

Einkristall-Röntgenstrukturanalysen von Oligonucleotiden und Oligonucleotid-Wirkstoff-Komplexen

Von Olga Kennard* und William N. Hunter

Nucleinsäuren stellen das Alphabet der genetischen Information für alle lebenden Organismen dar. Sie spielen zudem die Rolle eines Regulators bei vielen biologischen Vorgängen, bei denen genetische Information genutzt wird. Das Doppelhelix-Modell von *Watson* und *Crick* (1953) versuchte die strukturellen Grundlagen für die biologische Funktion der DNA zu erklären, doch scheint dieser Einblick in die Strukturen von Nucleinsäuren ebenso viele Fragen aufgeworfen wie gelöst zu haben. Experimentelle Untersuchungen, insbesondere die Röntgenbeugung an Fasern, lieferten reichlich Informationen über die konformative Flexibilität von Nucleinsäuren und die Bedeutung von Wechselwirkungen mit Wasser und Kationen. Große Fortschritte in der organischen Synthese trieben auch die Erforschung von Nucleinsäuren gegen Ende der siebziger Jahre voran. Als synthetische Oligonucleotide mit definierter Sequenz und hohem Reinheitsgrad in Milligramm-Mengen verfügbar wurden, war der Weg frei für genaue Strukturanalysen mit Einkristallbeugungsmethoden und später mit der NMR-Spektroskopie. Im folgenden soll ein ausführlicher Überblick über die Ergebnisse gegeben werden, die die Anwendung von kristallographischen Techniken auf DNA, RNA und Nucleinsäure-Wirkstoff-Komplexe im Zeitraum von 1979 bis 1990 erbracht hat. Darüber hinaus werden in einem Anhang wichtige Begriffe zur Beschreibung von Oligonucleotidkonformationen erläutert.

1. Einleitung

Ein Übersichtsartikel sollte sich nicht darauf beschränken, die Fakten auf einem Gebiet zusammenzustellen, sondern er sollte auch den Versuch unternehmen, die grundlegenden Probleme zu definieren, zeigen, inwieweit Lösungen gefunden wurden, und die Perspektiven künftiger Forschung besprechen. Während Fakten relativ sachlich dargestellt werden können, werden die Definition des Aufgabenbereichs und die Wertung der Ergebnisse zwangsläufig durch die Interessen und die Vorurteile des Autors beeinflusst. Dazu kommt noch die allzu menschliche Neigung, den Ergebnissen des eigenen Arbeitskreises zuviel Bedeutung beizumessen. Die Alternative, das Streben nach Unparteilichkeit, jedoch führt zu einem langweiligen Bericht, der mit den Wirren der tatsächlichen Forschung nicht viel gemein hat.

In dieser Übersicht stellen wir einige der wissenschaftlichen Ergebnisse vor, die uns für die Rolle der DNA- und RNA-Struktur in biologischen Systemen wesentlich scheinen, und besprechen, inwieweit sie zum Verständnis der grundlegenden Mechanismen, die Gegenstand der Forschung sind, beigetragen haben. Zu den behandelten Themen gehören sequenzspezifische Modellstrukturen, RNA-Helices, Hydrationsmuster und das Kontinuum der rechtshändigen DNA-Konformation. Wir stellen DNA-Modelle mit Basenfehlpaares und anderen Fehlern vor und geben einen Überblick über die Wechselwirkungen einer Reihe von Wirkstoffen und Antibiotica mit Oligonucleotiden.

Wir geben zu, daß dies eine sehr persönliche und zeitgebundene Sichtweise dessen ist, was wir im Rückblick auf das vergangene Jahrzehnt für besonders interessant halten; ebenso persönlich ist die Art, wie wir über Erfolg und Mißerfolg der immensen, in einer Reihe von Forschungsgruppen

durchgeführten Arbeiten bei der Beantwortung von grundlegenden Fragen zur Oligonucleotidstruktur und -funktion urteilen. Andere, vielleicht ebenso persönliche Sichtweisen finden sich in einigen der zitierten Veröffentlichungen, und wir hoffen, daß der Leser dazu angeregt wird, sie zur Hand zu nehmen, und somit einen vollständigeren Überblick über dieses Gebiet erhält. Des weiteren stellen wir kurz und ohne technische Einzelheiten die experimentellen Verfahren und die Computerprogramme vor, die bei der Einkristall-Röntgenstrukturanalyse von Oligonucleotiden zum Einsatz kommen, und zeigen ihre Möglichkeiten und Grenzen. Das umfassende Literaturverzeichnis zu den einzelnen Strukturanalysen enthält außerdem, wo angemessen, Hinweise auf ergänzende Untersuchungen sowie auf Übersichtsartikel und Lehrbücher. Um es dem Nicht-Spezialisten zu ermöglichen, unseren Überblick und die in den zitierten Arbeiten angeführten Einzelheiten zu verstehen, haben wir in einem Anhang Tabellen zusammengestellt, die die wichtigsten Ergebnisse der kristallographischen Untersuchungen zusammenfassen. Aus dem gleichen Grunde werden dort die geometrischen Begriffe, die zur Beschreibung von Oligonucleotidstrukturen dienen, definiert und mit Diagrammen veranschaulicht. Bei den Literaturangaben verweisen wir auch auf neuere Konferenzberichte, um den Leser auf bedeutende aktuelle Arbeiten aufmerksam zu machen, die wahrscheinlich schon bald veröffentlicht werden.

2. Die röntgenographische Strukturbestimmung an Oligonucleotideinkristallen

Die wichtigsten Arbeiten über die Strukturbestimmung an Oligonucleotidfragmenten aus vier oder mehr Basen, die in den vergangenen zehn Jahren veröffentlicht wurden, sind in den Tabellen 1–3 aufgeführt, die recht umfassend sind. Allerdings wurden in den Einzelfällen, in denen mehrere Strukturanalysen für dasselbe Molekül, jedoch bei unterschiedlichen Temperaturen, mit unterschiedlichen Gegenionen, mit

[*] Dr. O. Kennard
University Chemical Laboratory
Lensfield Road, GB-Cambridge, CB2 1EW (Großbritannien)
Dr. W. N. Hunter
Department of Chemistry, Manchester University (Großbritannien)

Tabelle 1. Röntgenographisch untersuchte rechtshändige Doppelhelices.

| Sequenz [a] | globale Form | Lit. |
|--------------------|--------------|---------------|
| d(pATAT) | | [1, 2] |
| d(IoC'CGG) | A | [3, 149] |
| d(C'CGG) | A | [4] |
| d(GGTATACC) | A | [5, 6] |
| d(GGBrUABrUAC'C) | A | [7] |
| d(GGCCGGCC) | A | [8] |
| d(GGGGCC'CC) | A | [9] |
| d(GGATCCC) | A | [10] |
| d(CTCTAGAG) | A | [11] |
| d(GGGCG'CCC) | A | [12, 13] |
| d(GCCC'GGGC) | A | [14] |
| d(CCCC'GGGG) | A | [15] |
| d(GmC'CGGCC) | A | [16] |
| d(GTGTACAC) | A | [17, 18] |
| d(GTGCACAC) | A | [155] |
| d(GGATGGGAG) | A | [19] |
| d(ACCGGCCGGT) | A | [20] |
| d(CpsCGTACGTACGG) | A | [21] |
| d(CCGTACGTACGG) | A | [157] |
| r(GC'G)d(TATAC'GC) | A | [22] |
| rUUUAUUAUUAUAA) | A | [23, 88] |
| d(GpsCGpsCGpsC) | B | [24] |
| d(CGCGAATT'CG'G) | B | [25, 26, 142] |
| d(CGCAAAATTT'GG'G) | B | [27] |
| d(CGCAAAAAAG'CG'G) | B | [28] |
| d(CGATATAT'GG'G) | B | [29] |
| d(CCAGGC'TGG) | B | [30] |
| d(CGCAAAATG'CG'G) | B | [31] |
| d(CGCGAm6ATT'CG'G) | B | [32] |
| d(ACCGGCGC'ACA) | B | [33] |
| d(CGATCGAT'CG'G) | B | [34] |
| d(CCAACGTTGG) | B | [35] |
| d(CGCGTTAAC'GG'G) | B | [154] |
| d(CCCCGCGGGGG) | B | [159] |

[a] IoC = 5-Iodecytosin, BrU = 5-Bromuridin, mC = 5-Methylcytosin, ps = Rp-Phosphorothioat, m6A = 6-Methyladenin.

Tabelle 2. Röntgenographisch untersuchte linkshändige Doppelhelices der Z-Form.

| Sequenz [a] | Kommentar | Lit. |
|------------------|--|---------|
| d(CGCG) | hohe Salzkonzentration | [36–38] |
| d(CGCG) | niedrige Salzkonzentration, fehlgeordnet | [39] |
| d(CGCGCG) | Spermin, Mg und Na | [40] |
| d(CGCGCG) | Mg und Na | [41] |
| d(CACGTG) | 2 Formen | [42] |
| d(BrCGBrCGBrCG) | | [43] |
| d(BrCGATBrCG) | | [44] |
| d(mCGATmCG) | | [44] |
| d(BrCGTABrCG) | | [45] |
| d(mCGTAmCG) | | [45] |
| d(mCGmCGmCG) | | [46] |
| d(CG)r(CG)d(CG) | | [47] |
| d(CG)(araC)d(CG) | | [47] |
| d(CGCGCGCG) | fehlgeordnet | [48] |
| d(CGCGATCG) | fehlgeordnet | [48] |
| d(CGTACCTACG) | fehlgeordnet | [49] |

[a] BrC = 5-Bromecytosin, mC = 5-Methylcytosin, araC = Arabinosecytosin.

Bromierung oder Methylierung einiger Basen oder anderen Änderungen durchgeführt wurden, nicht alle Arbeiten zielt, da die wesentlichen Ergebnisse solcher Mehrfachanalysen sehr ähnlich sind.

Die Oligonucleotidstrukturen lassen sich in drei Hauptkategorien einteilen: die rechtshändigen A- und B-Formen sowie die linkshändige Z-Form. In den Abbildungen 1–3 ist für jede Kategorie beispielhaft das Ergebnis einer Einkristallstrukturuntersuchung gezeigt. In dieser Übersicht nutzen wir die Gesamtkonformation als Kriterium für die Zuordnung zu einem Helixotyp, z.B. A-DNA, B-DNA oder



Olga Kennard wurde 1924 in Budapest, Ungarn, geboren. Sie studierte an der University of Cambridge (BA 1944, MA 1948), war ab 1948 wissenschaftliche Mitarbeiterin des Medical Research Council und arbeitete in London am Institute of Ophthalmology und am National Institute for Medical Research, bis sie 1961 an die University of Cambridge entsandt wurde, um dort eine Arbeitsgruppe Crystallographic Chemistry aufzubauen. Deren Ziel war die Aufklärung der Strukturen biologisch interessanter Verbindungen – zunächst einfacher Steroide, später dann auch komplexer Antibiotika. Seit den frühen siebziger Jahren konzentrierte sich die Arbeit auf die Analyse von DNA-Bruchstücken und DNA-Wirkstoff-Komplexen. In diese Zeit fiel auch ihre Promotion 1973. Pionierarbeit leistete sie zudem für das Sammeln und Nutzen wissenschaftlicher Daten durch die Gründung des Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) 1965. 1980 wurde sie mit dem Royal Society of Chemistry Prize ausgezeichnet, 1987 zum Fellow der Royal Society gewählt und 1988 mit dem Order of the British Empire geehrt. Zur Zeit ist sie wissenschaftliche Direktorin des CCDC und Gastprofessorin an der University of London. Ihr Forschungsschwerpunkt ist nun die Aufklärung der Strukturen von Oligonucleotiden, vor allem von RNA-Bruchstücken.



William N. Hunter, 1958 in Greenock, Schottland, geboren, studierte bis zum BSc 1979 Chemie am Paisley College. 1982 promovierte er bei D. W. A. Sharp und K. W. Muir an der University of Glasgow in Anorganischer Chemie und Kristallographie. 1983 und 1984 arbeitete er als Henry-Bertie-and-Florence-Mabel-Gritton-Stipendiat an der University of Sydney, Australien, bei H. C. Freeman über Proteinkristallographie, anschließend untersuchte er bis 1989 gemeinsam mit Olga Kennard die Strukturen von Nucleinsäuren. Inzwischen ist er Dozent in der Abteilung Structural Chemistry der University of Manchester und befaßt sich vor allem mit der Kristallographie makromolekularer Systeme.

Tabelle 3. Röntgenographisch untersuchte Doppelhelices mit Nicht-Watson-Crick-Basenpaaren oder Basenpaaren außerhalb der Helix.

| Sequenz [a] | Kommentar, Form | Lit. |
|---------------------|--------------------------|----------|
| d(TGCGCG) | G · T, Z | [50] |
| d(BrUGCGCG) | BrU · G, Z | [51] |
| d(CGCGFUG) | FU · G, Z | [53] |
| d(CGTDCG) | T · 2-Aminoadenin, Z | [52] |
| d(CDCGTG) | T · 2-Aminoadenin, Z | [52] |
| d(CGCGXG) | G · X, Z | [54] |
| d(CGCGTG) | G · T, Z | [55] |
| d(GGGGTCCC) | G · T, A | [56] |
| d(GGGGCTCC) | G · T, A | [57, 58] |
| d(GGGTGCCC) | G · T, A | [12] |
| d(GGIGCTCC) | I · T, A | [59] |
| d(CCAAGATTGG) | G(anti) · A(anti), B | [60, 61] |
| d(CGCGAATTGCG) | G · T, B | [62] |
| d(CGCGAATTAGCG) | G(anti) · A(syn), B | [63, 64] |
| d(CGCAAATTCGGG) | C · A, B | [65, 66] |
| d(CGCAATTAGCG) | I · A, B | [67] |
| d(CGCAAATTCGCG) | A(anti) · G(syn), B | [68] |
| d(CGCGAATTCGCG) | A außerhalb der Helix, B | [69] |
| d(CGCGAAATTACGCG) | A außerhalb der Helix, B | [70] |
| d(CGCGCGTTTTCGCGCG) | Haarnadel, Z | [71] |

[a] FU = 5-Fluoruridin, D = 2-Aminoadenin, X = N4-Methoxycytosin.

Z-DNA. Diese polymorphen Formen weisen große Unterschiede auf.

In der A-Form (Abb. 1) liegen elf Basenpaare pro Windung der Helix mit einer Verdrehung benachbarter Basenpaare (Helixdrehung) von 32.7° vor. Der Abstand zwischen den Basenpaaren beträgt 2.9 \AA . Die Basen sind bezüglich der glycosidischen Bindung *anti*-ständig, und der Furanosering nimmt eine C3'-*endo*-Konformation an. Die Helixachse liegt in der großen Furche, wobei die Basen etwas Abstand zu ihr haben. Der Gesamteindruck ist der eines um einen Stab gewundenen Bandes. Die Struktur ist durch eine breite und flache kleine Furche sowie eine schmale und tiefe große Furche charakterisiert.

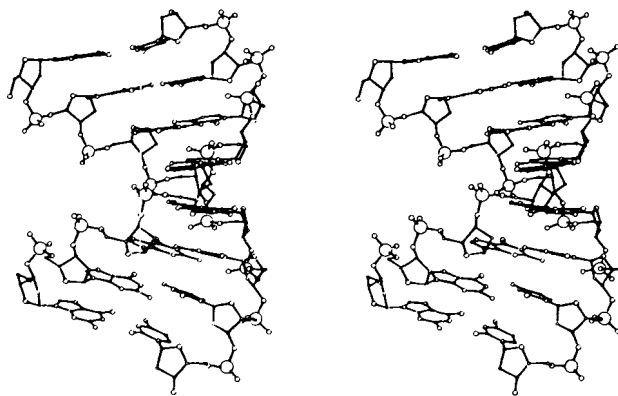


Abb. 1. Stereobild, das am Beispiel des Octamers d(GGGGCCCC) die Struktur der A-Form-DNA illustriert [9]. Man sieht unten die flache, aber weite kleine Furche und oben die schmale, aber tiefe große Furche.

Die B-Form (Abb. 2) weist zehn Basenpaare pro Windung, eine Helixdrehung von 36.0° und einen Abstand von 3.4 \AA zwischen den Basenpaaren auf. Die Ausrichtung zur glycosidischen Bindung ist *anti*, und der Zuckerring bevorzugt die C2'-*endo*-Konformation. Die Helixachse geht hier durch die Basenpaare. Verglichen mit der A-Form ist in der B-Form die kleine Furche eher schmal und tief und die große Furche wesentlich offener.

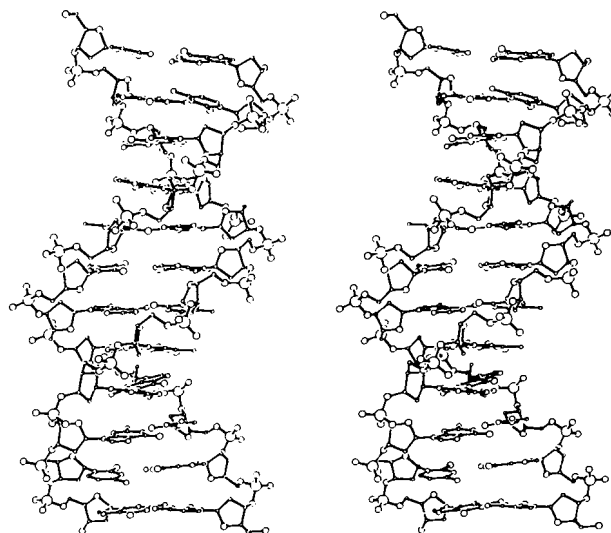


Abb. 2. Stereobild, das am Beispiel des Drew-Dickerson-Dodecamers d(CGCGAATTCGCG) die Struktur der B-Form-DNA illustriert. Zahlreiche Bezüge auf dieses Oligonucleotid sind im Text zu finden.

Die Z-Form (Abb. 3) ist eine linkshändige Helix mit einem Zucker-Phosphat-Rückgrat in Zickzackform, die ihr den Namen gegeben hat. Sie wird in erster Linie von alternierenden Cytosin/Guanin-Sequenzen angenommen und kann als eine Wiederholung von d(CpG)-Schritten angesehen werden. Es gibt pro Windung zwölf Basenpaare mit einem Abstand von jeweils 3.7 \AA . Die Helixdrehung, die Ausrichtung zur glycosidischen Bindung und die Zuckerkonformation hängen davon ab, ob man die Pyrimidin- oder die Purinbase betrachtet oder, ob es sich um das erste oder das zweite Basenpaar des Dinucleotidschrittes handelt.

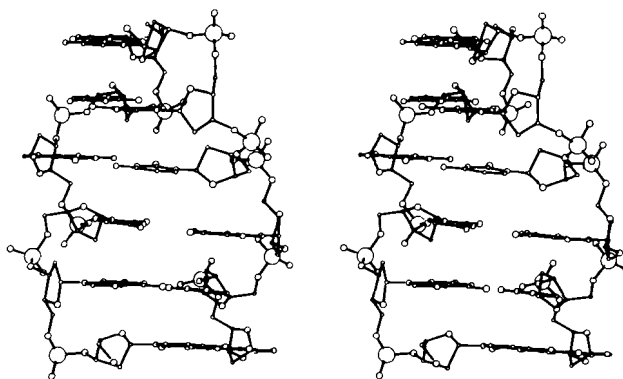


Abb. 3. Stereobild der linkshändigen polymorphen Z-DNA-Struktur von d(CGCGCG) [40, 41, 150]. Man beachte die Zickzackanordnung des Zucker-Phosphat-Rückgrats, die der Form den Namen gab.

Innerhalb jeder Strukturfamilie gibt es eine Reihe von Untergruppen, die als A', B' usw. bezeichnet werden. Diese Konformationen sind die Folge kleiner Strukturunterschiede. Vergleichswerte sind in Tabelle 11 im Anhang angegeben.

Die Zahl unterschiedlicher Strukturen, die im vergangenen Jahrzehnt erfolgreich röntgenographisch charakterisiert wurden, ist immer noch begrenzt. Es gibt mehrere Typen von B-DNA-Strukturen, die von zwei Dodecameren, d(CGCGAATTCGCG)^[26] und d(ACCGGCGCCACA)^[33], einem Hexamer, d(GpsCGpsCGpsC)^[24], zwei Decameren, d(CCAGGCCTGG)^[30] und d(CGATCGATCG)^[34] (Ta-

belle 1), sowie zwei Sequenzen mit zusätzlichen Adenineinheiten^[70, 71] (Tabelle 3) repräsentiert werden. Bei diesen Strukturtypen wird das regelmäßige Kristallgitter mit Hilfe unterschiedlicher Wechselwirkungen zwischen benachbarten Doppelhelices gebildet. Im Unterschied dazu kommen in allen untersuchten kristallisierten A-DNA-Helices sehr ähnliche Packungsmotive mit Wasserstoffbrücken und van-der-Waals-Wechselwirkungen in der flachen kleinen Furche zum Tragen. Diese Wechselwirkungen können in der Elementarzelle von einer Vielzahl von Symmetrieoperationen begleitet sein, darunter von sechs-, vier- und zweizähligen Schraubenachsen. Das gleiche Packungsmotiv kommt in einem DNA-RNA-Hybrid-Decamer vor, das orthorhombische Kristalle bildet^[22]. Linkshändige Z-DNA-Helices kristallisieren im wesentlichen in der gleichen Weise mit Kontakten zwischen den Helix-Endstücken in einer orthorhombischen Raumgruppe (Hexanucleotide) und zwei sehr ähnlichen Raumgruppen (Tetranucleotide). Ausgewählte Arbeiten über Desoxyoligonucleotide mit (Nicht-Watson-Crick)-Basenfehlpaaren und Basen außerhalb der Helix, die alleamt die genannten unterschiedlichen Kristallpackungen nutzen, sind in Tabelle 3 aufgeführt. Tabelle 4 (Abschnitt 8) nennt ausgewählte Arbeiten über Desoxyoligonucleotid-Wirkstoff-Komplexe.

Die geringe Zahl von Kristalltypen hat einige grundlegenden Fragen über den Einfluß der Sequenzlänge, der Basenzusammensetzung und der Kristallgitterkräfte auf die Wahl der Gesamtkonformation aufgeworfen sowie zu der Frage geführt, ob die Gesamtkonformation im Kristall mit jener in Lösung übereinstimmt. Die Folgerungen aus einigen für die Beantwortung dieser Fragen wichtigen Versuchsergebnissen werden später in diesem Artikel behandelt.

3. Techniken der Röntgenstrukturanalyse

3.1. Synthese, Reinigung, Kristallisation und Datensammlung

Die Techniken zur Synthese von Desoxyoligonucleotiden im Milligramm-Maßstab, wie sie für die Röntgenstrukturanalyse benötigt werden, haben seit den ursprünglichen Lösungsmethoden^[72, 73], die große Mengen lieferten, aber sehr zeitaufwendig waren, gewaltige Fortschritte gemacht. Moderne automatische Festphasengeräte auf der Grundlage der Phosphoramidit-Technik^[74] ermöglichen die rasche Synthese von Desoxyoligonucleotiden aus bis zu 24 Basenpaaren in akzeptabler Homogenität. Eine gute Reinigung scheint eine wesentliche Bedingung für die erfolgreiche Kristallisation zu sein. Im allgemeinen wird das von den Schutzgruppen befreite Oligonucleotid an einem starken Anionenaustauscherharz HPL-chromatographiert und mit einem Phosphatpuffer in Gradiententechnik bei neutralem pH eluiert. Bei diesem Verfahren werden ungeladene Moleküle und kürzere DNA-Fragmente, Nebenprodukte der Synthese, vom Hauptfragment aufgrund der Ladung getrennt. Ein zweiter HPLC-Durchgang auf einer C18-Umkehrphase unter Eluierung mit einem Acetonitril-Gradienten trennt die teilweise geschützten DNA-Fragmente mit gleicher Länge wie das Zielmolekül vom ungeschützten Hauptprodukt, indem die unterschiedliche Hydrophobie genutzt wird. Dieser zweite HPLC-Schritt entfernt zudem die Phosphatsalze. Das reine

Oligonucleotid wird dann lyophilisiert, und man erhält gewöhnlich 5–15 Milligramm des Ammoniumsalzes der Ziel-DNA.

