

# Trójniciowa forma kwasów nukleinowych

Marek Kwinkowski  
Centrum Badań Molekularnych  
i Makromolekularnych PAN  
Łódź

## 1. Wprowadzenie

Powszechnie znana podwójna spirala Watsona i Cricka jest obecnie sztandarowym symbolem biotechnologii i biologii molekularnej. Jednakże, choć najczęściej występująca, podwójna spirala nie jest jedyną znaną formą strukturalną przyjmowaną przez kwasy nukleinowe. RNA, a zwłaszcza DNA, cechuje polimorfizm strukturalny, mający istotne znaczenie w procesach biologicznych. Jedną z nieklasycznych form — struktura trójniciowa DNA — stała się ostatnio przedmiotem szerokiego zainteresowania jako potencjalny układ służący do hamowania ekspresji genów wirusowych lub onkogenów już na poziomie DNA. Jest to niejako naturalne przedłużenie strategii antysensowej, w której przedmiotem ataku jest mRNA kodująca niepożądane białka. Dlatego dla takich zastosowań formy trypleksu (*triplex*) używa się zaproponowanego przez C. Helene'a określenia terapia antygenowa (*anti-gene therapy*) (1 - 3).

Możliwość występowania kwasów nukleinowych w postaci trójniciowej spirali zbudowanej z polinukleotydów została wykryta dość wcześnie. Już od połowy lat sześćdziesiątych wiadomo było, że kompleksy tworzone przez polinukleotydy poli(A) i poli(dA) z poli(U) lub poli(T) mają strukturę trójniciową (4 - 8). W dalszych badaniach wyjaśniono mechanizm powstawania trypleksów i układ wiązań wodorowych występujących między zasadami, wykazano istnienie wielu różniących się orientacją i sekwencją rodzajów trypleksu, a także ujawniono możliwość występowania trypleksów międzycząsteczkowych i wewnątrzcząsteczkowych takich jak struktura H-DNA (2). Stwierdzono ponadto, że trypleks powoduje zahamowanie zdolności wiązania się białek do DNA w swoim obszarze, że istnieje wysoka specyficzność sekwencyjna wiązania się trzeciej nici do DNA, a także, iż stabilność termodynamiczna długich trypleksów jest wystarczająca do tego, aby mogły one istnieć w warunkach fizjologicznych stężeń soli oraz temperatur. Obecnie próbuje się zahamować ekspresję białek za pomocą syntetycznych oligonukleotydów wiążących się do dwuniciowego DNA (1,3).

Opisane niedawno *Peptide Nucleic Acids* (PNA) — syntetyczne analogi kwasów nukleinowych, zdolne do wiązania się do dwuniciowego DNA w sposób przypominający nieco tworzenie trypleksu — są również rozważane jako potencjalny czynnik aktywny w terapii antygenowej (8 – 11).

## 2. Struktura trójniciowych form kwasów nukleinowych

Trójniciowe formy DNA powstają jedynie w rejonach o regularnej sekwencji oligopurynowo-oligopirymidynowej, tzn. takiej w której jedna nić składa się wyłącznie z zasad purynowych, a druga — komplementarna — z zasad pirymidynowych. Struktura dwuniciowego DNA w takim rejonie cechuje się m.in. zwiększeniem rozmiaru dużej bruzdy. Dzięki temu powstaje możliwość wbudowania się trzeciej nici w dużą bruzdę i wytworzenia wiązań wodorowych pomiędzy zasadami trzeciej nici i zasadami purynowymi. Są one tworzone przy udziale grup: iminowej N7 i egzoaminowej N6 (w adeninie) albo iminowej N7 i karbonylowej O6 (w guaninie), pochodzących z zasad należących do nici purynowej. Wiązania takie określa się nazwą wiązań Hoogstena. Warunkiem wytworzenia się takich wiązań jest ponadto prawidłowe dopasowanie grup stanowiących akceptory i donory protonów wiązania wodorowego. Zazwyczaj w wiązaniu Hoogstena w strukturze trójniciowej grupa N7 (niezależnie od rodzaju zasady purynowej) jest akceptorem jednego protonu, grupa N6 adeniny jest donorem (dwóch protonów — jednego dla wiązania Watsona-Cricka i drugiego dla wiązania Hoogstena), zaś grupa O6 guaniny — akceptorem (analogicznie dwóch protonów). Trzecia nić tworzy wiązania wodorowe z tymi atomami przez atomy normalnie uczestniczące w wiązaniach Watsona-Cricka. Zazwyczaj dla występujących w komórce nukleozydów układ donorów i akceptorów wiązania wodorowego jest następujący w:

