

DNA-gesteuerte reversible Schaltung der Konformation und der Bioaktivität eines Peptids**

Lars Röglin, Mohammad R. Ahmadian und Oliver Seitz*

Das Schalten von Konformationen ist ein biologischer Schlüsselprozess, der die Funktion von Proteinen in Protein-Protein-Interaktionsnetzwerken reguliert. Die Bedeutung dieses Prozesses in der Zellkommunikation und die Aussicht, Signaltransduktionswege zu definierten Zeitpunkten zu beeinflussen, haben eine Suche nach schaltbaren Peptidkonjugaten ausgelöst.^[1] Es besteht die Erwartung, durch einen externen Stimulus, in Analogie zur Zellkommunikation, den konformativen Zustand und damit die Bioaktivität eines Peptids zu verändern. Häufig wurden Peptidmodifikationen verwendet, die bei Veränderung eines Reagens, des Lösungsmittels, des pH-Werts, der Metallionenkonzentration oder der Temperatur eine Konformationsumwandlung eingehen.^[2] Obwohl von hohem Interesse für die Untersuchung der Proteinfaltung, eignen sich diese Methoden nur bedingt für die Schaltung der Bioaktivität unter physiologischen Bedingungen. Für diesen Zweck eröffnet der Einbau photoisomerisierbarer Chromophore an definierten Stellen eines Peptids interessante Möglichkeiten.^[1a,3] Ein wichtiges Kriterium ist die Vollständigkeit der Photoschaltung, die mit den üblicherweise verwendeten Azobenzol-Photoschaltern schwierig zu erzielen ist.^[4] Kürzlich wurde die DNA-Hybridisierung dazu genutzt, die Aktivität eines modifizierten Proteins zu steuern.^[5] Hier präsentieren wir ein neues Konzept zur Steuerung des konformativen Zustands eines Peptidliganden unter physiologischen Bedingungen. Es wird gezeigt, dass die Nucleinsäure-Hybridisierung als Auslöser für Änderungen der Bioaktivität eines Peptids verwendet werden kann. Als Beispiel wird die Affinität eines Peptids zu einem Protein der zellulären Signaltransduktion reversibel und nach Belieben erhöht oder verringert.

Das betreffende Peptid wird hierzu mit DNA-analogen, nicht-komplementären Armsegmenten einer Peptidnuclein-

säure (PNA, peptide nucleic acid) ausgestattet, die den C- und N-Terminus flankieren (Abbildung 1).^[6] Folglich führt die Zugabe von komplementärer DNA zur PNA-Peptid-

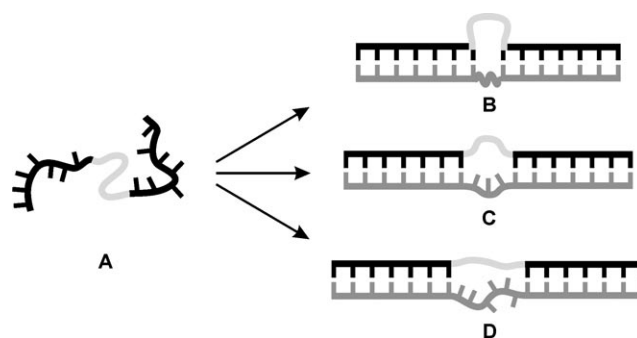


Abbildung 1. Hybridisierungsbasierte Steuerung der Peptidkonformation: Die Zugabe komplementärer oder teilweise komplementärer DNA zur Nucleinsäure-Peptid-Chimäre **A** führt zur Bildung der Duplexe **B–D**. Flexible Bereiche sind wellenförmig dargestellt. (Die Darstellung illustriert mögliche Konformationen und keine definierten Strukturen.)

