

Chemisch modifizierte Oligonucleotide als Sonden und Agentien

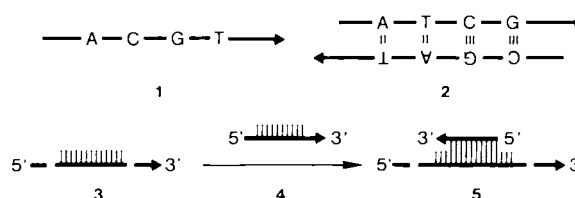
Von Uwe Englisch* und Dieter H. Gauss*

Oligonucleotide binden spezifisch an andere einzelsträngige Nucleinsäuren, wenn diese eine komplementäre Basensequenz in gegenläufiger Anordnung aufweisen; es bildet sich eine Doppelhelix. Ebenso binden Oligonucleotide spezifisch an eine Reihe von Proteinen. Daher kann man Vorgänge, an denen diese Nucleinsäuren oder Proteine beteiligt sind, durch Zusetzen entsprechender Oligonucleotide beeinflussen, gewöhnlich inhibieren. Durch chemische Modifizierung dieser Oligonucleotide läßt sich ihre Wirksamkeit erhöhen und das Spektrum der Anwendungsmöglichkeiten erweitern. Sind zum Beispiel in einem Oligonucleotid die Phosphatgruppen durch Phosphonatgruppen ersetzt, so fällt eine negative Ladung pro Nucleotid weg, und das Oligonucleotid ist lipophiler. Ein Oligonucleotid, das eine reaktive Gruppe trägt, kann seine Bindungspartner modifizieren. Ein Oligonucleotid, das kovalent mit einem Farbstoff verknüpft ist, läßt sich dadurch in biologischem Material orten. Oligonucleotide, die kovalent mit einem Enzym verknüpft sind, können in sehr kleinen Mengen nachgewiesen werden, da über die Wirkung des Enzyms die signalgebende Substanz, meistens ein fluoreszierender Stoff, vervielfacht werden kann. – Einschlägige biochemische Probleme, die durch chemisch modifizierte Oligonucleotide untersucht werden, sind die Frage nach dem Vorhandensein und dem Ort einer Messenger-RNA oder eines entsprechenden Gens, oder die Frage nach dem Vorhandensein bakterieller oder viraler Sequenzen in einem Gewebe oder in einer Lösung. Ferner wird versucht, die Translation einer mRNA oder die Transkription und Replikation einer DNA zu inhibieren. Derzeit ist insbesondere die Hemmung der Proteinbiosynthese und der reversen Transkription von Retroviren das Ziel vieler Arbeiten mit modifizierten Oligonucleotiden.

1. Prinzipien der Planung, Synthese und Erprobung modifizierter Oligonucleotide als Wirkstoffe am Beispiel Psoralen-modifizierter Oligonucleotide

Doppelsträngige Nucleinsäure ist gewöhnlich inaktiv, während DNA und RNA dort, wo sie eine Funktion ausüben, einzelsträngig sind, etwa DNA an der Stelle der Replikation oder Transkription und RNA insbesondere in der Form der Messenger-RNA, von der die Proteinbiosynthese ausgeht. An diese Einzelstränge oder einzelsträngigen Bereiche wie **1** können Oligonucleotide von komplementärer und

gegenläufiger Sequenz über Basenpaarung nach *Watson und Crick* spezifisch binden und dabei wieder einen doppelsträngigen Bereich wie **2** entstehen lassen (**3** + **4** → **5**).



Zwei Anwendungsmöglichkeiten dieses Vorgangs sind augenfällig: Versieht man das Oligonucleotid mit einer Markierung, so ist in einer Lösung die Anwesenheit der komplementären

[*] Dr. U. Englisch, Dr. D. H. Gauss
Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin
Abteilung Chemie
Hermann-Rein-Strasse 3, W-3400 Göttingen

tären Sequenz nachweisbar, in einem Aufschluß, einer Zelle oder einem Gewebe darüber hinaus auch der Ort der komplementären Sequenz. Es besteht die Möglichkeit der Identifizierung. Die zweite Anwendungsmöglichkeit ist die der Inhibierung. Dabei ist das Prinzip darin zu sehen, daß die Funktion eines einzelsträngigen Bereichs (z. B. im Falle der Replikation und Transkription die Sequenz eines neu zu synthetisierenden Strangs zu bestimmen, im Falle der Translation – ebenfalls über die komplementäre Basenpaarung – die richtige Transfer-RNA auszuwählen) durch das teilweise oder gänzliche Verschließen zum Doppelstrang teilweise oder gänzlich stillgelegt wird. Diese Art der Regulation kommt auch natürlich vor; man spricht dort von „Antisense RNA“ (Übersichten^[1-6]), bei künstlichen Produkten zur Nachahmung dieser Regulation von Antisense-Oligonucleotiden.

Einer solchen analogen Wirkung eines von außen eingebrachten unmodifizierten synthetischen Oligonucleotids in lebenden Zellen stehen jedoch drei wichtige Hindernisse entgegen:

- 1) Oligonucleotide, die an jeder Phosphatgruppe eine negative Ladung tragen, treten nicht ohne weiteres durch die im wesentlichen lipophilen Zellmembranen;
- 2) zahlreiche zelleigene Nucleasen bauen Oligonucleotide schnell ab;
- 3) die Stabilität eines Duplex aus einem RNA- oder DNA-Abschnitt und einem Oligonucleotid mittlerer Kettenlänge ist nicht groß, so daß die Lebensdauer des Duplex oft beträchtlich unter der erwünschten Lebensdauer liegt.

1.1. Modifizierte Oligonucleotide

Während die Beeinflussung von Vorgängen in lebenden Zellen durch unmodifizierte Oligonucleotide (Übersichten^[7-9]) bisher nicht sehr erfolgreich war, ist offensichtlich, daß chemische Manipulationen die Eigenschaften von Oligonucleo-

tiden in bezug auf die genannten drei Problemkreise verbessern können:

1) Da Zellmembranen in wesentlichen Teilen aus lipophilen Proteinen und aus Lipiden bestehen, erleichtert eine gelinde Erhöhung der Hydrophobie den Membrandurchtritt. Allerdings darf die Hydrophobie nicht zu drastisch erhöht werden, da sonst das modifizierte Oligonucleotid seinen Zielort nicht erreicht, zum Beispiel, weil es in der Zellmembran oder einem anderen lipophilen Bereich der Zelle verbleibt. Dazu käme noch der Verlust ausreichender Wasserlöslichkeit, die außerhalb und innerhalb der Zelle gegeben sein muß.

2) Da Nucleasen die Zucker-Phosphat-Kette spalten, ist die Stabilität der Oligonucleotide offensichtlich in erster Linie durch Modifizieren dieser Gruppen zu erhöhen. Jedoch beeinflußt die chemische Natur der Nucleobasen die Konformation der Zucker-Phosphat-Kette intensiv und subtil. Daher können auch Basen-modifizierte Oligonucleotide stark veränderte Nuclease-Resistenz aufweisen. Eine große Anzahl von Möglichkeiten kommt hierfür in Betracht, von chemischen Veränderungen der eigentlichen Schnittstelle bis hin zu sterischer Hinderung des Zutritts eines Enzyms.

3) Beim Auffinden einer komplementären gegenläufigen Sequenz und dem Binden an sie, dem Hybridisieren (Übersichten^[10, 11]), wird für jede entstehende H-Brücke und jede Basenstapelung ein (etwas unterschiedlicher) Energiebetrag freigesetzt. Die Summe aller dieser Beträge bestimmt die Stabilität des doppelsträngigen Bereichs. Sie hängt nur unwesentlich davon ab, ob beide Stränge der Ribo-Reihe oder der Desoxy-Reihe angehören (Homoduplex), oder ob der Doppelstrang ein Heteroduplex ist. (Daher kann die Mehrzahl der Versuche auch mit Ribo- oder Desoxyoligonucleotiden ausgeführt werden; gewöhnlich sind aber Desoxyoligonucleotide leichter zu synthetisieren und stabiler.) Zu kurze Oligonucleotide bilden keine stabilen Hybride, sehr lange binden schließlich unspezifisch. Dazwischen liegt ein Bereich, in welchem die Bindung schon von *einem* Nucleotid mehr oder



Uwe Englisch wurde 1954 in Oldenburg geboren. Er studierte ab 1974 Biochemie an der University of Michigan, USA, und Chemie an der Universität Göttingen, wo er 1983 bei F. Cramer promovierte. Seit 1984 ist er als wissenschaftlicher Angestellter und seit 1987 als Arbeitsgruppenleiter in der Abteilung Chemie am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen tätig. Englischs Arbeitsgebiete umfassen die Molekularbiologie und Biochemie der Transfer-RNAs sowie die Synthese und Anwendung modifizierter Oligonucleotide in der Molekularbiologie.

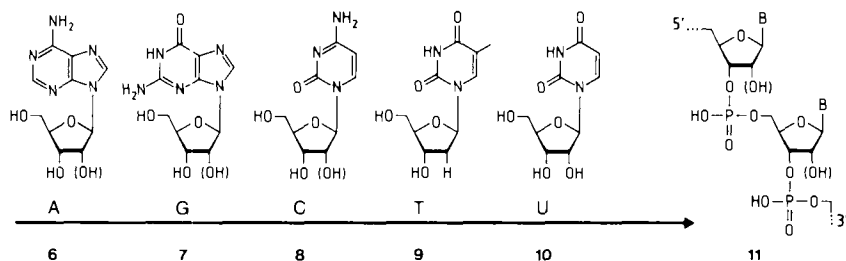


Dieter Gauss, geboren 1933 in Stuttgart, studierte ab 1953 an der Universität Tübingen Chemie (und Medizin). Er promovierte 1967 im Fach Biochemie bei G. Weitzel. Seit 1967 ist er am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen tätig, wo in der Abteilung Chemie (Leiter: Prof. Dr. F. Cramer) Nucleinsäurechemie betrieben wird. Seine „normalen“ Tätigkeitsfelder sind die Bereiche Bibliothek und Information.

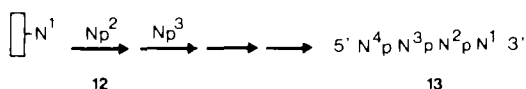
weniger, oder von nur *einer* fehlpaarenden Stelle darin, abhängig sein kann. Dabei spielen die physikalischen Bedingungen wie Temperatur und Ionenstärke eine sehr sensible Rolle. Bei physiologischen Bedingungen sind Doppelstrang-Bereiche oberhalb von etwa 15 Basenpaaren einigermaßen stabil; unter extremen Bedingungen können aber auch schon doppelsträngige Bereiche aus nur etwa fünf Basenpaaren bestehen. Dieses Binden der Stränge läßt sich durch viele Manipulationen am Oligonucleotid sehr fein modulieren, angefangen von Modifizierungen der Nucleobasen zu besserem Paaren oder Stapeln über das Hinzufügen intercalierender Substituenten bis hin zum irreversiblen Verknüpfen der beiden Stränge. Jedoch darf der zusätzlich freiwerdende Energiebetrag (z. B. aus einer Intercalation) nicht so hoch sein, daß er das sequenzspezifische Hybridisieren des Oligonucleotids zunichte macht.

1.2. Synthese

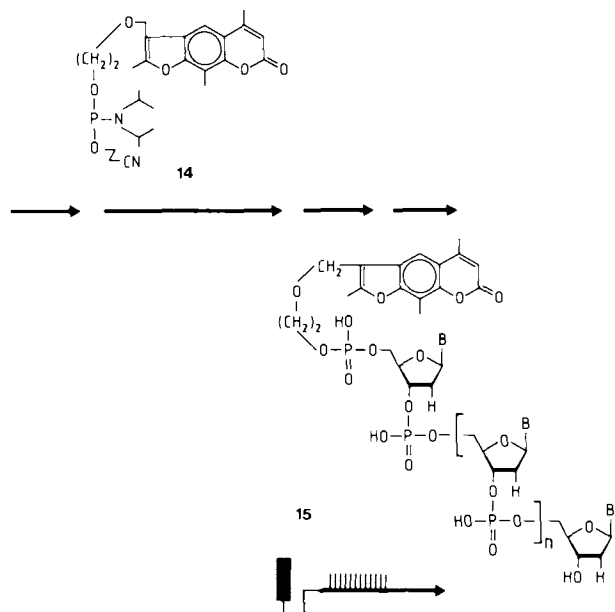
Oligonucleotide **11** können nach mehreren Verfahren in käuflichen Synthese-Apparaturen schrittweise aus entsprechend phosphorylierten, geschützten und aktivierten Derivaten **6–10** der Nucleoside aufgebaut werden (Übersichten^[8, 12–17]).



Die Synthese modifizierter Oligonucleotide richtet man deshalb so ein, daß diese Verfahren und Apparaturen beibehalten werden können. Eines der einzusetzenden Nucleotid-Derivate (oder mehrere) wird in einem Synthese-Cyclus (oder in mehreren) durch ein modifiziertes Nucleotid-Derivat ersetzt. Dies Nucleotid-Derivat kann bereits wie gewünscht modifiziert oder eine Vorstufe sein, die in einem späteren Schritt zum gewünschten Produkt umgesetzt wird. Im einfachsten Fall wird nur im letzten Schritt einer maschinellen Synthese eine veränderte Substanz eingebracht. So ist es zum Beispiel im Fall einer der Synthesen Psoralen-modifizierter Oligonucleotide^[18]: Das Oligonucleotid wird nach der Phosphoramidit-Methode an der Festphase von 3' nach 5' aufgebaut (**12** → **13**).



Im letzten Schritt bringt man statt eines Nucleotid-Derivats die Substanz **14** ein, einen Abkömmling des 4,5',8-Trimethylpsoralens, und erhält nach Ablösen des Produkts von der Festphase und Abspalten der Schutzgruppen vom Oligo-

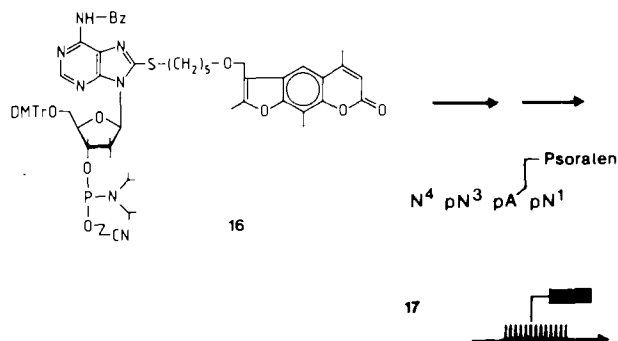


nucleotid das Psoralen-modifizierte Oligodesoxynucleotid der prinzipiellen Struktur **15**^[*].

In einer Variante der Synthese Psoralen-modifizierter Oligonucleotide **17** wird in die Phosphoramidit-Festphasen-

Synthese statt eines Adenosin-Derivats die Substanz **16** eingebracht^[19].

Es kann also jedes beliebige Adenosin in einer Sequenz durch das Psoralen-modifizierte Adenosin ersetzt werden. In weiteren Arbeiten zur gezielten kovalenten Verknüpfung von

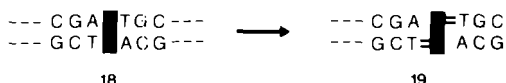


Psoralen und einem Oligonucleotid werden die modifizierten Oligonucleotide durch andere Reaktionen, aber prinzipiell nach demselben Baukastensystem, konstruiert^[20–22].

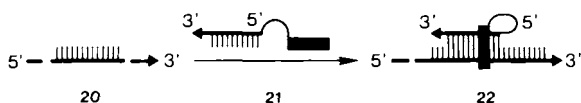
[*] Alle hier besprochenen Psoralen-modifizierten Verbindungen enthalten das in den Formeln **14–16** gezeichnete Psoralen-Derivat.

