

- [3] H.-J. Gaus, A. Beck-Sickinger, E. Bayer, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1399–1405.
 [4] E. Bayer, *Mod. Methods Protein Nucleic Acid Res.* **1990**, *3*, 133–148.
 [5] W. E. Gläßgen, H. U. Seitz, J. W. Metzger, *Biol. Mass Spectrom.* **1992**, *21*, 271–277.
 [6] S. Heuer, S. Richter, J. W. Metzger, V. Wray, M. Nimtz, D. Strack, *Phytochemistry* **1994**, *37*, 761–767.
 [7] E. Bayer, K. Albert, M. Nieder, E. Grom, T. Keller, *J. Chromatogr.* **1979**, *186*, 497–507.
 [8] H. C. Dorn, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 747A–758A.
 [9] D. A. Laude, Jr., C. L. Wilkins, *Trends Anal. Chem.* **1986**, *9*, 230–235.
 [10] K. Albert, E. Bayer in *HPLC Detection Newer Methods* (Hrsg.: G. Patonay), VCH, New York, **1992**, S. 197.
 [11] M. Spraul, M. Hofmann, P. Dvorsak, J. K. Nicholson, I. D. Wilson, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 327–330.
 [12] J. K. Roberts, R. J. Smith, *J. Chromatogr. A* **1994**, *677*, 385–389.
 [13] K. Albert, U. Braumann, L.-H. Tseng, G. Nicholson, E. Bayer, M. Spraul, M. Hofmann, C. Dowle, M. Chippendale, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3042–3046.
 [14] N. Wu, T. L. Peck, A. G. Webb, R. L. Magin, J. V. Sweedler, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7929–7930.
 [15] N. Wu, T. L. Peck, A. G. Webb, R. L. Magin, J. V. Sweedler, *Anal. Chem.* **1994**, *22*, 3849–3857.

Die räumliche Struktur von Hammerhead-Ribozymen**

Georg Sczakiel*

Seit vor etwa 13 Jahren Ribonucleinsäuren (RNA) entdeckt wurden, die chemische Reaktionen katalysieren können^[1], wurden diese sogenannten Ribozyme intensiv erforscht. Ribozyme – RNA-Moleküle definierter Basensequenz und räumlicher Struktur – erkennen bestimmte RNA-Sequenzen (Substrate) basenspezifisch und spalten eine definierte Phosphodiester-Bindung eines gewissen Basentriplets. Bei natürlich vorkommenden Ribozymen ist dieser Schritt essentiell, wie etwa bei der Reproduktion (Replikation) bestimmter Satelliten-RNAs und Viroide^[2]. In diesen Fällen befinden sich Ribozym- und Substratsequenzen auf einem einzigen RNA-Strang, was zu einer intramolekularen Spaltung (In-cis-Spaltung) führt. Ribozyme können jedoch auch intermolekular wirken (In-trans-Spaltung)^[3], so daß sie maßgeschneidert werden können, um beliebige Substrat-RNAs selektiv zu spalten und damit biologisch zu inaktivieren. Dies erklärt die große Bedeutung, die dieser Substanzklasse heute von Molekularbiologen und Biochemikern beigemessen wird und die langfristig eine therapeutische Anwendung in vivo als denkbar erscheinen läßt^[4].

Eines der am besten untersuchten Ribozyme ist das sogenannte Hammerhead-Ribozym^[5], da zuerst im Avocado-Sunblotch-Viroid (ASBVd)^[6] gefunden wurde. In diesem natürlichen System dient die Ribozym-Aktivität dazu, die bei der Replikation als kovalent verknüpfte Multimere gebildeten Genome in einer intramolekularen Reaktion (In-cis-Spaltung) in die Einheitslänge zu spalten. Die Erkennung der Substrat-RNA mit dem spaltbaren Sequenzmotiv (Basentriplett) erfolgt über spezifische Basenwechselwirkungen zwischen Teilen des Ribozym- und Substratstrangs (Abb. 1). Diese 5'- und 3'-Sequenzen des Ribozyms formen zusammen mit komplementären Sequenzen der Substrat-RNA die Helices I und III des Hammerheads und können daher als Antisense-Sequenzen aufgefaßt werden.

