

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)

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). 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:¹⁾ 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).²⁾ 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

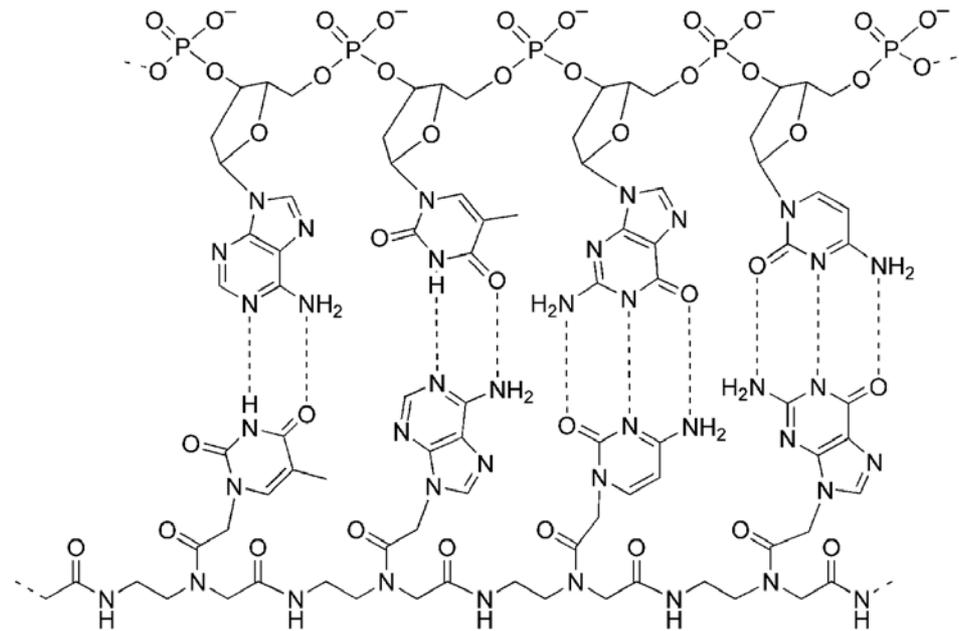
◆ Im Gegensatz zur Nutzung in der Antisense-Therapie konnte die PNA in der Bioanalytik einen wahren Siegeszug antreten: Fluoreszenzmar-

kierte PNA-Oligomere mit einem terminalen Desoxynukleotid werden von DNA-Polymerasen erkannt und finden bereits seit einiger Zeit breite Anwendung u. a. als Primer für die Real-Time-PCR.

Ein vielversprechender Ansatz zur homogenen DNA-Analyse sind beispielsweise PNA-Oligomere, die ein über einen flexiblen Linker gebundenes Thiazolorange(TO)-Molekül tragen.³⁾ Derartige, als „light-up probes“ bezeichnete Konjugate, fluoreszieren nur nach Hybridisierung mit einer Nukleinsäure zu einem Doppelstrang, da TO ein Intercalator ist, der nur im intercalierten Zustand fluoresziert (Abbildung 2A). Bei Temperaturen wenig unterhalb der Schmelztemperatur der komplementären PNA-DNA-Duplexes können solche PNA-TO-Proben auch zum Nachweis von Einzelbasenmutationen dienen.

Als noch wesentlich vielseitiger könnte sich ein kürzlich von der Arbeitsgruppe Seitz vorgestelltes Konzept erweisen: Statt über einen Linker am N- oder C-Terminus ist TO innerhalb des PNA-Stranges angebracht, so dass es als universelles Basensurrogat fungieren kann.⁴⁾ Im Falle einer Hybridisierung mit einem komplementären DNA-Strang kommt es zu einer erzwungenen Intercalation, die mit einem Fluoreszenzanstieg verbunden ist (Abbildung 2B). Sollte es zu einer Hybridisierung mit einer mutierten DNA kommen, was in unmittelbarer Nachbarschaft des TO-Restes zu ungepaarten Basen führen würde, so fällt die Intensität der Fluoreszenz deutlich geringer aus (Abbildung 2C). Auf diese Weise entsteht eine zusätzliche Ebene der Sequenzdiskriminierung, die eine Unterscheidung zwischen einer Wildtyp-DNA und einer spezifischen Einzelbasenmutante ermöglicht – auch deutlich unterhalb der Schmelztemperatur von PNA-DNA-Oligomeren, zum Beispiel bei Körpertemperatur.

