

elektrostatische
Komplementarität

Strategien für die Entwicklung gegen RNA und RNA-Protein-Komplexe gerichteter pharmakologischer Wirkstoffe

Thomas Hermann*

RNA-Moleküle spielen eine zentrale Rolle bei vielen Schritten der Genreplikation und -expression. Sie sind daher attraktive Ziele für pharmakologische Wirkstoffe. Die Funktion von Nucleinsäuren als Träger der Erbinformation wird von der Nucleotidsequenz bestimmt. Dagegen erfordern viele zelluläre Prozesse eine definierte dreidimensionale Struktur der beteiligten RNA-Moleküle, die, ähnlich wie Proteine, komplexe Tertiärstrukturen einnehmen können. Die Entwicklung spezifisch auf RNA-Moleküle zielender Wirkstoffe eröffnet vielversprechende neue Wege, um das vorhandene Repertoire gegen Proteine gerichteter Therapeutika bedeutend zu erweitern. Für die meisten Funktionen von RNA-Molekülen sind Wechselwirkungen mit

RNA-bindenden Proteinen erforderlich. Gegen RNA gerichtete Wirkstoffe können die funktionale dreidimensionale Struktur der Nucleinsäure verändern und damit deren Wechselwirkung mit Proteinen verhindern oder verstärken. Alternativ kann die Bildung von funktionsfähigen RNA-Protein-Komplexen durch Inhibitoren, die an der Kontaktfläche binden, direkt verhindert werden. Für die Entwicklung von gegen Nucleinsäuren gerichteten Wirkstoffen können dieselben theoretischen Werkzeuge verwendet werden, die auch für die Entwicklung von auf Proteine abzielenden Therapeutika zum Einsatz kommen. Die unterschiedlichen Beiträge der molekularen Wechselwirkungen in den dreidimensionalen Strukturen

von Proteinen und RNA-Molekülen erfordern jedoch neuartige Strategien der Wirkstoffentwicklung. Der vorliegende Übersichtsartikel fasst zusammen, wie die rasch zunehmende Kenntnis der dreidimensionalen Struktur und Funktion von RNA-Molekülen die Grundlage für rationale Ansätze zur Entwicklung von RNA-bindenden Wirkstoffen bildet. Neben der Besprechung von RNA-Molekülen, die als Ziele von Therapeutika geeignet sind, werden Fortschritte im Verständnis der Wechselwirkungen von RNA mit niedermolekularen Verbindungen und Proteinen diskutiert.

Stichwörter: Aminoglycoside • Antibiotika • RNA-Erkennung • RNA-Strukturen • Wirkstoff-Forschung

1. Einleitung

RNA-Moleküle sind an einer Vielzahl von Prozessen der Genreplikation und -expression beteiligt. Dies könnte ein Hinweis auf den Ursprung der heutigen Organismen in einer präbiotischen „RNA-Welt“ sein, in der sowohl die Speicherung der genetischen Information als auch deren Vervielfältigung von RNA-Molekülen, ohne Beteiligung von Proteinen, durchgeführt wurden.^[1] Die Frage, ob eine solche von Nucleinsäuren geprägte Welt tatsächlich existiert hat, ist gegenwärtig nicht zu beantworten. Die große Zahl der heute bekannten RNA-Strukturen rechtfertigt jedoch den Begriff

einer „Welt von RNA-Molekülen“. Trotz ihrer Schlüsselrolle bei vielen biochemischen Prozessen wird RNA erst seit kurzem als Zielort von pharmakologischen Wirkstoffen erwogen.^[2] Neben ihrer funktionellen Bedeutung machen weitere Faktoren die RNA zu einem attraktiven Ziel für Wirkstoffe, z.B. die Abwesenheit von RNA-Reparaturmechanismen in der Zelle, die Diversität der dreidimensionalen Strukturen^[3] von RNA-Molekülen und deren Zugänglichkeit in Ribonucleoprotein-Komplexen. Technische Fortschritte bei der Synthese und dreidimensionalen Strukturanalyse von RNA ermöglichen die Erforschung von Struktur-Funktions-Beziehungen und bilden die Grundlage für die rationale Entwicklung von spezifisch gegen RNA gerichteten Wirkstoffen.

Der gegenwärtige Stand der Entwicklung solcher Wirkstoffe und zukünftige Perspektiven sollen im vorliegenden Übersichtsartikel zusammengefasst werden. In Abschnitt 2 soll ein Überblick über einige der biologischen Vorgänge gegeben werden, bei denen RNA-Moleküle eine wichtige

[*] Dr. T. Hermann
Cellular Biochemistry and Biophysics Program
Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
1275 York Avenue, Box 557, New York, NY 10021 (USA)
Fax: (+1) 212-717-3066
E-mail: thermann@sbnmr1.ski.mskcc.org

Rolle spielen. Dabei werden vor allem solche RNA-Moleküle besprochen, die wegen ihrer Rolle bei pathologischen Prozessen als Ziel von Therapeutika in Frage kommen. Die molekularen Erkennungsprozesse, die für die spezifischen Wechselwirkungen zwischen RNA-Molekülen und Peptiden oder Proteinen verantwortlich sind, werden in Abschnitt 3 beschrieben. Im letzten Teil des Aufsatzes (Abschnitt 4) wird diskutiert, wie das gegenwärtige Wissen um die Prozesse, auf denen die Erkennung von RNA-Molekülen durch niedermolekulare Verbindungen beruht, für die Entwicklung von Therapeutika anhand bekannter Strukturen genutzt werden kann.

2. Die Rollen von RNA-Molekülen bei biologischen Prozessen

Die Replikation von Nucleinsäuren und die Expression von Genen sind vermutlich die evolutionsgeschichtlich ältesten zellulären Vorgänge, an denen zahlreiche verschiedene RNA-Moleküle beteiligt sind (Abbildung 1). In den folgenden Abschnitten werden, dem Fluss der genetischen Information von der DNA über „Boten“-RNA (messenger RNA, mRNA) zu Proteinen folgend, die Rollen von RNA-Molekülen bei Replikations- und Expressionvorgängen kurz beschrieben, die entweder unabhängig für das Leben der Zelle sind, oder die spezifisch an pathologische Prozesse gekoppelt sind. Das gegenwärtig rasch expandierende und hochinteressante Gebiet epigenetischer Mechanismen der Genregulation,^[4] bei der RNA-Moleküle an der Abschaltung von Genen und an der Chromatinmodifikation beteiligt sind, wird an dieser Stelle aus Platzgründen nicht besprochen. Ohne Vollständigkeit anstreben zu wollen, wurden von den zellulären Vorgängen, an denen RNA-Moleküle beteiligt sind, einige besonders herausragende ausgewählt.

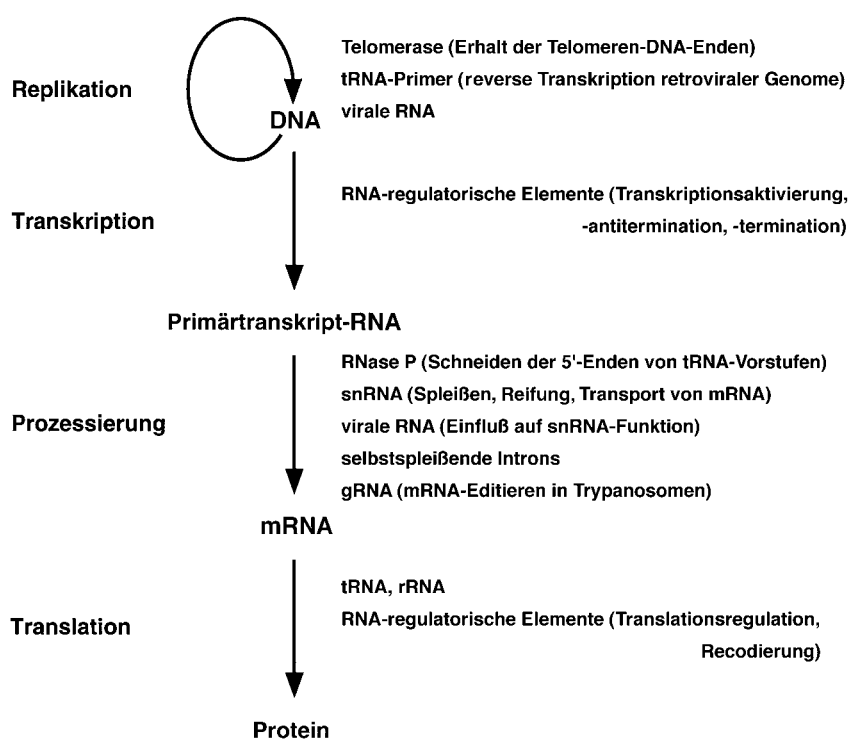


Abbildung 1. Schematische Übersicht einiger wichtiger Prozesse der Genreplikation und -expression, an denen RNA-Moleküle beteiligt sind. Zwischen normalen und pathologischen Vorgängen wurde nicht unterschieden. Für weitere Einzelheiten und Erklärung der Abkürzungen siehe Text.

2.1. Replikation

Die Enden eukaryotischer Chromosomen enthalten Spezies-spezifische Wiederholungseinheiten von DNA-Sequenzen, die bei der Replikation des Genoms für die Erhaltung der Chromosomenlänge verantwortlich sind.^[5] Diese als Telomere bezeichneten DNA-Abschnitte werden von dem Enzym Telomerase synthetisiert. Als Matrize für die Telomeren-Synthese dient ein RNA-Molekül, das ein fester Bestandteil des Telomerase-Ribonucleoprotein-Komplexes ist.^[6] Telomerase ist in Keimzellen und im frühen Embryonalstadium von Wirbeltieren aktiv, jedoch nicht mehr in somatischen Körperzellen. Wegen der bei den meisten Krebsarten des Menschen gefundenen verstärkten Telomerase-Aktivität, einer möglichen Ursache der Immortalisierung von Krebs-



Thomas Hermann, geboren 1966 in Wertingen (Bayern), studierte Chemie an der Universität Ulm, wo er 1992 seine Diplomarbeit in Physikalischer Chemie bei Marwan Dakkouri anfertigte. 1996 promovierte er, gefördert von der Studienstiftung des deutschen Volkes, in Biochemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Für Untersuchungen im Rahmen seiner Doktorarbeit bei Hermann Heumann am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried wurde ihm die Otto-Hahn-Medaille der Max-Planck-Gesellschaft verliehen. Als EMBO-Stipendiat arbeitete er anschließend zwei Jahre lang in der Gruppe von Eric Westhof am CNRS in Straßburg. Zur Zeit ist er Research Associate bei Dinshaw J. Patel am Sloan-Kettering-Institut in New York. Seine Forschungsinteressen umfassen die Beziehungen zwischen Struktur, Dynamik und Funktion von RNA-Molekülen und deren Wechselwirkungen mit Proteinen und niedermolekularen Verbindungen.

zellen, wurden Telomerase-Inhibitoren als potentielle Krebstherapeutika vorgeschlagen.^[7] Die etwa 450 Nucleotide (nt) umfassende RNA-Komponente der Telomerase des Menschen wurde als Ziel von RNA-schneidenden Ribozymen^[8] und Antisense-Nucleinsäuren untersucht.^[9] Um die begrenzte Wirksamkeit von Ribozymen und Antisense-Nucleinsäuren in der Therapie zu verbessern, wurde die Verwendung von chemisch modifizierten Nucleinsäuren^[10] oder selektiven niedermolekularen Inhibitoren, die spezifisch an den Telomerase-RNA-Protein-Komplex binden,^[11] vorgeschlagen. Wegen der erhöhten Telomerase-Aktivität in bestimmten Kinetoplastid-Protozoen, wie *Trypanosoma* und *Leishmania*, wird der Einsatz von Telomerase-Inhibitoren als Therapeutika auch bei parasitären Erkrankungen erwogen.^[12]

Während der Infektion mit Retroviren überträgt das vom Pathogen stammende Enzym Reverse Transkriptase (RT) das virale, einzelsträngige RNA-Genom in eine doppelsträngige DNA-Kopie, die in das Wirtschromosom integriert wird.^[13] Die reverse Transkription geht von einer zellulären Transfer-RNA (tRNA) aus, die zunächst mit der Primer-Bindungsstelle (primer binding site, PBS) der Virus-RNA hybridisiert.^[14] Bei einigen Retroviren wie dem menschlichen Immundefizienzvirus vom Typ 1 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) erhöhen zusätzliche Wechselwirkungen zwischen der als Primer fungierenden tRNA und der viralen genomischen RNA die Spezifität der Initiation der reversen Transkription.^[15] Daten aus Mutagenesestudien und chemischen Modifikationsexperimenten wurden verwendet, um ein Modell des Initiationskomplexes aus Primer-tRNA_{3^{Lys}}, HIV-1-RNA und RT zu konstruieren.^[16] Das resultierende dreidimensionale Modell ist eine mögliche Ausgangsbasis für die Entwicklung von Wirkstoffen, die die Bildung des Initiationskomplexes inhibieren. Molekulare Details der Wechselwirkungen zwischen Nucleinsäuren und der HIV-1-RT im Transkriptionskomplex sind darüber hinaus aus einer Reihe von Kristallstrukturanalysen ersichtlich.^[17]

Eine weitere wichtige intermolekulare RNA-RNA-Wechselwirkung bei der HIV-1-Infektion ist die Dimerisierung von zwei Exemplaren des Virusgenoms.^[18] Die Dimerisierung geht von einer als „RNA-Loop-Loop-Kissing“ bezeichneten Wechselwirkung^[19] aus, die sowohl für die effiziente Replikation als auch für die Einkapselung des Virus mit Hüllproteinen notwendig ist.^[20] Für den Dimer-Initiationskomplex in Lösung^[21] und den reifen Komplex in Lösung und im Kristall^[22] liegen dreidimensionale Strukturmodelle vor.

Die Kontrolle der Kopienzahl von Plasmiden wird in vielen Eubakterien durch eine ähnliche „Kissing“-Wechselwirkung zwischen zwei RNA-Molekülen vermittelt. Plasmide sind zwar nicht von lebenswichtiger Bedeutung für Bakterien, enthalten aber oft die genetische Information für medizinisch relevante Eigenschaften wie Antibiotikaresistenz und Erregerinfektiosität.^[23] Bei der Antisense-kontrollierten Plasmidreplikation bilden zwei Plasmid-codierte, komplementäre RNA-Moleküle einen anfänglichen Kontakt über einen Schleifen-Schleifen-Komplex,^[24] der als Ziel von niedermolekularen Wirkstoffen dienen könnte. Für die Antisense-Hybridisierung bei der Kopienzahlkontrolle einiger eubakterieller Plasmide wie *Escherichia coli* ColE1 ist ferner ein

RNA-bindendes Protein (Rop im Falle von ColE1) erforderlich.^[25]

Die Replikation des 1700 nt umfassenden RNA-Genoms des Hepatitis-Delta-Virus (HDV), eines pathogenen RNA-Satellitenvirus des Hepatitis-B-Virus, erfolgt in einem „Rolling-Circle“-Mechanismus, der zunächst multimere Kopien des Genoms liefert. Die HDV-Ribozyme, katalytische RNA-Motive, die sowohl in der genomischen als auch der antigenomischen RNA vorkommen, zerschneiden die Multimeren in einzelne, lineare Kopien des viralen Genoms.^[26] HDV-Ribozyme werden durch Aminoglycosid-Antibiotika inhibiert,^[27] die spezifisch an dreidimensionale Struktur motive der RNA binden. Während die Molekülstruktur eines HDV-Ribozyms durch eine Röntgenstrukturanalyse bestimmt wurde,^[28] ist die genaue Bindungsstelle der Aminoglycoside bisher unbekannt. Aminoglycoside inhibieren auch die Schneidereaktionen der „Hammerhead“-Ribozyme,^[29, 30] die als katalytische RNA-Moleküle an der Replikation pathogener Pflanzen-Viroide beteiligt sind.^[31] Das Selbstschneiden der HDV- und Hammerhead-Ribozyme verläuft in beiden Fällen nach Metallionen-abhängigen Mechanismen.^[32] Die Verdrängung katalytischer Metallionen durch elektrostatisch komplementäre kationische Moleküle wurde als das allgemeine Wirkprinzip der Aminoglycoside bei der Inhibierung der Aktivität dieser Ribozyme vorgeschlagen.^[33, 34]

2.2. Transkription

Während der Transkription, dem ersten Schritt der Genexpression, synthetisiert die RNA-Polymerase eine RNA-Kopie der DNA-Matrize. Initiation, Elongation und Termination des Transkripts sind präzise kontrollierte Vorgänge in Eubakterien^[35] und Eukaryoten.^[36] RNA-Moleküle stehen in Zentrum einer Reihe regulatorischer Mechanismen,^[37] wie der Transkriptionstermination durch das eubakterielle mRNA-bindende Rho-Protein,^[38] der tRNA-abhängigen Transkriptionsantitermination in Eubakterien^[39] und der *trans*-Aktivierung der Transkription viraler Genome bei HIV und verwandten Retroviren.^[40]

Die *trans*-aktivierende Region (TAR) in der Nähe des 5'-Endes der HIV-mRNA liegt im Bereich einer Haarnadelschleife, an die das virale Tat-Protein bindet. Die Wechselwirkung von Tat mit zellulären Cyclin-abhängigen Kinasen führt zur Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II. Dies hat eine Steigerung sowohl der Initiationsfrequenz als auch der Prozessivität der viralen mRNA-Synthese zur Folge.^[41] Nachdem die Tat-TAR-Wechselwirkung eine unabdingbare Voraussetzung für die virale Replikation ist, konzentrieren sich zahlreiche Ansätze der Suche nach Anti-HIV-Therapeutika auf die Identifizierung und Entwicklung von Verbindungen, die die Bildung und Funktion dieses Protein-RNA-Komplexes verhindern.^[42–50] Niedermolekulare Inhibitoren der Tat-TAR-Wechselwirkung wurden durch rationales Design anhand bekannter Strukturen,^[45] kombinatorische Synthese,^[43] Hochdurchsatz-Screening (high-throughput screening, HTS)^[44, 46] und mit einer Kombination dieser Techniken^[47] gefunden. Für die auf der Struktur beruhende Entwicklung von TAR-spezifischen Li-

ganden^[45, 50] werden die mittlerweile verfügbaren dreidimensionalen Strukturen der freien RNA,^[51] der RNA im Komplex mit Argininamid^[52] und mit Peptid-Fragmenten^[53] des Tat-Proteins hilfreich sein.

