

Hydratisierung der B-DNA-Doppelhelix [$d(CGCGAAT^{Me}T^{Me}, CGCG)_2$]₂ (T^{Me} = carbocyclisches 6'- α -Methylthymidin). Wassermoleküle sind als hellblaue und die Kohlenstoffatome der α -CH₃-Substituenten in den modifizierten Thymidinresten als gelbe Kugeln dargestellt.

Die Strukturen von Nucleinsäureanaloga und Antisense-Oligonucleotiden

Martin Egli*

Die Hybridisierung komplementärer Oligonucleotide ist ein Schlüsselvorgang bei wertvollen Forschungsmethoden in vielen Gebieten einschließlich Genetik, Molekularbiologie und Zellbiologie. Ein Antisense-Molekül für ein bestimmtes Segment einer Sense-Messenger-RNA ermöglicht zum Beispiel ein selektives Abschalten der Genexpression, und die Polymerase-Kettenreaktion erfordert komplementäre Primer, damit sie abläuft. Große Hoffnungen setzt man auch in den möglichen therapeutischen Nutzen von Antisense-Verbindungen bei der Behandlung verschiedener Krankheiten einschließlich Krebs. Gegenstand intensiver Forschung sind die Mechanismen der Aufnahme von Antisense-Verbindungen in die Zelle und ihrer Weiterleitung zu spezifischen Orten innerhalb der Zelle, ein verbessertes Verständnis der Art und Weise, wie diese Verbindungen die Produktion von Proteinen hemmen, sowie die Optimierung der chemischen Stabilität von Antisense-Verbindungen und der thermodynamischen Stabilität der Duplexe, die sie mit den mRNAs bilden. Die letzten

beiden Punkte haben besonders Chemiker motiviert, nach Oligonucleotidanaloga mit verbesserten Bindungseigenschaften für die Hybridisierung mit RNA und höherer Beständigkeit gegenüber Abbau durch Nuclease zu suchen. In den letzten Jahren führte diese Forschung zu einer Vielzahl neuer chemischer Modifikationen von DNA und RNA, die sowohl das Zucker-Phosphat-Rückgrat als auch die Nucleobasen betreffen. Bisher befaßten sich jedoch nur wenige Forschungen mit den genauen Ursachen von Stabilitätsgewinn oder -verlust bei Nucleinsäureanaloga, die an RNA binden. Obwohl sehr viele thermodynamische Daten zusammengetragen wurden, versteht man die durch die Modifikationen in Hybrid-Duplexen induzierten Umordnungen der Struktur nur schlecht. Bei vielen modifizierten Oligonucleotiden ist die Chemie des Anbringens und Entfernen von Schutzgruppen und der Kupplung inzwischen mit den Standardvorschriften der DNA- und RNA-Synthese vereinbar. Dies ermöglicht es, modifizierte Nucleinsäurefragmente oder gemischte Oligo-

nucleotide, die Modifikationen an ausgewählten Stellen enthalten, in für Untersuchungen der dreidimensionalen Struktur geeigneten Mengen herzustellen. Solche Untersuchungen sollten die strukturchemischen Ursachen für die beobachteten Affinitäts- und Spezifitätsveränderungen der Bindung bei bestimmten Modifikationen aufzeigen; sie können die Entwicklung von Antisense-Verbindungen der zweiten und dritten Generation in die richtige Richtung lenken. Darüber hinaus liefert die Verfügbarkeit einer zuvor unvorstellbaren Fülle an modifizierten Bausteinen und die Erforschung ihrer Strukturen die Möglichkeit, die Strukturen nativer DNA und RNA besser zu verstehen. Im vorliegenden Beitrag sind die Ergebnisse der in unserem Labor in den letzten drei Jahren durchgeführten Kristallstrukturuntersuchungen mit modifizierten Nucleinsäurefragmenten und die daraus gewonnenen Erkenntnisse zusammengestellt.

Stichworte: DNA · Kristallstrukturanalyse · RNA · Wasserstoffbrücken

1. Einleitung

Die von den vier Nucleotidbasen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C) in genau festgelegter Reihenfolge gebildeten Sequenzen und die Bildung komplementärer, über Wasserstoffbrücken verbundener A-T- und G-C-Basenpaare bilden die Grundlage für die Struktur und die Expression von Genen. In den Chromosomen liegt die DNA gewöhnlich in

Form einer antiparallelen Doppelhelix vor, die aus dem Sense-Strang und dem Antisense-Strang besteht. Die Spezifität der Paarung ist das Prinzip, das jeder biologischen Informationsübertragung – Replikation, Rekombination, Transkription und Translation – zugrundeliegt. Bei Bakterien und Viren ist die Hybridisierung zwischen Sense-RNA und Antisense-RNA ein häufiger Mechanismus der Regulation oder Inhibition der Genaktivität. Es wurde gezeigt, daß sowohl Replikation als auch Transkription bei Prokaryonten über solche Mechanismen gesteuert werden^[1–4]. Zur Steuerung der Replikation des *E.-coli*-Plasmids ColE1 wird ein Sense-Antisense-RNA-Komplex zwischen zwei komplementären Schleifen gebildet^[5, 6]. Diese ersten Beobachtungen eines natürlichen Mechanismus zur Unterdrückung von genetischer Information über Nucleinsäu-

* Prof. Dr. M. Egli
Department of Molecular Pharmacology and Biological Chemistry
Northwestern University Medical School
303 East Chicago Avenue
Chicago, IL 60611-3008 (USA)
Telefax: Int. + 312/503-0796
E-mail: m-egli@nwu.edu

ren folgte eine Dekade intensiver Erforschung der Möglichkeiten und Grenzen des Antisense-Ansatzes.

Antisense-RNA braucht nicht unbedingt über Expressionsvektoren verabreicht zu werden, sondern läßt sich auch in Form kurzer synthetischer Oligonucleotide in Zellen injizieren. Außerdem kann auch DNA verwendet werden, um die Proteinexpression effektiv zu hemmen, wie zuerst von Zamecnik und Mitarbeitern gezeigt wurde^[7, 8]. Messenger-RNA im unprozessierten und im prozessierten Zustand ist nicht die einzige mögliche Zielverbindung; ein Eingriff in die Proteinexpression kann im Prinzip auch auf dem Niveau des Gens erfolgen. Dieser Ansatz ist jedoch bisher weitgehend auf Homopurin-Zielsequenzen beschränkt, die mit dem Antisense-Strang einen Triplex bilden können^[9–11]. Wirksamer kann die Genexpression durch Antisense-RNA mit funktionellen Eigenschaften gesteuert werden, z. B. durch *trans*-aktive Hammerkopf-Ribozyme, die eine Zielsequenz nach UH (H = A, C, U) spalten können, so daß sie nicht nur deren Erkennung hemmen, sondern die Sequenz aktiv abbauen^[12, 13].

Die in den unterschiedlichen Bereichen der Antisense-Forschung in den letzten Jahren gesammelte Erfahrung weist auf mehrere entscheidende Punkte hin, mit denen man sich beschäftigen muß, wenn die Antisense-Methode bei der Therapie von Krankheiten des Menschen angewendet werden soll. Diese Hindernisse bei der Entwicklung von Antisense-Wirkstoffen werden hier nur kurz angesprochen; die meisten Aspekte dieses Themas wurden in einer Reihe ausgezeichnet er neuer Überblicksartikel und Büchern ausführlich behandelt^[14–33]. Mögliche Hindernisse für eine erfolgreiche Anwendung von Antisense-Therapeutica sind die häufig geringe Aufnahme in die Zelle sowie die unzureichende chemische Stabilität natürlicher und chemisch modifizierter Oligonucleotide gegenüber dem Abbau durch einige Nucleasen. Ein modifiziertes Oligonucleotid, das gegenüber Nucleasen beständig ist und seinen Wirkungsort erreicht hat, kann vielleicht nicht in ausreichendem Maße zwischen einer gewählten Zielsequenz und anderen Sequenzen unterscheiden. Weitere Komplikationen können sich daraus ergeben, daß die meisten modifizierten DNAs und RNAs keine durch RNase H vermittelte Spaltung der mRNA induzieren^[34], daß die Faltung zellulärer RNAs zur Sekundär- und Tertiärstruktur die gewählten Zielsequenzen unzugänglich machen kann und daß sich Antisense-Strang und Zielsequenz innerhalb der Zelle an verschiedenen Orten befinden können.

Es wird erwartet, daß eine geeignete chemische Modifikation von Oligonucleotiden dabei helfen kann, einige dieser Probleme zu überwinden. Insbesondere können Modifikationen zu verbesserten Hybridisierungseigenschaften, verbesserter Beständigkeit gegenüber Nucleasen und einem verbesserten Eintritt in die Zelle führen. Angesichts der Struktur von DNA und RNA ist eine Vielzahl chemischer Modifikationen am Phosphatrückgrat, an den Zucker- und an den Baseneinheiten möglich. Zu den Nucleinsäureanaloga (im folgenden auch kurz Analoga genannt) der ersten Generation, die auf der Modifikation dieser drei Bestandteile beruhen, gehören die Phosphorothioate^[35, 36], die Methylphosphonate^[37, 38] und eine Reihe von O2-modifizierten Nucleinsäuren^[39–42]. Die zur Zeit vorliegende Vielfalt von Analoga ist überwältigend, und der interessierte Leser sei hierzu z. B. auf die genannten Übersichtsartikel^[14–33] verwiesen.

Zu einer neueren Generation von Rückgrat-Modifikationen gehören 3'-Allylether und 3'-Allylsulfide^[43], Amide^[44], Amine^[45], Kohlenstoffketten^[46], Formacetale und Thioformacetale^[47, 48], Guanidiniumbrücken^[49], 5'-Methyl-DNA und -RNA^[50], Phosphoramidate^[51], Phosphorodithioate^[52], Sulfide^[53], Sulfonamide^[54] und Sulfone^[55]. Die Modifikationen am Zuckerteil beinhalten carbocyclische Verbindungen^[56, 57], L-2'-Desoxyribosen^[58] und Hexosen^[59–61]. Oligonucleotide, die an C5 der Pyrimidinringe propinsubstituiert sind, sind im Hinblick auf Anwendungen als Antisense-Verbindungen sehr vielversprechend^[62], und die 1994 erstmals hergestellten Peptidnucleinsäuren (PNA) gehören zu den Analoga, die am stärksten von den nativen Nucleinsäuren abweichen^[63].

Die große Zahl von Modifikationen steht in starkem Kontrast zu den wenigen detaillierten Strukturuntersuchungen an Analoga durch NMR-Spektroskopie in Lösung oder mit Molecular-Modeling-Rechnungen. Zu den bereits analysierten Verbindungen gehören amidverknüpfte DNA^[64, 65], Formacetal-DNA^[66, 67], Thioformacetal-DNA^[68], harnstoffverknüpfte DNA^[69], Phosphorodithioat-DNA^[70], 2'-O-Methyl-RNA^[71], 2'-5'-verknüpfte RNA^[72] und ein PNA-RNA^[73] sowie ein PNA-DNA-Duplex^[74]. Außerdem wurde kürzlich über die Kristallstruktur eines dreisträngigen Nucleinsäurekomplexes berichtet, der aus einem Homopurin-DNA-Nonamer und zwei über sechs Aminosäuren miteinander verknüpften Homopyrimidin-PNA-Nonameren besteht^[75]. Es werden noch viele Strukturuntersuchungen notwendig sein, um die thermodynamischen



M. Egli, geboren 1961 in Schaffhausen (Schweiz), erlangte sein Diplom in Chemie 1984 an der Eidgenössischen Technische Hochschule (ETH), Zürich (Schweiz), und promovierte dort 1988 bei Prof. V. Prelog, Prof. J. D. Dunitz und Prof. M. Dobler mit einer strukturchemischen Untersuchung der Enantioselektivität einfacher Rezeptoren, wie Weinsäurediestern, gegenüber biologisch interessanten Substraten einschließlich Salzen von α -Aminoalkoholen. Er schloß sich dann der Arbeitsgruppe von Prof. A. Rich am Massachusetts Institute of Technology, Cambridge (USA), an und untersuchte dort die Struktur von Nucleinsäuren, ihren Komplexen mit Wirkstoffen und die Eigenschaften von RNA-DNA-Chimären mit röntgenstrukturanalytischen Verfahren. 1992 wechselte er an das Labor für Organische Chemie an der ETH, um eigene Arbeiten über die Struktur chemisch modifizierter DNA und RNA durchzuführen. Dieser Beitrag ist Teil der an der ETH durchgeführten Forschungsarbeiten des Autors, der im Herbst 1995 als Assistant Professor an das Department of Molecular Pharmacology and Biological Chemistry der Northwestern University Medical School, Chicago (USA), ging.

mischen Daten von modifizierten Oligonukleotiden zu interpretieren und zu einem Verständnis des komplexen Zusammenspiels zwischen enthalpischen und entropischen Faktoren zu gelangen, wobei unter anderem konformativ Präorganisation, Hydratisierung, Salzkonzentration und Kooperativität zu berücksichtigen sind^[76, 77].

Neben der Suche nach therapeutisch einsetzbaren Antisense-Verbindungen gab es in letzter Zeit Fortschritte bei der chemischen Veränderung von DNA und RNA; daraus ergeben sich zahlreiche Möglichkeiten, die Struktur von Nucleinsäuren^[78, 79] sowie Protein-Nucleinsäure-Wechselwirkungen näher zu untersuchen^[80].

2. Die Strukturen von DNA und RNA

RNA unterscheidet sich von DNA durch die zusätzliche Hydroxygruppe an der 2'-Position der Ribose. Dieser scheinbar geringfügige Unterschied hat wichtige Folgen für die chemischen Eigenschaften und die Struktur von RNA sowie für deren biologische Rolle. DNA liegt normalerweise als Doppelstrang vor, während RNA einzelsträngig ist und komplexe Faltungsmotive mit einer Vielzahl von Strukturelementen annehmen kann, wie Doppelhelix-Bereiche, Ausbauchungen (mit ungepaarten Basen), Haarnadelschleifen und Pseudoknoten^[81]. DNA wird in zwei allgemeinen Klassen rechtsgängiger Duplexe mit antiparalleler Orientierung der Stränge beobachtet: der A- und der B-Form (Abb. 1). Es sei allerdings daran erinnert, daß Nucleinsäuren polymorph sind und in weiteren, nicht unbedingt doppelsträngigen stabilen Konformationen

vorliegen^[82]. Im folgenden beschränken wir uns auf die Beschreibung von rechtsgängigen Duplexen von DNA- und RNA-Analoga.

Doppelsträngige RNA nimmt ausschließlich die Konformation des A-Typs an und ist relativ wenig flexibel. Dagegen weist doppelsträngige DNA eine beträchtliche konformativ Polymorphie auf und kann in einer Reihe von Konformationen vorkommen, die sowohl Merkmale der A- als auch der B-Form aufweisen. Diese werden unter anderem von der Basensequenz^[83], vom Hydratisierungszustand^[84, 85], von den Wechselwirkungen im Gitter einer bestimmten Kristallform^[86–89] sowie bei Protein-DNA-Komplexen vom Bindungsmotiv und von der Wechselwirkungsfläche^[90] beeinflußt. Die Bestimmung der Kristallstruktur von mehr als 100 DNA-Fragmenten^[91–94] und gut vier Dutzend Protein-DNA-Komplexen^[95–98] hat uns ein detailliertes Bild von der DNA-Doppelhelix vermittelt. Während die Kristallstrukturanalyse unser Verständnis von Struktur und von der biologischen Funktion der DNA stark vorangebracht hat, sind ähnliche Erfolge mit RNA wegen der Schwierigkeiten bei der Herstellung hochreiner RNA-Proben bisher – abgesehen von dem frühen Erfolg bei der Aufklärung der Struktur von tRNA – nicht erzielt worden.