1.3. Psoralen und Psoralen-modifizierte Oligonucleotide

Psoralen kommt in Pflanzen vor; Extrakte solcher Pflanzen werden seit etwa 3000 Jahren gegen Haut- und Tumorerkrankungen eingesetzt (Übersichten^[23–25]). Dabei kommt es zu einer Hemmung der Replikation oder Transkription der DNA, weil sich das Psoralen wie in **18** angedeutet zwischen zwei übereinanderliegende Basenpaare der DNA einlagern kann. Wird dieses Addukt mit Licht der Wellenlänge 300–400 nm bestrahlt, so kann das Psoralen sowohl mit dem Furan- als auch mit dem Pyran-Ring kovalente Bindungen bilden, bevorzugt zu Thymidinen (vgl. **19**), so daß durch die kovalente Verknüpfung beider Stränge die inhibierende Wirkung langfristig etabliert wird.



Von den Psoralen-modifizierten Oligonucleotiden **21** erwartet man schließlich eine wesentliche Verbesserung der therapeutischen Wirkung des Psoralens allein (dessen Binden an die DNA natürlich statistisch erfolgt), da über das Hybridisieren des Oligonucleotids an die gegenläufige komplementäre Sequenz **20** das Psoralen an *nur eine* bestimmte Stelle gebracht werden kann (vgl. **22**) und es diese Stelle dann verschließt. Dabei kann es sich z. B. um einen DNA-Abschnitt handeln, der in Tumor-Zellen transkribiert wird, während in Zellen, die einer funktionierenden Regulation unterliegen, die Anlagerung von **21** unterbleibt.



Die Richtigkeit des Konzepts wurde *in vitro* gezeigt: Ein Psoralen-modifiziertes Oligonucleotid aus 18 Nucleotiden ist mit einem unmodifizierten Oligonucleotid **23** etwa gleicher Kettenlänge und gegenläufiger komplementärer Sequenz nach Hybridisieren und Bestrahlen kovalent verknüpft. Dies



läßt sich am chromatographischen Verhalten der Oligonucleotide in einem Medium nachweisen, in dem keine Doppelstränge, die nur durch Basenpaarung zusammengehalten werden, existieren können^[18, 19]. Mit weiteren Psoralen-modifizierten Oligonucleotiden wurde darüber hinaus die Inhibition der Transkription und Translation gezeigt^[20, 21, 26, 27].

Von besonderer Wichtigkeit ist, ob ein Substituent unmittelbar an ein Oligonucleotid geknüpft ist und deshalb wenig Beweglichkeit hat, oder ob ein Spacer ihm mehr Beweglichkeit verschafft. Ein direkt gebundener Substituent kann unter Umständen überhaupt nicht agieren; ein günstig gewählter Spacer – gewöhnlich zwischen drei und zwanzig Atomen je nach Einzelfall – soll der funktionellen Gruppe das Errei-

chen der gewünschten Stelle ermöglichen und das Erreichen anderer Stellen unmöglich machen. Gewöhnlich ist dies auf eine Nucleobase genau nicht erreichbar, sondern betrifft einen Bereich um ein Maximum herum – man bezeichnet die Reaktionen deshalb je nachdem als hoch bis gering regioselektiv und symbolisiert dies mit größeren und kleineren Pfeilen.

Im Falle der Psoralen-modifizierten Oligonucleotide ist erhöhte Hydrophobie festzustellen und eine gewisse Inhibition der Nucleasen durch den sperrigen Psoralen-Rest zu erwarten. Beides, Membrangängigkeit und Nucleasestabilität, soll auch durch den Ersatz der geladenen Phosphat-Gruppen durch die ungeladenen Methylphosphonat-Gruppen erhöht werden, wie es in einer anderen Familie Psoralen-modifizierter Oligonucleotide gelang^[20, 21]. Nachdem die Hybridisierung stattgefunden hat, bestimmt die Länge des Spacers, ob und wo intercaliert werden kann. Bei Verbindung **15** können maximal acht Atome als Spacer gezählt werden, so daß kein weiterer Spielraum zur Intercalation vorliegt. Die Hybridisierungsstelle (siehe **23**) und der Spacer (siehe **15**) sind so gewählt, daß das Psoralen an einer *der* Stellen intercalieren kann, wo gegenüberliegende Thymin-Reste unterhalb und oberhalb des Psoralens die Photoreaktion ermöglichen (siehe **23** und **18/19**). Mit diesem System können bei Bedarf noch weitere Reaktionsschritte ausgeführt werden, da die Verknüpfungen der Thymin-Reste mit dem Psoralen über Cyclobutan-Strukturen durch Bestrahlen mit UV-Licht der Wellenlänge < 300 nm wieder gelöst werden können. Auch die Bindung zwischen dem Psoralen und dem Oligonucleotid kann in einem Fall^[22], wo sie eine S-S-Brücke einschließt, leicht wieder gelöst werden.

1.4. Substrat-Analoga

Eine dritte Gruppe von Anwendungen modifizierter Oligonucleotide besteht darin, daß sie als Substrat-Analoga von Nucleasen, Polymerasen und weiteren Enzymen und als Bindungspartner von Proteinen dienen können. Dabei werden die modifizierten Oligonucleotide nicht nur als Einzelstrang, sondern auch als Duplex eingebracht. Auf diese Weise sind Untersuchungen von Reaktionsmechanismen (siehe z. B. Restriktions-Endonucleasen), Markierungen (siehe z. B. Sequenzieren), regulierende Eingriffe (siehe z. B. Nucleasen) und weitere Manipulationen möglich.

1.5. Literatur

Über Oligonucleotide – unmodifiziert und chemisch modifiziert – sind mehr als 3000 Publikationen erschienen. Dem entsprechend wurden auch modifizierte Oligonucleotide schon nach mehreren Gesichtspunkten kritisch zusammengefaßt; insbesondere wurden neben ihrer Chemie^[7, 9] und ihrer Bedeutung bei der Untersuchung der Replikation^[28] ihre hemmende Wirkung auf die Genexpression in Zellaufschlüssen und Zellkulturen sehr sorgfältig analysiert^[9, 29–35] und ihre Anwendung als Cytostatica diskutiert^[36–38]. Dasselbe gilt für die Anwendung zur Identifizierung von Nucleinsäuren und Proteinen^[39] bis hin zu entsprechenden Anwendungen in der Diagnose^[40]. In diesem Aufsatz werden als Beispiele die Gebiete gewählt, in denen Publikationen aus

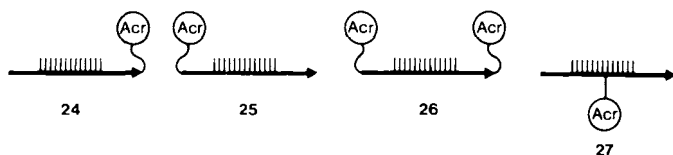
jüngster Zeit (bis etwa Mitte 1990) vorliegen; selbst dann können die vorgestellten Publikationen nicht ohne gewisse Willkür ausgewählt sein. Länger zurückliegende und grundsätzliche Arbeiten sind insbesondere bei^[7, 9, 30–35, 37–40] besprochen.

2. Inhibieren von RNA- und DNA-Funktionen durch modifizierte Oligonucleotide

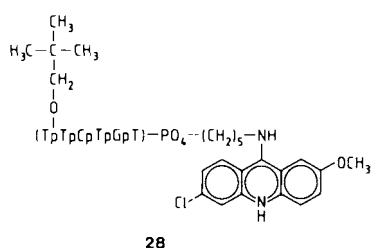
Psoralen-modifizierte Oligonucleotide, die in der Einleitung als Beispiel zur Erklärung einiger allgemeiner Fragen dienen, sind eine Untergruppe der zur Inhibierung von Funktionen der RNA und DNA konstruierten Oligonucleotide. Zahlreiche weitere Gruppen potentiell inhibierender Oligonucleotide existieren. Hier werden fünf Beispiele besprochen, nämlich aus der Gruppe der mit Intercalatoren (Übersicht^[41]) substituierten Oligonucleotide noch die Acridin-modifizierten Oligonucleotide, dann modifizierte Oligonucleotide, die zum Gegenstrang (oder einem Protein) kovalente Bindungen bilden, modifizierte Oligonucleotide, die den Gegenstrang spalten, Oligonucleotide, die mit tumorhemmenden Platin-Verbindungen beladen sind, und schließlich potentiell virustatische Oligonucleotide.

2.1. Acridin-modifizierte Oligonucleotide

Acridin-modifizierte Oligonucleotide ähneln (Übersichten^[42, 43]) Psoralen-modifizierten Oligonucleotiden darin, daß die intercalationsfähige Gruppe (meist nicht Acridin selbst, sondern 9-Amino-6-chlor-2-methoxyacridin (siehe **28**)) etwa gleicher Größe und Art ist; daher sind die bei der Intercalation von Acridin und Psoralen freiwerdenden Energiebeträge auch etwa gleich groß. Dagegen ist die reversible Photoreaktion nur für Psoralen typisch. Der Acridinrest kann nach mehreren Methoden, aber immer über die 9-Amino-Gruppe, an mehrere Stellen eines Oligonucleotids geknüpft werden, nämlich über das 3'-Phosphat (**24**)^[44], über das 5'-Phosphat (**25**)^[45, 46], über beide (**26**)^[45] oder über ein internes Phosphat (**27**)^[45, 47]. Ein Beispiel für ein Acridin-

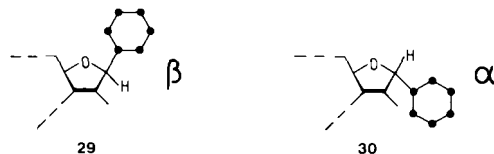


modifiziertes Oligonucleotid ist Verbindung **28**^[48]. Sie ist zusätzlich durch eine Neopentyl-Gruppe modifiziert, die das Oligonucleotid etwas lipophiler macht und Nuclease-Angriff-



fe über sterische Hinderung teilweise abwehrt^[48]. Neben Oligonucleotiden vom Typ **28** sind weitere Acridin-modifizierte Oligonucleotide bekannt, die eine zweite Modifizierung aufweisen, beispielsweise Phosphorothioat-Gruppen^[46, 50] oder Triester des 3'-Phosphats mit einer zusätzlichen positiven Ladung^[51] oder mit einer photoreaktiven Gruppe^[52]. Das Binden dieser Stoffe an Nucleinsäuren, einschließlich ihrer Intercalation, ist an kurzen Nucleinsäure-Fragmenten sehr gut dokumentiert, etwa mit NMR^[48, 49]. Ihre biologische Wirksamkeit wurde in vitro und in Zellen an mehreren Systemen gezeigt, beispielsweise an der Inhibierung der Proteinbiosynthese mit β -Globin-mRNA^[46, 53] oder mit Trypanosomen-mRNA^[54]. Auch die Proliferation viraler Systeme, beispielsweise von Influenza-Viren^[55], von SV-40-Viren^[52] und von Bacteriophagen^[56], wird inhibiert. Acridin-modifizierte Oligonucleotide können nicht nur an Einzelstränge binden, um Doppelstränge zu bilden, sondern auch an Doppelstränge unter Bildung von Tripelsträngen^[52, 57] (siehe Abschnitt 5); auch in diesem Fall intercaliert das Acridin.

Die Stabilität solcher Acridin-modifizierten Oligonucleotide gegenüber dem Abbau durch zelleigene Nucleasen nimmt steil zu, wenn das Oligonucleotid aus α -Anomeren der üblichen Nucleoside aufgebaut ist (**30** statt **29**)^[58–61]; entsprechend steigt auch die hemmende Wirkung^[62]. Während in normalen Nucleinsäure-Doppelsträngen, wo beide Stränge aus β -Anomeren bestehen, die beiden Stränge antiparallel verlaufen, paaren sich Stränge aus α -Anomeren mit Strängen aus β -Anomeren parallel^[58, 61]. Diese Gebilde kön-



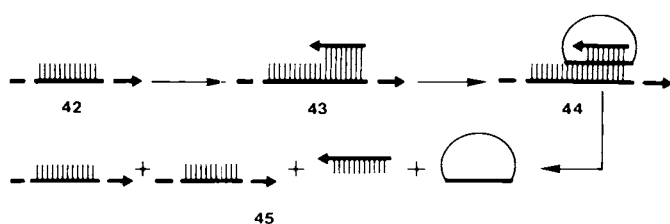
nen sehr stabil sein, besonders der Duplex aus einem α -Desoxyoligonucleotid und β -RNA; jedoch ist die Stabilität sequenzabhängig^[63]. Dies sind zwei Vorteile beim Einsatz von α -Oligonucleotiden als Inhibitoren; einer ihrer Nachteile (wie auch von Methylphosphonat-Oligonucleotiden) besteht darin, daß sie RNase H nicht aktivieren können^[62] (siehe Abschnitt 2.4). Ihre inhibierende Wirkung auf RNA rührt also nur von der blockierenden Wirkung der Duplex-Bildung her und ist nicht von einer Spaltung des Gegenstrangs begleitet.

Oligonucleotide aus α -Anomeren, ihre typischen Strukturen und ihre Verhaltensweisen in biologischen Systemen wurden jedoch nicht nur im Zusammenhang mit Acridin beschrieben (Übersicht^[64]; ^[65–68]). Oligonucleotide aus α -Anomeren inhibieren beispielsweise die Reverse Transkriptase von HIV-Viren^[65, 66] und die β -Globin-Synthese^[67] und blockieren die Spaltung von RNA-Strängen durch RNase H^[65, 68]. In anderen Konstrukten – analog zu den Acridin-modifizierten α -Oligonucleotiden – wurden Oligonucleotide aus α -Anomeren mit weiteren reaktiven Gruppen verknüpft wie der Proflavin-^[69] und der *p*-Azidophenacyl-Gruppe^[61, 70]; in beiden Fällen können nach dem Hybridisieren eines solchen modifizierten Oligonucleotids an einen RNA- oder DNA-Einzelstrang durch Bestrahlen Photoreaktionen gestartet werden (siehe Abschnitt 2.2).

Langfristig ist der wichtigste Aspekt dieser Spaltungen vermutlich nicht der des Spaltens einer Nucleinsäure zur Inaktivierung, sondern der des Spaltens zur gentechnischen Weiterarbeit an einer bestimmten Stelle. An der Möglichkeit zur künstlichen ertsspezifischen Spaltung von immer wieder anderen RNA- oder DNA-Einzelsträngen besteht Bedarf: Auch für DNA g bt es nicht überall günstig gelegene Schnittstellen von Restriktions-Endonucleasen, bei RNA fehlen analoge Enzyme im allgemeinen. Um gentechnisch weiterarbeiten zu können, ist natürlich Spezifität oder wenigstens hohe Regioselektivität nötig – diese Systeme müssen daher noch beträchtlich verbessert werden, um in der Praxis brauchbar zu sein.

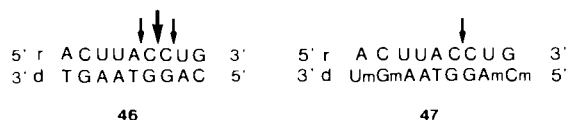
2.4. Spalten des Gegenstrangs durch RNase H über ein modifiziertes Oligonucleotid

Biologisch kommen Situationen vor, bei welchen nur ein Strang eines Duplex gespalten wird, so etwa bei Repair-Prozessen, bei denen ein Teil eines Strangs ausgeschnitten und ersetzt wird, und beim Start der Replikation, wenn der Primer – ein Ribooligonucleotid – wieder entfernt wird. In allen Fällen bewirkt die von der Norm abweichende Struktur des Duplex-Bereichs, daß ein Enzym tätig wird. Es lag deshalb nahe, durch Zugabe eines Oligonucleotids zu einem Einzelstrang (oder einem Doppelstrang mit Einzelstrang-Bereich) eine solche Situation zu simulieren und die Spaltung der Nucleinsäure durch ein natürlich vorhandenes Enzym an einer Stelle zu erreichen, die von der Sequenz des zugesetzten Oligonucleotids bestimmt ist. Soll RNase H aktiviert werden, so geht es darum, einen RNA-Einzelstrang **42** auf Zusatz zuerst eines Desoxyoligonucleotids (Bildung von **43**) und danach der RNase H (Bildung von **44**) zu spalten (**44** → **45**).