In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von Interesse, dass die *trans*-Aktivierung der Transkription im „Red Clover Necrotic Mosaic“(RCNMV)-Pflanzenvirus nicht durch ein Protein, sondern durch ein RNA-Molekül verursacht wird, das an ein TAR-ähnliches Element in der Virus-RNA bindet.^[54] Während bislang ungeklärt ist, ob ähnliche Systeme in anderen Organismen vorkommen, ist die RNA-vermittelte *trans*-Aktivierung der Transkription im RCNMV ein weiteres Beispiel dafür, dass ein RNA-Molekül die Rolle eines Proteins übernehmen kann.

Seit kurzem ist die Beteiligung der HIV-TAR-Struktur an einem weiteren Schlüsselprozess des viralen Replikationszyklus bekannt,^[55] der Einkapselung des RNA-Genoms in virale Hüllproteine.^[56] Dieser Vorgang erfordert die Wechselwirkung der TAR mit einem bislang unbekannten Protein. Während der Einkapselung kommt es zur Bildung eines weiteren Protein-RNA-Komplexes, der sich aus dem viralen Nucleocapsid-Protein (NC) und der aus drei viralen mRNA-Haarnadelsschleifen bestehenden ψ -Signalsequenz zusammensetzt.^[57] Das auf der Struktur beruhende Design von Inhibitoren der NC-RNA-Wechselwirkung könnte durch die bekannte dreidimensionale Struktur des HIV-1-NC, das an die SL3-Haarnadelsschleife der ψ -RNA gebunden ist, erleichtert werden.^[58]

2.3. Prozessierung, Transport und Lokalisation

RNA-Primärtranskripte durchlaufen eine Reihe verschiedener Prozessierungs- und Lokalisationsvorgänge, die von der Art der RNA (mRNA, rRNA, tRNA usw.) und vom Ursprungsorganismus abhängen. Funktionale tRNA-Moleküle werden in allen Organismen von dem Ribonucleoprotein-Enzym RNase P gebildet, das längere RNA-Vorstufen am 5'-Ende prozessiert.^[59] RNase P enthält eine (*Eucarya*) oder mehrere Proteinuntereinheiten (*Eucarya* und *Archaea*) und eine RNA-Komponente von 300–400 nt, die in allen Organismen das katalytisch aktive Zentrum des Enzyms enthält. Während die RNA-Komponente der eubakteriellen RNase P die Schneidereaktion in Abwesenheit der Proteinuntereinheiten katalysieren kann, benötigen die eukaryotischen und archaebakteriellen Enzyme die Proteinbestandteile für ihre Aktivität. Die Enzyme aus Eubakterien und Eukaryoten sind demnach hinreichend verschieden von der eubakteriellen RNase P, so dass eine Entwicklung von Verbindungen denkbar ist, die speziell das eubakterielle Enzym beeinflussen. Die RNase-P-Enzyme von *Escherichia coli*^[60] und dem Wimperntierchen *Tetrahymena thermophila*^[61] werden spezifisch durch Aminoglycoside und das Nucleosid-Derivat Puromycin inhibiert, die an die RNA-Komponente binden. Vitamin-A-Analoga (Retinoide) sind Inhibitoren der RNase P von *Dictyostelium discoideum*, wobei die Bindungsstelle der Verbindungen im Ribonucleoprotein-Komplex jedoch unbekannt ist.^[62] Dreidimensionale Strukturmodelle der RNA-Komponente der eubakteriellen RNase P wurden anhand

vergleichender phylogenetischer Analysen und biochemischer Daten konstruiert.^[63]

Im Plasma des Zellkerns werden die für den Export in das Cytoplasma bestimmten mRNA-Moleküle unter Beteiligung kleiner, im Zellkern lokalisierter Ribonucleoproteine (small nuclear ribonucleoproteins, snRNPs) gebildet. Die RNA-Bestandteile des Ribosoms (ribosomale RNA, rRNA) hingegen werden von den als snoRNPs (small nucleolar ribonucleoproteins) bezeichneten Partikeln im Nucleolus prozessiert.^[64] Wirbeltierzellen enthalten etwa 200 verschiedene snRNPs, die sich jeweils aus einer oder mehreren Proteinuntereinheiten und einer RNA-Komponente (small nuclear RNA, snRNA) von 60–300 nt zusammensetzen. Die wichtigste Funktion der snRNPs ist das Spleißen der Primärtranskripte. Während dieses Vorgangs, der in einem als Spleißosom bezeichneten Komplex aus vielen snRNA-Molekülen abläuft, entsteht die codierende mRNA durch Entfernen von Intronsequenzen.^[65] Bislang ist noch nicht genau aufgeklärt, in welchem Umfang snRNA-Moleküle, die zahlreiche spezifische Protein-RNA- und RNA-RNA-Wechselwirkungen eingehen müssen, an der Katalyse der Prozessierung beteiligt sind. Wirkstoffe, die spezifisch gegen den Spleißapparat von Parasiten gerichtet sind, wurden als potentielle Therapeutika bei Pilz-^[66] und Trypanosomen-Infektionen^[67] beschrieben. Seit kurzem wird versucht, mit Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie die dreidimensionalen Strukturen von snRNP-Proteinen und Protein-RNA-Komplexen aufzuklären, um die molekularen Grundlagen der Protein-RNA-Wechselwirkungen in den snRNP-Partikeln im Detail analysieren zu können.^[68]

Die Genome einer Reihe von Viren codieren für kleine RNA-Moleküle, die zusammen mit snRNP-Proteinen der Wirtszelle virale snRNP-Komplexe bilden,^[64] deren Aufgabe im Infektionszyklus der Viren möglicherweise eine Manipulation des RNA-Prozessierungsapparates des Wirtes ist. Solche viralen RNA-Moleküle finden sich unter anderem bei Infektionen menschlicher B-Lymphozyten mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV),^[69] bei Infektionen von Tumor- und Lymphomzellen mit dem Kaposi-Sarkom-assoziierten Herpesvirus (KSHV)^[70] und als Bestandteile des viralen Replikationskomplexes des „Simian Hemorrhagic Fever Virus“ (SHFV).^[71]

Das Spleißen und der Transport der HIV-mRNA wird durch eine Wechselwirkung zwischen dem viralen Rev-Protein und dem auf Rev ansprechenden Element (Rev-responsive element, RRE) kontrolliert.^[72] RRE bildet eine interne Schleifenstruktur in der RNA des *env*-Gens von HIV. Die genaue Rolle der Rev-RRE-Wechselwirkung ist bislang noch unklar, jedoch scheint sie für den Export von ungespleißter und partiell gespleißter viraler mRNA aus dem Zellkern verantwortlich zu sein. Diese mRNA-Varianten codieren für die Strukturproteine des Virus. Ähnliche Kontrollmechanismen des Spleißens finden sich in anderen Retroviren einschließlich des „Human T-Cell Leukemia Virus“ (HTLV).^[73] Obwohl sich die Sequenzen des regulatorischen Rex-Proteins und des entsprechenden RxRE-RNA-Elements aus HTLV von Rev/RRE aus HIV unterscheiden, sind die Wirkungsmechanismen verwandt.^[74] Die Beobachtung, dass Aminoglycosid-Antibiotika wie Neomycin B selektiv an RRE-RNA

binden und in vivo die Rev-RRE-Wechselwirkung verhindern können,^[75, 76] löste eine intensive Suche nach RRE-bindenden Verbindungen aus.^[77–80] Die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren der Rev-RRE-Wechselwirkung wird von Daten aus der Bestimmung dreidimensionaler Strukturen profitieren, die inzwischen für Komplexe der RNA-bindenden Domäne von Rev mit RRE^[81] und mit RNA-Aptameren^[82] vorliegen.

Ein Sonderfall der mRNA-Prozessierung ist das RNA-katalysierte, vom zellulären Spleißapparat unabhängige Ausschneiden bestimmter Intronsequenzen; zu dieser Familie katalytischer RNAs gehören auch die selbstspleißenden Introns der Gruppe I.^[83] Da diese Intronsequenzen in wichtigen Genen pathogener Mikroorganismen, nicht aber in Säugetierzellen vorkommen, sind sie potentielle Ziele für pharmakologische Wirkstoffe.^[84–86] Gruppe-I-Introns bilden große RNA-Strukturen mit einer konservierten Kerndomäne, in der sich die Spleißstelle und die Bindungstasche des Guanotin-Cofaktors befinden.^[87] Modelle der dreidimensionalen Struktur von Gruppe-I-Introns wurden anhand phylogenetischer Daten konstruiert.^[88] Mittlerweile sind Kristallstrukturen von Fragmenten der Kerndomäne verfügbar.^[89] Das Selbstspleißen der Gruppe-I-Introns wird durch Aminoglycoside,^[84, 90] Peptid-Antibiotika der Tuberactinomycin-Familie^[91] und L-Arginin-Derivate^[85] inhibiert. Auf der Suche nach weiteren Inhibitoren wurden HTS-Tests durchgeführt.^[86, 92]

Das Editieren von mRNA in Mitochondrien von Trypanosomen durch Uridin(U)-Insertion oder -Deletion ist ein weiterer, seltener posttranskriptionaler Modifikationsprozess.^[93] Die Stellen der U-Insertionen und -Deletionen in der mRNA werden spezifisch durch kurze, als „Guide“-RNA (gRNA) bezeichnete Moleküle bestimmt, die in der Nähe des Editierbereichs hybridisieren und Strukturelemente enthalten, die von den Proteinen des Editierapparates erkannt werden.^[94] Nachdem vergleichbare Prozesse in menschlichen Zellen nicht vorkommen, ist das mitochondriale mRNA-Editieren eine attraktive Ansatzstelle für gegen RNA gerichtete Wirkstoffe bei der Therapie von Erkrankungen, die von Trypanosomen verursacht werden.

Sowohl die spezifische Translation von mRNA-Molekülen in bestimmten Kompartimenten des Cytoplasmas als auch die Kontrolle der mRNA-Stabilität in Eukaryoten wird durch spezifische Protein-RNA-Wechselwirkungen vermittelt.^[95, 96] Erst seit kurzem ist bekannt, dass eine große Zahl von mRNA-Molekülen in der Zelle durch RNA-bindende Mikrotubuli- und Actin-assoziierte Proteine am Cytoskelett verankert sind.^[96] Die Lokalisierung von mRNA erfüllt zwei komplementäre Aufgaben: Einerseits können hohe lokale Konzentrationen des von der mRNA codierten Proteins erzielt werden, andererseits wird verhindert, dass das betreffende Protein überall in der Zelle exprimiert wird. Die Bindung zwischen einem internen, im selben Molekül wirkenden (*cis*-acting) RNA-Element, das sich gewöhnlich in der nicht translatierten Region am 3'-Ende (3' untranslated region, 3'-UTR) der mRNA befindet, an ein von außen wirkendes (*trans*-acting) Protein ist ein weitverbreiteter Mechanismus der mRNA-Lokalisation. Da zunehmend Protein-RNA-Wechselwirkungen bekannt werden, die an der

Kontrolle von mRNA-Lokalisation und -Stabilität bei entwicklungsbiologischen und pathologischen Vorgängen beteiligt sind, lässt sich schließen, dass ein breites Spektrum solcher Mechanismen existiert, von denen hier nur ein kleiner Teil angesprochen werden kann.

Defekte bei der Erkennung von regulatorischen Elementen in mRNA-Molekülen durch Proteine sind vermutlich ursächlich an der Entstehung einer Reihe von Krankheiten beteiligt, zu denen die menschliche Autoimmunerkrankung paraneoplastische opsoklonische-myoklonische Ataxie (POMA) und das Syndrom des fragilen X-Chromosoms (fragile X mental retardation syndrome, FMR), die häufigste Form erblicher mentaler Retardationen, gehören. POMA ist eine mit Brustkrebs und motorischer Dysfunktion verbundene Erkrankung, bei der die spezifische Bindung des neuronalen Proteins Nova-1 an RNAs, darunter die für Nova-1 codierende mRNA selbst und die mRNA des inhibitorischen Glycin-Rezeptors $\alpha 2$ (GlyR $\alpha 2$),^[97] durch Antikörper verhindert wird.^[98] Die Kristallstruktur der RNA-bindenden K-Homologie(KH)-Domänen von Nova-1^[99] weist Ähnlichkeiten mit den Strukturen der RNA-bindenden Domänen von FMR1 auf,^[100] einem mRNA-erkennenden Protein, das an der Entstehung von FMR beteiligt ist.^[101]

Kontrollfaktoren, die die Lokalisation und Stabilität steuern, binden an als „Postleitzahlen“-RNA (zipcode RNA) bezeichnete, *cis*-wirkende Sequenzmotive in den 3'-UTRs von mRNA-Molekülen.^[102] Die Lokalisation der mRNA des β -Actins an der Zellperipherie von Fibroblasten wird durch die Wechselwirkung zwischen einem konservierten 54-nt-Motiv in der 3'-UTR und einem Zipcode-Motive bindenden Protein (ZBP) gesteuert.^[103] ZBP-1 hat Sequenzähnlichkeit mit anderen Proteinen wie 1) dem allgemeinen mRNA-Lokalisationsfaktor Vera aus *Xenopus*, 2) dem „Coding Region Determinant-Binding Protein“ (CRD-BP) der Maus,^[104] 3) einem in menschlichen Krebszellen überexprimierten KH-Domänen-Protein (KOC)^[105] und 4) dem „p62 Consensus Sequence RNA-Binding Domain Protein“ (CS-RBD) aus menschlichen hepatozellulären Carcinomzellen (HCC-Zellen).^[106] Vera, ein konserviertes Protein des mRNA-Lokalisationsapparates, bindet spezifisch an ein RNA-Motiv in der 3'-UTR der Vg1-mRNA (Vg = vegetal).^[107] Das KH-Domänen-Protein CRD-BP ist ein Stabilitätsfaktor, der durch Bindung an die codierende Region die Lebensdauer der mRNA des Onkogens *c-myc* erhöht, indem er endonucleolytischen Abbau (Abbau durch Endonucleasen) verhindert.^[105]

