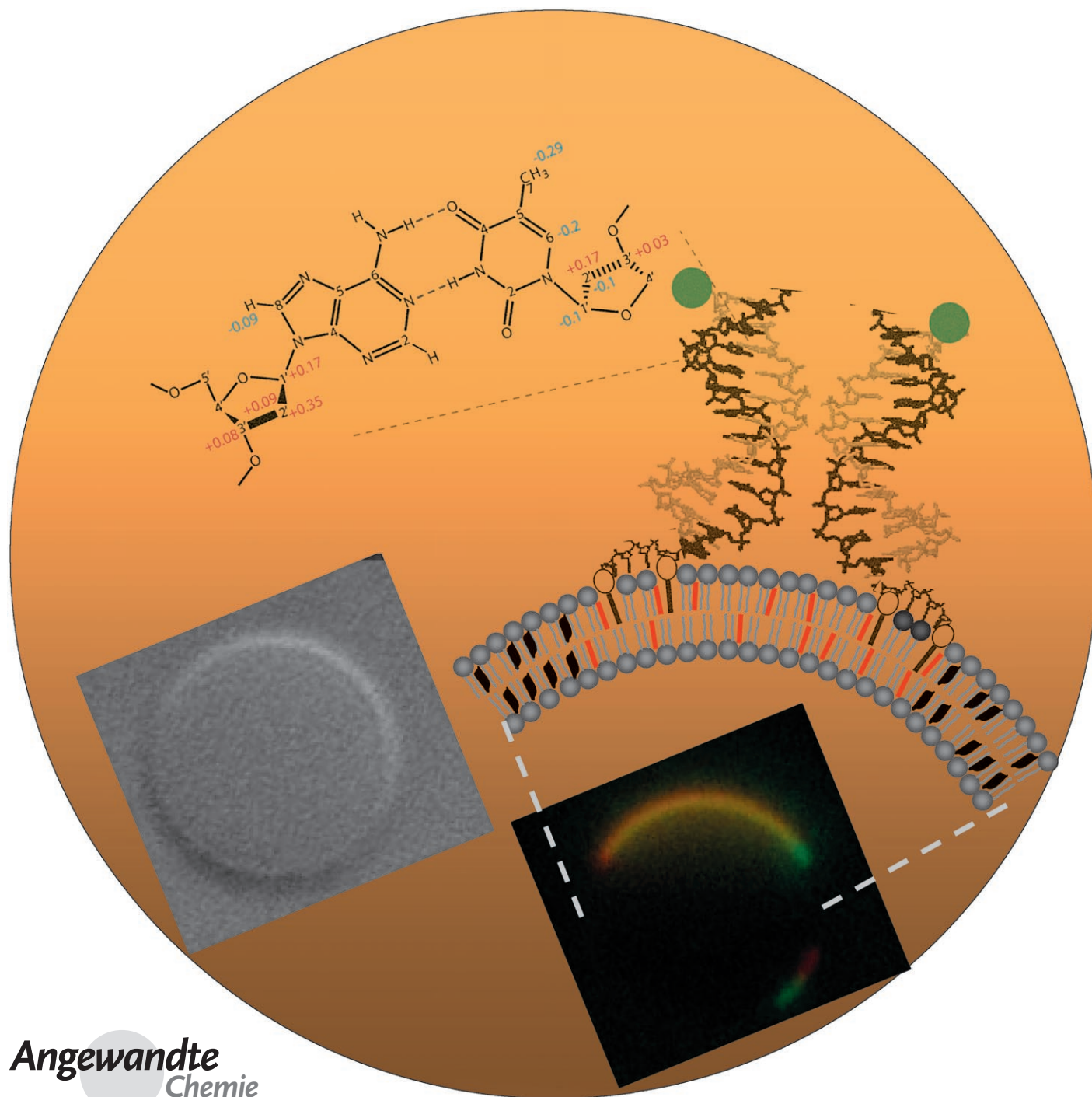


Lipidverankerte Oligonucleotide zur Bildung stabiler Doppelhelices in Membrandomänen**

