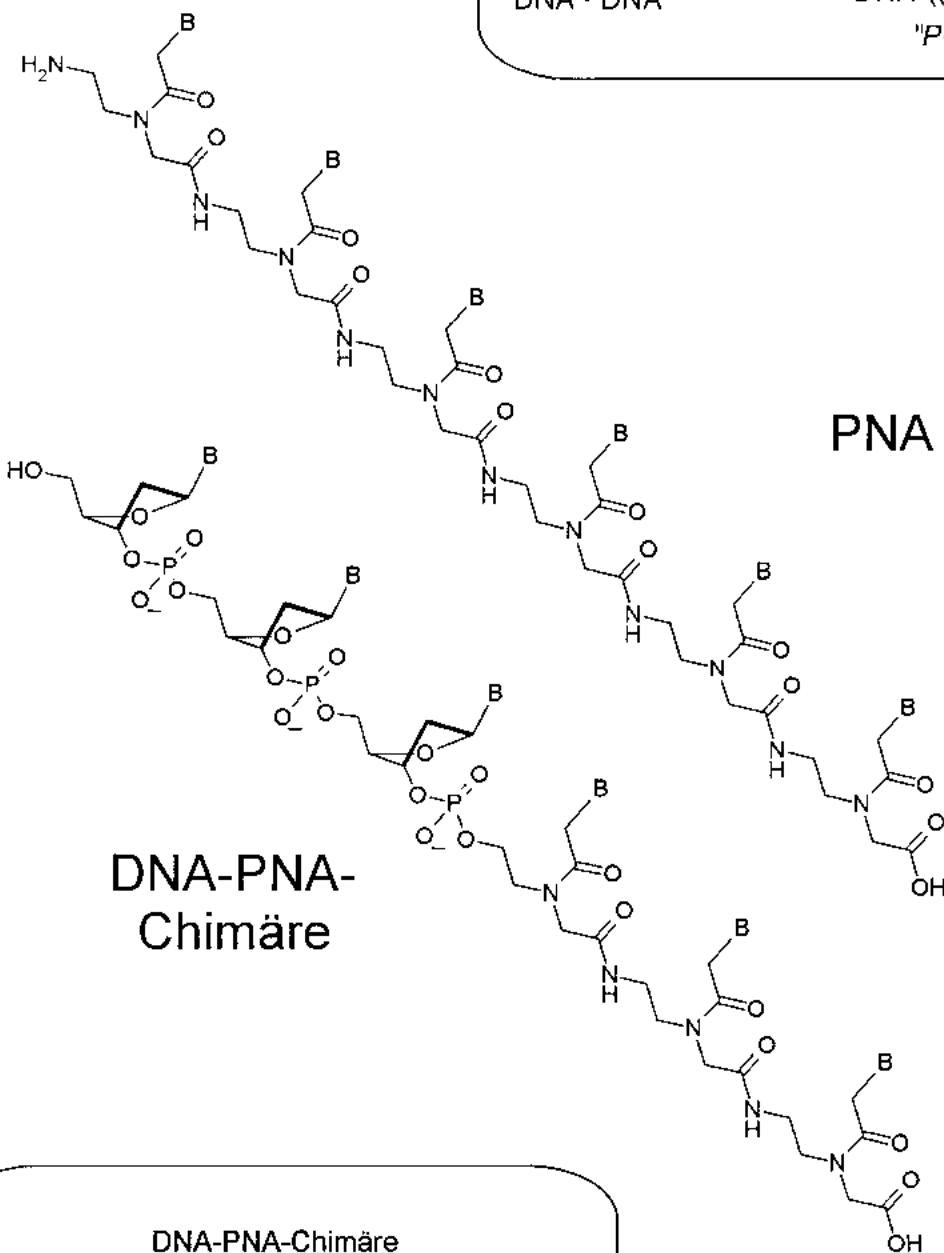
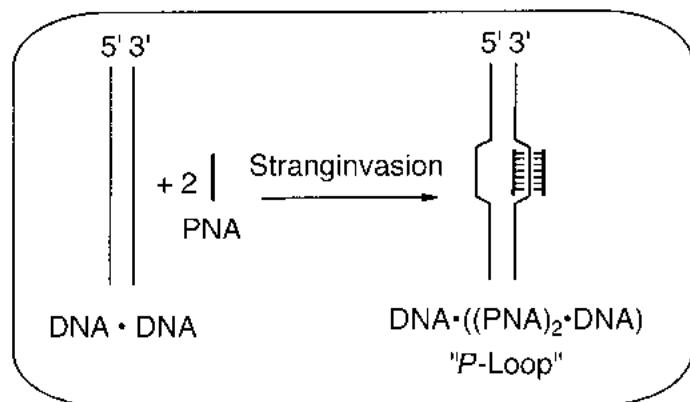


Polyamid- oder Peptidnucleinsäuren (PNAs) binden mit höherer Affinität an komplementäre Nucleinsäuren als ihre natürlichen Vorbilder.



DNA-PNA-Chimären übernehmen auch biologische Funktionen, beispielsweise die Aktivierung der Ribonuclease H zur Spaltung von RNA.

# PNAs: synthetische Polyamidnucleinsäuren mit außergewöhnlichen Bindungseigenschaften\*\*

Eugen Uhlmann,\* Anusch Peyman, Gerhard Breipohl und David W. Will

Professor Wolfgang Pfleiderer zum 70. Geburtstag gewidmet

Seit man erkannt hatte, daß Oligonucleotide als potentielle Therapeutica, die auf der Ebene der Nucleinsäuren wirken, in Frage kommen, hat eine rasante Suche nach Nucleinsäuremetica mit verbesserten Eigenschaften eingesetzt. Vorrangige Ziele sind die Erhöhung der Bindungsaffinität zu komplementären Nucleinsäuren, die Erhöhung der biologischen Stabilität und die Verbesserung der Aufnahme in die Zelle. Zu den interessantesten neuen Derivaten zählen zweifelsohne die im Jahre 1991 von Nielsen et al. erstmals beschriebenen Polyamid- oder Peptidnucleinsäuren (PNAs), bei denen das gesamte Zucker-Phosphat-Rückgrat durch eine *N*-(2-Aminoethyl)glycin-Polyamidstruktur ersetzt

ist. Da schon geringe strukturelle Änderungen in Oligonucleotiden, wie der Ersatz von Sauerstoff durch Schwefel (Phosphorothioate) oder durch eine Methylgruppe (Methylphosphonate), zu einer Absenkung der Bindungsaffinität führen, war es um so erstaunlicher, daß trotz der drastischen strukturellen Änderungen mit den PNAs Nucleinsäure-Analoga erhalten wurden, die mit höherer Affinität an komplementäre DNA und RNA binden als natürliche Oligonucleotide. Die außergewöhnlichen Bindungseigenschaften der PNAs haben zur Etablierung eines stark wachsenden neuen Forschungsgebiets geführt, das die effiziente Synthese von PNAs und davon abgeleiteten Derivaten sowie deren

Nutzung als therapeutische Wirkstoffe, DNA-Diagnostica und als Werkzeuge für die Biotechnologie zum Ziel hat. Darüber hinaus eignen sich die Untersuchungen an PNAs und PNA/DNA-Chimären auch dazu, Informationen über strukturelle und biologische Eigenschaften von DNA und RNA selbst zu gewinnen. Sie könnten ferner Anregungen für Modelle alternativer lebender Systeme und potentieller Übergänge zwischen unterschiedlichen genetischen Systemen liefern.

**Stichwörter:** Antisense-Wirkstoffe · DNA-Erkennung · Gentechnik · Molekulare Erkennung · Peptidnucleinsäuren

## 1. Einleitung

Die wichtigste molekulare Erkennung in der Natur ist die Basenpaarung der Nucleinsäuren, die die Speicherung, Weitergabe und Expression der genetischen Information in lebenden Systemen garantiert. Diese hochspezifische Erkennung gewinnt in zunehmendem Maße an Bedeutung für die Entwicklung von DNA-Diagnostica und für Oligonucleotid-Therapeutica in Form von Antisense- und Anti-Gen-Oligonucleotiden.<sup>[1-4]</sup> Zur Optimierung der Eigenschaften der Oligonucleotide wurde in den letzten Jahren eine große Vielfalt neuer Oligonucleotidderivate,<sup>[5]</sup> die beispielsweise am Phosphatrest, an der Ribose oder an der Nucleobase modifiziert sind, synthetisiert und untersucht. Die radikalste

Änderung der natürlichen Struktur bestand jedoch im Ersatz des gesamten Zucker-Phosphat-Rückgrats durch eine auf *N*-(2-Aminoethyl)glycin basierende Polyamidstruktur (Abb. 1)

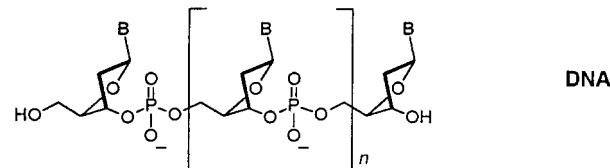
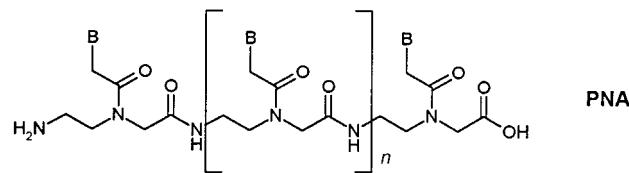


Abb. 1. Allgemeine PNA- und DNA-Struktur. B = Nucleobase.

[\*] Dr. E. Uhlmann, Dr. A. Peyman, Dr. G. Breipohl, Dr. D. W. Will  
Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH, G 838  
D-65926 Frankfurt am Main  
Fax: (+49) 69-305-89713  
E-mail: eugen.uhlmann@hmrag.com

[\*\*] Wichtige Abkürzungen sind im Anhang erklärt.

in der Gruppe um Buchardt, Nielsen, Egholm und Berg in Dänemark.<sup>[6-9]</sup> Die erstaunliche Entdeckung, daß diese Polyamid- oder Peptidnucleinsäuren (PNAs) mit höherer Affinität und in Einklang mit den Watson-Crick-Basenpaarungsregeln an komplementäre Nucleinsäuren binden als ihre natürlichen Vorbilder,<sup>[10]</sup> führte rasch zur Etablierung eines neuen Forschungszweiges, der auf die diagnostische und therapeutische Nutzung dieser hochinteressanten Verbindungsclasse abzielt.<sup>[11-14]</sup> Sehr bald wurde auch die Fähigkeit der PNAs zur Verdrängung eines Strangs der DNA-Doppelhelix erkannt,<sup>[15]</sup> ein Vorgang, der mit natürlicher DNA nicht effizient verläuft. Durch Vereinigung der Strukturelemente von PNAs und DNA in Form von PNA/DNA-Chimären sind Verbindungen zugänglich, die neben der exzellenten Bindung auch biologische Funktionen wie eine Primer-Funktion für DNA-Polymerasen<sup>[16]</sup> übernehmen können. Darüber hinaus

sind die PNAs als selbstorganisierende Strukturen für die Materialwissenschaften sowie zum Verständnis der Evolution oder potentieller alternativer Lebensformen von grundlegendem Interesse.<sup>[16-18]</sup> In den folgenden Abschnitten werden Synthese, Eigenschaften und mögliche Anwendungsgebiete von PNAs und PNA/DNA-Chimären beschrieben.

## 2. Monomerbausteine zur Synthese von PNAs

Für die Synthese der PNAs und ihrer chemischen Varianten wird eine Reihe von Monomerbausteinen eingesetzt. Diese unterscheiden sich einerseits in der Art der Schutzgruppe (PG) für die Aminofunktion des Rückgrats und/oder für die Nucleobase und andererseits in der Struktur des gewählten Rückgrats. Neben Aminoethylglycin sind auch andere achi-

*Eugen Uhlmann, 1953 in Bad Schussenried geboren, studierte in Konstanz Chemie und promovierte dort 1981 bei Wolfgang Pfleiderer in Organischer Chemie. Nachdem er von 1981 bis 1984 in der Pharmasynthese der Hoechst AG in Frankfurt mit dem Aufbau eines Nucleotidsyntheselabors beschäftigt war, verbrachte er ein Jahr am Department of Molecular Biology and Genetics des Massachusetts General Hospital und der Harvard Medical School in Boston. Seit 1986 ist er bei der Hoechst AG und seit Jahresbeginn bei Hoechst Marion Roussel in Frankfurt tätig und beschäftigt sich dort mit der Synthese von Nucleinsäurederivaten sowie deren therapeutischer Nutzung als Antisense-Wirkstoffe.*

*Anusch Peyman wurde 1958 in Freiburg im Breisgau geboren. Nach dem Studium der Chemie an der Universität Freiburg promovierte er dort 1986 bei C. Rüchardt mit einer Arbeit über stereoselektive Radikaldimerisierung. 1987 führte er als Postdoc bei J. R. Knowles an der Harvard University biochemische Studien zur Wirkungsweise der Triosephosphat-Isomerase aus. Nach Eintritt in die Peptid/Nucleotid-Gruppe der Hoechst AG 1988 folgte 1990 ein Aufenthalt in der Arbeitsgruppe von J. Szostak an der Harvard Medical School mit mechanistischen Arbeiten über Ribozyme. Seit 1992 liegen Peymans Forschungsinteressen auf dem Gebiet der Synthese und Anwendung von Antisense-Oligonucleotiden sowie der Synthese von Peptidmimetica.*

*Gerhard Breipohl, 1951 in Bielefeld geboren, studierte Chemie in Münster und promovierte dort 1982 bei B. Franck über die Biosynthese von Mykotoxinen. Von 1982 bis 1983 war er als DFG-Stipendiat Postdoctoral Fellow am Massachusetts Institute of Technology bei G. Buechi. Seit 1983 ist er in der Pharmaforschung der Hoechst AG tätig. Dort befaßte er sich in der Peptid/Nucleotid-Gruppe mit der Synthese von Enzyminhibitoren, Hormonanaloga, Rezeptorantagonisten, nicht-natürlichen Aminosäuren, Peptidmimetica und PNAs sowie der Entwicklung von Linkern und Kupplungsmethoden für die Festphasensynthese. Seit 1996 arbeitet er im Chemical Development an der Entwicklung und Optimierung von Syntheseverfahren für Arzneimittel-Kandidaten.*

*David William Will, geboren 1967 in Bathgate, Schottland, studierte Chemie an der University of Edinburgh und promovierte dort 1992 bei Tom Brown über die Synthese modifizierter Oligonucleotide. Von 1992 bis 1993 arbeitete er als Postdoc bei Eugen Uhlmann in Frankfurt über Oligonucleotidmimetica und Antisense-Therapeutica. 1994 wechselte er ans European Molecular Biology Laboratory in Heidelberg und arbeitete dort zusammen mit Brian Sproat an der Synthese modifizierter Ribozyme. Diese Arbeiten setzte er anschließend bei der Ribonetics GmbH in Göttingen fort. Ende 1994 kehrte er zur Hoechst AG zurück und arbeitete wieder über Antisense-Therapeutica. 1997 wechselte er zur Abteilung Automated Synthesis and New Technologies von Hoechst Marion Roussel in Frankfurt.*



E. Uhlmann



A. Peyman



G. Breipohl



D. W. Will

rale sowie chirale Rückgratbausteine eingesetzt werden. Die Strukturen der wichtigsten dieser Monomerbausteine und ihre Synthesen sind nachfolgend aufgezeigt. Die Auswahl beschränkt sich hierbei auf Monomere, deren Syntheseweg genauer beschrieben ist und die bereits für die Herstellung von Oligomeren genutzt wurden.

## 2.1. PNA-Monomerbausteine mit Aminoethylglycin-Rückgrat

Als „klassisches“ Rückgrat der PNAs wird die Aminosäure N-(2-Aminoethyl)glycin verwendet, bei der die sekundäre Aminogruppe mit einer Essigsäure, die eine Nucleobase als Substituenten trägt (Nucleobasen-Essigsäure), acyliert ist. Zum temporären Schutz der primären Aminogruppe werden bevorzugt säure- und basenlabile N-Schutzgruppen verwendet. Die Herstellung der Monomere lässt sich in die Synthese der Bausteine Aminoethylglycin und Nucleobasen-Essigsäure unterteilen. Deren Synthesen sind am Anfang dieses Abschnitts zusammenfassend dargestellt.

Die wichtigsten Varianten zur Herstellung von Aminoethylglycin sind in Abbildung 2 aufgeführt: Man kann 1,2-Diaminoethan mit Halogenessigsäurederivaten alkylieren<sup>[19–22]</sup> (Abb. 2 A), Glycinester mit geschütztem Aminoacetaldehyd reduktiv aminieren<sup>[23, 24]</sup> (Abb. 2 B) oder 1,2-Diaminoethan mit Glyoxylsäure umsetzen<sup>[25, 26]</sup> (Abb. 2 C). Weitere Reaktionen führen dann zu den geschützten Aminoethylglycinderivaten, deren sekundäre Aminogruppe nachfolgend mit der Nucleobasen-Essigsäure verknüpft wird.

Die Synthese der Nucleobasen-Essigsäuren ist in den Abbildungen 3–6 dargestellt. Die Thymylessigsäure, die keine zusätzliche Basen-Schutzgruppe benötigt, wird entweder durch Alkylierung mit Halogenessigsäureestern<sup>[6, 27]</sup> und anschließende Verseifung oder durch direkte Alkylierung mit Bromessigsäure<sup>[28]</sup> hergestellt (Abb. 3). Letztere Variante wird wegen der Einfachheit der Durchführung auch von uns bevorzugt.

Bei allen Synthesen von Cytosylessigsäurederivaten (Abb. 4) wurde zunächst die Schutzgruppe an der exocyclischen 4-Aminofunktion mit den entsprechenden Säurechloriden oder Mmt-Cl unter Verwendung von Pyridin als Lösungsmittel eingeführt. Die dadurch erhaltenen Benzyl-oxycarbonyl-,<sup>[9, 20, 27]</sup> 4-*tert*-Butylbenzoyl-, Anisoyl-<sup>[22, 26]</sup> und Mmt-Derivate<sup>[25]</sup> wurden anschließend mit Bromessigsäuremethylester<sup>[25–27]</sup> oder Bromessigsäure-*tert*-butylester<sup>[20]</sup> an N<sup>1</sup> alkyliert. Nachfolgende alkalische oder saure Verseifung ergab die Cytosylessigsäurederivate.

Wege zu Adenylessigsäurederivaten sind in Abbildung 5 gezeigt. Bei der ersten Variante (Abb. 5 A)<sup>[27]</sup> wurde zunächst Adenin mit Bromessigsäureethylester an N<sup>9</sup> alkyliert. Der anschließende Versuch, mit Cbz-Cl die exocyclische 6-Aminofunktion zu schützen, ergab allerdings komplexe Reaktionsgemische. Die Verwendung von *N*-(Benzoyloxycarbonyl)-*N'*-ethylimidazolium-tetrafluoroborat (Rapoports Reagens)<sup>[29]</sup> führte dagegen in glatter Reaktion zum gewünschten Produkt. Bei den in Abbildung 5 B gezeigten Reaktionsvarianten wurde zunächst die 6-Aminofunktion des Adenins geschützt; die Umsetzung mit Cbz-Cl gelang hier ohne

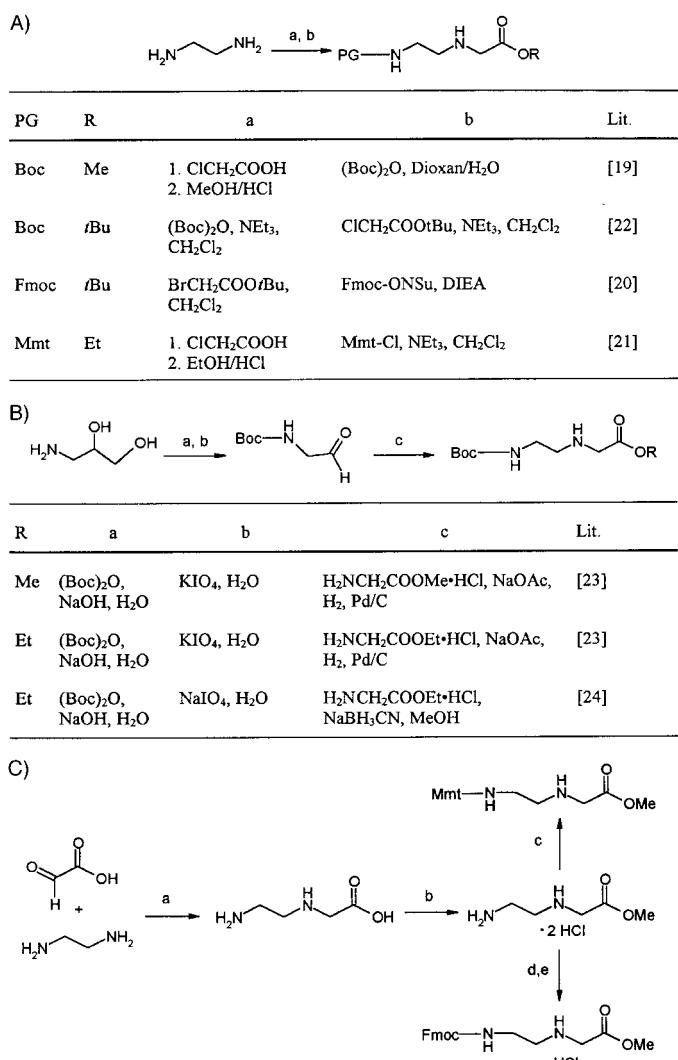


Abb. 2. A) Synthese von Aeg-Derivaten durch Alkylierung von 1,2-Diaminoethan; B) Synthese von Boc-Aeg-Derivaten durch reduktive Aminierung von Glycinestern mit Boc-Aminoacetaldehyd; C) Synthese von Aeg-Derivaten durch reduktive Aminierung von Glyoxylsäure mit 1,2-Diaminoethan.<sup>[25, 26]</sup> a) H<sub>2</sub>/Pd/C, H<sub>2</sub>O; b) MeOH/HCl; c) Mmt-Cl, DMF, NEt<sub>3</sub>; d) Fmoc-ONSu, Dioxan/H<sub>2</sub>O; e) MeOH/HCl.

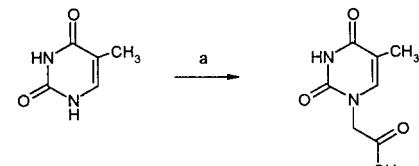
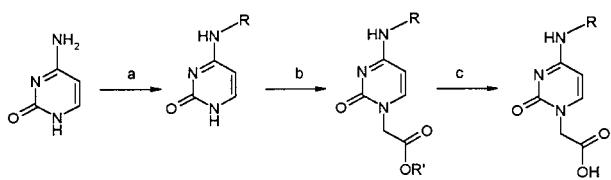


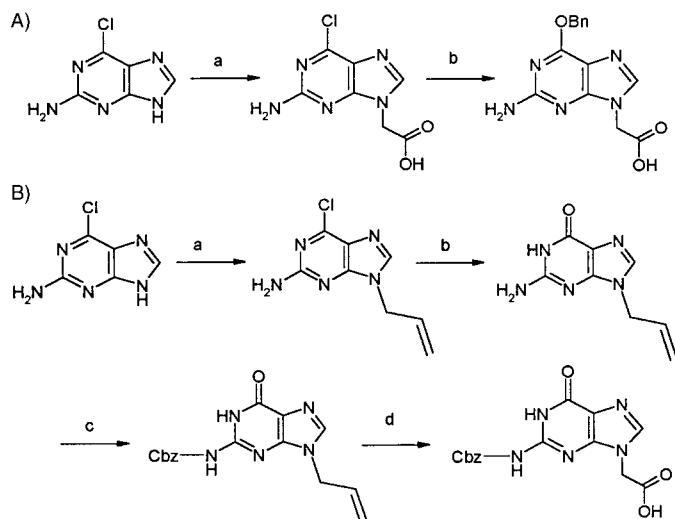
Abb. 3. Synthese von Thymylessigsäure. Variante 1:<sup>[27]</sup> a) 1. BrCH<sub>2</sub>COO-Me, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF; 2. NaOH, H<sub>2</sub>O. Variante 2:<sup>[28]</sup> a) BrCH<sub>2</sub>COOH, KOH, H<sub>2</sub>O.

Probleme,<sup>[20]</sup> und entsprechendes gilt für die Einführung der Mmt-<sup>[25]</sup> und der Anisoylgruppe<sup>[26]</sup> in Pyridin als Lösungsmittel. Die geschützten Adeninderivate wurden dann analog den Cytosinderivaten mit Bromessigsäuremethyl- oder *tert*-butylester an N<sup>9</sup> alkyliert. Nachfolgende alkalische oder saure Verseifung (in Gegenwart von Triethylsilan zur Verhinderung der partiellen Cbz-Abspaltung vom Adeninbaustein) führte zu den geschützten Adenylessigsäuren.



R	R'	a	b	c	Lit.
Cbz	Me	Cbz-Cl/ Pyridin	BrCH <sub>2</sub> COOMe, K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , DMF	NaOH (aq.)	[27]
Cbz	tBu	Cbz-Cl, DMAP, Pyridin	BrCH <sub>2</sub> COO/Bu, K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , DMF	HCl/Dioxan, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	[20]
Mmt	Me	Mmt-Cl, Pyridin, NEM	BrCH <sub>2</sub> COOMe, NaH/ DMF	NaOH, H <sub>2</sub> O/ Dioxan	[25]
tBuBz	Me	tBuBz-Cl/ Pyridin	BrCH <sub>2</sub> COOMe, NaH/ DMF	NaOH, H <sub>2</sub> O/ Dioxan	[26]
An	Me	Anisoylchlorid/ Pyridin	BrCH <sub>2</sub> COOMe, NaH/ DMF	NaOH, H <sub>2</sub> O/ Dioxan	[36]

Abb. 4. Synthese von Cytosylessigsäurederivaten.

