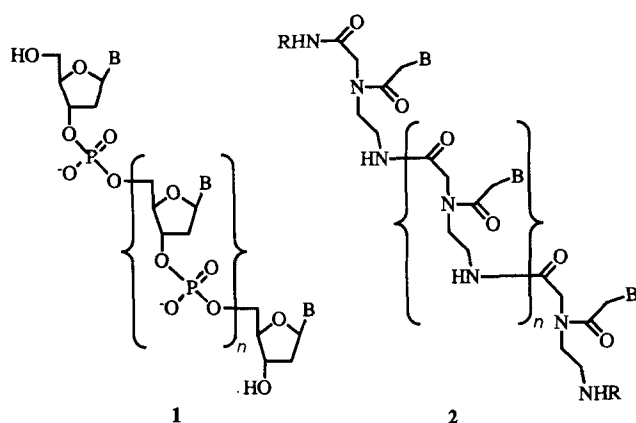


Peptidnucleinsäuren (PNAs) – ungewöhnliche Eigenschaften nichtionischer Oligonucleotid-Analoga

Von Chris Meier und Joachim W. Engels*

Es gibt keine Verbindung, die bei den molekularen Prozessen in lebenden Systemen die Bedeutung der durch Wasserstoffbrücken stabilisierten DNA-Doppelhelix übertrifft. Auf der DNA sind alle fundamentalen Prozesse des Lebens verankert: die Speicherung, die Übertragung (Replikation) und die Übersetzung (Expression) der genetischen Information. Diese ergibt sich aus der Abfolge von nur vier Bausteinen (Nucleosiden): Desoxyadenosin (dA), Desoxyguanosin (dG), Thymidin (T) und Desoxycytidin (dC). Jeweils zwei von diesen Nucleosiden, dA und T bzw. dG und dC, assoziieren durch Bildung von Wasserstoffbrücken zu den Watson-Crick-Basenpaaren, wodurch beim Polymer DNA die Doppelhelix entsteht. Die Einmaligkeit, die Bedeutung sowie das relativ einfache Baumuster der DNA-Doppelhelix hat dieses Biomolekül schon früh zu einem Untersuchungsobjekt für Chemiker gemacht.

Einzelsträngige Nucleinsäuren, die aus einer Abfolge von $n = 3-100$ Nucleotiden bestehen, bezeichnet man allgemein als Oligonucleotide. Heute ist es möglich, Oligonucleotide wie **1** mit definierter Sequenz synthetisch herzustellen (Schema 1). Aufgrund ihrer Eigenschaft, mit Oligonucleotiden



Schema 1. **2a**, $n = 6$; **2b**, $n = 8$; **2c**, $n = 10$.

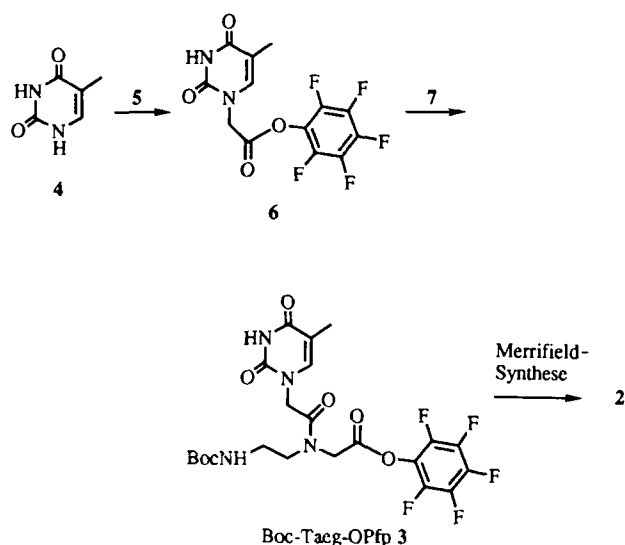
komplementärer Sequenz Watson-Crick-Basenpaare zu bilden, können relativ kurze Oligonucleotid-Doppelstränge als Modelle für die DNA-Doppelhelix bezüglich ihrer physikalischen und biologischen Charakteristika fungieren. Die synthetisierten Oligonucleotide **1** lassen sich aber nicht nur mit Desoxyribose-Oligonucleotiden unter Bildung einer Duplex hybridisieren, sondern sie lassen sich auch an komplementäre Sequenzen eines Ribose-Oligonucleotids sowie an komplementäre Sequenzen einer DNA-Doppelhelix nichtkovalent und reversibel binden, so daß eine Tripelhelix entsteht^[1]. Das enorme Potential synthetischer Oligonucleotide zeigt sich, wenn man bedenkt, daß ein Oligomer mit einer definierten Sequenz von 17 Nucleosiden (17mer Oligonucleotid) statistisch gesehen nur ein einziges, exakt komplementäres Ge-