Duplexe des A- und des B-Typs weisen sehr unterschiedliche Topographien auf (Abb. 1). Die große Furche des A-Duplex ist schmal und tief, die kleine Furche breit und flach. Beim B-Duplex ist die große Furche breit, aber weniger tief als die der A-Form, und die kleine Furche ist schmäler als die der A-Form, jedoch ähnlich tief. Der A-Duplex hat einen größeren Durchmesser, und die Helixachse befindet sich innerhalb der großen Furche, während sie beim B-Duplex durch die Mitte der Basenpaare verläuft. Die beiden Duplexe unterscheiden sich noch durch mehrere weitere Merkmale voneinander: Die Basenpaare sind beim A-Typ zur Helixachse hin geneigt, beim B-Typ sind sie mehr oder weniger senkrecht zur Achse angeordnet. Beim A-Typ sind die benachbarten Phosphatgruppen eines Stranges einander näher als beim B-Typ (im Mittel 5.9 Å, B-DNA 7 Å, Abb. 2). Diese Unterschiede in der Geometrie sind eine direkte Folge der konformativen Flexibilität der Zuckereinheit. Bei der A-DNA liegen die Zuckerbausteine in der C3'-endo- und bei der

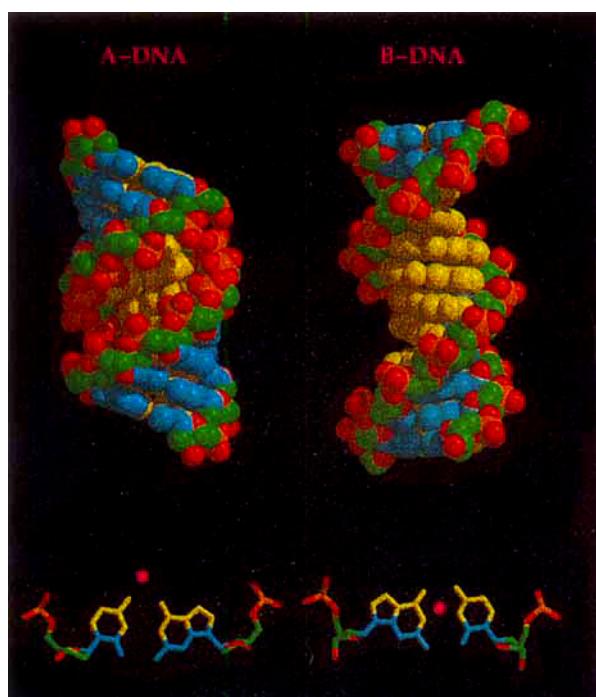
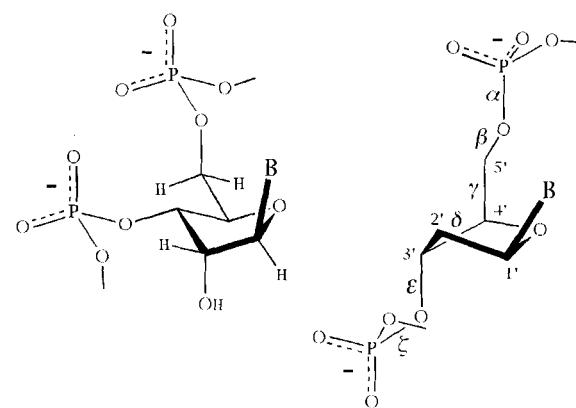


Abb. 1. Oben: van-der-Waals-Darstellungen der beiden rechtsgängigen Grundkonformationen der DNA-Doppelhelix (die RNA-Doppelhelix nimmt eine A-Konformation ein). Die Ränder der Basenpaare in der großen Furche sind gelb und in der kleinen Furche hellblau dargestellt. Unten: axiale Projektionen der relativen Anordnungen von Basenpaar und Helixachse (rosa) bei A-DNA/-RNA (links) und B-DNA (rechts).



A: C3'-endo

B: C2'-endo

Abb. 2. Idealisierte „Diamantgitter“-Darstellungen der Konformationen des Zucker-Phosphat-Rückgrates in Doppelhelices des A- und des B-Typs. Bezüglich der Torsionswinkel α , β , γ , δ , ε und ζ liegen bei A-DNA und A-RNA die Konformationen sc^- , ap , sc^+ , sc^- , ap bzw. sc^- und bei B-DNA die Konformationen sc^- , ap , sc^+ , ap , ap bzw. sc^- vor. **B** = Nucleinsäure-Base.

B-DNA in der C2'-*endo*-Konformation vor. Man beobachtet auch ganz ähnliche Zuckerkonformationen, die durch Pseudorotation der Furanose entstehen, die Gesamtkonformation aber nicht wesentlich ändern.

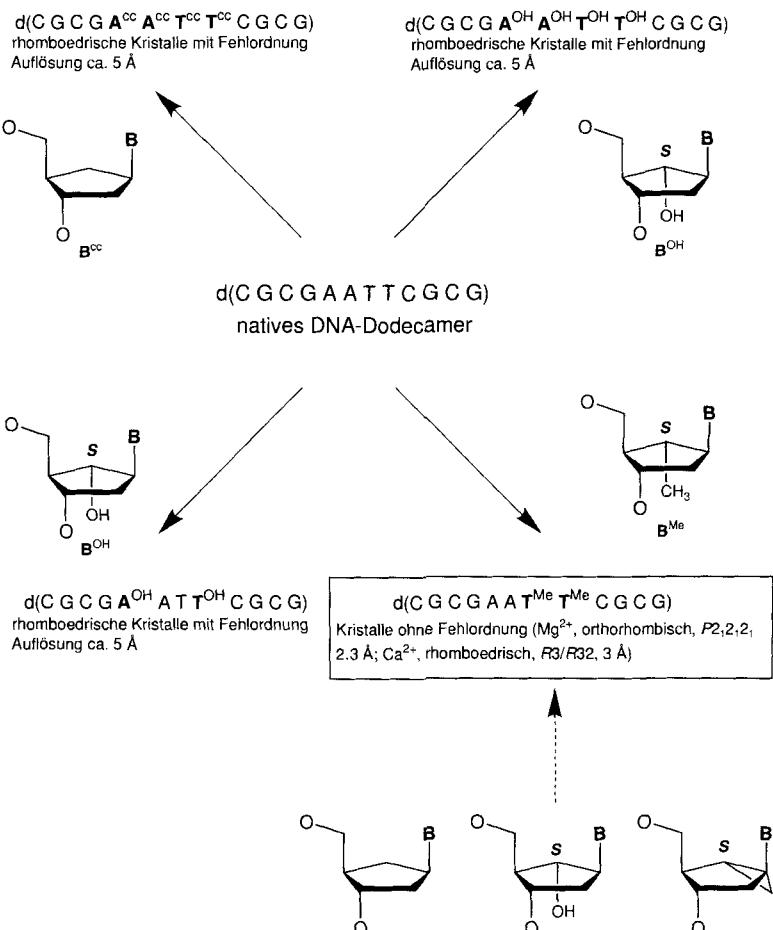
Die Geometrie des Zucker-Phosphat-Rückgrats von Oligonucleotiden kann durch sechs Torsionswinkel, α , β , γ , δ , ε und ζ , beschrieben werden, wobei der Winkel δ die Verdrehung um die C4'-C3'-Bindung der Ribose angibt (Abb. 2). In Duplexen des A-Typs entspricht δ einer sc^+ -Konformation, in solchen des B-Typs einer *ap*-Konformation. Alle anderen Torsionswinkel liegen bei beiden Duplexen in denselben Bereichen. Leser, die mit der Struktur von Nucleinsäuren nicht vertraut sind, seien bezüglich Nomenklatur und Definitionen auf einen ausgezeichneten Übersichtsartikel von Kennard und Hunter^[91] sowie auf das Buch von Saenger über die Prinzipien bei Nucleinsäurestrukturen^[99] verwiesen.

3. Kristallisation von Oligonucleotidanaloga

3.1. Wahl der Matrizensequenz und der Stellen für den Einbau modifizierter Nucleotide

Ein entscheidender Schritt auf dem Wege zur röntgenstrukturanalytischen Erforschung chemisch modifizierter Nucleinsäuren ist die Gewinnung von Matrizensequenzen, von denen man weiß, daß sie ausreichend gut beugende Kristalle liefern (Auflösung typischerweise besser als 2.5 Å), sowie die Bestimmung der Zahl und Lage von Stellen für den Einbau eines bestimmten Nucleotidanalogons, das die Kristallisation nicht beeinträchtigt. Wir haben solche Sequenzen und die Stellen für den Einbau sowohl bei modifizierten DNA- als auch RNA-Oligonucleotiden bestimmt. Schema 1 zeigt die Ergebnisse mit röntgenographisch unterschiedlich geeigneten Kristallen einer B-DNA-Matrize mit carbocyclischen Nucleotiden. Mit dem Dickerson-Drew-Dodecamer d(CGCGAATTCGCG) wurden optimale Kristallisationsergebnisse erhalten, wenn die carbocyclischen Analoga an den Stellen T(7) und T(8) eingebaut waren. Das Dodecamer wurde ursprünglich wegen seiner in über 35 Fällen nachgewiesenen Mutationstoleranz und Gitterkonservierung ausgewählt (NDB, Nucleic Acid Crystal Structure Data Base^[100], Recherche Dezember 1994).

Es wird heute allgemein angenommen, daß die Bindung eines RNA-Analogons an ein bestimmtes Teilstück einer Messenger-RNA hinsichtlich Stabilität und Selektivität vorteilhafter ist als die entsprechende Bindung eines DNA-Analogons. RNA·RNA-Duplexe sind beträchtlich stabiler als die entsprechenden RNA·DNA-Hybride^[101]. Daher ist es wichtig, RNA-Modifikationen in einer RNA- oder A-Form-Doppelhelix zu untersuchen. Wir haben zwei Matrizensequenzen für den Einbau von RNA-Analogona verwendet: das RNA-Octamer r(CCCGGGG)^[102, 103] und die A-DNA mit der Sequenz d(GCGTATACGC)^[104–106].



Schema 1. Bestimmung der Positionen für den Einbau von carbocyclischen Nucleotiden in ein B-DNA-Dodecamer [107] unter Erhaltung der Möglichkeit zur Züchtung von röntgenographisch geeigneten Kristallen. Mit carbocyclischen 6'- α -Methyl-Thymidinen (T^{Me}) in den Positionen 7 und 8 wurden zwei Kristallformen erhalten, wobei die orthorhombischen Kristalle mit denen des nativen DNA-Oligonucleotids isomorph sind. Dies eröffnet die Möglichkeit, weitere carbocyclische Analoga an diesen Stellen einzubauen, mit dem Ziel, gut streuende Kristalle zu züchten, um dann die resultierenden Strukturveränderungen vergleichen zu können.

3.2. Kristallzucht

Viele der zum Züchten der Oligonucleotidkristalle verwendeten Bedingungen sind einander erstaunlich ähnlich. In mehr als 90% der Fälle sind Natriumdimethylarsinat-Puffer, Magnesiumchlorid, Spermintetrahydrochlorid und das Fällungsmittel 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD) Bestandteile der Mutterlauge. Es ist daher sinnvoll, zunächst zu versuchen, die Nucleinsäureanaloga in Gegenwart dieser Komponenten zu kristallisieren. Doch selbstverständlich führen solche bewährten Methoden^[108, 109] nicht immer zur Bildung von Kristallen. Die Bedingungen für das Züchten von Proteinkristallen sind anders als bei Nucleinsäuren erheblich vielfältiger. Mit dem zur Untersuchung von Kristallisationbedingungen häufig verwendeten Sparse-Matrix-Screening-Verfahren^[110] ist eine effiziente Erprobung unterschiedlicher Puffer, Kationen und Fällungsmittel möglich. Entsprechende Screen-Kits sind im Handel erhältlich^[111]; modifizierte Versionen wurden erfolgreich bei der Kristallisation mittelgroßer und großer RNAs eingesetzt^[112, 113].

Zur Kristallisation von RNA-Doppelhelix-Fragmenten haben wir handelsübliche Screen-Kits verwendet. Zwei Kristallformen des Octamers r(C₄G₄) konnten aus Puffern mit pH-Wer-

ten zwischen 4.5 und 8.5 mit unterschiedlichen Fällungsmitteln wie Ammoniumsulfat in hoher Konzentration, niedermolekularen Polyethylenglycolen (PEGs) und MPD^[102] gezüchtet werden. Es wurde auch über die erfolgreiche Verwendung von niedermolekularen PEGs bei der Kristallisation von RNA-Oligonukleotiden berichtet^[114]. Die rhomboedrischen Kristalle des Octamers r(C₄G₄) beugen Röntgenstrahlen mit einer ungewöhnlich hohen Auflösung (besser als 1.5 Å) und können auch aus Lösungen gezüchtet werden, die zweiwertige Metall-Kationen (Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ usw.) in Konzentrationen von 100 bis 250 mM enthielten. Auf der Grundlage solch hochauflösender Kristallstrukturen sollte eine Untersuchung der Bindung dieser Ionen an die RNA möglich sein. Die besondere Anordnung von [r(C₄G₄)₂]-Duplexen im rhomboedrischen Gitter zeigt für viele Nukleotide keine Abstände, die einer dichten Packung entsprechen. Daher ist die r(C₄G₄)-Sequenz eine ideale Kristallisationsmatrix für RNA, die an mehreren Stellen modifiziert wurde. Versuche zur Kristallisation solcher modifizierter RNAs sind derzeit im Gange. Dieses Beispiel zeigt, daß man sich nicht nur auf klassische Kristallisationsbedingungen verlassen, sondern auch nach Alternativen suchen sollte. Modifikationen verändern die physikalischen Eigenschaften von Nucleinsäuren, und um röntgenographisch geeignete Kristalle von Analoga zu erhalten, wird man häufig die typischen DNA-Kristallisationsbedingungen entsprechend anpassen oder einen völlig neuen Ansatz wählen müssen.

3.3. Hydratisierung

Für ein tieferes Verständnis der Art und Weise, wie Antisense-Modifikationen die Struktur und Stabilität von Nucleinsäurefragmenten beeinflussen, ist es erforderlich, die Änderungen der Hydratisierung, die durch die Modifikationen induziert werden, sowohl auf globalem als auch auf lokalem Niveau zu bewerten. Durch die Kristallstrukturanalyse können aber nicht nur die Atomkoordinaten bestimmt werden, sondern auch die erste Hydratationsphäre sowie die thermische Bewegung von Molekülfragmenten und Wassermolekülen „sichtbar“ gemacht werden. Wenn Beugungsdaten mit atomarer Auflösung zur Verfügung stehen, kann die Hydratisierung der Moleküle in Kristallen sehr eingehend studiert werden^[103, 115]. Durch Vergleich der Hydratisierung eines Oligonukleotidfragments in kristallographisch unterschiedlichen Umgebungen können konservierte Hydratierungsmuster erkannt werden, und durch Kristallisation modifizierter Fragmente im Gitter der nativen Verbindung können die durch die chemische Modifikation hervorgerufenen Unterschiede bei der Hydratisierung bestimmt werden.

Das „Hydratgerüst“ von B-DNA-Dodecameren weist ein konserviertes Hydratierungsmuster auf, bei dem die Phosphatrückgrat- und Basen-Atome in der kleinen Furche beteiligt sind^[116, 117]. Anhand der Kristallstruktur solcher Dodecamere, in die nennenswerte Mengen an Nucleotidanalogen eingebaut sind, welche die Topographie der kleinen Furche beeinflussen (Schema 1, Tabelle 1), sollten die Veränderungen der globalen Hydratisierung deutlich werden, die durch diese Modifikationen verursacht werden, d.h. die Verdrängung und der Ersatz von Wassermolekülen des Hydratgerüstes. Entsprechend sollten anhand der Kristallstrukturen von Oligonukleotiden, in die ein-

zelne modifizierte Nucleinsäuren eingebaut sind, die Konsequenzen für die lokale Hydratisierung untersucht werden können. So lieferte der Einbau eines 2'-O-Methyladenosinrestes in eine DNA-Matrice einige Erkenntnisse hinsichtlich der Hydratisierung von 2'-O-methylierten Ribosen und der sich daraus ergebenden außergewöhnlichen Stabilität von RNAs, die am 2'-Sauerstoffatom methyliert sind^[106].

3.4. Die Modifikationen

Chemische Modifikationen von DNA und RNA beeinflussen verschiedene Bereiche in der Doppelhelix. In Tabelle 1 sind die Positionen der ausgewählten Zucker- und Basenmodifikationen in den Furchen zusammengestellt. Zu den Nucleinsäuremodifi-

Tabelle 1. Orte ausgewählter Modifikationen von Zuckern und Basen im Duplex (siehe Abb. 1 und 2).