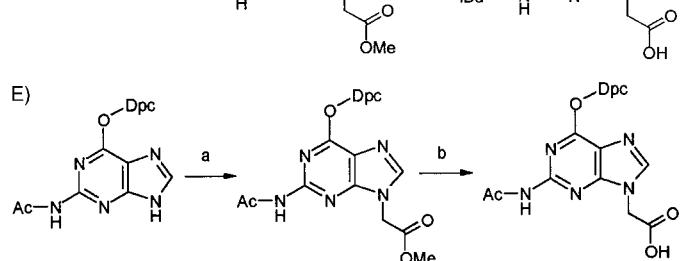


R	R'	a	b	c	Lit.
Cbz	tBu	NaH, Cbz-Cl, DMF	BrCH <sub>2</sub> COO tBu, K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , DMF	TFA, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , Et <sub>3</sub> SiH	[20]
Mmt	Me	Mmt-Cl, Pyridin, NEM	BrCH <sub>2</sub> COOMe, NaH/ DMF	NaOH, H <sub>2</sub> O/Dioxan	[25]
An	Me	Anisoylchlorid/ Pyridin	BrCH <sub>2</sub> COOMe, NaH/ DMF	NaOH, H <sub>2</sub> O/ Dioxan	[26]

Abb. 5. A) Synthese von Cbz-geschützter Adenylessigsäure nach Dueholm et al.<sup>[27]</sup> a) BrCH<sub>2</sub>COOEt, NaH, DMF; b) N-(Benzoyloxycarbonyl)-N'-ethylimidazolium-tetrafluoroborat, DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; c) NaOH (aq.); B) Synthese von Adenylessigsäurederivaten über N<sup>6</sup>-geschütztes Adenin.<sup>[20, 25, 26]</sup>

Die Herstellung von Guanylessigsäuren (Abb. 6) ist wegen des aus der Nucleosidchemie bekannten Problems der N<sup>7</sup>-Alkylierung als Nebenreaktion der gewünschten N<sup>9</sup>-Alkylierung die größte Herausforderung. Um dieses Selektivitätsproblem zu verringern, wurde daher in Alkylierungen häufig 2-Amino-6-chlorpurin eingesetzt. Bei der in Abbildung 6 A beschriebenen Herstellung des zunächst verwendeten Derivats<sup>[27]</sup> wurde 2-Amino-6-chlorpurin mit Bromessigsäure in moderater Ausbeute alkyliert. Der Chlor-Benzylalkoholat-Austausch ergab die gewünschte (O<sup>6</sup>-Benzylguanyl)essigsäure. Diese erwies sich jedoch für weitere Untersuchungen als wenig geeignet, da sie unter den Bedingungen der Boc-Abspaltung nicht gut löslich und instabil war.<sup>[27]</sup>

Auch die (N<sup>2</sup>-Cbz-Guanyl)essigsäure ist aus 2-Amino-6-chlorpurin zugänglich (Abb. 6B).<sup>[20]</sup> Nach Alkylierung mit Allylbromid und chromatographischer Trennung der im Verhältnis 3:1 entstandenen N<sup>9</sup>/N<sup>7</sup>-Alkylierungsprodukte er-

Abb. 6. A) Synthese von (O<sup>6</sup>-Benzylguanyl)essigsäure.<sup>[27]</sup> a) BrCH<sub>2</sub>-COOH; b) PhCH<sub>2</sub>ONa, DMF; B) Synthese von (N<sup>2</sup>-Cbz-Guanyl)essigsäure.<sup>[20]</sup> a) BrCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF; b) 1N HCl, Rückfluß; c) Cbz-Imidazol, [18]Krone-6, KH, THF; d) 1. O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH; 2. Me<sub>2</sub>S; 3. NaClO<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, THF, tBuOH, 2-Methyl-2-butene; C) Synthese von (N<sup>2</sup>-Mmt-Guanyl)essigsäure.<sup>[25]</sup> a) BrCH<sub>2</sub>COOMe, NaH/DMF; b) Mmt-Cl, Pyridin, NEt<sub>3</sub>; c) 10proz. NaOH (aq), Rückfluß; D) Synthese von (N<sup>2</sup>-iBu-CO-Guanyl)essigsäure.<sup>[26]</sup> a) Isobutrylchlorid, NEt<sub>3</sub>/DMF; b) BrCH<sub>2</sub>COOMe, NaH/DMF; c) NaOH, H<sub>2</sub>O/Dioxan; E) Synthese von (N<sup>2</sup>-Ac-O<sup>6</sup>-Dpc-Guanyl)essigsäure.<sup>[22]</sup> a) BrCH<sub>2</sub>COOMe, DMF, DIEA; b) NaOH/MeOH/Dioxan/H<sub>2</sub>O.

folgte die saure Hydrolyse zum 9-Allylguanin. Dieses wurde mit Cbz-Imidazol und KH in Gegenwart von [18]Krone-6 als Phasentransferkatalysator an der N<sup>2</sup>-Gruppe geschützt. Nach

Ozonolyse der Allylgruppe und oxidativer Aufarbeitung erhielt man die ( $N^2$ -Cbz-Guanyl)essigsäure.

Die Synthese der Guanylessigsäure mit der gegen schwache Säuren labilen Mmt-Schutzgruppe für die exocyclische Aminofunktion<sup>[25]</sup> ist in Abbildung 6C beschrieben. Auch hier wurde von 2-Amino-6-chlorpurin ausgegangen. Nach dessen Alkylierung mit Bromessigsäuremethylester wurde die Mmt-Schutzgruppe an  $N^2$  eingeführt, und unter den Bedingungen der anschließenden alkalischen Verseifung des Esters wurde auch das Chlor in Position 6 ausgetauscht und die gewünschte Guanylessigsäure erhalten.

Die Synthese der Guanylessigsäure mit der basenlabilen Isobutyrylschutzgruppe für die exocyclische 2-Aminofunktion (Abb. 6D)<sup>[26]</sup> begann mit der Umsetzung von Guanin mit Isobutyrylchlorid in Triethylamin/DMF oder Pyridin zu  $N^2$ -Isobutyrylguanin, das mit Bromessigsäuremethylester unter Standardbedingungen alkyliert werden konnte. Das hierbei entstandene Gemisch aus  $N^7$ - und  $N^9$ -alkyliertem Produkt wurde chromatographisch getrennt. Anschließende alkalische Verseifung des Methylesters ergab das gewünschte Produkt.

Gut zur Vermeidung der  $N^7$ -Alkylierung eignet sich die in Abbildung 6E gezeigte Variante mit  $N^2$ -Acetyl- $O^6$ -(diphenylcarbamoyl)purin.<sup>[30]</sup> Hier erhielt man nach Alkylierung mit Bromessigsäuremethylester unter Verwendung von Hünig-Base und anschließender Fällung nur das  $N^9$ -Alkylierungsprodukt.<sup>[22]</sup> Nach alkalischer Verseifung wurde daraus ( $N^2$ -Ac- $O^6$ -Dpc-Guanyl)essigsäure in guter Ausbeute erhalten.

### 2.1.1. Monomere mit säurelabiler N-Schutzgruppe

Für die ersten Synthesen<sup>[6]</sup> von PNAs wurden Monomere<sup>[8, 9, 27]</sup> mit der durch Trifluoressigsäure abspaltbaren Boc-Gruppe als temporärer N-Schutzgruppe eingesetzt. Zur Blockierung der exocyclischen funktionellen Gruppen der Nucleobasen finden die Cbz- und/oder Benzylschutzgruppe Verwendung, die sich beispielsweise mit flüssigem Fluorwasserstoff oder Trifluormethansulfonsäure abspalten lassen. Die Synthese der PNA-Monomere mit dieser Schutzgruppenkombination aus den zuvor beschriebenen Bausteinen zeigt Abbildung 7. Die Nucleobasen-Essigsäure und die

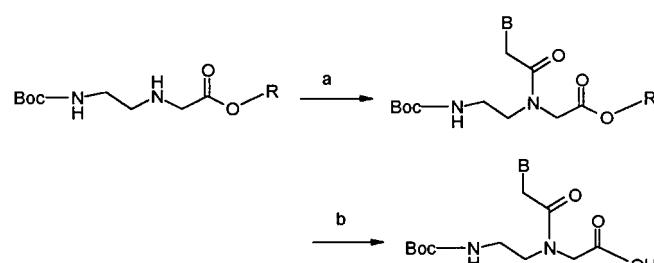


Abb. 7. Synthese von Boc-PNA-Monomeren.<sup>[27]</sup> a) B-CH<sub>2</sub>COOH (B = T,  $N^4$ -Cbz-C,  $N^6$ -Cbz-A,  $O^6$ -Bn-G,  $N^2$ -Cbz-G), DCC/HOBt<sup>[160]</sup> oder PyBrop/DIEA; b) LiOH/THF/H<sub>2</sub>O oder NaOH/MeOH/H<sub>2</sub>O.

sekundäre Aminogruppe des Boc-geschützten Aminoethylglycinesters werden dabei mit etablierten Peptidkupplungsreagentien, z. B. DCC/HOBt<sup>[31]</sup> oder PyBrop,<sup>[32]</sup> verknüpft.

Diese Boc-PNA-Monomere sind wegen der zur Abspaltung der Schutzgruppe nötigen stark sauren Bedingungen (TFA, HF), die zur Depurinierung von Oligonucleotidbausteinen führen können, nicht für die Kombination mit Oligonucleotiden verwendbar. Die von uns<sup>[26]</sup> und anderen<sup>[21, 24, 33, 34]</sup> beschriebenen Monomere (Abb. 8) mit der unter wesentlich mildereren Bedingungen (Trifluoressigsäure) abspaltbaren Mmt-Schutzgruppe haben diesen Nachteil nicht. Insbesondere die Kombination mit basenlabilen Schutzgruppen für die exocyclische Aminofunktion der Nucleobasen Cytosin, Adenin und Guanin erlaubt Entschützungsbedingungen, die mit den Reaktionsbedingungen der Standard-Oligonucleotidsynthese kompatibel sind. Bevorzugt werden daher die aus der Oligonucleotidsynthese bekannten Benzoyl-, Anisoyl- und *tert*-Butylbenzoylschutzgruppen für Cytosin und Adenin sowie die Isobutyryl- und Acetylschutzgruppen für Guanin verwendet. Die Herstellung dieser Monomere, die universell für die Synthese von PNAs und PNA/DNA-Chimären einsetzbar sind, ist in Abbildung 8 A – C dargestellt. Bei dem von uns verwendeten Verfahren<sup>[26]</sup> werden die Nucleobasen-Essigsäuren mit Mmt-Aeg-OMe unter Verwendung von TOTU<sup>[35]</sup> verknüpft. Nach Verseifung des Methylesters mit Natronlauge und chromatographischer Reinigung an Kieselgel mit Triethylamin-haltigen mobilen Phasen erhält man die fertigen Monomerbausteine. Der von Stetsenko et al.<sup>[21]</sup> beschriebene Weg geht von Mmt-Aeg-OEt aus, an das Thyminyl- oder Uracilylessigsäure als Pentafluorphenylester gekuppelt wird. Nach Verseifung des Ethylesters mit Natronlauge wird die Verbindung in das Tetrabutylammoniumsalz überführt. Für die Herstellung des Thyminderivats fanden wir in dem in Abbildung 8B gezeigten Weg<sup>[36]</sup> eine attraktive Alternative. Hierbei wird Mmt-Aeg-OMe mit Chloracetylchlorid acyliert und das Chloracetylderivat nach Lösungsmittelwechsel von THF zu DMF direkt zur Alkylierung von Thymin eingesetzt. Ein weiteres Herstellungsverfahren (Abb. 8C), das von van der Laan et al.<sup>[33, 34]</sup> und Finn et al.<sup>[24]</sup> verwendet wird, geht von den nach bekannten Verfahren erhaltenen Boc-Aeg-Estern aus, die in die entsprechenden Mmt-Aeg-Ester „umgeschützt“ werden. Anschließend werden die Monomere verseift und in ihre Tetrabutylammonium- bzw. Pyridiniumsalze überführt.

Die in Abbildung 8D gezeigte Variante ausgehend von Boc-Aeg-OtBu wird von uns besonders für die Synthese größerer Mengen an Monomerbausteinen eingesetzt,<sup>[22]</sup> da sich die aus der Kupplungsreaktion erhaltenen vollständig geschützten Zwischenprodukte gut durch Ausfällen reinigen lassen und somit chromatographische Reinigungsschritte vermieden werden.

### 2.1.2. Monomere mit basenlabiler N-Schutzgruppe

Hier sind bisher nur Monomere beschrieben, die auf dem Aeg-Rückgrat basieren und als basenlabile Schutzgruppe die Fmoc-Gruppe enthalten. Die Synthese dieser Monomerbausteine zeigt Abbildung 9. Die Fmoc-Gruppe wird bei Thomson et al.<sup>[20]</sup> mit der schon von Nielsen et al.<sup>[6, 27]</sup> verwendeten Cbz-Gruppe für die Nucleobasen kombiniert. Zur Herstellung der Monomere wurde zunächst die Nucleobasen-Essigsäure mit Fmoc-Aeg-OtBu, beispielsweise mit BOP<sup>[37]</sup> als

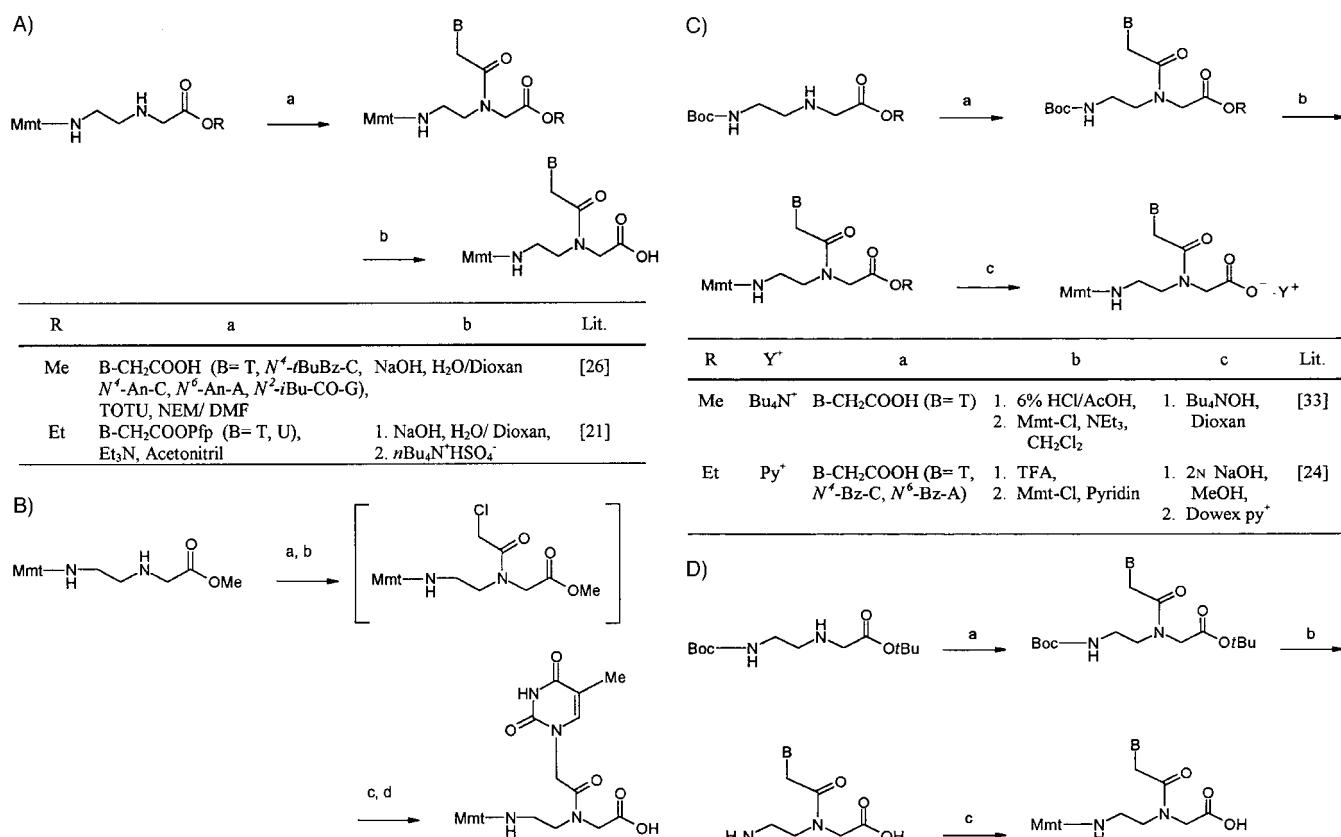


Abb. 8. A) Zwei Wege zu Mmt-PNA-Monomeren.<sup>[21, 26]</sup> B) Alternative Synthese des Thyminderivats:<sup>[36]</sup> a)  $\text{ClCH}_2\text{COCl}$ ,  $\text{NEt}_3$ , THF; b) DMF,  $\text{THF} \uparrow$ ; c) Thymin,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF; d)  $\text{NaOH}, \text{H}_2\text{O}/\text{Dioxan}$ ; C) Synthese von Mmt-PNA-Monomeren aus den entsprechenden Boc-Monomeren.<sup>[24, 33, 34]</sup> D) Synthese von Mmt-PNA-Monomeren über präzipitierbare Zwischenprodukte:<sup>[22]</sup> a)  $\text{B}-\text{CH}_2\text{COOH}$  ( $\text{B}=\text{T}, \text{N}^4\text{-An-C}, \text{N}^6\text{-An-A}, \text{N}^2\text{-iBu-CO-G}, \text{N}^2\text{-Ac-O}^6\text{-Dpc-G}$ , TOTU, NEM/DMF oder Propanphosphorsäureanhydrid,  $\text{EtOAc}, \text{NEt}_3$ ; b) 95proz. TFA; c)  $\text{Mmt-Cl}, \text{NEt}_3$ , DMF.

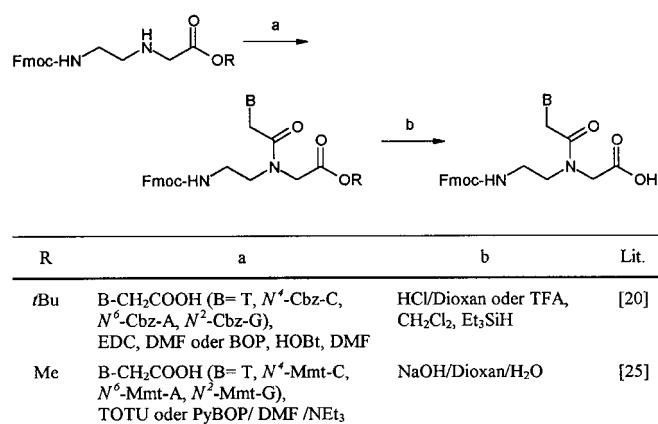


Abb. 9. Synthese von Fmoc-Monomeren.

Aktivator, gekuppelt. Durch Behandlung mit  $\text{HCl}/\text{Dioxan}$  oder TFA wurde dann der *tert*-Butylester gespalten. Der Zusatz von Triethylsilan ist zur Verhinderung der partiellen Cbz-Abspaltung vom Adeninbaustein notwendig. Diese Monomere haben allerdings weiterhin den Nachteil, daß die Cbz-Schutzgruppen nur unter stark sauren Bedingungen (HF, TFMSA) abgespalten werden können.

Unter wesentlich mildereren Bedingungen entschützen lassen sich Monomere mit einer Kombination von Fmoc-Schutzgruppe und der unter schwach sauren Bedingungen

spaltbaren Mmt-Gruppe (Abb. 9).<sup>[25]</sup> Während die Synthese dieser Monomere aus den zuvor beschriebenen Bausteinen durch Anbinden der Nucleobasen-Essigsäuren mit TOTU<sup>[35]</sup> oder PyBOP<sup>[38]</sup> reibungslos verlief, erwies sich die Spaltung des Methylesters in Gegenwart der Fmoc-Gruppe als etwas anspruchsvoll, da dabei die Fmoc-Gruppe teilweise abgespalten wurde. Diese Abspaltung ließ sich allerdings durch Zugabe von wenig Fmoc(ONSu) vor der Aufarbeitung einfach wieder rückgängig machen.

## 2.2. PNA-Monomerbausteine mit modifiziertem Rückgrat

Außer Aminoethylglycin wurden auch Homologe oder Modifikationen davon als Rückgratbausteine eingesetzt. Daneben sind Monomere mit chiralen Rückgratbausteinen beschrieben, die zur Kombination mit Aminoethylglycin-Monomeren und bei der Synthese von Homo-Oligomeren verwendet werden.

### 2.2.1. Monomere mit achiralem Rückgrat

Für die Herstellung von Phosphonoesternucleinsäuren (PHONAs) mit dem *N*-(2-Hydroxyethyl)aminomethylphosphonosäure-Rückgrat<sup>[39]</sup> werden Monomere eingesetzt, deren

Synthese in Abbildung 10 beschrieben ist: O-Mmt-geschütztes Aminoethanol wird mit Formaldehyd und Phosphonsäure-bis[4-nitrophenyl]ethylester] zum Aminomethylphosphonsäure-Rückgrat umgesetzt und dieses mit Thyminylessigsäure gekuppelt. Durch selektives Abspalten einer NPE-Schutz-

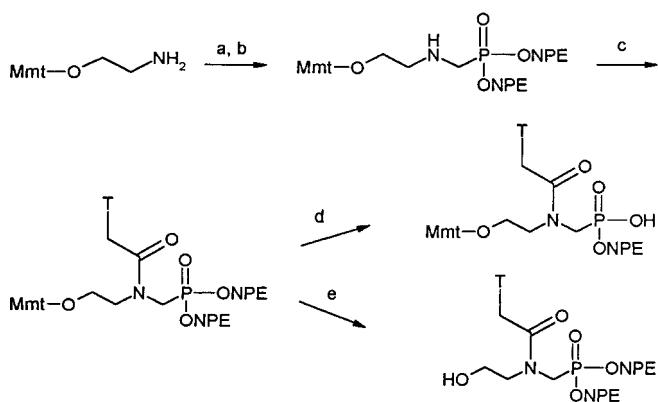


Abb. 10. Synthese von PHONA-Monomeren.<sup>[39a]</sup> a)  $\text{CH}_2\text{O}$ , MeOH; b)  $\text{H}(\text{O})\text{P}(\text{ONPE})_2$ ,  $100^\circ\text{C}$ ; c) Thyminylessigsäure, HOt, NEM, DIC, DMF; d) 0.1M DBU, Pyridin; e) 80proz. AcOH.

gruppe mit DBU<sup>[40]</sup> erhält man oligomerisierbare Monomere. Diese Bausteine eignen sich sowohl für die Herstellung von Homo-Oligomeren als auch für den Einbau in PNA- und DNA-Oligomere.

Monomere, basierend auf den zu Aminoethylglycin homologen Aminosäuren Aminoethyl- $\beta$ -alanin, Aminopropylglycin und Aminopropyl- $\beta$ -alanin (Abb. 11, **A**–**C**), sind von

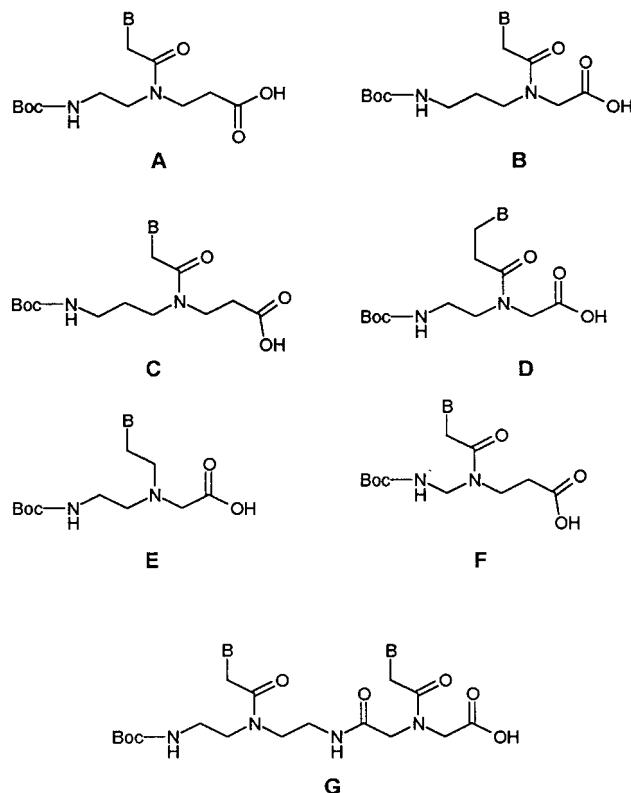


Abb. 11. Monomere mit modifizierter Rückgratstruktur (**A**–**E**)<sup>[41–43]</sup> sowie spezielle PNA-Bausteine für Retro-inverse-PNAs (**F**<sup>[44]</sup> und **G**<sup>[45]</sup>).

Hyrup et al.<sup>[41–43]</sup> beschrieben. Darüber hinaus stellten sie Monomere her, die sich im Abstand der Nucleobase vom Aeg-Rückgrat (**D**) oder in der Art der Verknüpfung von Nucleobase und Aeg-Rückgrat (**E**) unterscheiden. Synthetisiert wurden diese Verbindungen analog zu den früher beschriebenen Aeg-Derivaten.

Spezielle Monomere und Dimere, die sich für die Herstellung von „Retro-inverse“-PNAs einsetzen lassen,<sup>[44]</sup> sind die Verbindungen **F** bzw. **G**. Ähnliche Verwendung finden Heterodimere aus *N*-(2-Aminoethyl)ethylenediamin und Iminodiessigsäure.<sup>[45]</sup>

### 2.2.2. Monomere mit chiralem oder olefinischem Rückgrat

Monomere mit einem Chiralitätszentrum im Rückgrat (Abb. 12) sind von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben worden. Die Rückgrat-Aminosäure wurde durch reduktive

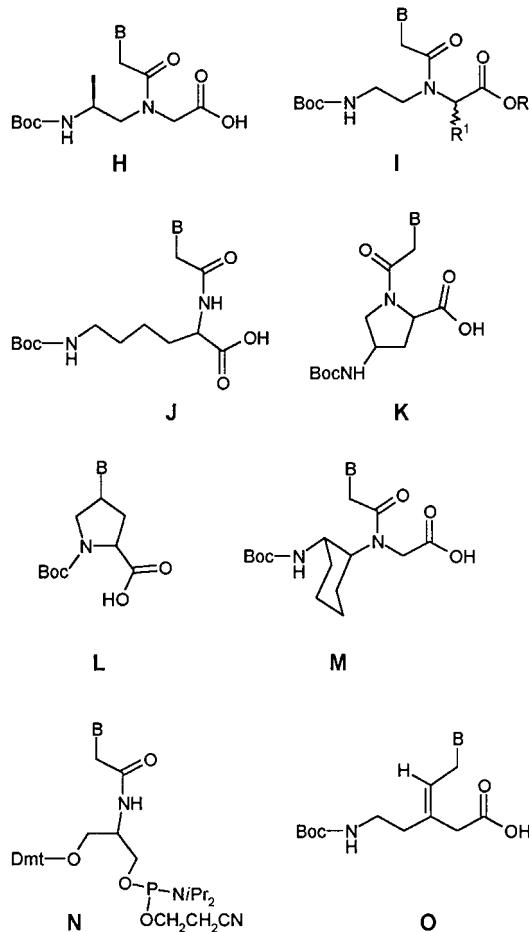


Abb. 12. Die Monomere **H**,<sup>[28]</sup> **I** (Beispiele für  $\text{R}^1$ :  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ,  $(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ),<sup>[46, 47]</sup> **J** (basierend auf Ornithin),<sup>[48, 49]</sup> **K**, **L** (basierend auf Prolin),<sup>[50–53]</sup> **M** (basierend auf Diaminocyclohexan),<sup>[54, 55]</sup> und **N** (basierend auf 2-Aminopropan-1,3-diol),<sup>[56]</sup> mit chiralem Rückgrat sowie ein Monomer mit einer (*Z*)-Olefineinheit (**O**).<sup>[57]</sup>

Aminierung aus Boc-Alaninal und Glycinmethylester<sup>[28]</sup> (**H**) oder aus Boc-Glycinal und Aminosäureestern<sup>[46, 47]</sup> (**I**) analog zu Aminoethylglycin hergestellt. Nach Kupplung mit Nucleobasen-Essigsäuren erhielt man die entsprechenden Monomerbausteine.

Weitere kürzlich beschriebene Variationen des Rückgrats basieren auf den Aminosäuren Ornithin (**J**)<sup>[48, 49]</sup> und Prolin (**K, L**)<sup>[50–53]</sup> auf dem konformativ eingeschränkten Diamino-cyclohexan (**M**)<sup>[54, 55]</sup> sowie auf dem Phosphoramidit von 2-Aminopropan-1,3-diol (**N**)<sup>[56]</sup>. Beschrieben sind ferner PNA-Monomere, in denen die zentrale Amidbindung durch eine konfigurativ definierte C-C-Doppelbindung ersetzt ist (**O**)<sup>[57]</sup>.

