

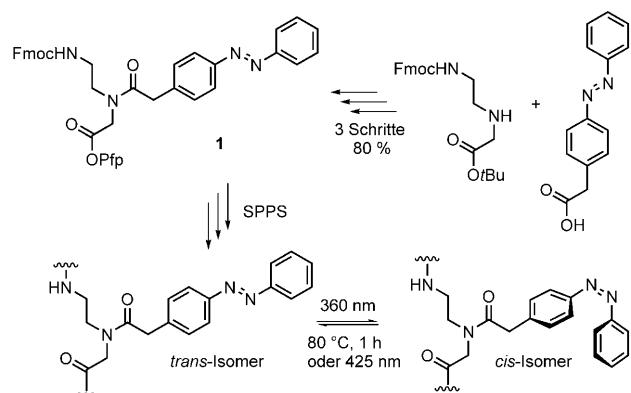
Photokontrolle der PNA-DNA-Hybridisierung**

Thorsten Stafforst* und Donald Hilvert*

Der Einbau photochromer Verbindungen in Oligonukleotide ermöglicht es, deren Struktur und Funktion unter hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung mit Licht zu schalten.^[1] Photolabile Schutzgruppen wurden bereits vielfach genutzt, um Oligonukleotide gezielt durch Belichtung freizusetzen.^[1c] In neueren Verfahren wurde die reversible Manipulation der Hybridisierung durch Modifizierung von Oligonukleotiden mit einem Photoschalter erreicht, der zwischen zwei geometrisch sehr unterschiedlichen Isomeren geschaltet werden kann.^[2,3] Hier zeigen wir, dass diese Strategie besonders effizient mit Peptidnukleinsäuren (PNAs) gelingt. Der Einbau eines einzelnen Photoschalters in einen kurzen PNA-Strang ermöglicht eine exzellente Photokontrolle im Triplexpaarungsmodus und kann zur Kontrolle von Transkription mit Licht genutzt werden. Solche Verbindungen haben ein beachtliches Potenzial für Biotechnologie, Diagnostik, Nanotechnologie und Medizin.

PNA ist ein synthetisches Nukleinsäureanalogon, in welchem die kanonischen Nukleobasen über ein *N*-(2-Aminooethyl)glycin-Rückgrat verbunden sind.^[4] Trotz des künstlichen Rückgrats werden DNA und RNA sequenzspezifisch über die Watson-Crick- oder die Hoogsteen-Bindungsseite erkannt.^[5] Aufgrund der hohen Affinität und Sequenzspezifität in Kombination mit ihrer guten physiologischen Stabilität sind PNAs den natürlichen Nukleinsäuren oft überlegen, etwa bei der Steuerung biochemischer Prozesse wie Transkription,^[6,7] Translation,^[8] RNA-Spleißen^[9] und Telomeraseaktivität.^[10] Um solche Prozesse mit Licht zu regulieren, haben wir den Fmoc-geschützten Azobenzolbaustein **1** (Schema 1) hergestellt, der in PNA-Oligomere eingebaut werden kann.

Der Baustein **1** wurde in einer einfachen Synthese in drei Schritten aus kommerziell zugänglichen Ausgangsstoffen hergestellt (siehe die Hintergrundinformationen). Seine photochromen Eigenschaften gleichen denen anderer Azobenzolderivate. Im thermischen Gleichgewicht liegt der Photoschalter zu über 90% in der *trans*-Konfiguration vor. Die Belichtung bei 360 nm bewirkt die Umwandlung des *trans*-Isomers in das *cis*-Isomer, und im Photogleichgewicht



Schema 1. Der Azobenzol-modifizierte Baustein **1** zum Einbau in PNA. Durch Bestrahlen kann das Azobenzol zwischen der planaren *trans*- und der sperrigeren *cis*-Form geschaltet werden. Fmoc = Fluorenylmethylcarbamat; Pfp = Pentafluorophenyl; SPPS = Festphasen-Peptidsynthese.

liegt ein Gehalt an 87% *cis*-Isomer vor. Die Isomerisierung kann thermisch oder durch Belichten umgekehrt werden. Bei 425 nm wird eine *trans/cis*-Mischung von 80:20 erhalten.

