

Sequenzspezifische Erkennung und Modifikation von Doppelhelix-DNA durch Oligonucleotide

Von Nguyen T. Thuong und Claude Hélène*

Professor Charles Sadron zum 90. Geburtstag gewidmet

Viele natürlich vorkommende und synthetische Liganden können Nucleinsäuren selektiv erkennen, Oligonucleotide aber zeigen die höchste Erkennungsspezifität. Sie binden unter Bildung von Watson-Crick-Wasserstoffbrücken an eine komplementäre einsträngige Sequenz. Des weiteren können sie in der großen Furche von Doppelhelix-DNA bestimmte Sequenzen erkennen, indem sie mit Purinbasen der Watson-Crick-Basenpaare Hoogsteen- oder reverse Hoogsteen-Wasserstoffbrücken bilden, wobei eine Tripelhelix entsteht. An der sequenzspezifischen Wechselwirkung sind hauptsächlich Homopurin · Homopyrimidin-Sequenzen in der Doppelhelix beteiligt. Es ist noch immer eine Herausforderung für Chemiker, den Bereich der Erkennungssequenzen zu erweitern. Es sind sowohl thermodynamische als auch kinetische Parameter für die Bildung von Tripelhelices bestimmt worden. Diese Parameter zeigen beispielsweise, daß die Bildung einer Tripelhelix viel langsamer ist als die einer Doppelhelix. Nuclease-resistente Oligonucleotide, die aus dem α -Anomer von Nucleosiden (anstatt aus dem natürlich vorkommenden β -Anomer) dargestellt werden, bilden mit doppelsträngiger DNA ebenfalls Tripelhelices. Tripelhelix-bildende Oligonucleotide können mit DNA-intercalierenden Agentien verknüpft werden, wodurch sie eine höhere Bindungsaffinität erhalten. Oligonucleotide können auch durch Reagentien modifiziert werden, die durch chemische oder photochemische Aktivierung in der Zielsequenz irreversible Reaktionen induzieren. Es können so künstliche Nucleasen entwickelt werden, die eine hohe Sequenzspezifität selbst für Megabasen-DNA aufweisen. Tripelhelix-bildende Oligonucleotide können ferner zur selektiven Steuerung der Genexpression verwendet werden. Binden sie an regulatorische Bereiche bestimmter Gene, so können sie die Aktivierung (oder Repression) der Transkription verhindern. Werden sie in der Nähe oder downstream von der Stelle gebunden, an der die Transkription beginnt, so kann die Fortsetzung des Ablesevorgangs gehemmt werden. Es ist vorstellbar, daß sich neue genblockierende Agentien entwickeln lassen, die zur therapeutischen Behandlung genetischer Störungen eingesetzt werden können.

1. Einleitung

Die Erkennung spezifischer Nucleinsäuresequenzen ist schon seit vielen Jahren Thema einer Vielzahl von Forschungsarbeiten. Dieses besondere Interesse beruht auf der schon früh gemachten Beobachtung, daß in allen lebenden Organismen die Genexpression durch Regulatorproteine kontrolliert wird, die an spezifische Sequenzen auf ein- oder doppelsträngigen Nucleinsäuren binden. Während der letzten zehn Jahre ist es durch die Röntgenstrukturanalyse einiger Nucleinsäure-Protein-Komplexe gelungen, Einzelheiten über die an dieser molekularen Erkennung beteiligten Wechselwirkungen zu erfahren^[1]. Trotz der dabei und beim Studium von Modellverbindungen^[2] gewonnenen Erkenntnisse sind wir bisher noch nicht in der Lage, die Oligopeptidsequenz für die Erkennung einer beliebigen Nucleinsäuresequenz vorherzusagen.

Nucleinsäuren, insbesondere doppelsträngige DNA, binden viele natürlich vorkommende und synthetische Ligan-

den wie Antibiotica und Antitumormittel. Intercalierende Agentien schieben beispielsweise ihre aromatischen Ringe zwischen zwei benachbarte Basenpaare der Doppelhelix-DNA^[3]. Liganden, die in der kleinen Furche binden, greifen in biologische Prozesse ein, an denen DNA als Substrat beteiligt ist^[4]. Bis in die jüngste Zeit hinein war noch kein Ligand verfügbar, dessen Selektivität ausreichend ist, um innerhalb einer lebenden Zelle eine singuläre bestimmte Sequenz in einer Doppelhelix-DNA zu erkennen. Die Größe des DNA-Genoms in lebenden Organismen reicht von einigen Millionen Basenpaaren in Bakterien (4.5×10^6 in *Escherichia coli*, dem Bakterium, das im menschlichen Verdauungstrakt angesiedelt ist) bis hin zu einigen Milliarden Basenpaaren in höheren (eukaryontischen) Systemen (3×10^9 Basenpaare in menschlicher DNA; dabei haben Menschen noch nicht das größte Genom aller lebenden Organismen)^[5]. Viren, die sich nach einer Infektion auf Kosten der Wirtszelle vermehren, haben ein kleineres Genom, das entweder aus einzel- oder aus doppelsträngigen Ribo- oder Desoxyribonucleinsäuren (RNA bzw. DNA) besteht. So ist beispielsweise die gentische Information (das Genom) des HI-Virus (human immunodeficiency virus, HIV) in einer einsträngigen RNA-Kette enthalten, die aus etwa 9200 Nucleotiden besteht^[6].

Damit ein Ligand eine einzige bestimmte Sequenz einer Nucleinsäure erkennt, muß er mit einer bestimmten Zahl von Nucleotiden oder Basenpaaren in Wechselwirkung tre-

[*] Prof. C. Hélène
Laboratoire de Biophysique
Muséum National d'Histoire Naturelle
INSERM U.201 – CNRS URA 481
43 rue Cuvier, F-75231 Paris Cedex 05 (Frankreich)
Telefax: Int. +1/40 79 37 05
Dr. N. T. Thuong
Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS
F-45071 Orléans Cedex 02 (Frankreich)

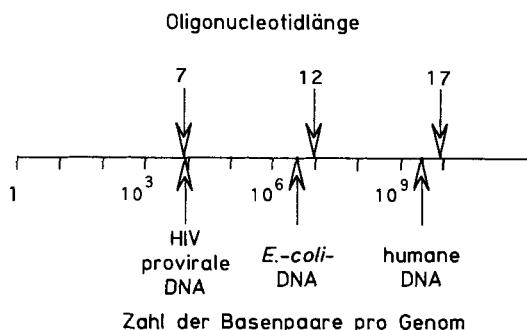


Abb. 1. Die Länge, die ein Oligonucleotid haben muß, um eine einzige DNA-Sequenz im Genom eines lebenden Organismus zu erkennen, ist unter der Annahme berechnet worden, daß eine Zufallsverteilung der Basenpaare vorliegt und daß der Anteil an A · T- und G · C-Basenpaaren bei jeweils 0.5 liegt. Für jede Nucleotidposition gibt es vier Möglichkeiten (A, T, G oder C). Da in doppelsträngiger DNA die Basenpaare immer komplementär zueinander sind (A zu T und G zu C), existieren bei n Basenpaaren $4^{n/2}$ Sequenzen für ungerade Werte von n und $4^{n/2} + 4^{n/2-1}$ Sequenzen für gerade Werte von n [195]. Wird eine einsträngige DNA oder RNA angegriffen, so existieren für eine Bindungsstelle von n Nucleotiden 4^n Sequenzen. In höheren (eukaryontischen) Organismen beträgt der Anteil an A · T-Basenpaaren 0.6. Die „Häufigkeit der nächsten Nachbarn“ ist ebenfalls bekannt, wodurch detailliertere Berechnungen möglich sind (siehe Lit. [7]). So ist beispielsweise die Sequenz $^5\text{CG}^3$ (aber nicht $^5\text{GC}^3$) in eukaryontischen Systemen weniger häufig vertreten (etwa fünfmal weniger häufig als statistischen Berechnungen zufolge). Sequenzen, die ausschließlich C und G mit einigen $^5\text{CG}^3$ -Sequenzen enthalten, werden in eukaryontischer DNA mit geringerer Wahrscheinlichkeit gefunden als Sequenzen, die viele A- und T-Basen enthalten. Das Genom von *E. coli* (4.5×10^6 Basenpaare) und das menschliche Genom (3×10^9 Basenpaare) sind zusammen mit dem Genom des HI-Virus durch Pfeile gekennzeichnet. Die genetische Information des HIVs ist in einer einsträngigen RNA codiert. Infolge einer Infektion wird diese RNA durch reverse Transkription in doppelsträngige DNA kopiert, die in die DNA der infizierten Zelle eingebaut wird. Eine Minimallänge von ca. 17 Basen ist deshalb notwendig, um eine einzigartige Sequenz innerhalb der proviralen DNA zu erkennen, wenn sie einmal in das Genom der infizierten Zelle integriert ist.

ten, die von der Größe der Nucleinsäure abhängt (Abb. 1). Die minimale Zahl an Basenpaaren, die erkannt werden muß, beträgt bei einem Bakterium wie *E. coli* (4.5×10^6 Basenpaare) etwa 11, bei einer menschlichen Zelle (3×10^9 Basenpaare)

dagegen etwa 17^[7]. Diesen Überlegungen liegt eine statistische Verteilung der Basenpaare im DNA-Genom und eine gleiche Anzahl von A · T- und G · C-Basenpaaren zugrunde. Genauere Berechnungen können durchgeführt werden, wenn man zusätzliche Parameter wie „die Häufigkeit nächster Nachbarn“ („nearest neighbor frequencies“), die für eine Vielzahl von Organismen ermittelt worden ist, berücksichtigt^[7].

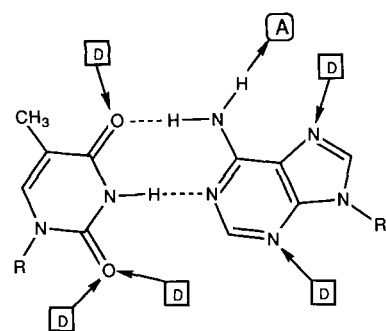
Die einzigen Nucleinsäure-bildenden Liganden, von denen bisher bekannt ist, daß sie eine derartig hohe Spezifität aufweisen, sind die Nucleinsäuren selbst. Seit der Entdeckung der Doppelhelix-Struktur der DNA im Jahre 1953^[8] liefert das auf der Bildung von Basenpaaren beruhende Watson-Crick-Modell den Code für die Erkennung jeder beliebigen einsträngigen Nucleinsäuresequenz. Zwei Wasserstoffbrückenbindungen ermöglichen die Erkennung von Adenin (A) durch Thymin (T) oder Uracil (U), und drei Wasserstoffbrückenbindungen sind an der Erkennung von Guanin (G) durch Cytosin (C) beteiligt (Abb. 2). Diese Regeln ermöglichen es, Oligonucleotide für die Erkennung jeder beliebigen Basensequenz auf einer einsträngigen Nucleinsäure zu entwickeln. Der Isomorphismus der Purin · Pyrimidin-Basenpaare garantiert, daß am Phosphodiester-Rückgrat einer Doppelhelix keine größere Verformung auftritt (die beiden Ketten winden sich in regelmäßiger Weise umeinander). Andere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Purinen und/oder Pyrimidinen als die A · T(U)- und G · C-Wechselwirkungen sind zwar möglich, führen aber zur Verzerrung des Phosphodiester-Rückgrats, was energetische Nachteile hat, so daß diese Wechselwirkungen bei einer perfekten Doppelhelix nicht zum Zug kommen. Unter bestimmten Umständen können jedoch auch Basenpaare wie G · T („Wobble“-Basenpaar) in der Doppelhelix vorkommen. Die hohe Zuverlässigkeit der DNA-Replikation, durch die sichergestellt ist, daß während der Zellteilung keine genetische Information verloren geht, erfordert ein hoch entwickeltes Korrekturverfahren, durch das falsche Basen, die bei der Replikation eingebaut wurden, wieder eliminiert werden^[9].



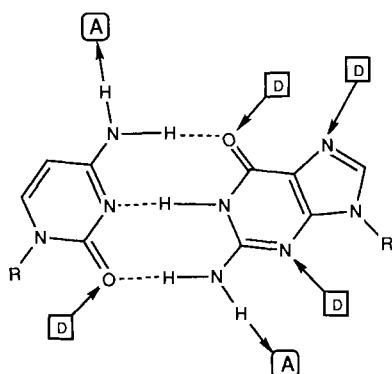
Nguyen Thanh Thuong verließ Vietnam 1950 im Alter von zwanzig Jahren. Er ging nach Frankreich und studierte dort von 1954–1958 Chemie an der Ecole Supérieure de Chimie de Mulhouse. 1960 promovierte er bei P. Chabrier in Paris. Bis 1978 arbeitete er als Organiker in der Industrie, dann ging er an das Centre de Biophysique Moléculaire (CNRS) in Orléans. Sein Arbeitsgebiet ist die Synthese modifizierter Oligonucleotide und deren Anwendung in der Molekularbiologie.



Claude Hélène wurde 1938 geboren. Nach dem Studium an der Ecole Normale Supérieure de Saint-Cloud promovierte er 1966 an der Universität von Paris. 1967 ging er als CNRS-Forscher an das Centre de Biophysique Moléculaire in Orléans, dessen Direktor er 1974 wurde. 1976 wurde er auf den Lehrstuhl für Biophysik am Muséum National d'Histoire Naturelle in Paris berufen, wo er 1980 eine neue INSERM- und CNRS-Forschungsabteilung schuf. Seit 1990 ist er darüber hinaus wissenschaftlicher Direktor bei Rhône-Poulenc. 1988 wurde er zum ordentlichen Mitglied der Französischen Akademie der Wissenschaften gewählt. Claude Hélène hat sich schon früh mit der Photochemie von Nucleinsäuren sowie mit Protein/Peptid-Nucleinsäure-Wechselwirkungen befaßt. Während der letzten zehn Jahre hat er neue Ansätze auf dem Gebiet der Antisense- und der Anti-Gen-Oligonucleotide entwickelt.



Thymin · Adenin



Cytosin · Guanin

Abb. 2. Bildung von Watson-Crick-Basenpaaren. Die Donor(D)- und Acceptor(A)-Bindungsstellen innerhalb der großen und kleinen Furche sind durch Pfeile gekennzeichnet (aus Lit. [2]).

Es ist schon seit langem bekannt, daß Nucleinsäure-Basenpaare in doppelhelicaler DNA sowohl in der kleinen als auch in der großen Furche der Doppelhelix noch weitere Möglichkeiten zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen haben. Diese Möglichkeiten können für die sequenzspezifische Erkennung genutzt werden (siehe Abb. 2)^[2]. Einige Jahre nach der Entdeckung der DNA-Doppelhelix-Struktur^[8] fand man, daß aus Polynucleotiden auch *Tripelhelix*-Strukturen aufgebaut werden können^[10]. Zwei Ketten des Polyribonucleotids poly(rU) konnten gleichzeitig an eine Kette poly(rA) binden. Diese Beobachtung war Ausgangspunkt für eine Reihe von Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, daß Doppelhelices, die in einer Kette nur Purine enthalten, ein drittes Polynucleotid binden können, das entweder nur aus Pyrimidinen (z.B. Bindung von poly(dCT) an poly(dGA) · poly(dCT)) oder nur aus Purinen (z.B. Bindung von poly(dG) an poly(dG) · poly(dC)) aufgebaut ist (Abb. 3)^[11–13]. Die an der Bildung der Tripelhelix beteiligten Wasserstoffbrücken werden häufig als Hoogsteen-Wasserstoffbrücken bezeichnet. Hoogsteen entdeckte, daß in Mischkristallen aus Adenin- und Thyminderivaten ein Wasserstoffbrückenbindungsmuster vorliegt, das von dem der Watson-Crick-Basenpaare abweicht^[14]. Derartige Wasserstoffbrückenbindungen treten auf, wenn ein (dritter) Strang poly(dT) an eine poly(dA) · poly(dT)-Watson-Crick-Doppelhelix bindet.

Das Interesse an Tripelhelices ist in jüngster Zeit aufgrund folgender Erkenntnisse neu belebt worden:

1) Sich spiegelbildlich wiederholende Homopurin · Homopyrimidin-Sequenzen von circularer doppelsträngiger DNA

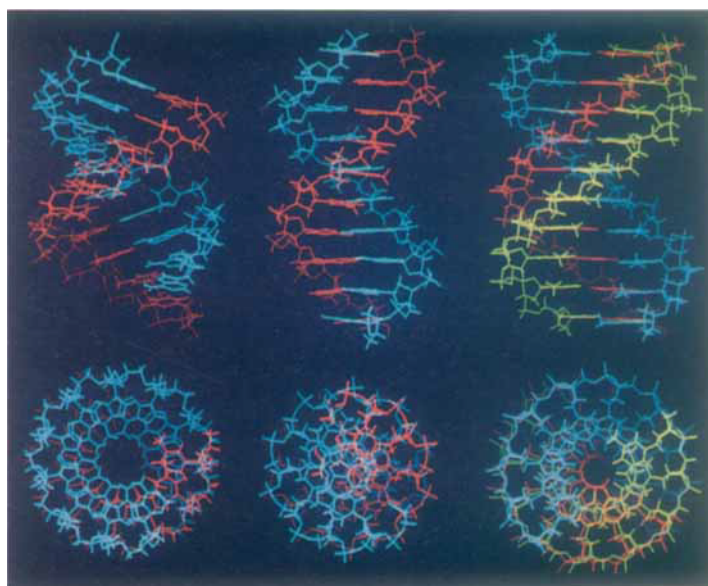


Abb. 3. Modelle für A-DNA (links), B-DNA (Mitte) und Tripelhelix-DNA (rechts). Im unteren Teil sind die Strukturen in der Aufsicht wiedergegeben. Die Strukturen von A- und B-DNA wurden mit den von Arnott et al. [208] bestimmten Atomkoordinaten erhalten. Die Tripelhelix-Struktur wurde durch Energieminimierungsstudien ausgehend von der durch Röntgenbeugungsanalyse ermittelten Struktur für poly(dA) · 2 poly(dT)-Fasern [50] erhalten. Bei der hier betrachteten Tripelhelix ist der dritte Strang nur aus Pyrimidinbasen aufgebaut, die zu dem Purinstrang der Doppelhelix Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen (siehe Abb. 5) bilden. Der dritte Strang ist parallel zum Watson-Crick-Purinstrang ausgerichtet. Weitere denkbare Tripelhelix-Strukturen werden im Text erörtert.

bilden unter superhelicaler Spannung eine neue Struktur, die als H-DNA bezeichnet wird^[15–17]. Diese Struktur entsteht durch gleichzeitige Bildung einer Tripelhelix und einer einsträngigen Schleife (Abb. 4) innerhalb der superhelicalen, circularen DNA.

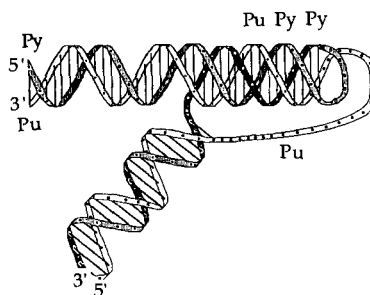


Abb. 4. Struktur von H-DNA, die sich bildet, wenn eine spiegelbildliche Polypurin · Polypyrimidin-Sequenz innerhalb einer circularen DNA den Spannungen durch Superspiralisierung (supercoiling) ausgesetzt ist. Die Hälfte des Polypyrimidinstrangs klappt zurück auf die pu · py-Doppelhelix, so daß sich eine py × pu · py-Tripelhelix bildet und die komplementäre Hälfte der Polypurinsequenz einsträngig vorliegt. Alternativ kann auch die Polypurinsequenz auf die pu · py-Doppelhelix zurückklappen, so daß eine pu × pu · py-Tripelhelix und ein Polypyrimidin-Einzelstrang entstehen (nach Lit. [16]).

2) Kurze Oligonucleotide können durch die sequenzspezifische Knüpfung von Hoogsteen-Wasserstoffbrücken unter Bildung einer kurzen Tripelhelix in der großen Furche von doppelhelicaler DNA gebunden werden^[18–20, 99].

Dieser Übersichtsartikel befaßt sich hauptsächlich mit der Bildung von Tripelhelices durch Bindung kurzer Oligonucleotide an Doppelhelix-DNA. In den letzten Jahren sind viele neue Erkenntnisse zu Struktur, Thermodynamik und Kinetik

derartiger Wechselwirkungen gewonnen worden. Die Möglichkeit auf der Basis der DNA-Erkennung durch Tripelhelix-bildende Oligonucleotide eine neue Generation sequenzspezifischer Regulatoren für die Genexpression zu entwickeln, weckt ein besonderes Interesse für die Chemie und Biologie von Oligonucleotid-Analoga. Wir haben diesen Ansatz als „Anti-Gen-Strategie“^[21] (ein spezifisches Gen ist das Ziel – der Bindungsort – für das Tripelhelix-bildende Oligonucleotid) bezeichnet in Analogie zur „Antisense-Strategie“ (bei der das Oligonucleotid eine einsträngige, „sense“-Nucleinsäure, z.B. eine Boten-RNA (messenger RNA, mRNA) oder eine virale RNA, unter Bildung von Watson-Crick-Basenpaaren angreift). Da es zur Antisense-Strategie neuere Übersichtartikel gibt^[22–25], erwähnen wir diesen Aspekt der Oligonucleotidchemie und -biologie in diesem Aufsatz nur dann, wenn in beiden Strategien ähnliche chemische Modifikationen benutzt worden sind.

2. Tripelhelix-Bildung durch Oligonucleotide

2.1. Basentriplets

Wie in der Einleitung dargelegt, beruht die Bildung von Tripelhelices auf der Knüpfung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Basen eines dritten Strangs und Purinen, die bereits über Watson-Crick-Wasserstoffbrücken mit Pyrimidinen verbunden sind. Abbildung 5 zeigt die Basentriplets, die mit natürlich vorkommenden Basen gebildet werden könnten^[21]. Einige Merkmale sind von Bedeutung:

1) Alle Basentriplets in Abbildung 5 sind durch zwei Wasserstoffbrücken zwischen den Purinen der A · T- und G · C-Basenpaare und der dritten Base charakterisiert.

2) Damit Guanin zwei Wasserstoffbrücken zu einem G · C-Basenpaar ausbilden kann, muß Cytosin protoniert werden. Der pK-Wert von isoliertem Desoxycytidin beträgt 4.3; in Oligonucleotiden und mehrsträngigen Nucleinsäuren liegt der pK-Wert infolge des polyanionischen Charakters der Nucleinsäuren jedoch bei höheren Werten. Homopyrimidin-Oligonucleotide können im sauren pH-Bereich stabile Tripelhelices aufbauen, deren Stabilität jedoch erwartungsgemäß mit steigendem pH-Wert abnimmt. Die pH-Abhängigkeit wird durch die Verteilung der Cytosine in der Oligonucleotidsequenz beeinflusst. Benachbarte Cytosine sind aufgrund der elektrostatischen Abstoßung zwischen den protonierten Basen weniger günstig.

3) Alle Basentriplets, die T, C oder G im dritten Strang enthalten, können zwei isomere Konfigurationen annehmen. Im einen Fall (linke Seite von Abb. 5) sind die Wasserstoffbrücken gemäß dem von Hoogsteen in Mischkristallen von A und T entdeckten Schema^[14] angeordnet. Derartige Basentriplets werden als *Hoogsteen-Basentriplets* bezeichnet. Im anderen Fall (rechte Seite von Abb. 5) ist die Base im dritten Strang um 180° gedreht und man spricht von *reversen Hoogsteen-Basentriplets*. Adenin als Base im dritten Strang kann nur aus einer Konfiguration heraus zwei Wasserstoffbrücken bilden. Das dabei entstehende A × A · T-Basentriplett gehört in die Kategorie der reversen Hoogsteen-Basentriplets. Inosin bildet mit A · T-Basenpaaren zwei Wasserstoffbrücken des Hoogsteen-Typs (I × A · T).

4) Ein wichtiger Parameter für das Design von Oligonucleotiden, die in der großen Furche von Doppelhelix-DNA bin-

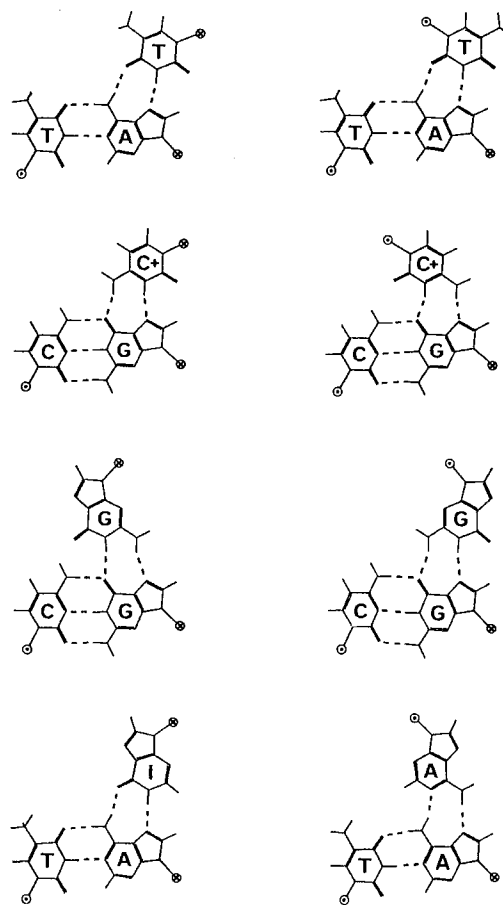


Abb. 5. Basentriplets, die aus Watson-Crick-A · T- und -G · C-Basenpaaren sowie T, protoniertem C (C⁺), G, A und I entstehen können. Liegen die Basen im dritten Strang bezogen auf den Zuckerring in der *anti*-Konformation vor, so entsprechen die in der linken Spalte wiedergegebenen Triplets einer parallelen Ausrichtung des dritten Strangs in Bezug auf die Homopurinsequenz der Ziel-DNA, während die Triplets in der rechten Spalte einer antiparallelen Ausrichtung entsprechen. Bei den T × A · T-Triplets zeigt das Triplet auf der linken Seite ein Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungsmuster, während auf der rechten Seite die entsprechende reverse Hoogsteen-Bindung abgebildet ist (siehe Text). Einige dieser Basentriplets sind in Kristallstrukturen von Transfer-RNAs (tRNAs) nachgewiesen worden [26, 27] [z.B. G × G · C (reverse Hoogsteen-Bindung) und A × A · U]. Selbstverständlich gibt es darüber hinaus noch viele andere Möglichkeiten für die Bindung zwischen Basen des dritten Strangs und den Basen der Watson-Crick-Basenpaare, wenn nur eine Wasserstoffbrückenbindung involviert ist. Die Strukturen der hier abgebildeten Basentriplets wurden an energieminierten Tripelhelices bestehend aus zehn gleichen Basentriplets ermittelt (siehe Lit. [63]).

den, ist der Isomorphismus der Basentriplets. Sind die C-1'-Atome der Watson-Crick-Basenpaare festgelegt, so hängt die Lage des C-1'-Atoms des Nucleotids im dritten Strang vom Basentriplett ab (Abb. 6). Nur zwei Triplets, T × A · T und C⁺ × G · C sind isomorph. Andere Kombinationen führen zu Verzerrungen am Rückgrat der Tripelhelix. Deren Stabilität verringert sich, wenn an mehreren Stellen solche Verzerrungen auftreten.

