

# Biochemie und Molekularbiologie 2005

*Niedermolekulare chemische Verbindungen helfen bei der Entschlüsselung komplexer biologischer Mechanismen. Peptidnukleinsäuren ermöglichen immer empfindlichere Methoden zur Identifikation von Einzelbasenmutationen und stehen möglicherweise auch bei Antisense-Anwendungen kurz vor einem Durchbruch. Regulatorische RNA-Moleküle haben das Bild von der Rolle der RNA in biologischen Systemen grundlegend verändert.*

## Chemische Biologie

◆ Im Zeitalter der Genomforschung und der funktionellen Genomanalyse reiht sich der experimentelle Ansatz der chemischen Biologie – Störung biologischer Prozesse durch niedermolekulare Substanzen – in die Strategien anderer molekularbiologischer Disziplinen ein, welche mit anderen Mitteln selektive Störungen in biologische Systeme einführen: So nutzt die molekulare Genetik die zufällige oder auch gezielte Mutation der entsprechenden Gene oder die Inaktivierung der entsprechenden mRNA mit kurzen komplementären Oligo-

nukleotiden. Ergo zielt die chemische Biologie nur auf die Expression der genetischen Information, auf die Ebene der Genprodukte, die Proteine. Man spricht deshalb auch oft von chemischer Genetik oder Genomik.

Einige Eigenschaften der niedermolekularen Inhibitoren/Aktivatoren machen den Ansatz der chemischen Biologie besonders attraktiv: Sie können membrangängig sein, sie wirken sofort, lassen sich zeitlich und räumlich gezielt einsetzen und wieder entfernen und sie können selektiv auf einzelne Funktionen multifunktionaler Proteine gerichtet werden. Darüber hinaus liefert ihre Wirkweise direkt Konzepte für In-

vivo-Studien; sie sind wirkstofffähig und daher selbst sowie auch die getroffenen Proteinwirkorte Leitstrukturen für die Medikamentenentwicklung. Einen aktuellen Überblick geben Darvas et al.<sup>1)</sup>

Viele Aspekte chemisch-biologischer Arbeiten ragen weit in Disziplinen wie Zellbiologie, medizinische Chemie und Pharmakologie hinein. Letztlich wird auch die moderne Systembiologie kleine Moleküle nutzen, um die Struktur und Dynamik regulatorischer zellulärer Netzwerke zu studieren.

Arbeiten zur chemischen Biologie reichen deutlich weiter zurück als die erst vor wenigen Jahren getroffene Wortschöpfung, und das Gebiet



**Thorsten Berg** (Jahrgang 1967) studierte Chemie als Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes an der Universität Köln und promovierte 1996 bei Dieter Enders an der RWTH Aachen. Als Postdoktorand am Scripps Research Institute (USA) bei Kim Janda und Peter Vogt identifizierte er die ersten nicht-peptidischen Inhibitoren eines dimeren Transkriptionsfaktors. Seine 2001 gegründete Arbeitsgruppe am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried befasst sich mit der Inhibition von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit organischen Molekülen.



**Thomas Mayer** (Jahrgang 1968) studierte Biologie an der Universität Heidelberg und promovierte 1998 bei Stefan Jentsch am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg. Während seines Postdoc-Aufenthalts an der Harvard University bei Stuart Schreiber und Timothy Mitchison identifizierte er Monastrol, den ersten membrangängigen Inhibitor für ein mitotisches Motorprotein. Seit 2002 leitet er eine Emmy-Noether-Forschungsgruppe am MPI für Biochemie in Martinsried und befasst sich weiterhin mit der Inhibition mitotischer Proteine mit niedermolekularen Verbindungen.



**Ronald Frank** (Jahrgang 1948) studierte Chemie in Hamburg und promovierte bei Hubert Köster über chemische Gensynthese. Seit 1980 arbeitet er an der GBF in Braunschweig, zunächst über DNA-Synthese mit ersten Arbeiten zur Kombinatorik, später als Leiter der Arbeitsgruppe Molekulare Erkennung über Peptidsynthese. Seit 2003 ist er Leiter der Abteilung für Chemische Biologie, die Verfahren zum Hochdurchsatzscreening entwickelt und für die Suche nach Antinfektiva einsetzt. Er ist Vorsitzender der Fachsektion Chemische Biologie der Dechema, GDCh, GBM und DPhG.

