
Prof. Dr. Thomas Lindel, TU Braunschweig, Institut für Organische Chemie

Vorlesung "Bioorganische Chemie" (2 SWS)

D. L. van Vranken, G. A. Weiss,

Introduction to Bioorganic Chemistry and Chemical Biology,

1. Aufl., Garland Publishers 2012, ISBN 978-0815342144, ca. € 80

J. McMurry, T. Begley, *Organische Chemie der biologischen Stoffwechselwege*, 1. Aufl.,

Spektrum Akademischer Verlag 2006, ISBN 978-3827416575, ca. € 30

Zitierte Originalliteratur!

Inhalt:

A. DNA

B. RNA

C. Peptide

D. Saccharide

E. Chemie der Targetsuche

Nobelpreis für Chemie 2022 an Carolyn R. Bertozzi, Morten Meldal, K. Barry Sharpless

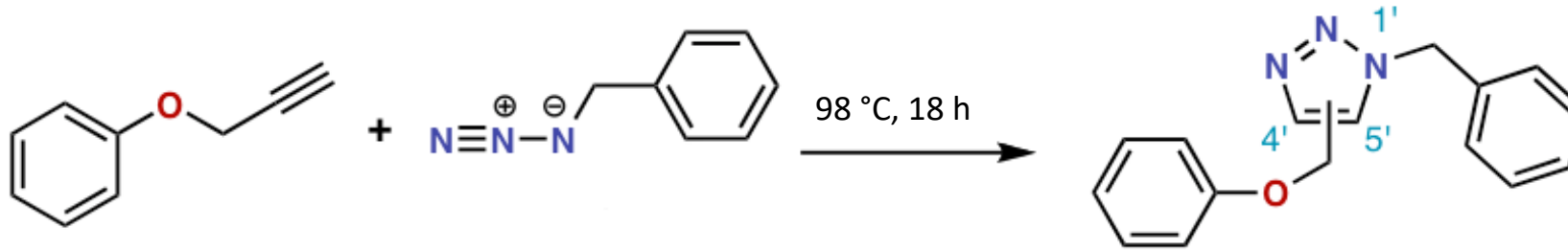
"It just says **click** – and the molecules are coupled together"



Rolf Huisgen
(1920-2020)

<https://cen.acs.org>

Huisgen-Reaktion

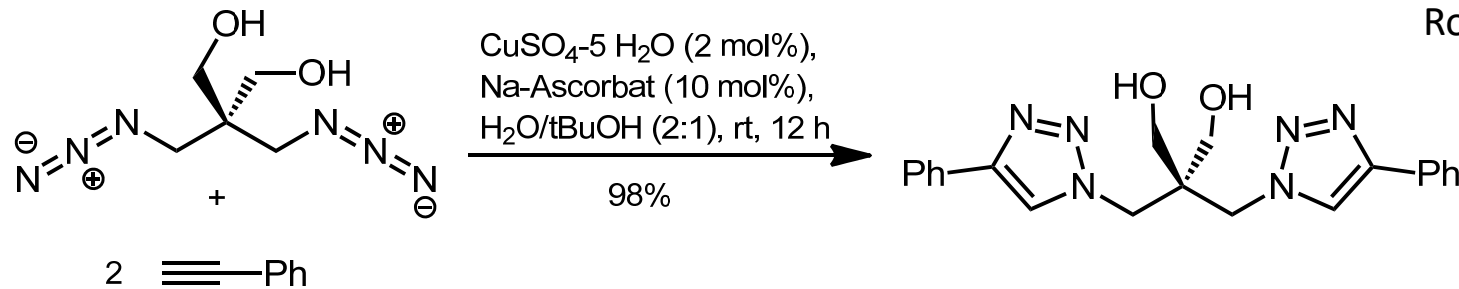


Cu(I)-Katalyse (Meldal, Sharpless, 2002):
schneller, regioselektiv zum 1,4-disubst. Triazol,
bioorthogonale "Click-Chemie"

Cu(I) in situ aus Cu(II) und Ascorbat

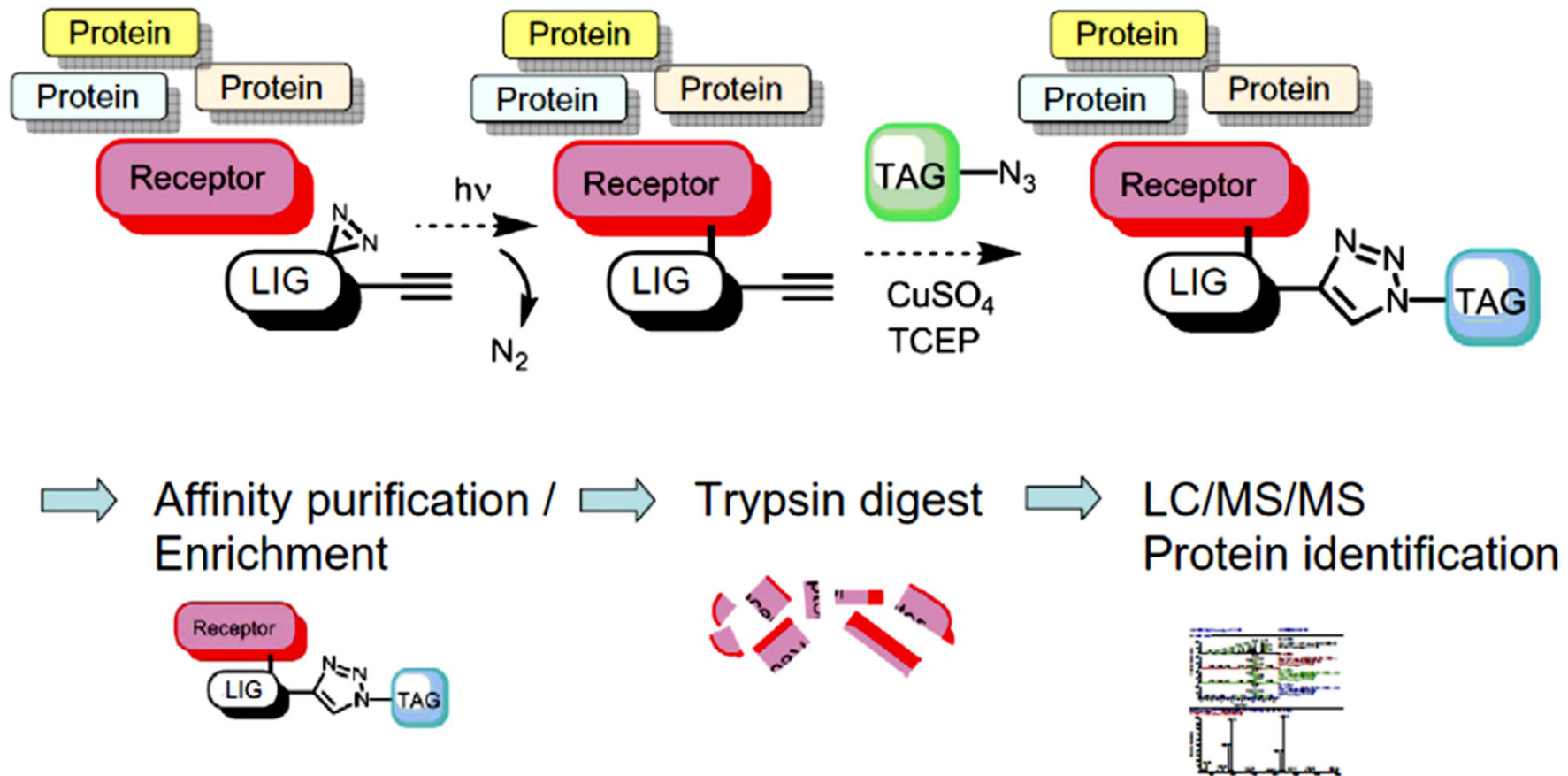


Rolf Huisgen (1920-2020)



Bioorganische Chemie


Photoreaktion eines potentiellen Liganden (z. B. eines funktionalisierten Naturstoffs) mit z. B. einem Proteingemisch, gefolgt von Identifizierung und Isolierung kovalenter Addukte und deren massenspektrometrischer Analyse; Identifizierung mit Hilfe von "Click-Chemie".



from: Meijler et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 554

Messenger RNA-Code eines Analogons des SARS-CoV-2 spike-Glycoproteins

```
GAGAAΨAAAC ΨAGΨAΨΨCΨΨ CΨGGΨCCCCA CAGACΨCAGA GAGAACCCGC 50
CACCAΨGΨΨC GΨGΨΨCCΨGG ΨGCΨGCΨGCC ΨCΨGGΨGΨCC AGCCAGΨGΨG 100
ΨGAACCCΨC cap 150
ACCAGAGΨC 5'-UTR sig S protein_mut 3'-UTR poly(A) CA 200
CΨCΨACCCAG GACCΨGΨΨC ΨGCCΨΨΨCΨΨ CAGCAACGΨG ACCΨGGΨΨCC 250
ACGCCAΨCCA CGΨGΨCCGGC ACCAAΨGGCA CCAAGAGAΨΨ CGACAACCCC 300
GΨGCΨGCCCY ΨCAACGACGG GGΨGΨACΨΨΨ GCCAGCACCG AGAAGΨCCAA 350
CAΨCAΨCAGA GGCΨGGAΨCΨ ΨCGGCACCAC ACΨGGACAGC AAGACCCACA 400
GCCΨGCΨGAΨ CGΨGAACAAC GCCACCAACG ΨG
ΨΨCCAGΨΨCΨ GCAACGACCC CΨΨCCΨGGGC GΨ
CAAGAGCΨGG AΨGGAAAGCG AGΨΨCCGGGΨ GΨ
GCACCΨΨCGA GΨACGΨGΨCC CAGCCΨΨΨCC ΨG
CAGGGCAACΨ ΨCAAGAACCΨ GCGCGAGΨΨC GΨ
CΨACΨΨCAAG AΨCΨACAGCA AGCACACCCC ΨA
ΨGCCΨCAGGG CΨΨCΨCΨGCΨ CΨGGAACCCC ΨG
AΨCAACAΨCA CCCGGΨΨΨCA GACACΨGCΨG GC
GACACCΨGGC GAΨAGCAGCA GCGGAΨGGAC AG
AΨGΨGGGCΨA CCΨGCAGCCΨ AGAACCCΨΨC ΨG
GGCACCAΨCA CCGACGCCGΨ GGAΨΨGΨGCΨ CΨ
AAAGΨGCACC CΨGAAGΨCCΨ ΨCACCGΨGGA AA
...
```



Ugur Sahin, Özlem Türeci
The New York Times, 20.11.2020

aus: WHO,
International nonproprietary names
programme 11889

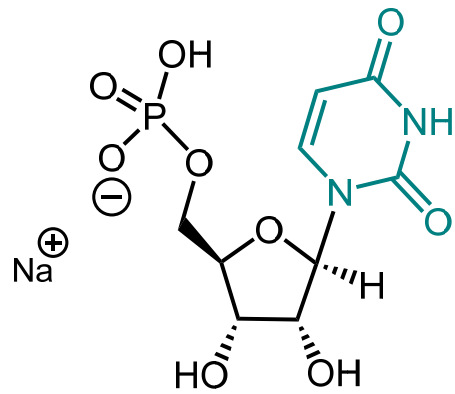
Ψ (hier) = 1-Methyl-3'-
pseudouridyl
(m¹Ψ)

Cominarty (60 G\$,
Biontech/Pfizer)

"The meteoric rise of the
COVID-19 vaccine from
Pfizer and BioNTech has
little precedent in the
pharmaceutical industry."

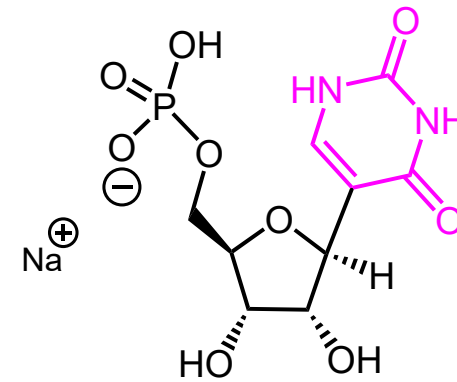
<https://www.nytimes.com/2020/11/10/business/biontech-covid-vaccine.html>

What is Ψ ? Ok, it's a Greek letter.



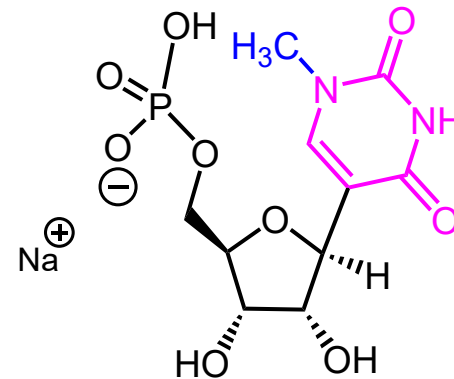
Uridinmonophosphat

Umwandlung von Uridin in Pseudouridin ist die häufigste Modifikation zellulärer RNA.

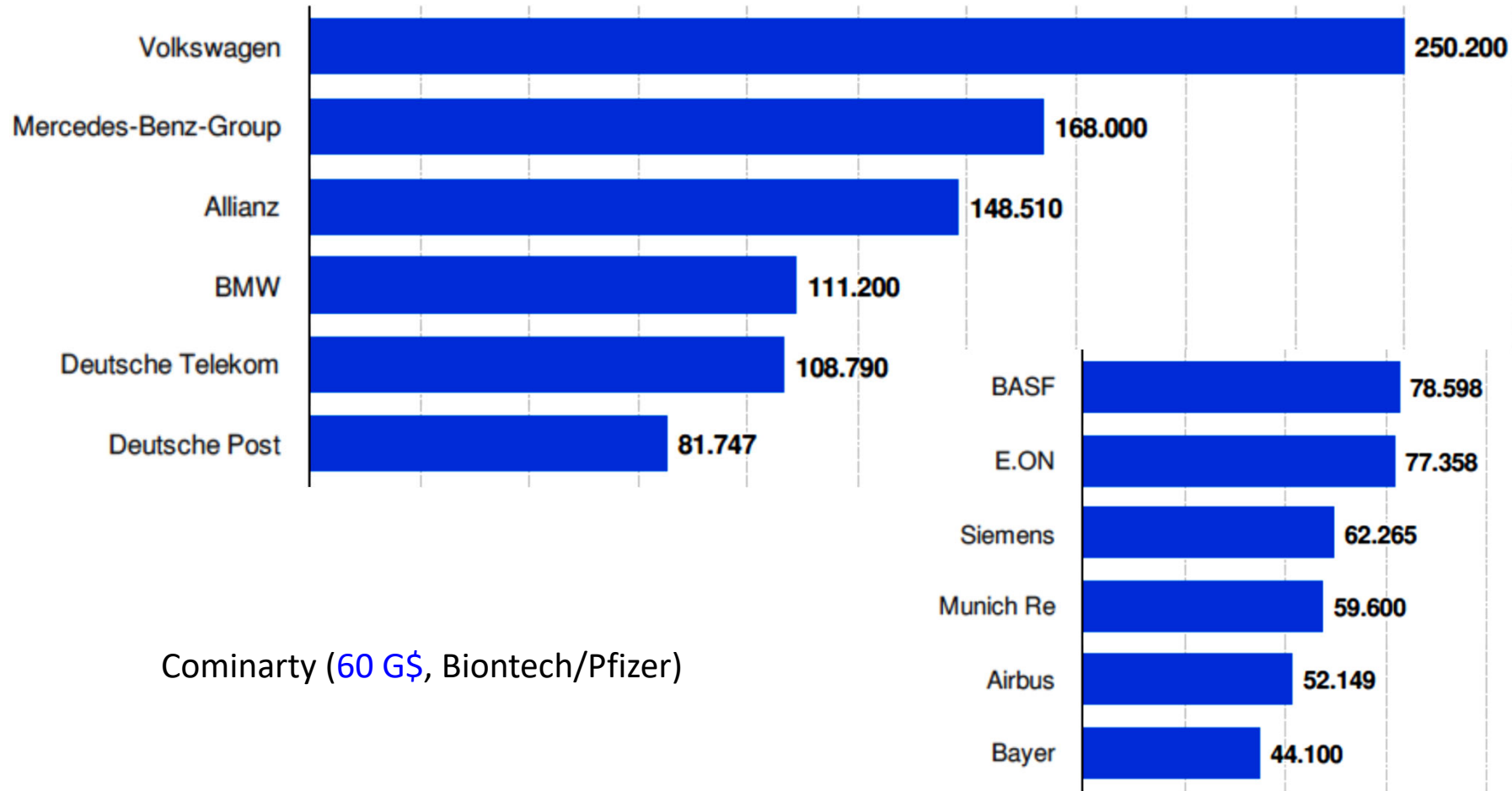


Pseudouridinmonophosphat

mRNA mit *N*-Methylpseudouridinmonophosphat-Bausteinen wird vom Immunsystem nicht erkannt.



Zum Vergleich: Umsätze ausgewählter DAX-Konzerne 2021 (<https://de.statista.com>):



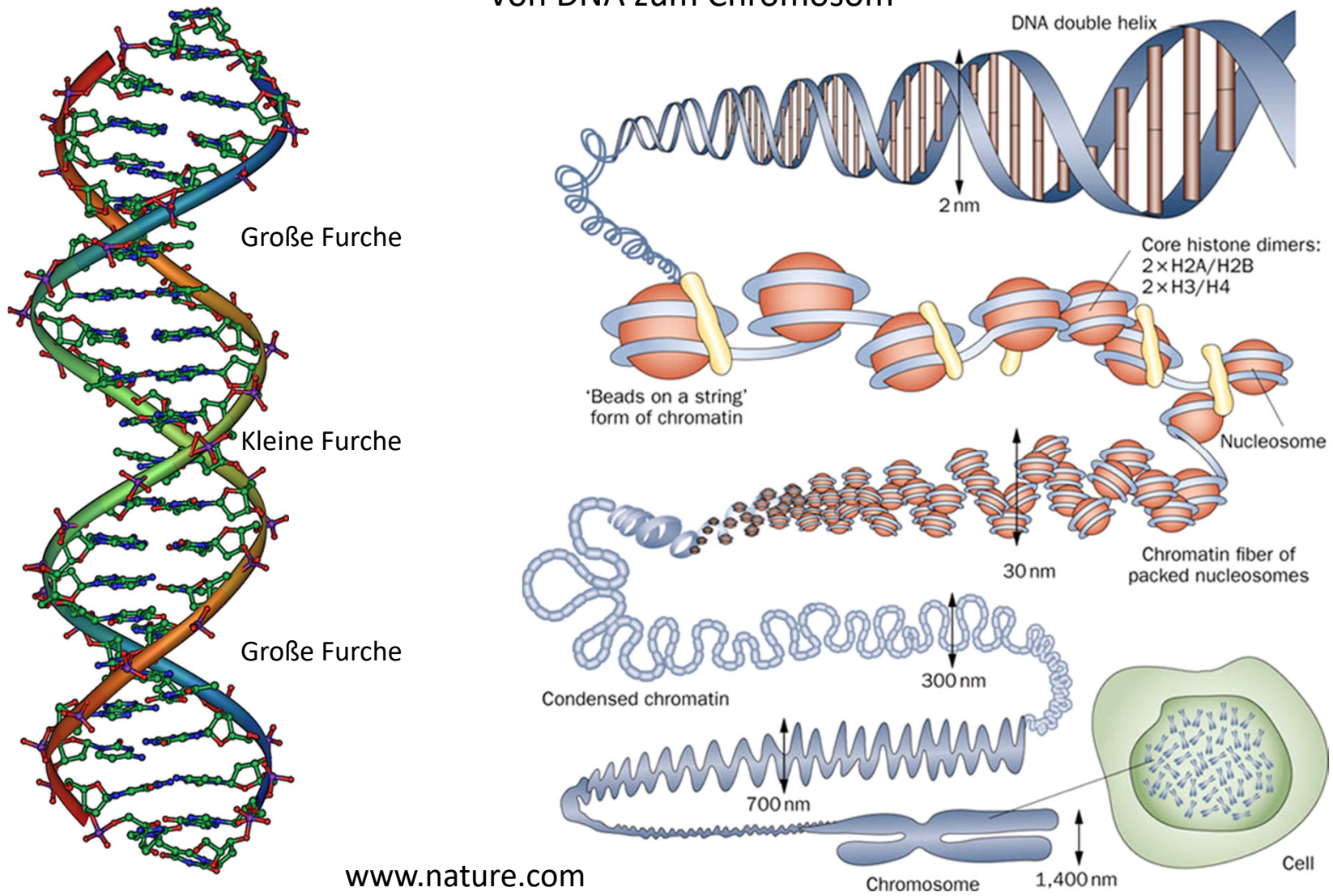
Chemische Biologie entwickelt *chemische Methoden*, Techniken und Moleküle, um biologische Systeme zu studieren, zu manipulieren und für chemische Fragestellungen einzusetzen. **Biochemie** erforscht allgemeiner die Chemie des Lebens, vor allem der Biomakromoleküle, unter Nutzung gentechnischer Methoden.

Chemische Biologie umfasst Bioorganische, Biophysikalische, Bioanalytische, Bioanorganische Chemie.

Bioorganische Chemie nutzt die Prinzipien und Techniken der *Organischen Chemie* zur Lösung von Problemen biologischer Relevanz und lässt sich von der Biologie zur Entwicklung neuer chemischer Prozesse inspirieren.

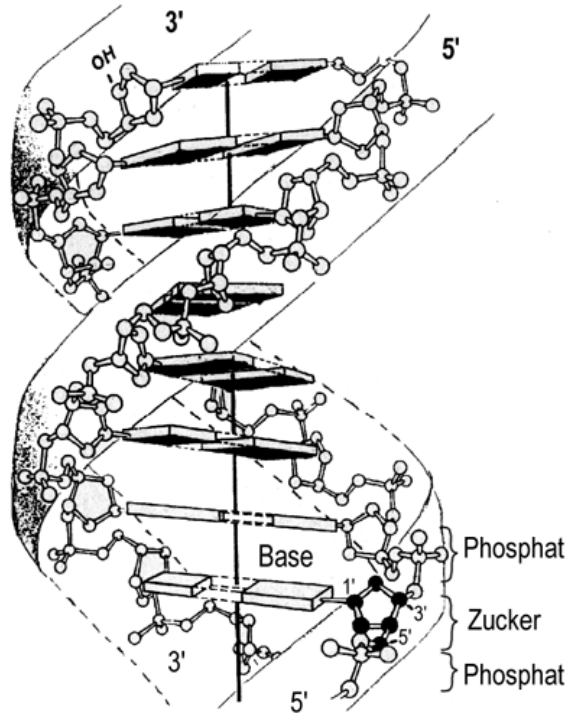
A. DNA - A.1. Struktur

Von DNA zum Chromosom

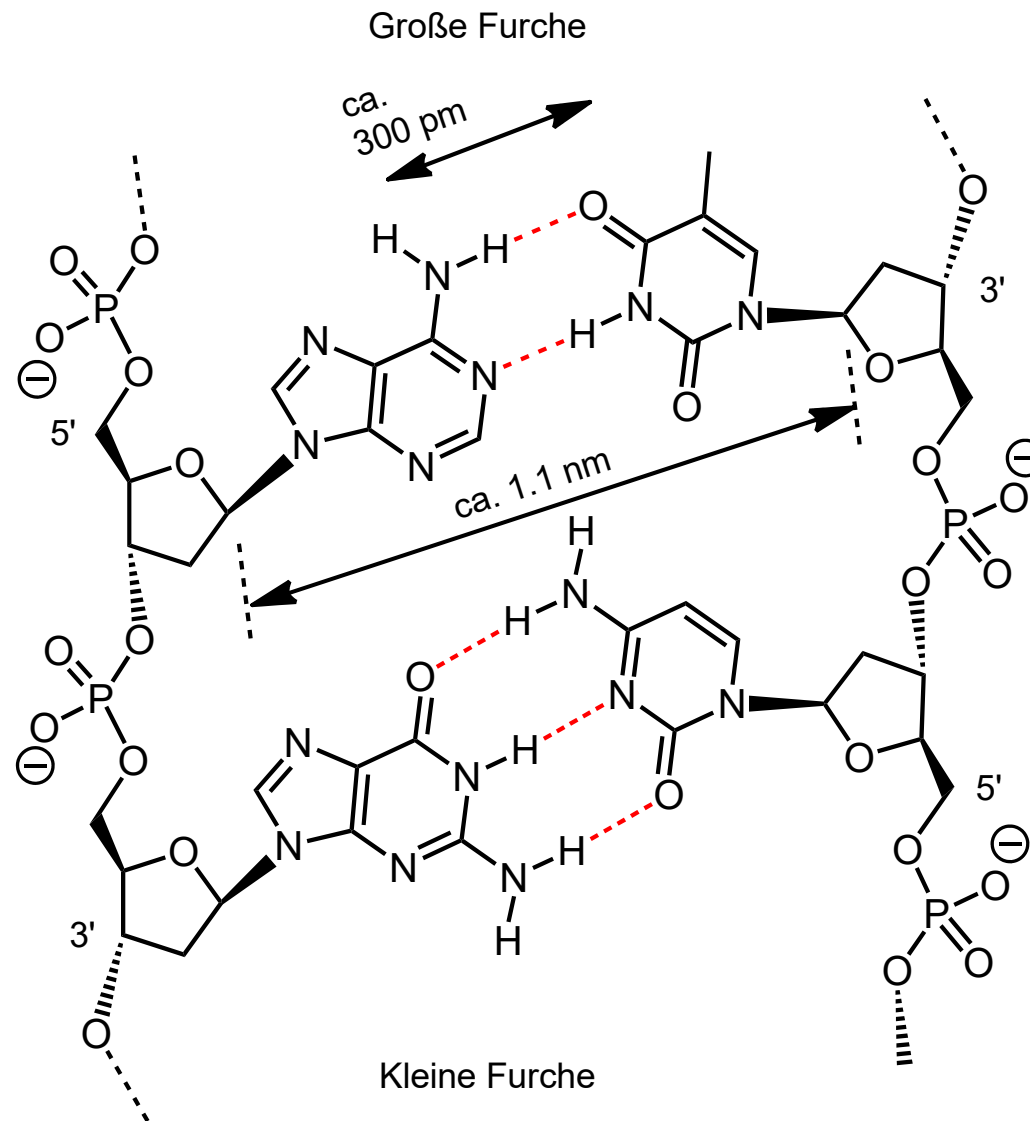


A. DNA - A.1. Struktur

Watson-Crick-Basenpaarung



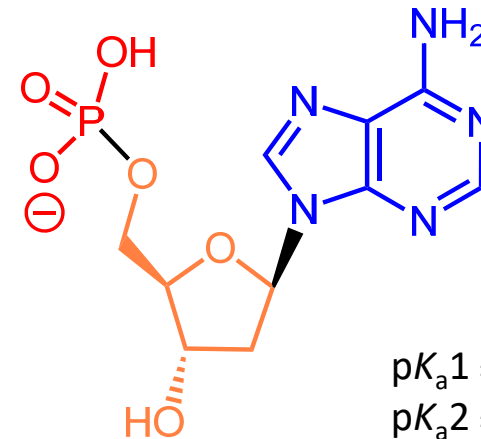
DNA-Basen sind kaum basisch, Nucleinsäuren nicht sauer



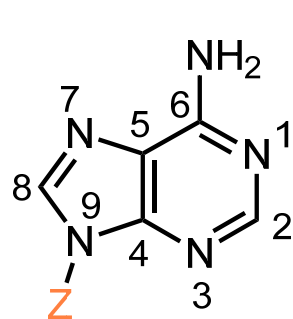
A. DNA - A.1. Struktur

Nucleoside	Nucleotide
(Desoxy)adenosin	(Desoxy)adenylat
(Desoxy)guanosin	(Desoxy)guanyl
(Desoxy)cytidin	(Desoxy)cytidylat
Desoxythymidin (od. Thymidin)	(Desoxy)thymidylat (od. Thymidylat)
Uridin	Uridylat

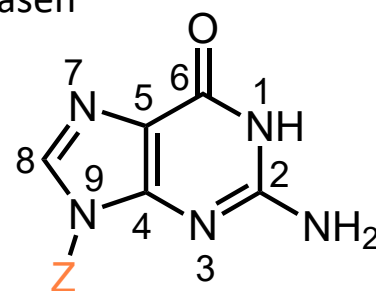
Desoxyadenosinmonophosphat (dAMP)
Desoxyadenosylphosphat
Desoxyadenylat



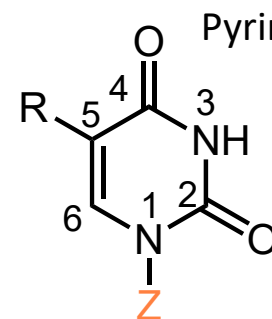
$pK_a1 \approx 1$,
 $pK_a2 \approx 6$



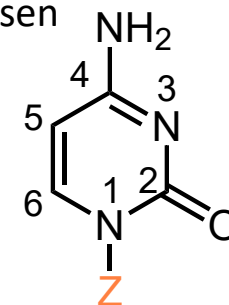
Adenin



Guanin

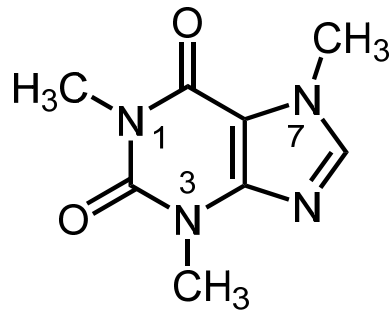


Uracil (R=H) in RNA
Thymin (R=Me) in DNA



Cytosin

A. DNA - A.1. Struktur



Koffein (= 1,3,7-Trimethylxanthin)

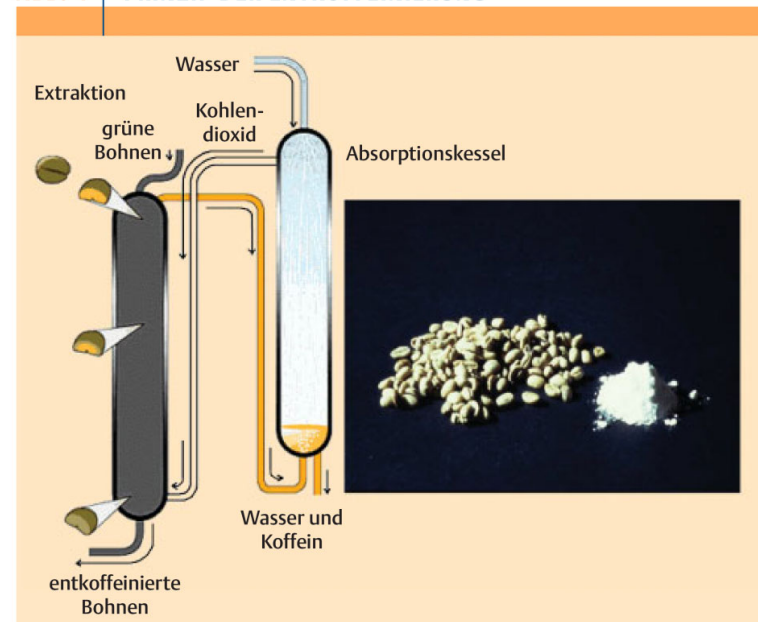
Isolierung: Runge, 1820.

Coffein hemmt die Phosphodiesterase, die cyclisches AMP (Adenosinmonophosphat) in AMP umwandelt, besitzt somit eine erregende Wirkung auf das ZNS. Herztätigkeit, Stoffwechsel und Atmung werden angeregt. Blutdruck und Körpertemperatur steigen, die Blutgefäße im Gehirn erweitern sich, die der Eingeweide verengen sich, weshalb von Müdigkeit verschont wird, sich die Stimmung hebt und die Leistungsfähigkeit gesteigert wird. Coffein ist auch bekannt für seine diuretische (harntreibende) Wirkung.



Leitner, CHIUZ 2003, 32.

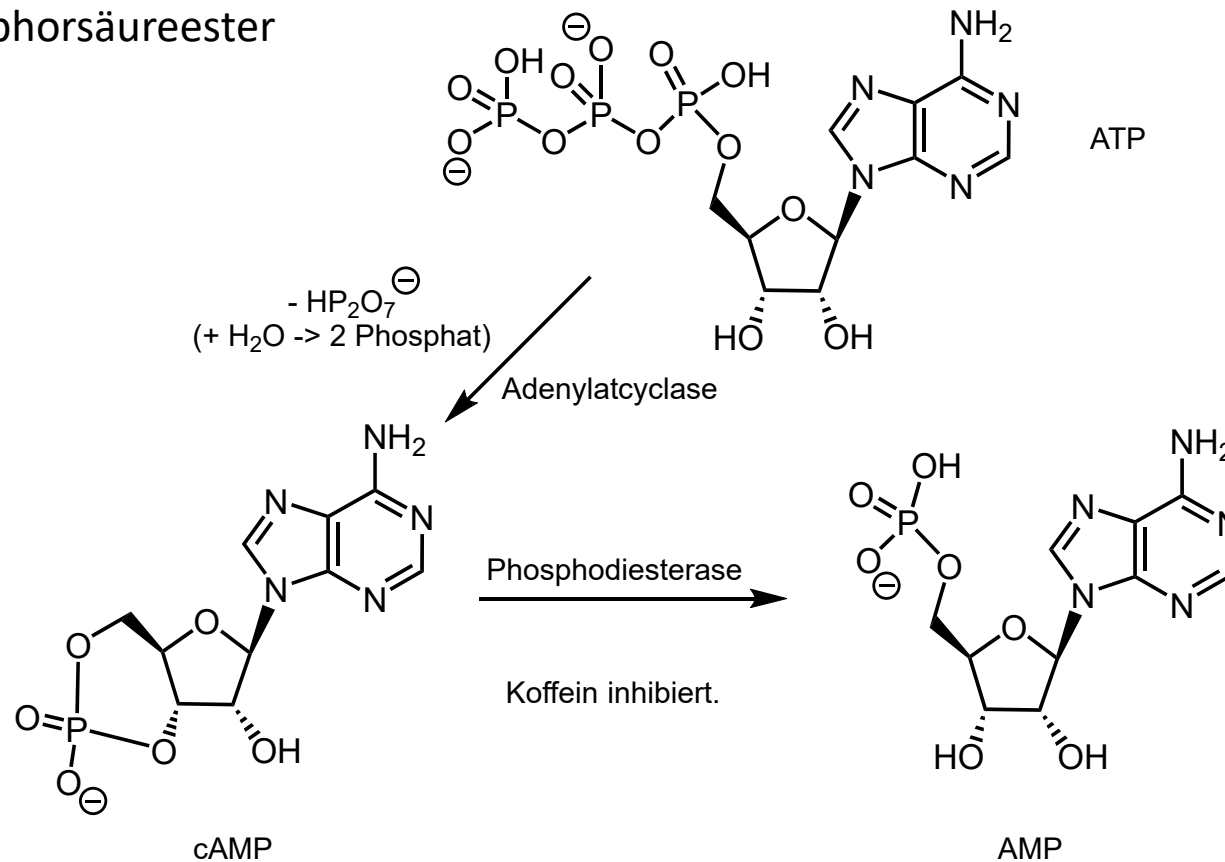
ABB. 4 | PRINZIP DER ENTKOFFEINIERUNG



Prinzip der Entkoffeinierung von grünen Kaffeebohnen mit $scCO_2$. Die abgebildeten Proben stammen aus den Pionierarbeiten von Dr. Kurt Zosel am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung.

A. DNA - A.1. Struktur

Cyclische Phosphorsäureester

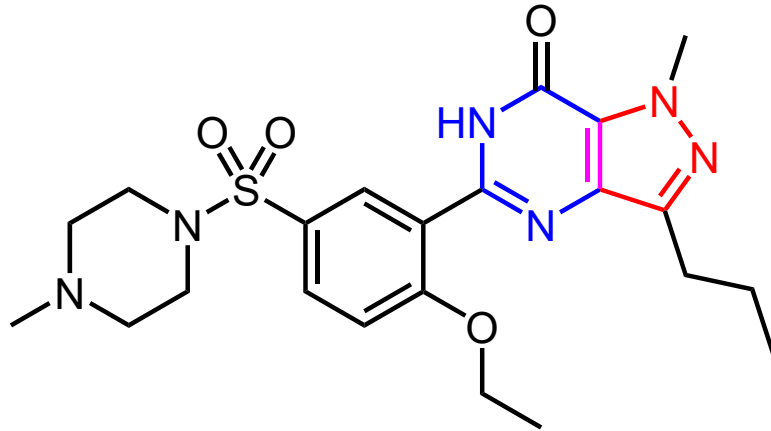


Hauptwirkmechanismus von Koffein (und Theophyllin = 1,3-Dimethylxanthin):

Antagonistische Bindung an purinerge G-Protein-gekoppelte Rezeptoren von ZNS-Neuronen => Ermüdungssymptome durch ansteigende Konzentrationen von Adenosin werden verringert.

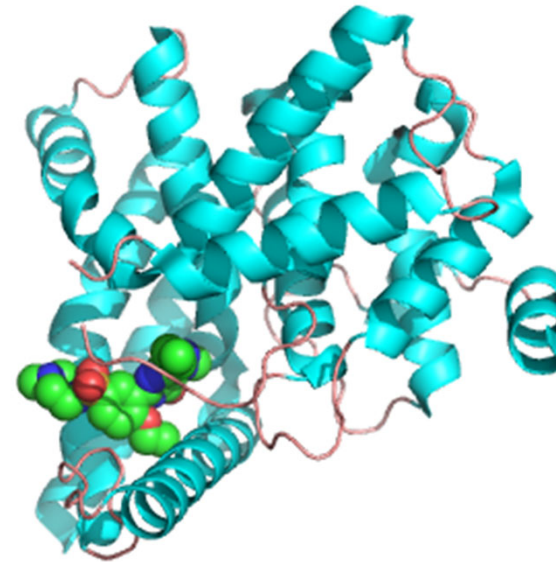
A. DNA - A.1. Struktur

Leitstruktur Purin



ein 7H-Pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-on

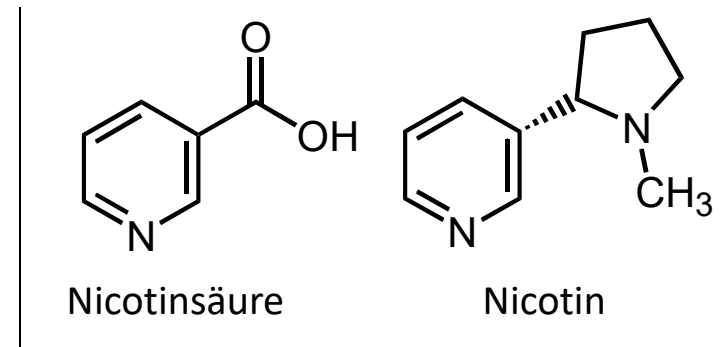
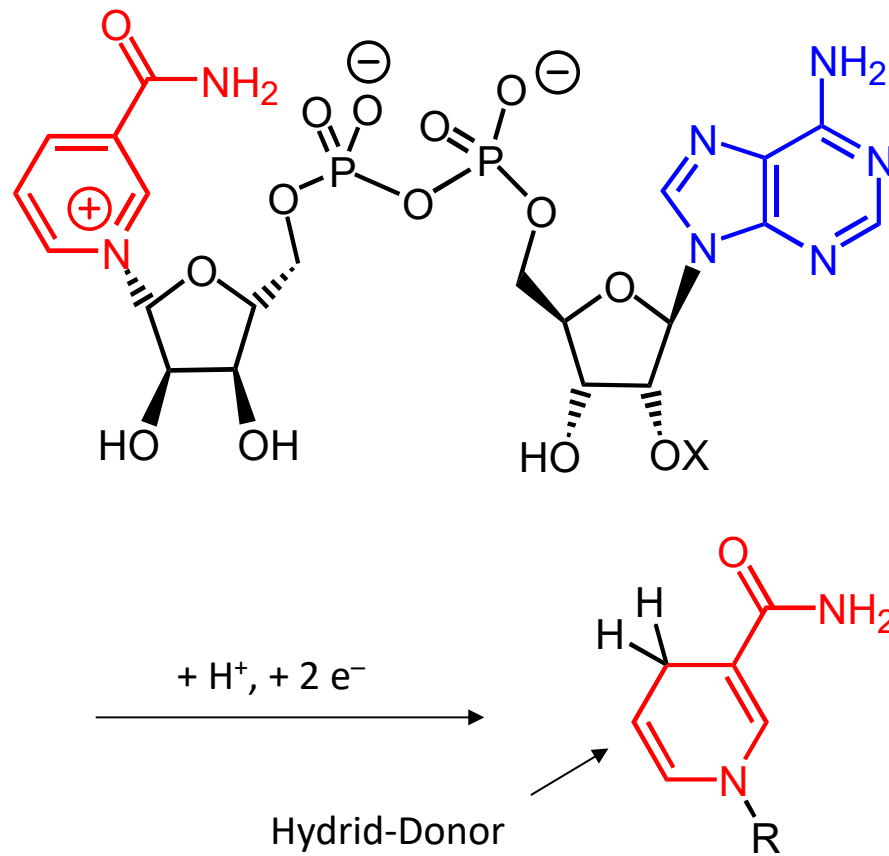
Sildenafil (-> Viagra) inhibiert die Phosphodiesterase 5 (PDE₅), die das gefäßerweiternde cGMP (Struktur?) hydrolysiert.



A. DNA - A.1. Struktur

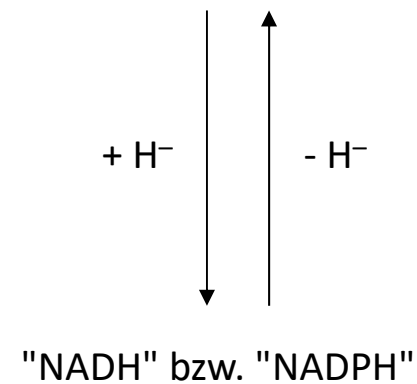
Adenin als Teilstruktur von NADH

Oxidation mit "NAD⁺" (bzw. Reduktion mit "NADH/H⁺")



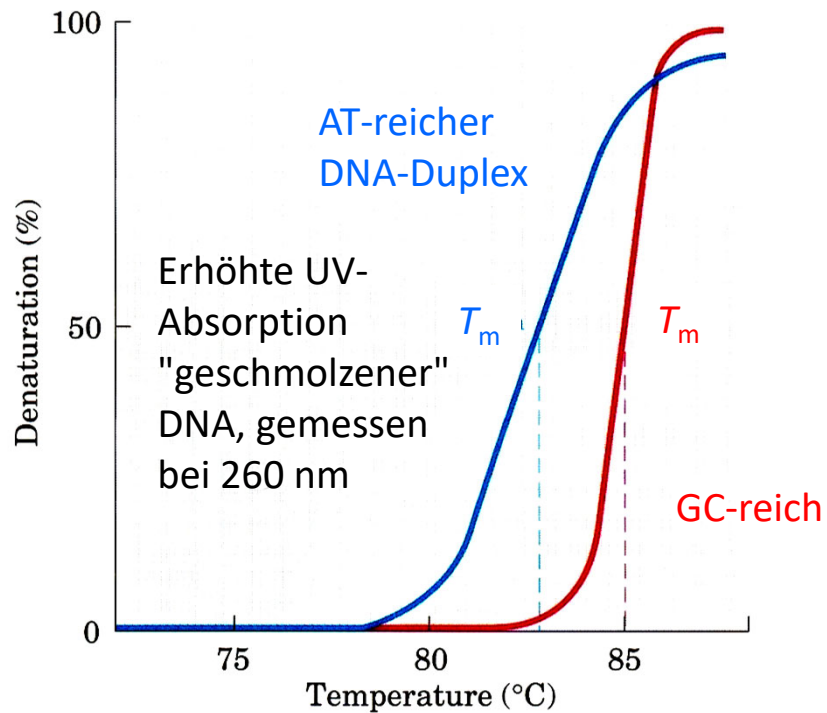
X = H:
Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid ("NAD⁺")

X = OPO₃H⁻: ("NADP⁺")



A. DNA - A.1. Struktur

Thermische Stabilität der DNA-Doppelhelix

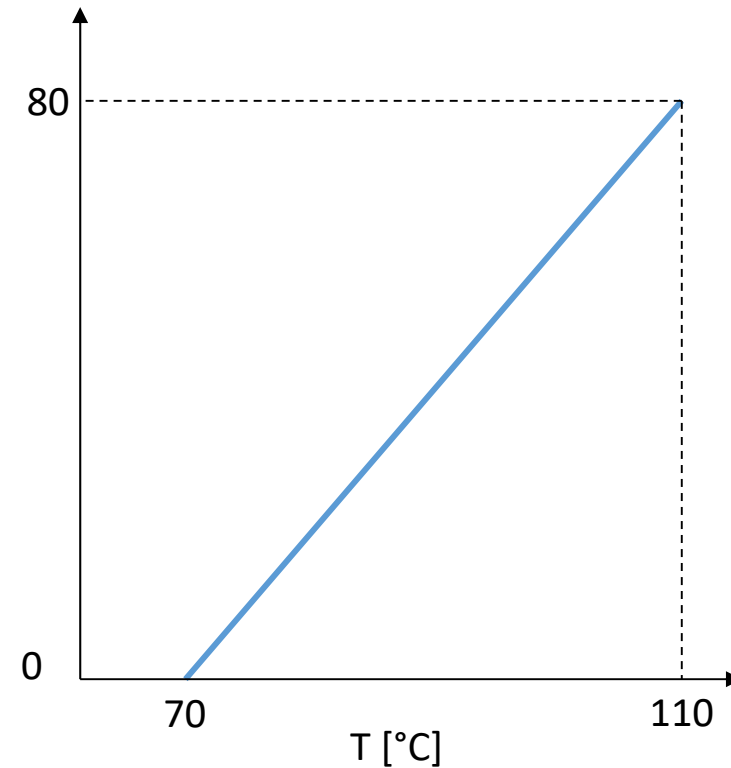


Denaturierungs-("Schmelz"-)Temperatur T_m

Wallace-Regel (b. kurzen Oligonukleotiden, gebunden an deutlich längere DNA-Monostränge): $T_m \approx (2 N_{AT} + 4 N_{GC}) \text{ } ^\circ\text{C}$

GC-Gehalt [%]

Abh. d. Schmelztemp. v. GC-Gehalt

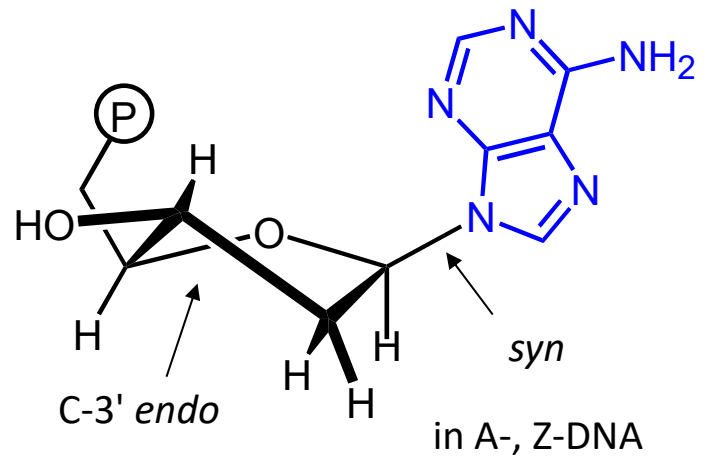
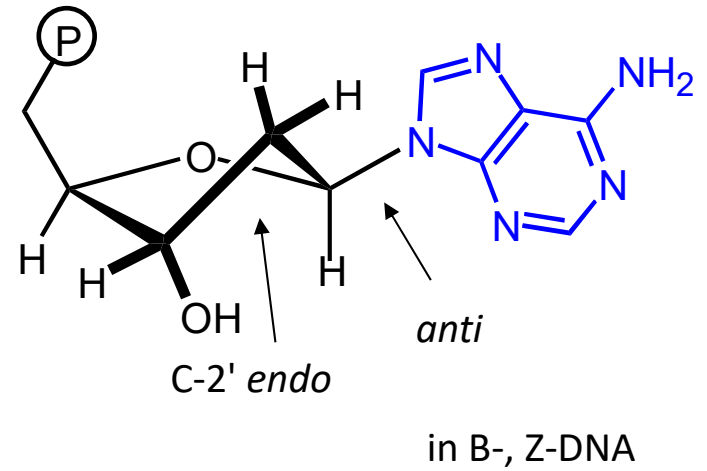
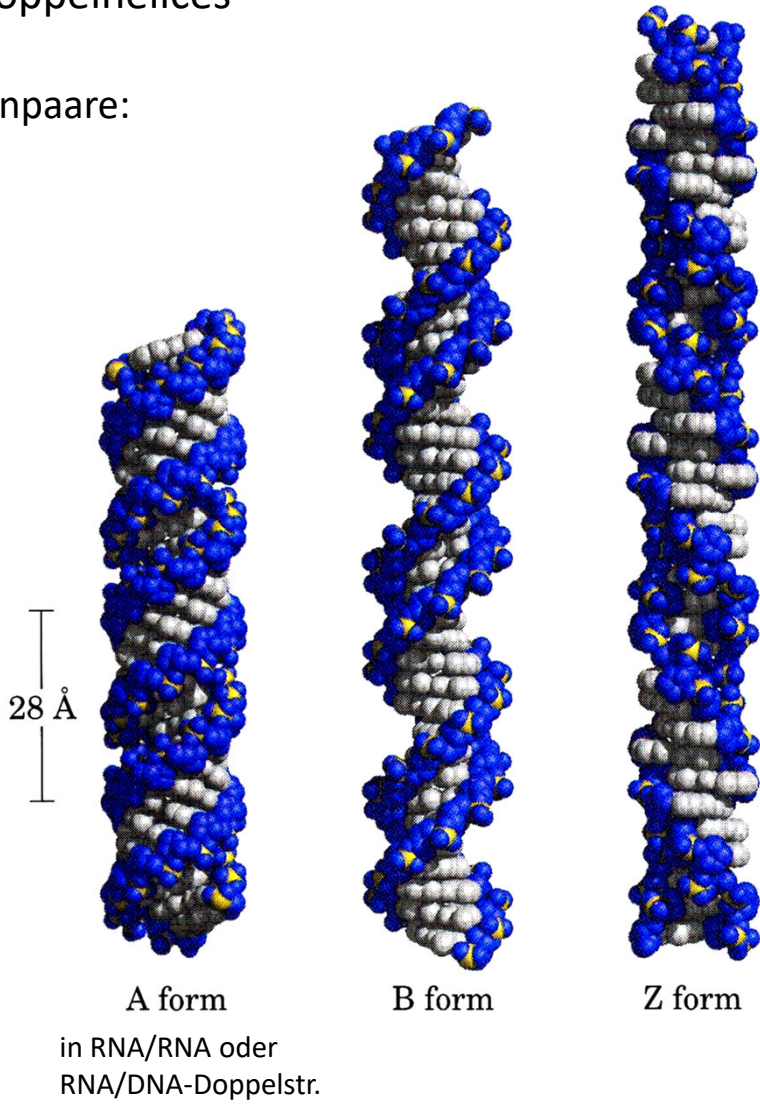


RNA-Duplexe stabiler!
 T_m ca. 20 °C größer.

A. DNA - A.1. Struktur

DNA-Doppelhelices

36 Basenpaare:

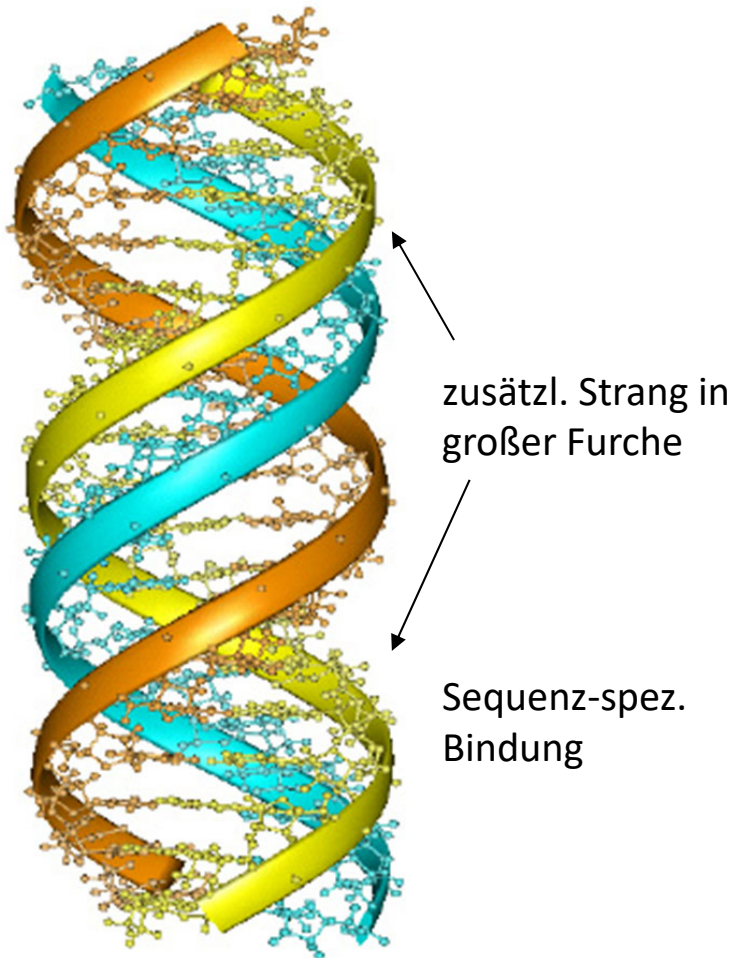


A. DNA - A.1. Struktur

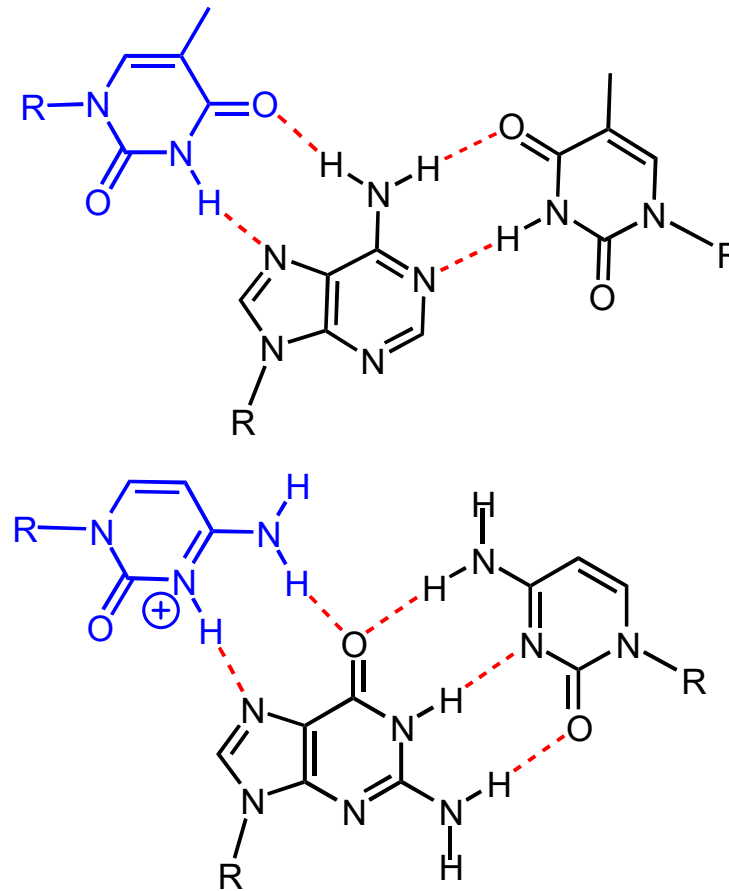
Strukturelement	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Helicität	rechts	rechts	links
Durchmesser	2.6 nm	2.0 nm	1.8 nm
Basen pro Windung	11	10.5	12
Helix-Anstieg pro Bp	2.6 Å	3.4 Å	3.7 Å
Basenneigung geg. Achse	20 °	6 °	7 °
Konf. d. 2'-Desoxyribose	<i>C-3' endo</i>	<i>C-2' endo</i>	<i>C-2' endo</i> (Pyrimidin-N.) <i>C-3' endo</i> (Purin-N.)
Konf. d. glycosid. Bdg.	<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>anti</i> (Pyrimidin-N.) <i>syn</i> (Purin-N.)
Vorliegen, wenn	Wassergeh. < 75 %	physiolog.	4 M NaCl

A. DNA - A.1. Struktur

DNA-Tripelhelix: Hoogsteen-Basentripel (Karst Hoogsteen, 1963)

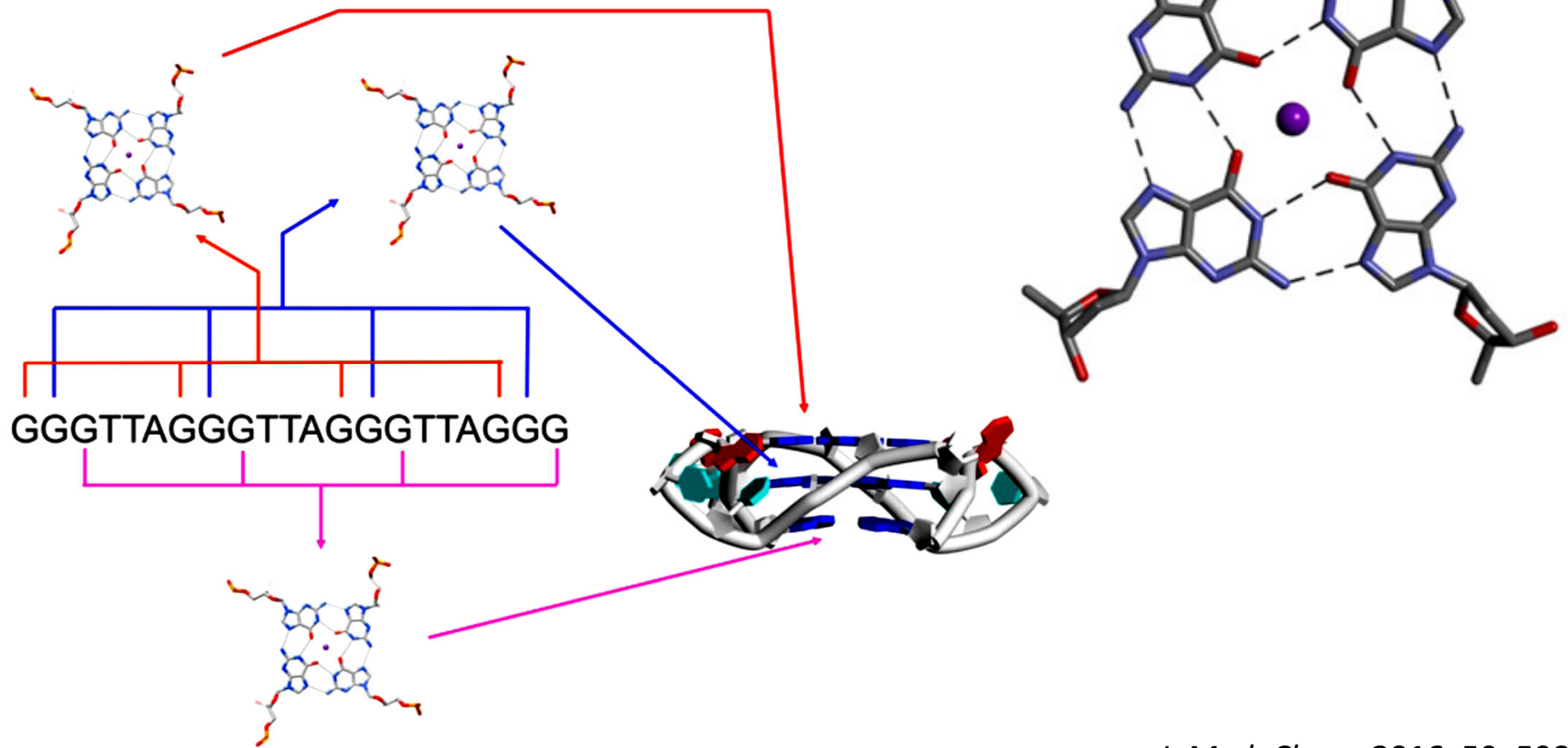


Am stabilsten bei a) kleinem pH, da eine Cytosin-Einheit protoniert sein muß, b) Vorliegen von nur aus Purin- bzw. Pyrimidin-Basen bestehenden Strängen ("2+1" oder "1+2").



A. DNA - A.1. Struktur

DNA-Quadruplexe: 4 Guanine
Telomere bestehen aus vielen Wiederholungen der DNA-Sequenz
TTAGGG.

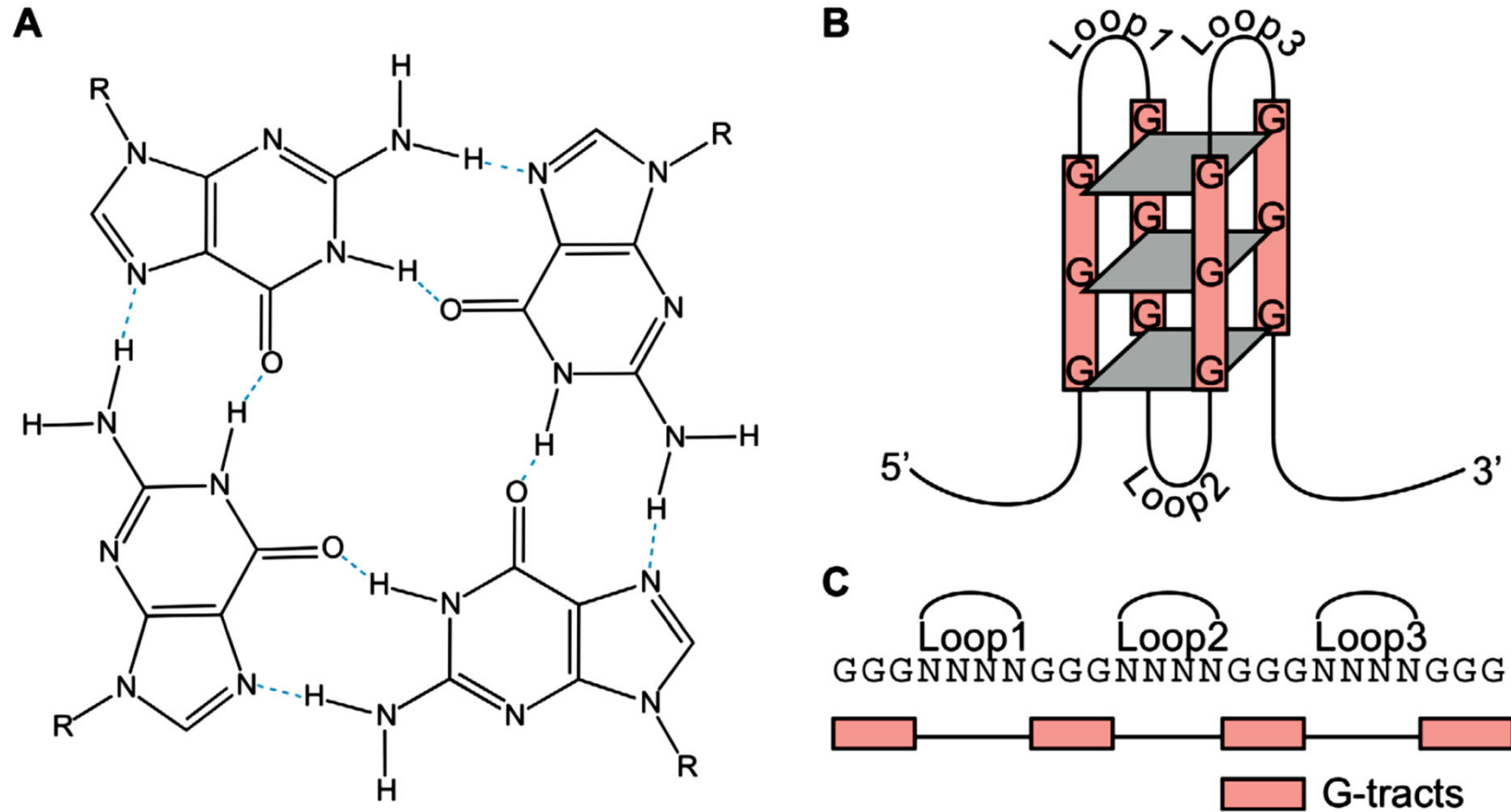


J. Med. Chem. **2016**, 59, 5987

A. DNA - A.1. Struktur

DNA-Quadruplexe: 4 Guanine

Telomere bestehen aus vielen Wiederholungen der DNA-Sequenz TTAGGG.



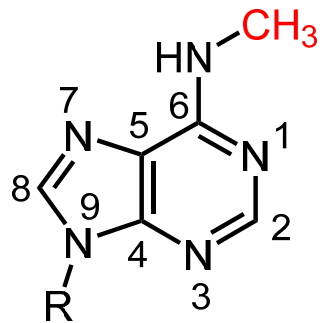
PLoS Comput Biol. 2010 Jul; 6(7): e1000861

A. DNA - A.1. Struktur

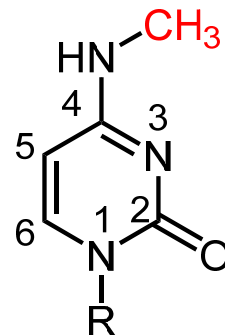
Modifizierung der DNA durch Basenmethylierung

Epigenetik untersucht stabile phänotypische Veränderungen, die keine Veränderungen in der DNA-Sequenz umfassen.

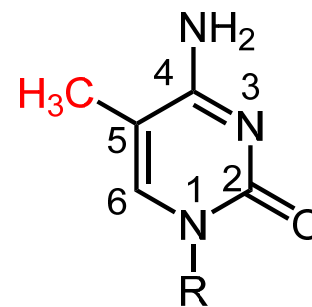
Studium des Effekts vererbbarer DNA-Modifizierungen (jenseits der Basensequenz) und der Histone.



N⁶-Methyladenin



N⁴-Methylcytosin



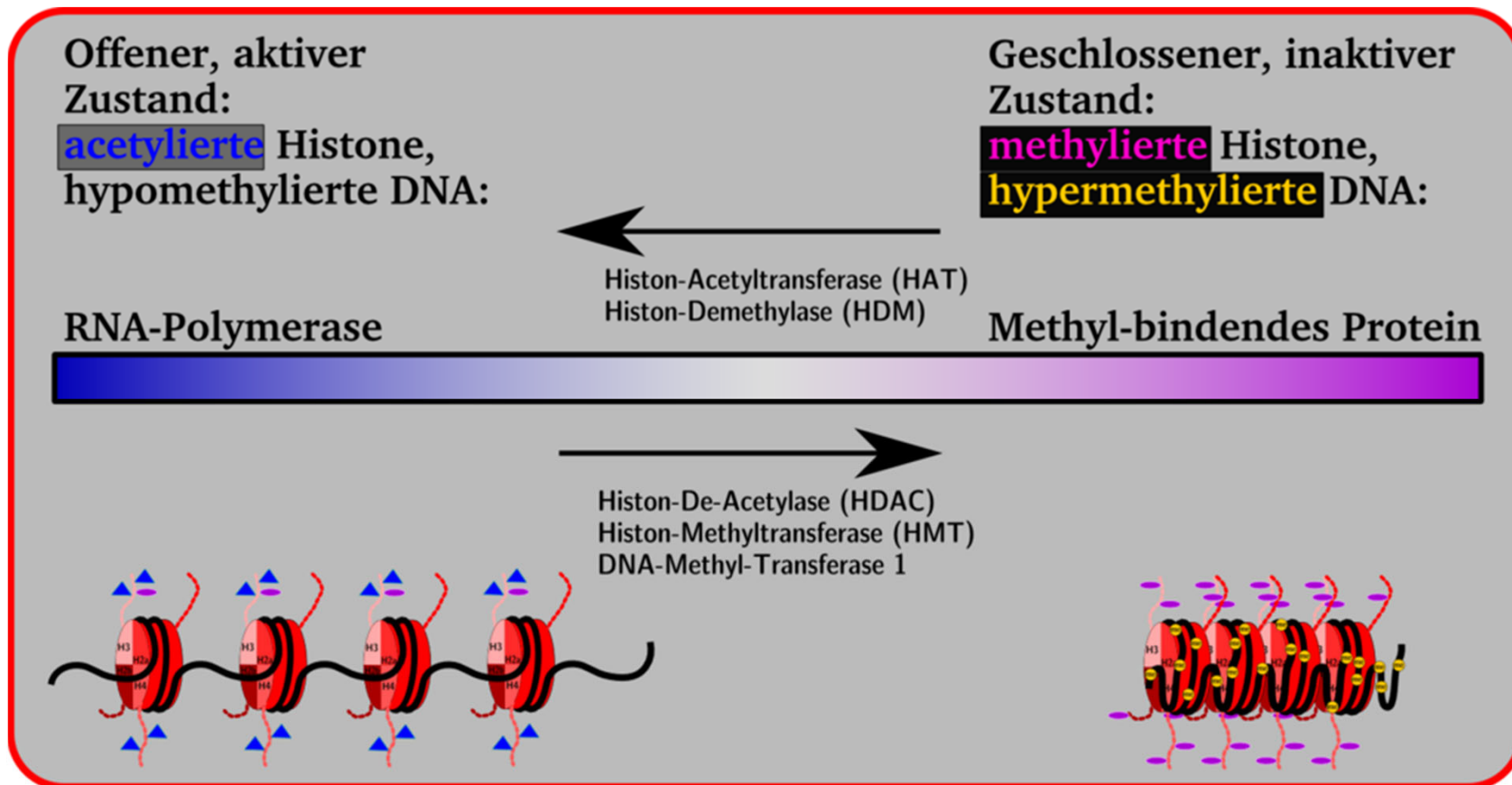
5-Methylcytosin

R = Desoxyribosyl

(R=H)

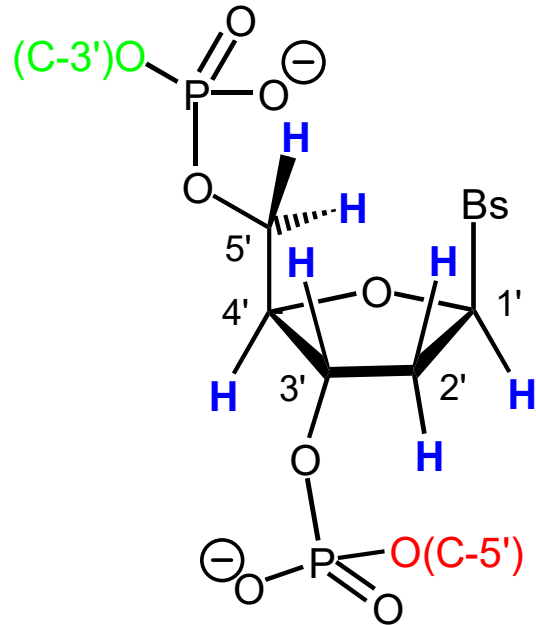
A. DNA - A.1. Struktur

Je stärker DNA und Histone methyliert sind, desto dichter gepackt und weniger zugänglich für RNA-Polymerase ist das Chromatin.



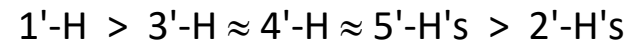
Chromatin: anfärbbar ($\chi\rho\rho\mu\alpha$, die Farbe)

Radikalische DNA-Spaltung



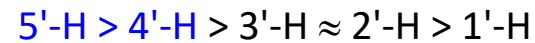
Abstraktion von $H\bullet$ (abnehmende Leichtigkeit):

Modell-Monomere mit freier Desoxyribose:



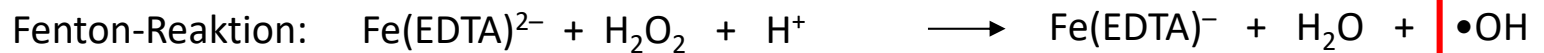
Radik. stabilisiert d. benachb. Heteroatome

Zugänglichkeit aus Lösungsm., wenn B-DNA-Doppelhelix:

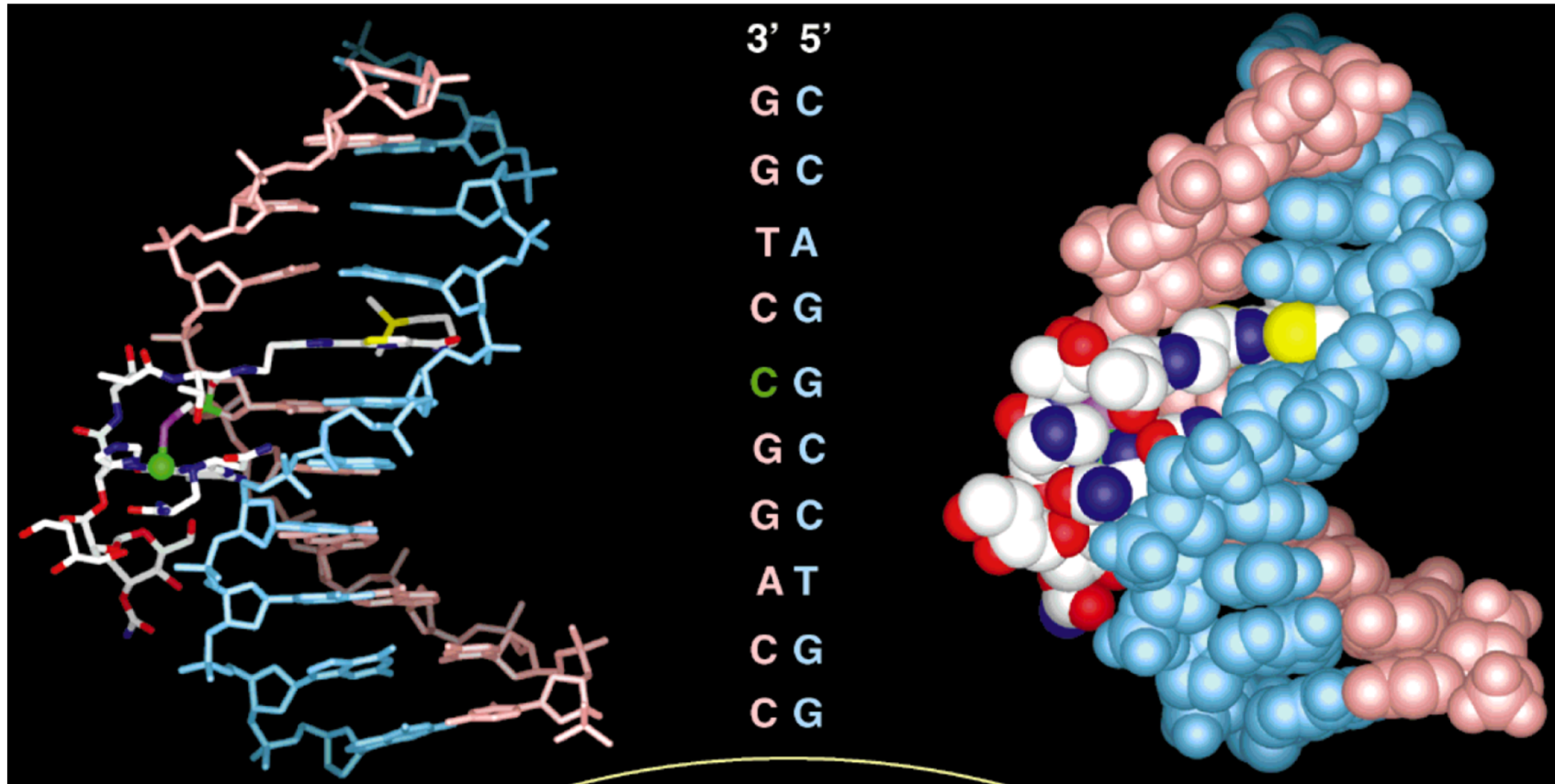


häufig

Experiment: Isotopeneffekte deuterierter Desoxyribosen unter Fenton-Bedingungen



Übersicht: Tullius et al., *Chem. Rev.* **1998**, 1089.



NMR-Struktur des Komplexes aus Co(III)-OOH-Bleomycin A₂ und einem kurzen DNA-Doppelstrang

aus: Boger et al.,
Angew. Chem. **1999**, 470.

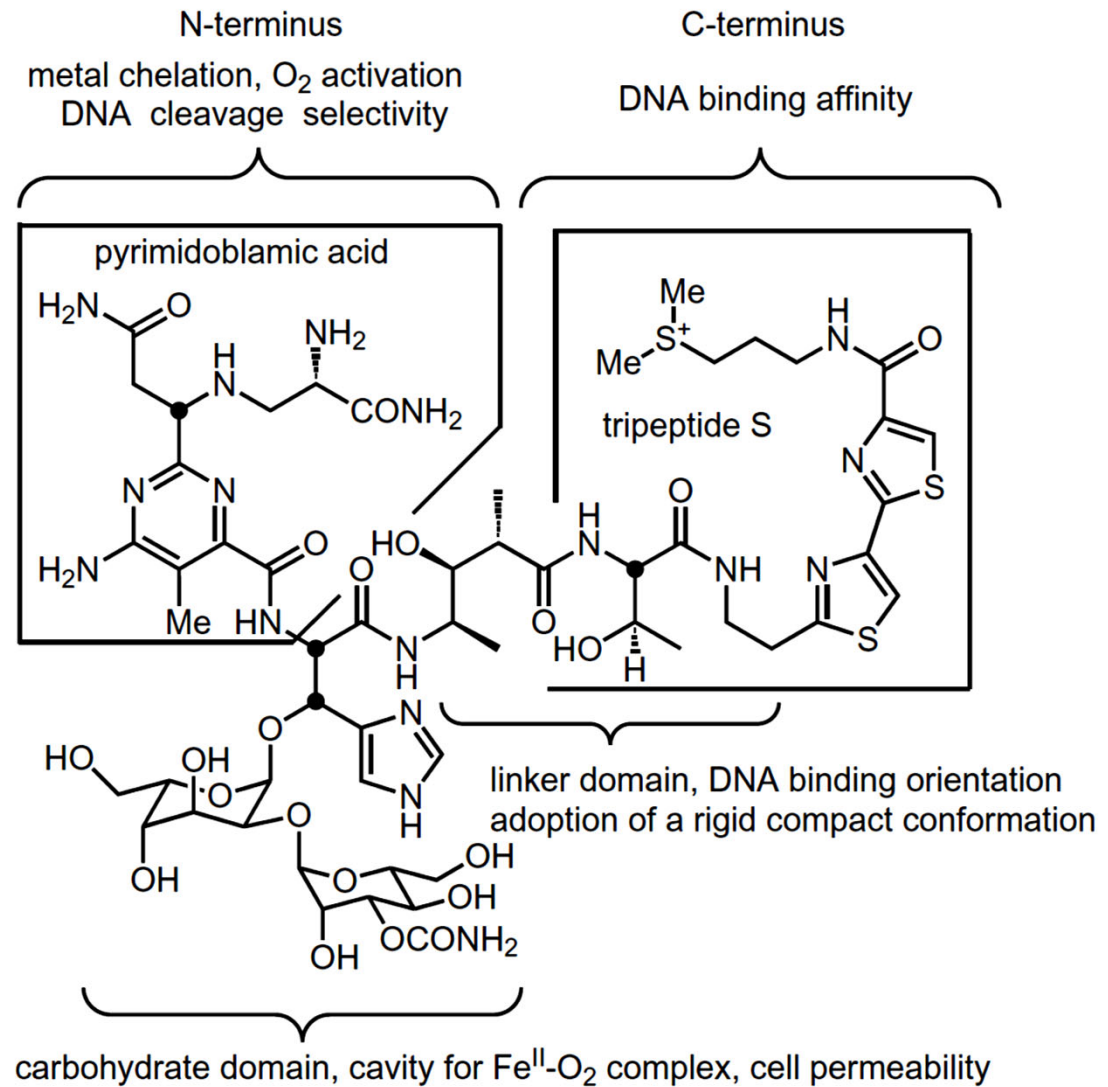
A. DNA - A.2. Reaktivität

Radikalische DNA-Spaltung

4'-H-Abstraktion
durch Fe(II)-Komplex von
Bleomycin A₂

1966 aus
Streptomyces verticollus

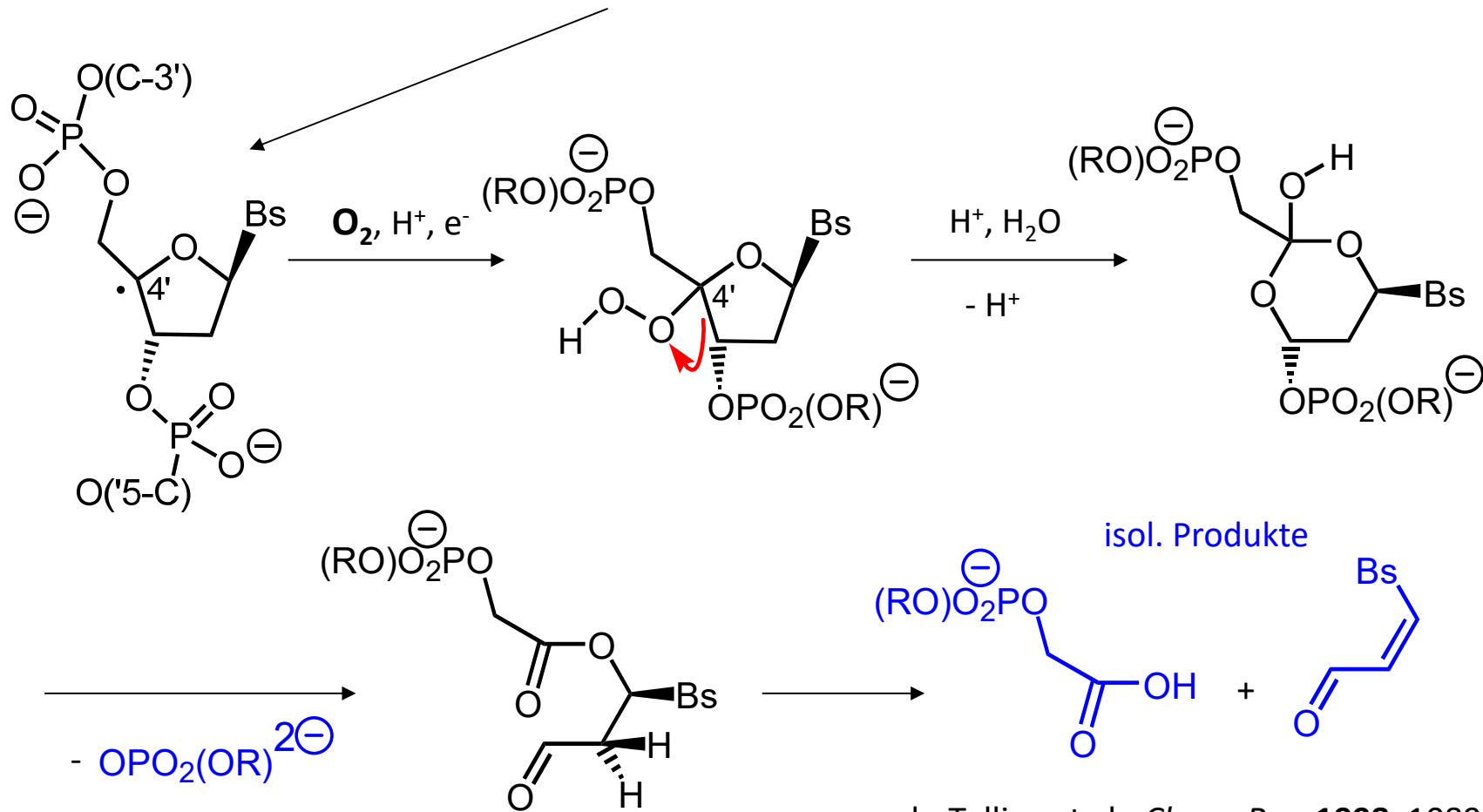
aus: Boger et al.,
Angew. Chem. **1999**, 470.



A. DNA - A.2. Reaktivität

Radikalische DNA-Spaltung durch 4'-H-Abstraktion

z. B. unter *aeroben* Bedingungen, initiiert durch Bleomycin•Fe(II):

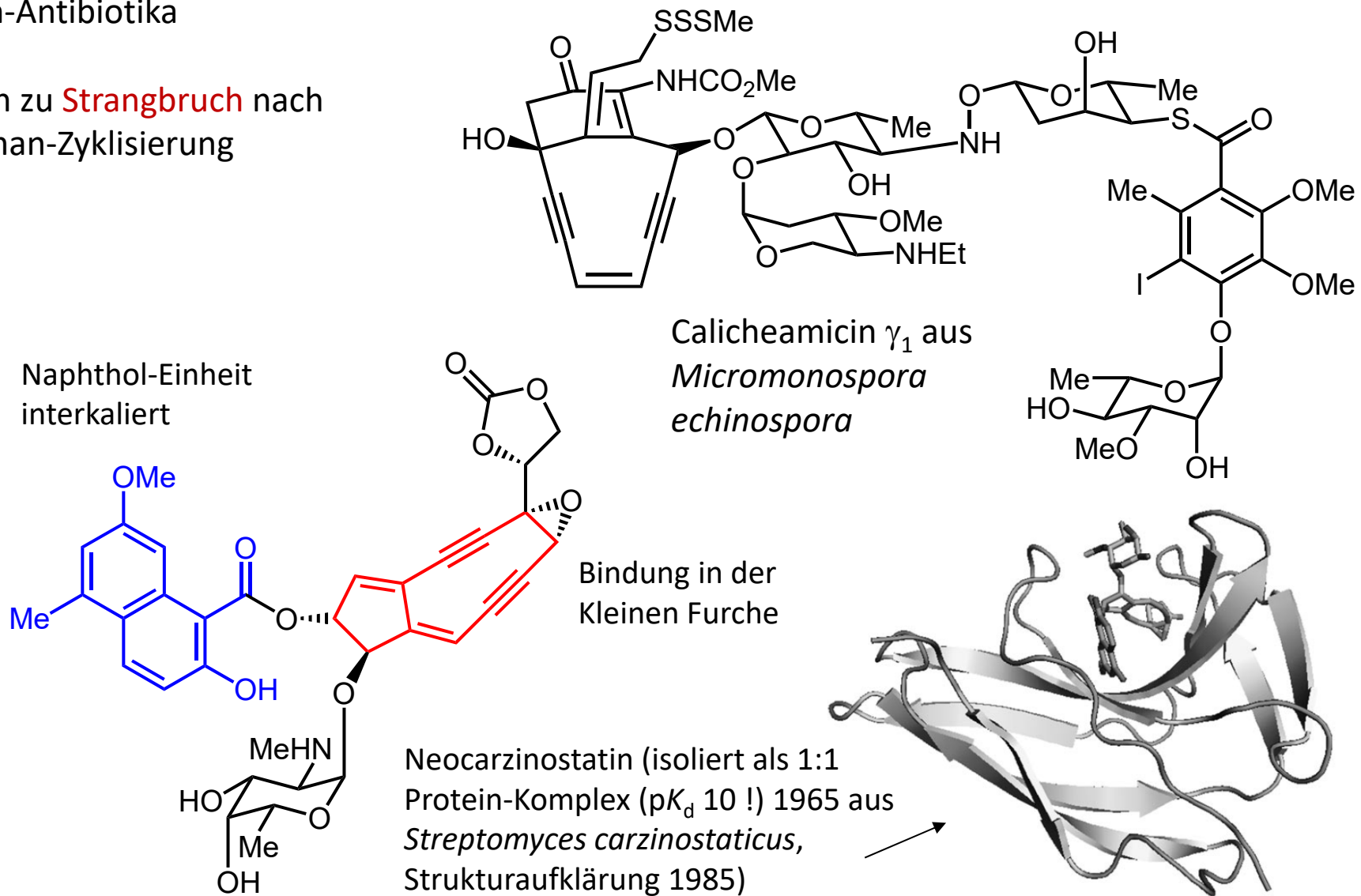


anaerob: Tullius et al., *Chem. Rev.* **1998**, 1089.

A. DNA - A.2. Reaktivität

Endiin-Antibiotika

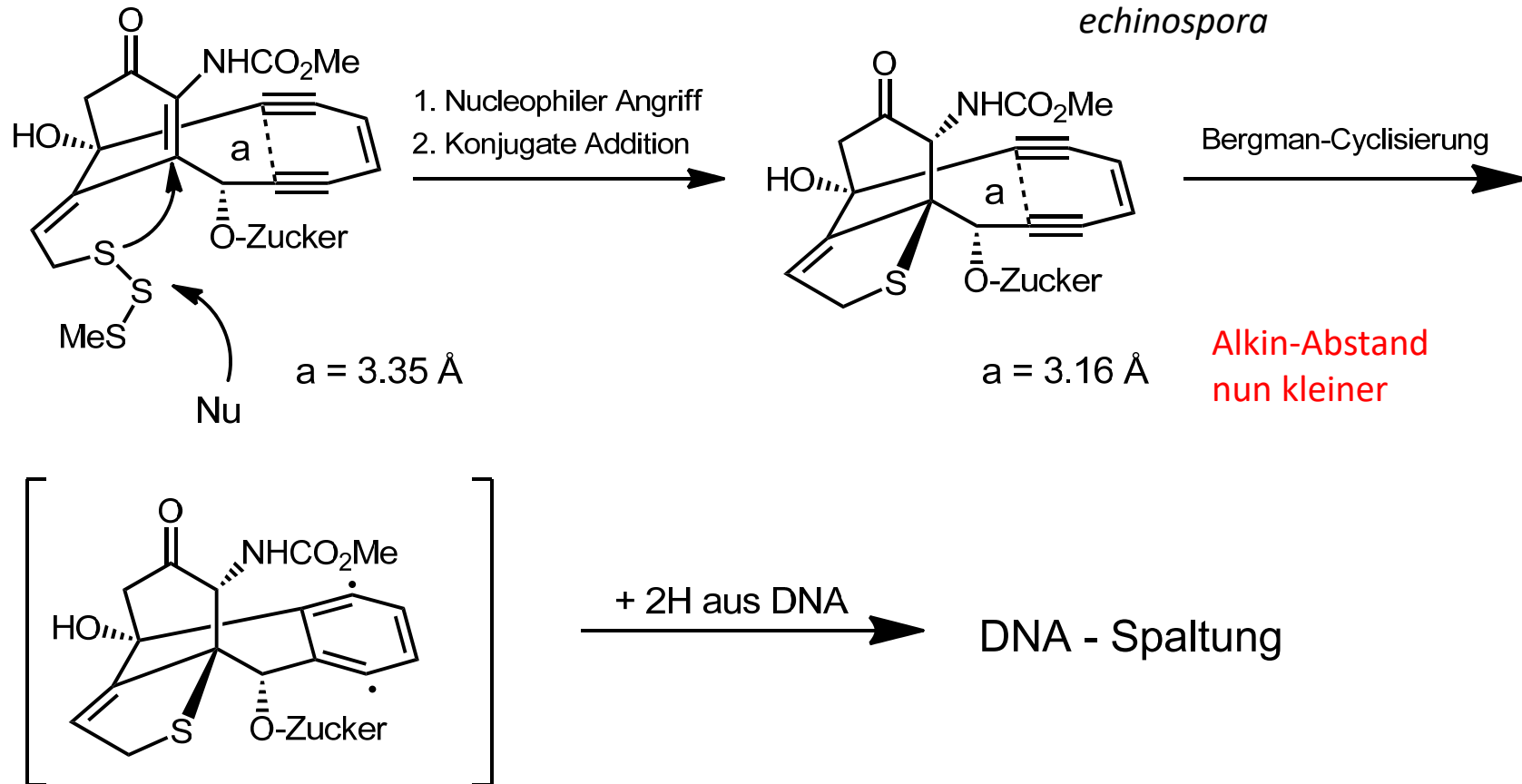
führen zu **Strangbruch** nach
Bergman-Zyklisierung



A. DNA - A.2. Reaktivität

Radikalische DNA-Spaltung

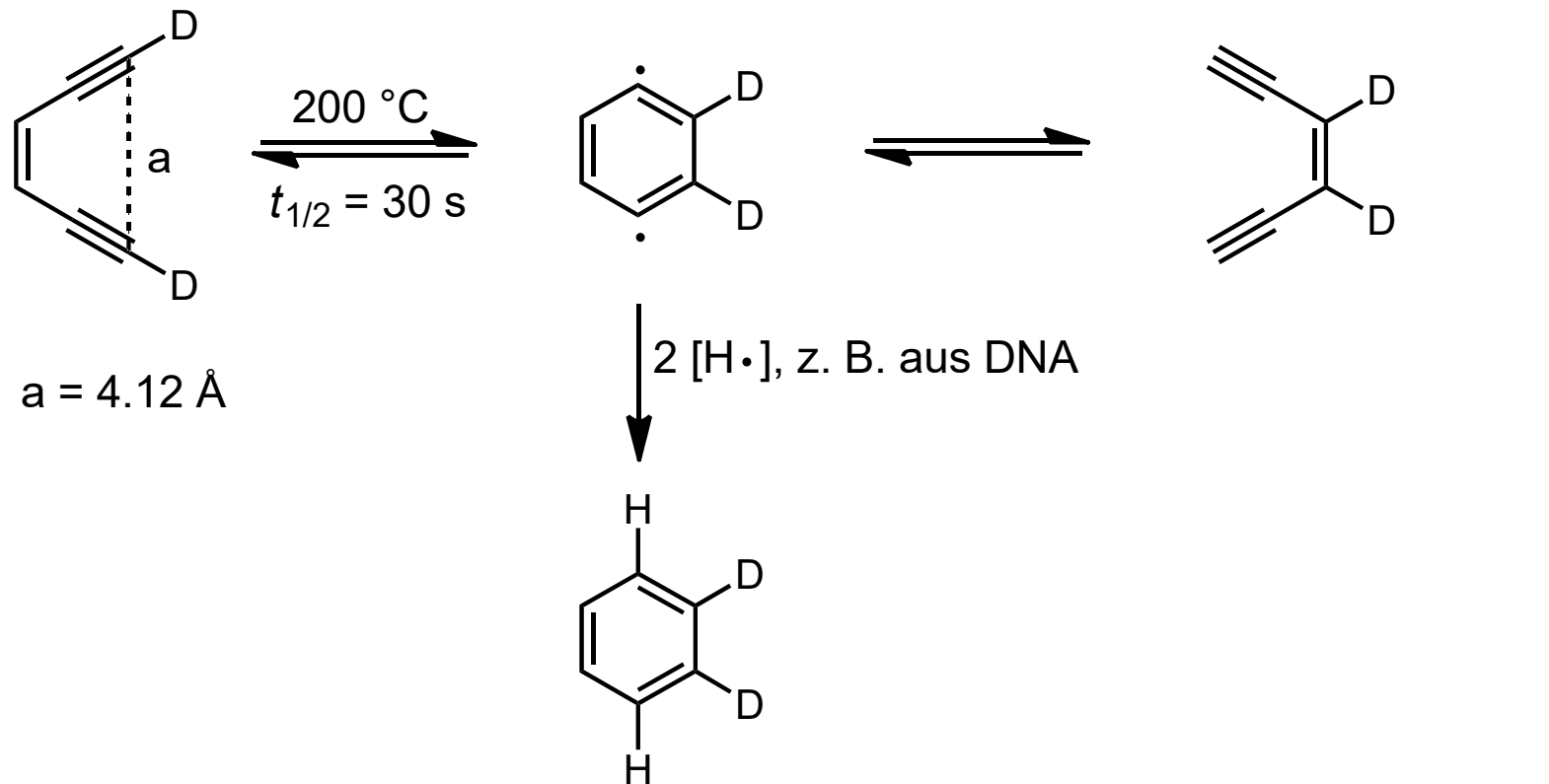
Radikalbildung durch Bergman-Cyclisierung



A. DNA - A.2. Reaktivität

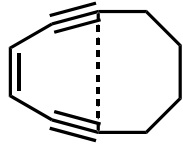
Bergman-Zyklisierung (1972):

desto schneller, je näher die Alkin-Teilstrukturen benachbart



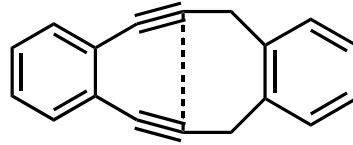
A. DNA - A.2. Reaktivität

Bergman-Zyklisierung: Beispiele, auch bei Raumtemp.!



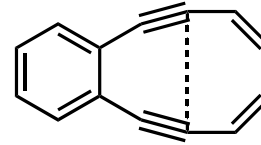
$$d = 3.25 \text{ \AA}$$

$$t_{1/2} = 18 \text{ h bei } 37 \text{ }^\circ\text{C}$$



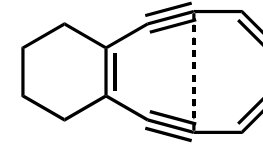
$$d = 3.03 \text{ \AA}$$

$$\text{zyklisiert bei } 25 \text{ }^\circ\text{C}$$



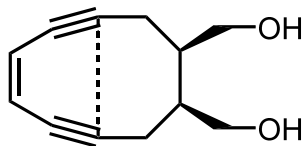
$$d = 3.01 \text{ \AA}$$

$$\text{zyklisiert bei } < 25 \text{ }^\circ\text{C}$$



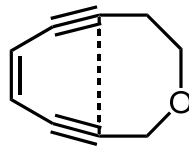
$$d = 2.99 \text{ \AA}$$

$$\text{zyklisiert bei } < 25 \text{ }^\circ\text{C}$$



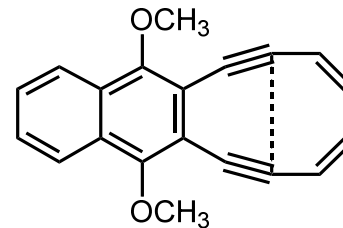
$$d = 3.20 \text{ \AA}$$

$$t_{1/2} = 12 \text{ h bei } 37 \text{ }^\circ\text{C}$$



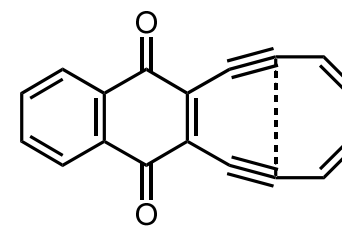
$$d = 3.40 \text{ \AA}$$

$$t_{1/2} = 52 \text{ h bei } 37 \text{ }^\circ\text{C}$$



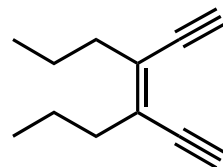
$$d = 2.96 \text{ \AA}$$

$$t_{1/2} > 7 \text{ d bei } 120 \text{ }^\circ\text{C}$$



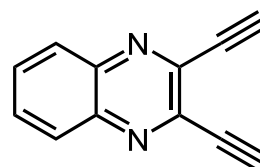
$$d = 2.97 \text{ \AA}$$

$$t_{1/2} = 3.6 \text{ d bei } 120 \text{ }^\circ\text{C}$$



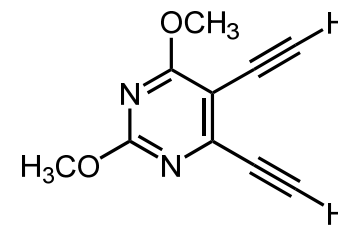
$$d = 3.94 \text{ \AA}$$

$$\text{zyklisiert bei } 156 \text{ }^\circ\text{C}$$



$$d = 4.10 \text{ \AA}$$

$$t_{1/2} = 26 \text{ min bei } 175 \text{ }^\circ\text{C}$$



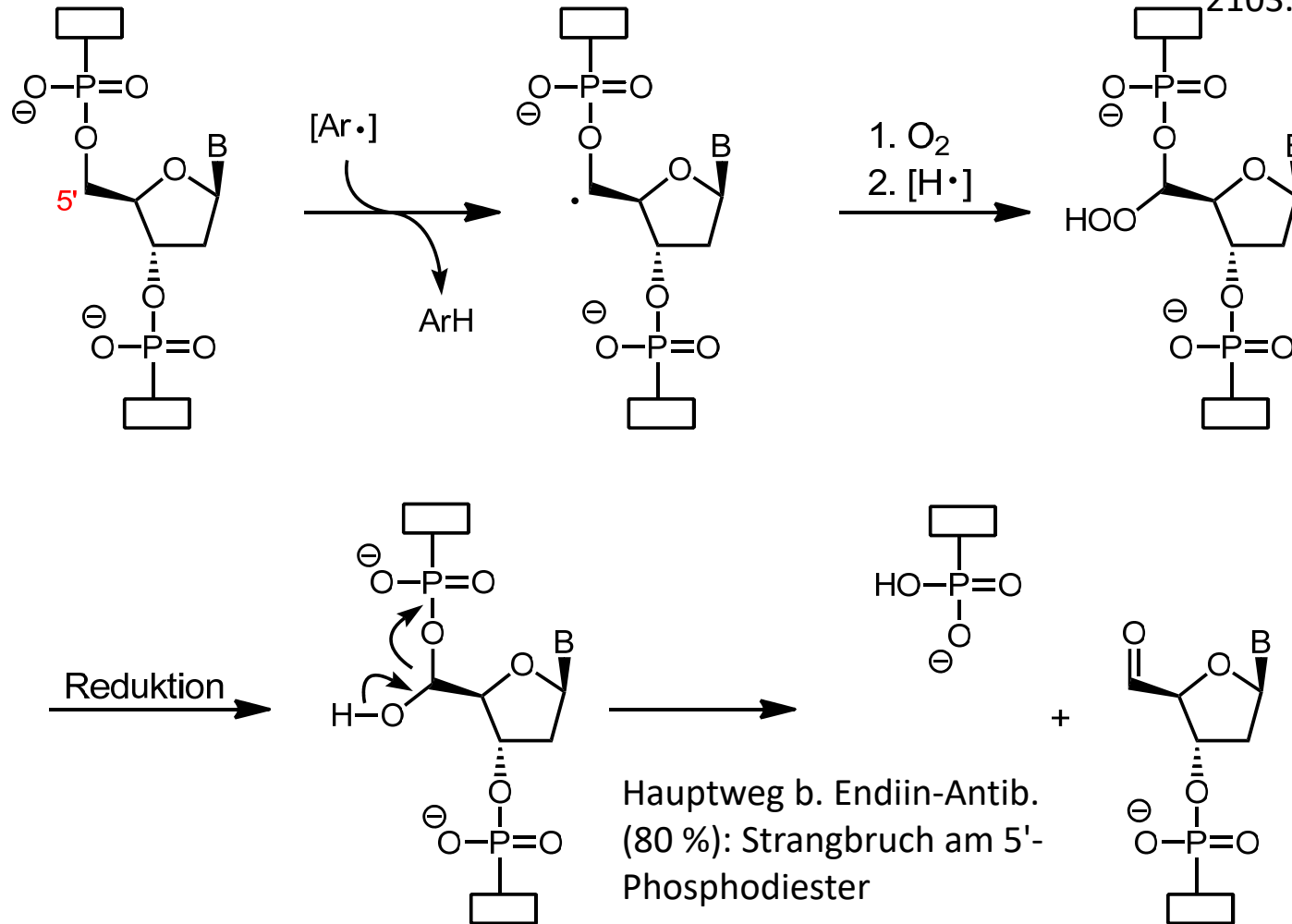
$$d = 4.13 \text{ \AA}$$

$$t_{1/2} = 3 \text{ min bei } 173 \text{ }^\circ\text{C}$$

A. DNA - A.2. Reaktivität

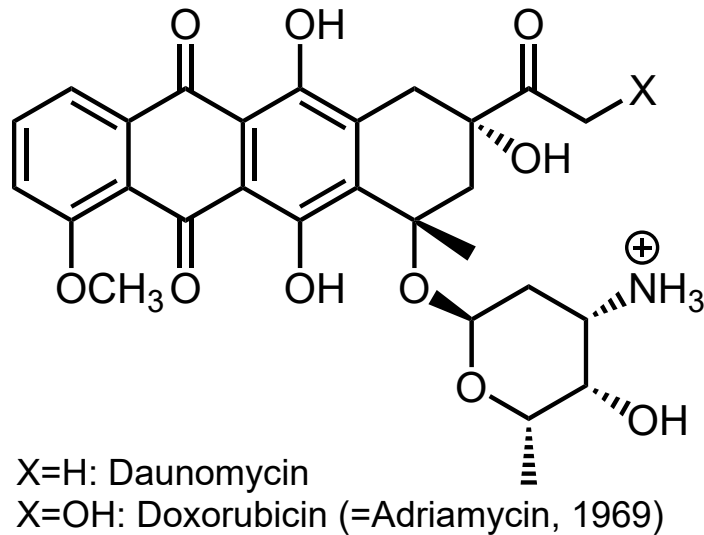
Radikalische DNA-Spaltung durch 5'-H-Abstraktion

nach: Nicolaou et al., *J. Med. Chem.* **1996**,
2103.