Ähnliche Mechanismen der mRNA-Stabilisierung wurden für die mRNA des Urokinase-Rezeptors (uPAR), des „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) und der Tumorspezifischen Genprodukte c-Fos und MYCN gefunden. uPAR-mRNA bindet ein stabilitätsverringendes Protein.^[108] Die 3'-UTR der VEGF-mRNA bindet das heterogene nucleäre Ribonucleoprotein L (hnRNP L).^[109] Die 3'-UTRs der mRNA von c-Fos und MYCN enthalten Bindungsstellen für regulatorische Proteine, die als malignitätsfördernde Faktoren diskutiert werden.^[110]

Die Expression des menschlichen GLUT1-Transporters, der den Transport von Glucose über die Blut-Hirn-Schranke vermittelt, wird von einem 10 nt umfassenden RNA-Element in der 3'-UTR reguliert, das die Stabilität der GLUT1-mRNA

erhöht.^[111] Während das Protein, das mit dem Stabilitätsmotiv wechselwirkt, noch unbekannt ist, wurde gezeigt, dass aus dem Hirn stammende Peptide einen stabilisierenden Effekt ausüben, der durch die Bindung der Peptide an die mRNA vermittelt sein könnte.^[112] Eine RNA-kontrollierte Regulation der mRNA-Stabilität wurde auch in Verbindung mit der Überproduktion von Cytokinen und Amyloid-Vorläuferprotein (amyloid precursor protein, APP) bei Krebsarten und der Alzheimer-Erkrankung beobachtet.^[113] Die Überproduktion von APP könnte durch die Ansammlung von APP-mRNA verursacht sein, deren Halbwertszeit in der Zelle durch 3'-UTR-bindende Proteine verlängert wird. Als eine spezifische Erkennungsstelle für verschiedene cytoplasmatische RNA-bindende Proteine wurde ein 29 nt langes AU-reiches RNA-Motiv in der 3'-UTR der APP-mRNA identifiziert.^[113] Zu diesen Stabilitätsfaktoren zählt das heterogene nucleäre Ribonucleoprotein C (hnRNP C).^[114, 115] Andere, bislang unbekannte Faktoren könnten vielleicht dasselbe 29-nt-Motiv erkennen und möglicherweise den Abbau der APP-mRNA in normalen Zellen beschleunigen. Dafür spricht, dass Mutanten der mRNA, in denen das Motiv deletiert wurde, in vitro und in Abwesenheit stabilisierender Proteine langlebiger sind als intakte Wildtyp-Sequenzen.^[115]

2.4. Translation

Das Ribosom, die zelluläre Synthesemaschine für die auf den mRNA-Molekülen codierten Proteine, ist der Wirkungs-ort der Aminoglycosid-Antibiotika, die spezifisch die ribosomale 16S-RNA-Komponente (rRNA) der Eubakterien erkennen.^[116] Aminoglycoside binden an die „A-Stelle“ der Decodierungsregion der rRNA^[117] und verursachen ein fehlerhaftes Ablesen der mRNA während der Translation.^[118] Die Aminoglycosid-rRNA-Wechselwirkung weist eine bemerkenswerte Spezifität auf. Dadurch können die Aminoglycoside gezielt an die eubakterielle A-Stelle binden, die sich im Wesentlichen durch einen einzigen Basenaustausch von der eukaryotischen A-Stelle unterscheidet (an Position 1408 befindet sich in allen Eukaryoten ein Guanin, in Eubakterien jedoch ein Adenin^[119]). Einen weiteren Beweis für die hohe Spezifität der Aminoglycoside liefert eine erbliche Punktmutation in der mitochondrialen rRNA des Menschen, die zu einer erhöhten Affinität zu Aminoglycosiden und dadurch zu einer toxischen Hypersensitivität gegenüber diesen Wirkstoffen führt.^[120] Die Aufklärung der molekularen Ursachen der Bindungsspezifität von Aminoglycosiden war Gegenstand zahlreicher Studien, bei denen biochemische^[121] und biophysikalische Untersuchungsmethoden^[122–127] eingesetzt wurden. Die dreidimensionalen Strukturen einer 27 nt umfassenden Modell-RNA, die der eubakteriellen A-Stelle entspricht, im Komplex mit den Aminoglycosiden Paromomycin oder Gentamicin wurden durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt.^[122, 125] Um die Stellen zu untersuchen, über die verschiedene Aminoglycoside mit Modellen der A-Stellen-rRNA wechselwirken, wurde eine vielversprechende neue Technik eingesetzt, die auf der Analyse der massenspektrometrischen Fragmentierungsmuster von Aminoglycosid-RNA-Komplexen beruht.^[127] Synthetische Analoga^[128] und

Mimetika^[129–132] der Aminoglycoside wurden auf ihre Fähigkeit hin getestet, die ribosomale Decodierungsregion zu erkennen. Ferner wurde ein HTS-Screening entwickelt, das es ermöglicht, Moleküle mit hoher Affinität für die 16S-rRNA-A-Stelle zu identifizieren.^[133]

Von einigen Antibiotika, deren inhibierende Wirkung auf die Peptidyltransferase-Reaktion des Ribosoms bekannt ist, wurden die Bindungsstellen auf der 23S-rRNA untersucht.^[134] Ein besonders bemerkenswerter Inhibierungsmechanismus wurde für Thiostrepton aufgedeckt, ein Thiazol enthaltendes zyklisches Peptid, das an das konservierte 58 nt umfassende GTPase-Zentrum eubakterieller 23S-rRNA bindet.^[135] Diese Wechselwirkung führt zur Stabilisierung einer tertiären Wechselwirkung in der rRNA^[136] und verhindert dadurch vermutlich eine Konformationsänderung im ribosomalen L11-Protein.^[137] Die seit kurzem bekannte Kristallstruktur des Komplexes zwischen dem L11-Protein und einer RNA, die die L11-Bindungsstelle enthält,^[138] ermöglicht die Untersuchung der molekularen Ursachen der Wirkung von Thiostrepton auf die Funktion des Ribosoms.

Weitere spezifische Bindungsstellen für Thiostrepton wurden in der 28S-rRNA gefunden, die auf extrachromosomaler DNA in Plastid-ähnlichen Organellen von *Plasmodium falciparum* codiert ist.^[139, 140] Ähnlich wie bei der Wirkung auf die 23S-rRNA stabilisiert Thiostrepton eine tertiäre Wechselwirkung in der Plastid-rRNA,^[141] was letztlich zur Inhibierung des Parasitenwachstums führt.^[140]

Licosamide, die zu den Pyrrolidin-Saccharid-Antibiotika gehören, wirken vermutlich durch einen ungewöhnlichen Mechanismus von Substratnachahmung am Peptidyltransferase-Zentrum der rRNA. Das Licosamin Clindamycin kann durch seine dreidimensionale Struktur das erste Adenin der tRNA einschließlich eines daran gebundenen L-Prolin-Methionin-Dipeptids nachahmen.^[142]

Das Pyrrolidin-Antibiotikum Anisomycin ist ein eindrucksvolles Beispiel für eine niedermolekulare Verbindung, die durch spezifische Bindung an RNA einen komplexen Vorgang auslöst. Die Wechselwirkung des Antibiotikums mit der 28S-rRNA eukaryotischer Ribosomen aktiviert, vermutlich durch eine induzierte Konformationsänderung in der rRNA, die Proteinkinase JNK1.^[143] Die gegenwärtigen Fortschritte bei der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Ribosoms werden in Zukunft bedeutend zu mechanistischen Studien von Verbindungen beitragen, die gezielt gegen rRNA gerichtet sind und so die Ribosomenfunktion beeinflussen.^[144, 145]

Strukturelemente der mRNA spielen eine wichtige Rolle bei einer Reihe von Recodierungsmechanismen, deren Ziel die alternative Decodierung der mRNA während der Translation ist.^[146] Ein herausragendes Beispiel ist die programmierte Leserahmenverschiebung bei der Synthese des retroviralen Gag-Pol-Polyproteins. Dabei ermöglichen drei konservierte RNA-Elemente – eine Verschiebungssequenz, ein Abstandshalter und ein stromabwärts (downstream) liegendes Verstärkerelement (Enhancer) – dem Ribosom, ein Stop-Codon zu überlesen.^[147] Das Verstärkerelement besteht aus einer stabilen RNA-Struktur, die ein Pausieren des Ribosoms während der Elongation verursacht, so dass kinetisch ungünstigere alternative Decodierungsschritte bevorzugt werden. In

der RNA einiger Retroviren bildet das Verstärkerelement einen Pseudoknoten,^[148] während HIV ein stabiles Haarnadelmotiv enthält.^[149] Nachdem die retrovirale Replikation von einem ausgewogenen Verhältnis bei der Synthese von Gag-Protein und Gag-Pol-Polypeptid abhängt, sind sowohl künstliche Stabilisierung als auch Destabilisierung des Verschiebungsmotivs als Strategien für eine RNA-gerichtete Therapie retroviraler Infektionen möglich. Die dreidimensionalen Strukturen von RNA-Pseudoknoten, die den Leserahmen verschieben, sind aus NMR-Untersuchungen und kristallographischen Studien verfügbar.^[150] RNA-Pseudoknoten enthalten spezifische Bindungsstellen für niedermolekulare Verbindungen wie das Peptid-Antibiotikum Viomycin^[151] und Biotin.^[152]

Ein besonderes Leserahmen-Verschiebungssignal, das nicht von einem stromabwärts liegenden Verstärkerelement abhängig ist, wurde in der mRNA einer Thymidin-Kinase in einer Herpesvirus-Mutante gefunden.^[153] Die G-reiche Sequenz dieses Verschiebungssignals bildet möglicherweise eine charakteristische dreidimensionale Struktur, die entweder vom Ribosom selbst oder von einem zusätzlichen Faktor erkannt wird.

Die alternative Decodierung eines Stop-Codons tritt im cotranslationalen Einbau von Selenocystein bei der Synthese von Selenoproteinen auf.^[154] In Eukaryoten wird der Recodierungsmechanismus durch die Selenocystein-Insertionssequenz (SECIS), ein konserviertes Strukturmotiv in der 3'-UTR von Selenoprotein-mRNA-Molekülen, ausgelöst.^[155] Das SECIS-Element enthält die Bindungsstelle für SECIS-bindende Proteine (SBP),^[155] die als Elongationsfaktoren eine alternative Decodierung steuern. Analysen viraler Genome weisen darauf hin, dass SECIS-Elemente in verschiedenen pathogenen Viren vorkommen.^[156]

Die Expression einiger für den Transport und die Resorption von Eisen verantwortlicher Proteine wird auf Translationsebene durch Wechselwirkung eines auf Eisen ansprechenden Elements (iron-responsive element, IRE), das in der 3'-UTR der mRNA-Moleküle enthalten ist, mit Eisenregulations-Proteinen (iron regulatory proteins, IRPs) kontrolliert.^[157] Die IREs – eine Familie konservierter, etwa 30 nt umfassender RNA-Haarnadelmotive mit definierter dreidimensionaler Struktur^[158] – sind Erkennungsstellen für verschiedene IRPs. Die IRE-IRP-Wechselwirkungen ermöglichen fein abgestimmte Reaktionen der Zelle in Abhängigkeit von der externen Eisenkonzentration.^[159] Mutationen in einem IRP, die sich möglicherweise auf das RNA-Bindungsvermögen des Proteins auswirken, werden als Ursache der abnormalen Verteilung von Eisen im Hirn von Alzheimer-Patienten vermutet.^[160]

Die Translation der menschlichen Thymidylat-Synthase (TS),^[161] eines wichtigen Zielmoleküls in der Krebstherapie,^[162] unterliegt einer autoregulatorischen Kontrolle, bei der das Protein an seine eigene mRNA bindet. TS bindet ebenfalls spezifisch an andere zelluläre mRNA-Moleküle, die für das Onkogen c-Myc,^[163] Interferon-induzierte Proteine^[164] und den Tumorsuppressor p53^[165] codieren. Die Erkennung der TS durch die TS-mRNA erfordert zwei verschiedene Domänen, von denen eine in der 5'-UTR und eine innerhalb der codierenden Region liegt.^[166] Die Bin-

dungsstelle in der 5'-UTR bildet vermutlich eine Haarnadelstruktur, die – als isoliertes RNA-Fragment – ebenfalls spezifisch an Aminoglycosid-Antibiotika bindet.^[167] Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde eine potentielle Krebstherapie vorgeschlagen, bei der niedermolekulare Verbindungen an die TS-Erkennungsstelle in der 5'-UTR der mRNA binden und so die Translation der TS verhindern.^[167]

3. Molekulare Erkennung von RNA-Molekülen durch Peptide und Proteine

Die Bildung von Protein-RNA-Komplexen ist eine Voraussetzung für die meisten Funktionen von RNA. Die Untersuchung von Protein-RNA-Komplexen liefert Informationen über intermolekulare Wechselwirkungen, die auch zum Verständnis der Erkennungsprozesse niedermolekularer Verbindungen wertvoll sind. Die Strategien der RNA-Bindung von Proteinen ähneln denen kleiner Moleküle. Außerdem sind Protein-Bindungsstellen der RNA potentielle Angriffsorte für Therapeutika. Ein eindrucksvolles Beispiel für ein RNA-Strukturelement, das sowohl von einem Protein als auch von einer niedermolekularen Verbindung erkannt wird, ist ein nichtkanonisches G·G-Basenpaar in der HIV-RRE-RNA. Das virale Rev-Protein und das Aminoglycosid Neomycin B binden gleichermaßen spezifisch an dieses Element.^[75, 168]

An dieser Stelle sollen RNA-Erkennungsstrategien von Peptiden und Proteinen nur kurz angesprochen werden, nachdem einige ausgezeichnete aktuelle Übersichtsartikel zu diesem Thema erschienen sind.^[169–173] Eine rasante Zunahme der Information über Protein-RNA-Wechselwirkungen ist in naher Zukunft von Strukturanalysen des Ribosoms zu erwarten. Gegenwärtig verfügbare Elektronendichtedaten mit einer Auflösung von etwa 8 Å für das komplette Ribosom^[144] und etwa 5 Å für die separaten Untereinheiten^[145] dürften bald zu höheren Auflösungen hin verfeinert und zugänglich sein.