2.2. Orientierung des dritten Strangs

Gemäß Abbildung 5 können Tripelhelix-bildende Oligonucleotide aus natürlich vorkommenden Nucleosiden aufgebaut werden. Die Basen des dritten Strangs binden über Wasserstoffbrücken an Purinbasen der DNA. Damit Verzerrungen des Oligonucleotid-Grundgerüsts durch einen Wech-

sel der Bindung von einem Strang der DNA auf den anderen vermieden werden, entstehen Tripelhelices bevorzugt an Homopurin · Homopyrimidin-Sequenzen der DNA (d.h. alle Purinbasen der Zielsequenz befinden sich auf demselben Strang der Doppelhelix).

Wie bereits festgestellt (Abb. 6), sind nur zwei Basentriplets ($T \times A \cdot T$ und $C^+ \times G \cdot T$) isomorph, wenn Hoogsteen-Wasserstoffbrücken vorliegen. Deshalb hat die Mehrzahl der neueren Untersuchungen Tripelhelix-bildende Oligonucleotide, die ausschließlich Pyrimidine (T und C) enthalten, zum Thema^[21]. Trotz der Gerüstverzerrung, die auf den Heteromorphismus anderer Basentriplets zurückzuführen ist, können auch andere Oligonucleotide als solche, die ausschließlich aus Pyrimidinen aufgebaut sind, mit Homopurin · Homopyrimidin-Sequenzen von DNA Tripelhelices bilden. So bilden Oligonucleotide, die entweder G und T^[28, 29], G und A^[30, 31] oder G, T und C^[32] enthalten, Tripelhelices. Auch die Bildung von Purin \times Purin · Pyrimidin-Triplets ist möglich, und zwar entweder mit intramolekular gefalteten Oligonucleotiden^[33–35], mit Polynucleotiden mit Wiederholungseinheiten^[36, 37] oder mit Polypurin · Polypyrimidin-Sequenzen in „superspiralisierten“ (supercoiled) Plasmiden^[38–40].

Mit allen Nucleotiden in der *anti*-Konformation^[*] führen Hoogsteen-Wasserstoffbrücken zu einer parallelen Ausrichtung des dritten Strangs in bezug auf den Homopurin-Strang. Reverse Hoogsteen-Wasserstoffbrücken entsprechen einer antiparallelen Ausrichtung. Bei einer *syn*-Konformation der Nucleotide des dritten Strangs sind die Ausrichtungen entgegengesetzt.

Die Orientierung der Oligonucleotide des dritten Strangs ist über verschiedene Wege nachgewiesen worden:

1) Bei Oligonucleotiden mit einer symmetrischen Basensequenz (d.h. wenn in $5' \rightarrow 3'$ -Richtung dieselbe Basensequenz abgelesen wird wie in $3' \rightarrow 5'$ -Richtung) ermöglichen an bestimmten Positionen angekuppelte Spaltungsreagentien wie Fe-EDTA^{[**][19, 30]} oder Photovernetzungsreagentien eine direkte Bestimmung der Orientierung durch Analyse der Spaltungsstellen oder der quervernetzten Stellen (eine Spaltung an den quervernetzten Stellen wurde durch alkalische Behandlung erzielt^[18, 41]).

2) Bei asymmetrischen Sequenzen wurden Schmelzkurvenbestimmungen (mit optischen Methoden)^[42], Footprinting^[60, 122] und Gel-Retentionsexperimente^[29, 98] mit Sequenzen entgegengesetzter Polarität angewendet, um die Orientierung des dritten Strangs zu ermitteln.

[*] Die Grundlagen der Struktur von Nucleinsäuren und deren Bausteinen sind in jedem Biochemie-Lehrbuch beschrieben. Siehe beispielsweise D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH, Weinheim, 1992, Kap. 28.

[**] Im Beitrag verwendete **Abkürzungen**: Ac: Acetyl, amP: 2-Aminopurin-9- β -D-2'-desoxyfuranosid (17a), Acr: 6-Chlor-2-methoxyacridin, bp: Basenpaar, B: Nucleinbase, B': N-geschützte Nucleinbase, Bz: Benzoyl, Cm: 2'-O-Methylpseudoisocytidin (14a), CPG: controlled pore glass, DMT: Dimethoxytrityl, dNu: 2'-Desoxynucleosid, Dr: Daunorubicin, EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure, Elli: Ellipticin, Et: Ethyl, Etd: Ethidium, Ibu: Isobutylryl, iPr: Isopropyl, Me: Methyl, MODA: 6-Methyl-8-oxo-2'-desoxyadenosin, MPPO: Methylphyrroprophyrin XXI, Phe: Phenacyl, OP: Orthophenanthrolin, P1: 5-Amino-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-3-methyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-on, p: Phosphat, pAr: Arylphosphat, ps: Thiophosphat, psR: Phosphorothioester, Pf: Proflavin, PNA: Polyamid-Nucleinsäure, Pso: Psoralen, Pyr: Pyridocarbazol, $Z \times Y \cdot X$: Basentriplett, in dem $Y \cdot X$ ein Watson-Crick-Basenpaar darstellt und Z das Oligonucleotid des dritten Strangs (\times steht für Hoogsteen- oder reverse Hoogsteen-, \cdot für Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen).

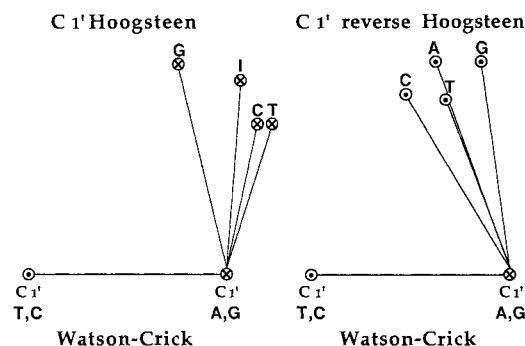


Abb. 6. Isomorphismus der Basentriplets. Die C1'-Atome der drei Nucleotide, die jeweils zu einem Triplett gehören, sind in der Weise abgebildet, daß die C1'-Atome des Watson-Crick-Basenpaars T · A oder C · G in ihrer Lage fixiert sind. Bei den C1'-Atomen des Nucleotids im dritten Strang wird zwischen Hoogsteen-Wasserstoffbrücken (linke Spalte von Abb. 5) und reversen Hoogsteen-Wasserstoffbrücken (rechte Spalte von Abb. 5) unterschieden.

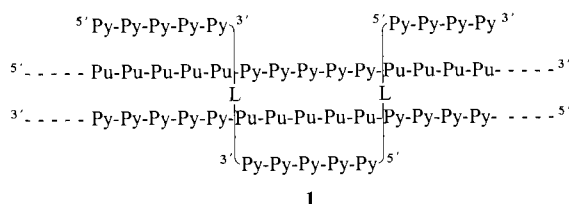
In allen Fällen entsprach die Orientierung den oben dargestellten Regeln. Oligopyrimidine sind in bezug auf den Homopurinstrang der Ziel-DNA-Sequenz parallel angeordnet^[18, 19, 41, 42]. Oligopurine binden in antiparalleler Richtung^[30]. Für G und T enthaltende Oligonucleotide wurde zunächst eine parallele Anordnung bezüglich der Homopurinsequenz vorgeschlagen^[28], später konnte jedoch gezeigt werden, daß in diesem Fall eine antiparallele Anordnung vorliegt^[29]. Die intrinsische Stabilität von $T \times A \cdot T$ - und $G \times G \cdot C$ -Basentriplets begünstigt Hoogsteen-Wasserstoffbrücken. Bei der reversen Hoogsteen-Konfiguration sind dagegen die energetischen Einbußen, die auf eine Gerüstverzerrung – die beiden Basentriplets sind nicht isomorph (Abb. 6) – zurückzuführen sind, weniger bedeutend. Man könnte daher vermuten, daß die Orientierung eines G und T enthaltenden Oligonucleotids von der Zahl der TpG- und GpT-Einheiten im dritten Strang abhängig ist. Diese Vermutung ist richtig, wie experimentell gefunden wurde^[43]. Ein T, C und G enthaltendes Oligonucleotid [$dT_4CT_4G_6$] bindet bezüglich der Homopurinsequenz antiparallel^[32]. In diesem Komplex liegen sechs benachbarte $G \times G \cdot C$ - sowie ferner $T \times A \cdot T$ - und $C^+ \times G \cdot C$ -Hoogsteen-Triplets vor.

2.3. Ausweitung der Erkennungssequenzen für die Bildung von Tripelhelices

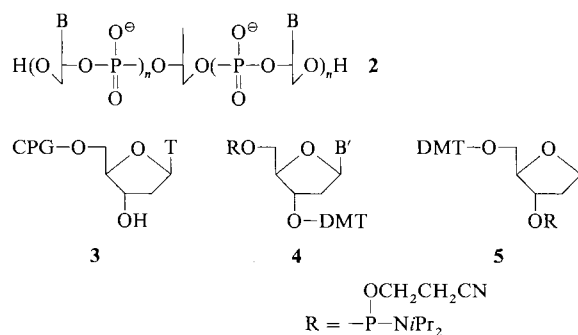
Die Bildung einer Tripelhelix erfordert eine Homopurin · Homopyrimidin-Sequenz in der Ziel-DNA. 1-(2-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-4-(3-benzamidophenyl)imidazol, ein nicht-natürliches Desoxynucleotid, bindet, wie kürzlich gezeigt wurde^[21, 5], sowohl an T · A- als auch an C · G-Watson-Crick-Basenpaare, wenn es in ein Oligopyrimidin eingebaut ist. Obwohl dieses Derivat nicht zwischen T · A- und C · G-Basenpaaren unterscheidet, ermöglicht es doch die Tripelhelix-Bildung bei Oligopurinsequenzen, die durch einen Pyrimidinbaustein unterbrochen sind. Es bleibt eine Herausforderung, Oligonucleotide zu entwickeln, die gemischte Purin/Pyrimidin-Sequenzen erkennen. Neuere Arbeiten haben gezeigt, daß es möglich ist, Tripelhelices mit Bindungen zu alternierenden Strängen zu erhalten. Die Bildung derartiger Strukturen erlaubt die Erkennung gemischter Sequenzen, bei denen die Homopurin-Abschnitte im Wechsel auf einem der beiden DNA-Stränge liegen.

2.3.1. Oligonucleotide mit entgegengesetzten Polaritäten

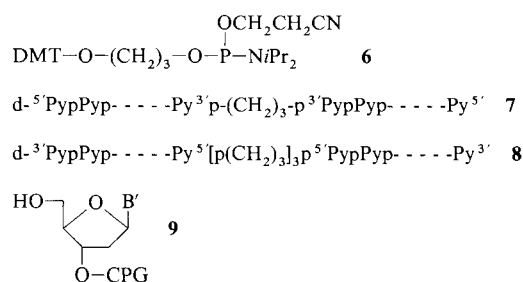
Zwei Homopyrimidin-Oligonucleotide, die bezogen auf die Homopurinsequenz der Doppelhelix-DNA in paralleler Anordnung binden, können an ihren 3'- oder 5'-Enden miteinander verknüpft werden^[44–46]. Es sind Verbindungsstücke (linker) beschrieben worden, mit denen es möglich ist, Homopyrimidin-Oligonucleotide gleichzeitig an benachbarte Purinabschnitte auf unterschiedlichen Strängen der DNA-Doppelhelix in paralleler Weise aber mit entgegengesetzter Orientierung zu binden (siehe 1).



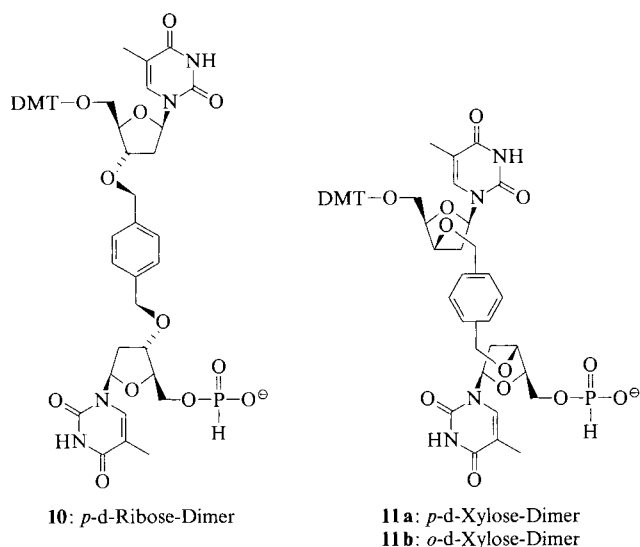
Das 3'-3'-Oligodesoxynucleotid **2** mit zwei Pyrimidinsequenzen zu beiden Seiten von 1,2-Didesoxy-D-ribose war durch Synthese an einem festen Träger **3** zugänglich, wobei das erste Nucleotid über seine 5'-Hydroxygruppe an den CPG-Träger gebunden wurde. Nach dem Aufbau des ersten Pyrimidin-Oligomers in 5'-3'-Richtung mit Nucleosid-5'-phosphoramidaten **4**, wurde das Verknüpfungsstück über sein 3'-Phosphoramidat (**5**) mit entgegengesetzter Orientierung eingeführt. Die zweite Pyrimidinsequenz wurde anschließend in normaler 3'-5'-Richtung über klassische Nucleosid-3'-phosphoramidate aufgebaut^[44].



Über einen analogen Weg und das Phosphoramidat von 1,3-Propandiol **6** konnten Pyrimidin-Oligonucleotide mit einer 3'-3'- oder einer 5'-5'-Internucleotid-Verknüpfung (**7** bzw. **8**) aufgebaut werden^[45]. Letztere wurden an dem klassischen Träger **9** (das erste Nucleotid wird über seine 3'-Hydroxygruppe an CPG gebunden) in umgekehrter Richtung



wie zuvor beschrieben aufgebaut. Auf ähnliche Weise wurden mit den H-Phosphonaten der Verbindungsstücke **10**, **11a** und **11b** 3'-3'-verknüpfte Pyrimidin-Oligonucleotide erhalten^[46], die abwechselnd an die beiden Stränge von Doppelhelix-DNA-Fragmenten binden.



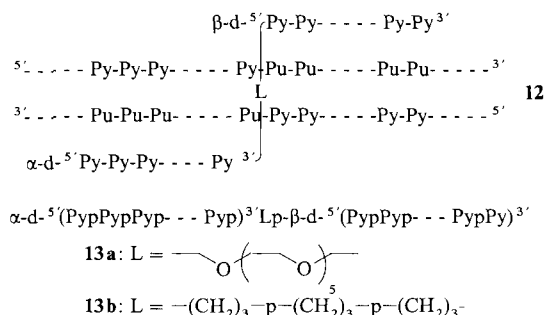
2.3.2. Oligonucleotide mit gleicher Polarität

In Abhängigkeit von der Art der an der Tripelhelix-Bildung beteiligten Basentriplets können die Oligonucleotide im dritten Strang eine unterschiedliche Orientierung annehmen. Aufgrund dieser Tatsache sollte es möglich sein, daß auch Oligonucleotide, die ausschließlich natürlich vorkommende 3'-5'-Phosphodiester-Bindungen enthalten, alternierend an die beiden Stränge einer Doppelhelix-DNA binden, indem sie von einer Homopurinsequenz zur anderen wechseln. Sun et al.^[43] haben gezeigt, daß die Orientierung von Oligonucleotiden, die G und T enthalten, von der Anzahl an GpT- und TpG-Schritten abhängt. Demzufolge ist es möglich, G und T enthaltende Oligonucleotide zu designen, die benachbarte Purinabschnitte auf alternierenden Strängen der Doppelhelix erkennen können. Die entgegengesetzte Orientierung, die Pyrimidin- und Purin-Oligonucleotide bei der Bindung an Homopurinsequenzen von Doppelhelix-DNA einnehmen, haben Beal und Dervan^[47] verwendet, um Oligonucleotide aus gemischten Sequenzen zu entwickeln, die Tripelhelices durch Bindung an alternierenden Strängen bilden können. Die Strukturen hängen davon ab, ob es sich bei der Bindungsstelle um 5'-(Purin)_m(Pyrimidin)_n-3' oder um 5'-(Pyrimidin)_m(Purin)_n-3' handelt. Im ersten Fall werden eine Pyrimidin- und eine Purin-Domäne benötigt, die über einen 3'-5'-Phosphodiester verknüpft sind, während im zweiten Fall mindestens zwei Nucleotide als Bindeglieder an der Stelle des Crossovers in der großen Furche benötigt werden^[47].

2.3.3. Oligonucleotide, die aus α- und β-Oligomeren gleicher Polarität aufgebaut sind

Die entgegengesetzte Orientierung des Pyrimidin-Oligo-α-nucleotids im dritten Strang in bezug auf das entsprechende

β -Oligomer^[1,22] (siehe Abschnitt 3.3 für α -Oligodesoxynucleotide) kann dazu verwendet werden, einen weiteren Satz von Molekülen aufzubauen, die an benachbarte Homopurinsequenzen auf alternierenden Strängen binden können (siehe 12). Ein Oligo- α -desoxynucleotid, das entweder über Hexa-



ethylenglycol (**13a**) oder über 1,3-Propandiol (**13b**) an ein β -Oligomer mit gleicher Polarität geknüpft ist, kann auf einfache Weise mit Hilfe des klassischen festen Trägers **9** und 3'-Phosphoramidaten von α - und β -Desoxynucleosiden dargestellt werden (V. Roig, N. T. Thuong, unveröffentlichte Ergebnisse).

2.4. Struktur der Tripelhelices

Bisher gelang noch keine Kristallstrukturanalyse von kurzen dreisträngigen Oligonucleotiden, die eine detaillierte Beschreibung der Konformation aller Nucleotideinheiten in den drei Strängen geben könnte. Lediglich Faserbeugungsdaten sind erhältlich^[48–51]. Tripelhelicale Komplexe (intra- oder intermolekulare) sind NMR-spektroskopisch intensiv untersucht worden^[52–58]. Basierend auf den Faserbeugungsdaten hat man geschlossen, daß die dreisträngige Struktur poly(dT) · poly(dA) · poly(dT) eine große axiale Ganghöhe pro Basentriplett hat, wobei die drei Stränge eine 12faltige Helix des A-Typs bilden, die ausschließlich C3'-endo-Furanoseringe enthält. Im Gegensatz dazu haben zweidimensionale ¹H-NMR-Untersuchungen an einem aus 31 Basen aufgebauten Oligonucleotid, das sich im sauren pH-Bereich zu einer stabilen Tripelhelix faltet, gezeigt, daß die meisten der Triplett-Zucker eine angenäherte C2'-endo-Konformation aufweisen^[54]. Stapelwechselwirkungen zwischen den Purinen in einem intermolekularen Komplex bestehend aus elf Basentriplets lassen vermuten, daß der Oligopurinstrang eine Konformation mit A-helicale Basenstapelung annimmt^[52]. Eine Moleküldynamik(MD)-Simulation des DNA-Triplex d(TC)₅ · d(GA)₅ · d(TC)₅ ergab ebenfalls erhebliche Abweichungen vom Faserbeugungsmodell^[59].

Für eine intramolekulare Tripelhelix, bestehend aus sieben Basentriplets, konnte mit Hilfe von dreidimensionalen homonuclearen NOESY-TOCSY-¹H-NMR-Methoden eine Zuordnung der nicht austauschbaren Protonen getroffen werden^[58]. Auch austauschbare Protonen sind sowohl für Watson-Crick- als auch für Hoogsteen-Wasserstoffbrücken^[52–54] identifiziert worden. Darüber hinaus kann man in C⁺ × G · C-Basentriplets Cytosin und protoniertes Cytosin unterscheiden. In Zukunft wird es sicherlich möglich sein, durch NMR-Untersuchungen noch detailliertere Informa-

tionen über lokale Konformationen (und über deren Sequenzabhängigkeit) innerhalb einer Tripelhelix zu erhalten.

Durch Tripelhelix-Bildung induzierte Konformationsänderungen in der DNA konnten auch durch Veränderung der Reaktivität der Basen gegenüber chemischen oder photochemischen Reagentien nachgewiesen werden. Die Spaltung mit einem Kupfer-Phenanthrolin-Komplex wurde verwendet, um einen „Fußabdruck“ (foot print) des Tripelhelix-bildenden Oligonucleotids auf der DNA-Doppelhelix zu erhalten^[60]. Während der durch das Oligonucleotid abgedeckte Bereich geschützt war, wurde auf dem purinreichen Strang am Triplex-Duplex-Übergang am 3'-Ende des Homopyrimidin-Oligonucleotids eine verstärkte Spaltung beobachtet. Am Triplex-Duplex-Übergang am 5'-Ende des Pyrimidin-Oligonucleotids wurde eine Bindungsstelle für ein Ellipticin-Derivat nachgewiesen^[61]. Die Intercalierung von Ethidium- oder Acridin-Derivaten an derselben Übergangsstelle führt zu einer Konformationsänderung, die sich in einer Überempfindlichkeit gegenüber Diethylpyrocarbonat (EtO₂C-O-CO₂Et) bemerkbar macht^[62]. Psoralen-Derivate (5- oder 8-Methoxypsoralen) zeigen in diesem Bereich eine erhöhte Reaktivität unter UV-B-Bestrahlung, wobei sich eine Quervernetzung zwischen den beiden Duplex-Strängen am Duplex-Triplex-Übergang bildet, sofern eine 5'-TpA-3'-Sequenz vorhanden ist (M. Takasugi, C. Helene, unveröffentlichte Ergebnisse). Diese erhöhte photochemische Reaktivität wurde mit einer verstärkten Intercalierung des Psoralengerüsts am Triplex-Duplex-Übergang erklärt.

Auch durch Molecular Modeling und Energieminimierungsstudien konnte gezeigt werden, daß die Tripelhelix-Bildung Konformationsänderungen insbesondere am Triplex-Duplex-Übergang hervorruft^[63, 64]. Neuere Untersuchungen zur elektrophoretischen Mobilität von DNA-Fragmenten, die in unterschiedlichen Positionen eine Tripelhelix enthielten, erbrachten einen experimentellen Nachweis für eine Verbiegung der DNA^[64]. Es wurde eine geringe Mobilitätserniedrigung beobachtet, die am größten war, wenn sich die Tripelhelix-Bindungsstelle in der Mitte des DNA-Fragments befand. Maher et al.^[65] fanden dagegen in ähnlichen Experimenten, daß DNA-Restriktionsfragmente, die einen Tripelhelixbereich enthalten, anstelle einer Erniedrigung eine permutationsabhängige Erhöhung der Mobilität zeigen, die eher mit einer DNA-Versteifung als mit einer Verbiegung am Duplex-Triplex-Übergang vereinbar ist. Es läßt sich voraussagen, daß dreisträngige DNA-Helices aufgrund der höheren radialen Ladungsdichte und der zusätzlichen Spannung, die sich aus der Gegenwart des dritten Strangs ergibt, eine geringere Flexibilität aufweisen als Doppelhelices. Die Veränderung helicaler Parameter innerhalb des Doppelstrangs im Bereich der Tripelhelix spricht auch für eine Verbiegung am Triplex-Duplex-Übergang. Energieminimierungsstudien ergaben, daß an der 5'-Übergangsstelle eine Verbiegung in Richtung der kleinen Furche und an der 3'-Übergangsstelle eine Verbiegung in Richtung der großen Furche vorliegt^[64]. Darüber hinaus nimmt man an, daß die Verbiegung von der Nucleotidsequenz am Duplex-Triplex-Übergang abhängt.

Eine durch Triplexbildung induzierte Verzerrung der Konformation des DNA-Doppelstrangs konnte im Regulatorbereich des menschlichen Papilloma-Virus Typ II nachgewiesen werden^[66]. An Basen, die den triplexbildenden Bereich flankieren, wurde eine Hypermodifikation durch chemische

Reagentien wie Dimethylsulfat, Diethylpyrocarbonat und Osmiumtetroxid beobachtet. Die erhöhte Zugänglichkeit für die Reagentien wurde als Folge einer Verbiegung der DNA-Doppelhelix am Triplex-Duplex-Übergang interpretiert. Wie durch Energieminimierungsstudien gezeigt werden konnte, hängt die durch intermolekulare Tripelhelix-Bildung induzierte Verbiegung von der Sequenz an der Übergangsstelle ab^[64]. Es ist somit anzunehmen, daß auch die Reaktivität gegenüber chemischen Sonden sequenzabhängig ist. Es werden natürlich noch weitere experimentelle Daten benötigt, um die Konformationsveränderungen, die an oder in der Nähe eines Tripelhelix-Bereichs auftreten, zu erklären.