Anionenaustauschchromatographie ist allerdings im präparativen Maßstab für die Reinigung von Oligonucleotiden, deren Länge 10–12 Nucleotide übersteigt, nicht sehr geeignet. Statt dessen wird das sogenannte „Trityl-on“-Verfahren genutzt. Die säurelabile und stark lipophile Dimethoxytrityl-Schutzgruppe am 5'-Ende verbleibt am Rohprodukt und dient zur Unterscheidung zwischen der Zielsequenz und den kürzeren Sequenzen, bei denen sie bereits entfernt wurde. Schon im ersten HPLC-Schritt wird auf einer C18-Umkehrphase durch Eluieren mit Acetonitril ein hoher Reinheitsgrad erreicht. Nach Detritylierung mit wäßriger Essigsäure und Lyophilisierung wird die Probe in einem zweiten HPLC-Schritt an einem Anionenaustauscherharz weiter gereinigt.

Das gesamte Verfahren dauert drei bis vier Tage, wobei die meiste Zeit zur Reinigung benötigt wird. Bei der Anionenaustauschchromatographie selbstkomplementärer Sequenzen treten häufig Probleme auf, da sich Sekundärstrukturen, wie DNA-Doppelstränge oder Haarnadelschleifen, bilden, die unterschiedlich schnell eluiert werden. In solchen Fällen hilft Erhitzen und/oder die Zugabe eines Phosphatpuffers mit 20% Acetonitril, stabile Einzelstränge zu erhalten.

Diese recht detaillierte Beschreibung des Reinigungsverfahrens wurde eingefügt, um Chemikern (und Kristallographen) die Probleme bei der Herstellung der Mengen äußerst reiner Verbindungen, die zur Kristallisation notwendig sind, zu verdeutlichen. Dennoch möchten wir betonen, daß die Wahrscheinlichkeit, für eine Strukturanalyse geeignete Kristalle zu erhalten, im allgemeinen kleiner als 10% ist, und somit die Kristallisation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt vieler Strukturanalysen bleibt. Bei den gebräuchlichsten Methoden der Kristallisation läßt man ein Fällungsmittel in eine Lösung eindiffundieren, die die DNA, ein geeignetes Kation, eine Pufferlösung und häufig auch Spermin enthält.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, Wasser aus der Lösung mit Hilfe eines hygroskopischen Lösungsmittels wie Hexan-1,6-diol oder 2-Methyl-2,4-pentandiol hinausdiffundieren zu lassen. Bei beiden Methoden werden kleine Tropfen der Oligonucleotidlösung von ungefähr 5 bis 10 µL als hängende Tropfen über einem Reservoir von bis zu 50 µL als „sitzenden Tropfen“ in ausgehöhlten Glasplatten suspendiert. Normalerweise wird dabei eine große Bandbreite an Bedingungen getestet: Man variiert die Oligonucleotidkonzentration, die Art und Konzentration der Gegenionen, den pH-Wert, kristallisiert bei Raumtemperatur oder bei 4 °C. Es ist bemerkenswert, daß das einzige bisher analysierte RNA-Fragment bei 37 °C kristallisiert wurde^[23]! Sobald die ungefähren Bedingungen feststehen, werden sie so lange verbessert, bis man Kristalle der erforderlichen Qualität erhält. Bei großer Sorgfalt können die Bedingungen reproduziert und weitere Kristalle gezüchtet werden.

Die Erfolgsrate der Kristallisation ist, wie bereits angemerkt wurde, sehr gering. Häufig werden nur fehlgeordnete Kristalle, manchmal auch gar keine gebildet. Selbst Kristalle mit hoher optischer Ordnung, d. h. solche, die im polarisierten Licht scharfe Extinktionen zeigen, ergeben teilweise nur Röntgenbeugungsmuster geringer Qualität. Sehr wahrscheinlich ist dies eine Folge von Rotationsfehlordnungen der zylindrischen DNA-Helices benachbarter Einheitszellen.

Dieses Problem wird häufig dadurch verstärkt, daß die Kristalle bis zu 50% Lösungsmittel enthalten. Die geringe Streukraft vieler Oligonucleotide, die im nächsten Abschnitt besprochen wird, ist eine Folge sowohl des Lösungsmittelgehalts als auch der DNA-Fehlordnung.

Einige Kristalle sind bei Raumtemperatur nicht stabil, so daß Beugungsmessungen häufig bei 4°C mit Proben durchgeführt werden, die in Glaskapillaren eingeschmolzen wurden, um Solvensverluste zu vermeiden. Vor kurzem wurden mehrere Strukturen bei 115 K ohne Kapillare unter Nutzung einer Schnellgefrieretechnik analysiert^[75, 76]. Auch wenn diese Methode die Beugungsauflösung nicht verbessert, stabilisiert sie doch die Kristalle und ermöglicht die Datensammlung mit einem einzigen Kristall.

Die Qualität der Beugungsdaten und die erreichbare Auflösung werden durch die Größe und vor allem durch die Güte der vermessenen Kristalle bestimmt. Die Z-Hexamere bilden die perfektesten Kristalle, die häufig mit einer Auflösung von 1 Å oder besser beugen. Kürzere wie längere Sequenzen der Z-Form neigen zu Fehlordnungen. Im allgemeinen beugen die rechtshändigen Desoxyoligonucleotid-Kristalle mit einer Auflösung zwischen 1.7 und 2.5 Å, nur beim B-DNA-Decamer^[60] beträgt die Auflösung 1.3 Å. Die Verwendung von Synchrotronstrahlung kann zu einer besseren effektiven Auflösung führen^[7] und wird in Zukunft sehr wahrscheinlich häufiger genutzt werden, um Strukturösungen durch anomale Beugungsmethoden zu unterstützen^[77, 152]. Eine typische Datensammlung an einem Diffraktometer umfaßt dabei etwa 2500 Reflexe mit einer Auflösung von ungefähr 2.0 Å, die zur Strukturlösung genutzt werden. Die Verfügbarkeit von Flächendetektoren, die neuerdings zur gleichzeitigen Aufnahme einer großen Zahl von Reflexen entworfen wurden, revolutioniert diesen Aspekt dieses Gebietes^[78, 79].

3.2. Strukturlösung und -verfeinerung

Eine Vielzahl experimenteller und Computertechniken kann angewendet werden, um Oligonucleotidstrukturen aufzuklären: molekularer Ersatz, mehrfacher isomorpher Ersatz und anomale Beugung (siehe *Blundell* und *Johnson*^[80]). Ziel ist es, das richtige Modell für das grundlegende Strukturmotiv, die asymmetrische Einheit, zu finden. In vielen Fällen besteht dieses Motiv aus zwei unabhängigen Oligonucleotidsträngen, die sich umeinander winden und so einen Doppelstrang bilden. Weniger häufig besteht das Motiv aus einem einzigen Strang, und die Doppelhelix wird durch eine zweizählige Symmetrieoperation gebildet. Manchmal enthält die asymmetrische Einheit vier oder mehr Stränge, was die Strukturaufklärung erschweren kann^[152].

Die meisten der bis heute erfolgreich durchgeführten Strukturaufklärungen verwendeten die Methode des molekularen Ersatzes mit einem Modell, das auf Koordination aus Beugungsuntersuchungen an Fasern oder auf Koordination einer verwandten Kristallstruktur beruht^[4, 81]. Eine bemerkenswerte Ausnahme ist die Anwendung der Methode maximaler Entropie auf ein 15mer mit zusätzlicher Base^[70].

Sobald das Phasenproblem gelöst ist, beginnt der Verfeinerungsprozeß. Er ist darauf ausgerichtet, die Unterschiede zwischen den im Rahmen des Modells berechneten und den experimentell bei Intensitätsmessungen bestimmten Werten zu verringern. Wenn ein Kristall nicht bis zu atomarer Auflö-

sung beugt, ist die Zahl der Meßwerte klein gegen die Zahl der Variablen. In solchen Fällen werden constrained/restrained-Methoden (eingeschränkte Parametervariation) zur Verfeinerung angewendet und gewisse Variablen wie Bindungslängen und -winkel konstant gehalten, so daß die experimentellen Daten möglichst effizient genutzt werden können.

Lösungsmittelmoleküle sind ein wesentlicher Teil der Oligonucleotidkristallstrukturen. Wenn es die Auflösung erlaubt, kann die Verfeinerung die Lokalisierung der Lösungsmittelmoleküle durch Auswerten verschiedener Elektronendichtekarten – häufig mit Hilfe von Computergraphiken – einschließen. Normalerweise findet man 3–8 Lösungsmittelmoleküle pro Nucleotid. Gegenionen konnten bisher nur in den Z-DNA-Hexameren und den B-DNA-Decameren sowie in einigen DNA-Wirkstoff-Komplexen eindeutig nachgewiesen werden. Es ist allgemein üblich, die Lösungsmittelpositionen dem Sauerstoffatom des Wassers zuzuordnen. Die Verfeinerung ist abgeschlossen, wenn eine optimale Übereinstimmung zwischen der Modellstruktur und den Elektronendichteverteilungen erzielt ist, wenn keine weiteren Lösungsmittelmoleküle lokalisiert werden können und wenn keine weitere Verbesserung des kristallographischen *R*-Faktors möglich ist. Dieser Faktor ist definiert als $R = \sum (|F_o| - |F_c|) / \sum |F_o|$ mit F_o als beobachteter und F_c als berechneter Strukturamplitude. Bei gut aufgelösten Oligonucleotidstrukturen sind Verfeinerungen bis zu einem *R*-Faktor von 0.12, bei schlecht aufgelösten bis zu einem von 0.25 möglich.

Die effektive Auflösung definiert die Grenze, bis zu der Strukturdetails noch genau bestimmt werden können. Die Koordinaten einzelner Atome können nur dann verlässlich bestimmt werden, wenn die Auflösung nahe an 1 Å liegt. Bei den meisten Oligonucleotidstrukturen beschränkt die Auflösung die Bestimmung auf Strukturmerkmale wie Zuckerkonformation, Orientierung der Basen und Haupttorsionswinkel. Die Informationen über die Positionen der Lösungsmittelmoleküle insbesondere der ersten Hydratationssphäre sind so verlässlich, daß gewisse Verallgemeinerungen über die Rolle der Hydratation und ihre Beziehung zur globalen Konformation erlaubt sind.

Eine Variante der oben beschriebenen Techniken wurde zur Analyse von Strukturen mit Basenfehlpaaren genutzt. Dabei wurden die Beiträge der Atome der Basenfehlpaare zunächst in den Berechnungen außer acht gelassen. In der mittleren Phase der Verfeinerung wurden die Positionen der Atome der Basenfehlpaare aus Elektronendichteverteilungen ermittelt und ihre Beiträge in die Berechnung aufgenommen. Auf diese Weise wird die Analyse nicht durch ein vorgefaßtes Modell der Basenfehlpaare verfälscht. Ähnliche Techniken wurden für die Analyse mehrerer anderer Strukturen genutzt, z. B. für die einiger Oligonucleotid-Wirkstoff-Komplexe, und führten zur Entdeckung neuer Merkmale wie der Hoogsteen-Basenpaarung in DNA-Fragmenten, die mit difunktionellen Intercalatoren einen Komplex bildeten^[82, 83].

4. Sequenzspezifische Modellstrukturen

4.1. Alternierende B-DNA

Der Zusammenhang zwischen Sequenz und Veränderung der lokalen Helixparameter wurde ausführlich von *Calladine*

und Drew^[84–86] sowie von *Shakke* und *Rabinovich*^[87] analysiert, und versuchsweise wurden einige „Regeln“ vorgeschlagen. Diese Regeln, die die Veränderungen der Helixdrehung und des Rollwinkels mit sterischer Hinderung zwischen Basenpaaren in Beziehung setzen, haben sich als zu einfach herausgestellt und wurden durch die Ergebnisse späterer Röntgenstrukturanalysen widerlegt.

Eine interessante Verallgemeinerung hat sich jedoch ergeben: es besteht ein regelmäßiger Wechsel in den lokalen Helixparametern von d(AT)-Bereichen. Nachdem solche alternierenden Folgen zunächst am Tetramer d(pTATA) festgestellt wurden^[1, 2, 89], kam es zum Vorschlag einer alternierenden B-DNA-Helix für Poly[d(AT)]. In diesem Modell ist die Helixdrehung beim ApT-Schritt kleiner als beim TpA-Schritt. Ein ähnlicher Wechsel wurde für die zentrale AT-Region von d(CGCAATATGCG) berichtet^[29]. Eine alternierende Rückgrat-Konformation wurde auch im Phosphorothioatanalogen von d(GCGCGC)^[24] sowie, bei genauer Auswertung, in den CGCG-Segmenten des Dodecamers d(CGCGAATTCGCG) nachgewiesen. Die Ergebnisse von DNase-footprinting-Experimenten (Protektionsexperimenten) stimmen gut mit der Beobachtung überein, daß diese Nuclease leichter zwischen ApT und GpC (kleine Drehung) als zwischen TpA und CpG (große Drehung) schneidet. Dies legt nahe, daß Modulationen der Rückgratkonformation als Erkennungssignale dienen können und die Wechselwirkungen mit Proteinen steuern.

4.2. Homopolymere d(A)-d(T)-Sequenzen

Die besonderen Merkmale von d(A)-d(T)-Sequenzen wurden mit kristallographischen Methoden zuerst von *Nelson et al.*^[28] am Doppelstrang aus d(CGCAAAAAAGCG) und d(CGCTTTTTTGCG) nachgewiesen. Obwohl diese Kristalle isomorph mit dem Dickerson-Drew-Dodecamer sind, zeigt die Doppelhelix einige interessante Strukturunterschiede. Die A · T-Basenpaare der zentralen Region haben ungewöhnlich große Propeller-Verdrillungen (ungefähr 25°), die die Bildung eines Netzwerkes aus Drei-Zentren-Wasserstoff-

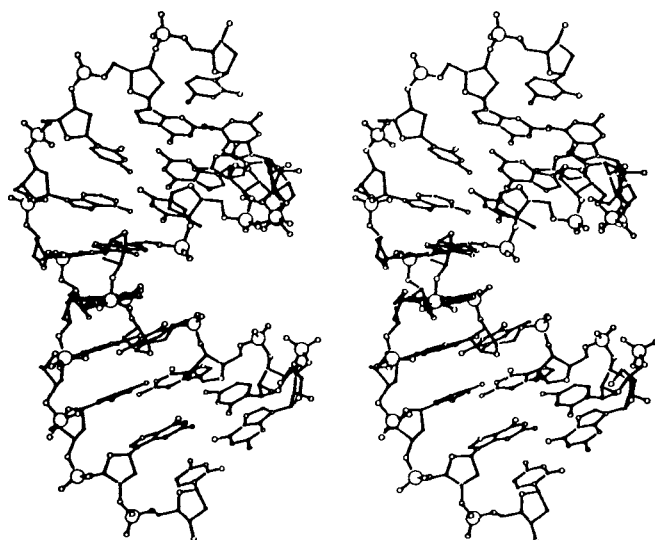


Abb. 4. Stereobild der Struktur des von Wang et al. untersuchten RNA-DNA-Hybrid-Decamers r(CGCG)d(TATAGCG) [22].

brücken in der großen Furche zwischen den N6-Atomen der Adenineinheiten und den O4-Atomen von zwei Thymineinheiten ermöglichen, wobei ein Thymin der Watson-Crick-Partner und das andere die Base in der 3'-Richtung des gegenüberliegenden Stranges ist. Ähnliche Wasserstoffbrücken wurden bei d(CGCAATTTGCG) nachgewiesen, und zwar sowohl, wenn es bei der Kristallisation mit sich selbst komplexiert, als auch im Komplex mit Distamycin^[27]. Derartige Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen in Verbindung mit einer ausgeprägten Purin-Purin-Überlappung verleihen den homopolymeren Sequenzen eine gewisse Starrheit. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, daß lange Adeninfolgen in den stärker gedrehten Chromosomensequenzen nicht anzutreffen sind, wohl aber am Ende der nucleosomalen, weniger verknäulten DNA^[90]. Die Art der Krümmung und die Starrheit der DNA sind äußerst kontrovers diskutierte Themen, und eine Vielzahl von Theorien wurde vorgeschlagen, um die zahlreichen experimentellen Beobachtungen zu erklären. Einen neueren Überblick geben *Calladine et al.*^[91].

4.3. Ribonucleotid-Doppelhelices

Strukturuntersuchungen an Transfer-RNA wurden bereits ausführlich beschrieben (siehe *Saenger*^[92]); deshalb beschränken wir uns auf Doppelstrang-RNA. Es gibt lediglich zwei Beispiele für gut charakterisierte Kristalle, die RNA-Doppelhelices enthalten: das Hybrid-Decamer r(GCG)d(TATACGC), das von *Wang et al.*^[22] untersucht

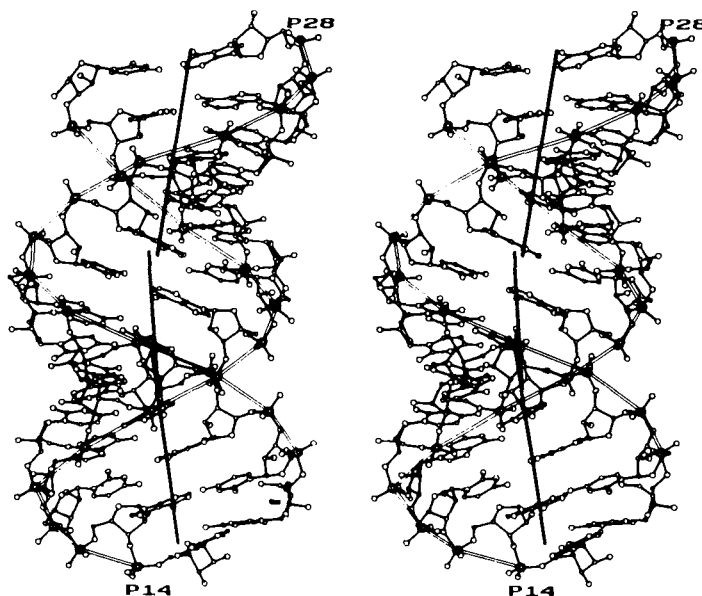


Abb. 5. Stereobild der Struktur von r(UUAUAUAUAUAUA), untersucht von Dock-Bregeon et al. [23]. Die Phosphoratome 14 und 28 sind markiert. Diese Struktur kann man so auffassen, als ob sie aus drei Segmenten bestünde; deren drei optimalen Helixachsen sind eingezeichnet. Man beachte die A-Form und, wie sich die Basen um die Helixachsen winden. Wir danken Professor D. Moras für diese Abbildung.

wurde, und das 14mer r(UUAUAUAUAUAUAUA)^[23, 88]. Stereobilder dieser Strukturen zeigen die Abbildungen 4 bzw. 5. In beiden Fällen ist die große Furche schmal und tief, die kleine Furche breit und flach. RNAs nehmen Konformationen an, die denen der A-DNAs ähnlich sind. Der Hy-

droxysubstituent am RNA-Furanosering trägt dazu bei, die Zuckerkonformation auf C3'-endo zu beschränken.

Die Decamer-Struktur (Abb. 4) besteht aus zwei Hybrid-DNA-RNA-Segmenten auf jeder Seite der Doppelstrang-DNA. Alle drei Abschnitte haben eine ähnliche Konformation wie das auf Faseruntersuchungen beruhende Modell der elffach Doppelstrang-RNA. Wassermoleküle bilden eine Brücke zwischen der Ribose-O2'-Hydroxygruppe und dem Cytosin-O2 auf der Seite des Basenpaares, auf der sich die kleine Furche befindet, und tragen eventuell zu der besonderen Ribosekonformation bei.

Die 14mer-Doppelstrang-RNA (Abb. 5) erlaubt die eingehendste Analyse einer RNA-Helix. Man kann diese Struktur als drei Segmente behandeln, die durch Knicke im Zucker-Phosphat-Rückgrat getrennt sind. Die Knicke beeinflussen die Größe der großen Furche und führen zu einer Struktur, die sich stark von denen der Fasermodelle unterscheidet. Die O2'-Hydroxylgruppe ist für die Struktur von Bedeutung, sie dient aber zugleich, da sie zur kleinen Furche ausgerichtet ist, als funktionelle Gruppe, die mit Proteinen in Wechselwirkung treten kann. Der Zugang zu dieser funktionellen Gruppe wird durch die relativ offene kleine Furche in den A-DNA-Strukturen erleichtert.

5. Hydratation

DNA-Kristalle enthalten, wie bereits erwähnt, etwa 50% Lösungsmittel. Diese beträchtliche Hydratation trägt zu den Schwierigkeiten bei, wohlgeordnete Kristalle und genaue Röntgenbeugungsdaten zu erhalten. Sie ermöglicht jedoch eine experimentelle Untersuchung der Nucleinsäurehydratation und die Extrapolation der Ergebnisse von Kristallstruk-

turanalysen auf Strukturen in vivo, so wie es auch bei Proteinen üblich ist.

In DNA gibt es unterschiedliche Hydratationsmuster um das Zucker-Phosphat-Rückgrat sowie in der kleinen und der großen Furche. Eine Untersuchung von Saenger et al.^[93] über die Wasserstrukturen in zahlreichen DNA-Fragmenten führte zu dem Vorschlag, daß in Mischsequenzen-DNA die Hydratation des Rückgrats mit der Gesamtkonformation in Beziehung steht. Die typischen Rückgrathydratationsmuster von A-, B- und Z-DNA-Helices sind in den Abbildungen 6–8 dargestellt. Man erkennt, daß sowohl in A- als auch in

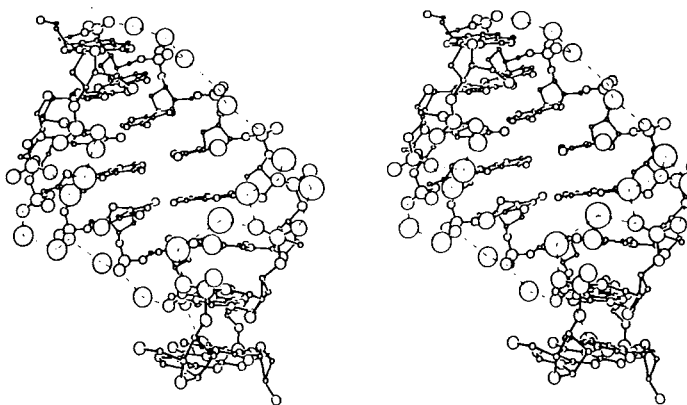


Abb. 7. Die Hydratation der Phosphatgruppen im A-DNA-Fragment d(GGBrUABrUACC). Dieses Stereobild zeigt einen Blick in die große Furche. Die größten Kugeln entsprechen Wassermolekülen, wobei Wasserstoffbrücken durch gestrichelte Linien angedeutet sind. Man beachte, daß es eine fast kontinuierliche Verbindung der Phosphatgruppen über Wassermoleküle gibt.

