

Tertiäre Motive bei Struktur und Faltung von RNA

Robert T. Batey, Robert P. Rambo und Jennifer A. Doudna*

Bei jedem Schritt der Übermittlung zellulärer Information von den in der DNA codierten Genen zu funktionellen Proteinen spielt RNA eine entscheidende Rolle. Die Vielfalt ihrer biologischen Funktionen geht auf die Fähigkeit von RNA zurück, einerseits Träger genetischer Information sein zu können und andererseits durch komplexe dreidimensionale Faltungen Zentren für eine chemische Katalyse zu schaffen. Durch die Analyse röntgenkristallographisch bestimmter Strukturen verschiedener großer RNA-Moleküle bei atomarer Auflösung konnten einige Prinzipien des Gesamtfaltungsmusters abgeleitet werden. In diesen RNAs gibt es Tertiärstruktur motive, die die dichte Packung der hochgeladenen, anioni-

schen doppelsträngigen Helices ermöglichen, so daß eine globuläre Architektur entsteht. In diesem Beitrag geben wir einen Überblick über die Strukturen dieser Motive und über ihren Beitrag zur Organisierung großer, biologisch aktiver RNA-Moleküle. Stapelwechselwirkungen zwischen den Basen, die Beteiligung der 2'-Hydroxygruppe der Ribose an der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen, die Bindung zweiwertiger Metallkationen, die nichtkanonische Basenpaarung und die Topologie des Rückgrats dienen allesamt dazu, die Gesamtstruktur von RNA zu stabilisieren, und spielen eine entscheidende Rolle für einen gerichteten Faltungsprozeß. Untersuchungen zum Problem der RNA-Faltung, das konzeptionell

dem Problem der Proteinfaltung analog ist, haben ergeben, daß die Faltung primär einem hierarchischen Reaktionsweg folgt, in dem sich Domänen nacheinander bilden. Bei der Bildung der korrekten tertiären Wechselwirkungen zwischen den Domänen entstehen diskrete Zwischenprodukte entlang des Reaktionsweges. Fortschritte beim Verständnis der RNA-Struktur haben es erleichtert, die Techniken zur Modellierung der Gesamtarchitektur solcher biologisch interessanter RNAs zu verbessern, die einer Strukturanalyse bei atomarer Auflösung nicht zugänglich waren.

Stichwörter: Molecular Modeling • Nucleinsäuren • Ribozyme • RNA • RNA-Strukturen

1. Einleitung

Mit der Entdeckung, daß RNA in der Lage ist, chemische Reaktionen zu katalysieren, wurde die Schwelle zu der Erkenntnis überschritten, daß RNA in vieler Hinsicht mehr den Proteinen ähnelt als ihrer chemischen Cousine, der DNA.^[1, 2] Wie Proteine nehmen auch RNAs komplexe dreidimensionale Faltungen ein, durch die chemische Gruppen, die essentiell für die Funktion der RNA als biologischer Katalysator, Übersetzerin genetischer Information oder Gerüst für Strukturzwecke sind, präzise positioniert werden. Um RNA unter diesem Gesichtspunkt zu verstehen, müssen wir

uns mit den gleichen fundamentalen Fragen auseinandersetzen, die auch im Zentrum der Untersuchungen von Proteinstrukturen und der Enzymologie stehen. Erstens: Wie hängen die dreidimensionale Struktur und die Funktion zusammen? Dies zieht im allgemeinen mechanistische Untersuchungen der enzymkatalysierten chemischen Reaktion, in Verbindung mit einer Charakterisierung der Strukturen von Grundzustand und Übergangszustand und von an der Katalyse beteiligten funktionellen Gruppen nach sich. Zweitens: Wie kann das Makromolekül sich schnell in die notwendige komplexe dreidimensionale Form falten, die Voraussetzung für die katalytische Aktivität ist, obwohl es fast unendlich viele potentiell mögliche Konformationen gibt – dies ist das berühmte „Levinthal-Paradoxon“?^[3] Wie in diesem Aufsatz im einzelnen dargestellt wird, konnten durch neuere Einsichten in die Tertiärstruktur der RNA einige Prinzipien aufgeklärt werden, durch die die RNA in der Lage ist, eine komplexe Gesamtstruktur einzunehmen, und es wird beschrieben, wie diese Wechselwirkungen dazu dienen, den Weg der Faltung zu lenken.

[*] Dr. J. A. Doudna, Dr. R. T. Batey, R. P. Rambo
Department of Molecular Biophysics and Biochemistry
and
Howard Hughes Medical Institute
Yale University
266 Whitney Ave., New Haven, CT 06520-8114 (USA)
Fax: (+1) 203-432-3104
E-mail: doudna@csb.yale.edu

2. Die Struktur der RNA

2.1. RNA-Strukturelemente

Die Struktur der RNA läßt sich in drei grundlegende Organisationsebenen einteilen: Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur. Mit Primärstruktur wird die Nucleotidsequenz einer RNA bezeichnet, die sich in erster Näherung aus der DNA-Sequenz des Gens ableiten läßt, das für die RNA codiert. Da viele biologisch aktive RNAs posttranskriptional modifiziert werden, spiegelt die DNA-Sequenz oft nicht die tatsächliche Primärstruktur wider. Zu den Modifikationen gehören die Methylierung von Nucleotidbasen und 2'-Hydroxygruppen der Ribose, die Bildung ungewöhnlicher Basen wie Pseudouracil (Ψ) und Dihydrouridin (D), Insertion oder Deletion von Nucleotiden in der Boten-RNA (messenger RNA, mRNA) und das Herausschneiden (splicing) von internen Sequenzen (Introns) aus der prä-mRNA. Um die Primärsequenz vollständig zu bestimmen, muß man die RNA also aus ihrer natürlichen Quelle reinigen und mit einer Kombination aus Sequenzierungsmethoden^[4] und Massenspektrometrie^[5] charakterisieren.

Die Sekundärstruktur der RNA wird durch die zweidimensionale Darstellung ihrer Watson-Crick-Basenpaare (Abbildung 1a) und dazwischenliegender „ungepaarter“ Bereiche wiedergegeben. Allgemein beschriebene Sekundärstrukturelemente sind Duplexe, Einzelstrang-Bereiche, Haarnadelschlaufen, Ausstülpungen, interne Schleifen und Verbindungsstellen, wie sie in Abbildung 1b dargestellt sind (eine ausführliche Beschreibung findet sich bei Chastain und Tinoco^[6]). Die Sekundärstruktur der Transfer-RNA (tRNA) ist beispielsweise in drei Haarnadelschlaufen, den D-, den T- und den Anticodon-Arm, und den Acceptor-Stamm organisiert; diese klassische Kleeblattstruktur ist in Abbildung 2a wiedergegeben.

Die RNA-Struktur auf dieser Ebene wird mit mehreren Methoden bestimmt. Die einfachste Technik, die zugleich aber mit großer Unsicherheit behaftet ist, ist der Einsatz von Computerprogrammen zur Vorhersage der Sekundärstruktur, die für eine vorgegebene Primärsequenz mögliche Sekundärstrukturen berechnen. Diese Programme sind alle darauf ausgerichtet, die Sekundärstruktur mit der niedrigsten freien Gesamtenergie zu finden, indem sie die freie Energie einer

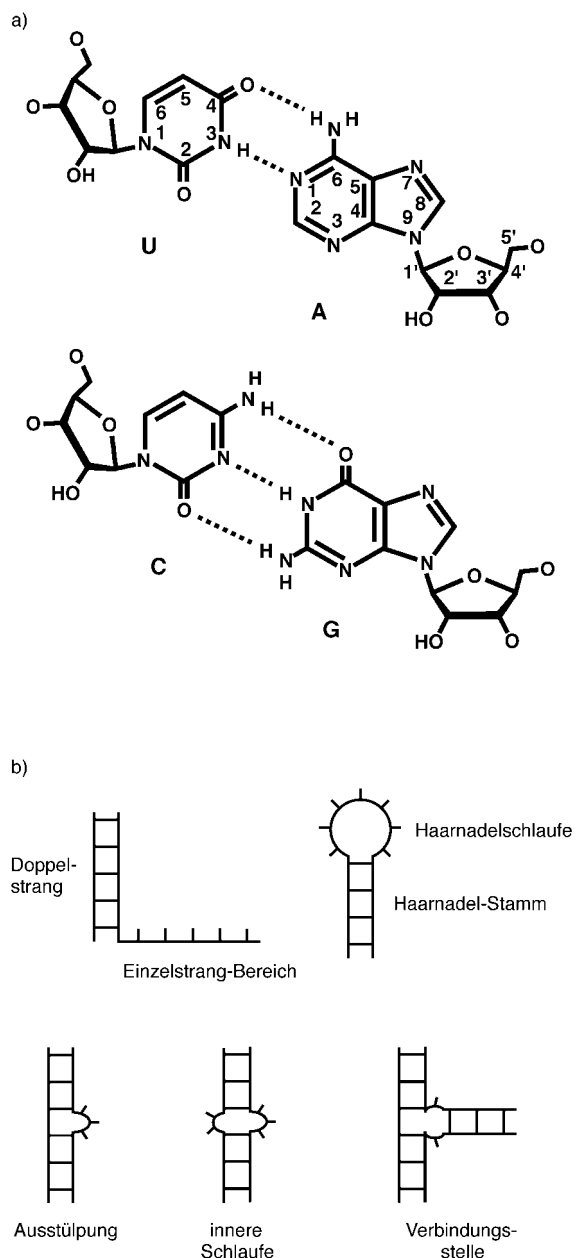


Abbildung 1. a) Standard-Watson-Crick-Basenpaare in RNA mit Nummerierung der Nucleotidbasen und der Ribose. b) Häufig auftretende RNA-Sekundärstrukturelemente.



Jennifer A. Doudna, geboren 1964 in Washington, D.C., erhielt 1985 ihren B.A. in Chemie mit Auszeichnung vom Pomona College in Claremont, CA, 1989 promovierte sie zum Ph.D. in Biochemie an der Harvard University. Dort arbeitete sie bei Prof. Jack Szostak am Entwurf selbstreplizierender RNA, wodurch ihr Interesse an Struktur und Faltung von RNA geweckt wurde. 1991 erhielt sie ein Lucille-P.-Markey-Scholar-Stipendium, um bei Prof. Tom Cech an der University of Colorado in Boulder zu arbeiten. Während der nächsten drei Jahre entwickelte sie Methoden zur Kristallisation von RNA in Zusammenarbeit mit Prof. Craig Kundrot. 1994 wurde sie Mitglied der Fakultät der Yale University am Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, 1997 wurde sie dort zum Associate Professor und 1999 zum Professor ernannt. Für ihre Arbeiten zur Kristallstrukturanalyse der P4-P6-Domäne des selbstspaltenden Tetrahymena-Introns erhielt sie 1996 den Prize for Innovative Research der Johnson Foundation. Gegenwärtig ist sie Assistant Investigator am Howard Hughes Medical Institute.

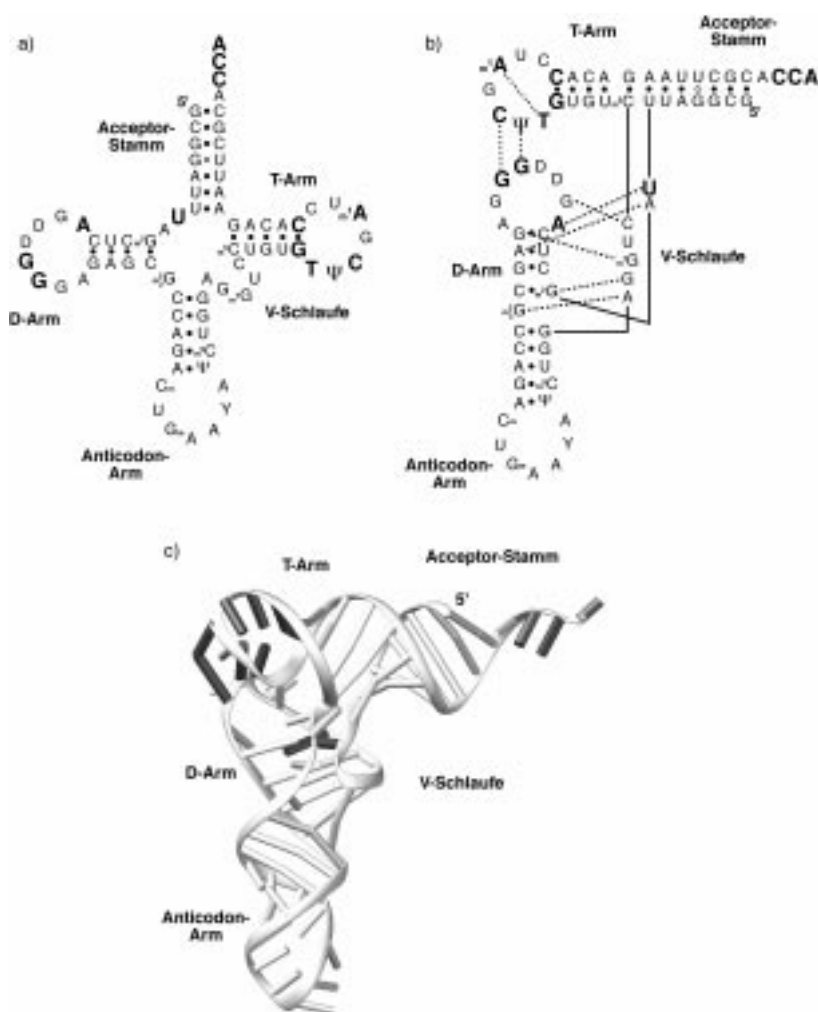


Abbildung 2. Die Strukturebenen am Beispiel der tRNA^{Phe} aus Hefe. a) Nucleotidsequenz, Modifikationen und Sekundärstruktur der tRNA^{Phe} in der klassischen Kleeblattstruktur-Darstellung. Watson-Crick-Basenpaare sind durch gefüllte Kreise, das G-U-Wobble-Basenpaar ist durch einen offenen Kreis symbolisiert. Nucleotidpositionen, die bei tRNAs der Klasse I unveränderlich sind, sind durch Fettdruck hervorgehoben. (Mit Veränderungen übernommen aus Lit. [135]). b) Die tertiären Wechselwirkungen der tRNA^{Phe} in einer modifizierten Darstellung der Sekundärstruktur, die die dreidimensionale Struktur widerspiegelt (tertiäre Wechselwirkungen zwischen den Basen sind durch gestrichelte Linien symbolisiert). Die konservierten Nucleotide, die hauptsächlich an diesen tertiären Wechselwirkungen beteiligt sind, sind in dem tRNA-Bereich konzentriert, der für die Bildung der Gesamtstruktur verantwortlich ist. c) Darstellung der Kristallstruktur von tRNA^{Phe} (Protein-Data-Bank (PDB)-Hinterlegungsnummer 6tna), in der die konservierten Nucleotide als schwarze Zylinder hervorgehoben sind.^[136] Die in diesem Beitrag gezeigten Darstellungen von RNA-Strukturen wurden mit dem Programm RIBBONS 2.0 erzeugt.^[137]

Anzahl von Basenpaarungsmöglichkeiten berechnen und die Struktur mit dem niedrigsten Energieinhalt als wahrscheinlichste Struktur bewerten.^[7] Ein verlässlicheres Verfahren zur Bestimmung der Sekundärstruktur biologischer RNAs ist die vergleichende Sequenzanalyse,^[8] welche sich darauf stützt, daß die Gesamtstruktur biologischer RNAs im allgemeinen weitgehend konserviert ist. Die phylogenetische Covarianz von zwei oder mehr Nucleotiden, die sich an voneinander entfernten Stellen in der Primärsequenz befinden, impliziert, daß sie zu einem gewissen Grad miteinander wechselwirken. In helicalen Bereichen manifestiert sich diese Covarianz als Austausch eines Typs von Watson-Crick-Basenpaaren gegen einen anderen (z. B. eines GC-Paares gegen ein AU-Paar). Für viele RNAs gibt es einen ausreichenden Datenbestand

von Sequenzen aus einem breiten evolutionären Spektrum, um sehr genau die Sekundärstrukturen neu sequenzierter RNA-Gene aus fast jedem Organismus ableiten zu können.

Eine Sekundärstruktur, die mit den beschriebenen Methoden erzeugt wurde, muß mit biochemischen Techniken experimentell bestätigt werden, die die Struktur der RNA in Lösung erfassen. Am häufigsten wird die RNA mit Ribonucleasen (RNasen) und Reagentien untersucht, die für bestimmte Eigenschaften der RNA spezifisch sind.^[9] Die meisten dieser Reagentien reagieren an Stellen der RNA, die nicht an der Bildung von Watson-Crick-Basenpaaren beteiligt und für das Lösungsmittel zugänglich sind; modifizierte Positionen werden anschließend durch die Sequenzierung von endständig ³²P-markierter RNA oder durch reverse Transkription der modifizierten RNA mit einem endständig ³²P-markierten DNA-Primer bestimmt. Aus dem Vergleich der biochemischen Tests mit den vorhergesagten RNA-Sekundärstrukturen läßt sich im allgemeinen eine genaue Karte des Watson-Crick-Paarungsschemas aufstellen.

