

# Wykorzystanie PNA w terapii genowej

Arkadiusz Kazula<sup>1</sup>, Ewa Kazula<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Apteka prywatna, Nisko

<sup>2</sup>Apteka prywatna, Tarnobrzeg

Adres do korespondencji: Arkadiusz Kazula, ul. Portowa 18/4, 27-600 Sandomierz, e-mail: Kazula.gen@wp.pl

Utilization of PNA in gene therapy · Peptide nucleic acids, or PNAs, are oligonucleotide analogs in which the phosphodiester backbone is replaced with a polyamide structure. PNA is one of the most promising new molecules for recognition of nucleic acids. First synthesized less than 20 years ago, they have received great attention due to their several favorable properties, including resistance to nuclease and protease digestion and stability in serum, and their high affinity for RNA and single and double-stranded DNA targets. In this article we present data obtained on the PNAs utility in gene therapy and medicine diagnostics.

**Keywords:** peptide nucleic acids, PNAs, molecules, RNA, DNA, gene therapy, diagnostics.

© Farm Pol, 2010, 66(6): 448-457

Jednym z bardziej skutecznych kierunków terapii genowej jest zastosowanie w charakterze leków oligonukleotydów antysens. Leki antysens są to krótkie fragmenty DNA lub RNA o ściśle określonej sekwencji, które posiadają zdolność wiązania się do komplementarnych fragmentów RNA czy DNA, powodując blokowanie ekspresji określonego genu. Przy zastosowaniu oligonukleotydów antysens można hamować ekspresję zmutowanych i chorobotwórczych białek w chorobach molekularnych. Najważniejszą wadą stosowanych obecnie antysensowych oligonukleotydów jest ich mała stabilność i duża wrażliwość na działanie różnych nukleaz obecnych w komórkach i środowisku pozakomórkowym, co stanowi znaczną przeszkodę w stosowaniu terapii antysens wobec komórek docelowych. W celu wyeliminowania tego problemu dokonuje się różnych modyfikacji oligonukleotydów antysens, aby poprawić ich stabilność i skuteczność w terapii. Prace prowadzone w tym kierunku doprowadziły do odkrycia nowej klasy cząsteczek o nazwie kwasy peptydonukleinowe PNA (ang. *Peptide Nucleic Acid*). Związki tego typu są polinukleotydowymi analogami DNA i RNA, otrzymanymi

w warunkach *in vitro*. W tych syntetycznych polimerach zamiast fosfodiesterowych szkieletów, jakie występują w naturalnych kwasach nukleinowych, są obecne znacznie prostsze i stabilniejsze łańcuchy poliamidowe, które połączone są wiązaniami peptydowymi [1], (**rycina 1**).

Ta całkowicie nowa grupa cząsteczek posiada ciekawe i nietypowe właściwości chemiczne. Pomimo różnic w stosunku do kwasów nukleinowych, cząsteczki PNA o ściśle określonej sekwencji wykazują zdolność wiązania się z komplementarnymi cząsteczkami DNA czy RNA za pomocą wodorowych wiązań Watsona-Cricka, blokując lub obniżając ekspresję odpowiednich genów [2, 3]. Połączenia PNA z DNA lub z RNA charakteryzują się termiczną stabilnością. Związki te, ze względu na tworzenie silniejszych wiązań komplementarnych z DNA lub RNA, już w chwili odkrycia były uważane za doskonałych kandydatów na lek antysens w terapii genowej [4]. Dodatkowo, za zastosowaniem tych związków w terapii przemawia fakt, że PNA jest znacznie bardziej odporny na działanie nukleaz i proteaz komórkowych, trawiących kwasy nukleinowe i białka. W chwili obecnej próbuje się wykorzystać PNA jako narzędzie molekularne w biotechnologii i biologii molekularnej [5–8]. Trwają prace nad użyciem PNA w diagnostyce medycznej i czujnikach biologicznych oraz w konstrukcji cząsteczek o nowych właściwościach katalitycznych [9, 10, 11].

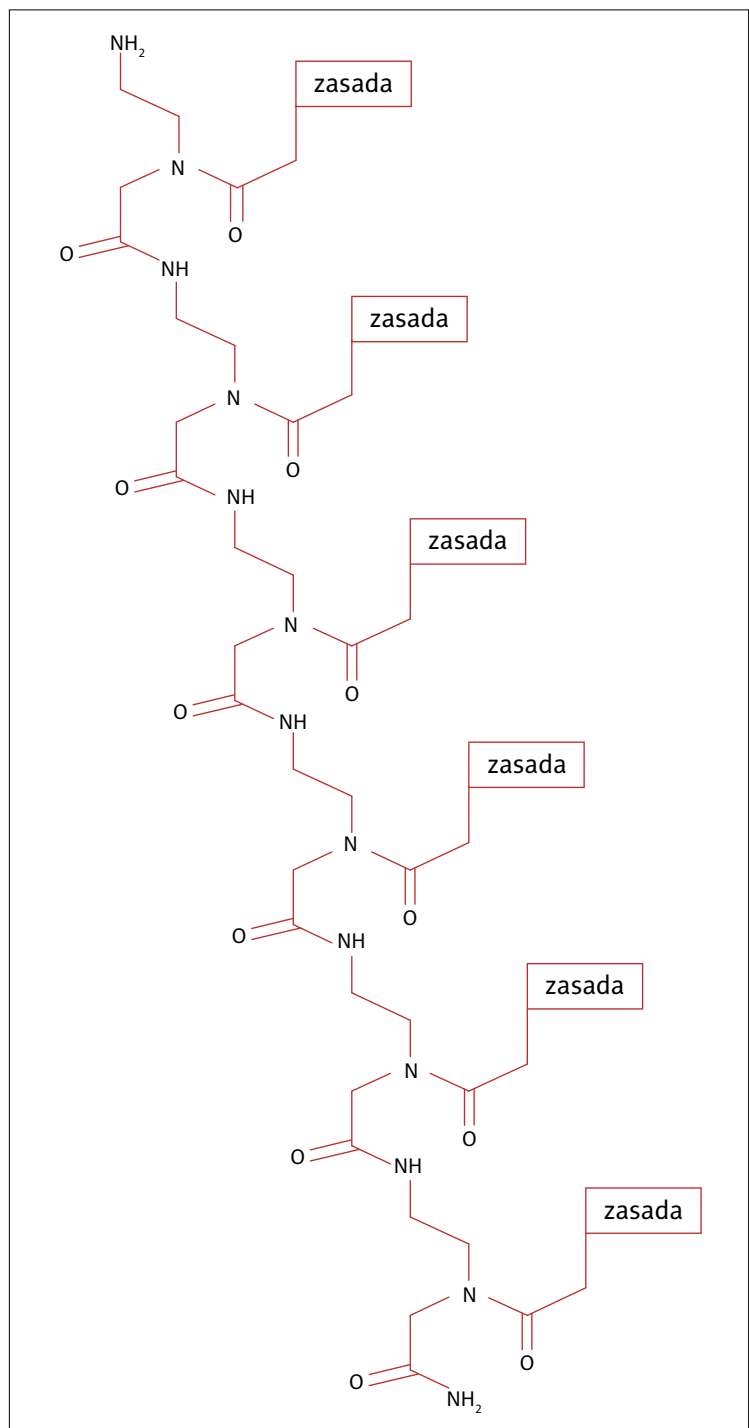
## Właściwości PNA

Cząsteczki PNA posiadają pośredni charakter między kwasami nukleinowymi i białkami. Łańcuch PNA, tak jak w przypadku białek i peptydów, oparty jest na szkielecie, w którym występują wiązania peptydowe (**rycina 2**).

