

Photoaktivierung eines Psoralen-vernetzten Luciferasegens mit blauem Licht**

Thorsten Stafforst* und Jens M. Stadler

Die Freisetzung aktiver Verbindungen aus lichtempfindlichen Vorläufern („photocaging“), wird seit Jahrzehnten intensiv genutzt. Besonders geeignet ist diese Strategie zur intrazellulären Freisetzung kleiner biologisch aktiver Moleküle wie Neurotransmitter, cyclischer Nucleotide und Calciumkationen.^[1] Jüngst wurde das Konzept auf die Kontrolle großer Biopolymere wie Nucleinsäuren und Proteine ausgedehnt.^[2] Ähnlich wie die Optimierung für kleine Moleküle Jahrzehnte gedauert hat, so ist die Suche nach effizienten und zweckmäßigen Methoden für Proteinen und Nucleinsäuren noch immer im vollen Gange. Die Aktivierung Psoralen-vernetzter Nucleinsäuren durch einen lichtabhängigen Elektronentransfer stellt einen neuartigen Ansatz dar, der einige Schwächen gegenwärtiger Methoden überwinden könnte.

Zur Freisetzung von Nucleinsäuren werden derzeit zwei Methoden angewendet, bei denen photolabile Schutzgruppen entweder an der Nucleobase oder an der Phosphatgruppe des Rückgrats eingeführt werden.^[1,2] In der ersten Strategie werden die Schutzgruppen am Mononucleotid angebracht und durch Festphasensynthese ortsspezifisch in einzelsträngige DNA- oder RNA-Oligonucleotide eingebaut.^[3] Während dies zwar die exakte Kontrolle über die Modifikation im Oligomer ermöglicht, ist der spätere Einbau in Plasmide oder größere RNA-Transkripte oft mühsam. In der zweiten Strategie werden die Schutzgruppen in biochemisch erzeugte Nucleinsäuren, etwa Plasmide oder RNA, stochastisch eingefügt.^[4] Bei diesem zufälligen Einbau lässt sich der Ort der Modifikation aber kaum kontrollieren. Da eine einzelne Schutzgruppe in der Regel nicht ausreicht, die Funktion einer Nucleinsäure vollständig zu blockieren,^[5] müssen meist mehrere Modifikationen eingebracht werden, um die Restaktivität ausreichend zu reduzieren.^[2–5] Besonders für stochastisch modifizierte Plasmide und mRNAs ist dies von Nachteil.^[4] Die lichtinduzierte Freisetzung ist niemals eine völlig glatte Reaktion, daher müssen Ort und Grad der Modifikation stets sorgfältig optimiert werden, um die Restaktivität niedrig zu halten und gleichzeitig ein gewisses Maß an Photoaktivierbarkeit zu gewährleisten. Gerade für stochas-

tisch modifizierte Nucleinsäuren erreicht man daher oft nur eine 5–10fache Steigerung ihrer Aktivität durch Photoaktivierung.^[4]

Eine simple und effiziente Lösung dieses Problems könnte die Vernetzung mit Psoralen bieten.^[6] Obwohl Psoralen ein kleines Molekül ist (258 Da), bewirkt bereits eine einzelne Vernetzung irgendwo innerhalb eines Plasmids, Gens oder RNA-Transkripts zuverlässig eine quasi vollständige Blockade der Nucleinsäure-Funktionen, was derartige Vernetzungen ausgesprochen nützlich zur Manipulation der Genexpression macht. Die starken inhibitorischen Wirkungen resultieren aus der Bildung von strangverknüpfenden Vernetzungen an 5'-d(TA)- oder 5'-r(UA)-Motiven durch zwei aufeinander folgende [2+2]-Cycloadditionen zwischen dem Psoralen und den sich gegenüber liegenden Pyrimidinbasen (Abbildung 1).^[6] Aufgrund der kovalenten Verknüpfung kann keine zelluläre Maschinerie die beiden Stränge entpaaren, um die genetische Information auszulesen. Da die zelluläre Reparatur der Vernetzung langsam, fehleranfällig ist und mehrere Reparaturmechanismen beansprucht,^[7] wird