Tertiärstrukturelemente entstehen vor allem durch die Wechselwirkung zwischen verschiedenen Sekundärstrukturelementen. Weil diese Arten der Wechselwirkung äußerst schwer vorhersagbar oder experimentell zu bestimmen sind, war bis vor kurzem außer der Struktur der tRNA nicht viel über diese Ebene der RNA-Architektur bekannt. Fortschritte wurden erst durch Verbesserungen bei der Synthese großer RNAs in Milligramm-Mengen^[10] und den Techniken zur Strukturanalyse durch Röntgenkristallographie und Kernresonanzspektroskopie (NMR) möglich (für ausgezeichnete Übersichtsartikel hierzu siehe Lit. [11, 12]). Bei den bis heute aufgeklärten hochaufgelösten Strukturen großer RNAs (tRNA,^[13, 14] Hammerhead-Ribozym,^[15, 16] P4-P6-Domäne des selbstspaltenden Introns von *Tetrahymena thermophila*,^[17] Ribozym des Hepatitis-Delta-Virus^[18]) spielen die tertiären

Wechselwirkungen eine maßgebliche Rolle beim Aufbau der Gesamtfaltung des Moleküls. Die tertiären Wechselwirkungen in der Phenylalanin-tRNA (tRNA^{Phe}) sind zusammen mit einer Darstellung der Sekundärstruktur, die die dreidimensionale Struktur widerspiegelt, in Abbildung 2b gezeigt. Diese Ansicht der tRNA verdeutlicht eine fundamentale Eigenschaft biologischer RNAs. Die konservierten Nucleotide in tRNAs der Klasse I (in Abbildung 2a, b durch Fettdruck, in Abbildung 2c durch schwarze Zylinder gekennzeichnet) gehören alle einer von zwei unterschiedlichen Gruppen an: den Nucleotiden mit biologischer Funktion, wie die am 3'-Ende des Aminoacyl-Acceptorarms, oder den Nucleotiden, die für den Aufbau der Gesamtstruktur von Bedeutung sind, wie die konservierten Nucleotide in der D-

und der T-Schleufe. Aus der Konservierung von Nucleotiden, die an der Bildung der Tertiärstruktur beteiligt sind, läßt sich ableiten, daß alle tRNAs dieser Klasse das gleiche Grundfaltungsmuster haben.

Im folgenden Abschnitt werden die Tertiärstrukturelemente beschrieben, die mit Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie aufgeklärt wurden. In diesem Aufsatz werden diese Motive in drei allgemeine Kategorien eingeteilt: Wechselwirkungen zwischen zwei doppelsträngigen helicalen Bereichen, zwischen einem helicalen Bereich und einem nichtdoppelsträngigen Bereich und zwischen zwei nichthelicalen Bereichen (dieses Klassifizierungsschema wurde von Westhof und Michel aus Lit. [19] übernommen). Hier werden wir uns im wesentlichen auf zwei RNA-Moleküle konzentrieren, deren Struktur und Faltung sehr detailliert charakterisiert wurden: Transfer-RNA (Abbildung 2a–c) und das selbstspießende Intron der Gruppe I aus *Tetrahymena thermophila* (Th-Intron) (Abbildung 3a, b). Zu Struktur und Funktion des Hammerhead-Ribozyms verweisen wir den interessierten Leser auf den ausführlichen Übersichtsartikel von Wedekind und McKay (Lit. [20]).

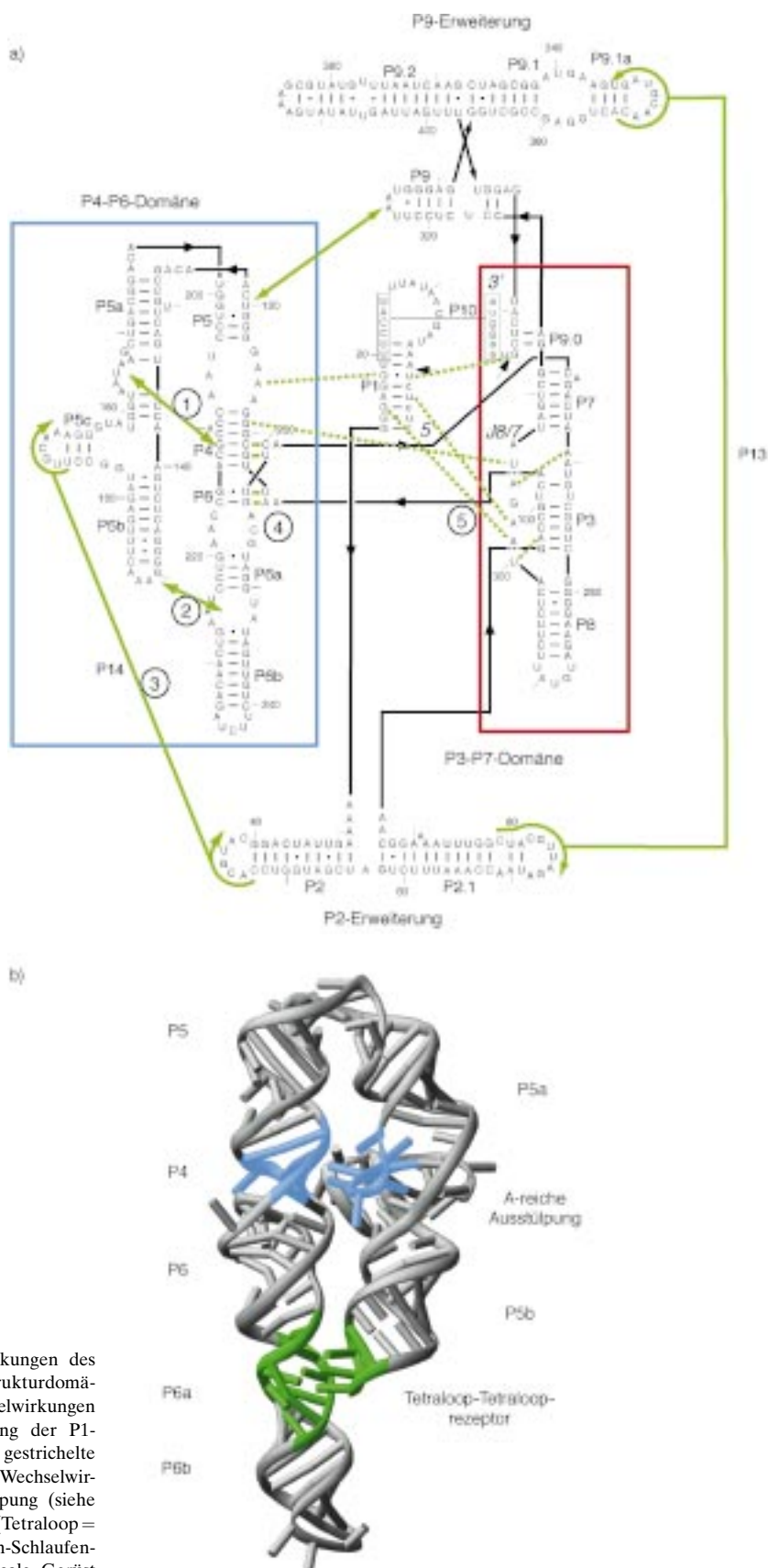
2.2. Wechselwirkungen zwischen helicalen Motiven

2.2.1. Coaxiale Stapelung

Die coaxiale Stapelung helicaler Bereiche, der grundlegendste Mechanismus, durch den in der RNA eine höhergeordnete Organisationsform erreicht wird, ist eine Folge der sehr günstigen energetischen Beiträge der Stapelwechselwirkungen des π -Elektronensystems der Nucleotidbasen zur Gesamtstabilität der Nucleinsäurestruktur.^[21] Die Dominanz der Basenstapelung bei der Stabilisierung der RNA-Struktur läßt sich überzeugend für tRNA zeigen, bei der nur 41 der 76 Basen an einer klassischen Helixstruktur beteiligt sind, aber 72 Basen an Stapelwechselwirkungen.^[22] Auch alle anderen bekannten

Abbildung 3. a) Sekundärstruktur und tertiäre Wechselwirkungen des *Tetrahymena*-Introns der Gruppe I. Die beiden wichtigsten Strukturdomänen, P4-P6 und P3-P7, sind eingerahmt, weitreichende Wechselwirkungen sind durch grüne Pfeile symbolisiert, und an der Bindung der P1-Substrathelix beteiligte Wechselwirkungen sind als grüne, gestrichelte Linien dargestellt. Die in diesem Aufsatz erwähnten tertiären Wechselwirkungen im Intron sind 1) die Adenosin(A)-reiche Ausstülpung (siehe Abschnitt 2.3.3), 2) das Tetraloop-Tetralooprezeptor-Motiv (Tetraloop = Vier-Basen-Schleufe) (siehe Abschnitt 2.3.2), 3) Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkungen (siehe Abschnitt 2.4.1), 4) das tripelhelicale Gerüst und 5) der J8/7-Triplex (siehe Abschnitt 4.2) In der Nomenklatur von Introns der Gruppe I bezeichnet P eine gepaarte Region, J einen Verbindungs- (joining) oder Einzelstrangbereich und L eine Haarnadelschleufe (hairpin loop). Die Darstellung wurde anhand von Daten aus der vergleichenden Datenbank von Introns der Gruppe I^[138] und Daten von Lehnert et al.^[62] erstellt.

b) Dreidimensionale Struktur der P4-P6-Domäne dieses Introns (PBD-Hinterlegungsnummer 1gid).^[17] Die tertiären Wechselwirkungen, die diese Domäne zusammenhalten, nämlich die A-reiche Ausstülpung und das Tetraloop-Tetralooprezeptor-Motiv, sind in Blau bzw. Grün hervorgehoben.



Strukturen großer RNAs weisen einen ähnlich hohen Anteil von Basenstapelungen auf.

Der Beitrag der coaxialen Stapelung zur Gesamtfaltung der RNA wurde zuerst anhand der Kristallstruktur von tRNA^{Phe} erkannt.^[13, 14, 23] In der dreidimensionalen Struktur sind die Stämme des D- und des Anticodon-Arms ebenso aufeinander gestapelt wie die Stämme des T-Arms und des Aminoacylacceptor-Arms (Abbildung 2b, c).^[23] Die beiden coaxialen Stapel sind durch tertiäre Wechselwirkungen zwischen der D- und der T-Schleife senkrecht zueinander orientiert, wodurch die L-Form des Gesamtmoleküls entsteht. Das Übergewicht der coaxialen Stapelung bei der Organisation der RNA-Struktur wird auch bei den Strukturen der P4-P6-Domäne (Abbildung 3b) und des Hepatitis-Delta-Ribozyms (siehe Abbildung 8) deutlich, da jede der Strukturen durch zwei Gruppen coaxial gestapelter Helices, die gegeneinander gepackt sind, beschrieben werden kann.

Die Organisation von Verbindungsstellen, in denen sich drei oder mehr Helices treffen, durch coaxiale Stapelung wird oft durch die Bindung zweiwertiger Metallkationen in der Nähe der Stapelstelle erreicht. Der direkte Einfluß der Bindung von Metallionen auf die Faltung dieses Sekundärstrukturmotivs wurde eindeutig bei Untersuchungen einer Verbindungsstelle aus drei Elementen im katalytischen Zentrum des Hammerhead-Ribozyms gezeigt. Im Kristall sind zwei der Helices coaxial gestapelt, und die dritte wird durch tertiäre Kontakte und hydratisierte Magnesiumionen, die spezifisch an die RNA gebunden sind, bezüglich dieses Stapels ausgerichtet (Abbildung 4a, b).^[15, 16, 24] Die Orientierung der Helices relativ zueinander hängt in äußerst empfindlicher Weise von der Konzentration zweiwertiger Kationen ab, wie durch native Gelelektrophorese,^[25, 26] Fluoreszenz-Resonanzenergieübertragung^[27] und Messung der

kurzzeitig elektrisch induzierten Doppelbrechungsänderung^[28] gezeigt wurde. In Abwesenheit von Mg²⁺ bildet diese Verbindungsstelle eine ausgedehnte Struktur, in der keine der Helices gestapelt ist (Abbildung 4c).^[25] Bei niedrigen Konzentrationen an zweiwertigen Kationen (500 µM Mg²⁺) sind die Helices II und III coaxial gestapelt, und Helix I bildet einen spitzen Winkel mit Helix II, was der katalytisch aktiven Form des Ribozyms entspricht. Obwohl extrem hohe Konzentrationen einwertiger Ionen (4 M Li₂SO₄) das Hammerhead-Ribozym in eine aktive Struktur bringen können,^[29] hängt unter physiologischen Bedingungen die konformative Umorientierung der Verbindungsstelle von der ortsspezifischen Bindung zweiwertiger Ionen ab. Die Untersuchung anderer Verbindungselemente deutet darauf hin, daß deren Faltung generell durch zweiwertige Kationen vermittelt wird.^[30–33] Dieser Mechanismus wird auch bei anderen tertiären Motiven beobachtet, für die eine coaxiale Stapelung wichtig ist (siehe Abschnitte 2.4.1 und 2.4.2).

2.2.2. Die Adenosin-Plattform

Die Kristallstruktur der P4-P6-Domäne des Th-Introns enthält ein Motiv, durch welches die Wechselwirkung zwischen Helices erleichtert wird, indem eine Stelle für eine Basenstapelung geschaffen wird.^[17, 34] Die Adenosin-Plattform (A-Plattform), die an drei unterschiedlichen Stellen in dieser RNA vorkommt, besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Adenosinresten, die Seite an Seite angeordnet sind und so ein „Pseudobasenpaar“ bilden (Abbildung 5a). In der Plattform kann sich in der Position des 3'-Adenosins auch ein Cytidin befinden, wie dies in der Struktur des Theophyllin-bindenden RNA-Aptamers in Lösung (aufgeklärt mit NMR-Spektroskopie)^[35] und bei einer In-vitro-Selektion auf Varianten der Tetraloop-Tetralooprezeptor-Wechselwirkung (siehe Abschnitt 2.3.2) gefunden wurde.^[36] Jede Adenosin-Plattform enthält ein nichtkanonisches Basenpaar (eine Paarung, die nicht vom Watson-Crick-Typ ist) in unmittelbarer Nachbarschaft, entweder ein GU-Wobble-Basenpaar oder ein A·U-Basenpaar vom Hoogsteen-Typ, wodurch eine lokale Konformation in der Helix erzwungen wird, die die Stapelung zwischen der Plattform und dem nichtkanonischen Basenpaar verstärkt. Die andere Seite des 3'-Adenosins der Plattform bleibt frei und ist an tertiären Stapelwechselwirkungen beteiligt, was in allen drei Plattformen gefunden wurde.

Zwei der Adenosin-Plattformen der P4-P6-Domäne sind im Kristallgitter an einem intermolekularen RNA-RNA-Kontakt zwischen zwei benachbarten Molekülen beteiligt (Abbildung 5b, c). Die A-Plattform in der internen Schleife J6/6a (der Schleife zwischen den Helices P6 und P6a) wird von zwei benachbarten Adenosinresten am 5'-Ende der Schleife gebildet; dabei ist das Watson-Crick-Basenpaar CG am 5'-Ende der Schleife über Stapelwechselwirkungen auf die Plattform gepackt, an deren 3'-Ende sich ein GU-Wobble-Basenpaar befindet. So kann die Plattform innerhalb der Helix, die P6 und P6a verbindet, Stapelwechselwirkungen eingehen, wodurch die drei Nucleotide auf der 3'-Seite der

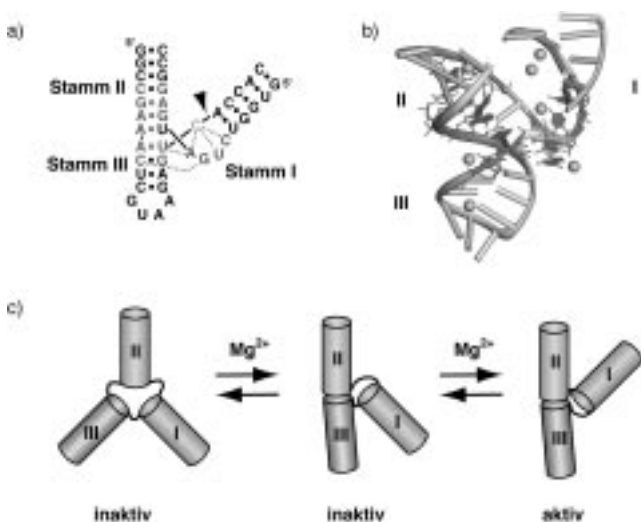


Abbildung 4. Das Hammerhead-Ribozym. a) Die Sekundärstruktur des Hammerhead-Ribozyms, das für die Strukturbestimmung verwendet wurde. Nucleotide, die für die katalytische Aktivität entscheidend sind, sind grau gezeichnet, die Base der Spaltungsstelle hellgrau und die beobachteten tertiären Wechselwirkungen als gestrichelte Linien. b) Dreidimensionale Struktur des Hammerhead-Ribozyms; die assoziierten Cobaltionen sind als Kugeln gezeigt (PDB-Hinterlegungsnummer 379D).^[24] c) Schematische Darstellung der magnesiumabhängigen Konformationen des Hammerhead-Ribozyms. (Mit Veränderungen aus Lit. [26] übernommen).