Position der Modifikation	Ort
C2' (Zucker)	kleine Furche
O4' (Zucker)	kleine Furche
C5' (Zucker) [50]	kleine Furche (Substituent ersetzt H ^{RE})
C5 (Base)	große Furche

kationen, die wir bisher röntgenstrukturanalytisch untersucht haben, gehören Bicyclo-DNA, Sulfon-RNA, carbocyclische DNA und 2'-O-methylierte RNA. Die mit jedem Analogon verbundenen chemischen Veränderungen sind in Abbildung 3 dargestellt. Drei der Modifikationen betreffen den Riboseteil; in Sulfon-RNA ist dagegen die verbrückende, negativ geladene Phosphatgruppe durch die neutrale Dimethylsulfongruppe ersetzt. In den folgenden Abschnitten sind die Befunde aus Einkristall-Röntgenstrukturanalysen für jedes dieser Nucleinsäureanaloga zusammengefaßt.

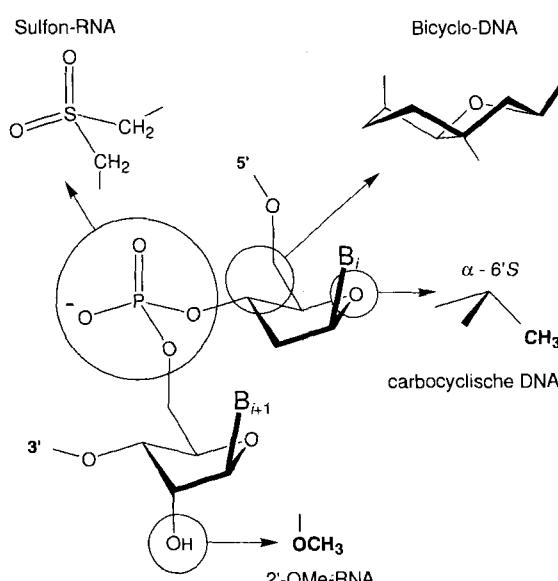


Abb. 3. Vier Arten von DNA- und RNA-Analoga.

4. Bicyclo-DNA

Präorganisation und geeignete Starrheit des Einzelstrangs sind für die Bildung stabiler Duplexe entscheidend. Dies wurde anhand der drastisch erniedrigten Schmelzpunkte T_m von Duplexen gezeigt, die sich aus dem Einbau offenkettiger Glycerinbausteine in Oligonukleotide ergeben^[118], sowie anhand der teilweise entropischen Stabilisierung bei Hexose-DNA-Duplexen^[119]. Die Möglichkeiten zur entropischen Stabilisierung der Hybridisierung wurden in mehreren Fällen untersucht. Zu den Modifikationen mit strukturell eingeschränkten bicyclischen Zuckern gehören die neutralen internukleosidischen Ribooacetale^[120], carbocyclische Bicyclo-Analoga^[121, 122] sowie ein DNA-Analogon mit einer Ethylenbrücke zwischen C3' und C5', die Bicyclo-DNA (bcdNA, Abb. 3)^[123]. Obwohl bei diesen Analoga der Entropiebeitrag bei der Duplexbildung verringert ist, war die Affinität von Oligonukleotiden, die bicyclische Nukleotide enthalten, zu DNA und RNA im Vergleich zu der der nativen Oligonukleotide im allgemeinen geringer. Dies zeigt, daß die Starrheit des Einzelstranges allein für die Bildung eines stabilen Duplex nicht ausreicht, sondern daß außerdem die Konformation des strukturell eingeschränkten Nukleotids mit der des Zielstranges im Duplex vereinbar sein muß.

Die Kristallstruktur eines zwischen C3' und C5' intranukleosidisch ethylenverbrückten, bicyclischen Analogons des Desoxy-cytidyl-3'-5'-desoxycytidin-Dimers (Abb. 3) wurde röntgenographisch mit atomarer Auflösung bestimmt^[124, 125]. Im Kristall bilden zwei bcd(CC)-Stränge einen parallelsträngigen Duplex, bei dem die Paarung über hemiprotonierte C-C⁺-Basenpaare erfolgt (Abb. 4). Die Konformationen der beiden Einzelstränge des Duplex weichen nur minimal vonein-

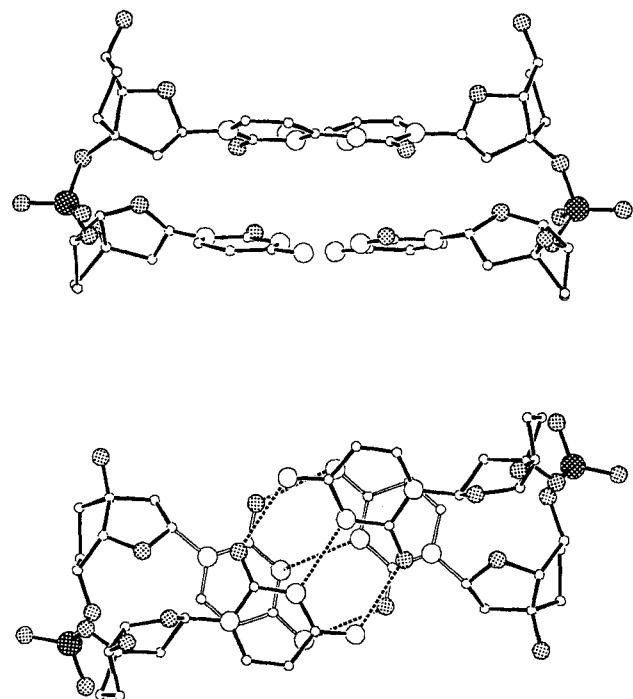


Abb. 4. Projektionen der $[bcd(CC)]_2$ -Doppelhelix mit paralleler Anordnung der Stränge entlang der Basenpaar-Ebenen (oben) und entlang der Helixachse (unten). Phosphoratome sind (hier wie im folgenden) dunkelgrau, Sauerstoffatome hellgrau und Wasserstoffbrücken als gestrichelte Linien dargestellt.

ander ab; daher werden wir uns bei unserer Diskussion nur auf die Konformation des bcd(C(1)pC(2))-Dimers konzentrieren.

Der helicale Anstieg pro Basenpaar beträgt 3.4 Å und die rechtsgängige helicale Windung pro Basenpaar 34°. Die gepaarten Basen sind leicht propellerartig verdreht (Abb. 4, oben). Diese Anordnung führt zu einer weitgehenden Überlappung zwischen Cytosinringen desselben Stranges, und die Carbonylgruppen der Basen eines Stranges stabilisieren den Duplex durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen wahrscheinlich zusätzlich (Abb. 4, unten). Die bicyclischen Zuckereinheiten im Dimer nehmen unterschiedliche Konformationen an. Die Desoxyriboseeinheit von C(1) liegt in der C1'-*exo*- und die von C(2) in der C2'-*endo*-Konformation vor.

Die Konformationen der beiden Cytidinreste unterscheiden sich auch durch die Torsionswinkel der glycosidischen Bindungen: In beiden Fällen liegt zwar eine *anti*-Konformation vor, doch unterscheiden sich die Torsionswinkel um etwa 40° (Abb. 5). Wegen der konformativen Heterogenität der Reste im Duplex ist es nicht möglich, einen parallelsträngigen poly(bcdC)-poly(bcdC)-Duplex mit durchgängigen Rückgraten und nur einem Basenpaar als Wiederholungseinheit aufzubauen.

Die Struktur des bcdNA-Dimers weicht erheblich von der Standardgeometrie von B-DNA ab, was auf Unterschiede in den Torsionswinkeln β und γ im Rückgrat zurückzuführen ist. Dementsprechend liegt im bicyclischen Zucker-Phosphat-Rückgrat eine *sc*⁺- bzw. *ap*-Konformation vor, während in B-DNA und A-RNA (bei der γ in einer Variante mit verlängertem Rückgrat auch eine *ap*-Konformation einnehmen kann) die Konformationen *ap* bzw. *sc*⁺ aufweisen. Die Aufweitung des Torsionswinkels γ ist eine direkte Konsequenz der Modifikation im Zuckergerüst der bcdNA.

Cytidin-reiche DNA kann eine viersträngige Anordnung bilden, die aus zwei miteinander verzahnten Duplexen besteht, die über hemiprotonierte C-C⁺-Basenpaare miteinander gepaart sind^[126]. Bei diesem Intercalations-Motiv (i-Motiv) ist der Abstand zwischen benachbarten Basenpaaren auf etwa 6.2 Å vergrößert, so daß die Intercalation von Basenpaaren des zweiten parallelsträngigen Duplex möglich ist (Abb. 6). Bei dieser Anordnung überlappen nur exocyclische funktionelle Gruppen, während die π -Elektronensysteme der Cytosinringe nicht direkt an der Stapelung beteiligt sind. Daher scheinen die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen benachbarten C2=O2-Carbonylbindungen und zwischen benachbarten C4-N4-Bindungen sowie C-H···O4'-Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Desoxyribosen der näher beieinander liegenden Zucker-Phosphat-Rückgrate intercalierter Duplexe (Abb. 6) die hauptsächlichen stabilisierenden Faktoren zu sein^[127]. Beim i-Motiv sind benachbarte Carbonylbindungen antiparallel zueinander ausgerichtet, während sie im $[bcd(CC)]_2$ -Duplex parallel sind (siehe Abb. 4 und 6).

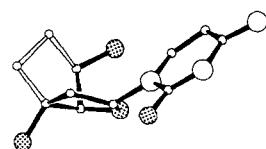
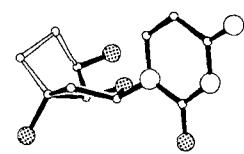


Abb. 5. Nucleosid-Konformationen in bcd(CC). Die Nucleoside C(1) und C(2) liegen in der C1'-*exo*- (oben) bzw. C2'-*endo*-Konformation (unten) vor. Die Bindungen der Ethylenbrücke zwischen C3' und C5' in bcdNA sind als unausgefüllte Linien dargestellt.

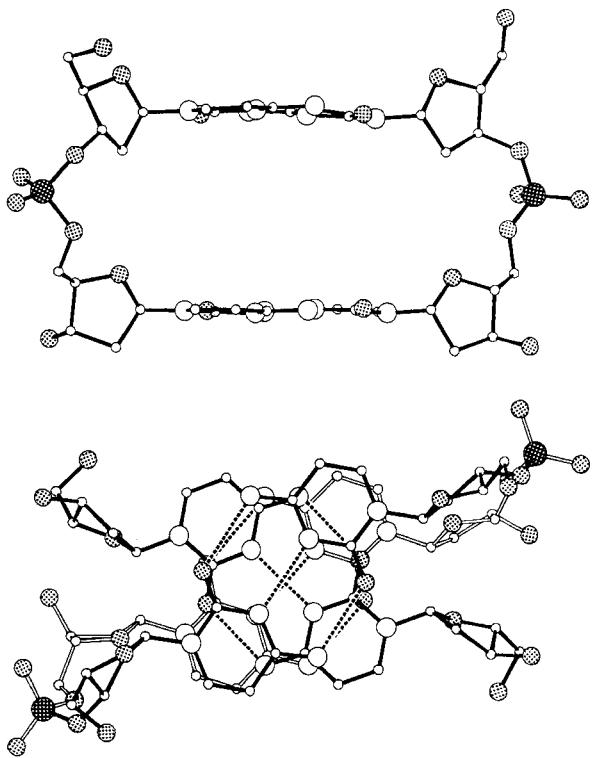


Abb. 6. Der C(2)pC(3)-C(6)pC(7)-Basenpaar-Bereich in einer der beiden intercalierten $[d(CCCC)]_2$ -Doppelhelices mit paralleler Anordnung der Stränge, betrachtet parallel zu den Basenpaar-Ebenen (oben) und in Richtung der Helixachse (unten). Das intercalierende C-C⁺-Basenpaar wurde in die axiale Projektion miteinbezogen, und die Bindungen des C(3)-C(7)-Basenpaares sind als unausgefüllte Linien dargestellt.

• Etwa die Hälfte der Desoxyriboseeinheiten im i-Motiv nimmt Zuckerkonformationen des A-Typs an. Die Vergrößerung der Abstände zwischen benachbarten Basenpaaren in axialer Richtung ist durch lokale Veränderungen der Torsionswinkel im Rückgrat gekennzeichnet. So treten häufig α - und γ -Winkel für ap, ap -Konformationen auf, ein Muster, das häufig bei DNA-Wirkstoff-Komplexen im Bereich des Rückgrats an den Interkalationsstellen auftritt^[94].

Die Geometrie des Zucker-Phosphat-Rückgrats in bcDNA unterscheidet sich von der in B-DNA und der im i-Motiv. Obwohl der Zuckerteil durch die Ethylenbrücke starrer wird, führen die eingeführten Struktureinschränkungen zu einer erheblichen Abweichung der Strangkonformation von der eines typischen B-Duplex, wodurch die Gewinne an entropischer Stabilität zum Teil wieder verloren gehen. Bisher wurden noch keine röntgenographisch geeigneten Kristalle des nativen d(CC)-Dimers erhalten. Möglicherweise ist für die Bildung eines stabilen intercalierten viersträngigen Motivs eine Cytidinsequenz mit einer bestimmten Mindestlänge erforderlich. Vielleicht bildet die parallelsträngige zwitterionische bcDNA-Doppelhelix eine unabhängige Paarungsstruktur, die bei Cytidin-reichen Oligodesoxynucleotiden nicht vorkommt.

5. Sulfon-RNA

Die Auswirkungen einer Entfernung der negativen Ladung, die die Phosphodiester-Rückgrate in DNA und RNA tragen, auf die Struktur der Doppelhelix wurde bisher kaum untersucht. In Duplex-DNA führt die Anordnung negativ geladener Phos-

phatreste entlang des Rückgrats zu einer symmetrischen Ladungsverteilung. Eine Störung dieses ausgewogenen Zustands durch Neutralisation der negativen Ladungen auf einer Seite der DNA führt dazu, daß sich die DNA zu dieser Seite hin krümmt^[78, 128]. Bei B-DNA kann man erwarten, daß die Verformung bei Neutralisation der Ladungen der Phosphatreste auf einander gegenüberliegenden Seiten der engen, kleinen Furche ausgeprägter ist als bei Neutralisation der Ladungen der Phosphatreste in der breiten, großen Furche.