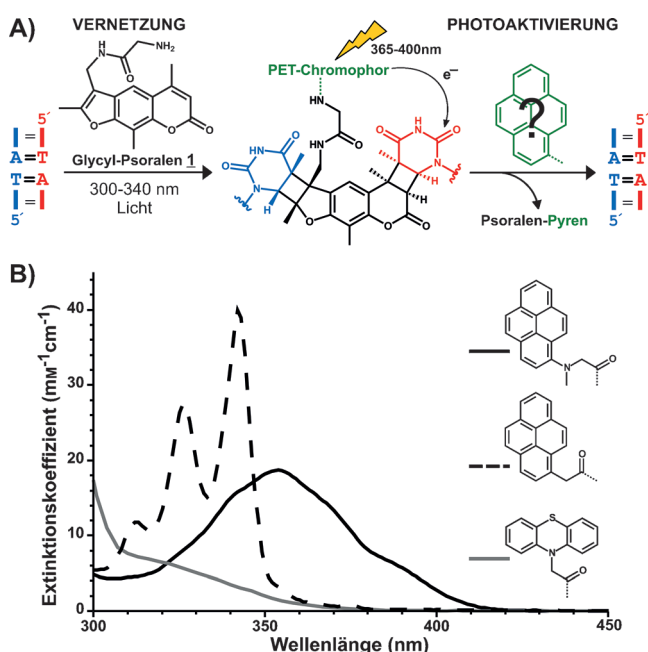


Abbildung 1. „Photocaging“ mithilfe der Psoralen-Vernetzung. A) Die Psoralen-Vernetzung blockiert die Genfunktion durch kovalente Verknüpfung der gepaarten Stränge vollständig. Der Photoelektronentransfer (PET) von einem externen Chromophor könnte angewendet werden, um vernetzte Gene zu aktivieren, falls ein geeigneter PET-Chromophor gefunden wird. B) UV-Spektren von Pyren, dem zuvor verwendeten Phenothiazin und von 1-Aminopyren, das hier untersucht wird.

[*] Dr. T. Stafforst, J. M. Stadler
Interfakultäres Institut für Biochemie
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 15, 72076 Tübingen (Deutschland)
E-Mail: thorsten.stafforst@uni-tuebingen.de
Homepage: <http://www.ifib.uni-tuebingen.de/forschung/stafforst.html>

[**] Wir danken der DFG (STA 1053/3-1), dem Fonds der Chemischen Industrie und der Universität Tübingen für die großzügige finanzielle Unterstützung.

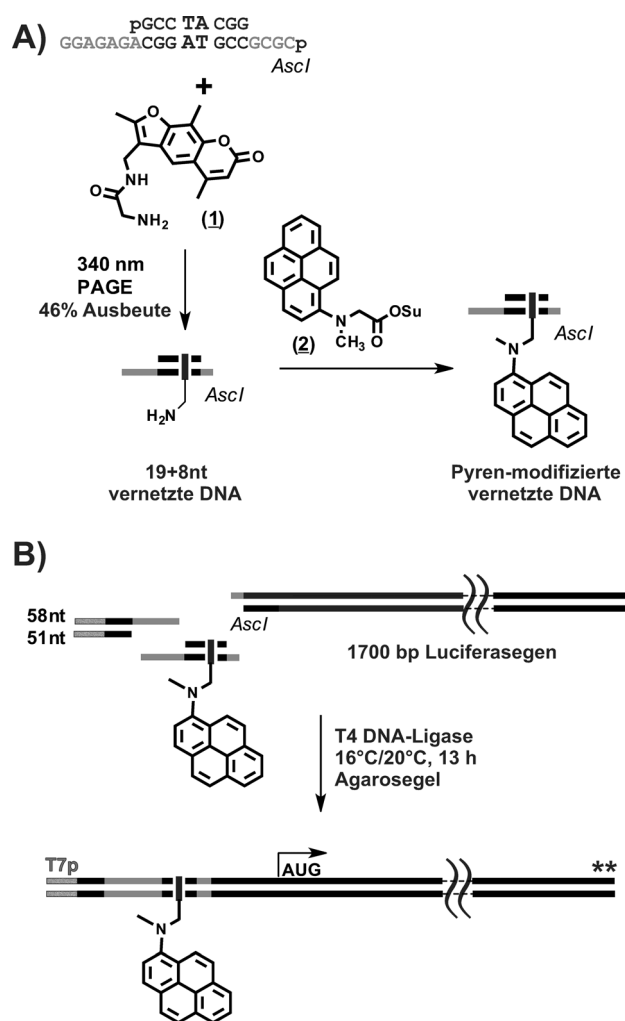
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201306150> zu finden.