Zur Früherkennung einer Reihe von Krebsarten ist es wünschenswert, geringste Mengen mutierter DNA in Anwesenheit von Wildtyp-DNA nachweisen zu können. Als



derzeit sensitivste Methode zum Nachweis von Einzelbasenmutationen gilt der „oligonucleotide ligation assay“ (OLA).⁵⁾ Diese Analyse-methode basiert auf der enzymatischen Ligation von zwei DNA-Fragmenten an einer definierten komplementären DNA-Matrize. Ungepaarte Basen in Nachbarschaft der Ligationstelle toleriert die Ligase kaum, und die Ligation verläuft bis zu 3000fach langsamer.

Eine aktuelle, der OLA zumindest ebenbürtige, PNA-basierte Methode nutzt eine der native chemical ligation analoge chemische Ligation.⁶⁾ Die zu verknüpfenden PNA-Stränge werden in sehr geringen Konzentrationen eingesetzt. Durch Bindung an ein DNA-Templat erhöht sich die effektive Molarität der reaktiven Gruppen, und die Geschwindigkeit der Reaktion wird stark erhöht. So verläuft die Ligation an einem komplementären DNA-Templat ca. 3500-mal schneller als an einer entsprechenden DNA mit einer Einzelbasenmutation. Mit dieser Methode konnte ein mutiertes ras-Gen-Segment noch bei einem 500fachen Überschuss an Wildtyp-DNA zuverlässig mit MALDI-TOF nachgewiesen werden.

Nur 10 fmol DNA-Templat benötigen Boll et al., um Einzelbasenfehlpaarungen aufzuspüren.⁷⁾ In dieser

Arbeit wird ein an PNA gebundener Cu^{2+} -Komplex so in die Nähe eines PNA-gebundenen N-Methyl-2-imidazolylesters gebracht, dass dieser an das koordinativ ungesättigte Kupferion bindet. Dadurch wird die Hydrolyse des Esters um einen Faktor von etwa 500 schneller. Die kinetische Diskriminierung gegenüber DNA-Templaten, die sich in einer einzigen Base unterscheiden, beläuft sich auf einen Faktor von über 200 und ist damit zumindest ebenso gut wie die Diskriminierung durch T4 Ligase.

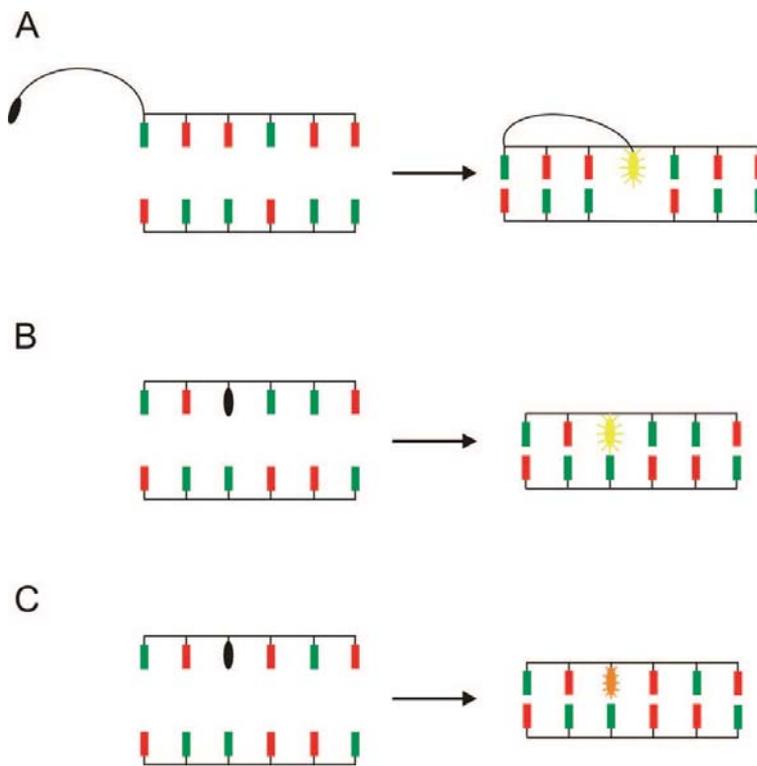
PNA-Peptid-Konjugate für Antisense-Anwendungen

◆ In jüngster Zeit ist das Interesse am Einsatz von PNA als Antisense-Moleküle wieder gestiegen: So gilt mittlerweile generell die geringe Zellgängigkeit von Antisense- und siRNA-Molekülen als das größte Problem, das einer breiteren Anwendung der Antisense-Technologie und verwandter Methoden für medizinische Zwecke im Wege steht.

Die kovalente Anbindung von Nukleinsäuren und ihren Derivaten an zellpenetrierende Peptide („cell penetrating peptides“, CPP), welche die Überwindung der Plasmamembran gewährleisten sollen, scheint ein prinzipieller Lösungsansatz zu sein. Die Herstellung derartiger

Abb. 1. Bindung von PNA an komplementäre DNA in der bevorzugten antiparallelen Orientierung.

Abb. 2.
 A) TO-PNA-Konjugat. Die Hybridisierung mit (komplementärer) DNA führt zur Intercalation des flexibel gebundenen TO-Restes und zu einem Anstieg der Fluoreszenzemission.
 B) Bei Verwendung eines TO-Restes als Basenurrogat kommt es durch die Hybridisierung mit DNA zu einer erzwungenen Intercalation und dem damit verbundenen Anstieg der Fluoreszenzemission.
 C) Wenn die dem TO-Rest benachbarten Basen nicht nach den Watson-Crick-Regeln gepaart sind, entsteht nur ein abgeschwächtes Fluoreszenzsignal.



Konjugate aus den in der Regel mehrfach positiv geladenen Transduktionspeptiden einerseits und den polyanionischen Nukleinsäuren andererseits ist jedoch aufgrund unspezifischer Aggregation äußerst schwierig. Hier könnten wiederum die speziellen Eigenschaften der PNA den entscheidenden Vorteil auf dem Weg zum breiten Einsatz von Antisense-Therapeutika liefern: Konjugate aus ungeladenen PNA und Peptiden sind mit Standard-Peptidsynthesemethoden einfach herstellbar. Folglich wurde in jüngerer Zeit über eine Reihe von Antisense-Experimenten berichtet, die PNA-CCP-Konjugate zur Hemmung der Genexpression nutzen.⁸⁾ Offenbar werden die meisten solcher PNA-CCP-Konjugate endosomal, also durch Einstülpung und Abschneuerung von Lipidvesikeln aus der Plasmamembran, aufgenommen. Nach Aufnahme in die Zelle scheint jedoch der weitaus größte Teil der Konjugate innerhalb der Endosomen festzusitzen und somit für eine Interaktion mit zellulären Nukleinsäuren nicht zur Verfügung zu stehen.

Kürzlich berichteten Nielsen et al. über eine signifikante Verbesserung des Antisense-Effektes von

PNA-CCP-Konjugaten durch gleichzeitige Gabe von Ca^{2+} -Ionen (bis zu 6 mM).⁹⁾ Mehrere Hinweise deuten darauf hin, dass dieser Effekt durch eine erhöhte Freisetzungsrates der Konjugate aus den Endosomen („endosomal escape“) zustande kommt.

Unterdrückung der Genexpression durch DNA-bindende PNA

◆ Als möglicherweise größter Vorteil von PNA-Oligomeren könnte sich deren Fähigkeit erweisen, auch mit doppelsträngiger DNA sequenzspezifisch zu interagieren. Bei dem als „Doppelstrang-Invasion“ bezeichneten Vorgang wird eine Hälfte eines DNA-Doppelstranges durch PNA verdrängt. Lange Zeit glaubte man, dass dieses Phänomen allein auf Homopurin- oder Homopyrimidin-Sequenzen beschränkt sei. Neuere Ergebnisse belegen jedoch, dass auch PNA-Oligomere mit einer gemischten Nukleobasensequenz zur Doppelstrang-Invasion fähig sind.¹⁰⁾ Voraussetzung ist allerdings, dass der komplementäre Bereich an einem der beiden Enden des betreffenden DNA-Doppelstrangs lokalisiert ist.

Eine erleichterte Stranginvasion

tritt auch bei DNA-Duplices ein, die teilweise ungepaarte Basen aufweisen. Eine derartige Situation findet sich in der Zelle zum Beispiel am „offenen Komplex“, der während der Initiation der RNA-Synthese an der Stelle des Transkriptionsstarts auftritt. Dabei wird die DNA-Doppelhelix auf einem elf Basenpaar langen Abschnitt entwunden. Dieser Bereich entspricht den Basen -9 bis +2 der zu synthetisierenden mRNA.

Die Gruppe um David R. Corey zeigte kürzlich, dass gegen die Transkriptionsstart-Sequenzen der humanen Progesteron Rezeptoren A und B gerichtete PNA-19mere die Transkription der entsprechenden mRNAs weitgehend unterdrücken.¹¹⁾ Da die PNA-Oligomere nicht zu den mRNAs, sondern nur zu den regulatorischen DNA-Sequenzen komplementär waren, ist ein posttranskriptionaler Mechanismus durch Blockierung oder Degradation der mRNA auszuschließen. In Abgrenzung zu herkömmlichen Antisense-Oligomeren werden diese PNA als „antigene Peptide Nucleic Acids“ (agPNA) bezeichnet.

Die agPNA wurden durch Lipotransfektion zusammen mit partiell komplementärer DNA in einer Konzentration von 25 nM auf menschliche Zellkulturen appliziert und sind damit etwa genauso potent wie PNA, die gegen die entsprechende mRNA gerichtet sind. Ob Konjugate aus PNA mit zellpenetrierenden Peptiden ebenfalls in der Lage sind, an die DNA des offenen Präinitiationskomplexes zu binden, wurde bisher nicht untersucht. Es bleibt



Christoph Arenz, Jahrgang 1971, studierte von 1991 bis 1997 Chemie in Bonn. Von 1998 bis 2000 promovierte er bei Athanassios Giannis in Karlsruhe. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei Konrad Sandhoff in Bonn von 2001 bis 2004 folgte er 2004 dem Ruf auf eine Juniorprofessur an die Humboldt-Universität zu Berlin. Seine Forschungsinteressen umfassen bioorganische Chemie, Biochemie und Molekularbiologie von Sphingolipiden und Nukleinsäuren.

abzuwarten, ob sich diese Strategie der Expressionshemmung letztendlich bewährt. Die prinzipiellen Vorteile liegen auf der Hand: Wie das Antigenprinzip, so ist auch die Bindung/Blockierung des offenen Komplexes ein fast universelles Prinzip zur Inhibition der Genexpression.

Darüber hinaus sollten agPNA jedoch auch in der Lage sein, mehrere Spleißvarianten eines Gens mit einer einzigen Sequenz zu unterdrücken. Die Zelle verfügt in der Regel nur über zwei Kopien eines Gens, ganz im Gegensatz zur mRNA, die normalerweise in vielen hundert Kopien in einer Zelle vorliegen kann. Im Falle einer verbesserten Administration der agPNA sollte diese Methode daher diejenige der Antisense-Moleküle an Sensitivität und folglich auch im Hinblick auf die Selektivität noch übertreffen. Es bleibt spannend, diese Entwicklung auch in den kommenden Jahren weiter zu verfolgen.

Christoph Arenz
Humboldt Universität zu Berlin
Christoph.arenz@chemie.hu-berlin.de

- 1) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* 1991, 254, 1497–1500.
- 2) 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, 566–568.
- 3) N. Svanvik, G. Westman, D. Y. Wang, M. Kubista, *Anal. Biochem.* 2000, 281, 26–35.
- 4) O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem.* 2005, 6, 69–77.
- 5) U. Landegren, R. Kaiser, J. Sanders, L. Hood, *Science* 1988, 241, 1077–1080.
- 6) S. Ficht, C. Dose, O. Seitz, *ChemBioChem.* 2005, 6, 2098–2103.
- 7) I. Boll, R. Krämer, A. Mokhir, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 7849–7856.
- 8) *Stellvertretend für eine Reihe aktueller Beispiele:* K. Albertshofer, A. M. Siwkowski, E. V. Wanczewicz, C. C. Esau, T. Watanabe, K. C. Nishihara, G. A. Kinberger, L. Malik, A. B. Eldrup, M. Manoharan, R. S. Geary, B. P. Monia, E. E. Swayze, R. H. Griffey, C. F. Bennett, M. A. Maier, *J. Med. Chem.* 2005, 48, 6741–6749.
- 9) T. Shirasaki, S. Pankratova, P. E. Nielsen, *Chem. Biol.* 2005, 12, 923–929.
- 10) I. V. Smolina, V. V. Demidov, V. A. Soldatenkov, S. G. Chasovskikh, M. D. Frank-Kamenetski, *Nucleic Acids Res.* 2005, 33, e146.
- 11) B. A. Janowski, K. Kaihatsu, K. E. Huffman, J. C. Schwartz, R. Ram, D. Hardy, C. R. Mendelson, D. R. Corey, *Nature Chem. Biol.* 2005, 1, 210–215.

RNA-Schalter

◆ Bis vor kurzem sah man die Rolle der RNA nur als Überträger der genetischen Information von der DNA zu den Proteinen. Seit der Entdeckung, dass RNA auch strukturelle, katalytische und regulatorische Funktionen übernehmen kann, hat sich diese Sicht drastisch geändert. So ähneln RNA-Moleküle in ihrer strukturellen Vielfalt viel stärker den Proteinen als dem chemisch verwandten „Schwestermolekül“ DNA. RNA-Moleküle können komplexe dreidimensionale Strukturen annehmen, um Bindetaschen oder katalytische Zentren zu bilden und so als biologischer Katalysator, Regulator oder Strukturelement fungieren.

Das Spektrum der in den letzten Jahren neu entdeckten RNA-Moleküle ist sehr groß. Kleine, nicht kodierende RNA, bekannt als short interfering RNA (siRNA), micro RNA (miRNA) in Eukaryoten und small noncoding RNA (srRNA) in Bakterien können die Expression vieler Gene reprimieren, in dem sie entweder an komplementäre messenger RNA (mRNA) oder an Proteine binden und deren biologische Aktivität modulieren.^{1–4)} Solche RNA können ganze Signalketten in zellulären Adaptations- und Differenzierungsprozessen steuern, den Virulenzstatus pathogener Bakterien bestimmen oder als Masterregulatoren der globalen Genexpression wirken.

Alternative Konformationen – Grundlage RNA-basierter Genschalter

◆ Neben den kleinen nicht kodierenden RNA-Molekülen gibt es eine weitere Gruppe regulatorischer RNA-Moleküle, die RNA-Schalter. Diese Schalterelemente sind im 5'-untranslatierten Bereich, also vor

dem eigentlichen Genstart, lokalisiert. Dabei bildet der regulatorische Bereich der RNA mit dem kontrollierten mRNA-Transkript eine Einheit. Die RNA-Schalter können zwei sich gegenseitig ausschließende Konformationen einnehmen, wobei nur eine der beiden eine Expression des anschließenden Gens zulässt.

Änderungen der zellulären Bedingungen stabilisieren eine der beiden Konformationen. Die Information dazu übermitteln meist Effektormoleküle. Solche Effektoren können Sensorproteine, RNA-Moleküle, z. B. in Form von unbeladenen tRNA-Molekülen, oder die Stoffwechselzwischenprodukte selbst sein.⁵⁾

2002 entdeckte Breaker eine neue Klasse von RNA-Schaltern, die er „riboswitches“ nannte.^{5–8)} Diese Schalterelemente setzen sich aus zwei Domänen zusammen (Abbildung 1). Zum einen bilden sie eine Bindedomäne, mit der sie ihren Liganden über eine direkte Wechselwirkung detektieren können. Eine Effektor-domäne interpretiert dann den Status der Bindedomäne und beeinflusst über eine Konformationsänderung die Expression der nachfolgenden Gene direkt. Neu an diesen Schalterelementen ist also, dass sie nur aus RNA-Elementen aufgebaut sind und dabei die Sensor- und Regulatorfunktion in einem Molekül vereinen. Damit sind sie nicht auf zusätzliche Sensormoleküle, z. B. Proteinfaktoren, für die Signaldetektion angewiesen.

Grundsätzliche Mechanismen der RNA-Schalter

◆ RNA-Schalter sind an vielen grundlegenden Stoffwechselwegen in phylogenetisch unterschiedlichen Bakterienspezies beteiligt. In den meisten Fällen dienen sie der Rückkopplungsregulation: Wenn die Konzentration eines Metaboli-

Abb. 1. Grundsätzliche Organisation von RNA-Schaltern in bakteriellen mRNA. Die Bindung eines Liganden an die Bindedomäne stabilisiert eine alternative Konformation der Effektor-domäne. Dies führt zu einer veränderten Expression des nachfolgenden Gens. ORF (offener Leserahmen): Abschnitt der DNA-Sequenz zwischen dem Translations-Startsignal (AUG) und dem terminierenden Codon, der in eine Polypeptidsequenz translatiert werden kann.