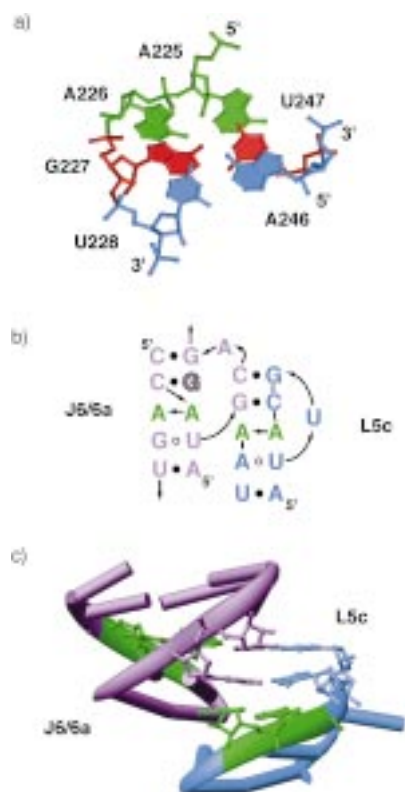


Abbildung 5. a) Struktur des Adenosin-Plattform-Motivs. Zwei benachbarte Adenosinreste (grün) sind nebeneinander unmittelbar unter einem GU-Wobble-Basenpaar (rot) angeordnet. b) Sekundär- und c) Tertiärstruktur eines Bereichs mit einer Wechselwirkung zwischen der inneren Schleife J6/6a (lila) und L5c (blau) von zwei P4-P6-Molekülen in der asymmetrischen Einheit, vermittelt über zwei Adenosin-Plattformen (grün).

internen Schleife aus der Helix herausgeschoben werden. Zwei dieser Nucleotide bilden Watson-Crick-Paare mit Nucleotiden in L5c einer benachbarten RNA und bilden so eine kleine Helix von zwei Basenpaaren, die auf die A-Plattform gestapelt ist, die L5c abschließt. Die andere Plattform in der P4-P6-Domäne ist an einer intramolekularen tertiären Wechselwirkung zwischen einer Schleife von vier Nucleotiden und einer internen Schleife beteiligt (siehe Abschnitt 2.3.2). Da alle drei A-Plattformen in der P4-P6-Domäne tertiäre Wechselwirkungen unterstützen, ist es wahrscheinlich, daß dieses Motiv in vielen anderen großen RNAs gefunden werden wird.

2.2.3. Helicale Wechselwirkungen, die über 2'-Hydroxygruppen vermittelt werden

Im Kristall besteht bei kleinen RNA-Duplexen ein erhebliches Problem beim Einfügen in ein dreidimensionales Gitter. Während natürliche RNAs viele spezialisierte interhelicale Packungsmotive haben, steht bei der streng helicalen Natur der Duplexe nur wenig chemische Diversität zur Verfügung, um diese tertiären Wechselwirkungen zu erzeugen. Die Kontakte zwischen den Helices in diesen Gittern können allerdings Hinweise darauf geben, wie Helices in manchen natürlichen RNAs gepackt sind. In den meisten der bisher untersuchten Kristalle sind die Duplex-Oligonucleotide coaxial zu „pseudo-unendlichen“ Helices gestapelt, die

auf zwei unterschiedliche Arten in ein dreidimensionales Gitter gepackt werden können.

Im Falle des RNA-Dodecamers $5'\text{GGCGCUUGCGUC}3'$ ordnen sich die quasi-kontinuierlichen Helices so an, daß das Rückgrat der einen Helix mit der flachen Furche einer senkrecht angeordneten Helix in Wechselwirkung steht.^[37] An jeder Kontaktstelle werden zahlreiche direkte Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den 2'-Hydroxygruppen, den 3'-Sauerstoffatomen sowie den Phosphat-Sauerstoffatomen des Rückgrats der einen Helix und dem O2-Atom des Pyrimidinrings, der exocyclischen Aminogruppe von Guanosin und den 2'-Hydroxygruppen in der kleinen Furche der benachbarten Helix gebildet (Abbildung 6). Die Mehrzahl der Wasserstoffbrückenbindungen wird über die 2'-Hydroxygruppen vermittelt: 8 von 13 in der ersten Kontaktstelle und 5 von 8 in der zweiten Kontaktstelle zwischen den Helices. Ähnliche Wechselwirkungen werden in Kristallen mit der gleichen Helixpackung gefunden.^[38, 39]

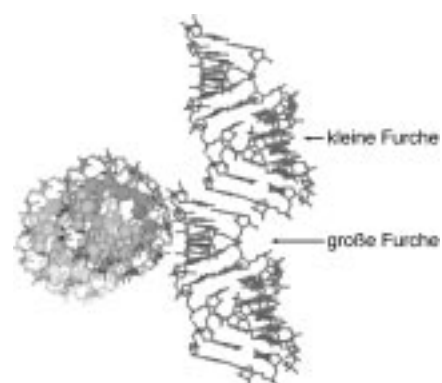


Abbildung 6. Die senkrechte Packungsanordnung pseudo-unbegrenzter RNA-Helices. Das Rückgrat der einen Helix steht mit Nucleotidbasen in der weiten, flachen kleinen Furche einer benachbarten Helix im Kristallgitter in Wechselwirkung. Die Abbildung wurde anhand der Kristallstruktur des Oligonucleotids $5'\text{GGCGCUUGCGUC}3'$ (Lietzke et al.,^[37] PDB-Hinterlegungsnummer 280D) erstellt.

Ganz anders sind die Verhältnisse in Kristallstrukturen, in denen die pseudo-unendlichen Helices parallel zueinander orientiert sind. In solchen Kristallen gehen die Rückgrate der RNA-Duplexe eine begrenzte Zahl von interhelicalen Wechselwirkungen ein, hauptsächlich über wasservermittelte Rückgrat-Rückgrat-Kontakte und 2'-Hydroxygruppen-Phosphat-Kontakte.^[40, 41] Die Dominanz der 2'-Hydroxygruppen bei der Vermittlung der Helixpackung in beiden Anordnungen findet sich auch in vielen tertiären Wechselwirkungen natürlicher RNAs wieder, z. B. im Ribose-Zipper-Motiv (siehe Abschnitt 2.3.4).

2.3. Wechselwirkungen zwischen helicalen und ungepaarten Motiven

2.3.1. Basentripel und Tripelhelices

Frühe biophysikalische Untersuchungen an Heteroduplexen aus poly(A) (homopolymeres Adenosinphosphat) und poly(U) (homopolymeres Uridinphosphat) ergaben, daß sich

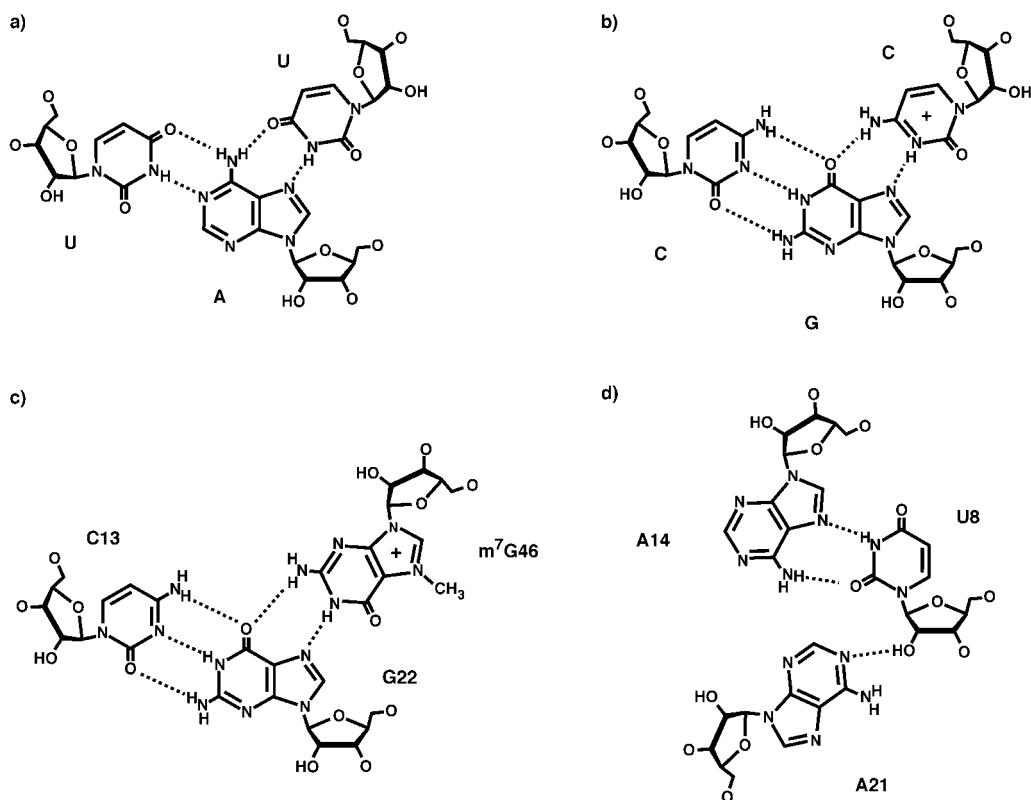


Abbildung 7. Beispiele für Basentripel in RNA. a) Basentripel U·A-U vom Hoogsteen-Typ, wobei der zweite Uracilrest über Wasserstoffbrückenbindungen an die der großen Furche zugewandte Seite eines herkömmlichen Watson-Crick-AU-Basenpaares gebunden ist. b) Protoniertes C⁺·GC-Basentripel vom Hoogsteen-Typ. c) Purin-Basentripel in der großen Furche der tRNA^{Phe}. d) Basentripel in der tRNA^{Phe}, in der ein Adenosinrest über eine H-Brücke in der kleinen Furche mit der 2'-Hydroxygruppe eines reversen Hoogsteen-A·U-Basenpaares verbunden ist.

die Duplexe bei hoher Ionenstärke in poly(U)-poly(A)-poly(U)-Triplexhelices und poly(A)-Einzelstränge umwandeln.^[42, 43] Im Triplex bilden poly(A) und poly(U) Standard-Watson-Crick-Basenpaare, während sich der zweite poly(U)-Strang in die große Furche des RNA-Duplex einlagert und mit dem poly(A)-Strang Basenpaare vom Hoogsteen-Typ bildet (Abbildung 7a). In ähnlicher Weise kann ein protonierter Cytosinrest eine Hoogsteen-Basenpaarung mit einem Guaninrest eingehen, der an einem Watson-Crick-GC-Paar beteiligt ist, so daß ein isosteres (C·G-C)⁺-Basentripel entsteht (Abbildung 7b). Die NMR-spektroskopische Strukturcharakterisierung eines RNA-Modelltriplex, der beide Typen von Basentripeln enthält, ergab, daß der dritte Strang ohne große Verzerrung der idealen A-Form der helicalen Struktur in die tiefe große Furche der RNA paßt.^[44]

Trotz der Stabilität des ausgedehnten Pyrimidin-Purin-Pyrimidin-Triplex wurde dieses Motiv noch in keiner natürlich vorkommenden RNA gefunden. Statt dessen findet man es in vielen RNAs in begrenztem Umfang als isoliertes Basentripel in der großen und der kleinen Furche. Strukturbeispiele existieren für beide Paarungstypen. Basentripel in der großen Furche findet man in der Kristallstruktur von tRNA^{Phe}, wo der D-Arm zwei aufeinander folgende Basentripel bildet.^[13, 14, 23] Anders als in den Modelltriplexen, in denen nur Pyrimidine in dem nach Hoogsteen paarenden Strang vorkommen, gehen hier in beiden Fällen Purinbasen

eine Wechselwirkung mit der Hoogsteen-Seite eines Purins ein, das Teil eines Watson-Crick-Paares ist (Abbildung 7c). Tripel in der kleinen Furche findet man ebenfalls in der tRNA^{Phe}, wo A21, das coplanar zu einem reversen U8·A14-Hoogsteen-Basenpaar ist, über die kleine Furche durch Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem eigenen N1-Atom und der 2'-Hydroxygruppe von U8 eine Wechselwirkung eingeht (Abbildung 7d). Im Th-Intron findet man Basentripel in der kleinen Furche als Bestandteil der GAAA-Tetraloop-Tetraloop-Wechselwirkung^[17] (siehe Abschnitt 2.3.2) und im triplexhelicalen Gerüst, einem Strukturelement, das für eine korrekte Orientierung der P4-P6- und der P3-P7-Domäne entscheidend ist. Basentripel spielen auch eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung vieler niedermolekularer Liganden und kleiner Peptide mit RNA.^[45]

Die unterschiedliche Morphologie der Basentripel in der großen und der kleinen Furche in biologisch aktiven RNAs läßt vermuten, daß die Art der Triplexen in diesen RNAs anders ist als die der Pyrimidin-Purin-Pyrimidin-Modelltriplexe. Offenbar werden die helicalen Bereiche von ausgedehnten Einzelstrang-Bereichen durch die Bildung von Basentripeln zusammengehalten. Die variable Schlaufe der tRNA^{Phe} (Abbildung 2b, c) bildet zwei Basentripel mit der großen Furche des D-Arms, Basenpaare mit der D-Schlaufe und eine coaxiale Stapelwechselwirkung zwischen D- und Anticodon-Arm. Im Hepatitis-Delta-Ribozym (Abbildung 8) geht ein einzelsträngiger Abschnitt von vier aufeinander

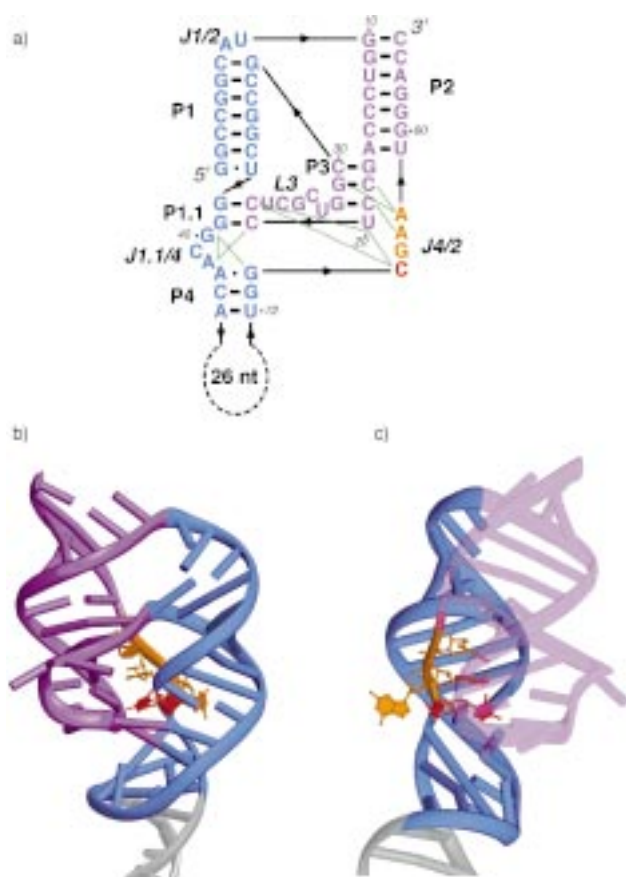


Abbildung 8. Das Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym. a) Darstellung der Sekundärstruktur des RNA-Konstrukts, welches für eine Röntgenstrukturanalyse verwendet wurde, auf der Basis seiner dreidimensionalen Faltung. Diese Faltung teilt das Ribozym in zwei coaxial gestapelte Helices (blau und lila) und einen einzelsträngigen Bereich J4/2 (orange), der einen für die katalytische Aktivität unverzichtbaren Cytosinrest (rot) enthält. b) Darstellung der dreidimensionalen Struktur des Hepatitis-Delta-Virus-Ribozyms, aus der die Gesamttopologie des Rückgrats ersichtlich wird, die einem doppelten Pseudoknoten entspricht (PDB-Hinterlegungsnummer 1drz).^[18] Der grau gezeichnete Abschnitt am unteren Ende des Ribozyms war Teil einer künstlich eingeführten U1A-Proteinbindungsstelle, durch die die Kristallisation der RNA erleichtert wurde (das Protein ist nicht dargestellt). c) Um 90° gedrehte Darstellung der Ribozymstruktur, bei der der coaxiale P2/P3-Stapel vorne liegt. Die hochkonservierten Nucleotide C75, A77 und A78 von J4/2 befinden sich tief in der katalytischen Spalte des Ribozyms zwischen den beiden Paaren coaxial gestapelter Helices.

folgenden Nucleotiden (J4/2) ausgedehnte Wechselwirkungen mit den beiden Paaren coaxial gestapelter Helices in der Region ein, in der man die katalytische Tasche vermutet.^[18] Zwei konservierte Adenosinreste in diesem einzelsträngigen Bereich stehen über ein Basentripel in der kleinen Furche, an dem ein Watson-Crick-GC-Basenpaar beteiligt ist, und ein Ribose-Zipper-Motiv (siehe Abschnitt 2.3.4) mit einer Helix in Wechselwirkung. Cytosin 75 (in Abbildung 8 rot gezeichnet), das für die katalytische Aktivität des Ribozyms entscheidend ist, bildet mit seinem N4-Atom eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Phosphatrest aus dem anderen coaxial gestapelten Helixpaar. Es gibt zahlreiche Hinweise aus biochemischen Untersuchungen, daß innerhalb des katalytischen Zentrums des Th-Introns eine Tripelhelix, die von J8/7 in der kleinen Furche gebildet wird, entscheidend für die Verbrückung der Substrathelix P1 mit den Helices P3 und P4

ist, die das Herzstück des katalytischen Zentrums bilden (siehe Abbildung 17).^[46] Auf Grund dieser Beispiele scheint es, daß einzelsträngige Abschnitte in vielen großen RNAs oft dazu dienen, helicale Regionen über die Bildung von Basentripeln miteinander zu verbinden.