Solche Spaltungen gelangen mit unmodifizierten Desoxyoligonucleotiden^[105–108] sowie mit modifizierten Oligonucleotiden, so etwa mit Phosphorothioat-Oligonucleotiden, während Methylphosphonat- und Phosphoramidat-Oligonucleotide (oder Oligonucleotide mit längeren solchen Bereichen) keine RNase-H-Spaltungen einleiten können^[107, 108]. Weitere modifizierte Oligonucleotide, die RNase-H-Spaltungen veranlassen sollen, sind nicht-uniform aufgebaut, um die Spaltung im RNA-Gegenstrang auf möglichst nur eine Internucleotidbindung zu beschränken. Derartige Stoffe, die auch im wesentlichen die Spaltung an nur einer Stelle erreichen, sind Oligonucleotide aus etwa gleich großen Desoxy- und Ribo-Teilen, die in der Nahtstelle statt der Phosphatgruppe auch eine Pyrophosphatgruppe tragen können^[109], oder Oligonucleotide aus einem längeren Ribo-Teil, der 2'-O-methyliert ist, und einem kürzeren Desoxy-Teil^[110]. In

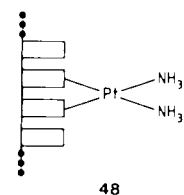
einer weiteren Gruppe von Oligonucleotiden ist ein Desoxy-Teil aus zwei bis vier Nucleotiden in ein Ribooligonucleotid^[111] oder ein Methylphosphonat-Oligonucleotid^[112] eingeschaltet, oder ein Desoxy-Phosphorothioat-Teil ist in ein Methylphosphonat-Oligonucleotid eingeschaltet^[108]. Während in einem Duplex **46** aus je neun Nucleotiden etwa drei Internucleotidbindungen gespalten werden, gibt es im Duplex **47** nur eine Spaltstelle, weil statt Desoxynucleotiden 2'-O-Methylribonucleotide den zentralen Desoxy-Teil flankieren^[113].



Die Reaktion ist insbesondere für molekularbiologische/gentechnologische Anwendungen, nämlich zur Spaltung eines Ribo-Strangs an einer bestimmten Stelle, sehr interessant (siehe Abschnitt 2.3). Umgekehrt läuft bei der Mehrzahl der Desoxyoligonucleotide mit antimessenger-Wirkung nicht nur eine Blockade durch Hybridisierung ab, sondern auch eine Hemmung dadurch, daß RNase H den Heteroduplex angreift.

2.5. Tumورهemmende Platin-Verbindungen

Cisplatin (*cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂]; Übersicht^[114]) sowie weitere Platin-Verbindungen unterschiedlicher Strukturen (Übersicht^[115]) werden als Therapeutica gegen neoplastische Erkrankungen eingesetzt, ohne daß man den Mechanismus dieser Wirkung kennt. Mit DNA bilden diese Platin-Verbindungen – ohne zu intercalieren – Addukte, die die DNA krümmen^[116–120], und binden dabei bevorzugt an zwei benachbarte Guanodin-Reste desselben Stranges. Bei einem Modell-Experiment wurden Oligonucleotide mit zwei benachbarten Guanodin-Resten zu *cis*-[Pt(NH₃)₂dGpG]-enthaltenden Oligonucleotiden **48** umgesetzt und dann in DNA

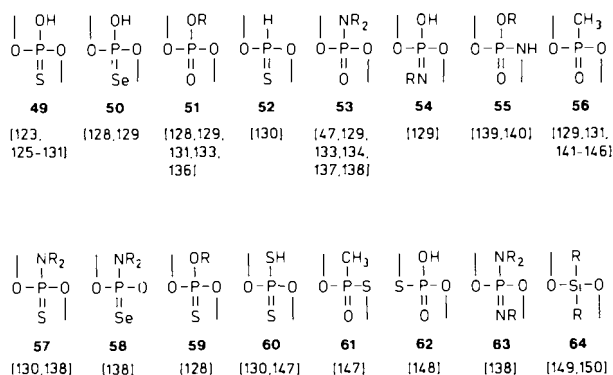


einkloniert, worauf die Funktion des betroffenen DNA-Einzelstrangs weitgehend inhibiert war^[121]; dies zeigt, daß dies der (oder ein) Mechanismus der cytostatischen Wirkung der Platin-Verbindungen sein könnte.

Durch Agentien gekrümmte Nucleinsäure kommt noch in weiteren Fällen vor, etwa beim Vorhandensein von Thymin-Dimeren (siehe Abschnitt 4.2) in der DNA. Auch unmodifizierte DNA kann gekrümmt sein, besonders dann, wenn sie A · T-Bereiche enthält, deren A_n-Sequenzen immer auf derselben Seite der Helix liegen (siehe Abschnitt 4 und 5).

2.6. Modifizierte Oligonucleotide als potentielle Virostatica

Die inhibierende Wirkung auf die Gen-Expression, die modifizierte Oligonucleotide haben können, wurde oben schon mehrfach andiskutiert und auch anderswo geordnet nach Stoffen^[122, 123] oder nach Wirkungen^[35, 43, 124] zusammengefaßt; so wurde beispielsweise die bisher erreichte Hemmung der Onkogene besprochen^[36]. Hier sollen einige antivirale Wirkungen noch einmal zusammengestellt und besprochen werden. Dabei spielen Phosphat-modifizierte Oligonucleotide eine wichtige Rolle. Daher sollen die wichtigsten Klassen zuvor in Formeln vorgestellt werden: 49–64.



Das Spektrum reicht von Verbindungen, in denen nur ein Atom ersetzt ist (Beispiel Phosphorothioate), bis zu Stoffen, in welchen Phosphat und/oder Zucker durch ein ganz anderes Trägersystem ersetzt sind (hier nicht besprochen). Die älteste und wichtigste Gruppe Phosphat-modifizierter Verbindungen sind Phosphorothioat-haltige Stoffe 49 (Übersichten^{[123, 125–127], [128–131]}). Das Ladungsmuster natürlicher Nucleinsäuren ist hier erhalten. Am wichtigsten neben Phosphorothioaten sind Methylphosphonate 56, weil sie eine Ladung weniger enthalten und deshalb membrangängiger sind; hier existieren noch weitere Variationen, die die Eigenschaften feiner modulieren können, z. B. Oligonucleotide mit CHF₂- statt der CH₃-Gruppen^[132]. In einigen Fällen ist die Modifizierung nicht nur chemisch und strukturell gesehen gering, sondern eine wesentliche Veränderung, etwa bei Triestern 51, wenn der Substituent lipophil ist^[133], bei Amidaten 53 wenn er positiv geladen ist (R = –X–NR₃⁺)^[133, 134], oder wenn er intercalationsfähig ist^[47]. Wird ein O-Atom ausgetauscht, das zur Hauptkette gehört (55, 61, 62), entstehen unterschiedliche Stoffe, je nachdem ob dies 5'- oder 3'-seitig vom Phosphor erfolgt. Die Si-haltigen Stoffe 64 sind die einfachsten Beispiele aus der Familie nicht mehr Phosphor-haltiger Oligonucleotide (hier nicht besprochen).

Durch die Einführung einer Gruppe wie beispielsweise CH₃ oder SH am Phosphor entsteht dort ein stereogenes Zentrum. Bei n modifizierten Zentren können 2ⁿ Isomere auftreten, die von Enzymen als unterschiedlich erkannt werden (hier nicht besprochen) und bei einer Hybridisierung nicht gleich gut an die Zielsequenz binden (ein Substituent kann ins Innere der Doppelhelix oder nach außen ragen, was sterisch günstiger ist). Über die Stabilität des Hybrids wirkt sich dies auch auf die biologische Aktivität aus. Es gibt deshalb eine Reihe von Versuchen zur stereoselektiven Synthese von

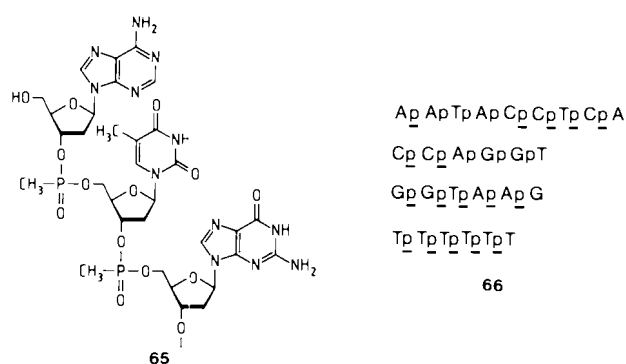
modifizierten Oligonucleotiden (hier nicht besprochen; Übersichten^[7, 39, 135]).

Eine beträchtliche Anzahl modifizierter Oligonucleotide wurde auf die Fähigkeit getestet, die Proliferation von HIV (Human Immunodeficiency Virus) oder von anderen Viren und Phagen zu hemmen. Im einfachsten Fall wird getestet, ob in einem in-vitro-System die Zunahme von Viren oder Phagen oder von Teilen dieser Spezies oder die Expression eines einzelnen viralen Proteins unterbunden ist. Solche Wirkungen haben Acridin-modifizierte Oligonucleotide gegen T4-Phagen^[56], Polylysine-modifizierte Oligonucleotide gegen VSV (Vesicular-Stomatitis-Viren)^[151, 158], Methylphosphonat-Oligonucleotide gegen VSV, SV-40- (Simian) und Herpes-Viren^[144, 152] und Phosphorothioat-Oligonucleotide gegen Herpes-Viren^[153]. Entsprechende Wirkungen gegen HIV sieht man bei Phosphorothioat-Oligonucleotiden^[154, 155] und bei Oligonucleotiden aus α-Anomeren^[65, 66] (siehe Abschnitt 2.1). Phosphorothioate sind weniger toxisch und wirksamer als entsprechende Selen-Oligonucleotide^[156]. Daß auch S-dC-28, eine Desoxyoligocytidylsäure mit Phosphorothioat-Gruppen (und andere Homo-Oligonucleotide), eine virostatistische Wirkung gegen HIV^[66, 154, 155] und gegen Herpes-Viren^[153] hat, erstaunte, da sich zu der Substanz keine komplementäre Sequenz im Virus findet. Hier ist offensichtlich der Angriffspunkt die Reverse Transkriptase oder die virale Polymerase, mit welcher sich stabile funktionsstörende Assoziate bilden, die nicht dem Antisense-Prinzip zugehören. Dabei ist die Reverse Transkriptase ein besonders interessantes Ziel, weil sie in normalen eukaryotischen Zellen fehlt.

Im Hinblick auf den angestrebten Einsatz als Arzneimittel sind Versuche in Zellkulturen bereits relevanter. Zwei Viren, HIV und VSV, wurden intensiv untersucht; darüber hinaus wurde auch die Hemmung von Influenza-Viren mit Acridin-Oligonucleotiden^[55], von Herpes- und SV-40-Viren mit Methylphosphonat^[144, 157] oder Acridin-Oligonucleotiden^[52] und von Coliphagen mit alkylierenden Oligonucleotiden^[73] erprobt. Gegen VSV erwiesen sich sowohl Methylphosphonat-Oligonucleotide^[144, 157] und Polylysine-Oligonucleotide^[151, 158–160] als auch Lipid-substituierte Oligonucleotide^[161] als wirksam. In Zellkulturen sieht man eine inhibierende Wirkung auf HIV durch Desoxyoligonucleotide, die Phosphoramidat^[137, 162], Phosphorothioat^[137, 162–165] oder Methylphosphonat-Gruppen^[162] enthalten. Dasselbe gilt für Oligonucleotide mit Polylysine-Gruppen^[166] und für Ribooligonucleotide, die Phosphorothioat- und 2'-O-Methyl-Gruppen enthalten^[167]. In beiden Fällen sind die Oligonucleotide komplementär zu viralen Sequenzen; die Wirkung der Stoffe im Sinne von Antisense-Oligonucleotiden ist wahrscheinlich. Ebenso wurde bei Oligonucleotiden (ohne oder mit Phosphorothioat-Gruppen), die zusätzlich einen Cholesterylrest tragen, sehr deutliche Anti-HIV-Wirkung gesehen; jedoch beruht hier die Wirkung offensichtlich nicht auf dem Antisense-Prinzip^[168]. Eine weitere Studie (Vergleich von unmodifizierten Oligonucleotiden und Phosphorothioat-Oligonucleotiden sowie Vergleich von Antisense-Oligonucleotiden und zufälligen Sequenzen) sprach sich klar für Phosphorothioat-Antisense-Oligonucleotide als wirksamste Stoffe aus^[165], wie schon früher postuliert^[73, 157, 167].

Zusammenfassend ist festzustellen, daß virostatistische Wirkungen eindeutig vorhanden sind, während ihr Entste-

hen noch weithin unklar ist – mindestens zwei Mechanismen, einer im Sinne des Antisense-Prinzips und einer, der an einer Polymerase angreift, sind im Spiel, vielleicht auch noch weitere. Bisher ist kein modifiziertes Oligonucleotid für den klinischen Gebrauch als virostatistischer Stoff zugelassen; solche Versuche sind aber begonnen worden. Ein gegen ein Virus als wirksam gefundenes Prinzip würde sich wahrscheinlich schnell auf viele andere Viren ausdehnen lassen. Formel 65, ein Ausschnitt aus einem Methylphosphonat-Oligonucleotid^[144], soll die gelinde Lipophilisierung beim Ersatz einer Phosphat- durch eine Methylphosphonat-Gruppe aufzeigen; aus der Zusammenstellung der Oligonucleotide 66 geht hervor^[144], welche Kombinationen von Phosphat- und Methylphosphonat (p bzw. p) an einigen Beispielen praktisch gewählt wurden.

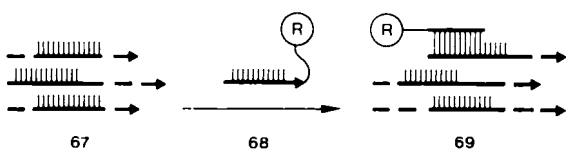


Eine vielversprechende Modifikation bezüglich der Verbesserung der Membrangängigkeit von antiviralen Oligonucleotiden ist die Anknüpfung von Polylysin an ein Oligonucleotid^[151, 158–161, 166], z. B. Lysin₁₀₀ and Oligonucleotide von etwa 15 Nucleotiden Kettenlänge^[159]. Sie wurden bisher ausführlich und mit guten Erfolgen an Zellen, die mit VSV infiziert waren, getestet^[151, 158–161], aber auch mit HIV-infizierten Zellen erprobt^[166]. In einigen Fällen erwiesen sie sich aber auch als toxisch. Oligonucleotide mit Peptiden nichtuniformer Sequenz wurden ebenfalls synthetisiert^[169, 170]; ihre antivirale Brauchbarkeit ist noch unklar.

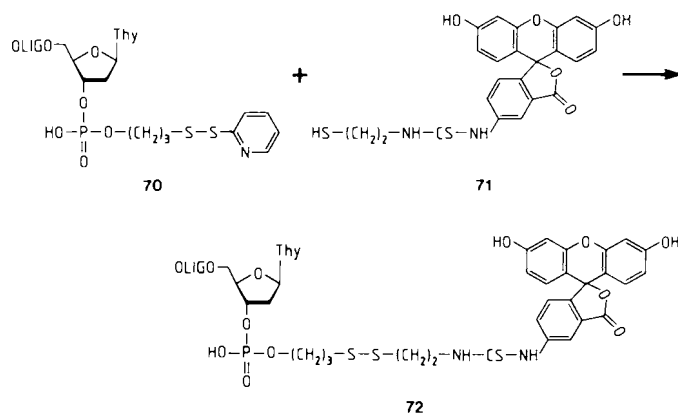
Derivate der 2'-5'-Oligoadenylate bilden eine eigene Serie antiviraler Stoffe. Sie sollen in diesem Zusammenhang erwähnt, hier aber nicht besprochen werden; ihr Wirkprinzip beruht nicht auf dem Antisense-Prinzip (Übersichten^[158, 171–174]).