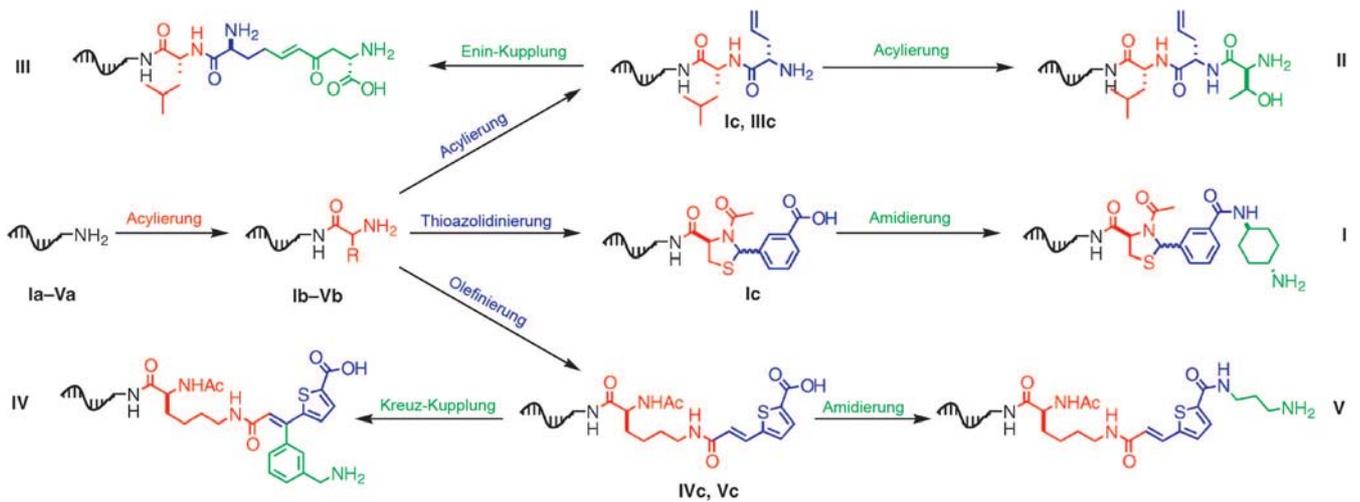


Abb. 1. Fünf DNA-gelenkte Synthesewege, schematische Darstellung. (Genehmigter Nachdruck nach Lit.2), Copyright Wiley-VCH, Weinheim)

ist umfangreicher als es zunächst scheint. Dieser Trendbericht behandelt nicht die klassischen Felder der Nucleinsäure- und Peptid/Proteinmimetika, sondern fokussiert auf Arbeiten mit wirkstoffähnlichen niedermolekularen Substanzen.

### Die Suche im chemischen Strukturraum

Die Identifizierung einer Substanz mit den gewünschten biologischen Eigenschaften folgt einem empirischen Prozess und ist das Ergebnis einer Testung unterschiedlichster Kandidatenverbindungen, in vivo, in vitro oder in silico. Verschiedens-

te Quellen wie Naturstoffe (auch Extrakte) und synthetische Substanzen kommen zum Einsatz. Die Dynamik der Entwicklung von Synthesewegen für neue Strukturen, die für die hochparallele oder kombinatorische Reaktionsführung in Lösung und an fester Phase geeignet sind, ist ungebrochen und erschließt kontinuierlich neue Molekülrepertoires. Pharmazeutische Unternehmen haben ihre Sammlungen über viele Jahre perfektioniert; die Qualität und Diversität käuflicher Repertoires ist aber auch deutlich gestiegen. Tatsächlich sind jedoch mehr unterschiedliche kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht bis 1000 Da

denkbar als auf der Erde an Masse für deren Synthese vorhanden ist, und jede Suche wird daher nur einen winzigen Ausschnitt des chemischen Strukturraumes durchforschen können.

Die ungünstigste Situation ist die Suche nach einem Liganden für ein Zielprotein unbekannter Struktur. Ohne Auswahlkriterien gilt: je mehr Verbindungen, desto besser. Entsprechend muss dann aber auch der materielle und technische Aufwand für eine solche Suche angepasst sein, d.h. weniger und kleiner. Hier werden primär Repertoires aus mehreren Millionen Verbindungen eingesetzt, erzeugt mit kombinatorischen Syntheseverfahren wie der Mix-and-Split-Methode. Solche Repertoires entstehen jedoch nach einem linearen Syntheseweg, und die Komponenten haben jeweils alle das gleiche Grundgerüst.

Synthesen, die über unterschiedliche Umlagerung der Zwischenprodukte zu verschiedenen Grundgerüsten führen, stammen aus den letzten Jahren. Durch kovalente Verknüpfung der Edukte mit jeweils komplementären DNA-Fragmenten haben Calderone und Li ein Verfahren entwickelt, mit dem kontrolliert und simultan in einem Reaktionsgemisch unterschiedliche Synthesewege zu verschiedenen Produkten führen können (Abbildung 1).<sup>2)</sup> Mit der DNA-Kodierung finden sich die jeweils produktiven Edukte in der Lösung durch Hybridisierung der

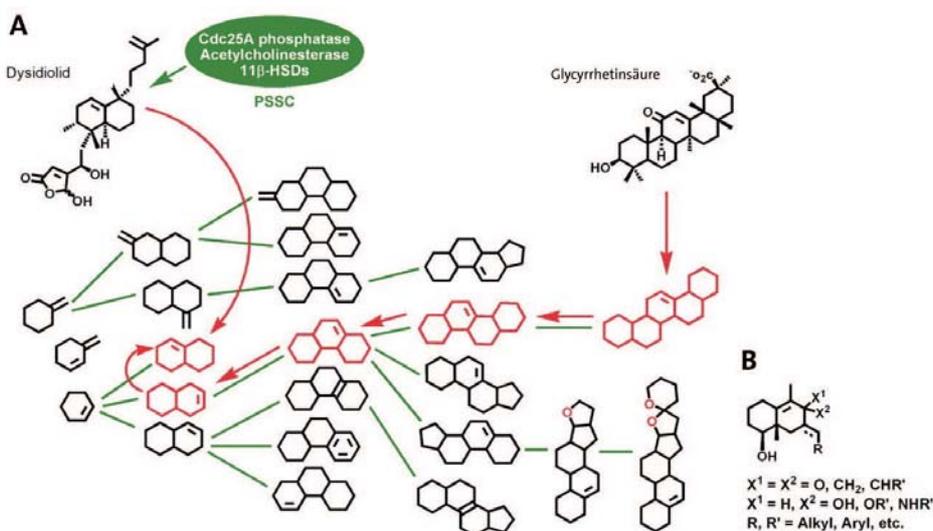


Abb. 2. A) Ausschnitt aus dem Stammbaum von cyclischen Naturstoffgerüsten mit dem Ast, der die Glycyrrhetinsäure mit Dysidiolid verbindet. B) Abgeleitetes Grundgerüst für die Bibliothekssynthese. (Genehmigter Nachdruck nach Lit.3), Copyright National Academy of Sciences, USA)

DNA-Tags; die Produkte können dann über die DNA-Tags aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden. Die Reaktionen werden im nmol-Maßstab durchgeführt und so wie nukleinsäurecodierte Peptid/Protein-Bibliotheken der Molekularbiologie für In-vitro-Selektion auf Bindung an immobilisierte Zielproteine eingesetzt; auch sehr wenige gebundene Moleküle können noch über PCR-Amplifizierung des DNA-Codes identifiziert werden.

Auswahlkriterien für eine Fokussierung auf kleinere Substanzsammlungen lassen sich der Natur selbst entnehmen, wie u. a. Waldmann in den letzten Jahren demonstrieren konnte. Durch Strukturvergleich des Zielproteins (besser der Bindungsdomäne) mit anderen Proteinen können Ähnlichkeitsfamilien abgeleitet werden. Wenn zu einem anderen Mitglied der Familie ein Ligand bekannt ist, kann man dem Ähnlichkeitsprinzip folgend diesen als Ausgang für die Herstellung einer Bibliothek nehmen. Naturstoffe haben den Vorteil, bereits als biologisch vorausgewählte Strukturen privilegiert für den Einsatz in der chemischen Biologie zu sein. Leider sind sie jedoch häufig sehr komplex und präparativ schlecht zugänglich.

Um den von der Natur genutzten Teil des chemischen Strukturraumes besser zu charakterisieren und nutzen zu können, haben Waldmann und Mitarbeiter jetzt ein Klassifizierungsschema entworfen, welches die Ringteilstrukturen von 154428 Naturstoffen nach Ringart und -zahl hierarchisch in Beziehung zueinander setzt.<sup>3)</sup> Dieses Schema diente zur Suche nach einem selektiven synthetischen und naturstoffähnlichen Inhibitor für die 11 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase(11 $\beta$ HSD)-Typ1. Der Strukturähnlichkeitsfamilie dieses Enzyms wurde auch die Cdc25A-Phosphatase zugeordnet, zu der ein natürlicher Inhibitor, Dysidiolid, ein sehr viel einfacheres Octahydronaphthalingerüst aufweist als der unspezifisch auf 11 $\beta$ HSD-Typ 1 und 2 wirkende Inhibitor Glycyrrhetinsäure, ein pentacyclisches Steroidanalogon (Abbildung 2). Unter den

162 Verbindungen um das beiden Strukturen gemeinsame einfachere Gerüst (Abbildung 2B) waren 20% Treffer, darunter der bisher potenteste ( $IC_{50} = 0,35 \mu M$ ) und selektivste Inhibitor für 11 $\beta$ HSD-Typ 1. RF

Ein zellbasierter, phänotypgerichteter Test auf die biologische Wirkung einer Substanz ist chancenreicher, da gleich eine Vielzahl an Wirkorten simultan abgefragt wird und Effektoren für sämtliche an einem bestimmten biologischen Signalweg beteiligten Proteine detektiert werden. So sind hier schon kleine Substanzrepertoires von wenigen Hundert bis Tausend diverser Strukturen sehr oft erfolgreich. Allerdings ist der Wirkort einer gefundenen Substanz noch nicht bekannt und muss erst durch weitere Analysen identifiziert werden. Mit einem  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Luciferase-Reporter-Assay (TCF = T-Zell-Faktor) konnten Liu und Kollegen<sup>4)</sup> aus einer Kollektion von 100000 Heterocyclen ein Pyrimidinderivat identifizieren, das aktivierend auf den Wnt-Pathway wirkt. Dieser Signalweg ist u. a. für die Embryogenese verantwortlich. Untersuchungen an Froschembryonen zeigten darüber hinaus, dass die identifizierte Substanz, deren Zielmolekül bislang noch nicht identifiziert wurde, Defekte in der Kopfmorphologie behandelter Froschembryonen – von verkleinerten Köpfen bis hin zu Köpfen ohne Augen – hervorrief (Abbildung 3). Ähnliche Phänotypen werden auch durch die Überexpression aktivierend wirkender Proteine des Wnt-Pathways hervorgerufen. Diese Beobachtung ist in Einklang mit der agonistischen Wirkung der niedermolekularen Verbindung. TM