Pseudopeptydowy szkielet w PNA składa się z podjednostek zbudowanych z N-(2-aminoetylo)-glicyny. Wszystkie wiązania peptydowe w PNA różnią się od tych występujących między  $\alpha$ -aminokwasami w łańcuchach białkowych. Skutkiem tych różnic jest

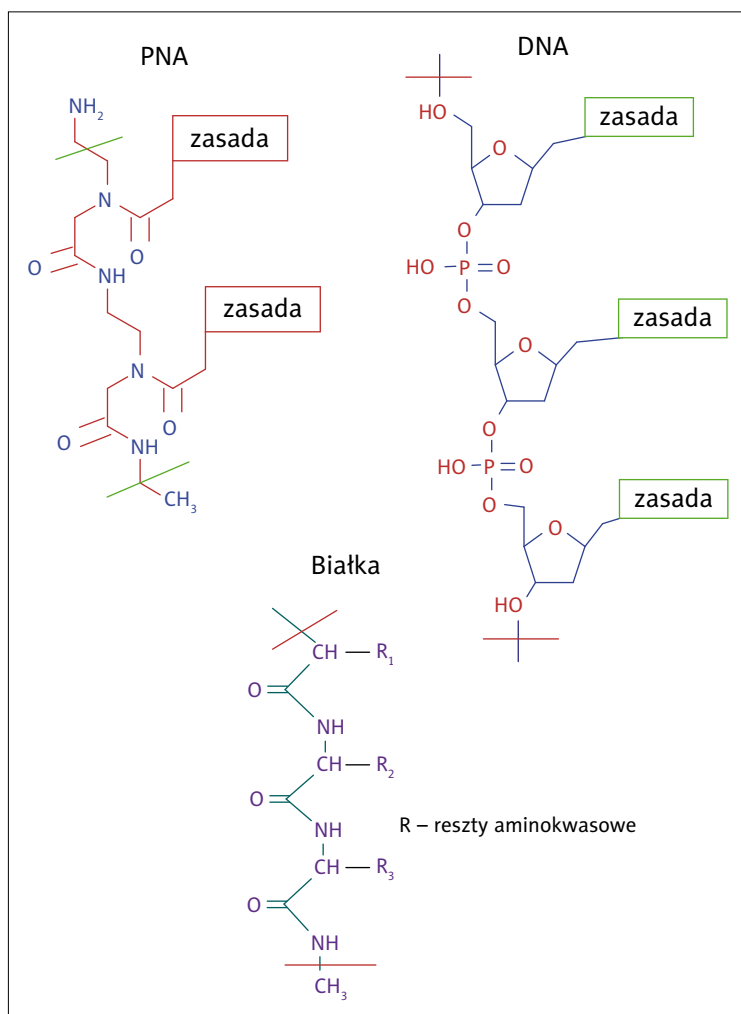
biologiczna stabilność oraz brak degradacji PNA przez komórkowe proteazy i peptydazy [12]. Enzymy komórkowe nie rozpoznają tych związków, ze względu na fakt, że posiadają one struktury obce dla enzymatycznego systemu komórkowego. Podobnie natomiast jak kwasy nukleinowe, cząsteczki PNA zbudowane są z podjednostek, a każda z nich zawiera zasadę azotową purynę (A-adeninę lub G-guaninę) lub pirymidynę (T-tyminę lub C-cytozynę). Zasady azotowe połączone są z poszczególnymi podjednostkami za pomocą mostków metylokarbonylowych. Z chemicznego punktu widzenia cząsteczki PNA bardziej przypominają peptydy niż kwasy nukleinowe. Ważną właściwością, która determinuje aktywność terapeutyczną tego związku jest fakt, że struktury PNA, podobnie jak w kwasach nukleinowych, posiadają zdolność tworzenia dwuniciowych struktur komplementarnych opartych na parowaniu zasad azotowych. Podwójna nić DNA czy RNA zbudowana jest z komplementarnych nitek połączonych wiązaniami wodorowymi, które tworzą szczebelki słynnej drabiny DNA, odkrytej przez Watsona i Cricka, w której cytozyna zawsze tworzy potrójne wiązanie wodorowe z guaniną komplementarnej nici, a adenina podwójne wiązanie wodorowe z tyminą (w przypadku RNA zamiast tyminy jest uracyl). W ten sposób sekwencja jednej nici dupletu jest komplementarna do sekwencji drugiej. Odległości między zasadami w PNA są podobne do tych w DNA i RNA, dzięki czemu krótkie fragmenty PNA (oligomery PNA) mogą tworzyć stabilne struktury dupletowe (za pomocą wiązań Watsona–Cricka) z DNA lub z RNA oraz z cząsteczkami PNA [11]. Elastyczne oligomery PNA są zdolne do znacznego wydłużania i konformacyjnej adaptacji podczas przyłączania się do oligomerów DNA czy RNA. W dupletach PNA-RNA, cząsteczki RNA przyjmują konformację helisy A. W przypadku dupletu PNA-DNA, cząsteczki DNA przyjmują konformację o strukturze B, natomiast PNA we wszystkich typach połączeń z kwasami nukleinowymi występuje w konformacji P, która charakteryzuje się wydłużeniem skrętu helisy (18 par zasad na jeden skręt helisy) [14] (**ryciny 3 i 4**).

Jedną z najważniejszych różnic pomiędzy PNA a DNA i RNA jest brak ujemnie naładowanych reszt fosfodiesterowych w szkielecie cząsteczki. Efektem tego jest brak odpychania elektrostatycznego w duplesie PNA-PNA, ale również brak takich oddziaływań pomiędzy PNA-DNA i PNA-RNA. Brak tych oddziaływań powoduje, że PNA ma pewną przewagę nad antysensowymi oligomerami DNA czy RNA, ponieważ stabilniej wiąże się z kwasami nukleinowymi. Otrzymane duplety PNA z DNA, czy PNA z RNA, są bardziej termicznie stabilne niż analogiczne duplety DNA-DNA i RNA-RNA [15]. Ponadto, oligomery PNA mogą przyłączać się do komplementarnych jednoniciowych fragmentów kwasów nukleinowych (DNA, RNA), formując duplety o wysokiej swoistości



Rycina 1. Schemat cząsteczki kwasu peptydonukleinowego – PNA

względem sekwencji docelowych i specyficzności przewyższającej oligonukleotydy DNA czy RNA, co wptywa na użyteczność tego związku w terapii antysens [16]. Wydaje się, że w zależności od sekwencji docelowej DNA i sposobu modyfikacji zasad w PNA możliwe są również inne rodzaje wiązań między DNA a PNA. Szczególnie interesująca jest możliwość wiązania się PNA do podwójnych dupletów DNA z tworzeniem dwóch dupletów DNA-PNA. Ważną przeszkodą, utrudniającą zastosowanie cząsteczek PNA w terapii



**Rycina 2.** Częsteczkę PNA można uważać za hybrydę, która łączy cechy białek i kwasów nukleinowych. Szkielet tego związku zbudowany jest ze stosunkowo prostych podjednostek połączonych ze sobą, podobnie jak w peptydach i białkach, wiązaniami peptydowymi. Obecność wiązań peptydowych w szkielecie PNA odróżnia ten związek od kwasów nukleinowych (DNA, RNA), w których szkielet częsteczki jest zbudowany z rybozy i wiązań fosfodiesterowych. Podobnie jak w DNA czy RNA, każda podjednostka PNA zawiera zasadę azotową – pirymidynę (C lub T) albo purynę (A lub G)

antysens, jest niska wydajność przenoszenia PNA do wnętrza cytozolu. Komórki naszych organizmów nie posiadają odpowiednich receptorów zdolnych przyłączyć częsteczki PNA i później przetransportować przez błony komórkowe. Z tego względu trwają prace nad otrzymaniem specyficznych wektorów, które będą transportowały tego typu związki do wnętrza komórek docelowych pacjentów [17, 18]

### PNA w terapii antysens

Strategia antysensowa jest skuteczną metodą w terapii chorób genetycznych, nowotworów, w terapii przeciwwirusowej i przeciwbakteryjnej. W przypadku gdy znamy sekwencję określonej matrycy DNA czy RNA, której ekspresję próbujemy zablokować,

wystarczy otrzymać fragment DNA czy RNA, tzw. antysensowy oligomer komplementarny do sekwencji docelowej, która jest celem terapii antysens [19]. Terapeutyczne antysensowe oligonukleotydy są najczęściej zmodyfikowanymi chemicznie krótkimi fragmentami RNA czy DNA o długości 17–45 nukleotydów. Wśród tych pochodnych najczęściej stosowanymi są metylofosfonaty, fosforoamidaty, fosfortioaty czy fosforoditioaty [19].

### Hamowanie translacji

Proces ekspresji określonego genu zaczyna się od transkrypcji katalizowanej przez polimerazę RNA. W wyniku tego procesu powstaje cząsteczka informacyjnego RNA (mRNA), czyli łańcuch RNA, który jest kopią sekwencji nici kodującej genomowego DNA komórki. Po procesie transkrypcji, w przypadku organizmów eukariotycznych, z pierwotnego transkryptu RNA są wycinane introny, a eksony są składane w kompletną cząsteczkę informacyjnego RNA (mRNA). Następnie cząsteczki mRNA trafiają do rybosomów, gdzie sekwencja zasad z mRNA przepisywana jest na język aminokwasów budujących dane białko. Proces ten nazywany jest translacją. Leki antysensowe hamują proces translacji w wyniku wiązania się do komplementarnych sekwencji mRNA. Przyłączenie tych antysensowych terapeutyków inicjuje enzymatyczną degradację mRNA. Powstały dupeks mRNA-oligomery antysens (DNA lub RNA), aktywuje RNA-zę H, enzym rozkładający struktury hybrydowe RNA-DNA. Efektem działania RNA-zy H jest degradacja odpowiedniego mRNA i zablokowanie translacji, a w konsekwencji zahamowanie ekspresji danego genu. W ten sposób antysensowe oligomery DNA lub RNA łącząc się do komplementarnych sekwencji mRNA wirusów lub mRNA aktywnych onkogenów obecnych w komórkach nowotworowych powodują zahamowanie ich ekspresji i pozytywny efekt terapeutyczny. Peptydowe kwasy nukleinowe zostały odkryte w latach 80. ubiegłego wieku. Historia odkrycia cząsteczki PNA związana jest z prof. Peterem E. Nielsenem, który próbował opracować leki antysens o większych możliwościach terapeutycznego działania niż stosowane antysensowe oligomery RNA, czy DNA. Leki te miały posiadać większą trwałość i potencjalnie silniejszą zdolność przyłączania się do sekwencji docelowych. Badania prowadzone nad PNA wykazały, że w hodowlach komórkowych związek ten może zastąpić tradycyjnie stosowane oligomery antysens. W wyniku reakcji komplementarnego przyłączania oligomerów PNA do matrycy następuje hamowanie transkrypcji, replikacji czy naprawy określonych genów [20], (rycina 5).