2.3.2. Das Motiv der Vier-Basen-Schleife (Tetraloop-Motiv)

Zu den hervorstechendsten Motiven in natürlichen RNAs gehören verschiedene Abschnitte aus vier Nucleotiden, die eine Schleife bilden (Tetraloops). Diese hat man in ribosomalen 16S- und 23S-RNAs (rRNAs), in selbstspaltenden Introns der Gruppen I und II, in Ribonuclease P und in mRNA des Bacteriophagen T4 gefunden.^[47] In eubakterieller 16S-rRNA machen Tetraloops beispielsweise etwa 55 % aller Haarnadelschleifen aus, während Schleifen aus fünf Nucleotiden, die zweithäufigste Größe von Schleifen, nur 13 % ausmachen.^[48] Die Mehrzahl der 16S-rRNA-Tetraloops fällt in eine von zwei Kategorien: das „UNCG“-Motiv oder das „GNRA“-Motiv. Das UNCG-Tetraloop-Motiv (N an der zweiten Position kann durch jedes Nucleotid besetzt werden) verleiht Untersuchungen zufolge einer RNA-Haarnadelschleife ungewöhnlich große thermodynamische Stabilität,^[47, 49] doch ist bis jetzt noch keine Beteiligung an tertiären Wechselwirkungen nachgewiesen worden.

Das GNRA-Sequenzmotiv, in dem an der zweiten Position jedes Nucleotid vorkommen kann und in dem sich an der dritten Position eine Purinbase (R = A oder G) befindet, ist das häufigste Tetraloop-Motiv in natürlich vorkommenden RNAs.^[48] NMR-spektroskopische Strukturanalysen von verschiedenen dieser Tetraloops (GAGA, GCAA und GAAA) deckten ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen und Stapelwechselwirkungen auf, die zu einer stabilen Struktur beitragen (Abbildung 9a).^[50, 51] In allen genannten Tetraloops bilden das Guanotin an Position 1 (G¹) und das Adenosin an Position 4 (A⁴) ein verzerrtes Basenpaar, in dem zwischen G¹-N3 und A⁴-N6 sowie zwischen G¹-N2 und A⁴-N7 je eine Wasserstoffbrückenbindung besteht. In den GCAA- und GAAA-Tetraloops ist der Abstand zwischen G¹-N3 und A⁴-N6 zu groß für eine direkte Wasserstoffbrückenbindung, so daß diese wahrscheinlich über ein dazwischen liegendes Wassermolekül vermittelt wird.^[51] Im GAAA-Tetraloop ist dieses Paar von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Phosphatrest von A⁴ und der Watson-Crick-Seite von G¹ sowie zwischen der 2'-Hydroxygruppe von G¹ und der Hoogsteen-Seite von G/A³ und A⁴-N6 umgeben. In den GAGA- und GAAA-Tetraloops ist das Nucleotid an der zweiten Position auf das an der dritten Position gestapelt, während in der GCAA-Schleife der Cytosinrest an Position 2 ungeordnet ist. Diese Variabilität bei der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und Stapelwechselwirkungen zwischen verschiedenen Mitgliedern der GNRA-Familie beeinflusst die thermodynamische Stabilität kaum, kann aber entscheidend für die Bildung tertiärer Wechselwirkungen zwischen diesem Motiv und diversen anderen RNA-Motiven sein.

Bei einer Covariationsanalyse von Introns der Gruppen I und II sowie RNase P wurden verschiedene RNA-Motive

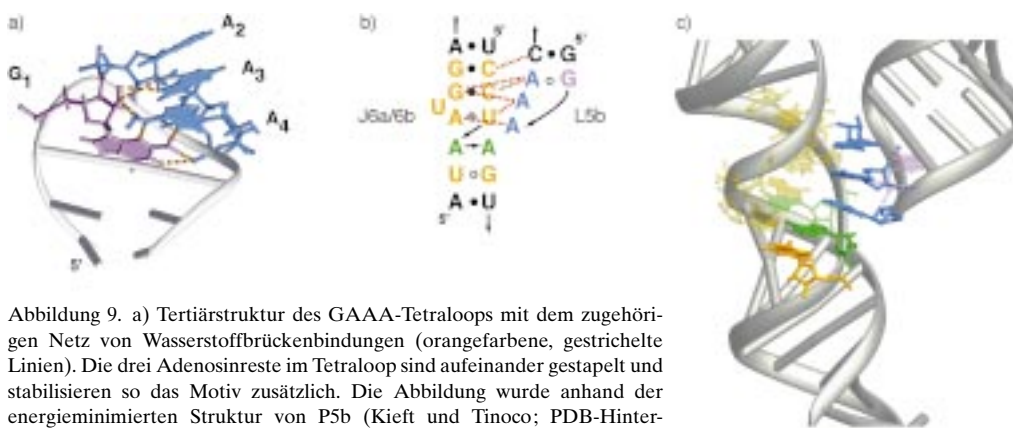


Abbildung 9. a) Tertiärstruktur des GAAA-Tetraloops mit dem zugehörigen Netz von Wasserstoffbrückenbindungen (orangefarbene, gestrichelte Linien). Die drei Adenosinreste im Tetraloop sind aufeinander gestapelt und stabilisieren so das Motiv zusätzlich. Die Abbildung wurde anhand der energieminierten Struktur von P5b (Kieft und Tinoco; PDB-Hinterlegungsnummer 1ajf)^[139] erstellt. b) Darstellung der Sekundärstruktur mit der Wechselwirkung zwischen dem GAAA-Tetraloop (lila/blau) und dem Tetralooprezeptor (gold-orange; die A-Plattform ist grün gezeichnet). Weitreichende Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Tetraloop und seinem Rezeptor sind rot eingezeichnet. c) Darstellung der dreidimensionalen Struktur, aus der die Wechselwirkung zwischen GAAA-Tetraloop und seinem Rezeptor ersichtlich wird. Die Konformation des rezeptorgebundenen Tetraloops ist nahezu identisch mit der seiner freien Form; die drei Adenosinreste bilden mit der Adenosin-Plattform innerhalb des Rezeptors einen kontinuierlichen Basenstapel.

entdeckt, die mit Tetraloops vom GNRA-Typ tertiäre Wechselwirkungen eingehen. Die Struktur eines internen Schlaufenmotivs, das als Tetralooprezeptor bezeichnet wird, weil es mit hoher Affinität und Spezifität den GAAA-Tetraloop bindet,^[52–54] wurde als Teil der P4-P6-Domäne des Th-Introns identifiziert (Abbildung 9b, c).^[17] Der Tetralooprezeptor nimmt eine Konformation ein, in der zwei Watson-Crick-GC-Basenpaare, ein reverses Hoogsteen-AU-Basenpaar, eine Adenosin-Plattform und ein GU-Wobble-Basenpaar vorliegen. Im rezeptorgebundenen Zustand sind die drei Adenosinreste des GAAA-Tetraloops auf der Adenosin-Plattform des Rezeptors gestapelt; ansonsten unterscheidet sich die Konformation kaum von der im ungebundenen Zustand. So wird ein Netz von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Adenosinresten des Tetraloops und der kleinen Furche des Rezeptors gebildet, das diese tertiäre Wechselwirkung stabilisiert.

Bei einer zweiten Art der Wechselwirkung zwischen Tetraloops und RNA besteht eine Bindung des GNRA-Tetraloops an die kleine Furche von zwei aufeinander folgenden Basenpaaren. Dabei steht ein GNAA-Tetraloop mit der kleinen Furche von zwei benachbarten Watson-Crick-GC-Basenpaaren oder ein GNGA-Tetraloop mit einer [5'CU...AG3']-Dinucleotidstufe in Wechselwirkung. Diese Anordnung wurde in der Kristallstruktur des Hammerhead-Ribozyms gefunden, wo der GAAA-Tetraloop eines Ribozymmoleküls an zwei aufeinander folgende GC-Paare eines Nachbarmoleküls andockt.^[15, 55] Biochemische Untersuchungen der Wechselwirkungen von GNRA-Tetraloops mit RNA zeigen, daß die Schlaufe und ihre Erkennungsstelle ein erstaunlich hohes Maß an Variabilität tolerieren, ohne daß die Bindungsaffinität oder die Spezifität verlorengeht.^[36, 56] Dies weist darauf hin, daß es weitere, noch nicht identifizierte Motive gibt, die intramolekulare Kontakte zum Tetraloop-Motiv in biologischen RNAs bilden können.

Die Bedeutung der kleinen Furche bei der Vermittlung tertiärer Wechselwirkungen, z. B. beim Andocken von Tetraloops, kann eine grundlegende Ursache dafür sein, daß RNA,

nicht aber DNA, sich zu komplexen dreidimensionalen Strukturen faltet. Die kleine Furche der A-Form helicaler RNA ist breit und flach (10–11 Å) und bietet damit einen einfachen Zugang zu dieser Seite der Helix, während die B-Form helicaler DNA mit 5.8 Å eine viel schmalere kleine Furche aufweist. So können auch die funktionellen Gruppen der Ribose, vor allem die 2'-Hydroxygruppe, an Wechselwirkungen beteiligt sein. Obwohl die große Furche der RNA in internen Schleifen mit Purin-Purin-Paaren oder am

Ende einer Helix genügend aufgeweitet werden kann, um Erkennungsprozesse zu ermöglichen, scheint die Bedeutung der großen Furche weit hinter der der kleinen Furche zurückzubleiben.

2.3.3. Das Motiv des Metallionenzentrums

Innerhalb der P4-P6-Domäne verschiedener Unterklassen von Introns der Gruppe I gibt es das Motiv einer Ausstülpung in Helix P5, deren Nucleotidzusammensetzung und Abstand zur Helix P4 konserviert sind. Diese Ausstülpung, die zwei konservierte Adenosinreste (A184 und A186 im Th-Intron) und einen weiteren hochkonservierten Rest (A183) enthält, ist entscheidend für die Faltung des Introns. Das Ribose-Phosphat-Rückgrat dieser Ausstülpung bildet eine kornenzieherartige Krümmung, in der die Phosphatreste nach innen gedreht sind und die Nucleotidbasen nach außen gerichtet sind (Abbildung 10).^[17] Möglicherweise ungünstige elektrostatische Abstoßungen, die durch die dichte Packung des Phosphatrückgrats entstehen, werden durch zwei gebundene Magnesiumionen abgeschwächt, für deren innere Koordina-

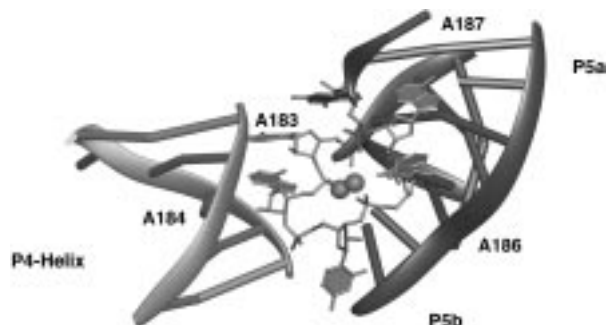


Abbildung 10. Die adenosinreiche Ausstülpung des *Tetrahymena*-Introns der Gruppe I. Hochkonservierte Adenosinreste (Sequenznummern sind angegeben) innerhalb der Ausstülpung stehen mit der Helix P4 und der Subdomäne P5abc in Wechselwirkung. Die kornenzieherartige Struktur der Ausstülpung wird durch zwei spezifisch gebundene Magnesiumionen (als Kugeln gezeichnet) stabilisiert.

tionssphäre die RNA viele Liganden bereitstellt.^[57] Die Nucleotidbasen, die von der Ausstülpung abgespreizt sind, bilden tertiäre Kontakte zu zwei Regionen der RNA. A183 und A184 binden an funktionelle Gruppen in der kleinen Furche der P4-Helix nach Art eines Ribose-Zipper-Motivs (siehe Abschnitt 2.3.4). A186 geht zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen mit der kleinen Furche des C137-G181-Basenpaares von P5a sowie mit G164 im verzerrten A139-G164-Basenpaar am oberen Ende von P5b ein. Stapelwechselwirkungen zwischen A186 und dem A139-G164-Basenpaar erleichtern die coaxiale P5a-5b-Stapelung an dieser Verbindungsstelle. Der vierte Adenosinrest der Ausstülpung, A187, bildet ein nichtkanonisches Basenpaar mit U135. So werden in der adenosinreichen Ausstülpung Nucleotidbasen in einer Konformation präsentiert, durch die die Helix P4 eng an den coaxialen Helixstapel aus P5a-5b andocken kann; auf diese Weise sowie durch das GAAA-Tetraloop-Tetralooprezeptor-Motiv werden die beiden Helixpaare, die die P4-P6-Domäne bilden, fest miteinander verbunden und bedingen die Gesamtfaltung dieser RNA.

Die Kristallstruktur der Transaktivierungs-Erkennungsregion (trans-activation response region, TAR) des menschlichen Immunschwächevirus (HIV) weist ein ähnliches Motiv auf.^[58] In dieser RNA bindet eine Ausstülpung mit der Sequenz UCU drei Calciumionen. Diese Ionen koordinieren Phosphat-Sauerstoffatome des RNA-Rückgrats der ausgestülpten sowie anderer Nucleotide. Als Folge davon weisen die drei Pyrimidinbasen von der RNA-Helix weg, so daß die Stämme, die die Ausstülpung flankieren, coaxial aufeinander stapeln können. Durch Messung der kurzzeitig elektrisch induzierten Doppelbrechungsänderung wurde gezeigt, daß auch Mg^{2+} -Ionen an diese pyrimidinreiche Ausstülpung binden und eine coaxiale Stapelung der beiden Helices verursachen. Wenn die Sequenz der Ausstülpung zu drei Adenosinresten verändert wird, verlieren die Magnesiumionen ihren Einfluß, woraus sich schließen läßt, daß die Nucleotidsequenz die Fähigkeit des Rückgrats zur spezifischen Metallionenbindung beeinflusst.^[59, 60] Ein solches Motiv wurde auch bei der Erkennung von einzelsträngiger DNA des Hunde-Parvovirus durch das virale Capsidprotein nachgewiesen; dort wird ein zweiwertiges Metallion vom DNA-Phosphatrückgrat komplexiert und dadurch die Nucleotidbasen für die Erkennung durch das Protein organisiert.^[61] Dieses Motiv scheint also die Basis für einen allgemeinen Mechanismus zu sein, durch den Nucleotidbasen für die Erkennung durch Nucleinsäuren oder Proteine präsentiert werden.

2.3.4. Das Ribose-Zipper-Motiv

Bei tertiären Wechselwirkungen, die durch adenosinreiche Ausstülpungen und die GAAA-Tetraloop-Tetralooprezeptor-Wechselwirkung vermittelt werden, kommen die Ribose-Phosphat-Rückgrate der beiden Helices, die aneinandergedockt werden, miteinander in engen Kontakt. An solchen Stellen werden die Ribosezucker antiparalleler Stränge ineinander geschoben. Gegabelte Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der 2'-Hydroxygruppe der Ribose einer Helix und der 2'-Hydroxygruppe und dem N3-Atom eines Purins oder dem O2-Atom eines Pyrimidins in der gegenüberliegen-

den Helix bilden einen „Reißverschluß“ (zipper) von Ribosezuckern in den kleinen Furchen der beiden Helices (Abbildung 11). Ähnliches wurde bei der intermolekularen Wechselwirkung zwischen einem GAAA-Tetraloop und der

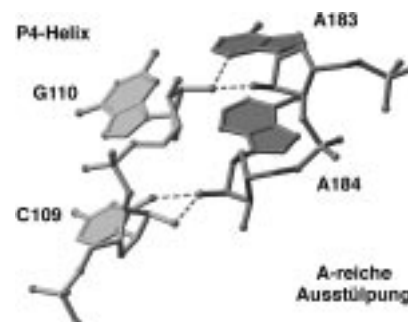


Abbildung 11. Das Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen zwischen 2'-Hydroxygruppen und Nucleotidbasen innerhalb des Ribose-Zipper-Motivs, das zwischen zwei Adenosinresten in der adenosinreichen Ausstülpung und der kleinen Furche der Helix P4 in der P4-P6-Domäne des *Tetrahymena*-Introns gefunden wurde.

kleinen Furche in der Kristallstruktur des Hammerhead-Ribozyms^[55] und der Kristallstruktur des Hepatitis-Delta-Virus-Ribozyms^[18] gefunden. Dieser Wechselwirkung kommt wahrscheinlich bei vielen biologischen RNAs vor, denn so können potentiell RNA-Stränge und Helices ohne große Sequenzspezifität zusammengepackt werden. Wegen dieses Mangels an Sequenzspezifität ist der Ribose-Zipper allerdings nur sehr schwer durch Covariationsanalyse oder andere biochemische Testmethoden vorherzusagen.