Psoralen gerne eingesetzt, um die DNA-Reparatur zu untersuchen, homologe Rekombination zu stimulieren, oder Gene stillzulegen.^[8,9] Hierzu wurden Techniken entwickelt, um Psoralen-Vernetzungen in Plasmide^[8] und selbst in Chromosomen^[9] ortsspezifisch einzubringen. Kürzlich konnten wir zeigen, dass man Psoralen-Vernetzungen unter Nachahmung des Photolyase-Mechanismus wieder lösen kann.^[10] Dies eröffnet die Möglichkeit für deren Anwendung im „photocaging“.

Die Photolyase-artige Reparatur der Psoralen-Vernetzung erfordert den lichtabhängigen reduktiven Transfer eines Elektrons von einem externen Donor auf die Vernetzung. Wegen dessen hohen Photoreduktionskraft hatten wir in einer früheren Arbeit Phenothiazin als Donor gewählt.^[10] Phenothiazin hat jedoch ein ungünstiges Absorptionsspektrum ($\lambda_{\max} = 315$ nm, mit $\epsilon \approx 5$ mm⁻¹ cm⁻¹), sodass lange Belichtungszeiten (im Bereich von Stunden) und energiereiches Licht (330 nm) notwendig waren, um die Vernetzungsstelle zu reparieren. Derartige Bedingungen sind mit Zellen kaum kompatibel und behindern daher den Einsatz in biologischen Systemen. Im Hinblick auf die Energetik des Elektronentransfers schätzen wir die minimal erforderliche Lichtenergie zu ≥ 3.0 eV (ca. 2 eV für die Reduktion der Vernetzung;^[11] ≥ 0.5 eV für die Oxidation des Donors; ≥ 0.5 eV zusätzliche Triebkraft zum Ausgleich der Reorganisationsenergie). Die Lichtenergie von ≥ 3.0 eV entspricht der Absorption von Photonen der Wellenlänge $\lambda \leq 410$ nm. Folglich scheint eine deutliche Verbesserung des Systems durch die Wahl eines geeigneteren Elektronendonors möglich.

Aus der Literatur zum reduktiven Elektronentransfer in DNA erschien uns die Klasse der Pyrene als Donoren besonders vielversprechend, denn sie absorbieren Licht sehr stark ($\lambda_{\max} = 345$ nm, mit $\epsilon \approx 35$ mm⁻¹ cm⁻¹) und haben eine hohe Photoreduktionskraft ($E^* \approx 2.5$ eV).^[12] Auch wurden mehrere Pyrenderivate mit rotverschobener Absorption beschrieben, einschließlich einiger, die direkt mit Uridin konjugiert sind.^[13] Letztere scheinen jedoch keine ausreichende Photoreduktionskraft zu besitzen, um Vernetzungen effizient zu lösen.^[14] Fügt man eine Aminogruppe einem aromatischen System hinzu, so resultiert daraus für gewöhnlich eine Rotverschiebung der Absorbanz und eine Verringerung des Oxidationspotentials. Wie erwartet absorbiert 1-Aminopyrene breit zwischen 330 nm und 400 nm mit $\epsilon \approx 3$ –19 mm⁻¹ cm⁻¹ (Abbildung 1B) und hat ein recht niedriges Oxidationspotential von 0.6 eV.^[12] Damit erfüllt 1-Aminopyren genau die hier definierten Erfordernisse. Kürzlich beschrieben Majima und Mitarbeiter die Synthese und Eigenschaften von *N,N*-dialkyliertem 1-Aminopyren, das sich bequem unter Bildung einer Peptidbindung in Nucleinsäuren einführen lässt.^[15] In Anlehnung an deren Beschreibung synthetisierten wir den *N*-Hydroxysuccinimidester **2** dieses Derivates zum Einbau in vernetzte Gene (Schema 1 A).

