

Modifizierte Peptidnucleinsäuren für die sequenzselektive
DNA-Spaltung
und
DNA-Nachweis

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Vorgelegt von
Diplom Chemiker
Felix Hubertus Zelder
Aus Marburg/Lahn

2003

Kurzfassung in deutsch

Es wurden Metallkomplex-Konjugate von Peptidnucleinsäuren (PNAs) synthetisiert und in zwei Projekten angewendet: als "künstliche Restriktionsenzyme" für die sequenzselektive Spaltung von Einzelstrang-DNA sowie als Komponenten einer DNA-templatvermittelten Metallkatalyse. Im ersten Projekt konnte durch MALDI-TOF MS und HPLC der Zr(IV)-Komplex des Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-PNA-Konjugats (Zr(IV)-**15**) als aktivste Spezies zur Spaltung komplementärer DNA identifiziert werden. Die Spaltung der Ziel-DNA erfolgte sequenzselektiv zu 91% (nach 164 Stunden) in unmittelbarer Nachbarschaft des Metallkomplexes.

Konjugate einer Cu(II)-Pyridylpyrazol-modifizierten PNA (Cu(II)-**31**) wurden für die DNA-templatvermittelte Spaltung estermodifizierter PNAs eingesetzt. Als Substrat-PNAs wurden die PNA-Ester-Konjugate **16** und **17** synthetisiert, in denen die Cu(II)-Ankergruppe (Chinolin-N) in die Alkohol-PNA-Komponente integriert ist. Es kann im Grunde mit beliebigen Carbonsäuren kombiniert werden. Die Spaltreaktionen wurden durch eine Kombination aus MALDI-TOF MS- und HPLC-Analyse untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktion durch das DNA-Templat etwa 100-fach beschleunigt wird. Des Weiteren wurden nach 10 Stunden 12 Turnover bei einem 100-fachen Substratüberschuss erzielt.

Short summary in english

Conjugates of peptide nucleic acids (PNAs) and metal-complexes were synthesized and tested in two projects: as "artificial restriction endonucleases" for the sequence-selective cleavage of single stranded DNA and as probes for DNA-templated metal-catalysis. The PNA conjugate with the Zr(IV)-complex of tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Zr(IV)-**15**) was identified by MALDI-TOF MS and HPLC as the most active species for the cleavage of complementary DNA. The cleavage of the target-DNA occurred sequence-selectively with 91% yield (after 164h) in close proximity to the metal complex.

Conjugates of Cu(II)-pyridylpyrazolyl-modified PNA (Cu(II)-**31**) were applied in DNA-templated cleavage of ester-modified-PNAs. The ester-modified-PNAs **16** and **17** were synthesized as substrate-PNAs, in which the Cu(II)-anchoring group (chinoline-N) is integrated in the alcohol-PNA-unit. Generally the combination with any carboxylic acid is possible. The cleavage reaction was followed by MALDI-TOF MS- and HPLC-analysis. It was shown that the DNA-templated reaction was accelerated up to approximately 100-fold. Furthermore 12 turnover were achieved after 10 hours at 100-fold excess of PNA **17**.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Vorgelegt von
Diplom Chemiker
Felix Hubertus Zelder
aus Marburg/Lahn
Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2003

Modifizierte Peptidnucleinsäuren für die sequenzselektive
DNA-Spaltung
und
DNA-Nachweis

Gutachter: Prof. Dr. Roland Krämer
Prof. Dr. Gerald Linti

Die experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Januar 2001 bis August 2003 im Anorganisch-Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg durchgeführt.

Herrn PROF. DR. ROLAND KRÄMER, unter dessen Anleitung diese Arbeit angefertigt wurde, danke ich herzlich für zahlreiche Anregungen, Diskussionen, sein Interesse an meiner Arbeit und die materielle Unterstützung. Dem Land Baden-Württemberg danke ich für ein Stipendium des Landesgraduiertenkollegs vom 1.4.2002-12.12.2003.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	DNA und PNA	1
1.1.1	Die Desoxribonucleinsäure	1
1.1.2	Die Peptidnucleinsäure (PNA)	2
1.2	Natürliche und künstliche Nucleasen	3
1.3	Wässrige Chemie des Zirconiums	7
1.4	Reaktionen an Oligonucleotid-Templaten	8
1.5	Schmelzpunktmessungen an PNA/DNA-Hybriden	10
1.6	Quantitative MALDI-TOF-Massenspektrometrie	11
2	ZIELSETZUNG	12
3	SYNTHESE DER LIGANDEN UND PNA-KONJUGATE	13
3.1	Liganden für die DNA-Spaltexperimente	13
3.1.1	Synthese von t-Butyl-geschützten Iminodiessigsäure-Derivaten	13
3.2	Synthese der Ligand-PNA-Konjugate für die DNA-Spaltexperimente	14
3.2.1	Direkte N'-terminale Modifikation von PNAs	15
3.2.2	N'-terminale PNA-Modifikation über einen Benzyllinker	16
3.3	PNA-Konjugate für die DNA-templatgesteuerten Esterhydrolysen	17
3.3.1	Synthese von 8-(Benzoyloxy)-2-chinoly-modifizierten PNAs	18
3.4	Übersicht über die dargestellten PNAs	19
3.5	Übersicht über die Sequenzen der eingesetzten DNAs	20
4	PNA/DNA HYBRIDISIERUNGSEXPERIMENTE	21
4.1	Einführung in die Hybridisierungsexperimente	21
4.2	Hybridisierung von PNA 6-9 und 12-15 mit DNA	21
4.2.1	T _m -Werte der PNAs für die DNA-Spaltexperimente	21
4.2.2	T _m -Werte in Abhängigkeit von Zr(IV)	23
4.2.3	PNA/DNA-Titrationsexperimente	24
4.3	T _m -Werte der PNAs 9 und 17	26
4.4	T _m -Werte in Abhängigkeit von Cu(II)	27

5	SEQUENZSELEKTIVE SPALTUNG EINZELSTRÄNGIGER DNA MIT Zr(IV)-PNA-KONJUGATEN	28
5.1	Einführung in die DNA-Spaltexperimente	28
5.2	Voruntersuchungen zur MALDI-TOF MS Analyse der DNA-Spaltreaktionen	30
5.2.1	Voruntersuchungen zur qualitativen MALDI-TOF MS Analyse	30
5.2.2	Voruntersuchung zur quantitativen MALDI-TOF MS Analyse	31
5.3	DNA-Spaltreaktionen mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugaten	32
5.3.1	Versuche zur DNA-Spaltung mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugaten ohne zusätzliche Pufferung	32
5.3.2	Versuche zur DNA-Spaltung mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugaten in Pyridinium- bzw. Acetatpuffer	32
5.3.3	Spaltung von DNA 19 mit Zr(IV)-PNA-Konjugaten bei pH7	33
5.3.4	Spaltung der DNAs 20-22 mit den Zr(IV)-Aminoalkohol-PNA-Konjugaten	37
5.3.5	Quantitative MALDI-TOF MS Analyse der Spaltung von 19	41
5.3.6	HPLC-Analytik der Spaltung von 19 mit dem Zr(IV)-TRIS-PNA-Konjugat	43
5.3.7	Modifizierung der Spaltfragmente mit [α - 32 P] ddATP	44
6	METALLKATALYSIERTE REAKTIONEN AM DNA-TEMPLAT	47
6.1	Einführung in die DNA-templatgesteuerten Spaltreaktionen	47
6.1.1	Cu(II)-induzierte Hydrolyse der Ester-PNA 16 am DNA-Templat	48
6.1.2	Cu(II)-induzierte Hydrolyse der Ester-PNA 17 am DNA-Templat bei 40°C	49
6.1.3	Cu(II)-induzierte Hydrolyse der Ester-PNA 17 am DNA-Templat bei 45°C	53
6.1.4	Cu(II)-katalysierte Hydrolyse der Ester-PNA 17 am DNA-Templat	54
7	ZUSAMMENFASSUNG	56
8	EXPERIMENTELLER TEIL	59
8.1	Verwendete Geräte und Chemikalien	59
8.2	Synthese der t-Butyl geschützten Iminodiessigsäure-Derivate 3a und 3b	61
8.2.1	Synthese von Bis-(N- <i>tert</i> -Butyloxycarbonylmethyl)-aminoessigsäureethyl-ester 2a	61
8.2.2	Synthese von 4-Bis-(N- <i>tert</i> -Butyloxycarbonylmethyl)-aminobuttersäure-ethylester 2b	61
8.2.3	Synthese von Bis-(N- <i>tert</i> -Butyloxycarbonylmethyl)-aminoessigsäure 3a	62
8.2.4	Synthese von 4-Bis-(N- <i>tert</i> -Butyloxycarbonylmethyl)-aminobuttersäure 3b	62
8.3	Synthese der PNA-Biokonjugate	63
8.3.1	Synthese der festphasengebundenen PNA 5	63
8.3.2	Synthese der PNAs 7, 8	63
8.3.3	Synthese der PNAs 9, 10 und 11	63
8.3.4	Synthese der PNA 12	63
8.3.5	Synthese der PNAs 13-15	64
8.3.6	Synthese der 8-(Benzoyloxy)-2-chinoly-PNAs 16 und 17	64

8.3.7	Reaktionskontrolle der Festphasensynthesen	64
8.3.8	Abspaltung der PNA von der Festphase und Aufarbeitung	64
8.3.9	HPLC-Reinigung der PNA-Biokonjugate	65
8.4	Durchführung der PNA/DNA-Hybridisierungsexperimente	66
8.4.1	Durchführung der Schmelzpunktuntersuchungen	66
8.4.2	Durchführung der T_m -Wertbestimmungen in Abhängigkeit von Zr(IV) bzw. Cu(II)	67
8.4.3	Durchführung des PNA/DNA-Titrationsexperiments	67
8.5	Durchführung der DNA-Spaltexperimente	68
8.5.1	Durchführung der Voruntersuchungen zur qualitativen MALDI-TOF MS Analyse	68
8.5.2	Untersuchungen zur DNA-Spaltung mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA Konjugaten ohne Puffer	68
8.5.3	Untersuchungen zur DNA-Spaltung mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugaten in Pyridinium bzw. Acetatpuffer	69
8.5.4	Untersuchungen zur DNA-Spaltung mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugaten in MOPS-Puffer	69
8.5.5	Beschreibung der HPLC-Analyse des DNA-Spaltexperimentes	70
8.6	Metallkatalysierte Reaktionen am DNA-Templat	71
8.6.1	Stammlösungen	71
8.6.2	Durchführung der Cu(II)-induzierten Hydrolyse der PNA 16	71
8.6.3	Durchführung der Cu(II)-induzierten Hydrolyse der PNA 17	71
8.6.4	Durchführung der Cu(II)-katalysierten Hydrolyse der PNA 17	72
8.6.5	Beschreibung der HPLC-Analyse der Esterspaltreaktion der PNA 17	72
9	LITERATURVERZEICHNIS	73

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abb. 1: Die DNA-Doppelhelix</i>	1
<i>Abb. 2: Vergleich von DNA und PNA</i>	2
<i>Abb. 3: Metallaktivierte Phosphodiesterhydrolyse</i>	4
<i>Abb. 4: Die polydentaten Liganden TRIS, Glucamin und TACI</i>	5
<i>Abb. 5: Sequenzspezifische DNA-Spaltung</i>	5
<i>Abb. 6: Struktur von $[Zr_4(OH)_8(H_2O)_{16}]^{8+}$</i>	7
<i>Abb. 7: Organokatalysierte Nitrophenylesterspaltung am DNA-Templat</i>	8
<i>Abb. 8: Schmelzkurve einer DNA-Doppelhelix</i>	10
<i>Abb. 9: Titration der Reaktionsmischungen (a) und (b) mit DNA 19</i>	25
<i>Abb. 10: MALDI-TOF MS Analyse eines DNA-Spaltexperimentes</i>	28
<i>Abb. 11: Signalintensität $I_{Analyt(28)}/I_{Kontrolle(29)}$</i>	31
<i>Abb. 12: Spaltexperiment I (120h)</i>	34
<i>Abb. 13: Spaltexperiment II (120h)</i>	35
<i>Abb. 14: Spaltexperiment IX (120h)</i>	35
<i>Abb. 15: Spaltexperiment VII (120h)</i>	36
<i>Abb. 16: Spaltexperiment XIIIa (oben) und XIIIb (unten) nach 120h</i>	39
<i>Abb. 17: Spaltexperiment XIIIc nach 120h</i>	40
<i>Abb. 18: Reaktionsgeschwindigkeiten der DNA-Spaltexperimente</i>	41
<i>Abb. 19: HPLC-Elutionsprofil der Mischung VIIc nach 0 min (a) und 164 h (b)</i>	43
<i>Abb. 20: Gelelektrophorese nach der 3'-terminalen Markierung mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ddATP</i>	45
<i>Abb. 21: Geplante Cu(II)-vermittelte Esterhydrolyse an einem DNA-Templat zu Beginn (a) und nach Ablauf der Spaltreaktion (b) (oben) und das erwartete MALDI-TOF MS Spektrum (unten)</i>	47
<i>Abb. 22: Spaltung der PNA 17 mit der Cu(II)-PNA 31 in Anwesenheit komplementärer (23), Fehlbasen- (24, 25) oder keiner DNA bei $T = 40^\circ\text{C}$</i>	50
<i>Abb. 23: MALDI-TOF MS der Spaltung von PNA 17 mit Cu(II)-PNA 31 und DNA 23 bei $T = 40^\circ\text{C}$ nach 0, 30 und 50 min (Exp. 1)</i>	50
<i>Abb. 24: MALDI-TOF MS der Spaltung von PNA 17 mit Cu(II)-PNA 31 ohne DNA 23 bei $T = 40^\circ\text{C}$ nach 0, 30 und 50 min (Exp. 4)</i>	50
<i>Abb. 25: HPLC-Analyse der Spaltung von PNA 17 mit Cu(II)-PNA 31 und DNA 23 bei $T = 40^\circ\text{C}$ nach 0 und 120 min (Exp 1)</i>	51

<i>Abb. 26: HPLC-Analyse der Spaltung von PNA 17 mit Cu(II)-PNA 31 ohne DNA bei T = 40°C nach 0 und 120 min (Exp 4)</i>	51
<i>Abb. 27: Spaltung der PNA 17 mit der Cu(II)-PNA 31 und komplementärer (23) oder keiner DNA bei T = 45°C</i>	53
<i>Abb. 28: Katalytische Spaltung der PNA 17 mit der Cu(II)-PNA 31 in Anwesenheit komplementärer (23) oder keiner DNA bei T = 40°C</i>	54
<i>Abb. 29: MALDI-TOF MS des Spaltexperimentes der PNA 17 (100 Äq.) mit der Cu(II)-PNA 31 und DNA 23 bei T = 40°C (nach 0, 60 und 360 min)</i>	55
<i>Abb. 30: MALDI-TOF MS des Spaltexperimentes der PNA 17 (100 Äq.) mit der Cu(II)-PNA 31 ohne DNA bei T = 40°C (nach 0, 60 und 360 min)</i>	55
<i>Abb. 31: Hydrolytische DNA-Spaltung (19) mit dem Zr(IV)-TRIS-PNA-Konjugat (Zr(IV)-15) (Metallkoordination an 15 und Mechanismus sind spekulativ)</i>	56
<i>Abb. 32: Katalysezyklus der DNA-templatgesteuerten Esterhydrolyse der Substrat-PNA 17 mit der Cu(II)-Komplex-PNA 31</i>	58

SCHEMATAVERZEICHNIS

<i>Schema 1: Synthese von t-Butyl-geschützten Iminodiessigsäure-Derivaten</i>	13
<i>Schema 2: Synthese terminal modifizierter PNAs</i>	15
<i>Schema 3: Synthese terminal modifizierter PNAs über einen Benzyl linker</i>	16
<i>Schema 4: Synthese 8-(Benzoyloxy)-2-chinoly-modifizierter PNAs</i>	18
<i>Schema 5: Übersicht über die festphasengebundenen PNAs</i>	19
<i>Schema 6: Übersicht über die dargestellten PNAs</i>	19
<i>Schema 7: Übersicht über die Sequenzen der verwendeten DNAs</i>	20
<i>Schema 8: Spaltfragmente der sequenzselektiven (a) bzw. unspezifischen (b) Spaltung der DNA 19</i>	33
<i>Schema 9: Fragmente der DNA-Spaltung von DNA 20 - 22 120h nach Reaktionsbeginn</i>	37
<i>Schema 10: Fragmente der DNA-Spaltung von 19-21 mit dem Zr(IV)-TRIS-PNA-Konjugat 120h nach Reaktionsbeginn</i>	40
<i>Schema 11: 3'-terminale Markierung des Fragments E in VIIc 164 Stunden nach Reaktionsbeginn</i>	44

TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tab. 1:</i>	<i>T_m-Werte von PNA/DNA-Hybriden.....</i>	<i>22</i>
<i>Tab. 2:</i>	<i>T_m-Werte in Abhängigkeit der Zr(IV)-Konzentration.....</i>	<i>23</i>
<i>Tab. 3:</i>	<i>T_m-Werte der PNAs für die DNA-Templatreaktionen.....</i>	<i>26</i>
<i>Tab. 4:</i>	<i>T_m-Werte in Abhängigkeit von Cu(II).....</i>	<i>27</i>
<i>Tab. 5:</i>	<i>Voruntersuchungen zur qualitativen MALDI-TOF Analyse.....</i>	<i>30</i>
<i>Tab. 6:</i>	<i>DNA-Fragmente der Spaltreaktionen von 19 (nach 120h).....</i>	<i>34</i>
<i>Tab. 7:</i>	<i>Spaltreaktion der DNAs 20-22 mit den PNAs 13-15 und ZrCl₄ (nach 120h)...</i>	<i>38</i>
<i>Tab. 8:</i>	<i>Spaltung der PNA 17 mit der Cu(II)-PNA 31 in Anwesenheit komplementärer (23), Fehlbasen- (24, 25) oder keiner DNA bei T = 40°C.....</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 9:</i>	<i>Spaltung der PNA 17 mit der Cu(II)-PNA 31 und komplementärer (23) oder keiner DNA bei T = 45°C.....</i>	<i>53</i>

ABKÜRZUNGEN

A	Adenosin
Bhoc	Benzylhydroxycarbonyl
Boc	t-Butyloxycarbonyl
C	Cytosin
CDI	Carbonyldiimidazol
DC	Dünnschichtchromatographie
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIMAP	Dimethylaminopyridin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat-dinatriumsalz
Fmoc	Fluorenyloxycarbonyl
Gluc	Glucamin
Gly	Glycin
G	Guanin
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
I	Intensität
IS	interner Standard
Lys	Lysin
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionisation – Time of Flight
MeCN	Acetonitril
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
m/ z	Masse pro Ladung
PNA	Peptidnucleinsäure
RNA	Ribonucleinsäure
R _f	ratios of fronts

R _t	Retentionszeit
T	Thymin
TACI	1,3,5-Triamino-1,3,5-trideoxy-cis-inositol
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T _m	Schmelzpunkt
UV/ VIS	ultraviolett/ visible (Wellenlängenbereich)

1 Einleitung

1.1 DNA und PNA

1.1.1 Die Desoxiribonucleinsäure

In der Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist die genetische Information aller Lebewesen gespeichert. Die DNA-Basensequenz dient als Schablone (Templat) für die Ribonucleinsäure (RNA)-Synthese (Transkription) und wird an den Ribosomen in die Aminosäuresequenz eines Proteins übersetzt (Translation).¹

Die DNA besteht aus zwei antiparallelen Strängen, die eine Doppelhelix bilden (Abb. 1).

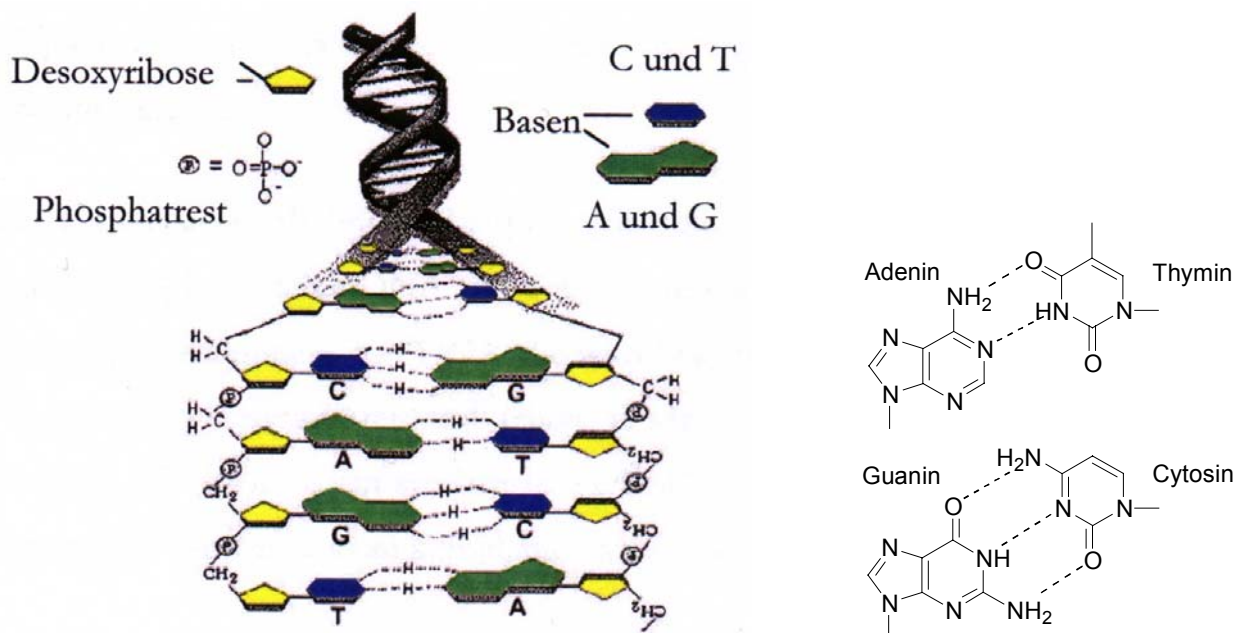


Abb. 1: Die DNA-Doppelhelix

Ein Einzelstrang ist aus Nucleotid-Bausteinen aufgebaut. Ein Nucleotid besteht aus einer 2'-Desoxyribose, einer Purinbase, Adenin (A) oder Guanin (G), bzw. Pyrimidinbase, Thymin (T) oder Cytosin (C), und einer Phosphatgruppe. Die Nucleotide sind über Phosphodiesterbindungen zwischen den 5'-Hydroxy- und 3'-Hydroxygruppen der 2'-Desoxyribose-Einheiten miteinander verbunden. Die Zuckerphosphate erfüllen strukturelle Aufgaben, sie bilden das Rückgrat der DNA. Die Basen zeigen hingegen in das Innere der Helix. Sie sind die Träger der genetischen Information. Die Basensequenz des einen Stranges

bestimmt die Sequenz des anderen, so ist Adenin mit Thymin über zwei und Guanin mit Cytosin über drei Wasserstoffbrückenbindungen verknüpft (Abb. 1).

Die RNA besteht ebenfalls aus Nucleotiden, die durch Phosphodiesterbindungen in 3'-5' Richtung verknüpft sind. Bei der Zuckereinheit handelt es sich um eine Ribose, die im Gegensatz zur Desoxyribose eine 2'-Hydroxygruppe besitzt. Außerdem verwendet die RNA an Stelle des Thymins die Pyrimidinbase Uracil.¹

Bei physiologischem pH-Wert liegt die Phosphatgruppe als Anion vor. Deshalb sind Angriffe negativ geladener Nucleophile schwierig.² Gegenüber einer hydrolytischen Spaltung ist die Phosphodiesterbindung wesentlich stabiler als eine Amid- oder Esterbindung. Die Geschwindigkeiten zweiter Ordnung für die Hydroxid-katalysierte Hydrolyse betragen bei 25°C $6,8 \times 10^{-12}$, 5×10^{-6} und $1,5 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.³

Diese hohe Stabilität erklärt, warum die Natur Phosphodiesterbindungen zur Verknüpfung der einzelnen Nucleotid-Bausteine und Konservierung der genetischen Information bevorzugt.

1.1.2 Die Peptidnucleinsäure (PNA)

Nielsen *et al.* gelang es 1991 ein DNA-Analogon darzustellen,⁴ bei dem das Zuckerphosphatrückgrat der DNA durch eine ungeladene N-(2-Aminoethyl)glycin-Polyamidstruktur ersetzt ist (Abb. 2). Die Nucleobasen sind daran über Methyl-Carbonyl-Gruppen gebunden.

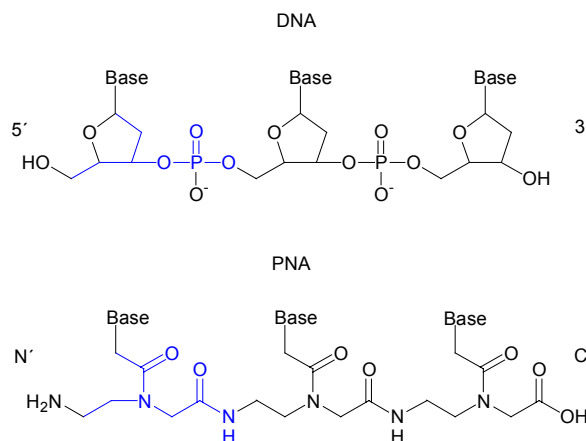


Abb. 2: Vergleich von DNA und PNA

Trotz dieser starken strukturellen Veränderungen besitzen PNAs eine höhere Bindungsaffinität und -spezifität gegenüber Nucleinsäuren als natürliche Oligonucleotide.⁵

PNAs können mit DNA sowohl PNA/ DNA Duplices als auch verschiedene Triplices ausbilden.^{6, 7} Da die PNA im Gegensatz zur DNA eine ungeladene Struktur besitzt, ist die Hybridisierung mit PNAs unabhängig von der Ionenstärke.⁸ Dies hat aber auch zur Folge, dass PNAs nur beschränkt wasserlöslich sind und zur Selbstaggregation neigen. Dieser Nachteil lässt sich durch den Einbau positiver bzw. negativer Ladungen, beispielsweise mehrerer Lysineinheiten, beheben.⁹

Zu den weiteren Vorteilen der PNAs gegenüber DNAs zählen eine hohe biologische und chemische Stabilität.¹⁰ PNAs sind resistent gegenüber Nucleasen und Proteasen.⁵

Da das Pseudopeptidrückgrat auch gegenüber starken Säuren stabil ist, lassen sich zur PNA-Synthese etablierte Synthesestrategien, die aus der Peptid-Festphasensynthese bekannt sind, anwenden.⁵

Aufgrund ihrer Bindungseigenschaften und ihrer hohen biologischen Stabilität eignen sich PNAs für potentielle Anwendungen als Antisense (Inhibierung der Translation) und Antigen-Therapeutika (Modulierung der Transkription).^{5, 11} Für therapeutische Anwendungen wirkt sich jedoch die geringe Aufnahme von PNAs in Zellen einschränkend aus.¹² Hier wird intensiv nach Möglichkeiten gesucht, die Aufnahme in das Cytoplasma bzw. den Zellkern zu verbessern, beispielsweise durch chemische Modifikation.

