

**DNA-kontrollierte Verknüpfung von Peptidnucleinsäuren-
Ein chemisches Werkzeug zum Nachweis von DNA-
Einzelbasenmutationen**

**Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
vom Fachbereich Chemie der
Universität Dortmund
angenommene**

DISSERTATION

**von
Diplom-Chemiker**

Amos Mattes

**aus
Strümpfelbach**

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. P. Eilbracht

Tag der mündlichen Prüfung: 05. März 2002

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. H. Waldmann unter der Betreuung von Dr. O. Seitz in der Zeit von Januar 1998 am Institut für Organische Chemie der Universität Karlsruhe (TH) und ab Mai 2000 am Institut für Organische Chemie der Universität Dortmund sowie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie bis August 2001 angefertigt.

Nöimnek, Katalinnak és Rebekkanak

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	ALLGEMEINER TEIL	3
II.1	Einzelbasenpolymorphismen (SNP) in DNA	3
II.2	Nachweis von Einzelbasenmutationen in DNA	5
II.3	Peptidnucleinsäuren (PNA)	9
II.4	Templat-gesteuerte chemische Synthese von Nucleinsäuren	13
III.	ZIELSETZUNG	19
IV.	SPEZIELLER TEIL	21
IV.1	Design eines PNA Ligation Assays	21
IV.2	PNA-Synthese	22
IV.2.1	Boc/Z-Strategie	22
IV.2.2	Fmoc/Bhoc-Strategie	27
IV.2.3	Vergleich der Festphasenstrategien	30
IV.3	Modellstudien zur Templatelektivität	31
IV.3.1	PNA-Fragmentkondensationen	31
IV.3.2	Konzept der Basenlückenverknüpfung	33
IV.3.3	<i>Native Chemical Ligation</i> von PNA-Aminosäure-Konjugaten	35
IV.3.4	Carbodiimid-vermittelte Kupplung von PNA-Glycin-Konjugaten	40
IV.3.5	Einfluß eines Interkalatorfarbstoffes auf die Selektivität	43
IV.4	Versuch eines fluoreszenzspektroskopischen Nachweises von Einzelbasenmutationen in DNA	47
IV.4.1	CFTR-Gen	48
IV.4.2	Versuch der FRET-Detektion im Modellsystem	51

IV.5	Massenspektrometrischer Nachweis der PNA-Verknüpfung	56
IV.5.1	Untersuchungen zur Selektivität an DNA-Templaten	56
IV.5.2	Untersuchungen zur Substratselektivität	66
IV.5.3	Massenspektrometrischer Multiplex-Nachweis von Einzelbasenmutationen am Beispiel des <i>ras</i> -Gens	69
IV.5.4	Bestimmung der Empfindlichkeit und der Selektivität der MALDI- TOF/MS-Detektion	75
IV.5.5	PNA-Verknüpfungssystem an PCR-amplifizierten DNA-Proben ..	76
V.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	80
VI.	EXPERIMENTELLER TEIL	88
VI.1	Messgeräte und Hilfsmittel	88
VI.2	Versuche zu Kapitel IV.2	91
VI.3	Versuche zu Kapitel IV.3	95
VI.4	Versuche zu Kapitel IV.4	102
VI.5	Versuche zu Kapitel IV.5	107
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	115
VIII.	ANHANG	120
VIII.1	Abkürzungsverzeichnis	120
VIII.2	Spektrenanhang	122

I. EINLEITUNG

Mit der Aufklärung der DNA-Struktur im Jahre 1953 durch Watson und Crick war nicht nur die chemische Struktur des zentralen Moleküls des Lebens beschrieben, sondern darüber hinaus auch der molekulare Mechanismus der Vererbung verstanden.^[1] Die von Watson und Crick postulierte DNA-Doppelhelix bildet sich aus zwei zueinander komplementären DNA-Strängen durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren Thymin (T) – Adenin (A) und Cytosin (C) – Guanin (G) (Abbildung. 1).

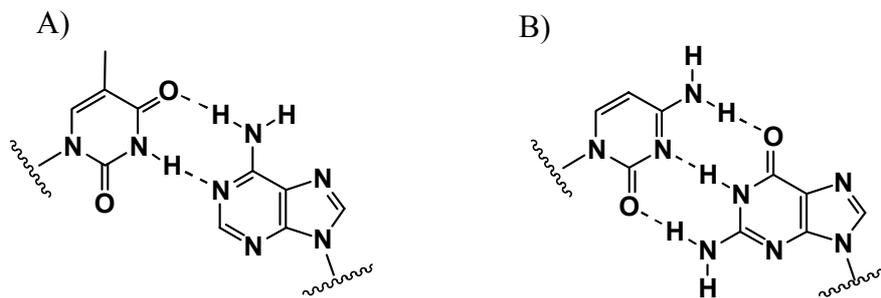


Abbildung 1: Watson-Crick-Basenpaarung zwischen den komplementären Nucleobasen A) Thymin – Adenin und B) Cytosin – Guanin.

Die Arbeiten von Watson und Crick sowie die Entwicklung der Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung von DNA durch Mullis^[2] stellen die Grundlagen für eine explosionsartige Entwicklung in der Biochemie und Molekularbiologie dar. Deren bisheriger Höhepunkt wurde im Februar 2001 mit der Entschlüsselung der Rohfassung des humanen Genoms erreicht, das aus ca. drei Milliarden Basenpaaren besteht.^[3, 4] Nachdem das humane Genomprojekt in Kürze abgeschlossen sein wird und die Sequenzdaten an Präzision gewinnen, wird es zunehmend wichtiger, Abweichungen von der Referenzsequenz zu ermitteln. Damit rückt nun das Individuum bzw. die individuell unterschiedliche Basensequenz in den Mittelpunkt des Interesses. Die am häufigsten gefundenen genetischen

Unterschiede sind Einzelbasenpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs), d.h. individuelle Differenzen einzelner Basen in der Nucleobasensequenz. Diese genetischen Unterschiede können Verwandtschaftsverhältnisse^[5] aufzeigen, zur Entstehung von Krankheiten führen,^[6] aber auch die Nebenwirkungen von Medikamenten^[7] erklären. Mit zunehmendem Verständnis der Bedeutung dieser genetischen Unterschiede auf den Organismus werden in nächster Zukunft DNA-Diagnostika an Bedeutung gewinnen, die Einzelbasenpolymorphismen rasch und effizient nachweisen können.

II. ALLGEMEINER TEIL

II.1 Einzelbasenpolymorphismen (SNP) in der DNA

Das Erbgut zweier beliebiger nichtverwandter Menschen ist zu 99,9 Prozent identisch. Für die genetische Individualität einer Person sind folglich Unterschiede in durchschnittlich jeder tausendsten Base die Ursache. Bei einer Größe des menschlichen Genoms von drei Milliarden Basenpaaren sollte es daher insgesamt bis zu einigen Millionen dieser Variationen geben. Statistisch unterscheidet sich das humane Genom vom Schimpansengenom nur durch jede hundertste Base. Vor diesem Hintergrund wird die Bedeutung so vieler Variationen deutlich.^[6] Tritt eine Abweichung in einer Base in einer Häufigkeit von mehr als 1% in einer Population auf, so spricht man von einem Einzelbasenpolymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP). Einzelbasenpolymorphismen verteilen sich mit unterschiedlicher Dichte über das Genom, wobei sich ein Großteil der SNPs in nichtkodierenden Bereichen befindet. Ohne direkten Einfluß auf den Organismus werden diese von Generation zu Generation weitervererbt, so daß vor allem über sie Verwandtschaftsanalysen erstellt werden können (Vaterschaftstest, Populationsgenetik^[5, 8]).

Befindet sich aber ein SNP in einem kodierenden oder regulatorischen Bereich des Erbgutes, so kann dieser zu einer phänotypischen Veränderung führen. Solche Einzelbasenmutationen sind von großer medizinischer Bedeutung. Die in weiten Teilen Afrikas auftretende Sichelzellenanämie ist ein eindruckliches Beispiel für die weitreichenden Konsequenzen einer Einzelbasenmutation. Bei Trägern dieser Mutation ist im Gen für die β -Kette des Hämoglobins das normale Codon für Glutaminsäure GAG zu GTG abgewandelt, so daß dadurch die Aminosäure Valin im Protein eingebaut wird. Als Folge dieser Punktmutation nehmen die roten Blutkörperchen eine charakteristische Sichelform ein (siehe Abbildung 2).

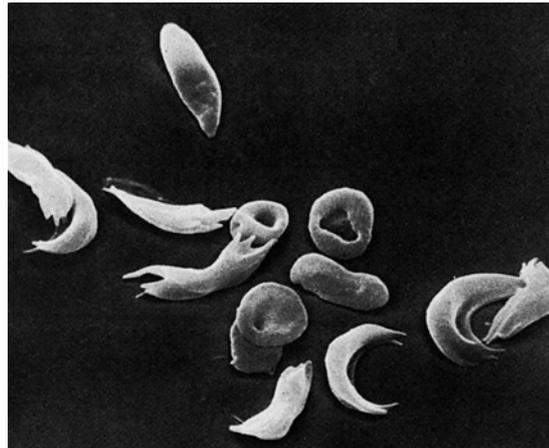


Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der deformierten roten Blutkörperchen bei der Sichelzellenanämie.^[9]

Solche Abweichungen in unseren Genen sind für die geschätzten 3.000 – 4.000 eindeutig genetisch bedingten Erkrankungen verantwortlich,^[6] zu denen auch Zystische Fibrose (Mukoviszidose) und Chorea Huntington (Veitstanz) gehören. Bei sogenannten komplexen Krankheiten wie Alzheimer, Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes mellitus und Schuppenflechte, vergrößern genetische Anlagen das Risiko einer Person, eine bestimmte Krankheit zu entwickeln. Die Krankheit selbst resultiert erst aus dem Zusammenspiel von genetischer Veranlagung mit bestimmten Umweltfaktoren, wie z.B. Ernährungsgewohnheiten, Streß oder Infektionen.

Größte Aufmerksamkeit, vor allem von Seiten der pharmazeutischen Industrie, kommt den SNPs von einem neuen Forschungszweig entgegen, der als Pharmakogenetik bezeichnet wird.^[7] Ziel ist es, für jeden Patienten das für ihn optimale Medikament aus dem großen Angebot der Pharmaka auszusuchen. Von Person zu Person tritt ein Medikament unterschiedlich stark in Wechselwirkung mit dem Zielprotein, da dieses von Individuum zu Individuum leicht variieren kann. Darin begründet sich die Unverträglichkeit eines Medikamentes gegenüber einzelnen Patienten. Die individuellen Unterschiede der Zielproteine spiegeln sich auf der genetischen Ebene anhand unterschiedlicher SNP-Muster wider. Sind die Zusammenhänge zwischen SNP-Mustern eines Patienten und der Unverträglichkeit eines bestimmten Medikamentes erst einmal bekannt, so erhofft man sich in Zukunft durch eine Genanalyse des Patienten eine präzisere Medikation, d.h. der Patient erhält das für ihn optimale Medikament. Dadurch hofft man Nebenwirkungen zu reduzieren, aber auch zeit- und kostengünstiger zu therapieren.

II.2 Nachweis von Einzelbasenmutationen in DNA

Die auf der Sangerschen Dideoxy-Methode basierende Sequenzierung ist nach wie vor die sicherste Methode zur Identifizierung von Einzelbasenmutationen,^[10] eignet sich jedoch nicht für moderne Screening-Verfahren bekannter Mutationen, da sie mit einem hohen technischen und zeitlichen Aufwand verbunden ist. Neue Methoden für die Routine-Diagnostik bekannter Sequenzen sollen daher vor allem schnell und nach Möglichkeit automatisiert durchgeführt werden können. Die gebräuchlichsten Methoden zum Nachweis bekannter Einzelbasenmutationen sind nachfolgend zusammengefaßt.

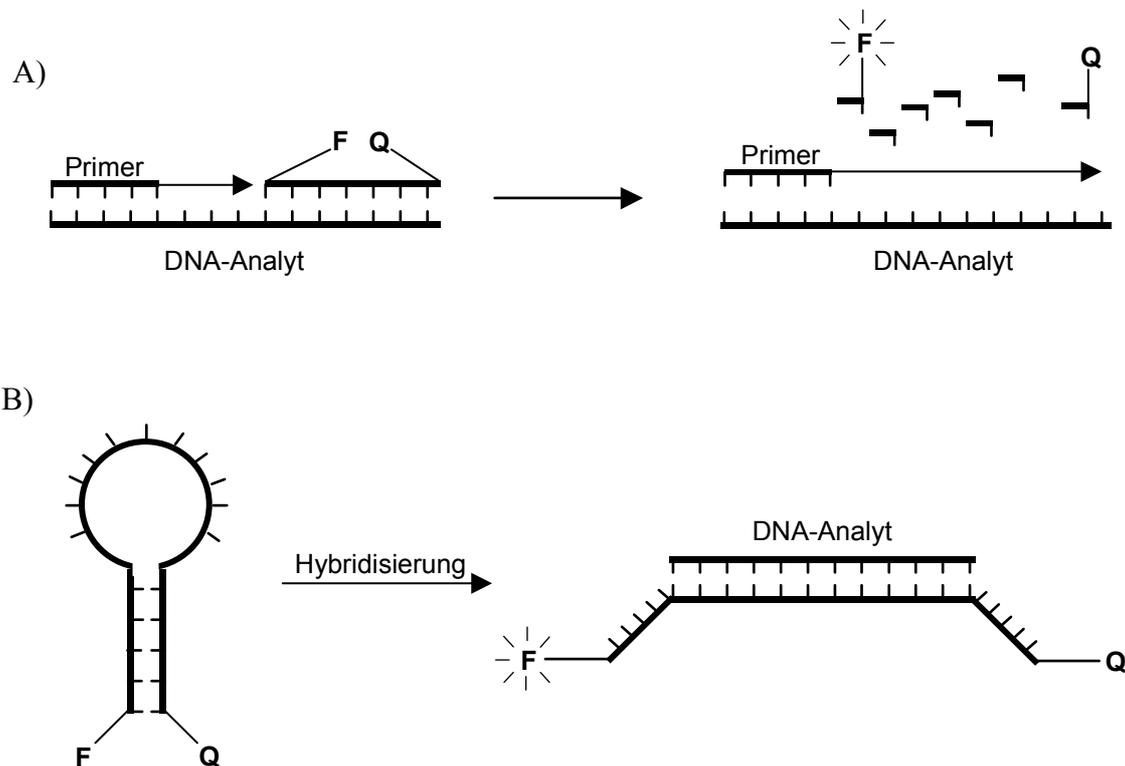
II.2.1 Reverse Dot Blot

Beim Reverse Dot Blot-Verfahren werden Oligonucleotide als Detektionssonden an einer festen Oberfläche immobilisiert und das Fluoreszenz-markierte PCR-Produkt des DNA-Analyten mit dieser hybridisiert.^[11] Diese Sonden mit einer Länge von 16 – 20 Basen sind lang genug, um einen statistisch einmaligen Genomabschnitt abzudecken, aber ebenso hinreichend kurz, um zwischen komplementären und einzelbasenfehlpaarenden Sequenzen zu unterscheiden. Die nichtbindenden fehlpaarenden Proben werden im Anschluß herausgewaschen und die Position des Duplexes wird fluoreszenzspektroskopisch nachgewiesen. Um eine unspezifische Bildung der Duplexe zu vermeiden, muß die Stringenz der Hybridisierung allerdings exakt eingestellt werden (z. B. Temperatur, Salzkonzentration). Dieses Nachweisverfahren liegt auch den für High-Throughput-Screenings entwickelten DNA-Mikroarrays oder DNA-Microchips zugrunde.^[12] Hierbei werden bis zu 250.000 Sonden/cm² auf einem Chip räumlich adressiert und einem multidimensionalen Dot-Blot unterzogen.

II.2.2 Homogene Detektionsmethoden

Nachweismethoden von Einzelbasenmutationen, die auf der Immobilisierung an einer festen Phase beruhen, bergen grundsätzlich die Gefahr unspezifischer Adsorption der Reagenzien oder Analyten an die feste Phase. Die Notwendigkeit zeitintensiver Waschprotokolle oder gelelektrophoretischer Aufreinigung ist ein weiterer Nachteil. Homogene Nachweismethoden umgehen diese Probleme, sind konzeptionell aber komplizierter, da das Detektionssignal, z.B.

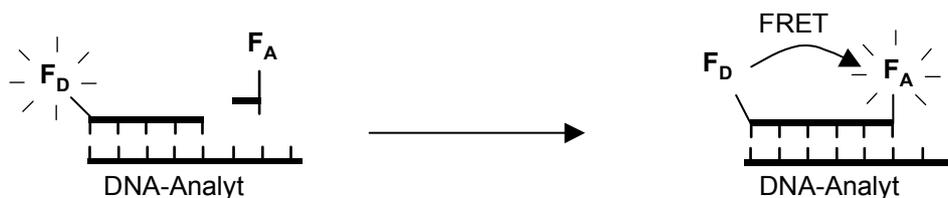
Fluoreszenz, sich als Folge der Bindung zweier Partner verändern muß.^[13] Diese Signaländerung kann durch die Wechselwirkung zweier Fluoreszenzmarker F und Q erfolgen. Bei der Fluoreszenzlöschung unterdrückt Q als direkter Nachbar die Eigenfluoreszenz von F und erst wenn die beiden Marker voneinander entfernt werden, wird die Fluoreszenz von F sichtbar. Dieses Prinzip liegt dem TaqMan-Assay^[14] und den Molecular Beacons^[15] zugrunde.



Schema 1: Prinzip A) des TaqMan-Assays und B) des Molecular Beacons.

In dem TaqMan-Assay wird eine doppelt markierte Detektionssonde durch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der *Taq* DNA-Polymerase abgebaut und dabei ein fluoreszierendes Nucleotid freigesetzt (Schema 1A). Der Fluoreszenzfarbstoff F ist in der Sonde durch den Fluoreszenzlöcher Q inaktiviert. Die Molecular Beacons bestehen aus einer zum Analyten komplementären Schleifensequenz, die an dem 5'- und dem 3'-Ende von kurzen zueinander komplementären Sequenzen flankiert ist (Schema 1B). Durch deren intramolekulare Hybridisierung nimmt das Molecular Beacons eine Haarnadelschleifenstruktur ein, so daß der Fluoreszenzfarbstoff F durch die unmittelbare Nachbarschaft des Fluoreszenzlöchers Q nicht fluoresziert. Mit der Hybridisierung an den komplementären DNA-Analyten bricht die Haarnadelschleifenstruktur des Molecular Beacons auf. Ohne direkte Nachbarschaft des Fluoreszenzlöchers Q fluoresziert nun F.

Beim Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) überträgt der angeregte Donor F_D seine Energie in einem strahlungslosen Vorgang auf den benachbarten Akzeptor F_A , so daß dieser mit seiner charakteristischen Wellenlänge λ_A emittiert.^[16] Mit zunehmendem Abstand nimmt die Effizienz dieses Energietransfers und damit die Intensität von λ_A ab und F_D fluoresziert mit seiner eigenen Wellenlänge λ_D . Chen *et al.* verwendeten FRET zur Entwicklung eines homogenen DNA-Diagnostik-Assays (Schema 2).^[17] Dabei hybridisiert an den DNA-Analyten ein mit einem FRET-Donor markierter Primer, so daß dessen 3'-Ende in unmittelbarer Nachbarschaft zur Mutationsstelle zu liegen kommt. Der Primer wird nun um eine Nucleobase verlängert, indem ein zur Mutationsstelle komplementäres Dideoxynucleosid Triphosphat, welches mit dem FRET-Akzeptor F_A markiert ist, eingebaut wird. Die unmittelbare Nachbarschaft der beiden Fluorophore F_D und F_A ermöglicht einen Energietransfer und F_A fluoresziert.

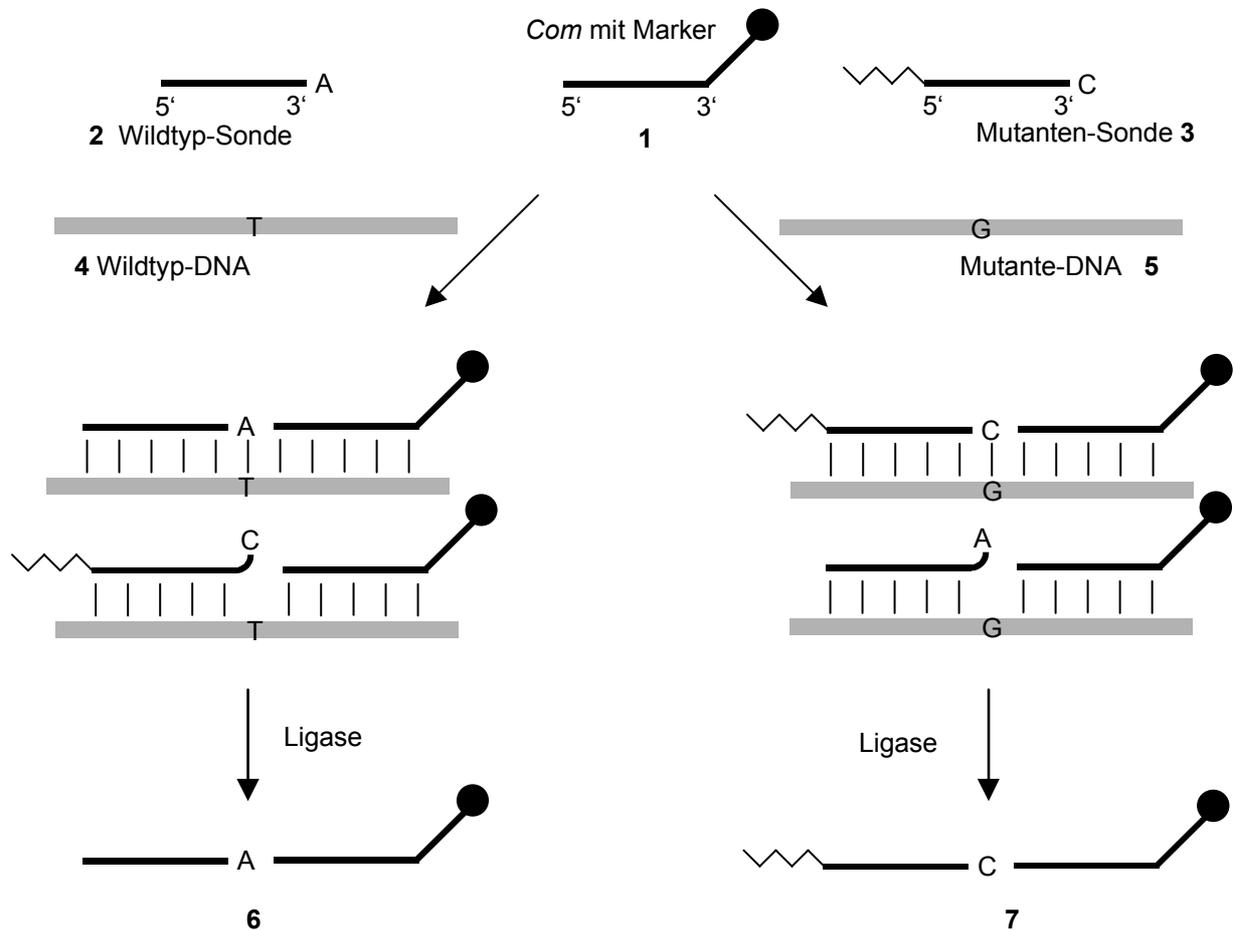


Schema 2: Prinzip des Primer Extension Assays.^[17]

II.2.3 Oligonucleotide Ligation Assay (OLA)

Der *Oligonucleotide Ligation Assay* macht sich die hohe Selektivität der DNA-Ligase zu Nutzen. Hierbei verknüpft dieses Enzym zwei synthetische Oligonucleotid-Sonden miteinander, vorausgesetzt, daß diese in direkter Nachbarschaft mit dem DNA-Analyten hybridisieren.^[18] Anstelle der Hybridisierung einer langen Sonde erfolgt also eine enzymatische Verknüpfung zweier kurzer Oligonucleotid-Sonden, wodurch die Diskriminierungseffizienz des Assays erheblich erhöht wird. Einen Beitrag hierzu liefert das Phänomen, nachdem eine Basenfehlpaarung in einem kurzen Duplex zu einer stärkeren Destabilisierung und damit zu einer höheren Selektivität führt als in einem langen Duplex. Einen zusätzlichen Beitrag leistet das Enzym, das die in Reaktion zu bringenden Gruppen exakt positioniert und durch diese geometrische Kontrolle eine hohe Präferenz für die Verknüpfung perfekt komplementärer Sequenzen aufweist. Die Eindeutigkeit des Nachweis-

systems bleibt dadurch erhalten, daß die beiden kurzen Oligomere in direkter Nachbarschaft an den Analyten binden müssen, und so gemeinsam wieder eine statistisch einmalige Sequenz von 16 – 20 Nucleobasen abdecken.



Schema 3: Prinzip des *Oligonucleotide Ligation Assays*.

Zur Identifizierung einer Einzelbasenmutation werden dem PCR-Amplikon drei Oligonucleotid-Sonden zugegeben: Eine konstantes Oligomer *com* **1** und je eine Wildtyp-Sonde **2** und eine Mutanten-Sonde **3**, die sich in ihrer Markierung (Fluoreszenz-Marker, Massen-Tag) unterscheiden. Die Sonden binden so an die DNA-Analyten **4** und **5**, daß die Enden der variablen Sonden und des konstanten Oligomers sich direkt gegenüber der Mutationsstelle befinden. Die Ligase ist nur dann in der Lage, beide Sonden miteinander zu verknüpfen, wenn die Sonden und der Analyt zueinander vollständig komplementär sind. Die unterschiedlichen Verknüpfungsprodukte **6** und **7** können dann entweder über die Massen-Tags gelelektrophoretisch oder aber, wenn das konstante Oligomer *com* **1** beispielsweise biotinyliert ist, über immobilisiertes Streptavidin isoliert und identifiziert werden. Die

außerordentliche Leistungsfähigkeit des *Oligonucleotide Ligation Assays* machen ihn zu einem Routineverfahren in der medizinischen Diagnostik.^[19]

II.3 Peptidnucleinsäuren (PNAs)

Das grundlegende Prinzip aller DNA-Diagnostika besteht in der Hybridisierung des DNA-Analyten mit einer komplementären Sonde. Der Erfolg eines Nachweises hängt daher entscheidend von der Genauigkeit der molekularen Erkennung während des Hybridisierungsprozesses ab. Nur wenn der Stabilitätsunterschied zwischen Analyt-Sonde und Nichtanalyt-Sonde hinreichend groß ist, können verwertbare Aussagen, über z.B. das Vorliegen einer Punktmutation, gemacht werden. Zur Optimierung der Eigenschaften von Oligonucleotid-Sonden wurden daher in den letzten Jahren eine Vielzahl von Oligonucleotid-Derivaten synthetisiert, die am Phosphatrest, an der Ribose oder an den Nucleobasen modifiziert sind, und ihre Bindungseigenschaften gegenüber natürlicher DNA untersucht.^[20, 21] Neben der Affinität, d.h. der thermodynamischen Stabilität des Duplexes aus DNA und DNA-Analogen, ist dabei vor allem das Diskriminierungsvermögen einzelner Basenfehlpaarungen sowie die chemische und biologische Stabilität der synthetischen DNA-Analoga von Interesse.

Eine weitgehende Änderung der natürlichen Struktur wurde bei den Peptidnucleinsäuren (PNA) realisiert.^[22] Hierbei handelt es sich um ein DNA-Analogen, bei dem das gesamte Ribose-Phosphat-Rückgrat der DNA durch ein auf *N*-(2-Aminoethyl)glycin basierendes, achirales Rückgrat ersetzt wurde (Abbildung 3).^[23] Die natürlichen Nucleobasen sind mit dem Rückgrat über eine Carboxymethylen-Einheit verbunden. Trotz dieses radikalen Strukturunterschiedes zeigen PNAs gegenüber komplementären Oligonucleotiden eine hohe Affinität verbunden mit einer hohen Selektivität. Diese Eigenschaften zusammen mit der Stabilität gegenüber enzymatischen und chemischen Abbaureaktionen stimulierten zahlreiche Anstrengungen, PNA im Kontext diagnostischer und therapeutischer Fragestellungen zu untersuchen.^[24-26]

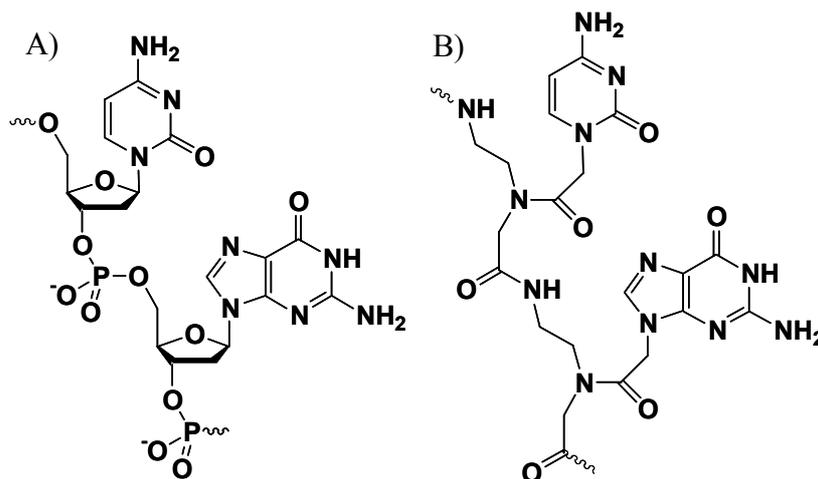


Abbildung 3: Vergleich der chemischen Struktur von A) DNA und B) PNA.

II.3.1 Festphasensynthese von PNA

Aufgrund der amidischen Struktur des PNA-Rückgrates gelingt die PNA-Synthese unter der Verwendung von Festphasenmethoden, die ursprünglich für die Synthese von Peptiden etabliert wurden. Im Gegensatz zur DNA, die bei der Behandlung mit starken Säuren depuriniert wird, sind PNAs säurestabil. Analog zur Peptidchemie haben sich deshalb für den Aufbau von PNA-Oligomeren zwei Synthesestrategien etabliert. Die eine folgt der klassischen Merrifield-Strategie,^[27] in der als temporäre Schutzgruppe am *N*-Terminus des Rückgrates die *t*Butyloxycarbonyl-(Boc)-Gruppe zum Einsatz kommt, die mit Trifluor-essigsäure (TFA) entfernt wird. Als permanente Schutzgruppe für die exocyclischen Aminofunktionen der Nucleobasen Adenin a^{a)}, Cytosin c und Guanin g wird die Benzyloxycarbonyl-(Z)-Gruppe verwendet (Abbildung 4.A).^[28] Die abschließende Behandlung mit Trifluormethansulfonsäure (TFMSA) oder HF spaltet die PNA-Oligomere von der festen Phase und entfernt gleichzeitig alle Schutzgruppen.

Die Boc/Z-Strategie ist eine sehr robuste und zuverlässige Methode zum Aufbau unmodifizierter PNA. Die sauren Bedingungen, die für die Abspaltung der Schutzgruppen benötigt werden, schützen das freigesetzte primäre Amin durch Protonierung vor den typischen Nebenreaktionen der PNA-Synthese (siehe unten). Zudem ist TFA ein exzellentes Lösungsmittel um Sekundärstrukturen aufzubrechen, die zu intra- oder intermolekularen Aggregaten der harzgebundenen Oligomere führen können.

^{a)} Zur Unterscheidung der DNA- und PNA-Oligomere werden hier und im folgenden Text DNA-Basen groß (B, A, C, G, T) und PNA-Basen klein (b, a, c, g, t) geschrieben.

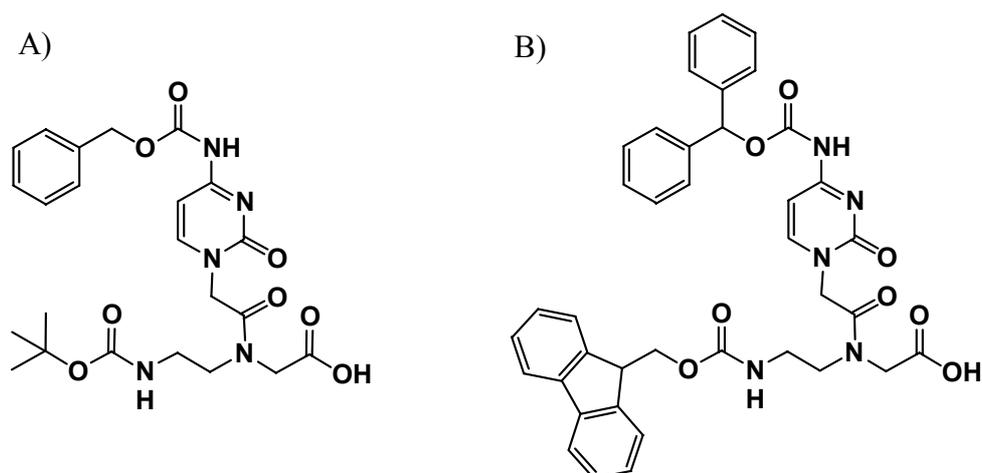
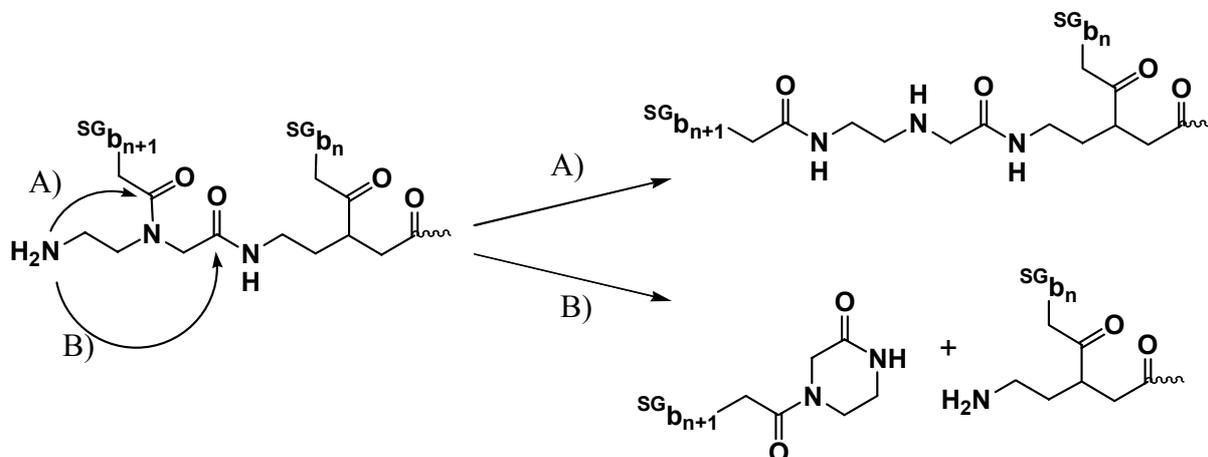


Abbildung 4: PNA-Monomerbaustein des Cytosins für A) die Boc/Z-Strategie (Boc-c^Z-OH) und B) die Fmoc/Bhoc-Strategie (Fmoc-c^{Bhoc}-OH).

Trotzdem sind einer Anwendung der Boc/Z-Strategie aber auch Grenzen gesetzt. Aufgrund der korrodierenden Eigenschaften der Trifluoressigsäure kann die Synthese von den meisten handelsüblichen Syntheserobotern nicht durchgeführt werden. Darüber hinaus sind die Abspaltungsbedingungen für den Aufbau von komplexen PNA-Konjugaten und für die meisten biologisch relevanten Fluoreszenzfarbstoffe zu harsch.

Aus diesen Gründen wurde eine zweite Strategie für die PNA-Synthese entwickelt, die sich an die etablierte Fmoc/*t*Bu-Strategie der Peptidchemie anlehnt.^[29] Hierbei dient die basenlabile Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc)-Gruppe als temporäre Schutzgruppe (Abbildung 4.B), die in jedem Zyklus durch Piperidin abgespalten wird. Zum Schutz der exocyclischen Aminofunktionen wird die säurelabile Benzhydryloxycarbonyl-(Bhoc)-Gruppe verwendet. Zum Abschluß der Synthese entfernt man mit TFA die Bhoc-Gruppen und spaltet das Oligomer vom polymeren Träger ab. Ein großer Vorteil der Fmoc/Bhoc-Strategie besteht darin, daß der Beladungsgrad des Harzes und damit die Ausbeuten der einzelnen Kupplungsschritte sich jederzeit durch eine photometrische Bestimmung des Piperidinfulvenadduktes als Abspaltungsprodukt der Fmoc-Gruppe bestimmen läßt.^[30] Es wurde jedoch beobachtet, daß die zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe benötigten basischen Bedingungen Nebenreaktionen begünstigen,^[31] wie etwa die Wanderung der Nucleobasen-Essigsäure von der sekundären Aminofunktion zur freien *N*-terminalen Aminofunktion des Aminoethylglycin-Rückgrates sowie die Abspaltung des *N*-terminalen PNA-Monomers (Schema 4). Wenn auch diese Synthesestrategie nicht so effizient wie die Boc/Z-Strategie ist, so lassen sich jedoch mit ihr

sehr einfach Fluoreszenz-markierte PNA-Sonden an fester Phase aufbauen, die über die Boc/Z-Strategie in Lösung und damit unter erheblich höherem präparativen Aufwand hergestellt werden müssen.



Schema 4: Basenkatalysierte Nebenreaktionen während der PNA-Synthese. A) *N*-Acyl-Transferreaktion. B) Abspaltung des *N*-terminalen PNA-Monomers (SG = Schutzgruppe).

II.3.2 Chemische und biophysikalische Eigenschaften von PNA

Im Gegensatz zur DNA, die als Polyanion vorliegt, besitzt PNA ein neutrales Rückgrat. Dieser grundlegende Unterschied hat wesentliche Konsequenzen für die Wechselwirkung von PNA mit DNA zur Folge. Die Bindungsstärke komplementärer PNA-DNA-Stränge ist deutlich höher als die komplementärer DNA-DNA-Stränge. Dies ist auf die fehlenden elektrostatischen Repulsionskräfte zwischen PNA-Strang und DNA-Strang zurückzuführen. Als Maß für die Stabilität eines Doppelstranges gilt die Schmelztemperatur T_m .^[32] Unterhalb von T_m liegt der Duplex und darüber liegen die Einzelstränge vor. Für das 10mer GTAGATCACT nimmt die Schmelztemperatur T_m vom PNA-PNA-Duplex ($T_m = 67\text{ °C}$) über den PNA-DNA-Hybrid ($T_m = 51\text{ °C}$) zum reinen DNA-DNA-Doppelstrang ($T_m = 33,5\text{ °C}$) ab.^[33] Über die reine Affinität hinaus zeichnen sich PNA/DNA-Hybride noch durch eine außerordentliche Selektivität aus, da die Watson-Crick-Regeln der Basenpaarung noch strenger eingehalten werden als bei DNA-DNA-Doppelsträngen. Dies lässt sich wiederum an den Schmelztemperaturen T_m der entsprechenden Doppelstränge, die eine Basenfehlpaarung beinhalten, zeigen. Der Unterschied der T_m -Werte zwischen einem komplementären DNA-

PNA-Duplex und einem fehlpaarenden DNA-PNA-Duplex ist mit 8 bis 20 K etwa doppelt so hoch wie bei den entsprechenden DNA-DNA- der DNA-RNA-Doppelsträngen.^[34]

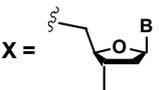
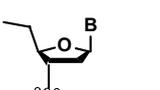
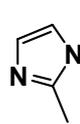
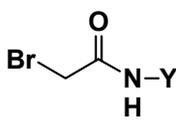
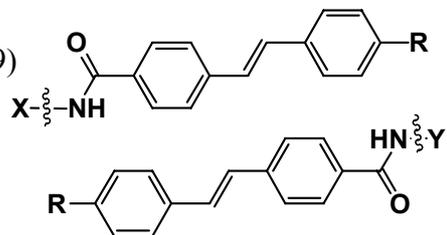
Trotz des Namens handelt es sich bei PNA weder um eine Nucleinsäure noch um ein Peptid. Aufgrund der vollkommen artifiziellen Struktur vermögen weder Nucleasen noch Proteasen PNA abzubauen.^[23] Neben der chemischen Stabilität verfügt PNA damit auch über eine außergewöhnliche biologische Stabilität. Die erhöhte Basenfehlpaarungs-Diskriminierung in Verbindung mit der gesteigerten Affinität und ihrer chemischen sowie biologischen Stabilität macht PNA daher zu einem interessanten und vielversprechenden Werkzeug für die DNA-Diagnostik (z.B. PCR-Clamping,^[35] Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH),^[36] Molecular Beacons,^[37] Allelspezifische Hybridisierung^[38]) und für gentherapeutische Anwendung (z.B. Antisense).^[39]

II.4 Templat-gesteuerte chemische Synthese von Nucleinsäuren

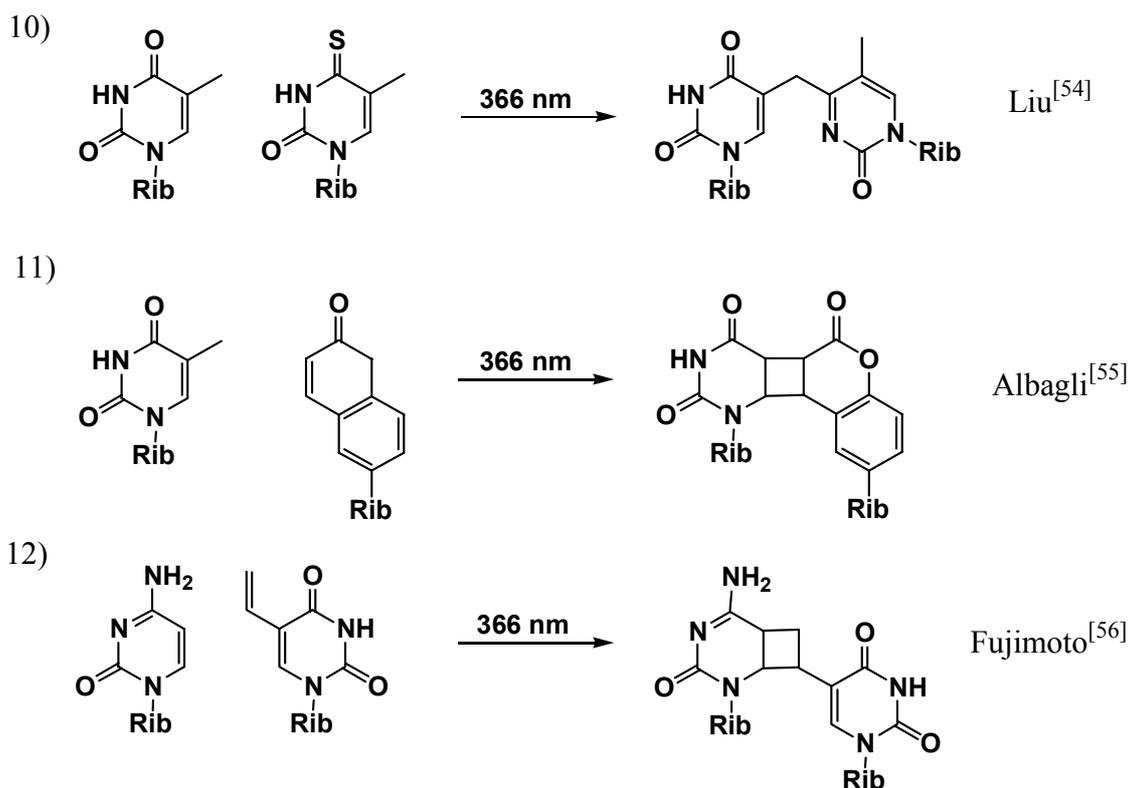
Bei der Replikation, Transkription und Translation überträgt die DNA bzw. RNA die in ihr gespeicherte Information mit hoher Präzision. In der chemischen Terminologie handelt es sich hierbei um Templat-gesteuerte Reaktionen. Template erkennen und binden die Reaktanden oder reaktiven Gruppen eines Moleküls und ordnen diese in einer für die Folgereaktion optimale Konformation an.^[40, 41] Die Einzelstränge der DNA und RNA dienen hierbei als Template, wobei die komplementären Stränge getreu den Gesetzen der Watson-Crick-Basenpaarungen positioniert werden.

Obwohl die Replikation und Translation der natürlichen Nucleinsäuren durch Enzyme katalysiert werden, nimmt man an, daß in einer präbiotischen Welt die ersten Replikationsprozesse chemisch abliefen. Da Replikation ein Kriterium für Leben ist, wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von nicht-enzymatischen Replikationssystemen entwickelt,^[57, 58] von denen man sich Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen der Entstehung von Leben erhofft. In Tabelle 1 sind die verschiedenen literaturbekanntesten chemischen Verknüpfungsarten von Oligonucleotiden zusammengefaßt.

Tabelle 1: Chemische Verknüpfungsreaktionen von Nucleinsäuren.

			Literatur
	$X = $  $Y = $ 		
1)	$X-OH$  $N-P(=O)(O^-)-O-Y$	\longrightarrow	Orgel ^[42]
2)	$X-O-P(=O)(O^-)-OPP_i$ $HO-Y$	\longrightarrow	Szostak ^[43]
3)	$X-O-P(=O)(O^-)-OH$ $HZ-Y$ $Z = O, NH$	$\xrightarrow[\text{bzw. BrCN}]{EDC}$	Naylor ^[44] Kanaya ^[45] Shabaraova ^[46]
4)	$X-O-P(=O)(O^-)-SH$ 	\longrightarrow	Letsinger ^[47]
5)	$X-O-P(=O)(O^-)-SH$ $HS-P(=O)(O^-)-O-Y$	$\xrightarrow[\text{Fe(CN)}_6^{3-}]{I_3 \text{ oder}}$	Letsinger ^[48]
6)	$X-O-P(=O)(O^-)-SH$ $TosO-Y$	\longrightarrow	Letsinger ^[49]
7)	$X-O-P(=O)(O^-)-ZH$ $I-Y$ $Z = S, Se$	\longrightarrow	Kool ^[50, 51]
8)	$X-CH_2-CHO$ H_2N-Y	$\xrightarrow{NaBH_3CN}$	Lynn ^[52]
9)		\longrightarrow	Letsinger ^[53]

Fortsetzung von Tabelle 1



Pionierarbeit auf diesem Gebiet leistete L. Orgel. Beispielsweise gelang es ihm, aktivierte 2-Methylimidazole von Mononucleosid-5'-monophosphaten an komplementären RNA-Templaten auch in Abwesenheit entsprechender Enzyme polymerisieren zu lassen (Tabelle 1.1).^[42] Allerdings konnte bei der Verwendung von Mononucleotiden kein vollständiger Replikationszyklus realisiert werden. Dieses Scheitern kann mit einer Produktinhibierung der Reaktion erklärt werden. Der entstandene komplementäre Produktstrang bindet mit höherer Affinität an das Templat und verhindert so eine erneute Anlagerung der Mononucleotiden. Die Realisierung der autokatalytischen Replikation gelang erst, als man sich von der Kondensation von Mononucleotiden entfernte und die Verknüpfung kurzer Oligomere untersuchte. Nachdem bereits seit 1966 die Templat-gesteuerte chemische Fragmentkondensation zweier Oligonucleotide bekannt war,^[44] konnte von Kiedrowski 1986 das erste Beispiel eines nichtenzymatischen selbstreplizierenden Systems vorstellen.^[59] Replikationsstudien wurden auch mit alternativen genetischen Polymeren durchgeführt.^[60-62] Der gegenseitige Informationstransfer zwischen den unterschiedlichen genetischen Polymeren, eine Voraussetzung für diagnostische Anwendungen, ist aber bisher nur mit PNA gelungen. So kann ein natürliches DNA-Templat auch als Matrix für den Aufbau der artifiziellen PNA dienen.^[60, 63] Ausgehend von den PNA-Dimeren g_2 und a_2 gelang eine

Synthese des PNA-Strangs $g_4a_2g_4$ entlang des komplementären DNA-Templates $C_4T_2C_4$. So wie der Informationstransfer von DNA auf PNA möglich ist, kann auch die Sequenzinformation des PNA-Stranges auf das natürliche Polymer RNA übertragen werden.^[64]

Die Beschäftigung mit der nicht-enzymatischen Oligonucleotidverknüpfung verdient nicht nur hinsichtlich der Suche nach präbiotischen selbstreplizierenden Systemen Interesse. So kann die Bildung eines Verknüpfungsproduktes die Anwesenheit eines bestimmten DNA-Templates anzeigen. Für solche potentielle Anwendungen in der DNA-Diagnostik ist die Selektivität der chemischen Fragmentkondensationen von entscheidender Wichtigkeit. Die ersten Untersuchungen hierzu wurden von Shabarova *et al.*^[46] durchgeführt (Abbildung 5). Bei der Carbodiimid-vermittelten chemischen Verknüpfung der DNA-Fragmente **8** und **9** in Gegenwart des Templates **10** entstand das Kondensationsprodukt für den komplementären Fall ($X=T$) zu 75%, während bei einer Basenfehlpaarung der Umsatz auf 32% und 50% ($X=A/C$) abfiel.