- adenozynie N6 — donor, N5 — akceptor;
- guanozynie O6 — akceptor, N5 — donor, N4 — donor;
- cytozynie N3 — akceptor, N4 — donor;
- cytozynie uprotonowanej (w obniżonym pH) N3 i N4 — donory;
- tymidynie N3 — donor, O4 — akceptor;
- inozynie N5 — donor, O6 — akceptor.

Istotne znaczenie ma orientacja trzeciej nici względem dupleksu. Możliwe są dwa rodzaje orientacji: równoległa i antyrównoległa do nici purynowej. Powstające w takich układach wiązania hoogstenowskie określa się jako normalne dla sytuacji, w której trzecia nić jest równoległa do nici purynowej, lub odwrócone dla trzeciej nici antyrównoległej względem nici purynowej. Dodatkowym wymogiem tworzenia się struktury trójniciowej jest prawidłowe dopasowanie rozmiarów zasad (izomorfizm). Problem ten jest istotny w przypadku, gdy trzecia nić struktury musi zawierać różne zasady. Warunki minimalnej energii wiązań Hoogstena tworzonych w odmiennych układach przez różne zasady powodują, że w trypletach składających się na strukturę trójniciową położenie atomu węgla C<sub>1</sub>, trzeciego nukleotydu jest różne w poszczególnych

trypletach. W tym sensie izomorficzne (tzn. takie w których atom C1' jest w takim samym położeniu) są jedynie cytozyny i tyminy normalnego wiązania Hoogstena. W odwrotnym wiązaniu Hoogstena żadne zasady nie są izomorficzne między sobą (1).

Ze względu na podane ograniczenia utworzenie stabilnego trypleksu wymaga określonej sekwencji nukleotyduowej i warunków środowiska. Dlatego stosowane najczęściej typy trypleksów należą do jednego z dwóch rodzajów:

Typ  $Py \times Pu \cdot Py$  — złożony z oligopurynowo-oligopirymidynowego dupleksu połączonego wiązaniami Watsona-Cricka (0), do którego dołączona jest wiązaniem hoogstenowskimi (x) trzecia nić oligopirymidynowa. Zazwyczaj trzecia nić w tym układzie jest równoległa do nici purynowej (normalne wiązanie Hoogstena). Obecność cytozyn w trzeciej nici powoduje, że stabilność takiego układu zależy od pH i wzrasta wraz z jego obniżaniem (tzn. ze wzrostem poziomu uprotonowania cytozyn w trzeciej nici). Wynika to z konieczności wprowadzenia dodatkowego, niezbędnego do wytworzenia wiązania hoogstenowskiego, protonu w grupie iminowej N3 cytozyny (1,3). Stabilność takiego trypleksu można znacząco zwiększyć zastępując w trzeciej nici cytozynę przez 5-metylocytozynę (12).

Typ  $Pu \times Pu \cdot Py$  — złożony z oligopurynowo-oligopirymidynowego dupleksu połączonego wiązaniami Watsona-Cricka, do którego dołączona jest odwróconymi wiązaniami hoogstenowskimi trzecia nić oligopurynowa (nić ta jest antyrównoległa do nici purynowej dupleksu). Układy tego typu są stabilne w fizjologicznym pH, zaś obecność jonów  $Mg^{+2}$  ją zwiększa (13 - 16).