2.4. Tertiäre Wechselwirkungen zwischen ungepaarten Bereichen

2.4.1. Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkungen

Haarnadelschlaufen bieten ein umfangreiches Potential für die Bildung tertiärer Kontakte durch paarende Wechselwirkungen zwischen ihren Nucleotidbasen, wodurch neue Helices entstehen. Diese Art von Wechselwirkungen findet sich in begrenztem Umfang in der Struktur der tRNA^{Phe}, in der Nucleotide in der D- und der T-Schleife zwei Basenpaare als Teil der umfangreichen tertiären Wechselwirkungen bilden, durch die der Ellenbogen des Moleküls entsteht (siehe Abbildung 2b, c). Im Th-Intron entstehen die Helices P13 und P14 durch die Bildung von fünf bis sieben nebeneinanderliegenden Watson-Crick-Basenpaaren zwischen komplementären Haarnadelschlaufen, wodurch isolierte Strukturdomänen miteinander verbunden werden (siehe Abbildung 3a).^[62]

Die strukturelle Basis komplementärer Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkungen wurde im Detail NMR-spektroskopisch an zwei Modellsystemen untersucht: dem dicht gepackten Komplex zwischen zwei RNAs, die an der Regulation der ColE1-Plasmid-Replikation beteiligt sind („kiss“-Komplex)^[63, 64] und der TAR-Schlaufensequenz von HIV-2.^[65, 66] Jeder Komplex ist eine einzelne, coaxial gestapelte Helix aus den beiden ursprünglichen Haarnadelstämmen und einer

neuen Helix, die zwischen diesen durch die Watson-Crick-Basenpaarung der Nucleotide in den komplementären Schleifen gebildet wird (Abbildung 12a, b). Es ist bemerkenswert, daß alle Nucleotide in jeder Schleife auf der 3'-Seite der zentralen Helix gestapelt und an Basenpaarungen

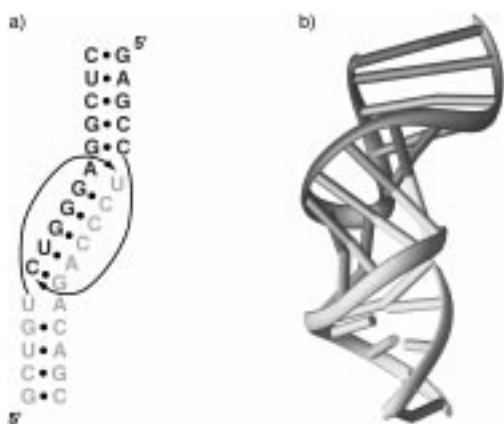


Abbildung 12. a) Sekundär- und b) Tertiärstruktur des dicht gepackten Komplexes („kissing“-Komplex) zwischen Stammschleifen in der Transaktivierungsregion genomischer RNA von HIV-2 (PDB-Hinterlegungsnummer 1kis).^[66]

beteiligt sind. Wie für die coaxialen Stapel in Verbindungsstellen-Motiven werden auch für die stabile Bildung dieser gestapelten Strukturen Magnesiumionen benötigt.^[67] Der ColE1-Komplex wird außerdem durch eine Purin-Purin-Stapelung zwischen sich überkreuzenden Strängen stabilisiert,^[64] ein RNA-Motiv, das auch in 5S-rRNA,^[68] der Sarcin-Ricin-Schleife,^[69] dem Hammerhead-Ribozym^[15, 16] und der P4-P6-Domäne gefunden wurde.^[17] Dieses Motiv besteht aus dem sechsgliedrigen Ring einer Purinbase, der auf die Purinbase im gegenüberliegenden Strang des Duplex gestapelt ist, im Unterschied zur Stapelung auf die Nachbarbase im selben Strang, wie dies in der regulären A-Form eines RNA-Duplex vorkommt.

2.4.2. Der Pseudoknoten

Ein Pseudoknoten ist ein Motiv, in dem Nucleotide einer Haarnadelschleife mit einer komplementären einzelsträngigen Sequenz Basenpaare bilden. Der klassische Pseudoknoten, dessen Struktur durch NMR-Spektroskopie genau charakterisiert wurde, besteht aus einer Haarnadelschleife, die in unmittelbarer Nähe zum Stamm der Schleife mit einer komplementären Sequenz paart und eine durchgängige, coaxial gestapelte Helix bildet (Abbildung 13a).^[70] Ähnlich wie bei Verbindungsstellen und dicht gepackten Schleifen („kissing“-Schleifen) ist auch für die coaxiale Stapelung

im Pseudoknoten Mg^{2+} oder eine hohe Na^{+} -Konzentration zur vollständigen Stabilisierung notwendig.^[71] Außerdem haben viele Pseudoknoten an der Stelle der coaxialen Stapelung Biegungen, die durch ungepaarte Nucleotide hervorgerufen werden, welche zwischen die zwei Helices intercalieren;^[72] dies ist eine notwendige Eigenschaft für die Funktion eines retroviralen mRNA-Pseudoknotens *in vivo*.^[73]

Die Schleifen L1 und L2, die die beiden Helices des Pseudoknotens verbinden, unterscheiden sich insofern, als L1 die große Furche des 3'-Stamms 2 (S2) und L2 die kleine Furche des 5'-Stamms (S1) überspannt. Eine kürzlich veröffentlichte Strukturanalyse des Pseudoknotens aus der tRNA-ähnlichen genomischen TYMV-RNA ergab, daß Nucleotide aus beiden Schleifen mit den Helices in Wechselwirkung stehen (Abbildung 13b, c).^[74] In Schleife 2, die die kleine Furche überspannt, bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einigen Nucleotiden und funktionellen Gruppen in der kleinen Furche von Stamm 1. Ein Adenosinrest in dieser Schleife, der bei Pflanzenviren-RNAs hochkonserviert ist, geht wahrscheinlich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen seinem N1-Atom und der exocyclischen Aminogruppe eines Guanosinrestes aus Stamm 2 einerseits und zwischen seiner exocyclischen Aminogruppe und dem N3-Atom eines in der Helix benachbarten Guanosinrestes ein. Der benachbarte Cytosinrest in Schleife 2 geht ebenfalls eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen seiner exocyclischen Aminogruppe und einer 2'-Hydroxygruppe in der kleinen Furche von Stamm 2 ein. Vermutlich werden in Pseudoknoten tripelhelicale Verstärkungselemente durch die Schleifen eingeführt, um die Struktur weiter zu stabilisieren. In einer vor kurzem veröffentlichten, hochaufgelösten Kristallstruktur eines Pseudoknotens aus mRNA des Beet Western Yellow Virus konnten intensive tertiäre Wechselwir-

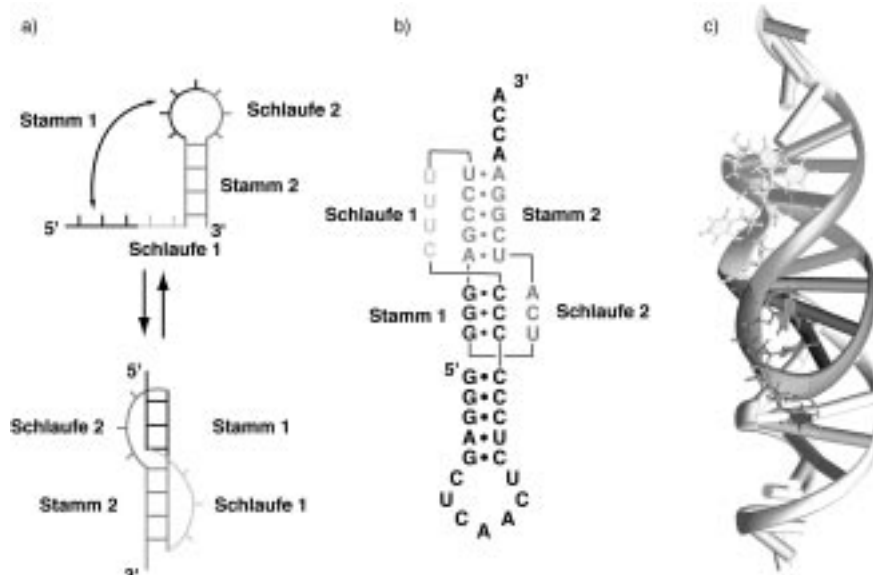


Abbildung 13. Das Pseudoknoten-Motiv. a) Der klassische Pseudoknoten wird durch Basenpaarung zwischen Nucleotiden in der Schleife eines Stamm-Schleifen-Bereichs und solchen eines benachbarten einzelsträngigen Bereichs gebildet. b) Sekundärstruktur des Pseudoknotens in der genomischen RNA des Steckrübenmosaikvirus (turnip yellow mosaic virus, TYMV). c) Dreidimensionale Struktur des TYMV-Pseudoknotens (PDB-Hinterlegungsnummer 1a60).^[74] Die Nucleotide in beiden Schleifen liegen in der großen und kleinen Furche von benachbarten Helices, wo sie dreifache Wechselwirkungen mit den Basenpaaren eingehen können.

kungen in der großen und der kleinen Furche nachgewiesen werden.^[75]

Ein bemerkenswertes Beispiel dafür, wie das Pseudoknoten-Motiv zur Steuerung der Gesamtarchitektur einer RNA genutzt wird, liefert das Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym.^[18] Dieses Ribozym ist außergewöhnlich stabil; sowohl die genomische als auch die dazu komplementäre Form weisen eine weitgehende Stabilität und Aktivität auch in Lösungen solcher Reagentien, die normalerweise Nucleinsäurestrukturen denaturieren (5–8 M Harnstoff oder 10–18 M Formamid) sowie bei erhöhten Temperaturen (65–70 °C) auf.^[76, 77] In der Kristallstruktur wurden keine zweiwertigen Kationen oder ungewöhnlichen Basenpaarungen gefunden; statt dessen wird die Struktur ausschließlich durch Watson-Crick-Basenpaarungen und die stark gewundene doppelte Pseudoknoten-Topologie des Rückgrats stabilisiert (siehe Abbildung 8).^[18] So kann eine RNA-Faltung durch die Packung von Helices unter Nutzung spezifischer tertiärer Andockmotive (wie in der P4-P6-Domäne) oder von der Topologie des Rückgrats (wie im Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym) bestimmt sein.

3. Die Faltung von RNA zu Strukturen höherer Ordnung

Analog zum Problem der Proteinfaltung stellt sich auch die Frage, wie sich bei RNA die dreidimensionale Faltung aus der Primärsequenz ergibt. In Untersuchungen zur Proteinfaltung wird der ungefaltete Zustand als Zufallsknäuel (random coil) charakterisiert, so daß der Faltungsprozeß den Aufbau von Sekundärstrukturen (α -Helices, β -Faltblätter etc.) und der Tertiärstruktur umfaßt. Im ungefalteten Zustand der RNA dagegen ist bereits der größte Teil der Sekundärstruktur vorgeformt, und der Faltungsvorgang umfaßt im wesentlichen die schrittweise Bildung der tertiären Wechselwirkungen bis zur nativen Struktur. Daher leisten die tertiären Wechselwirkungen, die in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben wurden, die wichtigsten Beiträge zur Steuerung des Faltungsvorgangs großer RNAs, was im folgenden Abschnitt behandelt wird.

3.1. Die Domänen-Architektur der RNA

Die meisten großen biologischen RNAs sind in Domänen organisiert, die sich im allgemeinen bereits in der Sekundärstruktur erkennen lassen. Bei RNA ist der Begriff Domäne nicht streng definiert, sondern bezeichnet meistens einen Bereich der Sekundärstruktur, der sich als unabhängige Einheit faltet. So haben alle Introns der Gruppe I zwei grundlegende Domänen, die für die Bildung des katalytischen Zentrums notwendig sind: die P4-P6-Domäne und die P3-P7-Domäne (siehe Abbildung 3a). Beim *Tetrahymena*-Intron werden diese beiden Domänen durch die peripheren Erweiterungen P2-P2.1 und P9 sowie durch die Subdomäne P5abc ergänzt. Es gibt überzeugende Hinweise dafür, daß diese Domänen und Erweiterungen im aktiven Ribozym fast ausschließlich durch tertiäre Wechselwirkungen und nicht durch Basenpaarungen miteinander in Kontakt stehen.

Der Übergang vom ungefalteten zum gefalteten Zustand beim Th-Intron erfordert die spezifische Bindung von mindestens drei Magnesiumionen, um das vollständig funktionsfähige katalytische Ribozym zu bilden; ohne Magnesium oder andere zweiwertige Ionen wird nur die Sekundärstruktur des Ribozyms gebildet. Diese durch Magnesium erleichterte Faltung läßt sich mit Hilfe von Fe^{II} -EDTA (EDTA = Ethylenediamintetraacetat) verfolgen, einem Reagens, das freie Hydroxylradikale erzeugt; diese können das Rückgrat einzel- und doppelsträngiger RNA an jeder Stelle spalten, die dem Lösungsmittel frei zugänglich ist.^[78, 79] Mit der Faltung zu höherer Ordnung werden manche Bereiche der RNA für das Lösungsmittel unzugänglich und sind dann vor der Strangspaltung durch freie Radikale geschützt; solche Bereiche werden dann durch Sequenzierung endständig ^{32}P -markierter RNA identifiziert.^[78] Bei Mg^{2+} -Konzentrationen $< 0.75 \text{ mM}$ ist fast das gesamte Intron für das Lösungsmittel zugänglich, was zeigt, daß sich keine nennenswerte Tertiärstruktur gebildet hat. Oberhalb dieser Konzentration gibt es zwei hochkooperative Übergänge, den ersten bei der Bildung der P5abc-Subdomäne und den zweiten bei der Faltung des katalytischen Zentrums. Indem man die stabilisierende periphere Erweiterung P9.1-9.2 entfernte, konnte man in nachfolgenden Untersuchungen zeigen, daß sich die gesamte P4-P6-Domäne bei niedrigeren Magnesiumkonzentrationen stabil faltet als das katalytische Zentrum.^[80]

Der Befund, daß die P4-P6-Domäne sich bei niedrigeren Konzentrationen an zweiwertigen Kationen faltet als das übrige Intron, weist darauf hin, daß sie unabhängig vom restlichen Intron eine stabile Tertiärstruktur bilden kann. Bei der Behandlung eines isolierten Fragments aus 160 Nucleotiden, das der P4-P6-Domäne entspricht, mit Fe^{II} -EDTA und Dimethylsulfat, einem Reagens, das das Imino-Stickstoffatom der Basen Adenin und Cytosin modifiziert, ergab sich, daß der in Gegenwart von Magnesium für das Lösungsmittel unzugängliche Bereich dieser RNA ein großer Teil des für das Lösungsmittel unzugänglichen Bereichs von P4-P6 im intakten Intron ist.^[81] Die magnesiumabhängige Faltung der P4-P6-Domäne hängt entscheidend vom GAAA-Tetraloop von P5b ab. Bei Mutationen in diesem Bereich ist die Magnesiumkonzentration, die benötigt wird, um das gleiche Muster des Schutzes vor Fe^{II} -EDTA-Einwirkung zu erzeugen wie bei der Wildtypdomäne,^[53] erhöht; dies ist in Übereinstimmung mit den tertiären Wechselwirkungen, die in der Kristallstruktur dieser Domäne gefunden wurden.^[17] In ähnlicher Weise sind auch Mutationen im Tetralooprezeptor und der internen Schlaufe J5/J6, der flexiblen Gelenkregion zwischen den beiden coaxial gestapelten Helixpaaren in P4-P6, nachteilig für die Bildung des für das Lösungsmittel zugänglichen Zentrums.

Während diese Mutationen den größten Teil der Tertiärstruktur der P4-P6-Domäne zerstören, bleiben die adenosinreiche Ausstülpung und die dreiteilige Verbindungsstelle P5abc für das Lösungsmittel unzugänglich, was vermuten läßt, daß sich die P5abc-Subdomäne unabhängig vom Rest der P4-P6-Domäne faltet. Die P5abc-Subdomäne weist im isolierten Zustand das gleiche Muster des Schutzes vor Fe^{II} -EDTA auf wie im Kontext des intakten Introns,^[81] und ein ähnliches Muster der Bindung von Magnesiumionen wie die

P4-P6-Domäne.^[57] Versuche ergaben, daß Substitutionen der *pro-R_p*-Sauerstoffatome in Phosphatgruppen des RNA-Rückgrats durch Schwefel die innere Koordinationssphäre der Magnesiumionen stören.^[82, 83] Die Substitution eines jeden der vier *pro-R_p*-Sauerstoffatome in der adenosinreichen Ausstülpung und in L5c, die in der Kristallstruktur der P4-P6-Domäne direkt an der Koordination von Magnesiumionen beteiligt sind, destabilisiert die Faltung der isolierten P5abc-Domäne merklich.^[57]

Andere Domänen des Th-Introns können keine unabhängigen stabilen Faltungen außerhalb des Kontexts des intakten Moleküls bilden. Bei Strukturuntersuchungen an einem RNA-Konstrukt, das der P3-P7-Domäne und der peripheren Erweiterung P9 entspricht, zeigte sich, daß die Sekundärstruktur zwar der im intakten Intron ähnlich ist, daß sich in der Domäne aber keine tertiären Wechselwirkungen bilden.^[84] Nur bei Assoziation mit der P4-P6-Domäne kann die P3-P7-Domäne ein stabiles Muster von tertiären Wechselwirkungen (innerhalb der Domäne) bilden, woraus sich schließen läßt, daß die P4-P6-Domäne ein Gerüst für eine Faltung höherer Ordnung von P3-P7 bildet.