genstück auf einem menschlichen Genom vorfindet. Ermöglicht wurde die leichte Zugänglichkeit sowie die zahlreichen Anwendungen von Oligonucleotiden (erwähnt sei hier die Verwendung als Primer (Starter-Oligonucleotid) bei der Polymerasekettenreaktion (PCR)-Amplifikation von DNA in der Molekularbiologie) durch ihre automatisierte Synthese in Oligonucleotidsynthesizern^[2].

Es verwundert so auch nicht, daß in jüngster Zeit eine weitere Anwendung von Oligonucleotiden intensiv untersucht wird: die Entwicklung von Pharmazeutika als Genblocker, wobei entweder die DNA-Doppelhelix selbst das Ziel der Blockierung ist (Tripelhelixbildung) oder aber die bei der Transkription entstandene mRNA (Duplexbildung; Antisense-Konzept)^[3, 4]. Der entscheidende Vorteil gegenüber bisherigen Ansätzen liegt auf der Hand: Zur Vervielfältigung beispielsweise eines Virus oder einer entarteten Zelle werden von deren DNA bestimmte Bereiche transkribiert und anschließend in Proteine „übersetzt“. Dabei werden von einem Transkript (mRNA) sehr viele Proteine synthetisiert. Gelänge es nun, entweder den Transkriptionsvorgang durch Tripelhelixbildung zu verhindern oder die Transkripte (mRNA) durch Oligonucleotide mit genau komplementärer Sequenz durch Bildung von Duplexstrukturen zu binden, so könnte man Erkrankungen direkt auf der DNA- bzw. RNA-Ebene und nicht erst nach der Expression durch Inhibierung der entstandenen Proteine (Enzymblocker) bekämpfen. Unmodifizierte Oligonucleotide kommen aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber zelleigenen Oligonucleotid-abbauenden Enzymen (Endo- oder Exonucleasen) sowie ihrer relativ schlechten Membrangängigkeit dafür allerdings nicht in Frage. Zur Steigerung der Nucleasestabilität sowie der Verbesserung der Transporteigenschaften hat man verschiedenartige Modifikationen eingeführt. So wurden Mono- oder Dithiophosphat-, Methylphosphonat-, Phosphotriester-Oligonucleotide aber auch phosphatfreie, nichtionische Analoga wie Formacetal-, Carbamat-, Sulfoxido- und Sulfon-verbrückte Spezies als Analoga des Zucker/Phosphat-Rückgrats intensiv untersucht^[5].

Über eine völlige Abkehr von diesem Konzept, isostere Gruppierungen der Phosphodiester zu untersuchen, berichteten kürzlich Egholm, Burchardt, Nielsen und Berg^[6a, b]. Sie nutzten ein in der Natur sehr verbreitetes Polymer als Rückgrat, die Peptide: Man nehme einen Monomerbaustein bestehend aus einer Aminosäure (hier 2-Aminoethylglycin) und bringe über einen definierten Spacer (hier Methylencarbonyl) die Nucleobase (hier Thymidin) an, verknüpfe diese Monomere nach der Merrifield-Peptidsynthese-Methode und fertig ist die Peptidnucleinsäure (PNA, **2**, Schema 1)^[6c]. Der für die Merrifield-Synthese benötigte Monomerblock **3** (Schema 2) wurde dazu wie folgt synthetisiert: Die Umsetzung von Thymin **4** mit α -Bromessigsäuremethylester **5** in Dimethylformamid (DMF) in Gegenwart von Kaliumcarbonat, anschließende wäßrige Verseifung in der Siedehitze und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) vermittelte Veresterung mit Pentafluorphenol (Pfp) läßt zunächst den α -Thyminylessigsäurepentafluorphenylester **6** entstehen. Dieser liefert nach Umsetzung mit *N*-(*N'*-Boc-aminoethyl)glycin (*N'*-Boc-Aeg)

[*] Prof. Dr. J. W. Engels, Dr. C. Meier
Institut für Organische Chemie der Universität
Niederurseler Hang 29, W-6000 Frankfurt/Main 50



Schema 2. **5** = α -Bromessigsäuremethylester, **7** = N -(N' -Boc-aminoethyl)glycin. Einzelheiten zur Synthese von **2** siehe Text.