Um zu demonstrieren, dass die Photolyse der Psoralen-Vernetzung als Strategie zur Photoaktivierung taugt, erzeugten wir ein vollständiges, funktionales Luciferasegen (1.8 kb), welches eine einzelne Psoralen-Vernetzung an einer definierten Stelle zwischen Promotor und Translationsstartseite enthält (Schema 1 B). Um eine genaue Kontrolle über die Zusammensetzung der Vernetzung und dessen Einbau zu



Schema 1. Aufbau des Psoralen-vernetzten Luciferasegens. A) Die Psoralen-Vernetzung wurde ortsspezifisch in den Paarungskomplex des 19nt- mit dem 8nt-Oligomer eingefügt. Die vernetzte Spezies wurde unter Bildung einer Peptidbindung direkt an der Vernetzung mit dem Aminopyrendonor modifiziert. B) Die Überhänge der vernetzten Spezies ermöglichten die Verknüpfung mit dem T7-Promotor und dem Luciferasegen durch T4-DNA-Ligase.

haben, setzten wir das Gen über Ligation aus drei Teilstücken zusammen: dem T7-Promotor (51 bp), der Vernetzung (27 nt) und dem Luciferasegen (1700 bp). Letzteres wurde durch Restriktionsverdau aus einem Plasmid gewonnen. Das definierte, vernetzte DNA-Stück wurde durch Belichten (340 nm) einer stöchiometrischen Mischung des 8nt-Oligomers 5'-d(pGCCTACGG) mit dem komplementären 19nt-Oligomer 5'-d(pCGCGCCGTAGGCAGAGAGG) in Gegenwart von *N*-Glycyl-L-aminomethyltrisoral (**1**) erhalten (Schema 1 A). Das Produkt wurde mit 20% Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) gereinigt und in 46% Ausbeute nach Isolierung und Fällung erhalten. Die Zusammensetzung der vernetzten Spezies wurde durch MALDI-Massenspektrometrie bestätigt (Abbildung S2). Diese vernetzte 19 + 8nt-Spezies wurde an der Aminogruppe der Vernetzung durch Inkubation mit dem Aminopyrensuccinimidester **2** weiter modifiziert. Die Zusammensetzung der einfach modifizierten

Spezies wurde durch MALDI-MS bestätigt (Abbildung S4). Die vernetzte 19+8nt-DNA mit oder ohne Pyrenmodifikation wurde dann zwischen den T7-Promotor und das Luciferasegen ligiert. Als Positivkontrolle wurde ein vollständiges Gen ohne Vernetzungsstelle nach derselben Strategie assembliert. Alle Gene wurden durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt, mit GelRed (Biotium) angefärbt und unter grünem Licht (505 nm) ausgeschnitten.

Im Hinblick auf die Synthese und Modifikation vernetzter Nucleinsäuren haben wir mehrere Verbesserungen gegenüber unserer ersten Studie erreicht.^[10] Erstens: die direkte Modifikation an der Aminomethyltrisoralen-Vernetzung unter Bildung einer Peptidbindung stellte sich als sehr ineffizient heraus, vermutlich infolge sterischer Hinderung. Tatsächlich ermöglichte das Einfügen einer zusätzlichen Glycylgruppe am Trisoralen (Verbindung 1) die hocheffiziente Modifikation (vollständiger Umsatz nach 1 h, siehe die Hintergrundinformationen) der vernetzten DNA mit *N*-Hydroxysuccinimidestern. Zweitens: das 19+8nt-Konstrukt war anfällig für die Bildung zusätzlicher Psoralenaddukte, die mithilfe von PAGE nicht abzutrennen waren. Unter Verwendung unseres alten Protokolls enthielten ca. 50% der vernetzten DNA ein zusätzliches Psoralenmonoaddukt, vermutlich an der *AscI*-Schnittstelle. Durch die Zugabe von Uracil (6 mM) während der Vernetzung (siehe die Hintergrundinformationen) sowie durch das Einführen eines zusätzlichen Belichtungsschrittes konnte die 19+8nt-Spezies frei von zusätzlichen Addukten erhalten werden.