Die Assoziation der Sekundärstrukturdomänen des *Tetrahymena*-Introns der Gruppe 1 wird hauptsächlich durch tertiäre Wechselwirkungen vermittelt. Die Deletion von P5abc aus dem Intron ($\rightarrow \Delta P5abc$ -Intron) beeinträchtigt deutlich die Aktivität unter Standard-Spleißbedingungen (5 mM $MgCl_2$, pH 7.5); dies kann jedoch durch höhere Ionenstärken (15 mM $MgCl_2$, 2 mM Spermin, pH 7.5) wieder ausgeglichen werden.^[85] Die Wildtypaktivität kann durch die Zugabe der P5abc-Subdomäne zum $\Delta P5abc$ -Intron in trans wieder hergestellt werden (trans-Assoziation bedeutet die Bindung von zwei separaten RNA-Molekülen im Unterschied zur cis-Assoziation, bei der sich zwei wechselwirkende Domänen in derselben RNA-Kette befinden). Die Bildung dieses bimolekularen Komplexes wird ausschließlich durch drei tertiäre Wechselwirkungen vermittelt: durch einen Tetraloop-Tetralooprezeptor-Kontakt, einen Kontakt zwischen der adenosinreichen Ausstülpung und der kleinen Furche von P4 und durch die enge Schlaufenwechselwirkung zwischen L5c und L2. Die Bildung dieses intermolekularen Komplexes ist magnesiumabhängig, und er ist ungewöhnlich fest; bei 10 mM $MgCl_2$ beträgt die scheinbare Dissoziationskonstante K_d 100 pM.^[86] Das *Tetrahymena*-Intron kann auch in drei separate Teile (die P4-P6-Domäne, das P1-P3-Substrat und die P3-P7/P9-Domäne) gespalten werden, die sich, ausschließlich durch tertiäre Wechselwirkungen, zu einem funktionsfähigen Ribozym zusammenlagern können.^[87]

Es scheint eine allgemein verbreitete Eigenschaft der meisten großen biologischen RNAs zu sein, daß sie aus sich unabhängig voneinander faltenden Sekundärstrukturelementen bestehen, die sich hauptsächlich durch tertiäre Wechselwirkungen und weniger durch Basenpaarungen unter trans-Assoziation zu funktionell aktiven Molekülen zusammenlagern können. Die katalytische Komponente der eubakteriellen RNase P, eines Ribonucleoproteins mit enzymatischer Aktivität, das für die posttranslationale Prozessierung kleiner zellulärer RNAs verantwortlich ist, liegt ausschließlich in der RNA.^[2, 88] In Abwesenheit der Proteinuntereinheit bindet der RNA-Teil von RNase P (P-RNA) das Substrat, eine tRNA-

Vorstufe, indem sie spezifisch den coaxial gestapelten T-Stamm/Acceptor-Stamm-Bereich der tRNA über tertiäre Wechselwirkungen erkennt; daran beteiligt sind eine Reihe von 2'-Hydroxy- und Phosphatgruppen in der P-RNA^[89, 90] und im tRNA-Substrat.^[91, 92] P-RNA besteht aus zwei sich unabhängig faltenden Domänen, die jede für sich gegenüber Fe^{II} -EDTA in Gegenwart von Magnesium ein ähnliches Schutzmuster aufweisen wie gemeinsam im Kontext des intakten Ribozyms.^[93, 94] Obwohl die Domänen einzeln nicht zur RNA-Prozessierung befähigt sind, assoziieren sie über tertiäre Wechselwirkungen und bilden einen katalytisch aktiven Komplex. Wie beim Th-Intron finden die Wechselwirkung zwischen den Domänen und die Substraterkennung über tertiäre Wechselwirkungen statt. In ähnlicher Weise sind auch einige der sechs phylogenetisch konservierten Domänen der Introns der Gruppe II zu einer effizienten trans-Assoziation in der Lage und bilden dabei eine funktionelle RNA (für einen ausgezeichneten Übersichtsartikel hierzu siehe Lit. [95]).

3.2. Das hierarchische Modell der RNA-Faltung

In wegweisenden Untersuchungen an tRNA in den siebziger Jahren konnten einige grundlegende Eigenschaften der RNA-Faltungsreaktion aufgeklärt werden. Mit Temperatursprung-Relaxationsmessungen und NMR-Spektroskopie wurde nachgewiesen, daß die tRNA^{Met} aus *E. coli* bei mäßiger Ionenstärke (174 mM Na^+ , kein Magnesium) während der thermisch induzierten Entfaltung fünf definierte Übergänge durchläuft.^[96] Bei den niedrigsten Temperaturübergängen werden die tertiären Wechselwirkungen zwischen der D- und der T-Schleife zerstört, gefolgt von den schwachen Sekundärstrukturelementen im D-Stamm.^[97] Bei höheren Temperaturen schmelzen die Sekundärstrukturelemente des T- und des Anticodonbereichs sowie des Acceptor-Stamms (Abbildung 14). Da die thermische Denaturierung bei tRNA reversibel ist, folgt daraus, daß sich die Struktur hierarchisch entlang des Faltungsweges bildet, wobei fast alle Sekundärstrukturelemente vor der Tertiärstruktur entstehen. Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei der thermischen Denaturierung von zwei anderen tRNAs beobachtet, so daß man auf einen allgemeinen Mechanismus der tRNA-Faltung schließen kann.^[98, 99]

In Gegenwart von 3 mM Mg^{2+} weist die *E.-coli*-tRNA^{Met} einen einzigen, kooperativen Denaturierungsübergang bei hoher Temperatur auf, was bedeutet, daß Tertiär- und Sekundärstruktur gleichzeitig zerstört werden.^[100] Darin kommt die Bindung eines einzelnen Magnesiumions an die tRNA mit hoher Affinität ($K_d = 33$ mM) sowie die schwache Bindung einiger Ionen^[101] bei der Bildung der Tertiärstruktur zum Ausdruck.^[100] Diese Aufnahme von Magnesiumionen durch die RNA während des Faltungsvorgangs beeinflusst im wesentlichen die Stabilisierung der Tertiärstruktur, weniger die Bildung der Sekundärstruktur. Da bei der Bildung der Tertiärstruktur das stark negativ geladene Rückgrat in verschiedenen Bereichen der tRNA eng zusammengepackt wird, ist es nicht überraschend, daß dabei Stellen entstehen, an denen mehrwertige Kationen mit hoher Affinität gebun-

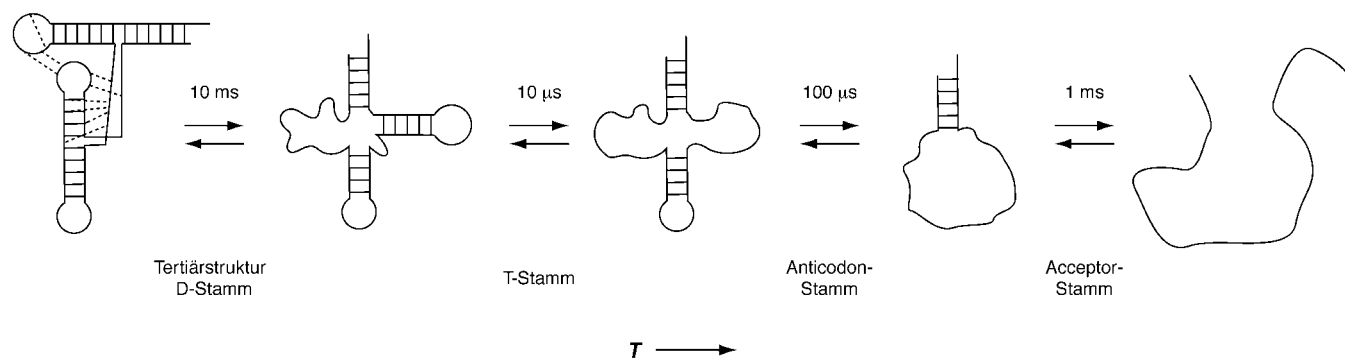


Abbildung 14. Der Entfaltungsweg der tRNA, bestimmt durch Untersuchungen zur thermischen Denaturierung. Die ungefähren Zeitkonstanten für jeden Schritt der Faltungsreaktion sind angegeben. (Mit Veränderungen aus Lit. [97, 140] übernommen.)

den werden können. In tRNA^{Phe} fand man verschiedene spezifisch gebundene Magnesiumionen an Stellen tertiärer Wechselwirkung, obwohl kein bestimmtes Kation mit der Stabilisierung im thermischen Schmelzprofil in Verbindung gebracht werden kann.

Diese Untersuchungen verdeutlichen also zwei grundlegende Eigenschaften der RNA-Faltung. Erstens hängt die Bildung der Tertiärstruktur in hohem Maße von der vorher erfolgten Bildung der Sekundärstruktur ab. Die schrittweise Bildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen in RNA ist die Basis des „hierarchischen Modells“ der RNA-Faltung. Zweitens dient die Bindung mehrwertiger Ionen an die RNA während des Faltungsvorganges im allgemeinen eher der Stabilisierung der Bildung der Tertiärstruktur als der der Sekundärstruktur. Diese Eigenschaft der RNA-Faltung wird besonders deutlich im Hinblick auf die Wechselwirkungen innerhalb der Tertiärstruktur, an denen Metallionen oft an wichtiger Stelle beteiligt sind.

3.3. Die kinetisch kontrollierte Faltung des *Tetrahymena*-Introns der Gruppe I

Die neueren Arbeiten über die RNA-Faltung haben sich hauptsächlich auf das *Tetrahymena*-Intron der Gruppe I als Modellsystem gestützt. Ähnlich wie tRNA kann man auch für dieses Intron durch Messen der UV-Absorption bei der thermischen Denaturierung verschiedene Übergänge feststellen.^[102] Auch chemische Untersuchungen der RNA bei verschiedenen Temperaturen deuten darauf hin, daß die Übergänge bei niedrigen Temperaturen durch die Zerstörung von Tertiärstrukturelementen zustandekommen und kaum durch die Öffnung von Basenpaaren in Sekundärstrukturelementen.^[102]

Um die Faltung im Millisekundenbereich untersuchen zu können, wurde eine Variation des Footprinting entwickelt, bei der ein Strahl hochenergetischer Photonen aus Synchrotronstrahlung benutzt wird, um eine hohe Konzentration von Hydroxylradikalen in einer wässrigen Lösung zu erzeugen. Damit kann die RNA in ähnlicher Weise untersucht werden wie mit der Fe^{II}-EDTA-Reaktion, aber die Expositionszeit liegt im Bereich von 10 Millisekunden.^[103, 104] Kombiniert man den Synchrotronstrahl mit einer Stopped-flow-Apparatur, kann die magnesiumabhängige Faltung jeder RNA 20 ms

nach der Induktion der Faltung verfolgt werden. Dies ist schnell genug, um gegebenenfalls die Faltung einer tRNA zur Tertiärstruktur zu verfolgen, die innerhalb von ca. 100 ms abgeschlossen ist.^[97]

Diese Untersuchungen zeigten, daß sich innerhalb der P4-P6-Domäne die P5abc-Domäne am schnellsten faltet, wobei die Nucleotide im magnesiumhaltigen Zentrum der adenosinreichen Ausstülpung und der dreiteiligen Verbindungsstelle mit einer Geschwindigkeit von 2 s^{-1} für das Lösungsmittel unzugänglich (d.h. geschützt) werden (Abbildung 15). Die übrigen tertiären Wechselwirkungen der P4-P6-Domäne werden konzentriert mit etwas geringerer Geschwindigkeit gebildet. Die Nucleotide in den peripheren Erweiterungen P2-2.1 und P9, deren unterstützende Funktion bei der Bildung des katalytischen Zentrums schon früher nachgewiesen wor-

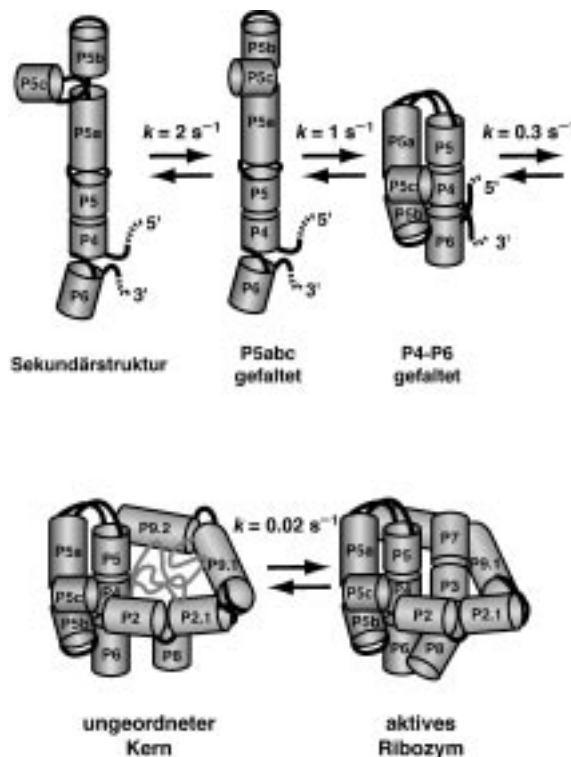


Abbildung 15. Modell der Mg^{2+} -abhängigen Faltung des *Tetrahymena*-Introns der Gruppe I auf der Grundlage von Daten aus zeitabhängigen Hydroxylradikal-Footprinting-Experimenten mit Synchrotronstrahlung. (Mit Veränderungen aus Lit. [104] übernommen.)

den war,^[105] werden mit einer Geschwindigkeit von ca. 0.3 s^{-1} vor der Spaltung geschützt. Diese beiden peripheren Erweiterungen winden sich vermutlich um das Zentrum des Ribozyms, wobei sie durch die Bildung der tertiären Wechselwirkungen zwischen P13 und P14 stabilisiert werden. An dieser Stelle des Faltungsweges ist die Außenseite des Ribozyms, die aus der P4-P6-Domäne und den peripheren Erweiterungen besteht, vollständig gefaltet, während das Innere des Ribozyms, das das katalytische Zentrum enthält, ungeordnet bleibt. Die Bildung der aktiven Struktur mit einer für das Lösungsmittel unzugänglichen P3-P7-Domäne verläuft sehr langsam und braucht Minuten ($k_{\text{obs}} = 0.02 \text{ s}^{-1}$) bis zur vollständigen Faltung. Die Faltung der beiden Strukturdomänen P4-P6 und P3-P7 ist also auch kinetisch bestimmt. Dieses Modell des kinetisch bestimmten Faltungsweges des Th-Introns I, das ursprünglich von Zarrinkar und Williamson aus Untersuchungen mit einem zeitabhängigen Oligonucleotid-Hybridisierungstest abgeleitet worden war,^[106, 107] wurde durch andere zeitabhängige Techniken, z. B. durch chemische Modifizierung,^[108] UV-Quervernetzung^[109] und Fe^{II}-EDTA-Footprinting^[103] weiter unterstützt.

Mit dem Oligonucleotid-Hybridisierungstest zum Verfolgen der Faltungskinetik konnte gezeigt werden, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Faltungsreaktion ein magnesiumunabhängiger Schritt bei der Bildung der Tertiärstruktur im tripelhelicalen Gerüst ist, von dem die korrekte Orientierung der beiden Strukturdomänen abhängt.^[107] Um die Art dieses geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes zu verstehen, wurde ein Selektionsschema entwickelt, um Mutationen im Intron zu finden, die das Durchlaufen der RNA durch diesen Schritt im Faltungsweg beschleunigen.^[110] Diese Selektion lieferte fünf Varianten mit einem sich schneller faltenden Phänotyp und einer Katalyseaktivität, die der des Wildtyps entsprach.^[110] Vier Varianten enthielten einzelne Punktmutationen in der P5abc-Subdomäne, durch die die schnellere Faltung ausgelöst wurde; wahrscheinlich beeinflussen sie den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt über einen gemeinsamen Mechanismus, aber vor allem beeinträchtigen sie nicht die Katalyse oder die Stabilität des Introns. Die charakterisierten Mutationen sind in der Gegend der adenosinreichen Ausstülpung von P5abc konzentriert und führen dort wahrscheinlich ebenso zu einer Störung der stabilen Bildung der Struktur, wie einzelne Phosphorothioat-Substitutionen im selben Bereich die stabile Faltung der P4-P6-Domäne verhindern.^[57] Obwohl P5abc in Modellen von Introns der Gruppe I nicht direkt mit der P3-P7-Domäne wechselwirkt,^[62] hat die Bildung dieser Domäne einen erheblichen Einfluß auf die Faltungsgeschwindigkeit von P3-P7. Weil die gesamte P4-P6-Domäne sich vor dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt faltet und die Destabilisierung des metallionenbindenden Motivs in P5abc die Bildung der P3-P7-Domäne beschleunigt, schließen Treiber et al.^[110] daß eine auch im nativen Zustand vorhandene tertiäre Wechselwirkung eine kinetische Falle während der Faltung verursacht.