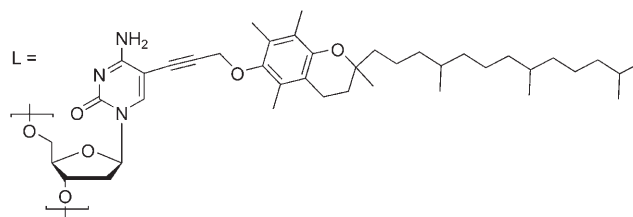
Anke Kurz, Andreas Bunge, Anne-Katrin Windeck, Maximilian Rost, Wolfgang Flasche, Anna Arbuzova, Denise Strohbach, Sabine Müller, Jürgen Liebscher,* Daniel Huster* und Andreas Herrmann*



Angewandte
Chemie

Lipidverankerte RNA- und DNA-Oligonucleotide haben sich als nützliche chimäre Moleküle für Anwendungen in der Nanobiotechnologie und Zellbiologie sowie für therapeutische Ansätze in der Medizin erwiesen.^[1,2] Beispielsweise wurden lipophile Oligonucleotide synthetisiert, um das Aufnahmevermögen von Zellen für einzelsträngige Antisense-DNA und Interferenz-RNA zu erhöhen.^[1,3] Kürzlich wurde darüber berichtet, wie mithilfe kurzer interferierender RNA-Moleküle (siRNA), die mit einem Cholesterol-Anker verknüpft waren, die Expression des endogenen Apolipoproteins B in Mäusen verringert werden konnte.^[4] Für vielseitige Anwendungen müssen die lipidverankerten Oligonucleotide charakteristische Eigenschaften aufweisen. Dazu gehören eine einfache und flexible Synthese, eine effiziente und stabile Membranassoziation und die molekulare Erkennung komplementärer DNA-Stränge. Für einige Anwendungen kann eine laterale Organisation der Oligonucleotide an der Membranoberfläche von Nutzen sein. Funktionelle Kompartimente auf der Membranoberfläche lassen sich erzeugen, indem durch die Wahl geeigneter Lipidanker die lipophilen Oligonucleotide in Lipiddomänen^[5] angereichert werden. Hier beschreiben wir die Synthese und Anwendung lipidmodifizierter einzelsträngiger DNA-Moleküle, für die der stabile Einbau in Membranen, die Lokalisation an der Membranoberfläche, die Bildung von Watson-Crick-Basenpaarungen mit komplementären DNA-Strängen und die Einlagerung in flüssig-ungeordneten Membrandomänen nachgewiesen werden konnte.

Das Oligonucleotid LT23mer ist ein 23-mer, das aus 21 Thymidineinheiten und 2 lipophilen Nucleotiden L in Position 1 und 8 besteht, wobei als lipophiler Anker eine α -Tocopherol-Einheit gewählt wurde (Schema 1). Das LT23mer



5' LTT TTT TLT TTT TTT TTT TTT TT 3' LT23mer

Schema 1. Struktur des lipophilen Nucleosids L, das als Monomer bei der Synthese des lipidmodifizierten Oligonucleotids verwendet wurde. Darunter ist die Sequenz des LT23mer dargestellt.

wurde nach der Phosphoramidit-Strategie mithilfe eines DNA-Synthesizers hergestellt (Hintergrundinformationen). Das lipophile Tocopherylpropinylcytidin wurde durch Sonogashira-Kupplung von 5-Iodcytidin mit racemischem *O*-Propargyltocopherol nach einer kürzlich von uns beschriebenen Methode synthetisiert^[6] und in das 5'-DMTr-geschützte 3'-Diisopropylaminocyanethylphosphoramidit mit konventionellen Methoden überführt. Mit diesem Baustein ist es nach der Phosphoramidit-Methode prinzipiell möglich, das lipophile Nucleotid flexibel an einer beliebigen Stelle der Oligonucleotidsequenz zu positionieren.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Membranaffinität und das Bindungsvermögen des LT23mer für komplementäre A20mere DNA-Stränge zu untersuchen. Es wurden unilamellare Riesenvesikeln (GUVs) hergestellt, die 1 Mol-% LT23mer und 0.5 Mol-% des fluoreszenzmarkierten Lipidanalogs *N*-NBD-PE enthielten (siehe *Experimentelles*). Danach wurden die am 3'-Ende (3'-Rh-A20mer) oder am 5'-Ende (5'-Rh-A20mer) mit Rhodamin (Rh) markierten Adenosin-20mere zugegeben. Die Bindung dieser komplementären Stränge an das GUV-assoziierte LT23mer konnte durch die Rh-Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abbildung 1, nur für das 5'-Rh-A20mer gezeigt). Die Fluoreszenz ist auf der gesamten Membranoberfläche homogen, woraus man auf eine gleich-