Chimäre **A** die Bildung der doppelsträngigen Komplexe **B**, **C** und **D** herbei. Die doppelhelicalen Segmente in **B**, **C** und **D** dienen dazu, die konformative Flexibilität des eingebetteten Peptids zu beschränken. In Abhängigkeit vom DNA-Templat könnten unterschiedliche Geometrien realisiert werden, von der Stabilisierung der Loop-Konformationen in **B** bis hin zur verstärkten Neigung von **D**, gestreckte Konformationen einzunehmen. Nach diesem Modell dient die DNA als Strukturtemplat, durch das die PNA-Peptid-Chimäre **A** entweder aktiviert oder deaktiviert werden kann. Die Attraktivität des Konzepts wird durch die Möglichkeit, zellendogene mRNA als Stimulus des Aktivierungs- und Desaktivierungsprozesses zu verwenden, noch vergrößert.

In einer Musterstudie haben wir die schaltbare Bindung eines Phosphopeptids an die Src-SH2-Domäne untersucht.^[7–9] Die Tyrosinkinase-Aktivität von Src wird durch die SH2-Domäne reguliert, die an ein C-terminales, Phosphotyrosin (pTyr) enthaltendes Segment binden kann.^[10] Die Analyse der Kristallstruktur von Src-SH2 mit pTyr enthaltenden Peptiden zeigt, dass diese in einer gestreckten Konformation gebunden werden.^[11] Wir erwarteten, dass Strukturen, die eine gestreckte Konformation stabilisieren, zu einem Anstieg der Bindungsaktivität führen. Eine Verringerung der Bindungsaktivität wurde für die Fälle erwartet, in denen das Phosphopeptid gezwungen wird, eine Loop-Konformation einzunehmen.

Das Design der schaltbaren Src-SH2-Binder beruht auf der Analyse der Kristallstruktur des bekannten hochaffinen

[*] Dipl.-Chem. L. Röglin, Prof. Dr. O. Seitz
Institut für Chemie
Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-2093-7266
E-Mail: oliver.seitz@chemie.hu-berlin.de

Priv.-Doz. Dr. M. R. Ahmadian
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)

[**] Wir danken der Volkswagen-Stiftung für finanzielle Unterstützung sowie Lars Hemsath und Patricia Stege (Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund) für die Bereitstellung der Expressionsvektoren und Hilfe bei den Proteinexpressionsexperimenten.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Liganden Glu-Pro-Gln-pTyr-Glu-Glu-Ile-Tyr-Leu im Komplex mit Src-SH2. Die Kristallstruktur zeigt starke Bindungen der SH2-Domäne zu pTyr und Isoleucin sowie zum Glutaminrest Gln(–1) am N-Terminus der bevorzugten Erkennungssequenz (unterstrichen).^[11] Daher entschieden wir uns, die konformative Schaltbarkeit des Pentapeptids Gln-pTyr-Glu-Glu-Ile zu untersuchen. Zunächst wurde die Stabilität der Komplexe aus Chimäre und DNA untersucht. Dafür wurden drei PNA-Phosphopeptid-PNA-Chimären mit 7mer-(1), 8mer-(2) und 9mer-Armsegmenten (3) synthetisiert (Abbildung 2; siehe auch Hintergrundinformationen). Die

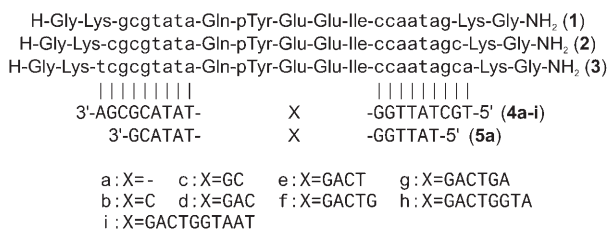


Abbildung 2. In dieser Studie verwendete Chimären-DNA-Komplexe; Kleinbuchstaben stehen für PNA-Basen, Großbuchstaben für DNA-Basen, und die Aminosäuren sind im Dreibuchstabencode dargestellt, wobei pTyr für Phosphotyrosin steht. Die terminalen Lysin-Reste wurden zur Erhöhung der Löslichkeit angefügt.

PNA-Phosphopeptid-Chimären wurden mit den DNAs 4a–4i hybridisiert, die vollständig komplementär zu den 9mer-Armsegmenten sind und keine oder 1–6, 8 und 10 zusätzliche ungepaarte Nucleotide gegenüber dem Peptidsegment enthalten. Alle untersuchten Chimären-DNA-Komplexe zeigten sigmoidale Schmelzkurven, was eine kooperative Basenpaarung belegt (Hintergrundinformationen). Zwei Trends wurden hierbei offensichtlich: Zum einen sank die thermische Stabilität mit der steigenden Zahl ungepaarter Nucleotide (d.h. innerhalb einer Reihe in Tabelle 1), zum anderen stieg

Tabelle 1: Schmelztemperaturen (in °C) der Komplexe der PNA-Peptid-PNA-Chimären (1–3) mit den entsprechenden DNAs 4.

	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g	4h	4i
1	60	49	46	41	44	46	44	42	41
2	65	56	52	53	50	53	51	51	50
3	67	59	56	56	56	56	55	54	51

die thermische Stabilität mit steigender Länge der PNA-Arme (d.h. innerhalb einer Spalte in Tabelle 1). Die Schmelztemperaturen von $T_M \geq 40^\circ\text{C}$ scheinen ausreichend hoch, um die strukturelle Integrität in den Proteinbindungsexperimenten aufrechtzuerhalten.

Zur Untersuchung der Affinität der PNA-Phosphopeptid-Chimäre 2 und ihrer DNA-Komplexe zur Src-SH2-Domäne wurde ein von Lynch und Mitarbeitern entwickelter Wettbewerbsassay mit Fluoreszenzpolarisationsanalyse verwendet.^[12] Die Verwendung des fluoreszenzmarkierten Peptids FAM-Gly-pTyr-Glu-Glu-Ile-Ala-NH₂ (6; $K_d = 0.24 \mu\text{M}$) er-

möglicht die Bestimmung des Peptidanteils, der bei unterschiedlichen Chimärenkonzentrationen an das Protein gebunden ist. Die freie Chimäre 2 inhibierte die Bindung des Referenzpeptids 6 mit $\text{IC}_{50} = 3.4 \mu\text{M}$ (Tabelle 2). Die Zugabe

Tabelle 2: IC_{50} -Werte (in μM) mit abgeschätzten Fehlern (\pm in μM) der Chimäre 2 und ihrer Komplexe mit den DNAs 4a–i.

	2	2-4a	2-4b	2-4c	2-4d	2-4e	2-4f	2-4g	2-4h	2-4i
IC_{50}	3.4	6.9	2.9	1.0	0.7	0.7	0.6	0.5	0.6	0.6
Fehler	0.4	1.0	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

von 3 Äquivalenten DNA 4a, die keine zusätzlichen ungepaarten Nucleotide enthält, reduzierte die Affinität zur SH2-Domäne, wie durch den gestiegenen IC_{50} -Wert von $6.9 \mu\text{M}$ belegt wird. Alle untersuchten DNAs, die im Komplex mehr als ein ungepaartes Nucleotide gegenüber dem Peptid aufspannten (4c–4i), induzierten signifikante Erhöhungen der Affinität der Phosphopeptidchimäre 2. Das Maximum des DNA-induzierten Affinitätsanstiegs wurde mit der DNA 4g ($\text{IC}_{50} = 0.5 \mu\text{M}$) erreicht, die sechs ungepaarte Nucleotide enthielt. Der Unterschied der IC_{50} -Werte überspannt mehr als eine Größenordnung. Dies sollte ausreichen, um von annähernd keiner bis hin zu annähernd vollständiger Inhibierung der Proteinbindung zu schalten.

Die Experimente belegten, dass das kürzere PNA-Phosphopeptid 1 ebenfalls durch DNA geschaltet werden kann. Das Ausmaß der Inhibierung bei gegebenen Bedingungen kann durch Vergleich der partiellen Inhibierung ($f_i = 1 - (\text{Anteil gebundenes Referenzpeptid } 6) = \text{Anteil gebundene Chimäre } 1 \text{ bzw. Komplex } 1-4)$ bestimmt werden. Abbildung 3 belegt, dass $1.25 \mu\text{M}$ Chimäre 1 etwa 18% der Inter-

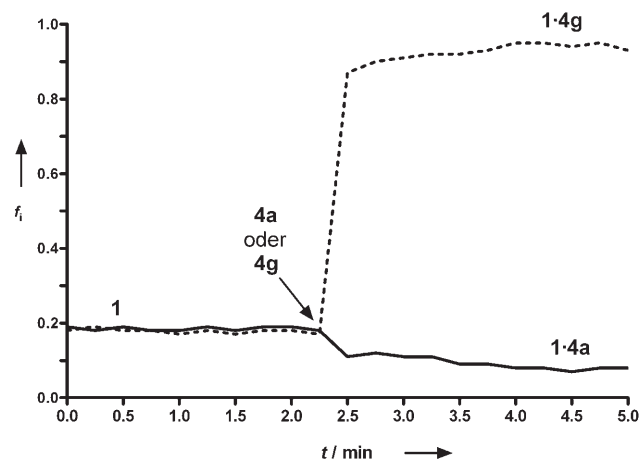


Abbildung 3. Schalten der partiellen Inhibierung (f_i) der Bindung von Peptid 6 an Src-SH2 durch die Chimäre 1 bei Zugabe der DNAs 4a (durchgezogene Linie) und 4g (gestrichelte Linie). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der DNA-Zugabe. Die Experimente konnten mit DNAs mit einem längeren Überhang reproduziert werden. Die f_i -Werte wurden aus der Fluoreszenzanisotropie von 6 bei einer Anregungs- und Emissionswellenlänge von 485 bzw. 525 nm berechnet. Bedingungen: $1.25 \mu\text{M}$ 1 im Puffer (20 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, 2 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT), pH 7.4, 0.1% Rinderserumalbumin (BSA)) mit 20 nM 6 und 700 nM GST-Src-SH2.

aktion zwischen Src-SH2 (700 nM) und dem FAM-markierten Referenzpeptid **6** (20 nM) inhibiert. Die Zugabe eines Äquivalents der aktivierenden DNA **4g** setzte das Referenzpeptid **6** nahezu quantitativ aus dem Komplex in die Lösung frei, woraus ein Anstieg der partiellen Inhibierung auf 95 % resultierte. Im Unterschied dazu reduzierte die Zugabe der desaktivierenden DNA **4a** zu **1** die partielle Inhibierung von 18 % auf 7 %. Kontrollexperimente mit dem nichtmarkierten Peptid Ac-Gln-pTyr-Glu-Glu-Ile-NH₂ (**7**) als kompetitivem Binder zeigten, dass weder DNA **4a** noch DNA **4g** direkt als allosterische Regulatoren auf Src-SH2 wirken (Hintergrundinformationen).

Hauptziel dieser Arbeit war es, zu erkunden, ob durch DNA-Hybridisierung reversible Schaltvorgänge induziert werden können. Wir vermuteten, dass Strangaustauschreaktionen die benötigte strukturelle Reorganisation vermitteln könnten. Ein Beispiel ist in Abbildung 4 gezeigt. Der Komplex von Chimäre **1** mit DNA **5a** wurde durch die fehlenden ungepaarten Nucleotide so gewählt, dass er nur eine geringe Affinität zu Src-SH2 hat. Wie erwartet, war **1·5a** bei einer Konzentration von 1.25 μ M nicht in der Lage, die Proteinbindung des Referenzpeptids **6** zu inhibieren. Der desaktivierende DNA-Strang **5a** wurde so gestaltet, dass er durch die aktivierende DNA **4g** ausgetauscht werden kann. Der Strangaustausch sollte durch die Bildung zweier zusätzlicher stabiler Basenpaare angetrieben werden. Tatsächlich führte die Zugabe von DNA **4g** zum Komplex **1·5a** zu einem drastischen Anstieg der Bindungsaffinität von Chimäre **1**. DNA **4g** wirkte demnach als starker Aktivator, und der Strangaustausch führte zu einem Anstieg der partiellen Inhibierung auf 96 %.

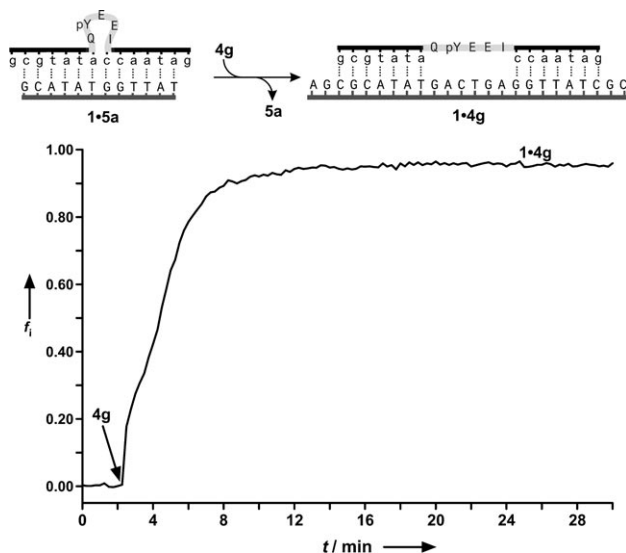


Abbildung 4. Aktivierung des desaktivierten Peptidkonjugats **1·5a** durch Strangaustausch liefert den aktivierten Komplex **1·4g**. Das Experiment konnte mit DNAs mit einem längeren Überhang reproduziert werden. Die Werte der partiellen Inhibierung (f_i) wurden wie in Abbildung 3 angegeben berechnet. Bedingungen: 1.25 μ M **1** im Komplex mit 2 μ M **5a** im Puffer (20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7.4, 0.1 % BSA) mit 20 nM **6** und 700 nM GST-Src-SH2, Zugabe von 10 μ M **4g** nach 135 Sekunden.

Ein Beispiel zur reversiblen Schaltung der Peptidaktivität ist in Abbildung 5 dargestellt. Zunächst wurde die Chimäre **1** mit DNA **4g** versetzt. Der resultierende Komplex **1·4g** zeigte

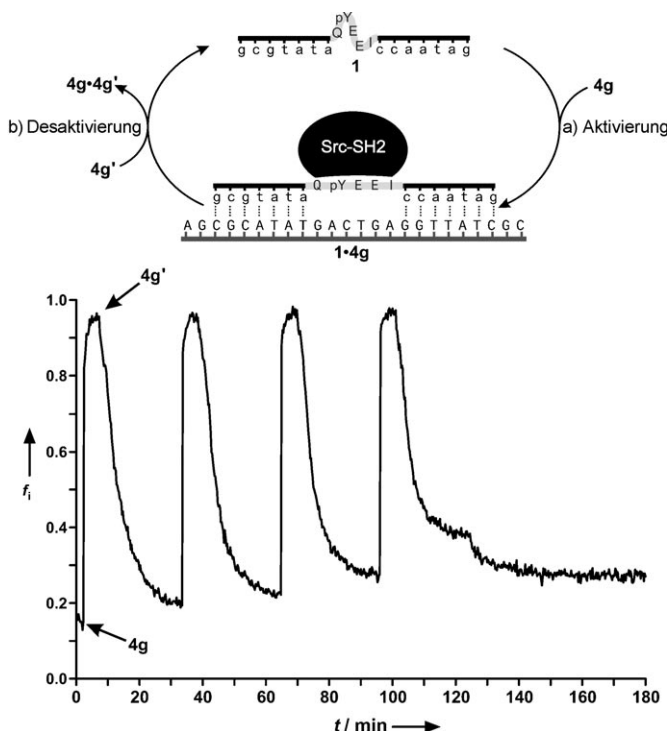


Abbildung 5. Reversible Schaltung der Peptidaktivität durch abwechselnde Zugabe der DNAs **4g** und **4g'** zur Chimäre **1**. Die Werte der partiellen Inhibierung (f_i) wurden wie in Abbildung 3 angegeben berechnet. Bedingungen: 1.25 μ M **1** im Puffer (20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7.4, 0.1 % BSA) mit 20 nM **6** und 700 nM GST-Src-SH2; dann abwechselnde Zugabe ansteigender Mengen an DNAs **4g** und **4g'** beginnend mit 1.25 μ M **4g** und endend bei 20 μ M **4g'**. Um den Schaltvorgang abzuschließen, wurden nach 125 min weitere 5 μ M DNA **4g'** zugegeben.

eine hohe Bindungsaffinität zu Src-SH2 und vermittelte daher eine hohe partielle Inhibierung ($f_i = 0.96$). Der Überhang an den Termini von insgesamt vier Nucleotiden und die sechs ungepaarten internen Nucleobasen im Komplex **1·4g** wurden durch DNA **4g'** adressiert, die vollständig komplementär zur DNA **4g** ist. Folglich setzt die Zugabe von **4g'** die Chimäre **1** frei, indem DNA **4g** im Komplex **4g·4g'** abgefangen wird.^[13] Demzufolge sinkt die partielle Inhibierung wieder auf einen kleinen Wert ($f_i = 0.20$). Die beiden Schaltvorgänge – a) Aktivierung durch Zugabe von **4g** und b) Desaktivierung durch Zugabe von **4g'** – können mehrfach wiederholt werden. Der rasche Aktivierungsvorgang (< 2 min) umfasst die sehr schnelle Hybridisierung (sollte im Millisekunden-Bereich ablaufen)^[14] und die Verdrängung des proteingebundenen Peptids **6**, das sich in einem dynamischen Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht befindet.^[15] Demgegenüber benötigt die Desaktivierung wegen des vergleichsweise langsamen Strangaustauschs deutlich mehr Zeit (ca. 25 min). Abbildung 5 zeigt vier aufeinander folgende Schaltvorgänge, und weitere sind möglich (siehe Hintergrundinformationen).

Es existieren zahlreiche Beispiele, in denen DNA dazu verwendet wurde, den konformativen Zustand DNA- und RNA-basierter Strukturen zu steuern.^[16] Beispielsweise wurde die DNA-Hybridisierung genutzt, um DNA-Pinzetten zu öffnen und zu schließen,^[13] um „DNA-Walking“ zu steuern^[17] und um die Aktivität von Aptameren, Ribozymen^[18] und DNA-bindenden Proteinen^[19] zu regulieren. Erst kürzlich wurde die DNA-Hybridisierung dazu verwendet, die Aktivität von DNA-Protein-Konjugaten über das Anlegen einer mechanischen Spannung zu steuern.^[5] Für die Schaltbarkeit war es erforderlich, dass die Proteine – Guanylatkinase und Proteinkinase A – ortsspezifisch mutagenisiert und durch divalente Anbindung eines 60mer-DNA-Steuerungselements modifiziert wurden. Die Reversibilität des Schaltvorgangs wurde nicht gezeigt. Anstatt die Konformation eines modifizierten Proteins zu verändern, wählten wir einen Ansatz, der die reversible Erhöhung und Verringerung der Aktivität eines Peptids als Ligand eines Wildtyp-Proteins bewirkt. Ein solcher Ansatz sollte Anwendungen in der Zellbiologie ermöglichen. Wir konnten erstmalig nachweisen, dass die DNA-Hybridisierung für beides genutzt werden kann: zur Absenkung und zur Steigerung der Proteinbindungsaffinität von PNA-Peptid-Konjugaten wie **1** und **2**. Die Verminderung der Aktivität durch DNA **4a** könnte dadurch induziert werden, dass das Peptid in **1-4a** dazu gezwungen wird, eine von Src-SH2 nicht bevorzugte Loop-Konformation einzunehmen. Die Erhöhung der Bindungsaffinität, wie sie die Zugabe von DNA wie **4g** zu PNA-Peptid-Chimären auslöst, kann erklärt werden, indem man die Tendenz des Peptids berücksichtigt, die benötigte lineare Konformation einzunehmen. Einzelsträngige Chimären sind flexible Moleküle, die ebenfalls lineare Konformationen einnehmen können. Der $IC_{50} = 3.4 \mu\text{M}$ von Chimäre **2** ist geringer als der $IC_{50} = 5.5 \mu\text{M}$ des nichtmarkierten Pentapeptids Ac-Gln-pTyr-Glu-Glu-Ile-NH₂ (**7**). Daher können negative Einflüsse der PNA-Segmente in Chimäre **2** auf die Bindungsaffinität ausgeschlossen werden. Die Hybridisierung der PNA-Arme schränkt die konformative Freiheit des Peptids ein, das in aktivierten Komplexen, wie **1-4g** oder **2-4g**, die benötigte gestreckte Konformation einfacher einnehmen könnte als in der einzelsträngigen Chimäre. Dennoch sind die einzelsträngigen Abschnitte dieser Komplexe immer noch flexibel, und es ist vorstellbar, das rigidere doppel- oder tripelhelicale Spacer sogar noch höhere Bindungsaffinitäten ermöglichen. Um den aktivierenden Effekt des einzelsträngigen DNA-Bereichs zu analysieren, untersuchten wir die Bindung von Chimäre **3**, wobei die PNA-Armsegmente mit den unbundenen DNA-Oligomeren 5'-TGCTATTGG-3' und 5'-TATACGCGA-3' hybridisiert wurden. Der resultierende $IC_{50} = 1.0 \mu\text{M}$ legt nahe, dass auch die Bildung einer Doppelhelix der beiden Armsegmente für sich bereits einen Anstieg der Bindungsaktivität bewirkt, wenn auch nicht in dem Ausmaß, das bei Verwendung der „verbundenen“ DNA **4g** beobachtet wurde. Es kann darüber spekuliert werden, ob die Coulomb-Abstoßung zwischen den beiden negativ geladenen Duplex-Enden einen alternativen, wenn auch weniger effizienten Weg bietet, die Population an Molekülen in gestreckter Konformation zu erhöhen.^[20]

Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der DNA-gesteuerten Änderungen der Bindungsaffinität sollten genügen, um Protein-Protein-Wechselwirkungen in zellulären Signaltransduktionsnetzwerken zu regulieren. Falls es gelingt, Chimären wie **1** (oder DNA-Komplexe wie **1-5a**) in eine Zelle einzuschleusen (z. B. durch Mikroinjektion, Elektroporation oder Transfektion), wäre die Aktivierung und Desaktivierung durch intrazelluläre RNA eine interessante Möglichkeit, ein Signalprotein wie Src unter der Kontrolle einer bestimmten endogenen RNA zu stellen. Vor solchen Studien werden wir zunächst die Fähigkeit von Nucleinsäure-Peptid-Chimären wie **1** untersuchen, die Enzymaktivität in Zell-Lysaten zu regulieren.

Eingegangen am 21. September 2006,
veränderte Fassung am 19. Dezember 2006
Online veröffentlicht am 2. März 2007

Stichwörter: DNA · Fluoreszenzpolarisation · Hybridisierung · Nucleinsäuren · Peptide

- [1] a) O. Pieroni, A. Fissi, N. Angelini, F. Lenci, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 9–17; b) D. S. Lawrence, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 570–575.
- [2] a) M. Mutter, R. Hersperger, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 195–197; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 185–187; b) M. Mutter, R. Gassmann, U. Buttke, K.-H. Altmann, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1504–1506; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1514–1516; c) G. P. Dado, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 12609–12610; d) L. Gonzalez, J. J. Plecs, T. Alber, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, 3, 510–515; e) S. G. Zhang, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 23–28; f) M. Mutter, A. Chandravarkar, C. Boyat, J. Lopez, S. Dos Santos, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Patiny, L. Saucède, G. Tuchscherer, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 4267–4273; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4172–4178; g) J. M. Smeenk, M. B. J. Otten, J. Thies, D. A. Tirell, H. G. Stunnenberg, J. C. M. van Hest, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2004–2007; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1968–1971; h) E. Cerasoli, B. K. Sharpe, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15008–15009; i) K. Pagel, T. Vagt, T. Kohajda, B. Koksche, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 2500–2502; j) K. Pagel, S. C. Wagner, K. Samedov, H. von Berlepsch, C. Böttcher, B. Koksche, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2196–2197; k) J. Hentschel, E. Krause, H. G. Börner, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 7722–7723.
- [3] I. Willner, *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 347–356.
- [4] a) M. Goodman, M. L. Falxa, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 3863–3867; b) R. Behrendt, C. Renner, M. Schenk, F. Q. Wang, J. Wachtveitl, D. Oesterheld, L. Moroder, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2941–2943; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2771–2774; c) J. R. Kumita, O. S. Smart, G. A. Woolley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 3803–3808; d) A. Cattani-Scholz, C. Renner, C. Cabrele, R. Behrendt, D. Oesterheld, L. Moroder, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 299–302; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 289–292; e) L. Guerrero, O. S. Smart, C. J. Weston, D. C. Burns, G. A. Woolley, R. K. Allemann, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7956–7960; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7778–7782; f) C. Renner, L. Moroder, *ChemBioChem* **2006**, 7, 868–878.
- [5] a) B. Choi, G. Zocchi, Y. Wu, S. Chan, L. J. Perry, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, 95, 78102; b) B. Choi, G. Zocchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 8541–8548.
- [6] a) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, 254, 1497–1500; b) P. E. Nielsen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, 12, 16–20.

- [7] a) T. Pawson, G. D. Gish, *Cell* **1992**, *71*, 359–362; b) T. Pawson, J. Schlessinger, *Curr. Biol.* **1993**, *3*, 434–442; c) T. Pawson, J. D. Scott, *Science* **1997**, *278*, 2075–2080.
- [8] a) S. M. Thomas, J. S. Brugge, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13*, 513–609; b) S. J. Parsons, J. T. Parsons, *Oncogene* **2004**, *23*, 7906–7909.
- [9] X. Q. Liu, T. Pawson, *Recent Prog. Horm. Res.* **1994**, *49*, 149–160.
- [10] a) X. Q. Liu, S. R. Brodeur, G. Gish, Z. Songyang, L. C. Cantley, A. P. Laudano, T. Pawson, *Oncogene* **1993**, *8*, 1119–1126; b) G. S. Martin, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 467–475; c) N. H. Nam, G. F. Ye, G. Q. Sun, K. Parang, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3131–3141; d) R. Roskoski, Jr., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *324*, 1155–1164.
- [11] G. Waksman, S. E. Shoelson, N. Pant, D. Cowburn, J. Kuriyan, *Cell* **1993**, *72*, 779–790.
- [12] B. A. Lynch, K. A. Loiacono, C. L. T'iong, S. E. Adams, I. A. MacNeil, *Anal. Biochem.* **1997**, *247*, 77–82.
- [13] B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, F. C. Simmel, J. L. Neumann, *Nature* **2000**, *406*, 605–608.
- [14] K. K. Jensen, H. Ørum, P. E. Nielsen, B. Nordén, *Biochemistry* **1997**, *36*, 5072–5077.
- [15] G. Payne, S. E. Shoelson, G. D. Gish, T. Pawson, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 4902–4906.
- [16] a) U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1888–1910; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1856–1876; b) C. V. Miduturu, S. K. Silverman, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1952–1955; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1918–1921.
- [17] a) J. S. Shin, N. A. Pierce, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10834–10835; b) P. Yin, H. Yan, X. G. Daniell, A. J. Turberfield, J. H. Reif, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5014–5019; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4906–4911; c) Y. Tian, Y. He, Y. Chen, P. Yin, C. D. Mao, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4429–4432; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4355–4358.
- [18] a) M. Araki, Y. Okuno, Y. Hara, Y. Sugiura, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3379–3384; b) M. P. Robertson, A. D. Ellington, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 62–66; c) M. Famulok, G. Mayer, M. Blind, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 591–599.
- [19] W. Shen, M. F. Bruist, S. D. Goodman, N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4854–4856; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4750–4752.
- [20] Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die PNA-Phosphopeptid-Chimären bei der DNA-Hybridisierung negative Ladungen erwerben. Dass multiphosphorylierte Peptide mit SH2-Domänen wechselwirken, konnte belegt werden: T. Gilmer, M. Rodriguez, S. Jordan, R. Crosby, K. Alligood, M. Green, M. Kimery, C. Wagner, D. Kinder, P. Charifson, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 31711–31719. Es ist festzustellen, dass die Einführung der Phosphodiestergruppen bei Hybridisierung mit DNA **4a** und **5a** die Bindungsaffinität des Peptids vermindert, was ohne Berücksichtigung konformativer Effekte schwierig zu verstehen ist. Es ist denkbar, dass die DNA-Hybridisierung sowohl konformative als auch Ladungseinflüsse ausübt und beide genutzt werden können, die Bindungsaffinität von PNA-Peptid-Chimären zu schalten.