3.1. Allgemeine Prinzipien von Protein-RNA-Wechselwirkungen

Im Vergleich zu DNA-bindenden Proteinen, deren Nucleinsäurebindungsvermögen hauptsächlich auf die Erkennung helicaler doppelsträngiger DNA ausgerichtet ist, spiegeln die Strukturen RNA-bindender Proteine die Komplexität der dreidimensionalen Strukturen von RNA-Molekülen wider, die der von Proteinen vergleichbar ist. Das Vorliegen der meisten RNA-Moleküle als einzelsträngige, zumindest teilweise gefaltete Strukturen ist ein Indiz dafür, dass RNA als wichtiger funktioneller Partner an zellulären Vorgängen beteiligt ist und nicht nur als Zwischenspeicher der genetischen Information dient. Doppelsträngige RNA in der Form regulärer A-Helices ist wenig geeignet für spezifische intermolekulare Wechselwirkungen. Die diskriminatorischen Seiten der Basen sind in einer engen und tiefen Furche (major groove) verborgen.^[174] Die zugängliche flache Furche (minor groove) enthält wenig Strukturinformation für molekulare

Erkennung. Dennoch sind große Teile von RNA-Strukturen in doppelsträngigen Regionen angeordnet, die Paarungen zwischen den Basen aufweisen. Veränderungen der regulären A-Konformation durch nichtkanonische Basenpaare, einzelne ungepaarte Basen und Plattformen von aufeinanderfolgenden Nucleotiden können die tiefe Furche aufweiten und dadurch Basen zugänglich machen.^[171, 172, 175] Solche Veränderungen der RNA-Struktur können von Proteinen erkannt und verstärkt werden. Ein häufiges Wechselwirkungsmotiv in Protein-RNA-Komplexen ist die Insertion einer α -Helix (Abbildung 2A) oder einer flexiblen Schleifenstruktur in

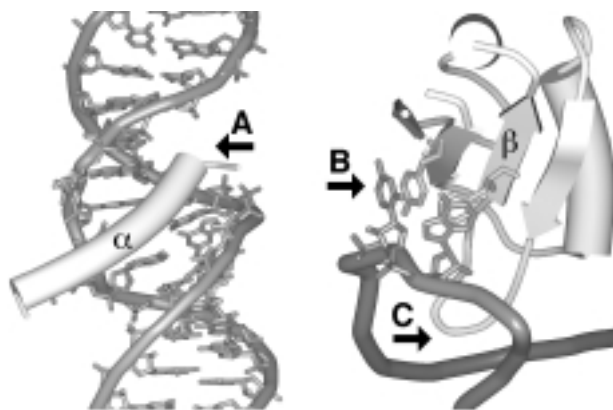


Abbildung 2. Strategien der molekularen Erkennung von RNA-Molekülen durch Proteine, illustriert an den Beispielen eines Komplexes aus einem Rev-Peptid und RRE-RNA (links)^[81] und eines U1A-Protein-RNA-Komplexes (rechts).^[216] Die RNA ist jeweils dunkelgrau, das Protein hellgrau gezeichnet. In der rechten Abbildung ist nur das RNA-Rückgrat in Schlauchdarstellung gezeigt. A: Die Aufweitung der tiefen Furche der RNA durch ungepaarte Basen, nichtkanonische Basenpaare oder Basen-tripel ermöglicht die Insertion einer α -Helix. Seitenketten von Aminosäuren der α -Helix können Wechselwirkungen mit Basenpaaren und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der RNA eingehen. B: Aromatische Seitenketten an der Oberfläche von β -Faltblättern sind für Stapelwechselwirkungen mit ungepaarten Basen in RNA-Schleifen zugänglich. C: Flexible Proteinschleifen können tiefer in RNA-Strukturen eindringen und H-Brücken und ionische Wechselwirkungen, bevorzugt mit dem RNA-Rückgrat, eingehen. Die Abbildungen wurden anhand von Atomkoordinaten aus der Protein Data Bank (PDB), Brookhaven, angefertigt (PDB-Codes: 1ETF, links; 1URN, rechts).

die aufgeweitete tiefe Furche der RNA.^[172, 173] Ungepaarte RNA-Regionen können mit zugänglichen β -Faltblättern in Proteinen wechselwirken, wobei einzelne Basen mit den aromatischen Seitenketten von Aminosäuren Stapelwechselwirkungen eingehen (Abbildung 2B).^[170, 171] Flexible Proteinschleifen gehen Wechselwirkungen hauptsächlich mit dem Rückgrat von RNA-Molekülen ein (Abbildung 2C), was die Mobilität dieser Schleifen verringert.^[171, 173]

Ein Vergleich von RNA-Komplexen kleiner Peptide mit solchen größerer Proteine zeigt bemerkenswerte Unterschiede.^[172, 176, 177] In Peptiden werden häufig adaptive Konformationsänderungen beobachtet, während sich die Struktur der gebundene RNA wenig ändert. Im Unterschied dazu passen sich RNA-Moleküle an ihre Bindungsstellen in großen Proteinen an, die dabei selbst weitgehend unverändert bleiben.

3.2. Molekulare Details von Protein-RNA-Wechselwirkungen

An den intermolekularen Wechselwirkungen in Protein-RNA-Komplexen sind vor allem die Proteinseitenketten beteiligt (ca. 90 % der Wechselwirkungen in allen Komplexen bekannter Struktur^[178]), die hauptsächlich als H-Brücken-Donoren fungieren. Die wichtigsten H-Brücken-Acceptoren in RNA sind die negativ geladenen Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats. An etwa 20 % der intermolekularen Wechselwirkungen in Protein-RNA-Komplexen sind 2'-OH-Gruppen der RNA beteiligt, ungefähr genauso oft als H-Brücken-Donor wie als -Acceptor.^[178] An den Moleküloberflächen von RNA-bindenden Peptiden und Proteinen finden sich häufig basische Aminosäuren, wie Arginin und Lysin, die an etwa 60 % der intermolekularen H-Brücken in Protein-RNA-Komplexen beteiligt sind.^[178] Aminosäuren mit sauren Seitenketten sind entsprechend selten an der Kontaktfläche zwischen Proteinen und RNA zu finden. Die wichtige Rolle der Aminosäure Arginin bei Protein-RNA-Wechselwirkungen beruht sowohl auf ihrem vielseitigen H-Brücken-Bindungspotential als auch auf ihrer planaren Guanidinium-Seitenkette, die zusätzliche Stapelwechselwirkungen mit Basen der RNA eingehen kann.

Intermolekulare Stapelwechselwirkungen können in Protein-RNA-Komplexen stark ausgeprägt sein, wobei eine enge wechselseitige Verzahnung^[172] von Basen der RNA und Aminosäuren des Proteins auftreten kann. Hydrophobe Teile der RNA-Basen, die in Tripeln, Plattformen und nichtkanonischen Basenpaaren zugänglich werden, stehen als Oberflächen für die Bindung unpolarer Proteinseitenketten bereit.^[172] Die Watson-Crick-Seiten der RNA-Basen sind wichtige Kontaktstellen für H-Brücken.^[172, 175] Hierfür geeignet sind speziell die Positionen 6 und 7 der Purinbasen und die Position 4 der Pyrimidinbasen, die sich in der tiefen Furche helicaler RNA befinden.

Für die molekulare Erkennung von RNA durch ein in der flachen Furche bindendes Peptid ist bisher nur ein einziger Fall bekannt. Dabei bindet ein zehn Aminosäuren langes Peptid an eine RNA-Helix, wenn diese ein zentrales G·U-Basenpaar enthält, nicht aber wenn ein G·C-Paar vorliegt.^[179] Dieses Beispiel demonstriert die bemerkenswerte Spezifität von Protein-RNA-Wechselwirkungen, die es Proteinen ermöglicht, kleinste Strukturmerkmale der RNA, wie die exponierte Aminogruppe eines einzelnen G·U-Paars, zu erkennen.

Nichtkanonische Basenpaare sind generell hervorragend geeignete Erkennungsstellen für Proteine in RNA-Molekülen.^[175] Beispiele sind gescherte (sheared) G·A-Paare, deren in Moleküldynamik(MD)-Simulationen beobachtete charakteristische „In-Plane-Breathing“-Dynamik^[180] die Wechselwirkung funktioneller Gruppen der Basen mit Proteinseitenketten erleichtert.

Schließlich spielen Ionen und Wasser als feste Bestandteile der dreidimensionalen Struktur von RNA-Molekülen^[181] eine wichtige Rolle bei Protein-RNA-Wechselwirkungen. Orientierte Wassermoleküle finden sich häufig an den Kontaktflächen von Protein-Nucleinsäure-Komplexen, wo sie durch Auffüllen von Hohlräumen zu einem verbesserten Oberflä-

chenkontakt beitragen.^[178] RNA-Moleküle sind ihrem Charakter als Polyanionen entsprechend von einer größeren Zahl positiv geladener Gegenionen umgeben, die mit Proteinen um Bindungsstellen konkurrieren.^[182] Proteine binden unter Bedingungen niedriger Ionenstärke an RNA durch die entropisch vorteilhafte Verdrängung von Kationen aus elektronegativen Taschen der Nucleinsäure. Bei hohen Salzkonzentrationen kehrt sich dieser Prozess um, da polare intermolekulare H-Brücken durch die Salzionen destabilisiert werden und eine Konkurrenz zwischen den Hydratationsgleichgewichten der geladenen Gruppen und der freien Ionen auftritt.^[183]

4. RNA-Erkennung durch niedermolekulare Verbindungen

Techniken für die Einbringung großer, oft hoch geladener Moleküle in Zellen und sichere virale Vektoren für die Gentherapie werden in Zukunft voraussichtlich Therapieansätze ermöglichen, die den Einsatz komplexer Biomoleküle wie Antisense- und Ribozym-RNA erfordern. Gegenwärtig jedoch konzentriert sich die Entwicklung von Leitstrukturen für Therapeutika nach wie vor auf niedermolekulare synthetische Verbindungen und Naturstoffe. Die folgende Diskussion wird sich auf die Erkennungsprinzipien konzentrieren, die den Wechselwirkungen zwischen natürlich vorkommenden RNA-Molekülen und niedermolekularen Verbindungen zugrunde liegen. Aptamere – Nucleinsäuremoleküle, die durch In-Vitro-Selektion (SELEX) aus Zufallssequenzen erhalten wurden und Substratmoleküle mit hoher Spezifität und Affinität binden –, werden nur in einigen wenigen Fällen besprochen. Die Beobachtung, dass in vitro selektierte Aptamer-RNA ihre Liganden auch in vivo erkennen,^[184] weist darauf hin, dass die Prinzipien der adaptiven molekularen Erkennung in Aptamerkomplexen^[177] für Strategien der rationalen Entwicklung von Wirkstoffen gegen natürlich vorkommende RNA-Moleküle nützlich sein könnten. Aktuelle Übersichtsartikel geben einen umfassenden Einblick in die Selektion von Aptameren,^[185] deren dreidimensionale Strukturen^[177, 186, 187] und Nutzung als Diagnostika, Therapeutika^[188] und bei der Wirkstoffentwicklung.^[189]

4.1. Prinzipien der gezielten molekularen Erkennung von RNA-Molekülen

Bei der Untersuchung und Beschreibung der Wechselwirkungen zwischen niedermolekularen Verbindungen und RNA wurden anfangs überwiegend Konzepte verwendet, die bereits früher anhand von DNA-Komplexen entwickelt worden waren. Daher waren Intercalatoren und Moleküle, die in den Furchen doppelhelicaler Strukturen binden, unter den ersten systematisch auf ihr Nucleinsäurebindungsvermögen getesteten Verbindungen.^[190] Die weitgehenden Unterschiede in den dreidimensionalen Strukturen von RNA-Molekülen,^[3] die im Vergleich zu DNA nicht auf reguläre Doppelhelices beschränkt sind, schränken jedoch die Übertragbarkeit von DNA-Erkennungsstrategien auf RNA ein. Reguläre RNA-

Doppelhelices sind wegen ihrer Struktureigenschaften ungeeignet als spezifische Bindungsstellen für Wirkstoffe. Sieht man vom Zusammenhang zwischen Sequenz und dreidimensionaler Struktur ab, ist demnach das Konzept der Sequenzspezifität keine gute Leitlinie für die Suche nach Therapeutika, die gegen RNA gerichtet sind.

Die spezifische Erkennung von RNA ist prinzipiell der Erkennung von Proteinen verwandter als der von DNA. Andererseits sind die verschiedenen Energiebeiträge zur Bindung von Effektmolekülen bei RNA anders zu gewichten als bei Proteinen. Diese Beiträge setzen sich zusammen aus elektrostatischen Kräften, H-Brücken und verschiedenen nichtkovalenten Wechselwirkungen, wie van-der-Waals-, Stapel- und hydrophoben Wechselwirkungen, die durch Komplementarität von Moleküloberflächen maximiert werden. In den folgenden Abschnitten wird diskutiert, wie diese Kräfte die Bindung niedermolekularer Verbindungen an RNA-Moleküle beeinflussen und wie die Entwicklung von gegen RNA gerichteten Wirkstoffen vom gegenwärtigen Verständnis dieser Wechselwirkungen in RNA-Komplexen profitieren kann.

4.2. Elektrostatische Wechselwirkungen und Metallionenbindung

Wegen des polyanionischen Charakters von RNA spielen elektrostatische Kräfte eine bedeutende Rolle für die intermolekularen Wechselwirkungen in RNA-Komplexen. Mehrere positiv geladene Gruppen finden sich in den meisten RNA-bindenden Molekülen (Abbildung 3), darunter Naturstoffe wie die Aminoglycosid-^[191] und Tuberactinomycin-Antibiotika^[91] und synthetische Verbindungen, wie Aminoglycosid-Derivate und -Mimetika,^[30, 49, 79, 128–132, 192] Diphenylfurane,^[77] Cyclophane,^[47, 193] Makrocyclen,^[80] Polyamin-Acridin-Konjugate,^[45] Arginin-Derivate^[48, 49] und Peptoid/Peptid-Oligomere.^[43] Die Bindungsaffinität in RNA-Komplexen beruht verstärkt auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen RNA-Rückgrat und kationischen Gruppen. Welche Rolle aber spielen elektrostatische Kräfte für die Vermittlung von Bindungsspezifität? Der Mangel an räumlicher Richtungsorientierung dieser Kräfte lässt sie in der Regel als Beiträge zur unspezifischen Bindung erscheinen. Wie Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen Aminoglycosiden mit verschiedenen RNA-Molekülen gezeigt haben,^[30, 34, 128, 129, 192] können elektrostatische Kräfte dennoch die spezifische Erkennung von konformativ festgelegten polykationischen Molekülen an RNA-Strukturen vermitteln. In quantitativen Experimenten mit der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie wurde beobachtet, dass eine zunehmende Konkurrenz von ionischen Wechselwirkungen durch Zugabe von Salz zu RNA-Aminoglycosid-Komplexen die spezifische wie auch die unspezifische Komponente der Bindungsaffinität im etwa gleichen Ausmaß reduziert.^[128] Anders ausgedrückt trägt der elektrostatische Anteil der Bindungsenergie erwartungsgemäß zur unspezifischen Bindung, aber in bemerkenswertem Umfang auch zur spezifischen Bindung bei. Der spezifische Anteil elektrostatischer Wechselwirkungen kann durch zwei Mechanismen vermittelt

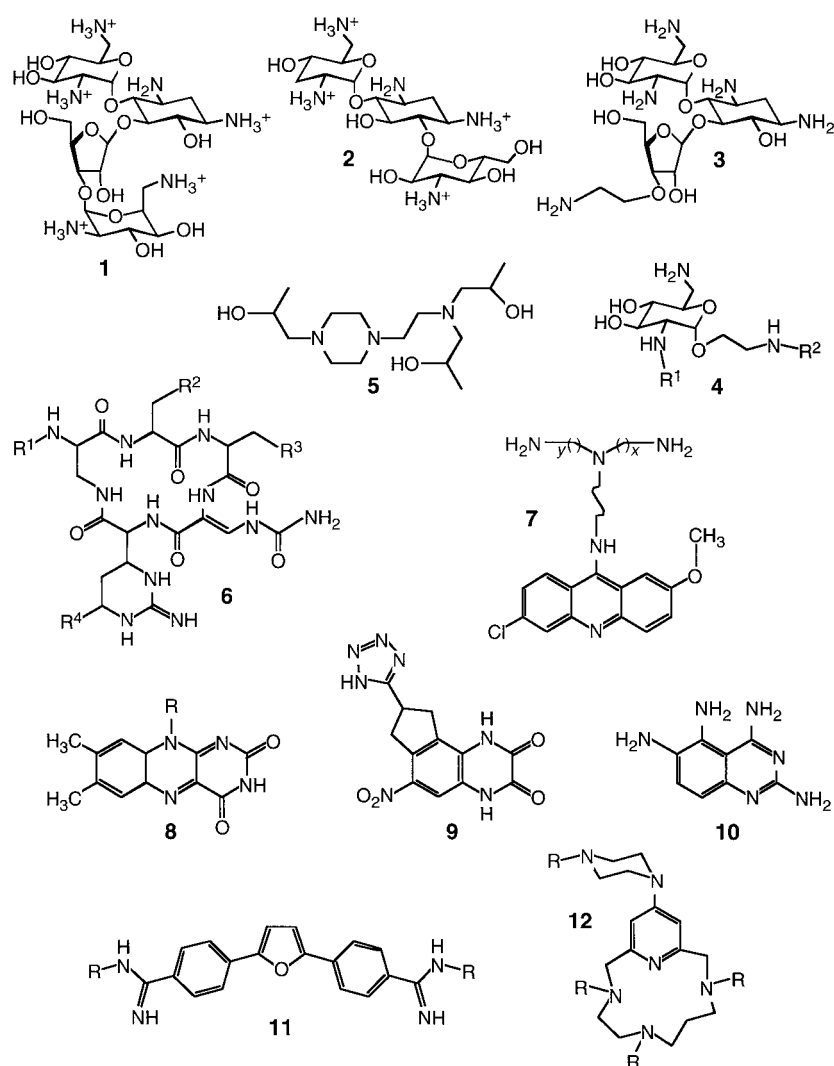


Abbildung 3. Auswahl einiger RNA-bindender Moleküle, die verschiedene RNA-Strukturen spezifisch erkennen (weitere Einzelheiten siehe Text): natürlich vorkommende Aminoglycosid-Antibiotika (Neomycin B **1**, Tobramycin **2**);^[191] vereinfachte semisynthetische Aminoglycosid-Mimetika (**3** und **4**);^[128, 130] ein Aminol-Aminoglycosid-Surrogat (**5**);^[131] natürliche Tuberactinomycin-Antibiotika (**6**; R^1 und/oder R^3 sind gewöhnlich kationische Substituenten);^[91] In-PRiNts (**7**);^[45] lichtaktivierbare, RNA-schneidende Flavinderivate (**8**);^[204] ein Chinoxalin-2,3-dion (**9**);^[46] ein 2,4-Diaminochinazolin (**10**);^[46] substituierte Diphenylfurane (**11**);^[77] Piperazinyl-Polyazacyclophane (**12**).^[47] Die meisten dieser Verbindungen sind bei physiologischem pH-Wert positiv geladen. Die protonierte Form ist hier nur für die natürlichen Aminoglycoside gezeigt, deren exakte pK_a -Werte bekannt sind.^[217]

werden. Zum einen sind an den elektrostatischen Wechselwirkungen mit RNA oft polare H-Brücken zwischen anionischen Sauerstoffatomen als Acceptoren und positiv geladenen H-Donor-Gruppen in den Liganden beteiligt (Abbildung 4A). Während die elektrostatischen Kräfte zwischen den geladenen Atomen zur Bindungsenergie beitragen, vermittelt die gerichtete Natur von H-Brücken eine räumliche Direktionalität der Wechselwirkung. Beispiele für solche polaren H-Brücken sind die Kontakte zwischen Phosphat-Sauerstoffatomen der RNA und Ammoniumgruppen der Aminoglycoside, wie sie in den dreidimensionalen Strukturen von RNA-Aminoglycosid-Komplexen gefunden wurden.^[122, 125, 194, 195] Weiterhin erzeugt die dreidimensionale Faltung der RNA-Kette in eine Anordnung von räumlich orientierten anionischen Gruppen elektronegative Taschen,

in denen negative Ladung fokussiert ist.^[196] Die räumliche Verteilung der negativ geladenen Taschen in einer RNA-Struktur kann für die spezifische Bindung von elektrostatisch komplementären Verbindungen genutzt werden.^[33, 34, 50]