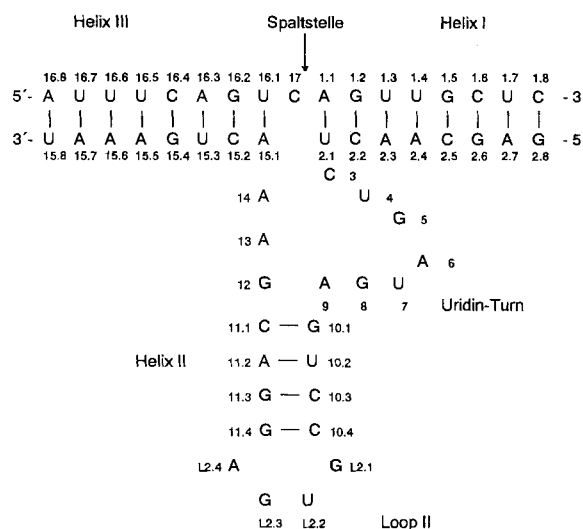


Abb. 1. Schematische Darstellung des Hammerheads mit der von Hertel et al. [21] eingeführten Nomenklatur.

Dazwischen wird die sogenannte katalytische Domäne gebildet, die aus den Strukturkomponenten Helix II, dem benachbarten Uridin-Turn sowie dem spaltbaren Basentriplett besteht. Durch diese strukturelle und funktionelle Domäne wird der katalytisch aktive Hammerhead gebildet, der das Zielmotiv spalten kann, wenn zusätzlich Metall-Ionen wie Mg^{2+} -Ionen vorhanden sind. Mindestens ein Mg^{2+} -Ion ist an der Spaltung der Phosphodiester-Brücke zwischen C17 und A1.1 stromabwärts des spaltbaren Basentriplets (G16.2, U16.1 und C17; Abb. 1) beteiligt, die durch einen nucleophilen Angriff des Sauerstoffatoms der 2'-Hydroxygruppe erfolgt. Die Freisetzung der 5'-Hydroxygruppe verläuft über ein Intermediat mit trigonal-bipyramidal um das zentrale Phosphoratom angeordneten Sauerstoffatomen und führt zu einem cyclischen 2',3'-Phosphodiester sowie zu einer freien 5'-Hydroxygruppe (Abb. 2). Die entscheidende Rolle der 2'-Hydroxygruppe wird dadurch verdeutlicht, daß Desoxyribose an der Schnittstelle die Spaltungsreaktion verhindert^[7].

[*] Priv.-Doz. Dr. G. Sczakiel
 Forschungsschwerpunkt Angewandte Tumorstudiologie
 Deutsches Krebsforschungszentrum
 Im Neuenheimer Feld 242, D-69120 Heidelberg
 Telefax: Int. + 6221/424932
 e-mail: vir037@atv-fs.inet.dkfz-heidelberg.de

[**] Sigrid Eckardt, Matthias Homann und Volker Patzel danke ich für ihre kritischen Anmerkungen zum Manuskript.

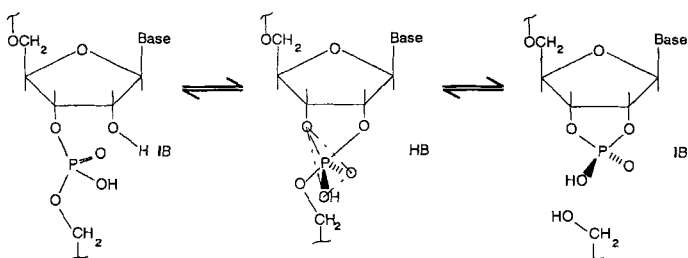


Abb. 2. Vereinfachter Reaktionsmechanismus der vom Hammerhead-Ribozym vermittelten Hydrolyse der Phosphodiesterbindung der Substrat-RNA [5].

