RP 18-HPLC mit Detektion bei 260 nm (Absorptionsmaximum der Nucleotide). Die zu erwartenden Produkte sind das cyclische U2':3'p, U2'p, U3'p und Uridin. Elektronische Integration der Peakflächen erlaubten eine quantitative Auswertung.<sup>69, 93</sup>

Dazu wurden die Flächen der einzelnen Peaks (UpU, U2':3'p, U2'p, U3'p, Uridin) addiert und daraus der Anteil  $x(\text{UpU})$  berechnet. Bei bekannter Anfangskonzentration von  $[\text{UpU}]_0$  ergab sich für UpU zur Zeit  $t$ :

$$[\text{UpU}] = [\text{UpU}]_0 \cdot x(\text{UpU})$$

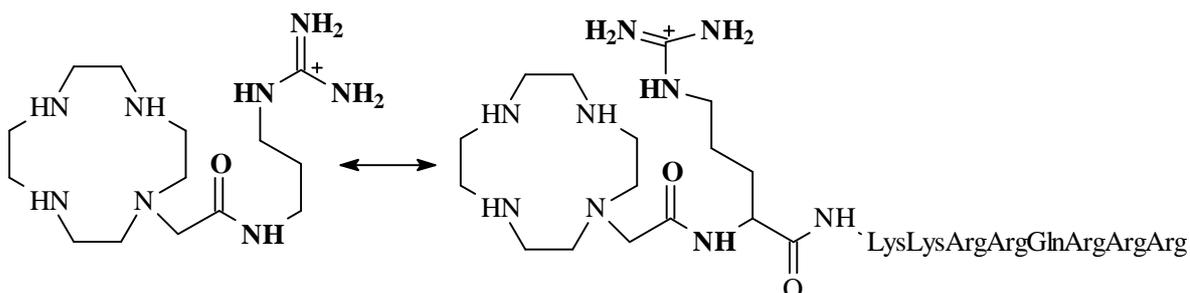
Die lineare Regression zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung wurde nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate durchgeführt. Der Zinkkomplex zeigte bei der Hydrolyse von UpU eine ähnliche pH-Abhängigkeit wie bei der Spaltung des HPNPP. Im Vergleich zu den Hydrolysewerten der Verbindung **AL** hat sich die Guanidiniumverbindung als die effektivere herausgestellt.

		Zn(II)-Komplex <b>43</b>	Zn(II)-Komplex <b>AL</b>
UpU	pH 7.0	$k_1 = 0.75 \text{ E-}7 \text{ s}^{-1}$	
	pH 7.14	$k_1 = 2.1 \text{ E-}7 \text{ s}^{-1}$	
	pH 7.3	$k_1 = 10.3 \text{ E-}7 \text{ s}^{-1}$	
	pH 8.3	$k_1 = 7.8 \text{ E-}7 \text{ s}^{-1}$	$k_1 = 5.0 \text{ E-}7 \text{ s}^{-1}$

**Abb. 5.11: Tabelle über die Geschwindigkeitskonstanten der Komplexe (43) und (AL) berechnet aus der Spaltung von UpU in seine Fragmente**

Die Einführung der Guanidiniumgruppe hat sich im Hinblick auf die Hydrolyseergebnisse als sehr effizient erwiesen. Bei der Spaltung von HPNPP lieferte die Verbindung gute, aber nur halbwegs so gute Geschwindigkeitskonstanten wie das freie Amin. Dafür zeigte Verbindung **43** ein Aktivitätsmaximum um pH 7, was unter physiologischer Sicht eine günstige Basis für die Verbindung ist. Auch die Spaltung von UpU lieferte mit einem Geschwindigkeitsmaximum bei pH 7.14 gute Voraussetzungen.

Diese vielversprechenden Vorversuche mit dem Zink-Cyclen-Komplex mit Arginin-ähnlicher Seitenkette bieten gute Ansatzpunkte für den Aufbau einer synthetischen Ribonuclease. So scheint die Kombination von Cyclen und Arginin für die Darstellung des Arginin-reichen Neunmer-Peptids im Einsatz gegen den HI-Virus geradezu ideal zu sein (Abb. 5.12).



**Abb. 5.12: Vergleich der Guanidiniumverbindung mit dem Neunmer-Peptid**

### 5.5 Spaltung von HPNPP durch verschiedene Zink-Cyclen-Komplexe

Inwiefern die Einführung einer Guanidiniumgruppe sich auf die hydrolytische Aktivität auswirkt, wurde im vorhergehenden Kapitel 5.1 diskutiert. Was passiert aber, wenn man neben einer Guanidiniumgruppe dem im Cyclen koordiniertem Zink noch eine Hydroxidfunktion zur Verfügung stellt? Die Verbindungen von Kimura wurden bereits diskutiert. Die Protolyse- und Komplexkonstanten dieser Verbindungen unterschieden sich kaum, so daß auf eine weitere Bestimmung der in diesem Kapitel vorgestellten Verbindungen verzichtet wurde. Interessant ist aber, wie sich der Einbau einer Hydroxidfunktion auf die Spaltung mit HPNPP auswirkt.

Durch die Einführung der Aminosäure Tyrosin wurde die Hydroxidfunktion schon mitgeführt, so daß sich die Darstellung vereinfachte. Über die erfolgreiche Darstellung der verschiedenen Cyclenderivate wurde bereits berichtet. Sie werden im folgenden dem photometrischen Schnelltest mit HPNPP unterzogen und mit den bisher dargestellten Verbindungen verglichen.

## 5.5.1 Spaltung von HPNPP durch die Zn(II)-Cyclenkomplexe 15, 20 und 24 in Wasser

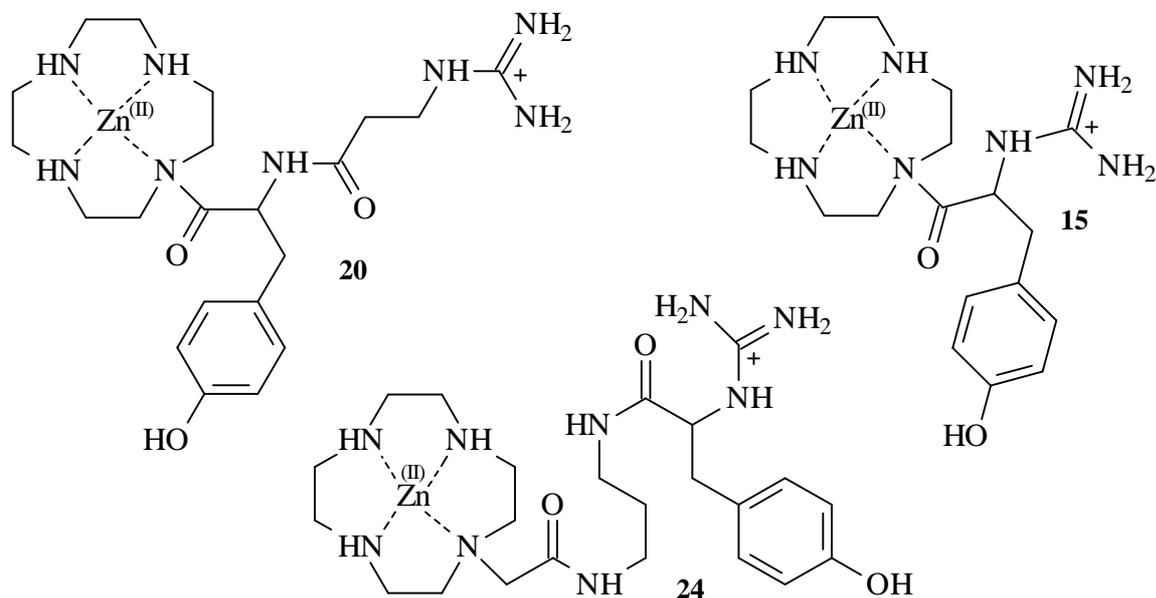
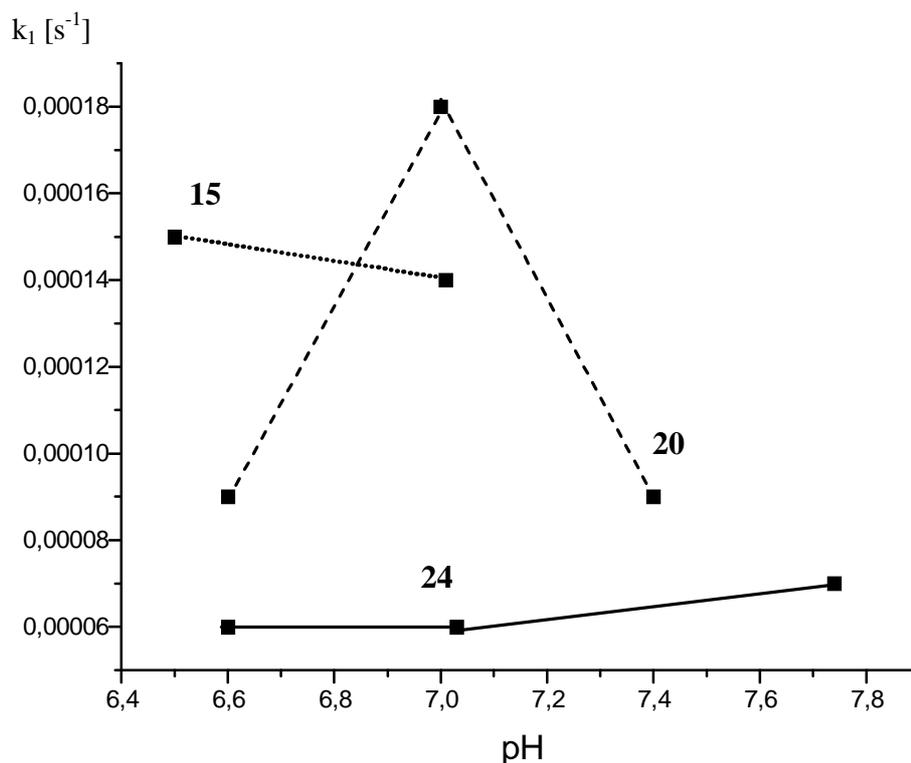


Abb. 5.13: Darstellung der drei verschiedenen Zn(II)-Cyclenkomplexe, die dem photometrischen Schnelltest mit HPNPP unterzogen wurden

Die praktische Durchführung erfolgte wie bisher beschrieben. Alle pH-Werte wurden mit HEPES eingestellt.

Komplex 20		Komplex 15		Komplex 24	
pH 6.6	$k_1 = 9.0 \cdot 10^{-5}$	pH 6.5	$k_1 = 15.0 \cdot 10^{-5}$	pH 6.6	$k_1 = 6.0 \cdot 10^{-5}$
7.0	$k_1 = 18.0 \cdot 10^{-5}$	7.01	$k_1 = 14.0 \cdot 10^{-5}$	7.03	$k_1 = 6.0 \cdot 10^{-5}$
7.4	$k_1 = 9.0 \cdot 10^{-5}$			7.74	$k_1 = 7.0 \cdot 10^{-5}$

Abb. 5.14: Tabelle über die Geschwindigkeitskonstanten der Verbindungen 15, 20 und 24 bei verschiedenen pH-Werten



**Abb 5.15: Geschwindigkeitsverlauf bei der Spaltung von HPNPP durch die Verbindungen 15, 20 und 24 als Zn(II)-Komplex**

Alle Verbindungen zeigen einen unterschiedlichen Hydrolyseverlauf, so daß hier der Einfluß der Seitenkette stark zur Geltung kam. Es ist schwer zu beurteilen, welcher Effekt für die differenzierenden Geschwindigkeitskonstanten verantwortlich ist, da auch nicht bekannt ist, wie die Koordination bzw. Stabilisation des Zinks verläuft. Dem Zink bieten sich zur Koordination sowohl verschiedene Carbonyl-Sauerstoffatome, als auch die freie Hydroxygruppe, die aufgrund des Aromaten in ihrer Beweglichkeit leicht eingeschränkt ist. Desweiteren existiert durch die Einführung der Hydroxygruppe ein weiteres Nucleophil, welches zum Angriff auf den Phosphodiester fähig ist.

Auffällig war Verbindung **20**, da sie wie die Guanidiniumverbindung **43** ein eindeutiges Maximum bei pH 7 vorweisen konnte. Ihre maximale Hydrolysegeschwindigkeit ist mehr als doppelt so groß wie die von Verbindung **43**. Der Abstand der Guanidiniumgruppe zum Cyclengerüst ist bei beiden Verbindungen identisch, was unter Umständen eine Erklärung für den ähnlichen Hydrolyseverlauf ist.

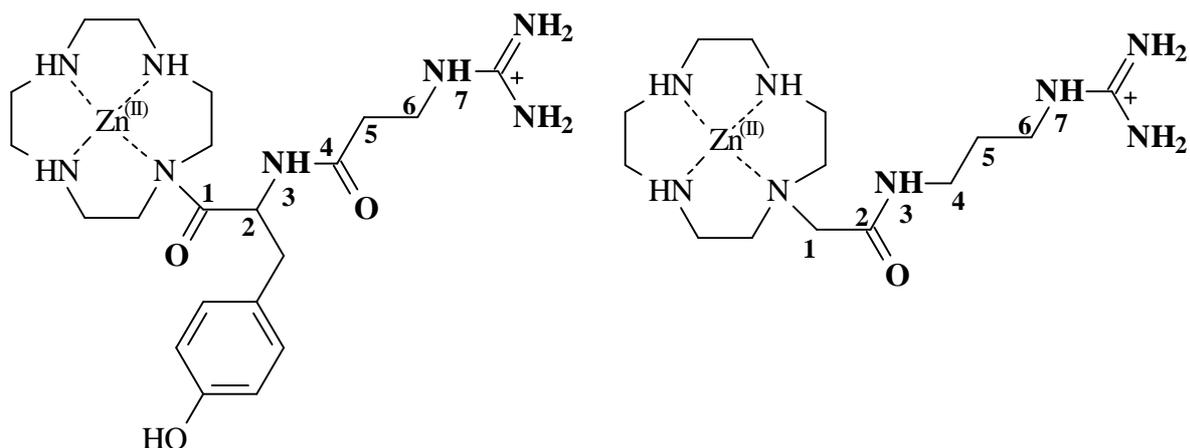


Abb. 5.16: Vergleich der Kettenlänge der Verbindungen 20 und 43

Auch hier war es nicht möglich, eine Erklärung für den etwas ungewöhnlichen Hydrolyseverlauf zu finden. Die Einführung der Tyrosineinheit hat sich jedoch in Bezug auf die Geschwindigkeit der Hydrolyse bewährt.

Auffällig ist weiterhin der Einfluß der Kettenlänge. Je weiter die Guanidiniumgruppe vom Cyclengerüst entfernt ist, um so schwächer ist die hydrolytische Aktivität der Verbindung. Verbindung **24** zeigte diesen Effekt, wobei ab pH 7 die Geschwindigkeit leicht zunimmt, was vielleicht auf die nun auftretende Hydroxidspezies zurückzuführen ist. Ihre Hydrolysegeschwindigkeit erreichte trotz Einführung der Tyrosineinheit nicht ganz das Maximum der Verbindung **43**. Aufgrund dieser negativen Auswirkung der Länge der Seitenkette und aus Zeitgründen wurde auch auf die Durchführung der Hydrolyse mit der Verbindung **28** verzichtet.

Verbindung **15** mit der kürzesten Seitenkette zeigte gute Geschwindigkeitskonstanten mit fast konstantem Verlauf über den pH-Bereich 6.5-7.

Vergleicht man die Ergebnisse mit der Verbindung **AL**, die sehr gute Geschwindigkeitskonstanten im alkalischen Bereich lieferte, so ist festzuhalten, daß die Einführung der Guanidiniumgruppe einen stabilisierenden Effekt bei der Hydrolyse mit HPNPP bewirkt, aber keineswegs eine Verbesserung der Geschwindigkeitskonstanten. Die zusätzliche Einführung einer Hydroxyfunktion führt, solange sich diese in unmittelbarer Nähe des Cyclens befindet, wiederum zu einer Steigerung der Geschwindigkeitskonstanten. Möglich wäre eine nucleophile Wirkung, was jedoch nicht nachweisbar ist.

Eine sich bei Betrachtung der unterschiedlich ausfallenden Hydrolysen immer mehr aufdrängende Hypothese ist die Bildung eines Dimers. Die hier nicht nachzuweisende Bildung könnte stark in das Hydrolysegeschehen eingreifen, was die ungewöhnlichen Hydrolyseverläufe erklären würde.

Aufgrund der guten, jedoch nicht ganz abgerundeten Hydrolyseergebnisse mit der Modell-RNA HPNPP konnte der große Schritt vom Modell weg zur echten RNA gewagt werden. Die weitere Klärung der beschriebenen verschiedenen Hydrolyseverläufe mußte aufgrund der Wichtigkeit der direkten Spaltung an der TAR-RNA zunächst zurückgestellt werden.

Bislang wurden die stabilen Metall-Cyclen-Komplexe nur an Modell-RNA's getestet. Dieser erstmalige Versuch, die TAR-RNA mit einem Metall-Cyclen-Komplex als hydrolytische Einheit zu spalten, ist nach dem bisher Gesagten vielversprechend.

Im folgenden Kapitel 6 wird erst die Methode der Elektrophorese erläutert, bevor die Versuche mit der TAR-RNA und den verschiedenen Cyclen-Komplexen beschrieben werden.

## 6. Die Gelelektrophorese

### I. Einführung

Die Elektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung ausgenutzt wird.

Die Methode basiert darauf, daß Nucleinsäuren bei einem neutralen pH-Wert aufgrund der Phosphatgruppen im Phosphodiesterückgrat polyanionisch sind. Deshalb wandern die Moleküle im elektrischen Feld auf die positive Elektrode zu. Die Beschaffenheit der Gelmatrix ist sehr wichtig, da sie die Nucleinsäuremoleküle entsprechend ihrer Größe auftrennt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Polyacrylamidgele verwendet, die viel kleinere Poren als Agarosegele besitzen und somit zu einer besseren Auftrennung führen. Die Porengröße des Gels kann durch Variation des Vernetzungsgrades so eingestellt werden, daß sich eine optimale Auftrennung der Nucleinsäuremoleküle ergibt. Da jedoch kleine Fragmente schneller durch die Poren des Polyacrylamids gelangen, werden die Fragmente nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, d.h. die niedermolekularen Nucleinsäurefragmente sind nach Abschluß der Elektrophorese der Anode am nächsten.

### 6.1 Denaturierende Polyacrylamidgele

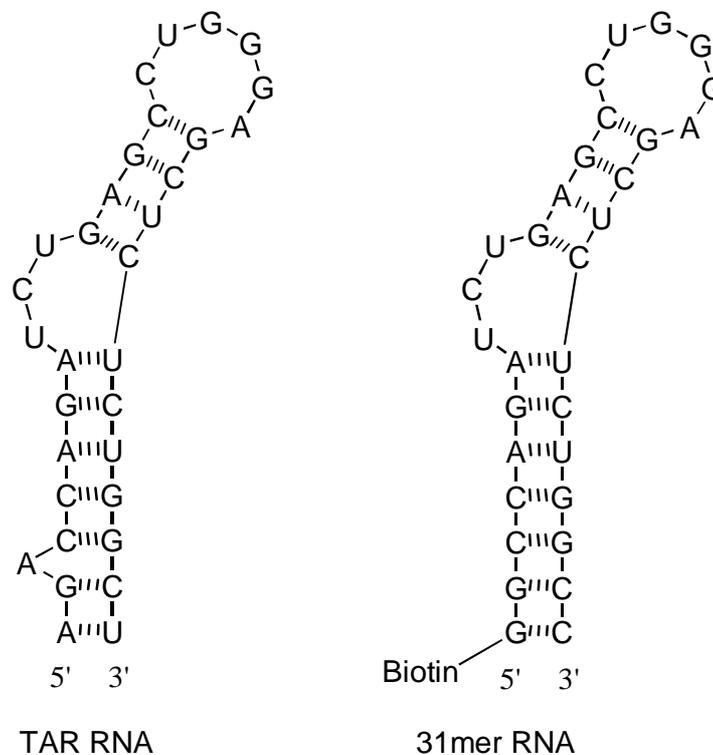
Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gelen handelt es sich um 20 %-ige denaturierende Polyacrylamidgele. Sie bestehen aus 20 % Polyacrylamid sowie 7M Harnstoff, einem Denaturierungsmittel, das die Effekte der RNA-Sekundärstruktur verringert. In Anwesenheit des Harnstoffes wird beim Polymerisieren des Gels die Basenpaarung der Nucleinsäuren unterdrückt, und es kommt zu einer klaren Aufspaltung. Die Trenneigenschaft von Polyacrylamidgelen hängt von der Acrylamidkonzentration ab. So besitzt ein 20 %-iges Gel eine optimale Trennung für 1-50 Basenpaare, d. h. die Trennschärfe ist hier so groß, daß sogar Fragmente voneinander unterschieden werden können, die in ihrer Länge nur um ein Nucleotid differenzieren. Diese Trennschärfe ist eine gute Basis für die 31 Basenpaare der TAR-RNA (Abb. 6.1).

Neben dem Acrylamid ist noch das N, N'-Methylenbisacrylamid enthalten, welches für die Quervernetzung des Gels zuständig ist. Es wird im Verhältnis 19:1 als Unterschußvariante

mit dem Acrylamid eingesetzt. Mit 10 %-igem Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und TMEDA (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) als Stabilisator wird die Kettenreaktion gestartet.

### 6.1.1 Die RNA

Die leicht veränderte HIV-1-TAR-RNA wurde von der Firma Genset bezogen, wobei die ungepaarte Adenineinheit (A17) ausgespart und anstatt des Basenpaares A15:U46 das Basenpaar G15:C46 eingeführt wurde. Am 5'-Ende dient Biotin als Markierung für die spätere Analyse der Spaltungsfragmente.



**Abb. 6.1: Die HIV-1-TAR-RNA und die 31mer TAR-RNA, die für die Spaltungsexperimente verwendet wird**

Jede RNA wurde vor der Verwendung 5 min. bei 80 °C erwärmt und durch langsames Abkühlen auf RT wieder renaturiert.

## II Detektion

### 6.1.2 Das Northern Elektroblot-Verfahren<sup>95</sup>

Nach der elektrophoretischen Auftrennung bezüglich Molekülgröße werden die Nucleinsäuren aus der Gelmatrix auf eine geeignete Trägerschicht aus Nylon übertragen und dort immobilisiert. Das ursprünglich im Gel erhaltene Trennmuster der Moleküle bleibt nach der Übertragung erhalten, so daß man eine exakte Replik des ursprünglichen Gels erhält. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Nytran-Plus-Membran verwendet. Diese positiv geladene Nylonmembran besitzt eine besonders hohe Bindungskapazität. Während des Blottens befindet sich die Membran in einem Blot-Sandwich, d.h. jeweils vier Schichten mit Puffer (Ionenreservoir) getränktes Blottingpapier (GB 003)<sup>96</sup> umhüllen das Gel und die daraufliegende Membran. Bei angelegtem Strom wandert die RNA aus dem Gel in die Membran. Zum Fixieren wird die Membran anschließend 30 min. bei 80 °C im Ofen erwärmt.

### 6.1.3 Nicht-radioaktive Markierung; enzymatisch aktivierte Chemolumineszenz

Bevor die markierte RNA auf der Membran detektiert wird, muß sie mit Wash- und Blockingpuffer<sup>97</sup> gewaschen werden. Anschließend findet die Erkennung der Biotinmarkierten RNA durch die spezifischen Bindungsproteine Streptavidin/Alkalische Phosphatase statt. Das Tetramere Protein Streptavidin besitzt in jeder Untereinheit eine Bindungsstelle für Biotin. Da die Zugabe während der Waschvorgänge erfolgt, kann Streptavidin das Biotin an der RNA sofort binden. An das Streptavidin ist die alkalische Phosphatase gekoppelt. Damit diese ihre Wirkung entfalten kann, muß die Membran mit einem basischen Puffer (Assaypuffer) behandelt werden (Abb. 6.2). Das Prinzip der nicht-radioaktiven Erkennung ist nun eine enzymatische Katalysereaktion. Die alkalische Phosphatase dephosphoryliert das Chemolumineszenzsubstrat CDP-Star<sup>TM</sup>, ein 1.2-Dioxetan, welches zuvor auf die Membran gegeben wurde.

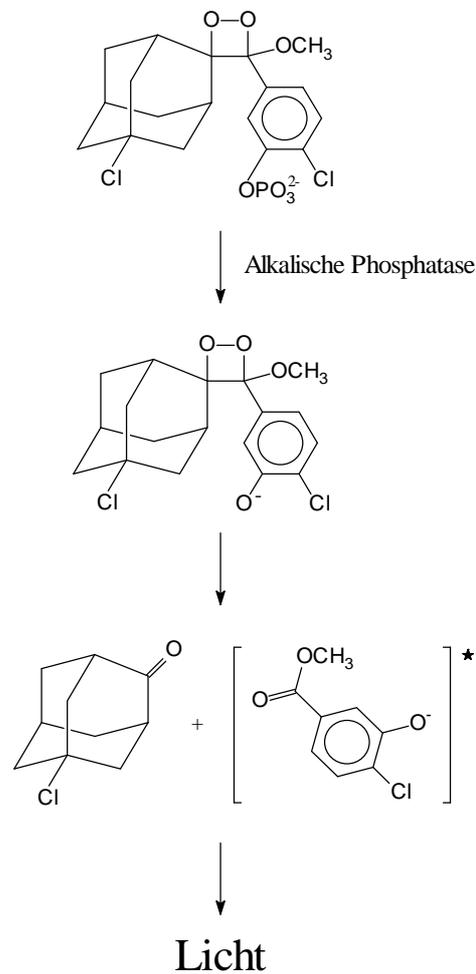
---

<sup>95</sup> Das Northern Blotting eignet sich speziell für RNA.

<sup>96</sup> GB 003 gibt die Stärke des Blottingpapiers an.

<sup>97</sup> Die Waschvorgänge werden nach einer Vorschrift der Firma Ambion durchgeführt, siehe Experimenteller-Teil.

Das Substrat geht in ein metastabiles Phenolatanion-Intermediat über, das beim Zerfall Licht der Wellenlänge 466 nm emittiert (Abb. 6.2). Die Halbwertszeit des Phenolatanions beträgt 1 min. bis mehrere Stunden.



**Abb. 6.2:** Darstellung des Licht-Emissions-Mechanismus von CDP-Star<sup>TM98</sup>

Die Detektion erfolgt über einen Kodak-Film. Ein großer Vorteil dieser nicht-radioaktiven Nachweismethode ist das Umgehen der gesundheitsschädlichen Arbeit mit radioaktiven Substanzen.

<sup>98</sup> *Applied Biosystems und Tropix Catalog 1997, Luminescence Products.*

#### 6.1.4 Filter-binding Assays (Dot-Blot) zur Bestimmung der Komplexkonstante

Dot-Blot-Geräte eignen sich hervorragend für Mehrfachfiltrationen. Die Rundloch-Probenplatte ist für 96 Dots ausgerüstet. Das Gerät besteht aus zwei Platten, die durch einen Filter bzw. eine Membran getrennt sind. Auf dieser werden dann die verschiedenen Proben aufgefangen und können gleich ausgewertet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Durchführung des Dot-Blot zur Bestimmung der Peptid-Cyclen-Komplexkonstante etwas verändert. Zwischen die Platten wurden in gleicher Reihenfolge eine Nitrozellulose-Membran, eine Nytran-Plus-Membran und Blotting-Papier als Filter gelegt. Die Nitrozellulose-Membran sollte als erstes den Komplex aus RNA und Peptid abfangen, während die Rest-RNA diese passieren konnte und auf der positiven Nytran-Membran hängen blieb. Durch Variation der Peptidkonzentration sollten die Dots nach der Auswertung unterschiedliche Intensitäten vorweisen können. Die Nytran-Membran wurde wie üblich behandelt, während der Komplex von der Nitrozellulose-Membran erst auf eine Nytran-Membran umgeblottet wurde. Diese Methode hat sich als effektiver erwiesen als die direkte Auswertung der Nitrozellulose-Membran. Aus der Durchleuchtung der Dots auf den entwickelten Filmen und der daraus resultierenden Bestimmung der Intensität konnte die Komplexkonstante ermittelt werden (Kapitel 6.3.7).

## 6.2 Material und Methoden

Alle im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden wurden, wenn nicht anderweitig vermerkt, nach Standardverfahren aus "Molecular Cloning"<sup>99</sup> durchgeführt. Eine Auflistung der Zusammensetzung der Puffer erfolgt im Experimentellen Teil.

Desweiteren wurden alle Experimente in autoklavierten Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Durch Behandlung des Wassers (Millipore-Qualität) und der gesamten Ausrüstung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) sowie anschließendes Autoklavieren wurde eine Kontamination mit RNasen ausgeschlossen.

---

<sup>99</sup> J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning* **1989**, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

### III. Ergebnis-Teil

#### 6.3 Selektive Spaltung der HIV-1-TAR-RNA durch ein Peptid-Cyclen-Konjugat.

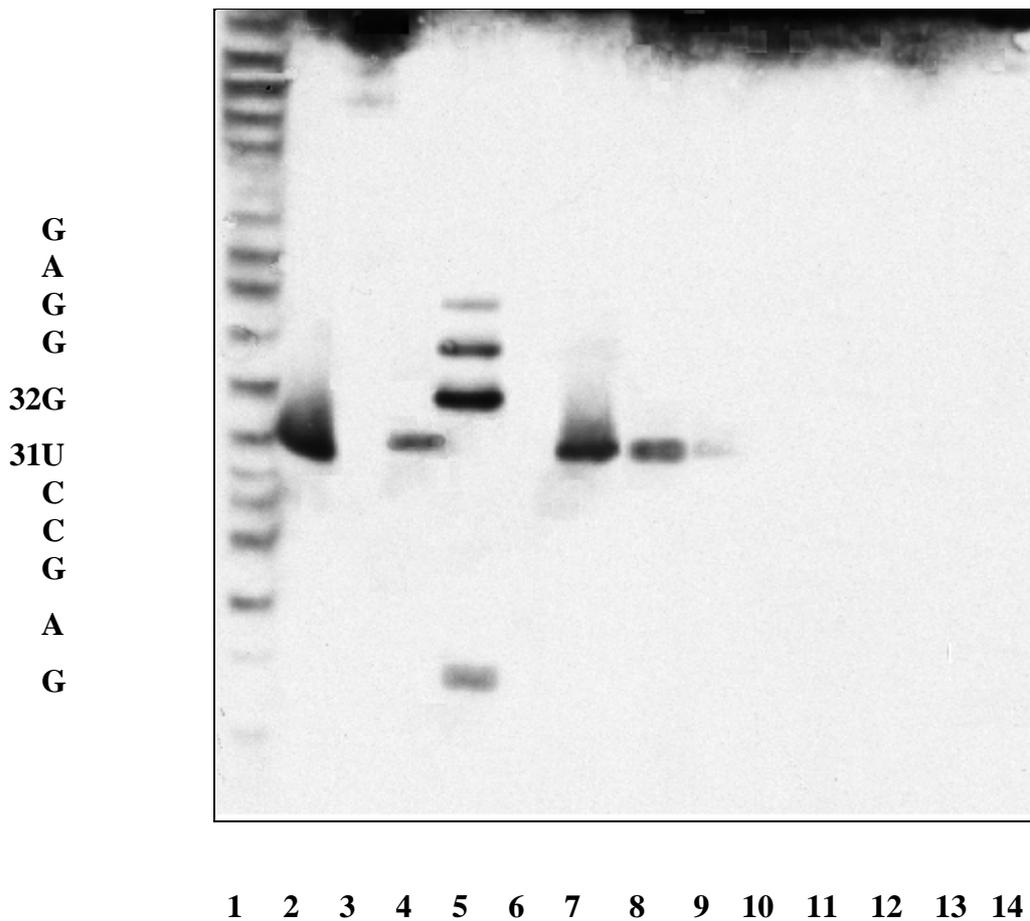
Wie in der Einleitung schon erwähnt, ist die Bindung des Tat-Proteins an die TAR-RNA des HIV-1 ein zentraler Prozeß bei der Transkription, da sie den aktiven Komplex aus Polymerase II, dem DNA-Templat und der entstehenden mRNA stabilisiert. Interessant ist, daß bereits die Anwesenheit der Arginin-reichen Region des Tat-Proteins das Ausknospen des Virus *in vivo* induziert. Diese basische Region des Tat-Proteins hat ähnliche Bindungseigenschaften an die TAR-RNA wie das Wildtyp-Tat-Protein, so daß die neun Aminosäuren als Erkennungseinheit am Peptid-Cyclen-Konjugat **I** für die TAR-RNA ausreichen. Neben der Synthese des Neunmer-Peptides wurde auch die Kupplung mit der hydrolytischen Cyclen-Einheit in Kapitel 4 gezeigt. Das Peptid-Cyclen-Konjugat **I** wurde nachfolgend als Wirtsmolekül für Metallkomplexe eingesetzt. Auch das Hexamer-Cyclen-Konjugat **II** und die jeweils freien Peptide (Nonamer **III** und Hexamer **IV**) ohne Cycleneinheit, die in Kapitel 4 synthetisiert wurden, fanden hier als Kontrollsubstanzen ihren Einsatz. Für die Darstellung des Metall-Komplexes wurde die Cyclen-Einheit mit dem jeweiligen Metall äquimolar (1:1) eingesetzt. Die Metalle  $\text{Eu}^{\text{III}}$  und  $\text{Zn}^{\text{II}}$  haben sich schon in zahlreichen Cyclenkomplexen bewährt und sollten hier ihre hydrolytischen Fähigkeiten an der Biotin-markierten 31-mer TAR-RNA (1) (Abb. 6.1) unter Beweis stellen. Bei den Metall-Komplex-Reaktionen wurden die Peptid-Cyclen-Komplexe mit den entsprechenden Metallsalzen 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem sich der Metallkomplex gebildet hat, konnte die RNA dazugegeben werden. Neben diesen Reaktionen wurden auch die anderen Peptide (ohne Metall) auf das 20 %-ige denaturierende Gel aufgetragen, mit der nicht-radioaktiven Methode über CDP-Star detektiert und auf einem Kodak-Film entwickelt.

Überraschenderweise schneidet das Nonamer-Cyclen-Konjugat in Abwesenheit von Metallionen sehr selektiv und effizient zwischen den Nucleotiden  $\text{U}_{31}$  und  $\text{G}_{32}$  (Abb. 6.3).<sup>100</sup> Die Schnittstelle läßt sich durch das Mitlaufen der Ribonuclease  $\text{T}_1$  leicht zuordnen.  $\text{T}_1$  schneidet nach jedem G, so daß die drei G's aus der *loop*-Region eine gute Orientierungsmöglichkeit darstellen. Die Spaltungen durch den Metallkomplex sowie auch

---

<sup>100</sup> K. Michaelis, M. Kalesse, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 15, 2382-2385.

die der Kontrollexperimente mit den freien Peptiden **III** und **IV** und dem Sechsmersmer-Peptid-Cyclen-Konjugat **II** blieben aus. Eine Verlängerung der Reaktionszeit des Neunmersmer-Konjugats **I** resultierte in einer Zunahme der Hydrolyseaktivität, wie an den Bahnen 2, 7 und 8 zu beobachten war.

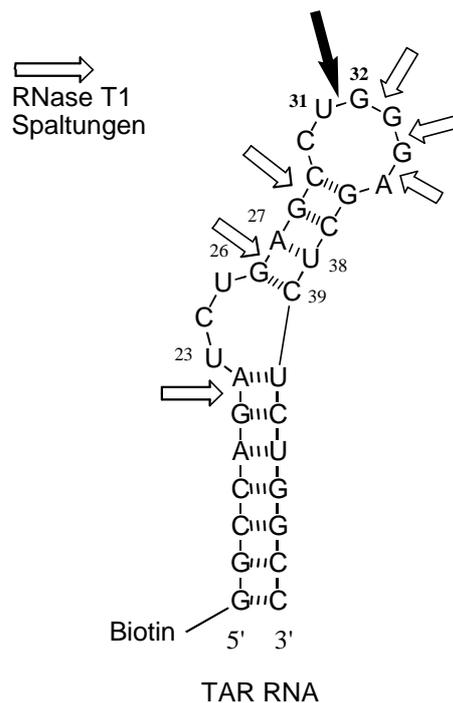


**Abb. 6.3:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Sequenzabhängige Hydrolyse der 31mer-RNA (1) (am 5'-Ende mit Biotin markiert) durch Peptide bei Raumtemperatur.

Peptid Konzentration: 167.2  $\mu\text{M}$ . Bahn 1, alkalische Hydrolyse; Bahn 2, (I) für 3 h; Bahn 3, Referenz-RNA; Bahn 4, (I) und EDTA (0.5 mM) für 1 h; Bahn 5, Hydrolyse durch RNase T<sub>1</sub> (G-spezifisch); Bahn 6, (III) für 1 h; Bahn 7, (I) für 2 h; Bahn 8, (I) für 1 h; Bahn 9, (I) für etwa 3 min; Bahn 10, (IV) for 1 h; Bahn 11, (II) für 1 h; Bahn 12, (I) and Eu<sup>III</sup> (167.2  $\mu\text{M}$ ) für 1 h; Bahn 13, (II) 167.2  $\mu\text{M}$  and Eu<sup>III</sup> (167.2  $\mu\text{M}$ ) für 1 h; Bahn 14, (III) 167.2  $\mu\text{M}$  and Eu<sup>III</sup> (167.2  $\mu\text{M}$ ) für 1 h.

Als Beweis, daß keine anderen Metallionen für die hydrolytische Spaltung verantwortlich sind, wurde das Peptid in Gegenwart von EDTA zur RNA gegeben. Trotz der Zugabe von EDTA wurde die RNA gespalten, was die Effizienz des metallfreien Peptid-Cyclen-Komplex auf Bahn 4 bestätigt.

Der Versuch, die Reaktionen durch Zugabe von Fischsperma-DNA im Formamid-Puffer zu stoppen, zeigte keine Änderung der Spaltung. Die Verwendung der Fischsperma-DNA diente zur Ablösung der RNA vom Peptid. Alle Ergebnisse konnten mehrmals reproduziert werden. Anhand der alkalischen Hydrolyse und der Ribonuclease T<sub>1</sub> ließ sich der Schnitt zwischen U<sub>31</sub> und G<sub>32</sub> leicht zuordnen. Wie erwartet, fand die Spaltung in der *loop*-Region statt. Es ist bemerkenswert, wie selektiv und effektiv die Hydrolyse ist, aber viel erstaunlicher ist, daß das Cyclen-Peptid-Konjugat **I** alleine, ohne Hilfe eines Metalls, zu einer solchen Hydrolyse befähigt ist. Dieses Ergebnis muß vor dem Hintergrund der Kenntnisse über Metallozyme überraschen (Kapitel 2.7.3).



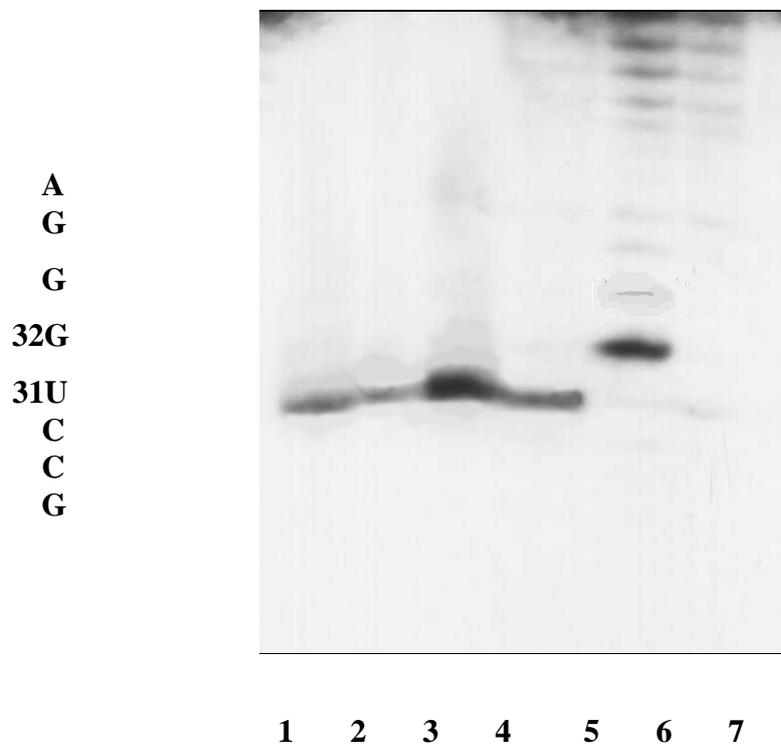
**Abb. 6.4: Selektive Spaltung der 31mer TAR-RNA (1) durch das Peptid-Cyclen-Konjugat (I), schwarzer Pfeil**

Die Tatsache, daß das Peptid-Cyclen-Konjugat **I** so effektiv und vor allem selektiv schneidet, wirft folgende Fragen auf. Welcher Mechanismus liegt diesem System zugrunde,

und warum versagt der Metall-Komplex? Zur Beantwortung dieser Fragen waren weitere Versuche notwendig, wobei hier darauf hingewiesen werden muß, daß die Ergebnisse nur zu einer spekulativen Interpretation führen können. Die hier gegebenen Bedingungen erlauben keinen absoluten Beweis.

### 6.3.1 pH-abhängige Spaltung des Peptid-Cyclen-Konjugats (I)

Die bisher diskutierten Versuche wurden im neutralen pH-Bereich durchgeführt. In diesem Fall liegt das Cyclen<sup>101</sup> zweifach protoniert vor. Dieser Sachverhalt bekräftigte die Annahme einer Beteiligung von Ammoniumionen oder auch einer Bis(ammonium)-Spezies.



**Abb. 6.5:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese, pH-abhängige Hydrolyse der 31mer-RNA (I). Peptid Konzentration: 167.2  $\mu$ M. Bahn 1, (I) für 1 h bei pH 7.4; Bahn 2, (I) für 1 h bei pH 8; Bahn 3, (I) für 1 h bei pH 6; Bahn 4, (I) und EDTA (0.5 mM) für 1 h; Bahn 5, Hydrolyse durch RNase T<sub>1</sub>; Bahn 6, (II) für 1h; Bahn 7, (III) für 1h.

<sup>101</sup> K. C. Chang, E. Grunwald, L. R. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 3794, Cyclen:  $pK_1 < 1$ ,  $pK_2 < 2$ ,  $pK_3 = 9.6$ ,  $pK_4 = 10.53$ .