Weitere Hinweise darauf, daß native tertiäre Wechselwirkungen im Intron kinetische Barrieren beim Faltungsvorgang verursachen, ergaben sich, als die Faltungsgeschwindigkeit von Wildtyp-RNA mit der schnellfaltenden Mutanten in Gegenwart von Harnstoff verglichen wurde.^[110, 111] Denatu-

rierende Agentien beschleunigen die Faltungsgeschwindigkeit von Proteinen^[112] und RNA,^[113, 114] indem sie das Entstehen solcher Wechselwirkungen verhindern, die das schnelle Fortschreiten zum vollständig gefalteten, nativen Zustand behindern. Die Faltung des Wildtyp-Introns wird durch steigende Harnstoff-Konzentrationen (bis zu 3 M) beschleunigt; die ausgewählten schnellfaltenden Mutanten werden in ihrer Faltungsgeschwindigkeit erheblich weniger beeinflusst.^[110, 111] Eine detaillierte Untersuchung der Effekte von Harnstoff und von Mutationen auf die Temperaturabhängigkeit der Faltungsgeschwindigkeit ergab, daß beide die Aktivierungsenthalpie für die Faltung von P3-P7 verringern, was die Theorie stützt, daß native tertiäre Wechselwirkungen an der primären kinetischen Falle bei der Faltung des Wildtyp-Introns beteiligt sind.^[111]

Statt die Faltung als einen einfachen Vorgang mit der schrittweisen Bildung von Zwischenstufen zu beschreiben, wie dies durch das hierarchische Faltungsmodell impliziert wird, wird sie korrekter durch ein Ensemble von Molekülen beschrieben, die parallelen Faltungswegen folgen, so daß sich insgesamt eine „Faltungsenergielandschaft“ ergibt.^[115, 116] Dies wird durch den Befund unterstützt, daß es in einer gegebenen Population von RNAs der Gruppe I eine kleine Gruppe gibt, die sich schnell zum nativen Zustand faltet, während der Rest der Moleküle sich langsam faltet und auf diesem Weg kinetisch in verschiedenen Zwischenzuständen abgefangen wird.^[113] Mäßige Konzentrationen denaturierender Agentien ändern die Verteilung der Moleküle auf den parallelen Faltungswegen, indem sie den Anteil der Population erhöhen, die den kinetischen Fallen entkommen kann und sich schnell faltet.^[113] Die im hierarchischen Faltungsmodell beschriebenen kinetischen Intermediate markieren daher den am stärksten besetzten Weg in der Faltungsenergielandschaft unter Standardbedingungen. Untersuchungen zur Faltung des Th-Introns ergaben, daß native Strukturen (wie das Metallzentrum von P4-P6)^[110, 111] ebenso wie nichtnative Wechselwirkungen (wie die Bildung falscher Basenpaare)^[113, 117] eine wichtige Rolle bei der Gestaltung dieser Landschaft spielen. Änderungen der Temperatur, des Lösungsmittels und der Nucleotidsequenz haben einen tiefgreifenden Einfluß auf die Energielandschaft, decken neue kinetische Barrieren und Fallen auf und sorgen dafür, daß andere Faltungswege stärker besetzt werden.^[111]

4. Die Entwicklung von Arbeitsmodellen für große RNAs

4.1. Modellierung der Faltung der RNA zu Tertiärstrukturen

Trotz erheblicher Fortschritte bei Isolierung und Kristallisation von RNA^[118–121] bleibt es schwierig, Kristalle zu erhalten, die Strukturinformationen bei hoher Auflösung liefern. Fehlen diese Strukturen, hat sich das Modellieren der dreidimensionalen Architektur von RNA als nützliche Alternative erwiesen. Der bei weitem erfolgreichste Modellierungsansatz ist bis heute der von Michel und Westhof^[62, 122] für das *Tetrahymena*-Intron der Gruppe I. Durch verglei-

chende Sequenzanalyse von 35 Sequenzen von Introns der Untergruppe IC1 (zu der auch das *Tetrahymena*-Intron gehört) erhielt man wichtige Informationen, um eine Konsensus-Sekundärstruktur und einige Typen tertiärer Wechselwirkungen zu bestimmen. Es wurden dabei auch konservierte Nucleotide entdeckt, die wahrscheinlich für die korrekte Faltung oder die biochemische Funktion essentiell sind. Diese Daten wurden weiter durch Informationen ergänzt, die mit chemischen und enzymatischen Untersuchungen der Intron-RNA erhalten wurden, und durch ortsspezifische Mutagenese ließ sich die Existenz basenspezifischer tertiärer Wechselwirkungen wie Basentripel^[123] und Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkungen bestätigen.^[62] Unter Heranziehung aller Ergebnisse wurde ein dreidimensionales Modell des *Tetrahymena*-Introns mit einem Ansatz konstruiert, der auf der hierarchischen Natur der RNA-Faltung basiert. Elementare Substrukturen und Motive wurden anhand bekannter Strukturen (wie der von doppelsträngigen Helices, Haarnadel-schlaufen und Pseudoknoten) gebaut und mit interaktiven Graphikprogrammen am Computer zusammengefügt, und schließlich wurde das Modell geometrisch und stereochemisch nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate verfeinert.^[124] Das resultierende Modell (Abbildung 16) stellt

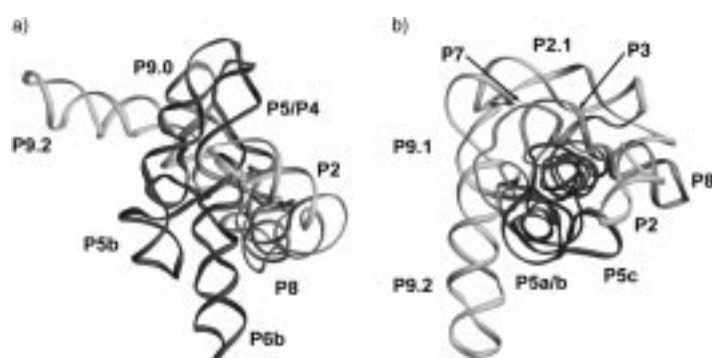


Abbildung 16. a) Modell des *Tetrahymena*-Introns der Gruppe I nach Lehnert et al.^[62] Das Band zeichnet das Rückgrat des Moleküls nach, wobei die P4-P6-Domäne schwarz, die P3-P7-Domäne hellgrau und die peripheren Erweiterungen P2 und P9 dunkelgrau gezeichnet sind. b) Ansicht desselben Modells nach Drehung um 90°; dadurch wird die Packung der P3-P7-Domäne zwischen P4-P6 und die peripheren Erweiterungen hervorgehoben.

ein Gerüst für die Interpretation der chemischen Aktivität und Faltung dar und hat ausführlicher Überprüfung durch biochemische Untersuchungen standgehalten; es stimmt mit der Gesamtfaltung des katalytischen Zentrums eines Introns der Gruppe I überein, die bei niedriger Auflösung (5–6 Å) durch eine Röntgenstrukturanalyse bestimmt wurde.^[125]

Zur Erstellung genauer RNA-Modelle ist es erforderlich, zunächst so viele tertiäre Wechselwirkungen wie möglich zu identifizieren, da diese die kritischen Einschränkungen für die mögliche Gesamtfaltung der RNA liefern, die nicht aus der Sekundärstruktur abgeleitet werden kann. So unterscheidet sich die Struktur eines Modells des Hepatitis-Delta-Virus-Ribozyms^[126] von der bei 2.3 Å Auflösung bestimmten Kristallstruktur.^[18] Dieser Unterschied geht hauptsächlich darauf zurück, daß die Helix P1.1 nicht vorhergesagt wurde;

diese jedoch ist essentiell für den Aufbau der Struktur des Ribozyms, eines doppelten Pseudoknotens. Diese Wechselwirkung war aus der Sekundärstruktur kaum vorherzusagen, da es nur zwei Sequenzen gab (die genomische und die antigenomische Variante), mit denen eine vergleichende Analyse durchgeführt werden konnte. Der Schlüssel zu besseren Modellen großer RNAs liegt daher in der Entwicklung biochemischer Techniken zur Identifizierung tertiärer Wechselwirkungen.

4.2. Hochauflösende Untersuchung der Tertiärstruktur von RNA

Eine geschickte Methode zur biochemischen Bestimmung tertiärer Wechselwirkungen in RNAs beruht auf dem zufälligen Einbau von Phosphorothioat-modifizierten Nucleotidanaloga in RNA-Transkripte. Nach der Trennung von funktionalen und inaktiven (oder ungefalteten) Molekülen können die Nucleotidpositionen, an denen der Einbau der Analoga die Struktur oder Aktivität der RNA stört, durch Spaltung der RNA mit I₂ lokalisiert werden.^[127–129] Der wichtigste Einwand gegen diese Technik ist, daß der Effekt der Nucleotidanaloga nicht sichtbar wird, wenn die Phosphorothioat-Bindung selbst die RNA-Funktion beeinträchtigt. Bei der Kartierung auf Basis der Störung durch Nucleotidanaloga wurden 2'-Desoxy- und 2'-Methoxyanaloga benutzt, um die essentiellen 2'-Hydroxygruppen in tRNA für die Erkennung durch RNase P zu identifizieren,^[92, 128] außerdem konnten mit Inosinanaloga die exocyclischen Aminogruppen im Th-Intron identifiziert werden, die für die Katalyse wichtig sind.^[129] Dieser Ansatz wurde von der Arbeitsgruppe von Strobel durch die Synthese einer großen Bibliothek von Nucleotidanaloga stark erweitert (für eine ausführliche Übersicht siehe Lit. [130]); mit verschiedenen Adenosinanaloga wurde der chemische und strukturelle Beitrag beinahe aller chemischen Gruppen in jedem Adenosinrest des Th-Introns untersucht.^[131]

Um mit der oben geschilderten „chemogenetischen“ Technik die biologische Genetik nachzuahmen, mußte ein zweiter experimenteller Ansatz entwickelt werden. In der Genetik sucht man im Anschluß an die Identifizierung einer Mutation, die den Ausfall einer bestimmten Funktion zur Folge hat, nach sekundären Mutationen, die diese Funktion wieder herstellen. Wenn diese Mutation an einer anderen Stelle als die ursprüngliche Mutation liegt, wird sie als Suppressormutation klassifiziert, und ihr kann eine intramolekulare oder intermolekulare Wechselwirkung zugrundeliegen. In ähnlicher Weise kann man, wenn mit der Störungskartierung durch Analoga funktionelle Gruppen oder Atome von Interesse bestimmt worden sind, potentielle tertiäre Wechselwirkungen identifizieren, an denen diese Position beteiligt ist, indem man ein RNA-Molekül synthetisiert, das die ursprüngliche Mutation der funktionellen Gruppe enthält und ein weiteres, zufällig eingebautes Analogon.^[132] Dieser Pool von Molekülen wird wiederum einer Selektion bezüglich Faltung oder Aktivität unterzogen, gefolgt von der Kartierung der Störstellen durch I₂-Spaltung der RNA. Bei diesem Experiment werden alle Analoga, die bei der ersten Kartierung identifi-

ziert wurden, erneut eine Störung bewirken, mit Ausnahme des Analogons, das mit der ortsspezifischen Mutation wechselwirkt. Da der Energieverlust, der mit der Zerstörung der tertiären Wechselwirkung einhergeht, bereits durch die ortsspezifische Mutation in jedem RNA-Molekül verursacht worden ist, stört das Analogon, das den Platz des Wechselwirkungspartner einnimmt, die Funktion der RNA nicht weiter, d.h., der negative Einfluß des Analogons wird durch die Gegenwart der ortsspezifischen Mutation unterdrückt. Testet man so eine Anzahl ortsspezifischer Mutanten, können möglicherweise zahlreiche tertiäre Wechselwirkungen, die Wasserstoffbrückenbindungen beinhalten, gefunden werden, die dann einschränkende Parameter für die Modellierung einer RNA-Struktur liefern.

Mit dieser Methode wurde ein detailliertes Strukturmodell des katalytischen Zentrums des Th-Introns erstellt.^[46] Es schließt die tertiären Wechselwirkungen ein, die für das Andocken der Substrathelix P1 in der katalytischen Spalte des Ribozyms notwendig sind und die im wesentlichen durch Wasserstoffbrückenbindungen über 2'-Hydroxygruppen^[133] vermittelt werden, sowie eine exocyclische Aminogruppe eines wichtigen GU-Wobble-Basenpaares^[134] in P1, das die Spaltstelle definiert. Mit der Störstellensuppressionsanalyse wurde auch aufgeklärt, daß eine 2'-Hydroxygruppe und eine exocyclische Aminogruppe des Guanosinrestes des GU-Basenpaares mit der kleinen Furche von zwei nichtkanonischen AA-Paaren in J4-5 wechselwirken.^[132] Die modellierte tertiäre Wechselwirkung ähnelt denen, die im Kristallgitter zwischen benachbarten P4-P6-Domänen zweier unterschiedlicher Moleküle beobachtet wurden, sowie denen zwischen kleinen Furchen in Kristallstrukturen mit senkrecht zueinander gepackten RNA-Duplexen (siehe Abschnitt 2.2.3). Eine zweite Gruppe von tertiären Wechselwirkungen, die im katalytischen Zentrum modelliert worden waren, umfaßt die Bildung einer Tripelhelix in der kleinen Furche zwischen dem Strang J8/7 und den Helices P1, P3 und P4 (Abbildung 17). Aus diesem Modell folgt, daß die 2'-Hydroxygruppen eine zentrale Rolle beim Aufbau eines Triplex in der kleinen Furche spielen, wie es in einer tRNA^{Phe} und einem Modell-triplex gefunden wurde (siehe Abschnitt 2.3.1). Da dieses Modell aufgrund biochemischer Experimente aufgestellt wurde, die Struktur und Funktion auf atomarer Ebene untersuchen, kann es Details möglicherweise mit höherer Genauigkeit auflösen als Modelle, die auf Covariationsanalyse und ortsspezifischer Mutagenese beruhen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

RNA als Katalysator und Träger von Erbinformationen bietet die ausgezeichnete Gelegenheit, Struktur-Wirkungs-Beziehungen und das Problem der Faltung von Makromolekülen mit biochemischen Techniken anzugehen, die dem Proteinchemiker nicht zur Verfügung stehen. Fortschritte in unserem Verständnis der RNA-Struktur liefern die Basis, um das Problem der RNA-Faltung aufzugreifen und um robuste Algorithmen zu entwickeln, mit denen große RNA-Strukturmodelle ohne kristallographische oder NMR-spektroskopische Daten entwickelt werden können. Die vor uns liegende

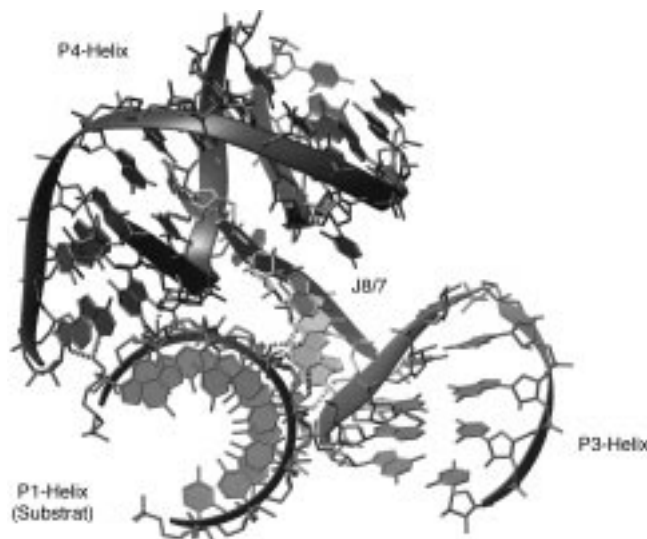


Abbildung 17. Modell des katalytischen Zentrums des *Tetrahymena*-Introns der Gruppe I, das auf paarweisen Einschränkungen (constraints; als gestrichelte Linien gezeichnet) beruht, die durch Störstellenskartierung mit Nucleotidanaloga (siehe Abschnitt 4.2) bestimmt wurden.^[46] Der einzelsträngige Bereich J8/7 bildet in der kleinen Furche eine Tripelhelix mit der Substrathelix P1 und Basentripel in der kleinen Furche der P4-Helix, außerdem ein Basentripel in der großen Furche der P3-Helix, wodurch das katalytische Zentrum dieses Ribozyms organisiert wird.

Herausforderung besteht darin, das erarbeitete Wissen über gut untersuchte Moleküle wie tRNA, das *Tetrahymena*-Intron der Gruppe I, das Hammerhead-Ribozym und die RNase P auf andere, kompliziertere Systeme wie selbstspaltende Introns der Gruppe II zu übertragen. Außerdem wirken die meisten RNAs in der Zelle mit zahlreichen Proteinen zusammen und bilden enzymatisch aktive Ribonucleoproteine (RNPs) wie Ribosomen, Spleißosomen, Telomerase und das Signal Recognition Particle. Unser Verständnis von Struktur, Faltung und Zusammenlagerung sowie der funktionellen Mechanismen dieser RNPs bleiben weit hinter dem zurück, was in diesem Beitrag über die Ribozyme berichtet worden ist. Zukünftige Untersuchungen werden sich zunehmend auf RNA-Protein-Wechselwirkungen konzentrieren und werden von Fragestellungen geleitet werden, die sich bei den Untersuchungen der Struktur und Funktion von RNA ergeben haben.