Kürzlich gelang es zwei Gruppen unabhängig voneinander, ein räumliches Strukturmodell für das Hammerhead-Ribozym aufzustellen^[8, 9]. Von der Arbeitsgruppe um F. Eckstein in Göttingen wurden durch chemische Synthese Ribozym-Substrat-Komplexe hergestellt, die an einer der drei Helices eine Fluoresceingruppe als Fluoreszenzdonor sowie an einer zweiten Helix eine Rhodamingruppe als Acceptor trugen. Die Ribozym-vermittelte Spaltung wurde durch Einführung von 2'-Desoxycytidin an der Spaltstelle verhindert. Dadurch waren Fluoreszenzenergietransfer(FRET)-Messungen möglich. Die jeweiligen Energieübertragungseffizienzen ermöglichten die Bestimmung der Entfernungen zwischen den an die Helices gekoppelten Donor- und Acceptorgruppen. Aus diesen Daten wurde ein Strukturvorschlag für das Hammerhead-Ribozym errechnet^[9]. Zur gleichen Zeit wurde von der Gruppe um D. B. McKay in Boulder (USA) die Röntgenstrukturanalyse eines kristallisierten Ribozym-Substrat-Komplexes publiziert^[8]. Bei diesem besteht der Substratstrang durchgehend aus Desoxyribonucleinsäure (DNA) an Stelle von RNA, so daß die Spaltungsreaktion verhindert wird. Die ermittelte Struktur im Kristall stimmt auffallend mit dem methodisch völlig anders erarbeiteten Strukturvorschlag von Eckstein et al. überein. Die Kristallstrukturanalyse gibt darüber hinaus auch Auskunft über unerwartete und nichtkonventionelle Wechselwirkungen zwischen Komponenten des Hammerheads, die das Zustandekommen der räumlichen Struktur ermöglichen und erklären.

In bisherigen Strukturmodellen wurden die drei Helices des Hammerheads eher als zweidimensionale T-förmige Struktur angenommen (Abb. 3a). Bei den beiden neuen Strukturvorschlägen sind die Helices nahezu collinear angeordnet, was zu einer Art „Wüschelrutenform“ führt^[9] (Abb. 3b). Helix III und Helix II setzen sich annähernd coaxial^[8] oder leicht gewinkelt^[9] fort, während die Achse von Helix I zwar collinear mit derjenigen von Helix III verläuft, aber gegenüber dieser etwas versetzt ist (Abb. 3c). Dies impliziert, daß auch Helix II und Helix I entweder collinear^[8] oder wüschelrutenartig^[9] angeordnet sind (Abb. 3c). Bemerkenswert sind die zusätzlich zu den Watson-Crick-Basenpaaren vorhandenen Wechselwirkungen zwischen den drei in A-Form vorliegenden Helices. Dabei fällt in besonderem Maße die Fortsetzung der ansonsten recht kurzen Helix II durch drei weitere Basen-Basen-Wechselwirkungen nahe der Verbindungsstelle der drei Helices auf (Abb. 3). Eine weitere zusätzliche Stabilisierung erfährt Helix II durch die Wechselwirkungen in Loop II (5'-GAAA-3'), einem sogenannten Tetraloop^[10]. Bei diesem wird ein Homopurin-Basenpaar (G-A) gebildet, auf dem die verbleibenden beiden Purine (A,A) stapeln können. Eine sehr ähnliche Loop-Struktur wird vom GAGA-Loop (5'-GAGA-3') Ricin-bindender RNA eingenommen, die kürzlich mit Hilfe von NMR-Studien detailliert charakterisiert werden konnte^[11]. Damit ist die Einheit Helix II/Loop II eine hinsichtlich der Struktur und Stabilität wesentliche Komponente des Hammerheads.

Gegenüber älteren Strukturmodellen müssen die Helices I und III um jeweils eine Basen-Basen-Wechselwirkung erweitert werden (C-C in Helix I und A-U in Helix III). Bemerkenswert ist dabei die Nicht-Watson-Crick-Basenpaarung zwischen A15.1 und dT16.1. Ein markantes Resultat der zusätzlichen Wechselwirkungen und der Anordnung aller drei Helices ist die besonders scharfe Krümmung des Uridin-Turns zwischen Helix I und Helix II, dessen Struktur nahezu exakt mit der des Uridin-Turns im Anticodon- und Pseudouridin-Loop der tRNA^{Phe} von Hefe übereinstimmt. Dieses Strukturelement wird zusätzlich durch Wasserstoffbrücken zwischen dem N3-Atom von U₄ und dem *pro*-S_p-Phosphat-Sauerstoffatom von U₇ sowie zwischen