Z-DNA eine durchgängige Kette aus Wassermolekülen die Phosphat-Sauerstoffatome entlang des Rückgrats verbindet. Benachbarte Phosphatgruppen teilen sich die Wassermoleküle, was zu einer großen Effizienz der Hydratation führt. In der B-Form finden sich mehr Wassermoleküle um jede Phosphatgruppe und praktisch keine Wasserbrücken zwischen

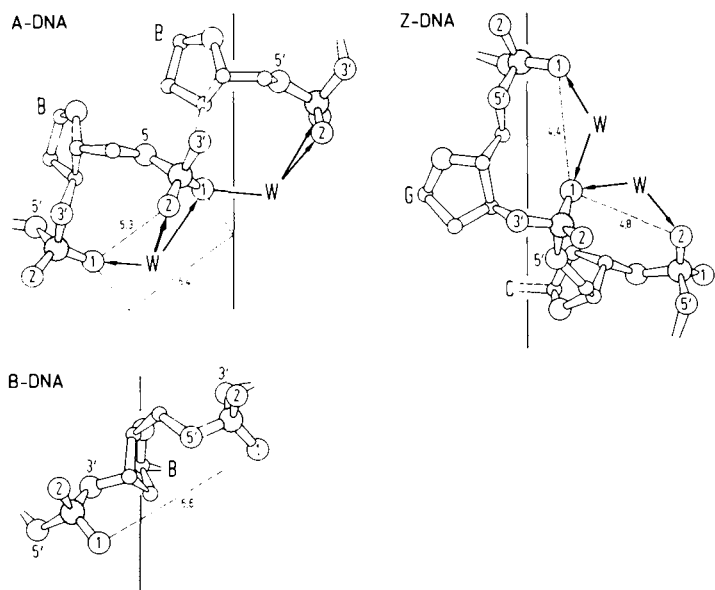


Abb. 6. Ein Vergleich von Desoxyribose-3',5'-diphosphatfragmenten in der A-Form-, B-Form- und Z-Form-DNA. Die Phosphoratompositionen sind schattiert, die Phosphat-Sauerstoffatome numeriert. Die vertikale Linie symbolisiert die Helixachse, wie sie für jedes Polymorph berechnet wurde, die gepunkteten Linien kennzeichnen die kürzesten Abstände (in Å angegeben) zwischen freien Phosphat-Sauerstoffatomen. Die Positionen der Basen werden für die rechtshändigen Formen durch B und für die Z-DNA durch G und C angezeigt. W steht für Wassermoleküle, die in der A- und Z-DNA freie Phosphat-Sauerstoffatome verbrücken können [93].

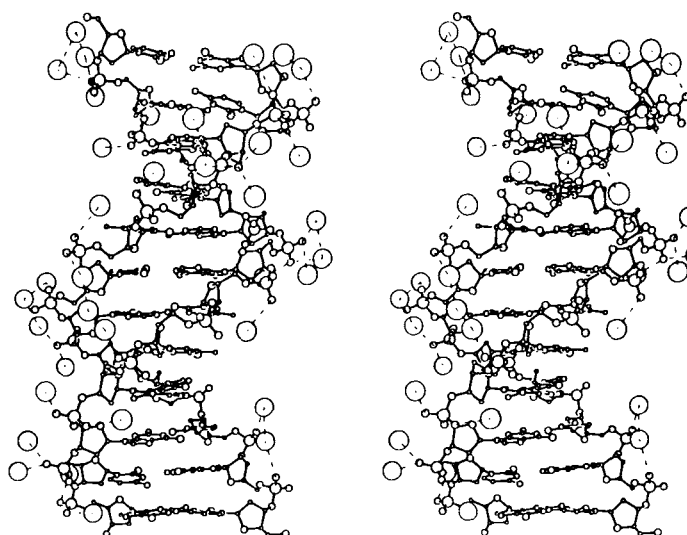


Abb. 8. Die Hydratation der Phosphatgruppen im B-DNA-Decamer d(CGCGAATTCGCG). Auch in diesem Stereobild stellen die größten Kugeln Wassermoleküle dar, und zugehörige Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte Linien angedeutet. Im Unterschied zur A-DNA sind die Phosphatgruppen hier von Clustern aus Wassermolekülen umgeben und nicht durch Wassermoleküle verbrückt [93].

benachbarten Phosphat-Sauerstoffatomen. Diese Beobachtungen lassen sich sehr einfach erklären, wenn man die O1P/O2P-O1P/O2P-Abstände in den drei Gesamtkonformationen betrachtet. In A- und Z-DNA liegen die Abstände bei etwa 5.4 bzw. 4.6 Å; sie sind also klein genug, um von einem einzigen Wassermolekül überbrückt zu werden. Im Falle der A-DNA kann das Muster der Rückgrathydratation durch örtlich begrenzte Änderungen beeinflusst werden, die mit spezifischen Sequenzen zusammenzuhängen scheinen. Bei zwei Octameren mit A-Gesamtkonformation zeigte sich an dem zentralen Pyrimidin-Purin-Schritt ein Durchbrechen des Rückgrathydratationsmusters^[11, 14]. An dieser Stelle unterscheiden sich die Strukturen sehr deutlich von der Standard-„Lehrbuch“-A-DNA-Struktur. Bei B-DNA betragen die Abstände zwischen den Phosphat-Sauerstoffatomen 6.5 Å und mehr, so daß sie nicht mehr von einem einzelnen Wassermolekül überbrückt werden können. Das gestreckte Zucker-Phosphat-Rückgrat der B-Form ist entweder die Ursache oder die direkte Folge der variableren Hydratation bei hoher Wasseraktivität.

Die Hydratation der Furchen scheint stärker von der Sequenz abzuhängen als die des Rückgrats. Dickerson et al. stellten als erste ein regelmäßiges Hydratationsmuster am zentralen AATT-Segment des Dodecamers d(CGCGAATTCGCG) fest. Eine Kette deutlich ausgerichteter Wassermoleküle ist über Wasserstoffbrücken mit den Stickstoff- und Sauerstoffatomen entlang der kleinen Furche verbunden, die in diesem Bereich sehr schmal ist^[94, 95]. Da sich die Furche an den CGCG-Enden weitet, wird die regelmäßige Anordnung der Wassermoleküle unterbrochen (Abb. 9 links). Dieses Wasserrückgrat (spine of hydration) spielt wahrscheinlich eine bedeutende Rolle bei der Stabilisierung der B-DNA-Konformation, insbesondere in dieser AT-reichen Region.

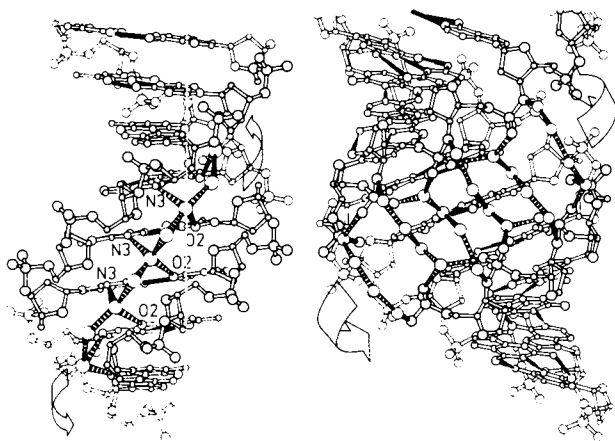


Abb. 9. Schematische Darstellungen der Hydratation der kleinen Furche – des Wasserrückgrats – im engen AATT-Abschnitt des B-DNA-Dodecamers (links) und der Hydratation der großen Furche im A-DNA-Fragment d(IoCCGG) (rechts). Unterbrochene Linien stehen für mögliche Wasserstoffbrücken zwischen Wassermolekülen, dunkle Linien für solche zwischen Atomen der DNA-Basen und Wassermolekülen. Man beachte, daß in der B-DNA die Purin-N3- und Pyrimidin-O2-Atome die hydrophilen Verknüpfungen bilden [92].

Bei A-DNA-Strukturen wurden einige sequenzspezifische Hydratationsmuster in der großen Furche identifiziert. In d(IoCCGG) finden sich Ketten aus Wassermolekülen, die über die Furche hinweg die Phosphatgruppen der Stränge

verbrücken (Abb. 9 rechts)^[13]. Das Hydratationsmuster in der großen Furche des Octamers d(GGBrUABrUACC) und in d(GGTATACC)^[17] besteht aus einer Reihe kondensierter Fünfecke, an denen Wasserstoffbrücken zwischen den Sauerstoffatomen des Wassers und den funktionellen Gruppen der Basen beteiligt sind (Abb. 10). Dieses Muster ist mit

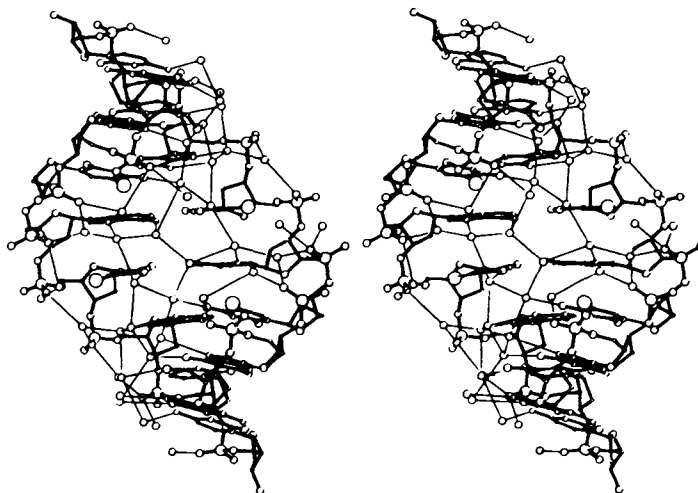


Abb. 10. Die Hydratation der großen Furche von d(GGBrUABrUACC). In diesem Stereobild sind die Wasserstoffbrücken als dünne Linien dargestellt. Man beachte die Reihe kondensierter Fünfecke, die die große Furche dieses A-DNA-Fragments füllen.

der Basensequenz verknüpft; es tritt in Octameren mit anderen Sequenzen nicht auf. Eine Darstellung der kondensierten Fünfecke und der Rolle des Wassers bei der Stabilisierung von Nicht-Watson-Crick-Basenpaaren zeigen die Abbildungen 13 und 14 (Abschnitt 7.1). Weitere Einzelheiten zur Hydratation finden sich bei Saenger^[92, 96] und Westhof^[97, 98].

6. Das Konformationskontinuum der rechtshändigen DNA

Das archetypische Konzept, daß die verschiedenen globalen Konformationen der rechtshändigen DNA diskontinuierliche Zustände darstellen, die nur in sehr unterschiedlicher Umgebung stabil sind, hat sich deutlich gewandelt. Einkristallstudien haben gezeigt, daß die globalen Merkmale einzelner Sequenzen vielfältiger sind, als dies Beugungsstudien an Fasern nahelegen. Ein Beispiel hierfür ist Tabelle 10 im Anhang, die zeigt, daß in Helices vom A-Typ die Weite der kleinen Furche zwischen 10.2 und 8.7 Å und die der großen Furche zwischen 10.1 und 3.2 Å schwankt. Extrapolation von den Einkristallstudien an kurzen Fragmenten wie d(GGGGCCCC) auf Poly(dG) · Poly(dC)-Modelle führte zu der Vermutung, daß das Homopolymer die bevorzugte Stapelung der Purineinheiten nutzt und eine Doppelhelixform, die der A-Form ähnlich ist^[9], sogar in Umgebungen annimmt, die die klassische B-Form erwarten lassen könnten. Die bevorzugte Stapelung von Purineinheiten wurde auch im Kristall des Nonamers d(GGATGGGAG) und seines Komplementärstrangs d(CTCCCATCC) nachgewiesen^[19]. Dieses Oligonucleotid, das der wesentlichen DNA-Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors TFIIIA von

Xenopus entspricht, nimmt eine Konformation des A-Typs an. Hierbei ist anzumerken, daß es sich bei TFIIA um ein Protein handelt, daß sowohl DNA als auch RNA binden kann.

Es stellt sich die Frage, ob diese Strukturen ein Artefakt im Kristall sind, das dadurch zustande kommt, daß Gitterkräfte die DNA-Struktur aus ihrer Gleichgewichtskonformation in Lösung bringen. Jahre hindurch war es unmöglich, die in festem Zustand und die in Lösung ermittelten Gesamtkonformationen in Einklang zu bringen. So konnten NMR- und CD-Spektren von Sequenzen, von denen bekannt war, daß sie in kristalliner Form A-Konformation annehmen, einzig als Folge der B-Form interpretiert werden^[99]. Eine bedeutende Arbeit zu diesem Themenkreis wurde von Fairall et al. veröffentlicht^[100]. In ihr werden die CD-Spektren einer Reihe von kurzen DNA-Fragmenten mit bekannter Festkörperkonformation verglichen. Dabei wurden sorgfältig ausgewählte Referenzspektren verwendet und die Konformationsänderungen in Abhängigkeit von den Lösungsbedingungen untersucht. Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß es in Lösung ein Kontinuum an sequenzabhängigen Helixkonformationen gibt. Aus den CD-Experimenten ergibt sich, daß die gesamte TFIIA-Bindungsstelle aus 54 Basenpaaren ebenso wie das kristallographisch untersuchte Nonamer-Fragment eine Konformation annimmt, die zwischen den Lehrbuchkonformationen A und B liegt. Zudem korrelierte die Untersuchung die CD-Spektren, die von dem der B-Form des Dickerson-Drew-Dodecamers bis zu dem der A-Form der Kälberthymus-DNA in 80% Ethanol reichen, erfolgreich mit den experimentell bestimmten Helixparametern wie Furchenweite, Kippwinkel der Basenpaare, Anstieg und Verschiebung.

6.1. Das gleichzeitige Auftreten von A- und B-Konformationen

Die Frage nach dem Einfluß der Umgebung auf die Stabilisierung der verschiedenen DNA-Gesamtkonformationen erhielt eine neue Dimension, als man beobachtete^[101], daß im Kristall von d(GGBrUABrUACC) Doppelhelices sowohl der A- als auch der B-Form vorliegen. Das Kristallgitter dieser Sequenz ist aus A-DNA-Doppelhelices aufgebaut, die sich helical um die sechszählige kristallographische Schraubenachse legen und einen breiten Tunnel mit einem Durchmesser von etwa 26 Å umschließen (Abb. 11). Auf Anwesenheit von DNA-Doppelhelices in diesen Kanälen deuteten diffuse Reflexe in einigen Hochintensitätssynchrotronbildern hin (Abb. 12), die an Faseraufnahmen erinnern. Die diffusen Reflexe wurden als Folge ungeordneter B-DNA-Helices gedeutet und erfolgreich durch Computersimulationen modelliert. Die Koexistenz dieser beiden DNA-Polymorphe mit gleicher Sequenz in ein und derselben Kristallstruktur bestätigt die schon lange gehegte Überzeugung, daß die beiden Konformationen energetisch sehr ähnlich sind. Sie zeigt weiterhin, daß verschiedene Gesamtkonformationen durch intramolekulare Wechselwirkungen, etwa durch Packungskräfte zwischen Basen und durch Wasserstoffbrücken zwischen Basenpaaren, ebenso stabilisiert werden können wie durch die bereits besprochenen Hydratationseffekte erster und wahrscheinlich auch zweiter Ordnung.

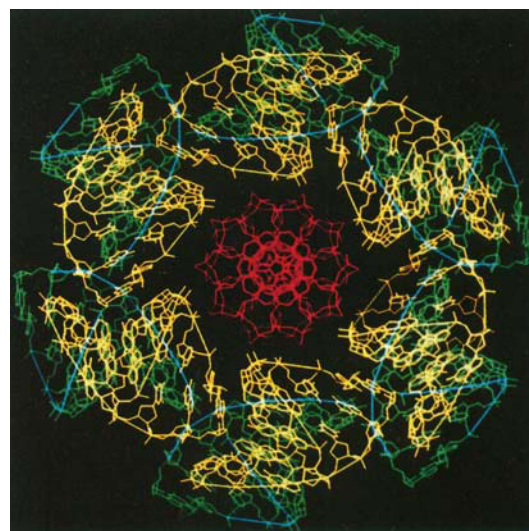


Abb. 11. Eine Darstellung der Kristallstruktur von d(GGBrUABrUACC) entlang der 6₁-Schraubenachse, die den mit B-DNA (rot) gefüllten Kanal und sechs ihn umgebende A-DNA-Helices (gelb und grün) zeigt. Es gibt keine unverträglichen intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den A- und den B-DNA-Helices.

Auf der Grundlage dieser Beobachtungen ist es vorstellbar, daß in vivo benachbarte DNA-Abschnitte unterschiedliche Gesamtkonformationen oder intermediäre Konformationen als Antwort auf die wechselseitige Anpassung der Strukturen von Protein und DNA-Basensequenz der Bindungsstelle annehmen. Denn Konformationsänderungen

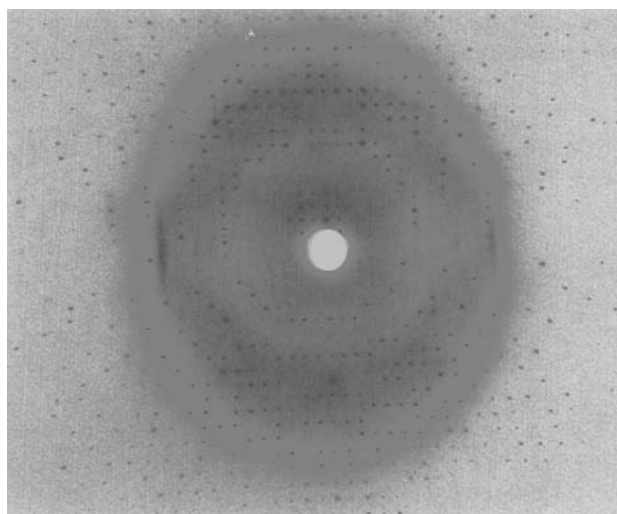


Abb. 12. Eine 2-Oszillationsphotographie eines Einkristalls von d(GGBrUABrUACC) [101]. Diskrete Bragg-Reflexe geben wohl definierte Punkte. Die Streifen sind typisch für B-DNA-Fasern. Die Verdunkelung durch diffuse Beugung an der Glaskapillare und am Lösungsmittel ist deutlich erkennbar.

scheinen hier ohne die grundlegende Änderung der Umgebung möglich, die für eine Änderung bei den Fasern nötig ist. Eine solche Situation könnte bei der bereits erwähnten TFIIA-Bindungsstelle eintreten, die eine starke Tendenz aufweist, die A-Struktur sowohl in Lösung als auch im Kristall zu bilden. Ein weiteres Beispiel ist die Ähnlichkeit zwischen der Struktur von d(CTCTAGAG), dessen zentraler Abschnitt ein wichtiger Teil der trp-Repressorbindungsstelle

ist^[11], und der des von *Sigler et al.* untersuchten trp-Repressor/Operator-Komplexes^[102].

7. Fehler im DNA-Doppelstrang

Der als Sequenz und Struktur der DNA verschlüsselte genetische Code ist ständig den chemischen und physikalischen Einflüssen unserer Umwelt ausgesetzt. Carcinogene Stoffe, UV-Licht und ionisierende Strahlen, um nur einige Beispiele zu nennen, können Nucleinsäurestrukturen unmittelbar schädigen oder Biosynthesefehler während der Replikation und der genetischen Rekombination auslösen. Zu den Fehlern gehören Strangbrüche, fehlende oder zusätzliche Basen, chemisch veränderte Basen sowie die Bildung von Basenpaaren, die nicht komplementär im Sinne von *Watson* und *Crick* sind. Biosynthesefehler können auch ohne äußere Faktoren als zufälliges Ereignis auftreten.

Veränderungen der DNA können eine sinnvolle Anpassung im Rahmen der Evolution herbeiführen, aber mutagene Prozesse können auch, wenn sie nicht überprüft werden, außer Kontrolle geraten, die Genauigkeit der Replikation mindern und zu unannehmbar hohen Raten punktueller Mutation mit schädlichen Auswirkungen auf den jeweiligen Organismus führen. Die Natur hat ein kompliziertes und bislang kaum verstandenes Erkennungs- und Reparatursystem für Fehler in der DNA entwickelt^[103]. In den vergangenen Jahren haben Röntgenstrukturanalysen an synthetischen Desoxyoligonucleotiden, die eine Reihe von Fehlern aufwiesen, bedeutsame Strukturinformationen erbracht und so geholfen, die Natur dieser Fehler und deren Bedeutung für die Fehlererkennung und -kontrolle zu verstehen. Die unterschiedlichen „Fehler“-Untersuchungen werden im folgenden erläutert.

7.1. Basenfehlpaare

Das Einfügen von Nicht-Watson-Crick-Basenpaaren in die Doppelhelix ist der häufigste Fehler bei der Replikation. Die klassische Theorie zur Erklärung solcher Fehlkombinationen, die zunächst von *Watson* und *Crick*^[140] vorgeschlagen, anschließend von *Topal* und *Fresco*^[104, 105] erweitert wurde, postuliert die Beteiligung von seltenen tautomeren Formen der Basen. Die sich ergebenden falsch kombinierten Basenpaare sind sterisch den Watson-Crick-Basenpaaren äquivalent, und es wird als unwahrscheinlich angesehen, daß sie die Doppelhelix in einem signifikanten Ausmaß destabilisieren. Die Hypothese der seltenen Tautomere ist Thema eines kürzlich erschienenen Übersichtsartikels von *Straszewski* und *Tamm*^[106].

Die Röntgenstrukturanalyse von DNA-Fragmenten mit potentiellen Basenfehlpaaren kann keinerlei Aufschluß über das vorübergehende Auftreten von seltenen tautomeren Formen während der Replikation geben. Sie kann jedoch die Struktur einer DNA-Doppelhelix definieren, die Basenfehlpaare enthält, und Informationen über die Wasserstoffbrückenordnung zwischen nicht komplementären Basen geben sowie über die Art, wie solche Basenpaare im Doppelstrang untergebracht sind, den Einfluß benachbarter Sequenzen auf die Struktur und Stabilität von Basenfehlpaaren, die Auswirkung der Gesamtkonformation auf das Basenfehlpaar und

insbesondere über die Art und Weise, wie Basenfehlpaare von den Proteinen erkannt werden können, die die enzymatischen Reparatursysteme bilden.

Tabelle 8 im Anhang enthält Einzelheiten zu den strukturell charakterisierten Sequenzen mit Basenfehlpaaren. Die Tabellen 1–3 zeigen, daß es in jedem Fall die entsprechende Watson-Crick-Sequenz zu Vergleichszwecken gibt.

Die Purin-Pyrimidin-Basenfehlpaare G · T und A · C ergeben Wobble-Basenpaare mit Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den funktionellen Gruppen der Basen. Zur Erklärung der G · T-Basenfehlpaarung ist es nicht notwendig, auf tautomere Nebenformen zurückzugreifen. Zwei der drei funktionellen Gruppen von Guanin, die in den G · C-Paaren an Wasserstoffbrücken beteiligt sind, werden auch in G · T-Paaren genutzt. Die dritte funktionelle Gruppe, N2, bleibt frei und ragt in die kleinen Furche hinein. Thymin ist in Richtung der großen Furche versetzt, so daß es in einen Abstand zu N1 von Guanin gebracht wird, der Wasserstoffbrückenbindungen ermöglicht. Die freien funktionellen Gruppen sind durch Wasserstoffbrücken mit Lösungsmittelmolekülen verbunden. Das Solvatationsmuster des G · T-Fehlpaars ist in den analysierten Strukturen mit G · T-Paaren vom A-, B- und Z-Typ erstaunlich ähnlich. Diese Lösungsmittelmoleküle spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung bestimmter Basenfehlpaare. Die Gesamtkonformation der Doppelhelix scheint wenig Einfluß auf die Bildung von Fehlpaaren zu haben. Das G · T-Paar kann ohne große Veränderung in jede der untersuchten Helices eingebaut werden.

Beim A · C-Wobble-Fehlpaar liegt ein enger Kontakt zwischen zwei Gruppen vor, die Wasserstoffbrücken eingehen können, nämlich zwischen O2 von Cytosin und N1 von Adenin. Mit Hilfe tautomerer Nebenformen der Basen kann eine Reihe von Wasserstoffbrückenordnungen konstruiert werden. Wegen des hohen Energiebedarfs für die Tautomerisierung wurde angenommen, daß die Bildung des A · C-Fehlpaars mit größter Wahrscheinlichkeit auf der Protonierung von Adenin an N1 beruht^[65, 66]. Die Hypothese wurde später durch NMR-Untersuchungen erhärtet^[107]. Man ent-

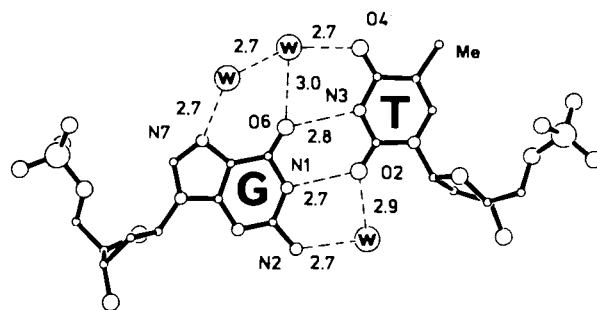


Abb. 13. Eines der G · T-Fehlpaare in d(CGCGAATTTGCG); Abstände in Å, Wasserstoffbrücken als gestrichelte Linien. Man beachte die Wassermoleküle, die die fehlgepaarten Basen in der großen und in der kleinen Furche verbrücken [62].

deckte ein als Brücke dienendes Wassermolekül, wie es im G · T-Paar beobachtet worden war, in der großen Furche des A · C-Fehlpaars. Die Abbildungen 13 und 14 zeigen diese Fehlpaare, wie sie in den Kristallstrukturanalysen bestimmt wurden; Abbildung 15 gibt die entsprechenden Strukturformeln an.