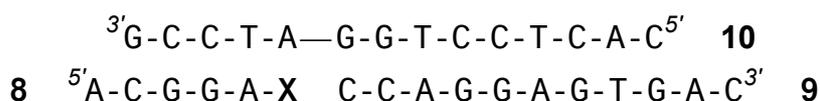


Abbildung 5: Carbodiimid-vermittelte Fragmentkondensation der Oligomere **8** und **9** in Gegenwart des Templates **10**.

Systematische Untersuchungen von James und Ellington zur Genauigkeit der chemischen Fragmentverknüpfung ergaben, daß der Einfluß von Basenfehlpaarungen besonders groß an den zur Verknüpfungsstelle benachbarten Positionen war.^[65] Fehlpaarungen wurden toleriert, wenn sie von der Verknüpfungsstelle weiter entfernt lagen. Dementsprechend nimmt mit zunehmender Länge der Sequenzen die Übertragungsgenauigkeit ab. Für eine effiziente aber auch sequenztreue Verknüpfung benötigt man Oligomere, die einerseits lang genug sind, um vom Templat gebunden werden zu können, aber andererseits so kurz sind, daß keine Fehlpaarungen toleriert werden. James und Ellington legten dar, daß für DNA Hexamere diese Eigenschaften optimal verbinden. Die Verwendung von Dodecameren führt zu Fehlsequenzen, während Trimere unter den gewählten Bedingungen nicht verknüpft werden konnten.

Verknüpfungsmethoden einer hohen Sequenzselektivität wurden von Letsinger^[66] und von Kool^[51, 67] beschrieben. Das System von Letsinger *et al.* basiert auf der Verknüpfung eines

Phosphorothioats als Nucleophil mit einem elektrophilen Bromacetamid (Tabelle 1.4).^[66] Die Gegenwart eines vollständig komplementären Templates führte bei 30 °C zu einem Umsatz von 75%, während der Austausch einer Base im Templat die Produktbildung auf unter 5% reduzierte. Die ideale Reaktionstemperatur für die Diskriminierung zweier Template befand sich den Beobachtungen Letsingers zufolge zwischen den Schmelztemperaturen T_m der Sonden-Duplexes mit dem komplementärem Templat einerseits und mit dem fehlpaarenden Templat andererseits. Wird der T_m -Wert des fehlpaarenden Templates unterschritten, kommt es entgegen der Waston-Crick-Basenpaarung zu einer signifikanten Anlagerung der Sonde an das fehlpaarende Templat und auch die unerwünschte Verknüpfungsreaktion findet statt.

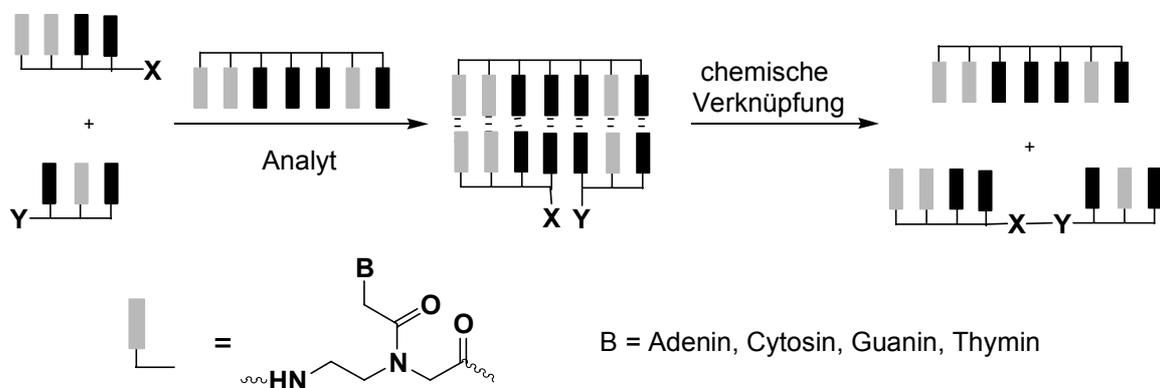
Kool *et al.* nutzten die Verknüpfung eines 5'-terminalen Oligonucleotid-Iodids mit einem Phosphorothioat (Tabelle 1.7), um am Beispiel von *H-ras* DNA-Segmenten Einzelbasenmutationen nicht-enzymatisch nachzuweisen.^[67] Dabei beobachteten sie bei sehr niedrigen Konzentrationen der Ziel-DNA das Phänomen der Templatkatalyse, d.h. das Analyt-Templat stand für mehrere Verknüpfungszyklen zur Verfügung. Mit einer Beschleunigung der Produktbildung in Gegenwart des perfekt komplementären gegenüber des einzelbasenfehlpaarenden Templates um einen Faktor von 180 verfügte das Kool'sche System über eine vergleichbare Selektivität wie der *Oligonucleotide Ligation Assay* mit der T4-Ligase. Aber mit Hilfe des *Tth*-Enzyms und bei Verwendung modifizierter Oligonucleotidsonden können für enzymatische Verknüpfungsreaktionen bis zu 13000fache Selektivitäten erreicht werden.^[68] Der Verwendung enzymatischer Verknüpfungsreaktionen sind aber enge Grenzen gesetzt. Beispielsweise zeigen Ligasen eine geringe Aktivität an RNA-Templaten. Darüber hinaus können Ligasen chemisch leicht modifizierte Oligonucleotid-Analoga nicht miteinander verknüpfen, die wegen ihrer günstigen Bindungseigenschaften und biologischen Stabilität für die DNA-Diagnostik und Gentherapie entwickelt wurden. Selbst minimale Modifizierungen, wie z. B. die Bildung eines Phosphoramids ($X = 3'-NH_2-T$ in Abbildung 5)^[46] oder die Einführung von Reportergruppen, können von der T4 Ligase nicht mehr toleriert werden, vor allem wenn sich diese direkt an der Verknüpfungsstelle befinden. Chemisch modifizierte Oligonucleotid-Analoga sind jedoch wegen ihrer hohen biologischen Stabilität vonnöten, um einen Sequenznachweis innerhalb lebender Zellen zu erbringen. Eine Einführung der Ligasen in die Zelle ist schwer zu realisieren, so daß enzymatische Methoden für *in vivo*-Verfahren problematisch sind. Vor diesem Hintergrund gewinnt die Entwicklung sequenztreuer chemischer Verknüpfungsmethoden für die DNA-Diagnostik an Bedeutung. Die in Tabelle 1 zusammengefaßten

Verknüpfungsreaktionen beschränkten sich auf Untersuchungen von Oligonucleotiden. Chemische Verknüpfungsmethoden ermöglichen es aber, das volle Potential unnatürlicher DNA-Analoga auszuschöpfen. Erste Untersuchungen zur Verknüpfung von DNA-Analoga an DNA-Templaten bestehen bereits,^[60,62,63] doch über deren Sequenzselektivität in Verknüpfungsreaktionen, eine für diagnostische Anwendungen zentrale Fragestellung, wurde bislang nicht berichtet.

III. ZIELSETZUNG

Nach dem Abschluß des humanen Genomprojektes gewinnt die Suche nach neuen Einzelbasenpolymorphismen und die Charakterisierung unbekannter Mutationen an Bedeutung. Mit der dichter werdenden Kartierung krankheitsrelevanter SNPs wird in der medizinischen Diagnostik der Bedarf an einfachen und raschen Methoden zur Identifizierung bekannter Mutationen in den nächsten Jahren zunehmen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das erfolgreiche Konzept des *Oligonucleotide Ligation Assays*, also die Templat-vermittelte Verknüpfung kurzer Sonden, auf das DNA-Analogon Peptidnucleinsäure (PNA) zu übertragen (Schema 5). Die günstigen Bindungseigenschaften der PNA gegenüber komplementärer DNA ließen auf eine hohe Selektivität des PNA-Nachweissystems hoffen. Eine direkte Übertragung der Bedingungen des *Oligonucleotide Ligation Assays* auf einen „PNA Ligation Assay“ ist jedoch nicht möglich, da PNA als vollkommen artifizielles System nicht von dem Enzym Ligase als Substrat toleriert wird. Folglich können die Sonden eines „PNA Ligation Assays“ nicht enzymatisch verknüpft werden.



Schema 5: Prinzip einer Templat-gesteuerten Verknüpfungsreaktion zweier PNA-Oligomere.

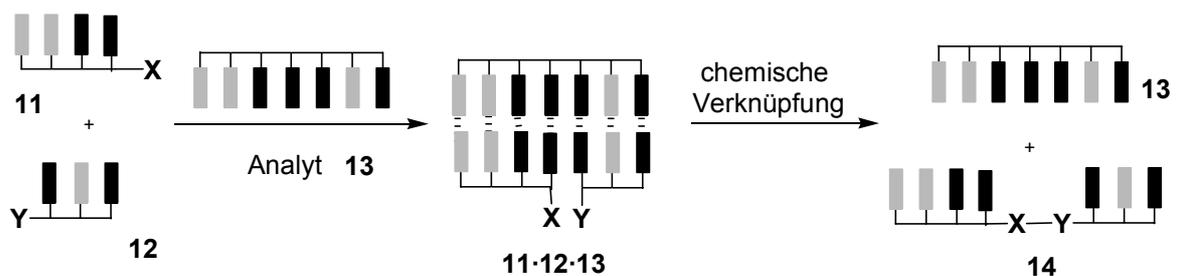
Erstes Ziel der Arbeit war daher die Entwicklung und Erprobung chemischer Verknüpfungsmethoden für einen „PNA Ligation Assay.“ Da bisher noch keine Untersuchungen zur Selektivität von PNA-Verknüpfungen unternommen wurden, sollte zunächst an einem Modellsystem die Tauglichkeit der PNA für chemische Fragmentverknüpfungen und deren Diskriminierungsvermögen gegenüber Basenfehlpaarungen untersucht werden. Anhand des Modellsystems sollten die Reaktionsbedingungen soweit optimiert werden, daß eine Anwendung zum Nachweis von Einzelbasenmutationen möglich ist.

In einem zweiten Schritt sollten die optimierten Bedingungen aus dem Modellsystem auf Beispiele von biologischer Relevanz übertragen werden. Vor allem im Hinblick auf eine Multiplex-Detektion, d.h. den gleichzeitigen Nachweis mehrerer Mutationsstellen durch eine einzige Untersuchung, sollten Möglichkeiten für einen raschen, automatisierbaren Nachweis von Einzelbasenmutationen in homogener Lösung gefunden werden. Hierfür sollten zum einen verschiedene Fluoreszenz-Marker, in Lösung und an fester Phase, an die PNA angebracht werden, um über einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) oder Fluoreszenzlöschung einen Mutationsnachweis zu erreichen. Im Gegensatz zu DNA läßt sich PNA sehr gut massenspektrometrisch analysieren. Neben der fluoreszenzspektroskopischen Detektion sollte daher auch als Alternative massenspektrometrische Detektionsmethoden herangezogen werden, die in den letzten Jahren speziell für die routinemäßige Untersuchung von Biomolekülen entwickelt worden sind.

IV. SPEZIELLER TEIL

IV. 1 Design eines PNA Ligation Assays

Um eine bimolekulare Reaktion zur Identifizierung einer bestimmten Nucleinsäuresequenz zu verwenden, müssen die beiden Reaktanden **11** und **12** zum einen mit einer molekularen Adresse, die eine eindeutige Erkennung durch das Nucleinsäuretemplat möglich macht, und zum anderen mit reaktiven Gruppen **X** und **Y** ausgestattet sein, die eine Verknüpfung ermöglichen (Schema 6). Ein komplementäres Templates **13** erkennt und bindet die Reaktanden **11** und **12** unter Ausbildung des ternären Komplexes **11·12·13** so an sich, daß die reaktiven Gruppen **X** und **Y** z.B. eine aktivierte Carbonsäure und ein Amin, in unmittelbare Nachbarschaft zueinander gebracht werden. Die vormals intermolekulare Reaktion zwischen **11** und **12** erfolgt im ternären Komplex intramolekular, so daß die Reaktion beschleunigt wird. In einem diagnostischen Ansatz kann die Bildung des Verknüpfungsproduktes **14** auch als Nachweis für die Anwesenheit des Templates verwendet werden. Hierfür ist die Selektivität der molekularen Erkennung zwischen dem nachzuweisenden Templat und den Reaktanden **11** und **12** von entscheidender Bedeutung. Nur in Gegenwart eines perfekt komplementären Templates dürfen die reaktiven Gruppen **X** und **Y** in Reaktion treten.



Schema 6: Prinzip einer Templat-gesteuerten PNA-Verknüpfungsreaktion.

Aufgrund der hohen Bindungsaffinität und Selektivität gegenüber komplementären Nucleinsäuren diente das DNA-Analogon PNA im Rahmen der vorliegenden Arbeit als molekulare Adresse für die Reaktanden **11** und **12**. PNA ist ein Polyamid und PNA-Verknüpfungsreaktionen lassen sich daher auf der Basis von Peptidkondensationen leicht durchführen. Hierfür muß die PNA-Sonde **11** als reaktive Gruppe C-terminal eine freie Carbonsäure tragen ($X = \text{COOH}$), während **12** N-terminal eine freie Aminogruppe besitzt ($Y = \text{H}_2\text{N}$).

IV. 2 PNA-Synthese

Für die Synthese der in Schema 6 dargestellten PNA-Sonden wurden literaturbekannte Protokolle adaptiert und den spezifischen Anforderungen folgend modifiziert. So kann der Aufbau der C-terminalen Kupplungssegmente **12** den Routineprotokollen für die Synthese von PNA mit C-terminalen Carboxamiden folgen.^[28] Im Gegensatz dazu müssen bei der Synthese der N-terminalen Acyldonorsegmenten **11** PNA-Oligomere mit einer freien Carbonsäure aufgebaut werden.

Aufgrund ihrer amidischen Struktur haben sich für den Aufbau von PNA-Oligomeren analog zur Peptidchemie zwei Synthesestrategien etabliert: die Boc/Z-Strategie und die Fmoc/Bhoc-Strategie.

IV.2.1 Boc/Z-Strategie

In Anlehnung an das klassische Merrifield-System^[27] ist das Abspaltungsprinzip der Boc/Z-Strategie durch die abgestufte Azidolyse der Schutzgruppen bestimmt. Die Boc-Gruppe wird als temporäre Schutzgruppe des N-Terminus des Aminoethylglycin-Rückgrates in jedem Zyklus mit TFA abgespalten. Die exozyklischen Aminofunktionen der Nucleobasen Adenin ^{a)}, Cytidin *c* und Guanin *g* werden durch die Benzyloxycarbonyl-Gruppe (*Z*) maskiert (Abbildung 6) und am Ende der Synthese mit der stärkeren Säure TFMSA entfernt.

^{a)} Zur Unterscheidung der DNA- und PNA-Oligomere werden hier und im folgenden Text DNA-Basen groß (B, A, C, G, T) und PNA-Basen klein (b, a, c, g, t) geschrieben.

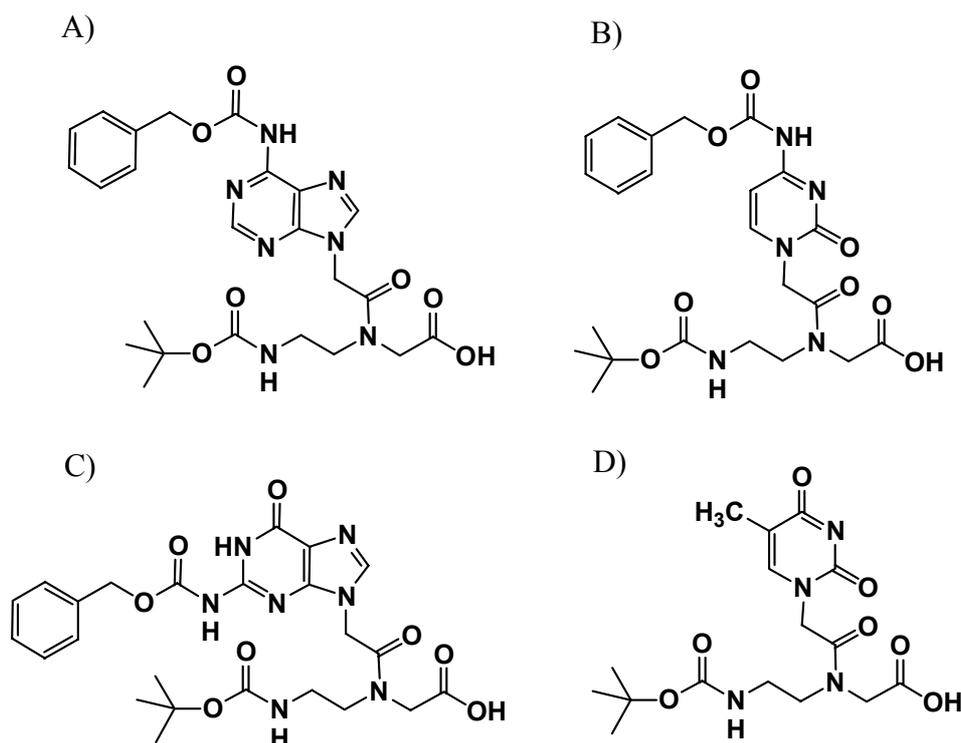
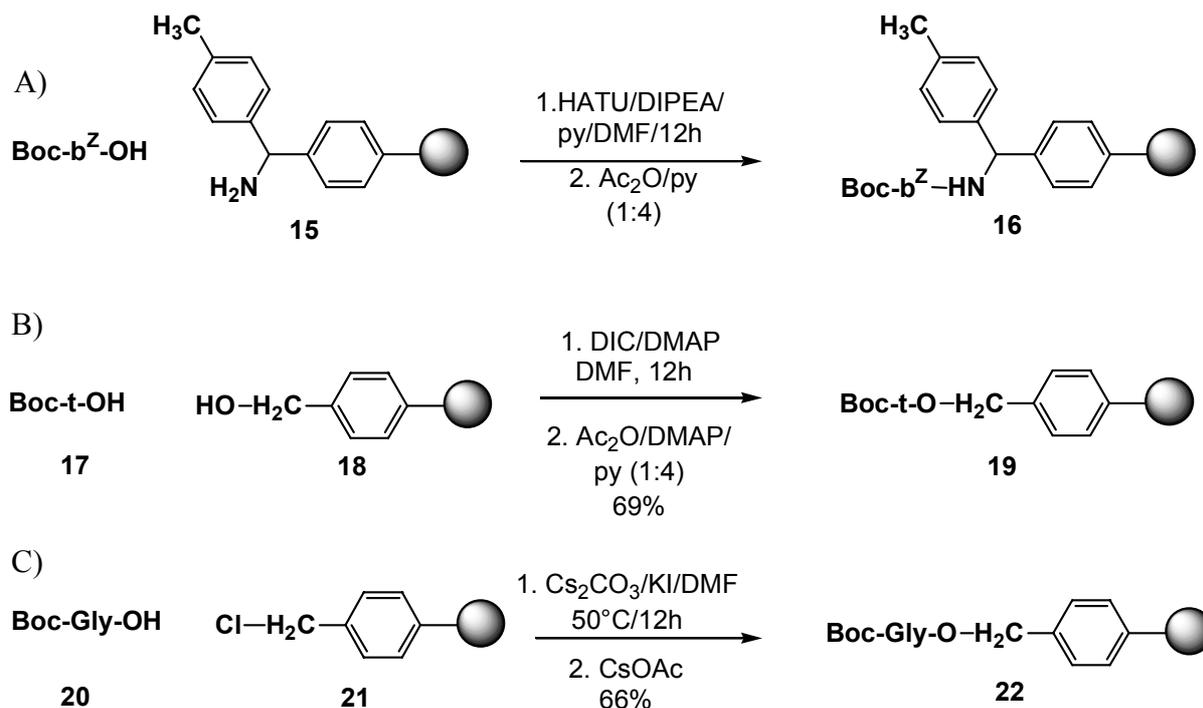


Abbildung 6: Monomerbausteine der Boc/Z-Strategie. A) Boc-a^Z-OH, B) Boc-c^Z-OH, C) Boc-g^Z-OH, D) Boc-t-OH.

Anknüpfung an die feste Phase

Zum Aufbau von C-terminalen Carboxamiden wurde nach literaturbekanntem Verfahren^[28] das erste Monomer mit dem Methylbenzhydrylamin-Harz (MBHA)^[69] **15** verknüpft. Für die Ausbildung der Amidbindung wurde als Kupplungsreagenz HATU in Anwesenheit zweier Äquivalente Hünig-Base verwendet. Der Beladungsgrad wurde stets auf ca. 250 $\mu\text{mol/g}$ reduziert, um beim Aufbau längerer Sequenzen störende Interaktionen zwischen den Oligomeren zu vermeiden. Hierzu wurde das erste Monomer im Unterschuß mit dem Harz umgesetzt. Nicht umgesetzte Aminogruppen des Harzes wurden durch eine Acetylierung blockiert.



Schema 4: Anknüpfung des ersten Synthesebausteins an verschiedene Anker. A) MBHA-Harz B) Hydroxymethyl-Polystyrolharz C) Chloromethyl-Polystyrolharz (Merrifield).

Für die Synthese der literaturunbekannten PNA-Säuren wurde das Startmonomer an ein Hydroxyl-modifiziertes Harz z.B. an das Hydroxymethyl-Harz **18** geknüpft. Hierfür wurden zwei Äquivalente des PNA-Monomers **17** mit Diisopropylcarbodiimid (DIC) in das symmetrische Anhydrid überführt, welches in Gegenwart katalytischer Mengen DMAP mit dem polymeren Alkohol **18** in Reaktion gebracht wurde. Nicht umgesetzte Hydroxyfunktionen wurden mit Essigsäureanhydrid und DMAP in Pyridin acetyliert. Ein Nachteil der Anknüpfung eines Monomeres über das symmetrische Anhydrid besteht darin, daß von zwei Äquivalenten des Monomers **17** nur eines umgesetzt werden kann. Effizienter war es daher, den immobilisierten Ester **22** über eine nucleophile Substitution aufzubauen.^[70] Dazu wurde das Cäsiumsalz von **20** in Anwesenheit katalytischer Mengen NaI mit dem klassischen Merrifield-Harz Chloromethyl-Polystyrol^[27] **21** bei 50 °C in 66%iger Ausbeute umgesetzt. Der Cappingschritt erfolgte mit Cäsiumacetat.

NMR-spektroskopische Bestimmung des Beladungsgrades

Der Beladungsgrad von Harzen, die mit Boc-geschützten Monomeren beladen wurden, kann im Gegensatz zu Fmoc-geschützten Monomeren nicht UV-spektrometrisch bestimmt werden. Zur Ermittlung des Beladungsgrades der Harze **19** und **22** wurde daher ein auf $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie basierendes Verfahren entwickelt. Hierfür wurden wenige Harzkügelchen mit einer Lösung aus deuteriertem Natriummethanolat in $[\text{d}_6]$ -DMSO behandelt, der Toluol als interner Standard beigelegt war. Der durch die Umesterung freigesetzte Methylester **23** wurde im Anschluß NMR-spektroskopisch quantifiziert. Diese Methode ist für alle Systeme geeignet, die über eine Esterbindung an den polymeren Träger fixiert sind. Bei amidischen Bindungen wie **16** funktioniert diese Methode jedoch nicht, so daß bei Anknüpfungen an das MBHA-Harz keine Bestimmung des Beladungsgrades möglich war.

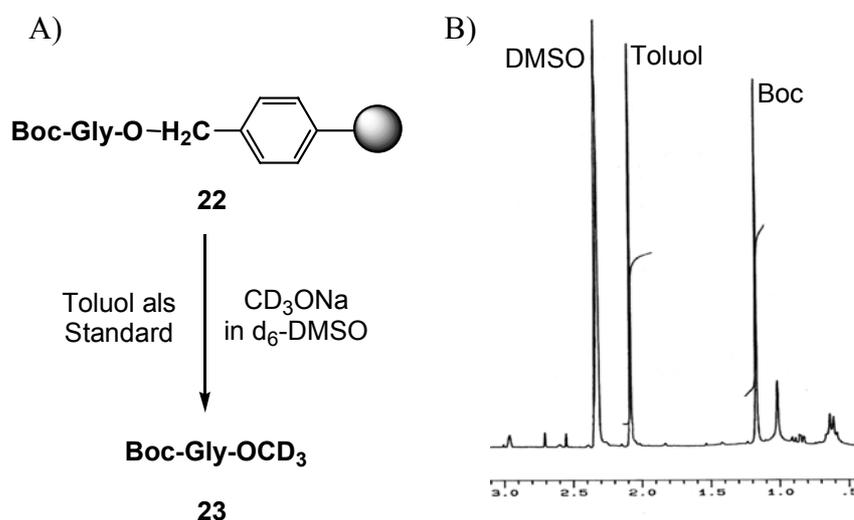
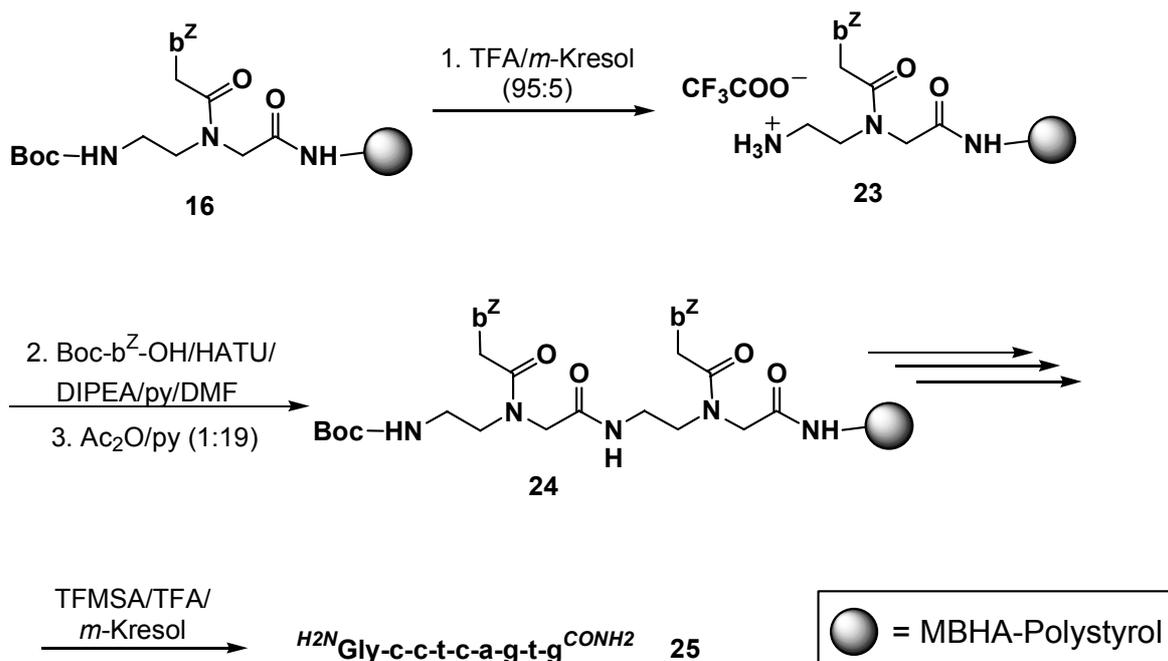


Abbildung 7: $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Bestimmung des Beladungsgrades am Beispiel von Harz **22**. Über den internen Standard Toluol im Verhältnis zu dem Signal der Boc-Gruppe wird die Menge abgespaltenen Produktes **23** bestimmt.

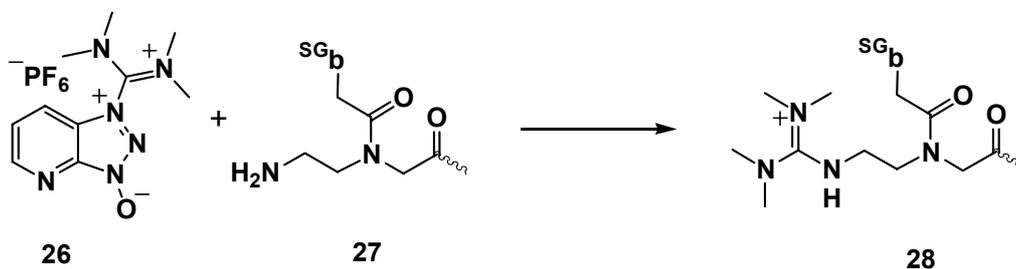
Festphasensynthese nach der Boc/Z-Strategie

Die Synthese der PNA-Oligomere lehnte sich an ein Protokoll von Koch *et al.* an, das für den Syntheseroboter ABI 433A der Firma Applied Biosystems optimiert wurde.^[28] Der Großteil der hier diskutierten PNA-Oligomere wurde manuell in Spritzenreaktoren aufgebaut und der Synthesemaßstab betrug zwischen 3 – 20 μmol .



Schema 8: PNA-Festphasensynthese nach der Boc/Z-Strategie.

Ausgehend vom beladenen Harz **16** wurde im ersten Schritt die temporäre Boc-Schutzgruppe mit TFA abgespalten. Als Kationenfänger diente *m*-Kresol. Im folgenden Kupplungsschritt wurde nun an den freien *N*-Terminus ein neuer Synthesebaustein geknüpft, der vor der Zugabe zum Harz in einem separaten Gefäß durch das Kupplungsreagenz HATU **26** in den HOAt-Aktivester überführt wurde. Dieser separate Voraktivierungsschritt war notwendig, da HATU ebenfalls mit dem freien Amin **27** unter Bildung des Guanidiniumsalzes **28** reagieren kann.^[28] Um das daraus resultierende Problem eines Sequenzabbruchs zu vermeiden, wurde HATU stets im leichten Unterschub zugegeben.



Schema 9: Bildung des Guanidiniumadduktes durch das Kupplungsreagenz HATU (SG = Schutzgruppe).

Die Zugabe von Pyridin zur Kupplungslösung ermöglichte eine *in situ* Neutralisierung des TFA-Ammoniumsalzes **23**. Neben der Vermeidung zusätzlicher Waschschritte minimiert diese Vorgehensweise die in Schema 4 beschriebenen Nebenreaktionen. Im Anschluß an den

Kupplungsschritt wurden nicht umgesetzte Aminofunktionen acetyliert ("Capping"), um die Bildung von Fehlsequenzen zu unterbinden und auf die Bildung von Rumpfsequenzen zu reduzieren. Dieser dreistufige Zyklus wurde mit jedem Baustein bis zum Erreichen der gewünschten Sequenz wiederholt.

Die Abspaltung des PNA-Oligomers vom polymeren Träger sowie das gleichzeitige Entfernen der Z-Gruppen von den exocyclischen Aminofunktionen erfolgte unter stark sauren Bedingungen mit TFMSA. Die Analyse des Rohproduktes erfolgte mittels MALDI/MS und HPLC. Die Synthese von C-terminalen Carboxamiden gelang analog den literaturbekannten Verfahren. An den Harzen **19** und **22** konnten zudem die bis dato nicht beschriebenen PNA-Säuren erfolgreich und in guten Ausbeuten hergestellt werden.

IV.2.2 Fmoc/Bhoc-Strategie

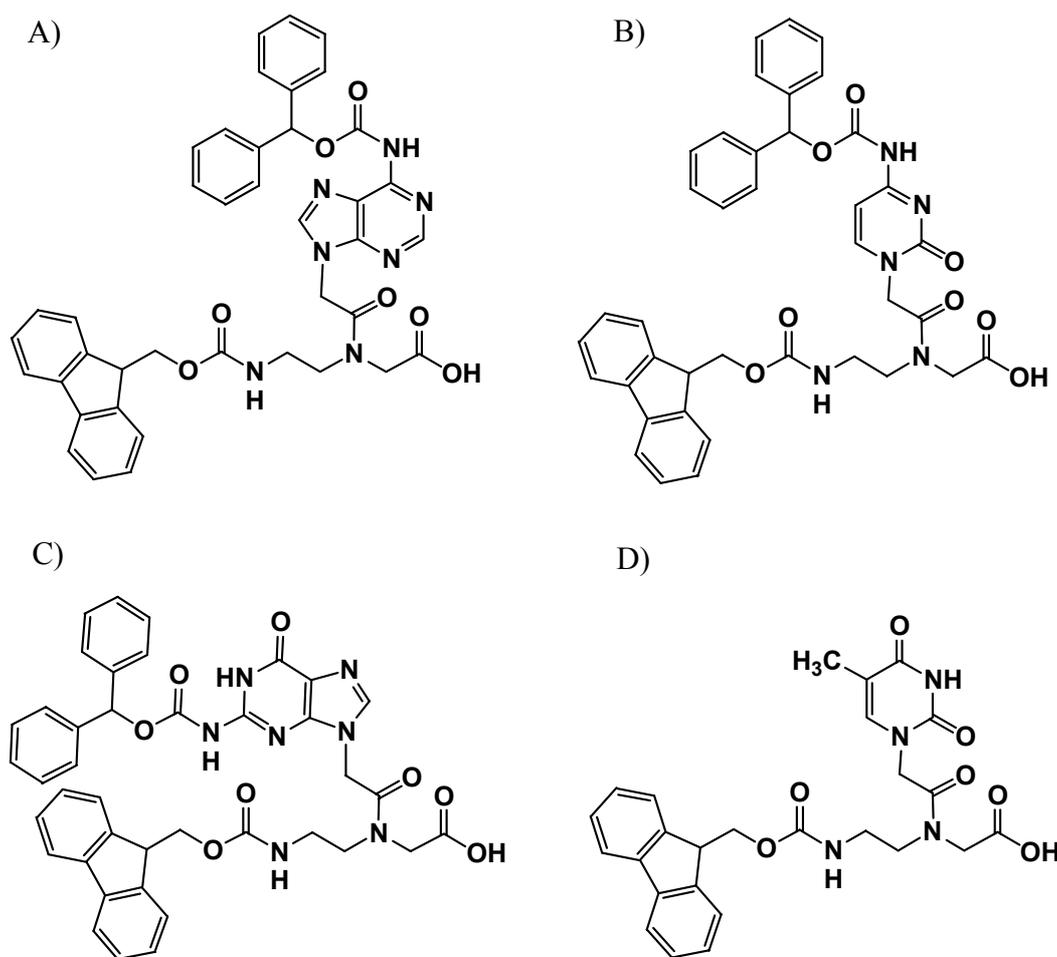
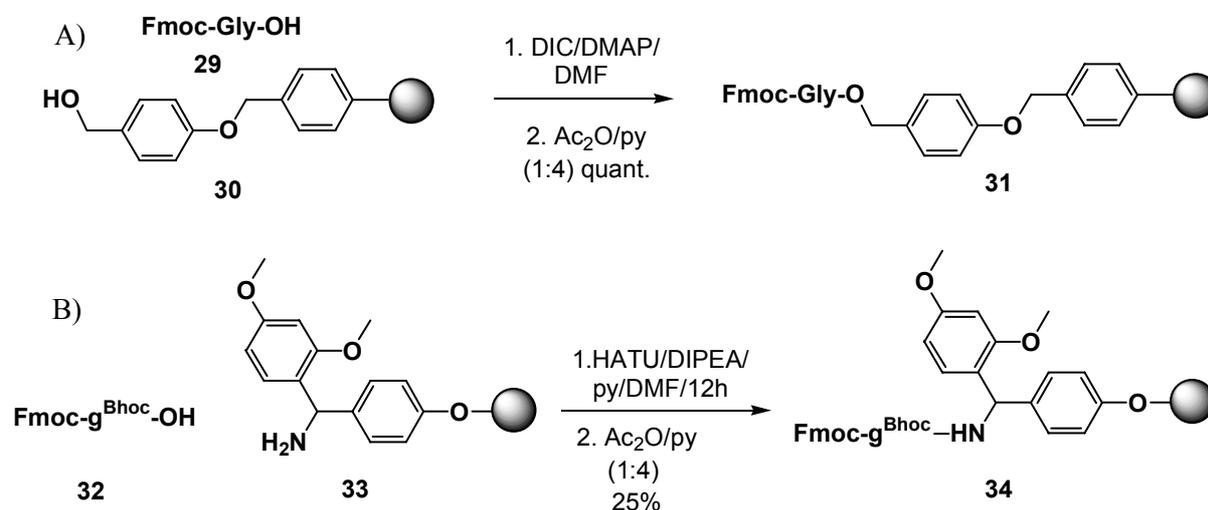


Abbildung 8: Monomerbausteine der Boc/Z-Strategie. A) Fmoc-a^{Bhoc}-OH, B) Fmoc-c^{Bhoc}-OH, C) Fmoc-g^{Bhoc}-OH, D) Fmoc-t-OH.

Als alternative Strategie für die PNA-Synthese wurde die Fmoc/Bhoc-Strategie entwickelt, die sich an die etablierte Fmoc/*t*Bu-Strategie^[30] der Peptidchemie anlehnt. Hierbei dient die basenlabile Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Gruppe als temporäre Schutzgruppe. Ein großer Vorteil der Fmoc/Bhoc-Strategie besteht darin, daß der Beladungsgrad des Harzes und damit die Ausbeuten der einzelnen Kupplungsschritte sich jederzeit durch eine UV-spektroskopische Bestimmung des Piperidinulvenadduktes als Abspaltungsprodukt der Fmoc-Gruppe bestimmen läßt.^[30] Die exocyclischen Aminofunktionen wurden mit der säurelabilen Benzhydryloxycarbonyl-Gruppe (Bhoc)^[29] geschützt.

Anknüpfung an die feste Phase

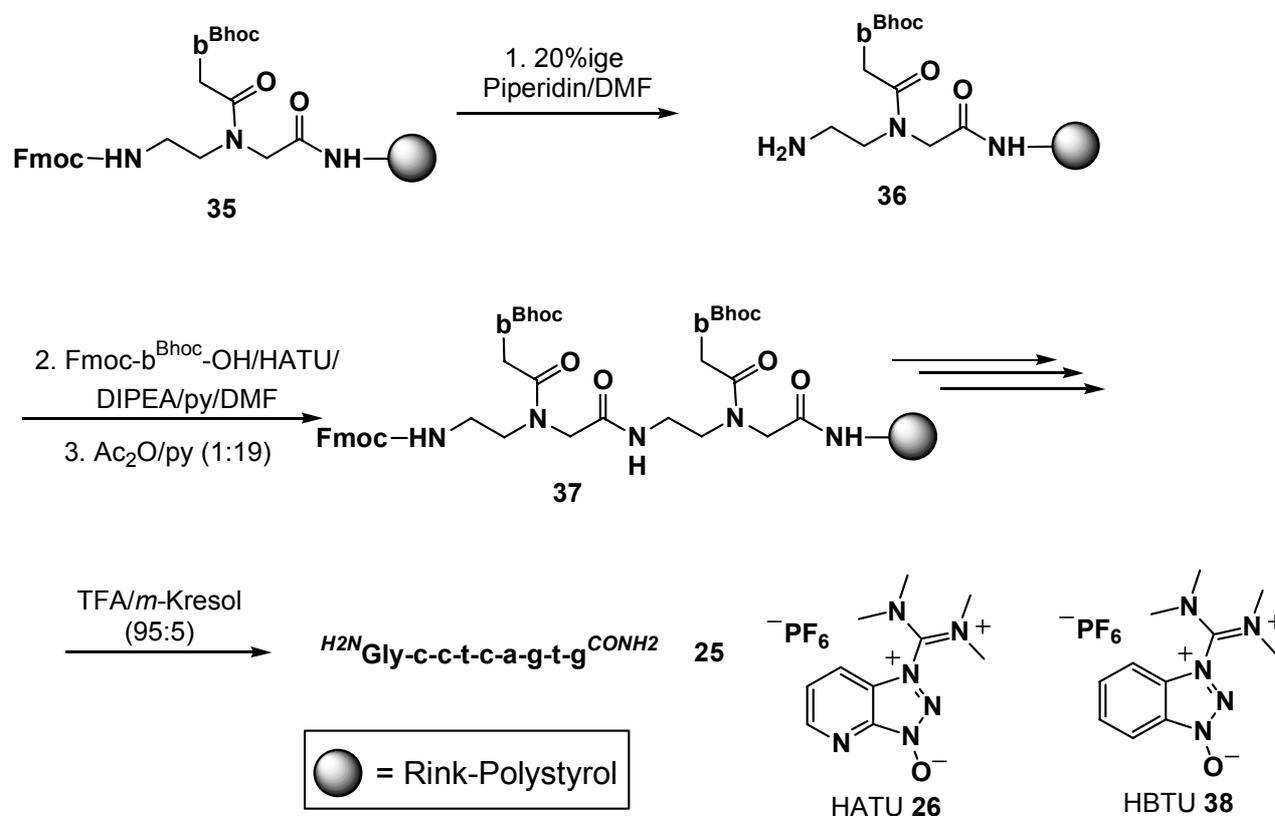
Um eine freie Carbonsäure zu erhalten, wurde das Oligomer am Wang-Harz^[71] **30** aufgebaut. In Analogie zum Hydroxymethylharz **18** der Boc/Z-Strategie wurde hier der erste Baustein über das symmetrische Anhydrid eingeführt. Für den Aufbau von C-terminalen Carboxamiden kam das Rink-Amid-Harz^[72] **33** zum Einsatz, das sich mit 95%iger TFA spalten läßt. Da auch hier eine Amidbindung geknüpft wurde, wurden die Standardreaktionsbedingungen des Fmoc-Syntheseprotokolls (s.u.) verwendet.



Schema 10: Erstbeladung des A) Wang-Harzes **30** und B) Rink-Harzes **33** für die Fmoc/Bhoc-Strategie.

Festphasensynthese nach der Fmoc/Bhoc-Strategie

Die Synthesen nach der Fmoc/Bhoc-Strategie wurden sowohl manuell als auch an dem Syntheseroboter Syro II der Firma MultiSynTech durchgeführt. Der Kupplungsschritt und der Cappingschritt waren identisch mit denen der Boc/Z-Strategie (Schema 11). Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte durch Behandlung mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF. Die Abspaltungszeiten wurden möglichst kurz gehalten (2x 4min), um die Nebenreaktionen der PNA-Synthese im basischen Milieu zu minimieren (vgl. Kap. II.3.1). Die Abspaltung vom Harz sowie die gleichzeitige Demaskierung der exocyclischen Aminofunktionen der Nucleobasen mit 95% TFA lieferte das freie PNA-Oligomer in Lösung.



Schema 11: Manuelle PNA-Festphasensynthese nach der Fmoc/Bhoc-Strategie.

Für den Syntheseroboter Syro II mußte das Protokoll abgewandelt werden. Da aus gerätetechnischen Gründen eine Voraktivierung der Monomere nicht möglich war, konnte als Kupplungsreagenz nicht das effiziente HATU **26** eingesetzt werden. Deshalb mußte auf das weniger reaktive HBTU **38** ausgewichen werden, bei dem die Guanidiniumaddukt-Bildung deutlich schwächer ausgeprägt ist. Um die reduzierte Reaktivität zu kompensieren, wurde das

stöchiometrische Verhältnis der Monomere zum Oligomer auf fünf angehoben und die Kupplungszeit von 90 min auf 4 h ausgedehnt.

IV.2.3 Vergleich der Festphasenstrategien

Zu Beginn der Untersuchungen wurde die Leistungsfähigkeit der unterschiedlichen Synthesemethoden verglichen. Als Testsequenz wurde das PNA-Octamer **25** gewählt, das sowohl nach der Boc/Z- als auch nach der Fmoc/Bhoc-Strategie aufgebaut wurde. Abbildung 9 stellt die HPLC-Chromatogramme der PNA-Rohprodukte, die unmittelbar nach der Abspaltung vom polymeren Träger erhalten wurden, gegenüber.

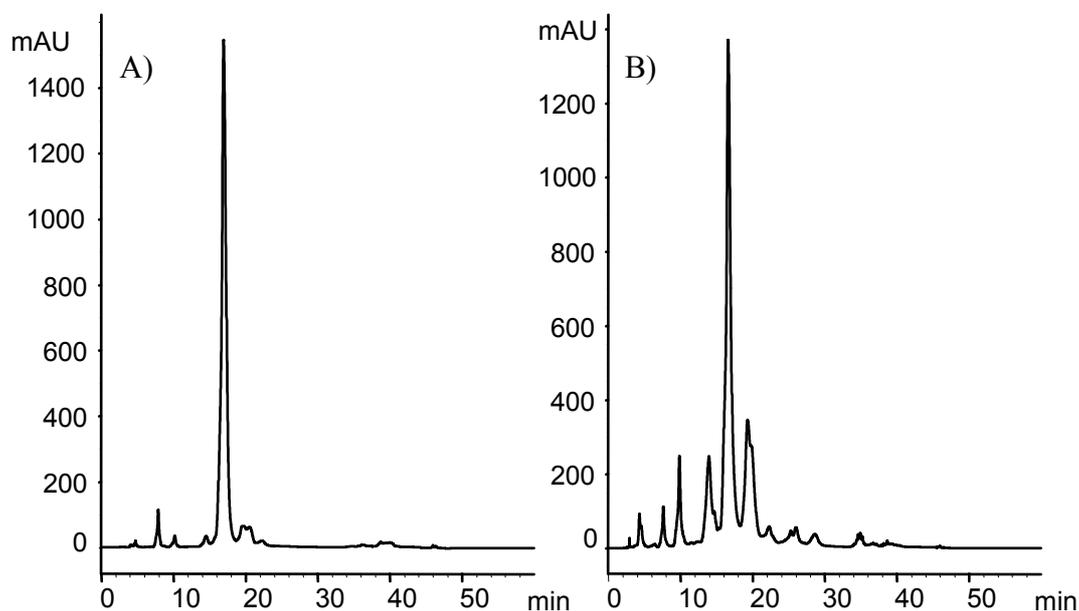


Abbildung 9: HPLC-Chromatogramme des Rohproduktes von **25**. A) Boc/Z-Strategie; B) Fmoc/Bhoc-Strategie; Detektionswellenlänge: $\lambda = 260$ nm.