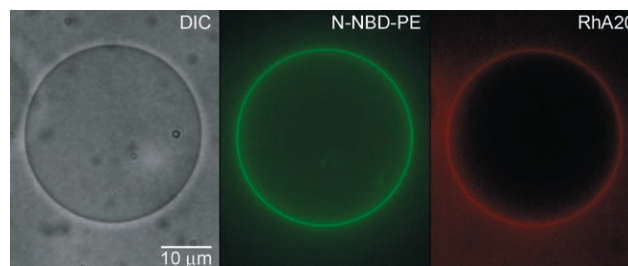


Abbildung 1. Molekulare Erkennung des Rh-A20mer durch das LT23mer, das in mit *N*-NBD-PE fluoreszenzmarkierten (0.5 Mol-%) POPC-GUVs eingebaut wurde (etwa 1 Mol-%, bei Raumtemperatur). Links: Differential-Interferenzkontrast (DIC), Mitte: Fluoreszenz des *N*-NBD-PE, rechts: Fluoreszenz des 5'-Rh-A20mer.

[*] Dr. A. Kurz,^[†] Dr. A.-K. Windeck, M. Rost, Dr. A. Arbuzova, Prof. Dr. A. Herrmann
Institut für Biologie/Biophysik
Humboldt Universität zu Berlin
Invalidenstraße 42, 10115 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-2093-8585
E-mail: andreas.herrmann@rz.hu-berlin.de
Dipl.-Phys. A. Bunge,^[†] Priv.-Doz. Dr. D. Huster
Nachwuchsgruppe „Strukturbiologie von Membranproteinen“
Institut für Biotechnologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Kurt-Mothes-Straße 3, 06120 Halle (Deutschland)
Fax: (+49) 345-55-27013
E-mail: daniel.huster@biochemtech.uni-halle.de
Dr. W. Flasche, Prof. Dr. J. Liebscher
Institut für Chemie
Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-2093-7552
E-mail: liebscher@chemie.hu-berlin.de
Dipl.-Chem. D. Strohbach, Prof. Dr. S. Müller
Institut für Biochemie
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Soldmannstraße 16, 17487 Greifswald (Deutschland)

[†] A.K. und A.B. trugen zu gleichen Anteilen zu dieser Studie bei.

[**] Diese Arbeit wurde durch das BMBF (Projekt-Nr. 0312018) gefördert. Wir danken Charlott Peters für Hilfe bei der Probenpräparation.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

mäßige Verteilung des LT23mer in der Membran schließen kann. Eine Fluoreszenz von Rh-markiertem T20mer mit lipophilen oligonucleotidbesetzten GUVs konnte nicht beobachtet werden. In Abwesenheit von LT23mer konnte keine Markierung der GUVs mit fluoreszierendem A20mer nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Zum weiteren Nachweis der Bindung der komplementären DNA-Stränge an membranassoziiertes LT23mer wurde der resonante Fluoreszenzenergietransfer (FRET) untersucht. Große unilamellare Vesikeln (LUVs) wurden verwendet, die entweder aus POPC und LT23mer oder nur aus POPC (Kontrolle) hergestellt wurden und *N*-NBD-PE (0.5 Mol-%) enthielten. Das an die Lipidkopfgruppe gebundene NBD wirkt als Donor für den FRET. Die LUVs wurden mit 3'-Rh-A20mer inkubiert, wobei Rhodamin als Fluoreszenz-Acceptor fungierte. Ein starker FRET wurde beobachtet, wenn die mit LT23mer beladenen LUVs mit 3'-Rh-A20mer inkubiert wurden (Abbildung 2a). Kein FRET wurde dagegen nach der Inkubation der Kontroll-LUVs beobachtet (Abbildung 2b). Die Bindung des 3'-Rh-A20mer an das membranassoziierte LT23mer erfolgt schnell mit einer Halbwertszeit von ca. 20 s (Abbildung 2c), wobei die Anlagerung reversibel ist. Nach Zugabe von nichtmarkiertem T20mer im zehnfachen Überschuss wurde eine Verringerung des FRET durch die Konkurrenz von T20mer und LT23mer um 3'-Rh-A20mer beobachtet (Abbildung 2c).