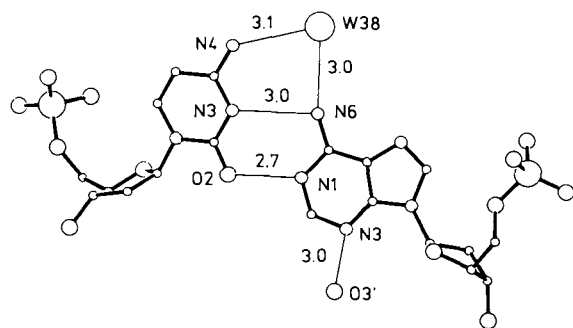


Abb. 14. Eines der C · A-Fehlpaare in d(CGCCAATTAGCG). Zum Vergleich siehe Abbildung 13. Hier gibt es nur ein verbrückendes Wassermolekül zwischen den funktionellen Gruppen, und zwar in der großen Furche [65, 66].

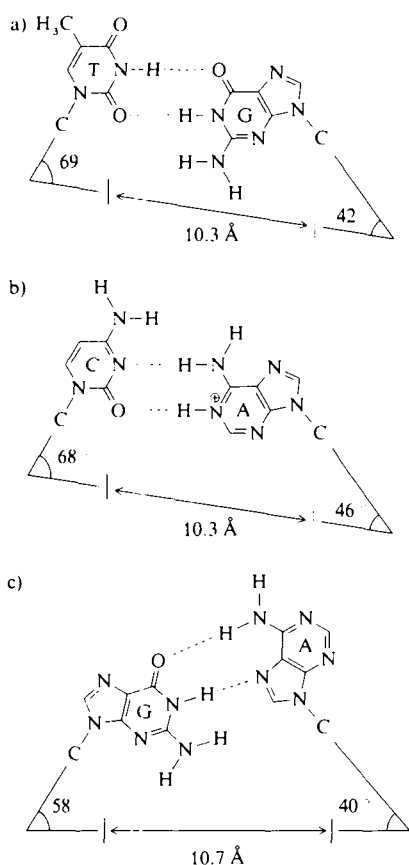


Abb. 15. Strukturformeln und geometrische Details von drei Fehlpaaren, die in der gleichen kristallographischen Umgebung, nämlich in den Positionen vier und neun der Dodecamersequenz d(CGC AAT GCG), analysiert wurden. a) T · G, b) C · A, c) G · A(syn). Es sind die C1'-C1'-Abstände und die N(Base)-C1'-C1'-Winkel angegeben. Diese betonen die Asymmetrie der Fehlpaare. (Aus [62 - 67].)

Das Purin-Purin-Paar G · A ist leichter veränderbar als die Fehlpaare G · T und A · C. Diese Feststellung ist interessant, wenn man sich vor Augen hält, was über die kritischen Stellen für Mutationen und die unterschiedlichen Reparaturmöglichkeiten bei G · A-Fehlpaaren bekannt ist. *Fersht* et

G(anti) · A(syn) in d(CGCGAATTAGCG) [63, 64]

G(syn) · A(anti) in d(CGCAAATTGGCG) [68]

G(anti) · A(anti) in d(CCAAGATTGG) [60, 61]

Schema 1. Wasserstoffbrückenanordnungen in G · A-Fehlpaaren.

al.^[108] zeigten, daß G · A das Fehlpaar ist, das am ehesten der Detektion durch die Polymerase III entgeht. Dieses Fehlpaar wurde mit drei unterschiedlichen Wasserstoffbrückenanordnungen beobachtet (Schema 1).

Abbildung 16 gibt die Strukturformeln für diese Purin-Purin-Paare an. Das Basenpaar G(anti) · A(syn) ist in Abbildung 17 dargestellt. Alle drei Arten von Basenpaaren kön-

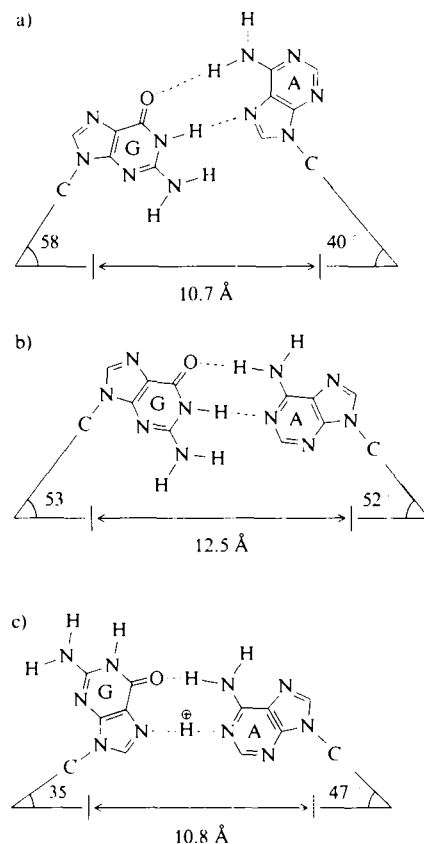


Abb. 16. Strukturformeln und geometrische Details von drei Arten der G · A-Paarung mit den zugehörigen C1'-C1'-Abständen und N(Base)-C1'-C1'-Winkeln. a) G(anti) · A(syn), b) G(anti) · A(anti), c) protoniertes G(syn) · A(anti). Die stärkste Verzerrung des Zucker-Phosphat-Rückgrats tritt im G(anti) · A(anti)-Paar auf, in dem der C1'-C1'-Abstand um fast 2 Å größer ist. (Aus [60, 61, 63, 68].)

nen in einer B-DNA-Doppelhelix untergebracht werden, wobei das G(anti) · A(anti)-Paar die stärksten Verzerrungen des Zucker-Phosphat-Rückgrats hervorruft.

Die Änderung der wechselseitigen Ausrichtung der Basen scheint sowohl mit den Nachbarsequenzen der Fehlpaare als auch mit dem pH-Wert zusammenzuhängen. In Lösung tritt das G(anti) · A(anti)-Paar bei neutralem pH-Wert auf^[109], während das G(syn) · A(anti)-Paar mit protoniertem Adeninteil bei pH-Werten zwischen 4.0 und 5.5 vorherrscht^[110]. Den Einfluß der benachbarten Sequenzen kann man bis zu einem gewissen Grad mit der Hypothese erklären, daß die Bildung dieses Purin-Purin-Fehlpaares in starkem Maße durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit benachbarten Basen beeinflusst wird^[68]. Die Bedeutung der umgebenden Sequenzen ist am deutlichsten beim G(anti) · A(anti)-Paar, das durch eine Inter-Basenpaar-Wasserstoffbrücke zwischen der N2-Aminogruppe des Guanins und O2 des Thymins im nächsthöheren Basenpaar auf dem gegenüberliegenden Strang stabilisiert wird (Abb. 18). Ohne ein Thymin in dieser

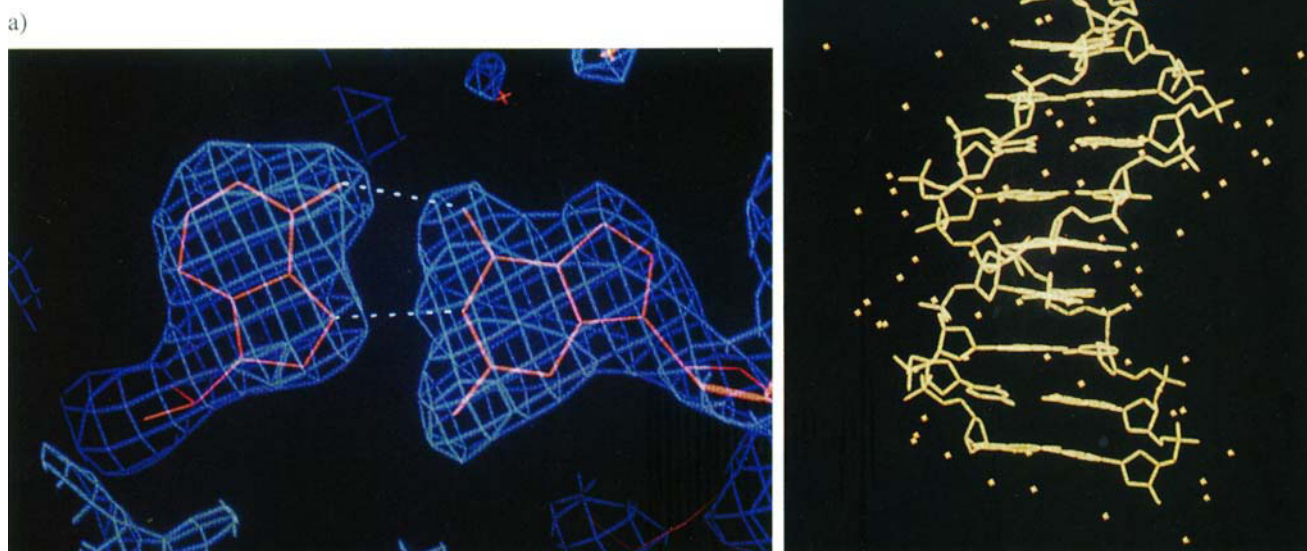


Abb. 17. Das $G(anti) \cdot A(syn)$ -Basenpaar im B-DNA-Dodecamer $d(CGCGAATTAGCG)$ [63, 64]. a) Das $G(anti) \cdot A(syn)$ -Fehlpaar in Blickrichtung senkrecht zur Ebene der Basen G(04) und A(21) zusammen mit der Elektronendichteverteilung in der Ebene der Basenpaare (berechnet aus einer $(2F_o - F_c)$ -Karte). b) Die Doppelhelix und die zugehörigen Positionen der Lösungsmittelmoleküle. Man beachte, daß es keine Verformung des Zucker-Phosphat-Rückgrats im Bereich des Fehlpaars gibt.

Position wäre die Stabilität des Fehlpaars geringer, und es käme wahrscheinlich zu einer anderen Ausrichtung.

Es gibt Hinweise darauf, daß $G \cdot A$ -Paare in vivo in unterschiedlichen Sequenzumgebungen unterschiedlich erkannt werden^[111]. Dies könnte eine Folge der höchst unterschiedlichen freien funktionellen Gruppen in den verschiedenen Anordnungen der $G \cdot A$ -Paare sein, die mit einer Polymerase oder einem Reparaturenzym wechselwirken können. Angesichts dieser Variabilität ist es vielleicht nicht mehr so überraschend, daß $G \cdot A$ das Fehlpaar ist, das am wenigsten repariert wird.

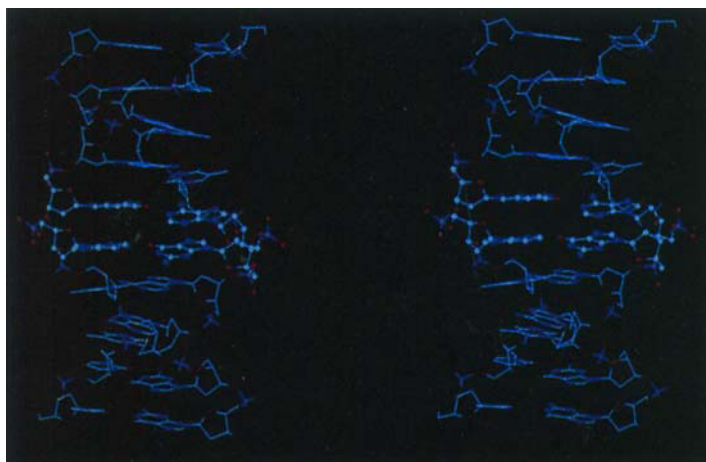


Abb. 18. Stereobild des B-DNA-Decamers $d(CCAAGATTGG)$ mit einem $G(anti) \cdot A(anti)$ -Basenpaar [60, 61]. Die Fehlpaare in der Mitte der Helix sind hervorgehoben. Man beachte die Wechselwirkungen mit den Thymineinheiten benachbarter Basenpaare im gegenüberliegenden Strang.

Die beschriebenen Studien über die Strukturen von Fehlpaaren wurden auch auf die Base Inosin ausgedehnt. Diese Base tritt am 5'-Hydroxyende einiger tRNA-Anticodons auf, wo sie mit Adenin, Cytosin oder Uracil Paare bilden kann. Obwohl diese Base keine N2-Aminogruppe aufweist, verhält sie sich sehr ähnlich wie Guanin und bildet Wobble-Paare mit Thymin^[60] und ein $I(anti) \cdot A(syn)$ -Paar mit Adenin^[67].

Ausgiebige Versuche, Fragmente mit den anderen Basenfehlpaaren, $A \cdot A$, $G \cdot G$, $C \cdot C$, $C \cdot T$, $T \cdot T$, zu kristallisieren, sind bis heute wenig erfolgreich gewesen. Die $T \cdot T$ -Paarbildung wurde nicht bei einem Doppelstrang-Basenpaar, sondern nur als intermolekulare Wechselwirkung in der Sequenz $d(CGCGCGTTTCGCGCG)$ nachgewiesen^[71]. Ein Symmetrie-verknüpftes Molekül ist so angeordnet, daß zwei Thyminreste in einer Weise in Paarstellung gebracht werden, daß es sich um ein Nicht-Watson-Crick-Paar handeln könnte. Das $T \cdot T$ -Paar ist in dieser Struktur so angeordnet, daß eine der Basen als Enoltautomer vorliegen könnte. Für zusätzliche Informationen über Fehlpaare aus NMR-Experimenten sei der Leser auf Übersichten von Patel et al.^[112] und van der Ven und Hilbers^[160] verwiesen.

7.2. Basen und Mutationszentren außerhalb der Helix

Drei Strukturen von Oligonucleotidfragmenten, die Basen außerhalb der Helix enthalten, wurden bisher veröffentlicht, darunter die der Sequenzen $d(CGCGAAATTTACGCG)$ ^[70] und $d(CGCGAATTCGCG)$ ^[69]. In beiden Fällen liegen B-DNA-Doppelhelices mit 14 bzw. 12 Basenpaaren und aus den Helices in Form einer Schlaufe herausragenden Adenin-

resten vor. Kristallpackungskräfte stellten sich als wichtiger Faktor für die Lage dieser zusätzlichen Adeninreste heraus. Doch ungeachtet der bedeutenden Rolle, die den Kristallpackungskräften zugesprochen wird, zeigen diese Untersuchungen auch, wie ein stabiler Doppelstrang trotz ungepaarter Basen möglich ist, und sie geben Hinweise auf die entscheidenden Merkmale von Sequenzen, bei denen Mutationen durch Verschiebung des Leserahmens auftreten.

Die oben genannte Sequenz d(CGCGCGTTTCGCGCG) wurde von *Chattopadhyaya et al.* untersucht^[71]. Sie nimmt eine monomere Haarnadelkonformation mit einem sechs Basenpaare langen DNA-Stamm an. Die zusätzlichen Thyminreste bilden eine Schleife, die den linkshändigen Teil der Helix bedeckt. Eine Untersuchung von *Timsit et al.*^[33] zu der nicht palindromischen, d. h. nicht von beiden Seiten gelesen identischen Sequenz d(ACCGGCGCCACA) ergab eine Struktur, bei der die Kristallgitterkontakte Wechselwirkungen zwischen Furche und Rückgrat umfassen, die für eine teilweise Öffnung der G · C-Basenpaare verantwortlich sind. Diese Struktur könnte ein brauchbares Modell für die DNA-DNA-Wechselwirkungen bei Prozessen wie der genetischen Rekombination sein. Die teilweise Öffnung der G · C-Basenpaare führt zu einer starken Propeller-Verdrillung und zu sequenzabhängigen Drei-Zentren-Wasserstoffbrücken. Es ist zu erwarten, daß dieser Abschnitt des Doppelstranges eine geringere Stabilität aufweist, was erklären könnte, warum diese Sequenz besonders anfällig für Mutationen durch Verschiebung des Leserahmens ist. Dies sollte mehr als alles andere die Bedeutung von Proteinen wie den Rekombinasen für die Gewährleistung der Verlässlichkeit des genetischen Codes verdeutlichen.

7.3. Fehlererkennung in der DNA

Die kristallographischen Studien zeigen, daß der DNA-Doppelstrang so beweglich ist, daß er Basenfehlpaare oder außerhalb der Helix liegende Basen in einem stabilen Doppelstrang aufnehmen kann, ohne daß sich die Konformation des Zucker-Phosphat-Rückgrats von jener der nativen Helix ohne Fehlpaaire unterscheidet. Wenn Verformungen auftreten, sind sie in starkem Maße örtlich begrenzt. Die Strukturuntersuchungen legen nahe, daß das Erkennen von Fehlpaaren wahrscheinlich auf der Ebene der Basen geschieht. Ein Aspekt dieses Erkennens ist die Verteilung von Donor- und Acceptorgruppen in der großen und der kleinen Furche der Helix. Das Erkennen von G · C- und A · T-Basenpaaren auf der Grundlage dieser Verteilung wurde von *Seeman et al.*^[113] vorgeschlagen und durch eine Reihe von neueren kristallographischen Untersuchungen an DNA-Protein-Komplexen bestätigt. Es ist anzunehmen, daß diese Verteilung eine Rolle beim Erkennen von Fehlpaaren spielt, da die Anordnung der funktionellen Gruppen charakteristisch für die einzelnen Fehlpaaire ist (Abb. 19).

Ein zweites Erkennungsmerkmal könnte die Asymmetrie der Glycosylwinkel zwischen Base und Zucker auf beiden Seiten eines Basenpaares sein. Die Glycosylwinkel bei Watson-Crick-Basenpaaren sind symmetrisch, sie werden bei A · G-, A · C- und G · T-Fehlpaaren immer asymmetrischer (siehe Abb. 15 und 16). Diese Asymmetrie ist korreliert mit der Wirksamkeit, mit der diese Fehlpaaire repariert werden. Ob eine solche Korrelation zwischen Struktur und biologi-

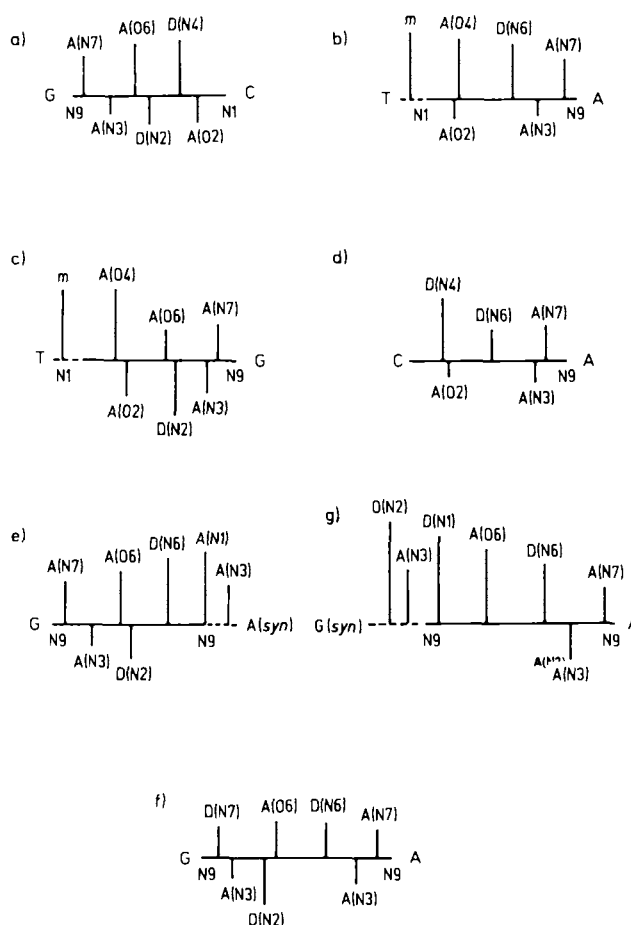


Abb. 19. Strichdarstellung (siehe auch Abb. 29) der Watson-Crick-Basenpaare G · C (a) und T · A (b) sowie der Fehlpaaire T · G (c), C · A (d), G(anti) · A(syn) (e), G(anti) · A(anti) (f) und G(syn) · A(anti) (g). Man beachte die Variationen in den Positionen der Donor- und Acceptorgruppen. (Aus [60–67].)

schen Eigenschaften bedeutsam ist oder nicht, wird deutlicher werden, sobald eine größere Zahl von Fehlpaaren in verschiedenen Sequenzumgebungen charakterisiert ist und sobald mehr Daten über die Reparaturenzyme und ihre Komplexe mit Oligonucleotidfragmenten, die Fehlpaaire enthalten, vorliegen.

8. DNA-Wirkstoff-Komplexe

Die DNA ist ein natürliches Ziel der Chemotherapie. Die Bindung von Peptiden sowie kleinen organischen und anorganischen Molekülen an die DNA kann die vielen Prozesse, an denen DNA beteiligt ist, z. B. die Transkription und Replikation, beeinflussen. Solche Wechselwirkungen können das Zellwachstum verlangsamen oder verhindern. Eine große Zahl von Veröffentlichungen beschäftigt sich mit chemischen und biochemischen Studien über Moleküle, die an DNA binden können, und viele auf diese Art wirkende Antibiotika wurden charakterisiert^[114]. Einige dieser Substanzen werden klinisch eingesetzt, die meisten aber haben toxische Nebenwirkungen.

Nachdem die Kenntnisse über die DNA-Struktur auf molekularer Ebene, die auf röntgenographischen und NMR-Studien basieren, inzwischen beachtlich sind, besteht die Aufgabe nun darin, ähnliche Informationen auch über DNA-Wirkstoff-Komplexe zu gewinnen. Man hofft, daß

solche Studien zu einem besseren Verständnis der Regeln führen, die das sequenzspezifische Binden bestimmen, und einen Einblick in die Zusammenhänge zwischen DNA-Struktur, -Sequenz und -Aktivität gewähren. Solche Informationen sind für das planvolle Entwickeln von Wirkstoffen wichtig^[115] und dürften zu besseren Antibiotika und Antikrebsmitteln führen. Dennoch sollte man sich vor einem Glauben an Strukturstudien hüten, der die Dinge zu stark vereinfacht. Den Wirkstoff gezielt am gewünschten Ort wirksam werden zu lassen, ist ein schwieriges Problem, das Untersuchungen in Lösung, biologische Experimente und ein völlig neues Verständnis für die Anforderungen des Wirkstoffdesigns erfordert.

Tabelle 4. DNA-Wirkstoff-Komplexe.

| Komplex [a] | Lit. |
|---------------------------------|------------|
| d(CGCGAATTCGCG) Cisplatin | [131] |
| d(CGCGAATTCGCG) Netropsin | [134] |
| d(CGCGATATCGCG) Netropsin | [146] |
| d(CCCAAATTTGCG) Distamycin | [27] |
| d(CGCGAATTCGCG) Berenil | [144] |
| d(CGCGAATTCGCG) DAPI | [145] |
| d(CGCGAATTCGCG) Hoechst 33258 | [126, 127] |
| d(CGCGATATCGCG) Hoechst 33258 | [129] |
| d(CGATACG) Daunomycin | [147] |
| d(CGATCG) Adriamycin | [164] |
| d(CGATCG) Daunomycin | [118, 164] |
| d(CGTPsACG) 11-Desoxydaunomycin | [161] |
| d(CGATCG)/4'-Epiadriamycin | [162] |
| d(CGATCG) Triostin A | [123] |
| d(CGATCG) Echinomycin | [82] |
| d(GCGTACG) Triostin A | [83] |
| d(BrCGBrCG) Proflavin | [148] |
| d(CGTPsACG) Nogalamycin | [121, 122] |
| d(mCGTPsAmCG) Nogalamycin | [163] |
| d(TBrUGGCCAA) Chromomycin | [152, 158] |
| d(ATGCATATGCAT) Actinomycin | [153] |
| d(CGCAAATTTGCG) Netropsin | [156] |

[a] ps = Rp-Phosphorothioat, mC = 5-Methylcytosin, BrC = 5-Bromcytosin.