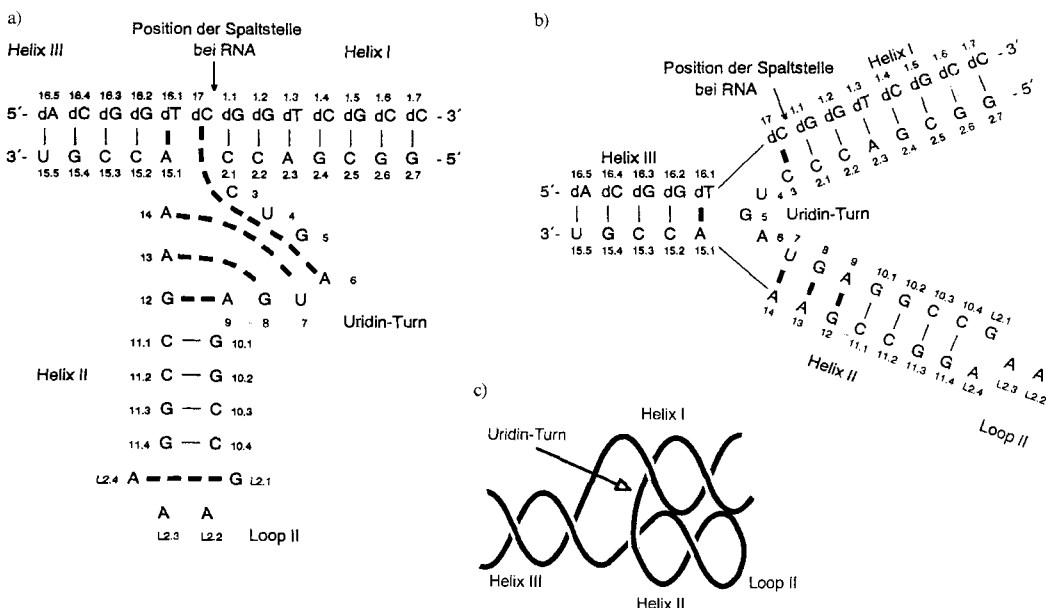


Abb. 3. Vereinfachte Darstellungen der Hammerhead-Struktur nach Lit. [8] und [9]. Dünne Balken symbolisieren Watson-Crick-Basenpaare; dicke Balken und dicke unterbrochene Linien stehen für Nicht-Watson-Crick-Basenpaarungen. a) Konventionelle Darstellung analog zu Abb. 1 mit Markierung zusätzlicher Wechselwirkungen nach Lit. [8]. b) Verdeutlichung der „Wüschelruten-Struktur“ nach Lit. [8] und des stark gekrümmten Uridin-Turns. c) Veranschaulichung der räumlichen Hammerhead-Struktur.

der 2'-OH-Gruppe von U₄ und dem N7-Atom von A₆ stabilisiert. Eine weitere und wichtige Wasserstoffbrücke wird zwischen der 2'-OH-Gruppe von G₅ im Uridin-Turn und der 2'-OH-Gruppe von C_{15,2} in Helix III gebildet. Die Bedeutung der 2'-Hydroxygruppe von G₅ für die Aktivität des Hammerhead-Ribozyms zeigt sich auch darin, daß der Austausch der Ribose gegen Arabinose in dieser Position die Aktivität nahezu auslöscht^[12].