Zunächst untersuchten wir die lichtabhängige Reparatur des vernetzten 19+8nt-DNA-Stück allein. Diese Ausgangsverbindung wurde dazu auf eine Endkonzentration von ca. 2 μM in Phosphatpuffer (10 mM, 100 mM NaCl, pH 7.0) verdünnt. Die Belichtung wurde in einem Fluoreszenzspektrometer durchgeführt, das mit einem Monochromator (± 20 nm) und einer 75-W-Xenonlampe ausgestattet war. Die Ausgangsverbindung (50 μL) wurde in einem PCR-Gefäß bei 365 nm oder 400 nm belichtet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben (5.0 μL) entnommen und der Umsatz mithilfe von 18% PAGE (7M Harnstoff) analysiert. Um Kinetiken zu messen, wurden Verdünnungsreihen (100%, 50%, 25%, 12.5%) der Ausgangsverbindung und des 19nt-Produktes auf das Gel aufgetragen. Nach Anfärben mit SybrGold und Geldokumentation mit einem LASER-Scanner, wurden die Kinetiken densitometrisch bestimmt.

Sowohl unter Bestrahlung mit UV-Licht (365 nm) als auch unter Bestrahlung mit blauem Licht (400 nm) wird die vernetzte Ausgangsverbindung in das erwünschte 19nt-Produkt umgesetzt (Abbildung 2). Die beiden Kinetiken weisen dabei Ähnlichkeiten auf. Erstens: die Umsetzung erfolgt anfangs sehr schnell, verlangsamt sich dann rasch und stoppt schließlich bei etwa 70% Umsatz. Zweitens: nur etwa 50% der erwarteten Menge an 19nt-Produkt werden gebildet, während mit ähnlicher Kinetik ein Nebenprodukt entsteht. In unserer vorausgegangenen Studie beobachteten wir bereits die Bildung von Psoralenmonoaddukten als Reaktionsintermediate, deren weiterer Umsatz entweder einen zweiten Elektronentransfer oder die direkte Lichtabsorption erfordert.^[10] MALDI-Massenspektrometrie der Reaktionsmischung nach 60 Sekunden Belichtung mit UV-Licht (Abbil-

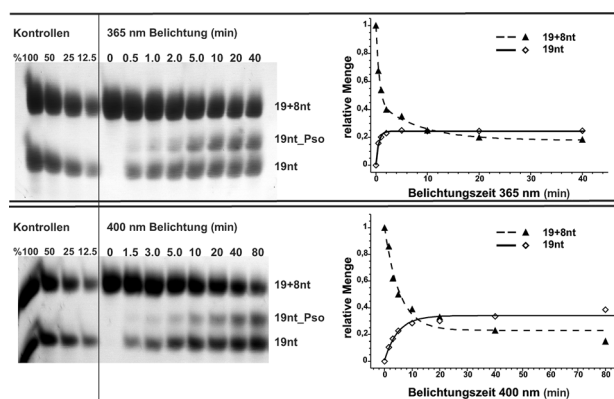


Abbildung 2. PAGE-Analyse der lichtabhängigen Freisetzung des gewünschten 19nt-Produktes nach Bestrahlung der vernetzten 19+8nt-DNA, modifiziert mit dem Aminopyrendonor, mit UV-Licht (365 nm) oder blauem Licht (400 nm). Die relativen Mengen an Ausgangsverbindung und Produkt wurden densitometrisch durch Vergleich mit den Kontrollen abgeschätzt.