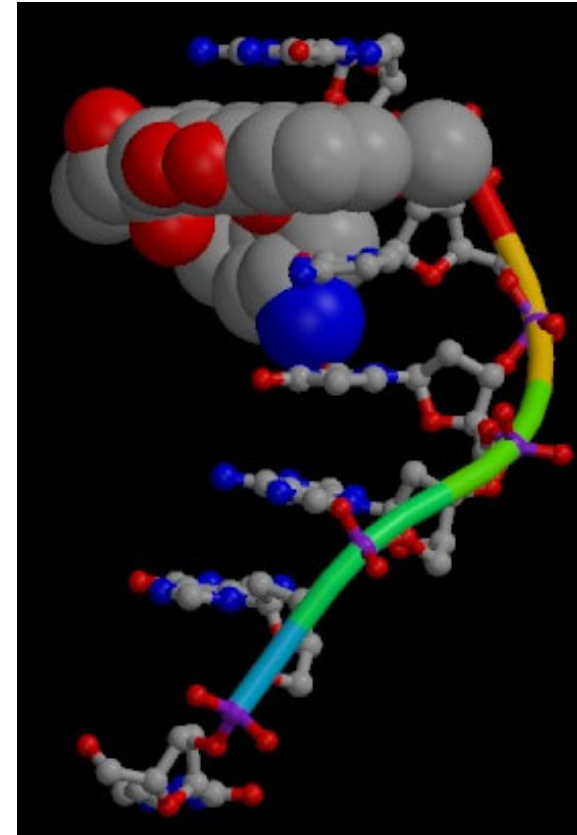


A. DNA - A.2. Reaktivität

Stapelung (" π -stacking") der DNA-Basen stabilisiert den Doppelstrang (Abstand 3.4 Å in B-DNA), erlaubt jedoch Interkalation durch Moleküle mit flacher Teilstruktur.



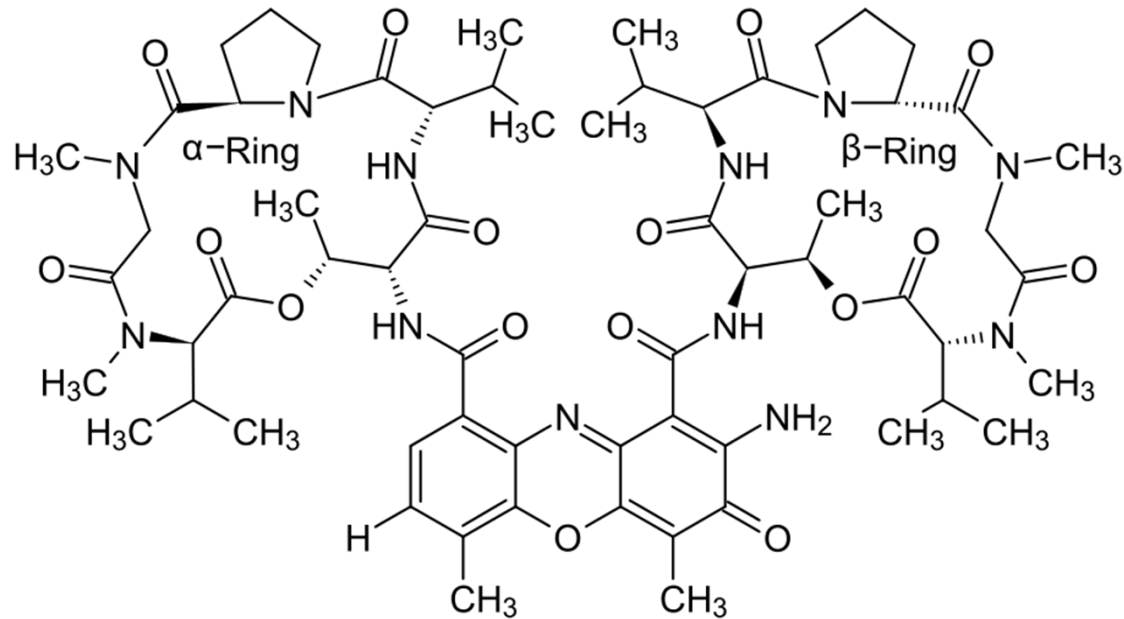
- Anthrazykline aus *Streptomyces* sp.,
- klinisch eingesetztes Cytostatikum (Hodgkin-Lymphom, Leukämie), unterbricht DNA-Transkription zu m-RNA.
- bindet an Topoisomerase II



DNA-Daunomycin-Komplex
(nur ein Strang gezeigt)

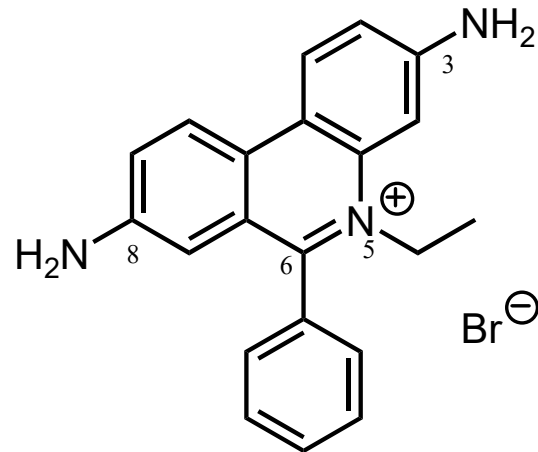
A. DNA - A.2. Reaktivität

Stapelung ("π-stacking") der DNA-Basen stabilisiert den Doppelstrang (Abstand 3.4 Å in B-DNA), erlaubt jedoch Interkalation durch Moleküle mit flacher Teilstruktur.



- Actinomycin D (= Dactinomycin) aus *Streptomyces parvulus*
- Bindung als Interkalator an DNA, wo die RNA-Synthese gehemmt wird.
- interkalierende Phenoxazon-Teilstruktur

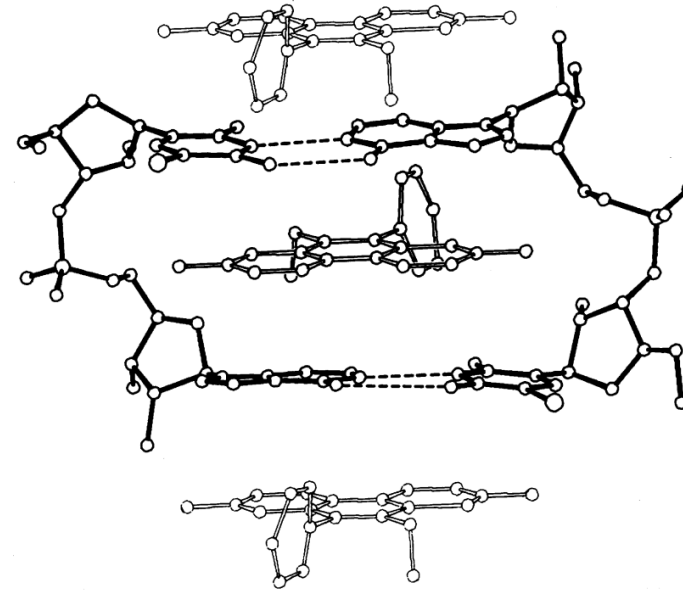
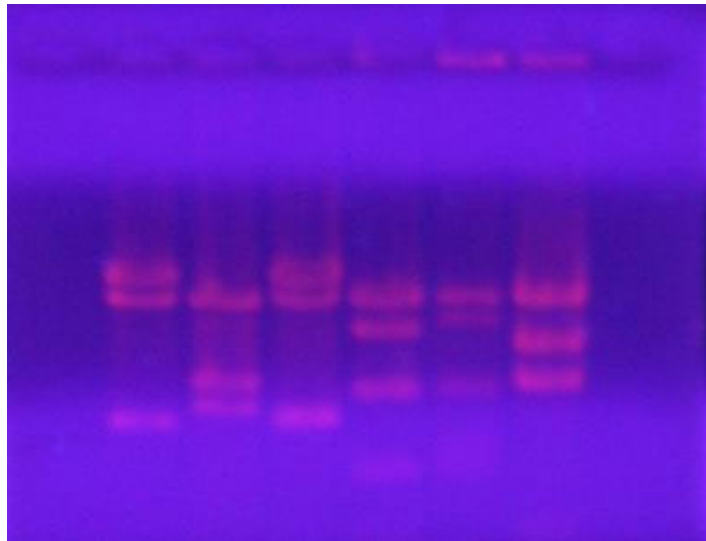
A. DNA - A.2. Reaktivität



Ethidiumbromid

(IUPAC: 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumbromid)

Quantifizierung von DNA und RNA nach der Gelelektrophorese (bis zu 3 Moleküle je 10 Basen) auf Basis der Erhöhung der Fluoreszenz der Verbindung nach Interkalation (erstmalig 1973).

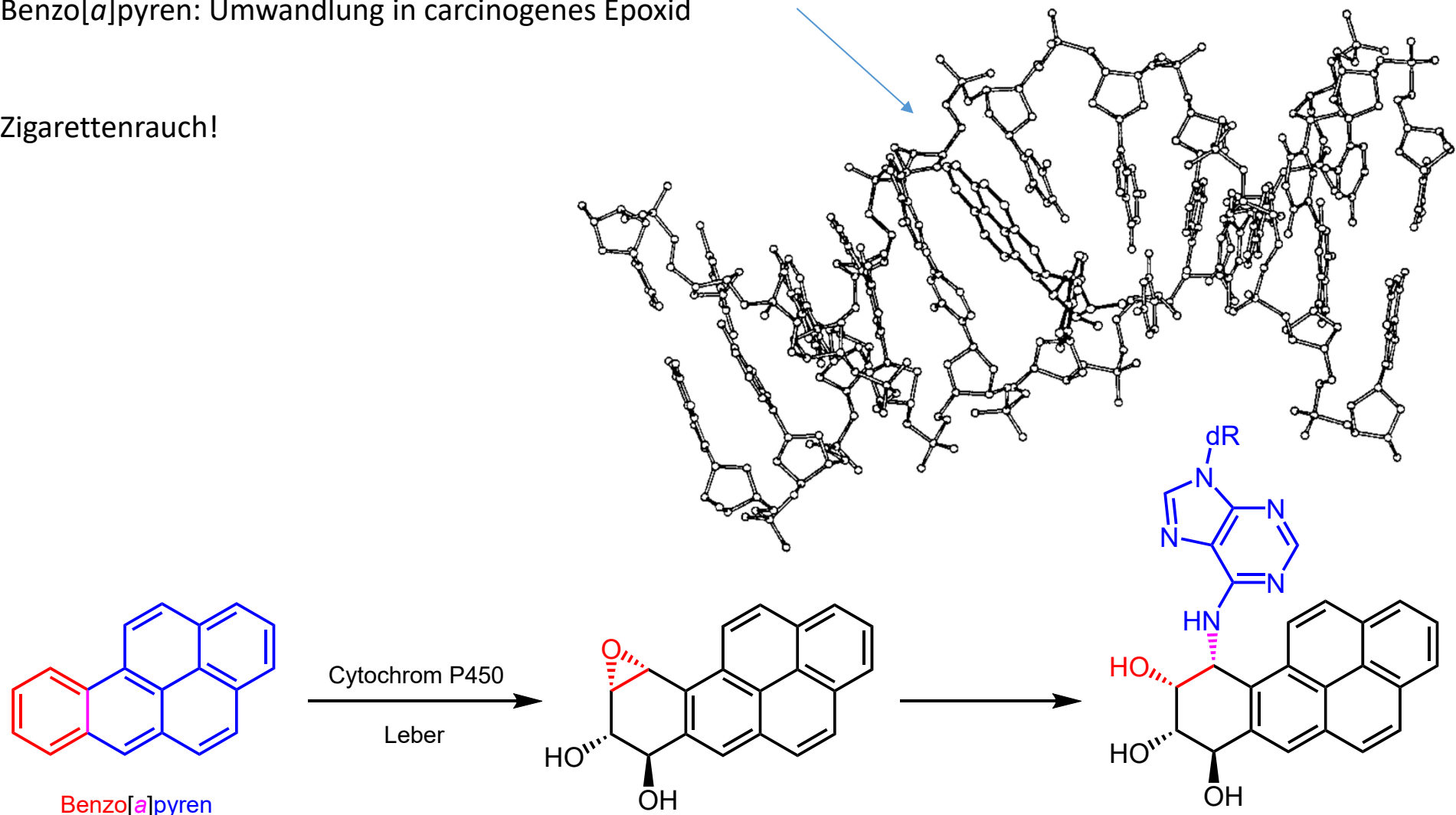


Struktur des Ethidium-(5-Ioduridylyl(3'-5')-Adenosin)-Komplexes im Kristall (Sobell et al., *PNAS* **1975**, 72, 628).

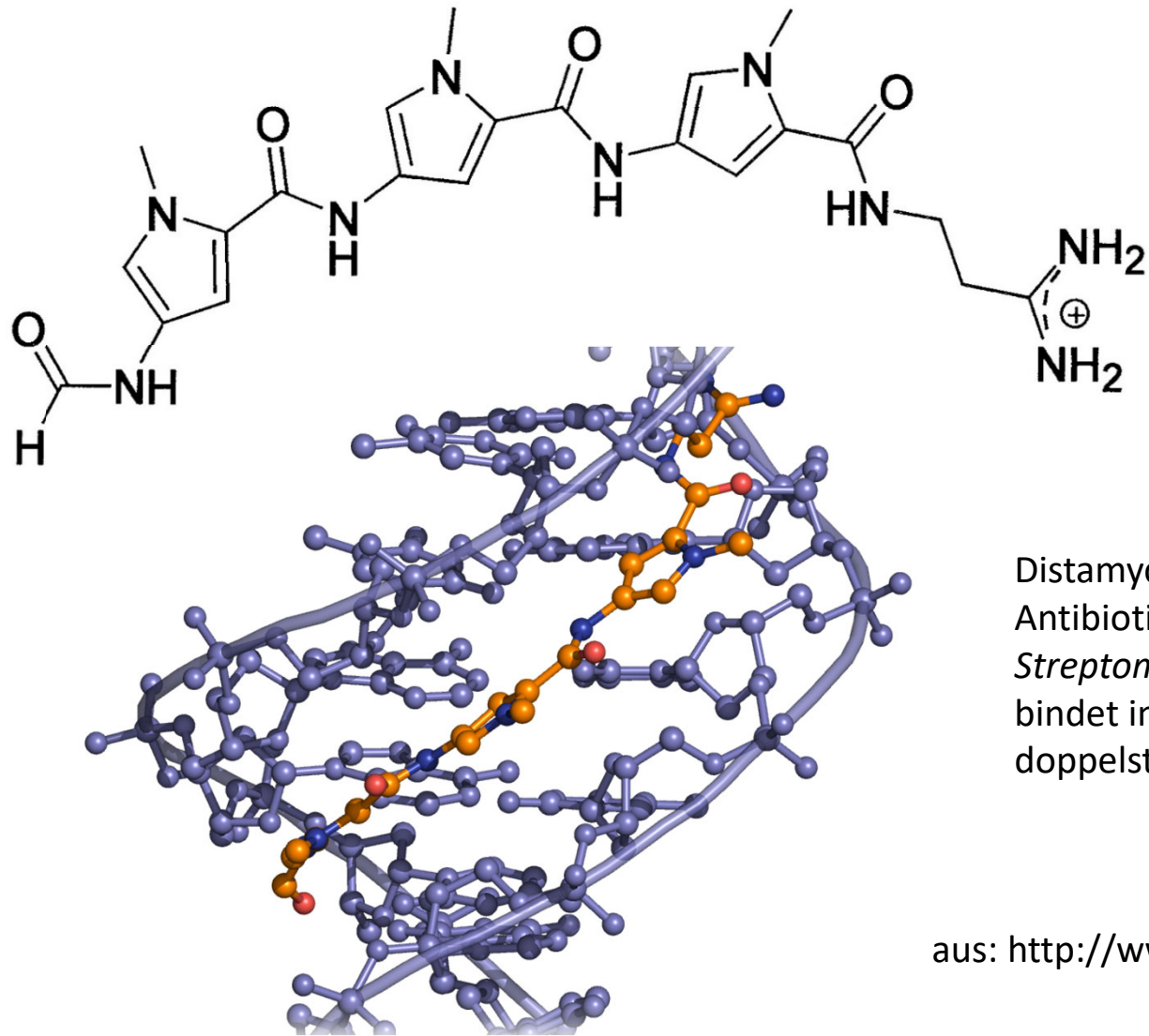
A. DNA - A.2. Reaktivität

Benzo[*a*]pyren: Umwandlung in carcinogenes Epoxid

Zigarettenrauch!



Mao et al., *Biochemistry* **1999**, *38*, 10381

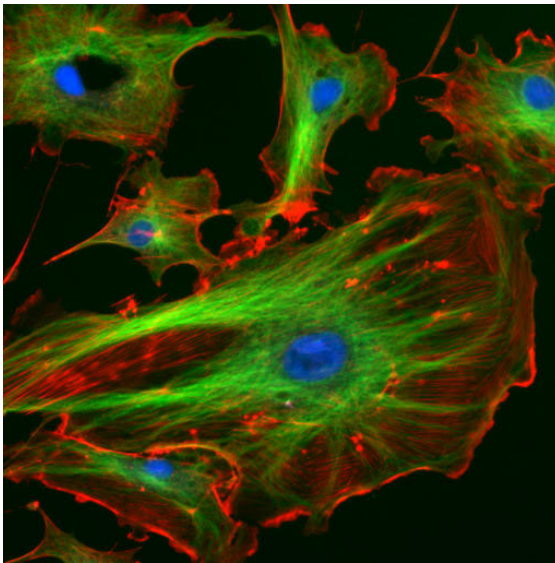
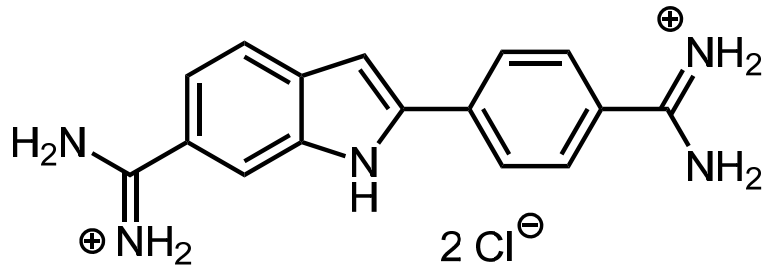


Distamycin A, ein Polyamid-Antibiotikum aus *Streptomyces distallus*, bindet in die kleine Furche doppelsträngiger DNA.

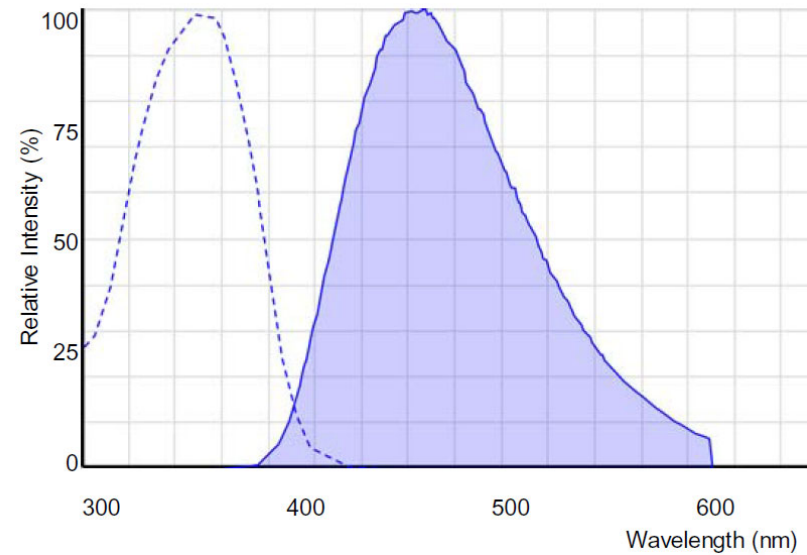
aus: <http://www.atdbio.com>

A. DNA - A.2. Reaktivität

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, 1971)
bindet in die kleine Furche AT-reicher Regionen.



Anregungs- und Emissionsspektren (DAPI)

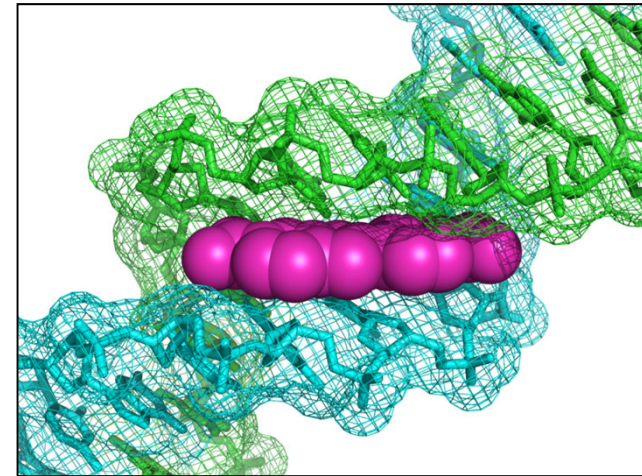
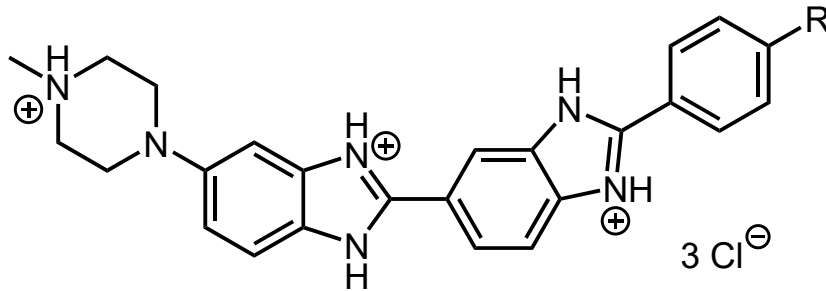


DAPI-behandelte DNA fluoresziert blau.

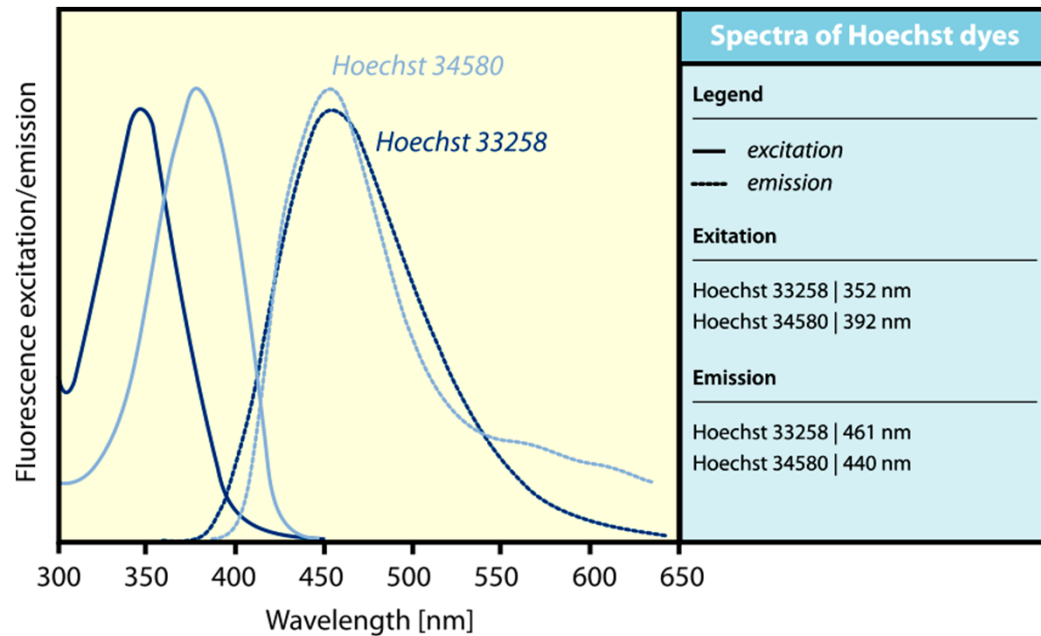
Epithelzellen;
rot, grün durch fluoreszierende Antikörper

A. DNA - A.2. Reaktivität

Farbstoffe Hoechst 33258 (R=OH)
und 34580 (R=NMe₂)

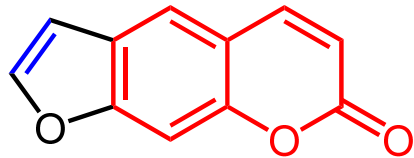


PDB: 264D

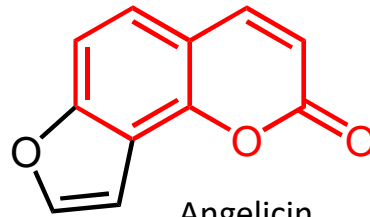


weniger toxisch als DAPI,
zellpermeabler

A. DNA - A.2. Reaktivität

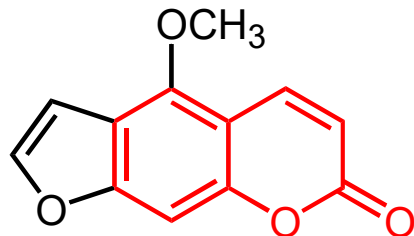


Psoralen

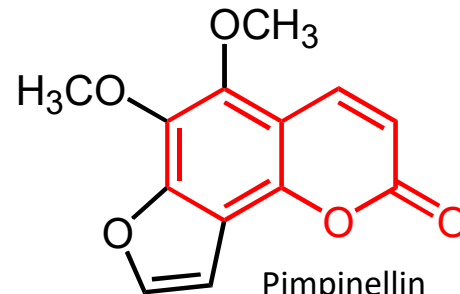


Angelicin

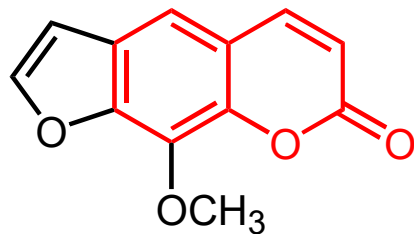
Im UV-Licht Anregung in $Ps(S_1)$, von dort entweder [2+2]Cycloaddukt an DNA, oder ISC zu $Ps(T_1)$. Verwendung v. Psoralen z. B. zur Photochemotherapie gegen Psoriasis.



Bergapten



Pimpinellin



Xanthotoxin



Riesenbärenklau (*Heracleum mantegazzianum*, > 3 m)

giftig durch: Bergapten, Xanthotoxin, Pimpinellin
Dermatitis nach Bestrahlung benetzter Haut mit Sonnenlicht

Mech. der Phototoxizität: s. Eriksson et al., *J. Photochem. Photobiol.* **2003**, 154. 235.

A. DNA - A.2. Reaktivität

Wechselwirkung von Psoralen mit DNA: Photo-[2+2]-Cycloaddition

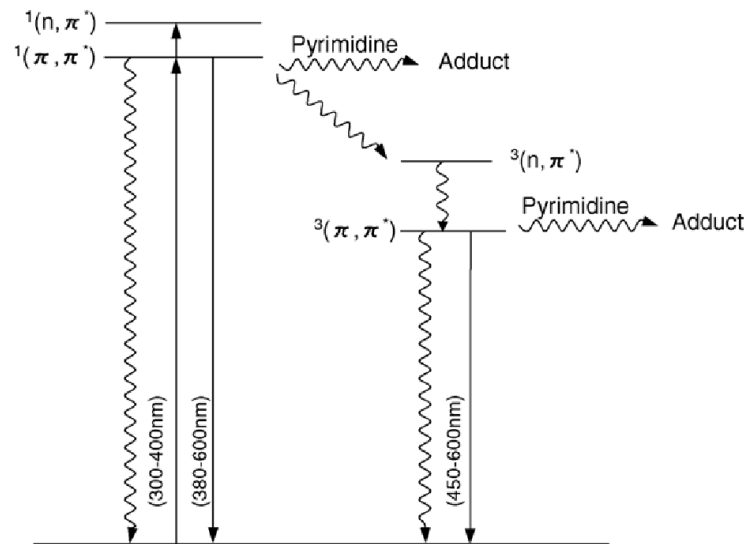
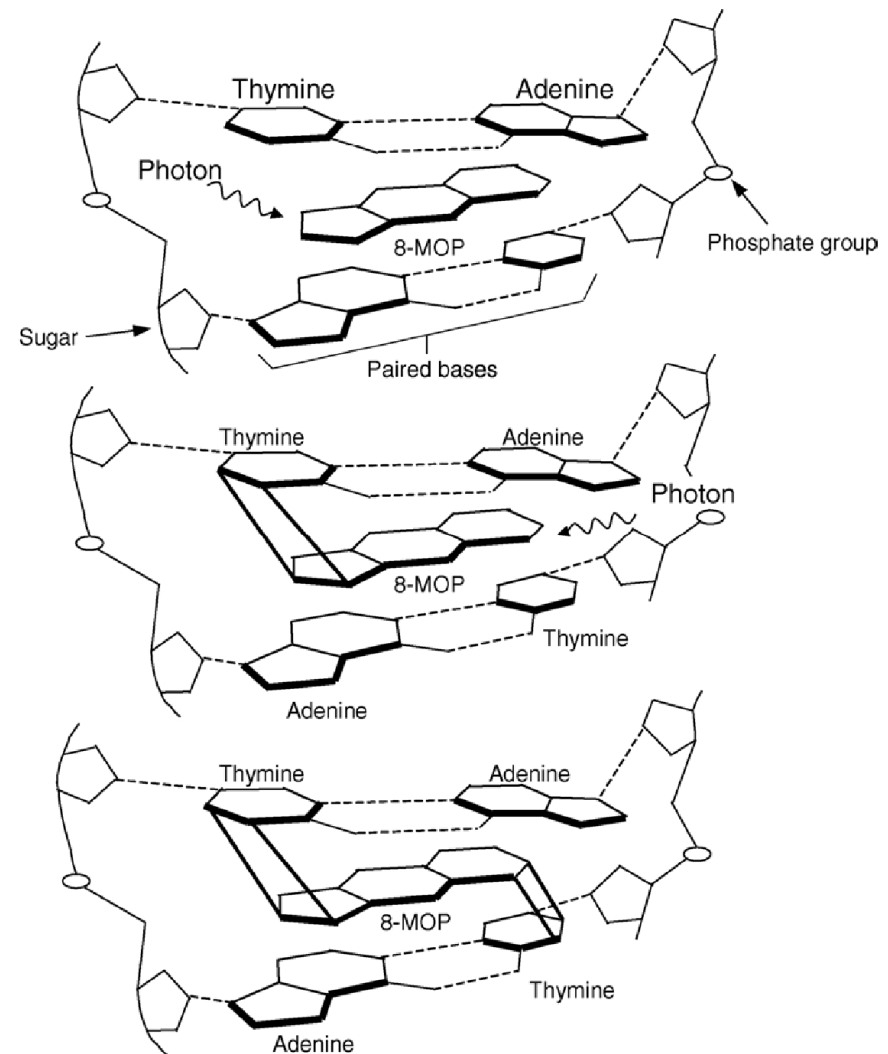


Fig. 3. Schematic representation of the energy levels of psoralen in the excited state.

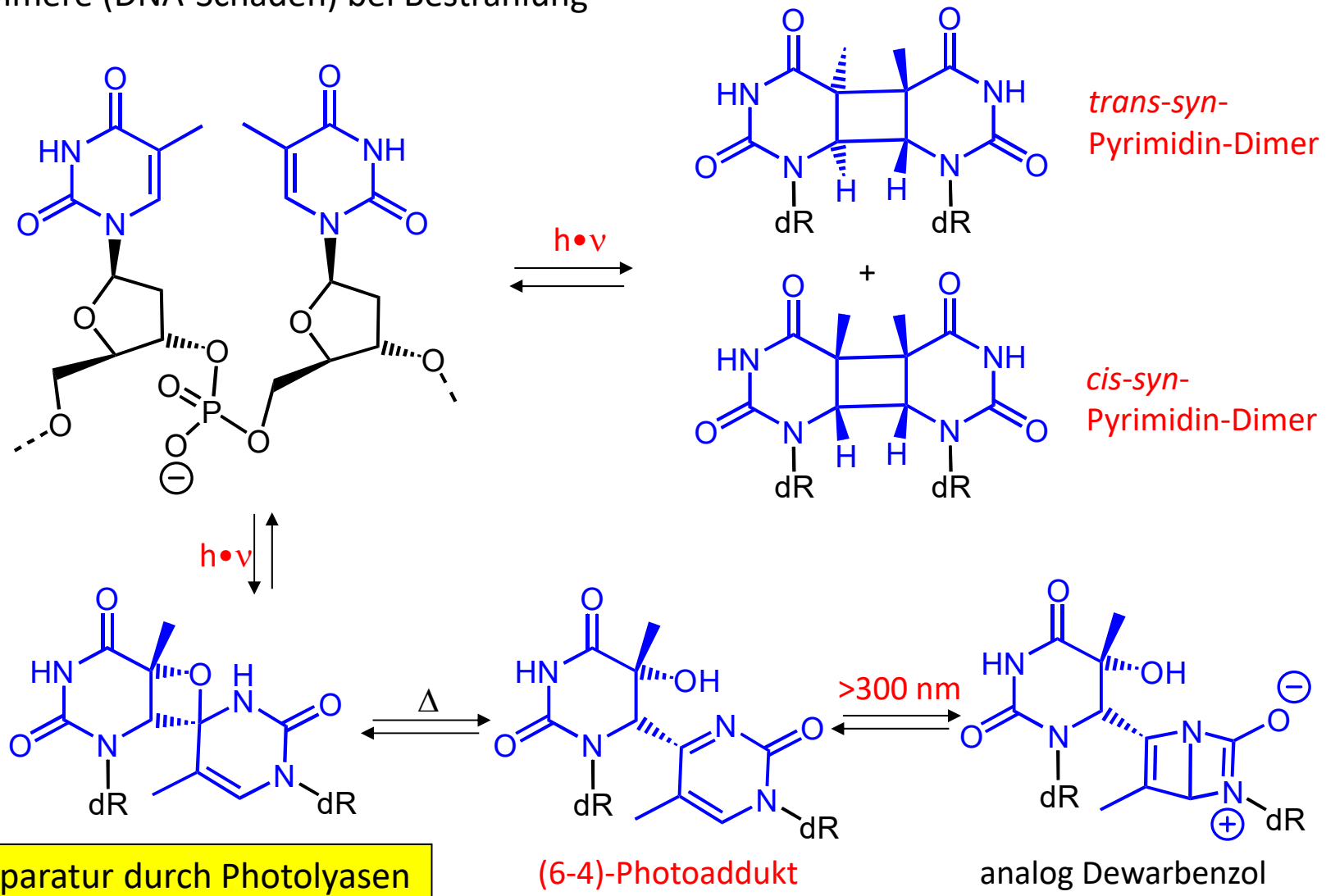
aus:

N. Kitamura et al., *J. Photochem. Photobiol. C* **2005**, 169, 168.



A. DNA - A.2. Reaktivität

Thymin-Dimere (DNA-Schäden) bei Bestrahlung



A. DNA - A.2. Reaktivität

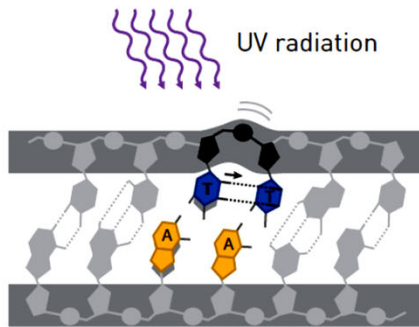
Aus "Scientific Background on the **Nobel Prize in Chemistry 2015**, MECHANISTIC STUDIES OF DNA REPAIR", compiled by the Class for Chemistry of the Royal Swedish Academy of Sciences:

Tomas Lindahl, Paul Modrich, and Aziz Sancar have made fundamental and groundbreaking discoveries on the [enzymatic mechanisms of DNA repair](#). Lindahl demonstrated that DNA is an inherently unstable molecule, subject to decay even under physiological conditions. Guided by this observation, Lindahl identified a completely new group of [DNA glycosylases](#) and described their role in base excision repair. Modrich transformed the field of [mismatch repair](#) from genetic observations to a detailed biochemical understanding, first in bacteria, and later in eukaryotic cells. Sancar has transformed the field of [nucleotide excision repair](#), from genetics and phenomena in cell extracts, to a detailed molecular description of the mechanisms involved, first in bacteria, and later also in eukaryotic cells. Sancar also explained the [molecular mechanisms underlying photoreactivation](#), the first form of DNA repair described."

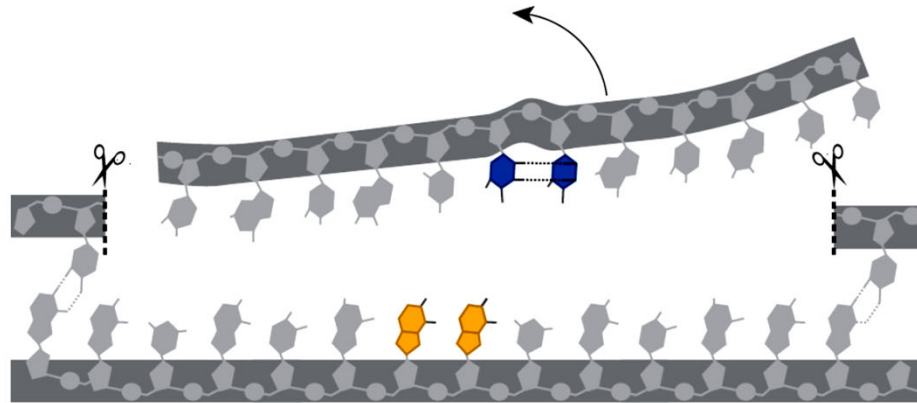


Nucleotide excision repair

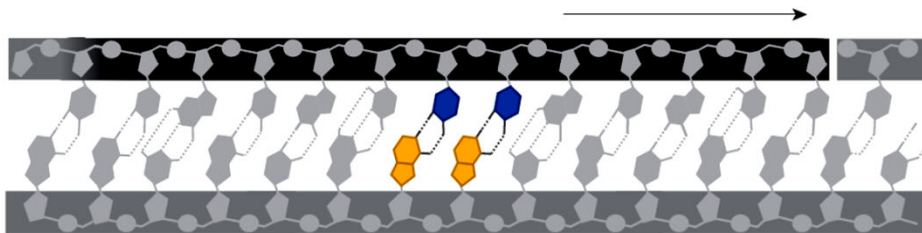
Nucleotide excision repairs DNA-injuries caused by UV radiation or carcinogenic substances like those found in cigarette smoke.



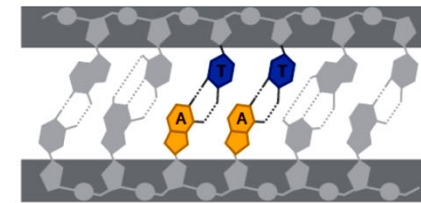
- 1 UV radiation can make two thymines bind to each other incorrectly.



- 2 The enzyme exinuclease finds the damage and cuts the DNA strand. Twelve nucleotides are removed.



- 3 DNA polymerase fills in the resulting gap.

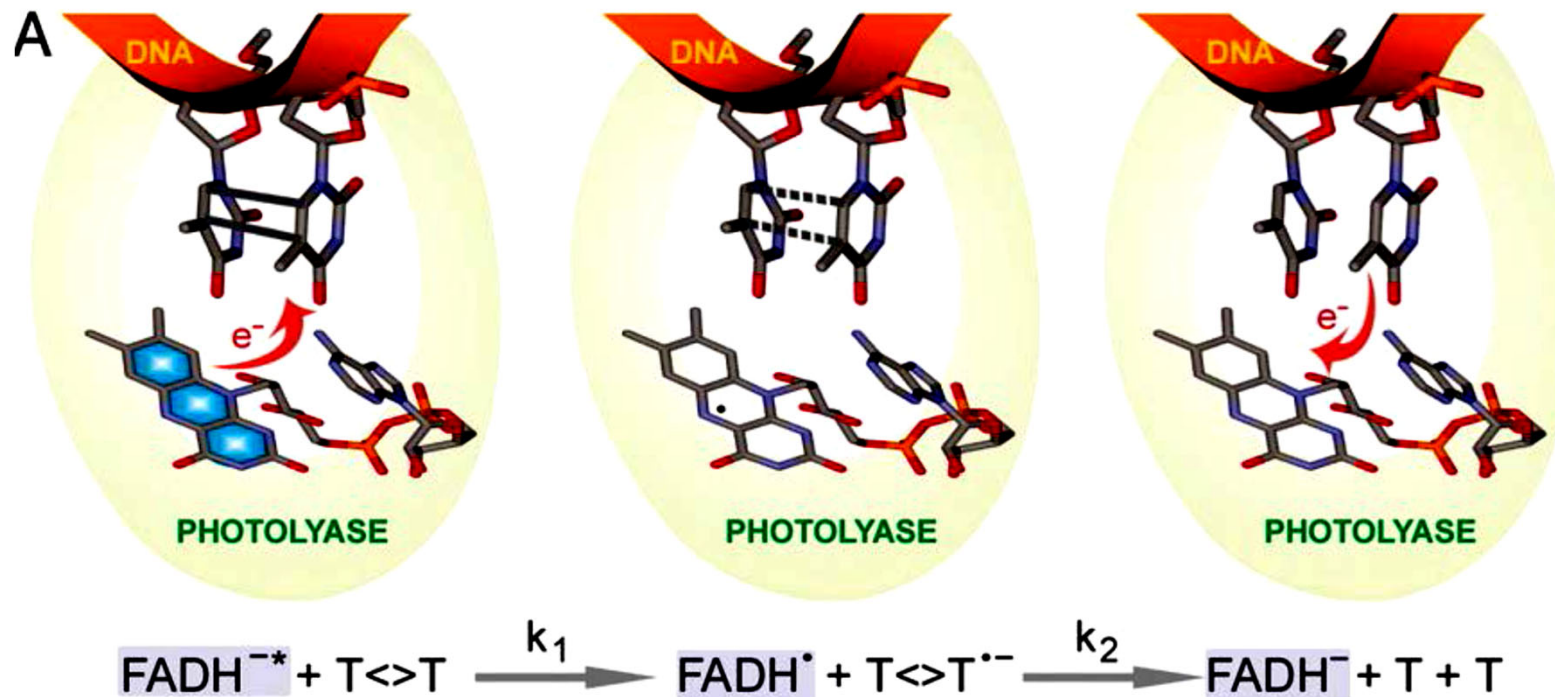


- 4 DNA ligase seals the DNA strand. Now the injury has been dealt with.

Illustration: © Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences

A. DNA - A.2. Reaktivität

Thymin-Dimere können durch Photolyasen durch Einelektronen-Übertragung (und zurück) getrennt werden:

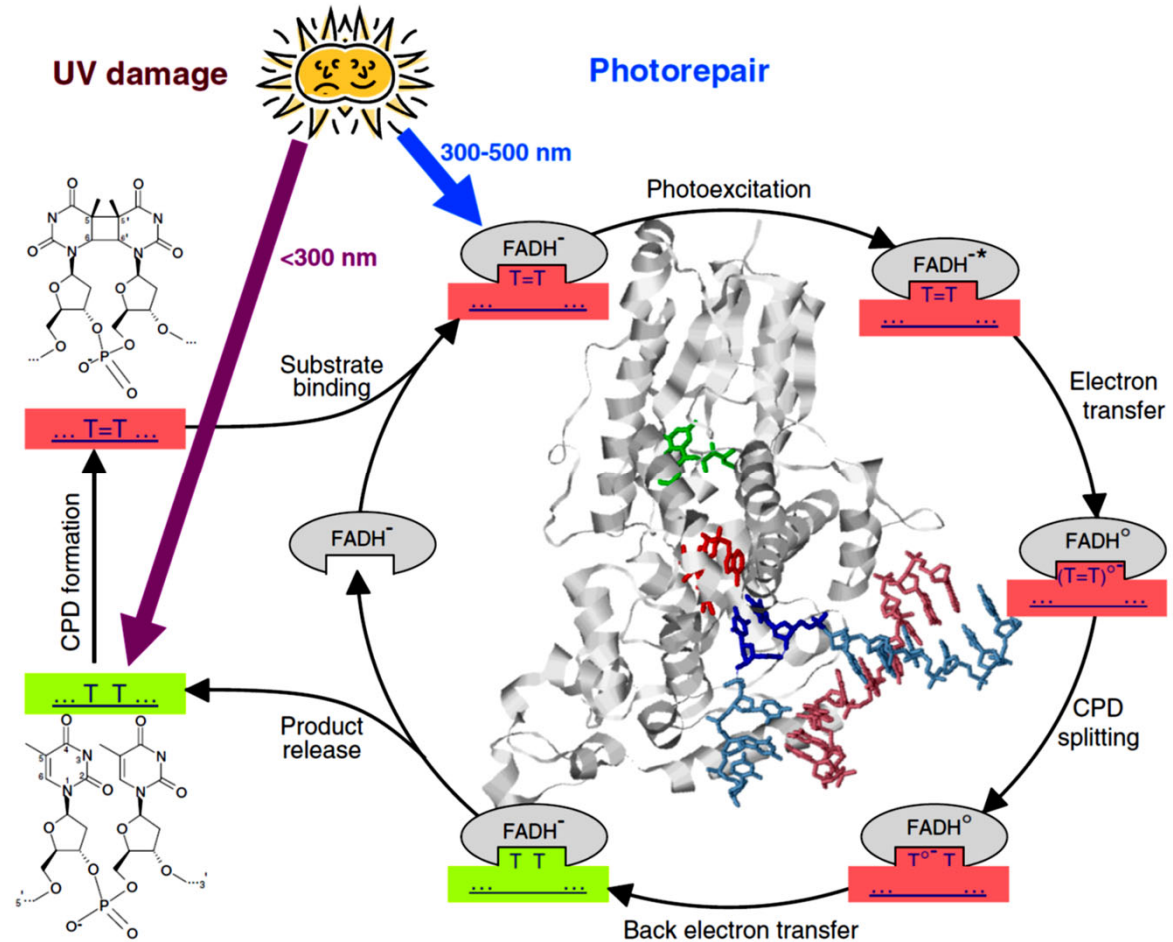
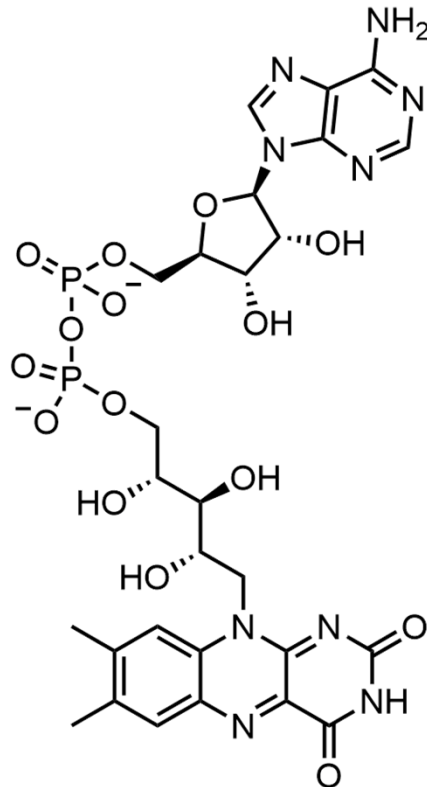


Aus: "Scientific Background on the **Nobel Prize in Chemistry 2015**, MECHANISTIC STUDIES OF DNA REPAIR", compiled by the Class for Chemistry of the Royal Swedish Academy of Sciences

A. DNA - A.2. Reaktivität

Zyklus der Photoreparatur von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer-Schäden (*PNAS* 2011, 9402):

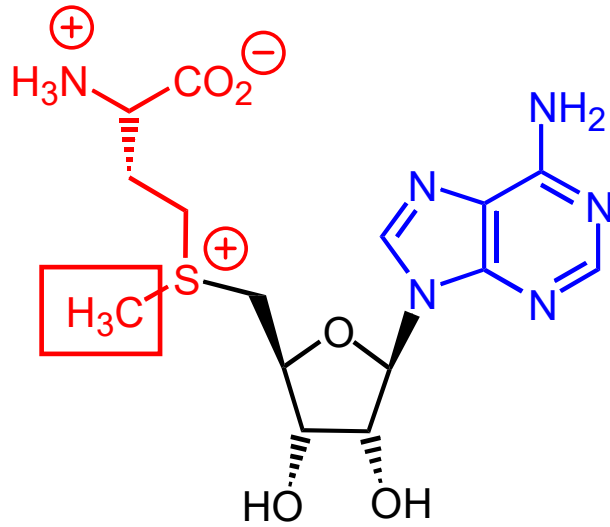
Flavin-Adenin-Dinukleotid
(FAD, gebunden an
Flavoproteine)



A. DNA - A.2. Reaktivität

Alkylierung

endogen:

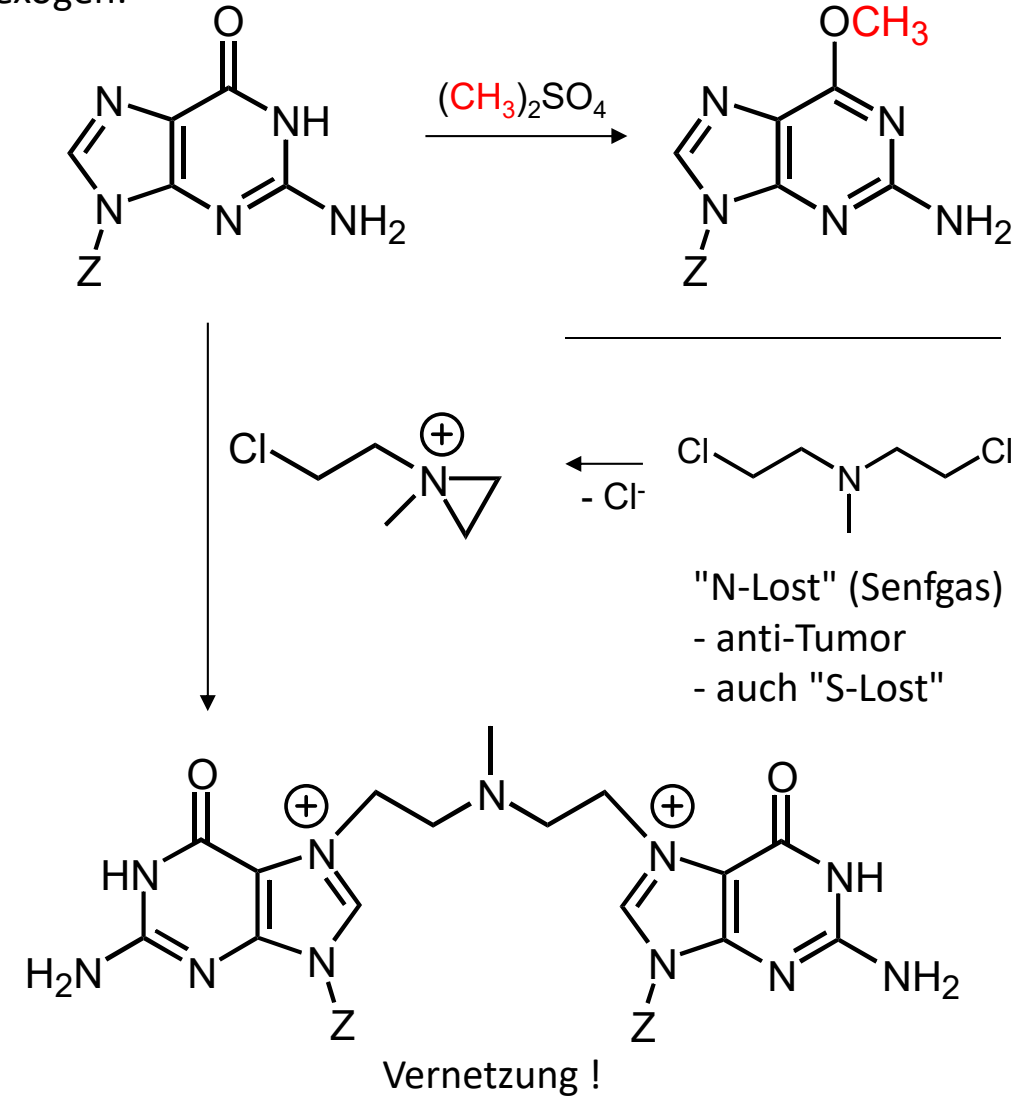


S-Adenosylmethionin (SAM)

Biosynthese von:

5-Me-dC, 1-Me-dA, N⁶-Me-dA

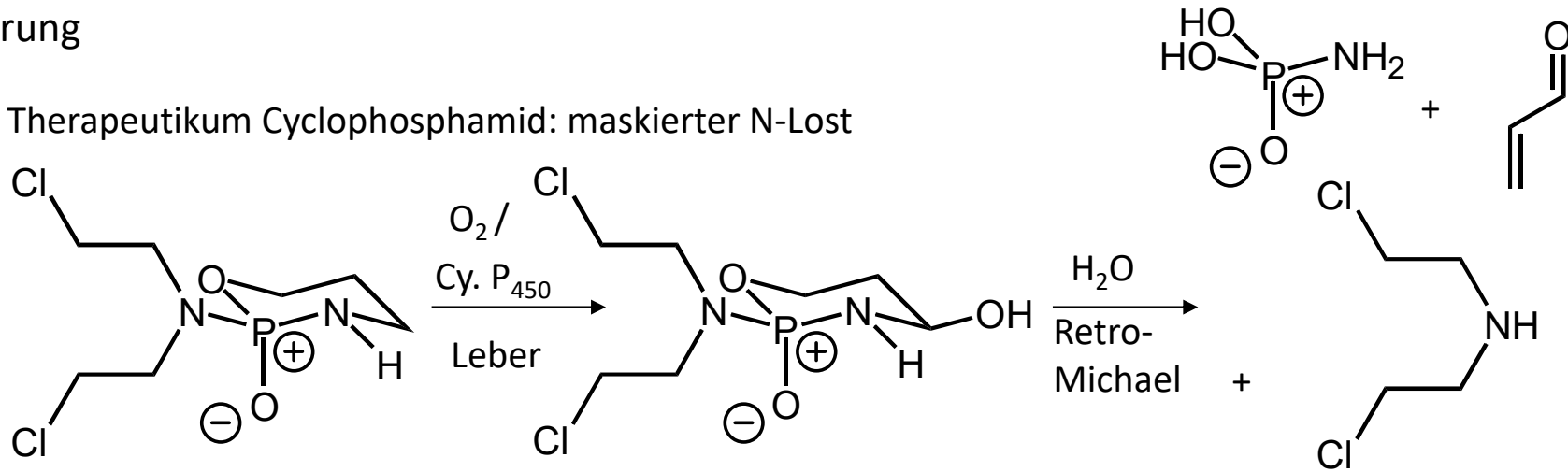
exogen:



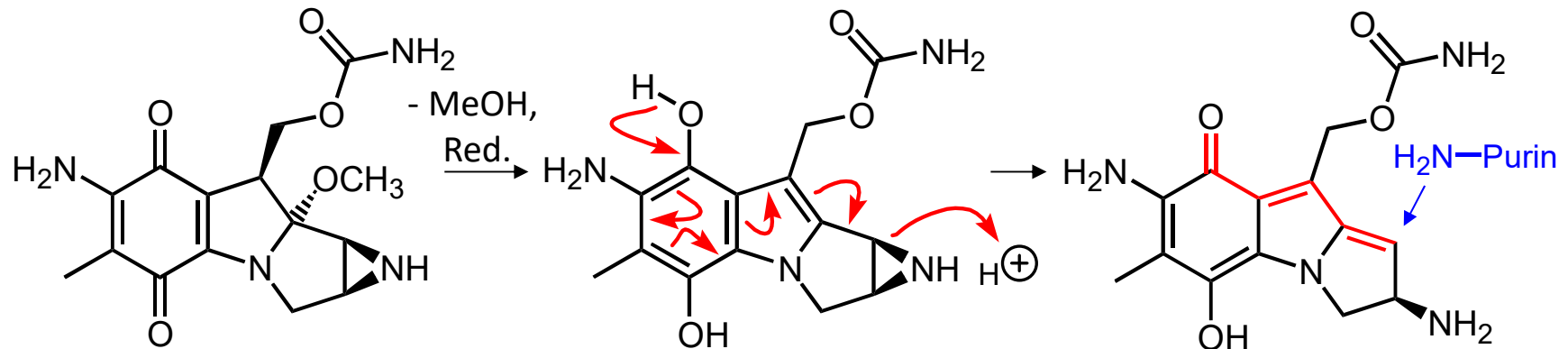
A. DNA - A.2. Reaktivität

Alkylierung

Therapeutikum Cyclophosphamid: maskierter N-Lost



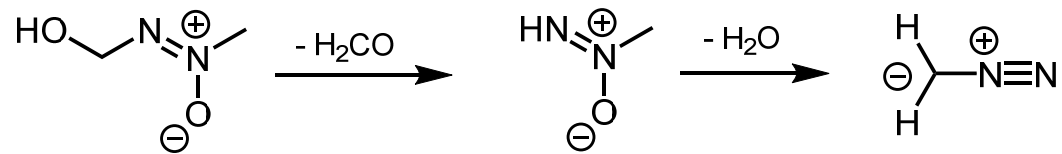
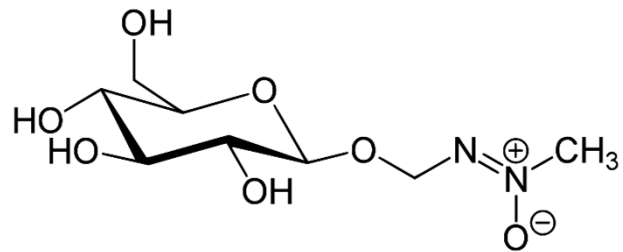
Therapeutikum Mitomycin C aus Streptomyceten:



DNA und Wirkstoffe: Yang, Wang, *Pharmacology & Therapeutics* **1999**, 83, 181.

A. DNA - A.2. Reaktivität

Alkylierung: Cycasin aus Palmfarnen (-> Nutzvieh)



Aglykon Methylazoxymethanol (MAM)

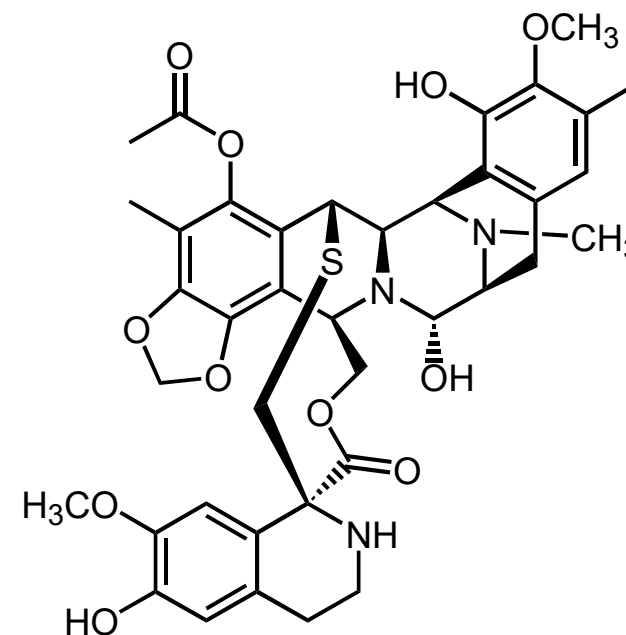
Diazomethan



Palmfarn *Cycas revoluta* (www.wikipedia.org/wiki/cycasin)



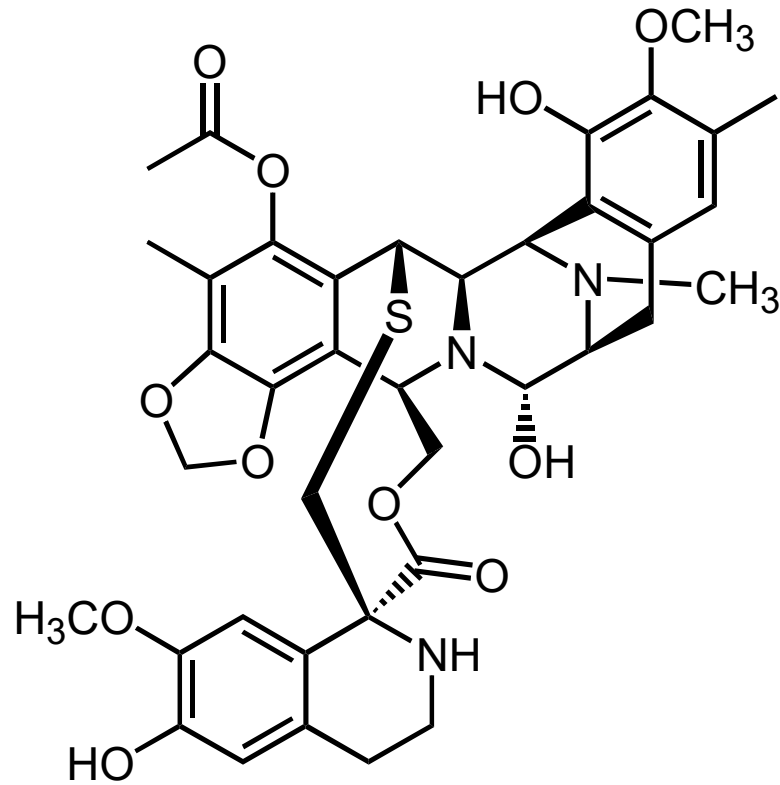
ascidian
Ecteinascidia turbinata
(PharmaMar Inc., Madrid)



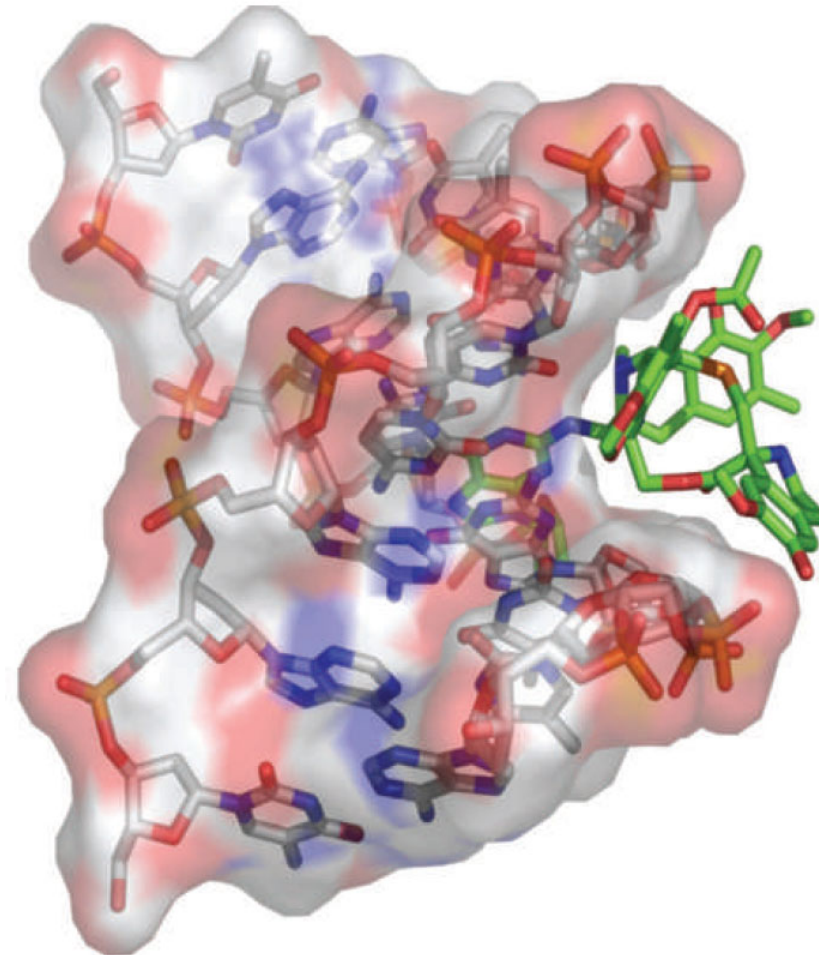
1986: isolation by Rinehart et al.

2007: EC approval for treatment of soft tissue sarcoma after failure of anthracyclines and ifosfamide

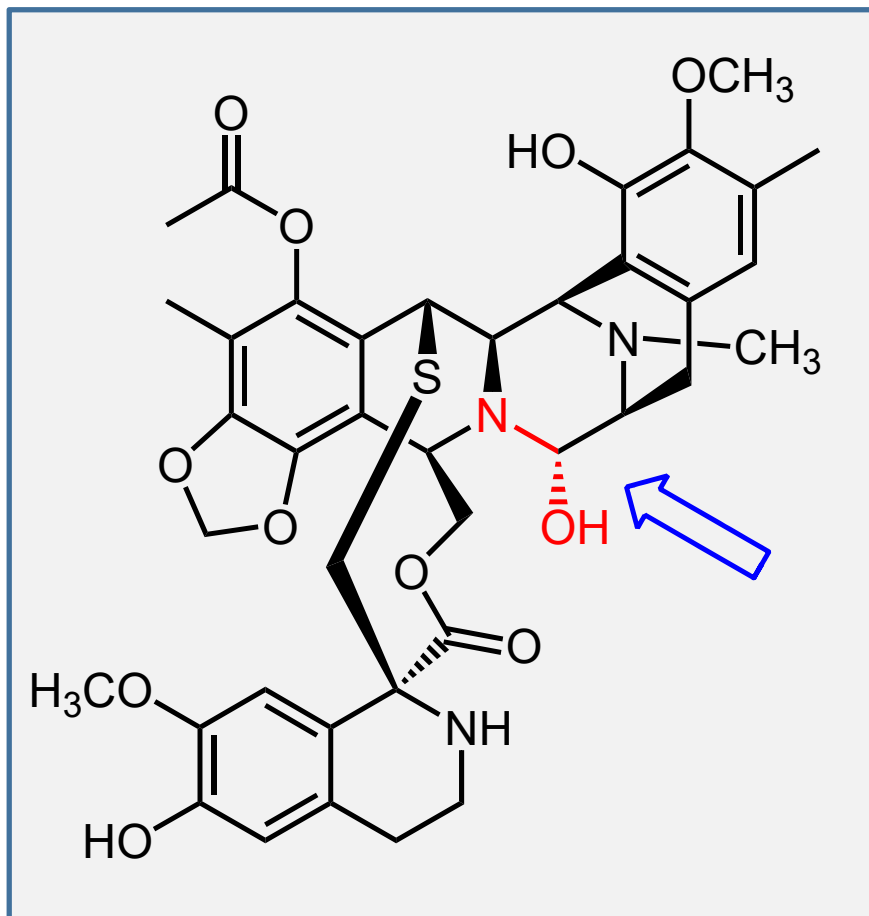
2009: EC approval for combination with pegylated liposomal doxorubicin for treatment of relapsed platinum-sensitive ovarian cancer



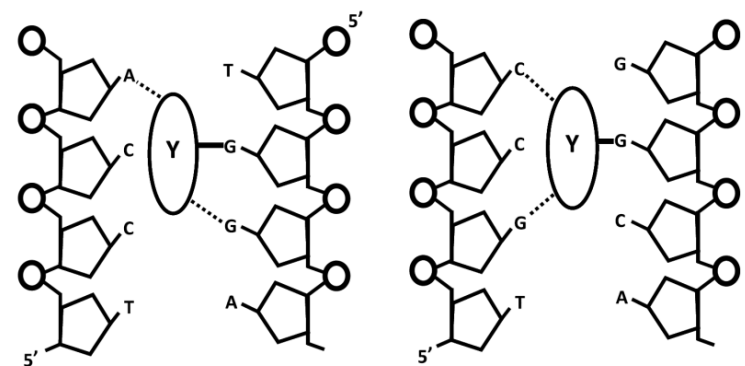
Ecteinascidin 743
(= Trabectedin, Yondelis®)
DNA binder



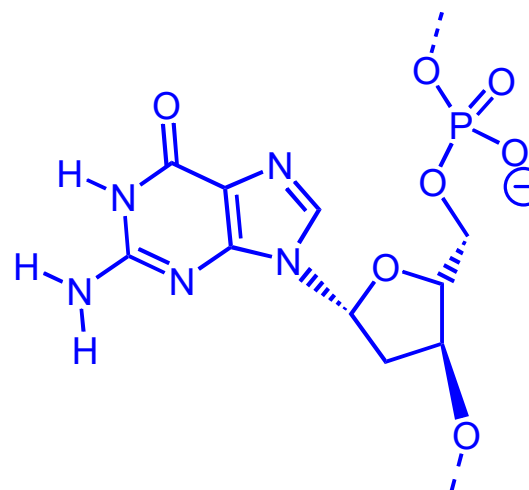
Review: D'Incalci and Galmarini, *Mol. Cancer Ther.* **2010**, 9, 2157



ecteinascidin 743: **N,O-acetal moiety**
necessary for activity



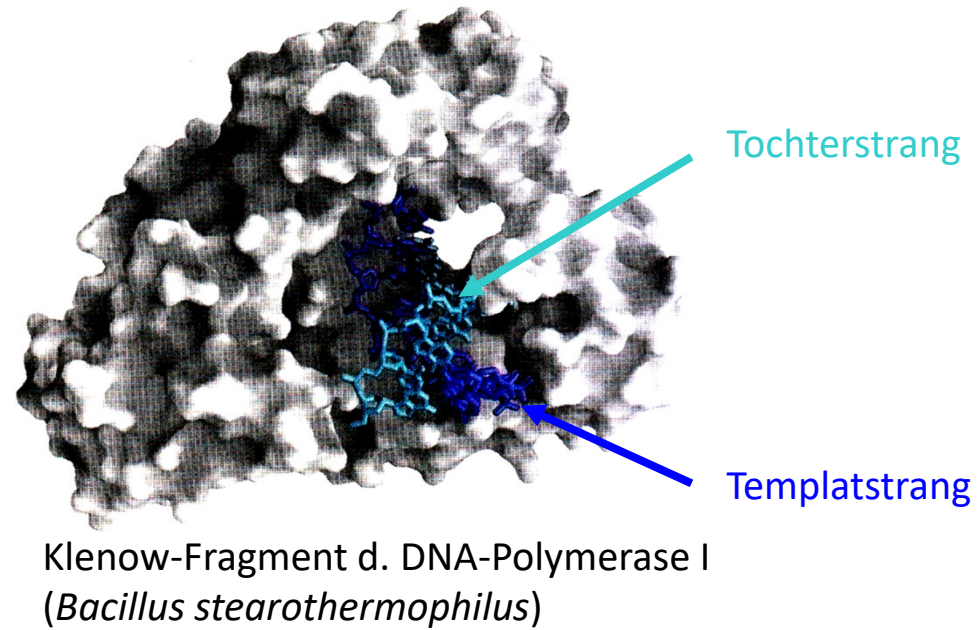
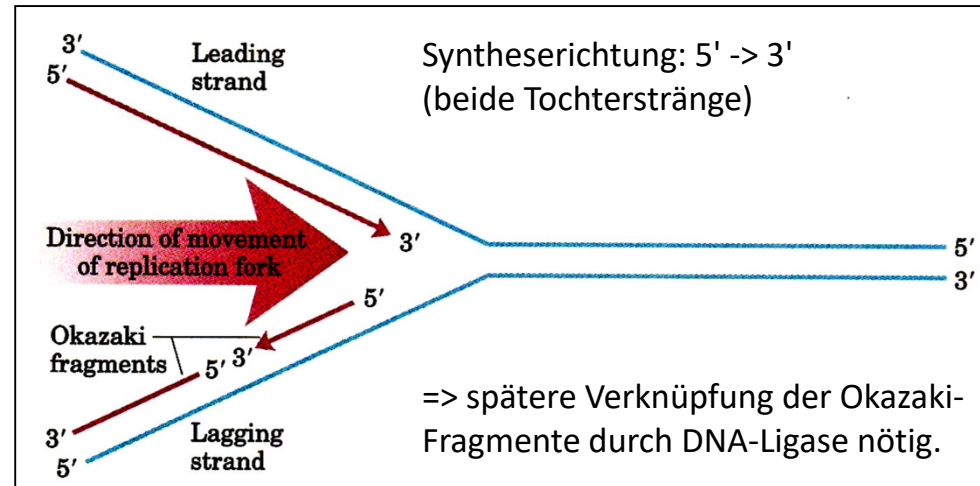
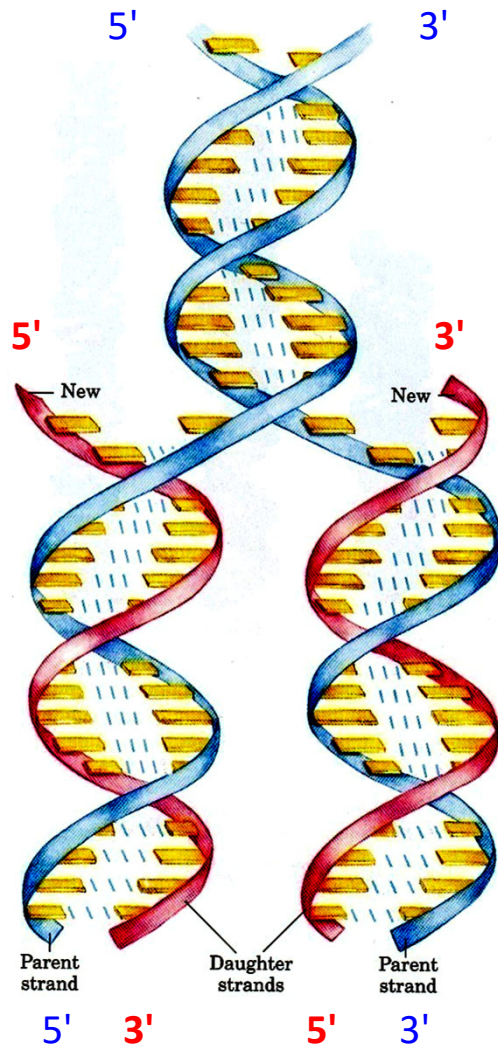
preferred base triplets



alkylation of the exocyclic amino group
of guanine (minor groove)

A. DNA - A.3. Synthese

Biosynthese



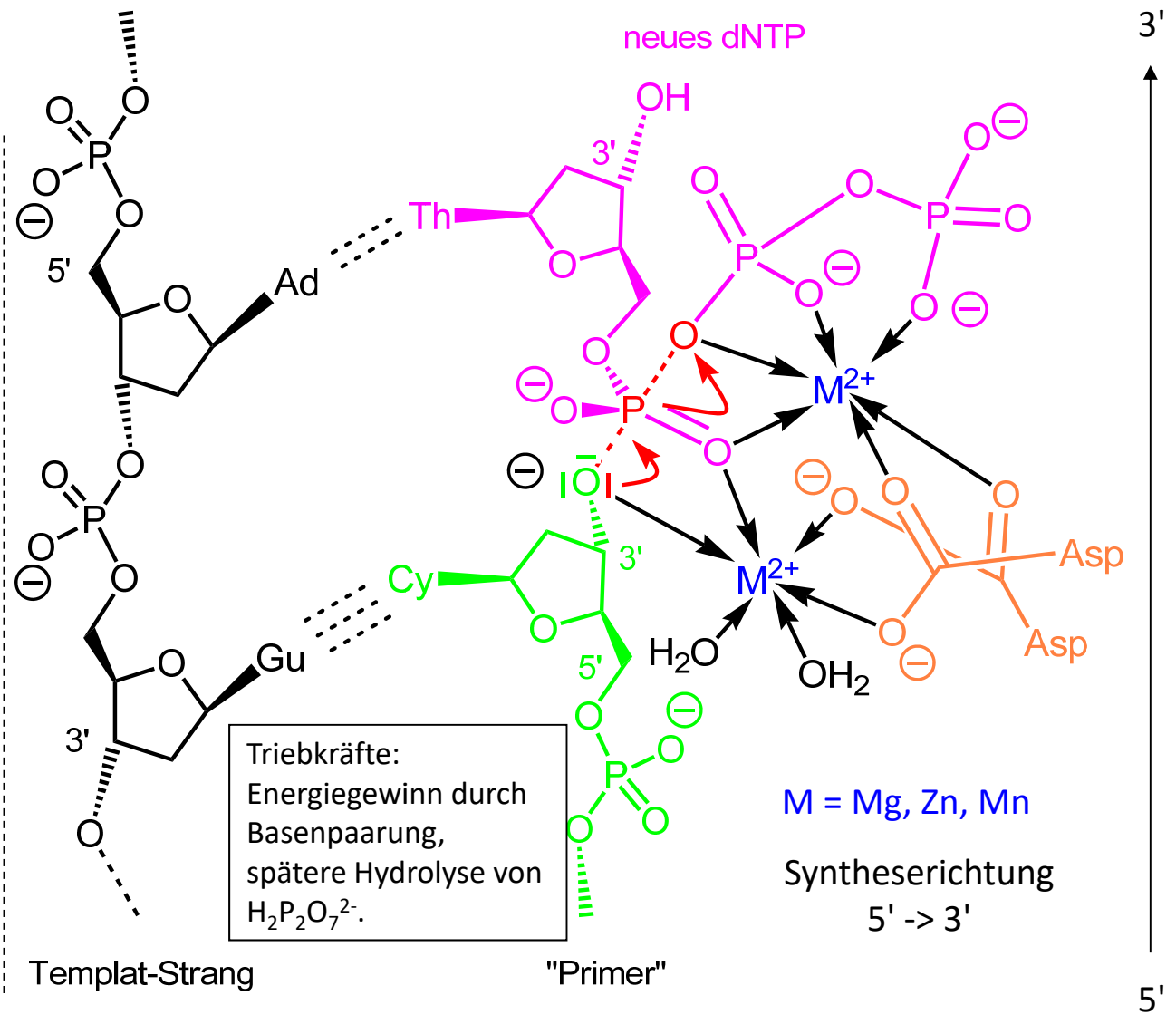
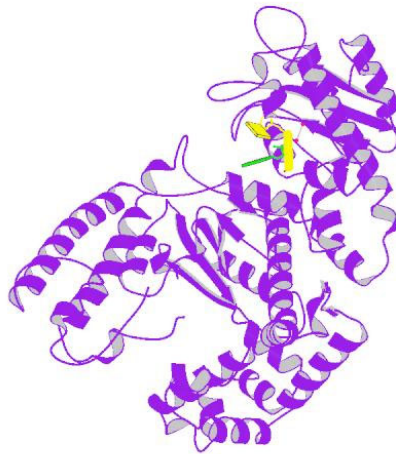
A. DNA - A.3. Synthese

Biosynthese

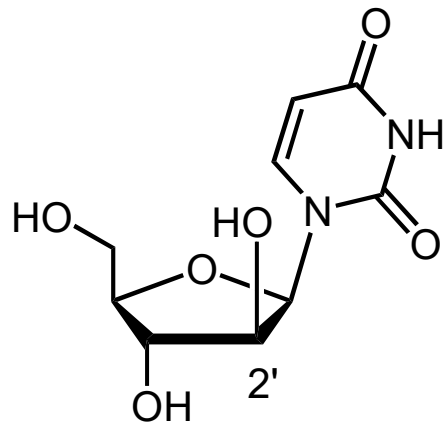
DNA-Polymerase I:

Zwei-Metallionen-Mechanismus

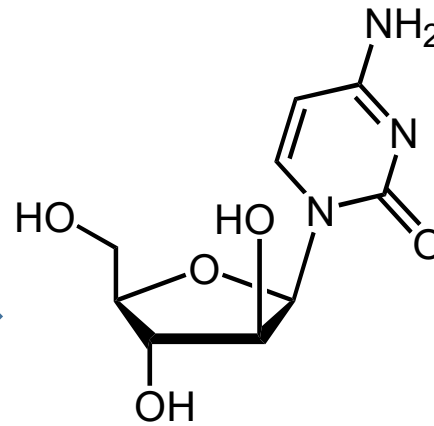
aus
www.rcsb.org/pdb:



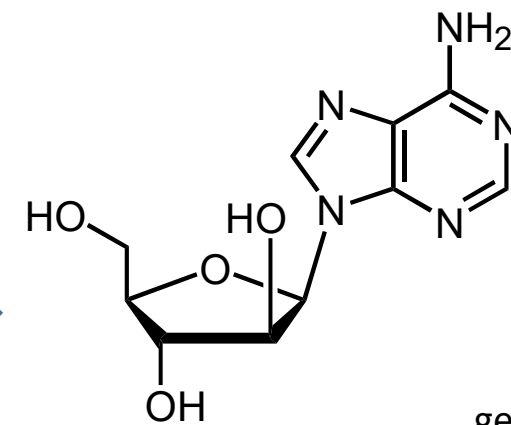
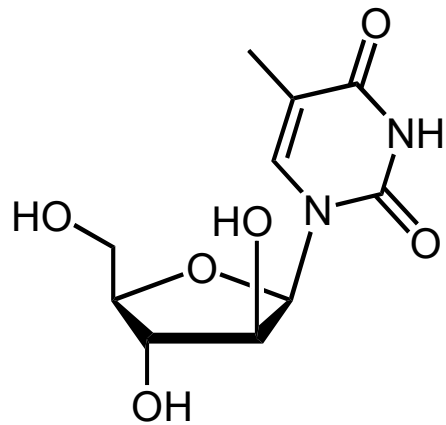
Biosynthese-Inhibitoren: "Antimetaboliten"



Spongouridin
(1951 aus *Tectitethya crypta*)



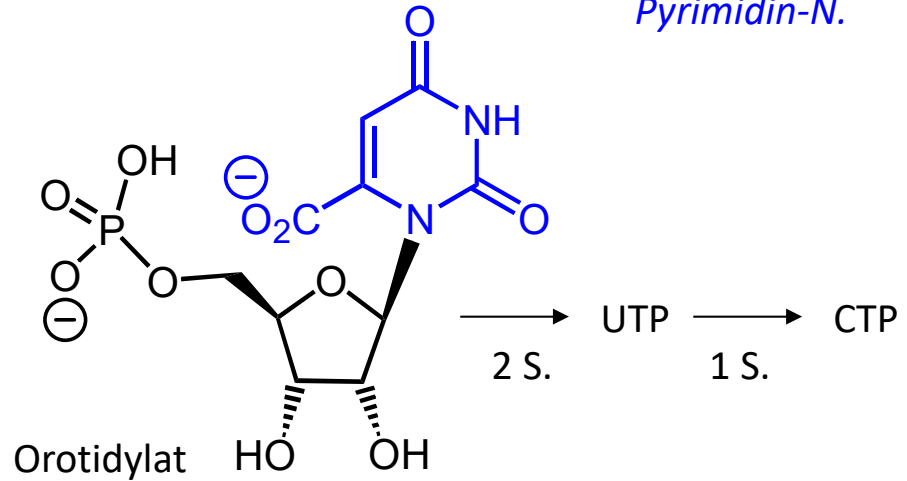
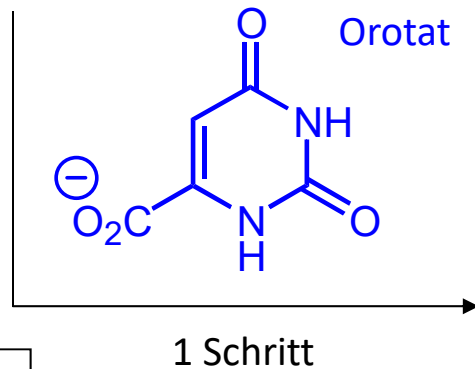
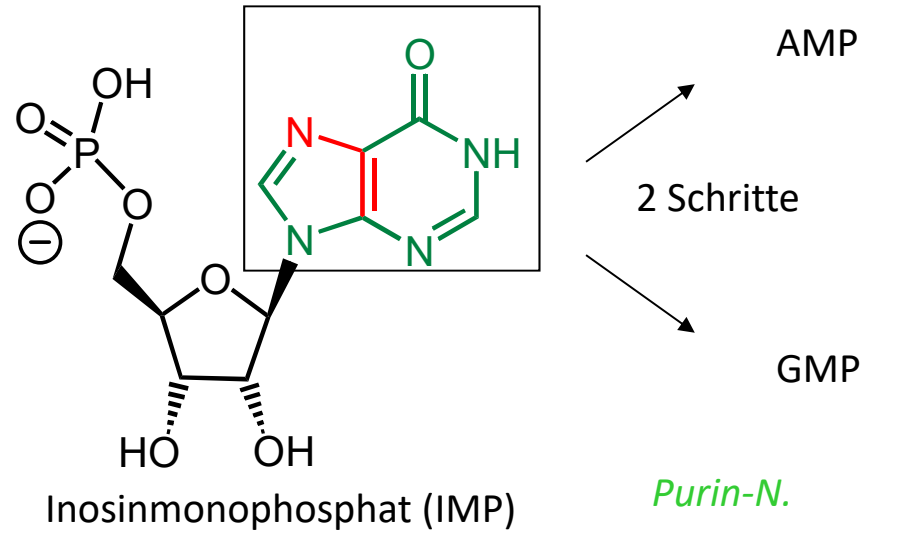
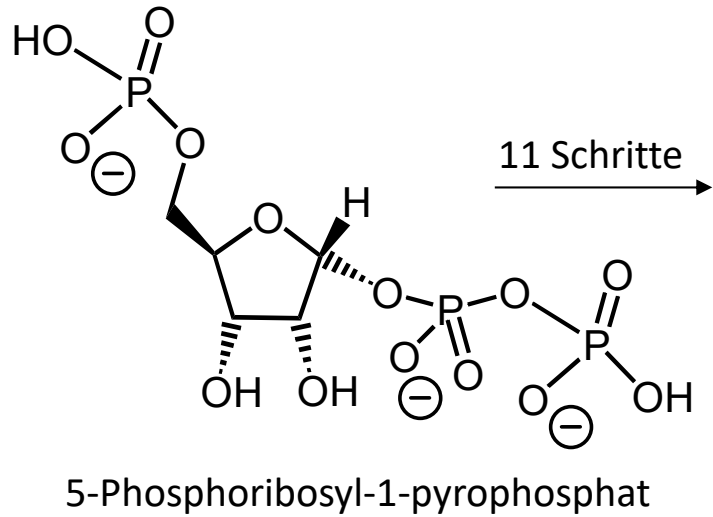
Cytarabin:
gegen myeloide Leukämie (1969)



Vidarabin:
gegen Virusinfektionen (1976)

A. DNA - A.3. Synthese

Biosynthese der (Desoxy)nukleotide

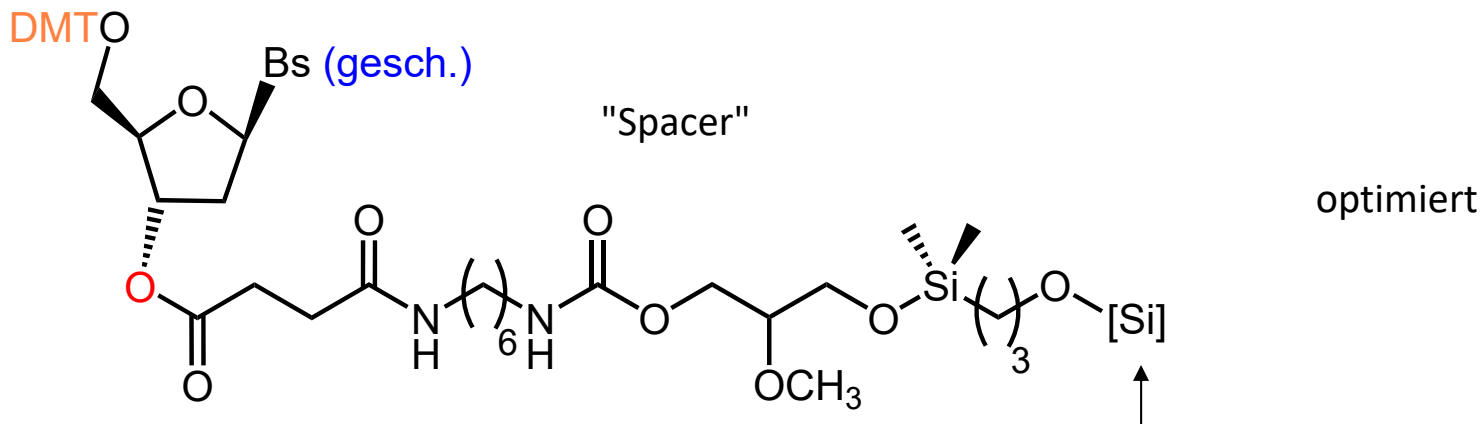
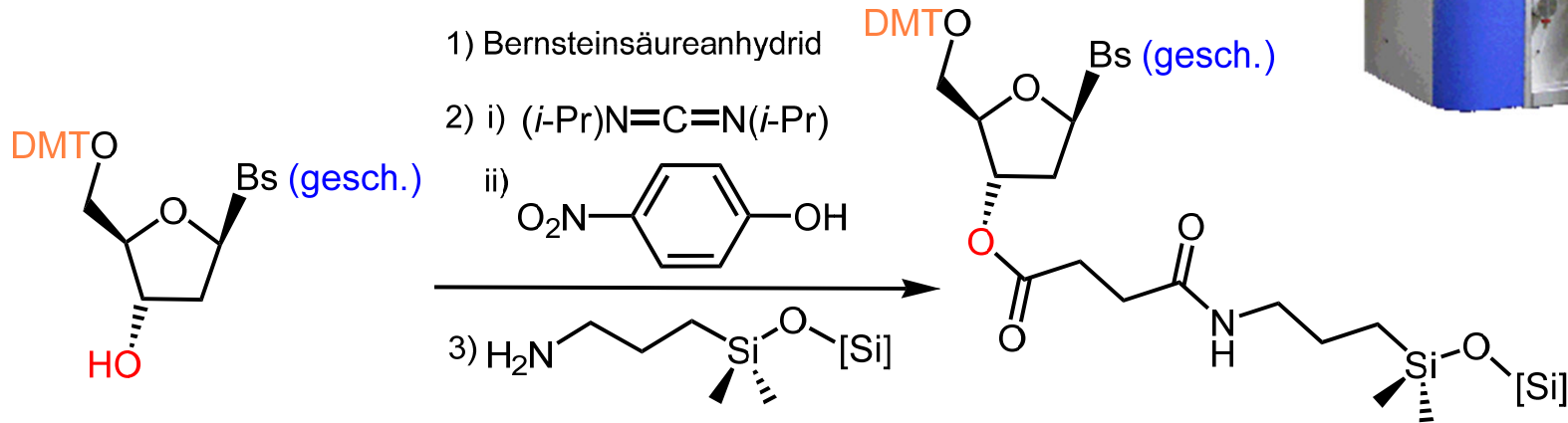


Skizze,
Details s. Lehrbücher

A. DNA - A.3. Synthese

Phosphoramidit-Verfahren

Verankerung an Kieselgel-Matrix:



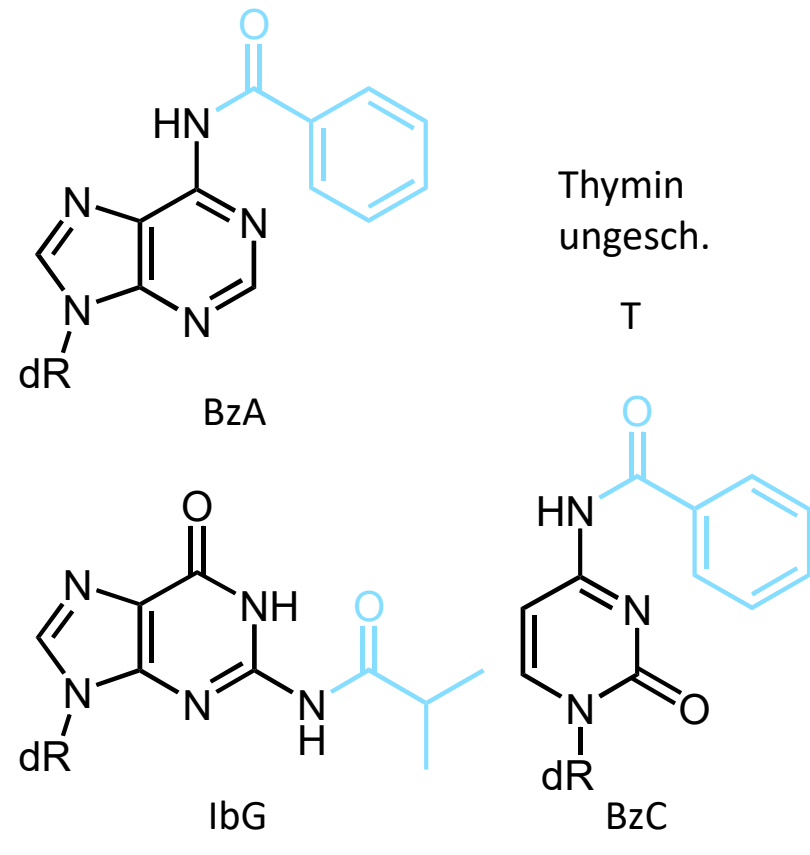
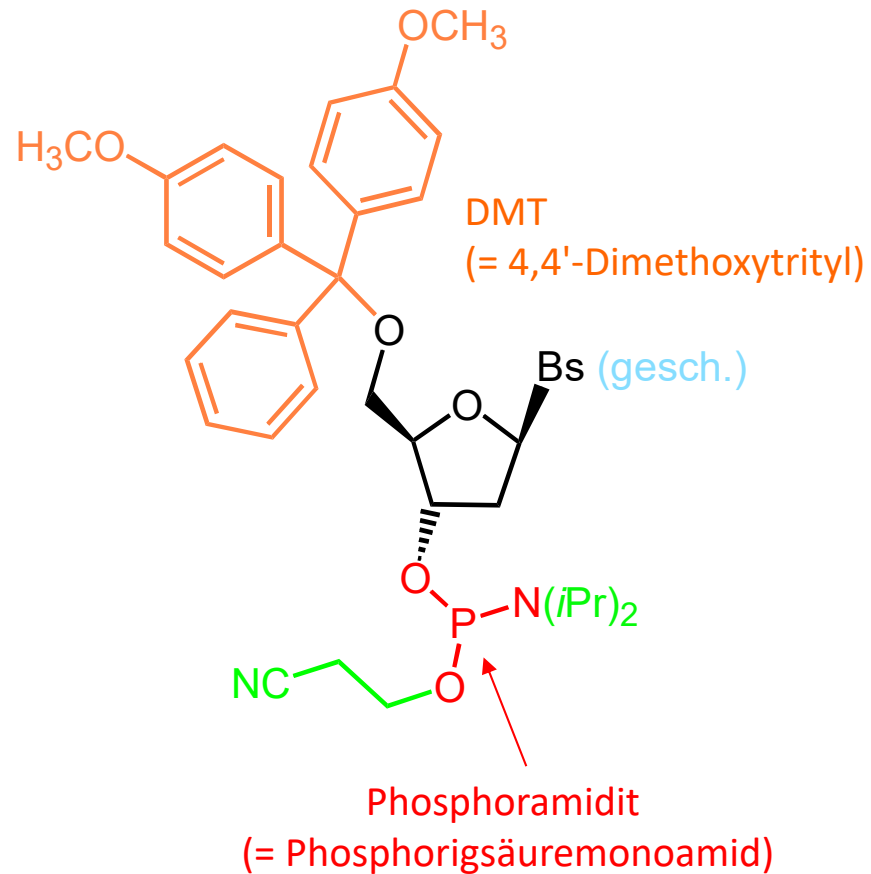
Übers.: M. H. Caruthers, *Acc. Chem. Res.* **1991**, 24, 278-284.

"controlled pore glass (CPG)"

A. DNA - A.3. Synthese

Phosphoramidit-Verfahren

Bausteine:



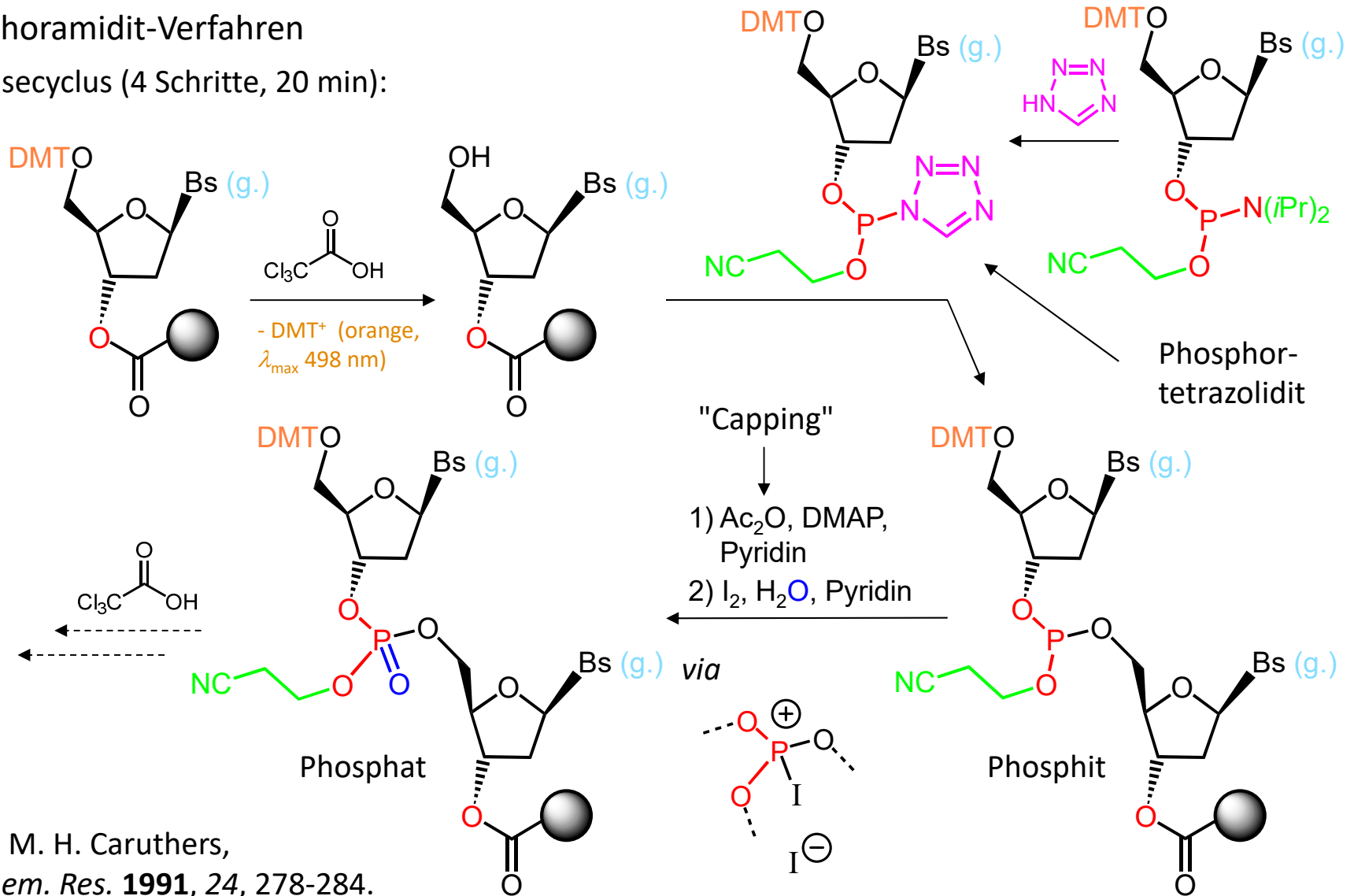
- Hydrolyse- und O₂-stabil,
- P(III).

Übers.: M. H. Caruthers, *Acc. Chem. Res.* **1991**, 24, 278-284.

A. DNA - A.3. Synthese

Phosphoramidit-Verfahren

Synthesecyclus (4 Schritte, 20 min):

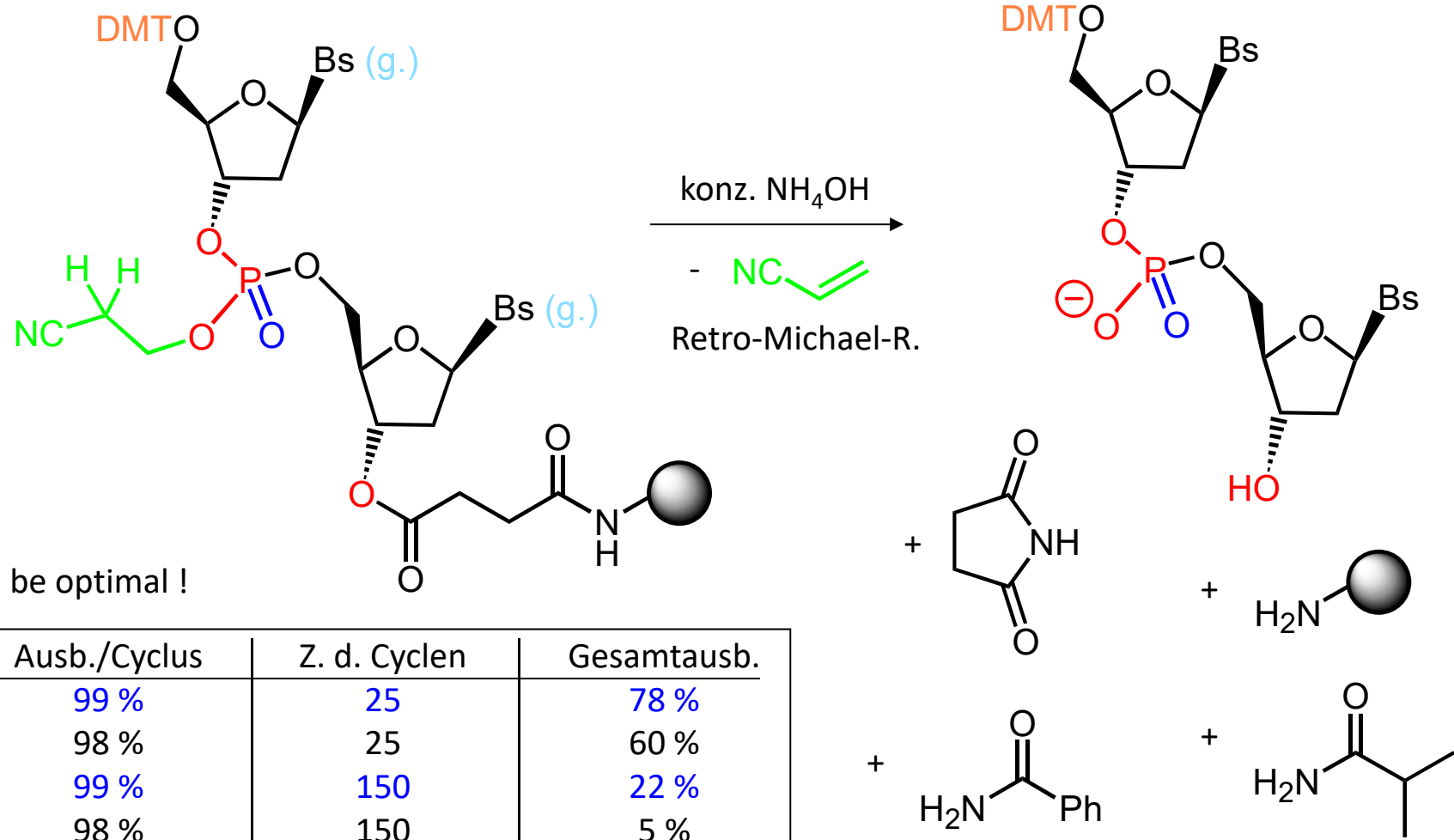


Übers.: M. H. Caruthers,
Acc. Chem. Res. **1991**, *24*, 278-284.