3. Identifizieren und Orten von RNA/DNA mit modifizierten Oligonucleotiden

Das Vorkommen eines RNA/DNA-Abschnitts wird dadurch nachgewiesen, daß ein komplementäres Oligonucleotid dort andockt. Dieses muß – nach Abtrennen des nichtgebundenen Anteils – erkennbar sein, was bei unmodifizierten Oligonucleotiden (Übersichten^[39, 175–179]) über



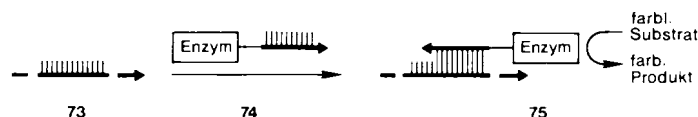
radioaktive Markierung, bei modifizierten Oligonucleotiden (68) im einfachsten Fall über farbige, lumineszierende oder fluoreszierende Substituenten gelingt (67 + 68 → 69). Dafür geeignete und verwendete Substituenten R sind von Fluorescein^[180–187], Isoluminol^[180], Rhodamin-Farbstoffen^[180, 188], einem Ruthenium-Bathophenanthrolin-Komplex^[189] und Pyren-Abkömmlingen abgeleitet^[182]. Die Farbstoffe (z. B. 71) können mit den Oligonucleotiden auf viele Weisen verknüpft werden, z. B. über das 3'-Phosphat (70 + 71 → 72)^[183]. Dem Vorgang des Erkennens kann sich das Isolieren^[39, 179] unmittelbar anschließen.



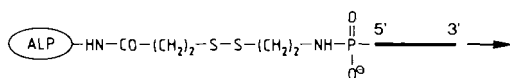
Eine andere Variante des Erkennens ist, das Oligonucleotid mit antigenen Gruppierungen zu verknüpfen und nach dem Binden des Oligonucleotids und des Antikörpers und geeignetem Färben die Bindungsstelle elektronenmikroskopisch zu betrachten. So wurden bestimmte ribosomale Stellen über die antigenen Gruppierungen 2,4-Dinitrophenyl und Isopentenyladenosyl lokalisiert^[190, 191].

3.1. Oligonucleotid-Sonden, die mit Enzymen verknüpft sind

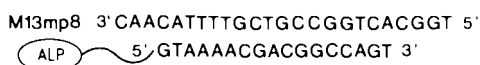
Wird beim Erkennen eines RNA/DNA-Abschnitts durch ein komplementäres Oligonucleotid eine hohe Empfindlichkeit verlangt, so eignet sich – neben radioaktiver Markierung und Farbstoff-Markierung – die Verknüpfung des Oligonucleotids mit einem Enzym (zu 74), wodurch das Signal (z. B. die Bildung eines farbigen oder fluoreszierenden Produkts) vervielfacht werden kann (73 + 74 → 75). Dabei ist die Emp-



findlichkeit von radioaktiv markierten Proben erreichbar. Zur Verknüpfung mit einem Enzym sind zwei Methoden etabliert. Bei der ersten können ein Oligonucleotid und ein Enzym über ein divalentes Reagens^[192–197] oder durch UV-Bestrahlung^[198] unmittelbar chemisch verknüpft werden – hier meist über einen etwa 30 Atome langen Spacer. Ein solches Konstrukt mit alkalischer Phosphatase ist 76^[196]; das modifizierte Oligonucleotid (5'-3') paart zu einer Teilsequenz des Phagen M13mp8 (3'-5') (77).



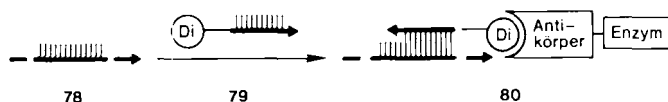
76



77

Als Erkennung dient eine durch das Enzym katalysierte Reaktion, deren Edukt oder Produkt gut nachweisbar ist; bei alkalischer Phosphatase ist dies die Bildung von *p*-Nitrophenol aus *p*-Nitrophenylphosphat^[194–196] oder die Bildung eines Farbstoffs auf 5-Brom-4-chlorindolylphosphat (BCIP) und 4-Nitrotetrazoliumchloridblau (NBT)^[193, 196], die beide colorimetrisch erfaßt werden, oder die Spaltung von 4-Methylumbelliferonphosphat, die fluorogen ist^[193, 194, 196], bei Peroxidase die Umsetzung von *o*-Phenylendiamin und Wasserstoffperoxid zu einem Farbstoff^[180].

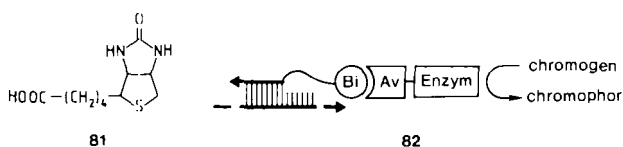
Bei der zweiten Gruppe von Stoffen ist das Enzym, das das Signal vervielfacht, nicht unmittelbar an das Oligonucleotid gebunden. Vielmehr enthält das Oligonucleotid einen Substituenten, der erst in situ über einen weiteren Stoff mit dem Enzym verknüpft wird. Die Variante über Antikörper geht so, daß das Oligonucleotid (79) einen antigenen Substituenten trägt, z. B. einen Digoxigenin (Di)-^[199, 200], 5-Brom-2'-desoxyuridin^[201] oder Fluorescein-Rest^[181] oder das DNA-Protein A^[198]; an diesen bindet sein Antikörper, der mit einem weiteren Agens verknüpft ist, das das Signal vervielfacht, beispielsweise einem Enzym, das einen Farbstoff bildet (78 + 79 → 80). Das wichtigste solche System ist das System Biotin-(Strept)Avidin (siehe Abschnitt 3.2).



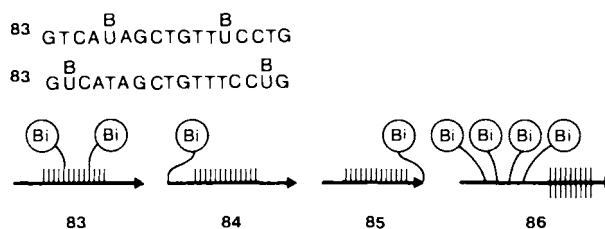
3.2. Das System Oligonucleotid-Biotin-Avidin-XXX

Biotin-markierte Oligonucleotide gehen in Lösungen, Aufschlüssen oder Gewebeproben über Biotin 81 mit dem Protein Avidin (Av) (oder Streptavidin) eine außerordentlich spezifische und feste Bindung ein. Avidin seinerseits kann ohne wesentliche Schwierigkeiten mit weiteren Agentien verknüpft werden, die dann das Erkennen ermöglichen. Dafür kommen insbesondere alkalische Phosphatase und Peroxidase infrage (siehe Komplex 82); in beiden Fällen läßt man durch das Enzym eine chromogene in eine chromophore Spezies überführen (oder umgekehrt) (siehe Abschnitt 3.1).

Die Einführung eines Biotins (Bi) in ein Oligonucleotid kann – über einen Spacer von wenigstens zehn Atomen – enzymatisch oder chemisch erfolgen. Im einfachsten Fall werden Biotin und ein Oligonucleotid durch ein difunkti-



nelles Reagens unspezifisch verbunden^[202] oder photochemisch verknüpft^[203]. In der Mehrzahl der Präparate wird aber eine spezifische Bindung geknüpft, so daß auch die Anzahl der Biotin-Gruppen pro Oligonucleotid gewählt werden kann. Gewöhnlich wird ein mit dem Spacer (oder einem Teil davon) derivatisiertes Nucleotid in die automatische Synthese eingebracht und anschließend biotinyliert. Verwendet wurden an C-8 derivatisiertes Adenosin^[204] (ausgehend von 8-Mercaptadenosin), 5-substituiertes 2'-Desoxyuridin^[182, 205], das sogenannte Biotin-11-dUMP und an der exocyclischen Aminogruppe substituiertes Cytidin^[182, 206, 207] (Beispiele 83^[205], B oder Bi = Biotinyl). Auch am endständigen Phosphat^[184, 208, 209] oder einer endständigen Hydroxygruppe^[192] kann biotinyliert werden (Beispiele 84, 85). Die Biotinylierung eines Oligonucleotids gelingt aber auch, indem an ein Oligonucleotid – synthetisiert oder isoliert – ein weiteres Nucleotid, das das Biotin trägt, mit Polymerase^[210, 211] oder Terminaler Nucleotidyl-Transferase^[181, 212] angefügt wird.



Das als Verbindung 86 schematisch abgebildete Oligonucleotid besteht aus einem Desoxy-Teil aus vier biotinylierten CMP und einem Ribo-Teil aus 2'-*O*-Methylribonucleotiden (Formel siehe 122 in Abschnitt 5). Es verbindet gute Erkennbarkeit durch Streptavidin mit Stabilität gegenüber Nucleasen^[207]. Oligonucleotide vom Typ 86 sind auch in komplizierten biologischen Vorgängen wie dem Splice-Vorgang zur Erkennung und Inaktivierung einsetzbar^[213, 214].

Zu den zahlreich synthetisierten Biotin-modifizierten Oligonucleotiden paßt, daß nahezu alle molekularbiologischen Experimente, in denen eine Nucleinsäure erkannt werden soll, (auch) mit den Biotin-haltigen Spezies ausgeführt werden können. Die Empfindlichkeit des Systems ist immer hervorragend, sowohl bei der bisher beschriebenen Erkennung über Farbreaktionen als auch bei der Erkennung über Immunfluoreszenz^[215].

Die in den Abschnitten 3, 3.1 und 3.2 beschriebenen Verfahren sind nicht auf biologische und molekularbiologische Anwendungen (Übersicht^[216]) beschränkt – dort kann man einzelne Gene oder Gen-Fragmente auffinden^[215, 217, 218], Enterotoxin-Gene^[181, 219] oder Sequenzen aus enterotoxischem *E. coli*^[195] aufspüren, RNA lokalisieren^[220] und Viren nachweisen^[181, 221] –, sondern erlangen zunehmende Bedeutung in der Biologie, etwa um phylogenetische Klassifizierungen vorzunehmen oder die Anwesenheit von Mikroorganismen nachzuweisen^[188], und in der Medizin (Übersicht^[140]), z. B. bei der Diagnose von Virus-Infektionen über den Nachweis viraler Sequenzen in Proben (Übersicht^[222]), den Nachweis anderer Infektionen^[222], von Erbkrankheiten^[140, 222] und von Tumorerkrankungen^[140] sowie bei der Identifizierung von Personen^[140]. Unter genau definierten Bedingungen kann die Reaktion so empfindlich sein,

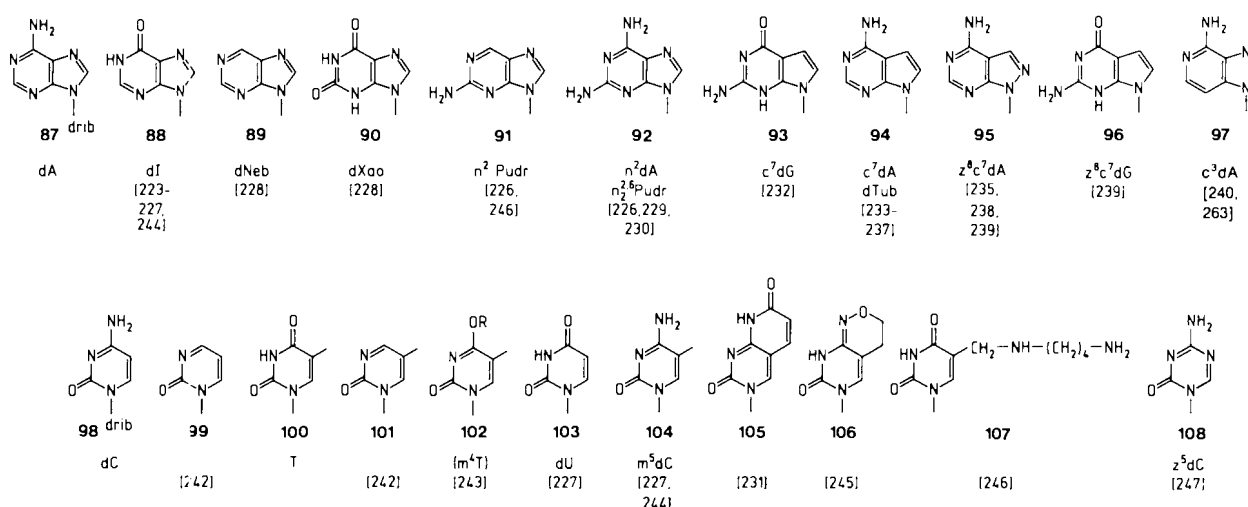
daß mit einer Sonde aus 15 Einheiten ein Basenaustausch in der Zielsequenz erkennbar ist^[192].

4. Modifizierte Oligonucleotide als Substrate für Nucleasen und Polymerasen

Die dritte Weise von Anwendungen modifizierter Oligonucleotide ist ihr Gebrauch als Substrat-Analoga von Nucleasen, Polymerasen und weiteren Enzymen sowie als Bindungspartner von Proteinen. Hier werden folgende Beispiele vorgestellt: Untersuchungen zum Mechanismus der Restriktions-Endonucleasen einschließlich der künstlichen Variation der Spaltung durch diese Enzyme, Untersuchungen zu den mutagenen Ereignissen, die mit dem Vorkommen apurinischer Stellen oder von Thymin-Dimeren beginnen, und das Sequenzieren mit Fluoreszenz-Farbstoffen.

Duplexe. Helix-stabilisierend sind der Einbau von 2-Amino-2'-desoxyadenosin **92** (n^2dA)^[226, 229, 230] sowie eines fluoreszierenden Pyridopyrimidins **105**, das mit Guanin und Adenin paart^[231]. Kern-modifizierte Stoffe sind Oligonucleotide mit 7-Desaza-2'-desoxyguanosin **93** (c^7dG)^[232], 7-Desaza-2'-desoxyadenosin **94** (c^7dA , 2'-Desoxytubercidin^[233–237]), 7-Desaza-8-aza-2'-desoxyadenosin **95** (z^8c^7dA)^[235, 238, 239], 7-Desaza-8-aza-2'-desoxyguanosin **96** (z^8c^7dG)^[239] und 3-Desaza-2'-desoxyadenosin **97** (c^3dA)^[240]. Zum Teil enthalten sie noch weitere Veränderungen, nämlich *N*⁶-Methylierung (bei **94** und **95**)^[241] sowie eine glycosidische Bindung zu N-8 anstatt N-9^[238, 241]. Zur Untersuchung von zwei Gebieten sind sie besonders wichtig, dem der DNA-Struktur (z. B. der DNA-Krümmung) und dem der DNA-Erkennung.

Im Pyrimidin-Bereich gibt es analoge Untersuchungen: 2'-Desoxycytidin **98** (dC) und Thymidin **100** (T) jeweils ohne die funktionelle Gruppe in *p*-Stellung zur glycosidischen Bin-



Schema 1.

Da Nucleasen schließlich die Ribose-Phosphat-Kette spalten, sind Modifizierungen des Zuckers und des Phosphats natürlich die erste Wahl (siehe Abschnitt 2.1 und 2.6), wenn beabsichtigt wird, die Eigenschaften eines Oligonucleotid-Substrats zu modulieren. Mit solchen Stoffen wurde der Mechanismus zahlreicher Nucleasen untersucht^[7], insbesondere mit Phosphorothioat-Analoga^[124–126]. Die Nucleobasen spielen jedoch nicht nur durch die Sequenz eine wichtige Rolle. Auch die Neigung der Nucleobasen zur Helixachse, die Verdrehung der Nucleobasen gegeneinander, der Helix-Durchmesser, die Ganghöhe, die Stabilität der Doppelhelix usw. – alle im wesentlichen von der Natur der Nucleobasen bestimmt – gehen in die Erkennung durch Enzyme (Nucleasen und Polymerasen) ein. Eine Zusammenstellung der unlängst beschriebenen Nucleobasen-Analoga wird deshalb der Besprechung der Restriktions-Endonucleasen vorangestellt (Schema 1).