Durch Tripelhelix-Bildung induzierte Veränderungen der DNA-Konformation sind auch durch „UV-Photofootprinting“ nachgewiesen worden. Nach UV-Bestrahlung bilden benachbarte Pyrimidine sowohl Pyrimidin-Dimere (mit einem Cyclobutanring zwischen den Kohlenstoff-Atomen C5 und C6 der beiden Ringe) als auch 6,4-Photoaddukte (mit einer Einfachbindung zwischen beiden Pyrimidinen). Die Bildung von 6,4-Photoaddukten wird durch Tripelhelix-Bildung verhindert, und zwar sowohl bei Pyrimidin \times Purin \cdot Pyrimidin^[67] als auch bei Purin \times Purin \cdot Pyrimidin^[68]-Tripelhelices.

Die Photospaltung von Phosphodiesterbindungen mit Uranyl-Ionen als Mediator ist verwendet worden, um die Zugänglichkeit von Phosphaten in Tripelhelices zu untersuchen^[69]. Am Purinstrang, insbesondere an dessen 5'-Ende, wurde eine geringere Zugänglichkeit beobachtet, während in der Nähe des 3'-Endes des Pyrimidinstrangs eine verstärkte Spaltung stattfand, wenn ausschließlich T \times A \cdot T-Triplets vorhanden waren.

2.5. Spezifität der Tripelhelix-Bildung

Die Spezifität der Tripelhelix-Bildung ist mit verschiedenen Methoden untersucht worden. Dervan et al.^[19, 70, 71] haben an ein Thymin des dritten Strangs gebundenes Fe-EDTA verwendet, um die Ziel-DNA an der für die Tripelhelix-Bildung spezifischen Bindungsstelle zu spalten. Diese Methode liefert zwar nur eine qualitative Information über das Ausmaß der Bindung, sie läßt jedoch einen schnellen Vergleich der Sequenzselektivität zu. Einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung zufolge^[206] kann die Spaltungsreaktion auch quantitativ durchgeführt werden. Eine zweite Methode beruht auf spektroskopischen Untersuchungen, bei denen „optische Schmelzkurven“ aufgezeichnet und bezüglich eines Zwei-Zustände-Modells („Alles-oder-Nichts-Modell“), das die Dissoziation des dritten Strangs von der Doppelhelix beschreibt, analysiert werden^[72, 73]. Die Genauigkeit thermodynamischer Daten aus UV-Schmelzkurven ist häufig durch die Schwierigkeit begrenzt, gute Grundlinien vor und nach dem Schmelzvorgang zu erhalten. In einer dieser Studien^[73] wurde der durch Fehlpaarungen herbeigeführte Stabilitätsunterschied zu 3.2–4.0 kcal mol⁻¹ pro Fehlpaarung (mismatch) bestimmt. Bei einer anderen Untersuchung^[72] liegt er zwischen 1.8 kcal mol⁻¹ für das am wenigsten destabilisierende nicht-kanonische Triplet G \times G \cdot C und 5.9 kcal mol⁻¹ für die am stärksten destabilisierende Fehlpaarung C \times T \cdot A. Aus der „superhelicalen Dichte“, die notwendig ist, um in Plasmiden den Übergang zur H-DNA-Struktur (Triplex) zu induzieren, ist der Energieun-

terschied zwischen kanonischen und nicht-kanonischen Basentriplets auf 3 bis 6 kcal mol⁻¹ abgeschätzt worden^[75]. Die Basensequenz-Spezifität der Tripelhelix-Bildung ist auch mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) untersucht worden^[74], jedoch wurden keine quantitativen Daten für die Stabilitätsunterschiede der Basentriplets veröffentlicht. Footprinting-Methoden, beispielsweise die Verwendung der Spaltungsreagentien DNase I oder Cu-Phenanthrolin, könnten ebenfalls zur Analyse der Sequenzspezifität der Tripelhelix-Bildung eingesetzt werden.

Es muß hervorgehoben werden, daß die durch Fehlpaarung hervorgerufene Erniedrigung der Stabilität einer Tripelhelix-Struktur von vielen Parametern abhängt. Zu diesen zählen: die Art der Fehlpaarung, die der Fehlpaarungsstelle benachbarten Basentriplets, der pH-Wert, falls in einem der Basentriplets eine Protonierung von Cytosin (oder Adenin in einem A \times G \cdot C-Triplett^[76]) erfolgen kann, die Ionenstärke und die Gegenwart von Liganden. Man muß daher vorsichtig sein, aus einer Untersuchung, die nur bei einem Satz dieser Parameter durchgeführt wurde, allgemeingültige Schlußfolgerungen zu ziehen.

Griffin und Dervan^[70] hatten anhand von Affinitätsspaltungsexperimenten für das Basentriplett G \times T \cdot A und das kanonische Basentriplett T \times A \cdot T ähnliche Stabilitäten festgestellt. Diese Beobachtung ist jedoch nur dann korrekt, wenn das G \times T \cdot A-Triplett an beiden Seiten von T \times A \cdot T-Triplets flankiert ist. Die direkte Nachbarschaft von C⁺ \times G \cdot C-Triplets destabilisiert diese Wechselwirkung^[71, 72]. Das G \times T \cdot A-Triplett in intramolekularen Tripelhelices wurde NMR-spektroskopisch eingehend untersucht^[76, 77]. Danach liegt nur eine Wasserstoffbrücke zwischen dem NH₂(2)-Proton von G und der C=O(4)-Gruppe von T vor. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den früher anhand von Energieminimierungs- und Molecular-Modeling-Untersuchungen getroffenen Voraussagen^[72]. NMR-spektroskopisch hat man auch Struktur und Stabilität von X \times G \cdot C-Fehlpaarungen im dritten Strang intramolekularer Tripelhelices untersucht^[78]. Das für G \times G \cdot C vorgeschlagene Schema der Wasserstoffbrücken war wiederum identisch mit dem durch Energieminimierungsstudien erhaltenen^[72]. Dieses Schema, das nur eine Wasserstoffbrücke annimmt, unterscheidet sich von dem in Abbildung 5 für G \times G \cdot C-Basentriplets wiedergegebenem Schema, demzufolge sich zwei Wasserstoffbrücken bilden sollten. Diese Abweichung spiegelt vermutlich die Gerüstverzerrung wider, die infolge des fehlenden Basen-Isomorphismus auftritt, wenn ein G \times G \cdot C-Triplett bei paralleler Orientierung (Hoogsteen-Anordnung) von zwei T \times A \cdot T-Triplets flankiert wird. Das Wasserstoffbrückenschema in Abbildung 5 ist dann zutreffend, wenn benachbarte Guanine benachbarte G \cdot C-Basenpaare auf der Doppelhelix erkennen.

Bisher sind nur wenige Daten über Fehlpaarungseffekte in Purin \times Purin \cdot Pyrimidin-Tripelhelices bekannt^[30]. Für Pyrimidin \times Purin \cdot Pyrimidin-Triplexe erkennt man langsam Leitlinien für eine geeignete Auswahl der Base des dritten Strangs, damit eine größtmögliche Stabilität erzielt wird, wenn ein Purin \cdot Pyrimidin-Watson-Crick-Basenpaar in einer Duplex-DNA durch ein Pyrimidin \cdot Purin-Basenpaar ersetzt wird (d. h. wenn ein Homopurin-Abschnitt durch ein Pyrimidin unterbrochen wird)^[63, 71, 72]. Fehlpaarungen in der Doppelhelix selbst können zu einer verbesserten Stabilität der Tripelhelix führen^[63]. So bildet sich beispielsweise mit einer

A · C-Fehlpaarung in der Doppelhelix ein T × A · C-Triplett, das stabiler ist als das kanonische Basentriplett T × A · T.

Eine sequenzselektive Erkennung von Homopurin · Homopyrimidin-Sequenzen wurde zuerst an Plasmiden aus einigen Tausend Basenpaaren beobachtet. Bei Verwendung eines Triplex-bildenden Oligonucleotids, an das Fe-EDTA^[19] oder Cu-Phenanthrolin^[79] angekuppelt war, trat nur eine einzige Schnittstelle auf. Strobel et al. konnten zeigen, daß ein mit Fe-EDTA als Spaltungsreagens ausgestattetes, Triplex-bildendes 18-Oligomer (18mer) die DNA des Bakteriophagen λ an einer einzigen Position des aus 48 502 Basenpaaren bestehenden Genoms spaltete^[80]. Sie zeigten außerdem, daß ein aus 20 Basen bestehendes Oligonucleotid eine einzelne Stelle auf dem Chromosom III der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, das aus 3.4×10^5 Basenpaaren aufgebaut ist, erkennt und dort spaltet^[81]. Dervan et al. haben daraus eine elegante Strategie entwickelt, um lange DNA-Sequenzen an einer definierten Stelle zu spalten^[82, 83]. Sie verwendeten ein Triplex-bildendes Oligonucleotid, das eine Methylierungs-/Restriktionsstelle überdeckt. Dies sind Stellen, die sowohl von Endonucleasen als auch von Methylasen erkannt werden. Wird die Sequenz zunächst methyliert (z.B. an den Adeninen), so kann die Endonuclease sie nicht mehr spalten. *EcoRI*-, *MspI*-, *HaeIII*-, *TaqI*-, *AclI*- und *HpaII*-Methylase/Endonucleasen erkennen symmetrische Sequenzen aus zwei oder drei aufeinanderfolgenden Purinen oder Pyrimidinen, die mit einer Triplex-Bindungsstelle überlappen können. Ein Oligonucleotid, das eine Homopurin · Homopyrimidin-Sequenz erkennt, auf der sich eine Methylase-Erkennungsstelle befindet, verhindert eine Methylierung an dieser Stelle, während alle anderen Stellen methyliert werden. Fügt man den Endonuclease-Partner hinzu, findet nur an der nicht methylierten Position eine Spaltung statt, alle anderen Stellen sind aufgrund der Methylierung geschützt. Diese Technik ähnelt einer Methode von Szybalsky et al.^[84, 85], die sie als „Achillesfersen-Spaltung“ bezeichnen. Bei dieser Technik wird ein DNA-bindendes Protein (z.B. der lac-Repressor) dazu verwendet, eine DNA-Sequenz vor einer Methylierung zu schützen. Die Restriktionsendonuclease spaltet dann selektiv an dieser geschützten Stelle.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die hohe Selektivität der Tripelhelix-Bildung in langen DNA-Molekülen (Chromosomen) und machen die Entwicklung von Tripelhelix-bildenden Oligonucleotiden, die für die Genkartierung an intakten Chromosomen von Nutzen sein könnten, denkbar. Die Möglichkeit, einen Pool degenerierter Oligonucleotide dazu zu verwenden, Cosmid-Klone von Chromosomen auf potentielle Bindungs- und Spaltungsstellen hin zu durchmustern, dehnt den Anwendungsbereich dieser Methode auf DNA-Regionen aus, die noch nicht sequenziert worden sind^[83].

2.6. Thermodynamik und Kinetik der Tripelhelix-Bildung

Verschiedene Untersuchungen haben sich mit der Bestimmung thermodynamischer Parameter für die Bildung von Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen an Oligopyrimidinen befaßt. ΔH -Werte konnten aus UV-Schmelzkurven^[42, 73, 86, 89] und aus der Veränderung von T_m mit der DNA-Konzentration^[87] sowie durch Kalorimetrie (DSC)^[86, 88, 89] und kinetische Messungen^[91] erhalten wer-

den. Es sind Systeme untersucht worden, die entweder aus drei verschiedenen Strängen bestehen^[87, 89, 91] – einer Watson-Crick-Doppelhelix-Haarnadelstruktur die ein „Hoogsteen-Oligopyrimidin“ bindet^[42] – oder aus einem einsträngigen Oligopurin, das an ein Oligopyrimidin gebunden war, das sowohl Watson-Crick als auch Hoogsteen-Wasserstoffbrücken bilden konnte. Die Reaktionen wurden analysiert, indem für den Übergang von Triplex zu Duplex + Einzelstrang^[42, 87, 88, 91] oder zu drei Einzelsträngen^[86] ein Zwei-Zustände-Modell zugrunde gelegt wurde. Nur die aus DSC-Messungen erhaltenen Werte stützen sich nicht auf ein Modell für die Triplex-zu-Duplex-Reaktion. In Tabelle 1 sind die für verschiedene Sequenzen berechneten Werte für ΔH wiedergegeben. Der niedrigste ΔH -Wert (2 kcal mol^{-1}

Tabelle 1. Thermodynamische Parameter für den Übergang von der Triplex- zur Duplexstruktur.

Sequenz des dritten Strangs (5' → 3')	ΔH [kcal mol ⁻¹]	ΔS [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	Lit.
CTTCCTCTCT [a]	84 ± 5	234 ± 15	[42]
*CTTCTCTCTCT [b]	65 ± 7 [c]	187 ± 19 [c]	[86]
	57 ± 6 [d]	181 ± 18 [d]	[86]
CCTCTCTCTCT [e]	80	243	[73]
T ₁₀ [f]	23.3 ± 0.9	56 ± 3	[87]
C ₃ T ₂ C ₃ [f]	42 ± 4	120 ± 14	[87]
T ₃ CTCTCTCTCT [g]	30.4 ± 2	97.6 ± 7	[89]
T ₃ C ₂ TC ₂ TC ₂ TCT ₂ CT ₂ CT ₆ [h]	112 ± 6	350 ± 20	[91]

[a] Aus Schmelzkurven (pH 6). [b] pH 6; * ist 5-Methylcytosin. [c] Aus der Auftragung $1/T_m$ gegen $\ln c_T$ (c_T ist die Totalkonzentration des 3. Strangs). [d] Aus DSC-Kurven. [e] Aus UV-Schmelzkurven, pH 5.0. [f] Aus der Auftragung $1/T_m$ gegen $\ln c_T$; pH 5.5. [g] Aus DSC-Kurven; pH 6.5. [h] Aus kinetischen Messungen; pH 6.8.

pro Basentriplett) stammt von kalorimetrischen Messungen^[89]. Diese Autoren berichten jedoch von van't-Hoff- ΔH -Werten, die sie aus optischen Schmelzkurven oder aus DSC-„Shape-Analysen“ erhalten haben, die um das Dreifache höher liegen als die kalorimetrisch bestimmte Enthalpie. Bei einer anderen Untersuchung waren die van't-Hoff- und DSC- ΔH -Werte innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen nahezu gleich^[86]. Es werden natürlich noch mehr Daten benötigt, um ein verlässliches Bild der thermodynamischen Eigenschaften von Tripelhelices zu erhalten. Die bisherigen Ergebnisse zeigen jedoch bereits, daß Tripelhelices weniger stabil sind als Doppelhelices. Es ist zu vermuten, daß die Stabilität von der Sequenz der Basentriplets, von der Art (Ladung) und Konzentration der Kationen und – im Falle eines Cytosin enthaltenden dritten Strangs – vom pH-Wert abhängt. Für die Cytidin-Protonierung wurde eine Enthalpie von $-2.8 \pm 0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ berechnet^[42].

Kinetische Messungen haben gezeigt, daß die Tripelhelix-im Vergleich zur Doppelhelix-Bildung ein langsamer Prozeß ist^[90, 91]. Maher et al.^[90] nutzten einen *AvaI*-Restriktionsendonuclease-Test, um die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation (pseudo-erster Ordnung) und Dissoziation einer Tripelhelix (erster Ordnung) zu messen, wobei sich die Tripelhelix zwischen einem 21mer, das 5-Methylcytosine enthielt, und einem aus 21 Basenpaaren bestehenden doppelsträngigen Abschnitt eines 6.4 kbp-Plasmids bildete. In Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen (Salzkonzentration, pH) wurden k_{Ass} -Werte zwischen 8×10^2 und $2.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und k_{Dis} -Werte zwischen 2.4×10^{-4} und

$2.2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ gemessen. Die Gleichgewichtskonstante (für die Assoziation) liegt in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen zwischen 3.3×10^6 und 10^8 M^{-1} . Die Assoziationsgeschwindigkeit ist um drei Größenordnungen langsamer als bei Doppelhelices. Mit steigendem pH-Wert nimmt die Dissoziationsgeschwindigkeit stark zu, während die Assoziationsgeschwindigkeit geringfügig sinkt. Mg^{2+} -Ionen bewirken eine Zunahme der Assoziationsgeschwindigkeit.

Rougée et al.^[91] machten die Beobachtung, daß in vielen Fällen bei thermischer Behandlung die Dissoziationskurve (Aufheizkurve), die UV-spektroskopisch gemessen wurde, im Vergleich zur Assoziationskurve (Abkühlkurve) zu höheren Temperaturen verschoben ist. Anhand dieser Hysterese wurde eine vollständige kinetische Analyse für die Tripelhelix-Bildung eines aus 21 Basen bestehenden Oligopyrimidins mit einem aus 21 Basenpaaren bestehenden Doppelhelix-DNA-Fragment vorgenommen. Die Assoziationskonstante lag bei 15 °C und pH 6.8 zwischen 13 und $300 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, wenn man in Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen die NaCl-Konzentration von 20 auf 300 mM erhöhte. In Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen stieg die Assoziationsgeschwindigkeit stark an. Die Dissoziationskonstante ($1.5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) war unabhängig von der NaCl-Konzentration. Eine Fehlpaarung $\text{X} \times \text{A} \cdot \text{T}$ ($\text{X} \neq \text{T}$) in der Mitte der Tripelhelix zeigte keine Auswirkung auf die Assoziationsgeschwindigkeit, hatte jedoch einen starken Anstieg der Dissoziationskonstante zur Folge (von $1.5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ für das kanonische $\text{T} \times \text{A} \cdot \text{T}$ -Triplett auf $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ für die stärker destabilisierende $\text{C} \times \text{A} \cdot \text{T}$ -Fehlpaarung). Man fand eine negative Aktivierungsenergie für die Assoziation. Diese Ergebnisse wurden über ein „Nucleations-Reißverschluß-Modell“ erklärt, bei dem drei bis fünf Basentriplets den Startkern bilden. Der Einfluß verschiedener Salze weist auf die Bedeutung mehrwertiger Kationen zur Stabilisierung der Tripelhelix hin, da in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen ein deutlicher Anstieg der Assoziationskonstante beobachtet wird. Einwertige Kationen haben in Abwesenheit mehrwertiger Kationen bei höheren Konzentrationen denselben Effekt. In Gegenwart zweiwertiger Kationen (z.B. Mg^{2+}) können einwertige Kationen aber eine Abnahme der Tripelhelix-Bildung bewirken, da sie die Bindung des mehrwertigen Kations an die DNA hemmen.

Die Ergebnisse von kinetischen Untersuchungen und insbesondere die Beobachtung, daß die Bildung der Tripelhelix langsam ist, müssen bei der Entwicklung von Oligonucleotiden zur Steuerung der Gentranskription oder -replikation berücksichtigt werden. Wenn Oligonucleotide mit einem Protein oder einem Enzym um die Bindung an einer spezifischen Bindungsstelle auf der DNA konkurrieren müssen, können kinetische Phänomene zu einem entscheidenden Faktor werden.

2.7. Kooperative Bindung von Oligonucleotiden an Duplex-DNA

Binden zwei Oligonucleotide in unmittelbarer Nachbarschaft an ein einsträngiges Templat, so ist dies infolge der Stapelwechselwirkungen zwischen den Basenpaaren an der Berührungsstelle der beiden Oligonucleotide ein kooperatives Phänomen. Dieselbe Situation tritt auf, wenn zwei Homopyrimidin-Oligonucleotide an zwei aneinandergrenzende Homopurin · Homopyrimidin-Sequenzen auf einer Doppel-

helix-DNA binden^[92]. Zwei Oligonucleotide, die nicht an benachbarte Sequenzen binden, können zu einer kooperativen Bindung gebracht werden, indem man das 3'-Ende des einen Oligonucleotids und das 5'-Ende des anderen Nucleotids durch zwei komplementäre Sequenzen verlängert, die Watson-Crick-Basenpaare bilden können^[93]. Diese beiden zusätzlichen Sequenzen wirken als Dimerisierungsdomänen. Sind zwei Oligonucleotide in direkter Nachbarschaft zueinander an ein DNA-Templat gebunden, so können sie entweder durch eine Phosphodiester-^[94, 95] oder durch eine Pyrophosphatbindung^[95] verknüpft werden. Das 5'-terminale Phosphat des einen Oligonucleotids kann durch BrCN, Imidazol und NiCl_2 aktiviert werden, so daß eine Phosphodiesterbindung zum 3'-OH des angrenzenden Oligonucleotids gebildet wird^[94]. Alternativ kann 1-(1-Dimethylamino-propyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid als Kondensationsreagens verwendet werden^[95].

Zwei Doppelhelix-DNA-Fragmente können in Nachbarschaft zueinander gebracht werden, indem sie an ein Tripelhelix-bildendes Oligonucleotid, das zu den terminalen Sequenzen der beiden DNA-Fragmente Hoogsteen-Wasserstoffbrücken ausbilden kann, binden^[96, 97]. Durch chemische Aktivierung mit *N*-Cyanimidazol können das 3'-Hydroxy- und das 5'-Phosphatende auf einem oder auf beiden Strängen kovalent verknüpft werden^[96]. Dieselbe Reaktion findet auch dann statt, wenn das Oligonucleotid an alternierende Stränge bindet, um die Duplex-Enden in einem Triplex zueinander zu bringen^[97].

3. Verbesserung der Triplex-Stabilität durch Oligonucleotid-Modifikationen

3.1. Basenmodifikationen

Modifizierte Basen sind in Tripelhelix-bildende Oligonucleotide eingebaut worden, um eine bessere Bindung unter physiologischen Bedingungen zu erzielen oder um den Bereich der Erkennungssequenzen zu erweitern. Es zeigte sich, daß durch den Austausch von Cytosin gegen 5-Methylcytosin eine aus den Polynucleotidketten $\text{polyd(CT)} \times \text{polyd(GA)} \cdot \text{polyd(CT)}$ zusammengesetzte Tripelhelix bis pH 8 stabil ist^[100]. In ähnlicher Weise konnte durch den Einbau von 5-Methylcytosin in Tripelhelix-bildende Oligonucleotide der pH-Bereich, in dem mit einer Homopurin · Homopyrimidin-Sequenz einer Duplex-DNA eine Tripelhelix entsteht, erweitert werden^[101, 102, 128]. Nach einer thermodynamischen Analyse beruht die Stabilisierung hauptsächlich auf Entropieeffekten durch den Aufbau eines „Rückgrats“ aus hydrophoben Methylgruppen der Thymin- und 5-Methylcytosinbasen in den Oligopyrimidinen^[102]. Der Austausch von Thymin gegen 5-Bromuracil verbessert ebenfalls die Tripelhelix-Stabilität bei höheren pH-Werten. Eine Kombination beider Substitutionen (Br^5U und m^5C) bewirkt eine starke Erhöhung der Spaltungseffizienz von Oligonucleotiden, an die Fe-EDTA gebunden ist, bei höheren pH-Werten^[101].

Oligonucleotide, die 5-Bromuracil, 5-Methylcytosin und 5-Bromcytosin enthalten, sind auf einfache Weise aus den käuflich erhältlichen Desoxyribonucleosid-3'-phosphoramidaten zugänglich. Auch bei diesen Oligonucleotiden muß das Stickstoffatom N(3) des Cytosins protoniert werden, damit

sich eine Tripelhelix bilden kann, die bei steigendem pH-Wert merklich destabilisiert ist, wenn sie mehrere benachbarte $C^+ \times C \cdot G$ -Triplets enthält.

Um diese Einschränkung zu umgehen, sind Oligonucleotide mit den Nucleosidpaaren (dT, dG)^[29, 32, 43], (dA, dG)^[30, 31], [dT, 2'-O-Methylpseudoisocytidin **14** (Cm)]^[103], [dT, 6-Methyl-8-oxo-desoxyadenosin **15a** (MODA)]^[105], 8-Oxodesoxyadenosin **15b** (dT)^[106], [dT, P1 **16**]^[107] (Abb. 7) und [damP **17**, dG] dargestellt worden. 2'-Des-

oxyxanthosin und 2'-Desoxyinosin sind ebenfalls in Oligonucleotide eingebaut worden^[104].

Der Einbau von Cm **14a** in ein Pyrimidin-Oligomer wurde über das Phosphoramidat **14b** erzielt, welches in siebenstufiger Synthese aus Pseudoisocytidin hergestellt werden konnte^[103]. Cm kann in neutraler Form zwei Wasserstoffbrücken (Hoogsteen-Konfiguration) zu einem Guanin eines G · C-Basenpaares ausbilden (Abb. 7 oben links). Anders als bei Cytidin ist keine Protonierung erforderlich.

Oligonucleotide, die MODA **15a** enthalten, wurden unter Verwendung des 3'-H-Phosphonat-Derivats **15c** aufgebaut^[105]. Das Nucleosid **15a** wurde aus N⁶-Methyl-2'-desoxyadenosin durch Bromierung, Bromid-Acetat-Austausch in 8-Position und anschließende Methanolyse erhalten^[105]. 8-Oxo-2'-desoxyadenosin **15b** ist ebenfalls über das Phosphoramidat^[106] des 8-Methoxyadenin-Derivats in Oligonucleotide eingebaut worden. Diese beiden Derivate (**15a** und **15b**) können zwei Wasserstoffbrücken zu G in einem G · C-Basenpaar ausbilden, ohne daß eine Protonierung erforderlich ist (Abb. 7 oben rechts).

Das Desoxyribonucleosid P1 **16a** wurde in fünfstufiger Synthese hergestellt. Der Einbau in Pyrimidin-Oligodesoxyribonucleotide erfolgte über das Phosphoramidat **16b**^[107]. Dieses modifizierte Nucleotid kann zwei Wasserstoffbrücken mit G in einem G · C-Basenpaar ausbilden (Abb. 7 unten).

Aus dG und 2-Aminopurin-9 β -D-2'-desoxyfuranosid **17a** (amP) bestehende Purin-Oligonucleotide wurden unter Verwendung des Phosphoramidats **17c** aufgebaut (V. Roig, N. T. Thuong, unveröffentlichte Ergebnisse). **17c** wurde aus **17b**, das durch eine Transglycosylierung mit 3',5'-Di-O-(4-nitrobenzoyl)thymidin als Glycosyldonor zugänglich war, nach Anomerentrennung erhalten.

Unter den für die Tripelhelix-Bildung verwendeten Basentriplett-Paaren [(T × A · T, C⁺ × G · C), (T × A · T, G × G · C), (A × A · T, G × G · C), (T × A · T, Cm × G · C), (T × A · T, MODA × G · C), (T × A · T, P1 × G · C) und (amP × A · T, G × G · C)] sind nur (T × A · T, C⁺ × G · C), (T × A · T, Cm × G · C) und (amP × A · T, G × G · C) isomorphe Paare (siehe Abb. 5–7). Im Gegensatz zu Cytosin, das protoniert werden muß, um zwei Wasserstoffbrücken zu einem Guanin eines G · C-Watson-Crick-Basenpaares zu bilden, konnten die modifizierten Basen Cm, MODA, 8-Oxoadenin und P1 G · C-Basenpaare unabhängig vom pH-Wert erkennen.

3.2. Gerüstmodifikationen

Intermolekulare Tripelhelices erfahren eine Stabilisierung, wenn man Desoxyribose durch Ribose ersetzt^[210, 214]. Pyrimidin-Oligoribonucleotide binden stärker an Duplex-DNA als die entsprechenden Oligodesoxyribonucleotide. 2'-OMe-Derivate binden stärker als unsubstituierte Oligoribonucleotide^[210, 214].

Der Einbau von Phosphorthioat-Gruppen in Polynucleotide hat einschneidende Auswirkungen auf die Triplex-Bildung: poly[d(TC)] · poly[d(sGsA)] bildet bei pH 8 spontan eine Tripelhelix, während poly[d(TsC)] · poly[d(GA)] dies nicht kann^[108]. Am Beispiel von poly[d(GA)] · 2poly[d(sTC)] und poly[d(sGA)] · 2poly[d(TC)]^[108] konnte gezeigt werden, daß ein Phosphorthioat 5' zu einem Purin

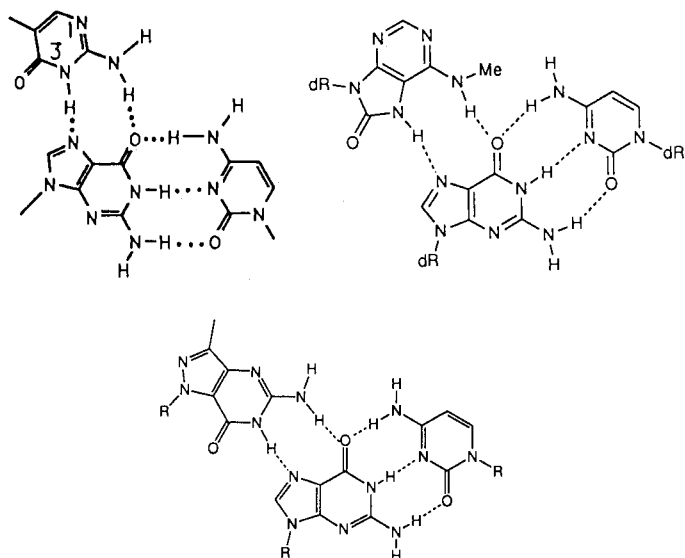
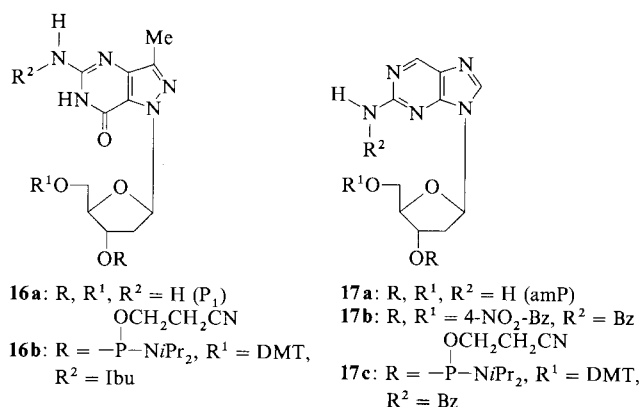
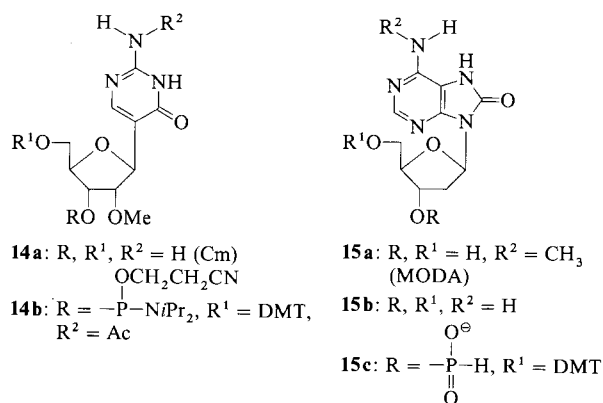


Abb. 7. Basentriplets zwischen modifizierten Basen und G · C-Basenpaaren der DNA. Oben links: Pseudoisocytidin **14** [103]; oben rechts: MODA **15** [105] (das gleiche Schema an Wasserstoffbrücken gilt auch für 8-Oxoadenin [106]); unten: Nucleosid P1 **16a** [107]. Im Gegensatz zu Cytosin müssen diese Basen nicht protoniert werden, um zwei Wasserstoffbrücken bilden zu können (siehe Abb. 5).



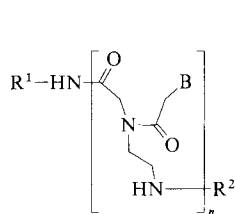
den Schmelzpunkt T_m der Tripelhelix erhöht, wohingegen ein Phosphorthioat 5' zu einem Pyrimidin T_m herabsetzt.

Bei der Bildung einer Tripelhelix tritt eine starke elektrostatische Abstoßung zwischen den negativ geladenen Partnersträngen auf. Metall-Ionen spielen eine wichtige Rolle für die Stabilität von Tripelhelices. Die Einführung eines neutralen Rückgrats, welches die negative Ladung des dritten Strangs herabsetzt, wäre eine attraktive Möglichkeit, um die Triplex-Stabilität zu erhöhen. Die Verwendung von Methylphosphonat-Gerüsten gab allerdings keinen Hinweis für eine Triplex-Stabilisierung. Zwischen $d(A)_{19}$ und $d(T)_{19}$ wurde entgegen den Erwartungen keine Triplexbildung festgestellt, wenn jeder Strang gegen einen Methylphosphonat-Strang ausgetauscht wurde^[109]. Für eine Triplexbildung zwischen $d(CT)_8$ und $d(AG)_8$, war sogar ein niedrigerer pH-Wert erforderlich, wenn der Pyrimidinstrang aus Methylphosphonaten bestand^[110]. In beiden Beispielen hat allerdings auch einer der beiden Watson-Crick-Stränge das Methylphosphonat-Gerüst. Es bleiben daher die Ergebnisse abzuwarten, die man erhält, wenn nur der dritte Strang Methylphosphonat-Gruppen aufweist. Man sollte nicht außer Acht lassen, daß Methylphosphonat-Gruppen in zwei diastereomeren Formen vorkommen und daß von einem Oligomer mit n derartigen Bindungen 2^n Diastereomere vorliegen. Es ist zu vermuten, daß die Stereochemie am Phosphoratom für die Tripelhelix-Bildung und deren Stabilität eine bedeutende Rolle spielt.

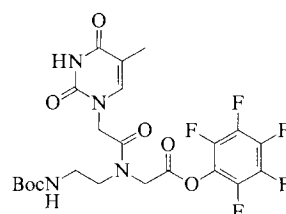
Um mit Duplex-DNA unter physiologischen Salzbedingungen Tripelhelices zu erhalten, hat man die Oligomere **18** dargestellt, die den Dinucleosid-Phosphodiesterbindungen analoge, neutrale Bindungen enthalten^[111]. Der Einbau jeder einzelnen analogen Bindung erfolgte über das *N*-Benzoyl-5-methyl-2'-desoxycytidin-Thymidin-Dimer (5-MeC-T-Dimer), das am 5'-Ende mit Dimethoxytrityl (DMT) geschützt war und am 3'-Ende als *H*-Phosphonatsalz vorlag. Das Methylphosphonat-Dinucleosid **19a** war über das 5'-Dimethoxytrityl-desoxyribonucleosid-3'-phosphonsäureimidazolid zugänglich. Durch Umsetzung von Dinucleosid-*H*-phosphonat mit Tetrachlorkohlenstoff in Gegenwart von Methoxyethylamin wurde die Vorstufe des Dinucleosid-Phosphoramidats **19b** erhalten. Die Vorstufe des Formacetal-Dinucleosids **19c** wurde aus 3'-Trialkylsilylthymidin und einem 5'-Dimethoxy-

Darstellung des Formacetal-Dimers. Das Formacetal-Dinucleosid-Thioanalogon **19d** wurde aus dem 5'-Thioanalogon erhalten. Die Formacetal-Verknüpfung ist für die Bildung einer sequenzspezifischen Tripelhelix geeignet, während Oligonucleotide mit Thioformacetal-, Methylphosphonat- und Methoxymethylamidat-Verknüpfungen eine geringere Affinität für Duplex-DNA aufwiesen^[111].

Oligomere mit einem neutralen Polyamid-Rückgrat (**20**, PNA) wurden durch Austausch der Desoxyribose-Phosphodiester-Bindung der DNA gegen ein Oligomer des Aminoethylglycins entwickelt^[112]. PNA wurde nach einem Standard-Peptidkupplungsverfahren aufgebaut. Der Boc-geschützte Pentafluorphenylester des Thymin-Monomers **21** wurde durch Kondensation von Boc-Aminoethylglycin mit Thyminessigsäurepentafluorphenylester dargestellt. PNA bindet stärker an einsträngige komplementäre Sequenzen als normale Oligonucleotide. Es wurde eine Stöchiometrie von PNA:DNA = 2:1 gefunden. Dies gilt möglicherweise nur für Pyrimidin-PNA, da diese Tripelhelices schneller als Doppelhelices bildet, und zwar sowohl über Hoogsteen- als auch über Watson-Crick-Wasserstoffbrücken.



20: $R^1 = \text{Lys-NH}_2$
 $R^2 = \text{H}$ oder Acridin-Derivat



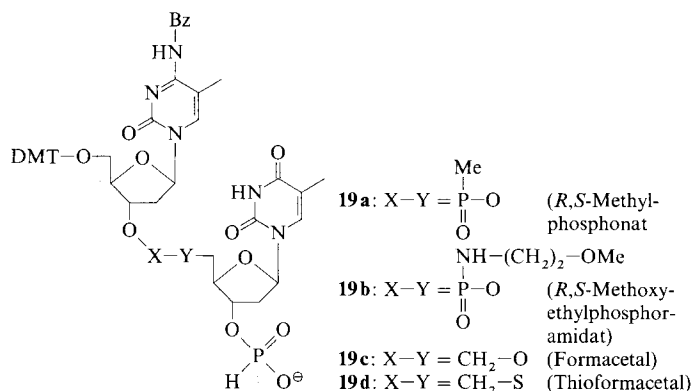
21

PNA kann auch über eine Strang-Austauschreaktion an doppelsträngige DNA binden^[112]. Bei dieser Reaktion wird die Doppelhelix lokal unterbrochen, und die PNA bindet an den ihr komplementären Strang. Diese Strang-Austauschreaktion erinnert an die durch das Rec-A-Protein aus *E. coli* katalysierte Reaktion, bei der eine Polynucleotidkette in eine Doppelhelix mit homologer Sequenz eindringt und einen D-Loop bildet, bei dem einer der Watson-Crick-Stränge entfernt und durch die eindringende Polynucleotid-Kette ersetzt ist^[152-158]. Wenn sich die Ergebnisse, die mit einer nur aus einer (T) oder zwei (C und T) Basen bestehenden PNA erzielt worden sind, auf jede beliebige Basensequenz übertragen lassen, so eröffnen sich neue Möglichkeiten für eine Bindung von PNAs an jede beliebige DNA-Sequenz. Auf diese Weise könnten die Spannungen verringert werden, durch die gegenwärtig die Tripelhelix-Bildung von Oligodesoxynucleotiden an Homopurin · Homopyrimidin-Sequenzen der DNA eingeschränkt wird.

3.3. Triplex-Bildung mit α -Oligonucleotiden

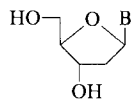
Natürlich vorkommende Nucleinsäuren sind aus den β -Anomeren der Nucleotideinheiten **22** aufgebaut. Es ist möglich, die α -Anomere **23**^[113-116] zu synthetisieren und daraus α -Oligonucleotide aufzubauen, in denen alle Bausteine α -konfiguriert sind. Diese α -Oligomere sind sowohl gegen Endo- als auch gegen Exonucleasen resistent^[115-117].

$d\text{-}^5\text{TpCpTpC}^{\text{Me}}\text{-TpC}^{\text{Me}}\text{-TpC}^{\text{Me}}\text{-TpC}^{\text{Me}}\text{-TpTpTpT}^{3'}$ **18**

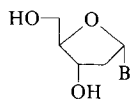


yltrityl-desoxynucleosid-3'-methylacetal durch Aktivierung mit *N*-Bromsuccinimid dargestellt. Analog dazu erfolgte die

Pyrimidin- α -D-desoxyribonucleoside (**23a, b**)^[118a] sind über eine Anomerisierung zugänglich, während Purin- α -D-desoxyribonucleoside (**23c, d**)^[118a] und **23e**^[118b] durch eine Transglycosylierung mit Pyrimidin- β -D-desoxyribonucleosiden als Glycosyldonor dargestellt wurden. 5-Methyl-2'-desoxy- α -cytidin **23f** wurde durch Aktivierung der C(4)-Position von α -Thyminidin und anschließende Aminolyse erhalten^[122].



β -D-Desoxyribonucleotide **22**

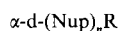


α -D-Desoxyribonucleotide **23**

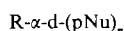
a: B = Thymin, **b:** B = Cytosin, **c:** B = Adenin, **d:** B = Guanin,
e: B = 2-Aminopurin, **f:** B = 5-Methylcytosin

Der Aufbau der Oligo- α -desoxyribonucleotide erfolgte ausgehend von α -Desoxyribonucleosiden entweder in Anlehnung an die Phosphotriester-Methode in Lösung^[114–116] oder in Anlehnung an die Phosphoramidat-Methode an einem festen Träger^[119–121]. Die Leistungsfähigkeit der Kupplungsreaktion war ähnlich wie bei der Synthese von Oligo- β -desoxyribonucleotiden. Oligo- α -desoxyribonucleotide, die entweder 5-Methylcytosin (**23f**)^[122] oder 2-Aminopurin (**23e**) (V. Roig, N. T. Thuong, unveröffentlichte Ergebnisse) enthalten, wurden über Phosphoramidat-Bausteine aufgebaut.

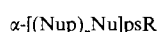
α -Oligomere, die über eine Phosphodiesterbindung entweder an ihrem 3'- (**24a**) oder an ihrem 5'-Ende (**25a**) einen Acridinrest tragen, wurden zuerst in Lösung synthetisiert^[115, 123]. **25a**^[121] sowie das Psoralen-Derivat **25b** waren auf einfache Weise über die Phosphoramidate **28a** bzw. **28b** durch Umsetzung am festen Träger zugänglich. Mit der Thiophosphatmethode^[133–136] konnten Oligo- α -desoxynucleotide erhalten werden, die entweder an ihrem 3'- (**26**) oder an ihrem 5'-Ende (**27**) kovalent mit Acridin-, Psoralen-, Orthophenanthrolin-, Azidoproflavin-, Proflavin- oder *para*-Azidophenacyl-Resten verknüpft waren (siehe Abb. 9)^[18, 41, 124].



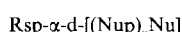
24



25

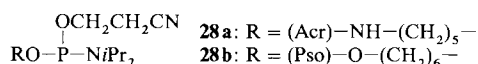


26



27

a: R = (Acr)–NH–(CH₂)₅–, **b:** R = (Pso)–O–(CH₂)₆–



Die Bindung von α -Oligonucleotiden an doppelsträngige DNA ist mit verschiedenen Methoden untersucht worden. Dazu zählen die Quervernetzung mit der Zielsequenz^[18, 41, 124], Absorptionsspektroskopie^[122] und die Hemmung der Spaltung durch Restriktionsenzyme^[122]. Für die Tripelhelix-Bildung sind nur Oligopyrimidin-Sequenzen getestet worden. Die Ausrichtung des α -Strangs bezüglich der Homopurin·Homopyrimidin-Sequenz der Duplex-DNA ist sequenzabhängig. Ein α -Oligomer, das ausschließ-

lich Thymin enthielt, wurde an die poly(dA)-Sequenz der Duplex-DNA genau wie das entsprechende β -Oligomer mit paralleler Orientierung gebunden^[18, 41]. Im Gegensatz dazu wurden T und C enthaltende α -Oligonucleotide in Hinblick auf die Homopurin-Sequenz der Ziel-DNA in antiparalleler Ausrichtung gebunden^[122]. Der durch die Cytosine im α -Strang hervorgerufene Wechsel in der Orientierung wurde als Folge einer Stabilisierung der Tripelhelix durch Bildung isomorpher Basentriplets erklärt. Nach Energieminimierungsuntersuchungen bevorzugten α -Oligo(dT) und α -Oligo(dC) in bezug auf Oligo(dA)- und Oligo(dG)-Stränge von Duplex-DNA eine Bindung in paralleler Ausrichtung unter Beteiligung reverser Hoogsteen-Wasserstoffbrücken^[125]. Wie bereits gezeigt (Abb. 5), sind die Basentriplets T \times A \cdot T und C⁺ \times G \cdot C bei reverser Hoogsteen-Konfiguration nicht isomorph, bei Hoogsteen-Konfiguration dagegen isomorph. Daraus ergibt sich, daß ein α -Oligonucleotid, das sowohl C- als auch T-Basen enthält, in antiparalleler Orientierung bindet, um eine durch parallele Orientierung verursachte Gerüstverzerrung zu vermeiden. Vermutlich hängt die Orientierung nicht allein von der Anzahl an Cytosinbasen im α -Oligonucleotid ab, sondern auch von deren Verteilung innerhalb der Sequenz.

Tripelhelices aus α -Oligonucleotiden und natürlich vorkommender DNA sind etwas weniger stabil als die der entsprechenden β -Analoga. Sie können jedoch durch intercalierende Reagentien an den Enden der α -Oligomere stabilisiert werden^[122]. Da ein α -Oligopyrimidin, das sowohl C- als auch T-Basen enthält, mit entgegengesetzter Orientierung bindet wie ein β -Oligonucleotid, schiebt sich ein intercalierendes Agens am 3'-Ende des α -Oligomers an der 5'-Pyrimidin-Purin-3'-Position des Duplex-Triplex-Übergangs ein (so wie ein intercalierendes Agens, das mit dem 5'-Ende eines β -Oligonucleotids verbunden ist). Ein α -Oligonucleotid-Psoralen-Konjugat kann unter UV-Bestrahlung eine Quervernetzung mit der Zielsequenz bilden, vorausgesetzt, daß in der Nähe des Triplex-Duplex-Übergangs zu Quervernetzungen befähigte Thyminbasen vorhanden sind (C. Giovannangeli, C. Hélène, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Nuclease-Resistenz der α -Oligonucleotide ist für die Entwicklung von Regulatoren der Gentranskription in vivo von Interesse.

3.4. Oligonucleotide mit kovalent gebundenen intercalierenden Agentien

Oligonucleotide mit intercalierenden Agentien am 3'- oder 5'-Ende sind ursprünglich entwickelt worden, um die Affinität von Antisense-Oligonucleotiden gegenüber ihren komplementären einsträngigen Sequenzen zu erhöhen^[126, 127]. Dieselbe Strategie wurde auf Tripelhelix-bildende Oligonucleotide angewendet in der Erwartung, daß ein Intercalator an einem oder an beiden Enden eines derartigen Oligonucleotids am Triplex-Duplex-Übergang intercaliert. Diese Strategie erwies sich als richtig: Ein Oligopyrimidin-Intercalator-Konjugat führte zu einer starken Stabilisierung der Tripelhelix zwischen Oligomer und Duplex-DNA^[128, 129]. Durch Fluoreszenz- und Molecular-Modelling-Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß eine Intercalierung am 5'-Ende des Oligonucleotids des dritten Strangs stark bevorzugt war, da das intercalierende Agens eine 5'-Pyrimidin-Purin-3'-Sequenz am Duplex-Triplex-Übergang er-

kennt (Abb. 8). Diese Sequenz ist für viele polycyclische aromatische Moleküle die bevorzugte Intercalierungsstelle^[31]. Zum selben Ergebnis gelangte man für Oligonucleotide mit einem Psoralenderivat am 5'-Ende^[130].

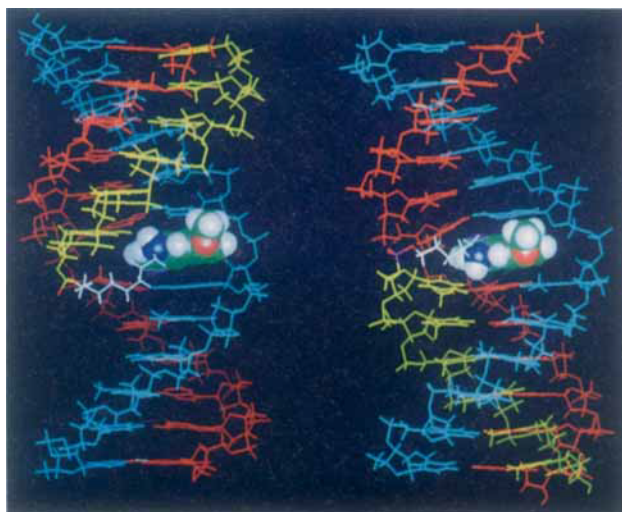


Abb. 8. Molekülmodelle für Tripelhelices bestehend aus Oligonucleotid-Intercalator-Konjugat und Doppelhelix-DNA. Als intercalierendes Agens wurde 9-Amino-6-chlor-2-methoxyacridin verwendet, welches entweder über ein Pentamethylen-Bindeglied an das 5'-Phosphatende (linkes Bild) oder über ein Nonamethylen-Bindeglied an das 3'-Phosphatende (rechtes Bild) des Tripelhelix-bildenden Oligonucleotids (grün/gelb) geknüpft war. Das Acridin-Derivat ist zwischen das letzte Basentriplett der Tripelhelix und das erste Basenpaar der Doppelhelix am Triplex-Duplex-Übergang eingeschoben (siehe Lit. [209]).

3.4.1. Einbau der konjugaten Gruppen im Verlauf der Oligonucleotid-Synthese

Der direkte Einbau einer konjugaten Gruppe (Zusammenstellung siehe Abb. 9) im Verlauf der Oligonucleotid-Synthese verläuft im allgemeinen über folgende Schritte: 1) Einführung einer funktionellen Gruppe, beispielsweise einer Hydroxygruppe, und Schutz der anderen, nicht an der Kupplungsreaktion beteiligten funktionellen Gruppen

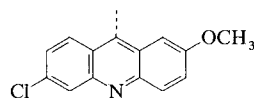
2) Durchführung einer Kupplungsreaktion, bei der die Oligonucleotid-Konjugate geschützt bleiben

3) Abspaltung der Schutzgruppen, ohne daß die konjugierten Oligomere angegriffen werden.

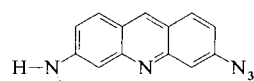
Oligodesoxynucleotide, die am 3'- (29a) oder 5'-Ende (30a) ein Acridin-Derivat (9-Amino-6-chlor-2-methoxyacridin) tragen, wurden zuerst in Lösung über die Phosphotriester-Methode synthetisiert, wobei die Hydroxygruppe des Acridin-Derivats 31a entweder mit dem 3'-Arylphosphodiester 32 oder mit dem 5'-Arylphosphodiester 33 des ge-

schützten Oligonucleotids kuppelt^[126, 127]. Die Freisetzung der Nucleinsäurebasen erfolgte mit NaOH, um eine Spaltung der 9-Aminoacridin-Bindung zu vermeiden. Nach derselben Methode wurde EDTA über den Trimethylester des EDTA-Derivats 31b mit dem 3'-Phosphat des Oligomers 29b verknüpft. Auf dem gleichen Weg gelang es auch, eine Acridin- und eine EDTA-Gruppe jeweils an die 3'- und 5'-Enden von Oligothymidylaten zu binden^[131].