Stabilność form trójniciowych DNA zależy od sekwencji rejonu dwuniciowego, do którego wiąże się trzecia nić, rodzaju tworzonej struktury oraz warunków środowiskowych (temperatura, pH, siła jonowa, itp.), (1,3,12 - 13,17 - 21). Najważniejszym wymaganiem jest oligopurynowo-oligopirymidynowa sekwencja docelowego fragmentu DNA. Dopuszczalne są jedynie pojedyncze, punktowe odchylenia od tego wymogu. Istotne znaczenie ma również sposób konstruowania sekwencji trzeciej nici. W fizjologicznych warunkach pH i siły jonowej znacznie bardziej stabilne są trypleksy typu  $Pu \times Pu \cdot Py$ , ponieważ do utworzenia wiązania hoogstenowskiego nie jest wymagane protonowanie zasad trzeciej nici.

Poza tym tworzące się trójki zasad powinny tworzyć najbardziej efektywny w danych warunkach układ wiązań, kolejno:

$G \times G \cdot C$  — odwrócone,

$T \times A \cdot T$  — normalne i odwrócone,

$A \times A \cdot T$  — odwrócone,

$C^{Me} \times G \cdot C$  — normalne,

(wiązanie normalne występuje przy równoległej orientacji trzeciej nici i nici purynowej dupleksu, wiązanie odwrócone ma miejsce przy orientacji antyrównoległej).

Wpływ środowiska przejawia się następująco: wysoka siła jonowa, poliaminy (spermina, spermidyna) oraz czynniki interkalujące stabilizują trypleks. Niskie pH stabilizuje trypleksy typu  $Py \times Pu \cdot Py$  zawierające trójki  $C \times G \cdot C$ ,

zaś obecność jonów  $Mg^{+2}$  znacząco podnosi stabilność trypleksów typu Pu x Pu · Py (17 – 23).

Często wykorzystywany jest fakt, że wiązanie się trzeciej nici do dupleksu ma charakter kooperatywny, tzn. jeżeli w pewnej części oligopurynowo-oligopirymidynowego odcinka DNA przyłączy się trzecia nić, to wzrasta prawdopodobieństwo związania następnej trzeciej nici w pozostałej części tego odcinka (24). Zjawisko to, opisane przez P. Dervana, zostało wykorzystane do stworzenia systemu nieenzymatycznej ligacji jednoniciowych oligonukleotydów na matrycy dwuniciowego DNA (25), stabilizacji struktury trójniciowej (26), a także opracowania ciekawej formy struktury trójniciowej: podwójnego trypleksu o odwrotnych orientacjach. Forma taka może się wytworzyć w rejonie DNA zawierającym obok siebie dwa bloki: jeden oligopurynowo-oligopirymidynowy i drugi oligopirymidynowo-oligopurynowy. Wykorzystując połączone ze sobą wiązaniem 3' – 3' oligonukleotydy, komplementarne w sensie trypleksu do tych bloków, można wytworzyć stabilną strukturę złożoną z dwóch trypleksów, z których każdy oddzielnie byłby niestabilny (27 – 28).

Innym sposobem tworzenia struktur trójniciowych jest wykorzystywanie syntetycznego oligonukleotydu (34) lub pary oligonukleotydów połączonych mostkiem 3' – 3' (35) jako elementu tworzącego wraz z jednoniciowym kwasem nukleinowym strukturę trypleksu. W odróżnieniu od opisywanych dotychczas trypleksów, w których jednoniciowy oligonukleotyd wiązał się do dwuniciowego DNA, w tego rodzaju strukturze jednoniciowy DNA (lub RNA) wbudowywany jest w formę trójniciową. Podejście to może znaleźć zastosowanie w terapii antysensowej, przez zablokowanie jednoniciowej formy kwasu nukleinowego (np. mRNA) oligonukleotydem tworzącym z nią kompleks o strukturze trójniciowej.

### 3. Wpływ modyfikacji oligonukleotydów na ich zdolność do tworzenia struktur trójniciowych

Modyfikacji w oligonukleotydach używanych do tworzenia trypleksów może podlegać zasada (wtedy celem jest przede wszystkim zwiększenie stabilności struktury trójniciowej przez wprowadzenie dodatkowych grup zdolnych do tworzenia wiązania wodorowego) lub łańcuch fosforanowo-cukrowy.