A. DNA - A.3. Synthese

Phosphoramidit-Verfahren

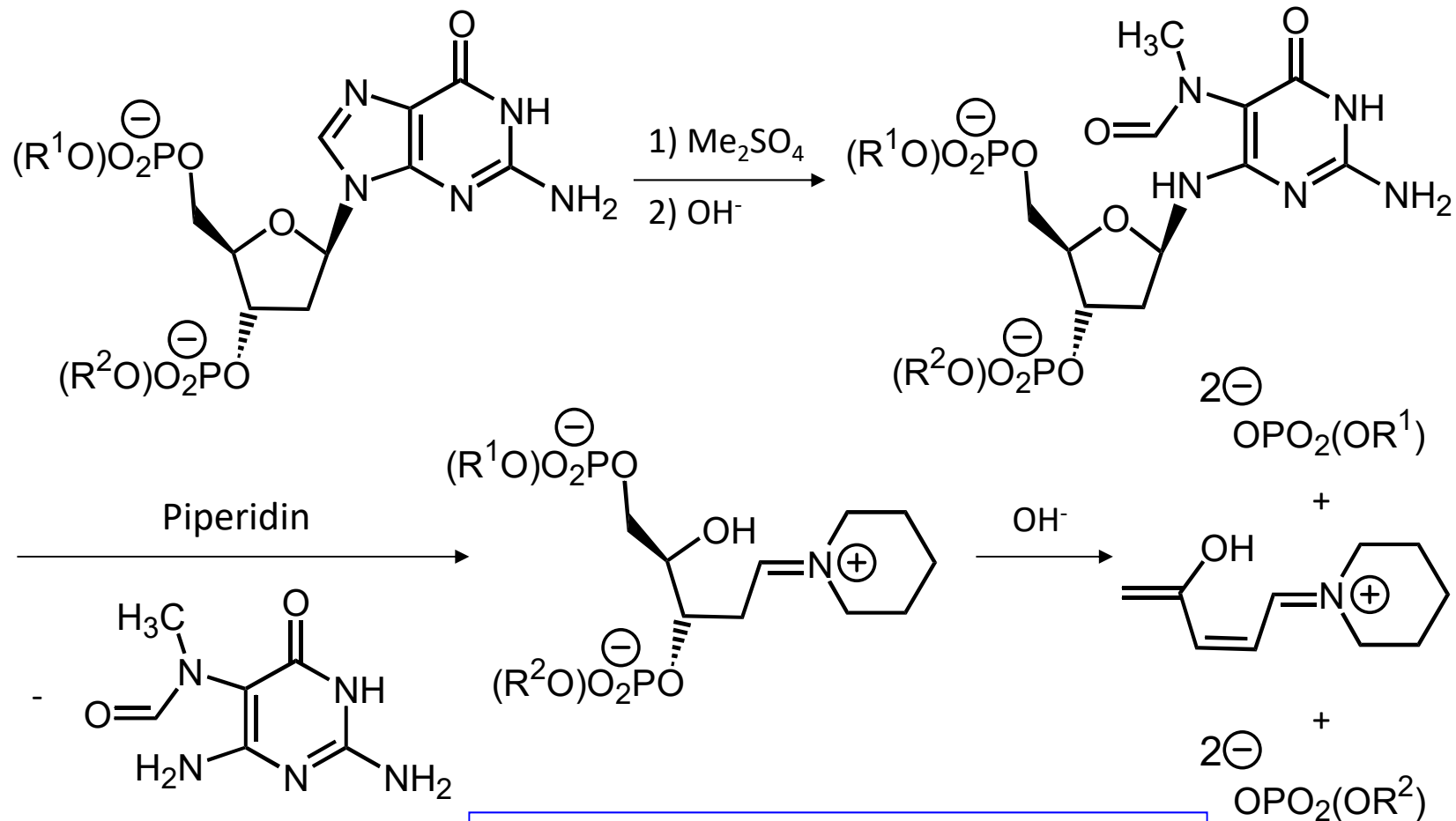
Decyanoethylierung/Deacylierung/Abspaltung:



Ausb./Cyclus	Z. d. Cyclen	Gesamtausb.
99 %	25	78 %
98 %	25	60 %
99 %	150	22 %
98 %	150	5 %

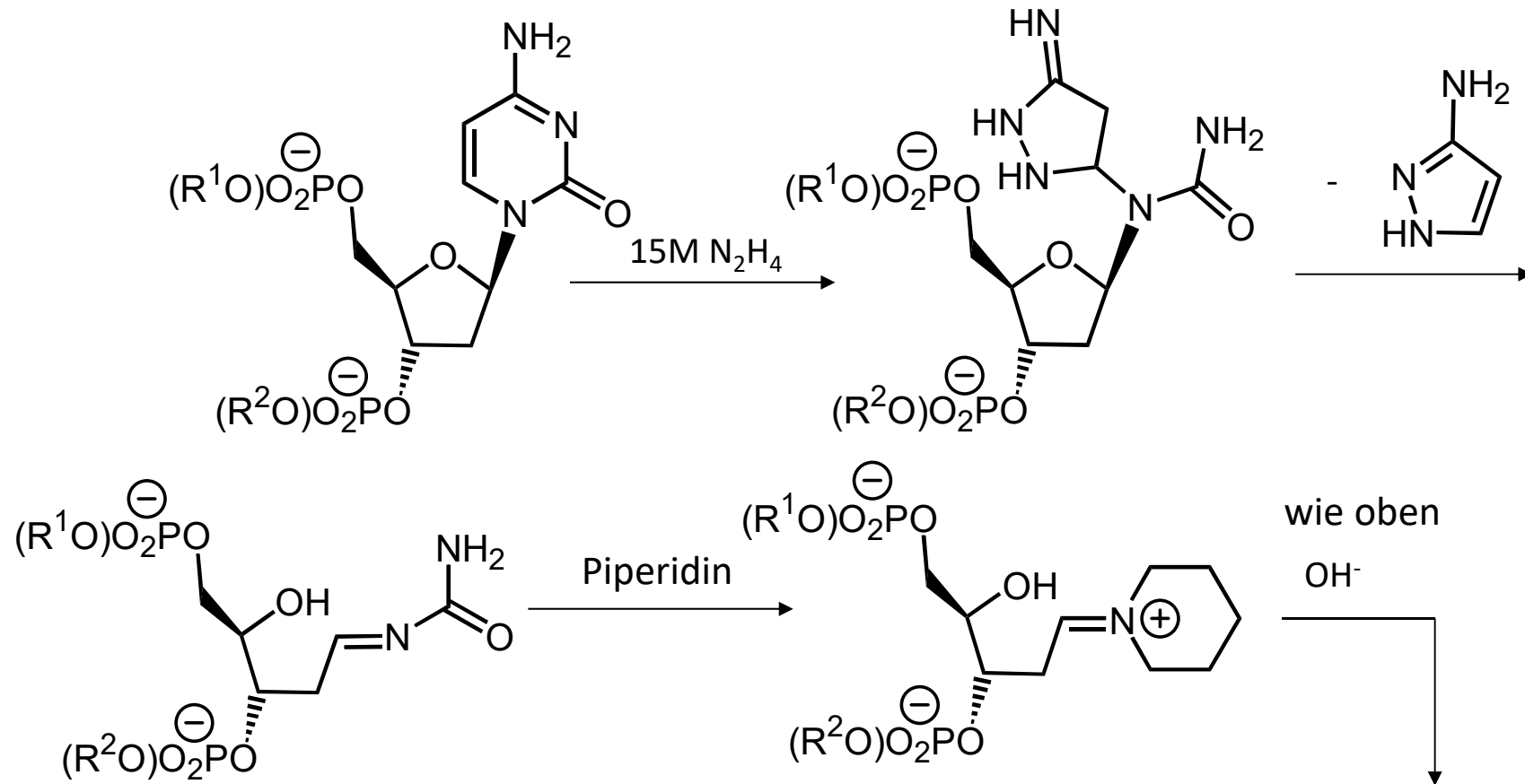
A. DNA - A.4. Sequenzierung

Depurinierung und Strangbruch mit Dimethylsulfat/Piperidin: Maxam-Gilbert-Sequenzierung



Strangbruch neben G bzw. G+A (Erwärmung)!
Methylierung v. Adenylat 5-mal langsamer !

Depyrimidinierung und Strangbruch mit Hydrazin/Piperidin: Maxam-Gilbert-Sequenzierung



Strangbruch neben C bzw. C+T !
Keine Hydrazinolyse von T in Anw. von 1M KCl (Bldg. d. Anions)!

A. DNA - A.4. Sequenzierung

Chemische Sequenzierung

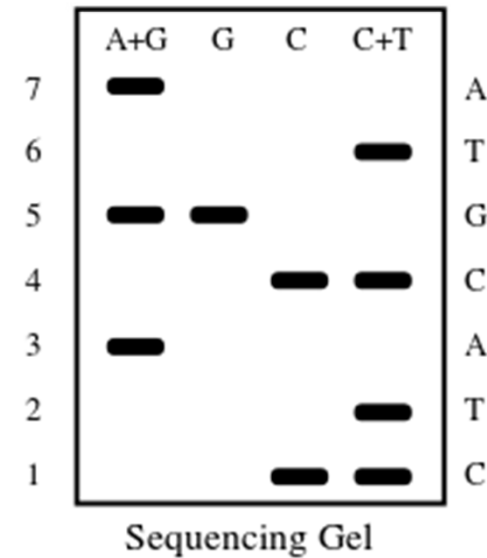
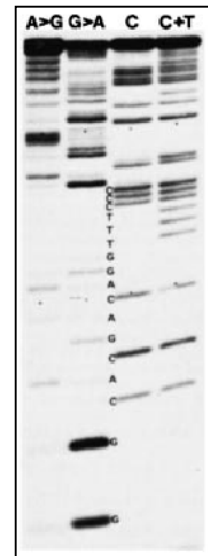
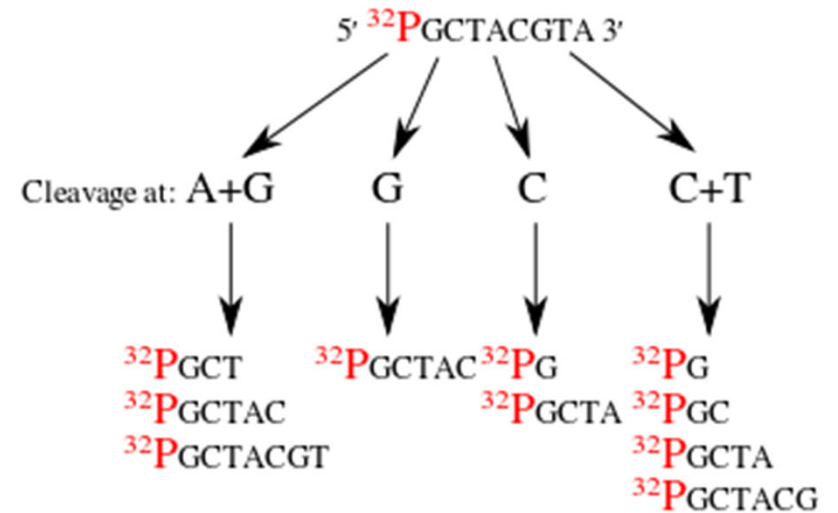
[Maxam-Gilbert (NP 1980)-Verfahren, 1977]

DNA wird endständig radioaktiv markiert und chemisch derart behandelt, dass auf der 3'-Seite von **A+G**, **G** (Alkylierung mit **Dimethylsulfat**), **C** oder **C+T** (Hydrazinolyse) gespalten wird.

Die Gemische aller vier Spaltungsreaktionen werden parallel per Gelelektrophorese getrennt, durch Autoradiographie analysiert und interpretiert.

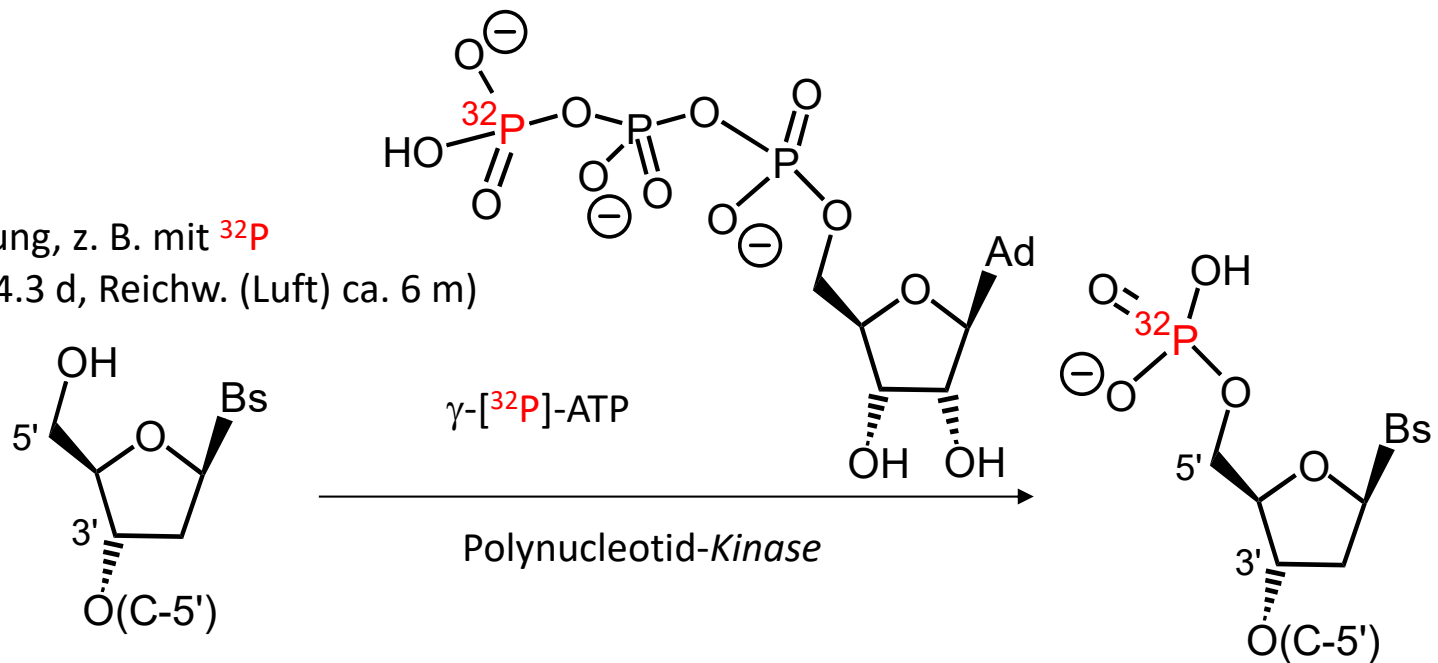
max. DNA-Länge ca. 500 bp.

Heute nur noch von historischem Interesse.



Maxam-Gilbert-Sequenzierung
endständig markierter DNA (1977)

5'-Markierung, z. B. mit ^{32}P
(β^- , HWZ 14.3 d, Reichw. (Luft) ca. 6 m)



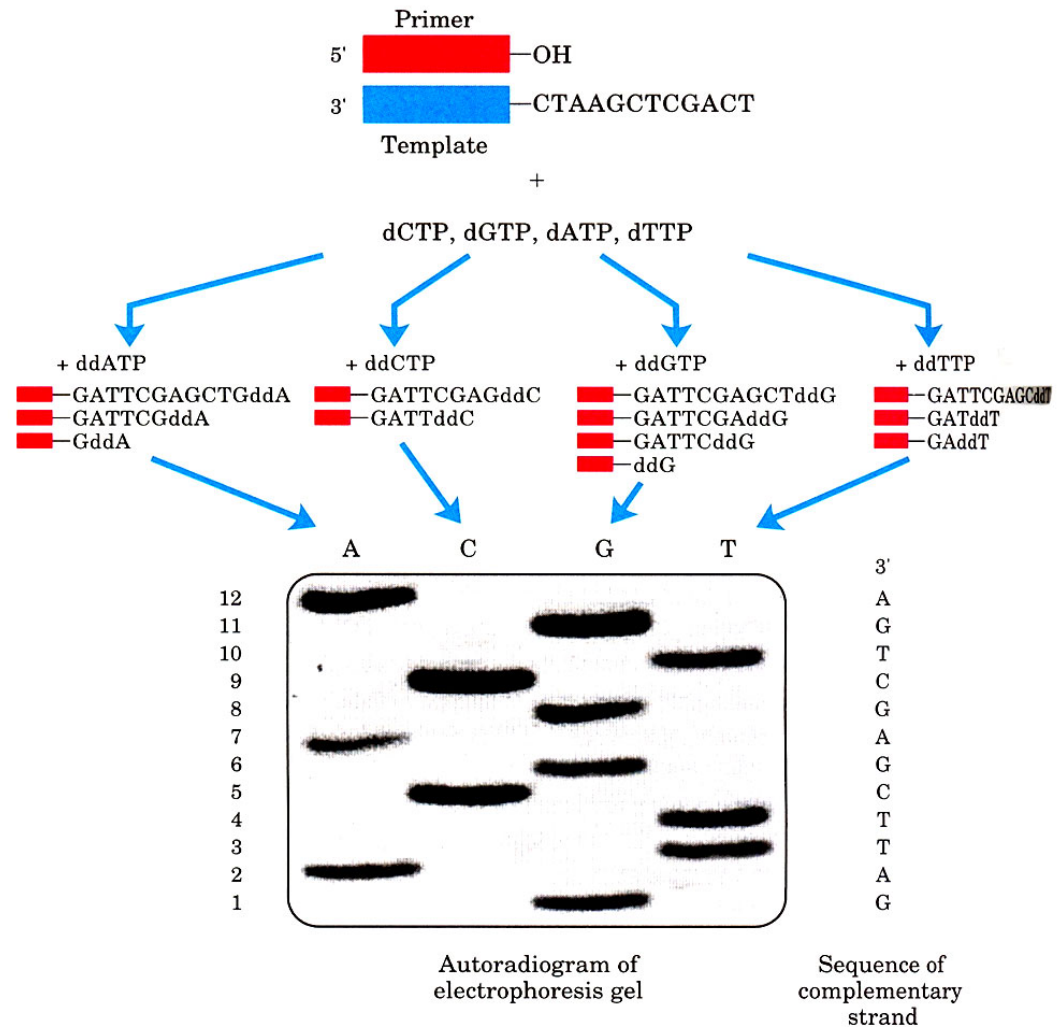
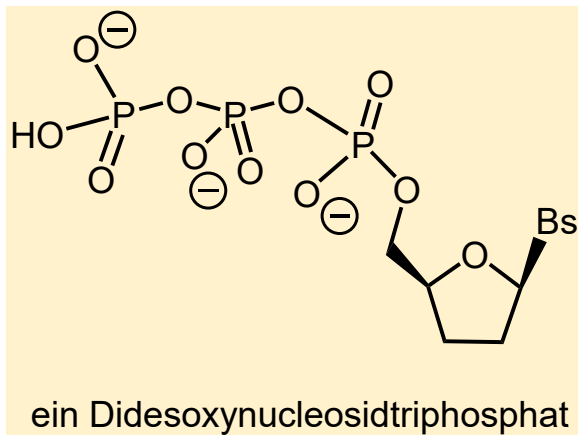
A. DNA - A.4. Sequenzierung

Enzymatische Sequenzierung

Didesoxynucleotid-
Methode (F. Sanger,
1977)

Einem Teil der dem
Enzym verfügbaren
Nukleotide fehlt das 3'-
Phosphat!

4 Ansätze nötig.

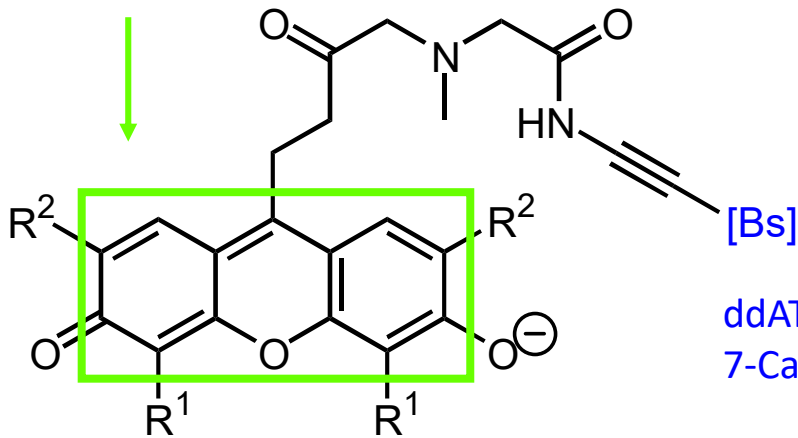


A. DNA - A.4. Sequenzierung

Didesoxynucleotid-Methode zur parallelen DNA-Sequenzierung:
Farbstoff-codierte ddNTPe

800-1000 Basenpaare

Xanthen-Gerüst



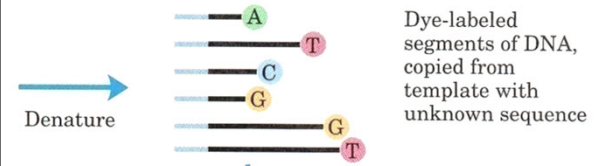
unbekannte DNA,
(5'→3')-Primer,
DNA-Polymerase,
4 dNTPe, 4 ddNTPe

ddATP, ddGTP:
7-Carbapurin-7-Pos.

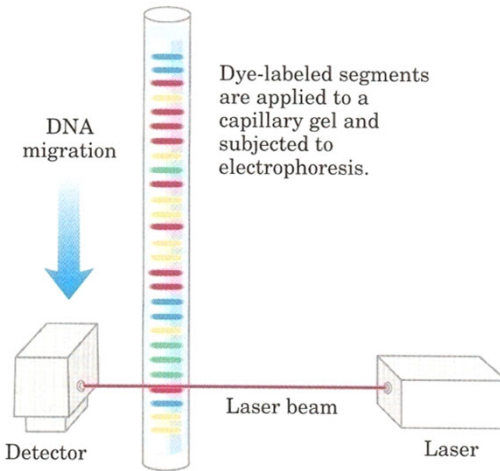
ddTTP, ddCTP:
Pyrimidin-5-Pos.

	R ¹	R ²
A-512	H	CH ₃
G-505	H	H
T-526	CH ₃	CH ₃
C-519	CH ₃	H

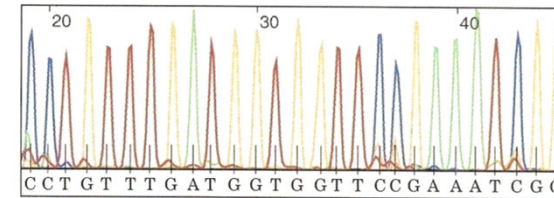
λ_{\max} {



Dye-labeled segments of DNA,
copied from
template with
unknown sequence



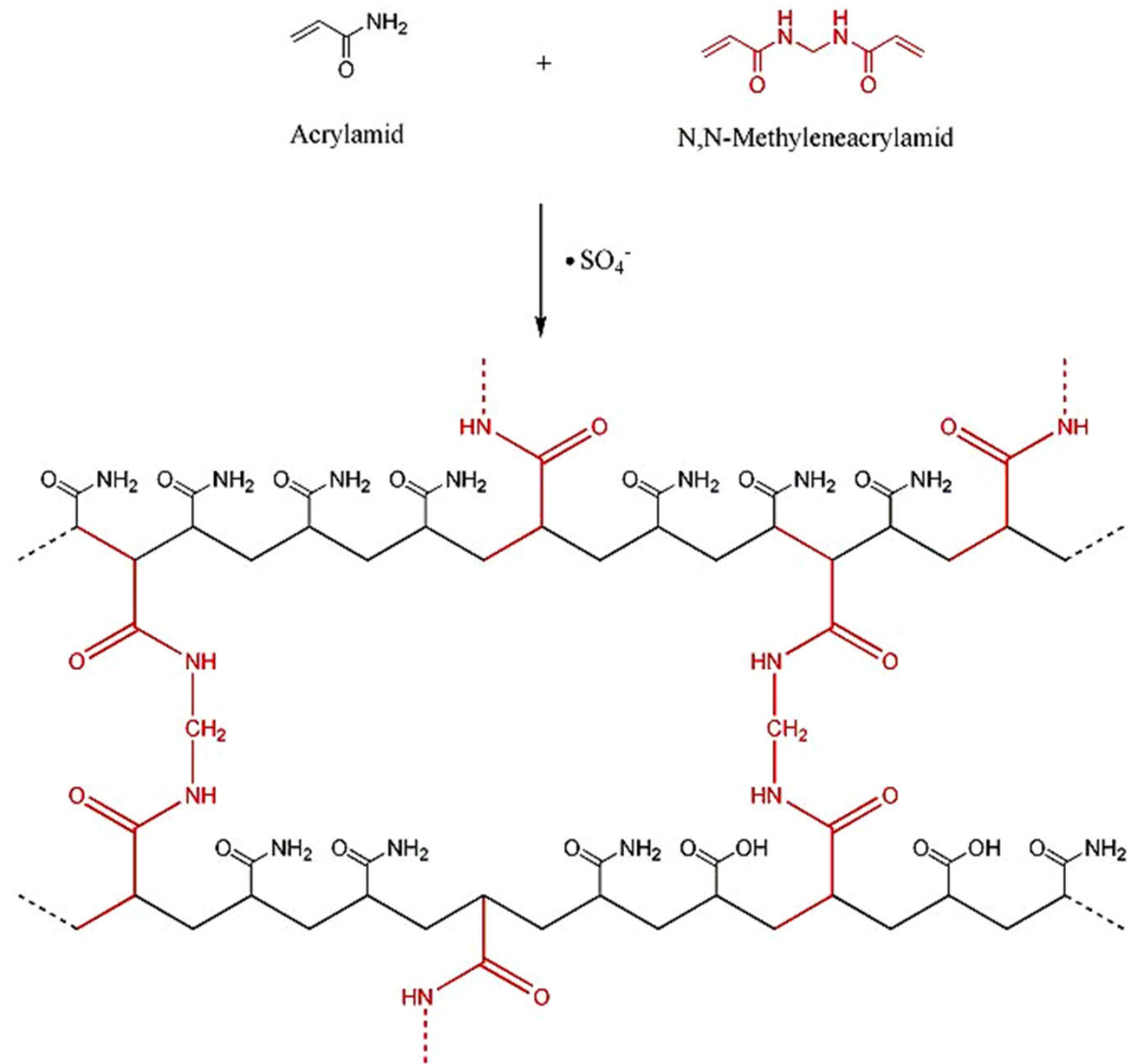
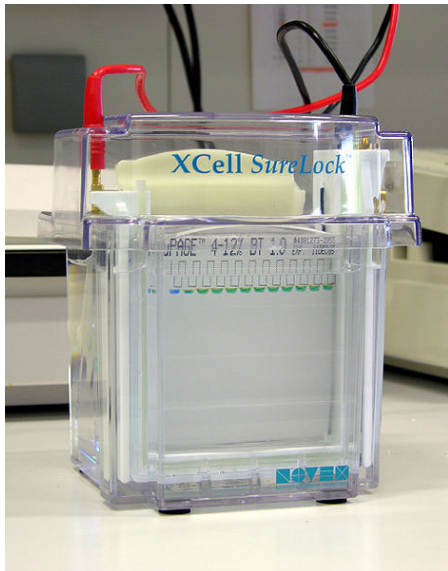
Dye-labeled segments
are applied to a
capillary gel and
subjected to
electrophoresis.



Computer-generated result after
bands migrate past detector

A. DNA - A.4. Sequenzierung

Polyacrylamid-Gel:



Pyrosequenzierung (1996, Nyrén, Ronaghi; 300-500 Basenpaare):

Enzymatischer (5'→3')-Aufbau eines zum zu sequenzierenden, immobilisierten DNA-Strang komplementären DNA-Strangs

Idee: Jeder Verlängerungsschritt wird nacheinander in Anwesenheit *nur eines, jeweils bekannten* der 4 möglichen Desoxynukleosidtriphosphate (dTTP, dGTP, dCTP; dATP α S = Desoxyadenosin- α -thiotriphosphat) versucht. dATP kann nicht verwendet werden, da es die Lichtreaktion (s. u.) auslösen würde.

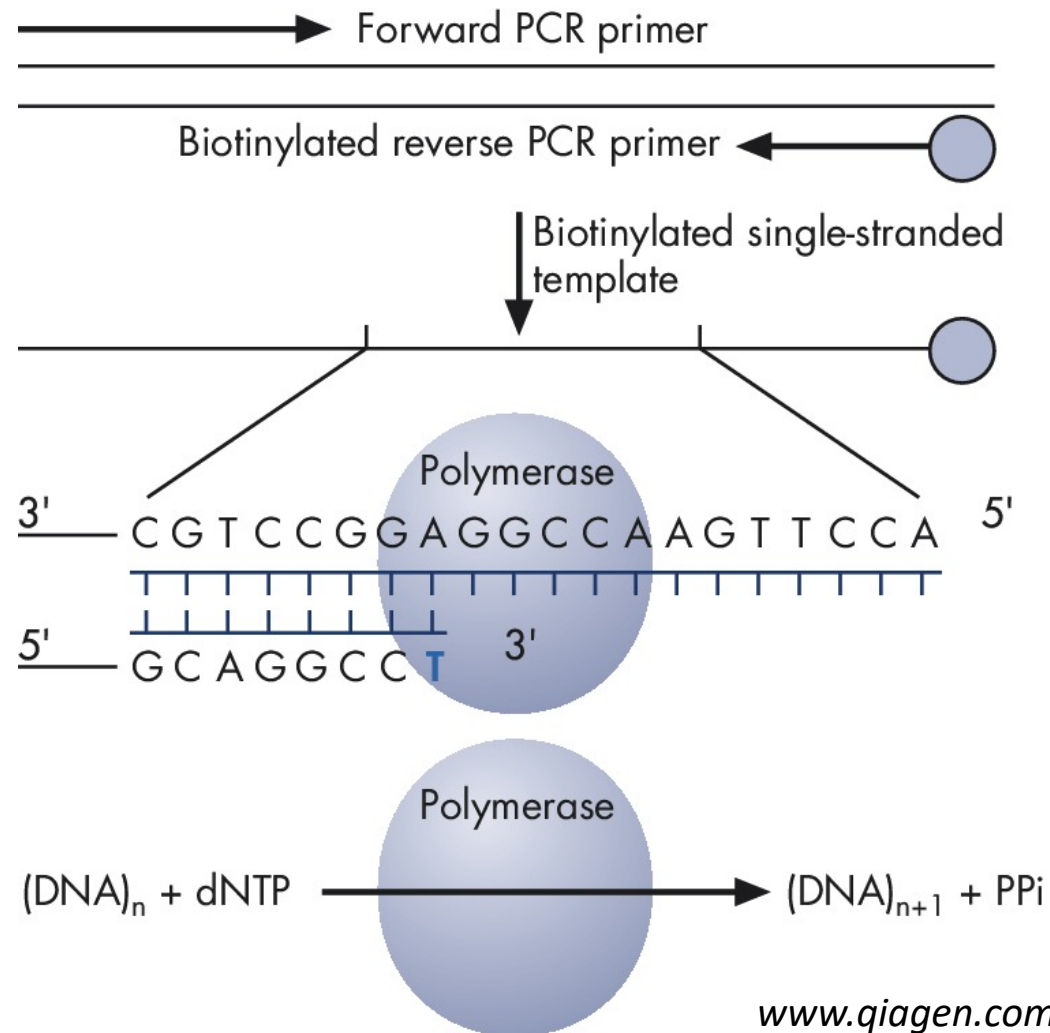
Nur bei Komplementarität wird Pyrophosphat freigesetzt.

Freigesetztes Pyrophosphat wird nach einer Luciferase-Reaktion als **Lichtsignal** registriert, dessen Stärke proportional zur Zahl der gebildeten Phosphodiester-Kupplungen ist. Sind also z. B. zwei gleiche dNTPs hintereinander einzubauen, so entsteht ein doppelt so intensives Lichtsignal.

Danach wird das getestete dNTP durch Apyrase zerstört, und der Zyklus beginnt erneut.

A. DNA - A.4. Sequenzierung

Pyrosequenzierung (1996): Quantifizierung freigesetzten Pyrophosphats



Der **Sequenzierungsprimer** und das einzelsträngige Templat werden inkubiert mit:

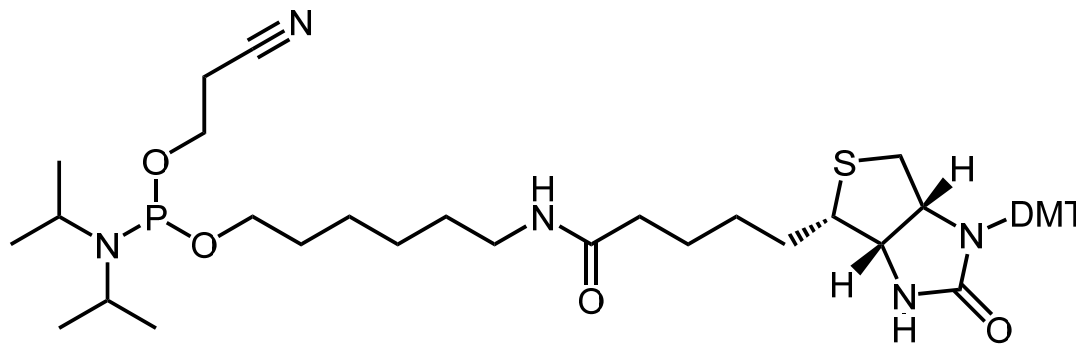
DNA-Polymerase,
ATP-Sulfurylase,
Luciferase,
Apyrase,
Adenosin-5'-phosphosulfat,
Luciferin

Dann folgt das erste dNTP.

Pyrophosphat wird in
konzentrationsproportionales
Lichtsignal umgewandelt.

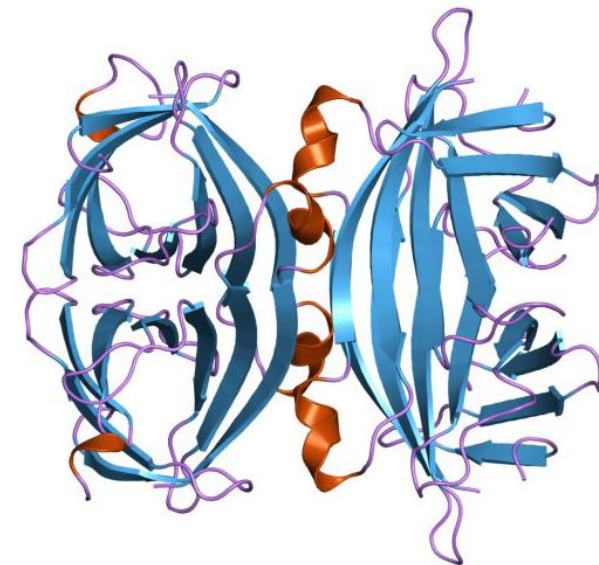
A. DNA - A.4. Sequenzierung

Vorab: Startend von einem **extern synthetisierten 5'-biotinylierten Primer** wird durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit der zu sequenzierenden doppelsträngigen DNA als Templat ein biotinylierter DNA-Einzelstrang synthetisiert, der auf einem mit Streptavidin beschichteten Kügelchen ("bead") immobilisiert wird (Festphasen-Pyrosequencing).

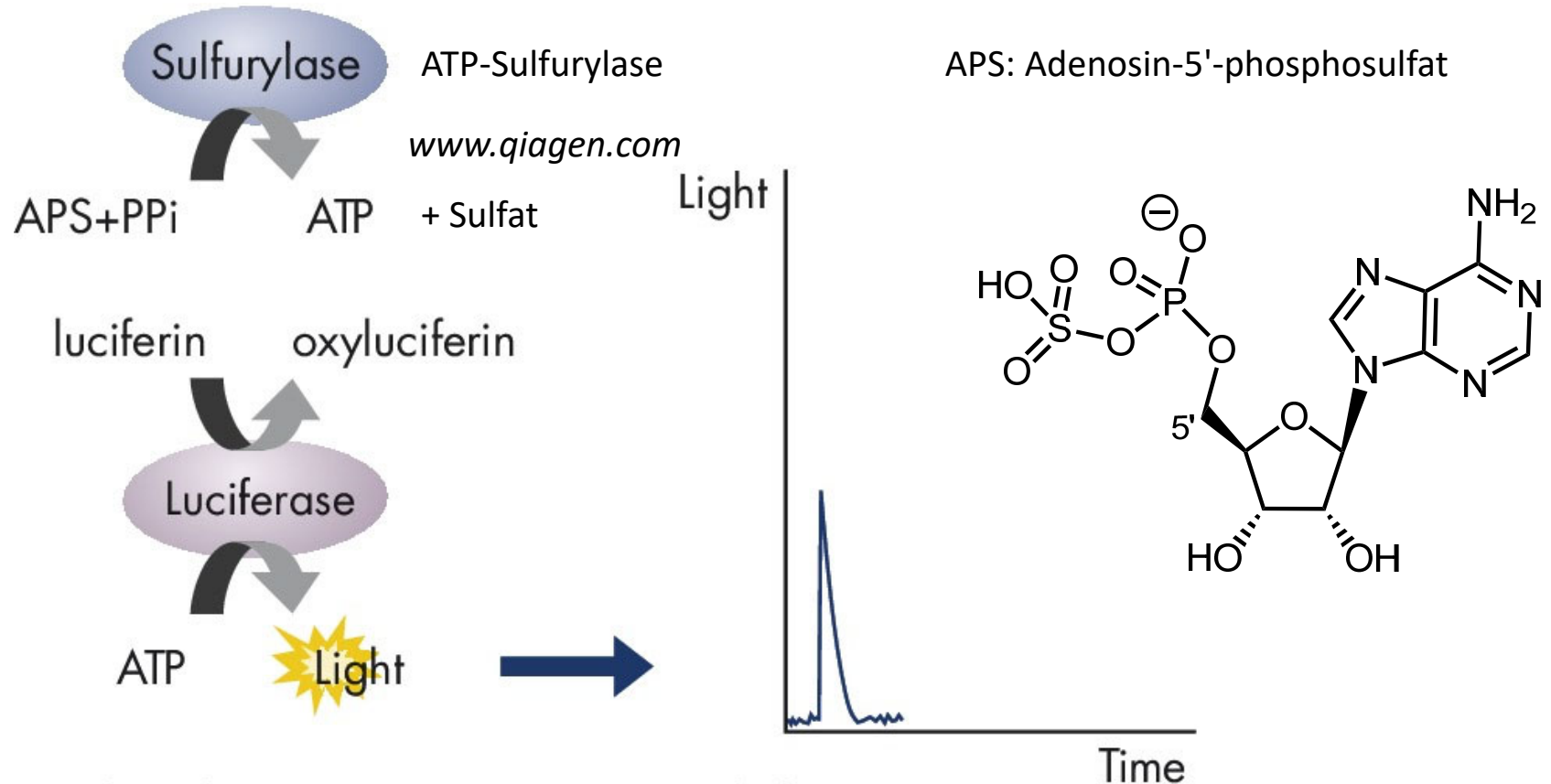


Biotin-Baustein für das Phosphoramidit-Verfahren zur Primer-Synthese (Einbau als letzter Baustein an das 5'-Ende)

Streptavidin: nicht-glycosyliertes homotetrameres Protein (4x159 Aminosäuren) aus *Streptomyces avidinii*, welches Biotin stark bindet (pK_D 14 bis 15)



Pyrosequenzierung: vom Pyrophosphat zum **Lichtsignal**

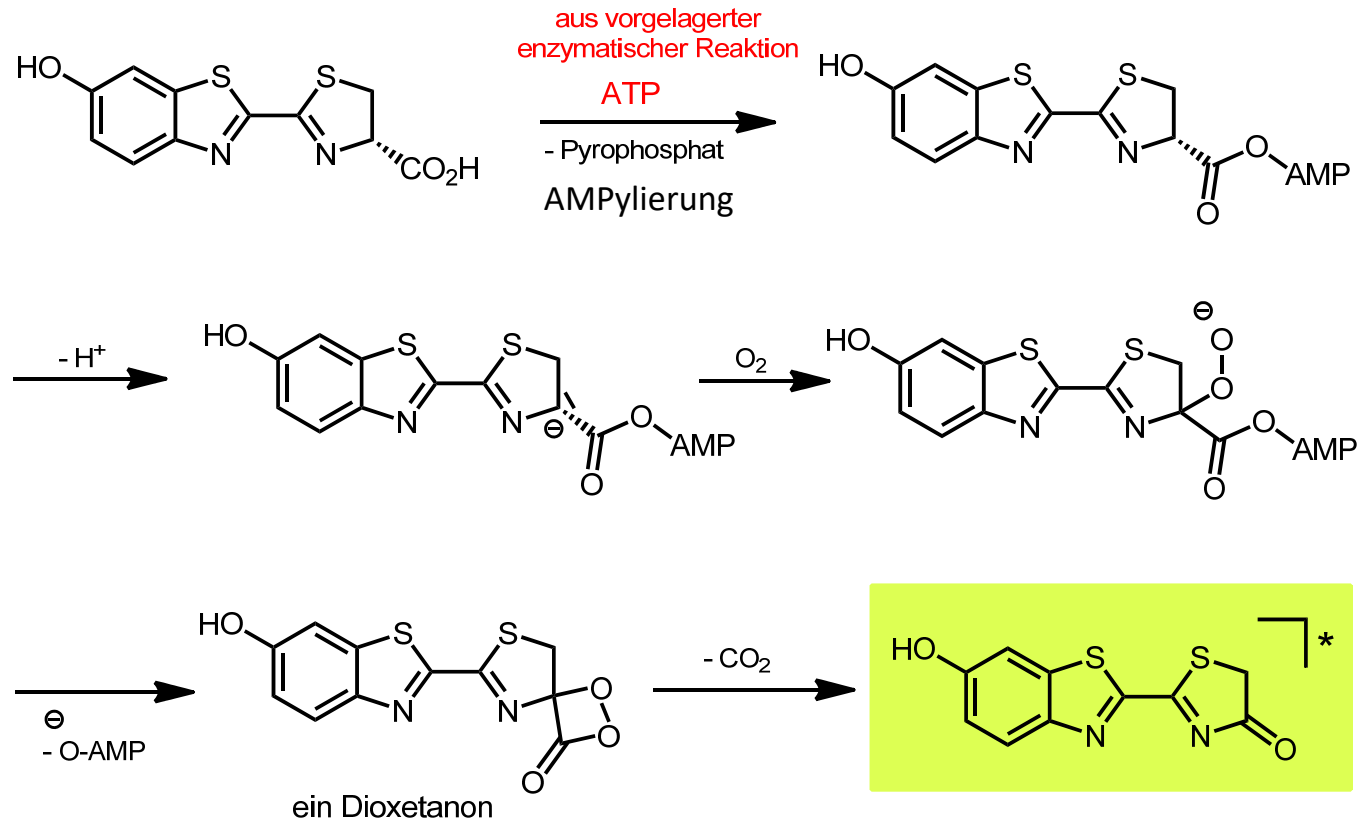


Nucleotide incorporation generates light seen as a peak in the Pyrogram trace

Lichtintensität proportional zur Zahl der eingebauten Desoxynucleotide

A. DNA - A.4. Sequenzierung

Glühwürmchen-Luciferin



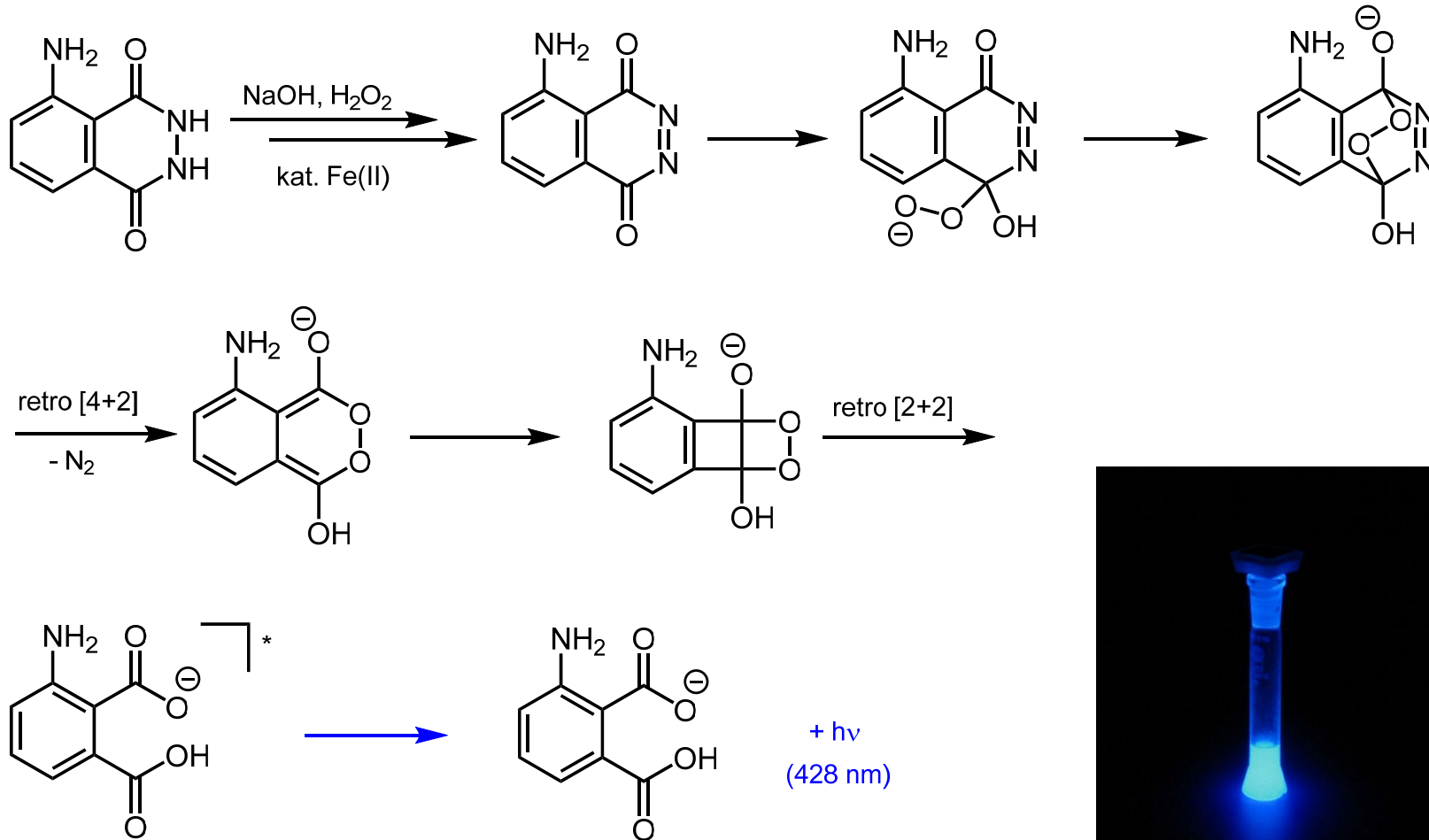
Großer Leuchtkäfer
Lampyris noctiluca



Woodward-Hoffmann-Regeln?
Eine der Komponenten muss im angeregten Zustand sein.

A. DNA - A.4. Sequenzierung

Luminol (3-Aminophthalsäurehydrazid): Chemilumineszenz

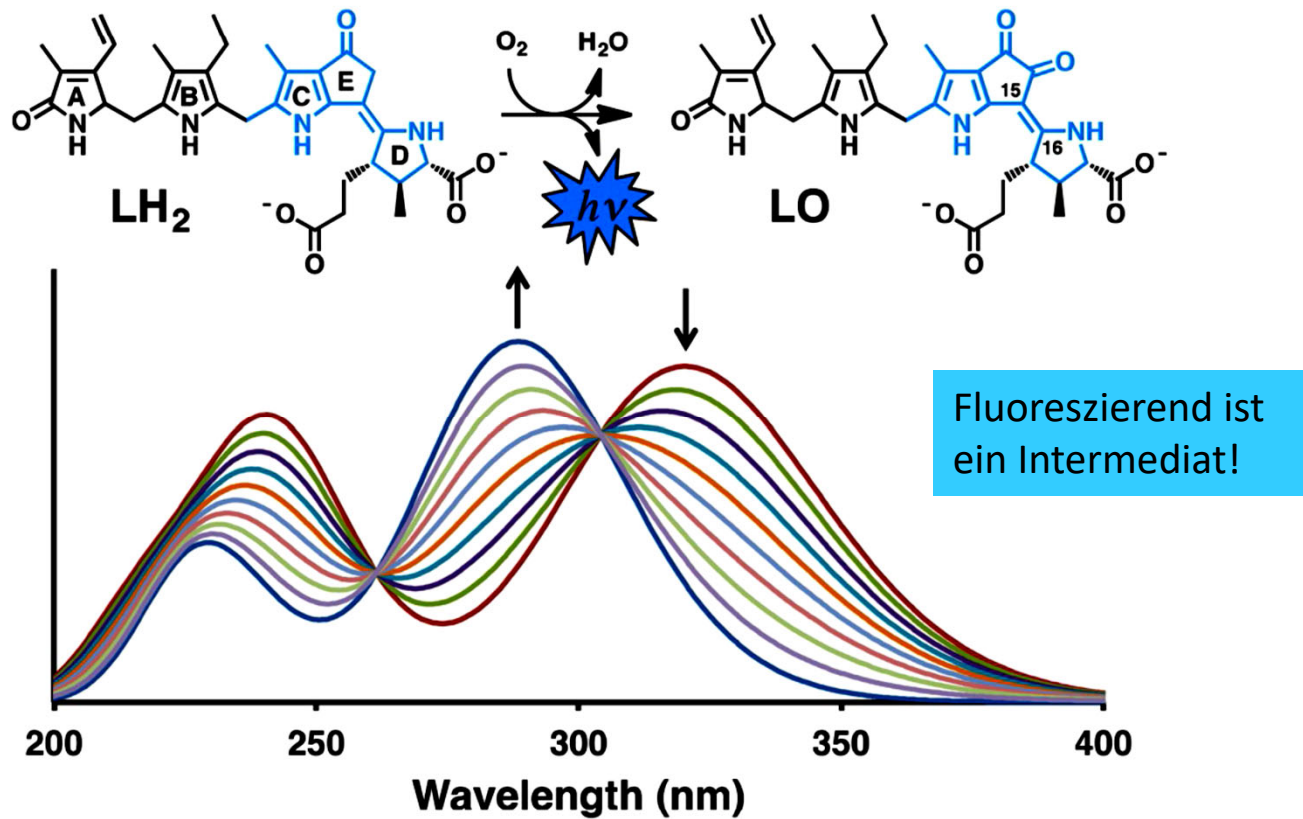


z. B. Nachweis von Blut in der Forensik

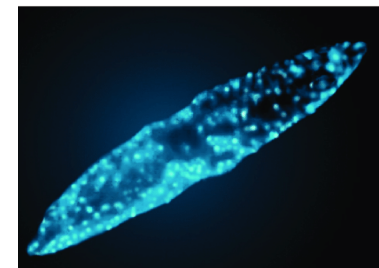
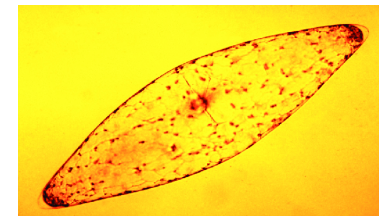
A. DNA - A.4. Sequenzierung

Meeresleuchten, ein weiteres Beispiel für Biolumineszenz

Dinoflagellat-Luciferin/Luciferase-Reaktion, mechanisch ausgelöst



Dinoflagellat *Pyrocystis fusiformis*

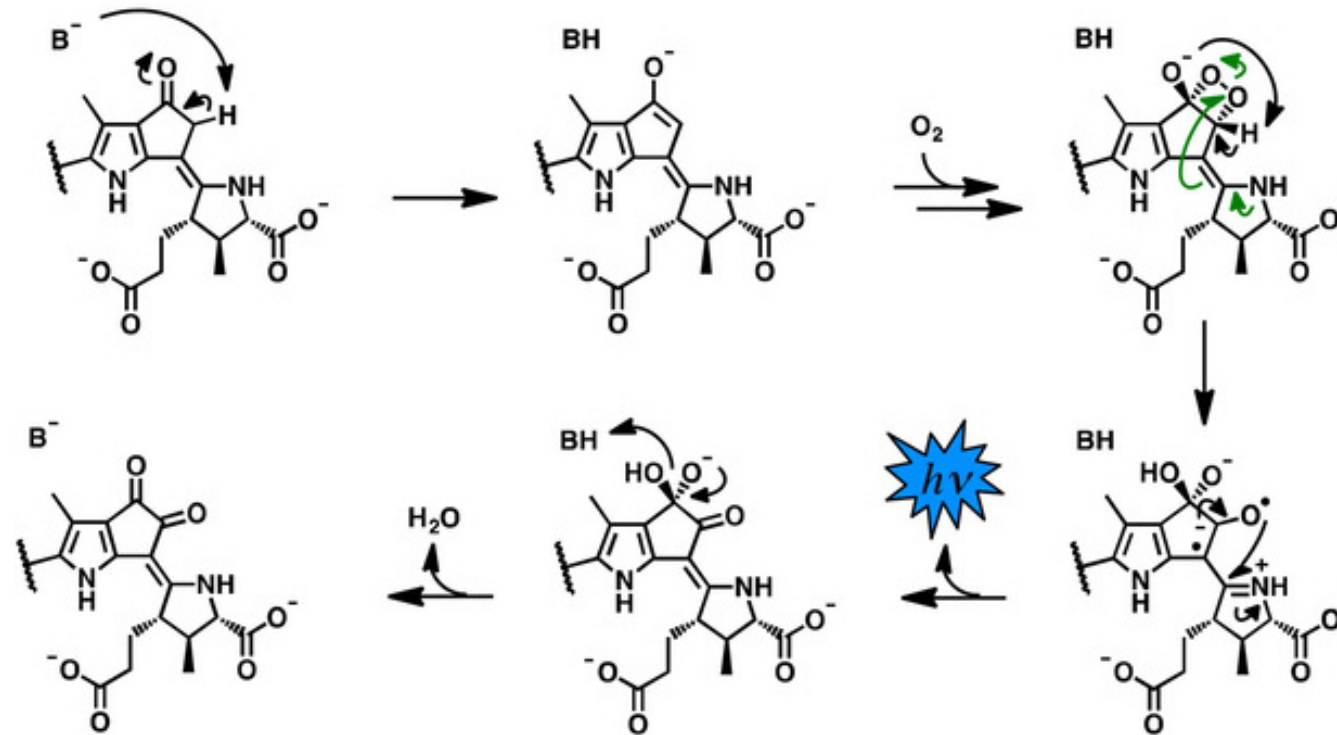


aus: Ngo, Mansoorabadi, *ChemPhotoChem* **2017**, 383.

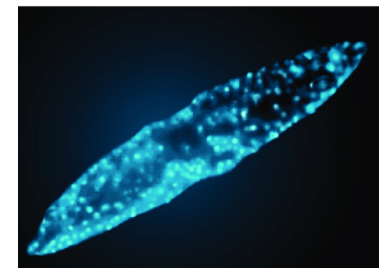
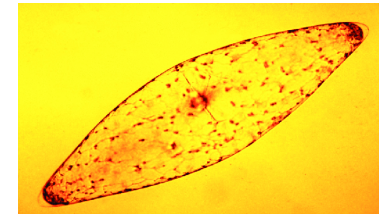
A. DNA - A.4. Sequenzierung

Meeresleuchten, ein weiteres Beispiel für Biolumineszenz

Dinoflagellat-Luciferin/Luciferase-Reaktion, mechanisch ausgelöst



Dinoflagellat *Pyrocystis fusiformis*



Fluoreszierend ist ein Intermediat!

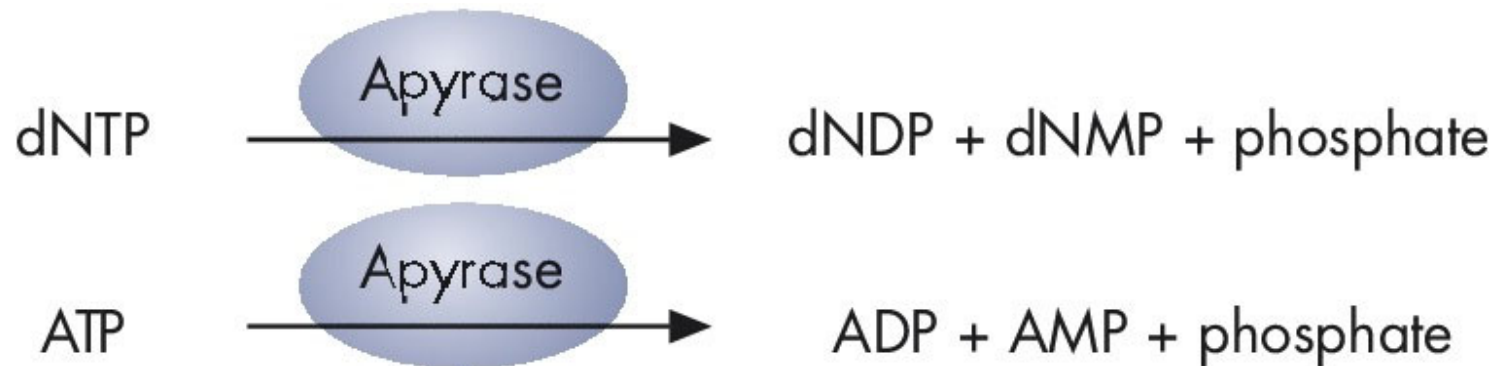
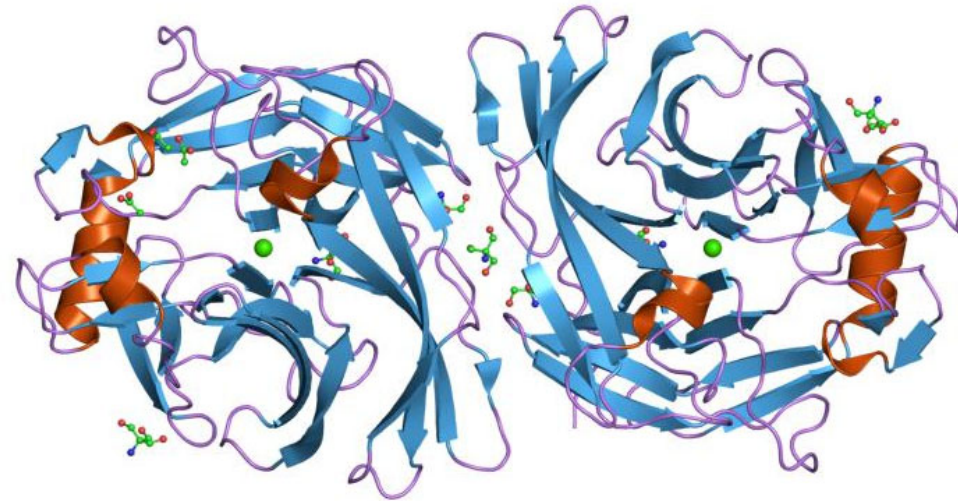
aus: Ngo, Mansoorabadi, *ChemPhotoChem* **2017**, 383.

A. DNA - A.4. Sequenzierung

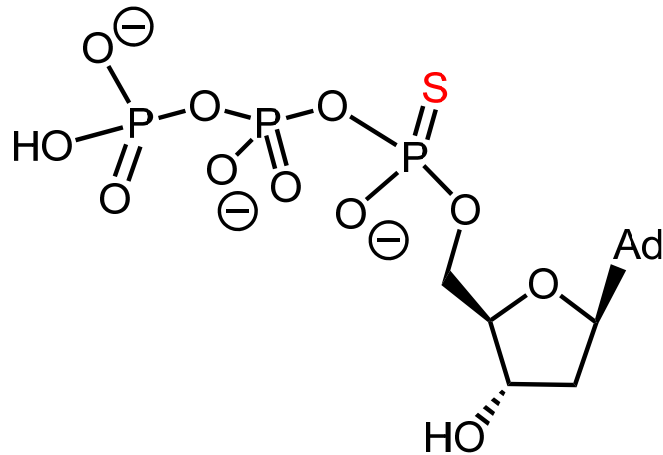
Pyrosequenzierung: Apyrase

Apyrase (Adenosin-Diphosphatase) baut beständig nicht-inkorporierte Nukleotide und ATP ab.

Wenn der Abbau vollständig ist, wird ein weiteres Nukleotid zugesetzt.



Pyrosequenzierung



Desoxyadenosin- α -thiotriphosphat (dATP α S)

wird statt des natürlichen Desoxyadenosin-Triphosphats (dATP) eingesetzt, da es effizient durch die DNA-Polymerase eingebaut, aber nicht durch Luciferase erkannt wird.

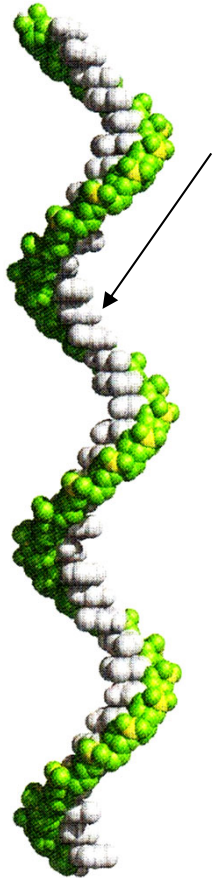
Ansonsten würde es permanent leuchten.

Pyrosequenzierung erreichte 2005 den Markt. Seitdem sind beständig effizientere Verfahren hinzugekommen, insbesondere die Illumina-Sequenzierung und seit 2012 auch die DNA-Sequenzierung einzelner Zellen. Hier sei auf die Vorlesungen der Biochemie verwiesen.

Inzwischen kommen Membranen mit Nanoporen zum Einsatz, in die jeweils 4 Nukleotide aufgenommen werden (Einzelstrang), die durch Messung der Leitfähigkeit identifiziert werden.

B. RNA – B.1. Funktion und Struktur

RNA strukturell vielfältiger als DNA



rechtsgängige Helix

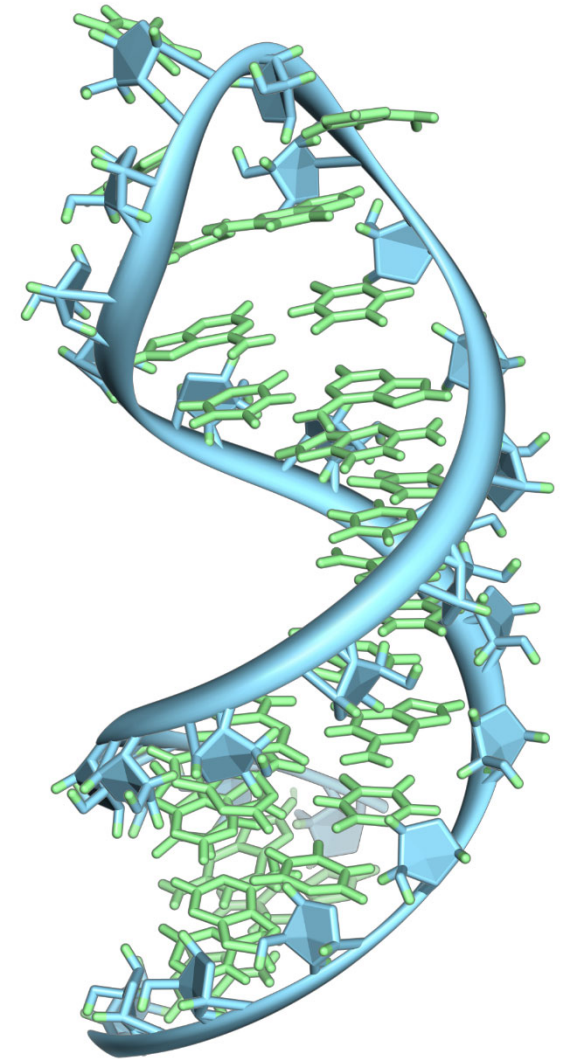
Basenstapel
(bes. stabil zw. Purinbasen)

RNA-Einzelstrang (z. B. b.
messenger-RNA (mRNA))

=> Selbst-Hybridisierung zu 3-
dimensionalen Strukturen (viel
eher als DNA, die klar die
Doppelhelix bevorzugt)

Ribose statt 2-Desoxyribose
Uracil statt Thymin

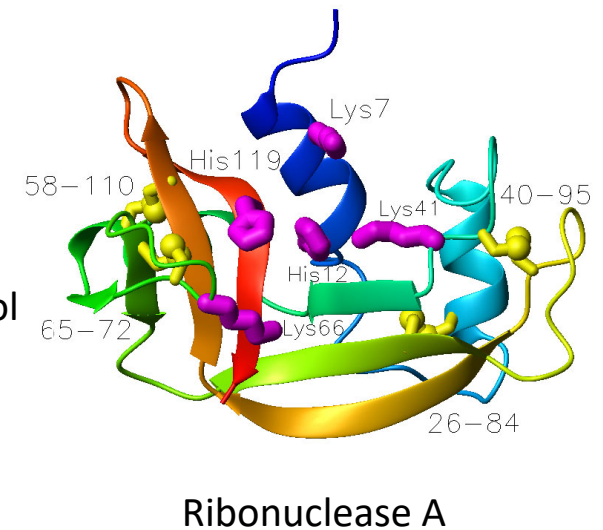
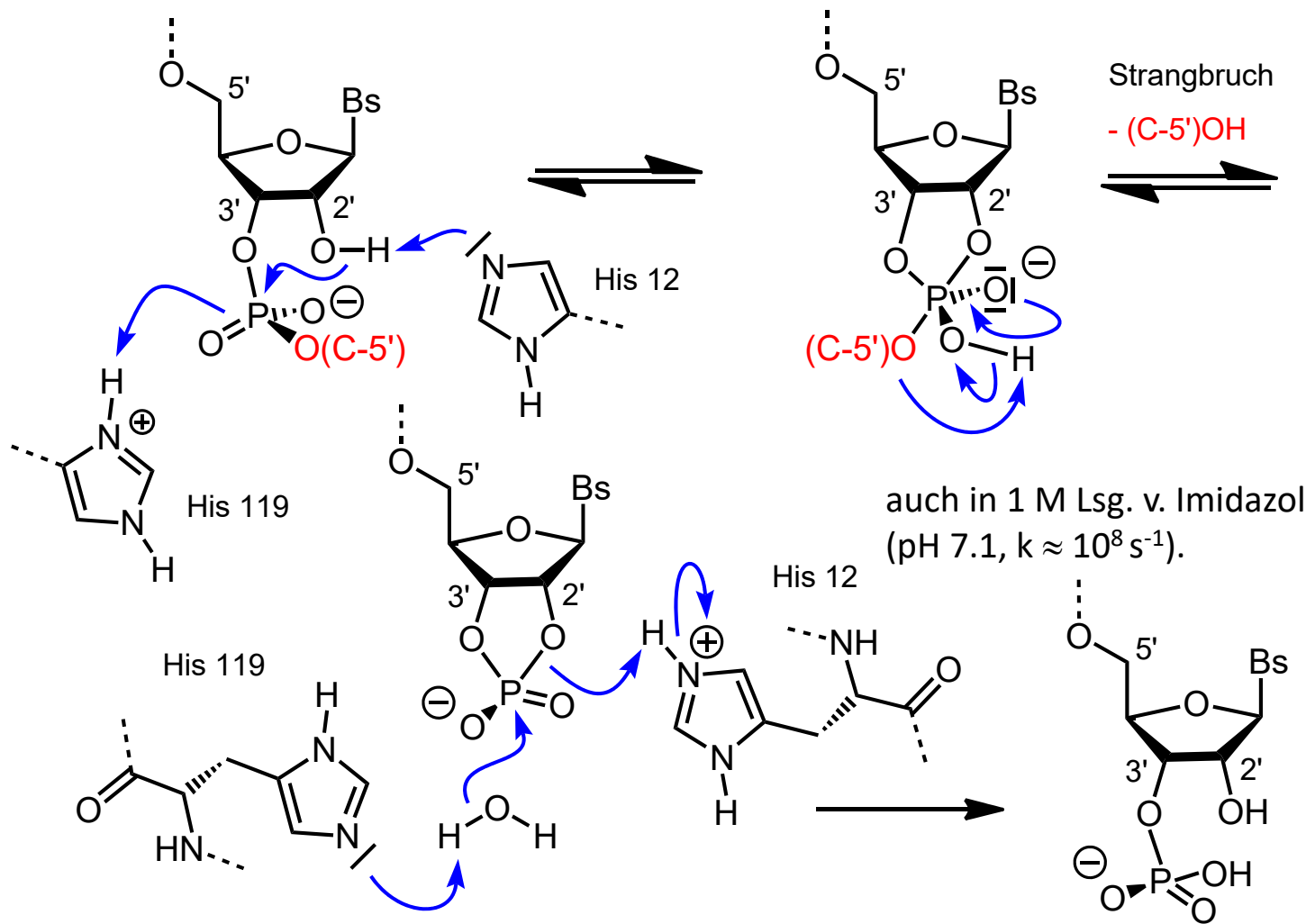
Haarnadel (hairpin)-
Struktur einer Prä-
Messenger-RNA



B. RNA – B.1. Funktion und Struktur

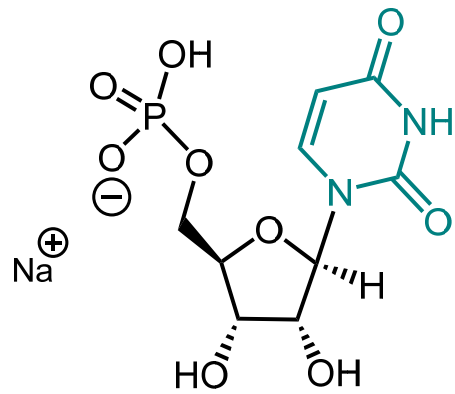
Leichter Strangbruch durch Umesterung in Enzymen:

Experimente mit RNA: Desaktivierung der RNAsen durch Diethylpyrocarbonat nötig (N-Ethoxycarbonylierung von His-Seitenketten)



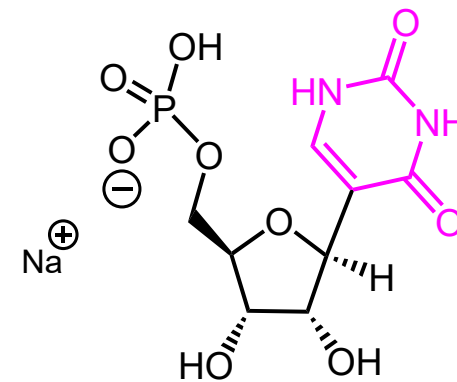
B. RNA – B.1. Funktion und Struktur

Uridin und Pseudouridin



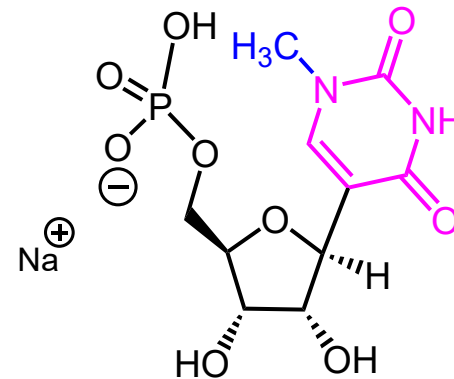
Uridinmonophosphat

Umwandlung von Uridin in Pseudouridin ist die häufigste Modifikation zellulärer RNA.



Pseudouridinmonophosphat

mRNA mit *N*-Methylpseudouridinmonophosphat-Bausteinen wird vom Immunsystem nicht erkannt.



B. RNA – B.1. Funktion und Struktur

Modifizierung von mRNA in Eukaryonten

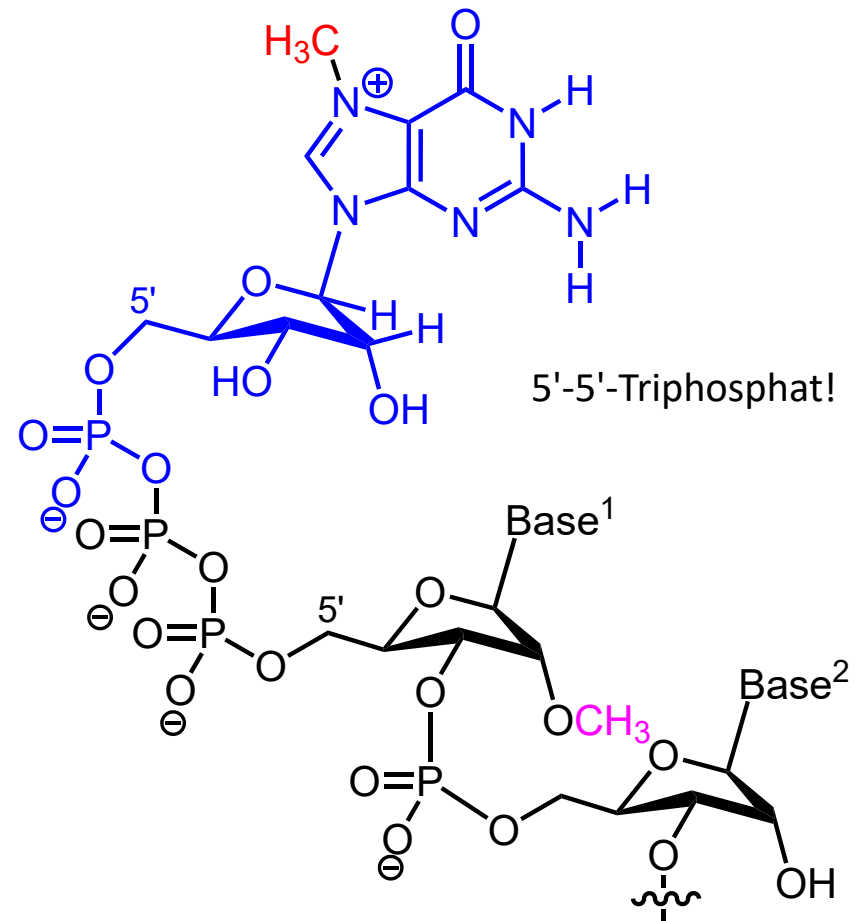
5'-Capping

Hydrolyse des γ -Phosphats am 5'-Ende
Kondensation mit **GMP**

N7-Methylierung durch S-Adenosylmethionin

Methylierung der 2'-OH-Gruppe des letzten
"regulären" Nukleotids

3'-Polyadenylation von mRNA durch Poly(A)-
Schwanz (50-200 Nukleotide)
=> Isolierung von mRNA an mit Oligo(dT)-
modifizierter Cellulose möglich.



B. RNA – B.1. Funktion und Struktur

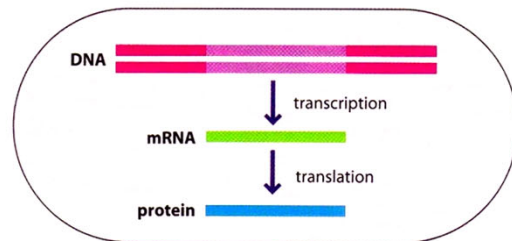
Genexpression im Menschen

Transkription:

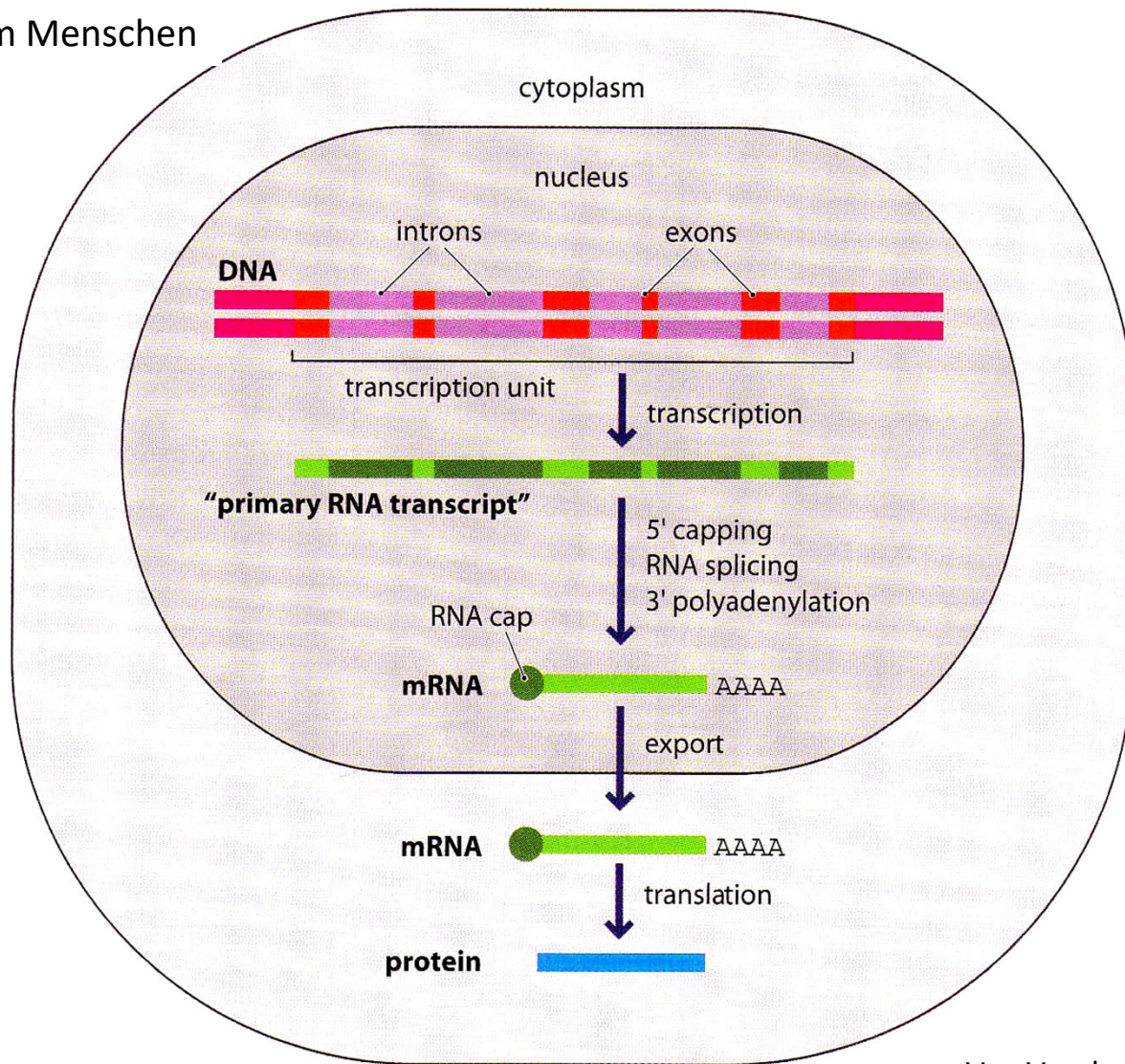
RNA-Polymerase I: Synthese ribosomaler RNA;

R.-P. III: Synthese von Transfer-RNA;

R.-P. II: Synthese der übrigen RNA (z. B. Messenger-RNA, micro-RNA)



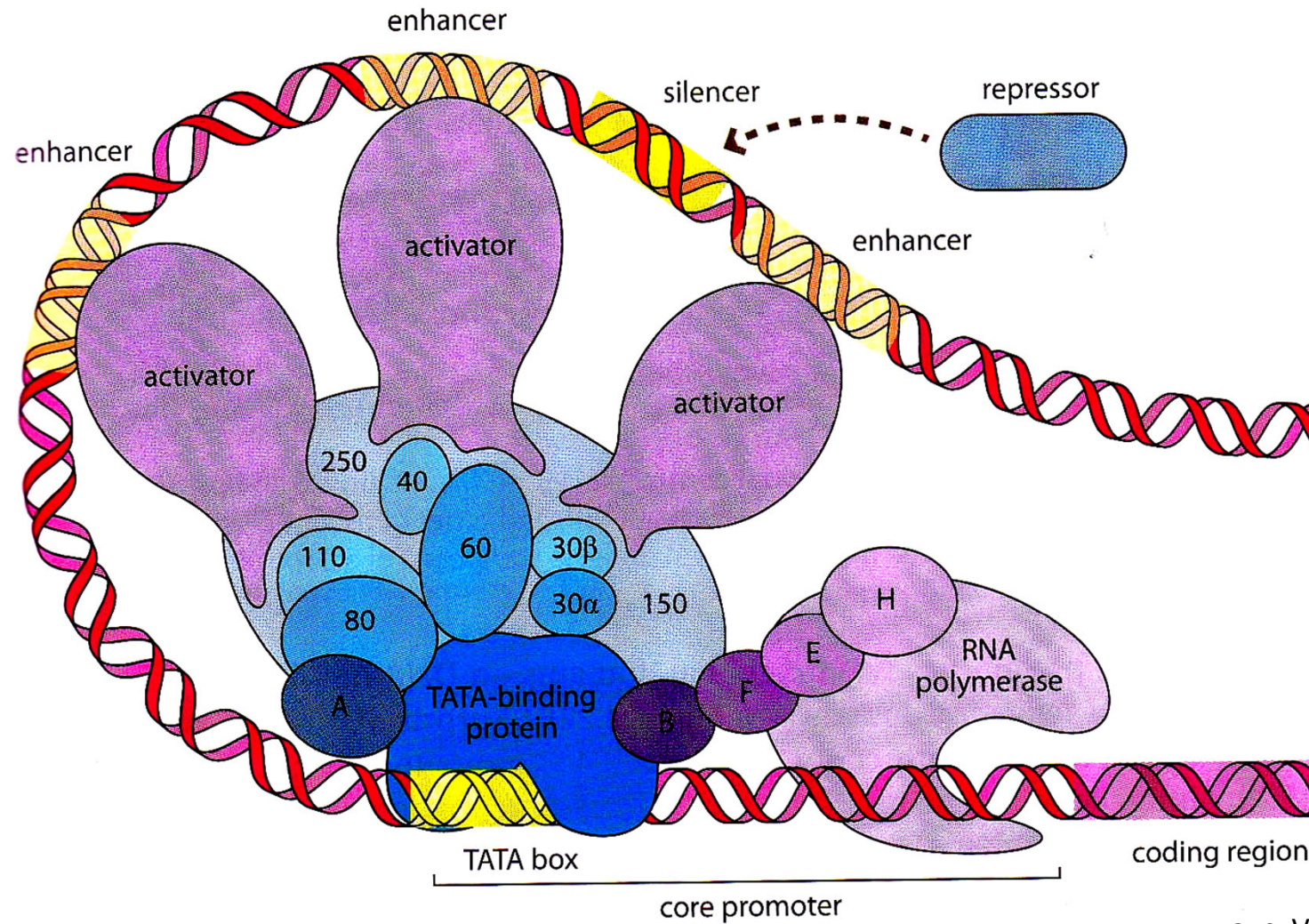
Bakterielle Genexpression



aus: Van Vranken/Weiss

B. RNA – B.1. Funktion und Struktur

Transkriptionaler Initiationskomplex an DNA -> Vorlesungen der Biochemie



aus: Van Vranken/Weiss

B. RNA – B.1. Funktion und Struktur

Genetischer Code als "wheel diagram"

Zu lesen von innen nach außen,
z. B. CUG -> Leucin

6 Tripel: -> Ser, Leu, Arg

4 Tripel: -> Gly, Ala, Val, Thr, Pro

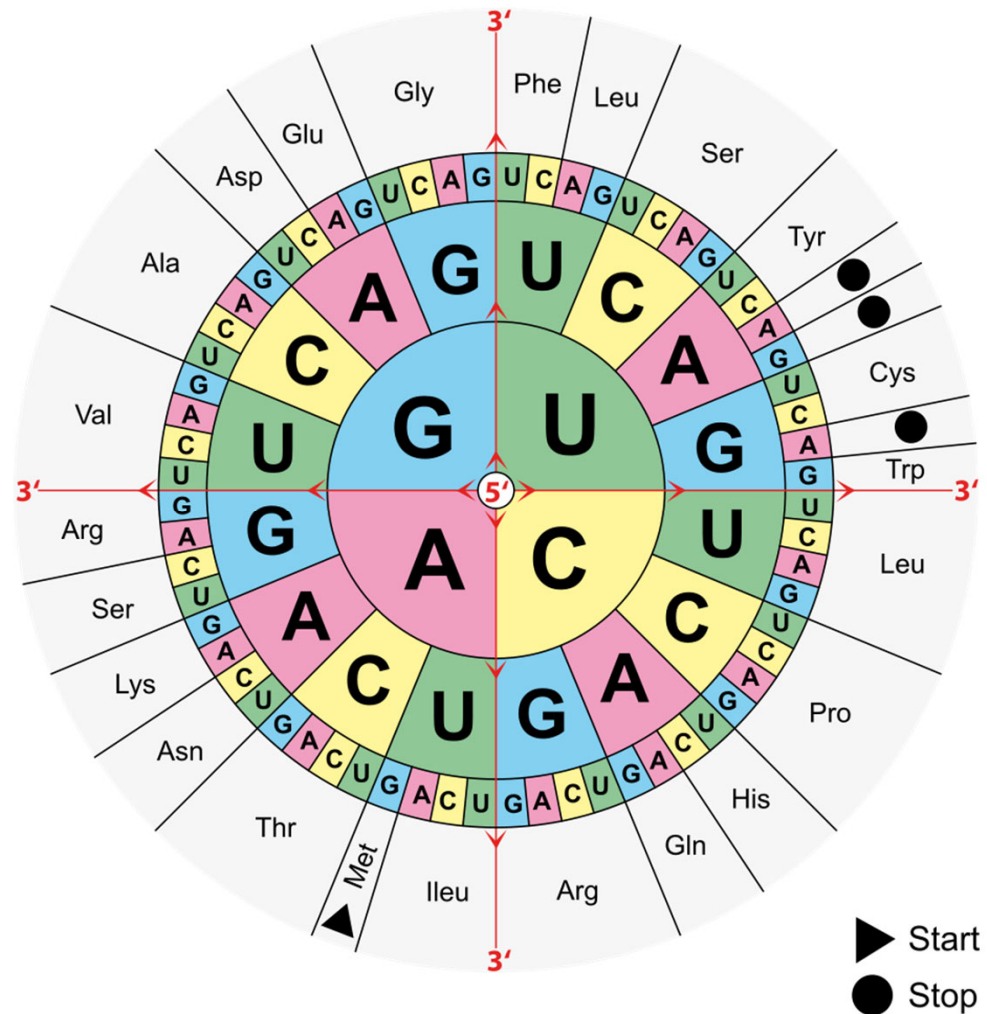
3 Tripel: -> Ile, Stop

2 Tripel:

-> Glu, Asp, Lys, Asn, Gln, His, Cys,
Tyr, Phe

1 Tripel: -> **Met/Start**, Trp

Humane Proteine beginnen zunächst mit
Methionin, welches durch die Methionin-
Aminopeptidase 2 abgespalten wird.

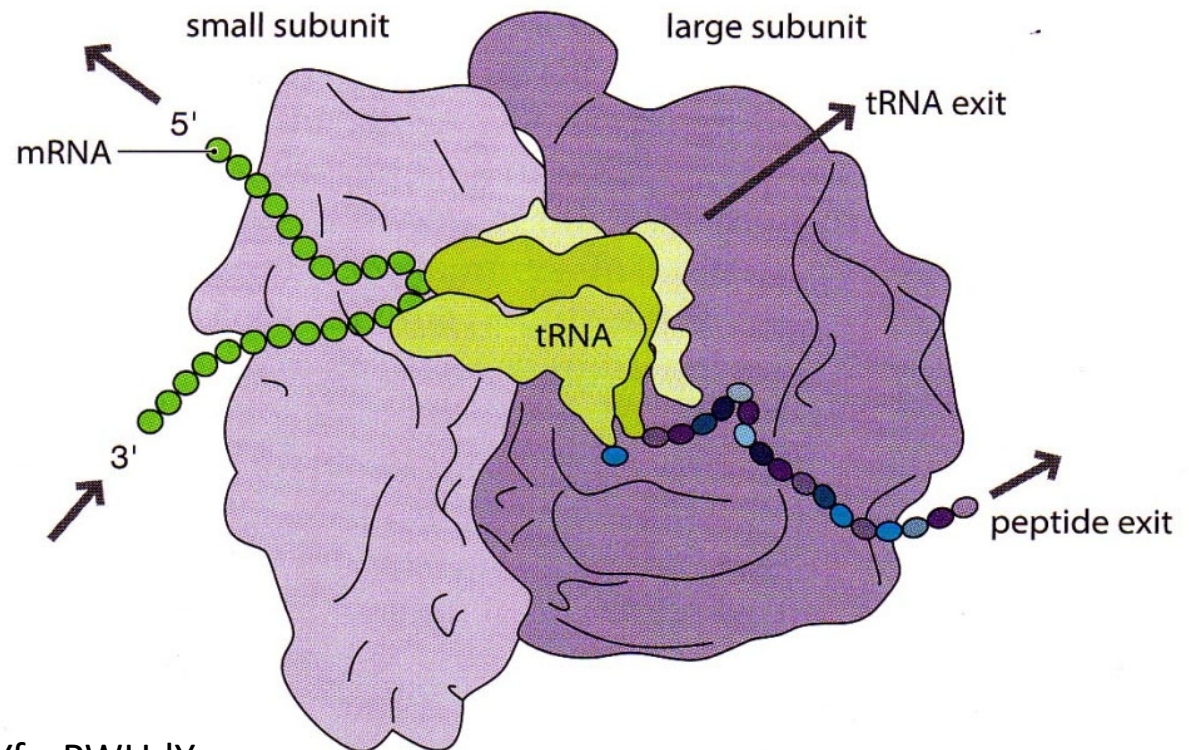


Selenocystein (Sec): Stop-Codon UGA, Synthese aus Ser-tRNA^{Sec}

B. RNA – B.1. Funktion und Struktur

Ein Ribosom bei der Arbeit (Protein-Synthese im Cytoplasma)

Eine menschliche Zelle enthält ca. 4 Millionen Ribosomen (80% der Gesamt-RNA, 5-10% des Gesamt-Proteins), aufgebaut aus 4 (3+1) RNA-Ketten und 80 Proteinen.

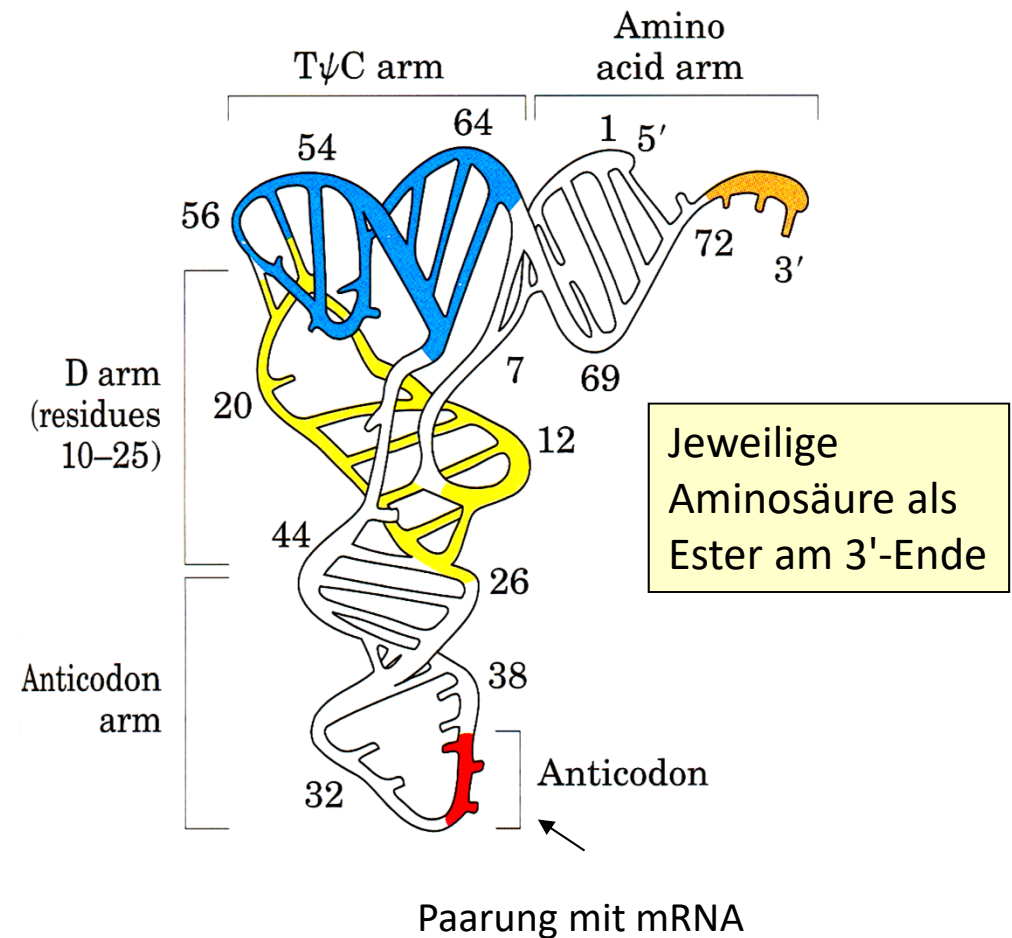
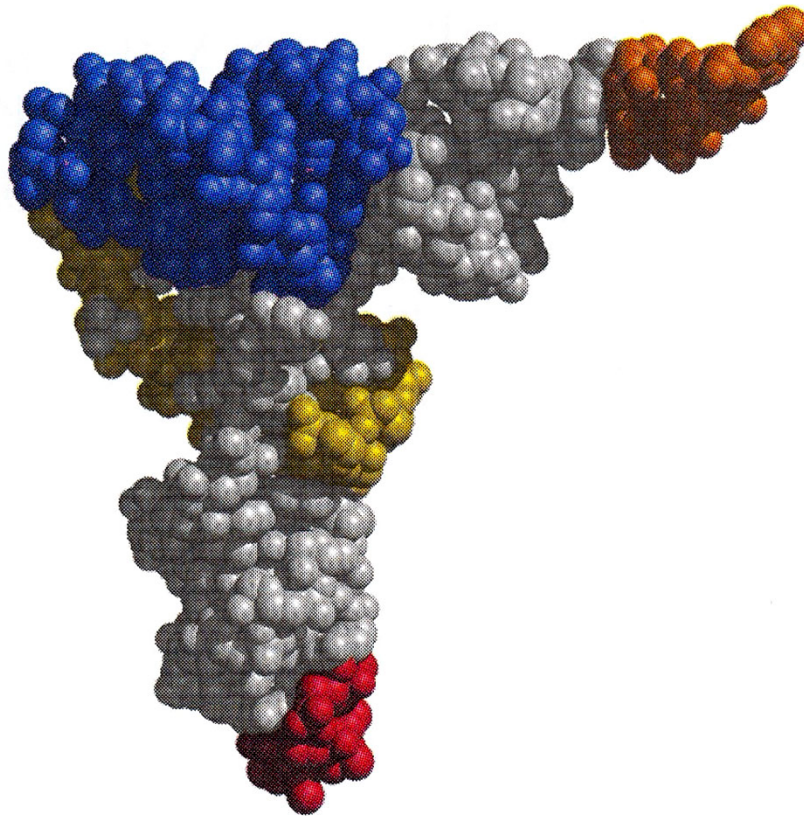


Das Ribosom ist ein Ribozym! Watch it:
https://www.youtube.com/watch?v=Tfyf_rPWUdY

aus: Van Vranken/Weiss

B. RNA – B.1. Funktion und Struktur

RNA- vielfältiger als DNA-Strukturen



Tertiärstruktur von tRNA^{Phe} aus Hefe;
auch ungewönl. Basen-Wechselwirkungen: Tripel (7-Methyl-G)-G-C, Paar A-(N²-Dimethylguanin),
Beteiligung von Phosphodiester-Sauerstoffatomen und der Ribose-2-OH-Gruppe

B. RNA – B.1. Funktion und Struktur

Transfer-RNA

für jede Aminosäure speziell;

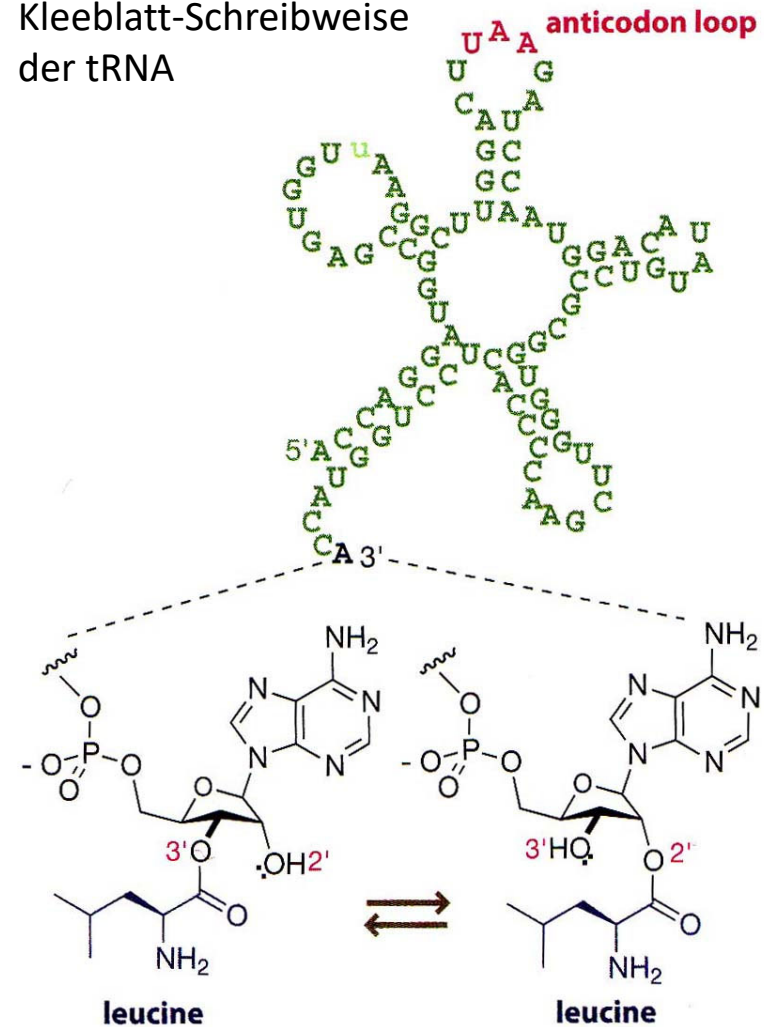
ca. 80 Nukleotide;

jeweilige Aminosäure als Ester an 3'- oder 2'-OH gebunden (schnelles Gleichgewicht, 5000-mal/s bei 25 °C);

Aminolyse nur des 3'-Esters;

für den Einbau der Aminosäure in den Peptidstrang muss der Anticodon (Nukleotid-Tripel, rot) zur vorgegebenen Sequenz der mRNA passen (Genetischer Code).

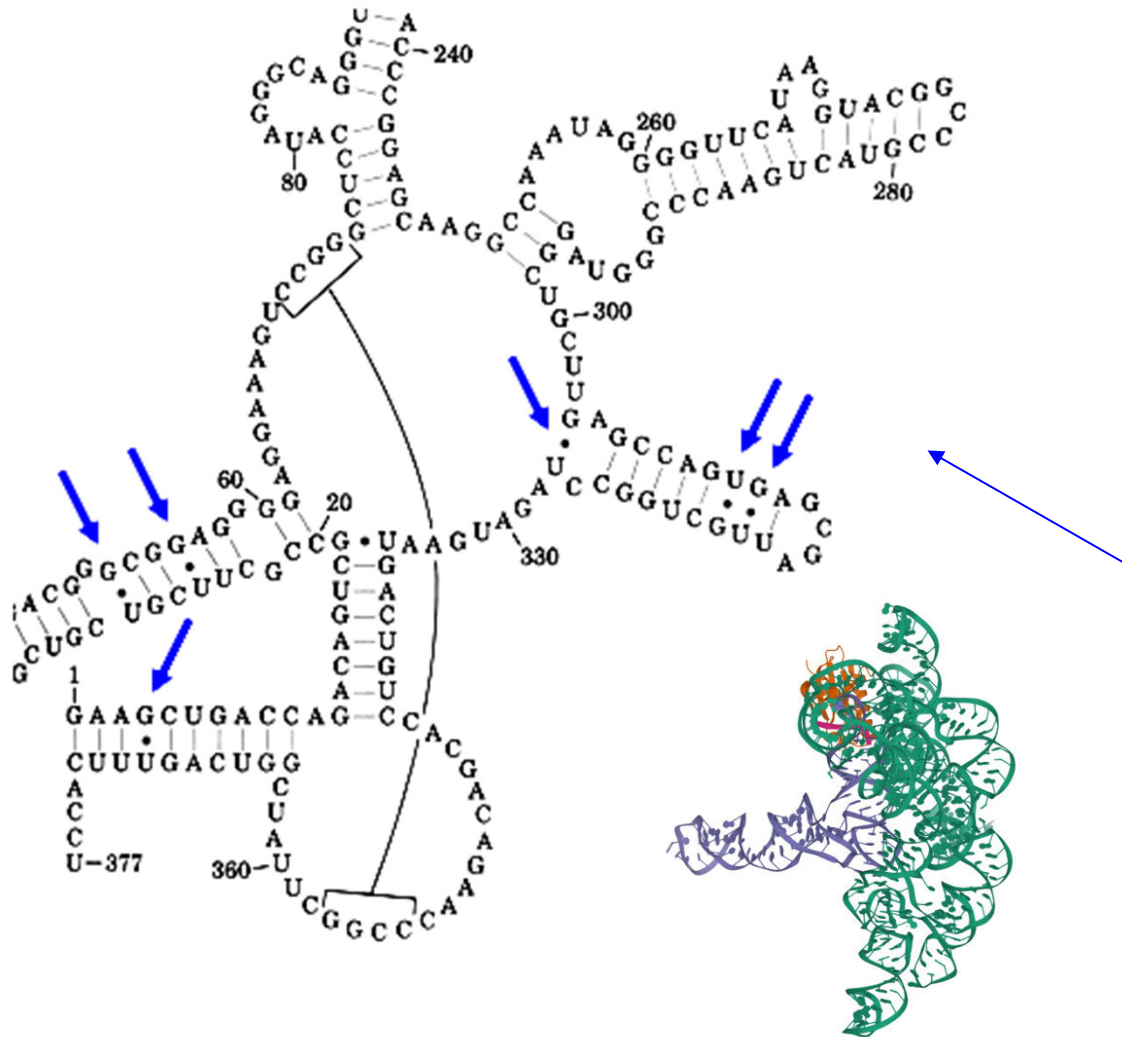
Kleeblatt-Schreibweise
der tRNA



aus: Van Vranken/Weiss

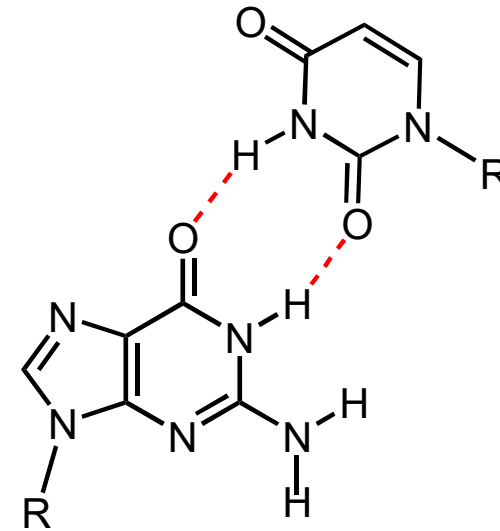
B. RNA – B.2. Ribozyme

Ribozym RNase P: spaltet am 5'-Ende von tRNA



Basenpaarung wie bei DNA;

zusätzlich z. B.:

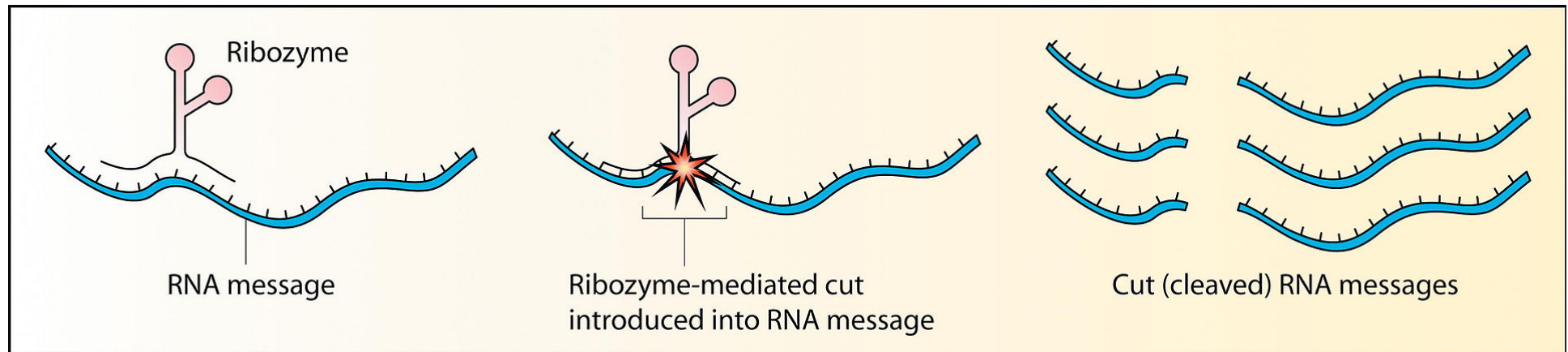


G=U-Basenpaar,
nur b. Paarung bereits
vorgebildeter Stränge

B. RNA – B.2. Ribozyme

Ribozyme: katalytisch aktive RNA (Cech, Altman, 1982: *Tetrahymena*-Ribozym; Nobelpreis Chemie 1989)

12 Klassen, davon 9 selbst-spaltende Ribozyme



B. RNA – B.2. Ribozyme

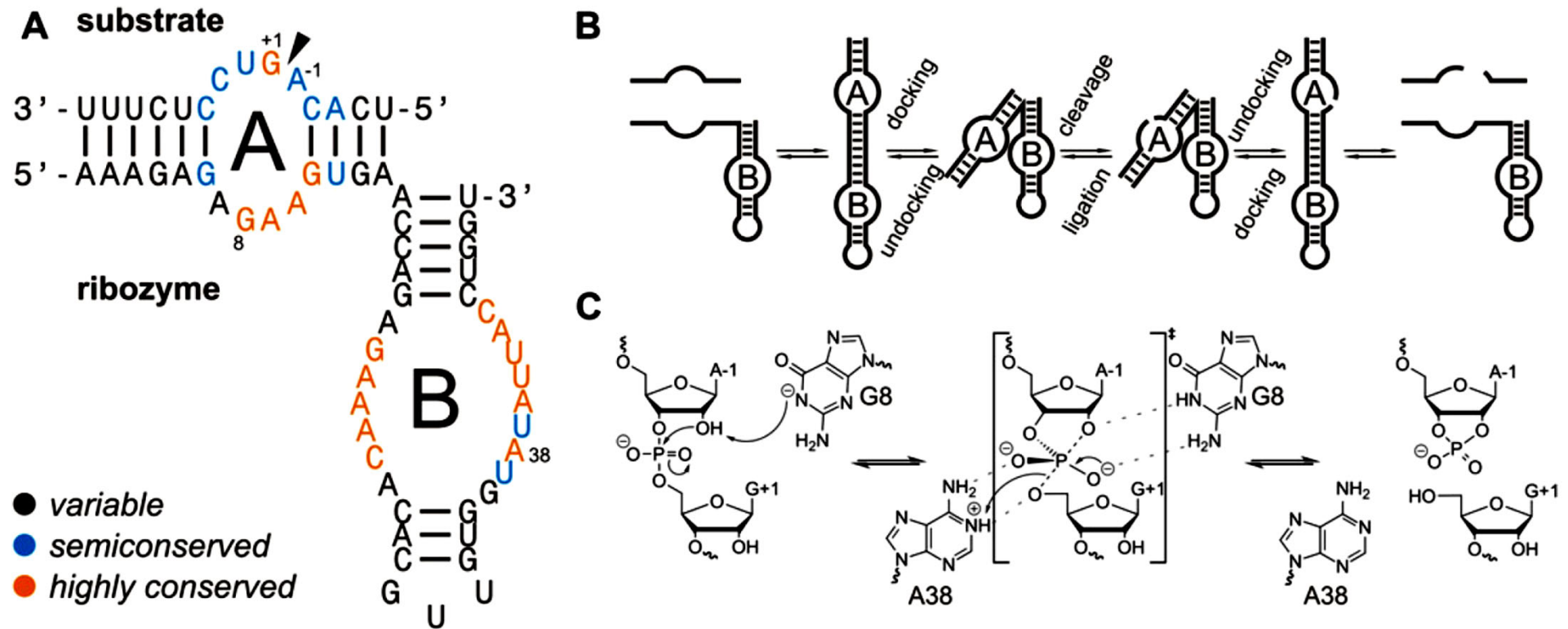
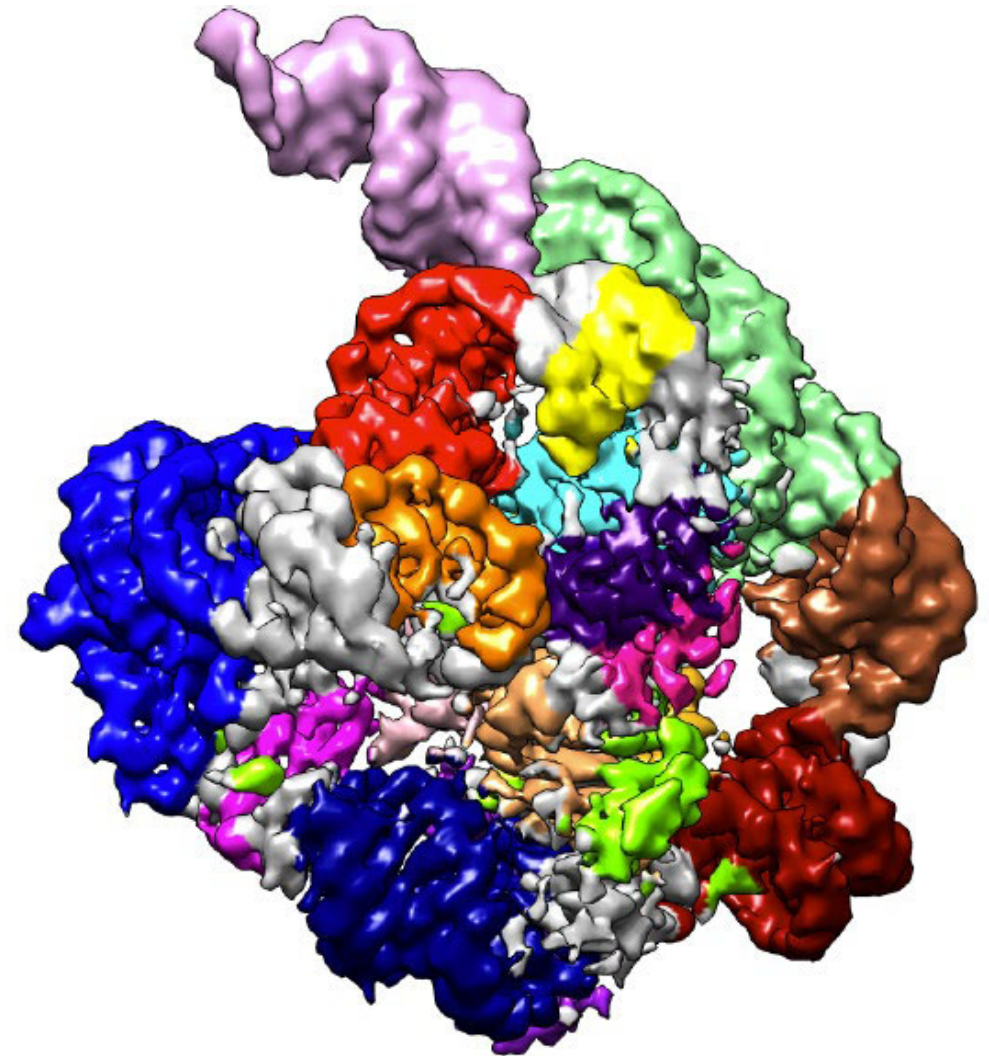
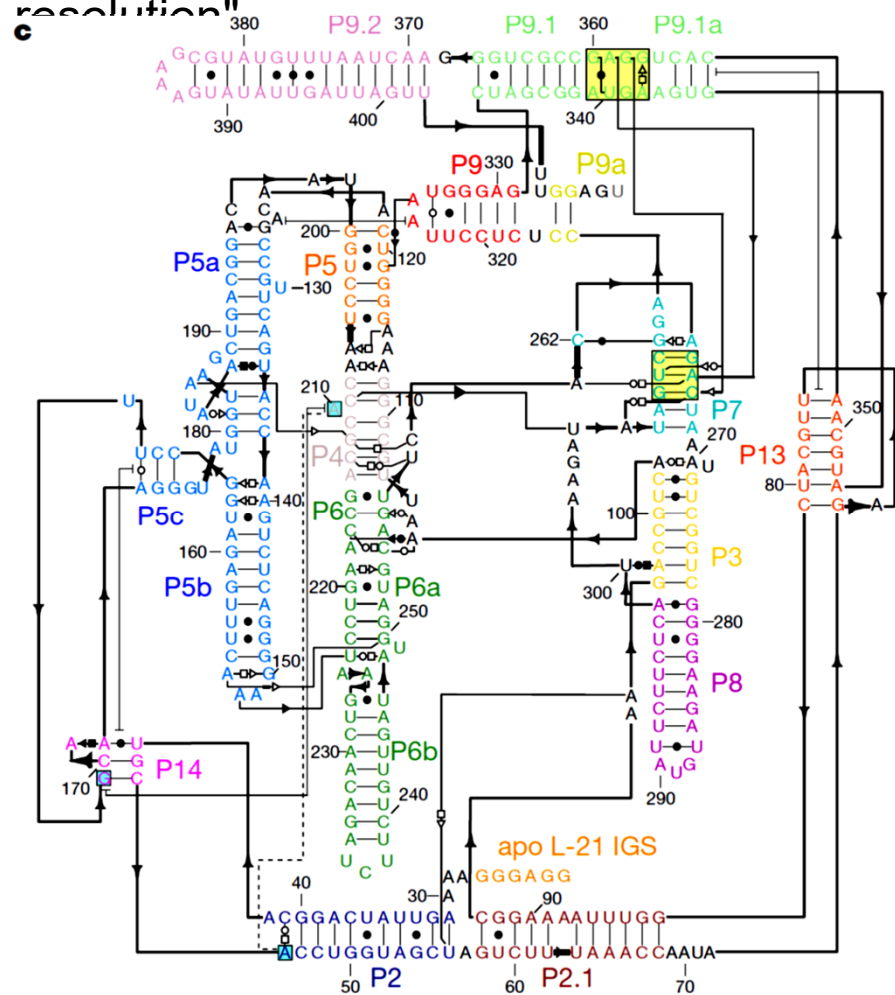


Figure 1. The hairpin ribozyme. (A) Secondary structure of the minimal motif with conserved nucleotides, according to Ref. 28. (B) Conformational dynamics of the hairpin ribozyme. Substrate association and product dissociation occur only in the extended conformation while catalysis proceeds in the docked complex. (C) Mechanism of hairpin ribozyme-catalyzed RNA cleavage and ligation (in opposite directions).

aus: Hieronymus, Müller, *Ann. NY Acad. Sci.* **2019**, 1447, 135

B. RNA – B.2. Ribozyme

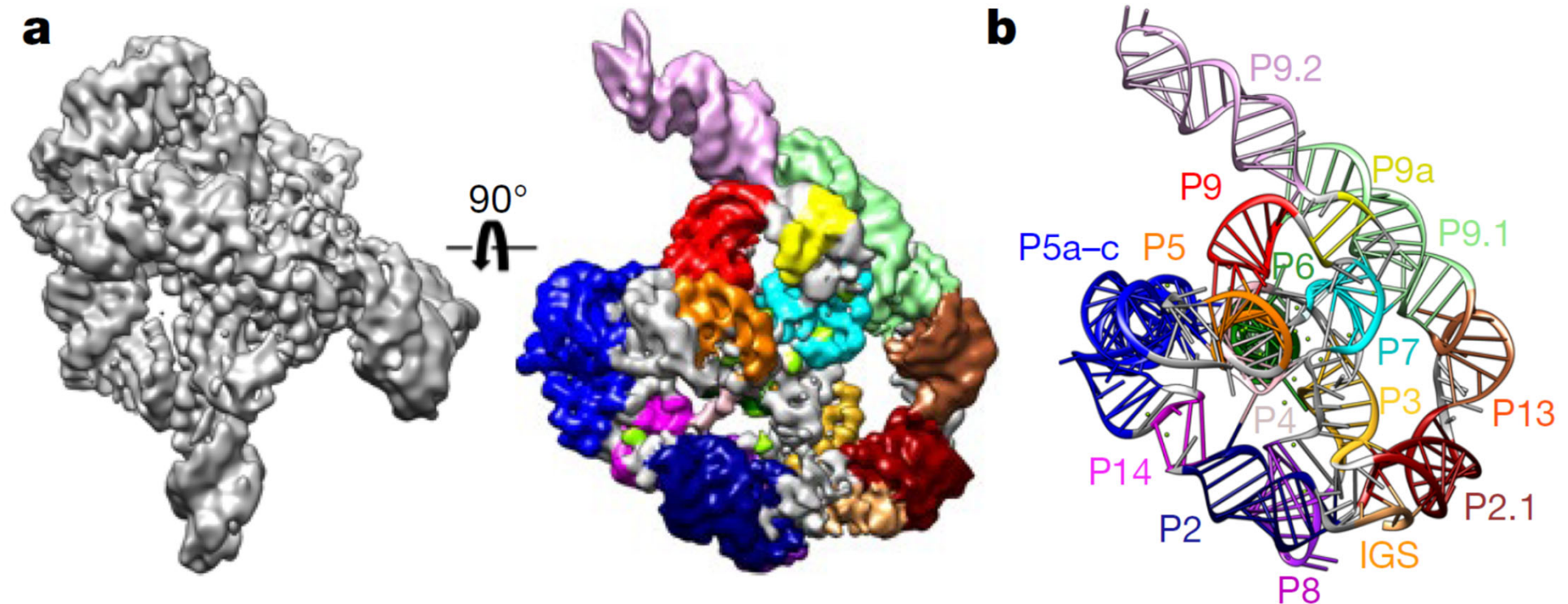
"Cryo-EM structures of full-length *Tetrahymena* ribozyme at 3.1 Å resolution"



aus: Su et al., *Nature* 2021, 596, 603

B. RNA – B.2. Ribozyme

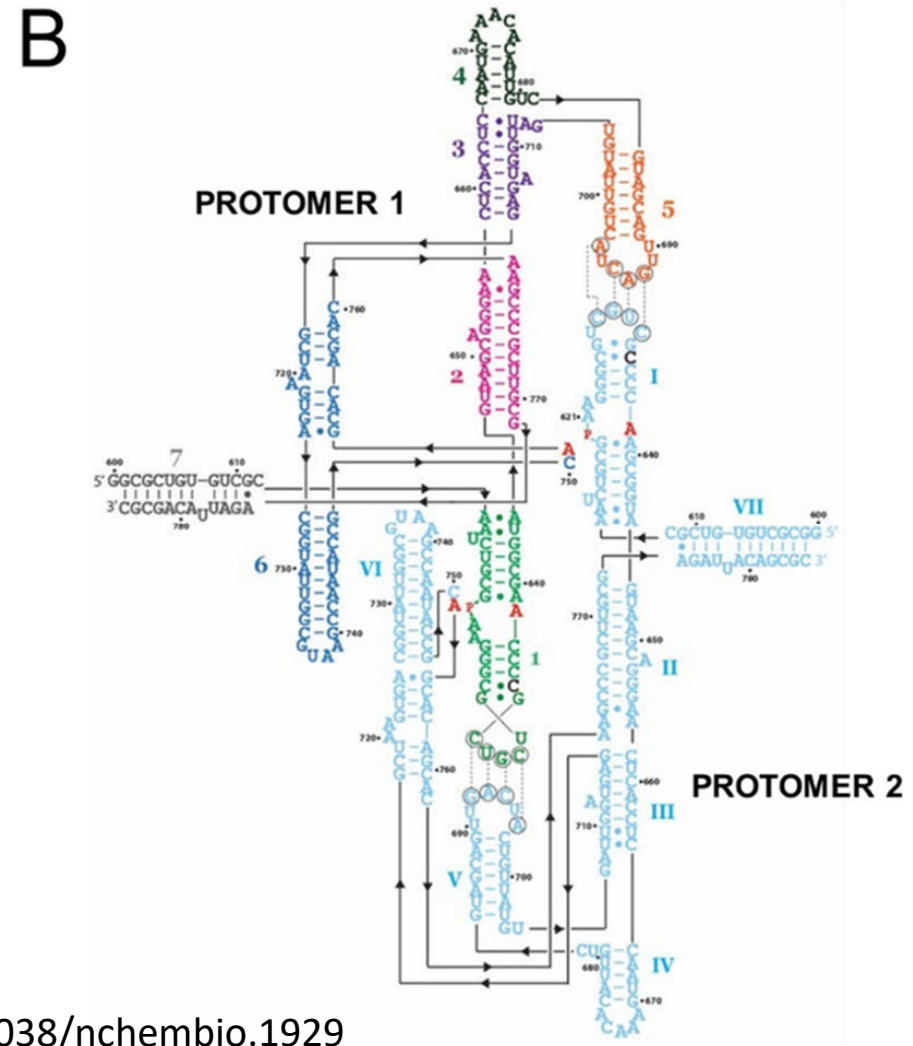
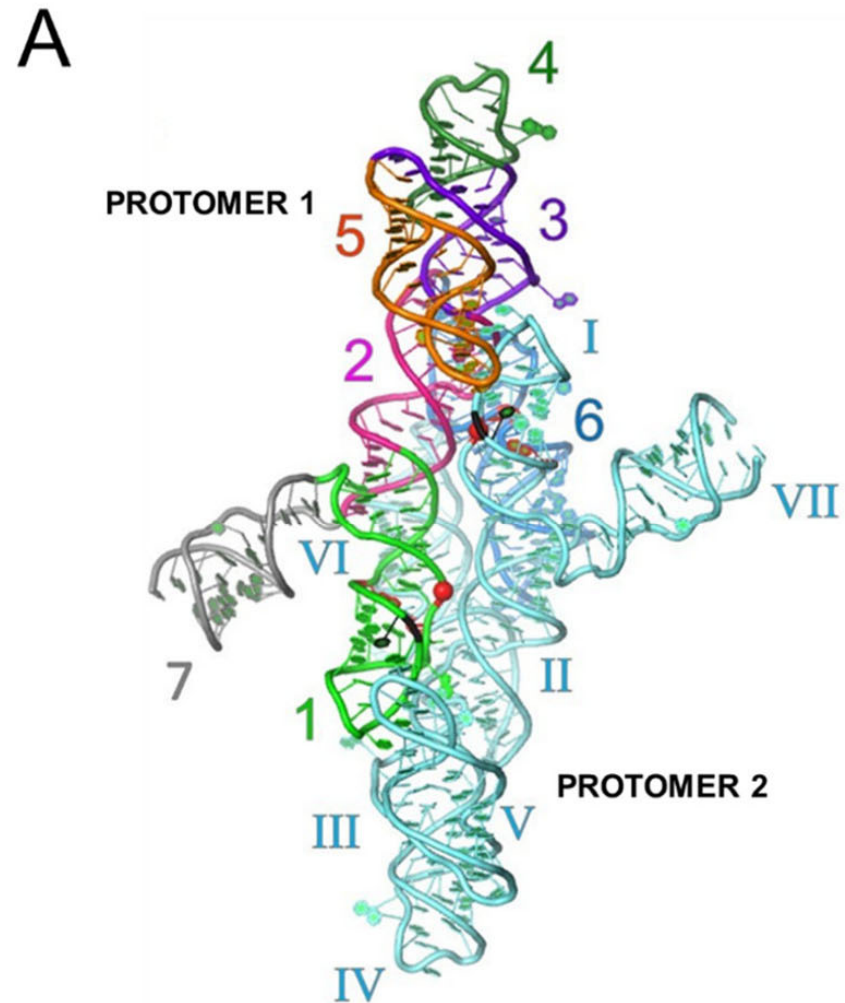
"The *Tetrahymena thermophila* group I self-splicing intron was the first ribozyme to be discovered [...]. Here we report [cryo-EM structures](#) of the full-length Tetrahymena ribozyme in substrate-free and bound states at a resolution of 3.1 Å. [...] The term 'ribozyme' was coined. This ribozyme catalyses two successive transesterification reactions to cleave the 5' splice site and then ligate the 5' and 3' exons. "



from: Su et al., *Nature* **2021**, 596, 603

B. RNA – B.2. Ribozyme

RNA strukturell vielfältiger als DNA: selbstspaltendes Varkud Satellite Ribozyme (das größte) aus *Neurospora*



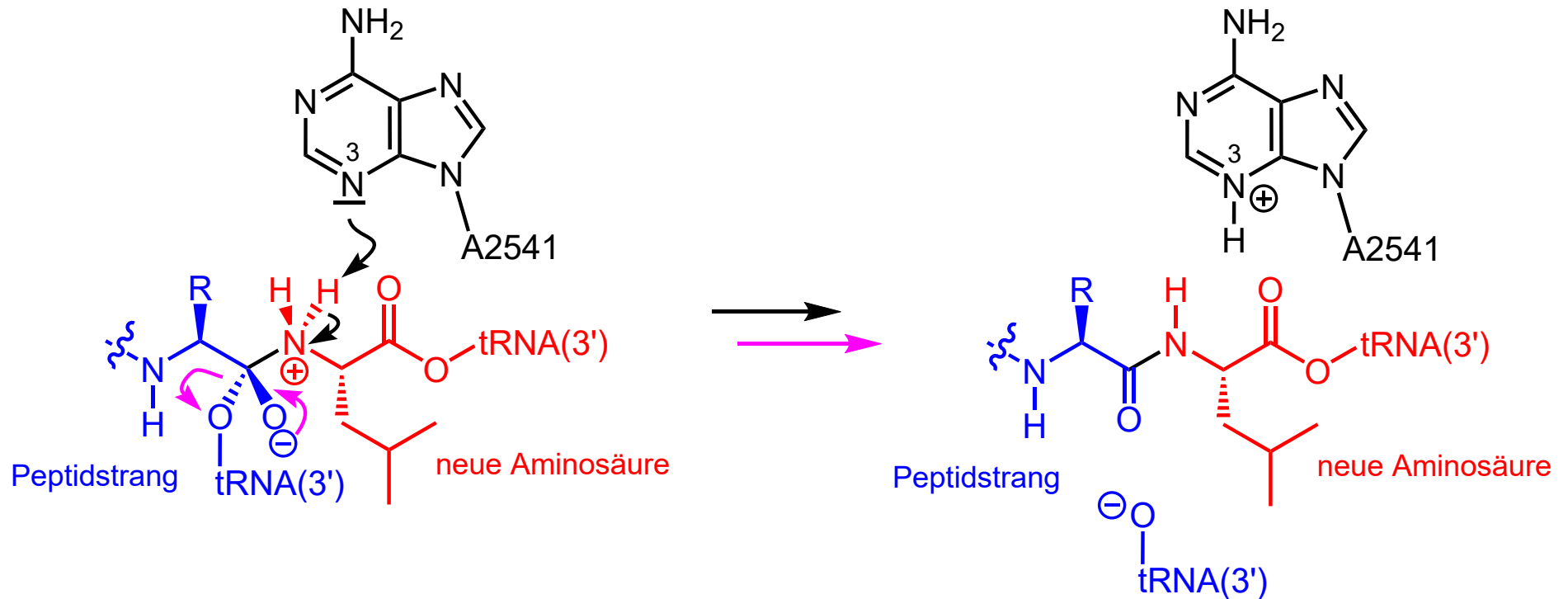
X-ray 2015: doi: 10.1038/nchembio.1929

B. RNA – B.2. Ribozyme

Am Ribosom

N3 eines einzigen katalytischen Adenins im Inneren des bakteriellen Ribosoms ($pK_a^+ 7.6$) deprotoniert das bei der Amid-Bildung intermediäre, tetraedrische Amidacetal.

Danach Austritt von tRNA(3')-OH.

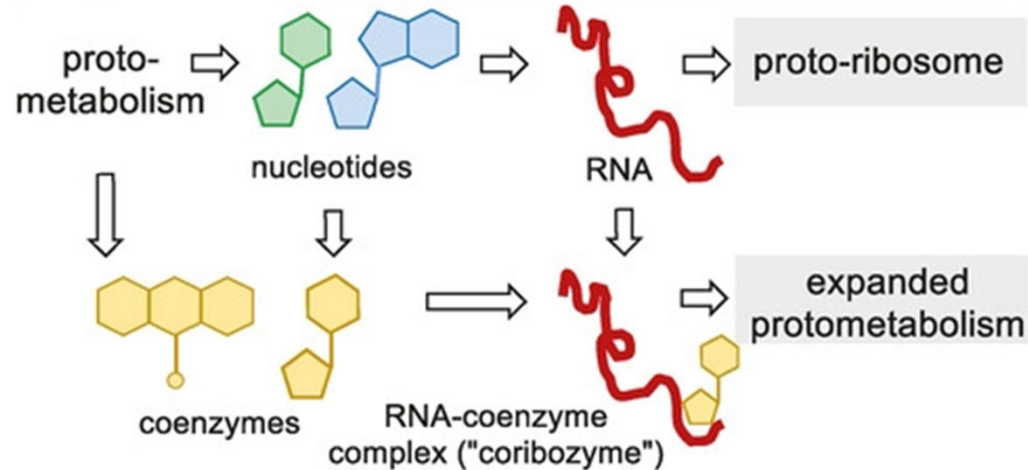


aus: Van Vranken/Weiss

B. RNA – B.2. Ribozyme

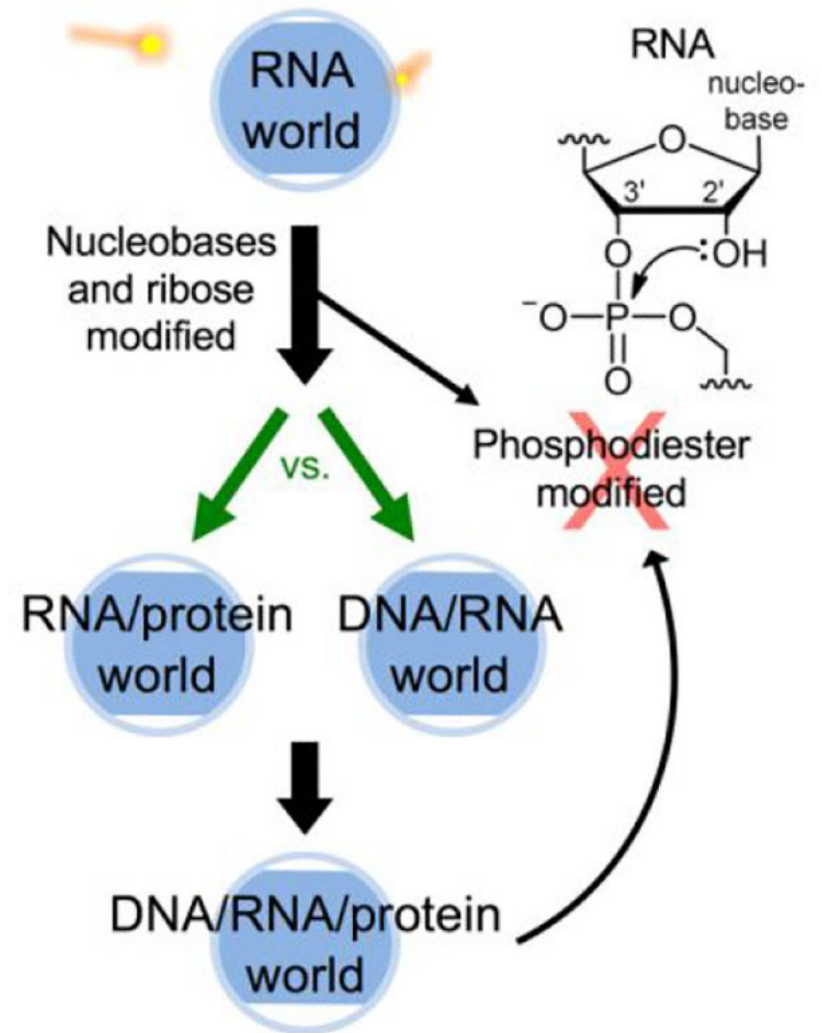
Basierend auf der Existenz katalytischer RNA (Ribozyme) und der leichten Bildung von RNA aus präbiotischen Bausteinen vermutet man, dass es zunächst eine RNA-Welt gab, vielleicht sogar mit Coenzymen.

The prebiotic role of coenzymes: A hypothesis



from: Kirschning, *ACIE* **2021**, 6242

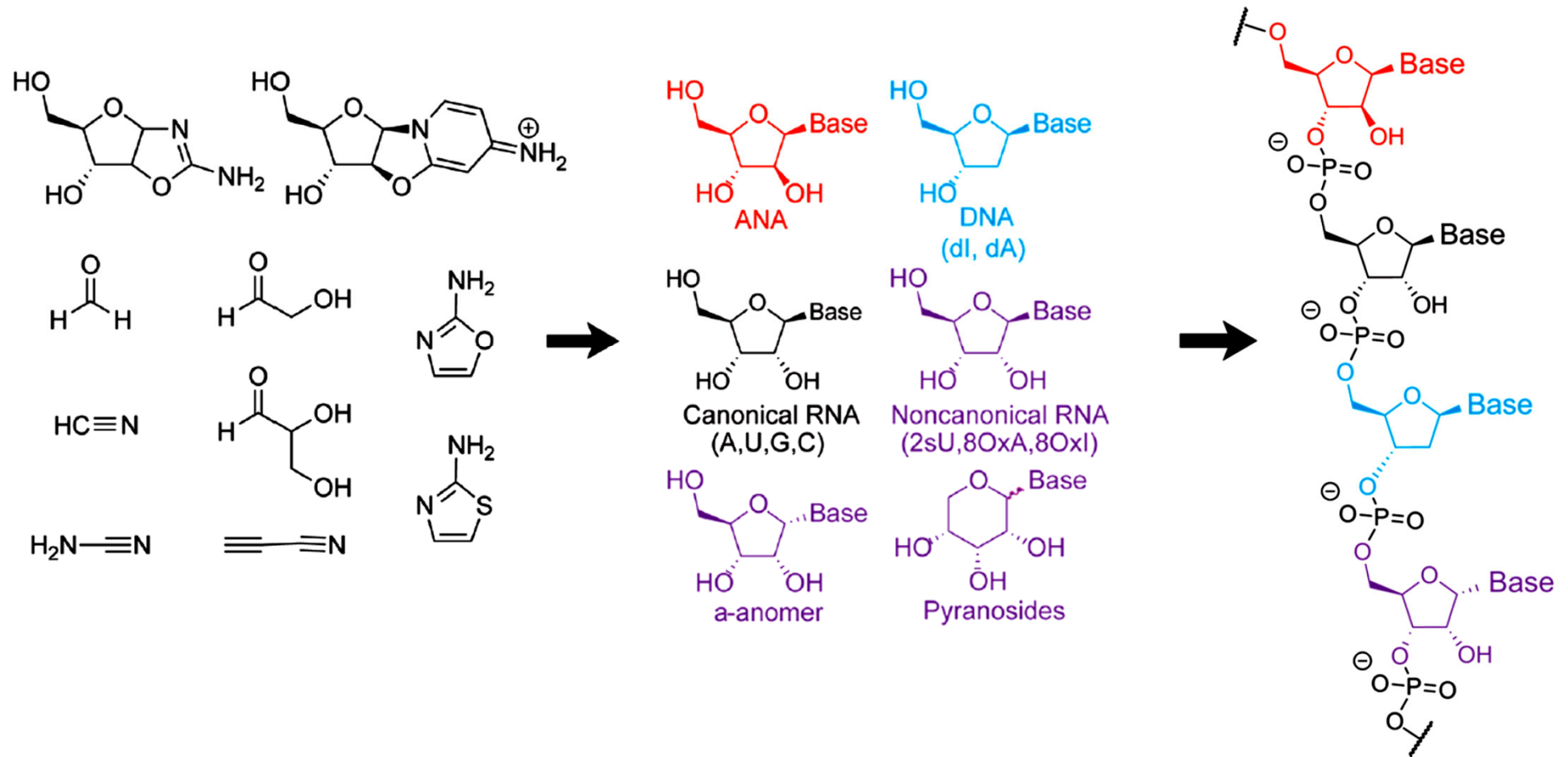
Lindel, *Bioorganische Chemie*



from: Forster, *Biochemistry* **2022**, 61, 749–751

B. RNA – B.2. Ribozyme

Präbiotische Chemie: RNA kann ausgehend von präbiotischen Bausteinen entstehen.

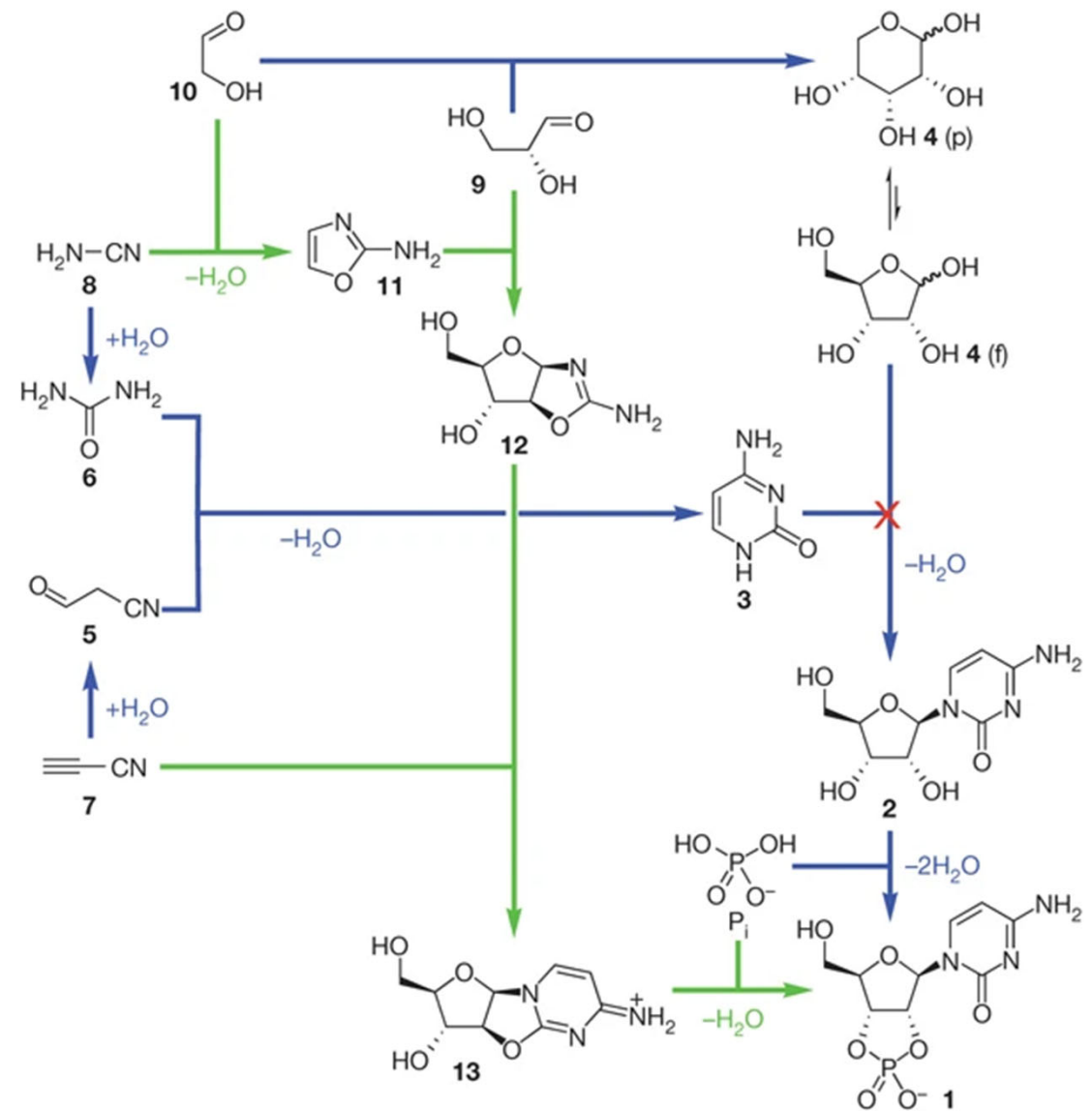


from: Szostak et al., *JACS* **2021**, 3267

B. RNA – B.2. Ribozyme

RNA kann ausgehend von präbiotischen Bausteinen entstehen.

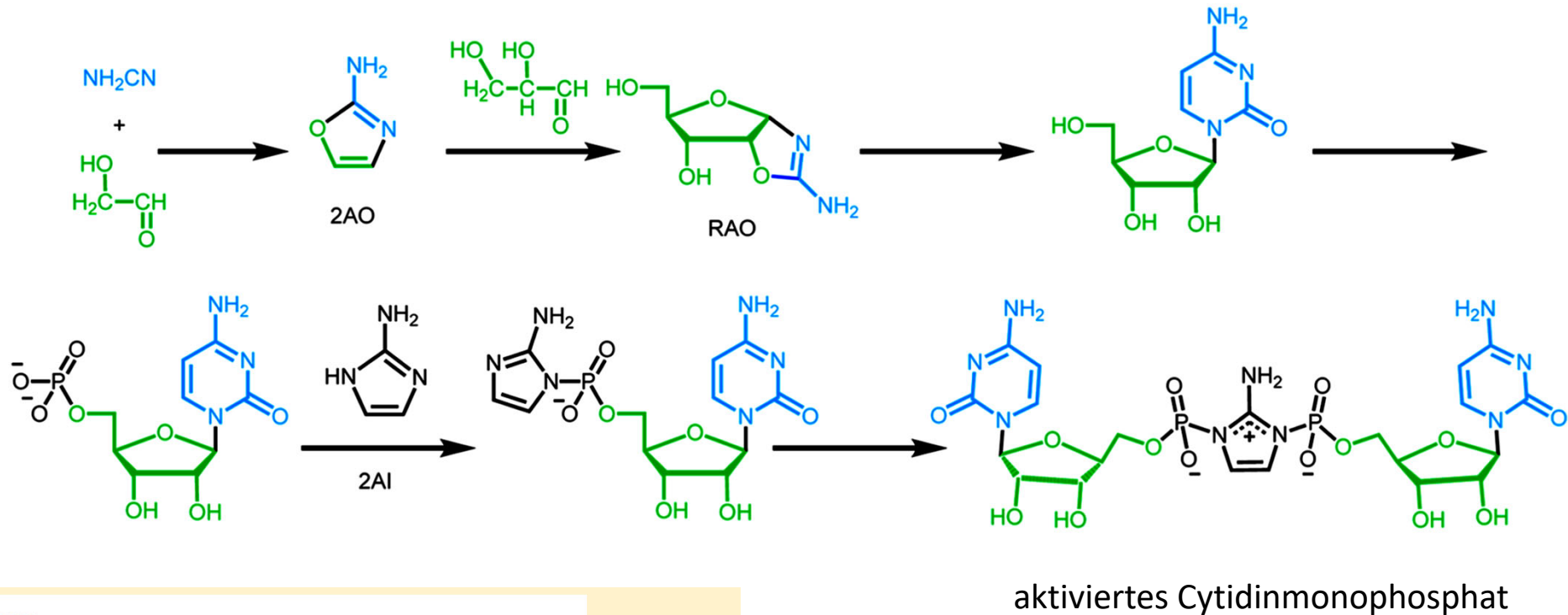
Optionen der Synthese von Pyrimidin-Ribonukleotiden



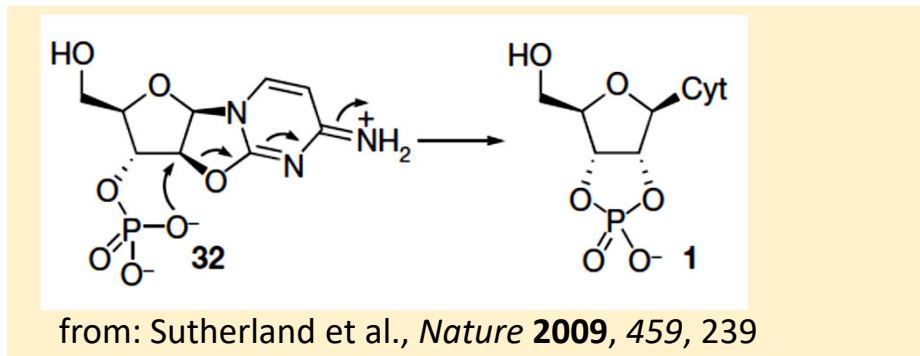
from: Sutherland et al., *Nature* **2009**, 459, 239

B. RNA – B.2. Ribozyme

RNA kann ausgehend von präbiotischen Bausteinen entstehen.



aktiviertes Cytidinmonophosphat

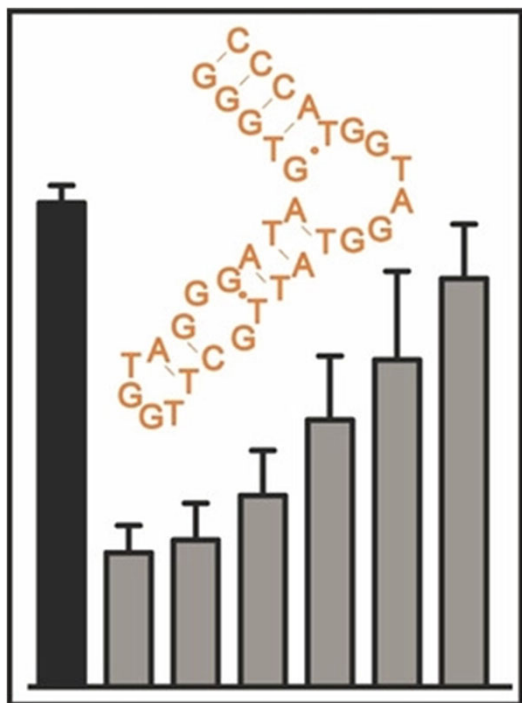


from: Sutherland et al., *Nature* **2009**, 459, 239

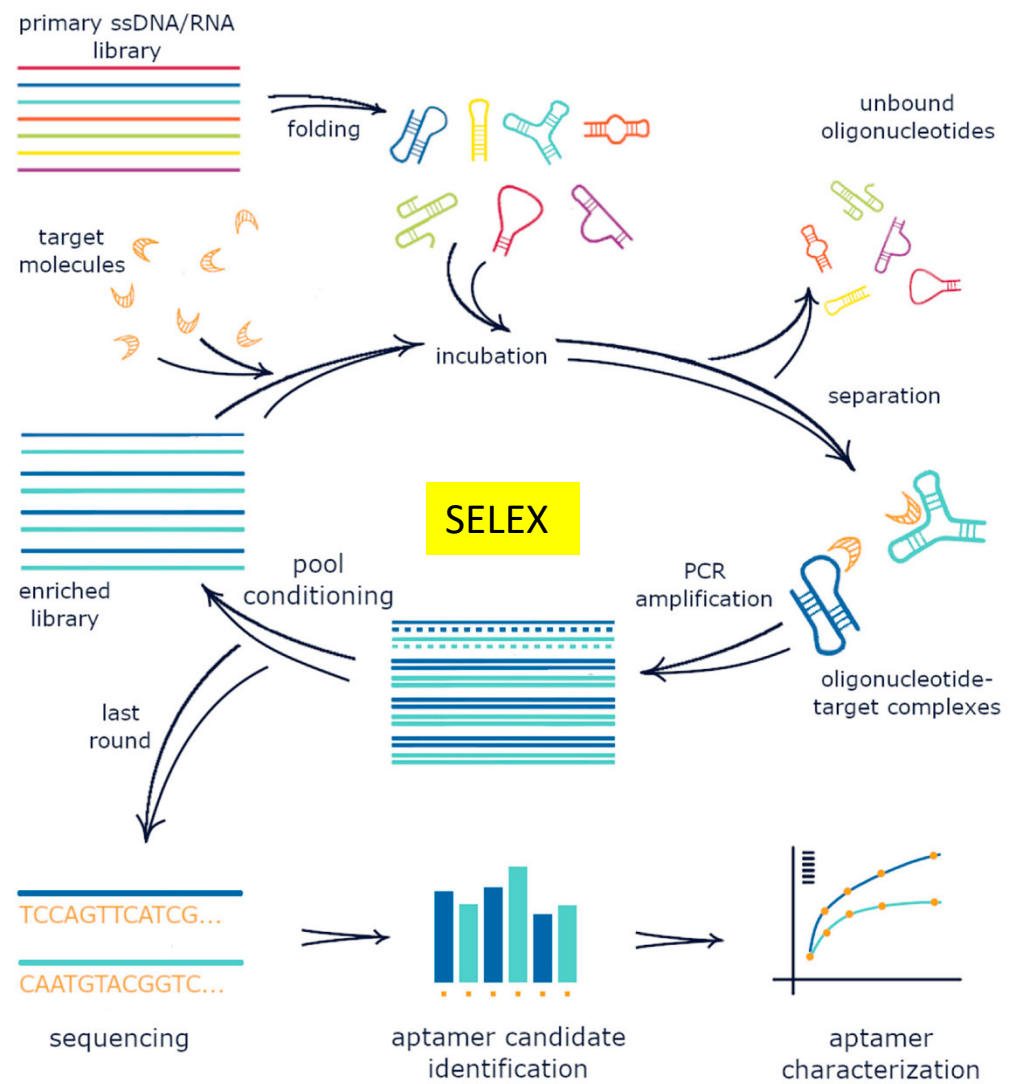
from: Szostak et al., *JACS* **2021**, 3267

B. RNA – B.3. Aptamere

Aptamer (lat. *aptus* passend): kurze (<70 Basen), einzelsträngige RNA (meist), die zur Bindung an ein relevantes Target "gezüchtet" wurde (in vitro-Selektion, SELEX).



Ein Aptamer bindend an das Sars-CoV-2-Spike-Protein (Famulok, Mayer, et al., *ACIE* **2021**, 10279)



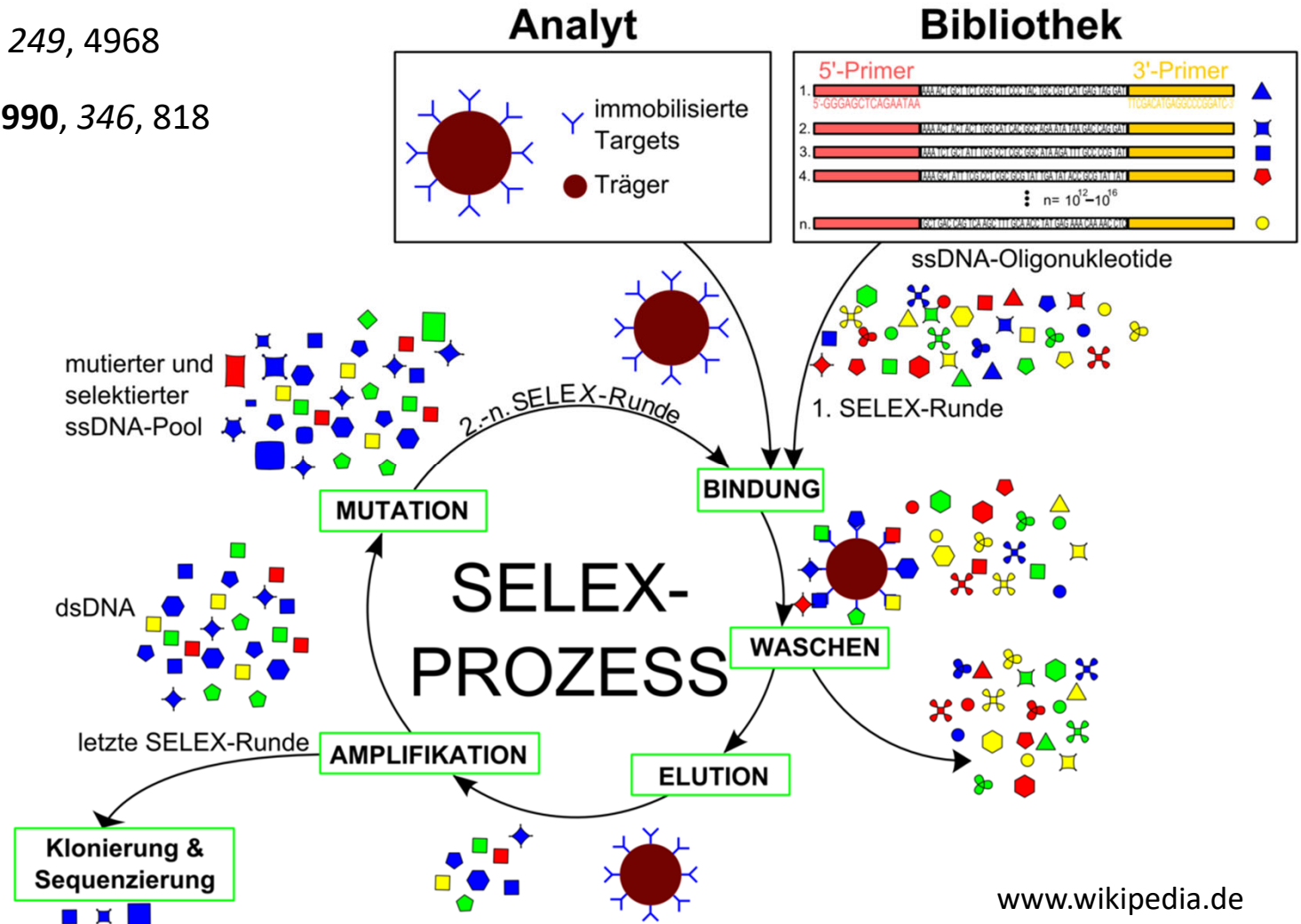
from: Komarova, *Molecules* **2019**, 3598

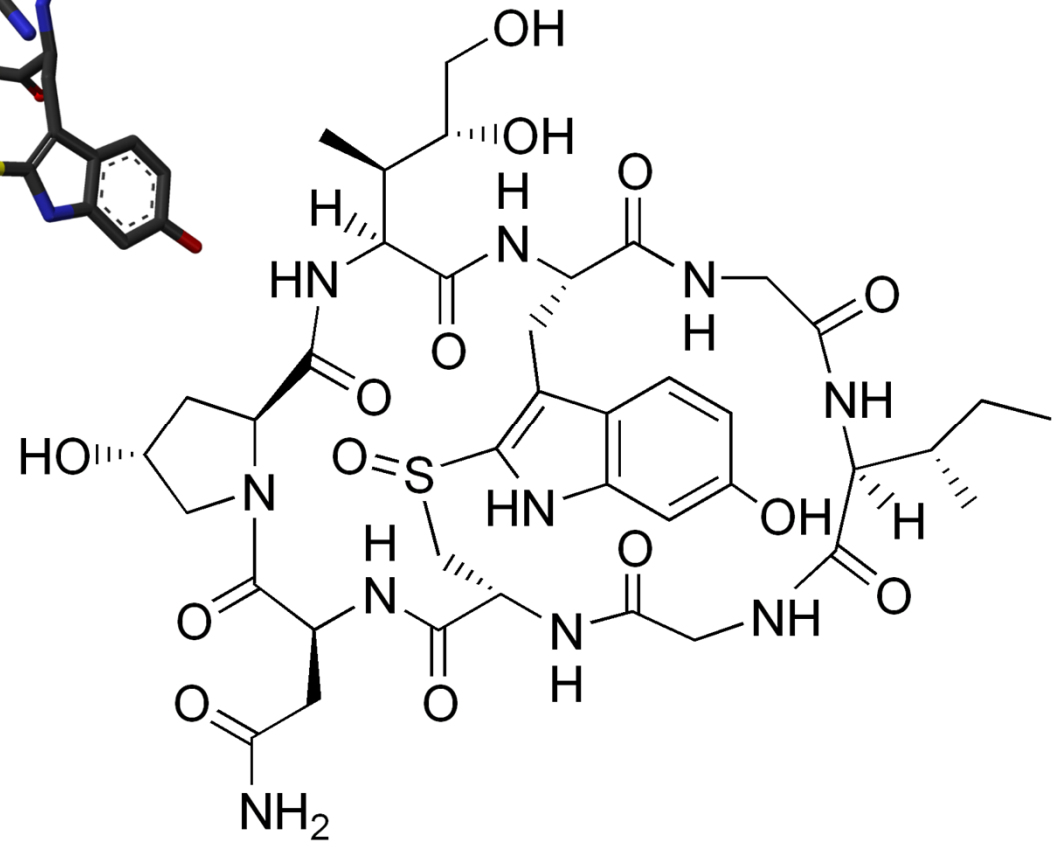
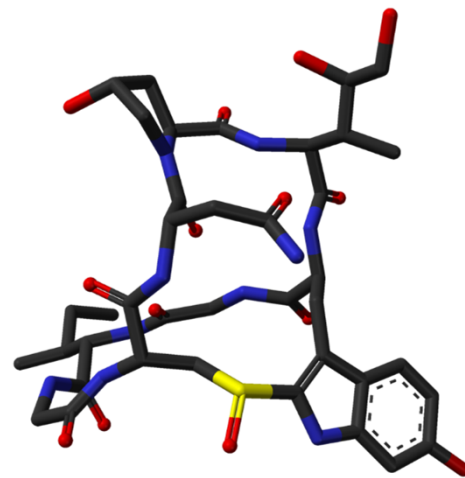
B. RNA – B.3. Aptamere

SELEX: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment

Tuerck, Gold, *Science* **1990**, *249*, 4968

Ellington, Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818



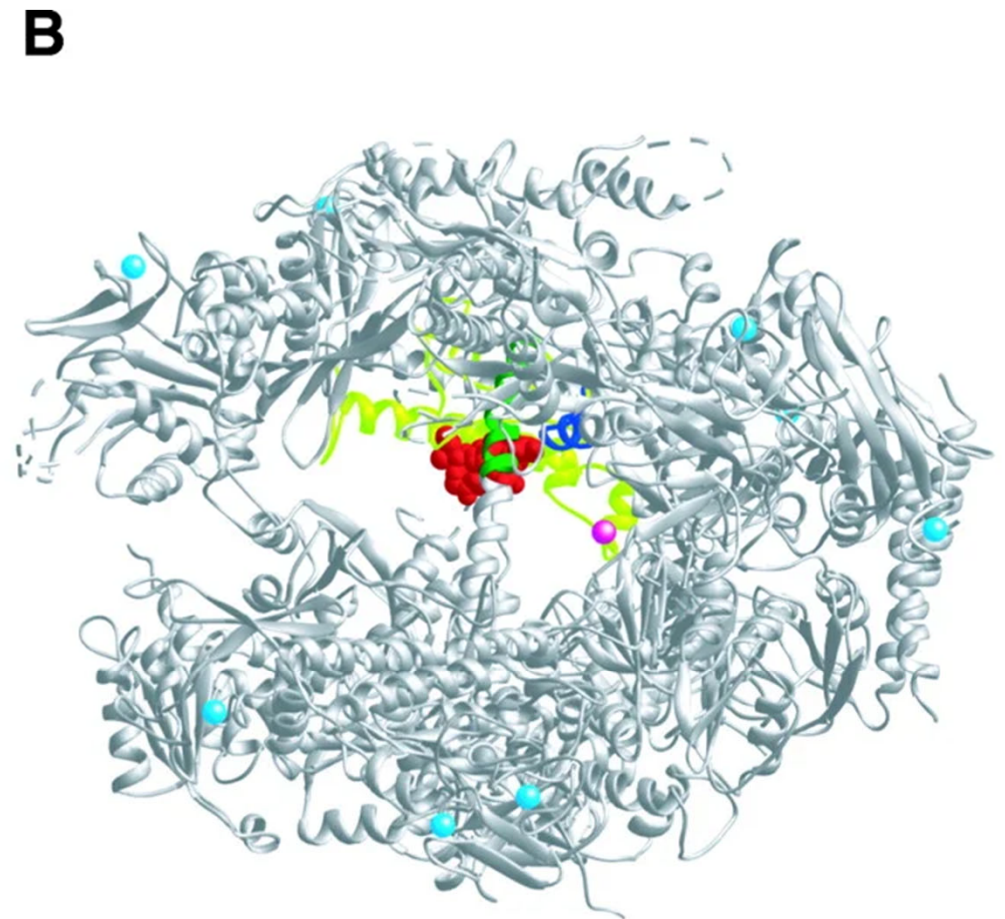
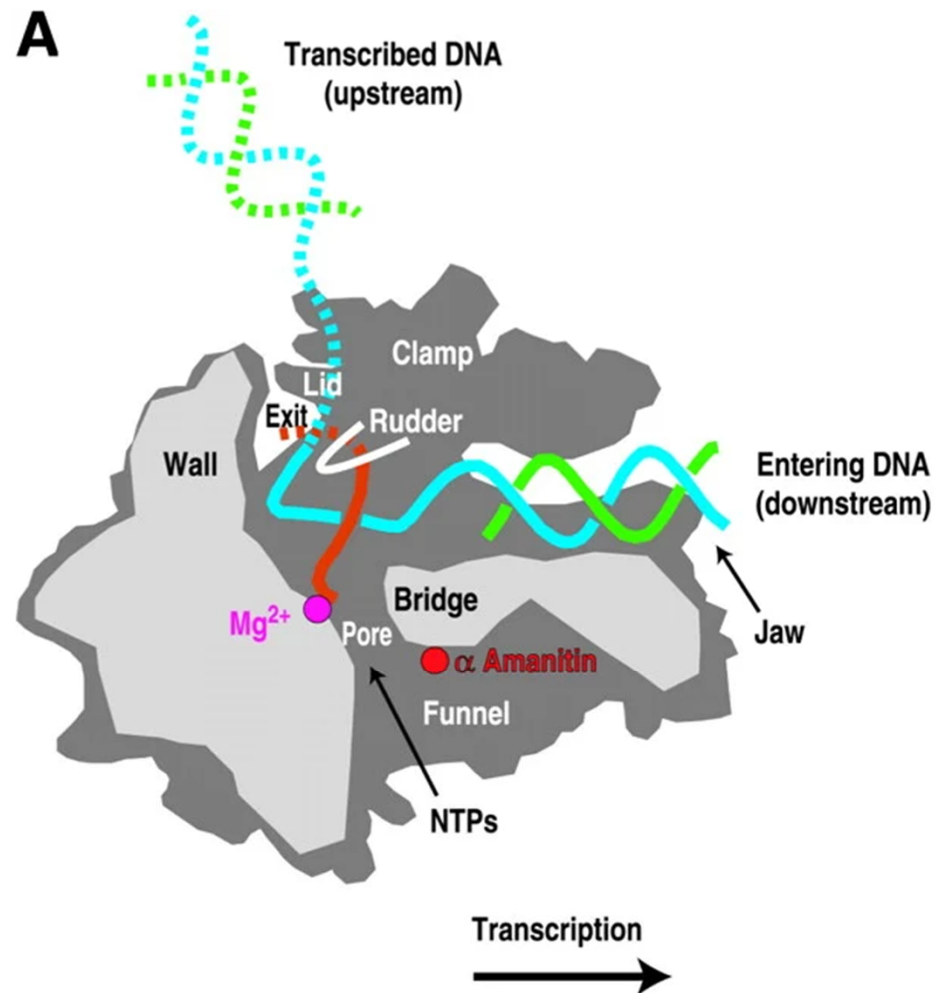


α -Amanitin aus dem Knollenblätterpilz
(*Amanita phalloides*)

Ungewöhnliche Tryptathionin-Brücke

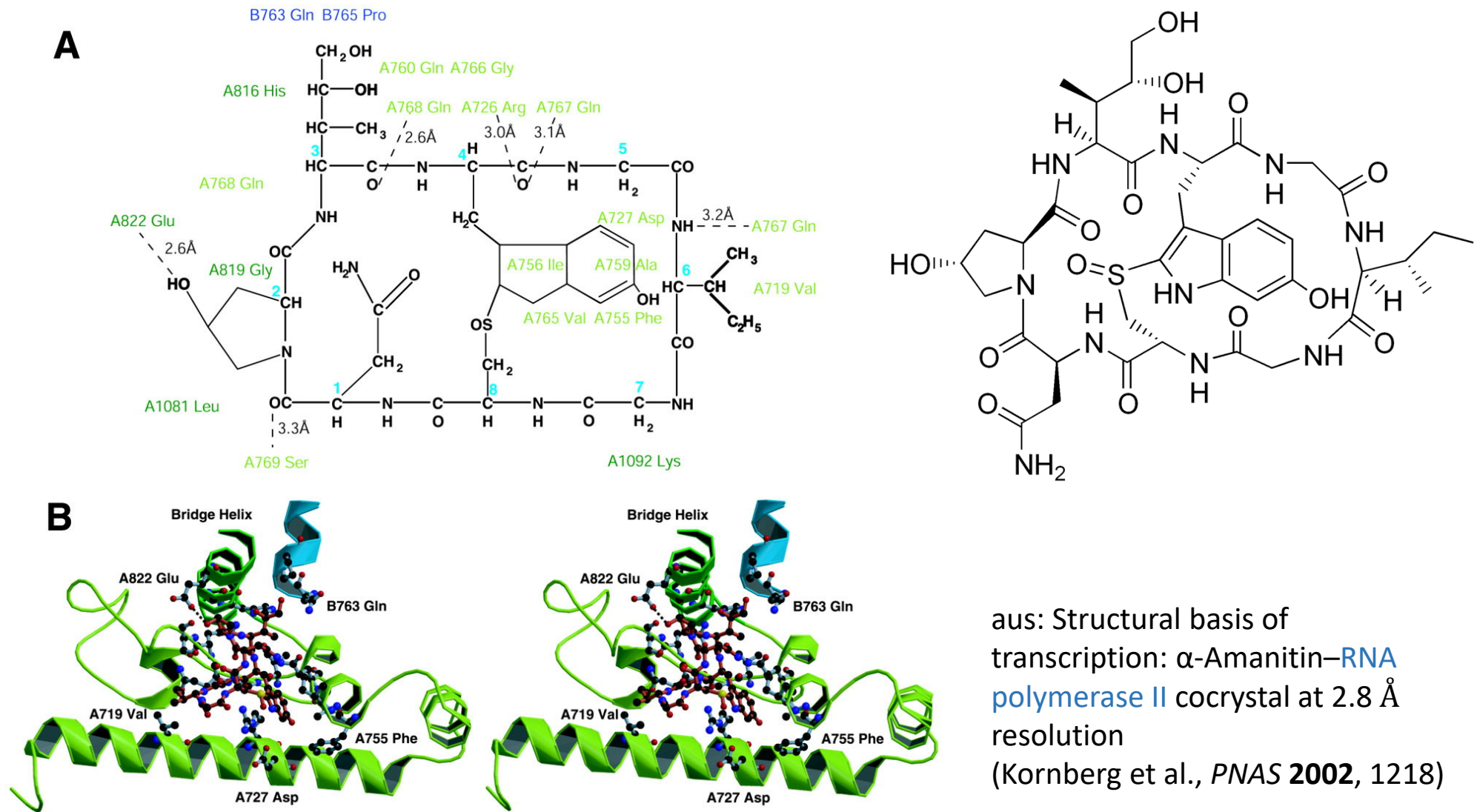
Inhibition der RNA-Polymerase II

Toxizität 0.3 mg/kg Maus! Leberschädigung



aus: Structural basis of transcription: α -Amanitin–RNA polymerase II cocystal at 2.8 Å resolution (Kornberg et al., *PNAS* **2002**, 1218)

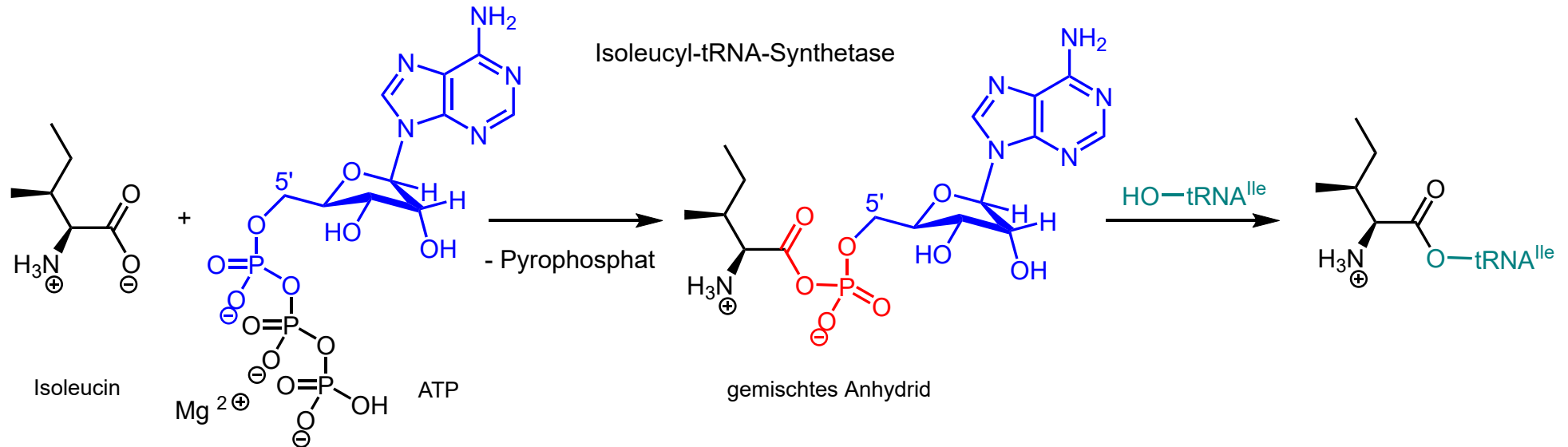
B. RNA – B.4. RNA und Naturstoffe



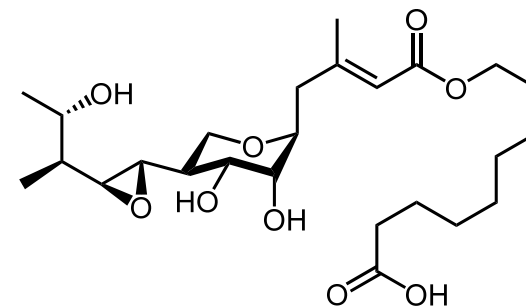
B. RNA – B.4. RNA und Naturstoffe

tRNA-Synthetasen:

Aktivierung einer Aminosäure zur Übertragung auf die 2'/3'-Position (Ggew.) des terminalen Nukleotids als **gemischtes Anhydrid**:

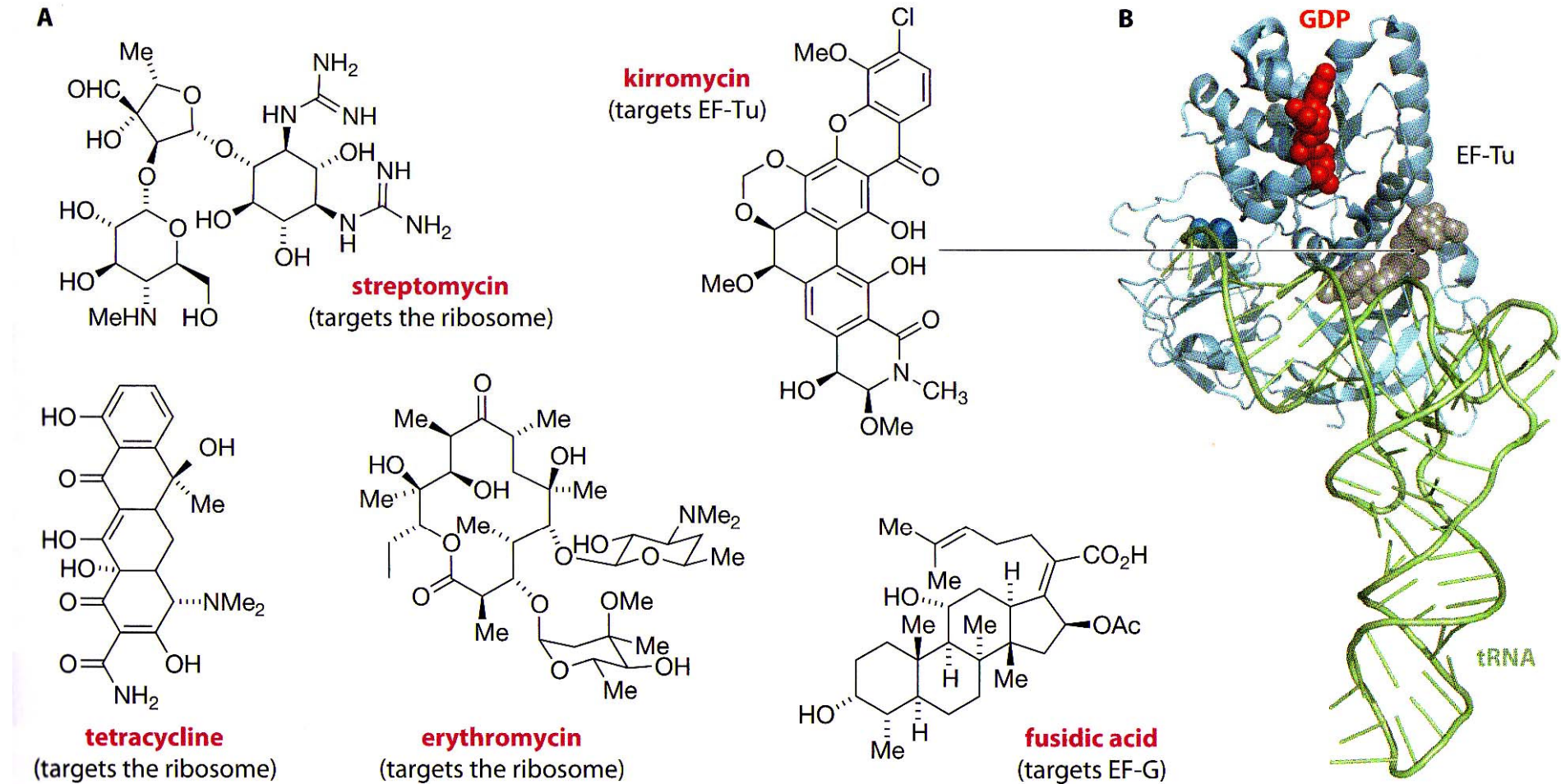


Naturstoff Pseudomoninsäure A aus *P. fluorescens*:
Hemmung der Isoleucyl-tRNA-Synthetase, also der
bakteriellen Proteinbiosynthese



B. RNA – B.4. RNA und Naturstoffe

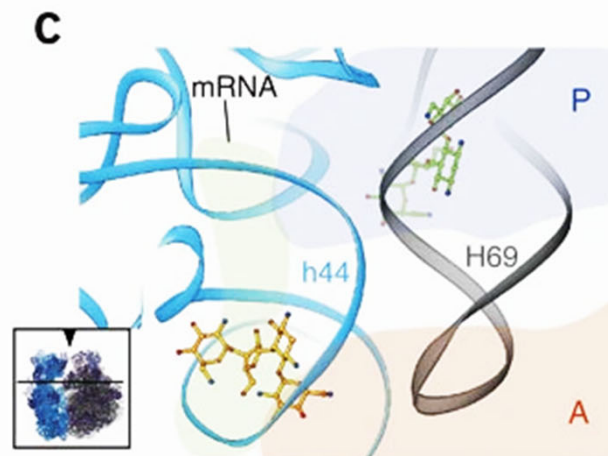
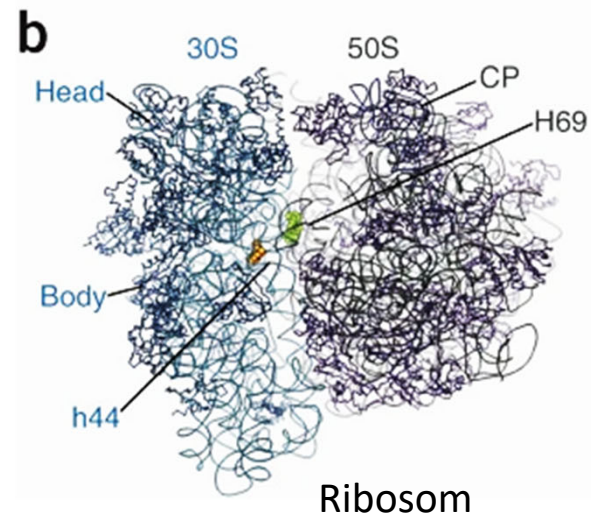
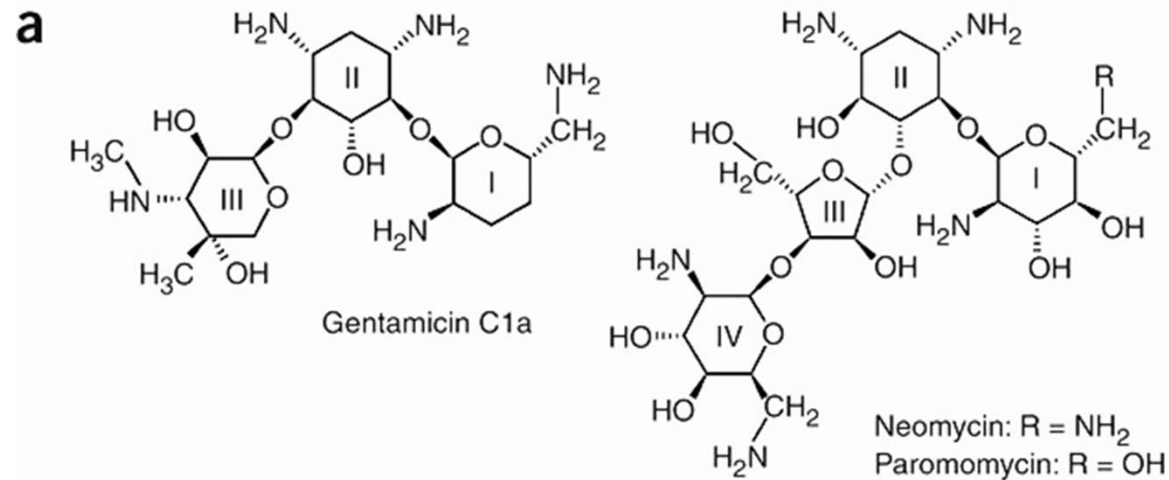
Antibiotische Inhibitoren der Protein-Biosynthese



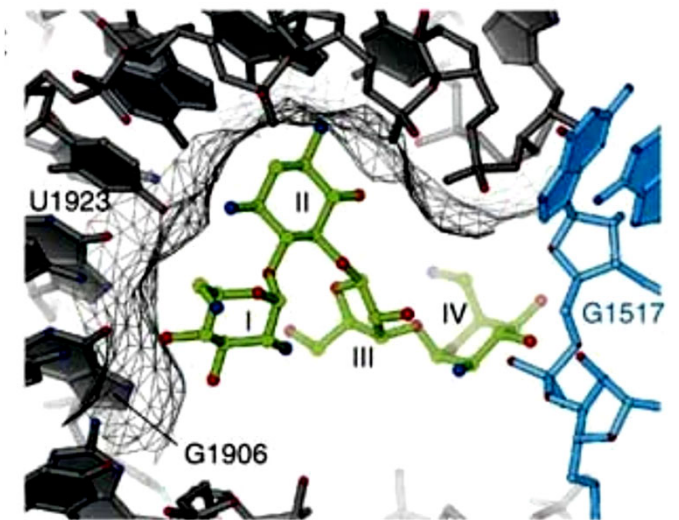
aus: Van Vranken/Weiss

B. RNA – B.4. RNA und Naturstoffe

Aminoglykosid-Antibiotika



Aminoglykoside binden an H(elix) 69 und stellen die Kontakte zwischen ribosomalen Untereinheiten, die durch den Ribosom-Recycling-Faktor (RRF) gestört sind, vollständig wieder her.



aus: Doudna Cate et al.,
Nat. Struct. Mol. Biol. **2007**, *14*, 727

B. RNA – B.5. Synthese

Wachsendes Interesse an RNA-Synthese für die siRNA-Technologie, Ribozyme und Aptamere

Selektives Gen-Silencing durch RNA-Interferenz (RNAi) verwendet eine doppelsträngige siRNA (gebildet aus einem einzelsträngigen (ss) Guide und Passagier-RNAs), die in das Cytosol transportiert werden muss. siRNA wird durch Endonukleasen des RNA-induzierten Silencing-Komplexes (RISC) identifiziert und prozessiert.

Die zelluläre Aufnahme von siRNA bleibt eine Herausforderung. Doppelsträngige RNAs müssen chemisch modifiziert werden, um die Serumstabilität zu verbessern, die Immunogenität zu minimieren und die Wirksamkeit zu erhöhen.



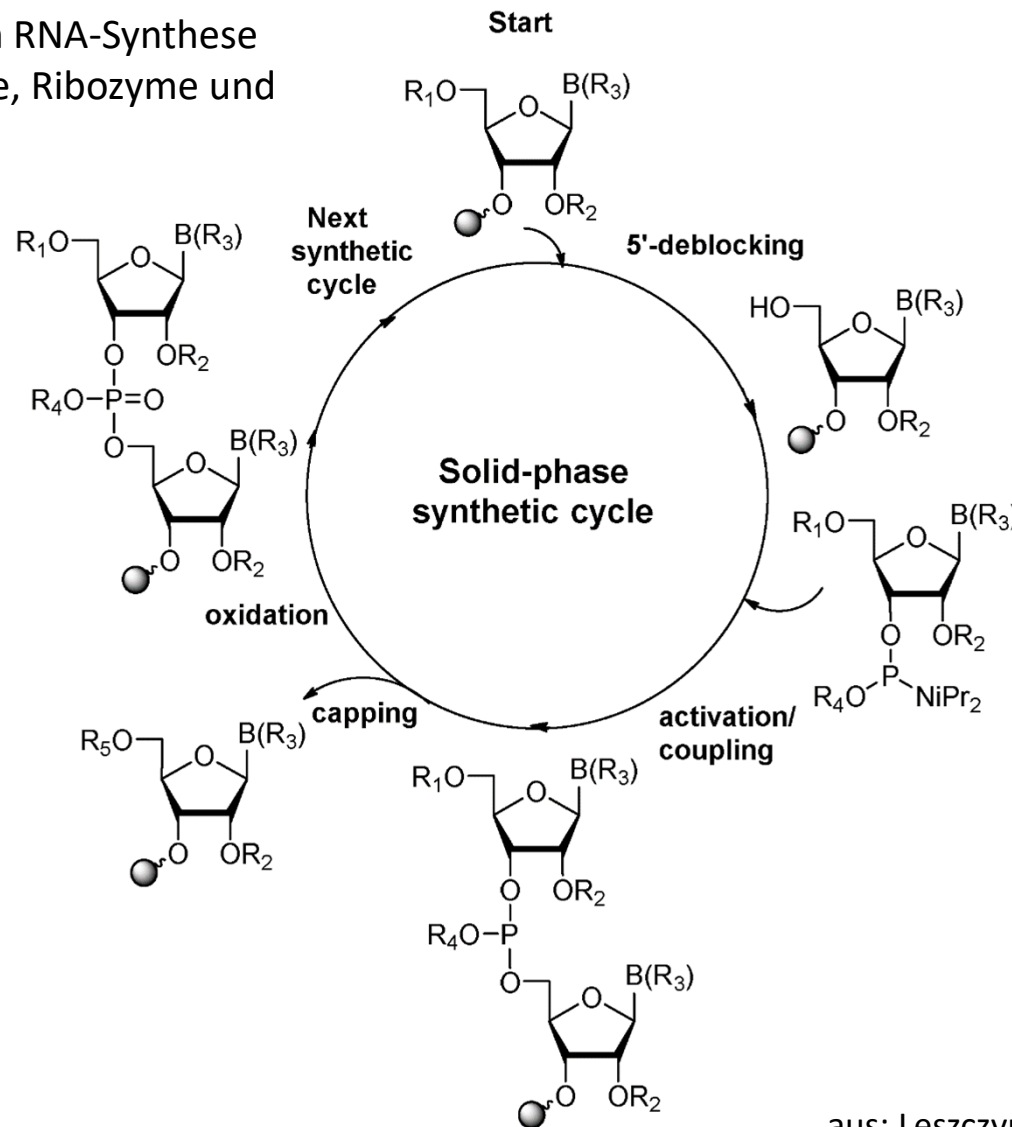
Onpattro (Patisiran, Alnylam Pharmaceuticals) zur Behandlung der Polyneuropathie der hereditären Transthyretin-vermittelten (hATTR) Amyloidose bei Erwachsenen. Es ist das erste RNA-Interferenz (RNAi)-Therapeutikum, das jemals zugelassen wurde (2018, www.biospace.com).

Andrew Fire, Craig Mello, Medizin-Nobelpreis 2006

B. RNA – B.5. Synthese

Wachsendes Interesse an RNA-Synthese für die siRNA-Technologie, Ribozyme und Aptamere

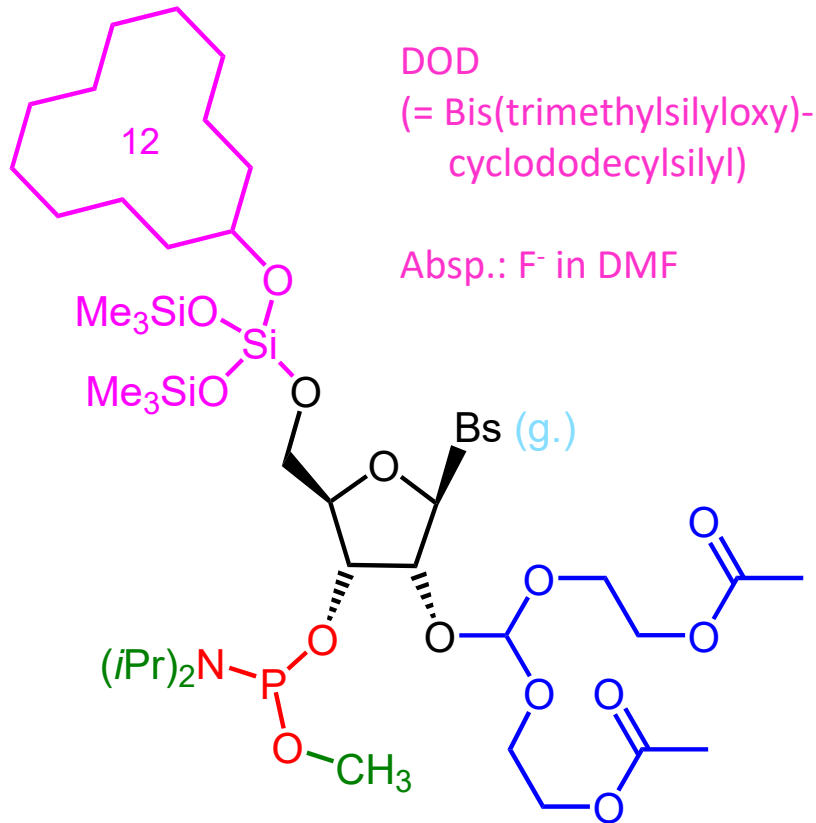
... you know that from DNA synthesis.



aus: Leszczynska et al., *Molecules* **2020**, 3344

B. RNA – B.5. Synthese

Phosphoramidit-Verfahren (RNA)



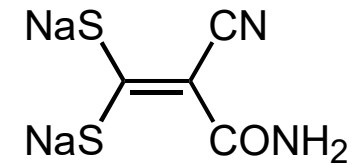
Übers.: S. A. Scaringe,
Methods **2001**, 23, 206-217.

Vergl. m. DNA-S.:

- keine DMT-Sg., da säurelabile ACE-Sg.
- Polystyrol- statt Kieselgel-Festphase (F⁻ !)

modif. Synthesecyclus:

- 5-(Ethylthio)tetrazol statt Tetrazol
- TBHP statt I₂
- Demethylierung (OCH₃) mit



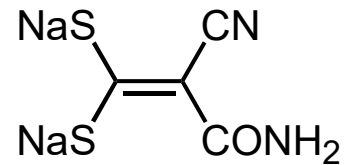
ACE

(= Bis(2-acetoxyethoxy)methyl)

Absp. n. d. Gesamtheit d. Cyclen:

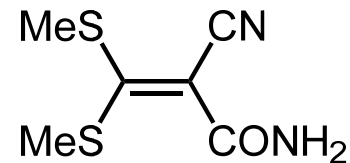
- 1) MeNH₂ (Deacylierung (generell));
- 2) pH 3.8 (Orthoester-Hydrolyse unter Beiteiligung einer der freigesetzten OH-Gruppen).

Dinatrium 2-carbamoyl-2-cyanoethylen-1,1-dithiolat (Dahl et al., *Act. Chem. Scand.* **1990**, 639)



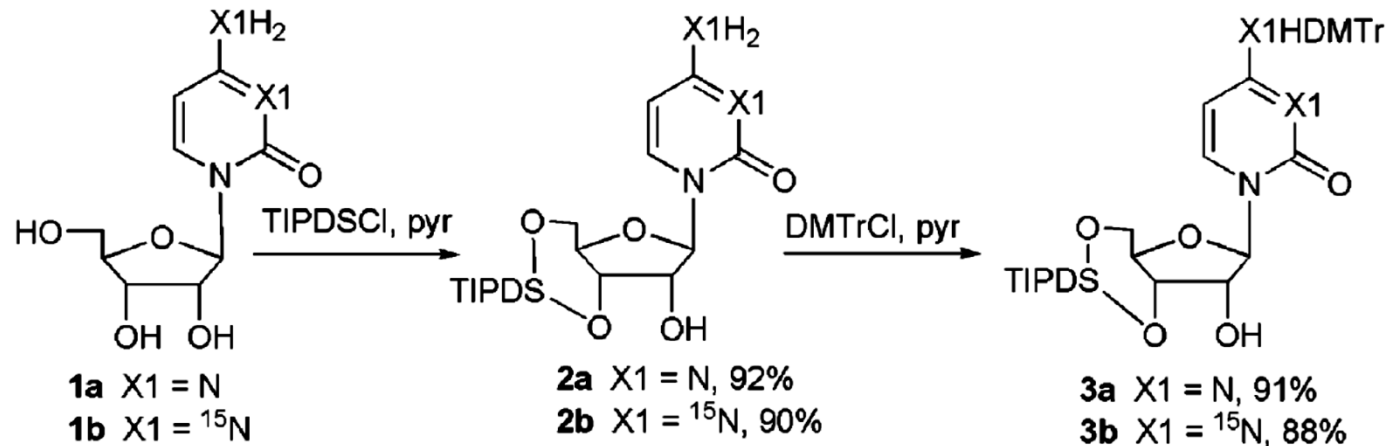
- kristallin (als Hydrat), stabil, geruchlos
- schwach basisch (pK_b 8.4)
- Synthese aus Cyanoacetamid, CS₂, wäßr. NaOH
- demethyliert Phosphorsäuretriester 10-mal schneller als PhSH/NEt₃

Demethylierung von Phosphit durch nukleophilen Angriff des Thiolat-Schwefels an der Methylgruppe zu

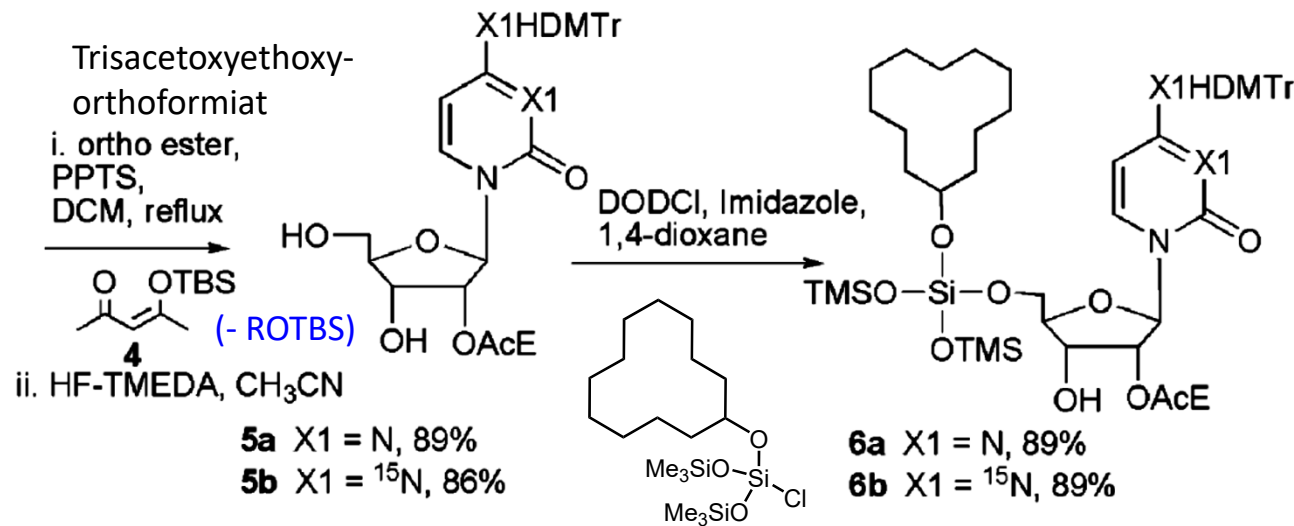


B. RNA – B.5. Synthese

Synthese von Cytidinyl-(3',5')-cytidin-Phosphoramidit und eines ^{15}N -Isotopomers, Teil 1



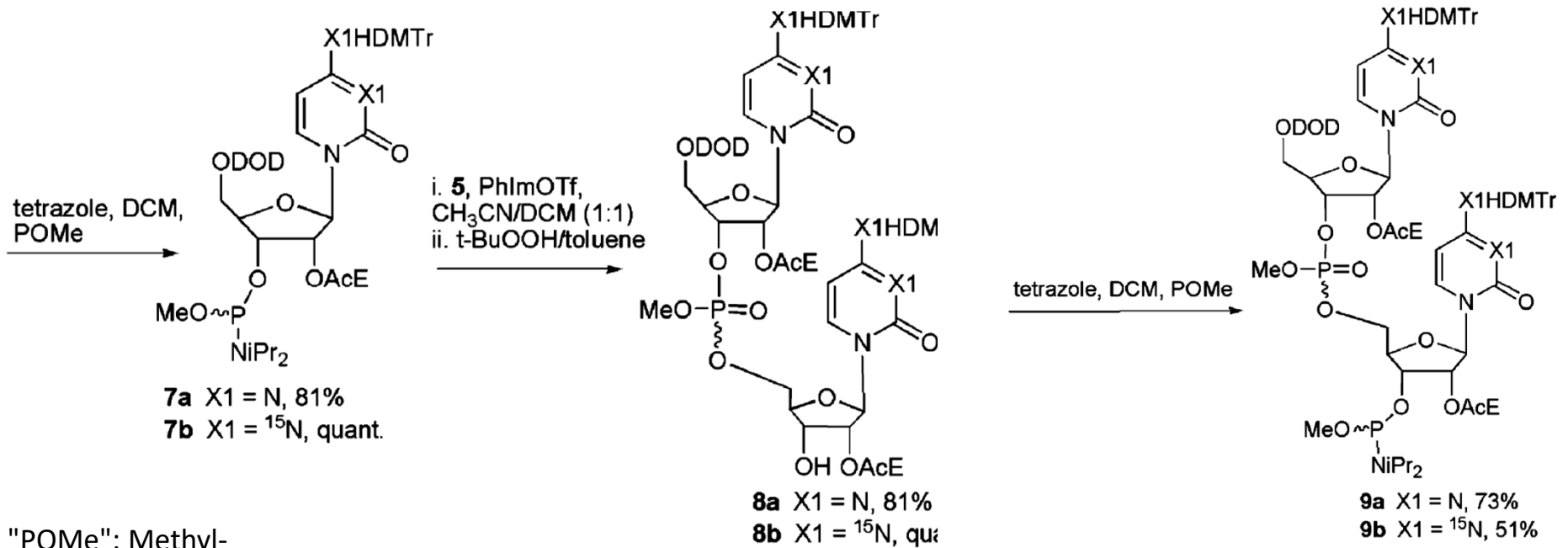
Isotopenmarkierte Nukleoside, Nukleotide und ihre Polymere (RNA und DNA) haben potenzielle Anwendungen bei der Erforschung von Proteinsynthese, DNA- und RNA-Synthese, mRNA-Modifikationen und -Verarbeitung nach der Transkription und Bildung kleiner RNAs.



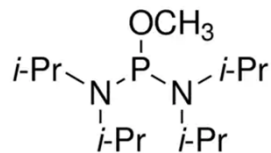
aus: Zhong, Strobel, *JOC* 2008, 603

B. RNA – B.5. Synthese

Synthese von Cytidinyl-(3',5')-cytidin-Phosphoramidit und eines ¹⁵N-Isotopomers, Teil 2



"POMe": Methyl-tetraisopropylphosphoramidit

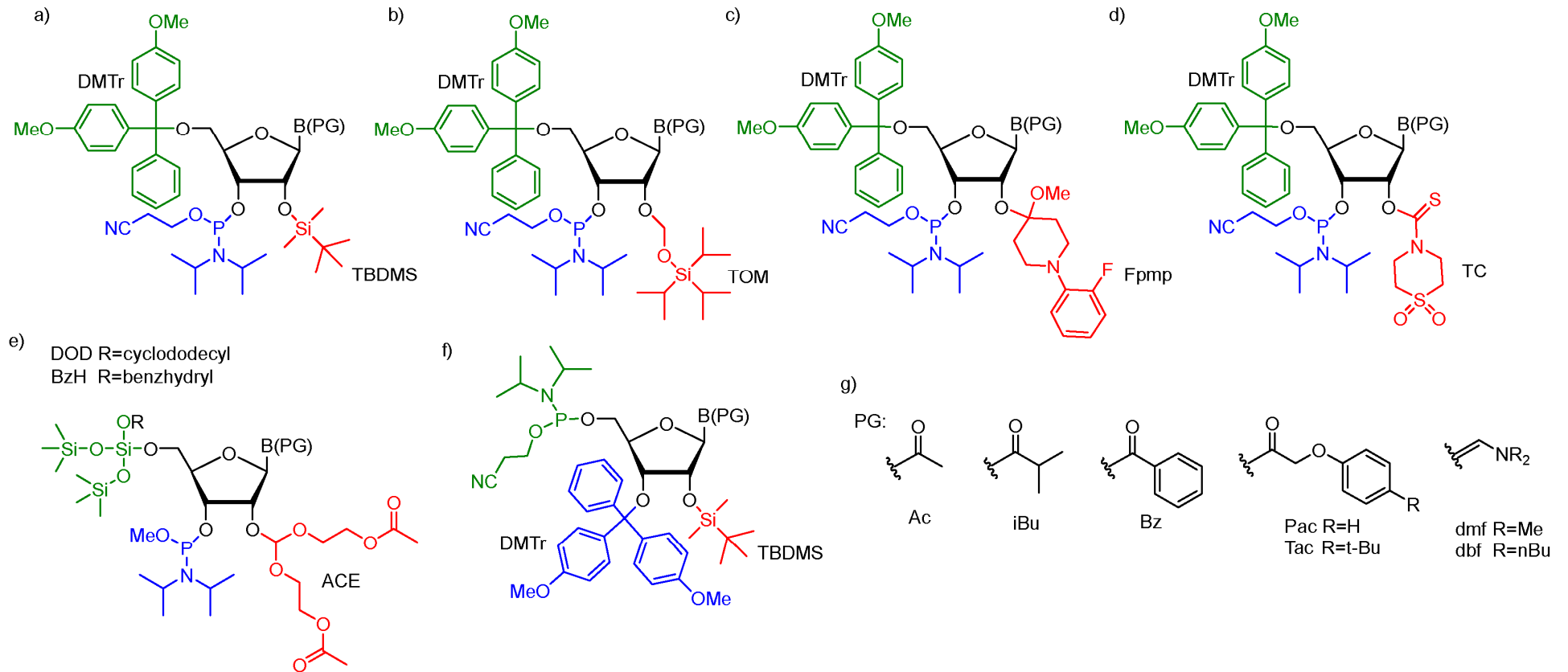


Promoter *N*-phenylimidazolium triflate
(PhImTf, *Nucl. Nucl. Nucl. Acids* **2001**, 20, 1047)

aus: Zhong, Strobel, *JOC* **2008**, 603

B. RNA – B.5. Synthese

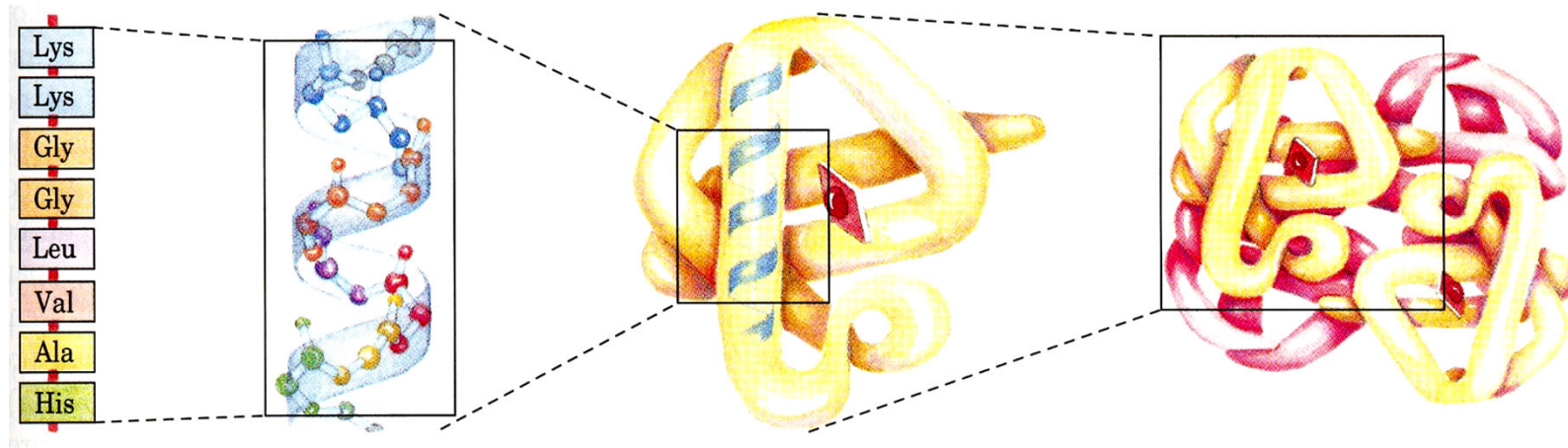
Die gebräuchlichsten Ribonukleosid-Phosphoramidit-Bausteine für die Festphasen-RNA-Synthese



aus: Leszczynska et al., *Molecules* **2020**, 3344

C. Peptide - C.1. Strukturelemente

Strukturebenen von Proteinen:



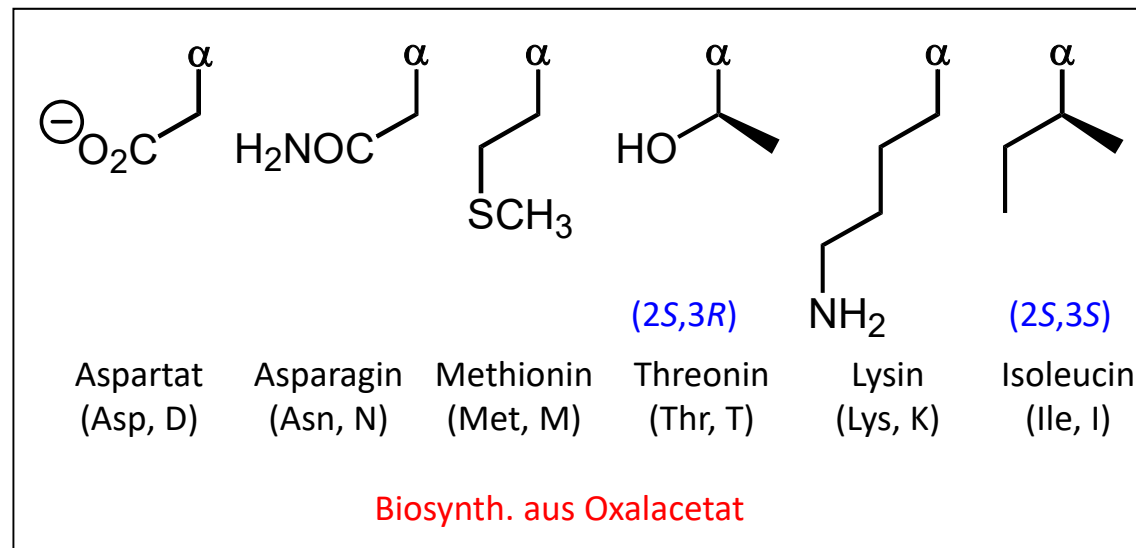
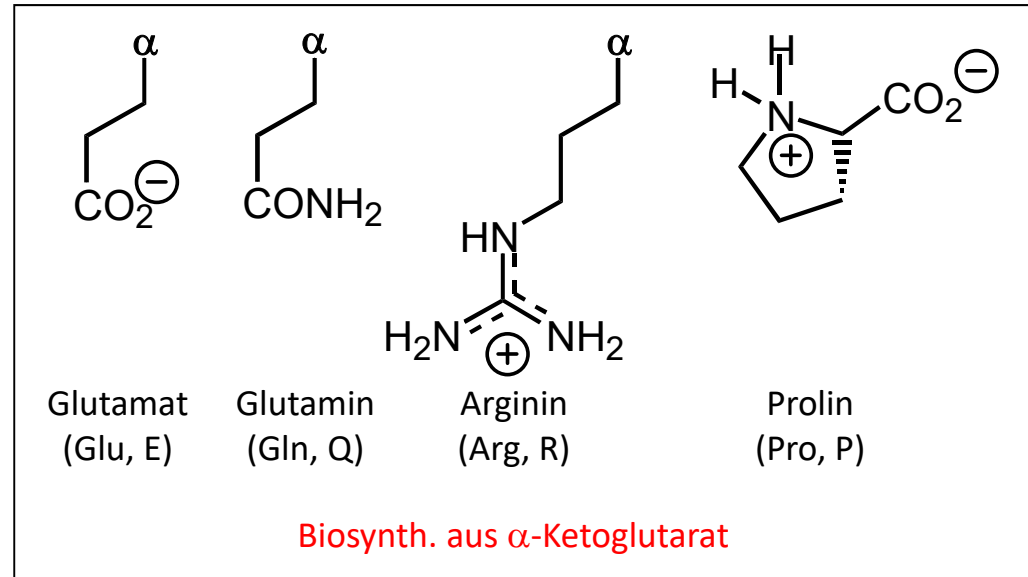
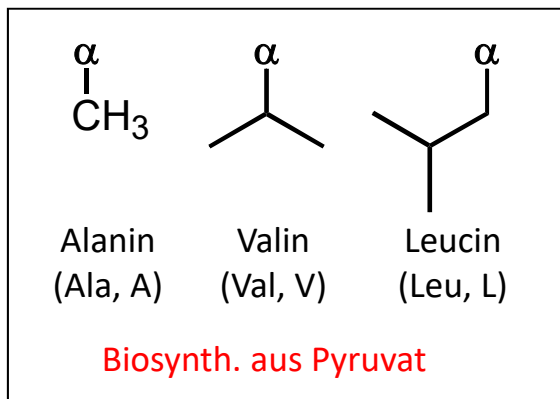
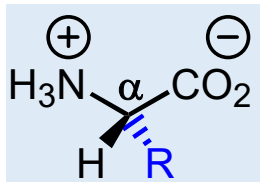
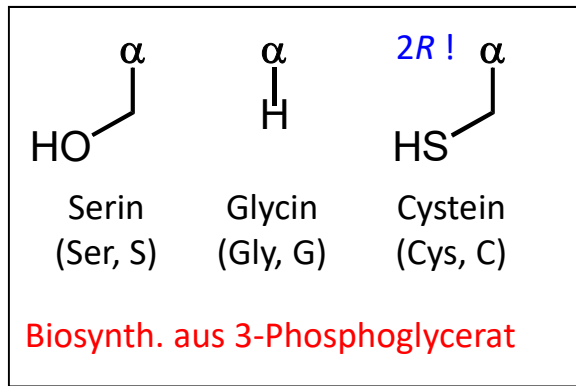
Primär-,
Sequenz

Sekundär-,
Helices,
Faltblätter, "Turns"

Tertiär-,
Untereinheit

Quartärstruktur
Gesamtprotein

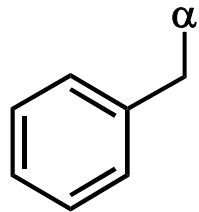
C. Peptide - C.1. Strukturelemente



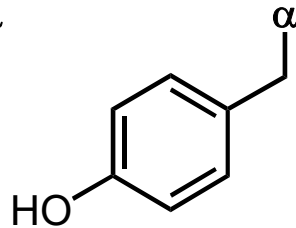
C. Peptide - C.1. Strukturelemente

20 *proteinogene* Aminosäuren: Einbau in Proteine durch *ribosomale* Biosynthese.