Dieses Prinzip der spezifischen Bindung durch elektrostatische Kräfte findet sich bei der Wechselwirkung von Aminoglycosiden mit RNA-Molekülen, wie sie für das Hammerhead-Ribozym eingehend untersucht wurde. Diese katalytische RNA dient als Modellsystem für die Analyse von Wechselwirkungen zwischen RNA und niedermolekularen Verbindungen, da über die Messung der katalytischen Aktivität neben der Bindungsaffinität auch die Spezifität einer Substanz bestimmt werden kann. Aufbauend auf dem Befund, dass Neomycin B (**1** in Abbildung 3) die Selbstspaltungsaktivität des Hammerhead-Ribozyms inhibiert, indem es mit der RNA um die Bindung von katalytischen Metallionen konkurriert,^[29] wurde gezeigt, dass in Lösung Konformere von Aminoglycosiden konformativ festgelegte Anordnungen kationischer Ammoniumgruppen enthalten, die in einer geeigneten räumlichen Orientierung vorliegen, um gleichzeitig mehrere Mg^{II} -Ionen von ihren Bindungsstellen in den elektronegativen Taschen der Hammerhead-Struktur zu verdrängen (Abbildung 4C).^[33] Ergebnisse aus MD-Simulationen von Hammerhead-Aminoglycosid-Komplexen weisen darauf hin, dass die Ammoniumgruppen der Aminoglycoside die Wechselwirkung der Mg^{II} -Ionen mit der RNA bis in atomare Details nachahmen können (Abbildung 5 A, B).

Experimentelle Untersuchungen an Hammerhead-Komplexen mit Aminoglycosid-Derivaten, in denen die Zahl, die Basizität oder die Flexibilität der Ammoniumgruppen systematisch moduliert wurden,

^[30, 128, 192] stützen das Modell der strukturellen elektrostatischen Komplementarität.^[34] Die inhibitorische Aktivität ist verstärkt, wenn entweder die Zahl oder die Ladungsdichte der Ammoniumgruppen in den Aminoglycosiden erhöht wurde.^[30, 34, 192] Die Bindungsspezifität der Aminoglycoside ist vermindert, wenn die konformative Fixierung der Molekülstruktur durch Ersatz eines der Ringe durch eine flexiblere aliphatische Seitenkette mit einer oder mehreren Aminogruppen verringert wurde (Verbindungen **3** und **4** in Abbildung 3).^[128]

Das Konzept der elektrostatischen Komplementarität wurde erfolgreich zur Erklärung der strukturellen Grundlagen der Inhibition der selbstspaltenden Gruppe-I-Introns durch Aminoglycoside verwendet.^[197] Für die Katalyse benötigte Mg^{II} -Ionen können aus dem katalytisch aktiven Zentrum

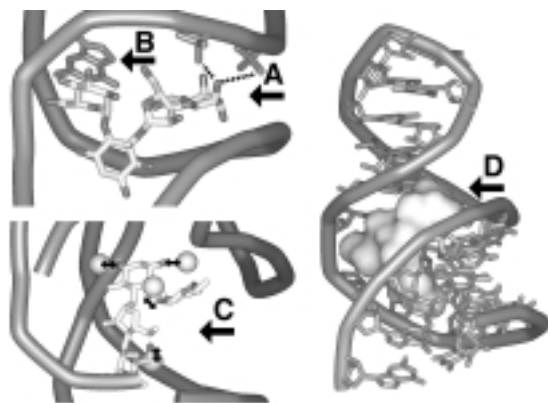


Abbildung 4. Einige Prinzipien der molekularen Erkennung von RNA durch niedermolekulare Verbindungen, illustriert anhand schematischer Darstellungen eines Komplexes aus 16S-A-Stellen-RNA und Paromomycin (links oben und rechts)^[122] und eines Hammerhead-RNA-Neomycin-Komplexes (unten links).^[33] Die RNA ist dunkel gezeichnet und in den linken Abbildungen als Schlauch dargestellt. Der Ligand ist hellgrau gezeichnet, in den linken Abbildungen in Stabdarstellung, rechts als raumfüllendes Oberflächenmodell. A: Zwischen polaren Donor- und Acceptor-Gruppen im Liganden und der RNA können sich H-Brücken bilden. Häufig sind negativ geladene Phosphatgruppen des RNA-Rückgrats als Acceptoren in H-Brücken mit kationischen Substituenten (hier: Ammoniumgruppe) der niedermolekularen Verbindung beteiligt. B: Flache, aber nicht notwendigerweise ideal planare hydrophobe Molekülfragmente, wie der hier gezeigte Zuckerring, stehen für Stapelwechselwirkungen mit Basen der RNA zur Verfügung. C: Niedermolekulare Verbindungen können aufgrund struktureller elektrostatischer Komplementarität kationische Gruppen in eine präzise räumliche Orientierung bringen, die der Anordnung der Metallionen-Bindungstaschen in RNA-Strukturen entspricht. In der vorliegenden Abbildung wurde eine Konformation von Neomycin in Lösung so an die Kristallstruktur der Hammerhead-RNA angedockt, dass die positiv geladenen Ammoniumgruppen des Antibiotikums in Richtung der kristallographisch bestimmten Mg^{II} -Bindungsstellen (Kugeln) weisen (Pfeile). D: Die Komplementarität zwischen den Kontaktflächen der niedermolekularen Verbindung und der RNA maximiert die intermolekularen van-der-Waals-Wechselwirkungen und trägt zur Spezifität der Bindung bei. Die Teilabbildungen links oben und rechts wurden mit Koordinaten aus der Brookhaven Protein Data Bank angefertigt (PDB-Code 1A3M). Die Abbildung links unten wurde aus Lit. [33] mit Veränderungen übernommen.

eines Gruppe-I-Introns durch Andocken von Lösungskonformeren von Neomycin B verdrängt werden.

Während die direkte Beteiligung von Metallionen an der Funktion von RNA auf Ribozyme beschränkt sein mag, bietet die Rolle von Kationen bei der Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur vermutlich aller RNA-Moleküle eine allgemeine Strategie, um niedermolekulare Verbindungen durch positiv geladenen Gruppen in Metallionen-Bindungstaschen der RNA spezifisch zu verankern. Ein hierarchisches Verfahren zur theoretischen Untersuchung von RNA-Wirkstoff-Wechselwirkungen wurde entwickelt, mit dem zunächst die elektronegativen Taschen einer RNA-Struktur berechnet^[196] und dann, auf der Grundlage von struktureller elektrostatischer Komplementarität, Andockstellen für kationische Verbindungen vorhergesagt werden können.^[50, 198] Diese Vorhersagemethode wurde zur Konstruktion von Komplexen zwischen HIV-1-TAR-RNA und Aminoglycosiden verwendet, mit denen der experimentell gesicherte allosterische Mechanismus, über den Neomycin die Dissoziation von Tat-TAR-Komplexen bewirkt,^[199] auf molekularer Ebene erklärt werden konnte.^[50]

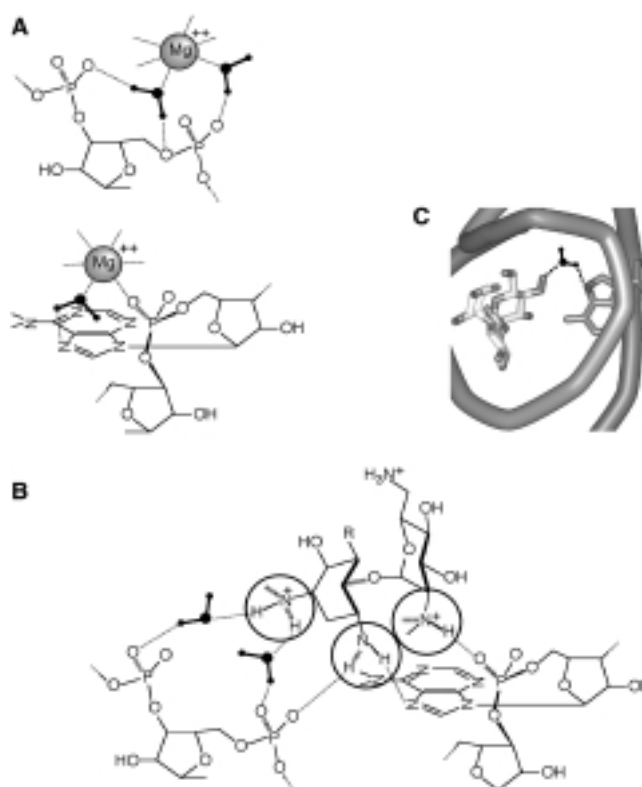


Abbildung 5. Im Hammerhead-Ribozym können Mg^{II} -Ionen von ihren in der Kristallstruktur^[218] bestimmten Bindungspositionen (A) durch Ammoniumgruppen von Aminoglycosiden verdrängt werden, deren Wechselwirkungen mit der RNA den Wechselwirkungen der Metallionen bis in atomare Details gleichen (B).^[33] Wassermoleküle (schwarze Kugel-Stab-Modelle) vermitteln eine gewisse Plastizität der Bindung. C: Eine vorgeschlagene wasservermittelte Wechselwirkung zwischen einer Hydroxygruppe des Liganden (Stabdarstellung) und dem N7-Atom eines Adenins der RNA (Schlauchdarstellung) in der dreidimensionalen Struktur eines Komplexes aus Tobramycin und Aptamer-RNA in Lösung.^[194] Die Abbildungen A und B wurden mit Veränderungen aus Lit. [33] übernommen. Die Abbildung C wurde anhand von Koordinaten angefertigt, die freundlicherweise von D. J. Patel zur Verfügung gestellt wurden.

4.3. H-Brücken und wasservermittelte Wechselwirkungen

Die Untersuchung des H-Brücken-Bildungsvermögens einzelner Atome in Protein-RNA-Komplexen (siehe Abschnitt 3.2) gelten entsprechend für Komplexe aus RNA und niedermolekularen Verbindungen. Wie schon angedeutet können polare H-Brücken vor allem zwischen Phosphatgruppen des RNA-Rückgrats als Acceptoren und Wasserstoffatomen der niedermolekularen Verbindung bedeutend zur Bindung zwischen RNA und Wirkstoffen beitragen. Ein Großteil der vorhandenen Daten über H-Brücken-Bildung in RNA-Wirkstoff-Komplexen stammt aus Untersuchungen von RNA-Aminoglycosid-Komplexen,^[200] darunter NMR-Studien von Aminoglycosiden, die an Aptamer-RNA^[194, 195, 201] und an Oligonucleotide, die aus der eubakteriellen rRNA-A-Stelle abgeleitet wurden,^[122, 124, 125] gebunden sind.

Experimentell bestimmte dreidimensionale Strukturen von RNA-Aminoglycosid-Komplexen zeigen, dass sowohl die Ammonium- wie auch die Hydroxygruppen der Wirkstoffe

als H-Brücken-Donoren überwiegend mit Sauerstoffatomen der RNA-Phosphatgruppen (Abbildung 4A) und mit den N7- und O4-Atomen von Purinen bzw. Uridin in Wechselwirkung treten.^[122, 124, 125, 194, 195, 201] Ähnliche Wechselwirkungen wurden in Modellkomplexen aus dem Andocken von Aminoglycosiden an RNA-Moleküle beobachtet.^[33, 202]

Die stereochemische Vielfalt der Substitutionsstellen für Ammonium- und Hydroxygruppen in Aminoglycosiden und deren beschränkte konformativer Flexibilität bieten vielfältige Möglichkeiten, um H-Brücken-Donoren räumlich so zu orientieren, dass ein enges Netz von H-Brücken zur spezifischen Erkennung von RNA-Strukturen entsteht. Die spezielle Eignung der Aminoglycoside für die Erkennung von RNA-Molekülen spiegelt sich in dem breiten Spektrum von RNA-Zielstrukturen wider, die jeweils spezifisch einzelne Aminoglycosid-Derivate mit hoher Affinität binden. Daher wurde vorgeschlagen, die grundlegenden Zuckerbausteine der Aminoglycoside als Synthone für die Entwicklung von gegen RNA gerichteten Wirkstoffen zu verwenden.^[33] Die Aminoglycosid-Bausteine wurden sowohl durch konventionelle^[128, 129, 131] als auch durch kombinatorische^[79, 130] Synthesemethoden vereinfacht, um synthetisch leicht zugängliche Kohlenhydratmimetika zu erhalten (**3** und **4** in Abbildung 3).^[132, 203]

Die Bildung von H-Brücken mit der 2-Aminogruppe eines Guanins ist vermutlich für die Erkennung von G·U-„Wobbel“-Basenpaaren in der flachen Furche durch ein kurzes Peptid verantwortlich.^[179] In einer ähnlichen Wechselwirkung vermittelt eine H-Brücke zwischen der 2-Aminogruppe eines Guanins und einer Carbonylgruppe eines Isoalloxazinrests die spezifische Erkennung eines G·U-Paars in der flachen Furche von RNA durch lichtaktivierbare, RNA-spaltende Flavinderivate (**8** in Abbildung 3).^[204, 205]

Wassermoleküle können an der H-Brücken-Bildung in Komplexen niedermolekularer Verbindungen mit RNA beteiligt sein, wie im Falle eines RNA-Aptamer-Tobramycin-Komplexes, in dem eine wasservermittelte H-Brücke zwischen einer Hydroxygruppe des Aminoglycosids und einem N7-Atom eines Adenins möglich ist (Abbildung 5C).^[194] Auch in MD-Simulationen von Hammerhead-RNA-Aminoglycosid-Komplexen wurden solche wasservermittelten Wechselwirkungen zwischen niedermolekularen Verbindungen und RNA, bevorzugt zu Phosphatgruppen und zu N7-Atomen von Purinen beobachtet (Abbildung 5B).^[33]

4.4. Stapelung und Intercalation

Die Basen von RNA-Molekülen stehen als Oberflächen für Stapelwechselwirkungen zur Verfügung, deren Grundlage hydrophobe Effekte, wie der Ausschluss von polaren Lösungsmittelmolekülen aus der unpolaren Umgebung der Oberflächen, van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wechselwirkungen zwischen aromatischen π -Elektronensystemen sind.^[206] Das ganze Spektrum dieser Wechselwirkungen trägt zur klassischen Intercalation planarer aromatischer Reste zwischen die Basenpaare von Nucleinsäuren bei. Eine Reihe von Antibiotika und Tumorthapeutika binden durch diesen Mechanismus an doppelsträngige DNA.^[207] Verschiedene

Klassen von DNA-Intercalatoren wurden auf ihr RNA-Bindungsvermögen hin untersucht,^[208] wobei sich zeigte, dass die meisten der an DNA bindenden Moleküle auch in A-Form-RNA-Duplexe intercalieren.^[190] Die Wechselwirkungen sowohl von klassischen Intercalatoren wie Ethidium^[209] als auch von Molekülen, die partiell in einzelsträngige Basenstapel intercalieren („bookmarking“) wie Kupfer-Phenanthrolin,^[210] wurden in modellierten Komplexen von HIV-TAR und tRNA untersucht.