Przyłączanie cząsteczek PNA do specyficznych regionów informacyjnego RNA (mRNA) następuje w wyniku tworzenia między tymi dwoma cząsteczkami komplementarnych wiązań Watsona–Cricka. Rezultatem takiego połączenia jest hamowanie ekspresji

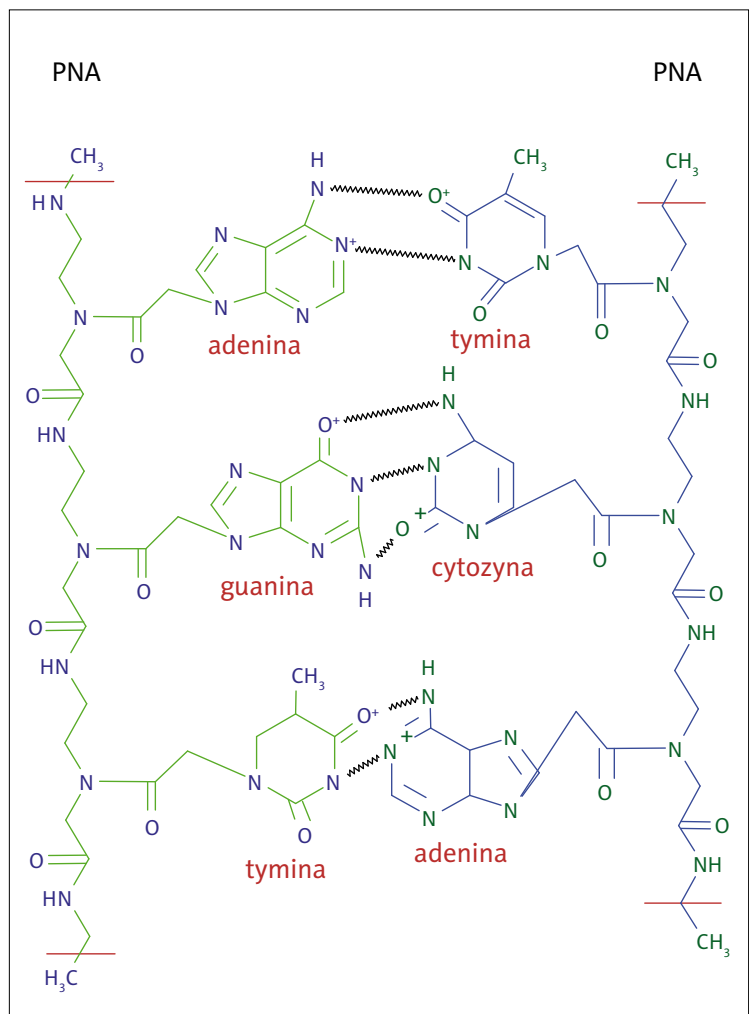
mRNA i blokowanie translacji. Pomimo że struktura dwuniciowa PNA-mRNA nie jest substratem dla RNAzy H, jak to ma miejsce w przypadku działania antysensownych oligonukleotydów RNA czy DNA, to jednak przyłączenie PNA w rejonie kodonu AUG (startu translacji) mechanicznie blokuje ten region, uniemożliwiając inicjację procesu biosyntezy białek [21].

Dalsze badania wykazały, że oligomery PNA zbudowane z 15–25 podjednostek hamują również elongację translacji oraz transport nowotranskrybowanych cząsteczek mRNA do rybosomów [22]. Efekty hamowania translacji występują już przy mikromolarnych stężeniach oligomerów PNA [23, 24]. W hodowlach komórkowych oraz w badaniach na modelach zwierzęcych ujawniono, że oligomery PNA mogą działać podobnie jak interferencyjne cząsteczki iRNA, hamując ekspresję genów na poziomie procesu translacji na rybosomach. Oczywiście mimo podobnego efektu mechanizm działania jest nieco inny. Oligomery PNA fizycznie blokują przebieg kluczowych reakcji z udziałem matrycy RNA. Natomiast naturalne oligomery iRNA wykorzystywane do interferencji RNA, inicjują rozcinanie i niszczenie tworzących się dupleksów RNA-DNA lub RNA-RNA przez enzymy komórkowe.

Dupleksy DNA-PNA posiadają tak obcą strukturę dla komórek, że enzymy komórkowe degradujące peptydy i kwasy nukleinowe nie rozpoznają takich połączeń. Taka nietypowa budowa nadaje oligomerom PNA dużą stabilność w cytozolu komórki i pozwala tym cząsteczkom z lepszą precyzją odnaleźć komplementarny odcinek RNA i następnie go unieczynnić [24]. O skuteczności PNA w terapii przekonały prace prowadzone na University of Oxford, badania na modelu zwierzęcym wykazały, że w niektórych przypadkach zablokowanie ekspresji w odpowiednim miejscu pozwoliło na odzyskanie utraconego białka na skutek mutacji [24]. Do mięśni myszy cierpiących na dystrofię mięśniową wstrzyknięto odpowiedni fragment PNA, który hamował skutki choroby. Przyczyną choroby jest brak białka dystrofiny, spowodowany mutacją w kodującym je genie. W wyniku tej mutacji następuje zamiana aminokwasu, co powoduje destabilizację łańcucha białkowego dystrofiny i jego szybki rozkład przez proteasomy. Wprowadzony oligomer PNA hamuje translację przed odczytaniem zmutowanego kodonu w mRNA. Powstaje odcinek białka wolny od destabilizującej mutacji i na tyle duży, że wystarcza do odtworzenia funkcji kompletnego peptydu [24].

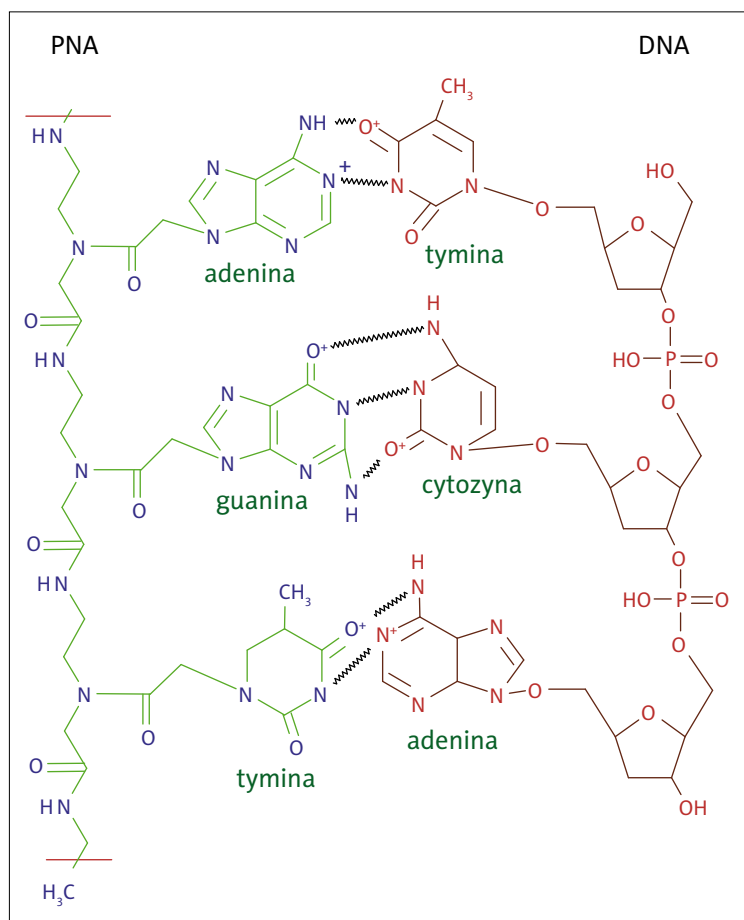
### Hamowanie aktywności telomerazy

Telomeraza jest kluczowym enzymem, który uzupełnia braki DNA, tzw. telomery, podczas procesu replikacji. Biosynteza telomerów jest katalizowana przez białkową część enzymu, która posiada właściwość odwrotnej transkryptazy. Wzrost aktywności tego enzymu wpływa stymulująco na etapy