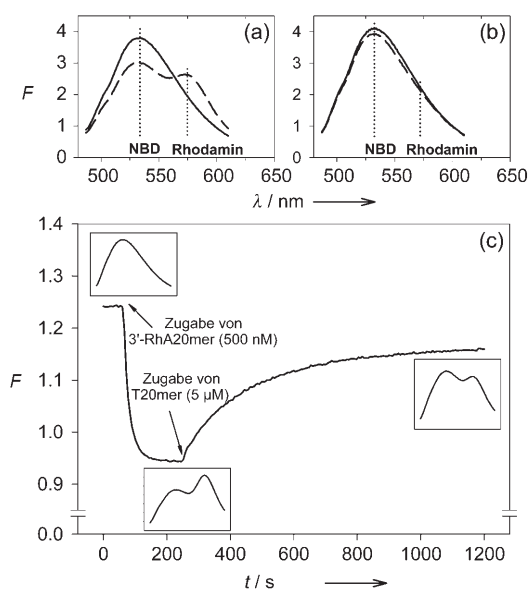


Abbildung 2. Fluoreszenz der mit *N*-NBD-PE markierten POPC-LUVs mit (a) oder ohne LT23mer (b) nach Inkubation in Abwesenheit (—) oder Gegenwart (----) von 3'-Rh-A20mer bei Raumtemperatur. Ein ausgeprägter FRET wird beobachtet, wenn 3'-Rh-A20mer zu LUV-assoziiertem LT23mer gegeben wird (LT23mer/3'-Rh-A20mer = 1:1). Die vertikal gepunkteten Linien markieren die Fluoreszenzmaxima von NBD und Rhodamin. c) Kinetik der Bindung von 3'-Rh-A20mer (500 nM) an LUV-assoziiertes LT23mer, gemessen durch die Abnahme der NBD-Fluoreszenz infolge des FRET (Anregung bei 460 nm, Emission bei 532 nm). Nach 280 s wurde nichtmarkiertes T20mer (5 μ M) zugegeben. Für drei ausgewählte Zeiten werden die Fluoreszenzspektren gezeigt, die die Abwesenheit, Zunahme und Abnahme des FRET illustrieren.

Die Struktur des membranassoziierten Komplexes aus LT23mer und A20mer wurde mit hochauflösender NMR-Spektroskopie untersucht. Als Kontrolle wurden stöchiometrische Mischungen aus A20mer und T20mer verwendet. Die Ausbildung der Basenpaarung und Basenstapelung führt zu einer charakteristischen Verschiebung der Signale im Spektrum.^[7] Aus ¹H-NOESY-Spektren extrahierte Schnitte sind in der Abbildung 3 gezeigt. Im Fall der membranassoziierten