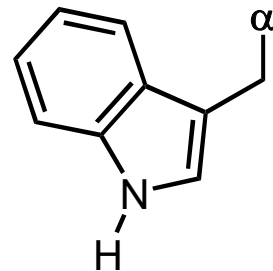
4 aromatische A.-s., R =



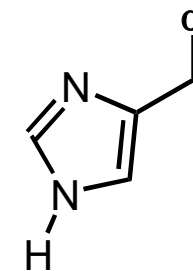
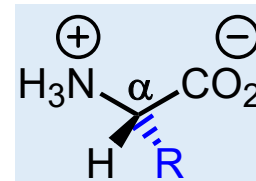
Phenylalanin
(Phe, F)



Tyrosin
(Tyr, Y)



Tryptophan
(Trp, W)



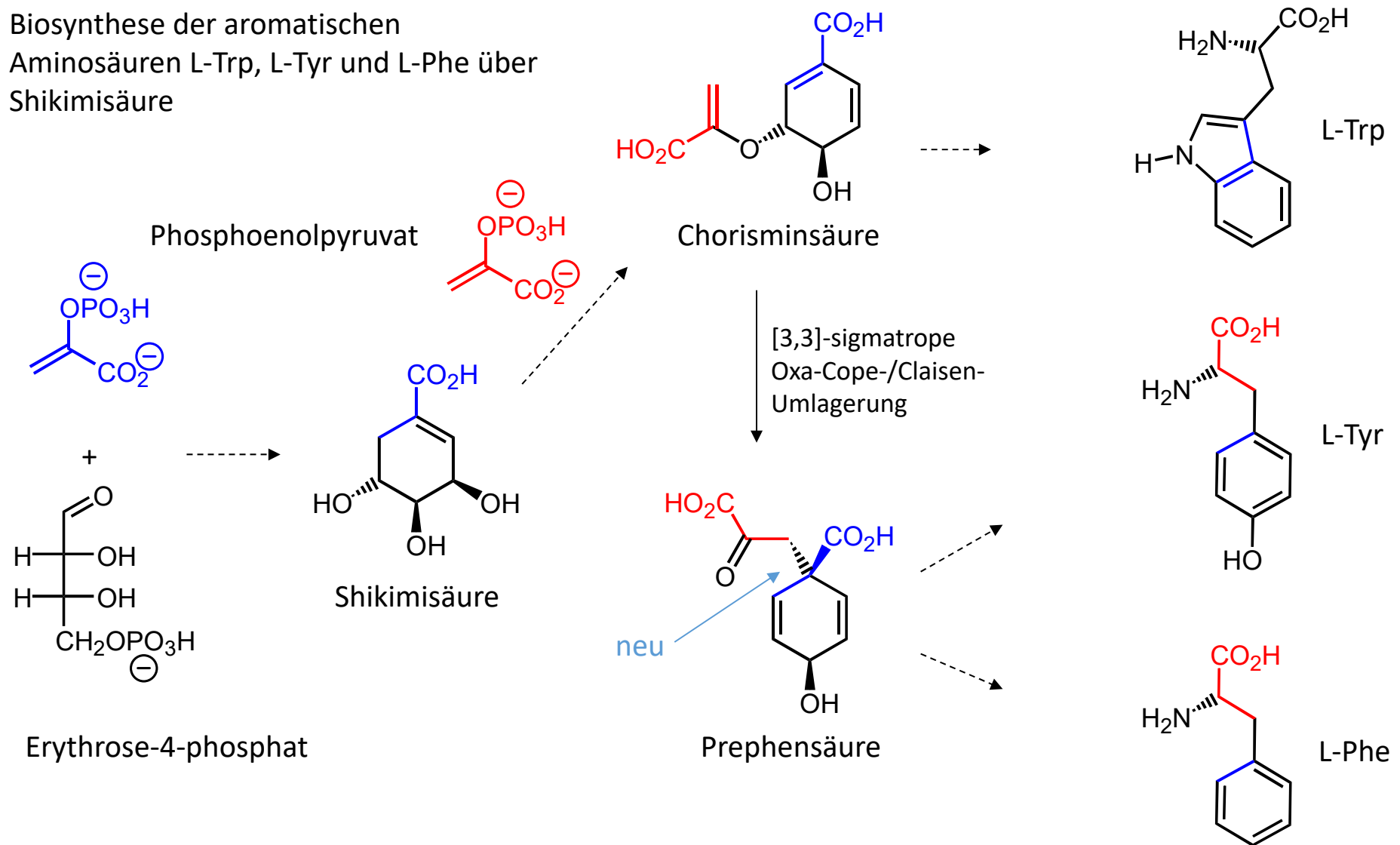
Histidin
(His, H)

Biosynth. aus 3-Phosphoglycerat u. Phosphoenolpyruvat

Biosynth. aus
Ribose-5-phosphat

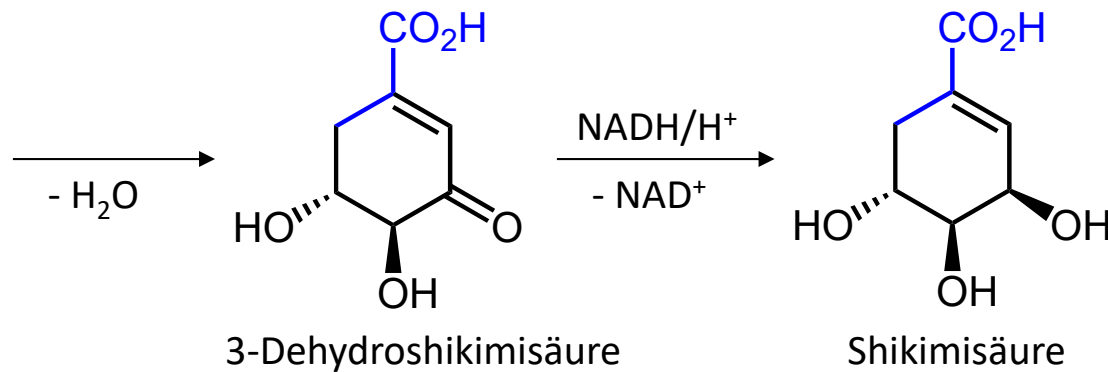
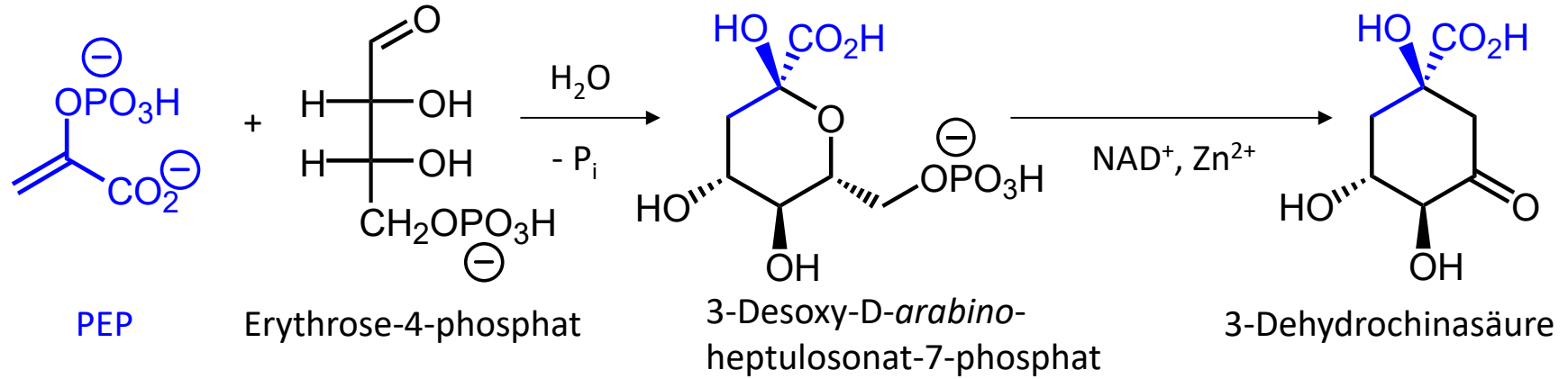
C. Peptide - C.1. Strukturelemente

Biosynthese der aromatischen Aminosäuren L-Trp, L-Tyr und L-Phe über Shikimisäure

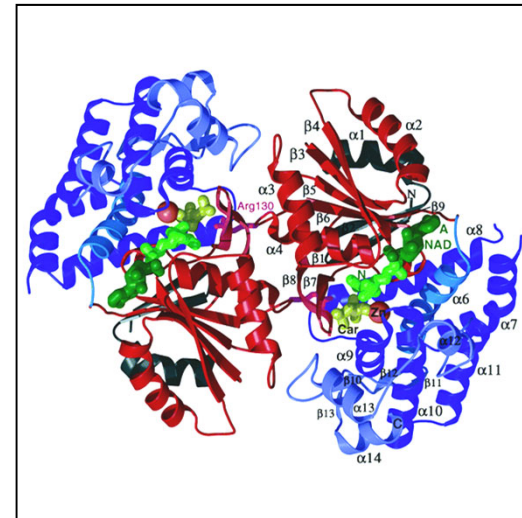


C. Peptide - C.1. Strukturelemente

Biosynthese von Shikimisäure

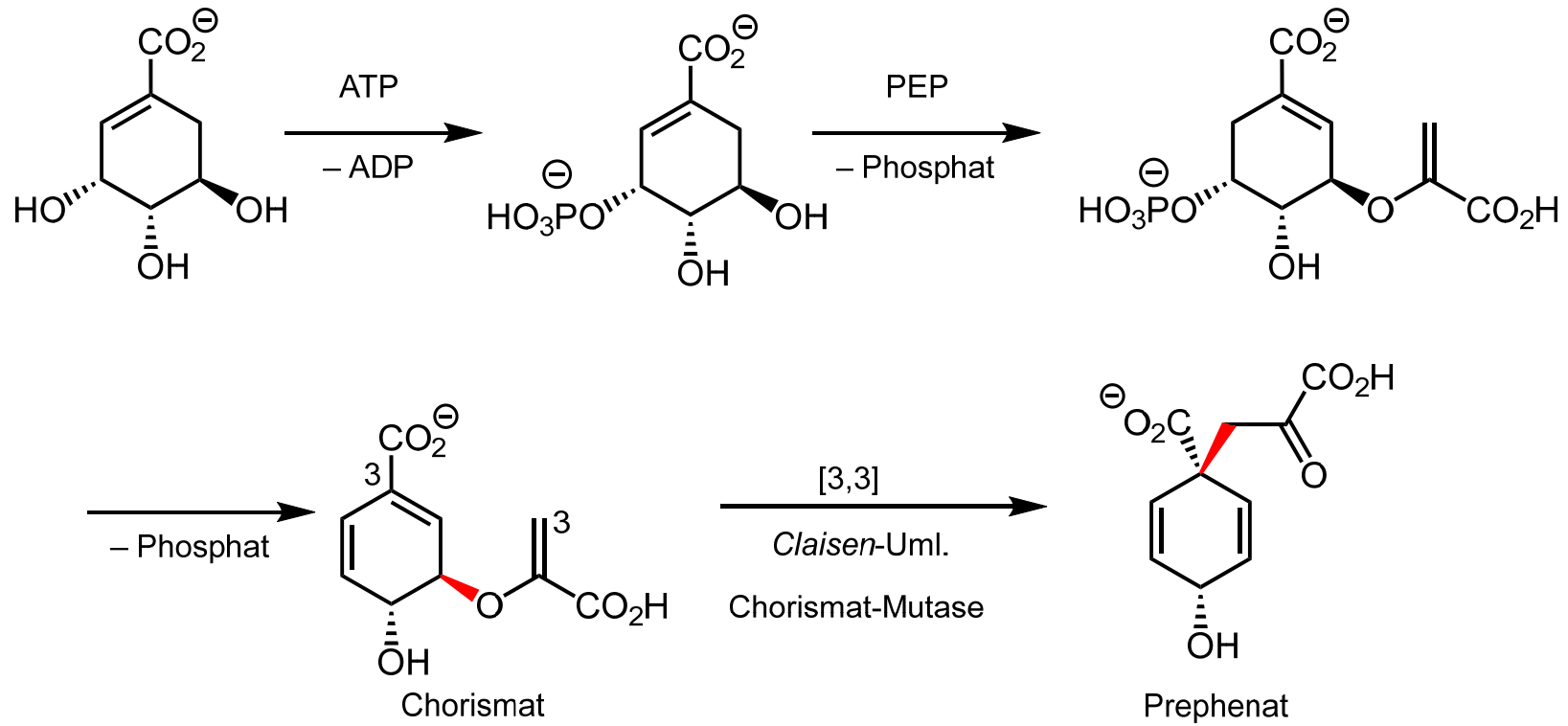


Dehydroshikinat-Synthase



C. Peptide - C.1. Strukturelemente

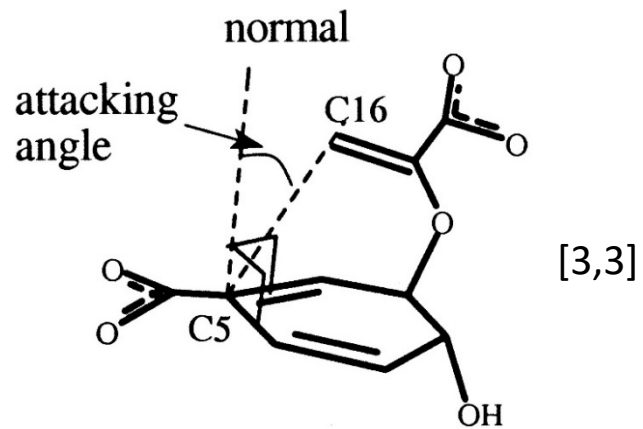
Biosynthese von Prephenat aus Shikimisäure



C. Peptide - C.1. Strukturelemente

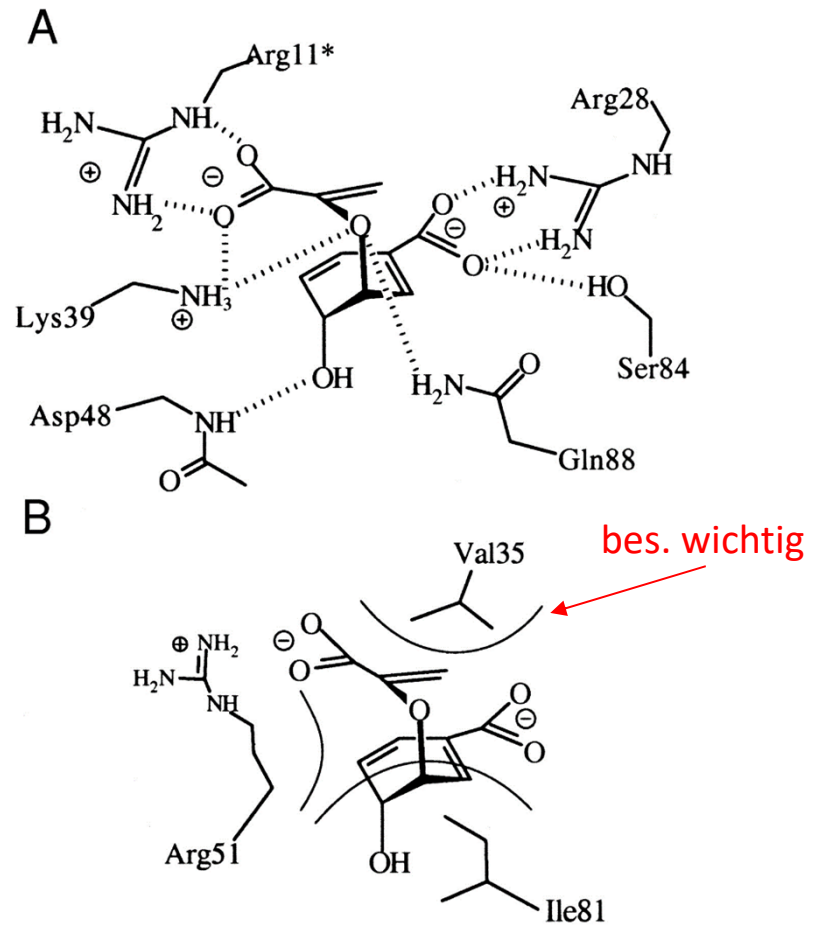
Chorismat-Mutase

veränderter Übergangszustand:



10^6 -fache Beschleunigung gegenüber
der Claisen-Umlagerung in Wasser

aus: Hur, Bruice, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 1766.

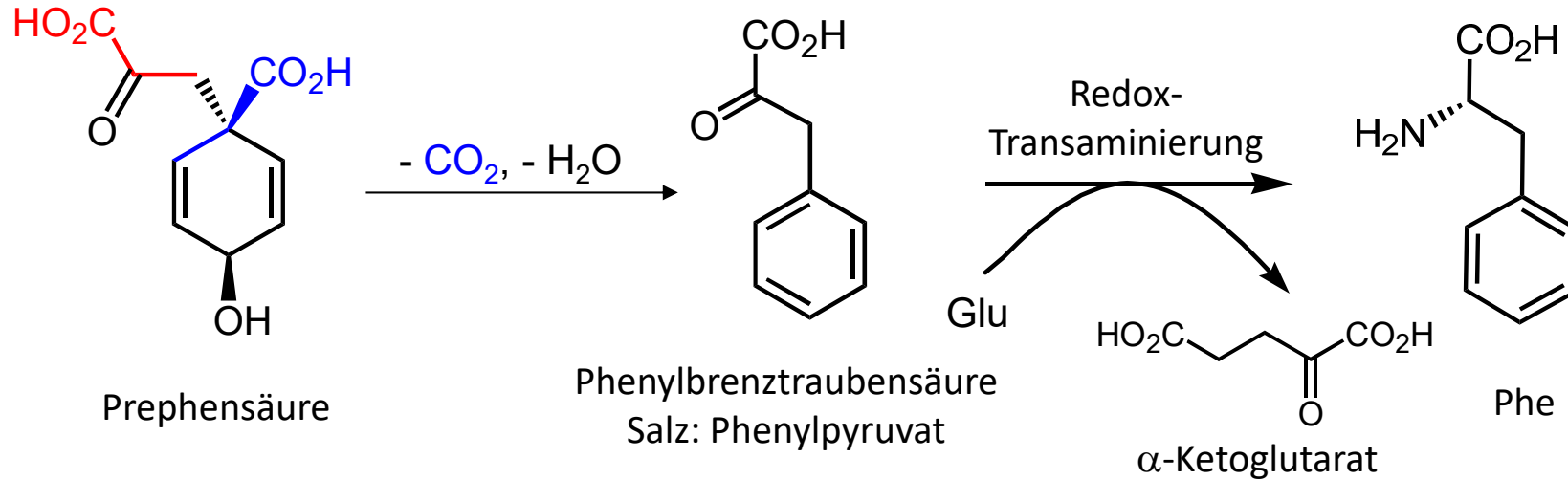


A: Elektrostatische W.-w. und H-Brücken
im akt. Zentrum

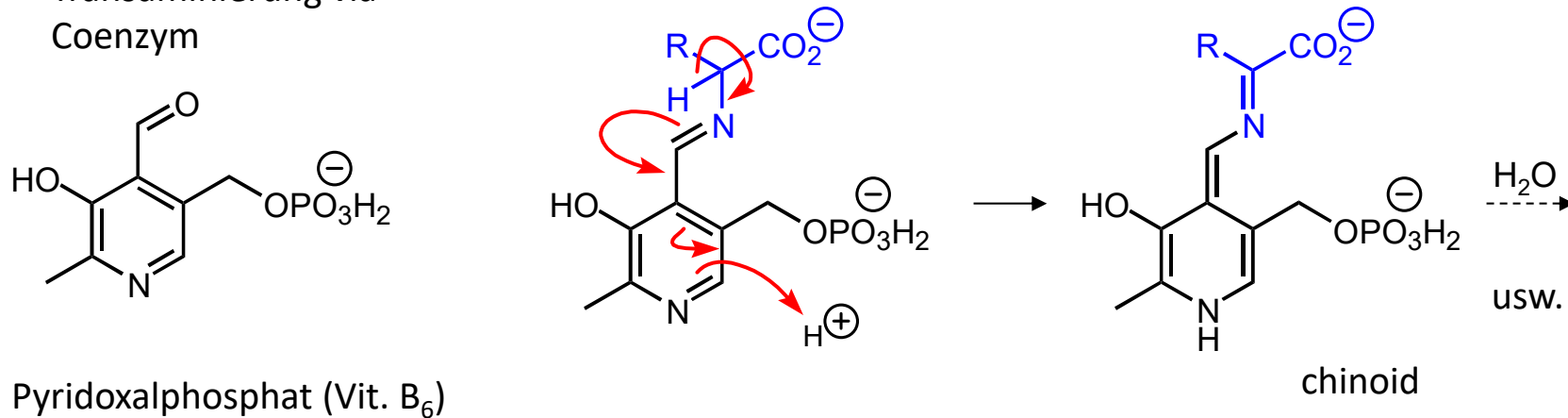
B: Hydrophobe W.-w. im akt. Zentrum

C. Peptide - C.1. Strukturelemente

Biosynthese von Phenylalanin aus Prephensäure

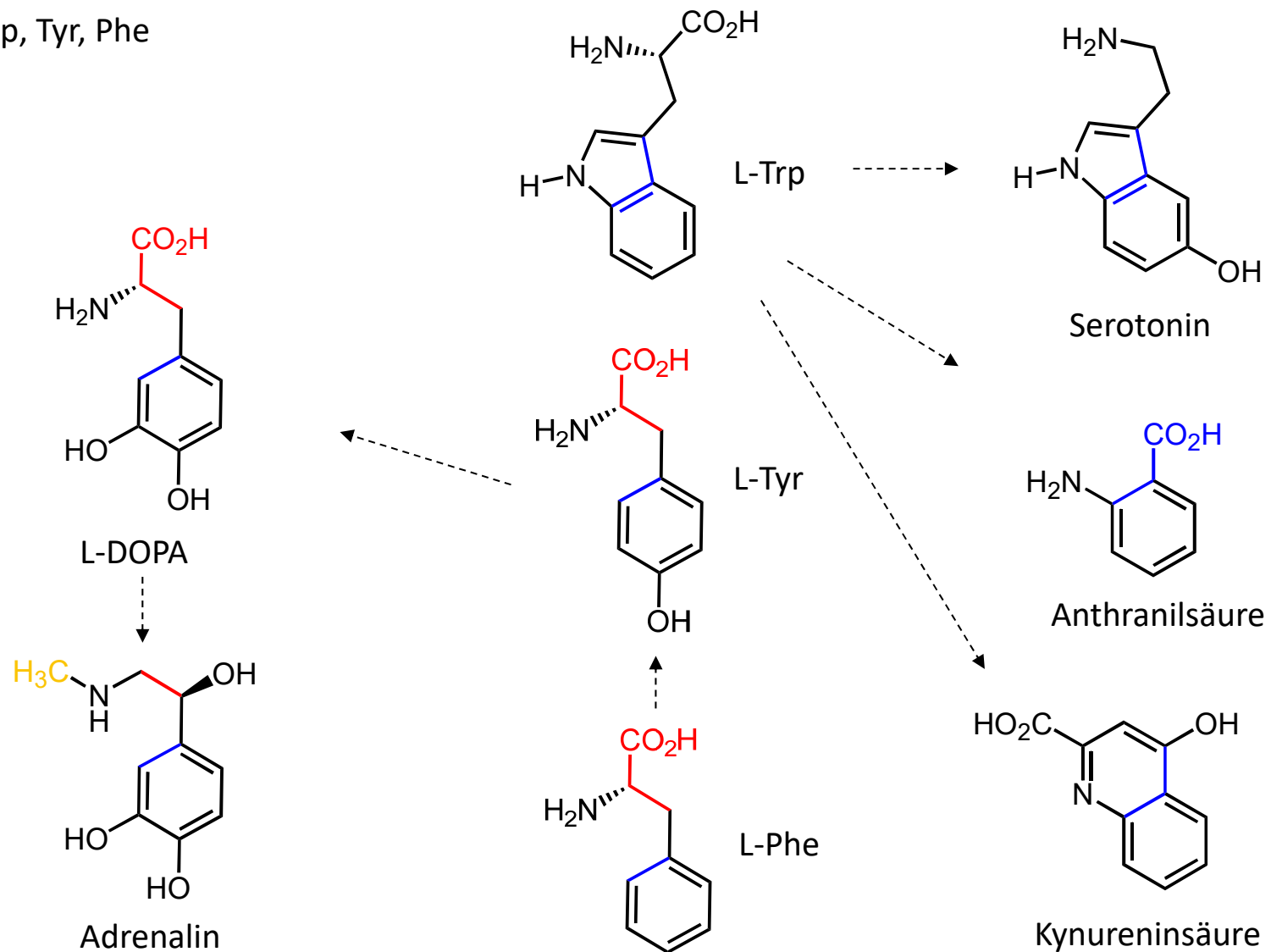


Transaminierung via
Coenzym



C. Peptide - C.1. Strukturelemente

Oxidation von Trp, Tyr, Phe

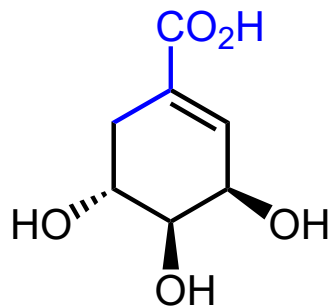


C. Peptide - C.1. Strukturelemente

Shikimisäure, z. B. aus dem Japanischen oder Chinesischen Sternanis ("Shikimi", *Illicium anisatum*, *I. verum*, 3-7% Gehalt) oder dem Amerikanischen Sweetgum (*Liquidambar styraciflua*, 1.5%), oder aus gentechnisch verändertem *E. coli*

Isolierung 1885, Strukturaufklärung 1934(?)

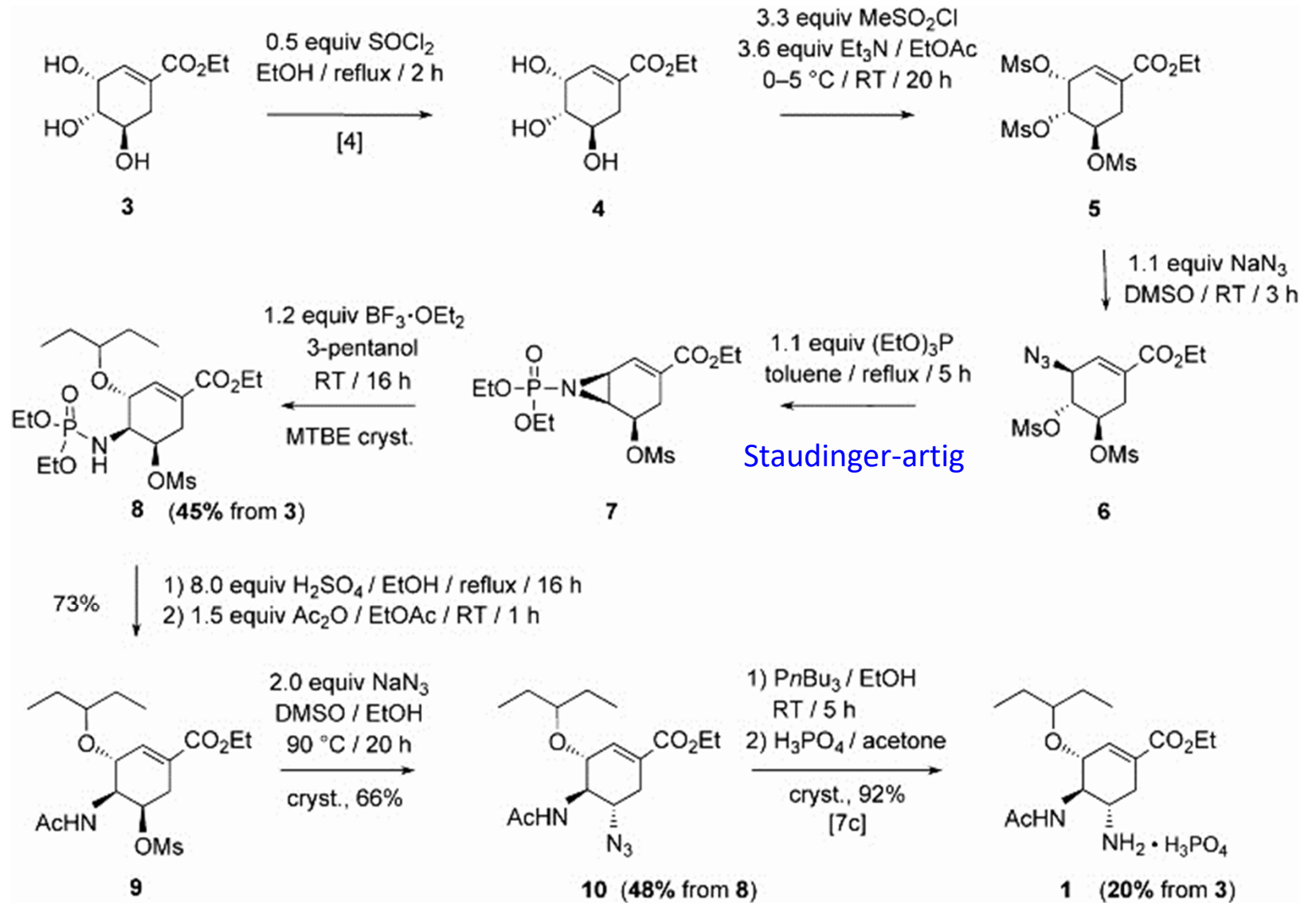
"4 kg Sweetgum ergeben ca. 14 Packungen Tamiflu (Oseltamivir, Neuraminidase-Inhibitor zur Therapie von Grippeerkrankungen, zugelassen in der EU seit 2002)."



Shikimisäure

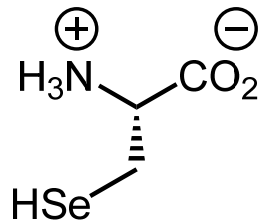
C. Peptide - C.1. Strukturelemente

Synthese des
Neuraminidase-
Inhibitors (-)-
Oseltamivir
("Tamiflu", Karpf,
Trussardi, *Angew.
Chem. Int. Ed.* **2009**,
5760): ausgehend
von Shikimisäure



C. Peptide - C.1. Strukturelemente

21. proteinogene Aminosäure:



Selenocystein (Sec, 1978)

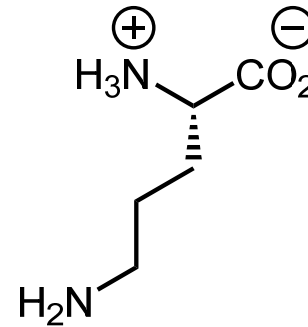
pK_a 5.3 \Rightarrow $\text{R-Se}^- / \text{R-SeH}$ (1:1) bei pH 5.3
(vgl. pK_a 8.1 für Cystein-SH)

ca. 45 Se-haltige Enzyme charakt.,
dort effizienter als Cys;
z. B. im aktiven Zentrum der Glutathion-
Peroxidase

Codierung: Stop-Codon UGA +
Sekundärstrukturelement d. mRNA

Curr. Opin. Chem. Biol. **2014**, 22, 27

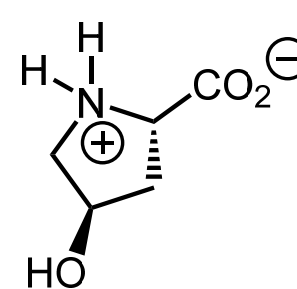
wichtige nicht-proteinogene A.-s.:



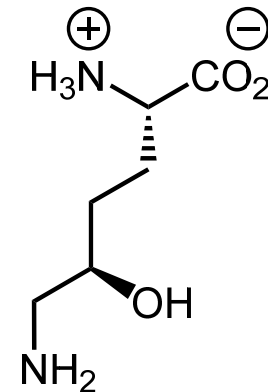
Ornithin (Orn)

Harnstoffcyclus,
Vorstufe von Prolin,
Einbau in Alkaloide.

durch posttranslationale Oxygenierung
der Kollagen-Tripelhelix:



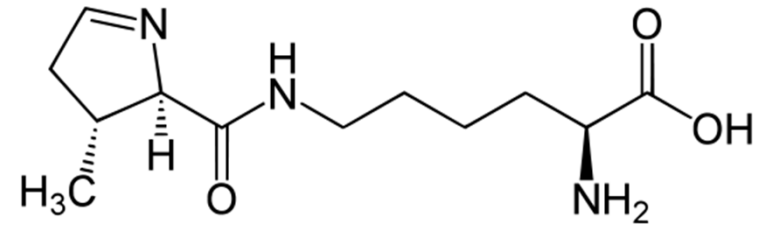
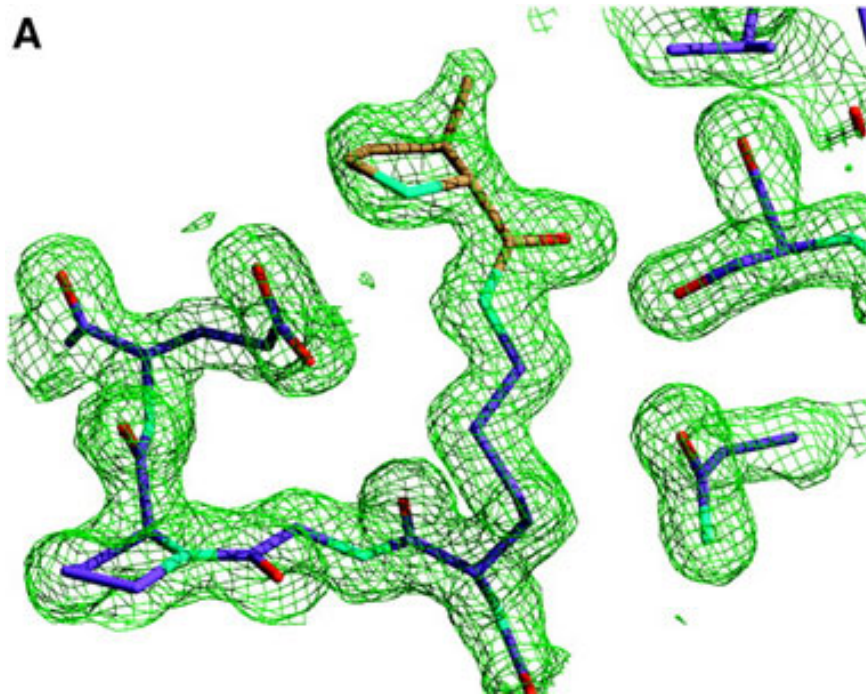
4-Hydroxyprolin (2S,4R)



5-Hydroxylysin (2S,5R)

C. Peptide - C.1. Strukturelemente

Pyrrolysin: 22. genetisch codierte Aminosäure in Archeen, Buchstabencode "O"
Codon UAG (=Stoppcodon, hier desaktiviert)

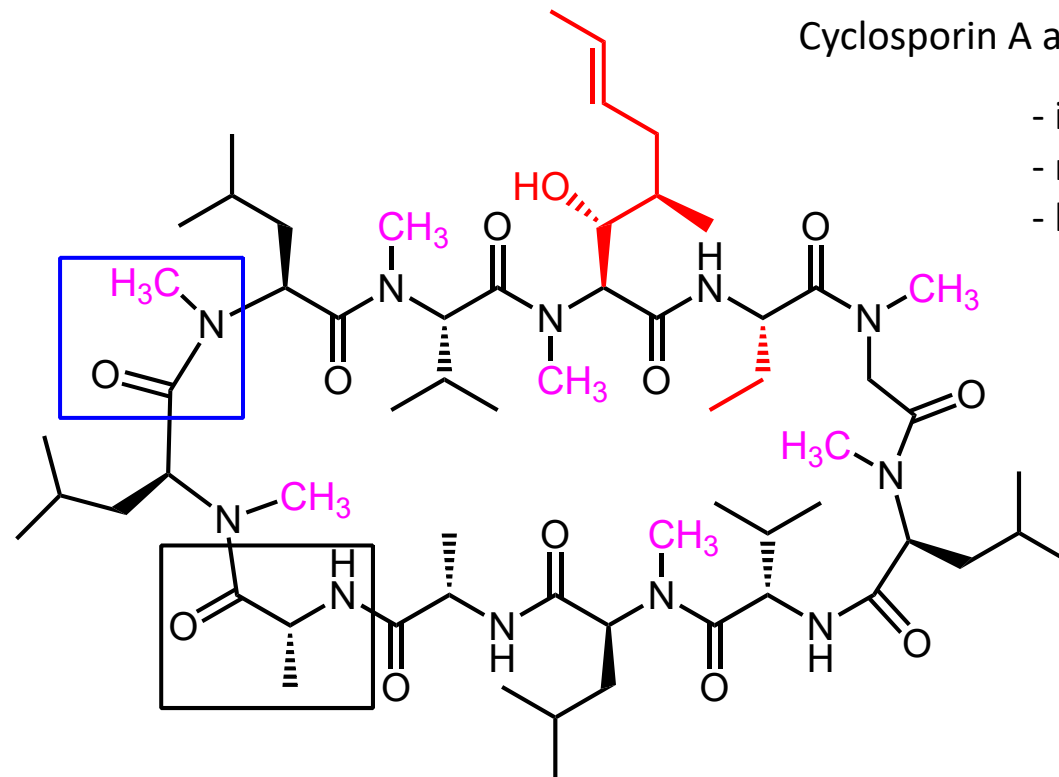


Monomethylamin-Methyltransferase von *Methanosarcina barkeri*

aus: Bing Hao et al., *Science* **2002**, 296, 1462

C. Peptide - C.1. Strukturelemente

Es gibt mehr als die proteinogenen Aminosäuren ...



Cyclosporin A aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum*

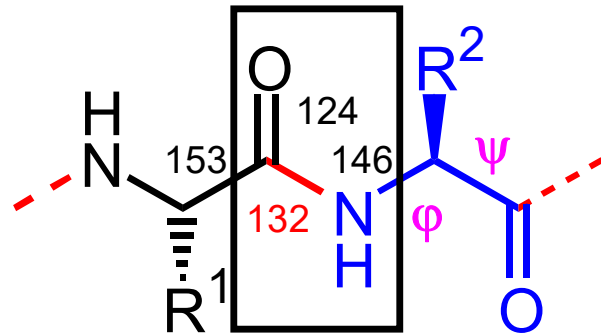
- immunsuppressiv
- nicht cytostatisch
- klin. Einsatz b. Organtransplantationen

- cyclisches Undecapeptid
- ungewöhnliche Seitenketten
- D-Alanin
- 7 N-Methylierungen
- Z-Amid-Bindung

cyclo[MeBmt-Abu-Sar(=MeGly)-MeLeu-V-MeLeu-A-a-MeLeu-MeLeu-MeVal]

Nicht-ribosomale Peptid-Biosynthese!

C. Peptide - C.1. Strukturelemente



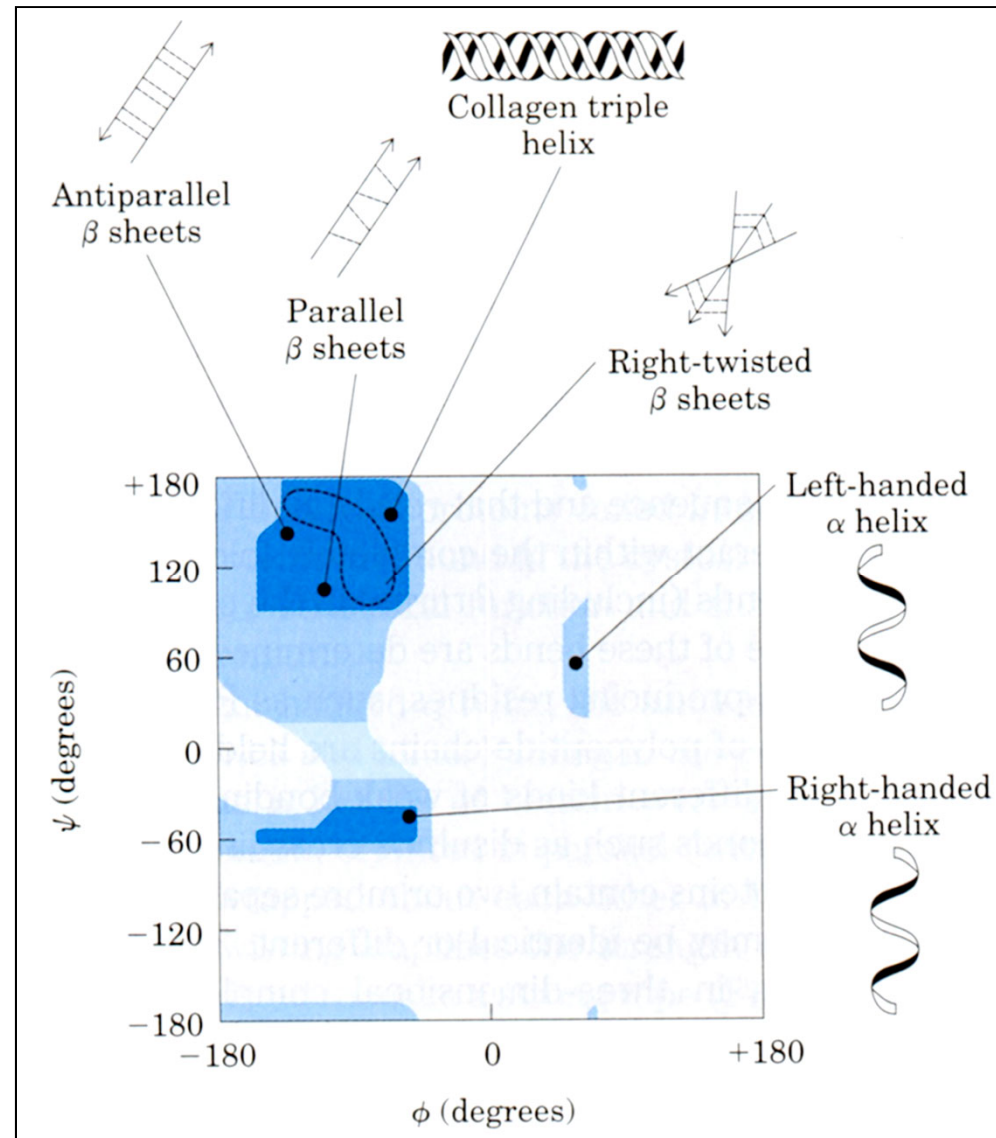
planare Peptidbindung
(Bindungslängen in pm)

ϕ : Diederwinkel C-N-C_α-C
 ψ : Diederwinkel N-C_α-C-N

Peptid voll gestreckt: $\phi, \psi = 180^\circ$

Sekundärstrukturen:

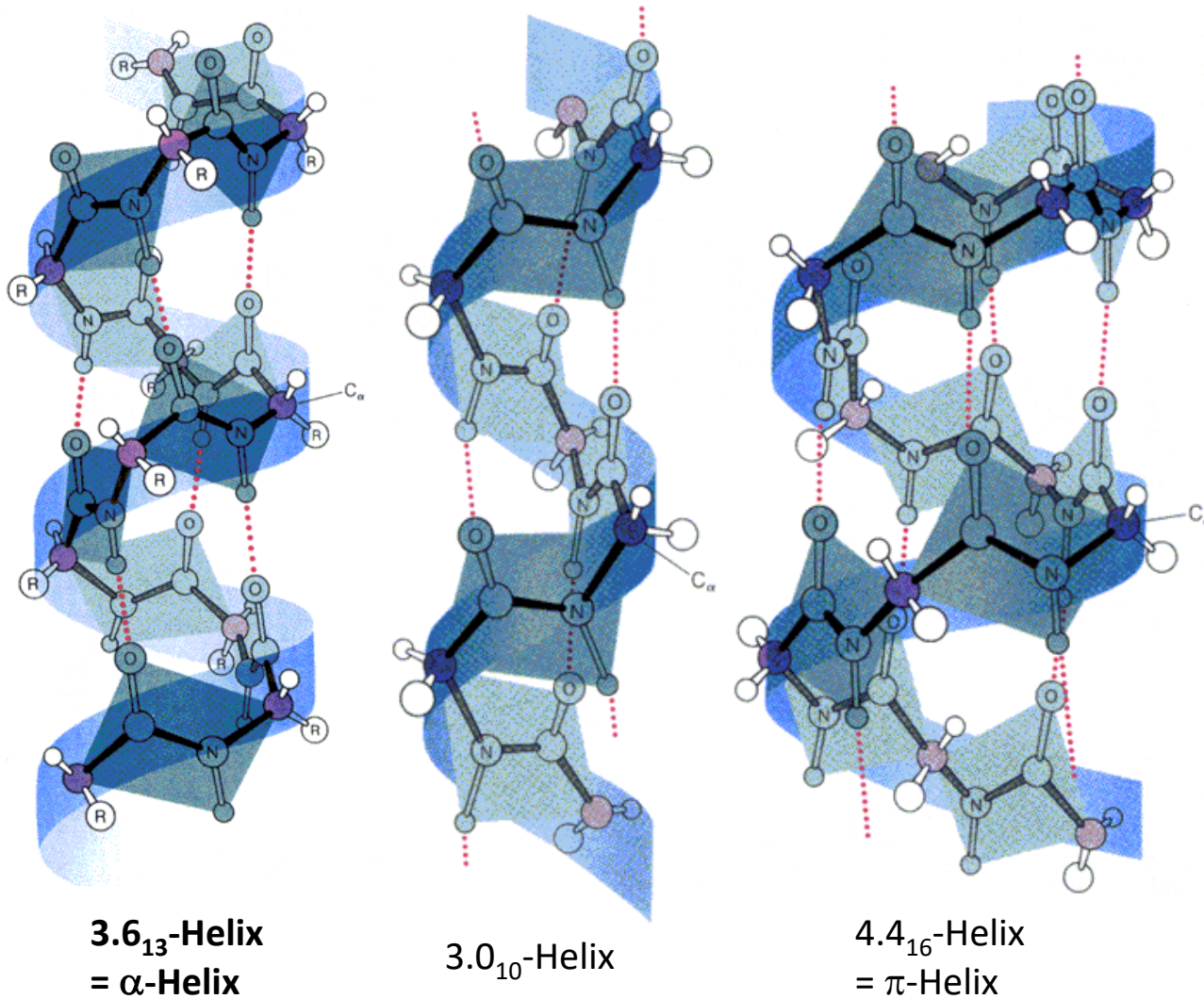
Ramachandran-Darstellung



C. Peptide - C.1. Strukturelemente

Sekundärstrukturen

(Aminosäuren/Windung)_{Länge H-Brücken-Schleife}



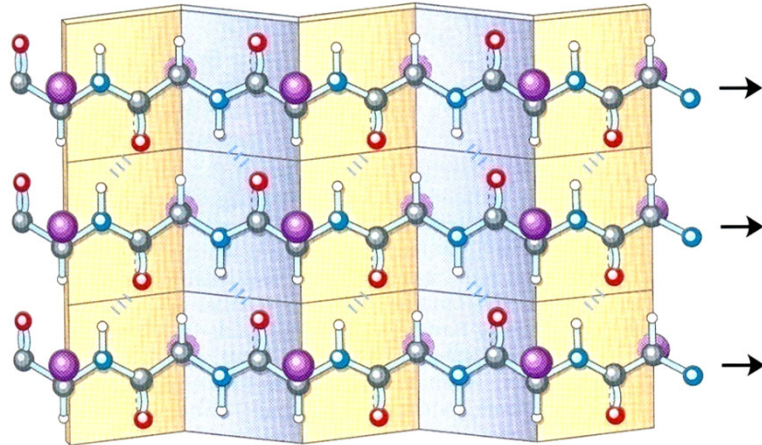
Typ	C=O \cdots H-N
3.0 ₁₀	i+3
3.6 ₁₃	i+4
4.4 ₁₆	i+5

rechtsgängige Helices
 stabilisierende **H-Brücken**

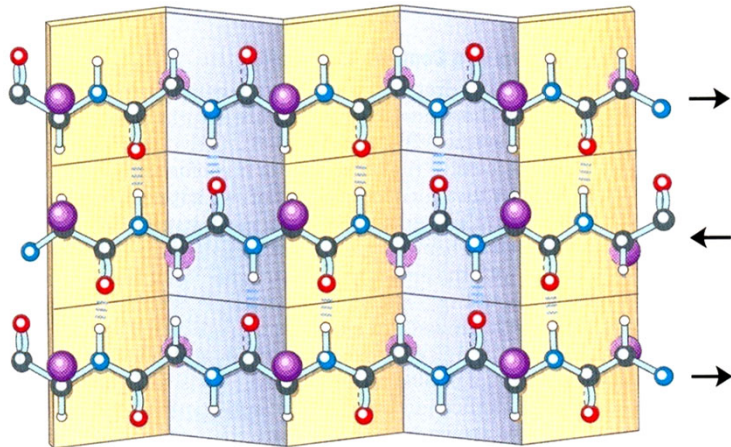
C. Peptide - C.1. Strukturelemente

Sekundärstrukturen

β -Faltblatt-Strukturen

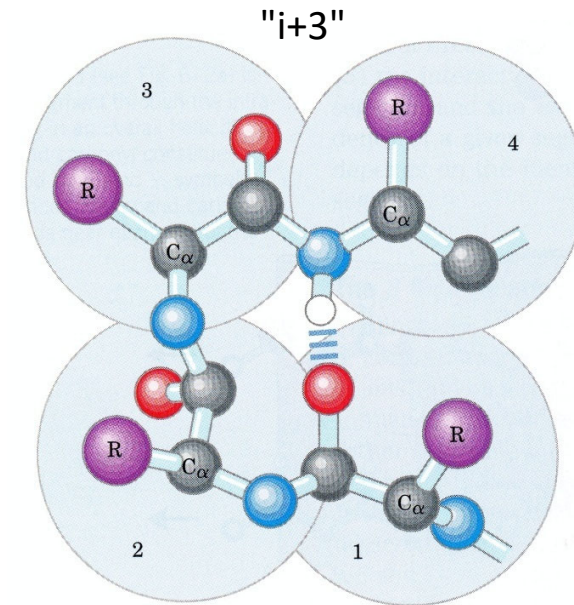


parallel



antiparallel

β -Schleife (Typ I)



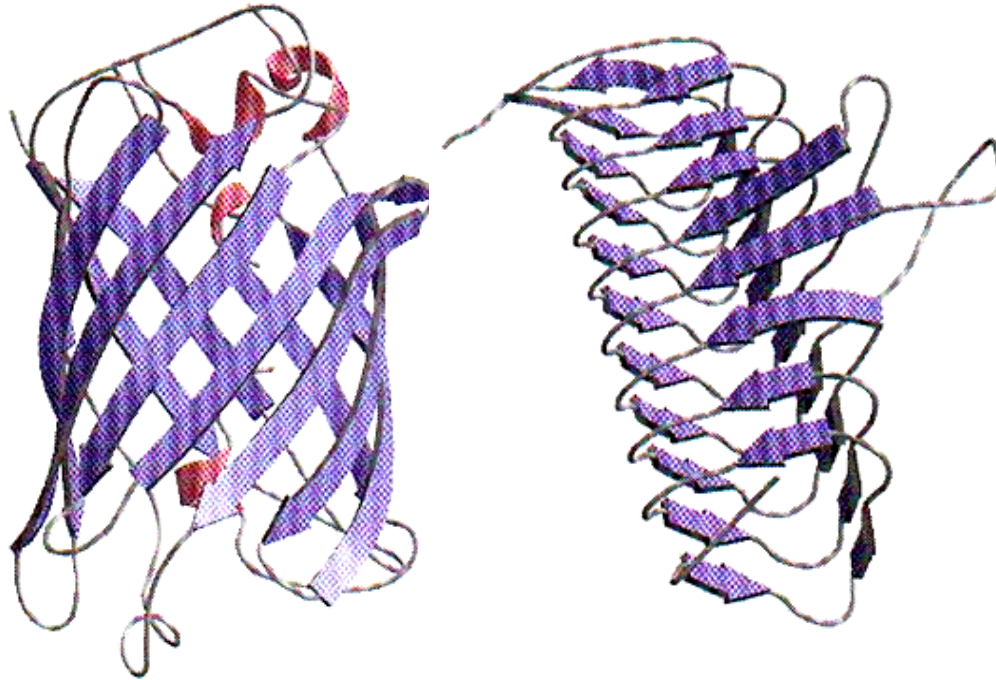
auch: γ -Schleife (" $i+2$ ")

weiterhin:
Amid-*E/Z*-Isomerie bei Pro !

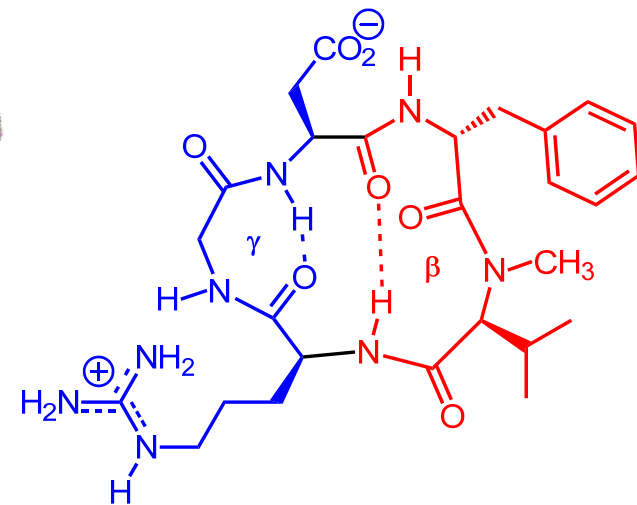
C. Peptide - C.1. Strukturelemente

Sekundär- und Tertiärstruktur (Quartärstruktur: s. Hämoglobin)

z. B.



Grün fluoreszierendes Protein:
 α -Helix in antiparallelem " β -Faß"

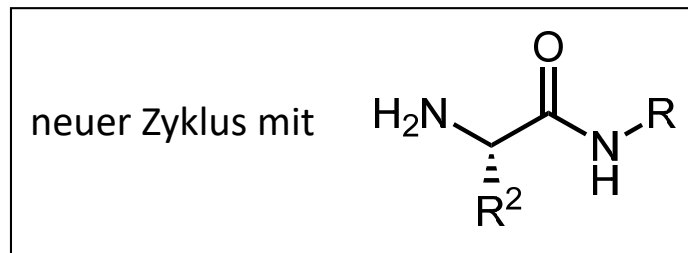
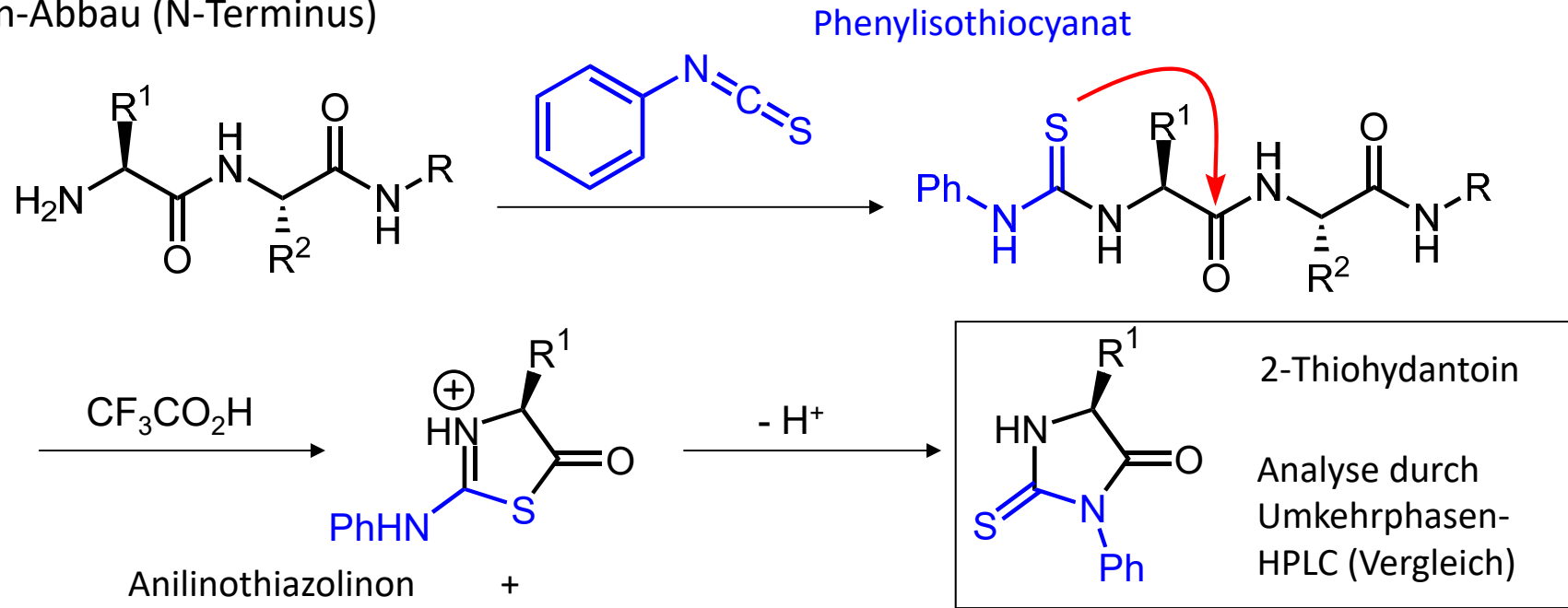


c[RGDf(N-Me)V]
("Cilengitide"; Kessler (TU München)
Merck KGaA)
- Zell-Adhäsions-Erkennungsmotiv

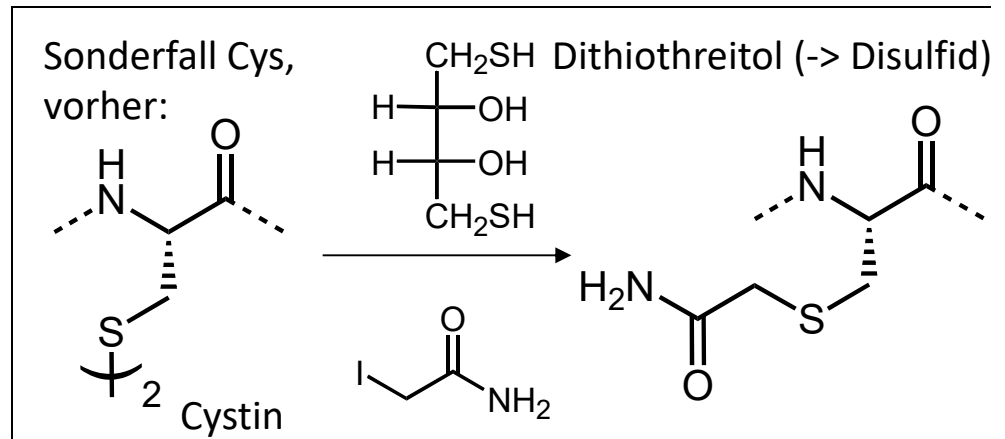
UDP N-Acetylglucosamin-Acyltransferase:
3 parallele β -Faltblatt-Teilstrukturen

C. Peptide - C.2. Sequenzierung

Edman-Abbau (N-Terminus)

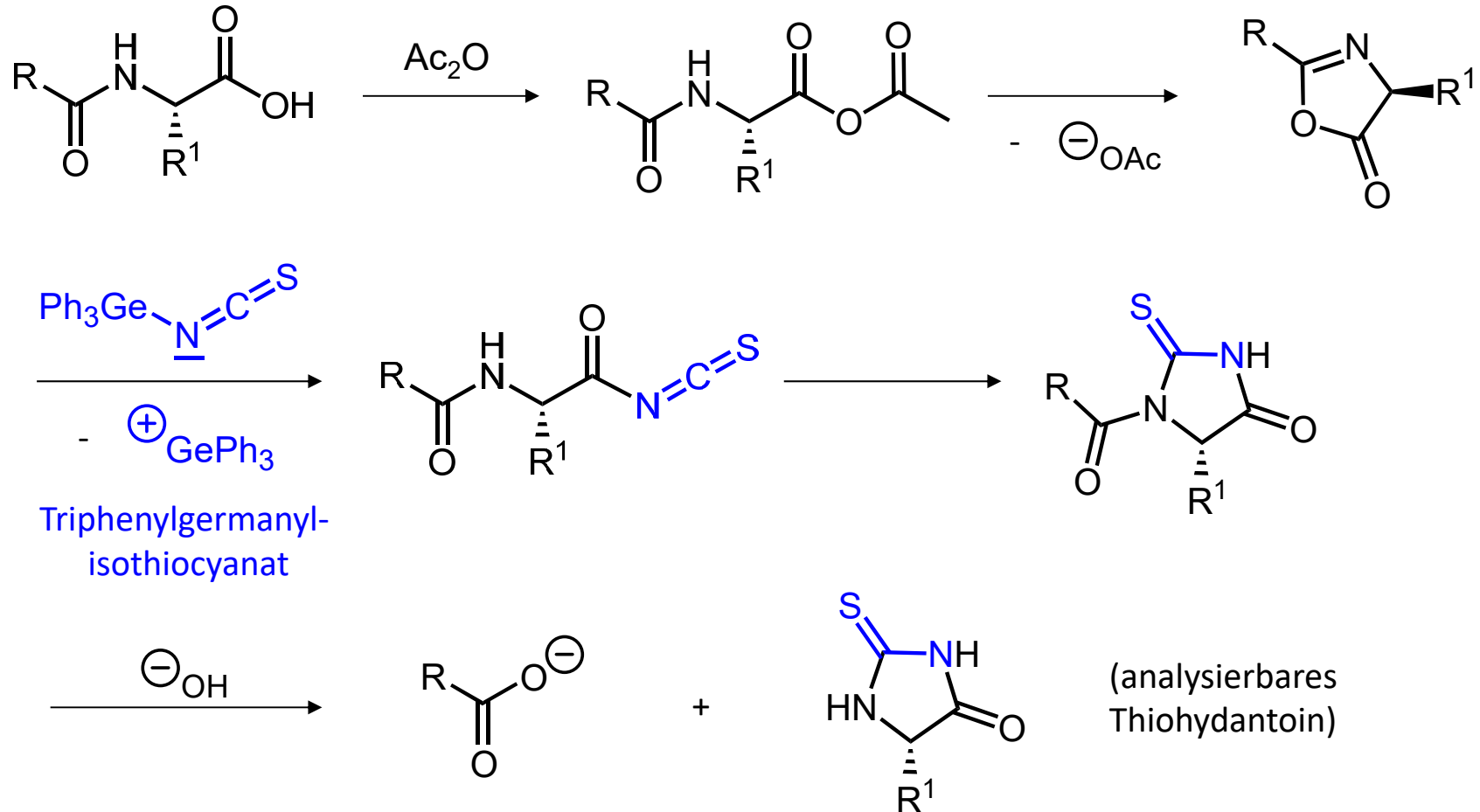


Ausb. 95 % pro Zyklus, 40-60 min.



C. Peptide - C.2. Sequenzierung

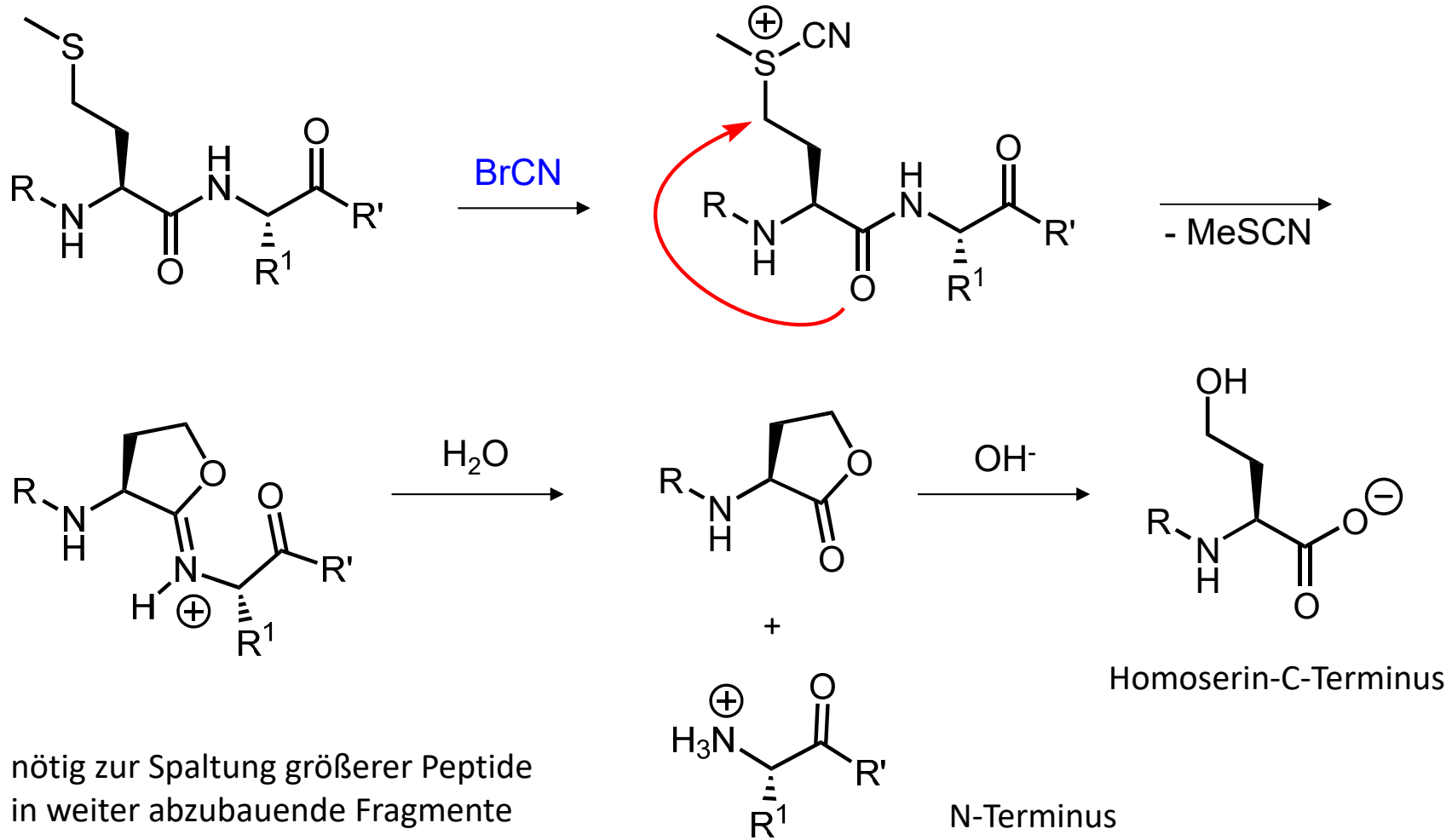
Abbau ausgehend vom C-Terminus über Acylisothiocyanat



Li, Liang, *Anal. Biochem.* **2002**, 302, 108

S-Cyanylierung

Bromcyan-Spaltung: C-Seite neben Methionin

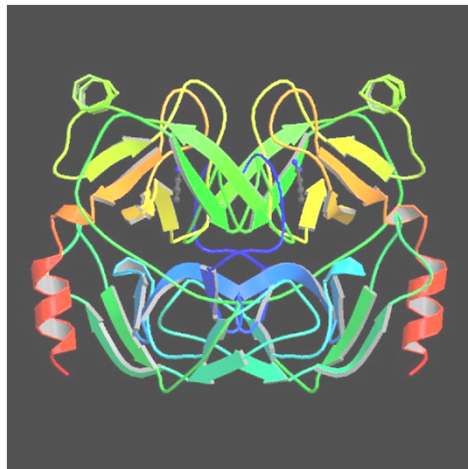


nötig zur Spaltung größerer Peptide
in weiter abzubauen Fragmente

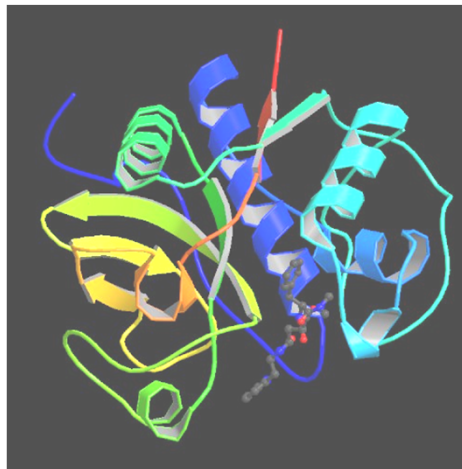
C. Peptide - C.2. Sequenzierung

Enzymatische Spaltung

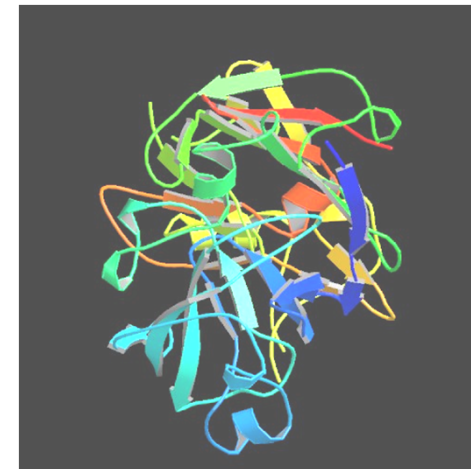
Enzym	Hydrolase-Typ	Hydrolyse-Ort	Vorkommen
Trypsin	Serin-Protease	K, R (C-Seite)	Pankreas
Chymotrypsin	Serin-Protease	F, W, Y (C-Seite)	Pankreas
Papain	Cystein-Protease	F, Y (C-Seite), wen. spez.	Papaya
Pepsin	Aspartat-Protease	F, W, Y (N-Seite)	Magen



Trypsin (dimer)



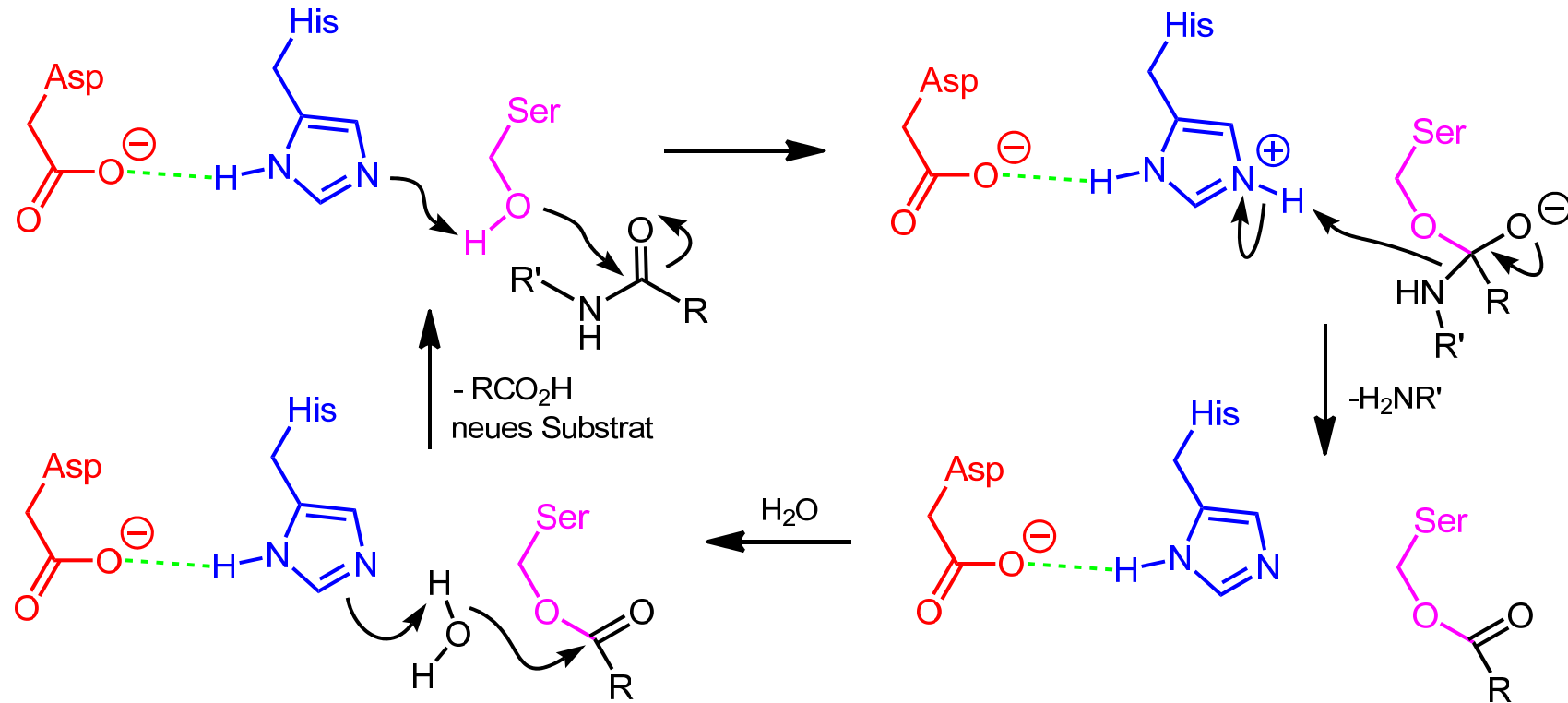
Papain



Pepsin

C. Peptide - C.2. Sequenzierung

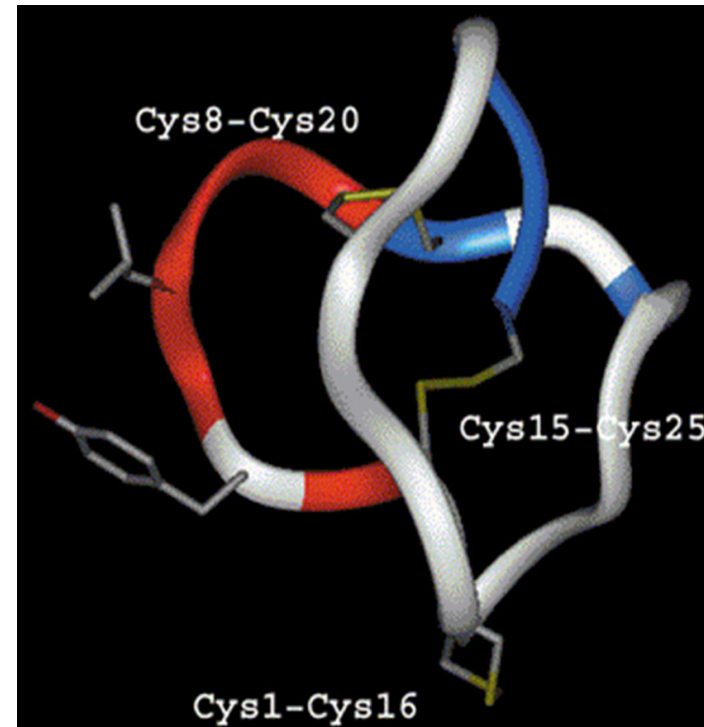
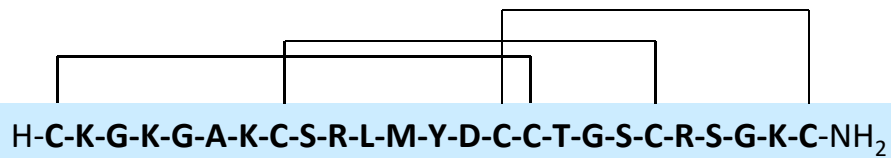
Enzymatische Spaltung durch Serin-Proteasen





B. M. Oliveira et al., *Biochemistry* **1984**, 5087.

ω -Conotoxin MVIIA (= Ziconotid, "Prialt")



ω -Conotoxin MVIIA in Lösung
(R. A. Atkinson et al., *Biochemistry* **2000**, 3908)

- blockiert Ca²⁺-Kanäle (Typ N)

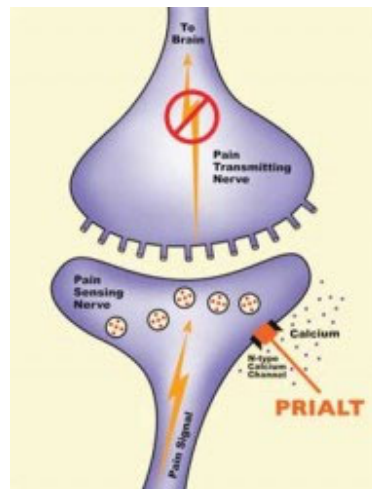
FDA-Zulassung 2004

Indikation: Opioid-resistente Schmerzen

maximale Dosis 20 μ g/d



ω -Conotoxin MVIIA (= Ziconotid, "Prialt")

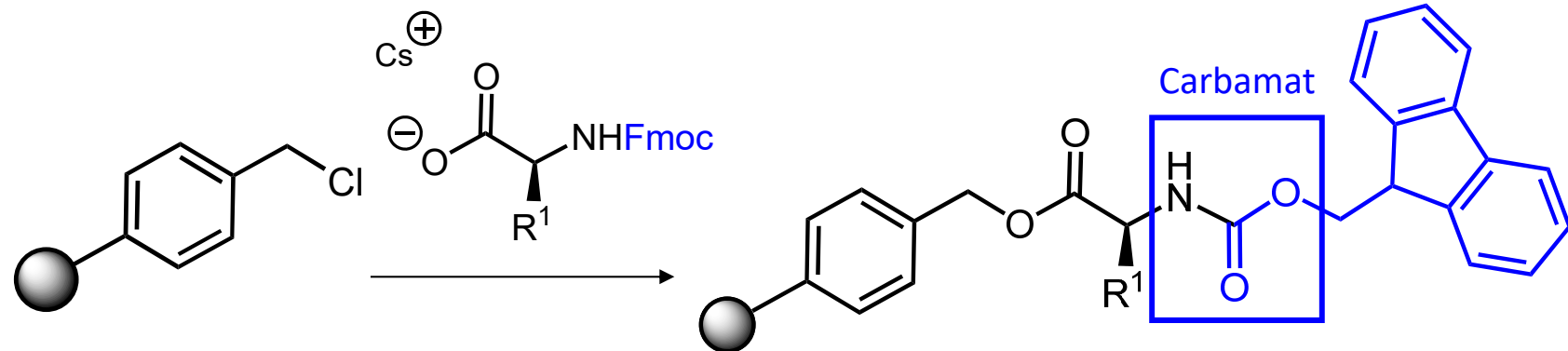


Baldomero Olivera
(nihrecord.od.nih.gov)



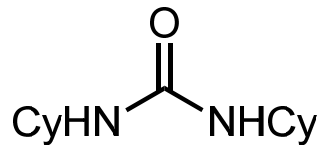
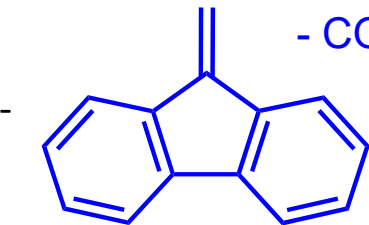
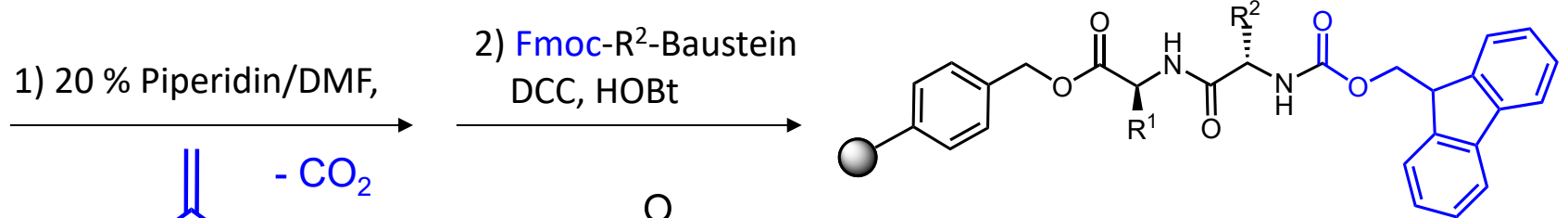
C. Peptide - C.3. Synthese

Festphasensynthese (Prinzip: R. B. Merrifield, 1962)



chlormethyliertes Polystyrol,
vernetzt m. Divinylbenzol ("Merrifield-Harz")

DCC: Dicyclohexylcarbodiimid
HOBT: *N*-Hydroxybenzotriazol

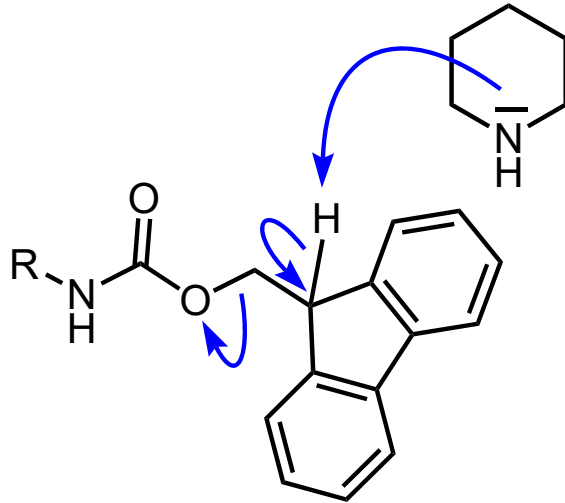


---> ---> ; Abspaltung vom Harz: TfOH.
usw.

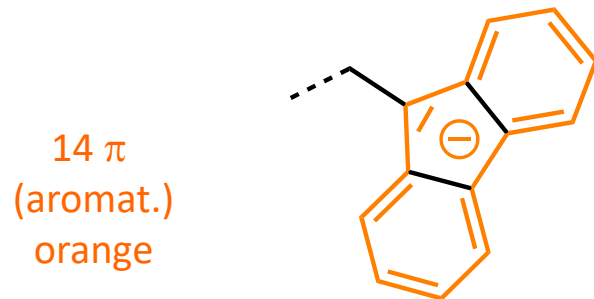
C. Peptide - C.3. Synthese

Festphasensynthese

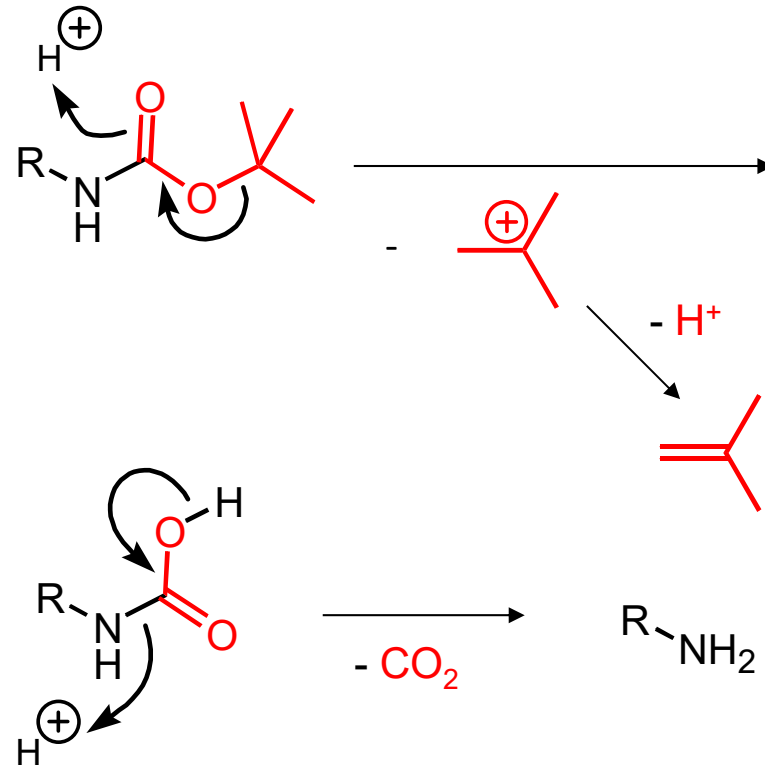
Schutzgruppe Fmoc:
Abspaltung m. Base (E1cB-Mech.)



schwach acide (pK_a 22.5 in DMSO) wg.:



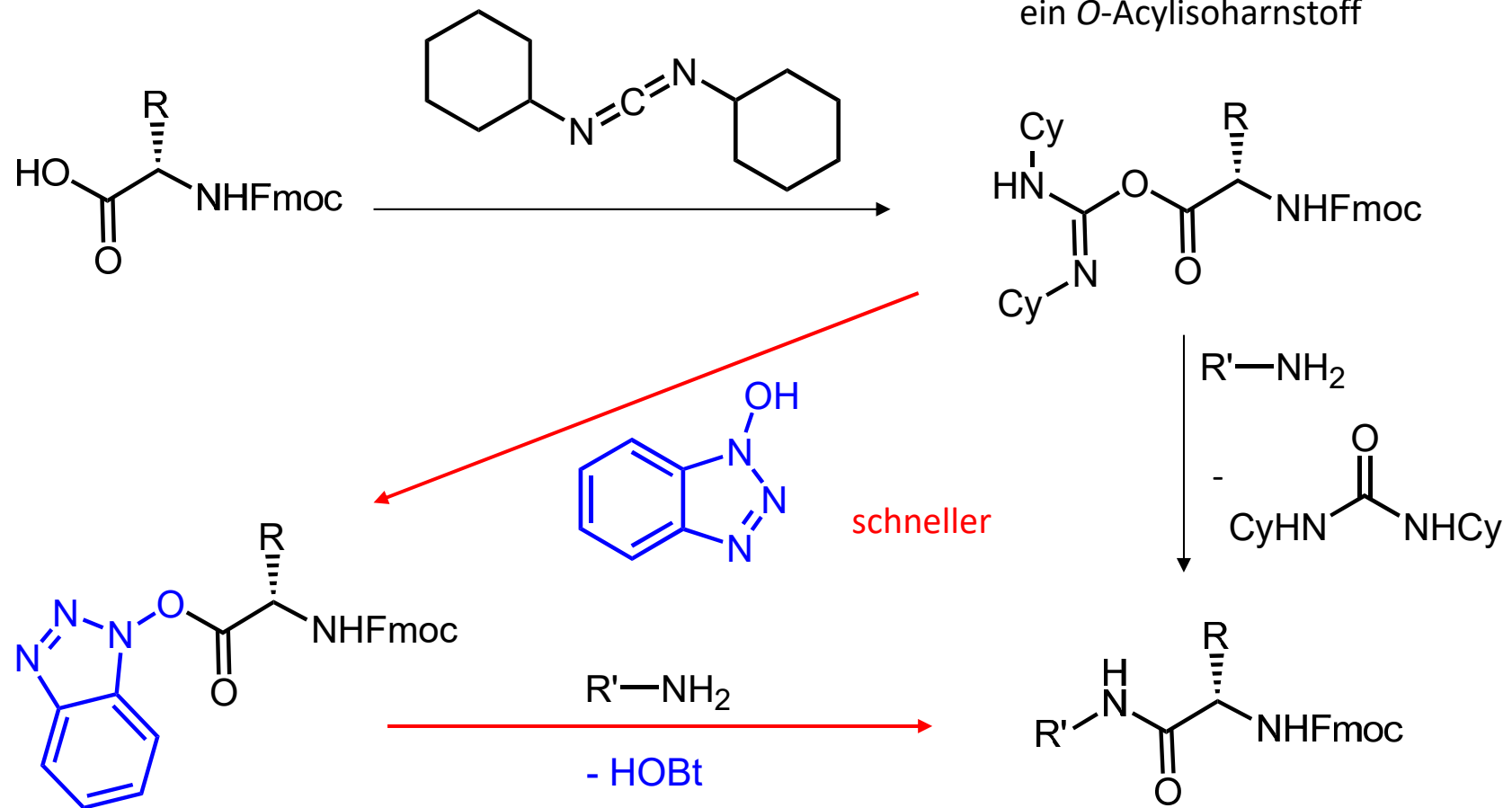
Schutzgruppe Boc (= *tert.*-Butoxycarbonyl):
Abspaltung m. TFA

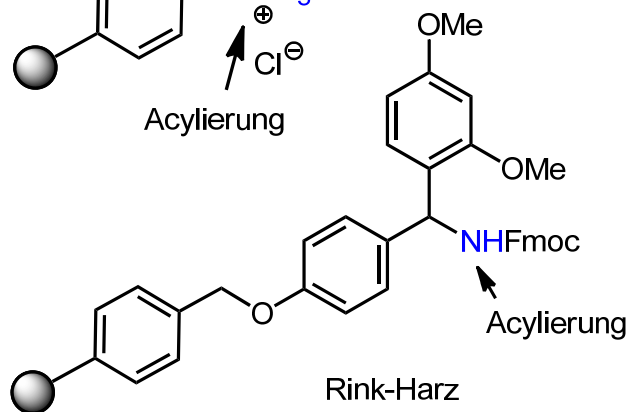
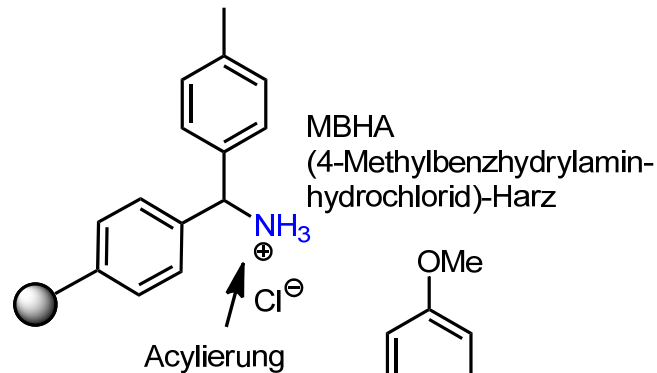
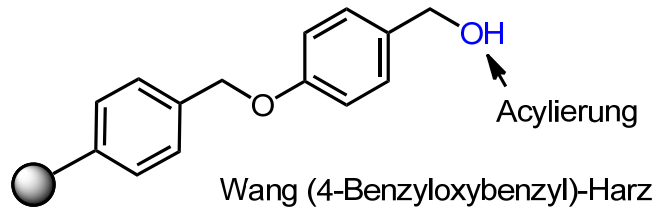
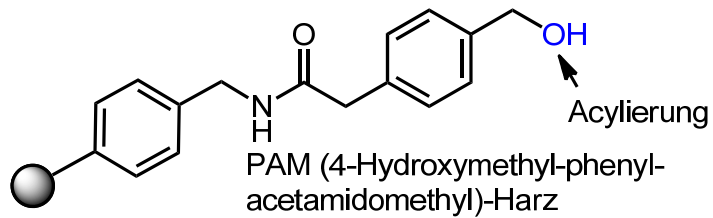


C. Peptide - C.3. Synthese

Festphasensynthese

Aktivierung durch Carbodiimide





Boc-Protokoll; Amide 10^6 -fach basischer als Ester => selektive Protonierung des Amids und 100-fach größere Stabilität des Esters, auch gegen TFA
 Peptid-Absp.: TfOH/TFA/PhSMe/Ethandithiol (reagiert als Nukleophil in benzylicher Position, S_N2)

-> Carboxyterminus

Fmoc-Protokoll;
 Peptid-Absp.: TFA

Boc-Protokoll;
 Peptid-Absp.: HF oder TfOH zum Carboxamid (repräsentiert Protein-Teilstrukturen besser); möglich durch 2. Phenylgruppe (S_N1); stabil gegen TFA

-> Carboxamidterminus

Fmoc-Protokoll;
 Peptid-Absp.: TFA zum Carboxamid (S_N1)
 ebenso *o*-Chlortrityl-Harz: mit TFA zur Carbonsäure

Bei allen Harzen erfolgt die Abspaltung des Peptidstrangs unter sauren Bedingungen, wobei PAM- und MBHA-Harze TFA aushalten, also mit dem Boc-Protokoll kompatibel sind, nicht aber Wang- und Rink-Harze (Fmoc-Protokoll).

PAM- und Wang-Harze liefern Carbonsäuren, MBHA- und Rink-Harze Carboxamide, so dass alle Kombinationen abgedeckt sind.

Schutzgruppen der Seitenketten bei **Fmoc-Aminosäuren** stabil gegen Basen und labil gegen TFA, bei **Boc-Aminosäuren** stabil gegen TFA und labil gegen HF, TfOH bzw. Thiophenolat (H, W).

Fmoc-Aminosäuren:

N- oder S-Tritylierung: Fmoc-N, -Q, -H, -C
tert.-Butylierung: Fmoc-D, -E, -Y, -S, -T
tert.-Butoxycarbonylierung (Boc): Fmoc-K, -W
Sulfonylierung (Pbf-Schutzgruppe): Fmoc-R

Boc-Aminosäuren:

O-Benzylierung: Boc-D, -E, -S, -T
N-ortho-Chlorbenzylierung: Boc-K
S-para-Methylbenzylierung: Boc-C
ortho-Brombenzyloxycarbonylierung: Boc-Y
N-Tosylierung: Boc-R
N-Formylierung: Boc-W
N-2,4-Dinitrophenylierung: Boc-His

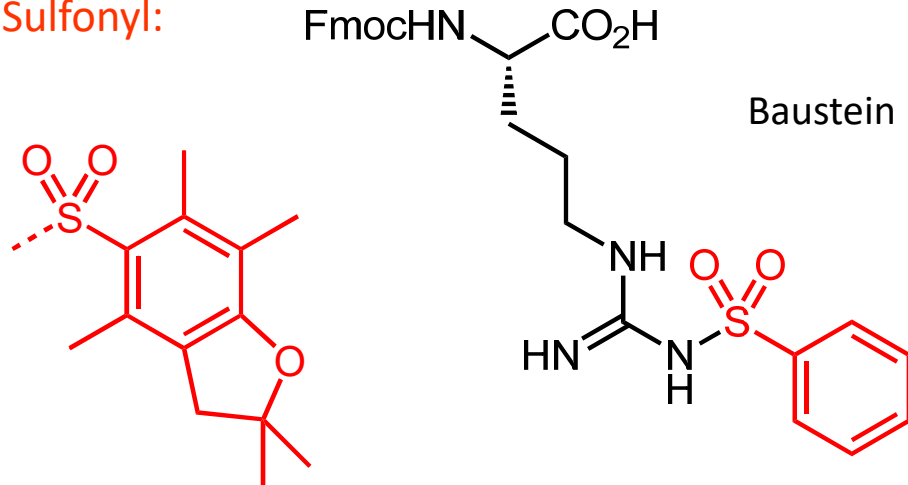
C. Peptide - C.3. Synthese

Festphasensynthese

Schutzgruppen der Aminosäure-Seitenketten

von Aminogruppen (bei K, W, H, R):

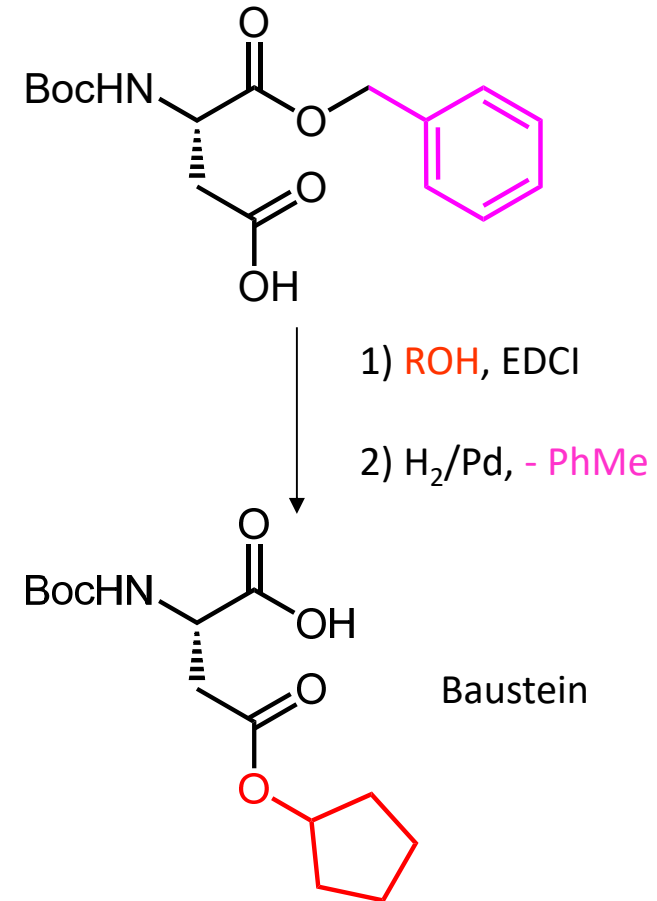
Sulfonyl:



Pbf (Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)

- Einf. als Sulfonsäurechlorid, Absp. m. TFA.

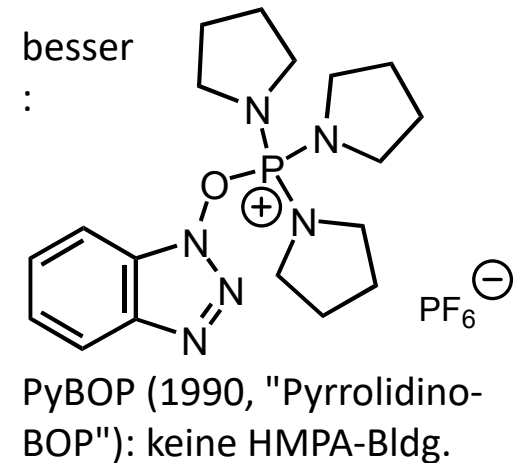
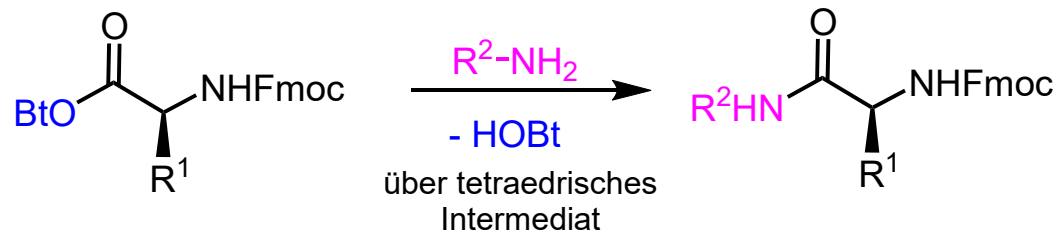
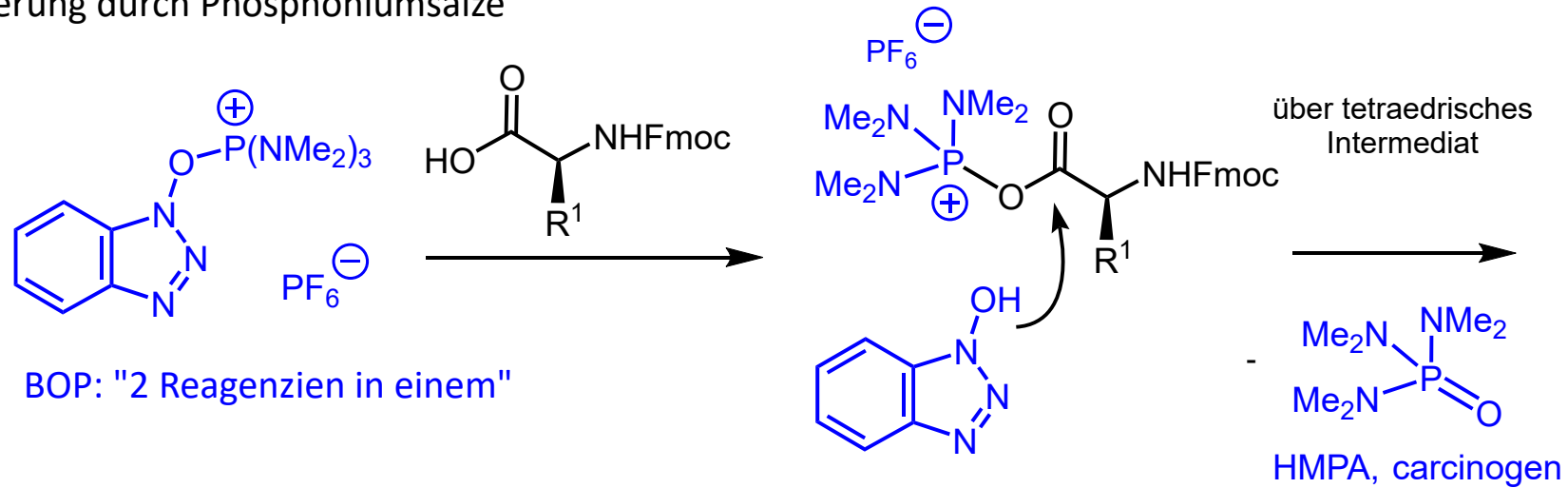
von Carboxylgruppen (bei D, E):



- Absp. m. MeSO₃H

C. Peptide - C.3. Synthese

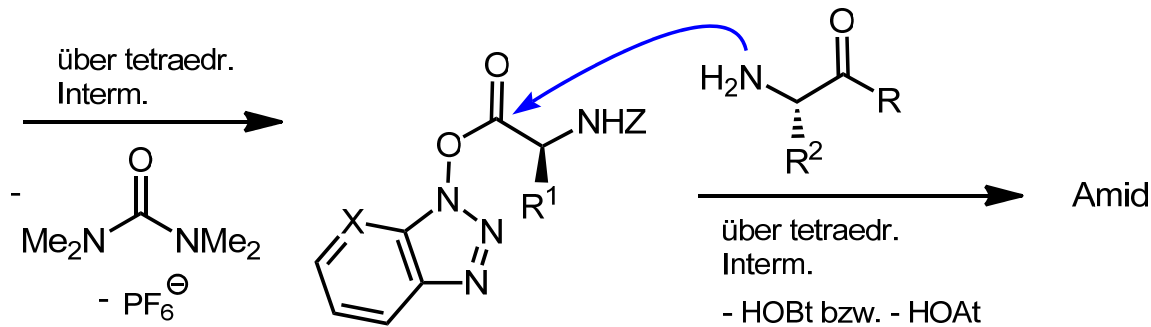
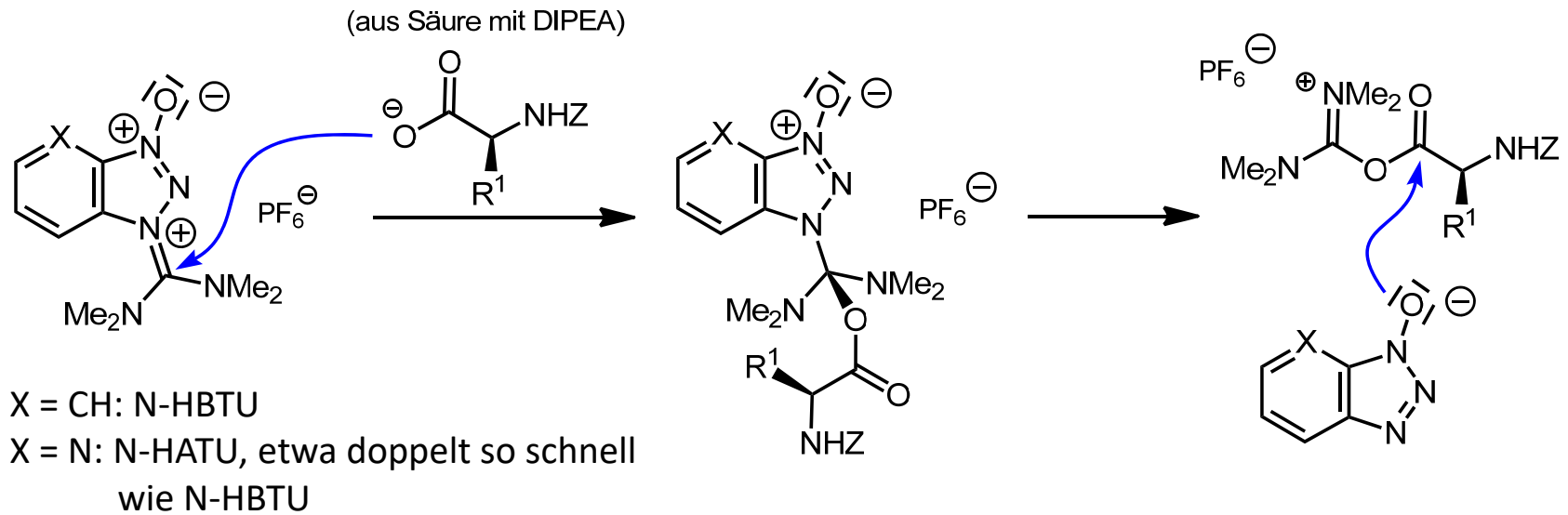
Aktivierung durch Phosphoniumsalze



BOP (Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorosphat ("Castro's Reagenz", 1975))

C. Peptide - C.3. Synthese

Aktivierung durch Amidiniumsalze

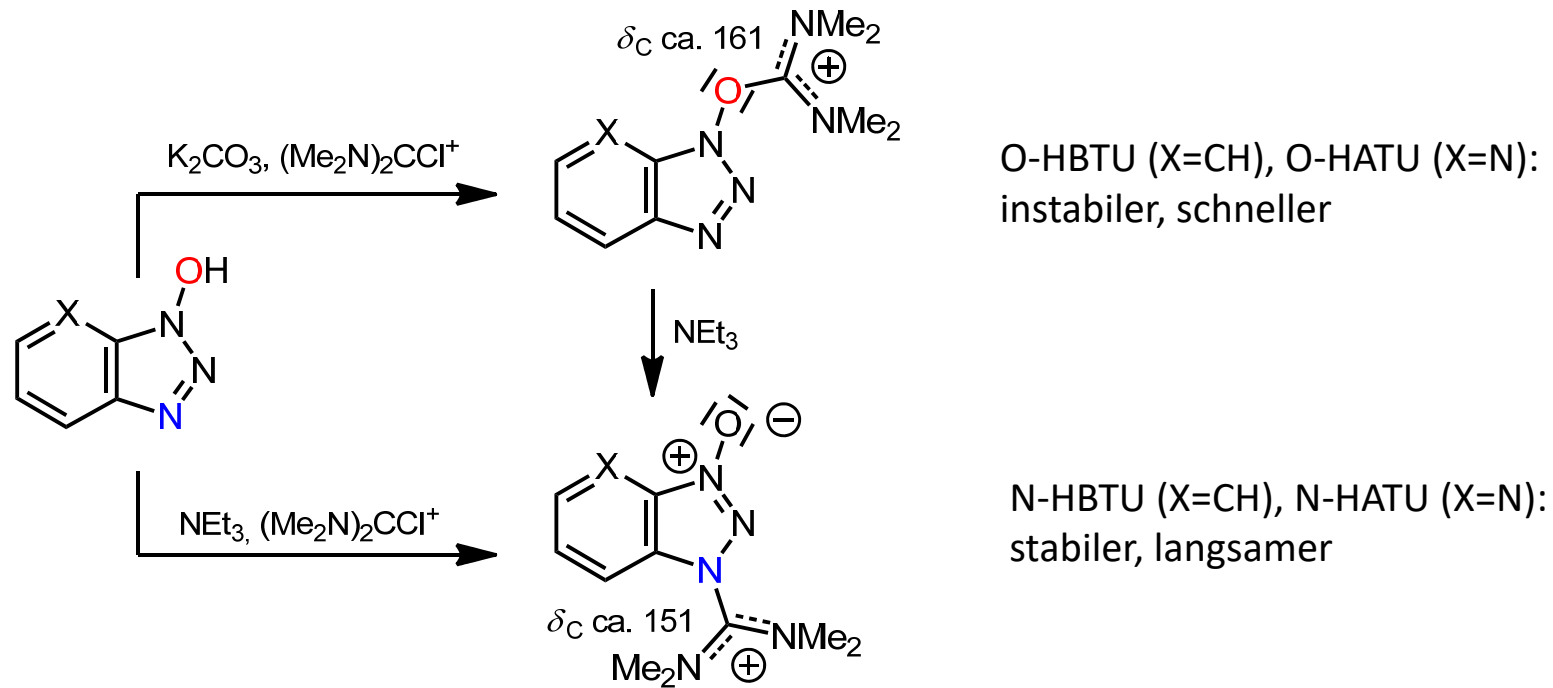


Nukleophile Katalyse

Vergleich: Albericio et al., *JOC* **1998**, 9678.

C. Peptide - C.3. Synthese

Für HBTU und HATU wurden zunächst (1978 bzw. 1993) Uroniumsalz-Strukturen angenommen, die später zu Guanidiniumsalz-Strukturen revidiert wurden.



Carpino et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 442

Genauer Vergleich:

Table 2. Cyclization of H-Ala-Ala-Ala-BnAla-Ala-Ala-OH with O- and N-isomers of HBTU and HATU, %^[a]

	O-HBTU	N-HBTU	O-HATU	N-HATU
<i>all</i> -L-linear peptide ^[b]	11.6(48.4) ^[c]	9.0(91.2) ^[c]	7.5(27.7) ^[c]	0(45) ^[c]
<i>all</i> -L-cyclic monomer	31.4(18.4)	37.6(3.0)	56.3(46.5)	68.4(32.0)
epimeric cyclic monomer	7.5	4.2	4.1	< 4

[a] 10^{-3} M in DMF, coupling reagent (1.1 equiv), TMP (2 equiv), DIEA (1 equiv), HPLC analysis after 60 min. [b] epimerized linear precursor cannot be excluded. [c] values in parentheses are HPLC values after 15 sec.

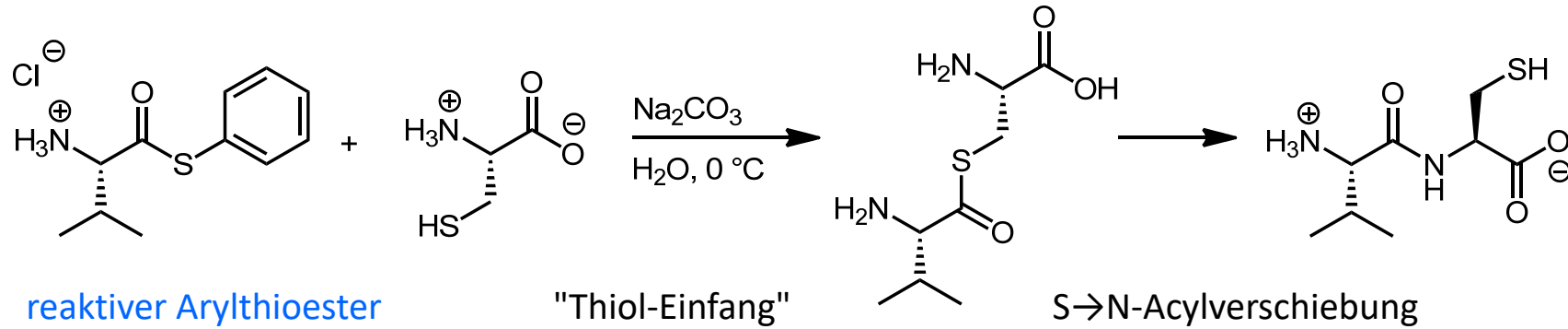
TMP: 2,4,6-Trimethylpyridin (Collidin); DIEA: Diisopropylethylamin (Hünig-Base)

aus: Carpino et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 442

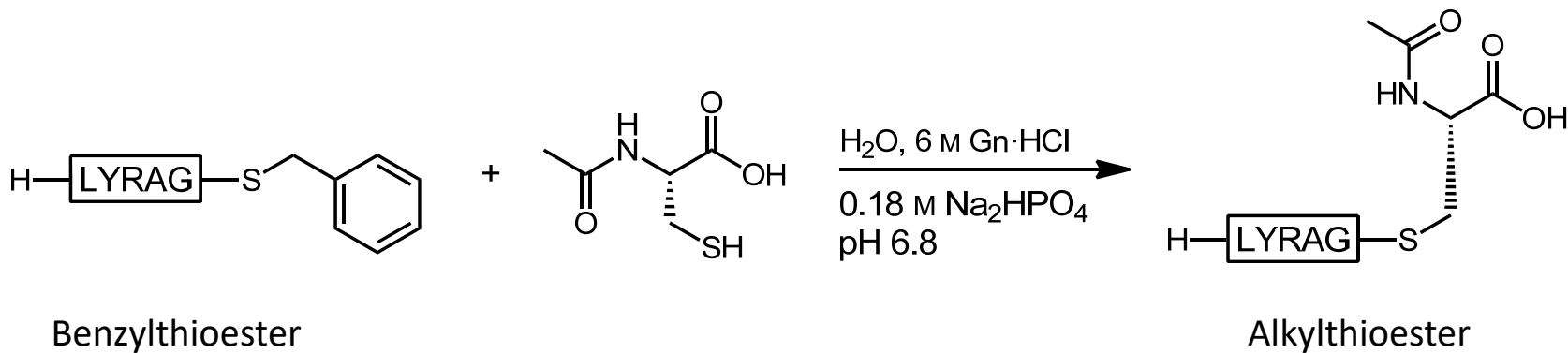
C. Peptide - C.3. Synthese

Verknüpfung von Peptiden ["native chemical ligation (NCL)"]

Theodor Wieland, 1953:



Kent, 1994: Isolierung des Thio(l)ester-Intermediats nach Reaktion von N-acetyliertem Cystein

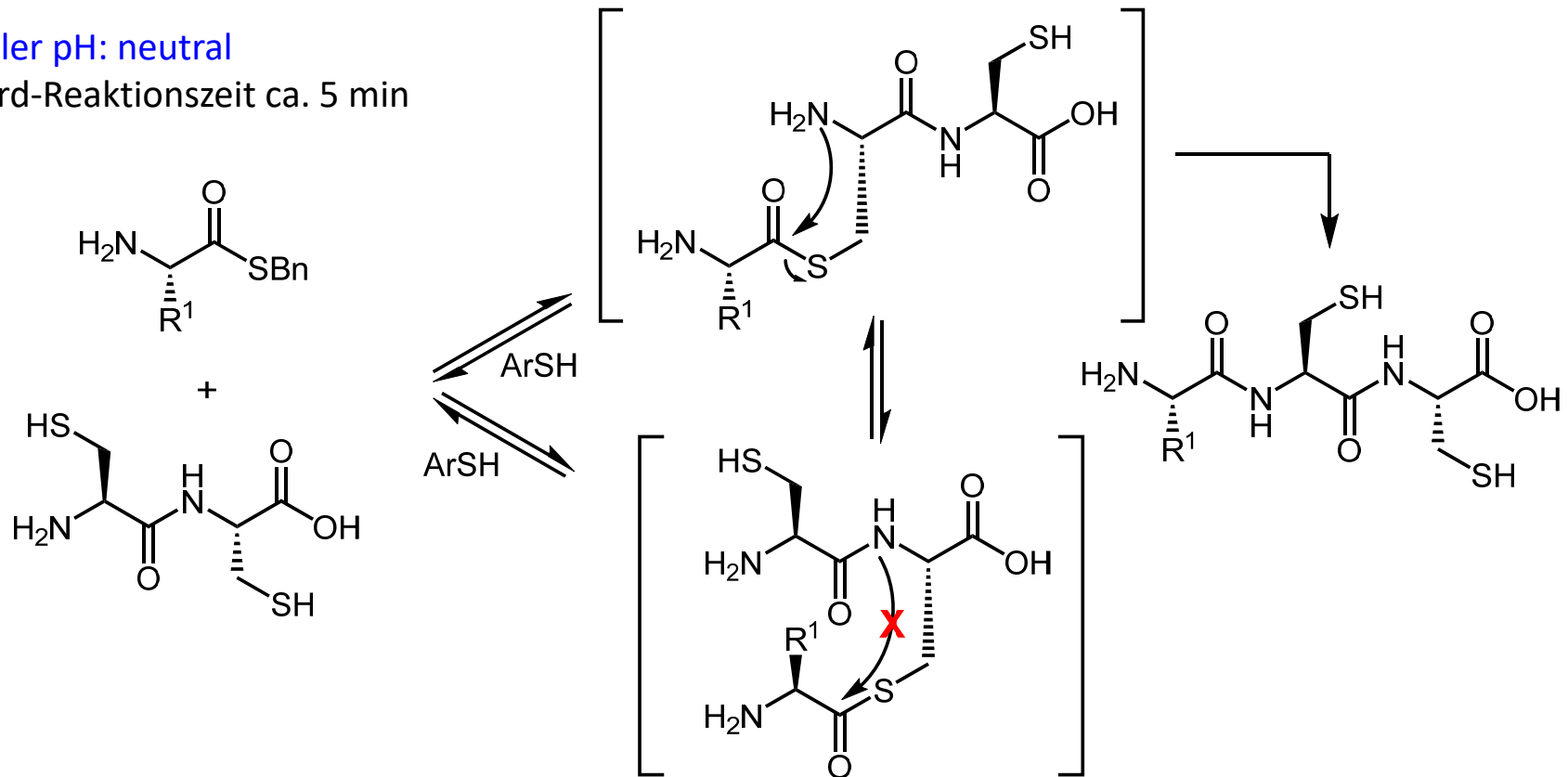


C. Peptide - C.3. Synthese

Nicht-N-terminale Cystein-Seitenketten bilden reversibel Thioester, die jedoch keine irreversible Zyklisierung zum Amid eingehen können.

optimaler pH: neutral

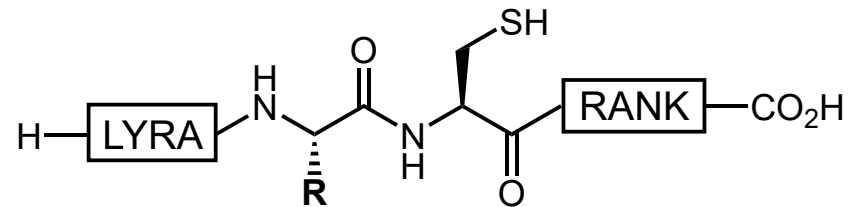
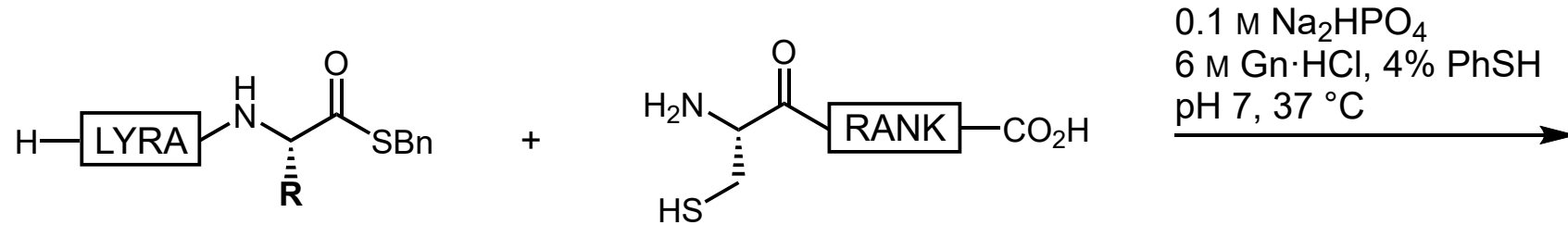
Standard-Reaktionszeit ca. 5 min



Zusatz katalytischer Mengen Thiophenol bei Kupplung von Benzylestern estert diese in schneller reagierende Phenylthioester um.

C. Peptide - C.3. Synthese

Einfluss der C-terminalen Aminosäure:



NCL desto langsamer, je
sterisch anspruchsvoller R:

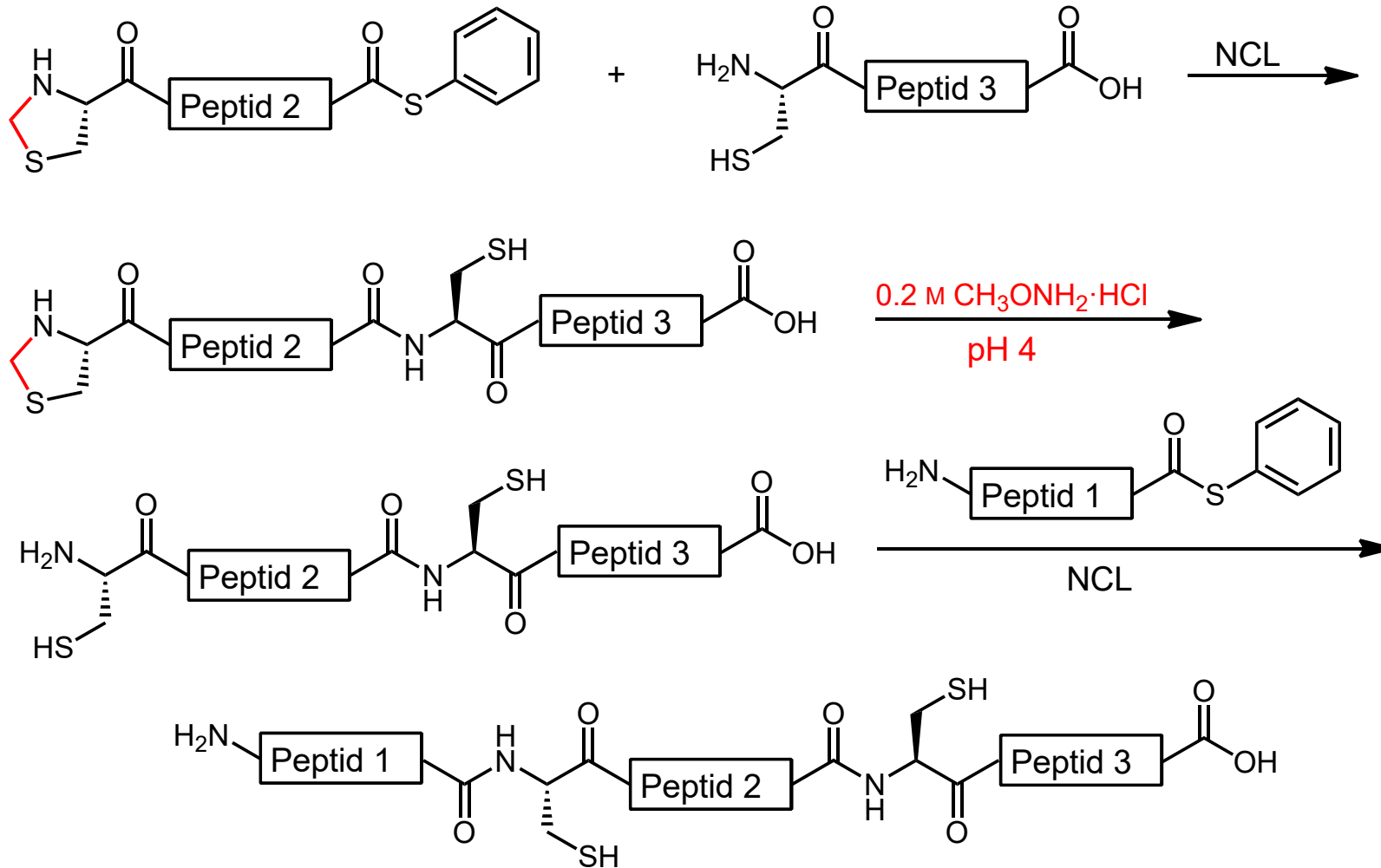
G, C, H: < 4 h
A, M, F, W, Y: < 9 h
R, N, D, E, Q, K, S: < 24 h
I, L, P, T, V: < 48 h

Rolle Thiophenol:



C. Peptide - C.3. Synthese

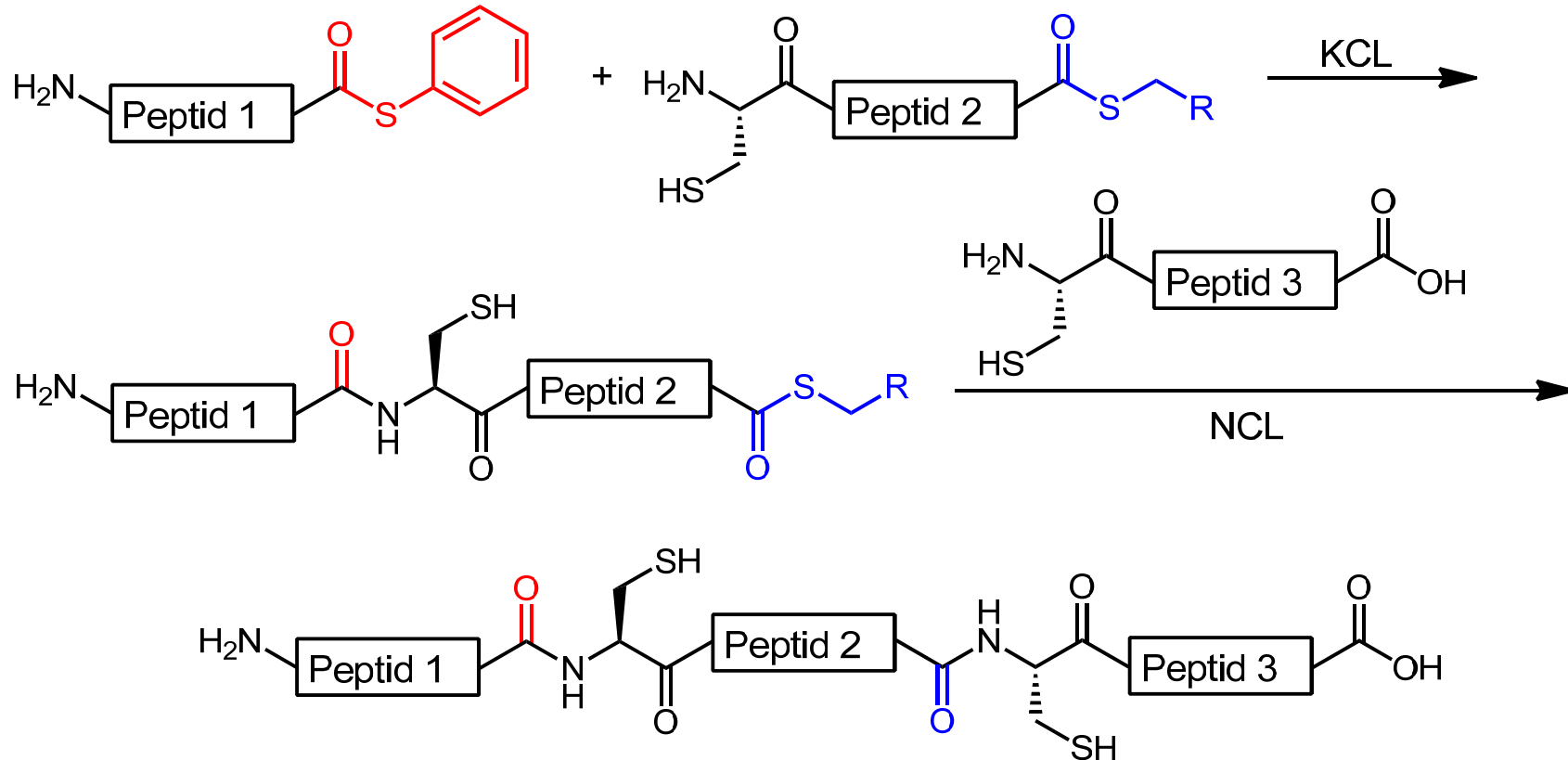
Schutz N-terminalen Cysteins als Thiazolidin: Verknüpfung dreier Sequenzen in C→N-Richtung



C. Peptide - C.3. Synthese

3 Teilsequenzen in N→C-Richtung: "Kinetisch kontrollierte Ligation (KCL)"

Thiophenyl- reagieren schneller als Thiobenzylester:



KCL nur dann selektiv, wenn die C-terminale Aminosäure des N-terminalen Peptids mind. genauso schnell reagiert wie die des C-terminalen (s. 4 Kategorien bei NCL).

C. Peptide - C.3. Synthese

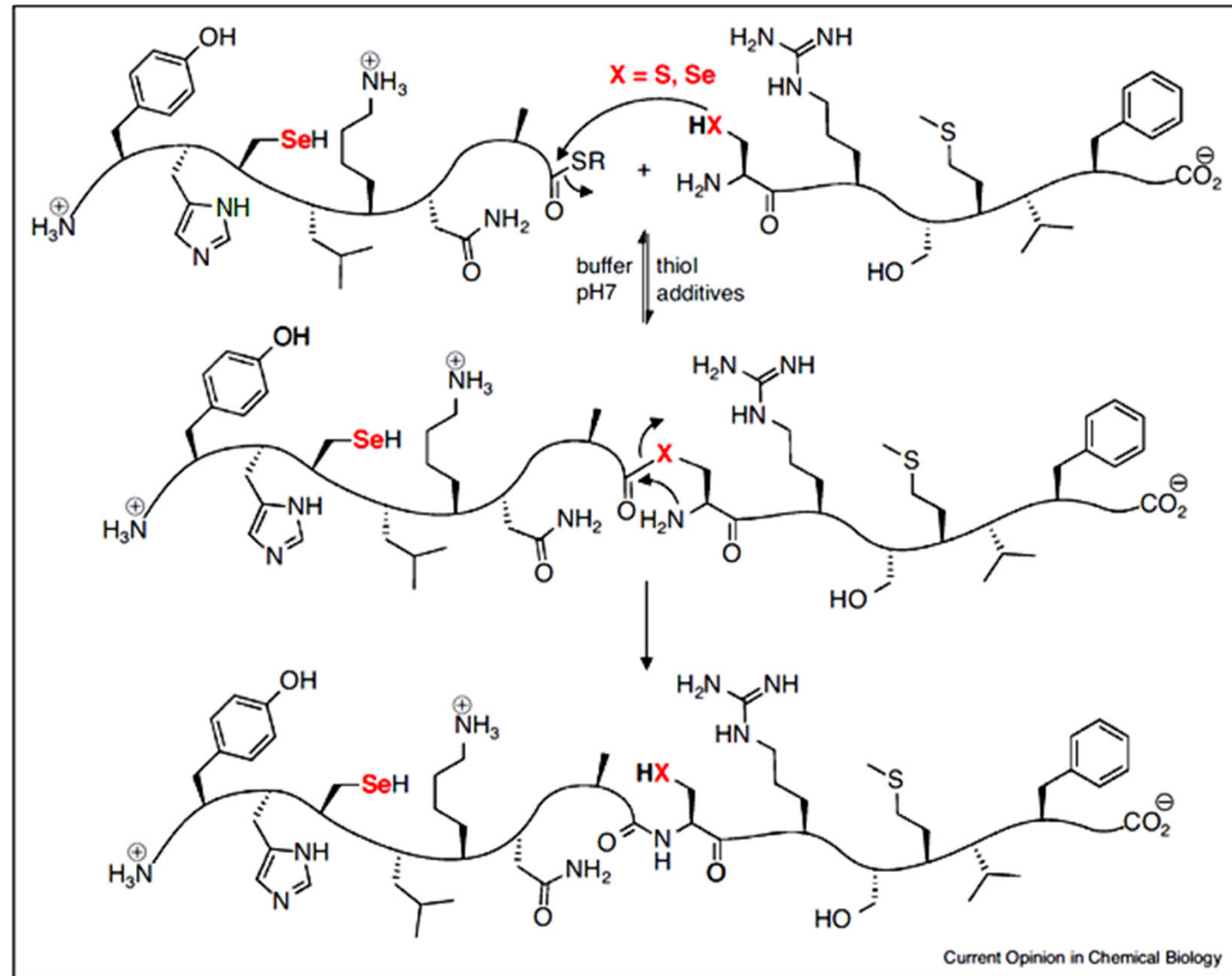
NCL, auch mit
Selenocystein

aus:

*Curr. Opin. Chem.
Biol.* **2014**, 22, 27;

Festphasen-Synthese
der *ungeschützten*
Bausteine,

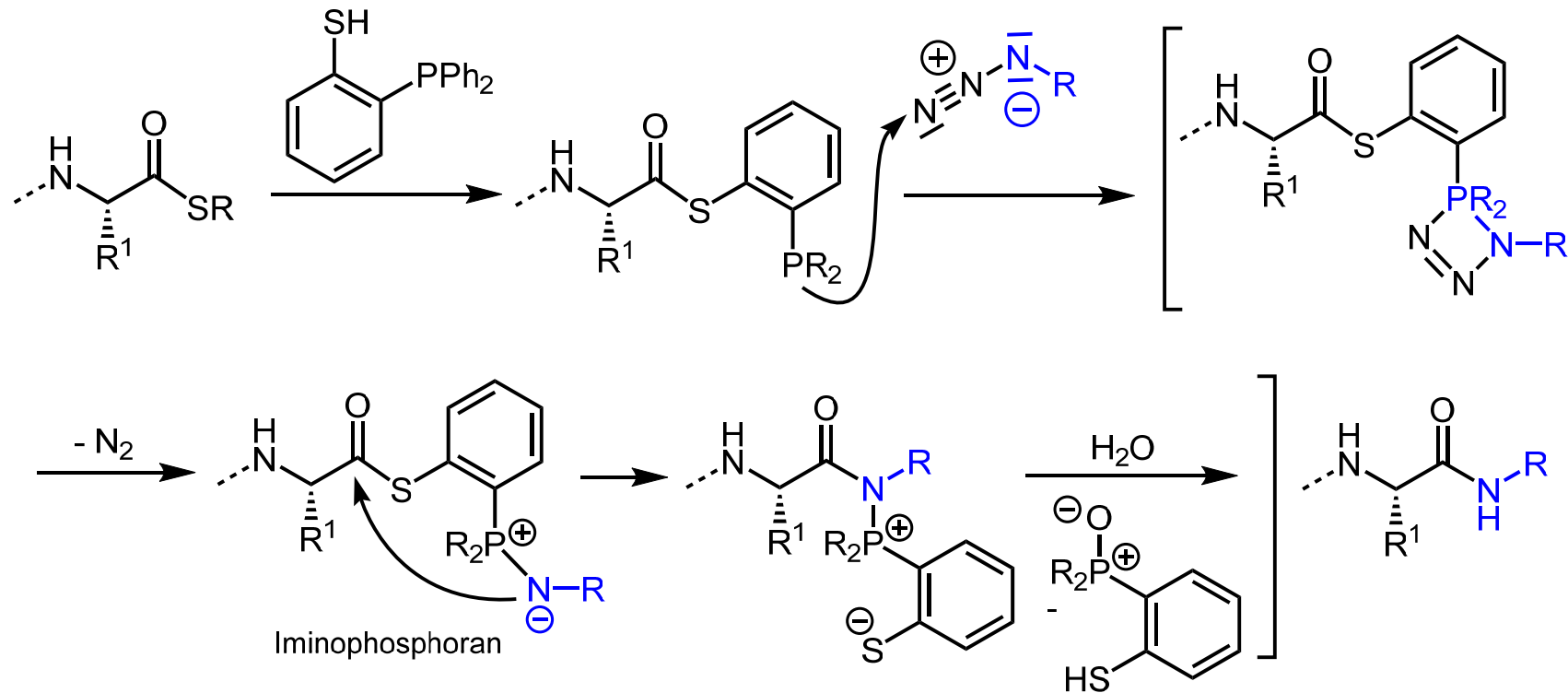
Native Chemical
Ligation zu deren
konvergenter
Verknüpfung.



C. Peptide - C.3. Synthese

Staudinger-Verknüpfung von Peptiden: R muss kein Cystein sein, sondern wird als Azid angeboten.

Reaktionsbedingungen z. B. THF/H₂O 3:1, rt, 12 h, > 90%; Carolyn Bertozzi et al., 2000

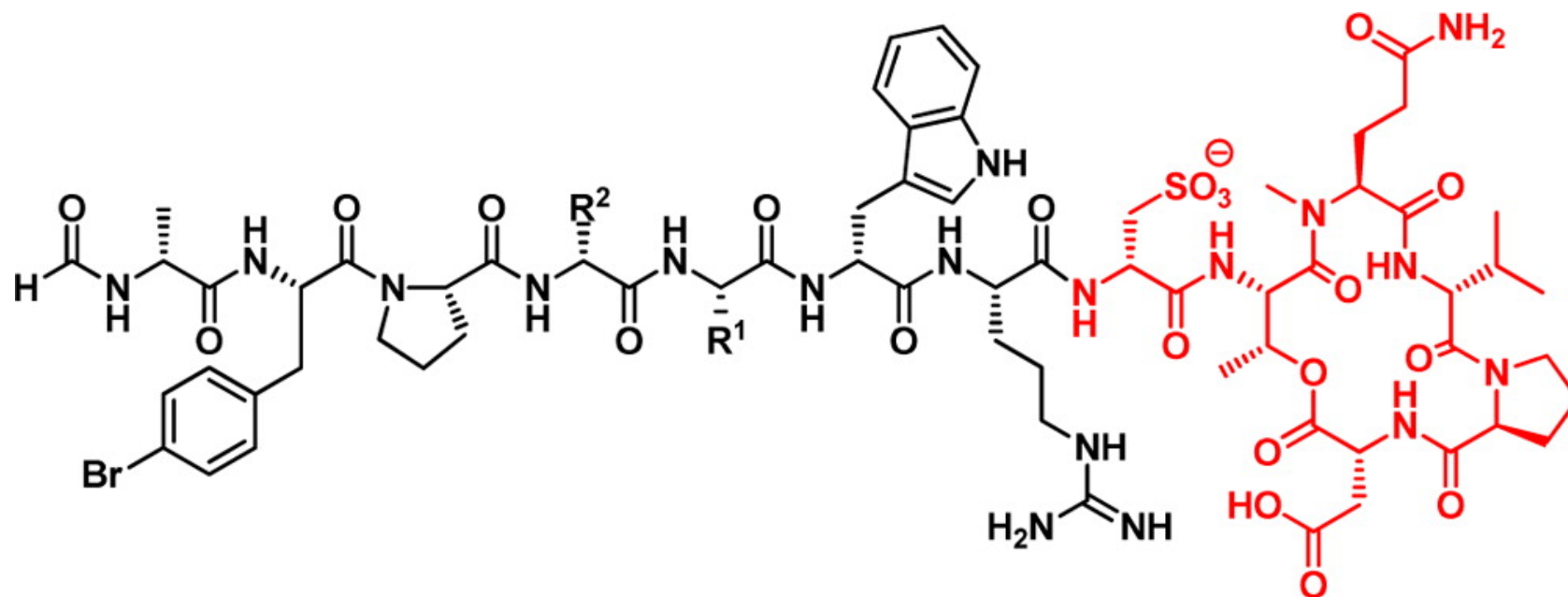


Darstellung des Thioesters aus der Säure durch DCC/HOBt-Kupplung mit RSH.

C. Peptide - C.3. Synthese

Totalsynthese durch NCL: z. B. Polydiscamide aus dem Meeresschwamm *Ircinia* sp.

Beide Teile durch Festphasen-Synthese, Verknüpfung durch NCL.



Polydiscamide B (1) : R¹ = C(CH₃)₂CH₂CH₃, R² = C(CH₃)₃,

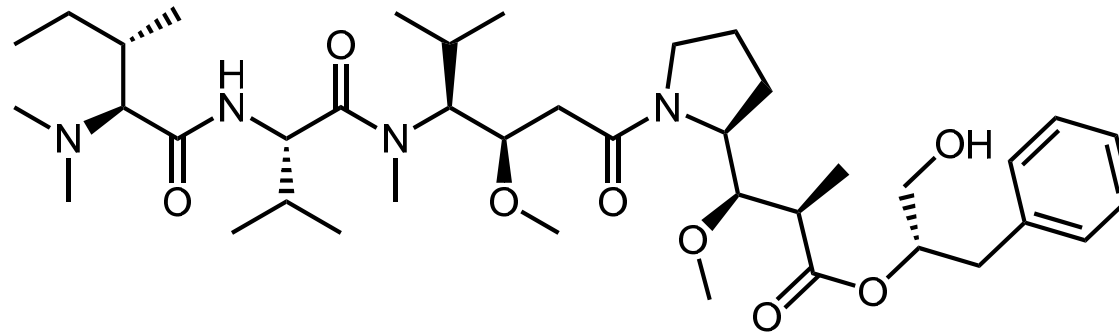
Polydiscamide C (2) : R¹ = C(CH₃)₂CH₂CH₃, R² = CH(CH₃)₂,

Polydiscamide D (3) : R¹ = C(CH₃)₃, R² = CH(CH₃)₂

Payne et al., *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4500

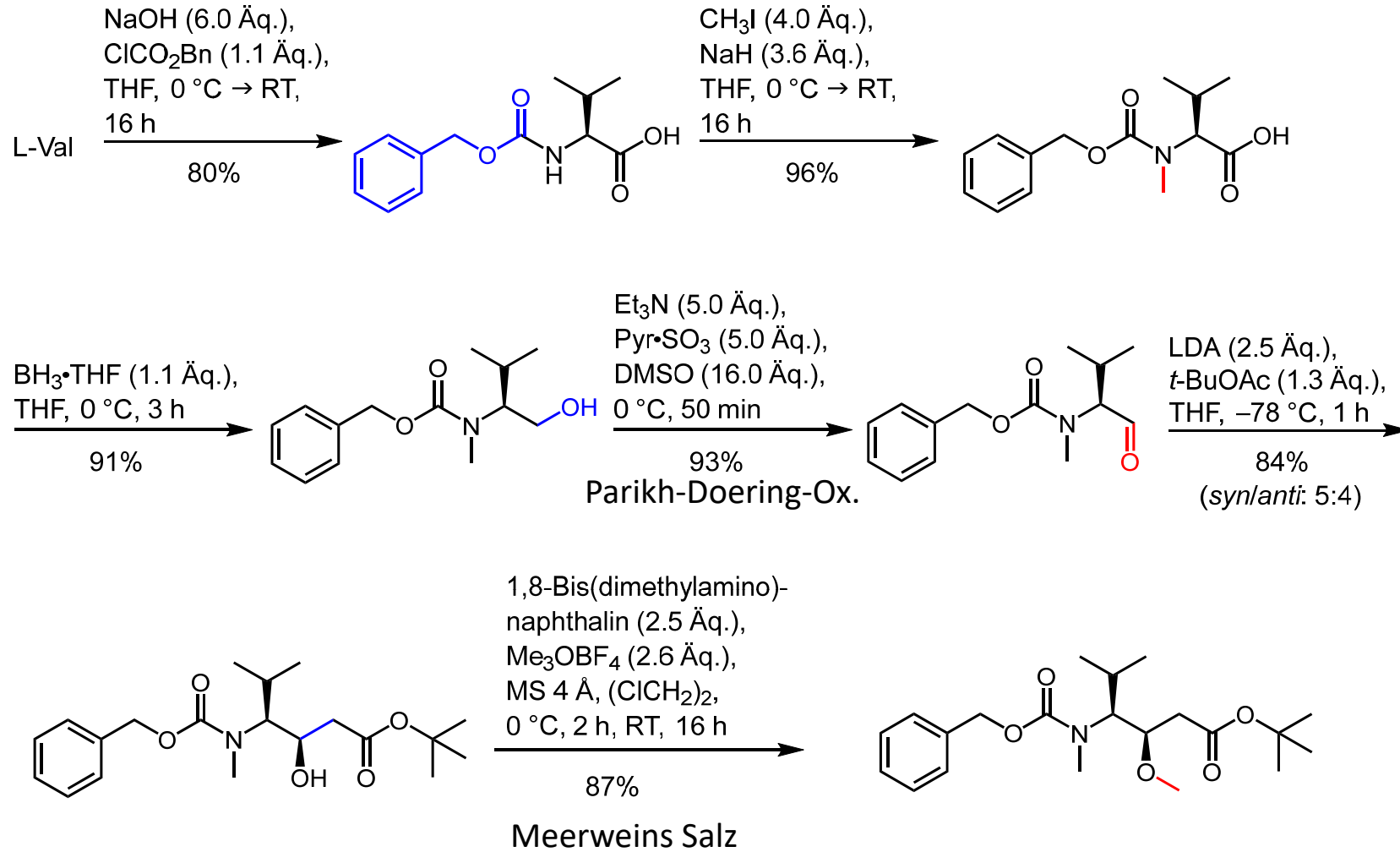
C. Peptide - C.3. Synthese

Stark zytotoxischer Naturstoff Malevamid D aus dem Cyanobakterium *Symploca hydroides*:
nicht-ribosomales Peptid, hemmt die Tubulin-Polymerisation



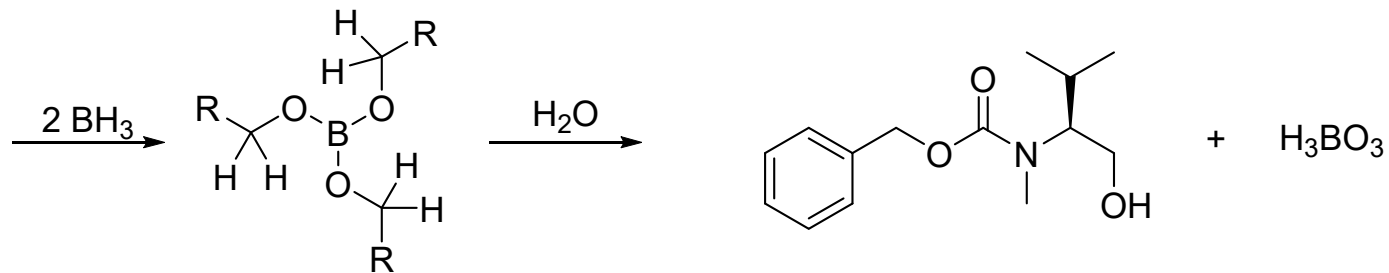
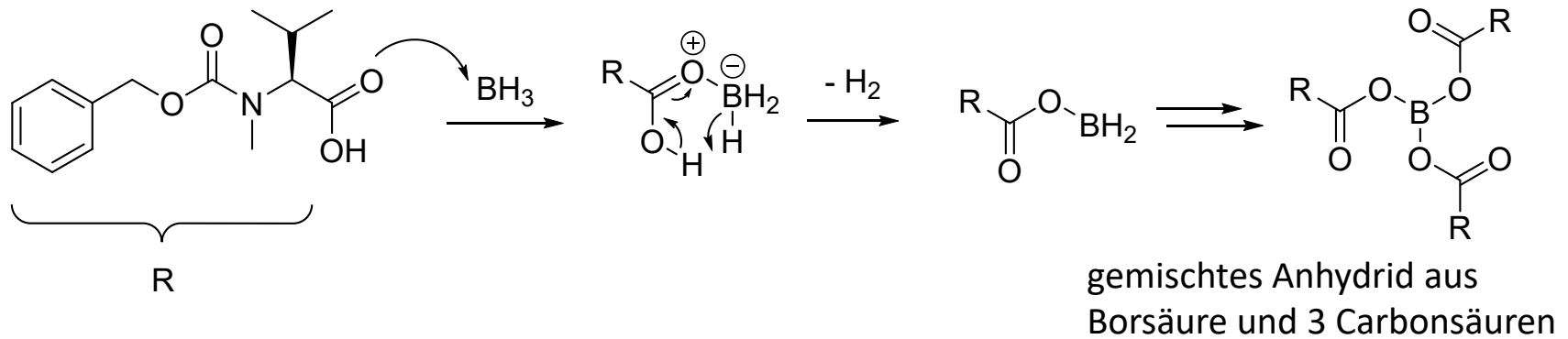
C. Peptide - C.3. Synthese

Zur Westhälfte von Malevamid D



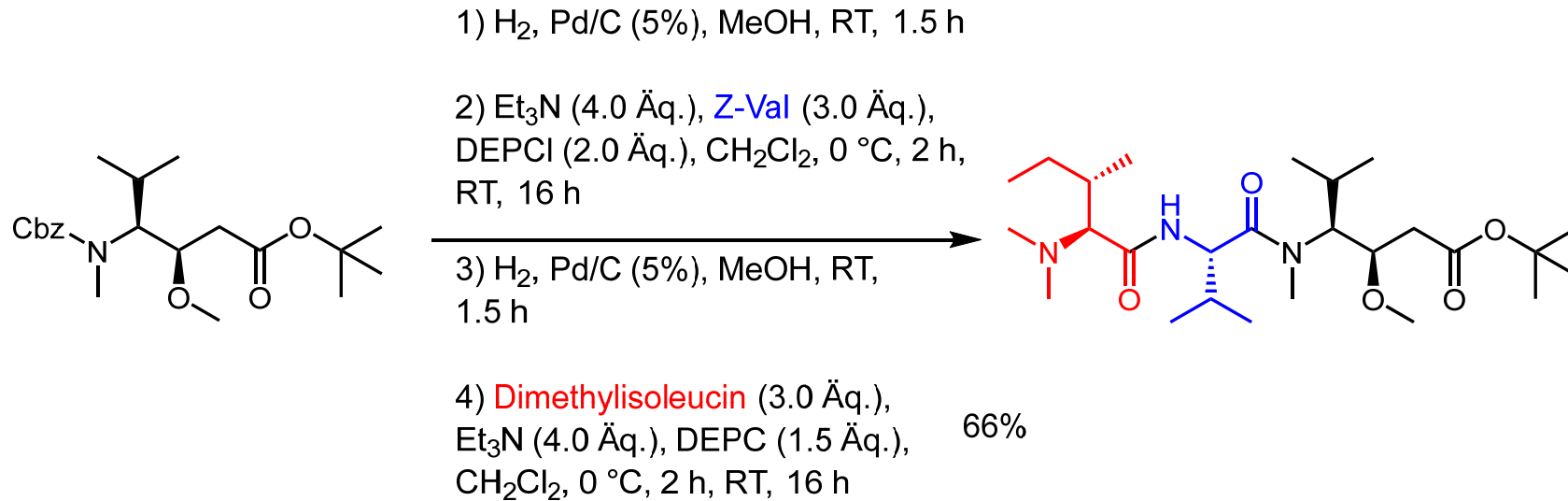
C. Peptide - C.3. Synthese

Mechanismus der Carbonsäure-Reduktion mit Boran:

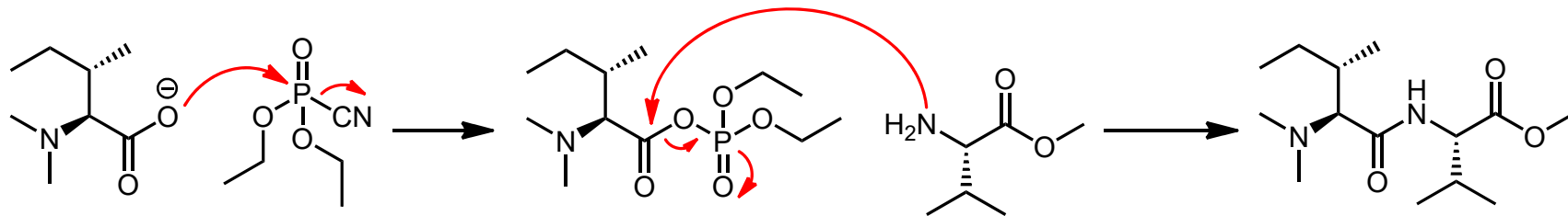


C. Peptide - C.3. Synthese

Westhälfte von Malevamid D



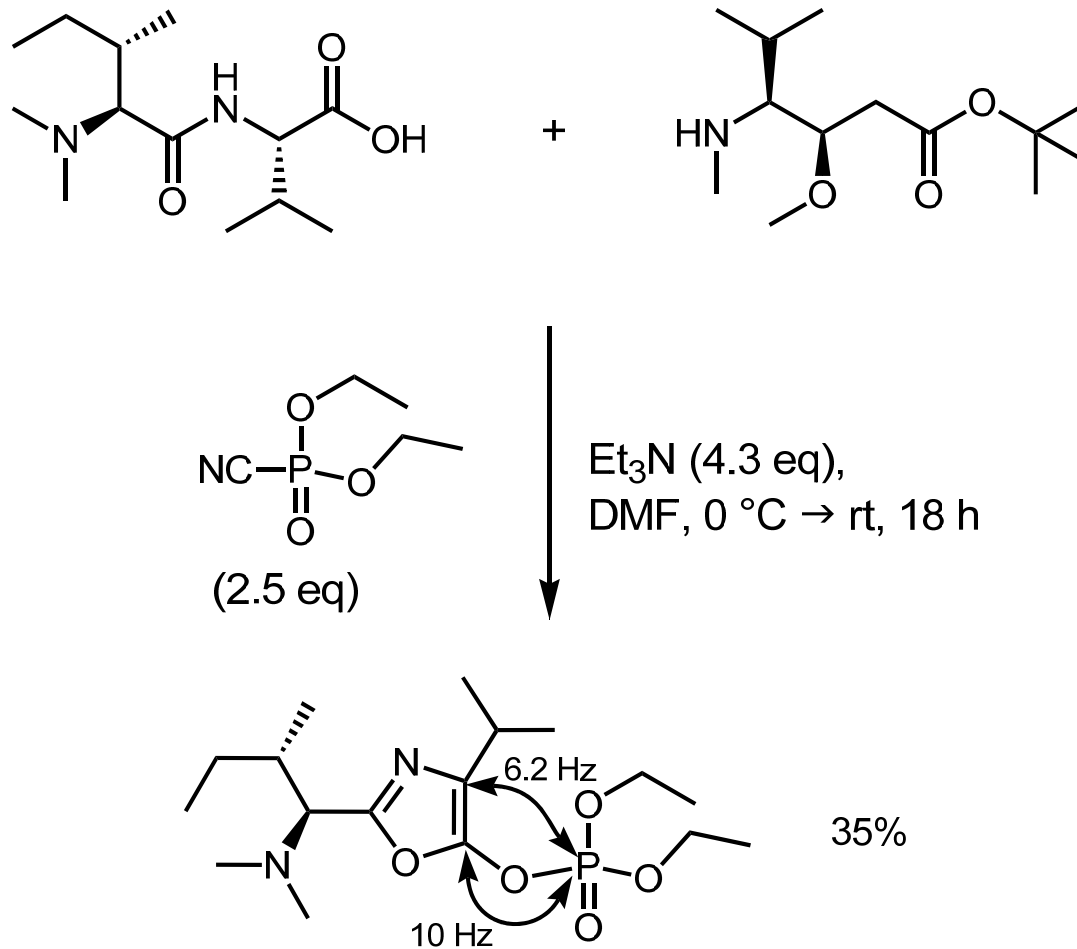
DEPC (Diethylcyanophosphonat, Diethylphosphorylcyanid), ein Kupplungsreagenz:



Analog: DEPCI (Diethylphosphorochloridat)

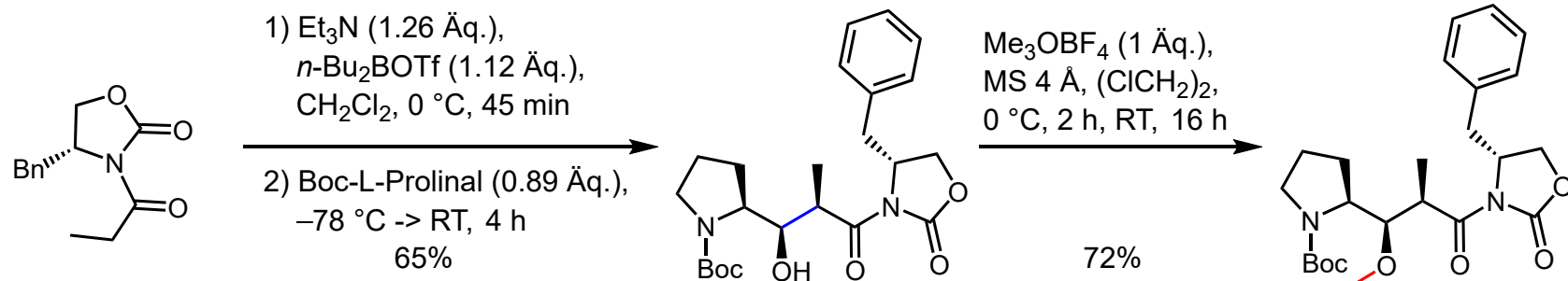
C. Peptide - C.3. Synthese

Nebenreaktion bei versuchter DEPC-Kupplung: Formulieren Sie einen Mechanismus!

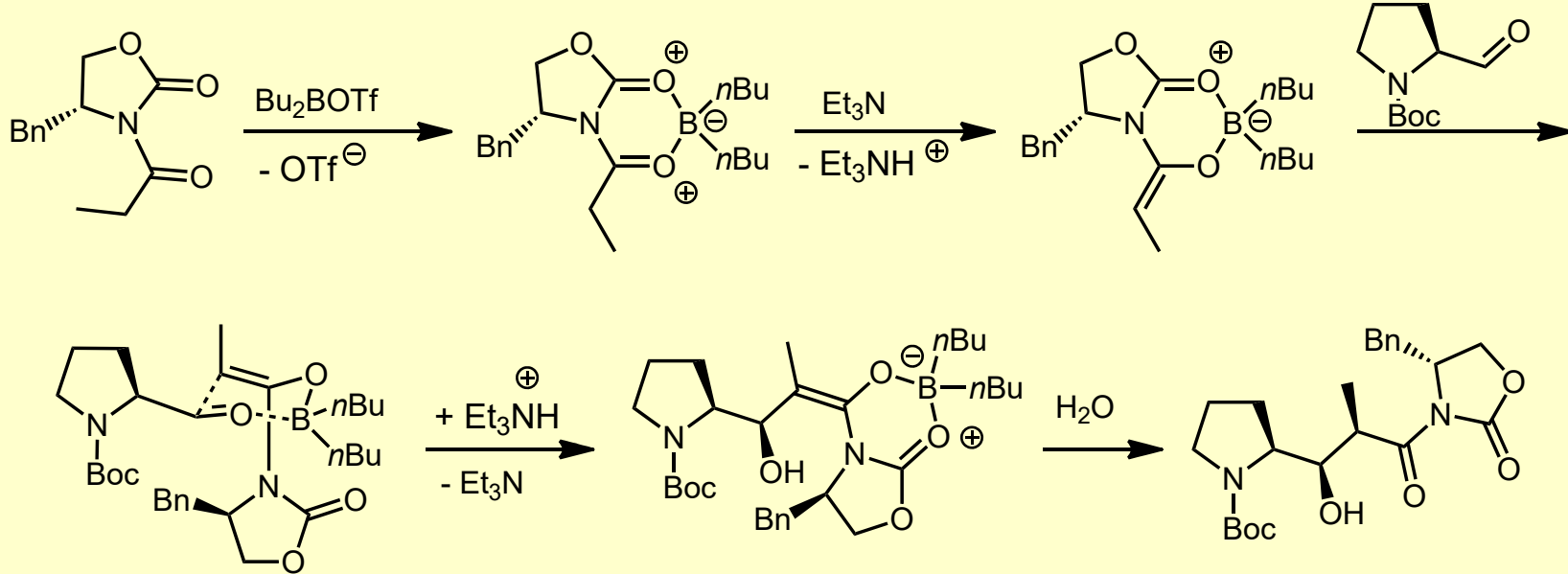


C. Peptide - C.3. Synthese

Evans-Aldol-Addition:

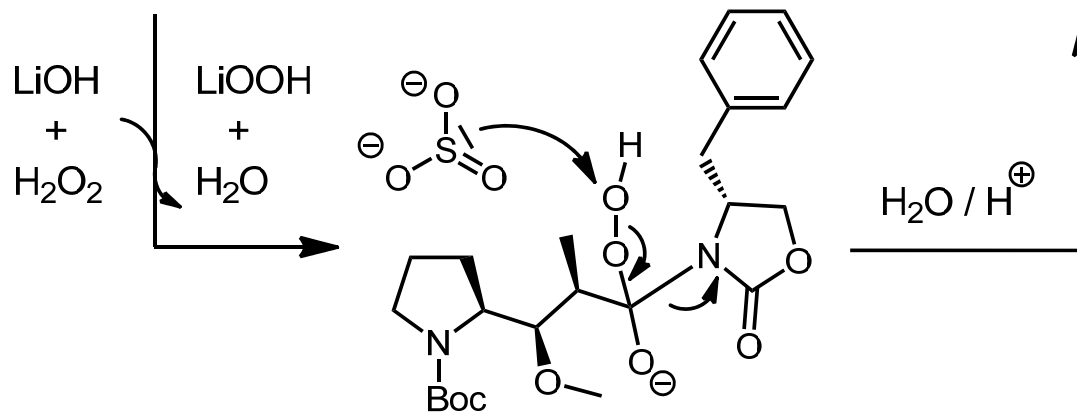
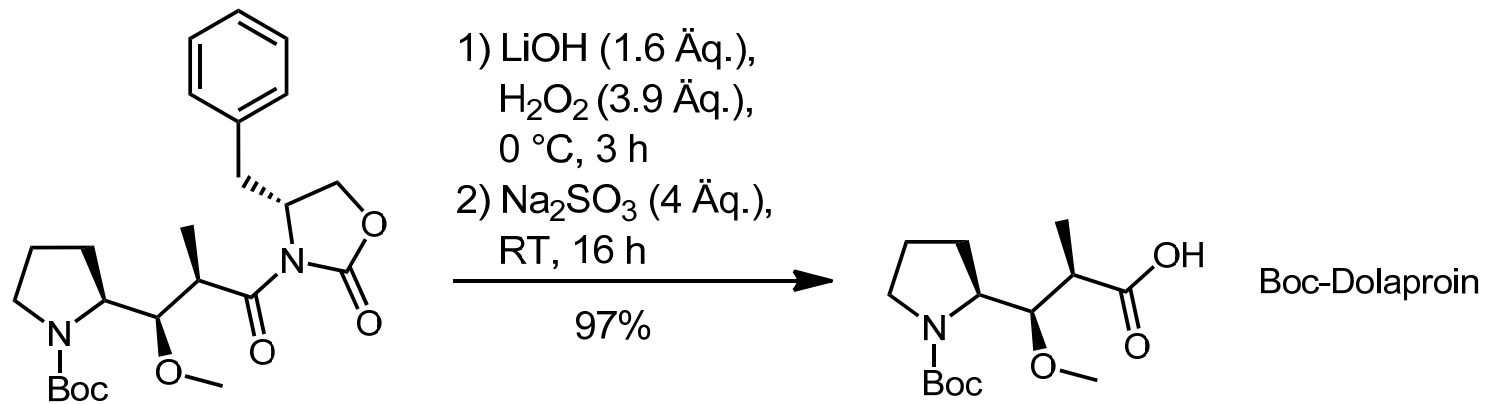


Mechanismus:



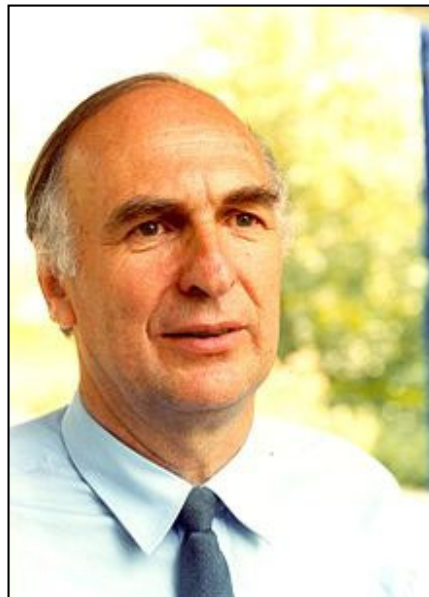
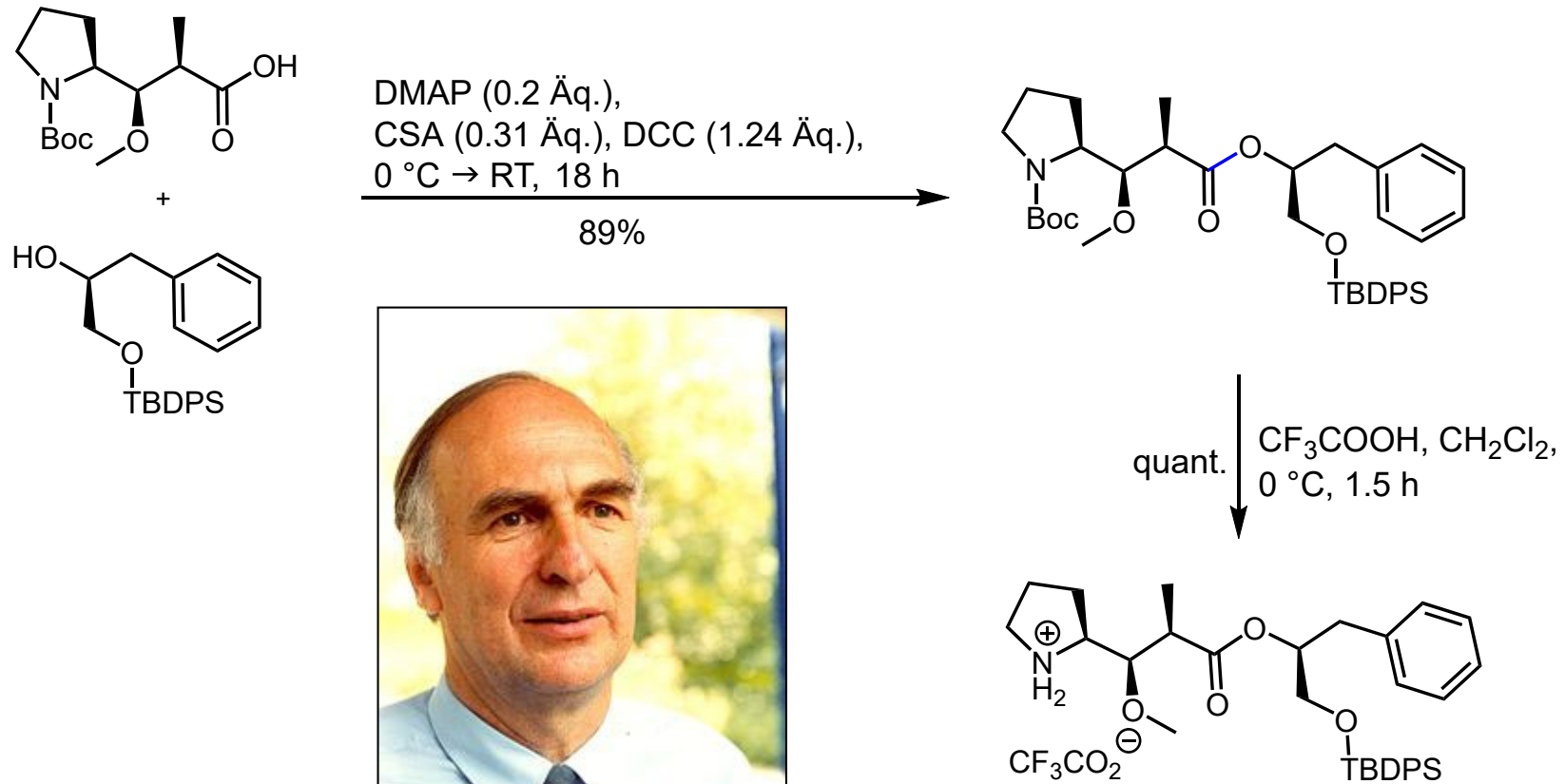
C. Peptide - C.3. Synthese

Abspaltung des Evans-Auxiliars:



C. Peptide - C.3. Synthese

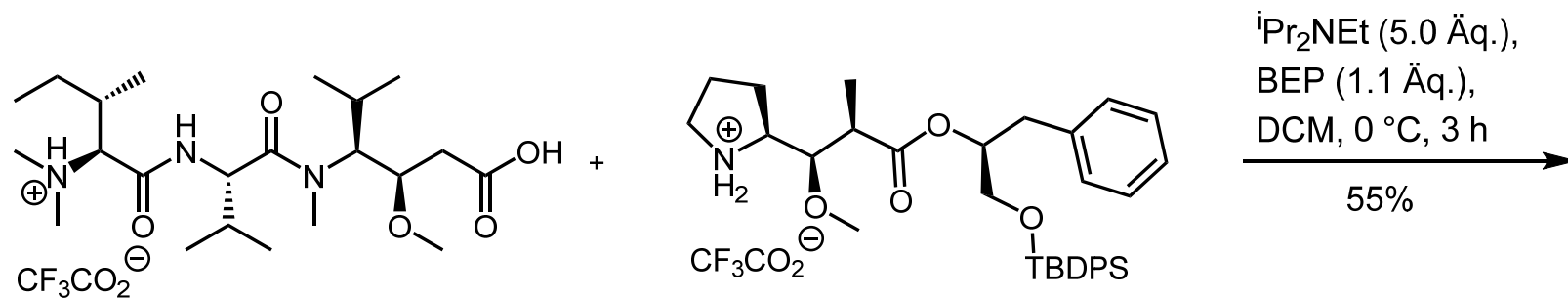
Steglich-Veresterung zur Osthälfte von Malevamid D:



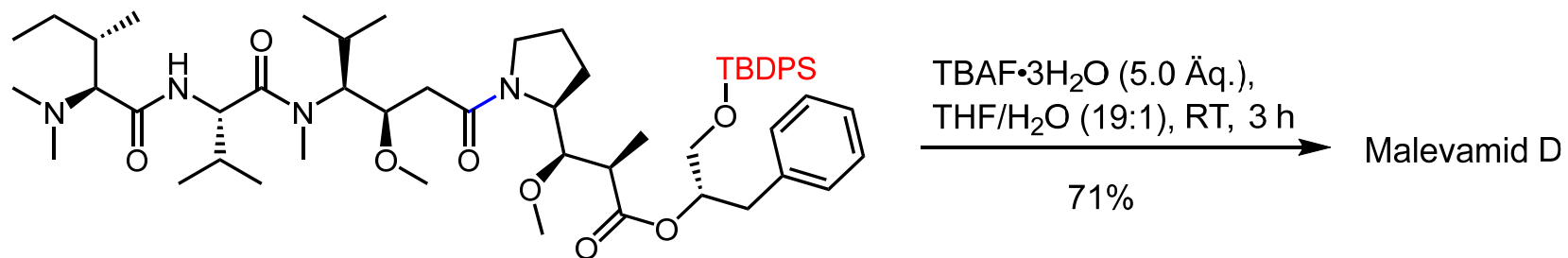
Wolfgang Steglich (*1933)

C. Peptide - C.3. Synthese

Endgame:

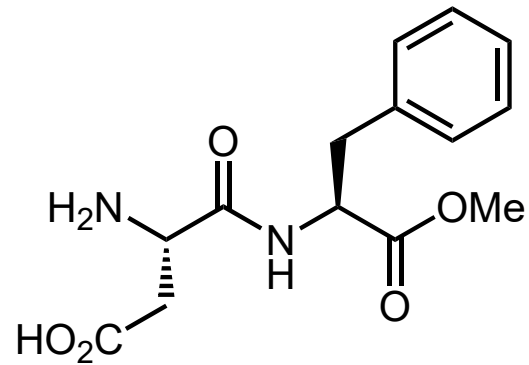


BEP: 2-Brom-1-ethylpyridiniumtetrafluoroborat

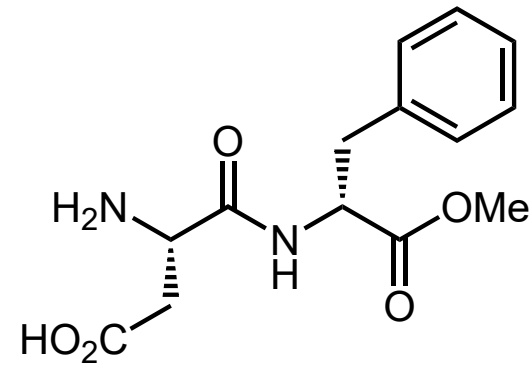


C. Peptide - C.3. Synthese

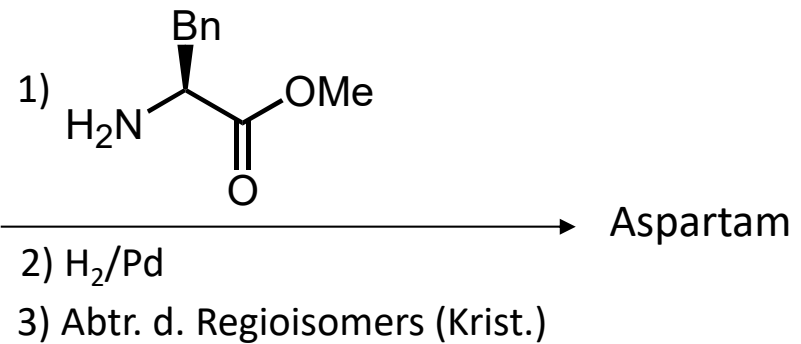
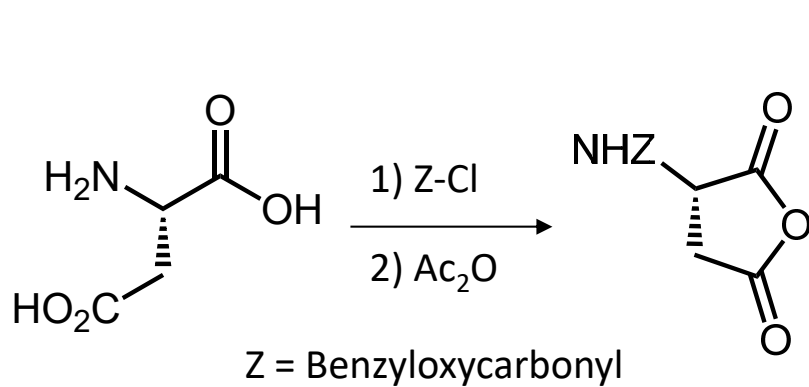
Aspartam



H₂N-D-F-OMe:
150-fach süßer als Rohrzucker (1965)

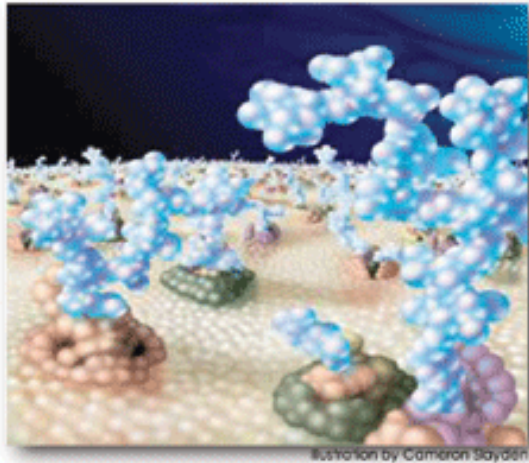


H₂N-D-f-OMe:
bitter

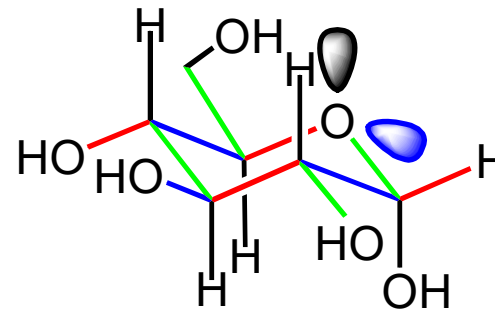


Süßstoffe: *Angew. Chem.* **1998**, 1900.

D. Saccharide - D.1. Struktur



Zelloberfläche mit *glycosylierten* Membranproteinen
(from: Homepage of Carolyn Bertozzi, Berkeley)



α -D-Glucose (α -D-Glc),
Pyranose-Form.

axiale Subst. senkrecht,
farbiges parallel zeichnen.

9 Monosaccharide in eukaryontischen Glycoproteinen bedeutend:

Aldosen:

C_6 : D-Glucose (Glc), D-Glucuronsäure (GlcA), D-N-Acetylglucosamin (GlcNAc), D-Galactose (Gal), D-N-Acetylgalactosamin (GalNAc), D-Mannose (Man), L-Fucose (Fuc)

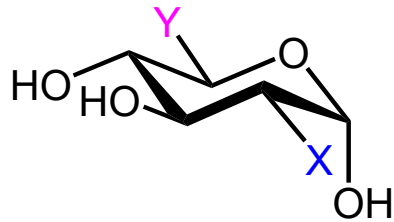
C_5 : D-Xylose (Xyl)

C_9 : Ketose D-N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)

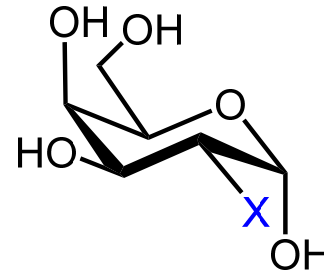
Review: *Chem. Rev.* **2018**, 8359

D. Saccharide - D.1. Struktur

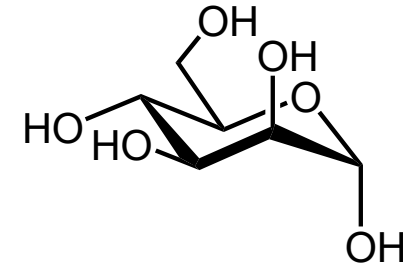
Wichtige Monosaccharide



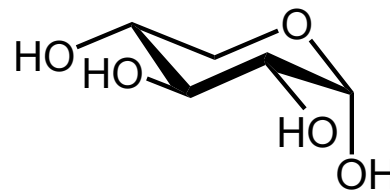
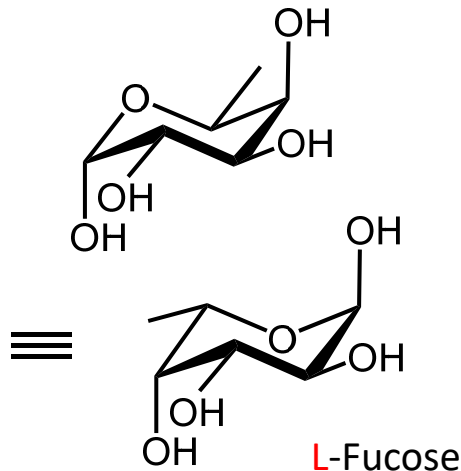
X=OH, Y=CH₂OH: D-Glucose
X=OH, Y=CO₂H: D-Glucuronsäure
(nicht Gluconsäure!)
X=NHAc, Y=CH₂OH: D-GlcNAc



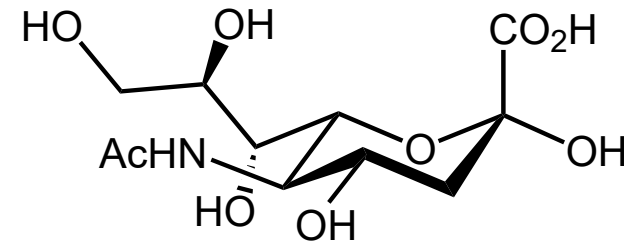
X=OH: D-Galactose
X=NHAc: D-GalNAc



D-Mannose



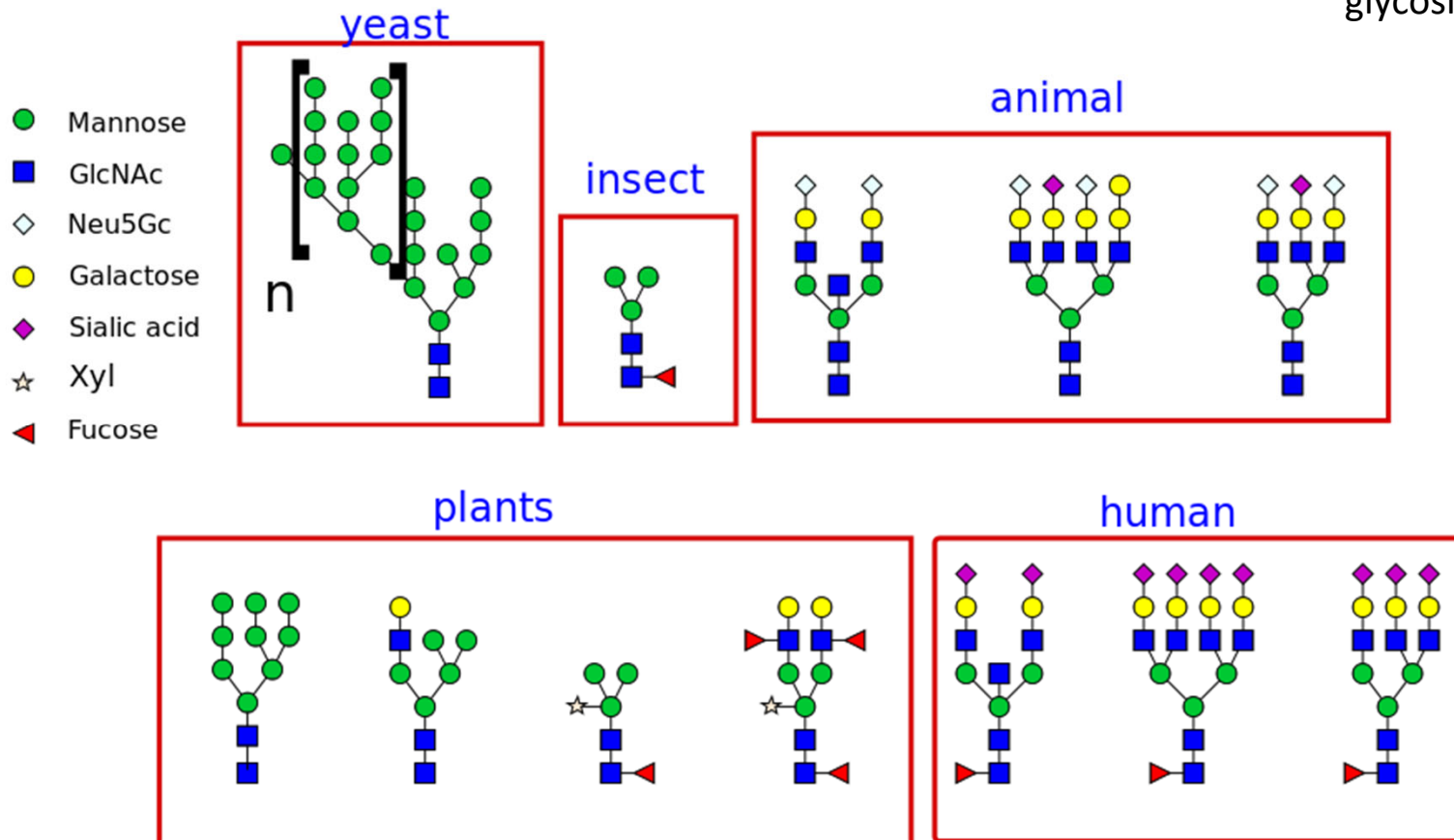
D-Xylose



D-N-Acetylneuraminsäure
(eine Sialinsäure; griech. σιαλον, Speichel)

Glycan-Typen (Skizze) bei verschiedenen Organismen

Verzweigung: 1,4- und 1,6-glycosidische Bindungen



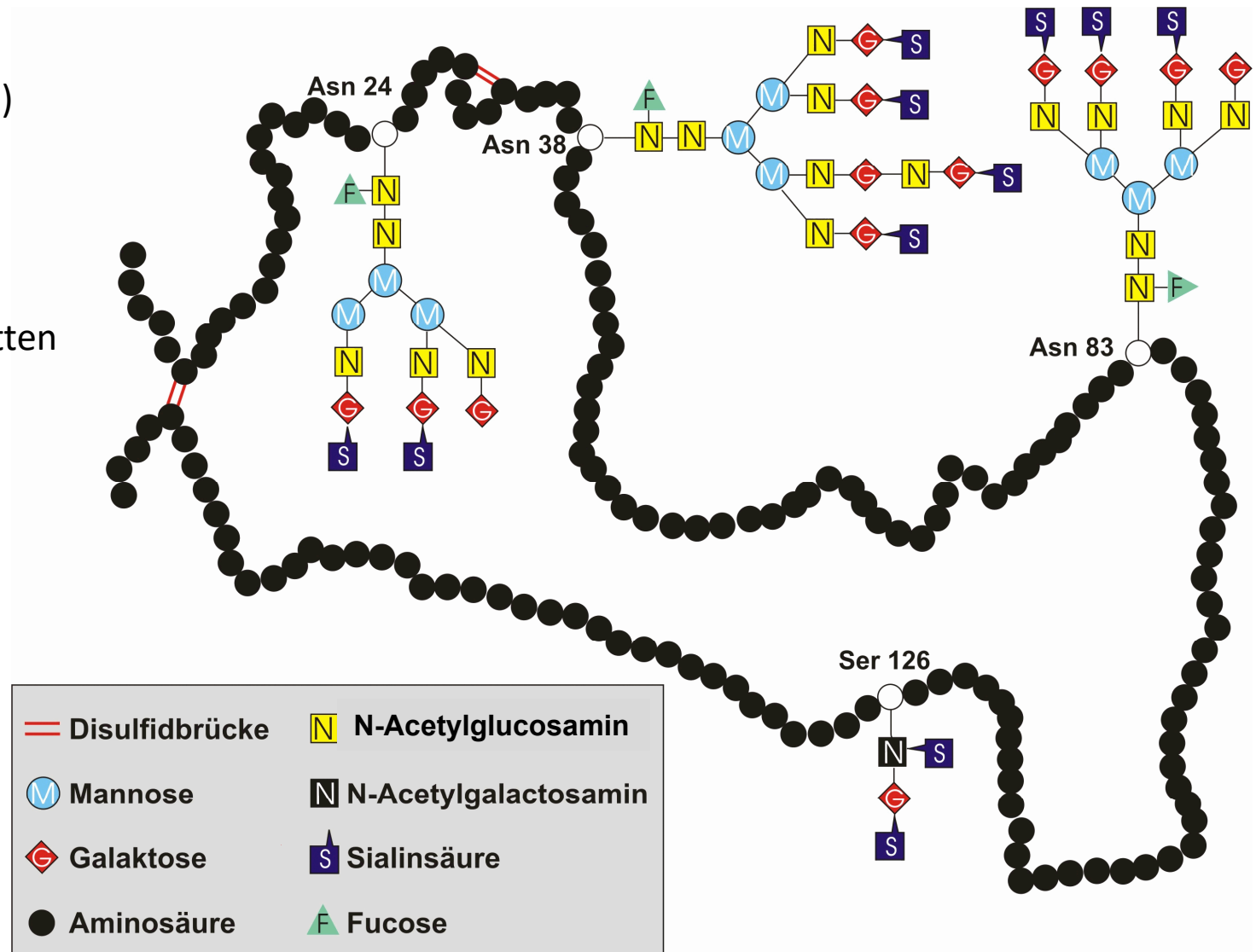
Oligosaccharid gebunden z. B. an den Stickstoff von Asparagin- (N-Glycan) oder den Sauerstoff von Serin-Seitenketten (O-Glycan) von Proteinen

D. Saccharide - D.1. Struktur

Glycosylierung des
Glykoprotein-Hormons
Erythropoietin (165 A.-s.)

Wachstumsfaktor bei
Erythrozyten

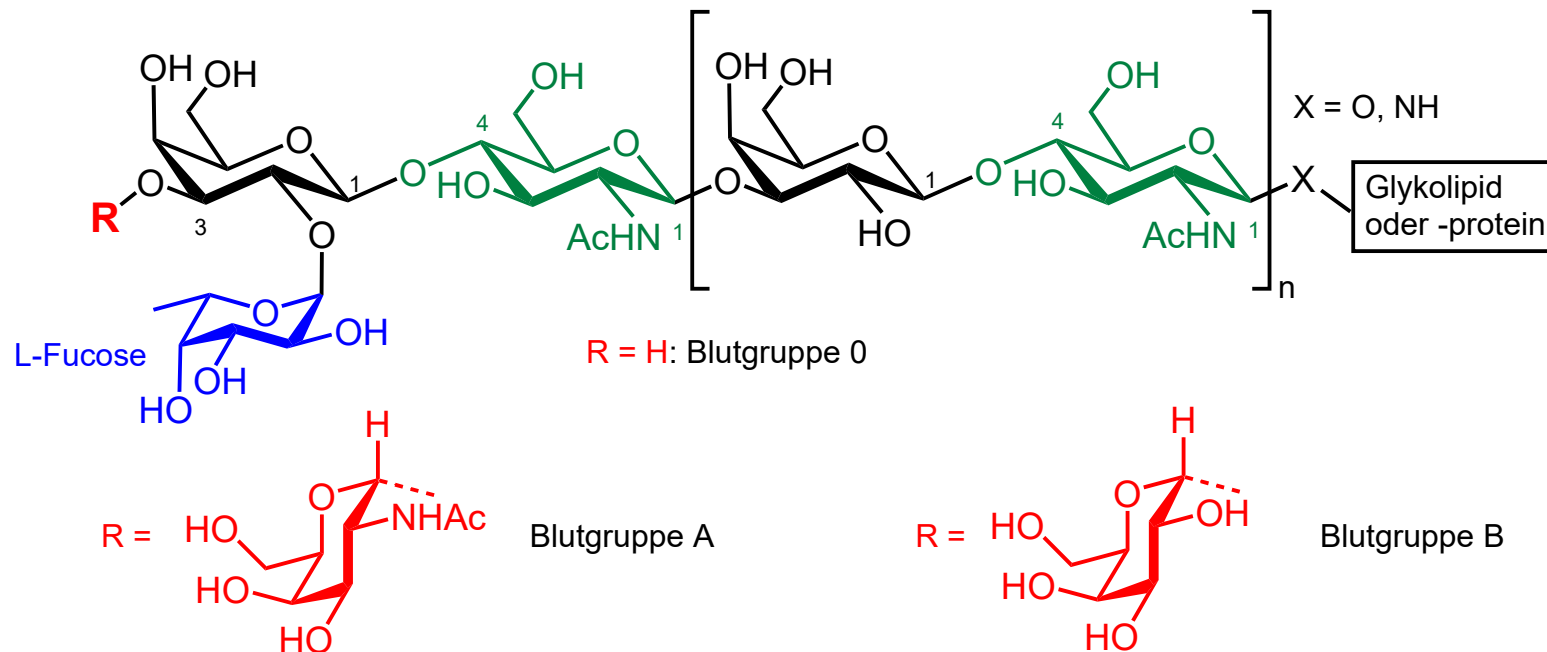
Oligosaccharid-Seitenketten
können variieren.



D. Saccharide - D.1. Struktur

Die **Blutgruppe** wird durch die Termini der an Glykolipide und -proteine von Erythrozyten, Endothelial- und (den meisten) Epithelialzellen gebundenen Oligosaccharide bestimmt.

Polylactosamin-Kette (z. B. $[\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow3)]_n$)
verknüpft ABH-Antigen mit Glykolipiden und -proteinen.

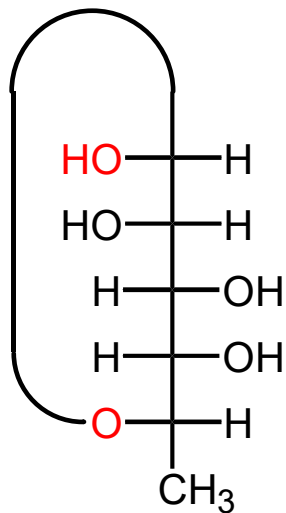


D. Saccharide - D.1. Struktur

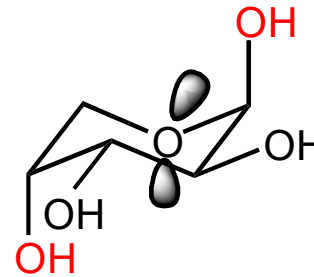
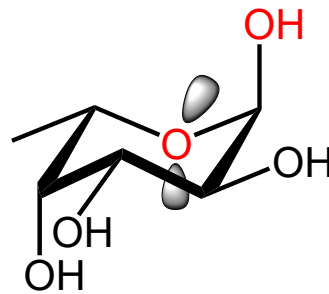
D,L-Nomenklatur: Rückführung auf Glyceraldehyd (s. Grundvorlesung);

Anomere Konfiguration:

α : Substituenten des anomeren Zentrums u. d. entferntesten Stereozentrums zeigen in der *Fischer-Projektion* in dieselbe Richtung; β : sonst.



α -L-Fucose (α -6-Desoxy-L-galactose)



β -D-Arabinose

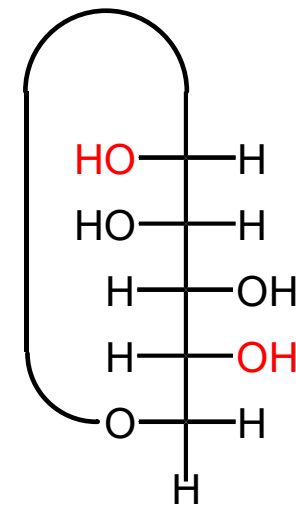
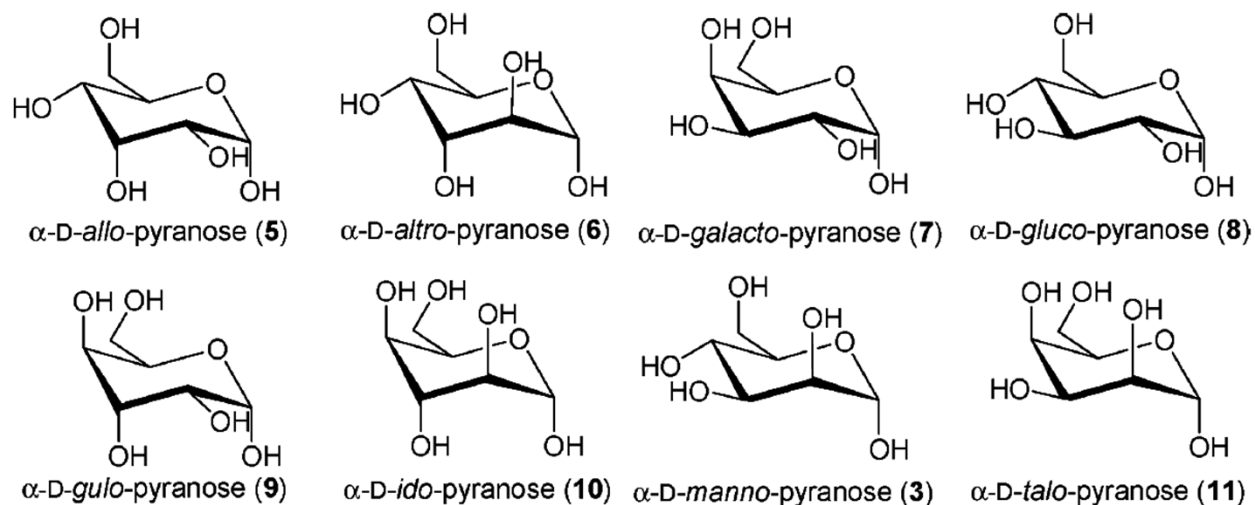


Table 2 Percentage of cyclic and acyclic forms of D-aldopyranoses in water at 30 °C

aus: Vogel,
Carbohydr. Chem.
 2009, 35, 13–32

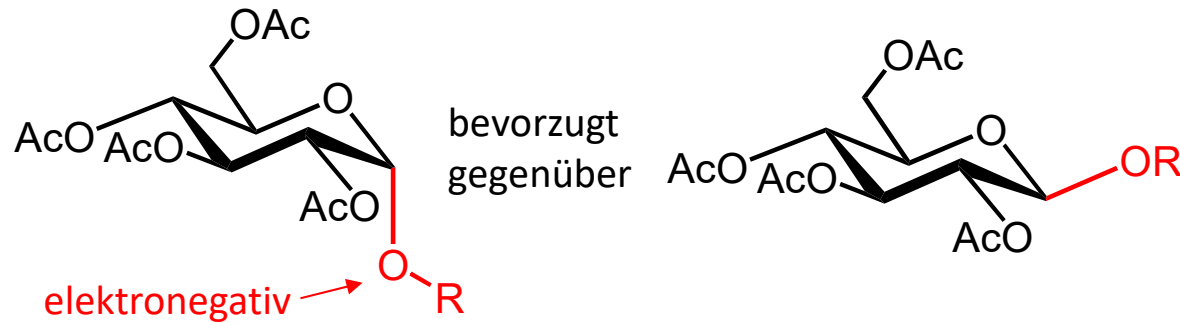
Monosaccharide	α -p	β -p	α -f	β -f	Hydrate	Aldehyde
D-allo (5)	14.6	77.1	3.0	5.3	0.0063	0.0032
D-altro (6)	26.8	41.0	8.6	13.4	0.079	0.014
D-galacto (7)	31.2	62.7	2.3	3.7	0.046	0.006
D-gluco (8)	37.6	62	0.1	0.28	0.0059	0.004
D-gulo (9)	12.2	83.7	0.94	3.04	0.077	0.005
D-ido (10)	33.7	37.3	12.14	16.12	0.7	0.094
D-manno (3)	66.23	32.85	0.64	0.24	0.022	0.0044
D-talo (11)	42.1	28.7	17.9	11.1	0.052	0.029

α -p: α -pyranose, β -p: β -pyranose, α -f: α -furanose, β -f: β -furanose.

D. Saccharide - D.1. Struktur

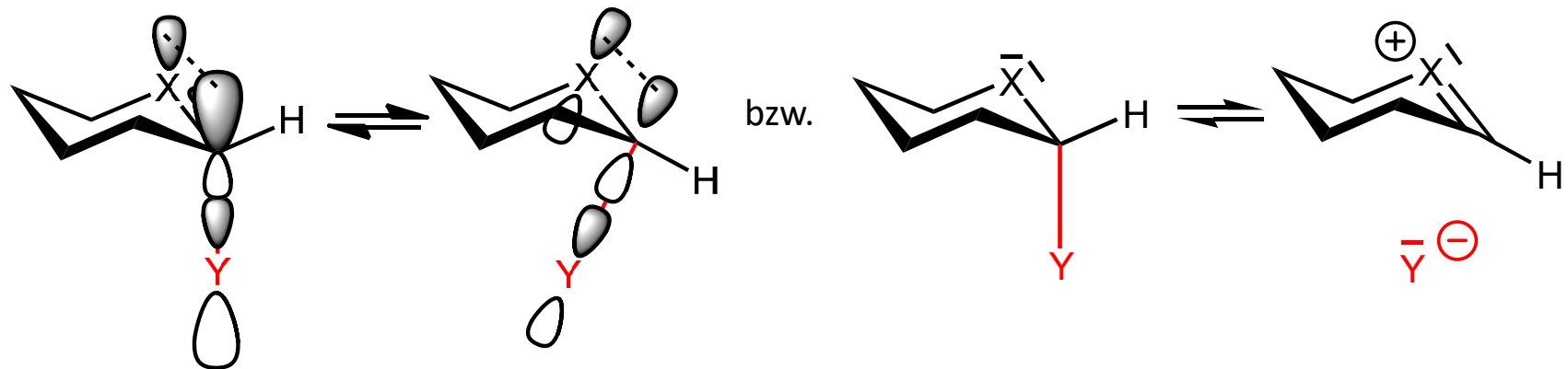
Anomerer Effekt (Edward 1955, Lemieux 1958)

8-13 kJ/mol
Stabilisierungsbeitrag



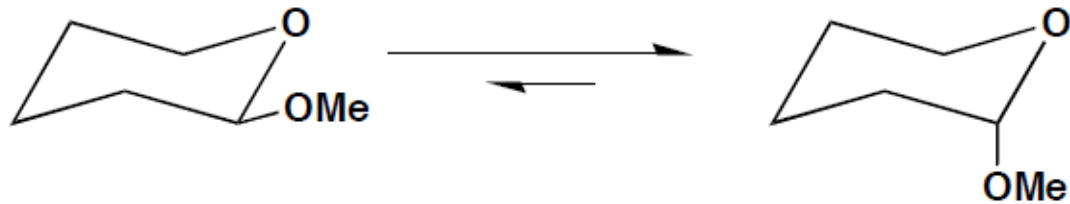
trotz sterisch
günstigerer, äquatorialer
Anordnung von OR

allg.: Stabilisierung durch $(n_X - \sigma_{C-Y}^*)$ - Delokalisierung, günstig bei elektroneg. Y in axialer Pos..



Hyperkonjugation zwischen n- und σ^* -Orbitalen \Rightarrow verlängerte C-O-Bindung

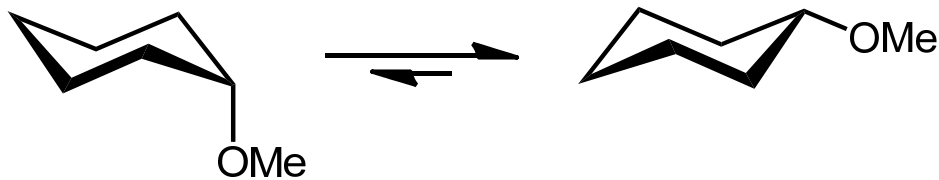
Anomerer Effekt: nicht nur bei Sacchariden



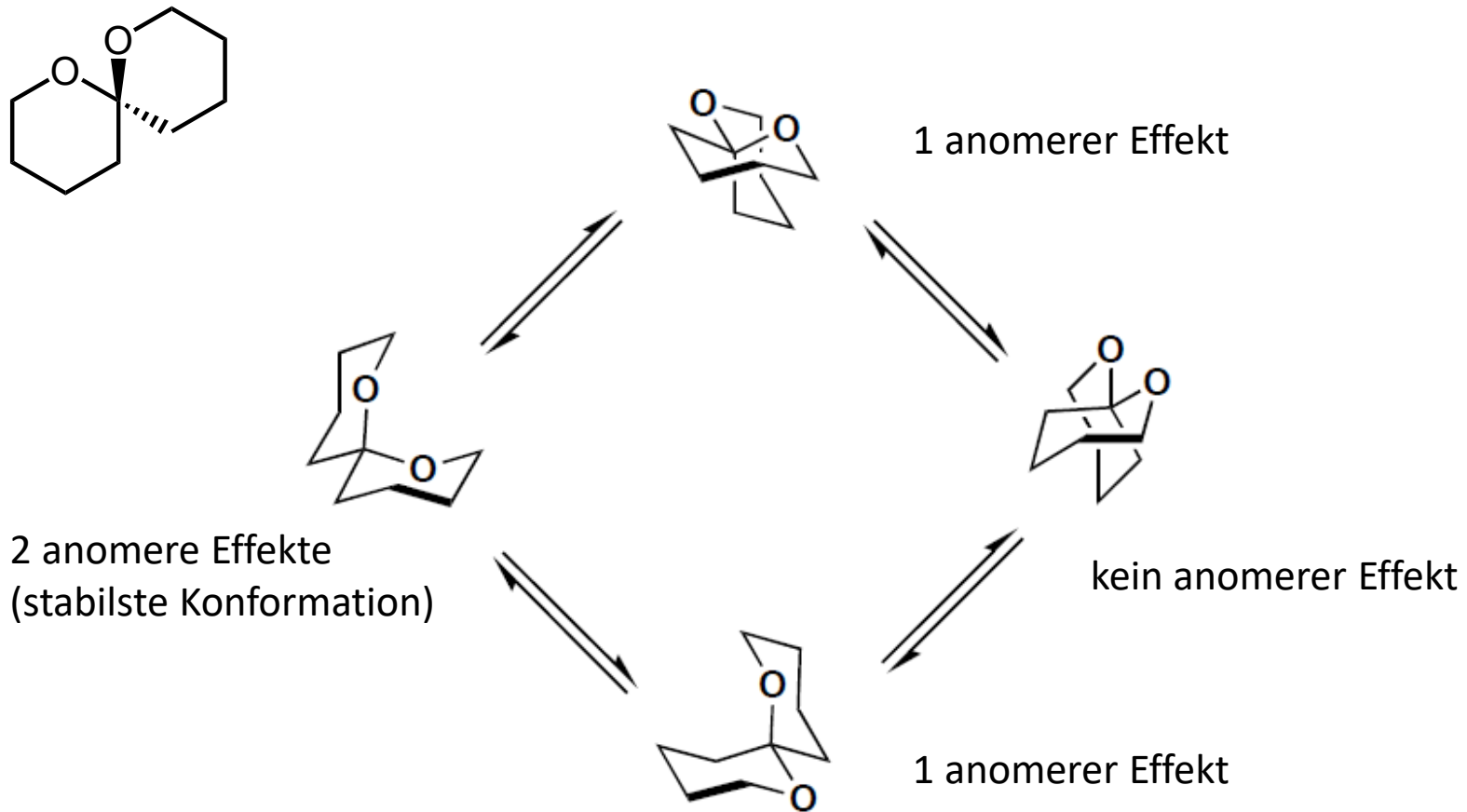
<u>Solvent</u>	<u>Dipole</u>	<u>% axial</u>
CCl ₄	2.2	83
benzene	2.3	82
CHCl ₃	4.7	71
acetone	20.7	72
MeOH	32.6	69
MeCN	37.5	68
H ₂ O	78.5	52

aber:

am Cyclohexan äquatoriale Position bevorzugt (ΔG ca. 2.5 kJ/mol bei Raumtemp.):



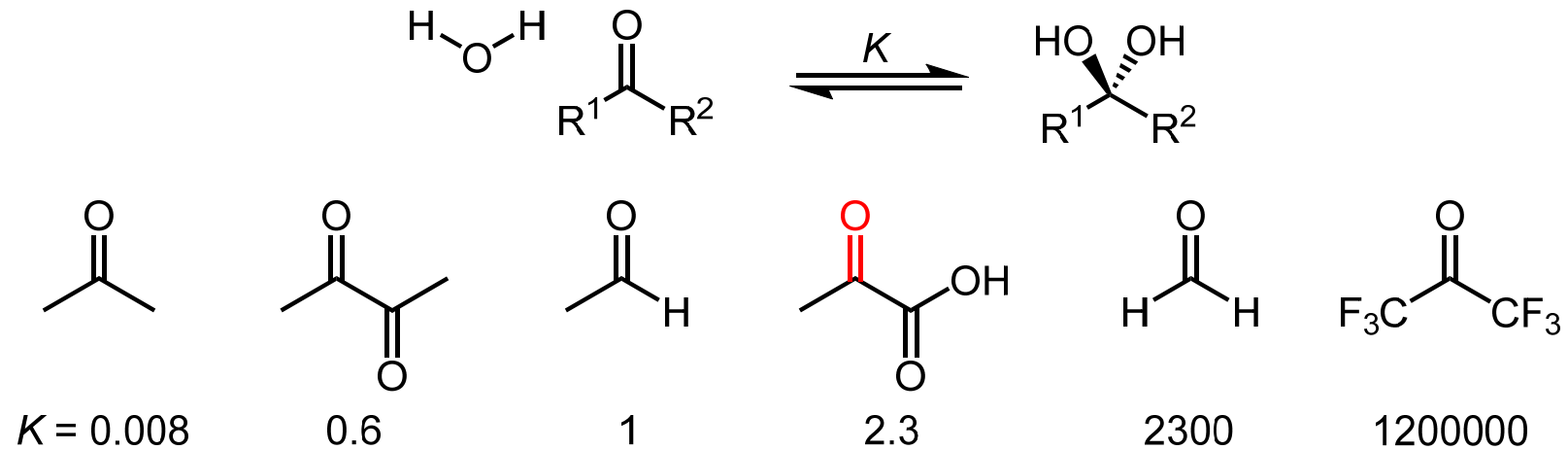
Anomerer Effekt bestimmt auch Konformationen, z. B. bei Spiroketalen:



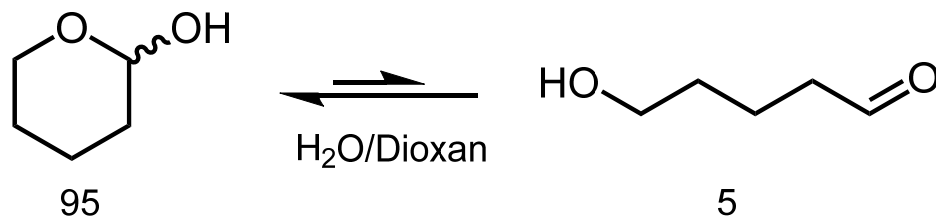
D. Saccharide - D.1. Struktur

Acetalisierung und Ketalisierung

Substituenteneinfluss:



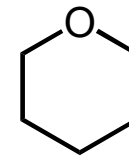
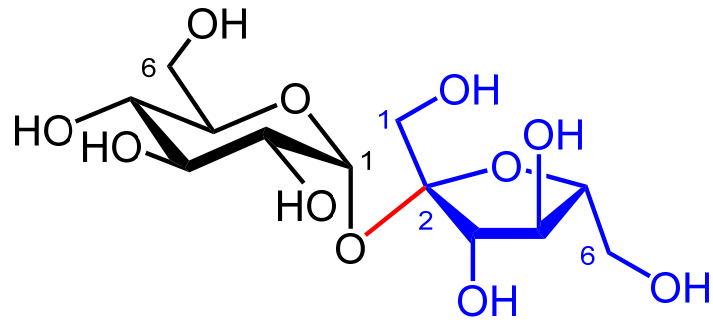
Einfluss der Ringgröße:



Oxetan: < 1% geschlossen
Tetrahydrofuran: 90%
Tetrahydropyran: 95%
größere Ringe: < 20%

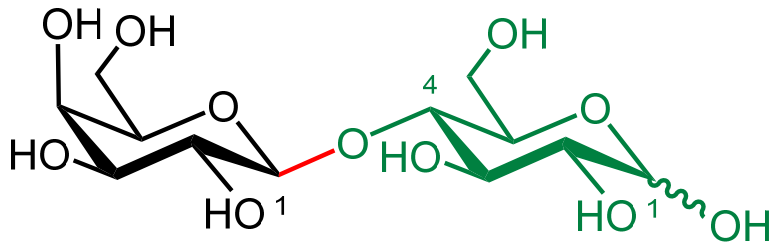
D. Saccharide - D.1. Struktur

Di- und höhere Saccharide

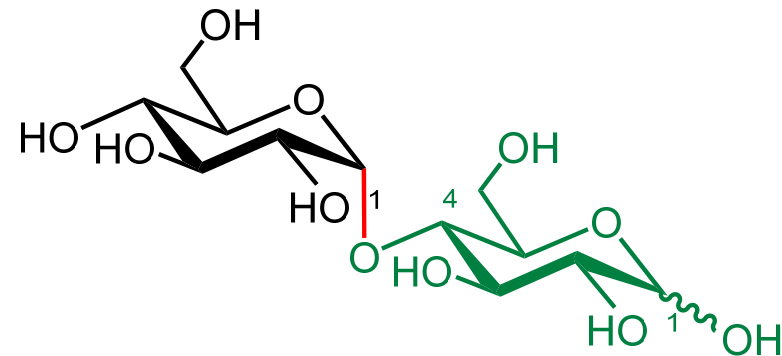


Tetrahydropyran Tetrahydrofuran

β -D-Fructofuranosyl-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-glucopyranosid
Saccharose, "Rohrzucker", engl. "sucrose"



β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose
Lactose



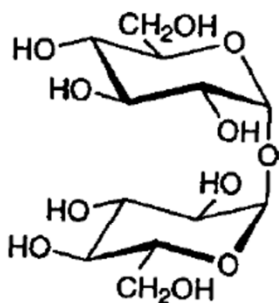
α -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose
Maltose

IUPAC (*Pure Appl. Chem.* 1996, 1919):

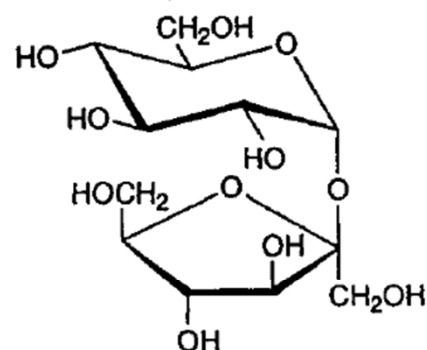
2-Carb-36.2. Disaccharides without a free hemiacetal group

Disaccharides which can be regarded as formed by reaction of the two glycosidic (anomeric) hydroxy groups with one another are named, systematically, as glycosyl glycosides. The parent (cited as the 'glycoside' component) is chosen according to 2-Carb-2.1. Both anomeric descriptors must be included in the name.

Examples:



α -D-Glucopyranosyl α -D-glucopyranoside
[α -D-Glcp-(1 \leftrightarrow 1)- α -D-Glcp]
(trivial name α,α -trehalose)



β -D-Fructofuranosyl α -D-glucopyranoside
[β -D-Fruf-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-Glcp]
not α -D-glucopyranosyl β -D-fructofuranoside
(trivial names sucrose, saccharose)

IUPAC (*Pure Appl. Chem.* **1996**, 1919):

2-Carb-2. Parent monosaccharides

2-Carb-2.1. Choice of parent structure

In cases where more than one monosaccharide structure is embedded in a larger molecule, a parent structure is chosen on the basis of the following criteria, applied in the order given until a decision is reached:

2.1.1. The parent that includes the functional group most preferred by general principles of organic nomenclature [13,14]. If there is a choice, it is made on the basis of the greatest number of occurrences of the most preferred functional group. Thus aldaric acid > uronic acid/ketoaldonic acid/aldonic acid > dialdose > ketoaldose/aldose > diketose > ketose.