Die klassische Intercalation ist aufgrund der physikalischen Natur der beteiligten Wechselwirkungskräfte relativ unspezifisch. In einem Ansatz zur rationalen Wirkstoffentwicklung gegen den HIV-Tat-TAR-Komplex wurden die In-PRiNTs (inhibitor of protein-ribonucleotide sequences;^[45] **7** in Abbildung 3) entwickelt, in denen ein aromatischer Acridinrest, der Stapelwechselwirkungen vermitteln soll, und eine flexible polykationische Seitenkette, die elektrostatische Wechselwirkungen eingehen kann, über eine aliphatische Brücke verbunden sind. Obwohl dieser Ansatz eine Reihe vielversprechender Tat-TAR-Inhibitoren lieferte, zeigten sich große Aktivitätsunterschiede zwischen verschiedenen Verbindungen, die nicht aufgrund einfacher Struktur-Wirkungs-Beziehungen erklärt werden konnten.^[45] Dies deutet darauf hin, dass zusätzliche Randbedingungen, wie eine festgelegte konformative Flexibilität die Inhibitorspezifität erhöhen könnten. Für die Klasse der In-PRiNTs wurde eine Stapelwechselwirkung mit der RNA vorgeschlagen, die sich von klassischer Intercalation dadurch unterscheidet, dass zusätzliche H-Brücken zwischen dem substituierten Acridinrest und RNA-Basenpaaren gebildet werden.^[45] Nichtklassische Intercalation wurde auch als Bindungsmodus synthetischer Diphenylfuran-Kationen (**11** in Abbildung 3) diskutiert, die selektiv die Bindung des HIV-Rev-Proteins und die RRE-RNA inhibieren.^[77]

Vor kurzem wurde über die spezifische Inhibition der HIV-Tat-TAR-Wechselwirkung durch Derivate von Chinoxalin-2,3-dion und 2,3-Diaminochinazolin (**9** bzw. **10** in Abbildung 3) berichtet, die einen internen ungepaarten Basenbereich bzw. eine Haarnadelschleife der TAR-RNA erkennen.^[46] Obwohl detaillierte Strukturmodelle der Komplexe zwischen TAR und diesen Verbindungen nicht verfügbar sind, ist es wahrscheinlich, dass Stapelwechselwirkungen zur RNA-Affinität beitragen, da beide Moleküle flache aromatische Gruppen enthalten. Ferner spielt vermutlich die Bildung zusätzlicher H-Brücken in der Intercalationsebene, ähnlich wie bei den In-PRiNTs, eine Rolle für die RNA-Bindung, da in den Chinoxalindionen und Diaminochinazolinen einige potentielle H-Brücken-Donor- und -Acceptorgruppen vorliegen. Kombinierte Wechselwirkungen, wie in den In-PRiNTs, Diphenylfuranen, Chinoxalindionen und Diaminochinazolinen, erhöhen die Spezifität der Intercalation, wie die häufige Kombination von Stapel- und H-Brücken-Wechselwirkungen als Grundlage der spezifischen Ligandenerkennung in RNA-Aptamer-Komplexen beweist.^[177]

Hinreichend planare unpolare Molekülfragmente können über klassische Intercalation hinaus an einer allgemeineren Art der Stapelwechselwirkung beteiligt sein, die durch van-der-Waals- und hydrophobe Effekte stabilisiert wird. Spektrale Beispiele dafür finden sich in den dreidimensionalen

Strukturen der Komplexe von Paromomycin und Gentamicin mit einem A-Stellen-Oligonucleotid,^[122, 125] und von Tobramycin mit einer Aptamer-RNA,^[194] in denen Stapelwechselwirkungen zwischen der weniger polaren Seite eines Zucker-Sechsrings der Aminoglycoside und einer Purinbase bestehen (Abbildung 4B). Die umgekehrte – vermutlich weniger stabile – Situation eines flachen aromatischen Moleküls, das Stapelwechselwirkungen mit dem Zuckerring einer Ribose in RNA eingeht, kommt im Modell eines Komplexes zwischen einem lichtaktivierbaren Flavinderivat (**8** in Abbildung 3) und einer RNA-Helix vor.^[205] Die Stapelung des Isoalloxazinrests mit einer Ribose orientiert das Flavinmolekül so, dass eine Carbonylgruppe des Liganden eine H-Brücke mit der freien 2-Aminogruppe eines Guanins in einem G·U-Paar bilden kann.

4.5. Molekulare Oberflächenkomplementarität und konformative Anpassung

Eine der stärksten Triebkräfte der Bildung biomolekularer Komplexe ist die Komplementarität von Moleküloberflächen, durch die hohe Bindungsaffinität und spezifische Liganden-erkennung vermittelt werden. Die dreidimensionalen Strukturen von RNA-Aptamer-Komplexen belegen dies eindrucksvoll.^[177, 186, 187] Eine Eigenschaft der Aptamere ist die fast vollständige Einkapselung des Liganden im Inneren der RNA. Beispielsweise werden in einem Tobramycin-Aptamer-Komplex 75 % der Oberfläche des Aminoglycosids von der RNA-Struktur umschlossen.^[194] Die Bindung von Liganden an RNA-Aptamere ist normalerweise mit größeren Konformationsänderungen in der Nucleinsäure verbunden, die sich an das Substrat anpasst.^[177, 187]

Die molekulare Oberflächenkomplementarität zwischen der RNA und einem Wirkstoff ist im Falle natürlicher RNA-Moleküle vermutlich schwerer zu erreichen, da diese, im Unterschied zu Aptameren, nicht evolutionär auf die spezifische Bindung an eine bestimmte niedermolekulare Verbindung selektiert wurden. Es wurde beobachtet, dass in Aminoglycosid-Komplexen natürlicher RNA-Moleküle ein erheblich geringerer Anteil der Moleküloberfläche der Liganden durch RNA umschlossen wird als in den entsprechenden Komplexen mit Aptameren.^[50] Dennoch besteht in Komplexen der eubakteriellen ribosomalen A-Stelle mit Aminoglycosiden eine relativ gute Komplementarität zwischen den Oberflächen von RNA und Liganden (Abbildung 4D).^[122, 125]

Oberflächenkomplementarität kann die Grundlage präziser Bindungsstellenselektion sein, wie im Falle eines lichtaktivierbaren RNA-spaltenden Phenanthrolin-Rhodium-Komplexes, der selektiv an G·U-Paare in doppelsträngigen RNA-Regionen bindet und diese schneidet.^[211]

Die Bindung von Liganden an RNA kann geringfügige Konformationsänderungen verursachen, wie in A-Stellen-Oligonucleotiden,^[123] oder solche größeren Ausmaßes, wie bei der Wechselwirkung zwischen HIV-TAR-RNA und Argininamid.^[52] Eine vielversprechende Strategie zur Entwicklung von gegen RNA gerichteten Wirkstoffen ist die Suche nach Effektoren, die durch die Bindung an eine RNA einen für die

biologische Funktion der Nucleinsäure notwendige Konformationsänderung verhindern. Das Thiazol enthaltende Peptid-Antibiotikum Thiostrepton bindet an eine komplexe Struktureinheit im konservierten GTPase-Zentrum eubakterieller 23S-rRNA und stabilisiert dadurch einen tertiären Kontakt, dessen Flexibilität essentiell für die Wechselwirkung der RNA mit dem ribosomalen L11-Protein ist.^[136–138] Die rationale Entwicklung solcher Wirkstoffe, die auf die Flexibilität von RNA-Molekülen Einfluss nehmen, erfordert eine detaillierte Kenntnis der dreidimensionalen Struktur und Funktion des jeweiligen RNA-Zielmoleküls. Aufgrund umfangreicher Modellierungs- und Simulationsuntersuchungen wurde vorgeschlagen, dass der allosterische Mechanismus, durch den Neomycin B eine Dissoziation von HIV-Tat-TAR-Komplexen verursacht,^[199] auf einer konformativen Arretierung beruht, bei der das Aminoglycosid die TAR-RNA in einer Form stabilisiert, die eine niedrige Affinität für Tat aufweist.^[50]

Schließlich wird eine weitgehende Oberflächenkomplementarität in RNA-Liganden-Komplexen durch fest gebundene Wassermoleküle ermöglicht, wie sie auch häufig in Komplexen von Proteinen mit niedermolekularen Verbindungen gefunden werden.^[212] Wassermoleküle ermöglichen durch Umorientierung eine gewisse Plastizität der H-Brücken-Bildung (siehe Abschnitt 4.3) und füllen Hohlräume an der Kontaktfläche des Komplexes auf. Um Informationen über die Positionen fest gebundener Wassermoleküle für die rationale Wirkstoffentwicklung zu nutzen, müssen bevorzugte Wasserbindungsstellen durch Kristallstrukturanalyse,^[213] spezielle NMR-Techniken^[214] und MD-Simulationen^[215] bestimmt werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die zunehmende Aufklärung zahlreicher pathologischer Prozesse, bei denen RNA-Moleküle Schlüsselrollen spielen, zeigt, dass RNA ein hervorragendes potentielles Ziel für therapeutische Wirkstoffe ist. Niedermolekulare Verbindungen können die Funktionen von RNA durch eine Reihe von Mechanismen beeinflussen. Durch Bindung an ein RNA-Strukturelement können Wirkstoffe die Konformation oder Flexibilität der RNA verändern und dadurch deren Wechselwirkung mit Proteinen verhindern oder die Protein-RNA-Bindung sogar noch verstärken. RNA-bindende Wirkstoffe können also Prozesse auslösen, die entweder die Bildung oder die Dissoziation von Protein-RNA-Komplexen erfordern. Herausragende Beispiele dafür liefern die Aminoglycosid-Antibiotika und Thiostrepton, die auf die Funktion von Protein-RNA-Komplexen Einfluss nehmen indem sie deren Bildung verhindern (Aminoglycoside) oder die Konformation der RNA-Komponente fixieren (Thiostrepton). Eine weitere Klasse von gegen RNA gerichteten Wirkstoffen könnte als Kontaktflächen-Inhibitoren die Bindung von Proteinen an RNA direkt verhindern.

Aus der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms ist eine sprunghafte Zunahme der Zahl potentieller Zielmoleküle für die pharmakologische Therapie zu erwar-

ten, darunter RNA-Transkripte und deren verschieden prozessierte aktive Formen. Die extrem große Zahl möglicher RNA-Zielmoleküle erfordert wirkungsvolle neue Ansätze des Hochdurchsatz-Screenings (HTS) zur Identifizierung niedermolekularer Verbindungen, die RNA-Funktionen beeinflussen können. Die Weiterentwicklung von Leitstrukturen, die durch HTS gefunden wurden, in hochspezifisch an RNA-Zielmoleküle bindende Wirkstoffe ist kaum vorstellbar ohne ein detailliertes Verständnis der molekularen Erkennung dreidimensionaler RNA-Strukturen. Dieses Wissen stammt aus Strukturuntersuchungen von RNA-Molekülen und deren Komplexen mit Proteinen und niedermolekularen Verbindungen durch Kristallstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie. Das sich gegenwärtig rasch vertiefende Verständnis der dreidimensionalen Struktur und Funktion von RNA aus der Anwendung dieser Analysemethoden auf Nucleinsäuren und deren Komplexe bildet die Grundlage für die Entwicklung spezifischer gegen RNA gerichteter Wirkstoffe.

Auf der Struktur basierende Ansätze sind unabdingbar, um durch HTS identifizierte Verbindungen weiter zu Wirkstoffen zu entwickeln, insbesondere dann, wenn die selektive Wirkung dieser Verbindungen auf kleinsten Unterschieden zwischen den RNA-Zielmolekülen von Pathogenen und denen des Menschen beruht.

Gegenwärtig mögen unsere Auffassungen der rationalen Wirkstoffentwicklung noch von der Proteinwelt beherrscht sein, was einige der Schwierigkeiten auf der Suche nach RNA-bindenden Wirkstoffen erklärt, nachdem Methoden zur Untersuchung von Protein-Zielmolekülen nur begrenzt auf RNA übertragbar sind. Genauso wie neue experimentelle Werkzeuge zur Analyse von RNA entwickelt worden sind, bedürfen auch theoretische Methoden für die Untersuchung von RNA und ihrer Wechselwirkungen neuartiger Ansätze. Anfängliche Erfolge zeigen sich bereits in der rationalen Entwicklung und Synthese neuartiger gegen RNA gerichteter Verbindungen.

Für die intermolekularen Wechselwirkungen von Proteinen und RNA gelten dieselben physikalischen Gesetze. Das Beispiel der elektrostatischen Kräfte zeigt jedoch, dass der Beitrag einzelner energetischer Komponenten im Vergleich zwischen Proteinen und RNA verschoben ist, was eine präzisere theoretische Beschreibung erfordert. Die gegenwärtig entwickelten Neuerungen bei Rechenalgorithmen, experimentellen Techniken zur Analyse von RNA-Komplexen durch Kristallographie oder NMR-Spektroskopie sowie neue Ansätze des Moleküldesigns werden von außerordentlichem Nutzen für die auf der Struktur beruhende Entwicklung von Wirkstoffen sein, unabhängig davon, ob die Zielmoleküle RNA oder Proteine sind.

Obwohl versucht wurde, die bis September 1999 verfügbare Literatur zu berücksichtigen, ist die Auswahl der Literaturzitate notwendigerweise subjektiv, und ich bitte um Nachsicht für etwaige übersehene Beiträge. Ich danke Dinshaw J. Patel für seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie Eric Westhof, Eugene Skripkin und Seema Qamar für hilfreiche Kommentare. Besonders bedanke ich mich bei meiner Frau Tatjana Singer für die kritische Durchsicht des Manuskripts und zahlreiche wertvolle Verbesserungsvorschläge. Eigene

Forschungsarbeiten des Autors zum Thema dieses Aufsatzes im Labor von D.J.P. werden von den NIH gefördert (GM-54777).