Um die Identifizierung des Zielproteins zu vereinfachen, haben Evans et al. eine an den Merkmalen von Naturstoffen orientierte Substanzbibliothek erstellt. Dazu gehören eine proteinreaktive Funktion (Spiroepoxid) sowie eine Alkylgruppe für spätere Markierung mit einer Fluoreszenz- und Biotingruppe durch Triazolkopplung (Click-Chemie) (Abbildung 4).<sup>5)</sup> Eine Biblio-

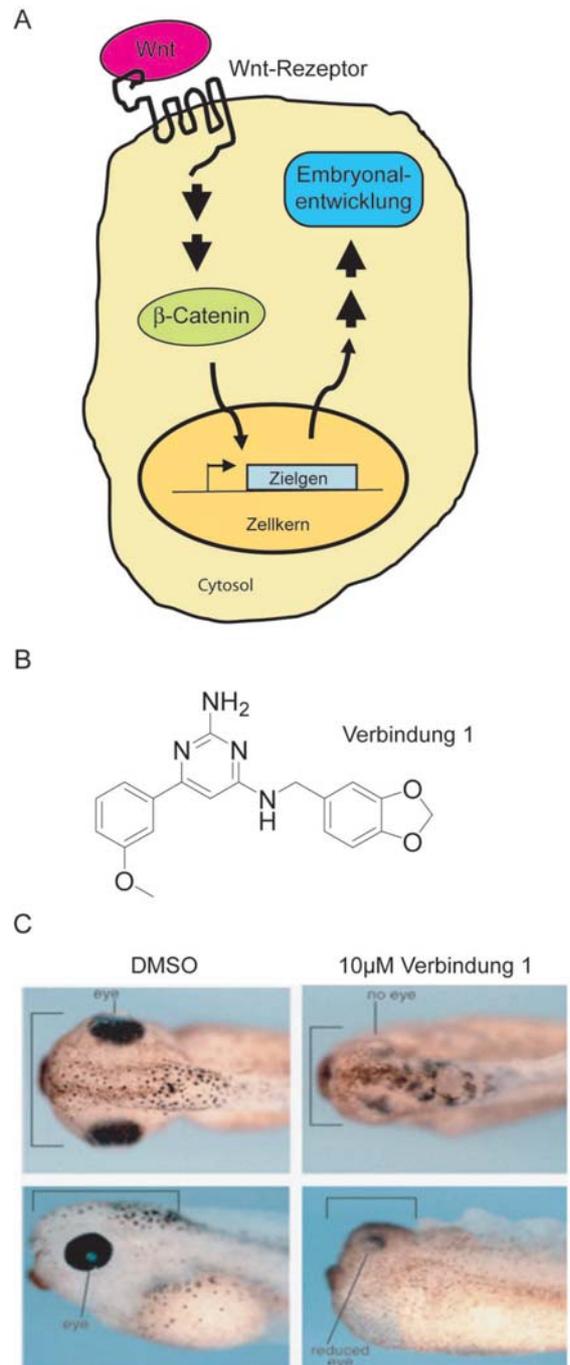
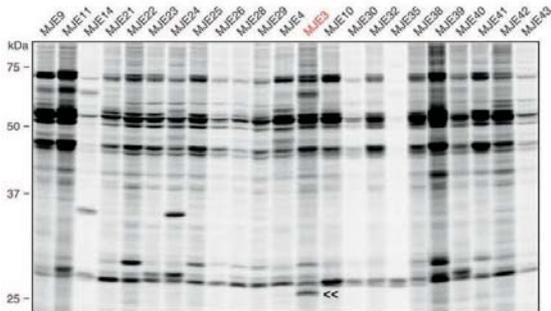
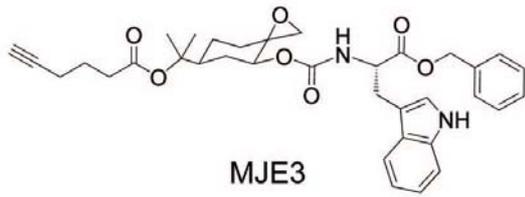


Abb. 3. A) Der Wnt-Pathway in schematischer Darstellung des: Die Bindung des Wnt-Proteins an seinen Transmembranrezeptor verhindert den cytosolischen Abbau von  $\beta$ -Catenin. Stabilisiertes  $\beta$ -Catenin gelangt in den Zellkern und aktiviert im Komplex mit Transkriptionsfaktoren der TCF-Familie die Expression von Proteinen, welche die Embryonalentwicklung regulieren. B) Struktur von Verbindung 1, die aktivierend in einem  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Luciferase-Reporter Assay wirkt. C) Verbindung 1 induziert Kopfddefekte bei Froschembryonen. (Genehmigter Nachdruck nach Lit.4), Copyright Wiley-VCH, Weinheim)



**Abb. 4.**  
**Struktur von MJE3**  
**und das Rhodamin-**  
**fluoreszenzabbild**  
**der Gelelektrophore**  
**re behandelter**  
**Zellextrakte.** (Genehmigter Nachdruck nach Lit.5), Copyright nature publishing group).

thek von nur 50 Verbindungen enthält bereits eine Substanz (MJE3), welche die Proliferation der invasiven humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 inhibieren kann. Zellextrakte der behandelten Zelllinie wurden mit einem Rhodaminazid markiert und zeigten eine MJE3-spezifische Proteinbande in einem Elektrophoresegele. Dieses Protein wurde durch Markierung des Extraktes mit einem Rhodamin-Biotin-Azid über eine Avidinsäule angereichert, gelelektrophoretisch gereinigt und über

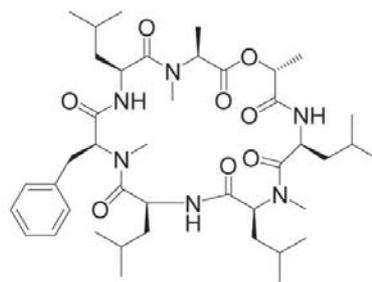
LC-MS der tryptischen Peptide als Phosphoglyceratmutase 1 (PGAM1) erkannt. Rekombinante Expression von PGAM1 in einer anderen Zelllinie bestätigte, das dieses Enzym das Zielprotein von MJE3 ist. RF

**Substanzen zeigen Profil**

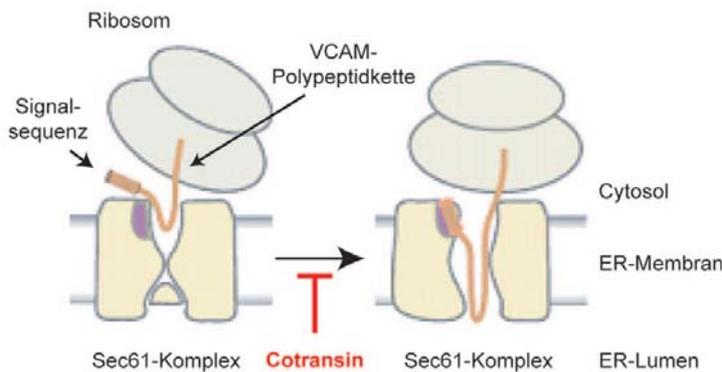
Das große Potential phänotypgerichteter zellbasierter Tests zeigen zwei weitere Publikationen: Yarrow et al. identifizierten bei der Suche nach Inhibitoren der Zellwanderung anhand von weiterführenden zellulären Assays die Rock-Kinase als Zielmolekül einer Substanz namens Rockout.<sup>6)</sup> Diese Arbeit ist somit eines der noch wenigen Beispiele, bei dem das zelluläre Zielprotein einer in einem phänotypbasierten Test gefundenen bioaktiven Substanz identifiziert werden konnte. Darüber hinaus belegt diese Publikation, wie die Untersuchung bekannter bioaktiver Substanzen und die anschließende „Profilierung“ der beobachteten Phänotypen, Aufschluss darüber geben können, welche biologischen Signalwege bei einem Test betroffen sein können. Diese Information kann einerseits dazu dienen, Substanzen auszusortieren, deren Profil

auf die Beeinflussung eines unerwünschten Signalweg vermuten lässt und andererseits kann sie als Anhaltspunkt für die Identifizierung des zellulären Zielproteins herangezogen werden. Die automatisierte Bildanalyse von morphologischen Zelländerungen im Hochdurchsatz entwickelt sich zu einer sehr ergiebigen Quelle zur unvoreingenommenen Beurteilung der Bioaktivität bekannter und neuer Substanzen.

In einer Reihe eleganter Experimente wiesen Garrison und Kollegen nach, dass Cotransin, ein synthetisches Cyclodepsipeptid, die Translokation von Proteinen aus dem Cytosol in das Endoplasmatische Retikulum (ER) und somit den Transport von sekretierten oder Plasmamembran-Proteinen an die Zelloberfläche inhibiert.<sup>7)</sup> Bei Cotransin handelt es sich um ein vereinfachtes Derivat von HUN-7293, ein aus Pilzextrakten isoliertes cyclisches Heptadepsipeptid. Obwohl HUN-7293 ursprünglich aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf die Sekretion des extrazellulären Proteins VCAM identifiziert wurde, war das zelluläre Zielprotein dieser Substanz bislang unbekannt. Mit Crosslinking-Experimenten gelang es Garrison und Mitarbeitern den Sec61-Translokationskomplex als das zelluläre Target von Cotransin zu identifizieren (Abbildung 5). Der Sec61-Proteinkomplex bildet eine Pore in der ER-Membran, durch den alle sekretierten Proteine transportiert werden müssen. In Anbetracht der universellen Funktionen des Sec61-Komplex überrascht es, dass Cotransin nur die Sekretion von VCAM, jedoch nicht von Preprolactin, einem ebenfalls sekretierten Protein, inhibiert. TM



**Abb. 5.**  
**Oben: Struktur von**  
**Cotransin.**  
**Unten: Cotransin**  
**inhibiert die Trans-**  
**lokation der VCAM-**  
**Polypeptidkette**  
**durch den Sec61-**  
**Komplex in das ER-**  
**Lumen.** (Genehmigter Nachdruck nach Lit.7), Copyright nature publishing group).



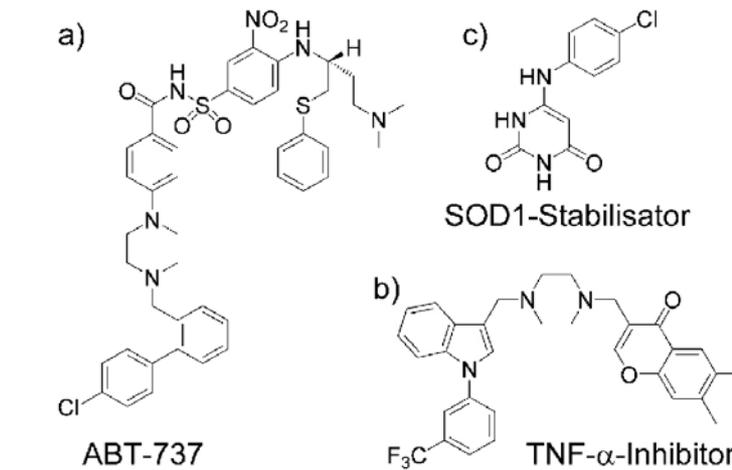
**Protein-Protein-Wechselwirkungen**

Genomweite Interaktionsanalysen mit der Hefe-Zwei-Hybrid-Methode und der Analyse nativer zellulärer Proteinkomplexe enthüllen eine Vielfalt potentieller Protein-Protein-Wechselwirkungen, die sich für

die biologische Validierung durch chemische Inhibition anbieten. Jedoch ist die Identifikation hochaffiner niedermolekularer Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen nicht zuletzt aufgrund der Größe der Protein-Protein-Grenzflächen nicht trivial. Zudem stehen nicht immer Bindungstaschen wie bei Enzymen für das Eindocken zur Verfügung.

Ein Highlight des vergangenen Jahres war die Entdeckung eines nanomolaren Inhibitors der Wechselwirkungen zwischen anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-w) und ihren pro-apoptotischen Bindungspartnern.<sup>8)</sup> Anti-apoptotische Bcl-2-Proteine unterdrücken den programmierten Zelltod (Apoptose), indem sie an pro-apoptotische Proteine binden und diese dadurch deaktivieren. Die Substanz mit der Bezeichnung ABT-737 haben die Arbeitsgruppen von Fesik und Rosenberg durch eine Kombination von NMR-basierter Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen, Parallelsynthese und rationales Design entwickelt (Abbildung 6). ABT-737 blockiert die Bindungsstelle wichtiger Bcl-2-Proteine für pro-apoptotische Proteine. Die Aktivität und Selektivität der Substanz in der Zellkultur und im Tiermodell sollte ABT-737 zu einem nützlichem Werkzeug für die Untersuchung apoptotischer Mechanismen machen.

Ein weiteres Highlight war die Entdeckung eines niedermolekularen Inhibitors des Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). TNF- $\alpha$  spielt eine wichtige Rolle bei der Reaktion des Immunsystems auf Gewebeschäden sowie virale und bakterielle Infektionen. Es bildet Homotrimer, die an die TNF- $\alpha$ -Rezeptoren binden und deren Trimerisierung induzieren. Cunningham und Mitarbeiter fanden eine niedermolekulare Substanz, die im mikromolaren Konzentrationsbereich die Dissoziation eines der drei TNF- $\alpha$ -Moleküle des (TNF- $\alpha$ )<sub>3</sub>-Komplexes induziert und einen Komplex mit den verbleibenden beiden TNF- $\alpha$ -Untereinheiten bildet (Abbildung



gen 6, 7).<sup>9)</sup> Der resultierende TNF- $\alpha$ /TNF- $\alpha$ /Inhibitor-Komplex kann nicht mehr an die TNF-Rezeptoren binden und diese deshalb auch nicht mehr aktivieren – ein überraschender Wirkungsmechanismus, der Möglichkeiten zur Inaktivierung multimerer Proteinkomplexe eröffnet.