Inosin kann in der Doppelhelix allen Nucleobasen gegenüberstehen. 2'-Desoxyinosin **88** (dI)^[223–227] enthaltende Oligonucleotide sind deshalb als polyvalente Sonden geeignet. Ähnliches kann für Oligonucleotide mit 2'-Desoxynebularin **89** (dNeb)^[228] und 2'-Desoxyxanthosin **90** (dXao)^[228] gelten; Doppelstränge mit diesen Nucleobasen sind meistens weniger stabil als entsprechende normale

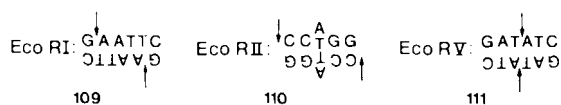
dung (vgl. **99** bzw. **101**)^[242] dienen dazu, die Struktur-stabilisierenden Anteile dieser funktionellen Gruppen in einem Duplex zu quantifizieren. Weitere modifizierte Pyrimidine, die in Oligonucleotide eingebracht wurden, sind *O*⁴-Methyl(ethyl)-thymidin **102** (m^4T , et^4T)^[243], 2'-Desoxyuridin **103** (dU)^[227], 5-Methylcytidin **104** (m^5dC)^[227, 244], das schon erwähnte Pyridopyrimidin **105**^[231] und ein ähnliches System **106**^[245], das ebenfalls mit mehreren Basen paart, 5-Putresciny-thymidin **107** (und einige weitere einfacher substituierte Thymidine)^[246], das in Phagen vorkommt und in Oligonucleotiden den Abbau durch Nucleasen hindert, und ein Oligonucleotid mit 5-Azacytidin **108** (z^5dC) (oder 5,6-Dihydro-5-azacytidin)^[247], womit auch bei Pyrimidinen der Bereich Kern-modifizierter Stoffe betreten wurde.

Erwähnt (aber hier nicht besprochen) sei, daß es eine weitere Serie von Nucleinsäure-Analoga mit künstlichen neuen Basenpaaren oder analogen Strukturen gibt^[28, 248, 249].

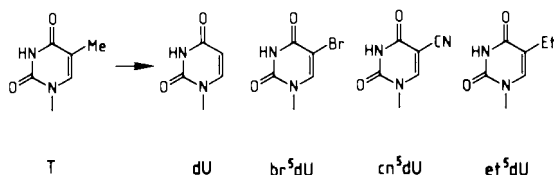
4.1. Erkennungssequenzen und Spaltstellen von Restriktions-Endonucleasen

Restriktions-Endonucleasen – ungefähr 600 sind derzeit bekannt – unterscheiden sich von einfachen Nucleasen da-

durch, daß sie nur an den von der Erkennungssequenz festgelegten Stellen spalten (siehe 109–111).

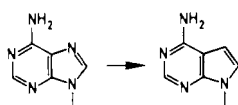


Der Mechanismus der Spaltung und die Struktur der Erkennungssequenz wurden in vielen Beispielen durch modifizierte Oligonucleotide untersucht, nämlich solchen mit modifizierten Phosphaten (z. B. Pyrophosphat, Triester, Phosphorothioat)^[148, 250–252], mit modifizierten Zuckern (z. B. Ribose oder Xylose statt Desoxyribose)^[250, 251, 253], mit modifizierten Nucleobasen mit Pyrimidin mit oder ohne 5-Methylierung^[250, 254–258], mit anderen Substitutionen (z. B. Thio-, Brom-, Alkyl-, Fluor-, Cyan-Gruppen)^[250, 251, 253, 254, 257, 259–261], mit methylierten Purinen^[258, 260, 262, 263], mit Purinen mit modifizierten funktionellen Gruppen^[230, 260, 263–265] und mit Kern-modifizierten Purinen^[235, 236, 238, 240, 241, 262, 263, 265]. In der Oligonucleotid-Serie des Beispiels 112^[259] sind zwei Thymidine durch Uridin und Uridin-Derivate ersetzt; in der Oligonucleotid-Serie des Beispiels 113^[236] sind Adenosinreste in drei Oligonucleotiden durch Desazaadenosine ersetzt.



GGAGATCTCC	GGAGATCTCC
GGAGATCUCC	GGAGAUCTCC
GGAGATCbr ⁵ UCC	GGAGAbr ⁵ UCTCC
GGAGATCcn ⁵ UCC	GGAGAcn ⁵ UCTCC
GGAGATCet ⁵ UCC	GGAGAct ⁵ UCTCC

112



GGAAATCC	CGCGAATTCGCG	GTAGAATTCTAC
GGc ⁷ AATCC	CGGc ⁷ AATTCGCG	GTAGc ⁷ AATTCTAC
GGAc ⁷ ATTCC	CGCGAc ⁷ ATTCGCG	GTAGAc ⁷ ATTCTAC
GGc ⁷ Ac ⁷ ATTCC	CGGc ⁷ Ac ⁷ ATTCGCG	GTAGc ⁷ Ac ⁷ ATTCTAC
		GTc ⁷ AGAATTCTAC
		GTAGAATTCTc ⁷ AC

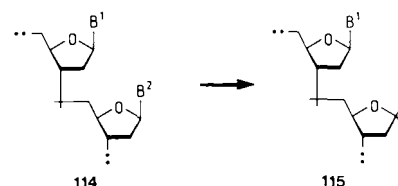
113

Obwohl eine Serie von funktionellen Gruppen als essentielle Elemente des Erkennens und Spaltens identifiziert wurden (z. B. die exocyclischen Aminogruppen von Adenin und Cytosin, N-7 von Adenin und die Methylgruppe von Thymin – jeweils an bestimmten Nucleobasen – für das Enzym Eco RV^[265] und eine weitere Serie von funktionellen Gruppen für das Enzym Eco RI^[360]), wird im allgemeinen aus den

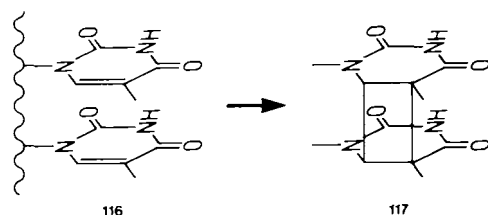
Systemen Restriktions-Endonuclease/modifiziertes Oligonucleotid auf die Frage, ob eine bestimmte Gruppierung vorhanden sein muß, keine Ja-Nein-Antwort erhalten. Vielmehr ist festzustellen, daß Erkennung und Spaltung in subtiler Weise von der gesamten räumlichen Struktur der Erkennungsstelle abhängen; daher sieht man nicht nur verlangsamte oder gestoppte Spaltungen, sondern auch Zwischeneffekte, z. B. das Spalten nur einen Strangs. Der sehr verlangsamte oder unterbleibende Abbau eines Phosphorothioat-haltigen DNA-Strangs, der im Duplex mit einem unmodifizierten DNA-Strang vorliegt, ist auch einer der entscheidenden Kniffe bei der ortsspezifischen Mutagenese nach Eckstein et al.^[126, 127].

4.2. Polymerasen und Oligonucleotide mit apurinischen/abasischen Stellen und mit Thymin-Dimeren

Die vielfältigen Interaktionen von Polymerasen (Ligasen usw.) mit RNA und DNA können mit (modifizierten) Oligonucleotiden simuliert werden; man kann auf diese Weise also Untersuchungen anstellen und regelnd eingreifen. Hier sollen Oligonucleotide mit abasischen Stellen und Oligonucleotide mit Thymin-Dimeren wegen ihrer biologischen Bedeutung bei Mutationen besprochen werden.



Apurinische oder abasische Stellen oder Teilstrecken 115 spielen biologisch eine Rolle, weil die glycosidische Bindung zwischen Nucleobase und Zucker unter in-vivo-Bedingungen zerbrechen kann. An diesen Stellen ist dann die zurückbleibende Zucker-Phosphat-Kette labilisiert. RNA/DNA mit solchen Stellen muß abgebaut oder repariert werden; andernfalls entstehen dort Mutationen (Übersicht^[266]). Als Modell-Substrate für Nucleasen und Polymerasen dienen abasische^[267–270] und apurinische^[271–274] Oligonucleotide, bei denen je eine oder mehrere (bestimmte) Nucleobasen fehlen; diese Basen wurden entweder herausgespalten^[268, 271], oder es wurden bei der Synthese Bausteine eingesetzt, die nur Phosphat und Zucker^[267, 270, 273, 274] enthalten. Bei einigen dieser Oligonucleotide ist die Struktur mit NMR, CD, IR usw. sorgfältig untersucht worden^[267, 273, 274]. Präparativ kann die apurinische/abasische Stelle in einem Oligonucleotid zur Spaltung der Kette an dieser Stelle (alkalisch^[272]) oder zur Einführung von Reporter-Gruppen (z. B. über Aminogruppen^[274–276]) benutzt



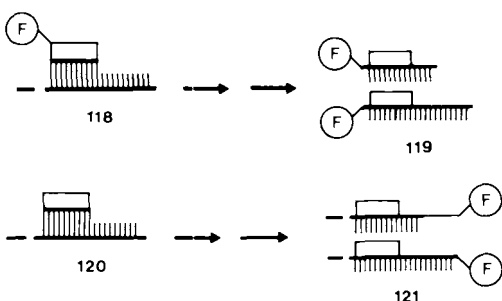
werden. In biologischen Test-Systemen verhalten sich weder die abbauenden noch die aufbauenden Enzyme an solchen Stellen nach einer einheitlichen Regel. Einige Enzyme stoppen, einige führen weitere Reaktionsschritte aus, deren Ursache und Zweck noch unklar sind.

Thymin-Dimere **117** sind das wichtigste Produkt der Strahleneinwirkung auf DNA. Dabei werden zwei in einem Strang übereinanderliegende Thyminreste unter Bildung einer Cyclobutanstruktur verbunden. Die Funktionen der DNA sind dadurch gestört. Deshalb wird eine solche Stelle in vivo durch das Reparatursystem wieder instandgesetzt.

Zahlreiche Oligonucleotide mit Thymin-Dimeren sind hergestellt worden – entweder durch Bestrahlen unmodifizierter Oligonucleotide^[277–279] oder durch Synthese unter Einbeziehung des Thymin-Dimers^[280, 281] – um ihre Struktur zu analysieren^[282–285] und daraus Schlüsse auf analog modifizierte DNA^[286] (Thymin-Dimere biegen DNA; vgl. Abschnitt 2.5), ihre Reparatur^[277, 287] oder, im Falle des Versagens der Reparatur, die mutagene Wirkung der Modifizierung^[279] zu ziehen.

4.3. Sequenzieren mit Fluoreszenz-Farbstoffen anstelle von radioaktiver Markierung

Sequenzierungstechniken werden mit mehreren Zielrichtungen weiterentwickelt (Übersicht^[288]): Von einigen Systemen erwartet man, daß sie sehr gleichmäßige Banden ergeben und deshalb maschinenlesbar werden^[289–291], von anderen Systemen, daß sie die Einbeziehung seltener Nucleotide erlauben^[292], daß sie mit sehr kleinen Mengen möglich sind (massenspektroskopisches Sequenzieren) und schließlich, daß sie ohne Radioaktivität auskommen. Im letzten Fall werden die Banden statt über die übliche Autoradiographie fluoreszenz-spektroskopisch erkannt. Der Fluoreszenz-Farbstoff (F), z. B. Rhodamin oder Fluorescein und weitere Systeme, kann am Primer hängen^[189, 291, 293–297], d. h. bei der schließlichen chromatographischen Trennung aller Oligonucleotide am 5'-Ende jedes Oligonucleotids sein (**118** → **119**), oder mit demjenigen Nucleotid eingebracht



werden, das den Kettenabbruch bewirkt, so daß jedes Oligonucleotid 3'-ständig markiert ist^[290, 298, 299] (**120** → **121**).

5. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Beitrag wurde eine Reihe von Anwendungen der modifizierten Oligonucleotide vorgestellt, die teilweise ausführlich untersucht wurden; viele weitere Gebiete, z. B. das

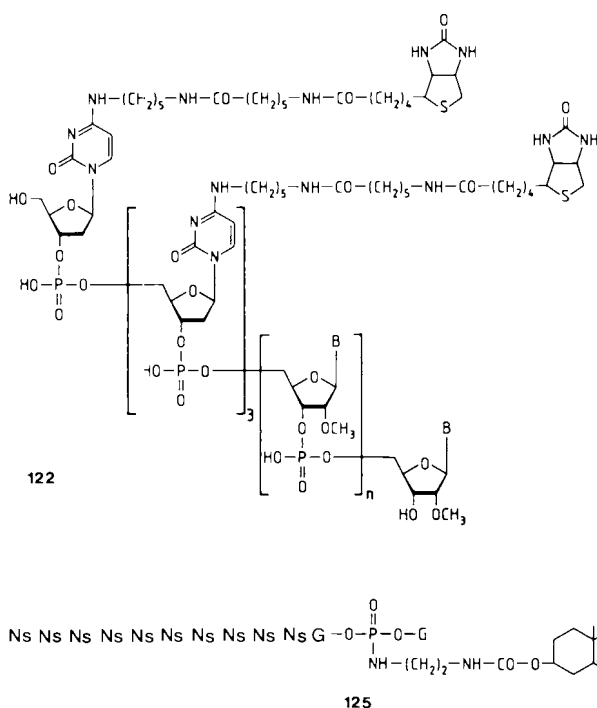
künstlicher Enzyme oder Ribozyme, und viele weitere Substanzen blieben unerwähnt, z. B. cyclische^[300–302], verzweigte^[303–306], magnetische^[307], katalysierende^[308, 309], gekrümmte^[226, 227, 233, 234, 244, 286] (vgl. Abschnitt 2.5 und 4), Spin-Label-tragende^[310], zur Immobilisierung einer Nucleinsäure geeignete^[311, 312], Schwermetall-bindende für Röntgenstrukturanalysen^[295, 313] oder Elektronenmikroskopie^[314] und antigene oder die Immunantwort modulierende^[315] Oligonucleotide.

Schematisch eingeteilt fallen die bisher bekannten Anwendungen modifizierter Oligonucleotide in drei Gebiete: Modifizierte Oligonucleotide als Substrat-Analoga, für Identifizierungen und als Antisense-Oligonucleotide. Einige Anwendungen als Substrat-Analoga wurden in Abschnitt 1.4 besprochen. Vorgänge zur Identifizierung und Lokalisierung mit Hilfe modifizierter Oligonucleotide werden derzeit Alltagspraxis. Dagegen ist bisher kein Antisense-Oligonucleotid als Arzneimittel im Gebrauch, obwohl dies besonders interessant erscheint, denn der sequenzspezifische Zugriff auf einen bestimmten RNA- oder DNA-Abschnitt ist nur über ein Protein (natürliches Beispiel: Repressor, Antikörper, Restriktionsendonuclease) oder ein Antisense-Oligonucleotid denkbar. Erstere können aber derzeit nicht entworfen und nicht synthetisiert werden. Dagegen sind Oligonucleotide gut herstellbar und ihre inhibitorische Wirkung über die Basenpaarung ist wohl etabliert. Gründe, die dem Einsatz als Arzneimittel entgegenstehen, sind in drei schon genannten Bereichen zu suchen: Aufnahme in Zellen, Abbau durch zelleigene Nucleasen, genügend lange Existenz des Duplex. Das Problem der Synthese Nuclease-stabiler Oligonucleotide kann als gelöst betrachtet werden. Für die Verlängerung der Lebensdauer des Duplex steht ein großes Arsenal von Verbindungen bereit, bis hin zu solchen, die in geordneter Reihenfolge erst nach Bildung des Duplex eine kovalente Bindung zum Gegenstrang herstellen; auch die Verfahren zur Induzierung einer Spaltung des Gegenstrangs sind leistungsfähig. Als Hauptproblem bleibt das der Aufnahme der modifizierten Oligonucleotide in Zellen. Mit der anderen Möglichkeit, das Oligonucleotid in der Zelle über ein eingebrachtes künstliches Gen zu erzeugen, ist die Molekularbiologie derzeit noch überfordert.

Über den Mechanismus der Aufnahme von Oligonucleotiden in Zellen ist wenig gesichertes Wissen vorhanden^[131]. Wahrscheinlich müssen geladene Oligonucleotide, modifiziert oder nicht, durch einen aktiven Transport aufgenommen werden^[316, 317]. Für ungeladene Oligonucleotide wird auch eine passive Aufnahme diskutiert.

Die Konzentrationen an Oligonucleotiden im Zellkultur-Medium für die wirksame Hemmung der Virus-Proliferation in Virus-infizierten Zellen liegen im Bereich von 0.5–30 μM für Phosphorothioat-Oligonucleotide. Für Methylphosphonat-Oligonucleotide ergeben sich erst deutliche Effekte bei 50–200 μM , was einerseits auf die schlechtere Wasserlöslichkeit, andererseits auf die fehlende Aktivierung von RNase H zurückzuführen sein dürfte. Dabei wird grob veranschlagt, daß die intrazelluläre Konzentration der Oligonucleotide bis zu 10 % der Außenkonzentration^[318] erreicht und daß die Aufnahme Minuten bis Stunden benötigt. Ein weiteres Vordringen der Oligonucleotide in den Zellkern ist in mehreren Experimenten (siehe z. B.^[77]), insbesondere durch die hemmende Wirksamkeit von Antisense-Oligonucleotiden gegen Splicestellen, belegt^[144, 157, 162, 213]. Die Verteilung von

Oligonucleotiden über alle Zellkompartimente ist aber im wesentlichen noch unklar^[319]. Zu diesen Daten über die in-vivo-Verhältnisse ist noch ergänzend zu erwähnen, daß in vitro, wenn eine 80–90proz. Inhibition erzielt werden soll, das wirksame Verhältnis von Oligonucleotid und Zielsequenz im Bereich von 1000:1 bis 5:1 liegt^[27]. An dieser Stelle ist die Erarbeitung weiterer Kenntnisse am notwendigsten. Erwähnt sei, daß für Arzneimittel auch noch ganz andere Prinzipien zur Aufnahme in Zellen in Frage kommen, etwa der Einschluß von Oligonucleotiden in Liposomen, die außerdem über eine Antigen-Antikörper-Reaktion an bestimmte Stellen im Körper gebracht werden können^[319], oder die Bindung eines Oligonucleotids an ein Protein, z. B. Interleukin^[321], mit dem es über den entsprechenden Rezeptor gewebespezifisch internalisiert wird, und noch weitere Verfahren (siehe^[38]).

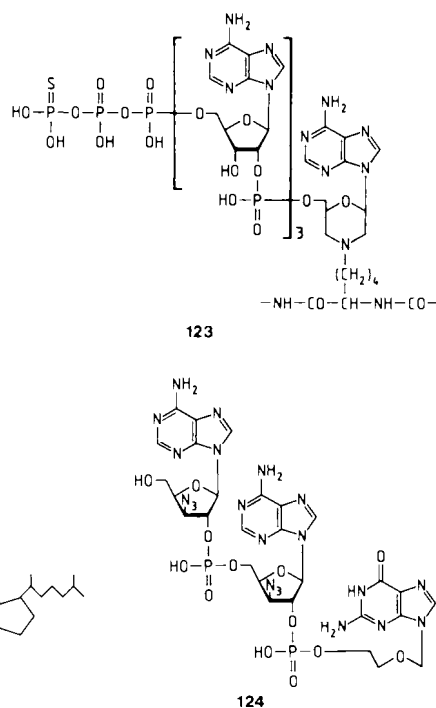


Die für gute Wirksamkeit zu erreichende Konzentration wäre dann niedriger, wenn die Transkriptionsebene und nicht die Translationsebene das Ziel der Oligonucleotide wäre, da die Konzentration der Ziel-Nucleinsäure auf der Transkriptionsebene wesentlich geringer ist. Während auf der Translationsebene Inhibition im wesentlichen die Bildung eines Duplex aus der einzelsträngigen mRNA und dem Oligonucleotid bedeutet, geht die Transkription im Prinzip von doppelsträngiger DNA aus. Die Bildung von Tripelhelix-Strukturen als inhibierende Einheiten über Hoogsteen-Wasserstoffbrücken ist bisher nur für Polypurin-(Polypyrimidin-)Bereiche der DNA gezeigt^[76, 96, 97, 102], wie sie in Kontrollregionen eukaryotischer Gene vorkommen (z. B.^[322]), während sie bei gemischten Sequenzen noch nicht eindeutig belegt ist^[323] und bisher keine klaren Erfolge festgestellt werden können (Übersicht^[324]).

Eine weitere Voraussetzung auf dem Weg zum Arzneimittel, nämlich das Testen der potentiell dafür geeigneten Stoffe in vielen biologischen Systemen, ist bisher kaum erfüllt. Jeder synthetisierte Stoff mag etwa in *einem* System getestet

worden sein. Das Testen in vielen Kombinationen von Erregern und Wirten oder gesunden und neoplastischen Geweben etc. ist notwendig, da vorherzusehen ist, daß sich dasselbe modifizierte Oligonucleotid in verschiedenen Systemen verschieden verhalten wird. Im günstigsten Falle könnten anhand der dann vorliegenden vielen Daten einige Grundregeln aufgestellt werden, die beschreiben, wie man – im Sinne des „rational drug design“ – Oligonucleotide durch chemische Modifizierung wenigstens in bezug auf die drei Probleme Membrangängigkeit, Nucleaseresistenz und Hybridstabilität verändert, ohne daß andere Eigenschaften (und weitere medizinische wie etwa die Toxizität) sich drastisch verschlechtern (vgl. die Übersichtsarbeiten^[7, 31–34, 37, 40, 325]).

Modifizierte Oligonucleotide werden deshalb in naher Zukunft weiterhin Objekte der Forschung sein; die darauf



folgende Möglichkeit klinischer Anwendung wäre sehr erfreulich. Sehr wahrscheinlich wird das Oligonucleotid, das allen Fällen entkommt, recht exotisch aussehen, d. h. mehrfach vom natürlichen Oligonucleotid abweichen. Als Beispiele für die Generation dieser Oligonucleotide betrachten wir ein Biotin-modifiziertes Oligonucleotid **122**^[207], ein 5'-γ-Phosphorothioat(2'-5')A₄-poly(Lys)-Konjugat **123**^[174], ein Trinucleotid-Analogon **124**^[326], das dreifach verändert ist (es soll in der Zelle das letzte Kettenglied, das antivirale Acyclovir, als Monophosphat^[327] freisetzen), oder ein Cholesteryl-Phosphorothioat-Oligonucleotid **125**^[168].

Vorstellbar für uns ist auch das „mitdenkende“, mehrstufig agierende Oligonucleotid: beispielsweise hydrophob beim Membrandurchtritt, dann durch ein Ereignis, etwa einen Kontakt mit RNase, seine Eigenschaften zur Erfüllung einer nächsten Aufgabe ändernd und am richtigen Ort in einen Dead-End-Komplex übergehend. Kaum vorstellbar dagegen ist, daß die Organische Chemie das richtige Oligonucleotid nicht synthetisieren könnte.

Die Autoren danken Frau Ute Rust für das Schreiben und Drs. W. Freist und H. Rosemeyer für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts.

Eingegangen am 13. Dezember 1989,
ergänzte Fassung am 21. Dezember 1990 [A 816]

- [1] M. Inouye, *Gene* 72 (1988) 25.
- [2] R. W. Simons, N. Kleckner, *Annu. Rev. Genet.* 22 (1988) 567.
- [3] R. Frankham, *J. Theor. Biol.* 135 (1988) 85.
- [4] B. Polisky, *Cell (Cambridge, Mass.)* 55 (1988) 929.
- [5] A. R. van der Krol, J. N. M. Mol, A. R. Stuitje, *Gene* 72 (1988) 45.
- [6] R. W. Simons, *Gene* 72 (1988) 35.
- [7] J. S. Cohen (Hrsg.): *Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression*, Macmillan, London 1989.
- [8] K. Itakura, J. J. Rossi, R. B. Wallace, *Annu. Rev. Biochem.* 53 (1984) 323.
- [9] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* 90 (1990) 543.
- [10] J. E. Hearst, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 39 (1988) 291.
- [11] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis: *Molecular Cloning*, 2. Aufl., Kap. 11: „Synthetic Oligonucleotide Probes“, Cold Spring Harbor Lab. 1989.
- [12] J. W. Engels, E. Uhlmann, *Angew. Chem.* 101 (1989) 733; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989) 716.
- [13] R. Wu, L. Grossman (Hrsg.): *Methods Enzymol.* 154 (1987) 221–236, Section III: „Chemical Synthesis and Analysis of Oligonucleotides“.
- [14] S. A. Narang (Hrsg.): *Synthesis and Applications of DNA and RNA*, Academic, Orlando 1987.
- [15] M. J. Gait (Hrsg.): *Oligonucleotide Synthesis*, IRL Press, Oxford 1984.
- [16] H. G. Gassen, A. Lang (Hrsg.): *Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments*, Verlag Chemie, Weinheim 1982.
- [17] M. H. Caruthers in [7], S. 7–24.
- [18] U. Pieses, U. Englisch, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 285.
- [19] U. Pieses, B. S. Sproat, P. Neuner, F. Cramer, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 8967.
- [20] B. L. Lee, K. R. Blake, P. S. Miller, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 10 681.
- [21] B. L. Lee, A. Murakami, K. R. Blake, S.-B. Lin, P. S. Miller, *Biochemistry* 27 (1988) 3197.
- [22] J. Teare, P. Wollenzien, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 3359.
- [23] G. D. Cimino, H. B. Gamper, S. T. Isaacs, J. E. Hearst, *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985) 1151.
- [24] E. Moustacchi, *Arch. Toxicol. Suppl.* 12 (1988) 26.
- [25] J. E. Hearst, *Chem. Res. Toxicol.* 2 (1989) 69.
- [26] U. Englisch, F. Benseler et al., unveröffentlicht.
- [27] A. Wolf, U. Pieses, U. Englisch et al., unveröffentlicht.
- [28] P. Strazewski, C. Tamm, *Angew. Chem.* 102 (1990) 37; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (1990) 36.
- [29] Siehe [7], Kap. 3–5, 7.
- [30] P. O. P. Ts'o, P. S. Miller, L. Aurelian, A. Murakami, C. Agris, K. R. Blake, S. B. Lin, B. L. Lee, C. C. Smith, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 507 (1987) 220.
- [31] P. S. Miller, P. O. P. Ts'o, *Annu. Rep. Med. Chem.* 23 (1988) 295.
- [32] C. A. Stein, J. S. Cohen, *Cancer Res.* 48 (1988) 2659.
- [33] J. J. Toulmé, C. Hélène, *Gene* 72 (1988) 51.
- [34] C. J. Marcus-Sekura, *Anal. Biochem.* 172 (1988) 289.
- [35] J. S. Cohen, *Trends Pharmacol. Sci.* 10 (1989) 435.
- [36] L. M. Neckers in [7], S. 211–232.
- [37] D. M. Tidd, *Anticancer Res.* 10 (1990) 1169.
- [38] G. Zon, *Pharm. Res.* 5 (1988) 539.
- [39] C. G. Miyada, A. B. Studencki, R. B. Wallace in [14], S. 207–227.
- [40] B. S. Reckmann, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 37 (1989) 692.
- [41] H. W. Zimmermann, *Angew. Chem.* 98 (1986) 115; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 115.
- [42] N. T. Thuong, U. Asseline, T. Monteny-Garestier in [7], S. 25–51.
- [43] C. Hélène, J. J. Toulmé in [7], S. 137–172.
- [44] U. Asseline, M. Dalarac, G. Lancelot, F. Toulmé, N. T. Thuong, T. Monteny-Garestier, C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 3297.
- [45] U. Asseline, N. T. Thuong, *Nucleosides Nucleotides* 7 (1988) 431.
- [46] K. Mori, C. Subasinghe, C. A. Stein, J. S. Cohen, *Nucleosides Nucleotides* 8 (1989) 649.
- [47] A. Jäger, M. J. Levy, S. M. Hecht, *Biochemistry* 27 (1988) 7237.
- [48] G. Lancelot, J.-L. Guesnet, U. Asseline, N. T. Thuong, *Biochemistry* 27 (1988) 1265.
- [49] G. Lancelot, N. T. Thuong, *Biochemistry* 25 (1986) 5357.
- [50] C. A. Stein, K. Mori, S. L. Loke, C. Subasinghe, K. Shinozuka, J. S. Cohen, L. M. Neckers, *Gene* 72 (1988) 333.
- [51] U. Asseline, N. T. Thuong, C. Hélène, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 8936.
- [52] F. Birg, D. Praseuth, A. Zerial, N. T. Thuong, U. Asseline, T. Le Doan, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 2901.
- [53] C. Cazenave, N. Loreau, N. T. Thuong, J. J. Toulmé, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 4717.
- [54] P. Verspieren, A. W. C. A. Cornelissen, N. T. Thuong, C. Hélène, J. J. Toulmé, *Gene* 61 (1987) 307.
- [55] A. Zerial, N. T. Thuong, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 9909.
- [56] J. J. Toulmé, H. M. Krisch, N. Loreau, N. T. Thuong, C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 1227.
- [57] J.-S. Sun, J.-C. François, T. Monteny-Garestier, T. Saison-Behmoaras, V. Roig, N. T. Thuong, C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 9198.
- [58] J.-S. Sun, U. Asseline, D. Rouzaud, T. Monteny-Garestier, N. T. Thuong, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 6149.
- [59] N. T. Thuong, U. Asseline, V. Roig, M. Takasugi, C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 5129.
- [60] N. T. Thuong, M. Chassignol, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 5905.
- [61] D. Praseuth, M. Chassignol, M. Takasugi, T. Le Doan, N. T. Thuong, C. Hélène, *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 939.
- [62] C. Hélène, N. T. Thuong, *Biochem. Pharmacol.* 37 (1988) 1797.
- [63] J. Paoletti, D. Bazile, F. Morvan, J.-L. Imbach, C. Paoletti, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 2693.
- [64] B. Rayner, C. Malvy, J. Paoletti, B. Lebleu, C. Paoletti, J.-L. Imbach in [7], S. 119–136.
- [65] J.-L. Imbach, B. Rayner, F. Morvan, *Nucleosides Nucleotides* 8 (1989) 627.
- [66] R. Pauwels, Z. Debyser, J. Balzarini, M. Baba, J. Desmyter, B. Rayner, F. Morvan, J. L. Imbach, E. De Clercq, *Nucleosides Nucleotides* 8 (1989) 995.
- [67] J.-R. Bertrand, J.-L. Imbach, C. Paoletti, C. Malvy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164 (1989) 311.
- [68] C. Gagnor, B. Rayner, J.-P. Leonetti, J.-L. Imbach, B. Lebleu, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 5107.
- [69] D. Praseuth, T. Le Doan, M. Chassignol, J.-L. Decout, N. Habhouh, J. Lhomme, N. T. Thuong, C. Hélène, *Biochemistry* 27 (1988) 3031.
- [70] D. Praseuth, L. Perrouault, T. Le Doan, M. Chassignol, N. T. Thuong, C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 1349.
- [71] D. G. Knorre, V. V. Vlassov, V. F. Zarytova in [7], S. 173–196.
- [72] V. V. Vlassov, A. A. Godovikov, N. D. Kobets, A. S. Rytel, L. V. Yurchenko, A. G. Bukrinskaya, *Adv. Enzyme Regul.* 24 (1985) 301.
- [73] V. V. Vlassov, V. F. Zarytova, I. V. Kutyavin, S. V. Mamaev, *FEBS Lett.* 231 (1988) 352.
- [74] I. V. Kutyavin, M. A. Podyminogin, Y. N. Bazhina, O. S. Fedorova, D. G. Knorre, A. S. Levina, S. V. Mamayev, V. F. Zarytova, *FEBS Lett.* 238 (1988) 35.
- [75] V. V. Vlassov, V. F. Zarytova, I. V. Kutyavin, S. V. Mamaev, M. A. Podyminogin, *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 4065.
- [76] V. V. Vlassov, S. A. Gaidamakova, V. F. Zarytova, D. G. Knorre, A. S. Levina, A. A. Nikonova, L. M. Podust, O. S. Fedorova, *Gene* 72 (1988) 313.
- [77] A. S. Boutorin, L. V. Guskova, E. M. Ivanova, N. D. Kobetz, V. F. Zarytova, A. S. Rytel, L. V. Yurchenko, V. V. Vlassov, *FEBS Lett.* 254 (1989) 129.
- [78] T. Le Doan, L. Perrouault, D. Praseuth, N. Habhouh, J.-L. Decout, N. T. Thuong, J. Lhomme, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 7749.
- [79] R. K. Evans, J. D. Johnson, B. E. Haley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 5382.
- [80] R. K. Evans, B. E. Haley, *Biochemistry* 26 (1987) 269.
- [81] T. R. Webb, M. D. Matteucci, *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 7661.
- [82] M. Chatterjee, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 6397.
- [83] B. C. F. Chu, L. E. Orgel, *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 5163.
- [84] T. P. Brent, J. S. Remack, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 6779.
- [85] T. S. Godovikova, M. A. Grachev, J. V. Kutyavin, J. G. Tsarev, V. F. Zarytova, E. F. Zaychikov, *Eur. J. Biochem.* 166 (1987) 611.
- [86] B. C. F. Chu, L. E. Orgel, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 3671.
- [87] R. N. Zuckermann, D. R. Corey, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 1614.
- [88] D. R. Corey, D. Pei, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 8523.
- [89] T. Le Doan, L. Perrouault, M. Chassignol, N. T. Thuong, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 8643.
- [90] E. I. Frolova, E. M. Ivanova, V. F. Zarytova, T. V. Abramova, V. V. Vlassov, *FEBS Lett.* 269 (1990) 101.
- [91] B. C. F. Chu, L. E. Orgel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 963.
- [92] E. B. Brosalina, V. V. Vlassov, S. A. Kazakov, *Bioorg. Khim.* 14 (1988) 125.
- [93] G. B. Dreyer, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 968.
- [94] T. Le Doan, L. Perrouault, C. Hélène, M. Chassignol, N. T. Thuong, *Biochemistry* 25 (1986) 6736.
- [95] A. S. Boutorin, V. V. Vlassov, S. A. Kazakov, I. V. Kutyavin, M. A. Podyminogin, *FEBS Lett.* 172 (1984) 43.
- [96] M. Boidot-Forget, M. Chassignol, M. Takasugi, N. T. Thuong, C. Hélène, *Gene* 72 (1988) 361.
- [97] H. E. Moser, P. E. Dervan, *Science (Washington, D. C.)* 238 (1987) 645.
- [98] S. A. Strobel, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 7286.
- [99] J.-C. François, T. Saison-Behmoaras, M. Chassignol, N. T. Thuong, J.-S. Sun, C. Hélène, *Biochemistry* 27 (1988) 2272.
- [100] C. H. B. Chen, D. S. Sigman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 7147.
- [101] C. H. B. Chen, D. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 6570.
- [102] J. C. François, T. Saison-Behmoaras, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 11 431.
- [103] B. L. Iverson, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 1241.

- [104] L. Perrouault, U. Asseline, C. Rivalle, N. T. Thuong, E. Bisagni, C. Giovannangeli, T. Le Doan, C. Hélène, *Nature (London)* **344** (1990) 358.
- [105] O. B. Stepanova, V. G. Metelev, N. V. Chichkova, V. D. Smirnov, N. P. Rodionova, J. G. Atabekov, A. A. Bogdanov, Z. A. Shabarova, *FEBS Lett.* **103** (1979) 197.
- [106] J. Shuttleworth, G. Matthews, L. Dale, C. Baker, A. Colman, *Gene* **72** (1988) 267.
- [107] P. J. Furdon, Z. Dominski, R. Kole, *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 9193.
- [108] S. Agrawal, S. H. Mayrand, P. C. Zamecnik, T. Pederson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (1990) 1401.
- [109] K. J. Atabekov, L. G. Tyulkina, O. V. Karpova, V. G. Metelev, N. P. Rodionova, Z. A. Shabarova, J. G. Atabekov, *FEBS Lett.* **232** (1988) 96.
- [110] S. Shibahara, S. Mukai, T. Nishihara, H. Inoue, E. Ohtsuka, H. Morisawa, *Nucleic Acids Res.* **15** (1987) 4403.
- [111] J. R. Wyatt, G. T. Walker, *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 7833.
- [112] R. S. Quartin, C. L. Brakel, J. G. Wetmur, *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 7253.
- [113] H. Inoue, Y. Hayase, S. Iwai, E. Ohtsuka, *FEBS Lett.* **215** (1987) 327.
- [114] A. Pasini, F. Zunino, *Angew. Chem.* **99** (1987) 632; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **26** (1987) 615.
- [115] N. P. Johnson, P. Lapetoule, H. Razaka, G. Villani, *Assoc. Int. Cancer Res. Symp.* **4** (1985) 1.
- [116] L. Marrot, M. Leng, *Biochemistry* **28** (1989) 1454.
- [117] M. F. Anni, M. Leng, *Nucleic Acids Res.* **18** (1990) 4395.
- [118] C. J. van Garderen, H. van den Elst, J. H. von Boom, J. Reedijk, L. P. A. van Houte, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 4123.
- [119] S. E. Sherrnan, D. Gibson, A. H. Wang, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 7368.
- [120] T. P. Kline, L. G. Marzilli, D. Live, G. Zon, *Biochem. Pharmacol.* **40** (1990) 97.
- [121] L. G. Naser, A. L. Pinto, S. J. Lippard, J. M. Essigmann, *Biochemistry* **27** (1988) 4357.
- [122] P. S. Miller in [7], S. 79-95.
- [123] C. A. Stein, J. S. Cohen in [7], S. 97-117.
- [124] J. Goodchild in [7], S. 53-77.
- [125] F. Eckstein, *Angew. Chem.* **95** (1983) 431; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **22** (1983) 423.
- [126] F. Eckstein, G. Gish, *Trends Biochem. Sci.* **14** (1989) 97.
- [127] D. B. Olsen, F. Eckstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (1990) 1451.
- [128] B. Uznanski, A. Wilk, W. J. Stec, *Tetrahedron Lett.* **28** (1987) 3401.
- [129] M. J. Nemer, K. K. Ogilvie, *Tetrahedron Lett.* **21** (1980) 4149.
- [130] J. Nielsen, W. K.-D. Brill, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **29** (1988) 2911.
- [131] C. J. Marcus-Sekura, A. M. Woerner, K. Shinozuka, G. Zon, G. V. Quinnan, *Nucleic Acids Res.* **15** (1987) 5749.
- [132] D. E. Bergstrom, P. W. Shum, *J. Org. Chem.* **53** (1988) 3953.
- [133] R. L. Letsinger, S. A. Bach, J. S. Eadie, *Nucleic Acids Res.* **14** (1986) 3487.
- [134] R. L. Letsinger, C. N. Singman, G. Hestand, M. Salunkhe, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 4470.
- [135] M. Koziolkiewicz, B. Uznanski, W. Stec, G. Zon, *Chem. Scr.* **26** (1986) 251.
- [136] H. M. Moody, M. H. P. van Genderen, L. H. Koole, H. J. M. Kocken, E. M. Meijer, H. M. Buck, *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 4769.
- [137] S. Agrawal, J. Goodchild, M. Civeira, A. H. Thornton, P. S. Sarin, P. C. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** (1988) 7079.
- [138] M. J. Nemer, K. K. Ogilvie, *Tetrahedron Lett.* **21** (1980) 4153.
- [139] R. L. Letsinger, W. S. Mungall, *J. Org. Chem.* **35** (1970) 3800.
- [140] M. Mag, J. W. Engels, *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 5973.
- [141] R. S. Quartin, J. G. Wetmur, *Biochemistry* **28** (1989) 1040.
- [142] Z. J. Lesnikowski, M. Jaworska, W. J. Stec, *Nucleic Acids Res.* **16** (1988) 11675.
- [143] A. Murakami, K. R. Blake, P. S. Miller, *Biochemistry* **24** (1985) 4041.
- [144] P. S. Miller, C. H. Agris, L. Aurelian, K. R. Blake, A. Murakami, M. P. Reddy, S. A. Spitz, P. O. P. Ts'o, *Biochimie* **67** (1985) 769.
- [145] D. M. Tidd, P. Hawley, H. M. Warenus, I. Gibson, *Anti-Cancer Drug Des.* **3** (1988) 117.
- [146] L. J. Maher, B. J. Dolnick, *Nucleic Acids Res.* **16** (1988) 3341.
- [147] W. K.-D. Brill, M. H. Caruthers, *Nucleosides Nucleotides* **8** (1989) 1011.
- [148] R. Cossticks, J. S. Yyle, *Tetrahedron Lett.* **30** (1989) 4693.
- [149] H. Seliger, G. Feger, *Nucleosides Nucleotides* **6** (1987) 483.
- [150] J. F. Cormier, K. K. Ogilvie, *Nucleic Acids Res.* **16** (1988) 4583.
- [151] G. Degols, J.-P. Leonetti, C. Gagnor, M. Lemaitre, B. Lebleu, *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 9341.
- [152] C. H. Agris, K. R. Blake, P. S. Miller, M. P. Reddy, P. O. P. Ts'o, *Biochemistry* **25** (1986) 6268.
- [153] W. Gao, C. A. Stein, J. S. Cohen, G. E. Dutschman, Y.-C. Cheng, *J. Biol. Chem.* **264** (1989) 11521.
- [154] M. Matsukura, K. Shinozuka, G. Zon, H. Mitsuya, M. Reitz, J. S. Cohen, S. Broder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** (1987) 7706.
- [155] C. Majumdar, C. A. Stein, J. S. Cohen, S. Broder, S. H. Wilson, *Biochemistry* **28** (1989) 1340.
- [156] K. Mori, C. Boiziau, C. Cazenave, M. Matsukura, C. Subasinghe, J. S. Cohen, S. Broder, J. J. Toulmé, C. A. Stein, *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 8207.
- [157] C. C. Smith, L. Aurelian, M. P. Reddy, P. S. Miller, P. O. P. Ts'o, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (1986) 2787.
- [158] M. Lemaitre, C. Bisbal, B. Bayard, B. Lebleu, *Nucleosides Nucleotides* **6** (1987) 311.
- [159] M. Lemaitre, B. Bayard, B. Lebleu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** (1987) 648.
- [160] J.-P. Leonetti, G. Degols, P. Milhaud, C. Gagnor, M. Lemaitre, B. Lebleu, *Nucleosides Nucleotides* **8** (1989) 825.
- [161] R. G. Shea, J. C. Marsters, N. Bischofberger, *Nucleic Acids Res.* **18** (1990) 3777.
- [162] S. Agrawal, J. Goodchild, M. Civeira, P. S. Sarin, P. C. Zamecnik, *Nucleosides Nucleotides* **8** (1989) 819.
- [163] M. Matsukura, G. Zon, K. Shinozuka, C. A. Stein, H. Mitsuya, J. S. Cohen, S. Broder, *Gene* **72** (1988) 343.
- [164] M. Matsukura, G. Zon, K. Shinozuka, M. Robert-Guroff, T. Shimada, C. A. Stein, H. Mitsuya, F. Wong-Staal, J. S. Cohen, S. Broder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989) 4244.
- [165] S. Agrawal, T. Ikeuchi, D. Sun, P. S. Sarin, A. Konopka, J. Maizel, P. C. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989) 7790.
- [166] M. Stevenson, P. L. Iversen, *J. Gen. Virol.* **70** (1989) 2673.
- [167] S. Shibahara, S. Mukai, H. Morisawa, H. Nakashima, S. Kobayashi, N. Yamamoto, *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 239.
- [168] R. L. Letsinger, G. Zhang, D. K. Sun, T. Ikeuchi, P. S. Sarin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989) 6553.
- [169] J. Haralambidis, L. Duncan, G. W. Tregear, *Tetrahedron Lett.* **28** (1987) 5199.
- [170] E. Kuyil-Yeheskiely, C. M. Dreef-Tromp, A. Geluk, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 2897.
- [171] E. De Clercq, *Nucleosides Nucleotides* **4** (1985) 3.
- [172] I. M. Kerr, *J. Interferon Res.* **7** (1987) 505.
- [173] D. C. Montefiori, R. W. Sobol, S. W. Li, N. L. Reichenbach, R. J. Suhadolnik, R. Charubala, W. Pfeiderer, A. Modliszewski, W. E. Robinson, W. M. Mitchell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989) 7191.
- [174] C. Bisbal, M. Silhol, M. Lemaitre, B. Bayard, T. Salehzada, B. Lebleu, T. D. Perrée, M. G. Blackburn, *Biochemistry* **26** (1987) 5172.
- [175] C. G. Miyada, R. B. Wallace, *Methods Enzymol.* **154** (1987) 94.
- [176] W. I. Wood, *Methods Enzymol.* **152** (1987) 443.
- [177] N. A. Spoerel, F. C. Kafatos, *Methods Enzymol.* **152** (1987) 588.
- [178] R. B. Wallace, C. G. Miada, *Methods Enzymol.* **152** (1987) 432.
- [179] A. A. Reyes, R. B. Wallace, *Genet. Eng. (London)* **6** (1984) 157.
- [180] M. S. Urdea, B. D. Warner, J. A. Running, M. Stempien, J. Clyne, T. Horn, *Nucleic Acids Res.* **16** (1988) 4937.
- [181] A. Kumar, P. Tchen, F. Roulet, J. Cohen, *Anal. Biochem.* **169** (1988) 376.
- [182] J. Telser, K. A. Cruickshank, L. E. Morrison, T. L. Netzel, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 6966.
- [183] R. Zuckermann, D. Corey, P. Schultz, *Nucleic Acids Res.* **15** (1987) 5305.
- [184] V. K. Kansal, T. Huynh-Dinh, J. Igolen, *Tetrahedron Lett.* **29** (1988) 5537.
- [185] K. A. Cruickshank, D. L. Stockwell, *Tetrahedron Lett.* **29** (1988) 5221.
- [186] J. Haralambidis, M. Chai, G. W. Tregear, *Nucleic Acids Res.* **15** (1987) 4857.
- [187] T. Tanaka, Y. Yamada, M. Ikehara, *Chem. Pharm. Bull.* **36** (1988) 1386.
- [188] R. I. Amann, L. Krumholz, D. A. Stahl, *J. Bacteriol.* **172** (1990) 762.
- [189] W. Bannwarth, D. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **30** (1989) 1513.
- [190] L. S. Lasater, P. A. Cann, D. G. Glitz, *J. Biol. Chem.* **264** (1989) 21798.
- [191] L. S. Lasater, L. Montesano-Roditis, P. A. Cann, D. G. Glitz, *Nucleic Acids Res.* **18** (1990) 477.
- [192] A. M. Alves, D. Holland, M. D. Edge, F. J. Carr, *Nucleic Acids Res.* **16** (1988) 8722.
- [193] J. L. Ruth, E. Jablonski, *Nucleosides Nucleotides* **6** (1987) 541.
- [194] E. Jablonski, E. W. Moomaw, R. H. Tullis, J. L. Ruth, *Nucleic Acids Res.* **14** (1986) 6115.
- [195] P. Li, P. P. Medon, D. C. Skingle, J. A. Lanser, R. H. Symons, *Nucleic Acids Res.* **15** (1987) 5275.
- [196] A. Murakami, J. Tada, K. Yamagata, J. Takano, *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 5587.
- [197] S. S. Ghosh, P. M. Kao, D. Y. Kwok, *Anal. Biochem.* **178** (1989) 43.
- [198] J. Czichos, M. Köhler, B. Reckmann, M. Renz, *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 1563.
- [199] W. S. Young, *Neuropeptides (Edinburgh)* **13** (1989) 271.
- [200] H. Zischler, R. Schäfer, J. T. Epplen, *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 4411.
- [201] J. F. R. Ramalho-Ortigao, G. F. Jirikowski, H. Seliger, *Nucleosides Nucleotides* **8** (1989) 805.
- [202] A. H. Al-Hakim, R. Hull, *Biochem. J.* **251** (1988) 935.
- [203] E. L. Sheldon, D. E. Kellogg, R. Watson, C. H. Levenson, H. A. Erlich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (1986) 9085.
- [204] J.-P. Roduit, J. Shaw, A. Chollet, A. Chollet, *Nucleosides Nucleotides* **6** (1987) 349.
- [205] A. F. Cook, E. Vuocolo, C. L. Brakel, *Nucleic Acids Res.* **16** (1988) 4077.
- [206] R. Kierzek, W. T. Markiewicz, *Nucleosides Nucleotides* **6** (1987) 403.
- [207] B. S. Sproat, A. I. Lamond, B. Beijer, P. Neuner, U. Ryder, *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 3373.
- [208] T. Kempe, W. I. Sundquist, F. Chow, S.-L. Hu, *Nucleic Acids Res.* **13** (1985) 45.
- [209] B. C. F. Chu, L. Orgel, *DNA* **4** (1985) 327.