**Rycina 3.** Struktura dupleksu PNA. Pojedyncza nić PNA łączy się z komplementarną cząsteczką PNA za pomocą wiązań wodorowych Watsona–Cricka i, podobnie jak w DNA, adenina jednej nici PNA tworzy podwójne wiązanie wodorowe z tyminą nici komplementarnej, a guanina tworzy potrójne wiązanie wodorowe z cytozyną drugiej nici PNA

karcinogenezy [25]. Jego duża aktywność pozwala zachować wysoki potencjał replikacyjny komórek nowotworowych. Z tego względu telomeraza jest brana pod uwagę jako idealny cel w terapii genowej nowotworów. Zahamowanie aktywności telomerazy w komórkach nowotworowych może w nich uruchomić procesy apoptozy – zaprogramowanej śmierci komórki. W celu hamowania aktywności tego enzymu próbuje się zastosować metody molekularne z wykorzystaniem fragmentów antysens, rybozymów [25–27], interferencji RNAi oraz immunoterapii (wobec białkowej części telomerazy) [28]. Oligomery PNA komplementarne do telomerowego RNA wykazują zdolność hamowania aktywności telomerazy. Hamowanie aktywności tego enzymu przez PNA jest silniejsze niż stosowane do tej pory modyfikowane antysensowne oligomery DNA, wskazuje to na możliwość zastosowania oligomerów PNA w przeciwnowotworowej terapii genowej [29, 30].



**Rycina 4.** Struktura dupletu PNA-DNA. Częsteczki PNA oprócz łączenia się z komplementarnymi częsteczkami PNA, wykazują również zdolność łączenia się z komplementarnymi częsteczkami DNA i RNA. Pojedyncza nić PNA łączy się z komplementarną częsteczką DNA za pomocą wiązań wodorowych Watsona–Cricka i, podobnie jak w duplekcie DNA, adenina jednej nici PNA tworzy podwójne wiązanie wodorowe z tyminą komplementarnej nici DNA, a guanina (z PNA) tworzy potrójne wiązanie wodorowe z cytozyną komplementarnej nici DNA

### Struktura tripleksa a PNA

Sytuacja staje się bardziej skomplikowana, gdy mamy do czynienia z dupleksem DNA, w którym atomy odpowiedzialne za wytwarzanie wiązań Watsona–Cricka są już całkowicie zaangażowane i nie ma możliwości przyłączenia terapeutycznego oligomeru antysensu za pomocą wiązań wodorowych do określonej sekwencji matrycy. W komórce istnieje wiele białek regulujących ekspresję genów dzięki rozpoznaniu konkretnych sekwencji w dwuniciowym DNA. Z tego względu podjęto próby otrzymania takiej cząsteczki, która łączyłaby się z dupleksem DNA na zasadzie białek regulatorowych i byłaby nowym lekiem modyfikującym aktywność określonych genów. Warto zwrócić uwagę, że komórki regulują ekspresję genów już na poziomie transkrypcji. W czasie tego procesu, do rozpoznania określonych sekwencji w genomie komórka wykorzystuje kilka typów białek regulujących transkrypcję, tzw. czynników transkrypcyjnych. Białka

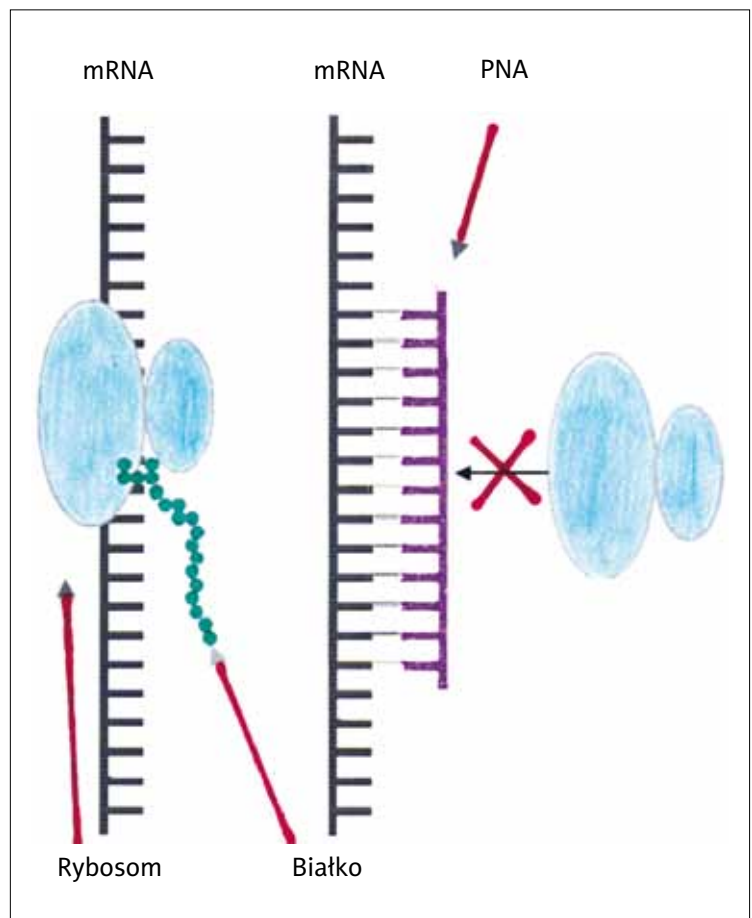
tego typu mogą hamować proces transkrypcji mRNA, w wyniku zakłócenia działania enzymu odpowiedzialnego za transkrypcję tzw. polimerazy RNA zależnej od DNA. Czynniki te w badaniach nowych leków odgrywały i odgrywają nadal rolę wzorca do konstrukcji nowych cząsteczek o charakterze leków, które działając spoza helisy DNA, mogłyby odczytać określoną sekwencję DNA i hamować ekspresję zmutowanych czy niepożądanych genów. Pod koniec ubiegłego wieku nie posiadaliśmy dostatecznej wiedzy, aby zaprojektować cząsteczkę białka, która rozpoznawałaby wybraną sekwencję zasad [31]. Komórkowe czynniki transkrypcyjne wykonują to działanie dzięki odpowiedniej sekwencji reszt aminokwasowych w łańcuchu białkowym, co powoduje odpowiednie przestrzenne ukształtowanie łańcucha polipeptydowego i odsłonięcie określonych grup funkcyjnych, które łączą się z określonymi sekwencjami na powierzchni DNA [32]. Pozwala to na związanie się z dupleksem DNA w tzw. wielkiej bruzdzie helisy, w której możliwy jest dostęp do par zasad układających się wzdłuż osi helisy. W chwili obecnej nie jest możliwe wymodelowanie procesu związania i zaprojektowanie takiego łańcucha peptydowego, który przyjąłby określoną konformację przestrzenną. W kwestii tej daje się jednak zauważyć postęp, trwają bowiem prace nad białkami zawierającymi tzw. palce cynkowe. Te dość dobrze opisane struktury przestrzenne białek, czyli domeny budowane przez ciągi około 30 aminokwasów, zawiązujące się wokół jonu cynku i dzięki temu tworzące charakterystyczny palec, mieszczący się w wielkiej bruzdzie helisy DNA. Udało się opracować sekwencję aminokwasów w łańcuchu w celu dopasowania kształtu zwiniętego białka do odpowiedniej sekwencji DNA [32, 33].

Nowe podejście w syntezie leków przyłączających się do struktury dupletu DNA umożliwiło odkrycie dokonane w 1957 roku. Wykazano bowiem, że w pewnych warunkach DNA może tworzyć lokalnie struktury trójniciowe. Kilka lat po odkryciu dwuniciowej struktury DNA przez Watsona i Cricka, w której pojedyncze nici DNA połączone są ze sobą wiązaniami wodorowymi, otrzymano w warunkach *in vitro* syntetyczne polimery w poliA i poliU, które oprócz struktury dwuniciowej AU tworzyły strukturę trójniciową UAU. Proces tworzenia trójniciowej struktury RNA obserwowano podczas renaturacji poliA i poliU. W trakcie tego procesu powstawała struktura trójniciowa poli U-A-U. Struktura ta zawierała pary złożone z nici poliA i poliU połączone wiązaniami wodorowymi według modelu Watsona–Cricka, zorientowane antyrównolegle oraz dołączoną do nich trzecią nić poliU, która, wchodząc w tzw. dużą bruzdę, związana była z nicią poliA za pomocą wiązań wodorowych nazwanych od nazwiska odkrywcy wiązaniami Hoogsteena, w których wykorzystano do wiązania atomy N7 i N6 adeniny. Struktura tripleks została następnie wykryta w przypadku DNA, występuje ona najczęściej w sekwencjach typu