2.1.2. The parent with the greatest number of carbon atoms in the chain, e.g. a heptose rather than a hexose.

2.1.3. The parent with the name that comes first in an alphabetical listing based on:

2.1.3.1. the trivial name or the configurational prefix(es) of the systematic name, e.g. allose rather than glucose, a *gluco* rather than a *gulo* derivative;

2.1.3.2. the configurational symbol D rather than L ;

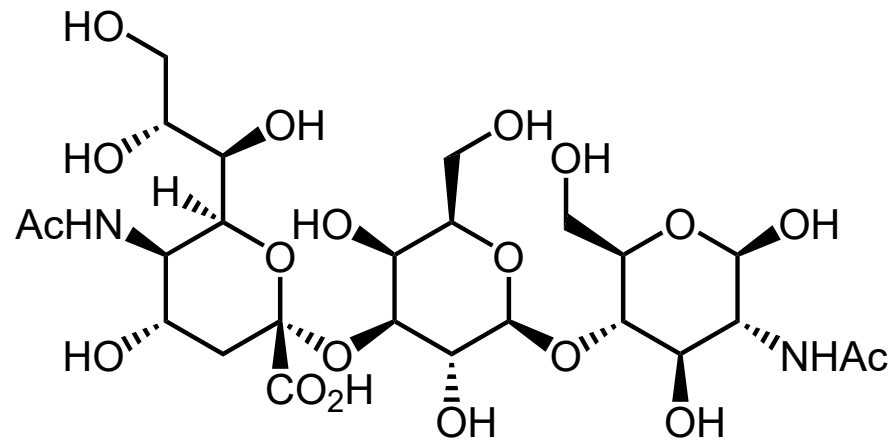
2.1.3.3. the anomeric symbol α rather than β .

2.1.4. The parent with the most substituents cited as prefixes (bridging substitution, e.g. 2,3-*O*-methylene, is regarded as multiple substitution for this purpose).

2.1.5. The parent with the lowest locants (see [14], p. 17) for substituent prefixes.

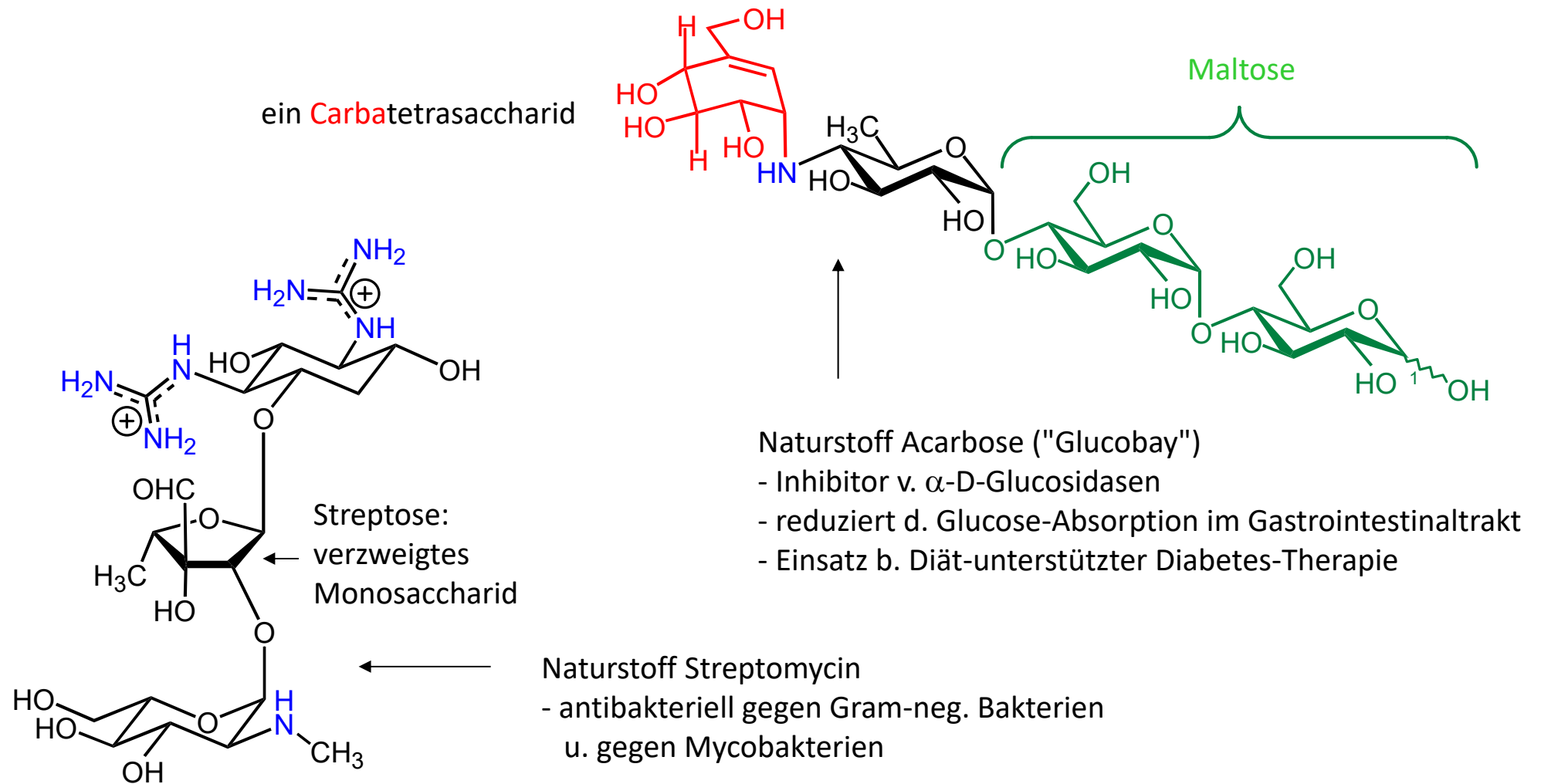
2.1.6. The parent with the lowest locant for the first-cited substituent.

Nomenklatur von Oligosacchariden



D. Saccharide - D.1. Struktur

Saccharidische Naturstoffe (hier: aus *Streptomyces* sp.)



D. Saccharide - D.1. Struktur

Polysaccharide

Biosynthese: $4 \cdot 10^{11}$ t/a (Vergl.: $2 \cdot 10^7$ t/a (0.05 %) Industrieproduktion von Polyethylen)

a) Stärke:

α -Amylose (Poly- $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -D-Glucose, linksgängige Helix)

+ Amylopektin (zusätzl. $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -Verzw. an jeder 24.-30. Glc-Einh.)

- insgesamt bis zu 10^6 Glc-Einh.

b) Glykogen:

wie Amylopektin, jedoch ca. 3-fach höherer Vernetzungsgrad; außerdem + 1 % Protein.

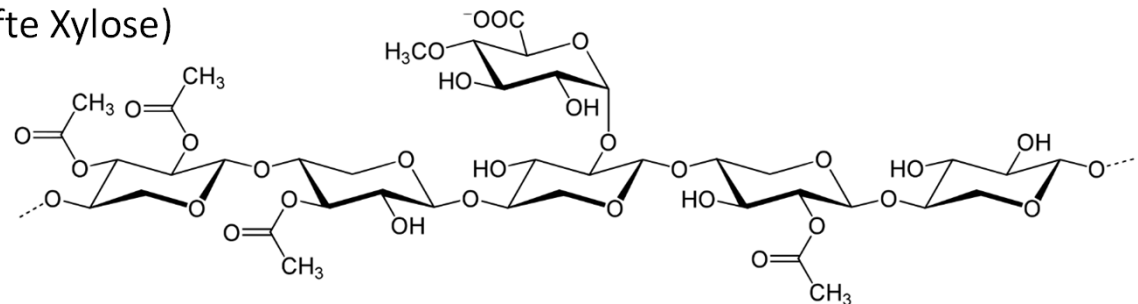
c) Cellulose:

Poly- $\beta(1 \rightarrow 4)$ -D-Glucose

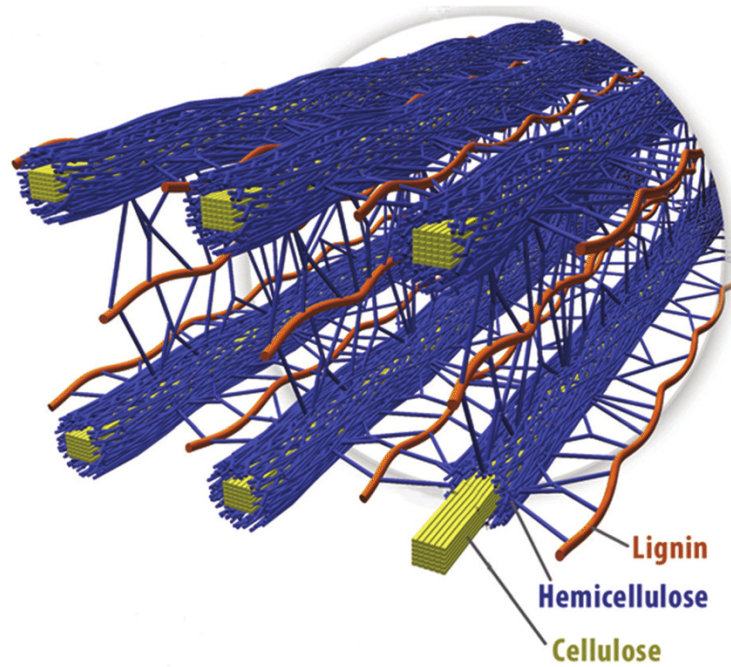
(gestreckte Konformation, parallele Ketten).

d) Hemicellulose Xylan (haupts. β -1,4-verknüpfte Xylose)

dritthäufigstes Biopolymer:



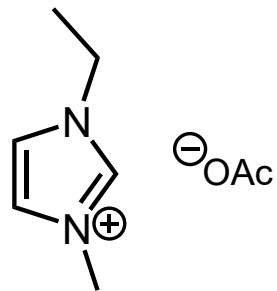
Kettenform von L-Xylose ... ?



aus *Green Chem.* **2013**, *15*, 550



Fig. 20 Dissolution of beech powder in $[\text{C}_2\text{C}_1\text{im}][\text{MeCO}_2]$; left: ionic liquid, middle: beech powder, right: solution. Reproduced from ref. 114.

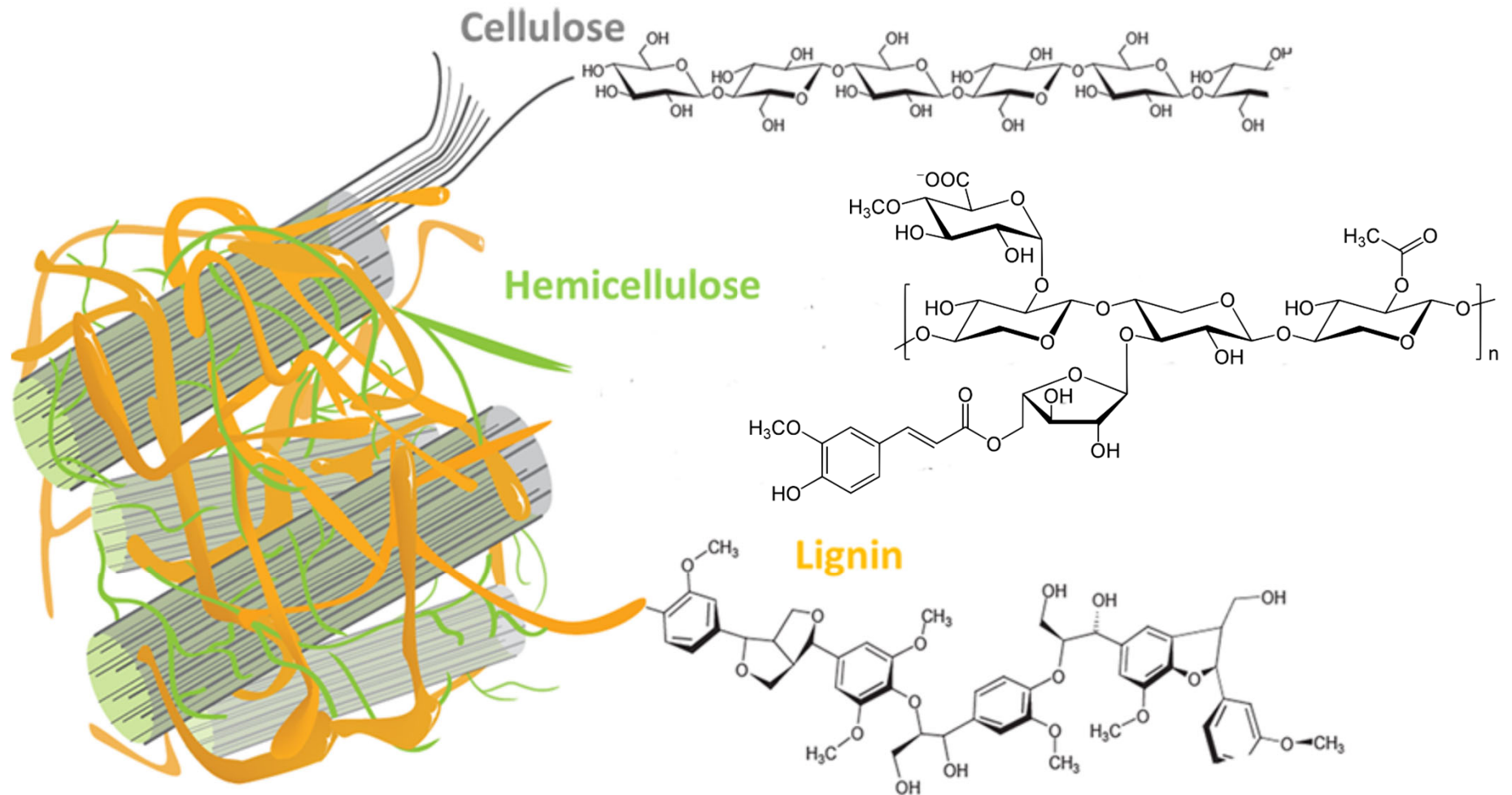


genutzt zur Darstellung von
industriellem "Kraft Lignin (Indulin AT)"

ionische Flüssigkeit: löst Lignin

D. Saccharide - D.1. Struktur

Zusammensetzung der Pflanzenzellwand

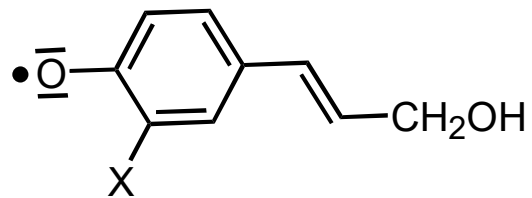


www.psb.ugent.be

D. Saccharide - D.1. Struktur

Lignin (lat. lignum: Holz),

Polymer des Resonanz-stab. Radikals



X = H, OH, OMe

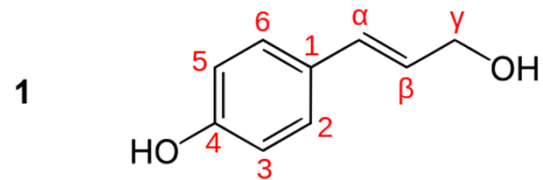
$2 \cdot 10^{10}$ t/a Biosynthese;

Holz:

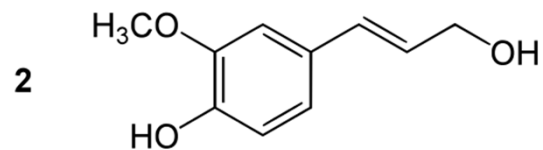
35-60 % Cellulose (zugfest)

10-40 % Hemicellulose

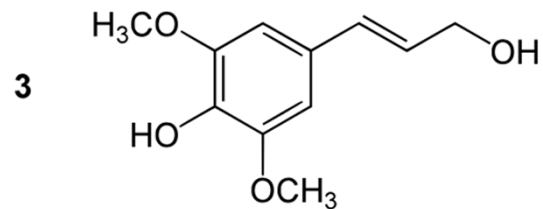
15-30% % Lignin (druckfest)



Cumarylalcohol



Coniferylalcohol



Sinapylalcohol

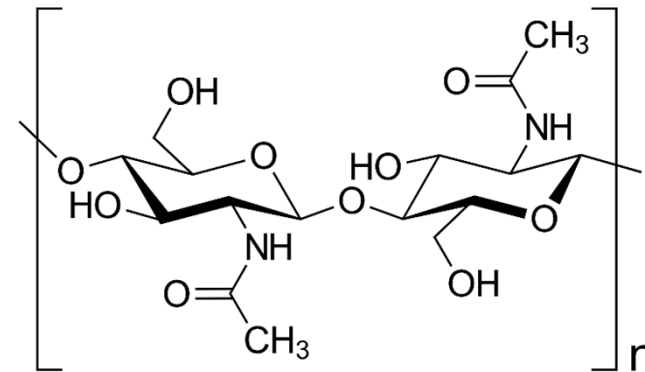
D. Saccharide - D.1. Struktur

Polysaccharide

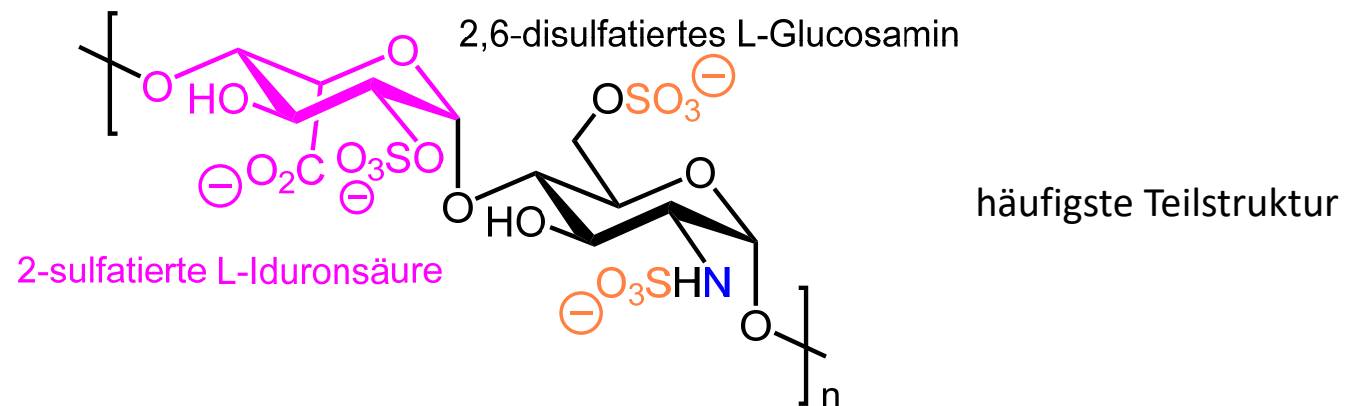
e) Chitin (griech. χιτών Hülle, Panzer):



Poly- β (1-4)-*N*-Acetyl-D-Glucosamin
(Chitosan: *N*-deacetyliert).

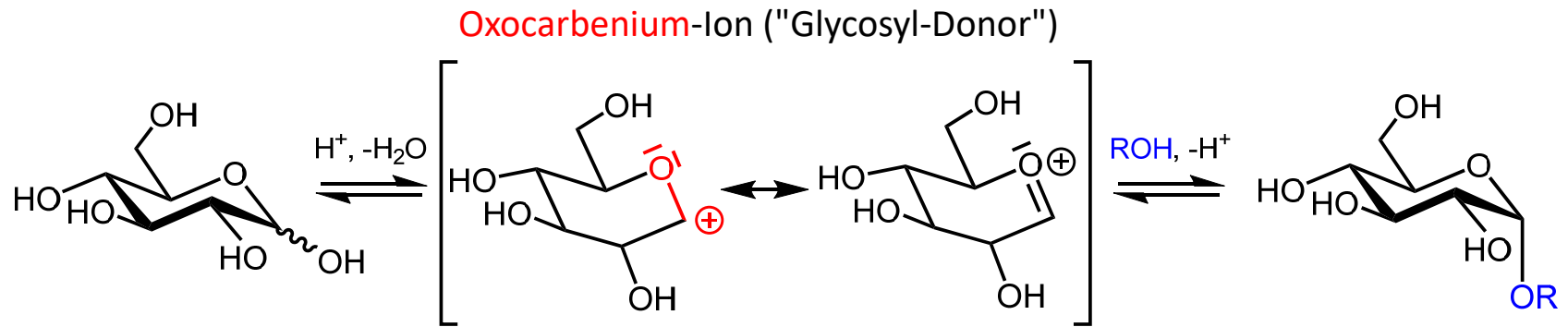


f) Heparin: Bindung an Antithrombin III => Inhibition der Blutgerinnung



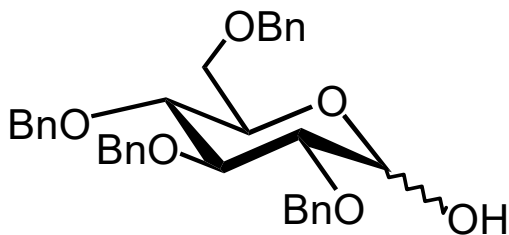
D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.1 Schützung

a) am anomeren Zentrum

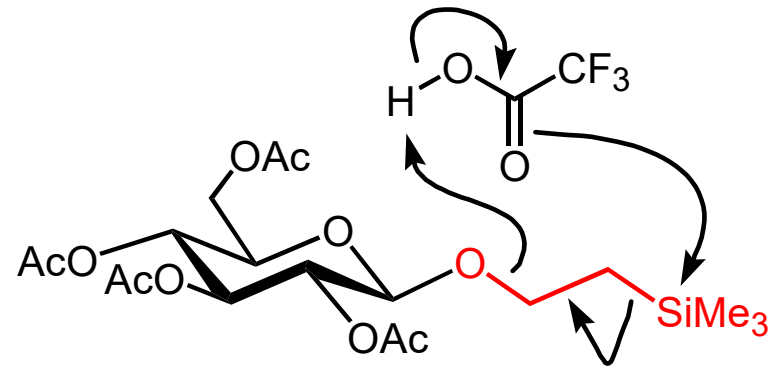


z. B.:

- 1) Allylalkohol/ H^+
- 2) BnCl, aq. NaOH, nBu_4NBr
- 3) [Pd], p-TsOH



wenn beim Entschützen glycosidische Bindungen erhalten bleiben sollen:

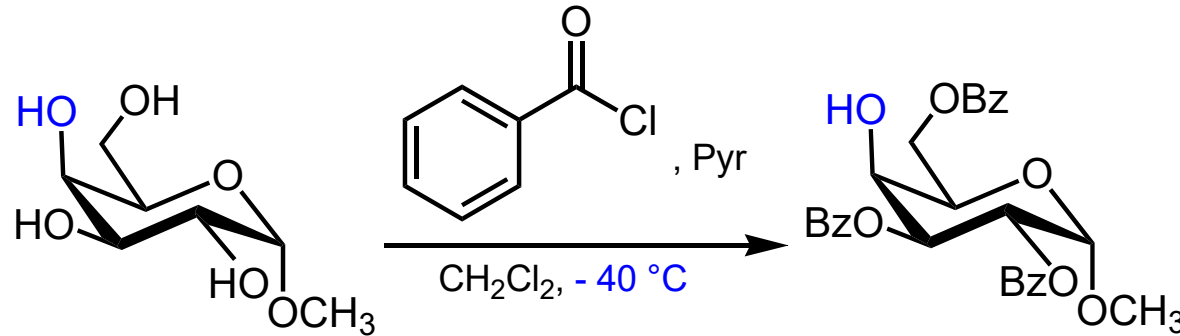


2-(Trimethylsilyl)ethyl-S.-gr. (TMSET)

D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.1 Schützung

b) Acyl-S.-gr.: häufig Acetylierung oder Benzoylierung

z. B.:

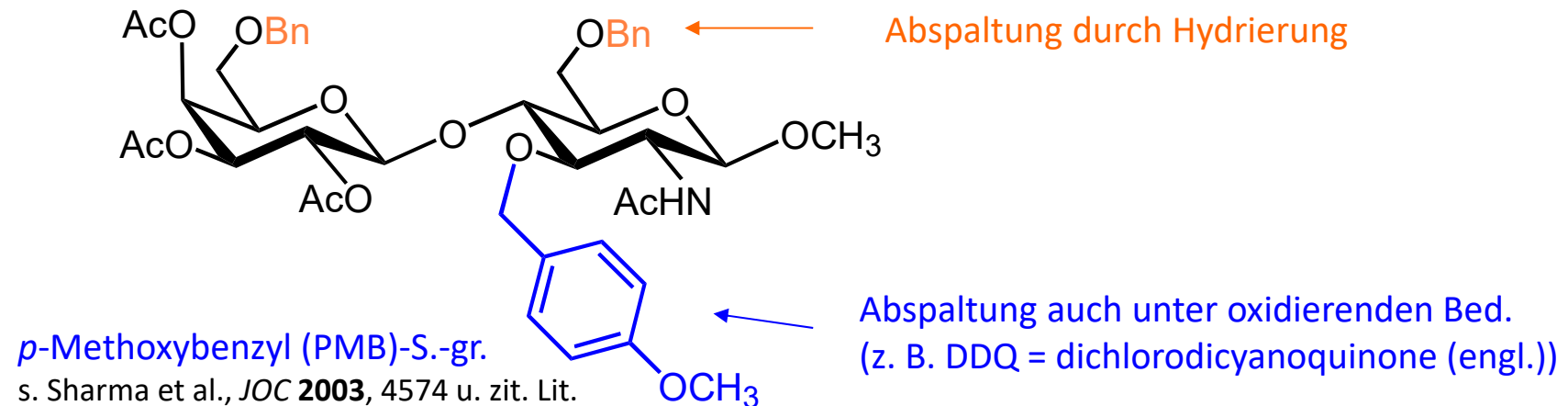


primär > sekundär,
äquatorial > axial.

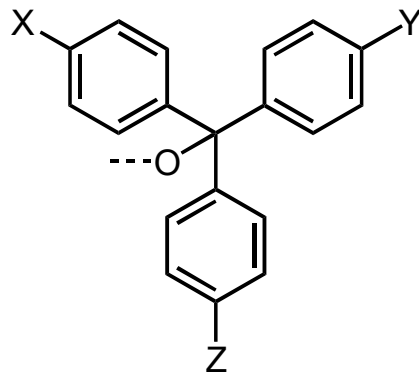
spez. Reaktivitäten für
jedes Monosaccharid.

c) Ether-S.-gr.: häufig **Benzylierung**, Allylierung, Tritylierung, Silylierung

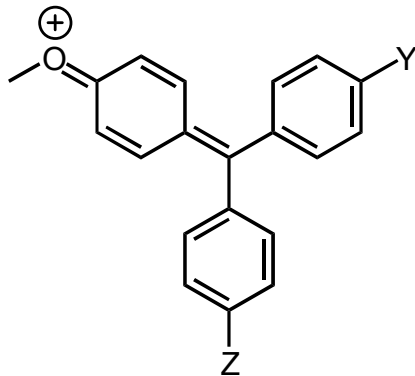
z. B.:



Ether-Schutzgruppen



Trityl-S.-gr.n (X, Y, Z = H, OMe)
- saure Absp. je OMe-Gruppe
10-fach schneller wg.:



s. auch DMT-S.-gr. b. DNA-Synth.

Säurestabilität von **Silyl-S.-gr.n**:

TMS < TES < TB(DM)S < TIPS < TBDPS

TMS: Abspaltung teilw. schon bei der
Chromatographie
an Kieselgel;

TBDPS: saure Abspaltung am schwierigsten

- alle Silyl-S.-gr.n abspaltbar durch F⁻ (z. B. TBAF).

TMS: Trimethylsilyl,

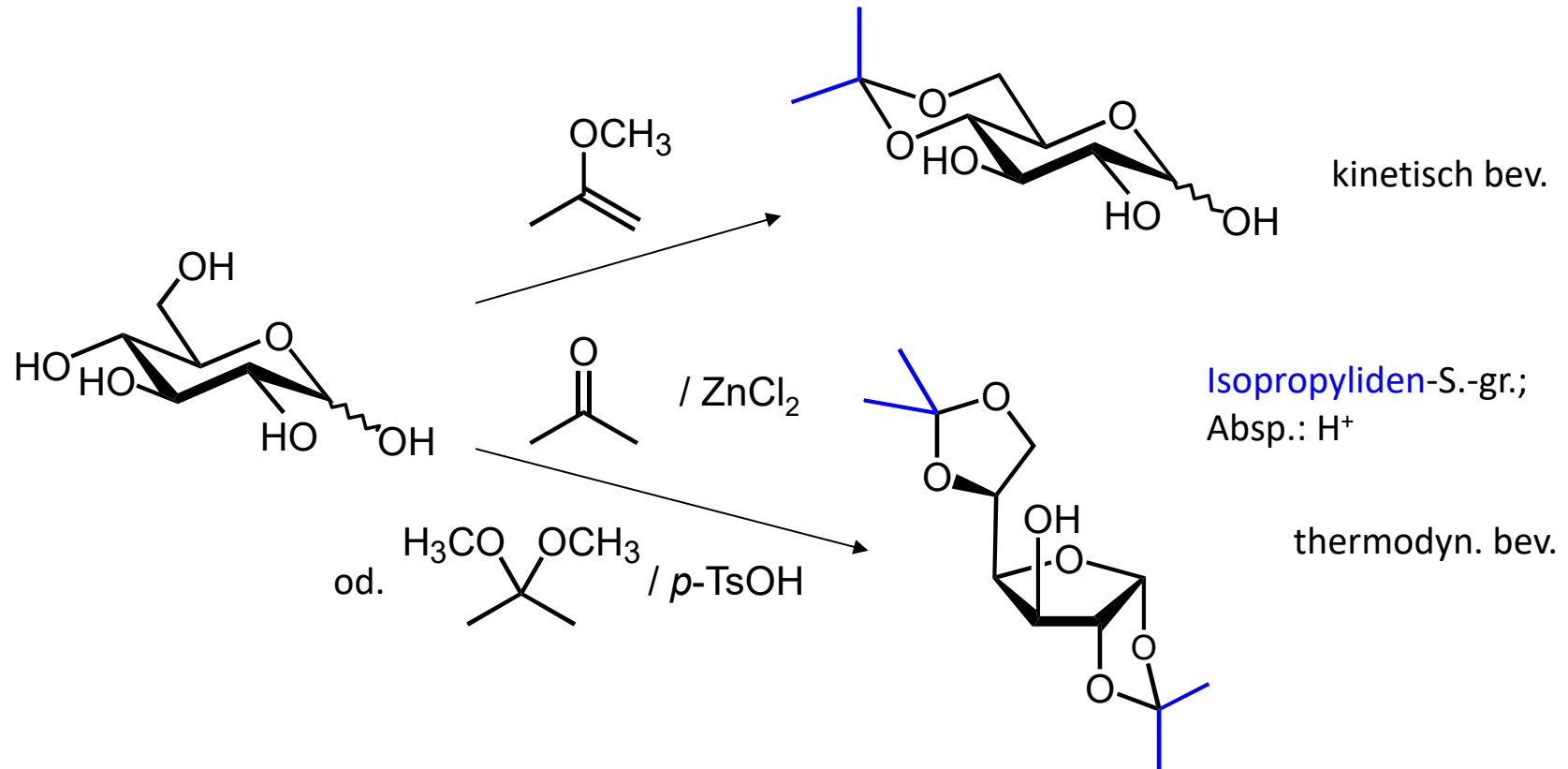
TES: Triethylsilyl,

TB(DM)S: *tert*-Butyldimethylsilyl,

TIPS: Triisopropylsilyl,

TBDPS: *tert*-Butyldiphenylsilyl.

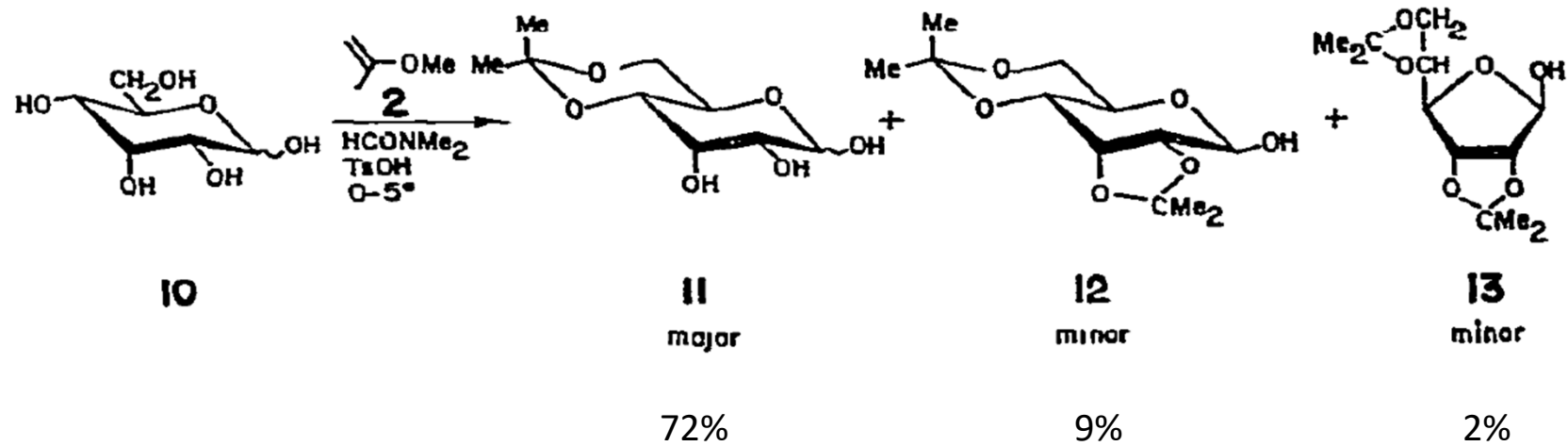
d) Acetal-S.-gr.n



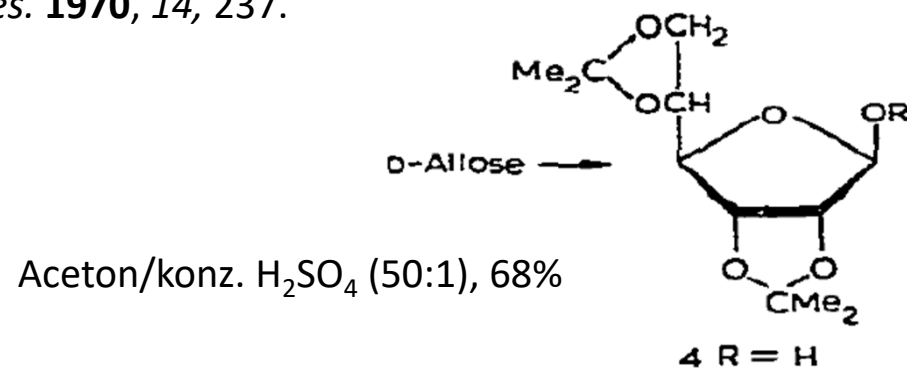
D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.1 Schützung

Es hängt von den Reaktionsbedingungen ab: z. B. Acetonierung von D-Allose

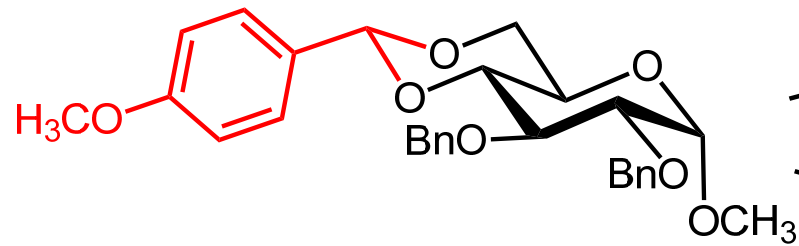
J. Gelas et al., *Carbohydr. Res.* **1979**, 71, 103.



S. Tejima et al., *Carbohydr. Res.* **1970**, 14, 237.



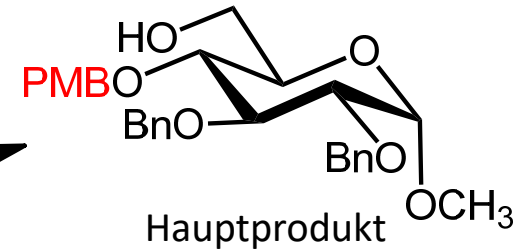
regioselektive Acetalspaltung:



p-Methoxybenzyliden-S.-gr.

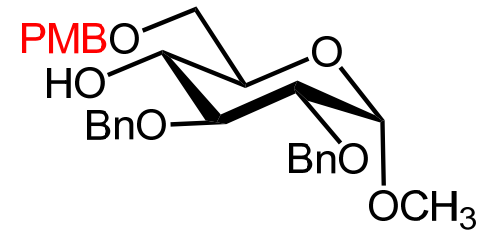
sterisch
anspruchvollere Lewis-
Säure

NaCNBH₃,
TMSCl, MeCN



Hauptprodukt

NaCNBH₃,
TFA, DMF

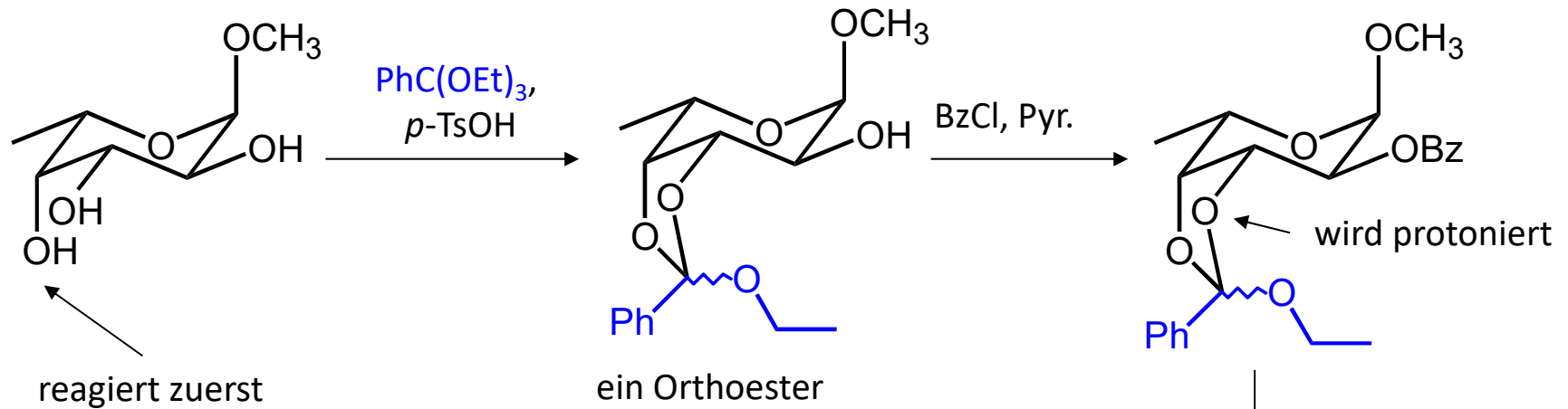


Hauptprodukt

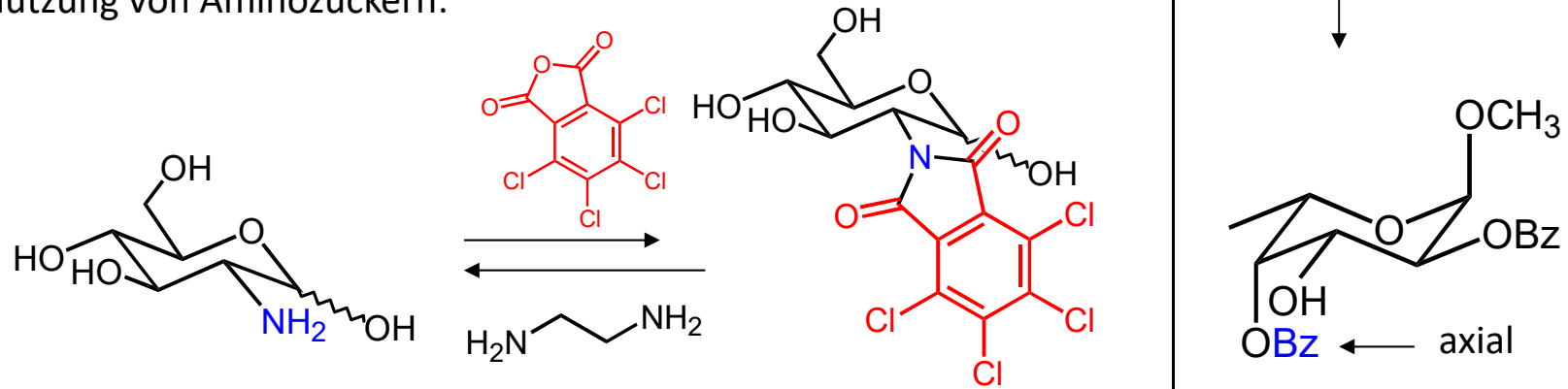
Mechanismus?

D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.1 Schützung

e) Orthoester-S.-gr.n

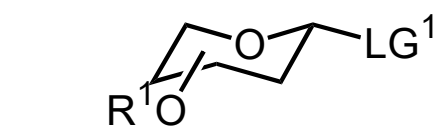


f) N-Schützung von Aminozuckern:



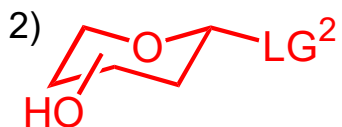
D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.2 Glycosid-Synthese

allg.:

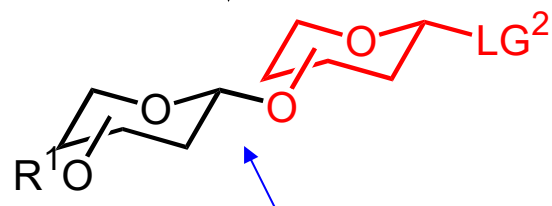


Glycosyl-Donor

1) Akt. d. Abgangsgruppe
("leaving group") LG¹



Glycosyl-Akzeptor

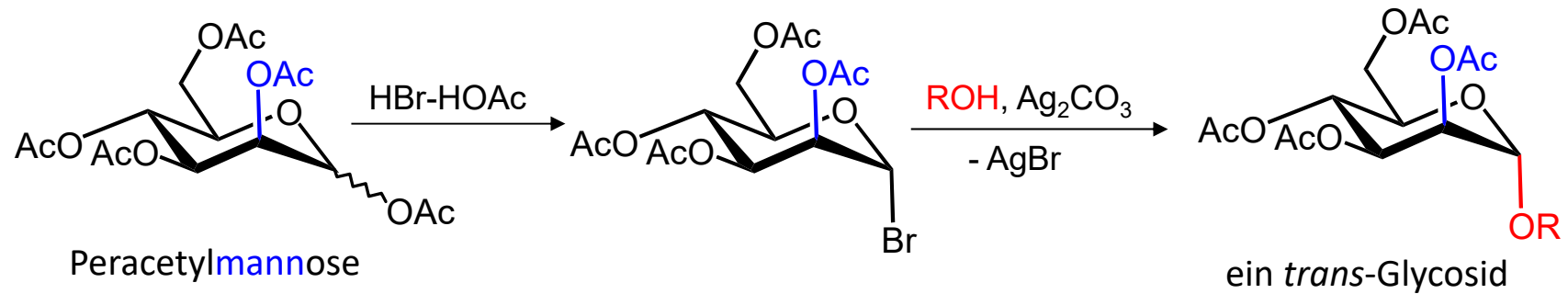
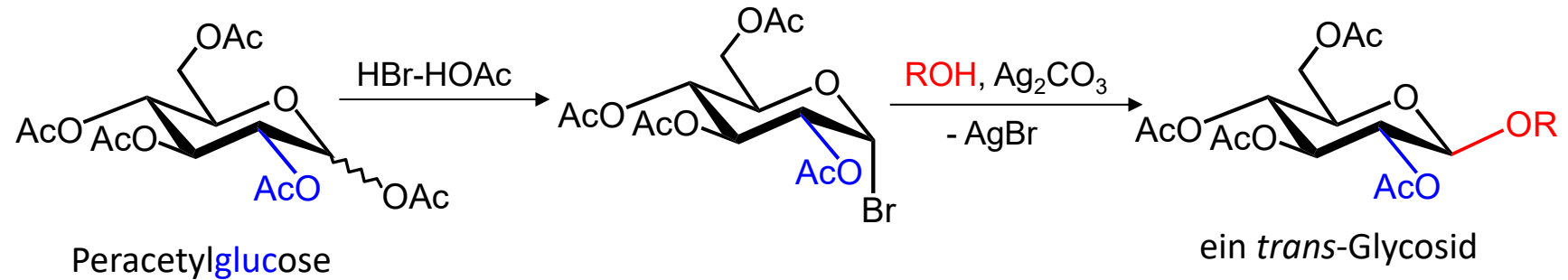


glycosid. Bdg.

LG	akt. Agens
OAc	BF ₃ -Et ₂ O, SnCl ₄ , TMSOTf
Br	Ag ₂ CO ₃ , AgOTf
Cl	AgOTf
F	SnCl ₂ -AgOTf
	BF ₃ -Et ₂ O, TMSOTf
SR	TfOH-NIS, DMTST, IDCP
	"Br ⁺ ", "I ⁺ "

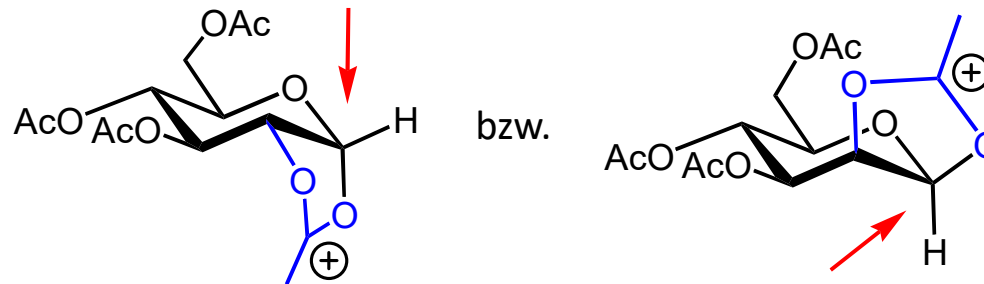
D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.2 Glycosid-Synthese

a) Koenigs-Knorr-Methode



Beteil. d. Nachbargruppe:

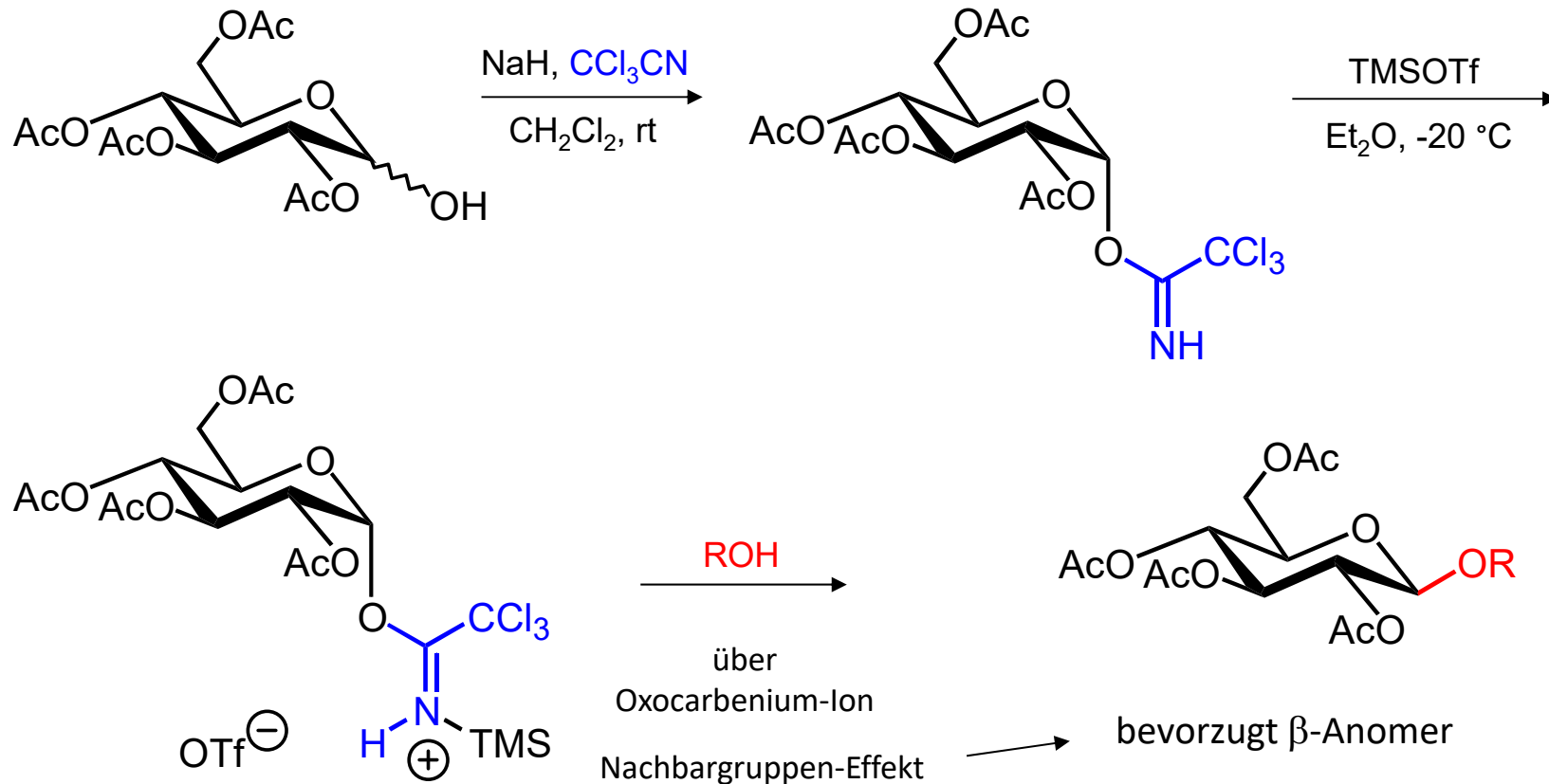
S_N2 -Mech.



D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.2 Glycosid-Synthese

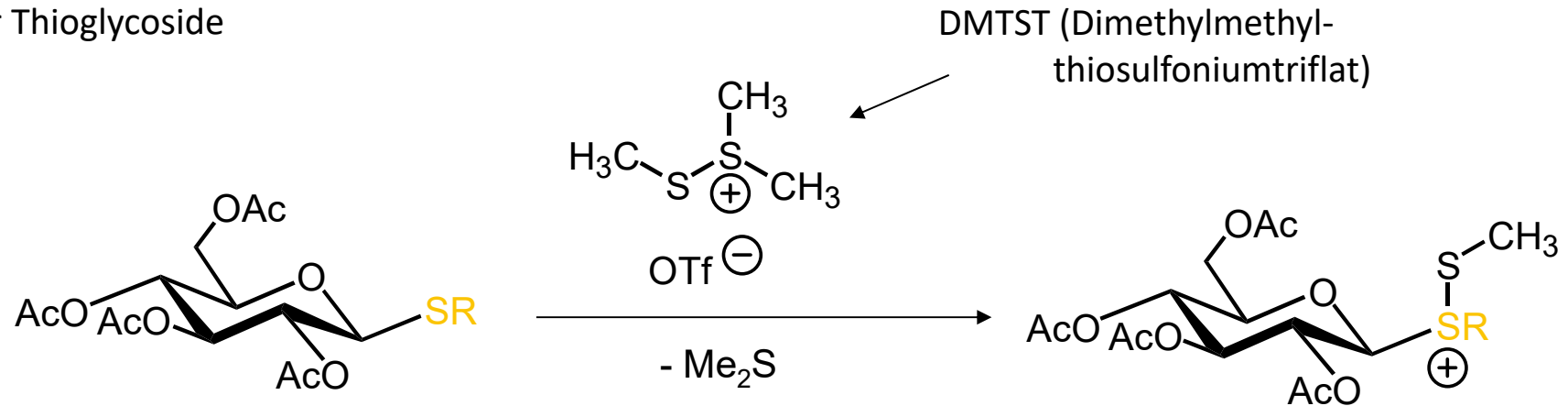
b) Trichloracetimidat-Verfahren (R. R. Schmidt)

α -Anomer thermodynamisch bevorzugt (β -Anomer kinetisch bevorzugt, da β -Glykosid nukleophiler; kin. anomerer Effekt!)

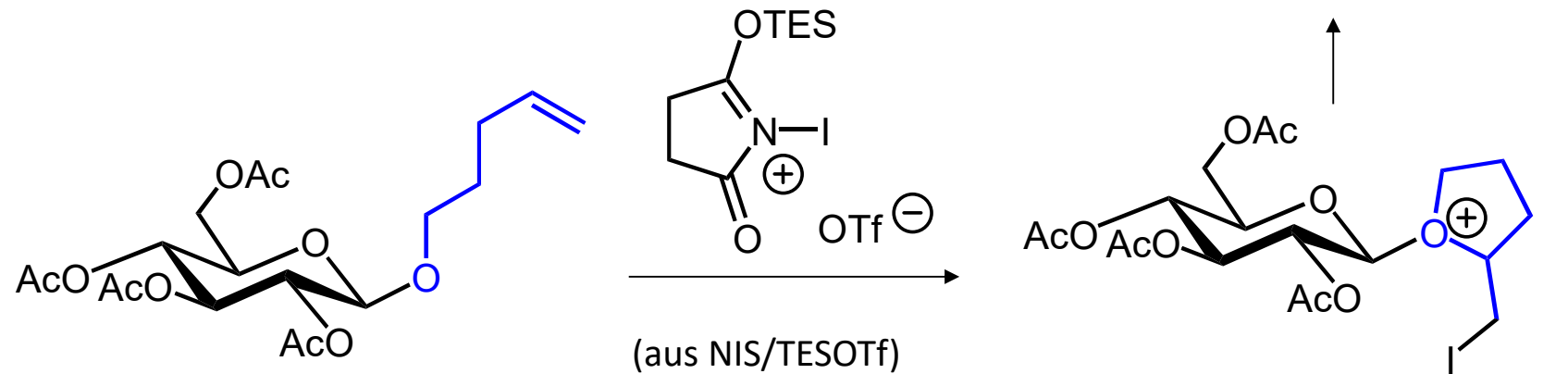


D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.2 Glycosid-Synthese

c) über Thioglycoside



d) über *n*-Pentenylglycoside

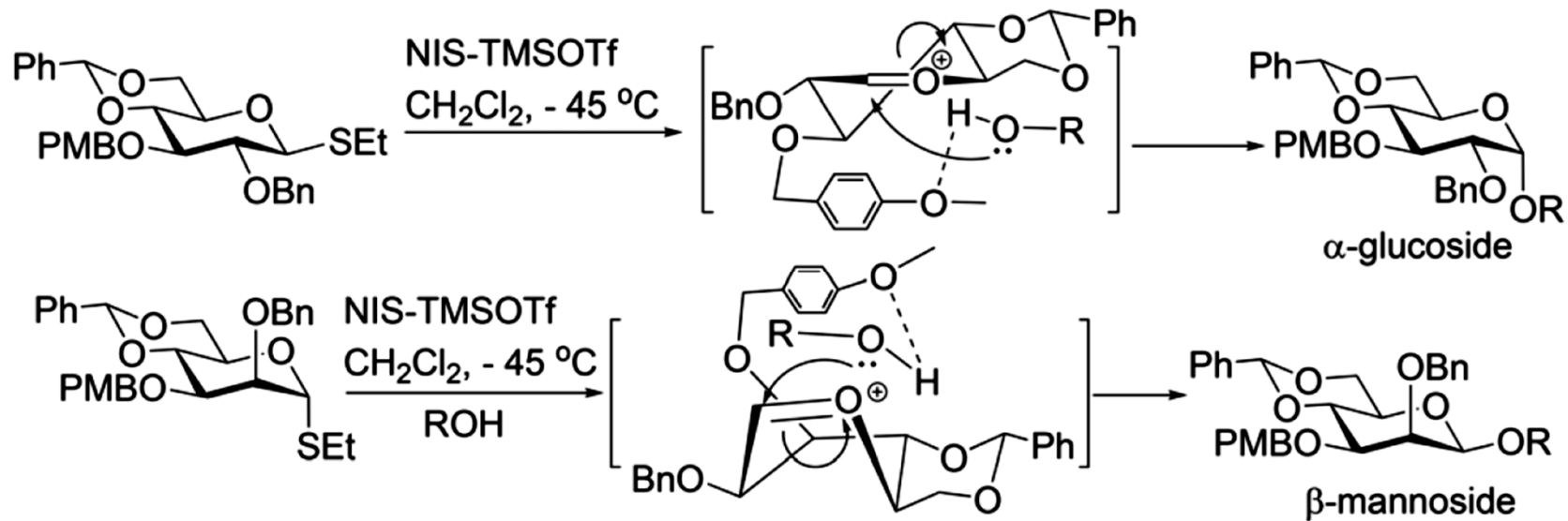


D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.2 Glycosid-Synthese

Diastereoselektive *cis*-Glycosylierung: es wird noch immer geforscht!

Ausschluss koordinierender Schutzgruppen an C2 reicht nicht (Anomerengemische)!

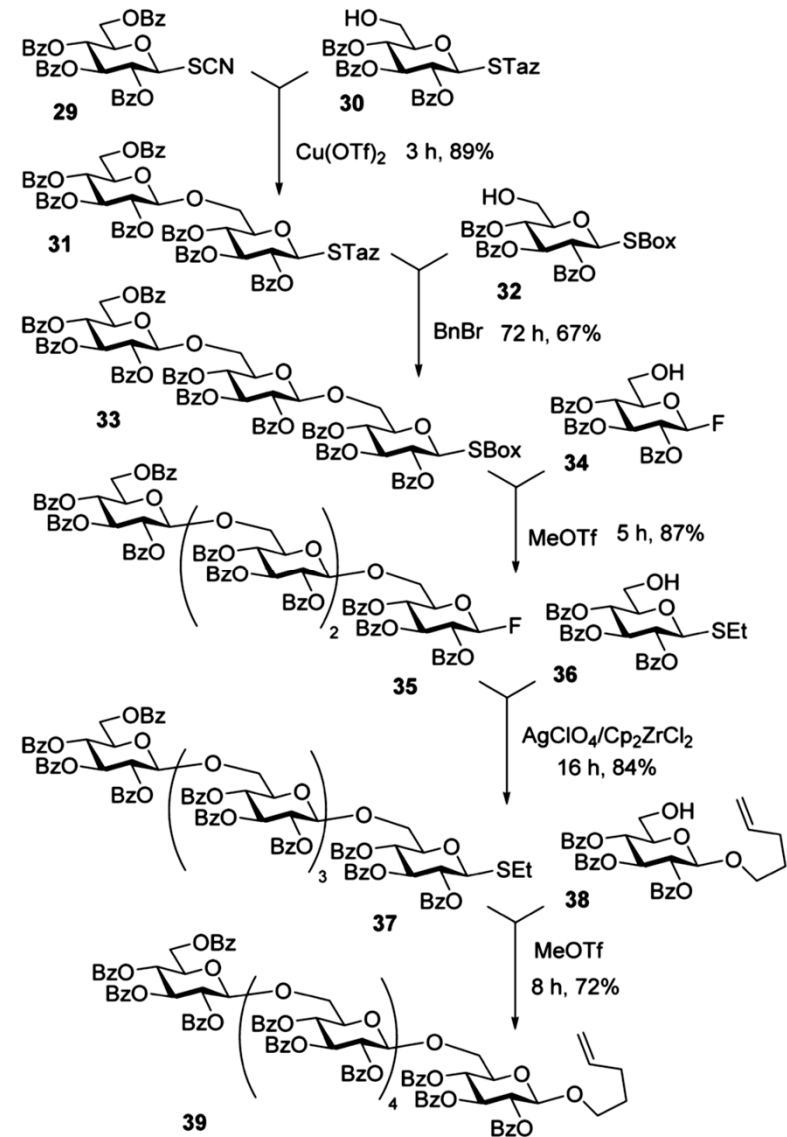
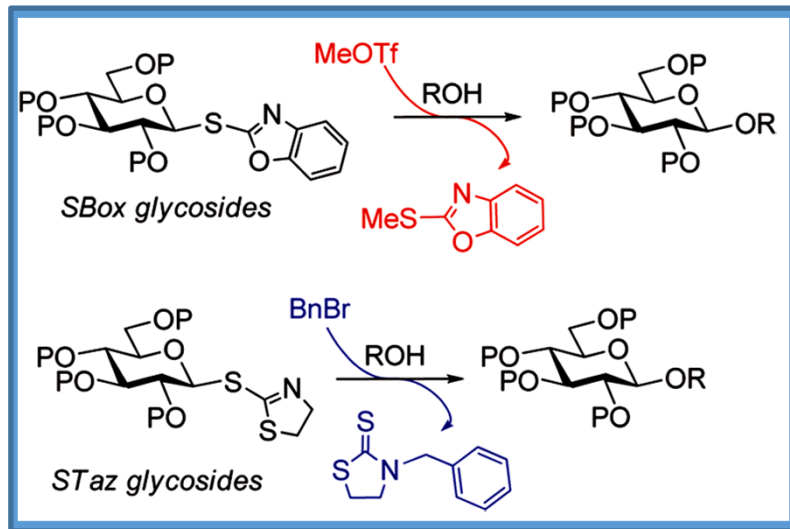
Wirkung entfernter Schutzgruppen: z. B. *O*-4,6-Benzyliden und 3-*O*-PMB



A. K. Misra et al., *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 4605

D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.3 Oligosaccharid-Synthese in Lösung

Orthogonale Aktivierung von Glycosyldonoren:

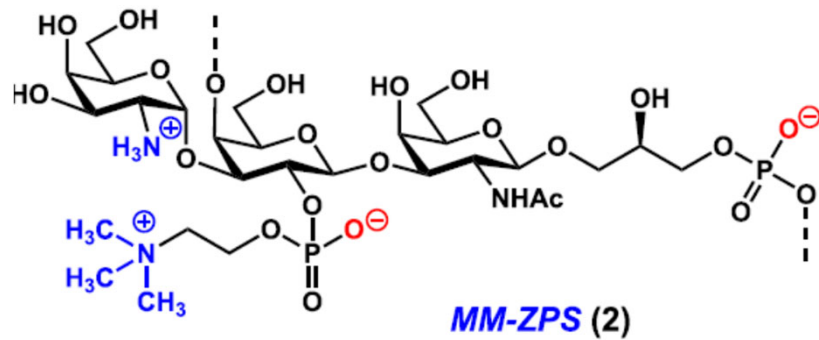


Kaethip, Demchenko, *JOC* **2011**, 7388

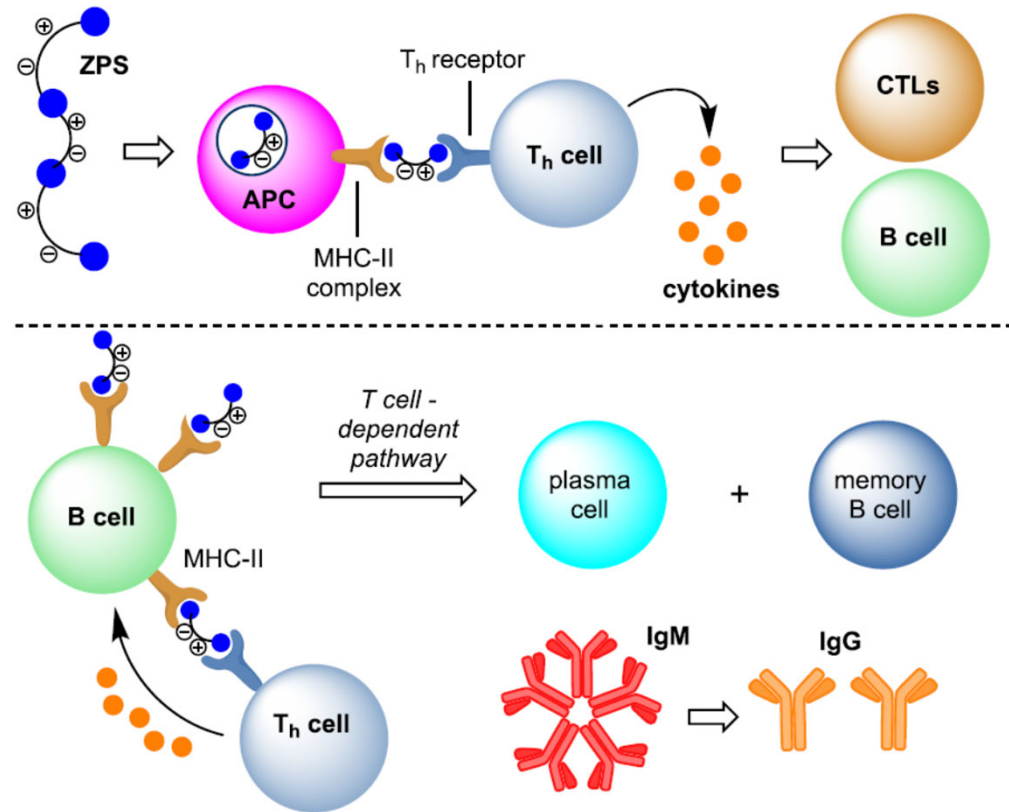
D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.3 Oligosaccharid-Synthese in Lösung

Total Synthesis of the Congested,
Bisphosphorylated *Morganella morganii*
Zwitterionic Trisaccharide Repeating Unit
(Keith, Townsend, *JACS* **2019**, 12939)

Entsprechendes Zwitterionisches
Polysaccharid aktiviert T-cell-abhängige
Immunantwort

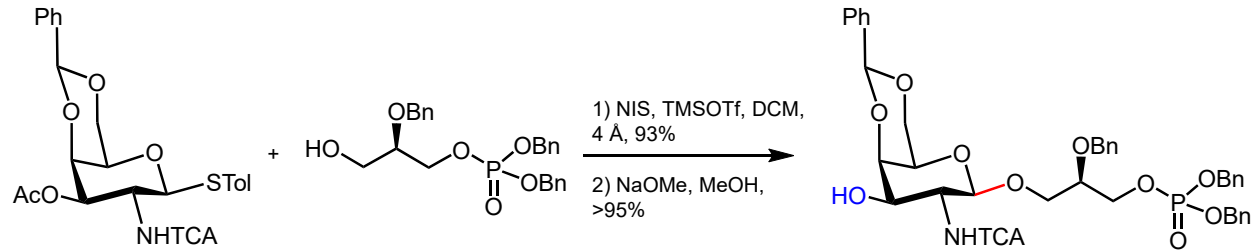


(b) Zwitterionic polysaccharides induce a robust T cell-dependent response.

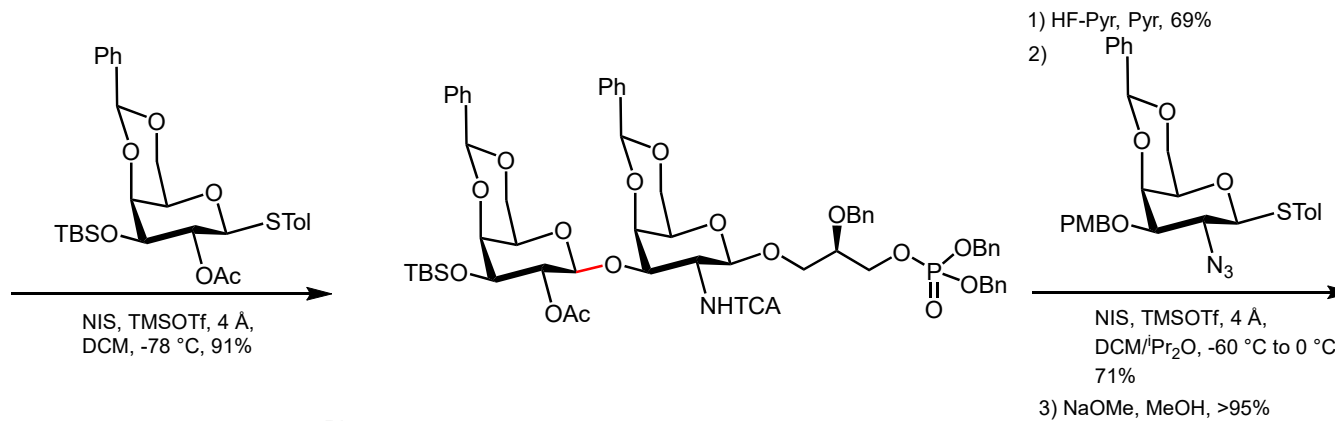


D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.3 Oligosaccharid-Synthese in Lösung

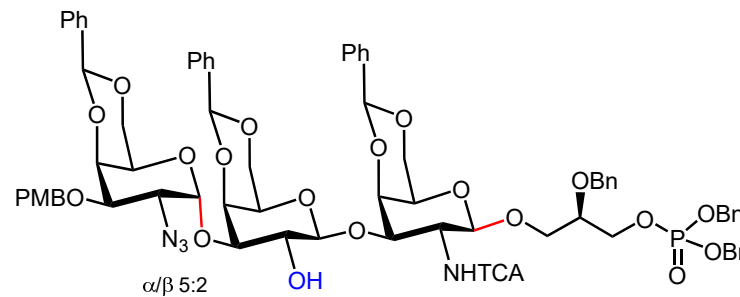
Total Synthesis of the Congested, Bisphosphorylated *Morganella morganii* Zwitterionic Trisaccharide Repeating Unit (Keith, Townsend, *JACS* **2019**, 12939)



TCA: Trichloroacetyl

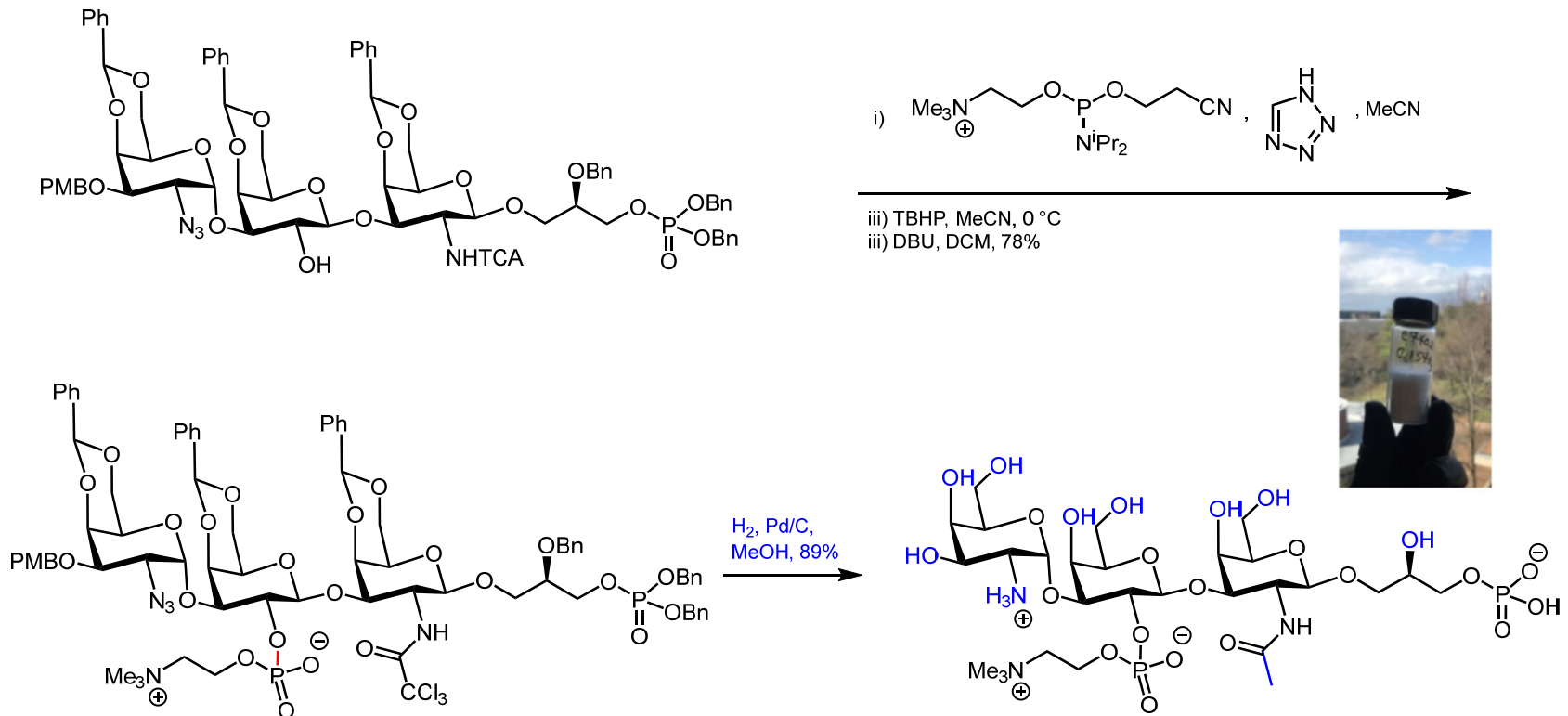


Pr_2O : bessere α -Selektivität



D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.3 Oligosaccharid-Synthese in Lösung

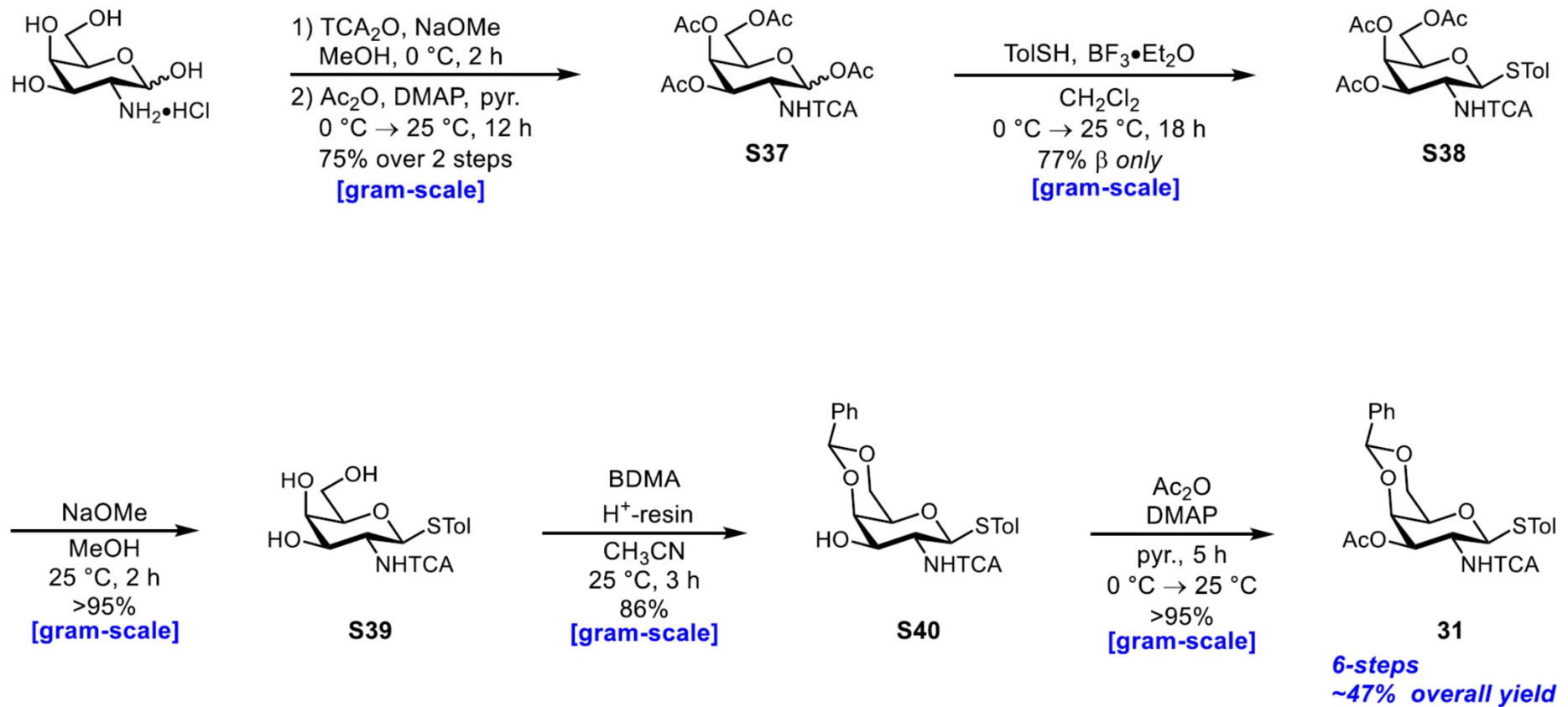
Total Synthesis of the Congested, Bisphosphorylated *Morganella morganii* Zwitterionic Trisaccharide Repeating Unit (Keith, Townsend, *JACS* **2019**, 12939)



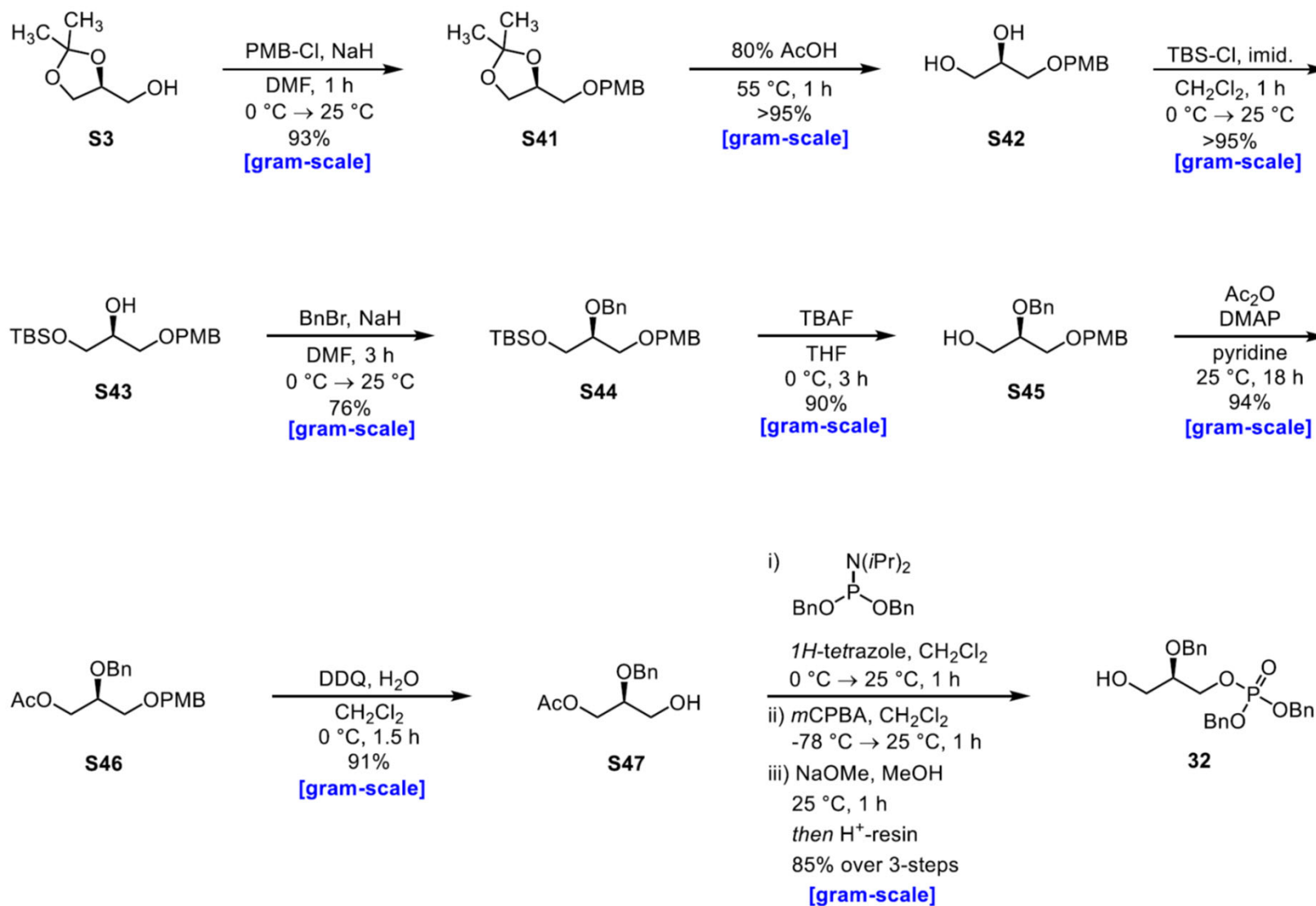
155 mg (Reinigung durch
Größenausschlusschromatographie an P2-Biogel)

D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.3 Oligosaccharid-Synthese in Lösung

Man trainiere die Kenntnisse zur Monosaccharid-Synthese:



D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.3 Oligosaccharid-Synthese in Lösung

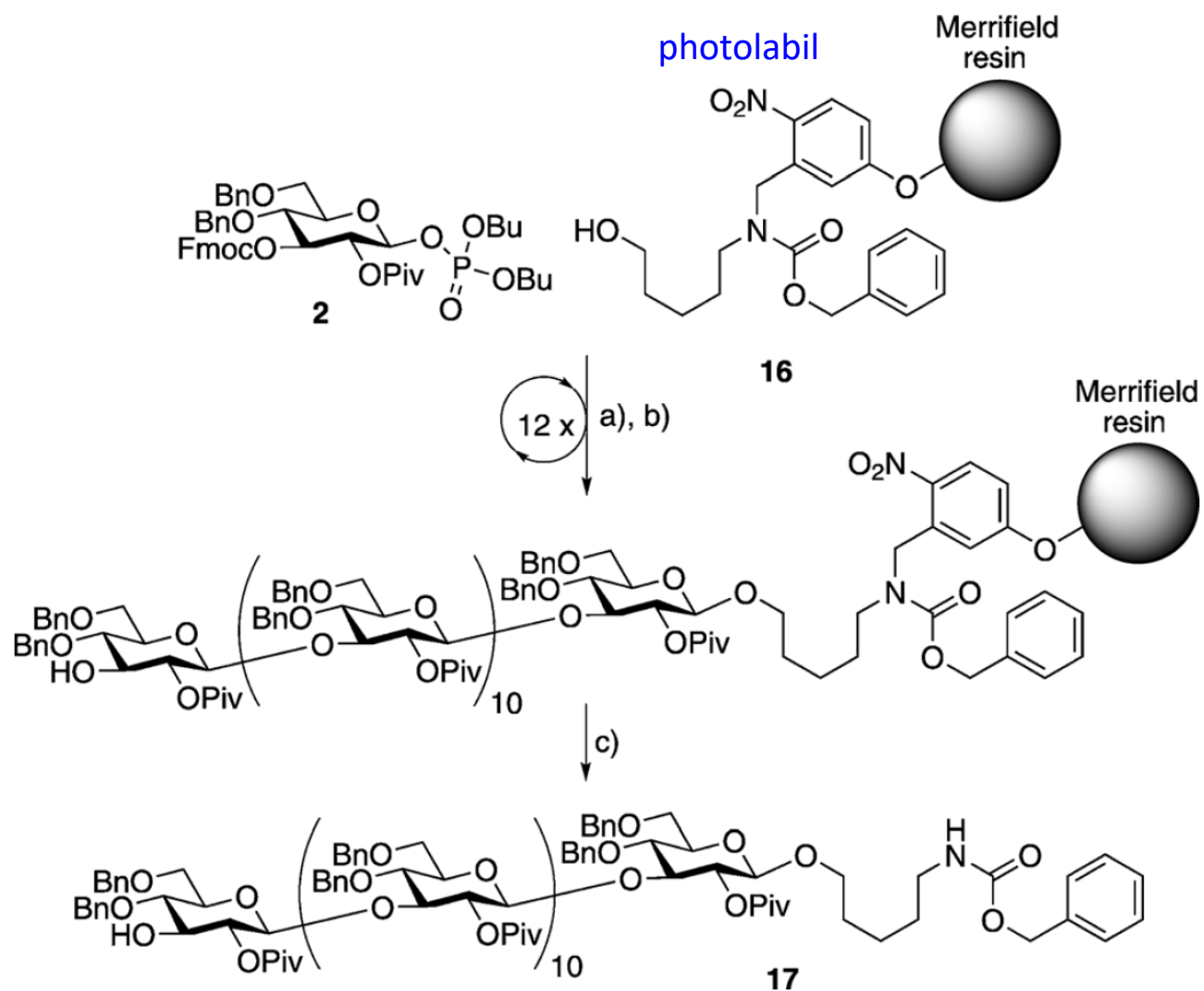


D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.4 Festphasensynthese

a) 3x3 Äq. **2**, TMSOTf, DCM, -15 °C (45 min) nach 0 °C (15 min);

b) Piperidin (20% v/v), DMF, RT, 15 min (3 x);

c) hv, DCM.

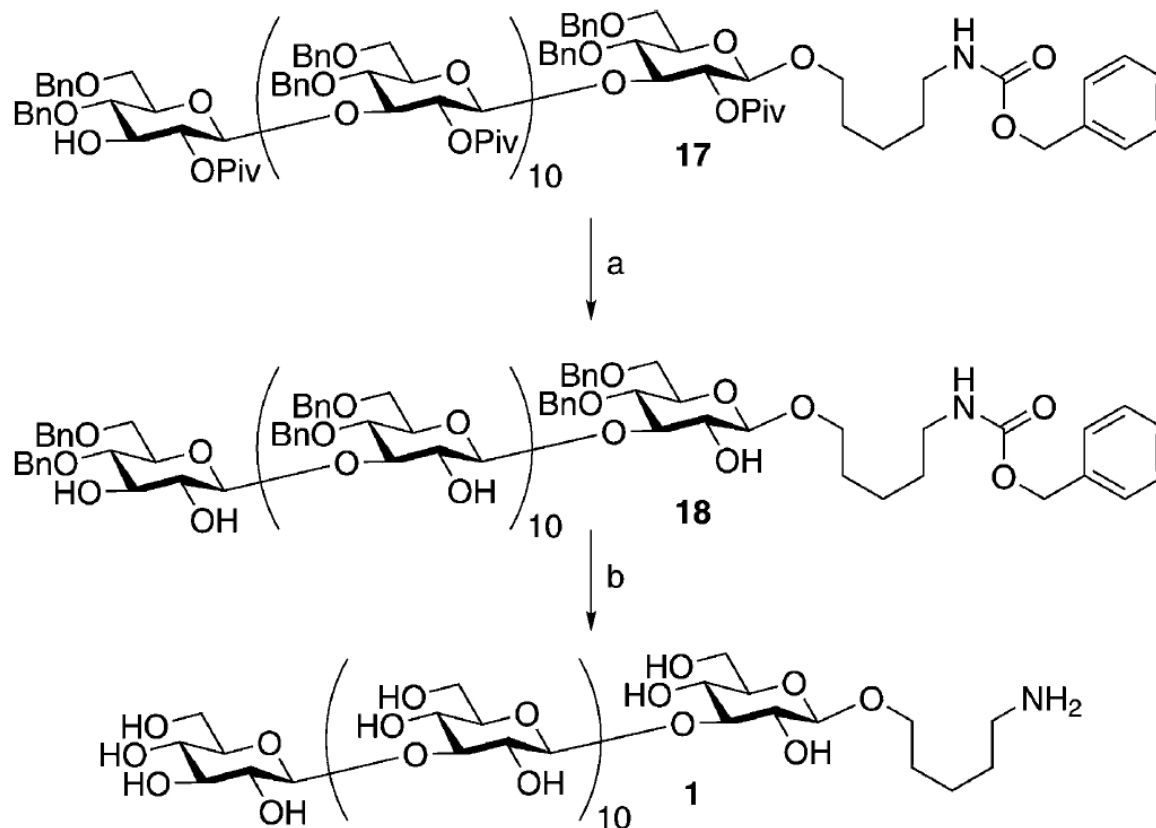


Seeberger et al., *CEJ* **2013**, 12497

D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.4 Festphasensynthese

Globale Entschützung
zum Dodecasaccharid,
einem β -1,3-Glucan.

Insgesamt: 56 h, 88%



a) NaOMe, MeOH, DCM, 56%; b) Pd(OH)₂, H₂, THF, H₂O, AcOH, 52%.

Seeberger et al., *CEJ* **2013**, 12497

D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.4 Festphasensynthese

Synthese eines Kupplungsbausteins

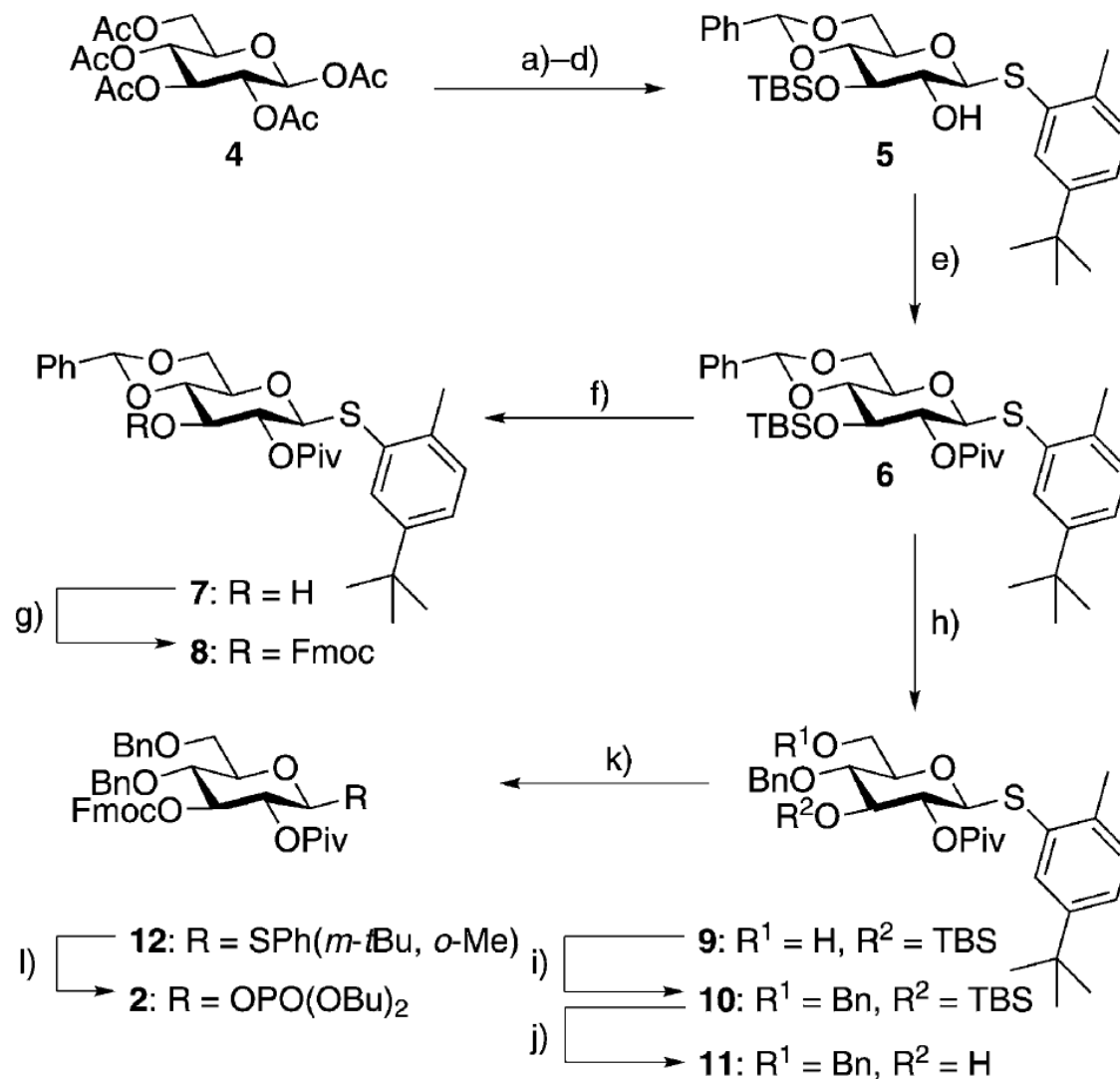
a) 2-Methyl-5-*tert.*-butylthiophenol, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, DCM, 94%;

b) NaOMe, MeOH, quant.;

c) Benzaldehyd-Dimethylacetal, CSA, MeCN, 87%;

d) TBSCl, Imidazol, DMF, 0 °C, 69%;

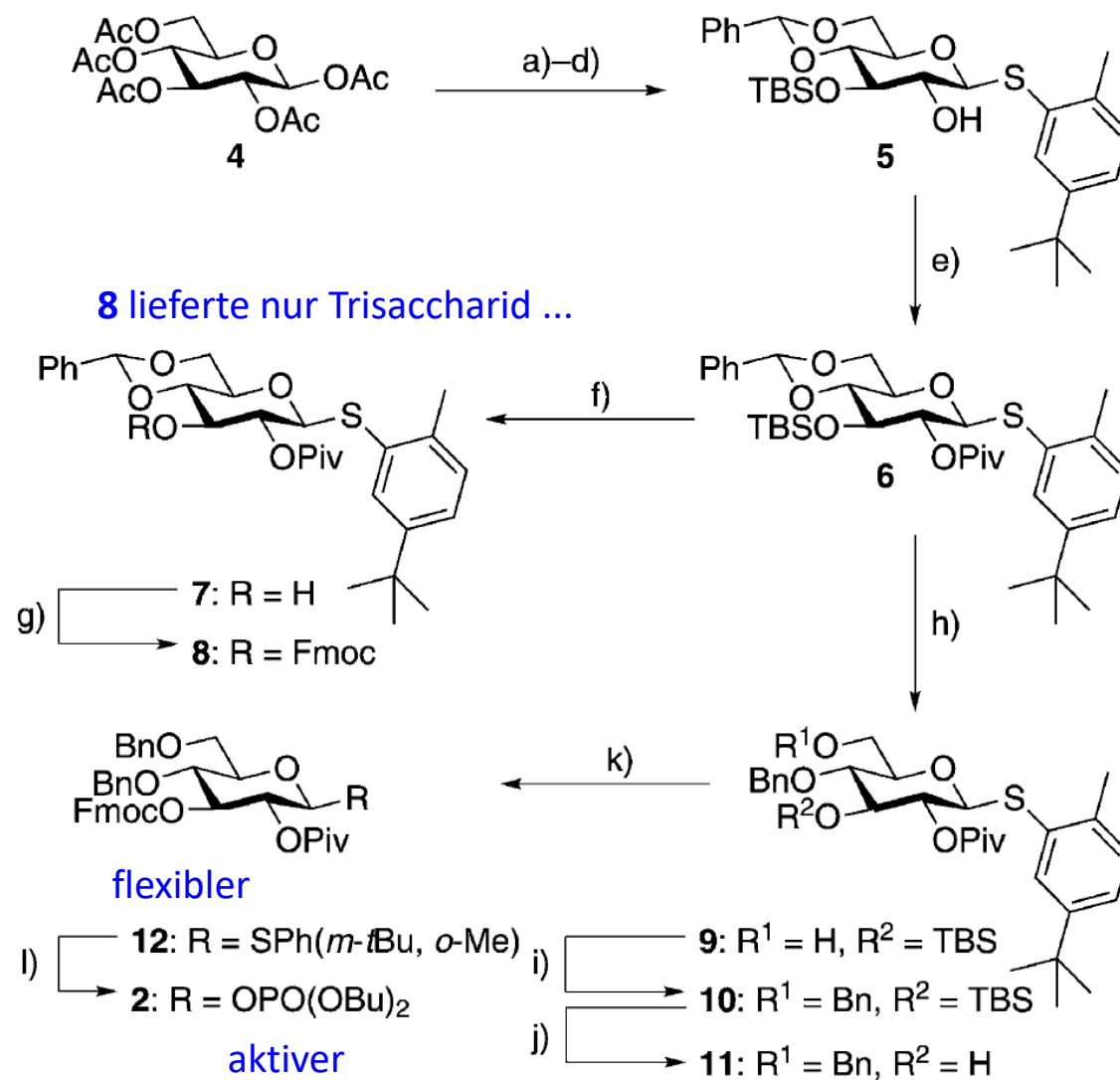
e) PivCl, DMAP, Pyridin, 79%;



D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.4 Festphasensynthese

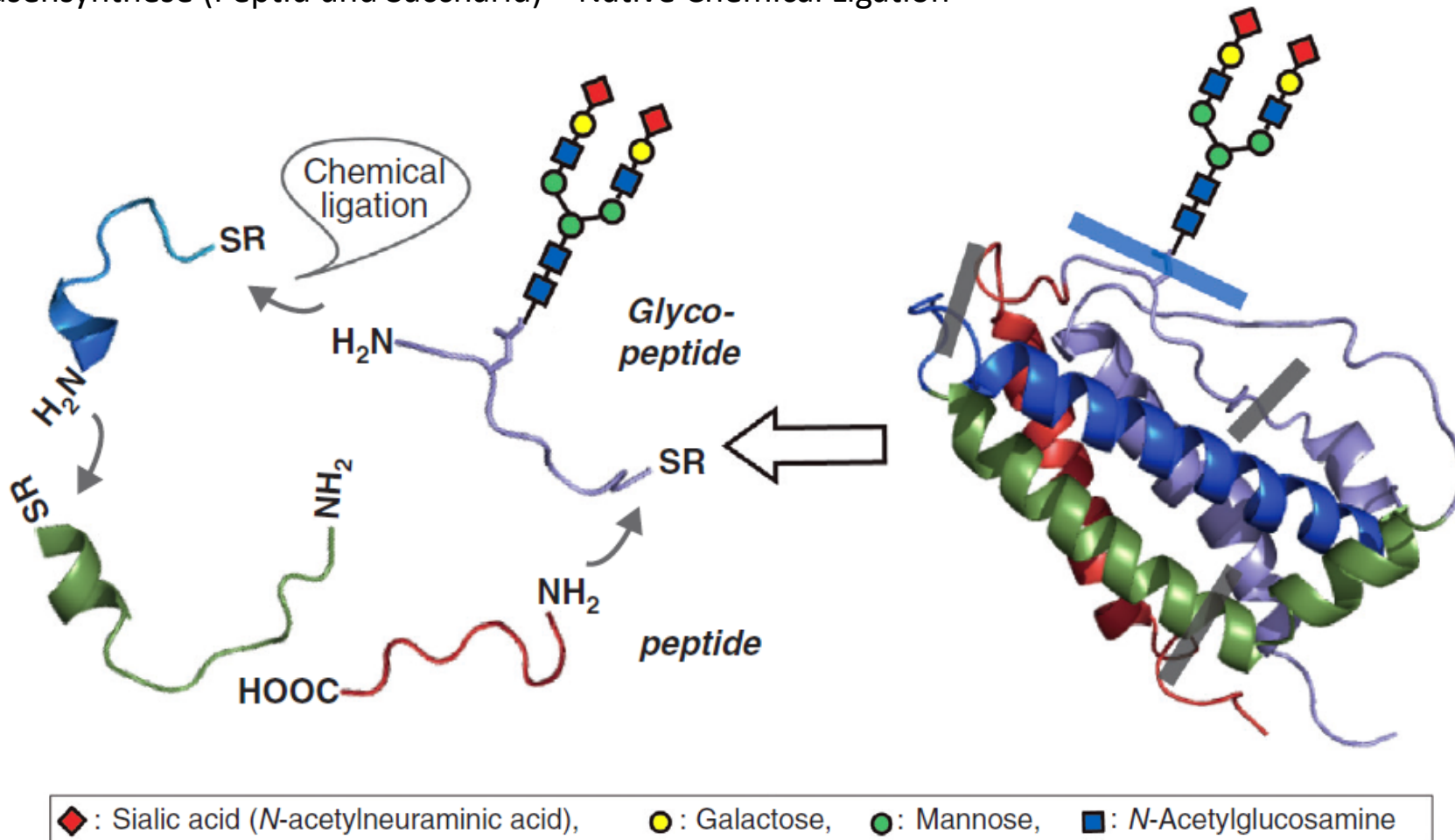
Synthese eines Kupplungsbausteins

- f) TBAF·3H₂O, AcOH, DMF, 97%; g) FmocCl, Pyridin, DCM, 97%;
- h) BH₃·THF, TMSOTf, DCM, 97%;
- i) BnBr, NaH, DMF, 78%;
- j) TBAF·3H₂O, AcOH, DMF, 85%;
- k) FmocCl, Pyridin, DCM, 91%;
- l) Dibutylphosphat, NIS, TfOH, 4 Å MS, DCM, 71%.



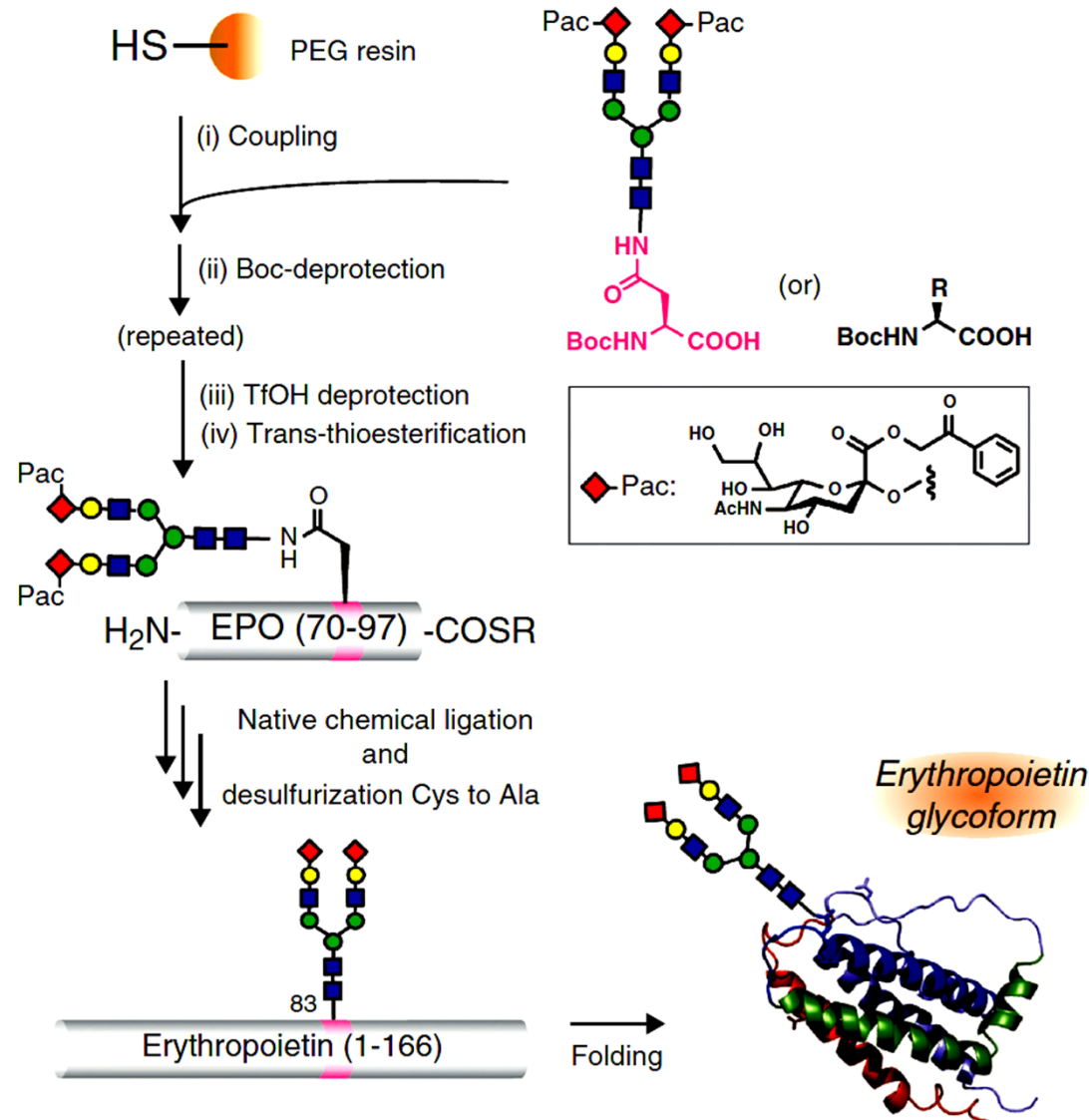
D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.4 Festphasensynthese

Eine Strategie zur Synthese von Glycoproteinen:
Festphasensynthese (Peptid und Saccharid) + Native Chemical Ligation



aus: Okamoto et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 92

D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.4 Festphasensynthese



Einbau synthetischer Glycopeptide durch Native Chemical Ligation, z. B. zum Glycoprotein-Hormon Erythropoietin

aus: Okamoto et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 92

D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.5 Biosynthese

Enzymatische *O*-Glycosid-Synthese

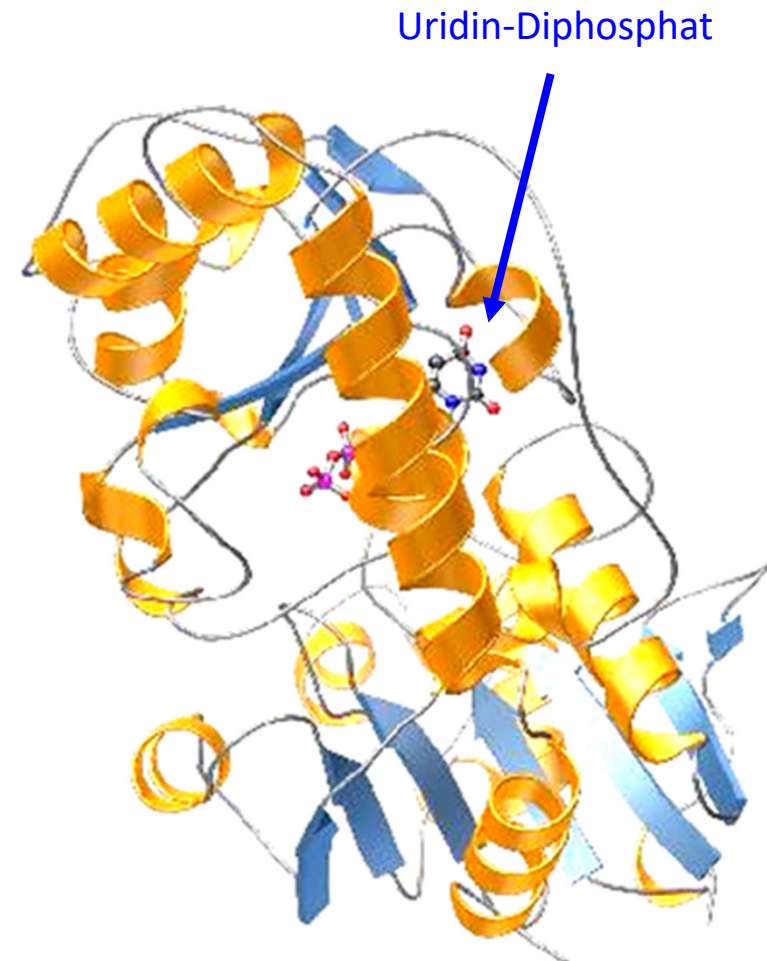
Vorteile: keine Schutzgruppen, definierte Stereochemie am anomeren Zentrum.

Nachteil: keine nicht-natürlichen Oligosaccharid-Analoga zugänglich.

2 Enzym-Klassen:

a) Glycosidasen (unspezifisch, da eigentl. Funktion beim Abbau von Oligosacch.)

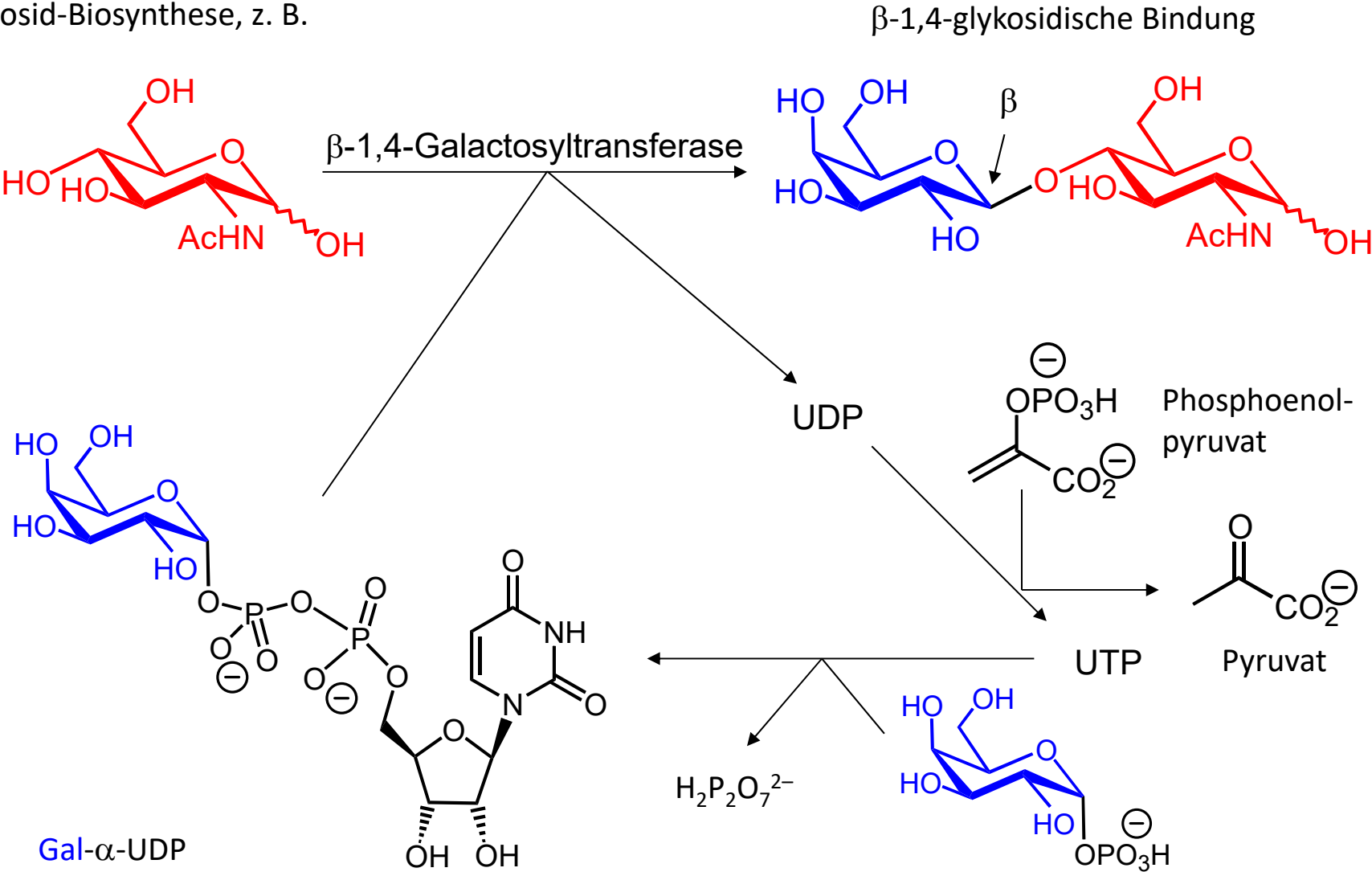
b) Glycosyltransferasen (spezifisch)



β -Glucosyltransferase (Phage T4)

D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.5 Biosynthese

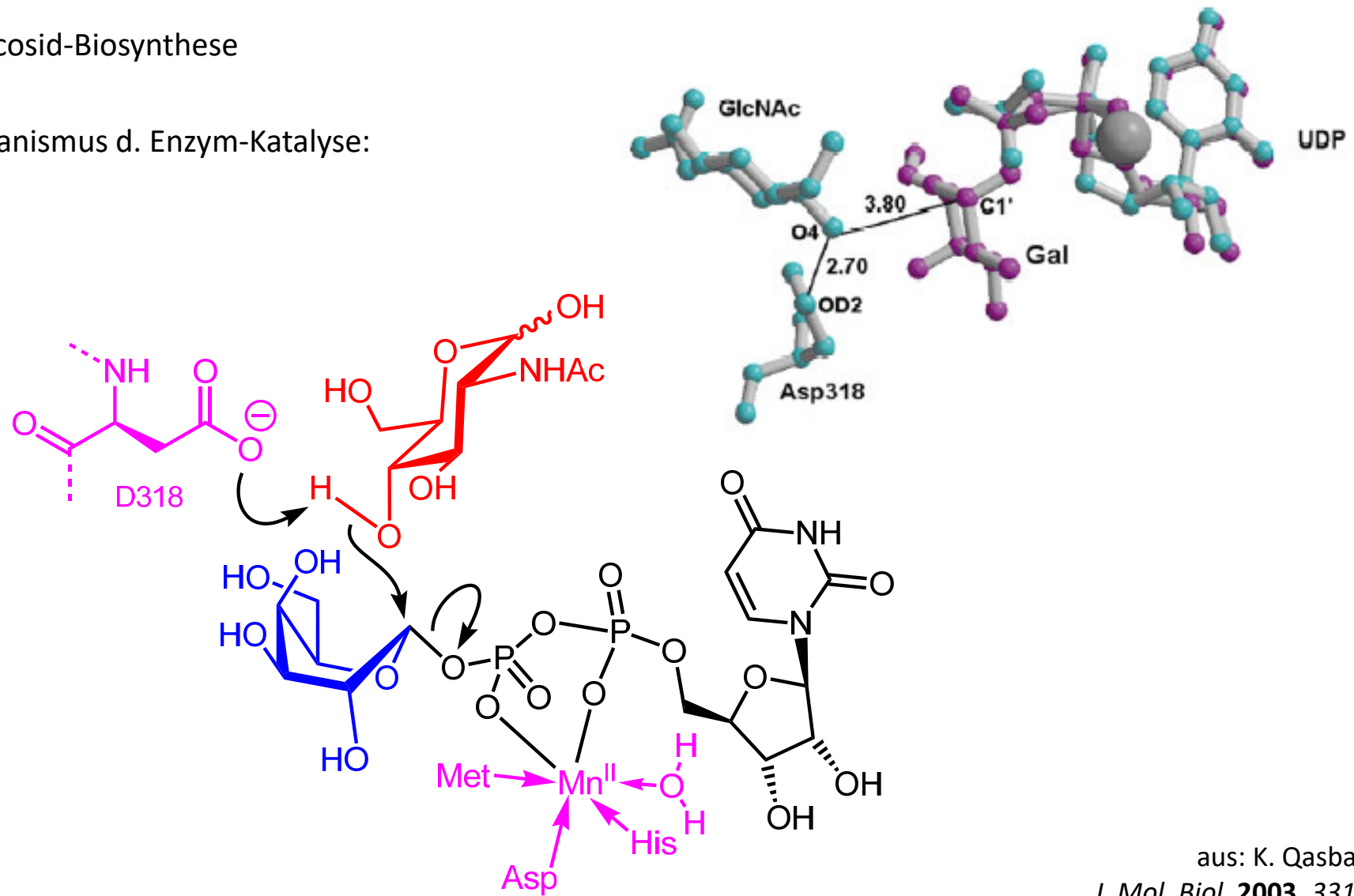
O-Glycosid-Biosynthese, z. B.



D. Saccharide - D.2 Synthese - D.2.5 Biosynthese

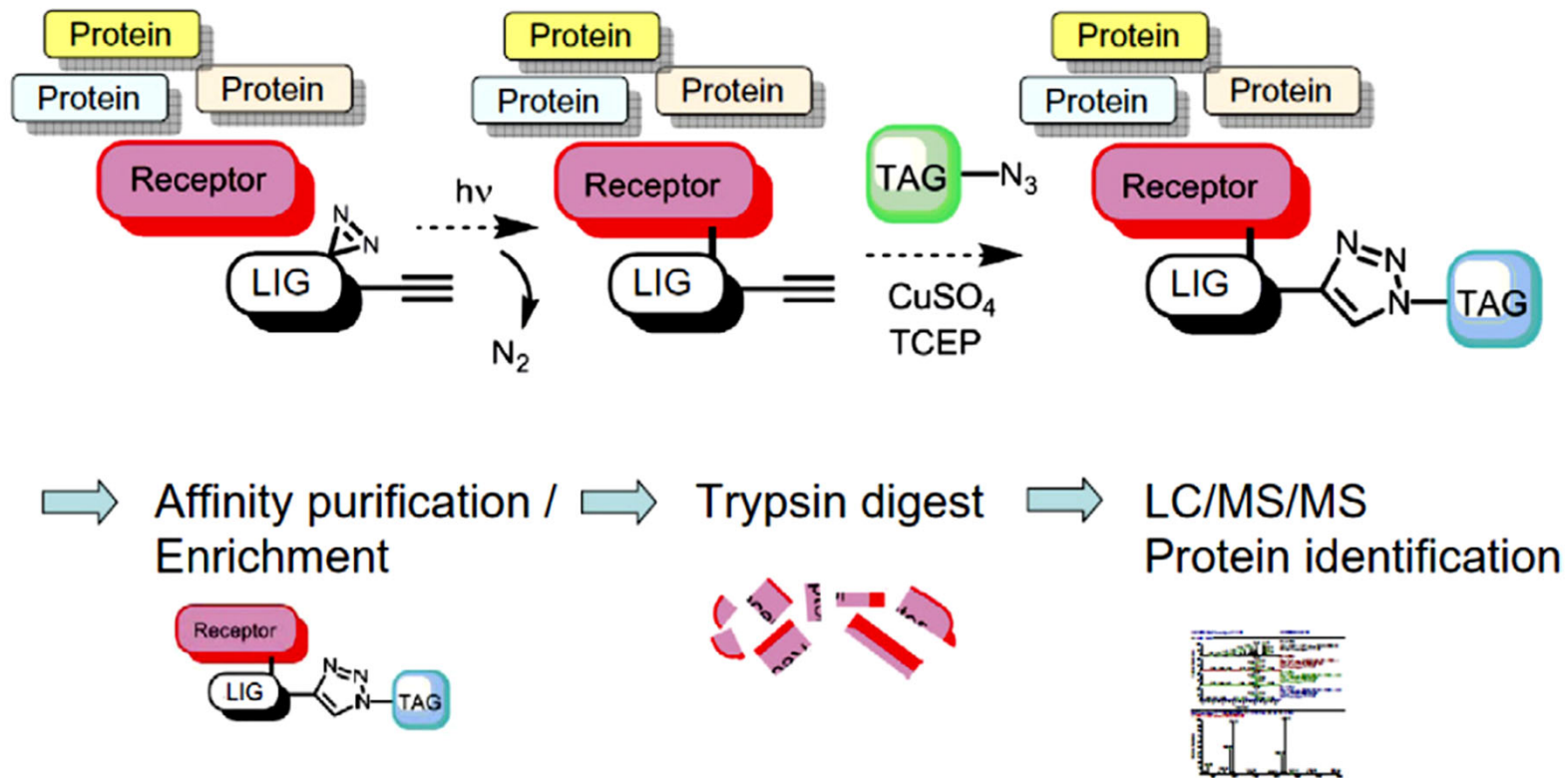
O-Glycosid-Biosynthese

Mechanismus d. Enzym-Katalyse:



E. Chemie der Targetsuche

Photoreaktion eines potentiellen Liganden (z. B. eines funktionalisierten Naturstoffs) mit z. B. einem Proteingemisch, gefolgt von Identifizierung und Isolierung kovalenter Addukte und deren massenspektrometrischer Analyse; Identifizierung häufig mit Hilfe von "Click-Chemie".

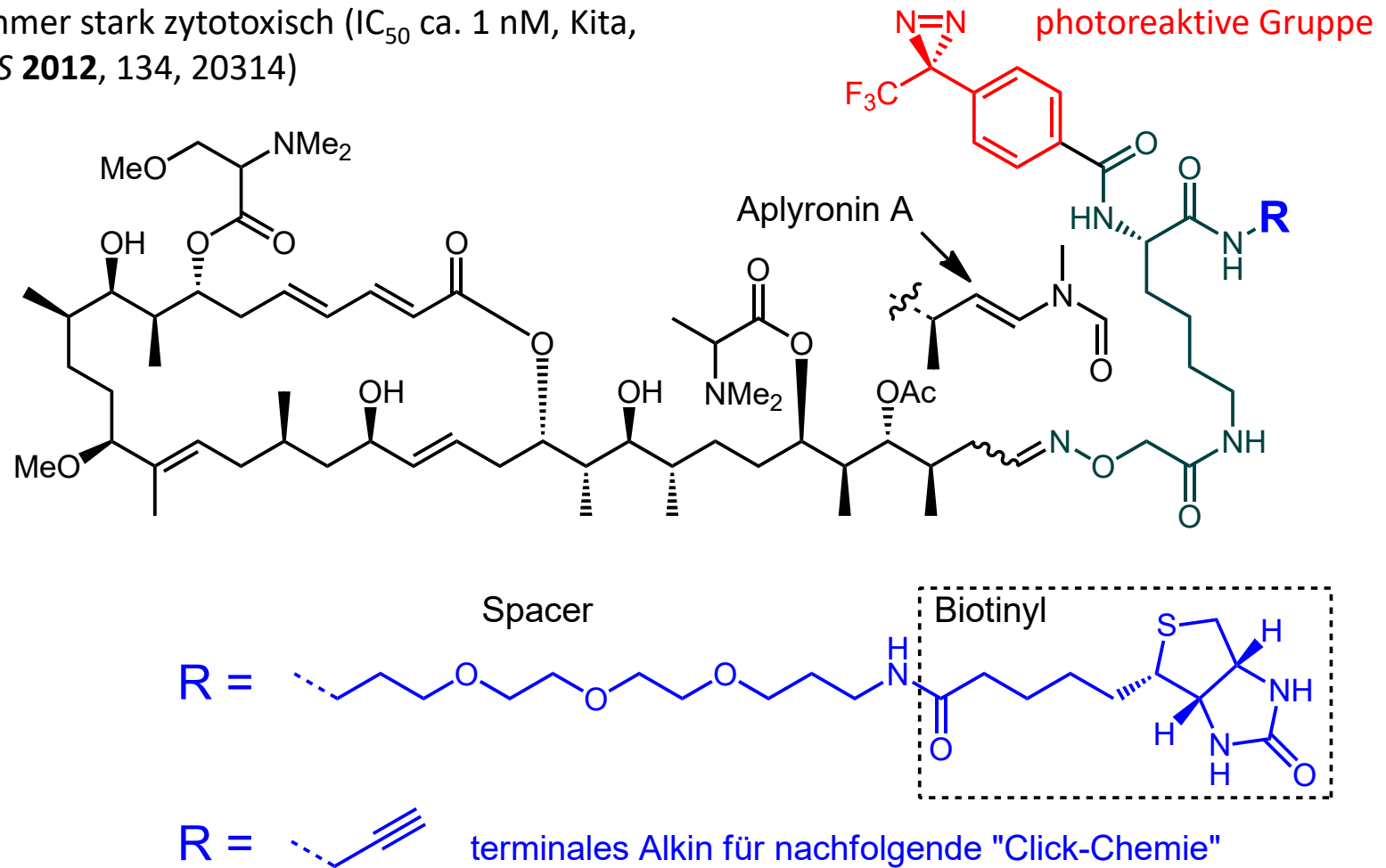


from: Meijler et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 554

E. Chemie der Targetsuche

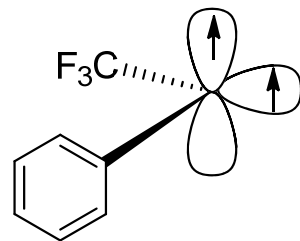
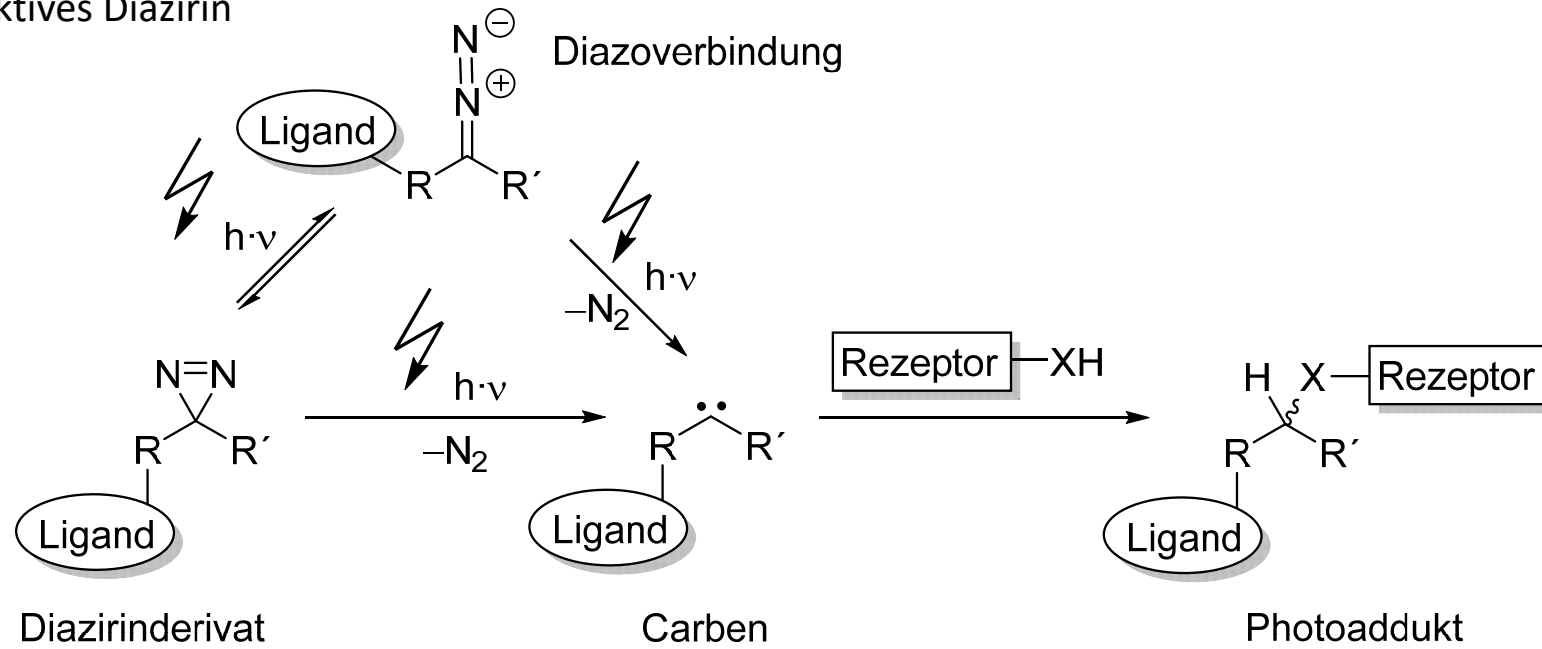
Aplyronin A aus dem Seehasen *Aplysia kurodai* ist stark zytotoxisch, inhibiert die Polymerisation von Actin und führt zur Depolymerisierung von F-Actin.

Analogon noch immer stark zytotoxisch (IC_{50} ca. 1 nM, Kita, Kigoshi et al., *JACS* **2012**, 134, 20314)

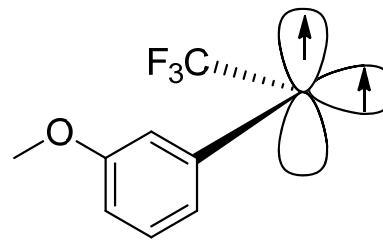


E. Chemie der Targetsuche

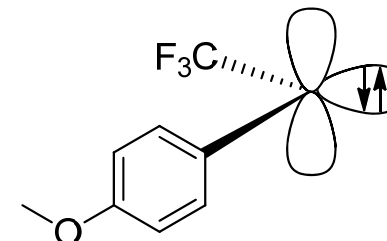
Photoreaktives Diazirin



Triplettcarben



Triplettcarben



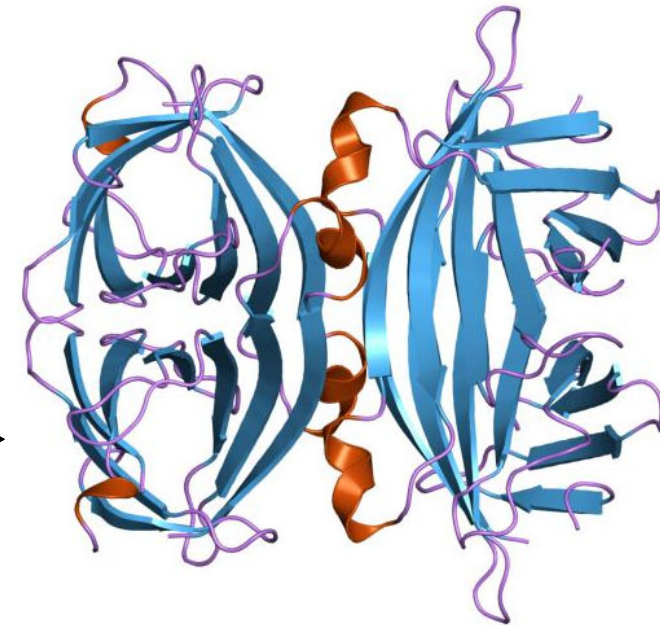
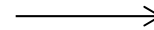
Singulettcarben

E. Chemie der Targetsuche

Avidin und Streptavidin

Avidin: glycosyliertes homotetrameres Protein (4x128 Aminosäuren) aus Eiklar, welches Biotin stark bindet (pK_D 14 bis 15), sogar Biotin-Mangel auslösen kann; Denaturierung beim Kochen.

Streptavidin: nicht-glycosyliertes homotetrameres Protein (4x159 Aminosäuren) aus *Streptomyces avidinii* mit ähnlich starker Bindung an Biotin.



Vorgehen:

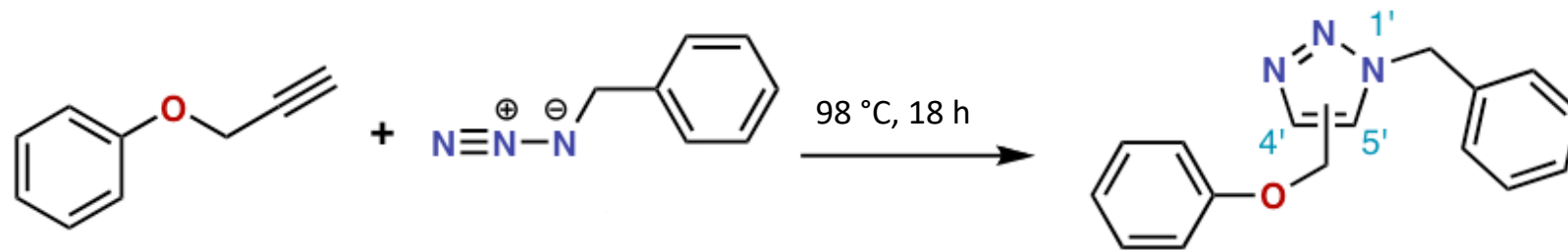
Die Probe wird mit Streptavidin/Avidin-Harz/Gel-Kügelchen (beads) inkubiert. Jede biotinylierte Gemisch-Komponente wird binden, und nicht biotinylierte Proteine werden ausgewaschen.

Häufig wird monomeres Streptavidin verwendet, welches schwächer bindet (pK_D 8) und die Elution der gewünschten Proteine mit Biotin-Lösung erlaubt.



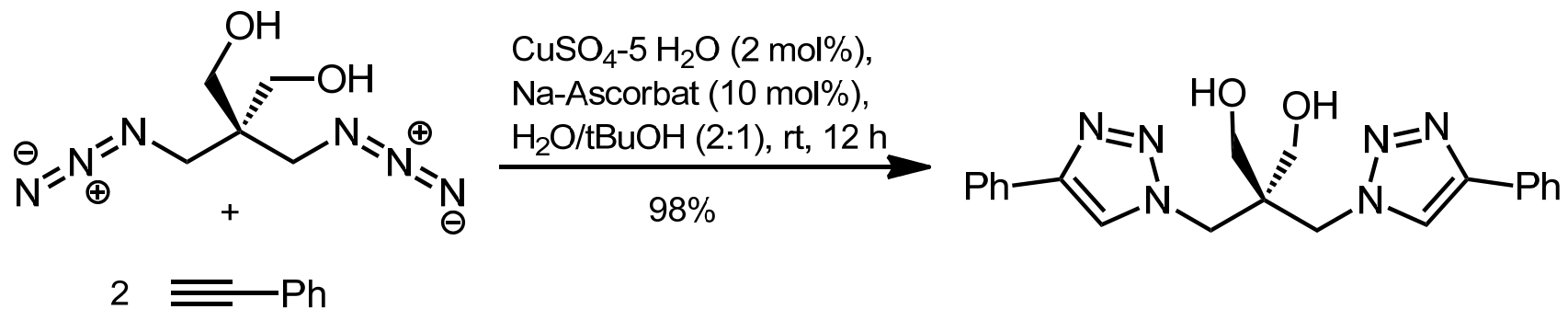
E. Chemie der Targetsuche

Huisgen-Reaktion



Cu(I)-Katalyse (Meldal, Sharpless, 2002, NP 2022):
schneller, regioselektiv zum 1,4-disubst. Triazol,
bioorthogonale "Click-Chemie"

Cu(I) in situ aus Cu(II) und Ascorbat



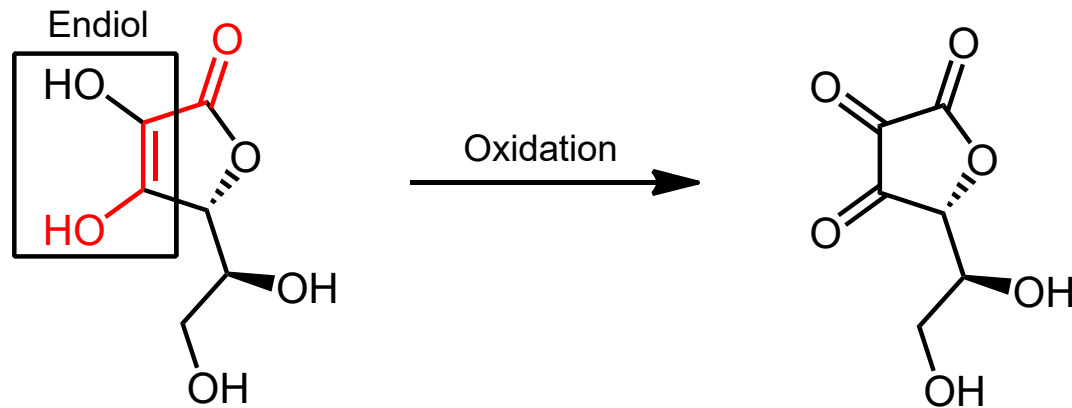
Rolf Huisgen
(geb. 1920)



E. Chemie der Targetsuche

Ascorbinsäure

Mangel führt zu Skorbut als Folge von Kollagenschäden, da Vitamin C Cofaktor bei der Hydroxylierung von Lysin und Prolin.



L(+)-Ascorbinsäure (Vitamin C)
eine vinyloge Carbonsäure (pK_a 4.25)



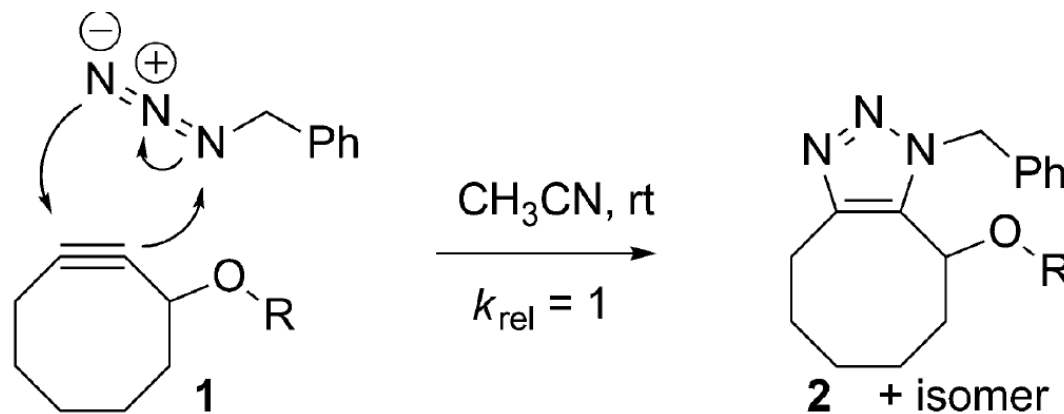
Sanddorn: 2-8 g Ascorbinsäure pro kg,
Vogelbeere 1 g/kg, Orange 500 mg/kg,
Apfel 100 mg/kg

E. Chemie der Targetsuche

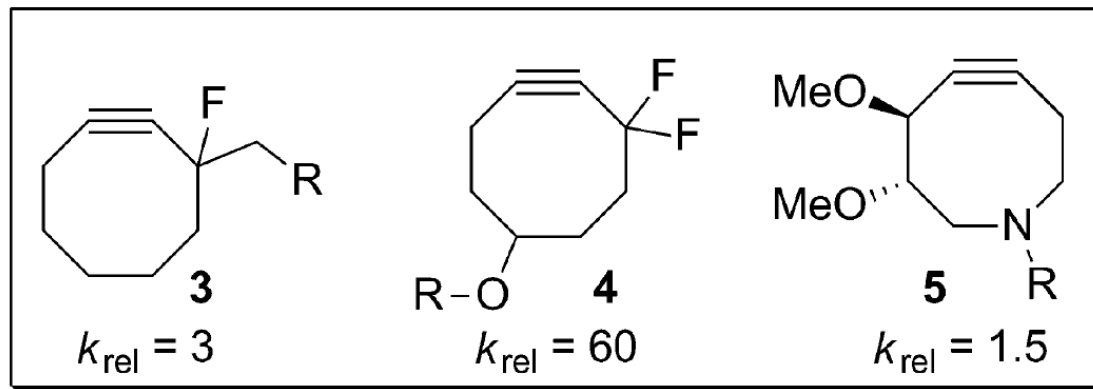
Cu-freie Click-Reaktion mit ring-gespannten Alkinen (Bertozzi, NP 2022)

HOMO des Azids + LUMO des Alkins:

elektronenziehende Substituenten erniedrigen LUMO (k : Geschw.-Konst. 2. Ordnung)



100-1000x
langsamer als Cu⁺-
katalysiert



aus: Bertozzi et al., *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 1272.

E. Chemie der Targetsuche

Vorgehen am Beispiel der Photoaffinitäts- und Fluoreszenzmarkierung von Actin

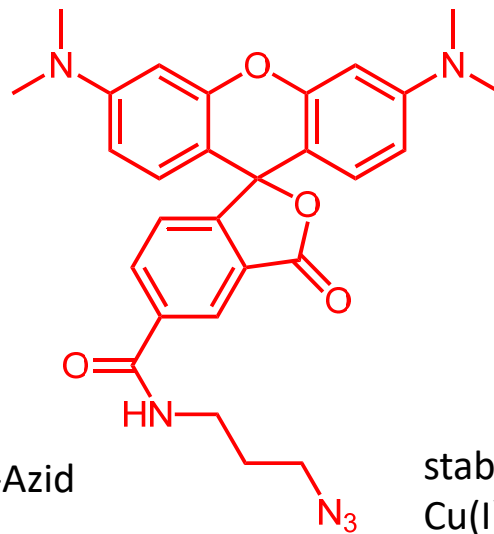
Inkubation von Actin (0.24 nmol, aus Kaninchenmuskel, kommerziell) mit dem Aplyronin A-Click-Konstrukt in DMSO/Puffer (0 °C, 30 min)

UV-Bestrahlung (Handlampe, 365 nm, 0 °C, 15 min)

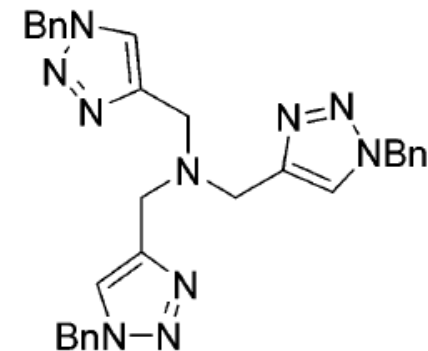
Zugabe von TAMRA-Azid, TBTA (Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin), Na-ascorbat, CuSO₄

Quenching mit SDS-Puffer (95 °C)

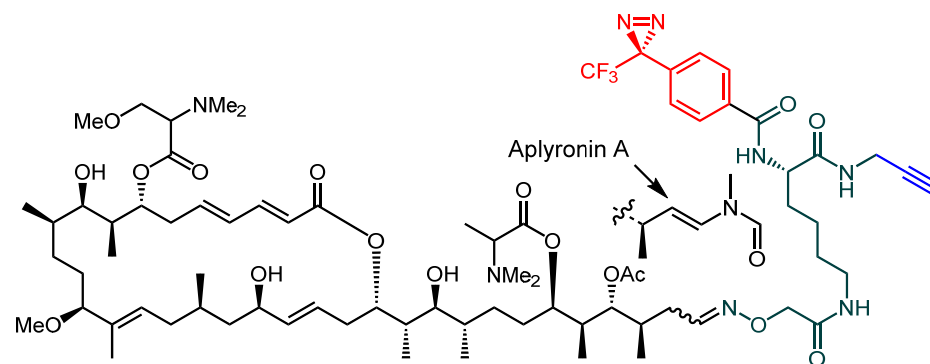
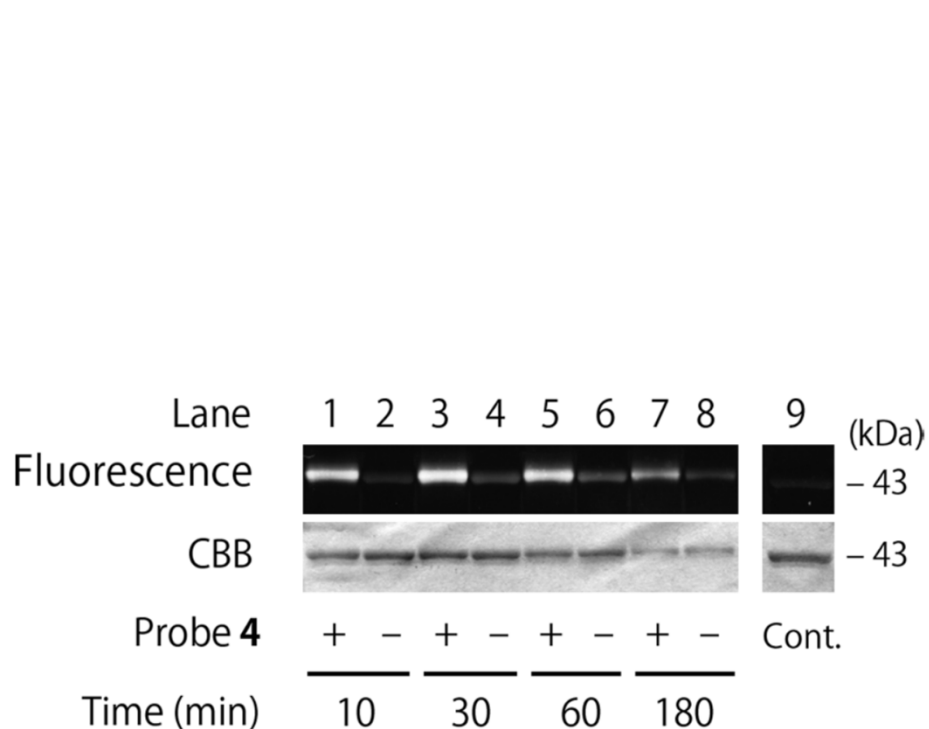
PAGE mit Fluoreszenz-Detektion



Tetramethylrhodamin-Azid
(rot fluoreszierend)



stabilisiert katalytisch wirksames
Cu(I) (Fokin, *OL* **2004**)



=> Aplyronin-Konstrukt
bindet an Actin

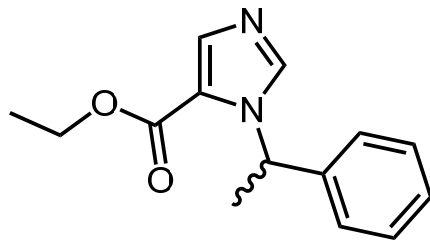
Figure 2. Photolabeling experiments for actin with **4**. After actin (10 μM) was incubated with or without **4** (20 μM) in DMSO/G-buffer (1:9), samples were irradiated with UV₃₆₅, TAMRA azide, sodium ascorbate, CuSO₄, and TBTA were added, and the mixture was incubated for the times shown at the bottom. Labeled actin was detected by TAMRA fluorescence and CBB (Coomassie brilliant blue) stain. The control (lane 9) consisted of actin without UV irradiation or fluorescence labeling.

E. Chemie der Targetsuche

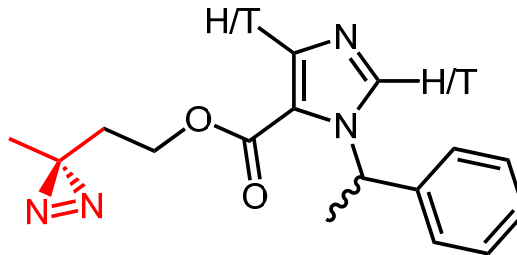
Anästhetikum Etomidat: (*R*)-Enantiomer 10-fach stärker wirksam als (*S*)-Enantiomer

Bindung an den γ -Aminobuttersäure-Rezeptor Typ A (GABA_ARs)

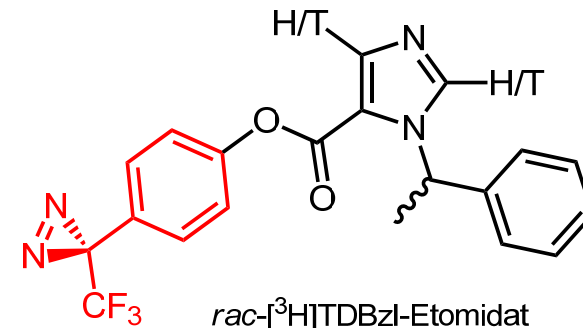
Tritium als Reportergruppe!



rac-Etomidat



rac-[³H]Azi-Etomidat

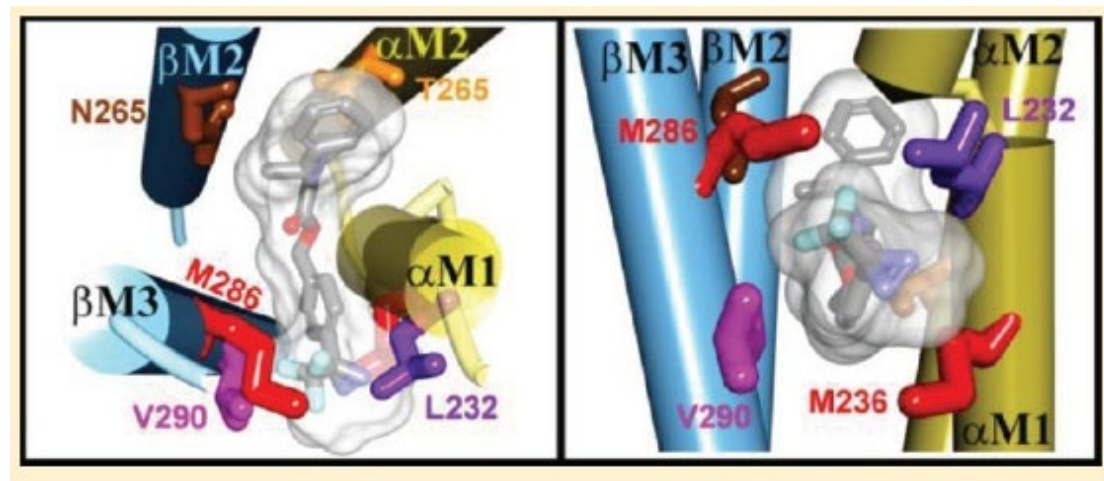


rac-[³H]TDBzl-Etomidat

Links: Photomarkierung durch [³H]TDBzl-Etomidat: β 3Val-290 in der β 3M3-Transmembran-Helix

Rechts: Photomarkierung durch [³H]Azietomidat: α 1Met-236 in α 1M1

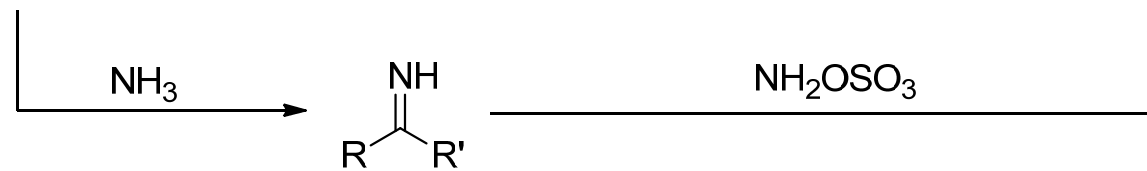
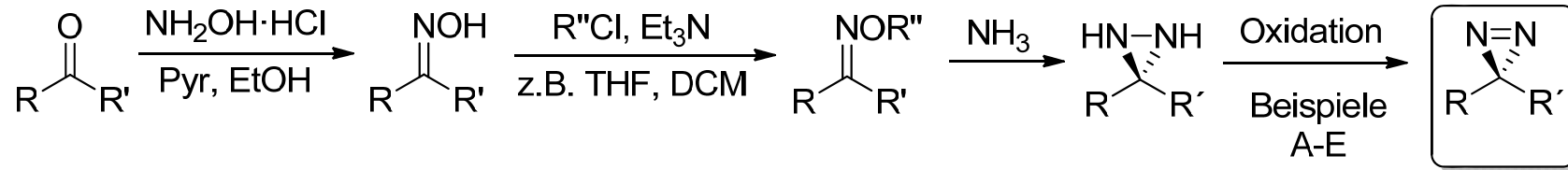
In den α M2- und β M2-Helices wurde keine Aminosäure photomarkiert.



Cohen et al., *Biochemistry* **2012**, 51, 836

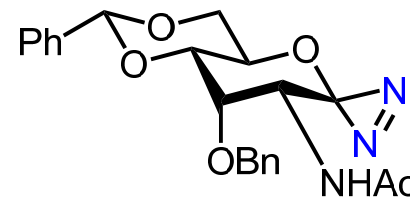
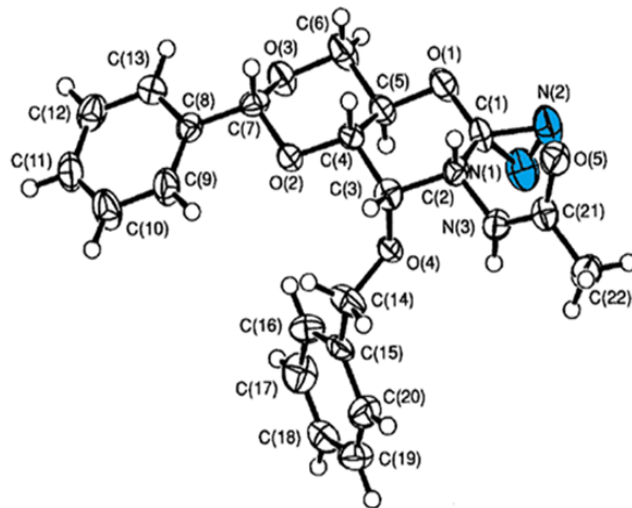
E. Chemie der Targetsuche

Diazirin-Synthese



- A: I₂, Et₃N, DCM, 0 °C
- B: Ag₂O, Et₂O, RT
- C: *t*-BuOCl, Et₂O, -50 °C
- D: MnO₂, Et₂O, RT
- E: PCC, Pyr, DCM, 0 °C

R = Alkyl, Phenyl R' = H, Alkyl, CF₃ R'' = Tos, Mes



Bindungslänge:

N=N = 126 pm

C-N = 147 pm

Winkel:

N-C-N = 50.8°

O-C(N₂)-C = 116.0°

E. Chemie der Targetsuche

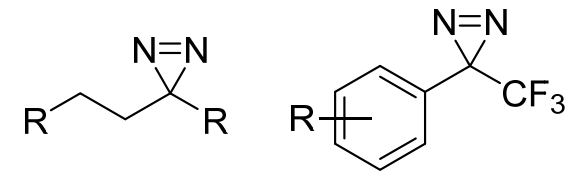
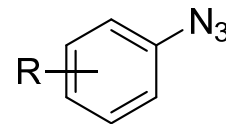
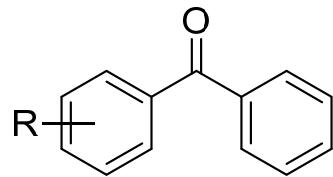
Häufig verwendete photoreaktive Gruppen

Photophor:

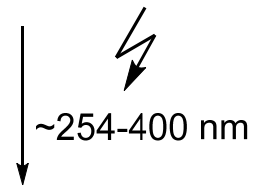
Benzophenon

Arylazid

**Alkyldiazirin/
Trifluormethylaryldiazirin**



Wellenlänge
zur Aktivierung:

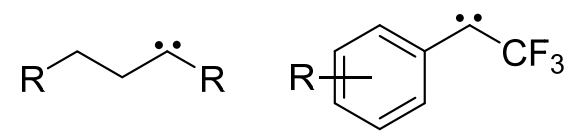
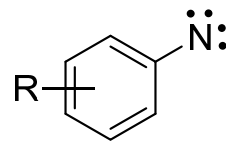
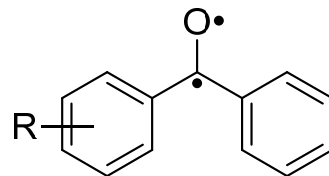


reaktives
Intermediat:

Diradikal

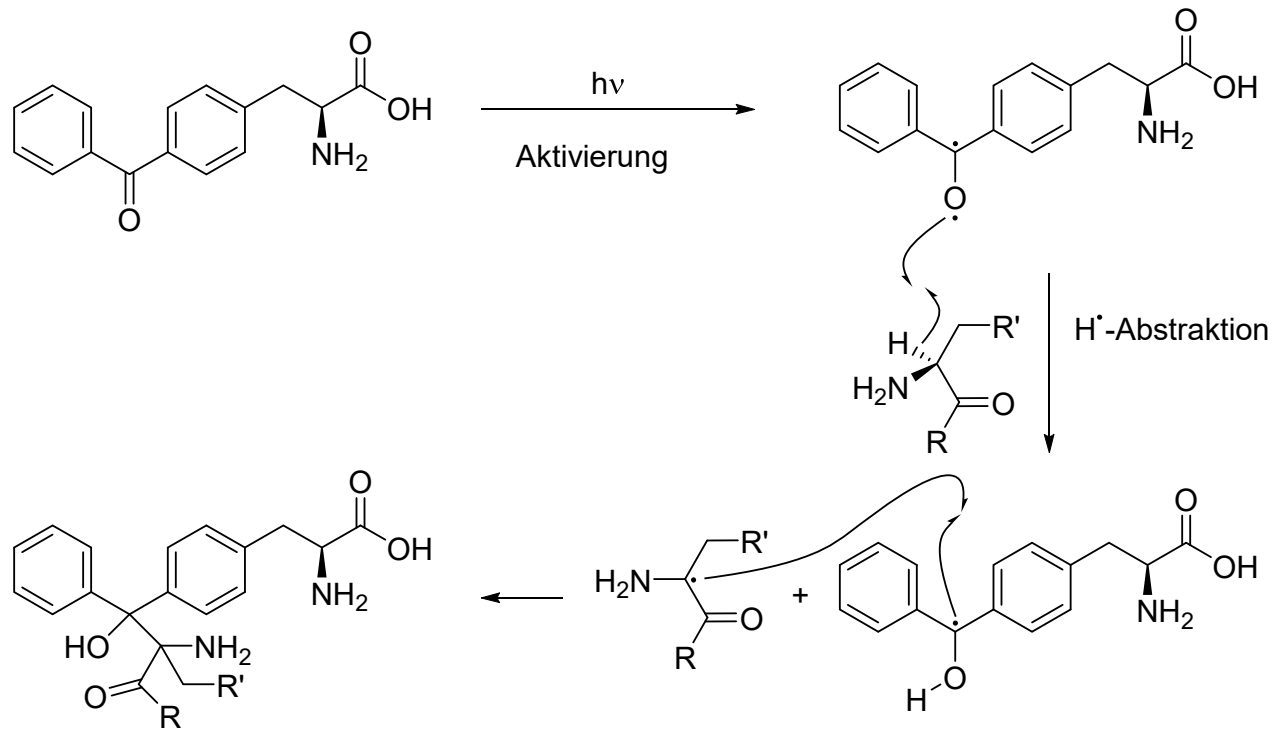
Nitren

Carben



E. Chemie der Targetsuche

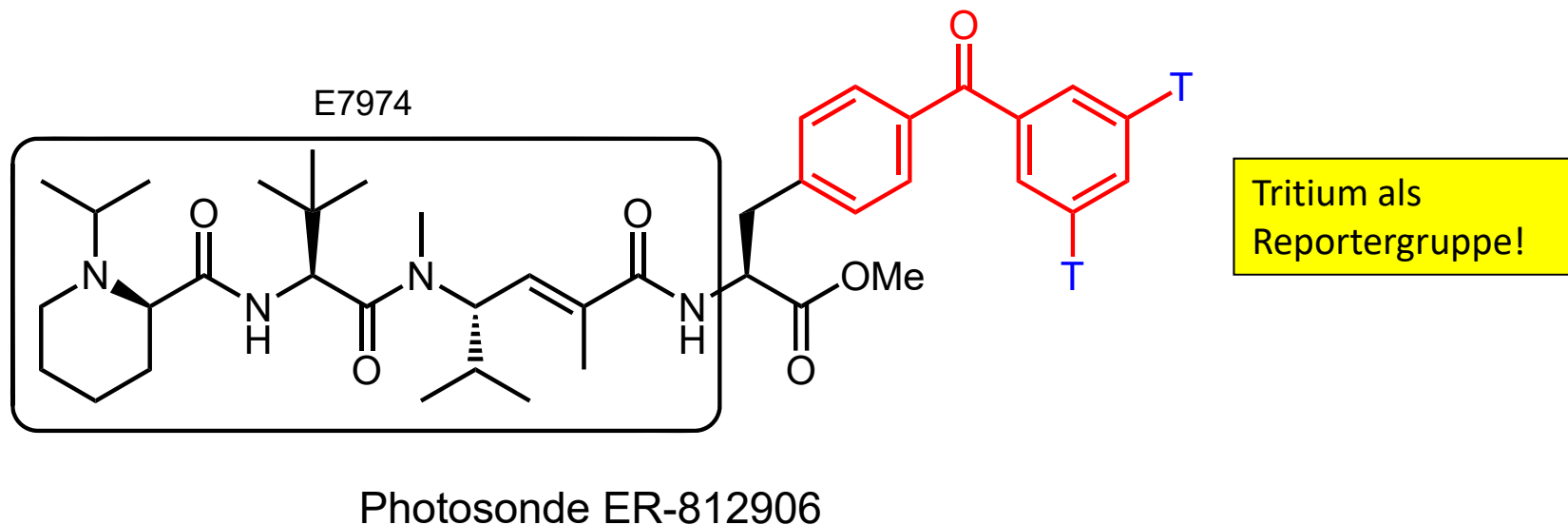
Photoreaktives Benzophenon



E. Chemie der Targetsuche

Mariner Naturstoff Hemiasterlin

Die Benzophenon-Photosonde ER-812906 inhibiert die Tubulin-Polymerisation (IC_{50} 2.2 $\mu\text{mol/L}$).

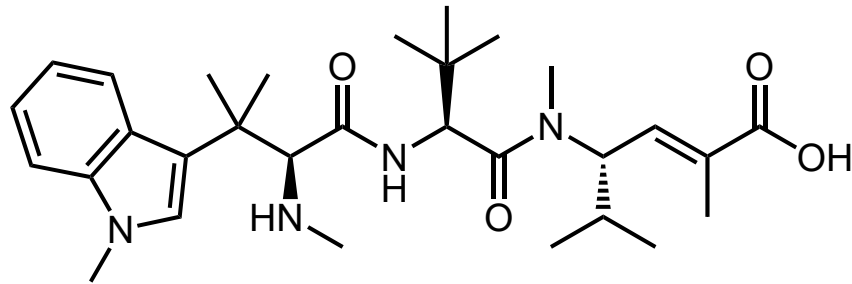


Die radioaktive Photosonde [^3H] ER-812906 wurde mit Rinderhirn-Tubulin inkubiert und bestrahlt, zeigend eine bevorzugte Bindung an α -Tubulin ([Autoradiographie nach SDS-PAGE](#)).

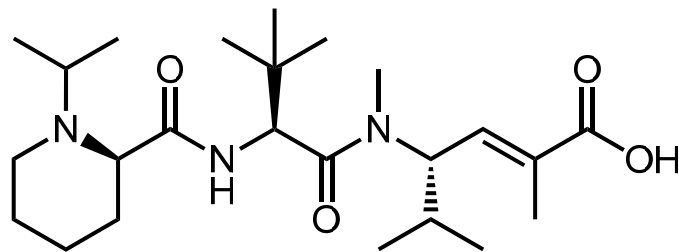
Kuznetsov et al., *Mol. Cancer Ther.* **2009**, 8, 2852

E. Chemie der Targetsuche

Mariner Naturstoff Hemiasterlin

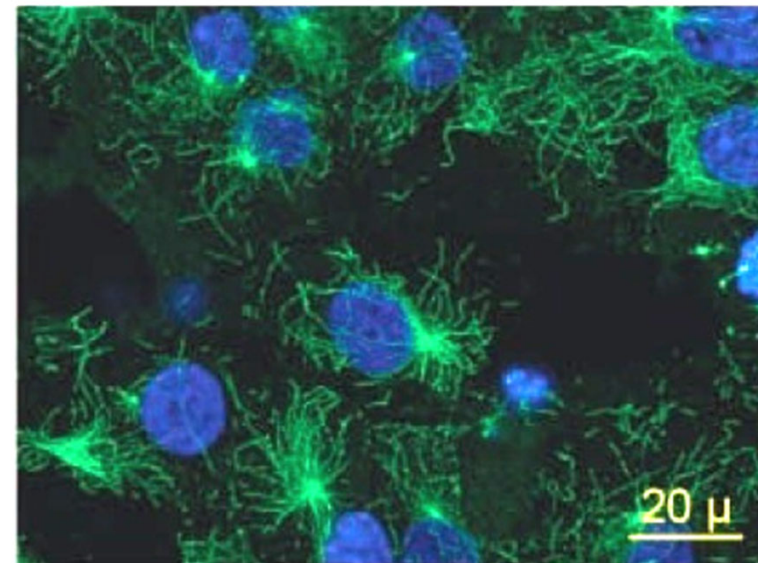


Hemiasterlin



Analogon E7974

Das Hemiasterlin-Analogon E7974 (65 nM) blockiert die Bildung der Mikrotubuli in menschlichen Prostatakrebszellen (DU 145).



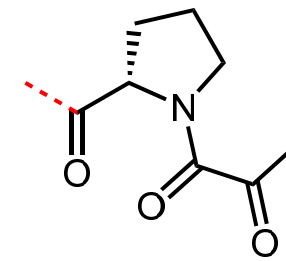
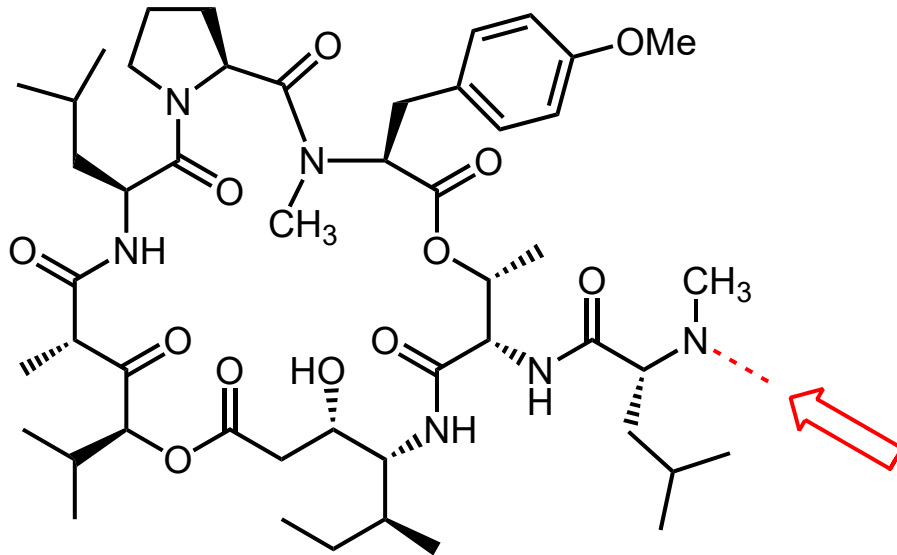
E7974, 65 nM

Kuznetsov et al., *Mol. Cancer Ther.* **2009**, 8, 2852

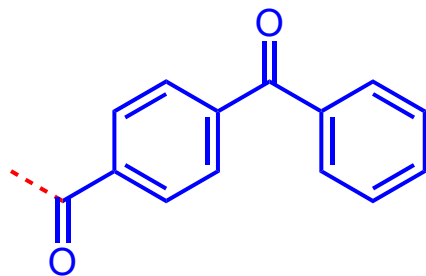
E. Chemie der Targetsuche

Aplidin (= Dehydrodidemnin B, Plitidepsin)

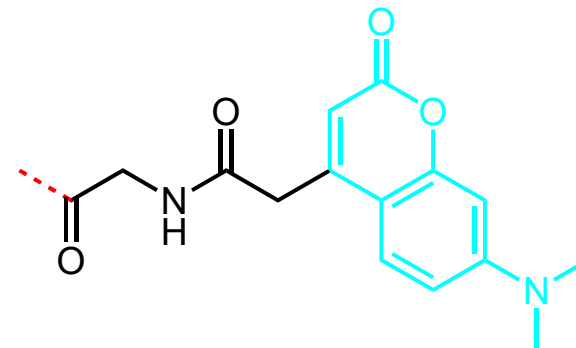
Klinische Phase III



Review: Joullié et al., *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 404



Benzophenon zur
Photoaffinitätsmarkierung



Cumarin zur
Fluoreszenzmikroskopie

E. Chemie der Targetsuche

Aplidin (= Dehydrodidemnin B, Plitidepsin)

Didemnin B:

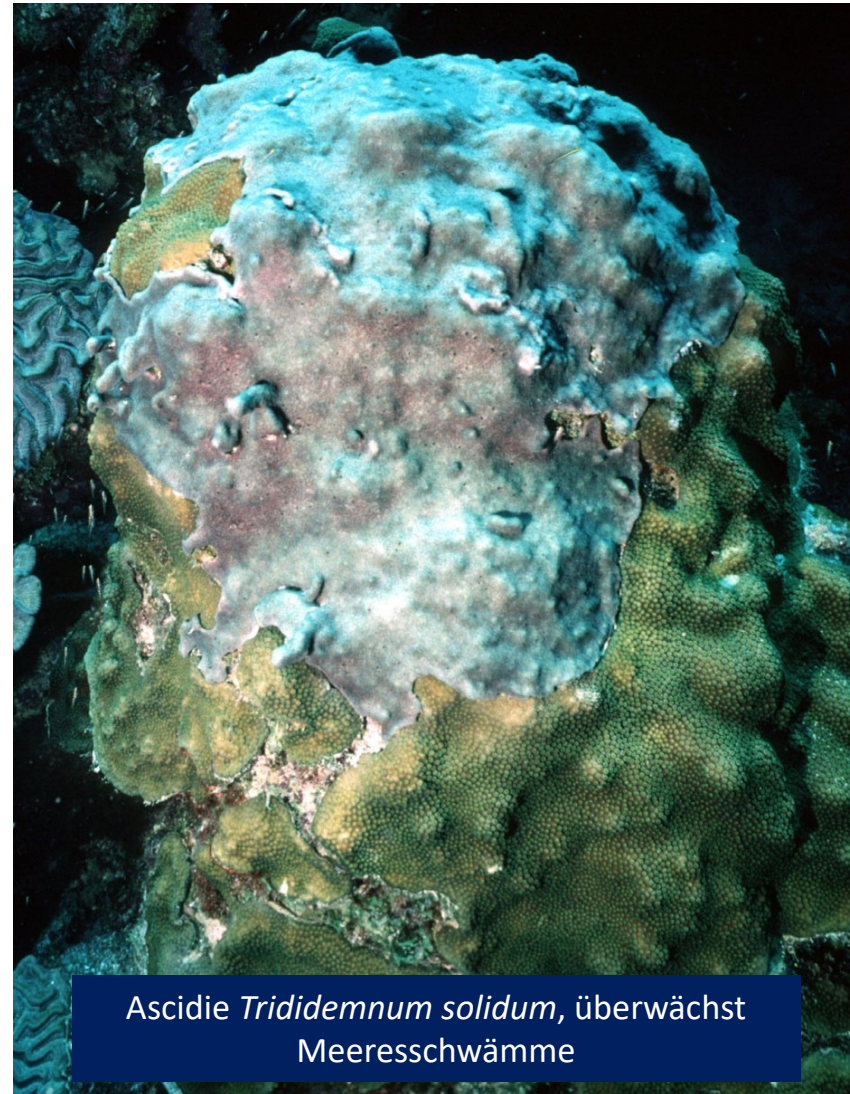
erster mariner Naturstoff in klinischer
Testung als Antitumormittel
(abgebrochen 1990 wg. Kardiotoxizität)

Aplidin:

Phase III zur Behandlung bösartiger
Neoplasmen, T-Zell-Lymphomen,
Myelofibrose, Myelomen

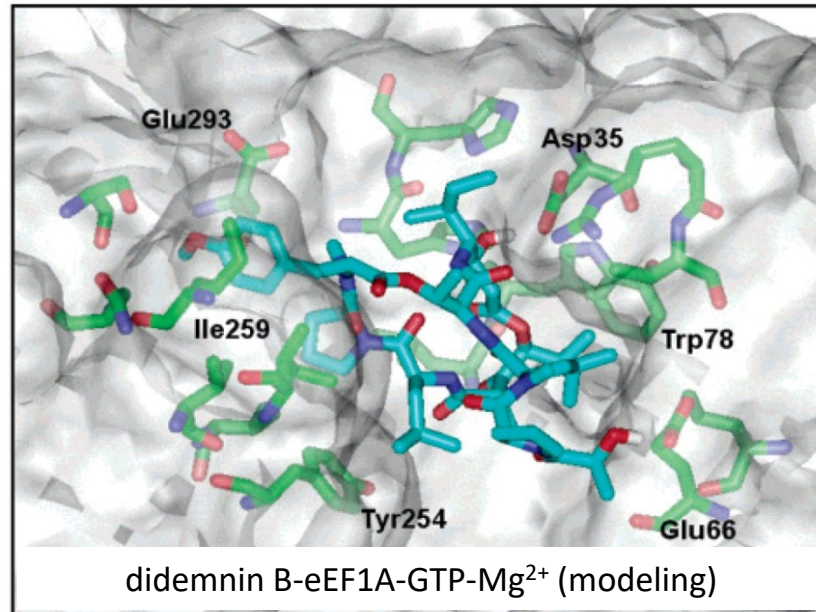
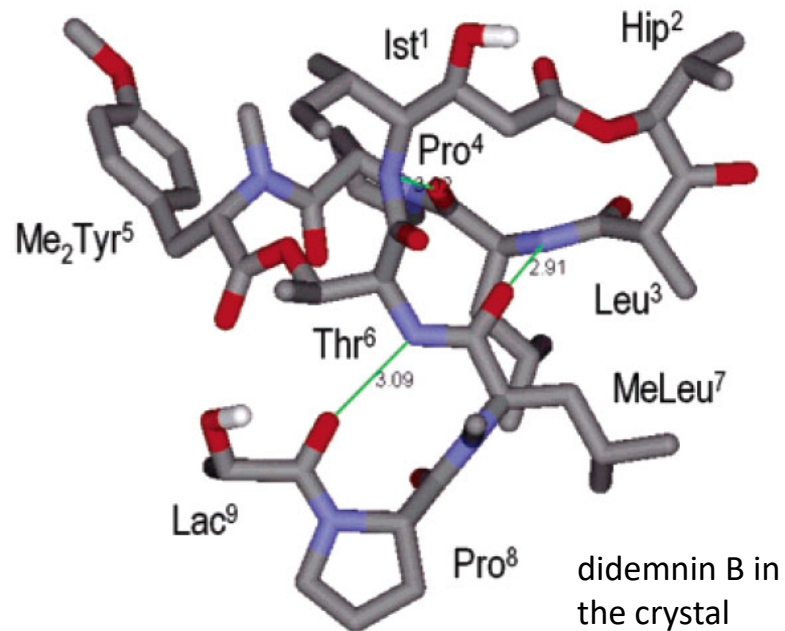
EC and FDA:
"Orphan drug"; keine Kardiotoxizität
(PharmaMar)

Review: Joullié et al., *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 404



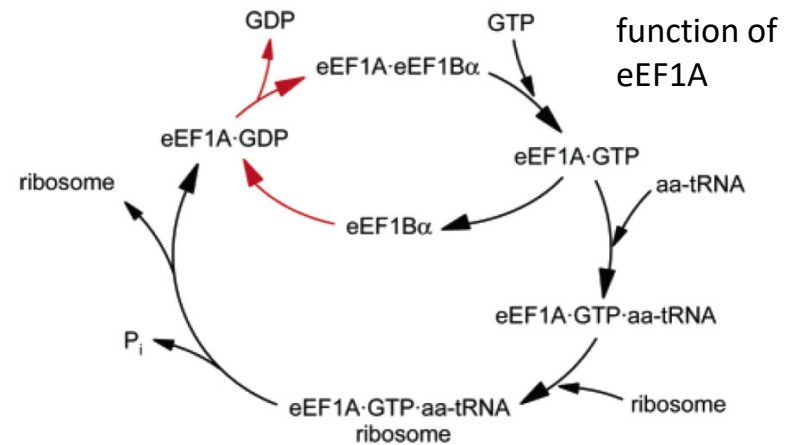
Ascidie Trididemnum solidum, überwächst
Meeresschwämme

E. Chemie der Targetsuche



didemnin B binds to the human elongation factor 1a (eEF1A), if GTP is bound

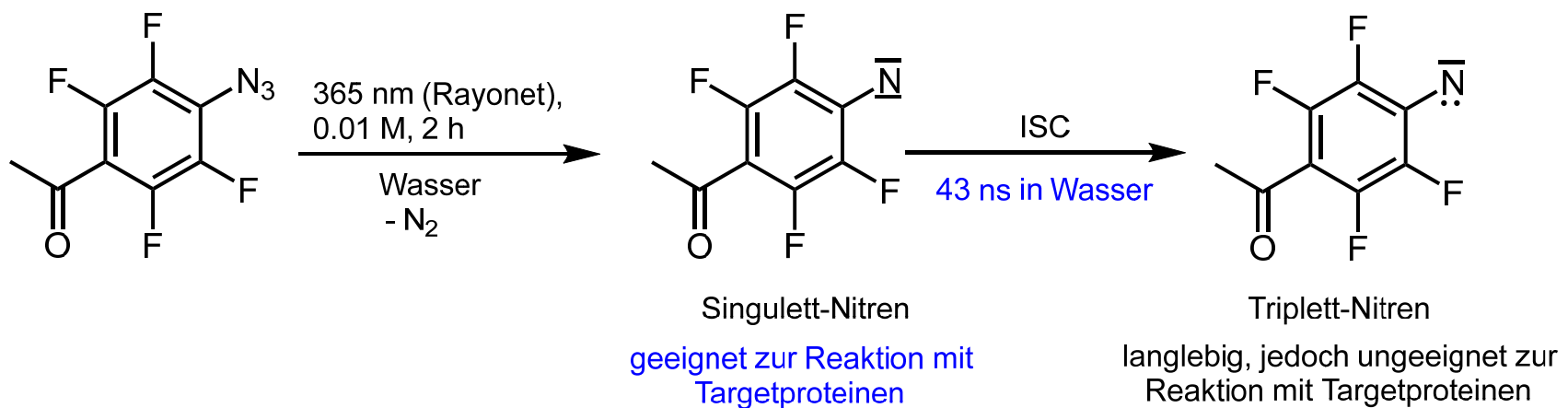
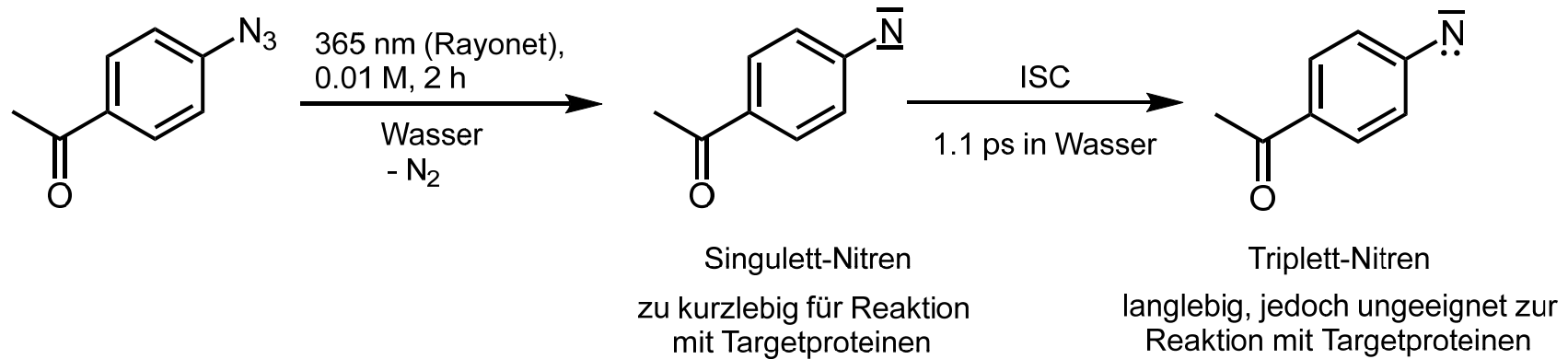
=> inhibition of protein synthesis



Gago et al., *J. Med. Chem.* **2004**, 4439

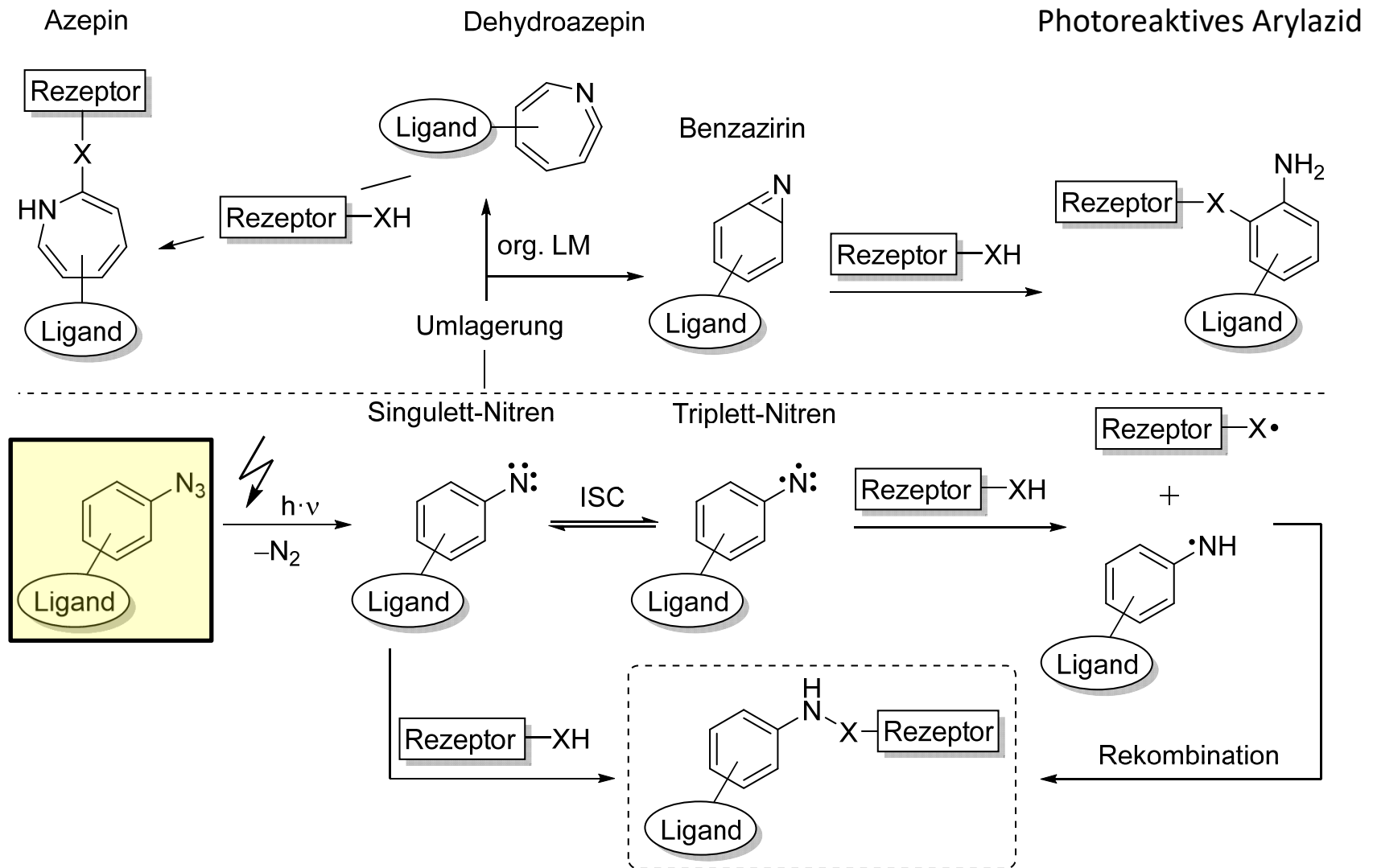
E. Chemie der Targetsuche

Photoreaktive Arylazide in Wasser, z. B.:



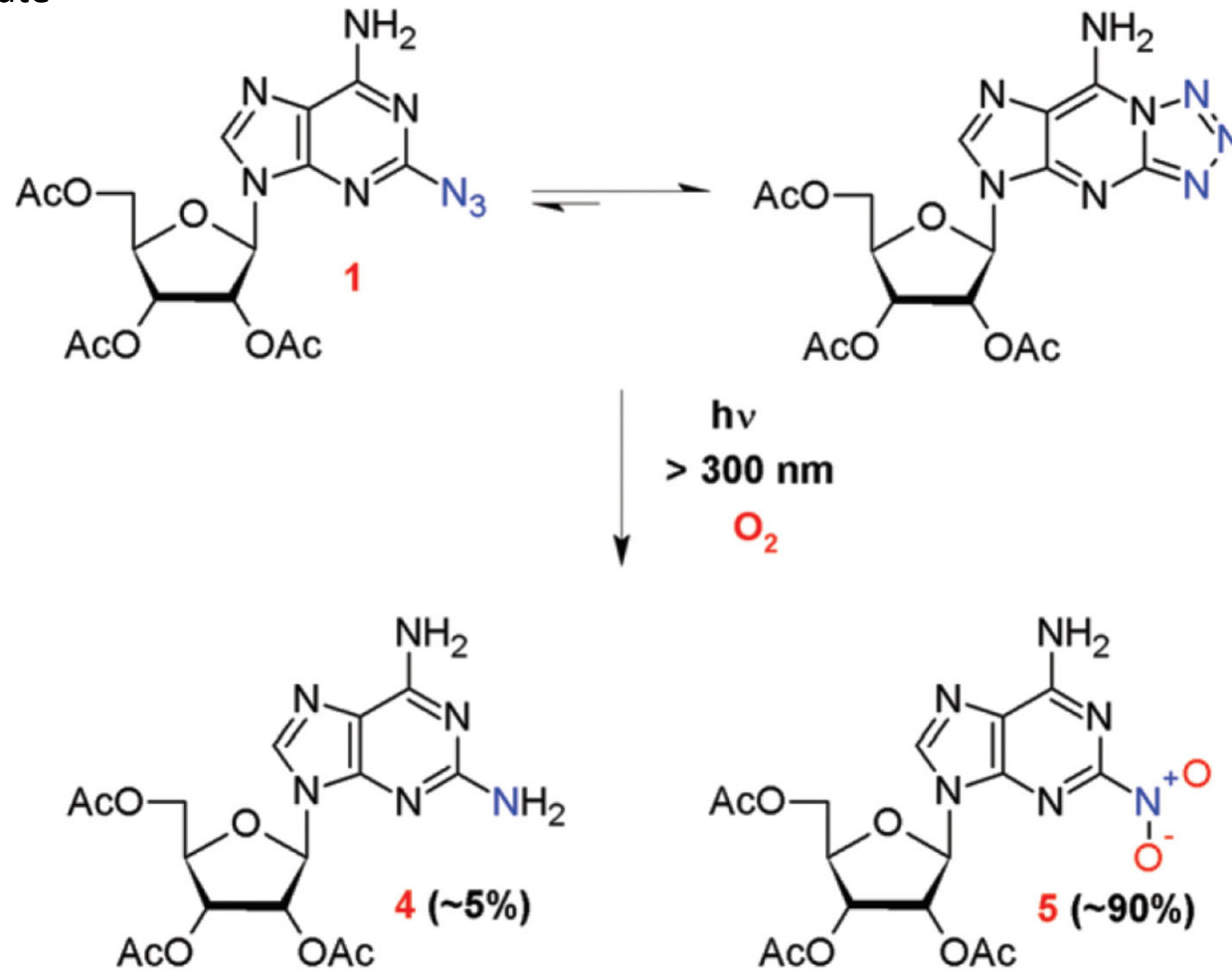
Ketenimin-Bildung nur in organischen LM und nicht bei Fluorierung;
Platz et al., *Biochemistry* **2007**, 1981

E. Chemie der Targetsuche



E. Chemie der Targetsuche

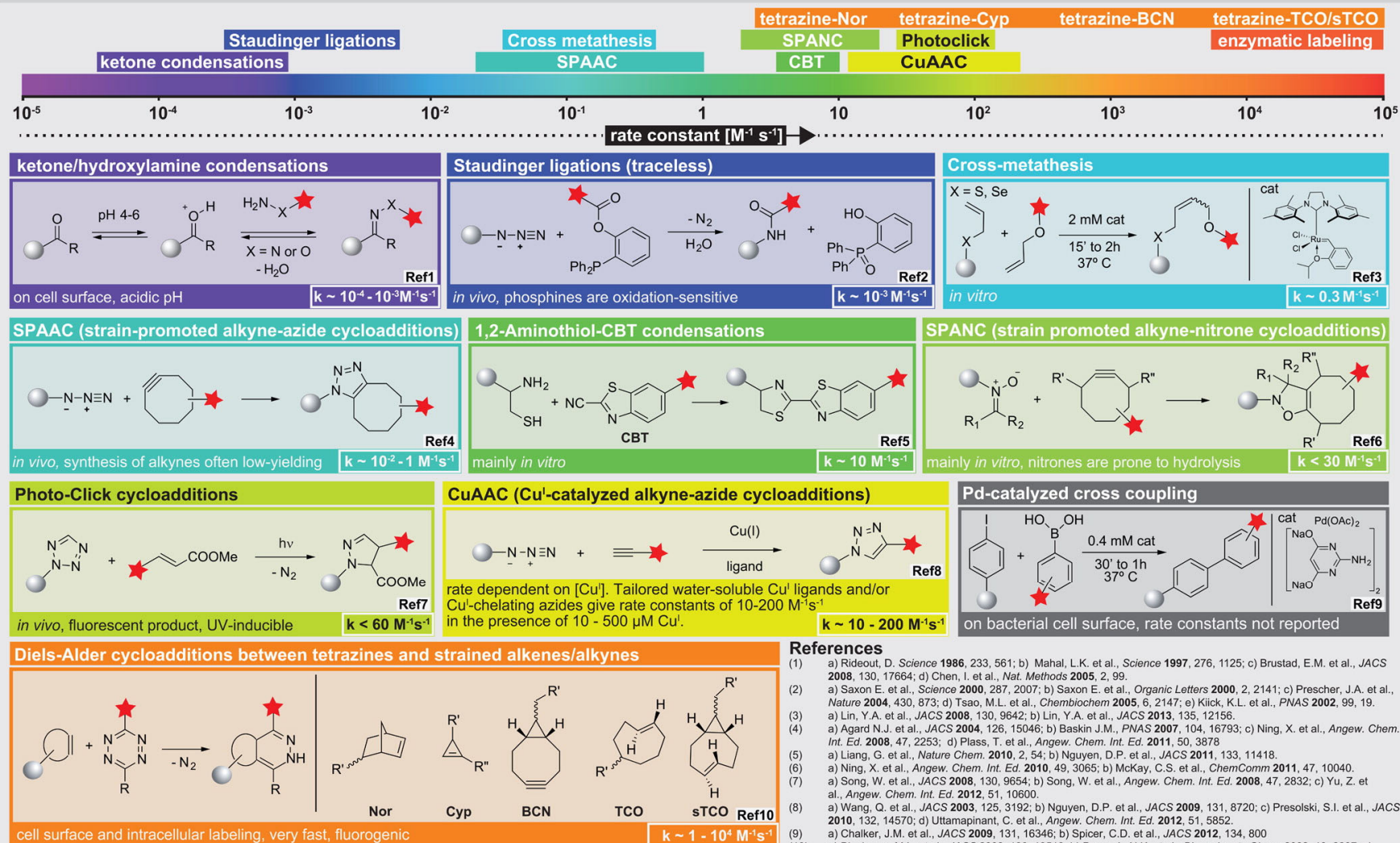
Azidopurin-Derivate



einziges Produkt unter anaeroben Bed.

aus Skalski et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 563

BIOORTHOGONAL REACTIONS FOR LABELING PROTEINS

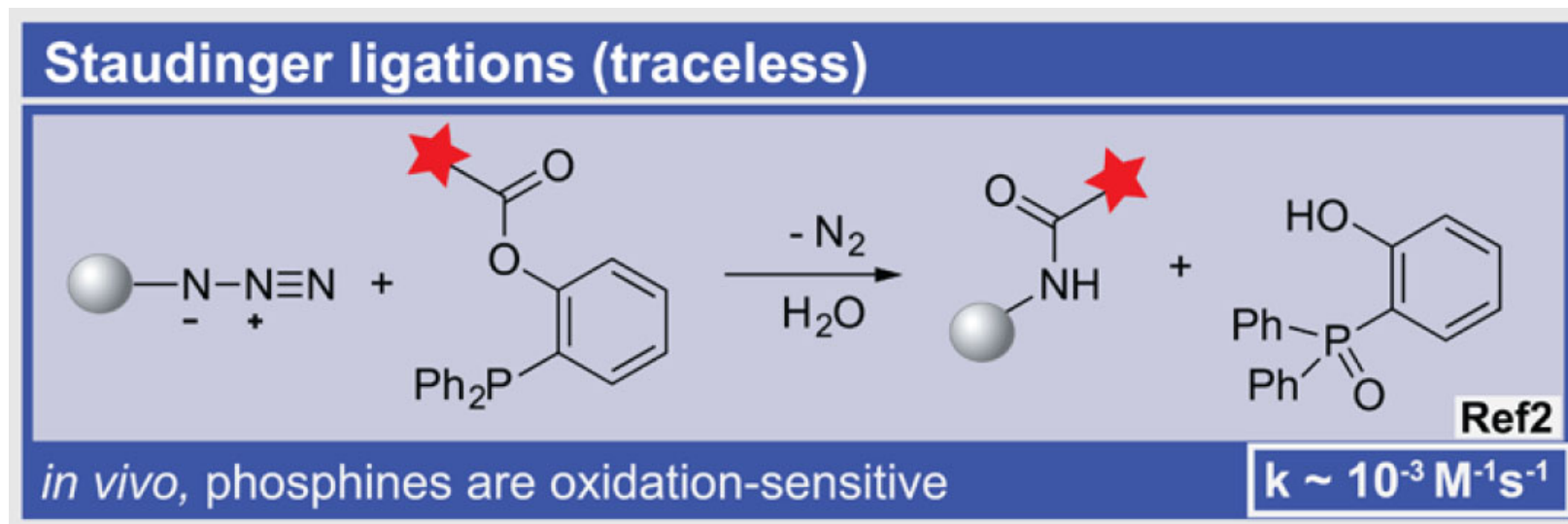
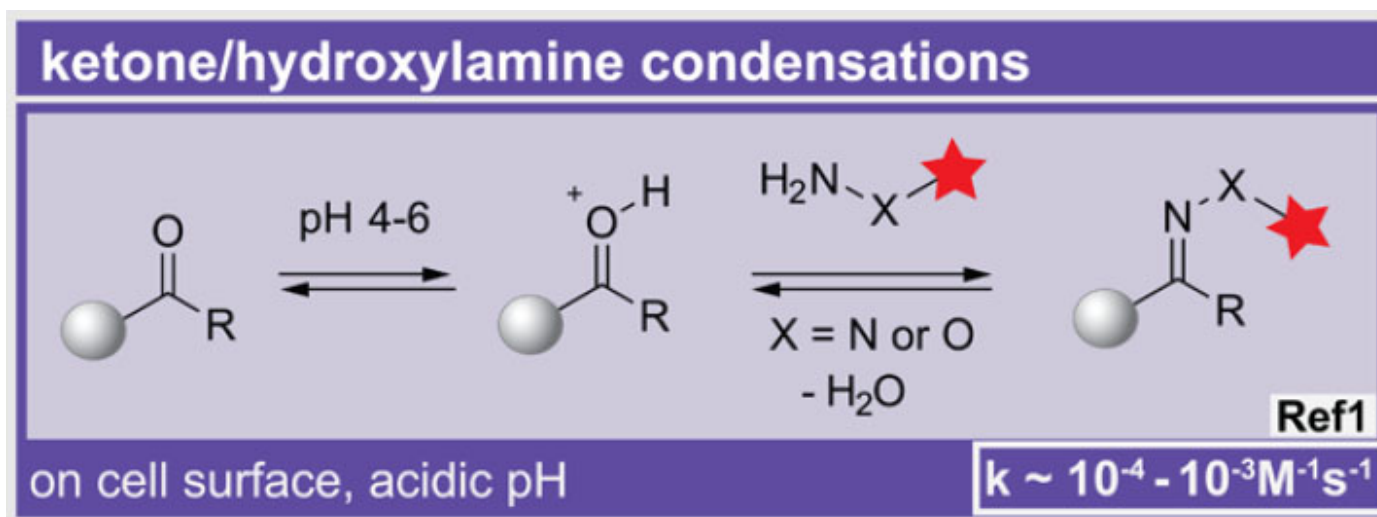


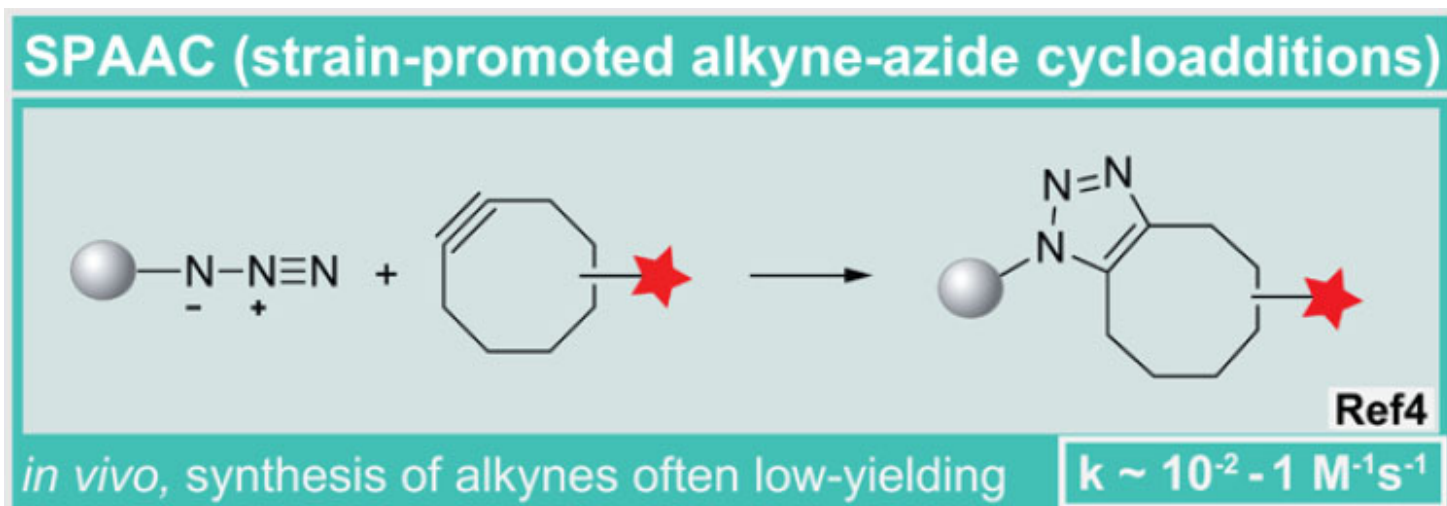
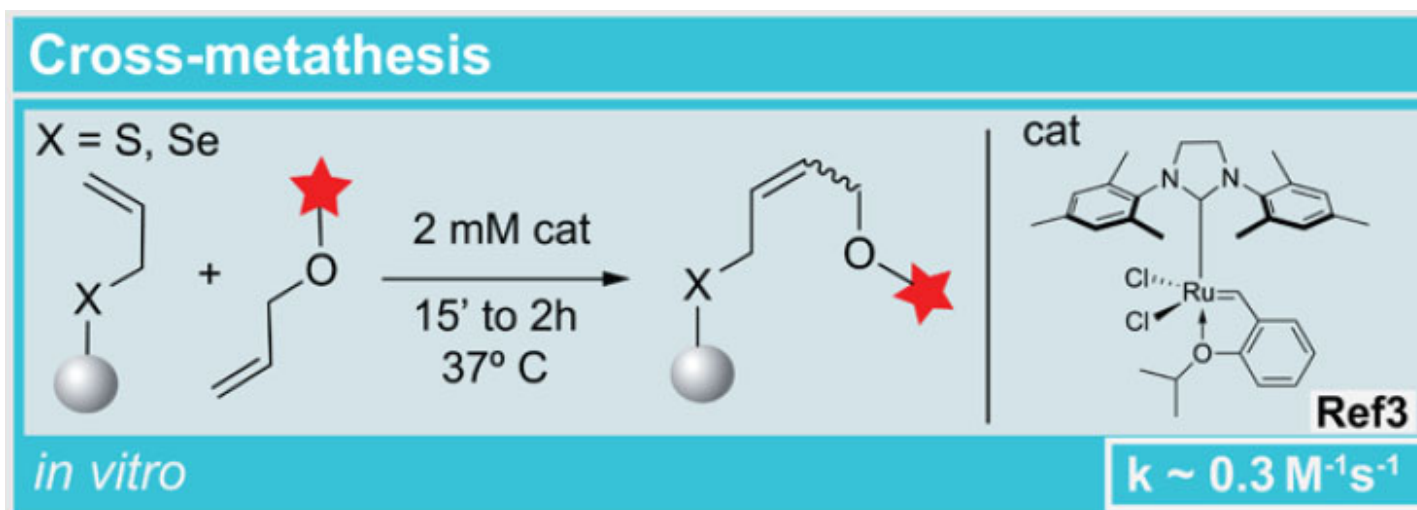
Kathrin Lang and Jason W. Chin

Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Center for Chemical and Synthetic Biology, Division for Protein and Nucleic Acid Chemistry, Francis Crick Avenue, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, CB2 0QH, UK

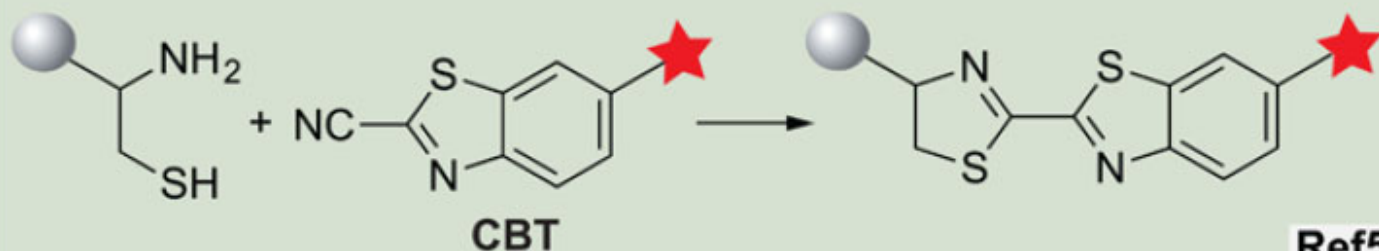
References

- (1) a) Rideout, D. *Science* **1986**, 233, 561; b) Mahal, L.K. et al., *Science* **1997**, 276, 1125; c) Brustad, E.M. et al., *JACS* **2008**, 130, 17664; d) Chen, I. et al., *Nat. Methods* **2005**, 2, 99.
- (2) a) Saxon E. et al., *Science* **2000**, 287, 2007; b) Saxon E. et al., *Organic Letters* **2000**, 2, 2141; c) Prescher, J.A. et al., *Nature* **2004**, 430, 873; d) Tsao, M.L. et al., *ChemBiochem* **2005**, 6, 2147; e) Klück, K.L. et al., *PNAS* **2002**, 99, 19.
- (3) a) Lin, Y.A. et al., *JACS* **2008**, 130, 9642; b) Lin, Y.A. et al., *JACS* **2013**, 135, 12156.
- (4) a) Agard N.J. et al., *JACS* **2004**, 126, 15046; b) Baskin J.M., *PNAS* **2007**, 104, 16793; c) Ning, X. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2253; d) Plass, T. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 3878.
- (5) a) Liang, G. et al., *Nature Chem.* **2010**, 2, 54; b) Nguyen, D.P. et al., *JACS* **2011**, 133, 11418.
- (6) a) Ning, X. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 3065; b) McKay, C.S. et al., *ChemComm* **2011**, 47, 10040.
- (7) a) Song, W. et al., *JACS* **2008**, 130, 9654; b) Song, W. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2832; c) Yu, Z. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 10600.
- (8) a) Wang, Q. et al., *JACS* **2003**, 125, 3192; b) Nguyen, D.P. et al., *JACS* **2009**, 131, 8720; c) Presolski, S.I. et al., *JACS* **2010**, 132, 14570; d) Uttamapinant, C. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 5852.
- (9) a) Chalker, J.M. et al., *JACS* **2009**, 131, 16346; b) Spicer, C.D. et al., *JACS* **2012**, 134, 800.
- (10) a) Blackman, M.L. et al., *JACS* **2008**, 130, 13518; b) Devaraj, N.K. et al., *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 2297; c) Lang, K. et al., *Nature Chem.* **2012**, 4, 298; d) Plass, T. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 4166; e) Lang, K. et al., *JACS* **2012**, 134, 10317; f) Yang, J. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 7476; g) Seitchik, J.L. et al., *JACS* **2012**, 134, 2898; h) Elliott, T. et al., unpublished data.





1,2-Aminothiols-CBT condensations

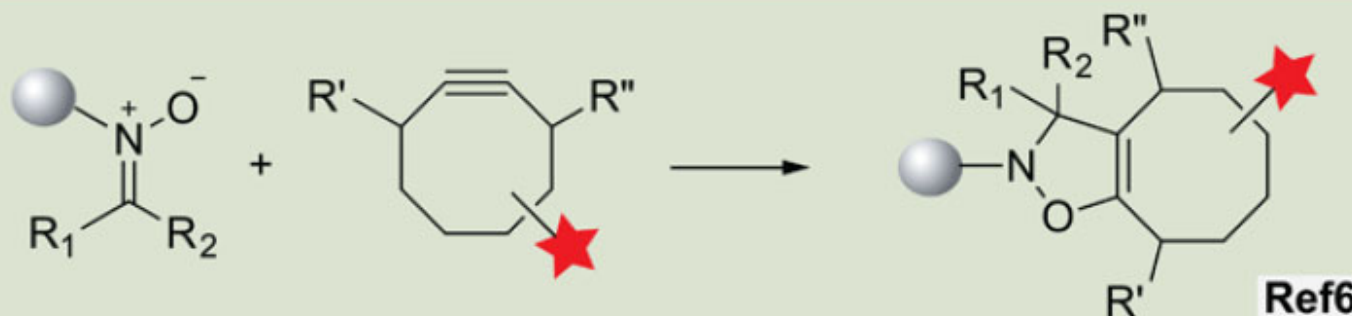


Ref5

mainly *in vitro*

$k \sim 10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

SPANC (strain promoted alkyne-nitrone cycloadditions)

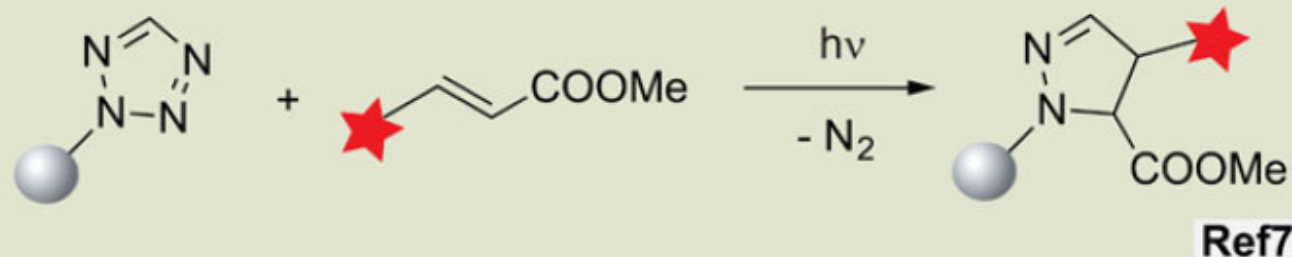


Ref6

mainly *in vitro*, nitrone are prone to hydrolysis

$k < 30 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

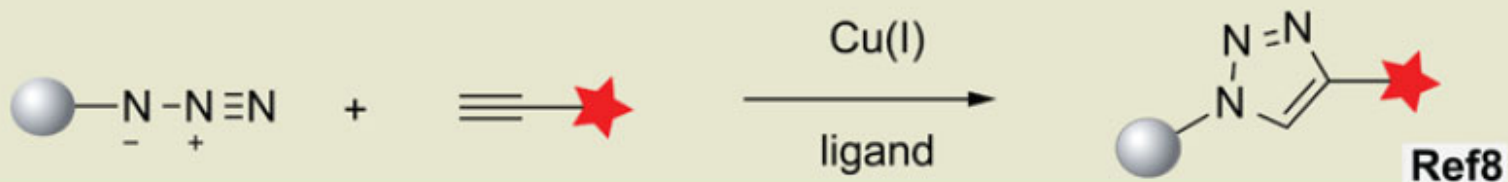
Photo-Click cycloadditions



in vivo, fluorescent product, UV-inducible

$$k < 60 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

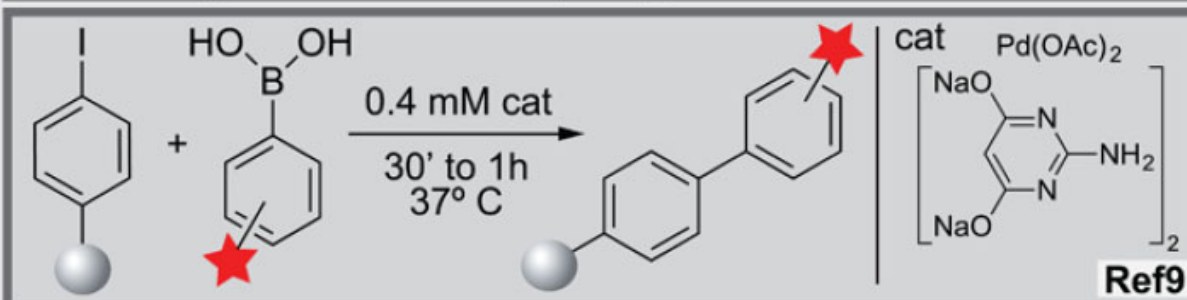
CuAAC (Cu^I-catalyzed alkyne-azide cycloadditions)



rate dependent on [Cu^I]. Tailored water-soluble Cu^I ligands and/or Cu^I-chelating azides give rate constants of 10-200 M⁻¹s⁻¹ in the presence of 10 - 500 μM Cu^I.

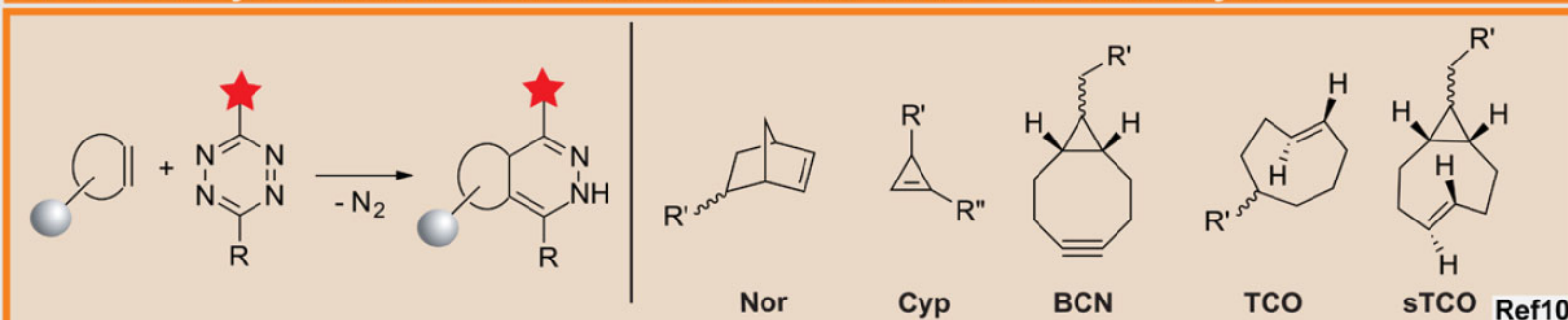
$$k \sim 10 - 200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

Pd-catalyzed cross coupling



on bacterial cell surface, rate constants not reported

Diels-Alder cycloadditions between tetrazines and strained alkenes/alkynes



cell surface and intracellular labeling, very fast, fluorogenic

$k \sim 1 - 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