dung S8) zeigt klar die Bildung von beidem: des gewünschten Produktes (5983 Da) und seines Psoralenmonoadduktes (6568 Da). Interessanterweise fanden wir auch substanzielle Mengen an Ausgangsverbindung (9058 Da), das den Aminopyrendonor verloren hatte (minus 271 Da). Daraufhin testeten wir die Photostabilität des Donors und fanden, im Einklang mit Literaturangaben,^[15] dass 1-Aminopyren nicht photostabil ist, sondern sich unter Bestrahlung vollständig zersetzt (Abbildung S14). Die begrenzte Photostabilität des Donors erklärt somit den vorzeitigen Stopp der Photoaktivierung, den wir auf dem Gel beobachten. Trotz dieser beiden Widrigkeiten wird das gewünschte, nichtmodifizierte 19nt-Templat durch Belichten in substanziellen Mengen (20–30%) gebildet. Die Effizienz, mit der dies geschieht, ist bemerkenswert: Unter UV-Licht wird die Sättigung (20% Produkt) bereits nach 1 min, unter blauem Licht nach 5 min (23% Produkt) erreicht (Abbildung 2). Aus den Anfangssteigungen des Umsatzes können wir die Halbwertszeiten für die Reparatur der Vernetzung vor dem Beginn der Zersetzung des Donors abschätzen. Diese betragen 1.6 min mit UV- und 7.1 min mit blauem Licht. Um daraus Quantenausbeuten abzuleiten, verglichen wir diese Daten mit der Halbwertszeit für die Photoaktivierung von kommerziell erhältlichem Dimethoxynitrobenzyl-geschützten cAMP unter denselben Bedingungen (siehe die Hintergrundinformationen), für welche Quantenausbeute Φ und Extinktionskoeffizient ϵ bekannt sind. Daraus ergibt sich für unsere Photoaktivierung das Produkt $\epsilon\Phi$ zu ca. $1100\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ bei 365 nm und zu ca. $250\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ bei 400 nm. Mit dem Absorptionskoeffizienten von $15.5\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ für den Donor ergibt sich eine Quantenausbeute $\Phi \approx 7\%$ für die initiale Photoaktivierung. Unseres Wissens ist dies für eine chemische Reaktion, die auf einem Elektronentransfer beruht, eine außergewöhnlich hohe Quantenausbeute.

Um die Machbarkeit der Psoralen-abhängigen Photoaktivierung im biochemischen Assay zu belegen, untersuchten wir die lichtabhängige Aktivierung des assemblierten Luciferasegens, welches die Vernetzung flussabwärts des T7-Pro-

motors enthält (Schema 1B). Dazu wurde die Ausgangsverbindung in Phosphatpuffer (1 mM, 10 mM NaCl, pH 7.0) zu einer Endkonzentration von ca. 40 nM verdünnt. Die Belichtung wurde, wie zuvor, im PCR-Gefäß in einem Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben (4 µL) entnommen und als Templat für die In-vitro-Transkriptions/Translations-Reaktion verwendet (PURExpress, New England Biolabs, siehe die Hintergrundinformationen). Die Aktivität der translatierten Luciferase wurde nach 2.5 h Inkubation (37 °C) gemessen.

Die Stärke der Psoralen-abhängigen Strategie kommt nun klar zum Vorschein (Abbildung 3). Das Einfügen der einzelnen Vernetzung reduzierte die Luciferaseaktivität um mehr als das 1000fache. Nach Abzug des Hintergrunds war das