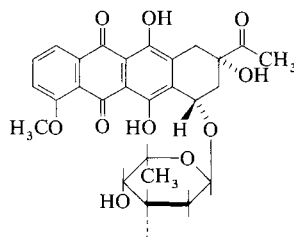
Oligonucleotide, die am 5'-Ende entweder mit einem Intercalator (30a) oder mit einer photoreaktiven Gruppe (30c) verknüpft sind, konnten auch am festen Träger auf einfache



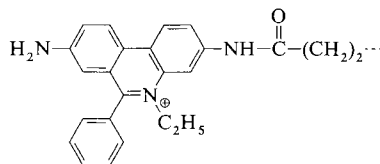
Acridin (Acr)



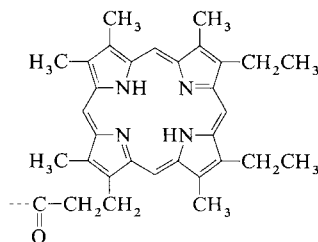
Azidoproflavin (N₃-Pf)



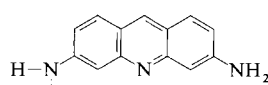
Daunorubicin (Dr)



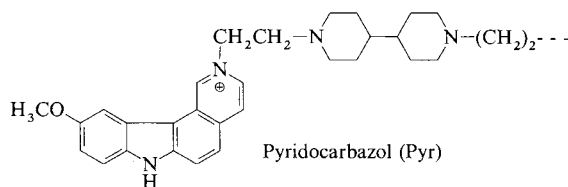
Ethidium (Etd)



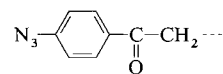
Methylpyrroporphyrin XXI (MPPo)



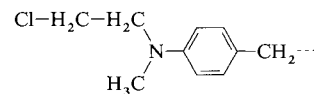
Proflavin (Pf)



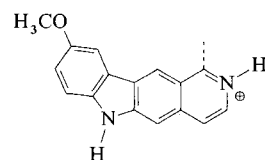
Pyridocarbazol (Pyr)



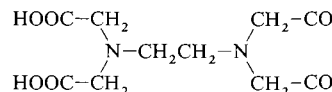
Azidophenacyl (N₃-Phe)



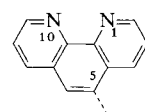
Chloroethylamin-Derivat



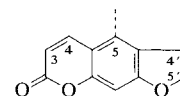
Ellipticin (Elli)



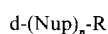
Ethyldiamintetraessigsäure-Rest (ED)



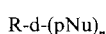
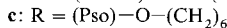
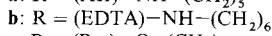
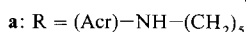
Orthophenanthrolin (OP)



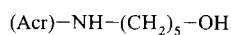
Psoralen (Pso)



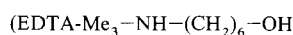
29



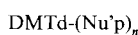
30



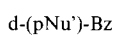
31a



31b



32



33

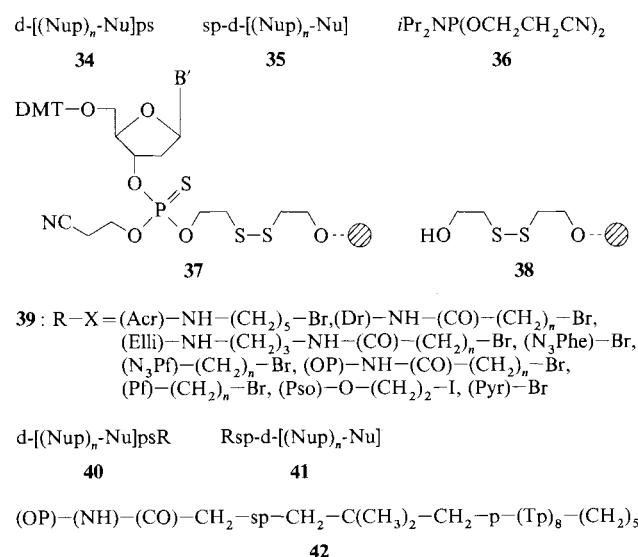
Abb. 9. Agentien („Liganden“), die mit Triplex-bildenden Oligonucleotiden verknüpft wurden. Die gestrichelte Linie zeigt jeweils, an welcher Stelle der Ligand an das Verbindungsstück gebunden ist (siehe Text und Lit. [134]).

Weise dargestellt werden. Das Phosphoramidat-Derivat des Acridins (**28a**) oder des Psoralens (**28b**) konnte unter Fixierung an das Trägermaterial mit der 5'-Hydroxygruppe eines Oligonucleotids kondensiert werden^[132, 181].

3.4.2. Einbau konjugater Gruppen in ungeschützte Oligonucleotide

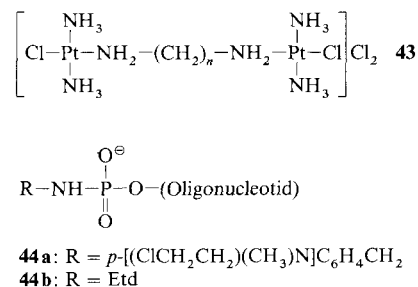
Bei dieser Strategie werden geeignete funktionelle Gruppen in die beiden Kupplungspartner eingeführt, und es folgt eine spezifische Kupplung, die das konjugierte Oligodesoxyribonucleotid liefert. Es können viele Verfahren angewendet werden, um funktionelle Gruppen, z.B. Phosphat-, Phosphorthioat-, Amin-, Thiol-, Carboxy- und *cis*-Diolgruppen, in Oligodesoxynucleotide einzuführen. Unter diesen Verfahren ist die *S*-Alkylierung von Phosphorthioaten mit substituierten Alkylhalogeniden vielfach benutzt worden, um konjugierte Oligonucleotide zur Untersuchung von Tripelhelices herzustellen.

Die Einführung einer Thiophosphatgruppe am 3'-(**34**) oder 5'-Ende (**35**) des Oligonucleotids gelingt entweder in Lösung über die Phosphotriester-Methode oder am festen Träger über Phosphoramidate. Die Modifikation des 5'-Endes mit einer Phosphorthioatgruppe wurde auf einfache Weise erreicht, indem durch Tetrazol aktiviertes Bis(cyanoethyl)-*N,N*-diisopropylamidophosphit **36** entweder in Lösung^[133] oder an einem festen Träger^[134] mit der 5'-Hydroxygruppe des geschützten Oligomers kondensiert und anschließend eine Sulfurierung durchgeführt wurde. Die 5'-Thiophosphatgruppe kann in den Oligonucleotiden durch Umsetzung mit NH_4OH freigesetzt werden. Die Einführung der Thiophosphatgruppe am 3'-Ende über die Synthese am festen Träger machte eine Anbindung des Nucleosids über seine 3'-(2-Cyanoethylthiophosphat)-Gruppe mit Hilfe einer Dithiodiethyl-Brücke (**37**) an den Träger erforderlich. **37** erhält man, wenn man den mit Dithiodiethanol derivatisierten Träger **38** und das klassische Nucleosid-3'-cyanethylphosphoramidat verwendet und statt des Oxidationsschritts eine Sulfurierung durchführt. Nach dem Aufbau der Oligonucleotidketten wird die 3'-Thiophosphatgruppe entschützt und durch Umsetzung mit einer wäßrigen Lösung von Dithiothreitol und NaOH vom Träger abgespalten^[135, 136].



Die Kondensation der Thiophosphat enthaltenden Oligonucleotide **34** und **35** mit Halogenalkyl-Liganden **39** führte zu den Phosphorthioestern der konjugierten Oligonucleotide **40** bzw. **41**^[133, 134, 136]. Mit den beschriebenen Methoden wurde das Oligothymidylat **42** synthetisiert, das an seinem 3'-Ende kovalent mit Acridin und an seinem 5'-Ende kovalent mit Orthophenanthrolin verknüpft ist^[159].

Kürzlich wurde die Nucleophilie der Phosphorthioate dazu benutzt, die zweikernige Pt^{II} -Verbindung **43** mit dem 5'-Ende von Oligodesoxynucleotiden zu verbinden^[167]. 4-(*N*-2-Chlorethyl-*N*-methylanino)benzylamin^[137] oder das Aminderivat von Ethidium^[138] konnten mit einem Oligonucleotid, das eine endständige Phosphatgruppe enthielt, zu den Phosphoramidat-Oligomeren **44a** bzw. **44b** phosphoryliert werden.



4. Tripelhelix-Liganden

Mehrwertige Kationen begünstigen die Triplex-Bildung bei neutralem pH-Wert. Wie bereits in Abschnitt 2.6 erwähnt, bewirken Mg^{2+} -Ionen eine starke Stabilisierung von $\text{py} \times \text{pu} \cdot \text{py}$ -Tripelhelices, und es scheint, daß Mg^{2+} -Ionen oder andere zweiwertige Kationen für die Bildung derartiger Tripelhelices unbedingt erforderlich wären^[17]. Polyamine, wie Spermin oder Spermidin wirken ebenfalls stark stabilisierend auf Tripelhelices^[19, 128, 139]. Die Konzentration von Polyaminen im Zellkern eukaryontischer Zellen liegt im millimolaren Bereich, so daß Tripelhelices im Zellkern stabilisiert werden könnten. Diese Möglichkeit könnte einerseits für die natürliche Regulation bestimmter Gene über intramolekulare H-DNA-Bildung und andererseits für die künstliche Steuerung der Genexpression durch Tripelhelix-Bildung von Bedeutung sein.

Es war von Interesse, ob Liganden, die an die DNA-Doppelhelix binden, auch an Tripelhelices binden. Spektroskopische Untersuchungen mit dem klassischen DNA-Intercalator Ethidiumbromid zeigten, daß dieses auch in Tripelhelices intercaliert^[140, 141]. Die Bindung von Ethidium an $\text{poly(dA)} \cdot 2\text{poly(dT)}$ verschiebt den Übergang Triplex zu Duplex + Einzelstrang zu höheren Temperaturen^[140]. Dies scheint eine Folge der geringen Affinität von Ethidium für die Doppelhelix $\text{poly(dA)} \cdot \text{poly(dT)}$ zu sein, die in Lösung in einer unüblichen B-Konformation vorliegt. Die Bindung von Ethidium an kurze Triplettssequenzen, die sowohl $\text{T} \times \text{A} \cdot \text{T}$ als auch $\text{C}^+ \times \text{G} \cdot \text{C}$ -Basentriplets enthalten, führt dagegen zu einer Erniedrigung der Temperatur des Triplex-Duplex-Übergangs und zu einem Anstieg der des Duplex-Einzelstrang-Übergangs^[141]. Aus diesen Ergebnissen

läßt sich schließen, daß bei der in dieser Studie eingesetzten Sequenz Ethidium stärker an die Duplex- als an die Triplex-Struktur bindet. Energieminimierungsuntersuchungen haben gezeigt, daß das positiv geladene Ethidium-Molekül bevorzugt zwischen $T \times A \cdot T$ -Basentriplets eingeschoben wird, um eine elektrostatische Abstoßung mit den positiv geladenen $C^+ \times G \cdot C$ -Basentriplets zu vermeiden^[142].

Liganden wie Netropsin oder ein Distamycin-Analogon, die in der kleinen Furche von Doppelhelix-DNA binden, binden auch an Triplex-Strukturen, und zwar sowohl an $\text{poly(dA)} \cdot 2 \text{ poly(dT)-Polynucleotide}$ ^[143a] als auch an kurze $(dT)_6 \cdot (dA)_6 \cdot (dT)_6$ -Oligonucleotide^[143b]. In beiden Fällen bindet der Ligand an die Triplex-Struktur, ohne daß eine Dissoziation des dritten Strangs stattfindet. Dennoch wirkt Netropsin destabilisierend auf den Triplex-Zustand, da es die entsprechende Duplex stabilisiert^[143].

Die einzigen bisher bekannten Triplex-helix-spezifischen Liganden sind Benzopyridoindol-Derivate (Abb. 10)^[144], die nach Mergny et al. Triplexhelices stark stabilisieren: Die Schmelztemperaturen für den Triplex-Duplex-Übergang stiegen um bis zu 20 K. Es wurde eine Abhängigkeit der

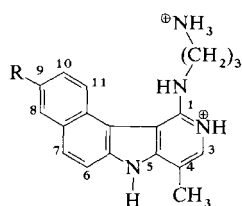


Abb. 10. Allgemeine Struktur von Benzo[e]pyridoindol-Derivaten, die an Triplexhelices binden und diese stabilisieren (siehe Lit. [144]). Das Derivat mit $R = \text{OCH}_3$ stabilisiert Triplexhelices am besten.

Stabilisierung von der Sequenz der Basentriplets nachgewiesen, wobei sich $T \times A \cdot T$ -Triplets als besonders bevorzugt erwiesen. Diese Abhängigkeit ist eine Folge der elektrostatischen Abstoßung zwischen dem positiv geladenen Liganden und positiv geladenen $C^+ \times G \cdot C$ -Basentriplets in der Nähe. Ergebnisse von Energietransfer-Experimenten weisen darauf hin, daß der Benzopyridoindol-Ring zwischen benachbarte Basentriplets eingeschoben wird. Die durch derartige Verbindungen hervorgerufene Stabilisierung einer Triplexhelix-Struktur am β -Lactamase-Gen von *E. coli* erhöhte den Inhibitoreffekt Triplexhelix-bildender Oligonucleotide auf die Transkription durch *E. coli*-RNA-Polymerase. Außerdem wurde berichtet, daß unter UV-Bestrahlung bei sehr geringen Wirkstoffdosen kovalente Addukte mit dem Zielstrang gebildet wurden. Diese Untersuchungen eröffnen die Möglichkeit, bessere Triplexhelix-Liganden zu entwickeln und Oligonucleotid-Ligand-Konjugate zu synthetisieren, die eine hohe Selektivität und eine starke Affinität für Duplex-DNA-Sequenzen aufweisen.

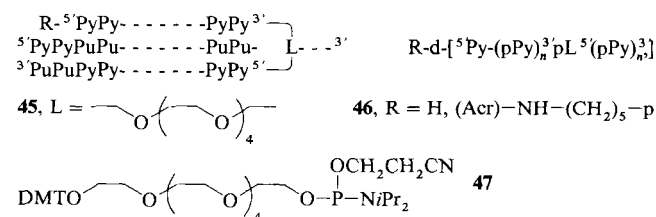
5. Triplexhelix-Bildung an einer einsträngigen Nucleinsäure

5.1. Erkennung einer Polypurinsequenz über Watson-Crick- und Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen

Bisher haben wir die Triplexhelix-Bildung zwischen einer Duplex-DNA und einem Oligonucleotid, das den dritten Strang

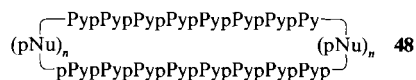
liefert, erörtert. Bei intramolekularen Triplexhelices von Polypurin · Polypyrimidin-Sequenzen (H-DNA) wird ein Strang umgeklappt, damit eine Triplexhelix entsteht^[15–17, 145]. Es sollte somit möglich sein, an einem einsträngigen DNA-Fragment eine Triplexhelix aufzubauen. Da sowohl bei $\text{pu} \times \text{pu} \cdot \text{py}$ als auch bei $\text{py} \times \text{pu} \cdot \text{py}$ -Triplexhelices der dritte Strang an den Purinstrang der Watson-Crick-Doppelhelix bindet, kann eine einsträngige Homopurinsequenz als Zielsequenz dienen. Bisher sind zwei Ansätze beschrieben worden:

1) Es kann eine Polypyrimidinsequenz gewählt werden, die mit einer Hälfte Watson-Crick-Basenpaare bildet, mit der anderen Hälfte Hoogsteen-Wasserstoffbrücken mit der Watson-Crick-Doppelhelix^[86, 146]. Diese Konfiguration ist möglich, da die Watson-Crick- und Hoogsteen-Polypyrimidinsequenzen in einer $\text{py} \times \text{pu} \cdot \text{py}$ -Triplexhelix wie **45** antiparallel angeordnet sind. Das Verbindungsstück zwischen den beiden Polypyrimidinsequenzen kann entweder eine nicht-nucleotidische Kette, wie Hexaethylenglycol (**45**, **46**)^[146],



oder eine kurze Sequenz aus drei bis fünf Nucleotiden sein (C. Giovannangeli, C. Hélène, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine ähnliche Situation ist von Xodo et al.^[86] beschrieben worden, die eine Triplex-Bildung zwischen einem kurzen Oligopurin (11 Basen) und einem längeren Polypyrimidin (24 Basen), das einer H-DNA-Struktur ähnelte, beobachtet haben. Die Hexaethylenglycol-Oligonucleotide **45** und **46** konnten mit einem Syntheseeutomat aus dem Phosphoramidat **47** hergestellt werden.

2) Die Watson-Crick- und Hoogsteen-Polypyrimidinsequenzen können wie in **48** über zwei kurze Verbindungsstücke (drei bis fünf Nucleotide) zwischen den beiden Polypyrimidinsequenzen in ein ringförmiges Molekül eingebaut werden^[147, 148].



Die Cyclisierung linearer 5'-phosphorylierter Oligomere wurde auf chemischem Wege ($\text{BrCN/Imidazol/Ni}^{2+}$) erreicht, indem kurze komplementäre einsträngige DNA-Template, die das freie 3'-OH- und das aktivierte 5'-Phosphatende in Nachbarschaft zueinander bringen, verwendet wurden.

In beiden Fällen erkennen die linearen oder ringförmigen Polypyrimidin-Oligonucleotide die Polypurinsequenz durch Bildung von Watson-Crick- und Hoogsteen-Wasserstoffbrücken (Abb. 11). Adenine werden demnach über vier und Guanine über fünf Wasserstoffbrücken erkannt. Die aus 16 Nucleotiden bestehende Sequenz, die Giovannangeli et al.^[146] untersucht haben und die ein Teil des HIV-Genoms ist, enthält beispielsweise neun Adenin- und sieben Guaninbasen. Das Polypyrimidin kann somit zu dieser Sequenz 71

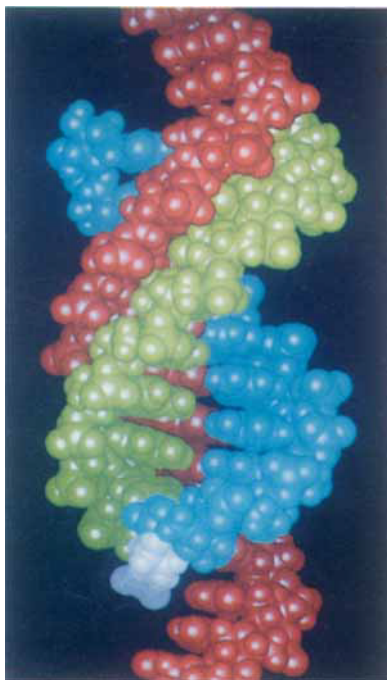


Abb. 11. Kalottenmodell einer Tripelhelix aus einer einsträngigen Oligopurinsequenz (rotbraun) und einem unnatürlichen Oligonucleotid bestehend aus zwei Polypyrimidinsequenzen, die über ein Hexaethylenglycol-Bindeglied (weiß) verknüpft sind. Das Bindeglied (der „Linker“) kann auch ein Oligonucleotid sein [211]. Eine der Polypyrimidinsequenzen (blau) bildet Watson-Crick-Basenpaare mit der Zielsequenz, während die zweite (grün) Hoogsteen-Basenpaare bildet (siehe Lit. [146]). 3'- und 5'-Ende des chimären Polypyrimidin-Oligonucleotids können miteinander verbunden werden, so daß ein ringförmiges Oligomer entsteht [147, 148].

Wasserstoffbrücken knüpfen. Das Unterscheidungsvermögen hinsichtlich einer mutierten Sequenz, bei der eine einzige Base verändert ist, ist im Vergleich zu einem komplementären Antisense-Nucleotid sehr hoch, da sowohl Watson-Crick- als auch Hoogsteen-Wasserstoffbrücken gestört sind.

Ringförmige Oligonucleotide mit optimierten Verbindungsstücken binden mit einer höheren Affinität an Polypurin-Sequenzen als lineare Oligomere, die aus denselben Basen zusammengesetzt sind^[148]. Dies ist dem Entropiegewinn zuzuschreiben, der sich durch die Präorganisation der Basen im Ring ergibt. Ein oder beide Enden der linearen Oligomere können mit reaktiven Gruppen verknüpft werden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß die Verknüpfung des 5'-Endes von **45** mit einem intercalierenden Agens die Tripelx-Struktur stark stabilisiert, vorausgesetzt, daß der Watson-Crick-Anteil des Oligomers um ein oder zwei Basenpaare verlängert wurde^[146]. Als intercalierendes Agens kann auch eines gewählt werden, das mit der Zielsequenz reagiert. Wir haben kürzlich gezeigt, daß ein mit dem 5'-Ende des Hoogsteen-Strangs verknüpft Psoralen-Derivat mit beiden Zielsträngen, dem Purin- und dem Watson-Crick-Pyrimidinstrang quervernetzt werden kann, so daß die Tripelx-Struktur an dieser Stelle „abgeriegelt“ ist. Die Replikation derartiger irreversibel blockierter Template ist inhibiert^[211]. Wir bezeichnen diese Moleküle als Oligonucleotid-Klammern^[211].

5.2. Bindung von Oligonucleotiden an einsträngige Bereiche, die durch Bildung intramolekularer Triplexe (H-DNA) entstehen

Eine spiegelbildliche Polypurin · Polypyrimidin-Sequenz von circularer Doppelhelix-DNA kann in eine intramoleku-

lare Tripelx-Struktur umgewandelt werden, wobei sich die durch Superspiralisierung auftretenden Spannungen verringern^[15–17]. Während dieses Prozesses wird entweder die Hälfte der Polypurinsequenz auf die Doppelhelix zurückgeklappt, so daß eine $pu \times pu \cdot py$ -Tripelhelix entsteht und die Hälfte der Polypyrimidinsequenz einsträngig wird, oder es wird die Hälfte der Polypyrimidinsequenz zurückgeklappt, so daß eine $py \times pu \cdot py$ -Tripelhelix entsteht und die Hälfte der Polypurin-Sequenz einsträngig wird (Abb. 4). In beiden Fällen kann ein zur einsträngigen Sequenz komplementäres Oligonucleotid entwickelt werden. Die Bindung von Oligomeren ist *in vitro*^[149, 150] und *in vivo*^[149] beobachtet worden. Das Abfangen der einsträngigen Sequenz der DNA begünstigt die H-DNA-Bildung^[150].

Ein ähnliches Modell ist vorgeschlagen worden, um die Effekte zu beschreiben, die bei der *in-vivo*-Transkription des Polypurin-enthaltenden Strangs der veränderlichen Region des Gens von Immunglobulin A (Ig A) in superspiralisierten Plasmiden auftreten^[151]. Primäre RNA-Transkripte bleiben mit ihrem Templat als RNase-H-sensitive RNA-DNA-Hybride verbunden. Diese stabilisieren eine intramolekulare Tripelhelix und führen zur Bildung von stabilen, weniger superspiralisierten Konformeren des Plasmids.

6. RecA-vermittelte Bildung dreisträngiger Strukturen

Bei der normalen genetischen Rekombination werden genetische Informationen zwischen homologen Sequenzen auf zwei Chromosomen ausgetauscht. Ein Schlüsselschritt bei der Rekombination ist die Orientierung und Paarung homologer DNA-Sequenzen. Rekombinasen, wie das RecA-Protein aus *E. coli* gehen eine kooperative Bindung zu einsträngigen Oligonucleotiden ein. In Gegenwart doppelsträngiger homologer DNA induzieren sie die Bildung eines synaptischen Komplexes, in dem drei DNA-Stränge mit RecA-Proteinen assoziiert sind^[152–155]. Verwendet man eine superspiralisierte circular DNA als Substrat, so bilden sich bei der Deproteinierung des synaptischen Komplexes Moleküle, in denen das einsträngige Oligonucleotid noch immer mit der superspiralisierten DNA verbunden ist. Die Linearisierung der DNA durch eine Restriktionsendonuclease, die mit der Superspiralisierung verbundenen Spannungen abbaut, setzt das Oligonucleotid frei. Werden anstelle kurzer Oligonucleotide lange einsträngige DNA-Fragmente verwendet (und wird ATP anstelle des nicht hydrolysierbaren ATP γ S verwendet), so kann ein Strangaustausch stattfinden, z.B. zwischen einem circularen Einzelstrang und linearer Duplex-DNA^[153, 154].

In Gegenwart nicht hydrolysierbarer ATP-Analoga – 5'-(γ -Thio)ATP (ATP γ S) und ADP – kann das RecA-Protein ein kurzes einsträngiges Oligomer (15 Basen) mit Duplex-DNA paaren^[155]. Schon eine Homologie von acht Basen ist ausreichend, um derartige synaptische Komplexe zu bilden. Die Verbindung zwischen dem Oligonucleotid und der Duplex-DNA bleibt bestehen, wenn das Protein entfernt wird, vorausgesetzt, daß sich der Homologiebereich über mindestens 26 Basen erstreckt^[155]. Die Struktur dieser dreisträngigen Komplexe ist bisher noch nicht bekannt. Einer der Strän-

ge der Duplex-DNA könnte verschoben sein und eine D-Schleife bilden, doch es sind auch alternative Strukturen vorgeschlagen worden, bei denen alle drei Stränge über Wasserstoffbrücken verbunden sind^[152]. Es muß betont werden, daß sich die RecA-vermittelten dreisträngigen Komplexe von den in allen übrigen Abschnitten dieses Aufsatzes erörterten Tripelhelices grundlegend unterscheiden. Der Unterschied beruht auf der Orientierung des dritten Strangs. In Tripelhelices – sowohl in intramolekularen (H-DNA) als auch in intermolekularen – ist der dritte Strang bezogen auf den Watson-Crick-Strang mit identischer Basensequenz entgegengesetzt polarisiert, während in RecA-vermittelten dreisträngigen Komplexen der dritte Strang dieselbe Polarität aufweist wie der Watson-Crick-Strang mit identischer Sequenz.

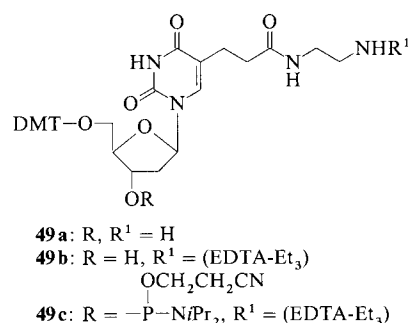
Die RecA-vermittelte Bildung dreisträngiger Komplexe kann dazu verwendet werden, eine Duplex-DNA ortsspezifisch zu schädigen. Ein Oligonucleotid, das an einem Furanring einen Psoralenrest trägt, ist in Gegenwart von RecA mit einer homologen Sequenz von Duplex-DNA zu einem Addukt umgesetzt worden^[156]. Unter UV-Bestrahlung reagierte das Psoralen (mit seinem Pyronring) unter Quervernetzung mit einer Thyminbase im komplementären Strang des Oligonucleotids. Da die Quervernetzung eine genaue Positionierung der zum Cyclobutanring reagierenden Doppelbindung des Psoralens voraussetzt, ist zu vermuten, daß das Oligonucleotid durch Watson-Crick-Basenpaarung mit der komplementären Sequenz verbunden war. Oligonucleotide aus mindestens 50 Resten waren erforderlich, um einen 50proz. Wirkungsgrad für die Quervernetzung zu erzielen. Derartige Komplexe sind darüber hinaus verwendet worden, um den Mechanismus der Quervernetzungs-Reparatur durch *E. coli*-ABC-Excinuclease zu untersuchen^[156].