Da zu erwarten ist, daß im Vergleich zu DNA und RNA lipophile Spezies besser in die Zelle gelangen, wurden mehrere nichtionische Nucleinsäureanaloga entwickelt. Überdies könnte die fehlende Ladungsabstoßung zwischen Phosphatresten bei Duplexen, die eine ungeladene Spezies sowie RNA enthalten, zu einer erhöhten Bindungsstabilität solcher Analoga im Vergleich zu der von DNA und RNA führen. Die Methylphosphonate waren die ersten ungeladenen Nucleinsäureanaloga. Der Ersatz eines der nichtverbrückenden Phosphatsauerstoffatome durch eine Methylgruppe führt jedoch zu Diastereomeren. Die Dimethylensulfongruppe ist ein nahezu iso-sterischer, neutraler und achiraler Ersatz für die Phosphatgruppe der DNA (Abb. 3)^[55, 129]. Kürzlich wurden Methoden zur Synthese von Dimethylensulfon-verbrückter RNA entwickelt^[130]. Die Folgen der Entfernung der Ladung für die Struktur der RNA-Doppelhelix wurden anhand der Kristallstruktur des Dimethylensulfonverknüpften Ribodinucleotidanalogons $r(G-SO_2-C)$ analysiert^[131]: Dabei zeigte sich, daß das neutrale RNA-Analogon die Struktur eines relativ regelmäßigen Teils einer rechts-gängigen Doppelhelix des Watson-Crick-Typs annimmt (Abb. 7). Insgesamt ist dieser Duplex dem des natürlichen $r(GpC)$ -RNA-Dimers sehr ähnlich. Zwar erscheint der Dimethylensulfon-RNA-Duplex auf den ersten Blick breiter, doch unterscheiden sich die S-S- und P-P-Abstände zwischen den Strängen in den Duplexen tatsächlich nur um 0.3 Å. Die Achsen der Rückgrate im Dimethylensulfon-RNA-Duplex sind allerdings stärker in Richtung der Ebenen der Basenpaare geneigt als die in $[r(GpC)]_2$. Dies geht mit einer ausgeprägten gegenseitigen Verschiebung von Basenpaaren in $[r(G-SO_2-C)]_2$, mit einem gleichzeitigen Verlust von Überlappung zwischen den aromatischen Ringen aufeinandergestapelter Basen sowie mit einem etwas

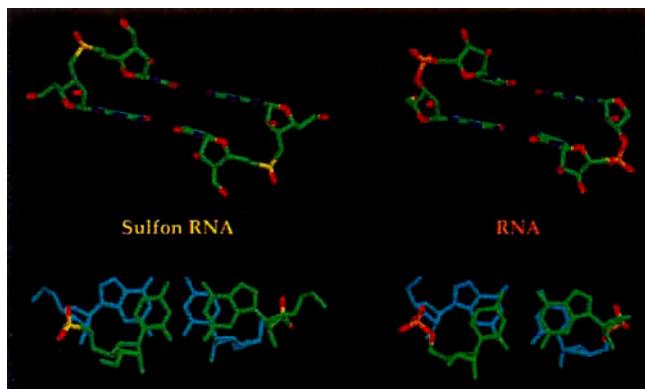


Abb. 7. Darstellungen der durch das nichtionische Dimethylensulfon-RNA-Analogon $r(G-SO_2-C)$ und das natürliche RNA-Dimer $r(GpC)$ gebildeten Doppelhelices [132, 133]. Oben sind jeweils Projektionen mit Blick in die kleine Furche, ungefähr entlang der kristallographischen zweizähligen Rotationsachse, wiedergegeben, unten Projektionen entlang der Normalen zur Ebene der oberen Basenpaare (grün). Die Schwefelatome sind gelb und die Phosphoratome orangefarben dargestellt.

kleineren Stapelabstand im Sulfon-Duplex (3.4 \AA) im Vergleich mit dem im Phosphat-Duplex (3.68 \AA) einher. Neben diesen Veränderungen ist auch die helicale Windung in $[\text{r}(\text{G}-\text{SO}_2-\text{C})_2]$ im Vergleich zu der in $[\text{r}(\text{GpC})_2]$ um etwa 14° kleiner, was anhand des Winkels zwischen den glycosidischen Bindungen der Guanosin- und Cytidinreste bei beiden Dimeren zu erkennen ist (Abb. 7, unten links und rechts).

Nach einer sorgfältigen Betrachtung der möglichen Gründe für die Strukturveränderungen beim Dimethylensulfon-RNA-Duplex scheint hierfür nicht so sehr die fehlende Ladung entscheidend zu sein, sondern vor allem die Tatsache, daß die verbrückenden Sauerstoffatome der Phosphatgruppen durch Methylengruppen ersetzt sind. Bemerkenswerterweise liegen alle Torsionswinkel des Zucker-Sulfon-Rückgrats innerhalb der für einen Duplex des A-Typs zu erwartenden Bereiche^[131]. Beide Riboseeinheiten liegen weitgehend in der Standard-C3'-endo-Konformation vor, und die glycosidischen Bindungen weisen *anti*-Konformation auf. Der bei natürlichen Nucleosiden zwischen O3' und O4' auftretende *gauche*-Effekt fehlt bei 3'-CH₂-substituierten Ribonucleosiden, was die C3'-endo-Konformation stabilisieren würde. Um aber die Methylengruppe unterzubringen, die O5' ersetzt, ist eine Anpassung der Nucleotidkonformation erforderlich (Abb. 8; die Kohlenstoffatome der Dimethylensulfongruppe werden mit C3'' bzw. C6' bezeichnet). So besetzt das H^{Re}-Wasserstoffatom an C6' ungefähr die Position, die im Standard-Phosphatrückgrat von Duplexen der A-Form von O5' eingenommen wird. Dies wird durch leichte Veränderungen der Zuckerkonformation erreicht, und zwar insbesondere dadurch, daß der Winkel δ auf beinahe 90° geöffnet wird, so daß die C4'-C5'- und die C1'-N1-Bindung in bezug auf den Ribosering stärker äquatorial angeordnet sind. Darüber hinaus kann durch die ausgeprägte antiperiplanare Konformation an der glycosidischen Bindung die Wechselwirkung zwischen dem H^{Re}-Atom an C6' und dem Wasserstoffatom an C6 minimiert werden.

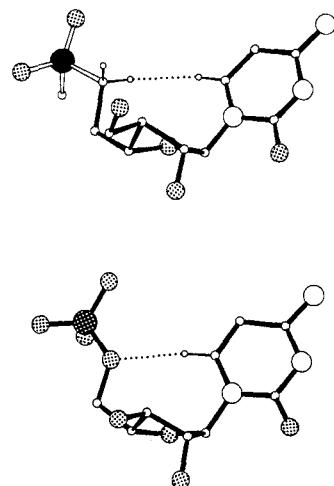


Abb. 8. Konformation von Cytidin in der Dimethylensulfon-Doppelhelix $[\text{r}(\text{G}-\text{SO}_2-\text{C})_2]$ (oben) und in der nativen $[\text{r}(\text{GpC})_2]$ -Doppelhelix (unten). Die gepunkteten Linien markieren die Abstände zwischen H6 und H^{Re} bei der Dimethylensulfon-Doppelhelix (2.21 Å) sowie zwischen H6 und O5' bei der nativen Doppelhelix (2.34 Å). Man beachte die etwas unterschiedlichen Ribose-Konformationen der beiden Nucleotide. Das Schwefelatom ist schwarz und das Phosphoratom dunkelgrau dargestellt, die S=O- und S-CH₂-Bindungen sind als unausgefüllte Linien wiedergegeben.

ist sehr wahrscheinlich eine Folge des Unterschieds zwischen den Bindungswinkeln S-C6'-C5' (111°) und P-O5'-C5' (120° ; Abb. 7, unten). Wegen des kleineren Winkels in $[\text{r}(\text{G}-\text{SO}_2-\text{C})_2]$ ist das C(2)-G(3)-Basenpaar (grün) nach hinten, über das G(1)-C(4)-Basenpaar (blau) hinaus gedreht.

Wegen der nahezu identischen Konformationen der Nucleoside im Dimethylensulfon-Dimer kann ein verlängerter Oligonucleotid-Duplex mit einer helicalen Windung und einer Steigung wie in $[\text{r}(\text{G}-\text{SO}_2-\text{C})_2]$ aufgebaut werden. Ein Vergleich zwischen einem solchen Duplex und einem Standard-A-RNA-Duplex ist in Abbildung 9 gezeigt. Der Sulfon-RNA-Duplex weist etwa

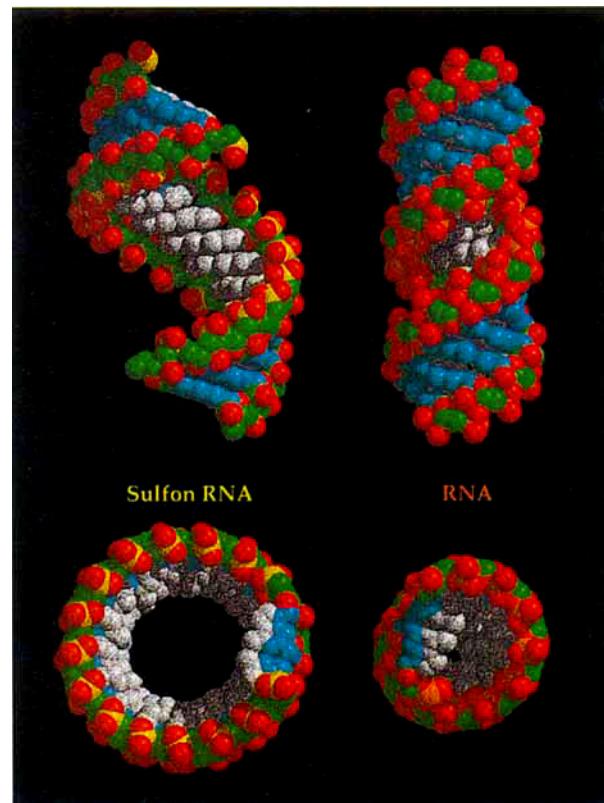


Abb. 9. Projektionen einer vollständigen Windung einer Sulfon-RNA-Doppelhelix (zur Konstruktion des 17mers ging man von der Konformation der $[\text{r}(\text{G}-\text{SO}_2-\text{C})_2]$ -Dimer-Doppelhelix aus) und einer Standard-A-RNA gleicher Länge senkrecht zur Helixachse (oben) sowie entlang der Helixachse (unten). Die Ränder der Basenpaare in der großen Furche sind weiß und die in der kleinen Furche hellblau, die Schwefelatome sind gelb und Phosphoratome orangefarben dargestellt.

17 Basenpaare pro helicaler Windung (11 Basenpaare pro Windung in A-RNA) auf und ist durch einen im Vergleich zu RNA 50% größeren Durchmesser sowie durch einen zylinderförmigen Hohlraum entlang der Helixachse gekennzeichnet. Die tiefe, große Furche der A-RNA ist im Sulfon-Duplex stark aufgeweitet, und der Abstand zwischen den Schwefelatomen in gegenüberliegenden Strängen dieser Furche ist auf etwa 15 Å, ungefähr das Dreifache des Wertes für die Phosphatgruppen bei RNA, vergrößert. Die Veränderungen bei der kleinen Furche sind im Vergleich hierzu viel geringer.

Man möge jedoch bedenken, daß die recht drastischen topographischen Unterschiede zwischen Sulfon-RNA und RNA, die aus der Bestimmung der Struktur des $[\text{r}(\text{G}-\text{SO}_2-\text{C})_2]$ -Duplex hervorgehen, vielleicht nur dem ungünstigsten Fall entsprechen.

Der Einbau eines kurzen Segments Sulfon-RNA in ein natives oder in ein auf andere Weise modifiziertes RNA-Oligonucleotid könnte weniger weitreichende Folgen für die Konformation haben. Genauso könnten die größere Verschiebung und die kleinere Verdrehung zwischen Basenpaaren in Sulfon-RNA zu einer verbesserten Stapelung zwischen den Purinringen zweier Stränge aus 5'-Pyrimidin-Purin-3'-Einheiten und damit zu einer höheren Stabilität führen. Derzeit werden DNA/Sulfon-DNA- und RNA/Sulfon-RNA-Oligonucleotid-Chimäre synthetisiert, und es wird interessant sein, die Auswirkungen des Einbaus Dimethylensulfon-verknüpfter Dimere in Standard-Oligonucleotide auf die thermodynamische Stabilität zu untersuchen sowie die entsprechenden Strukturen zu analysieren.

Die Folgen des Ersatzes von O_{5'} durch eine Methylengruppe für die Konformation wurden am r(UpcA)-5'-Desoxy-5'-phosphonomethylen-Dimer^[134] und an den r(A-(pcA)₈-pcA)-5'-Desoxy-5'-phosphonomethylenadenosin-Decameren^[135] untersucht. Circulardichroismus-Untersuchungen^[134] ergaben, daß die eingebaute Methylengruppe die Stapelung im Dimer unterbindet. Triplexe, die das obige 5'-modifizierte Homo(A)-Decamer mit zwei r(U)₁₀-Strängen bildet, sind allerdings ähnlich stabil wie die der natürlichen RNA-Oligonucleotide. Diese widersprüchlichen Befunde können mit den unterschiedlichen Längen und Sequenzen der untersuchten Verbindungen zusammenhängen. Wahrscheinlich sind darüber hinaus die Folgen des Ersatzes von O_{5'} durch eine Methylengruppe für die Konformation der Purin- und die der Pyrimidinnucleoside unterschiedlich. So kann die Methylengruppe möglicherweise leichter in der Nachbarschaft von H₈ des Adenosinrestes untergebracht werden als im Falle von [r(G-SO₂-C)]₂ in der Nachbarschaft von H₆ des Cytidinrestes (Abb. 8). Da sich die S-C- und die P-C-Bindungslängen nur minimal unterscheiden, ist es unwahrscheinlich, daß die Phosphonomethylen- und die Dimethylensulfon-Brücke zu sehr unterschiedlichen Stapelungen führen. Weiterhin könnte eine vermutlich etwas schwächere Stapelwechselwirkung innerhalb eines Stranges, wie bei [r(G-SO₂-C)]₂ festgestellt, die Stabilität von Doppel- und Tripelhelices mit einem Homopurinstrang (z. B. dem oben genannten Oligo-5'-desoxy-5'-phosphonomethylenadenosin) weniger stark beeinflussen als die von Doppel- und Tripelhelices aus gemischten Sequenzen mit Purin- und Pyrimidinbasen. Vor kurzem wurde über die Synthese eines Thymidin-Dimers, das eine Phosphinatobrücke zwischen Nucleosiden enthält (O_{5'} sowie O_{3'} durch Methylengruppen ersetzt), und seinen Einbau in Oligonucleotide berichtet^[136]. Be merkenswerterweise führte die Hybridisierung einer DNA, die zehn aufeinanderfolgende Phosphinato-verbrückte Nucleotide aufweist, und ihres RNA-Komplements zu einer Erniedrigung des Schmelzpunkts im Vergleich zu dem des nativen Hybrids von etwas weniger als 2 Grad pro Modifikation. Es bleibt abzuwarten, wie sich der zusätzliche Ersatz der negativ geladenen PO₂⁻-Gruppe durch die SO₂-Gruppe auf die Affinität der RNA auswirkt.

Die Kristallstruktur des r(A-SO₂-U)-Dimers in einzelsträngigem Zustand sowie der Vergleich seiner Konformation mit der des r(G-SO₂-C)-Stranges im Duplexzustand haben etwas Licht auf die Konformationsumordnungen geworfen, die – in diesem besonderen Fall – beim Übergang vom Einzelstrang zum Duplex erforderlich sind^[137]. Das einzelsträngige Dimer liegt in einer gestreckten Konformation vor, wobei alle Torsionswinkel

des Zucker-Sulfon-Rückgrats (außer δ) einer *ap*-Konformation entsprechen. Interessanterweise liegen die Riboseeinheiten im r(A-SO₂-U)-Dimer in der C₂'-*exo*-Konformation vor (Abb. 10). Wegen der *ap*-Konformation bezüglich des Winkels γ ist eines der Wasserstoffatome an C_{5'} stärker in Richtung der β-Fläche des Riboseringes gedreht. Eine normale C₃'-*endo*-Konformation der Ribose, wie man sie im Duplex findet, würde zu einer ungünstigen sterischen Wechselwirkung zwischen diesem Wasserstoffatom und H_{3'} führen. Dies wird durch „Herunterbiegen“ des C₃'-Atoms der C_{4'}-C_{3'}-C₂'-Einheit in der Ribose vermieden (Abb. 10). Eine Änderung von α und γ unter Bildung einer sc⁺-Konformation könnte zu einer

C₃'-*endo*-Faltung der Ribose führen, und durch eine zusätzliche Drehung um ζ würde dann aus der gestreckten, einzelsträngigen Konformation von r(A-SO₂-U) eine gestapelte Anordnung ähnlich der im [r(G-SO₂-C)]₂-Duplex des A-Typs.

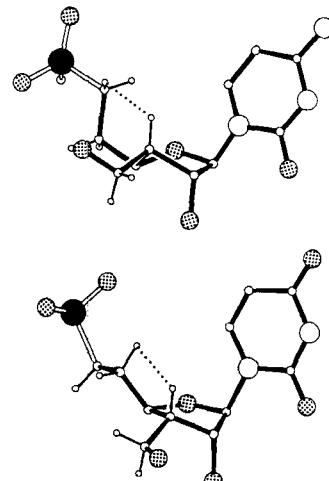


Abb. 10. C₃'-*endo*-Konformation von Cytidin in [r(G-SO₂-C)]₂ (oben) und C₂'-*exo*-Konformation von Uridin im r(A-SO₂-U)-Einzelstrang (unten). Die gepunkteten Linien markieren die Abstände zwischen H^{δi} von C₆ und H_{3'} von Cytidin (2.16 Å) sowie zwischen H^{κe} von C_{5'} und H_{3'} von Uridin (2.35 Å). Man beachte die unterschiedlichen Konformationen bezüglich des Torsionswinkels γ in den beiden Nucleotiden. Eine C₃'-*endo*-Konformation von Uridin würde zu einer ungünstigen Wechselwirkung zwischen H_{3'} und dem H^{κe}-Wasserstoffatom von C_{5'} führen. Das Schwefelatom ist schwarz dargestellt.