Eingegangen am 17. Mai 1999 [A344]

- [1] *The RNA World*, 2. Aufl. (Hrsg.: R. F. Gesteland, T. R. Cech, J. F. Atkins), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1999**.
- [2] a) N. D. Pearson, C. D. Prescott, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 409–414; b) T. Hermann, E. Westhof, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9*, 66–73; c) K. Michael, Y. Tor, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2091–2098; d) M. Afshar, C. D. Prescott, G. Varani, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 59–63; e) Y. Tor, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1681–1685; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1579–1582.
- [3] a) A. R. Ferré-D'Amaré, J. A. Doudna, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, *28*, 57–73; b) P. B. Moore, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *67*, 287–300; c) R. T. Batey, R. P. Rambo, J. A. Doudna, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2472–2491; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2326–2343; d) T. Hermann, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 829–849.
- [4] a) A. Fire, *Trends Genet.* **1999**, *15*, 358–363; b) D. C. Baulcombe, *Curr. Biol.* **1999**, *9*, R599–R601; c) R. A. Jorgensen, R. A. Atkinson, R. L. S. Forster, W. J. Lucas, *Science* **1998**, *279*, 1486–1487; d) N. Brockdorff, *Curr. Opin. Genet. Devel.* **1998**, *8*, 328–333.
- [5] V. A. Zakian, *Science* **1995**, *270*, 1601–1607.
- [6] E. H. Blackburn in Lit. [1], *S. 609–635*.
- [7] a) N. Axelrod, *Nat. Med.* **1996**, *2*, 158–159; b) E. Raymond, D. Sun, S. F. Chen, B. Windle, D. D. Von Hoff, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7*, 583–591; c) H. W. Sharma, J. Y. Maltese, X. Zhu, H. E. Kaiser, R. Narayanan, *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 511–515; d) A. J. Lustig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3339–3341.
- [8] Y. Kanazawa, K. Ohkawa, K. Ueda, E. Mita, T. Takehara, Y. Sasaki, A. Kasahara, N. Hayashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *225*, 570–576.
- [9] A. I. Glukhov, O. V. Zimnik, S. A. Gordeev, S. E. Severin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *248*, 368–371.
- [10] a) J. C. Norton, M. A. Piatyszek, W. E. Wright, J. W. Shay, D. R. Corey, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 615–619; b) A. E. Pitts, D. R. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11549–11554.
- [11] S. E. Hamilton, D. R. Corey, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 863–867.
- [12] M. I. N. Cano, J. M. Dungan, N. Agabian, E. H. Blackburn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3616–3621.
- [13] A. M. Skalka, S. P. Goff, *Reverse Transcriptase*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1993**.
- [14] R. Marquet, C. Isel, C. Ehresmann, B. Ehresmann, *Biochimie* **1995**, *77*, 113–124.
- [15] C. Isel, C. Ehresmann, G. Keith, B. Ehresmann, R. Marquet, *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*, 236–250.
- [16] C. Isel, E. Westhof, C. Massire, S. F. J. Le Grice, B. Ehresmann, C. Ehresmann, R. Marquet, *EMBO J.* **1999**, *18*, 1038–1048.
- [17] a) J. Ding, K. Das, Y. Hsiou, S. G. Sarafianos, A. D. Clark, A. Jacobo-Molina, C. Tantillo, S. H. Hughes, E. Arnold, *J. Mol. Biol.* **1998**, *284*, 1095–1111; b) H. Huang, R. Chopra, G. L. Verdine, S. C. Harrison, *Science* **1998**, *282*, 1669–1675.
- [18] J. C. Paillart, R. Marquet, E. Skripkin, C. Ehresmann, B. Ehresmann, *Biochimie* **1996**, *78*, 639–653.
- [19] E. Skripkin, J. C. Paillart, R. Marquet, B. Ehresmann, C. Ehresmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4945–4949.
- [20] a) J. C. Paillart, L. Berthou, M. Ottmann, J. L. Darlix, R. Marquet, B. Ehresmann, C. Ehresmann, *J. Virol.* **1996**, *70*, 8348–8354; b) G. P. Harrison, G. Miele, E. Hunter, A. M. L. Lever, *J. Virol.* **1998**, *72*, 5886–5896.
- [21] a) A. Mujeeb, J. L. Clever, T. M. Billeci, T. L. James, T. G. Parslow, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 432–436; b) F. Jossinet, J.-C. Paillart, E. Westhof, T. Hermann, E. Skripkin, J. S. Lodmell, C. Ehresmann, B. Ehresmann, R. Marquet, *RNA* **1999**, *5*, 1222–1234.
- [22] a) A. Mujeeb, T. G. Parslow, A. Zarrinpar, C. Das, T. L. James, *FEBS Lett.* **1999**, *458*, 387–392; b) E. Ennifar, M. Yusupov, P. Walter, R. Marquet, B. Ehresmann, C. Ehresmann, P. Dumas, *Structure* **1999**, *7*, 1439–1449.
- [23] L. A. Actis, M. E. Tolmasky, J. H. Crosa, *Front. Biosci.* **1999**, *4*, D43–D62.

- [24] E. Gerhart, H. Wagner, S. Brantl, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 451–454.
- [25] P. F. Predki, L. M. Nayak, M. B. Gottlieb, L. Regan, *Cell* **1995**, *80*, 41–50.
- [26] M. D. Been, G. S. Wickham, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *247*, 741–753.
- [27] a) J. Rogers, A. H. Chang, U. von Ahsen, R. Schroeder, J. Davies, *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 916–925; b) J.-S. Chia, H.-L. Wu, H.-W. Wang, D.-S. Chen, P.-J. Chen, *J. Biomed. Sci.* **1997**, *4*, 208–216.
- [28] A. R. Ferré-D'Amaré, K. Zhou, J. A. Doudna, *Nature* **1998**, *395*, 567–574.
- [29] a) T. K. Stage, K. J. Hertel, O. C. Uhlenbeck, *RNA* **1995**, *1*, 95–101; b) B. Clouet-d'Orval, T. K. Stage, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1995**, *34*, 11186–11190.
- [30] H. Wang, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8734–8735.
- [31] R. H. Symons, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2683–2689.
- [32] R. G. Kuimelis, L. W. McLaughlin, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1027–1104.
- [33] T. Hermann, E. Westhof, *J. Mol. Biol.* **1998**, *276*, 903–912.
- [34] Y. Tor, T. Hermann, E. Westhof, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, R277–R283.
- [35] S. M. Uptain, C. M. Kane, M. J. Chamberlin, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 117–172.
- [36] J. Greenblatt, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 310–319.
- [37] P. H. von Hippel, W. A. Rees, K. S. Wilson, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1995**, *33*, 1–4.
- [38] T. Platt, *Mol. Microbiol.* **1994**, *11*, 983–990.
- [39] T. M. Henkin, *Mol. Microbiol.* **1994**, *13*, 381–387.
- [40] a) M. J. Gait, J. Karn, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 255–259; b) A. D. Frankel, J. A. T. Young, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 1–25.
- [41] K. Yankulov, D. Bentley, *Curr. Biol.* **1998**, *8*, R447–R449.
- [42] a) M. J. Gait, J. Karn, *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 430–438; b) H.-Y. Mei, A. A. Galan, N. S. Halim, D. P. Mack, D. W. Moreland, K. B. Sanders, H. N. Truong, A. W. Czarnik, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2755–2760; c) J. Wang, S. Y. Huang, I. Choudhury, M. J. Leibowitz, S. Stein, *Anal. Biochem.* **1995**, *232*, 238–242; d) C. Bailly, P. Colson, C. Houssier, F. Hamy, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1460–1464; e) L. Dassonneville, F. Hamy, P. Colson, C. Houssier, C. Bailly, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4487–4492; f) A. C. Lim, J. K. Barton, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1131–1136; g) K. Michaelis, M. Kalesse, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2382–2385; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2243–2245.
- [43] F. Hamy, E. R. Felder, G. Heizmann, J. Lazdins, F. Aboul-Ela, G. Varani, J. Karn, T. Klimkait, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 3548–3553.
- [44] H.-Y. Mei, D. P. Mack, A. A. Galan, N. S. Halim, A. Heldsinger, J. A. Loo, D. W. Moreland, K. A. Sannes-Lowery, L. Sharmeen, H. N. Truong, A. W. Czarnik, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1173–1184.
- [45] F. Hamy, V. Brondani, A. Florsheimer, W. Stark, M. J. Blommers, T. Klimkait, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5086–5095.
- [46] H.-Y. Mei, M. Cui, A. Heldsinger, S. M. Lemrow, J. A. Loo, K. A. Sannes-Lowery, L. Sharmeen, A. W. Czarnik, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14204–14212.
- [47] H. An, B. D. Haly, P. D. Cook, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2345–2350.
- [48] A. Farese-Di Giorgio, S. Pairot, N. Patino, R. Condom, C. Di Giorgio, A. Aumelas, A. M. Aubertin, R. Guedj, *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 263–275.
- [49] A. Litovchick, A. G. Evdokimov, A. Lapidot, *FEBS Lett.* **1999**, *445*, 73–79.
- [50] T. Hermann, E. Westhof, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1250–1261.
- [51] a) F. Aboul-ela, J. Karn, G. Varani, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3974–3981; b) J. A. Ippolito, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9819–9824.
- [52] a) J. D. Puglisi, R. Tan, B. J. Calnan, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Science* **1992**, *257*, 76–80; b) J. D. Puglisi, L. Chen, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3680–3684; c) A. S. Brodsky, J. R. Williamson, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 624–639.
- [53] a) J. D. Puglisi, L. Chen, S. Blanchard, A. D. Frankel, *Science* **1995**, *270*, 1200–1203; b) X. Ye, R. A. Kumar, D. J. Patel, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 827–840.
- [54] T. L. Sit, A. A. Vaewhongs, S. A. Lommel, *Science* **1998**, *281*, 829–832.
- [55] A. T. Das, B. Klaver, B. Berkhout, *J. Virol.* **1998**, *72*, 9217–9223.
- [56] J. L. Clever, D. A. Eckstein, T. G. Parslow, *J. Virol.* **1999**, *73*, 101–109.
- [57] J. L. Clever, T. G. Parslow, *J. Virol.* **1997**, *71*, 3407–3414.
- [58] R. N. de Guzman, Z. R. Wu, C. C. Stalling, L. Pappalardo, P. N. Borer, M. F. Summers, *Science* **1998**, *279*, 384–388.
- [59] S. Altman, L. Kirsebom in Lit. [1], S. 351–380.
- [60] a) N. E. Mikkelsen, M. Brännvall, A. Virtanen, L. A. Kirsebom, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6155–6160; b) A. Vioque, *FEBS Lett.* **1989**, *246*, 137–139.
- [61] H. L. True, D. W. Celander, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 16559–16566.
- [62] E. Papadimou, S. Georgiou, D. Tsambaos, D. Drinas, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 24375–24378.
- [63] a) C. Massire, L. Jaeger, E. Westhof, *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 773–793; b) J. L. Chen, J. M. Nolan, M. E. Harris, N. R. Pace, *EMBO J.* **1998**, *17*, 1515–1525.
- [64] Y.-T. Yu, E. C. Scharl, C. M. Smith, J. A. Steitz in Lit. [1], S. 487–524.
- [65] C. B. Burge, T. Tuschl, P. A. Sharp in Lit. [1], S. 525–560.
- [66] L. Silver, K. Bostian, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1990**, *9*, 455–461.
- [67] C. C. Wang, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1995**, *35*, 93–127.
- [68] a) G. Varani, K. Nagai, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 407–445; b) C. Kambach, S. Walke, K. Nagai, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 222–230.
- [69] D. P. Toczyski, A. G. Matera, D. C. Ward, J. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3463–3467.
- [70] W. Zhong, D. Ganem, *J. Virol.* **1997**, *71*, 1207–1212.
- [71] Y. K. Hwang, M. A. Brinton, *J. Virol.* **1998**, *72*, 4341–4351.
- [72] V. W. Pollard, M. H. Malim, *Annu. Rev. Microbiol.* **1998**, *52*, 491–532.
- [73] H. P. Bogerd, G. L. Huckaby, Y. F. Ahmed, S. M. Hanly, W. C. Greene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5704–5708.
- [74] P. Askjaer, J. Kjems, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 11463–11471.
- [75] M. L. Zapp, S. Stern, M. R. Green, *Cell* **1993**, *74*, 969–978.
- [76] G. Werstuck, M. L. Zapp, M. R. Green, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 129–137.
- [77] L. Ratmeyer, M. L. Zapp, M. R. Green, R. Vinayak, A. Kumar, D. W. Boykin, W. D. Wilson, *Biochemistry* **1996**, *35*, 13689–13696.
- [78] a) W. D. Wilson, L. Ratmeyer, M. Zhao, D. Ding, A. W. McConnaughie, A. Kumar, D. W. Boykin, *J. Mol. Recognit.* **1996**, *9*, 187–196; b) M. L. Zapp, D. W. Young, A. Kumar, R. Singh, D. W. Boykin, W. D. Wilson, M. R. Green, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1149–1155.
- [79] W. K. C. Park, M. Auer, H. Jaksche, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10150–10155.
- [80] K. Li, M. Fernandez-Saiz, C. T. Rigl, A. Kumar, K. G. Ragunathan, A. W. McConnaughie, D. W. Boykin, H. J. Schneider, W. D. Wilson, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1157–1172.
- [81] J. L. Battiste, H. Mao, N. S. Rao, R. Tan, D. R. Muhandiram, L. E. Kay, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Science* **1996**, *273*, 1547–1551.
- [82] a) X. Ye, A. Gorin, A. D. Ellington, D. J. Patel, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 1026–1033; b) X. Ye, A. Gorin, R. Frederick, W. Hu, A. Majumdar, W. Xu, G. McLendon, A. Ellington, D. J. Patel, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 657–669.
- [83] T. R. Cech, B. L. Golden in Lit. [1], S. 321–349.
- [84] U. von Ahsen, J. Davies, R. Schroeder, *Nature* **1991**, *353*, 368–370.
- [85] Y. Liu, M. J. Leibowitz, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1284–1291.
- [86] H. Y. Mei, M. Cui, S. T. Sutton, H. N. Truong, F.-Z. Chung, A. W. Czarnik, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 5051–5053.
- [87] V. Lehnert, L. Jaeger, F. Michel, E. Westhof, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 993–1009.
- [88] F. Michel, E. Westhof, *J. Mol. Biol.* **1990**, *216*, 585–610.
- [89] a) J. H. Cate, A. R. Gooding, E. Podell, K. Zhou, B. L. Golden, C. E. Kundrot, T. R. Cech, J. A. Doudna, *Science* **1996**, *273*, 1678–1685; b) B. L. Golden, A. R. Gooding, E. R. Podell, T. R. Cech, *Science* **1998**, *282*, 259–264.
- [90] U. von Ahsen, J. Davies, R. Schroeder, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 935–941.
- [91] H. Wank, J. Rogers, J. Davies, R. Schroeder, *J. Mol. Biol.* **1994**, *236*, 1001–1010.
- [92] H.-Y. Mei, M. Cui, S. M. Lemrow, A. W. Czarnik, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1185–1195.
- [93] L. Simpson in Lit. [1], S. 585–608.