Das Rohprodukt der PNA, die über die Boc/Z-Strategie aufgebaut wurde, zeigte eine Reinheit von 85% im HPLC-Chromatogramm, während mit der Fmoc/Bhoc-Methode nur eine Reinheit von 56% erzielt werden konnte. Die Aufreinigung durch präparative HPLC lieferte das reine Produkt **25** über die Boc/Z-Strategie in 41%iger und über die Fmoc/Bhoc-Methode in 6%iger Ausbeute. Die Boc/Z-Strategie lieferte demnach nicht nur das reinere Produkt, sondern auch höhere Ausbeuten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im weiteren, wenn die Syntheseplanung es zuließ, die PNA-Oligomere nach der Boc/Z-Methode aufgebaut.

IV.3 Modellstudien zur Templatselektivität

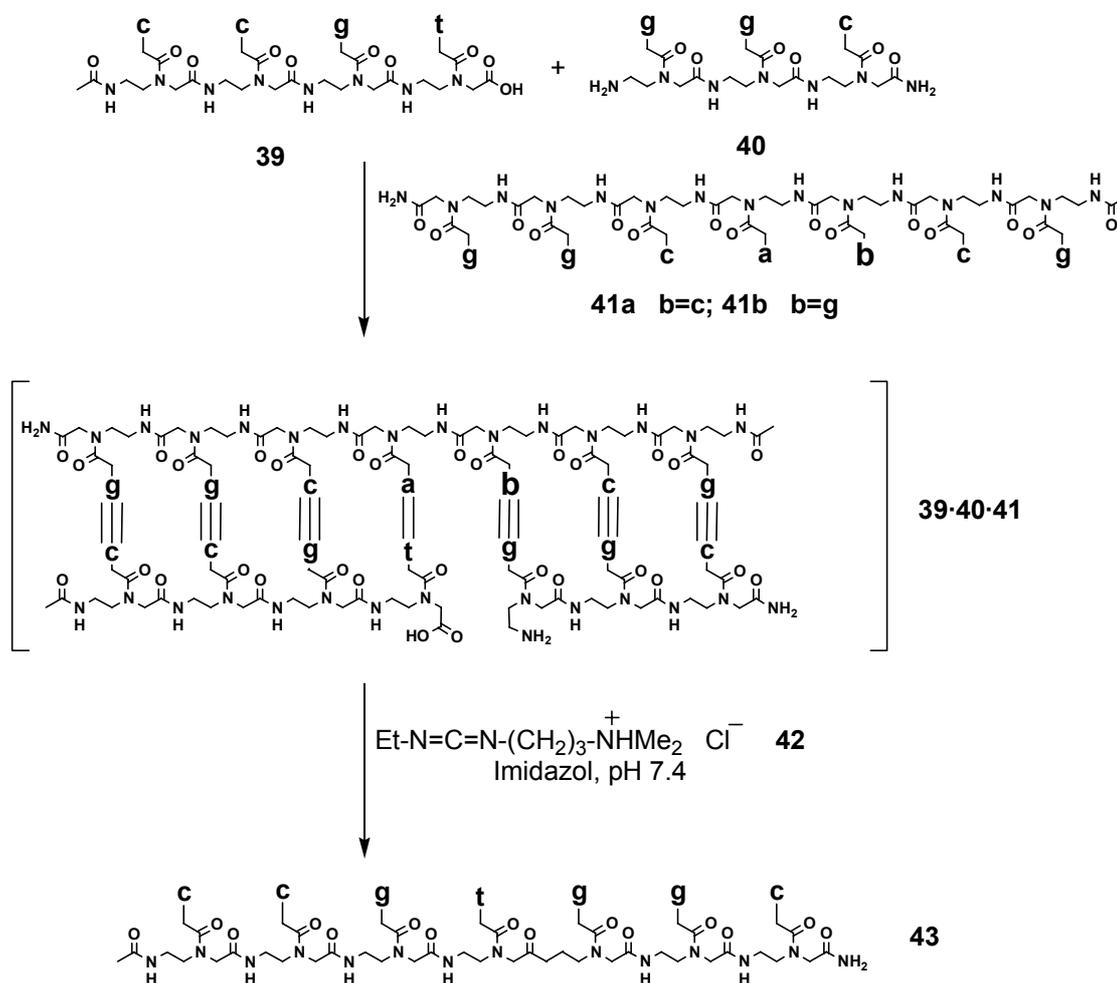
Untersuchungen über die Selektivität von templatgesteuerten PNA-Fragmentverknüpfungen sind noch nicht beschrieben worden. Daher sollte in einem ersten Schritt zunächst einmal am Beispiel kurzer PNA-Fragmente die Genauigkeit der Fragmentverknüpfungen in einem Modellsystem untersucht werden. Darin sollten Bedingungen gefunden werden, unter denen ein zu den PNA-Fragmenten komplementäres Templat von einem Strang mit einer einzigen Fehlbase unterschieden werden kann. In diesem Modellsystem wurde die Verwendung kurzer PNA-Oligomere vorgezogen, um eine Aufspürung eventueller Nebenreaktionen zu erleichtern. Orgel *et al.* zeigten, daß die Oligomerisierung von PNA-Dimeren sowohl durch DNA- als auch durch PNA-Templates beschleunigt werden kann.^[63] Größere Reaktionsbeschleunigungen sollten durch eine Erhöhung der Bindungsstärke erzielt werden können. Eine Möglichkeit zur Steigerung der Templatbindung ist es, längere Fragmente einzusetzen. Aus den oben genannten Gründen wurde dieser Option nicht gefolgt und stattdessen die Verwendung eines PNA-Templates vorgezogen. PNA-PNA-Komplexe sind stabiler als PNA-DNA-Komplexe.^[33] Ein PNA-PNA-Paarungssystem sollte bei gleicher Oligomerlänge zu höheren Templateffekten führen.

IV.3.1 PNA-Fragmentkondensationen

Im Rahmen von Studien zur Entstehung präbiotischen Lebens beschrieben Orgel *et al.* zum ersten Mal eine templatgesteuerte Verknüpfung von PNA-Dimeren,^[60] wobei ihnen als Kupplungsreagenz für die Bildung der Amidbindungen das wasserlösliche Carbodiimid *N*-(Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid **42** (EDC) in einem Imidazolpuffer diente.

Diese Bedingungen adaptierend wurde die Carbodiimid-vermittelte Kondensation des PNA-Tetramers **39** mit dem Trimer **40** untersucht (Schema 12). Der Reaktionsverlauf wurde mittels HPLC verfolgt, indem durch wiederholte Probenentnahme die zeitliche Abhängigkeit der Bildung des Kondensationsproduktes **43** gemessen wurde (Abbildung 10). In Abwesenheit eines Templates und bei einer 160 μM Konzentration der PNA-Fragmente **39** und **40** konnte eine vom Templat unbeeinflusste Hintergrundreaktion beobachtet werden. Diese Bedingungen

fürten zur geringfügigen Bildung des Verknüpfungsproduktes **43**. Die HPLC-Analyse bekundete eine 6%ige Verknüpfungsausbeute nach 24 h Reaktionszeit.



Schema 12: PNA-Fragmentkondensation des Tetramers **39** und des Trimers **40** an dem komplementären PNA-Template **41a** (X=c) sowie dem fehlpaarendem Template **41b** (X=g). Konzentration der PNA-Oligomere: 160 μM .

Wie Abbildung 10 zu entnehmen ist, beschleunigte die Zugabe des komplementären Templates die Produktbildung und erhöhte die Ausbeute um das dreifache. Erklärlich wird dies durch die Bildung des ternären Komplexes **39-40-41**, in dem, wie in Schema 12 abgedeutet, die reaktiven Gruppen in einer für die Verknüpfung begünstigten Geometrie vororientiert werden. Um die Selektivität dieser molekularen Erkennung zu ergründen, wurde im weiteren die Bildung von **43** in Anwesenheit eines Templates verfolgt, das sich in einer Nucleobase von dem komplementären Template **41a** unterschied und damit den Fall einer Einzelbasenmutation simulieren sollte. Das fehlpaarende Template **41b** war ebenso in der Lage, die Produktbildung zu beschleunigen. Interessanterweise war die Verknüpfung am

einzelbasenfehlpaarenden Templat **41b** ein effizienterer Prozeß als am komplementären Templat **41a**. Die Ursache dieses Phänomens ist unklar. Jedoch weisen diese Ergebnisse darauf hin, daß diese Bedingungen nicht geeignet sind, Einzelbasenmutationen selektiv nachweisen zu können.

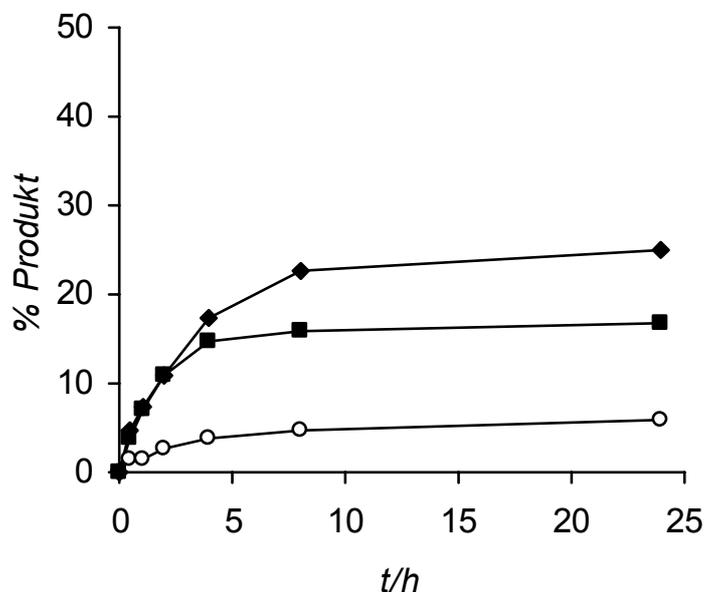


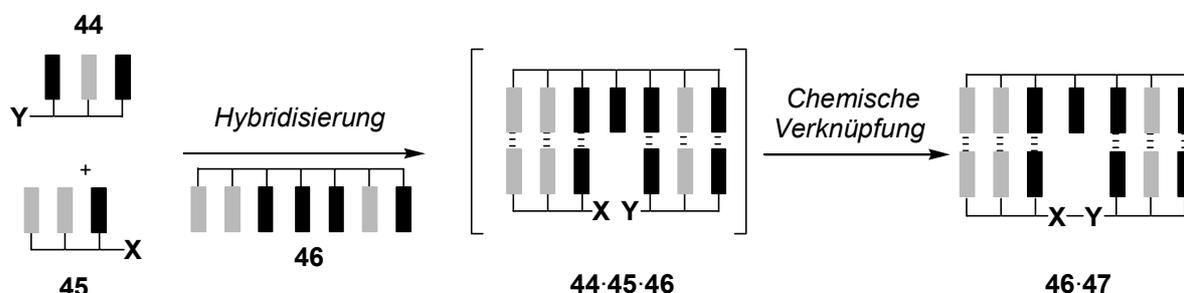
Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung aus **39** und **40** ohne Templat (○), in Gegenwart des komplementären Templates **41a** (■) und des fehlpaarenden Templates **41b** (◆).

IV.3.2 Konzept der Basenlückenverknüpfung

Aufgrund der mangelnden Selektivität der PNA-Segmentverknüpfung mußte ein alternatives Konzept entwickelt werden. Folgende Überlegungen legten die Basis für die Gestaltung eines selektiveren Nachweissystems:

Bei Reaktionen mit einem produktähnlichen Übergangszustand sollte die Stabilität des entstehenden Produktduplex den Reaktionsverlauf beeinflussen. Zur Erziehung einer höheren Templatselektivität sollte daher der Einzelbasenfehlpaar-Duplex stärker destabilisiert werden als der perfekte Duplex. Bei Nucleinsäuren setzt sich die Stabilität eines Doppelstranges im wäßrigen Medium aus zwei Faktoren zusammen: die selektiven Wasserstoffbrückenbindungen, die sich getreu den Watson-Crick-Regeln zwischen komplementären Basenpaaren ausbilden, sowie die unselektiven aber stärkeren hydrophoben Kräfte (π - π -Stacking). Die Selektivität gegenüber Fehlpaarungen sollte sich daher steigern lassen, indem die unspezifischen π - π -Stacking-Kräfte destabilisiert werden. Aus UV-spektroskopischen und

calorimetrischen Studien von DNA-Duplices ist bekannt, daß der Verlust einer Nucleobase, d.h. die Gegenwart einer Basenlücke, die Duplex-Stabilität drastisch reduziert.^[73, 74] Eine Erhöhung der Templaselektivität sollte daher durch die Inkorporierung einer Basenlücke möglich sein (Schema 13).



Schema 13: Konzept der Basenlückenverknüpfung. Anstatt von PNA-Fragmenten werden die PNA-Aminosäure-Konjugate **44** und **45** unter Ausbildung einer Basenlücke miteinander verknüpft.

Durch die Erzeugung einer Basenlücke bei der Verknüpfung der beiden PNA-Fragmente sollte die Kooperativität der Basenstapelung unterbrochen und damit der relative Anteil der unselektiven π - π -Stacking-Kräfte an der Stabilität reduziert werden. Der ternäre Komplex **44-45-46** könnte damit soweit destabilisiert werden, daß weitere Störfaktoren, wie z.B. eine Basenfehlpaarung in direkter Nachbarschaft, von dem System nicht mehr toleriert werden sollten. Die selektiven Watson-Crick-Wechselwirkungen zwischen den Strängen sollten für die Stabilität von **44-45-46** an Bedeutung gewinnen und die Selektivität gegenüber Basenfehlpaarungen zunehmen.

Zur Realisierung der Basenlücke wurde das zentrale Thymin durch ein isosteres Dipeptid ersetzt (Abbildung 11), das durch die Verknüpfung zweier PNA-Aminosäure-Konjugate **44** und **45** gebildet werden sollte. Somit wurde das Problem der Verknüpfung zweier PNA-Fragmente auf die Bildung eines Dipeptides zurückgeführt.

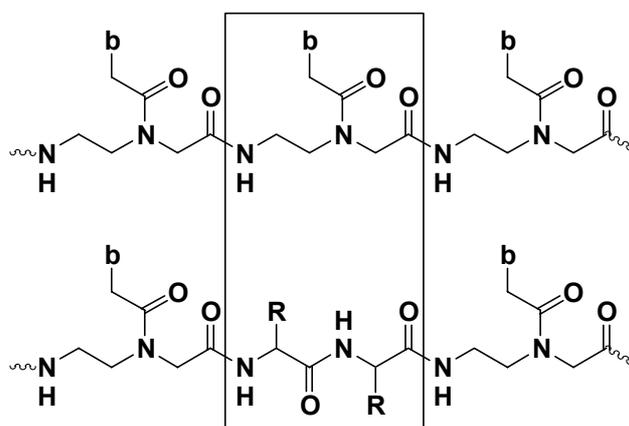


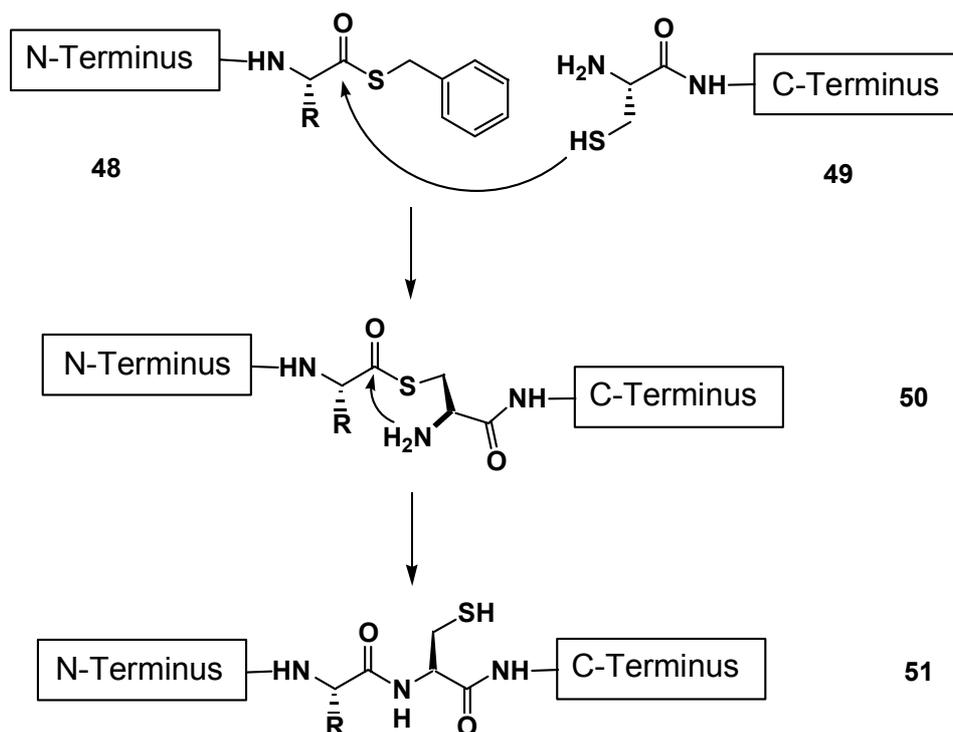
Abbildung 11: Der Austausch eines PNA-Monomers durch ein isosteres Dipeptid erzeugt eine Basenlücke.

Alternativ zu den Überlegungen bezüglich der Unterbrechung der Basenkooperativität könnte angenommen werden, daß die Verknüpfungsreaktionen eine gewisse Flexibilität der reaktiven Gruppen erfordert. Bei den PNA-Fragmentkondensationen erfolgte die verhältnismäßig starke Vororientierung in einer Weise, daß die reaktiven Enden sich nicht in einer für die Bindungsknüpfung notwendigen Geometrie anordnen konnten. Eine flexiblere Anordnung der reaktiven Enden, wie sie bei den PNA-Aminosäure-Konjugaten **44** und **45** vorliegt, könnte daher eine effizientere und selektivere Verknüpfung zulassen.

IV.3.3 *Native Chemical Ligation* von PNA-Aminosäure-Konjugaten

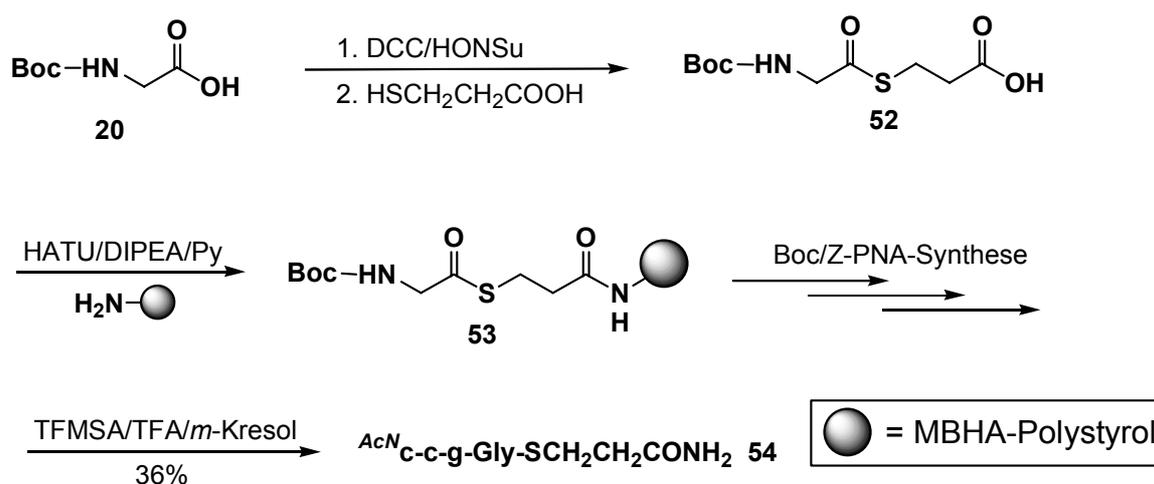
Seit ihrer Entwicklung 1994^[75] erwies sich die *Native Chemical Ligation* als leistungsfähigste Methode zur Verknüpfung ungeschützter Peptidfragmente (Schema 14).^[76] Hierbei wird der Thioester **48** mit einem Fragment **49** umgesetzt, das am *N*-Terminus ein freies Cystein trägt. Im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt greift zunächst der nucleophile Schwefel des Cysteins den Thioester an und es kommt zu einem Thiolaustausch. Im Anschluß folgt ein sofortiger intramolekularer Acyltransfer von der Seitenkettenthiolegruppe auf die Aminogruppe des Cysteins. Als Resultat entsteht in **51** eine natürliche Peptidbindung.

Die in der Peptidchemie äußerst erfolgreich eingesetzte *Native Chemical Ligation* wurde im folgenden auf die Templat-gesteuerte Verknüpfung zweier PNA-Aminosäure-Konjugate übertragen. Hierfür mußten zunächst die beiden PNA-Aminosäure-Konjugate **54** und **55** hergestellt werden. Während **55** analog zum PNA-Trimer **40** aufgebaut werden konnte, mußte die Synthesestrategie für den Aufbau des Thioesters **54** modifiziert werden (Schema 15).^[77]



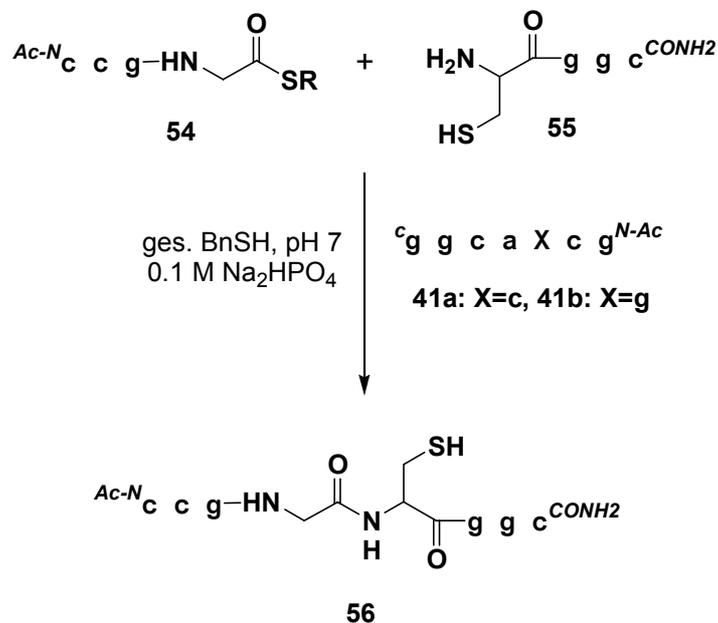
Schema 14: Prinzip der *Native Chemical Ligation* zur Verknüpfung zweier ungeschützter Peptidfragmente.

Der Aufbau der benötigten Thioesterstruktur erfolgte durch die Kupplung von Boc-geschütztem Glycin **20** an 3-Mercaptopropionsäure, die nach Aktivierung des Glycins mit DCC und Zugabe von Hydroxysuccinimid in 65 %iger Ausbeute gelang.^[78] Der Thioester **52** wurde im Anschluß an das MBHA-Harz **15** geknüpft.



Schema 15: Synthese des PNA-Glycin-Thioesters **54** als Ausgangsverbindung für die *Native Chemical Ligation*.

Der Boc/Z-Strategie folgend wurden die drei PNA-Monomere gekuppelt, der *N*-Terminus acetyliert und anschließend das Oligomer vom Harz in 36% Ausbeute abgespalten. Der erhaltene Thioester **54** ist im sauren und unter Ausschluß von Nucleophilen auch im neutralen Medium stabil.



Schema 16: Basenlückenkupplung der PNA-Aminosäure-Konjugate **54** und **55** unter den Bedingungen der *Native Chemical Ligation*; Oligonucleotidkonzentration: 160 μ M.

Die beiden PNA-Aminosäure-Konjugate **54** und **55** wurden den Bedingungen der *Native Chemical Ligation* ausgesetzt und die Bildung des Produktes **56** mittels HPLC verfolgt. Als Reaktionsmedium diente ein mit Benzylmercaptan gesättigter 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 7). In einer vorgelagerten Reaktion bildete sich in einer Thiolaustauschreaktion aus **54** der Benzylmercaptanester, der als eigentlicher Aktivester die *Native Chemical Ligation* vermittelt. Zudem verhinderte die Anwesenheit des BnSH die Oxidation des Cysteins zum Cystin. Wie Abbildung 12 zu entnehmen ist, wurde bereits in Abwesenheit eines Templates das Produkt **56** rasch und in hoher Ausbeute gebildet. Während die Carbodiimid-vermittelte Fragmentverknüpfung in einem zeitlichen Rahmen von Stunden ablief und der Umsatz nur 6% betrug, bildete die *Native Chemical Ligation* das Produkt **56** unter den gewählten Bedingungen bereits nach 150 min in 77% Ausbeute. Die Zugabe des komplementären Templates **41a** führte zu Beginn der Reaktion zu einer Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit. Der Templateeffekt verringerte sich jedoch bereits nach wenigen Minuten, so daß gegen Ende der Reaktion das Produkt **56** in identischen Ausbeuten gebildet wurde. In

Anwesenheit des fehlpaarenden Templates **41b** konnte keine Beschleunigung der Produktbildung nachgewiesen werden, und der kinetische Verlauf war von dem der Hintergrundreaktion nahezu ununterscheidbar. Damit deuteten diese Ergebnisse die prinzipielle Richtigkeit des Konzeptes der Basenlückenverknüpfung an. Der Einfluß des komplementären Templates war aber noch zu gering, um im Umkehrschluß auf dessen Anwesenheit schließen zu können.

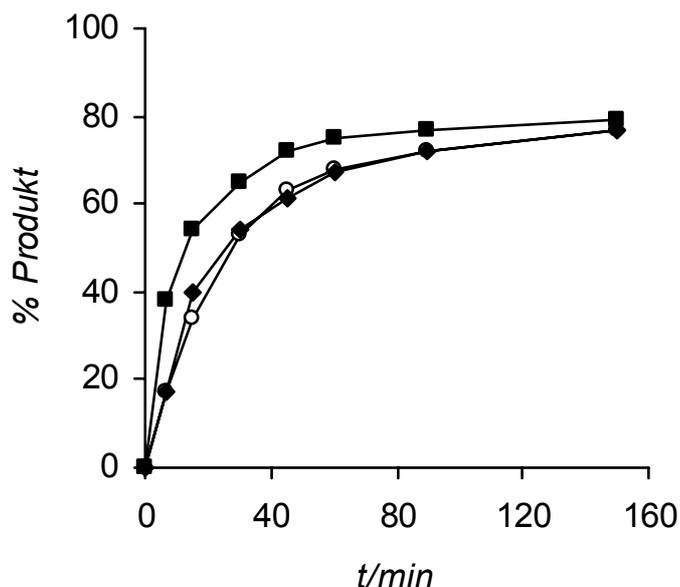


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der Bildung des Verknüpfungsproduktes **56** unter den Bedingungen der *Native Chemical Ligation* aus **54** und **55** ohne Templat (○), in Gegenwart des komplementären Templates **41a** (■) und des fehlpaarenden Templates **41b** (◆).

Die geringe Auswirkung des Templateffektes bei der *Native Chemical Ligation* begründet sich möglicherweise in der ungünstigen Geometrie der Zwischenverbindung **57**. Der von DNA vorgegebene Abstand zwischen zwei Nucleobasen besteht aus sechs Atombindungen. PNA aber auch ein Dipeptid (Abbildung 13.A–C), wie z.B. das Endprodukt **56** der *Native Chemical Ligation*, weisen ebenfalls diesen Abstand auf. Im Gegensatz dazu stehen in der Zwischenverbindung **57** (Abbildung 13.D) die beiden Fragmente in einem ungünstigeren Abstand von sieben Atombindungen zueinander. Durch diese Verlängerung um eine Atombindung können sich die räumlich gerichteten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den gegenüberliegenden Nucleobasen der Fragmente und des Templates nicht mehr optimal ausbilden. Daraus resultiert eine deutliche Destabilisierung des Duplexes aus **41** und **57** und das Templat ist nicht mehr in der Lage, die Bildung von **56** zu beschleunigen.

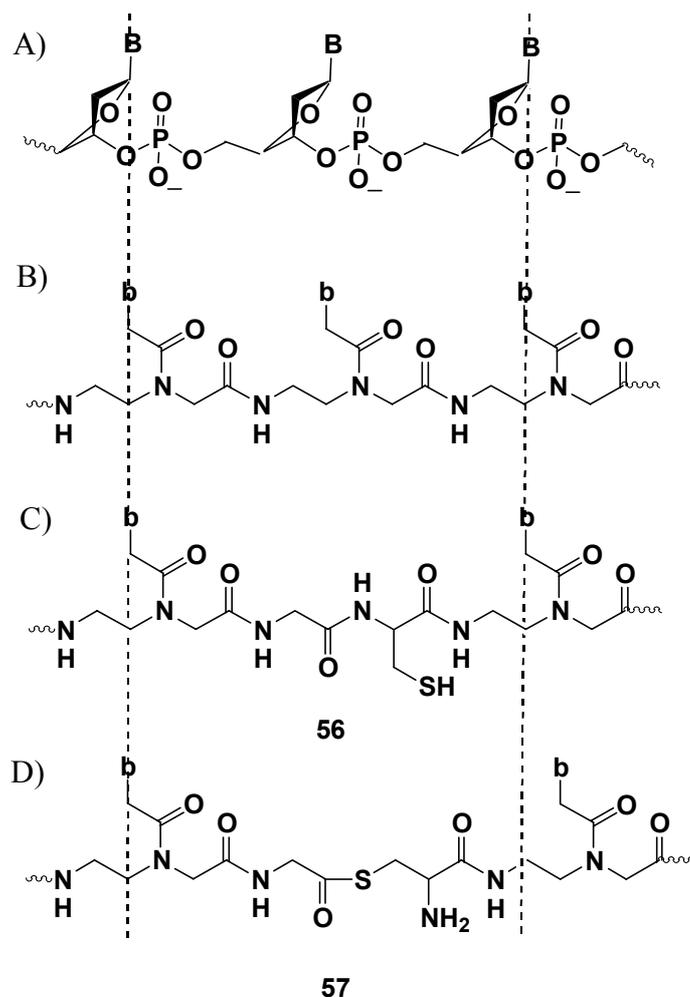
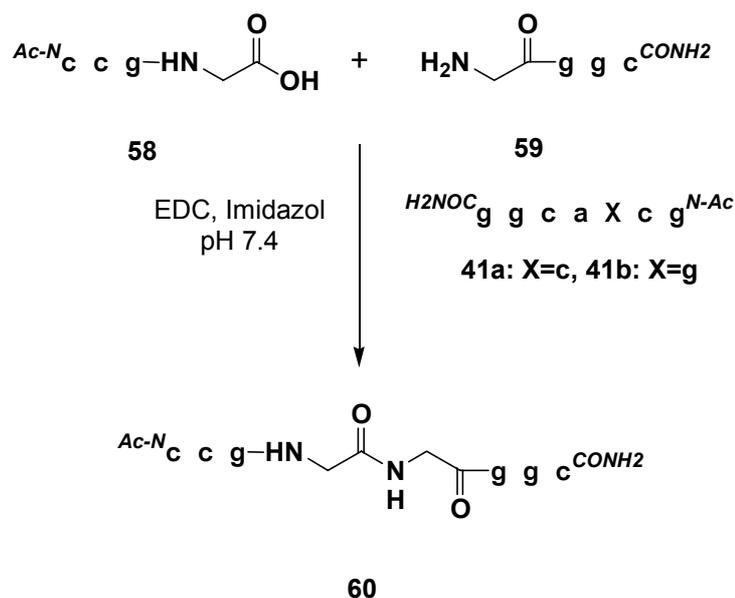


Abbildung 13: Vergleich der Bindungsabstände zwischen den Nucleobasen in A) DNA, B) PNA C) in dem Endprodukt **56** und D) in der Zwischenverbindung **57** der *Native Chemical Ligation*.

Vor dem Hintergrund der Arbeiten von Ghadiri *et al.*^[79] ist der unzureichende Templateffekt bei der Kupplung von PNA-Fragmenten durch die *Native Chemical Ligation* bemerkenswert. Sie nutzten erfolgreich die *Native Chemical Ligation* als Kupplungsmethode zur Entwicklung des ersten selbstreplizierenden Peptidsystems, das auf der autokatalytischen Synthese eines 32 Aminosäure langen α -helicalen Peptids beruht. Hierbei vermittelte die hydrophobe Interaktion einer Leucin-Zipper-Domäne die molekulare Erkennung zwischen Templat und Reaktanden. Aus einem Vergleich der beiden unterschiedlichen Prinzipien der molekularen Erkennung kann man schließen, daß die gerichteten Wasserstoff-Brückenbindungen, wie sie bei den Nucleinsäuren vorkommen, gegenüber räumlichen Änderungen empfindlicher reagieren als die hydrophoben Wechselwirkung zwischen Peptiden.

IV.3.4 Carbodiimid-vermittelte Kupplung zweier PNA-Glycin-Konjugate

Die bisher gewählten Bedingungen für die Verknüpfung zweier PNA-Fragmente erwiesen sich für einen Nachweis von Einzelbasenmutationen als unzureichend. Daher diente die Kupplung der beiden PNA-Glycin-Konjugate **58** und **59** als ein zweites Beispiel für die Basenlückenverknüpfung. Analog zu den Bedingungen der PNA-Fragmente **39** und **40** diente erneut das wasserlösliche Carbodiimid EDC **42** als Kupplungsreagenz in einem Imidazolpuffer.



Schema 17: Basenlückenverknüpfung der PNA-Glycin-Konjugate **58** und **59** an dem komplementären PNA-Templet **41a** sowie dem fehlpaarenden Templet **41b**; Oligonucleotidkonzentration: 160 μM .

Vergleichbar mit den Beobachtungen der in Abbildung 10 dargelegten PNA-Fragmentkondensation war in Abwesenheit eines Templates eine schwache Hintergrundreaktion nachweisbar. Abbildung 14 zeigt, daß nach 24 h das Produkt **60** in 8% Ausbeute gebildet wurde. Die Zugabe des komplementären Templates **41a** bewirkte eine Beschleunigung der Produktbildung um das 5fache, so daß nach 24 h **60** in 37% Ausbeute gebildet wurde. Für den Nachweis einer Einzelbasenmutation war nun die Frage entscheidend, wie sich das fehlpaarende Templet **41b** unter diesen Bedingungen verhielt. Die Präsenz des fehlpaarenden Templates zeigte keinen signifikanten Einfluß und die Produktbildung verblieb auf dem Niveau der Hintergrundreaktion. Daraus folgt, daß die Carbodiimid-vermittelte Verknüpfung zweier PNA-Glycin-Konjugate eine hohe Empfindlichkeit gegenüber der Templetsequenz

aufweist. Diese Bedingungen scheinen daher für eine Unterscheidung von Einzelbasenmutationen bestens geeignet zu sein.

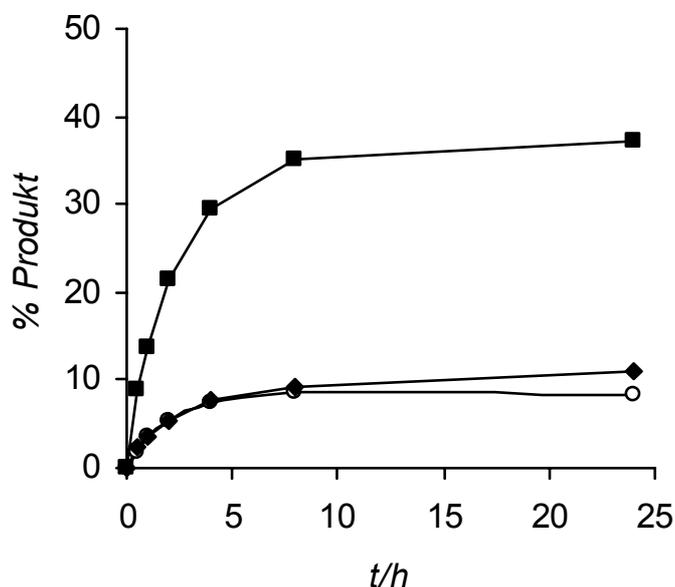
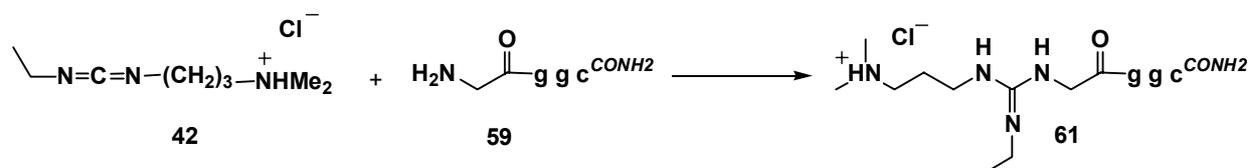


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der Bildung des Verknüpfungsproduktes **60** aus den PNA-Glycin-Konjugaten **58** und **59** ohne Templat (○), in Gegenwart des komplementären Templates **41a** (■) und des fehlpaarenden Templates **41b** (◆).

Ein besonderes Merkmal ist eine Erwähnung wert. So sollte in einem idealen System die Gegenwart eines Templates nur die Geschwindigkeit, nicht aber den Gesamtumsatz der Reaktion beeinflussen. Diese idealen Bedingungen sind beispielsweise durch die *Native Chemical Ligation* verwirklicht, bei der zu Beginn der Reaktion das Templat die Produktbildung beschleunigt, auf den Gesamtumsatz nach fortgeschrittener Reaktionszeit jedoch keinen Einfluß hat. Ganz anders verhält es sich bei der Carbodiimid-vermittelten Reaktion. Hierbei erreichen die Templat-gesteuerte und die Hintergrundreaktion zwischen sechs und acht Stunden gleichzeitig eine Plateau-Phase. Das Produktverhältnis zwischen beiden bleibt konstant und die Graphen nähern sich im Gegensatz zum idealen Verhalten einander nicht an. Dieses Abweichen vom idealen System ist möglicherweise auf die Hydrolyse des Kupplungsreagenzes EDC zurückzuführen. Demnach käme die langsame Hintergrundreaktion verfrüht zum Erliegen, da das benötigte Kupplungsreagenz EDC bereits hydrolysiert ist, so daß sie den Vorsprung der schnellen Templat-gesteuerten Reaktion auch nach fortgeschrittener Reaktionszeit nicht mehr einholen könnte. Tatsächlich führte eine erneute Zugabe von EDC zu weiterem Umsatz, allerdings ohne Einfluß auf das

Produktverhältnis. Dieses Phänomen könnte für eine diagnostische Anwendung von unmittelbarem Nutzen sein, da der Zeitpunkt der Probenentnahme irrelevant ist und stets zum gleichen Ergebnis führt.

Die Studien anhand des Modellsystems ermöglichten die Identifizierung einer weiteren Nebenreaktion. Die hohen Konzentrationen an EDC (0.3 M) begünstigten einen Angriff des EDCs an die *N*-terminale Aminogruppe des Nucleophils **59** und führten zur Ausbildung des Guanidiniumsalzes **61** (Schema 18).

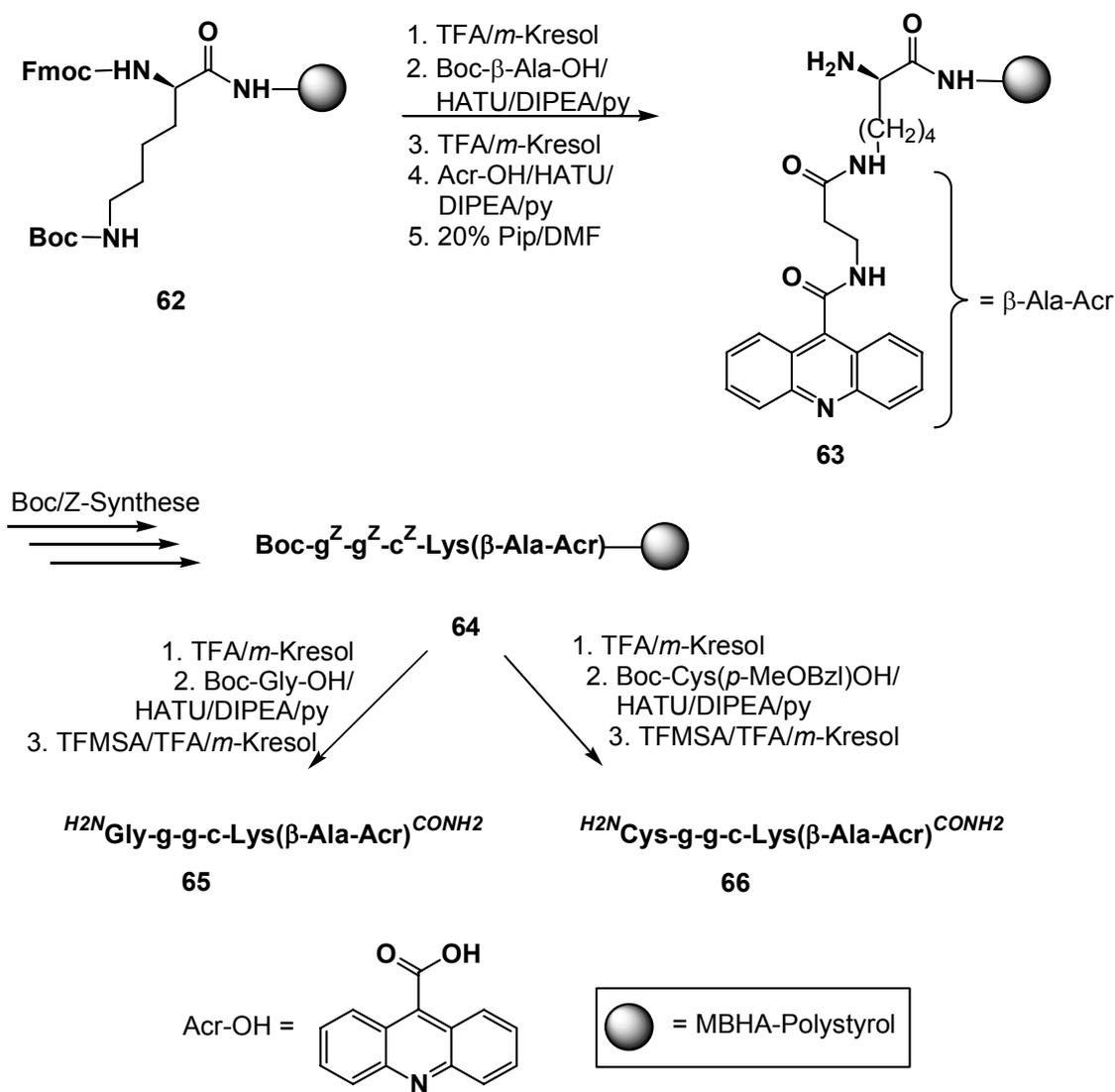


Schema 18: Bildung des Guanidiniumsalzes **61** aus dem Nucleophil **59** und dem Kupplungsreagenz EDC **42**.

Das Ausmaß dieser Nebenreaktion scheint interessanterweise vom Templat abhängig zu sein. In Abwesenheit eines Templates wurde laut HPLC-Analyse das EDC-Addukt **61** in 18% und das Verknüpfungsprodukt **60** zu 8% gebildet. Ähnliche Werte von 17% Addukt **61** und 11% **60** wurden in Gegenwart des einzelbasenfehlpaarenden Templates **41b** ermittelt. Dagegen wurden in Gegenwart des perfekt komplementären Templates **41a** nur 12% des EDC-Adduktes **61** aber 37% des Verknüpfungsproduktes **60** analysiert. Die Gegenwart des komplementären Templates scheint demnach die Nebenreaktion zu unterdrücken. Erklärlich wird dies unter der Annahme, daß nur das perfekt komplementäre Templat **41a** das Nucleophil **59** fest an sich binden kann und vor dem Angriff des EDCs "schützt". Demnach sollte die Adduktbildung zur Diskriminierung zwischen den Templaten beitragen. In den folgenden Beispielen wurde deshalb stets die nucleophile Verknüpfungssonde als variable Sonde mit der Mutationsposition gewählt.

IV.3.5 Einfluß eines Interkalatorfarbstoffes auf die Selektivität

In den vorangegangenen Beispielen wurde die Bildung des Kupplungsproduktes mittels HPLC verfolgt, die jedoch für geringe Konzentrationen zu unempfindlich ist. Durch die Anbindung eines Fluoreszenz-Farbstoffes an die PNA sollte die Nachweisempfindlichkeit gesteigert werden. Die Wahl fiel dabei auf den Duplex-stabilisierenden Interkalatorfarbstoff Acridin, für den Göbel *et al.* einen positiven Einfluß auf die Templat-vermittelte Oligomerisierung von DNA feststellten.^[80]



Schema 19: Festphasensynthese der Acridin-haltigen Nucleophile 65 und 66.

Der Interkalatorfarbstoff Acridin zeichnet sich durch eine hohe Stabilität gegenüber Säuren aus, so daß er selbst den harschen Abspaltungsbedingungen von TFMSA standhält. Für die Synthese der markierten PNA wurde daher die effiziente Boc/Z-Methode gewählt, wobei geplant war, den Farbstoff an der festen Phase einzuführen (Schema 19). Ausgehend vom immobilisierten Lysinderivat **62** wurde die Boc-Schutzgruppe entfernt und die freigesetzte ϵ -Aminogruppe zur Anbindung des Fluorophors genutzt. Nach der Entfernung der Fmoc-Gruppe durch Piperidin, wurden die Boc/Z-geschützten PNA-Monomere der Reihe nach gekuppelt, das Harz **64** in zwei Reaktoren aufgeteilt und als letzter Synthesebaustein Boc-Glycin-OH bzw. Boc-Cys(*p*-MeOBzl)-OH eingeführt. Nach der Abspaltung von der festen Phase wiesen die beiden Rohprodukte eine Reinheit nach HPLC-Chromatogramm von 77 und 49% auf (Abbildung 15). Acridin-markierte PNAs können folglich an der festen Phase effizient aufgebaut werden.

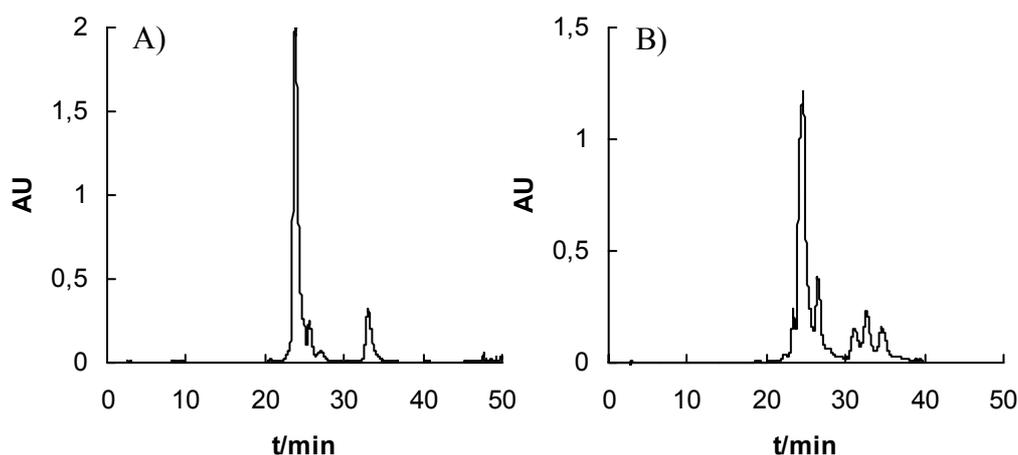


Abbildung 15: HPLC-Chromatogramme nach der Abspaltung der Acridin-markierten Nucleophile **65** (A) und **66** (B) von der festen Phase.