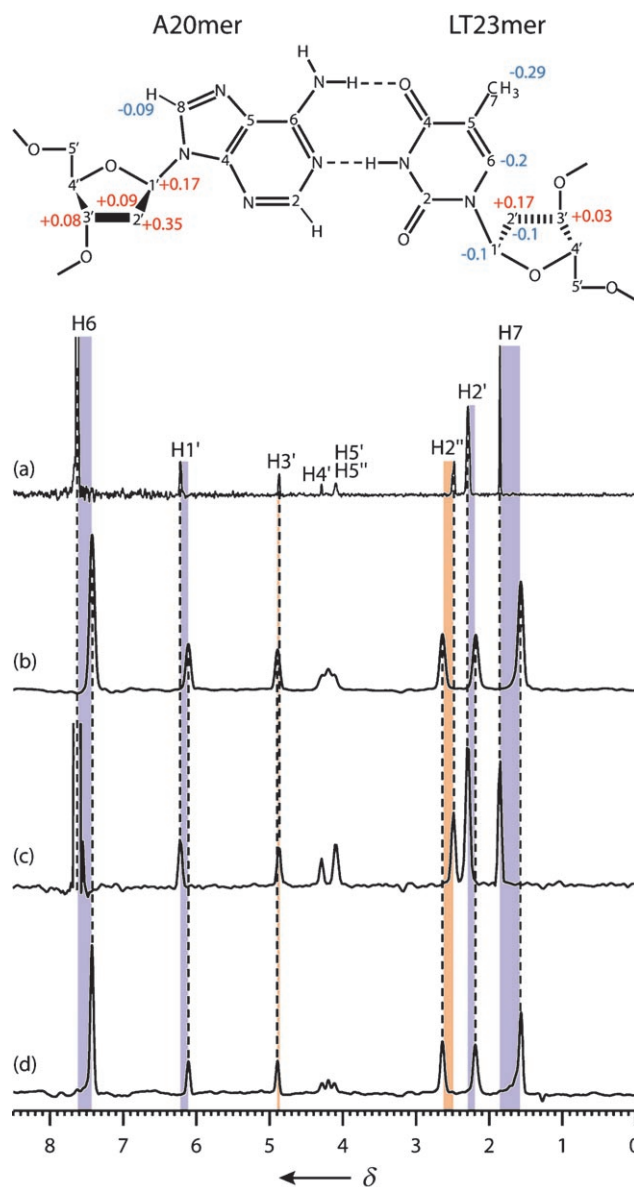


Abbildung 3. Schnitte aus ¹H-NOESY-NMR-Spektren freier und membranassoziierten Oligonucleotide in Abwesenheit oder Gegenwart komplementärer Stränge. a) T20mer in Puffer; b) A20mer und T20mer (1:1) in Puffer; c) LT23mer, assoziiert mit POPC-Membranen; d) LT23mer, assoziiert mit POPC-Membranen in Gegenwart von A20mer. Die Linien und Farben zeigen die Veränderungen der chemischen Verschiebungen an (blau: Verschiebungen zu höherem, orange: zu niedrigerem Magnetfeld). Eine Übersicht über die Veränderungen der chemischen Verschiebungen für A und T ist oben dargestellt. Kleine Veränderungen der chemischen Verschiebungen der Signale H5'/H5'' sind möglicherweise auf Konformationsänderungen der Furanose durch Bildung des Doppelstrangs zurückzuführen.

Oligonucleotide enthalten die 1D-Spektren intensive Lipid-signale. Im Unterschied dazu zeigen die Schnitte aus den NOESY-Spektren nur Signale der Basen und Zucker. Abbildung 3a zeigt das ^1H -NMR-Spektrum von T20mer. Nach Zugabe des komplementären Strangs verschieben sich die Resonanzlinien in spezifischer Weise (Abbildung 3b). An POPC-LUVs gebundenes LT23mer (Abbildung 3c) zeigt exakt identische ^1H -chemische Verschiebungen wie isoliertes T20mer (vgl. Abbildung 3a). Nach Zugabe des komplementären A20mer weisen die Resonanzlinien relative Verschiebungen auf, die identisch zu den Signalen der A20mer-T20mer-Doppelhelix sind (Abbildung 3d). Die Änderungen der chemischen Verschiebungen der Signale von A20mer nach Bindung an T20mer oder LT23mer sind ebenfalls identisch (Spektrum nicht gezeigt). Dies legt die Vermutung nahe, dass sehr ähnliche Strukturen entstehen und dass weder die Lipidverankerung noch die Membrannähe bei der Bildung der DNA-Doppelhelix durch Watson-Crick-Basenpaarungen stören.