Wir danken Elizabeth Doherty, Patrick Zarrinkar und Scott Strobel für hilfreiche Diskussionen. Unsere eigenen Arbeiten zum Thema dieses Aufsatzes wurden vom Jane Coffin Childs Memorial Medical Research Fund (Postdoktoranden-Stipendium an R.T.B.), von der Beckman Foundation, der Packard Foundation, den National Institutes of Health sowie vom Howard Hughes Medical Institute (J.A.D.) gefördert.

Eingegangen am 8. Dezember 1998 [A 317]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2326–2343

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

[1] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, 31, 147–157.

[2] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* **1983**, 35, 849–857.

- [3] C. Levinthal, *J. Chim. Phys. Phys. Chim. Biol.* **1968**, 65, 44–45.
- [4] D. J. Lane, B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. Sogin, N. Pace, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 6955–6959.
- [5] J. A. Kowalak, S. C. Pomerantz, P. F. Crain, J. A. McCloskey, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 4577–4585.
- [6] M. Chastain, I. Tinoco, Jr., *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1991**, 41, 131–177.
- [7] Übersichtsartikel: D. H. Turner, N. Sugimoto, S. M. Freir, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1988**, 17, 167–192.
- [8] Übersichtsartikel: C. R. Woese, N. R. Pace, *The RNA World* (Hrsg.: R. Gesteland, J. F. Atkins), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, **1993**, S. 91–117.
- [9] Übersichtsartikel: C. Ehresmann, F. Baudin, M. Mougel, P. Romby, J.-P. Ebel, B. Ehresmann, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 53–72.
- [10] J. F. Milligan, D. R. Groebe, G. W. Witherell, O. C. Uhlenbeck, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 8783–8798.
- [11] S. R. Holbrook, *RNA structure and function* (Hrsg.: R. W. Simons, M. Grunberg-Manago), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, **1998**, S. 147–174.
- [12] E. V. Puglisi, J. D. Puglisi, *RNA structure and function* (Hrsg.: R. W. Simons, M. Grunberg-Manago), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, **1998**, S. 117–146.
- [13] S. H. Kim, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, J. L. Sussman, A. Wang, N. C. Seeman, A. Rich, *Science* **1974**, 185, 435–440.
- [14] J. D. Robertus, J. E. Ladner, J. T. Finch, D. Rhodes, R. D. Brown, B. F. C. Clark, A. Klug, *Nature* **1974**, 250, 546–551.
- [15] H. W. Pley, K. M. Flaherty, D. B. McKay, *Nature* **1994**, 372, 68–74.
- [16] W. G. Scott, J. T. Finch, A. Klug, *Cell* **1995**, 81, 991–1002.
- [17] 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.
- [18] A. R. Ferré-D'Amaré, K. Zhou, J. A. Doudna, *Nature* **1998**, 395, 567–574.
- [19] E. Westhof, F. Michel in *RNA-Protein interactions* (Hrsg.: K. Nagai, I. W. Mattaj), IRL Press, New York, **1994**, S. 25–51.
- [20] J. E. Wedekind, D. B. McKay, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, 27, 475–502.
- [21] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, New York, **1984**.
- [22] S. H. Kim, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1976**, 17, 181–216.
- [23] A. Jack, J. E. Lander, A. Klug, *J. Mol. Biol.* **1976**, 108, 619–649.
- [24] J. B. Murray, D. P. Terwey, L. Maloney, A. Karpeisky, N. Usman, L. Beigelman, W. G. Scott, *Cell* **1998**, 92, 665–673.
- [25] G. S. Bassi, N.-E. Mollegaard, A. I. H. Murchie, E. von Kitzing, D. M. J. Lilley, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 45–55.
- [26] G. S. Bassi, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, *RNA* **1996**, 2, 756–768.
- [27] T. Tuschl, C. Gohlke, T. M. Jovin, E. Westhof, F. Eckstein, *Science* **1994**, 266, 785–789.
- [28] K. M. A. Amiri, P. J. Hagerman, *Biochemistry* **1994**, 33, 13172–13177.
- [29] J. B. Murray, A. A. Seyhan, N. G. Walter, J. M. Burke, W. G. Scott, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 587–595.
- [30] Z. Shen, P. J. Hagerman, *J. Mol. Biol.* **1994**, 241, 415–430.
- [31] D. R. Duckett, A. I. H. Murchie, D. M. Lilley, *Cell* **1995**, 83, 1027–1036.
- [32] J. W. Orr, P. J. Hagerman, J. R. Williamson, *J. Mol. Biol.* **1997**, 275, 453–464.
- [33] R. T. Batey, J. R. Williamson, *RNA* **1998**, 4, 984–997.
- [34] J. H. Cate, A. R. Gooding, E. Podell, K. Zhou, B. L. Golden, A. A. Szewczak, C. E. Kundrot, T. R. Cech, J. A. Doudna, *Science* **1996**, 273, 1696–1699.
- [35] G. R. Zimmerman, R. D. Jenison, C. L. Wick, J.-P. Simorre, A. Pardi, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 644–649.
- [36] M. Costa, F. Michel, *EMBO J.* **1997**, 16, 3289–3302.
- [37] S. E. Lietzke, C. L. Barnes, J. A. Berglund, C. E. Kundrot, *Structure* **1996**, 4, 917–930.
- [38] S. R. Holbrook, C. Cheong, I. Tinoco, Jr., S.-H. Kim, *Nature* **1991**, 353, 579–581.
- [39] K. J. Baeyens, H. L. De Bondt, S. R. Holbrook, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 56–62.
- [40] G. A. Leonard, K. E. McAuley-Hecht, S. Ebel, D. M. Lough, T. Brown, W. N. Hanter, *Structure* **1994**, 2, 483–494.
- [41] M. C. Wahl, S. T. Rao, M. Sundaralingam, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, 3, 24–31.
- [42] R. D. Blake, J. Massoulié, J. R. Fresco, *J. Mol. Biol.* **1967**, 30, 291–308.
- [43] J. Massoulié, *Eur. J. Biochem.* **1968**, 3, 439–447.
- [44] R. Klinck, J. Liquier, E. Taillandier, C. Gouyette, T. Huynh-Dinh, E. Guittet, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 233, 544–553.
- [45] Übersichtsartikel: J. D. Puglisi, J. R. Williamson, *The RNA World*, 2. Aufl. (Hrsg.: R. F. Gesteland, T. R. Cech, J. F. Atkins), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, **1999**, S. 403–425.
- [46] A. A. Szewczak, L. Ortoleva-Donnelly, S. P. Ryder, E. Moncoeur, S. A. Strobel, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 1037–1042.
- [47] C. Turek, P. Gauss, C. Thermes, D. R. Groebe, M. Gayle, N. Guild, G. Stormo, Y. D'Aubenton-Carafa, O. C. Uhlenbeck, I. Tinoco, Jr., E. N. Brody, L. Gold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 1364–1368.
- [48] C. R. Woese, S. Winker, R. R. Gutell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 8467–8471.
- [49] M. Molinaro, I. Tinoco, Jr., *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 3056–3063.
- [50] H. Heus, A. Pardi, *Science* **1991**, 253, 191–194.
- [51] F. M. Jucker, H. A. Heus, P. F. Yip, E. H. Moors, A. Pardi, *J. Mol. Biol.* **1996**, 264, 968–980.
- [52] L. Jaeger, F. Michel, E. Westhof, *J. Mol. Biol.* **1994**, 236, 1271–1276.
- [53] F. L. Murphy, T. R. Cech, *J. Mol. Biol.* **1994**, 236, 49–63.
- [54] M. Costa, F. Michel, *EMBO J.* **1995**, 14, 1276–1285.
- [55] H. Pley, K. Flaherty, D. McKay, *Nature* **1994**, 372, 111–113.
- [56] D. L. Abramovitz, A. M. Pyle, *J. Mol. Biol.* **1997**, 266, 493–506.
- [57] J. H. Cate, R. L. Hanna, J. A. Doudna, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 553–558.
- [58] J. A. Ippolito, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 9819–9824.
- [59] M. Zacharias, P. J. Hagerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 6052–6056.
- [60] M. Zacharias, P. J. Hagerman, *J. Mol. Biol.* **1995**, 247, 486–500.
- [61] M. S. Chapman, M. G. Rossmann, *Structure* **1995**, 3, 151–162.
- [62] V. Lehnert, L. Jaeger, F. Michel, E. Westhof, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 993–1009.
- [63] J. P. Marino, R. S. Gregorian, Jr., G. Csankovszki, D. M. Crothers, *Science* **1995**, 268, 1448–1454.
- [64] A. J. Lee, D. M. Crothers, *Structure* **1998**, 6, 993–1005.
- [65] K.-Y. Chang, I. Tinoco, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 8705–8709.
- [66] K.-Y. Chang, I. Tinoco, Jr., *J. Mol. Biol.* **1997**, 269, 52–66.
- [67] R. S. Gregorian, Jr., D. M. Crothers, *J. Mol. Biol.* **1995**, 248, 968–984.
- [68] C. C. Correll, B. Freeborn, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Cell* **1997**, 91, 705–712.
- [69] A. A. Szewczak, P. B. Moore, *J. Mol. Biol.* **1995**, 247, 81–98.
- [70] J. D. Puglisi, J. R. Wyatt, I. Tinoco, Jr., *J. Mol. Biol.* **1990**, 214, 437–453.
- [71] J. R. Wyatt, J. D. Puglisi, I. Tinoco, Jr., *J. Mol. Biol.* **1990**, 214, 455–470.
- [72] L. X. Shen, I. Tinoco, Jr., *J. Mol. Biol.* **1995**, 247, 963–978.
- [73] X. Chen, H. Kang, L. X. Shen, M. Chamorro, H. E. Varmus, I. Tinoco, Jr., *J. Mol. Biol.* **1996**, 260, 479–483.
- [74] M. H. Kolk, M. van der Graaf, S. S. Wijnga, C. W. A. Pleij, H. A. Heus, C. W. Hilbers, *Science* **1998**, 280, 434–438.
- [75] L. Su, L. Chen, M. Egli, J. M. Berger, A. Rich, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 285–292.
- [76] S. P. Rosenstein, M. D. Been, *Biochemistry* **1990**, 29, 8011–8016.
- [77] J. B. Smith, G. Dinter-Gottlieb, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 1285–1289.
- [78] J. A. Latham, T. R. Cech, *Science* **1989**, 245, 276–282.
- [79] D. C. Celander, T. R. Cech, *Biochemistry* **1990**, 29, 1355–1361.
- [80] B. Lagerbauer, F. L. Murphy, T. R. Cech, *EMBO J.* **1994**, 13, 2669–2676.
- [81] F. L. Murphy, T. R. Cech, *Biochemistry* **1993**, 32, 5291–5300.
- [82] E. L. Christian, M. Yarus, *J. Mol. Biol.* **1992**, 228, 743–758.
- [83] E. L. Christian, M. Yarus, *Biochemistry* **1993**, 32, 4477–4480.
- [84] E. A. Doherty, J. A. Doudna, *Biochemistry* **1997**, 36, 3159–3169.
- [85] G. Van Der Horst, A. Christian, T. Inoue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 184–188.

- [86] E. A. Doherty, D. Herschlag, J. A. Doudna, *Biochemistry* **1999**, *38*, 2982–2990.
- [87] J. A. Doudna, T. R. Cech, *RNA* **1995**, *1*, 36–45.
- [88] C. Guerrier-Takada, S. Altman, *Science* **1984**, *223*, 285–286.
- [89] W. D. Hardt, J. M. Warnecke, V. A. Erdmann, R. K. Hartmann, *EMBO J.* **1995**, *14*, 2935–2944.
- [90] W. D. Hardt, V. A. Erdmann, R. K. Hartmann, *RNA* **1996**, *2*, 1189–1198.
- [91] T. Pan, A. Loria, K. Zhong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 12510–12514.
- [92] F. Conrad, A. Hanne, R. K. Gaur, G. Krupp, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1845–1853.
- [93] T. Pan, *Biochemistry* **1995**, *34*, 902–909.
- [94] A. Loria, T. Pan, *RNA* **1996**, *2*, 551–563.
- [95] P. Z. Qin, A. M. Pyle, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 301–308.
- [96] P. E. Cole, D. M. Crothers, *Biochemistry* **1972**, *11*, 4368–4374.
- [97] D. M. Crothers, P. E. Cole, C. W. Hilbers, R. G. Shulman, *J. Mol. Biol.* **1974**, *87*, 63–88.
- [98] C. W. Hilbers, G. T. Robillard, R. G. Shulman, R. D. Blake, P. K. Webb, R. Fresco, D. Riesner, *Biochemistry* **1976**, *15*, 1874–1882.
- [99] E. R. Hawkins, S. H. Chang, W. L. Mattice, *Biopolymers*, **1977**, *16*, 1557–1566.
- [100] A. Stein, D. M. Crothers, *Biochemistry* **1976**, *15*, 160–168.
- [101] A. Stein, D. M. Crothers, *Biochemistry* **1976**, *15*, 157–160.
- [102] A. R. Banerjee, J. A. Jaeger, D. H. Turner, *Biochemistry* **1993**, *32*, 153–163.
- [103] B. Sclavi, S. Woodson, M. Sullivan, M. R. Chance, M. Brenowitz, *J. Mol. Biol.* **1997**, *266*, 144–159.
- [104] B. Sclavi, M. Sullivan, M. R. Chance, M. Brenowitz, S. A. Woodson, *Science* **1998**, *279*, 1940–1943.
- [105] P. P. Zarrinkar, J. R. Williamson, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 854–858.
- [106] P. P. Zarrinkar, J. R. Williamson, *Science* **1994**, *265*, 918–924.
- [107] P. P. Zarrinkar, J. R. Williamson, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 432–438.
- [108] A. R. Banerjee, D. H. Turner, *Biochemistry* **1995**, *34*, 6504–6512.
- [109] W. D. Downs, T. R. Cech, *RNA* **1996**, *2*, 718–732.
- [110] D. K. Treiber, M. S. Rook, P. P. Zarrinkar, J. R. Williamson, *Science* **1998**, *279*, 1943–1946.
- [111] M. S. Rook, D. K. Treiber, J. R. Williamson, *J. Mol. Biol.* **1998**, *281*, 609–620.
- [112] J. S. Weissman, P. S. Kim, *Science* **1991**, *253*, 1386–1393.
- [113] J. Pan, D. Thirumalai, S. A. Woodson, *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 7–13.
- [114] T. Pan, T. R. Sosnick, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 931–938.
- [115] D. Thirumalai, S. A. Woodson, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 433–439.
- [116] K. A. Dill, H. S. Chan, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 10–19.
- [117] J. Pan, S. A. Woodson, *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 597–609.
- [118] S. R. Price, N. Ito, C. Oubridge, J. M. Avis, K. Nagai, *J. Mol. Biol.* **1995**, *249*, 398–408.
- [119] A. R. Ferré-D'Amaré, J. A. Doudna, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 977–978.
- [120] J. A. Doudna, C. Grosshans, A. Gooding, C. E. Kundrot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 7829–7833.
- [121] W. G. Scott, J. T. Finch, F. Grenfell, J. Fogg, T. Smith, M. J. Gait, A. Klug, *J. Mol. Biol.* **1995**, *250*, 327–332.
- [122] F. Michel, E. Westhof, *J. Mol. Biol.* **1990**, *216*, 585–610.
- [123] M. A. Tanner, T. R. Cech, *Science* **1997**, *275*, 847–849.
- [124] E. Westhof, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1993**, *286*, 203–210.
- [125] B. L. Golden, A. R. Gooding, E. R. Podell, T. R. Cech, *Science* **1998**, *282*, 259–264.
- [126] N. K. Tanner, S. Schaff, G. Thill, E. Petit-Koskas, A. Crain-Denoyelle, E. Westhof, *Curr. Biol.* **1994**, *4*, 488–498.
- [127] G. Gish, F. Eckstein, *Science* **1988**, *240*, 1520–1522.
- [128] R. K. Gaur, G. Krupp, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 21–26.
- [129] S. A. Strobel, K. Shetty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2903–2908.
- [130] S. A. Strobel, *Biopolymers*, im Druck.
- [131] L. Ortoleva-Donnelly, A. A. Szewczak, R. R. Gutell, S. A. Strobel, *RNA* **1998**, *4*, 498–519.
- [132] S. A. Strobel, L. Ortoleva-Donnelly, S. P. Ryder, J. H. Cate, E. Moncoeur, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 60–66.
- [133] S. A. Strobel, T. R. Cech, *Biochemistry* **1993**, *32*, 13593–13604.
- [134] S. A. Strobel, T. R. Cech, *Science* **1995**, *267*, 675–679.
- [135] D. Söll, *The RNA world* (Hrsg.: R. Gesteland, J. F. Atkins), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, **1993**, S. 157–184.
- [136] J. L. Sussman, S. R. Holbrook, R. W. Warrant, G. M. Church, S. H. Kim, *J. Mol. Biol.* **1978**, *123*, 607–630.
- [137] M. Carson, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, *47*, 110.
- [138] S. H. Damberg, R. R. Gutell, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 3508–3510.
- [139] J. S. Kieft, I. J. Tinoco, *Structure* **1997**, *5*, 713–721.
- [140] D. E. Draper, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 397–400.