oligopuryna – oligopirymidyna [19]. W National Institute of Memorial Health otrzymano potrójną helisę, w której dodatkowa nić DNA układa się w wielkiej bruzdzie dupleksowego DNA. Nić ta przyłącza się do dupleksu wykorzystując inny typ wiązań między zasadami par A-T i G-C, tzw. wiązaniami Hoogsteena. W każdej pozycji powstałego tripleksu znajduje się trójka zasad, w której T wiąże się z parą A-T (T-A-T), natomiast C wiąże się z parą G-C (C-G-C). W roku 1987 wykazano, że istnieje możliwość wykorzystania struktury potrójnej helisy do projektowania oligomerów (fragmentów DNA o długości 15–25 nukleotydów), które odczytują sekwencję podwójnej nici DNA i wiążą się za pomocą wiązań Hoogsteena. Zdolność odczytu podwójnej helisy DNA i możliwość łączenia się dodatkowego fragmentu DNA do wielkiej bruzdy oraz tworzenia potrójnej helisy DNA zainspirował badaczy do wykorzystania w tym celu cząsteczek PNA. W badaniach wykazano, że cząsteczki PNA posiadają zdolność tworzenia struktur tripleks z DNA [34]. Dwuniciowy fragment PNA wciska się do wnętrza helisy DNA, odnajduje odcinek komplementarny do siebie i tworzy z nim wiązania Watsona–Cricka, kosztem jego dotychczasowego partnera – drugiej nici DNA, wypychanej poza helisę. Natomiast z nowym dupleksem PNA-DNA oddziałuje druga nić PNA, tworząc tripleks PNA-DNA-PNA z wykorzystaniem wiązań Hoogsteena. Wypchnięty z helisy fragment DNA tworzy obok tripleksu tzw. pętlę P. Taki sposób budowania tripleksu ma wiele ciekawych konsekwencji biologicznych, ponieważ tripleks jest bardzo stabilny, a pętla P wpływa na kluczowe procesy biologiczne, takie jak: transkrypcja czy replikacja DNA i naprawa zmutowanych genów. Struktura ta może inicjować przepisywanie danego fragmentu DNA na mRNA albo służyć jako punkt zaczepienia podczas powielania DNA do badań genetycznych [19, 35]. Proces tworzenia przez PNA z DNA struktury tripleks można zachodzić na kilka sposobów. Jeżeli mamy pojedynczy łańcuch homopirymidynowy PNA, to tworzy on z podwójną helisą DNA strukturę tripleks DNA-PNA-DNA, natomiast jeżeli podczas połączenia PNA i DNA obie cząsteczki posiadają dwuniciową strukturę, to w pierwszym etapie łączenia może utworzyć się struktura tripleks PNA-DNA-DNA, która stosunkowo szybko jest przekształcana w termodynamicznie korzystniejszy tripleks PNA-DNA-PNA [36], (rycina 6).

### Hamowanie transkrypcji i replikacji DNA

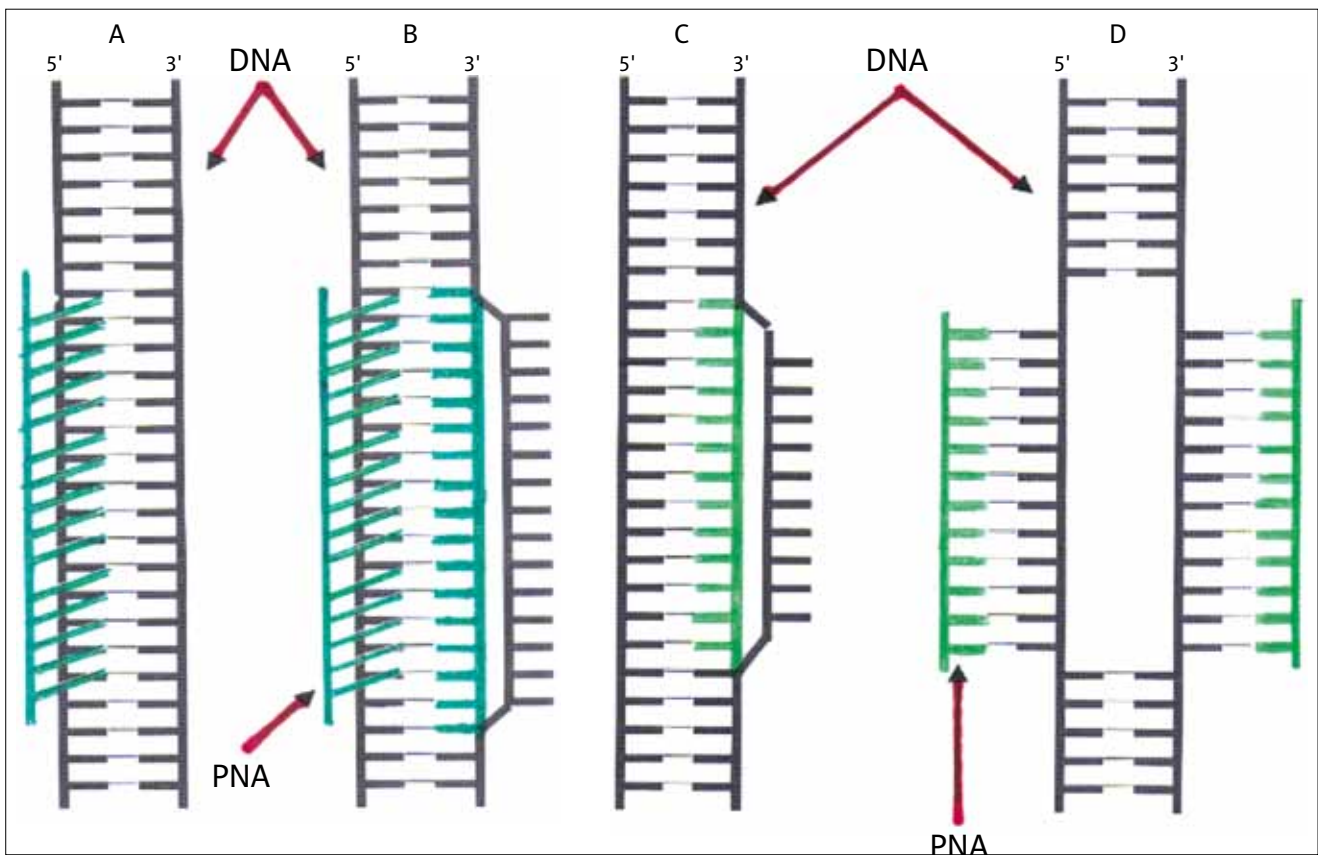
Początkowo sądzono, że struktury te są tylko intrygującymi osobliwościami. Jednak dokładniejsze badania wykazały możliwość występowania takich struktur w warunkach fizjologicznych [19]. Wykazano, że układy trójniciowe mają wiele ciekawych właściwości. Obecność tej struktury powoduje, że fragment trójniciowy nie może być substratem dla



**Rycina 5.** Zahamowanie translacji. W drugim etapie ekspresji rybosomy przepisują sekwencję z mRNA na sekwencję aminokwasów tworzących białko. Cząsteczki PNA mogą hamować ten proces w wyniku przyłączenia się do komplementarnych sekwencji mRNA, co powoduje blokowanie translacji

restryktaz, metylaz i innych białek wiążących się do DNA w jądrach komórek eukariotycznych. Prace prowadzone w 1987 r. w California Institute of Technology wykazały, że istnieją pewne obszary w jądrowym DNA zawierające liczne sekwencje bogate w pary zasad AT i GC, które są potencjalnymi miejscami tworzenia struktur trójniciowych. Sekwencje te występują często w miejscach promotorowych, a zatem tworzenie układów trójniciowych w tych obszarach może w istotny sposób wpływać na ekspresję informacji genetycznej. Już w latach 80. ubiegłego wieku wykazano, że struktury tripleks wykazują zdolność hamowania transkrypcji. Utworzenie stabilnej struktury tripleks przez PNA z DNA w rejonie transkrybowanym hamuje proces transkrypcji, na skutek blokowania aktywności polimerazy RNA zależnej od DNA (rycina 7).

W warunkach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że kompleksy tripleks utworzone przy współdziałaniu PNA w miejscach transkrypcji hamują ten proces zarówno u organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Obecność struktury tripleks PNA-DNA-PNA w miejscu promotorowym ogranicza dostęp



**Rycina 6.** Sposoby wiązania PNA do kwasów nukleinowych.

PNA wiąże się do kwasów nukleinowych – DNA i RNA oraz do innych cząsteczek PNA za pomocą komplementarnych wiązań wodorowych Watsona–Cricka. Oprócz standardowych wiązań wodorowych Watsona–Cricka, PNA może łączyć się z kwasami nukleinowymi za pomocą dodatkowych wiązań Hoogsteena, tworząc struktury tripleksowe. W rezultacie PNA z kwasami nukleinowymi tworzy szereg połączeń, a lek antysensowy wywodzący się z PNA może oddziaływać z komórką, wpływając na jej funkcjonowanie za pomocą różnych mechanizmów [13].