Niedermolekulare Substanzen können Protein-Protein-Wechselwirkungen jedoch nicht nur inhibieren, sondern auch stabilisieren. In Patienten mit familiärer amyotropher Lateralsklerose treten Mutationen in dem für das Enzym Superoxid-Dismutase kodierenden Gen (SOD1) auf, die zur vermehrten Dissoziation des als Dimer vorliegenden Proteins führen. Die monomeren Proteinmutanten bilden anschließend oligomere Proteinaggregate, die im Zusammenhang mit den Krankheitssymptomen stehen könnten. Die Arbeitsgruppen von Ray und Lansbury identifizierten etwa 15 Substanzen, welche die dimere Form einer dissoziationslabilen Mutante der Superoxid-Dismutase stabilisieren und damit die Aggregation des Proteins unterdrücken (Abbildungen 6, 8).<sup>10)</sup> Diese Substanzen könnten wertvolle Hilfsmittel für mechanistische Untersuchungen der Proteinaggregation sein.

Die Bedeutung der Stabilität von Proteinkomplexen demonstrierten Kessler und Mitarbeiter anhand der DNA-Bindungseigenschaften von Mutanten des Tumorsuppressors p53.<sup>11)</sup> Die Bindung von p53 an

DNA wird durch eine Salzbrücke zwischen den Proteinen kooperativ verstärkt. Diese Salzbrücke kann nicht zwischen bestimmten p53-Mutanten gebildet werden, die bei der mit p53-Mutationen assoziierten Krebserkrankung Li-Fraumeni-Syndrom vorliegen. TB

**Entwicklung und Ausblick**

◆ Wie kann nun ein Biologe mit einer spannenden Frage die Methodik der chemischen Biologie für sich nutzen? Teure Substanzsammlungen sind für ein universitäres Biologielabor, das im wesentlichen an einer zentralen Frage arbeitet, nicht erschwinglich. Darüber hinaus wäre das Instrumentarium für Hochdurchsatztestung auch nicht ausgelastet. Förderung für solche „Screening-Projekte“ ist eher selten.

Abb. 6. Chemische Strukturen der im Text genannten Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen. a) ABT-737, Inhibitor anti-apoptotischer Bcl-2 Proteine; b) TNF- $\alpha$ -Inhibitor; c) Beispiel für einen Stabilisator von SOD1-Dimeren.

Abb. 7. Überlagerung der Kristallstrukturen des TNF- $\alpha$ -Trimers (grau) und dem aus zwei TNF- $\alpha$ -Molekülen (gelb-blau) und dem niedermolekularen Inhibitor (grün) bestehenden Komplex. (Genehmigter Nachdruck aus Lit.9), Copyright AAAS)



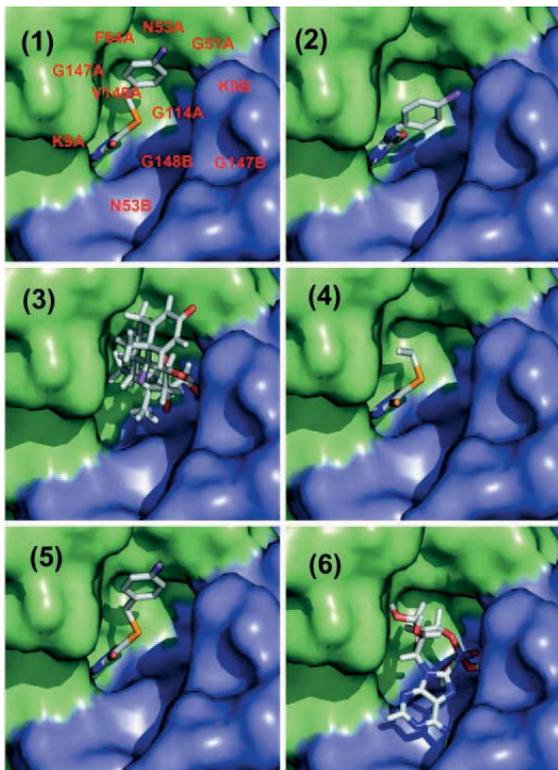


Abb. 8. Interdisziplinäre Zusammenarbeit ist daher gefragt. **Docking von SOD1-Stabilisatoren in die Bindungstasche von SOD1.** (Genehmigter Nachdruck aus Lit. 10), Copyright National Academy of Sciences, USA)

Zusammenarbeit ist daher gefragt.

In den USA sind Infrastrukturen entstanden, die Zugang dazu bieten. Die National Institutes of Health haben mit ihrer Roadmap die Suche nach niedermolekularen Liganden für alle humanen Proteine ausgerufen und fördern mit der „Molecular Library Initiative“ den Aufbau einer entsprechenden Substanzbank.