- [94] a) T. Hermann, B. Schmid, H. Heumann, U. Göringer, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 2311–2318; b) J. Köller, U. F. Müller, B. Schmid, A. Missel, V. Kruff, K. Stuart, H. U. Göringer, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 3749–3752.
- [95] a) L. D. Etkin, H. D. Lipshitz, *FASEB J.* **1999**, 13, 419–420; b) P. Lasko, *FASEB J.* **1999**, 13, 421–433; c) K. L. Mowry, C. A. Cote, *FASEB J.* **1999**, 13, 435–445; d) G. J. Bassell, Y. Oleynikov, R. H. Singer, *FASEB J.* **1999**, 13, 447–454.
- [96] R. P. Jansen, *FASEB J.* **1999**, 13, 455–466.
- [97] R. J. Buckanovich, R. B. Darnell, *Mol. Cell Biol.* **1997**, 17, 3194–3201.
- [98] R. J. Buckanovich, Y. Y. Yang, R. B. Darnell, *J. Neurosci.* **1996**, 16, 1114–1122.
- [99] H. A. Lewis, H. Chen, C. Edo, R. J. Buckanovich, Y. Y. Yang, K. Musunuru, R. Zhong, R. B. Darnell, S. K. Burley, *Structure* **1999**, 7, 191–203.
- [100] G. Musco, G. Stier, C. Joseph, M. A. Castiglione Morelli, M. Nilges, T. J. Gibson, A. Pastore, *Cell* **1996**, 85, 237–245.
- [101] V. Brown, K. Small, L. Lakkis, Y. Feng, C. Gunter, K. D. Wilkinson, S. T. Warren, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 15521–15527.
- [102] E. H. Kislaukis, R. H. Singer, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1992**, 4, 975–978.
- [103] A. F. Ross, Y. Oleynikov, E. H. Kislaukis, K. L. Taneja, R. H. Singer, *Mol. Cell Biol.* **1997**, 17, 2158–2165.
- [104] G. A. Doyle, N. A. Betz, P. F. Leeds, A. J. Fleisig, R. D. Prokipcak, J. Ross, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 5036–5044.
- [105] F. Mueller-Pillasch, U. Lacher, C. Wallrapp, A. Micha, F. Zimmerhackl, H. Hameister, G. Varga, H. Friess, M. Buchler, H. G. Beger, M. R. Vila, G. Adler, T. M. Gress, *Oncogene* **1997**, 14, 2729–2733.
- [106] J. Y. Zhang, E. K. Chan, X. X. Peng, E. M. Tan, *J. Exp. Med.* **1999**, 189, 1101–1110.
- [107] J. O. Deshler, M. I. Highett, T. Abramson, B. J. Schnapp, *Curr. Biol.* **1998**, 8, 489–496.
- [108] S. Shetty, S. Idell, *Am. J. Physiol.* **1998**, 274, L871–L882.
- [109] S. C. Shih, K. P. Claffey, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 1359–1365.
- [110] a) D. Chagnovich, S. L. Cohn, *Eur. J. Cancer* **1997**, 33, 2064–2067; b) R. A. Ross, D. L. Lazarova, G. T. Manley, P. S. Smitt, B. A. Spengler, J. B. Posner, J. L. Biedler, *Eur. J. Cancer* **1997**, 33, 2071–2074.
- [111] R. J. Boado, W. M. Pardridge, *Brain Res. Mol. Brain Res.* **1998**, 59, 109–113.
- [112] R. J. Boado, *Neurosci. Lett.* **1998**, 255, 147–150.
- [113] a) S. H. Zaidi, R. Denman, J. S. Malter, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 24000–24006; b) S. H. Zaidi, J. S. Malter, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 24007–24013.
- [114] S. H. Zaidi, J. S. Malter, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 17292–17298.
- [115] L. E. Rajagopalan, C. J. Westmark, J. A. Jarzembowski, J. S. Malter, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 3418–3423.
- [116] D. Moazed, H. F. Noller, *Nature* **1987**, 327, 389–394.
- [117] P. Purohit, S. Stern, *Nature* **1994**, 370, 659–662.
- [118] H. F. Chambers, M. A. Sande in *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9. Aufl. (Hrsg.: J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, A. Goodman Gilman), McGraw-Hill, New York, **1996**, S. 1103–1121.
- [119] Y. Van de Peer, E. Robbrecht, S. de Hoog, A. Caers, P. De Rijk, R. De Wachter, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 179–183.
- [120] a) T. Hutchin, I. Haworth, K. Higashi, N. Fischel-Ghodsian, M. Stoneking, N. Saha, C. Arnos, G. Cortopassi, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 4174–4179; b) K. Hamasaki, R. R. Rando, *Biochemistry* **1997**, 36, 12323–12328.
- [121] a) J. Woodcock, D. Moazed, M. Cannon, J. Davies, H. F. Noller, *EMBO J.* **1991**, 10, 3099–3103; b) M. I. Recht, D. Fourmy, S. C. Blanchard, K. D. Dahlquist, J. D. Puglisi, *J. Mol. Biol.* **1996**, 262, 421–436; c) M. I. Recht, S. Douthwaite, K. D. Dahlquist, J. D. Puglisi, *J. Mol. Biol.* **1999**, 286, 33–43; d) M. Famulok, A. Hüttenhofer, *Biochemistry* **1996**, 35, 4265–4270; e) Y. Wang, K. Hamasaki, R. R. Rando, *Biochemistry* **1997**, 36, 768–779; f) S. C. Blanchard, D. Fourmy, R. G. Eaton, J. D. Puglisi, *Biochemistry* **1998**, 37, 7716–7724.
- [122] D. Fourmy, M. I. Recht, S. C. Blanchard, J. D. Puglisi, *Science* **1996**, 274, 1367–1371.
- [123] D. Fourmy, S. Yoshizawa, J. D. Puglisi, *J. Mol. Biol.* **1998**, 277, 333–345.
- [124] D. Fourmy, M. I. Recht, J. D. Puglisi, *J. Mol. Biol.* **1998**, 277, 347–362.
- [125] S. Yoshizawa, D. Fourmy, J. D. Puglisi, *EMBO J.* **1998**, 17, 6437–6448.
- [126] C.-H. Wong, M. Hendrix, E. S. Priestley, W. A. Greenberg, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 397–406.
- [127] a) R. H. Griffey, M. J. Greig, H. An, H. Sasnor, S. Manalili, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 474–475; b) R. H. Griffey, S. A. Hofstadler, K. A. Sannes-Lowery, D. J. Ecker, S. T. Crooke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 10129–10133.
- [128] a) P. B. Alper, M. Hendrix, P. Sears, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1965–1978; b) W. A. Greenberg, E. S. Priestley, P. S. Sears, P. B. Alper, C. Rosenbohm, M. Hendrix, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6527–6541.
- [129] M. Hendrix, P. B. Alper, E. S. Priestley, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 119–122; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 95–98.
- [130] C.-H. Wong, M. Hendrix, D. D. Manning, C. Rosenbohm, W. A. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8319–8327.
- [131] J. B. H. Tok, R. R. Rando, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8279–8280.
- [132] P. Sears, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2446–2471; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2300–2324.
- [133] K. Hamasaki, R. R. Rando, *Anal. Biochem.* **1998**, 261, 183–190.
- [134] a) J. Egebjerg, S. Douthwaite, R. A. Garrett, *EMBO J.* **1989**, 8, 607–611; b) I. G. Leviev, C. Rodriguez-Fonseca, H. Phan, R. A. Garrett, G. Heilek, H. F. Noller, A. S. Mankin, *EMBO J.* **1994**, 13, 1682–1686; c) G. T. Tan, A. DeBlasio, A. S. Mankin, *J. Mol. Biol.* **1996**, 261, 222–230; d) C. Spickler, M.-N. Brunelle, L. Brakier-Gingras, *J. Mol. Biol.* **1997**, 273, 586–599; e) B. T. Porse, R. A. Garrett, *J. Mol. Biol.* **1999**, 286, 375–387; f) N. B. Matassova, M. V. Rodnina, R. Endermann, H.-P. Kroll, U. Pleiss, H. Wild, W. Wintermeyer, *RNA* **1999**, 5, 939–956.
- [135] P. C. Ryan, D. E. Draper, *J. Mol. Biol.* **1991**, 221, 1257–1268.
- [136] D. E. Draper, Y. Xing, L. G. Laing, *J. Mol. Biol.* **1995**, 249, 231–238.
- [137] a) Y. Xing, D. E. Draper, *Biochemistry* **1996**, 35, 1581–1588; b) B. T. Porse, I. Leviev, A. S. Mankin, R. A. Garrett, *J. Mol. Biol.* **1998**, 276, 391–404.
- [138] a) G. L. Conn, D. E. Draper, E. A. Lattman, A. G. Gittis, *Science* **1999**, 284, 1171–1174; b) B. T. Wimberly, R. Guymon, J. P. McCutcheon, M. S. White, V. Ramakrishnan, *Cell* **1999**, 97, 491–502.
- [139] B. Clough, M. Strath, P. Preiser, P. Denny, I. R. Wilson, *FEBS Lett.* **1997**, 406, 123–125.
- [140] G. A. McConkey, M. J. Rogers, T. F. McCutchan, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 2046–2049.
- [141] M. J. Rogers, Y. V. Bukhman, T. F. McCutchan, D. E. Draper, *RNA* **1997**, 3, 815–820.
- [142] A. L. Fitzhugh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 87–92.
- [143] M. S. Iordanov, D. Pribnow, J. L. Magun, T.-H. Dinh, J. A. Pearson, S. L.-Y. Chen, B. E. Magun, *Mol. Cell Biol.* **1997**, 17, 3373–3381.
- [144] a) J. H. Cate, M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, T. N. Earnest, H. F. Noller, *Science* **1999**, 285, 2095–2104; b) G. M. Culver, J. H. Cate, G. Z. Yusupova, M. M. Yusupov, H. F. Noller, *Science* **1999**, 285, 2133–2135.
- [145] a) W. M. Clemons, Jr., J. L. C. May, B. T. Wimberly, J. P. McCutcheon, M. S. Capel, V. Ramakrishnan, *Nature* **1999**, 400, 833–840; b) N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, M. Capel, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Nature* **1999**, 400, 841–847.
- [146] J. F. Atkins, A. Böck, S. Matsufuji, R. F. Gesteland in Lit. [1], S. 637–673.
- [147] a) D. Hatfield, S. Oroszlan, *Trends Biochem. Sci.* **1990**, 15, 186–190; b) P. J. Farabaugh, *Annu. Rev. Genet.* **1996**, 30, 507–528.
- [148] a) M. Chamorro, N. Parkin, N. E. Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 713–717; b) N. M. Wills, R. F. Gesteland, J. F. Atkins, *EMBO J.* **1994**, 13, 4137–4144.
- [149] H. Kang, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1397, 73–78.
- [150] a) C. W. Pleij, *Genet. Eng.* **1995**, 17, 67–80; b) X. Chen, H. Kang, L. X. Shen, M. Chamorro, H. E. Varmus, I. Tinoco, *J. Mol. Biol.* **1996**, 260, 479–483; c) L. Su, L. Chen, M. Egli, J. M. Berger, A. Rich, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 285–292.
- [151] M. G. Wallis, B. Streicher, H. Wank, U. von Ahsen, E. Clodi, S. T. Wallace, M. Famulok, R. Schroeder, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 357–366.
- [152] C. Wilson, J. Nix, J. Szostak, *Biochemistry* **1998**, 37, 14410–14419.
- [153] B. C. Horsburgh, H. Kollmus, H. Hauser, D. M. Coen, *Cell* **1996**, 86, 949–959.
- [154] S. C. Low, M. J. Berry, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, 21, 203–208.
- [155] R. Walczak, E. Westhof, P. Carbon, A. Krol, *RNA* **1996**, 2, 367–379.

- [156] a) C. S. Ramanathan, E. W. Taylor, *Biol. Trace Elem. Res.* **1997**, *56*, 93–106; b) L. Grate, *J. Acquired Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **1998**, *17*, 398–403.
- [157] E. C. Theil, *Met. Ions Biol. Syst.* **1998**, *35*, 403–434.
- [158] K. J. Address, J. P. Basilion, R. D. Klausner, T. A. Rouault, A. Pardi, *J. Mol. Biol.* **1997**, *274*, 72–83.
- [159] Y. Ke, J. Wu, E. A. Leibold, W. E. Walden, E. C. Theil, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 23637–23640.
- [160] M. A. Smith, K. Wehr, P. L. R. Harris, S. L. Siedlak, J. R. Connor, G. Perry, *Brain Res.* **1998**, *788*, 232–236.
- [161] E. Chu, C. J. Allegra, *Bioessays* **1996**, *18*, 191–198.
- [162] E. Chu, C. J. Allegra, *Adv. Enzyme Regul.* **1996**, *36*, 143–163.
- [163] E. Chu, T. Takechi, K. L. Jones, D. M. Voeller, S. M. Copur, G. F. Maley, F. Maley, S. Segal, C. J. Allegra, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 179–185.
- [164] E. Chu, T. Cogliati, S. M. Copur, A. Borre, D. M. Voeller, C. J. Allegra, S. Segal, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3222–3228.
- [165] E. Chu, S. M. Copur, J. Ju, T. M. Chen, S. Khleif, D. M. Voeller, M. Mizunuma, M. Patel, G. F. Maley, F. Maley, C. J. Allegra, *J. Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 1582–1594.
- [166] E. Chu, D. Voeller, D. M. Koeller, J. C. Drake, C. H. Takimoto, F. Maley, C. J. Allegra, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 517–521.
- [167] J. B.-H. Tok, J. Cho, R. R. Rando, *Biochemistry* **1999**, *38*, 199–206.
- [168] J. Cho, R. R. Rando, *Biochemistry* **1999**, *38*, 8548–8554.
- [169] K. Nagai, I. W. Mattaj, *RNA-Protein Interactions*, Oxford University Press, Oxford, **1994**.
- [170] K. Nagai, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 53–61.
- [171] S. Cusack, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 66–73.
- [172] D. J. Patel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 74–87.
- [173] D. E. Draper, L. P. Reynaldo, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 381–388.
- [174] K. M. Weeks, D. M. Crothers, *Science* **1993**, *261*, 1574–1577.
- [175] T. Hermann, E. Westhof, *Chem. Biol.* **1999**, *R335–343*.
- [176] A. D. Frankel, C. A. Smith, *Cell* **1998**, *92*, 149–151.
- [177] T. Hermann, D. J. Patel, *Science* **2000**, *287*, 820–825.
- [178] K. Nadassy, S. J. Wodak, J. Janin, *Biochemistry* **1999**, *38*, 1999–2017.
- [179] M. Frugier, P. Schimmel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 11291–11294.
- [180] T. Hermann, P. Auffinger, E. Westhof, *Eur. Biophys. J.* **1998**, *27*, 153–165.
- [181] a) D. E. Draper, V. K. Misra, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 927–930; b) A. L. Feig, O. C. Uhlenbeck in Lit. [1], S. 287–319; c) E. Westhof in *Water and Biological Macromolecules* (Hrsg.: E. Westhof), CRC Press, Boca Raton, FL, **1993**, S. 226–243.
- [182] C. F. Anderson, M. T. Record, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1995**, *46*, 657–700.
- [183] T. Hermann, E. Westhof, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 540–544.
- [184] a) G. Werstuck, M. R. Green, *Science* **1998**, *282*, 296–298; b) M. Blind, W. Kolanus, M. Famulok, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3606–3610; c) H. Shi, B. E. Hoffman, J. T. Lis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10033–10038.
- [185] a) J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 103–110; b) B. E. Eaton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 10–16; c) Y. Li, R. R. Breaker, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 315–323; d) M. Famulok, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 324–329.
- [186] a) J. Feigon, T. Dieckmann, F. W. Smith, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 611–617; b) D. J. Patel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 32–46.
- [187] D. J. Patel, A. K. Suri, F. Jiang, L. Jiang, P. Fan, R. A. Kumar, S. Nonin, *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 645–664.
- [188] a) S. E. Osborne, I. Matsumura, A. D. Ellington, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 5–9; b) M. Famulok, G. Mayer, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1999**, *243*, 123–136.
- [189] A. D. Ellington, *Drug Dev. Res.* **1994**, *33*, 102–115.
- [190] W. D. Wilson, L. Ratmeyer, M. Zhao, L. Streckowski, D. Boykin, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4098–4104.
- [191] R. Schroeder, U. von Ahsen, *Nucleic Acids Mol. Biol.* **1996**, *10*, 53–74.
- [192] H. Wang, Y. Tor, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 117–120; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 109–111.
- [193] M. Fernandez-Saiz, H.-J. Schneider, J. Sartorius, W. D. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4739–4745.
- [194] L. Jiang, D. J. Patel, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 769–774.
- [195] L. Jiang, D. J. Patel, *Structure* **1999**, *7*, 817–827.
- [196] T. Hermann, E. Westhof, *Structure* **1998**, *6*, 1303–1314.
- [197] I. Hoch, C. Berens, E. Westhof, R. Schroeder, *J. Mol. Biol.* **1998**, *282*, 557–569.
- [198] T. Hermann, E. Westhof in *RNA-Binding Antibiotics* (Hrsg.: M. G. Wallis, R. Schroeder), Landes Bioscience, Austin, TX, **2000**, S. 148–158.
- [199] S. Wang, P. W. Huber, M. Cui, A. W. Czarnik, H.-Y. Mei, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5549–5557.
- [200] T. Hermann, E. Westhof, *Biopolymers* **1999**, *48*, 155–165.
- [201] L. Jiang, A. K. Suri, R. Fiala, D. J. Patel, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 35–50.
- [202] F. Leclerc, R. Cedergren, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 175–182.
- [203] P. Sears, C.-H. Wong, *Chem. Commun.* **1998**, 1161–1169.
- [204] P. Burgstaller, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1137–1138.
- [205] P. Burgstaller, T. Hermann, C. Huber, E. Westhof, M. Famulok, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4018–4027.
- [206] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, New York, **1984**.
- [207] B. C. Baguley, *Anticancer Drug Des.* **1991**, *6*, 1–35.
- [208] C. S. Chow, F. M. Bogdan, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1489–1513.
- [209] S. Yao, W. D. Wilson, *J. Biomol. Struct. Dynam.* **1992**, *10*, 367–387.
- [210] T. Hermann, H. Heumann, *RNA* **1995**, *1*, 1009–1017.
- [211] C. S. Chow, J. K. Barton, *Biochemistry* **1992**, *31*, 5423–5429.
- [212] C. S. Poornima, P. M. Dean, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1995**, *9*, 521–531.
- [213] a) S. R. Holbrook, S. H. Kim, *Biopolymers* **1997**, *44*, 3–21; b) M. Egli, *Antisense Nucleic Acid Drug. Dev.* **1998**, *8*, 123–128.
- [214] a) G. Otting, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1997**, *31*, 259–285; b) A. T. Phan, J. L. Leroy, M. Gueron, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 505–519.
- [215] a) P. Auffinger, E. Westhof, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 227–236; b) M. Feig, B. M. Pettitt, *Structure* **1998**, *6*, 1351–1354.
- [216] C. Oubridge, N. Ito, P. R. Evans, C.-H. Teo, K. Nagai, *Nature* **1994**, *372*, 432–438.
- [217] R. E. Botto, B. Coxon, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1021–1028.
- [218] W. G. Scott, J. B. Murray, J. R. P. Arnold, B. L. Stoddard, A. Klug, *Science* **1996**, *274*, 2065–2069.