Szczególnie ciekawą strukturą, która ma potencjalne działanie terapeutyczne, jest inwazyjny tripleks z udziałem dwóch nici PNA i jednej nici DNA. A – tripleks, B – inwazyjny tripleks, C – inwazyjny dupleks, D – podwójny inwazyjny dupleks

polimerazy RNA, inicjującej proces transkrypcji mRNA, natomiast wytworzenie struktury tripleks poza promotorem powoduje przedwczesne odłączenie polimerazy RNA i zbyt szybkie zakończenie transkrypcji mRNA, który nie zawiera pełnej informacji o kodowanym białku [37]. PNA można również wykorzystać do hamowania replikacji DNA, katalizowanej przez polimerazę DNA. PNA nie wykazuje naturalnie żadnego bezpośredniego działania w stosunku do polimerazy czy odwrotnej transkryptazy. Może on jednak przerywać katalizowane przez nich procesy na skutek przyłączenia się do matrycy DNA czy RNA, co powoduje utworzenie silnego tripleksu, który przerywa postępujący proces replikacji czy odwrotnej transkrypcji [38–40]. Oprócz hamowania replikacji genomowego DNA, cząsteczki PNA wykazują również zdolność hamowania replikacji mitochondrialnego DNA. Hamowanie replikacji zmutowanego DNA przez cząsteczki PNA może być wykorzystane jako narzędzie terapeutyczne o dużej specyficzności, ze względu na fakt, że cząsteczki PNA mogą selektywnie hamować replikację zmutowanych genów. Przypadek ten jest szczególnie

ważny w odniesieniu do mutacji mitochondrialnych, gdzie część mitochondrii w komórkach może posiadać prawidłowe geny, a część – geny zmutowane [41].

#### Terapia genowa nowotworów

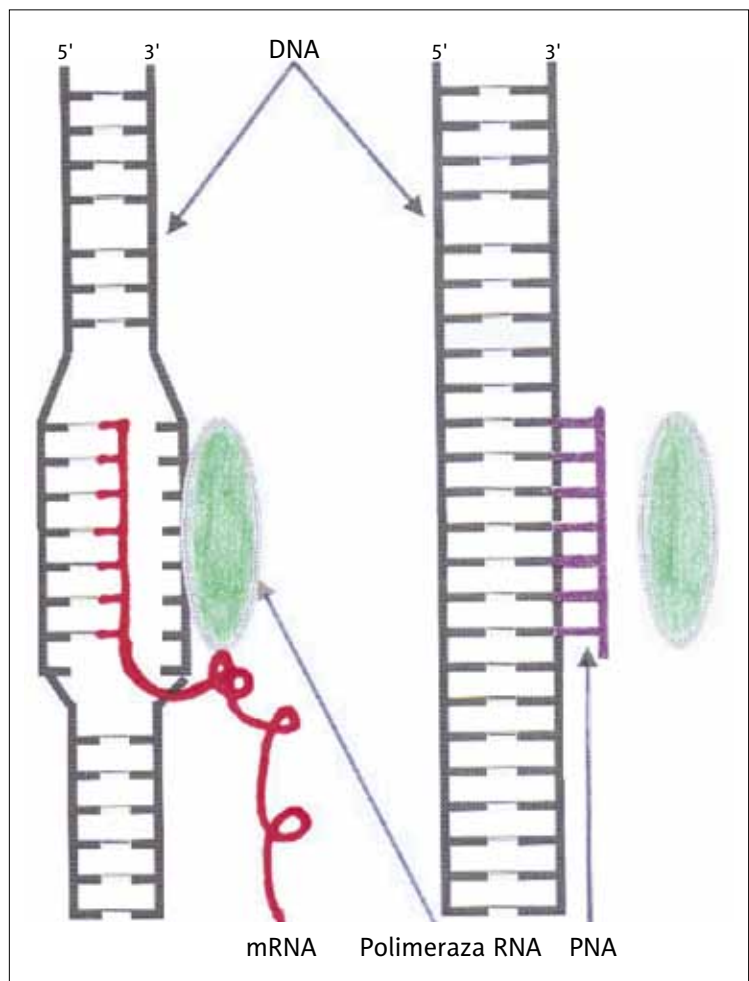
W 1998 roku wykazano, że utworzenie struktury tripleks przy udziale PNA (PNA-DNA-PNA) powoduje na modelu zwierzęcym zahamowanie procesu transkrypcji onkogenu c-myc. Blokowanie ekspresji onkogenu c-myc powodowało hamowanie proliferacji komórek nowotworowych [42]. Udało się również otrzymać cząsteczki PNA o potencjalnym działaniu antysensowym w stosunku do genu bcl-2, obecnego w zmienionych na skutek transformacji białaczkowej ludzkich leukocytach typu B. Te blokujące oligomery PNA były komplementarne do różnych sekwencji genu bcl-2, tj. sekwencji niekodujących od końca 5' i homopurynowych sekwencji kodujących bcl-2. Cząsteczki PNA komplementarne do tych sekwencji powodują selektywne hamowanie zarówno transkrypcji genu bcl-2, jak i translacji białka bcl-2, co można wykorzystać w terapii przeciwnowotworowej [43].

### Terapia genowa chorób infekcyjnych

Badania ujawniły, że już oktamer PNA potrafi blokować aktywność fagowej polimerazy  $T_3$  [44]. Jedną z głównych przeszkód w stosowaniu PNA w celu hamowania transkrypcji jest niska wydajność procesu w warunkach fizjologicznego stężenia soli [45]. Kilka modyfikacji w PNA spowodowało poprawę tego procesu. Do tych modyfikacji należy zaliczyć podstawienie do cząsteczek PNA pseudoizocytozyny, zamiast cytozyny, oraz przyłączenie reszt lizyny, co powoduje podwyższenie zdolności wiązania PNA z DNA [46, 47]. Lee i wsp. [47] wykazali, że tak modyfikowany PNA może zablokować transkrypcję dla tRNA<sub>3</sub>Lys w genomie HIV-1, powodując hamowanie inicjacji transkrypcji wirusowego genomu. PNA można wykorzystać do hamowania aktywności odwrotnej transkryptazy wirusa HIV. Oligomery PNA przyłączające się do krytycznych regionów wirusowego genomu mogą hamować replikację wirusów i być wykorzystywane w terapii przeciwwirusowej [48, 49]. Antysensowna aktywność PNA została również wykazana w przypadku bakterii – na przykładzie *E. coli*. Komplementarny fragment PNA w stosunku do rybosomowego RNA 23S *E. coli*, hamuje selektywnie aktywność rybosomów bakteryjnych już w mikromolarnym stężeniu [49]. Wydaje się, że cząsteczki PNA mogą pomóc w terapii chorób infekcyjnych i wspomóc obecnie stosowaną antybiotykoterapię w lek o bakteriostatycznej aktywności.

### Biodostępność PNA

Wadą stosowanych obecnie oligonukleotydów antysens RNA i DNA jest ich niska biodostępność. Również cząsteczki PNA, ze względu na właściwości fizykochemiczne, stosunkowo trudno przedostają się do wnętrza komórek. Wszystkie powyższe cząsteczki są bardzo duże i posiadają charakter hydrofilowy, co utrudnia ich przenikanie do wnętrza komórek, otoczonych przez hydrofobowe błony lipidowe. Pomimo faktu, że cząsteczki PNA są bardzo stabilne w środowisku zewnątrzkomórkowym, to nie pozostają w organizmie zwierzęcym zbyt długo, ponieważ ze względu na charakter hydrofilowy są szybko wydalone z moczem. W organizmie myszy połowa dawki PNA jest wydalana z ustroju przed upływem 1/2 godz. Z tego względu należy przed wprowadzeniem tego typu leków opracować chemiczne modyfikacje PNA lub odpowiednie wektory, np. wirusosomy pozwalające na zwiększenie biodostępności tych nowych leków antysens. W celu poprawienia efektywności przenikania przez błony lipidowe komórek docelowych oraz zwiększenia siły działania PNA stosuje się różne związki, które w czasie łączenia się z PNA poprawiają parametry dotyczące tego procesu. Związkami tymi są najczęściej peptydy, które są związane z cząsteczkami PNA w postaci koniugatów peptydowych zawierających specyficzne sekwencje o długości 40–60 aminokwasów,



**Rycina 7.** Kontrola transkrypcji. Podczas ekspresji informacji genetycznej w pierwszym etapie polimeraza RNA zależna od DNA przepisuje zakodowaną informację z genomowego DNA na cząsteczkę informacyjnego RNA (mRNA). PNA może blokować ten proces wiążąc się z odcinkiem DNA, który ma być transkrybowany

umożliwiające przenikanie przez błonę komórki. Aminokwasy składające się na te sekwencje sygnałowe wykazują konfigurację L lub D. Peptydy nośnikowe wiążą się z PNA za pośrednictwem stabilnego wiązania kowalencyjnego lub labilnego wiązania za pomocą mostka disiarczkowego. PNA sprzężony z nośnikiem, wykazuje swoją aktywność w strategii antysens [50, 51]. Nośnikami PNA stosowanymi w biotechnologii mogą być proteiny pochodzące z różnego typu wirusów. Jednym z pierwszych peptydów, który zastosowano w celu zwiększenia przenikania PNA przez błony komórkowe był jądrowy sygnał lokalizacyjny (nuclear localization signal – NLS) z wirusa SV40. Wektor ten posiada sekwencję peptydową PKKKRKV [52]. Związany z NLS fragment antysens PNA skierowany wobec onkogenu c-myc przenika do komórek i hamuje ekspresję tego genu. Wystarczy jednak drobna mutacja w sekwencji peptydowej NLS, np. zamiana lizyny w pozycji trzeciej peptydu sygnałowego, a NLS nie spełnia już swoich funkcji i nie transportuje



cząsteczek PNA do wnętrza komórek [53]. Następny polipeptyd użyteczny w transporcie PNA to białko TAT (wirusa HIV). Białko to wykorzystano do przenoszenia terapeutycznych fragmentów PNA w hodowlach tkankowych neuronów oraz do hamowania aktywności telomerazy w komórkach melanoma [54]. Oprócz peptydów nośnikami dla PNA mogą być również proste związki chemiczne. Przykładem może być dihydrotestosteron, który kowalencyjnie połączony z PNA działa jak wektor, transportując terapeutyczne cząsteczki PNA do zmienionych nowotworowo komórek prostaty, gdzie terapeutyczny PNA wykazuje zdolność hamowania ekspresji onkogenu c-myc, sugerując strategię terapii genowej raka prostaty z wykorzystaniem cząsteczek PNA [55].

### PNA w diagnostyce

Przyłączanie pojedynczych cząsteczek PNA do komplementarnych sekwencji DNA czy RNA przebiega z wysokim powinowactwem i specyficznością większą niż naturalne oligonukleotydy (DNA lub RNA). Termiczna stabilność dupleksu PNA-DNA jest niezależna od stężenia soli w medium hybrydacyjnym. Ponadto, termiczna stabilność dupleksu PNA-DNA jest większa niż odpowiedniego dupleksu DNA-DNA, nawet w wypadku braku całkowitej komplementarności. Pojedyncza zmiana w sekwencji nukleotydowej DNA podczas łączenia do komplementarnego fragmentu PNA obniża punkt topnienia dupleksu PNA-DNA o 15°C, natomiast w przypadku odpowiedniego dupleksu DNA-DNA ten punkt topnienia obniża się o 11°C [56]. Większa specyficzność przyłączania, stabilność połączeń komplementarnych i różnica w punkcie topnienia, przyczyniają się do faktu, że cząsteczki PNA są lepszymi sondami podczas hybrydacji do DNA czy RNA. Technika hybrydacji, która polega na kontrolowanej renaturacji komplementarnych regionów między różnymi nićmi kwasów nukleinowych, jest często wykorzystywana jako narzędzie diagnostyczne do wykrywania i badania określonych sekwencji genów i ich zmian mutacyjnych w testach diagnostycznych [57]. Większa szybkość łączenia się PNA z komplementarnymi sekwencjami DNA czy RNA (około 100 razy), odporność na enzymy komórkowe, pH i temperaturę powoduje, że technika hybrydacji staje się bardziej czuła i prostsza w wykonaniu [58]. W chwili

obecnej trwają badania dotyczące użycia cząsteczek PNA w fluorescencyjnej hybrydacji *in situ* (ang. *Fluorescence In Situ Hybridization, FISH*), która służy do oznaczania długości telomerów, aberracji chromosomów w badaniach cytogenetycznych. Cząsteczki PNA próbuje się również wykorzystywać do otrzymywania starterów do reakcji PCR, która jest dobrym narzędziem w diagnostyce zmian mutacyjnych w onkogenach czy w szybkim wykrywaniu obecności konkretnych infekcji wirusowych w organizmie pacjentów [59].

### Podsumowanie

Cząsteczkę PNA można traktować jako swoisty pomost łączący kwasy nukleinowe i białka. Podobnie jak kwasy nukleinowe, PNA może odgrywać rolę cząsteczki zawierającej informację genetyczną oraz pełnić funkcje katalityczne, podobnie jak wiele enzymów białkowych. Ta potencjalna dwufunkcyjność wzbudziła duże zainteresowanie wśród naukowców zajmujących się stworzeniem sztucznego życia. Pod wieloma względami cząsteczka PNA wydaje się mniej skomplikowana niż RNA. Cząsteczka RNA występuje w wielu różnych kopiach, spełniających różne funkcje komórkowe, włącznie z magazynowaniem informacji i funkcją katalityczną [60], podczas gdy takie funkcje dla cząsteczki PNA dopiero czekają na odkrycie. Ze względu jednak na fakt, że łańcuchy PNA, podobnie jak białka i RNA, przyjmują struktury drugo- i trzeciorzędowe kluczowe dla katalizy, wydaje się, że opracowanie katalitycznych odmian PNA jest kwestią czasu. W chwili obecnej najbardziej zaawansowane próby stworzenia życia koncentrują się na znalezieniu samo replikujących się cząsteczek RNA, które będą katalizowały syntezę własnego łańcucha<sup>1</sup>. Odkryto już systemy replikacji autokatalitycznej, które wykorzystują krótkie oligonukleotydy, a także samoreplikujące się peptydy. Z tego względu opracowanie analogicznych samoreplikujących się systemów PNA powinno też być możliwe, a ich zaletą byłaby trwałość wiązań peptydowych oraz wysoka specyficzność rozpoznawania sekwencji zasad [61].

Strukturalne i hybrydacyjne właściwości PNA, włączając w to jego prostą syntezę chemiczną i stosunkowo dobrą stabilność w materiale biologicznym, przyczyniają się do tego, że związek ten jest doskonałym kandydatem jako lek antysensowy w terapii

<sup>1</sup> Cząsteczki PNA, które inspirowały wielu badaczy do prowadzenia badań medycznych mogły pełnić ważne funkcje podczas powstawania życia na naszej planecie. Sugeruje się, że cząsteczki PNA lub podobne związki mogły tworzyć podstawy życia w jego pierwotnej formie, zanim jeszcze wyeluuowały białka czy kwasy nukleinowe. W oparciu o PNA próbuje się stworzyć kombinację cząsteczek, które podtrwałyby układać się całość, metabolizować, wykorzystywać źródła energii rosnąć i rozmnażać. Pozwoliłoby to być może na zrozumienie istoty życia i wyjaśnienie jego powstania na Ziemi. Obecnie, uważa się, że z cząsteczek RNA rozwinął się nasz świat składający się z DNA, RNA i białek. Nadal jednak nie jest jasne w jaki sposób w warunkach prebiotycznych mogły powstać molekuly RNA, a szczególnie cząsteczki rybozy, które budują łańcuch nukleinowy utrzymujący cząsteczki RNA w postaci liniowej. Inną cechą RNA, która jest ważna w początkowych etapach życia jest bardzo mała stabilność RNA. Ta niska stabilność wskazuje, że cząsteczka tego typu nie jest zdolna przetrwać samodzielnie w środowisku bez dodatkowej osłony na tyle długo aby odegrać pierwszoplanową rolę w pierwszym etapie ewolucji chemicznej. Z tego względu cząsteczka PNA, która jest bardziej stabilna chemicznie i niesie informację w postaci sekwencji zasad, wydaje się bardziej atrakcyjnym kandydatem na fundament życia sprzed ery RNA. Należy jednak stwierdzić, że obecność cząsteczek PNA i stopniowe przejście świata PNA w prebiotyczny świat RNA nie jest jeszcze w pełni udowodnione.

antysens. Wydaje się, że PNA znajdzie szerokie zastosowanie w terapii antysens nowotworów, chorób infekcyjnych wywołanych przez wirusy i bakterie oraz w diagnostyce chorób zakaźnych i molekularnych.