Eine notwendige Komponente des katalytisch aktiven Hammerheads sind Metall-Ionen wie Mg²⁺, Mn²⁺ oder Ca²⁺, wobei in vitro normalerweise Mg²⁺-Ionen verwendet werden. Daher wird das Hammerhead-Ribozym oft auch als Metalloenzym betrachtet^[13]. Durch Austausch der Sauerstoffatome der als Substrat dienenden prochiralen Phosphodiester-Brücke gegen Schwefelatome wurden Hinweise darauf gefunden, daß das *pro-R_p*-Sauerstoffatom mit einem Mg²⁺-Ion koordiniert ist (Abb. 4). Ein Kandidat hierfür kann in der Struktur im Kristall

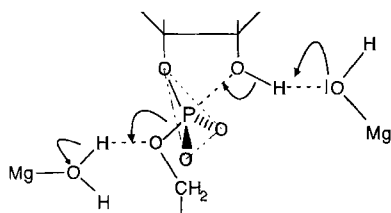


Abb. 4. Mögliche Beteiligung von Mg²⁺-Ionen an der Ribozym-katalysierten Spaltung.

jedoch nicht ausgemacht werden, obwohl an anderer Stelle der Struktur ein Mn²⁺- bzw. Cd²⁺-Ion an das *pro-R_p*-Phosphodiester-Sauerstoffatom von A₉ sowie N7-Atom von G_{10,1} (vermutlich über ein H₂O-Molekül) gebunden sind. Pley et al.^[8] diskutieren auch die Möglichkeit, daß ein Helixelement am Ende von Helix II (5'-G₈A₉G_{10,1}-3' und 3'-A₁₄A₁₃G₁₂-5') ein weiteres Metall-Ion binden kann, was durch Aktivitätsuntersuchungen mit Schwefelderivaten unterstützt wird^[14]. Ein vereinfachtes Modell für die Beteiligung von Magnesium bei der Ribozym-vermittelten Spaltung ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt (nach Lit.^[5]). Während ein Mg²⁺-Ion als Magnesiumhydroxid an der Abstraktion des 2'-OH-Wasserstoffatoms beteiligt sein könnte, wird angenommen, daß ein zweites Mg²⁺-Ion die Spaltung der P-O-Bindung unterstützt (Abb. 4). Nach Sawata et al. könnte das zweite Mg²⁺-Ion auch direkt als Lewis-Säure auf das austretende Sauerstoffatom wirken, und damit am chemischen Schritt der Spaltung mitwirken^[15]. Unabhängig davon könnten Mg²⁺-Ionen aber auch strukturstabilisierende Funktionen im Hammerhead haben. Zum Beispiel konnte vor kurzem mit RNA-modifizierenden Reagentien in Lösung gezeigt werden, daß die räumliche Struktur des Hairpin-Ribozyms deutlich vom Vorhandensein von Mg²⁺-Ionen beeinflusst und stabilisiert wird^[16]. Auch beim Hairpin-Ribozym spielen nichtkonventionelle Basen-Basen-Wechselwirkungen eine große Rolle bei der Substratbindung.

Bei bisherigen biochemischen Analysen des Hammerhead-Ribozyms wurde in der Regel versucht, eine Korrelation zwischen der gezielten chemischen Substitution einzelner funktioneller Gruppen oder Atome und der veränderten Spaltaktivität bei kinetischen Messungen herzustellen, um daraus Aussagen be-

züglich der Funktion und weniger hinsichtlich der strukturellen Bedeutung zu gewinnen^[17]. Bei der Bestimmung kinetischer Parameter machen sich zu einem wesentlichen Teil die Einflüsse von chemischen und strukturellen Veränderungen auf den Übergangszustand der Spaltung bemerkbar, die weder bei der Röntgenstrukturanalyse noch bei den FRET-Messungen in Lösung berücksichtigt werden können. Auch Packungseffekte im Kristall können die ermittelte RNA-Struktur beeinflussen und gegenüber der Struktur in Lösung ändern, so daß bis zu einem gewissen Grad Abweichungen zwischen biochemischen Daten und der vorgestellten Struktur zwar hingenommen werden müssen, aber keineswegs die Qualität der Strukturbestimmung in Frage stellen. Eine Vergrößerung der Zuverlässigkeit des Strukturmodells für den Hammerhead bedarf der Aufklärung weiterer Hammerhead-Ribozyme im Kristall und in Lösung. In diesem Zusammenhang scheint die Frage angebracht, warum bisherige Bemühungen, die Hammerhead-Struktur mit NMR-Methoden zu bestimmen, offensichtlich vergeblich waren. Eine denkbare Ursache hierfür könnte damit zusammenhängen, daß die tatsächliche Struktur stark von der bisher angenommenen Struktur des Hammerheads in Lösung abweicht. So könnte man zum Beispiel vermuten, daß in hochkonzentrierten Lösungen, wie sie bei NMR-Untersuchungen benötigt werden, nicht nur 1:1-Komplexe von Ribozym und Substrat, sondern auch Multimeren mit größeren Massen, aber auch veränderten räumlichen Strukturen vorliegen. Dies wäre nicht überraschend, wenn man bedenkt, daß bei der Analyse zahlreicher RNA-Spezies mit Gelelektrophorese unter nichtdenaturierenden Bedingungen im Konzentrationsbereich von 100 nM und darüber mehrere definierte Banden auftreten, die sich bei der Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen zu einer Bande vereinigen. Diese hier angestellten, eher kritischen Betrachtungen sollen nicht davon ablenken, daß die Mehrzahl bisheriger Befunde mit den beiden publizierten räumlichen Strukturmodellen in Einklang ist und sich mit ihrer Hilfe erklären läßt.