Die markierten Nucleophile **60** und **66** wurden nun unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel IV.3.3. und IV.3.4. umgesetzt, um den Einfluß des Acridins auf die Templatgesteuerten Verknüpfungsreaktionen zu testen. Abbildung 16 zeigt, daß vor allem bei der Carbodiimid-vermittelten Reaktion von **58** mit **65**, im Einklang mit den Ergebnissen von Göbel *et al.* eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit und der Ausbeute zu beobachten war. Dieser Effekt wirkte sich jedoch negativ auf die Templatselektivität aus. Die Kupplung der Konjugate **58** und **65** verlief zwar an dem komplementären Templat **41a** und dem

fehlpaarenden Templat **41b** mit unterschiedlicher Effizienz, das Diskriminierungsvermögen erreichte jedoch nicht jenes Systems ohne Marker in Abbildung 14.

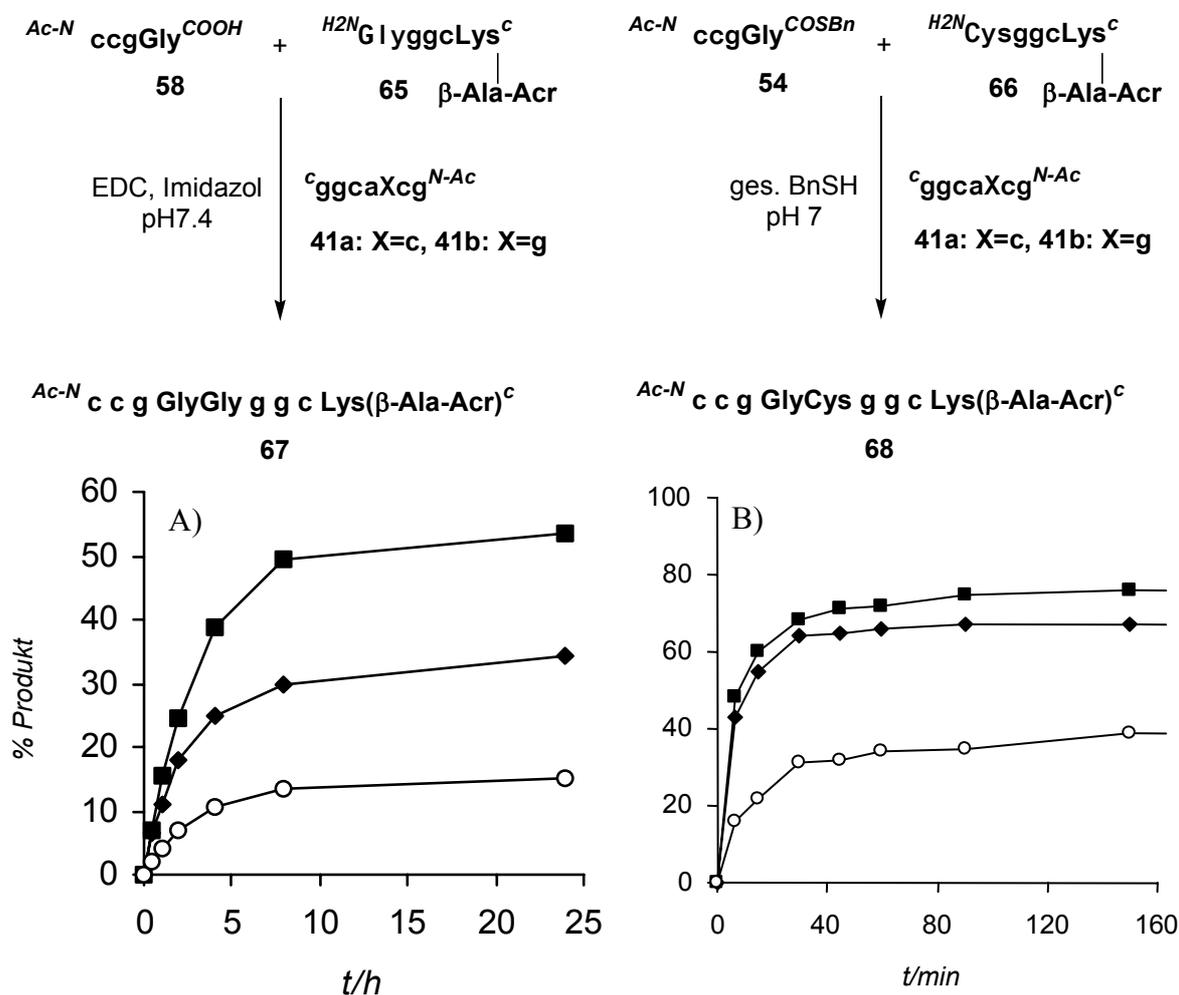


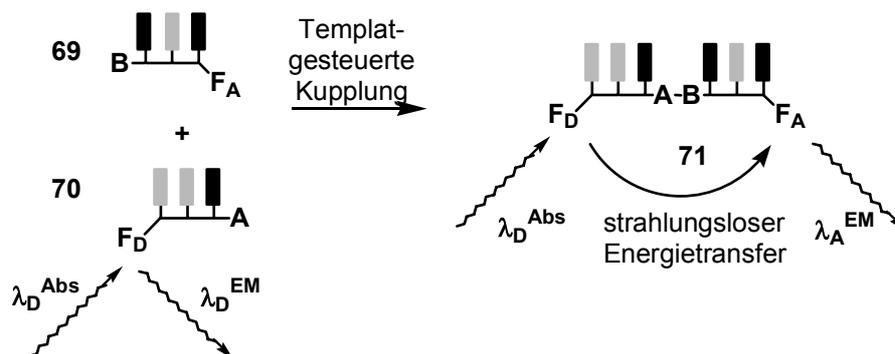
Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Basenlückenkupplung mit Acridin-Marker. A) Carbodiimid-vermittelte Kondensation von **58** und **65**; B) *Native Chemical Ligation* von **54** und **66** ohne Templat (○), in Gegenwart des komplementären Templates **41a** (■) und des fehlpaarenden Templates **41b** (◆). Reaktionsbedingungen analog Schema 17 für A) bzw. Schema 16 für B); Oligonucleotidkonzentration: 160 μM .

Überraschenderweise führte die Anbindung des Acridins bei der *Native Chemical Ligation* zu einem deutlichen Templateffekt (Abbildung 16B). Dieser war aber nicht auf eine Beschleunigung der Templat-gesteuerten Reaktion zurückzuführen. Sowohl in Gegenwart des komplementären Templates **41a** als auch des fehlpaarenden Templates **41b** wurde das Verknüpfungsprodukt **68** in sehr guten Ausbeuten gebildet. Interessanterweise reduzierte die Anbindung des Acridins allerdings die Ausbeute der von Templat unbeeinflussten Hintergrundreaktion von 77% von **56** (Abbildung 12) auf 37% von **68**. Die Anbindung eines

Farbstoffes an eine PNA-Sonde kann die Effizienz der Verknüpfungsreaktion reduzieren und hat folglich einen deutlichen Einfluß auf die Reaktivität der Sonden (vgl hierzu Kap. IV.4.2). Der Vergleich der nichtmarkierten mit den Acridin-markierten Kupplungsreaktionen in Abwesenheit und Anwesenheit der beiden Template läßt schließen, daß Acridin eine unspezifische Assoziation der PNA-Oligomere induziert und damit als Marker für Sequenzuntersuchungen nicht geeignet ist.

IV.4 Versuch eines fluoreszenzspektroskopischen Nachweises von Einzelbasenmutationen in DNA

Für das in den Modelluntersuchungen (s. Kap. IV. 3) ausgeführte PNA-Verknüpfungssystem war in einem weiteren Schritt die Verwendung von DNA-Templaten biologisch-medizinischer Relevanz geplant. In den bisher geschilderten Untersuchungen diente die HPLC-Chromatographie als Detektionsmethode zur Reaktionskontrolle. Dabei stieß die HPLC-Analyse an ihre Grenzen, die weitergehende Studien erschwerten. Die unzureichende Empfindlichkeit des UV-Detektors der HPLC verhinderte eine geringere Probenkonzentration, wie für diagnostische Anwendungen erforderlich wären. Zudem erforderte die mangelnde Trennleistung lange Meßzeiten. Eine fluoreszenzspektroskopische Detektion verfügt über eine hohe Empfindlichkeit, ein Umstand, der in vielen DNA-Nachweisverfahren zum Einsatz kommt.^[81]



Schema 20: Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zur homogenen Detektion der PNA-Verknüpfung.

Im Format eines homogenen Nachweissystems muß sich eine meßbare Eigenschaft als Folge der Fragmentkupplung ändern (vgl. Kap. II.2.2).^[13] Eine solche Signaländerung vermittelt beispielsweise der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET).^[16] Hierbei treten zwei Fluoreszenzmarker, F_D und F_A , in eine abstandsabhängige Wechselwirkung (Schema 20). Entscheidend ist der räumliche Abstand und nicht der Bindungsabstand. Infolge der Templat-gesteuerten Verknüpfung der beiden Fluoreszenz-markierten PNA-Aminosäure-Konjugate **69** und **70** sollten die Fluoreszenzmarker F_D und F_A in unmittelbare Nachbarschaft treten und so einen strahlungslosen Energieübertrag vom angeregten FRET-Donor F_D auf den FRET-

Akzeptor F_A ermöglichen. Die Entstehung des Kupplungsproduktes **71** würde in diesem Szenario durch eine Abnahme der Emissionsintensität von λ_D^{EM} und zeitgleicher Zunahme der Intensität von λ_A^{EM} erkennbar. Ob sich zwei Fluorophore als FRET-Paar eignen, hängt in erster Linie davon ab, in wieweit das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlappt.

IV.4.1 Cystic-Fibrosis-Transmembran-Regulator-Gen (CFTR-Gen)

Eine homogene Detektion der PNA-Verknüpfungsreaktion wurde an einem ersten Beispiel der S549R2-Punktmutation^[82] aus dem Gen des Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Regulators (CFTMR)^[83] erprobt, die für das Auftreten der Zystischen Fibrose (Mukoviszidose) verantwortlich ist. Als FRET-Paar kamen die Fluorophore 3-(4-Maleimidylphenyl)-7-(diethylamino)-4-methylcoumarin (CPM) **72** und Oregon Green 488 (OG) **73** zum Einsatz. Der CPM-Farbstoff zeichnet sich durch eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute aus und eignet sich daher als ein exzellenter Donor für den OregonGreen-Fluorophor.^[84]

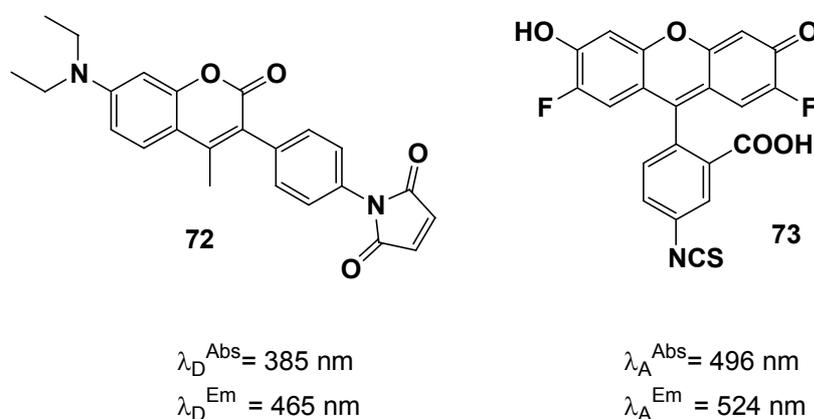
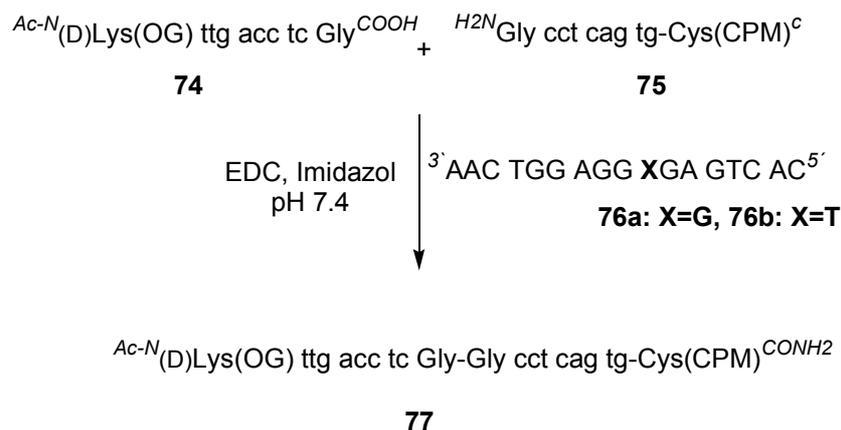


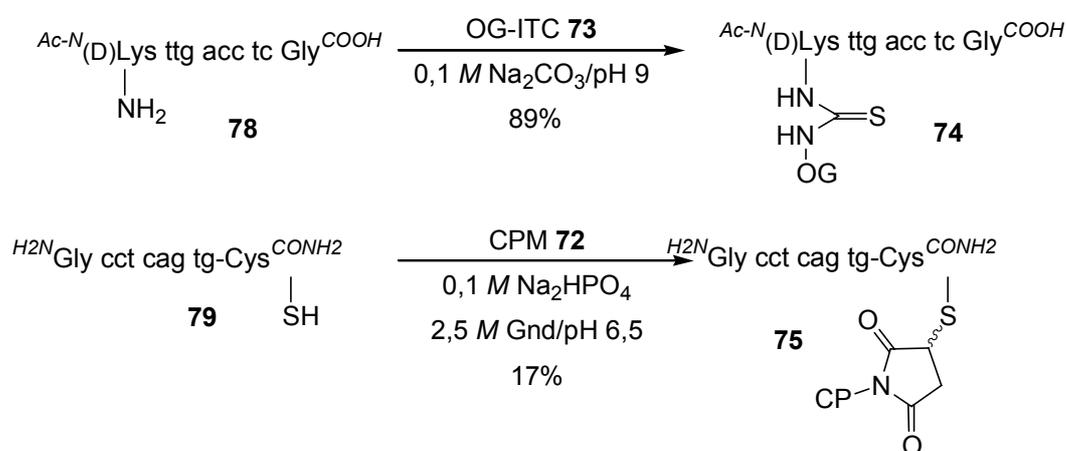
Abbildung 17: FRET-Paar CPM **72** und Oregon Green 488-Isothiocyanat (OG-ITC) **73**.

In der Verknüpfungsreaktion dienten die beiden Fluoreszenz-markierten PNA-Glycin-Konjugate **74** und **75** als Sonden (Schema 21). Dabei wurde die Position der Basenlückenverknüpfung so gewählt, daß sie in direkter Nachbarschaft zur Mutationsstelle **X** im DNA-Templat **76** erfolgte, da hier die Selektivität nach den Studien von James und Ellington am höchsten sein sollte.^[65]



Schema 21: Basenlückenkupplung der PNA-Glycin-Konjugate **74** und **75** in Gegenwart der DNA-Template **76**.

Für die Synthese der PNA-Sonden wurde die zuverlässige Boc/Z-Synthesestrategie bestritten (Schema 22). Da die Fluoreszenzmarker den harschen Abspaltungsbedingungen der TFMSA nicht standhalten würden, mußten diese im Anschluß an die Festphasensynthese in Lösung eingeführt werden. Für eine selektive Fluoreszenzmarkierung war es erforderlich, daß sich die Konjugationsstellen in ihrer Reaktivität deutlich von der Reaktivität der Glycinreste, die in der Fragmentkupplung involviert sind, unterscheiden.



Schema 22: Synthese der Fluoreszenz-markierten PNA-Glycin-Sonden **74** und **75**.

Im Fall des *N*-terminalen Kupplungssegmentes **74** gelingt eine Markierung über die Reaktion des Oregon Green-Isothiocyanats mit der freien ϵ -Aminogruppe eines *N*-terminalen Lysins (Schema 22).^[85] Ein analoges Vorgehen ist für die Markierung des *C*-terminalen Kupplungspartners **75** nicht anwendbar, da unter diesen Umständen die α -Aminogruppe des Glycins blockiert würde. Aus diesem Grunde wurde am *C*-terminalen Ende ein Cystein eingefügt. Aufgrund der höheren Nucleophilie eines Thiols gegenüber einem Amin sollte der

Angriff des Coumarin-Maleinimids bevorzugt an dem Thiol des Cysteins erfolgen. Während die Einführung des Oregon Greens als Isothiocyanat in sehr guten Ausbeuten verlief, ließ sich im Falle des Maleinimids eine zusätzliche Alkylierung des Amins nicht ganz unterdrücken.

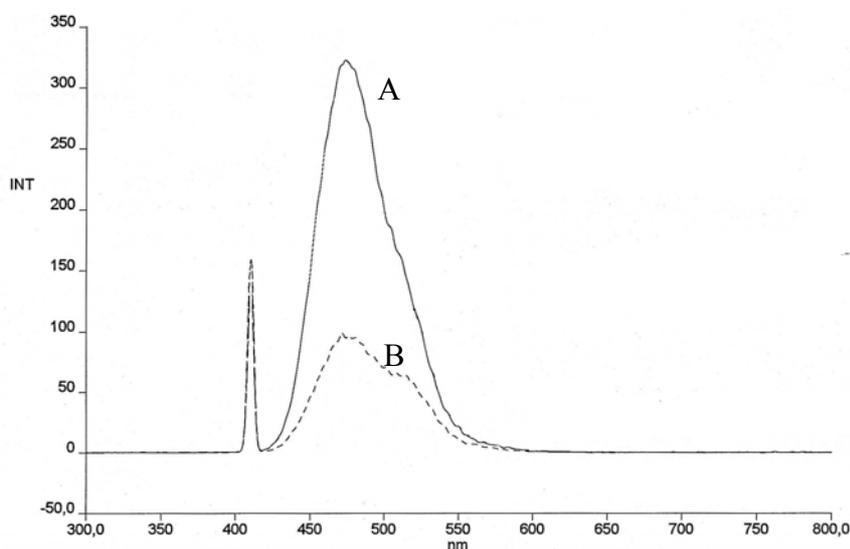


Abbildung 18: Fluoreszenzspektren des FRET-Paares **75** und **75** in Abwesenheit (A) und in Gegenwart des Templates **76a** (B).

Da die PNA-Glycin-Sonden mit einer Länge von acht Nucleobasen im Vergleich zu den Trimeren der Modellstudien über eine deutlich gesteigerte Affinität an das Templat **76** verfügten, sollte in Lösung der ternäre Komplex, bestehend aus den beiden PNA-Sonden **74** und **75** und dem Templat, bei Raumtemperatur stabil sein. Daher wurden vor den Kupplungsreaktionen die Fluoreszenzeigenschaften des FRET-Paares im ternären Komplex untersucht. In Abbildung 18 sind die zugehörigen Fluoreszenzspektren dargestellt. In Abwesenheit jeglicher Template erhielt man erwartungsgemäß für **74** und **75** bei einer Einstrahlwellenlänge von 410 nm ein für CPM charakteristische Emissionsmaximum von 470 nm. Eine für den FRET-Akzeptor Oregon Green charakteristische Emission bei 524 nm konnte nicht beobachtet werden. Aufgrund der hohen Verdünnung (400 nM) der markierten PNA-Sonden war ein Energietransfer nicht möglich. Die Zugabe des komplementären DNA-Templates **76a** führte zu einem drastischen Abfall der Emission des FRET-Donors **75** bei 470 nm auf 31%. Doch der erwartete Energietransfer auf den Akzeptor **74** blieb aus, wie an der mangelnden Zunahme der Emission bei ca. 525 nm ersichtlich wurde. Durch die Zugabe des

komplementären Templates war statt eines Energieübertrags nur eine Fluoreszenzlöschung zu beobachten.

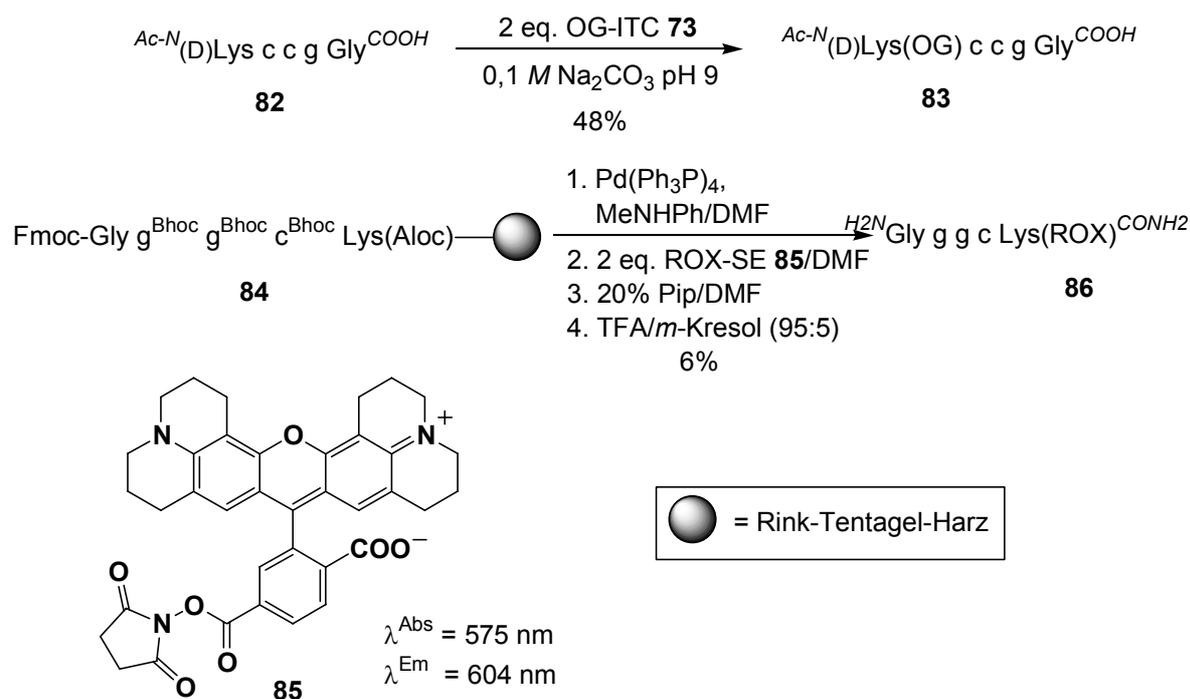
Für die Überprüfung der Selektivität wurde das Experiment mit der nicht-komplementären Wildtyp-DNA **76b** wiederholt. Auch hier kam es zu einer Fluoreszenzlöschung und die Intensität ging auf 42% zurück, d.h. trotz der Basenfehlpaarung zwischen der PNA-Sonde **75** und Templat **76b** kam es zu einer signifikanten Anlagerung. Um die Reversibilität der Fluoreszenzlösung zu testen, wurden dem ternären Komplexen **74·75·76a** die zu den PNA-Sonden komplementäre DNA-Segmente $5' \text{CAC TGA GG} 3'$ **80** und $5' \text{GAG GTC AA} 3'$ **81** im Überschuß zugegeben. Auch in Anwesenheit von 11 eq. **80** und **81** konnte keine Zunahme der Intensität bei 470 nm beobachtet werden. Ein anschließendes Kontrollexperiment ohne Templat **76** ergab, daß die Fluoreszenz im gleichen Maße von den Segmenten **80** und **81** gelöscht wurde. Die Fluoreszenzlöschung des Coumarin-Farbstoffes beruhte also nicht auf einer spezifischen Wechselwirkung mit dem FRET-Akzeptor **73**, sondern auf einer unspezifischen Interkalation in die komplementäre DNA. Damit wurde gezeigt, daß die Fluoreszenz-markierten PNA-Sonden **74** und **75** nicht geeignet waren, Einzelbasenmutationen auf der Basis von FRET nachzuweisen.

IV.4.2 Versuch der FRET-Detektion im Modellsystem

Wie die Experimente in Kap. IV.3.4 zeigten, gelingt eine sequenzspezifische Verknüpfung der PNAs durch eine Carbodiimid-vermittelte Kupplung. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Anwendbarkeit der FRET-Detektion konzentrierten sich daher auf das Modellsystem (Schema 23). Als FRET-Paar diente nun Oregon Green 488 **73** als Donor und 5-Carboxy-X-rhodamin (5-ROX) **85** als Akzeptor. Die Kombination dieser Fluorophore wurde von Chen *et al.* bereits erfolgreich zur homogenen DNA-Detektion eingesetzt.^[17]

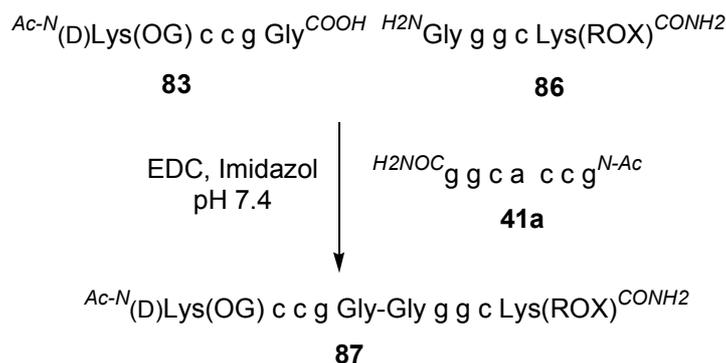
Die Einführung von Oregon Green über das Isothiocyanat an die Seitenkette des *N*-terminalen Lysins hatte sich bewährt und so wurde an dieser Strategie für die Synthese des markierten Acyldonors **83** festgehalten (Schema 23). Da es bei der Einführung des Markers im Falle des Nucleophils zur Bildung des doppelt markierten Produktes kam, wurde die Syntheseroute verändert. Die Einführung eines Markers in Lösung benötigt mehrere Stufen und ist präparativ aufwendig. Von besonderem Interesse sind daher Synthesestrategien, die es erlauben, die Marker bereits an der festen Phase einzuführen. Für die Darstellung der PNA-Sonde **86** wurde daher eine Strategie ausgearbeitet, die eine Einführung von ROX an der festen Phase

ermöglicht. Da der *N*-Terminus als Anknüpfungspunkt nicht zur Verfügung stand, mußte **85** entweder *C*-terminal^[86] oder über eine *N*-Aminoalkyl-modifizierte PNA-Base^[37] eingeführt werden. Über die Fmoc/Bhoc-Strategie wurde zunächst am Rink-Harz das Nucleophil **84** mit einem *C*-terminalen Lysin aufgebaut. Durch einen Pd⁰-katalysierten Allyltransfer wurde die ε-Aminofunktion des Lysins freigesetzt und das freie Amin mit ROX-Succinimidester **85** acyliert. Nach Abspalten der Schutzgruppen und des Ankers ließ sich **86** schließlich in 6 % Ausbeute isolieren. Die Festphasensynthese lieferte die markierten PNA-Sonde in vergleichbaren Ausbeuten wie die Synthese in Lösung, aber der präparative Aufwand war deutlich geringer und eine Reinigung des Rohproduktes nur nach dem Abspalten von der festen Phase am Ende der Synthese vonnöten. Im Vergleich zu Synthesen in Lösung ermöglicht die Festphasensynthese somit einen einfacheren und schnelleren Zugang zu markierten PNA-Sonden.



Schema 23: Synthese der Fluoreszenz-markierten PNA-Glycin-Sonden **83** und **86**.

Mit den markierten Sonden **83** und **86** wurde nun die Anwendbarkeit der FRET-Detektion für das PNA-Verknüpfungssystem untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß die Anwesenheit des PNA-Templates **41a** zu keinerlei FRET-Effekten führte. Möglicherweise waren die Trimere zu kurz und damit ihre Affinität zum Templat zu schwach, um bei Raumtemperatur einen stabilen ternären Komplex **41a**·**83**·**86** auszubilden.

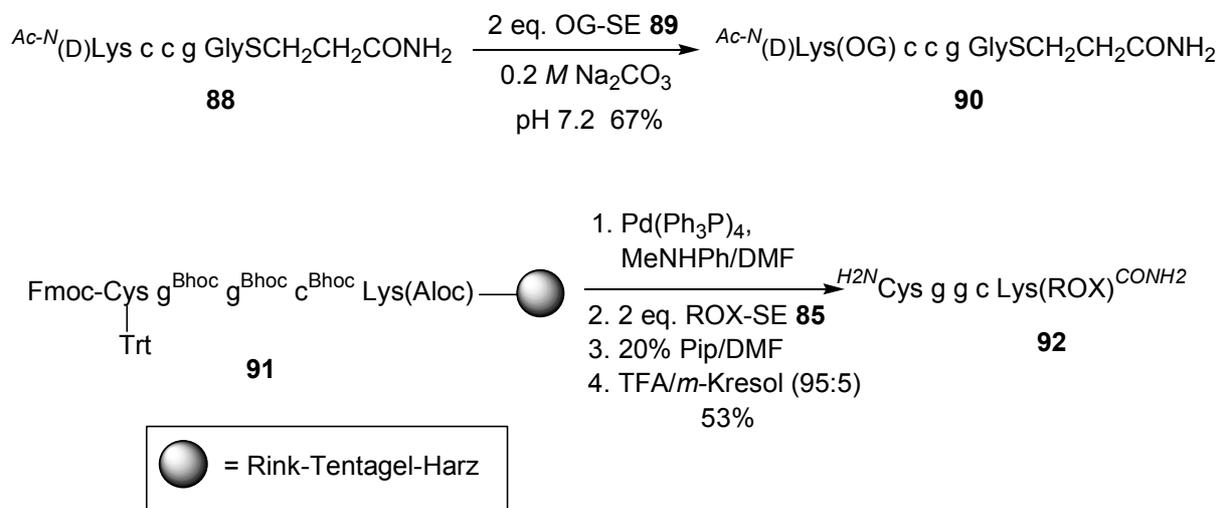


Schema 24: Carbodiimid-vermittelte Basenlückenkupplung der markierten PNA-Glycin-Konjugate **83** und **86** in Gegenwart des PNA-Templates **41a**.

Daher wurden die beiden markierten Sonden **83** und **86** in einer Carbodiimid-vermittelten Verknüpfungsreaktion umgesetzt, um am isolierten Kupplungsprodukt den FRET-Effekt studieren zu können (Schema 24). Dabei stellte sich heraus, daß das Nucleophil **86** mit dem FRET-Akzeptor ROX im Imidazolpuffer bei einer Konzentration von 160 μM schwerlöslich war und nur durch Zugabe von DMF als Löslichkeitsvermittler in Lösung ging. Bei der Verknüpfungsreaktion war allerdings auch in Gegenwart des Templates **41a** keinerlei Umsetzung erkennbar und das gewünschte Produkt ließ sich nicht isolieren. Als eine mögliche Erklärung hierfür kann das unpolare Reaktionsmedium dienen. Durch Zugabe von unpolaren Lösungsmitteln werden die hydrophoben Wechselwirkungen, die in erster Linie für die Stabilität eines DNA-Duplexes verantwortlich gemacht werden, zwischen den Strängen geschwächt. Das Templat **41a** konnte daher die Fragmente **83** und **86** nicht binden, so daß die Fragmentverknüpfung auf das Niveau der wenig effizienten Hintergrundreaktion zurückfiel. Eine Identifizierung und Isolierung des Kupplungsproduktes war nicht möglich.

Um trotzdem die Tauglichkeit des FRET-Paares Oregon Green und ROX testen zu können, sollten die beiden markierten Fragmente unter den Bedingungen der *Native Chemical Ligation* miteinander verknüpft werden. Wie die Modellstudien zeigten, vermittelt die *Native Chemical Ligation* auch in Abwesenheit eines Templates eine effiziente Verknüpfung und sollte aus diesem Grund geeignet sein, die FRET-Detektion zu überprüfen. Die Synthese des ROX-markierten Nucleophils **92** verlief analog zur Synthese des Nucleophils **86**, die Ausbeute konnte jedoch auf 53% gesteigert werden. Die Synthesebedingungen für den Acyldonor **90** waren aber nicht kompatibel mit dem Thioester **88**, da die für die Einführung des Isothiocyanats benötigten basischen Bedingungen von pH 9 zu einer sofortigen Hydrolyse des

Thioesters geführt hätten. Da der Thioester im neutralen Medium noch stabil ist, wurde das Amin durch den Succinimidester von Oregon Green (OG-SE) **89** bei pH 7.2 mit 67% Ausbeute acyliert (Schema 25).



Schema 22: Synthese der Fluoreszenz-markierten PNA-Sonden **90** und **92** für die *Native Chemical Ligation*.

Unter den gleichen Bedingungen wie in Schema 16 wurden die Fragmente **90** und **92** miteinander umgesetzt, dabei war wiederum DMF als Löslichkeitsvermittler vonnöten. Doch auch unter den Bedingungen der *Native Chemical Ligation* konnte überraschenderweise das erwartete Kupplungsprodukt nicht isoliert werden und eine massenspektrometrische Verfolgung der Reaktion mittels MALDI/MS ließ nur ein signifikantes Signal für den Thioester **90** erkennen. Offensichtlich wurde die Verknüpfungsreaktion durch die Anwesenheit der Fluorophore inhibiert. Interessanterweise konnte dieses Phänomen bereits in abgeschwächter Form bei der Acridin-markierten PNA-Verknüpfung unter den Bedingungen der *Native Chemical Ligation* beobachtet werden. Eine Erklärung für dieses Phänomen der Farbstoff-induzierten Inhibierung kann zu diesem Zeitpunkt nicht gegeben werden. Eine FRET-Detektion der PNA-Verknüpfungsreaktion ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht realisieren. Daß FRET prinzipiell für die Detektion von Oligonucleotidverknüpfungen geeignet ist, konnten Kool *et al.* anhand der Verknüpfung eines 7mers mit einem 13mer zeigen.^[67] In weiterführenden Experimenten müßte daher untersucht werden, ob in längeren PNA-Sonden der negative Einfluß der Fluorophore auf die Effizienz der Verknüpfungsreaktion zurückgedrängt werden kann. Dabei ist auch nicht auszuschließen, daß die Inhibierung ein sequenzabhängiges Phänomen von PNA-Oligomeren ist.

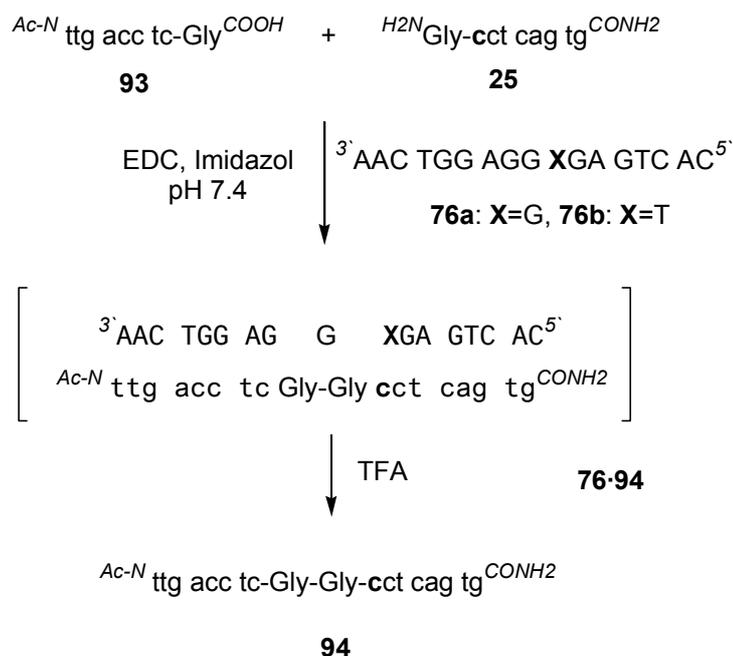
Von weitergehenden Untersuchungen wurde jedoch zu Gunsten einer alternativen Detektionsmethode, die massenspektrometrische Detektion, abgesehen, die vielversprechendere Ergebnisse lieferte und daher weiterverfolgt wurde.

IV.5 Massenspektrometrischer Nachweis der PNA-Verknüpfung

Nachdem die auf Fluoreszenz basierende Detektion der PNA-Verknüpfung (vgl. Kap. IV.4) keine zufriedenstellenden Ergebnisse brachte, wurde als alternative Nachweisttechnik die massenspektrometrische Detektion des Verknüpfungsproduktes herangezogen. Mit der Entwicklung schonender Ionisierungsmethoden (ESI, MALDI) ist die moderne Massenspektrometrie in den letzten Jahren zu einer attraktiven Untersuchungsmethode in der Bioanalytik geworden.^[87] Darüber hinaus verfügt sie gegenüber der Fluoreszenzspektroskopie über einige Vorteile. So entfällt die kosten- und zeitintensive Einführung des Fluorophors, die den Komplexizitätsgrad der Synthese deutlich erhöht. Das Problem der Ausbildung von Artefakten, die durch die bloße Anwesenheit der Fluorophore zustande kommen können, wie z.B. die unspezifische Wechselwirkung der Interkalatorfarbstoffe Acridin (Kap. IV.3.5) und CPM (Kap. IV.4.1) mit dem Analyten, tritt bei der MS-Detektion ebenfalls nicht auf. Durch die begrenzte Anzahl der spektral aufgelösten Fluorophore ist die Möglichkeit, mehrere diagnostische Ereignisse mit einer einzigen Untersuchung (Multiplexing) zu erfassen, stark begrenzt. Im Gegensatz dazu verfügt die moderne Massenspektrometrie über ein so hohes Auflösungsvermögen, daß auch Gemische aus mehreren Analyten gleichzeitig nachgewiesen werden können. Daher wurde die Massenspektrometrie bereits erfolgreich zur Genotypisierung von Einzelbasenmutationen eingesetzt.^[38, 88-90]

IV.5.1 Untersuchungen zur Selektivität an DNA-Templaten

In einem ersten Schritt wurden die Bedingungen, die in den Modellstudien eine sequenzselektive PNA-Verknüpfung unterstützten, hinsichtlich ihrer Eignung geprüft, Einzelbasenmutationen in DNA nachzuweisen. Als Beispiel diente hierbei S549R2-Punktmutation des Cystic-Fibrosis-Transmembran-Regulator-Gens (CFTR).^[83] Schema 26 zeigt die PNA-Glycin-Konjugate **25** und **93**, die an den DNA-Templaten **76** verknüpft werden sollten. Die Position der Basenlückenverknüpfung wurde so gewählt, daß sie in direkter Nachbarschaft zur Mutationsstelle **X** liegt, da hier die Selektivität nach den Studien von James und Ellington am höchsten sein sollte.^[65]



Schema 26: Basenlückenverknüpfung der PNA-Glycin-Konjugate **25** und **93** in Gegenwart der DNA-Template **76**.

Die PNA-Sonden **25** und **93** verfügten mit einer Länge von acht Nucleobasen über eine deutlich höhere Affinität gegenüber einem komplementären Oligonucleotid als die PNA-Trimere des Modellsystems, so daß die Konzentration der Proben von 160 μM des PNA-Modellsystems auf 10 μM reduziert werden konnte. Bei diesen geringen Konzentrationen ließen sich in der HPLC-Analyse keine der PNA zugehörigen Signale detektieren. Aus diesem Grunde wurden die Proben vor der Analyse in einer Festphasenextraktion über eine RP-C18 Sep-Pak-Kartusche vom Puffer abgetrennt und aufkonzentriert. Die hohe Säurestabilität der PNA erlaubte eine anschließende Behandlung der Probe mit 20%iger TFA, die zu einer vollständigen Hydrolyse der DNA führte. Dadurch vereinfachte sich die Analyse des HPLC-Chromatogramms, da das Signal für die DNA-Template nicht mit den PNA-Signalen überlagern konnte. Aus den kinetischen Studien in Kap. IV.3 ist ersichtlich, daß für die Carbodiimid-vermittelte Verknüpfung die Reaktion nach 6 – 8 h zum Erliegen kommt. Folglich wurden für die weiteren Untersuchungen mit DNA-Template die Reaktionszeiten auf 6 h begrenzt.

In Abbildung 19 sind die HPLC-Chromatogramme der Kupplungsreaktionen aus Schema 26 dargestellt. In Abwesenheit eines DNA-Template war keinerlei Produktbildung nachweisbar und nach 6 h konnten nur die beiden Eduktsignale von **25** und **93** detektiert werden. Durch die Verringerung der Konzentration auf 10 μM konnte also die unspezifische bimolekulare

Hintergrundreaktion, die bei einer Konzentration von $160 \mu\text{M}$ in den Modellstudien noch bei ca. 8% lag, völlig zurückgedrängt werden. Erst durch Zugabe des komplementären DNA-Stranges **76a** bildete sich das Kupplungsprodukt **94** in 28% Ausbeute, das bei einer Retentionszeit von 24 min im HPLC-Chromatogramm identifiziert wurde. Auch DNA-Template können folglich PNA-Glycin-Konjugate als Substrate erkennen und deren Verknüpfung vermitteln.

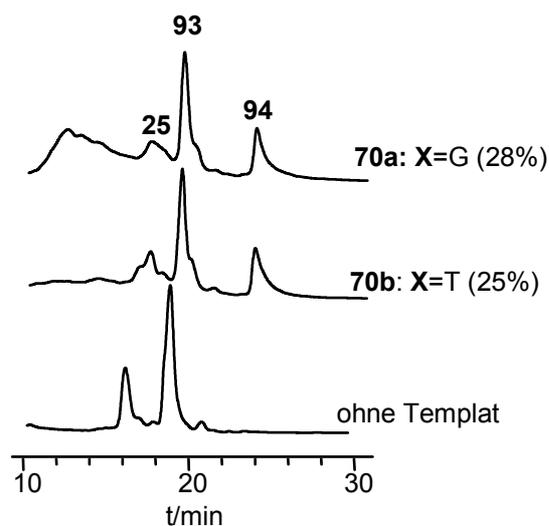


Abbildung 19: HPLC-Chromatogramme der Basenlückenverknüpfung von **25** und **93** nach 6 h in Gegenwart der DNA-Template **76**.

Um aber Einzelbasenmutationen in DNA nachweisen zu können, muß die PNA-Verknüpfung sequenzselektiv erfolgen. Für eine Überprüfung der Sequenztreue wurde die Reaktion in Gegenwart der Wildtyp-DNA **76b** als Beispiel eines fehlpaarenden DNA-Templates durchgeführt. Wie Abbildung 19 zu entnehmen ist, führte die Anwesenheit des fehlpaarenden DNA-Templates **76b** ebenfalls zur Bildung des Verknüpfungsproduktes **94**. Somit ließen sich anhand der Produktbildung keine Aussagen über das Vorhandensein der S549R2-Einzelbasenmutation in dem DNA-Abschnitt **76** machen.

Die mangelnde Selektivität läßt sich durch eine ungenügend diskriminierende Hybridisierung der PNA-Sonde **25** mit den beiden DNA-Templaten erklären. Offensichtlich war unter den gewählten Reaktionsbedingungen der destabilisierende Einfluß der Basenfehlpaarung zwischen Templat **76b** und PNA-Sonde **25** zu gering, um die unerwünschte Duplex-Bildung zu unterbinden. Da die Ionenkonzentration eine untergeordnete Rolle spielt, ist die Stabilität eines PNA-DNA-Duplexes in erster Linie von der Temperatur abhängig. Als Maß für die

Duplex-Stabilität gilt die Schmelztemperatur T_m .^[32] Unterhalb von T_m liegt der Duplex und darüber liegen die ungeordneten Einzelstränge vor. Das Diskriminierungsvermögen einer Verknüpfungsreaktion ist folglich optimal, wenn die Reaktionstemperatur oberhalb des T_m -Wertes des fehlpaarenden Templates und unterhalb dem des komplementären Templates liegt. Im folgenden wurden daher die T_m -Werte des **76a-25**- und des **76b-25**-Duplexes experimentell bestimmt, um die ideale Reaktionstemperatur für eine templatelektive PNA-Glycin-Kupplung zu finden. Der T_m -Wert eines Duplexes läßt sich über die temperaturabhängige Hyperchromizität UV-spektroskopisch bestimmen.^[91] In Abbildung 20 sind die Schmelzkurven des fehlpaarenden **76b** und des komplementären Templates **76a** dargestellt. Der Wendepunkt der Schmelzkurven ist als Schmelztemperatur T_m definiert.

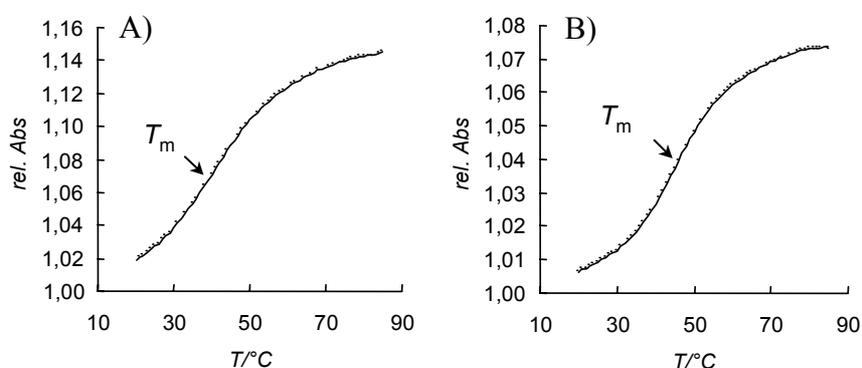


Abbildung 20: Schmelzkurven der PNA-DNA-Duplexe aus der Hybridisierung von **25** mit A) dem fehlpaarenden DNA-Templat **76b** ($T_m = 39$ °C) und B) mit dem komplementären DNA-Templat **76a** ($T_m = 46$ °C).

Anhand der Wendepunkte der Schmelzkurven ergaben sich für das fehlpaarende DNA-Templat ein T_m -Wert von 39 °C und für das komplementäre Templat ein T_m -Wert von 46 °C. Die vorstehend beschriebenen Reaktionen wurden stets bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt, die weit unterhalb des T_m -Wertes des fehlpaarenden Templates liegt. Die PNA-Sonde **25** konnte also an das fehlpaarende DNA-Templat binden und eine unselektive Verknüpfungsreaktion zum Kupplungsprodukt **94** einleiten. Es verwundert daher nicht, daß das System aus Schema 26 über keine ausreichende Sequenzselektivität verfügte. Mit zunehmender Reaktionstemperatur sollte die Toleranz gegenüber einer Basenfehlpaarung abnehmen. Das Verknüpfungsexperiment aus Schema 26 wurde bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C wiederholt. Unter diesen Bedingungen sollte der Anteil Templatgebundener PNA-Sonden bei Verwendung der komplementären DNA **76a** höher sein als bei Verwendung der fehlpaarenden DNA **76b**. Eine HPLC-Analyse ließ jedoch keinerlei

Im Gegensatz zum fehlpaarenden Templat **76b** aus Abbildung 20, das eine Basenfehlpaarung am Terminus der PNA-Sonde bildete, zeigte in Abbildung 22 keines der drei fehlpaarenden Template **76c-e** ($Y = A, C, G$) das für eine Schmelzkurve charakteristische sigmoidale Verhalten. Daraus kann gefolgert werden, daß sich in diesen Fällen kein Duplex zwischen den Templaten und der PNA-Sonde ausbilden konnte. Die PNA-Sonde bindet nur an das komplementäre Templat **76a**, das in der zentralen Position ein T trägt, wie aus der sigmoidalen Schmelzkurve aus Abbildung 22.D ersichtlich ist ($T_m = 46\text{ °C}$).