1.2 Natürliche und künstliche Nucleasen

Restriktionsendonucleasen sind Enzyme, die das Phosphodiesterückgrat der doppelsträngigen DNA sequenzspezifisch spalten.¹ Sie besitzen eine hohe Selektivität und Effektivität, können jedoch nur Oligonucleotidsequenzen von vier bis acht Basenpaaren erkennen.¹³ Da die Spaltung eines DNA-Genoms somit zu einer Vielzahl von DNA-Bruchstücken führt, ist die Darstellung künstlicher Nucleasen mit einer höheren Sequenzspezifität wünschenswert.¹³ Ihnen werden potentielle Anwendungen als Antisense und Antigen-Wirkstoffe vorhergesagt.^{14, 15} Künstliche Nucleasen sind Verbindungen, die die DNA entweder oxidativ oder hydrolytisch spalten. Die oxidative Spaltung wird bei Verwendung redoxaktiver Metallkomplexe, beispielsweise von Cu(II) und Fe(II), beobachtet.¹⁶ Das Metallion erzeugt dabei reaktive Radikale des Sauerstoffs oder Wasserstoffperoxids. Anschließend diffundieren diese zur Ziel-DNA und initiieren durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms den radikalischen DNA-Abbau.¹³

Die hydrolytische Spaltung wird hingegen durch redox-inaktive Metallkomplexe ausgelöst,¹⁴ wobei die Spaltaktivität auf der Lewis-Acidität des Metallions beruht.¹⁴

Die metallaktivierte Phosphodiesterhydrolyse wird durch folgende Schlüsselschritte charakterisiert:¹⁷

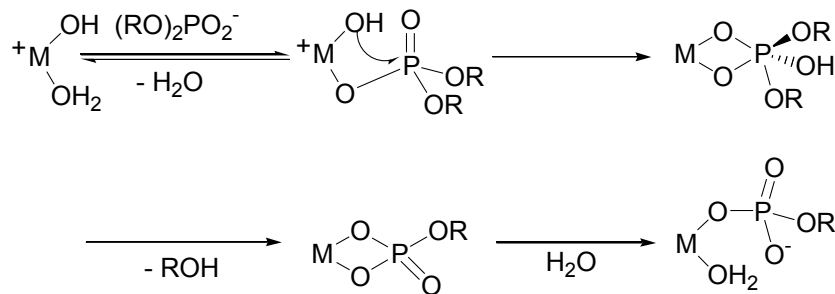


Abb. 3: Metallaktivierte Phosphodiesterhydrolyse¹⁷

1. Das Metallion aktiviert als starke Lewis-Säure das Substrat für einen nucleophilen Angriff am Phosphoratom. Je nach Metallion kann $M-OH$ selbst bei pH 7 und kleineren pH-Werten gebildet werden.
2. Die Reaktionspartner werden durch das Metall in cis-Koordination zueinander gebracht.
3. Der Phosphatester wird durch das Metallion aktiviert.
4. Die Phosphoran-Zwischenstufe wird stabilisiert.

Ein Nachteil der oxidativen Spaltung ist die Erzeugung von Produkten, die über keine 3'-OH bzw. 5'-OH Termini verfügen.¹³ Im Gegensatz dazu besitzen die DNA-Bruchstücke einer hydrolytischen Spaltung diese Enden. Solche DNA-Bruchstücke können von Enzymen erkannt und modifiziert werden,¹⁴ beispielsweise durch Religation mit anderen DNA-Strängen.

Die meisten literaturbekannten Beispiele beschreiben die Spaltung der Ribonucleinsäure (RNA).¹⁸ Dies ist mit einer Vielzahl unterschiedlicher Spezies wie beispielsweise Amininen,¹⁹ $Cu(II)$,²⁰ $Zn(II)$,²¹ $Pb(II)$ ²² und trivalenten Lanthanidionen²³ möglich. Im Gegensatz dazu erfolgt die effiziente hydrolytische Spaltung der stabileren, linearen DNA nur mit starken Lewis-Säuren wie $Ce(IV)$,²⁴ $Zr(IV)$,²⁵ $Th(IV)$ ²⁶ und $Co(III)$ ²⁷. Von besonderem Interesse sind dabei definierte Metallkomplexe mit polydentaten Liganden, die die Lewis-Acidität der Metallionen nicht reduzieren.^{14b} Arbeiten unseres Arbeitskreises konnten zeigen, dass Komplexe von $Ce(IV)$ und $Zr(IV)$ mit den austauschbaren Polyol- bzw. Aminopolyol Liganden Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), 1,3,5-Triamino-1,3,5-trideoxy-cis-inositol (TACI) und Glucamin die DNA-Hydrolyse beschleunigen.²⁵

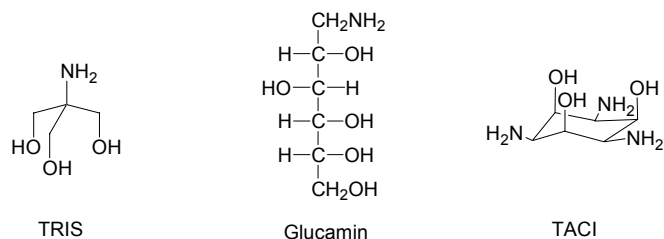


Abb. 4: Die polydentaten Liganden TRIS, Glucamin und TACI

Dabei konnte TRIS-Zr(IV) als aktivster Komplex mit einer Reaktionsbeschleunigung von 5×10^8 identifiziert werden.²⁵ Vergleichbare Beschleunigungen werden sonst nur mit Ce(IV) erzielt.¹⁷ Ein Vorteil der Zr(IV)-Komplexe ist, dass sie lediglich als starke Lewis-Säuren fungieren, wohingegen das Ce(IV) als redox-aktives Metallion zum Ce(III) reduziert werden kann. Dadurch können unerwünschte Radikalreaktionen ausgelöst werden.

Die Sequenzspezifität der hydrolytischen Oligonucleotidsplattung mit Metallkomplexen ist sehr gering, kann jedoch durch die kovalente Verknüpfung mit Oligonucleotid-Erkennungsreagenzien verbessert werden (Abb. 5).¹⁴ Wiederum beschreiben die meisten literaturbekannten Beispiele eine sequenzspezifische Spaltung der labileren RNA.^{14, 28}

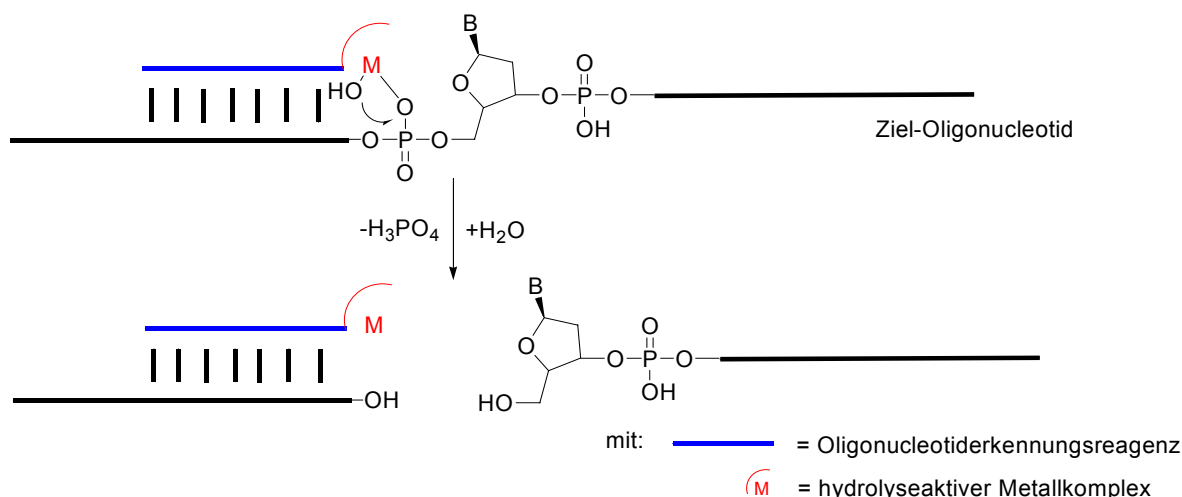


Abb. 5: Sequenzspezifische DNA-Splattung

Im Gegensatz dazu sind nur sehr wenige Beispiele der sequenzselektiven, nicht-enzymatischen Hydrolyse der viel stabileren, linearen DNA bekannt: Mit einer Iminodiessigsäure-modifizierten 19-mer DNA und Ce(IV) gelang es *Komiyama et al.* eine 40

mer-DNA zu 60 % nach 24 Stunden bei 37°C zu spalten.²⁹ *Franklin et al.* benutzte für die sequenzselektive DNA-Spaltung von supercoiled Plasmid-DNA und linearer Doppelstrang-DNA ein Metallo-Peptid-Chimär,³⁰ wobei dieser Ansatz jedoch keine Erkennung beliebiger Sequenzen ermöglicht.

Bei Verwendung von DNA-Konjugaten zur sequenzspezifischen Nucleinsäure-Spaltung besteht das Problem, daß das Erkennungsreagenz selbst durch die aktive Spezies gespalten wird.³¹ Dieses Problem kann durch Verwendung von PNA anstelle von DNA vermieden werden. PNA-Konjugate wurden bereits zur sequenzspezifischen Spaltung von RNA^{21, 32} und oxidativen Spaltung von Doppelstrang-DNA³³ eingesetzt, jedoch noch nicht zur hydrolytischen Spaltung von DNA.

1.3 Wässrige Chemie des Zirconiums

Komplexe des Zr(IV) mit neutralen, polydentaten Aminoalkoholliganden gehören zu den aktivsten Metallkomplexen zur Spaltung linearer DNA unter physiologischen Bedingungen.^{14b, 25} Bisweilen gelang es jedoch noch nicht die genaue Struktur dieser Komplexe aufzuklären.³⁴ Dies hängt mit der vielseitigen und pH-abhängigen Chemie des Zr(IV) in wässriger Lösung zusammen. Bei $\text{pH} < 1$ liegen $[\text{Zr}(\text{OH})]^{3+}$ -Spezies vor, die bei höheren pH-Werten in kationische Polyhydroxyspezies wie $[\text{Zr}_3(\text{OH})_4]^{8+}$ und $[\text{Zr}_4(\text{OH})_8]^{8+}$ übergehen. Durch Röntgenstrukturanalyse an $\text{ZrOX}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$) konnten vierkernige Hydroxospezies wie $[\text{Zr}_4(\text{OH})_8(\text{H}_2\text{O})_{16}]^{8+}$ ermittelt werden, wobei die vier Zr(IV)-Ionen ein Quadrat aufspannen.

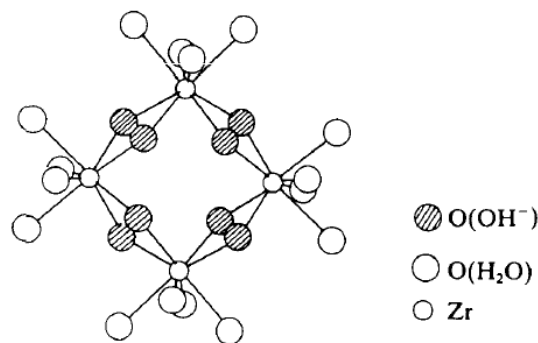


Abb. 6: Struktur von $[\text{Zr}_4(\text{OH})_8(\text{H}_2\text{O})_{16}]^{8+}$ ³⁵

Je zwei Hydroxygruppen verbrücken benachbarte Metallionen, die mit vier weiteren Wassermolekülen pro Metall koordiniert sind. Die Koordinationszahl beträgt acht. Auch spektroskopische Untersuchungen an konzentrierten wässrigen Lösungen von Zr(IV) bestätigen, dass das Kation $[\text{Zr}_4(\text{OH})_8(\text{H}_2\text{O})_{16}]^{8+}$ bei niedrigen pH-Werten die vorherrschende Spezies ist.³⁵

1.4 Reaktionen an Oligonucleotid-Templaten

DNA-templatgesteuerte Reaktionen zwischen zwei chemisch modifizierten Oligonucleotiden³⁶ werden für die Erzeugung von Molekülbibliotheken,³⁷ in chemischen Replikationssystemen³⁸ und in der nicht-enzymatischen Nucleinsäure-Analytik eingesetzt.³⁹ Die meisten dieser Reaktionen beinhalten die kovalente Verknüpfung zweier chemisch modifizierter Oligonucleotidstränge.^{39, 40} In Anwesenheit komplementärer DNA werden die Reaktionspartner in unmittelbare Nähe zueinander gebracht, und die Reaktion läuft wesentlich schneller ab als in Abwesenheit des Templats. Da das verknüpfte Oligonucleotidprodukt eine höhere Affinität zum Templat besitzt als die Edukte, ist ein katalytischer Umsatz am Templat nicht möglich. Für viele potentielle Anwendungen wäre jedoch eine Signalamplifizierung wünschenswert. Eine Strategie, um die unerwünschte Produktinhibierung zu vermeiden, konnte durch Verknüpfung und anschließende chemische Umsetzung am Beispiel einer Iminkupplung/Reduktion demonstriert werden.⁴¹ Diese Methode ist jedoch auf sehr kurze DNA-Sequenzen beschränkt.

Eine andere, vielversprechende Strategie wurde kürzlich von *Taylor et al.* eingeführt.⁴² Im Unterschied zu bisherigen DNA-templatgesteuerten Verknüpfungsreaktionen beschreibt er eine DNA-templatgesteuerte Spalt-Reaktion. Dieses Prinzip konnte an einem Modellsystem bestehend aus drei Komponenten demonstriert werden (Abb.7).

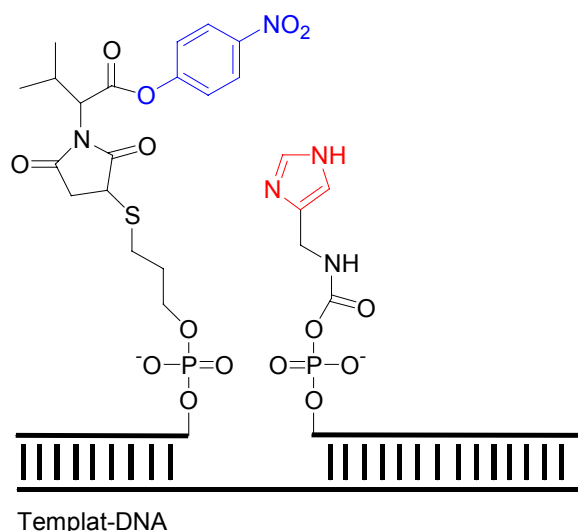


Abb. 7: Organokatalysierte Nitrophenylesterspaltung am DNA-Templat

Der Katalysator besteht aus einer Imidazolgruppe, die an das 5'-Ende einer 15-mer DNA gebunden ist, wohingegen das abzuspaltende Substrat, ein para-Nitrophenolatanion, über eine

Esterbindung mit dem 3'-Ende einer 8-mer DNA verknüpft ist (Abb. 7). Mit diesem System konnte ein dreifacher Turnover nach 10 h erzielt werden. Die erste metallkatalysierte Reaktion an DNA-Templaten wurde von der Arbeitsgruppe Krämer beschrieben.⁴³ Dabei wurde die bekannte, hohe Aktivität von Komplexen des Cu(II) ausgenutzt. Sie können Esterhydrolysen um den Faktor 10^9 beschleunigen.⁴⁴ Durch die Modifikation einer PNA mit einem Cu(II) bindenden Pyridylpyrazol-Liganden⁴⁵ als Katalysator und der Verwendung einer Picolinsäureester-modifizierten PNA als Substrat-PNA konnte eine 485-fache Reaktionsbeschleunigung sowie 35-facher Turnover in Gegenwart komplementärer DNA erzielt werden.⁴³

Diese beiden grundlegenden Arbeiten demonstrierten die allgemeine Anwendbarkeit von DNA-templatgesteuerten Spalt-Reaktionen.

Zur Zeit beschränken sich die entwickelten Systeme jedoch noch auf sehr spezielle Substrate als Abgangsgruppen. Im Falle der metallkatalysierten Esterhydrolyse erfolgt die Spaltreaktion nur, wenn ein in der Abgangsgruppe vorhandener Pyridin-Donor als "Anker" für Cu(II) wirkt. Wird anstelle des Picolinsäure- oder Benzoessäureester eingesetzt, kann keine Umsetzung mehr beobachtet werden.⁴³

Für zukünftige Anwendungen wäre ein vielseitigerer Ansatz wünschenswert, der die Freisetzung eines beliebigen Substrates, beispielsweise eines cytotoxischen Wirkstoffs, erlauben würde.⁴²

1.5 Schmelzpunktmessungen an PNA/DNA-Hybriden

Die sequenzspezifische Hybridisierung komplementärer Nucleinsäure-Einzelstränge zu einer Doppelhelix ist ein reversibler Prozess und wird als Renaturierung/Denaturierung oder 'thermisches Schmelzen' bezeichnet.⁴⁶ Der Vorgang beruht auf der gegenseitigen, reversiblen Erkennung zweier Oligonucleotid-Stränge. Bei Wärmezufuhr brechen die Wasserstoffbrückenbindungen in der Doppelhelix auf und die Stränge dissoziieren. Kühlt man ab, bildet sich die Doppelhelix erneut aus.^{1, 47} Der Schmelzpunkt (T_m -Wert) einer Duplex ist die Temperatur, bei der die Hälfte des Doppelstranges dissoziiert vorliegt. Er kann photometrisch durch Absorptionsmessungen bei $\lambda = 260$ nm und unterschiedlichen Temperaturen bestimmt werden, da in der Doppelhelix die Absorption um 10-40% (DNA-Duplices) bzw. 5-10% (PNA/ DNA-Duplices) gegenüber den dissoziierten Einzelsträngen verringert ist. Dieser Effekt beruht auf einer unterschiedlichen Anordnung der Basenpaare, wobei in der Doppelhelix die Übergangsdipolmomente der Nucleobasen gekoppelt sind (Hyperchromizität).^{1, 46} Trägt man die Absorption gegen die Temperatur auf, kann der T_m -Wert aus dem Wendepunkt der erhaltenen Kurve ermittelt werden (Abb.8).^{1, 46}

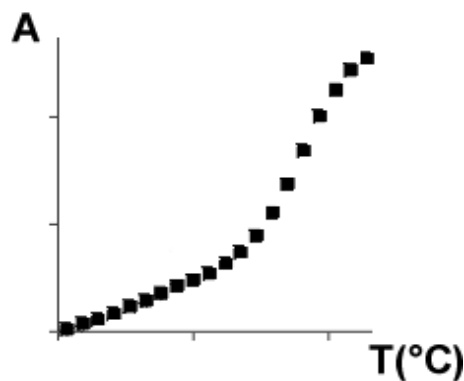


Abb. 8: Schmelzkurve einer DNA-Doppelhelix

Die Duplexstabilität hängt einerseits vom Basengehalt, der Basensequenz und der Duplexlänge, andererseits vom Lösungsmittel und der Kationenkonzentration ab.^{1, 46}

1.6 Quantitative MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Im Jahre 1988 wurde die Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie von Hillenkamp als Methode vorgestellt,⁴⁷ um Molmassen von Biopolymeren (bis zu 100 kDa) wie Peptiden, Proteinen und Oligonucleotiden zu ermitteln. Die Ladungsverteilung (m/z) der Ionen wird hierbei durch Messung der Flugzeit bestimmt. Diese Detektionsmethode besticht durch die einfache Probenvorbereitung und ihre hohe Sensitivität. Neuere Entwicklungen zeigen, dass sich die MALDI-TOF Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) neben der Detektion auch für die Quantifizierung komplexer Reaktionsmischungen eignet.⁴⁸ Im Vergleich zu der High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Analytik ermöglicht die MALDI-TOF MS Detektion eine schnellere Analyse ($< 1\text{min}$) und benötigt geringere Substratmengen (3 pmol für ein Drei-Punkte-Experiment). Außerdem sind automatische Probenvorbereitung, Messung und Auswertung möglich. Deshalb eignet sich die MALDI-TOF MS ausgezeichnet für die Hochdurchsatz-Analytik von Reaktionsmischungen.

2 Zielsetzung

Die Entwicklung von chemischen Reagenzien für die sequenzspezifische hydrolytische Spaltung von Nucleinsäuren (sog. "künstliche Nucleasen") hat aufgrund potentieller Anwendungen in der Medizin und Biotechnologie großes Interesse hervorgerufen.

Während es für die sequenzselektive Spaltung von RNA viele Beispiele gibt, ist nur eine Arbeit zur sequenzspezifischen Hydrolyse linearer DNA mit einem Oligonucleotid-Ce(IV)-Metallkomplex-Konjugat bekannt. Anwendungen des reduktionsempfindlichen Ce(IV) könnten in biologischen Systemen jedoch Probleme bereiten. Redox-inaktive Zr(IV)-Komplexe mit Aminoalkoholliganden gehören ebenfalls zu den aktivsten, nicht-enzymatischen Reagenzien mit Phosphodiesterase-Aktivität. Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese und andere Liganden an Peptidnucleinsäuren gekoppelt werden und als Zr(IV)-Metallkomplex-Konjugate auf die Fähigkeit zur sequenzspezifischen hydrolytischen Spaltung linearer Einzelstrang-DNA untersucht werden.

Einen weiteren Aspekt dieser Arbeit stellte die Untersuchung von Cu(II)-induzierten Esterhydrolysen an DNA-Templaten dar. Die DNA übernimmt dabei die Aufgabe, einen Cu(II)-Komplex und einen Ester, die beide an unterschiedliche Termini von Peptidnucleinsäuren gebunden sind, in räumliche Nähe zueinander zu bringen und somit die Spaltreaktion auszulösen. Während eine geeignete Cu(II)-Komplex-PNA als katalytische Komponente aus früheren Untersuchungen unseres Arbeitskreises zur Verfügung stand, sollte eine neue Klasse von estermodifizierten PNA-Substraten dargestellt werden, in der eine abzuspaltende Carbonsäure mit der PNA verbunden ist. Ein solches Design würde die Abspaltung *beliebiger* Carbonsäure-Substrate ermöglichen und würde diesbezügliche strukturelle Einschränkungen zuvor beschriebener Katalysen an DNA-Templaten aufheben.

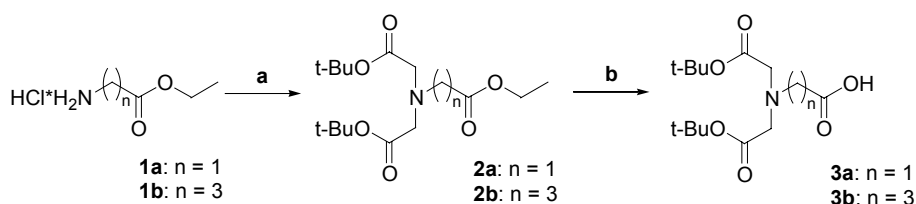
3 Synthese der Liganden und PNA-Konjugate

3.1 Liganden für die DNA-Spaltexperimente

Untersuchungen unseres Arbeitskreises zeigten, dass Komplexe von Zr(IV) mit den polydentaten Aminoalkoholen Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), 1, 3, 5-Triamino-1, 3, 5-trideoxy-cis-inositol (TACI) und Glucamin die DNA-Hydrolyse beschleunigen.²⁵ Um mit diesen Metallkomplexen eine selektive DNA-Spaltung zu erreichen, sollten sie an die N'-Termini von Peptidnucleinsäuren gekoppelt werden. Dabei sollte die Festphasenmodifikation mit den ungeschützten Aminoalkoholen erfolgen, um aufwendige Synthesen zur selektiven Einführung mehrerer Schutzgruppen zu vermeiden.

Im Gegensatz dazu sollte die PNA-Modifikation mit Iminodiessigsäure über geschützte Liganden erfolgen. Diese Derivate erschienen ausgehend von Aminosäuren leicht zugänglich. Die Zr(IV)-Iminodiessigsäure-PNA-Konjugate waren von Interesse, um den Einfluss zweifach negativ geladener Chelatliganden auf die DNA-Spaltaktivität untersuchen zu können. Als weitere potentiell Zr(IV)-bindende Liganden sollten 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure und 3,4-Dihydroxycatechol-2-carbonsäure mit der PNA verknüpft und untersucht werden.

3.1.1 Synthese von t-Butyl-geschützten Iminodiessigsäure-Derivaten



Schema 1:

Synthese von t-Butyl-geschützten Iminodiessigsäure-Derivaten

a: Br-CH₂COOC₄H₉, DIEA, DMF, 25°C; b: 1.) NaOH; MeOH, 2.) Dowex[®]-Pyridiniumform.

Um Iminodiessigsäure an den N'-Terminus von Peptidnucleinsäuren koppeln zu können, sollten Derivate synthetisiert werden, die über eine freie Säurefunktion zur Ankopplung an die festphasengebundene PNA verfügen. Die beiden für die Metallkomplexierung vorgesehenen Carboxylatfunktionen sollten hingegen geschützt sein. Als Schutzgruppe wurde der t-Butylester gewählt, da er während der geplanten PNA-Festphasensynthese stabil ist, jedoch

im Zuge des Abspaltens der Peptidnucleinsäure vom polymeren Träger mit Trifluoressigsäure entfernt wird.

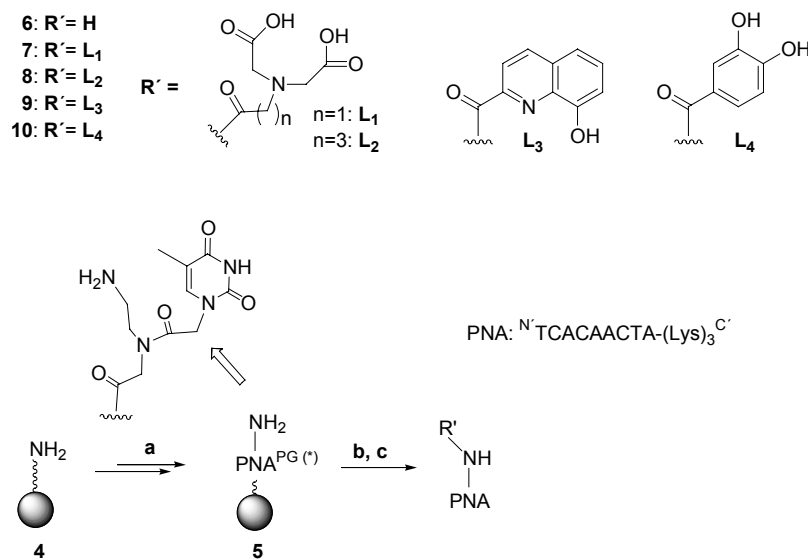
Den Ausgangspunkt für die Synthese der t-Butyl-geschützten Iminodiessigsäurederivate (**3a** bzw. **3b**) bildeten die kommerziell erhältlichen Salze des Glycin- bzw. 4-Aminobutylethylesters (**1a** bzw. **1b**). Zunächst wurde die Aminfunktion zweifach mit Bromessigsäure-t-Butylester alkyliert, das hellgelbe Öl (**2a** bzw. **2b**) isoliert und säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt. Anschließend wurde der Ethylester mit Natronlauge bei pH 14 hydrolysiert. Durch Zugabe der Pyridiniumform des Dowex[®]-Kationenaustauschers wurde neutralisiert, filtriert und im Vakuum eingedunstet. Das dabei erhaltene, ölförmige Produkt (**3a** bzw. **3b**) konnte sofort zur Verknüpfung mit dem N'-Terminus festphasengebundener PNA weiterverwendet werden.

3.2 Synthese der Ligand-PNA-Konjugate für die DNA-Spaltexperimente

Die Iminodiessigsäurederivate (**3a, b**), die 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure und die 3,4-Dihydroxycatechol-2-carbonsäure verfügen über eine Säurefunktion, die die Verknüpfung mit dem N'-Terminus der festphasengebundenen PNA erlaubt (Kap. 3.2.1).

Im Gegensatz dazu sollte die Modifikation mit den Aminoalkoholen TRIS, TACI und Glucamin (Abb. 4) über die Aminfunktion der ungeschützten Liganden erfolgen. Dafür sollte zunächst ein Linkermolekül an den N'-Terminus der festphasengebundenen PNA gekoppelt werden. Anschließend sollten die Liganden über eine selektive Alkylierung mit dem Linker verknüpft werden (Kap. 3.2.2).