7/Triethylamin in DMF und erneuter Pfp-Veresterung mit DCC den Pfp-Aktivester **3** (Boc-Taeg-OPfp) des Monomerbausteins (Schema 2). Unter Verwendung des „Single-coupling-protocols“^[7] führte man die Oligomerisierung in 30% DMF/Dichlormethan an einem 4-Methylbenzhydrylamino-Festphasenträger durch. Die Synthesausbeute pro Schritt wurde durch quantitative Ninhydrinanalyse zu >99% bestimmt. Die Abspaltung der Oligomere **2** vom Trägermaterial erfolgte mit wasserfreier Flußsäure.

Dieses auf den ersten Blick verblüffend einfache Konzept birgt einige Vorteile gegenüber den bislang studierten modifizierten Oligonucleotiden. Nichtionische Oligonucleotide sind inerte Verbindungen gegenüber Nucleasen. In wäßrigem Medium sollten nichtionische Verbindungen stabilere Komplexe mit unmodifizierten Oligonucleotiden bilden als ionische Vertreter. PNAs **2** lassen sich dank der Merrifield-Methode in relativ großen Mengen synthetisieren, während die Herstellung von modifizierten Oligonucleotiden bezüglich der Quantität von den maximalen Kapazitäten der Oligonucleotidsynthesizer abhängt. Außerdem lassen sich neben PNAs **2** mit einem achiralen Peptidrückgrat auch solche mit einem chiralen (stereochemisch einheitlichen) Rückgrat mit den Methoden der Peptidchemie herstellen. Diese Möglichkeit zur Kontrolle der Stereochemie ist bei den Synthesen von Methylphosphonaten, Phosphotriestern und Phosphothioaten^[8] bis heute nur für letztere gelöst. Stereochemisch uneinheitliche Produkte liefern dann komplexe, unkontrollierbare Hybridisierungseigenschaften. Weiter ist die Flexibilität im Peptidrückgrat gegenüber der in einem Phosphodiester-rückgrat durch zwei Amidbindungen pro Monomereinheit deutlich eingeschränkt. Nachteilig auswirken könnte sich allerdings ein gegenüber Oligonucleotiden verminderter Transport der PNAs **2** über die Zellmembran aufgrund fehlender aktiver Transportmechanismen. Ungewiß sind ebenfalls die Metabolisierungswege von **2** in der Zelle.

Die Anwendung von Molecular Modeling half den Autoren bei der Wahl des Monomerbausteins. Eine Monomereinheit mit sechs Bindungen (2-Aminoethylglycin) sowie ein Abstandhalter mit zwei Bindungen zwischen der Nucleobase und dem Peptidrückgrat (Methylencarbonylspace) ver-

sprach die optimale Anbindung von **2** an einen B-DNA-Einzelstrang unter Bildung einer Doppelhelix. Diese Abstände wurden unabhängig von Nielsen et al. kürzlich in der Arbeitsgruppe von Weller ermittelt^[9]. Bei diesen, ebenfalls auf Molecular Modeling basierenden Studien stand die Abhängigkeit der Monomerlänge zur Bildung helicaler Peptidstrukturen unter gleichzeitiger Bildung von Basenstapeln im Vordergrund^[9]. Die von beiden Arbeitsgruppen gefundenen optimalen Abstände überraschen allerdings nicht, da diese auch in einem natürlichen DNA-Strang zu finden sind (siehe Schema 1). Nielsen et al. synthetisierten im folgenden Hexa-**2a**, Octa-**2b** und Decamere **2c** des Thymidinylmonomers, die am C-Terminus durch einen Lysin-Rest verlängert wurden. Dieser Lysin-Rest, dessen Aminogruppe in der Seitenkette unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegt, soll einerseits bessere Wechselwirkungseigenschaften mit einem natürlichen Oligomer gewährleisten (attraktive Wechselwirkungen) und wirkt andererseits der Selbstassoziation entgegen. Weitere Modifikationen am N-Terminus sind möglich, was durch das Anbringen des Intercalators Acridin gezeigt wurde. Wie bei anderen Verbindungen verursacht Acridin eine erhöhte Assoziation zum Doppelstrang.