Die Röntgenstrukturanalyse an DNA-Wirkstoff-Komplexen begann sehr langsam. Bis 1984 wurde nur die Struktur eines einzigen Komplexes als vorläufige Mitteilung publiziert^[116], aber nach und nach (wie Tabelle 4 zeigt) wurden die Kristallstrukturen von immer mehr Komplexen gelöst. Der Fortschritt war in den Jahren 1988 und 1989 besonders groß, als sich die Zahl der Veröffentlichungen mehr als verdoppelte. Häufig handelt es sich dabei nur um Konferenzberichte, doch die wesentlichen Ergebnisse auch dieser Untersuchungen sind im folgenden erfaßt.

8.1. Wirkstoffkategorien

Drei Wirkstoffkategorien sind kristallographisch untersucht worden: Intercalatoren, Moleküle, die in der kleinen Furche binden, und eine anorganische Verbindung, die an DNA koordiniert. Alle diese Wirkstoffe können an doppelsträngige DNA binden. Die Strukturformeln ausgewählter Antibiotika sind in Abbildung 20 wiedergegeben.

Bevor das Ergebnis der Röntgenstrukturanalysen beschrieben wird, mag es nützlich sein, die Strukturmerkmale des DNA-Doppelstranges in Erinnerung zu rufen, die wichtig für die sequenzspezifische Erkennung durch andere Moleküle, seien sie groß oder klein, sein könnten. Dazu gehören das negativ geladene Phosphatrückgrat, die Donor- und Ac-

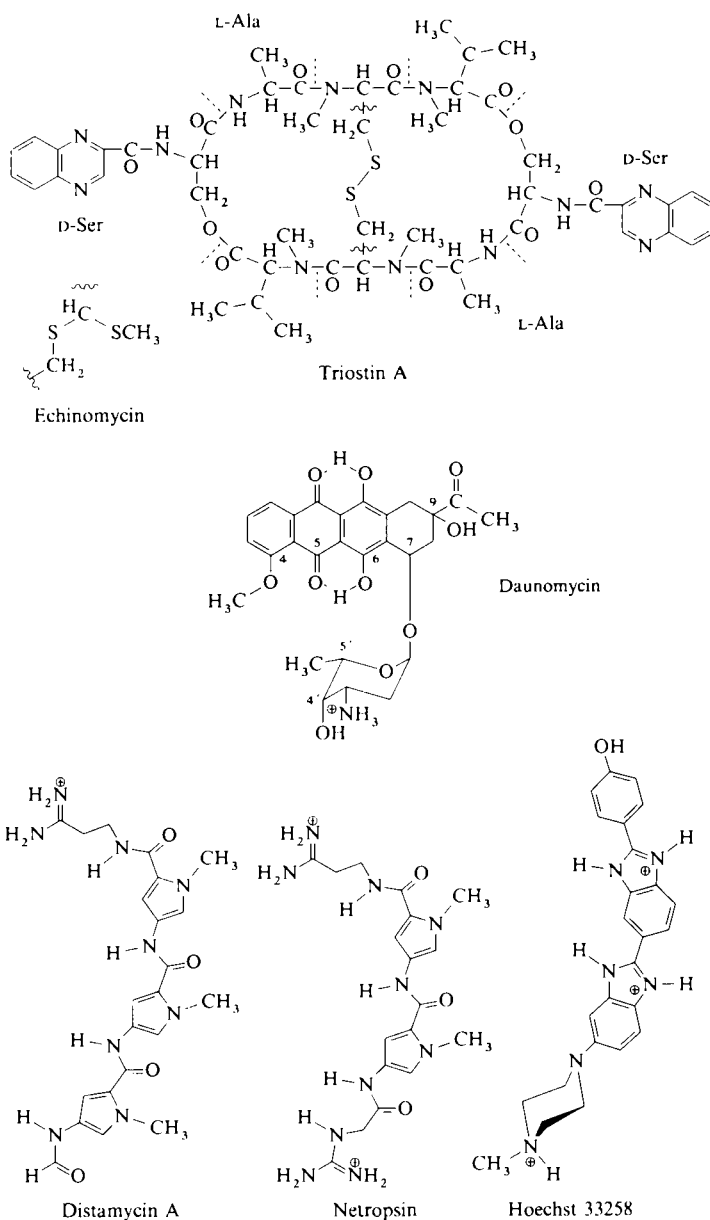


Abb. 20. Strukturformeln ausgewählter DNA-bindender Antibiotika, die in Komplexen mit Oligonucleotiden untersucht wurden. Oben: Intercalatoren; unten: Moleküle, die in der kleinen Furche binden. Letztere sind so gezeichnet, daß die linke Seite diejenige ist, die mit der kleinen Furche der Basen wechselwirkt, während die rechte Seite die vom Doppelstrang abgewandte ist. Für weitere Informationen über Wechselwirkungen zwischen Nucleinsäuren und Basen siehe [151].

ceptorguppen für Wasserstoffbrückenbindungen in der großen und der kleinen Furche sowie aromatische, hydrophobe Komponenten, die van-der-Waals- und hydrophobe Wechselwirkungen möglich machen. Als weitere bemerkenswerte Strukturmerkmale sollten berücksichtigt werden: die physikalische Form und Dimension der kleinen und der großen Furche, die bis zu einem gewissen Grad sequenzabhängig sind, das Hydrationsmuster und die enorme strukturelle Flexibilität der Doppelhelix.

8.2. Intercalatoren

Das Phänomen der Intercalation wurde zum ersten Mal von Lerman^[117] beschrieben. Sie beruht darauf, daß sich der

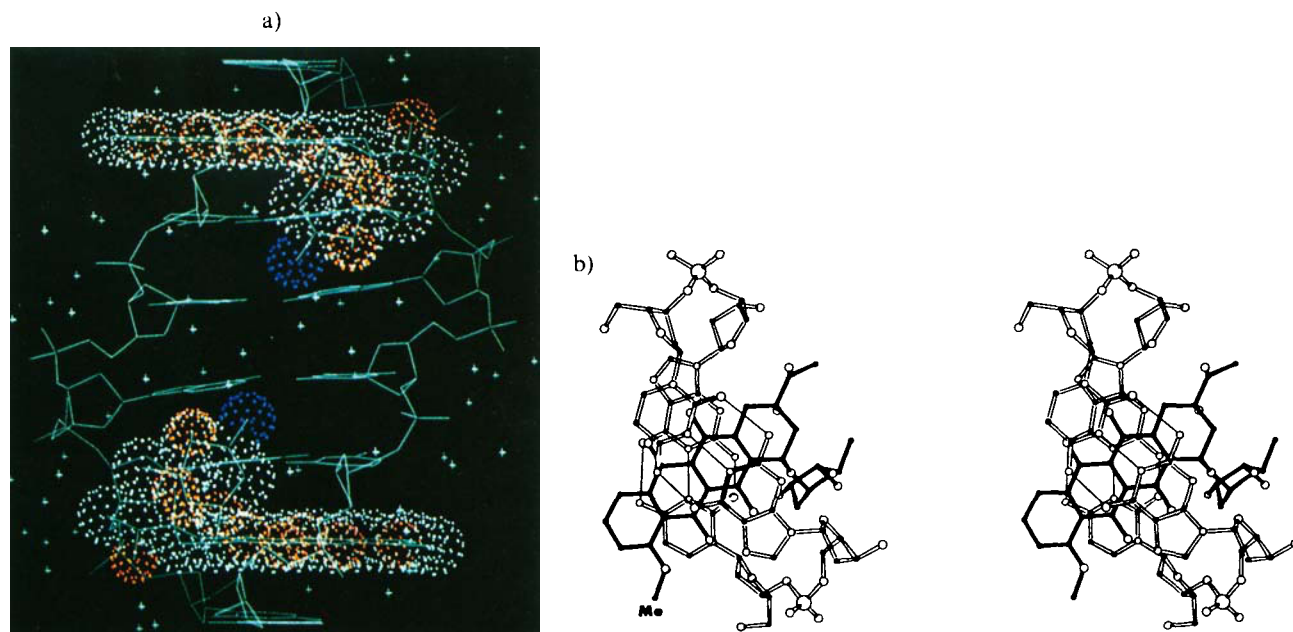


Abb. 21. Der von Moore et al. untersuchte d(CGATCG)/Daunomycin-Komplex [118]. a) Blick von der Seite der kleinen Furche auf den Komplex. Der Wirkstoff ist als Punktoberfläche gezeichnet, die 50% des van-der-Waals-Bereichs darstellt. Man beachte, daß die Daunomycin-Moleküle einen weiten Bereich der kleinen Furche bedecken. b) Stereobild mit Blick senkrecht zum Chromophor unter Einschluß der CpG-Intercalationsstelle. Der Wirkstoff ist mit dunklen Bindungen gezeichnet. Dieses Bild zeigt die „head-on“-Intercalation.

aromatische Teil eines Wirkstoffmoleküls zwischen Basenpaare schiebt. Die Intercalation vergrößert den Abstand benachbarter Basenpaare, die resultierende Helixverformung wird durch Anpassung im Zucker-Phosphat-Rückgrat und eine Entwindung des Doppelstranges ausgeglichen. Aromatische Stapelwechselwirkungen zwischen den Basen und dem intercalierenden Molekül sind die wesentlichen stabilisierenden Faktoren der gebildeten Komplexe.

Einfache Monointercalatoren wie Acridin sind kristallographisch nur in Dinucleosidphosphaten untersucht worden, die zu kurz für eine verlässliche Extrapolation auf die Intercalation in die Doppelhelix sind. Komplexere monofunktionelle Intercalatoren wie Daunomycin, Adriamycin und ihre Derivate, die einen planaren Chromophor und einen Zuckerrest aufweisen, wurden erfolgreich mit Hexanucleotiden cokrystallisiert, insbesondere mit d(CGTACG), d(CGATCG) und Varianten von d(CGTACG) mit methylierten Cytosinresten und/oder einer Phosphorthioatverknüpfung. Tabelle 4 enthält ausgewählte Veröffentlichungen zu einigen Strukturbestimmungen, Tabelle 13 (Anhang) kristallographische Details. In all diesen Strukturen intercalieren zwei Wirkstoffmoleküle, eines pro CpG-Schritt. Die Chromophore sind „head on“ inseriert, wobei die lange Achse des Aglycons im rechten Winkel zur langen Achse benachbarter Basenpaare ausgerichtet ist und der Cyclohexenring A in die große Furche eindringt. Der Aminozucker liegt in der kleinen Furche. Innerhalb dieses generellen Schemas hängen die individuellen Kontakte zwischen Wirkstoff und DNA sowohl von der Sequenz der Basen, die sich in Nachbarschaft zur Intercalationsstelle befinden, als auch von chemischen Modifikationen des intercalierenden Wirkstoffes ab.

Die bereits veröffentlichten Untersuchungen geben uns die Möglichkeit, die verschiedenen Einflußfaktoren abzuwägen, da wir, wie aus Tabelle 4 zu entnehmen ist, Komplexe zwischen verschiedenen Wirkstoffen und der gleichen Sequenz, zum Beispiel die Sequenz d(CGATCG) komplexiert

mit Daunomycin, 4'-Desoxyadriamycin und Adriamycin, sowie Komplexe eines Wirkstoffes mit verschiedenen Sequenzen, wie Daunomycin komplexiert mit d(CGTACG) und d(CGATCG), zur Hand haben. Zusätzlich existieren vom Komplex d(CGATCG)/Daunomycin sogar zwei unabhängige Analysen^[118, 119]. Es ist beruhigend, daß diese beiden Bestimmungen innerhalb des relativ kleinen experimentellen Fehlers, der für die Auflösung bei diesen Untersuchungen zu erwarten war, zur gleichen Struktur führten.

Von vielen dieser Wirkstoffe gibt es Röntgenstrukturanalysen der unkomplexierten Form, nicht aber von den in den Untersuchungen verwendeten Hexameren. Abbildung 21 zeigt eine Hexamer-Daunomycin-Struktur und Abbildung 22 das Wasserstoffbrückensystem zwischen der DNA und Daunomycin in den Komplexen mit d(CGATCG) und d(CGTACG)^[118]. Abbildung 22 zeigt deutlich die Flexibilität der Wasserstoffbrückenanordnungen in diesen Komplexen. Die Wasserstoffbrücken können direkt zwischen den funktionellen Gruppen von Wirkstoff und DNA gebildet werden, so zwischen der Hydroxygruppe des Rings A (die wesentlich für die pharmazeutische Wirkung ist) und den Atomen N2 und N3 des Guanins an der Intercalationsstelle. Eine weitere Wasserstoffbrücke besteht zwischen der NH_3^+ -Gruppe und dem O2-Atom des Cytidins. Die Umkehrung der Basensequenz in Nachbarschaft zur Intercalationsstelle wird begleitet von einer durch Wasser vermittelten Wechselwirkung statt einer direkten Wasserstoffbrückenbindung zwischen der entsprechenden Base und der NH_3^+ -Gruppe. Daunomycin geht auch durch Wassermoleküle oder Natrium-Ionen vermittelte Wechselwirkungen mit DNA in der großen Furche ein, an denen O4 und O5 des Chromophorteils beteiligt sind.

Die beiden Strukturbestimmungen zeigen deutlich, weshalb d(CpG) die Intercalationsstelle für diesen Wirkstoff ist, und legen nahe, daß nur der d(TpG)-Schritt eine ähnliche Anordnung der Wasserstoffbrücken bei Intercalation liefern

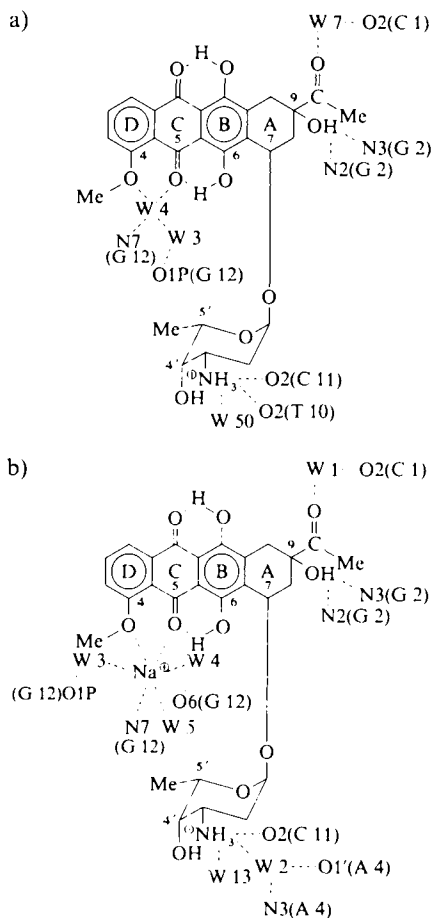


Abb. 22. Schematische Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen a) im d(CGATCG):Daunomycin-Komplex, b) im d(CGATACG):Daunomycin-Komplex [118]. In Klammern sind jeweils die zu den koordinierenden Atomen gehörenden Nucleobasen angegeben.

könnte^[118]. Ein derartiger Schritt wurde von *Chaires et al.*^[120] als mögliche Bindungsstelle identifiziert und von *Kenard* kristallographisch charakterisiert. Zusätzlich zu den Wasserstoffbrücken und den Stapelwechselwirkungen an der Intercalationsstelle stabilisiert den Komplex eine Reihe von van-der-Waals-Kontakten unter 3,4 Å. Diese Kontakte sind im d(CGATCG)-Komplex zahlreicher als im d(CGATACG)-Komplex und gleichen möglicherweise aus, daß die durch Wassermoleküle vermittelten Wasserstoffbrückenwechselwirkungen schwächer sind als der direkte NH_3^+ -Kontakt im AT-Komplex. Vorhersagen über die Bedeutung elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen und positiv geladenen Zuckersubstituenten wurden durch die Ergebnisse der Kristallstrukturanalyse nicht gestützt.

Zwei weitere Aspekte dieser Hochauflösungsuntersuchungen sind erwähnenswert: Änderungen der Wirkstoffstruktur und die Verformung der DNA-Doppelhelix. Daunomycin und ähnliche Moleküle bestehen aus einem starren aromatischen System und einem beweglichen Zuckerteil. Der Vergleich der Kristallstrukturen von freien und komplexierten Wirkstoffmolekülen zeigt, daß Veränderungen in den Strukturen fast ausschließlich im Zuckerteil vorkommen. Der Vergleich der beiden Hexamer-Daunomycin-Komplexe ergibt nur sehr geringe strukturelle Unterschiede, die wiederum nur im Zuckerteil auftreten. Die Verformung der DNA kann nur indirekt abgeschätzt werden, da die Strukturen der nicht

komplexierten Hexamere bisher noch unbekannt sind. Die Doppelhelix ist deutlich asymmetrisch verformt, und es ist möglich, den Gesamtentwindungswinkel abzuschätzen; er beträgt ungefähr 8° pro Daunomycin-Molekül. Bisher kann die Wirkung unterschiedlicher Wirkstoffmoleküle, die an das gleiche Oligomer gebunden sind, noch nicht genau abgeschätzt werden, da nur vorläufige Berichte über die anderen Strukturen vorliegen.

Kürzlich wurde über einen Komplex zwischen d(CGTPsACG) und dem Monointercalator Nogalamycin berichtet^[121, 122]. In diesem Wirkstoff sind zwei Zuckerreste an den Aglyconchromophor gebunden, wobei der Nogalose-substituent in der kleinen Furche und die Aminoglucose in der großen Furche komplexiert. Genau wie in der Daunomycin-Familie gibt es zahlreiche hydrophobe Wechselwirkungen, die den Komplex stabilisieren. Eine genaue Betrachtung der Aglyconringe zeigt, daß bei Nogalamycin der Wirkstoff stärker in Richtung der kleinen Furche des Doppelstranges ausgerichtet ist als bei Daunomycin. Das könnte eventuell damit erklärt werden, daß ein Abschnitt des Nogalamycins in der großen Furche untergebracht werden muß. Die Verschiebung verstärkt so die hydrophoben Wechselwirkungen auf dieser Seite des Moleküls, und der bewegliche Zuckerrest auf der Seite der kleinen Furche ist wiederum in der Lage sich anzupassen, um die Wechselwirkungen mit der DNA zu maximieren.

Die grundlegenden Strukturmerkmale der oben behandelten DNA-Wirkstoff-Komplexe werden durch Untersuchungen an Komplexen mit den difunktionellen Intercalatoren Triostin A und Echinomycin (siehe Abb. 20) erhärtet und erweitert^[83, 123, 124]. Diese Moleküle enthalten zwei planare Chinoxalingruppen, die durch ein recht starres cyclisches Depsipeptidsystem getrennt sind. Die beiden Chromophore sind (mit Hilfe von D-Serineinheiten) optimal ausgerichtet, um zu intercalieren und zwei benachbarte Basenpaare auf der Seite der kleinen Furche der B-DNA-Helix zu verklammern. Zwei Ansichten eines Octamer-Di-intercalator-Komplexes sind in Abbildung 23 dargestellt. In diesem Komplex

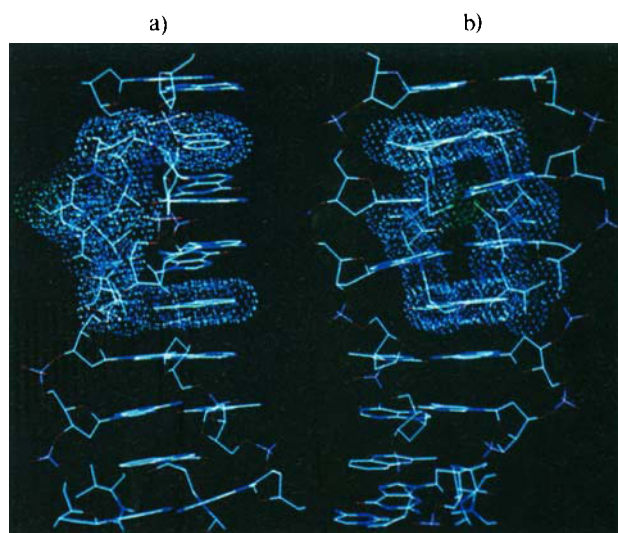


Abb. 23. Blick auf den d(GCGTACGC') Triostin-Komplex, der von *Quigley et al.* charakterisiert wurde [83]. Der hohe Grad an Verformung der DNA führt zu einem leiterartigen Doppelstrang. a) Seitenansicht des Wirkstoffs, die die doppelte Intercalation verdeutlicht. b) Ansicht von der Seite der großen Furche der DNA. In beiden Fällen ist der Wirkstoff als Punktoberfläche gezeichnet, die 50% des van-der-Waals-Bereichs darstellt.

ist die Entwindung der Doppelhelix sehr viel stärker als in den Komplexen mit monofunktionellen Intercalatoren. Die DNA gleicht hier viel eher einer Leiter als einer Doppelhelix. Wie bei den monofunktionalen Intercalatoren gibt es bestimmte Wasserstoffbrücken zwischen den funktionellen Gruppen des Wirkstoffs, den Alanin-Amidgruppen und den Nucleotidbasen (Guaninen) an der Intercalationsstelle, die für die Spezifität des Wirkstoffs entscheidend sind. Das Erstaunlichste an diesen Strukturen, das zudem in den vielen theoretischen Untersuchungen über bifunktionelle Intercalation nicht vorhergesagt wurde, ist der Bruch der Watson-Crick-Wasserstoffbrücken in den Basenpaaren, die dem intercalierenden Chinoxalinring benachbart sind. Das zentrale A · T-Basenpaar und die G · C-Paare an jedem Ende haben nun Hoogsteen-Geometrie^[125]. Diese Paarung tritt dann auf, wenn die Purine statt der normalen *anti*-Ausrichtung eine *syn*-Ausrichtung um die glycosidische Bindung annehmen. Die veränderte Basenpaarung ermöglicht einen viel engeren DNA-Wirkstoff-Kontakt und führt zu starken van-der-Waals-Wechselwirkungen. Solche Wechselwirkungen scheinen die wesentlichen Faktoren bei der Stabilisierung dieser DNA-Wirkstoff-Komplexe zu sein.