Es konnte gezeigt werden, daß ein ähnlicher Molekülverband aus einem Oligonucleotid und Duplex-DNA in Gegenwart von RecA die Initiation der Transkription hemmt, wenn man ein dem Promotorbereich homologes Oligonucleotid verwendet. Wählt man ein Oligonucleotid, das downstream vom Promotor bindet, so ist die Fortsetzung der Transkription blockiert^[157]. Die RecA-vermittelte Bildung dreisträngiger Komplexe kann eine Spaltung durch Restriktionsenzyme und eine Methylierung durch Methylasen hemmen, wenn das Oligonucleotid die Restriktionsstelle abdeckt. Diese Beobachtung ist dazu verwendet worden, eine neue Strategie (genannt RARE für „RecA-assisted restriction endonuclease“-Spaltung) zu entwickeln, um an langen DNA-Fragmenten und Chromosomen Einzelschnitte durchzuführen^[158]. Durch die Bildung eines dreisträngigen Komplexes ist die Methylierung an dieser Stelle gehindert, während sie an den anderen Methylase-Erkennungsstellen stattfindet. Wird anschließend die entsprechende Restriktionsendonuclease zugegeben, so erfolgt ausschließlich an der nicht methylierten Position eine Spaltung. Diese Methode arbeitet nach einem ähnlichen Prinzip wie die „Achillesfersen“-Methode von Koob und Szybalsky^[84, 85] und wie die Methode von Strobel und Dervan^[18–83], bei der Tripelhelix-bildende Oligonucleotide verwendet werden. Das RARE-Verfahren ist jedoch allgemeiner anwendbar, da in Gegenwart von RecA jede beliebige doppelsträngige Sequenz mit einem dritten Strang komplexiert werden kann.

7. Sequenzspezifische Modifikationen von DNA

7.1. Sequenzspezifische Spaltung von Duplex-DNA durch Tripelhelix-bildende Oligonucleotide mit reaktiven Gruppen

Die sequenzspezifische Tripelhelix-Bildung durch Oligodesoxynucleotide hat zur Entwicklung künstlicher Nucleasen geführt, die DNA an spezifischen Stellen spalten können. Eine direkte Spaltung unter physiologischen Bedingungen kann erreicht werden, indem man an das Oligonucleotid ein Reagens bindet, das bei chemischer Aktivierung reaktive Spezies, z.B. Hydroxyl-Radikale, erzeugt. Für diese Strategie sind Metallkomplexe wie Fe-EDTA^[19, 30, 80, 81, 131] und Cu-Phenanthrolin^[79, 159] eingesetzt worden. Alternativ kann die Spaltung durch photochemische Aktivierung einer aromatischen Gruppe, z.B. eines Ellipticin-Derivats^[61, 160] ausgelöst werden. Die Ausbeuten sind bei diesen Reaktionen im allgemeinen gering, nur mit Cu-Phenanthrolin ist von einer 70proz. Spaltung doppelsträngiger DNA berichtet worden^[79]. Die Verknüpfung intercalierender Agentien wie Phenanthrolin oder Ellipticin mit Oligonucleotiden ist in Abschnitt 3.4 beschrieben worden. Oligonucleotide mit einer EDTA-Gruppe an der C(5)-Position von dU wurden am festen Träger über das Phosphoramidat-Derivat **49c** des modifizierten Nucleosids **49b** aufgebaut. **49b** wurde aus 2'-Desoxyuridin durch Umwandlung in das Aminderivat **49a** und anschließende Acylierung von **49a** mit einem (EDTA-Triethylester)hydroxysuccinimidester erhalten^[204].



Nicht nur chemische Reagentien können an die Enden eines Tripelhelix-bildenden Oligonucleotids gebunden werden, sondern auch Enzyme^[203]. Das Addukt eines Oligonucleotids mit einer Staphylokokken-Nuclease spaltet Plasmid-DNA an einer spezifischen Stelle mit 75% Ausbeute. Sind auf einem DNA-Molekül zwei Zielsequenzen vorhanden, so gelingt es, DNA-Fragmente herauszuschneiden. Obwohl die Spaltung durch die Nuclease nicht an einer einzelnen Phosphordiesterbindung erfolgt, können die Fragmente für Klonierungsstudien verwendet werden^[203].

Diffundierende Reagentien wie OH-Radikale, die in einer oder beiden Furchen der Doppelhelix erzeugt werden, lassen eine asymmetrische Verteilung des Spaltungsmusters auf entgegengesetzten Strängen erwarten. In Abbildung 12 oben ist eine zylindrische Projektion des Zucker-Phosphat-Gerüsts von „Standard“-B-DNA wiedergegeben. Wenn man davon ausgeht, daß die OH-Radikale in der Mitte einer der Furchen entstehen, so werden sie die Desoxyribosen in Abhängigkeit vom Abstand angreifen. Von Zuckereinheiten, die

senkrecht zur Achse der *Furche* angesiedelt sind, ist eine schnellere Reaktion zu erwarten als von Zuckern senkrecht zur Achse der *Helix*. Markiert man die Angriffsstellen in einer linearen Auftragung der DNA durch Pfeile, deren Länge der angenommenen Reaktivität proportional ist, so erkennt man, daß die Verteilung eindeutig asymmetrisch ist (Abb. 12 unten). In der kleinen Furche erzeugte OH-Radi-

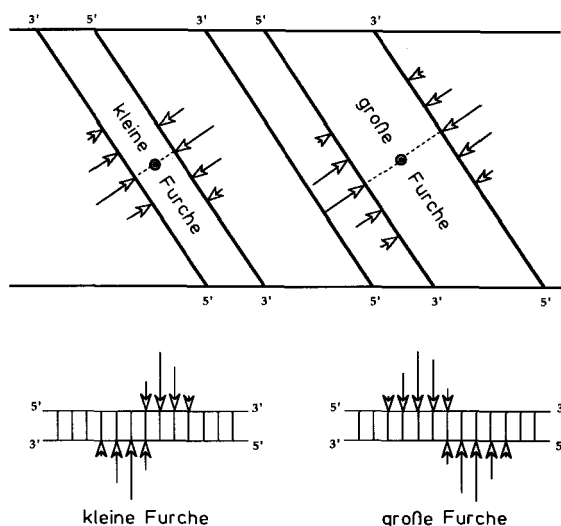


Abb. 12. Asymmetrische Verteilung der Spaltungsstellen auf den beiden DNA-Strängen hervorgerufen durch eine diffundierende Spezies (z.B. OH-Radikale) innerhalb der kleinen und großen Furche der DNA. Im oberen Teil ist eine schematische zylindrische Projektion des Zucker-Phosphat-Rückgrats der B-Form der DNA abgebildet [201]. Der Zylinder ist aufgeschnitten, auf eine Ebene projiziert und von außen betrachtet worden. Wenn reaktive Spezies (z.B. OH-Radikale) im Zentrum einer der Furchen (Kreis mit Punkt) entstehen, so werden sie am meisten mit den Zuckern reagieren, die ihnen am nächsten sind (in einer Richtung senkrecht zur Achse der Furche). Diese gehören *nicht* zu Nucleosiden eines Basenpaares. Wie man anhand der Pfeile in der zylindrischen Projektion und in der linearen Darstellung (unterer Teil der Abbildung) erkennen kann, ist die Reaktivität (Spaltung) abstandsabhängig. Die beiden „Kurven“ für die Spaltungsstellen auf den einzelnen Strängen lassen eine asymmetrische Verteilung erkennen. Findet die Spaltung in der kleinen Furche statt, so tritt eine Verschiebung zum 3'-Ende auf. Dagegen wird bei einer Spaltung in der großen Furche eine Verschiebung zum 5'-Ende beobachtet. Der tatsächliche Ort, die Amplitude und die Verteilung der Spaltungsstellen hängen von der Position der die OH-Radikale erzeugenden Spezies ab.

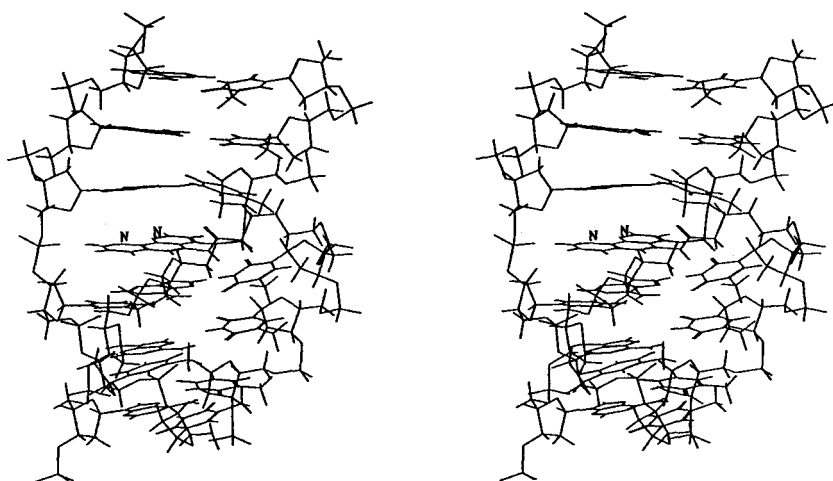
kale verschieben die Spaltungsstellen zum 3'-Ende, während in der großen Furche erzeugte OH-Radikale die Spaltungsstellen zum 5'-Ende verschieben.

Aus dem Muster der Spaltung mit Fe-EDTA, das an C(5) eines Pyrimidin-Nucleosids auf einem Oligonucleotid gebunden war, kann man ablesen, daß diese Sonde in der großen Furche der Duplex-DNA angesiedelt ist^[19]. Die Analyse der ortsspezifischen Spaltung mit Cu-Phenanthrolin ergab eine Verschiebung des Spaltungsmusters zu den 3'-Enden der entgegengesetzten Stränge. Dies ist ein Zeichen, daß die Spaltung in der kleinen Furche stattfindet^[79, 205]. Es sind verschiedene Verbindungsstücke verwendet worden, um Phenanthrolin an das Triplex-bildende Oligonucleotid zu binden. Die Ergebnisse zeigten, daß für die Spaltung eine Intercalierung des Phenanthrolins am Triplex-Duplex-Übergang notwendig war. Durch die Intercalierung gelangten die beiden Stickstoffatome des Phenanthrolins in die kleine Furche, wo eine Chelatisierung des Kupfers mit anschließender Erzeugung oxidierender Spezies in Gegenwart eines Reduktionsmittels (3-Mercaptopropionsäure) erfolgte. Die Bindung des Oligonucleotids in der großen Furche zusammen mit der Intercalierung von Phenanthrolin am Triplex-Duplex-Übergang richteten somit die Spaltungsreaktion auf die kleine Furche mit der charakteristischen asymmetrischen Verschiebung der Spaltungsstellen zum 3'-Ende der entgegengesetzten Stränge (Abb. 13). Die ortsspezifische Spaltung fand bei höheren Temperaturen und pH-Werten statt als man auf Basis der Stabilität der Oligonucleotid-DNA-Tripelhelix erwartet hatte. Das Intercalierungsmodell liefert eine Erklärung für diese Beobachtungen. Durch die Bindung des Oligonucleotids in der großen Furche und die Bindung von Kupfer an intercaliertes Phenanthrolin in der kleinen Furche sollte der Komplex in seiner Lage fixiert sein, wobei Phenanthrolin als Brücke dient, die die beiden Furchen miteinander verbindet.

7.2. Quervernetzung von Oligonucleotiden mit Doppelhelix-DNA

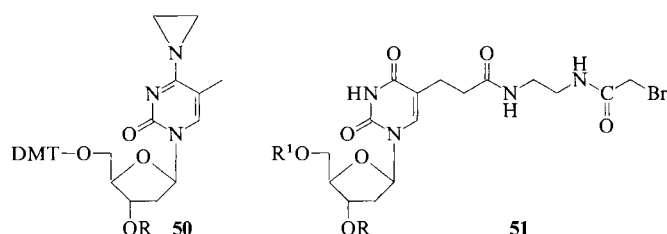
Eine indirekte Spaltung von Duplex-DNA tritt auf, wenn zunächst zwischen einer reaktiven Gruppe, die mit dem Oligonucleotid des dritten Strangs verbunden ist, und Nucleotiden der Ziel-DNA eine kovalente Bindung entsteht und anschließend die Phosphodiesterbindungen an diesen Quervernetzungsstellen alkalisch gespalten werden. Diese Methode ist von Le Doan et al.^[18] und von Praseuth et al.^[41]

Abb. 13. Stereobild der Phenanthrolin-Intercalierung am Triplex-Duplex-Übergang. Es sind drei Basenpaare (oben) und drei Basentriplets (unten) abgebildet. Das 5'-Phosphatende des Oligonucleotids des dritten Strangs ist über eine Hexamethylenbrücke mit 5-Amino-1,10-phenanthrolin verknüpft. Der dritte Strang wird in der großen Furche gebunden, wo sich auch das Verbindungsstück zum Phenanthrolin befindet. Wenn Phenanthrolin intercaliert, weisen die beiden Stickstoffatome in die kleine Furche, wo die Chelatisierung von Kupfer und die Spaltung stattfinden.



angewendet worden, um die sequenzspezifische Triplexbildung von β - und α -Oligonucleotiden nachzuweisen. Diese Arbeitsgruppen verwendeten Azidoproflavin bzw. Azidophenacyl (Abb. 9), um durch Bestrahlung eine Quervernetzung der Oligonucleotide mit den komplementären Sequenzen zu erzielen.

Oligonucleotide mit kovalent gebundenen Alkylierungsmitteln wie *N*-2-Chlorethyl-*N*-methylaminobenzylamid konnten ebenfalls mit spezifischen DNA-Sequenzen quervernetzt werden; unter alkalischen Bedingungen fand dann eine ortspezifische Spaltung statt^[161, 162, 164–168]. Diese Alkylierung ist, wie auch die anderer Reagentien, spezifisch für die N(7)-Position von Guaninen. Andere Reagentien sind *N*⁴,*N*⁴-Ethano-5-methyldesoxycytidin **50**^[163] und das Thymidin **51**, das über ein Verbindungsstück an der C(5)-Position des



Pyrimidinrings mit einer *N*-Bromacetylgruppe verbunden ist^[162, 166]. Unter alkalischen Bedingungen erfolgt eine Entpurinierung des alkylierten Guanins, und anschließend laufen β -Eliminierungsreaktionen ab, die schließlich mit 95proz. Wirksamkeit zu einer Gerüstspaltung und Freilegung von 5'- und 3'-Phosphatenden führen. Bei all diesen Reaktionen kann das Quervernetzungs-Reagens jeweils nur mit einem der DNA-Stränge reagieren. Folglich beschränkt sich auch die Spaltung auf einen der DNA-Stränge. Man kann jedoch zwei alkylierende Oligonucleotide in der Weise konstruieren, daß sie an benachbarten Stellen auf der DNA binden und bestimmte Guanine auf unterschiedlichen Strängen alkylieren. Sind die beiden alkylierten Guanine nur durch wenige Basenpaare voneinander getrennt, so führen die beiden Spaltungen der Einzelstränge eine Doppelstrang-Spaltung langer DNA-Fragmente an einer bestimmten Stelle herbei. Dieses Verfahren ist kürzlich bei einem Chromosom der Hefe mit einem Wirkungsgrad von über 90% angewendet worden^[166].

Eine Quervernetzung von Oligonucleotiden mit doppelsträngigen DNA-Sequenzen hat man auch mit dem zweikernigen Platinkomplex **43** beobachtet^[167]. Eines der Pt-Zentren reagierte mit einer 5'-Phosphorthioat-Funktion des Oligonucleotids, während das zweite Pt-Zentrum kovalent an Guanine der Zielsequenz gebunden wurde.

7.3. Sequenzspezifische Quervernetzung beider Doppelhelix-DNA-Stränge mit Psoralen-derivatisierten Oligonucleotiden

Psoralene finden schon seit vielen Jahren Verwendung als photoaktive Sonden für DNA- und RNA-Strukturen, als photoaktive Wirkstoffe bei Hautkrankheiten wie Psoriasis und als Hilfsmittel bei der Untersuchung von Mutagenesemechanismen und Reparaturprozessen^[168]. Unter UV-Be-

strahlung reagieren Psoralene mit Thyminbasen der DNA. Intercaliert Psoralen in einer 5'TpA3'-Position, so bildet sich eine Quervernetzung zwischen den beiden DNA-Strängen, da das Psoralen mit zwei Thyminen auf unterschiedlichen Strängen reagiert. Die Quervernetzung erfolgt durch [2 + 2]-Cycloaddition zwischen der 5,6-Doppelbindung der Thymine und der 3,4-(Pyrone-) und/oder der 4',5'-(Furan-) Doppelbindung des Psoralens. NMR-spektroskopische Untersuchungen lassen darauf schließen, daß das Psoralen-Gerüst bei der Quervernetzung mit der C(8)-Position voraus in die kleine Furche ragt und daß die Addukte eine *cis-syn*-Konfiguration aufweisen.

Bei der Tripelhelix-Bildung wird das Oligonucleotid in der großen Furche gebunden. Damit das Psoralen-Gerüst mit passender Orientierung in die für die Quervernetzung zwischen den beiden DNA-Strängen erforderliche 5'TpA3'-Position gelangt, muß es demnach mit dem Oligonucleotid über dessen C(5)-Position (siehe Abb. 9) verknüpft sein. Aus Experimenten mit unterschiedlichen Sequenzen als Zielmolekül für Psoralen-Oligonucleotid-Konjugate ging hervor, daß eine sequenzspezifische Quervernetzung der beiden DNA-Stränge dann in hoher Ausbeute erreicht wurde, wenn am Triplex-Duplex-Übergang ein 5'TpA3'-Strukturelement vorhanden war^[130, 202] (Abb. 14). Unlängst konnte gezeigt werden, daß ein Psoralen-Oligonucleotid-Konjugat seine spezifische Zielsequenz aus den drei Milliarden Basenpaaren der menschlichen DNA herausfindet (C. Giovannangeli, L. Serrouault, C. Hélène, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Zielsequenz lag auf der proviralen DNA von HIV, die als Einzelkopie in eines der Chromosomen einer chronisch infizierten menschlichen Zellreihe eingebaut war.

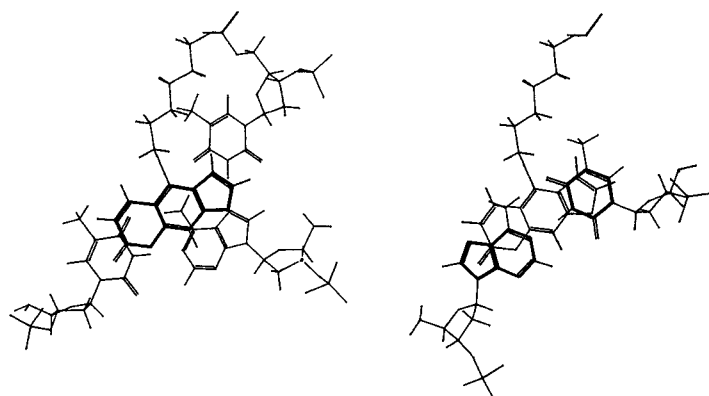


Abb. 14. Durch Energieminimierung ermittelte Strukturen eines Oligonucleotid-Psoralen-Konjugats. Das Psoralen ist an das 5'-Ende eines Triplex-bildenden Oligonucleotids gebunden und intercaliert am Triplex-Duplex-Übergang. Diese Abbildung zeigt, wie das Psoralen-Gerüst oberhalb des letzten Basen-tripletts (T \times A \cdot T) der Tripelhelix (links) und unterhalb des ersten Basenpaars (T \cdot A) der Doppelhelix (rechts) gestapelt wird. Es ist nur eine Lage des Psoralen-Gerüsts gezeigt, bei der der Furanring auf die erste Thyminbase der Duplex-Region ausgerichtet ist (die Sequenz am Duplex-Triplex-Übergang ist 5'TpA3'). Die beiden reaktiven Doppelbindungen des Psoralens (4',5' am Furanring und 3',4' am Pyronring) befinden sich in der Nähe der 5,6-Doppelbindungen der beiden Thymine, die unter Bildung von Cyclobutaneinheiten reagieren, so daß eine Quervernetzung zwischen den beiden DNA-Strängen entsteht (siehe Lit. [130] und [202]).

Das Psoralen-Gerüst kann bei der Intercalierung a priori zwei Orientierungen einnehmen, die sich durch 180°-Drehung um die C(5)-O-Bindung ergeben. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß das Psoralen-Gerüst bei der Quervernet-

zung vorzugsweise so ausgerichtet ist, daß der Furanring an den purinreichen Strang gebunden wird^[130]. Diese bevorzugte Orientierung spiegelt einerseits einen Unterschied in der Bindungsenergie der beiden Rotamere und andererseits einen Unterschied in der photochemischen Reaktivität wider. Der zweite Parameter scheint von größerer Bedeutung zu sein, da durch die Lage des Furanrings in unmittelbarer Nachbarschaft zur Homopurin-Sequenz beide reaktiven Doppelbindungen des Psoralens hinsichtlich der Doppelbindungen der beiden Thymine auf den unterschiedlichen DNA-Strängen günstig orientiert sind (Abb. 14).

8. Genkontrolle durch Triplex-bildende Oligonucleotide

Die Bildung einer lokalen Tripelhelix-Struktur durch Bindung eines Oligonucleotids an eine spezifische Sequenz der DNA-Doppelhelix kann die Genexpression auf verschiedene Weise beeinflussen (in Abb. 15 sind die inhibitorischen Prozesse für den Fall der Transkription schematisch dargestellt):

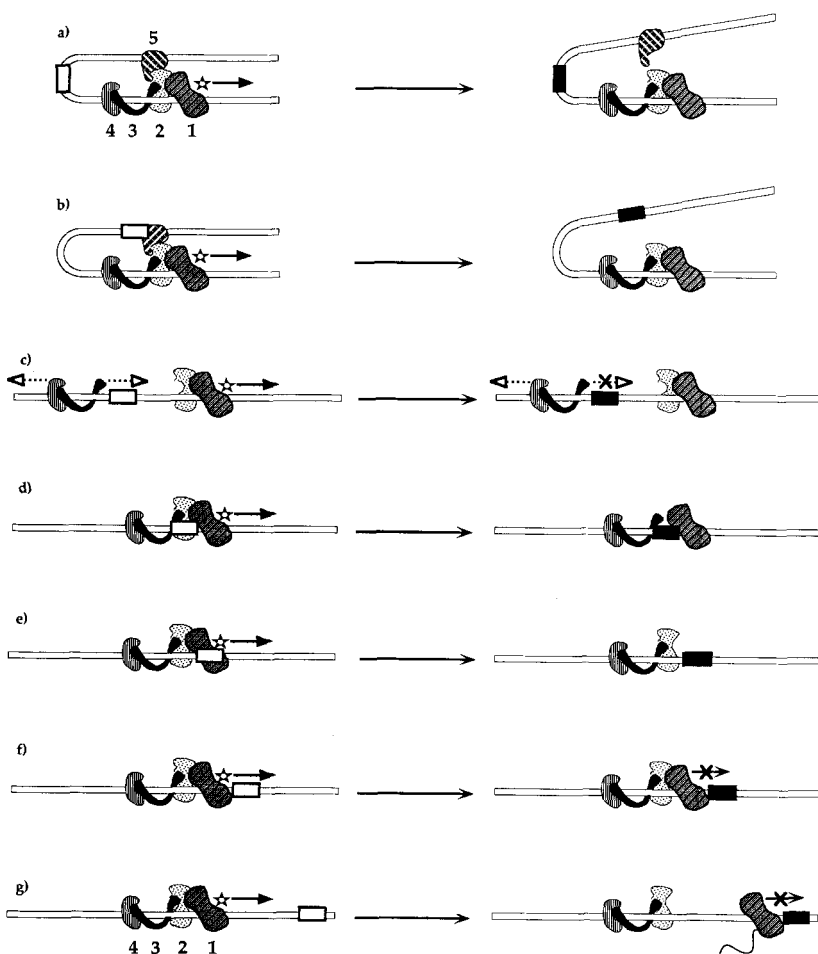
1) Das Triplex-bildende Oligonucleotid kann die Erkennungs- und Bindungsstellen einer der Komponenten der Transkriptions- oder Replikationsmaschinerie überlappen^[169–173, 196]. Es ist zu erwarten, daß das Konkurrieren um eine Bindungsstelle einen direkten Einfluß auf den biologischen Prozeß ausübt (Abb. 15 b,d,e).

2) Durch Triplex-Bildung hervorgerufene Konformationsänderungen der DNA^[60–69] können die Bindung von Protein-Faktoren und/oder Enzymen stören. Die Störung der Doppelhelix-Struktur setzt sich über den Bindungsbereich des Oligonucleotids hinaus fort, so daß Auswirkungen mittlerer Reichweite auf die Proteinbindung anzunehmen sind. Eine durch die Triplex-Bildung induzierte Biegung, Bieungsänderung und/oder Versteifung der DNA kann weitreichende Effekte zur Folge haben. Derartige Konformationsstörungen könnten Wechselwirkungen durch den Raum verändern, beispielsweise zwischen zwei Transkriptionsfaktoren, die an verschiedene Bereiche der DNA gebunden sind, oder sie können die Verteilung von Nucleosomen innerhalb der Chromatinstruktur modifizieren (Abb. 15 a,c).

3) Ein Triplex-bildendes Oligonucleotid, das direkt downstream von einer an ihren Promotor gebundenen RNA-Polymerase bindet, könnte die Initiation der Transkription verhindern. Eine Hemmung könnte auch dann eintreten, wenn ein Oligonucleotid am Anfangsort der Replikation in unmittelbarer Nähe von DNA-Polymerase bindet (Abb. 15 f).

4) Ein an DNA-gebundenes Oligonucleotid könnte als eine Art „Sperre“ für Transkriptions- oder Replikationsenzyme dienen (Abb. 15 g). Es ist wahrscheinlich, daß kurze Oligonucleotide als Liganden nicht stark genug sind, die enzymatische Maschinerie zu stoppen, wenn diese bereits in Gang gesetzt ist. Dieses Phänomen erinnert an Antisense-Oligodesoxynucleotide, die die Translation auch nicht verhindern, wenn sie innerhalb der Codesequenz für eine

Abb. 15. Schematische Darstellung verschiedener Mechanismen, mit denen Tripelhelix-bildende Oligonucleotide die Transkription blockieren können. Die Transkriptionsmaschinerie besteht aus RNA-Polymerase und damit verbundenen Faktoren, aus aktivierenden Faktoren, die upstream im Promotorbereich binden, und aus Aktivatoren, die an „Enhancer-Sequenzen“ in großer Entfernung von der RNA-Polymerase-Bindungsstelle binden und auf die Faltung der DNA einwirken. Der Pfeil zeigt die Richtung der Transkription an, und der Stern kennzeichnet den Startpunkt der Transkription. Die leeren Kästchen stehen für eine unbesetzte Triplex-Bindungsstelle, während die geschwärzten Kästchen eine Tripelhelix auf der Duplex-DNA repräsentieren. Proteine sind schematisch dargestellt: RNA-Polymerase (1) mit mehreren basalen Faktoren (2), die mit Aktivierungsfaktoren für die Transkription wechselwirken. Diese Aktivierungsfaktoren binden entweder in derselben Promotorregion (3, 4) – und zwar entweder direkt oder nach Vorbeigleiten an der Promotorsequenz – oder in weiter Entfernung (5), indem sie durch Faltung der Duplex-DNA mit der Transkriptionsmaschinerie wechselwirken. Das Tripelhelix-bildende Oligonucleotid kann nun wie folgt wirken: a) Die Biegung (Faltung) der DNA wird verändert; weitreichende Wechselwirkungen zwischen „Enhancer“-gebundenen Proteinen und der Transkriptionsmaschinerie werden verhindert. b) Die Bindung von Aktivatoren wird verhindert, die entweder über weitreichende Wechselwirkungen oder über Faktoren, die in der Nähe des RNA-Polymerase-Komplexes gebunden sind (nicht gezeigt), wirken. c) Die Bewegung von Transkriptionsfaktoren, die an Enhancer-Sequenzen weit entfernt vom Promotor binden und die DNA entlanggleiten, um mit der Polymerasemaschinerie in Berührung zu kommen, wird blockiert. Dies ist kürzlich für späte T4-Gene gezeigt worden [172]. d) Die Bindung von basalen Faktoren (Polypeptiden, die mit dem Protein verknüpft sind, das die enzymatische Aktivität aufweist) wird blockiert. e) Die Bindung von RNA-Polymerase wird verhindert. f) Die Initiation der Transkription wird durch Bindung downstream, aber in direktem Kontakt mit der Transkriptionsmaschinerie verhindert. g) Die Elongation der Transkription wird durch Bindung innerhalb des Transkriptionsbereichs des Gens blockiert. Andere Mechanismen wie beispielsweise eine zusätzliche Bindung weiterer Proteine an die Tripelhelix, was die Feinabstimmung der Wechselwirkungen aller an der Transkriptionsmaschinerie beteiligten Proteine stören könnte, oder eine Störung der Struktur von Nucleosomen, die upstream oder downstream der Promotorregion gebunden sind, sind nicht dargestellt. Eine Verzerrung der Chromatinstruktur kann die Transkription ebenfalls verändern (für eine Übersicht siehe Lit. [173]).



mRNA gebunden sind, es sei denn, Ribonuclease H spaltet die mRNA an der Oligodesoxynucleotid-Bindungsstelle. Ribosomen, die sich entlang einer mRNA bewegen, entfernen ein gebundenes Oligonucleotid auf dieselbe Weise, wie sie Sekundärstrukturen innerhalb der mRNA entfalten. Ausschließlich irreversible Reaktionen, die durch Ribonuclease H oder durch chemische Reagentien, die an das Oligonucleotid gebunden sind, ausgelöst werden, können die Translation an den Ribosomen zu stoppen. Für die Replikation und die Transkription ist eine ähnliche Situation zu erwarten. Es wird vermutet, daß die DNA-prozessierenden Enzyme nur durch eine irreversible Reaktion an der Bindungsstelle des Oligonucleotids aufzuhalten sind.

Die bisher beschriebenen Mechanismen beschränken sich auf die *Hemmung* eines enzymatischen Prozesses, der die DNA als Templat benutzt. Die Bindung eines Oligonucleotids in der großen Furche der DNA unter Bildung einer Tripelhelix könnte aber auch eine *Aktivierung* eines enzymatischen Prozesses bewirken. Es gibt eine Vielzahl von Veröffentlichungen über aktivierende Faktoren, die die Transkription positiv beeinflussen. Es gibt aber auch negativ regulierende Proteinfaktoren, bei deren Bindung an einen Genkontrollbereich die Leistungsfähigkeit der Transkription herabgesetzt wird^[171]. Gelingt es, die Bindung derartiger Faktoren durch Tripelhelix-bildende Oligonucleotide zu verhindern, so mildert dies deren inhibitorische Wirkung. Alternativ könnten Veränderungen der DNA- oder der Chromatinstruktur die Effizienz der Transkription und/oder der Replikation verbessern^[173].

Diese einleitende Erörterung befaßt sich ausschließlich mit der Transkription und der Replikation, zwei biologischen Prozessen, an denen die DNA als Matrix beteiligt ist. Die Auswirkungen Tripelhelix-bildender Oligonucleotide auf diese Prozesse sind bereits beschrieben. Es gibt jedoch noch weitere biologische Phänomene, bei denen enzymatische Systeme DNA als Matrix verwenden. So ist es vorstellbar, daß beispielsweise die Reparatur von DNA durch Tripelhelix-bildende Oligonucleotide beeinflusst wird. Die für die DNA-Reparatur verantwortlichen Enzymsysteme müssen Defekte auf der DNA-Doppelhelix erkennen, die entweder durch Replikationsfehler (Fehlpaarungen) oder durch äußere Einflüsse (Strahlung, Chemikalien, Wirkstoffe, Metabolite, etc.) verursacht worden sind^[9]. Liegt die veränderte Stelle auf der Doppelhelix in der Nähe oder in einer Tripelhelix-Bindungsstelle, so könnte die DNA-Reparatur durch Tripelhelix-Bildung beeinflusst werden. Weitere Prozesse wie die Rekombination, die Modulation der DNA-Superspiralisierung durch Topoisomerasen oder Veränderungen in der Chromatin-Überstruktur^[173] könnten ebenfalls durch Tripelhelix-bildende Oligonucleotide beeinflusst werden. Ferner könnte es Proteine geben, die in Zellen spezifisch tripelhelicale Strukturen binden^[179]. Sie könnten sowohl intramolekulare (H-DNA) als auch intermolekulare Tripelhelices stabilisieren.

8.1. Hemmung der Bindung und Spaltungsaktivität von Restriktionsenzymen

Mit Restriktionsenzymen und Methylasen läßt sich nachweisen, daß Tripelhelix-bildende Oligonucleotide die Proteinbindung an spezifischen Stellen der DNA hemmen können^[174–176]. Einige Beispiele haben wir in früheren Ab-

schnitten beschrieben. Diese Strategie ist verwendet worden, um in langen DNA-Fragmenten einschließlich Chromosomen eine Spaltung an einer spezifischen Stelle zu bewirken (siehe Abschnitt 2.5). Ein Triplex-bildendes Oligonucleotid kann eine Restriktionsstelle vor der Methylierung durch eine Methylase schützen, wohingegen die ungeschützten Stellen methyliert werden. Setzt man dieser partiell modifizierten DNA das Restriktionsenzym zu, so wird ausschließlich die vorher geschützte Stelle gespalten^[82, 83]. Bei den meisten der bisher beschriebenen Experimente erfolgt eine Abdeckung der Erkennungsstellen (d.h. der Tripelhelix-bildende Bereich überlappt den Erkennungsbereich des Enzyms um ein oder mehrere Basenpaare). Die durch die Tripelhelix-Bildung hervorgerufenen Konformationsänderungen könnten jedoch auch Effekte auf entfernte DNA-Regionen zur Folge haben.

8.2. Hemmung der Bindung von eukaryontischen Transkriptionsfaktoren in vitro

Es ist beschrieben worden, daß durch Oligonucleotid-gesteuerte Tripelhelix-Bildung die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindert wird. Oligonucleotide, die C und T^[65, 174, 182], G und T^[28, 185–187] oder G und C^[183] enthalten, sind verwendet worden, um die Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische Stellen im Promotorbereich verschiedener Gene zu hemmen. In einigen Fällen konnte die Hemmung der Transkription sowohl in vitro^[28, 65, 182] als auch in Zellkulturen^[182, 185, 187] nachgewiesen werden. Intramolekulare Tripelhelices (H-DNA) können eine ähnliche Rolle spielen. So hat man beispielsweise eine poly(dG) · poly(dC)-Sequenz an das 5'-Ende eines Thymidin-Kinase-Promotors in Maus-LTK⁻-Zellen gebunden^[184]. Man vermutete, daß die Bildung einer Tripelhelix (mit G × G · C-Basentriplets) die Bindung eines transaktivierenden Faktors hemmt, der in doppelsträngigen (dG · dC)-Abschnitten eine Stimulation der Transkription bewirkt.

Maher et al. haben die Auswirkungen Tripelhelix-bildender Oligonucleotide auf ein eukaryontisches (*Drosophila*) zellfreies Transkriptionssystem untersucht^[65]. Sie haben Homopurin · Homopyrimidin-Sequenzen in Bindungsstellen für den transaktivierenden Faktor Sp1 in eukaryontischen Promotoren eingebaut. In Abwesenheit des Sp1-Faktors konnte eine Promotor- und Oligonucleotid-spezifische Repression der basalen Transkription beobachtet werden. Diese Effekte wurden über eine Veränderung der DNA-Flexibilität infolge der Tripelhelix-Bildung im Promotorbereich erklärt. Auch andere Mechanismen, z.B. die Hemmung des DNA-„Trackings“ (Abb. 15c), können die Wechselwirkungen von Aktivatoren und basalen Faktoren mit RNA-Polymerase verändern, indem deren Entlanggleiten an der DNA-Doppelhelix verhindert wird. Damit eine Hemmung der Transkription durch Tripelhelix-bildende Oligonucleotide eintritt, ist es notwendig, daß die Tripelhelix-Komplexe aufgebaut werden, bevor das Zellkernextrakt zugesetzt wird. Diese Beobachtung könnte man durch Aktivitäten in den Zellkern-Extrakten erklären, die den Zugang zur DNA erschweren und/oder die Oligonucleotide abfangen oder hydrolysieren, so daß deren freie Konzentration verringert ist. Wir haben gezeigt, daß Zellkernextrakte Nuclease-Aktivitäten aufweisen, durch die Oligonucleotide, die nicht fest an Proteine oder DNA gebunden sind, hydrolysiert werden. Wurde der Faktor

Sp1 im Anschluß an die Triplex-bildenden Oligonucleotide zugesetzt, so erfolgte – unabhängig davon, ob die Sp1-Bindungsstellen die Tripelhelix-Bindungsstellen überlappten oder nicht – keine Derepression. Diese Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit, daß auch Triplex-bildende Oligonucleotide, die an solchen Stellen binden, die *nicht* bekannte Proteinbindungsstellen überlappen, eine Transkriptionskontrolle ausüben könnten.

8.3. Hemmung der Transkriptionsinitiation und -elongation in vitro

Morgan und Wells^[177] haben schon 1968 gezeigt, daß die Transkription von Polynucleotid-Doppelhelices, in denen alle Purinbasen auf demselben Strang liegen (poly[d(T · C)] · poly[d(G · A)] oder poly(dA) · poly(dT)), gehemmt wurde, wenn vor der Zugabe von RNA-Polymerase aus *E. coli* ein dritter Strang RNA (poly[r(U · C)] oder poly(rU)) zugesetzt wurde.

In einem anderen Fall verhinderte ein Oligonucleotid, das direkt downstream der *E.-coli*-RNA-Polymerase gebunden war, die Initiation der Transkription des β -Lactamase-Gens^[181]. Mit DNase-I-Footprinting-Experimenten wurde nachgewiesen, daß die Triplex-Bindungsstelle auf dem β -Lactamase-Promotor neben der Bindungsstelle für RNA-Polymerase liegt. In Gegenwart des Oligonucleotids wurde die Transkription bei der Zugabe von Nucleosidtriphosphaten nicht unmittelbar ausgelöst. Es wurde eine Verzögerung beobachtet, die mit der Lebensdauer des Triplex-Komplexes zusammenhängen könnte. Durch die Dissoziation des Oligonucleotids wird der RNA-Polymerase die Initiation der Transkription ermöglicht. Tripelhelices können durch Benzo[e]pyridindol-Derivate stark stabilisiert werden^[144]. In Gegenwart eines derartigen Liganden wurde die Wirkung Triplex-bildender Oligonucleotide auf die Initiation der Transkription am β -Lactamase-Promotor schon bei sehr viel geringeren Konzentrationen an Oligonucleotid beobachtet. Eine irreversible Hemmung wurde durch Verwendung eines Psoralen-Oligonucleotid-Konjugats erreicht, das unter UV-Bestrahlung mit der DNA-Sequenz quervernetzt wird^[181].

Wird ein Oligonucleotid in größerer Entfernung downstream von der Transkriptionsinitiationsstelle einer DNA, die ein eukaryontisches Pol-II-Promotorgen trägt, gebunden, so wird die Transkription vorübergehend gestoppt, bis das Oligonucleotid durch die sich entlang des Templates bewegende RNA-Polymerase verdrängt wird^[180]. Ein Polymerase-Komplex in der Nähe einer Tripelhelix scheint deren Dissoziation zu fördern. Das Oligonucleotid wirkte nur dann als Sperre, wenn es mit seiner Bindungsstelle quervernetzt war^[180].

Die Initiation der Transkription durch T7-RNA-Polymerase wurde durch ein Tripelhelix-bildendes Oligonucleotid inhibiert; die Oligonucleotid-Bindungsstelle überlappt mit dem Polymerase-spezifischen Promotor^[207].

8.4. Hemmung der Transkription in vivo

In einigen wenigen Fällen ist eindeutig nachgewiesen worden, daß die durch Oligonucleotide induzierten Effekte auf die Transkription innerhalb der Zelle eine Folge der Triplex-

Bildung und der Hemmung von transaktivierenden Faktoren sind. Postel et al.^[185] haben einen Beweis für die Bindung eines Triplex-bildenden Oligonucleotids an das *myc*-Gen geliefert: Sie konnten nachweisen, daß eine gegen DNase I hyperempfindliche Stelle durch das Oligonucleotid im Zellkern abgeschirmt wurde. In unserer Arbeitsgruppe wurde das Gen, das die α -Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors (IL2R α) codiert, verwendet, um Triplex-spezifische Effekte nachzuweisen^[182, 212, 213]. Die Zielsequenz im Promotorbereich des IL2R α -Gens überlappt die Erkennungsstelle für einen Transkriptionsfaktor (NF κ B), der die Transkription stark aktiviert. Wir haben eine Mutante der Zielsequenz hergestellt, die ein Triplex-bildendes, aus 15 Basenpaaren bestehendes Oligonucleotid nicht binden konnte. Während in transfizierten Zellen das Wildtyp-Gen (natürliche Sequenz) durch das Oligonucleotid gehemmt wurde, galt dies nicht für das mutierte Gen. Diese Beobachtung ist ein eindeutiger Beweis, daß die Triplex-Bildung eine Vorbedingung für den Inhibitoreffekt des Oligonucleotids darstellt. In diesem System haben wir entweder Oligonucleotide verwendet, die am 5'-Ende mit einem intercalierenden Agens (Acridin-Derivat) versehen waren, wodurch die Tripelhelix-Struktur stark stabilisiert wurde^[212], oder Oligonucleotide, die mit einem Psoralen-Derivat verknüpft waren, so daß durch Bestrahlung eine Quervernetzung zwischen den beiden DNA-Strängen an der Oligonucleotid-Bindungsstelle induziert werden konnte^[213]. In diesem Fall ergab eine Analyse der angegriffenen DNA nach Bestrahlung der Zellen, daß die Quervernetzung tatsächlich an der erwarteten Oligonucleotid-Bindungsstelle entstanden war^[213]. Chemische Sonden wie KMnO₄, Dimethylsulfid und OsO₄/Pyridin können in lebenden Zellen eingesetzt werden. Sie könnten die Charakterisierung intermolekularer Tripelhelices durch in-vivo-Footprinting ermöglichen, wie kürzlich bei intramolekularer H-DNA in Bakterien demonstriert^[188].

In mehreren Untersuchungen hat man zwar beobachtet, daß Oligonucleotide, die Tripelhelices bilden können, eine inhibitorische Wirkung auf die Gentranskription ausüben, doch konnte man die Hemmung nicht als direkte Folge einer Tripelhelix-Bildung nachweisen. Zielsequenzen dieser Untersuchungen waren der IL2R α -Genpromotor in T-Lymphocyten und der HIV-1-Promotorbereich akut oder chronisch infizierter Zellen. In beiden Fällen war ein Rückgang der mRNA-Synthese zu erkennen^[186, 187].

8.5. Hemmung der DNA-Replikation

Triplex-bildende Oligonucleotide könnten die Replikationsmaschinerie daran hindern, sich an der Oligonucleotid-Bindungsstelle vorbeizubewegen. Es ist allerdings wahrscheinlicher, daß der Oligonucleotid-DNA-Komplex dissoziiert, wenn die Replikation voranschreitet. Eine an der Oligonucleotid-Bindungsstelle induzierte irreversible Reaktion sollte demzufolge eine effizientere Hemmung bewirken.

Die Bindung eines Oligonucleotids am Startpunkt der Replikation könnte den Aufbau der Replikationsmaschinerie verhindern und auf diese Weise die Initiation des biologischen Prozesses hemmen. In der Tat hemmt ein Oligonucleotid-Intercalator-Konjugat, das am Startpunkt der Replikation von SV 40 bindet, die Replikation viraler DNA in CV-1-Zellen^[189]. In der Veröffentlichung zu dieser Untersu-

chung werden allerdings andere Mechanismen als die Triplex-Bildung für die Deutung der Ergebnisse vorgeschlagen. Dies sind die bisher einzigen Befunde zur Hemmung der Replikation, wenn Duplex-DNA als Templat dient. Bei einzelsträngiger DNA als Templat konnten wir dagegen vor kurzem zeigen, daß ein chimäres Oligonucleotid, das sowohl Watson-Crick- als auch Hoogsteen-Sequenzen enthält, die Replikation durch T7-DNA-Polymerase blockiert, indem sich an der einsträngigen Zielsequenz eine Tripelhelix bildet^[211].

Bei anderen Experimenten, in denen einsträngige DNA als Templat für *E. coli*- (Klenow-Fragment) oder für *Thermus aquaticus* (Taq)-DNA-Polymerase verwendet wurde, stoppte die Replikation in der Mitte der Polypurin- oder Polypyrimidinabschnitte^[190]. Dieses Ergebnis wurde so erklärt, daß sich pu × pu · py- oder py × pu · py-Tripelhelices bilden, und zwar durch Faltung der zweiten Hälfte des Polypurin- oder Polypyrimidinabschnitts an die Doppelhelix, die sich zwischen dem Templat und seinem replizierten komplementären Strang bildet. Diese Replikationshemmung konnte aufgehoben werden, indem ein an den Einzelstrang bindendes Protein mit dem Templat incubiert wurde^[190].

8.6. Nachweis dreisträngiger Strukturen in Zellen

Durch die Immunisierung von Mäusen mit poly[d(T^mC)] · poly[d(GA)] · poly[d(T^mC⁺T)], welches unter physiologischen Bedingungen eine stabile Tripelhelix bildet, konnte ein monoklonaler Antikörper für Triplex-DNA entwickelt werden. Mit Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Mäuse-Myelomzellen, die in Methanol/Essigsäure fixiert wurden, wurde eine Bindung dieses Antikörpers an Metaphasen-Chromosomen und Interphasen-Zellkerne beobachtet^[192]. Immunpositive Bereiche, die kondensierten Chromatinringen entsprachen, wurden auch in fixierten Polytän-Chromosomen von *Chironomus tentans* und *Drosophila melanogaster* beobachtet^[193]. Das häufige Auftreten von Polypurin · Polypyrimidin-Sequenzen in der DNA von Eukaryonten^[198, 199] macht es wahrscheinlich, daß sich unter bestimmten Bedingungen H-DNA (intramolekulare Tripelhelices) bilden kann^[178]. Ein immunologischer Nachweis für intermolekulare Tripelhelices in lebenden Zellen steht allerdings noch aus.

9. Zusammenfassung und Ausblick

Durch den Nachweis^[18–20], daß kurzkettige Oligonucleotide mit doppelsträngiger DNA sequenzspezifische Komplexe bilden können, ist ein neues Forschungsgebiet eröffnet worden. Die Bindung erfolgt in der großen Furche der Doppelhelix durch zwei Wasserstoffbrücken pro Basenpaar. Auch wenn die Stabilität der Tripelhelix geringer ist als die einer Doppelhelix, so ist die Spezifität der Erkennung mindestens genauso gut. Es werden einzelne Stellen auf der genomischen DNA höherer Organismen erkannt, wodurch sich neue Möglichkeiten eröffnen, um individuelle Chromosomen an einer begrenzten Anzahl von Stellen sequenzspezifisch zu spalten. Die Tripelhelix-Bildung durch Oligonucleotide kann auch genutzt werden, um bestimmte

Doppelstrang-DNA-Sequenzen aus komplexen Gemischen „herauszufischen“^[191].

Die Triplex-Bildung beschränkte sich ursprünglich auf Zielsequenzen, in denen alle Purinbasen auf demselben Strang angesiedelt waren. Wie wir in diesem Aufsatz gezeigt haben, konnte der Bereich der Erkennungssequenzen erweitert werden. Dennoch bleibt es eine Herausforderung für die Organiker, weitere Basen-Analoga zu entwickeln, damit alle vier Basenpaare (A · T, T · A, G · C und C · G) abgelesen werden können. Strang-Austauschreaktionen (beispielsweise mit Polyamid-Nucleinsäuren (PNAs)^[112] oder über Rekombinase-vermittelte Reaktionen)^[155–158] sind möglicherweise eine Alternative zur Tripelhelix-Bildung, da die Vielfalt der zu erkennenden Basensequenzen dann keine Rolle mehr spielt.

Viele Gene weisen Polypurin · Polypyrimidin-Bereiche auf, die in Genomen höherer Organismen offenbar überrepräsentiert sind^[198–200]. Tripelhelix-bildende Oligonucleotide eröffnen daher neue Möglichkeiten, die Genexpression schon auf der Ebene der Gene selbst zu kontrollieren. In einer diploiden Zelle liegen normalerweise nur zwei Kopien von jedem Gen vor. Im Vergleich zu anderen Zielsequenzen für Oligonucleotide wie mRNA-Sequenzen, die in Zellen in großer Zahl vorhanden sind, könnte dies von Vorteil sein. Die „Anti-Gen-Strategie“^[21], bei der das Oligonucleotid das Gen selbst angreift, ist somit eine vielversprechende Alternative zur „Antisense-Strategie“^[22, 194], bei der das Oligonucleotid nicht das Gen, sondern die mRNA angreift^[197].

Es ist viel Chemie getrieben worden, um Stabilität, Selektivität und den Bereich der Erkennungssequenzen Tripelhelix-bildender Oligonucleotide zu verbessern. Einige Probleme, die die in-vivo-Anwendung von Anti-Gen-Oligonucleotiden betreffen, ähneln denen der Antisense-Oligonucleotide. Zu diesen Problemen zählen die Stabilität in biologischen Medien, die Aufnahme in die Zelle, die intrazelluläre Verteilung und die Pharmakokinetik. Die Synthese von Oligonucleotid-Analoga und das Studium ihrer physikochemischen und biologischen Eigenschaften tragen dazu bei, grundlegende Prinzipien und Konzepte für eine neue Klasse von Therapeutica zu entwickeln.

Wir danken allen unseren Mitarbeitern, deren Arbeiten in diesem Aufsatz zitiert sind. Unser Dank gilt auch Dr. Daniel Pilch für sorgfältiges Lesen des Manuskripts und Anmerkungen dazu. Catherine Alvarez danken wir für das Tippen des Manuskripts. Unsere Forschungsarbeiten wurden von Rhône-Poulenc finanziell gefördert.

Eingegangen am 22. Oktober 1992 [A901]
Übersetzt von Dr. Sabine Töteberg-Kaulen, Odenthal

- [1] T. Steitz, *Q. Rev. Biophys.* **1990**, 23, 205–280; S. Harrison, *Nature* **1991**, 353, 715–719.
- [2] C. Hélène, G. Lancelot, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1982**, 39, 1–68.
- [3] S. Neidle, H. M. Berman, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1983**, 41, 43–66; B. C. Baguley, *Anti-Cancer Drug Design* **1991**, 6, 1–35.
- [4] C. Zimmer, U. Wähnert, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1986**, 47, 31–112; C. Bailly, J. P. Hénichart, *Bioconjugate Chem.* **1991**, 2, 379–393.
- [5] B. Lewin, *Genes*, Wiley, New York, **1983**; Deutsch: B. Lewin, *Gene*, 2. Aufl., VCH, Weinheim, **1991**.
- [6] S. Wain-Hobson, P. Sonigo, O. Danes, S. Cole, M. Alizon, *Cell* **1985**, 40, 9–17.
- [7] C. Hélène, J. J. Toulmé in *Oligodeoxynucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression* (Hrsg.: J. S. Cohen), McMillan Press, London, **1989**, S. 137–172.
- [8] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737–738.

- [9] M. Radman, R. Wagner, *Annu. Rev. Genet.* **1986**, *20*, 523; R. S. Lahne, K. G. Au, P. Modrich, *Science* **1989**, *245*, 160–164.
- [10] G. Felsenfeld, D. Davies, A. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2023.
- [11] G. Felsenfeld, H. T. Miles, *Annu. Rev. Biochem.* **1967**, *36*, 407–448.
- [12] A. M. Michelson, J. Massoulié, W. Guschlbauer, *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **1967**, *6*, 83–141.
- [13] R. D. Wells, D. A. Collier, J. C. Hanvey, M. Shimizu, F. Wohlrab, *FASEB J.* **1988**, *2*, 2939–2949.
- [14] K. Hoogsteen, *Acta Crystallogr.* **1959**, *12*, 822–823.
- [15] S. M. Mirkin, V. I. Lyamichev, K. V. Drushlyak, V. N. Dobrynin, S. A. Filippov, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nature* **1987**, *330*, 495–497.
- [16] H. Htun, J. E. Dahlberg, *Science* **1989**, *243*, 1571–1576.
- [17] Y. Kohwi, T. Kohwi-Shigematsu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 3781–3785.
- [18] T. Le Doan, L. Perrouault, D. Praseuth, N. Habboub, J. L. Decout, N. T. Thuong, J. Lhomme, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 7749–7760.
- [19] H. E. Moser, P. B. Dervan, *Science* **1987**, *238*, 645–650.
- [20] V. I. Lyamichev, S. M. Mirkin, M. D. Frank-Kamenetskii, C. R. Cantor, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 2165–2178.
- [21] C. Hélène, *Anti-Cancer Drug Design* **1991**, *6*, 569–584.
- [22] C. Hélène, J. J. Toulmé, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1049*, 99–125.
- [23] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543–584.
- [24] U. English, D. H. Gauss, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 629–646; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 613–629.
- [25] S. T. Crooke, *Annu. Rev. Mol. Toxicol.* **1992**, *32*, 329.
- [26] A. Jack, J. E. Ladner, A. Klug, *J. Mol. Biol.* **1976**, *108*, 619–649.
- [27] G. L. Quigley, A. H. J. Wang, N. C. Seeman, F. L. Suddath, A. Rich, J. L. Sussman, S. H. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 4866–4870.
- [28] M. Cooney, G. Czernuszewicz, E. H. Postel, S. J. Flint, M. E. Hogan, *Science* **1988**, *241*, 456–459.
- [29] R. H. Durland, D. J. Kessler, S. Gunnell, M. Duvic, B. M. Pettitt, M. E. Hogan, *Biochemistry* **1991**, *30*, 9246–9255.
- [30] P. A. Beal, P. B. Dervan, *Science* **1991**, *251*, 1360–1363.
- [31] D. S. Pilch, C. Levenson, R. H. Shafer, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6081–6087.
- [32] C. Giovannangeli, M. Rougée, T. Montenay-Garestier, N. T. Thuong, C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 8631–8635.
- [33] I. Radhakrishnan, C. de los Santos, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.* **1991**, *221*, 1403–1418.
- [34] F. M. Chen, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4472–4479.
- [35] S. D. Jayasena, B. H. Johnston, *Biochemistry* **1992**, *31*, 320–327.
- [36] C. Mark, D. Thiele, C. Schneider, W. Guschlbauer, *Nucleic Acids Res.* **1978**, *5*, 1979–1996.
- [37] A. G. Letai, M. A. Palladino, E. Fromm, V. Rizzo, J. R. Fresco, *Biochemistry* **1988**, *27*, 9108–9112.
- [38] T. Kohwi-Shigematsu, Y. Kohwi, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *15*, 4267–4271.
- [39] J. Bernués, R. Beltrán, J. M. Casasnovas, F. Azorin, *EMBO J.* **1989**, *8*, 2087–2094.
- [40] D. Michel, G. Chatelain, Y. Herault, G. Brun, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 439–443.
- [41] D. Praseuth, L. Perrouault, T. Le Doan, M. Chassignol, N. Thuong, C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 1349–1353.
- [42] G. Manzini, L. E. Xodo, D. Gasparotto, F. Quadrifoglio, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 833–843.
- [43] J. S. Sun, T. de Bizemont, G. Duval-Valentin, T. Montenay-Garestier, C. Hélène, *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. III* **1991**, *313*, 585–590.
- [44] D. A. Horne, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2435–2437.
- [45] A. Ono, C. N. Chen, L. S. Kan, *Biochemistry* **1991**, *30*, 9914–9921.
- [46] B. C. Froehler, T. Terhorst, J. P. Shaw, S. N. McCurdy, *Biochemistry* **1992**, *31*, 1603–1609; S. McCurdy, C. Moulds, B. Froehler, *Nucleosides Nucleotides* **1991**, *10*, 287–290.
- [47] P. A. Beal, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4976–4982.
- [48] S. Arnott, P. J. Bond, *Nature New Biol.* **1973**, *244*, 99–101.
- [49] S. Arnott, E. Selsing, *J. Mol. Biol.* **1974**, *88*, 509–521.
- [50] S. Arnott, P. J. Bond, E. Selsing, P. J. C. Smith, *Nucleic Acids Res.* **1976**, *2459*–2470.
- [51] J. Lourdes Campos, J. A. Subirana, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1991**, *8*, 793–800.
- [52] C. de los Santos, M. Rosen, D. Patel, *Biochemistry* **1989**, *28*, 7282–7289.
- [53] P. Rajagopal, J. Feigon, *Nature* **1989**, *339*, 637–640.
- [54] V. Sklenar, J. Feigon, *Nature* **1990**, *345*, 836–838.
- [55] D. S. Pilch, C. Levenson, R. H. Shafer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1942–1946.
- [56] M. M. W. Mooren, D. E. Pulleyblank, S. S. Wijmenga, M. J. J. Blommers, C. W. Hilbers, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 6523–6529.
- [57] R. Macaya, E. Wang, P. Schultze, V. Sklenar, J. Feigon, *J. Mol. Biol.* **1992**, *225*, 755–773.
- [58] I. Radhakrishnan, D. J. Patel, *Biochemistry* **1992**, *31*, 2514–2523.
- [59] C. A. Laughton, S. Neidle, *J. Mol. Biol.* **1992**, *223*, 519–529.
- [60] J. C. François, T. Saison-Behmoaras, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 11431–11440.
- [61] L. Perrouault, U. Asseline, C. Rivalle, N. T. Thuong, E. Bisagni, C. Giovannangeli, T. Le Doan, C. Hélène, *Nature* **1990**, *344*, 358–360.
- [62] D. Collier, J. L. Mergny, N. T. Thuong, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 4219–4224.
- [63] J. S. Sun, J. L. Mergny, R. Lavery, T. Montenay-Garestier, C. Hélène, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1991**, *9*, 411–424.
- [64] J. Chomilier, J. S. Sun, D. A. Collier, T. Montenay-Garestier, C. Hélène, R. Lavery, *Biophys. Chem.* **1992**, *45*, 143–152.
- [65] L. J. Maher III, P. B. Dervan, B. J. Wold, *Biochemistry* **1992**, *31*, 70–81.
- [66] D. A. Hartman, S. R. Kuo, T. R. Broker, L. T. Chow, R. D. Wells, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 5488–5494.
- [67] V. I. Lyamichev, M. D. Frank-Kamenetskii, V. N. Soyfer, *Nature* **1990**, *344*, 568–570.
- [68] V. I. Lyamichev, O. N. Voloshin, M. D. Frank-Kamenetskii, V. N. Soyfer, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 1633–1638.
- [69] P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 2735–2739.
- [70] L. C. Griffin, P. B. Dervan, *Science* **1989**, *245*, 967–971.
- [71] L. L. Kiessling, L. C. Griffin, P. B. Dervan, *Biochemistry* **1992**, *31*, 2829–2834.
- [72] J. L. Mergny, J. S. Sun, M. Rougée, T. Montenay-Garestier, F. Barcelo, J. Chomilier, C. Hélène, *Biochemistry* **1991**, *30*, 9791–9798.
- [73] R. W. Roberts, D. M. Crothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 9397–9401.
- [74] K. Yoon, C. A. Hobbs, J. Koch, M. Sardaro, R. Kutny, A. L. Weis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3840–3844.
- [75] B. P. Belotserkovskii, A. G. Veselkov, S. A. Filippov, V. N. Dobrynin, S. M. Mirkin, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 6621–6624.
- [76] E. Wang, S. Malek, J. Feigon, *Biochemistry* **1992**, *31*, 4838–4846.
- [77] I. Radhakrishnan, X. Gao, C. de los Santos, D. Live, D. J. Patel, *Biochemistry* **1991**, *30*, 9022–9030.
- [78] R. F. Macaya, D. E. Gilbert, S. Malek, J. S. Sinsheimer, J. Feigon, *Science* **1991**, *254*, 270–274.
- [79] J. C. François, T. Saison-Behmoaras, C. Barbier, M. Chassignol, N. T. Thuong, C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 9702–9706.
- [80] S. A. Strobel, H. E. Moser, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7927–7929.
- [81] S. A. Strobel, P. B. Dervan, *Science* **1990**, *249*, 73–75.
- [82] S. A. Strobel, P. B. Dervan, *Nature* **1991**, *350*, 172–174.
- [83] S. A. Strobel, L. A. Doucette-Stamm, L. Riba, D. E. Housman, P. B. Dervan, *Science* **1991**, *254*, 1639–1642.
- [84] M. Koob, E. Grimes, W. Szybalski, *Science* **1988**, *241*, 1084–1086.
- [85] M. Koob, W. Szybalski, *Science* **1990**, *250*, 271–273.
- [86] L. E. Xodo, G. Manzini, F. Quadrifoglio, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3557–3564.
- [87] D. S. Pilch, R. Brousseau, R. H. Shafer, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 5743–5750.
- [88] J. Ohms, T. Ackermann, *Biochemistry* **1990**, *29*, 5237–5244.
- [89] G. E. Plum, Y. W. Park, S. F. Singleton, P. B. Dervan, K. J. Breslauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9436–9440.
- [90] L. J. Maher III, P. B. Dervan, B. J. Wold, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8820–8826.
- [91] M. Rougée, B. Faucon, J. L. Mergny, F. Barcelo, C. Giovannangeli, T. Garestier, C. Hélène, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9269–9278.
- [92] S. A. Strobel, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7286–7287.
- [93] M. D. Distefano, J. A. Shin, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5901–5902.
- [94] K. J. Luebke, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8733–8735.
- [95] N. G. Dolinnaya, O. V. Pyatrauskene, Z. A. Shabarova, *FEBS Lett.* **1991**, *284*, 232–234.
- [96] K. J. Luebke, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7447–7448.
- [97] K. J. Luebke, P. B. Dervan, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3005–3009.
- [98] R. G. Shea, P. Ng, N. Bischofberger, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 4859–4866.
- [99] M. T. Sarocchi-Landousy, B. L. Haas, W. Guschlbauer, *Biochemistry* **1977**, *16*, 5414–5420.
- [100] J. S. Lee, M. L. Woodsworth, L. J. P. Latimer, A. R. Morgan, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 6603–6614.
- [101] T. J. Povsic, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3059–3061.
- [102] L. E. Xodo, G. Manzini, F. Quadrifoglio, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 5625–5631.
- [103] A. Ono, P. O. P. Ts'o, L. S. Kan, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4032–4033; *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3225–3230.
- [104] M. Shimizu, H. Inoue, E. Ohtsuka, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1991**, *25*, 141–142.
- [105] S. H. Krawczyk, J. F. Milligan, S. Wadwani, C. Moulds, B. C. Froehler, M. D. Matteucci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3761–3764.
- [106] P. S. Miller, P. Bhan, C. D. Cushman, T. L. Trapane, *Biochemistry* **1992**, *31*, 6788–6793.
- [107] J. S. Koh, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1470–1478.
- [108] L. J. P. Latimer, K. Hampel, J. S. Lee, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *1549*–1561.
- [109] L. Kibler-Herzog, B. Kell, G. Zon, K. Shinozuka, S. Mizan, W. D. Wilson, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3545–3555.
- [110] D. E. Callahan, T. L. Trapane, P. S. Miller, P. O. P. Ts'o, L. S. Kan, *Biochemistry* **1991**, *1650*–1655.
- [111] M. Matteucci, K. Y. Lin, S. Butcher, C. Moulds, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *7767*–7768.
- [112] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*,

- 1497–1500; M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895–1897; siehe auch: C. Meier, J. W. Engels, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1039; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *31*, 1008.
- [113] U. Sequin, *Helv. Chim. Acta* **1974**, *57*, 68–81.
- [114] F. Morvan, B. Rayner, J. L. Imbach, D. K. Chang, J. W. Lown, *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 5019–5035.
- [115] N. T. Thuong, U. Asseline, V. Roig, M. Takasugi, C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 5129–5133.
- [116] F. Morvan, B. Rayner, J. L. Imbach, S. Thenet, J. R. Bertrand, J. Paoletti, C. Malvy, C. Paoletti, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 3421–3437.
- [117] C. Cazenave, M. Chevrier, N. T. Thuong, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 10507–10521.
- [118] a) T. Yamaguchi, M. Sanyoshi, *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *32*, 1441–1450; b) R. Kurfürst, *Dissertation*, Orléans, **1990**.
- [119] N. T. Thuong, M. Chassignol, *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. II* **1987**, *305*, 1527–1530.
- [120] F. Morvan, B. Rayner, J. P. Leonetti, J. L. Imbach, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 833–847.
- [121] N. T. Thuong, M. Chassignol, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5905–5908.
- [122] J. S. Sun, C. Giovannangeli, J. C. François, R. Kurfürst, T. Monténay-Garestier, U. Asseline, T. Saison-Behmoaras, N. T. Thuong, C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 6023–6027.
- [123] J. S. Sun, U. Asseline, D. Rouzard, T. Monténay-Garestier, N. T. Thuong, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 6149–6158.
- [124] D. Praseuth, M. Chassignol, T. Takasugi, T. Le Doan, N. T. Thuong, C. Hélène, *J. Mol. Biol.* **1987**, *196*, 939–942.
- [125] J. S. Sun, R. Lavery, *J. Mol. Recognition* **1992**, *5*, 93–98.
- [126] U. Asseline, N. T. Thuong, C. Hélène, *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. III* **1983**, *297*, 369–372.
- [127] U. Asseline, M. Delarue, G. Lancelot, F. Toulmé, N. T. Thuong, T. Monténay-Garestier, C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3297–3301; U. Asseline, F. Toulmé, N. T. Thuong, M. Delarue, T. Monténay-Garestier, C. Hélène, *EMBO J.* **1984**, *3*, 795–800.
- [128] J. S. Sun, J. C. François, T. Monténay-Garestier, T. Saison-Behmoaras, V. Roig, N. T. Thuong, C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 9198–9202.
- [129] D. A. Collier, N. T. Thuong, C. Hélène, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1457–1458.
- [130] M. Takasugi, A. Guendouz, M. Chassignol, J. L. Decout, J. Lhomme, N. T. Thuong, C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5602–5606.
- [131] M. Boidot-Forget, M. Chassignol, M. Takasugi, N. T. Thuong, C. Hélène, *Gene* **1988**, *72*, 361–371.
- [132] N. T. Thuong, M. Chassignol, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5905–5908.
- [133] N. T. Thuong, M. Chassignol, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4157–4160.
- [134] N. T. Thuong, U. Asseline in *Oligonucleotides and Analogues* (Hrsg.: F. Eckstein), IRL Press, Oxford, **1991**, Kap. 12.
- [135] U. Asseline, N. T. Thuong, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2521–2524.
- [136] U. Asseline, E. Bonfils, R. Kurfürst, M. Chassignol, V. Roig, N. T. Thuong, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1233–1254.
- [137] D. G. Knorre, V. V. Vlassov, *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **1985**, *32*, 292–322.
- [138] L. Z. Benimetskaya, N. V. Bulychev, A. L. Kozionov, A. A. Koshkin, A. V. Lebedev, S. Yu. Novozhilbov, M. I. Stockmann, *Bioorg. Khim.* **1988**, *14*, 48–57.
- [139] K. J. Hampel, P. Crosson, J. S. Lee, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4455–4459.
- [140] P. V. Scaria, R. H. Shafer, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 5417–5423.
- [141] J. L. Mergny, D. Collier, M. Rougée, T. Monténay-Garestier, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 1521–1526.
- [142] J. S. Sun, R. Lavery, J. Chomilier, K. Zakrzewska, T. Monténay-Garestier, C. Hélène, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1991**, *9*, 425–436.
- [143] a) Y. W. Park, K. J. Breslauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6653–6657; b) K. Umemoto, M. H. Sarma, J. Luo, R. H. Sarma, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4539–4545.
- [144] J. L. Mergny, G. Duval-Valentin, C. H. Nguyen, L. Perrouault, B. Faucou, M. Rougée, T. Monténay-Garestier, E. Bisagni, C. Hélène, *Science* **1992**, *256*, 1681–1684.
- [145] S. C. Harvey, J. Luo, R. Lavery, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 11795–11809.
- [146] C. Giovannangeli, T. Monténay-Garestier, M. Rougée, M. Chassignol, N. T. Thuong, C. Hélène, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7775–7777.
- [147] E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6265–6266.
- [148] G. Prakash, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3523–3527.
- [149] D. Michel, G. Chatelain, Y. Hérault, G. Brun, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 439–443.
- [150] B. P. Belotserkovskii, M. M. Krasilnikova, A. G. Veselkov, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 1903–1908.
- [151] M. E. Reaban, J. A. Griffin, *Nature* **1990**, *348*, 342–344.
- [152] P. Hsieh, C. S. Camerini-Otero, R. D. Camerini-Otero, *Genes Dev.* **1990**, *4*, 1951–1963.
- [153] B. J. Rao, M. Dutreix, C. M. Radding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2984–2988.
- [154] B. J. Rao, B. Jwang, M. Dutreix, *Biochimie* **1991**, *73*, 363–370.
- [155] P. Hsieh, C. S. Camerini-Otero, R. D. Camerini-Otero, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6492–6496.
- [156] S. Cheng, B. Van Houten, H. B. Gampert, A. Sancar, J. E. Hearst, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 15110–15117.
- [157] E. I. Golub, D. C. Ward, C. M. Radding, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3121–3125.
- [158] L. Ferrin, R. D. Camerini-Otero, *Science* **1991**, *254*, 1494–1497.
- [159] J. C. François, T. Saison-Behmoaras, M. Chassignol, N. T. Thuong, C. Hélène, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 5891–5898.
- [160] T. Le Doan, L. Perrouault, U. Asseline, N. T. Thuong, C. Rival, E. Bisagni, C. Hélène, *Antisense Res. Develop.* **1991**, *1*, 43–54.
- [161] O. S. Fedorova, D. G. Knorre, L. M. Podust, V. F. Zarytova, *FEBS Lett.* **1988**, *228*, 273–276.
- [162] T. J. Povsic, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9428–9430.
- [163] J. P. Shaw, J. F. Milligan, S. H. Krawczyk, M. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7765–7766.
- [164] E. B. Brossalina, E. N. Demchenko, V. V. Vlassov, S. V. Mamaev, *Antisense Res. Dev.* **1991**, *1*, 229–242.
- [165] D. G. Knorre, V. V. Vlassov, *Genetica* **1991**, *85*, 53–63.
- [166] T. J. Povsic, S. A. Strobel, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5934–5941.
- [167] E. S. Gruff, L. E. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 6849–6854.
- [168] G. D. Cimino, H. B. Gampert, S. T. Isaacs, J. E. Hearst, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 1151–1193.
- [169] M. Ptashne, A. A. F. Gann, *Nature* **1990**, *346*, 329–331.
- [170] C. C. Thompson, S. L. McKnight, *Trends Genet.* **1992**, *8*, 232–236.
- [171] R. Weinmann, *Gene Expression* **1992**, *2*, 81–91.
- [172] D. R. Herendeen, G. A. Kassavitis, E. P. Geiduschek, *Science* **1992**, *256*, 1298–1303.
- [173] G. Felsenfeld, *Nature* **1992**, *355*, 219–224.
- [174] L. J. Maher III, B. J. Wold, P. B. Dervan, *Science* **1989**, *245*, 725–730.
- [175] J. C. François, T. Saison-Behmoaras, N. T. Thuong, C. Hélène, *Biochemistry* **1989**, *28*, 9617–9619.
- [176] J. C. Hanvey, M. Shimizu, R. D. Wells, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *18*, 157–161.
- [177] A. R. Morgan, R. D. Wells, *J. Mol. Biol.* **1968**, *37*, 63–80.
- [178] T. L. Davis, A. B. Firulli, A. J. Kinniburgh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 9682–9686.
- [179] R. Kiyama, R. D. Camerini-Otero, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10450–10454.
- [180] S. L. Young, S. H. Krawczyk, M. D. Matteucci, J. J. Toole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10023–10026.
- [181] G. Duval-Valentin, N. T. Thuong, C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 504–508.
- [182] M. Grigoriev, D. Praseuth, P. Robin, A. Hemar, T. Saison-Behmoaras, A. Dautry-Varsat, N. T. Thuong, C. Hélène, A. Harel-Bellan, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 3389–3395; C. Hélène, N. T. Thuong, A. Harel-Bellan, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1992**, *660*, 27–36.
- [183] J. E. Gee, S. Blume, R. C. Snyder, R. Ray, D. M. Miller, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 11163–11167.
- [184] Y. Kohwi, T. Kohwi-Shigematsu, *Genes Dev.* **1991**, *5*, 2547–2554.
- [185] E. H. Postel, S. J. Flint, D. J. Kessler, M. E. Hogan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 8227–8231.
- [186] F. M. Orson, D. W. Thomas, W. M. McShan, D. J. Kessler, M. E. Hogan, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 3435–3441.
- [187] W. M. McShan, R. D. Rossen, A. H. Laughter, J. Trial, D. J. Kessler, J. G. Zengdegi, M. E. Hogan, F. M. Orson, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 5712–5721.
- [188] P. Karlovsky, P. Pecinka, M. Vojtkova, E. Makaturova, E. Palecek, *FEBS Lett.* **1990**, *274*, 39–42.
- [189] F. Birg, D. Praseuth, A. Zerial, N. T. Thuong, U. Asseline, T. Le Doan, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 2901–2908.
- [190] N. Baran, A. Lapidot, H. Manor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 507–511.
- [191] T. Ito, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 495–498.
- [192] J. S. Lee, G. D. Burkholder, L. J. P. Latimer, B. L. Haug, R. P. Braun, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 1047–1061.
- [193] G. D. Burkholder, L. J. P. Latimer, J. S. Lee, *Chromosoma* **1991**, *101*, 11–18.
- [194] C. Hélène, *Eur. J. Cancer* **1991**, *27*, 1466–1471.
- [195] P. B. Dervan, *Science* **1986**, *232*, 464–471.
- [196] J. P. Landers, T. C. Spelsberg, *CRC Crit. Eukaryotic Gene Expression* **1992**, *2*, 19–63.
- [197] J. M. Chubb, M. E. Hogan, *Trends Biotechnol.* **1992**, *10*, 132–136.
- [198] A. M. Beatty, M. J. Behe, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 1517–1528.
- [199] M. J. Behe, *Biochemistry* **1987**, *26*, 7870–7875.
- [200] H. Manor, B. S. Rao, R. G. Martin, *J. Mol. Evol.* **1988**, *27*, 96–101.
- [201] J. Aymami, M. Coll, C. A. Frederick, A. H. J. Wang, A. Rich, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 3229–3245.
- [202] C. Giovannangeli, N. T. Thuong, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4275–4281.
- [203] D. Pei, D. R. Corey, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9858–9862.

- [204] G. B. Dreyer, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 447–450.
 [205] D. S. Sigman, *Biochemistry* **1990**, 29, 9097–9105.
 [206] S. F. Singleton, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 6957–6965.
 [207] L. J. Maher III, *Biochemistry* **1992**, 31, 7587–7595.
 [208] S. Arnott, R. Chandrasekharan, D. L. Birdsall, A. G. W. Leslie, R. L. Ratliff, *Nature* **1980**, 283, 743.
 [209] T. Montenay-Garestier, J. S. Sun, J. Chomilier, J. L. Mergny, M. Takasugi, U. Asseline, N. T. Thuong, M. Rougée, C. Hélène in *Molecular Basis of Specificity in Nucleic Acid-Drug Interactions* (Hrsg.: B. Pullman, J. Jortner), Kluwer Acad. Publ., Amsterdam, **1990**, S. 275–290.

- [210] C. Escudé, J. S. Sun, T. Garestier, M. Rougée, C. Hélène, *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. III* **1992**, 315, 521–525.
 [211] C. Giovannangeli, N. T. Thuong, C. Hélène, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1993**, im Druck.
 [212] M. Grigoriev, D. Prasenth, A. L. Guieysse, P. Robin, N. T. Thuong, C. Hélène, A. Harel-Bellan, *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. III* **1993**, im Druck.
 [213] M. Grigoriev, D. Prasenth, A. L. Guieysse, P. Robin, N. T. Thuong, C. Hélène, A. Harel-Bellan, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1993**, im Druck.
 [214] M. Shimizu, A. Konishi, Y. Shimada, H. Inoue, E. Ohtsuka, *FEBS Lett.* **1992**, 302, 155–158.
 [215] L. C. Griffin, L. L. Kiesling, P. A. Beal, P. Gillepsie, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7976–7982.



Willy P., Doktorand,

neue Routen zur Spitzenforschung
 erkundend - zuverlässige Orientierung gibt
 ihm sein ganz persönliches Exemplar der
ANGEWANDTEN

Bestellen auch Sie gleich Ihr
 persönliches Abonnement der Angewandten!
 Anruf beim VCH-Leserservice genügt:
 0 62 01/ 606-199 (Fax -117).