Es ist bekannt, dass GUVs, die aus einem Gemisch von POPC, Cholesterol und Sphingomyelin (1:1:1) zusammengesetzt sind, flüssig-ungeordnete und flüssig-geordnete Domänen bilden.^[8] Unter Verwendung fluoreszenter Lipidanaloga, die sich bevorzugt in einer der beiden Domänen anreichern, kann diese Phasenseparation mit Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Das lipophile fluoreszente Merocyanin 540 interagiert bevorzugt mit der flüssig-ungeordneten Domäne.^[9] Dieses konnte mit dem aus der Literatur als ein weiterer Domänenmarker für diese Phase bekannten^[8b] *N*-NBD-PE verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). GUVs mit der oben genannten Membranzusammensetzung wurden mit LT23mer (≈ 1 Mol-%) und Merocyanin 540 versetzt. Danach erfolgte die Zugabe des komplementären Oligonucleotids (5'FITC-A20mer). Im Vergleich zur homogenen Verteilung im reinen POPC-GUV-System reichern sich die LT23mer-5'FITC-A20mer-Komplexe bevorzugt in der flüssig-ungeordneten Domäne an, was aus der Überlagerung der Fluoreszenz des Merocyanins 540 und der des Gegenstranges nachgewiesen wurde (Abbildung 4). Die bevorzugte Wechselwirkung mit dieser Domäne kann durch den sperrigen α -Tocopherol-Anker erklärt werden, der sich leichter in die flüssig-ungeordnete Phase einfügt. Die bevorzugte Einlagerung von isoprenylierten Proteinen in flüssig-ungeordnete Domänen wurde bereits beschrieben.^[10]

In dieser Arbeit wurde eine einfache Strategie zur Synthese größerer Mengen lipophiler Oligonucleotide mit variabler Primärstruktur und Länge beschrieben. Diese Moleküle bauen sich spontan in Lipidmembranen ein, wobei die einsträngige DNA der wässrigen Phase zugewandt ist. Komplementäre Stränge werden unter Bildung von Doppelhelices durch Watson-Crick-Basenpaarung gebunden. Auf diesem Wege können Moleküle, Vesikeln, Wirkstoffe oder biologisch aktive RNA an Oberflächen von Membranen oder Zellen spezifisch angelagert und immobilisiert werden. Eine sehr wichtige Erkenntnis ist der Einbau der lipophilen Oligonucleotide in Lipiddomänen. Auf diesem Weg können verschiedene Membrandomänen mit doppelsträngiger DNA spezifisch funktionalisiert werden. Ausgehend von der Tatsache, dass Lipiddomänen eine wichtige Rolle bei der Endozytose^[11]

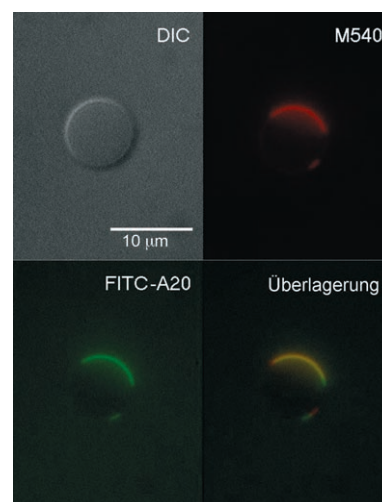


Abbildung 4. LT23mer lagert sich bevorzugt in flüssig-ungeordnete Membrandomänen ein. Die GUVs, die aus einer Mischung von POPC/Sphingomyelin/Cholesterol (1:1:1; molares Verhältnis) und 1 Mol-% LT23mer zusammengesetzt waren, wurden mit 5'FITC-A20mer in KCl-Puffer (50 mM) bei pH 8.0 und Raumtemperatur inkubiert. Die LT23mer-5'FITC-A20mer-Komplexe reichern sich bevorzugt in der flüssig-ungeordneten Phase an. Der Nachweis dafür erfolgte mit Merocyanin 540, das sich bevorzugt in dieser Phase einlagert.

spielen, kann mithilfe der Affinität zu solchen Domänen die Aufnahme in die Zelle erleichtert werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mithilfe der lipophilen Oligonucleotide Nanostrukturen aufgebaut werden können und neuartige zellbiologische oder medizinische Anwendungen möglich sind.

Experimentelles

1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerophosphocholin (POPC), Sphingomyelin (SM) und das fluoreszierende Lipid *N*-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamin (*N*-NBD-PE) wurden von Avanti Polar Lipids (Birmingham, USA) bezogen. Cholesterol und Merocyanin 540 (M540) wurden von Sigma (Deisenhofen) geliefert. DNA-Oligonucleotide mit und ohne Fluorophor (Rhodamin, Fluoresceinisothiocyanat (FITC)) wurden von BioTez (Berlin) synthetisiert. Alle Lösungen wurden mit 10 mM HEPES (pH 8) gepuffert. Die Präparation von unilamellaren Vesikeln wurde in einer Saccharoselösung durchgeführt (80–250 mM). Zum Waschen und Verdünnen der Vesikeldispersionen und zur Präparation von multilamellaren Vesikeln wurden gepufferte KCl-, KCl-Glucose- oder Glucoselösungen gleicher Osmolarität verwendet.