Um den Einfluss Azobenzol-modifizierter PNA auf die Hybridisierung mit Nukleinsäuren zu untersuchen, wurde der Baustein **1** entweder C- oder N-terminal in zwei repräsentative PNA-Sequenzen eingebaut. Während die cattcac-Sequenz mit komplementären einsträngigen Nukleinsäuren Duplexe bildet, kann die t₇-Sequenz Nukleinsäuren im PNA₂-DNA-Modus binden. Wie üblich wurden alle PNAs als C-terminale Carboxamide hergestellt, am N-Terminus acetyliert und mit Lysinresten versehen, um ihre Wasserlöslichkeit zu erhöhen (Tabelle 1). Analoge PNAs ohne den Photoschalter wurden als Kontrolle verwendet.

PNA-Oligomere wurden per Festphasen-Peptidsynthese in guten Ausbeuten hergestellt^[11] und mithilfe von HPLC gereinigt. Vor der Hybridisierung wurden die PNA-Derivate jeweils entweder thermisch (80°C, 1 h) oder durch Belichtung (360 nm) mit dem *trans*- bzw. *cis*-Isomer angereichert. Anschließend wurden sie in neutralem Phosphatpuffer zu komplementärer einsträngiger DNA gegeben, und die Komplexbildung wurde in Abhängigkeit von der Temperatur UV-spektroskopisch verfolgt. Die Schmelzkurven wiesen einen einstufigen sigmoidalen Verlauf auf, was die Bestimmung der thermodynamischen Parameter aus konzentrationsabhängigen Schmelztemperaturen (T_m) ermöglichte.^[12] Obwohl sich das *cis*-Azobenzol beim Erhitzen über 80°C spontan und beinahe vollständig (> 95%) in das *trans*-Isomer umwandelt, so ist es doch ausreichend stabil, um zuverlässige Schmelzkurven zu erhalten, solange die T_m -Werte unter 60°C liegen (die Halbwertszeit des *cis*-Isomers beträgt 13.5 h bei 50°C; siehe die Hintergrundinformationen).

[*] Dr. T. Stafforst, Prof. Dr. D. Hilvert
Laboratorium für Organische Chemie, ETH Zürich
Hönggerberg HCI F339, 8093 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 44-632-1486
E-Mail: stafforst@org.chem.ethz.ch
hilvert@org.chem.ethz.ch
Homepage: <http://www.protein.ethz.ch>

[**] Diese Arbeit wurde großzügig unterstützt durch die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina (Bundesministerium für Bildung und Forschung BMBF-LPD 9901/8-158) und die ETH Zürich.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201004548> zu finden.

Tabelle 1: Aus den Schmelzkurven abgeleitete Parameter der PNA-DNA-Hybride.^[a]

Azb	Schmelzparameter			Stapelwechselwirkung		cis-trans-Diskriminierung	
	T_m [°C]	ΔG^{298} [kcal mol ⁻¹]	ΔT_m [°C]	$\Delta \Delta G^{298}$ [kcal mol ⁻¹]	ΔT_m [°C]	$\Delta \Delta G^{298}$ [kcal mol ⁻¹]	
PNA-DNA-Duplex							
AcGly-Lys-(cattcac)-Lys-GlyNH ₂	–	40.3	-10.7 ± 0.1	–	–	–	–
AcGly-Lys-(cattcac Azb)-Lys-GlyNH ₂	trans	47.6	-12.1 ± 0.2	7.3	-1.4	2.5	-0.2
AcGly-Lys-(<u>Azb</u> cattcac)-Lys-GlyNH ₂	cis	45.1	-11.9 ± 0.3	4.8	-1.2		
AcGly-Lys-(<u>Azb</u> cattcac)-Lys-GlyNH ₂	trans	46.8	-11.8 ± 0.2	6.5	-1.1	4.2	-0.7
AcGly-Lys-(<u>Azb</u> cattcac)-Lys-GlyNH ₂	cis	42.6	-11.1 ± 0.2	2.3	-0.4		
PNA₂-DNA-Triplex							
Ac(ttttttt)-Lys-Lys-GlyNH ₂	–	50.8	-22.2 ± 0.2	–	–	–	–
Ac(ttttttt Azb)-Lys-Lys-GlyNH ₂	trans	66.0	-29.7 ± 0.4	15.2	-7.5	13.4	-6.7
Ac(ttttttt)-Lys-Lys-GlyNH ₂	cis	52.6	-23.0 ± 0.4	1.8	-0.8		
Ac(Azb ttttttt)-Lys-Lys-GlyNH ₂	trans	59.5	-25.1 ± 0.6	8.7	-2.9	7.3	-3.5
Ac(Azb ttttttt)-Lys-Lys-GlyNH ₂	cis	52.2	-21.6 ± 0.5	1.4	$+0.6$		

[a] Die Schmelztemperaturen (T_m) wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer, 100 mM NaCl, pH 7.0 gemessen, mit Oligomerkonzentrationen von $[\text{CATC GTATGA ATG CTAC}] = 3.0 \mu\text{M}$, $[\text{PNA}] = 3.0 \mu\text{M}$ für duplexbildende PNAs, und $[\text{CGTTAAAAAAATTGC}] = 3.0 \mu\text{M}$, $[\text{PNA}] = 6.0 \mu\text{M}$ für triplexbildende PNAs; Indices: *cis* = Photogleichgewicht (360 nm) mit *cis/trans* 87:13; *trans* = thermisches Gleichgewicht (80 °C) *cis/trans* 5:95; der Standardfehler der Schmelztemperaturen (T_m) wurde zu $\pm 0.5^\circ\text{C}$ geschätzt; die Fehler für ΔG^{298} entsprechen den Standardabweichungen vom Mittelwert von jeweils wenigstens vier unabhängigen Messungen; Stapelwechselwirkung: $\Delta \Delta G^{298} = (\Delta G^{298} \text{ mit Modifikation} - \Delta G^{298} \text{ ohne Modifikation})$ und $\Delta T_m = (T_m(\text{modifiziert}) - T_m(\text{Referenz}))$; *cis-trans*-Diskriminierung: $\Delta T_m = (T_m^{\text{trans}} - T_m^{\text{cis}})$; $\Delta \Delta G^{298} = (\Delta G^{298}(\text{trans}) - \Delta G^{298}(\text{cis}))$; Gly = Glycin; Lys = Lysin; Ac = N-Acetyl; NH₂ = Carboxamid; der Einbau von 1 ist durch Azb gekennzeichnet.

Das PNA-Oligomer der Sequenz cattcata bildet mit dem DNA-Oligomer 5'-d(CATCGTATGAATGCTAC) einen antiparallelen helicalen Duplex durch Bindung an die komplementäre Paarungsstelle (fett gedruckt). Durch Anfügen des Azobenzol-Photoschalters an den N- oder C-Terminus wird der Duplex um 0.4 bis 1.4 kcal mol⁻¹ stabilisiert (Tabelle 1). Diese Werte sind vergleichbar mit der Stabilisierung von Doppelstrang-DNA durch überhängende aromatische Gruppen wie Benzol ($\Delta G = -0.7 \text{ kcal mol}^{-1}$) und Naphthalin ($\Delta G = -1.45 \text{ kcal mol}^{-1}$).^[13] In der planaren *trans*-Konfiguration stabilisiert der Photoschalter den Duplex um 0.2 bis 0.7 kcal mol⁻¹ besser als in der sperrigeren *cis*-Konfiguration, was aus der besseren Wechselwirkungsfähigkeit mit dem benachbarten Basenpaar resultiert. Obwohl der Photoschalter den Duplex stärker stabilisiert, wenn er am C-Terminus angebracht ist, so ist die *cis-trans*-Diskriminierung bei der Modifikation am N-Terminus ausgeprägter. Überhängende Nukleotide haben einen vernachlässigbaren Einfluss, wie durch die nahezu unveränderten ΔT_m -Werte und Stabilisierungsenergien mit dem verkürzten DNA-Oligomer 5'-d(**GTATGAATG**) belegt ist (siehe die Hintergrundinformationen).

Die Triplexbildung unterliegt einer wesentlich stärkeren Photokontrolle. In Gegenwart der DNA 5'-d(CGTTAA-**AAAAATTGC**) bildet die PNA t₇ stabile helikale PNA₂-DNA-Triplexe (Abbildung 1). Durch das Anfügen von *trans*-Azobenzol an die PNA werden solche Triplexe signifikant stabilisiert ($\Delta G = -2.9$ bis $-7.5 \text{ kcal mol}^{-1}$), wohingegen das *cis*-Isomer nur eine geringe Stabilisierung oder gar eine Destabilisierung bewirkt ($\Delta G = -0.8$ bis $+0.6 \text{ kcal mol}^{-1}$; Tabelle 1). Folglich ist der Paarungskomplex mit dem *trans*-Azobenzol am C-Terminus um 6.7 kcal mol⁻¹ stabiler als mit dem *cis*-Isomer. Dies bewirkt eine um 13.4°C höhere Schmelztemperatur T_m (Abbildung 1). Am N-Terminus ist die *cis-trans*-Diskriminierung etwas geringer, jedoch mit $\Delta \Delta G = -3.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ noch immer bemerkenswert. Dem kann man

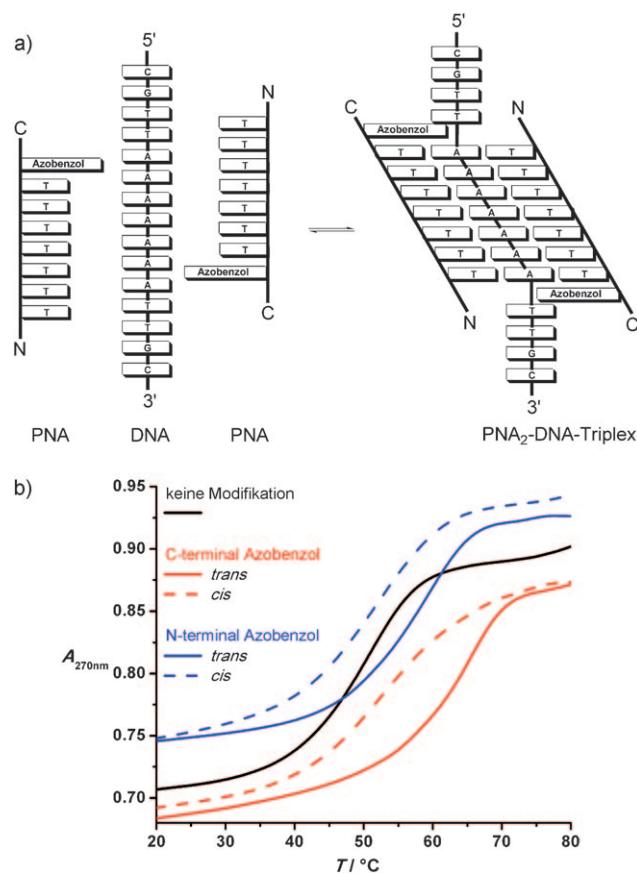


Abbildung 1: Photoschaltbare PNA₂-DNA-Triplexe. a) Bindung der Azobenzol-PNA an DNA unter Bildung der PNA₂-DNA-Triplexhelix; b) Einfluss des Photoisomers von Azobenzol auf die UV-Schmelzkurven der PNA₂-DNA-Komplexe; $[\text{DNA}] = 3.0 \mu\text{M}$, $[\text{PNA}] = 6.0 \mu\text{M}$ in 10 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH 7.0; Absorbanz bei 270 nm, Aufheizkurve ($0.5^\circ\text{C min}^{-1}$).