6. 6'-α-Substituierte carbocyclische DNA

Bei carbocyclischen Analoga ist das 4'-Sauerstoffatom des natürlichen Furanosylnucleosids durch eine Methylengruppe ersetzt (Abb. 3, Schema 1). Das Entfernen des elektronenziehenden 4'-Sauerstoffatoms der Furanosyleinheit hat eine erhebliche Wirkung auf die Basizität des Pyrimidinrings. Das carbocyclische Analogon von 5-Methyl-2'-desoxycytidin weist einen höheren pK_a-Wert auf als die Stammverbindung, und entsprechende Oligonucleotide bilden sehr stabile Triplexe vom Pu·Py-Py-Typ, bei denen eine Protonierung von Cytidin im dritten Strang erforderlich ist^[156]. Außerdem lässt sich die höhere Stabilität, die durch carbocyclische Reste im Pyrimidinstrang vermittelt wird, auf das Fehlen abstoßender Wechselwirkungen zwischen Phosphatresten des Purinstranges und den 4'-Sauerstoffatomen des in der großen Furche gebundenen dritten Stranges zurückführen^[25]. Carbocyclische Analoga sind gegenüber einer enzymatischen Spaltung der glycosidischen Bindung beständiger^[138].

Obwohl Oligonucleotide, die unsubstituierte carbocyclische Bausteine enthalten, günstige RNA-Bindungseigenschaften aufweisen, reicht die erhöhte Stabilität gegenüber einem Abbau durch Nukleaseen für biologische Anwendungen vermutlich nicht aus^[25]. Oligonucleotide, die carbocyclische Analoga mit

α -Substituenten an der CH₂-Gruppe (C6', Abb. 3) enthalten, erwiesen sich als resistenter gegenüber enzymatischem Abbau^[57]. Die Analoga mit der stärksten Abnahme der Stabilität des DNA-RNA-Duplex sind jedoch gerade die, die gegenüber Nucleasen am beständigsten sind. Nach den bisher gesammelten Befunden zur Stabilität von DNA-Homo- und DNA-RNA-Heteroduplexen, die carbocyclische Oligonukleotide enthalten, ist keine der Konformationen des Cyclopentanrings merklich bevorzugt. Stattdessen ist er wegen fehlender stereoelektronischer Einflüsse auf die Konformation der Furanosyleinheit viel flexibler, was dazu führt, daß carbocyclische Nucleotide unterschiedliche, durch den Duplex induzierte Geometrien einnehmen können.

Um die Konformationsmerkmale carbocyclischer Nucleotide zu beurteilen, haben wir drei unterschiedliche carbocyclische Analoga – sowohl solche mit als auch eines ohne 6'- α -Substituenten – in die Dickerson-Drew-Matrizensequenz d(CGCGAATTGCG) eingebaut (Schema 1). Von allen vier bisher synthetisierten, modifizierten Strängen konnten Kristalle gezüchtet werden, die abgesehen von einem Fall röntgenographisch wenig geeignet waren. Unseres Wissens wurde die rhomboedrische Raumgruppe von Kristallen carbocyclischer Dodecamere bei keinem der zahlreichen, in den letzten 15 Jahren kristallisierten Varianten der Dodecamersequenz beobachtet. Mehr als 30 Dodecamere des d(CG_xyyyzGCG)-Typs ($x = G, A, T; y = A, T; z = C, A, T$), die entweder veränderte Sequenzen aufwiesen, chemisch modifiziert worden waren oder als Komplexe mit in der kleinen Furche gebundenen Wirkstoffen vorlagen, kristallisierten sämtlich wie auch das native Dodecamer in der orthorhombischen Raumgruppe P₂,₂,₂₁^[107]. Es ist bemerkenswert, daß eine geringfügige chemische Modifikation, wie der Ersatz von O4' durch CH₂ bei einigen wenigen Nucleotiden des Dodecamers, dazu führen kann, daß dieses im Kristall eine andere Packung aufweist, die möglicherweise die Konformation der DNA beeinflußt.

Die Kristallstruktur von d(CGCGAAT^{M_e}T^{M_e}CGCG), das zwei carbocyclische 6'- α -Methylthymidinreste enthält, wurde mit einer Auflösung von 2.5 Å bestimmt^[139]. Die Struktur ist zu der des unmodifizierten Dodecamers isomorph, und die vier modifizierten Nucleotide pro Duplex nehmen Konformationen an, die mit denen einer B-DNA vereinbar sind. Von den 20 Zuckereinheiten der nativen Struktur (terminale Reste sind nicht berücksichtigt) liegen zehn in der C1'-*exo*-, sieben in der C2'-*endo*-, zwei in der O4'-*endo*- und eine in der O4'-*exo*-Konformation vor^[140, 141]. Die Zuckereinheiten der Reste T(7) und T(8) weisen die O4'-*endo*- bzw. C1'-*exo*-Konformation auf, während sie im modifizierten Dodecamer in der C2'-*endo*- bzw. C1'-*exo*-Konformation vorliegen (Abb. 11). Im zweiten Strang nehmen die Zuckerbausteine von T(19) und T(20) im nativen Dodecamer beide die C1'-*exo*-Konformation an, während die von T^{M_e}(19) und T^{M_e}(20) im modifizierten Duplex die C2'-*endo*- bzw. C1'-*exo*-Konformation bevorzugen. Die carbocyclischen Reste verursachen also nur sehr geringfügige Abweichungen von der Standard-Geometrie des Desoxyoligonukleotid-Duplex, und die Cyclopentanringe passen sich den geometrischen Anforderungen des Furanosyl-Phosphat-Rückgrats gut an. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Konformation des Cyclopentanrings unsubstituierter und 6'- α -substituierter carbocyclischer Nucleotide nicht festgelegt ist und sich an unterschied-

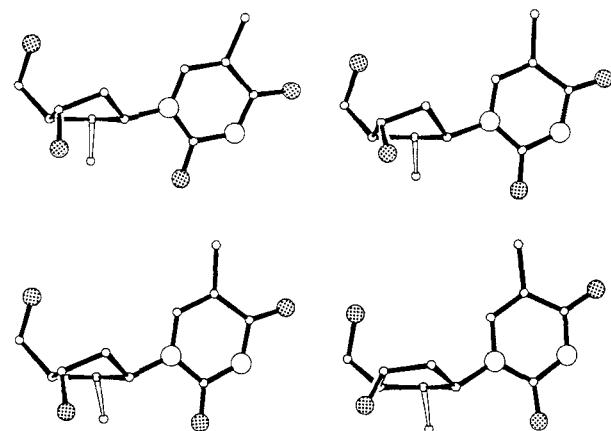


Abb. 11. Konformationen der vier carbocyclischen 6'- α -Methyl-Thymidinreste in [d(CGCGAATTGCG)]₂: T(8) (C2'-*endo*, oben links), T(9) (C1'-*exo*, oben rechts), T(19) (C2'-*endo*, unten links) und T(20) (C1'-*exo*, unten rechts). Die C6'-C7'-Bindungen sind als unausgefüllte Linien dargestellt.

lichste geometrische Gegebenheiten anpassen kann, die durch die RNA- oder DNA-Rückgrate festgelegt werden.

In [d(CGCGAATTGCG)]₂ werden N3 oder N2 von Guanin, N3 von Adenin und O2 von Cytosin sowie Thymin vom jeweils anderen Strang in der Mitte der kleinen Furche durch sieben Wassermoleküle der ersten Hydratationssphäre verbrückt, so daß diese zwei benachbarte Basenpaare überspannen (Abb. 12, links). Darüber hinaus koordinieren sechs Wassermoleküle der zweiten Hydratationssphäre die der ersten Hydratationssphäre, die somit nahezu tetraedrisch koordiniert sind^[116]. Die 4'-Sauerstoffatome der Ribose in der kleinen Furche stabilisieren das Hydratgerüst entweder über Wasserstoffbrückenbindungen oder die durch sie geschaffene polare Umgebung^[117]. Es ist überraschend, wie wenig die Methylgruppen der carbocyclischen Thymidineinheiten im mittleren

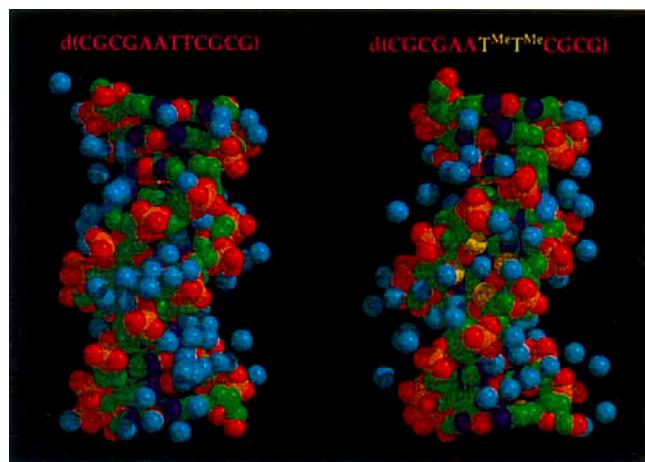


Abb. 12. Hydratisierung der kleinen Furche in den B-DNA-Doppelhelices [(d(CGCGAATTGCG)]₂ (links) und [d(CGCGAAT^{M_e}T^{M_e}CGCG)]₂ (^{M_e} = carbocyclisches 6'- α -Methyl-Thymidin; rechts). Wassermoleküle sind als hellblaue Kugeln dargestellt und die CH₃-Kohlenstoffatome der α -Substituenten in den modifizierten Thymidinresten als gelbe. Das Hydratgerüst ist als Kette aus Wassermolekülen der ersten und zweiten Hydratationsphären erkennbar, die sich entlang der kleinen Furche der modifizierten Doppelhelix windet. Beim nativen Dodecamer wird der Blick auf den zentralen Teil des Rückgrates durch Wassermoleküle höherer Hydratationsphären etwas verdeckt.

Bereich des modifizierten Duplex die erste Hydratationssphäre beeinflussen: Wie im nativen Dodecamer verbrückt ein Wassermolekül die O2-Atome der Reste T^{Me}(7) und T^{Me}(19) (Abb. 12, rechts). Dieses Wassermolekül wird durch die vier Methylgruppen vom äußeren Teil der kleinen Furche abgeschirmt, von denen sich eine in einem Abstand von 3.12 Å zum Wassermolekül befindet. Zwei Wassermoleküle, die dieses Wassermolekül flankieren und die die Reste T^{Me}(8) und A(18) bzw. A(6) und T^{Me}(20) verbrücken, sind ebenfalls konserviert, wie auch das gesamte Hydratisierungsmuster am Grund der kleinen Furche sehr ähnlich ist. Der von den Methylgruppen in der Mitte der kleinen Furche gebildete lipophile Bereich führt zu einer Verdrängung der beiden Wassermoleküle der zweiten Hydratationssphäre, die in [d(CGCGAATTCTCGCG)]₂ die drei Wassermoleküle im Zentrum der kleinen Furche miteinander verknüpfen. Im B-DNA-Duplex stehen die Vektoren, die durch die 6'- α -Methylkohlenstoffatome der Reste T^{Me}(7) und T^{Me}(20) sowie durch die entsprechenden C-Atome von T^{Me}(8) und T^{Me}(19) definiert werden, ungefähr senkrecht zur Längsrichtung der kleinen Furche, und die Abstände zwischen den van-der-Waals-Oberflächen der Methylgruppen dieser Reste über die Furche hinweg betragen 1.21 bzw. 0.87 Å (der van-der-Waals-Radius einer Methylgruppe wurde mit 2 Å angesetzt). Die entsprechenden Abstände zwischen den Methylgruppen von T^{Me}(7) und T^{Me}(8) sowie zwischen denen von T^{Me}(19) und T^{Me}(20) betragen 1.03 bzw. 0.53 Å.

Anhand dieser Struktur wird deutlich, daß 6'- α -substituierte carbocyclische Nucleotide ähnliche konformativ Konsequenzen haben wie die Furanosyl-Nucleotide in einem Duplex des B-Typs. Der Einbau isolierter 6'- α -methylierter Bausteine in DNA könnte den Duplex durch Verzerrung des globalen Hydratisierungsmotivs destabilisieren. Zusammenhängende Abschnitte von zehn 6'- α -methylierten carbocyclischen Pyrimidinen führten hingegen zu etwas höheren Schmelztemperaturen des Duplex pro eingebautem Rest im Vergleich zu denen nach Einbau isolierter Nucleinsäureanaloga ($\Delta T_m = -1.3$ bzw. -1.7 Grad, bezogen auf komplementäre DNA)^[139, 142]. Diese kooperative, relative Stabilitätserhöhung kann auf die Freisetzung von Wassermolekülen in der Nähe der Methylsubstituenten und auf die kleinen Abstände zwischen den van-der-Waals-Oberflächen der Methylgruppen benachbarter Reste eines Stranges zurückgeführt werden.

7. 2'-O-Methylierte RNA

2'-O-Alkylierung^[40, 62, 143] und 2'-Alkylsubstitution^[144] führen zu Oligonucleotiden mit erhöhter metabolischer Stabilität. Heteroduplexe aus 2'-O-alkylierter RNA und natürlicher RNA sind stabiler als solche aus DNA und RNA, wobei kleinere Substituenten wie Methyl, Ethyl und Allyl in höherem Maße stabilisierend wirken als längerkettige Alkylgruppen^[39, 42]. Die 2'-Hydroxygruppe der RNA trägt zur thermodynamischen Stabilität des RNA-Duplex bei und zwar sowohl enthalpisch durch eine Verbesserung der Hydratisierung als auch entropisch durch eine konformativ Präorganisation der Ribose.

Die hochauflöste Kristallstruktur des A-RNA-Duplex [r(C₄G₄)₂]^[103] und der Vergleich mit der Kristallstruktur des

A-DNA-Duplex mit gleicher Sequenz^[145, 146] lieferten Hinweise für die außergewöhnliche Hydratisierung des RNA-Duplex an den 2'-Hydroxygruppen in der kleinen Furche (Abb. 13).

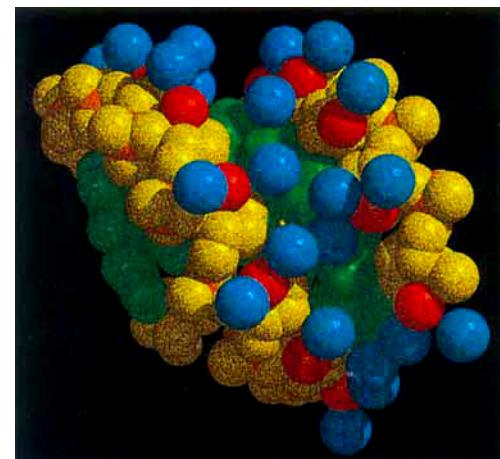


Abb. 13. Hydratisierung der 2'-Hydroxygruppen in der kleinen Furche der RNA-Doppelhelix [r(C₄G₄)₂]. Jedes der Wassermoleküle (hellblau, teilweise verdeckt) befindet sich in einer Entfernung von weniger als 3.4 Å von einem 2'-Sauerstoffatom (rot). Die Phosphoratome sind orangefarben, die übrigen Ribose-Phosphat-Rückgrat-Atome gelb und die Basen-Atome grün dargestellt.

Diese bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit durchschnittlich zwei Wassermolekülen und fungieren außerdem in einigen Fällen als Donoren in einer Wasserstoffbrücke zum 4'-Sauerstoffatom der in 5' → 3'-Richtung benachbarten Ribose.

Die thermodynamischen Daten der Hybridisierung wurden für r(C₄G₄) und d(C₄G₄) aus den Daten temperaturabhängiger UV-spektroskopischer Messungen berechnet (Tabelle 2). Die

Tabelle 2. Thermodynamische Daten von r(C₄G₄) und d(C₄G₄) auf der Basis temperaturabhängiger UV-Hyperchromie-Messungen [a].