Zur Präparation der LUVs wurde das Lipidgemisch in Chloroform gelöst, ein dünner homogener Film mithilfe eines Rotationsverdampfers hergestellt und anschließend unter manuellem Schütteln des Glasgefäßes resuspendiert. LUVs wurden nach fünf Gefrier-Tau-Schritten durch Extrusion durch Polycarbonatfilter (Porendurchmesser 100 nm, Nucleopore, Tübingen) mit einem Extruder (Lipex Biomembranes, Vancouver) hergestellt.^[12] Zur Inkorporierung in die Membran wurde LT25mer zu den LUVs gegeben und die Suspension nach weiteren fünf Gefrier-Tau-Schritten ultrazentrifugiert (120 000 \times g). Ungebundenes LT25mer und möglicherweise entstandene Micellen wurden mit dem Überstand entfernt.

GUVs wurden bei Raumtemperatur mit der Elektroformations-technik in einer Kammer aus mit Indiumzinnoxid (ITO) beschichte-

ten Glasscheiben hergestellt.^[13] Die Lipide wurden in Chloroform gelöst (0.25 mg Lipid mL⁻¹), und 70 µL der Lösung wurde in kleinen Tropfen auf jede Scheibe aufgetragen. Das Lösungsmittel wurde in einem Exsikkator (10 mbar) bei Raumtemperatur innerhalb von 60 min entfernt. Danach wurde die Kammer geschlossen und mit Siliconpaste versiegelt. Die Saccharoselösung (250 mM in 10 mM HEPES, 0.02 % NaN₃) wurde mit einer Spritze durch einen Mikroporenfilter injiziert. Unmittelbar danach wurde die versiegelte Kammer an den Generator angeschlossen. LT23mer wurde zur Saccharoselösung gegeben, damit es sich bei der GUV-Präparation in die Membran einbauen konnte. Die angelegte Spannung wurde alle 6 min schrittweise von 20 mV auf 1.1 V erhöht, wobei in der ersten Minute die Frequenz kontinuierlich von 4 auf 10 Hz erhöht wurde. Das Wechselfeld wurde 3 bis 12 Stunden appliziert. Zum Schluss wurde die Spannung auf 1.3 V erhöht und die Frequenz auf 4 Hz erniedrigt. Die Kammer wurde dann bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.^[13]

Die Fluoreszenzspektren und -kinetiken wurden mit einem Aminco-Bowman-Spektrometer Serie 2 (SLM-Aminco, Rochester, USA) aufgenommen. Die N-NBD-PE wurden bei 460 nm angeregt (Spaltbreite 4 nm) und die Fluoreszenzspektren zwischen 470 und 610 nm mit einer zeitlichen Auflösung von 1 ns⁻¹ aufgenommen, wobei für Messungen der Kinetik die Emissionswellenlänge auf 532 nm gesetzt wurde (Spaltbreite 4 nm). Die GUVs wurden mit einem inversen Olympus-IX81-Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg) untersucht, das mit einer gekühlten CCD-Kamera ausgerüstet ist (SPOT slider, Visitron Systems, Puchheim). Die Bilder wurden mit einem 100×-Plan-APO-Ölimmersionsobjektiv mit einer passenden Differentialinterferenzkontrastoptik und Fluoreszenzfiltern aufgenommen: BP470-490, FT505 und BP510-550 (NBD, FITC); BP530-550, FT580 und LP590 (Rhodamin, Merocyanin 540).

Für die NMR-Experimente wurden Aliquote von LT23mer zu extrudierten 100 nm POPC-Vesikellösungen (20 mM in D₂O-Puffer (10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.0)) bei einem molaren Verhältnis von LT23mer zu POPC wie 1:100 titriert. Die NMR-Experimente wurden an Bruker-DRX600- (600.13 MHz) und Avance-700-NMR-Spektrometern (700.13 MHz) bei 30 °C durchgeführt. Die Spektren wurden bei einer spektralen Weite von 7 kHz und einer 90°-Pulslänge von 10.3 µs aufgenommen. Für die phasenempfindlichen NOESY-Experimente (Mischzeit 300 ms) wurden 480 komplexe Datenpunkte in der *t*₁-Dimension mit 32 bzw. 64 Scans pro Inkrement bei einem Relaxationsdelay von 4 s aufgenommen. Aliquote von A20mer wurden im äquimolaren Verhältnis zum LT23mer zugegeben.