Überraschende Ergebnisse zeigten sich bei den PNA-DNA-Bindungsstudien. Gegen ein dA-Decamer (dA₁₀) zeigte die Lysin-Thymidin-Decamer-PNA **2c** einen außergewöhnlich hohen Schmelzpunkt T_m von 72 °C, d. h. einen um ca. 50 °C höheren T_m -Wert als bei einem dA:T-Decamer-Oligonucleotid! Auch die Erhöhung des T_m -Wertes pro zusätzlich eingebauter molekularer Einheit um ca. 10 °C ist ungewöhnlich hoch. Erwartungsgemäß fällt der T_m -Wert bei Einbringen eines oder zweier Mismatches dann aber ebenfalls etwa um diesen Wert ab. Acridin am N-Terminus erhöht den T_m -Wert um 13 °C. Bei diesen ungewöhnlich hohen T_m -Werten muß man sich fragen, ob elektrostatische Wechselwirkungen gekoppelt mit der Bildung von H-Brücken diese Beobachtungen ausreichend erklären oder ob hier bislang nicht beachtete Effekte zusätzlich bindende Anteile verursachen. Jedoch sind Hybridisierungsexperimente von Oligo(dA) gegen Oligo(T) immer ein Spezialfall. Deshalb sollte man Studien an sequenzspezifischen Oligomeren abwarten.

Bei Studien an doppelsträngiger 248-Basenpaar-DNA, die ein T₁₀/dA₁₀-Fragment enthält, konnten weitere interessante Eigenschaften beobachtet werden: Hier scheint die Lysin-Thymidin₁₀-PNA **2c** das T₁₀-Fragment vom dA₁₀-Fragment zu verdrängen, und nicht eine Dreifachhelix auszubilden, wie man vielleicht zunächst annehmen könnte und ursprünglich auch von den Autoren geplant war^[6a]. Dieser Schluß konnte durch enzymatische und chemische Abbaureaktionen überzeugend untermauert werden.

Trotz dieser äußerst positiven Eigenschaften der von Nielsen et al. erstmals beschriebenen PNAs **2** drängen sich noch einige Fragen auf, deren Beantwortung für den Einsatz dieser Verbindungen als Antisense-Oligonucleotid-Analoga mit mRNA als Zielmolekül wichtig ist. Zunächst wäre die Frage nach den Eigenschaften einer 17mer-PNA bedeutend, welche für die sequenzspezifische Erkennung benötigt wird. Eine grobe Extrapolation des beim 10mer gefundenen T_m -Wertes auf ein 17mer würde einen T_m -Wert von ca. 140 °C ergeben. Es fällt schwer, bei einem solchen Wert noch von einer bei menschlicher Körpertemperatur reversiblen Assoziation zu sprechen. Gekoppelt damit ist die Frage, ob ein solches Oligomer überhaupt noch spezifische Anbindung an kom-

plementäre Sequenzen erlaubt. Selbst acht (!) Fehlstellen im 17mer würden den T_m -Wert nicht unter Körpertemperatur abfallen lassen. Unklar ist außerdem der Befund, daß bei den UV-Titrationsen der gebildeten Duplices ein PNA:DNA-Verhältnis von 2:1 ermittelt wurde. Sollte hier vielleicht doch eine Tripelhelix im Spiel sein?