Otrzymano: 2010.01.12 · Zaakceptowano: 2010.02.26

## Piśmiennictwo

- Egholm M., Buchardt O.: Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogues with an achiral peptide backbone. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114: 1895–1899.
- Egholm M., Buchardt O.: PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen bonding rules. *Nature*, 1998, 365: 566–568.
- Boffa L. C., Morris P. L., Carpeneto E. M.: Invasion of the CAG triplet repeats by a complementary peptide nucleic acid inhibits transcription of the androgen receptor and TATA binding protein genes and correlates with refolding of an active nucleosome containing a unique AR gene sequence. *J. Biol. Chem.* 1999, 271: 13228–13233.
- Nielsen P.E.: Sequence selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine -substituted polyamide. *Science*. 1999, 254: 1497–1500.
- Demers D. B., Curry E. T.: Enhanced PCR amplification of VNTR locus D1S80 using peptide nucleic acid (PNA). *Nucleic Acids Res.* 1998, 23: 3050–3055.
- Örum H., Nielsen P. E.: Sequence-specific purification of nucleic acids by PNA-controlled hybrid selection. *BioTechniques*. 2003, 19: 472–480.
- Perry-O'Keefe H., Yao X.-W.: Peptide nucleic acid pre-gel hybridization: an alternative to Southern hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 93: 14670–14675.
- Veselkov A. G., Demidov V.: A new class of genome rare cutters. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24: 2483–2487.
- Carlsson C., Jonsson M.: Screening for genetic mutations. *Nature*. 1998, 380: 207–213.
- Thiede C., Bayerdörffer E.: Simple and sensitive detection of mutations in the ras proto-oncogenes using PNA-mediated PCR clamping. *Nucleic Acids Res.* 1998, 24: 983–984.
- Wang J., Palecek E.: Peptide nucleic acid probes for sequence-specific DNA biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 118: 7667–7670.
- Boffa L.C., Mariani M.R.: PNA anti-gene/antisense can access intact viable cells and downregulate target genes. *Gene Ther Mol Biol.* 2004, 5: 45–49.
- Eriksson M., Nielsen P.E.: Solution structure of a peptide nucleic acid-DNA duplex. *Struct. Biol.* 1996, 3: 410–421.
- Uhlmann E., Peyman A.: PNA: synthetic polyamide nucleic acids with unusual binding properties. *Gene Ther Mol Biol.* 2003, 2: 96–99.
- Nielsen P.E., Buchardt O.: Evidence for PNA-DNA triplex structure upon binding of PNA to dsDNA by strand displacement. *J. Mol. Biol.* 2001, 7: 165–170.
- Lebrun A., Lavery R.: Unusual DNA conformations. *Curr Opin Struct. Biol.* 2003, 7: 348–354.
- Soomets U., Hallbrink M.: Antisense properties of peptide nucleic acids. *Frontiers Biosci.* 2003, 4: 782–786.
- Jakimov D., Kojić V.: Peptide nucleic acid—sequence specific recognition in cancer diagnostics and gene therapy. *Oncology*, 2001, 9(1): 33–37.
- Kazula A.: Utilization of antisense strategy, triplex structure and ribozymes in gene therapy. *Polish Pharmacy* 2004, LX(16): 736–756.
- Nielsen P.E., Orgel L.E.: Template switching between PNA and RNA oligonucleotides *Nature*, 1997, 367: 578–581.
- Knudsen H., Nielsen P. E.: Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs. *Nucleic Acids Res.* 2001, 24: 494–500.
- Mologni L., LeCoutre P.: Additive antisense effects of different PNAs on the in vitro translation of the PML/RAR  $\alpha$  gene. *Nucleic Acids Res.* 1998, 26: 1934–1938.
- Good L., Nielsen P. E.: Inhibition of translation and bacterial growth by peptide nucleic acid targeted to ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998, 95: 2073–2076.
- Good L., Nielsen P. E.: Antisense inhibition of gene expression in bacteria by PNA targeted to mRNA. *Nature Biotechnol.* 2002, 16: 355–358.
- Kazula A.: Wykorzystanie aktywności telomerazy w terapii genowej nowotworów. *Farmacja Polska*, 2007, LXIII(1–15): 211–220.
- Kraemer K., Fuessel S., Schmidt U.: Peptide nucleic acid in therapy. *Cancer Res.* 2003, 9(10 Pt 1): 3794–3800.
- Nakajima A., Tauchi T., Sashida G.: Telomerase activity. *Leukemia* 2003.
- Olausen K.A., Dubrana K.: Inhibition of human telomerase activity. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2006, 57(3): 191–214.
- Norton J. C., Piatyszek M. A.: Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids. *Nat. Biotech.* 2001, 14: 615–621.
- Hamilton S. E., Simmons C. G.: Cellular delivery of peptide nucleic acids and inhibition of human telomerase. *Chem. Biol.* 1999, 6: 343–351.
- Blancafort P.: Designing transcription factor architectures for drug discovery. *Molecular Pharmacology* 2004, 6: 1361–1371.
- Brown T.A.: *Genomy*, 2001, PWN Warszawa 2001.
- Harrison S.C.: DNA recognition by proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 2001, 68: 677–682.
- Rosolen A.: Peptide nucleic acid in cancer therapy. *Cancer Research* 2001, 50: 6316–6322.
- Nielsen E.P.: Peptide nucleic acids as therapeutic agents. *Curr Opin Struct. Biol.* 2000, 9: 353–357.
- Nielsen P.E.: Peptide nucleic acid. *Accounts of Chemical Research*. 1999, 32: 624–630.
- Nielsen P. E., Egholm M.: Sequence-specific transcription arrest by peptide nucleic acid bound to the DNA template strand. *Gene* 2003, 149: 139–145.
- Nielsen P. E., Egholm M.: Peptide nucleic acids (PNAs): potential antisense and antigene agents. *Anti-Cancer Drug Design*. 2001, 8: 53–63.
- Lutz M. J., Benner S. A.: Recognition of uncharged polyamide-linked nucleic acid analogs by DNA polymerases and reverse transcriptases. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 119: 3177–3178.
- Koppelhus U., Zachar V.: Efficient in vitro inhibition of HIV-1 gag reverse transcription by peptide nucleic acid (PNA) at minimal ratios of PNA/RNA. *Nucleic Acids Res.* 2002, 25: 2167–2173.
- Kazula A.: Mitochondrial gene therapy. *Polish Pharmacy* 2005, vol. LXI, 791–801.
- Vasquez M.K., Wilson H.J.: Triplex-directed modification of genes and gene activity. *Trends Biochem Sci.* 2003, 23: 4–9.
- Mologni L., Nielsen E.P.: In vitro transcriptional and translational block of the bcl-2 gene operated by peptide nucleic acid. *Biochem Biophys Res. Commun.* 2003, 264: 537–543.
- Hanvey J. C., Peffer N.: Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids. *Science* 1999, 258: 1481–1485.
- Bentin T., Nielsen P.: Enhanced peptide nucleic acid binding to supercoiled DNA: possible implications for DNA 'breathing' dynamics. *Biochemistry* 2002, 35: 8863–8869.
- Armitage B., Koch T.: Peptide nucleic acid (PNA)/DNA hybrid duplexes: intercalation by an internally linked anthraquinone. *Nucleic Acids Res.* 2002, 26: 715–720.
- Kuhn H.: Kinetic sequence discrimination of cationic bis-PNAs upon targeting of double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* 2001, 26: 582–587.
- Lee R., Kaushik N., Modak M. J.: Polyamide nucleic acid targeted to the primer binding site of the HIV-1 RNA genome blocks in vitro HIV-1 reverse transcription. *Biochemistry* 2003, 37: 900–910.
- Larsen H.J., Nielsen P. E.: Transcription-mediated binding of peptide nucleic acid (PNA) to double-stranded DNA: sequence-specific suicide transcription. *Nucleic Acids Res.* 2001, 24: 458–463.
- Pooga M.: *Nature Biotechnology*. 2003, 15: 431–444.
- Simons G.C.: *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 1999, 7(23): 3001–3006.
- Gorlich D., Mattaj J.W.: Nucleocytoplasmic transport. *Science*, 1999, 271: 1513–1518.
- Cutrona G., Carpaneto E.M.: Effects in live cells of a c-myc anti-gene PNA linked to a nuclear localization signal. *Nat. Biotechnol.* 2000, 18: 300–303.
- Villa R., Daidone M.R.: Inhibition of telomerase activity by a cell-penetrating peptide nucleic acid construct in human melanoma cells. *FEBS Letters*. 2000, 474: 241–248.
- Boffa L.C., Scarfi S., Mariani M.R.: Dihydrotestosterone as a selective cellular/nuclear localization vector for antigene peptide nucleic acid in prostatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000, 60: 2258–2262.
- Lowe R.C.: Chemoselective biosensors. *Curr Opin Struct Biol.* 1999, 3: 106–111.
- Turner P.C.: *Biologia molekularna*. PWN Warszawa 1999.
- Griffin J.T., Smith M.L.: Single-nucleotide polymorphism analysis. *Trends Biotechnol.* 2003, 18: 77–84.
- Behn M., Thiede C.: Facilitated detection of oncogene mutations from exfoliated tissue material by a PNA-mediated PCR. *J. Pathol.* 2003, 190: 69–75.
- Orgel L.E.: Probiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2004, 39: 99–123.
- Szostak J., David P.: Synthesizing life. *Nature* 2001, 409: 387–390.