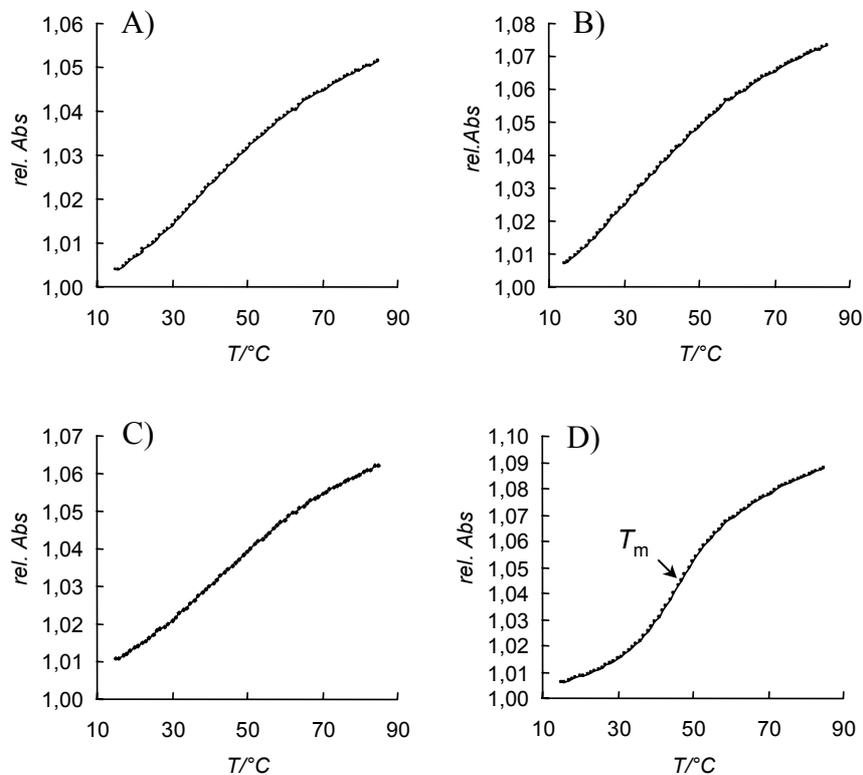
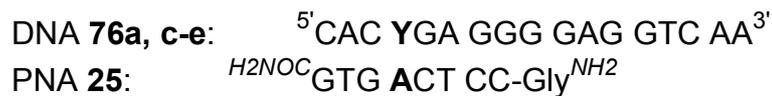
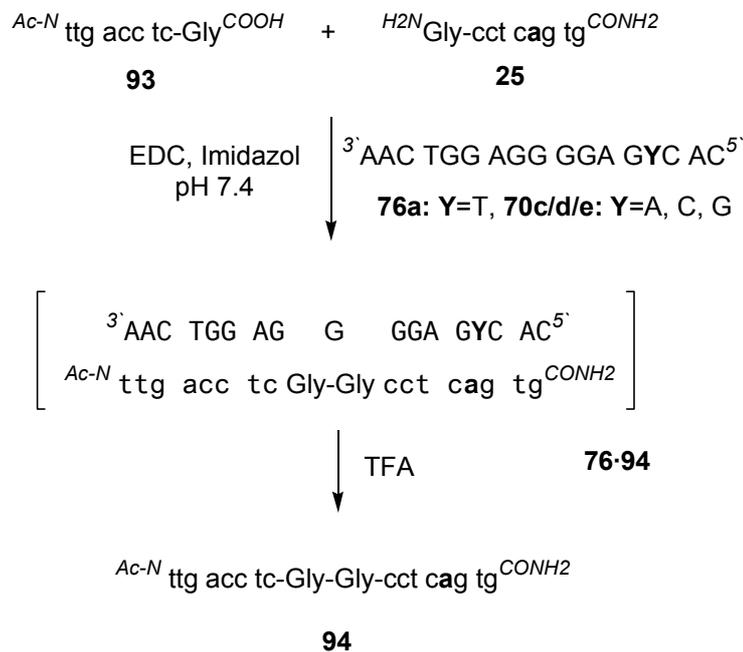


Abbildung 22: Schmelzkurven der PNA-DNA-Duplices, die durch Hybridisierung des PNA-Glycin-Konjugates **25** mit den DNA-Templaten **76** erhalten wurden. A) $Y=A$, B) $Y=C$, C) $Y=G$ und D) $Y=T$

Das unterschiedliche Schmelzverhalten aus Abbildung 22 ließ für die PNA-Verknüpfung in Schema 27 eine sequenzselektive Produktbildung erwarten.



Schema 27: Basenlückenverknüpfung der PNA-Glycin-Konjugate **25** und **93** in Gegenwart von **76**. Die DNA-Templates unterscheiden sich in der zentralen Position **Y**. Die PNA-Base gegenüber der Mutationsstelle ist fett hervorgehoben. Oligonucleotidkonzentration: 10 μM .

Wie bereits aus den vorangegangenen Untersuchungen (Abbildung 19) bekannt war, konnte in Abwesenheit eines DNA-Templates keine Produktbildung nachgewiesen werden (Abbildung 23). Nach Zugabe des komplementären DNA-Templates **76a** (**Y** = T) lieferte die PNA-Verknüpfungsreaktion das Kupplungsprodukt **94** in 25% Ausbeute. Für die Sequenzselektivität der PNA-Verknüpfung war nun der Einfluß der Einzelbasenfehlpaar-DNA-Templates **76c-e** (**Y** = A, C, G) entscheidend. Abbildung 23 zeigt, daß die Anwesenheit der drei fehlpaarenden Templates die Bildung des Kupplungsproduktes **94** mit geringer Effizienz beschleunigte. An den DNA-Templaten **76d** (A-C-Basenpaar) und **76e** (A-G-Basenpaar) entstand das Verknüpfungsprodukt **94** in 3% Ausbeute. Bei einer A-A-Basenfehlpaarung in Templat **76c** betrug die Verknüpfungsausbeute nur 2%. Im Vergleich zu den einzelbasenfehlpaarenden Templaten **76c-e** beschleunigte folglich das komplementäre Templat **76a** bei einer 10 μM Konzentration die Verknüpfung von **25** und **93** um den Faktor 8-13. Eine weitere Steigerung der Selektivität sollte bei niedrigeren DNA-Konzentrationen erreicht werden können (Vgl. Kap.IV.5.3).

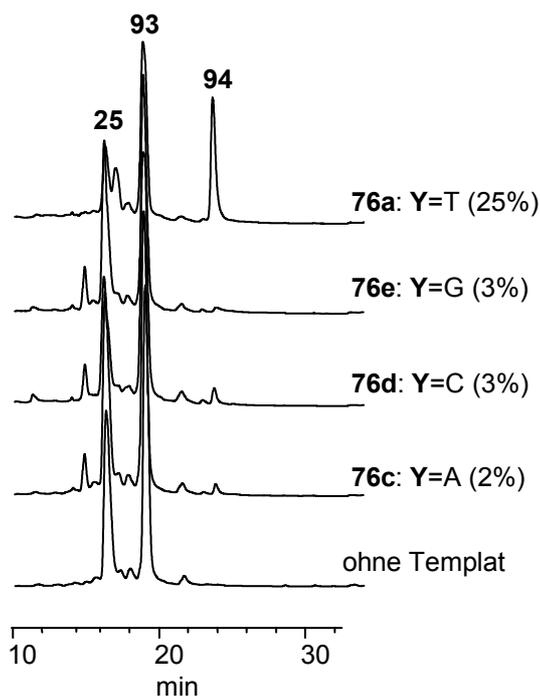


Abbildung 23: HPLC-Chromatogramme der Basenlückenkupplung von **25** und **93** nach 6 h in Gegenwart der DNA-Templates **76**.

Die aufgestellte Hypothese, nach der eine selektive Hybridisierung auch eine selektive Verknüpfung nach sich zieht, wurde also mit dem in Schema 27 gezeigten Verknüpfungsexperiment bestätigt. Durch die Verlagerung der Mutationsstelle von einer terminalen in eine interne Position der PNA-Sonde nimmt die Sequenzselektivität der Verknüpfungsreaktion drastisch zu. Ähnliches beobachteten auch Letsinger und Kool für deren chemische DNA-Verknüpfungssysteme.^[66, 94] Die von ihnen untersuchten Systeme weisen ein vergleichbares Diskriminierungsvermögen gegenüber Einzelbasenfehlpaarungen auf.

Interessant ist ein Vergleich der unterschiedlichen Diskriminierungsmechanismen zwischen chemischen und enzymatischen Verknüpfungsreaktionen. Enzymkatalysierte (T4-Ligase, *Tth*-Ligase) Verknüpfungen, wie sie beim Oligonucleotide Ligation Assay eingesetzt werden, zeigen die höchste Selektivität, wenn die Mutationsstelle direkt an der Verknüpfungsstelle zu liegen kommt. Dabei binden beide Oligonucleotidsonden an den Analyten, aber die Selektivität der Verknüpfungsreaktion erfolgt durch die Substratspezifität des Enzyms. Die hier gewonnenen Ergebnisse lassen dagegen den Schluß zu, daß die Selektivität chemischer Verknüpfungsreaktionen bei internen Einzelbasenfehlpaarungen größer ist als bei einer Fehlpaarung an der Verknüpfungsstelle. Verantwortlich hierfür scheint allein die unterschiedliche, von der Position der Basenfehlpaarung abhängende Duplexstabilität zwischen der Sonde und dem Analyten zu sein. Eine terminale Fehlpaarung destabilisiert die

Duplexstabilität nur unwesentlich (vgl. Abbildung 20) und das PNA-Verknüpfungssystem kann ein einzelbasenfehlpaarendes Templat von einem perfekt komplementären nicht unterscheiden. Eine interne Fehlpaarung dagegen destabilisiert den Duplex soweit, daß die PNA-Sonde nicht an den DNA-Analyten binden kann, wie anhand der Schmelzkurven aus Abbildung 22 ersichtlich ist. Eine templat-vermittelte Bildung des Verknüpfungsproduktes ist daher nicht möglich. Mit Hilfe der Kalkulationsprogramme sollte es daher möglich sein, über die unterschiedlichen Duplexstabilitäten PNA-Sonden zu finden, mit denen Einzelbasenmutationen erkannt werden können.

Die oben ausgeführten Ergebnisse bezeugten von dem DNA-Segment **76** gesteuerten Verknüpfung eine hohe Selektivität. Es war nun das Ziel, die selektive Bildung des Verknüpfungsproduktes **88** massenspektrometrisch zu detektieren. Wie sich herausstellte, erwies sich die MALDI-TOF/Massenspektrometrie als eine sehr empfindliche Methode, PNAs nachzuweisen.^[95] So wurde bei der Analyse der in dieser Arbeit erstellten PNA-Syntheserohprodukte offenkundig, daß mittels MALDI-TOF/Massenspektrometrie die Reinheit einer Substanz beurteilt werden kann. Daher erfolgte nun die massenspektrometrische Detektion der PNA-Verknüpfung mittels MALDI-MS.

In den MALDI-Messungen, die im Anschluß der PNA-Synthesen mit den Rohprodukten durchgeführt wurden, diente 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrix. Mit den Proben der in Schema 27 gezeigten Verknüpfungsreaktion kristallisierte DHB jedoch nicht. Dagegen bildete Sinapinsäure in der Mischung mit den Proben Kristalle aus, die sich sehr gut massenspektrometrisch untersuchen ließen. Ein weiterer Vorteil der Sinapinsäure besteht darin, daß deren Kristalle sehr viel kleiner als die der DHB sind, so daß sich eine homogenere Zusammensetzung in den Kristallen ausbildet und die Reproduzierbarkeit einer Messung zunimmt.

In Abbildung 24 sind die MALDI/TOF-Massenspektren der in Schema 27 beschriebenen PNA-Verknüpfungsreaktionen dargestellt, die bereits HPLC-analytisch untersucht wurden (s. Abbildung 23). Eine Analyse der MALDI-Spektren führt dabei zu dem gleichen Ergebnis wie die der Chromatogramme. In Abwesenheit eines Templates werden die Signale der beiden Edukte **25** und **93** mit einem (m/z)-Verhältnis von 2219 bzw. 2237 detektiert. Ein Dimer-Aggregat von **93** erscheint in geringer Intensität mit einem (m/z)-Verhältnis von 4471. Dagegen läßt sich in Gegenwart der komplementären DNA **76a** ($Y = T$) zusätzlich und mit höchster Intensität das Produktsignal mit einem (m/z)-Verhältnis von 4437 beobachten. Die

MALDI-TOF/MS-Analyse ist darüber hinaus auch in der Lage, das in Anwesenheit der fehlpaarenden Template **76c-e** ($Y = A, C, G$) nur in Spuren gebildete Verknüpfungsprodukt zu detektieren, wobei die Intensität dieser Signale deutlich geringer ist.

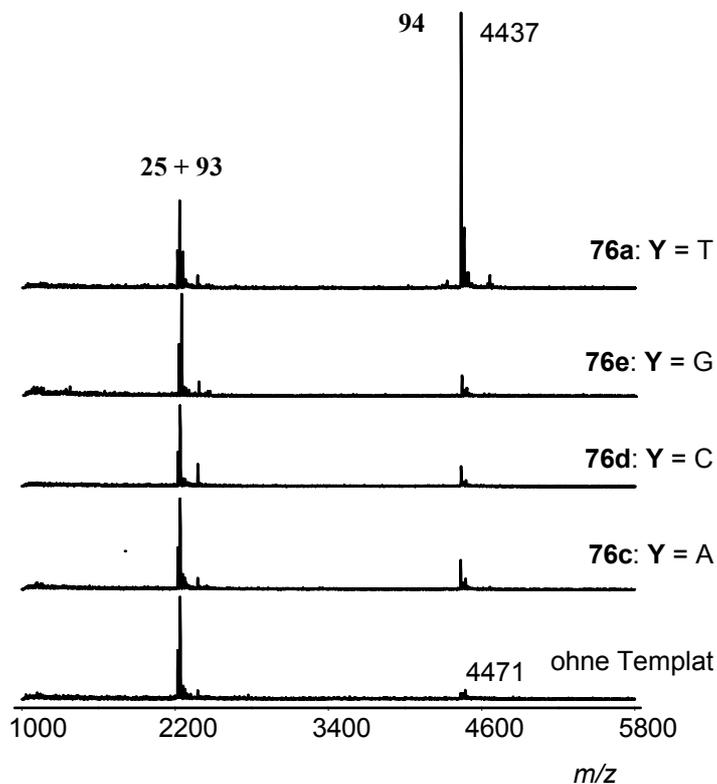


Abbildung 24: MALDI/TOF-MS-Detektion der Basenlückenkupplung der PNA-Glycin-Konjugate **25** und **93** in Anwesenheit der DNA-Template **76** (m/z für $[M+H]^+$: **25**: 2219; **93**: 2237; **94**: 4437; Matrix: Sinapinsäure).

Mit der MALDI-TOF/Massenspektrometrie steht also eine empfindliche und rasche Nachweismethode zur Detektion von Einzelbasenmutationen zur Verfügung. Während für die bisherige HPLC-Detektion für jede Probe eine Zeit von mindestens 45 min eingeplant werden mußte, lieferte die massenspektrometrische Analyse die gleiche Information in wenigen Sekunden. Zudem ist für PNA das Auflösungsvermögen der MALDI-MS dem der HPLC weit überlegen, so daß auch komplexere Substanzgemische untersucht werden können. Auch die für eine präzise Detektion benötigte Substanzmenge ist um Größenordnungen geringer für MALDI-TOF/MS (pMol) als bei der HPLC (nMol).

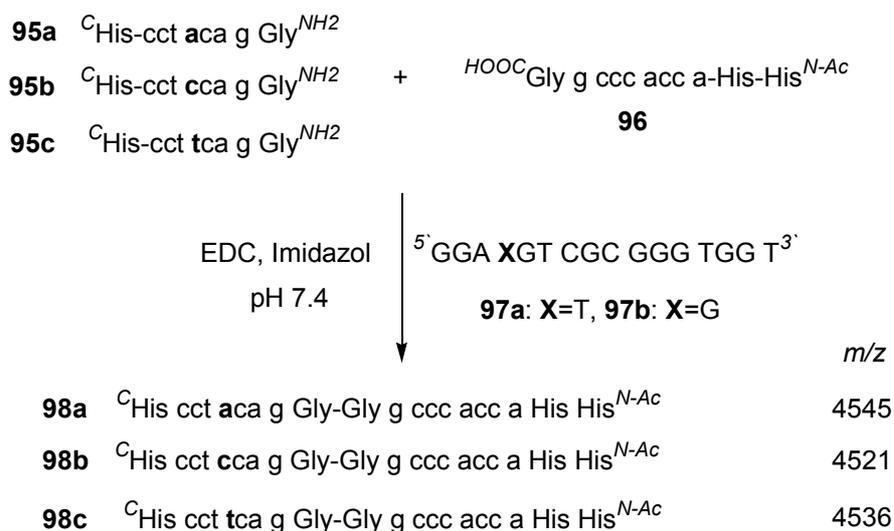
Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte PNA-Verknüpfungssystem in Verbindung mit der MALDI-Massenspektrometrie verfügt damit über eine Reihe von Vorteilen gegenüber herkömmlichen „Ligation Assays“ auf der Basis natürlicher Oligonucleotide.^[66, 67] Die höhere Affinität und Fehlbasendiskriminierung der PNAs läßt eine gesteigerte

Verknüpfungselektivität erwarten. Im Gegensatz zu DNA kommt es bei PNA weder zu Fragmentierungsreaktionen noch zur Bildung von Metallsalzzaddukten, die zu einer Verbreiterung der Signale und damit zu einer Verminderung der Auflösung führen.^[96, 97] PNA ist daher leichter und mit höherer Präzision als natürliche Oligonucleotid-Sonden massenspektrometrisch analysierbar. Aufgrund der amidischen Struktur ist PNA ein unter neutralen Bedingungen ungeladenes Molekül, das im sauren Medium leicht protoniert wird. Daher erfolgt die MS-Detektion im Positiv-Modus. Die nachzuweisenden Analyten als natürliche Oligonucleotide sind dagegen Polyanionen und desorbieren im Positiv-Modus weniger leicht. Da nur die gebildeten PNA-Verknüpfungsprodukte im MALDI detektiert werden, stört die Anwesenheit von DNA-Verunreinigungen, die bei der Gewinnung und Aufarbeitung der DNA-Probe entstanden sein könnten, nicht die Detektion.

IV.5.2 Untersuchungen zur Substratspezifität

Für eine Überprüfung hinsichtlich der praktischen Anwendbarkeit des PNA-Verknüpfungssystems mußte die Substratspezifität bestimmt werden. So müßten zum Nachweis einer Einzelbasenmutation mindestens zwei Sonden, eine Wildtyp- und eine Mutantensonde, um die Bindung an den Analyten konkurrieren. Dabei dürfte ausschließlich nur die zum Analyten komplementäre Sonde erkannt und in der Verknüpfungsreaktion umgesetzt werden. (vgl. Schema 3 in Kap. II.2.3).

Zur Untersuchung der Substratspezifität wurde die Verknüpfungsreaktion mit drei um ein Templat konkurrierenden PNA-Glycin-Konjugaten geführt. Das Ziel bestand darin, eine G→T Mutation in dem DNA-Segment **97** nachzuweisen (Schema 28). Die drei variablen PNA-Glycin-Sonden **95** dienten dazu, die Mutationsstelle in dem DNA-Segment **97** zu erkennen, und wurden in Konkurrenz zueinander mit dem Acyldonor **96** umgesetzt. Dabei war prinzipiell die Bildung von drei Verknüpfungsprodukten **98** möglich, die über ihre molekulare Masse unterscheidbar waren.



Schema 28: Bestimmung der Substratspezifität der PNA-Kupplungsstrategie am Beispiel des Nachweises einer G→T Mutation in dem DNA-Segment **87**. Die drei variablen PNA-Glycin Sonden **95** konkurrieren um einen konstanten Bindungspartner **96**. Oligonucleotidkonzentration: 10 μM .

Die Synthese der PNA-Sonden **95** und **96** erfolgte mit dem Syntheseroboter SYRO II der Firma MultiSynTech über die Fmoc/Bhoc-Methode. Da aus gerätespezifischen Gründen vor der Kupplung keine Voraktivierung der einzelnen Bausteine möglich war, konnte nicht das bewährte Kupplungsreagenz HATU **26** verwendet werden. Daher wurde auf das weniger potente HBTU **38** zurückgegriffen. Die dadurch ungünstigeren Synthesebedingungen hatten zur Folge, daß der Aufbau der PNA-Sonden weitaus schlechter verlief. Es bildeten sich mehr Abbruchsequenzen als bei den bisherigen Synthesen, die manuell nach der Boc/Z-Strategie aufgebaut worden waren. Es gelang zwar durch mehrmalige HPLC-Chromatographie, die gewünschten Produkte aus dem komplexen Gemisch zu isolieren, doch die Ausbeute betrug im Durchschnitt weniger als 1%. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit von MALDI-MS, die selbst Substanzen im oberen fMol-Bereich nachweisen kann, reichten die isolierten Mengen an PNA-Sonden jedoch aus, um Untersuchungen zur Substratspezifität durchführen zu können.

Aufgrund des geringen Probevolumens von 50 μl wurden die Proben nicht mehr über eine Sep-Pak-Kartusche, sondern über eine 10 μl RP-C18 ZipTip-Pipettenspitze konzentriert und mit Sinapinsäure kokristallisiert. Wie dem MALDI-Spektrum aus Abbildung 25.A zu entnehmen ist, vermittelte die Anwesenheit der Mutanten-DNA **97a** (X=T) ausschließlich die Bildung eines der drei möglichen PNA-Verknüpfungsprodukte. Das *m/z*-Verhältnis des Signals von 4545 entsprach der Molmasse des Produktes **98a**, d.h. allein die Adenin-

enthaltende Mutantensonde **95a** wurde in Gegenwart der Mutanten-DNA umgesetzt. Die Reaktion an der Wildtyp-DNA **97b** (X=G) führte zur überwiegenden Bildung des Cytosin-enthaltenden Produktes **98b**. Die hohe Substratselektivität des PNA-Verknüpfungssystems wurde darüber hinaus anhand der Thymin-enthaltenden PNA-Sonde **95c** verdeutlicht. In keinem der beiden Fälle konnten auch nur Spuren eines Verknüpfungsproduktes **98c** mit einem m/z -Verhältnis von 4536 nachgewiesen werden.

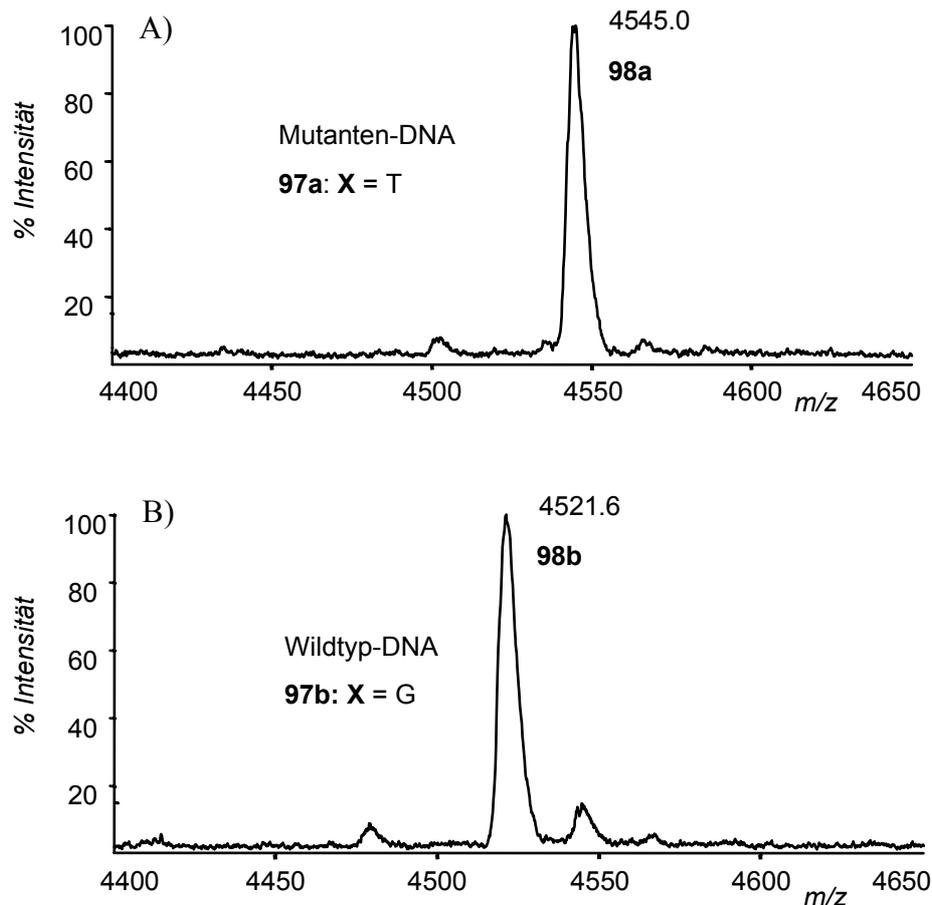


Abbildung 25: MALDI-TOF/MS-Detektion einer Konkurrenzreaktion zur Bestimmung einer G→T Einzelbasenmutation im DNA-Segment **97**, in Gegenwart A) der Mutanten-DNA **97a** (X = T) und B) der Wildtyp-DNA **97b** (X = G).

Das in Schema 28 dargelegte Verknüpfungssystem bezeugt eine hohe Substratselektivität und scheint daher für den Nachweis einer Einzelbasenmutation geeignet zu sein.

IV.5.3 Massenspektrometrischer Multiplex-Nachweis von Einzelbasenmutationen am Beispiel des *ras*-Gens

Mutationsanalysen für die medizinisch-biologische Diagnostik und pharmakogenetische Anwendungen (vgl. Kap. II.1), bei der viele SNP-Muster verglichen werden müssen, erfordern einen hohen Analysendurchsatz. Um die Anzahl der durchzuführenden Tests nicht erhöhen zu müssen, wurden Multiplex-Detektionssysteme entwickelt, die den Nachweis mehrerer Mutationsstellen in einem einzigen Experiment ermöglichen. Ihr hohes Auflösungsvermögen macht die MALDI-Massenspektrometrie besonders attraktiv für Multiplex-Nachweise, da mit ihr innerhalb weniger Sekunden Substanzgemische analysiert werden können. Erste Beispiele für die Analyse mehrerer Mutationsstellen eines Gens in einem Multiplex-Format wurden bereits beschrieben.^[38, 98] Damit ist die Massenspektrometrie der ansonsten in der DNA-Diagnostik dominierenden Fluoreszenzspektroskopie überlegen. Deren Tauglichkeit für Multiplex-Nachweise ist durch die begrenzte Anzahl an spektral aufgelösten Fluorophoren begrenzt.

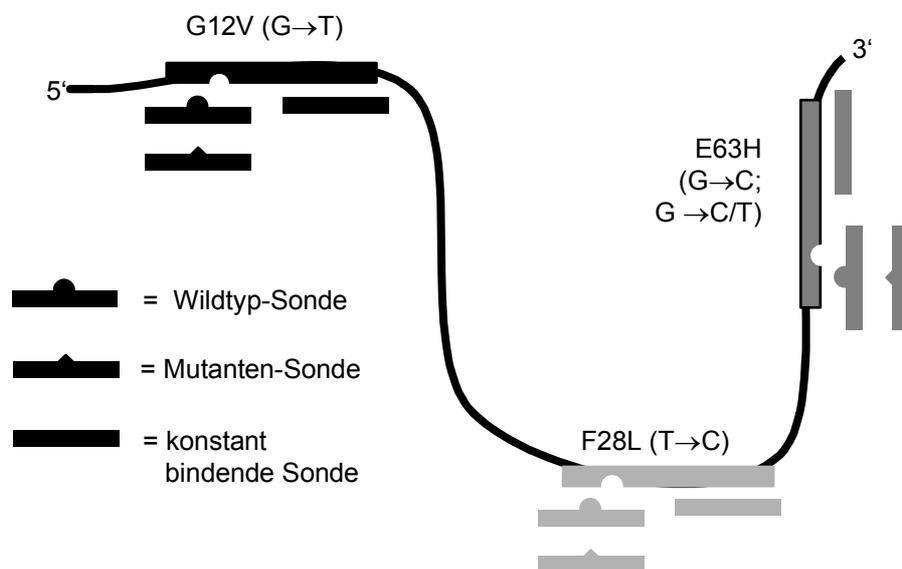


Abbildung 26: Prinzip des Multiplex-Nachweises am Beispiel der drei karzinogenen Mutationen G12V, F28L und E63H in *ras*.

In wieweit ein Multiplex-Nachweis mit dem PNA-Verknüpfungssystem möglich ist, wurde am Beispiel dreier potentieller Mutationsstellen im *ras*-Gen^[99] überprüft (Abbildung 26). Das *Ras*-Protein ist ein zentraler Schalter in der intrazellulären Signaltransduktion und steuert die

Zellproliferation.^[100] Bei den untersuchten Positionen handelt es sich um die karzinogenen G12V (G→T), F28L (T→C) und E63H (G→C, G→C/T) Mutationen.^[101]

Konstante PNA-Sonden

G12V: ^{HOOC}Gly-c acc cct t^{N-Ac} **99a**

F28L: ^{HOOC}Gly-c cta ctc at^{N-Ac} **99b**

E63H: ^{HOOC}Gly-g tca cgg t^{N-Ac} **99c**

Mutanten-PNA-Sonden

G12V: ^CGly-Gly-gac atc c-Gly^{NH2} **100a**

F28L: ^CGly-Gly-gtg gaa c-Gly^{NH2} **100b**

E63H: ^CGly-Gly-ctc gtg a-Gly^{NH2} **100c**

+

Wildtyp-PNA-Sonden

^CGly-gac ctc c-Gly^{NH2} **101a**

^CGly-gtg aaa c-Gly^{NH2} **101b**

^CGly Gly-ctc ctc a-Gly^{NH2} **101c**

EDC, Imidazol
500 nM, pH 7.4

DNA-Proben

G12V: 5' CTG (**G/T**)AG GTG TGG GGA A^{3'}

F28L: 5' CAC (**T/C**)TT GTG GAT GAG TA^{3'}

E63H: 5' GAG (**G/C**)A(**G/C**) TAC AGT GCC A^{3'}

Mutanten-Produkte

Codon 12: 4214 **102a**

Codon 28: 4584 **102b**

Codon 63: 4365 **102c**

Wildtyp-Produkte

Codon 12: 4133 **103a**

Codon 28: 4511 **103b**

Codon 63: 4285 **103c**

Schema 29: Für den Multiplex-Nachweis dreier karzinogener Mutationen in *ras* wurden neun PNA-Glycin-Sonden, drei Acyldonoren **99** und sechs Nucleophile **100/101**, miteinander umgesetzt. Von den spezifischen Kupplungsprodukten **102/103** sind lediglich die molaren Massen $[M+H]^+$ angegeben.

Zur genauen Bestimmung einer Mutation muß je eine konstant bindende Verknüpfungssonde mit je einer Wildtyp- und Mutanten-Sonde umgesetzt werden. Dies bedeutete, daß zur Detektion von drei Mutationstellen insgesamt neun PNA-Sonden, nämlich die drei Acyldonoren **99a-c** sowie sechs Nucleophile **100a-c** und **101a-c**, in Reaktion gebracht werden müssen (Schema 29). Um eine Überlagerungen der Produktsignale im Massenspektrum zu vermeiden, wurden den nucleophilen PNA-Sonden **100** und **101** am C-Terminus eine unterschiedliche Anzahl an Glycinresten als Massenmarker angehängt. Diese sollten keinen Einfluß auf die Hybridisierung ausüben.

Die Umsetzung der neun PNA-Sonden miteinander ließ prinzipiell 18 verschiedene Kupplungsprodukte erwarten, zwölf Kreuzkupplungsprodukte und sechs spezifische Kupplungsprodukte. Die Multiplex-Kupplung erfolgte bei 500 nM Konzentration an DNA und PNA-Glycin-Sonden. Nach einer Kupplungszeit von 4 h ergab die MALDI/MS Analyse, daß in Gegenwart der Mutanten-DNAs von den 18 möglichen drei Verknüpfungsprodukte mit hoher Ausbeute gebildet wurden (Abbildung 27.A).

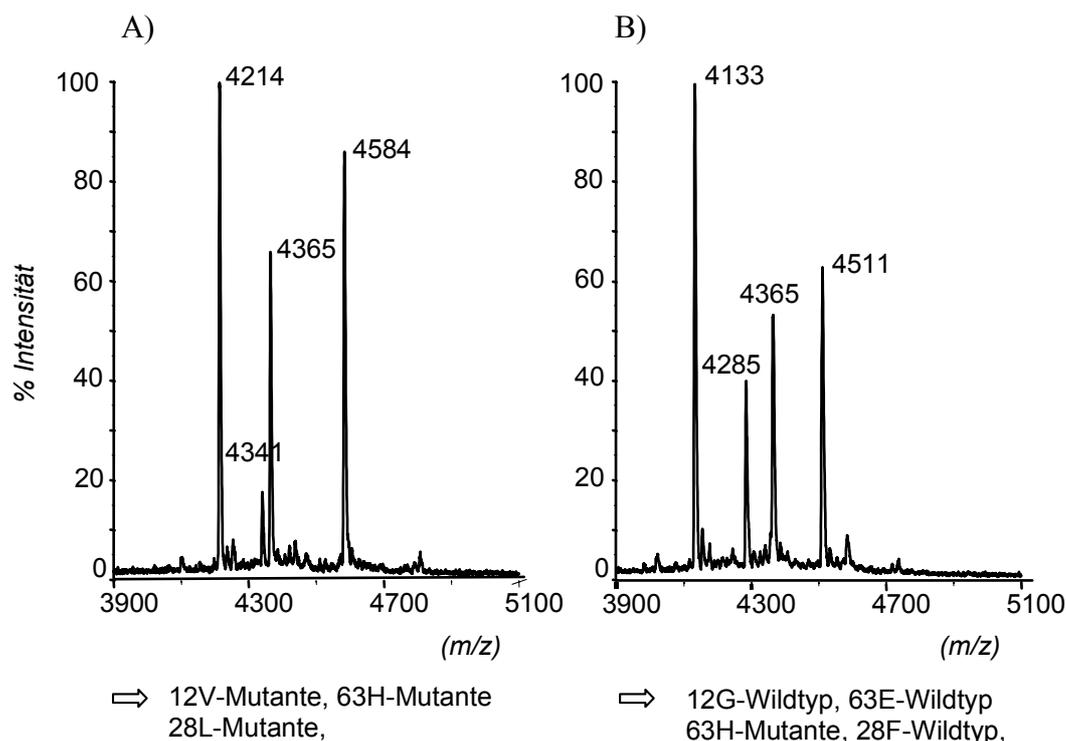


Abbildung 27: MALDI-TOF-Analyse der Multiplex-Verknüpfung. A) in Gegenwart der Mutanten-DNAs und B) in Gegenwart der Wildtyp-DNAs. Matrix: Sinapinsäure.

Ein Vergleich der gemessenen Werte mit den berechneten Massen der Kupplungsprodukte aus Schema 29 ergab, daß die detektierten Signale eindeutig den spezifischen Kupplungsprodukten **102** der Mutanten-Sonden zugeordnet werden konnten. Ein weiteres schwaches Signal mit einem m/z -Wert von 4341 korrespondiert mit der Molmasse, die für das Kreuzkupplungsprodukt der Reaktion von **99c** mit **101b** zu erwarten wäre. In einem Kontrollversuch wurde die Multiplex-Kupplung in Gegenwart der Wildtyp-DNAs durchgeführt. Wie Abbildung 27.B zu entnehmen ist, zeigte das MALDI-Spektrum vier Signale. Ein Vergleich mit den berechneten Massen führte zu dem Schluß, daß an den Wildtyp-Templaten die drei Wildtyp-Kupplungsprodukte **103** gebildet wurden. Das vierte, zusätzliche Signal mit einem m/z -Wert von 4365 entsprach allerdings dem Kupplungsprodukt der E63H-Mutanten-Sonde

(vgl. Abbildung 27.A). Auch in Abwesenheit der E63H-Mutanten-DNA bildete sich das zugehörige Kupplungsprodukt **102c** in einer unspezifischen Reaktion. Während unspezifische Reaktionen, die zur Bildung von Kreuzkupplungsprodukten wie in Abbildung 27.A führen, toleriert werden können, gilt dies nicht für Reaktionen, die zur Bildung spezifischer Produkte führen. Durch die zusätzliche Bildung des Mutantensignals bei 4365 werden die Aussagen aus Abbildung 27.B verfälscht, denn sie suggerieren, daß ein Gemisch an Wildtyp- und Mutanten-DNA vorliegt. Während die Mutationsstellen G12V und F28L präzise abgefragt werden konnten, bedurfte der Nachweis für die E63H-Mutationsstelle weiterer Optimierung. Ein Kontrollversuch mit den neun PNA-Sonden in Abwesenheit jeglicher DNA-Template ergab, daß ausschließlich das E63H-Mutantensignal **102c** (m/z -Wert = 4365) gebildet wurde (Abbildung 28).

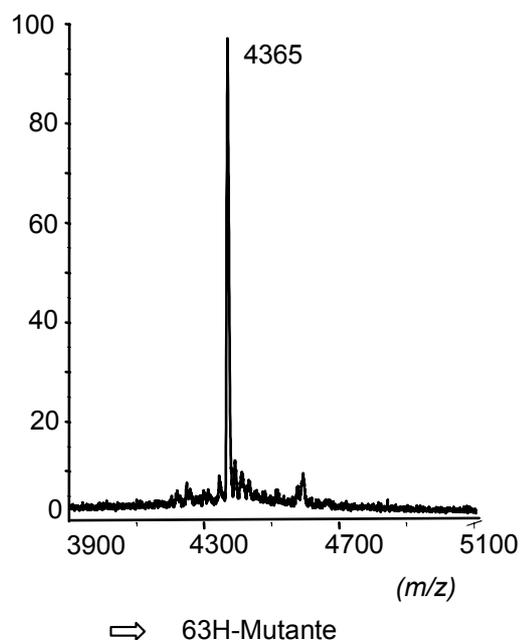


Abbildung 28: MALDI-TOF-Analyse der Multiplex-Verknüpfung in Abwesenheit jeglicher DNA-Template. Matrix: Sinapinsäure.

Die Vermutung lag daher nahe, daß eine ungewünschte Assoziation zwischen der E63H-Mutanten-Sonde **100c** und dem E63H-Acyldonor **99c** die unspezifische Verknüpfung bewirkte. Wie aus Abbildung 29 hervorgeht, wurde für die mangelnde Verknüpfungselektivität die teilweise komplementäre Basensequenz der beiden Sonden verantwortlich gemacht. Bei einer Gesamtlänge von sieben Nucleobasen können sich im **99c/100c**-Duplex (Abbildung 29.A) fünf Watson-Crick-Basenpaare ausbilden. Aufgrund der hohen Bindungsstärke der PNA-PNA-Paarung könnte der Duplex aus den PNA-Verknüpfungssonden **99c** und **100c** eine höhere Stabilität aufweisen als der vollständig komplementäre PNA-DNA-Komplex. In der Folge würde auch ein Erwärmen und anschließendes Abkühlen

der Lösung vor dem Reaktionsstart keine Abhilfe schaffen können. Die Untersuchungen zur Detektion der E63H-Mutation offenbarten, daß eine Selbstkomplementarität von Oligonucleotid-Sonden eine prinzipielle Limitierung darstellen kann. Dies gilt generell für Nucleinsäuren, aber aufgrund der außerordentlichen Stabilität der PNA-PNA-Duplices im besonderen Maße für PNA.

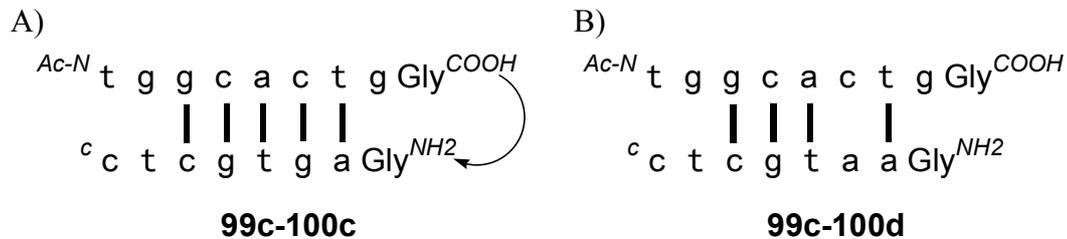


Abbildung 29: Stabilität zwischen A) **99c-100c** und B) **99c-100d**.

Für die Multiplex-Analyse konnte die E63H-Mutantensonde **100c** nicht weiter verwendet werden. Daher wurden die weiteren Experimente mit der E63H-Mutantensonde **100d** durchgeführt, die statt CAC das zweite Codon für Histidin CAT erkennt. Mit **100d** kann **99c** in einem Duplex nur drei durchgängige Basenpaare ausbilden und die Stabilität des PNA-Eduktduplexes sollte drastisch reduziert sein (Abbildung 29.B). Die zur Multiplex-Verknüpfung benötigten PNA-Sonden sind in Abbildung 30 dargestellt. Die Anwesenheit der Mutanten-DNAs führte zur Bildung von drei der 18 möglichen Signalen. Die jeweiligen *m/z*-Verhältnisse entsprechen den erwarteten Massen für die Mutanten-Kupplungsprodukten. Dabei betrug die Masse des Kupplungsproduktes der E63H-Mutantensonde nun 4349 g/mol (Abbildung 30). Ob die Duplexbildung und damit die unspezifische Reaktion zwischen **99c** und **100d** durch den Austausch der PNA-Base in der E63H-Mutantensonde unterbunden wurde, ließ sich durch eine Multiplex-Verknüpfung an den Wildtyp-DNAs klären. Das MALDI-Spektrum der Kupplungsprodukte aus Abbildung 30.B weist nur drei signifikante Signale aus, die eindeutig den Wildtypsonden zugeordnet werden konnten.

Das letztgenannte Beispiel zur Detektion dreier Mutationsstellen im *ras*-Gen zeigt, daß das PNA-Verknüpfungssystem mit der MALDI/MS als Detektionsmethode auch im Multiplex-Verfahren durchgeführt werden kann.

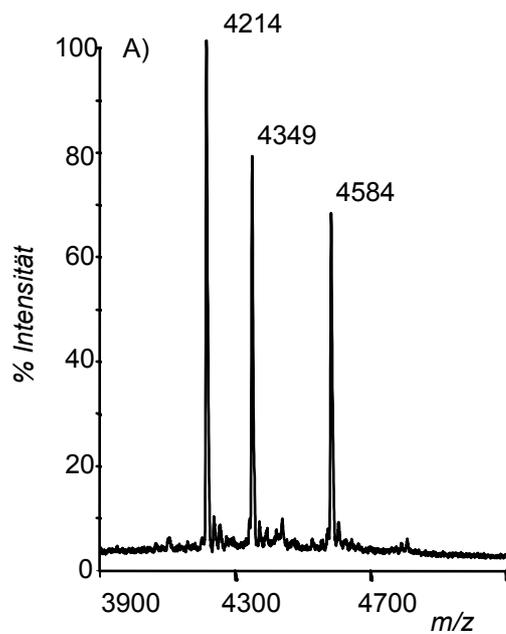
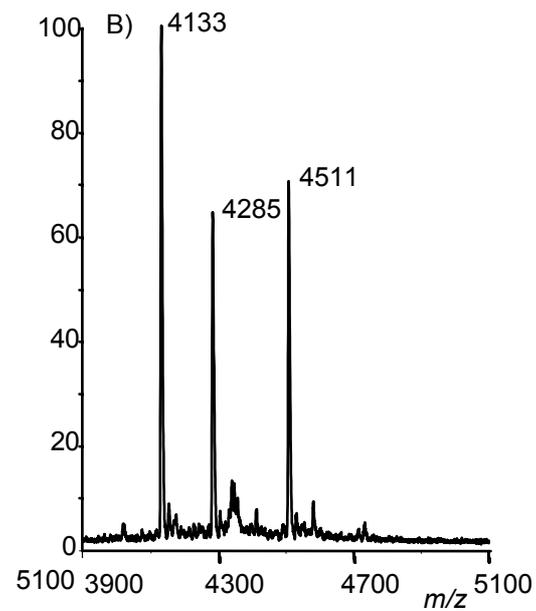
Konstante PNA-SondenG12V: HOOC Gly-c acc cct t $^{N-Ac}$ **99a**F28L: HOOC Gly-c cta ctc at $^{N-Ac}$ **99b**E63H: HOOC Gly-g tca cgg t $^{N-Ac}$ **99c****Mutanten-PNA-Sonden**G12V: C Gly-Gly-gac atc c-Gly NH_2 **100a**F28L: C Gly-Gly-gtg gaa c-Gly NH_2 **100b** +E63H: C Gly-Gly-ctc gta a-Gly NH_2 **100d****Wildtyp-PNA-Sonden** C Gly-gac ctc c-Gly NH_2 **101a** C Gly-gtg aaa c-Gly NH_2 **101b** C GlyGly-ctc ctc a-Gly NH_2 **101c**EDC, Imidazol
500 nM, pH 7.4**DNA-Proben**G12V: 5' CTG (**G/T**)AG GTG TGG GGA A $^{3'}$ F28L: 5' CAC (**T/C**)TT GTG GAT GAG TA $^{3'}$ E63H: 5' GAG (**G/C**)A(**G/T**) TAC AGT GCC A $^{3'}$ **Mutanten-Produkte**Codon 12: 4214 **102a**Codon 28: 4584 **102b**Codon 63: 4349 **102d****Wildtyp-Produkte**Codon 12: 4133 **103a**Codon 28: 4511 **103b**Codon 63: 4285 **103c**⇒ 12V-Mutante, 63H-Mutante,
28L-Mutante,⇒ 12G-Wildtyp, 63E-Wildtyp,
28F-Wildtyp,

Abbildung 30: MALDI-TOF-Analyse der Multiplex-Verknüpfung. A) in Gegenwart der Mutanten-DNAs und B) in Gegenwart der Wildtyp-DNAs.

IV.5.4 Bestimmung der Empfindlichkeit und der Selektivität der MALDI-TOF/MS-Detektion

Die bisherigen Experimente basierten auf der Annahme, daß entweder der reine Wildtyp- oder die reine Mutantensequenz zur Diagnose vorliegt. Bei Erbkrankheiten wie Zystische Fibrose sind dies realistische Szenarien. Anders verhält es sich aber z.B. bei Krebserkrankungen, bei denen es zunächst zu spontanen Mutationen weniger Zellen kommt, die sich im Anschluß dann überproportional stark vermehren. Für die Heilungschancen ist eine sehr frühe Diagnose entscheidend. Für einen gendiagnostischen Tumornachweis besteht daher die Herausforderung, die Mutation vor einem hohen Hintergrund der Wildtypsequenz zu erkennen. Daher wurde am Beispiel der G12V Mutationsstelle im *ras*-Gen die Nachweisempfindlichkeit und die Selektivität der MALDI-detektierten Verknüpfung überprüft. Hierzu wurden unterschiedliche Mischungsverhältnisse von Wildtyp- und Mutanten-DNA untersucht (Abbildung 31).