Eingegangen am 2. März 2006

Stichwörter: Molekulare Erkennung · Nanostrukturen · NMR-Spektroskopie · Nucleinsäuren · Resonanter Fluoreszenzenergietransfer (FRET)

- [4] J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R. K. Pandey, T. Racie, K. G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Koteliansky, S. Limmer, M. Manoharan, H. P. Vornlocher, *Nature* **2004**, 432, 173–178.
- [5] a) P. F. F. Almeida, A. Pokorny, A. Hinderliter, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1720, 1–13; b) M. Edidin, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, 32, 257–283; c) R. G. Anderson, K. Jacobson, *Science* **2002**, 296, 1821–1825.
- [6] W. Flasche, C. Cismas, A. Herrmann, J. Liebscher, *Synthesis* **2004**, 2335–2341.
- [7] a) S. R. LaPlante, E. A. Boudreau, N. Zanatta, G. C. Levy, P. N. Borer, J. Ashcroft, D. Cowburn, *Biochemistry* **1988**, 27, 7902–7909; b) R. F. Epand, B. G. Sayer, R. M. Epand, *FEBS J.* **2005**, 272, 1792–1803.
- [8] a) J. Korlach, P. Schwille, W. W. Webb, G. W. Feigensohn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 8461–8466; b) C. Dietrich, L. A. Bagatolli, Z. N. Volovyk, N. L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, E. Gratton, *Biophys. J.* **2001**, 80, 1417–1428; c) K. Bacia, P. Schwille, T. Kurzchalia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 3272–3277; d) T. Baumgart, S. T. Weiss, W. W. Webb, *Nature* **2003**, 425, 821–824; e) Z. Orynbayeva, S. Kolusheva, E. Livneh, A. Lichtenshtein, I. Nathan, R. Jelinek, *Angew. Chem.* **2005**, 44, 1092–1096; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1092–1096; f) I. O. Benítez, D. R. Talham, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2814–2815.
- [9] P. Williamson, K. Mattocks, R. A. Schlegel, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 732, 387–393.
- [10] C. Nicolini, J. Baranski, S. Schlummer, J. Palomo, M. Lumbierres-Burgues, M. Kahms, J. Kuhlmann, S. Sanchez, E. Gratton, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 192–201.
- [11] R. G. Parton, A. A. Richards, *Traffic* **2003**, 4, 724–738.
- [12] M. J. Hope, M. B. Bally, G. Webb, P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 812, 55–65.
- [13] a) M. Angelova, S. Soleau, P. Meleard, J. F. Faucon, P. Bothorel, *Prog. Lipid Res.* **1992**, 89, 127–131; b) L. Mathivet, S. Cribier, P. F. Devaux, *Biophys. J.* **1996**, 70, 1112–1121.

- [1] a) A. S. Boutorin, L. V. Gus'kova, E. M. Ivanova, N. D. Kobetz, V. F. Zarytova, A. S. Rytte, L. V. Yurchenko, V. V. Vlassov, *FEBS Lett.* **1989**, 254, 129–132; b) R. G. Shea, J. C. Marsters, N. Bischofberger, *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 3777–3783.
- [2] a) C. MacKellar, D. Graham, D. W. Will, S. Burgess, T. Brown, *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 3411–3417; b) J. M. Tomkins, K. J. Barnes, A. J. Blaker, W. J. Watkins, C. Abell, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 691–694; c) S. Bonaccio, P. Walde, P. L. Luisi, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 6661–6663.
- [3] a) A. M. Krieg, J. Tonkinson, S. Matson, Q. Zhao, M. Saxon, L. M. Zhang, U. Bhanja, L. Yakubov, C. A. Stein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 1048–1052; b) C. Lorenz, P. Hadwiger, M. John, H. P. Vornlocher, C. Unverzagt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 4975–4977.