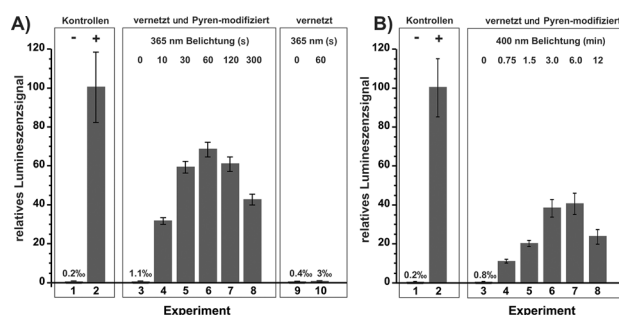


Abbildung 3. In-vitro-Transkriptions/Translations-Assay. A) Experiment 1,2: Positiv- und Negativkontrollen (Wasser und freies Gen); Experiment 3–8: Luciferasesignal bei zunehmender Belichtungsdauer (365 ± 20 nm), mit dem Pyren-modifizierten vernetzten Gen; Experiment 9,10: Kontrolle zur Rolle des Pyrendonors: das vernetzte Gen ohne Pyrenmodifikation wurde belichtet. B) Experiment 3–8: Luciferasesignal bei zunehmender Belichtungsdauer (400 ± 20 nm), mit dem Pyren-modifizierten vernetzten Gen.

Restsignal quasi null. Bereits eine kurze Bestrahlung (10 s) mit UV-Licht bedingt eine substantielle Rückgewinnung der Luciferaseaktivität (30 %). Das maximale Signal (68 % der Positivkontrolle) wird nach 1–2 Minuten erreicht, alles im Einklang mit der Kinetik der Reparatur des vernetzten DNA-Stücks allein. Wegen des minimalen Restsignals ist die Berechnung des Photoaktivierungsfaktors stark fehlerbehaftet. Dennoch: Faktoren ≥ 500fach sind zugänglich. Um die Abhängigkeit vom Pyrendonor zu demonstrieren, ligierten wir das 19 + 8nt-DNA-Stück auch ohne Pyrenmodifikation in das Luciferasegen. Dieses Gen war entsprechend stillgelegt und konnte nicht substantiell mit UV-Licht reaktiviert werden (Abbildung 3A, Experimente 9 und 10). Wie zu erwarten gelingt die Photoaktivierung auch mit blauem Licht. Wegen des 5fach niedrigeren Extinktionskoeffizienten des Donors bei 400 nm (2.8 mm⁻¹cm⁻¹) versus 365 nm (15.5 mm⁻¹cm⁻¹), werden 5fach längere Belichtungszeiten benötigt. Für kurze Belichtungszeiten (0.75 bis 3 Minuten) hängt das Luciferasesignal linear von der Belichtungszeit ab. Die maximale Ausbeute wird nach 3–6 Minuten, also wiederum im Einklang mit der Kinetik des 19 + 8nt-DNA-Stücks, erreicht. Zur Simulation der Photoaktivierung unter zellulären Bedingungen wiederholten wir das Belichtungsexperiment bei 365 nm mit den gleichen Mengen an Templat, führten die Belichtung

(60 Sekunden) aber direkt in der vollständig assemblierten Transkriptions/Translationsmischung noch vor der Inkubation durch. Die Luciferaseaktivität wurde auf 45 % der Positivkontrolle photoaktiviert (Abbildung S10). Damit ist die Anwendbarkeit in Gegenwart von Proteinen, Salz, Magnesium und Reduktionsmitteln gezeigt.