8.3. Moleküle, die in der kleinen Furche binden

Es gibt eine Reihe von Veröffentlichungen über Strukturuntersuchungen an Molekülen, die in der kleinen Furche binden, insbesondere über Distamycin, Netropsin, Hoechst 33258 (siehe Abb. 20), DAP1 (4',6-Diamidin-2-phenylindol) und kürzlich auch über Berenil, jeweils im Komplex mit dem Dickerson-Drew-Dodecamer d(CGCGAATTCGCG) oder einer seiner Varianten. Die Abbildungen 24 und 25 zeigen,

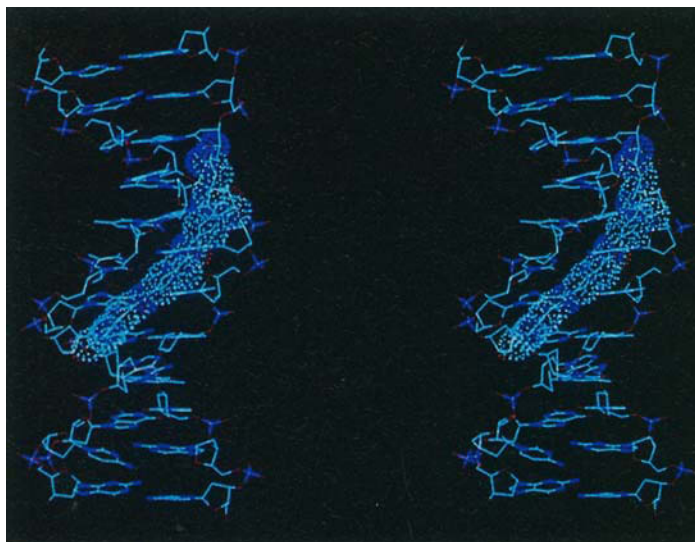


Abb. 24. Stereobild der Struktur des d(CGCAAATTTGCG)/Distamycin-Komplexes [27]. Die B-DNA-Gestalt des Oligonucleotids ist unverändert, und der Wirkstoff, der in die kleine Furche paßt, ist als Punktoberfläche gezeichnet, die 50% des van-der-Waals-Bereichs darstellt.

wie diese Wirkstoffe mit DNA wechselwirken. Quellenangaben und kristallographische Daten sind Tabelle 13 im Anhang zu entnehmen. Anders als bei den im vorigen Abschnitt vorgestellten Komplexen wurden die Strukturbestimmungen

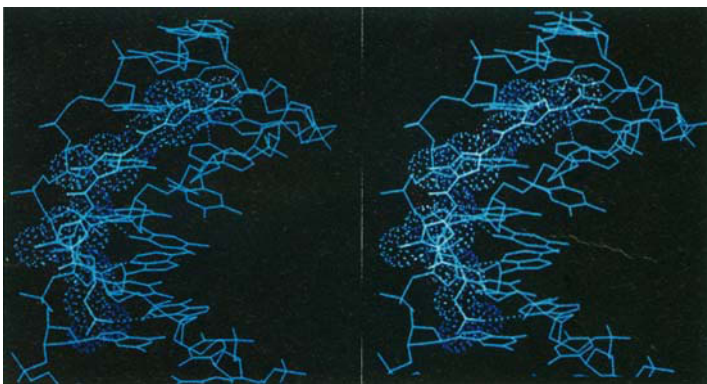


Abb. 25. Eine „Nahaufnahme“ der d(CGCAAATTTGCG)-Distamycin-Wechselwirkungen. Die Wasserstoffbrücken zwischen dem Wirkstoff und der DNA sind durch gestrichelte Linien symbolisiert.

bei einer geringeren Auflösung (2,2 und 2,4 Å) durchgeführt, so daß bei der Wertung von Einzelheiten und bei Schlußfolgerungen Vorsicht angebracht ist. Im Falle des Komplexes aus d(CGCGAATTCGCG) und Hoechst 33258 führten zwei unabhängig durchgeführte Strukturanalysen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Eine Analyse^[126] ergab, daß der Wirkstoff an die vier zentralen AATT-Basenpaare bindet, während aus der anderen Analyse^[127] eine asymmetrische Bindung an die ATTC-Region folgte. In NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde lediglich die symmetrische Bindung an AATT beobachtet^[128].

Es ist interessant festzustellen, daß der gleiche Wirkstoff, wenn er mit dem modifizierten DNA-Dodecamer d(CGCGATATCGCG) komplexiert wird, mit umgekehrter Orientierung bindet und die GATAT-Region abdeckt^[129]. Dieser Befund widerspricht auch früheren Ergebnissen, nach denen die Moleküle, die in der kleinen Furche binden, wenig Einfluß auf die DNA-Struktur haben und lediglich das Wasserrückgrat in der kleinen Furche verschieben. Im d(CGCGATATCGCG)-Komplex wird die Helixdrehung zwischen den ApT- und den TpA-Schritten gegenüber der umgekehrt, die im Abschnitt über alternierende DNA beschrieben wurde. Zusätzlich wird ein Thyminrest gedreht, um die Bildung von Wasserstoffbrücken mit dem Wirkstoff zu erleichtern.

Bei einigen Wirkstoffen, die in der Furche binden, treten überraschend große Konformationsänderungen auf. Dazu zählen Änderungen der Diederwinkel zwischen den vier starren Einheiten des Hoechst-Wirkstoffes. Es ist möglich, daß in einigen Komplexen der Wirkstoff nur die geordnete Wasserstruktur in der engen kleinen Furche passiv ersetzt, während in anderen Fällen diese Furche kein Merkmal der nativen gelösten Sequenz ist, sondern durch aktive Wechselwirkungen mit dem geeigneten Wirkstoff hervorgerufen wird.

8.4. Cisplatin

Die zufällige Entdeckung, daß *cis*-Diammindichloroplatin(II) mit DNA in Wechselwirkung tritt^[130], hat einen der in der Medizin erfolgreichsten Wirkstoffe zur Bekämpfung von Krebs hervorgebracht, der jedoch schwerwiegende Nebenwirkungen hat. Das Platin koordiniert an Purine, insbeson-

dere an benachbarte Guanine: Tränkeexperimente zur Anlagerung von Schwermetallen an d(CGCGAATTCGCG) ergaben Hinweise darauf, daß das Platinatom von den N7-Atomen der Guaninmoleküle komplexiert wird^[131]. Untersuchungen zur Wirkstoff-pGpG-Wechselwirkung haben gezeigt, daß dieser Wirkstoff im DNA-Doppelstrang vermutlich starke lokale Verformungen hervorruft^[132, 133].

8.5. Allgemeine Prinzipien der DNA-Wirkstoff-Wechselwirkungen

In allen bislang besprochenen DNA-Antibiotika-Komplexen traten hauptsächlich Wechselwirkungen des Wirkstoffes mit der kleinen Furche der B-DNA auf, in gewissem Maße jedoch auch Veränderungen der großen Furche. Es wurden bisher noch keine direkten elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen geladenen Teilen eines Wirkstoffes und dem negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrat nachgewiesen. Zu den Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und DNA gehören im allgemeinen direkte Wasserstoffbrücken zwischen den funktionellen Gruppen beider Komponenten sowie Wasserstoffbrückenkontakte zwischen ihnen, die durch Wasserstoffmoleküle oder Gegenionen vermittelt werden. Van-der-Waals-Kräfte tragen in bedeutendem Maße zur Stabilisierung der Komplexe bei und können zu schwerwiegenden Störungen der üblichen Watson-Crick-Geometrie der DNA-Helix führen. Im Extremfall können solche Störungen die Bildung von Hoogsteen-Basenpaaren anstelle der normalen Watson-Crick-Paare bewirken. Die Wechselwirkung mit der DNA führt darüber hinaus auch zu einigen Änderungen in der Konformation der Wirkstoffe selbst.

Die Intercalation an bestimmten Basenschritten läßt sich durch Wasserstoffbrückenwechselwirkungen erklären. Die Vorliebe der in der kleinen Furche bindenden Moleküle für A · T-reiche Regionen scheint mit der Notwendigkeit zusammenzuhängen, die van-der-Waals-Wechselwirkungen zu maximieren. In manchen Sequenzen ist die kleine Furche in dieser Region besonders schmal. Dadurch kommt eine schmale Furche mit hydrophoben Wänden und einem polaren Boden zustande, die sich für Wechselwirkungen mit den behandelten Arten organischer Moleküle gut eignet. Bei anderen Sequenzen ruft der Wirkstoff erst die Verengung der kleinen Furche in der A · T-reichen Region hervor, um enge van-der-Waals-Kontakte möglich zu machen. Es wäre sehr viel schwieriger, die Verengung einer Furche in der Guaninhaltigen Region herbeizuführen, da die N2-Gruppe von Guanin das Eindringen des Wirkstoffes in die kleine Furche verhindern würde^[134, 135]. Diese allgemeinen Prinzipien, die sich aus Strukturanalysen ergaben, bieten nützliche Richtlinien für den Syntheschemiker, der effizientere und sequenzspezifische DNA-bindende Wirkstoffe entwirft.

9. Ausblick

Kristallographen behaupten nicht wie der Wahrsager mit seiner Kristallkugel, die Zukunft vorhersagen zu können. Doch die in den letzten Jahren erzielten Erfolge bei der Strukturbestimmung sowie die Beteiligung einer größeren

Zahl von Arbeitsgruppen deuten darauf hin, daß die kommenden zehn Jahre viele neue Ergebnisse bringen werden. Wir erwarten eine Fülle neuer Daten über die Konformationen der verschiedenen Basenschritte in unterschiedlichen Sequenzen und Kristallumgebungen. Es ist möglich, daß man einige Regeln für die Schrittekonformationen finden wird, doch sollten wir auch nicht zu sehr enttäuscht sein, wenn sich aufgrund der extremen Beweglichkeit der DNA-Doppelhelix keine einfachen Zusammenhänge ergeben sollten. Die Bandbreite an Oligonucleotidstrukturen, die erfolgreich mit Röntgenbeugungsmethoden analysiert werden können, wird durch die Entwicklung von Synthesetechniken vergrößert werden, die die Präparation größerer Mengen reiner Oligonucleotide vereinfachen, aber auch durch verbesserte Techniken der Datensammlung (Synchrotronquellen, Flächendetektoren usw.) und durch die Verwendung von Methoden der anomalen Dispersion für die Strukturlösung.

Ohne Zweifel wird man sich verstärkt den DNA-Wirkstoff-Komplexen mit den wichtigsten Antibiotika und Antikrebsmitteln zuwenden. Eine Reihe von Arbeitsgruppen befaßt sich bereits mit anderen Wirkstoffklassen, z. B. mit jenen, die kovalente oder Inter-Strang-Bindungen eingehen. Solche Untersuchungen werden mit Sicherheit zu einem besseren Verständnis der DNA-Wirkstoff-Wechselwirkung führen und möglicherweise die Entwicklung neuer Antikrebsmittel fördern.

Es könnte auch versucht werden, Moleküle zu synthetisieren, die in der großen statt in der kleinen Furche Wechselwirkungen eingehen. Vorschläge für solche neuen Verbindungen könnten sich unter anderem aus der Analyse von Wirkstoffen wie Nogalomycin ergeben, die Einfluß auf die große Furche haben; eine bessere Charakterisierung der DNA-Protein-Wechselwirkungen, die hauptsächlich in der großen Furche auftreten, könnte ebenfalls hilfreich sein. Wir erwarten einen explosionsartigen Anstieg der Zahl analysierter DNA-Protein-Komplexe.

Einer der Hauptwachstumsbereiche ist wahrscheinlich das Gebiet der RNA-Strukturen. Nach jahrelangen Mißerfolgen ist die Synthese von RNA-Fragmenten nun zu einem realisierbaren Vorhaben geworden, und künftige Entwicklungen in der RNA-Chemie lassen uns darauf hoffen, daß in zehn Jahren ein ähnlicher Übersichtsartikel wie dieser Hunderte von RNA-Strukturen aufzählen wird.

Eine enge Zusammenarbeit zwischen Vertretern vieler Disziplinen, die unterschiedliche Ansätze und Techniken anwenden, wird für diese Forschung unerlässlich sein, wenn wir die strukturellen Grundlagen der DNA- und RNA-Funktion in den unzähligen biologischen Prozessen, an denen diese einzigartigen Polymere beteiligt sind, wirklich verstehen wollen.

Wir danken unseren früheren und derzeitigen Kollegen in der Crystallographic Chemistry Gruppe des University Chemical Laboratory in Cambridge, die an vielen der in dieser Übersicht genannten Untersuchungen beteiligt waren, sowie unseren Freunden in anderen Laboratorien, die uns ihre Ergebnisse noch vor der Veröffentlichung zugänglich gemacht haben. Wir danken dem Springer-Verlag für die Erlaubnis, Landolt-Börnstein-Graphiken zu übernehmen. Die Forschungsarbeit in Cambridge wurde vom Medical Research Council gefördert. W. N. H. dankt dem Department of Chemistry der University of Manchester, dem Science and Engineering Research Council und dem Wellcome Trust für ihre Unterstützung.

10. Anhang

In den Tabellen 5–13 sind die Ergebnisse von Röntgenbeugungsanalysen an ausgewählten Oligonucleotidfragmenten aus den Jahren 1980 bis 1990 aufgelistet. Dabei enthalten die Tabellen 5–7 ausgewählte Daten für DNA-Fragmente, die als A-, B- bzw. Z-Helices kristallisieren. Für jede Kristallstruktur werden folgende Informationen angegeben: Temperatur während der Datensammlung, Raumgruppe, Zelldimensionen, Auflösung der Analyse, R -Wert, Zahl N_{sol} , der

durch die Analyse lokalisierten Lösungsmittelmoleküle und Volumen V pro Basenpaar. Das Volumen pro Basenpaar wird berechnet, indem man das Volumen der asymmetrischen Einheit durch die Zahl der Basenpaare in ihr dividiert. In all diesen Kristallen bilden zwei Stränge des Oligomers die Doppelhelix, und häufig hat diese keine kristallographische Symmetrie.

In Tabelle 8 sind die entsprechenden Daten für DNA-Fragmente mit Basenfehlpaaren zusammengestellt. Ein Vergleich dieser Tabelle mit den Tabellen 5–7 zeigt, daß

Tabelle 5. Kristallographische Daten ausgewählter A-Form-Oligonucleotide. IoC = 5-Iodecytosin.

| Sequenz | T [°C] [c] | Raumgruppe | Dimensionen der Elementarzelle [Å] | | | Auflösung [Å] | R | N_{sol} | V [Å ³] |
|---------------------|--------------|--------------|------------------------------------|------|------|---------------|------|------------------|-----------------------|
| d(IoCCGG) | 2 | $P4_12_12$ | 41.1 | 41.1 | 26.7 | 2.2 | 0.16 | 86 | 1409 |
| d(GGTATACC) | RT | $P6_1$ | 45.0 | 45.0 | 41.5 | 2.2 | 0.20 | 66 | 1519 |
| d(GGBrUABrUACC) [a] | RT | $P6_1$ | 45.1 | 45.1 | 41.7 | 1.8 | 0.14 | 84 | 1530 |
| d(GGGGGCCC) | RT | $P6_1$ | 45.3 | 45.3 | 42.3 | 2.5 | 0.14 | 104 | 1566 |
| d(GGGATCCC) | RT | $P6_1$ | 46.8 | 46.8 | 44.5 | 2.5 | 0.17 | 9 | 1615 |
| d(GCCCGGGC) [b] | RT | $P4_12_12$ | 43.2 | 43.2 | 24.6 | 1.8 | 0.17 | 68 | 1435 |
| d(GGGTACCC) [b] | RT | $P4_12_12$ | 43.3 | 43.3 | 24.7 | 1.7 | 0.16 | 88 | 1447 |
| d(GTGTACAC) [b] | 4 | $P4_12_12$ | 42.4 | 42.4 | 24.8 | 2.0 | 0.12 | 86 | 1393 |
| d(GGGCGCCC) | RT | $P4_12_12$ | 43.3 | 43.3 | 24.7 | 1.8 | 0.16 | 88 | 1444 |
| d(GGGCGCCC) | – 158 | $P4_12_12$ | 42.7 | 42.7 | 24.6 | 1.7 | 0.21 | 62 | 1403 |
| d(GGGCGCCC) | RT | $P6_1$ | 47.0 | 47.0 | 44.3 | 2.9 | 0.12 | 45 | 1763 |
| d(GGGCGCCC) | – 158 | $P6_1$ | 43.6 | 43.6 | 41.5 | 1.9 | 0.16 | 100 | 1424 |
| d(CTCTAGAG) [b] | RT | $P4_12_12$ | 42.5 | 42.5 | 24.3 | 2.2 | 0.15 | 70 | 1315 |
| d(GGCCGGCC) [b] | RT | $P4_12_12$ | 42.0 | 42.0 | 25.1 | 2.2 | 0.18 | 80 | 1383 |
| d(CCCCGGGG) [b] | RT | $P4_12_12$ | 43.4 | 43.4 | 24.8 | 2.2 | 0.15 | 82 | 1459 |
| d(GGATGGGAG) | RT | $P4_1$ | 45.3 | 45.3 | 24.7 | 3.0 | 0.33 | | 1410 |
| d(ACCGGCCGGT) | 10 | $P6_12_2$ | 39.2 | 39.2 | 78.0 | 2.0 | 0.18 | 36 | 1772 |
| d(CpsCGTACGTACGG) | RT | $P6_12_2$ | 46.2 | 46.2 | 71.5 | 2.5 | 0.14 | 71 | 1836 |
| r(GCG)d(TATACGC) | 0 | $P2_12_12_1$ | 24.2 | 43.5 | 49.4 | 2.0 | 0.16 | 179 | 1300 |
| r(UUAUAUAUAUAUA) | RT | $P2_12_12_1$ | 34.1 | 44.6 | 49.1 | 2.2 | 0.13 | 86 | 1334 |

[a] Analyse mit Synchrotronstrahlen. [b] Die asymmetrische Einheit besteht aus einem Einzelstrang oder aus vier Basenpaaren. Eine zweizählige Achse entspricht der zweizähligen Symmetrieachse des Octamer-Doppelstranges. [c] RT = Raumtemperatur (Angabe in der Originalveröffentlichung).

Tabelle 6. Kristallographische Daten ausgewählter B-Form-Oligonucleotide [a].

| Sequenz | T [°C] [b] | Raumgruppe | Dimensionen der Elementarzelle [Å] | | | Auflösung [Å] | R | N_{sol} | V [Å ³] |
|-------------------|--------------|-------------------|------------------------------------|------|------|---------------|------|------------------|-----------------------|
| d(CGCGAATTCGCG) | RT | $P2_12_12_1$ | 24.9 | 40.4 | 66.2 | 1.9 | 0.18 | 80 | 1385 |
| d(CGCGAATTCGCG) | – 257 | $P2_12_12_1$ | 23.4 | 29.3 | 65.3 | 2.7 | 0.15 | 83 | 1253 |
| d(CGCGAATTCGCG) | 7 | $P2_12_12_1$ | 24.2 | 40.1 | 63.9 | 2.3 | 0.17 | 114 | 1293 |
| d(CGCAAATTCGCG) | RT | $P2_12_12_1$ | 25.2 | 41.7 | 65.8 | 2.5 | 0.16 | 32 | 1440 |
| d(CGCAAAAAAGCG) | 4 | $P2_12_12_1$ | 25.4 | 40.7 | 65.8 | 2.5 | 0.20 | 27 | 1417 |
| d(CGCATATATGCG) | 6 | $P2_12_12_1$ | 23.5 | 38.9 | 66.6 | 2.2 | 0.19 | 43 | 1268 |
| d(CGCAAAAAATGCG) | 12 | $P2_12_12_1$ | 24.5 | 40.3 | 65.9 | 2.6 | 0.20 | 23 | 1355 |
| d(CGCGAm6ATTCGCG) | RT | $P2_12_12_1$ | 25.6 | 40.7 | 67.3 | 2.0 | 0.17 | 87 | 1461 |
| d(GpsCGpsCGpsC) | RT | $P2_12_12_1$ | 34.9 | 39.2 | 20.6 | 2.2 | 0.14 | 72 | 1175 |
| d(CCAGGCCTGG) | RT | $C2, \beta = 117$ | 32.2 | 25.5 | 34.8 | 1.6 | 0.17 | | 1275 |
| d(ACCGGCGCCACA) | 4 | $R3$ | 65.9 | 65.9 | 47.1 | 2.8 | 0.15 | 20 | 1640 |
| d(CGATCGATCG) | RT | $P2_12_12_1$ | 38.9 | 39.6 | 33.2 | 1.8 | 0.22 | 42 | 1278 |

[a] BrC = 5-Bromocytosin, m6A = 6-Methyladenin, ps = Rb-Phosphorothioat. [b] RT = Raumtemperatur.

Tabelle 7. Kristallographische Daten ausgewählter Z-Form-Oligonucleotide [a].

| Sequenz (vorhandene Kationen) | Raumgruppe | Dimensionen der Elementarzelle [Å] | | | Auflösung [Å] | R | N_{sol} | V [Å ³] |
|-------------------------------|--------------|------------------------------------|------|------|---------------|------|------------------|-----------------------|
| d(CGCGCG) (Na, Mg, Spermin) | $P2_12_12_1$ | 17.9 | 31.5 | 44.6 | 0.9 | 0.14 | 68 | 1048 |
| d(CGCGCG) (Na, Mg) | $P2_12_12_1$ | 18.0 | 31.0 | 44.8 | 1.0 | 0.18 | 88 | 1043 |
| d(mCGmCGmCG) (Mg, Spermin) | $P2_12_12_1$ | 17.8 | 30.6 | 45.4 | 1.3 | 0.16 | 98 | 1027 |
| d(mCGTAmCG) (Mg, Na) | $P2_12_12_1$ | 17.9 | 30.4 | 44.9 | 1.2 | 0.16 | 98 | 1021 |
| d(CG)r(CG)d(CG) | $P2_12_12_1$ | 18.3 | 30.9 | 43.1 | 1.5 | 0.20 | 82 | 1015 |
| d(CG)(araC)d(GCG) | $P2_12_12_1$ | 18.6 | 30.7 | 42.9 | 1.5 | 0.17 | 91 | 1020 |
| d(CGCG) (Mg und/oder Na) | $C222_1$ | 19.5 | 31.3 | 64.7 | 1.5 | 0.21 | 84 | 1232 |
| d(CGCGCGCG) (Mg und/oder Na) | $P6_3$ | 31.3 | 31.3 | 43.6 | 1.6 | 0.19 | 85 | 1025 |
| d(CGCATGCG) (Mg und/oder Na) | $P6_3$ | 30.9 | 30.9 | 43.1 | 2.5 | 0.16 | | 991 |

[a] mC = 5-Methylcytosin, araC = Arabinosecytosin.

Tabelle 8. Kristallographische Daten einiger Oligonucleotide mit Nicht-Watson-Crick-Basenpaaren [a].

| Sequenz | Fehlpaar | DNA-Form | Raumgruppe | Dimensionen der Elementarzelle [Å] | | | Auflösung [Å] | <i>R</i> | <i>N</i> _{tot} | <i>V</i> [Å ³] |
|-----------------|----------|----------|---|------------------------------------|------|------|---------------|----------|-------------------------|----------------------------|
| d(GGGGCTCC) | G · T | A | <i>P</i> 6 ₁ | 45.2 | 45.2 | 42.9 | 2.2 | 0.14 | 52 | 1584 |
| d(GGGGTCCC) | G · T | A | <i>P</i> 6 ₁ | 44.7 | 44.7 | 42.4 | 2.1 | 0.14 | 104 | 1529 |
| d(GGGTGCCC) | G · T | A | <i>P</i> 6 ₁ | 45.6 | 45.6 | 41.0 | 2.5 | 0.15 | 63 | 1507 |
| d(GGIGCTCC) | I · T | A | <i>P</i> 6 ₁ | 45.1 | 45.1 | 45.5 | 1.7 | 0.14 | 81 | 1600 |
| d(CCAAGATTGG) | G · A | B | <i>C</i> 2, $\beta = 119$ | 32.5 | 26.2 | 34.3 | 1.3 | 0.17 | 48 | 1278 |
| d(CGCGAATTAGCG) | G · A | B | <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | 25.7 | 41.9 | 65.2 | 2.5 | 0.17 | 83 | 1464 |
| d(CGCAAATTGGCG) | G · A | B | <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | 25.2 | 41.2 | 65.0 | 2.3 | 0.16 | 94 | 1406 |
| d(CGCTAATTAGCG) | I · A | B | <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | 25.8 | 41.9 | 65.1 | 2.5 | 0.19 | 64 | 1466 |
| d(CGCAAATTCGCG) | C · A | B | <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | 25.4 | 41.4 | 65.2 | 2.5 | 0.19 | 82 | 1428 |
| d(CGCGAATTTGCG) | G · T | B | <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | 25.5 | 41.2 | 65.6 | 2.5 | 0.18 | 71 | 1436 |
| d(TGCGCG) | G · T | Z | <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | 17.9 | 30.7 | 45.1 | 1.5 | 0.18 | | 1033 |
| d(BrUGCGCG) | BrU · G | Z | <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | 17.9 | 30.9 | 49.9 | 2.2 | 0.16 | 64 | 1152 |
| d(CGCGTG) | G · T | Z | <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | 17.5 | 31.6 | 45.6 | 1.0 | 0.20 | 91 | 1048 |
| d(CGCGFUG) | G · Fu | Z | <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | 17.8 | 31.3 | 45.4 | 1.5 | 0.20 | 64 | 1047 |
| d(CGCGXG) | G · X | Z | <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | 18.2 | 30.4 | 43.9 | 1.7 | 0.16 | 79 | 1012 |

[a] BrU = 5-Bromuridin, FU = 5-Fluoruridin, X = *N*4-Methoxycytosin.

Tabelle 9. Kristallographische Daten einiger Oligonucleotide mit zusätzlichen Basen.

| Sequenz | <i>T</i> [°C] [a] | Raumgruppe | Dimensionen der Elementarzelle [Å] | | | Auflösung [Å] | <i>R</i> |
|---------------------|-------------------|--------------------------|------------------------------------|------|-------|---------------|----------|
| d(CGCAGAATTCGCG) | − 150 | <i>C</i> 2, $\beta = 99$ | 78.5 | 42.8 | 25.2 | 2.8 | 0.15 |
| d(CGCGAAATTTACGCG) | 4 | <i>I</i> 222 | 37.0 | 53.7 | 101.6 | 3.0 | 0.24 |
| d(CGCGCGTTTTCGCGCG) | RT | <i>C</i> 2, $\beta = 95$ | 57.2 | 21.6 | 36.4 | 2.1 | 0.23 |

[a] RT = Raumtemperatur.

Tabelle 10. Mittlere Helixparameter für ausgewählte rechtshändige Oligonucleotide [a].

| Sequenz | Helixdrehung [°] | α [Å] | Kippwinkel [°] | Propeller- Verdrillung [°] | w [Å] | | D [Å] |
|-------------------|------------------|--------------|----------------|-------------------------------|---------|------|---------|
| | | | | | klein | groß | |
| <i>A-Form</i> | | | | | | | |
| d(GGTATACC) | 32 | 2.9 | 13 | 10 | 10.2 | 6.3 | 4.0 |
| d(GGGGCCCC) | 32 | 2.9 | 13 | 10 | 10.1 | 6.8 | 4.1 |
| d(GGGCGCCC) | 32 | 3.3 | 7 | 12 | 9.5 | 10.1 | 3.7 |
| d(GGCCGGCC) | 33 | 3.1 | 12 | 13 | 9.8 | 7.5 | 3.5 |
| d(IoCCGG) | 34 | 2.8 | 14 | 16 | 9.5 | 4.8 | 3.5 |
| d(CTCTAGAG) | 32 | 3.1 | 10 | 11 | 8.7 | 8.0 | 3.6 |
| r(GCG)d(TATACGC) | 33 | 2.5 | 19 | 12 | 10.2 | 3.2 | 4.5 |
| r(UUAUAUAUAUAUA) | 33 | 2.8 | 17 | 19 | 10.2 | 3.7 | 3.6 |
| Faser-A-DNA [b] | 33 | 2.6 | 22 | 6 | 11.0 | 2.4 | 4.4 |
| <i>B-Form</i> | | | | | | | |
| d(CGCGAATTCGCG) | 36 | 3.3 | 2 | 13 | 5.3 | 11.7 | − 0.2 |
| d(CGCGAATTBrCGCG) | 36 | 3.4 | − 2 | 18 | 4.6 | 12.2 | − 0.2 |
| d(GpCGpCGpC) [c] | 37/34 | 3.5/3.3 | 0 | 9 | 6.4 | 10.2 | − 0.6 |
| Faser-B-DNA [b] | 36 | 3.4 | 2 | 13 | 6.0 | 11.4 | − 0.6 |

[a] IoC = 5-Iodocytosin, BrC = 5-Bromcytosin. [b] Aus Beugungsdaten an Fasern [143]. [c] Dieses Oligonucleotid liegt in zwei Konformationen vor.

innerhalb jedes Konformationstyps (A, B oder Z) die Oligonucleotide mit Fehlpaaren isomorph mit den nativen Oligonucleotiden kristallisieren, die nur Watson-Crick-komplementäre Basenpaare aufweisen. Tabelle 9 enthält Daten über drei Oligonucleotide mit zusätzlichen Basen.

In Tabelle 10 sind die globalen Helixparameter für A- und B-Helices, wie sie in typischen Einkristalluntersuchungen ermittelt wurden, und zu Vergleichszwecken Werte aus Beugungsuntersuchungen an Fasern zusammengefaßt. Die Tabelle beschränkt sich auf Helices, die ausschließlich Watson-Crick-Basenpaare enthalten. Angegeben sind die Helixdrehung, der Anstieg α pro Basenpaar, der Kippwinkel des Basenpaares, die Propeller-Verdrillung, die Furchenweite w und die Verschiebung D der Basenpaare relativ zur Helixachse. Diese Parameter lassen sich am besten im Zusammenhang mit den Abbildungen 26–32 und den in Abschnitt 10.1 gegebenen Definitionen verstehen. Man beachte, daß sich diese Parameter je nach DNA-Fragmenten

Tabelle 11. Vergleich der A-, B- und Z-DNA.

| | A-DNA [a] | B-DNA [a] | B'-DNA [b] | Z-DNA [c] |
|--|--------------------------|----------------------|--------------------------|---|
| Helixdrehsinn | rechtshändig | rechtshändig | rechtshändig | linkshändig |
| Basenpaare pro Windung | 11 | 10 | 10 | 12 (6 Dimere) |
| Helixdrehung [°] | 32.7 | 36.0 | 34.1, 36.8 | − 10, − 50 |
| Anstieg pro Basenpaar [Å] | 2.9 | 3.4 | 3.5, 3.3 | 3.7 |
| Helixsteigung [Å] | 32 | 34 | 34 | 45 |
| Kippwinkel zwischen Basenpaaren [°] | 13 | 0 | 0 | − 7 |
| Abstände der P-Atome von der Helixachse [Å] | 9.5 | 9.3 | 9.1 | 6.9, 8.0 |
| Anordnung relativ zur glycosidischen Bindung | <i>anti</i> | <i>anti</i> | <i>anti</i> | <i>anti</i> , <i>syn</i> |
| Konformation des Zuckerrestes | <i>C</i> 3'- <i>endo</i> | sehr unterschiedlich | <i>C</i> 2'- <i>endo</i> | <i>C</i> 2'- <i>endo</i> , <i>C</i> 3'- <i>endo</i> [d] |

[a] Die Zahlen wurden durch Mittelwertbildung aus den globalen Parametern der entsprechenden Doppelhelixfragmente erhalten. [b] Die B'-DNA-Werte gelten für eine Konformation des Doppelhelix-Rückgrats, die zwischen den Konformationen I und II wechselt [24]. [c] Die beiden Werte für die Helixdrehung und die Abstände der P-Atome gelten für die CpG- und GpC-Schritte, die übrigen Doppellangaben gelten für Cytidin und Guanotin. [d] Angabe für beiden Konformationen.

Tabelle 12. Mittlere Torsionswinkel [°] ausgewählter rechtshändiger Oligonucleotide (siehe Abb. 27).

| Sequenz | $\alpha(\text{P-O}5')$ | $\beta(\text{O}5' - \text{C}5')$ | $\gamma(\text{C}5' - \text{C}4')$ | $\delta(\text{C}4' - \text{C}3')$ | $\epsilon(\text{C}3' - \text{O}3')$ | $\zeta(\text{O}3' - \text{P})$ | $\chi(\text{Glycosyl})$ |
|---------------------|------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| A-Form | | | | | | | |
| d(GGTATACC) | -62 | 173 | 52 | 88 | -152 | -78 | -160 |
| d(GGGGCCCC) | -76 | 178 | 63 | 84 | -156 | -70 | -158 |
| d(IoCCGG) | -73 | 180 | 64 | 89 | -157 | -66 | -157 |
| d(GGCCGGCC) [a] | -67 | 170 | 58 | 80 | -142 | -76 | -162 |
| d(CCCCGGG) [a] | -87 | 182 | 72 | 79 | -153 | -66 | -162 |
| d(CTCTAGAG) [a] | -76 | 170 | 52 | 79 | -175 | -54 | -156 |
| d(GCCCGGG) [a] | -71 | 177 | 55 | 85 | -165 | -64 | -159 |
| d(GGGCGCCC) [a] | -71 | 178 | 62 | 80 | -158 | -70 | -163 |
| d(GGGATCCC) | -101 | 181 | 81 | 81 | -164 | -63 | -164 |
| r(GCG)d(TATACGC) | -69 | 175 | 58 | 82 | -151 | -75 | -162 |
| r(UUAUAUAUAUAUA) | -61 | 169 | 53 | 80 | -148 | -79 | -159 |
| A-DNA [b] | -50 | 172 | 42 | 79 | -146 | -78 | -159 |
| A-RNA [b] | -68 | 178 | 54 | 82 | -153 | -71 | -158 |
| B-Form | | | | | | | |
| d(CGCGAATTCGCG) | -63 | 171 | 54 | 122 | -169 | -108 | -117 |
| d(CGCGAATTBrCGCG) | -62 | 170 | 55 | 120 | -169 | -109 | -120 |
| d(GpsCGpsCGpsC) [c] | -53 | 154 | 46 | 138 | -164/-114 | -102/-192 | -109 |
| B-DNA [b] | -33 | 138 | 33 | 142 | -141 | -157 | -139 |

[a] α und γ des fünften Nucleotids sind ausgeschlossen. [b] Aus Beugungsdaten an Fasern [143]. [c] Zwei Werte stehen für die Konformationen I und II.

Tabelle 13. Kristallographische Daten ausgewählter DNA-Antibiotica-Komplexe. BrC = 5-Bromcytosin.

| Komplex | T [°C] | Raumgruppe | Dimensionen der Elementarzelle [Å] | | | Auflösung [Å] | N_{univ} | R |
|-----------------------------------|----------|---|------------------------------------|------|------|---------------|-------------------|-----|
| d(CGTACG)/Triostin A [a] | -16 | F222 | 31.4 | 62.4 | 61.3 | 1.7 | 137 | 19 |
| d(CGTACG)/Echinomycin [a] | -16 | F222 | 30.7 | 62.6 | 61.7 | 1.8 | 88 | 20 |
| d(GCGTACG)/Triostin A [a] | 12 | P6 ₃ 22 | 40.9 | 40.9 | 80.7 | 2.2 | 91 | 20 |
| d(CGTACG)/Daunomycin [a] | -15 | P4 ₁ 2 ₁ 2 | 27.9 | 27.9 | 52.7 | 1.2 | 83 | 18 |
| d(CGTACG)/Daunomycin [b] | 4 | P4 ₁ 2 ₁ 2 | 28.0 | 28.0 | 52.9 | 1.5 | 40 | 25 |
| d(CGCGAATTCGCG)/Hoechst 33258 [b] | RT | P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | 25.0 | 40.3 | 65.9 | 2.2 | 175 | 14 |
| d(CGCGAATTCGCG)/Hoechst 33258 [b] | RT | P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | 25.2 | 40.6 | 66.1 | 2.2 | 126 | 16 |
| d(CGCGAATTBrCGCG)/Netropsin | RT | P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | 24.3 | 39.6 | 63.6 | 2.2 | 75 | 25 |
| d(CGCGATATCGCG)/Netropsin | RT | P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | 25.5 | 41.3 | 66.9 | 2.4 | 60 | 20 |
| d(CGCAAATTTGCG)/Distamycin | RT | P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | 25.2 | 41.1 | 64.7 | 2.2 | 70 | 20 |
| d(CGCGAATTCGCG)/Cisplatin | RT | P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | 24.2 | 39.3 | 66.1 | 2.6 | 128 | 17 |

[a] Zwei Wirkstoffmoleküle pro Doppelstrang. [b] Für diesen Komplex existieren zwei unabhängige Strukturuntersuchungen.

beträchtlich unterscheiden können. Diese Variationen lassen sich auf Unterschiede in der Basensequenz zurückführen, insbesondere dann, wenn Oligonucleotide mit gleichem Strukturmotiv verglichen werden. Die Furchenweite ist einer der besonders betroffenen Parameter. In A-Typ-Kristallen liegt die Weite der kleinen Furche zwischen 10.2 und 8.7 Å (bei einem Faserwert von 11.04 Å) und die große Furche zwischen 10.1 und 3.2 Å (Faserwert 2.4 Å). Kürzlich erschienen zwei Berichte^[13, 18] über Variationen der globalen und lokalen Parameter derselben Sequenz, die in zwei verschiedenen Raumgruppen, d. h. mit zwei verschiedenen Kristallumgebungen kristallisierte. Diese Untersuchungen erhellen den relativen Einfluß von Basensequenzen und Gitterkräften auf die Konformation.

In Tabelle 11 sind wichtige Parameter der A-, B- und Z-DNA verglichen. Tabelle 12 enthält die Torsionswinkel ausgewählter Oligonucleotide und Tabelle 13 wichtige Strukturparameter von DNA-Wirkstoff-Komplexen.

10.1. Definitionen von Begriffen zur Charakterisierung von Oligonucleotidstrukturen

In diesem Abschnitt geben wir Definitionen der wichtigsten Begriffe, die zur detaillierten Charakterisierung von Oli-

gonucleotidstrukturen verwendet werden. Sie enthalten die IUPAC-IUB-Empfehlungen^[136] und die von Dickerson et al. eingeführte Definitionen^[137, 138], die in weit verbreiteten HELIX/NEWHELIX-Computerprogramme Eingang gefunden haben. Die wichtigsten Gruppen, die sich mit der Entwicklung von Algorithmen zur Analyse von Oligonucleotidstrukturen beschäftigen, haben sich kürzlich auf eine überarbeitete Nomenklatur geeinigt^[139]. Wir verwenden die neuen Ausdrücke in diesem Text.

10.2. Der Oligonucleotideinzelstrang

Abbildung 26 zeigt ein DNA-Fragment mit der Sequenz Adenosin (A), Guanosin (G), Cytidin (C) und Thymidin (T). Die Basen sind über 3',5'-Phosphordiesterbindungen verknüpft. Das Fragment kann als d(5'ApGpCpT3') oder, gebräuchlicher, als d(AGCT) bezeichnet werden. Man beachte, daß das Fragment selbstkomplementär im Watson-Crick-Sinne ist. Abbildung 27 zeigt das Atomnumerierungsschema und die Definition der Torsionswinkel. In Abbildung 28 sind Aspekte der Nucleosidgeometrie für Purine in den Orientierungen *syn* und *anti* sowie der intermolekulare Phosphor-Phosphor-Abstand für beide Zuckerkonformationen gezeigt.

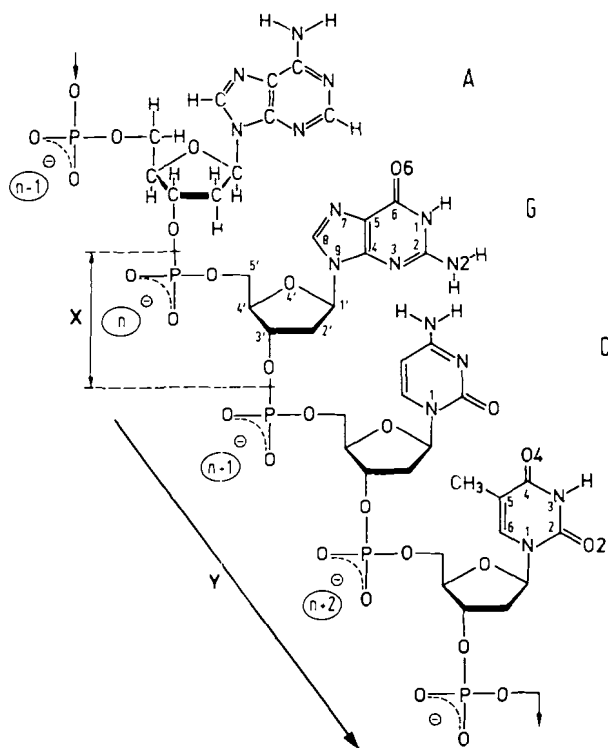


Abb. 26. Die Formel für ein DNA-Fragment der Sequenz Adenosin (A), Guanosin (G), Cytosin (C) und Thymidin (T), verknüpft durch 3',5'-Phosphodiesterbindungen [92, 139]. X kennzeichnet eine Nucleotidineinheit, Y die Richtung der Kette.

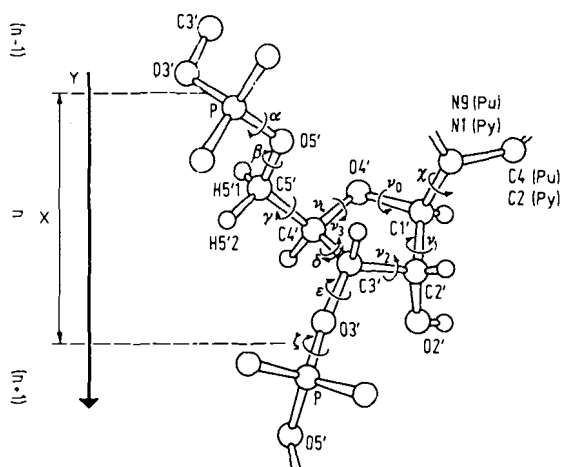


Abb. 27. Eine Darstellung des Zucker-Phosphat-Rückgrats mit dem Nummerierungsschema und der Definition der Torsionwinkel [92, 136] (X und Y vgl. Abb. 26). Pu = Purinrest, Py = Pyrimidinrest.

10.3. Die Basenpaare

Die Watson-Crick-Basenpaare^[140] sind in Abbildung 29 dargestellt. Die Abbildungen 30 und 31 zeigen Begriffsdefinitionen für einzelne Basenpaare, die in Abbildung 32 diejenigen für aufeinanderfolgende Basenpaare. Bei den folgenden Definitionen sind die englischen Ausdrücke jeweils in Klammern angegeben.

Verschiebung (displacement) bedeutet den Abstand des C6(Py)-C8(Pu)-Vektors von der Helixachse.

Propeller-Verdrillung (propeller twist) ist der Diederwinkel zwischen den beiden Basenebenen, wenn man entlang des C6-C8-Vektors des Basenpaares schaut.

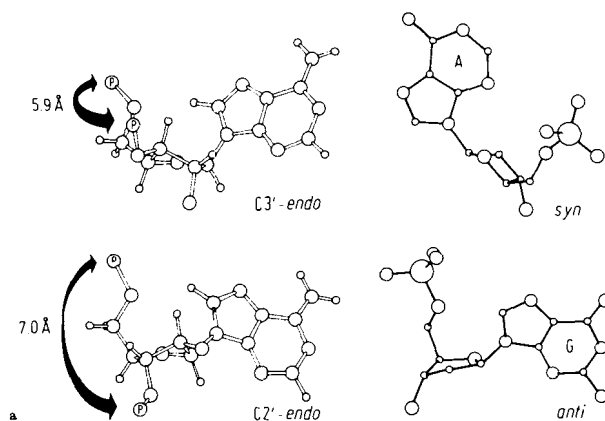


Abb. 28. Nucleosidgeometrien. Links: die beiden Hauptkonformationen der Furanose, wie man sie bei Strukturuntersuchungen findet, sowie deren Auswirkung auf den Phosphor-Phosphor-Abstand. Rechts: die *syn*- und *anti*-Konformationen der Purine relativ zum Furanosering [92, 136].

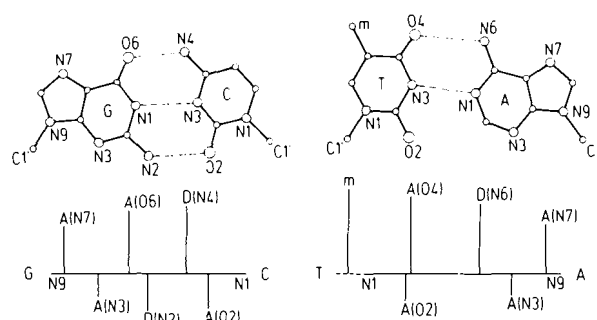


Abb. 29. Die Watson-Crick-Basenpaare G · C und T · A. Die Liniendarstellungen unten sollen einen Eindruck von den Verschiebungen der funktionellen Gruppen der Basen geben. D steht für eine Gruppe, die als Donor in einer Wasserstoffbrücke fungieren kann, und A für eine, die als Acceptor in Frage kommt; die Basenpaare werden durch eine Linie parallel zum N9-N1-Vektor dargestellt. Die große Furche ist oberhalb des Vektors, die kleine unterhalb.

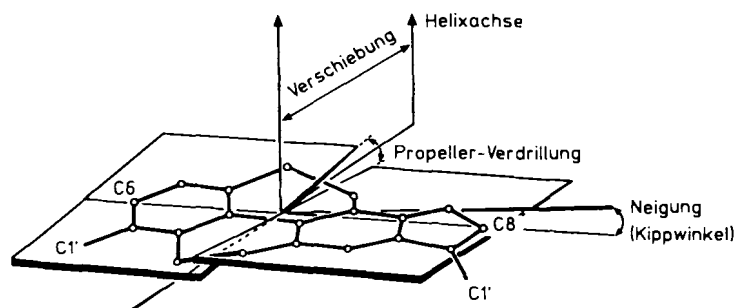


Abb. 30. Schematische Zeichnung, um die Verschiebung, die Propeller-Verdrillung und die Neigung (früher Kippwinkel genannt) an einem C · G-Basenpaar zu definieren. Der C6(Py)-C8(Pu)-Vektor ist eingezeichnet. Er wird häufig als Referenz genutzt.

Neigung (inclination), früher Kippwinkel des Basenpaares (base-pair tilt) genannt, definiert zum Teil die Orientierung eines Basenpaares relativ zur Helixachse. Sie beschreibt eine Rotation der Basenpaarebene um die Pseudodyadenachse.

Tip-Winkel (tip), früher Rollwinkel des Basenpaares (base-pair roll) genannt, dient ebenfalls zur Definition der Orientierung eines Basenpaares relativ zur Helixachse. Er beschreibt eine Rotation der Basenpaarebene um eine Achse, die durch den C6-C8-Vektor angenähert wird. Diese Achse

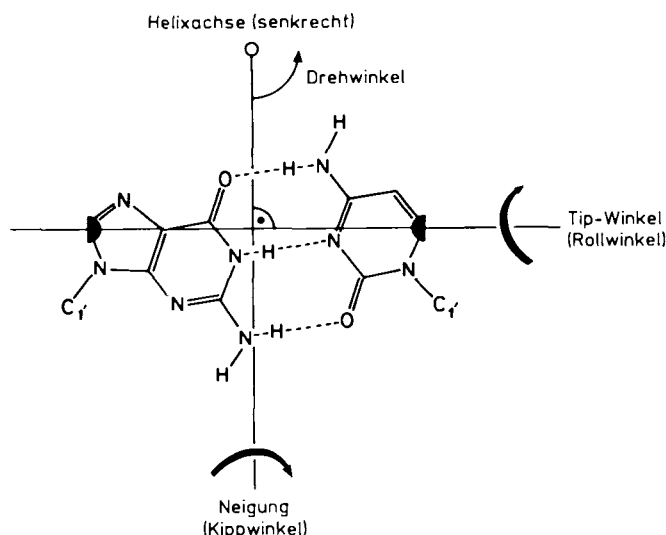


Abb. 31. Zur Definition der Helixdrehung, der Neigung (früher Kippwinkel) und des Tip-Winkels (früher Rollwinkel) für das G-C-Basenpaar. Die dunklen Halbkreise markieren die Positionen der Atome C6 und C8 des Pyrimidin- bzw. Purinrests.

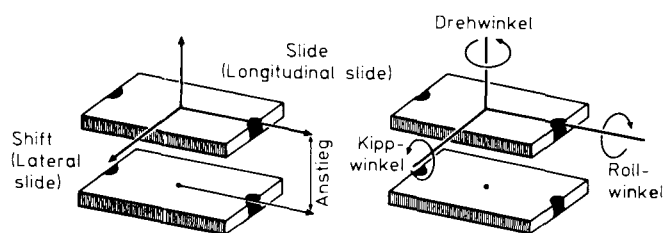


Abb. 32. Begriffsdefinitionen für aufeinanderfolgende Basenpaare. In Klammern stehen die alten Begriffe. Die Basenpaare sind als Quader dargestellt, wobei die Seite der kleinen Furche schattiert ist und die C6(Py)-, C8(Pu)-Atome als dunkle Halbkreise auf den schmalen Seiten angedeutet sind.

steht senkrecht sowohl auf der Helixachse als auch auf der Pseudodyadenachse.

Auch die Helixdrehung (helix twist) definiert die Orientierung des Basenpaares in bezug auf die Helixachse. Sie wird berechnet, indem man aufeinanderfolgende C1'-C1'-Vektoren auf eine Ebene senkrecht zur Helixachse projiziert und den Winkel zwischen den projizierten Vektoren mißt. Man kann auch eine lokale Helixachse bestimmen und durch Projektion der C6-C8-Vektoren auf die gleiche Weise die lokale Helixdrehung berechnen.

Begriffsdefinitionen für aufeinanderfolgende Basenpaare: Roll- und Kippwinkel (roll, tilt) definieren die Winkel zwischen aufeinanderfolgenden Basenpaaren in Richtung der langen bzw. der kurzen Achse.

Anstieg (rise) ist der Abstand zwischen aufeinanderfolgenden Basenpaaren entlang der Helixachse.

Shift, früher lateral slide genannt, bezeichnet die relative Verschiebung des Mittelpunktes des C6-C8-Vektors eines Basenpaares senkrecht zur langen Achse des vorausgehenden Basenpaares.

Slide, früher longitudinal slide genannt, bezeichnet die entsprechende relative Verschiebung parallel zur langen Achse.

Analytische Ausdrücke der Definitionen werden in^[137, 138, 141] gegeben. Für die Berechnung der globalen Helixachse wird der Leser auf^[6] verwiesen.

10.4. Eigenschaften der Furchen

Es ist wichtig, die Form der großen und der kleinen Furche der Doppelhelix zu charakterisieren, da sie in vielen Fällen den Zugang zu den funktionellen Gruppen der Basen für sequenzspezifische Moleküle wie Wirkstoffe oder Proteine, aber auch das Hydratationsmuster beeinflusst. Sie wird im allgemeinen über die Furchenweite und die Furchentiefe charakterisiert. Die Furchenweite wird gleich dem kürzesten Phosphor-Phosphor-Abstand abzüglich 5.8 Å gesetzt, um die van-der-Waals-Radien zweier Phosphatgruppen zu berücksichtigen. Die Tiefe der kleinen Furche wird erhalten, indem vom Abstand zwischen dem Phosphoratom und N2 von Guanin, N3 von Adenin, O2 von Cytosin oder O2 von Thymin die Summe der van-der-Waals-Radien abgezogen wird. Die Tiefe der großen Furche wird berechnet, indem vom Abstand zwischen dem Phosphoratom und O6 von Guanin, N6 von Adenin, O4 von Thymin oder N4 von Cytosin die Summe der van-der-Waals-Radien abgezogen wird. Für die van-der-Waals-Radien der Sauerstoff- und der Stickstoffatome werden im allgemeinen 1.4 bzw. 1.5 Å angenommen.

Eingegangen am 6. September 1990 [A 837]
Übersetzt von Dipl.-Chem. Harald Schwalbe,
Steinbach im Taunus

- [1] M. A. Viswamitra, O. Kennard, P. G. Jones, G. M. Sheldrick, S. A. Salisbury, L. Favollo, Z. Shakked, *Nature* 273 (1978) 687-688.
- [2] M. A. Viswamitra, Z. Shakked, P. G. Jones, G. M. Sheldrick, S. A. Salisbury, O. Kennard, *Biolpolymers* 21 (1982) 513-532.
- [3] B. N. Conner, T. Takano, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Nature* 295 (1982) 294-299.
- [4] R. Chattopadhyaya, P. Chakrabarti, *Acta Crystallogr. Sect. B* 44 (1988) 651-657.
- [5] Z. Shakked, D. Rabinovich, W. B. T. Cruse, E. Egert, O. Kennard, G. Sala, S. A. Salisbury, M. A. Viswamitra, *Proc. R. Soc. London B*, 213 (1981) 479-487.
- [6] Z. Shakked, D. Rabinovich, O. Kennard, W. B. T. Cruse, S. A. Salisbury, M. A. Viswamitra, *J. Mol. Biol.* 166 (1983) 183-201.
- [7] O. Kennard, W. B. T. Cruse, J. Nachman, T. Prange, Z. Shakked, D. Rabinovich, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 3 (1986) 623-648.
- [8] A. H.-J. Wang, S. Fujii, J. H. van Boom, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 3968-3972.
- [9] M. McCall, T. Brown, O. Kennard, *J. Mol. Biol.* 183 (1985) 385-396.
- [10] H. Lauble, R. Frank, H. Blocker, U. Heinemann, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 7799-7816.
- [11] W. N. Hunter, B. Langlois, d'Estaintot, O. Kennard, *Biochemistry* 28 (1989) 2444-2451.
- [12] D. Rabinovich, T. E. Haran, M. Eisenstein, Z. Shakked, *J. Mol. Biol.* 200 (1988) 151-161.
- [13] Z. Shakked, G. G. Guzikovich, M. Eisenstein, F. Frolow, D. Rabinovich, *Nature* 342 (1989) 456-460.
- [14] U. Heinemann, H. Lauble, R. Frank, H. Blocker, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 9531-9550.
- [15] T. E. Haran, Z. Shakked, A. H.-J. Wang, A. Rich, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 5 (1987) 199-217.
- [16] C. A. Frederick, D. Saal, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. H.-J. Wang, A. Rich, *Biopolymers* 26 (1987) 145-160.
- [17] S. Jain, G. Zon, M. Sundaralingam, *J. Mol. Biol.* 197 (1987) 141-145.
- [18] S. Jain, M. Sundaralingam, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 12780-12784.
- [19] M. McCall, T. Brown, W. N. Hunter, O. Kennard, *Nature* 322 (1986) 661-664.
- [20] C. A. Frederick, G. J. Quigley, M.-K. Teng, M. Coll, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, A. H.-J. Wang, *Eur. J. Biochem.* 181 (1989) 295-307.
- [21] C. A. Bingman, S. Jain, D. Jebaratnam, M. Sundaralingam, *Conf. abstr. sixth conversation Biomol. Stereodyn.* 1989, 28-29.
- [22] A. H.-J. Wang, S. Fujii, J. H. van Boom, G. A. van der Marel, S. A. A. van Boeckel, A. Rich, *Nature* 299 (1982) 601-604.
- [23] A. C. Dock-Bregeon, B. Chevrier, A. Podjarny, D. Moras, J. S. de Bear, G. R. Gough, P. T. Gilham, J. E. Johnson, *Nature* 335 (1988) 375-378.
- [24] W. B. T. Cruse, S. A. Salisbury, T. Brown, F. Eckstein, R. Costick, O. Kennard, *J. Mol. Biol.* 192 (1986) 891-905.

- [25] R. Wing, H. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Nature* 287 (1980) 755–758.
- [26] H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 2179–2183.
- [27] M. Coll, C. A. Frederick, A. H.-J. Wang, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 8385–8389.
- [28] H. C. M. Nelson, J. T. Finch, B. E. Luisi, A. Klug, *Nature* 330 (1987) 221–226.
- [29] C. Yoon, G. G. Prive, D. S. Godsell, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 6332–6336.
- [30] U. Heinemann, C. Alings, *J. Mol. Biol.* 210 (1989) 369–373.
- [31] A. Di Gabriele, M. Sanderson, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 1816–1820.
- [32] C. A. Frederick, G. J. Quigley, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. H.-J. Wang, A. Rich, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 17872–17879.
- [33] Y. Timsit, E. Westhof, R. P. P. Fuchs, D. Moras, *Nature* 341 (1989) 459–462.
- [34] K. Grzeskowiak, K. Yanagi, G. G. Prive, K. M. Grzeskowiak, M. L. Kopka, R. G. Harvey, R. E. Dickerson, *Conf. abstr. sixth conversation Biomol. Stereodyn.* 20 (1989) 120–124.
- [35] G. G. Prive, R. E. Dickerson, *Conf. abstr. sixth conversation Biomol. Stereodyn.* 1989, 259.
- [36] H. R. Drew, R. E. Dickerson, K. Itakura, *J. Mol. Biol.* 125 (1978) 535–543.
- [37] H. R. Drew, T. Takano, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Nature* 286 (1980) 567–573.
- [38] H. R. Drew, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* 152 (1981) 723–736.
- [39] J. L. Crawford, E. J. Kolpak, A. H.-J. Wang, G. J. Quigley, J. H. van Boom, G. A. van der Marel, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 406–4020.
- [40] A. H.-J. Wang, G. J. Quigley, R. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. A. van der Marel, A. Rich, *Nature* 282 (1979) 680–686.
- [41] R. V. Gessner, C. A. Frederick, G. J. Quigley, A. Rich, A. H.-J. Wang, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 7921.
- [42] M. Coll, I. Pita, J. Lloveras, J. A. Subirana, P. Bardella, T. Huynh-Dinh, J. Igolen, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 8695–8705.
- [43] B. Chevrier, A. C. Dock, B. Hartmann, M. Leng, D. Moras, M. T. Thoug, E. Westhof, *J. Mol. Biol.* 188 (1986) 707–711.
- [44] A. H.-J. Wang, R. V. Gessner, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 3611–3615.
- [45] A. H.-J. Wang, T. Hakoshima, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, *Cell* 37 (1984) 321–331.
- [46] S. Fujii, A. H.-J. Wang, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 7879–7892.
- [47] M.-K. Teng, Y.-C. Liaw, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. H.-J. Wang, *Biochemistry* 28 (1989) 4923–4928.
- [48] S. Fujii, A. H.-J. Wang, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, *Biopolymers* 24 (1985) 243–250.
- [49] R. G. Brennan, E. Westhof, M. Sundaralingam, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 3 (1986) 649–666.
- [50] O. Kennard, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 3 (1985) 205–225.
- [51] T. Brown, G. Kneale, W. N. Hunter, O. Kennard, *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 1801–1809.
- [52] M. Coll, A. H.-J. Wang, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 4 (1986) 157–172.
- [53] M. Coll, D. Saal, C. A. Frederick, J. Aymami, A. Rich, A. H.-J. Wang, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 911–923.
- [54] L. Van Meervelt, M. H. Moore, L. P. Kong Thoo, D. M. Brown, O. Kennard, *J. Mol. Biol.* 216 (1990) 773–778.
- [55] P. S. Ho, C. A. Frederick, G. Quigley, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. H.-J. Wang, A. Rich, *EMBO J.* 4 (1985) 3617–3623.
- [56] G. Kneale, T. Brown, O. Kennard, D. Rabinovich, *J. Mol. Biol.* 186 (1985) 805–814.
- [57] T. Brown, O. Kennard, G. Kneale, D. Rabinovich, *Nature* 315 (1985) 604–606.
- [58] W. N. Hunter, G. Kneale, T. Brown, D. Rabinovich, O. Kennard, *J. Mol. Biol.* 190 (1986) 605–618.
- [59] W. B. T. Cruse, J. Aymami, O. Kennard, T. Brown, A. G. C. Jack, G. A. Leonard, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 55–72.
- [60] G. G. Prive, U. Heinemann, S. Chandrasegaran, L. S. Kan, M. L. Kopka, R. E. Dickerson, *Science* 238 (1987) 498–504.
- [61] G. G. Prive, U. Heinemann, S. Chandrasegaran, L. S. Kan, M. L. Kopka, R. E. Dickerson in W. K. Olson, R. H. Sarma, M. H. Sarma, M. Sundaralingam (Hrsg.): *Structure and Expression, Vol. 2*, Adenine Press, Guilderland, NY, USA 1988, S. 27.
- [62] W. N. Hunter, T. Brown, G. Kneale, N. N. Anand, G. Rabinovich, O. Kennard, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 9962–9970.
- [63] T. Brown, W. N. Hunter, G. Kneale, O. Kennard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 2402–2406.
- [64] W. N. Hunter, T. Brown, O. Kennard, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 4 (1986) 173–191.
- [65] W. N. Hunter, T. Brown, N. N. Anand, O. Kennard, *Nature* 320 (1986) 552–555.
- [66] W. N. Hunter, T. Brown, O. Kennard, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 6589–6606.
- [67] P. W. R. Corfield, W. N. Hunter, T. Brown, P. Robinson, O. Kennard, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 7935–7949.
- [68] T. Brown, G. A. Leonard, E. D. Booth, J. Chambers, *J. Mol. Biol.* 207 (1989) 455–457.
- [69] L. Joshua-Tor, D. Rabinovich, H. Hoppe, F. Frolow, E. Appella, J. L. Sussman, *Nature* 334 (1988) 82–84.
- [70] M. Miller, R. W. Harrison, A. Wlodawer, E. Appella, J. L. Sussman, *Nature* 334 (1988) 85–86.
- [71] R. Chattopadhyaya, S. Ikuta, K. Grzeskowiak, R. E. Dickerson, *Nature* 344 (1988) 175–179.
- [72] M. J. Gait, H. W. D. Matthes, M. Singh, B. S. Sproat, R. C. Titmus, *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 6243–6248.
- [73] R. Arentzen, C. A. A. van Boeckel, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Synthesis* 1979, 137–139.
- [74] L. J. McBride, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 24 (1983) 245–248.
- [75] H. Hope, *Acta Crystallogr. Sect. B* 44 (1988) 22–26.
- [76] M. Eisenstein, H. Hope, T. E. Haran, F. Frolow, Z. Shakked, D. Rabinovich, *Acta Crystallogr. Sect. B* 44 (1988) 625–628.
- [77] W. Hendrickson, J. L. Smith, S. Sheriff, *Methods Enzymol.* 115 (1985) 41–55.
- [78] U. W. Arndt, *Methods Enzymol.* 114 (1985) 472–485.
- [79] R. Hamlin, *Methods Enzymol.* 114 (1985) 416–452.
- [80] T. Blundell, L. N. Johnson, *Protein Crystallography*, Academic Press, New York 1976.
- [81] D. Rabinovich, Z. Shakked, *Acta Crystallogr. Sect. A* 40 (1984) 195–200.
- [82] G. Ughetto, A. H.-J. Wang, G. J. Quigley, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 2305–2323.
- [83] G. J. Quigley, G. Ughetto, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. H.-J. Wang, A. Rich, *Science* 232 (1986) 1255–1258.
- [84] C. R. Calladine, *J. Mol. Biol.* 161 (1982) 343–352.
- [85] C. R. Calladine, H. R. Drew, *J. Mol. Biol.* 178 (1984) 773–782.
- [86] C. R. Calladine, H. R. Drew, *J. Mol. Biol.* 192 (1986) 907–918.
- [87] Z. Shakked, D. Rabinovich, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 47 (1986) 159–195.
- [88] A. C. Dock-Bregeon, B. Chevrier, A. Podjarny, J. Johnson, J. S. de Bear, G. R. Gough, P. T. Gilham, D. Moras, *J. Mol. Biol.* 209 (1989) 459–463.
- [89] A. Klug, A. Jack, M. A. Viswamitra, O. Kennard, Z. Shakked, T. A. Steitz, *J. Mol. Biol.* 131 (1979) 669–680.
- [90] S. C. Satchwell, H. R. Drew, A. A. Travers, *J. Mol. Biol.* 191 (1986) 659–675.
- [91] C. R. Calladine, H. R. Drew, M. J. McCall, *J. Mol. Biol.* 201 (1988) 127–137.
- [92] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, New York 1984.
- [93] W. Saenger, W. N. Hunter, O. Kennard, *Nature* 324 (1986) 385–388.
- [94] H. R. Drew, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* 151 (1981) 535–556.
- [95] M. L. Kopka, A. V. Fratini, H. R. Drew, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* 163 (1983) 129–146.
- [96] W. Saenger, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 16 (1987) 93–114.
- [97] E. Westhof, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 17 (1987) 125–144.
- [98] E. Westhof, *J. Biol. Macromol.* 9 (1987) 185–192.
- [99] J. M. Gottesfeld, J. Blanco, L. L. Tennant, *Nature* 329 (1987) 460–462.
- [100] L. Fairall, S. Martin, D. Rhodes, *EMBO J.* 8 (1989) 1809–1817.
- [101] J. Doucet, J.-P. Benoit, W. B. T. Cruse, T. Prange, O. Kennard, *Nature* 337 (1989) 190–192.
- [102] Z. Otwinowski, R. W. Schvitz, R.-G. Zhang, C. L. Lawson, A. Joachimiak, R. O. Marmorstein, B. F. Luisi, P. B. Sigler, *Nature* 355 (1988) 321–329.
- [103] M. Modrich, *Annu. Rev. Biochem.* 56 (1987) 435.
- [104] M. D. Topal, J. R. Fresco, *Nature* 263 (1976) 285.
- [105] M. D. Topal, J. R. Fresco, *Nature* 263 (1976) 290–293.
- [106] P. Strazewski, C. Tamm, *Angew. Chem.* 102 (1990) 37–59; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (1990) 36–57.
- [107] L. C. Sowers, G. V. Fazakerly, H. Kim, L. Dalton, M. F. Goodman, *Biochemistry* 25 (1986) 3983–3988.
- [108] A. R. Fersht, T. W. Knill-Jones, W. C. Tsui, *J. Mol. Biol.* 156 (1982) 37–51.
- [109] L.-S. Kan, S. Chandrasegaran, S. M. Pulford, P. S. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 4263–4265.
- [110] X. Gao, D. Patel, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 5178–5182.
- [111] G. V. Fazakerly, E. Quignard, A. Woisard, W. Guschlbauer, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, M. Radman, *EMBO J.* 5 (1986) 3697–3703.
- [112] D. J. Patel, L. Shapiro, D. Hare in F. Eckstein, D. M. J. Lilley (Hrsg.): *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Springer, Berlin 1987, S. 70–84.
- [113] N. C. Seeman, J. M. Rosenberg, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 804–808.
- [114] J. F. Fischer, P. A. Aristoff, *Prog. Drug Res.* 32 (1988) 412–415.
- [115] W. Hol, *Angew. Chem.* 98 (1986) 765–777; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 767–778.
- [116] G. J. Quigley, A. H.-J. Wang, G. Ughetto, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 7204–7208.
- [117] L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.* 3 (1961) 18–30.
- [118] M. H. Moore, W. N. Hunter, B. Langlois d'Estaintot, O. Kennard, *J. Mol. Biol.* 206 (1989) 693–705.
- [119] R. V. Gessner, D. L. Williams, A. Rich, C. A. Frederick, *Conf. abstr. sixth conversation Biomol. Stereodyn.* 1989, 104–105.

- [120] J. B. Chaires, K. R. Fox, J. E. Herrera, M. Britt, M. J. Waring, *Biochemistry* 26 (1987) 8227–8232.
- [121] Y.-C. Liaw, Y.-G. Gao, H. Robinson, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. H.-J. Wang, *Biochemistry* 28 (1989) 9913–9918.
- [122] L. D. Williams, M. Egli, Q. Gao, P. Bash, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, C. A. Frederick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 2225–2230.
- [123] A. H.-J. Wang, G. Ughetto, G. J. Quigley, T. Hakoshima, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, *Science* 225 (1984) 1115–1121.
- [124] A. H.-J. Wang, G. Ughetto, G. J. Quigley, A. Ring, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 4 (1986) 319–342.
- [125] K. Hoogsteen, *Acta Crystallogr.* 16 (1963) 907–916.
- [126] M.-K. Teng, N. Usman, C. A. Frederick, A. H.-J. Wang, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 2671–2690.
- [127] P. E. Pjura, K. Grzeskowiak, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* 197 (1987) 257–271.
- [128] J. A. Parkinson, J. Barber, K. T. Douglas, J. Rosamund, D. Sharples, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1989, 1023–1025.
- [129] M. A. A. F. Carondo, M. Coll, J. Aymami, A. H.-J. Wang, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, *Biochemistry* 28 (1989) 7849–7852.
- [130] B. Rosenberg, J. van Camp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature* 222 (1969) 385–386.
- [131] R. M. Wing, P. Pjura, H. R. Drew, R. E. Dickerson, *EMBO J.* 3 (1984) 1201–1206.
- [132] S. E. Sherman, D. Gibson, A. H.-J. Wang, S. J. Lippard, *Science* 230 (1985) 412–417.
- [133] S. E. Sherman, D. Gibson, A. H.-J. Wang, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 7368–7381.
- [134] M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1376–1380.
- [135] M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* 183 (1985) 553–563.
- [136] IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, *Eur. J. Biochem.* 131 (1983) 9–11 (Abbreviations and Symbols for the Description of Conformations of Polynucleotide Chains).
- [137] A. V. Fratini, M. L. Kopka, H. R. Drew, R. E. Dickerson, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 14686–14707.
- [138] R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* 166 (1983) 419–441.
- [139] R. E. Dickerson, *EMBO J.* 8 (1989) 1–4.
- [140] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* 171 (1953) 737–738.
- [141] R. E. Dickerson, H. R. Drew, *J. Mol. Biol.* 149 (1981) 761–786.
- [142] H. R. Drew, S. Samson, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 4040–4044.
- [143] S. Arnott, D. W. J. Hukins, *Biochem. Res. Commun.* 47 (1972) 1504–1509.
- [144] D. G. Brown, M. R. Sanderson, J. V. Skelly, T. C. Jenkins, T. Brown, E. Garman, D. I. Stuart, S. Neidle, *EMBO J.* 9 (1990) 1329–1333.
- [145] T. A. Larsen, D. S. Goodsell, D. Cascio, K. Grzeskowiak, R. E. Dickerson, *J. Biomol. Stereodyn.* 7 (1989) 477–483.
- [146] M. Coll, J. Aymami, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, A. H.-J. Wang, *Biochemistry* 28 (1989) 310–320.
- [147] A. H.-J. Wang, G. Ughetto, G. J. Quigley, A. Rich, *Biochemistry* 26 (1987) 1152–1163.
- [148] E. Westhoff, M. V. Hosur, M. Sundaralingam, *Biochemistry* 27 (1988) 5742–5747.
- [149] B. N. Conner, C. Yoon, J. L. Dickerson, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* 174 (1984) 663–695.
- [150] A. Rich, A. Nordheim, A. H.-J. Wang, *Annu. Rev. Biochem.* 53 (1984) 791–846.
- [151] S. Neidle, L. Pearl, J. V. Skelly, *Biochem. J.* 243 (1987) 1–9.
- [152] C. M. Ogata, W. Hendrickson, X. Gao, D. J. Patel, *Abstr. Am. Crystallogr. Assoc. Meet.* 17 (1989) 53–57.
- [153] S. C. Jain, H. M. Sobell, *Abstr. Am. Crystallogr. Assoc. Meet.* 18 (1990) 86–92.
- [154] K. Balendran, C. Bingman, M. Sundaralingam, *Abstr. Am. Crystallogr. Assoc. Meet.* 18 (1990) 86–90.
- [155] X. Li, C. Bingman, M. Sundaralingam, *Abstr. Am. Crystallogr. Assoc. Meet.* 18 (1990) 87–95.
- [156] L. Taberner, J. Aymami, J. A. Subirana, *Abstr. XVth Int. Congr. Int. Union Crystallogr. C-147* (1990) 04.02.08.
- [157] M. Sundaralingam, K. Balendran, C. Bingman, G. Zon, *Abstr. XVth Int. Congr. Int. Union Crystallogr. C-147* (1990) 04.02.05.
- [158] C. M. Ogata, W. A. Hendrickson, *Abstr. XVth Int. Congr. Int. Union Crystallogr. C-146* (1990) 04.02.03.
- [159] N. Verdager, J. Aymami, I. Fita, J. A. Subirana, *Abstr. XVth Int. Congr. Int. Union Crystallogr. C-148* (1990) 04.02.07.
- [160] F. J. M. van der Ven, C. W. Hilbers, *Eur. J. Biochem.* 178 (1988) 1–7.
- [161] L. D. Williams, M. Egli, G. Ughetto, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, G. J. Quigley, A. H.-J. Wang, A. Rich, C. A. Frederick, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 313–319.
- [162] L. D. Williams, C. A. Frederick, G. Ughetto, A. Rich, *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 5533–5540.
- [163] Y.-G. Gao, Y.-C. Liaw, H. Robinson, A. H.-J. Wang, *Biochemistry* 29 (1990) 10307–10311.
- [164] C. A. Frederick, L. D. Williams, G. Ughetto, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, G. J. Quigley, A. H.-J. Wang, *Biochemistry* 29 (1990) 2538–2542.