die Photoregulation der Triplexbildung mit Azobenzol-modifizierter DNA gegenüberstellen, die im Wesentlichen auf der sterischen Destabilisierung des Paarungskomplexes durch das *cis*-Isomer beruht.^[2c] Während die PNA₂-DNA-Triplehelix wesentlich stabiler ist als analoge DNA₃-Strukturen, wird sie durch das *trans*-Azobenzol noch zusätzlich stabilisiert.^[15] Diese hohe inhärente Stabilität der PNA₂-DNA-Triplehelix ermöglicht die Verwendung deutlich kürzerer Oligomere und erfordert geringere Mg²⁺-Konzentrationen, was potenziell von Vorteil im Hinblick auf biologische Anwendungen ist.

Die außergewöhnliche *cis-trans*-Diskriminierung der photoschaltbaren PNA resultiert vermutlich aus dem Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Wie im Fall des Duplex kann man erwarten, dass das planare *trans*-Isomer wesentlich besser mit dem terminalen Basentriplett wechselwirkt als das sperrigere *cis*-Isomer. Durch die Stapelung mit dem Photoschalter wird die Entpaarung des Triplex an den Termini reduziert und dieser zusätzlich stabilisiert.^[12a] Da ein einzelnes Basentriplett wesentlich mehr zur Komplexstabilität beiträgt als ein Duplex-Basenpaar ($\Delta G = -2.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ ^[16] bzw. $-1.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ ^[4a]), ist der effektive Energiegewinn entsprechend höher. Die Gegenwart des Photoschalters an beiden Seiten, 3' und 5', verstärkt den Effekt zusätzlich, und eine exzellente *cis-trans*-Diskriminierung wird erreicht.

Triplexbildende PNA ist potenziell interessant für Antigen-Anwendungen, da sie in der Lage ist, Doppelstrang-DNA durch Invasion zu binden, was erfolgreich zur Inhibition der Transkription *in vivo* eingesetzt wurde.^[6a] Um zu zeigen, dass ein solcher Prozess mit Licht gesteuert werden kann, haben wir die Transkription zweier Gene, *efgp* (960 nt) und *torA* (414 nt), mit T7-RNA-Polymerase in Gegenwart einer kurzen ct₅c-PNA mit und ohne C-terminale Azobenzolmodifikation untersucht (Abbildung 2a). Das Gen *efgp* enthält die komplementäre 5'-d(GA₅G)-Zielsequenz 300 nt stromabwärts des Startpunkts der Transkription. Das Gen *torA*, dem eine entsprechende Bindungsstelle fehlt, diente als Kontrolle für die nichtspezifische Bindung. Beide Gene wurden von zirkulären Plasmiden unter Kontrolle des T7-Promotors und des T7-Terminators exprimiert. Durch Trennung der resultierenden RNA-Transkripte per Agarose-Gelelektrophorese wurde der Effekt der PNA auf die Transkription analysiert (Abbildung 2b und c).

Wie aus Abbildung 2b ersichtlich, bewirkt die Zugabe der PNA (0 bis 125 μM) eine konzentrationsabhängige Inhibition der Transkription des Gens *efgp*. Die PNA-Konzentration, bei der die Transkription um die Hälfte reduziert ist (IC₅₀), ist abhängig von der Gegenwart und der Konfiguration des Azobenzols (Abbildung 2b) und folgt der Paarungsenergetik mit der Zielsequenz 5'-d(TCTTGA₅GTCAT). Die *trans*-Azobenzol-PNA bindet am stärksten ($T_m = 58^\circ\text{C}$) und ist der potenteste Inhibitor (IC₅₀ ≈ 35 μM); die schwächer bindende *cis*-Azobenzol-PNA ($T_m = 45^\circ\text{C}$) ist gut zweifach weniger wirksam (IC₅₀ ≈ 90 μM), während die Referenz-PNA ohne Photoschalter ($T_m = 40^\circ\text{C}$) der schlechteste Inhibitor ist (IC₅₀ > 125 μM). Die Mutation der Bindungsstelle auf dem *efgp*-Templat [5'-d(GAAAAAG) → 5'-d(GAACGCG)] reduziert die Inhibition signifikant (Abbildung 2c), und erst bei hohen PNA-Konzentrationen (≥ 100 μM) bewirkt eine nichtspezifische Inhibition die Abnahme der Transkriptionsaus-

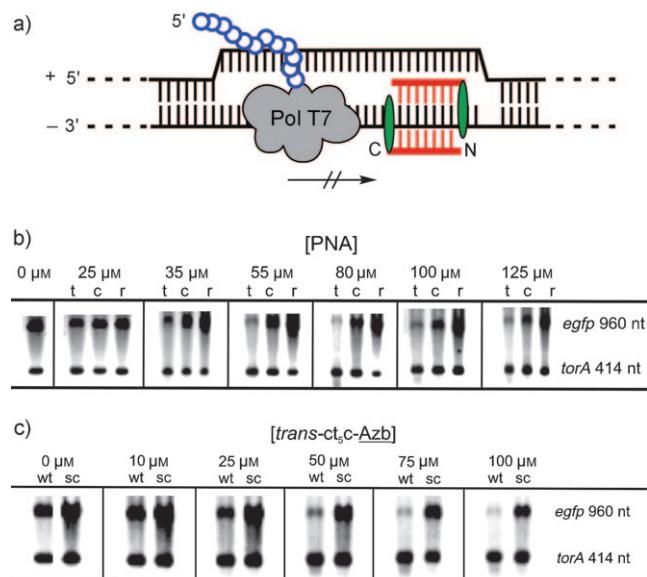


Abbildung 2. Inhibition der Transkription durch modifizierte PNAs. a) Die PNA-Derivate (PNA in rot, Azobenzol in grün) erkennen die Zielsequenz auf dem Plasmid 300 nt stromabwärts des T7-Promotors und binden daran durch Triplexinvasion. Der PNA₂-DNA-Invasionskomplex blockiert das Fortschreiten der T7-RNA-Polymerase (Pol T7) entlang des Gens, was zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription führt. b) Die Bildung der vollständigen RNA-Transkripte von *efgp* (960 nt) und *torA* (414 nt) wurde mit 2% Agarose-Gelelektrophorese in 0.5 × TBE-Puffer (45 mM Tris-Base, 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8.3, 100 V) analysiert. Die PNA-Derivate wurden in zunehmenden Konzentrationen (0 bis 125 μM) zur Transkriptionsmischung gegeben, wodurch es zu einer schrittweisen Abnahme des *efgp*-Transkripts kam. t = ct₅c-PNA mit dem Azobenzol in *trans*-Konfiguration am C-Terminus (thermisches Gleichgewicht: 1 h bei 80°C); c = PNA mit dem *cis*-Isomer des Azobenzols am C-Terminus (kontinuierliche Belichtung bei 360 nm); r = Referenz-PNA ohne Photoschalter. Die Expression des Gens *torA* diente als interne Kontrolle für die nichtspezifische Bindung. c) Die Spezifität der Inhibition durch *trans*-ct₅c-Azb wurde untersucht, indem die Transkription vom Wildtyp-Gen wt-*efgp* mit der Transkription von einem analogen „scrambled“ (sc)-*efgp*-Templat untersucht wurde, in welchem die PNA-Bindungsstelle von 5'-d(GAAAAAG) zu 5'-d(GAACGCG) mutiert war. Das Gen *torA* diente wiederum als interne Kontrolle.

beute. Die Transkription des Gens *torA*, das keine Bindungsstelle enthält, reagiert sogar noch weniger empfindlich auf die Gegenwart der PNA. Eine weitere Kontroll-PNA, bei der zwei Nukleotide ausgetauscht wurden (ct₅c-Azb → ctgtatc-Azb), hat keinerlei Bindungsstellen auf den beiden Genen, und in Konzentrationen unter 100 μM interferiert diese PNA ebenfalls nicht mit der Transkription (Abbildung S22). Zusammengenommen ist damit gezeigt, dass die PNA sequenzspezifisch mit dem dsDNA-Templat wechselt.

Dass diese kurzen triplexbildenden PNAs so effizient in die Genexpression eingreifen, ist bemerkenswert, vor allem im Hinblick auf analoge DNA-basierte Triplehelices, die kaum in der Lage sind, die Transkription während der Elongation zu blockieren.^[17] Darüber hinaus eröffnet das Ansprechen der Inhibitionspotenzen auf die Konfiguration des Photoschalters die Möglichkeit, die Transkription in lichtabhängiger Weise zu regulieren, wenngleich die gut zweifache

cis-trans-Diskriminierung, die im Transkriptionsassay beobachtet wurde, substanzial kleiner ist, als man allein aus den thermodynamischen Daten erwarten könnte. Dies mag aus der Schwierigkeit resultieren, dass die PNA die ungepaarte Bindungsstelle in der Transkriptionsblase des aktiv transkribierten Gens abfangen muss – ein komplexer Prozess, der sowohl von der Kinetik der Invasion als auch von der Stabilität des Invasionskomplexes bestimmt wird.^[16] Um die Photoschaltung für praktische Anwendungen nutzbar zu machen, ist daher eine weitere Optimierung notwendig. Es sollte in einfacher Weise möglich sein, sowohl die Selektivität als auch die Affinität der PNA allein durch die Verwendung längerer Oligomere signifikant zu verbessern, wie dies in der Literatur für RNA-bindende PNAs beschrieben ist.^[8,9] Potentere PNAs würden ebenfalls das Problem der nichtspezifischen Inhibition reduzieren, da die Antigen-PNA in deutlich niedrigeren Konzentrationen eingesetzt werden könnte. Alternative PNA-Architekturen sind die bisPNA^[5,14a] und das „Tail-clamp“-Motiv,^[8b] in denen die Verknüpfung der duplex- und triplexbildenden Domänen über einen Linker hilft, die langsame und stark konzentrationsabhängige Triplexinvasion^[16] zu beschleunigen. Die Bindung der triplexbildenden Domäne ist insbesondere im „Tail-clamp“-Motiv empfindlich gegen strukturelle Eingriffe. Dies könnte genutzt werden, um die Bildung und/oder das Auflösen der Tripelhelix gezielt mit Licht zu steuern. Der Einbau des Photoschalters an inneren Positionen oder an mehreren Stellen in der PNA-Sequenz ist eine weitere Strategie, um die *cis-trans*-Diskriminierung zu verbessern. Solche Verfahren sind bereits erfolgreich mit DNA-basierten Antigen-Oligomeren verfolgt worden.^[2a]

Die Hybridisierung Azobenzol-modifizierter PNA spricht in nützlicher Weise auf Licht an. Die Effekte lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) Das *trans*-Isomer des Azobenzols stabilisiert die Paarungskomplexe stärker als die *cis*-Form.
- 2) Das Ausmaß der *cis-trans*-Diskriminierung hängt vom Terminus der Modifikation ab.
- 3) Die Diskriminierung ist im Triplexpaaarungsmodus substanzial stärker als im Duplexmodus.
- 4) Die *cis-trans*-Diskriminierung im Triplexmodus kann zur Photokontrolle der Transkription genutzt werden.

Es wurde gezeigt, dass triplexbildende PNAs stark inhibitorisch auf Translation,^[8b] reverse Transkription^[7] und Replikation^[14b] wirken. Daher sollte es möglich sein, mit optimierter Azobenzol-PNA eine nützliche Photokontrolle solcher Prozesse zu erzielen. Ihre inhärente Stabilität und Zellgängigkeit sollte PNA zu einer attraktiven Alternative für derzeit verfügbare photoschaltbare Systeme auf DNA- und RNA-Basis machen, insbesondere für Anwendungen in vivo.

Eingegangen am 24. Juli 2010,
veränderte Fassung am 20. September 2010
Online veröffentlicht am 18. November 2010

Stichwörter: Antogene · Antisense · Azobenzole · Peptidnucleinsäuren · Photochromie

- [1] a) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900; b) X. Tang, I. Dmochowski, *Mol. BioSyst.* **2007**, *3*, 100; c) L. Kröck, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 475; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 471.
- [2] a) H. Asanuma, X. Liang, H. Nishioka, D. Matsunaga, M. Liu, M. Komiyama, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 203; b) H. Asanuma, D. Matsunaga, M. Komiyama, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2005**, *49*, 35; c) X. Liang, H. Asanuma, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1877.
- [3] S. Ogasawara, M. Maeda, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8971; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8839.
- [4] a) M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Nordén, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566; b) P. Wittung, P. E. Nielsen, O. Burchardt, M. Egholm, B. Nordén, *Nature* **1994**, *368*, 561.
- [5] a) P. E. Nielsen, U. Koppelhus, F. Beck in *Pseudo-Peptides in Drug Discovery* (Hrsg.: P. E. Nielsen), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, S. 153; b) T. Bentin, H. J. Larsen, P. E. Nielsen, *Biochemistry* **2003**, *42*, 13987.
- [6] a) B. A. Janowski, K. Kaihatsu, K. E. Huffman, J. C. Schwartz, R. Ram, D. Hardy, C. R. Mendelson, D. R. Corey, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 210; b) N. E. Møllegaard, O. Buchardt, M. Egholm, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3892.
- [7] U. Koppelhus, V. Zachar, P. E. Nielsen, X. Liu, J. Eugen-Olsen, P. Ebbesen, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2167.
- [8] a) L. Good, P. E. Nielsen, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 355; b) H. Knudsen, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 494.
- [9] P. Sazani, F. Gemignani, S.-H. Kang, M. A. Maier, M. Manoharan, M. Persmark, D. Bortner, R. Kole, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1228.
- [10] a) J. C. Norton, M. A. Piatyszek, W. E. Wright, J. W. Shay, D. R. Corey, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 615; b) S. E. Hamilton, C. G. Simmons, I. S. Kathiriya, D. R. Corey, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 343.
- [11] T. Staffor, U. Diederichsen, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 681.
- [12] a) M. Petersheim, D. H. Turner, *Biochemistry* **1983**, *22*, 256; b) D. D. Albergo, L. A. Marky, K. J. Breslauer, D. H. Turner, *Biochemistry* **1981**, *20*, 1409; c) P. N. Borer, B. Dengler, I. Tinoco, Jr., O. C. Uhlenbeck, *J. Mol. Biol.* **1974**, *86*, 843.
- [13] K. M. Guckian, B. A. Schweitzer, R. X.-F. Ren, C. J. Sheils, P. L. Paris, D. C. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8182.
- [14] a) J. Y. Chin, J. Y. Kuan, P. S. Lonkar, D. S. Krause, M. M. Seidman, K. R. Peterson, P. E. Nielsen, R. Kole, P. M. Glazer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 13514; b) S. Diviacco, V. Rapozzi, L. Xodo, C. Hélène, F. Quadrifoglio, C. Giovannangeli, *FASEB J.* **2001**, *15*, 2660.
- [15] N. T. Thuong, C. Hélène, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 697; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 666.
- [16] a) O. V. Krupnik, Y. A. Guscho, K. A. Sluchanko, P. E. Nielsen, Y. S. Lazurkin, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2001**, *19*, 535; b) O. V. Krupnik, Y. S. Lazurkin, *Russ. J. Genet.* **2005**, *41*, 707.
- [17] L. J. Maher III, *Biochemistry* **1992**, *31*, 7587.