Die räumliche Hammerhead-Struktur bildet zudem eine wesentlich verbesserte Grundlage zur Diskussion bisher nicht erklärbarer Beobachtungen. Zum Beispiel wurden für katalytische Antisense-RNA, das heißt für Hammerhead-Ribozyme mit langkettigen Antisense-Flanken oder langkettigen Substratsträngen (mehr als 50 Basen), Geschwindigkeitskonstanten für die Hydrolyse gemessen, die um einen Faktor ≥ 100 ^[18] kleiner waren als die für kurzkettige Ribozyme und Substrate (weniger als 40 Basen), die den Wert $k_{\text{obs}} = 1 \text{ min}^{-1}$ liefern. Für eine ungehindert verlaufende S_N2-Reaktion (siehe Abb. 2) erscheint dieser Wert etwas langsam. Dies nährt Spekulationen, daß die Winkel der drei Helices des Hammerheads oder die Anordnung des „aktiven Zentrums“ die Spaltaktivität entscheidend beeinflussen. So könnte man sich vorstellen, daß eine extreme Verlängerung des Ribozym- oder Substratstrangs (oder beider) zu einer negativen Beeinflussung der exakten Anordnung der katalytischen Domäne und der damit verknüpften Aktivität führen kann. Auch die Beobachtung, daß eine Verkürzung von Helix III bis auf das innerste Watson-Crick-Basenpaar (N_{1,1}-N_{2,1}) die Aktivität nicht beeinflusst^[19], ist in Einklang mit dem Strukturmodell; die weiter entfernten Basenpaare sind weder aus strukturellen noch aus funktionellen Gründen notwendig.

Das Verständnis der Struktur und der Funktion des Hammerhead-Ribozyms wird durch die beiden vorgestellten Arbeiten

mit ihrem unabhängigen, aber übereinstimmenden Strukturvorschlag deutlich verbessert. Zahlreiche Befunde lassen sich auf dieser Basis einordnen und diskutieren. Für den Chemiker wird das Hammerhead-Ribozym nun zunehmend interessanter. Für den anwendungsorientiert arbeitenden Biochemiker und Molekularbiologen entstehen umgängliche Modelle, mit Hilfe derer medizinisch relevante Hammerhead-Ribozyme besser entworfen und modifiziert werden können. Im Prinzip sollte sich eine mindestens ebenso große Palette chemischer Modifikationen bei synthetischen Ribozymen vornehmen lassen wie etwa auf dem Gebiet der Antisense-Oligonucleotide^[20]. Sicherlich trägt die Strukturaufklärung des Hammerhead-Ribozyms auch zum Verständnis der Biochemie und biologischen Bedeutung anderer „aktiver“ Ribonucleinsäuren bei, die den Horizont des Denkbaren und Machbaren in den letzten Jahren stark erweitert haben.

Stichworte: Biochemie · Hammerhead-Ribozyme · Metalloenzyme · RNA · Strukturaufklärung

- [1] a) K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, 31, 147–157; b) C. K. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. R. Pace, S. Altman, *ibid.* **1983**, 35, 849–857; c) S. Altman, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 735–744; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 749–758; d) T. R. Cech, *ibid.* **1990**, 102, 745–755 bzw. **1990**, 29, 759–768.
- [2] a) T. R. Cech in *The RNA World* (Hrsg.: R. F. Gesteland, J. F. Atkins), Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1993**, S. 239–269; b) R. H. Symons, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, 61, 641–671.
- [3] a) O. C. Uhlenbeck, *Nature* **1987**, 328, 4855–4861; b) J. Hasseloff, W. L. Gerlach, *ibid.* **1988**, 334, 585–591; c) M. Koizumi, S. Iwai, S. Ohtsuka, *FEBS Lett.* **1988**, 239, 285–288.
- [4] a) J. J. Rossi, D. Elkins, J. A. Zaia, S. Sullivan, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1992**, 8, 183–189; b) S. Altman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 10898; c) P. Marshall, J. B. Thompson, F. Eckstein, *Cell. Mol. Neurobiol.*, im Druck.
- [5] J. Bratty, P. Chartrand, G. Ferbeyre, R. Cedergren, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1216, 345–359.
- [6] a) A. C. Forster, R. H. Symons, *Cell* **1987**, 49, 211; b) A. C. Forster, R. H. Symons, *ibid.* **1987**, 50, 9.
- [7] J. Yang, J.-P. Perreault, D. Labuda, N. Usman, R. Cedergren, *Biochemistry* **1993**, 29, 11156–11160.
- [8] H. W. Pley, K. M. Flaherty, D. B. McKay, *Nature* **1994**, 372, 68–74.
- [9] T. Tuschl, C. Gohlke, T. M. Jovin, E. Westhof, F. Eckstein, *Science* **1994**, 266, 785–789.
- [10] H. A. Heus, A. Pardi, *Science* **1991**, 253, 191–194.
- [11] M. Orita, F. Nishikawa, T. Shimayama, K. Taira, Y. Endo, S. Nishikawa, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 5670–5678.
- [12] D.-j. Fu, S. B. Rajur, L. W. McLaughlin, *Biochemistry* **1994**, 33, 13903–13909.
- [13] a) J. A. Piccirilli, J. S. Vyle, M. H. Caruthers, T. R. Cech, *Nature* **1993**, 361, 85–88; b) M. Yarus, *FASEB J.* **1993**, 7, 31–39; c) A. M. Pyle, *Science* **1993**, 261, 709–714.
- [14] D. E. Ruffner, O. C. Uhlenbeck, *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 6025–6029.
- [15] S. Sawata, M. Komiyama, K. Taira, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [16] S. E. Butcher, J. M. Burke, *J. Mol. Biol.* **1994**, 244, 52–63.
- [17] a) D. E. Ruffner, O. C. Uhlenbeck, *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 6025–6029; b) J. M. Buzayan, H. Van Tol, P. A. Feldstein, G. Bruening, *ibid.* **1990**, 18, 4447–4451; c) O. Odai, H. Hiroaki, T. Sakata, T. Tanaka, S. Uesugi, *FEBS Lett.* **1990**, 267, 150–152; d) W. A. Pieken, D. B. Olsen, F. Benseler, H. Aurup, F. Eckstein, *Science* **1991**, 253, 314–317; e) D.-J. Fu, L. W. McLaughlin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 3985–3989; f) G. Slim, M. Gait, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 183, 605–609.
- [18] M. Homann, S. Tzortzakaki, M. Tabler, G. Sczakiel, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 3951–3957.
- [19] M. Homann, S. Tzortzakaki, K. Rittner, G. Sczakiel, M. Tabler, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 2809–2814.
- [20] C. Hélène, J. J. Toulmé, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1049, 99–125; b) E. Uhlmann, A. Peymann, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 543–584; c) C. A. Stein, Y.-C. Cheng, *Science* **1993**, 261, 1004–1012.
- [21] K. J. Hertel, A. Pardi, O. C. Uhlenbeck, M. Koizumi, E. Ohtsuka, S. Uesugi, R. Cedergren, F. Eckstein, W. L. Gerlach, R. Hodgson, R. H. Symons, *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 3252.