Wenn tatsächlich die Ammoniumspezies der Cycleneinheit die Spaltung der Phosphodiester katalysieren, dann müßte auch ein pH-abhängiger Spaltungsmechanismus vorliegen. Um diesen Effekt zu testen, wurde das Peptid-Cyclen-Konjugat **I** bei verschiedenen pH-Werten (pH 6, 7 und 8) mit der TAR-RNA zusammengegeben (Abb. 6.5). Die Reaktionen wurden nach zwei Stunden bei Raumtemperatur unter normalen Bedingungen mit Formamid-Puffer gestoppt und mittels Elektrophorese ausgewertet. Alle drei Reaktionen zeigten die Spaltung zwischen U<sub>31</sub> und G<sub>32</sub>, jedoch mit unterschiedlicher Intensität. Die effektivste Spaltung erfolgte bei pH 6 (Bahn 3), auch pH 7.4 (Bahn 1) lieferte befriedigende Ergebnisse. Bei pH 8 war nur wenig Spaltungsintensität zu beobachten. Diese Ergebnisse wiesen eindeutig auf eine pH-Abhängigkeit des Spaltmechanismus hin.

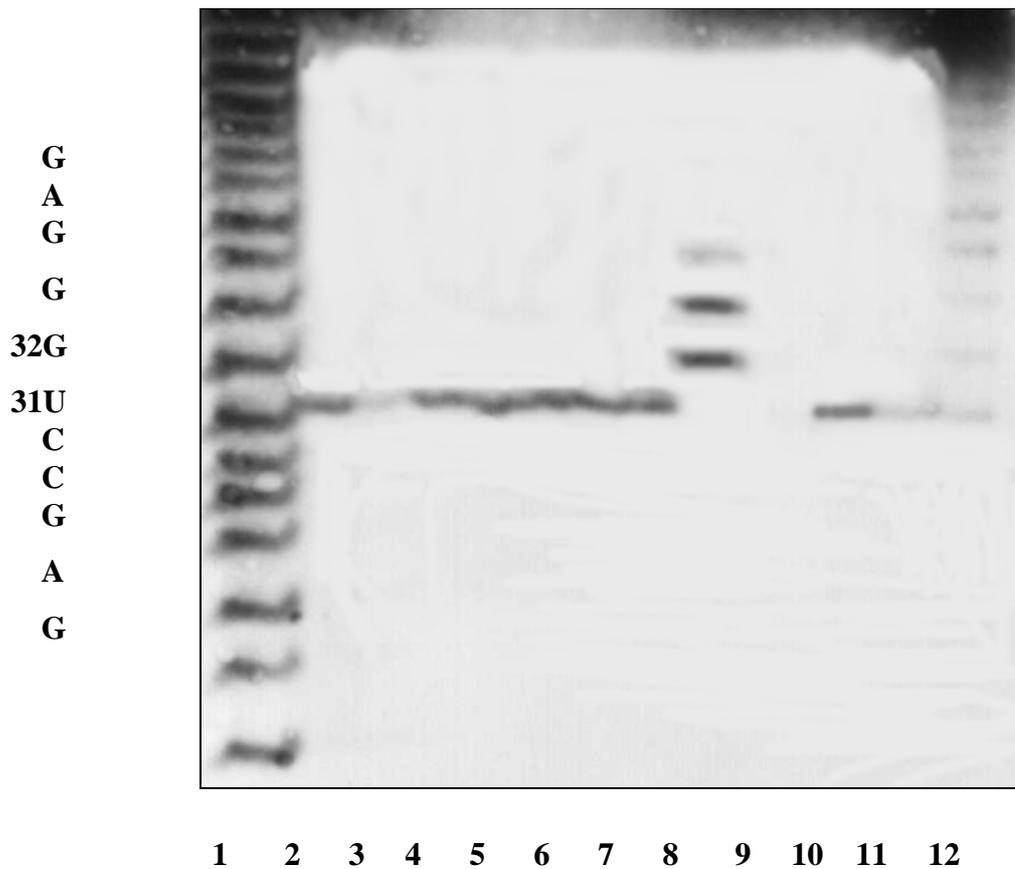
### **6.3.2 Spaltungsversuche mit unterschiedlichen Metallkonzentrationen von Zn(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> und Eu(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>**

Wie bereits erwähnt, zeigte der 1:1 Metall-Cyclenkomplex keine Spaltung der TAR-RNA. Dies entsprach nicht ganz den Erwartungen, da in Kapitel 2.7.3 ausgeführt wurde, daß Metallionen<sup>102</sup> schon allein für eine Spaltung der RNA sorgen (siehe Bahn 12 in Abb. 6.5 und Bahn 11 in Abb. 6.6). Zur Überprüfung dieser Aussage wurden verschiedene Konzentrationen der Metalle Zn<sup>II</sup> und Eu<sup>III</sup> (1.35 mM, 135 µM, 13.5 µM, 1.35 µM, 135 nM) mit dem Peptid-Cyclen-Konjugat **I** an der TAR-RNA getestet.

Die Anwesenheit von 13.5 µM Eu(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> inhibierte die RNA-Hydrolyse von 0.135 µM RNA mit 167µM **I**. Die Anwesenheit von Zn(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> unterdrückte die Spaltung der RNA ebenfalls, jedoch erst in einer Konzentration von 1.35 mM. Interessanterweise schienen die Konzentrationen, bei der die beiden Metallionen mit der Spaltung interferieren, unterschiedlich zu sein. Dieses Ergebnis könnte das Resultat voneinander abweichender Konstanten für die Bindung mit dem RNA-Peptid-Komplex oder verschiedener Bindungsstellen sein. Es ist bemerkenswert, daß Eu<sup>III</sup> die Spaltung der RNA bei einer Konzentration von ungefähr 1/10 der Konzentration von **I** verhindert. Obwohl der exakte Mechanismus der Spaltungsinhibition derzeit noch nicht bekannt ist, ist es trotzdem sehr beachtlich, daß Metallionen die hydrolytische Wirkung von **I** unterdrücken.

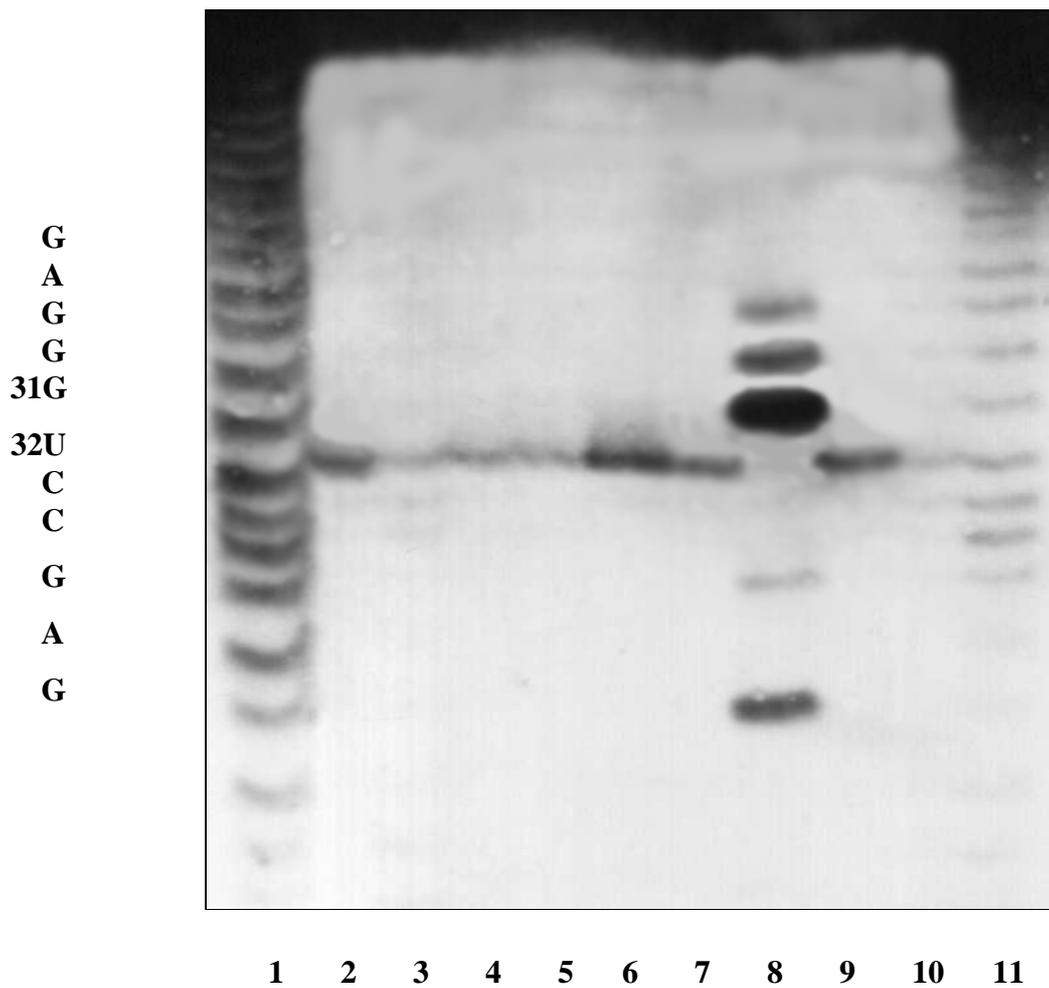
---

<sup>102</sup> J. Hall, D. Hüsken, R. Häner, *Nucleic Acids Research* **1996**, *24*, 3522-3526.



**Abb. 6.6:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese, konzentrationsabhängige Unterdrückung der Hydrolyse der 31mer-RNA (1) (am 5'-Ende mit Biotin markiert) durch einen Zink(II)-Peptid-Komplex bei Raumtemperatur.

Peptid Konzentration: 167.2  $\mu\text{M}$ . Bahn 1, alkalische Hydrolyse; Bahn 2, (I) für 1 h; Bahn 3, (I) + Zn (1.35 mM) für 1 h; Bahn 4, (I) + Zn (135  $\mu\text{M}$ ) für 1 h; Bahn 5, (I) + Zn (13.5  $\mu\text{M}$ ) für 1 h; Bahn 6, (I) + Zn (1.35  $\mu\text{M}$ ) für 1 h; Bahn 7, (I) + Zn (135 nM) für 1 h; Bahn 8, Hydrolyse durch RNase T<sub>1</sub> (G-spezifisch); Bahn 9, Referenz-RNA; Bahn 10, (I) + Zn (0.9 mM) für 1 h; Bahn 11, (I) + Zn (90 nM) für 1 h; Bahn 12, Zn (1.35 mM) für 1 h(I).

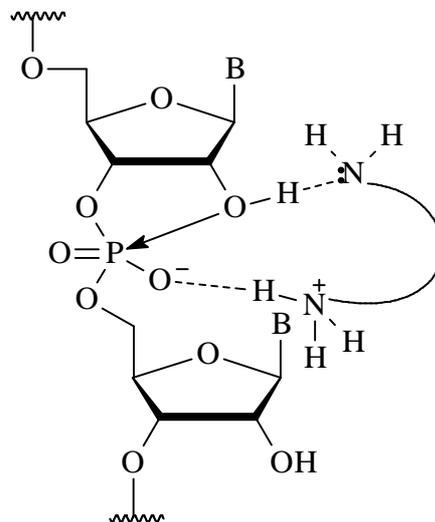


**Abb. 6.7:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese, konzentrationsabhängige Unterdrückung der Hydrolyse der 31mer-RNA (1) (am 5'-Ende mit Biotin markiert) durch einen Europium (III)-Peptid-Komplex bei Raumtemperatur

Peptid Konzentration: 167.2  $\mu\text{M}$ . Bahn 1, alkalische Hydrolyse; Bahn 2, (I) für 1 h; Bahn 3, (I) + Eu (1.35 mM) für 1 h; Bahn 4, (I) + Eu (135  $\mu\text{M}$ ) für 1 h; Bahn 5, (I) + Eu (13.5  $\mu\text{M}$ ) für 1 h; Bahn 6, (I) + Eu (1.35  $\mu\text{M}$ ) für 1 h; Bahn 7, (I) + Eu (135 nM) für 1 h; Bahn 8, Hydrolyse durch RNase T<sub>1</sub> (G-spezifisch); Bahn 9, Referenz-RNA; Bahn 10, (I) + Eu (0.9 mM) für 1 h; Bahn 11, (I) + Eu (90 nM) für 1 h; Bahn 12, Eu (1.35 mM) für 15 min.

### 6.3.3 Cyclen als Bis(ammonium)-Spezies

Die Tatsache, daß in Experimenten mit Peptiden ohne Cycleneinheit keine Hydrolyse beobachtet wurde und daß die Hydrolyse bei höherem pH-Wert abnahm, bekräftigte die Annahme einer Beteiligung von Ammoniumionen, eventuell einer Bis(ammonium)-Spezies, an der Hydrolyse. Obwohl bereits gezeigt wurde, daß basische Amine effizient RNA hydrolysieren können, wurde bislang angenommen, daß Nuclease-Modellsysteme mit Metallionen effektiver wirken als solche mit basischen Gruppen. Arbeiten von Komiyama *et al.*<sup>103</sup> haben gezeigt, daß Bis(amine) RNA durch einen Säure/Base-Mechanismus spalten können, indem die Nucleophilie an der 2'OH-Gruppe erhöht und gleichzeitig die Fluchtgruppenqualität durch Wechselwirkung mit einer Ammoniumgruppe verstärkt wird.



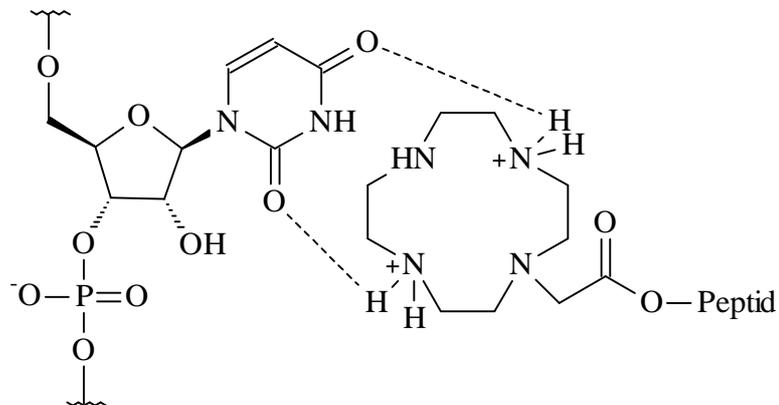
**Abb. 6.8:** Darstellung des Säure/Base-Mechanismus der Bis(amine) nach Komiyama

Andererseits konnten Kurz und Göbel<sup>62</sup> zeigen, daß ein RNA-Spaltungsbruch ohne Mitwirken einer internen Base durchgeführt werden kann. Da die Cycleneinheit bei neutralem pH-Wert als Bis(ammonium)-Einheit vorliegt, wird für die Spaltung ein Bis-Kation-Mechanismus vorgeschlagen.

Warum schneidet nun das Peptid-Cyclen-Konjugat **I** so effizient und selektiv zwischen U<sub>31</sub> und G<sub>32</sub>? Die *loop*-Region bietet aufgrund seiner endständigen, einzelsträngigen Struktur

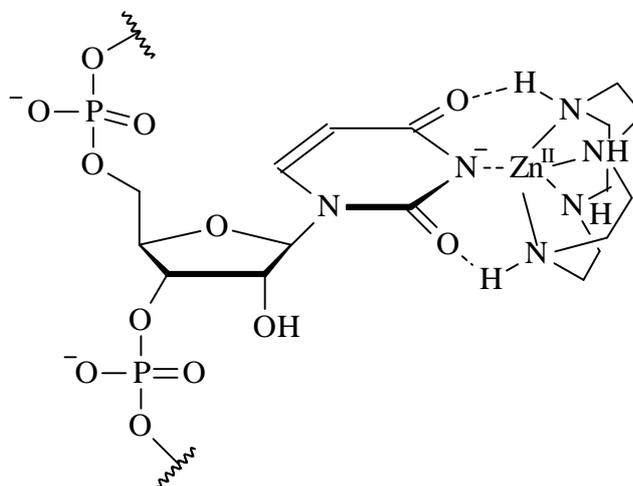
<sup>103</sup> M. Komiyama, T. Inokawa, K. Yoshinari, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 77.  
M. Komiyama, K. Yoshinari, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2155.

einen guten Zugang. Außerdem liegt die Vermutung nahe, daß das Cyclen mit dem Uridin gut wechselwirken kann (Abb. 6.9).



**Abb. 6.9:** Assoziation des Peptid-Cyclen-Konjugats (I) mit Uridin

Kimura<sup>104</sup> hat für den Zink(II)-Cyclen-Komplex (Abb. 6.10) eine intrinsische Erkennung für Uracil gefunden. Dieser kann bei pH 7.6 bereits an Uracil in seiner am Imidstickstoff deprotonierten Form koordiniert werden und inhibiert so die Hybridisierung von Poly(U) mit Poly(A).



**Abb. 6.10:** Darstellung der Erkennung von Uracil durch den Cyclen-Zink-Komplex

Der Metall-Cyclen-Komplex hat keine Affinität zu den Modell-RNA-Systemen Poly(A), Poly(G) und Poly(C). Die Struktur des Uracils scheint für die Koordination mit dem

<sup>104</sup> M. Shionoya, M. Sugiyama, E. Kimura, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1747-1748.

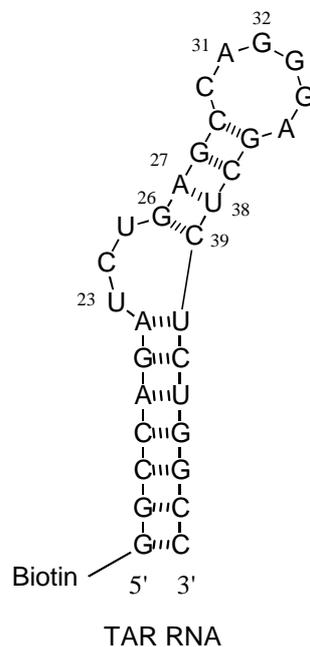
Cyclen verantwortlich zu sein. Nach dieser Erkenntnis müßte aber das Peptid-Cyclen-Konjugat **I** gerade als Metall-Komplex an der TAR-RNA koordinieren und schneiden. Was aber vermutlich zu einer viel besseren Wechselwirkung führt, ist das Auftreten der angenommenen Bis(ammonium)-Spezies, zumal sie bei pH 6 ihre beste Wirkung entfaltet. Durch das Fehlen des Metall-Kations und der nicht eintretenden Deprotonierung des Amins am Uracil bei pH 6, geht das zweifachprotonierte Cyclen vermutlich eine Koordination mit den Sauerstoffatomen des Uracils ähnlich der Abb. 6.9 ein. Die angenommene Bis(ammonium)-Spezies kann dann die selektive Spaltung am Phosphodiester bewirken.

Eine derartige Korrelation scheint auch ohne die Erkennungseinheit des "shuttle-peptids" eine vergrößerte Assoziation von Substrat und Reagenz zu erzeugen, so daß eine bemerkenswert hohe Spaltungsbeschleunigung erzielt werden kann. Diese Erkenntnis wird in Kapitel 6.4 über die synthetischen Ribonucleasen mit Cyclen-, ohne Erkennungseinheit aufgegriffen und in ihrer Aussage bestätigt. Ganz anders verhält sich das Hexamer-Cyclen-Konjugat **II**, welches zu keiner Spaltung geführt hat, wobei das Sechser-Peptid durch die Verkürzung um drei Aminosäuren die Näherung der Cycleneinheit an das Uridin vermutlich gar nicht erst verwirklichen kann, da es in der *bulge*-Region verankert ist.

Nach den oben diskutierten Erkennungseigenschaften des Cyclen-Konjugats ist eine Verwendung zur Analyse der Tertiärstruktur von RNA vorstellbar. Die Identifizierung der tertiären Struktur von Nucleinsäuren stellt auch heute noch eine anspruchsvolle Aufgabe dar. Uridin-Basen, die kein Basenpaar bilden, wie etwa in *loop*- oder *bulge*-Strukturen, wären in der Lage, ein Assoziat mit dem Cyclen-Konjugat einzugehen und an diesen Stellen bevorzugt eine Spaltung der RNA zu erzeugen. Die Hydrolyse in *bulge*-Regionen hängt zudem von den stereoelektronischen Rahmenbedingungen ab. Wie bereits eingangs erwähnt, ist der *in line*-Mechanismus für eine effiziente Spaltung unbedingt notwendig. Die Fähigkeit zur Spaltung in *bulge*-Regionen hängt daher von der Möglichkeit zur Bildung eines 180°-Winkels zwischen Nucleophil und Fluchtgruppe ab.

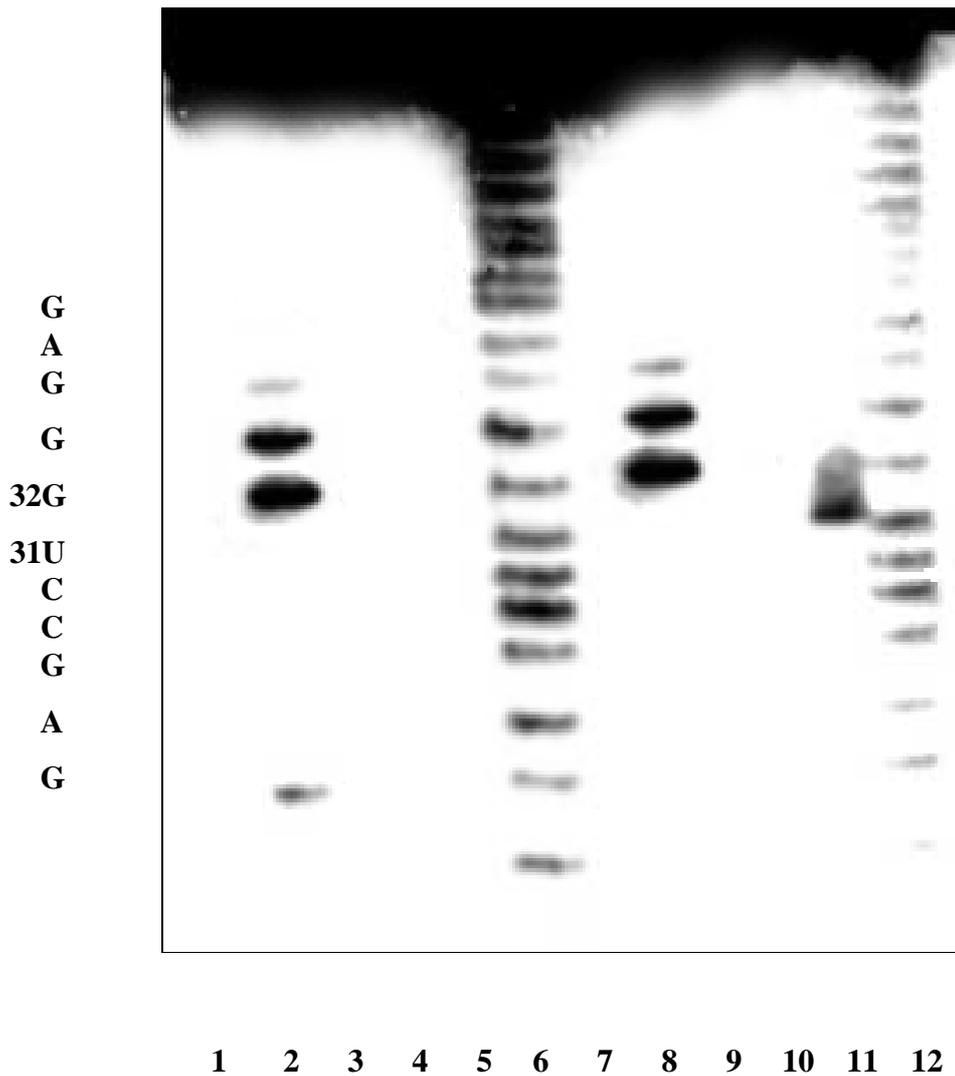
### 6.3.4 Austausch von U<sub>31</sub> gegen A<sub>31</sub> in der TAR-RNA (2)

Um zu testen, wie effizient die Struktur des Uridins für eine Spaltung ist, wurde von der Firma Genset eine RNA mit ausgetauschter Base (U<sub>31</sub> gegen A<sub>31</sub>) bezogen. Wäre tatsächlich eine so gute Koordination zwischen Cyclen und Uridin vorhanden, so würde der Austausch von Adenin gegen Uracil dem Cyclen jegliche Koordinationsmöglichkeit nehmen. Die Folge wäre ein Ausbleiben der Spaltung.



**Abb. 6.11: Durch Austausch von U<sub>31</sub> gegen A<sub>31</sub> veränderte TAR-RNA (2)**

Unter den üblichen Bedingungen wurde das Peptid-Cyclen-Konjugat **I**, das Peptid **III** und reines Cyclen mit der veränderten TAR-RNA (2) zusammengegeben. Als Vergleich wurden die gleichen Versuche mit der ursprünglichen TAR-RNA (1) angesetzt. Zwei Stunden Reaktionszeit haben sich für die Spaltungen als sehr effizient herausgestellt und wurden im folgenden auch beibehalten. Alle Versuchsansätze sowie jeweils T<sub>1</sub> und Referenz-RNA wurden auf ein 20 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und per Elektrophorese und anschließender Detektion über einen Kodak-Film ausgewertet.



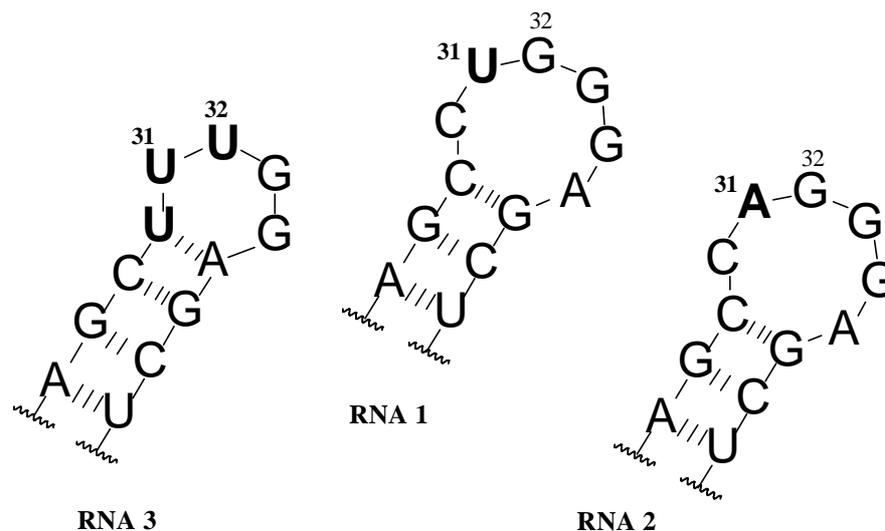
**Abb. 6.12: Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Spaltversuche an der 31mer-RNA (am 5'-Ende mit Biotin markiert) mit veränderter Base an U<sub>31</sub> gegen A<sub>31</sub> und der Original-TAR-RNA durch Peptid (I), Peptid (III) und Cyclen bei Raumtemperatur. RNA-Konzentrationen: 0.135  $\mu$ M.**

**Peptid (I), (III) und Cyclen Konzentration: 167.2  $\mu$ M. Bahn 1-6 veränderte RNA (2), Bahn 1, Referenz-RNA; Bahn 2, Hydrolyse durch RNase T<sub>1</sub> (G-spezifisch); Bahn 3, Cyclen für 2h; Bahn 4, (III) für 2h; Bahn 5, (I) für 2h, Bahn 6, alkalische Hydrolyse; Bahn 7-12 original RNA; Bahn 7, Referenz-RNA; Bahn 8, Hydrolyse durch RNase T<sub>1</sub> (G-spezifisch); Bahn 9, Cyclen für 2 h; Bahn 10, (III) für 2h; Bahn 11, (I) für 2h; Bahn 12, alkalische Hydrolyse.**

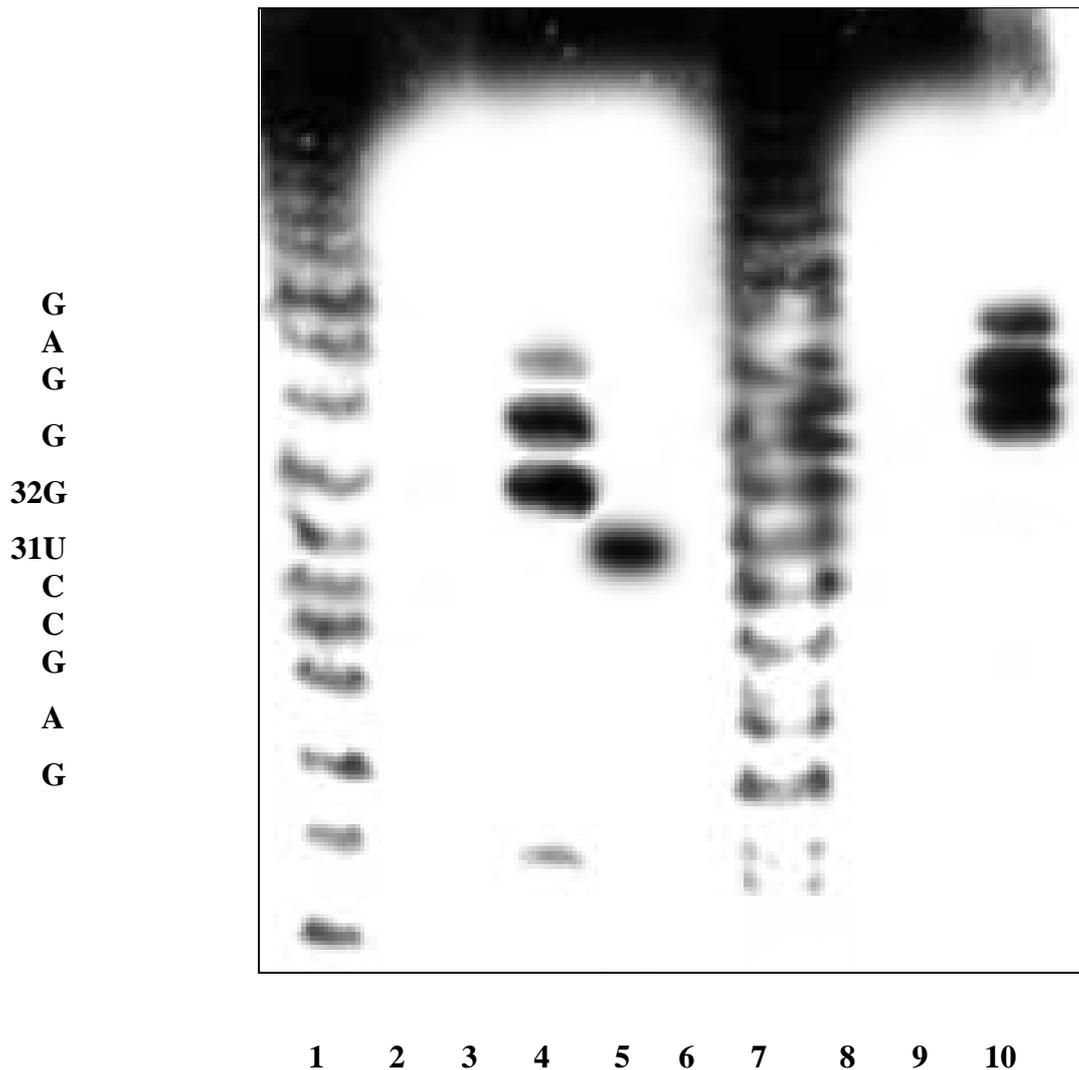
Wie erwartet, trat durch den Austausch der Base keine Spaltung (Abb. 6.12, Bahn 5) ein. Das Peptid-Cyclen-Konjugat konnte seine Wirkung nur in Verbindung mit Uridin entfalten. Eine exakte Aussage über den Effekt des Uridins kann aber noch nicht endgültig erfolgen. Die Beschaffenheit der Tertiärstruktur der RNA könnte auch der Auslöser für die Spaltung sein. So könnte es sich bei der Spaltstelle auch um eine Soll-Bruchstelle handeln. Zweifellos scheint die *loop*-Region den besten Zugang zur RNA zu bieten. Wie gut gerade der Zugang zu den Basen U<sub>31</sub> und G<sub>32</sub> ist, kann hier noch nicht gesagt werden. Eine große Veränderung wird der Austausch einer Pyrimidinbase gegen eine Purinbase in der Tertiärstruktur jedoch nicht bewirken.

### 6.3.5 Umstrukturierung der *loop*-Region

Eine andere Möglichkeit, den Effekt des Cyclens zu testen wäre, dem System gleich mehrere Uridin-Basen zur Koordination zu bieten. Eine auf diese Fragestellung zugeschnittene RNA soll letztlich einen Hinweis auf den Koordinationseffekt liefern. Durch den Austausch von C<sub>30</sub> und G<sub>32</sub> gegen jeweils ein U in der *loop*-Region, kommt es zu einer Schleifenverkleinerung um zwei Basenpaare, da das neue U<sub>30</sub> mit dem A<sub>35</sub> eine Basenpaarung eingehen kann (Abb. 6.13). Die RNA (3) scheint nun auch in einer leicht veränderten Tertiärstruktur vorzuliegen.



**Abb. 6.13: Ausschnitt der *loop*-Regionen der drei verschiedenen RNA's. Allen gemeinsam ist die Biotin-Markierung in 5'-Position**



**Abb. 6.14:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Spaltversuche an der 31mer-RNA (am 5'-Ende mit Biotin markiert) mit veränderten Basen an C<sub>30</sub> und G<sub>32</sub> (3) gegen jeweils ein U, sowie der beiden anderen RNA's (1, 2) durch Peptid (I).

RNA-Konzentrationen: 0.135  $\mu$ M.

Peptid (I) Konzentration: 167.2  $\mu$ M. Bahn 1-4 RNA (2), Bahn 1, alkalische Hydrolyse; Bahn 2, (I) für 2 h; Bahn 3, Referenz-RNA; Bahn 4, Hydrolyse durch RNase T<sub>1</sub> (G-spezifisch); Bahn 5-6 RNA (1), Bahn 5, (I) für 2 h, Bahn 6, Referenz-RNA; Bahn 7-10 RNA (3), Bahn 7, alkalische Hydrolyse; Bahn 8, (I) für 2h; Bahn 9, Referenz-RNA; Bahn 10, Hydrolyse durch RNase T<sub>1</sub> (G-spezifisch);

Unter den üblichen Bedingungen wurde das Peptid-Cyclen-Konjugat **I** mit der veränderten TAR-RNA (3) eingesetzt und elektrophoretisch untersucht. Als Vergleich wurden die beiden anderen RNA's (1, 2) mit dem Peptid **I** und jeweils T<sub>1</sub> und Referenz-RNA aufgetragen.

Die eigentlich hier zu erwartende RNA-Spaltung blieb jedoch aus (Bahn 8). Die einzige Spaltung zeigte das Peptid-Cyclen-Konjugat **I** mit der TAR-RNA (1). Durch die Einführung der neuen Uridin-Basen stellten sich dem Cyclen zwei einzelsträngige Uridine, die auch einen freien Zugang aufgrund der *loop*-Struktur zulassen. Über die tatsächliche Tertiärstruktur der neuen RNA, die sich aufgrund der neuen Basenpaarung verändert haben muß, konnte jedoch keine Aussage gemacht werden. Die Uridinbasen könnten sich auch so angeordnet haben, daß ein Zugang für das Cyclen unmöglich ist. Durch seine freien Guanidinium-Gruppen ist das Peptid fest an der RNA verankert und ist nicht vollends flexibel.

Die Verwendung der neuen RNA hat zu keiner Klärung der Uridinspezifität beigetragen, vielmehr wirft sie noch mehr Fragen auf, die durch die einfachen Methoden der Elektrophorese nicht geklärt werden können. Daß die Spaltung des Peptid-Cyclen-Konjugats **I** von der Tertiärstruktur abhängt, ließe sich durch andere Cyclenderivate beweisen, die an unterschiedlichen Stellen der RNA koordinieren können und somit nicht fest verankert sind. Würde es gelingen, ein Cyclenderivat zu finden, welches sich einen einfachen Zugang zur *loop*-Region verschaffen kann und dort weitgehend am Uridin koordiniert und spaltet, so wäre die Uridin-Spezifität und die Abhängigkeit des Peptides von der Tertiärstruktur geklärt. Es muß dann neben der RNA (1) auch die Uridin-Basen der RNA (3) erkennen können. Die Seitenkette mit der Guanidiniumgruppe darf nicht zu lang sein, damit das Cyclenderivat die Chance hat, sich dem Uridin der *loop*-Region zu nähern, ohne vorher eine Koordination mit den Phosphorsäureestern unterhalb der *loop*-Region der RNA einzugehen. In Kapitel 6.4 über die synthetischen Ribonucleasen wird vornehmlich auf diese Überlegung eingegangen.

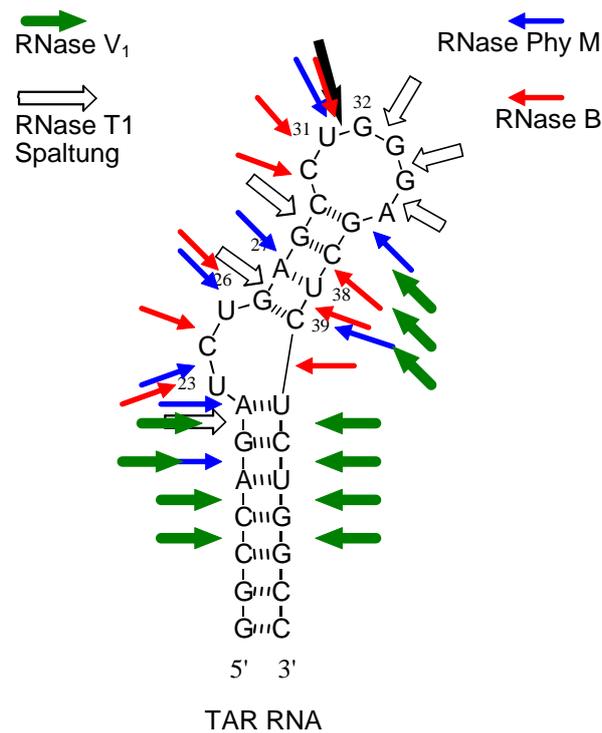
Zuvor sollte noch geklärt werden, wo das Cyclen-Peptid-Konjugat sitzt und wie fest seine Bindungskonstante ist. Durch Verdauungsexperimente mit Ribonucleasen, die definiert hinter bestimmten Basen schneiden, gelingt es, Aussagen über die Position des Peptides zu treffen.

### 6.3.6 Verdauungs-Experimente, Footprints

Die einfachsten Ansatzpunkte, die die Elektrophorese für die Erkennung der Koordination einer Verbindung mit der RNA bieten kann, sind Verdauungsexperimente. Hierbei wirken verschiedene Ribonucleasen auf die RNA ein. Anschließend werden die Spaltungen untersucht. Dabei ist es wichtig, die Ribonucleasen gezielt zu wählen.

Die bisher eingesetzte Ribonuclease  $T_1$  zeigt eine typische G-Spezifität, d. h. sie schneidet nach jedem G bevorzugt bei ungepaarten Nucleotiden. Genauso existieren diverse andere Ribonucleasen, die gezielt für bestimmte Spaltungen eingesetzt werden können. Für die Verdauungsexperimente werden nun neben  $T_1$  auch  $V_1$ , B und Phy M verwendet.  $V_1$  zeigt eine typische Spezifität für gepaarte Basen-Regionen, während B bevorzugt nach jedem U und C schneidet und Phy M an den Basen U und A wirksam ist. Damit sollte der Bereich an Nucleotiden für die Erkennung abgedeckt sein. Wenn nun das Peptid I mit der RNA einen Komplex eingeht und sich an bestimmte Regionen setzt, können dort die Ribonucleasen nicht mehr ihre Arbeit verrichten. Sie schneiden nur noch dort, wo ihnen der Zugang gewährt ist. Als Vergleich läßt man immer die RNA allein mit der Ribonuclease reagieren, damit auch die eigentlich erreichbaren Schnittstellen ermittelt werden können. Durch das Ausbleiben einiger Spaltungen kann dann die Position des Peptides an der RNA festgestellt werden.

In Abb. 6.15 sind alle Schnittstellen der verschiedenen Ribonucleasen an der RNA (1) eingezeichnet. Wie mit Blick auf die in Abb. 6.16 dargestellten Ergebnisse festzuhalten ist, lassen sich in der Realität die Spezifitäten der Ribonucleasen nicht immer richtig ausnutzen. So hat Phy M trotz seiner U- und A-Basen-Spezifität in der *loop*-Region nach jedem G und in der *bulge*-Region neben den beiden U's auch nach dem C (Abb. 6.15) geschnitten. Das hatte jedoch keine negativen Folgen, zumal so der wichtigste Bereich gänzlich abgedeckt wurde. Schwieriger zu beurteilen war die Stamm-Region.  $V_1$  schien bevorzugt mit den einzelsträngigen Basen zu interagieren, wobei hier allerdings keine Spezifität zu erkennen war. In Anwesenheit des Peptides waren kaum Schnitte erkennbar, was eher an der Wirkungslosigkeit von  $V_1$  liegen dürfte als an der totalen Abdeckung der RNA durch das Peptid.



**Abb. 6.15:** Darstellung der möglichen Schnittstellen der Ribonucleasen T<sub>1</sub> (G-spezifisch), V<sub>1</sub> (spezialisiert auf gepaarte Basen), B (U- und C-spezifisch) und Phy M (U- und A-spezifisch)

Bei genauer Untersuchung der Footprint-Experimente zeigten T<sub>1</sub> und Phy M, daß der Bereich der Basen G<sub>32</sub> und G<sub>33</sub> abgedeckt ist. T<sub>1</sub> gelang trotz der Anwesenheit des Peptides die Spaltung nach den G's (26, 28) in der oberen Stamm-Region, was darauf hinweist, daß das Peptid sich auf der gegenüberliegenden gepaarten Basenregion befinden mußte. B bestätigte wiederum den freien Zugang zu den Basen U<sub>31</sub>, C<sub>30</sub> und C<sub>29</sub>, was bei Betrachtung der Tertiärstruktur der RNA logisch erschien. Der *bulge*-Bereich konnte nur von Phy M eindeutig identifiziert werden. Die Ribonuclease schnitt vor U<sub>23</sub>, C<sub>24</sub> und U<sub>25</sub>. Die Schnitte verschwanden jedoch, wenn die RNA zuvor mit dem Peptid besetzt wurde. Aus den so zusammengetragenen Ergebnissen war es möglich, die Angriffspunkte des Peptides einigermaßen genau vorherzusagen. Aufgrund der mit den Ribonucleasen erhaltenen Ergebnisse kann festgehalten werden, daß die *bulge*-, sowie die *loop*-Basen von A<sub>35</sub>-G<sub>32</sub> und letztlich die eine obere Stamm-Seite von G<sub>36</sub>-C<sub>39</sub> durch die Bindung des Peptides an der TAR-RNA belegt wurden (Abb. 6.17).

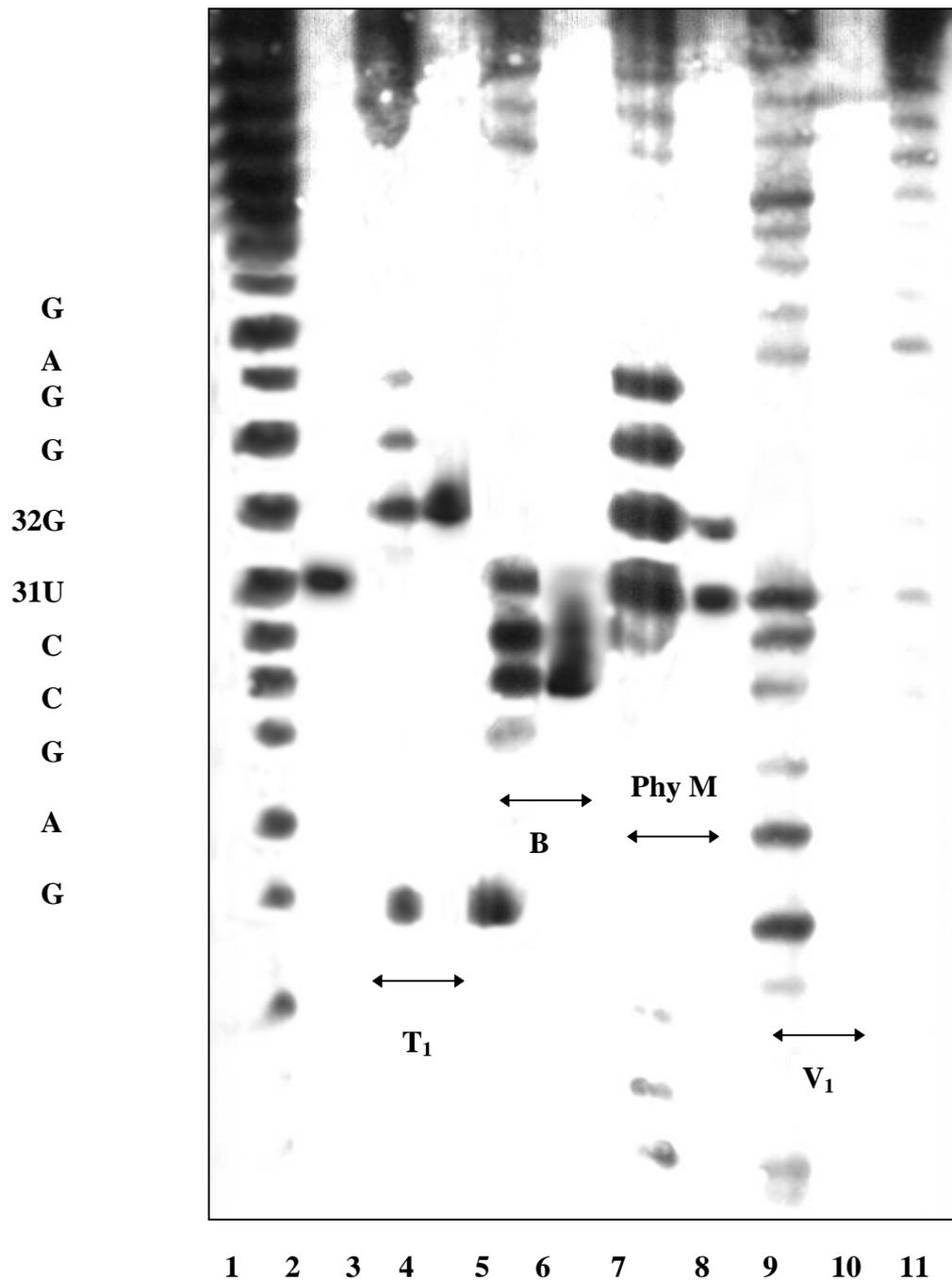
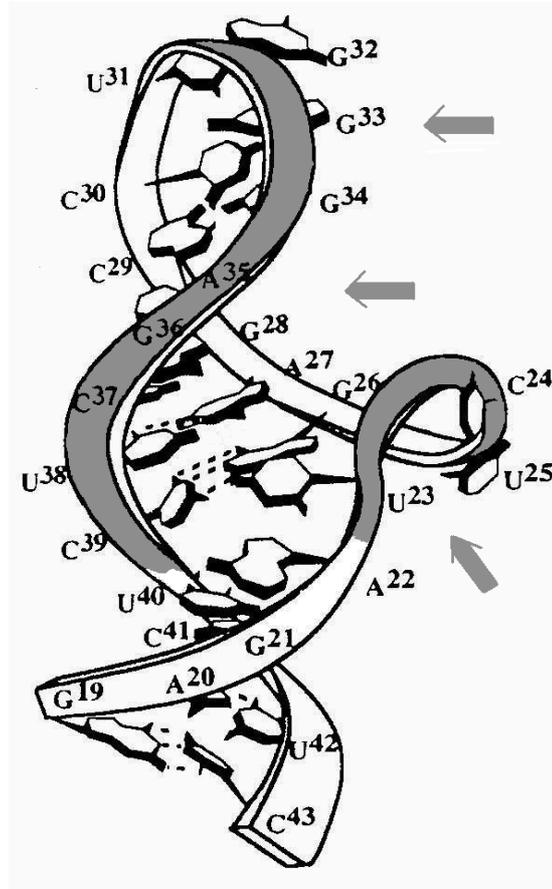


Abb. 6.16: Footprint-Experimente mit den Ribonucleasen T<sub>1</sub>, B, Phy und V<sub>1</sub>.

RNA-Konzentration: 0.113  $\mu\text{M}$ ; Peptid-Konzentration 185.7  $\mu\text{M}$ : Bahn 1, alkalische Hydrolyse; Bahn 2, (I) für 2h; Bahn 3, T<sub>1</sub> (G-spezifisch); Bahn 4, (I) + T<sub>1</sub>; Bahn 5, B (U- und C-spezifisch); Bahn 6, (I) + B; Bahn 7, Phy (U- und A-spezifisch); Bahn 8, (I) + Phy; Bahn 9, V<sub>1</sub> (gepaarte Basen), Bahn 10, (I) + V<sub>1</sub>; Referenz-RNA.



**Abb. 6.17:** Darstellung der Tertiärstruktur der TAR-RNA. Der graue Bereich gibt die mutmaßlichen Bindungsstellen des Peptides an

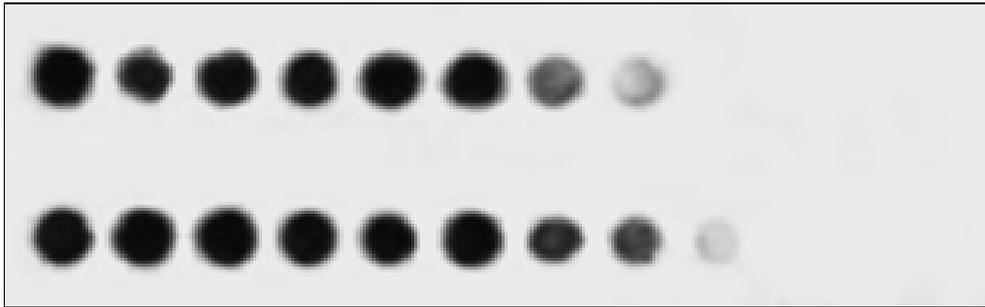
Der untere Stamm-Bereich konnte nicht untersucht werden, wobei er für die Klärung der Spaltung auch keine Rolle spielt. Durch die fast exakte Erkennung des Aufenthaltsortes des Peptides ließ sich die Spaltung des Peptid-Cyclen-Konjugates **I** leichter erklären. Wie beschrieben wurde, bindet die Guanidiniumgruppe des Arginin 52 in der *bulge*-Region. Welche Arginin-Einheit des Konjugats hier für die Bindung in der *bulge* zuständig ist, konnte durch diese Methoden nicht festgestellt werden. Das Peptid schien sich den kürzesten Weg zum Uridin, durch Koordination an der oberen Stamm-Region und dem einen Teil der *loop*, gesucht zu haben, so daß das Cyclen noch genügend Spielraum für die Interaktion mit der Uridin-Einheit hat. Dies würde auch erklären, warum das Sechsmers-Peptid-Konjugat **II** nicht zu einer Spaltung führt. Erstens ist nicht zwingend, daß überhaupt ein Arginin in der *bulge*-Region bindet und zweitens ist durch die Kettenverkürzung kein Zugang zu dem Uridin mehr gegeben.

### 6.3.7 Filter-binding assays (Dot-Blot), Bestimmung der Komplexkonstante des Peptid-Cyclen-Konjugats (I)

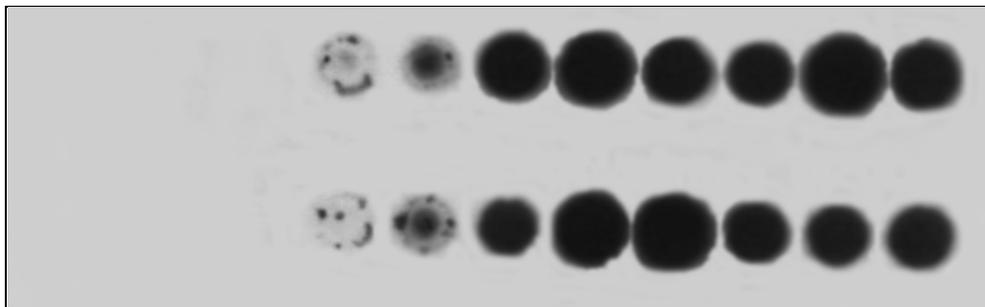
Mittels einer Dot-Blot-Apparatur wurde versucht, die Komplexkonstante des Peptid-Cyclen-Konjugats **I** zu ermitteln. Dabei wurden jeweils 12 Versuche mit verschiedenen Konzentration des Peptides **I** und **III** bei konstanter RNA-Konzentration (36 nM) angesetzt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei RT sollte sich der Komplex zwischen den Peptiden und der RNA gebildet haben, so daß die Proben aufgetragen wurden. Mit abnehmender Peptidkonzentration nahm auch die Bildung des Komplexes ab, was an der Intensitätsabnahme der Spots auf der Nitrozellulose-Membran, die hier als Filter diente, zu beobachten war. Im Gegensatz dazu mußte aber die Intensität der RNA auf der darunterliegenden Nylon-Membran zunehmen.

In den Abbildungen 6.18 und 6.19 sind die Filme der Dot-Blots wiedergegeben, wobei Abbildung 6.18 den Komplex auf der Nitrozellulose-Membran und Abbildung 6.19 die durch das Peptid nicht gebundene RNA auf der Nylon-Membran enthält. Die obere Reihe zeigt die 12 Versuche mit dem Peptid-Cyclen-Konjugat **I** bei konstanter RNA- und abnehmender Peptid-Konzentration. Die untere Reihe enthält zum Vergleich bei gleichen Konzentrationen das Peptid **III** ohne Cycleneinheit.

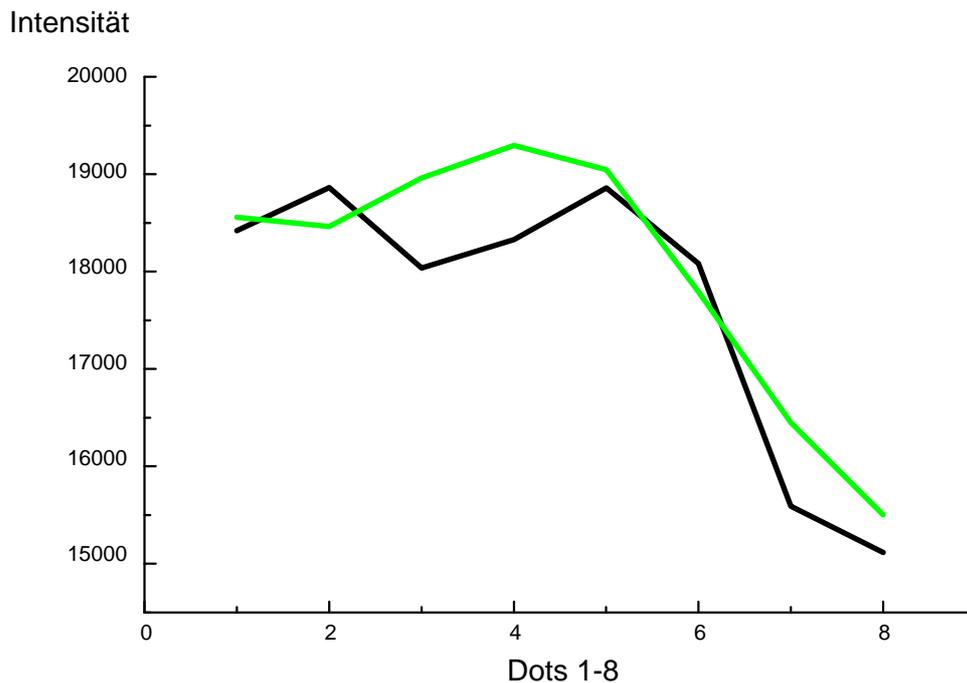
Neben der densitometrischen Quantifizierung der Resultate kann die Auswertung auch visuell erfolgen. Abbildung 6.18 demonstriert durch die Schwärzung der Dots 1-6 die Anwesenheit des Komplexes, während Dot 7 durch die Intensitätsabnahme deutlich an Komplexstabilität verliert. Für eine exakte Auswertung reichte hier die visuelle Betrachtung nicht mehr aus. Mit Hilfe der densitometrischen Quantifizierung wurde die Intensität der Dots bestimmt und in einer Graphik aufgetragen (Abb. 6.20).



**Abb. 6.18:** Darstellung der Dot-Blots mit Ansicht auf die Nitrozellulose-Membran. Die Spots zeigen den Komplex von Peptid und RNA, der auf der Nitrozellulose-Membran aufgefangen wird. RNA-Konzentration: 36 nM;  
Obere Reihe: Peptid-Cyclen-Konjugat (I) mit den Konzentrationen 1. 89.2  $\mu$ M; 2. 44.6  $\mu$ M; 3. 22.3  $\mu$ M; 4. 8.9  $\mu$ M; 5. 4.46  $\mu$ M, 6. 2.23  $\mu$ M; 7. 892 nM; 8. 446 nM; 9. 89.15 nM; 10. 8.92 nM; 11. 892 pM; 12. Referenz RNA. Untere Reihe: Peptid (III) mit den Konzentrationen 1. 89.2  $\mu$ M; 2. 44.6  $\mu$ M; 3. 22.3  $\mu$ M; 4. 8.9  $\mu$ M; 5. 4.46  $\mu$ M, 6. 2.23  $\mu$ M; 7. 892 nM; 8. 446 nM; 9. 89.15 nM; 10. 8.92 nM; 11. 892 pM; 12. Referenz RNA.



**Abb. 6.19:** Darstellung der gleichen Dot-Blots mit Ansicht auf die Nylon-Membran. Die Spots geben die RNA, die keinen Komplex mit dem Peptid eingegangen ist und auf der Nylon Membran aufgefangen wird, wieder. RNA-Konzentration: 36 nM;  
Obere Reihe: Peptid-Cyclen-Konjugat (I) mit abnehmender Konzentration des Komplexes und Zunahme der RNA-Konzentration. Untere Reihe: Peptid (III) mit gleichen Konzentrationen (siehe Abb. 6.18).



**Abb. 6.20:** Die Graphik gibt die Intensitäten des Komplexes der Dots 1-8 auf der Nitrozellulose-Membran wieder. Die schwarze Linie zeigt den Kurvenverlauf des Peptid-Cyclen-Konjugats I und die graue den des Peptides III

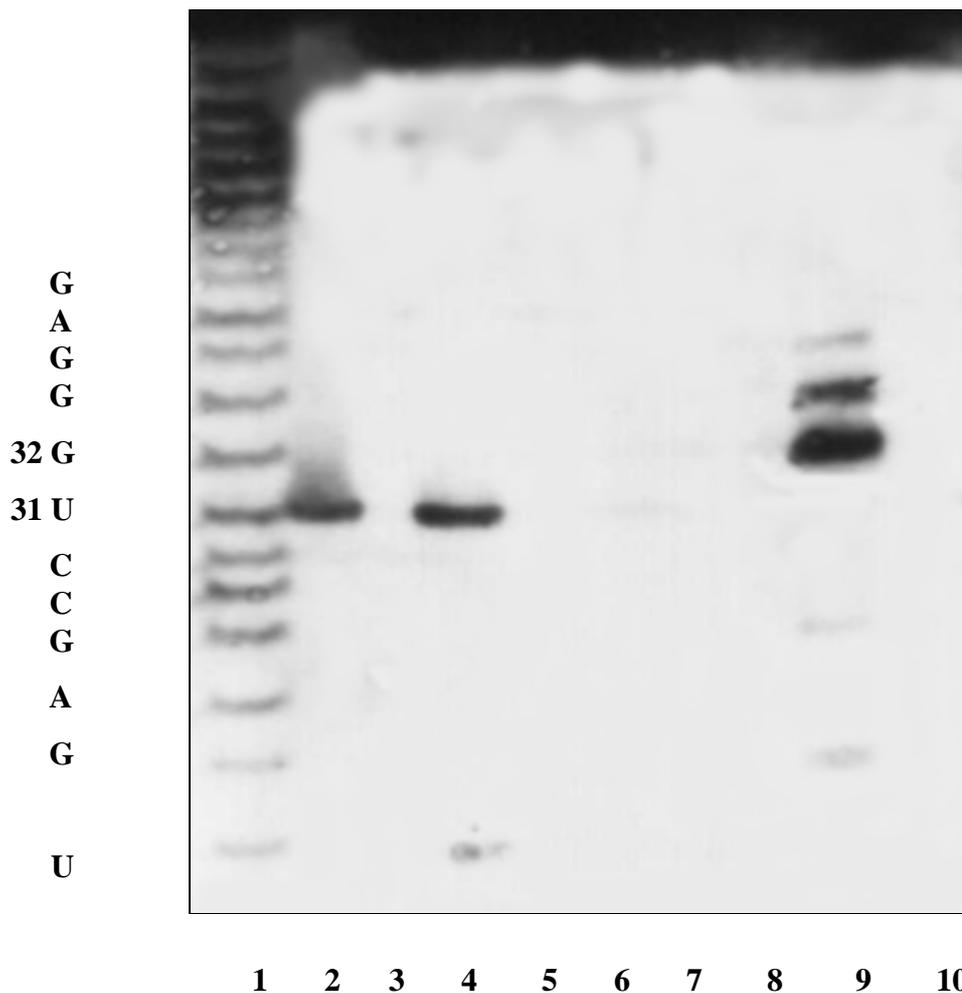
Zwischen den Dots 6 und 7 konnte auch nach der densitometrischen Quantifizierung noch genügend Komplex nachgewiesen werden. Beide Peptide zeigten ähnliche Resultate, so daß das Cyclen keine zusätzliche Stabilisierung bewirkt.

Die Komplexkonstante wurde nach der Ermittlung der Konzentrationen, die für die Bildung des Komplexes zuständig waren, nach dem Massenwirkungsgesetz bestimmt. Für die Komplexkonstante wurde somit ein Wert von  $K = 1.3 \mu\text{M}$  berechnet.

Die Bindungskonstanten des Tat-TAR-Komplexes liegen bei 6-12 nM (Weeks, Calnan und Frankel),<sup>24,27</sup> wobei der Komplex sich auf 59 Basen und 86 Aminosäuren bezieht und deswegen eine höhere Bindungsaffinität besitzt. Als weiterer Vergleich dient die Bindungskonstante des Argininamids ( $K = 3 \mu\text{M}$ , Tao und Frankel).<sup>27c</sup> Beide Komplexkonstanten zeigen, daß die Werte für den Neunmer-Peptid-Komplex im akzeptablen Bereich liegen und somit einen stabilen Komplex ausmachen.

#### 6.4 Spaltung der HIV-1-TAR-RNA durch synthetische Ribonucleasen

Die gemäß Kapitel 4 synthetisierten künstlichen Ribonucleasen wurden nach den RNA-Modelltests in Kapitel 5 auch direkt an der TAR-RNA getestet. Wie üblich erfolgte die elektrophoretische Durchführung mit einem 20 %-igen Polyacrylamidgel und anschließender Detektion mit CDP-Star. Auch hier wurden die Verbindungen zwei Stunden mit der TAR-RNA (1) bei RT inkubiert.



**Abb. 6.21:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Spaltversuche an der 31mer-RNA (1) durch die synthetischen Ribonucleasen 15, 20, 24, 28, 43 und das Dimer mit der Konzentration 1.67 mM. RNA-Konzentrationen: 0.135  $\mu$ M.

Bahn 1, alkalische Hydrolyse; Bahn 2, Peptid-Konjugat (I) für 2h; Bahn 3, Dimer für 2h; Bahn 4, (15) für 2h; Bahn 5, (24) für 2h; Bahn 6, (28) für 2h; Bahn 7, (36) für 2h; Bahn 8, (43) für 2h; Bahn 9, T<sub>1</sub>; Bahn 10, Referenz-RNA

Die Verbindungen wurden als erstes ohne Metall getestet, damit auch hier im Fall einer Spaltung die effektive Wirkung des Cyclens herausgestellt wurde. Tatsächlich spaltete die Verbindung **15** neben dem Peptid **I** mit gleicher Effizienz die TAR-RNA und auch an gleicher Stelle. Alle anderen Verbindungen zeigten jedoch keine hydrolytischen Eigenschaften an der RNA. Wieso schneidet gerade diese Verbindung? Zum Überblick wurden in Abb. 6.22 alle Verbindungen aufgelistet.

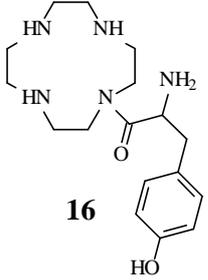
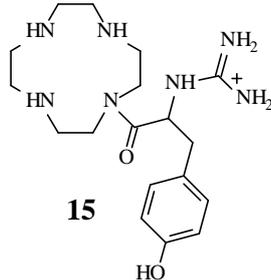
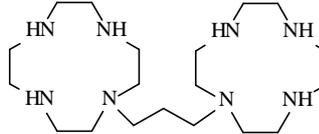
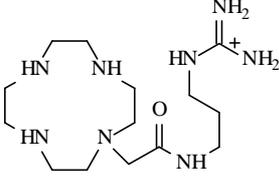
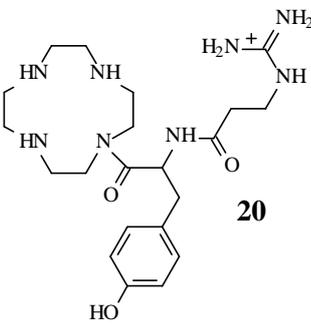
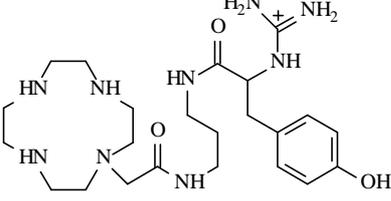
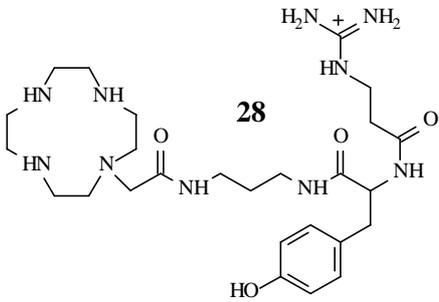
Abstand: 2	Abstand: 2	Dimer
 <p><b>16</b></p>	 <p><b>15</b></p>	
Abstand: 6	Abstand: 6	
 <p><b>43</b></p>	 <p><b>20</b></p>	
Abstand: 9	Abstand: 13	
 <p><b>24</b></p>	 <p><b>28</b></p>	

Abb. 6.22 : Überblick über die synthetischen Ribonucleasen und deren Abstand von Cyclen zur koordinierenden Gruppe (Guanidinium- oder Aminogruppe) in Atomen

Auffällig ist, daß nur Verbindung **15** mit der kürzesten Seitenkette die hydrolytischen Eigenschaften besaß, während die Verbindungen **20** oder **43** mit nur vier Atomen mehr in der Seitenkette keine Wirkung mehr zeigten. Selbst das dem potenten Anti-HIV-Wirkstoff JM2763<sup>105</sup> ähnliche Dimer zeigte keinerlei Spalteigenschaften.

In Kapitel 4 wurde bereits erwähnt, daß aufgrund dieser Spalt-Ergebnisse der Verbindung **15** die Darstellung weiterer Cyclenderivate mit ähnlicher Struktur und gleicher Kettengröße notwendig ist. Es wurde deshalb versucht, das Serin- und Glycin-Analogon der Verbindung **15** darzustellen. Die Schwierigkeiten der Darstellung sind bekannt, weshalb nur die Verbindung **16**, die nicht guanidierte Verbindung (ansonsten identisch mit **15**) getestet wurde. Weiter wurde versucht, das Glycinderivat **35**, das nach der MALDI-TOF Untersuchung nicht ganz rein vorlag, zu testen. Beide Verbindungen weisen den gleichen Abstand von Cyclen und koordinativer Gruppe vor, nur besitzt das Glycinderivat keine Hydroxyfunktion.

Gleichzeitig sollten die Verbindungen nochmal als Metallkomplex getestet werden. Wie bereits berichtet wurde, hat sich Cobalt (III) als sehr gutes, gerade mit Cyclen komplexierendes, Metallkation erwiesen,<sup>106</sup> weshalb es hier zum Einsatz kommt. Der  $\text{Na}_3[\text{Co}^{\text{III}}(\text{CO}_3)_3]$ <sup>107</sup> Cobalt(III)-Komplex wurde durch Reduktion des Cobalt(II)-Chlorids mit Wasserstoffperoxid und 0.5M Natriumhydrogencarbonat-Lösung hergestellt. Der grüne Cobalt-Carbonat-Komplex war in Wasser schwer löslich, weshalb der  $\text{Na}_3[\text{Co}^{\text{III}}(\text{N}_4)(\text{H}_2\text{O})_2]$  Komplex *in situ* hergestellt werden mußte. Der Cobalt-Carbonat-Komplex wurde mit dem Cyclenderivat äquimolar eingesetzt und in Gegenwart von Wasser ca. 20 Minuten auf 55°C erhitzt. Der zuvor grüne Carbonat-Komplex färbte sich rosa bis violett, als das Cobalt vom Cyclen komplexiert wurde. Dieser  $\text{Na}_3[\text{Co}^{\text{III}}(\text{N}_4)(\text{H}_2\text{O})_2]$  Komplex ist wasserlöslich und kann nach dem Abzentrifugieren der Carbonate sofort eingesetzt werden.

---

<sup>105</sup> G. J. Bridger, R. T. Skerlj, S. Padmanabhan, D. Thorton, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1519-1522.

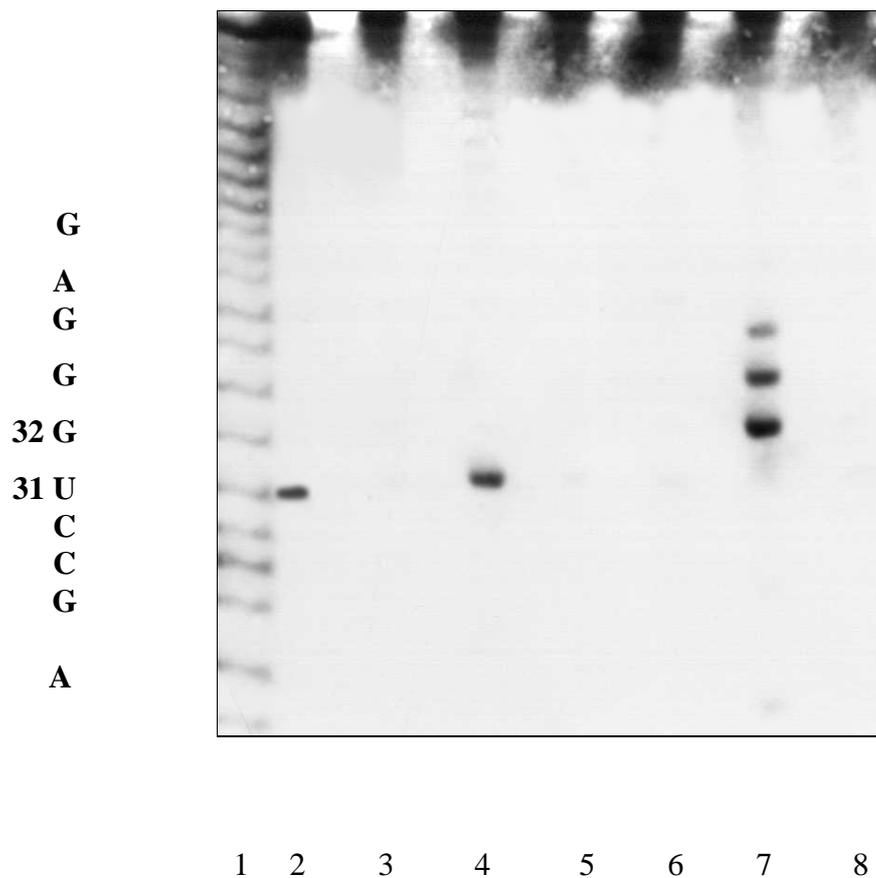
<sup>106</sup> R. Hettich, H.-J. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5638-5647.

M. Komiyama, Y. Matsumoto, H. Takahashi, T. Shiiba, H. Tsuzuki, H. Yajima, M. Yashiro, J. Sumaoka, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 691-695.

J. H. Kim, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9792-9795.

<sup>107</sup> H. F. Bauer, W. C. Drinkard, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 5031-5032.

O. Schrage, mündliche Mitteilung, Institut für Organische Chemie, Uni Hannover.



**Abb 6.23: Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Spaltversuche an der 31mer-RNA (1) durch die Cyclenderivate 15, 16, und 35 mit und ohne Co(III)-Komplex. Konzentration der Verbindungen 1.67 mM. RNA-Konzentrationen: 0.135  $\mu$ M.**

**Bahn 1, alkalische Hydrolyse; Bahn 2, (15) für 2h; Bahn 3, (15) + Co(III) für 2h; Bahn 4, (16) für 2h; Bahn 5, (16) + Co(III) für 2h, Bahn 6, (35) für 2h, Bahn 7, T<sub>1</sub> (G-spezifisch); Bahn 8, Referenz-RNA**

Interessanterweise wurde durch den Cobalt-Komplex die Spaltung total unterdrückt. Dies bestätigen die Ergebnisse der Zink- und Europium-Peptid-Cyclen-Komplexe. Welcher Effekt hinter dieser Inhibition steckt, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Vermutungen tendieren zu einer Dimerisierung des Metallkation mit zwei Cyclenderivaten. Hier könnte eine Röntgenstruktur Abhilfe leisten, die aber aufgrund der schwierigen Kristallbildung im Rahmen dieser Arbeit nicht angefertigt werden konnte.

Ferner ist gemäß Abb. 6.22 auffällig, daß Verbindung **16**, das freie Amin, noch intensiver spaltet als Verbindung **15**, obwohl die Struktur beider Verbindungen identisch ist. Die Aminofunktion scheint hier die Spaltung besser zu katalysieren als eine Guanidiniumgruppe.

Aussagen über die Effizienz der Spaltung durch die Verbindungen **15** und **16** können hier nicht gemacht werden, dagegen sollte die Uracil-Spezifität, die sich immer wieder bemerkbar macht, leicht nachzuweisen sein.

Betrachtet man Abb 6.21 genauer, so wird auf Bahn 4 ein weiterer weniger intensiver Spot sichtbar. Es handelt sich hier um die Base U<sub>25</sub> aus der *bulge*-Region. Das U<sub>23</sub> nicht so leicht gespalten werden kann, wurde eingangs schon berichtet. Es bildet mit dem Basenpaar A<sub>27</sub> und U<sub>38</sub> eine Basentriple Interaktion. Auch dieses Resultat weist wieder auf eine bestimmte U-Spezifität für ungepaarte Basen hin.

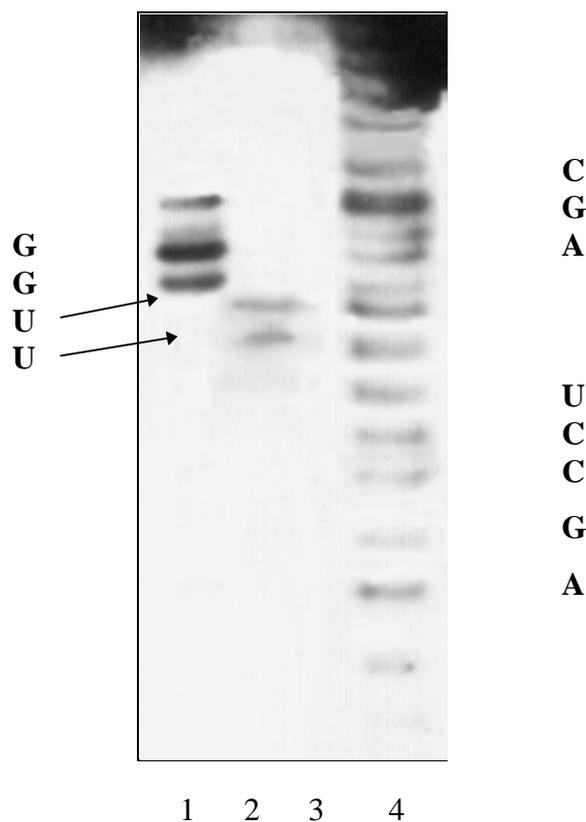
Als erstes werden die beiden hydrolytisch aktiven Verbindungen **15** und **16** an den beiden anderen RNA's (2, 3) getestet. Wie bisher wurden die Verbindungen auf ein 20 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und über die nichtradioaktive Methode mit CDP-Star detektiert, sowie auf Fotofilm entwickelt.

Sehr bemerkenswert ist das Ergebnis dieser Versuche. Tatsächlich konnte eine Uridin-Spezifität für beide Ribonucleasen nachgewiesen werden. Wie bisher zeigten beide Ribonucleasen einen intensiven Schnitt zwischen U<sub>31</sub> und G<sub>32</sub> bei der RNA (1), wobei die Spaltung wie erwartet in Gegenwart der RNA (2), die die vertauschte Base A gegen U besitzt, ausbleibt. Anders verliefen die Spaltungsreaktionen mit der RNA (3), die durch einen Basenaustausch drei aufeinander folgende Uracile besitzt. Die *loop*-Region ist aufgrund einer zusätzlichen Basenpaarung um zwei Basen kleiner, was eine Veränderung der Tertiärstruktur der RNA mit sich führt.

Beide Verbindungen schneiden die zwei ungepaarten Uracile in Folge. Die Schnitte sind nicht ganz so effektiv und weisen Intensitätsunterschiede vor. Das dritte Uracil U<sub>30</sub> zeigt

einen leichten Schnitt, was aufgrund der schwer hydrolysierbaren Basenpaarung nicht weiter verwunderlich ist.

Aufgrund der dichten aufeinanderfolgenden Schnitte, was sich besonders bei  $T_1$  und der alkalischen Hydrolyse bemerkbar machte, konnte unter der bisherigen Durchführung der Gelelektrophorese keine exakte Analyse des Gels stattfinden. Erst ein 15 %-iges Gel zeigte eine bessere Auftrennung der Basen (Abb. 6.24).



**Abb 6.24: Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Spaltversuche an der 31mer-RNA (3) durch die Cyclenderivate 15 und 16. Konzentration der Verbindungen 1.67 mM. RNA-Konzentrationen: 0.135  $\mu$ M.**

**Bahn 1,  $T_1$  (G-spezifisch); Bahn 2, (15) für 2h; Bahn 3, Referenz-RNA; Bahn 4, alkalische Hydrolyse;**

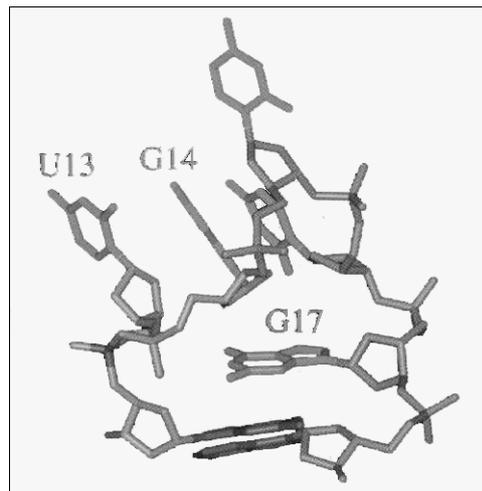
Durch die Herabsetzung der Acrylamidkonzentration konnte das Laufverhalten der RNA-Spaltstücke verändert werden, was eine gute Basis für die RNA (3) war.



Neben der Funktion des Tat-Proteins kontrolliert auch das Rev-Protein die Regulation des viralen Replikationszyklus. Die Wirkungsweise des Rev-Proteins ist dem Tat-Protein sehr ähnlich. Das Protein verfügt ebenso über eine kurze Arginin-reiche Peptidsequenz (17 Aminosäuren), die an der RRE-RNA bindet.

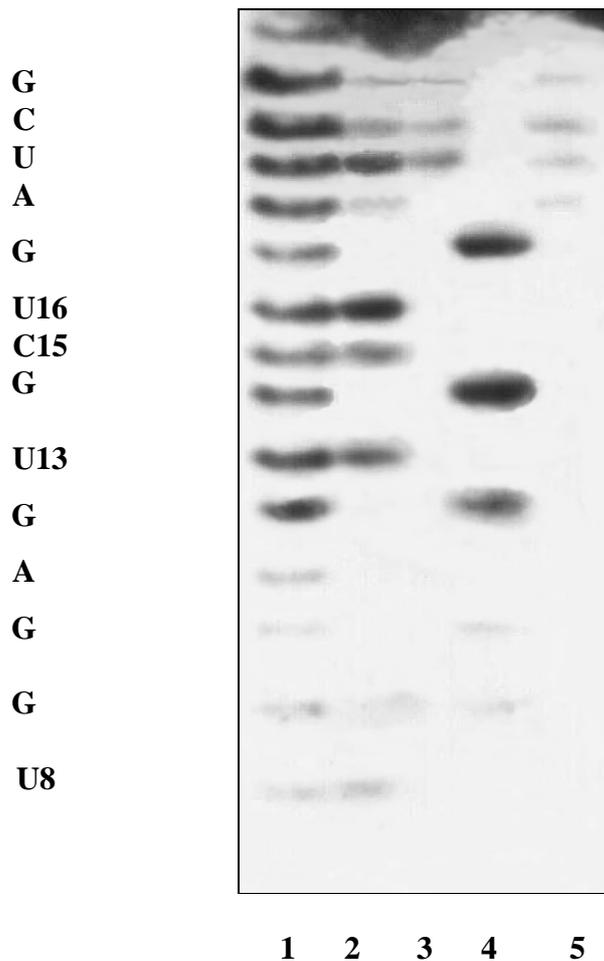
Da die in Abb. 6.25 gezeigten RNA's nur für den Nachweis der Uridinspezifität herangezogen werden sollen, wird im Rahmen dieser Arbeit nicht näher auf die Rev-RRE Interaktion eingegangen. Vielmehr interessiert hier die Tertiärstruktur der 27mer und 35mer RNA und somit der Zugang zu den ungepaarten Regionen (*loop* und *bulge*).

Abb. 6.26 zeigt die *loop*-Region, einen Teil der Tertiärstruktur der 27mer RRE-RNA, sowie den guten Zugang zu den Pyrimidin-Basen U<sub>13</sub> und U<sub>16</sub>. Für die Verbindungen **15** und **16** ist somit eine hohe Spaltmöglichkeit gewährleistet.



**Abb. 6.26:** Darstellung der *loop*-Region der 27mer RRE-RNA. Bei der nach oben ragenden Base handelt es sich um C<sub>15</sub>, während U<sub>16</sub> etwas nach hinten zeigt

Zuerst wurde die hydrolytische Aktivität der Verbindung **15** an der kürzeren 27mer RRE-RNA getestet. Verbindung **16** wurde hier noch verwendet, zeigte sich jedoch nicht mehr effektiv genug und wurde deshalb in weiteren Versuchen vernachlässigt. Aufgrund der unterschiedlichen Größe beider Aptamere wurden die Versuche bei zwei unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen (15 %- und 20 %-igen Gel) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte analog der zuvor beschriebenen Spaltungsreaktionen.



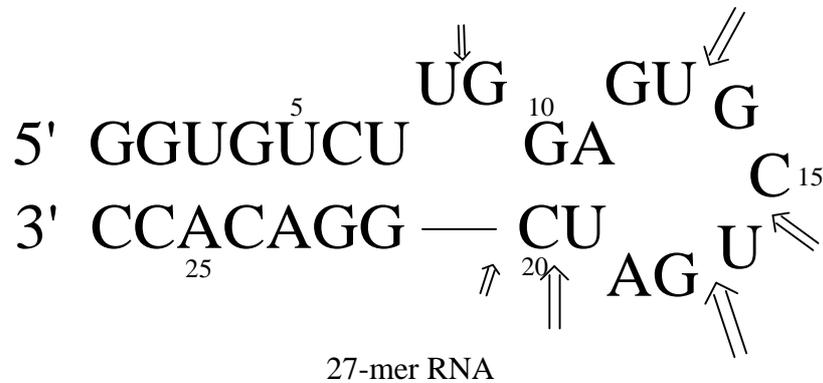
**Abb 6.27: Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Spaltversuche an der 27mer-RRE-RNA durch die Cyclenderivate 15 und 16. Konzentration der Verbindungen 1.67 mM. RNA-Konzentrationen: 0.135  $\mu$ M.**

**Bahn 1, alkalische Hydrolyse; Bahn 2, (15) für 2h; Bahn 3, (16) für 2h; Bahn 4, T<sub>1</sub> (G-spezifisch); Bahn 5, Referenz-RNA.**

Das Gel in Abb. 6.27 zeigt eindeutig, daß Verbindung **15** beide Uracile in der *loop*-Region schneidet. Selbst U<sub>19</sub>, das eigentlich gepaart vorliegen sollte (Bahn 2), wurde geschnitten. Einen schwachen Schnitt kann auch die *bulge*-Region an U<sub>8</sub> verzeichnen. Neben der effizienten Spaltung der Verbindung **15** scheint Verbindung **16** offensichtlich keine Spaltqualitäten mehr zu besitzen.

Auffällig sind neben den starken Spaltungen am Uracil die etwas schwächeren, erstmalig an Cytosin (C<sub>15</sub> und C<sub>20</sub>) auftretenden Spaltungen. Vermutlich beschränkt sich die Spezifität

der Verbindung **15** nicht nur auf das Nucleotid Uracil, sondern allgemein auf die Pyrimidin-Basen, wobei die Uracilspezifität viel ausgeprägter zu sein scheint (Abb. 6.28).

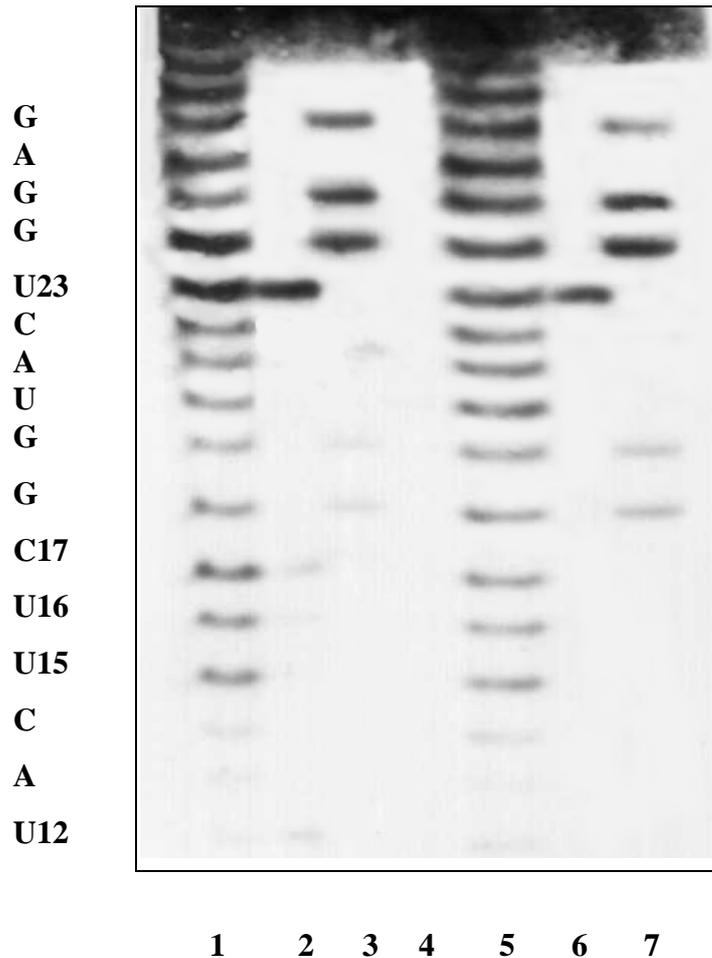


**Abb. 6.28:** Spaltstellen der Verbindung (15) an der 27mer RNA. Die Größe der Pfeile gibt die Spalteffizienz wieder

Diese Vermutung kann im folgenden an der 35mer RRE-RNA überprüft werden. Für ein gutes Laufverhalten der RNA-Fragmente muß aufgrund des viel höheren Basenanteils der RNA die Acrylamidkonzentration gesenkt werden. Das bereits bei der RNA (3) verwendete 15 %-ige Gel ist hier gut geeignet.

Neben dem Uracil in der oberen *bulge*-Region besitzt die 35mer RNA noch zwei weitere Uracile in der *loop*-Region. Desweiteren liegt noch ein Cytosin in der *loop* vor.

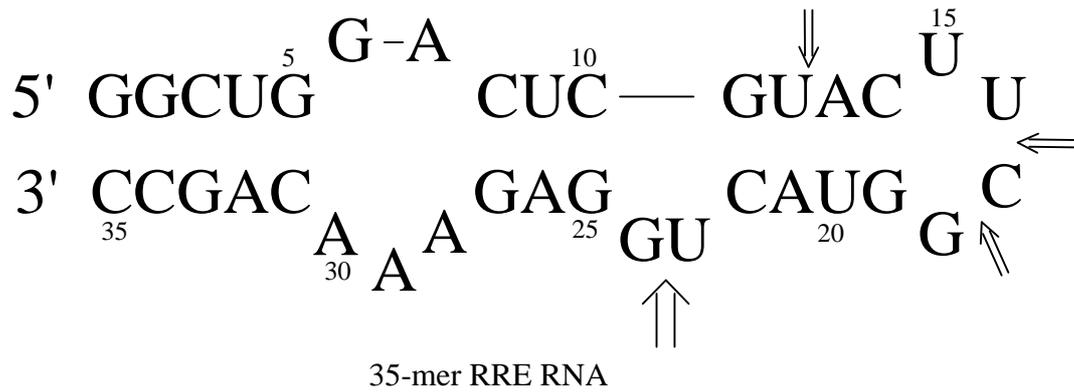
Die Durchführung des 15 %-igen Gels erfolgte analog dem 20 %-igem Gel. Verbindung **16** wurde aufgrund der mangelnden hydrolytischen Aktivität nicht mehr getestet.



**Abb 6.28:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Spaltversuche an der 35mer RRE-RNA durch das Cyclenderivat (15). Konzentration der Verbindung 1.67 mM. RNA-Konzentrationen: 0.135  $\mu\text{M}$  (Bahn 2-4) bzw. 13.5 nM (Bahn 6-7).

Bahn 1, alkalische Hydrolyse; Bahn 2, (15) für 2h; Bahn 3,  $T_1$  (G-spezifisch); Bahn 4, Referenz-RNA; Bahn 5, alkalische Hydrolyse; Bahn 6, (15) für 2h; Bahn 7,  $T_1$  (G-spezifisch).

Verbindung **15** schneidet in der oberen *bulge*-Region am U<sub>23</sub> mit hoher Effizienz. Ferner sind schwache Schnitte in der *loop*-Region an C<sub>17</sub> und U<sub>16</sub> und am oberen Stamm an U<sub>12</sub> zu erkennen. Die Effektivität der Spaltungen in der *loop*-Region ist aufgrund des größeren Basenanteils der RNA schwer zu steuern (Variation der Gelkonzentration), so daß weder  $T_1$  noch Verbindung **15** unter den bisher gegebenen Bedingungen ihre eigentliche hydrolytische Aktivität an den für sie spezifischen Basen wiedergeben können.



**Abb. 6.30: Spaltstellen der Verbindung (15) an der 35mer RNA. Die Größe der Pfeile gibt die Spalteffizienz wieder**

Neben der starken Uracilspezifität konnte auch bei der 35mer RNA wieder eine geringe Tendenz zur Pyrimidinspezifität aufgrund der Spaltung an C<sub>17</sub> festgestellt werden.

Anhand fünf verschiedener RNA's wurde nun die Pyrimidinspezifität der Verbindung **15** bewiesen, wobei sich die Spezifität hauptsächlich auf das Nucleotid Uracil bezieht. Diese Wirkung konnte auch bei der Verbindung **16** in den ersten Tests mit der RNA (1) und (2) mit hoher Effizienz belegt werden. Beide Verbindungen und besonders Verbindung **15** deuten auf eine neuartige Ribonuclease hin, die von ihrer Spaltselektivität die Wirkung der Ribonuclease B übertrifft.

### 6.5 Diskussion der Ergebnisse

Im kinetischen Teil (Kapitel 5) konnte anhand der synthetisierten Cyclenderivate unter Verwendung der RNA-Modellsubstanz HPNPP gezeigt werden, daß die Metall-Cyclen-Komplexe nicht nur stabil sind, sondern auch die Hydrolyse von Phosphorsäurediestern beschleunigen. Besonders interessant ist das unterschiedliche Verhalten der Verbindungen bei verschiedenen pH-Werten. Alle Verbindungen wurden als 1:1 Zink-Cyclen-Komplexe auf ihre hydrolytische Aktivität getestet. Die Ergebnisse zeigten, daß mit zunehmender Kettenlänge und somit auch zunehmendem Abstand der Guanidiniumgruppe vom Cyclen die hydrolytische Aktivität der Verbindungen abnimmt. Die Rolle der Guanidiniumgruppe konnte dabei noch nicht geklärt werden.

Auffällig war bei den Verbindungen **20** und **43** der gleiche pH-abhängige Hydrolyseverlauf mit einem Maximum bei pH 7. Nur der Abstand zwischen Guanidiniumgruppe und Cyclen ist bei beiden Verbindungen identisch, ansonsten zeigen die Seitenketten keine Analogie. Daß aber gerade die Guanidiniumgruppe bei diesen Verbindungen für den Abfall der hydrolytischen Aktivität zu hohen und niedrigen pH-Werten verantwortlich sein muß, beweist die um mehr als eine Zehnerpotenz hydrolytisch aktivere Verbindung **AL**. Wie alle anderen Verbindungen weist sie einen linearen Verlauf der hydrolytischen Aktivität auf.

Was für eine Wirkung der stabilisierende Effekt der Guanidiniumgruppe gerade bei den unterschiedlichen pH-Werten auf die verschiedenen Verbindungen hat und welche Effekte zu den verschiedenen Hydrolyseverläufen führen, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr vollständig geklärt werden. Desweiteren liegt bisher keine Erklärung vor, warum die Verbindung **AL** als freies Amin eine viel höhere hydrolytische Aktivität aufweist als Verbindung **43**.

Im Hinblick auf die wichtigeren Spaltungsergebnisse an der TAR-RNA und die hydrolytischen Resultate an der Modell-RNA wurde auf eine weitere Klärung der Hydrolyseverläufe jedoch verzichtet.

Obwohl der Zink-Cyclen-Komplex ausschlaggebend für die Beschleunigung der Hydrolyse der Modell-RNA HPNPP ist, versagte er beim Einsatz mit der TAR-RNA gänzlich. Hier schienen die Metallkationen eine Näherung der hydrolytischen Einheit an die RNA zu verhindern. Überraschenderweise zeigten die Cyclenverbindungen **15** und **16** ohne Verwendung eines durch das Cyclen komplexierten Metallkations eine selektive und effiziente Spaltung in der *loop*-Region der TAR-RNA zwischen den Basen U<sub>31</sub> und G<sub>32</sub>

und in der *bulge*-Region an U<sub>25</sub>. In den folgenden Spaltungsreaktionen konnte keine der synthetisierten Cyclenderivate mit hydrolytischer Aktivität überzeugen, was vermutlich auf die Länge oder sogar die Struktur der Seitenkette zurückzuführen ist. Verbindung **20**, die im Einsatz mit der Modell-RNA HPNPP eine sehr gute hydrolytische Aktivität vorweisen konnte, zeigte keine Spaltung mit der TAR-RNA. Den Beweis für die Effizienz der kurzen Seitenkette, bzw. für die Effektivität der über den Abstand von zwei C-Atomen verlaufenden Guanidiniumgruppe, sollte die Untersuchung der Serin- und Glycinderivate erbringen. Die Synthesen scheiterten jedoch im letzten Schritt durch die basische Aufreinigung, wobei sich die leichte Hydrolysierbarkeit der Verbindungen bemerkbar machte.

Die eigentlich anfänglich als synthetische Ribonucleasen ohne strukturspezifische Erkennungseinheit eingesetzten Verbindungen **15** und **16** zeigten neben ihrer hohen Effizienz die TAR-RNA in der *loop*- und *bulge*-Region zu spalten, noch eine gewisse Selektivität. Diese Selektivität bezog sich auf die Pyrimidinbasen, insbesondere auf das Nucleotid Uracil, was durch Tests mit verschiedenen RNA's, die in der *loop*- und *bulge*-Region über mehrere Uracil-Einheiten verfügten, nachgewiesen werden konnte. Daß Nucleotide im Einzelstrang aufgrund des *in-line*-Mechanismus besser gespalten werden können, wurde bereits ausgeführt. Somit wurden die ersten zwei synthetischen Ribonucleasen generiert, die neben einer pyrimidinspezifischen Erkennung insbesondere die Spaltung von Uracil in verschiedenen einzelsträngigen RNA-Regionen ermöglichen.

Der Grund für die effektive Erkennung des Nucleotides Uracil ist vermutlich die gute Koordinationsmöglichkeit der Cycleneinheit am Uracil. Diese Selektivität kam auch der durch die Erkennungseinheit spezifisch wirkenden Ribonuclease, dem Peptid-Cyclen-Konjugat **I**, zu Gute. Diese synthetische Ribonuclease, die die neun entscheidenden Aminosäuren des Arginin-reichen Tat-Proteins besitzt, zeigte ebenfalls eine vielversprechende effiziente Spaltung in der *loop*-Region zwischen U<sub>31</sub> und G<sub>32</sub>. Durch Verdauungsexperimente konnte gezeigt werden, daß das Peptid wie vermutet in der *bulge*-Region bindet und dann entlang dem oberen Stamm bis zum G<sub>32</sub> der *loop*-Region koordiniert. Das Konjugat **I** hat somit vermutlich die optimale Länge, um das Uracil zu erreichen und effektiv zu schneiden.

Das wäre auch eine Begründung dafür, warum das Sechser-Peptid-Konjugat **II** keine hydrolytische Aktivität zeigte. Seine um drei Aminosäuren kürzere Peptidkette reicht für eine Anlagerung des Cyclens an das entfernte Uracil demnach nicht aus.

Als weitere Beweise für die Spezifität können die Spaltversuche mit veränderten RNA's gewertet werden. Nach Austausch der Base Uracil gegen Adenin konnte keine Spaltung mehr festgestellt werden. Die Veränderung der *loop*-Region durch Einführung von U<sub>32</sub> gegen G und U<sub>30</sub> gegen C hatte eine weitere Basenpaarung zur Folge und führte deshalb auch zu einer Veränderung der Tertiärstruktur. Trotz der drei hintereinander folgenden Uracile kam es bei Verwendung des Peptid-Konjugats **I** zu keiner Spaltung. Da die Verbindungen **15** und **16** im Einsatz mit dieser veränderten RNA vor jeder Uracileinheit hydrolytisch aktiv wurden, konnte die Veränderung der Tertiärstruktur als Motiv für das Ausbleiben der Spaltung mit dem Peptid-Konjugat **I** herangezogen werden.

Die Frage, warum das Cyclen als Grundgerüst so effektiv ist, konnte nach einigen Versuchen auch geklärt werden. Im sauren bis neutralem Zustand liegt das Cyclen zweifach protoniert vor. Daraus läßt sich folgern, daß das Cyclen als Ammonium- oder sogar Bis(ammonium)spezies auftritt. Spaltversuche bei den pH-Werten 6, 7, 8 und 9 bestätigten durch effektive Spaltungen der RNA bei den pH-Werten 6 und 7 und eher schlechtere Spaltung bei pH 8 den Effekt der Bis(ammonium)spezies im Cyclen. Durch diese Bis(ammonium)spezies wäre auch eine gute Koordination mit den Sauerstoffatomen des Uracils möglich.

Die Hypothese der Bis(ammonium)-spezies würde auch erklären, warum neben der Cytosin- gerade die Uracilspezifität so hoch ist. Uracil bietet der Bis(ammonium)spezies gleich zwei Sauerstoffatome zur Koordination an.

## 6.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Dissertation wurde erfüllt. Es konnten synthetische Ribonucleasen entworfen und synthetisiert werden, deren molekularbiologische Evaluierung sowohl an der Modell-RNA HPNPP wie auch an der TAR-RNA des HI-Virus hervorragende Spalteigenschaften belegte.

Unter Verwendung des 1,4,7,10-Tetraazacyclododecans (Cyclen) als aktivem Zentrum, das sich durch seine besonders stabile Komplexbildung mit verschiedenen Metallkationen auszeichnet, wurde eine künstliche Ribonuclease generiert. Diese wurde mit einer spezifischen Erkennungssequenz, einem Arginin-reichen Neunmer-Peptid versehen, welches die basische Region des Tat-Peptids (Tat<sub>49-57</sub>) enthält. Somit konnte diese sinnvoll gewählte synthetische Ribonuclease die TAR-RNA als Ziel erkennen und daran binden. Die Peptideinheit war lang genug gewählt, damit das hydrolytisch wirksame Cyclen-Gerüst zur Uracil-Einheit der *loop*-Region gelangen und dort aktiv werden konnte.

Diese selektive Spaltung, die in der Lage wäre, die Interaktion von Tat und TAR und somit die Stimulation der Transkription von HIV-1 mRNA zu stören, konnte überraschender Weise nur in Abwesenheit jeglicher Metallkationen beobachtet werden. Vermutungen gehen vielmehr von einer katalytisch aktiven Bis(ammonium)spezies des Cyclens aus, was auch die effektiveren Spaltungen bei pH 6-7 bestätigen. Eine Möglichkeit, die Hypothese einer Bis(ammonium)spezies zu untermauern, könnte das synthetisierte 1,4,7-Triazacyclononan liefern, das ebenfalls mit dem Neunmer-Peptid gekoppelt wurde. Im protonierten Fall besitzt das Nonan nur ein zentral liegendes Proton. Diese Verbindung liefert keine gute Koordinationsmöglichkeit durch das einfachprotonierte Nonan. Eine ausbleibende Spaltung würde die Vermutung der Bis(ammonium)spezies bestärken.

Die Bis(ammonium)spezies des Cyclens scheint dem Uracil eine gute Möglichkeit zur Komplexierung zu liefern.

Gerade diese Eigenschaft macht sich auch bei den synthetischen Ribonucleasen ohne strukturspezifische Erkennungseinheit bemerkbar: Die guten Spaltergebnisse der Verbindungen **15** und **16** deuten auf die führende Rolle des Cyclens hin. Auch ohne die vollständige Neunmer-Erkennungseinheit konnte bereits eine gewisse spezifische Erkennung erreicht werden. So wurden durch die Synthese der Tyrosinderivate **15** und **16** Ribonucleasen generiert, die durch ihre unerwartete Pyrimidinspezifität, speziell auf das Nucleotid Uracil bezogen, einen Einsatz als Ribonuclease-Werkzeug für die

Sequenzanalyse einer RNA möglich erscheinen lassen. Sie sind deutlich effizienter als die kommerziell erhältliche Ribonuclease B, die spezifisch Uracil und Cytosin schneidet.

Zusammenfassend sind zwei wesentliche Erkenntnisse festzuhalten: Eine synthetische Ribonuclease mit Cyclengerüst und spezifischer peptidischer Erkennungseinheit spaltet in Abwesenheit chelatisierender Metallionen selektiv die TAR-RNA des HIV-1 (Peptid-Cyclenkonjugat **I**). Darüberhinaus zeigen Cyclenderivate, die nur Tyrosin als verkürzte Seitenkette tragen, eine Pyrimidinspezifität (insbesondere Uridinspezifität) der hydrolytischen Cycleneinheit. Somit ergeben sich weitreichende Optionen für Anschlußarbeiten:

Durch Variation der Erkennungseinheit müßte die Möglichkeit bestehen, andere RNA-Sequenzen ausfindig zu machen, zu binden und - sofern die RNA Uracil in Einzelstrangregionen aufweist - dort auch zu spalten. Das Peptid als Erkennungseinheit muß so lang gewählt sein, daß es eine Chance hat, das Uracil von der Bindungsregion aus zur *loop*- oder *bulge*-Region erreichen zu können.

Synthetische Ribonucleasen auf Cyclen-Basis könnten somit nicht nur erfolgreich zur Spaltung der HIV-TAR-RNA eingesetzt werden, sondern bieten auch das Potential für eine vielfältige Ausweitung des Anwendungsgebietes.

## 7. Experimenteller Teil

### 7.1 Allgemeine Verfahren

**Lösungsmittel und Chemikalien** wurden nach den üblichen Methoden<sup>109</sup> gereinigt und absolutiert. Tetrahydrofuran und Diethylether wurden über Natrium/Benzophenon unter Stickstoff getrocknet und direkt vor Gebrauch destilliert. Dichlormethan, N,N-Dimethylformamid und Triethylamin wurden über Calciumhydrid unter Stickstoff absolutiert und nach der Destillation über Molsieb gelagert. Methanol wurde mit Magnesium und Ethanol mit Natrium absolutiert. Für die kinetischen Messungen, sowie die Herstellung der Puffer und Versuche für die Elektrophorese wurde Wasser aus einer MILLIPORE-Anlage der Firma *Waters* verwendet. **Dünnschichtchromatographie:** DC Alufolien der Firma *Merck* des Typs Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Schichtdicke 0.2 mm). Die Detektion erfolgte in der Regel durch UV-Licht (254 nm, 356 nm). Als Anfärbereagenzien wurden ein Cer(IV)-, Dragendorf (nach Munier)- bzw. Bromkresolgrün-Tauchreagenz und Vanillin verwendet.

**Säulenchromatographie:** Kieselgel (Korngröße 60-80 µm) der Firma *T. J. Baker*. Die Trennung erfolgte unter leichtem Überdruck und mit den angegebenen Laufmitteln.

**Lösungsmittel für die Chromatographie:** Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. Es wurde Petrolether mit einem Siedebereich von 35°C bis 65°C verwendet.

**Reversed Phase-Chromatographie** im 100 mg-Maßstab wurde mit RP18-Cartridges der Firma *Waters* (Sep Pak Cartridges WAT051910) durchgeführt.

**Schmelzpunkte** werden in dem Schmelzpunktbestimmungsapparat nach *Dr. Tottoli* der Firma *Gallenkamp* gemessen. Die Werte sind nicht korrigiert.

**Infrarotspektren:** FT-IR-Spektrometer 580 oder FT 1710 der Firma *Perkin-Elmer*. Die Proben wurden als KBr-Preßlinge, als kapillarer Film (Kap. Film) oder in CHCl<sub>3</sub> gelöst gemessen. Die Wellenzahlen  $\nu$  charakteristischer Absorptionsbanden sind in cm<sup>-1</sup> angegeben. **UV/Vis-Spektren** wurden mit dem Zweistrahl-Photometer Modell UV-1601 der Firma *Shimadzu* durchgeführt.

---

<sup>109</sup> a) D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, D. R. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, Oxford, 1966;

b) M. Casey, J. Leonard, B. Lygo, G. Procter, *Advanced Practical Organic Chemistry*, Blackie, Glasgow, London, 1990

**<sup>1</sup>H NMR-Spektren:** Modelle WP 200 SY (200 MHz), AM 400 (400 MHz) und AVS 400 (400 MHz) der Firma *Bruker*. Die verwendeten Feldstärken sind jeweils angegeben. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei Raumtemperatur und als Lösungsmittel dienten CDCl<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>O und CD<sub>3</sub>OD. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der δ-Skala angegeben. Als interner Standard diente Tetramethylsilan ( $d_{\text{TMS}} = 0.00$  ppm). Die Multiplizität der Signale wurde durch folgende Abkürzungen angegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett etc., m = Multiplett, weiterhin br für breite Signale. Die Kopplungskonstanten *J* sind in Hertz (Hz) angegeben. Die angegebenen Protonenzahlen wurden elektronisch integriert.

Im Falle der stickstoffhaltigen Verbindungen waren die Signale infolge des Kernquadrupolmomentes des Stickstoffes oft verbreitert, was eine genaue Auswertung (Bestimmung von Kopplungskonstanten/Spinsystemen) erschwerte bzw. unmöglich machte.

**<sup>13</sup>C-NMR-Spektren:** Modelle AM 400 (100 MHz) und AVS 400 (100 MHz) der Firma *Bruker*. Als interner Standard diente Tetramethylsilan (siehe oben). Die chemischen Verschiebungen der Signale wurden dem <sup>1</sup>H-Breitband-entkoppelten Spektren entnommen, ihre Feinstruktur wurde durch Attached Proton Test-(APT)-Experimente oder mit DEPT-Technik (90 ° und 135 °) bestimmt.

**Massenspektren:** Modelle MAT 312 (niederaufgelöste Spektren) der Firma *Finnigan* und Autospec (hochaufgelöste Spektren, MS-FAB) der Firma *VG*. Das Ionisierungspotential betrug 70 eV, und die Messungen erfolgten bei der jeweils angegebenen Temperatur. Die in Klammern gesetzten Prozentzahlen geben die Intensitäten der Peaks bezogen auf den Basispeak (*I* = 100 %) an. **MS-FAB**-Spektren wurden bei Raumtemperatur in *m*-Nitrobenzylalkohol gemessen.

**Elementaranalysen:** Die Elementaranalysen wurden mit dem Gerät CHN-Rapid der Firma *Heraeus* im mikroanalytischen Labor der Universität Hannover durchgeführt. Bestimmt wurden die Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff.

**MALDI-TOF-MS:** Kompakt Maldi 3 von *Kratos*. Die Experimente wurden im positiven Linear-high-Modus mit α-Zimtsäure als Matrix durchgeführt. Die Matrix wurde mit einer Mischung aus MeCN/0.1 proz. wäβr. TFA (2:1) gesättigt.

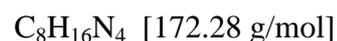
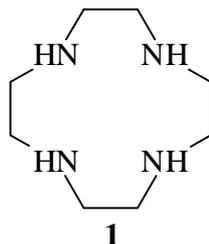
**Potentiometrische Messungen** wurden mit dem Titrino 716 und der kombinierten pH-Glaselektrode 6.0233.100 der Firma *Metrohm* bei 20 °C durchgeführt. **Pufferlösungen** (pH 3, 7 und 9) der Firma *Merck* zum Kalibrieren der pH-Glaselektrode.

**Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)** wurde mit folgendem Aufbau durchgeführt:

Säule: Nucleosil 250/4-5C<sub>18</sub>-AB HPLC Säule der Firma *Macherey & Nagel*, Flußrate: 1.0 bis 2.0 ml/min (abhängig vom Säulenhalter). Probenvolumen: 10 µl. Eluenten: 50mM wäßriger Natriumacetat/Essigsäure-Puffer pH 4.3, Acetonitril und Wasser (für HPLC von *ACROS*).

## 7.2 Beschreibung der Versuche

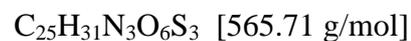
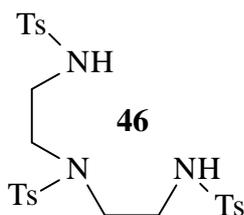
### 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan (Cyclen) (1)



7g KOH werden in 65 ml Isopropanol gelöst und auf 80°C erhitzt. 10 g Cyclensulfat werden in 10 ml Wasser gelöst und in die heiße Lösung gegeben. Anschließend wird die Lösung 1.5 Stunden rückflusiert. Nachdem die Lösung auf RT gekommen ist, wird das K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abfiltriert. Der Rückstand wird mit 20 ml Toluol versehen, am Rotationsverdampfer etwas eingengt und erneut mit 25 ml Toluol umkristallisiert. Dann wird über 600 mg Aktivkohle 15 min. rückflusiert und über Kieselgur filtriert. Nachdem Waschen mit Toluol werden lange weiße Nadeln erhalten, die das Cyclen<sup>80,109</sup> in reiner Form wiedergeben. Die Ausbeute liegt bei 70 %.

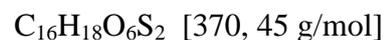
### N, N', N''-Tri(*p*-tosyl)diethylentriamin (46)

<sup>109</sup> Verbesserte Vorschriften für die Darstellung des Cyclens: a) G. Herve, H. Bernard, N. Le Bris, J.-J. Yaouane, H. Handel, L. Toupet, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 6861-6864.  
b) G. R. Weisman, D. P. Reed, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 5186-5187.



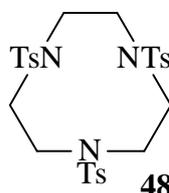
Die Darstellung erfolgt nach der Literaturvorschrift.<sup>81</sup> Es wurde eine Ausbeute von 66 % erreicht.

### 1, 2-Di(*p*-tosyloxy)ethan (**47**)



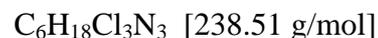
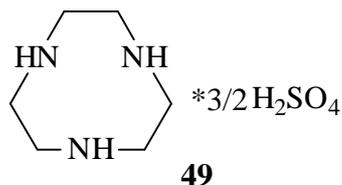
Die Darstellung erfolgt nach der Literaturvorschrift.<sup>81</sup> Es wurde eine Ausbeute von 37 % erreicht.

### 1,4,7-Tri(*p*-tosyl)-1,4,7-triazacyclononan (**48**)



Die Darstellung erfolgt nach der Literaturvorschrift.<sup>81</sup> Die Deprotonierung der beiden Stickstoffatome der Verbindung **46** kann bei der Cyclisierung auch durch Verwendung von Natriumethylat<sup>80</sup> erfolgen. Ein anderer erfolgreicher Weg zur Cyclisierung geht über das N, N', N''-Tri(*p*-tosyl)-diethylentriamin und das entsprechende 1,2-Dibromethan oder das 1,2-Di(mesyloxy)-ethan.<sup>82</sup> Es wurde eine Ausbeute von 86 % erhalten.

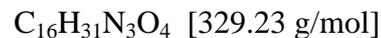
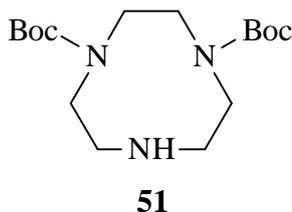
### 1,4,7-Triazacyclononan Sulfat (**49**)



Die Entschützung erfolgt nach der Literaturvorschrift.<sup>83</sup> Die Ausbeute liegt bei 76 %. Neben dieser drastischen Methode kann das geschützte Nonan **48** auch über 3 Tage<sup>80</sup> bei mind. 100°C in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gekocht werden. Zur vollständigen Entschützung kann auch HBr<sup>110</sup> verwendet werden.

Als beste Methode zur Überführung aus der Salz-Form in die reine Form **50** erweist sich die Vorschrift des Cyclens **1**.

#### 1,4,7-Triazanonan-1,4-dicarbonensäure-di-tert.-butylester (**51**)



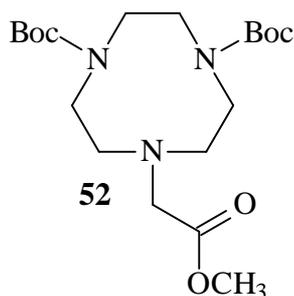
Da die Zweifachschützung mit Boc<sub>2</sub>O scheiterte, wurde das 2-(tert.-Butoxycarbonyloxyimino)-2-phenylacetonitril (Boc-ON)<sup>84</sup> verwendet.

65 mg (0.5 mmol) 1,4,7-Triazacyclononan werden in 400 µl Aceton/H<sub>2</sub>O (1:1) gelöst und 259 mg (1.05 mmol) Boc-ON<sup>84</sup> sowie 153 µl (1.1 mmol) Et<sub>3</sub>N werden dazugegeben. Die Lösung wird für drei Stunden auf 65 °C erhitzt. Anschließend wird dreimal mit CHCl<sub>3</sub> extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationverdampfer abgezogen. Es folgt die säulenchromatographische Reinigung MTB-E/ PE (1:5), später EE. Ausbeute: 140 mg (84 %) eines gelblichen Feststoffes.

<sup>110</sup> J. M. Erhardt, E. R. Grover, J. D. Wuest, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6369-6370.

- $^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta = 29.38$  (-,  $\text{CH}_3$ ), 48.17, 48.55, 48.95, 49.11, 50.4, 50.67, 51.24, 51.3, 52.43, 53.17, 53.32, 53.91 (+,  $\text{NCH}_2$ ), 80.56, 80.68, (+,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 156.62, 156.89 (+, CO)
- $^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta = 1.46$  (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ), 2.89-2.96 (m, 4H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.19-3.31 (m, 4H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.38-3.5 (m, 4H,  $\text{NCH}_2$ )
- MS: (RT)  
 $m/z$  (%): 330 ( $\text{M}^+$ , 15.3), 273 (1.1), 256 (6.1), 199 (15.3), 156 (31.9)

**7-Methoxycarbonylmethyl-[1,4,7]triazanonan-1,4-dicarbonsäure-di-tert.-butylester (52)**



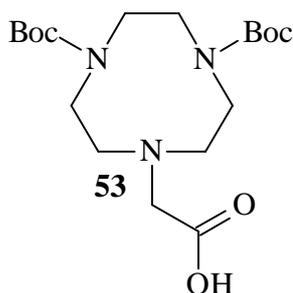
$\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6$  [401.25 g/mol]

Zu dem im Kolben vorgelegten 6 ml Acetonitril und 183 mg trockenem  $\text{K}_2\text{CO}_3$  werden unter Stickstoffatmosphäre 336 mg (1.02 mmol) des Boc-geschützten Nonans **51** gegeben. Danach fügt man langsam 122.4  $\mu\text{l}$  (1.33 mmol) Bromessigsäuremethylester dazu. Die Reaktion scheint nach einem Tag Rühren bei RT vollkommen zu sein. Das Reaktionsgemisch wird nach dem Abfiltrieren am Rotationsverdampfer engeengt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (EE/PE 2:1) erhält man 331 mg (81 %) eines bräunlich, klaren Feststoffes.

- $^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta = 27.62$  (-,  $\text{CH}_3$ ), 49.4, 49.66, 49.91, 50.13, 50.48, 50.76, 50.92, 53.19, 53.53, 53.69, 53.78, 54.26 (+,  $\text{NCH}_2$ ), 51.33 (-,  $\text{OCH}_3$ ) 56.07 (+,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 79.51, 79.65 (+,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 155.68, 155.72 (+, CO), 171.18 (+, CO)

$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta = 1.47$  (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ), 2.81-2.9 (m, 4H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.2-3.32 (m, 4H,  $\text{NCH}_2$ ),  
 3.42-3.52 (m, 6H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.6 (t, 3H,  $\text{OCH}_3$ )  
 $\text{IR}$  ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu = 2978, 1738, 1681, 1461, 1415, 1367, 1250, 1160, 1102, 1031, 998 \text{ cm}^{-1}$   
 $\text{MS}$ : (70 °C)  
 $m/z$  (%): 402 ( $\text{M}^+$ , 14.1), 342 (34.1), 313 (6.8), 271 (18.9)

### 7-Carboxymethyl-[1,4,7]triazanonan-1.4-dicarbon säure-di-tert.-butylester (53)



$\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$  [387.24 g/mol]

Im Kolben werden 47 mg  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  vorgelegt. Dazu gibt man 298 mg (0.74 mmol) des in 6.5 ml  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (3:1) gelösten Nonanderivates **52** und läßt die Lösung fünf Stunden bei RT rühren. Das Lösungsmittel wird nach dem Abfiltrieren des  $\text{LiOH}$  am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand wird in Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 0.1 N  $\text{HCl}$  extrahiert man dreimal mit Dichlormethan. Anschließend wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (EE später  $\text{EE}/\text{MeOH}$ ) wird ein weißer, schaumartiger Feststoff erhalten.

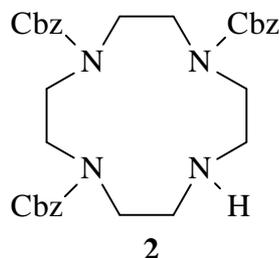
Ausbeute: 277 mg (96%).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta = 28.58$  (-,  $\text{CH}_3$ ), 47.84 49.15, 50.16, 50.56, 53.63, 53.73, (+,  $\text{NCH}_2$ ),  
 50.82(-,  $\text{OCH}_3$ ) 54.59(+,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 80.81, 81.16 (+,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 155.61,  
 156.45 (+, CO), 157.67 (+, CO)  
 $^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta = 1.47$  (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ), 2.6-2.76 (m, 4H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.17-3.53 (m, 10H,  $\text{NCH}_2$ )

MS: (140 °C)

$m/z$  (%): 388 ( $M^+$ , 5.5), 331 (9.7), 314 (19), 257 (19.5), 230 (84.5), 214 (68.2)

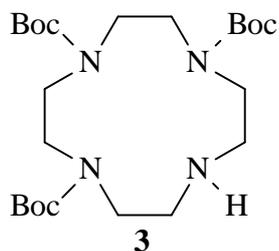
### 1,4,7-Tri(benzyloxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (2)



$C_{32}H_{38}N_4O_6$  [574.72 g/mol]

Die Synthese wurde nach einer literaturbekannten Vorschrift<sup>68</sup> durchgeführt, wobei die Ausbeute auf 65% gesteigert werden konnte. Durch effektives Rühren, Kühlen und Verlängern der Reaktionszeit läßt sich die Ausbeute leicht optimieren.

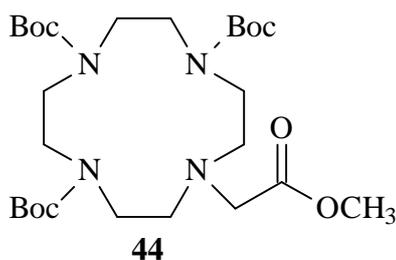
### 1,4,7-Tri (tert.-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (3)



$C_{23}H_{44}N_4O_6$  [472.33 g/mol]

Die Synthese wurde nach einer literaturbekannten Vorschrift<sup>70</sup> durchgeführt. Es wurde eine Ausbeute von 74 % erreicht.

### 10-Methoxycarbonylmethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäuretri-tert.-butylester (44)



$C_{26}H_{48}N_4O_8$  [544.35 g/mol]

Zu dem im Kolben vorgelegten 113 ml Acetonitril und 3.47 g trockenem  $K_2CO_3$  werden unter Stickstoffatmosphäre 9.11 g (19.3 mmol) des Boc-geschützten Cyclenderivates **3** gegeben. Danach fügt man langsam 2.31 ml (25.1 mmol) Bromessigsäuremethylester dazu. Die Reaktion scheint nach einem Tag Rühren bei RT nicht ganz vollkommen zu sein. Erhitzen auf 60 °C führt zu einem schnellen Ende der Reaktion. Nach dem Abfiltrieren des  $K_2CO_3$  wird die organische Phase am Rotationsverdampfer engeengt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (EE) wird ein weißer schaumartiger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 10.56 g (100 %).

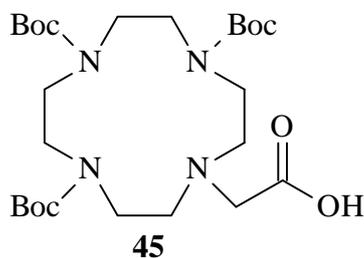
$^{13}C$ -NMR: (100 MHz,  $CDCl_3$ , TMS)  
 $\delta$  = 28.5, 28.74 (-,  $CH_3$ ), 47.05, 47.41, 47.77, 49.97, 50.98 (+,  $NCH_2$ ), 51.25 (-,  $OCH_3$ ) 53.64 (+,  $NCH_2CO$ ), 79.28, 79.5 (+,  $C(CH_3)_3$ ), 155.34, 155.81, 156.14, (+, CO), 171.1 (+, CO)

$^1H$ -NMR: (400 MHz,  $CDCl_3$ , TMS)  
 $\delta$  = 1.23 (s, 18H,  $CH_3$ ), 1.48 (s, 9H,  $CH_3$ ), 2.9 (brs, 4H,  $NCH_2$ ), 3.2-3.61 (m, 14H,  $NCH_2$ ), 3.68 (s, 3H,  $OCH_3$ )

MS: (130°C)  
 $m/z$  (%): 545 ( $M^+$ , 29.3), 486 (52.8), 472 (3.5), 388 (100), 371 (22.9), 288 (16.1), 271 (45.5), 171 (75.8), 99 (35.4)

IR ( $CHCl_3$ ):  $\nu$  = 2980, 2933, 1734, 1681, 1459, 1417, 1367, 1250, 1163, 1045  $cm^{-1}$

#### 4-Carboxymethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tri-tert.-butylester (**45**)



$C_{25}H_{46}N_4O_8$  [530.33 g/mol]

Im Kolben werden 52 mg  $LiOH \cdot H_2O$  vorgelegt. Dazu gibt man 450 mg (0.82 mmol) des in 7.3 ml MeOH/ $H_2O$  (3:1) gelösten Cyclenderivates **44** und läßt die Lösung 24 Stunden bei RT rühren. Das Lösungsmittel wird nach dem Abfiltrieren am Rotationsverdampfer

abgezogen, und der Rückstand wird in Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 0.1 N HCl extrahiert man dreimal mit Dichlormethan. Es wird Ethanol bis zur Klärung der Lösung zugegeben. Anschließend wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Die säulenchromatographische Reinigung (EE) liefert einen weißen, schaumartigen Feststoff. Ausbeute: 412 mg (94 %).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)

δ = 1.44 (s, 18H, CH<sub>3</sub>), 1.48 (s, 9H, CH<sub>3</sub>) 2.87 (brs, 4H, NCH<sub>2</sub>), 3.21-3.6 (m, 14H, NCH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)

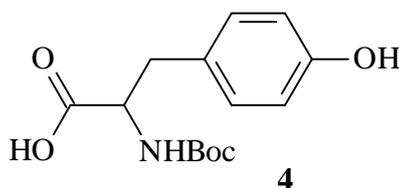
δ = 28.39, 28.59 (-, CH<sub>3</sub>), 48.81, 49.91, 52.19, 54.31 (+, NCH<sub>2</sub>), 60.44 (+, NCH<sub>2</sub>CO), 79.72, 80.09 (+, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.54, 156.15, 175.8 (+, CO)

MS: 170°C

*m/z* (%): 530 (M<sup>+</sup>, 4.1), 486 (7.1), 430 (11.9), 374 (22.5), 330 (100), 274 (20.2), 230 (15.1), 99 (57.4)

IR(CHCl<sub>3</sub>): ν = 2980, 2933, 1682, 1461, 1417, 1367, 1250, 1163, 1046 cm<sup>-1</sup>

#### N-(tert.-butoxycarbonyl)-L-tyrosin (**4**)



C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub> [281.13 g/mol]

Die Schützung des Amins wird ähnlich der Literaturvorschrift<sup>111</sup> durchgeführt.

Eine NaOH-Lsg. wird bei RT aus 837 mg (20.9 mmol) NaOH und 19 ml H<sub>2</sub>O hergestellt. In dieser Lösung werden unter Rühren 2 g (19 mmol) L-Tyrosin und anschließend 14.2 ml tert.-Butanol gelöst. Innerhalb einer Stunde werden dann 4.15 g (19 mmol) Di-tert.-butyl-dicarbonat dazugegeben. Ein weißer Niederschlag setzt sich während der Zugabe ab und sollte nach weiterem Rühren über Nacht verschwinden. Die milchige Flüssigkeit wird zweimal mit MTB-Ether extrahiert. Danach wird die organische Phase fünfmal mit einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. gewaschen. Die kombinierten wässrigen Phasen werden

<sup>111</sup> M.E. Jung, T.J. Lazarova, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 1553-1555

vorsichtig mit  $\text{KHSO}_4$  auf  $\text{pH} = 1-1.5$  gebracht und zwei- bis viermal mit Ethylacetat extrahiert. Abschließend wäscht man die vereinigten organischen Phasen zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}$  und trocknet sie über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Nach Abziehen des Lösungsmittels unter verminderten Druck erhält man einen weißen schaumartigen Feststoff, der ohne weitere Reinigung eingesetzt werden kann.

Ausbeute: 3.4 g (87 %)

$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

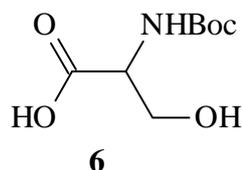
$\delta = 1.41$  (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 2.8-3.08 (m, 2H,  $\text{CHCH}_2$ ), 4.36-4.57 (m, 1H, CH), 6.69 (d, 2H,  $J = 8$  Hz, CH-aromatisch), 6.97 (d, 2H,  $J = 8$  Hz, CH-aromatisch)

$^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

$\delta = 28.273$  (-,  $\text{CH}_3$ ), 54.47 (-, CH), 60.58 (+,  $\text{CH}_2$ ), 80.6 (+,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 115.63 (-, CH-aromatisch), 127.27 (+,  $\text{C}_q$ -aromatisch), 130.46 (-, CH-aromatisch), 155.02 (+,  $\text{C}_q$ -OH), 156.08 (+, CO), 175.66 (+, CO)

$\text{IR}(\text{CHCl}_3)$ :  $\nu = 3437, 2982, 1713, 1612, 1511, 1454, 1369, 1230, 1165, 1025 \text{ cm}^{-1}$

#### **N-(tert.-butoxycarbonyl)-D,L-serin (6)**

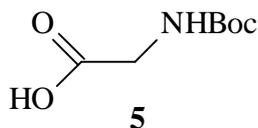


$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_5$  [205.10 g/mol]

Durchführung analog des Tyrosins **4**. Ausbeute: 97 % eines leicht gelblichen, schaumartigen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ : (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

$\delta = 1.46$  (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 3.75-3.92 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3.94-4.13 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 4.36-4.44 (m, 1H, CH)

**N-(tert.-butoxycarbonyl)-glycin (5)**C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub> [175.08 g/mol]

Durchführung analog des Tyrosins **4**. Ausbeute: 55 % eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

<sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)

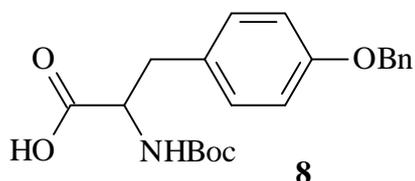
δ = 1.45 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 3.97-4.1 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.28 (brs, 1H, NH)

<sup>13</sup>C-NMR: (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)

δ = 28.31 (-, CH<sub>3</sub>), 42.29 (+, CH<sub>2</sub>), 80.43 (+, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 156.11 (+, CO), 174.56 (+, CO)

IR(CHCl<sub>3</sub>): ν = 3456, 2981, 2933, 1716, 1508, 1395, 1369, 1242, 1162, 1055 cm<sup>-1</sup>

FAB-MS: *m/z* (%): = 176 (M<sup>+</sup>, 40)

**O-(benzyl-N-tert.-butoxycarbonyl)-L-tyrosin (8)**C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub> [371.17 g/mol]

Die Verbindung wurde fast analog der Literaturvorschrift<sup>72</sup> synthetisiert, wobei die Ausbeute noch gesteigert werden konnte. In einer früheren Literatur<sup>112</sup> wurde die Verbindung mittels eines Kupferkomplexes hergestellt.

418 mg (17.43 mmol) NaH (hier sollte erwähnt werden, daß das 100 %-ige NaH nicht mehr ganz frei von NaOH war, weshalb die Äquivalente erhöht wurden) werden in 14.7 ml Dimethylformamid gelöst. Unter Eiskühlung werden langsam 1.953 g (6.97 mmol) des Boc-geschützten Tyrosins **4**, welches in 20 ml Dimethylformamid gelöst wurde, dazugespritzt. Wenn die Reaktion aufhört zu schäumen (Gasentwicklung), scheint sie beendet zu sein (ca. eine Stunde) und 879 µl (7.67 mmol) des Benzylchlorids werden dazugegeben. Die Reaktion kann nach fünf Stunden aufgearbeitet werden. Die Lösung wird

mit etwas Wasser versehen und zweimal mit MTB-Ether extrahiert. Die wässrige Phase wird mit 3N HCl auf pH 3.5 gebracht und wird anschließend fünfmal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit Wasser gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach dem Einengen des Lösungsmittels erfolgt die säulenchromatographische Aufarbeitung (EE/PE 1:6).

Ausbeute: 2.036 g (79 %) eines weißen schaumartigen Feststoffes.

<sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)

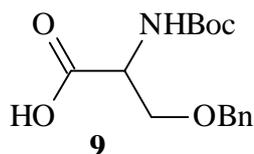
δ = 1.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.41 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 3.02-3.19 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>), 4.54-4.65 (m, 1H, CH), 4.99 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-benzylisch), 6.88 (d, 2H, *J* = 8 Hz, CH-aromatisch), 7.1 (d, 2H, *J* = 8 Hz, CH-aromatisch), 7.29-7.5 (m, 5H, CH-aromatisch)

<sup>13</sup>C-NMR: (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)

δ = 28.30 (-, CH<sub>3</sub>), 36.97 (+, CH<sub>2</sub>), 54.39 (-, CH), 69.99 (+, CH<sub>2</sub>-benzylisch), 80.20 (+, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 114.96 (-, CH-aromatisch), 127.46, 127.93, 128.56(-, CH-aromatisch), 130.45 (-, CH-aromatisch), 137.00 (+, C<sub>q</sub>-aromatisch), 156.85 (+, COBn), 157.94 (+, CO), 176.27 (+, CO)

FAB-MS: *m/z* (%): 371 (M<sup>+</sup>, 21), 316 (57), 272 (54), 254 (8), 226 (23), 197 (100)

### O-(benzyl-N-tert.-butoxycarbonyl)-D,L-serin (**9**)



C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub> [295.14 g/mol]

Die Durchführung erfolgt analog dem Tyrosin **8**. Ausbeute: 40 % eines weißen schaumartigen Feststoffes.

<sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)

δ = 1.44 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 3.68-3.74 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>, *J* = 3.5, 9.4 Hz), 3.9-3.96 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>, *J* = 3, 9.4 Hz), 4.43-4.5 (m, 1H, CH), 4.54 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-benzylisch), 5.42 (d, 1H, NH), 7.25-7.37 (m, 5H, CH-aromatisch)

<sup>112</sup> E. Wünsch, G. Fries, A. Zwick, *Chem. Ber.* **1958**, *91*, 542-547.

$^{13}\text{C}$ -NMR: (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

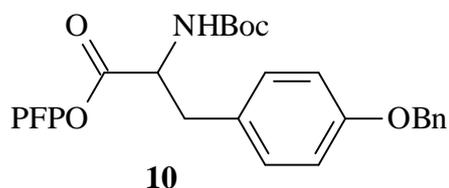
$\delta = 28.32$  (-,  $\text{CH}_3$ ),  $53.84$  (-, CH),  $69.69$  (+,  $\text{CH}_2$ ),  $73.49$  (+,  $\text{CH}_2$ -benzylisch),  $80.40$  (+,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ),  $127.71$ ,  $127.91$ ,  $128.48$  (-, CH-aromatisch),  $137.33$  (+,  $\text{C}_q$ -aromatisch),  $155.74$  (+, CO),  $175.27$  (+, CO)

IR( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu = 3270$ ,  $2981$ ,  $1742$ ,  $1653$ ,  $1497$ ,  $1454$ ,  $1394$ ,  $1369$ ,  $1222$ ,  $1168$ ,  $1049$ ,  $910$ ,  $735$ ,  $698$   $\text{cm}^{-1}$

MS:  $100^\circ\text{C}$

$m/z$  (%):  $238$  (5),  $194$  (7.2),  $148$  (24.9),  $107$  (8.3),  $91$  (100)

**(4-Benzyloxy-phenyl)-2-tert.-butoxycarbonylamino-propionsäure-pentafluorphenylester (10)**



$\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{F}_5\text{NO}_5$  [537.16 g/mol]

Der Aktivester wurde nach einer Literaturvorschrift<sup>74</sup> für Pentafluoraktivester hergestellt.

Unter Stickstoffatmosphäre werden 1.71 g (4.61 mmol) des geschützten Tyrosinderivates **8** in 51 ml Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird auf  $0^\circ\text{C}$  gekühlt und 998 mg (4.84 mmol) DCC werden dazugefügt. Nach 20 Minuten Rühren bei  $0^\circ\text{C}$  werden 891 mg (4.84 mmol) Pentafluorphenol zugegeben, wobei schon nach wenigen Minuten das entstehende Urethan ausfällt. Nachdem das Gemisch auf RT gekommen ist, wird fünf Stunden weiter gerührt. Dann wird das Urethan abfiltriert und die klare Lösung wird jeweils zweimal mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. und  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Es folgt die säulenchromatographische Aufarbeitung (EE/PE 1:1).

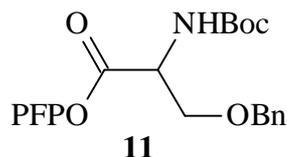
Ausbeute: 2.37 g (96 %) eines weißen Feststoffes.

$^1\text{H}$ -NMR: (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

$\delta = 1.43$  (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ),  $3.1$ - $3.3$  (m, 2H,  $\text{CHCH}_2$ ),  $4.05$ - $4.18$  (m, 1H, CH),  $5.08$  (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -benzylisch),  $6.95$  (d, 2H,  $J = 8\text{Hz}$ , CH-aromatisch),  $7.16$  (d, 2H,  $J = 8\text{Hz}$ , CH-aromatisch),  $7.33$ - $7.48$  (m, 5H, CH-aromatisch)

MS: (130°C)  
 $m/z$  (%): 537 ( $M^+$ , 1.9), 464 (1.8), 326 (1.1), 237 (2.9), 210 (1.0), 184 (24.2),  
 117 (8.7), 107 (7.4), 91 (100)  
 IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu = 3437, 2982, 2933, 1790, 1713, 1521, 1369, 1244, 1166, 1109 \text{ cm}^{-1}$

**(4-Benzyloxy)-2-tert.-butoxycarbonylamino-propionsäure-pentafluorphenylester (11)**

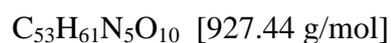
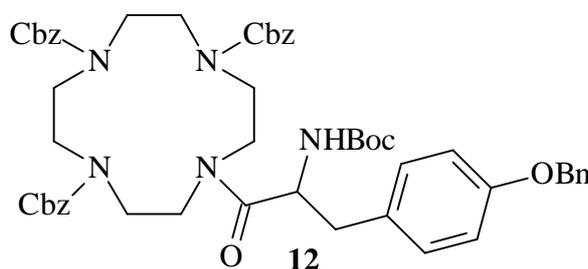


$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{F}_5\text{NO}_5$  [461.12 g/mol]

Die Durchführung erfolgt analog zu **10**. Ausbeute: 87 % eines gelblichen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta = 1.46$  (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 3.79-3.84 (dd, 1H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 3.1, 9.4$  Hz), 4.06-4.09 (dd, 1H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 2.64, 9.4$  Hz), 4.54-4.64 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -benzylich), 4.77-4.86 (m, 1H, CH), 4.5 (d, 1H, NH), 7.25-7.42 (m, 5H, CH-aromatisch)  
 $^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta = 28.27$  (-,  $\text{CH}_3$ ), 54.08 (-, CH), 69.78 (+,  $\text{CH}_2$ ), 73.75 (+,  $\text{CH}_2$ -benzylich), 80.63 (+,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 127.79, 128.06, 128.54 (-, CH-aromatisch), 137.07 (+,  $\text{C}_q$ -aromatisch), 155.31 (+, CO), 167.27 (+, CO)  
 FAB-MS:  $m/z$  (%): 463 ( $M^+$ , 15), 406 (63), 362 (12)

**10-[3-(4-Benzyloxy-phenyl)-2-tert.-butoxycarbonylamino-propionyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tribenzylester (12)**



Unter Stickstoffatmosphäre werden 1.142 g (1.99 mmol) des dreifach Cbz-geschützten Cyclenderivates **2** in 5.5 ml Dimethylformamid gelöst. Zu der Lösung werden 244 mg (1.81 mmol) HOBT und 971 mg (1.81 mmol) des Aktivesters **10** gegeben. Nach zwei Tagen Rühren bei RT wird die Lösung mit etwas Ethylacetat verdünnt und zweimal mit jeweils ges.  $NaHCO_3$ -Lsg. und  $H_2O$  extrahiert. Über  $Na_2SO_4$  wird getrocknet und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer abgezogen. Anschließend erfolgt die säulenchromatographische Aufarbeitung (EE). Ausbeute: 1.513 g (90 %) eines weißen schaumartigen Feststoffes.

$^{13}C$ -NMR: (100 MHz,  $CDCl_3$ , TMS)

$\delta$  = 28.3 (-,  $CH_3$ ), 39.25 (+,  $CH_2$ ), 49.24, 49.54, 49.88, 50.84 (+, N- $CH_2$ - $CH_2$ -N), 51.65 (-, CH), 60.36 (+,  $CHCH_2$ -C), 67.35, 69.88 (+,  $CH_2$ -benzylisch), 79.42 (+,  $C(CH_3)_3$ ), 114.71 (-, CH-aromatisch), 127.4-128.9 (-, CH-aromatisch), 130.39 (-, CH-aromatisch), 136.07, 136.5, 137.0 (+,  $C_q$ -aromatisch), 154.69 (+, COBz), 156.13, 157.44, 157.7 (+, CO)

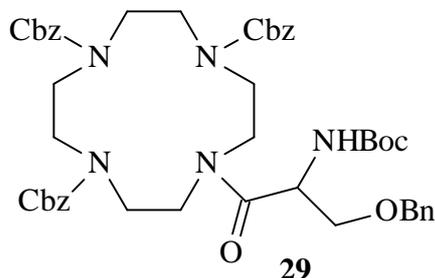
$^1H$ -NMR: (400 MHz,  $CDCl_3$ , TMS)

$\delta$  = 1.45 (s, 9H,  $CH_3$ ), 2.68-3.8 (m, 18H,  $NCH_2$ ), 4.6-4.74 (m, 1H, CH), 4.9-5.15 (m, 8H,  $CH_2$ -benzylisch), 6.78 (d, 2H,  $J$  = 8Hz, CH-aromatisch), 7.15 (d, 2H,  $J$  = 8 Hz, CH-aromatisch), 7.24-7.51 (m, 20H, CH-aromatisch)

IR ( $CHCl_3$ ):  $\nu$  = 3434, 2999, 1699, 1644, 1473, 1421, 1368, 1245, 1170, 1026  $cm^{-1}$

FAB-MS:  $m/z$  (%): 929 ( $M^+$ , 55), 828 (100), 575 (27), 441 (10), 307 (11), 154 (48)

**10-[3-(4-Benzoyloxy)-2-tert-butoxycarbonylamino-propionyl]-1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecan-1,4,7-tricarbonsäure-tribenzylester (29)**



$C_{47}H_{57}N_5O_{10}$  [851.41 g/mol]

Die Durchführung erfolgt analog dem Tyrosinderivat **12**. Nach drei Tagen ist die Reaktion vollkommen. Säulenchromatographische Aufarbeitung EE/PE (3:2).

Ausbeute: (71 %) eines kristallinen Feststoffes.

$^{13}C$ -NMR: (100 MHz,  $CDCl_3$ , TMS)

$\delta$  = 28.28 (-,  $CH_3$ ), 49.02, 49.32, 49.67, 50.85 (+,  $NCH_2CH_2N$ ), 50.12 (-, CH), 67.41, 70.92 (+,  $CH_2$ -benzylisch), 73.05 (+,  $CH_2$ ), 79.63 (+,  $C(CH_3)_3$ )  
127.00, 127.85, 128.00, 128.03, 128.14 (-, CH-aromatisch), 136.06, 136.11, 137.74 (+,  $C_q$ -aromatisch), 154.79, 156.25, 158.18 (+, CO)

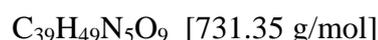
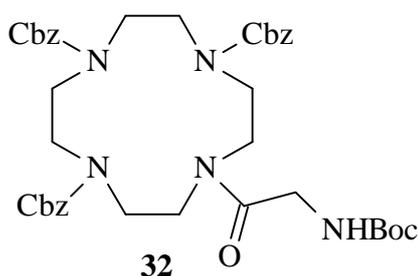
$^1H$ -NMR: (400 MHz,  $CDCl_3$ , TMS)

$\delta$  = 1.41 (s, 9H,  $CH_3$ ), 2.8-3.87 (m, 16H,  $NCH_2$ ), 4.42 (brs, 2H,  $CH_2$ ), 4.66 (brs, 1H, NH), 4.97-5.19 (m, 8H,  $CH_2$ -benzylisch), 5.31 (d, 1H, CH), 7.15-7.46 (m, 20H, CH-aromatisch)

IR( $CHCl_3$ ):  $\nu$  = 3433, 2930, 1699, 1644, 1474, 1421, 1367, 1249, 1169, 1104, 909  $cm^{-1}$

FAB-MS:  $m/z$  (%): 852 ( $M^+$ , 27), 752 (55), 575 (8), 467 (6), 307 (18)

**10-(2-tert.-Butoxycarbonylamino-acetyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tribenzylester (32)**



Unter Stickstoffatmosphäre werden 360 mg (2.05 mmol) des N-tert.-butoxyglycins **7** in 5 ml Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und 236 mg (2.05 mmol) N-Hydroxysuccinimid und 423 mg (2.05 mmol) DCC werden dazugegeben. Das Gemisch wird auf 0 °C gehalten und 1.18 g (2.05 mmol) des dreifach Cbz-geschützten Cyclenderivates **2**, welches in 3.5 ml Dichlormethan gelöst wird, werden zugespritzt. Das Urethan fällt nach wenigen Minuten aus. Nach fünf Tagen Rühren bei RT wird die Lösung ohne vollständigem Umsatz mit etwas Ethylacetat verdünnt und zweimal mit jeweils ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und H<sub>2</sub>O extrahiert. Über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird getrocknet und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer abgezogen. Anschließend erfolgt die säulenchromatographische Aufarbeitung (EE).

Ausbeute: 488 mg (32 %) eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

<sup>13</sup>C-NMR: (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)

δ = 28.39 (-, CH<sub>3</sub>), 48.91, 49.47, 49.69, 49.97 (+, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 60.38 (+, CH<sub>2</sub>), 67.48 (+, CH<sub>2</sub>-benzylisch), 79.47 (+, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 128.43, 128.55, 128.62, 128.70, 128.76 (-, CH-aromatisch), 136.01 (+, C<sub>q</sub>-aromatisch), 155.63, 156.1, 157.45 (+, CO), 171.34 (+, CO)

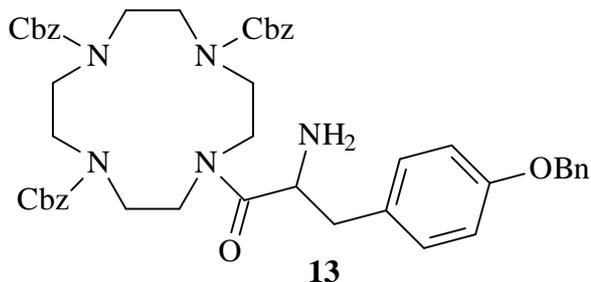
<sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)

δ = 1.49 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2.8-3.8 (m, 18H, NCH<sub>2</sub>), 5.06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-benzylisch), 5.1 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-benzylisch), 5.29 (brs, 1H, NH), 7.24-7.41 (m, 15H, CH-aromatisch)

IR(CHCl<sub>3</sub>): ν = 3428, 2980, 1699, 1653, 1474, 1420, 1368, 1247, 1168, 1103, 1052, 978, 909 cm<sup>-1</sup>

FAB-MS: m/z (%): 731 (M<sup>+</sup>, 38), 631 (100), 307 (73)

**10-[2-Amino-3-(4-benzyloxy-phenyl)-propionyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tribenzylester (13)**



$C_{48}H_{53}N_5O_8$  [827.39 g/mol]

Die Entfernung der Boc-Gruppe erfolgt ähnlich der von R.A. Houghten für Peptidfestphasensynthese beschriebenen Entschützung.<sup>75</sup>

589 mg (0.64 mmol) des Cyclenderivates **12** werden in 10 ml Dioxan gelöst und anschließend langsam mit 264  $\mu$ l konz. Schwefelsäure versehen. Die Reaktionsdauer variiert zwischen 2-6 Stunden. Zur Aufarbeitung wird die Lösung mit  $K_2CO_3$  auf pH 11-12 gebracht und weitgehend am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und fünfmal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über  $Mg_2SO_4$  getrocknet und eingeeengt. Leichte Verunreinigungen werden durch die säulenchromatographische Reinigung (EE/MeOH später nur MeOH) entfernt. Ausbeute: 525 mg (100 %) eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

$^1H$ -NMR: (400 MHz,  $CDCl_3$ , TMS)

$\delta$  = 2.46-3.65 (m, 19H,  $NCH_2$ ,  $CHCH_2$ ), 4.8-5.2 (m, 8H,  $CH_2$ -benzylisch),  
6.71-7.14 (m, 4H, CH-aromatisch), 7.17-7.44 (m, 20H, CH-aromatisch)

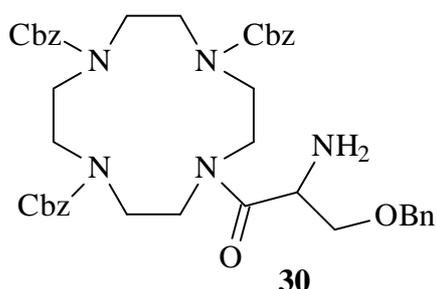
$^{13}C$ -NMR: (100 MHz,  $CDCl_3$ , TMS)

$\delta$  = 49.55, 49.68, 49.70, 50.23 (+,  $NCH_2CH_2N$ ), 67.05 (-, CH), 67.1, 67.42  
(+,  $CH_2$ -benzylisch), 69.92 (+,  $CHCH_2C$ ), 114.89 (-, CH-aromatisch),  
127.45, 127.88, 128.28, 128.39, 128.58 (-, CH-aromatisch), 130.61 (-, CH-  
aromatisch), 136.17, 136.38, 137.01 (+,  $C_q$ -aromatisch), 157.78 (+, CO)

IR( $CHCl_3$ ):  $\nu$  = 2999, 2964, 1697, 1473, 1420, 1367, 1245, 1121, 1027  $cm^{-1}$

FAB-MS:  $m/z$  (%): 828 ( $M^+$ , 100), 630 (13), 575 (15), 307 (40), 154 (100)

**10-[2-Amino-3-(benzyloxy)-propionyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tribenzylester (30)**



$C_{42}H_{49}N_5O_8$  [751.88 g/mol]

Die Durchführung erfolgt analog dem Tyrosinderivat **13**. Ausbeute: 100 % eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

$^{13}C$ -NMR: (100 MHz,  $CDCl_3$ , TMS)

$\delta$  = 49.22, 49.51, 49.70, 51.2 (+,  $NCH_2CH_2N$ ), 67.11 (-, CH), 67.12, 67.42, (+,  $CH_2$ -benzylisch), 73.26 (+,  $CH_2O$ ), 127.64, 127.70, 128.33, 128.39, 128.60 (-, CH-aromatisch), 136.09, 136.14, 137.98 (+,  $C_q$ -aromatisch), 156.07 (+, CO)

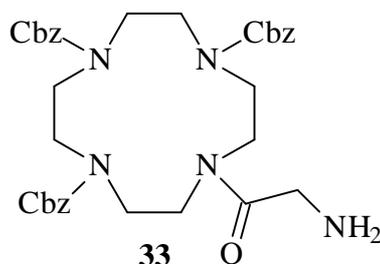
$^1H$ -NMR: (400 MHz,  $CDCl_3$ , TMS)

$\delta$  = 3.07-3.67 (m, 17H,  $NCH_2$ ), 4.47 (s, 2H,  $CH_2$ ), 5.02-5.15 (m, 8H,  $CH_2$ -benzylisch), 7.24-7.4 (m, 20H, CH-aromatisch)

IR( $CHCl_3$ ):  $\nu$  = 2928, 1696, 1474, 1419, 1370, 1248, 1169, 1103,  $cm^{-1}$

FAB-MS:  $m/z$  (%): 752 ( $M^+$ , 49), 674 (20), 575 (27), 307 (69)

**10-[2-Amino-acetyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tribenzylester (33)**



$C_{34}H_{41}N_5O_7$  [631.30 g/mol]

Die Durchführung erfolgt analog der Vorschrift für das Tyrosinderivat **13**. Ausbeute: 74 % eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

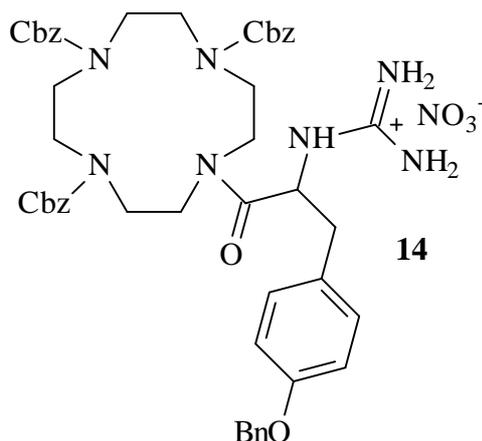
$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta = 2.8\text{-}3.6$  (m, 18H,  $\text{NCH}_2$ ),  $5.04\text{-}5.15$  (m, 6H,  $\text{CH}_2$ -benzylisch),  $7.25\text{-}7.42$  (m, 15H, CH-aromatisch)

$^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta = 48.71, 49.35, 49.70, 50.29, 51.19$  (+,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ),  $60.39$  (+,  $\text{CH}_2$ ),  $67.09, 67.47$  (+,  $\text{CH}_2$ -benzylisch),  $128.47, 128.56, 128.59, 128.68$  (-, CH-aromatisch),  $136.02$  (+,  $\text{C}_q$ -aromatisch),  $155.91, 157.63$  (+, CO),  $171.14$  (+, CO)

IR( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu = 3611, 3043, 2876, 1532, 1482, 1353, 1230, 1094, 1041, 891, 815\text{ cm}^{-1}$

FAB-MS:  $m/z$  (%):  $631$  ( $\text{M}^+$ , 100)

**10-[3-(4-benzyloxy-phenyl)-2-guanidinium-propionyl]-1,4,7,10-tetraazacyclodecan-1,4,7-tricarbonsäure-tribenzylester-nitrat (14)**



$\text{C}_{49}\text{H}_{56}\text{N}_8\text{O}_{11}$  [932.41 g/mol]

In der Literatur<sup>77</sup> werden verschiedene Vorschläge zur Durchführung der Guanidierung gemacht.

496 mg (0.6 mmol) des freien Amins **13** werden unter Stickstoffatmosphäre in 833  $\mu\text{l}$  DMF gelöst und 121 mg (0.6 mmol) des 3.5-Dimethylpyrazol-1-formamidiniumnitrats sowie 84  $\mu\text{l}$  (0.6 mmol) Ethyldiisopropylamin werden dazugegeben. Die Lösung wird 24 Stunden bei RT gerührt.<sup>113</sup> Anschließend wird das Produkt mit Diethylether ausgefällt, wobei ein voluminöser weißer Niederschlag entsteht. Dieser wird abzentrifugiert und nochmal mit

<sup>113</sup> Je nach Ansatzgröße und nach Molekül variieren die Reaktionszeiten. Bei kleinen Ansätzen spielt der Verdünnungseffekt eine Rolle, d.h. die Reaktion wird zur vollständigen Lösung der Edukte mit DMF verdünnt, was eine Verlängerung der Reaktionszeiten bewirkt.

Ether gewaschen. Durch die Etherfällung wird das Produkt von DMF, Hünigs Base sowie dem 3,5-Dimethylpyrazol befreit. Der nun zähe Feststoff wird zur vollständigen Entfernung der Verunreinigungen säulenchromatographisch (erst EE, später EE/MeOH) gereinigt. Ausbeute: 333 mg (64 %) eines klaren gelblichen Feststoffes.

$^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ , TMS)

$\delta = 42.63$  (+,  $\text{CH}_2$ ),  $49.0\text{-}50.53$  (+,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ),  $54.45$  (-, CH),  $67.6$ ,  $69.9$  (+,  $\text{CH}_2$ -benzylisch),  $114.9$  (-, CH-aromatisch),  $127.51$ ,  $128.48$ ,  $128.54$ ,  $128.63$  (-, CH-aromatisch),  $130.75$  (-, CH-aromatisch),  $135.84$ ,  $136.16$ ,  $136.9$  (+,  $\text{C}_q$ -aromatisch),  $157.67$  (+,  $\text{C}_q$ -Guanidinium),  $158.03$  (+, COBn),  $170.33$  (+, CO)

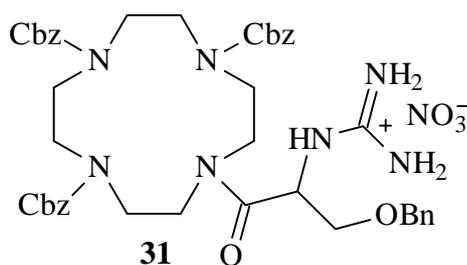
$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

$\delta = 2.4\text{-}3.9$  (m, 19H,  $\text{NCH}_2$ ,  $\text{CHCH}_2$ ),  $4.5\text{-}5.2$  (m, 8H,  $\text{CH}_2$ -benzylisch),  $6.82$  (d, 2H,  $J = 8\text{Hz}$ , CH-aromatisch),  $6.07$  (d, 2H,  $J = 8\text{Hz}$ , CH-aromatisch),  $7.12\text{-}7.5$  (m, 20H, CH-aromatisch)

IR( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu = 2999$ ,  $2964$ ,  $1697$ ,  $1511$ ,  $1473$ ,  $1420$ ,  $1367$ ,  $1245$ ,  $1121$ ,  $1027\text{ cm}^{-1}$

FAB-MS:  $m/z$  (%):  $870$  ( $\text{M}^+$ , 80),  $828$  (24),  $575$  (13),  $307$  (44),  $154$  (100)

**10-[3-(benzyloxy)-2-guanidinium-propionyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tribenzylester-nitrat (31)**

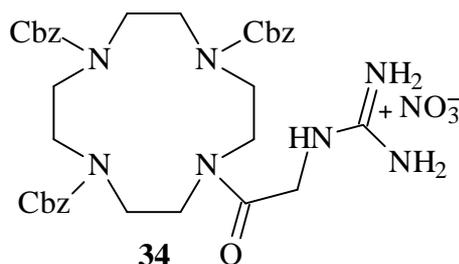


$\text{C}_{43}\text{H}_{52}\text{N}_8\text{O}_{11}$  [856.41 g/mol]

Die Durchführung erfolgt analog dem Tyrosinderivat **14**. Ausbeute: 88 % eines klaren gelblichen Feststoffes.

- $^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS)  
 $\delta = 48.84, 49.06, 49.45, 50.42$  (+,  $\text{NCH}_2$ ),  $54.35$  (-, CH),  $67.57, 70.78$  (+,  $\text{CH}_2$ -benzylisch),  $73.48$  (+,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ),  $127.82, 128.17, 128.45, 128.69$  (-, CH-aromatisch)  $135.72, 135.83, 135.96, 136.84$  (+,  $\text{C}_q$ -aromatisch),  $157.2$  (+,  $\text{C}_q$ -Guanidinium),  $157.47, 168.25$  (+, CO)
- $^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS)  
 $\delta = 3.03\text{-}3.65$  (m, 16H,  $\text{NCH}_2$ ),  $4.54$  (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ),  $4.56\text{-}4.63$  (m, 1H, CH)  $4.9$  (s, 8H,  $\text{CH}_2$ -benzylisch),  $7.21\text{-}7.4$  (m, 20H, CH-aromatisch)
- IR( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu = 3336, 2999, 1697, 1474, 1411, 1244, 1176, 1104, 971, 909\text{ cm}^{-1}$
- FAB-MS:  $m/z$  (%):  $794$  ( $\text{M}^+$ , 100),  $752$  (9),  $575$  (10),  $307$  (9)

**10-(Guanidinium-acetyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tri-benzylester-nitrat (34)**

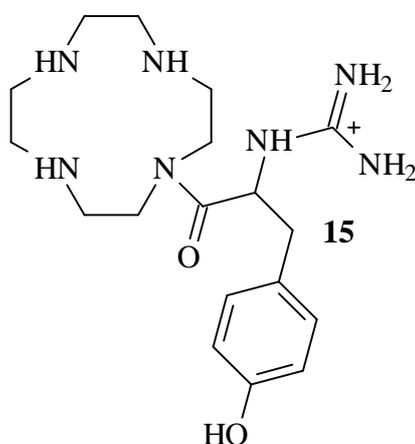


$\text{C}_{35}\text{H}_{44}\text{N}_8\text{O}_{10}$  [736.77 g/mol]

Die Durchführung erfolgt analog der Vorschrift für das Tyrosinderivat **14**. Ausbeute: 100 % eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

- $^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS)  
 $\delta = 48.63, 49.01, 49.78, 50.53$  (+,  $\text{NCH}_2$ ),  $54.37$  (+,  $\text{CH}_2$ ),  $67.67, 67.83$  (+,  $\text{CH}_2$ -benzylisch),  $128.22, 128.59, 128.67, 128.94$  (-, CH-aromatisch)  $135.84, 136.16$  (+,  $\text{C}_q$ -aromatisch),  $156.81$  (+,  $\text{C}_q$ -Guanidinium),  $157.11, 157.83, 167.16$  (+, CO)
- $^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS)  
 $\delta = 3.0\text{-}3.55$  (m, 16H,  $\text{NCH}_2$ ),  $3.91$  (brs, 2H,  $\text{CH}_2$ )  $4.06$  (s, 6H,  $\text{CH}_2$ -benzylisch),  $7.25\text{-}7.36$  (m, 15H, CH-aromatisch)
- IR( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu = 3349, 2999, 1697, 1475, 1412, 1373, 1246, 1174, 1105, 1045\text{ cm}^{-1}$
- FAB-MS:  $m/z$  (%):  $674$  ( $\text{M}^+$ , 100),  $307$  (57)

**N-[1-(4-Hydroxy-benzyl)-2-oxo-2-(1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl)-ethyl]-guanidinium (15)**



$C_{18}H_{32}N_7O_2$  [378.26 g/mol]

328 mg (0.38 mmol) des Cbz-geschützten-Cyclenderivates **14** werden in 8.3 ml Methanol gelöst und unter Stickstoffgegenstrom werden 31 mg Pd/C (10 %) zugegeben. Nachdem die Reaktion zwei Tage hydriert wurde, wird der Katalysator abzentrifugiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wird in Wasser gelöst und durch einen basischen Ionenaustauscher und durch Reversed Phase-Chromatographie (Waters Sep-Pak C18 Cartridges, Elution mit Wasser/Methanol) gereinigt.

Ausbeute: 129 mg (91 %) eines klaren, gelblichen Feststoffes.

$^{13}C$ -NMR: (100 MHz,  $D_2O$ , TSP- $d_4$ )

$\delta$  = 42.86 (+,  $CH_2$ ), 46.11, 46.74, 47.8, 49.62 (+,  $NCH_2CH_2N$ ), 51.95 (+,  $CHCH_2C$ ), 55.02 (-, CH), 118.28, 133.54 (-, CH-aromatisch), 157.32 (+,  $C_q$ -Guanidinium), 157.66 (+, C-OH), 179.68 (+, CO)

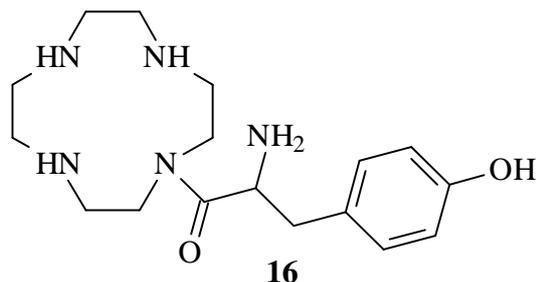
$^1H$ -NMR: (400 MHz,  $D_2O$ , TSP- $d_4$ )

$\delta$  = 2.7-3.5 (m, 19H,  $NCH_2$ ,  $CHCH_2$ ), 6.78-6.91 (m, 2H, CH-aromatisch), 7.023-7.2 (m, 2H, CH-aromatisch)

IR( $CHCl_3$ ):  $\nu$  = 3688, 3606, 3043, 2359, 1602, 1419, 1230, 930  $cm^{-1}$

Maldi: ( $\alpha$ -Cyanozimtsäure)

$M = 377.6$

**2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl)-propan-1-on (16)**C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> [335.23 g/mol]

735 mg (0.844 mmol) des Cbz-geschützten-Cyclenderivates **13** werden in 19 ml Methanol gelöst und unter Stickstoffgegenstrom werden 69 mg Pd/C (10 %) zugegeben. Nachdem die Reaktion 2 Tage hydriert wurde, wird der Katalysator abzentrifugiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wird in Wasser gelöst und durch einen basischen Ionenaustauscher und durch Reversed Phase-Chromatographie (Waters Sep-Pak C18 Cartridges, Elution mit Wasser/Methanol) gereinigt. Ausbeute: 295 mg (99 %) eines klaren, bräunlichen Feststoffes. Aufgrund leichter Verunreinigungen wird das Produkt säulenchromatographisch (MeOH) gereinigt. Ausbeute: 120 mg (42 %) eines gelblichen Feststoffes.

<sup>13</sup>C-NMR: (100 MHz, D<sub>2</sub>O, TSP-d<sub>4</sub>)

δ = 40.2 (+, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 46.5, 47.5, 48.88, 50.22 (+, NCH<sub>2</sub>), 50.8 (+, CHCH<sub>2</sub>C), 54.76 (-, CH), 118.64 (-, CH-aromatisch), 128.97 (+, C<sub>q</sub>-aromatisch), 133.82 (-, CH-aromatisch), 158.05 (+, C-OH), 175.4 (+, CO)

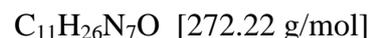
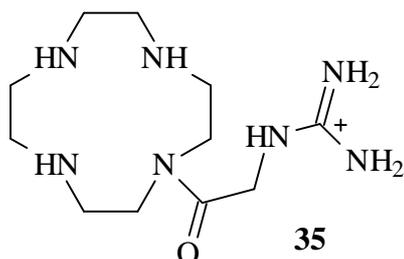
<sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, D<sub>2</sub>O, TSP-d<sub>4</sub>)

δ = 2.55-3.45 (m, 18H, NCH<sub>2</sub>, CHCH<sub>2</sub>), 3.73-3.81 (m, 1H, CH), 6.88 (d, 2H, J = 8.5Hz, CH-aromatisch), 7.16 (d, 2H, J = 8.5Hz, CH-aromatisch)

IR (CHCl<sub>3</sub>): ν = 3688, 3605, 3043, 2399, 1602, 1353, 1230, 1154, 1114, 930 cm<sup>-1</sup>

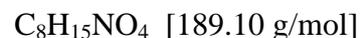
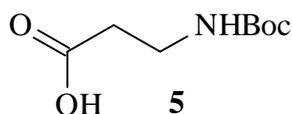
Maldi: (α-Cyanozimtsäure)

M = 336

**N-[2-Oxo-2-(1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl)-ethyl]-guanidinium (35)**

Die Durchführung und Aufarbeitung erfolgt analog dem Tyrosinderivat **15**. Ausbeute: 19 % eines gelblichen Feststoffes.

Maldi:           (α-Cyanozimtsäure)  
 M = 272 (mit Spaltprodukt)

**3-(tert.-Butoxycarbonylamino)propansäure (5)**

Die Boc-Schützung erfolgt wie bei allen Aminosäuren in dieser Arbeit, wobei sie ähnlich der Literaturvorschrift<sup>114</sup> durchgeführt wird.

Bei RT wird eine NaOH-Lsg. aus 296 mg (7.4 mmol) NaOH und 6.74 ml H<sub>2</sub>O hergestellt. In diese Lösung werden unter Rühren 600 mg (6.73 mmol) β-Alanin und anschließend 5 ml tert.-Butanol gelöst. Innerhalb einer Stunde werden dann 1.47 g (6.73 mmol) Di-tert.-butyl-dicarbonat dazugegeben. Ein weißer Niederschlag setzt sich während der Zugabe ab und sollte nach weiterem Rühren über Nacht verschwinden. Die klare Flüssigkeit wird zweimal mit MTB-Ether extrahiert, wobei die organische Phase dann dreimal mit einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. gewaschen wird. Die kombinierten wässrigen Phasen werden vorsichtig mit KHSO<sub>4</sub> auf pH = 1-1.5 gebracht und dann zwei- bis viermal mit Ethylacetat extrahiert. Abschließend wäscht man die vereinigten organischen Phasen zweimal mit H<sub>2</sub>O und trocknet über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nach Abziehen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck werden 1.024 g (80 %) eines weißen Feststoffes erhalten, der ohne weitere Reinigung eingesetzt wird.

$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

$\delta$  = 1.45 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 2.58 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.34 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ )

$^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

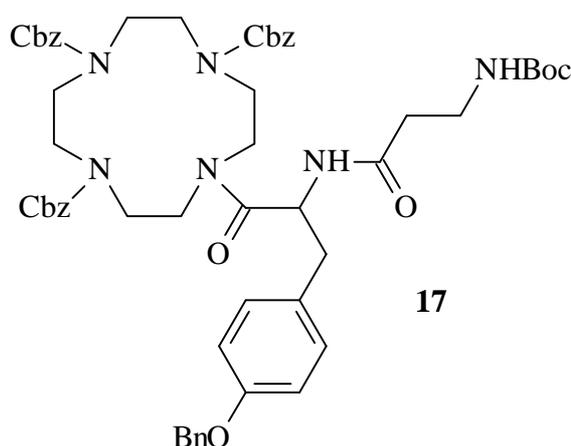
$\delta$  = 28.39 (-,  $\text{CH}_3$ ), 34.49 (+,  $\text{CH}_2$ ), 35.93 (+,  $\text{CH}_2$ ), 79.73 (+,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 155.95 (+, CO), 177.4 (+, CO)

IR( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu$  = 3457, 2981, 1712, 1507, 1404, 1368, 1242, 1168, 1068, 977  $\text{cm}^{-1}$

MS: (90 °C)

$m/z$  (%): 189 ( $\text{M}^+$ , 0.6), 174 (1.0), 133 (92.3), 116 (100), 98 (55.9), 90 (48.5), 72 (22.1)

**10-[3-(4-Benzoyloxyphenyl)-2-(3-tert.-butoxycarbonylamino-propionylamino)-propionyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tribenzylester (17)**



$\text{C}_{56}\text{H}_{66}\text{N}_6\text{O}_{11}$  [998.48 g/mol]

Unter Stickstoffatmosphäre werden 121 mg (0.64 mmol) des Boc-geschützten  $\beta$ -Alanins **5** in 3 ml Dichlormethan gelöst. Anschließend wird die Lösung auf 0°C gekühlt. Dann werden 78 mg (0.64 mmol) DMAP und 132 mg (0.64 mmol) DCC dazugegeben. Darauf folgt die Zugabe von 528 mg (0.64 mmol) des Cyclenderivates **14**. Nach zwei Tagen wird das DCU (Urethan) abfiltriert. Die organische Phase wird zweimal mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. extrahiert und nach dem Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  eingeeengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (EE) gereinigt. Ausbeute: 472 mg (74 %) eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

<sup>114</sup> A. Ricouart, J. C. Gesquiere, A. Tatar, Serghera et al. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 1, 73-78.

<sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)

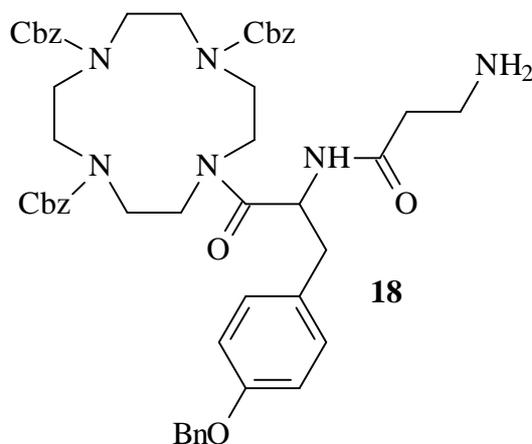
δ = 1.44 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2.7-2.75 (m, 23H, NCH<sub>2</sub>, CHCH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.92-5.18 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-benzylisch), 6.24 (d, 1H, NH), 6.29-7.0 (m, 4H, CH-aromatisch), 7.2-7.43 (m, 20H, CH-aromatisch)

<sup>13</sup>C-NMR: (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)

δ = 28.46 (-, CH<sub>3</sub>) 36.11, 38.73 (+, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 49.25, 49.35, 49.80, 50.99 (+, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 60.40 (-, CH), 68.55, 69.98 (+, CH<sub>2</sub>-benzylisch), 79.22 (+, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 114.85 (-, CH-aromatisch), 127.46, 128.42, 128.56, 128.58, 128.61 (-, CH-aromatisch), 130.37 (-, CH-aromatisch), 136.01, 136.12, 136.47, 136.96 (+, C<sub>q</sub>-aromatisch), 156.24 (+, COBn), 157.43, 157.87, (+, CO), 170.63, 171.15 (+, CO)

IR (CHCl<sub>3</sub>): ν = 3428, 2933, 1699, 1642, 1510, 1473, 1420, 1367, 1245, 1174, 1104 cm<sup>-1</sup>

**10-[2-(3-Amino-propionylamino)-3-(4-benzyloxyphenyl)propionyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tribenzylester (18)**



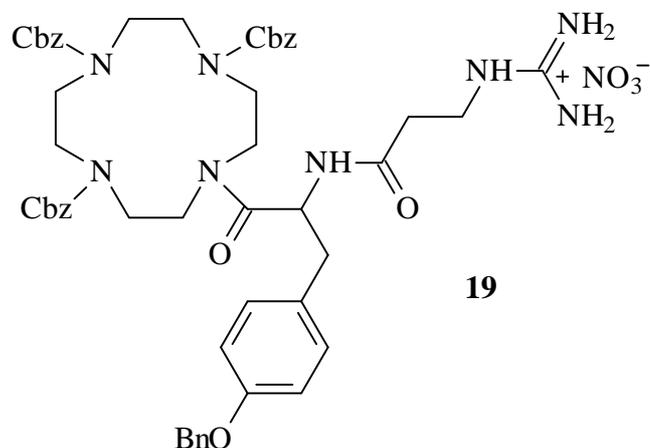
C<sub>51</sub>H<sub>58</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> [898.43 g/mol]

471 mg (0.47 mmol) des Cyclenderivates **17** werden in 7 ml Dioxan gelöst und anschließend langsam mit 189 µl konz. Schwefelsäure versehen. Die Reaktionsdauer variiert zwischen 2-6 Stunden. Zur Aufarbeitung wird die Lösung mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf pH 11-12 gebracht und weitgehend am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Leichte Verunreinigungen werden durch die säulenchromatographische Reinigung (EE/MeOH später nur MeOH) entfernt.

Ausbeute: 424 mg (100 %) eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

- $^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta$  = 2.2-4.1 (m, 23H,  $\text{NCH}_2$ ,  $\text{CHCH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 4.95-5.14 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ -benzylisch), 6.7-7.05 (m, 4H, CH-aromatisch), 7.2-7.5 (m, 20H, CH-aromatisch)
- IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu$  = 3424, 2999, 2932, 1697, 1640, 1510, 1473, 1420, 1368, 1245, 1176, 1108  $\text{cm}^{-1}$
- FAB-MS:  $m/z$  (%): 899 ( $\text{M}^+$ , 26), 575 (20), 307 (40), 226 (8), 154 (100)

**10-[3-(4-Benzyloxyphenyl)-2-(3-guanidinium-propionylamino)-propionyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tribenzylester-nitrat (19)**



$\text{C}_{52}\text{H}_{61}\text{N}_9\text{O}_{12}$  [1003.44 g/mol]

Unter Stickstoffatmosphäre werden 424 mg (0.47 mmol) des freien Amins **18** in 700  $\mu\text{l}$  DMF gelöst. Dazu werden 95 mg (0.47 mmol) des 3.5-Dimethylpyrazol-1-formamidinium-nitrats sowie 66  $\mu\text{l}$  (0.47 mmol) Ethyldiisopropylamin gegeben. Die Lösung wird vier Tage bei RT gerührt (Referenz 11). Anschließend wird das Produkt mit Diethylether ausgefällt, wobei ein voluminöser weißer Niederschlag entsteht. Dieser wird abzentrifugiert und nochmal mit Ether gewaschen. Durch die Etherfällung wird das Produkt von DMF, Hünigs Base sowie dem 3.5-Dimethylpyrazol befreit. Der nun zähe Feststoff wird zur vollständigen Entfernung der Verunreinigungen säulenchromatographisch (EE/MeOH für die Verunreinigungen, MeOH/ $\text{NH}_3$  für das Produkt) gereinigt. Ausbeute: 236 mg (53 %) eines klaren, kristallinen Feststoffes

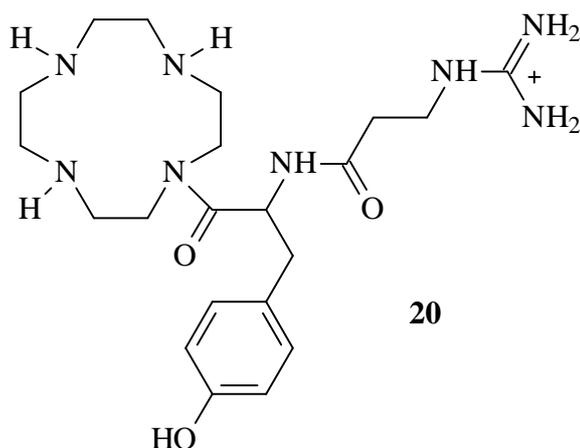
$^{13}\text{C}$ -NMR: (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS)

$\delta = 36.99, 38.74 (+, \text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NH}), 49.17, 49.38, 49.59, 51.04 (+, \text{NCH}_2), 52.66 (+, \text{CHCH}_2\text{C}), 54.84 (-, \text{CH}), 68.67, 70.98 (+, \text{CH}_2\text{-benzylisch}), 116.03 (-, \text{CH-aromatisch}), 128.56, 128.72, 129.69, 129.71, 129.83 (-, \text{CH-aromatisch}), 131.48 (-, \text{CH-aromatisch}), 137.56, 137.71, 137.9, 138.67 (+, \text{C}_q\text{-aromatisch}), 158.00 (+, \text{C}_q\text{-Guanidinium}), 159.15 (+, \text{COBn}), 172.4, 174.26, 175.73 (+, \text{CO})$

$^1\text{H}$ -NMR: (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS)

$\delta = 2.49 (\text{t}, 2\text{H}, \text{CH}_2\text{CH}_2), 2.6\text{-}3.56 (\text{m}, 21\text{H}, \text{NCH}_2, \text{CHCH}_2, \text{CH}_2\text{CH}_2), 4.9\text{-}5.1 (\text{m}, 8\text{H}, \text{CH}_2\text{-benzylisch}), 6.79 (\text{d}, 2\text{H}, \text{CH-aromatisch}), 6.93 (\text{brs}, 2\text{H}, \text{CH-aromatisch}), 7.04\text{-}7.4 (\text{m}, 20\text{H}, \text{CH-aromatisch})$

**3-Guanidinium-N-[1-(4-hydroxybenzyl)-2-oxo-2-(1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl)-ethyl]-propionamid (20)**



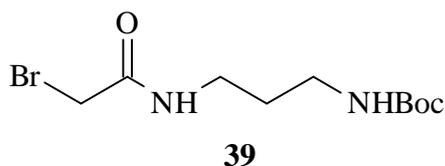
$\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{N}_8\text{O}_3$  [449.30 g/mol]

280 mg (0.297 mmol) des Cbz-geschützten Cyclenderivates **19** werden in 6.5 ml Methanol gelöst und unter Stickstoffgegenstrom werden 24 mg Pd/C (10 %) zugegeben. Nachdem die Reaktion zwei Tage hydriert wurde, wird der Katalysator abzentrifugiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wird in Wasser gelöst und durch einen basischen Ionenaustauscher und durch Reversed Phase-Chromatographie (Waters Sep-Pak C18 Cartridges, Elution mit Wasser/Methanol), sowie einem Filter (Firma Waters) für Millipore-Wasser gereinigt. Rohausbeute: 134 mg (100 %) eines gelblichen Feststoffes.

Ausbeute: 37 mg (28 %) eines klaren, gelblichen Feststoffes.

- $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , TSP- $\text{d}_4$ )  
 $\delta = 33.94, 37.47$  (+,  $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ),  $43.01, 43.09, 45.10, 46.61$  (+,  $\text{NCH}_2$ ),  
 $46.74$  (+,  $\text{CHCH}_2\text{C}$ ),  $52.83$  (-,  $\text{CH}$ ),  $115.90$  (-,  $\text{CH}$ -aromatisch),  $126.96$  (+,  
 $\text{C}_q$ -aromatisch),  $130.94$  (-,  $\text{CH}$ -aromatisch),  $155.32$  (+,  $\text{COH}$ ),  $157.03$  (+,  $\text{C}_q$ -  
Guanidinium),  $173.56, 175.55$  (+,  $\text{CO}$ )
- $^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , TSP- $\text{d}_4$ )  
 $\delta = 2.1\text{-}3.6$  (m, 23H,  $\text{NCH}_2, \text{CHCH}_2, \text{CH}_2\text{CH}_2$ ),  $6.36$  (d, 2H,  $J = 8\text{Hz}$ ,  $\text{CH}$ -  
aromatisch),  $6.75$  (d, 2H,  $J = 8\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}$ -aromatisch)
- IR(KBr):  $\nu = 3396, 2928, 2372, 1636, 1576, 1456, 1408, 1280\text{ cm}^{-1}$
- Maldi: ( $\alpha$ -Cyanozimtsäure)  
 $M = 449$

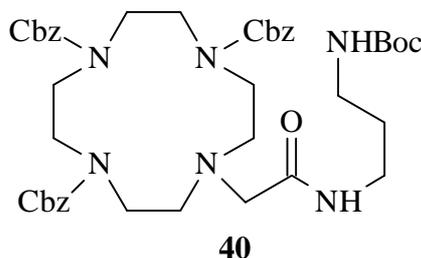
### 2-Brom-N-(3-tert.-butoxycarbonylamino)propyl)acetamid (39)



$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3\text{Br}$  [295.18 g/mol]

Darstellung siehe Dissertation von A. Loos.<sup>69</sup>

### N-[3-tert.-Butoxycarbonyl)aminopropyl]-2-[4,7,10-tri(benzyloxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl]acetamid (40)



$\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{N}_6\text{O}_9$  [788.94 g/mol]

Unter Stickstoffatmosphäre werden 2.71 g (4.72 mmol) des dreifach Cbz-geschützten Cyclens **2** in 33 ml Acetonitril gelöst. Dann werden 1.46 g (4.95 mmol) der Seitenkette **39** und 218 mg (5.2 mmol) LiOH dazugegeben. Die Reaktion wird anschließend fünf Tage rückflusiert. Zur Aufarbeitung wird die Lösung filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abgezogen. Das Produkt wird dann

säulenchromatographisch (EE) gereinigt. Ausbeute: 3.498 g (94 %) eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

$\delta$  = 1.42 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 1.54 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.34-3.68 (m, 22H,  $\text{NCH}_2$ ), 4.8-5.18 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ -benzylisch), 5.26 (brs, 1H, NH), 6.94 (brs, 1H, NH), 7.30 (m, 15H, CH-aromatisch)

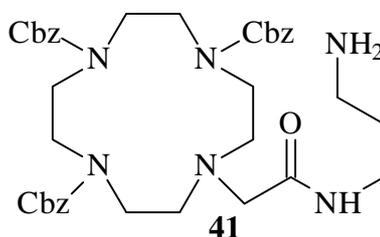
$^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

$\delta$  = 28.4 (-,  $\text{CH}_3$ ), 29.9 (+,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 35.8, 37.2 (+,  $\text{NHCH}_2$ ), 48.8 (+,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 57.0 (+,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 66.9, 67.3 (+,  $\text{CH}_2$ -benzylisch), 78.9, (+,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 128.0, 128.1, 128.4, 128.5 (-, CH-aromatisch), 136.3, 136.6 (+,  $\text{C}_q$ -aromatisch), 156.0, 156.3, 156.7 (+, CO), 170.8 (+, CO)

IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu$  = 3368, 2936, 1472, 1424, 1364, 1252, 1164, 696  $\text{cm}^{-1}$

Schmelzp. : 84-85 °C

**N-(Aminopropyl)-2-[4,7,10-tri(benzyloxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl]acetamid (41)**



$\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_7$  [688.82 g/mol]

3.498 g (4.44 mmol) des Cyclenderivates **40** werden in 70.5 ml Dioxan gelöst und anschließend langsam mit 1.83 ml konz. Schwefelsäure versehen. Die Reaktionsdauer variiert zwischen 2-6 Stunden. Zur Aufarbeitung wird die Lösung mit  $\text{K}_2\text{CO}_3$  auf pH 11-12 gebracht und weitgehend am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingeeengt. Ausbeute: 3.068 g (100 %) eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

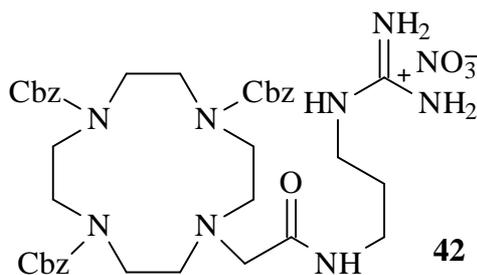
$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta$  = 1.55 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.37-3.68 (m, 22H,  $\text{NCH}_2$ ), 4.78-5.14 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ -benzylisch), 7.30 (m, 15H, CH-aromatisch)

$^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta$  = 32.6 (+,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 36.7, 39.3 (+,  $\text{NHCH}_2$ ), 48.9 (+,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 57.0 (+,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 67.1, 67.4 (+,  $\text{CH}_2$ -benzylisch), 128.0, 128.2, 128.4, 128.5 (-, CH-aromatisch), 136.3, 136.6 (+,  $\text{C}_q$ -aromatisch), 156.0, 156.8 (+, CO), 170.6 (+, CO)

IR (KBr):  $\nu$  = 2934, 1695, 1472, 1425, 1247, 1208, 1185, 1131, 1000, 699  $\text{cm}^{-1}$

Schmelzp.: 37 °C

**10-(3-Guanidinopropylcarbamoyl-methyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäurebenzylester-nitrat (42)**



$\text{C}_{38}\text{H}_{51}\text{N}_9\text{O}_{10}$  [793.86 g/mol]

Unter Stickstoffatmosphäre werden 3.068 (4.45 mmol) des freienamins **41** in 6 ml DMF gelöst und 896 mg (4.45 mmol) des 3,5-Dimethylpyrazol-1-formamidiniumnitrats sowie 626  $\mu\text{l}$  (4.45 mmol) Ethyldiisopropylamin werden dazugegeben. Die Lösung wird 24 Stunden bei RT gerührt. Anschließend wird das Produkt mit Diethylether ausgefällt, wobei ein voluminöser weißer Niederschlag entsteht. Dieser wird abzentrifugiert und nochmal mit Ether gewaschen. Durch diese Etherfällung wird das Produkt von DMF, Hünigs Base sowie dem 3,5-Dimethylpyrazol befreit.

Ausbeute: 3.533 g (100 %) eines klaren, gelblichen Feststoffes.

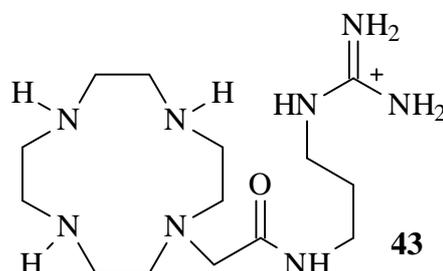
$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta$  = 1.6-1.7 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.45-3.63 (m, 22H,  $\text{NCH}_2$ ), 4.78-5.13 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ -benzylisch), 6.8-7.5 (m, 15H, CH-aromatisch)

$^{13}\text{C}$ -NMR: (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta = 28.7$  (+,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 36.4, 39.0 (+,  $\text{NHCH}_2$ ), 47.9, 48.6, 48.8 (+,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 58.2 (+,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 67.0, 67.3 (+,  $\text{CH}_2$ -benzylisch), 127.8, 127.9, 128.1, 128.4, 128.5 (-, CH-aromatisch), 136.3, 136.5 (+,  $\text{C}_q$ -aromatisch), 156.5, (+, CO), 157.2 (+,  $\text{C}_q$ -Guanidinium), 170.6 (+, CO)

IR (KBr):  $\nu = 3412, 2948, 1668, 1472, 1424, 1384, 1312, 1252, 1212, 1160, 696 \text{ cm}^{-1}$

Maldi:  $m/z$  (%): 732.7 ( $\text{M}^+$ , 100)

**N-(3-Guanidino-propyl)-2-(1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl)acetamid (43)**



$\text{C}_{14}\text{H}_{33}\text{N}_8\text{O}$  [329.47 g/mol]

100 mg (0.13 mmol) der Cbz-geschützten Guanidiniumverbindung **42** werden in 5 ml Methanol gelöst und im Stickstoffgegenstrom werden 10 mg Pd/C (10 %) zugegeben. Nachdem die Reaktion einen Tag hydriert wurde, wird der Katalysator abzentrifugiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wird in Wasser gelöst und durch einen basischen Ionenaustauscher und durch Reversed Phase-Chromatographie (Waters Sep-Pak C18 Cartridges, Elution mit Wasser/Methanol) gereinigt. Zur Entfernung der restlichen Mineralien wird die Verbindung in Miliporewasser gelöst und durch einen entsprechenden Filter (Firma Waters) gegeben.

Ausbeute: 42 mg (94 %) eines klaren, leicht gelblichen Feststoffes.

$^1\text{H}$ -NMR: (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , TSP- $\text{d}_4$ )  
 $\delta = 1.58$ -1.7 (quint, 2H,  $J = 7\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.62-2.9 (m, 16H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.02-3.18 (dt, 4H,  $J = 7 \text{ Hz}$ ,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.21 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ )

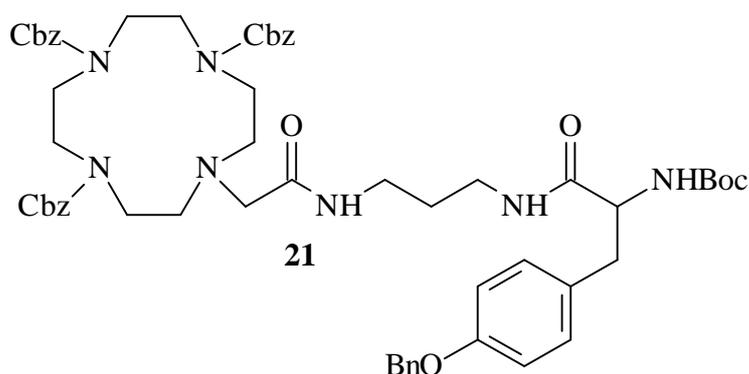
$^{13}\text{C}$ -NMR: (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , TSP- $\text{d}_4$ )  
 $\delta = 27.72$  (+,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 36.82, 38.87 (+,  $\text{NHCH}_2$ ), 43.3, 43.38, 45.01, 50.62 (+,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 56.65 (+,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ) 157.0 (+,  $\text{C}_q$ -Guanidinium), 173.78 (+, CO)

FAB-MS:  $m/z$  (%): 329 ( $M^+$ , 100)

$C_{14}H_{37}N_8OCl_5 \cdot 2H_2O$  (546.79): ber. C 30.75, H 7.56, N 20.49; gef. C 30.78, H 7.41, N 18.71

Schmelzpt.: (HCl-Salz) 170 °C Erweichung, 230 °C Zersetzung

**10-({3-[3-(4-Benzyloxyphenyl)-2-tert.-butoxycarbonylamino-propionylamino]-propylcarbamoyl}-methyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tri-benzylester (21)**



$C_{58}H_{71}N_7O_{11}$  [1041.52 g/mol]

Unter Stickstoffatmosphäre werden 750 mg (1.1 mmol) des dreifach Cbz-geschützten Cyclenderivates **40** in 3 ml Dimethylformamid gelöst. Zu der Lösung werden 147 mg (1.1 mmol) HOBt und 532 mg (1.0 mmol) des Aktivesters **10** gegeben. Nach einer Stunde Rühren bei RT ist die Reaktion vollkommen und die Lösung wird mit etwas Ethylacetat verdünnt. Dann wird die Phase zweimal mit jeweils ges.  $NaHCO_3$ -Lsg. und  $H_2O$  extrahiert. Nach dem Trocknen über  $Na_2SO_4$  wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer abgezogen. Anschließend erfolgt die säulenchromatographische Aufarbeitung (erst EE, später EE/MeOH). Ausbeute: 1.069 g (94 %) eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

$^1H$ -NMR: (400 MHz,  $CDCl_3$ , TMS)

$\delta$  = 1.35 (s, 9H,  $CH_3$ ), 1.49 (s, 2H,  $CH_2CH_2CH_2$ ), 2.25-3.6 (m, 25H,  $NCH_2$ ,  $CHCH_2$ ), 4.28 (brs, 1H, NH), 4.85-5.13 (m, 8H,  $CH_2$ -benzylich), 5.32 (brs, 1H, NH), 6.86 (d, 2H, CH-aromatisch,  $J = 8$  Hz), 7.1 (d, 2H, CH-aromatisch,  $J = 8$  Hz), 7.2-7.45 (m, 20H, CH-aromatisch)

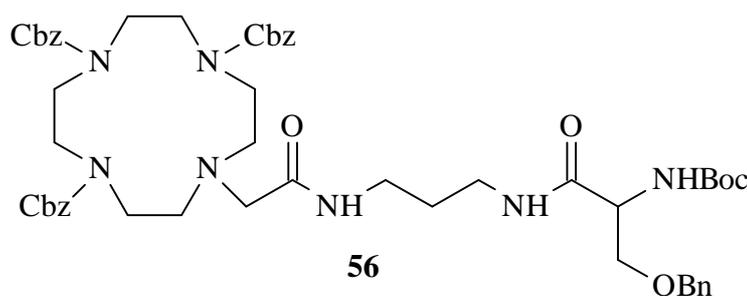
$^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

$\delta$  = 28.28 (-,  $\text{CH}_3$ ), 29.34 (+,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 35.78, 36.12, 37.87 (+,  $\text{NHCH}_2$ ), 47.7, 48.86 (+,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 56.13 (+,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 60.4 (-,  $\text{CH}$ ), 67.5, 69.95 (+,  $\text{CH}_2$ -benzyllisch), 80.05 (+,  $\text{C}_q$ - $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 114.88 (-,  $\text{CH}$ -aromatisch), 127.4, 127.91, 128.16, 128.47 (-,  $\text{CH}$ -aromatisch), 130.37 (-,  $\text{CH}$ -aromatisch) 136.27, 136.52, 137.0 (+,  $\text{C}_q$ -aromatisch), 156.5, (+,  $\text{C-OBn}$ ), 157.7 (+,  $\text{CO}$ ), 171.21, 171.99, 174.5 (+,  $\text{CO}$ )

IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu$  = 3431, 2999, 1694, 1511, 1473, 1422, 1368, 1244, 1162, 1046  $\text{cm}^{-1}$

FAB-MS:  $m/z$  (%): 1043 ( $\text{M}^+$ , 100), 587 (45), 307 (18), 154 (52)

**10-({3-[3-Benzoyloxy-2-tert.-butoxycarbonylamino-propionylamino]-propylcarbamoyl]-methyl}-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tribenzylester (56)**



**56**

$\text{C}_{52}\text{H}_{67}\text{N}_7\text{O}_{11}$  [965.49 g/mol]

Die Durchführung erfolgt analog dem Tyrosinderivat **21**. Ausbeute: 91 % eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

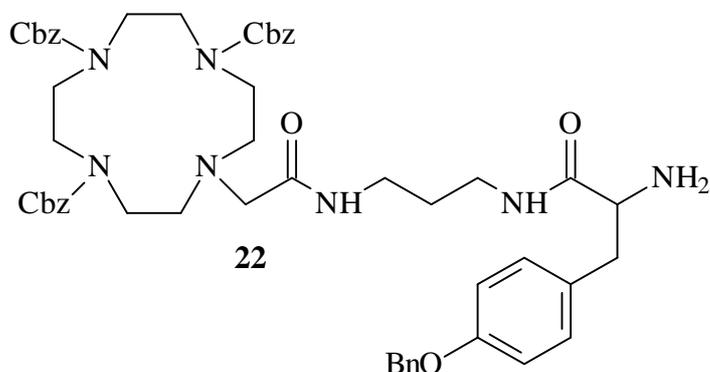
$\delta$  = 1.45 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 1.50-1.52 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.35-2.9 (m, 4H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.03-3.62 (m, 20H,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.88-3.94 (m, 1H,  $\text{CH}$ ), 4.36 (brs, 1H,  $\text{NH}$ ), 5.05 (s, 8H,  $\text{CH}_2$ -benzyllisch), 5.65 (brs, 1H,  $\text{NH}$ ), 7.2-7.48 (m, 20H,  $\text{CH}$ -aromatisch)

$^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

$\delta$  = 28.30 (-,  $\text{CH}_3$ ), 29.41 (+,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 35.7, 36.21 (+,  $\text{NHCH}_2$ ), 48.9 (br, +,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 54.47 (-,  $\text{CH}$ ), 67.46, 70.02 (+,  $\text{CH}_2$ -benzyllisch), 73.27 (+,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 80.11 (+,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 114.88 (-,  $\text{CH}$ -aromatisch), 127.73, 128.07, 128.42, 128.46, 128.53 (-,  $\text{CH}$ -aromatisch), 136.31, 136.57, 137.59 (+,  $\text{C}_q$ -aromatisch), 155.59, 156.10 (+,  $\text{CO}$ ), 171.19, 174.78 (+,  $\text{CO}$ )

FAB-MS:  $m/z$  (%): 967 ( $M^+$ , 100)

**10-({3-[2-Amino-3-(4-benzyloxyphenyl)-propionylamino]-propylcarbamoyl}-methyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tribenzylester (22)**



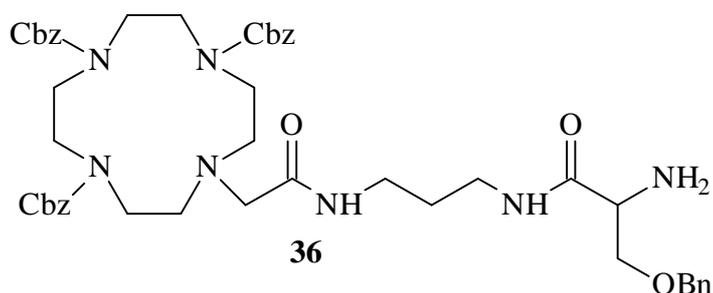
$C_{53}H_{63}N_7O_9$  [941.47 g/mol]

870 mg (0.835 mmol) des Cyclenderivates **21** werden in 13.2 ml Dioxan gelöst und anschließend mit 329  $\mu$ l konz. Schwefelsäure langsam versehen. Nach 90 Minuten scheint die Reaktion vollkommen zu sein. Zur Aufarbeitung wird die Lösung mit  $K_2CO_3$  auf pH 11-12 gebracht und weitgehend am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über  $Mg_2SO_4$  getrocknet und eingeeengt. Ausbeute: 788 mg (100 %) eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

$^1H$ -NMR: (200 MHz,  $CDCl_3$ , TMS)

$\delta$  = 1.5-1.63 (m, 2H,  $CH_2CH_2CH_2$ ), 2.5-3.6 (m, 25H,  $NCH_2$ ,  $CHCH_2$ ), 5.05 (s, 8H,  $CH_2$ -benzylisch), 6.9 (d, 2H,  $J$  = 8Hz, CH-aromatisch), 7.12 (d, 2H,  $J$  = 8Hz, CH-aromatisch), 7.18-7.46 (m, 20H, CH-aromatisch)

**10-((3-[2-Amino-3-benzyloxy-propionylamino]-propylcarbamoyl)-methyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tribenzylester (36)**



36

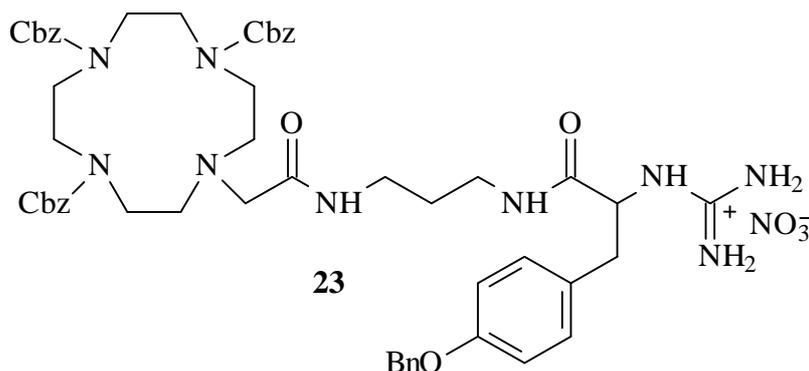
C<sub>47</sub>H<sub>59</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub> [865.44 g/mol]

Die Durchführung erfolgt analog der Vorschrift für das Tyrosinderivat **22**. Ausbeute: 100 % eines weißen Feststoffes.

<sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)

δ = 1.50-1.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.42-3.01 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>), 3.02-3.9 (m, 21H, NHCH<sub>2</sub>), 4.41 (brs, 1H, NH), 5.08 (s, 8H, CH<sub>2</sub>-benzylisch), 5.72 (brs, 1H, NH), 7.18-7.47 (m, 20H, CH-aromatisch)

**10-((3-[3-(4-Benzyloxyphenyl)-2-guanidinium-propionylamino]-propylcarbamoyl)-methyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tribenzylester-nitrat (23)**



23

C<sub>54</sub>H<sub>65</sub>N<sub>10</sub>O<sub>12</sub> [1045.52 g/mol]

Unter Stickstoffatmosphäre werden 349 mg (0.371 mmol) des freien Amins **22** in 500 µl DMF gelöst. Dann werden 75 mg (0.371 mmol) des 3,5-Dimethylpyrazol-1-formamidinium-nitrats sowie 52 µl (0.371 mmol) Ethyldiisopropylamin dazugegeben.

Die Lösung wird vier Tage<sup>115</sup> bei RT gerührt. Anschließend wird das Produkt mit Diethylether ausgefällt, wobei ein voluminöser weißer Niederschlag entsteht. Dieser wird abzentrifugiert und nochmal mit Ether gewaschen. Durch die Etherfällung wird das Produkt von DMF, Hünigs Base sowie dem 3.5-Dimethylpyrazol befreit. Ausbeute: 350 mg (90 %) eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

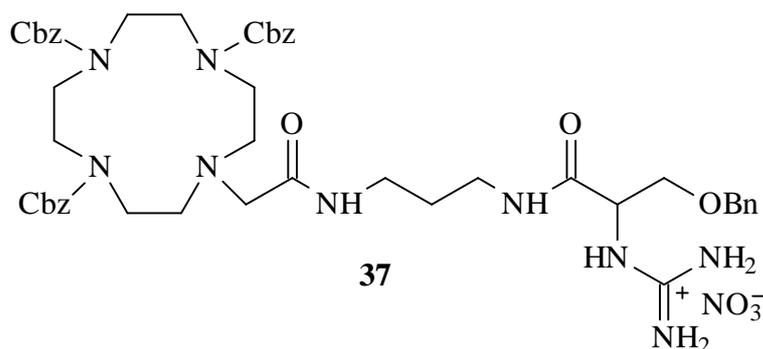
<sup>13</sup>C-NMR: (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS)

$\delta$  = 29.14 (+, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 36.8 (+, N-CH<sub>2</sub>), 38.0 (+, CH<sub>2</sub>CH), 47.8, 48.9 (+, br, N-CH<sub>2</sub>), 55.95 (-, CH), 67.5, 69.97 (+, CH<sub>2</sub>-benzylisch), 115.13 (-, CH-aromatisch), 127.5, 128.06, 128.47, 128.47, 128.6 (-, CH-aromatisch), 130.48 (-, CH-aromatisch), 136.38, 136.62, 136.95 (+, C<sub>q</sub>-aromatisch), 156.96 (+, COBn), 157.95 (+, C<sub>q</sub>-Guanidinium), 170.92, 171.3, 172.64 (+, CO)

<sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS)

$\delta$  = 1.45-1.6 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.5-3.65 (m, 25H, NCH<sub>2</sub>, CHCH<sub>2</sub>), 4.44 (brs, 1H, NH), 4.8-5.1 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-benzylisch), 6.83 (d, 2H, CH-aromatisch,  $J$  = 8.4Hz), 7.14 (d, 2H, CH-aromatisch,  $J$  = 8.4Hz), 7.2-7.4 (m, 20H, CH-aromatisch)

**10-({3-[3-Benzoyloxy-2-guanidinium-propionylamino]-propylcarbamoyl}-methyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tribenzylester-nitrat (37)**



C<sub>48</sub>H<sub>61</sub>N<sub>10</sub>O<sub>12</sub> [969.49 g/mol]

Die Durchführung erfolgt analog dem Tyrosinderivat **23**. Ausbeute: 85 % eines klaren Feststoffes.

<sup>115</sup> Aufgrund der größeren Verdünnung (900 $\mu$ l DMF, anstatt 500 $\mu$ l wegen schlechter Löslichkeit eingesetzt) verlängert sich die Reaktionszeit.

$^{13}\text{C}$ -NMR: (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

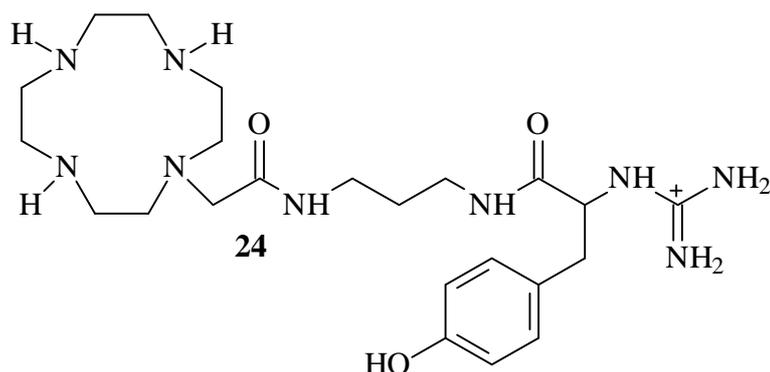
$\delta = 29.08$  (+,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 35.98, 36.51 (+,  $\text{NCH}_2$ ), 48.1, 49.07 (+, br,  $\text{N-CH}_2$ ), 55.69 (-,  $\text{CH}$ ), 67.42, 70.49 (+,  $\text{CH}_2$ -benzylisch), 73.47 (+,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 127.79, 127.95, 128.45, 128.49, 128.54 (-,  $\text{CH}$ -aromatisch), 136.32, 136.40, 137.5 (+,  $\text{C}_q$ -aromatisch), 156.13 (+,  $\text{CO}$ ), 157.55 (+,  $\text{C}_q$ -Guanidinium), 171.23, 171.31 (+,  $\text{CO}$ )

$^1\text{H}$ -NMR: (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

$\delta = 1.56$ -1.66 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.5-2.88 (m, 4H,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.08-4.06 (m, 21H,  $\text{NCH}_2$ ,  $\text{CHCH}_2\text{O}$ ), 4.48-4.56 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -benzylisch), 5.01 (s, 6H,  $\text{CH}_2$ -benzylisch), 7.2-7.42 (m, 20H,  $\text{CH}$ -aromatisch)

FAB-MS:  $m/z$  (%): 908 ( $\text{M}^+$ , 92), 866 (20), 391 (70), 307 (35), 154 (100)

**2-Guanidinium-3-(4-hydroxyphenyl)-N-[3-(2-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl-acetylamino)-propyl]-propionamid (24)**



$\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{N}_9\text{O}_3$  [492.34 g/mol]

413 mg (0.42 mmol) des Cbz-geschützten-Cyclenderivates **23** werden in 9.2 ml Methanol gelöst und unter Stickstoffgegenstrom werden 34 mg Pd/C (10 %) zugegeben. Nachdem die Reaktion zwei Tage hydriert wurde, wird der Katalysator abzentrifugiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt wird in Wasser gelöst und durch einen basischen Ionenaustauscher und durch Reversed Phase-Chromatographie (Waters Sep-Pak C18 Cartridges, Elution mit Wasser/Methanol) gereinigt.

Rohausbeute nach der Cartridge: 207 mg (100 %) eines klaren, gelblichen Feststoffes.

Weitere Reinigung über die Säulenchromatographie ( $\text{MeOH}/\text{NH}_3$ ): 116 mg (56 %)

$^1\text{H}$ -NMR: (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , TSP- $\text{d}_4$ )

$\delta = 1.4-1.52$  (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.7-3.23 (m, 23H, NCH<sub>2</sub>, CHCH<sub>2</sub>), 3.28 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>CO), 6.72 (d, 2H, CH-aromatisch,  $J = 8.4\text{Hz}$ ), 7.0 (d, 2H, CH-aromatisch,  $J = 8.4\text{Hz}$ )

<sup>13</sup>C-NMR: (100 MHz, D<sub>2</sub>O, TSP-d<sub>4</sub>)

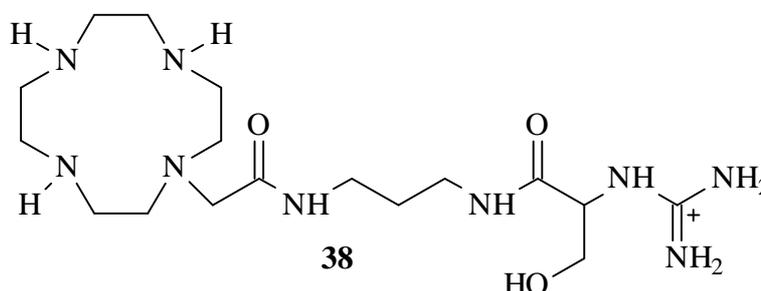
$\delta = 30.62$  (+, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 39.73 (+, CH<sub>2</sub>CH), 39.8, 40.05 (+, NH-CH<sub>2</sub>), 45.23, 45.6, 47.38, 52.6 (+, N-CH<sub>2</sub>), 58.23 (+, N-CH<sub>2</sub>CO), 59.66 (-, CH), 118.45 (-, CH-aromatisch), 130.03 (+, C<sub>q</sub>-aromatisch), 133.55 (-, CH-aromatisch), 157.78 (+, C<sub>q</sub>-Guanidinium), 159.32 (+, COH), 174.12, 175.92 (+, CO)

IR(CHCl<sub>3</sub>):  $\nu = 3686, 3606, 3043, 2399, 2359, 1602, 1521, 1417, 1230, 930\text{ cm}^{-1}$

Maldi: ( $\alpha$ -Cyanozimtsäure)

M = 492

**2-Guanidinium-3-hydroxy-N-[3-(2-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl-acetylamino)-propyl]-propionamid (38)**



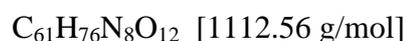
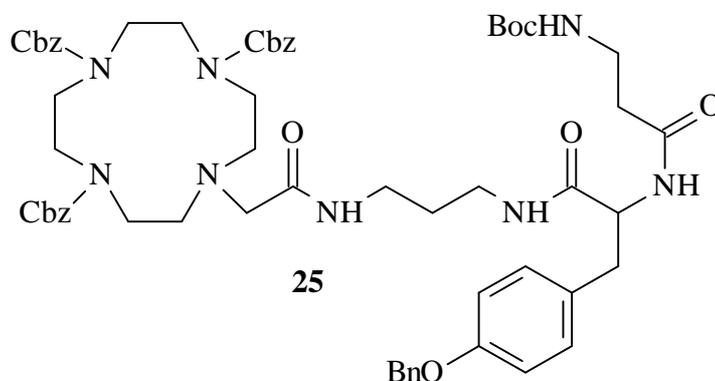
C<sub>17</sub>H<sub>38</sub>N<sub>9</sub>O<sub>3</sub> [416.31 g/mol]

Die Durchführung erfolgt analog dem Tyrosin. Eine Ausbeuteangabe ist nicht möglich, da das Produkt nicht rein erhalten werden konnte. Die <sup>13</sup>C-NMR- und <sup>1</sup>H-NMR Spektren geben das benzylierte Produkt wieder, wobei eine zweite Hydrierung oder Entschützung mit HBr/EtOAc nur Zersetzungsprodukte liefert.

Maldi: ( $\alpha$ -Cyanozimtsäure)

M = 507 (benzyliert), 416 (Produkt), 287 (Cyclen mit Seitenkette)

**10-((3-[3-(4-Benzyloxy-phenyl)-2-(3-tert.-butoxycarbonylamino-propionylamino)-propionylamino]-propylcarbamoyl-methyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tribenzylester (25)**



Unter Stickstoffatmosphäre werden 50 mg (0.265 mmol) Boc-geschütztes- $\beta$ -Alanin **5** in 1.1 ml Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung werden 32 mg (0.265 mmol) DMAP gegeben, und anschließend wird das Gemisch auf 0 °C gekühlt. Dann erfolgt die Zugabe von 55 mg (0.265 mmol) DCC. Nach 10 min. Rühren bei 0 °C werden 250 mg (0.265 mmol) des Cyclenderivates **22** dazugefügt. Durch das ausfallende Urethan wird die Lösung schnell trübe. Nach einem Tag wird das Urethan abfiltriert. Mit etwas Dichlormethan wird verdünnt, und die Lösung wird jeweils zweimal mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. und  $\text{H}_2\text{O}$  extrahiert. Nach dem Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird das Lösungsmittel unter verminderten Druck am Rotationsverdampfer abgezogen. Es folgt die säulenchromatographische Aufarbeitung (EE).

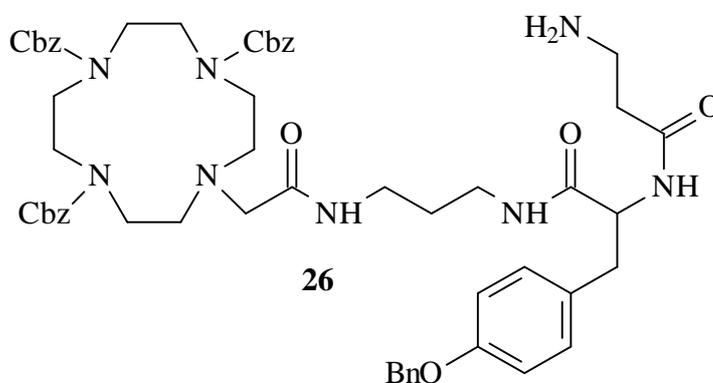
Ausbeute: 292 mg (99 %) eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

$^{13}\text{C}$ -NMR: (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

$\delta = 28.44$  (-,  $\text{CH}_3$ ),  $29.32$  (+,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ),  $33.94$  (+,  $\text{NHCOCH}_2$ ),  $35.96$  (+,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ),  $36.18$  (+,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ),  $37.6$  (+,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ),  $48.01$  (+, br,  $\text{NCH}_2$ ),  $54.62$  (-, CH),  $67.08$ ,  $67.5$ ,  $69.96$  (+,  $\text{CH}_2$ -benzylisch),  $79.83$  (+,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ),  $114.96$  (-, CH-aromatisch),  $127.46$ ,  $127.83$ ,  $128.48$   $129.0$  (-, CH-aromatisch),  $130.32$  (-, CH-aromatisch),  $136.78$ ,  $136.99$ ,  $137.18$  (+,  $\text{C}_q$ -aromatisch),  $156.09$  (+, COBn),  $157.77$  (+, CO),  $171.05$ ,  $172.14$  (+, CO)

$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta$  = 1.45 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 1.55-1.75 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.32-3.65 (m, 29H,  $\text{NCH}_2$ ,  $\text{CHCH}_2$ ,  $\text{CONHCH}_2$ ), 4.9-5.1 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ -benzylisch), 5.4 (brs, 1H, NH), 6.9 (d, 2H,  $J$  = 8.4Hz), 7.11 (d, 2H,  $J$  = 8.4Hz), 7.2-7.45 (m, 20H, CH-aromatisch)

**10-((3-[2-(3-Amino-propionylamino)-3(4-benzyloxyphenyl)-propionylamino]-propyl-carbamoyl)-methyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tribenzylester (26)**

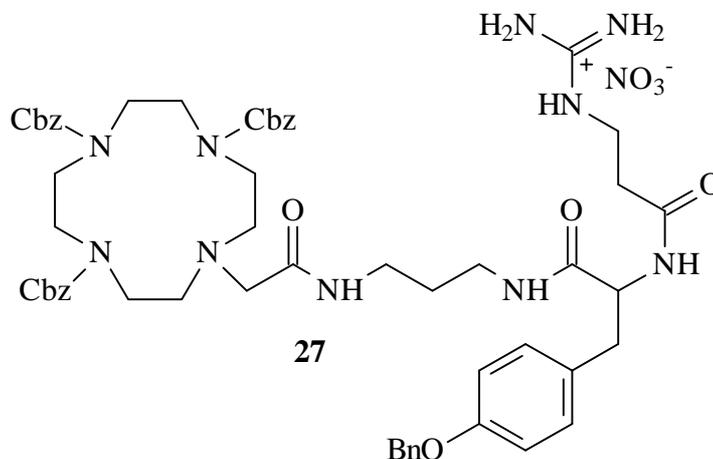


$\text{C}_{56}\text{H}_{68}\text{N}_8\text{O}_{10}$  [1012.51 g/mol]

292 mg (0.26 mmol) des Cyclenderivates **25** werden in 4.2 ml Dioxan gelöst und anschließend langsam mit 104  $\mu\text{l}$  konz. Schwefelsäure versehen. Nach 120 Minuten wird die Lösung zur Aufarbeitung mit  $\text{K}_2\text{CO}_3$  auf pH 11-12 gebracht und weitgehend am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingengt. Ausbeute: 266 mg (100 %) eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  
 $\delta$  = 1.58-1.69 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.40-3.61 (m, 29H,  $\text{NCH}_2$ ,  $\text{CHCH}_2$ ), 5.32 (s, 8H,  $\text{CH}_2$ -benzylisch), 6.92 (d, 2H,  $J$  = 8Hz, CH-aromatisch), 7.12 (d, 2H,  $J$  = 8Hz, CH-aromatisch), 7.20-7.47 (m, 20H, CH-aromatisch)

**10-((3-[3-(4-Benzyloxyphenyl)-2-guanidinium-propionylamino]-propionylamino)-propylcarbamoyl)-methyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäuretribenzylester-nitrat (27)**



27

 $C_{57}H_{71}N_{11}O_{13}$  [1117.52 g/mol]

Unter Stickstoffatmosphäre werden 266 mg (0.263 mmol) des freien Amins **26** in 370  $\mu$ l DMF gelöst, und 53 mg (0.263 mmol) des 3.5-Dimethylpyrazol-1-formamidiniumnitrats sowie 37  $\mu$ l (0.263 mmol) Ethyldiisopropylamin werden dazugegeben. Die Lösung wird sechs Tage bei RT gerührt. Anschließend wird das Produkt mit Diethylether ausgefällt, wobei ein voluminöser weißer Niederschlag entsteht. Dieser wird abzentrifugiert und nochmal mit Ether gewaschen. Durch die Etherfällung wird das Produkt von DMF, Hünigs Base sowie dem 3.5-Dimethylpyrazol befreit. Als weitere Reinigung wird eine Säulenchromatographie (MeOH/NH<sub>3</sub>) vorgenommen.

Ausbeute: 171 mg (62 %) eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

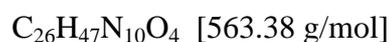
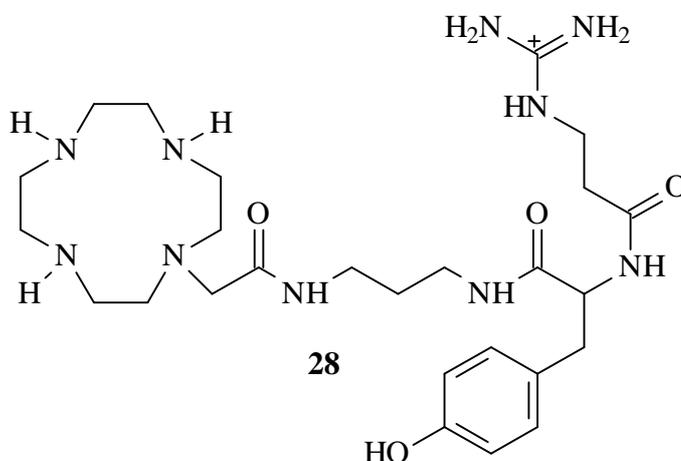
<sup>13</sup>C-NMR: (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)

$\delta$  = 30.07 (+, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 35.65 (+, NHCOCH<sub>2</sub>), 36.57 (+, CH<sub>2</sub>NHCO), 37.64 (+, CH<sub>2</sub>CH), 38.28 (+, CH<sub>2</sub>NHCO), 48.65 (+, br, NCH<sub>2</sub>), 56.69 (-, CH), 68.14, 69.87 (+, CH<sub>2</sub>-benzylich), 115.94 (-, CH-aromatisch), 129.16, 130.03, 130.32 (-, CH-aromatisch), 131.36(-, CH-aromatisch), 137.56, 138.80 (+, C<sub>q</sub>-aromatisch), 157.89 (+, COBn), 158.79 (+, C<sub>q</sub>-Guanidinium), 159.12 (+, CO), 172.80, 173.74 (+, CO)

IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu$  = 2999, 1686, 1511, 1473, 1422, 1374, 1245, 1134 cm<sup>-1</sup>

FAB-MS:  $m/z$  (%): 1057 (M<sup>+</sup>, 15), 1014 (17), 587 (10), 307 (100)

**2-(3-Guanidinium-propionylamino)-3-(4-hydroxyphenyl)-N-[3-(2-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl-acetylamino)-propyl]-propionamid (28)**



171 mg (0.16 mmol) des Cbz-geschützten-Cyclenderivates **27** werden in 3.7 ml Methanol gelöst, und unter Stickstoffgegenstrom werden 15 mg Pd/C (10 %) zugegeben. Nachdem drei Tage hydriert wurde, wird der Katalysator abzentrifugiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wird in Wasser gelöst und durch einen basischen Ionenaustauscher sowie durch Reversed Phase-Chromatographie (Waters Sep-Pak C18 Cartridges, Elution mit Wasser/Methanol) gereinigt. Als weitere Reinigung wird eine Säulenchromatographie (MeOH/NH<sub>3</sub>) vorgenommen.

Ausbeute: 48 mg (53 %) eines klaren, leicht gelblichen Feststoffes.

<sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, D<sub>2</sub>O, TSP-d<sub>4</sub>)  
1.51-1.59 (m, 2H), 2.56 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz), 2.92-3.5 (m, 26H), 4.44 (t, 1H), 6.85 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.15 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz)

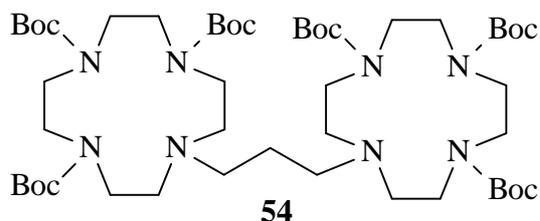
<sup>13</sup>C-NMR: (100 MHz, D<sub>2</sub>O, TSP-d<sub>4</sub>)  
30.66 (+, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 37.32 (+, CH<sub>2</sub>CO), 39.33 (+, CH<sub>2</sub>-Guanidinium), 39.59 (+, CH<sub>2</sub>CH), 40.3, 45.18 (+, CH<sub>2</sub>NH), 45.89, 46.53, 52.79 (+, NCH<sub>2</sub>), 58.23 (+, NCH<sub>2</sub>CO), 58.68 (-, CH), 118.53, (-, CH-aromatisch), 131.23 (+, C<sub>q</sub>-aromatisch), 133.61 (-, CH-aromatisch), 157.55 (+, COH), 159.82 (+, C<sub>q</sub>-Guanidinium), 175.94, 176.05, 176.19 (+, CO)

IR(CHCl<sub>3</sub>):  $\nu = 3687, 3606, 3037, 2360, 2341, 1602, 1521, 1419, 1230, 930 \text{ cm}^{-1}$

Maldi: ( $\alpha$ -Cyanozimtsäure)

M = 564

**10-[3-(1,4,7-Tris-tert.-butoxycarbonyl-1,4,7,10-tetraazacyclododec-10-yl)-propyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäure-tri-tert.-butylester (54)**



$C_{50}H_{93}N_8O_{12}$  [997.69 g/mol]

650 mg (1.4 mmol) des Boc-geschützten Cyclens **3** und 64 mg (1.5 mmol)  $LiOH \cdot H_2O$  werden in 10 ml Acetonitril im Kolben vorgelegt und gelöst. Dann werden 147  $\mu$ l (1.45 mmol) 1,3-Dibrompropan dazu gespritzt. Die Lösung wird dann vier Tage auf 80 °C erhitzt. Die DC-Kontrolle zeigt, daß alles vollständig abreagiert ist, wobei ein weiteres Nebenprodukt (undefinierbar) entstanden ist. Die Reaktion wird durch Waschen mit  $NaHCO_3$  und  $H_2O$  aufgearbeitet. Nach dem Trocknen über  $Na_2SO_4$  wird am Rotationsverdampfer das restliche Lösungsmittel abgezogen. Die säulenchromatographische Reinigung mit EE/PE 2:1 liefert 230 mg (17 %) eines leicht gelblichen Feststoffes und 420 mg Nebenprodukt als weißen schaumartigen Feststoff.

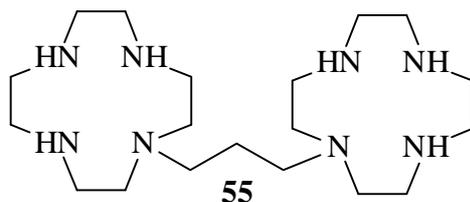
$^1H$ -NMR: (400 MHz,  $CDCl_3$ , TMS)

1.43-1.5 (ds, 54H,  $CH_3$ ), 2.0-2.05 (m, 2H,  $CH_2CH_2CH_2$ ), 2.6-2.75 (m, 8H,  $NHCH_2$ ), 3.2-3.6 (m, 28H,  $NHCH_2$ ).

$^{13}C$ -NMR: (100 MHz,  $CDCl_3$ , TMS)

21.05 (+,  $CH_2CH_2CH_2$ ), 28.55 (-,  $CH_3$ ), 31.83 (+,  $CH_2$ ), 47.89, 50.4 (br, +,  $NHCH_2$ ), 79.36 (-,  $C(CH_3)_3$ ), 155.42, 155.78, 156.24 (+, CO)

FAB-MS:  $m/z$  (%): 996 ( $M^+$ , 7), 594 (14), 473 (100), 372 (22), 173 (56)

**1-[3-(1,4,7,10-tetraazacyclododec-10-yl)-propyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (55)**


$C_{19}H_{44}N_8$  [384.37 g/mol]

Von dem geschützten Dimer **54** werden 160 mg (0.16 mmol) in einem Kolben vorgelegt und in 6 ml Dioxan gelöst. Dann werden 200  $\mu$ l konz.  $H_2SO_4$  dazugespritzt. Nach einem Tag Rühren bei RT kann aufgearbeitet werden. Zur Aufarbeitung wird die Lösung mit  $K_2CO_3$  auf pH 11-12 gebracht und weitgehend am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über  $Mg_2SO_4$  getrocknet und eingengt. Zur vollständigen Reinigung erfolgt die Verwendung des basischen Ionenaustauschers und die Reversed Phase-Chromatographie (Waters Sep-Pak C18 Cartridges, Elution mit Wasser/Methanol). Ausbeute: 62 mg (100 %) eines zähen bräunlichen Feststoffes.

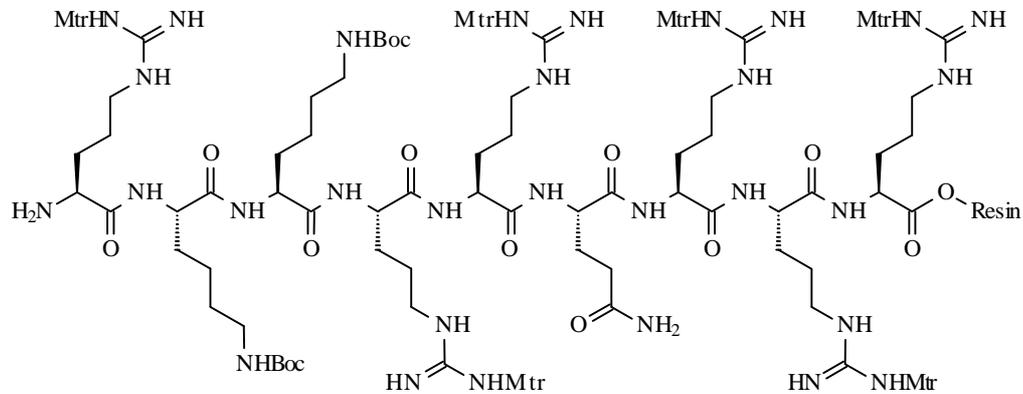
$^1H$ -NMR: (400 MHz,  $D_2O$ )  
 2.09-2.2 (m, 2H,  $CH_2CH_2CH_2$ ), 2.88-2.98 (m, 4H,  $NHCH_2$ ), 3.18-3.62 (m, 32H,  $NHCH_2$ ).

$^{13}C$ -NMR: (100 MHz,  $D_2O$ )  
 19.66 (+,  $CH_2CH_2CH_2$ ), 42.4, 42.54, 43.03 (+,  $NHCH_2$ ), 49.61, 51.9 (+,  $NHCH_2$ )

IR(Kap. Film):  $\nu = 3437, 3025, 1637, 1179, 1051, 873 \text{ cm}^{-1}$

### 7.3 Festphasenpeptidsynthese der Peptide

am Beispiel des Neunmer-Peptides



$\text{NH}_2\text{Arg(Mtr)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Mtr)-Arg(Mtr)-Gln-Arg(Mtr)-Arg(Mtr)-Arg(Mtr)-Resin}$

Die Peptidfestphasensynthese wird nach dem “Du Pont RaMPS<sup>TM</sup> Multiple Peptide Synthesis System, Instruction Manual“ durchgeführt.

Gekuppelt wird an einem Wang-Resin (*para*-Benzyloxybenzylalkohol), das bereits die erste Mtr-geschützte Aminosäure (Arginin) trägt. Die Synthese wird in einem Scheidetrichter mit eingebauter Glasfritte durchgeführt. Zur Reinigung werden die flüssigen Phasen mit einem Wasserstrahlvakuum aus dem Reaktionsgefäß gesaugt. Zu Beginn wird die Fmoc-geschützte  $\alpha$ -Aminofunktion der terminalen Aminosäure mit 50 % (v/v) Piperidin/DMF entschützt und mit der nächsten auch an der Aminofunktion Fmoc-geschützten Aminosäure gekuppelt. Diese Aminosäure wird jedoch als Aktivester (Pentafluorphenyl- bzw. 1-Hydroxybenzotriazol-Ester) in 2.5-fachem Überschuß eingesetzt. Der 1-Hydroxybenzotriazol-Ester wird bereits vor der Kupplung unter Verwendung des Kupplungsreagenzes N, N'-Diisopropylcarbodiimid gebildet. Die Vollständigkeit jeder Kupplung wird mit dem Kaiser (Ninhydrin)-Test<sup>78</sup> überprüft. Zwischendurch wird das Resin immer wieder mit DMF und Methanol gewaschen. Weitere Angaben zur Synthese befinden sich in der folgenden Tabelle.

	Mengenangabe
Resin-Fmoc-Arg(Mtr)	0.2 mmol (363.6 mg)
Entschützen (10 min) 50 % Piperidin/DMF	6 ml
Kupplung eines Hobt-Esters (2h)	
Fmoc-Arg(Mtr)OH/Fmoc-Lys(Boc)OH	0.5 mmol
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2 ml
Hobt (0.5 M in DMF)	0.5 mmol (1 ml)
DIC	0.5 mmol (78 µl)
DMF	3 ml
Kupplung des Opfp-Esters (2 h)	
Fmoc-GlnOPfp	0.5 mmol
Hobt (0.5 M in DMF)	0.4 ml
DMF	6 ml
Kupplung des Cyclenderivates (2 h)	
Resin-Peptid-NH <sub>2</sub>	0.1 mmol
Cyclenderivat 12	0.25 mmol
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 ml
Hobt (0.5 M in DMF)	0.5 ml
DIC	39 µl
DMF	1.5 ml
Abspalten vom Resin/Entschützen	
TFA	5.7 ml
Thioanisol	270 µl
1.2-Ethandithiol	30 µl

Die Ausbeute nach der Kupplung mit dem Cyclenderivat **45** beträgt 79 %. Die Entschützung wurde zweimal durchgeführt, da sich nicht alle Boc-Schutzgruppen gleichzeitig entfernen ließen. Zur Reinigung wird das Peptid in Diethylether gefällt, abzentrifugiert und erneut zweimal in Ether gewaschen. Durch anschließendes Gefriertrocknen erhält man ein weißes Pulver.

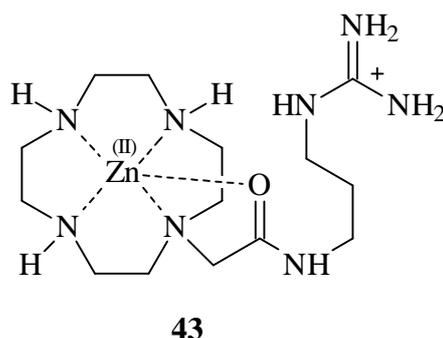
Ein MALDI-MS ( $\alpha$ -Cyanozimtsäure) ( $m/z$ ): 1553 [ $M^+$ ] bestätigt die Reinheit des Produktes.

Analog dieser Versuchsbeschreibung wurde die Sechsmers- und die 1,4,7-Triazacyclononan Peptidsynthese durchgeführt. Ebenso konnten die Peptide ohne Cycleneinheit hergestellt werden. Sie wurden ohne den letzten Kupplungsschritt entschützt und vom Resin getrennt.

## 7.4 Kinetische Messungen

### 7.4.1 Durchführung der Titration

Die Bedingungen für die Bestimmung der Protolyse- und Komplexstabilitätskonstanten der Verbindung **43** sind der Tabelle zur Abb. 7.1 angegeben.



	Konzentrationen [M]
Verbindung 43	0.002
Zn(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.002
TEAOH	0.1
HClO <sub>4</sub> /TEAP	0.01/0.9
Ionenstärke	0.1

**Abb. 7.1:** Tabelle über die Konzentrationen der Titrationslösungen zur Bestimmung von Protolyse- und Komplexstabilitätskonstanten

Zu Beginn jeder Meßreihe wird das Millipore Wasser, das für das Ansetzen der Lösungen benötigt wird, entgast. Dazu wird es 1 h auf Siedetemperatur erhitzt und unter Argonatmosphäre auf RT abgekühlt.

Zum Einstellen der 0.1 M TEAOH-Lösung wird zuvor die 0.01 M HClO<sub>4</sub>- und 0.09 M TEAP-Lösung mit einer 0.1 M NaOH-Lösung (Titrisol Maßlösung von der Firma Merck) eingestellt. Die Ionenstärke beträgt 0.1. Gemessen wird mit einer kombinierten pH-Glaselektrode, die vor jedem Gebrauch mit Puffern (pH 3, 7 und 9) geeicht wird.

Zur Bestimmung der Protolyse- und Komplexstabilitätskonstanten werden 0.2 mmol der Verbindung **43** als HCl-Salz im äquimolaren Verhältnis mit Zn(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O in 100 ml

0.01 M HClO<sub>4</sub>-Lösung gelöst. Für jede Messung werden 20 ml der 2 mM Lösung entnommen und in ein Metronom-Titriergefäß mit Rührer gegeben. Die Zelle wird, nachdem die Elektrode und der Dosierer in die Lösung tauchen, fest verschlossen und mit Argon gespült. Ein weiterer Argonballon sorgt für ständigen Argon-Überdruck in dem Gefäß. Die Titration erfolgt dann mit einer automatischen 5 ml Bürette der Firma Metronom (Dosimat 716) in konstanten Zeitintervallen (1-5 min) mit einem Inkrement von 0.05 ml 0.1 TEAOH. Eine einzelne Messung dauert demnach 1.67 bis 8.33 Stunden. Für die Komplexstabilitätskonstanten wird die längere Meßzeit gewählt, da die Gleichgewichtseinstellung länger dauert als bei der Säure-Base-Titration.

Die Auswertung der Protolyse- und Komplexstabilitätskonstanten erfolgt mit dem Computerprogramm BEST und wird für ca. fünf Messungen pro Wert herangezogen. Dabei werden nur pH-Werte von pH 2 bis pH 11 berücksichtigt, da in diesem Bereich sich noch kein Niederschlag bemerkbar gemacht hat.

#### 7.4.2 Umesterung von HPNPP durch Zn(II)-Cyclenkomplexe in Wasser

Die Bedingungen der kinetischen Messungen in Wasser sind in der Tabelle der Abb. 7.2 angegeben.

Für die Hydrolysen wurde ausschließlich nur Millipore Wasser verwendet.

Konzentrationen [mM]	
Cyclen-Komplex	10
HPNPP	0.2
Puffer (Tris/HEPES)	100
Ionenstärke (KCl)	0.5M
pH-Wert	variabel (6.5-8.3)
Temperatur	55 °C

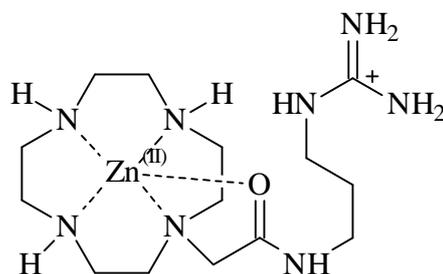
**Abb. 7.2: Bedingungen der kinetischen Messungen in Wasser für Meß- und Referenzlösung bei der Hydrolyse von HPNPP mit den Zn(II)-Cyclenkomplexen. Die Referenzlösungen enthalten keinen Komplex**

Zur Hydrolyse des Phosphates werden die Puffer-Stammlösungen (100 mM Hepes-Säure bzw. Tris und 0.5 M KCl) angesetzt, die Meßlösung mit dem Komplex (10 mM) versehen und auf den gewünschten pH-Wert mit NaOH-Lösung eingestellt. Der Komplex setzt sich aus den entsprechenden Cyclenderivaten und der äquimolaren Menge  $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  zusammen. Die eingestellten Lösungen (2 ml) werden in Quarzküvetten ( $l = 1 \text{ cm}$ ) überführt, wobei nur die Meßküvette den Komplex enthält. Die beiden Küvetten werden in einem Wasserbad ca. 10 Minuten auf  $55 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  temperiert. Dann werden 20  $\mu\text{l}$  der HPNPP-Stammlösung (0.02 M) mit einer Eppendorf Mikroliterspritze in beide Küvetten gegeben (Endkonzentration: 0.2 mM HPNPP), die Lösungen mit der Spitze gut durchmischt und die Küvetten mit einem Teflondeckel verschlossen. In einem Abstand von 3-5 Minuten wird dann über einen Zeitraum von 1.5 Stunden bei 400 nm ( $\lambda_{\text{max}}$  von *para*-Nitrophenolat) die Absorption der Meßlösung gegen die der Referenzlösung gemessen. Am Ende jeder Meßreihe wird noch einmal der pH-Wert der beiden Lösungen überprüft ( $\Delta\text{pH} \leq 0.02$ ). Für jede Verbindung werden in der Regel zwei Meßreihen aufgenommen (Reproduzierbarkeit  $\pm 10 \%$ ).

Die Hintergrundhydrolyse liegt im Bereich 6.6 - 8.5 zwei bis drei Zehnerpotenzen unter der der Komplexe. Sie wird deshalb nicht weiter berücksichtigt.

#### 7.4.3 Umesterung von HPNPP durch den Zn(II)-Cyclen-Komplex (43)

Die Konzentrationen und pH-Werte in der Meß- und Referenzlösung sind der Tabelle 7.2 zu entnehmen.



43

Wie unter 7.3 beschrieben, wird die Verbindung als HCl-Salz bei den Hydrolysen eingesetzt. Die mit NaOH-Lösung eingestellten exakten pH-Werte können der Tabelle in

Abb. 5.6 Kapitel 5 entnommen werden, wobei HEPES für die Einstellung der pH-Werte 6.53-7.8 und Tris für pH 8.2 verwendet wurde.

#### 7.4.4 Umesterung von HPNPP durch die Zn(II)-Cyclenkomplexe 15, 20 und 24 in Wasser

Die Verbindungen 15, 20 und 24 werden nicht als HCl-Salz eingesetzt. Aufgrund der hohen hygroskopischen Eigenschaft der Cyclenderivate sind die Hydrolysen mit dem Rohprodukt mit einer höheren Fehlerquote behaftet als die mit dem eingesetzten HCl-Salz. Die Durchführung und Konzentrationsangaben sind der Tabelle in Abb. 7.2 zu entnehmen. Die Proben für die pH-Werte 6.5, 7 und 7.5 werden mit HEPES eingestellt. Schwierigkeiten ergeben sich bei der Hydrolyse mit pH-Werten über pH 7.5. Bei der Bildung des Zink-Cyclen-Komplexes fällt ein Niederschlag aus, bei dem es sich vermutlich um  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  handelt.

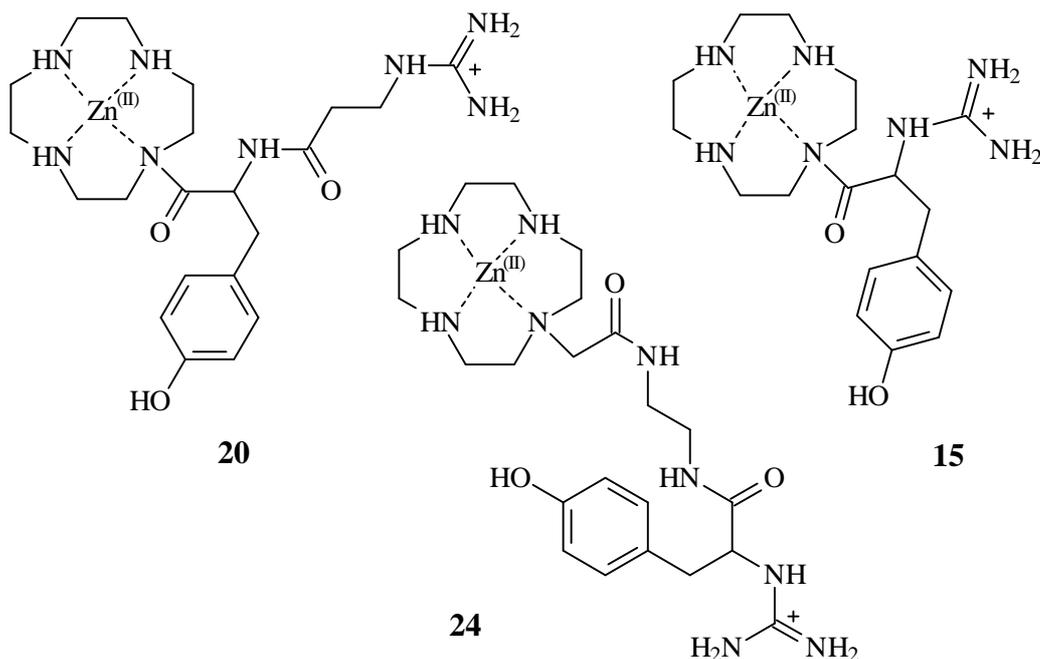


Abb. 7.3: Drei verschiedene Zn(II)-Cyclenkomplexe, die auf ihre hydrolytische Aktivität mit HPNPP getestet werden

### 7.5 Spaltung des Dinucleotids UpU durch das Cyclenderivat (43)

Die Bedingungen der kinetischen Messungen sind in Tabelle 7.4 angegeben.

	Konzentrationen [mM]
Zn(II)-Komplex	10
UpU	0.1
Puffer	50

**Abb. 7.4:** Tabelle über die Bedingungen der kinetischen Messung zur Spaltung von UpU durch den Zn(II)-Cyclen-Komplex (43)

Für jeden Hydrolyseversuch werden drei Stammlösungen (RNase-frei) benötigt:

11.1 mM des Komplexes in einem 0.0556 M Puffer mit eingestelltem pH-Wert

55.6 mM Pufferlösung des gleichen pH-Wertes

1.0 mM Lösung des Dinucleotides UpU

Eine Lösung aus 0.0111 M Lösung des Komplexes **43** wird durch eine 0.0556 M HEPES Lösung (pH 7-7.3) hergestellt. In der Lösung befinden sich 28.35 mg des HCl-Salzes der Verbindung **43**, 20.7 mg  $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  und 66.25 mg HEPES in 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und mit NaOH-Lösung auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt. Für die Referenzprobe wird eine ebenfalls 0.0556 M Lösung aus HEPES (1.324 g/100ml) angesetzt und mit HCl-Lösung auf pH 7-7.3 gebracht. Zu beiden Lösungen gibt man UpU-Stammlösung (1 mg UpU in 1.76 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Für eine Messung werden 0.9 ml der Komplexlösung und 0.1 ml der UpU-Lösung in einem 1.5 ml HPLC-Probengläschen mit Teflonseptum gemischt und im Wasserbad auf 60 °C temperiert. Die Referenzprobe wird aus 0.9 ml der Pufferlösung und 0.1 ml der UpU-Lösung angesetzt und ebenfalls auf 60 °C temperiert.

In bestimmten Zeitabständen (bis zu mehreren Tagen) werden die Proben mittels RP-18 HPLC untersucht. Eine qualitative Analyse ist in Kapitel 5 beschrieben.

## 8. Experimenteller Teil, Gelelektrophorese

### 8.1 Allgemeiner Teil

#### 8.1.1 Inaktivierung von RNAsen

Zur Vermeidung der Kontamination durch potentiell vorhandene RNAsen in Puffern und Lösungen sowie Eppendorf- Hütchen und Spitzen werden gesonderte Maßnahmen getroffen. Millipore Wasser und alle Puffer und Lösungen werden durch 24 stündige Inkubation mit 0.1 % DEPC und anschließendem Autoklavieren<sup>116</sup> vorbehandelt. Die Apparaturen (nur benutzte Flächen) werden vor dem Einsatz mit Ethanol abgerieben.

#### 8.1.2 Quantifizierung von RNA

Die von der Firma MWG erhaltene RNA muß vor dem Einsatz geschützt werden. Die Quantifizierung der RNA erfolgt über eine Absorptionsmessung bei 260 nm. Nach Gleichung (1) ist:

$$\text{Anzahl der } \mu\text{mole} = \text{Gesamt OD}_{260} / (10 \times \text{Anzahl der Basen im Oligo}) \quad (1)$$

Eine  $\text{OD}_{260}$  Einheit (=  $A_{260}$ ) ist die Menge, die in 1 ml Wasser gelöst, im Spektralphotometer (1cm Küvette) bei 260 nm einen Absorptionswert von 1.0 erzeugt.

Eine  $\text{OD}_{260}$  Einheit entspricht 30-35  $\mu\text{g}$  DNA.

#### 8.1.3 Behandlung der RNA

Die von der Firma Genset erhaltene und auch die quantifizierte RNA werden in autoklaviertem Wasser gelöst und renaturiert (bei 80 °C 5 min. erwärmen und langsam auf RT abkühlen lassen). Die RNA bleibt über einige Wochen bei - 20 °C im Gefrierschrank stabil. Bei jedem Gebrauch sollte sie möglichst kühl gelagert werden.

---

<sup>116</sup> Zum Autoklavieren wurde ein Schnellkochtopf verwendet. Seine Effektivität wurde bei jedem Einsatz mit Autoklavierpapier nachgewiesen.

#### 8.1.4 Die Elektrophorese mit einem 20 %-igem denaturierenden Polyacrylamidgel

Das Gel wird aus 21 g Harnstoff, 10 ml 5x TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer), 25 ml 40 % (w/v) Polyacrylamidlösung (19/1 Bisacrylamid) und 23µl TMEDA hergestellt. Durch leichtes Erwärmen und Rühren im Rotationsverdampfer-Wasserbad löst sich der Harnstoff schneller, wobei aufgrund der leichten Polymerisierbarkeit darauf geachtet werden sollte, daß die Lösung nur wenig gerührt wird. Kurz bevor das Gel in die Kammer des Gelträgers gegossen wird, werden 300 µl APS als Polymerisationsstarter zugegeben. Mit der umgekehrten Seite des Kammes wird das frisch gegossene Gel geglättet. Frühestens nach drei Stunden kann das Gel beladen werden. Die Kammer wird dann mit einem Liter 1x TBE gefüllt und das Gel wird bei 55 W konstant auf 50 °C erwärmt, bevor die Proben aufgetragen werden können. Die aufzutrennenden Proben werden in kleine Geltaschen (slots) von wenigen Millimetern Durchmesser pipettiert. Das Auftrennen der RNA erfolgt ebenso bei 55 W. Zur Erkennung des Laufverhaltens der RNA-Fragmente wird nach der Reaktion der Proben loading Puffer zugefügt. Dieser stoppt die Reaktion und ist aufgrund des Formamids auch für eine klare Aufspaltung der Fragmente zuständig. Zusätzlich sorgt das Formamid durch seine große Dichte für ein gutes Absacken der Proben, so daß sie schneller in das Gel einziehen können. Neben dem Formamid liegen im loading Puffer noch zwei Farbstoffe, Bromphenol-Blau und Xylencyanol, vor. Der Verlauf der Elektrophorese wird somit kontrolliert und die Elektrophoresefront markiert. Nach der Zugabe des loading Puffers werden die Proben 2 min. bei 80 °C gehalten und dann sofort auf Eis gelegt. Diese Methode dient zur perfekten Auftrennung der RNA-Bruchstücke und sorgt für klare Spots.

<b>20 % denat. Gel</b>	21 g Harnstoff
	25 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung (19:1)
	10 ml TBE (5x)
	23 µl TMEDA
	300 µl APS

### 8.1.5 Darstellung der Puffer<sup>117</sup>

Puffer	Substanzen in g und ml Angabe
5x TBE	54 g Tris 27.5 g Borsäure 20 ml EDTA-Lsg 0.5 M auf 1 Liter mit H <sub>2</sub> O auffüllen
APS	1 g Ammoniumperoxodisulfat auf 10 ml Wasser
Loading Puffer	1 mg Bromphenolblau 1 mg Xylencyanol FF 20 µl EDTA auf 1 ml mit Formamid auffüllen
1x TBE	200 ml 5x TBE mit H <sub>2</sub> O auf 1 Liter auffüllen
0.5 x TBE	50 ml 5x TBE mit H <sub>2</sub> O auf 500 ml auffüllen

**Tabelle 8.1: Darstellung der Puffer für die Zubereitung der Elektrophorese**

### 8.1.6 Das Northern Blot Verfahren

Das Northern Blot Verfahren beinhaltet die Übertragung der RNA auf eine positive Nylon-Membran (Nytran Plus 0.45 µm der Firma Schleicher & Schuell). Das Gel wird nach der Elektrophorese auf RT abgekühlt und von der einen Platte auf ein Stück Blotting Papier (GB 003) übertragen, welches zuvor mit 0.5 x TBE befeuchtet wurde. Mit einem trockenem Stück Blotting Papier wird das Gel gerade gestrichen. Erst nachdem alle Luftblasen entfernt wurden, kann die hochempfindliche Nylon-Membran (Die Bindungskapazität von Nucleinsäuren liegt bei 400 µg/cm<sup>2</sup>) auf das Gel gelegt werden. Jeweils darüber und darunter werden vorsichtig vier Schichten mit 0.5 x TBE befeuchtetes Blotting Papier gelegt. Der Sandwich wird dann in einer Blotting Apparatur (Sammy Dry von Schleicher & Schuell) 45 min. bei 400 mA geblottet. Dieser Zeitraum hat sich für den

<sup>117</sup> Die Substanzen werden von den Firmen Biomol, Serva und Sigma bestellt.

vollständigen Transfer der RNA bei mindestens 10 x 20 cm<sup>2</sup> Sandwichen als effektiv herausgestellt. Zum Fixieren wird die Membran anschließend 30 min. bei 80 °C erwärmt. Danach kann sie entweder gleich weiter behandelt werden oder in Frischhaltefolie gepackt im Kühlschrank 1-2 Tage verweilen.

### 8.1.7 Detektionsprotokoll für Biotin-markierte RNA auf Nylon-Membran

Das folgende Protokoll stammt von der Firma Ambion für Biotin-markierte RNA auf positiver Nylon-Membran. Alle Stufen werden bei RT durchgeführt.

- |            |             |  |
|------------|-------------|--|
| 1. Waschen | 2 x 5 min.  | Wash Puffer (1 ml /cm <sup>2</sup> )   |
| 2. Waschen | 2 x 5 min.  | Blocking Puffer (0.5 ml /cm <sup>2</sup> )   |
| 3. Waschen | 30 min.     | Blocking Puffer (1 ml /cm <sup>2</sup> )   |
| 4. Waschen | 30 min.     | Blocking Puffer+Streptavidin Alkalische Phosphatase<br>(10 ml + 1 µl/100 cm <sup>2</sup> ) |
| 5. Waschen | 15 min.     | Blocking Puffer (0.5 ml /cm <sup>2</sup> )   |
| 6. Waschen | 3 x 15 min. | Wash Puffer (1 ml /cm <sup>2</sup> )   |
| 7. Waschen | 2 x 2 min.  | Assay Puffer (0.5 ml /cm <sup>2</sup> )  |

Zur anschließenden Fixierung der Membran wird sie in eine Plastikbox überführt, die abwechselnd, je nach Größe der Membran, mit der im Protokoll angegebenen Menge an Puffer versehen wird. Die Box wird mittels einer Schwenkmaschine in Bewegung gehalten, so daß die Membran immer von Puffer benetzt ist. Nach den sechs Waschvorgängen wird die Membran im letzten Schritt durch den Assay Puffer alkalisch gemacht, damit die alkalische Phosphatase aktiviert wird. Das anschließende Trocknen der Membran erfolgt durch Abtropfen lassen des Puffers. Die Membran wird auf Frischhaltefolie gelegt und mit CDP-Star (Firma Tropix) zur Detektion behandelt. Dafür wird mit einer Eppendorf Pipette mehrmals etwas CDP-Star auf die Membran gespritzt, bis diese gut befeuchtet ist. Durch Anheben der Membran wird die Lösung mehrmals hin und her bewegt, bis die Membran vollständig mit der Lösung bedeckt ist. Durch mehrmaliges Abtropfen auf Papier wird die Membran so gut es geht getrocknet. Sie wird dann in Frischhaltefolie gepackt und kann in einer Entwicklungskammer mit einem Kodak-Film versehen und entwickelt werden. Der Wirkungsbereich von CDP-Star hat nach 4 Stunden sein Maximum. Eine Belichtungszeit von

2.5-3 Stunden hat sich für die Membran als optimal herausgestellt. Die Entwicklung erfolgt mit Entwickler und Fixierer der Firma Sigma.

### 8.1.8 Herstellung der Puffer für das Detektionsprotokoll

Puffer	Substanzen in g und ml Angabe
Wash	25 ml SDS 100 ml 10x PBS auf 1 Liter mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Blocking	22.5 ml SDS 90 ml 10x PBS 1.8 g I-Block (Tropix) auf 900 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Assay	100 mM Tris 100 mM NaCl auf 1 Liter mit H <sub>2</sub> O auffüllen
20 % SDS	20 g SDS mit H <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen
10 x PBS	82.3 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 23.5 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 40 g NaCl

**Tabelle 8.2: Darstellung der Puffer für die Zubereitung des Detektionsprotokolls**

Alle Puffer werden mit destilliertem, nicht autoklaviertem Wasser angesetzt. Der Blocking Puffer muß etwas erwärmt werden, damit sich das I-Block Reagenz lösen kann.

### 8.1.9 Die Ribonucleasen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Ribonucleasen handelt es sich um T<sub>1</sub>, B, Phy M und V<sub>1</sub>. Die Konzentrationsangabe in units bezieht sich auf die Menge, die von der Firma Pharmacia Biotech bezogen wird, wobei jede Ribonuclease vor dem Einsatz mit 100 µl autoklaviertem Millipore Wasser verdünnt wird. Die unit-Erklärung erfolgt bei der

Verwendung der einzelnen Ribonucleasen. Die Menge (in  $\mu\text{l}$ ), die bei der Elektrophorese eingesetzt wird, bezieht sich daher auf die der verdünnten Lösungen der Ribonucleasen.

## 8.2 Durchführung der Gelelektrophorese, die einzelnen Versuche

Die von der Firma Genset erhaltene RNA (1) wird in 1 ml autoklaviertem Millipore Wasser gelöst (9.0 pmol/ $\mu\text{l}$ ). Bevor sie eingesetzt wird, wird sie nochmal 1:10 verdünnt (0.9 pmol/ $\mu\text{l}$ ). In jedem Versuch werden 1.5  $\mu\text{l}$  RNA eingesetzt, da die Gele mit dieser Konzentration die besten Ergebnisse gezeigt haben. Jede Probe wird, wenn nicht anders angegeben, auf 10  $\mu\text{l}$  verdünnt, wovon jeweils 7  $\mu\text{l}$  aufgetragen werden, so daß letztlich die RNA-Konzentration 135 nM beträgt.

### 8.2.1 Durchführung für das Gel der Abb. 6.3, Spaltung der TAR-RNA zwischen U<sub>31</sub> und G<sub>32</sub> durch das Peptid-Cyclen-Konjugat I in Abwesenheit von Eu<sup>III</sup>

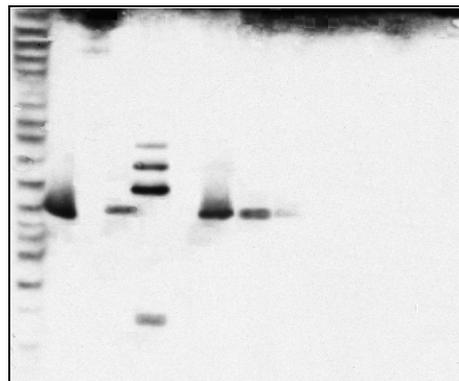


Abb. 6.3: Polyacrylamid Gelelektrophorese, Sequenzabhängige Hydrolyse der 31mer-RNA (1) (am 5'-Ende mit Biotin markiert) durch Peptide bei Raumtemperatur

Peptid Konzentration: 167.2  $\mu\text{M}$ . Bahn 1, alkalische Hydrolyse; Bahn 2, (I) für 3 h; Bahn 3, Referenz-RNA; Bahn 4, (I) und EDTA (0.5 mM) für 1 h; Bahn 5 Hydrolyse durch RNase T<sub>1</sub> (G-spezifisch); Bahn 6, (III) für 1 h; Bahn 7, (I) für 2 h; Bahn 8, (I) für 1 h; Bahn 9, (I) für etwa 3 min; Bahn 10, (IV) for 1 h; Bahn 11, (II) für 1 h; Bahn 12, (I) and Eu<sup>III</sup> (167.2  $\mu\text{M}$ ) für 1 h; Bahn 13, (II) 167.2  $\mu\text{M}$  and Eu<sup>III</sup> (167.2  $\mu\text{M}$ ) für 1 h; Bahn 14, (III) 167.2  $\mu\text{M}$  and Eu<sup>III</sup> (167.2  $\mu\text{M}$ ) für 1 h.

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Die Proben werden mit Eppendorfpipetten in Eppendorfgläsern (1.5 ml) angesetzt und mit der RNA (1) und dem entsprechenden Peptid versehen. Die Mengenangaben und

Konzentrationsangaben sind in Tabelle 8.3 zusammengefaßt. Alle Proben werden mit autoklaviertem Millipore-Wasser auf das Gesamtvolumen von 5 µl aufgefüllt und abzentrifugiert. Je nach Zeitangabe erfolgt der Ansatz 1, 2 und 3 Stunden vor dem Beladen des Gels. Die Proben verweilen bis zur Beladung bzw. Quenschen mit dem loading Puffer bei RT. Bei dem Metallkomplex wird das  $M^{n+}$  mit dem Peptid für 15 min. inkubiert, bevor anschließend die RNA und das Wasser dazugegeben werden. Die Probe für die alkalische Hydrolyse setzt sich aus 6 µl loading Puffer, 5 µl RNA und 5 µl Natriumcarbonat/-Natriumhydrogencarbonatlösung pH 9.1 zusammen. Sie wird 2 Stunden vor dem Beladen des Gels angesetzt und im Heizblock auf 55 °C erwärmt.

Substanz	Menge	Konzentration	Endkonzentration
RNA (1)	1.5 µl	1.35 µM	135.0 nM
Peptid I, II, III, IV	1.5 µl	1.67 mM	167.0 µM
Eu <sup>III</sup>	1.5 µl	1.67 mM	167.0 µM
T <sub>1</sub> (200 u) <sup>118</sup>	1.5 µl		
loading Puffer	5.0 µl		
EDTA	2.0 µl	0.5 mM	

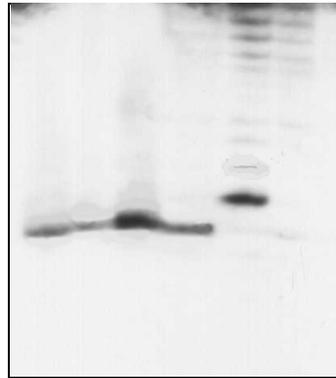
**Tabelle 8.3: Mengen und Konzentrationsangaben für das Gel in Abb. 6.3**

Kurz vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wird die Probe mit T<sub>1</sub> (1.5 µl der verdünnten 200 u Lösung) und die Kontroll-RNA angesetzt. Die RNA wird direkt mit T<sub>1</sub> und Wasser oder bei der Kontroll-RNA nur mit Wasser versehen und abzentrifugiert. Danach werden alle Proben mit 5 µl loading Puffer versehen, der die Reaktion stoppt. Letztlich haben alle Proben bis auf die der alkalischen Hydrolyse ein Gesamtvolumen von 10 µl. Die abzentrifugierten Proben werden für 2 min. auf 80 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gelegt. Das Denaturieren und plötzliche Abschrecken sorgt für eine klare Aufspaltung. Das Gel wird mit jeweils 7 µl einer jeden Probe beladen, d.h. die Proben werden in kleine Taschen, die von einem im Gel steckenden Kamm vorgegeben sind,

<sup>118</sup> Ein unit genügt um die Menge von 3 µg RNA, bei einer Inkubationszeit von 12 min. bei 55 °C in 6µl Assay Puffer zu hydrolysieren.

gespritzt. Eine optimale Sequenzierung erfolgt bei 50°C. Damit diese Temperatur eingehalten werden kann, wird das Gel zuvor 2 Stunden bei konstant 55 W erwärmt. Nach dem Beladen wird die Apparatur weiterhin auf konstant 55 W gehalten. Nach ca. 2 Stunden zeigen die beiden im loading Puffer enthaltenen Farbstoffe eine gute Laufhöhe an, so daß das Gel abgekühlt, auf eine Nylon-Membran übertragen und immobilisiert werden kann. Das ursprüngliche im Gel erhaltene Trennmuster der Moleküle bleibt nach der Übertragung bestehen, so daß man eine exakte Replik des Gels erhält (Durchführung siehe 8.1.6).

### 8.2.2 Durchführung für das Gel der Abb. 6.5, pH-abhängige Spaltung des Peptid-Cyclen-Konjugats (I)



**Abb. 6.5:** Polyacrylamid Gelelektrophorese, pH-abhängige Hydrolyse der 31mer-RNA (I). Peptid-Konzentration: 167.2  $\mu\text{M}$ . Bahn 1, (I) für 1 h bei pH 7.4; Bahn 2, (I) für 1 h bei pH 8; Bahn 3, (I) für 1 h bei pH 6; Bahn 4, (I) und EDTA (0.5 mM) für 1 h; Bahn 5, Hydrolyse durch RNase T<sub>1</sub>; Bahn 6, (II) für 1h; Bahn 7, (III) für 1h.

#### Die Puffer für die pH-abhängigen Tests:

pH 6 : 95.3 mg HEPES auf 10 ml autoklaviertem Millipore Wasser. Der genaue pH-Wert wird mit HCl eingestellt.

pH 7 : 35.2 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 72.6 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  auf 10 ml autoklaviertem Millipore Wasser.

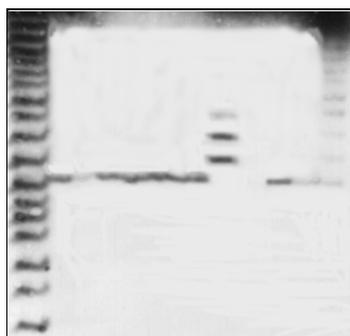
pH 8 : 485 mg Tris auf 100 ml autoklaviertem Millipore Wasser. Der genaue pH-Wert wird mit HCl eingestellt.

Substanz	Menge	Konzentration	Endkonzentration
RNA (1)	1.5 $\mu$ l	1.35 $\mu$ M	135.0 nM
Peptid I, II, III	1.5 $\mu$ l	1.67 mM	167.0 $\mu$ M
T <sub>1</sub> (200 u)	1.5 $\mu$ l		
loading Puffer	5.0 $\mu$ l		
EDTA	2.0 $\mu$ l	0.5 mM	
Puffer pH 6	2.0 $\mu$ l	0.04 M	
Puffer pH 7	2.0 $\mu$ l	0.04 M	
Puffer pH 8	2.0 $\mu$ l	0.04 M	

**Tabelle 8.4: Mengen und Konzentrationsangaben für das Gel in Abb. 6.5**

Die Durchführung erfolgt wie die in 8.2.1 unter "allgemeiner Arbeitsvorschrift" beschriebene Vorschrift, wobei die Reaktionszeit der pH-abhängigen Proben nur 1 Stunde beträgt.

### 8.2.3 Durchführung für das Gel der Abb. 6.7, konzentrationsabhängige Spaltungsinhibition durch Zn<sup>II</sup> und Eu<sup>III</sup>



**Abb. 6.7: Polyacrylamid Gelelektrophorese, konzentrationsabhängige Unterdrückung der Hydrolyse der 31mer-RNA (I) (am 5'-Ende mit Biotin markiert) durch einen Zink(II)-Peptid-Komplex bei Raumtemperatur.**

**Peptid-Konzentration: 167.2  $\mu$ M. Bahn 1, alkalische Hydrolyse; Bahn 2, (I) für 1 h; Bahn 3, (I) + Zn (1.35 mM) für 1 h; Bahn 4, (I) + Zn (135  $\mu$ M) für 1 h; Bahn 5, (I) + Zn (13.5  $\mu$ M) für 1 h; Bahn 6, (I) + Zn (1.35  $\mu$ M) für 1 h; Bahn 7, (I) + Zn (135 nM) für 1 h; Bahn 8, Hydrolyse durch RNase T<sub>1</sub> (G-**

spezifisch); Bahn 9, Referenz-RNA; Bahn 10, (I) + Zn (0.9 mM) für 1 h; Bahn 11, (I) + Zn (90 nM) für 1 h; Bahn 12, Zn (1.35 mM) für 1 h(I).

Substanz	Menge	Konzentration	Endkonzentration
RNA (1)	1.5 $\mu$ l	1.35 $\mu$ M	135.0 nM
Peptid I	1.5 $\mu$ l	1.67 mM	167.0 $\mu$ M
Zn <sup>II</sup>	1.5 $\mu$ l	9 mM-1.35 $\mu$ M	0.9 mM-135 nM
T <sub>1</sub> (200 u)	1.5 $\mu$ l		
loading Puffer	5.0 $\mu$ l		

**Tabelle 8.5: Mengen und Konzentrationsangaben für das Gel in Abb. 6.7**

Die Durchführung erfolgt wie die in 8.2.1 unter "allgemeiner Arbeitsvorschrift" beschriebene Vorschrift, wobei hier bei allen Metallkomplexen darauf zu achten ist, daß das Peptid I mit dem Zn<sup>II</sup> erst 15 min. inkubiert werden muß, bevor die RNA dazugegeben wird. Die Reaktionszeit beträgt 1 h für alle Komplex-Proben.

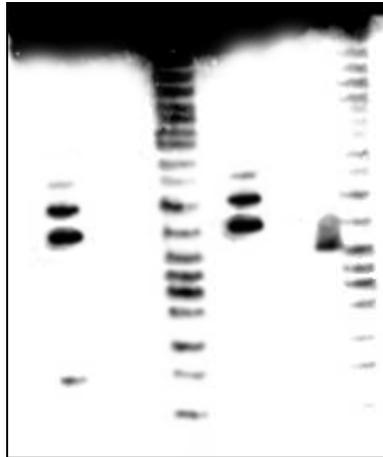
Da die Gelelektrophorese mit dem Eu<sup>III</sup> analog dem Zn<sup>II</sup> durchgeführt wurde und die Mengen und Konzentrationen identisch sind, wird hier auf die erneute Wiedergabe der Abbildung 6.6 und Durchführung verzichtet.

#### **8.2.4 Durchführung für das Gel in Abb. 6.12, Spaltungsversuche an der RNA (2) mit ausgetauschter Base A<sub>31</sub> gegen U<sub>31</sub>**

Die Konzentration der neuen RNA (2) beträgt 5.5 nmol, wobei sie nach der Verdünnung wie die RNA (1) 0.55 pmol/ $\mu$ l beträgt. Für einen Vergleich der beiden RNAs in einer Spaltungsreaktion mit den Peptiden müssen die einzusetzenden Konzentrationen auf dem Gel identisch sein.

Die Proben werden alle, mit Ausnahme von T<sub>1</sub> und der Referenz-Probe, identisch angesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 2 h, so daß die angesetzten, abzentrifugierten Proben bei RT und die beiden alkalischen Hydrolysen mit jeweils 5  $\mu$ l RNA, 5  $\mu$ l

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und 6 µl loading Puffer bei 55 °C solange verweilen, bis sie auf das Gel geladen werden. Die Durchführung ist identisch der allg. Arbeitsvorschrift unter 8.2.1.



**Abb. 6.12:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Spaltversuche an der 31mer-RNA (am 5'-Ende mit Biotin markiert) mit veränderter Base an U<sub>31</sub> gegen A<sub>31</sub> und der Original-TAR-RNA durch Peptid (I), Peptid (III) und Cyclen bei Raumtemperatur. RNA-Konzentrationen: 0.135 µM.

Peptid (I), (III) und Cyclen Konzentration: 167.2 µM. Bahn 1-6 veränderte RNA (2), Bahn 1, Referenz-RNA; Bahn 2, Hydrolyse durch RNase T<sub>1</sub> (G-spezifisch); Bahn 3, Cyclen für 2h; Bahn 4, (III) für 2h; Bahn 5, (I) für 2h, Bahn 6, alkalische Hydrolyse; Bahn 7-12 original RNA; Bahn 7, Referenz-RNA; Bahn 8, Hydrolyse durch RNase T<sub>1</sub> (G-spezifisch); Bahn 9, Cyclen für 2 h; Bahn 10, (III) für 2h; Bahn 11, (I) für 2h; Bahn 12, alkalische Hydrolyse.

Substanz	Menge	Konzentration	Endkonzentration
RNA (1)	1.5 µl	1.35 µM	135.0 nM
RNA (2)	2.5 µl	1.35 µM	135.0 nM
Peptid I	1.5 µl	1.67 mM	167.0 µM
Peptid III	1.5 µl	1.67 mM	167.0 µM
Cyclen	1.5 µl	1.67 mM	167.0 µM
T <sub>1</sub> (200 u)	1.5 µl		
loading Puffer	5.0 µl		

**Tabelle 8.6:** Mengen und Konzentrationsangaben für das Gel in Abb. 6.12

### 8.2.5 Durchführung für das Gel in Abb. 6.14, Spaltungsversuche an der RNA (1, 2 und 3). RNA (3) mit gegen U ausgetauschten Basen an C<sub>30</sub> und G<sub>32</sub>.

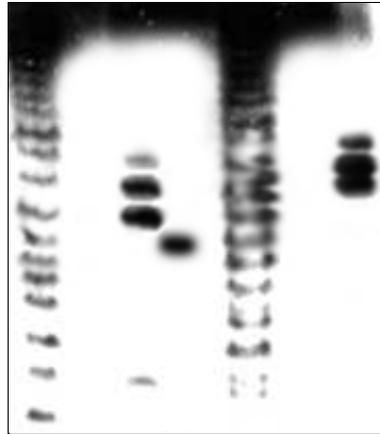


Abb. 6.14: Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Spaltversuche an der 31mer-RNA (am 5'-Ende mit Biotin markiert) mit veränderten Basen an C<sub>30</sub> und G<sub>32</sub> (3) gegen jeweils ein U, sowie der beiden anderen RNA's (1, 2) durch Peptid (I).

RNA-Konzentrationen: 0.135 µM.

Peptid (I) Konzentration: 167.2 µM. Bahn 1-4 RNA (2), Bahn 1, alkalische Hydrolyse; Bahn 2, (I) für 2 h; Bahn 3, Referenz-RNA; Bahn 4, Hydrolyse durch RNase T<sub>1</sub> (G-spezifisch); Bahn 5-6 RNA (1), Bahn 5, (I) für 2 h, Bahn 6, Referenz-RNA; Bahn 7-10 RNA (3), Bahn 7, alkalische Hydrolyse; Bahn 8, (I) für 2h; Bahn 9, Referenz-RNA; Bahn 10, Hydrolyse durch RNase T<sub>1</sub> (G-spezifisch);

Auch RNA (3) wird aufgrund einer neuen Anfangskonzentration (7.6 nmol) der RNA (1) angeglichen.

Substanz	Menge	Konzentration	Endkonzentration
RNA (1)	1.5 µl	1.35 µM	135.0 nM
RNA (2)	2.5 µl	1.35 µM	135.0 nM
RNA (3)	1.8 µl	1.35 µM	135.0 nM
Peptid I	1.5 µl	1.67 mM	167.0 µM
T <sub>1</sub> (200 u)	1.5 µl		
loading Puffer	5.0 µl		

Tabelle 8.6: Mengen und Konzentrationsangaben für das Gel in Abb. 6.14

Nur die alkalischen Hydrolysen werden in unterschiedlicher Konzentration, aber identischer Menge (5  $\mu$ l der jeweiligen RNA, 5  $\mu$ l  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ -Lsg., 6  $\mu$ l loading Puffer) angesetzt. Bei Entnahme von jeweils 7  $\mu$ l reicht in allen Fällen die Konzentration der RNA aus, wobei die Intensität der Banden auch hier keine Rolle spielt.

Die Durchführung erfolgt wieder wie unter 8.2.1 beschrieben.

### 8.2.6 Durchführung für das Gel in Abb. 6.16, Footprint oder Verdauungsexperimente

Die Verdauungsexperimente werden wieder mit der RNA (1) durchgeführt. Die Konzentrationen der Ribonucleasen sind in units angegeben. Da die Ribonucleasen B und Phy M schon etwas länger im Gefrierschrank lagerten, wurden aufgrund der Alterung einige Experimente durchgeführt, bis die exakte Einsatzmenge ermittelt wurde, die für gut sichtbare Spaltungen verwendet werden kann. Die alkalische Hydrolyse wird wie bisher gehandhabt. Die Proben, die mit dem Peptid und der RNA eine Stunde bei RT reagieren ("Verdauung"), werden erst kurz vor dem Beladen des Gels mit den Ribonucleasen zusammengegeben. Die Handhabung der Ribonucleasen erfolgt im allgemeinen wie bei  $T_1$ . Sie werden mit der RNA zusammengefügt, abzentrifugiert und wie alle anderen Proben mit loading Puffer versehen, der die Reaktion und somit die recht schnelle Wirkung der Ribonucleasen stoppt. Auch die Proben mit dem Peptid werden erst kurz vor dem Beladen mit den Ribonucleasen zusammengefügt.

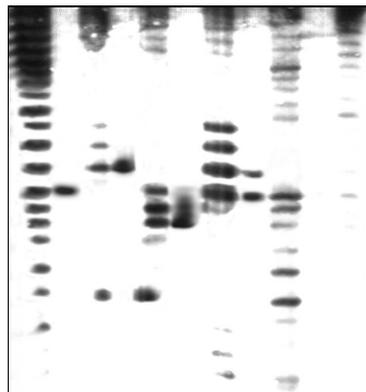


Abb. 6.16: Footprint-Experimente mit den Ribonucleasen  $T_1$ , B, Phy und  $V_1$ .

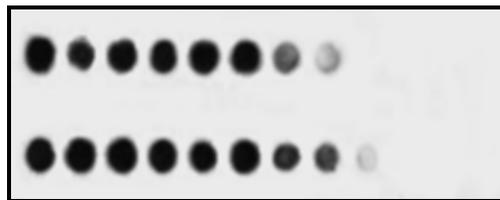
RNA-Konzentration: 0.113  $\mu$ M; Peptid-Konzentration 185.7  $\mu$ M; Bahn 1, alkalische Hydrolyse; Bahn 2, (I) für 2h; Bahn 3,  $T_1$  (G-spezifisch); Bahn 4, (I) +  $T_1$ ; Bahn 5, B (U- und C-spezifisch); Bahn 6, (I) + B; Bahn 7, Phy (U- und A-spezifisch); Bahn 8, (I) + Phy; Bahn 9,  $V_1$  (gepaarte Basen), Bahn 10, (I) +  $V_1$ ; Referenz-RNA.

Substanz	Menge	Konzentration	Endkonzentration
RNA (1)	1.5 µl	1.35 µM	113.0 nM
Peptid I	2 µl	2.23 mM	185.7 µM
T <sub>1</sub> (200 u)	2.5 µl		
B (200 u) <sup>119</sup>	3.5 µl		
Phy M (200 u) <sup>120</sup>	2.5 µl		
V <sub>1</sub> (40 u) <sup>121</sup>	3.5 µl		
loading Puffer	5.0 µl		

**Tabelle 8.7: Mengen und Konzentrationsangaben für das Gel in Abb. 6.16**

Das Gesamtvolumen (12 µl) ändert sich hier durch die größere Mengenzugabe der Ribonucleasen. Somit beträgt die Endkonzentration der RNA 113 nM. Eingesetzt werden aber 9 µl des Gesamtvolumens, so daß die RNA keine Konzentrationsverluste hat und somit genauso gut sichtbar ist.

### 8.2.7 Durchführung der filter-binding-assays, Dot-Blots von Abb. 6.18 bzw. 6.19



**Abb. 6.18: Darstellung der Dot-Blots mit Ansicht auf die Nitrozellulose-Membran. Die Spots zeigen den Komplex von Peptid und RNA, der auf der Nitrozellulose-Membran aufgefangen wird. RNA-Konzentration: 72 nM;**

<sup>119</sup> Eine unit genügt für die Hydrolyse von 3 µg RNA unter Standard-Sequenzier-Bedingungen in der Abwesenheit von Harnstoff

<sup>120</sup> Eine unit genügt für die Hydrolyse von 3µg RNA unter Standard-Sequenzier-Bedingungen

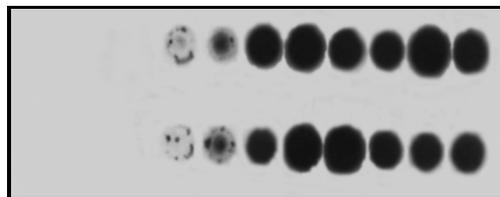
<sup>121</sup> Eine unit produziert 1µg säurelösliches Produkt der tRNA oder 5S rRNA pro Minute bei 37 °C

**Obere Reihe: Peptid-Cyclen-Konjugat (I) mit den Konzentrationen 1. 89.2  $\mu\text{M}$ ; 2. 44.6  $\mu\text{M}$ ; 3. 22.3  $\mu\text{M}$ ; 4. 8.9  $\mu\text{M}$ ; 5. 4.46  $\mu\text{M}$ , 6. 2.23  $\mu\text{M}$ ; 7. 892 nM; 8. 446 nM; 9. 89.15 nM; 10. 8.92 nM; 11. 892 pM; 12. Referenz RNA. Untere Reihe: Peptid (III) mit den Konzentrationen 1. 89.2  $\mu\text{M}$ ; 2. 44.6  $\mu\text{M}$ ; 3. 22.3  $\mu\text{M}$ ; 4. 8.9  $\mu\text{M}$ ; 5. 4.46  $\mu\text{M}$ , 6. 2.23  $\mu\text{M}$ ; 7. 892 nM; 8. 446 nM; 9. 89.15 nM; 10. 8.92 nM; 11. 892 pM; 12. Referenz RNA.**

Die Proben werden 30 min. vor dem Beladen der Dot-Blots (Minifold I von Schleicher & Schuell) angesetzt, wobei die RNA-Konzentration konstant bleibt und die Peptid-Konzentration variiert wird. Die Zeit sollte zur Bildung des Komplexes ausreichen. Die Proben werden mit der RNA und der jeweiligen Konzentration an Peptid versehen. Dann werden sie mit autoklaviertem Millipore-Wasser auf das Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  gefüllt, wobei nur 25  $\mu\text{l}$  aufgetragen werden. Da es hier lediglich auf die Komplexbildung ankommt, werden die Proben ohne Renaturieren oder loading Puffer in die Dots pipettiert. Dazu wird das Dot-Blot Gerät folgendermaßen eingerichtet: Der Komplex wird auf einem Filter, der Nitrozellulose-Membran (Abb. 6.18) aufgefangen, wobei die restliche RNA durch den Filter läuft. Sie wird, nachdem sie noch eine Lage blotting Papier durchlaufen hat, auf einer Nylon-Membran (Nytran plus, Abb. 6.19) aufgefangen. Die drei Schichten werden daher zwischen die Kammern des Minifold I geklemmt und mit 0.5 TBE befeuchtet. Das Befeuchten ist sinnvoll, da ansonsten die guten Kapillarkräfte der Membran für verlaufende Spots sorgen. An die fertige Kammer wird dann ein Wasserstrahlvakuum gelegt, so daß die Proben gleich nach dem Auftragen abgesaugt werden. Jede aufgetragene Probe wird mit 400  $\mu\text{l}$  Wasser nachgespült. Anschließend wird 20 min. nachgesaugt, bis die Platten auseinandergelöst werden. Die untere Nylon-Membran kann gleich zur Fixierung im Ofen auf 80 °C erwärmt und anschließend gewaschen werden. Die Nitrozellulose-Membran wird auf eine Nylon-Membran umgeblottet, damit sie wie gewohnt behandelt werden kann. Die Behandlung der Nitrozellulose-Membran mit Nitro-Block II zeigte sich nicht gerade erfolgreich.

Substanz	Menge	Konzentration	Endkonzentration
RNA (1)	4 $\mu$ l	3.6 $\mu$ M	72.0 nM
Peptid I	4 $\mu$ l	4.5 mM	89.2 $\mu$ M
Peptid I	4 $\mu$ l	2.2 mM	44.6 $\mu$ M
Peptid I	4 $\mu$ l	1.1 mM	22.3 $\mu$ M
Peptid I	4 $\mu$ l	0.45 mM	8.9 $\mu$ M
Peptid I	4 $\mu$ l	0.22 mM	4.46 $\mu$ M
Peptid I	4 $\mu$ l	0.11 mM	2.23 $\mu$ M
Peptid I	4 $\mu$ l	45 $\mu$ M	892 nM
Peptid I	4 $\mu$ l	4.5 $\mu$ M	89.2 nM
Peptid I	4 $\mu$ l	0.45 $\mu$ M	8.92 nM
Peptid I	4 $\mu$ l	45 nM	892 pM

**Tabelle 8.8: Mengen und Konzentrationsangaben für die Dot-Blots für die Abb. 6.17, 6.18**



**Abb. 6.17: Darstellung der gleichen Dot-Blots mit Ansicht auf die Nylon-Membran. Die Spots geben die nicht gebundene RNA, die durch die Nitrozellulose-Membran auf der Nylon-Membran aufgefangen wird wieder. RNA-Konzentration: 72 nM;**

**Obere Reihe: Peptid-Cyclen-Konjugat (I) mit abnehmender Konzentration des Komplexes und Zunahme der RNA-Konzentration. Untere Reihe: Peptid (III) mit ebenfalls abnehmender Konzentration des Komplexes und Zunahme der RNA-Konzentration.**

### 8.2.8 Durchführung für das Gel in Abb. 6.21, Spaltung der TAR-RNA mit synthetischen Ribonucleasen ohne Strukturspezifität

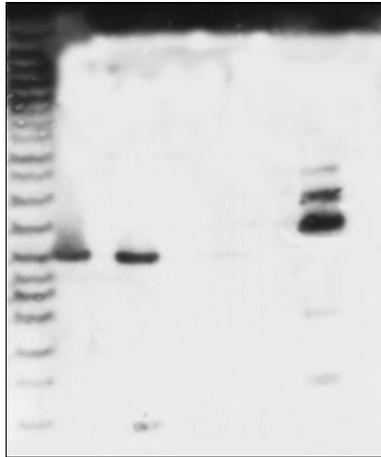


Abb. 6.21: Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Spaltversuche an der 31mer-RNA (1) durch die synthetischen Ribonucleasen 15, 20, 24, 28, 43 und das Dimer mit der Konzentration 1.67mM. RNA-Konzentrationen: 0.135  $\mu$ M.

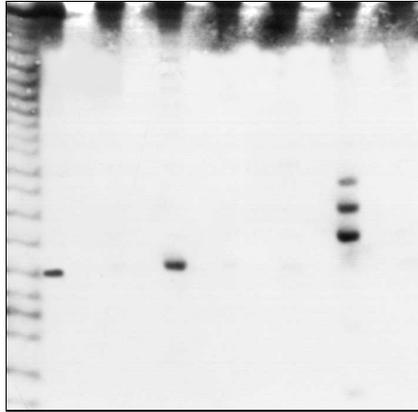
Bahn 1, alkalische Hydrolyse; Bahn 2, Peptid-Konjugat (I) für 2 h; Bahn 3, Dimer für 2 h; Bahn 4, (15) für 2 h; Bahn 5, (24) für 2 h; Bahn 6, (28) für 2 h; Bahn 7, (20) für 2 h; Bahn 8, (43) für 2 h; Bahn 9, T<sub>1</sub>; Bahn 10, Referenz-RNA

Die Verbindungen 15, 20, 24, 28, 43 und das Dimer werden in der zehnfachen Konzentration des Peptides angesetzt. Die Durchführung ist wieder analog der in 8.2.1. beschrieben.

Substanz	Menge	Konzentration	Endkonzentration
RNA (1)	1.5 $\mu$ l	1.35 $\mu$ M	135.0 nM
Peptid I	1.5 $\mu$ l	1.67 mM	167.0 $\mu$ M
15, 20, 24, 28, 43 und Dimer	1.5 $\mu$ l	16.7 mM	1.67 mM
T <sub>1</sub> (200 u)	2 $\mu$ l		
loading Puffer	5.0 $\mu$ l		

Tabelle 8.9: Mengen und Konzentrationsangaben für das Gel in Abb. 6.21

### 8.2.9 Spaltung der TAR-RNA mit den synthetischen Ribonucleasen 15 und 16 und ihre Cobalt-Komplexe



**Abb 6.23:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Spaltversuche an der 31mer-RNA (1) durch die synthetischen Ribonucleasen 15, 16, und 35 mit und ohne Co(III)-Komplex. Konzentration der Verbindungen 1.67 mM. RNA-Konzentrationen: 0.135  $\mu$ M.

**Bahn 1,** alkalische Hydrolyse; **Bahn 2,** (15) für 2h; **Bahn 3,** (15) + Co(III) für 2h; **Bahn 4,** (16) für 2h; **Bahn 5,** (16) + Co(III) für 2h, **Bahn 6,** (35) für 2h, **Bahn 7,** T<sub>1</sub> (G-spezifisch); **Bahn 8,** Referenz-RNA

Für dieses Gel wird ein Co(III)-Komplex hergestellt, der durch Reduktion des  $\text{CoCl}_2$  mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{NaHCO}_3$  zum unlöslichen  $\text{Na}_3[\text{Co}^{\text{III}}(\text{CO}_3)_3]$  umgesetzt wird. Dieser grüne Komplex ist wasserunlöslich. In Verbindung mit einem Cyclenderivat entsteht der rosa-violette wasserlösliche  $\text{Na}_3[\text{Co}^{\text{III}}(\text{N}_4)(\text{H}_2\text{O})_2]$  Komplex. Dieser bildet sich durch äquimolare Mengen an Cyclenderivat und Cobaltcarbonat-Komplex in Wasser bei 55 °C für ca. 20 min. Die Cyclenderivate **15** und **16** werden in äquimolaren Mengen (jeweils 16.7 mM) mit dem Cobalt-Carbonat-Komplex zusammengegeben und erwärmt. Der grüne Komplex wechselt durch die Cyclenkomplexierung seine Farbe schnell in den violetten Bereich. Das restliche Carbonat wird abzentrifugiert, während die darüberstehende Co(III)-Komplex-Lösung eingesetzt werden kann. Diesmal wird der Komplex direkt ohne vorherige Inkubierung zu der RNA gegeben werden. Die Metallkomplex-Proben werden wie diejenigen ohne Metall zwei Stunden vor dem Beladen des Gels angesetzt. Wie unter 8.2.1 erfolgt dann nach dem Ansetzen der Proben von T<sub>1</sub> und der Referenz-RNA die Zugabe des loading-Puffers und die anschließende Renaturierung.

Substanz	Menge	Konzentration	Endkonzentration
RNA (1)	1.5 µl	1.35 µM	135.0 nM
Peptid I	1.5 µl	1.67 mM	167.0 µM
<b>15, 16, 35</b>	1.5 µl	16.7 mM	1.67 mM
Na <sub>3</sub> [Co <sup>III</sup> (N <sub>4</sub> )(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	1.5 µl	16.7 mM	1.67 mM
T <sub>1</sub> (200 u)	2 µl		
loading Puffer	5.0 µl		

**Tabelle 8.10: Mengen und Konzentrationsangaben für das Gel in Abb. 6.23**

Der Na<sub>3</sub>[Co<sup>III</sup>(N<sub>4</sub>)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]-Komplex scheint sehr stabil zu sein, so daß er daher mehrmals unter den gleichen Resultaten angewendet wurde.

### 8.2.10 Untersuchung der Uracil-Spezifität an der RNA (3) und der RRE-RNA



**Abb 6.24: Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Spaltversuche an der 31mer-RNA (3) durch die Cyclenderivate 15 und 16. Konzentration der Verbindungen 1.67 mM. RNA-Konzentrationen: 0.135 µM. Bahn 1, T<sub>1</sub> (G-spezifisch); Bahn 2, (15) für 2h; Bahn 3, Referenz-RNA; Bahn 4, alkalische Hydrolyse;**

Für die Auswertung der Spaltung an der RNA (3) durch die Verbindung **15** war ein 15 %-iges Gel notwendig, damit die dicht verlaufenden RNA-Fragmente gut getrennt werden und nicht ineinander verlaufen. Für das bessere Laufverhalten wird die Acrylamidkonzentration herabgesetzt.

<b>15 % denat. Gel</b>	21 g Harnstoff
	19.6 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung (19:1)
	10 ml TBE (5x)
	5.4 ml dest. H <sub>2</sub> O
	23 µl TMEDA
	300 µl APS

Die Durchführung erfolgt nach der allgemeinen Durchführung in 8.2.1.

Substanz	Menge	Konzentration	Endkonzentration
RNA (3)	1.8 µl	1.35 µM	135.0 nM
<b>15</b>	1.5 µl	16.7 mM	1.67 mM
T <sub>1</sub> (200 u)	2.5 µl		
loading Puffer	5.0 µl		

**Tabelle 8.11: Mengen und Konzentrationsangaben für das Gel in Abb. 6.24**

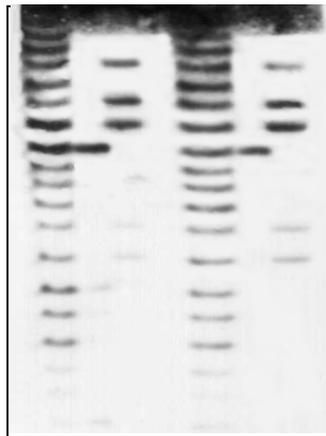
Auch die beiden RRE-RNA (4, 5) werden aufgrund einer neuen Anfangskonzentration, (10.6 nmol) für die 27-mer RNA und (5.2 nmol) für die 35-mer RNA, der RNA (1) angeglichen.

Substanz	Menge	Konzentration	Endkonzentration
RNA (4)	1.3 µl	1.35 µM	135.0 nM
RNA (5)	2.6 µl	1.35 µM	135.0 nM
15, 16	1.5 µl	16.7 mM	1.67 µM
T <sub>1</sub> (200 u)	2.5 µl		
loading Puffer	5.0 µl		

**Tabelle 8.12: Mengen und Konzentrationsangaben für die Gele in Abb. 6.27 und 6.28**



**Abb 6.27:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Spaltversuche an der 27mer-RRE-RNA durch die Cyclenderivate 15 und 16. Konzentration der Verbindungen 1.67 mM. RNA-Konzentrationen: 0.135  $\mu$ M. Bahn 1, alkalische Hydrolyse; Bahn 2, (15) für 2h; Bahn 3, (16) für 2h; Bahn 4, T<sub>1</sub> (G-spezifisch); Bahn 5, Referenz-RNA.



**Abb 6.28:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Spaltversuche an der 35mer RRE-RNA durch das Cyclenderivat (15). Konzentration der Verbindung 1.67 mM. RNA-Konzentrationen: 0.135  $\mu$ M (Bahn 2-4) bzw. 13.5 nM (Bahn 6-7).  
 Bahn 1, alkalische Hydrolyse; Bahn 2, (15) für 2h; Bahn 3, T<sub>1</sub> (G-spezifisch); Bahn 4, Referenz-RNA;  
 Bahn 5, alkalische Hydrolyse; Bahn 6, (15) für 2h; Bahn 7, T<sub>1</sub> (G-spezifisch).

Für beide RNA's werden 15 %-ige Gele verwendet. Die Durchführungen sind analog der allgemeinen Durchführung in 8.2.1.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Katrin Michaelis  
Geburtsdatum: 07.07.1970  
Geburtsort: Hannover  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Schulbildung

1976-1980 Grundschule Comeniusschule, Hannover  
1980-1982 Orientierungsstufe Röntgenstraße, Hannover  
1982-1990 Leibnizschule Hannover,  
naturwissenschaftl.-neuspr. Gymnasium  
05.1990 Allgemeine Hochschulreife

## Hochschulstudium

10.1990 Immatrikulation Studiengang Chemie (Diplom)  
Universität Hannover  
12.1992 Diplom-Chemiker-Vorprüfung  
30.11.-4.12.1995 Diplom-Chemiker-Hauptprüfung  
12.1995-06.1996 Anfertigung der Diplomarbeit  
bei Prof. H.M.R. Hoffmann, Phd, DSc. am Institut  
für Organische Chemie der Universität Hannover  
Thema: „*Ansätze zur Synthese der  
Spongistatin-1-Seitenkette*“

## Promotion

07.1996-10.1999 Anfertigung der Dissertation am Institut für Organische  
Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von  
Priv.-Doz. Dr. M. Kalesse  
Thema: „*Design, Synthese und molekularbiologische  
Evaluierung synthetischer Ribonucleasen mit Cyclen-  
Grundgerüst*“  
14.12.1999 Tag der Doktorprüfung  
Nebenfach: Biochemie

## Poster und Veröffentlichungen

*“Modelle für künstliche Ribonucleasen“*

M. Kalesse\*, T. Oost, A. Loos, K. Michaelis  
Poster anlässlich des " 1. Minisymposiums  
des Graduiertenkollegs Hannover", **1996**

*“Thiazole synthesis by MnO<sub>2</sub> dehydrogenation“*

M. Kalesse\*, K. Michaelis, E. Claus  
*Organic Synthesis*, **1999**, (eingereicht)

*“Selektive Spaltung der HIV-TAR-RNA durch ein Peptid-Cyclen-Konjugat“*

M. Kalesse\*, K. Michaelis  
*Angew. Chem.* **1999**, *111*, 15, 2382-2385

*“Highly selective cleavage of the HIV-1 TAR-RNA with metal complexes and basic amines“*

M. Kalesse\*, K. Michaelis  
Poster anlässlich des 36<sup>th</sup> National Organic Chemistry Symposium in  
Madison/Wisconsin, **1999**

*“Highly selective cleavage of the HIV-1 TAR-RNA with basic amines“*

M. Kalesse\*, K. Michaelis  
Poster anlässlich des Jungchemiker Workshops **99**, Universität Paderborn