Modyfikacje zasad wprowadzane są ze względu na to, że nie wszystkie zasady azotowe zdolne są do efektywnego tworzenia wiązań wodorowych typu Hoogstena. Na przykład w cytozynie grupa iminowa N3 w fizjologicznych warunkach pH jest akceptorem protonu. Wynika z tego, że grupa ta nie może stworzyć wiązania wodorowego ani z grupą N7 puryn ani z O6 guaniny, co destabilizuje trypleks. Dopiero obniżanie pH umożliwia uprotonowanie cytozyny i zmianę właściwości grupy N3. Aby ominąć ten problem zaproponowano zastąpienie cytozyny w oligonukleotydzie tworzącym trzecią nić trypleksu bądź przez proste jej analogi (5-metylocytozynę, 5-bromocytozynę), w których zdolność wiązania protonu przez grupę iminową N3 jest lepsza niż w niemodyfi-

kowanej cytozynie (12), bądź przez pseudoizocytozynę, której układ umożliwia łatwe tworzenie wiązań Hoogstena ze względu na obecność dwóch protonów przy atomach azotu grupy egzoaminowej oraz iminowej pierścienia pirymidynowego (29). Opisano także inne takie zasady (np. analog zasad purynowych 1-(2-deoksy-D-rybofuranozyl)-3-metylo-5-amino-1H-pyrazolo[4,3-d]-pyrimidin-7-on (30)). Ich zastosowanie praktyczne w układach *in vivo*, jak się wydaje, jest jednak ograniczone ze względu na nieokreśloność dalszych losów (sposobu degradacji i ewentualnego metabolizmu) w organizmach ssaków.

Łańcuch fosforanowo-cukrowy może być modyfikowany w różny sposób. Trypleksy, w których trzecia nić jest oligorybonukleotydem są bardziej stabilne termodynamicznie od takich, w których nić ta jest deoksyrybonukleotydem. Jednakże oligorybonukleotydy są znacznie bardziej wrażliwe na degradację enzymatyczną. Stabilność trypleksów zawierających jako trzecią nić oligo(2'-O-metylorybonukleotydy) jest najwyższa (1).

Analogi, których elementem składowym są  $\alpha$ -D-nukleotydy zamiast zazwyczaj występujących w DNA  $\beta$ -D-nukleotydów również mogą tworzyć trypleksy, choć ich stabilność jest nieco niższa niż „normalnych” (31).

Modyfikacje wiązania fosfodiesterowego, takie jak: zastępowanie grupy fosforanowej przez tiofosforany, metanofosfoniany lub amidofosforany — co jest często stosowane w konstrukcji oligonukleotydów dla potrzeb strategii antysensowych — również ma wpływ na zdolność tworzenia trypleksu przez odpowiedni analog. Stwierdzono m.in., że tiofosforanowe analogi oligonukleotydów polipurynowo-polipirymidynowych są zdolne do tworzenia trypleksu typu  $Py \times Pu \cdot Py$  jeżeli tylko nić purynowa zawiera tiofosforany. Obecność wiązań tiofosforanowych w nici pirymidynowej blokuje tworzenie się trypleksu (32). Niedawno w pracowni Dervana pokazano, że można otrzymać strukturę trójniciową typu  $Pu \times Pu \cdot Py$  jeżeli trzecia nić (purynowa) będzie zawierała w wiązaniu fosfodiesterowym tiofosforany i to zarówno, wtedy gdy centra chiralne na wszystkich atomach fosforu łańcucha fosforowo-cukrowego będą miały konfigurację  $R_p$ , jak i wówczas, gdy konfiguracja ta nie będzie precyzyjnie zdefiniowana. Natomiast trypleks typu  $Py \times Pu \cdot Py$ , w którym trzecia nić (pirymidynowa) zawiera tiofosforany w wiązaniu fosfodiesterowym nie może powstać (33).