Bei einer DNA-Gesamtkonzentration von 500 nM und einem Mischungsverhältnis der Wildtyp/Mutanten-Sequenzen von 9:1 kam es zu einem signifikanten Signal des Mutanten-Kupplungsproduktes **102a** mit einem m/z -Wert von 4215 (Abbildung 31.A). Bei einem Verhältnis von 99:1 setzte sich das Mutantensignal immer noch deutlich vom Hintergrundrauschen ab (Abbildung 31.B). In Gegenwart des reinen Wildtyps (Abbildung 31.C) konnte hingegen keine Bildung des Mutanten-Kupplungsproduktes **102a** nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß das PNA-Verknüpfungssystem bei 5 nM DNA-Konzentrationen funktionieren könnte. Wichtiger noch ist der Befund, daß die Verknüpfungssonden an einem perfekt komplementären Templat mit einer mindestens um zwei Größenordnungen höheren Spezifität umgesetzt wurden. Dabei stellt die auf 99:1 bezifferte Selektivität einen Minimalwert dar, der durch die Nachweisempfindlichkeit der MALDI-Detektion bestimmt wird. Es könnte daher möglich sein, daß mit Hilfe empfindlicherer Detektionsmethoden eine höhere Selektivität meßbar wäre.

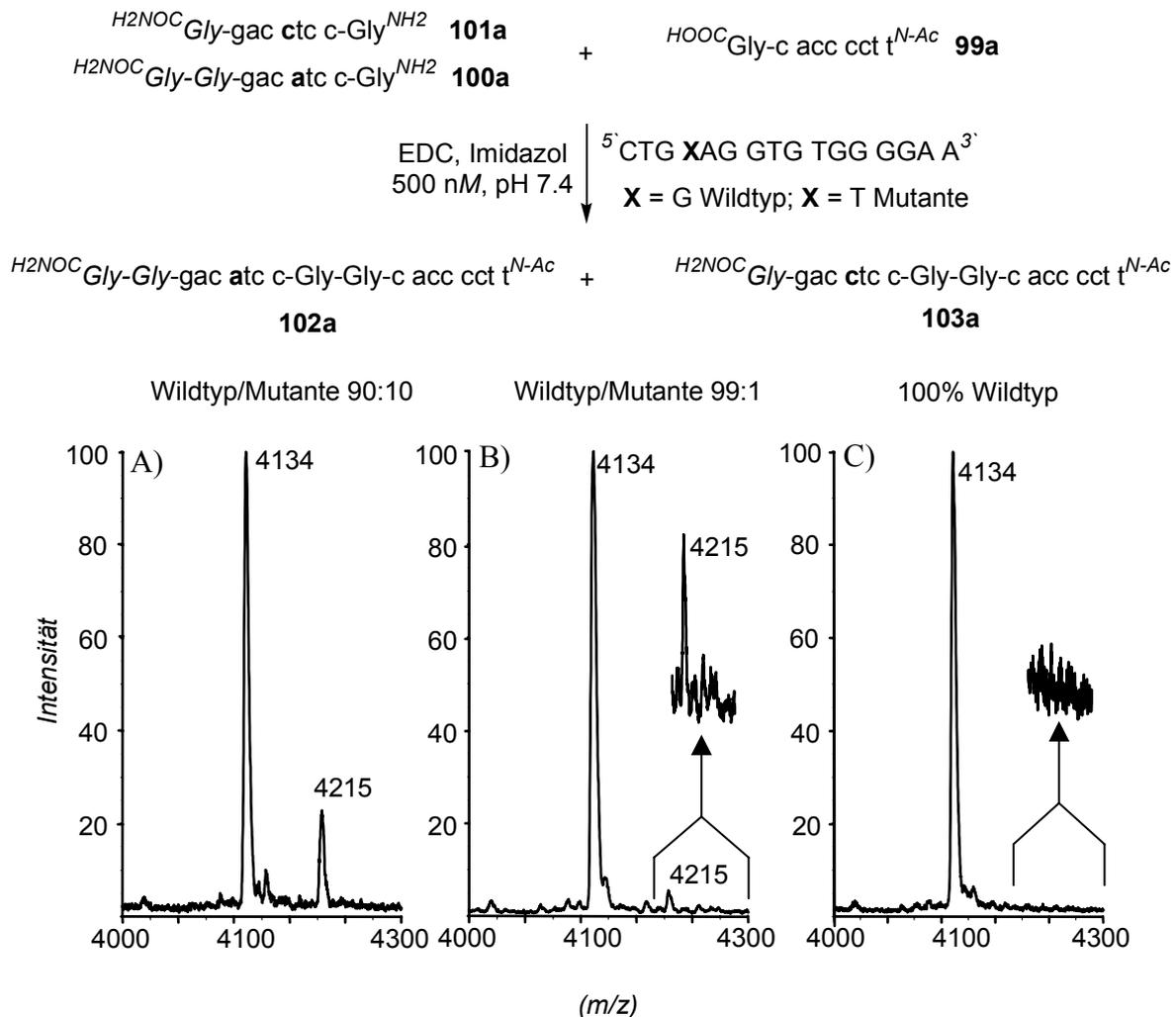
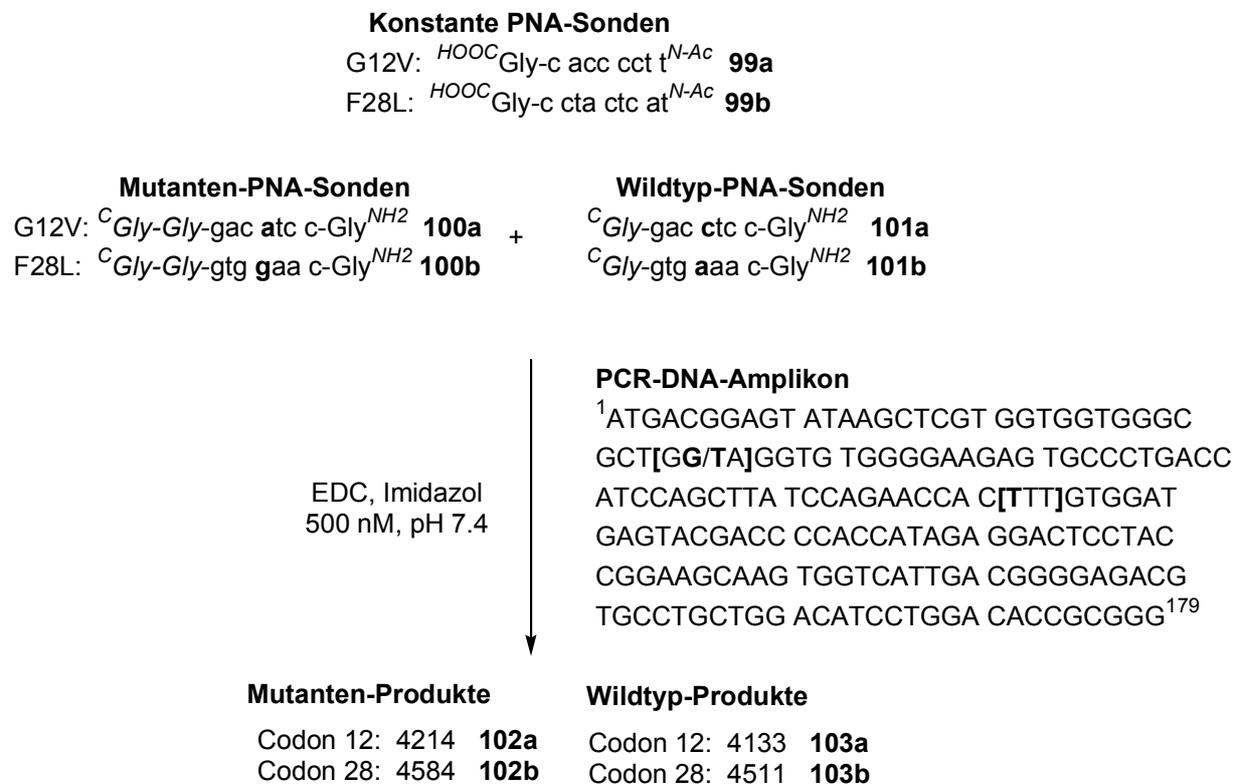


Abbildung 31: Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit und der Selektivität der MALDI-detektierten PNA-Verknüpfung. (DNA-Gesamtkonzentration 500 nM, theoretische Masse der Wildtyp-**103a** (m/z): 4133 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) und Mutantensignals **102a** (m/z): 4214 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)).

IV.4.5 PNA-Verknüpfungssystem an PCR-amplifizierten DNA-Proben

Die in den bisherigen Experimenten eingesetzte DNA war synthetischen Ursprungs. Um als Nachweismethode für die Diagnostik einsetzbar zu sein, muß die PNA-Verknüpfung auch an DNA-Proben biologischen Ursprungs durchgeführt werden können. Im folgenden wurde daher die Verwendung der durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) erzeugten DNA-Template untersucht. So wurde das Multiplexing-Experiment aus Kap. IV.4.3 mit einem PCR-Produkt des Abschnitts 1-179 des *ras*-Gens vom Schwein wiederholt (Schema 30).^[99] Da die Mutationsstelle E63H in diesem Abschnitt nicht enthalten ist, wurden die Experimente nur mit den PNA-Proben für die Mutationsstellen G12V und F28L durchgeführt. Die PCR-

amplifizierte DNA wurde von Dipl.-Biol. Alexander Wolf, Abteilung Strukturelle Biologie des MPI Dortmund, hergestellt und der DNA-Einzelstrang unter Standardbedingungen isoliert.^[102]



Schema 30: PNA-Verknüpfungssystem an PCR-amplifizierter DNA. Das DNA-Amplikon des Abschnitts 1-179 des *ras*-Gens beinhaltet die beiden karzinogenen Mutationsstellen G12V und F28L.

Die Multiplexing-Experimente mit der PCR-amplifizierten DNA wurden unter den identischen Bedingungen wie zuvor durchgeführt, allerdings konnte auch nach wiederholten Versuchen keine Produktsignale im MALDI-Massenspektrum detektiert werden. Die Ergebnisse der Versuche mit synthetischen kurzen DNA-Abschnitten ließen sich also nicht auf ein 179-Basen-PCR-Amplikon übertragen. Möglicherweise führte die Länge des PCR-Amplikons zur Ausbildung von DNA-Überstrukturen, die eine Anlagerung der PNA-Sonden verhinderte. Um diese Überstrukturen aufzubrechen, wurden die PNA-Sonden und die DNA bis zu 45 min auf 90 °C in einem Imidazolpuffer erhitzt. Nach der schnellen Abkühlung wurde der EDC/Imidazol-Puffer zugesetzt. Allerdings war eine Verknüpfung nicht nachweisbar. Bei Oligonucleotiden wird die Ausbildung von Überstrukturen durch zweiwertige Kationen gefördert. Aus diesem Grund wurde dem Puffer EDTA zugesetzt, um Mg²⁺-Ionen durch Komplexbildung zu entfernen. Eine Verknüpfung war jedoch auch unter

diesen Bedingungen nicht nachweisbar. Daß die Zugabe von EDTA die Verknüpfungsreaktion nicht beeinträchtigt, wurde in einem Kontrollexperiment mit synthetischen DNAs bestätigt.

Die Tendenz zur Ausbildung von Überstrukturen nimmt mit der Länge des Oligonucleotids zu. Die synthetischen 17-mer DNA-Template, an denen die PNA-Verknüpfungen aus Abbildung 30 durchgeführt wurden, sind zu kurz, um Überstrukturen auszubilden. Bei längeren synthetischen DNA-Template sollte aber die Ausbildung von Überstrukturen begünstigt sein. Wenn Überstrukturen der Grund für die Inhibierung der PNA-Verknüpfungsreaktion im PCR-Amplikon waren, sollte auch an langen synthetischen DNA-Oligomeren die Reaktion unterdrückt werden. In der Standardsynthese können DNA-Oligonucleotide von einer Länge bis zu 70 Nucleobasen hergestellt werden. Daher wurde an einem synthetischen 70-mer Oligonucleotid das Experiment wiederholt, das den Bereich von 30-100 des *ras*-Gens abdeckt, der die beiden Mutationsstellen G12V und F28L enthält. Wie Abbildung 32 zu entnehmen ist, können mit dem synthetischen 70mer die Wildtypprodukte **103a/b** zweifelsfrei detektiert werden. In der synthetischen 70mer DNA verhindern eventuell ausgebildete Überstrukturen die Verknüpfungsreaktion nicht.

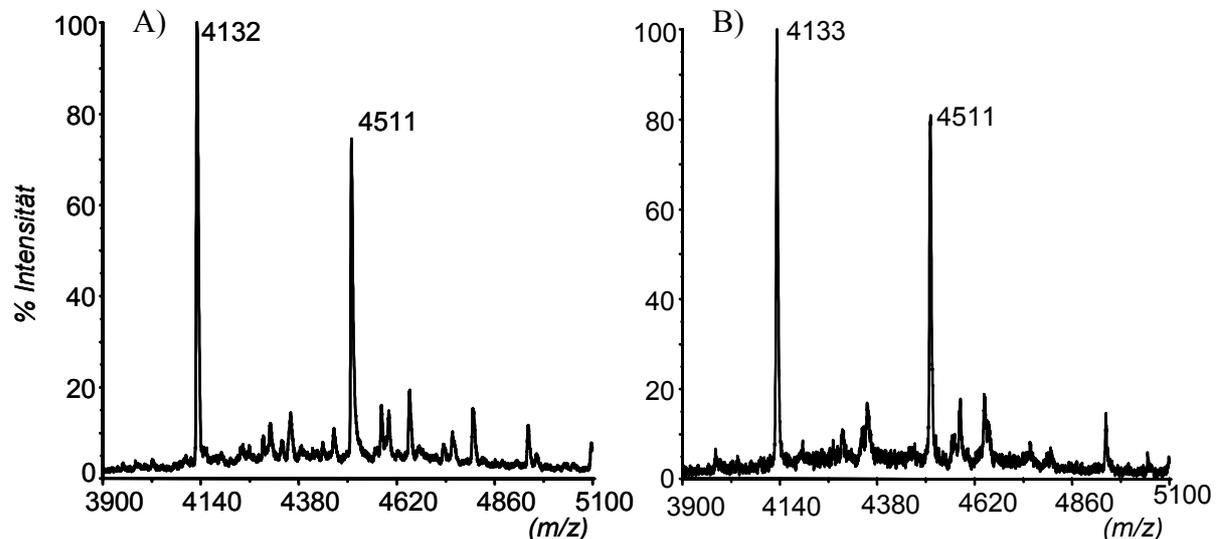


Abbildung 32: MALDI-TOF-Analyse des PNA-Verknüpfungssystems A) an einer synthetischen 70mer Wildtyp-DNA, welche die Mutationsstellen G12V und F28L abdeckt; B) einer Mischung aus PCR-Amplikon (1-179) und der synthetischen 70mer Wildtyp-DNA aus (A). Theoretische Masse des G12V Wildtypproduktes **103a** (m/z): 4133 ($[M+H]^+$) und des F28L-Wildtypproduktes **103b** (m/z): 4511 ($[M+H]^+$).

Eine Mischung aus dem synthetischen 70mer und einer PCR-Probe sollte nun die Frage klären, ob die PNA-Kupplung durch das PCR-Amplikon selbst oder durch mögliche

Verunreinigungen, die in der PCR-Probe enthalten waren, inhibiert wurde. Indem beide Wildtypprodukte **103a/b** in der Mischung einwandfrei nachweisbar waren, konnten mögliche Verunreinigungen als Inhibitoren der PNA-Verknüpfung ausgeschlossen werden.

Einer möglichen Ausbildung von Überstrukturen in dem PCR-Amplikon sollte durch eine Verkürzung des Amplikons entgegengetreten werden. Der Abstand der PCR-Primer zueinander wurde soweit verringert, daß die Polymerasekettenreaktion ein 79-mer Amplikon erzeugte. Das kürzere PCR-Amplikon deckte nun den Bereich von 1-79 des *ras*-Gens ab. Obwohl das PCR-Amplikon nun von ähnlicher Größe war wie die synthetische 70mer Wildtyp-DNA, konnte nach wie vor nur das Hintergrundrauschen analog zum Kontroll-experiment ohne Templat detektiert werden. Eine erneute Sequenzierung des Gens bestätigte die bekannte Sequenz, so daß sich die mangelnde Detektierbarkeit der Mutationsstellen auch nicht durch ein mutiertes PCR-Amplikon erklären läßt.

In diesen ersten Experimenten war es nicht möglich, die Ergebnisse des PNA-Verknüpfungssystems von synthetischer DNA auf PCR-amplifizierte DNA zu übertragen. Da durch das Mischungsexperiment (Abbildung 32.B) Verunreinigungen in der PCR-DNA-Probe ausgeschlossen werden können, erhärtet sich der Verdacht, daß das PCR-Amplikon selbst die Verknüpfungsreaktion unterbindet. Bei dem gewählten Beispiel der G12V-Mutationsstelle im *ras*-Gen handelt es sich um eine Guanin-reiche Sequenz, die zur Ausbildung von Überstrukturen neigen. In diesem Kontext ist es erwähnenswert, daß Kool ebenfalls an dem Beispiel der G12V-Mutationsstelle des *ras*-Gens eine Templat-gesteuerte Oligonucleotid-verknüpfung durchführte.^[67] Als Templat verwendete er allerdings nicht das PCR-Amplikon des Guanin-reichen Sense-Stranges sondern das des komplementären Antisense-Stranges. An dem Guanin-armen Antisense-Strang ließ sich die Oligonucleotidverknüpfung erfolgreich durchführen. In weiterführenden Untersuchungen muß deshalb das PNA-Verknüpfungssystem an weiteren PCR-DNA-Sequenzen, wie z.B. dem Antisense-Strang von *ras*, getestet werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

V.1 Zusammenfassung

Der zuverlässige Nachweis von Einzelbasenmutationen ist für die Diagnose von genetisch bedingten Krankheiten wie Mukoviszidose oder Krebs von essentieller Bedeutung. Dabei besteht das Prinzip aller DNA-Diagnostika in der Hybridisierung des DNA-Analyten mit einer komplementären Sonde. Die Selektivität der Hybridisierung allein ist jedoch selten ausreichend, um eine komplementäre DNA-Probe von einer Einzelbasenmutante zu unterscheiden. Zur Erhöhung der Diskriminierungseffizienz wurde in dieser Arbeit Peptidnucleinsäure (PNA, Abbildung 33.B) eingesetzt, ein DNA-Analogon mit verbesserten Basenpaarungseigenschaften.

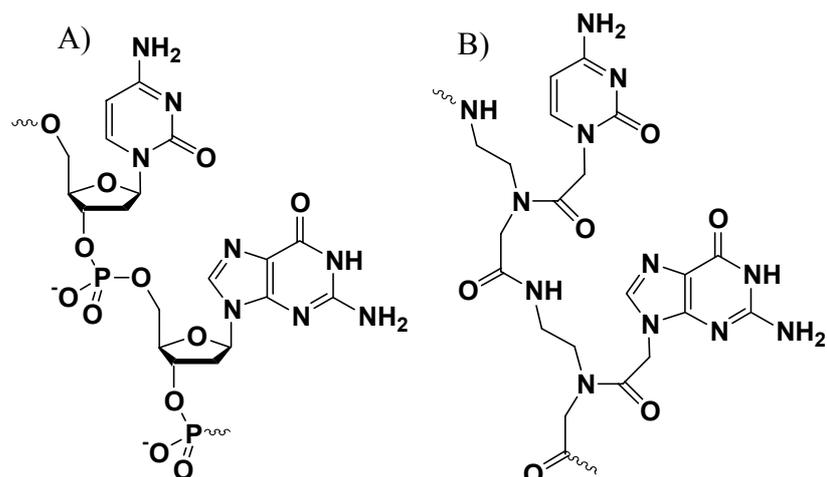


Abbildung 33: Vergleich der chemischen Struktur von A) DNA und B) PNA.

Peptidnucleinsäuren zeichnen sich durch eine außerordentlich hohe Affinität gegenüber komplementären Nucleinsäuren aus, die mit einer gesteigerten Selektivität gegenüber Basenfehlpaarungen einhergeht. Diese Eigenschaften, gepaart mit der Stabilität gegenüber

chemischen und enzymatischen Abbaureaktionen, machen PNA zu einer attraktiven Substanzklasse für die DNA-Diagnostik.

Für eine eindeutige Detektion werden Oligonucleotidsonden mit einer Länge von mehr als 16 Basen benötigt. PNA-Segmente dieser Länge sind jedoch relativ unselektive DNA-Binder. Hingegen zeichnen sich kurze PNA-Oligomere bei einer immer noch ausreichenden DNA-Affinität durch eine sehr gute Einzelbasendiskriminierung aus. Eine hochspezifische Sequenzanalyse eines eindeutigen Genabschnittes sollte also mit einer Verknüpfungsstrategie möglich sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die anstelle der Detektion der Hybridisierung einer langen Sonde die Verknüpfung zweier kurzer Sonden nachweist.

Eine Nucleinsäure-kontrollierte Verknüpfung von PNA-Oligomeren wurde bereits beschrieben. Untersuchungen zur Sequenzselektivität von PNA-Verknüpfungsreaktionen waren hingegen nicht bekannt. Aus diesem Grund wurde zunächst an einem Modellsystem der Einfluß einer Basenfehlpaarung auf die Effizienz der PNA-Verknüpfungsreaktion ermittelt (Abbildung 34).

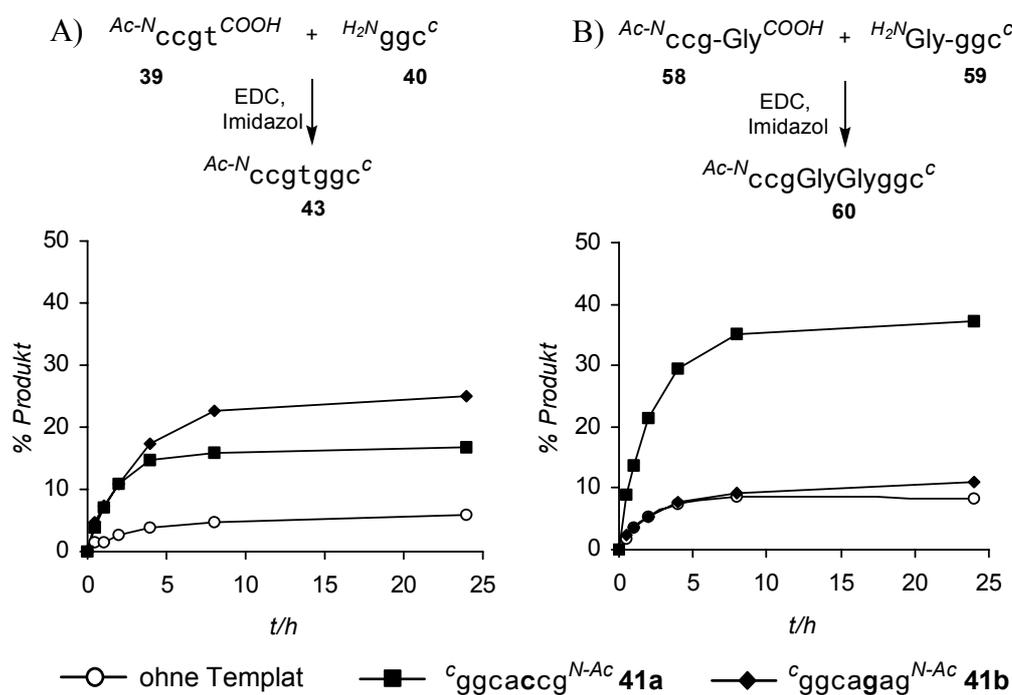


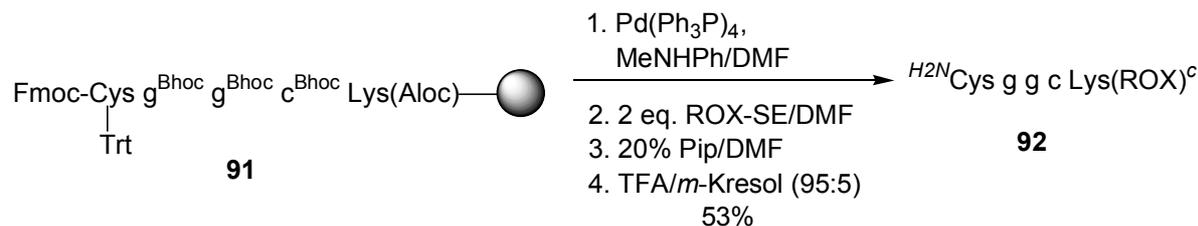
Abbildung 34: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung der A) PNA-Fragmentverknüpfung von **39** und **40** und B) der Verknüpfung der PNA-Glycin-Konjugate **58** und **59** ohne Templat (○), in Gegenwart des komplementären Templats **41a** (■) und des fehlpaarenden Templats **41b** (◆). Die Ausbeuten der Kupplungsprodukte wurden durch HPLC-Analyse aliquotierter Proben bestimmt.

Am Beispiel der Verknüpfung des PNA-Tetramers **39** mit dem Trimer **40** zeigte sich, daß die PNA-Fragmentkupplung am komplementären Templat **41a** und dem fehlpaarenden Templat **41b** mit ähnlicher Effizienz verlief. Die Bildung des Kupplungsproduktes **43** war daher ein ungenügendes Mittel, die Einzelbasenmutation im Templat **41b** nachzuweisen. Die Templatselektivität des PNA-Verknüpfungssystems ließ sich durch die gezielte Erzeugung einer Basenlücke während der Kupplung erhöhen. Diesem Konzept der Basenlückenkupplung liegt die Annahme zugrunde, daß durch die erzeugte Basenlücke die Kooperativität der Basenstapelung unterbrochen wird. Damit sollten sich die Sonden-Analyt-Komplexe weniger tolerant gegenüber weiteren Störfaktoren wie einer Einzelbasenfehlpaarung erweisen. Die Bildung einer Basenlücke erfolgte durch den Austausch des zentralen PNA-Monomers gegen ein isosteres Dipeptid, welches durch die Verknüpfung zweier PNA-Aminosäure-Konjugate **58** und **59** aufgebaut wird. Der Modellversuch bestätigte diese Annahme. Die Zugabe des komplementären Templates **41a** erhöhte die Verknüpfungseffizienz und, wichtiger noch, die Sequenzselektivität. So konnte die Zugabe des fehlpaarenden Templates **37b** die Produktbildung nicht beschleunigen.

Die Bedingungen, die in den Modellstudien eine sequenzselektive Verknüpfung gewährleisteten, wurden für die Analyse einer Einzelbasenmutation in einem DNA 17mer übertragen. Die HPLC-Analysen belegten, daß nur das perfekt komplementäre DNA-Templat und nicht das Einzelbasenmutanten-Templat in der Lage war, die Produktbildung zu beschleunigen. Eine Voraussetzung für die Templatselektivität ist, daß die Mutationsposition im Zentrum der Verknüpfungssonden plziert wird. Ist sie in unmittelbarer Nachbarschaft der Verknüpfungsstelle lokalisiert, kann keine Diskriminierung zwischen einem Wildtyp- und einem Mutanten-Templat vorgenommen werden.

Im zweiten Teil der Dissertation wurde nach Alternativen zur zeitaufwendigen und verhältnismäßig insensitiven HPLC-Detektion gesucht. So wurde versucht, über FRET die Verknüpfung einer Fluoreszenzdonor- mit einer Fluoreszenzakzeptor-markierten PNA-Sonde zu detektieren. Die Einführung der Fluorophore erfolgte sowohl in Lösung als auch an der festen Phase. Dabei erwies sich die Festphasensynthese der in Lösung überlegen (Schema 31). Die Festphasensynthese lieferte die markierten PNA-Sonde in vergleichbaren Ausbeuten wie die Synthese in Lösung. Der präparative Aufwand aber war deutlich geringer und eine Reinigung des Rohproduktes nur nach dem Abspalten von der festen Phase am Ende der

Synthese vonnöten. Die Festphasensynthese ermöglicht somit einen einfachen Zugang zu markierten PNA-Sonden.



Schema 31: Festphasensynthese der Fluoreszenz-markierten PNA-Sonde **92**. Als Marker wurde der Rhodaminfarbstoff ROX verwendet.

Die Fluoreszenz-markierten PNA-Sonden ließen sich unter keinen der gewählten Bedingungen verknüpfen. Unerklärlicherweise scheint die Anwesenheit der Fluorophore die Verknüpfungsreaktion zu inhibieren. Ein fluoreszenzspektroskopischer Nachweis der PNA-Verknüpfungsreaktion auf der Basis von FRET konnte daher nicht realisiert werden.

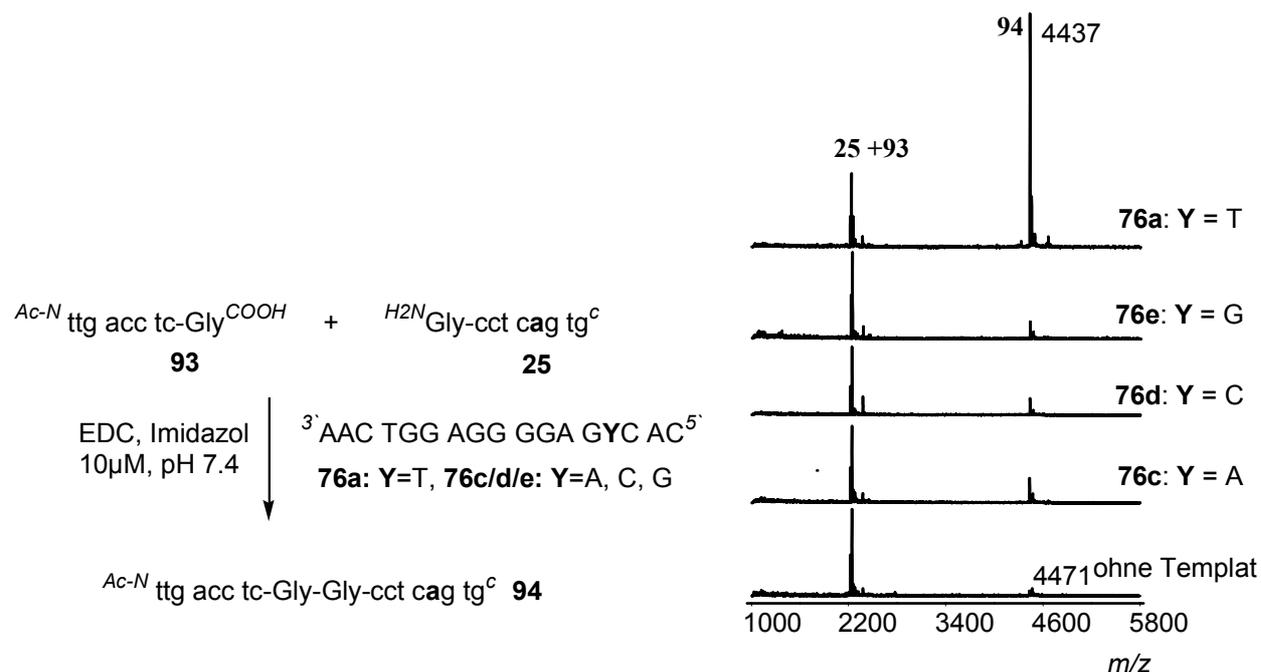


Abbildung 35: MALDI-TOF-Analyse der Basenlückenverknüpfung von **25** und **93** in Gegenwart der DNA-Template **76**. Nur in Gegenwart des komplementären Templates **76a** ist ein signifikanter Produktpeak bei (*m/z*) für [(M+H)⁺]: 4437 erkennbar.

Die besonderen Vorteile des PNA-Testsystems kamen dagegen bei der Verwendung der Massenspektrometrie als alternativer Nachweistechnik zur Geltung. Im Gegensatz zu DNA

läßt sich PNA sehr einfach und präzise mit MALDI-TOF/MS analysieren. Am Beispiel des in Abbildung 35 gezeigten synthetischen DNA-Segementes **76** aus dem Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Regulator-Gen (CFTR) konnte mit MALDI-TOF/MS als Analysenmethode die Templatelektivität der PNA-Verknüpfung auch an DNA-Templaten nachgewiesen werden.

Für die Routinediagnostik besteht ein zunehmender Bedarf an Nachweissystemen, die eine Multiplex-Detektion ermöglichen, d.h. den Nachweis mehrerer Mutationsstellen durch ein einziges Experiment. Das hohe Auflösungsvermögen der Massenspektrometrie ermöglicht einen solchen Multiplex-Nachweis. Am Beispiel der drei karzinogenen Mutationen des *ras*-Gens G12V, F28L und E63H wurde die Anwendbarkeit des PNA-Verknüpfungssystems zur Multiplex-Analyse untersucht (Abbildung 36). Zur Bestimmung jeder potentiellen Mutationsstelle benötigt man drei PNA-Sonden (einen konstanten Acyldonor und je ein Wildtyp- und Mutanten-Nucleophil), so daß insgesamt sechs Nucleophile mit drei Acyldonoren umgesetzt wurden.

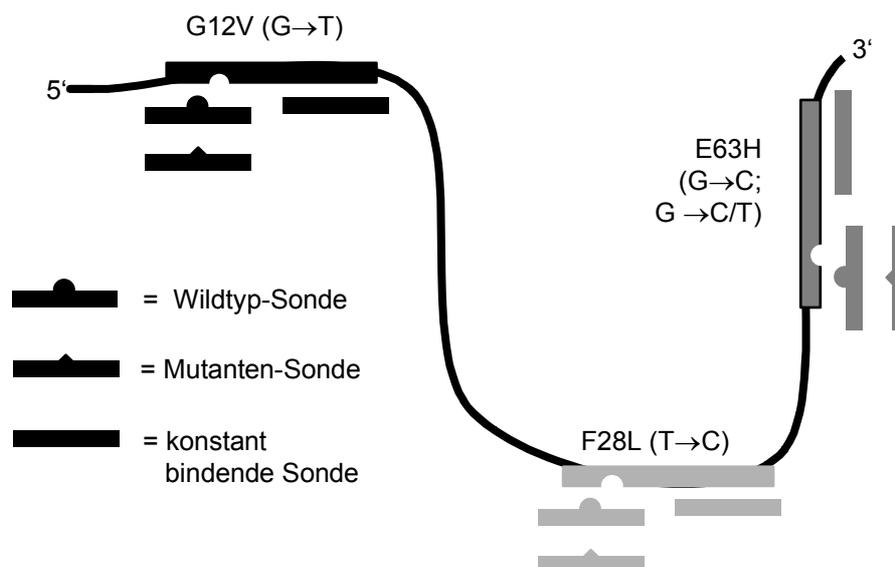


Abbildung 36: Prinzip des Multiplex-Nachweises am Beispiel der drei karzinogenen Mutationen G12V, F28L und E63H in *ras*.

Von den 18 möglichen Kupplungsprodukten entstanden laut MALDI-TOF-Analyse an den Mutanten-DNAs nur die drei in einer spezifischen Reaktion gebildeten Kupplungsprodukte der Mutantensonden (Abbildung 37.A). Ebenso bildeten sich in Gegenwart der Wildtyp-DNAs ausschließlich die spezifischen Kupplungsprodukte der Wildtypsonden.

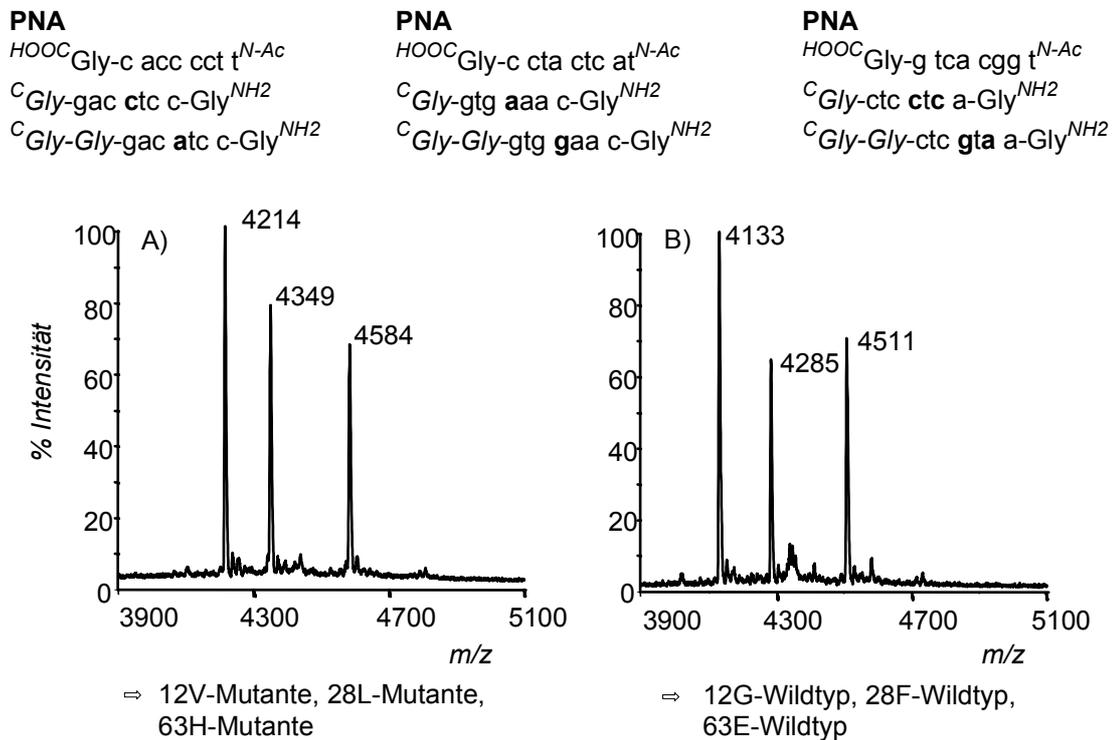


Abbildung 37: Multiplex-Nachweis dreier Mutationsstellen in *ras* (G12V, F28L, E63H) mittels MALDI-TOF/MS in Gegenwart der A) Mutanten-DNAs und B) Wildtyp-DNAs (DNA-Konzentration: 500 nM; Berechnete Massen der Kupplungsprodukte (Mutante/Wildtyp): Codon 12: 4214/4133, Codon 28: 4584/4511, Codon 63: 4349/4285).

Um die Empfindlichkeit des Detektionssystems zu testen, wurde die Verknüpfung mit einer Mischung der Codon 12-Template durchgeführt. In einem Mischungsverhältnis von 99:1 der Wildtyp/Mutante-Sequenzen war bei 500 nM DNA-Gesamtkonzentration die Anwesenheit der Mutante nachweisbar. Da die Wildtyp-DNA nicht in der Lage war, eine Verknüpfung der Mutantensonden herbeizuführen, kann dem Verknüpfungssystem eine Selektivität von $\geq 99:1$ attestiert werden. Damit übertrifft die Selektivität der chemischen Peptidbindungsknüpfung die der T4-Ligase-vermittelten Verknüpfung, erreicht aber nicht die der *Tth*-Ligase-katalysierten Reaktion. Zudem könnten mit der MALDI-Detektion selbst DNA-Konzentrationen bis zu 5 nM nachgewiesen werden.

Fazit

Ausgehend von einem einfachen Modellsystem wurde im Rahmen dieser Arbeit ein DNA-gesteuertes PNA-Verknüpfungssystem entwickelt, das durch den Einbau einer Basenlücke an der Verknüfungsposition eine hohe Selektivität bezüglich Einzelbasenfehlpaarungen aufweist. PNA ist im Gegensatz zu DNA gegenüber einer sauren Hydrolyse stabil. Daher können DNA-Hintergrundssignale durch saure Hydrolyse entfernt und auf den Einsatz Festphasen-basierter Hybridisierungstechniken verzichtet werden. Die aus sechs unterschiedlichen Sequenzen erhaltenen Daten lassen den Schluß zu, daß die Nucleobase gegenüber der Glycylglycin-Basenlücke keine wesentliche Rolle spielt, denn Adenin, Guanin und Thymin wurden toleriert. Mit der Entwicklung des PNA-Verknüpfungssystems in Verbindung mit einer massenspektrometrischen Analyse scheint somit ein effizienter Multiplex-Nachweis von Einzelbasenmutationen in homogener Lösung möglich. Für medizinisch-biologische Untersuchungen muß das PNA-Verknüpfungssystem auch PCR-amplifizierte DNA erkennen können. Weiterführende Untersuchungen widmen sich deshalb der Verwendung PCR-amplifizierter DNA-Proben.

Wenn die Verwendung von PCR-DNA möglich sein sollte, dann bietet das in dieser Arbeit entwickelte PNA-Verknüpfungssystem eine Alternative zu bestehenden chemischen und enzymatischen Methoden der DNA-Detektion. Vor allem die Fähigkeit, Einzelbasenmutationen in einem Multiplex-Verfahren präzise nachzuweisen, unterscheidet das hier vorgestellte PNA-Verknüpfungssystem vorteilhaft von etablierten DNA-Nachweissystemen. Solche Multiplex-Detektionssysteme ermöglichen einen hohen Analysendurchsatz, ohne die Anzahl der durchzuführenden Tests erhöhen zu müssen. Davon könnten vor allem pharmakogenetische Anwendungen profitieren, bei denen viele SNP-Muster verglichen werden müssen.

V.2 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die PNA-Verknüpfung eine Multiplex-Analyse dreier gleichzeitig vorliegender Mutationen unterstützt. Im weiteren wäre nun von Interesse, wieviele Mutationen simultan untersucht werden könnten. Hierbei wird voraussichtlich nicht so sehr das Auflösungsvermögen der MALDI-TOF-Massenspektrometrie, sondern eher die Komplementarität einzelner PNA-Sonden zueinander der limitierende Faktor sein.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen wurden an synthetischer DNA durchgeführt. Um eine Anwendung des PNA-Verknüpfungssystems für biologisch-medizinische Fragestellungen zu ermöglichen, muß auch durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifizierte DNA von dem PNA-Verknüpfungssystem erkannt werden. Die ersten Experimente mit PCR-DNA verliefen bisher ohne Erfolg. Als Grund hierfür können Überstrukturen verantwortlich gemacht werden, die sich in Guanin-reichen DNA-Sequenzen ausbilden. In weitergehenden Studien muß das PNA-Verknüpfungssystem daher am Beispiel weiterer Sequenzen für den Nachweis von Mutationen in PCR-DNA optimiert werden.

Die PNA-Verknüpfung lief bisher nur Templat-vermittelt ab, nicht aber Templat-katalysiert. Da das PNA-Verknüpfungsprodukt mit einer höheren Affinität an das Templat bindet als die Reaktanden, kommt es zur Inhibierung des Templates durch das gebildete Produkt, so daß der Templatstrang für weitere Reaktionszyklen nicht mehr zur Verfügung steht. Eine Templat-katalysierte Reaktion würde die Nachweisempfindlichkeit erhöhen, da nur noch katalytische Konzentrationen des DNA-Templates erforderlich sind. Eine Katalyse sollte sich zum einen realisieren lassen, indem die Konzentration der nachzuweisenden DNA-Segmente deutlich reduziert und damit die Stabilität des Templat-Verknüpfungsprodukt-Duplex verringert würde. Dies erfordert allerdings ein empfindliches Detektionssystem, wie z.B. Fluoreszenz-detektierte Kapillarelektrophorese. Zum anderen könnten Kupplungsreaktionen gewählt werden, die auch bei höheren Konzentrationen eine Katalyse unterstützten. So wird in einer laufenden Arbeit die Hypothese verfolgt, daß in einer spontanen Folgereaktion das Verknüpfungsprodukt seine Geometrie soweit ändert, daß die Affinität gegenüber dem DNA-Templat abnimmt und die Reaktanden das Produkt verdrängen können.

VI. EXPERIMENTELLER TEIL

VI.1 Meßgeräte und Hilfsmittel

¹H-NMR-Spektren: Gerät AC 250 (250 MHz) der Firma Bruker; Lösungsmittel und "Lock"-Substanzen: CDCl₃ (interner Standard CHCl₃, $\delta=7.24$) und [D₆]-DMSO (interner Standard [d₅]-DMSO, $\delta=2.49$).

Dünnschichtchromatographie: Zur analytischen Dünnschichtchromatographie dienten Kieselgelplatten der Firma Merck (Kieselgel 60 F₂₅₄). Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlänge $\lambda=254$ nm und die folgenden Anfärbereagenzien verwendet:

Reagenz A: 2.5 g Molybdätophosphorsäure, 1 g Cer(IV)-sulfat, 6 ml konz. Schwefelsäure und 94 ml Wasser.

Reagenz B: 300 mg Ninhydrin, 3 ml Essigsäure und 997 ml Butanol.

Analytische HPLC: Für die Kapitel IV.2, IV.3 und IV.5: Anlage der Serie HP1100 der Firma Hewlett-Packard; Die Detektion der Signale erfolgte mittels eines Dioden-Array-Detektors bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm. Für das Kapitel IV.4: L-6000A-Anlage der Firma Merck/Hitachi; Die Detektion erfolgte mit dem Dioden-Array-Detektor L-3000; Als Trennsäulen dienten auf 50 °C temperierte RP-C18 Säulen vom Typ CC 250/4 Nucleosil (100-5) HD und EC 250/4 Nucleosil (100-5) PPN der Firma Macherey&Nagel. Als Lösungsmittel diente ein ternäres Gemisch aus Wasser/Acetonitril/1%iger TFA mit einer Flußrate von 1 ml/min. Für die Trennungen wurden folgende Gradienten verwendet:

Gradient A: 0 min (89% Wasser/1% Acetonitril/10% einer 1%igen wäßrigen TFA-Lösung), binnen 30 min auf (76/14/10).

Gradient B: 0 min (89% Wasser/1% Acetonitril/10% einer 1%igen wäßrigen TFA-Lösung), binnen 40 min auf (70/20/10).

Gradient C: 0 min (89% Wasser/1%Acetonitril/10% einer 1%igen wäßrigen TFA-Lösung), nach 2 min binnen 30 min auf (75/15/10).

Gradient D: 0 min (79% Wasser/20% Acetonitril/10% einer 1%igen wäßrigen TFA-Lösung) binnen 30 min auf (20%/70%/10).

Präparative HPLC: Anlage der Serie Dynamax (Modell SD-300) der Firma Rainin. Als Trennsäule dienten auf 50 °C temperierte RP-C18 Säulen vom Typ VP 250/10 Nucleosil (100-7) HD und VP 250/10 Nucleosil (100-7) PPN mit entsprechenden Vorsäule der Firma Macherey&Nagel. Die Detektion der Signale erfolgte mittels eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von $\lambda=280$ nm. Als Lösungsmittel diente ein binäres Gemisch aus A (99% Wasser/1% Acetonitril/0.1% TFA) und B (99% Acetonitril/1% Wasser/ 0.1% TFA) mit einer Flußrate von 3 ml/min.

MALDI-Massenspektrometrie: Für die Kapitel IV.2 – IV.4: Gerät VoyagerTM Biospectrometry Workstation der Firma PerSeptive Biosystems; Die Beschleunigungsspannung betrug 22 500 Volt. Zur Anregung wurde ein Stickstoff-UV-Laser der Wellenlänge $\lambda=337$ nm eingesetzt. Als Matrix diente eine gesättigte Lösung von 2.5-Dihydroxybenzoesäure in 0.1 M TFA/Ethanol (9:1). Als externe Eichsubstanzen dienten Leucin-Enkephalin (555.6 Da) und Angiotensin (1297.5 Da).

Für das Kapitel IV.5: Gerät Voyager-DETM Pro Biospectrometry Workstation der Firma PerSeptive Biosystems. Zur Anregung wurde ein Stickstoff-UV-Laser der Wellenlänge $\lambda=337$ nm eingesetzt. Beschleunigungsspannung: 20.000 Volt; Grid: 95%; Guide Wire: 0.05; Delay time: 400 nsec. Als Matrix diente eine 10%ige Lösung von Sinapinsäure in MeCN/1%TFA (1:1). Als externer Standard dienten: Angiotensin (1297.51 Da), ACTH clip1-17 (2.094.46 Da), ACTH clip18-39 (2466.72 Da), ACTH clip7-38 (3660.19 Da), Insulin (5734.59 Da).

UV-VIS-Spektroskopie: Gerät Carey 100 der Firma Varian; wenn nicht genauer ausgeführt, diente als Lösungsmittel Wasser. Zur Konzentrationsbestimmung der Stammlösungen von Oligonucleotiden wurden die spezifischen Absorptionskoeffizienten ϵ der Oligonucleotide anhand der "nearest-neighbour"-Methode bestimmt.^[103]

Fluoreszenzspektroskopie: Gerät LS 50 B der Firma Perkin Elmer.

Festphasensynthesen: Alle manuellen Synthesen wurden in 5 ml Polyethylen-Spritzenreaktoren der Firma MultiSynTech/Witten durchgeführt, die mit Teflonfiltern (Porengröße 50 μm) und Teflonstempeln ausgestattet waren. Wenn nicht genauer spezifiziert, wurden sämtliche Reaktionen bei Raumtemperatur durchgeführt.

Chemikalien: Die PNA Monomere und HATU wurden von der Firma PerSeptive Biosystems erworben. Die geschützten Aminosäuren und die Harze wurden von Novabiochem bezogen. Die Fluoreszenzmarker stammen von der Firma Molecular Probes. Die DNA-Oligomere wurden von MWG-Biotech in HPSF[®]-Qualität synthetisiert. Die übrigen Chemikalien wurden von den Firmen Acros, Aldrich, Avocado, Fluka und Riedel de Haen geliefert. Alle verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und gegebenenfalls nach Standardmethoden getrocknet.^[104] Sämtliche wäßrigen Lösungen wurden mit Wasser der Reinheitsstufe MilliQPure hergestellt.

VI.2 Versuche zu Kapitel IV.2

Erstbeladung des MBHA-Ankers 16:

Der Belegungsgrad des Harzes wird auf ca. 250 $\mu\text{mol/g}$ dimensioniert, indem bei der Erstbeladung des Harzes der zu knüpfende Baustein im Unterschub zugegeben wird. Das Harz wird zunächst gewaschen (2x mit je 2 ml DCM, 3 min mit 2.5 ml 5% DIPEA/DCM, 2x mit je 2 ml DCM, 2x mit je 2 ml DMF). Zur Voraktivierung gibt man zu einer 0.09 M Lösung des Bausteins in NMP und 2 eq. DIPEA/Py 0.95 eq. HATU. Nach 3 min schlämmt man mit dieser Lösung des voraktivierten Bausteins das Harz auf. Nach 12 h Schütteln wäscht man das Harz (2x mit je 2 ml DMF, 4x mit je 2 ml DCM, 3 min mit 2.5 ml 5% DIPEA/DCM, 4x mit je 2 ml DCM, 2x mit je 2 ml DMF). Nicht umgesetzte Aminofunktionen des Harzes werden mit Essigsäureanhydrid/Py (1:4) blockiert (2x 30 min mit je 2.5 ml). Das Harz wird mit 3x je 2 ml DMF und 2x mit je 2 ml DCM gewaschen und i. Feinvak. Getrocknet.

[*N*-(2-(*t*Butyloxycarbonyl-amino)ethyl)-*N*-[thymine-1-ylacetyl]glycinyloxy]-methyl-polystyrol (Boc-*t*-Merrifield) 19:

Zu einer Lösung von 76.0 mg (200 μmol) Boc-*t*-OH in 1 ml NMP werden bei 5 °C 15.5 μl (100 μmol) DIC zugegeben. Nach 20 min gibt man eine Spatelspitze DMAP zu und überführt die Lösung auf 150 mg Hydroxymethylphenyl-Polystyrolharz (Beladungsgrad 0.67 mmol/g). Nach 16 h wird das Harz mit DMF (5x) gewaschen und mit Essigsäureanhydrid/Py (1:4) und katalytischen Mengen DMAP 2 h acetyliert. Nach dem Waschen mit DMF (4x) und DCM (5x) wird das Harz i. Feinvak. getrocknet. Der Belegungsgrad des Harzes wurde $^1\text{H-NMR}$ -spektrometrisch bestimmt (s. unten).

Belegungsgrad des Harzes: 0.46 mmol/g; Verknüpfungsausbeute: 69% (bezogen auf DIC)

N-*t*Butyloxycarbonyl-glycinyloxy-methyl-polystyrol (Boc-Gly-Merrifield) 22:

Zu einer Lösung von 210 mg (1.20 mmol) Boc-Gly-OH in 3 ml Methanol gibt man unter Rühren 195 mg (0.60 mmol) Cs_2CO_3 . Nach 15 min wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der Rückstand in Toluol aufgenommen und im Ultraschallbad digeriert. Der erhaltene Niederschlag wird unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit und zusammen mit einer Microspatelspitze KI in 8 ml DMF aufgenommen. Die Lösung gibt man zu 1.00 g

Chloromethyl-Harz (Beladungsgrad 0.60 mmol/g), welches zuvor mit DCM (5x) und mit DMF (2x) gewaschen worden ist. Nach 16 h Schütteln bei 50 °C, wäscht man das Harz mit DMF (2x), DCM (5x), DMF (2x). Im Anschluß gibt man eine Lösung von 230 mg (1.20 mmol) Cäsiumacetat in 6 ml DMF aufs Harz, schüttelt 4 h bei 50 °C, wäscht erneut mit DMF (3x) und DCM (2x) und trocknet das Harz i. Feinvak. Der Belegungsgrad des Harzes wurde ¹H-NMR-spektrometrisch bestimmt (s. unten).

Beladungsgrad des Harzes: 0.40 mmol/g; Verknüpfungsausbeute: 66% (bezogen auf Chloromethylharz)

NMR-Spektroskopische Bestimmung des Beladungsgrades von Boc-geschützten Aminosäuren am Merrifield-Harz:

Zu 200 µl [d₄]-Methanol werden 20 mg Natrium gegeben. Nach beendeter Gasentwicklung gibt man 600 µl [d₆]-DMSO und anschließend die für ca. 20 µmol Kupplungsprodukt entsprechende Menge Harz hinzu, schüttelt 4 h und versetzt die Suspension mit 5.0 µl (47.2 µmol) Toluol als NMR-Referenz. Von dem löslichen Anteil der Suspension wird ¹H-NMR-spektroskopisch die Signale der Methylgruppe des Toluols in Relation zu dem Signal der *t*-Bu-Gruppe der Boc-Schutzgruppe gesetzt.

Standardprotokoll zur manuellen PNA-Synthese nach der Boc/Z-Strategie:

Es werden die für 3 – 20 µmol des beladenen Bausteins entsprechende Menge an Harz **16**, **19** oder **22** verwendet.

Boc-Abspaltung: Nach 2x 4 min Schütteln in 1.5 ml *m*-Kresol/TFA (5:95) wird 5x mit je 2 ml DCM und 3x mit je 2 ml DMF gewaschen.

Kupplung: Das Harz wird mit 4 eq. des Bausteins (Endkonzentration ca. 0.1 M) umgesetzt, welcher zuvor binnen 2 min durch 3.95 eq HATU in einer Lösung von 0.5 M DIPEA in Pyridin/NMP (1:4) voraktiviert worden ist. Nach 2 h Schütteln wird das Harz 4x mit je 2 ml DMF gewaschen.

Capping: Nach 5 min Schütteln in 1.5 ml Essigsäureanhydrid/Pyridin (1:10) wird das Harz 5x mit je 2 ml DMF und 5x mit je 2 ml DCM gewaschen.

Terminales Capping: Nach 30 min Schütteln in 2.0 ml Essigsäureanhydrid/Pyridin (1:10) wird das Harz 5x mit je 2 ml DMF und 5x mit je 2 ml DCM gewaschen und anschließend i. Feinvak. getrocknet.

Finale Abspaltung und Freisetzung vom polymeren Träger: Das Polymer wird 4 h in TFMSA/TFA/*m*-Kresol (2:8:1) geschüttelt und anschließend 4x mit je 1.5 ml TFA gewaschen.

Aufarbeitung: Die vereinigten TFA-Phasen werden i. Vak. auf ein fünftel des Volumens eingengt. Durch Zugabe kalten Diethylethers wird das Rohprodukt ausgefällt und abzentrifugiert. Dieser Prozeß wird solange wiederholt bis die Etherphase farblos bleibt. Das Rohprodukt wird in 2 ml Wasser aufgenommen, über eine mit Wasser equilibrierte RP-C18 Sep-Pak-Kartusche extrahiert und mit 2 ml Wasser/Acetonitril (1:1) eluiert. Das Eluat wird über präparative RP-HPLC aufgereinigt und im Anschluß durch Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit. Die Reinheit des Rohproduktes wird durch MALDI-TOF/MS und RP-HPLC-Analyse überprüft.

Erstbeladung von Fmoc-Gly-OH an den Wang-PEG-Harz 31:

Zu einer Lösung von 89.0 mg (300 μ mol) Fmoc-Gly-OH in 1ml NMP werden bei 5 °C 24 μ l (150 μ mol) DIC zugegeben. Nach 20 min gibt man eine Spatelspitze DMAP zu und schlämmt mit dieser Lösung 130 mg Wang-PEG-Polystyrolharz (Beladungsgrad 0.23 mmol/g) auf. Nach 16 h wird das Harz mit DMF (5x) gewaschen und nicht umgesetzte Hydroxyfunktionen mit Essigsäureanhydrid/Py (1:4) und katalytischen Mengen DMAP 2 h acetyliert. Nach Waschen mit DMF (4x 2 ml) und mit DCM (5x 2 ml) wird das Harz i. Feinvak. getrocknet. Die Bestimmung des Beladungsgrades erfolgt photometrisch (s.u.).

Beladungsgrad des Harzes: 0.22 mmol/g; Verknüpfungsausbeute: 96% (bezogen auf das Wang-Harz)

Erstbeladung des RINK-Ankers 34:

Der Belegungsgrad des Harzes wird auf ca. 250 μ mol/g dimensioniert. Das Harz wird zunächst gewaschen (2x mit je 2 ml DCM, 3 min mit 2.5 ml 5% DIPEA/DCM, 2x mit je 2 ml DCM, 2x mit je 2 ml DMF). Zur Voraktivierung gibt man zu einer Lösung von 1 eq. einer 0.09 M Lösung des PNA-Monomers in NMP und 2 eq. DIPEA/Py 0.95 eq. HATU. Nach 3 min gibt man die Lösung des voraktivierten Bausteins auf das Harz. Nach 12 h Schütteln wäscht man das Harz (2x mit je 2 ml DMF, 4x mit je 2 ml DCM, 3 min mit 2.5 ml 5% DIPEA/DCM, 4x mit je 2 ml DCM, 2x mit je 2 ml DMF). Nicht umgesetzte Aminogruppen

werden durch Behandlung mit Essigsäureanhydrid/Py (1:4) blockiert (2x 30 min mit je 2.5 ml). Das Polymer wird gewaschen (3x mit je 2 ml DMF, 2x mit je 2 ml DCM) und i. Feinvak. getrocknet.

UV-Spektroskopische Bestimmung des Beladungsgrades von Fmoc-beladenen Harzen:

Zunächst werden zwei UV-Küvetten mit je 3 ml 20% Pip/DMF gefüllt und ihr UV-Spektrum als Nulllinie definiert. Im Anschluß wiegt man die für ca. 1 μmol entsprechende Menge Harz ab und gibt sie direkt in eine der beiden Küvetten, schüttelte diese mehrmals und bestimmt die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=290$ nm. Den bestimmten Wert multipliziert man mit dem Faktor 0.60606 und erhält die Stoffmenge n , mit der die abgewogene Menge Harz beladen ist.^[105]

Standardprotokoll zur manuellen PNA-Synthese nach der Fmoc/Bhoc-Strategie:

Es werden die für 3 – 20 μmol des beladenen Bausteins entsprechende Menge an Harz **31** oder **34** verwendet.

Fmoc-Abspaltung: Nach 2x 4 min Schütteln in 1.5 ml Piperidin/DMF(2:8) wird 5x mit je 2 ml DCM und 3x mit je 2 ml DMF gewaschen.

Kupplung: Das Harz wird mit 4 eq. des Bausteins (Endkonzentration ca. 0.1 M) umgesetzt, welcher zuvor binnen 2 min durch 3.95 eq HATU in einer Lösung von 0.5 M DIPEA in Pyridin/NMP (1:4) voraktiviert worden ist. Nach 2 h Schütteln wird das Harz 4x mit je 2 ml DMF gewaschen.

Capping: Nach 5 min Schütteln in 1.5 ml Essigsäureanhydrid/Pyridin (1:10) wird das Harz 5x mit je 2 ml DMF und 5x mit je 2 ml DCM gewaschen.

Terminales Capping: Nach 30 min Schütteln in 2.0 ml Essigsäureanhydrid/Pyridin (1:10) wird das Harz 5x mit je 2 ml DMF und 5x mit je 2 ml DCM gewaschen und anschließend i. Feinvak. getrocknet.

Finale Abspaltung und Freisetzung vom polymeren Träger: Das Polymer wird 2 h in TFA/*m*-Kresol (95:5) geschüttelt und anschließend 4x mit je 1.5 ml TFA gewaschen.

Die Aufarbeitung erfolgt analog der Boc/Z-Strategie.

Synthese von ^{H2N}Gly-c-c-t-c-a-g-t-g^{CONH2} 25:

Nach der Fmoc/Bhoc-Strategie wird zunächst 74.2 mg (100 µmol) g-Monomer an 200 mg (110 µmol) Rink-Amid-MBHA-Harz (Beladungsgrad 0.55 mmol/g) gekuppelt. Eine UV-spektroskopische Bestimmung des Beladungsgrades nach der Einführung des g-Monomers beträgt 0.11 mmol/g (20%). Mit 95 mg (10.5 µmol) dieses Harzes wird das Oligomer **25** aufgebaut.

Gesamtausbeute: 6.4 mg (2.7 µmol, 6%).

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 2219 ber. für [M+H]⁺: 2219.15

HPLC: *t*_R: 16.6 min (Gradient A, PPN)

C₈₇H₁₁₂N₄₆O₂₆ · TFA (2332.16)

Die gleiche Sequenz wird ebenfalls in einem 15 µmol Maßstab nach der Boc/Z-Strategie am MBHA-Harz **25** aufgebaut.

Gesamtausbeute: 16.3 mg (7.35 µmol, 41%). Die analytischen Daten stimmen mit denen der Fmoc/Bhoc-Synthese überein.

VI.3 Versuche zu Kapitel IV.3***Ac-N*c-c-g-t^{COOH} 39:**

Es werden 33 mg (15 µmol) des mit Boc-t beladenen Polymers **19** (0.46 mmol Boc-t/g) verwendet. Der Aufbau des Produktes **39** erfolgt nach der Boc/Z-Strategie (siehe allgemeine Versuchsvorschrift S. 92).

Ausbeute: 14.9 mg (12.0 µmol, 80%).

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 1121 ber. für [M+H]⁺: 1121.07

HPLC: *t*_R: 12.2 min (Gradient A, HD)

C₄₄H₅₇N₂₁O₁₅ · TFA (1234.08)

H_2N -g-g-c^{CONH2} 40:

Zum Aufbau des Produktes **40** werden 10.1 mg (20 μ mol) von Boc-c^Z-OH nach der allgemeinen Vorschrift von Seite 91 an 74.7 mg des MBHA-Harzes (Beladungsgrad: 0.80 μ mol/g) geknüpft und das Produkt nach der Boc/Z-Strategie (siehe allgemeine Vorschrift S. 92) synthetisiert.

Ausbeute: 16.7 mg (17.3 μ mol, 86%).

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 851 ber. für [M+H]⁺: 851.8

HPLC: *t*_R: 6.0 min (Gradient A, HD)

C₃₂H₄₂N₂₀O₉ · TFA (964.83)

 $Ac-N$ -g-c-c-a-c-g-g^{CONH2} 41a:

Zum Aufbau des Produktes **41a** werden 8.2 mg (15 μ mol) von Boc-g^Z-OH nach der allgemeinen Vorschrift von Seite 91 an 56 mg des MBHA-Harzes (Beladungsgrad: 0.80 μ mol/g) geknüpft und das Produkt nach der Boc/Z-Strategie (siehe allgemeine Vorschrift S. 92) synthetisiert.

Ausbeute: 13.3 mg (6.4 μ mol, 42%).

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 1963 ber. für [M+H]⁺: 1962.89

HPLC: *t*_R: 17.8 min (Gradient A, HD)

C₇₆H₉₆N₄₄O₂₁ · TFA (2075.90)

 $Ac-N$ -g-c-g-a-c-g-g^{CONH2} 41b:

Zum Aufbau des Produktes **41b** werden 8.2 mg (15 μ mol) von Boc-g^Z-OH nach der allgemeinen Vorschrift von Seite 91 an 56 mg des MBHA-Harzes (Beladungsgrad: 0.80 μ mol/g) geknüpft und das Produkt nach der Boc/Z-Strategie (siehe allgemeine Vorschrift S. 92) synthetisiert.

Ausbeute: 3.8 mg (1.9 μ mol, 13%).

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 2004 ber. für [M+H]⁺ 2002.91

HPLC: t_R : 19.0 min (Gradient A, HD)

$C_{77}H_{96}N_{46}O_{21} \cdot TFA$ (2115.93)

***Ac-N*c-c-g-t-g-g-c^{CONH2} 43:**

Zum Aufbau des Produktes **43** werden 2.5 mg (5 μ mol) von Boc-c^Z-OH nach der allgemeinen Vorschrift von Seite 91 an 19 mg des MBHA-Harzes (Beladungsgrad: 0.80 μ mol/g) geknüpft und das Produkt nach der Boc/Z-Strategie (siehe allgemeine Vorschrift S. 92) synthetisiert.

Ausbeute: 5.9 mg (2.9 μ mol, 58%).

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 1956 ber. für [M+H]⁺: 1953.88

HPLC: t_R : 22.1 min (Gradient A, HD)

$C_{76}H_{97}N_{41}O_{23} \cdot TFA$ (2066.89)

Carbodiimid-vermittelte Fragmentverknüpfung:

Zunächst werden von den eingesetzten Oligonucleotiden wässrige Stammlösungen hergestellt und deren Konzentrationen UV-spektrometrisch bestimmt (ca. 1–5 mM).^[103] Als Puffermedium dient eine wässrige Lösung von 0.6 M Imidazol und 0.3 M EDC bei pH 7.4. Die entsprechende Menge Puffer wird vorgelegt, anschließend die Reaktanden **39** und **40** gegebenenfalls das Templat **41** (1 eq.) zugegeben und bei 25 °C geschüttelt. Um den Verlauf der Reaktion verfolgen zu können, wird in bestimmten Zeitabständen jeweils eine Probe von 40 μ l der Reaktionslösung entnommen, 20 μ l einer 20%igen TFA-Lösung der Probe zugesetzt und anschließend wird die Probe HPLC-chromatographisch (Säule RP-C18 HD; Gradient C) charakterisiert. Die angegebenen Daten wurden aus vier Messungen ermittelt.

3-(Boc-Glyciny)mercaptopropionsäure 52:

Darstellung gemäß Lit.^[78]

***Ac-N*c-c-g-Gly-SCH₂CH₂CONH₂ 54:**

Zum Aufbau des Produktes **47** werden 8.0 mg (30 μ mol) von **52** nach der allgemeinen Vorschrift von Seite 91 an 112 mg des MBHA-Harzes (Beladungsgrad: 0.80 μ mol/g)

geknüpft und das Produkt nach der Boc/Z-Strategie (siehe allgemeine Vorschrift S. 92) synthetisiert.

Ausbeute: 12.0 mg (10.8 μmol , 36%)

MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 1001 ber. für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 999.02

HPLC: t_{R} : 12.8 min (Gradient A, HD)

$\text{C}_{38}\text{H}_{51}\text{N}_{19}\text{O}_{12}\text{S} \cdot \text{TFA}$ (1112.03)

H_2N Cys-g-g-c^{CONH₂} 55:

Zum Aufbau des Produktes **55** werden 31.6 mg (45 μmol) von Fmoc-c^{Bhoc}-OH nach der allgemeinen Vorschrift von Seite 93 an 65 mg des Rink-Harzes **34** (Beladungsgrad: 230 $\mu\text{mol/g}$) geknüpft und das Produkt nach der Fmoc/Bhoc-Strategie (siehe allgemeine Vorschrift S. 94) synthetisiert. Als Cysteinbaustein dient Fmoc-Cys(Trt)-OH. Um eine vollständige Trityl-Abspaltung zu gewährleisten, wird dem finalen Abspaltungsreagenz 5% Triethylsilan als Fänger zugegeben.

Ausbeute: 6.3 mg (5.9 μmol , 40%).

MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 955 ber. für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 954.96

HPLC: t_{R} : 13.7 min (Gradient A, HD)

$\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{N}_{21}\text{O}_{10}\text{S} \cdot \text{TFA}$ (1067.98)

Ac-N c-c-g-Gly-Cys-g-g-c^{CONH₂} 56:

Zum Aufbau des Produktes **56** werden 2.5 mg (5 μmol) von Boc-c^Z-OH nach der allgemeinen Vorschrift von Seite 91 an 19 mg des MBHA-Harzes (Beladungsgrad: 0.80 $\mu\text{mol/g}$) geknüpft und das Produkt nach der Boc/Z-Strategie (siehe allgemeine Vorschrift S. 92) synthetisiert.

Ausbeute: 4.7 mg (2.4 μmol , 48%).

MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 1848 ber. für $[M+H]^+$: 1847.82

HPLC: t_R : 22.0 min (Gradient A, HD)

$C_{70}H_{91}N_{39}O_{21} \cdot TFA$ (1960.83)

Basenlückenkupplung nach der *Native Chemical Ligation*:

Zunächst werden von den eingesetzten Oligonucleotiden wäßrige Stammlösungen hergestellt und deren Konzentrationen UV-spektrometrisch bestimmt (ca. 1–5 mM).^[103] wobei bei den freien Cystein-PNA-Konjugaten auf die Verwendung von entgastem Wasser zu achten ist, da in wäßrigem Medium die Thiole rasch zu den inaktiven Cystin-PNA-Konjugaten oxidiert werden. Als Reaktionsmedium dient eine entgaste und mit Argon gesättigte wäßrige Lösung von 0.1 M NaH_2PO_4 bei pH 7.0, welche direkt vor Beginn der Reaktion mit Benzylmercaptan gesättigt (ca. 1.6 mM) wird. Die entsprechende Menge Puffer wird vorgelegt, anschließend die Reaktanden **54** und **55** sowie gegebenenfalls das Templat **41** (1 eq.) zugegeben und bei 25 °C geschüttelt. Um den Verlauf der Reaktion verfolgen zu können, wird in bestimmten Zeitabständen jeweils eine Probe von 40 µl der Reaktionslösung entnommen, 20 µl einer 20%igen TFA-Lösung der Probe zugesetzt und anschließend wird die Probe HPLC-chromatographisch (Säule: RP-C18 HD; Gradient B) charakterisiert. Die angegebenen Daten wurden aus drei Messungen ermittelt.

***Ac-N* c-c-g-Gly^{COOH} **58**:**

Nach der Boc/Z-Strategie (siehe allgemeine Versuchsvorschrift S. 92) wird an 37.5 mg (20 µmol) des Boc-Gly-Merrifieldharzes **22** das Produkt **58** aufgebaut.

Ausbeute: 19.6 mg (19.1 µmol, 96%)

MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 912 ber. für $[M+H]^+$: 911.87

HPLC: t_R : 9.5 min (Gradient A, HD)

$C_{35}H_{46}N_{18}O_{12} \cdot TFA$ (1024.88)

***H₂N* Gly-g-g-c^{CONH₂} **59**:**

Zum Aufbau des Produktes **59** werden 7.6 mg (15 µmol) von Boc-c^Z-OH nach der allgemeinen Vorschrift von Seite 91 an 56 mg des MBHA-Harzes (Beladungsgrad: 0.80

$\mu\text{mol/g}$) geknüpft und das Produkt nach der Boc/Z-Strategie (siehe allgemeine Vorschrift S. 92) synthetisiert.

Ausbeute: 14.1 mg (13.7 μmol , 90%).

MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 909 ber. für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 908.87

HPLC: t_{R} : 7.1 min (Gradient A, HD)

$\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{N}_{21}\text{O}_{10} \cdot \text{TFA}$ (1021.89)

$^{Ac-N}$ c-c-g-Gly-Gly-g-g-c CONH_2 60:

Zum Aufbau des Produktes **60** werden 2.5 mg (5 μmol) von Boc-c^Z-OH nach der allgemeinen Vorschrift von Seite 91 an 19 mg des MBHA-Harzes (Beladungsgrad: 0.80 $\mu\text{mol/g}$) geknüpft und das Produkt nach der Boc/Z-Strategie (siehe allgemeine Vorschrift S. 92) synthetisiert.

Ausbeute: 4.0 mg (2.1 μmol , 42%).

MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 1801 ber. für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1801.72

HPLC: t_{R} : 14.6 min (Gradient A, HD)

$\text{C}_{69}\text{H}_{89}\text{N}_{39}\text{O}_{21} \cdot \text{TFA}$ (1914.74)

Carbodiimid-vermittelte Basenlückenkupplung:

Zur Durchführung werden die identische Vorgehensweise wie bei der Carbodiimid-vermittelten Fragmentkupplung gewählt. Zur HPLC-Analyse wird die Säule RP-C18 HD und der Gradient A verwendet. Die angegebenen Daten wurden aus drei Messungen ermittelt.

H2N Gly-g-g-c-Lys(β -Ala-Acridin)^C 65 bzw. H2N Cys-g-g-c-Lys(β -Ala-Acridin)^C 66:

An 100 mg MBHA-Harz (Belegungsgrad 0.80 mmol/g) werden 14.1 mg (30.0 μmol) Fmoc-Lys(Boc)-OH analog zu **16** gekuppelt. Unter Standardbedingungen der Boc/Z-Strategie (siehe allgemeine Versuchsvorschrift S. 92) wird die Boc-Schutzgruppe der ϵ -Aminofunktion entfernt und zunächst Boc- β -Ala-OH und dann 9-Carboxylacridin eingeführt. Nach einer Behandlung mit 20% Piperidin in DMF (2x 4 min mit je 1.5 ml) wird das Harz 4x mit je 2 ml DMF, 3x mit je 2 ml DCM und 3x mit je 2 ml DMF gewaschen. An der α -Aminofunktion des

Lysins-Derivates wird das PNA-Oligomer nach der allgemeinen Synthesevorschrift von S. 92 der Boc/Z-Strategie aufgebaut. Vor dem letzten Kupplungsschritt wird das Harz i. Feinvak. getrocknet und zu gleichen Teilen in zwei Reaktoren aufgeteilt, die dann mit Boc-Gly-OH bzw. Boc-Cys(*p*-MeOBzl)-OH beschickt werden.

H^{2N} Gly-g-g-c-Lys(β -Ala-Acridin) CONH_2 65:

Ausbeute: 17.1 mg (12.0 μ mol, 80%)

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 1312 ber. für $[M+H]^+$: 1312.34

HPLC: t_R : 20.0 min (Gradient A, HD)

$C_{57}H_{69}N_{25}O_{13} \cdot TFA$ (1426.36)

H^{2N} Cys-g-g-c-Lys(β -Ala-Acridin) CONH_2 66:

Ausbeute: 14.4 mg (9.7 μ mol, 65%)

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 1360 ber. für $[M+H]^+$: 1358.43

HPLC: t_R : 20.9 min (Gradient A, HD)

$C_{58}H_{71}N_{25}O_{13} \cdot TFA$ (1472.45)

VI.4 Versuche zu Kapitel IV.4

^{Ac-N}(D)-Lys(OregonGreen)-t-t-g-a-c-c-t-c-Gly^{COOH} **74**:

Zu einer Lösung von 2.0 mg (0.85 μmol) des freien Amins **78** in 50 μl eines 0.1 M Na₂CO₃-Puffers (pH 9) wird eine Lösung von 0.9 mg (2.1 μmol , 2.5 eq.) OregonGreen-Isothiocyanat **73** in 40 μl DMF zugegeben. Nach ca. 5 h wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt durch präparative HPLC gereinigt.

Ausbeute: 2.2 mg (0.76 μmol , 89%).

MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 2791 ber. für [M+H]⁺: 2790.69

HPLC: *t*_R: 14.3 min (Gradient D, HD)

UV/VIS (Wasser): λ_{max} = 265, 496 nm

Fluoreszenzspektrum (λ_{ex} : 470 nm): λ_{max} = 524 nm

C₁₁₆H₁₃₅F₂N₄₅O₃₅S · TFA (2903.71)

^{H2N}Gly-c-c-t-c-a-g-t-g-Cys(CPM)^{CONH2} **75**:

Zu einer Lösung von 2.0 mg (0.86 μmol) des freien Thiols **79** in 100 μl eines entgasten 0.1 M Phosphat – 2.5 M Gnd-Puffers (pH 6.5) wird eine Lösung von 2.0 mg (5.0 μmol , 6 eq.) CPM-Maleinimid in 100 μl DMF zugegeben. Nach ca. 5 h wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das nicht markierte sowie das doppelt markierte Produkt von **75** durch präparative HPLC abgetrennt.

Ausbeute: 0.4 mg (0.14 μmol , 17%).

MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 2726 ber. Für [M+H]⁺: 2724.73

HPLC: *t*_R: 25.2 und 25.7 min (Gradient D, HD)

UV/VIS (Wasser): λ_{max} = 265, 385 nm

Fluoreszenzspektrum (λ_{ex} 390 nm): λ_{max} = 469 nm

C₁₁₄H₁₃₉N₄₉O₃₁S · TFA (2837.75)

***Ac-N*(D)-Lys-t-t-g-a-c-c-t-c-Gly^{COOH} 78:**

Nach der allgemeinen Versuchsvorschrift der Boc/Z-Strategie (s. S. 92) wird an 37.5 mg (15 μ mol) des Boc-Gly-Polystyrolharzes **22** die gewünschte Verbindung aufgebaut. Zur Einführung des Lysinrestes wird mit Boc-(D)-Lys(2Cl-Z)-OH gekuppelt.

Ausbeute: 10.4 mg (4.2 μ mol, 28%).

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 2367 ber. Für [M+H]⁺: 2365.32

HPLC: *t*_R: 24.6 min (Gradient A, HD)

C₉₅H₁₂₆N₄₄O₃₀ · TFA (2478.34)

***H²N*Gly-c-c-t-c-a-g-t-g-Cys^{CONH₂} 79:**

Zum Aufbau des Produktes **79** werden 5.1 mg (15 μ mol) von Boc-Cys(pMeOBzl)-OH nach der allgemeinen Vorschrift von Seite 91 an 56 mg des MBHA-Harzes (Beladungsgrad: 0.80 μ mol/g) geknüpft und das Produkt nach der Boc/Z-Strategie (siehe allgemeine Vorschrift S. 92) synthetisiert.

Ausbeute: 12.7 mg (5.2 μ mol, 35%).

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 2321 ber. Für [M+H]⁺: 2322.29

HPLC: *t*_R: 21.1 min (Gradient A, HD)

C₉₀H₁₁₇N₄₇O₂₇S · TFA (2435.30)

***Ac-N*(D)-Lys-c-c-g-Gly^{COOH} 82:**

Nach der allgemeinen Synthesevorschrift der Boc/Z-Strategie (s.S. 92) wird an 37.5 mg (20 μ mol) des Boc-Gly-Merrifieldharzes **22** die Zielsequenz aufgebaut. Zur Einführung des Lysinrestes wird mit Boc-(D)-Lys(2Cl-Z)-OH gekuppelt.

Ausbeute: 13.5 mg (11.7 μ mol, 78%).

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 1041 ber. Für [M+H]⁺: 1040.04

HPLC: *t*_R: 11.9 min (Gradient A, HD)

C₄₁H₅₈N₂₀O₁₃ · TFA (1153.06)

***Ac-N*(D)Lys(OregonGreen)-c-c-g-Gly^{COOH} 83:**

Zu einer Lösung von 2.8 mg (2.70 μmol) des freien Amins **82** in 100 μl eines 0.1 M Na_2CO_3 -Puffers (pH 9) wird eine Lösung von 2.3 mg (5.40 μmol , 2eq.) OregonGreen-Isothiocyanat **73** in 40 μl DMF zugegeben. Nach ca. 2 h wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt durch präparative HPLC gereinigt.

Ausbeute: 2.1 mg (1.30 μmol , 48%).

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 1466 ber. für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1465.41

HPLC: t_{R} : 14.8 min (Gradient D, HD)

UV/VIS (Wasser): λ_{max} = 270, 480 nm

Fluoreszenzspektrum (λ_{ex} 480 nm): λ_{max} = 520 nm

$\text{C}_{62}\text{H}_{67}\text{F}_2\text{N}_{21}\text{O}_{18}\text{S} \cdot \text{TFA}$ (1578.43)

Fmoc-AS-g^{Bhoc}-g^{Bhoc}-c^{Bhoc}-Lys(Aloc)-Rink-PEG-Harz 84 und 91:

Zur Beladung werden in Analogie zu **34** 130 mg (30 μmol) Rink-Tentagelharz (Beladungsgrad 0.23 mmol/g) in einer Lösung von 54 mg (120 μmol , 4 eq.) Fmoc-Lys(Aloc)-OH in 480 μl einer 0.5 M DIPEA/Pyridin und 1 ml DMF aufgeschlämmt, die zuvor 3 min durch 43.0 mg (112 μmol) HATU voraktiviert worden ist. Nach 12 h Schütteln wird das Harz analog zu **34** gewaschen und i. Feinvak. getrocknet. Eine photometrische Bestimmung des Beladungsgrades ergibt 0.19 mmol/g; Verknüpfungsausbeute 81%. Die nachfolgende Festphasensynthese folgt der allgemeinen Versuchsvorschrift der Fmoc/Bhoc-Synthesestrategie (s S. 94). Nach Kupplung der PNA-Monomere wird das Harz i. Feinvak. getrocknet und zu gleichen Teilen in zwei Reaktoren aufgeteilt, die im Anschluß mit 5 eq. (75 μmol) Fmoc-Gly-OH bzw. 5 eq. (75 μmol) Fmoc-Cys(Trt)-OH beschickt werden. Eine erneute photometrische Bestimmung des Beladungsgrades des Harzes ergibt eine Ausbeute von 9.4 μmol (63%, bezogen auf das Rink-Harz) für das Glycin-PNA-Konjugat **84**, bzw. 9.8 μmol (65% bezogen auf das Rink-Harz) für das Cystein-PNA-Konjugat **91**.

^{H2N}Gly-g-g-c-Lys(5-ROX)^C 86:

Unter einer Schutzgasatmosphäre werden 17.0 mg (2 μ mol) **84** mit *N*-Methylanilin/DMF (1:9) gewaschen und anschließend mit kat. Mengen Pd(Ph₃P)₄ in 10% *N*-Methylanilin/DMF (1:9) über Nacht und unter Lichtausschluß umgesetzt. Nach intensivem Waschen mit DMF (7x mit je 2 ml) und DCM (5x mit je 2 ml) wird die Entfernung der Aloc-Schutzgruppe durch einen qualitativen Kaisertest (Erhitzen weniger Harzkügelchen in einer 0.3%igen Ninhydrin-Lösung) kontrolliert. Das Harz wird in einer Lösung von 2.5 mg (4.0 μ mol, 2 eq.) 5-ROX-Succinimidylester und 10 μ l DIPEA in 50 μ l DMF aufgeschlämmt und 16 h Schütteln lassen. Nach Waschen des Harzes mit DMF (3x mit je 2 ml), DCM (3 x mit je 2 ml) und DMF (3x mit je 2 ml) wird die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung mit einer 20%igen Piperidin-Lösung in DMF (2x 4 min mit je 2 ml) entfernt und das Harz erneut mit 3x je 2 ml DMF und 3x mit je 2 ml DCM gewaschen. Die Abspaltung vom Harz erfolgt 2.5 h mit TFA/*m*-Kresol (95:5) in Analogie zur allgemeinen Fmoc/Bhoc-Strategie (s. S. 93). Nach einer chromatographischen Abtrennung der nichtmarkierten PNA erhält man 0.2 mg (0.12 μ mol, 6%) des gewünschten Produktes.

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 1554 ber. Für [M+H]⁺ 1554.65

HPLC: *t*_R: 22.6 min (Gradient D, HD)

UV/VIS (Wasser): λ_{max} = 270, 580 nm

Fluoreszenzspektrum(λ_{ex} 580 nm): λ_{max} = 603 nm

C₇₃H₈₆N₂₅O₁₅ · TFA (1667.66).

^{Ac-N}(D)-Lys-c-c-g-Gly-SCH₂CH₂CONH₂ 88:

Nach der allgemeinen Synthesevorschrift der Boc/Z-Strategie (s. S. 92) werden 4.0 mg (15 μ mol) Boc-Gly-Thioester **52** an das MBHA-Harz gekuppelt und im Anschluß die PNA-Monomerbausteine und Boc-(D)-Lys(2Cl-Z)-OH eingefügt.

Ausbeute: 1.7 mg (1.4 μ mol, 10%)

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 1127 ber. Für [M+H]⁺: 1127.19

HPLC: *t*_R: 13.4 min (Gradient A, HD)

C₄₄H₆₃N₂₁O₁₃S · TFA (1240.20)

^{Ac-N}(D)-Lys(OregonGreen)-c-c-g-Gly-SCH₂CH₂CONH₂ 90:

Zu 100 µl einer Lösung von 1.5 mg (1.2 µmol) des freien Amins **88** in 0.2 M NaHCO₃-Puffers (pH 7.2) wird eine Lösung von 1.2 mg (2.4 µmol, 2eq.) OregonGreen-Succinimidester in 40 µl DMF zugegeben. Nach 2 h wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt durch präparative HPLC gereinigt.

Ausbeute: 1.3 mg (0.8 µmol, 67%).

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 1522 ber. Für [M+H]⁺: 1521.47

HPLC: *t*_R: 12.3 min (Gradient D, HD)

UV/VIS (Wasser): λ_{max} = 270, 497 nm

Fluoreszenzspektrum (λ_{ex} 470 nm): λ_{max} = 524 nm

C₆₅H₇₁F₂N₂₁O₁₉S · TFA (1634.49)

^{H2N}Cys-g-g-c-Lys(5-ROX)^C 92:

Analoge Vorgehensweise wie bei **86**. 9.4 mg (1 µmol) des Harzes **91** werden mit 2.0 mg (3.2 µmol, 3.2 eq.) 5-ROX-Succinimidylester umgesetzt.

Ausbeute: 0.9 mg (0.53 µmol, 53%).

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 1601 ber. Für [M+H]⁺: 1600.74

HPLC: *t*_R: 12.7 min (Gradient D, HD)

C₇₄H₈₈N₂₅O₁₅S · TFA (1713.76)

VI.5 Versuche zu Kapitel IV.5

^{Ac-N}t-t-g-a-c-c-t-c-Gly^{COOH} **93**:

Nach der allgemeinen Versuchsvorschrift der Fmoc/Bhoc-Strategie (s. S. 94) wird an 18.7 mg (15 μ mol) Fmoc-Gly-Wang-Harz **31** das Produkt **93** aufgebaut. Eine photometrische Beladungsbestimmung nach der Einführung des terminalen PNA-Monomers ergibt ca. 6 μ mol.

Ausbeute: 8.5 mg (3.7 μ mol, 25%).

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 2238 ber. Für [M+H]⁺: 2237.15

HPLC: *t*_R: 19.6 min (Gradient A, PPN)

C₈₉H₁₁₄N₄₂O₂₉ · TFA (2350.16)

DNA-Templat-Screening bei der Verknüpfung der PNA-Konjugate **25** und **93**

Zunächst werden von den eingesetzten Oligonucleotiden wäßrige Stammlösungen hergestellt und deren Konzentrationen photometrisch bestimmt (ca. 1–5 mM).^[103] Als Puffermedium dient eine wäßrige Lösung von 0.6 M Imidazol und 0.3 M EDC bei pH 7.4. Zu je 15 nmol der PNA-Reaktanden **25** und **93** werden 1.5 ml Puffer, anschließend 15 nmol (1 eq.) des entsprechenden DNA-Templates zugegeben und 6 h bei 25 °C geschüttelt. Die Reaktionslösung wird auf eine zuvor mit Acetonitril gespülte und auf reines Wasser equilibrierte RP-C18 Sep-Pak-Kartusche gegeben. Nachdem der Puffer mit ca. 6 ml Wasser abgetrennt wird, eluiert man die Oligonucleotide mit 2 ml Wasser/Acetonitril (1:1). Das Lösungsmittelgemisch wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 120 μ l einer 20%igen TFA-Lösung aufgenommen und anschließend 1 h bei 50 °C geschüttelt, um eine vollständige Hydrolyse der DNA-Templates zu gewährleisten. Die Charakterisierung der Probe erfolgt HPLC-chromatographisch (Säule RP-C18 PPN; Gradient A) und mittels MALDI-TOF/MS (Matrix: SINAP).

Bestimmung der Schmelztemperaturen von PNA/DNA-Duplices:

Als Medium für die Bestimmung der Schmelztemperatur T_m der Oligonucleotid-Duplices dient eine wäßrige Pufferlösung von 100 mM NaCl und 10 mM NaH₂PO₄ bei pH 7.0. Um eine Bläschenbildung beim Aufheizen der Probe zu vermeiden, wird der Puffer 15 min entgast. In einem 2 ml Eppendorf-Gefäß wird der Puffer vorgelegt und mit je 2 nmol der beiden Oligonucleotid-Einzelstränge auf ein Gesamtvolumen von 1000 µl aufgefüllt. Die Probe wird in einem Wasserbad auf 95 °C aufgeheizt und binnen 3 h langsam auf die Starttemperatur abgekühlt. Nachdem die Probe in eine 10 mm UV-Küvette überführt worden ist, wird UV-spektroskopisch die Änderung der Absorption gegenüber der Temperatur bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm gemessen. Die Heizrate beträgt 0.5 °C/min. Anhand des Hochpunktes der ersten Ableitung des Graphen wird dann die Schmelztemperatur T_M ermittelt.

Berechnung der Schmelztemperatur T_m eines DNA Duplex:

Der Zugang zum Programm zur Berechnung der Schmelztemperatur T_m erfolgte über das Internet: <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/melting.html>.

Parametrisierung:

Hybridisation type: DNA/DNA

Nearest Neighbor parameters set: SantaLucia *et al.* 1996

Sequence string: CACXGAGG

Complementary sequence: GTGACTCC

Salt concentration: 0.3 M

Nucleic acid concentration: 0.00005 M

Salt correction: SantaLucia 1998

Allgemeines Fmoc/Bhoc-Protokoll für den Syntheseroboter Syro II der Firma**MultiSynTech/Witten**

Für die automatisierte PNA-Festphasensynthese werden zunächst die PNA-Monomere und HOBT 12 h am Hochvakuum getrocknet.^[106] Im Anschluß werden für einen 3 µmol-Ansatz mit einem Überschuß von sechs Äquivalenten des Monomers die entsprechenden Stammlösungen der PNA-Monomeren, Aminosäuren (building blocks) und der Reagenzien hergestellt:

Building block: 0.345 M in NMP

Capping-Reagenz:	Ac ₂ O in Py 1:19 (v/v)
DIPEA/Pyr:	0.69 M in Pyridin
HBTU/HOBt:	0.328/0.492 M in NMP
Piperidin/DMF:	20% (v/v) Piperidin in DMF

Als polymere Träger dienen Tentagel-Harze (Beladungsgrad ca. 230 µmol/g), wobei die Anknüpfung des ersten Bausteins manuell erfolgt. Über eine externe Zeitschaltuhr wird das Harz alle 2 min für 12 sec gerührt. Das nachfolgende Syntheseprogramm diente als *Chemfile* für einen 3 µmol Ansatz:

- 1 FILL reactor with 200µl reagent pip/DMF 20%
- 2 HOLD for 2.5 min
- 3 EMPTY for 0.2 min into wastecont. A
- 4 REPEAT from step 1 1 times
- 5
- 6 WASH systeml.: DMF; 2 cycles 250 µl 0.2 min; wastecont. A
- 7 WASH systeml.: DCM; 2 cycles 250 µl 0.2 min; wastecont. A
- 8 WASH systeml.: DMF; 3 cycles 250 µl 0.2 min; wastecont. A
- 9 FILL reactor with 60 µl building block
- 10 FILL reactor with 60 µl reagent DIPEA/Pyr
- 11 FILL reactor with 60 µl reagent HBTU/HOBt
- 12 HOLD for 240 min
- 13 EMPTY for 0.5 min into wastecont.A
- 14
- 15 WASH systeml.: DMF; 3 cycles 250 µl 0.2 min; wastecont. A
- 16 WASH systeml.: DCM; 3 cycles 250 µl 0.2 min; wastecont. A
- 17 WASH systeml.: DMF; 3 cycles 250 µl 0.2 min; wastecont. A
- 18
- 19 FILL reactor with 200 µl reagent Ac₂O/Pyr
- 20 HOLD for 4.5 min
- 21 EMPTY for 0.2 min into wastecont. A
- 22 REPEAT from step 19 1 times
- 23
- 24 WASH systeml.: DMF; 3 cycles 250 µl 0.2 min; wastecont. A

- 25 WASH systeml.: DCM; 3 cycles 250 μ l 0.2 min; wastecont. A
26 WASH systeml.: DMF; 3 cycles 250 μ l 0.2 min; wastecont. A

PNA Mutantensonden 95a-c:

Der Aufbau der Sonden **95a-c** erfolgt durch den Syntheseroboter Syro II an einem mit Fmoc-His(Trt)OH beladene Rink-PEG-Harz (0.21 mmol/g). Die Abspaltung und Aufarbeitung der Probe erfolgte analog der Fmoc/Bhoc Strategie von S. 94. Die Ausbeutenbestimmung erfolgte photometrisch.^[103]

A-Mutante: H^{2N} Gly-g-a-c-a-t-c-c-His^{CONH2} **95a:**

Ausbeute: OD₂₆₀ = 0.3; 4 nmol, 0.1%.

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 2074 ber. für [M+H]⁺ 2074.04

HPLC: *t*_R: 12.6 min (Gradient A, PPN)

C₈₂H₁₀₃N₄₅O₂₁ (2073.03)

C-Mutante: H^{2N} Gly-g-a-c-c-t-c-c-His^{CONH2} **95b:**

Ausbeute: OD₂₆₀ = 1.6; 26 nmol, 0.9%.

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 2051 ber. für [M+H]⁺: 2050.01

HPLC: *t*_R: 11.9 min (Gradient A, PPN)

C₈₁H₁₀₃N₄₃O₂₂ (2049.00)

T-Mutante: H^{2N} Gly-g-a-c-t-t-c-c-His^{CONH2} **95c:**

Ausbeute: OD₂₆₀ = 1.0; 16 nmol, 0.5 %.