- [210] P. R. Langer, A. A. Waldrop, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 6633.
- [211] A. Murasugi, R. B. Wallace, *DNA* 3 (1984) 269.
- [212] L. K. Riley, M. E. Marshall, M. S. Coleman, *DNA* 5 (1986) 333.
- [213] S. M. L. Barabir o, B. S. Sproat, U. Ryder, B. J. Blencowe, A. I. Lamond, *EMBO J.* 8 (1989) 4171.
- [214] B. J. Blencowe, B. S. Sproat, U. Ryder, S. M. L. Barabino, A. I. Lamond, *Cell (Cambridge, Mass.)* 59 (1989) 531.
- [215] E. Viegas-Pequignot, B. Dutrillaux, H. Magdelenat, M. Coppey-Moisand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 582.
- [216] A. K. Basu, J. M. Essigmann, *Chem. Res. Toxicol.* 1 (1988) 1.
- [217] N. Gregersen, V. Winter, K. B. Petersen, J. Koch, S. Kolvræ, N. Rüdiger, E.-M. Heinsvig, L. Bolund, *Clin. Chim. Acta* 182 (1989) 151.
- [218] L. L. Tilzer, E. G. Concepcion, *Am. J. Clin. Pathol.* 91 (1989) 464.
- [219] X. Saez-Llorens, L. M. Guzman-Verduzco, S. Shelton, J. D. Nelson, Y. M. Kupersztch, *J. Clin. Microbiol.* 27 (1989) 1684.
- [220] A.-F. Guitteny, B. Fouque, C. Mougou, R. Teoule, B. Bloch, *J. Histochem. Cytochem.* 36 (1988) 563.
- [221] H. E. Hopp, L. Giavedoni, M. A. Mandel, A. Aresé, B. Orman, F. B. Almonacid, H. N. Torres, A. N. Mentaberry, *Arch. Virol.* 103 (1988) 231.
- [222] D. T. Kingsbury, *Trends Biotechnol.* 5 (1987) 107.
- [223] Y. Kawase, S. Iwai, E. Ohtsuka, *Chem. Pharm. Bull.* 37 (1989) 599.
- [224] F. H. Martin, M. M. Castro, F. Abdoul-elai, I. Tinoco, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 8927.
- [225] E. Ohtsuka, S. Matsuki, M. Ikehara, Y. Takahashi, K. Matsubara, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 2605.
- [226] S. Diekmann, E. von Kitzing, L. McLaughlin, J. Ott, F. Eckstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 8257.
- [227] P. J. Hagerman, *Biochemistry* 29 (1990) 1980.
- [228] R. Eritja, D. M. Jorowitz, P. A. Walker, J. P. Ziehler-Martin, M. S. Boosalis, M. F. Goodman, K. Itakura, B. E. Kaplan, *Nucleic Acid Res.* 14 (1986) 8135.
- [229] B. L. Gaffney, L. A. Marky, R. A. Jones, *Tetrahedron* 40 (1984) 3.
- [230] A. Chollet, E. Kawashima, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 305.
- [231] H. Inoue, A. Imura, E. Ohtsuka, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 7119.
- [232] F. Seela, H. Driller, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 911.
- [233] F. Seela, H. Berg, H. Rosemeyer, *Biochemistry* 28 (1989) 6193.
- [234] F. Seela, H. Rosemeyer, T. Grein, *Nucleosides Nucleotides* 9 (1990) 411.
- [235] F. Seela, U. Bindig, H. Driller, W. Herdering, K. Kaiser, A. Kehne, H. Rosemeyer, H. Steker, *Nucleosides Nucleotides* 6 (1987) 11.
- [236] F. Seela, A. Kehne, *Biochemistry* 26 (1987) 2232.
- [237] M. J. McLean, F. Seela, M. J. Waring, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 9687.
- [238] F. Seela, K. Kaiser, *Helv. Chim. Acta* 71 (1988) 1813.
- [239] F. Seela, H. Driller, K. Kaiser, H. Rosemeyer, H. Steker, *Nucleosides Nucleotides* 8 (1989) 789.
- [240] R. Cosstick, X. Li, D. K. Tuli, D. M. Williams, B. A. Connolly, P. C. Newman, *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 4771.
- [241] F. Seela, K. Kaiser, U. Bindig, *Helv. Chim. Acta* 72 (1989) 868.
- [242] B. Gildea, L. W. McLaughlin, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 2261.
- [243] Y.-Z. Xu, P. F. Swann, *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 4061.
- [244] H.-S. Koo, D. M. Crothers, *Biochemistry* 26 (1987) 3745.
- [245] P. K. T. Lin, D. M. Brown, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 10373.
- [246] T. Takeda, K. Ikeda, Y. Mizuno, T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.* 35 (1987) 3558.
- [247] A. J. Goddard, V. E. Marquez, *Nucleosides Nucleotides* 8 (1989) 1015.
- [248] J. A. Piccirilli, T. Crauch, S. E. Moroney, S. A. Benner, *Nature (London)* 343 (1990) 33.
- [249] N. Bischofberger, M. D. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 3041.
- [250] E. A. Kubareva, C.-D. Pein, E. S. Gromova, S. A. Kuznezova, V. N. Tashlitzki, D. Cech, Z. A. Shabarova, *Eur. J. Biochem.* 175 (1988) 615.
- [251] Z. A. Shabarova, *Biochimie* 70 (1988) 1323.
- [252] M. Koziolkiewicz, B. Uznanski, W. J. Stec, *Nucleosides Nucleotides* 8 (1989) 185.
- [253] D. Cech, C.-D. Pein, E. A. Kubareva, E. S. Gromova, T. S. Oretskaya, Z. A. Shabarova, *Nucleosides Nucleotides* 7 (1988) 585.
- [254] A. A. Yolov, M. N. Vinogradova, E. S. Gromova, A. Rosenthal, D. Cech, V. P. Veiko, V. G. Metelev, V. G. Kosykh, Y. I. Buryanov, A. A. Bayev, Z. A. Shabarova, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 8083.
- [255] J. Benhattar, J. Jiricny, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 4160.
- [256] A. Fliess, H. Wolfes, A. Rosenthal, K. Schweltnus, H. Blöcker, R. Frank, A. Pingoud, *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 3463.
- [257] B. A. Connolly, P. C. Newman, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 4957.
- [258] A. Ono, T. Ueda, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 219.
- [259] T. Hayakawa, A. Ono, T. Ueda, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 4761.
- [260] C. A. Brennan, M. D. van Cleve, R. I. Gumpert, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 7270.
- [261] H. Wolfes, A. Fliess, F. Winkler, A. Pingoud, *Eur. J. Biochem.* 159 (1986) 267.
- [262] F. Seela, H. Driller, *Nucleosides Nucleotides* 8 (1989) 1.
- [263] A. Ono, T. Ueda, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 3059.
- [264] L. W. McLaughlin, T. Leong, F. Benseler, N. Piel, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 5631.
- [265] A. Fliess, H. Wolfes, F. Seela, A. Pingoud, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 11781.
- [266] L. A. Loeb, *Cell (Cambridge, Mass.)* 40 (1985) 483.
- [267] S. Pochet, T. Huynh-Dinh, J.-M. Neumann, S. Tran-Dinh, S. Adam, J. Taboury, E. Taillandier, J. Igolen, *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 1107.
- [268] L. S. Kappen, C.-Q. Chen, I. H. Goldberg, *Biochemistry* 27 (1988) 4331.
- [269] M. Takeshita, C. N. Chang, F. Johnson, S. Will, A. P. Grollman, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 10171.
- [270] R. Eritja, P. A. Walker, S. K. Randall, M. F. Goodman, B. E. Kaplan, *Nucleosides Nucleotides* 6 (1987) 803.
- [271] G. R. Stuart, R. W. Chambers, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 7451.
- [272] T. Horn, M. S. Urdea, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 11559.
- [273] J. Raap, C. E. Dreef, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, C. W. Hilbers, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 5 (1987) 219.
- [274] J.-J. Vasseur, B. Rayner, J.-L. Imbach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134 (1986) 1204.
- [275] J.-J. Vasseur, B. Rayner, J.-L. Imbach, S. Verma, J. A. McCloskey, M. Lee, D. K. Chang, J. W. Lown, *J. Org. Chem.* 52 (1987) 4994.
- [276] J.-R. Bertrand, J.-J. Vasseur, B. Rayner, J.-L. Imbach, J. Paoletti, C. Paoletti, C. Malvy, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 10307.
- [277] T. Inaoka, M. Ishida, E. Ohtsuka, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 2609.
- [278] V. V. Demidov, V. N. Potaman, *J. Chromatogr.* 285 (1984) 135.
- [279] S. K. Banerjee, R. B. Christensen, C. W. Lawrence, J. E. LeClerc, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 8141.
- [280] J.-S. Taylor, I. R. Brockie, C. L. O'Day, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 6735.
- [281] J.-S. Taylor, I. R. Brockie, *Nucleic Acids Res.* 11 (1988) 5123.
- [282] F. N. Hayes, D. L. Williams, R. L. Ratliff, A. J. Varghese, C. S. Rupert, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 4940.
- [283] S. N. Rao, J. W. Keepers, P. Kollman, *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) 4789.
- [284] J. Kemmink, R. Boelens, T. M. G. Koning, R. Kaptein, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Eur. J. Biochem.* 162 (1987) 37.
- [285] J. Kemmink, R. Boelens, T. M. G. Koning, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, R. Kaptein, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 4645.
- [286] I. Husain, J. Griffith, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 2558.
- [287] I. Husain, A. Sancar, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 1109.
- [288] R. Wu (Hrsg.): *Methods Enzymol.* 155 (1987) 51–331, Section II: „Rapid Methods for DNA Sequence Analysis“.
- [289] G. Gish, F. Eckstein, *Science (Washington, D. C.)* 240 (1988) 1520.
- [290] G. L. Trainor, F. W. Hobbs, A. J. Cocuzza, P. N. Confalone, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 20 (1988) 119.
- [291] J. A. Brumbaugh, L. R. Middendorf, D. L. Grone, J. L. Ruth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 5610.
- [292] A. Rosenthal, H. Billwitz, A. Kehne, F. Seela, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 1631.
- [293] L. M. Smith, R. J. Kaiser, J. Z. Sanders, L. E. Hood, *Methods Enzymol.* 155 (1987) 260.
- [294] L. M. Smith, *Genet. Eng. (London)* 10 (1988) 91.
- [295] B. S. Sproat, B. Beijer, P. Rider, P. Neuner, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 4837.
- [296] W. Ansorge, B. Sproat, J. Stegemann, C. Schwager, M. Zenke, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 4593.
- [297] P. Richterich, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 2181.
- [298] D. A. Amorese, A. M. Hochberg, *Am. Biotechnol. Lab.* 7 (1989) 38.
- [299] J. M. Prober, G. L. Trainor, R. J. Dam, F. W. Hobbs, C. W. Robertson, R. J. Zagursky, A. J. Cocuzza, M. A. Jensen, K. Baumeister, *Science (Washington, D. C.)* 238 (1987) 336.
- [300] E. de Vroom, H. J. G. Broxterman, L. A. J. M. Slidregt, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 4607.
- [301] S. Barbato, L. de Napoli, L. Mayol, G. Piccialli, C. Santacroce, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 5727.
- [302] M. V. Rao, C. B. Reese, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 8221.
- [303] M. Sekine, J. Heikkilä, T. Hata, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 5691.
- [304] N. Balgobin, X.-X. Zhou, J.-M. Vial, A. Nyilas, A. Földesi, J. Chattopadhyaya, *Nucleosides Nucleotides* 8 (1989) 793.
- [305] M. J. Damha, S. Zabarylo, *Tetrahedron Lett.* 30 (1989) 6295.
- [306] T. Horn, M. S. Urdea, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 6959.
- [307] V. Lund, R. Schmid, D. Rickwood, E. Hornes, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 10861.
- [308] J. Visscher, C. G. Bakker, R. Vanderwoerd, A. W. Schwartz, *Science (Washington, D. C.)* 244 (1989) 329.
- [309] J.-P. Perreault, T. Wu, B. Cousineau, K. K. Ogilvie, R. Cedergren, *Nature (London)* 344 (1990) 565.
- [310] E. A. M. de Jong, J. P. M. van Duynhoven, B. J. M. Harmsen, G. I. Tesser, R. N. H. Konings, C. W. Hilbers, *J. Mol. Biol.* 206 (1989) 133.
- [311] J. N. Kremisky, J. L. Wooters, J. P. Dougherty, R. E. Meyers, M. Collins, E. L. Brown, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 2891.
- [312] R. Bischoff, J. M. Coull, F. E. Regnier, *Anal. Biochem.* 164 (1987) 336.
- [313] R. D. Sheardy, N. C. Seeman, *J. Org. Chem.* 51 (1986) 4301.
- [314] B. S. Sproat, B. Beijer, P. Rider, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 6181.
- [315] Y. Borel, H. Borel, *J. Clin. Invest.* 82 (1988) 1901.
- [316] L. A. Yakubov, E. A. Deeva, V. F. Zarytova, E. M. Ivanova, A. S. Ryté, L. V. Yurchenko, V. V. Vlassov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 6454.

- [317] S. L. Loke, C. A. Stein, X.-H. Zhang, K. Mori, M. Nakanishi, C. Subasinghe, J. S. Cohen, L. M. Neckers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3474.
- [318] P. C. Zamecnik, J. Goodchild, Y. Taguchi, P. S. Sarin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 4143.
- [319] M. Ceruzzi, K. Draper, J. Schwartz, *Nucleosides Nucleotides* 9 (1990) 679.
- [320] J.-P. Leonetti, P. Machy, G. Degols, B. Lebleu, L. Leserman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 2448.
- [321] A. Chollet, *Nucleosides Nucleotides* 9 (1990) 957.

- [322] U. Englisch, S. Englisch, P. Markmeyer, J. Schischkoff, H. Sternbach, H. Kratzin, F. Cramer, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368 (1987) 971.
- [323] M. Cooney, G. Czernuszewicz, E. H. Postel, S. J. Flint, M. E. Hogan, *Science (Washington, D. C.)* 241 (1988) 456.
- [324] P. B. Dervan in [7], S. 197–210.
- [325] G. Zon in [7], S. 233–247.
- [326] P. Herdewijn, R. Charubala, R. Pauwels, E. De Clercq, W. Pfeleiderer, *Nucleosides Nucleotides* 6 (1987) 441.
- [327] G. B. Elion, *Angew. Chem.* 101 (1989) 893; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989) 870.

WUT ZUR LÜ KE



**Hat schon wieder ein anderer die Angewandte?
Statt vor Wut zu kochen: Lückenlos auf dem
neuesten Stand mit einem persönlichen
Abonnement!**

Anruf oder Fax genügt



Tel. (06201) 602216, Fax (06201) 602328
Postfach 10 11 61, D-6940 Weinheim