Oligomer	T_m [°C]	ΔG [kcal mol ⁻¹]	ΔH [kcal mol ⁻¹]	$-T \cdot \Delta S$ [kcal mol ⁻¹]
d(C ₄ G ₄)	44.6	-8.4	-54.0	+45.6
r(C ₄ G ₄)	70.1	-15.5	-85.1	+69.6

[a] Die T_m -Werte wurden in 10 mM Natriumdimethylarsinat (pH = 7), 100 mM NaCl und 0.1 mM Ethylendiamintetraessigsäure bei Strangkonzentrationen von 8.2 μM gemessen. Die thermodynamischen Daten sind für 37°C angegeben.

höhere thermodynamische Stabilität der Duplexbildung bei RNA im Vergleich zu der bei DNA beruht, was vielleicht überrascht, nicht auf einem günstigeren Entropieterm infolge der konformativen Präorganisation des Ribose-Phosphat-Rückgrats in einzelsträngiger RNA bei einem Duplex der A-Form. Stattdessen ist die Reaktionsenthalpie der Duplexbildung bei RNA über 30 kcal mol⁻¹ größer als bei DNA, was mit der viel besseren Hydratisierung der RNA im Kristall im Einklang ist (siehe 2'-OH-Hydratisierung in Abb. 13). Bei der Bildung eines DNA-Duplex können mehrere Wassermoleküle abgegeben werden, wohingegen sich die Gesamtzahl der Wassermoleküle zweier RNA-Einzelstränge von der eines RNA-Duplex nicht notwendigerweise erheblich unterscheidet. Die sehr geringfügige Verringerung (oder die möglicherweise sogar leichte Erhöhung)

des Hydratisierungsgrades bei der Duplexbildung von RNA (entropisch ungünstig) steht dem Enthalpiegewinn durch gebundenes Wasser sowie dem Beitrag aus der Präorganisation des Einzelstranges, die den Entropieterm günstig beeinflussen sollte, gegenüber. Die Enthalpiezunahme ist jeweils größer als die Entropieerniedrigung, und im Fall der C₄G₄-Octamersequenz ist ΔG der Duplexbildung bei RNA etwa doppelt so groß wie bei DNA. Hierbei ist folgendes interessant: Oligonucleotide mit 2'-alkoxysubstituierten carbocyclischen Bausteinen, in denen keine *gauche*-Wechselwirkung zwischen dem 2'-Substituenten und dem 4'-Sauerstoffatom der Ribose auftritt, weisen eine niedrigere RNA-Bindungsaffinität auf als entsprechende DNA-Oligonucleotide^[57]. Dies bedeutet, daß sich der aus der größeren Starrheit des Ribose-Phosphat-Rückgrats (*gauche*-Effekt zwischen O' und O') ergebende entropische Vorteil für die erhöhte Stabilität der Duplexbildung sowohl bei RNA als auch bei 2'-O-Me-RNA von großer Bedeutung ist.

In der Kristallstruktur des Decamer-Duplex [d(GCGT)^{O2'Me}r(A)d(TACGC)]₂, der 2'-O-methylierte Adenosineinheiten enthält, bilden die beiden Methoxysauerstoffatome

je eine Wasserstoffbrückenbindung zu nur einem Wassermolekül^[106]. Durch die Methylierung der 2'-Hydroxygruppe wird der Hydratisierungsgrad im Vergleich zu dem bei nativer RNA (bei der die 2'-Hydroxygruppen meistens an zwei Wassermoleküle gebunden sind) erniedrigt und darüber hinaus die Bildung der inneren Wasserstoffbrückenbindung verhindert, die häufig zwischen O' und O' der benachbarten Ribose des selben Stranges auftritt. Die Consensus-Muster der Hydratisierung der kleinen Furche für Cytidin und Guanosin sind auf der Basis der Kristallstruktur von [r(C₄G₄)]₂ im oberen Teil von Abbildung 14 dargestellt. Die 2'-Hydroxygruppen stabilisieren hier eine ununterbrochene Reihe von Wassermolekülen in der Furche, die mehr oder weniger in der durch die G-C-Basenpaare definierten Ebenen liegen und die die Rückgrate und Basen miteinander verbinden (Abb. 13, Vordergrund). Bei den meisten G-C-Basenpaaren befindet sich eines der beiden Wassermoleküle, die mit den 2'-Sauerstoffatomen Wasserstoffbrückenbindungen bilden, am Rande der kleinen Furche und verbrückt O' und

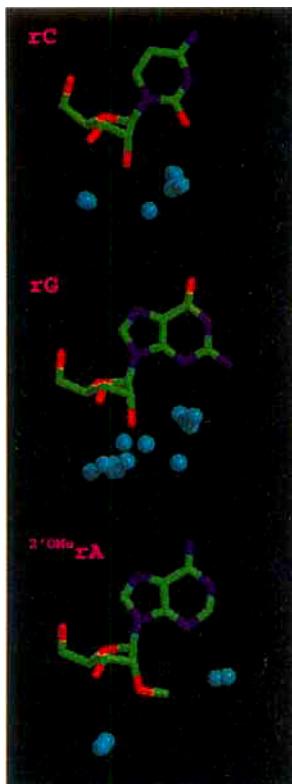


Abb. 14. Konservierte Hydratisierungsmuster in der kleinen Furche im Bereich von rC (oben), rG (Mitte) und 2'-O-Me-rA (unten). Die rC- und rG-Darstellungen wurden durch Superposition der je acht Nucleoside aus der [r(C₄G₄)]₂-Kristallstruktur (in den Darstellungen ersetzt durch ein Nucleosid mit durchschnittlicher Geometrie) und der sie umgebenden Wassermoleküle erhalten. Das Hydratisierungsmuster für 2'-OMe-rA beruht auf den beobachteten Anordnungen von Wassermolekülen um die beiden modifizierten Adenosinreste in der Kristallstruktur einer DNA/2'-O-Me-RNA-Decamer-Doppelhelix [106].

die Phosphatgruppe. Das andere Wassermolekül verbrückt O' und N3 vom Guanosin- oder O2 vom Cytidinrest (Abb. 14). Diese Wassermoleküle bilden entweder direkte Wasserstoffbrückenbindungen untereinander oder werden ihrerseits durch ein Wassermolekül miteinander verbrückt, das gewöhnlich ebenfalls eine Wasserstoffbrückenbindung zu N2 des Guanosinrestes bildet (in Abb. 13 nicht gezeigt, da diese Wassermoleküle nicht direkt mit den 2'-Sauerstoffatomen wechselwirken)^[103].

Beim Vergleich mit der Anordnung der Wassermoleküle im Bereich der 2'-O-methylierten Adenosinreste wird deutlich, daß hier das Wassermolekül, das bei Guanosin im RNA-Duplex O' und N3 verknüpft, durch die Methoxygruppe zur Mitte der Furche verschoben ist (Abb. 14, unten). Die Kristallstruktur von [d(GCGT)^{O2'Me}r(A)d(TACGC)]₂ sowie NMR-Experimente in Lösung^[71] belegen, daß die Methoxysubstituenten in die kleine Furche ragen, was zu einer angenäherten *trans*-Anordnung der C2'-C3'- und der O'CH₃-Bindung führt. Durch die 2'-O-Methylierung von RNA scheint somit die Hydratisierung in der kleinen Furche lokal und global verändert zu werden; die hohe Stabilität von 2'-O-Me-RNA ist daher möglicherweise hauptsächlich entropisch bedingt. Dafür spricht auch die noch höhere thermodynamische Stabilität von Hybriden aus 2'-Desoxy-2'-fluoroligonucleotiden und RNA^[42, 147]. Eine Wasserstoffbrückenbindung zum kovalent gebundenen Fluoratom wurde postuliert^[148]; doch ist Fluor (anders als das Fluorid-Ion) ein äußerst schlechter Wasserstoffbrückenbindungsacceptor^[149]. Es ist daher unwahrscheinlich, daß die hohe RNA-Affinität von einheitlich 2'-Fluor-substituierten Oligodesoxynucleotiden auf eine enthalpische Stabilisierung durch Hydratwassermoleküle zurückzuführen ist. Allerdings trägt auch die veränderte Elektronegativität durch Stabilisierung der C3'-*endo*-Zuckerkonformation wesentlich zu der außergewöhnlich hohen RNA-Affinität bei^[99]. Insgesamt stützen die Struktur- und die thermodynamischen Daten die Vorstellung, daß 2'-O-Me-RNA zum einen wie DNA durch Wasserverlust bei der Duplexbildung und zum anderen wie RNA infolge konformativer Präorganisation des Einzelstranges entropisch stabilisiert wird. Darüber hinaus können auch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen unmittelbar benachbarten O'-'Substituenten entlang des Stranges zur Stabilität beitragen^[106]. Eine feine Balance zwischen Entropiegewinn und Enthalpieverlust infolge einer Veränderung der Hydratisierung kann auch an der enorm stabilisierenden Wirkung einer Methylgruppe an C5 in Pyrimidinen^[150] sowie an der außergewöhnlich hohen RNA-Affinität von Oligonucleotiden, die 5-propinsubstituierte Pyrimidine enthalten^[62], beteiligt sein.

8. Sequenzspezifische Spaltung von RNA

Heteroduplexe aus RNA und fast allen Oligonucleotidanalogen mit modifizierten Zucker- und/oder Phosphateinheiten können den natürlichen Abbau von mRNA durch RNase H nicht aktivieren. Das Enzym spaltet den RNA-Strang in DNA·RNA-Hybriden, und die einzigen Analoga, bei denen die Erkennung des Heterosubstrats durch das Enzym nicht unterbunden ist, sind Phosphorothioate, Phosphorodithioate und solche mit Basenmodifikationen, die die große Furche betreffen (z. B. 5-Propinpyrimidine)^[24]. Bei fehlender Induzierung des RNA-Abbaus

könnte die therapeutische Anwendbarkeit von Antisense-Verbindungen stark eingeschränkt sein. Funktionalisierte RNAs, die einen spezifischen mRNA-Bereich erkennen und effizient spalten können^[151], sowie nichtmodifizierte und chemisch modifizierte Hammerkopf-Ribozyme^[13, 41, 152, 153] könnten sich als leistungsfähigere Antisense-Therapeutika erweisen.

Bei der Ribozym-katalysierten Spaltung von RNA-Strängen durch Phosphodiester-Umesterung wird das Rückgrat für eine S_N2-Substitution vororientiert. Die angreifende 2'-OH-Gruppe und die 5'-OH-Abgangsgruppe müssen beide im trigonal-bipyramidalen Übergangszustand, den das Nucleophil und die Phosphatgruppe mit der zu spaltenden P-O5'-Bindung bilden, die apicalen Positionen einnehmen^[154–156]. Bei einem intakten A-RNA-Duplex ist eine solche lineare Anordnung wegen der relativen Positionen der 2'-OH- und der benachbarten 5'-Phosphatgruppe nicht möglich. Verzerrungen des Rückgrats in der Nachbarschaft von ein- oder mehrbasigen „Ausbauchungen“ scheinen allerdings die für eine effiziente Spaltung des Stranges notwendige konformative Freiheit liefern zu können. So wurde in Gegenwart von Mg²⁺ ein RNA-Strang an der Phosphatgruppe eines ungepaarten Nucleotids gespalten^[157]. Durch die Spaltung der 3'-5'-Phosphodiesterbindung zwischen dem ungepaarten Nucleotid und den in 5' → 3'-Richtung benachbarten Nucleotiden wird, wie bei der durch Hammerkopf-Ribozyme katalysierten Spaltung, ein cyclischer 2',3'-Phosphodiester gebildet und die 5'-Hydroxygruppe freigesetzt^[158].

Wir haben die Kristallstruktur einer selbstkomplementären RNA-DNA-Chimäre mit einzelnen ungepaarten Adenosineinheiten mit einer Auflösung von 2.8 Å bestimmt (Abb. 15)^[160].

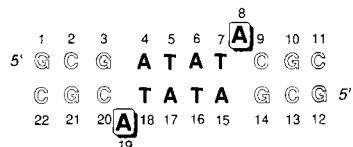


Abb. 15. Sequenz der kristallographisch untersuchten selbstkomplementären RNA-DNA-Chimäre mit zwei ungepaarten Adenosinresten (DNA-Bausteine sind durch unausgefüllte und RNA-Bausteine durch ausfüllte Buchstaben gekennzeichnet). Der zentrale Teil des Undecamers wurde ursprünglich als DNA belassen, um einige Eigenschaften einer komplett basengepaarten RNA-DNA-Chimäre, von der bereits gut streuende Kristalle erhalten wurden, zu konservieren [159] und um eine Spaltung des Stranges zwischen den Nucleotiden A(8) und C(9) (oder A(19) und C(20)) bei Kristallisierungsversuchen in Gegenwart von zweiwertigen Metall-Kationen zu verhindern.

Im Kristall liegt das Fragment auf einer kristallographischen zweizähligen Achse, und beide Adenosineinheiten ragen aus dem Duplex heraus (Abb. 16). Die Desoxyriboseeinheiten der ungepaarten Nucleotide A(8) und A(19) sowie die der Reste A(6), T(7), A(17) und T(18) liegen in der C2'-endo-Konformation und alle anderen in der C3'-endo-Konformation der A-RNA vor. Infolge der Störungen der Rückgratgeometrie, die durch die ungepaarten Adenosineinheiten hervorgerufen werden, ist das Fragment um 20° geknickt und die enge, große Furche auf etwa das Doppelte ihrer normalen Breite aufgeweitet.

Ausgehend von der Struktur dieser RNA-DNA-Chimäre im Kristall wurde durch Molecular Modeling die Struktur der selbstkomplementären RNA-DNA-Chimäre mit 2'-OH-Grup-

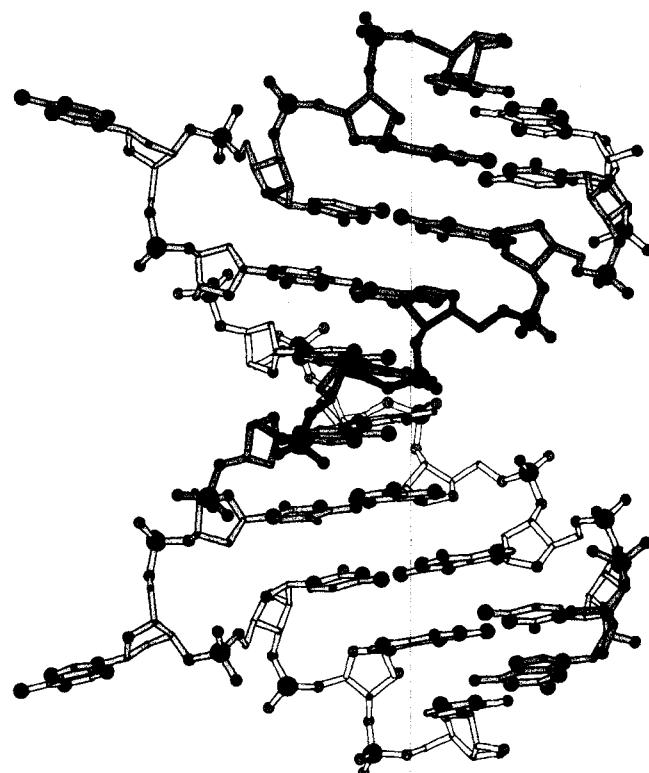


Abb. 16. Globale Konformation der einer A-RNA-ähnlichen Doppelhelix mit ungepaarten Adenosinresten. Phosphoratome sind schwarz dargestellt, und dunklere Regionen befinden sich näher beim Betrachter. Ungepaarte Adenosinreste sind wichtige RNA-Sekundärstruktur-Elemente, von Bedeutung beispielsweise für die RNA-Faltung, für Protein-RNA-Wechselwirkungen sowie für das Spleißen von Gruppe-I- und -II-Intronen und von Vorläufern der Boten-RNA [161–165].

pen an den ungepaarten Adenosinresten berechnet. Diese Hydroxygruppe ist relativ weit von der zu spaltenden P-O5'-Bindung entfernt (O2'-P 4.2 Å; Abb. 17, unten) und liegt ungefähr in der durch die Phosphatsauerstoffatome O1P, O2P und O3' aufgespannten Ebene. Der berechnete O2'-P-O5'-Winkel von 90° würde eine Spaltung der Phosphodiesterbindung nicht begünstigen (Abb. 17, unten). Durch „Umklappen“ der C2'-endo-Zuckerkonformation der ungepaarten Adenosineinheit in die C3'-endo-Konformation würde die 2'-OH-Gruppe in die im Übergangszustand erforderliche apicale Position gelangen (O2'-P 3.6 Å, O2'-P-O5' 150°; Abb. 17, oben). Durch lokale konformativ Umordnungen des Rückgrats im Bereich des ungepaarten Nucleotids könnten also das Nucleophil und die Abgangsgruppe relativ leicht in die apicalen Positionen des trigonal-bipyramidalen Übergangszustands gebracht werden; dies ist mit dem Befund im Einklang, daß die effiziente metallkatalysierte Spaltung an diesen Stellen stattfindet. Der kristallstrukturanalytisch bestimmte PO^{Si}-O^{Re}P-Abstand von 3.95 Å zwischen C(9) und G(10), die dem ungepaarten Nucleotid in 5'-Richtung benachbart sind, ist der kleinste im gesamten Duplex und deutlich kleiner als die üblichen entsprechenden Abstände zwischen benachbarten Phosphatgruppen innerhalb eines Stranges bei Duplexen des A-Typs (Abb. 17). Diese nahe beieinanderliegenden Phosphatgruppen könnten somit als Bindungsstelle für ein Mg²⁺ fungieren, das die Phosphatgruppe für den nucleophilen Angriff aktivieren und die 5'-Hydroxy-Abgangsgruppe stabilisieren könnte.