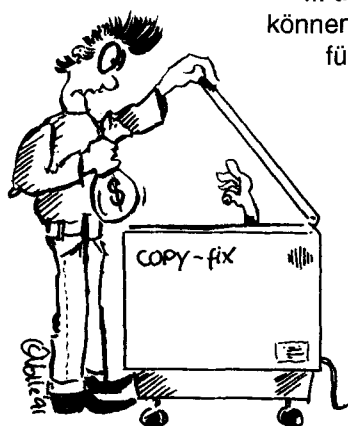
Eine weitere Frage wäre, inwiefern sich ein auf einen B-DNA-Einzelstrang zugeschnittenes Oligonucleotid gegenüber RNA verhält, zumal RNA nicht in einer B-DNA-Konformation vorliegt, sondern dem A-Typ angehört. Sind die hier beschriebenen PNAs in der Lage, die für diesen Konformationswechsel nötigen konformativen Änderungen zuzulassen? Auch zur Stabilität der beschriebenen PNAs sollten weitere Untersuchungen folgen. Sicherlich weisen diese Verbindungen eine gute Nucleasestabilität auf, aber wie verhält es sich mit der Protease- oder Peptidastabilität?

Trotz alledem läßt das hier beschriebene Konzept, PNAs anstatt Rückgrat-modifizierter Oligonucleotide zu untersuchen, noch viele aufregende Ergebnisse erhoffen, auf die mit Spannung gewartet werden wird. Kleine Änderungen am natürlichen Zucker/Phosphat-Rückgrat (Methylphosphonate oder Phosphothioate) zeigten bisher große Eigenschaftsänderungen der Oligonucleotide. Die Ergebnisse von Nielsen et al. deuten dagegen an, daß große Änderungen anscheinend eher kontrollierbare Eigenschaftsänderungen zur Folge haben können. Eines aber machen diese Arbeiten

ganz deutlich: Die Suche nach neuen DNA-Mimetica für den Einsatz als Antisense-Agentien bringt immer wieder neue, überraschende und nicht vorhersehbare Erkenntnisse über die Wechselwirkung dieser Verbindungen mit unmodifizierten Oligonucleotiden zu Tage. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß der Einsatz von Molecular Modeling ein nützliches Hilfsmittel bei dieser Aufgabe sein kann.

- [1] H. E. Moser, P. B. Dervan, *Science* **1987**, 238, 645–650; P. A. Beal, P. B. Dervan, *ibid.* **1991**, 251, 1360–1363.
- [2] M. H. Caruthers, *Science* **1985**, 230, 281–285; J. Engels, E. Uhlmann, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 733–751; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 716–734.
- [3] J. Engels, *Nachr. Chem. Tech.* **1991**, 39, 1250, zit. Lit.
- [4] An dieser Stelle sei auch auf die bereits bei Tomaten gelungene Regulation der Genexpression hingewiesen: P. Eckes, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 182; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 175, zit. Lit.
- [5] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 544–584.
- [6] a) M. Egholm, O. Burchardt, P. E. Nielsen, R. Berg, *Science* **1991**, 254, 1497–1500; b) *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1895–1897; c) Peptide als DNA/RNA-Rückgrat-Analoga wurden bereits von anderen Autoren beschrieben, allerdings zeigten die untersuchten Derivate keine Hybridisierungseigenschaften: H. De Koning, U. K. Pandit, *Rec. Trav. Chim.* **1971**, 91, 1069; J. D. Buttrey, A. S. Jones, R. T. Walker, *Tetrahedron* **1975**, 31, 73–75.
- [7] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 801; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, 24, 799.
- [8] W. Stec, A. Grajkowski, M. Koziolkiewicz, B. Uznanski, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 58883–58888.
- [9] D. D. Weller, D. T. Daly, W. K. Olson, J. E. Summerton, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 6000–6006; S.-B. Huang, J. S. Nelson, D. D. Weller, *ibid.* **1991**, 56, 6007–6018.

Nur Kopieren ist teurer...



... und zudem mühsamer! Diplomanden und Doktoranden können als studentische Mitglieder der GDCh die "Angewandte" für zehn Mark und ein paar Zerquetschte jeden Monat druckfrisch frei Haus erhalten. Das sind weniger als acht Pfennige pro Seite!

Interessiert?

Dann rufen Sie doch einfach bei Beate Schork an (Tel. 0 62 01 / 6 06 - 1 99) oder schicken ihr ein Fax (0 62 01 / 6 06 - 1 84). Aber natürlich können Sie ihr auch schreiben:

VCH-Leserservice, Postfach 10 11 61, 6940 Weinheim