Interesującym rodzajem modyfikacji okazała się radykalna zmiana charakteru łańcucha wiążącego ze sobą zasady azotowe. W DNA jest to łańcuch fosforanowo-cukrowy z D-deoksyrybozą, połączony z zasadami wiązaniem N-glikozydowym. W wyniku analizy komputerowej oraz licznych prób eksperymentalnych stwierdzono, że układy zawierające, jako jednostkę podstawową, zamiast 3'-fosforanu 2'-deoksyrybozy N-(2-aminoglicynę) połączoną z zasadą azotową wiązaniem amidowym, (PNA — *Protein Nucleic Acids*) są zdolne do tworzenia struktur trójniciowych o bardzo dużej stabilności (9,10). Jednakże inne badania sugerują, że struktura taka jest jedynie stanem przejściowym w procesie tworzenia się kompleksu pomiędzy PNA i jedną nicią (komplementarną do sekwencji PNA) z podwójnej helisy DNA (11).

## 4. Metody identyfikowania struktur trójniciowych

Najprostszą metodą stwierdzenia, że oligonukleotydy w analizowanej próbce utworzyły strukturę trójniciową jest badanie jej właściwości spektroskopowych. Trypleks, analogicznie do dwuniciowego DNA, podlega procesowi dysocjacji na parę złożoną z dupleksu i pojedynczej nici. Proces ten uwidacznia się przez hipochromizm trypleksu obserwowany przy 284 nm i zależy od temperatury. Dlatego też możliwe jest zarówno obserwowanie krzywej mięknięcia trypleksu i wyznaczanie na jej podstawie temperatury mięknięcia i parametrów termodynamicznych struktury trójniciowej, jak również badanie krzywych mieszania oligonukleotydów, a następnie określanie na tej podstawie proporcji poszczególnych nici tworzących układ o minimalnej absorbancji (36).

Zastosowanie spektrometrii dichroizmu kołowego pozwala na zidentyfikowanie kształtu widma charakterystycznego dla struktury trójniciowej. Widmo dwuniciowego DNA w konformacji B cechuje się występowaniem efektów Cottona — dodatnich przy ok. 280 nm, 220 nm i 180 nm, oraz ujemnych przy 245 nm i 210 nm. W widmie struktury trójniciowej zanika dodatni efekt Cottona przy 220 nm, zaś zwiększają się oba ujemne efekty Cottona (37 – 39).

Bardzo efektywną metodą obserwacji powstawania form trójniciowych jest elektroforeza oligonukleotydów w niedenaturującym żelu poliakrylamidowym. W takim żelu trypleksy migrują z reguły wolniej niż formy jedno- lub dwuniciowe i porównanie szybkości migracji pozwala na łatwe zidentyfikowanie struktury trójniciowej (1).

Częstym sposobem identyfikacji rejonu powstania trypleksu na cząsteczce dwuniciowej jest zastosowanie modyfikacji chemicznych. Zazwyczaj czynniki reagujące z grupą iminową N7 puryn, takie jak dimetylosiarczan lub dietylopirowęglan nie działają na zasady wewnątrz trypleksu, co stanowi czynnik różnicujący tę strukturę (23).

Inne podejście polega na połączeniu oligonukleotydu stanowiącego trzecią nić z grupą reaktywną chemicznie (np. alkilującą lub generującą reaktywny rodnik) i obserwację miejsca degradacji cząsteczki dwuniciowej. Metoda taka ma, obok zastosowań analitycznych, także istotne znaczenie praktyczne dla terapii antygenowej. Oligonukleotyd związany z reaktywną grupą chemiczną „dostarcza” ją do celu jakim jest gen (np. wirusowy) i wiążąc się specyficznie w jego rejonie umożliwia reakcję, prowadzącą do zmian w chemicznej strukturze DNA, a w konsekwencji do zahamowania ekspresji tego genu (31,40 – 44).