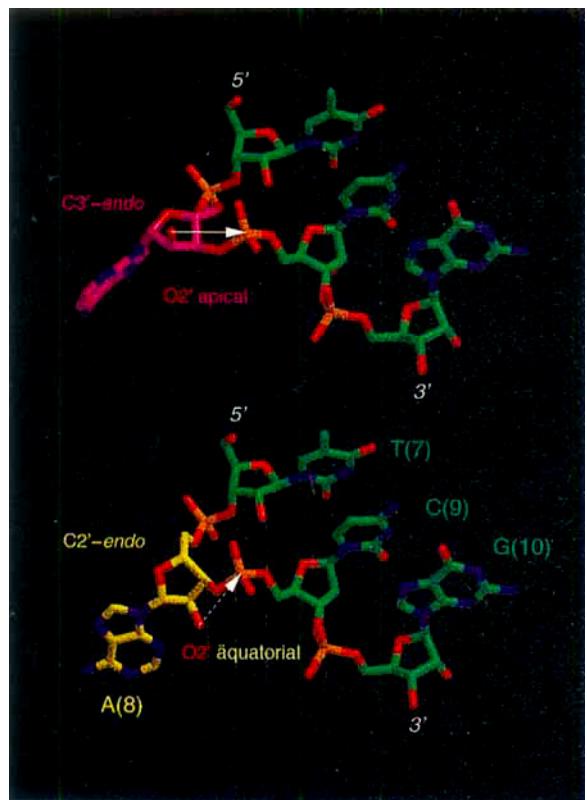


Abb. 17. Rückgrat-Konformation in der Umgebung des ungepaarten Adenosinrestes (gelb) in der Kristallstruktur (unten) sowie modellierte Rückgrat-Konformation in der Umgebung des ungepaarten Adenosinrestes (violett) durch Änderung seiner Zuckerkonformation von C2'-endo zu C3'-endo (oben). Der durchgezogene und der gestrichelte Pfeil markieren die Vektoren zwischen der 2'-OH-Gruppe des Adenosinrestes (die hier abgebildet ist, in der Kristallstruktur aber fehlt) und dem Phosphoratom der 3'-Phosphatgruppe. Man beachte den geringen Abstand zwischen den Phosphat-Sauerstoffatomen O^{3'} und O^{5'} der Nucleotide C(9) bzw. G(10).

Interessanterweise weist das chimäre Fragment in der bei 1.83 Å gelösten Struktur einer zweiten Kristallform in der Region des ungepaarten Nucleotids eine Konformation auf, die der im modellierten Fragment sehr ähnlich ist^[160]. In dieser Struktur liegt der Zucker der ausgebauten Adenosineinheit in einer C3'-endo-Konformation vor, und die addierte 2'-OH-Gruppe nimmt bezüglich der Phosphatgruppe eine apicale Position ein (O2'-P 3.8 Å, O2'-P-O5' 145°).

9. Zusammenfassung und Ausblick

Der Fortschritt unseres Verständnisses der Strukturen von Nucleinsäuren war schon immer eng mit den Fortschritten bei der chemischen Synthese von DNA und RNA verknüpft. Nachdem in den frühen 80er Jahren sehr reine Oligodesoxynucleotide in Milligramm-Mengen verfügbar wurden, war der Weg für die ersten hochauflösten Kristallstrukturen von DNA-Fragmenten geebnet. In etwas mehr als zehn Jahren erhielt man anhand von über hundert Kristallstrukturen einen Einblick in viele Aspekte der Doppelhelixstruktur. Schwierigkeiten bei der Synthese von Oligoribonucleotiden in großem Maßstab verhinderten lange Zeit, daß man bei RNAs ähnliche Erfolge erzielte. Diese Probleme wurden inzwischen weitgehend gelöst, und in den nächsten Jahren ist mit einem deutlichen Anstieg der Zahl der RNA-Strukturuntersuchungen zu rechnen.

Angesichts der Herausforderung, die Antisense-Methode nicht nur als analytisches Instrument, sondern auch für therapeutische Anwendungen zu nutzen, wurde eine erstaunliche Vielfalt an synthetischen Nucleinsäureanaloga hergestellt. Viele davon sind gegenüber einem Abbau durch zelluläre Nucleasen wesentlich beständiger als die jeweiligen natürlichen Nucleinsäuren. Mehrere Analoga weisen sowohl eine höhere chemische Stabilität als auch eine erhöhte RNA-Affinität auf. Abgesehen von sehr wenigen Ausnahmen, wie den Phosphorothioatanaloga der ersten Generation, blockieren Modifikationen allerdings den natürlichen mRNA-Abbau durch RNase H. Modifizierte Oligonucleotide, die im Zellkern stabile Komplexe mit gerade transkribierter RNA bilden und die RNase H nicht behindern, scheinen bei der Unterdrückung der mRNA-Translation besonders effektiv zu sein^[167].

Detaillierte dreidimensionale Strukturen geben Hinweise auf den Ursprung der durch chemische Modifikationen hervorgerufenen Änderungen der thermodynamischen Stabilität von DNAs und RNAs. Wie ein Vergleich der hochauflösten Kristallstrukturen eines DNA-Octamer- und eines RNA-Octamer-Duplex mit identischen Sequenzen ergab, unterscheiden sich DNA- und RNA-Doppelhelices in ihrem Hydratisierungsgrad grundlegend: Der RNA-Duplex ist infolge der zusätzlichen 2'-Hydroxygruppen der Ribose stärker hydratisiert. Infolgedessen ist die Bildung eines RNA-Duplex im Vergleich zur DNA-Duplexbildung in bezug auf gebundenes H₂O enthalpisch begünstigt, entropisch hingegen benachteiligt. Die größere Starrheit der Riboseeinheit trägt zur thermodynamischen Gesamtstabilität des RNA-Duplex bei. Änderungen der Hydratisierung und das daraus folgende Wechselspiel zwischen Enthalpie und Entropie werden bei der Analyse der Daten der thermodynamischen Stabilität von Nucleinsäureanaloga meistens übersehen^[27]. Da die Hydratisierung für die relative Stabilität von nativer DNA und RNA eine wichtige Rolle spielt, sollten Änderungen der Solvatisierung infolge chemischer Modifikationen entscheidend zur Änderung der thermodynamischen Stabilität von DNA- und RNA-Analoga beitragen. Dies wird durch die kristallstrukturanalytisch festgestellten Änderungen der Hydratisierung gestützt, die durch Methylgruppen an O2' (2'-O-Me-RNA) und an C6' (carbocyclische DNA) hervorgerufen werden. Etwas vereinfacht dargestellt, weisen diese Ergebnisse darauf hin, daß die Enthalpieverluste infolge der geänderten oder verringerten Hydratisierung in der Nachbarschaft kurzer Alkylgruppen oder heteroatomhaltiger Substituenten durch die Entropiegewinne infolge des Wasserverlustes ausgeglichen oder gelegentlich auch überkompenziert (2'-O-substituierte RNA) werden. Wegen des geringen Abstands zwischen solchen Substituenten in der kleinen Furche von Duplexen der A-Form sind diese wahrscheinlich stabiler und werden leichter gebildet, während längere Alkylgruppen oder allgemein sperrige, lipophile Substituenten die Hydratisierung so stark beeinträchtigen, daß die Enthalpieabnahme dominiert. Hydratisierungseffekte sind wahrscheinlich auch an der stabilisierenden Wirkung von Substituenten wie Methyl und Propyl an C5 der Pyrimidinreste beteiligt, wobei Stapelung und Wechselwirkungen zwischen Substituenten zusätzliche Beiträge liefern.

Die systematische Untersuchung der Strukturen chemisch modifizierter Nucleinsäuren liefert nicht nur Konzepte für den Entwurf weiterer, für Antisense-Anwendungen möglicherweise

interessante Nucleinsäureanaloga, sondern verspricht auch ein tieferes Verständnis der Eigenschaften nativer DNAs und RNAs. So wie durch Strukturuntersuchungen von punktmutierten Proteinen eine Beurteilung des Einflusses einzelner Aminosäuren auf Faltung und katalytische Eigenschaften des Proteins möglich wurden, kann mit spezifisch modifizierten Nucleinsäuren die Bedeutung der unterschiedlichen Parameter für die Gesamtstrukturen von DNA und RNA analysiert werden. Nucleinsäureanaloga können also für ein verbessertes Verständnis z. B. von lokalen Verformungen in Oligonukleotiden („bending“) und Protein-Nucleinsäure-Wechselwirkungen von Nutzen sein.

Ich danke meinen Mitarbeitern aus unserem Labor, P. Lubini, S. Portmann, A. Roughton und C. Richert, sowie aus anderen Institutionen, C. Leumann (Universität Bern), K.-H. Altmann, M. Blommers, D. Hüsken, H. Moser (CIBA AG, Basel), N. Usman (Ribozyme Pharmaceuticals Inc., Boulder, USA) und F. K. Winkler (Hoffmann LaRoche, Basel) für ihre Beiträge und anregenden Diskussionen. Darüber hinaus möchte ich A. Roughton für die kritische Durchsicht des Manuskripts danken. Diese Arbeit wurde von der ETH, Zürich, sowie von der Ciba-Geigy-Jubiläums-Stiftung und der CIBA AG gefördert.

Eingegangen am 19. Juli 1995 [A 123]
Übersetzt von Dr. Stefan Müller-Becker, St. Ingbert

- [1] P. J. Green, O. Pines, M. Inouye, *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 569–597.
- [2] R. W. Simons, N. Kleckner, *Annu. Rev. Genet.* **1988**, *22*, 567.
- [3] H. M. Weintraub, *Sci. Am.* **1990**, *262*(1), 34–40.
- [4] Y. Eguchi, T. Itoh, J. Tomizawa, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 631–652.
- [5] J. Tomizawa, *Cell* **1984**, *38*, 861–870.
- [6] J. P. Marino, R. S. Gregorian, Jr., G. Csankovszki, D. M. Crothers, *Science* **1995**, *268*, 1448–1454.
- [7] P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 280–284.
- [8] M. L. Stephenson, P. C. Zamecnik, *ibid.* **1978**, *75*, 285–288.
- [9] H. E. Moser, P. B. Dervan, *Science* **1987**, *238*, 645–650.
- [10] T. Le Doan, L. Perronault, D. Praseuth, N. Habhoub, J. L. Decout, N. T. Thuong, J. L. Homme, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 7749–7760.
- [11] J.-S. Sun, C. Hélène, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 345–356; N. T. Thuong, C. Hélène, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 697–723; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 666–690.
- [12] G. A. Prodty, J. T. Bakos, J. M. Buzayan, I. R. Schneider, G. Bruening, *Science* **1986**, *231*, 1577–1580; A. C. Forster, R. H. Symons, *Cell* **1987**, *49*, 211–220; O. C. Uhlenbeck, *Nature* **1987**, *328*, 596–600.
- [13] T. R. Cech, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, *2*, 605–609; N. Usman, J. McSwigan, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1995**, *30*, 285–294.
- [14] C. A. Stein, J. S. Cohen, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 2659–2668.
- [15] J. Goodchild, *Biocong. Chem.* **1990**, *1*, 165–187.
- [16] C. Hélène, J.-J. Toublé, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1049*, 99–125.
- [17] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543–584.
- [18] P. Cook, *Anti-Cancer Drug Design* **1991**, *6*, 585.
- [19] C. Hélène, *Anti-Cancer Drug Design* **1991**, *6*, 569–584.
- [20] J. A. H. Murray, *Antisense RNA and DNA, Modern Cell Biology*, Vol. 11, Wiley-Liss, New York, **1992**.
- [21] S. T. Crooke, *Curr. Opinion Biotechnol.* **1992**, *3*, 656–661.
- [22] R. Tullis, E. Wilkinson, J. Caravaca-Trujillo, *Biotechnol. Int.* **1992**, *79*–89.
- [23] *Antisense Research and Applications* (Hrsg.: S. T. Crooke, B. Lebleu), CRC Press, Boca Raton, FL, **1993**.
- [24] J. F. Milligan, M. D. Matteucci, J. C. Martin, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1923–1937.
- [25] H. E. Moser in *Perspectives in Medicinal Chemistry* (Hrsg.: B. Testa, W. Furter, E. Kyburz, R. Giger), Helvetica Chimica Acta, Basel, **1993**, S. 275–297, zit. Lit.
- [26] E. Uhlmann, A. Peyman in *Methods in Molecular Biology* (Hrsg.: S. Agarwal), Humana, Clifton, NJ, **1993**, S. 355–390.
- [27] R. S. Varma, *Synlett* **1993**, 621–637.
- [28] J. S. Cohen, M. E. Hogan, *Sci. Am.* **1994**, Dec., 50–55.
- [29] *Modified Oligonucleotides* (Hrsg.: G. L. Trainor), *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 965–1085.
- [30] M. Z. Ratajczak, A. M. Gewirtz in *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol. 8 (Hrsg.: F. Eckstein, D. M. J. Lilley) Springer, Berlin, **1994**, S. 298–326.
- [31] R. W. Wagner, *Science* **1994**, *372*, 333–335.
- [32] „Carbohydrate Modifications in Antisense Research“: *ACS Symp. Ser.* **1994**, *580*.
- [33] A. De Mesmaeker, K.-H. Altmann, A. Waldner, S. Wendeborn, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 343–355.
- [34] J. A. Walder, *Biotechnol. Int.* **1992**, *67*–71.
- [35] F. Eckstein, *Ann. Rev. Biochem.* **1986**, *54*, 367–402.
- [36] G. Zon, *Biotechnol. Int.* **1992**, *119*–124.
- [37] K. K. Chacko, K. Lindner, W. Saenger, P. S. Miller, *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 2801–2814.
- [38] P. S. Miller, C. H. Agris, L. Aurelian, K. R. Blake, A. Murakami, M. P. Reddy, S. A. Spitz, P. O. P. Ts'o, *Biochimie* **1985**, *67*, 769–776.
- [39] H. Inoue, Y. Hayase, A. Imura, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 6131–6148.
- [40] A. M. Ibarra, B. S. Sproat, P. Neuner, I. Sulston, U. Ryder, A. I. Lamond, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 7747–7751.
- [41] J. Goodchild, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4607–4612, zit. Lit.
- [42] E. A. Lesnik, C. J. Guinoss, A. M. Kawasaki, H. Sasmor, M. Zounes, L. L. Cummins, D. J. Ecker, P. D. Cook, S. M. Freier, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7832–7838.
- [43] X. Cao, M. D. Matteucci, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2325–2328.
- [44] A. De Mesmaeker, J. Lebreton, A. Waldner, V. Fritsch, R. M. Wolf, S. M. Freier, *Synlett* **1993**, 733–736.
- [45] C. V. C. Prasad, T. J. Caulfield, C. P. Prouty, A. K. Saha, W. C. Schairer, A. Yawman, D. A. Upson, L. I. Kruse, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 411–414.
- [46] J. Lebreton, A. De Mesmaeker, A. Waldner, *Synlett* **1994**, 54–56.
- [47] R. J. Jones, K.-Y. Lin, J. F. Milligan, S. Wadwani, M. D. Matteucci, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2983–2991.
- [48] K.-I. Lin, J. S. Pudlo, R. J. Jones, N. Bischofberger, M. D. Matteucci, B. Fröhler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1061–1064.
- [49] a) R. O. Dempsey, K. A. Browne, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6140–6141; b) R. O. Dempsey, K. A. Browne, T. C. Bruice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 6097–6101.
- [50] a) A. K. Saha, T. J. Caulfield, C. Hobbs, D. A. Upson, C. Waychunas, A. M. Yawman, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 788–789; b) L. Beigelman, A. Karpeisky, N. Usman, *Nucleosides Nucleotides* **1995**, *14*, 901–905.
- [51] a) S. M. Gryaznov, D. H. Lloyd, J.-K. Chen, R. G. Schultz, L. A. DeDionisio, L. Ratmeyer, W. D. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5798–5802; b) J.-K. Chen, R. G. Schultz, D. H. Lloyd, S. M. Gryaznov, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 2661–2668.
- [52] W. S. Marshall, M. H. Caruthers, *Science* **1993**, *259*, 1564–1570.
- [53] B. Meng, S. H. Kawai, D. Wang, G. Just, P. A. Giannaris, M. J. Dahma, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 733–735; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 729–731.
- [54] E. B. McElroy, R. Bandaru, J. Huang, T. S. Widlanski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1071–1076.
- [55] Z. Huang, K. C. Schneider, S. A. Benner, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3869–3882.
- [56] B. C. Froehler, D. J. Ricca, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8320–8322.
- [57] K.-H. Altmann, M.-O. Bévierre, A. De Mesmaeker, H. E. Moser, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 431–436.
- [58] A. Garbesi, M. L. Capobianco, F. P. Colonna, L. Tondelli, F. Aceramone, G. Manzini, C. W. Hilbers, J. M. E. Aelen, M. J. J. Blommers, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 4159–4165.
- [59] A. Eschenmoser, E. Loewenthal, *Chem. Soc. Rev.* **1992**, 1–16.
- [60] A. Eschenmoser in *Proceedings of the Robert A. Welch Foundation*, Vol. 37, The Robert A. Welch Foundation, Houston, TX, **1993**, S. 201–235.
- [61] P. Herdewijn, H. De Winter, B. Doboszewski, I. Verheggen, K. Augustyns, C. Hendrix, T. Saison-Behmoaras, C. De Ranter, A. Van Aerschot in Lit. [32], S. 80–99.
- [62] R. W. Wagner, M. D. Matteucci, J. G. Lewis, A. J. Gutierrez, C. Moulds, B. C. Froehler, *Science* **1993**, *260*, 1510–1513.
- [63] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, *Biocong. Chem.* **1994**, *5*, 3–7.
- [64] A. De Mesmaeker, A. Waldner, J. Lebreton, P. Hoffmann, V. Fritsch, R. M. Wolf, S. M. Freier, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 237–240; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 226–229.
- [65] V. Fritsch, A. De Mesmaeker, A. Waldner, J. Lebreton, M. J. J. Blommers, R. M. Wolf, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 321–335.
- [66] X. Gao, F. K. Brown, P. Jeffs, N. Bischofberger, K.-Y. Lin, A. J. Pipe, S. A. Noble, *Biochemistry* **1992**, *31*, 6228–6236.
- [67] J. M. Veal, F. K. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1873–1880.
- [68] X. Gao, P. W. Jeffs, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 17–34.
- [69] A. Waldner, A. De Mesmaeker, J. Lebreton, V. Fritsch, R. M. Wolf, *Synlett* **1994**, 57–61.
- [70] Y. Cho, F. C. Zhu, B. A. Luxon, D. G. Gorenstein, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1993**, *11*, 685–701.
- [71] M. J. J. Blommers, U. Pieles, A. De Mesmaeker, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4187–4194.
- [72] H. Robinson, K.-E. Jung, C. Switzer, A. H.-J. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 837–838.

- [73] S. C. Brown, S. A. Thomson, J. M. Veal, D. G. Davis, *Science* **1994**, *265*, 777–780.
- [74] M. Leijon, A. Gräslund, P. E. Nielsen, O. Buchardt, B. Nordén, S. M. Kristensen, M. Eriksson, *Biochemistry* **1994**, *33*, 9820–9825.
- [75] L. Betts, J. A. Josey, J. M. Veal, S. R. Jordan, *Science* **1995**, *270*, 1838–1841.
- [76] R. H. Griffey, E. Lesnik, S. Freier, Y. S. Sanghvi, K. Teng, A. Kawasaki, C. Guinossou, P. Wheeler, V. Mohan, P. D. Cook in Lit. [32], S. 212–224.
- [77] B. Honig, A. Nicholls, *Science* **1995**, *268*, 1144–1149, zit. Lit.
- [78] J. K. Strauss, L. J. Maher III, *Science* **1994**, *266*, 1829–1834.
- [79] K. Ezaz-Nikpay, G. L. Verdine, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 235–240.
- [80] S. A. Wolfe, A. E. Ferentz, V. Grantcharova, M. E. A. Churchill, G. L. Verdine, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 213–221.
- [81] J. R. Wyatt, I. Tinoco, Jr. in *The RNA World* (Hrsg.: R. F. Gesteland, J. F. Atkins), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, **1993**, S. 465–496.
- [82] A. Rich, *Gene* **1993**, *195*, 99–109.
- [83] K. Yanagi, G. G. Privé, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* **1991**, *217*, 201–214.
- [84] W. Saenger, W. N. Hunter, O. Kennard, *Nature* **1986**, *324*, 385–388.
- [85] H. M. Berman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, *1*, 423–427.
- [86] J. Doucet, J.-P. Benoit, W. B. T. Cruse, T. Prange, O. Kennard, *Nature* **1989**, *337*, 190–192.
- [87] Z. Shakked, G. Guerstein-Guzikovich, M. Eisenstein, F. Frolow, D. Rabino-vich, *Nature* **1989**, *342*, 456–460.
- [88] S. Jain, M. J. Sundaralingam, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 12780–12784.
- [89] A. Lipanov, M. L. Kopka, M. Kaczor-Grzeskowiak, J. Quintana, R. E. Dickerson, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1373–1389.
- [90] L. Nekludova, C. O. Pabo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 6948–6952.
- [91] O. Kennard, W. N. Hunter, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1280–1304, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1254–1277.
- [92] R. E. Dickerson in *Methods in Enzymology*, Vol. 211 (Hrsg.: D. M. J. Lilley, J. E. Dahlberg), Academic Press, San Diego, **1992**, S. 67–111.
- [93] L. Joshua-Tor, J. L. Sussman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 323–335.
- [94] M. Egli in *Structure Correlation* (Hrsg.: H.-B. Bürgi, J. D. Dunitz), VCH, New York, **1994**, S. 705–749.
- [95] A. Rich in *The Chemical Bond: Structure and Dynamics* (Hrsg.: A. Zewail), Academic Press, New York, **1992**, S. 31–85.
- [96] P. B. Sigler, *Proc. Robert A. Welch Found.* **1993**, *37*, S. 63–76.
- [97] T. A. Steitz, *Structural Studies of Protein-Nucleic Acid Interaction*, Cambridge University Press, Cambridge, **1993**.
- [98] *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 1–66.
- [99] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, 1. Aufl., Springer, New York, **1986**.
- [100] H. M. Berman, W. K. Olson, D. L. Beveridge, J. Westbrook, A. Gelbin, T. Demeny, S.-H. Hsieh, A. R. Srinivasan, B. Schneider, *Biophys. J.* **1992**, *63*, 751–759.
- [101] K. B. Hall, L. W. McLaughlin, *Biochemistry* **1991**, *30*, 10606–10613.
- [102] M. Egli, S. Portmann, D. Tracz, C. Workman, N. Usman, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1995**, *51*, 1065–1070.
- [103] S. Portmann, N. Usman, M. Egli, *Biochemistry* **1995**, *34*, 7569–7575; M. Egli, S. Portmann, N. Usman, *ibid.* **1996**, *35*, 8489–8494.
- [104] M. Egli, N. Usman, S. Zhang, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 534–538.
- [105] M. Egli, N. Usman, A. Rich, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3221–3237.
- [106] P. Lubini, W. Zürcher, M. Egli, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 39–45.
- [107] R. Wing, H. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Nature* **1980**, *287*, 755–758.
- [108] A.-H. Wang, Y.-G. Gao in *Methods*, Vol. 1 (Hrsg.: J. N. Abelson, M. I. Simon), Academic Press, San Diego, **1990**, S. 91–99.
- [109] A. C. Dock-Bregeon, D. Moras in *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins* (Hrsg.: A. Ducruix, R. Giegé), Oxford University Press, Oxford, **1992**, S. 145–174.
- [110] J. Jancarik, S.-H. Kim, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, *24*, 409–411.
- [111] *Hampton Research Crystallization News* **1995**, *5*, Nr. 1.
- [112] J. A. Doudna, C. Grosshans, A. Gooding, C. E. Kundrot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 7829–7833.
- [113] W. G. Scott, J. T. Finch, R. Grenfell, J. Fogg, T. Smith, M. J. Gait, A. Klug, *J. Mol. Biol.* **1995**, *250*, 327–332.
- [114] K. J. Baeyens, J. Jancarik, S. R. Holbrook, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1994**, *50*, 764–767.
- [115] R. V. Gessner, G. J. Quigley, M. Egli, *J. Mol. Biol.* **1994**, *236*, 1154–1168.
- [116] H. R. Drew, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* **1981**, *151*, 535–556.
- [117] M. L. Kopka, A. V. Fratini, H. R. Drew, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* **1983**, *163*, 129–146.
- [118] K. C. Schneider, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 453–455.
- [119] J. Hunziker, H.-R. Roth, M. Böhringer, A. Giger, U. Diedrichsen, M. Göbel, R. Krishnan, B. Jaun, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 259–352.
- [120] R. J. Jones, S. Swaminathan, J. F. Milligan, S. Wadwani, B. C. Froehler, M. D. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9816–9817.
- [121] K.-H. Altmann, R. Kesselring, E. Francotte, G. Rihs, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2331–2334.
- [122] K.-H. Altmann, R. Imwinkelried, R. Kesselring, G. Rihs, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 7625–7628.
- [123] M. Tarköy, M. Bolli, C. Leumann, *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 716–744.
- [124] M. Egli, P. Lubini, M. Bolli, M. Dobler, C. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5855–5856.
- [125] P. Lubini, M. Egli in *Structural Biology: The State of the Art, Proceedings of the Eighth Conversation*, Vol. 2 (Hrsg.: R. H. Sarma, M. H. Sarma), Adenine Press, Schenectady, NY, **1994**, S. 155–175.
- [126] K. Gehring, J.-L. Leroy, M. Guérion, *Nature* **1993**, *363*, 561–565; L. Chen, L. Cai, X. Zhang, A. Rich, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13540–13546; C. H. Kang, I. Berger, C. Lockshin, R. Ratliff, R. Moysis, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11636–11640; J.-L. Leroy, M. Guérion, *Structure* **1995**, *3*, 101–120; I. Berger, C. H. Kang, A. Fredian, R. Ratliff, R. Moysis, A. Rich, *Nature Struct. Biol.* **1995**, *2*, 416–425; C. H. Kang, I. Berger, C. Lockshin, R. Ratliff, R. Moysis, A. Rich, *Proc. Natl. Sci. USA* **1995**, *92*, 3874–3878.
- [127] I. Berger, M. Egli, A. Rich, *Proc. Natl. Sci. USA* **1996**, *93*, im Druck.
- [128] D. M. Crothers, *Science* **1994**, *266*, 1819–1820, zit. Lit.
- [129] Z. Huang, K. C. Schneider, S. A. Benner in *Antisense Nucleotide Analogs* (Hrsg.: S. Agrawal), Humana Press, Totowa, NJ, **1993**, S. 315–353.
- [130] C. Richert, A. L. Roughton, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4518–4531.
- [131] A. L. Roughton, S. Portmann, S. A. Benner, M. Egli, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7249–7250.
- [132] R. O. Day, N. C. Seeman, J. M. Rosenberg, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 849–853.
- [133] J. M. Rosenberg, N. C. Seeman, R. O. Day, A. Rich, *J. Mol. Biol.* **1976**, *104*, 145–167.
- [134] N. P. Johnson, T. Schleich, *Biochemistry* **1974**, *13*, 981–987.
- [135] R. R. Breaker, G. R. Gough, P. T. Gilham, *Biochemistry* **1993**, *32*, 9125–9128.
- [136] S. P. Collingwood, A. D. Baxter, *Synlett* **1995**, 703–705.
- [137] B. Hyrup, C. Richert, T. Schulte-Herbrüggen, S. A. Benner, M. Egli, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 2427–2433.
- [138] Übersichtartikel: S. L. Beauchage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 6123–6194.
- [139] S. Portmann, K.-H. Altmann, N. Reynes, M. Egli, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, eingereicht.
- [140] R. E. Dickerson, H. R. Drew, *J. Mol. Biol.* **1981**, *149*, 761–786.
- [141] H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 2179–2183.
- [142] K.-H. Altmann CIBA AG, persönliche Mitteilung.
- [143] B. S. Sproat, A. I. Lamond, B. Beijer, P. Neuner, U. Ryder, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 3373–3386.
- [144] C. Schmit, M.-O. Bévier, A. De Mesmaeker, K.-H. Altmann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1969–1974.
- [145] T. E. Haran, Z. Shakked, A. H.-J. Wang, A. Rich, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1987**, *5*, 199–217.
- [146] M. Eisenstein, Z. Shakked, *J. Mol. Biol.* **1995**, *248*, 662–678.
- [147] A. M. Kawasaki, M. D. Casper, S. M. Freier, E. A. Lesnik, M. C. Zounes, L. L. Cummings, C. Gonzalez, P. D. Cook, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 831–841.
- [148] C. Mattos, B. Rasmussen, X. Ding, G. A. Petsko, D. Ringe, *Nature Struct. Biol.* **1994**, *1*, 55–58.
- [149] R. Taylor, J. D. Dunitz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [150] S. Wang, E. T. Kool, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4125–4132.
- [151] J. Hall, D. Hüskens, U. Pieles, H. E. Moser, R. Häner, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 185–190, zit. Lit.
- [152] N. Usman, R. Cedergren, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 334–339, zit. Lit.
- [153] N. Usman, D. T. Stinchcomb, *Nucleic Acids Mol. Biol.* **1995**, *10*, 243–264, zit. Lit.
- [154] F. H. Westheimer, *Acc. Chem. Res.* **1968**, *1*, 70–78.
- [155] D. A. Usher, A. H. McHale, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 1149–1153.
- [156] R. S. Brown, J. C. Dervan, A. Klug, *Biochemistry* **1985**, *24*, 4785–4801.
- [157] D. Hüskens, G. Goodall, R. Häner, H. E. Moser, noch unveröffentlichte Ergebnisse.
- [158] H. W. Pley, K. M. Flaherty, D. B. McKay, *Nature* **1994**, *372*, 68–74.
- [159] A. H.-J. Wang, S. Fujii, J. H. van Boom, G. A. van der Marel, S. A. A. van Boeckel, A. Rich, *Nature* **1982**, *299*, 601–604.
- [160] S. Portmann, S. Grimm, C. Workman, N. Usman, M. Egli, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 173–184.
- [161] H.-N. Wu, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1987**, *26*, 8221–8227.
- [162] F. Michel, M. Hanna, R. Green, D. P. Bartel, J. W. Szostak, *Nature* **1989**, *342*, 391–395.
- [163] A. Jacquier, *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*, 351–354.
- [164] K. Valegård, J. B. Murray, P. G. Stockley, N. J. Stonehouse, L. Liljas, *Nature* **1994**, *371*, 623–626.
- [165] C. C. Query, M. J. Moore, P. A. Sharp, *Genes Dev.* **1994**, *8*, 587–597.
- [166] K.-H. Altmann, N. M. Dean, D. Fabbro, S. M. Freier, T. Geiger, R. Häner, D. Hüskens, P. Martin, B. P. Monia, M. Müller, F. Natt, P. Nicklin, J. Phillips, U. Pieler, H. Sasmor, H. E. Moser, *Chimia* **1996**, *50*, 168–176.
- [167] C. Moulds, J. G. Lewis, B. C. Fröhler, D. Grant, T. Huang, J. F. Milligan, M. D. Matteucci, R. W. Wagner, *Biochemistry* **1995**, *34*, 5044–5053.