### 3. Die Synthese von PNAs

Die im folgenden vorgestellten Möglichkeiten, PNAs herzustellen, sind zusätzlich in Tabelle 1 zusammengefaßt.

#### 3.1. PNAs aus Aminoethylglycin-Monomeren

##### 3.1.1. Die *tert*-Butyloxycarbonyl/Benzyloxycarbonyl(Boc/Cbz)-Schutzgruppenstrategie

Die ersten PNAs waren Homopolymere des Thymins.<sup>[6, 8]</sup> Sie waren nach der Merrifield-Festphasensynthese zugänglich, wobei man von MBHA-Polystyrol ausging, das mit Boc-L-Lys derivatisiert war (Abb. 13 a). Dies liefert die PNAs in Form ihrer C-terminalen Lysinamide, was von Vorteil ist, weil die positive Ladung der Lysinseitenkette die unerwünschte Tendenz der PNAs zur Selbstaggregation zurückdrängt und zudem ihre Reinigung und Charakterisierung vereinfacht. Als Bausteine wurden die in Abschnitt 2.1.1 beschriebenen Monomere eingesetzt. Im Synthesecyclus wurde der Boc-geschützte N-Terminus mit TFA entschützt und in 94 bis 99 % Ausbeute mit den vorgebildeten Pentafluorphenyl-Aktivestern umgesetzt. Nach Abschluß der Kettenverlängerung wurde das fertige PNA-Oligomer mit HF vom Träger abgespalten. Bereits in diesen frühen Synthesen wurden PNA-Nitrobenzylamido-Acridinium-Konjugate hergestellt,<sup>[6, 8]</sup> die als Photonuclease/Intercalator-Liganden zum Bindungsnachweis dienten.

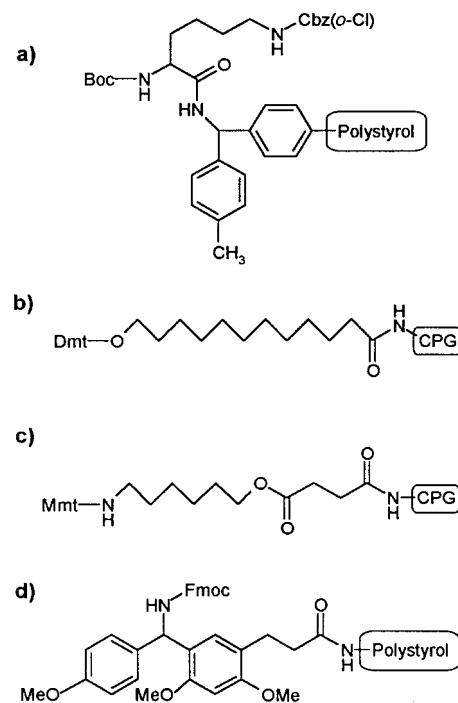


Abb. 13. Träger für die Festphasensynthese von PNAs und PNA/DNA-Chimären. a) Boc-Lys(Cl-Cbz)-MBHA-Polystyrol;<sup>[6, 8, 27]</sup> b) Dimethoxytrityl-12-hydroxydodecansäure-CPG;<sup>[68]</sup> c) Monomethoxytritylaminohexylsuccinat-CPG;<sup>[25, 26]</sup> d) Breipohl-Linker.<sup>[25]</sup>

Die Synthese von PNAs aus Boc-geschützten Thymin-, *N*<sup>4</sup>-(Benzylloxycarbonyl)cytosin-,<sup>[7]</sup> *N*<sup>6</sup>-(Benzylloxycarbonyl)adenin- und *O*<sup>6</sup>-Benzylguanin-Monomerbausteinen<sup>[9]</sup> kann durch In-situ-Aktivierung mit DCC in 50proz. DMF/Dichlormethan in 98 bis 100 % Ausbeute pro Cyclus erfolgen. Die erste detaillierte Beschreibung der Synthese dieser Bausteine sowie ihre Verwendung zur Herstellung von PNAs stammt aus dem Jahre 1994.<sup>[27]</sup> Die Oligomersynthese gelingt für alle vier Monomere sehr effizient durch In-situ-Aktivierung mit DIC.

Tabelle 1. Zusammenfassung ausgewählter PNA-Synthesemethoden.<sup>[a]</sup>

Lit.	N-terminale Schutzgruppe	Base und Schutzgruppe	Festphasentyp	Kupplungsmethode (Ausbeute)	Capping	Spalten und Entschützen
[58]	Boc	T: keine, C: <i>N</i> <sup>4</sup> -Cbz, A: <i>N</i> <sup>6</sup> -Cbz, G: <i>N</i> <sup>2</sup> -Cbz	MBHA-Polystyrol (Abb. 13 a)	HBTU, Diethylcyclohexylamin in DMF/Pyridin (97 %)	<i>N</i> <sup>1</sup> -Benzylloxycarbonyl- <i>N</i> <sup>3</sup> -methylimidazoltriflat	TFA/TFMSA
[59]	Boc	T: keine, C: <i>N</i> <sup>4</sup> -Cbz, A: <i>N</i> <sup>6</sup> -Cbz, G: <i>N</i> <sup>2</sup> -Cbz	MBHA-Polystyrol	HATU, DIPEA in NMP/Pyridin (99 %)	Acetanhydrid/NMP/Pyridin, Piperidin	TFA/TFMSA
[20]	Fmoc	T: keine, C: <i>N</i> <sup>4</sup> -Cbz, A: <i>N</i> <sup>6</sup> -Cbz, G: <i>N</i> <sup>2</sup> -Cbz	MBHA- oder Rink-Harz	Pentafluorphenyl-Aktivester (95–99 %)	Acetanhydrid/DIEA in NMP	HF/Anisol
[25]	Fmoc	T: keine, C: <i>N</i> <sup>4</sup> -Mmt, A: <i>N</i> <sup>6</sup> -Mmt, G: <i>N</i> <sup>2</sup> -Mmt	Breipohl-Linker-Polystyrol (Abb. 13 d) oder Aminohexylsuccinat-CPG	PyBOP, NEM in DMF (94 %)	–	95 % TFA oder NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O
[68]	Fmoc	T: keine, C: <i>N</i> <sup>4</sup> -Bz, A: <i>N</i> <sup>6</sup> -Bz, G: <i>N</i> <sup>2</sup> -iBu-CO	Hydroxydodecansäure-CPG (Abb. 13 b)	HATU, DIPEA in DMF (nicht beschrieben)	Acetanhydrid in DMF	NH <sub>3</sub> /EtOH
[26]	Mmt	T: keine, C: <i>N</i> <sup>4</sup> -tBuBz, A: <i>N</i> <sup>6</sup> -An, G: <i>N</i> <sup>2</sup> -iBu-CO	Aminohexylsuccinat-CPG oder Tentagel (Abb. 13 c)	HATU oder PyBOP, NEM oder DIEA in DMF (95–99 %)	Acetanhydrid/Lutidin/ <i>N</i> -Methylimidazol in THF	NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O

[a] Die Abkürzungen sind im Anhang erläutert.

Die Abspaltung der N-terminalen Boc-Schutzgruppe erfolgt mit 50proz. TFA in Dichlormethan. Mit einem quantitativen Ninhydrin-Test lässt sich die Kupplungseffizienz überprüfen. Noch vorhandene Aminogruppen werden notfalls durch Amidbildung („Capping“) mit Acetanhydrid in Pyridin/Dichlormethan an der Weiterreaktion im nächsten Cyclus gehindert. Nach Abspaltung der PNA-Oligomere gemischter Sequenz vom Festphasenträger mit HF/2.5proz. Thioanisol können die Rohprodukte durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt werden.

Eine systematische Untersuchung der Reaktionsbedingungen anhand der Synthese einer 17mer-PNA-Modellsequenz ergab, daß die höchsten Kupplungsausbeuten mit HBTU erhalten werden,<sup>[58]</sup> wobei der Guaninbaustein nun N<sup>2</sup>-Cbz geschützt ist. Außerdem führt N<sup>1</sup>-Benzylloxycarbonyl-N<sup>3</sup>-methylimidazolium-triflat als Capping-Reagens zu weniger unerwünschten Nebenreaktionen als Acetanhydrid. Die wichtigste Nebenreaktion unter basischen und neutralen Bedingungen ist die Wanderung der Nucleobasen-Essigsäure von der sekundären Aminofunktion zur freien N-terminalen Aminofunktion des Aminoethylglycin-Rückgrats (Abb. 14a).

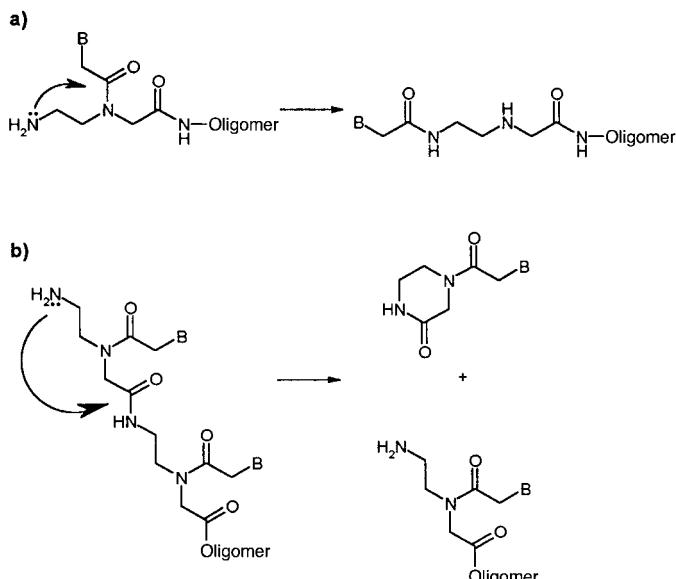


Abb. 14. a) *N*-Acy-Transferreaktion;<sup>[58]</sup> b) Abspaltung der N-terminalen PNA-Einheit.<sup>[20]</sup>

Noch effizienter scheint dasselbe PNA-Heptadecamer aus den Boc/Cbz-geschützten Monomeren mit HATU als Kupplungsreagens zugänglich zu sein.<sup>[59]</sup> Mit einem kommerziellen Peptidsynthesizer (5- $\mu$ mol-Cyclen, kurze Voraktivierung mit HATU, Vorliegen des Monomers in siebenfachem Überschuß, Reaktion in Gegenwart von DIEA) betragen die Ausbeuten pro Cyclus 99.4%. Das Capping wurde mit Acetanhydrid/NMP/Pyridin durchgeführt. Durch anschließendes Waschen mit Piperidin sollten die während des Capping potentiell auftretenden hochreaktiven acetylierten Derivate der Nucleobasen zerstört werden.<sup>[59]</sup>

Die Boc/Cbz-geschützten PNA-Monomerbausteine können auch in Verbindung mit der HATU-Aktivierung zur Synthese von PNAs auf Polyethylenlycol-Polystyrol-Pfropf-copolymeren<sup>[60]</sup> oder auf Polystyrol-gepfropften Polyethylenfilmen<sup>[61]</sup> eingesetzt werden.

Des weiteren wurde bereits über den Einbau von Nicht-Standard-Nucleobasen in PNAs berichtet (Abb. 15). So wurde Pseudoisocytosin<sup>[62]</sup> für Bindungsstudien in Bis(PNAs)

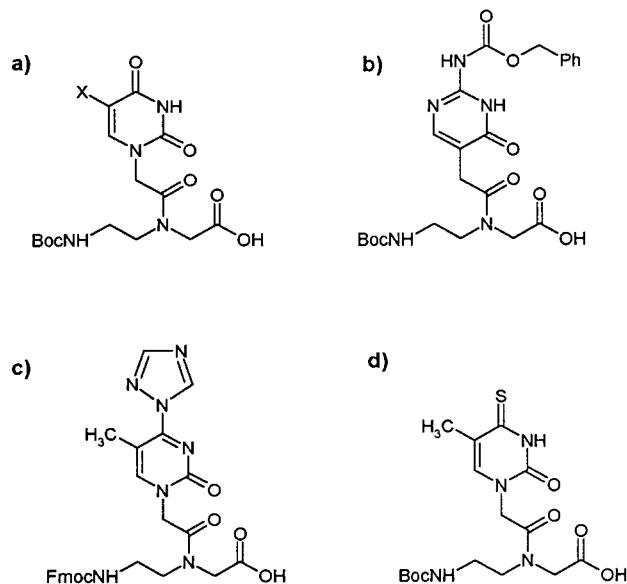


Abb. 15. PNA-Monomerbausteine mit modifizierten Nucleobasen. a) 5-Brom (X = Br) und 5-Ioduracil (X = I); b) Pseudoisocytosin; c) Triazolothymin; d) 4-Thiothymin.

eingeführt (siehe Abschnitt 4.3.2), in denen zwei unterschiedliche PNA-Sequenzen über flexible 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure-Linker „Kopf-Schwanz“-verknüpft sind.<sup>[63]</sup> Eine zweite Nicht-Standard-Nucleobase, 5-Ioduracil, diente nach Einbau in eine Bis(PNA)/Peptid-Chimäre<sup>[64]</sup> über das Iodatom als Phaseninformationsbezugspunkt bei der Röntgenstrukturanalyse eines Bis(PNA)/Oligonucleotid-Komplexes. In ähnlicher Weise erleichtert der Einbau von 5-Bromuracil<sup>[65]</sup> die strukturelle Charakterisierung von PNA · PNA-Duplizes. Für Strukturuntersuchungen mittels photochemischer Reaktionen können PNAs auch mit 4-Thiothymin derivatisiert werden.<sup>[66]</sup> Wir haben 5-Methyl-4-(3H-1,2,4-triazol-1-yl)-3,4-dihydro-1*H*-pyrimidin-2-on nach der Fmoc-Strategie in PNAs eingebaut,<sup>[25]</sup> die zur Herstellung von 5-Methylcytosin- oder 5-Methyluracilderivaten dienen sollten. Anders als bei Oligonucleotiden<sup>[67]</sup> lässt sich die Triazolylfunktion in aminoterminal ungeschützten PNAs nicht durch Ammoniak, Ethylen-diamin oder Natriumhydroxid verdrängen.

### 3.1.2. Die 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl(Fmoc)-Schutzgruppenstrategie

Mit der Fmoc-Gruppe für den temporären Schutz der N-terminalen Aminofunktion<sup>[20]</sup> und der Benzylloxycarbonylgruppe für den Schutz der exocyclischen Aminofunktion der Nucleobasen erhält man bei der Festphasensynthese auf MBHA- oder MBHA-Rink-Polystyrolträgern die entsprechenden C-terminalen Amide und auf Chlortrityl-Polystyrolträgern die C-terminalen Säuren. Zur Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppe wird 30proz. Piperidin/20proz. DMSO in NMP verwendet. Mit den Monomeren in Form

der Pentafluorphenyl-Aktivester in zweifachem Überschüß und bei Capping mit Acetanhydrid/DIEA in NMP lassen sich Ausbeuten von 95 bis 99 % pro Cyclus erzielen. Beim Vergleich der Pentafluorphenylester-Kupplungsmethode mit der HBTU/HOBt-Aktivierung der freien Säure des Monomers schneidet erstere eindeutig besser ab.<sup>[20]</sup>

Nach Erreichen der gewünschten Kettenlänge wird das PNA-Oligomer vorteilhaft noch N-terminal Fmoc-geschützt mit HF/Anisol vom Träger abgespalten, da die Fmoc-Gruppe als lipophile Hilfsgruppe zur Trennung des gewünschten PNA-Oligomers von möglichen kürzeren Sequenzen bei der Umkehrphasen-HPLC genutzt werden kann. Nach der Reinigung lässt sich die Fmoc-Gruppe mit Piperidin entfernen, wobei allerdings bei längeren Reaktionszeiten die Abspaltung der N-terminalen PNA-Einheit als Nebenreaktion auftritt (Abb. 14b). Dagegen wird die früher beobachtete *N*-Acyl-Transferreaktion<sup>[58]</sup> (Abb. 14a) unter diesen Bedingungen nicht detektiert.

Obwohl die Fmoc-Strategie zweifellos mildere Reaktionsbedingungen ermöglicht als die Boc/Cbz-Strategie, erfordert die Kombination mit dem MBHA-Festphasen-Linker und der Benzyloxycarbonylschutzgruppe immer noch stark saure Bedingungen bei der Abspaltung des PNA-Oligomers vom Träger und bei dessen Entschützen. Vorteilhafter ist die Verwendung der Fmoc-Gruppe als temporäre Schutzgruppe in Kombination mit der Mmt-Gruppe zum Schutz der exocyclischen Aminofunktionen der Basen,<sup>[25]</sup> da diese nach Abschluß der PNA-Synthese mit 80proz. Essigsäure entfernt werden kann. Die Mmt-Gruppe verleiht den Monomerbausteinen zudem eine ausgezeichnete Löslichkeit in organischen Solventien. Bei der Oligomersynthese kann einerseits unser Amid-Linker (Abb. 13d) verwendet werden, der das Abspalten des PNA-Amids von der Festphase und das Entschützen der Mmt-Gruppen mit Trifluoressigsäure simultan erlaubt. Andererseits kann bei Verwendung unseres basenlabilen Aminoheksylsuccinyl-Linkers<sup>[26]</sup> das entschützte PNA-Hydroxyhexylamid mit NH<sub>3</sub> (conc.) vom Träger abgespalten und so die Anwendung stark saurer Bedingungen völlig umgangen werden.

Eine weitere Variante der PNA-Synthese nach der Fmoc-Strategie wurde von Bergmann et al.<sup>[68]</sup> am Beispiel der Herstellung von PNA/DNA-Chimären beschrieben. Hierzu wurden Fmoc/Acyl-Schutzgruppenkombinationen mit *N*<sup>4</sup>-Benzoylcytosin-, *N*<sup>6</sup>-Benzoyladenin- und *N*<sup>2</sup>-Isobutyrylguanin-derivatisierten Monomerbausteinen vorgeschlagen. Zur Kupplung wurde HATU/DIEA in DMF und zum Capping Acetanhydrid in DMF verwendet. Ein Alkylamino-CPG-Träger, der mit 12-Hydroxydodecansäure derivatisiert ist (Abb. 13b), ermöglichte die Anbindung des ersten PNA-Bausteins über eine Esterfunktion. Diese konnte nach erfolgter Oligomersynthese mit wasserfreiem ethanolischem Ammoniak zusammen mit den Nucleobasen-Acylschutzgruppen abgespalten werden.

### 3.1.3. Die (4-Methoxyphenyl)diphenylmethyl/Acyl(Mmt/Acyl)-Schutzgruppenstrategie

Auf der Suche nach einer milden Methode zur PNA-Synthese, die mit den Bedingungen der DNA-Synthese kompatibel sein sollte, haben wir eine neue Strategie entwi-

kelt, bei der die Mmt-Gruppe als N-terminale temporäre Schutzgruppe und Acylschutzgruppen für die Aminofunktionen der Nucleobasen Verwendung finden.<sup>[26]</sup> Die Mmt/Acyl-Monomerbausteine sind in Abschnitt 2.1.1 (Abb. 8) beschrieben. Die lipophile Mmt-Gruppe erhöht die Löslichkeit der Monomere in polaren organischen Solventien wie DMF oder Acetonitril. Durch Kombination der Mmt-Gruppe mit der *tert*-Butylbenzoyl- oder der Anisoyl- anstelle der häufig verwendeten unsubstituierten Benzoylschutzgruppe lässt sich die Löslichkeit der Monomere weiter verbessern.

Abbildung 16 zeigt den PNA-Synthesecyclus ausgehend von Mmt-Bausteinen. Die temporäre Mmt-Schutzgruppe kann unter sehr milden Bedingungen abgespalten werden (3proz. Trichloressigsäure in Dichlormethan) und erlaubt anhand der spektroskopischen Messung des farbigen Mmt-Kations eine einfache Erfolgskontrolle der Kupplungsreaktionen. Die Kupplung selbst wird durch kurze Voraktivierung mit HATU oder PyBOP in Gegenwart von DIEA durchgeführt. Das Capping erfolgt analog wie bei der DNA-Synthese mit Acetanhydrid/Lutidin/*N*-Methylimidazol in THF. Wird mit einem basenlabilen Aminoheksylsuccinyl-Linker zwischen CPG- oder Tentagel-Festphasenträger und PNA gearbeitet (Abb. 13c), kann das fertige PNA-Oligomer durch Einwirkung von NH<sub>3</sub> (conc.) simultan vom Träger gespalten und an den Nucleobasen entschützt werden. Wegen der Gefahr der in Abbildung 14 dargestellten Nebenreaktionen wird die N-terminale Mmt-Schutzgruppe erst anschließend mit 80proz. Essigsäure entfernt. Alternativ führt man die PNAs nach Abspaltung der endständigen Mmt-Gruppe durch eine abschließende Capping-Reaktion in die basenstabilen N-terminal acylierten PNAs über.

Die resultierenden PNAs fallen in Form der C-terminalen Hydroxyhexylcarboxamide an. Natürlich kann die N-terminale Mmt-Gruppe, ähnlich wie die Dmt-Gruppe bei der Oligonucleotidreinigung, auch als lipophiler Rest zur „Tritylon“-Reinigung per Umkehrphasen-HPLC genutzt werden. Weiterhin fanden wir, daß N-terminal acetylierte PNAs mit mehr als drei Thymin- oder Guanin-Einheiten vorteilhaft bei pH 12 durch HPLC oder FPLC an Ionenaustauschersäulen analysiert und gereinigt werden, da sowohl die Guanin- als auch die Thymin-Nucleobasen bei hohem pH deprotoniert vorliegen. Die HPLC im alkalischen Milieu, die besonders für aggregierende Guanin-reiche PNA-Sequenzen von Vorteil ist, wurde auch von Bohler et al.<sup>[18]</sup> und Schmidt et al.<sup>[69]</sup> beschrieben. Die mehrfach negativ geladenen PNA/DNA-Chimären (siehe Abschnitt 3.3) lassen sich zudem wie Oligonucleotide durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysieren und reinigen.<sup>[70]</sup>

Wir verwenden die Mmt/Acyl-Schutzgruppenstrategie routinemäßig zur Synthese von PNAs und PNA/DNA-Chimären im 3- bis 5- $\mu$ mol-Maßstab an einem modifizierten Eppendorf-Biotronik-Ecosyn-D300-DNA-Synthesizer<sup>[71]</sup> oder, ähnlich wie von van der Laan et al. beschrieben,<sup>[34]</sup> im 1- bis 2- $\mu$ mol-Maßstab am ABI(Applied-Biosystems)-DNA-Synthesizer.

### 3.1.4 Andere Strategien

Auf einer Tagung wurde 1994 die Synthese von H-ttttt-Gly-NH<sub>2</sub> mit Hilfe eines PNA-Monomerbausteins vorgestellt, bei

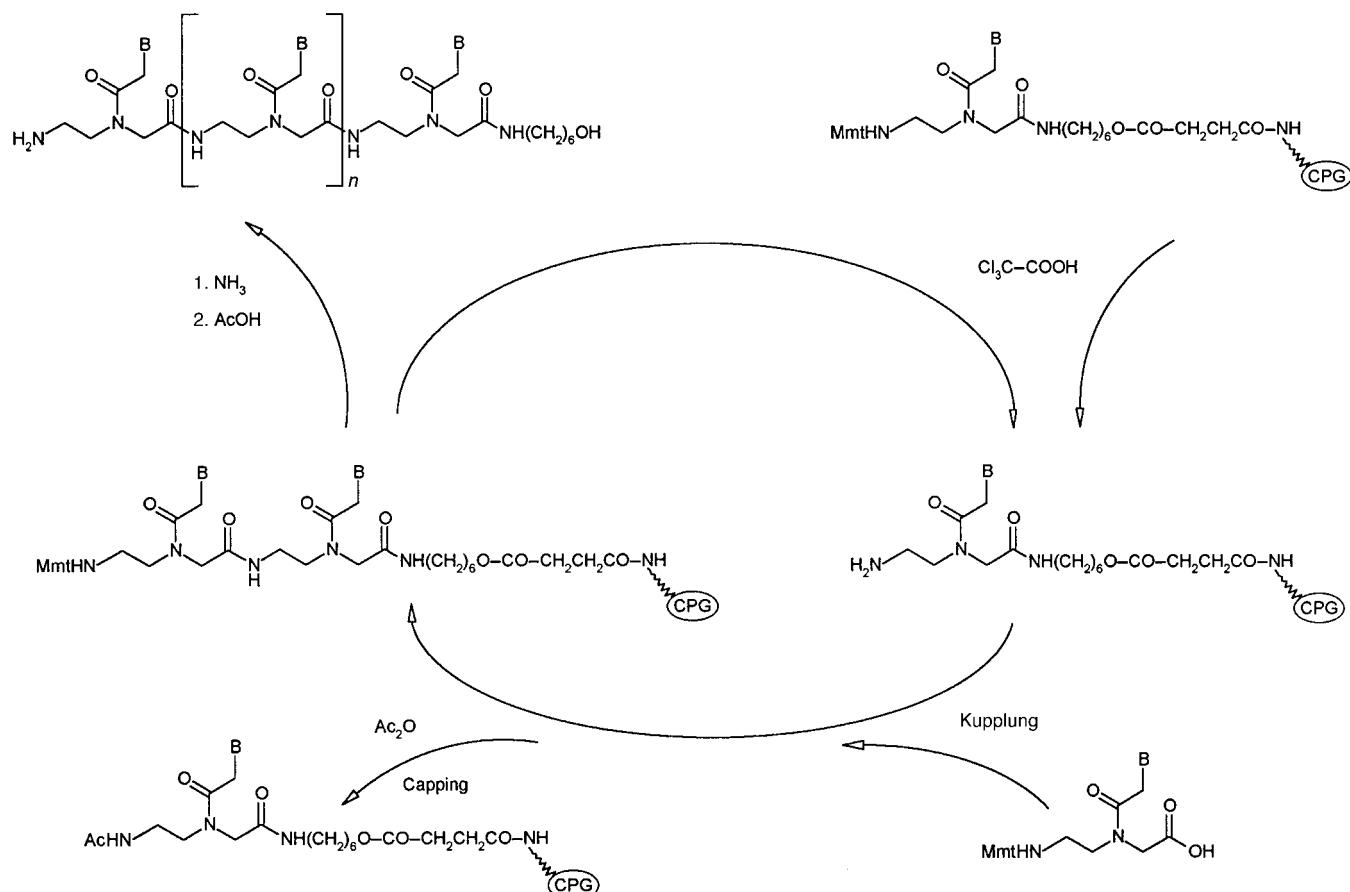


Abb. 16. PNA-Synthesecyclus nach der Mmt/Acyl-Schutzgruppenstrategie.<sup>[26]</sup> Bevorzugte PNA-Kupplungsreagentien sind HATU, HBTU und PyBOP.