Die Verwendung von Psoralen-Vernetzungen zur Photoaktivierung von Genfunktionen ist ein neuartiges Konzept. Wir demonstrieren hier dessen Machbarkeit auf dem Level eines vollständigen Gens. Wir haben Aminopyren als Elektronendonator eingeführt, um das Systems für die praktische Anwendung geeigneter zu machen. Obwohl die vollständige Wiederherstellung der Genfunktion unerreich blieb, ermöglichte eine ungewöhnlich effiziente Photoaktivierung die schnelle und substantielle Aktivierung Psoralen-vernetzter Gene mit UV-Licht (365 nm) oder blauem Licht (400 nm) unter Verwendung einfacher Mittel (Fluoreszenzspektrometer). Wegen der vollständigen Unterdrückung jeglicher Restaktivität wurden ausgesprochen hohe Photoaktivierungsfaktoren im Luciferaseassay erreicht. Wir erwarten, dass unsere Strategie dort von Vorteil ist, wo hohe Photoaktivierungsfaktoren oder die vollständige Suppression der Genaktivität notwendig sind. Im Gegensatz zur klassischen „Caging“-Strategie mit lichtlabilen Schutzgruppen,^[1,2] sind bei der Psoralen-Strategie die Vernetzung und der lichtsammlende Chromophor separiert. Dies wird es uns in der Zukunft erlauben, über die sequenzspezifische Photoaktivierung eines Gens in einer Mischung mehrerer vernetzter Gene nachzudenken, wobei der Donor ortsspezifisch an ein bestimmtes Gen über PNAs^[16] oder Polyamide^[17] adressiert werden könnte. Ganz generell sollte sich die Psoralen-abhängige Photoaktivierung auf nahezu jedes denkbare DNA- und RNA-Konstrukt einfach übertragen und anwenden lassen.

Eingegangen am 15. Juli 2013

Online veröffentlicht am 2. Oktober 2013

Stichwörter: Elektronentransfer · Nucleinsäure · Photoaktivierung · Photochemie · Pyren

- [1] a) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900.
- [2] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8572–8604; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476.
- [3] L. Kröck, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 475–477; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 471–473.
- [4] a) W. T. Monroe, M. M. McQuain, M. S. Chang, J. S. Alexander, F. R. Haselton, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20895–20900; b) H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, H. Okamoto, *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 317–325; c) S. Shah, S. Rangarajan, S. H. Friedman, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1352–1356; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1328–1332.
- [5] A. Rodrigues-Correia, M. B. Koepfel, F. Schäfer, K. B. Joshi, T. Mack, A. Heckel, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 441–447.
- [6] G. D. Cimino, H. B. Gamper, S. T. Isaacs, J. E. Hearst, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 1151.
- [7] P. A. Muniandy, J. Liu, A. Majumdar, S.-T. Liu, M. M. Seidman, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *45*, 23.

- [8] a) W. A. Saffran, M. Goldenberg, C. R. Cantor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, 79, 4594; b) M. Raha, G. Wang, M. M. Seidman, P. M. Glazer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 2941; c) G. Wang, D. D. Levy, M. M. Seidman, P. M. Glazer, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, 15, 1759.
- [9] a) A. Majumdar, A. Khorlin, N. Dyatkina, F.-L. M. Lin, J. Powell, J. Liu, Z. Fei, Y. Khripine, K. A. Watanabe, J. George, P. M. Glazer, M. M. Seidman, *Nat. Genet.* **1998**, 20, 212; b) K.-H. Kim, P. E. Nielsen, P. M. Glazer, *Biochemistry* **2006**, 45, 314; c) A. K. Thazhathveetil, S.-T. Liu, F. E. Indig, M. M. Seidman, *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 431; d) K.-H. Kim, P. E. Nielsen, P. M. Glazer, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 7604.
- [10] T. Stafforst, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 9655–9658; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 9483–9486.
- [11] M. P. Scannell, G. Prakash, D. E. Falvey, *J. Phys. Chem. A* **1997**, 101, 4332–4337.
- [12] P. Daublain, A. K. Thazhathveetil, V. Shafirovich, Q. Wang, A. Trifonov, T. Fiebig, F. D. Lewis, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 14265–14272.
- [13] a) N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 4877–4883; b) M. Rist, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2498–2504.
- [14] S. T. Gaballah, G. Collier, T. L. Netzel, *J. Chem. Phys. B* **2005**, 109, 12175–12181.
- [15] K. Tainaka, M. Fujitsuka, T. Takada, K. Kawai, T. Majima, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 14657–14663.
- [16] a) 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; b) P. Wittung, P. E. Nielsen, O. Buchardt, M. Egholm, B. Norden, *Nature* **1994**, 368, 561; c) eine Übersicht: *Pseudo-Peptides in Drug Discovery* (Hrsg.: P. E. Nielsen), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [17] P. B. Dervan, B. S. Edelson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, 13, 284.