## 5. Właściwości biologiczne struktur trójniciowych

Struktura trójniciowa jest całkowicie odporna na działanie typowych enzymów katalizujących różne reakcje z udziałem kwasów nukleinowych. Oznacza to np., że jeżeli fragment DNA jest zdolny do utworzenia struktury

trójniciowej i zawiera miejsce restrykcyjne, to dołączenie trzeciej nici w taki sposób, aby powstający trypleks je obejmował spowoduje specyficzne zahamowanie aktywności, zarówno restryktazy jak i odpowiadającej jej metylazy, wobec tego miejsca (45,46). Zjawisko to wykorzystywane jest zarówno jako metoda badania trypleksu, jak i jako narzędzie w inżynierii genetycznej. Firma „Stratagene” oferuje wektory do klonowania DNA zawierające dwa rejony oligopurynowo-oligopirymidynowe, każdy z miejscem rozpoznawanym przez restryktazę, przedzielone „polilinkerem”, przeznaczonym do klonowania obcego DNA. Wydobywanie sklonowanych fragmentów DNA realizuje się następująco: najpierw do wektora dołącza się oligonukleotydy tworzące trypleksy z rejonami oligopurynowo-oligopirymidynowymi, a potem za pomocą odpowiedniej specyficznej metylazy wprowadza się grupy metylowe (w pozycję 5' cytozyn lub N6 adenin (oczywiście metylacji podlegają zasady we wszystkich sekwencjach kanonicznych metylazy obecnych na wektorze, poza obszarem obu trypleksów), wreszcie usuwa się oligonukleotydy i wolny wektor jest trawiony odpowiednią restryktazą. Ponieważ na całym wektorze tylko dwa miejsca restrykcyjne w obrębie rejonów zablokowanych uprzednio strukturą trójniciową są niemetylowane i dostępne do działania restryktazy, uzyskuje się w ten sposób całkowity i nienaruszony fragment obcego DNA sklonowanego w takim systemie. Także niespecyficzne sekwencyjne enzymy, takie jak DNaza I są blokowane w swej aktywności przez trypleks (47).

Z punktu widzenia zastosowań w strategii terapii antygenowej istotna jest zdolność hamowania przez trypleks takich procesów jak transkrypcja DNA czy też jego replikacja, a także blokowanie wiązania się specyficznych białek regulujących procesy genetyczne (np. eukariotycznych czynników transkrypcyjnych). Zbadano, że trypleks blokuje wiązanie z DNA czynnika transkrypcyjnego Sp1 (46), a także innych białek pochodzenia jądrowego zdolnych do specyficznego wiązania się z DNA promotora *Ki-ras* (48). W eksperymentach *in vitro* oraz *in vivo* pokazano, że można efektywnie zahamować transkrypcję genów drogą zablokowania sekwencji specyficznych dla czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (49). Natomiast struktura trójniciowa może blokować proces elongacji mRNA podczas transkrypcji, jedynie wtedy gdy jest „utrwalona” za pomocą kowalencyjnych wiązań pomiędzy dwuniciowym DNA oraz trzecią nicią. Proces transkrypcji niszczy wytworzony trypleks (najpewniej ze względu na lokalną denaturację struktury dwuniciowej podczas transkrypcji), (50 – 52). Natomiast replikacja dwuniciowego DNA przez fragment Klenowa DNA-polimerazy I z *E. coli* jest hamowana przez wytworzenie trypleksu na fragmencie przez który przesuwa się enzym podczas replikacji (53).

## 6. Trypleks w terapii antygenowej — podsumowanie

Celem strategii antysensowej RNA, polegającej na wprowadzaniu do komórki oligonukleotydu lub jego analogu komplementarnego do mRNA kodującego patologiczne białko (wirusa, onkogenu itp.), jest zahamowanie procesu