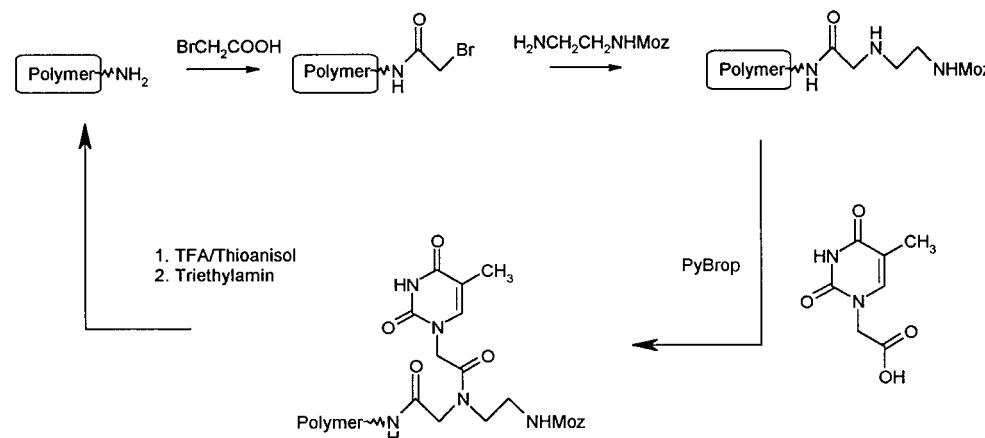


Abb. 17. PNA-Synthesecyclus mit Hilfe von Submonomeren.<sup>[73a]</sup> MoZ = (4-Methoxybenzyloxy)carbonyl.

dem die gegen Thiole labile Dithiasuccinat(Dts)-Gruppe als N-terminale temporäre Schutzgruppe Verwendung fand.<sup>[72]</sup>

Eine etwas ausgefallenere Methode zur Synthese von PNAs mit Hilfe von Submonomeren, die die Nucleobasen noch nicht enthalten,<sup>[73a]</sup> ist in Abbildung 17 beschrieben. Bei ihr wird das Aminoethylglycin-Rückgrat stufenweise durch Festphasensynthese aufgebaut und anschließend die sekundäre Aminofunktion mit den Nucleobasen-Essigsäuren acyliert. Diese Strategie, die an die Synthese von Peptoiden erinnert,<sup>[73b]</sup> wurde zur Synthese von Ac-(t)<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub> eingesetzt.

Es bleibt abzuwarten, ob diese Methode, bei der neben den Nucleobasen-Essigsäuren lediglich ein Monomerbaustein vollständig zu synthetisieren ist, allgemeine Verwendung zur Synthese gemischter PNA-Sequenzen finden kann.

### 3.2. PNAs aus Monomeren mit modifiziertem Rückgrat

PNAs mit modifiziertem Rückgrat werden in den meisten Fällen in Anlehnung an die oben beschriebenen Methoden

synthetisiert. So wurden hetero-oligomere PNAs aus den regulären Aminoethylglycin- und Aminoprolinbausteinen nach der Boc-Strategie aufgebaut.<sup>[51, 74]</sup> Anders verhält es sich natürlich bei PNA-Derivaten, wie den PHONAs, die sich strukturell stark von den Aminoethylglycin-PNAs unterscheiden; für diese wurden spezielle Synthesemethoden entwickelt.<sup>[39, 75, 76]</sup>

### 3.3. Synthese von PNA/DNA-Chimären

Der praktische Nutzen reiner PNAs ist trotz der wirklich bemerkenswerten Bindungseigenschaften eingeschränkt, weil ihre Handhabung während der Aufarbeitung, Analyse und Reinigung aufgrund ihrer Tendenz zur Selbstaggregation oft schwierig ist. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen und zugleich die Verfügbarkeit in Zellen sowie die Aktivierung der RNaseH zu gewährleisten (siehe Abschnitt 5), besteht in der Synthese chimärer Moleküle aus PNA und DNA (Abb. 18).

Die beiden prinzipiellen Strategien zur Synthese von PNA/DNA-Chimären sind die „Blockkondensation“ zuvor herge-

weise On-line-Festphasensynthese hat sich dagegen als erfolgreiche und flexible Methode zur Synthese von PNA/DNA-Chimären erwiesen. Um jedoch die volle Kompatibilität von DNA- und PNA-Synthese zu gewährleisten, mußten spezielle Schutzgruppenstrategien entwickelt werden. Zudem waren Linkermoleküle notwendig (Abb. 19), die DNA mit PNA verbinden und umgekehrt.

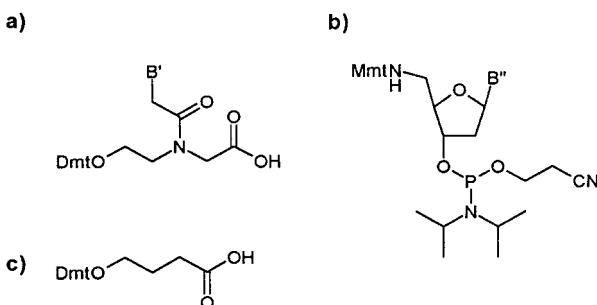


Abb. 19. Arten von Linkermolekülen.<sup>[81]</sup> a) *N*-(2-Hydroxyethyl)glycin-PNA-DNA-Linker ( $B'$  = T,  $N^4$ -An-C,  $N^6$ -An-A,  $N^2$ -iBu-G); b) 5'-Amino-2',5'-didesoxynucleosid-DNA-PNA-Linker ( $B''$  = T,  $N^4$ -Bz-C,  $N^6$ -Bz-A,  $N^2$ -iBu-CO-G); c) einfacher, nicht an der Nucleinsäurebindung teilnehmender PNA-DNA-Linker.

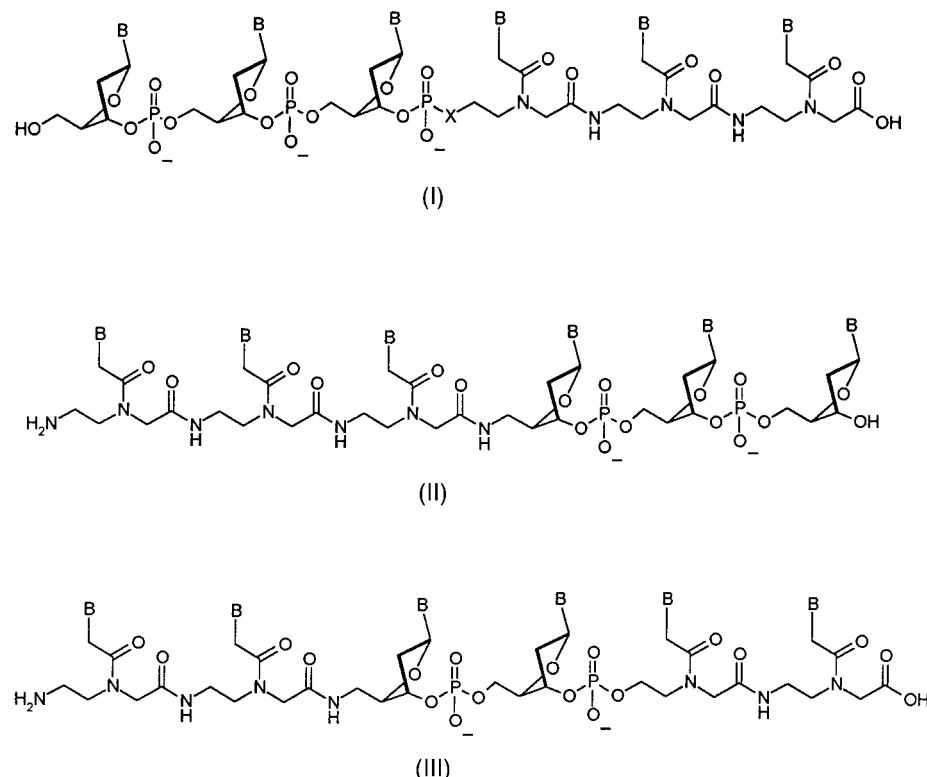


Abb. 18. PNA/DNA-Chimären: (I) 5'-DNA-(Linker)-PNA-(pseudo-3'), X = NH oder O; (II) (pseudo-5')-PNA-(Linker)-DNA-3'; (III) (pseudo-5')-PNA-(Linker)-DNA-(Linker)-PNA-(pseudo-3').

stellter PNA- und DNA-Oligomere in Lösung und die stufenweise „On-line“-Festphasensynthese aus geeignet geschützten monomeren Bausteinen. Die Herstellung der Chimären durch Blockkondensation ist mit Problemen wie nicht ausreichender Löslichkeit und niedrigen Ausbeuten behaftet<sup>[77]</sup> und wurde noch nicht beschrieben. Die stufen-

Bislang sind die Synthesen dreier Strukturklassen von PNA/DNA-Chimären beschrieben (siehe Abb. 18): (I) 5'-DNA-(Linker)-PNA-(pseudo-3'); (II) (pseudo-5')-PNA-(Linker)-DNA-3'; (III) PNA/DNA/PNA-Chimären, die als Kombination von (I) und (II) angesehen werden können. Um Verwirrungen bei der Angabe der Sequenzen von PNA/DNA-Chimären zu vermeiden, verwenden wir im folgenden für die PNA-Basen kleine Buchstaben und für die DNA-Basen große Buchstaben.

Das Homothymin-Oligomer (*pseudo-5'*)-(Acetyl)-tttt-**TTTT**-3' (**T**: 5'-Amino-5'-desoxythymidin) vom Strukturtyp (II) wurde nach van der Laan et al.<sup>[33]</sup> durch On-line-Festphasensynthese auf CPG erhalten. Dabei wurde zuerst der 3'-DNA-Teil nach Standardverfahren<sup>[78]</sup> im 10-µmol-Maßstab hergestellt. Als Linker wurde das früher von Bannwarth<sup>[79]</sup> und Mag et al.<sup>[80]</sup> beschriebene 3'-Phosphoramidit von 5'-*N*-(4-Monomethoxytrityl)amino-5'-desoxythymidin (Abb. 19b,  $B''$  = T) eingesetzt, das mit Hilfe des Standard-DNA-Cyclus an das 5'-Ende des Thymidylat-Trimers gekuppelt wurde. Nach Abspaltung der terminalen Mmt-Schutzgruppe mit 2proz. Trichloressigsäure in Dichlormethan wurde der PNA-Tetramerteil des Oligomers mit einem Mmt-geschützten Thymin-

PNA-Baustein und HBTU/DIEA als Aktivierungsreagens in über 85 % Ausbeute pro Cyclus ankondensiert. Nach dem letzten Synthesecyclus wurde die terminale Mmt-Gruppe abgespalten und der Aminoterminus durch Capping mit Acetanhydrid blockiert. Durch Behandlung mit Ammoniak wurden die  $\beta$ -Cyanoethylschutzgruppen der Internucleotidbindungen und das Oligomer vom Träger abgespalten. Leider finden sich keine Bindungsdaten für die gereinigte und charakterisierte Chimäre.

Petersen et al. beschrieben die Synthese von drei PNA/DNA-Chimären vom Strukturtyp (I).<sup>[77]</sup> Nach erfolglosen Versuchen, Nucleosid-3'-phosphoramidite in Lösung an eine PNA-Hydroxyfunktion zu kuppeln, gelang die stufenweise On-line-Festphasensynthese. Als Linker zwischen PNA- und DNA-Teil diente *N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-(thymin-1-ylacetyl)-glycin (Abb. 19 a, B' = T). Die Boc-geschützten Thymin-PNA-Bausteine können für den Aufbau von Homopyrimidinsequenzen verwendet werden, nicht aber für den von Chimären mit Purinbasen im DNA-Teil, da das zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe an Cytosin, Guanin und Adenin erforderliche HF zur Depurinierung im DNA-Teil führt. Mit dieser Schutzgruppenstrategie können somit nur Homopyrimidin-Chimären hergestellt werden. Ihre Synthese gelingt am CPG-Träger, der über einen 4-(Hydroxymethyl)benzoësäure-Linker Glycin gebunden hat. Der PNA-Teil wird aus Boc/Cbz-geschützten Monomeren<sup>[58]</sup> hergestellt. Als Übergangsbaustein von PNA zu DNA dient eine Dmt-geschützte Hydroxyethylglycin-Thyminelessigsäure. Nach Detriylierung wird der DNA-Teil der Chimären mit Standard-DNA-Synthesemethoden aufgebaut,<sup>[78]</sup> und man erhält „Kopf-Schwanz“-verknüpfte Chimären, in denen das 3'-Ende des DNA-Teils mit dem N-Terminus des PNA-Teils verbunden ist. Umgekehrt sind durch Einbau von Nucleosid-5'-phosphoramiditen Chimären mit einer „Kopf-Kopf“-Verknüpfung zugänglich, in denen das 5'-Ende des DNA-Teils mit dem N-Terminus des PNA-Teils verbunden ist. Da der Aminoterminus der PNAs dem 5'-Terminus der DNA entspricht, findet in dieser Chimäre am DNA-PNA-Übergang ein Orientierungswechsel statt. Schließlich erhält man die Chimären mit einem Glycinrest am C-Terminus durch Spaltung mit 0.1M wäßriger Natronlauge. Die Benzoylschutzgruppen der Desoxycytidin enthaltenden Chimären werden durch etwa zwölfständiges Behandeln mit NH<sub>3</sub> (conc.) bei 55 °C entfernt.

Bergmann et al.<sup>[68]</sup> beschrieben die Synthese von PNA/DNA-Chimären der Strukturtypen (I) und (II). Für die Herstellung der Homopyrimidin-Chimären (*pseudo*-5')-PNA-(Linker)-DNA-3' wurde ein Sarcosin-verbrückter CPG-Träger eingesetzt. Interessant ist die Verwendung spezieller Nucleosid-3'-phosphoramidite mit der reduktiv oder mit Base spaltbaren Allylschutzgruppe anstelle der üblichen  $\beta$ -Cyanoethyl-Phosphatschutzgruppe. Die Synthese des DNA-Strangs schloß mit einem Mmt-geschützten 5'-Amino-5'-desoxynucleosid-3'-phosphoramidit ab<sup>[79]</sup> (Abb. 19b), das als Übergangsbaustein zum PNA-Teil diente. Der PNA-Teil der Homopyrimidin-Chimären wurde aus Boc/Cbz-geschützten PNA-Bausteinen aufgebaut. Der Oligopyrimidin-DNA-Teil der Chimären ist so stabil, daß das Entschützen des PNA-Teils unter stark sauren Bedingungen durchgeführt werden konnte. Das vollständige Entschützen der Chimären gelang

mit NH<sub>3</sub> (conc.). Zur Synthese gemischter Sequenzen mit Purinnucleosiden im DNA-Teil sind Fmoc/Acyl-geschützte PNA-Bausteine vorgeschlagen worden.<sup>[68]</sup> Allerdings ist bislang weder die Herstellung dieser Monomerbausteine noch ihre Anwendung zur Synthese purinhaltiger gemischter Sequenzen beschrieben.

Zur Synthese von Chimären des Typs (I) kann von einem Alkylamino-CPG-Träger ausgegangen werden, der mit Dmt-geschützter 12-Hydroxydodecansäure derivatisiert ist (Abb. 13b).<sup>[68]</sup> Die erste PNA-Einheit wird als Ester an die freigesetzte Hydroxyfunktion gekuppelt, so daß die fertige Chimäre am Ende mit ethanolischem Ammoniak vom Träger abgespalten werden kann. Für den Aufbau des PNA-Teils eignen sich Fmoc/Acyl-geschützte Monomere, für den des DNA-Teils die üblichen Cyanoethyl-geschützten Phosphoramidite. Da die Phosphoramidite direkt an den N-Terminus des PNA-Teils ankondensiert werden, erhält man am Übergang von PNA zu DNA eine Phosphoramidatverknüpfung. Nach der Reinigung der negativ geladenen Chimären durch präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese und ihrer Charakterisierung mittels Massenspektrometrie wurden ihre Stabilität gegen Nucleasen (Abschnitt 5.1) und ihre Bindungseigenschaften (Abschnitt 4.3) studiert.

Finn et al.<sup>[24]</sup> beschrieben die Synthese von zwei PNA/DNA-Chimären des Typs (II) nach einem Verfahren, das sich an die Synthesestrategien von van der Laan et al.<sup>[33]</sup> für PNA/DNA-Chimären und von Will et al. für Mmt-geschützte PNA-Einheiten<sup>[26]</sup> anlehnt. Als Übergang von DNA zu PNA diente, wie bei Bergmann et al.,<sup>[68]</sup> ein 5'-Amino-5'-desoxynucleotid. Leider wird auch in dieser Arbeit nur die Synthese von Homopyrimidinsequenzen beschrieben, deren Bindung im Duplex mit komplementären Nucleinsäuren durch ihre ausgeprägte Neigung zur Tripelhelixbildung kompliziert wird (siehe Abschnitt 4.3).

Die erste Synthese einer Uracil enthaltenden PNA/DNA-Chimäre findet sich in der Arbeit von Stetsenko et al.<sup>[21]</sup> Mit einem Mmt-geschützten Uracil-PNA-Monomer wurde eine Chimäre vom Typ (II) synthetisiert, wobei wiederum 5'-Amino-5'-desoxythymidin als Übergangsbaustein zwischen DNA und PNA diente. T<sub>m</sub>-Messungen mit dieser Chimäre ergaben, daß der DNA-Teil kooperativ an der Bindung zur komplementären Nucleinsäure teilnimmt.

Wir berichteten kürzlich über Synthese und Eigenschaften von PNA/DNA-Chimären aller drei Strukturtypen, die alle vier Nucleobasen sowohl im PNA- als auch im DNA-Teil enthalten.<sup>[81]</sup> Bereits ein Jahr zuvor hatten wir Mmt/Acyl-geschützte PNA-Monomere vorgestellt, deren Schutzgruppenkombination speziell im Hinblick auf die Verwendung zur Synthese von PNA/DNA-Chimären ausgewählt worden war.<sup>[26]</sup> Wichtig schien uns dabei, daß der DNA-Teil aus den kommerziell erhältlichen Standard-DNA-Bausteinen aufbaubar ist. Mit Hilfe eines CPG-Trägers, der mit einem (6-Aminohexyl)succinat-Linker derivatisiert ist (Abb. 13c), konnten Chimären vom Typ (I) synthetisiert werden, die nach der Abspaltung vom Träger in Form der C-terminalen Hydroxyhexylamide anfielen. Als Übergangsbausteine von PNA zu DNA wurden Dmt-geschützte Hydroxyethylglycin-derivate der entsprechenden Nucleobasen-Essigsäuren verwendet (Abb. 19a). Alternativ kommen nicht an der Basen-

bindung beteiligte Linker, z. B. Dmt-geschützte 4-Hydroxybuttersäure (Abb. 19c), in Betracht, die an den N-Terminus des PNA-Teils gekoppelt werden. Nach Abspaltung der Dmt-Schutzgruppe mit 3proz. Trichloressigsäure in Dichlormethan kann der DNA-Teil nach Standardmethoden aufgebaut werden.<sup>[78]</sup> Chimären vom Typ (II) wiederum ließen sich mit Hilfe der 5'-Amino-2',5'-didesoxynucleosid-3'-phosphoramidite (Abb. 19b) als DNA-PNA-Linker gewinnen. Zudem berichteten wir als erste auch über die Synthese von Chimären des Strukturtyps (III), in dem zwei strukturelle Übergänge innerhalb einer Sequenz auftreten. Interessant ist die enorme Bindungskraft dieser PNA/DNA/PNA-Chimären gegenüber komplementärer DNA, wobei ein PNA-Teil über Watson-Crick- und der andere über Hoogsteen-Basenpaarung bindet (siehe Abschnitt 4.3.2).

### 3.4. Synthese von PNA/Peptid-Chimären

Für die Synthese von PNA/Peptid-Chimären bieten sich die „Standard“-Peptidsynthesestrategien, wie Fmoc- und Boc-Chemie, an. So stellten Koch et al.<sup>[82]</sup> durch Kombination der Boc/Cbz-PNA-Synthesestrategie mit der Boc-Peptidsynthesemethode ein PNA-Pentadecamer her, das am N-Terminus ein Heptapeptid über einen Tris(8-amino-3,6-dioxaoctansäure)-Linker gebunden hatte. Die PNA/Peptid-Chimäre zeigte bei der Hybridisierung mit einem überhängenden DNA-Templat einen etwas höheren  $T_m$ -Wert als das nichtkonjugierte PNA-Oligomer, was der Anwesenheit zweier positiv geladener Argininreste zugeschrieben werden könnte. Nach Circular dichroismus(CD)-Untersuchungen ändert sich die Struktur des Duplex durch die Einführung des Peptidteils nicht wesentlich. Da dieser Teil der Chimäre ein Substrat für Protein-Kinase A ist, kann eine enzymatische Markierung durch Kinasierung der Serin-Seitenkette mit radioaktivem Phosphat durchgeführt werden.

Eine PNA/Peptid/PNA-Chimäre, bestehend aus zwei Oligopyrimidin-PNA-Nonameren, die über ein His-Gly-Ser-Ser-Gly-His-Peptid zusammengehalten werden, wurde von Betts et al. synthetisiert.<sup>[64]</sup> Sie bildete mit einem Oligopurin-DNA-Strang eine stabile Tripelhelixstruktur, die röntgenstrukturanalytisch charakterisiert wurde. Die Herstellung ähnlicher Bis(PNA)-Strukturen mit einer positiv geladenen Lysin-Haarnadelstruktur wurde von Griffith et al. beschrieben.<sup>[83]</sup> Sie erhielten mit Boc/Cbz-geschützten PNA-Bausteinen ein PNA-Derivat, an das N-terminal ein Oligohistidinpeptid mittels Fmoc-Synthese<sup>[84]</sup> ankondensiert wurde. Solche PNA/[Linker-(His)<sub>6</sub>]-Chimären lassen sich auf mit Nickel derivatisierten Säulenmaterialien aufbringen und so zur Selektion spezifischer DNA- und RNA-Sequenzen nutzen.

## 4. Chemische und physikalische Eigenschaften von PNAs und Chimären

### 4.1. Chemische Stabilität

Bis auf die Nucleobasen haben PNAs und DNA keine gemeinsamen funktionellen Gruppen; dementsprechend un-

terscheiden sich die beiden Verbindungsklassen vollkommen in ihrer chemischen Stabilität. Im Gegensatz zur DNA, die bei der Behandlung mit starken Säuren depuriniert wird, sind PNAs säurestabil. Daher können bei der PNA-Synthese die in der Peptidchemie üblichen Schutzgruppen eingesetzt werden, die mit Trifluormethansulfonsäure oder wasserfreier HF abgespalten werden.<sup>[27]</sup> Auch gegenüber schwachen Basen sind die PNAs ausreichend stabil, so daß die klassischen, mit NH<sub>3</sub> conc. abspaltbaren Schutzgruppen für die Nucleobasen und die mit Piperidin abspaltbare Fmoc-Aminoschutzgruppe bei der Synthese verwendet werden können.<sup>[20, 25]</sup> Die einzige bemerkenswerte chemische Instabilität der PNAs röhrt von der freien Aminogruppe am N-Terminus her und kann sich in einer wenn auch langsamen N-Acyl-Transferreaktion oder in der Abspaltung der N-terminalen PNA-Monomereinheit äußern<sup>[58]</sup> (siehe Abb. 14). Diese Nebenreaktionen laufen hauptsächlich unter basischen Bedingungen ab und lassen sich durch Capping, beispielsweise mit einer Acetylgruppe, unterdrücken. Aus dem Gesagten folgt, daß zur Synthese der PNAs säurelabile Aminoschutzgruppen besser geeignet sind.<sup>[26]</sup>

Für die chemische Stabilität von PNA/DNA-Chimären sind einerseits die Eigenschaften der Molekülteile entscheidend, also etwa die Säurelabilität des DNA-Teils. Andererseits gibt es kooperative stabilisierende Effekte; so schützt der DNA-Teil in (5'-DNA)/PNA-Chimären den PNA-Teil vor der in Abbildung 14b gezeigten Spaltungsreaktion.

### 4.2. Löslichkeit

Bei den reinen PNAs handelt es sich um neutrale, zur Selbtaggregation neigende Verbindungen mit beschränkter Wasserlöslichkeit. Diese läßt sich jedoch durch den Einbau geladener Gruppierungen, etwa eines C-terminalen Lysinamids, stark verbessern. So ist H-(t)<sub>10</sub>-Lys-NH<sub>2</sub> in Konzentrationen von über 1.5 mM wasserlöslich.<sup>[8]</sup> Die PNA-Löslichkeit sinkt allerdings mit steigender Länge und zunehmendem Purin/Pyrimidin-Verhältnis.<sup>[13]</sup> Überraschenderweise erwies sich das Homoadeninpolymer in unseren Versuchen als sehr gut wasserlöslich. Die positive Ladung kann nicht nur am C-Terminus, sondern auch im PNA-Rückgrat eingeführt werden, etwa durch den Ersatz der Glycin- durch eine Lysin-Einheit.<sup>[47]</sup> Der Einbau von nur zwei solchen Gruppen steigert die Löslichkeit erheblich. Alternativ können negative Ladungen eingeführt werden. Ein Beispiel sind die PNA/DNA-Chimären, die tatsächlich hervorragend wasserlöslich sind.<sup>[81]</sup>

### 4.3. Bindungsaffinität

PNAs binden ausgezeichnet an komplementäre DNA und, noch besser, an komplementäre RNA. Am höchsten ist die Bindungsaffinität gegenüber PNAs selbst. Da es sich um neutrale Moleküle handelt, ist die Tendenz zur Bildung tripelhelicaler Strukturen stark ausgeprägt. Das ursprüngliche Design der PNAs<sup>[6]</sup> beruhte auf dem Computermodell einer DNA-Tripelhelix, bei der im dritten Strang das Zucker-Phosphat-Rückgrat durch das PNA-Gerüst ersetzt war.

Dennoch treten solche PNA · (DNA)<sub>2</sub>-Tripelhelices nur bei bestimmten Sequenzen auf (siehe Abschnitt 4.3.2). Bevorzugt kommt es zur Bildung von (PNA)<sub>2</sub> · DNA-Hybriden, teilweise unter Strangverdrängung in doppelsträngiger DNA. Läßt die Sequenz keine Tripelhelixbildung zu, so entstehen PNA · DNA-, PNA · RNA- oder gegebenenfalls auch PNA · PNA-Duplices.

#### 4.3.1. Duplexbildung mit komplementärer DNA und RNA

PNAs hybridisieren mit komplementärer DNA und RNA in Einklang mit den Watson-Crick-Regeln, allerdings sowohl in paralleler wie in antiparalleler Orientierung,<sup>[10, 81]</sup> wobei der PNA-C-Terminus dem 3'-, der N-Terminus dem 5'-Ende natürlicher Oligodesoxynucleotide entspricht. Wie Tabelle 2

Tabelle 2. Schmelztemperaturen von Komplexen aus PNAs oder PNA/DNA-Chimären und komplementärer DNA oder RNA in paralleler (p) und antiparalleler Orientierung (ap). Der Amino(H)-Terminus der PNA entspricht dem 5'-Terminus der DNA.

Sequenz	$T_m$ [°C]				Puffer <sup>[d]</sup>	Lit.
	DNA <sup>ap</sup>	DNA <sup>p</sup>	RNA <sup>ap</sup>	RNA <sup>p</sup>		
H-tgt acg tca caa cta <sup>[a]</sup>	69.5	56.1	72.3	51.2	A	[10]
5'-TGTACGTCACAACTA	53.3	–	50.6	–	A	[10]
H-aca tca tgg tcg <sup>[b]</sup>	58.7	47.6	62.3	43.5	B	[81]
5'-ACATCATGG TCG	47.9	–	44.5	–	B	[81]
5'-ACATCA tgg tcg <sup>[b, c]</sup>	52.6	< 25	52.1	< 25	B	[81]

[a] Terminales Carboxamid. [b] Terminales 6-(Hydroxyhexyl)carboxamid. [c] 1:1-T-Hydroxyethylglycin als PNA-DNA-Linker. [d] Puffer A: 100 mM NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 M EDTA, pH 7.0; Puffer B: 140 mM KCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 M EDTA, pH 7.4.

zeigt, wird die antiparallele Orientierung bevorzugt: Antiparallele PNA · DNA-Hybride sind deutlich stabiler als die entsprechenden DNA/DNA-Komplexe, wobei eine Erhöhung des  $T_m$ -Werts um etwa 1 K pro Base beobachtet wird. Noch stabiler sind die antiparallelen PNA · RNA-Duplices; die Stabilisierung gegenüber DNA · RNA-Hybriden beträgt ca. 1.5 K pro Base. Die PNA · RNA-Duplices sind durchschnittlich 0.2–0.5 K pro Base stabiler als die entsprechenden PNA · DNA-Duplices.<sup>[85]</sup> Die Stabilität der parallelen PNA · DNA- und PNA · RNA-Duplices entspricht dagegen recht genau derjenigen der (antiparallelen) DNA · DNA- bzw. DNA · RNA-Duplices. Rose zeigte in einer Kinetikstudie unter Zuhilfenahme der Kapillarelektrophorese,<sup>[86]</sup> daß sich auch die Geschwindigkeiten der Bildung der Duplexstrukturen unterschiedlicher Orientierung recht drastisch unterscheiden: Während der antiparallele Komplex sofort entsteht (<30 s), benötigt die Bildung des parallelen Duplex mehrere Stunden.

Ein besonders interessanter Aspekt der PNA · DNA-Duplexbildung ist die Abhängigkeit von der Ionenstärke, die von Tomac et al.<sup>[87]</sup> sorgfältig untersucht wurde. Während sich der  $T_m$ -Wert von DNA · DNA-Hybriden mit steigender Salzkonzentration (0.01–0.5 M NaCl) stark erhöht (über 20 K bei einem 10mer), nimmt er bei PNA · DNA-Duplices ab (ca. 8 K), so daß bei 0.5 M NaCl nahezu identische  $T_m$ -Werte vorliegen. Noch höhere Salzkonzentrationen wirken dann sowohl auf PNA · DNA- als auch auf DNA · DNA-Duplices

schwach destabilisierend. Dieser entgegengesetzte Einfluß der Ionenstärke auf die Duplexbildung läßt sich durch die Assoziation von Gegenionen im Fall der DNA · DNA-Duplexbildung und durch die Verdrängung von Gegenionen im Fall der PNA · DNA-Duplexbildung erklären.

Basenfehlpaarungen haben eine Erniedrigung des  $T_m$ -Werts um 8 bis 20 K zur Folge.<sup>[10]</sup> Diese Diskriminierung ist in manchen Fällen etwa doppelt so hoch wie bei DNA · DNA-Duplices.

Auch PNA/DNA-Chimären binden komplementäre DNA und RNA in Einklang mit den Watson-Crick-Regeln<sup>[34, 81]</sup> (Tabelle 2). Der  $T_m$ -Wert der Duplices liegt im allgemeinen zwischen den Werten der entsprechenden PNA · DNA- und DNA · DNA-Duplices. Im Detail hängt er natürlich stark vom Verhältnis PNA:DNA in der Chimäre sowie von deren Sequenz ab, aber auch von der Natur und der Position des Linkermoleküls zwischen DNA und PNA. (5'-DNA)/PNA-Chimären mit einem von Hydroxyethylglycin abgeleiteten Linker gehen mit DNA und RNA unter physiologischen Bedingungen ausschließlich Komplexe antiparalleler Orientierung ein. Basenfehlpaarungen im PNA- und im DNA-Teil haben ähnliche Erniedrigungen der Schmelztemperatur zur Folge, während eine Basenfehlpaarung am PNA-DNA-Linker zu einer etwas geringeren Absenkung des  $T_m$ -Werts führt,<sup>[34, 81]</sup> was auf eine geringe Destabilisierung des Duplex am Übergang zwischen DNA und PNA hindeutet. Chimären des Typs (II) scheinen am PNA-DNA-Übergang, der eine Amidbindung zwischen der PNA-Carboxygruppe und der 5'-Aminofunktion des Nucleotids aufweist, einer stärkeren strukturellen Störung zu unterliegen. Interessanterweise ist die Absenkung der  $T_m$ -Werte in Duplices mit RNA viel geringer als in denen mit DNA. Dies könnte damit erklärt werden, daß die Störung durch den Linker im Duplex mit RNA besser toleriert wird, weil der PNA · RNA-Duplex dem DNA · RNA-Duplex strukturell näher steht als der PNA · DNA-Duplex einem DNA · DNA-Duplex. Der Einbau einer PNA-Einheit am Chimärenende wirkt sich viel weniger störend auf die Duplexstruktur aus als der Einbau in der Mitte der Sequenz.<sup>[68, 88]</sup> Interessant sind in diesem Zusammenhang auch selbstkomplementäre DNA/PNA-Chimären, beispielsweise 5'-CGCGAAttcgcg vom Dickerson-Typ, die sehr stabile Duplices bilden, da jeder PNA-Einheit im Duplex eine DNA-Einheit gegenübersteht und somit offensichtlich eine relativ einheitliche Duplexstruktur vorliegt.<sup>[81]</sup>

Große Vorsicht ist bei der Interpretation von Untersuchungen mit PNA/DNA-Chimären geboten, die einen Homothymin-PNA-Teil enthalten, da diese Verbindungen sehr stark zur Bildung zumindest partiell tripelhelicaler Strukturen neigen. Finn et al. berichteten beispielsweise,<sup>[24]</sup> daß die Einführung einer Fehlpaarung in die PNA-Region der PNA/DNA-Chimäre Ac-tttctTGCCAT-3' zu einer drastischen Reduktion des  $T_m$ -Werts um 37.3 K führte, während eine Fehlpaarung in der DNA-Region nur eine Absenkung um 1.9 K bewirkte. Unserer Meinung nach kann dieser krasse Unterschied in der Destabilisierung nur durch das Auftreten einer partiell tripelhelicalen Struktur im PNA-Teil erklärt werden (Abb. 20); immerhin ist bekannt, daß ein (t)<sub>n</sub> · (dA)<sub>n</sub>-Duplex ein ausgezeichneter Acceptor für einen weiteren PNA-Strang unter Bildung einer (t)<sub>n</sub> · (dA)<sub>n</sub> · (t)<sub>n</sub>-Tripelhelix

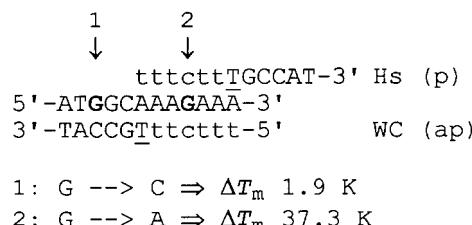


Abb. 20. Bildung partiell tripelhelicaler Strukturen. Großbuchstaben: DNA, Kleinbuchstaben: PNA; T: 5'-Amino-5'-desoxythymidin. Hs = Hoogsteen-Basenpaarung, WC = Watson-Crick-Basenpaarung.

ist. Während die Daten der (Homopyrimidin-PNA)/DNA-Chimären von Petersen et al.<sup>[77]</sup> vermutlich aus dem gleichen Grund nicht eindeutig zu interpretieren sind, zeigen die  $T_m$ -Daten der Uracil enthaltenden PNA/DNA-Chimären von Stetsenko et al.<sup>[21]</sup> eindeutig, daß der DNA-Teil tatsächlich an der Bindung an komplementäre DNA beteiligt ist.

Der Ersatz der Glycin-Einheit in den PNA-Bausteinen durch andere Aminosäuren wirkt sich, je nach Seitenkette, unterschiedlich auf die Duplexstabilität aus.<sup>[46, 47]</sup> In allen Fällen erwies sich die D-Konfiguration als die günstigere. Kleine, ungeladene Seitenketten, wie in D-Alanin und D-Serin, beeinflussen die Duplexstabilität nicht. Positiv geladene Seitenketten, wie in D-Lysin, stabilisieren mit etwa 1 K pro Einheit, während negativ geladene Seitenketten, wie in D-Glutaminsäure, destabilisierend wirken.

#### 4.3.2. Tripelhelixbildung

(Homopyrimidin-PNA)-Oligomere und PNA-Oligomere mit hohem Pyrimidin:Purin-Verhältnis binden an komplementäre DNA normalerweise unter Bildung ungewöhnlich stabiler (PNA)<sub>2</sub>·DNA-Tripelhelices.<sup>[6]</sup> Im Falle C-reicher PNAs und GC-reicher DNA-Duplices werden dagegen PNA·(DNA)<sub>2</sub>-Tripelhelices gebildet. Der  $T_m$ -Wert von H-(t)<sub>10</sub>·(dA)<sub>10</sub> beträgt 73 °C, während derjenige des entsprechenden (dT)<sub>10</sub>·(dA)<sub>10</sub>-Hybrids unter 23 °C liegt.<sup>[6]</sup> Allerdings ist darauf zu achten, daß es sich im Falle des PNA-Decamers um eine Tripelhelixstruktur handelt, während die DNA als Duplex vorliegt. Als Faustregel kann eine Erhöhung des  $T_m$ -Werts in ((t)<sub>n</sub>)<sub>2</sub>·(dA)<sub>n</sub>-Komplexen um etwa 10 K pro Basenpaar angenommen werden.<sup>[8]</sup> Die Schmelzkurven von (PNA)<sub>2</sub>·DNA-Tripelhelices weisen eine sehr starke Hysteresis von bis zu 30 K auf,<sup>[62, 83]</sup> was ein Hinweis darauf ist, daß die Tripelhelixbildung unter diesen Bedingungen recht langsam ist.<sup>[89]</sup> Basenfehlpaarungen führen zu einem Absinken der Schmelztemperatur um 14 bis 25 K.<sup>[7]</sup> Aus einer detaillierten Kinetikuntersuchung schlossen Demidov et al.,<sup>[90]</sup> daß sowohl Bindungseffizienz wie auch Sequenzspezifität kinetisch kontrolliert sind. Die Sequenzspezifität der Tripelhelixbildung beruht danach auf der Selektivität der Bildung des intermedialen PNA·DNA-Duplex, und die Anbindung des dritten Strangs trägt nur wenig zur Selektivität bei.

Sequenzen, die Cytosin enthalten, weisen wie erwartet eine pH-Abhängigkeit der Schmelztemperatur auf (Tabelle 3).<sup>[7]</sup> Die Tripelhelix ist bei pH 5 (C<sup>+</sup>GC) am stabilsten. Allerdings liefert die CGC-Basenkonstellation selbst bei pH 9, bei dem keine Protonierung von C mehr zu erwarten ist, einen Beitrag

Tabelle 3. pH-Abhängigkeit der Schmelztemperaturen von (PNA)<sub>2</sub>·DNA-Tripelhelices.

PNA <sup>[a]</sup>	DNA	$T_m$ [°C]		
		pH 5.0	pH 7.2	pH 9.0
H-ttt tct tt t	5'-d(AAA AGA AAAA A)	80	74	71
H-ttt tt ttt t	5'-d(AAA AAA AAAA A)	71	73	71

[a] Terminales Carboxamid.

zur Stabilität. Eine Erklärung hierfür könnte ein lokal erhöhter  $pK_a$ -Wert von Cytosin in der Tripelhelixstruktur sein, der zu teilweiser Protonierung führt (Abb. 21 oben), oder die Hoogsteen-Bindung über nur eine Wasserstoffbrücke. In „Bis(PNAs)“ (siehe unten) läßt sich diese pH-Abhängigkeit durch die Einführung von Pseudoisocytosin im Hoogsteen-Strang eliminieren (Abb. 21 unten),<sup>[62]</sup> wie dies auch schon für DNA-Tripelhelices beobachtet wurde.<sup>[91, 92]</sup>

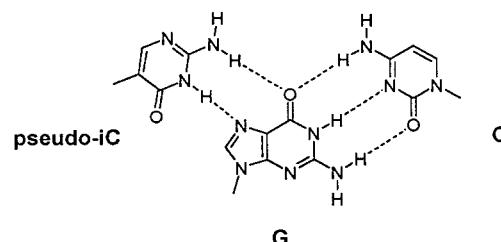
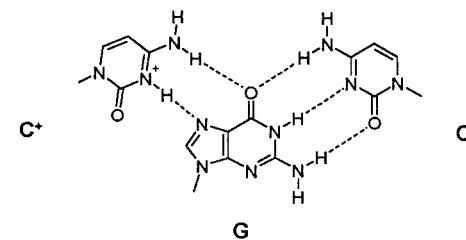


Abb. 21. Hoogsteen-Bindung mit protoniertem Cytosin (oben) und mit Pseudoisocytosin (unten).<sup>[62]</sup>

Wird nur eine PNA-Sequenz zur Bildung einer (PNA)<sub>2</sub>·DNA-Tripelhelix eingesetzt, so sind beide Stränge notwendigerweise entweder parallel oder antiparallel zur DNA. Während in der Literatur beide Anordnungen als etwa gleich stabil beschrieben sind,<sup>[62, 93]</sup> konnten wir für die Sequenz (pseudo-5')-tcttt-(pseudo-3') eine Bevorzugung der antiparallelen Orientierung ( $T_m$ : 30 °C) gegenüber der parallelen Orientierung ( $T_m$ : 22 °C) bei pH 5 beobachten. Der primär gebildete antiparallele Duplex ist sowohl kinetisch als auch thermodynamisch günstiger und bestimmt demnach die Orientierung der Stränge in der Tripelhelix. Beim Einsatz zweier PNA-Sequenzen werden im Falle der Homopyrimidin-PNAs die stabilsten Komplexe erzielt, wenn der Watson-Crick-PNA-Strang antiparallel zur DNA und der Hoogsteen-Strang parallel zum Purinstrang der DNA angeordnet ist.<sup>[62]</sup>

Während DNA-Tripelhelices auch nach den Basenmotiven A\*AT und G\*GT (\* bedeutet Hoogsteen-Basenpaarung) auftreten, wobei der Hoogsteen-Homopurinstrang antiparallel zum Watson-Crick-Homopurinstrang ist,<sup>[94]</sup> werden ana-

logen  $(PNA)_2 \cdot$  DNA-Tripelhelices mit Homopurin-PNA nicht gebildet.<sup>[95]</sup>

PNAs bilden auch mit RNA stabile Tripelhelices.<sup>[96–98]</sup> Die  $T_m$ -Werte scheinen denen von  $(PNA)_2 \cdot$  DNA-Tripelhelices ähnlich zu sein, doch sind die Hybride mit RNA weit weniger gut untersucht als die mit DNA: Ein decameres H-ttcctttt-Lys-NH<sub>2</sub> bindet an komplementäre RNA mit einem  $T_m$ -Wert von 69 °C.<sup>[98]</sup> Die Tripelhelixbildung wurde bislang meist indirekt durch biologische Experimente nachgewiesen: So wird die Translation von CAT-mRNA mit der eben erwähnten tripelhelixbildenden PNA erfolgreich unterbunden, während ein duplexbildendes PNA-Molekül trotz eines höheren  $T_m$ -Werts nicht inhibierend wirkt.<sup>[98]</sup>

In den „Bis(PNAs)“ werden der zur DNA antiparallele Watson-Crick- und der zu ihr parallele Hoogsteen-Strang mit einem Linker zu einem einzigen Molekül verknüpft (Abb. 22).<sup>[62, 64, 83]</sup> Dies führt zu einem leichten Anstieg der

einem positiv geladenen Lysin-Aminohexyl-Linker erheblich besser binden als solche mit dem neutralen ( $\text{eg-1}$ )-Linker (siehe oben),<sup>[83]</sup> was sich auf die elektrostatische Wechselwirkung mit der negativ geladenen DNA zurückführen lässt. Ein weiteres Beispiel für eine Bis(PNA) ist die PNA/DNA-Chimäre (*pseudo-5'*)-ctcttcTTTTtcttc(pseudo-3'), die so konzipiert ist (Abb. 22b), daß der aminoterminale PNA-Teil über Watson-Crick-Basenpaarung an das komplementäre Hexamer 3'-GAGAAG-5' bindet und der DNA-Teil als Schleife zur Rückfaltung dient, um die Bindung des carboxyterminalen PNA-Teils über Hoogsteen-Basenpaarung zu ermöglichen.<sup>[81]</sup> Die im sauren Milieu resultierende Tripelhelix schmilzt bei 65 °C, während das DNA-Analogon bereits bei 27 °C schmilzt.

Alternierende PNA/PHONA-Chimären ähneln in ihrem Bindungsverhalten den PNAs. Ein solches alternierendes Thymin-12mer bindet an d(A)<sub>12</sub> unter Bildung einer Tripelhelix mit einem Schmelzpunkt von 62,6 °C.<sup>[39b]</sup> Damit liegt der Schmelzpunkt etwas niedriger als derjenige von  $(PNA)_2 \cdot$  DNA-Tripelhelices, was sich auf die Abstoßung der Ladungen von Phosphat- und Phosphonatgruppen zurückführen lässt, aber immer noch viel höher als derjenige entsprechender DNA-Tripelhelices. Über die Bindungseigenschaften der reinen PHONAs ist noch recht wenig bekannt.<sup>[39a]</sup> Obwohl ein (PHONA-(t)<sub>10</sub>)/(dA)<sub>10</sub>-Komplex einen ähnlichen  $T_m$ -Wert wie der entsprechende (T)<sub>10</sub>·(dA)<sub>10</sub>-Duplex zeigt, liegt vermutlich auch in ihm eine tripelhelicale Struktur vor.

Wird in die PNA-Struktur eine Monomereinheit mit um eine Methyleneinheit verlängerter Kette oder mit verlängertem Linker zur Base (Abb. 23) eingebaut, bleibt zwar die

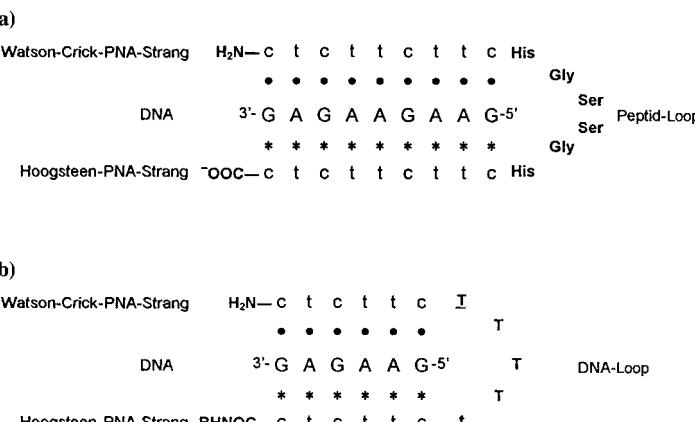


Abb. 22. a) Peptid-<sup>[64]</sup> und b) DNA-verbrückte<sup>[81]</sup> Bis(PNAs). Watson-Crick-Basenpaarung: ●: Hoogsteen-Basenpaarung; \*; t: Hydroxyethylglycin-Übergangsbaustein; T: 5'-Amino-5'-desoxythymidin-Übergangsbaustein.

Schmelztemperatur, der vermutlich auf einem etwas geringeren Entropieverlust bei der Tripelhelixbildung beruht: Wird als Linkermolekül 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure ( $\text{eg-1}$ ) eingesetzt, so liegt der  $T_m$ -Wert des Hybrids aus H-tctttt-( $\text{eg-1}$ )<sub>3</sub>-tttctt-Lys-NH<sub>2</sub> und 5'-d(CGCAGAGAAACGC) bei 49 °C, während die entsprechende Tripelhelix aus H-ttccttt-Lys-NH<sub>2</sub> und H-ttctct-Lys-NH<sub>2</sub> bei 45 °C schmilzt. Die bei  $(PNA)_2 \cdot$  DNA-Tripelhelices stets auftretende Hysterese wird weitgehend, bis auf 2–3 K, unterdrückt. Die hohe lokale Konzentration des dritten Strangs führt vermutlich zu der sehr viel schnelleren Tripelhelixbildung.<sup>[62]</sup> Die Sequenzdiskriminierung ist bei den Bis(PNAs) extrem hoch: Basenfehlpaarungen bewirken einen Abfall der Schmelztemperatur von teilweise über 30 K, was von Egholm et al.<sup>[62]</sup> als Hinweis auf einen zweifachen Erkennungsprozeß (durch beide PNA-Stränge) gewertet wird. Mit Pseudoisocytosin statt Cytosin im Hoogsteen-Strang ist die Tripelhelixbildung nicht mehr pH-abhängig, während der gleiche Ersatz im Watson-Crick-Strang auf die pH-Abhängigkeit keinen Einfluß hat,<sup>[62]</sup> was die Bindung nach dem angenommenen Schema (Abb. 21) bestätigt. Variation des Linkermoleküls ergab, daß Bis(PNAs) mit

	<i>n</i>	<i>m</i>	<i>q</i>	Rückgrat / Linker	Bezeichnung
	1	2	1	<i>N</i> -(2-Aminoethyl)-β-alanin	β-PNA
	2	1	1	<i>N</i> -(3-Aminopropyl)glycin	apg-PNA
	1	1	2	Propansäure	pa-PNA

Abb. 23. PNA-Einheiten mit verlängertem Rückgrat oder verlängertem Abstand der Nucleobase zum Rückgrat, die in Untersuchungen zur Duplex- und Tripelhelixbildung eingesetzt wurden.

grundständliche Fähigkeit zur Tripelhelixbildung erhalten, doch nimmt die Stabilität der Tripelhelix erheblich ab.<sup>[41, 42]</sup> Die Absenkung der Schmelztemperatur beträgt etwa 13–18 K. Dennoch scheinen die Nucleobasen dieser Einheiten zur Bindung beizutragen, wie sich aus der Sequenzspezifität ablesen lässt: Basenfehlpaarungen schlagen mit 6–21 K zu Buche. Der Einbau von *pa*-PNA-Einheiten (Abb. 23) reduziert die Tripelhelixstabilität noch am wenigsten: Homo-Oligomere aus *pa*-PNA-Monomeren binden an komplementäre DNA, wenn auch mit sehr niedrigem  $T_m$ -Wert; Homo-Oligomere aus  $\beta$ -PNA- und *apg*-PNA-Monomeren dagegen binden nicht an komplementäre DNA. Dies ist verständlich, da nur *pa*-PNA-Bausteine den Nucleobasenabstand unverändert lassen ( $n = m = 1$  wie bei Aeg), während beim Einbau mehrerer  $\beta$ -PNA- oder *apg*-PNA-Bausteine der Nucleobasenabstand relativ zu dem in den natürlichen Nucleinsäuren „außer Phase“ gerät.

Ein  $(t)_{10}$ -Homo-Oligomer der auf der Aminosäure Ornithin basierenden Modifikation *orn*-PNA bindet nicht an komplementäre DNA, dafür aber an das Oligoribonucleotid  $r(A)_{10}$  unter Bildung einer Tripelhelix,  $(orn\text{-PNA})_2 \cdot \text{RNA}$ , die immerhin einen  $T_m$ -Wert von 21 °C aufweist.<sup>[48]</sup> Auch die Verlängerung des Linkers zur Nucleobase (*pa*-PNA) wirkt sich negativ auf die Stabilität von  $(\text{PNA})_2 \cdot \text{DNA}$ -Tripelhelices (und  $\text{PNA} \cdot \text{DNA}$ -Duplices) aus: Die Schmelztemperatur sinkt um ca. 17 K.<sup>[43]</sup> Der Ersatz einer *tt*-Einheit durch das in Abbildung 11 (Struktur **G**) gezeigte Heterodimer ändert dagegen nur wenig an den Tripelhelix-Bildungseigenschaften von PNAs.<sup>[45]</sup>

#### 4.3.3. Strangverdrängung

Die Tendenz zur Bildung von  $(\text{PNA})_2 \cdot \text{DNA}$ -Tripelhelices ist so groß, daß Homopyrimidin-PNAs unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, aus einer doppelsträngigen DNA (ds-DNA) einen Strang unter Bildung einer solchen Tripelhelix zu binden, während der zweite DNA-Strang zunächst einzelsträngig in einer Schleifenstruktur (*P*-Loop<sup>[90]</sup>) verbleibt.<sup>[6, 15, 90, 99–101]</sup> Diese Schleifenstruktur gleicht der bei der RecA-Protein-vermittelten Rekombination auftretenden *D*-Loop-Struktur (displacement loop). Voraussetzung für eine solche Strangverdrängung durch PNA ist eine nicht allzu hohe Stabilität des DNA-Duplex in dieser Region, wie sie vor allem in AT-reichen Regionen und, dies ist besonders wichtig, bei niedrigen Salzkonzentrationen (<50 mM NaCl) gegeben ist.<sup>[15, 101]</sup>

Schon in ihrer Originalarbeit zu PNAs setzten Nielsen et al.<sup>[6]</sup> mehrere Techniken zum Nachweis der Strangverdrängung ein, die mit  $H\text{-}(t)_{10}\text{-Lys-NH}_2$  an einem DNA-Fragment durchgeführt wurde, das eine  $(\text{dA})_{10} \cdot (\text{T})_{10}$ -Zielsequenz enthielt: Photo-Footprinting mit einem Acridinderivat zeigte einen deutlichen Schutz von  $(\text{dA})_{10}$ , während  $(\text{T})_{10}$  nicht geschützt war. Zudem ergab die Inkubation mit Staphylokokken-Nuclease eine verstärkte Spaltung von  $(\text{T})_{10}$ , während der Abbau von  $(\text{dA})_{10}$  unbeeinflußt blieb. Die  $(\text{T})_{10}$ -*P*-Loop-Struktur ließ sich auch mit den Einzelstrang-spezifischen Reagenzien  $\text{KMnO}_4$  und Nuclease S1 spalten. In einem anderen Experiment wurde der verdrängte Einzelstrang sogar von RNA-Polymerase erkannt, so daß der Komplex aus PNA und ds-DNA als effizienter Transkriptionspromotor für RNA-Polymerasen dienen kann.<sup>[102]</sup> Hinweise auf die Bildung einer Tripelhelix lieferte die Behandlung des Komplexes mit Dimethylsulfat (PNA:  $H\text{-ttctcttt-Lys-NH}_2$ ; ds-DNA: 5'-AAGAAGAAAA · 3'-TTCTCTTTT), bei der die N7-Atome der Guaninreste nicht methyliert wurden, da sie über Hoogsteen-Basenpaarung an einen weiteren PNA-Strang gebunden waren.<sup>[99]</sup> Auch die pH-Abhängigkeit der Strangverdrängung (SD) ( $SD_{\text{pH}5.5} > SD_{\text{pH}6.5} > SD_{\text{pH}7.5}$ ) ist ein guter Hinweis auf eine Tripelhelixbildung,<sup>[99]</sup> ebenso wie der Nachweis der Bindung von zwei Streptavidin-Molekülen pro Komplex bei Verwendung biotinylierter PNAs.<sup>[103]</sup> Dieses letzte Experiment wurde unter dem Elektronenmikroskop durchgeführt, mit dem sich die Strangverdrängung direkt visualisieren läßt.<sup>[103]</sup> Die Strangverdrängung verläuft, wie die Tripelhelixbildung, weitgehend unabhängig von der Anordnung (parallel oder antiparallel) des Pyrimidin-PNA-Strangs

zum Purinstrang der komplementären DNA.<sup>[93]</sup> Ein besonders interessanter Aspekt der Strangverdrängung ist die Abhängigkeit von der Salzkonzentration. In einer ausführlichen Kinetikstudie konnten Wittung et al.<sup>[100]</sup> zeigen, daß die Aktivierungsenergie für die Strangverdrängung mit steigender Salzkonzentration erheblich zunimmt (Tabelle 4). Es

Tabelle 4. Aktivierungsenergien  $E_a$  für die Anbindung von PNA an Poly(dA) · Poly(dT) unter Strangverdrängung.<sup>[100]</sup>

PNA <sup>[a]</sup>	c(NaCl) [mM]	$E_a$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]
$t_{10}$	50	$58.4 \pm 3$
$t_{10}$	150	$68.8 \pm 4$
$t_{5}\text{ct}_4$	50	$79 \pm 4$

[a] Carboxyterminales Lysinamid.

handelt sich dabei eindeutig um einen kinetischen, nicht um einen thermodynamischen Effekt: Während schon bei Konzentrationen von 80 bis 100 mM die Strangverdrängung nicht mehr stattfindet,<sup>[101]</sup> läßt sich der PNA-Komplex problemlos bei niedrigeren Salzkonzentrationen vorbilden und widersteht dann auch höheren Salzkonzentrationen bis zu 500 mM.<sup>[15]</sup>

Die Strangverdrängung verläuft mit hoher Sequenzspezifität: Die Aktivierungsenergie steigt in dem in Tabelle 4 gezeigten Beispiel für ein 10mer um 20 kJ mol<sup>-1</sup> an, wenn eine Basenfehlpaarung vorliegt,<sup>[100]</sup> und bei zwei Fehlpaarungen wird bei 20 °C keine Strangverdrängung mehr beobachtet. Zum gleichen Ergebnis kommen Nielsen et al.<sup>[101]</sup> in einer Arbeit zur Inhibition der Spaltung von doppelsträngiger DNA durch Restriktionsenzyme. Während das komplementäre PNA-Oligomer die Spaltung inhibiert, wird bei einer Basenfehlpaarung eine reduzierte, bei zwei Fehlpaarungen keine Inhibition mehr erzielt, und das, obwohl der  $T_m$ -Wert bei einer Basenfehlpaarung lediglich von 73 auf 59 °C reduziert wurde, für den bei 37 °C durchgeführten Assay also immer noch ausreichen sollte. Dies läßt sich wiederum mit der geringen Geschwindigkeit erklären, mit der die Strangverdrängung im Falle einer Fehlpaarung abläuft (60- bis 100mal langsamer).<sup>[90, 100]</sup> Die Sequenzspezifität kann hier als kinetisch kontrolliert bezeichnet werden.

Während die Strangverdrängung normalerweise sehr schnell verläuft (50 % in 4 min), ist die Dissoziation der PNAs aus solchen Komplexen sehr langsam (etwa 50 % nach 5–20 h, wie Peffer et al. in einem Transkriptions-Assay nachwiesen<sup>[93]</sup>). Detaillierte Kinetikuntersuchungen wurden von Demidov et al.<sup>[90]</sup> mit Gelshift- und Nuclease-S1-Assays und von Wittung et al.<sup>[100]</sup> über CD-Spektroskopie, die eine Verfolgung der Strangverdrängung in Echtzeit erlaubt, durchgeführt. Auffällig ist dabei, daß die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der PNA-Konzentration etwa zweiter bis dritter Ordnung ist, was den Schluß zuläßt, daß zwei oder mehr PNA-Moleküle am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beteiligt sind. Die Aktivierungsenergie der Reaktion liegt im Bereich derjenigen, die zur Öffnung einiger Basenpaare von doppelsträngiger DNA benötigt wird. Auch die Abhängigkeit von der Salzkonzentration spricht dafür, daß geöffnet vorliegende Basenpaare ein essentieller Teil des „aktivierten Zustands“ sind. Bei hohen PNA-Konzentrationen läßt sich

darüber hinaus zu Beginn der Reaktion ein Intermediat beobachten, das möglicherweise einem lokal mit PNA überladenen Komplex entspricht. Auf dieser Basis wurden mehrere Reaktionswege und Zwischenstufen für die Strangverdrängung vorgeschlagen, doch können bisher nicht alle experimentellen Befunde schlüssig erklärt werden.<sup>[100]</sup> Eine Möglichkeit ist die reversible Strangverdrängung unter Bildung einer PNA · DNA-Doppelhelix vom Watson-Crick-Typ, gefolgt von der sehr schnellen (irreversiblen) Tripelhelixbildung zu einem stabilen Produkt<sup>[90, 100]</sup> (siehe Abschnitt 5.3.2 und Abb. 26).

#### 4.3.4. Bindung von PNA an PNA

PNAs bilden mit komplementären PNA-Sequenzen ausgesprochen stabile Duplices.<sup>[104]</sup> So schmilzt der Duplex aus dem PNA-Decamer H-gtagatca-L-Lys-NH<sub>2</sub> und der komplementären antiparallelen Sequenz H-agtgatctac-L-Lys-NH<sub>2</sub> bei 67 °C, während der entsprechende antiparallele DNA · PNA-Duplex bei 51 °C und der DNA · DNA-Duplex bei 33,5 °C schmilzt. Die antiparallele Orientierung ist bevorzugt: Der entsprechende parallel angeordnete Duplex schmilzt bei 45,5 °C, und damit 20 K tiefer, jedoch bei immer noch deutlich höherer Temperatur als der entsprechende DNA · DNA-Duplex. Die Geschwindigkeit der PNA · PNA-Duplexbildung wurde von Wittung et al.<sup>[104]</sup> mittels CD-Spektroskopie untersucht. Carboxyterminales L- und D-Lysinamid induzieren Helices entgegengesetzter Chiralität, wobei das Spektrum des L-Lysinamidderivats dem der DNA · DNA-Doppelhelix ähnelt. Ohne Aminosäure wird kein CD-Spektrum erhalten, vermutlich weil ein Racemat aus den Duplices mit entgegengesetzter Helicität entsteht. Die Duplexbildung erfolgt in Sekunden, doch schließt sich daran ein Reorganisationsprozeß an, der der Inversion des Duplex in die bevorzugte chirale Form zugeschrieben wird. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurde ferner die Existenz einer PNA · PNA · PNA-Tripelhelixstruktur wahrscheinlich gemacht.<sup>[54]</sup>

Erwähnt sei an dieser Stelle, daß es auch andere selbstpaarende PNA-Derivate gibt, die nicht auf dem Aminoethyl-glycin-Rückgrat beruhen, beispielsweise die alternierenden Alanyl/Homoalanyl-Oligomere.<sup>[105, 106]</sup> Es ist klar, daß der Nucleobasenabstand in diesen artifiziellen Polyamidnucleinsäuren von dem in natürlichen Nucleinsäuren verschieden ist.

### 4.4. Struktur von PNA/DNA- und PNA/RNA-Komplexen

#### 4.4.1. Struktur von PNA · DNA-Duplices

Recht detaillierte Strukturaussagen stammen aus der NMR-spektroskopischen Untersuchung zweier antiparalleler PNA · DNA-Duplices (8mer und 10mer).<sup>[107]</sup> Danach liegt der DNA-Strang in einer der B-Form ähnlichen Konformation vor, mit glykosidischer anti-Konformation und der Desoxyribose in C2'-endo-Form. Die Signale der Imino-Protonen der PNA-Nucleobasen sind gegenüber denen der DNA-Nucleobasen zu etwas höherem Feld verschoben, und die NOESY-Kreuzpeaks lassen auf eine Watson-Crick-Basenpaarung schließen.

Eine neuere NMR-spektroskopische Untersuchung<sup>[108]</sup> ergab dagegen, daß ein oktamerer antiparalleler PNA · DNA-

Duplex Elemente der A-Form- (laterale Position der Basenpaare) und der B-Form-DNA (Krümmung des Rückgrats, Inklination der Basenpaare, helicale Steigung) enthielt. In der rechtsgängigen Helix lagen etwa 13 Basenpaare pro Windung gegenüber 10 Basenpaaren bei der B-Form-DNA vor, die große Furche war aufgeweitet, die kleine Furche entsprechend flach und eng, und die Stapelung der Basenpaare variierte erheblich innerhalb der Sequenz. Die primären Amidbindungen des PNA-Rückgrats lagen durchweg in der trans-Konformation vor, und die Carbonyl-Sauerstoffatome der Rückgrat-Nucleobasen-Linkermoleküle zeigten in Richtung Carboxyterminus des PNA-Strangs, während die Amid-Carbonylgruppen des Rückgrats bis auf wenige Ausnahmen in die Lösung gerichtet waren. Wie bei PNA · RNA-Duplices (siehe Abschnitt 4.4.2) gab es keinen Hinweis auf Wasserstoffbrücken zwischen Amid- und Carbonylgruppen im Rückgrat.

Die CD-Spektren antiparalleler PNA · DNA-Duplices ähneln denen der DNA · DNA-Duplices und deuten auf die Bildung einer rechtsgängigen Helix hin.<sup>[10, 107]</sup> Die CD-Spektren paralleler PNA · DNA-Duplices deuten dagegen darauf hin, daß diese sich deutlich von der B- und der A-Form unterscheiden.<sup>[10]</sup> Es konnten auch bereits Kristalle eines 10mer-PNA · DNA-Duplex erhalten werden,<sup>[109]</sup> doch liegen, wegen zu geringer Auflösung, noch keine Ergebnisse aus der Röntgenstrukturanalyse vor. Die reduzierte Affinität von PNA · DNA-Duplices zu Bindungsliganden für die kleine Furche und die fehlende Bindung von Intercalatoren<sup>[110]</sup> lassen, wegen der gleichzeitig „fehlenden“ Ladungen, nur wenig Rückschlüsse auf strukturelle Änderungen zu.

#### 4.4.2. Struktur von PNA · RNA-Duplices

Auch für PNA · RNA-Duplices existieren detaillierte <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Studien,<sup>[111]</sup> wobei der PNA-Strang im Rückgrat zu >98 % <sup>13</sup>C und <sup>15</sup>N enthielt, um die Signalzuordnung zu erleichtern. Sie ergaben, daß alle Basen eine Watson-Crick-Basenpaarung eingehen, die glykosidischen Bindungen im RNA-Strang in der anti-Konformation und die Ribosen in der C2'-endo-Form vorliegen. Insgesamt ähnelt die Struktur des RNA-Strangs der A-Form. Die tertiären Amidbindungen haben alle cis-Konformation, und die sekundären Amid-Protonen des Rückgrats bilden keinerlei Wasserstoffbrücken aus, was im Widerspruch zu Molecular-Modeling-Vorhersagen<sup>[112, 113]</sup> steht. Die Existenz solcher Wasserstoffbrücken wurde, ebenfalls NMR-spektroskopisch, auch für einzelsträngige PNAs ausgeschlossen.<sup>[114]</sup> In der ermittelten Struktur ist die Carbonylgruppe des tertiären Amids im PNA-Rückgrat isoster zur C2'-Hydroxygruppe, was den Solvenskontakt der Carbonyl-Sauerstoffatome erhöht.

In Einklang mit dieser Struktur sind auch die CD-Spektren antiparalleler PNA · RNA-Duplices, aus denen auf die Bildung einer rechtsgängigen Helix mit einer Geometrie ähnlich der A- oder B-Form geschlossen werden kann.<sup>[10]</sup>

#### 4.4.3. Struktur von (PNA)<sub>2</sub> · DNA-Tripelhelices

Die 1995 von Betts et al.<sup>[64]</sup> publizierte Röntgenstrukturanalyse eines Komplexes aus einer Bis(PNA) und komple-

mentärer antiparalleler DNA (siehe Abb. 22a) lieferte wichtige Informationen über die Struktur von  $(\text{PNA})_2\text{-DNA}$ -Tripelhelices. Die Nucleobasen der PNA-Stränge binden die DNA über Watson-Crick- und Hoogsteen-Basenpaarung. Die Struktur unterscheidet sich jedoch von der A- wie auch von der B-Form der DNA; es liegt eine „P-Helix“ mit 16 Basen pro Windung vor. Die DNA-Phosphatreste bilden Wasserstoffbrücken mit den Amid-Protonen des PNA-Rückgrats des Hoogsteen-Strangs. Diese Wasserstoffbrücken, zusätzliche van-der-Waals-Kontakte und die fehlende elektrostatische Abstoßung sind hauptverantwortlich für die enorme Stabilität der Tripelhelix. Die Helix ist stark aufgeweitet: Der mittlere Basenversatz beträgt 6.8 Å, während es bei der A-Form-DNA 4.5 Å sind. Die Desoxyribose des DNA-Strangs liegt, wie in der A-Form-DNA, in der C3-*endo*-Konformation vor. Die Basen stehen jedoch, ähnlich wie in der B-Form, nahezu senkrecht zur Helixachse. In der kleinen Furche stabilisieren Wasserstoffbrücken zum Solvens die Watson-Crick-PNA-DNA-Wechselwirkung.

Die Struktur im Kristall ist in Einklang mit den in Lösung gemessenen CD-Spektren von  $(\text{PNA})_2\text{-DNA}$ -Tripelhelices.<sup>[115]</sup> Diese deuten auf das Vorhandensein einer rechts-gängigen Helix und einer Geometrie ähnlich derjenigen der reinen DNA-Tripelhelix hin.

Interessant sind auch erste Hinweise zur P-Loop-Struktur (siehe Abschnitt 4.3.3), die nach Strangverdrängung aus doppelsträngiger DNA durch Bis(PNA) unter Bildung einer  $(\text{PNA})_2\text{-DNA}$ -Tripelhelix entsteht.<sup>[116]</sup> Wird eine DNA-spalrende Gruppe am 5'- oder 3'-Ende der Bis(PNA) angebracht (Gly-Gly-His,  $\text{Ni}^{2+}$ -Spaltung), so wird, neben dem hybridisierten DNA-Strang, auch der P-Loop an spezifischen Stellen gespalten, was für eine enge räumliche Nähe zur Tripelhelix, möglicherweise sogar für ein viersträngiges Bis(PNA)-DNA<sub>2</sub>-Bündel spricht.

#### 4.4.4. Struktur von PNA · PNA-Duplex

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit berichteten Rasmussen et al.<sup>[65]</sup> über die Röntgenstrukturanalyse eines selbst-komplementären PNA · PNA-Duplex (H-cgtacg-NH<sub>2</sub>). Hier liegen im Kristall sowohl rechts- als auch linksgängige Helices vor, die alternierend koaxial aufeinander stehen und so eine kontinuierliche Pseudohelix bilden. Es liegt die erwartete Watson-Crick-Basenpaarung vor, wobei die Basen nahezu senkrecht zur Helixachse stehen; der Propeller-Twist beträgt nur etwa 5–9°. Die Basenpaare sind um 8.3 Å relativ zur Helixachse versetzt, was eine weite Helix (28 Å) mit 18 Basen pro Windung (vgl. 11 bzw. 10 Basen pro Windung in A- bzw. B-Form-DNA) zur Folge hat. Da die beiden Stränge recht dicht beieinander liegen, weist die Helix eine sehr weite und tiefe große Furche und eine enge, flache kleine Furche auf. Die Amidgruppen des Rückgrats liegen in *trans*-Konformation vor, und die Carbonylgruppe des Linkers weist in Richtung des Carboxyterminus. Insgesamt ähnelt die Struktur recht stark der oben beschriebenen P-Form des  $(\text{PNA})_2\text{-DNA}$ -Duplex.<sup>[64]</sup>

## 5. Biologische Eigenschaften von PNAs und Chimären

### 5.1. Stabilität in biologischen Systemen

Für eine therapeutische Nutzung als Antisense- und Anti-Genwirkstoffe müssen die PNAs eine ausreichende biologische Stabilität in Serum und Zellen aufweisen. Unmodifizierte Oligonukleotide werden in Serum relativ rasch durch Nuklease abgebaut;<sup>[1]</sup> analog konnte man vermuten, daß PNAs wegen ihrer peptidähnlichen Struktur durch Peptidasen und Proteasen abgebaut würden. Es zeigte sich jedoch, daß PNAs sowohl in Humanserum als auch in Zellextrakten außergewöhnlich stabil sind.<sup>[117]</sup> So kann nach zweistündiger Inkubation des Homo-Oligomers H-(t)<sub>10</sub>-Lys-NH<sub>2</sub> in Humanserum oder mit Extrakten cytoplasmatischer oder nuklearer Fraktionen aus Maus-Tumorzellen HPLC-analytisch kein merklicher Abbau detektiert werden. Gegenüber Proteinase K und Peptidase aus Schweinemucosa ist das PNA-Homo-Oligomer ebenfalls stabil, während das Kontrollpeptid ACTH(4-10) unter den gleichen Bedingungen schnell abgebaut wird.<sup>[117]</sup>

Abbildung 24 zeigt die Stabilität des PNA-Oligomers H-(t)<sub>8</sub>-Lys-NH<sub>2</sub> im Vergleich zum unmodifizierten Oligonukleotid (T)<sub>8</sub> bei der Inkubation in frischem Meerschweinchenserum.

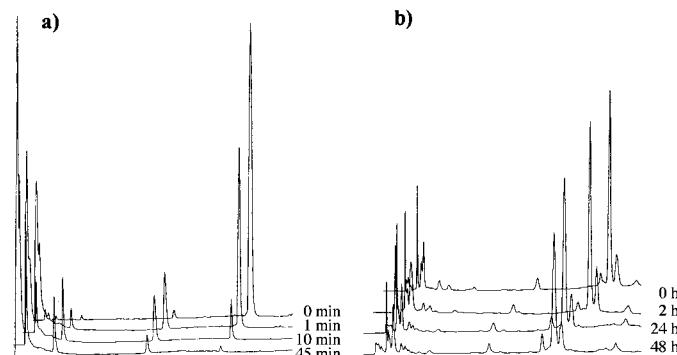


Abb. 24. Vergleich der Stabilitäten unmodifizierter DNA und PNA in frischem Meerschweinchenserum. a) Ionenaustrauscher-HPLC nach Inkubation von (T)<sub>8</sub>; b) Umkehrphasen-HPLC nach Inkubation von H-(t)<sub>8</sub>-Lys-NH<sub>2</sub>.

rum. Während die Halbwertszeit des natürlichen Oligonukleotids sehr kurz ist (nur wenige Minuten), sind nach zwei Tagen immer noch etwa 50% intakte PNA durch HPLC nachweisbar. Während beim Oligonukleotid zudem deutlich Abbauzwischenprodukte auftreten, sind solche im Falle des PNA-Oligomers nicht detektierbar. Es ist daher wahrscheinlich, daß das Verschwinden der PNA aus dem Meerschweinchenserum nicht Folge eines Abbaus ist, sondern daß sich die PNA durch langsame Assoziation mit Komponenten des Serums der Detektion entzieht.

PNA/DNA-Chimären, in denen der PNA-Teil an das 3'-Ende des Oligonukleotids gebunden ist,<sup>[81]</sup> sind in fötalem Kälberserum etwa 50mal stabiler als die entsprechenden unmodifizierten Oligonukleotide. Auch PNA/DNA-Chimären mit nur jeweils einer PNA-Einheit an den 5'- und 3'-Enden sind in Humanserum bereits 25mal stabiler als die

korrespondierenden unmodifizierten Oligonukleotide.<sup>[68]</sup> Dies kann damit erklärt werden, daß die Hauptnukleaseaktivität in Serum eine 3'-Exonuklease ist. Oligonukleotide werden zudem durch Endonukleasen langsam abgebaut, die bevorzugt Pyrimidin-Nukleotide angreifen;<sup>[118, 119]</sup> dagegen kann der Oligonukleotidteil der Chimären durch Modifikationen wie Phosphorothioat-Internukleotidbindungen weitgehend stabilisiert werden.

## 5.2. Aufnahme von PNAs und Chimären in Zellen

Die Aufnahme von PNAs in Zellen ist äußerst gering.<sup>[11, 13, 120]</sup> Daher ist es nicht weiter verwunderlich, daß bislang keine Antisense-Wirkungen reiner PNAs in Zellkultur ohne Zuhilfenahme von Techniken, die die Membranbarriere umgehen, beschrieben sind. Zum Studium der Antisense- und Anti-Genaktivitäten können PNAs durch Mikroinjektion intrazellulär appliziert werden.<sup>[96, 97, 121]</sup> Alternativ ermöglicht eine Permeabilisierung der Zellen mit Lysolecithin<sup>[122]</sup> oder Detergentien wie Tween 20<sup>[123]</sup> den Eintritt der PNAs in die Zellen. Im Falle transienter Transfektionsassays kann PNA auch als Plasmid/PNA-Komplex mit Hilfe von LipofectAmine in Abwesenheit von Serum transfiziert werden.<sup>[124]</sup> Durch kovalente Verknüpfung von PNAs mit Peptiden, die selektiv an Zelloberflächenrezeptoren binden, kann die Aufnahme für bestimmte Zelltypen gezielt erhöht werden.<sup>[125]</sup>

Im Widerspruch zu diesen und unseren eigenen Studien stehen zwei Arbeiten, die die Aufnahme von PNAs in Rattenembryo-Fibroblasten<sup>[121]</sup> und Human-Myoblasten<sup>[126]</sup> beschreiben. Allerdings wurden die PNAs in diesen Studien in hoher Konzentration (20 µM) eingesetzt. Dabei wurde eine punktförmige intrazelluläre Verteilung beobachtet, die eine Lokalisierung der PNAs in Vesikeln nahelegt. Jedoch wurde in keiner der beiden Arbeiten eine biologische Wirksamkeit der PNAs durch Inkubation mit diesen Zellen nachgewiesen.

Anders verhält es sich mit PNA/DNA-Chimären, die bereits bei niedriger extrazellulärer Konzentration (1 µM) von Verozellen oder NIH3T3-Zellen in ähnlichem Ausmaß und zeitlichem Verlauf wie Oligonukleotide gleicher Sequenz aufgenommen werden.<sup>[81]</sup> Auch die intrazelluläre Verteilung fluoreszenzmarkierter PNA/DNA-Chimären gleicht derjenigen reiner Oligonukleotide. Reine PNAs, wie H-(t)<sub>8</sub>-Lys-NH<sub>2</sub>, konnten in unseren Versuchen mit Verozellen nur bei hohen Konzentrationen (>50 µM), bei denen Zelltoxizität zu beobachten war, in den Zellen nachgewiesen werden.

## 5.3. Inhibierung der Genexpression

### 5.3.1. Inhibierung der Translation

Die sequenzspezifische Inhibierung der Replikation, Transkription und Translation durch PNAs ist potentiell therapeutisch nutzbar (Abb. 25). Während mittlerweile zahlreiche Publikationen zur Inhibierung der Translation durch Antisense-Oligonukleotide erschienen sind, gibt es erstaunlich wenige Studien mit PNA-Oligomeren als Antisense-Agenten, die zudem meist in zellfreien Systemen durchgeführt

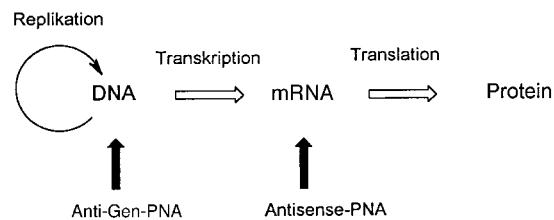


Abb. 25. Anwendungsmöglichkeiten für PNAs als Therapeutika: Hemmung der Replikation und Transkription von DNA durch Anti-Gen-PNA und Inhibition der Translation von mRNA durch Antisense-PNA.

wurden. So kann die In-vitro-Translation einer SV40-T-Antigen-mRNA, die die komplementäre Sequenz zu H-(t)<sub>3</sub>ac(t)<sub>2</sub>c(t)<sub>2</sub> enthält, in sequenzspezifischer Weise bei einer Konzentration von 1 bis 2 µM gehemmt werden.<sup>[97]</sup> Die Inhibition erfolgt dabei sehr wahrscheinlich durch eine sterische Blockade und nicht durch einen RNase H-vermittelten mRNA-Abbau (siehe Abschnitt 5.6.1), was auch der Nachweis eines entsprechend verkürzten Proteins nahelegt. Nach Mikroinjektion des PNA-Oligomers in die Zellen ist bei einer intrazellulären PNA-Konzentration von 1 µM eine spezifische Reduktion der SV40-T-Antigen-Expression zu beobachten, ohne daß die β-gal-Expression (Kontrolle) beeinflußt wird. Das therapeutische Fenster ist allerdings sehr eng, da schon ab einer PNA-Konzentration von 5 µM eine unspezifische β-gal-Expressionshemmung konstatiert wird und bereits bei einer PNA-Konzentration von <0.5 µM keine Translationshemmung mehr nachweisbar ist.<sup>[96]</sup> Interessanterweise ist die Antisense-Wirkung der PNAs nach Mikroinjektion geringer als die der sequenzanalogen Propinylpyrimidin-Phosphorothioate. Als Ursachen kommen die langsamere Assoziation der PNAs mit der komplementären RNA und die Unfähigkeit der PNAs, die RNase H zu stimulieren (siehe Abschnitt 5.6.1), in Betracht. Ein Vorteil der PNAs ist, daß ihre Antisense-Wirkung in diesen Experimenten anders als die anderer sterischer Blocker, wie der 2'-O-Alkyloligonucleotide, nicht auf die 5'-nichttranslatorsche Region begrenzt ist.<sup>[96]</sup> Es ist allerdings zu betonen, daß in diesen Studien Homopyrimidin-PNAs wie H-(t)<sub>5</sub>(ct)<sub>5</sub> verwendet wurden, die unserer Erfahrung nach auch im neutralen Medium zur Bildung partiell tripelhelicaler Strukturen neigen.

Die In-vitro-Translationshemmung gelingt aber auch mit PNAs, die alle vier Basen enthalten, schon bei Konzentrationen ab 100 nM.<sup>[127]</sup> So läßt sich die Translation von PML/RAR (Promyelozytische-Leukämie/Retinsäure-Rezeptor-α) mit einem gegen die Translationsstartregion gerichteten PNA-Pentadecamer bei einer Konzentration von 200 nM zu 80% inhibieren. Um dieselbe Hemmung mit einem unmodifizierten Oligonukleotid zu erreichen, muß dieses in 40fach höherer Konzentration angeboten werden. Allerdings führt die Anwendung von >300 nM PNA bereits wieder zu einer unspezifischen Translationshemmung. Ein anderes PNA-Oligomer, das gegen die PML/RAR-Fusionsregion gerichtet ist, zeigt unter gleichen Bedingungen keine Wirkung. Dies ist in Einklang mit den Studien von Knudsen und Nielsen,<sup>[98]</sup> nach denen PNAs gegen die 5'-proximale Region zum AUG-Startcodon spezifisch inhibieren, während PNAs gegen die kodierende Region nicht wirksam sind.

Anders verhält es sich mit tripelhelixbildenden PNAs sowie mit Bis(PNAs) und Clamp-PNAs, die zumindest partiell tripelhelicale Strukturen bilden. Solche  $(PNA)_2 \cdot$  RNA-Tripelhelix-bildenden Derivate verursachen auch dann einen Translationsstop, wenn sie gegen den kodierenden Bereich der mRNA gerichtet sind, was durch Detektion eines verkürzten Proteins nachgewiesen wurde.<sup>[98]</sup> Da jedoch die Effizienz der Translationshemmung nicht einfach mit der Bindungsstärke korreliert, muß für jedes neue Target eine Sequenzoptimierung durchgeführt werden.

### 5.3.2. Inhibierung der Transkription

Die Inhibierung der Transkription mit PNAs gelingt entweder durch Tripelhelixbildung oder durch eine Stranginvasions- oder -verdrängungsreaktion (Abb. 26). Die Stranginvasionsreaktion, bei der die PNA einen DNA-Strang im DNA-Duplex verdrängt, ist ganz besonders attraktiv, da der sich primär bildende PNA · DNA-Duplex in Einklang mit den

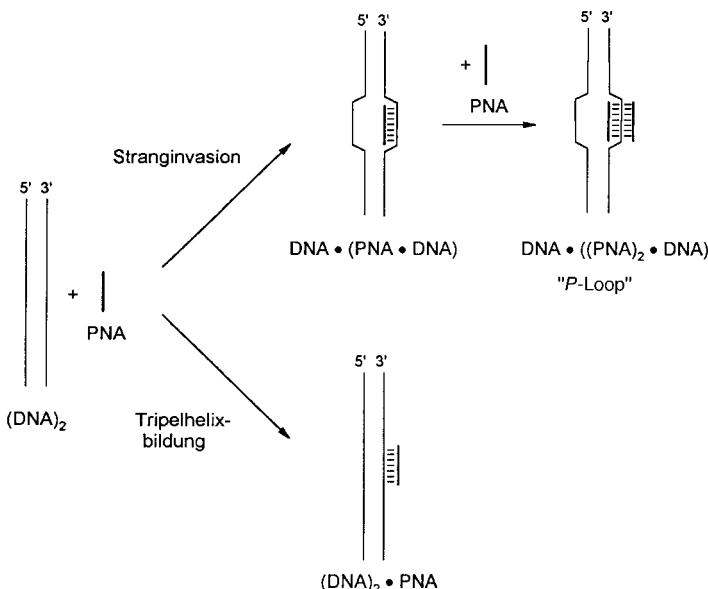


Abb. 26. Stranginvasion und Tripelhelixbildung mit PNAs.

Watson-Crick-Basenpaarungsregeln entsteht. Somit können im Prinzip alle vier Basenarten im DNA-Doppelstrang erkannt werden. Der sich lokal bildende PNA · DNA-Duplex kann gegebenenfalls unter Bindung eines weiteren PNA-Moleküls in eine lokale  $(PNA)_2 \cdot$  DNA-Tripelhelix übergehen. Dagegen gelingt die direkte  $(DNA)_2 \cdot$  PNA-Tripelhelixbildung zur Zeit nur mit Homopurin · Homopyrimidin-Doppelsträngen und C-reichen Homopyrimidin-PNAs effizient.<sup>[128]</sup> Beispielsweise kann Thymin in einem T · A-Basenpaar des DNA-Doppelstrangs bei der Tripelhelixbildung durch keine der vier natürlichen Basen spezifisch erkannt werden. Auf welche Art PNAs mit doppelsträngigen DNA-Rezeptoren interagieren, hängt demnach stark von der Basenzusammensetzung der verwendeten Sequenzen ab.

Die ersten Arbeiten zur Stranginvasion wurden mit Homopyrimidin-PNAs bei niedrigen Salzkonzentrationen durchgeführt.<sup>[12, 97, 129]</sup> Ist das Homopyrimidin-PNA-Oligomer an

den Homopurinstrang des Templatstrangs gebunden, kommt es zu einer effizienten Blockade der Transkription (Abb. 27a). Wird das PNA-Oligomer dagegen an den Nicht-Templatstrang gebunden, beeinträchtigt es die RNA-Polymerase-

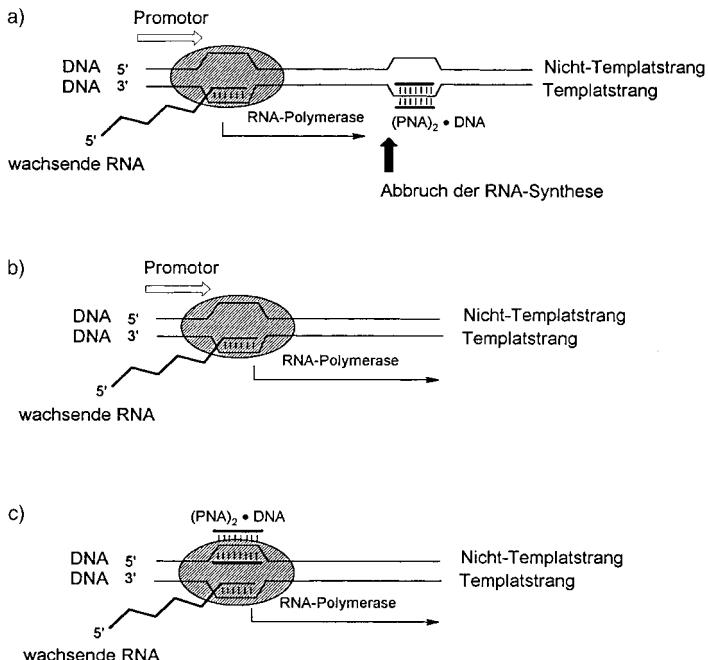


Abb. 27. a) Hemmung der Transkription mit PNAs durch Stranginvasion und Tripelhelixbildung am Einzelstrang; b) offener Promotorkomplex; c) Aktivierung der Transkription mit PNAs.

Reaktion in vitro kaum. Die Länge des gebildeten Transkripts hängt sowohl von der Sequenz als auch von der eingesetzten Polymerase ab. Ein hoher Thymingehalt in der Pyrimidin-PNA führt zu kürzeren Transkripten, d.h. zu einer effizienteren Blockade der RNA-Polymerase. Dies könnte entweder mit der verzögerten Protonierung von Cytosin zusammenhängen oder mit der Neigung Thymin-reicher PNAs, zumindest partiell tripelhelicale Strukturen zu bilden. Die Verdrängung des Nicht-Templatstrangs durch Homopyrimidin-PNA mit anschließender Bildung einer P-Loop-Struktur,<sup>[90]</sup> die durch einen  $(PNA)_2 \cdot$  DNA-Komplex stabilisiert wird (siehe Abb. 26 oben), kann mittels DNase-Footprinting nachgewiesen werden.<sup>[130]</sup> Sie führt in zellfreien Systemen zu einer effizienten Hemmung der T7-DNA-Polymerase-Reaktion. Jedoch läßt sich diese Hemmung nicht auf lebende Zellen übertragen, weil sich wahrscheinlich der  $(PNA)_2 \cdot$  DNA-Komplex bei physiologischen Salzkonzentrationen nicht bildet.

Bislang ist uns nur eine Studie bekannt, in der PNAs, die alle vier Basen enthielten, die Transkription in einem Zellassay erfolgreich inhibierten.<sup>[122]</sup> Die gegen CAG-Triplett-Wiederholungen gerichteten PNAs wurden ursprünglich zur selektiven Isolierung von transkriptionsaktiven Chromatin-Fragmenten unter Nutzung der Strangverdrängungsreaktion verwendet.<sup>[131]</sup> Die Zellen mußten dabei mit Lysolecithin permeabilisiert werden; anschließend war eine sequenzspezifische und dosisabhängige Transkriptionshemmung der Gene für den Androgen-Rezeptor (AR) und das TATA-Bindungs-

protein (TBP) möglich. Die Transkription des *c-myc*-Gens wurde durch die AR/TBP-spezifischen PNAs nicht gehemmt, während umgekehrt ein für *c-myc* spezifisches PNA-Oligomer die Transkription von *c-myc*, nicht aber die von AR/TBP hemmte.

Die Stabilität des natürlichen DNA-Doppelstrangs, insbesondere GC-reicher Sequenzen (siehe Abschnitt 4.3.3), unter physiologischen Salzbedingungen scheint das Haupthindernis für eine therapeutische Anwendung des Strangverdrängungsprinzips zu sein. Möglicherweise lassen sich die überraschenden positiven Befunde von Boffa et al.<sup>[122]</sup> damit erklären, daß das PNA-Oligomer gegen ein transkriptionsaktives DNA-Fragment gerichtet war. Hierfür spricht auch, daß während des aktiven Transkriptionsvorgangs die Geschwindigkeit der Stranginvasion drastisch erhöht war.<sup>[132]</sup>

#### 5.4. Aktivierung der Transkription

Bei der Transkription doppelsträngiger DNA in RNA durch RNA-Polymerasen/Transkriptionsfaktoren tritt bei der Initiierung ein „offener“ Komplex auf, in dem ca. 12 Basenpaare einzelsträngig so exponiert vorliegen, daß sie mit den Basen der synthetisierten RNA paaren können (Abb. 27b). Ein solcher offener Komplex gleicht der *P*-Loop-Struktur,<sup>[90]</sup> wenn zwei PNA-Stränge unter Tripelhelixbildung an den Nicht-Templatstrang gebunden sind. Tatsächlich wird ein DNA·((PNA)<sub>2</sub>·DNA)-Komplex von RNA-Polymerasen erkannt und die RNA-Transkription am *P*-Loop initiiert (Abb. 27c).<sup>[102]</sup> Daher können solche PNA-Zielstrukturen als artifizielle Promotoren betrachtet werden, die vom entsprechenden PNA-Oligomer im Sinne eines Transkriptionsfaktors positiv gesteuert werden.

#### 5.5. Inhibierung der Replikation

PNAs hemmen in zellfreien Systemen die Elongation von Primern durch DNA-Polymerasen (siehe Abschnitt 5.6.3). Folglich sollte prinzipiell auch eine Hemmung der DNA-Replikation durch PNAs möglich sein, sofern der DNA-Duplex unter physiologischen Salzbedingungen einer Stranginvasion zugänglich ist oder die DNA während des Replikationsprozesses einzelsträngig vorliegt. Im Falle der extrachromosomal Mitochondrien-DNA, die während der Replikation größtenteils einzelsträngig vorliegt, kann die Replikation mit entsprechenden PNAs tatsächlich effizient gehemmt werden.<sup>[126]</sup>

#### 5.6. Wechselwirkung mit Enzymen

##### 5.6.1. Ribonuclease H (RNase H)

RNA bildet im Doppelstrang mit unmodifizierten Oligodesoxynucleotiden ein Substrat für die Spaltung durch RNase H, die ubiquitär in Zellen auftritt. Die Fähigkeit von Oligonucleotiden, die RNase H zur RNA-Spaltung zu stimulieren, hängt in starkem Maße von ihrer chemischen Struktur

ab. Es ist bekannt, daß Antisense-Oligonucleotide, die die RNase H aktivieren können (Phosphodiester- und Phosphorothioat-Oligonucleotide), im allgemeinen viel bessere Antisense-Inhibitoren sind als solche Derivate, die dieses Enzym nicht stimulieren (z.B. Methylphosphonate, 2'-*O*-Alkylribonucleotide,  $\alpha$ -Oligonucleotide und Hexitol-Nucleinsäuren). PNAs gehören ebenfalls zu den Nucleinsäure-Analoga, die im Doppelstrang mit RNA die RNase H nicht zu stimulieren vermögen. Daher ist es nicht verwunderlich, daß PNAs trotz ihrer exzellenten Bindungseigenschaften schwächere Antisense-Wirkstoffe als die RNase H-stimulierenden Propinyl-pyrimidin-Phosphorothioate sind.<sup>[96]</sup>

Wir haben jedoch gefunden, daß PNA/DNA-Chimären im Doppelstrang mit RNA die RNase H zur Spaltung der RNA zu stimulieren vermögen. Die RNA wird dabei an den Ribonucleotiden gespalten, die mit den Basen im DNA-Teil der Chimären paaren (Abb. 28). Die Spaltung ist sequenzspezifisch, da PNA/DNA-Chimären mit randomisierter Sequenz die RNA unter gleichen Bedingungen nicht spalten.<sup>[133]</sup>

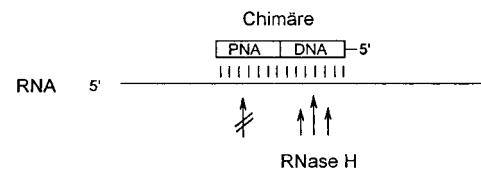


Abb. 28. Schematische Darstellung der RNase H-vermittelten Spaltung von RNA im Duplex mit einer PNA/DNA-Chimäre.

##### 5.6.2. Telomerase

Die Telomerase ist ein Ribonucleoprotein aus einer Proteinkomponente mit DNA-Polymerase-Aktivität und einer RNA-Komponente als Primerbindungsstelle. Die Human-Telomerase synthetisiert lange (TTAGGG)<sub>n</sub>-Wiederholungssequenzen an das 3'-Ende eines DNA-Strangs. PNAs, die komplementär zur RNA-Primerbindungsstelle sind, hemmen die Telomerase-Aktivität wegen ihrer höheren Bindungsaffinität besser als entsprechende Phosphorothioat-Oligonucleotide.<sup>[123]</sup> In Abhängigkeit von der Position der Bindungsstelle und der Basenzusammensetzung des PNA-Oligomers sind IC<sub>50</sub>-Werte bis zu 1 nm für die Inhibition der Human-Telomerase gefunden worden.<sup>[134]</sup>

##### 5.6.3. DNA-Polymerasen und Reverse Transkriptasen

PNAs wechselwirken normalerweise nicht direkt mit DNA-Polymerasen und Reversen Transkriptasen, können aber die Elongation von Oligonucleotid-Primern durch Bindung an den Templatstrang unterbrechen oder mit dem Oligonucleotid-Primer um die Bindung an das Templat konkurrieren. So kann die von *Taq*-Polymerase katalysierte Primer-Extension durch H-(t)<sub>10</sub>-PNA an einer (dA)<sub>10</sub>-Bindungsstelle im Templat angehalten werden.<sup>[12]</sup> In ähnlicher Weise lässt sich die Primer-Elongation mit MMLV-Reverser-Transkriptase durch ein entsprechendes PNA-Oligomer hemmen.<sup>[97]</sup>

PNAs selbst können aufgrund ihrer Struktur nicht als Primer für Polymerase-Reaktionen dienen. Jedoch konnten wir kürzlich zeigen,<sup>[16]</sup> daß ungeladene PNA-Primer mit

inem einzigen 5'-Amino-2',5'-didesoxynucleosid am C-Terminus (Abb. 29) von mehreren Polymerasen, beispielsweise dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (*Escherichia coli*) und der Vent-DNA-Polymerase (*Thermococcus litoralis*), erkannt werden. Dies ist um so erstaunlicher, als kristallographische und biochemische Untersuchungen nahegelegt hatten, daß die Polymerasen über konservierte Aminosäuren in ihrer Struktur an die negativen Ladungen des Phosphat-Rückgrats binden. Wird dieser „PNA-DNA-Primer“ im Überschuß eingesetzt, so ist mit Hilfe thermostabiler Polymerasen eine lineare Amplifizierung möglich.<sup>[16]</sup> Wenninger und Seliger fanden, daß das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I ein DNA-Templat, das in der Mitte eine PNA-Einheit enthält, prinzipiell als Matrize zur Polymerisation akzeptiert, wenn auch in Abhängigkeit von der Struktur dieser PNA-Einheit ein teilweiser Polymerisationsabbruch in der Nähe der Modifikation stattfindet.<sup>[135]</sup> Interessanterweise gelingt auch die chemische Polymerisation sowohl von PNA-Einheiten als auch von Ribonucleotiden an PNA-Templaten.<sup>[18]</sup> Erwähnenswert ist ferner, daß PNA-analoge Triphosphate durch DNA-Polymerasen eingebaut werden können und dabei zum Kettenabbruch führen,<sup>[136]</sup> wodurch sie prinzipiell zur Sequenzierung nach der Sanger-Methode von Interesse sein könnten.

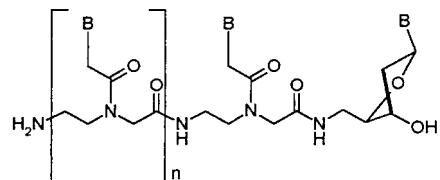


Abb. 29. Struktur eines PNA-Primers, der nur ein 5'-Amino-2',5'-didesoxynucleosid am C-Terminus enthält.<sup>[16]</sup>

Die Möglichkeiten zur therapeutischen Nutzung der PNAs folgen direkt aus den in Abschnitt 5 beschriebenen biologischen Eigenschaften. Die Inhibierung der Translation (Antisense-Wirkstoffe), die Modulierung der Transkription und Replikation (Anti-Gen-Wirkstoffe) sowie die Wechselwirkung mit Ribonucleoproteinen wie Telomerasen (Enzyminhibitoren) stellen grundsätzlich mögliche therapeutische Strategien dar. Die Ergebnisse mit PNAs in zellfreien Systemen sind sehr ermutigend, doch für eine effektive therapeutische Anwendung ist ihre schlechte Zellgängigkeit momentan das Haupthindernis. Im Falle der Antisense-PNAs<sup>[96–98, 121, 137]</sup> ist ihre Unfähigkeit, die zelluläre RNase H zu stimulieren, eine weitere Limitierung.

Aussichtsreichste Kandidaten für Antisense-PNA-Wirkstrukturen sind zur Zeit die PNA/DNA-Chimären, da sie ähnlich gut wie Oligonucleotide von Zellen aufgenommen werden, eindeutig in antiparalleler Orientierung an komplementäre RNA binden und im Duplex die zelluläre RNase H

zur sequenzspezifischen RNA-Spaltung stimulieren.<sup>[81]</sup> Vorteilhaft ist zudem die gegenüber reinen PNAs verbesserte Löslichkeit der partiell negativ geladenen Chimären in wässrigem Milieu. Zur Verbesserung der Stabilität gegen Endonukleasen kann der DNA-Teil in ihnen zusätzlich nach bekannten Methoden, beispielsweise durch Phosphorothioatbrücken, modifiziert werden.<sup>[1]</sup> Erste Versuche in Zellkultur zeigten, daß drei bis fünf Nucleotide in PNA/DNA-Chimären ausreichen, um Antisense-Effekte zu erzielen, die denen durchgängig Phosphorothioat-modifizierter Oligonucleotide hinsichtlich Spezifität und Wirkstärke überlegen sind.

Theoretisch sollten Anti-Gen-Wirkstrukturen (Stranginvadoren und Tripelhelixbildner) wegen des hohen Dosis-Effekts (eine oder zwei Kopien DNA pro Zelle) äußerst günstig für einen therapeutischen Eingriff sein. Die spezifische Inhibition der Wechselwirkung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B mit einer IL2-R $\alpha$ -Bindungsstelle als Folge einer PNA-Stranginvasion,<sup>[124]</sup> die Invasion von CAG-Triplett-Wiederholungsstrukturen unter Hemmung der Transkription des Androgen-Rezeptors in humanen Prostata-Krebszellen<sup>[122]</sup> sowie die Hemmung der Transkription eines PML/RAR-Hybrid-Gens, das bei der Akuten Promyelozytischen Leukämie von Bedeutung ist,<sup>[127]</sup> sind erste Beispiele für den Versuch, die PNA-Stranginvasion therapeutisch zu nutzen. Obwohl PNAs über 500mal schneller mit doppelsträngiger DNA assoziieren als normale Oligonucleotide,<sup>[138]</sup> verläuft die Stranginvasionsreaktion *in vitro* nur bei Salzkonzentrationen von <50 mM wirklich effizient,<sup>[129]</sup> während physiologische Salzkonzentration bei >100 mM liegen. Diese Tatsache sollte sich jedoch nicht entmutigend auf die Durchführung von Versuchen auf zellulärer Ebene auswirken, da unter *In-vivo*-Bedingungen zusätzliche Effekte wie eine Bindungsstabilisierung durch zelluläre Proteine zum Tragen kommen können. So gelang Boffa et al.<sup>[122]</sup> mit PNAs die spezifische Inhibition der Transkription der Androgen-Rezeptor- und TATA-Bindungsprotein-Gene sowie des *c-myc*-Gens in mit Lysolecithin permeabilisierten Zellen. Erwähnenswert ist hierbei, daß die Anti-Gen-PNA, die gegen den Sense-Strang der DNA gerichtet ist, die Transkription auf beiden Strängen des DNA-Templats gleich gut hemmt. Dies steht im Widerspruch zu den Befunden in zellfreien Systemen und könnte beispielsweise daran liegen, daß der RNA-Polymerase-II-Elongationskomplex *in vivo* viel größer ist als der Pol-II-Komplex in Rekonstitutionssystemen oder daß zusätzliche Einflüsse der nucleosomalen Struktur der verwendeten Chromatin-Template eine Rolle spielen.<sup>[122]</sup> Ferner scheint die Stranginvasion mit PNAs durch einen aktiven Transkriptionsvorgang begünstigt zu werden („Suizid-Transkription“).<sup>[132]</sup>

Die reverse Transkription des *gag*-Gens von HIV-1 kann durch PNAs *in vitro* gehemmt werden.<sup>[139]</sup> Dabei verläuft die Inhibition mit einem Bis(PNA)-Oligomer, das über zwanzig PNA-Nucleobasen die entsprechenden zehn Nucleobasen der RNA erkennt, effizienter als mit einem entsprechenden Antisense-PNA-Decamer. Jedoch kann mit einer pentadekameren Antisense-PNA die reverse Transkription bei einem Molverhältnis von 10:1 (PNA:RNA) komplett gehemmt werden, wobei keine Spaltung der RNA durch RNase H festgestellt wird.

Die Inhibierung der Replikation mutierter Human-Mitochondrien-DNA (*mtDNA*) durch PNAs<sup>[126]</sup> ist ein möglicher Ansatz zur Therapie von Patienten mit Krankheiten, die auf der Heteroplasmie von *mtDNA* beruhen (siehe Abschnitt 5.5). Bei der Heteroplasmie liegen mutierte und Wildtyp-DNA nebeneinander in der derselben Zelle vor. Es wurde gezeigt, daß PNAs unter physiologischen Bedingungen die Replikation der mutierten *mtDNA* inhibieren, ohne die der Wildtyp-*mtDNA* zu beeinflussen. Angesprochen wurde bereits die Möglichkeit (siehe Abschnitt 5.6.2), die Human-Telomerase, die in etwa 90 % aller humaner Tumoren nachgewiesen werden kann, mit PNAs zu hemmen.<sup>[123]</sup> Schließlich sei daran erinnert, daß PNAs die Transkription auch stimulieren können.<sup>[102]</sup> Dieses Prinzip (siehe Abschnitt 5.4) sollte sich auch therapeutisch anstelle einer Substitutionstherapie mit Proteinen nutzen lassen, sofern die entsprechenden Gene nicht oder nur schwach exprimiert werden und im kodierenden Bereich nicht defekt sind.

## 6.2. Diagnostik

Bei der Anwendung der PNAs in der DNA-Diagnostik werden im wesentlichen folgende Merkmale genutzt: 1) PNAs zeigen bei der Hybridisierung eine bessere Diskriminierung als Oligonukleotide und bilden zudem stabilere Hybride (siehe Abschnitt 4.3.1). 2) Im Gegensatz zu Oligonukleotiden sind sie unter In-vitro-Bedingungen prädestiniert für Strangverdrängungsreaktionen. 3) Als ungeladene Verbindungen ändern PNAs nach Bindung an komplementäre Nucleinsäuren deren Mobilität bei der Elektrophorese beträchtlich. Dementsprechend lassen sich PNAs vorteilhaft zum Screening von Genmutationen einsetzen, beispielsweise zum Nachweis des CFTR-Gens bei der Zystischen Fibrose.<sup>[140]</sup> Das Verfahren beruht im Prinzip darauf, daß die PNA · DNA-Hybride bei niedriger Ionenstärke und erhöhter Temperatur (70 °C) stabil sind und durch Kapillar-Elektrophorese einfach nachgewiesen werden können. Als Alternative zur Southern-Hybridisierung können markierte PNAs als Sonden in Prä-Gel-Hybridisierungsexperimenten eingesetzt werden.<sup>[141]</sup> Da die Bindung von PNA im Gegensatz zu der von DNA nur unwesentlich von der Ionenstärke abhängt, kann doppelsträngige DNA vor der Gelelektrophorese bei niedriger Salzkonzentration dissoziiert und mit PNA hybridisiert werden.

Das „PCR-Clamping“ zum Nachweis von Punktmutationen<sup>[142]</sup> beruht darauf, daß PNAs stärker als Oligonukleotide an komplementäre Nucleinsäuren binden, jedoch nicht in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als Primer fungieren. Wenn das PNA-Oligomer zumindest partiell gegen die Primer-Bindungsstelle gerichtet ist, kann die Bildung des PCR-Produkts blockiert werden. Bei geschickter Wahl der Primer-Länge könnte sogar zwischen Allelen diskriminiert werden, die sich nur in einem Basenpaar unterscheiden. Durch PCR-Clamping ließen sich beispielsweise Punktmutationen des *Ki-ras*-Gens unterscheiden:<sup>[143]</sup> Ein PNA-Oligomer, das komplementär zur Wildtyp-*Ki-ras*-DNA ist, wird die Amplifizierung des Wildtyp-Gens gegenüber der des mutierten Gens, das das Wildtyp-PNA-Oligomer schlechter bindet, stark unterdrücken (Abb. 30).

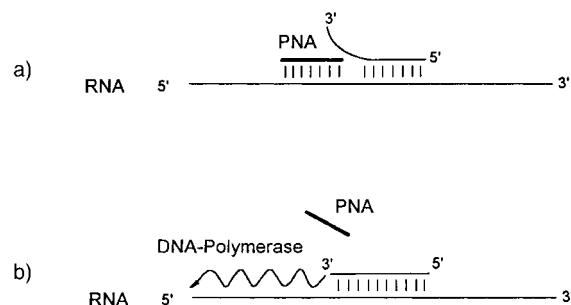


Abb. 30. Schematische Darstellung des PCR-Clamping. a) Blockade der PCR durch starke Bindung von PNA an ein Wildtyp-Gen; b) positive PCR infolge schlechter PNA-Bindung an ein mutiertes Gen.

Demers et al. verwendeten PNAs, um die bevorzugte Amplifizierung kleiner allelischer PCR-Produkte bei der Vervielfältigung von VNTR-Loci (variable number of tandem repeats) zu unterdrücken, die zu verfälschten Genotypmustern führt.<sup>[144]</sup> Mit Hilfe von PNAs und einer In-situ-Hybridisierungstechnik konnte mRNA in Paraffinschnitten schnell und mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden.<sup>[145]</sup> Die quantitative Messung telomerer Wiederholungssequenzen gelang ebenfalls mit PNAs.<sup>[146]</sup> Interessant ist ferner die Verwendung oberflächengebundener PNAs als sequenzspezifische DNA-Biosensoren,<sup>[147–149]</sup> wobei die Hybridisierung elektrochemisch detektiert wurde.<sup>[147]</sup> Die Detektion von PNA · DNA-Hybriden kann aber auch mit Antikörper-Fab-Fragmenten erfolgen.<sup>[150]</sup>

## 6.3. PNAs als Werkzeuge in der Biotechnologie

PNAs können nicht nur beim PCR-Clamping und in Strangverdrängungsreaktionen, sondern auch zur Modulierung enzymatischer Spaltungen eingesetzt werden. Beispielsweise kann nach Verdrängung eines Strangs in einem DNA-Duplex durch PNA dieser Strang selektiv mit Nuclease S1 gespalten werden (Abb. 31 a),<sup>[151]</sup> und mit Hilfe zweier PNAs wird die einzelstrangspezifische Nuclease S1 zu einem artifiziellen Restriktionsenzym, das beide DNA-Stränge durchschneidet und dessen Erkennungssequenz durch die verwendeten PNA-Sequenzen determiniert ist (Abb. 31 b). Umgekehrt lassen sich PNAs auch zur Blockierung der Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme verwenden.<sup>[101]</sup> Weiterhin kann mit PNAs die Methylierung von DNA sequenzspezifisch unterbunden werden; nach Dissoziation des PNA/DNA-Komplexes wird dann nur die nichtmethylierte Erkennungssequenz durch entsprechende Methylase-sensitive Restriktionsenzyme geschnitten.<sup>[152, 153]</sup> In ähnlicher Form wurden auch oligonukleotidische Tripelhelixbildner als „seltene Genom-Scheren“ genutzt.<sup>[154]</sup> PNAs können ferner als Hilfssequenzen die Ribozymaktivität langer RNA-Substrate erhöhen, die durch Hammerhead-Ribozyme nur unzulänglich spaltbar sind.<sup>[155]</sup> Modifizierte PNAs lassen sich auch vorteilhaft zur sequenzspezifischen Reinigung von Nucleinsäuren<sup>[84]</sup>

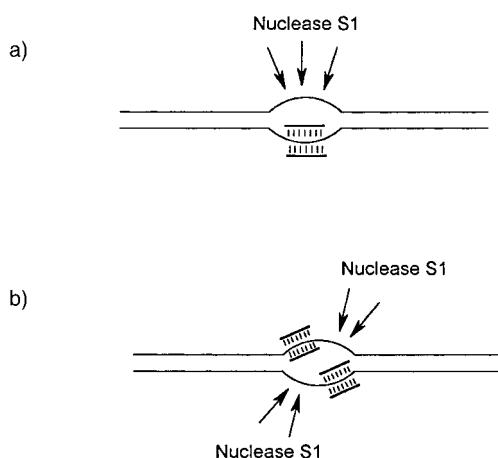


Abb. 31. Artifizielle Restriktionsenzyme. a) Einzelstrangspaltung mit Hilfe von PNA; b) Doppelstrangspaltung durch doppeltes PCR-Clamping.

und zur Isolierung aktiver Gene<sup>[151]</sup> einsetzen. Schließlich sei erwähnt, daß PNAs ähnlich wie Oligonucleotide zur Generierung chemischer Substanzbibliotheken verwendet werden können,<sup>[156]</sup> aus denen sich analog zum Aptamer-Prinzip<sup>[157]</sup> Moleküle mit definierten Eigenschaften selektionieren lassen sollten.

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

In den letzten Jahren wurden effiziente Methoden zur Synthese sowohl von PNAs als auch von PNA/DNA-Chimären entwickelt. Diese Substanzen sind wegen ihrer hohen Bindungsaffinität und -spezifität von enormem Interesse. Der praktische Nutzen der reinen PNAs ist aber wegen ihrer relativ schlechten Löslichkeit und ihrer Tendenz zur Aggregation etwas eingeschränkt. Durch gezielte strukturelle Veränderungen, wie die Einführung positiver oder negativer Ladungen, konnten diese Nachteile zurückgedrängt werden, so daß die PNAs zumindest für In-vitro-Versuche von großem Nutzen wurden. Bei speziellen Anwendungen, beispielsweise dem PCR-Clamping und der Stranginvasionsreaktion, bieten die PNAs gegenüber ihren natürlichen Analoga klare Vorteile und erweitern das Arsenal biotechnologischer und diagnostischer Werkzeuge.

Die Nutzbarmachung der PNAs als Antisense-Wirkstoffe ist maßgeblich von ihrer intrazellulären Verfügbarkeit abhängig. Während reine PNAs nur schlecht von Zellen in Kultur aufgenommen werden, ist mit den PNA/DNA-Chimären eine Inhibition der Genexpression in Zellkultur möglich. Leider liegen bislang noch keine Daten über Pharmakologie und Toxizität von PNA-Derivaten vor. Aufschluß über diese Aspekte ist jedoch in den nächsten Jahren zu erwarten, zumal die Zahl an Veröffentlichungen auf dem PNA-Gebiet stark ansteigt. Zur Zeit befinden sich etwa fünfzehn Oligonucleotide der ersten Generation, die Phosphorothioate, in der klinischen Entwicklung mit teilweise vielversprechenden Ergebnissen.<sup>[158, 159]</sup> Erst 1997 wurden Oligonucleotide der zweiten Generation, die chemisch Chimären aus Oligodesoxyribonucleotid-Phosphorothioaten und 2'-O-substituierten Oligoribonucleotiden sind, in die klinische Entwicklung ge-

bracht. Die Untersuchungen der nächsten Jahre werden zeigen, ob auch Oligomere auf der Basis von PNA zu einer neuen Generation von Arzneimitteln führen können. Aber selbst wenn sich keine therapeutische Nutzung der PNAs ergeben sollte, sind sie auf jeden Fall wertvolle Werkzeuge zur Überprüfung der Funktion neuer Gene, die bei der Sequenzierung des menschlichen Genoms anfallen („Functional Genomics“).

Es zeichnet sich ab, daß besonders die Kombination von PNA-Einheiten mit Teilen natürlicher Nucleinsäurestrukturen in Form von Chimären zu außerordentlich interessanten Molekülen führt, da diese von bestimmten Enzymen wie DNA-Polymerasen oder RNase H erkannt werden. Solche PNA/DNA-Chimären sind außer als potentielle Diagnostica und Therapeutica auch für das Studium der Mechanismen biologischer Prozesse von Interesse.

Unter strukturellen Gesichtspunkten sind PNAs ebenfalls äußerst interessant. Bereits heute liegen zahlreiche Untersuchungen zur Struktur von Komplexen aus PNAs mit sich selbst oder den natürlichen Nucleinsäuren vor. Diese dienen nicht nur dem Verständnis der PNA-Struktur, sondern sie liefern auch neue Informationen über die strukturellen und biologischen Eigenschaften von DNA und RNA selbst. Somit sollten Untersuchungen an PNAs und PNA/DNA-Chimären auch helfen, mehr über die Möglichkeit der Entwicklung alternativer Lebensformen und über potentielle Übergänge zwischen unterschiedlichen genetischen Systemen zu lernen, was wiederum neue Wege der Speicherung und Weitergabe genetischer Information aufzeigen könnte.

## Anhang: wichtige Abkürzungen

Aeg	N-(2-Aminoethyl)glycyl
An	Anisoyl
Bn	Benzyl
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
BOP	Benzotriazolyl-1-oxytris(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat
tBuBz	4-tert-Butylbenzoyl
Bz	Benzoyl
Cbz	Benzoyloxycarbonyl
CPG	Controlled pore glass
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Ethyldiisopropylamin
Dmt	Bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl
Dpc	Diphenylcarbamoyl
Dts	Dithiasuccinyl
Fmoc(ONSu)	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl(N-hydroxysuccimid)
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOOBt	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin (4-Methylbenzhydryl)amin

Mmt	(4-Methoxyphenyl)diphenylmethyl
NEM	<i>N</i> -Ethylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NPE	(4-Nitrophenyl)ethyl
Pfp	Pentafluorophenyl
PG	Schutzgruppe
PyBOP	Benzotriazolyl-1-oxy-tris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat
PyBrop	Bromtris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOTU	<i>O</i> -[(Cyano(ethoxycarbonyl)methylen)amino]-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat

Eingegangen am 16. Juli,  
veränderte Fassung am 20. Oktober 1997 [A243]

- [1] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543–584.
- [2] U. Englisch, D. H. Gauss, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 629–646; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 613–630.
- [3] N. T. Thuong, C. Helene, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 697–723; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 666–690.
- [4] S. T. Crooke, C. F. Bennett, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996**, *36*, 107–129.
- [5] E. Uhlmann, A. Peyman, D. W. Will, *Encyclopedia of Cancer*, Vol. 1 (Hrsg.: J. R. Bertino), Academic Press, San Diego, CA, **1997**, S. 64–81.
- [6] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497–1500.
- [7] M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9677–9678.
- [8] M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895–1897.
- [9] M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 800–801.
- [10] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566–568.
- [11] O. Buchardt, M. Egholm, R. H. Berg, P. E. Nielsen, *Trends Biotechnol.* **1993**, *11*, 384–386.
- [12] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Anti-Cancer Drug Des.* **1993**, *8*, 53–63.
- [13] B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 5–23.
- [14] C. Meier, J. W. Engels, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1039–1041; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1008–1010.
- [15] D. Y. Cherny, B. P. Belotserkovskii, K. M. D. Frank, M. Egholm, O. Buchardt, R. H. Berg, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 1667–1670.
- [16] M. J. Lutz, S. A. Benner, S. Hein, G. Breipohl, E. Uhlmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3177–3178.
- [17] P. E. Nielsen, *Origins Life Evol. Biosphere* **1993**, *23*, 323–327.
- [18] C. Bohler, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *Nature* **1995**, *376*, 578–581.
- [19] E. P. Heimer, H. E. Gallo-Torres, A. M. Felix, M. Ahmad, T. J. Lambros, F. Scheidl, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1984**, *23*, 203–211.
- [20] S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, M. D. Gaul, C. F. Hassman, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L. Reed, D. J. Ricca, R. W. Wiethe, S. A. Noble, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6179–6194.
- [21] D. A. Stetsenko, E. N. Lubyako, V. K. Potapov, T. L. Azhikina, E. D. Sverdlov, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3571–3574.
- [22] G. Breipohl, D. W. Will, A. Peyman, E. Uhlmann, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 14671–14686.
- [23] K. L. Dueholm, M. Egholm, O. Buchardt, *Org. Prep. Proced. Int.* **1993**, *25*, 457–461.
- [24] P. J. Finn, N. J. Gibson, R. Fallon, A. Hamilton, T. Brown, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3357–3363.
- [25] G. Breipohl, J. Knolle, D. Langner, G. O'Malley, E. Uhlmann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 665–670.
- [26] D. W. Will, G. Breipohl, D. Langner, J. Knolle, E. Uhlmann, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12069–12082.
- [27] K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5767–5773.
- [28] L. Kosynkina, W. Wang, T. C. Liang, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5173–5176.
- [29] B. E. Watkins, J. S. Kiely, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5702.
- [30] R. Zou, M. J. Robins, *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 1436–1437.
- [31] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788–798.
- [32] B. Castro, J. Coste, M. N. Dufour, A. Pantaloni, *Pept. Chem. Struct. Biol. Proc. Am. Pept. Symp.* **1990**, *11*, 900–901.
- [33] A. C. van der Laan, N. J. Meeuwenoord, E. Kuyl-Yeheskiely, R. S. Oosting, R. Brands, J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1995**, *114*, 295–297.
- [34] A. C. van der Laan, R. Brill, R. Kuimelis, E. Kuyl-Yeheskiely, J. H. van Boom, A. Andrus, R. Vinayak, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2249–2252.
- [35] W. König, G. Breipohl, P. Pokorny, M. Birkner, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp.* **1991**, *21*, 143–145.
- [36] G. Breipohl, D. W. Will, D. Langner, J. Knolle, E. Uhlmann, *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis* (Hrsg.: R. Epton), Mayflower, Birmingham, Großbritannien, **1996**, S. 61–64.
- [37] D. Le-Nguyen, B. Castro, *Pept. Chem.* **1988**, 231–238.
- [38] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205–208.
- [39] a) A. Peyman, E. Uhlmann, K. Wagner, S. Augustin, G. Breipohl, D. W. Will, A. Schaefer, H. Wallmeier, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2797–2800; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2636–2638; b) A. Peyman, E. Uhlmann, K. Wagner, S. Augustin, C. Weiser, D. W. Will, G. Breipohl, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2919–2922; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2809–2812.
- [40] E. Uhlmann, W. Pfleiderer, *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 1688–1703.
- [41] B. Hyrup, M. Egholm, M. Rolland, P. E. Nielsen, R. H. Berg, O. Buchardt, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 518–519.
- [42] B. Hyrup, M. Egholm, P. E. Nielsen, P. Wittung, B. Norden, O. Buchardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7964–7970.
- [43] B. Hyrup, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1083–1088.
- [44] A. H. Krotz, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6937–6940.
- [45] P. H. Lagriffoul, M. Egholm, P. E. Nielsen, R. H. Berg, O. Buchardt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1081–1082.
- [46] K. L. Dueholm, K. H. Petersen, D. K. Jensen, M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1077–1080.
- [47] G. Haaima, A. Lohse, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2068–2070; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1939–1941.
- [48] K. H. Petersen, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 793–796.
- [49] E. Liroy, H. Kessler, *Liebigs Ann.* **1996**, 201–204.
- [50] B. P. Gangamani, V. A. Kumar, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 15017–15030.
- [51] S. Jordan, C. Schwemler, W. Kosch, A. Kretschmer, E. Schwennner, U. Stropp, B. Mielke, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 681–686.
- [52] G. Lowe, T. Vilaivan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 547–554.
- [53] G. Lowe, T. Vilaivan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 539–546.
- [54] P. Wittung, P. Nielsen, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3189–3190.
- [55] P. Lagriffoul, P. Wittung, M. Eriksson, K. K. Jensen, B. Norden, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 912–919.
- [56] K. S. Ramasamy, W. Seifert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1799–1804.
- [57] M. Cantin, R. Schütz, C. J. Leumann, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4211–4214.
- [58] L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 175–183.
- [59] T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Ottesen, H. Örum, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 80–88.

- [60] F. Albericio, J. Barcardit, G. Barany, J. M. Coull, M. Egholm, E. Giralt, G. W. Griffin, S. A. Kates, E. Nicolas, N. A. Sole, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp.* **1994**, 23, 271–272.
- [61] L. Christensen, P. E. Nielsen, O. Buchardt, M. Egholm, R. H. Berg, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp.* **1994**, 23, 283–284.
- [62] M. Egholm, L. Christensen, K. L. Dueholm, O. Buchardt, J. Coull, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 217–222.
- [63] R. M. Cook, J. H. Adams, D. Hudson, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 6777–6780.
- [64] L. Betts, J. A. Josey, J. M. Veal, S. R. Jordan, *Science* **1995**, 270, 1838–1841.
- [65] H. Rasmussen, J. S. Kastrup, J. N. Nielsen, J. M. Nielsen, P. E. Nielsen, *Nature Struct. Biol.* **1997**, 4, 98–101.
- [66] P. Clivio, D. Guillaume, M.-T. Adeline, J.-L. Fourrey, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5255–5256.
- [67] Y. Z. Xu, Q. Zheng, P. F. Swann, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 3839–3845.
- [68] F. Bergmann, W. Bannwarth, S. Tam, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6823–6826.
- [69] J. G. Schmidt, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *Anal. Biochem.* **1996**, 235, 239–241.
- [70] D. W. Will, G. Breipohl, D. Langner, E. Uhlmann, *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis* (Hrsg.: R. Epton), Mayflower, Birmingham, Großbritannien, **1996**, S. 65–68.
- [71] E. Uhlmann, D. W. Will, G. Breipohl, A. Peyman, D. Langner, J. Knolle, G. J. O’Malley, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, 16, 603–608.
- [72] K. J. Jensen, E. Bardaji, F. Albericio, J. M. Coull, G. Barany, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp.* **1994**, 23, 757–758.
- [73] a) L. S. Richter, R. N. Zuckermann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 1159–1162; b) R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, S. B. Kent, W. H. Moos, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10646–10647.
- [74] S. Jordan, C. Schwemler, W. Kosch, A. Kretschmer, U. Stropp, E. Schwemmer, B. Mielke, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 687–690.
- [75] V. A. Efimov, M. V. Choob, A. L. Kalinkina, O. G. Chakhmakhcheva, R. Stromberg, A. C. van der Laan, N. J. Meeuwenoord, E. Kuyl-Yeheskiely, J. H. van Boom, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1996**, 61, S262–S264.
- [76] A. C. van der Laan, R. Stromberg, J. H. van Boom, E. Kuyl-Yeheskiely, V. A. Efimov, O. G. Chakhmakhcheva, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 7857–7860.
- [77] K. H. Petersen, D. K. Jensen, M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 1119–1124.
- [78] M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 3185–3191.
- [79] W. Bannwarth, *Helv. Chim. Acta* **1988**, 71, 1517–1527.
- [80] M. Mag, J. W. Engels, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 5973–5988.
- [81] E. Uhlmann, D. W. Will, G. Breipohl, D. Langner, A. Ryte, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2793–2797; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2632–2635.
- [82] T. Koch, M. Naesby, P. Wittung, M. Joergensen, C. Larsson, O. Buchardt, C. J. Stanley, B. Norden, P. E. Nielsen, H. Oerum, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6933–6936.
- [83] M. C. Griffith, L. M. Risen, M. J. Greig, E. A. Lesnik, K. G. Sprankle, R. H. Griffey, J. S. Kiely, S. M. Freier, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 831–832.
- [84] H. Oerum, P. E. Nielsen, M. Joergensen, C. Larsson, C. Stanley, T. Koch, *BioTechniques* **1995**, 19, 472–480.
- [85] K. K. Jensen, H. Oerum, P. E. Nielsen, B. Norden, *Biochemistry* **1997**, 36, 5072–5077.
- [86] D. J. Rose, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 3545–3549.
- [87] S. Tomac, M. Sarkar, T. Ratilainen, P. Wittung, P. E. Nielsen, B. Norden, A. Graeslund, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5544–5552.
- [88] D. Wenninger, H. Seliger, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, 16, 997–980.
- [89] E. A. Lesnik, L. M. Risen, D. A. Driver, M. C. Griffith, K. Sprankle, S. M. Freier, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 568–574.
- [90] V. V. Demidov, M. V. Yavnilovich, B. P. Belotserkovskii, M. D. Frank-Kamenetskii, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 2637–2641.
- [91] A. Ono, P. O. P. Ts’O, L.-S. Kan, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4032–4033.
- [92] A. Ono, P. O. P. Ts’O, L.-S. Kan, *J. Org. Chem.* **1991**, 57, 3225–3230.
- [93] N. J. Peffer, J. C. Hanvey, J. E. Bisi, S. A. Thomson, C. F. Hassman, S. A. Noble, L. E. Babiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 10648–10652.
- [94] C. Helene, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1993**, 4, 29–36.
- [95] P. E. Nielsen, L. Christensen, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2287–2288.
- [96] M. A. Bonham, S. Brown, A. L. Boyd, P. H. Brown, D. A. Bruckenstein, J. C. Hanvey, S. A. Thomson, A. Pipe, F. Hassman, J. E. Bisi, B. C. Froehler, M. D. Matteucci, R. W. Wagner, S. A. Noble, L. E. Babiss, *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 1197–1203.
- [97] J. C. Hanvey, N. J. Peffer, J. E. Bisi, S. A. Thomson, R. Cadilla, J. A. Josey, D. J. Ricca, C. F. Hassman, M. A. Bonham, K. G. Au, S. G. Carter, D. A. Bruckenstein, A. L. Boyd, S. A. Noble, L. E. Babiss, *Science* **1992**, 258, 1481–1485.
- [98] H. Knudsen, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 494–500.
- [99] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, *J. Mol. Recognit.* **1994**, 7, 165–170.
- [100] P. Wittung, P. E. Nielsen, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7049–7054.
- [101] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 197–200.
- [102] N. E. Mollegaard, O. Buchardt, M. Egholm, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 3892–3895.
- [103] V. V. Demidov, D. I. Cherny, A. V. Kurakin, M. V. Yavnilovich, V. A. Malkov, M. D. Frank-Kamenetskii, S. H. Soennichsen, P. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 5218–5222.
- [104] P. Wittung, P. E. Nielsen, O. Buchardt, M. Egholm, B. Norden, *Nature* **1994**, 368, 561–563.
- [105] U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 458–461; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 445–448.
- [106] U. Diederichsen, H. W. Schmitt, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 475–478.
- [107] M. Leijon, A. Graeslund, P. E. Nielsen, O. Buchardt, B. Norden, S. M. Kristensen, M. Eriksson, *Biochemistry* **1994**, 33, 9820–9825.
- [108] M. Eriksson, P. E. Nielsen, *Nature Struct. Biol.* **1996**, 3, 410–413.
- [109] J. S. Kastrup, M. Pilgaard, F. S. Jorgensen, P. E. Nielsen, H. Rasmussen, *FEBS Lett.* **1995**, 363, 115–117.
- [110] P. Wittung, S. K. Kim, O. Buchardt, P. Nielsen, B. Norden, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 5371–5377.
- [111] S. C. Brown, S. A. Thomson, J. M. Veal, D. G. Davis, *Science* **1994**, 265, 777–777.
- [112] O. Almarsson, T. C. Bruice, J. Kerr, R. N. Zuckermann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 7518–7522.
- [113] O. Almarsson, T. C. Bruice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 9542–9546.
- [114] S. M. Chen, V. Mohan, J. S. Kiely, M. C. Griffith, R. H. Griffey, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 5105–5108.
- [115] S. K. Kim, P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, R. H. Berg, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6477–6481.
- [116] M. Footer, M. Egholm, S. Kron, J. M. Coull, P. Matsudaira, *Biochemistry* **1996**, 35, 10673–10679.
- [117] V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, S. H. Soennichsen, P. E. Nielsen, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 48, 1310–1313.
- [118] A. Peyman, E. Uhlmann, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1996**, 377, 67–70.
- [119] A. Peyman, M. Helsberg, G. Kretzschmar, M. Mag, A. Ryte, E. Uhlmann, *Antiviral Res.* **1997**, 33, 135–139.
- [120] P. Wittung, J. Kajanus, K. Edwards, P. Nielsen, B. Norden, B. G. Malmstroem, *FEBS Lett.* **1995**, 365, 27–29.
- [121] S. A. Noble, M. A. Bonham, J. E. Bisi, D. A. Bruckenstein, P. H. Brown, S. C. Brown, R. Cadilla, M. D. Gaul, J. C. Hanvey, C. F. Hassman, J. A. Josey, M. J. Luzzio, P. M. Myers, A. J. Pipe, D. J. Ricca, C. W. Su, C. L. Steveson, S. A. Thomson, R. W. Wiethe, L. E. Babiss, *Drug Dev. Res.* **1995**, 34, 184–195.
- [122] L. C. Boffa, P. L. Morris, E. M. Carpaneto, M. Louissaint, V. G. Allfrey, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 13228–13233.
- [123] J. C. Norton, M. A. Piatyszek, W. E. Wright, J. W. Shay, D. R. Corey, *Nature Biotechnol.* **1996**, 14, 615–619.
- [124] T. A. Vickers, M. C. Griffey, K. Ramasamy, L. M. Risen, S. M. Freier, *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 3003–3008.
- [125] S. Basu, E. Wickstrom, *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8, 481–488.

- [126] R. W. Taylor, P. F. Chinnery, D. M. Turnbull, R. N. Lightowers, *Nature Genet.* **1997**, *15*, 212–215.
- [127] C. Gambacorti-Passerini, L. Mologni, C. Bertazzoli, P. le Coutre, E. Marchesi, F. Grignani, P. E. Nielsen, *Blood* **1996**, *88*, 1411–1417.
- [128] P. Wittung, P. Nielsen, B. Norden, *Biochemistry* **1997**, *36*, 7973–7979.
- [129] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, *Gene* **1994**, *149*, 139–145.
- [130] D. Praseuth, M. Grigoriev, A.-L. Guicysse, L. L. Pritchard, A. Harel-Bellan, P. E. Nielsen, C. Helene, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1309*, 226–238.
- [131] L. C. Boffa, E. M. Carpaneto, V. G. Allfrey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 1901–1905.
- [132] H. J. Larsen, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 458–463.
- [133] M. Reiter, D. W. Will, S. Hein, G. Breipohl, J. W. Engels, E. Uhlmann, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [134] S. E. Hamilton, A. E. Pitts, R. R. Katipally, X. Jia, J. P. Rutter, B. A. Davies, J. W. Shay, W. E. Wright, D. R. Corey, *Biochemistry* **1997**, *36*, 11873–11880.
- [135] D. Wenninger, H. Seliger, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 761–768.
- [136] C. I. Martinez, K. Burgess, *Abstr. Pap. 213rd ACS National Meeting* (San Francisco, CA) **1997**, CARB-095.
- [137] A. De Mesmaeker, K.-H. Altmann, A. Waldner, S. Wendeborn, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 343–355.
- [138] M. Iyer, J. C. Norton, D. R. Corey, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 14712–14717.
- [139] U. Koppelhus, V. Zachar, P. E. Nielsen, X. Liu, J. Eugen-Olsen, P. Ebbesen, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2167–2173.
- [140] C. Carlsson, M. Jonsson, B. Norden, M. T. Dulay, R. N. Zare, J. Noolandi, P. E. Nielsen, L.-C. Tsui, J. Zielenksi, *Nature* **1996**, *380*, 207.
- [141] H. Perry-O'Keefe, X.-W. Yao, J. M. Coull, M. Fuchs, M. Egholm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 14670–14675.
- [142] H. Oerum, P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, C. Stanley, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5332–5336.
- [143] C. Thiede, E. Bayerdoerffer, R. Blasczyk, B. Wittig, A. Neubauer, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 983–984.
- [144] D. B. Demers, E. T. Curry, M. Egholm, A. C. Sozer, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 3050–3055.
- [145] M. Thisted, T. Just, K.-J. Pluzek, K. H. Petersen, J. J. Hyldig-Nielsen, S. E. Godtfredsen, *Cell Vision* **1996**, *3*, 358–363.
- [146] P. M. Lansdorp, N. P. Verwoerd, F. M. van de Rijke, V. Dragowska, M.-T. Little, R. W. Dirks, A. K. Raap, H. J. Tanke, *Hum. Mol. Genet.* **1996**, *5*, 685–691.
- [147] J. Wang, E. Palecek, P. E. Nielsen, G. Rivas, X. Cai, H. Shiraishi, N. Dontha, D. Luo, P. A. M. Farias, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7667–7670.
- [148] H. F. Arlinghaus, M. N. Kwoka, K. B. Jacobson, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3747–3753.
- [149] J. Weiler, H. Gausepohl, N. Hauser, O. N. Jensen, J. D. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2792–2799.
- [150] M. H. Hansen, L. L. Sode, J. J. Hyldig-Nielsen, J. Engberg, *J. Immunol. Methods* **1997**, *203*, 199–207.
- [151] V. Demidov, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2103–2107.
- [152] A. G. Veselkov, V. V. Demidov, P. E. Nielsen, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2483–2487.
- [153] A. G. Veselkov, V. V. Demidov, M. D. Frank-Kamenetskii, P. E. Nielsen, *Nature* **1996**, *379*, 214.
- [154] S. A. Strobel, P. B. Dervan, *Nature* **1991**, *350*, 172–174.
- [155] E. Jankowsky, G. Strunk, B. Schwenzer, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2690–2693.
- [156] P. E. Nielsen, *Methods Enzymol.* **1996**, *267*, 426–433.
- [157] M. Famulok, J. W. Szostak, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1001–1011; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 979–988.
- [158] W. Roush, *Science* **1997**, *276*, 1192–1193.
- [159] S. Akhtar, S. Agrawal, *Trends Pharm. Sci.* **1997**, *18*, 12–18.
- [160] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2034–2040.