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 2065 ber. für [M+H]⁺: 2065.03

HPLC: *t*_R: 13.3 min (Gradient A, PPN)

C₈₂H₁₀₃N₄₅O₂₁ (2064.03)

$Ac-N$ His-His-a-c-c-a-c-c-g-Gly^{COOH} **96:**

Nach erfolgtem Aufbau des Oligomers durch den Syntheseroboter Syro II an das Fmoc-Gly-Wang-PEG-Harz **31** (0.23 mmol/g) wird manuell Fmoc abgespalten und der *N*-Terminus 15 min mit Essigsäureanhydrid/Py (1:19) acyliert. Die Abspaltung und Aufarbeitung der

Probe erfolgt analog der Fmoc/Bhoc Strategie von S. 94. Aufgrund der geringen Ausbeute erfolgt die Ausbeutenbestimmung UV-spektroskopisch.^[103]

Ausbeute: $OD_{260} = 5.8$; 80 nmol, 2.7 %

MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 2490 ber. für $[M+H]^+$: 2490.43

HPLC: t_R : 16.0 min (Gradient A, PPN)

$C_{99}H_{125}N_{53}O_{27}$ (2489.42)

Untersuchung der Substratspezifität am Beispiel der Verknüpfung des PNA-Glycin-Acyldonors 95 mit den PNA-Glycin-Nucleophilen 96:

Wäßrigen Stammlösungen (ca. 50 μM) der PNA-Sonden **95** und **96** werden 500 pmol entnommen, in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit und in 50 μl Puffermedium (wäßrige Lösung von 0.6 M Imidazol und 0.3 M EDC bei pH 7.4) aufgenommen. Aus Stammlösungen der DNA-Oligonucleotide überführt man 500 pmol Templat und schüttelt die Reaktionsmischung 6 h bei 25 °C. Eine mit RP C18 Kieselgel bestückte 10 μl ZipTip Pipettenspitze wird zunächst mit Wasser/Acetonitril (1:1) gespült (5x) und mit Wasser equilibriert (5x). Durch wiederholtes Ein- und Auspipettieren (15x) der Reaktionslösung extrahiert man die Oligonucleotide. Die ZipTip Pipettenspitze wird mit Wasser (5x 10 μl) gewaschen und Oligonucleotide werden anschließend mit 5x 10 μl Wasser/Acetonitril (1:1) von ZipTip Pipettenspitze eluiert. Nach Zugabe von 25 μl einer 20%igen wäßrigen TFA-Lösung erwärmt man das Eluat 2 h auf 50 °C. Im Anschluß wird die Probe unter vermindertem Druck eingeeengt, in 5 μl 20%iger TFA aufgenommen und zur Analyse komplett (5x 1 μl) auf einen MALDI-Analysenteller pipettiert (Matrix: Sinapinsäure).

Synthese der Acyldonoren 99:

Nach erfolgtem Aufbau des Oligomers durch den Syntheseroboter Syro II an ein Fmoc-Gly-Wang-PEG-Harz **31** (0.23 mmol/g) wird manuell Fmoc abgespalten und der N-Terminus durch Behandlung mit 1 ml Essigsäureanhydrid/Py (1:19) 15 min acetyliert. Die Abspaltung und Aufarbeitung der Probe erfolgt analog der Fmoc/Bhoc Strategie von S. 94. Die Ausbeutenbestimmung erfolgte photometrisch.^[103]

G12V-Common: $^{Ac-N}$ t-t-c-c-c-a-c-Gly^{COOH} **99a:**Ausbeute: OD₂₆₀ = 37.1; 0.55 μmol, 18 %.MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 2182 ber. für [M+H]⁺: 2182.10HPLC: *t*_R: 17.3 min (Gradient A, PPN)C₈₇H₁₁₃N₄₁O₂₈ (2181.11)**F28L-Common:** $^{Ac-N}$ t-a-c-t-c-a-t-c-cGly^{COOH} **99b:**Ausbeute: OD₂₆₀ = 20.9; 0.26 μmol, 9%.MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 2472 ber. für [M+H]⁺: 2472.39HPLC: *t*_R: 19.1 min (Gradient A, PPN)C₉₉H₁₂₇N₄₇O₃₁ (2471.39)**E63H-Common:** $^{Ac-N}$ t-g-g-c-a-c-t-g-Gly^{COOH} **99c:**Ausbeute: OD₂₆₀ = 16.0; 0.22 μmol, 7%.MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 2303 ber. für [M+H]⁺: 2302.19HPLC: *t*_R: 20.3 min (Gradient A, PPN)C₉₀H₁₁₃N₄₇O₂₈ (2301.18)**Synthese der Nucleophile 100 und 101:**

Nach der Boc/Z-Strategie werden die Verbindungen **100a-101d** analog Kapitel VI.2 manuell in einem 3 μmol Maßstab am MBHA-Polystyrolharz aufgebaut. Bei dem Kupplungsschritt werden 5 Äquivalente der Monomere eingesetzt. Die Ausbeutenbestimmung erfolgte photometrisch.

G12Vmut: H2N Gly-c-c-t-a-c-a-g-Gly-Gly^{CONH2} **100a:**Ausbeute: OD₂₆₀ = 58.3; 0.88 μmol, 29%.MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 2050 ber. für [M+H]⁺: 2050.98HPLC: *t*_R: 13.3 min (Gradient A, PPN)C₈₀H₁₀₄N₄₄O₂₃ (2049.97)**F28Lmut:** H2N Gly-c-a-a-g-g-t-g-Gly-Gly^{CONH2} **100b:**Ausbeute: OD₂₆₀ = 12.9; 0.18 μmol, 6%.

MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 2131 ber. für $[M+H]^+$: 2131.04
HPLC: t_R : 13.9 min (Gradient A, PPN)
 $C_{82}H_{105}N_{48}O_{23}$ (2130.03)

E63Hmut-1: H^{2N} Gly-a-g-t-g-c-t-c-Gly-Gly CONH2 100c:

Ausbeute: $OD_{260} = 35.2$; 0.54 μ mol, 18%.
MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 2082 ber. für $[M+H]^+$: 2082.00
HPLC: t_R : 14.4 min (Gradient A, PPN)
 $C_{81}H_{105}N_{43}O_{25}$ (2080.99)

E63Hmut-2: H^{2N} Gly-a-a-t-g-c-t-c-Gly-Gly CONH2 100d:

Ausbeute: $OD_{260} = 33.3$; 0.51 μ mol, 17%.
MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 2066 ber. für $[M+H]^+$: 2066.00
HPLC: t_R : 14.3 min (Gradient A, PPN)
 $C_{81}H_{105}N_{43}O_{24}$ (2064.99)

G12Vwt: H^{2N} Gly-c-c-t-c-c-a-g-Gly CONH2 101a:

Ausbeute: $OD_{260} = 66.6$; 1.1 μ mol, 37%.
MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 1970 ber. für $[M+H]^+$: 1969.90
HPLC: t_R : 13.1 min (Gradient A, PPN)
 $C_{77}H_{101}N_{41}O_{23}$ (1968.89)

F28Lwt: H^{2N} Gly-c-a-a-a-g-t-g-Gly CONH2 101b:

Ausbeute: $OD_{260} = 70.0$; 0.91 μ mol, 30%.
MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 2057 ber. für $[M+H]^+$: 2057.99
HPLC: t_R : 14.5 min (Gradient A, PPN)
 $C_{80}H_{102}N_{47}O_{21}$ (2056.98)

E63Hwt: H^{2N} Gly-a-c-t-c-c-t-c-Gly-Gly CONH2 101c:

Ausbeute: $OD_{260} = 15.3$; 0.26 μ mol, 9%.
MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 2001 ber. für $[M+H]^+$: 2001.94
HPLC: t_R : 13.7 min (Gradient A, PPN)
 $C_{79}H_{105}N_{39}O_{25}$ (2000.93)

Multiplex-Nachweis von Einzelbasenmutationen in *ras*:

Die PNA-Sonden **99 – 101** werden wäßrigen Stammlösungen (100 μM) entnommen und mit 250 μl eines Imidazolpuffers (0.6 M Imidazol, pH 7.4) auf 2 μM verdünnt. Nach Zugabe der DNA-Oligonucleotide (250 pmol) werden die Proben bei 90 °C im Wasserbad für 10 min erhitzt, und danach in einem Eisbad rasch abgekühlt. Nach Zugabe von 250 μl des EDC-Puffers (0.6 M Imidazol, 0.6 M EDC, pH 7.4) werden die Proben 6 h bei 25 °C und einer Endkonzentration von 1 μM der PNAs und 500 nM der DNAs geschüttelt. Zur Aufarbeitung der Proben wird eine 10 μl ZipTip Pipette mit Wasser/Acetonitril (1:1) gespült und 3x mit Wasser equilibriert. Durch wiederholtes Ein- und Auspipettieren (15x) der Reaktionslösung extrahiert man die Proben, wäscht sie mit Wasser (1x) und eluiert sie anschließend mit 3x 10 μl Wasser/Acetonitril (1:1). Nach Zugabe von 25 μl 20%iger TFA werden die Proben unter vermindertem Druck eingengt, in 5 μl MALDI-Matrix aufgenommen und zur Analyse auf einen MALDI-Analysenteller pipettiert (Matrix: Sinapinsäure).

Versuche zum Mutationsnachweis in PCR-amplifizierter DNA am Beispiel von G12V in *ras*

Die Proben der PCR-DNA (ca. 80 pmol) werden in ein Eppendorf-Gefäß vorgelegt und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Nach Zugabe des Imidazolpuffers (0.6 M Imidazol, pH 7.4) beträgt die DNA-Konzentration 1 μM . Die für eine 2 μM Konzentration nötige Menge der PNA-Sonden **99a/b**, **100a/b** und **101a/b** werden aus Stammlösungen (100 μM) zupipettiert. Die Proben werden bei 90 °C im Wasserbad für 10 min erhitzt, und danach in einem Eisbad rasch abgekühlt. Nach Zugabe des EDC-Puffers (0.6 M Imidazol, 0.6 M EDC, pH 7.4) werden die Proben 6 h bei 25 °C und einer Endkonzentration von 1 μM der PNAs und 500 nM der DNA geschüttelt. Die Aufarbeitung erfolgte in Analogie zum Multiplex-Experiment (s.o.).

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [2] R. K. Sakai, S. Scharf, F. Faloon, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim, *Science* **1985**, *230*, 1350-1354.
- [3] International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* **2001**, *409*, 860-922.
- [4] C. Venter *et al.*, *Science* **2001**, *291*, 1304-1351.
- [5] S. Pääbo, *Trends in Genetics* **1999**, *15*, M13-M16.
- [6] A. J. Brookes, *Gene* **1999**, *234*, 177-186.
- [7] D. Pfost, M. Boyce-Jacino, D. Grant, *Trends in Biotech.* **2000**, *18*, 334-338.
- [8] B. Sykes, *The Seven Daughters of Eve*, Bantam Press, London, **2001**.
- [9] H. Knodel, H. Bayrhuber, *Linder Biologie*, J. B. Metzler, Stuttgart, **1983**.
- [10] F. Sanger, S. Nicklen, A. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 5463-5467.
- [11] B. Conner, A. Reye, C. Morin, K. Itakura, R. Teplitz, R. Wallace, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 278-282.
- [12] C. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2865-2869; *Angew. Chem.*, **1999**, *111*, 3039-43.
- [13] L. E. Morrison, *J. Fluoresc.* **1999**, *9*, 187-197.
- [14] P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, D. H. Gelfand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7276-7280.
- [15] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308.
- [16] L. Stryer, *Ann. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 819-846.
- [17] X. Chen, B. Zehnbauser, A. Gnirke, P. Kwok, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10756-10761.
- [18] U. Landegren, R. Kaiser, J. Sanders, L. Hood, *Science* **1988**, *241*, 1077-1080.

- [19] H. Baron, S. Fung, A. Aydin, S. Bähring, F. Luft, H. Schneider, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1279-1282.
- [20] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543-584.
- [21] P. K. Ghosh, P. Kumar, K. C. Gupta, *J. Indian Chem. Soc.* **2000**, *77*, 109-132.
- [22] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
- [23] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2796-2823; *Angew. Chem.*, **1998**, *110*, 2954-2983.
- [24] A. Ray, B. Nordén, *FASEB* **2000**, *14*, 1041-1060.
- [25] P. E. Nielsen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 71-75.
- [26] P. E. Nielsen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 16-20.
- [27] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [28] T. Koch, H. Hanssen, P. Andersen, T. Larsen, H. Batz, K. Otteson, H. Ørum, *J. Peptide Res.* **1997**, *49*, 80-88.
- [29] R. Casale, I. Jensen, M. Egholm, in *Peptide Nucleic Acids* (Eds.: P. E. Nielsen, M. Egholm), Horizon Scientific Press, Norfolk, **1999**, pp. 39-50.
- [30] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *35*, 161-214.
- [31] L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, B. Warren, J. Coull, in *Solid Phase Synthesis. Peptides, Proteins and Nucleic Acids* (Ed.: R. Epton), Mayflower Worldwide Limited, Birmingham, **1994**, pp. 149-156.
- [32] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, Berlin, **1984**.
- [33] P. Wittung, P. E. Nielsen, O. Buchardt, M. Egholm, B. Nordén, *Nature* **1994**, *368*, 561-562.
- [34] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. Freier, D. Driver, R. Berg, S. Kim, B. Nordén, P. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566-568.
- [35] H. Ørum, P. E. Nielsen, M. Egholm, R. Berg, O. Buchardt, C. Stanley, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5332-5336.
- [36] P. Lansdorp, N. Verwoerd, v. d. F. Rijke, V. Dragowska, M.-T. Little, R. Dirks, A. Raap, H. Tanke, *Hum. Mol. Genet.* **1996**, *5*, 685-691.
- [37] O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3249-3252; *Angew. Chem.*, **2000**, *112*, 3389-3392.
- [38] P. Ross, K. Lee, P. Belgrader, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4197-4202.
- [39] D. A. Dean, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2000**, *44*, 81-95.

- [40] S. Anderson, H. Anderson, J. K. M. Sanders, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 469-475.
- [41] R. Hoss, F. Vögtle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, *Angew. Chem.*, **1994**, *106*, 389-398.
- [42] L. Orgel, R. Lohrmann, *Acc. Chem. Res.* **1974**, *7*, 368-379.
- [43] D. P. Bartel, J. W. Szostak, *Science* **1993**, *261*, 1411-1413.
- [44] R. Naylor, P. T. Gilham, *Biochemistry* **1966**, *5*, 2722-2728.
- [45] E. Kanaya, H. Yanagawa, *Biochemistry* **1986**, *25*, 7423-7428.
- [46] N. Dolinnaya, N. Sokolova, O. Gryaznova, Z. Shabarova, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 3721-3738.
- [47] S. Gryaznov, R. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3808-3809.
- [48] S. Gryaznov, R. Letsinger, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 1403-1408.
- [49] M. K. Herrlein, J. S. Nelson, R. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10151-10152.
- [50] Y. Xu, E. T. Kool, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5595-5597.
- [51] Y. Xu, E. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9040-9041.
- [52] J. T. Goodwin, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9197-9198.
- [53] R. Letsinger, T. Wu, R. Elghanian, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 643-652.
- [54] J. Liu, J.-S. Taylor, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3300-3304.
- [55] D. Albagli, R. Atta, P. Cheng, B. Huan, M. Wood, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6954-6955.
- [56] K. Fujimoto, S. Matsuda, N. Takahashi, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5646-5647.
- [57] L. Orgel, *Nature* **1992**, *358*, 203-209.
- [58] B. Bag, G. v. Kiedrowski, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 2145-2152.
- [59] G. v. Kiedrowski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 932-934; *Angew. Chem.*, **1986**, *98*, 932-934.
- [60] C. Böhler, P. E. Nielsen, L. Orgel, *Nature* **1995**, *376*, 578-581.
- [61] M. Bolli, R. Micura, S. Pitsch, A. Eschenmoser, *Chem. & Bio.* **1997**, *4*, 309-320.
- [62] I. Kozlov, M. Zielinski, B. Allart, L. Kerremans, A. Aerschot, R. Busson, P. Herdewijn, L. Orgel, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 151-155.
- [63] J. Schmidt, L. Christensen, P. E. Nielsen, L. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4792-4796.
- [64] J. Schmidt, P. E. Nielsen, L. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4797-4802.

- [65] K. James, A. Ellington, *Chem. & Biol.* **1997**, *4*, 595-605.
- [66] S. Gryaznov, R. Schultz, S. Chaturvedi, R. Letsinger, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2366-2369.
- [67] Y. Xu, N. Karalkar, E. T. Kool, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 148-152.
- [68] J. Luo, D. Bergstrom, F. Barany, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3071-3078.
- [69] G. R. Matsueda, J. M. Stewart, *Peptides* **1981**, *2*, 45-50.
- [70] B. F. Gisin, *Helv. Chim. Acta* **1973**, *56*, 1476-1482.
- [71] S.-S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [72] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787-3790.
- [73] H. Ide, H. Shimizu, Y. Kimura, S. Sakamoto, K. Makino, M. Glackin, S. Wallace, H. Nakamuta, M. Sasaki, N. Sugimoto, *Biochemistry* **1995**, *34*, 6947-6955.
- [74] C. Gelfand, G. Plum, A. Grollman, F. Johnson, K. Breslauer, *Biochemistry* **1998**, *37*, 7321-7327.
- [75] P. E. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- [76] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Ann. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923-960.
- [77] K. Severin, D. Lee, J. Martinez, R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1017-1024.
- [78] H. Hojo, S. Aimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 111-117.
- [79] D. Lee, J. Granja, J. Martinez, K. Severin, R. Ghadiri, *Nature* **1996**, *382*, 525-528.
- [80] M. Kurz, K. Göbel, C. Hartel, M. Göbel, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 873-876.
- [81] C. Wojczewski, K. Stolze, J. W. Engels, *Synlett* **1999**, *10*, 1667-1678.
- [82] P. Grossman, W. Bloch, E. Brinson, C. Chang, F. Eggerding, S. Fung, D. Iovannisci, S. Woo, E. Winn-Deen, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4527-4534.
- [83] B.-S. Kerem, J. M. Rommens, J. A. Buchanan, D. Markiewicz, T. K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald, L.-C. Tsui, *Science* **1989**, *245*, 1059-1080.
- [84] B. W. v. d. Meer, G. Coker, S.-Y. S. Chen, *Resonance Energy Transfer*, VCH, Weinheim, **1994**.
- [85] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, **1996**.
- [86] X. Liu, S. Balasubramanian, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6153-6156.
- [87] W. Lehmann, *Massenspektrometrie in der Biochemie*, Spektrum Verlag, Berlin, **1996**.
- [88] P. Ross, L. Hall, I. Smirnov, L. Haff, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 1347-1351.
- [89] P. Jiang-Baucorn, J. Girard, J. Butler, P. Belgrader, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4894-4898.
- [90] T. Griffin, L. Smith, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 77-84.

- [91] J. SantaLucia, H. T. Allawi, P. A. Seneviratne, *Biochemistry* **1996**, *35*, 3555-3562.
- [92] <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/melting.html>
- [93] U. Giesen, W. Kleider, C. Berding, A. Geiger, H. Ørum, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5004-5006.
- [94] Y. Xu, E. Kool, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 875-881.
- [95] J. Butler, P. Jiang-Baucorn, M. Huang, P. Belgrader, J. Gairard, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3283-3287.
- [96] L. Zhu, G. R. Parr, M. C. Fitzgerald, C. M. Nelson, L. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6048-6056.
- [97] E. Nordhoff, M. Karas, R. Cramer, S. Hahner, F. Hillenkamp, F. Kirpekar, A. Lezius, J. Muth, C. Meier, J. W. Engels, *J. Mass Spectrometry* **1995**, *30*, 99-112.
- [98] T. J. Griffin, W. Tang, L. M. Smith, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 1368-1372.
- [99] M. Plass, E. Hartmann, O. Müller, J. Kuhlmann, *Natl. Center Biotechnology Information*, www.ncbi.nih.gov, AF116346.
- [100] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Intern. Ed.* **2000**, *39*, 4193-4214; *Angew. Chem.*, **2000**, *112*, 4360-4384.
- [101] Bei der Mutationsstelle E63H handelt es sich strenggenommen nicht mehr um eine Einzelbasenmutation, da für ein Austausch der Glutaminsäure durch Histidin zwei Nucleobasen verändert werden müssen. Für die Gestaltung der Mutantensonde gab es zwei Möglichkeiten, da die Aminosäure Histidin die beiden Codons CAC und CAT besitzt.
- [102] M. A. Innis, D. H. Gelford, J. J. Sninsky, T. J. White, *PCR Protocols*, Academic Press, San Diego, **1990**.
- [103] J. D. Puglisi, I. Tinoco, *Methods in Enzymology* **1989**, *180*, 304-325.
- [104] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, Oxford, **1988**.
- [105] B. Dörner, P. White, *Novabiochem-Katalog* **2000**, P4.
- [106] L. D. Mayfield, D. R. Corey, *Anal. Biochem.* **1999**, *268*, 401-404.

VIII. ANHANG

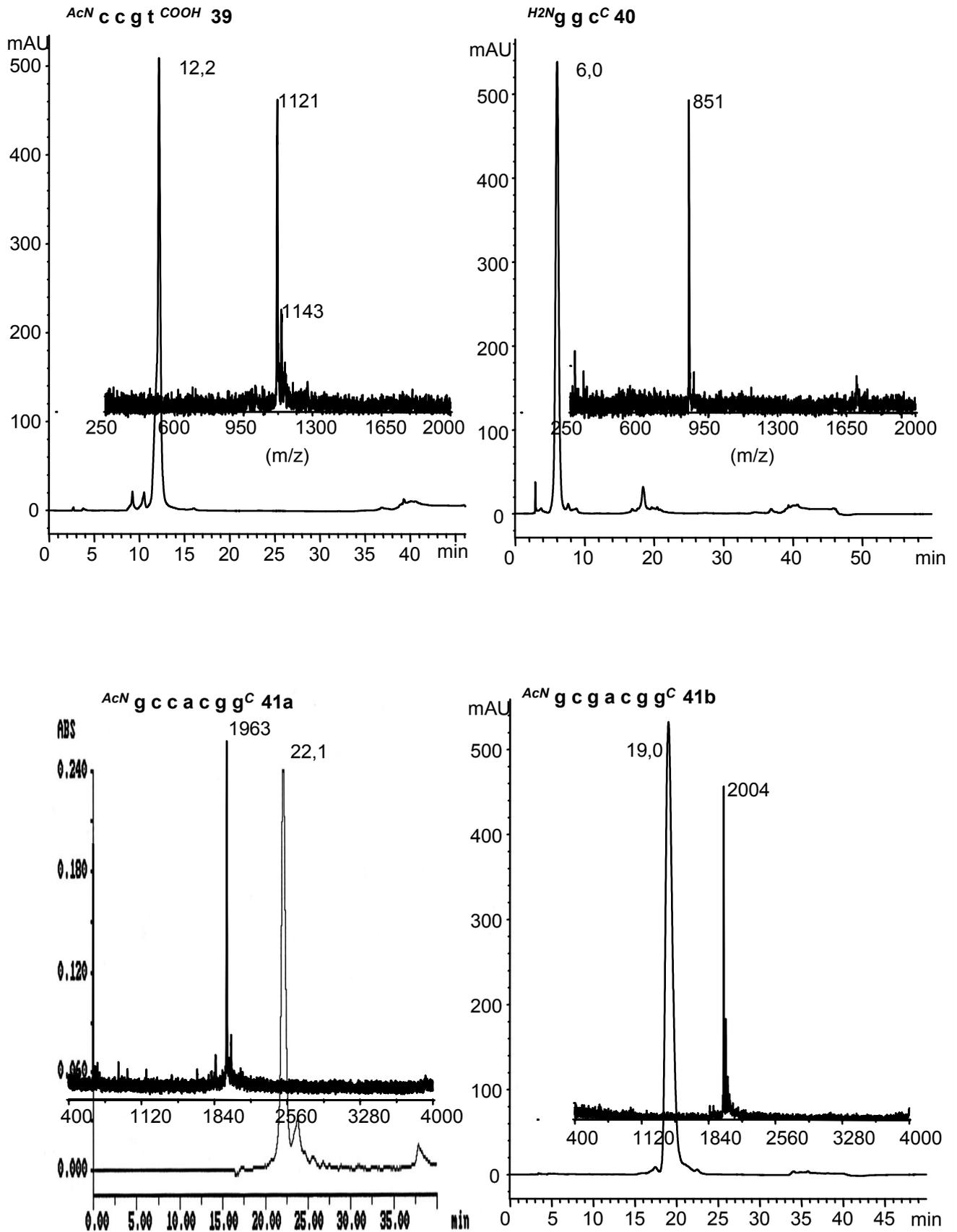
VIII.1 Abkürzungsverzeichnis

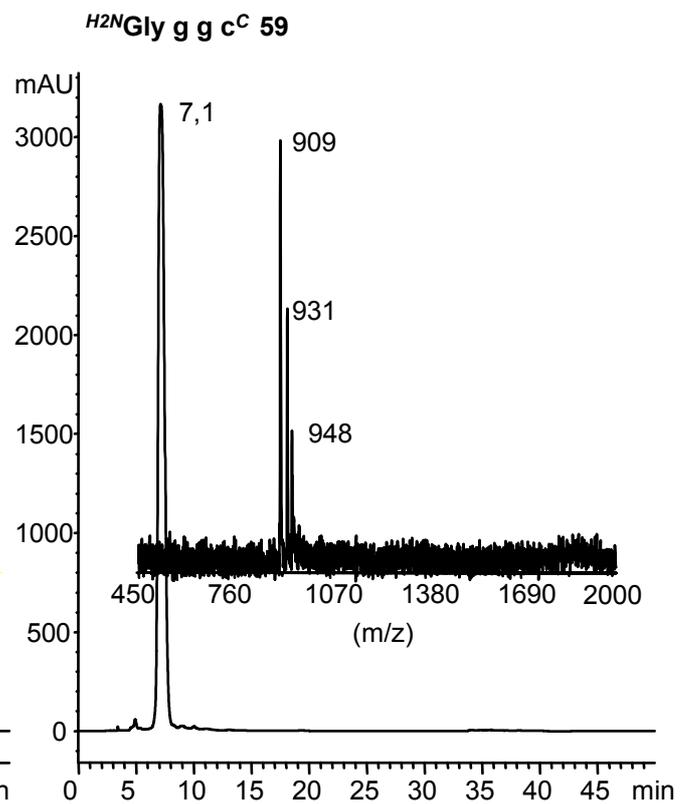
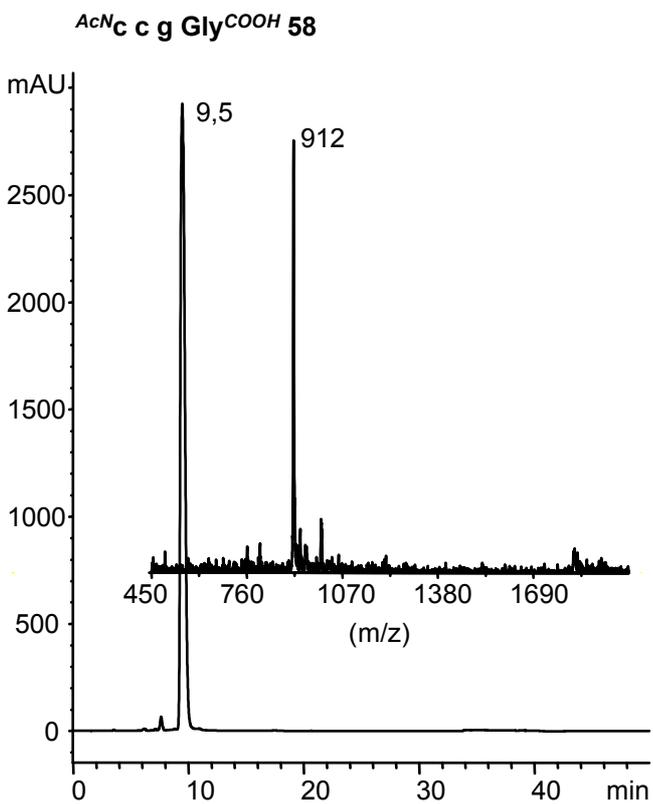
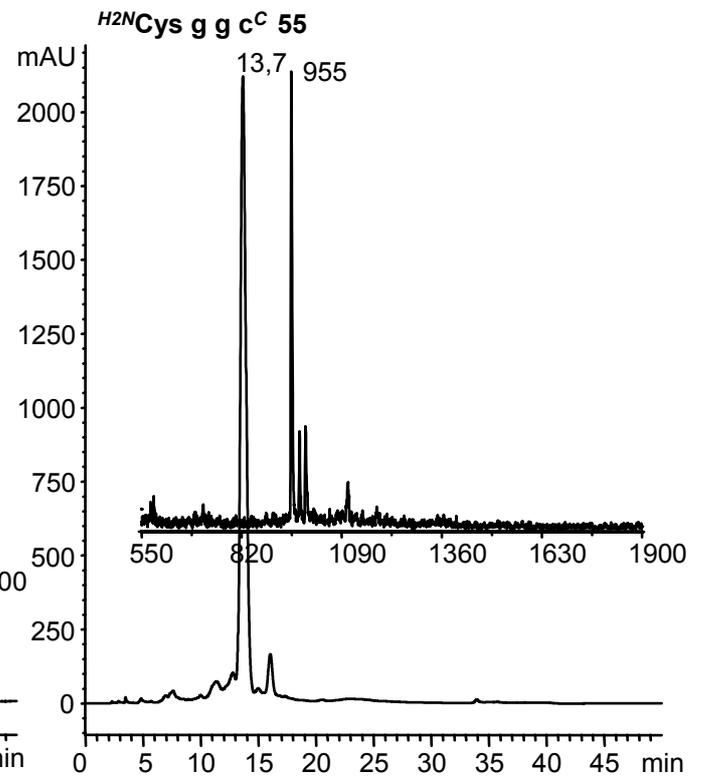
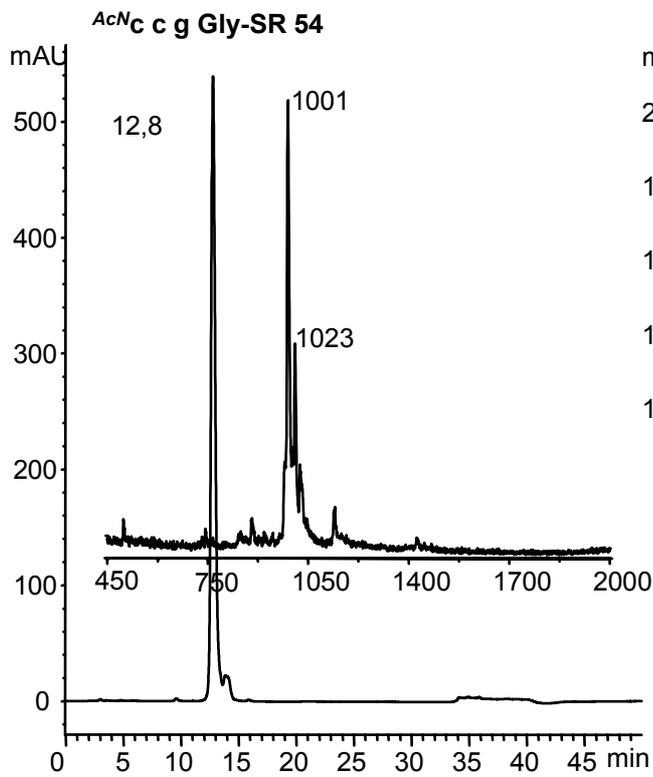
Nukleotide werden in der üblichen Weise durch den Einbuchstabencode abgekürzt. Zur Unterscheidung der DNA- und PNA-Oligomere werden DNA-Basen groß (B, A, C, G, T) und PNA-Basen klein (b, a, c, g, t) geschrieben. Aminosäuren werden durch den Dreibuchstabencode abgekürzt und haben L-Konfiguration nach der FISCHER-Projektion (vgl. IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature, *Pure Appl. Chem.* **1982**, 54, 1517 und 1525).

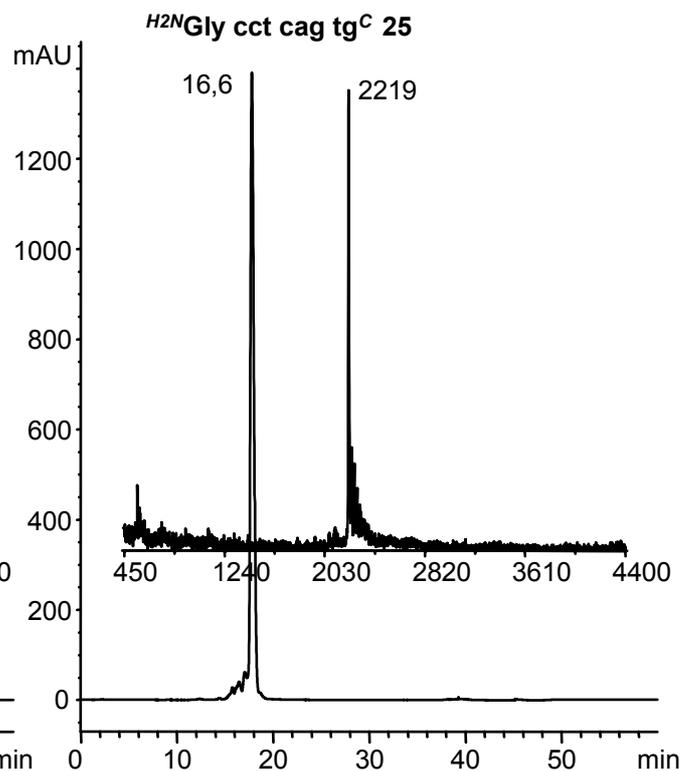
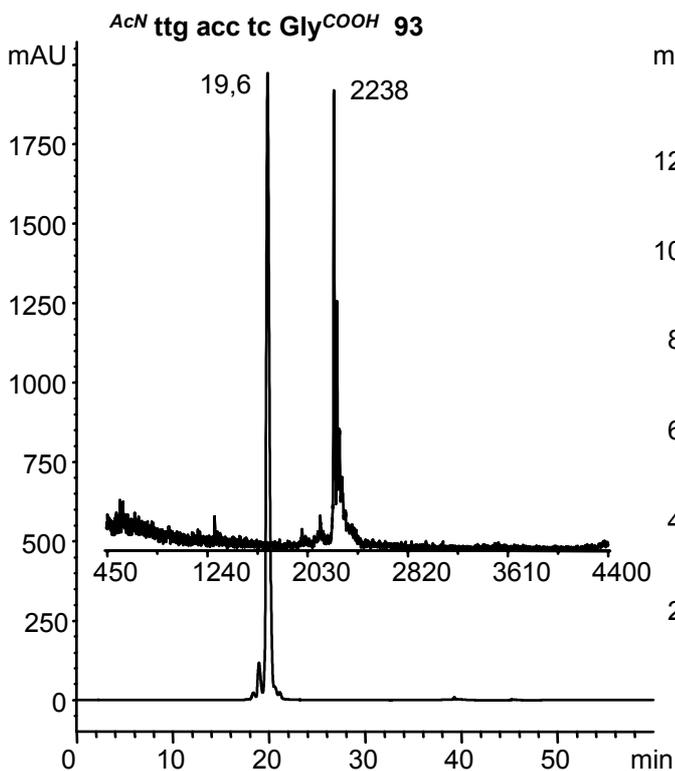
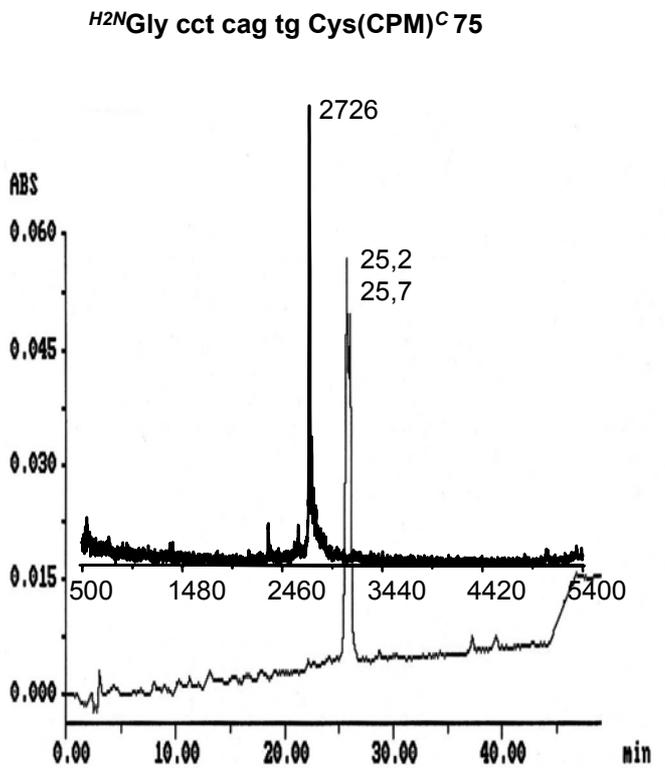
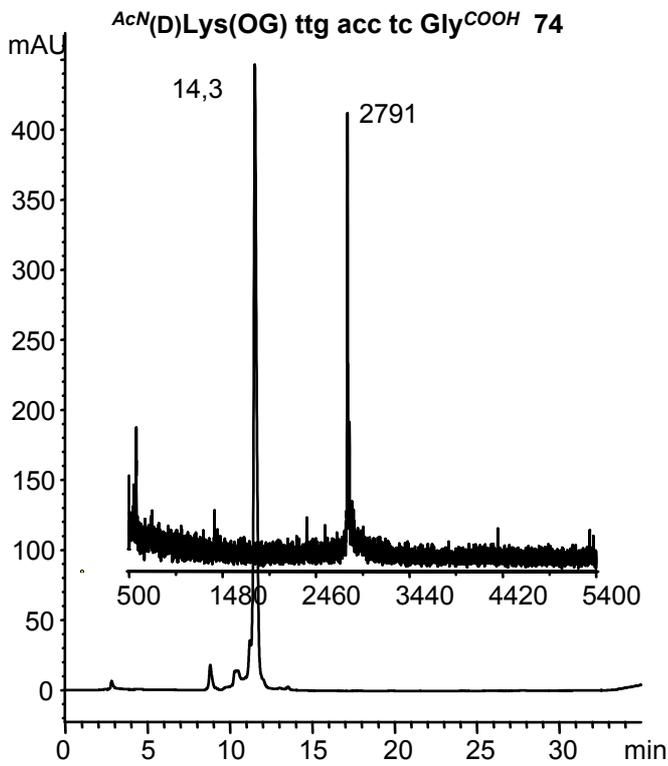
Aloc	Allyloxycarbonyl
Bhoc	Benzhydryloxycarbonyl
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
DIC	<i>N, N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DCM	Dichlormethan
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMF	<i>N, N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	<i>N</i> -(Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethyl-carbodiimid-hydrochlorid
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HONSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid

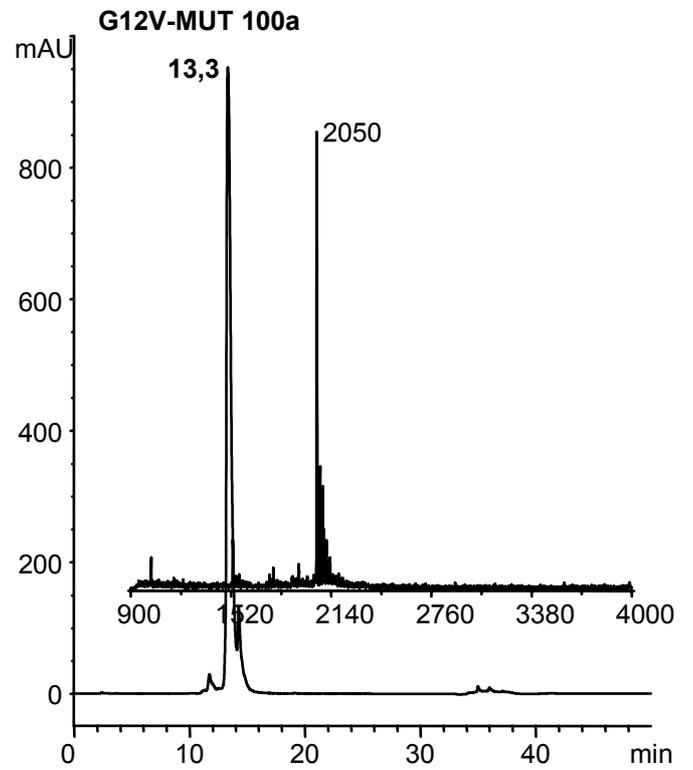
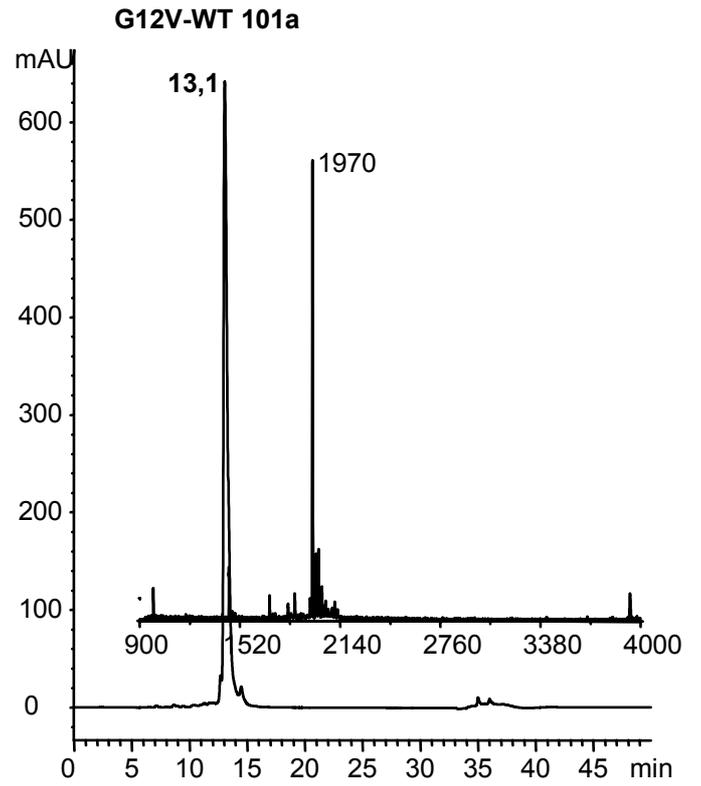
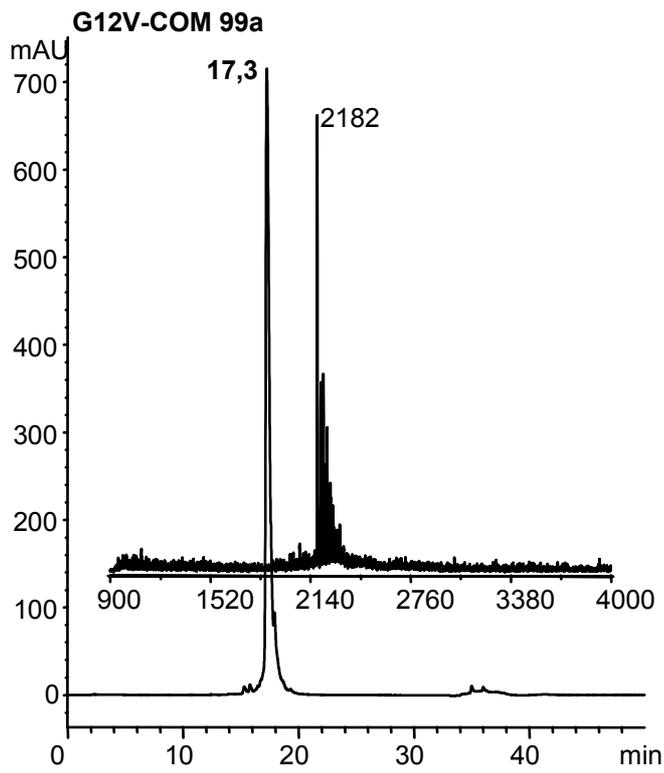
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation-Time of Flight
MBHA	<i>p</i> -Methylbenzylhydramid
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
RP	Reversed Phase
Pip	Piperidin
PNA	Peptidnucleinsäure
Py	Pyridin
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
t_R	Retentionszeit bei der HPLC
Trt	Triphenylmethyl
Z	Benzyloxycarbonyl

VIII.2 Spektrenanhang









Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H. Waldmann für seine wohlwollende Unterstützung, die mir alle Vorteile seines Arbeitskreises eröffnete, jedoch niemals in mir das Gefühl aufkommen ließ, Diener zweier Herren zu sein.

Mein ganz besonderer Dank gilt aber auch Herrn Dr. Oliver Seitz. Als eigentlicher Doktorvater trug er am meisten zur Entstehung meiner Doktorarbeit bei. Er führte mich in die weite Welt der Bioorganik ein und ermöglichte mir darüberhinaus interessante Einblicke in die *Scientific Community*.

Dem Fonds der Chemischen Industrie danke ich für seine finanzielle Unterstützung in Form eines Kekulé-Stipendiums, das mich die ersten zwei Jahre unterstützte.

Des weiteren trugen nachfolgende Damen und Herren nicht unwesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei:

Die Erstkorrektoren des Manuskriptes Jantje Gerdes, Florian Münstermann, Olaf Köhler und Simon Ficht leisteten Schwerstarbeit. Olaf Köhler brachte den Syro soweit zum Laufen, daß er mir zumindest in den letzten Wochen eine Hilfe war. Massenspektrometrische Probleme diskutierte ich mit Dr. Heino Prinz. Indem Petra Stahl und Jantje Gerdes so vehement auf die regelmäßige Ausrichtung unseres Retrosyntheseminars bestanden, ging mein synthetisches Wissen über die Jahre nicht verloren. Alexander Wolf stellte die PCR-amplifizierte *ras* DNA-Sequenz zur Verfügung. Ihnen allen sei an dieser Stelle herzlichst gedankt.

Doch all meinen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die freundliche Aufnahme im Arbeitskreis und für manch lustige Stunden.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meiner Familie für die breite Unterstützung meines langjährigen Studiums bedanken. Ganz besonders gilt dies für meine beiden Frauen Katalin und Rebekka, die beide entbehrungsreiche Monate hinter sich haben.

Lebenslauf

Name: Bernhard Amos Mattes
Geburtsdatum / -ort: 25.04.1972 in Waiblingen
Familienstand: verheiratet mit Dr. med. Katalin Mattes-György, eine Tochter

Schullaufbahn:

1978 – 1982 Grundschule in Strümpfelbach
1982 – 1991 Remstalgymnasium in Weinstadt (Abitur: 14. Juni 1991)

Ersatzdienst:

Sept. 91 – Okt. 92 Zivildienst in der Sozial- und Diakoniestation Weinstadt

Studium:

WS 92/93 – SoSe 94 Grundstudium der Chemie an der Universität Kaiserslautern
WS 94/95 – SoSe 97 Hauptstudium der Chemie an der Universität Würzburg
SoSe 96 Auslandssemester an der École Supérieur de Chimie Physique
Électronique de Lyon (CPE, ehem. ESCIL) in Frankreich im
Rahmen des ERASMUS-Austauschprogrammes
März – Sept. 1997 Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. R. Tacke am Institut
für Anorganische Chemie der Universität Würzburg Thema:
Beiträge zur C/Si-Bioisosterie: Synthese C/Si-analoger
enantiomerenreiner potentieller Antimuscarinika
September 1997 Diplom (ausgezeichnet mit dem Fakultätspreis)

Promotion

Jan. 1998 – August 2001 „DNA-kontrollierte Verknüpfung von Peptidnucleinsäuren – Ein
chemisches Werkzeug zum Nachweis von DNA-Einzelbasen-
mutationen“ an der Universität Dortmund im Arbeitskreis von
Prof. Dr. H. Waldmann unter der Betreuung von Dr. Oliver
Seitz.

Dortmund, im September 2001