przekazywania informacji genetycznej pomiędzy etapem transkrypcji i dojrzewania mRNA a etapem translacji. Jest to stosunkowo późny etap ekspresji genów. mRNA występuje w komórce w wielu kopiach i jest stale produkowany w procesie transkrypcji. Stąd, aby efekt takiej strategii był znaczący należy osiągnąć relatywnie wysokie stężenia oligonukleotydu w cytoplazmie. Zazwyczaj jest to utrudnione z wielu różnych powodów (degradacja enzymatyczna oligonukleotydów, utrudnienia w ich transporcie przez błony, zróżnicowany rozkład w organellach komórkowych oraz w tkankach i inne). Natomiast gen zlokalizowany w DNA zazwyczaj występuje w komórce w pojedynczej kopii (czasami jest ich kilka). Poza tym obok sekwencji kodujących białka w obrębie genu znajduje się wiele innych sygnałów, takich jak rejony promotorowe genu lub miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych, będących dogodnym punktem ataku na gen. Co więcej — można przypuszczać, że w zwalczaniu AIDS strategia antygenowa okaże się efektywniejsza niż antysensowa RNA. Specyfika cyklu życiowego retrowirusa HIV polega na integrowaniu jego materiału genetycznego do chromosomowego DNA zaatakowanej komórki i namnażaniu wirusa z wykorzystaniem komórkowego aparatu ekspresji genów. Zatem atakowanie wielu kopii wirusowego RNA znajdujących się w cytoplazmie, i stale produkowanych przez zainfekowaną komórkę, jest — przynajmniej w teorii — mniej efektywne niż zniszczenie co najwyżej kilku wbudowanych w chromosom kopii wirusowego DNA.

## Literatura

1. Thuong N.T., Helene C., (1993), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32, 666 – 690.
2. Wells R.D., Collier D.A., Hanvey J. C., Shimizu M., Wohlrab F., (1988), *FASEB J.*, 2, 2939 – 2949.
3. Helene C., (1993), in: *Antisense Research and Application*, Eds. Crooke S. T., and Lebleu B., CRC Press Inc. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 375 – 385.
4. Chamberlin M.J., (1965), *Federation Proc.*, 24, 1446 – 1457.
5. Riley M., Maling B., Chamberlin M.J., (1966), *J. Mol. Biol.*, 20, 359 – 389.
6. Blake R.D., Massoulie J., Fresco J. R., (1967), *J. Mol. Biol.*, 30, 291 – 308.
7. Morgan A.R., Wells R.D., (1968), *J. Mol. Biol.*, 37, 63 – 80.
8. Arnott S., Selsing E., (1974), *J. Mol. Biol.*, 88, 509 – 512.
9. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., Burchardt O., (1991), *Science*, 254, 1497 – 1500.
10. Egholm M., Burchardt O., Nielsen P.E., Berg R.H., (1992), *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 1895 – 1897.
11. Egholm M., Nielsen P.E., Burchardt O., Berg R.H., (1992), *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 9677 – 9678.
12. Povsic T.J., Dervan P.B., (1989), *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 3059 – 3061.
13. Pilch D.S., Levenson C., Shafer R.H., (1991), *Biochem.*, 30, 6081 – 6087.
14. Chen F.-M., (1991), *Biochem.*, 30, 4472 – 4479.
15. Kohwi Y., Kohwi-Shigematsu T., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3781 – 3785.
16. Beal P.A., Dervan P.B., (1991), *Science*, 251, 1360 – 1363.
17. Fossella J.A., Kim Y.J., Shih H., Richards E.G., Fresco J.R., (1993), *Nucl. Acid. Res.*, 21, 4511 – 4515.
18. Hampel K.J., Crosson P., Lee J.S., (1991), *Biochem.*, 30, 4455 – 4459.