3.2.1 Direkte N'-terminale Modifikation von PNAs

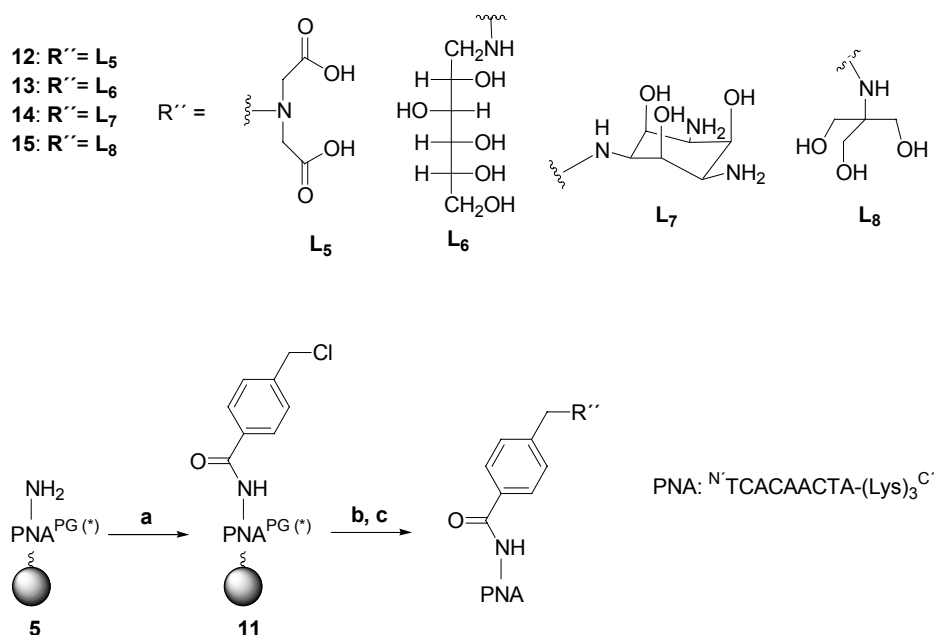
**Schema 2:**

Synthese terminal modifizierter PNAs

a: PNA-Synthese; b: HBTU, HOBT, DIEA, DMF, 3a, 3b (für 7, 8) bzw. L_{3,4}-OH (für 9, 10); c: TFA:m-Cresol=4:1; PG: Bhoc für Nucleobasen, Boc für Lysin

Die modifizierten Peptidnucleinsäurekonjugate **7-10** wurden einstufig dargestellt.⁴⁹ Zunächst wurde die Säureform des Liganden mit den Uroniumsalzen 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) und 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) aktiviert und nach Basenzugabe an den N'-Terminus der festphasengebundenen PNA (**5**) gekoppelt.⁴⁹ Anschließend wurde die PNA mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure und m-Cresol vom festen Träger abgespalten. Bei den Konjugaten **7-8** wurden dabei gleichzeitig die als t-Butylester geschützten Carboxylatfunktionen der Iminodiessigsäureliganden (**3a, 3b**) entschützt. Die Reinheit der PNAs **7-9** wurde mit MALDI-TOF MS und HPLC überprüft und betrug 49-86%. PNA **10** konnte nur in sehr kleinen Ausbeuten neben dem Edukt, der unmodifizierten PNA **6**, erhalten werden. Zur Reinigung wurden die Produkte mittels HPLC von entstandenen Nebenprodukten getrennt, und die erhaltenen Fraktionen über MALDI-TOF MS charakterisiert. Fraktionen, die mehr als 90% des gewünschten Produktes enthielten, wurden vereinigt, gefriergetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Aufgrund der geringen Ausbeute wurde auf eine Isolierung von PNA **10** verzichtet.

3.2.2 N'-terminale PNA-Modifikation über einen Benzyl linker

**Schema 3:**

Synthese terminal modifizierter PNAs über einen Benzyl linker

a: ClCH₂-C₆H₄-CO₂H, HBTU, HOBT, DIEA, DMF; **b:** NaI, DMSO, H-L₅-(C₄H₈)₂ (für **12**) bzw. H-L₆₋₈ (für **13-15**); **c:** TFA:m-Cresol=4:1; PG: Bhoc für Nucleobasen, Boc für Lysin

Um die PNA mit den polydentaten, ungeschützten Aminoalkoholen TRIS, TACI und Glucamin zu modifizieren, wurde eine zweistufige Syntheseroute entwickelt. Zunächst wurde die als Linker fungierende 4-Chloromethylbenzoesäure an den N'-Terminus der festphasengebundenen PNA (**5**) gebunden. Dies erfolgte analog zu der in Kap. 3.2.1 beschriebenen Amidverknüpfung.⁴⁹ Anschließend wurde die festphasengebundene PNA **11** mit den Aminoalkoholliganden (H-L₆ – H-L₈) durch nucleophile Substitution von Chlorid aminiert. Untersuchungen zeigten, daß die effiziente Alkylierung ausschließlich bei Verwendung von NaI in Dimethylsulfoxid erfolgte. Wurden hingegen Basen den Reaktionslösungen hinzugefügt, konnten lediglich komplexe Produktmischungen erhalten werden.

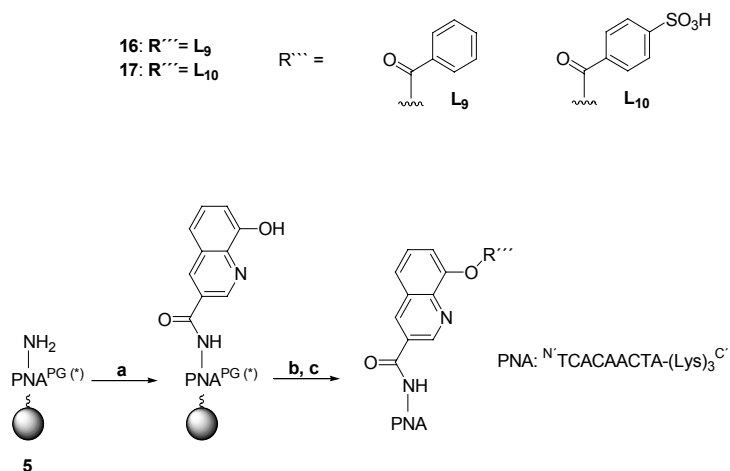
Die Darstellung der Iminodiessigsäure-modifizierten PNA **12** erfolgte analog. Zur Synthese wurde jedoch der im Arbeitskreis verfügbare, als t-Butylester geschützte Ligand (H-L₅-(C₄H₈)₂) eingesetzt. Diese Schutzgruppen wurden bei der Abspaltung der festphasengebundenen PNA mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure und m-Cresol entfernt.

Die Reinheit der PNAs **12-15** wurde über MALDI-TOF MS und HPLC überprüft und betrug 43-79%. Zur Reinigung wurden die Produkte über HPLC von entstandenen Nebenprodukten getrennt und die erhaltenen Fraktionen über MALDI-TOF MS charakterisiert. Fraktionen, die mehr als 90% des gewünschten Produktes enthielten, wurden vereinigt, gefriergetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.3 PNA-Konjugate für die DNA-templatgesteuerten Esterhydrolysen

Unser Arbeitskreis berichtete über die erste Metallkatalyse an einem DNA-Templat,⁴³ es handelte sich um eine Esterspaltung durch Cu(II). Dieses System ist jedoch beschränkt auf Carbonsäuren, die Donorgruppen als "Anker" für das Metallion enthalten, wie z.B. Picolinsäure. Um dieses Konzept zu erweitern, so dass beliebige Carbonsäuren abgespalten werden können, sollte die Ankergruppe in den Linker integriert werden, so dass beliebige Carbonsäuren freigesetzt werden können. Einen derartigen Linker würde die 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure bilden, die einerseits eine Verknüpfung mit dem N'-Terminus festphasengebundener PNA über die Carbonsäurefunktion erlaubt, und andererseits die Ankopplung von Carbonsäuren an die 8-Hydroxyfunktion des Linkers möglich ist. Es ist bekannt, dass die daraus resultierende Esterfunktion durch Cu(II), das an das 8-Hydroxychinolin-N-Atom koordiniert, leicht gespalten werden kann.⁵⁰

3.3.1 Synthese von 8-(Benzoyloxy)-2-chinoly-modifizierten PNAs

**Schema 4:**

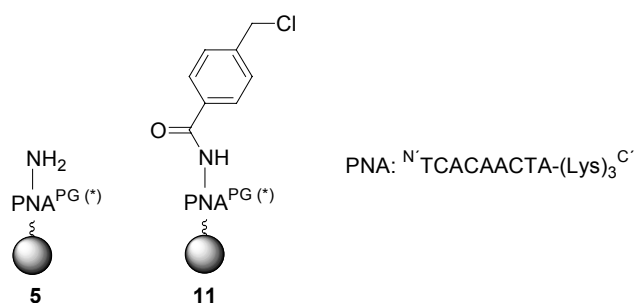
Synthese 8-(Benzoyloxy)-2-chinoly-modifizierter PNAs

a: 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure, HBTU, HOBT, DIEA, DMF; b: HOBT, DIMAP,

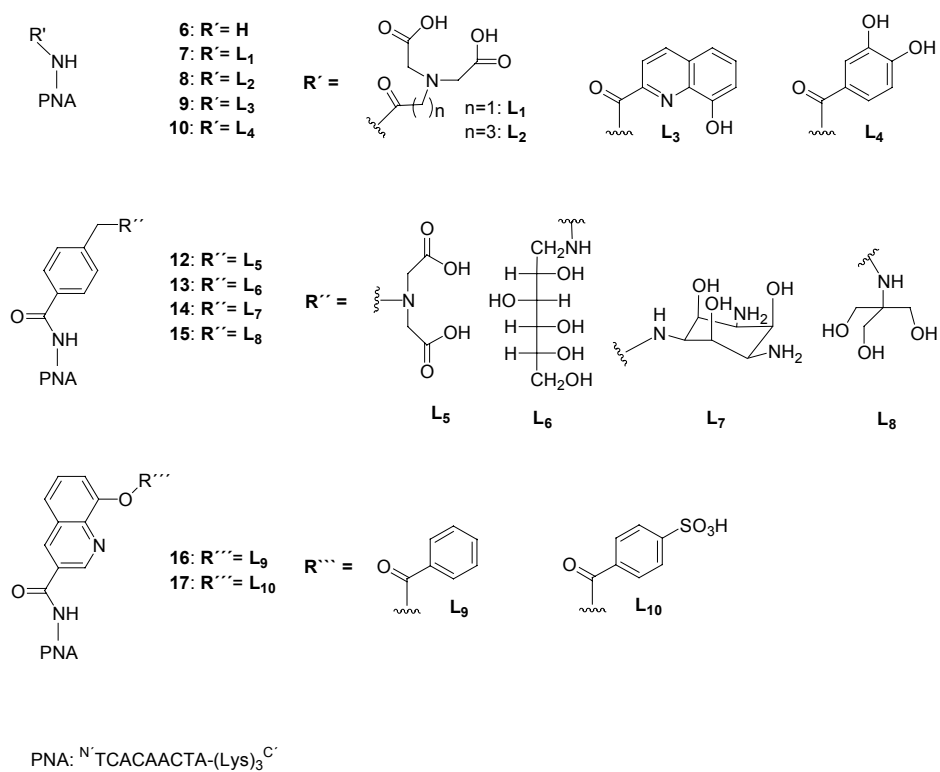
DIC, DMF, L_{9,10}-OH,; c: TFA:m-Cresol=4:1; PG: Bhoc für Nucleobasen, Boc für Lysin

Die PNA-Konjugate **16** und **17** wurden ausgehend von der unmodifizierten PNA **5** in zwei Stufen dargestellt. Zunächst erfolgte die Umsetzung von **5** mit 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure zu der festphasengebundenen PNA **9** (Kap. 3.2.1).⁴⁹ Anschließend wurden an die festphasengebundene PNA **9** die durch Zugabe von Diisopropylcarbodiimid (DIC) und Dimethylaminopyridin (DIMAP) aktivierten Benzoesäurederivate (**L₉-OH**, **L₁₀-OH**) gekoppelt. Nach Abspaltung vom festen Träger und anschließender HPLC-Trennung konnten die PNAs **16** und **17** in Ausbeuten von ca. 30% isoliert werden.

3.4 Übersicht über die dargestellten PNAs



Schema 5: Übersicht über die festphasengebundenen PNAs



Schema 6: Übersicht über die dargestellten PNAs

3.5 Übersicht über die Sequenzen der eingesetzten DNAs

5' TCT TAG TTG TGA CCA ^{3'} : 18	5' TAT TTG TGA TCC ATC C ^{3'} : 24
5' TAG TTG TGA CCA TCT ^{3'} : 19	5' TAG TTG TGA TCT ATC C ^{3'} : 25
5' TAG TTG TGA CCA TCT AAT CT ^{3'} : 20	5' TCT TAG TTG TGA ^{3'} : 26
5' TAG TTG TGA TGT CCT AA ^{3'} : 21	5' CCA ^{3'} : 27
5' TAT TTC TGA CCA TCT ^{3'} : 22	5' TTTTTTTT ^{3'} : 28
5' TAG TTG TGA TCC ATC C ^{3'} : 23	5' TTTTTTTTTT ^{3'} : 29
	5' TTT TTT TTT TTT TTT T ^{3'} : 30

Schema 7: Übersicht über die Sequenzen der verwendeten DNAs

4 PNA/DNA Hybridisierungsexperimente

4.1 Einführung in die Hybridisierungsexperimente

In den Hybridisierungsexperimenten sollte der Schmelzpunkt (T_m -Wert) der PNA/DNA-Duplices bestimmt werden, wobei die Höhe des beobachteten T_m -Werts die thermodynamische Stabilität der Duplex widerspiegelt. Insbesondere sollte der Einfluss der PNA-Modifikationen sowie die Auswirkungen unterschiedlicher Metallsalzkonzentrationen an Zr(IV) bzw. Cu(II) auf das Hybridisierungsverhalten untersucht werden. Dies war in Hinblick auf die geplanten Aktivitäts- und Katalyseuntersuchungen von Interesse.

Die Schmelzexperimente wurden für Lösungen, die DNA (2 μ M), PNA (2 μ M), MOPS-Puffer (10 mM) und NaCl (50mM) enthielten, durchgeführt. Sollte der Einfluss von Zr(IV)- bzw. Cu(II)-Ionen auf den Schmelzpunkt untersucht werden, wurde zusätzlich die gewünschte Metallsalzkonzentration eingestellt.

Der T_m -Wert wurde bestimmt, indem die Abhängigkeit der Absorption von der Temperatur photometrisch bei $\lambda = 260$ nm verfolgt wurde. Anschließend wurde der T_m -Wert aus dem Wendepunkt der erhaltenen Kurve ermittelt.

4.2 Hybridisierung von PNA 6-9 und 12-15 mit DNA

4.2.1 T_m -Werte der PNAs für die DNA-Spaltexperimente

Für die PNAs **6-9** und **12-15**, die als Zr(IV)-Komplexe auf die Fähigkeit zur selektiven DNA-Hydrolyse untersucht werden sollten, wurden zunächst die Schmelzpunkte (T_m -Werte) mit der komplementären DNA **18** bestimmt (Tab. 1).

Die PNA/DNA-Duplex der unmodifizierten PNA **6** mit der DNA **18** dissoziiert bei $T_m = 59 \pm 2^\circ\text{C}$ (Nr. 1). Im Vergleich dazu bewirken die N'-terminalen PNA-Modifikationen einen leicht stabilisierenden (Nr. 6, 7) oder destabilisierenden (Nr. 2-5, 8) Effekt. Die Duplex-Destabilisierung mit den Iminodiacetat-modifizierten PNAs (Nr. 2, 3, 5) von $5,5 - 7^\circ\text{C}$ kann durch elektrostatische Abstoßung der zweifach negativ geladenen Liganden mit dem polyanionischen Rückgrat der DNA **18** erklärt werden. Für die TRIS-PNA (**15**) wurde nur eine geringfügige Destabilisierung beobachtet (Nr. 8), wohingegen die Glucamin- (**13**) und TACI-PNA (**14**) einen stabilisierenden Effekt von $\text{knapp } 3 - 4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ bewirkten (Nr. 6, 7).

Nr.	DNA	PNA	T _m (°C)
1	18	6	59,2
2	18	7	53,7
3	18	8	53,8
4	18	9	57
5	18	12	52,2
6	18	13	62,1
7	18	14	63,1
8	18	15	56,1
9	19	6	54,5
10	19	15	56,2

Tab.1: T_m-Werte von PNA/DNA-Hybriden.

[DNA] = 2 μM; [PNA] = 2 μM; [MOPS pH 7] = 10 mM; [NaCl] = 50 mM; ΔT_m = ± 2°C.

Übersicht über die PNAs: Kap. 3.4, Schema 6, über die DNAs **18**, **19**: Kap. 3.5, Schema 7.

Wurde die Duplexstabilität der unmodifizierten PNA **6** hingegen mit der komplementären, aber am 5'-Ende kürzeren, jedoch am einzelsträngigen 3'-Ende längeren DNA **19** (Nr. 9) untersucht, konnte gegenüber dem Experiment mit der DNA **18** (Nr. 1) ein um 4,7°C ± 2°C (Nr.1) niedrigerer T_m-Wert beobachtet werden. Dies könnte durch attraktive Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Lysineinheiten der PNA **6** und dem gegenüberliegendem anionischem, einzelsträngigem Bereich von **18** ausgelöst worden sein. In der Duplex mit der DNA **19** fehlt hingegen eine am 5'-Ende überlappende DNA-Basensequenz. Da sich jedoch die Duplexstabilitäten von **18** und **19** mit der TRIS-PNA (**15**) nicht merklich unterscheiden (Nr. 8, 10), kann keine gesicherte Aussage über die Ursache dieses Effektes getroffen werden.

4.2.2 T_m -Werte in Abhängigkeit von Zr(IV)

Zur Untersuchung des Einflusses von Zr(IV) auf die PNA/DNA-Duplexstabilität wurden die Schmelzpunktexperimente von Kap. 4.2.1 unter den gleichen Bedingungen, aber in Gegenwart von $ZrCl_4$ wiederholt.

Nr.	DNA	PNA	T_m (°C)	[Zr(IV)]/ [µM]	Bemerkungen
1	18	6	59,2	-	s. Tab. 1
11	18	6	56,2	2	-
12	18	6	58,8	6	-
13	18	6	59,3	12	-
14	18	6	-	40	Präzipitat
6	18	13	62,1	-	s. Tab. 1
15	18	13	61,4	2	-
16	18	13	58,4	6	-
17	18	13	57,7	12	-
18	18	13	-	40	Präzipitat
7	18	14	63,1	-	s. Tab. 1
19	18	14	59,2	2	-
20	18	14	58,2	6	-
21	18	14	57,6	12	-
22	18	14	-	40	Präzipitat
8	18	15	56,1	-	s. Tab. 1
23	18	15	56,1	2	
24	18	15	55,7	6	
25	18	15	52,7	12	
26	18	15	-	40	Präzipitat

Tab. 2: T_m -Werte in Abhängigkeit der Zr(IV)-Konzentration (als $ZrCl_4$).

$[DNA] = 2 \mu M$; $[PNA] = 2 \mu M$ [MOPS pH 7] = 10 mM; $[NaCl] = 50 \text{ mM}$; $\Delta T_m = \pm 2^\circ C$.

Übersicht über die PNAs: Kap. 3.4, Schema 6, über die DNA 18: Kap. 3.5, Schema 7.

Die Experimente mit Zr(IV) waren in Hinblick auf die geplanten DNA-Spaltexperimente von Interesse, da einerseits eine selektive DNA-Spaltung nur bei Hybridisierung mit dem Metall-PNA-Konjugat zu erwarten ist. Andererseits muß, um bei $\mu\text{molaren}$ Konzentrationen eine

Komplexbildung von Zr(IV) mit Aminoalkoholen in wässriger Lösung zu erhalten, in der Regel mit einem Überschuss an Zr(IV)-Salz gearbeitet werden.²⁵

Die Experimente wurden mit unmodifizierter PNA **6**, den Aminoalkohol-funktionalisierten PNAs **13-15** und DNA **18** durchgeführt (Tab. 2).

Bis zu einem 6-fachen Zr(IV)-Überschuss (12 μM) wurde die Hybridisierung der PNAs (**6**, **13-15**) mit der DNA (**18**) nicht stark beeinflusst ($\Delta T_m = \pm 0,1^\circ\text{C} - 5,5^\circ\text{C}$), wohingegen bei einem 20-fachen Zr(IV)-Überschuss (40 μM) keine Hybridisierung mehr beobachtet werden konnte. Es ist anzunehmen, dass bei höheren Zr(IV)-Konzentrationen die DNA mit dem Übergangsmetall aggregiert, so dass eine Duplexbildung nicht mehr möglich ist.

4.2.3 PNA/DNA-Titrationsexperimente

Um eine PNA/DNA-Hybridisierung bei Zr(IV)-Überschuß und bei pH 4, wo Zr(IV)-Komplexe ihr Aktivitätsmaximum in der DNA-Spaltung besitzen,²⁵ zu bestätigen, wurden Titrationsexperimente durchgeführt. Zunächst wurde ZrCl_4 (20 μM , pH 4) in Wasser (pH 4) gelöst und die unmodifizierte PNA **6** (2 μM) hinzugefügt. Die Absorption wurde ermittelt und anschließend in bestimmten Schritten die Konzentration der DNA **19** erhöht. Das Titrationsexperiment wurde photometrisch bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ verfolgt (a). Als Kontrollexperiment wurde die gleiche Titration ohne PNA **6** durchgeführt (b).

Während der Titration nimmt die Absorption aufgrund der schrittweisen DNA-Konzentrationserhöhung zu. Wenn das zugefügte Oligonucleotid mit einem in der Lösung vorhandenem PNA-Strang eine Doppelhelix ausbildet, ist die Absorptionserhöhung niedriger, als wenn es einzelsträngig vorläge (Hyperchromizität). Trägt man die Absorption gegen die DNA-Konzentration auf, kann anhand der unterschiedlichen Steigungen der Äquivalenzpunkt bestimmt werden. Deutlicher wird dies, wenn man anstelle der Absorption, die Differenz ΔA aus der Absorption der Lösung mit vorhandener PNA (a) und des Kontrollperiments ohne PNA (b) ermittelt (Abb. 9). Hybridisiert die hinzugefügte DNA mit der PNA, resultiert eine Abnahme von ΔA . Erfolgt keine Hybridisierung, d. h. die zugefügte DNA liegt wie im Kontrollexperiment einzelsträngig vor, erhält man keine Änderung von ΔA .

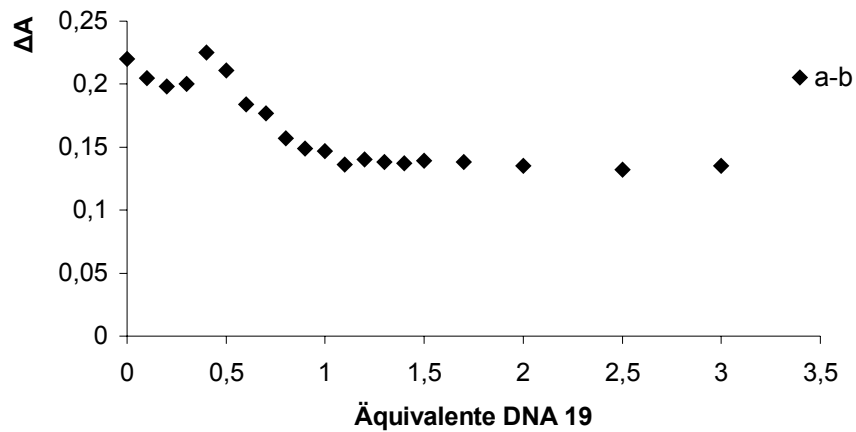


Abb. 9: Titration der Reaktionsmischungen (a) und (b) mit DNA 19

(a) $ZrCl_4$ (20 μM , pH 4), PNA 6 (2 μM), DNA 19 (0-6 μM); pH 4.

(b) $ZrCl_4$ (20 μM , pH 4), DNA 19 (0-6 μM); pH 4.

ΔA ist die Differenz der Absorption A der Lösungen (a) und (b).

Aus Abbildung 9 wird deutlich, dass bei einem 10-fachen Zr(IV)-Überschuss (20 μM), die vollständige PNA/DNA Hybridisierung nach Zugabe eines Äquivalents der DNA 19 abgeschlossen ist.

4.3 T_m-Werte der PNAs 9 und 17

PNA **17** sollte als Substrat-PNA in Katalysen an DNA-Templaten eingesetzt werden. PNA **9** stellt das Hydrolyseprodukt der Ester-PNA **17** dar.

Nr.	DNA	PNA	T _m (°C)	Bemerkungen
27	23	9	54,2	-
28	23	17	51,2	-
29	24	17	29	1 Fehlbase (T3)

Tab.3: T_m-Werte der PNAs für die DNA-Templatreaktionen

[DNA] = 2 μM; [PNA] = 2 μM [MOPS pH 7] = 10 mM; [NaCl] = 50 mM; ΔT_m = ± 2°C.

Übersicht über die PNAs: Kap. 3.4, Schema 6, über die DNAs **23**, **24**: Kap. 3.5, Schema 7.

In den Hybridisierungsexperimenten wurde zunächst für die Duplex von **17** mit der komplementären DNA **23** ein T_m-Wert von 51,2°C ermittelt. Die im Vergleich dazu beobachtete Stabilisierung der Duplex von **9** mit **23** um 3°C könnte von der fehlenden Abstoßung der negativ geladenen Sulfonatgruppe von **17** mit dem anionischen Phosphodiesterückgrat von **23** herrühren.

Hybridisiert **17** mit der DNA **24**, die eine Fehlbase (T3) gegenüber der PNA aufweist, erfolgt eine Schmelzpunktserniedrigung um 22,2°C (Nr. 28 vs. 29). Dieser Effekt ist eine Folge der hohen Sequenzspezifität von Peptidnucleinsäuren gegenüber Fehlbasen von Oligonucleotiden.⁵

4.4 T_m -Werte in Abhängigkeit von Cu(II)

In diesen Experimenten sollte untersucht werden, ob einerseits ein Cu(II)-Überschuß und andererseits die Komplexbildung zwischen den PNA-gebundenen Iminodiacetatliganden (7, 8, 12) und Cu(II) die PNA/ DNA Duplex stabilisiert.

Nr.	DNA	PNA	T_m (°C)	[Cu(II)]/[μ M]	Bemerkungen
2	18	7	53,7	-	s. Tab. 1
30	18	7	53,1	2	
31	18	7	52,7	20	
32	18	7	54,6	40	
33	18	7	49,2	100	Partielle Fällung
3	18	8	53,8	-	s. Tab. 1
34	18	8	53,4	2	
35	18	8	51,2	20	
36	18	8	51,1	40	
37	18	8	50,2	100	Partielle Fällung
5	18	12	52,2	-	s. Tab. 1
38	18	12	52,2	2	
39	18	12	52,4	20	
40	18	12	52,1	40	
41	18	12	49,2	100	Partielle Fällung

Tab.4: T_m -Werte in Abhängigkeit von Cu(II)

[DNA] = 2 μ M; [PNA] = 2 μ M; [Mops pH 7] = 10 mM; [NaCl] = 50 mM; $\Delta T_m = \pm 2^\circ\text{C}$.

Übersicht über die PNAs: Kap. 3.4, Schema 6, über DNA 18: Kap. 3.5, Schema 7.

Aus den Ergebnissen lässt sich ablesen, dass überschüssiges Cu(II) (2 μ M, 20 μ M, 40 μ M) keinen wesentlichen Einfluss auf den Schmelzpunkt der Duplex ausübt. Bei Zugabe von 50 Äquivalenten Cu(II) (100 μ M) erhöhte sich die beobachtete Absorption sprunghaft. Dieses Verhalten ist typisch für unspezifische Effekte und könnte die Folge einer partiellen DNA-Fällung durch überschüssiges Cu(II) sein.

5 Sequenzselektive Spaltung einzelsträngiger DNA mit Zr(IV)-PNA-Konjugaten

5.1 Einführung in die DNA-Spaltexperimente

Die isolierten PNAs mit einer Reinheit von über 90% (6-9, 12-15) sollten als Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugate auf ihre Fähigkeit zur sequenzspezifischen Spaltung komplementärer DNAs untersucht werden. Die Spaltexperimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, um eine vollständige Hybridisierung der Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugate mit den Ziel-DNAs zu gewährleisten (Vgl. Kap. 4). Spaltaktive Zr(IV)-Konjugate sollten zunächst durch MALDI-TOF MS identifiziert werden (Abb. 10).

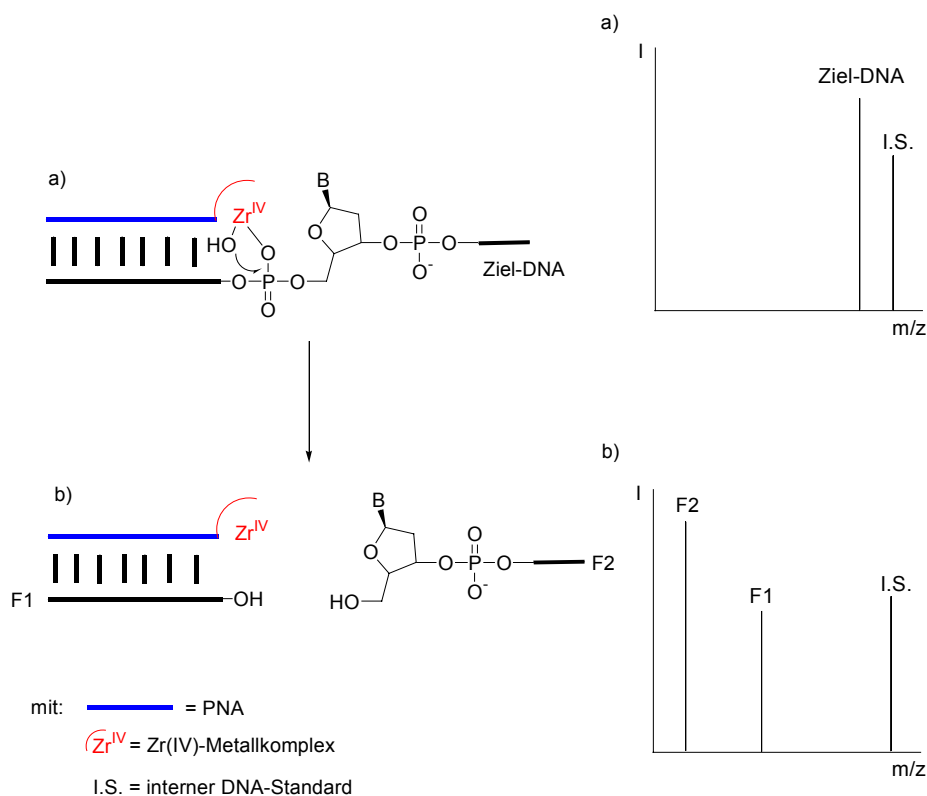


Abb. 10: MALDI-TOF MS Analyse eines DNA-Spaltexperimentes

a) zu Beginn des Experimentes b) nach vollständiger, sequenzspezifischer DNA-Spaltung.

Zu Beginn des Experimentes ist im zugehörigen Massenspektrum neben dem Molekülionpeak eines mit der Matrix hinzugefügten internen DNA-Standards (I.S.) lediglich die Ziel-DNA sichtbar (Abb. 10a). Nachdem diese durch das Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugat

sequenzspezifisch gespalten wurde, können die beiden neu entstandenen DNA-Spaltfragmente F1 und F2 beobachtet werden (Abb. 10b).

Nach einem Screening der Spaltreaktionen durch MALDI-TOF MS, sollte für das Zr(IV)-Konjugat, das die Ziel-DNAs am selektivsten spaltet, die Reaktionsgeschwindigkeit durch quantitative MALDI-TOF MS abgeschätzt und die Ausbeute mit HPLC quantifiziert werden. Des Weiteren sollten enzymkatalysierte Markierungsexperimente Aufschluss geben, ob die DNA-Spaltprodukte durch Enzyme erkannt und modifiziert werden können. Dies ist in Hinblick auf potentielle Anwendungen in der Biotechnologie von Interesse.

Für die MALDI-TOF MS Untersuchungen wurden den Reaktionslösungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben (1 μ l) entnommen, auf einen Träger getüpfelt und dort mit der Matrix (1 μ l) vermischt. Diese bestand aus einer Mischung gleicher Volumina einer gesättigten ethanolischen Lösung von Azathiathymidin ($ATT_{\text{ges. (EtOH)}}$) und wässrigem Diammoniumcitrat (DAC; 0,1M). Der Matrix wurde außerdem **30** als interner DNA-Standard (IS) hinzugefügt, so dass die Endkonzentration von **30** 1,35 μ M betrug. Die Proben trockneten an der Luft und wurden anschließend massenspektrometrisch untersucht.

5.2 Voruntersuchungen zur MALDI-TOF MS Analyse der DNA-Spaltreaktionen

5.2.1 Voruntersuchungen zur qualitativen MALDI-TOF MS Analyse

Die Analyse einer DNA-Spaltreaktion durch MALDI-TOF MS setzt voraus, dass die Ziel-DNA und die bei einer Spaltung erwarteten DNA-Fragmente in Anwesenheit des Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugats identifiziert werden können. Um dies zu überprüfen, wurden wässrige Lösungen, die als Komponenten eine 15-mer DNA (**18**), eine 12-mer DNA (**26**), eine 3-mer DNA (**27**), eine PNA (**6**) und ZrCl₄ enthielten, untersucht. (Tab. 5; + = vorhanden, - = nicht vorhanden). Dabei sollten **18** die Ziel-DNA, **26** und **27** die DNA-Bruchstücke der sequenzspezifischen Spaltung von **18**, **6** das PNA-Konjugat und Zr(IV) das hydrolyseaktive Metallion darstellen (Vgl. Abb. 10). Die Lösungen waren mit MOPS (2 mM; pH 7) gepuffert und enthielten NH₄Cl (25 mM).

Nr.	DNA 18	DNA 26	DNA 27	PNA 6	ZrCl ₄
42	+	+	+	-	-
43	+	+	+	-	+
44	+	+	+	+	-
45	+	+	+	+	+

Tab. 5: Voruntersuchungen zur qualitativen MALDI-TOF Analyse

[DNA] = 0,5 μM; [PNA **6**] = 0,5 μM; [MOPS pH 7] = 2 mM; [NH₄Cl] = 25 mM; [ZrCl₄] = 2 μM. + = vorhanden; - = nicht vorhanden. PNA **6** (Kap. 3.4; Schema 6); DNAs **18**, **26**, **27** (Kap. 3.5; Schema 7). DNA **18**: [M-H⁺] = 4557; **26**: [M-H⁺] = 3665; **27**: [M-H⁺] = 929.

Alle in den jeweiligen Lösungen (Nr. 42-45) vorhandenen DNAs unterschiedlicher Sequenz und Länge konnten durch MALDI-TOF MS identifiziert werden, wobei die PNA (**6**) und überschüssiges Zr(IV) (4 Äq.) nicht störten.

Durch diese Voruntersuchung konnte gezeigt werden, dass sich die MALDI-TOF MS Analyse für die schnelle Identifizierung (< 1 min) DNA-spaltaktiver Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugate eignet.

5.2.2 Voruntersuchung zur quantitativen MALDI-TOF MS Analyse

In einer weiteren Voruntersuchung, die von Dr. Mokhir/AK Krämer durchgeführt wurde, sollte gezeigt werden, dass DNA-Konzentrationen durch MALDI-TOF MS abgeschätzt werden dürfen. Dafür wurden verschiedene Mischungen bestehend aus einem DNA-Analyt (**28**) unterschiedlicher Konzentration (20-100 μM) und einem internen DNA-Standard (IS; **29**) konstanter Konzentration (35 μM) durch MALDI-TOF MS analysiert und die Abhängigkeit der Signalintensität des Analyts von der eingesetzten Analyt-Konzentration untersucht (Abb. 11).

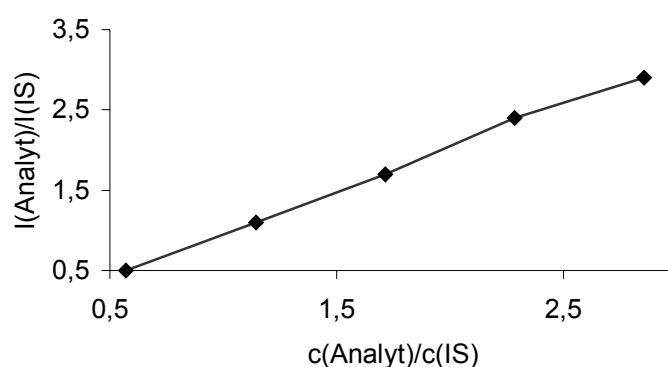


Abb. 11: Signalintensität $I_{\text{Analyt (28)}/I_{\text{Kontrolle(29)}}$

$[DNA\ 29] = 35\ \mu\text{M}$; $[DNA\ 28] = 20, 40, 60, 80, 100\ \mu\text{M}$. DNA **28**, **29** (Kap. 3.5; Schema 7). **28**: $[M-H^+] = 2370$;
29: $[M-H^+] = 2979$; $\Delta I_{28/29} = \pm 10-20\ \%$.

Die lineare Abhängigkeit der Signalintensität von der Analyt-Konzentration (Abb. 11) zeigt, dass unter bestimmten Bedingungen DNA-Konzentrationen durch MALDI-TOF MS ermittelt werden können. Somit dürfen Reaktionskinetiken von DNA-Spaltreaktionen mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugaten durch MALDI-TOF MS aufgenommen werden.

5.3 DNA-Spaltreaktionen mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugaten

5.3.1 Versuche zur DNA-Spaltung mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugaten ohne zusätzliche Pufferung

Bei den ersten Versuchen zur DNA-Spaltung mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugaten wurde auf eine zusätzliche Pufferung der Reaktionslösungen verzichtet, da Untersuchungen unseres Arbeitskreises zur Spaltung von Dinucleotiden und aktivierten Phosphodiestern zeigten, dass Zr(IV)-Komplexe in millimolaren Konzentrationen selbst über eine ausreichende Pufferkapazität verfügen.²⁵ Versuche zur gezielten Spaltung einzelsträngiger DNAs (**18**, **19**, **22**; 10 μM) wurden mit den PNA-Konjugaten **6-9**, **12-15** (10 μM) bei unterschiedlichen Zr(IV)-Konzentrationen (10 μM , 50 μM , 100 μM) durchgeführt. Die Reaktionstemperatur betrug $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Kontrollen, die vor, während und nach den Experimenten durchgeführt wurden, zeigten jedoch, dass bei den eingesetzten Zr(IV)-Konzentrationen zwischen 10 und 100 μM keine ausreichende Pufferung erreicht wurde ($\Delta\text{pH} = +1,2$). Aufgrund dieser Tatsache ließen sich zunächst beobachtete Spaltaktivitäten einiger Zr(IV)-PNA-Konjugate nicht reproduzieren. Größere Zr(IV)-Überschüsse konnten nicht verwendet werden, da die Ziel-DNAs dann als Niederschläge ausfielen (Vgl. Kap. 4). Alle weiteren Untersuchungen zur DNA-Spaltung mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugaten wurden deshalb mit Zusatz von Puffern durchgeführt.

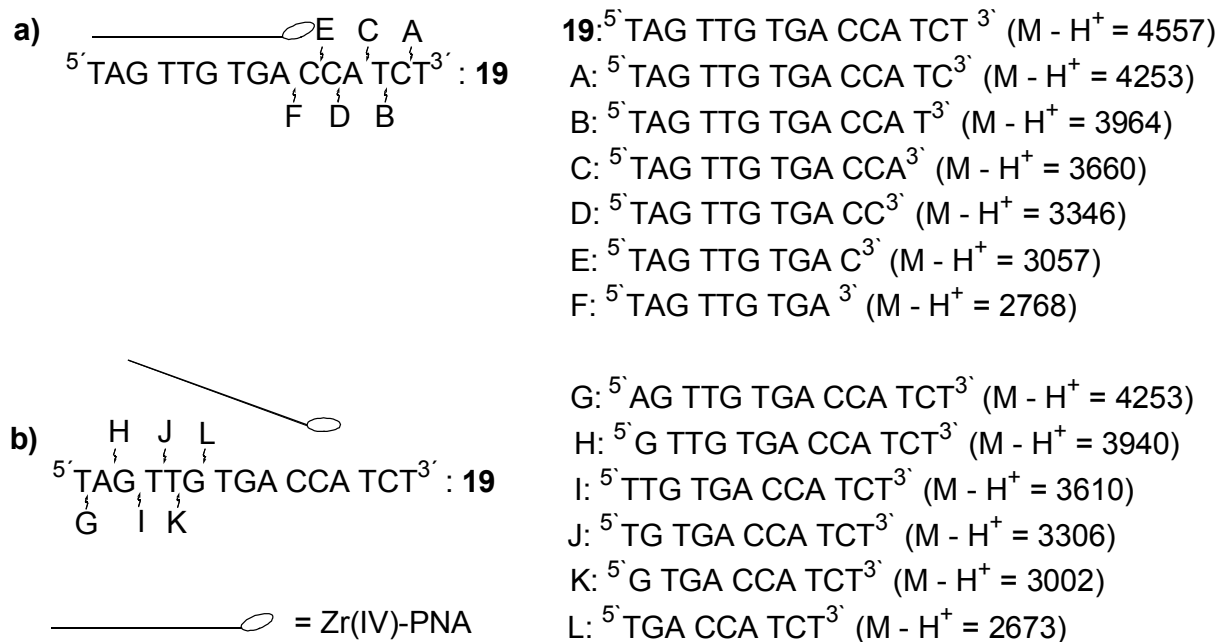
5.3.2 Versuche zur DNA-Spaltung mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugaten in Pyridinium-bzw. Acetatpuffer

Da Zr(IV)-Komplexe in leicht saurem Milieu ($\text{pH} = 4 - 5$) ihr Aktivitätsmaximum für die Spaltung von aktivierten Phosphodiestern und Dinucleotiden besitzen,²⁵ wurden Versuche zur DNA-Spaltung in Acetatpuffer $\text{pH} 4,67$ (10 mM) sowie Pyridiniumpuffer $\text{pH} 5,27$ (10 mM) durchgeführt. Es wurden die DNAs **18**, **19** und **22** (10 μM), die PNAs **6**, **12** und **15** (10 μM) bei Verwendung eines 10-fachen ZrCl_4 -Überschusses (100 μM) eingesetzt. Die Reaktionstemperatur betrug $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Die Spaltexperimente wurden durch MALDI-TOF MS untersucht, wobei nach 240 Stunden keine charakteristischen Fragmente einer DNA-Spaltung beobachtet wurden.

5.3.3 Spaltung von DNA 19 mit Zr(IV)-PNA-Konjugaten bei pH7

Die Spaltexperimente der DNA **19** (10 μ M) wurden in MOPS-Puffer (5 mM; pH 7) bei 22°C \pm 2°C durchgeführt. Es wurden die zu **19** komplementären PNAs **6-7**, **12-15** (10 μ M) und die unmodifizierte PNA **6** (10 μ M) in Verbindung mit den ungebundenen Liganden Iminodiacetat (IDA, **L₅-H**), TACI (**L₇-H**) und TRIS (**L₈-H**) (je 10 μ M) eingesetzt. Um eine ausreichende Komplexierung der Liganden zu erreichen, wurden äquimolare Zr(IV)-Konzentrationen bzw. ein 5 oder 10-facher Überschuss verwendet (10, 50 und 100 μ M).

In allen Proben, die PNA-Konjugate enthielten, wurden immer drei charakteristische Peaks beobachtet für die eingesetzten PNA (*₁), ein PNA x MOPS (*₂; m/z = PNA + 208,3) und PNA x Citronensäure x Zr(IV)-Addukt (*₃; m/z = PNA + 282,4). Des weiteren wurden 120 Stunden nach Reaktionsbeginn sequenzselektive Spaltungen im einzelsträngigen DNA-Bereich (Fragmente A: [M - H⁺] = 4253; B: [M - H⁺] = 3964; D: [M - H⁺] = 3346; E: [M - H⁺] = 3057; Schema 8a), aber auch unspezifische Spaltungen am, dem Metallkomplex entgegengesetzten, 5'-Ende der Ziel-DNA **19** beobachtet (Fragmente I: [M - H⁺] = 3610; J: [M - H⁺] = 3306; Schema 8b) (Tab. 6).



Schema 8: Spaltfragmente der sequenzselektiven (a) bzw. unspezifischen (b) Spaltung der DNA **19** (M - H⁺ bezieht sich auf dephosphorylierte DNAs)

Bei den Experimenten mit "freiem" Zr(IV) (Ia-c; Abb. 12), mit unmodifizierter PNA **6** (IIa - c; Abb.13) und Iminodiacetat-modifizierter PNA **7** (IIIa - c) wurden keine charakteristischen

DNA-Bruchstücke beobachtet. Auch bei Einsatz unmodifizierter PNA **6** in Kombination mit den ungebundenen Liganden IDA, TRIS und TACI (VIII - X) ließen sich keine Bruchstücke (VIIIb - c, IXa) bzw. bei $[M - H^+] = 3610$ (Fragment I) und $[M - H^+] = 3306$ (Fragment J) lediglich die Bruchstücke einer unselektiven DNA-Hydrolyse beobachten (VIIIa, IXb - c und X; IX ist in Abb.14 dargestellt). Die Intensität dieser Peaks war jedoch sehr schwach.

	I “Freies“ Zr(IV)	II PNA 6	III PNA 7	IV PNA 12	V PNA 13	VI PNA 14	VII PNA 15	VIII PNA 6/ IDA	IX PNA 6/ TRIS	X PNA 6/ TACI
a) $[ZrCl_4] = 10 \mu M$	-	-	-	I, J	-	-	-	I	-	I, J
b) $[ZrCl_4] = 50 \mu M$	-	-	-	I	-	-	-	-	I, J	I, J
c) $[ZrCl_4] = 100 \mu M$	-	-	-	I, J	D, A	B; D; E	D;E	-	I, J	I, J

Tab.6: DNA-Fragmente der Spaltreaktionen von **19** (nach 120h)

$[DNA \mathbf{19}] = 10 \mu M$; $[PNA] = 10 \mu M$; $[MOPS \text{ pH } 7] = 5 \text{ mM}$; $[ZrCl_4] = 10, 50, 100 \mu M$. PNAs **6, 7, 12-15** (Kap. 3.4; Schema 6); DNA **19** (Kap. 3.5; Schema 7). Selektive Spaltung: Fragmente A-F (Schema 8a); Unspezifische Spaltung: Fragmente G-L (Schema 8b).

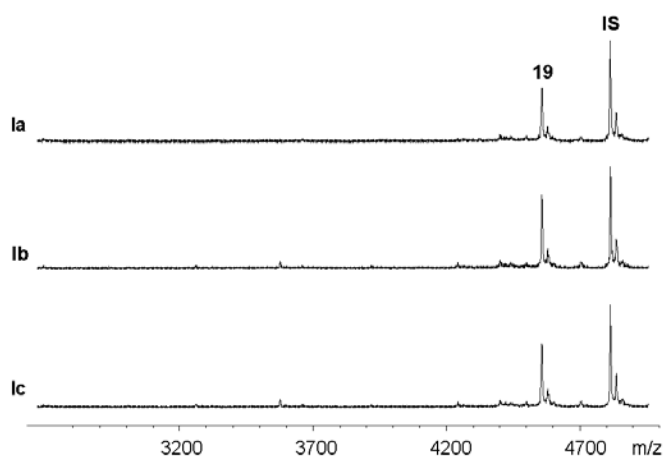


Abb. 12: Spaltexperiment I (120h)

$[19] = 10 \mu M$; $[MOPS \text{ pH}7] = 5 \text{ mM}$; Ia) $[ZrCl_4] = 10 \mu M$; Ib) $[ZrCl_4] = 50 \mu M$; Ic) $[ZrCl_4] = 100 \mu M$. **19:** $[M - H^+] = 4557$.

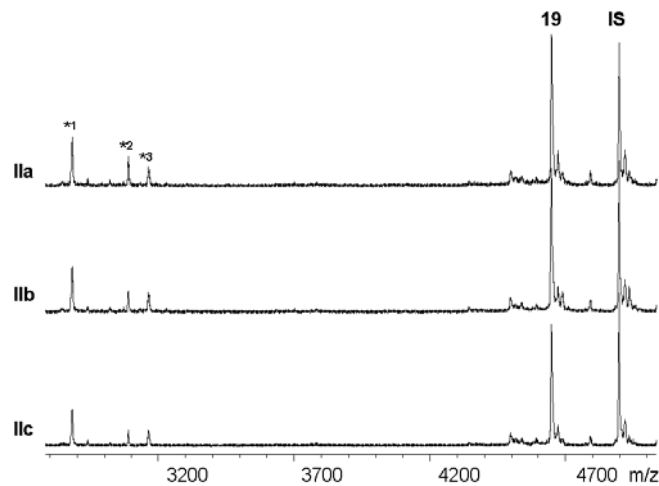


Abb. 13: Spaltexperiment II (120h)

[**19**], [**6**] = 10 μM ; [MOPS pH 7] = 5 mM; IIa) [ZrCl_4] = 10 μM ; IIb) [ZrCl_4] = 50 μM ; IIc) [ZrCl_4] = 100 μM . *₁ = **6**; *₂ = **6** x MOPS; *₃ = **6** x Citrat x Zr(IV). **19**: [$M - H^+$] = 4557.

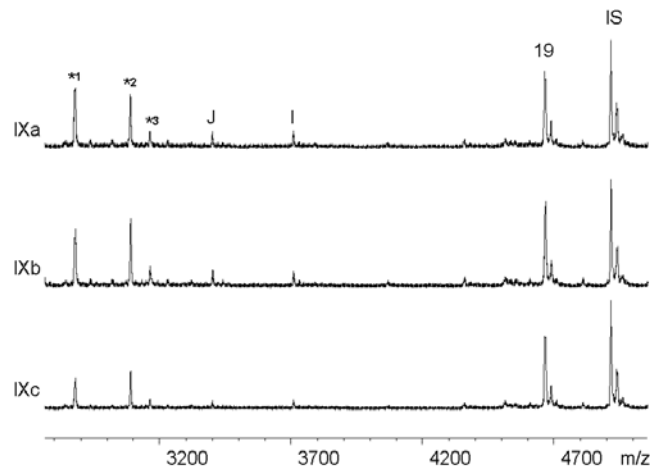


Abb. 14: Spaltexperiment IX (120h)

[**19**], [**6**], [TRIS] = 10 μM ; [MOPS pH 7] = 5 mM; IXa) [ZrCl_4] = 10 μM ; IXb) [ZrCl_4] = 50 μM ; IXc) [ZrCl_4] = 100 μM . *₁ = **6**; *₂ = **6** x MOPS; *₃ = **6** x Citrat x Zr(IV). **19**: [$M - H^+$] = 4557; Fragment I: [$M - H^+$] = 3610; J: [$M - H^+$] = 3306 (Schema 8b).

Die gezielte Spaltung von **19** im einzelsträngigen DNA-Bereich wurde ausschließlich mit den Aminoalkohol-modifizierten PNAs (**13-15**) und einem 10-fachen Überschuss an Zr(IV)

erreicht (Vc, VIc, VIIc). Der benötigte Überschuss an Zr(IV) lässt auf eine geringe thermodynamische Stabilität der Zr(IV)-Komplexe schließen. Die Spaltung von **19** erfolgte jeweils an zwei bis drei unterschiedlichen Phosphodiesterbindungen, wobei immer eine Spaltung zwischen dem zweiten und dritten Nucleotid ausgehend vom Liganden (Fragment D: $[M - H^+] = 3346$) beobachtet wurde. Bei Verwendung der Glucamin-PNA (**13**) und TACI-PNA (**14**) waren die Signalintensitäten jedoch sehr schwach. Spaltfragmente mit hoher Abundanz wurden mit der TRIS-modifizierten PNA (**15**) und einem 10-fachen Zr(IV)-Überschuss erhalten (Abb. 15, VIIc).

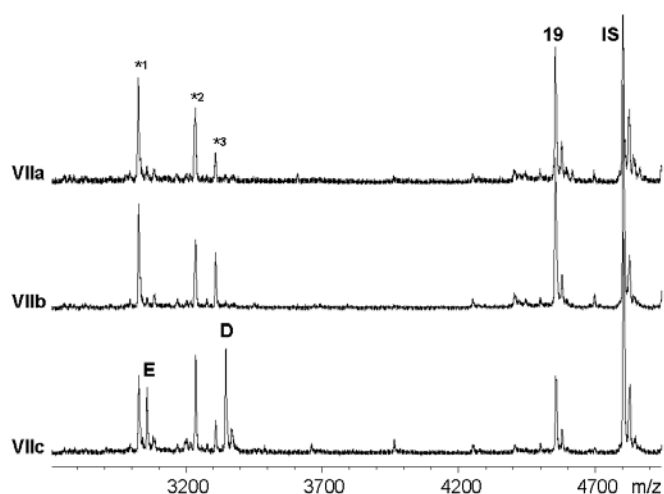


Abb. 15: Spaltexperiment VII (120h)

[**19**], [**15**] = 10 μM ; [MOPS pH 7] = 5 mM; VIIa) $[\text{ZrCl}_4] = 10 \mu\text{M}$; VIIb) $[\text{ZrCl}_4] = 50 \mu\text{M}$; VIIc) $[\text{ZrCl}_4] = 100 \mu\text{M}$. *₁ = **15**; *₂ = 15 x MOPS; *₃ = 15 x Citrat x Zr(IV). **19**: $[M - H^+] = 4557$; Fragment D: $[M - H^+] = 3346$; E: $[M - H^+] = 3057$ (Schema 8a).

Die bevorzugte Spaltung erfolgte zwischen dem ersten und zweiten (Fragment E: $[M - H^+] = 3057$), sowie zweiten und dritten Nucleotid (Fragment D: $[M - H^+] = 3346$) ausgehend vom Liganden.

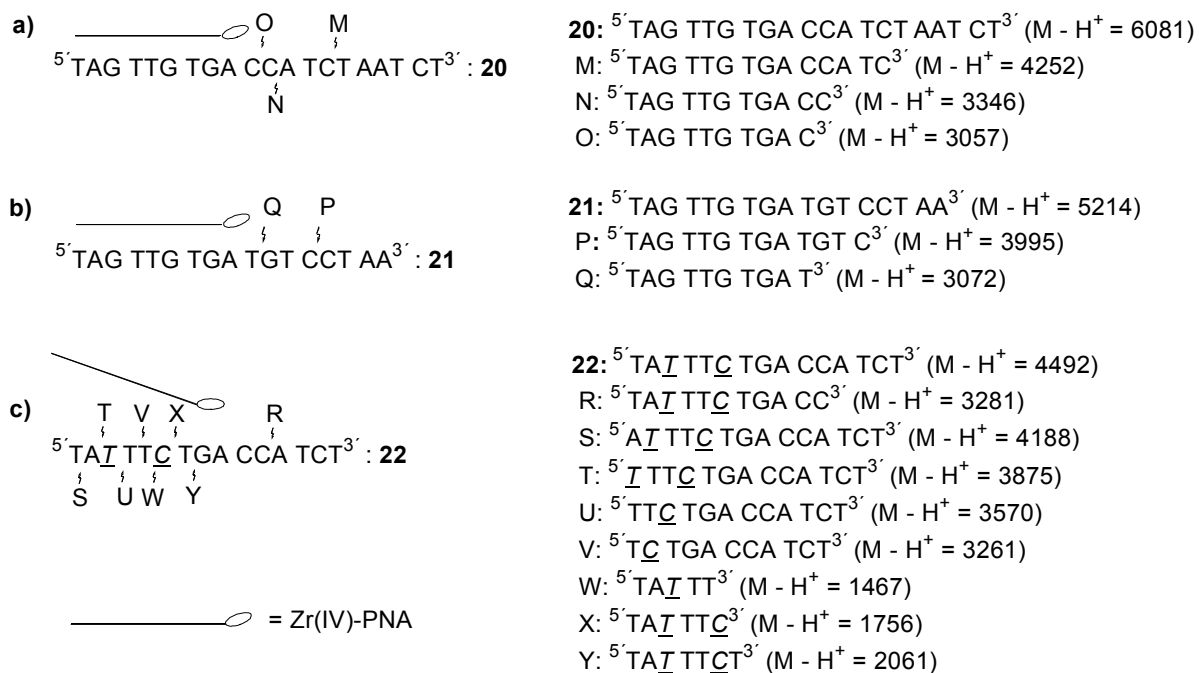
In allen Experimenten wurden nur diejenigen DNA-Spaltfragmente identifiziert, die mit der komplementären PNA eine Doppelhelix ausbildeten. Die einzelsträngigen DNA-Fragmente wurden hingegen nicht beobachtet. Vermutlich werden diese durch überschüssiges Zr(IV) unselektiv weitergespalten. Hingegen ist die DNA innerhalb der PNA/DNA-Duplex vor der Hydrolyse durch "freies" Zr(IV) geschützt. Auch die Spaltung der den Metallkomplexen direkt benachbarten Phosphodiesterbindung wurde nicht beobachtet (Schema 8a) (Fragment F: $[M - H^+] = 2768$). Die MALDI-TOF Analysen ergaben, daß alle beobachteten DNA-

Bruchstücke terminal dephosphoryliert waren. Eine Fragmentierung der PNAs ließ sich massenspektrometrisch nicht beobachten.

Um genauere Aussagen über die Spaltaktivitäten und Selektivitäten der Zr(IV)-Aminoalkohol-PNA-Konjugate (**13-15**) treffen zu können, wurden weitere Untersuchungen mit DNAs unterschiedlicher Sequenz und Länge durchgeführt (Kap. 5.3.4).

5.3.4 Spaltung der DNAs 20-22 mit den Zr(IV)-Aminoalkohol-PNA-Konjugaten

In den Experimenten zur gezielten Spaltung der DNA **19** mit komplementären Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugaten konnten die Aminoalkohol-modifizierten PNAs (**13-15**) bei Verwendung eines 10-fachen Zr(IV)-Überschusses als aktive Spezies MALDI-TOF massenspektrometrisch identifiziert werden (Kap. 5.3.3). Mit diesen Konjugaten sollten weitere Spaltexperimente mit DNAs unterschiedlicher Sequenz und Länge durchgeführt werden, wobei die Reaktionsbedingungen analog zu denen der Spaltung von **19** waren (Kap. 5.3.3). Es wurden komplementäre DNAs (**20-21**; Schemata 9a, b), sowie eine DNA (**22**; Schema 9c), die zwei Fehlbasen gegenüber den PNAs **13-15** aufweist, eingesetzt. Aus den Ergebnissen der Spaltreaktionen sollten Informationen über die Spaltselektivitäten der einzelnen Zr(IV)-Aminoalkohol-PNAs (**13-15**) gewonnen werden.



Schema 9: Fragmente der DNA-Spaltung von DNA 20 - 22 120h nach Reaktionsbeginn (Tab. 7; M-H⁺ bezieht sich auf dephosphorylierte DNAs)

Die DNA **20** hat ausgehend vom 5'-Ende für die ersten fünfzehn Nucleotide die gleiche Basensequenz wie die DNA **19**, jedoch ist der 3'-Terminus um 5 Basen länger. In den Experimenten mit dieser Ziel-DNA sollte überprüft werden, ob zusätzliche Spaltstellen in dem am 3'-Ende verlängerten Bereich von **20** auftreten. DNA **21** ist ebenfalls zu den eingesetzten PNAs komplementär, jedoch unterscheidet sich die Basensequenz des einzelsträngigen Bereichs der PNA/ DNA Duplex (Schema 9b) gänzlich von dem der DNAs **19, 20**. Dieses Experiment war von Interesse, da überprüft werden sollte, ob die beobachteten Spaltselektivitäten von der Basensequenz im einzelsträngigen DNA-Bereich abhängig sind. Um den Einfluss von Fehlbasen in der PNA/ DNA-Duplex auf die Spaltselektivität der Zr(IV)-Aminoalkoholkonjugate (**13-15**) zu untersuchen, wurden Experimente mit der DNA **22** durchgeführt.

Bei den Spaltexperimenten der komplementären DNAs (**20, 21**) mit den Zr(IV)-Aminoalkohol-modifizierten PNAs (**13-15**) wurde immer mindestens eine Phosphodiesterbindung im einzelsträngigen DNA-Bereich gespalten (Tab. 7; Schema 9).

	XI PNA 13	XII PNA 14	XIII PNA 15
a) DNA 20	N, O	M, O	N, O
b) DNA 21	Q, P	P	Q, P
c) DNA 22	U	R; U-W, Y	R; U, T, W, X, Y

Tab. 7: Spaltreaktion der DNAs **20-22** mit den PNAs **13-15** und $ZrCl_4$ (nach 120h)

$[DNA] = 10 \mu M$; $[PNA] = 10 \mu M$; $[MOPS \text{ pH } 7] = 5 \text{ mM}$; $[ZrCl_4] = 100 \mu M$.

Die Spaltungen erfolgten einerseits in unmittelbarer Nähe des Metallkomplexes zwischen dem ersten und zweiten Nucleotid (Fragment O: $[M - H^+] = 3057$, CC-Verknüpfung; Fragment Q: $[M - H^+] = 3072$, TG-Verknüpfung), andererseits jedoch auch in größerer Entfernung zwischen dem fünften und sechsten Nucleotid der Ziel-DNA (Fragment M: $[M - H^+] = 4252$, CT-Verknüpfung). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass durch die konformative Flexibilität des einzelsträngigen DNA-Bereichs auch weiter entfernte Phosphodiesterbindungen in unmittelbare Umgebung des aktiven Zr(IV)-Komplexes gebracht und gespalten werden. Zu vergleichbaren Schlussfolgerungen kommen auch kürzlich erschienene Arbeiten zu DNA-Templat-gesteuerten Verknüpfungsreaktionen chemisch modifizierter Oligonucleotide.³⁷

Wie schon bei der Spaltung von **19** mit den Zr(IV)-PNAs (**13-15**) beobachtet wurde, ließen sich lediglich diejenigen DNA-Bruchstücke erhalten, die durch die komplementäre PNA vor dem benötigten, überschüssigen Zr(IV) geschützt waren. Diese Fragmente waren dephosphoryliert. Bezieht man in die Diskussion die Spaltreaktionen der DNA **19** ein (Kap. 5.3.3), stellt man fest, dass mit den Zr(IV)-Glucamin (**13**)- und TACI (**14**)-modifizierten PNAs Phosphodiesterbindungen an unterschiedlichen Positionen ausgehend vom Metallkomplex gespalten wurden. Dabei fällt auf, dass außer einer gespaltenen Phosphodiesterbindung (XIIb: Fragment Q, TG-Verknüpfung,), alle anderen mindestens ein Cytosylnucleotid verknüpften.

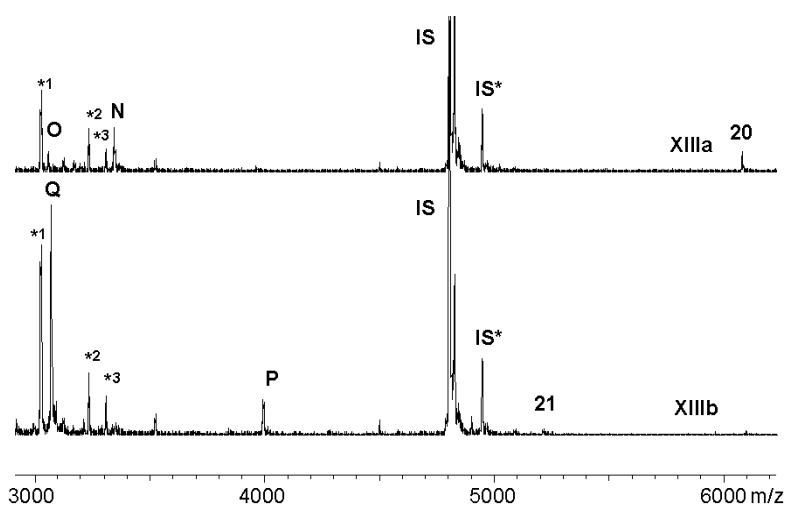
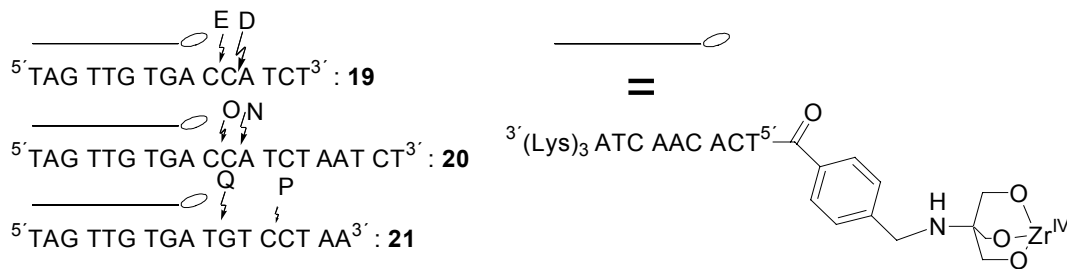


Abb. 16: Spaltexperiment XIIIa (oben) und XIIIb (unten) nach 120h
 $[15] = 10 \mu\text{M}$; $[\text{MOPS pH } 7] = 5 \text{ mM}$; $[\text{ZrCl}_4] = 100 \mu\text{M}$; XIIIa: mit $[20] = 10 \mu\text{M}$; XIIIb: mit $[21] = 10 \mu\text{M}$. *₁ = **15**, *₂ = **15 x MOPS**; *₃ = **15 x Citrat x Zr(IV)**. **20**: $[M - H^+] = 6081$; **21**: $[M - H^+] = 5214$;
 Fragment N: $[M - H^+] = 3346$; O: $[M - H^+] = 3057$; P: $[M - H^+] = 3995$; Q: $[M - H^+] = 3072$; IS =
 interner DNA-Standard (**30**); IS* = Verunreinigung des IS.

Eine sequenzselektive Spaltung komplementärer DNAs (**19-21**) wurde für das TRIS-PNA-Konjugat (**15**) bei zehnfachem Zr(IV)-Überschuss beobachtet (XIIIa und XIIIb sind in Abb. 16 dargestellt). Diese erfolgte unabhängig von der Basensequenz zwischen dem ersten und zweiten Nucleotid (Fragment E bei **19**, CC-Verknüpfung; Fragment O bei **20**, CC-Verknüpfung; Fragment Q bei **21**, TG-Verknüpfung) ausgehend vom Metallkomplex (Schema 10). Neben dieser Phosphodiesterbindung wurde in jeder Ziel-DNA jedoch noch eine weitere Bindung durch das Zr(IV)-TRIS-PNA-Konjugat (**15**) gespalten. Da diese wiederum mindestens ein Cytosylnucleotid verknüpften, könnte vermutet werden, dass

Phosphodiesterbindungen von Cytosylnucleotiden besonders anfällig für die DNA-Spaltung sind und die Spaltselektivität beeinflussen.



Schema 10: Fragmente der DNA-Spaltung von 19-21 mit dem Zr(IV)-TRIS-PNA-Konjugat 120 Stunden nach Reaktionsbeginn (VIIc, XIIIa und XIIIb)

Bei den Experimenten mit der DNA **22**, die zwei Fehlbasen gegenüber den PNAs **13-15** aufweist, konnte zwar auch eine Spaltung zwischen dem zweiten und dritten Nucleotid (Fragment R: CA Verknüpfung) festgestellt werden, jedoch wurden Fragmente hoher Intensität einer unspezifischen Spaltung am 5'-Ende von **22** beobachtet (XIc-XIIIc; XIIIc ist in Abb. 17 dargestellt).

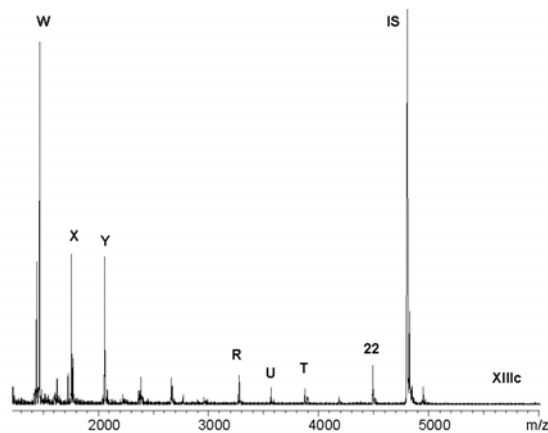


Abb. 17: Spaltexperiment XIIIc nach 120h
 [22], [15] = 10 μ M; [MOPS pH 7] = 5mM; [ZrCl₄] = 100 μ M. 22: [M - H⁺] = 4492; Fragment T: [M - H⁺] = 3875; U: [M - H⁺] = 3570; R: [M - H⁺] = 3281; W: [M - H⁺] = 1467; X: [M - H⁺] = 1756; Y: [M - H⁺] = 2061; IS = interner DNA-Standard (30).

Diese unspezifische Spaltung könnte dadurch erklärt werden, dass aufgrund der zwei Fehlbasen die schützende PNA/DNA Duplex nur teilweise ausgebildet wird und "freies" Zr(IV) an diesen Stellen bevorzugt spaltet.

5.3.5 Quantitative MALDI-TOF MS Analyse der Spaltung von 19

Nachdem das TRIS-PNA-Konjugat **15** bei Verwendung eines 10-fachen Zr(IV)-Überschusses als selektivstes Reagenz zur Spaltung komplementärer DNAs (**19-21**) identifiziert wurde (Kap. 5.3.4), sollten die Ausbeuten der Spaltreaktionen durch quantitative MALDI-TOF MS abgeschätzt werden. Die Analyse wurde auf das spaltaktive Zr(IV)-TRIS-PNA-Konjugat (**15**) und die komplementären DNAs (**19-21**) beschränkt (VIIc, XIIIa, XIIIb). Für die Spaltreaktion der DNA **19** wurden die entsprechenden Kontrollexperimente mit “freiem“ Zr(IV) (Ic), mit unmodifizierter PNA (**6**)/ Zr(IV) (IIc), sowie unmodifizierter PNA (**6**) mit externem, ungebundenem Liganden TRIS/ Zr(IV) (IXc) berücksichtigt (Abb. 18). Anschließend sollte die mit DNA **19** beobachtete Spaltausbeute des Zr(IV)-TRIS-PNA-Konjugats (**15**) mit den Aktivitäten gegenüber DNA **20** und **21** verglichen werden (XIIIa, XIIIb).

Verfolgt wurde die Abnahme der Konzentration der Ziel-DNA **19** (Abb. 18), indem die Verhältnisse der Integrale des Molekülionpeaks der Ziel-DNA und des internen DNA-Standards **30** (IS) konstanter Konzentration ermittelt wurden.

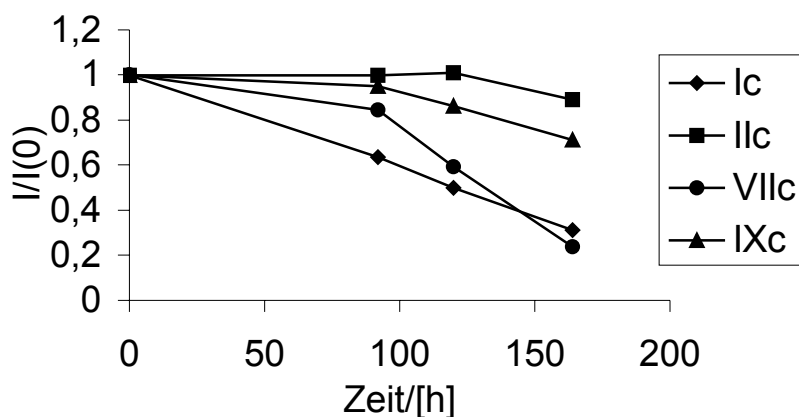


Abb. 18: Reaktionsgeschwindigkeiten der DNA-Spaltexperimente

[PNA], [DNA **19**] = 10 μ M; [MOPS pH 7] = 5mM; [ZrCl₄] = 100 μ M; Ic: ohne PNA, $\Delta I/I(0) = \pm 16\%$; IIc: PNA **6**, $\Delta I/I(0) = \pm 26\%$; VIIc: PNA **15**, $\Delta I/I(0) = \pm 19\%$; IXc: PNA **6**/ [TRIS] = 10 μ M, $\Delta I/I(0) = \pm 4\%$. $I = I_{Analyt}/I_{IS}$; $I(0)=I$ bei $t = 0$ min; $\Delta I/I(0)$ wurde aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten bestimmt.

Bei Verwendung von “freiem“ Zr(IV) wurde 164 Stunden nach Beginn der Spaltreaktion eine 69 ± 16 %-ige Konzentrationsabnahme von **19** beobachtet (Mischung Ic). Da jedoch in den MALDI-TOF Massenspektren keine charakteristischen DNA-Fragmente beobachtet wurden (Kap. 5.3.3; Abb. 12), ist die Konzentrationsabnahme wahrscheinlich auf eine unselektive Spaltung in einzelne Nucleotidbausteine durch das überschüssige Zr(IV) zurückzuführen.

Interessanterweise wurde dieser Effekt mit der unmodifizierten PNA (**6**)/ Zr(IV) (Mischung IIc; Abb. 13), sowie der unmodifizierten PNA (**6**) in Verbindung mit dem externen ungebundenen Liganden TRIS/ Zr(IV) (Mischung IXc; Abb. 14) unterdrückt.

Für die Zr(IV)-TRIS-modifizierte PNA (**15**), die **19** in unmittelbarer Nähe des Liganden spaltet (Mischung VIIc: Fragment D, E; Abb. 15) wurde 164 Stunden nach Reaktionsbeginn eine Konzentrationsabnahme von $76 \pm 19\%$ erhalten (Abb. 18).

Diese durch MALDI-TOF MS abgeschätzten Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen unseres Arbeitskreises überein, in denen gezeigt wurde, dass der Zr(IV)-TRIS Komplex eine besonders hohe Aktivität zur Spaltung von aktivierten Estern und Dinucleotiden besitzt.²⁵

In den Spaltexperimenten der DNAs **20** und **21** mit der Zr(IV)-TRIS PNA (**15**) (XIIIa bzw. XIIIb) wurden nach 164 Stunden DNA-Konzentrationsabnahmen von 94% bzw. 95% beobachtet. Dieses Ergebnisse liegen im Rahmen der Fehlergrenze von VIIc.

5.3.6 HPLC-Analytik der Spaltung von **19** mit dem Zr(IV)-TRIS-PNA-Konjugat

Für das Zr(IV)-TRIS-PNA-Konjugat **15**, das komplementäre DNAs unterschiedlicher Sequenz und Länge (**19-21**) mit größter Selektivität spaltet, ließ sich 164 Stunden nach Reaktionsbeginn über MALDI-TOF MS eine Spaltausbeute von $76 \pm 19\%$ ermitteln. Diese Ergebnisse sollten durch HPLC-Analyse überprüft und quantifiziert werden. Dafür wurde die selektive Spaltung von **19** mit dem Zr(IV)-TRIS-PNA-Konjugat **15** untersucht (Mischung VIIc).

Der Reaktionslösung wurden zwei Proben (1 μ l) entnommen: zum Zeitpunkt $t = 0$ min sowie $t = 164$ h. Die Spaltreaktion in diesen Proben wurde mit EDTA (1 μ l, 10 mM in Wasser) gestoppt und nach anschließender Verdünnung (10 μ l) an einer apolaren reversed-phase C4-Säule unter Verwendung eines Gradienten des Lösungsmittels A (0,1 M Triethylammoniumacetat; pH 7; 0,1% EDTA) und B (Acetonitril) getrennt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/ min. Die Identifizierung der Ziel-DNA **19** erfolgte UV-spektroskopisch, die des Hydrolyseproduktes UV-spektroskopisch und durch MALDI-TOF MS. Die quantitative Auswertung der Spaltreaktion erfolgte UV-spektroskopisch, indem zunächst dem Molekülionpeak der Edukt-DNA **19** der Mischung VIIc nach 0 min (a) die eingesetzte Anfangskonzentration von 10 μ M zugeordnet wurde. Dann wurde die Spaltausbeute der Mischung VIIc nach 164 Stunden bestimmt (b), indem einerseits die Abnahme der Edukt-DNA **19** und andererseits die Zunahme der Spaltfragmente E/D herangezogen wurde. Dies erfolgte unter Berücksichtigung der Anzahl der vorhandenen Nucleobasen und der Extinktionskoeffizienten.

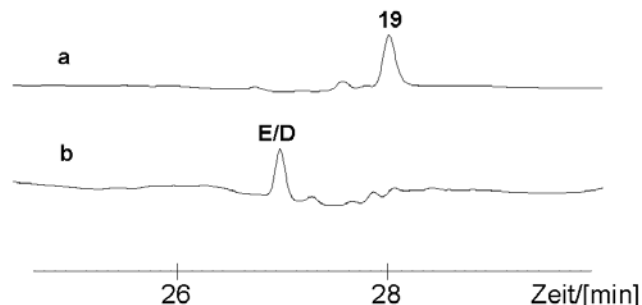


Abb. 19: HPLC-Elutionsprofil der Mischung VIIc nach 0 min (a) und 164 h (b)

VIIc: $[19] = 10 \mu\text{M}$; $[15] = 10 \mu\text{M}$; $[\text{MOPS pH7}] = 5 \text{ mM}$; $[\text{ZrCl}_4] = 100 \mu\text{M}$.

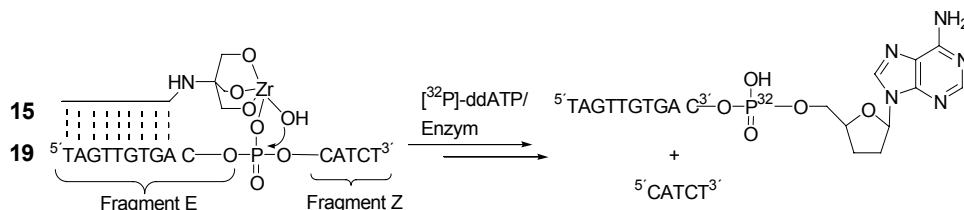
Bei der Probe, die der Mischung VIIc sofort entnommen wurde, ist im HPLC-Elutionsprofil der Peak der DNA **19** bei $R_t = 28,1$ min erkennbar (Abb. 19a). Nach 164 Stunden ist dieser fast vollständig verschwunden, wohingegen ein dominanter Peak bei $R_t = 27,1$ min beobachtet wird (Abb. 19b). Dieser Peak konnte durch MALDI-TOF Analyse einer Mischung bestehend aus den Fragmenten D und E zugeordnet werden. Die Konzentrationsabnahme von **19** beträgt nach 164 Stunden 91%. Dieses Ergebnis stimmt mit dem durch MALDI-TOF Analyse abgeschätzten von $76 \pm 19\%$ überein.

Wie auch die MALDI-TOF MS Untersuchungen zeigten, konnte durch HPLC-Analyse lediglich das DNA-Bruchstück identifiziert werden, das durch die PNA als Doppelhelix während der Spaltreaktion geschützt wurde. Dies verstärkt die Annahme, dass das einzelsträngige DNA-Fragment durch überschüssiges, "freies" Zr(IV) in lineare Einzelstücke zerlegt wurde.

5.3.7 Modifizierung der Spaltfragmente mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ddATP

Durch eine Kombination aus MALDI-TOF MS und HPLC-Analytik wurde das Zr(IV)-TRIS-PNA-Konjugat (**15**) als selektivste Spezies zur Spaltung komplementärer DNAs identifiziert. Die dabei beobachteten DNA-Fragmente waren dephosphoryliert. Für potentielle Anwendungen in der Biotechnologie (z. B. enzymatische Religation) müssen die Spaltfragmente durch Enzyme weiter umgesetzt werden können.

Um dies festzustellen, wurden Markierungsexperimente mit dem Enzym Terminale Transferase und 32 Phosphat-markiertem Didesoxy-ATP ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ddATP) von dem dafür gewonnenen Kooperationspartner BASF AG durchgeführt.⁵¹ Bei dieser Markierungsmethode werden die in den Proben vorhandenen DNAs mit nur einem Nucleotid pro 3'-Ende markiert (Schema 11). Nach anschließender Trennung durch Gelelektrophorese können die markierten DNA-Stränge durch Fluorimetrie sichtbar gemacht werden.



Schema 11: 3'-terminale Markierung des Fragments E in VIIc 164 Stunden nach Reaktionsbeginn. Fragment Z wird nicht markiert (Abb. 20)

Die Markierung wurde für Mischung VIIc, die Spaltreaktion der DNA **19** mit dem Zr(IV)-TRIS-PNA-Konjugat (**15**), nach 120 Stunden (Abb. 20: Spur 5) sowie 164 Stunden (Abb. 20: Spur 6) Reaktionszeit durchgeführt. Sie erfolgte direkt in der Reaktionslösung der Spaltexperimente. Um die dabei markierten DNA-Stränge identifizieren zu können, wurden analoge Markierungsexperimente für Lösungen, die das Fragment E (Abb. 20: Spur 1), das Fragment Z (Abb. 20: Spur 2), die TRIS-PNA (**15**) (Abb. 20: Spur 3), sowie eine Mischung aus Ziel-DNA **19**, Fragment E, Fragment Z und TRIS-PNA (**15**) (Abb. 20: Spur 4) enthielten, durchgeführt. Fragment E (Abb. 20: Spur 1, 4) und die Ziel-DNA **19** (Abb. 20: Spur 4) konnten erfolgreich markiert werden. Die TRIS-PNA (**15**) wurde vom Enzym nicht erkannt (Spur 3). Auch das Fragment Z konnte, wahrscheinlich wegen seiner geringen Länge von nur 5 Nucleobasen, nicht markiert werden (Abb. 20: Spur 2).

Durch Vergleich mit den Kontrollexperimenten konnte in Mischung VIIc (nach 120 h) Fragment E als dominierendes Spaltprodukt identifiziert werden. Die Ziel-DNA **19** war hingegen nur noch schwach zu erkennen (Abb. 20: Spur 5). Nach weiteren 44 Stunden Reaktionszeit war die Ziel-DNA **19** dann ganz verschwunden. Es konnte nur noch das markierte Fragment E beobachtet werden (Abb. 20: Spur 6).

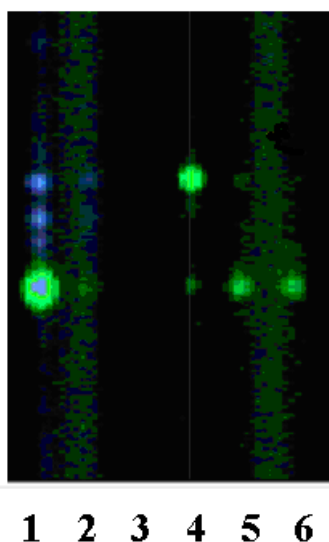


Abb. 20: Gelelektrophorese nach der 3'-terminalen Markierung mit [α - 32 P] ddATP

*Spur 1: Fragment E ($m/z = 3058$); Spur 2: Fragment Z ($m/z = 1438$); Spur 3: TRIS-PNA ($m/z = 3026$); Spur 4: Mischung von Fragment E ($m/z = 3058$), Fragment Z ($m/z = 1438$), DNA **19** ($m/z = 4558$), $ZrCl_4$, TRIS-PNA **15** ($m/z = 3026$); Spur 5: Mischung VIIc 120 h nach Reaktionsbeginn; Spur 6: Mischung VIIc 164 h nach Reaktionsbeginn.*

Mit den Markierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Bruchstücke von DNA-Spaltreaktionen mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugaten von Enzymen erkannt und umgesetzt werden können. Dabei ist die enzymkatalysierte Markierung in den Reaktionslösungen ohne spezielle Probenvorbereitungen möglich. Die DNA Bruchstücke müssen jedoch eine ausreichende Länge besitzen.

6 Metallkatalysierte Reaktionen am DNA-Templat

6.1 Einführung in die DNA-templatgesteuerten Spaltreaktionen

In diesen Experimenten sollte die DNA-templatgesteuerte Cu(II)-katalysierte Freisetzung von Carbonsäuren untersucht werden. Als Substrat-PNAs wurden die estermodifizierte PNAs **16**, **17** eingesetzt. Bei ihnen ist die für die Esterspaltung notwendige Donorgruppe für Metallionen in den 8-Hydroxychinol-2-yl Linker integriert. Ein solches Konzept erlaubt prinzipiell die Abspaltung jeder beliebigen Carbonsäure.

Als Katalysator-PNA sollte die aus früheren Arbeiten unseres Arbeitskreises bekannte PNA **31** eingesetzt werden.⁴³ In PNA **31** ist eine Cu(II)-chelatisierende Pyridylpyrazol-Einheit über die α -Aminofunktion eines Lysins mit dem C'-Terminus der PNA verknüpft.

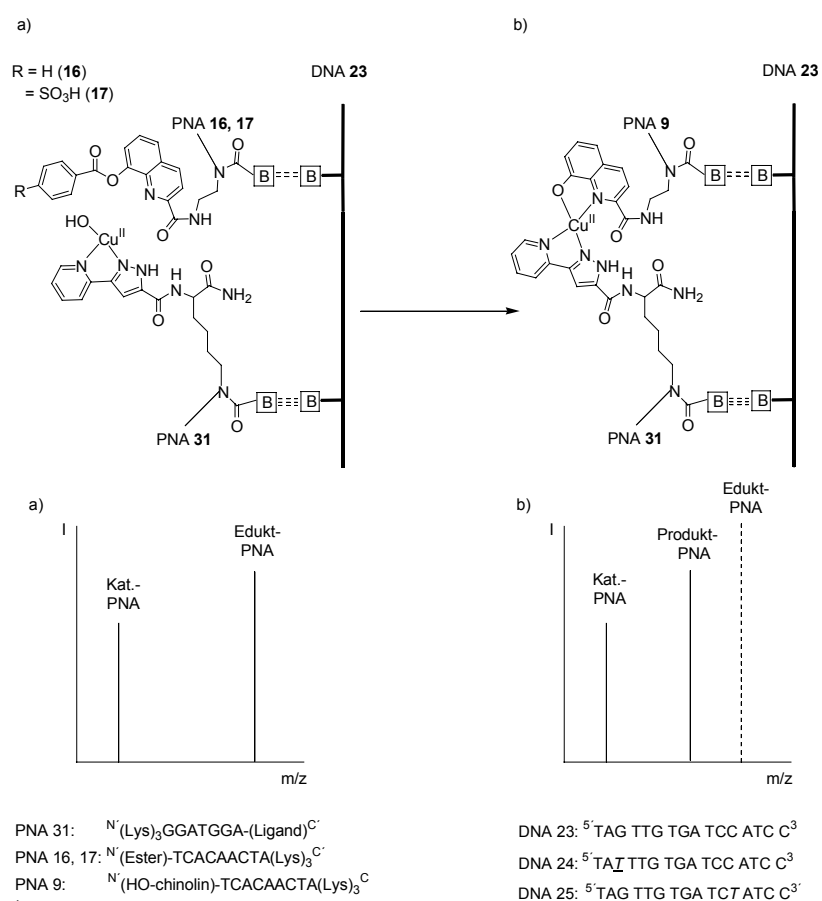


Abb. 21: Geplante Cu(II)-vermittelte Esterhydrolyse an einem DNA-Templat zu Beginn (a) und nach Ablauf der Spaltreaktion (b) (oben) und das erwartete MALDI-TOF MS Spektrum (unten)

(Fehlbasen in den DNAs **24**, **25** sind kursiv und unterstrichen)

In Anwesenheit komplementärer DNA sollten Metallkomplex und Carbonsäureester in unmittelbare Nähe zueinander gebracht werden, so dass die Esterhydrolyse wesentlich schneller ablaufen kann als in Abwesenheit des Templats (Abb. 21 oben).

Die Spaltreaktionen sollten durch quantitative MALDI-TOF MS untersucht werden, indem die Abnahme des Peaks der Edukt-PNA (**16**: $[M+H^+] = 3065,4$; **17**: $[M+H^+] = 3143,2$) bei gleichzeitiger Zunahme des Peaks der Produkt-PNA (**9**: $[M+H^+] = 2961,6$) verfolgt wurde (Abb. 21 unten). Da im MALDI-TOF MS Spektrum der eingesetzten Edukt-PNA **17** schon zu $3 \pm 5 \%$ als Synthese-Nebenprodukt die PNA **9** beobachtet wurde, wurden die Ausbeuteberechnungen von **9** um diesen Wert korrigiert.

Neben den Untersuchungen durch MALDI-TOF MS sollte die Spaltausbeute anhand eines ausgewählten Beispiels auch durch HPLC quantifiziert werden.

Des Weiteren sollte der Einfluss von Fehlbasen auf die Spaltselektivität sowie der katalytische Umsatz am DNA-Templat näher untersucht werden.

6.1.1 Cu(II)-induzierte Hydrolyse der Ester-PNA **16** am DNA-Templat

Die ersten Versuche zur Esterspaltung wurden mit den PNAs **16** ($1 \mu\text{M}$), **31** ($1 \mu\text{M}$) und Cu(II) ($1 \mu\text{M}$) in An- bzw. Abwesenheit komplementärer DNA **23** ($1 \mu\text{M}$) bei 40°C durchgeführt. Des Weiteren enthielten die Lösungen NaCl (50 mM) und MOPS-Puffer (10 mM). Um eine Adsorption von **16** an den Oberflächen der Reaktionsgefäße zu vermeiden, musste den Reaktionslösungen 20% Acetonitril hinzugefügt werden.

In Anwesenheit komplementärer DNA wurde nach 20 min eine Esterspaltung von 33,3 % beobachtet und der vollständige Umsatz nach 90 Minuten erreicht. Im Gegensatz dazu konnte im Kontrollexperiment ohne DNA auch nach 24 Stunden Reaktionszeit noch keine Spaltung von **16** beobachtet werden.

Die Durchführung dieser Experimente erwies sich aufgrund der schlechten Löslichkeit der PNA **16** als schwierig. Deshalb wurde in den weiteren Untersuchungen die PNA **17** als Substrat-PNA eingesetzt. Aufgrund der zusätzlichen Sulfonsäuregruppe war die PNA **17** uneingeschränkt wasserlöslich, und ihre Handhabung erwies sich als unproblematisch.

6.1.2 Cu(II)-induzierte Hydrolyse der Ester-PNA 17 am DNA-Templat bei 40°C

Um in den Untersuchungen zur Cu(II)-induzierten Esterhydrolyse auf den Zusatz von Acetonitril verzichten zu können, wurde anstelle der PNA 16 die wasserlösliche PNA 17 (1 μM) als estermodifizierte Substrat-PNA eingesetzt. Des Weiteren enthielten die Reaktionslösungen PNA 31 (1 μM), Cu(II) (1 μM), NaCl (50 mM) und MOPS-Puffer (10 mM).

Experiment.-Nr. Komponenten	1	2	3	4
PNA 31 [μM]	1	1	1	1
PNA 17 [μM]	1	1	1	1
Cu(II) [μM]	1	1	1	1
DNA 23 [μM]	1	-	-	-
DNA 24 [μM]	-	1	-	-
DNA 25 [μM]	-	-	1	-
Spaltung	57 % nach 20 Minuten	14 % nach 20 Minuten	29 % nach 20 Minuten	3,5 % nach 2 Stunden

Tab. 8: Spaltung der PNA 17 mit der Cu(II)-PNA 31 in Anwesenheit komplementärer (23), Fehlbasen- (24, 25) oder keiner DNA bei $T = 40^\circ$, [MOPS-Puffer pH 7] = 10mM; [NaCl] = 50mM.

Die Spaltreaktionen wurden in Anwesenheit komplementärer DNA 23 (1 μM) und mit den DNAs 24 und 25 (je 1 μM) durchgeführt. Mit den beiden letzteren sollte die Spaltselektivität näher untersucht werden. DNA 24 weist eine Fehlbase (T3) gegenüber der PNA 17 und DNA 25 (T12) gegenüber PNA 31 auf. Die Reaktionstemperatur betrug 40°C und die Spaltreaktionen wurden durch quantitative MALDI-TOF MS untersucht. In Anwesenheit

komplementärer DNA **23** wurde nach 20 Minuten eine Esterhydrolyse von 57 % und nach 30 min von 73 % erreicht (Abb. 22, 23), wohingegen die Spaltreaktion ohne Templat deutlich langsamer verlief (Abb. 22, 24). Nach 2 Stunden wurde lediglich ein Umsatz von 3,5 % beobachtet. Bezüglich der Anfangsspaltgeschwindigkeit verlief die DNA-templatgesteuerte Reaktion 106-fach schneller (Abb. 22).

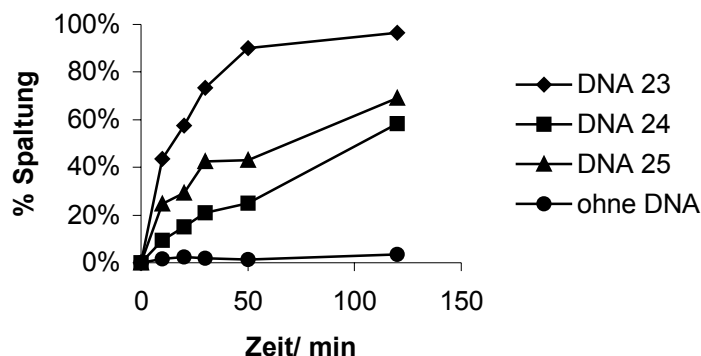


Abb. 22: Spaltung der PNA **17** mit der Cu(II)-PNA **31** in Anwesenheit komplementärer (**23**), Fehlbasen- (**24**, **25**) oder keiner DNA bei $T = 40^\circ\text{C}$

[MOPS-Puffer pH 7] = 10mM; [NaCl] = 50mM; [PNA **17**] = 1 μM ; [PNA **31**] = 1 μM ; [DNA **23-25**] = 1 μM . Alle Werte sind Nullpunkt korrigiert; $\Delta\% = \pm 15\%^{43}$.

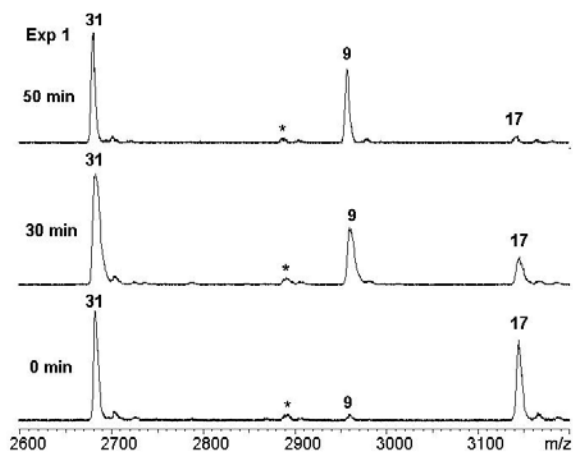


Abb. 23: MALDI-TOF MS der Spaltung von PNA **17** mit Cu(II)-PNA **31** und DNA **23** bei $T = 40^\circ\text{C}$ nach 0, 30 und 50 min (Exp. 1)

[MOPS-Puffer pH 7] = 10mM; [NaCl] = 50mM; [PNA **17**], [PNA **31**], [DNA **23**] und [Cu(II)] je 1 μM .

31: $[M + H^+] = 2682,2$; **17:** $[M + H^+] = 3143,2$;
9: $[M + H^+] = 2961,6$; * = Verunreinigung.

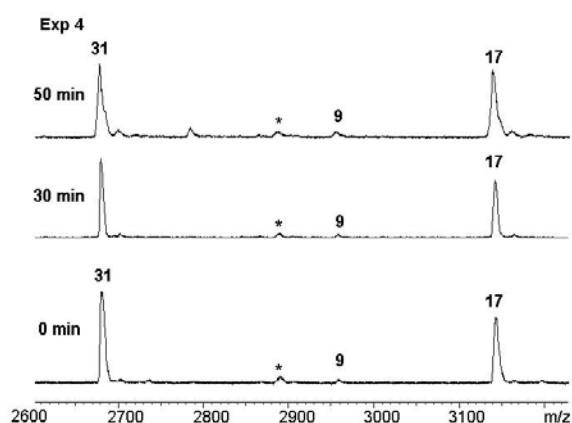


Abb. 24: MALDI-TOF MS der Spaltung von PNA **17** mit Cu(II)-PNA **31** ohne DNA **23** bei $T = 40^\circ\text{C}$ nach 0, 30 und 50 min (Exp. 4)

[MOPS-Puffer pH 7] = 10mM; [NaCl] = 50mM; [PNA **17**], [PNA **31**] und [Cu(II)] je 1 μM .

31: $[M + H^+] = 2682,2$; **17:** $[M + H^+] = 3143,2$;
9: $[M + H^+] = 2961,6$; * = Verunreinigung.

Eine Fehlbase in der PNA **17**/DNA und PNA **31**/DNA-Duplex verringerte die Anfangsspaltgeschwindigkeiten um den Faktor 4 bzw. 1,9 (Tab. 8; Spaltung nach 20 min). Dies kann als Folge der verringerten Stabilität der Fehlbasen-Duplex interpretiert werden: Die T_m -Werte betragen $51,2^\circ\text{C}$ für PNA **17**/ DNA **23** gegenüber 29°C für PNA **17**/ DNA **24** (s. Kap. 4. 3), und $56,5^\circ\text{C}$ für PNA **31**/ DNA **23** gegenüber $38,1^\circ\text{C}$ für PNA **31**/ DNA **25**⁴³. Die beobachtete Fehlbasen-Diskriminierung ist jedoch gering.

Die Spaltreaktionen der estermodifizierte PNA **17** mit der Cu(II)-PNA **31** und komplementärer (**23**) oder keiner DNA wurden neben den MALDI-TOF MS Untersuchungen auch durch HPLC analysiert (Abb. 25, 26).

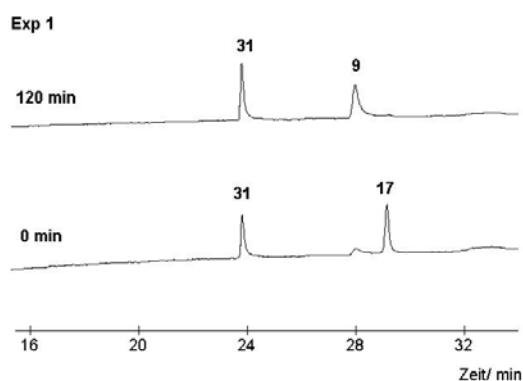


Abb. 25: HPLC-Analyse der Spaltung von PNA **17** mit Cu(II)-PNA **31** und DNA **23** bei $T = 40^\circ\text{C}$ nach 0 und 120 min (Exp 1)

[MOPS-Puffer pH 7] = 10mM; [NaCl] = 50mM;
[PNA **17**], [PNA **31**], [DNA **23**], [Cu(II)] je 1 μM . **31**:
 $R_t = 23,8$ min; **17**: $R_t = 29,2$ min; **9**: $R_t = 28,1$ min.

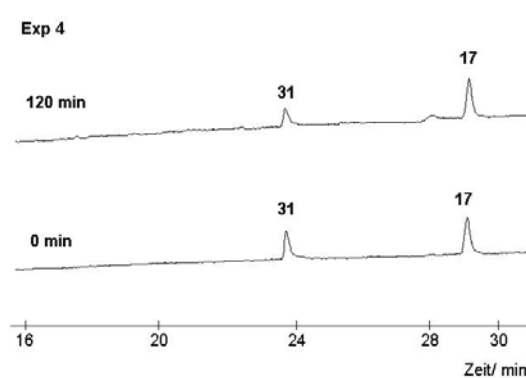


Abb. 26: HPLC-Analyse der Spaltung von PNA **17** mit Cu(II)-PNA **31** ohne DNA bei $T = 40^\circ\text{C}$ nach 0 und 120 min (Exp 4)

[MOPS-Puffer pH 7] = 10mM; [NaCl] = 50mM;
[PNA **17**], [PNA **31**], [Cu(II)] je 1 μM . **31**: $R_t = 23,8$
min; **17**: $R_t = 29,2$ min; **9**: $R_t = 28,1$ min.

Die Trennung der einzelnen PNA-Komponenten erfolgte an einer reversed-phase C-4 Säule bei $T = 49^\circ\text{C}$ unter Verwendung eines Gradienten des Laufmittels A (Wasser, 0,1% TFA) und B (CH_3CN , 0,1% TFA). Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/ min und die Identifizierung und Quantifizierung erfolgte photometrisch bei $\lambda = 260$ nm.

Bei den Proben, die den Reaktionslösungen sofort entnommen wurden, konnten die Katalysator-PNA **31** bei $R_t = 23,8$ min sowie die estermodifizierte PNA **17** bei $R_t = 29,2$ min

beobachtet werden, wobei in der Mischung mit DNA-Templat schon zu 8 % das Hydrolyseprodukt **9** bei $R_t = 28,1$ min identifiziert werden konnte (Abb. 25 unten). Da **9** in der Mischung ohne Templat nicht beobachtet wurde (26 unten), macht dies deutlich, wie schnell die templatgesteuerte Reaktion in den ersten zwei bis drei Minuten bis zur HPLC-Injektion verläuft. Nach 120 Minuten Reaktionszeit wurde in der Probe der templatgesteuerten Reaktion fast ausschließlich das Spaltprodukt PNA **9** identifiziert, wohingegen die Edukt-PNA **17** nahezu vollständig verschwunden war. Die Spaltausbeute betrug 98 % (Abb. 25 oben). Im Gegensatz dazu ist deutlich zu erkennen, dass in dem Experiment ohne DNA-Templat nach 120 Minuten Reaktionszeit nur eine Umsetzung von 5 % zu **9** erfolgte (Abb. 26 oben).

Die Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen bestätigen die der MALDI-TOF MS Analyse (Abb. 22 mit $\Delta\% = \pm 15\%^{43}$), wo die templatgesteuerte Reaktion nach 120 Minuten zu 96 %, hingegen die Reaktion ohne DNA lediglich zu 3, 5 % verlief (Abb. 22).

Außerdem wurde noch untersucht, ob die Spaltreaktionen auch durch Fluorimetrie verfolgt werden könnten, jedoch fluoreszierte die Hydroxychinolin-PNA **9** weder im wässrigen Medium noch im System Wasser/CH₃CN (20% v/v).

6.1.3 Cu(II)-induzierte Hydrolyse der Ester-PNA 17 am DNA-Templat bei 45°C

Um den Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Geschwindigkeit der DNA-templatgesteuerten Spaltreaktion zu untersuchen, wurden die Spaltexperimente auch bei höherer Temperatur, $T = 45^\circ\text{C}$, durchgeführt. Es wurde die komplementäre DNA **23** eingesetzt, ein Kontrollexperiment ohne DNA wurde durchgeführt.

Exp.-Nr.	5	6
Komp.		
PNA 31 [μM]	1	1
PNA 17 [μM]	1	1
Cu(II) [μM]	1	1
DNA 23 [μM]	1	-
Spaltung	79 % nach 20 Minuten	2 % nach 60 Minuten

Tab. 9: Spaltung von PNA **17** mit Cu(II)-PNA **31** und komplementärer (**23**) oder keiner DNA bei $T = 45^\circ\text{C}$
[MOPS-Puffer pH 7] = 10mM; [NaCl] = 50mM.

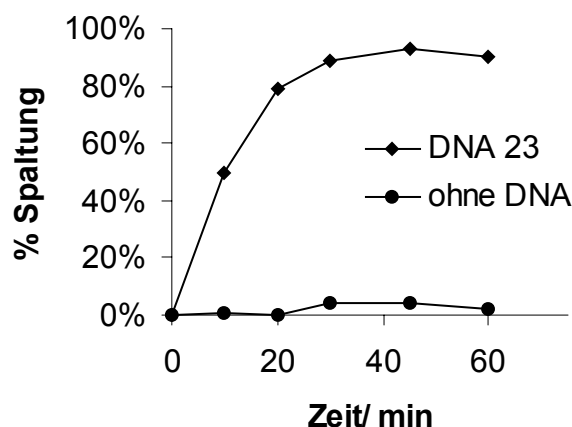


Abb. 27: Spaltung der PNA **17** mit der Cu(II)-PNA **31** und komplementärer (**23**) oder keiner DNA bei $T = 45^\circ\text{C}$

[MOPS-Puffer pH 7] = 10mM; [NaCl] = 50mM;
[PNA **17**], [PNA **31**], [DNA **23-25**] je 1 μM . Alle Werte sind Nullpunkt korrigiert; $\Delta\% = \pm 15\%^{43}$.

Nach 20 Minuten betrug der Hydrolyseumsatz bei einer Reaktionstemperatur von 45°C und in Anwesenheit komplementärer DNA 79 %. Dies bedeutet eine 1,3-fache Beschleunigung gegenüber dem selbem Experiment bei $T = 40^\circ\text{C}$. Im Experiment ohne DNA wurde hingegen lediglich eine Spaltung von 2 % nach einer Stunde beobachtet. Dieser Wert ist im Rahmen der Fehlergrenze vergleichbar mit der entsprechenden Spaltung bei 40°C (Exp. 4).

6.1.4 Cu(II)-katalysierte Hydrolyse der Ester-PNA 17 am DNA-Templat

Nachdem gezeigt wurde, dass bei stöchiometrischer Verwendung aller beteiligten Reaktionspartner die templatgesteuerte Esterspaltung wesentlich schneller abläuft (Kap. 6.1.2, 6.1.3), wurde in diesen Experimenten die katalytische Umsetzung am DNA-Templat untersucht. Dafür wurde die estermodifizierte PNA 17 (10 μM) in einem 100-fachem Überschuss eingesetzt. Die Konzentrationen der weiteren Komponenten betragen: PNA 31 (0,1 μM), Cu(II) (0,1 μM), NaCl (50 mM) und MOPS-Puffer (10 mM). Die Reaktionstemperatur betrug $T = 40^\circ\text{C}$.

Die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion war in Anwesenheit komplementärer DNA 23 (0,1 μM) immer noch 2,3-mal schneller als die der Hintergrundreaktion ohne DNA. Nach der Bildung von 28 Äquivalenten des Produktes 9 bezogen auf die DNA 23 war nach 10 Stunden jedoch kein weiterer katalytischer Umsatz mehr zu beobachten (Abb. 28). Die Inhibierung der Katalyse kann einerseits auf die etwas höhere Affinität des Produktes 9 zum DNA-Templat zurückgeführt werden. Die Schmelzpunkte T_m -Werte betragen $51,2^\circ\text{C}$ für Edukt-PNA 17/ DNA 23 gegenüber $54,2^\circ\text{C}$ für Produkt-PNA 9/ DNA 23 (s. Kap. 4. 3).

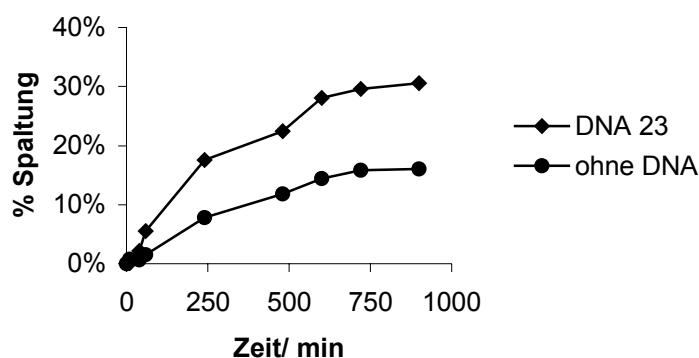


Abb. 28: Katalytische Spaltung der PNA 17 mit der Cu(II)-PNA 31 in Anwesenheit komplementärer (23) oder keiner DNA bei $T = 40^\circ\text{C}$

$[\text{MOPS-Puffer pH } 7] = 10\text{mM}$; $[\text{NaCl}] = 50\text{mM}$; $[\text{PNA } 17] = 10 \mu\text{M}$; $[\text{PNA } 31] = 0,1 \mu\text{M}$; $[\text{DNA } 23] = 0,1 \mu\text{M}$; $[\text{Cu(II)}] = 0,1 \mu\text{M}$. Alle Werte sind Nullpunkt korrigiert; $\Delta\% = \pm 15\%^{43}$.

Außerdem ist die Cu(II)-Bindungskonstante des Hydroxychinolinkomplexes $K = 10^{12,1} \text{ M}^{-1}$ ^{50b} wesentlich höher als die von Pyridylpyrazol $K = 4(\pm 2) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ⁴³, der Modifikation der Katalysator-PNA 31. Deshalb ist es bemerkenswert, dass überhaupt ein katalytischer Umsatz beobachtet werden konnte, und dass das Hydrolyseprodukt 9 die Spaltreaktion nicht viel stärker inhibierte durch Komplexbildung des Cu(II) durch Hydroxychinolin.

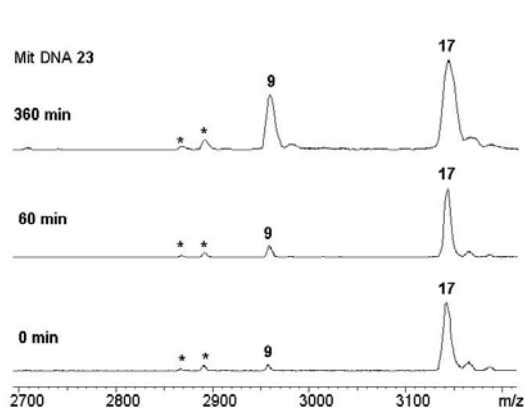


Abb. 29: MALDI-TOF MS des Spaltexperimentes der PNA 17 (100 Äq.) mit der Cu(II)-PNA 31 und DNA 23 bei $T = 40^\circ\text{C}$ (nach 0, 60 und 360 min)

[MOPS-Puffer pH 7] = 10mM; [NaCl] = 50mM; [PNA 17] = 10 μM ; [PNA 31], [DNA 23] und [Cu(II)] je 0, 1 μM . 17: $[M + H^+] = 3143,2$; 9 $[M + H^+] = 2961,6$; * = Verunreinigung.

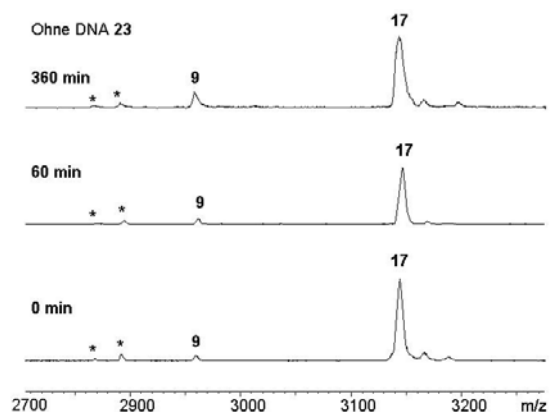


Abb. 30: MALDI-TOF MS des Spaltexperimentes der PNA 17 (100 Äq.) mit der Cu(II)-PNA 31 ohne DNA bei $T = 40^\circ\text{C}$ (nach 0, 60 und 360 min)

[MOPS-Puffer pH 7] = 10mM; [NaCl] = 50mM; [PNA 17] = 10 μM ; [PNA 31] und [Cu(II)] je 0, 1 μM . 17: $[M + H^+] = 3143,2$; 9 $[M + H^+] = 2961,6$; * = Verunreinigung.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Metallkomplex-Konjugate von Peptidnucleinsäuren (PNAs) synthetisiert und in zwei Projekten angewendet: als “künstliche Restriktionsenzyme“ für die sequenzselektive Spaltung von Einzelstrang-DNA sowie als Komponenten einer DNA-templatvermittelten Metallkatalyse. PNAs sind Oligonucleotid-Analoga, in denen das Zuckerphosphat-Rückgrat durch ein neutrales Polyamid-Rückgrat ersetzt ist. PNAs bilden stabilere Duplices mit komplementären Nucleinsäuren als DNA, so dass relativ kurze, präparativ gut zugängliche Sequenzen (5-10mer) verwendet werden können. Für das erste Projekt wurden Konjugate von PNAs mit Chelatliganden für die Komplexierung von Zr(IV) dargestellt. Zr(IV) zählt zu den wenigen Metallionen, die die Phosphodiesterbindung in Einzelstrang-DNA unter milden Bedingungen hydrolytisch spalten. Dafür wurden einerseits vorher entsprechend geschützte Iminodiessigsäure-Liganden oder die kommerziell erhältliche 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure direkt an den N'-Terminus der PNA gekoppelt (**7-9**). Andererseits erfolgte die Ligandverknüpfung auch über eine als Linker fungierende 4-Chloromethylbenzyl-Einheit (**12-15**). Diese Synthesestrategie erlaubte auch die Verknüpfung mit den ungeschützten Aminoalkohol-Liganden Glucamin, 1,3,5-Triamino-1,3,5-trideoxy-cis-inositol (TACI) und Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (**13-15**). Die Aktivität der dargestellten Zr(IV)-Komplex-PNA-Konjugate (Zr(IV)/**6-9**, **12-15**) für die sequenzspezifische Spaltung linearer Einzelstrang-DNA wurde anschließend durch eine Kombination aus MALDI-TOF MS und HPLC untersucht.

Als aktivste Spezies, die komplementäre Ziel-DNAs unterschiedlicher Länge und Sequenz am selektivsten spaltet, wurde der Zr(IV)-Komplex des TRIS-PNA Konjugats **15** identifiziert. Die Spaltung der Ziel-DNA erfolgte sequenzselektiv in unmittelbarer Nachbarschaft des Metallkomplexes.

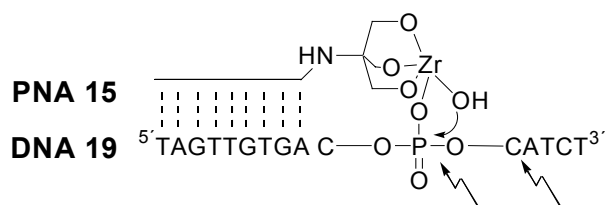


Abb. 31: *Hydrolytische DNA-Spaltung (19) mit dem Zr(IV)-TRIS-PNA-Konjugat (Zr(IV)-15)
(Metallkoordination an 15 und Mechanismus sind spekulativ)*

Als Hauptprodukte der Spaltung von DNA **19** entstehen zwei länger-kettige Fragmente, deren Ausbeute durch MALDI-TOF MS auf $76 \pm 19\%$ (nach 164 Stunden) abgeschätzt wurde und

anschließend durch HPLC mit 91% (nach 164 Stunden) bestimmt wurde. In Markierungsexperimenten mit dem Enzym Terminale Transferase und 32 Phosphat-markiertem Dideoxy-ATP ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ddATP) konnte gezeigt werden, dass die DNA-Spaltprodukte des Zr(IV)-TRIS-Konjugats von Enzymen erkannt und modifiziert werden können. Diese Experimente wurden von der BASF AG im Rahmen einer Kooperation durchgeführt.

Die Untersuchungen zur gezielten DNA-Spaltung sind ein wichtiger Schritt zur Entwicklung künstlicher Restriktionsenzyme auf PNA-Basis. Ein Vorteil der Verwendung von PNA gegenüber DNA ist die Resistenz der PNA-Metallkomplex-Konjugate gegenüber einer "Selbstverdauung" durch intramolekulare Spaltung. Einschränkend wirken sich jedoch die langsame Reaktionsgeschwindigkeit und eine signifikante nicht-spezifische Hintergrund-Spaltung im einzelsträngigen DNA-Bereich durch das benötigte, überschüssige Zr(IV) aus. In Hinblick auf potentielle Anwendungen der Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugate werden Liganden benötigt, die stabilere Komplexe mit Zr(IV) bilden, ohne jedoch ihre Phosphodiesteraseaktivität zu verlieren.

Im zweiten Projekt wurden die PNA-Konjugate eines Cu(II)-Komplexes für DNA-templatvermittelte Katalysen eingesetzt. Die erste Metallkomplex-Katalyse an DNA-Templaten wurde erst vor kurzem von der Arbeitsgruppe Krämer beschrieben und eröffnet die Möglichkeit einer chemischen Signalverstärkung, die unter anderem für die nicht-enzymatische Detektion von Nucleinsäure-Sequenzen relevant ist. Ein Nachteil der beschriebenen, Cu(II)-katalysierten Esterhydrolyse war die Integration der für die Reaktion essentiellen "Ankergruppe" (Pyridyl-Donor) in die abzusplattende Carbonsäure-Komponente. Dies schränkt Strukturvariationen der Carbonsäure-Komponente, die in Hinblick auf Anwendungen wünschenswert sind, ein. Hier wurden deshalb die PNA-Ester-Konjugate **16** und **17** synthetisiert, in denen die Ankergruppe (Chinolin-N) in die Alkohol-PNA-Komponente integriert ist, so dass im Grunde mit beliebigen Carbonsäuren kombiniert werden kann.

In den Benzoyl-PNAs **16**, **17** ist die abzusplattende Carbonsäure über einen durch Cu(II)-Ionen hydrolysierbaren 8-Hydroxychinol-2-yl-Linker mit der PNA verbunden. Die Spaltreaktionen wurden mit der Cu(II)-Pyridylpyrazol-modifizierten PNA (Cu(II)-**31**) durchgeführt und durch eine Kombination aus MALDI-TOF MS- und HPLC-Analyse untersucht. Es konnte gezeigt

werden, dass die Reaktion durch das DNA-Templat 106-fach beschleunigt wird. Des Weiteren wurden nach 10 Stunden 12 turnover bei einem 100-fachen Substratüberschuss erzielt.

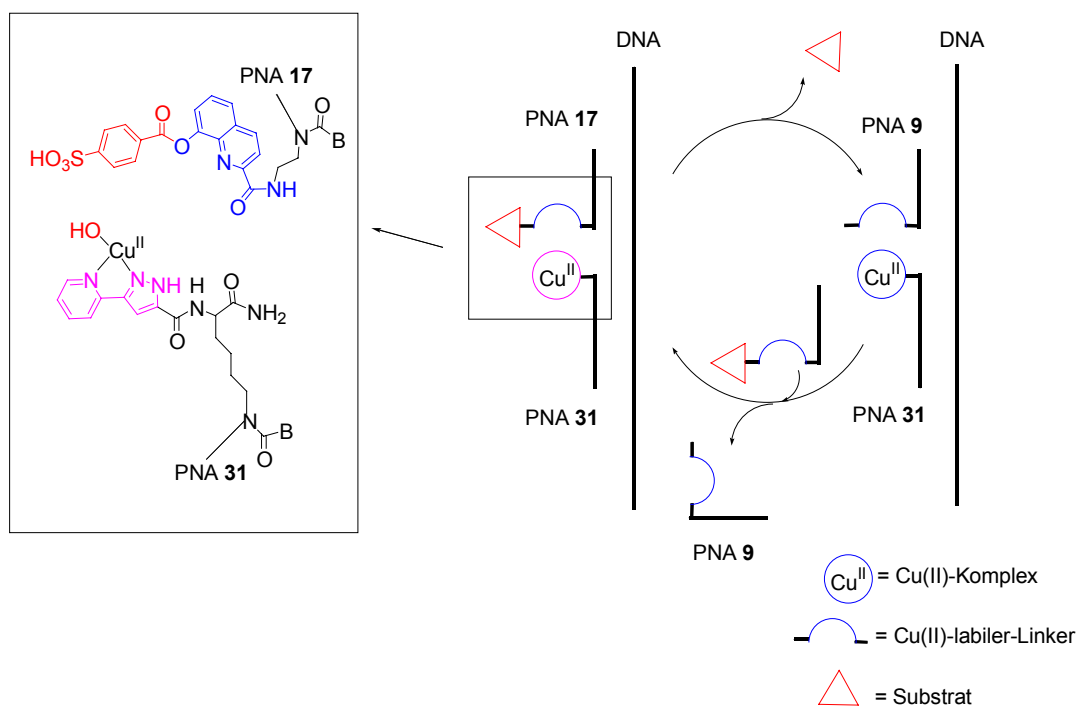


Abb. 32: *Katalysezyklus der DNA-templatgesteuerten Esterhydrolyse der Substrat-PNA 17 mit der Cu(II)-Komplex-PNA 31*

8 Experimenteller Teil

8.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

Die für die Synthesen und die Aktivitätsuntersuchungen verwendeten Chemikalien wurden von Acros (Geel, Belgien), Aldrich /Sigma /Fluka (Deisenhofen, Deutschland), Advanced Chemtech (Louisville, KY) und Novabiochem (Weidenmattweg, Schweiz) bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Die Reagenzien für die PNA-Synthesen wurden von PerSeptiv Biosystems (Hamburg, Deutschland) bezogen und die PNA-Biokonjugate mit einem Expedite™ 8909 System der selben Firma synthetisiert. Der Ligand TRIS wurde freundlicherweise von Prof. Hegetschweiler von der Universität Saarbrücken zur Verfügung gestellt. Die verwendeten DNA-Oligonucleotide wurden von Metabion (Plannegg-Martinsried, Deutschland) bezogen und waren HPLC gereinigt. Für alle Versuche wurde Wasser mit HPLC-Reinheit verwendet. Mit Ausnahme der Cu(II)-Salz- und Puffer-Lösungen wurden alle anderen Lösungen vor den Experimenten frisch angesetzt.

Die MALDI-TOF MS Untersuchungen wurden im Zeitraum vom 15.01.01-01.11.01 am Organisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg mit einem Bruker BIFLEX Spektrometer und anschließend am Anorganisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg an einem Bruker BIFLEX III Spektrometer durchgeführt, wobei für Messungen der DNAs der negative und für Messungen der PNA-Konjugate der positive Messmodus verwendet wurde. Wenn nicht anders erwähnt, wurde für MALDI-TOF MS Analysen der DNAs eine Matrix bestehend aus einer gesättigten ethanolischen Lösung von Azathiathymidin ($\text{ATT}_{\text{ges. (EtOH)}}$):Diammoniumcitrat (DAC; 0,1M, in Wasser) = 1:1 benutzt, wohingegen für die PNA-Konjugate eine Lösung von 27 mM Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxycimtsäure) in Acetonitril:Wasser:Methanol = 1:1:1 mit 0,1% TFA verwendet wurde. Die zu untersuchende Probe (1 μl) wurde auf einen MALDI-Träger gegeben und mit der Matrix vermischt. Für die PNA-Proben wurden für Wasser- und Wasser/ CH_3CN -Lösungen ein Probe zu Matrix-Verhältnis von 1:3 verwendet, wohingegen für TFA/m-Cresol-Lösungen (4:1) ein Verhältnis von 1:20 benutzt wurde. Bei den wässrigen DNA-Proben wurde immer eine Probe zu Matrix-Verhältnis von 1:1 verwendet. Die Proben trockneten an der Luft und wurden innerhalb der nächsten drei Stunden untersucht, oder bis zur Messung in einer Argonatmosphäre bei 4°C aufbewahrt. Die Genauigkeit der MALDI-TOF MS Untersuchungen mit externer Kalibrierung betrug $\pm 0,1$ % der Molekülionenneutronenmasse.

Die HPLC-Messungen wurden bei 22°C und 49°C an einem Shimadzu Flüssigkeits-Chromatographen durchgeführt, der mit einem UV-VIS-Detektor und seit dem 1.10.02 auch

mit einem Säulen-Ofen ausgerüstet ist. Als Säule wurde eine "Nucleosil C4" Säule (250 x 4,6 mm) von Machery-Nagel eingesetzt. Für die HPLC-Reinigung der PNA-Biokonjugate wurde eine 500 µl Injektionsschleife verwendet, wohingegen in allen anderen Untersuchungen eine 20 µl Injektionsschleife eingesetzt wurde. Als Lösungsmittelgradient wurde für PNA-Proben CH₃CN (0,1 % TFA, Lösungsmittel B) und Wasser (0,1 % TFA, Lösungsmittel A) und für die DNA-Proben CH₃CN (Lösungsmittel B) und Wasser (Ammoniumacetat 0,1 M, 0,1 % EDTA, pH 7) eingesetzt. Der Reinheitsgrad der für die HPLC-Untersuchungen verwendeten Lösungsmittel betrug > 99,8%.

UV-VIS Experimente wurden auf einem Varian Cary 100 Bio UV-VIS Spektrophotometer durchgeführt, wobei für Absorptionsmessungen (T = 22°C) eine Quarz-Makroküvette (3,5 ml; ø = 1 cm) der Firma Helma und für DNA/PNA-Schmelzpunktbestimmungen (T = 10-70°C; 20-80°C) schwarzwandige Quarz-Semi-Mikroküvetten (V = 0,9 ml; ø = 1 cm) der Firma Varian benutzt wurden.

NMR-Messungen wurden am Anorganisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg mit einem Bruker AVANCE DPX 200 NMR-Spektrometer durchgeführt. Deuterierte Lösungsmittel wurden von Deutero bezogen. Zur Standardisierung der chemischen Verschiebungen wurden die Restwasserstoffsignale der deuterierten Lösungsmittel als interner Standard verwendet.

Um Reaktionslösungen zu zentrifugieren, wurde die Biofuge pico von Heraeus verwendet. Für die Zentrifugation im Vakuum wurde hingegen ein Speed Vac-Konzentrate SPD 111V-System eingesetzt.

Als Reaktionsgefäße für die Spaltexperimente wurden low-retention Reaktionsgefäße (V = 0,6 und 1,7 ml) der Firma Kisker (Steinfurt) benutzt.

Um Lösungen zu mischen, wurde ein Vortex-2 Genie von Scientific Industries verwendet.

Um Reaktionslösungen zu temperieren und zu durchmischen, wurde der Thermomixer comfort für 1,5 ml Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf verwendet.

Um PNA-Lösungen bis zur Trockene einzuengen, wurde ein Gefriertrockner VaCo 5 der Firma Zirbus verwendet.

Die DNA-Markierungsexperimente mit der Terminalen Transferase und ³²Phosphat-markiertem Didesoxy-ATP ([α-³²P] ddATP) wurden in der BASF AG Ludwigshafen durchgeführt.

8.2 Synthese der t-Butyl geschützten Iminodiessigsäure-Derivate **3a** und **3b**

8.2.1 Synthese von Bis-(N-tert-Butyloxycarbonylmethyl)-aminoessigsäureethylester **2a**

Das Glycinethylesterhydrochlorid **1a** (279,2 mg; 2 mmol) wird in DMF (10 ml) und Diisopropylethylamin (2 ml; 12 mmol) gelöst. Anschließend wird Bromessigsäure t-Butylester (3.22 ml; 20 mmol) hinzugefügt und die Lösung für 60 Stunden bei 25°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 50 ml Ethylacetat vereinigt und anschließend mit destilliertem Wasser (3x15 ml), NaHCO₃ (10% v/v) (2x10 ml) und einer gesättigten Kochsalzlösung

(3x5 ml) gewaschen. Anschließend wird die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ gewaschen (4x15 ml) und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet.

Die Reaktionslösung wird im Vakuum bis zur Trockene eingeengt. Anschließend wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel; 2% EtOH/ CH₂Cl₂) und **2a** als gelbes Öl gewonnen.

Ausbeute: 439 mg (1,32 mmol; 66%)

DC (Kieselgel; 2% EtOH/ CH₂Cl₂): R_f = 0,3.

¹H-NMR (CDCl₃; 200MHz): δ 4,14 (q; ³J = 7,18; 2H); 3,58 (s; 2H); 3,50 (s; 4H); 1,42 (s; 18H); 1,23 (t; ³J = 7,18; 3H).

¹³C-NMR (CDCl₃; 50MHz): δ 171,29; 170,40; 81,43; 60,84; 56,13; 55,22; 28,41; 14,49.

MS (CI⁺): m/z 332.5 (M+H)⁺; theor. 332.41.

C,H,N-Analyse: C₁₆H₂₉NO₆, Berechnet: C, 57,99; H, 8,82; N, 4,23. Gefunden: C, 57,85; H, 8,73; N, 4,43.

8.2.2 Synthese von 4-Bis-(N-tert-Butyloxycarbonylmethyl)-aminobuttersäureethylester **2b**

Die Synthese wird mit 4-Aminobuttersäureethylesterhydrochlorid **1b** (328,4 mg; 2 mmol), Diisopropylethylamin (2 ml; 12 mmol) und Bromessigsäure t-Butylester (3.22 ml; 20 mmol) analog zu der in **8.2.1** beschriebenen Synthese von **2a** durchgeführt. Es wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel; 10% Aceton/n-Hexan) und **2b** als farbloses Öl gewonnen.

Ausbeute: 536,7 mg (1,49 mmol; 74 %)

DC (Kieselgel; 10% Aceton/ n-Hexan): $R_f = 0,35$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 200MHz): δ 4,09 (q; $^3J = 7,14$; 2H); 3,42 (s; 4H); 2,73 (t; $^3J = 7,00$; 2H); 2,35 (t; $^3J = 7,37$; 2H); 1,77 (m; $^3J = 7,21$; 2H); 1,43 (s; 18H); 1,22 (t; $^3J = 7,18$; 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 50MHz): δ 173,85; 170,72; 81,30; 60,49; 56,00; 53,57; 32,00; 28,80; 23,40; 14,51.

MS (CI^+): m/z 360,3 ($\text{M}+\text{H}^+$); theor. 360,2.

C, H, N-Analyse: $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{NO}_6$, Berechnet: C, 60,14; H, 9,25; N, 3,90. Gefunden: C, 59,98; H, 9,26; N, 4,20.

8.2.3 Synthese von Bis-(N-*tert*-Butyloxycarbonylmethyl)-aminoessigsäure **3a**

2a (21 mg; 63 μmol) wird in MeOH (4 ml) gelöst. Anschließend wird NaOH (2N; 2ml) hinzugefügt und die Reaktionslösung für 4 Stunden bei 25°C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit der Pyridiniumform von Dowex[®]-Kationenaustauscher neutralisiert, filtriert und im Vakuum eingengt. Es wird in Toluol (2x25 ml) gelöst, im Vakuum bis zur Trockene eingengt und **3a** als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 17,2 mg (57 μmol ; 91%)

DC (Kieselgel; 2% EtOH/ CH_2Cl_2): $R_f = 0$

$^1\text{H-NMR}$ (d^6 -DMSO; 200MHz): δ 3,33 (s; 4H); 3,24 (s; 2H); 1,29 (s; 18H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (d^6 -DMSO; 50MHz): δ 172,99; 170,67; 81,01; 78,8; 55,93; 28,90.

MS (CI^+): m/z 304,3 ($\text{M}+\text{H}^+$); theor. 304,2.

8.2.4 Synthese von 4-Bis-(N-*tert*-Butyloxycarbonylmethyl)-aminobuttersäure **3b**

Die Darstellung von **3b** erfolgt analog zu der von **3a** (Kap.8.2.3). Sie wird ausgehend von **2b** (20 mg; 56 μmol) mit NaOH (2N; 2 ml) in MeOH (4 ml) durchgeführt und **3b** anschließend als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 17,1mg (52 μmol ; 92%)

DC (Kieselgel; 10% Aceton/ n-Hexan): $R_f = 0$

$^1\text{H-NMR}$ (d^6 -DMSO; 200MHz): δ 3,21 (s; 4H); 2,47 (t; $^3J = 7,68$; 2H); 2,10 (t; $^3J = 7,34$; 2H); 1,53 (m, $^3J = 7,08$); 1,39 (s, 18H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (d^6 -DMSO; 50MHz): δ 175,73; 171,30; 80,74; 56,30; 53,63; 39,82; 32,18; 23,64

MS (CI^+): m/z 332,3 ($\text{M}+\text{H}^+$); theor. 332,4.

8.3 Synthese der PNA-Biokonjugate

8.3.1 Synthese der festphasengebundenen PNA 5

Die Synthese der unmodifizierten, festphasengebundenen PNA **5** erfolgt nach dem vom Hersteller empfohlenem Standardprotokoll für 2 μmol PNA-Ansätze.

8.3.2 Synthese der PNAs 7, 8

Die Iminodiacetatderivate **3a** bzw. **3b** (15 μmol), HBTU (5,4 mg; 13,5 μmol) und HOBT (2 mg; 15 μmol) werden in DMF (500 μl) und DIEA (4,2 μl ; 33 μmol) gelöst und umgehend zur unmodifizierten, festphasengebundenen PNA **5** (2,4 mg; 0,3 μmol Beladung mit festphasengebundenem primärem Amin) gegeben. Die Reaktionsmischung wird bei 25°C für 1 Stunde geschüttelt und anschließend die überschüssige Reaktionslösung entfernt. Das festphasengebundene Produkt wird mit DMF, CH_3CN und Aceton (je 2x1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet.

8.3.3 Synthese der PNAs 9, 10 und 11

Die Synthese erfolgt analog zu der in **8.3.2** beschriebenen Darstellung der PNAs **7, 8**. Für die Synthese von **9** wird 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (1,9 mg; 10 μmol), für **10** 2,3-dihydroxybenzoesäure (1,5 mg; 10 μmol) und für **11** 4-Chloromethylbenzoesäure (1,7 mg; 10 μmol) eingesetzt. Des Weiteren wird HBTU (3,6 mg; 9 μmol), HOBT (1,35 mg; 10 μmol), DIEA (2,84 μl ; 22 μmol), DMF (500 μl) und die unmodifizierte, festphasengebundene PNA **5** (0,8 mg; 0,1 μmol Beladung mit festphasengebundenem primärem Amin) verwendet.

8.3.4 Synthese der PNA 12

Di-tert-Butyliminodiacetat (3,6 mg; 15 μmol), NaI (2,2mg; 15 μmol) und die festphasengebundene PNA **11** (2,4 mg; 0,3 μmol Beladung mit festphasengebundenem primärem Amin) werden in DMSO (500 μl) suspendiert. Die Reaktionsmischung wird für 12 Stunden bei 55°C geschüttelt. Die überschüssige Reaktionslösung wird entfernt und das festphasengebundene Produkt mit DMF, CH_3CN und Aceton (je 2x1 ml) gewaschen. Anschließend wird es im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet.

8.3.5 Synthese der PNAs 13-15

Die Synthese ist analog zu der in 8.3.4 beschriebenen Darstellung der PNA 12, nur dass für 13 Glucamin (2,8 mg; 15 μmol), 14 TACI (2,7 mg; 15 μmol) und 15 TRIS (1,8 mg; 15 μmol) anstelle des Di-tert-Butyliminodiacetats eingesetzt wird.

8.3.6 Synthese der 8-(Benzoyloxy)-2-chinoly-PNAs 16 und 17

Benzoessäure (24,4 mg; 189 μmol) bzw. p-Sulfobenzoessäure (40,4 mg; 200 μmol) und HOBT (27 mg; 200 μmol), sowie DIMAP (24,43 mg; 200 μmol) und DIC (25,24 mg; 31,3 μmol) werden in DMF (je 400 μl) suspendiert, vereinigt und umgehend zu der festphasengebundenen PNA 9 (16 mg; 2 μmol Beladung mit festphasengebundenem primärem Amin) gegeben. Die Reaktionsmischung wird bei 25°C für 12 Stunden geschüttelt und dann die überschüssige Reaktionslösung entfernt. Das festphasengebundene Produkt wird mit DMF, CH₃CN und Aceton (je 2x1 ml) gewaschen und anschließend im Vakuum (10⁻² mbar) getrocknet.

8.3.7 Reaktionskontrolle der Festphasensynthesen

Ein bis fünf Körner des Harzes mit der festphasengebundenen PNA (5-17) werden mit einer Lösung aus TFA/m-Cresol = 4:1 (30 μl) versetzt. Nach 60 Minuten wird der Lösung eine Probe (1 μl) entnommen, mit der Sinapinsäure-Matrix (30 μl) verdünnt und anschließend durch MALDI-TOF MS untersucht.

8.3.8 Abspaltung der PNA von der Festphase und Aufarbeitung

Dem festphasengebundene PNA-Konjugat (6-9, 12-17; 0,8-2mg; 0,1-2 μmol Beladung mit festphasengebundenem primärem Amin) wird eine Lösung aus TFA/m-Cresol = 4:1 (500 μl) hinzugefügt. Nach 90 Minuten wird die Mischung filtriert, die Festphase mit TFA (200 μl) gewaschen und nochmals filtriert. Das vereinigte Filtrat wird mit Diethylether (1 ml) versetzt. Der gebildete weiße Niederschlag wird abfiltriert, bei RT (20 min) und dann im Vakuum (10⁻² mbar) getrocknet. Anschließend wird das Produkt mit HPLC gereinigt.

8.3.9 HPLC-Reinigung der PNA-Biokonjugate

Zur Reinigung werden die PNA-Biokonjugate (**6-9**, **12-17**) über HPLC von entstandenen Nebenprodukten getrennt, und die erhaltenen Fraktionen über MALDI-TOF MS charakterisiert. Fraktionen die mehr als 90% des gewünschten Produktes enthalten, werden vereinigt, gefriergetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Dafür werden folgende Laufmittelgradienten von 0,1 % TFA in CH_3CN (Lösungsmittel B) und 0,1 % TFA in Wasser (Lösungsmittel A) verwendet:

- 1) Gradient A, 22°C : in 5 min von 0-2 % B, in 23 min von 2-20 % B, in 7 min von 20-95 % B, 10 min bei 95 % B.
- 2) Gradient B, 49°C : 5 min bei 0 % B, in 30 min von 0-35 % B, in 10 min von 35-90 % B, 10 min bei 90 % B.

Charakterisierung der PNAs **6-9**, **12-17**:

6: Ausbeute 85,8%; HPLC $R_t=22,6$ min (Gradient A); MALDI-TOF MS für $\text{C}_{114}\text{H}_{159}\text{N}_{58}\text{O}_{28}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: theor. 2789,8; gef. 2789,2.

7: Ausbeute 49%; HPLC $R_t=29,1$ min (Gradient A); MALDI-TOF MS für $\text{C}_{120}\text{H}_{166}\text{N}_{59}\text{O}_{33}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: theor. 2962,6; gef. 2960,4.

8: Ausbeute 79,9%; HPLC $R_t=27,8$ min (Gradient A); MALDI-TOF MS für $\text{C}_{122}\text{H}_{170}\text{N}_{59}\text{O}_{33}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: theor. 2991,0; gef. 2989,4.

9: Ausbeute 74%; HPLC $R_t=30,4$ min (Gradient A); MALDI-TOF MS für $\text{C}_{124}\text{H}_{164}\text{N}_{59}\text{O}_{30}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: theor. 2961,2; gef. 2961,6.

12: Ausbeute 65%; HPLC $R_t=28,2$ min (Gradient A); MALDI-TOF MS für $\text{C}_{126}\text{H}_{170}\text{N}_{59}\text{O}_{33}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: theor. 3039,7; gef. 3037,7.

13: Ausbeute 79,3%; HPLC $R_t=25,1$ min (Gradient A); MALDI-TOF MS für $\text{C}_{128}\text{H}_{178}\text{N}_{59}\text{O}_{34}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: theor.3087,1; gef. 3085,1.

14: Ausbeute 42,7%; HPLC $R_t=23,5$ min (Gradient A); MALDI-TOF MS für $\text{C}_{128}\text{H}_{178}\text{N}_{61}\text{O}_{32}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: theor. 3083,2; gef. 3081,4.

15: Ausbeute 75,3%; HPLC $R_t=26,4$ min (Gradient A); MALDI-TOF MS für $\text{C}_{126}\text{H}_{174}\text{N}_{59}\text{O}_{32}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: theor. 3027,1; gef. 3028,0.

16: Ausbeute: 31,3%; HPLC $R_t=34,1$ min (Gradient B); MALDI-TOF MS für $\text{C}_{131}\text{H}_{167}\text{N}_{59}\text{O}_{31}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: theor. 3065,3; gef. 3064,3.

17: Ausbeute: 29,5%; HPLC $R_t=29,2$ min (Gradient B); MALDI-TOF MS für $\text{C}_{131}\text{H}_{167}\text{N}_{59}\text{O}_{34}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: theor. 3144,2; gef. 3143,2.

8.4 Durchführung der PNA/DNA-Hybridisierungsexperimente

8.4.1 Durchführung der Schmelzpunktuntersuchungen

Für die Schmelzpunktexperimente werden Lösungen ($V = 700 \mu\text{l}$) bestehend aus DNA ($2 \mu\text{M}$), PNA ($2 \mu\text{M}$), MOPS-Puffer (10 mM) und NaCl (50 mM) untersucht.

$$A = \epsilon c d$$

Zunächst wird die Absorption (A ; dimensionslos) der wässrigen PNA- und DNA-Lösungen photometrisch bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt, so dass anschließend die Konzentrationen (c ; mol l^{-1}) bei bekannter Küvettendicke (d ; cm) und molarem Extinktionskoeffizienten (ϵ ; $\text{l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) über das Lambert-Beersche Gesetz bestimmt werden können.

Der molare Extinktionskoeffizient ϵ der PNAs und DNAs wird folgendermaßen berechnet:⁵²

$$\epsilon = n \epsilon(\text{A}) + m \epsilon(\text{C}) + l \epsilon(\text{G}) + k \epsilon(\text{T})$$

$n =$ Anzahl der Adeninbasen in der PNA bzw. DNA; $\epsilon(\text{A}) = 13700 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$m =$ Anzahl der Cytosinbasen in der PNA bzw. DNA; $\epsilon(\text{A}) = 6600 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$l =$ Anzahl der Guaninbasen in der PNA bzw. DNA; $\epsilon(\text{A}) = 11700 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$k =$ Anzahl der Thyminbasen in der PNA bzw. DNA; $\epsilon(\text{A}) = 8600 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Dann werden nacheinander die MOPS-, NaCl-, PNA- und DNA-Lösungen sowie Wasser in eine Küvette gegeben, so dass das gewünschte Endvolumen ($V = 700 \mu\text{l}$) mit den anfangs angegebenen Konzentrationen erreicht wird. Die Lösung wird durchmischt ($3 \times 10 \text{ sec}$) und mit Argon gespült (5 min). Anschließend wird auf 90°C erwärmt (10 min) und dann auf die gewünschte Starttemperatur abgekühlt. Bei der Messung wird die Abhängigkeit der Absorption von der Temperatur bestimmt, indem in Schritten von $0,5^\circ\text{C}$ erwärmt bzw. abgekühlt wird. Jeder Messvorgang wird mindestens zweimal wiederholt. Ist der Messbereich so gewählt, dass die Temperatur von 20°C unterschritten wird, wird die Küvette von außen mit Stickstoff umspült, um ein Beschlagen des Küvettenglases zu vermeiden.

8.4.2 Durchführung der T_m -Wertbestimmungen in Abhängigkeit von Zr(IV) bzw. Cu(II)

Zu den Lösungen ($V = 700 \mu\text{l}$) bestehend aus DNA ($2 \mu\text{M}$), PNA ($2 \mu\text{M}$), MOPS-Puffer (10 mM) und NaCl (50 mM), für welche in Schmelzpunktexperimenten die DNA/PNA-Duplexstabilität bereits bestimmt wurde (Kap. 8.4.1), werden schrittweise folgende wässrige ZrCl_4 - oder CuCl_2 -Lösungen hinzugefügt:

ZrCl_4 -Lösung: $0,7 \mu\text{l}$ ($2 \times 10^{-3} \text{ M}$), zweimal $0,56 \mu\text{l}$ ($5 \times 10^{-3} \text{ M}$) und $2,16 \mu\text{l}$ (10^{-2} M).

CuCl_2 -Lösung: $0,46 \mu\text{l}$ ($3 \times 10^{-3} \text{ M}$), $0,5$, $0,56$ und $1,68 \mu\text{l}$ ($25 \times 10^{-3} \text{ M}$).

Nach jeder Metallsalzzugabe wird durchmischt ($3 \times 10 \text{ sec}$), mit Argon gespült (5 min) und der T_m -Wert, analog zu der in 8.4.1 beschriebenen Durchführung, bestimmt.

8.4.3 Durchführung des PNA/DNA-Titrationsexperiments

Für die PNA/DNA-Titrationsexperimente wurden folgende Stammlösungen verwendet:

2 mM ZrCl_4 in Wasser, $234,2 \mu\text{M}$ PNA **6** in Wasser und $117,7 \mu\text{M}$ DNA **19** in Wasser.

Die ZrCl_4 -Lösung, sowie das verwendete Wasser wird mit NaOH (2 N) auf pH 4 eingestellt.

Zu $10 \mu\text{l}$ der ZrCl_4 -Lösung werden $8,5 \mu\text{l}$ der PNA **6**-Lösung hinzugefügt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von $1000 \mu\text{l}$ aufgefüllt. Dieser Lösung werden schrittweise $1,7 \mu\text{l}$ der DNA **19**-Lösung zugegeben, bis eine Konzentration der DNA **19** von $3 \mu\text{M}$ bei einem konstanten Volumen von 1 ml erreicht worden wäre. Daraufhin werden der Mischung noch $3,4$, $5,1$ und zweimal $8,5 \mu\text{l}$ der DNA **19**-Lösung hinzugefügt, so dass die Endkonzentration der DNA **19** bei einem konstanten Volumen von 1 ml $6 \mu\text{M}$ betrüge. Nach jeder DNA-Zugabe wird die Lösung durchmischt ($3 \times 10 \text{ sec}$) und photometrisch bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ untersucht, wobei für die Auswertung das Volumen auf 1 ml korrigiert wird. Ein Kontrollexperiment wird analog, nur ohne PNA **6** durchgeführt.

Der pH-Wert (pH 4) der Lösungen wird vor, während und nach den Experimenten kontrolliert.

8.5 Durchführung der DNA-Spaltexperimente

8.5.1 Durchführung der Voruntersuchungen zur qualitativen MALDI-TOF MS Analyse

Für diese Voruntersuchungen werden folgende Stammlösungen verwendet:

15,1 μM PNA **6** in Wasser, 30 μM DNA **18** in Wasser, 17,9 μM DNA **26** in Wasser, 15,7 μM DNA **27** in Wasser, 10 μM ZrCl_4 in Wasser, 10 mM MOPS (pH 7) in Wasser und 1 M NH_4Cl in Wasser.

Es werden vier verschiedene Mischungen (Nr. 42-45) vorbereitet. Zu je 4 μl der MOPS-Lösung werden 0,5 μl der NH_4Cl -, 0,33 μl der DNA **18**-, 0,56 μl der DNA **26**- und 0,64 μl der DNA **27**-Lösungen hinzugefügt. Zu den Mischungen Nr. 43 und 45 werden außerdem 4 μl der ZrCl_4 -Lösung und zu den Mischungen 44 und 45 noch 0,66 μl der PNA **6**-Lösung hinzugegeben. Anschließend werden alle Mischungen mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 μl aufgefüllt und durch MALDI-TOF MS untersucht.

8.5.2 Untersuchungen zur DNA-Spaltung mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA Konjugaten ohne Puffer

Für diese Spaltexperimente werden Lösungen ($V = 10 \mu\text{l}$) verwendet, die die DNA-Oligonucleotide **18**, **19**, **22** (10 μM ; in Wasser), die PNA-Biokonjugate **6-9**, **12-15** (10 μM ; in Wasser) und ZrCl_4 (10, 50 oder 100 μM ; in Wasser) enthalten. Als Kontrollen werden dieselben Lösungen untersucht, nur ohne PNA sowie ohne PNA und ZrCl_4 .

Vor der Durchführung des Experimentes werden die ZrCl_4 -Lösungen frisch angesetzt und mit NaOH (2 N) auf pH 3, 4 oder 5 eingestellt. Außerdem werden die Konzentrationen der PNA- und DNA-Lösungen photometrisch bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ (Vgl. Kap. 8.4.1) bestimmt.

Dann werden nacheinander Wasser, die PNA- und DNA-Lösungen in das Reaktionsgefäß gegeben, so dass bei dem gewünschten Endvolumen ($V = 10 \mu\text{l}$) die anfangs angegebenen Konzentrationen erreicht werden. Die Lösung wird geschüttelt (3x15 sec) und nach 1-2 Stunden mit ZrCl_4 (1 mM; pH 3, 4 oder 5) auf das Endvolumen aufgefüllt, so daß die Zr(IV)-Konzentration in der Reaktionslösung 10, 50 oder 100 μM beträgt. Durch die ZrCl_4 -Zugabe wird das Experiment gestartet. Die Reaktionstemperatur beträgt $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Für die MALDI-TOF MS Untersuchungen werden den Reaktionslösungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben (1 μl) entnommen, auf einen MALDI-Träger gegeben und dort mit der Matrix (1 μl) vermischt. Die Matrix besteht aus einer Mischung gleicher Volumina einer gesättigten

ethanolischen Lösung von Azathiathymidin ($\text{ATT}_{\text{ges. (EtOH)}}$) und wässrigem Diammoniumcitrat (DAC; 0,1M). Die Matrix enthält außerdem die DNA **30** als internen DNA-Standard (1,35 μM). Die Proben trocknen an der Luft und werden anschließend massenspektrometrisch untersucht.

Die Reaktionslösung mit der PNA **6** besitzt anstelle eines Endvolumens von 10 μl ein Volumen von 200 μl . In dieser Lösung werden pH-Wert-Kontrollen vor ($t = 0$ min), während ($t = 92$ h) und nach dem Experiment ($t = 164$ h) durchgeführt.

8.5.3 Untersuchungen zur DNA-Spaltung mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugaten in Pyridinium bzw. Acetatpuffer

Diese Untersuchungen werden analog zu den Experimenten zur DNA-Spaltung mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugaten ohne Puffer (Kap. 8.5.2) durchgeführt, nur dass die Reaktionslösungen Pyridinium- (10 mM; pH 5,27) oder Acetatpuffer (10 mM; pH 4,67) enthalten. Die frisch angesetzte ZrCl_4 -Lösung wird mit NaOH (2 N) auf pH 4,6 eingestellt.

Die Konzentrationen in den Reaktionslösungen betragen 10 μM DNA-Oligonucleotid, 10 μM PNA-Biokonjugat, 10 mM Puffer und 100 μM ZrCl_4 bei $24 \pm 2^\circ\text{C}$ und pH 4,67 bzw. 5,27.

Als DNAs werden **18**, **19**, **22** und als PNA-Biokonjugate **6**, **12** und **15** eingesetzt. Das Spaltexperiment wird durch die Metallsalzzugabe gestartet und zu bestimmten Zeitpunkten ($t = 0$, 140 und 240 Stunden) durch MALDI-TOF MS analysiert.

8.5.4 Untersuchungen zur DNA-Spaltung mit Zr(IV)-Metallkomplex-PNA-Konjugaten in MOPS-Puffer

Diese DNA-Spaltexperimente werden analog zu den in **8.5.2** beschriebenen Untersuchungen durchgeführt, nur dass die Reaktionslösungen zusätzlich MOPS-Puffer (5 mM; pH 7) enthalten. Somit betragen die Konzentrationen in den Reaktionslösungen 10 μM DNA-Oligonucleotid, 10 μM PNA-Biokonjugat, 5 mM Puffer und 10, 50 oder 100 μM ZrCl_4 bei $22 \pm 2^\circ\text{C}$ bzw. $45 \pm 2^\circ\text{C}$ und pH 7.

Als Substrat-DNAs werden **19-22** eingesetzt. Die Experimente der DNA **19** werden mit den PNA-Biokonjugate **6-7**, **12-15**, sowie PNA **6** mit den externen, ungebundenen Liganden IDA (**L₅-H**), TACI (**L₇-H**) und TRIS (**L₈-H**) (je 10 μM) durchgeführt, wohingegen in den Experimenten mit den DNAs **20-22** die PNAs **13-15** eingesetzt werden. Das Spaltexperiment

wird durch die Metallsalzzugabe gestartet und zu bestimmten Zeitpunkten ($t = 0, 92, 120$ und 164 Stunden) durch MALDI-TOF MS analysiert.

8.5.5 Beschreibung der HPLC-Analyse des DNA-Spaltexperimentes

Dem Spaltexperiment (VIIc) der DNA **19** ($10 \mu\text{M}$) mit der PNA **15** ($10 \mu\text{M}$) und ZrCl_4 ($100 \mu\text{M}$) in MOPS-Puffer (5 mM ; $\text{pH } 7$) werden zwei Proben (je $1 \mu\text{l}$) entnommen: nach 0 min und nach 164 Stunden . Die Spaltreaktion in diesen Proben wird mit EDTA (10 mM in Wasser, $1 \mu\text{l}$) gestoppt, die Probe mit Wasser verdünnt ($10 \mu\text{l}$) und durch HPLC analysiert. Das Injektionsvolumen beträgt $10 \mu\text{l}$ und es wird ein Laufmittelgradient von CH_3CN (Lösungsmittel B) und $0,1 \text{ M}$ Triethylammoniumacetat in Wasser ($\text{pH } 7$; $0,1\%$ EDTA) (Lösungsmittel A) verwendet: 5 min bei 0% B, in 30 min von $0-25\%$ B, in 10 min von $25-90\%$ B, 9 min bei 90% B.

8.6 Metallkatalysierte Reaktionen am DNA-Templat

8.6.1 Stammlösungen

Für die Cu(II)-induzierten Esterhydrolysen der 8-(Benzoyloxy)-2-chinoly-PNAs (**16**, **17**) werden Stammlösungen von NaCl, CuSO₄ und MOPS-Puffer hergestellt. Die Konzentration an CuSO₄ beträgt dabei 10 µM, die von NaCl 1 M und die des MOPS-Puffers 50 mM. Der MOPS-Puffer wird in Wasser gelöst und mit NaOH (2N) auf pH 7 eingestellt. Vor den eigentlichen Spaltexperimenten werden die Konzentrationen der wässrigen PNA-, und DNA-Lösungen durch Messung der Absorption bei $\lambda = 260$ nm bestimmt, und die Reinheit durch MALDI-TOF MS überprüft. Sie muss über 90% betragen.

8.6.2 Durchführung der Cu(II)-induzierten Hydrolyse der PNA 16

Die Reaktionslösung (V = 20 µl) des Spaltexperimentes der PNA **16** enthält PNA **16** (1 µM), PNA **31** (1 µM), DNA **23** (1 µM), CuSO₄ (1 µM), MOPS-Puffer (10 mM; pH 7), NaCl (50 mM) und CH₃CN (20% v/v) bei 40°C und pH 7. Außerdem wird ein analoges Experiment, nur ohne DNA durchgeführt.

Es werden Wasser, die CH₃CN-, MOPS-, NaCl-, PNA **31**- und CuSO₄-Lösungen in das Reaktionsgefäß gegeben und die Lösung geschüttelt (3x15 sec). Nach 15 Minuten wird die PNA **16** und DNA **23** (Wasser im Kontrollexperiment) zugegeben, so dass das gewünschte Endvolumen (V = 20 µl) mit den anfangs angegebenen Konzentrationen erreicht wird. Durch die DNA-Zugabe wird die Reaktion gestartet. Für die MALDI-TOF MS Untersuchungen werden den Reaktionslösungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben (1 µl) entnommen, auf einen MALDI-Träger gegeben und dort mit der Sinapinsäure-Matrix (3 µl) vermischt. Die Proben trocknen an der Luft und werden anschließend massenspektrometrisch untersucht.

8.6.3 Durchführung der Cu(II)-induzierten Hydrolyse der PNA 17

Diese Untersuchungen werden analog zu den Spaltexperimenten der PNA **16** (Kap. 8.6.2) durchgeführt, nur das anstelle von **16** die PNA **17** als Substrat-PNA eingesetzt und auf die Verwendung von CH₃CN verzichtet wird.

Somit setzt sich die Reaktionslösung (V = 10 oder 50 µl) wie folgt zusammen: PNA **17** (1 µM), PNA **31** (1 µM), DNA **23-25** (1 µM), CuSO₄ (1 µM), MOPS-Puffer (10 mM; pH 7) und NaCl (50 mM). Die Reaktion wird durch die DNA-Zugabe gestartet. Den Reaktionslösungen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben für die MALDI-TOF MS Untersuchung (1 µl) oder HPLC-Analyse (15 µl) entnommen und anschließend untersucht.

Die Reaktionstemperatur für die Experimente mit den DNAs **23-25** beträgt 40°C. Die Reaktion mit der DNA **23** wird auch bei 45°C durchgeführt.

8.6.4 Durchführung der Cu(II)-katalysierten Hydrolyse der PNA 17

Diese Reaktion wird analog zu dem Spaltexperiment der PNA **17** (Kap. 8.6.3) bei T= 40°C durchgeführt, nur dass die an der Esterhydrolyse beteiligten Komponenten folgende Konzentrationen besitzen: PNA **17** (10 µM), PNA **31** (0,1 µM), DNA **23** (0,1 µM) (Wasser im Kontrollexperiment) und CuSO₄ (0,1 µM). Diese Spaltreaktion werden durch MALDI-TOF MS untersucht.

8.6.5 Beschreibung der HPLC-Analyse der Esterspaltreaktion der PNA 17

Der Reaktionslösung mit PNA **17** (1 µM), PNA **31** (1 µM), CuSO₄ (1 µM), MOPS-Puffer (10 mM; pH 7), NaCl (50 mM) und DNA **23** (1 µM) bzw. keiner DNA bei 40°C und pH 7 (Kap. 8.6.3) werden nach 0 min und nach 120 Stunden Proben (15 µl) entnommen und durch HPLC analysiert. Das Injektionsvolumen beträgt 10 µl. Es wird folgender Laufmittelgradient von 0,1 % TFA in CH₃CN (Lösungsmittel B) und 0,1 % TFA in Wasser (Lösungsmittel A) verwendet (Gradient B, 49°C): 5 min bei 0 % B, in 30 min von 0-35 % B, in 10 min von 35-90 % B, 10 min bei 90 % B.

9 Literaturverzeichnis

- [1] L. Stryer, Biochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg **1996**.
- [2] J. K. Bashkin, L. A. Jenkins, *Comments Inorg. Chem.* **1994**, *16*, 77.
- [3] J. H. Kim, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9792-9795.
- [4] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
- [5] *Peptide Nucleic Acids*-Protocols and Application. Eds. P. E. Nielsen, M. Egholm, Horizon Scientific Press, Norfolk 1999.
- [6] M. Eriksson, P. E. Nielsen *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 410-413.
- [7] L. Betts, J. A. Josey, J. M. Veal, S. R. Jordan *Science* **1995**, *270*, 1838-1841.
- [8] B. Armitage, T. Koch, H. Frydenlund, H. Orum, G. B. Schuster *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26*, 715-720.
- [9] M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895-1897.
- [10] V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Engholm, O. Buchardt, S. H. Sonnichsen, P. E. Nielsen *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1310-1313.
- [11] W. Mier, R. Eritja, A. Mohammed, U. Haberkorn, M. Eisenhut, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2012-2015.
- [12] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2012-2015.
- [13] Reviews: (a) W. K. Pogozelski, T. D. Tullis, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1089-1108; (b) C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1152.
- [14] Reviews: (a) B. N. Trawick, A. T. Daniher, J. K. Bashkin, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 939-960; (b) R. Ott, R. Krämer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *52*, 761-767.
- [15] (a) R. Haner, J. Hall, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7(4)*, 423-430; (b) S. Matsuda, A. Ishikuba, A. Kuzuya, M. Yashiro, M. Komiyama, *Angew. Chem.* **1998**, *110(23)*, 3477-3479.
- [16] (a) G. Pratviel, J. Bernadou, B. Meunier, *Adv. Inorg. Chem.* **1998**, *45*, 251-312; (b) B. Meunier: DNA and RNA cleavers and chemotherapy of cancer or viral diseases, Kluwer Academic, Dordrecht, **1996**.
- [17] J. Chin, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 145-152.
- [18] (a) C. L. Hannon, E. V. Anslyn, *Bioorg. Chem. Front* **1993**, *3*, 193-255; (b) J. K. Bashkin, L. A. Jenkins *Comments Inorg. Chem.* **1994**, *16*, 77-93; (c) J. R. Morrow *Adv. Inorg. Biochem.* **1994**, *9*, 41-74; (d) J. R. Morrow, *Met. Ions Biol. Syst* **1996**, *33*, 561-592. (e) R. Breslow, *Nato ASI Ser., Ser. E.* **1996**, *320*, 113-135; (f) S. Kuusela, H. Lönnberg, *Metal Ions in Biological Systems*; A. Sigel, H. Sigel, Eds.; Marcel Dekker: New York, **1996**; Vol. 32.
- [19] K. Yoshinari, M. Komiyama, *Nucl. Acids Symp. Ser.* **1991**, *23-24*.
- [20] E. L. H. Hegg, K. A. Deal, L. Laura, J. N. Burstyn, *Inorg. Chem.* **1997**, *36(8)*
- [21] A. Whitney, G. Gavory, S. Balasubramanian, *Chem. Comm.* **2003**, *1*, 36-37.
- [22] K. Zito, A. Huttenhofer, N. R. Peace, *Nucl. Acids Res.* **1993**, *21(25)*, 5916-5920.
- [23] A. K. O. Chin, J. R. Morrow, *Inorg. Chem.* **1994**, *33(22)*, 5036-5041.
- [24] (a) J. Sumaoka, Y. Azuma, M. Komiyama, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 205-209; (b) M. E. Branum, A. K. Tipton, S. Zhu, L. Que Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1898-1904; (c) M. E. Branum, L. Que Jr., *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 593-600; (d) S. J. Franklin *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 201-208.
- [25] R. Ott, R. Krämer, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2064-2067.
- [26] T. Ihara, H. Shimura, K. Ohmori, H. Tsuji, J. Takeuchi, M. Takagi, *Chem. Lett.* **1996**, *8*, 687-688.
- [27] N. E. Dixon, R. J. Geue, J. N. Lambert, S. Moghaddas, D. A. Pearce, A. M. Sargeson, *Chem. Comm.* **1996**, *11*, 1287-1288.
- [28] (a) R. Haner, D. Husken, J. Hall, *Chimia* **2000**, *54(10)*, 569-573; (b) B. N. Trawick, A. T. Daniher, J. K. Bashkin, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 939-960; (c) R. Haner, J. Hall, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **1997**, *7(4)*, 423-430; (d) S. Matsuda, A. Ishikubo, A. Kuzuya, M. Yashiro, M. Komiyama, *Angew. Chem.*, **1998**, *110(23)*, 3477-3479; (e) A. T. Daniher, J. K. Bashkin, *Chem. Comm.* **1998**, 1077-1078; (f) J. Hau, D. Hüsken, R. Häner, *Nucleic Acids. Res.* **1996**, *24(18)*, 3522-3536.
- [29] M. Komiyama, *J. Biochem.* **1995**, *118*, 665-670.
- [30] (a) J. T. Welch, M. Sirish, K. M. Lindstrom, S. M. Franklin, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 1982-1984; (b) R. T. Kovavic, J. T. Welch, S. J. Franklin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6656-6662.
- [31] H. E. Moser, P. B. Dervan, *Science*, **1987**, *238*, 6451.
- [32] (a) J. C. Verheijen, B. A. L. M. Deiman, E. Yeheskiely, G. A. Van der Marel, J. H. Van Boom, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39(2)*, 369-372.
- [33] P. Bigey, S. H. Sonnichsen, B. Meunier, P. E. Nielsen, *Bioconj. Chem.* **1997**, *8*, 267-270.
- [34] R. Ott, *Inaugural-Dissertation*, Heidelberg **2001**.
- [35] R. C. Fay in *Comprehensive Coordination Chemistry*, Vol. 3, Hrsg. G. Wilkinson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty, Pergamon Press, Oxford, **1987**, 384.
- [36] Reviews: (a) D. Summerer, A. Marx, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 93-95; (b) L. E. Orgel, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 109-118.

-
- [37] (a) Z. J. Gartner, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6961-6963; (b) Z. J. Gartner, M. W. Kanan, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1874-1878.
- [38] (a) A. Luther, R. Brandsch, G. von Kiedrowski, *Nature*, **1998**, *396*, 245-248; (b) X. Li, Z.-Y. J. Zhan, R. Knipe, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 746-747; (c) Z.-Y. J. Zhan, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12420-12421.
- [39] (a) Y. Xu, N. B. Karalkar, E. T. Kool, *Nature Biotechnol.* **2001**, *19*, 148-152; (b) S. Sando, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9686-9687.
- [40] (a) A. Mattes, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3277-3280; (b) J. L. Czalpinski, T. L. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *123*, 8618-8619.
- [41] Z.-Y. J. Zhan and D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 12420-12421.
- [42] (a) Z. Ma, J. S. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11159-11163; (b) J. S. Taylor, *U.S. Pat. Appl. Pub.* **2003**, 35pp. (c) Z. Ma, J. S. Taylor, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9(9)*, 2501-2510.
- [43] J. Brunner, A. Mokhir, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125 (41)*, 12410-12411.
- [44] J. Chin, V. Jubian, *Chem. Commun.* **1989**, 839-841.
- [45] R. Krämer, I. O. Fritsky, H. Pritzkow, L. A. Kovbasyuk, *Dalton Trans.* **2002**, 1307-1314.
- [46] B. Lewin *Genes* **1998**, Oxford University Press.
- [47] M. Karas, F. Hillenkamp *Anal. Chem.* 1988, *60(20)*, 2299-2301.
- [48] (a) A. A. Mokhir, C. N. Tetzlaff, S. Herzberger, A. Mosbacher, C. Richert, *J. Combin. Chem.* **2001**, *3*, 374-386; (b) R. K. Altman, I. Schwöpe, D.A. Sarracino, C. N. Tetzlaff, C. F. Bleczynski, C. Richert, *J. Combin. Chem.* **1999**, *28(21)*, 4254-4265; (c) F. Rosche, J. Schmidt, T. Hoffmann, R. P. Pauly, C. H. S. McIntosh, R. A. Pederson, H.-U. Demuth, *Methods Mol. Biol.* **2000**, *146*, 251-272.
- [49] (a) S. R. Pully, L. S. Hegedus, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9037-9047; (b) P. A. Tempest, S. D. Brown, R. W. Armstrong, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 640-642; (c) G. Böhm, J. Dowden, D. C. Rice, I. Burgess, J. F. Pilard, B. Guilbert, A. Haxton, R. C. Hunter, N. J. Turner, S. L. Flitsch *Tetrahedron Lett.* **1997**, *39*, 3819-3822.
- [50] (a) R. H. Barca, H. Freiser, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88(16)*, 3744-3748; (b) *Stability constants*, part 1, Chem. Soc. London special Publ. No.6.
- [51] Die 3'-terminale Markierung wurde unter Standardbedingungen mit dem 3'-end labeling Kit der Roche Diagnostics GmbH durchgeführt. <http://biochem.roche.com/pack-insert/1028715b.pdf>.
- [52] Handbuch *Expedito 8900 PNA Chemistry User's Guide C-2/ C-3*.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Dr. Andriy Mokhir danke ich für die gute Zusammenarbeit, die fachlichen Diskussionen, die Instandhaltung der Laborgeräte und für die praktischen Tipps und Kniffe.

Jens Brunner danke ich für die Kooperation bei den DNA-templatvermittelten Metallkatalysen sowie für das Konjugat **31**.

Stefan Hermann und Dr. Oskar Zelder von der BASF AG danke ich für die ³²Phosphat-Markierungsexperimente.

Karin Gabel danke ich für die Unterstützung bei den MALDI-TOF MS Untersuchungen.

Bei Heike Vongerichten möchte ich mich für die Organisation des 'alltäglichen' Laborbetriebs und für die Unterstützung bei den HPLC Untersuchungen bedanken.

Tanja Krüger danke ich für die Synthesen der unmodifizierten, festphasengebundenen PNA-Konjugate.

Meinen Laborkollegen Jens Brunner, Dr. Andriy Mokhir, Iris Boll, Patrick Plitt, Stefan Wörl, Mareike Göritz und Malgorzata Jagoda danke ich für das gute "Teamwork".

Mareike Göritz und Stefan Wörl gilt mein Dank für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen übrigen Arbeitskreis-Mitgliedern danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Besonderer Dank an meine Eltern, meine Großmutter, meine Brüder und meine Freundin Margarida für die Unterstützung und das Verständnis während des gesamten Studiums.

Erklärungen gemäß § 7 (3) b) und c) der Promotionsordnung:

- a) ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe,

- b) ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 22.10.2003

.....
(Felix Zelder)