In Europa zeigen sich erste Ansätze. Das ChemBioNet versucht ein Netzwerk aus Chemikern und Biologen für die akademische Forschung in Deutschland aufzubauen ([www.chembionet.de](http://www.chembionet.de)). RF

Thorsten Berg, Thomas U. Mayer  
Max-Planck-Institut für Biochemie  
Martinsried  
berg@biochem.mpg.de  
mayer@biochem.mpg.de  
Ronald Frank  
Abteilung Chemische Biologie  
Gesellschaft für Biotechnologische  
Forschung mbH, Braunschweig  
frank@gbf.de

- 1) Chemical Genomics (Hrsg.: F. Darvas, A. Guttman, G. Doormán), Marcel Dekker, New York, 2004.
- 2) C. T. Calderone, D. R. Liu. *Angew. Chem.* 2005, 117, 7549–7552.
- 3) M. A. Koch, A. Schuffenhauer, M. Scheck, S. Wetzel, M. Casaulta, A. Odermatt, P. Ertl, H. Waldmann. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 17272–17277.
- 4) J. Liu, X. Wu, B. Mitchell, C. Kintner, S. Ding, P. G. Schultz. *Angew. Chem.* 2005, 117, 2023–2026.
- 5) M. J. Evans, A. Saghatelian, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt. *Nature Biotechnol.* 2005, 23, 1303–1307.
- 6) J.C. Yarrow, G. Totsukawa, G. T. Charras, T. J. Mitchison. *Chem. Biol.* 2005, 12, 385–395.
- 7) J. L. Garrison, E. J. Kunkel, R. S. Hedge, J. Taunton. *Nature* 2005, 436, 285–289.
- 8) T. Oltersdorf, S. W. Elmore, A. R. Shoemaker, R. C. Armstrong, D. J. Augeri, B. A. Belli, M. Bruncko, T. L. Deckwerth, J. Dinges, P. J. Hajduk, M. K. Joseph, S. Kitada, S. J. Korsmeyer, A. R. Kunzer, A. Letai, C. Li, M. J. Mitten, D. G. Nettesheim, S. Ng, P. M. Nimmer, J. M. O'Connor, A. Oleksijew, A. M. Petros, J. C. Reed, W. Shen, S. K. Tahir, C. B. Thompson, K. J. Tomaselli, B. Wang, M. D. Wendt, H. Zhang, S. W. Fesik, S. H. Rosenberg. *Nature* 2005, 435, 677–681.
- 9) M. M. He, A. Stroustrup Smith, J. D. Oslob, W. M. Flanagan, A. C. Braisted, A. Whitty, M. T. Cancilla, J. Wang, A. A. Lugovskoy, J. C. Yoburn, A. D. Fung, G. Farrington, J. K. Eldredge, E. S. Day, L. A. Cruz, T. G. Cachero, S. K. Miller, J. E. Friedman, I. C. Choong, B. C. Cunningham. *Science* 2005, 310, 1022–1025.
- 10) S. S. Ray, R. J. Nowak, R. H. Brown, Jr., P. T. Lansbury, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 3639–3644.
- 11) A. Dehner, C. Klein, S. Hansen, L. Müller, J. Buchner, M. Schwaiger, H. Kessler. *Angew. Chem.* 2005, 117, 5381–5386.

## Peptidnukleinsäuren in der Biomedizin

◆ Ende der achtziger Jahre löste die Entwicklung des Antisense-Konzepts, das auf der selektiven Hemmung der Expression einzelner Gene durch sequenzspezifische Bindung an zelluläre Nukleinsäuren beruht, eine fieberhafte Suche nach metabolisch stabilen Nukleinsäuremimetika aus. Die 1991 von Nielsen und Mitarbeitern entdeckten Peptid- oder Polyamidnukleinsäuren (PNA) sind Nukleinsäureanaloge, bei denen das Ribosephosphatrückgrat durch eine Polyamidstruktur ersetzt ist. Sie haben eine Reihe von Eigenschaften, die sie für den Einsatz als Antisense-Therapeutika geeignet erscheinen lassen:<sup>1)</sup> Sie sind nicht nur chemisch und metabolisch überaus stabil, sondern sind in ihren Bindungseigenschaften denen natürlicher RNA oder DNA überlegen. PNA hybridisieren mit komplementärer DNA oder RNA in Einklang mit den Watson-Crick-Regeln der Basenpaarung (Abbildung 1).<sup>2)</sup> Da es sich bei PNA um ungeladene Moleküle handelt, entfällt jedoch eine abstoßende Wechselwirkung mit dem Phosphodiesterückgrat der Nukleinsäuren und ein PNA-DNA-Duplex weist, im Vergleich zu einem DNA-DNA-Duplex, eine um ca. 1 K pro Base erhöhte Schmelztemperatur auf. Eine Einzelbasenfehlpaarung in einem PNA-DNA-Duplex erniedrigt aber die Schmelztemperatur um 8 bis 20 K. Dieser Wert ist damit fast doppelt so hoch wie der für eine Einzelbasenfehlpaarung in einem entsprechenden DNA-DNA-Duplex. Vor allem geringe Zellgängigkeit, schlechte Wasserlöslichkeit und die aufgrund des hydrophoben Charakters relativ stark ausgeprägte Neigung zur (Selbst-)Aggregation, verhinderten bisher jedoch den Einsatz der PNA als Antisense-Wirkstoffe.

### PNA in der Bioanalytik

◆ Im Gegensatz zur Nutzung in der Antisense-Therapie konnte die PNA in der Bioanalytik einen wahren Siegeszug antreten: Fluoreszenzmar-