19. Rougee M., Faucon B., Mergny J. L., Barcelo F., Giovannangeli C., Garestier T., Helene C., (1992), *Biochem.*, 31, 9269 – 9278.
20. Maher III L. J., Wold B., Dervan P. B., (1990), *Biochem.*, 29, 8820 – 8826.
21. Mergny J.L., Sun J.-S., Rougee M., Montenay-Garestier T., Barcelo F., Chomilier J., Helene C., (1991), *Biochem.*, 30, 9791 – 9798.
22. Mergny J.L., Collier D., Rougee M., Montenay-Garestier T., Helene C., (1991), *Nucl. Acid. Res.*, 19, 1521 – 1526.
23. Collier D., Mergny J.L., Thuong N.T., Helene C., (1991), *Nucl. Acid. Res.*, 19, 4219 – 4224.
24. Strobel S.A., Dervan P.B., (1989), *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 7286 – 7287.
25. Luebke K.J., Dervan P.B., (1989), *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 8733 – 8735.
26. Distefano M.D., Shin J.A., Dervan P. B., (1991), *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 5901 – 5902.
27. McCrudy S., Moulds C., Froehler B., (1991), *Nucleotides & Nucleosides*, 10, 287 – 290.
28. Horne D.A., Dervan P.B., (1990), *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 2435 – 2437.
29. Ono A., Ts'o P.O.P., Kan L.-S., (1991), *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 4032 – 4033.
30. Koh J.S., Dervan P.B., (1992), *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 1470 – 1478.
31. Praseuth D., Perrouault L., Le Doan T., Chassignol M., Thuong N., Helene C., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85, 1349 – 1353.
32. Latimer L.J.P., Hampel K., Lee J.S., (1989), *Nucl. Acid. Res.*, 17, 1549 – 1561.
33. Hacia J.G., Wold B.J., Dervan P.B., (1994), *Biochem.*, 33, 5367 – 5369.
34. Haner R., Dervan P. B., (1990), *Biochem.*, 29, 9761 – 9765.
35. Giovannangeli C., Montenay-Garestier T., Rougee M., Chassignol M., Thuong N.T., Helene C., (1991), *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 7775 – 7777.
36. Manzini G., Xodo L. E., Gasparotto D., Quadrioglio F., van der Marel G. A., van Boom J. H., (1990), *J. Mol. Biol.*, 213, 833 – 843.
37. Johnson K.H., Gray D.M., Sutherland J.C., (1991), *Nucl. Acid. Res.*, 19, 275 – 2280.
38. Johnson K.H., Durland R.H., Hogan M.E., (1992), *Nucl. Acid. Res.*, 20, 3859 – 3864.
39. Gray D.M., Ratliff R. L., Vaughan M. R., (1992), *Meth. Enzymol.*, 211, 389 – 405.
40. Moser H.E., Dervan P. B., (1987), *Science*, 238, 645 – 650.
41. Povsic T.J., Dervan P. B., (1990), *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 9428 – 9430.
42. Strobel S.A., Moser H. E., Dervan P. B., (1988), *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 7927 – 7929.
43. Strobel S.A., Dervan P.B., (1990), *Science*, 249, 73 – 75.
44. Shaw J.-P., Milligan J.F., Krawczyk S. H., Matteucci M., (1991), 113, 7765 – 7766.
45. Francois J.-C., Saison-Behmoaras T., Thuong N.T., Helene C., (1989), *Biochem.*, 9617 – 9619.
46. Maher III L. J., Wold B., Dervan P.B., (1989), *Science*, 245, 725 – 730.
47. Kessler D.J., Pettitt B. M., Cheng Y.-K., Smith S. K., Jayaraman K., Vu H.M., Hogan M. E., (1993), *Nucl. Acid. Res.*, 21, 4810 – 4815.
48. Mayfield C., Squibb M., Miller D., (1994), *Biochem.*, 33, 3358 – 3363.
49. Orson F.M., Thomas D.W., McShan W.M., Kessler D.J., Hogan M.E., (1991), *Nucl. Acid. Res.*, 19, 3435 – 3441.
50. Durland R.H., Kessler D.J., Gunnel S., Duvic M., Pettitt B.M., Hogan M.E., (1991), *Biochem.*, 30, 9246 – 9255.
51. Maher III L. J., Dervan P. B., Wold B., (1992), *Biochem.*, 31, 70 – 81.
52. Hobbs C.A., Yoon K., (1994), *Antisense Res. Dev.*, 4, 1 – 8.
53. Hacia J.G., Dervan P.B., Wold B.J., (1994), *Biochem.*, 33, 6192 – 6200.

## Triple-stranded forms of nucleic acids

### Summary

Triple-stranded DNA structures are presented. Methods for their analysis and their physical and biological properties are reviewed. Application of triplex-forming oligonucleotides as agents for anti-gene therapy is discussed.

### Key words:

anti-gene therapy, triple-stranded DNA, triplex-forming oligonucleotides.

### *Adres dla korespondencji:*

Marek Kwinkowski, Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź.