

RNA-Reparatur

Gezielte RNA-Sequenz-Veränderung durch ein synthetisches Twinribozym**

Rüdiger Welz, Katrin Bossmann, Christian Klug,
Christian Schmidt, Hans-Joachim Fritz und
Sabine Müller*

In den letzten Jahren hat sich die RNA zu einem Fokus für gentherapeutische Ansätze entwickelt; Antisense-RNA,^[1] interferierende RNA (RNAi)^[2] und *trans*-spaltende Ribozyme^[3] lassen sich zur Verhinderung unerwünschter Genexpression einsetzen. Eine zusätzliche Option mit eigenem therapeutischem Potenzial ist die Verwendung von Ribozymen zur spezifischen Veränderung von RNA-Sequenzen.^[4] Eine generelle Methode zur Manipulation eines willkürlich gewählten RNA-Abschnitts mit beliebiger Sequenz könnte die Tür zur Korrektur der phänotypischen Ausprägung eines genetischen Defekts öffnen, ohne die entsprechende DNA anzugreifen. Eine solche Strategie erfordert ein Agens, das zwei RNA-Spaltungen und zwei Ligationen strikt kontrolliert katalysiert. Hier berichten wir über eine synthetische, nur 141 Nucleotide lange RNA (HP-TW5), die sich vom Hairpin-Ribozym durch Tandemduplikation (darum Twinribozym genannt) ableitet und alle funktionellen Anforderungen einer solchen Prozedur erfüllt. Das Twinribozym HP-TW5 bewirkt die Insertion von vier Nucleotiden an einer spezifischen Stelle einer willkürlich gewählten Modell-RNA. Während dieses Prozesses werden 16 Nucleotide der Substratsequenz gegen 20 Nucleotide ausgetauscht, die der Reaktionslösung als separates, synthetisches „Reparaturfragment“

zugesezt werden. Bis zu 30 % des Ausgangssubstrats wurden in das Insertionsprodukt überführt.

Das Hairpin-Ribozym entstammt dem (–)-Strang der *Tobacco-Ringspot-Virus-Satelliten-RNA* und katalysiert die ortsspezifische Spaltung geeigneter RNA-Substrate unter Bildung von Fragmenten mit einer 2',3'-Cyclophosphat-Einheit bzw. einer freien 5'-OH-Gruppe.^[5] In der Rückreaktion greift das Sauerstoffatom der freien 5'-OH-Gruppe des einen Fragments die 2',3'-Cyclophosphat-Einheit des anderen Fragments an, was – unter Ringöffnung mit Freisetzung einer 2'-OH-Funktion – zur Ligation beider Fragmente führt. Wegen der spezifischen konformativen Dynamik des Hairpin-Ribozyms erreichen Bindungsspaltung und Ligation das Gleichgewicht, lange bevor die Produkte vom Ribozym dissoziieren. Deshalb verläuft hier die Ligation effizienter als mit anderen kleinen katalytischen RNAs wie dem Hammerhead-Ribozym.^[6] Wir wollten die Spalt- und Ligationsaktivität des Hairpin-Ribozyms für einen ortsspezifischen und flickenartig durchführbaren RNA-Sequenzaustausch nutzen und entwickelten dafür ein Twinribozym, das zwei Strangspaltungen und zwei Ligationen in Position *trans* katalysiert.

Um die Reparatur einer kleinen Deletion auf RNA-Ebene zu simulieren, wurde das Twinribozym HP-TW5 so konstruiert, dass es die Insertion von vier spezifischen Nucleotiden an einer spezifischen Position einer willkürlich bestimmten Substrat-RNA unterstützt (Abbildung 1). Im Ribozym/Substrat-Komplex ist eine Folge von vier Nucleotiden im mittleren Bereich des Ribozymstrangs ausgestülpt (GAUU, siehe Abbildung 1). Spaltung an den beiden definierten Orten führt zu einem 16-mer, das wegen des destabilisierenden Einflusses der einzelsträngigen Schleife leicht vom Ribozymstrang dissoziieren kann. Die beiden RNA-Fragmente, welche die Spaltorte flankieren, bilden dagegen durchgängige Duplexe von 11 bzw. 14 Basenpaaren und sollten somit vorzugsweise am Ribozym gebunden bleiben. Das zugegebene Reparaturoligonucleotid enthält zusätzlich die vier Nucleotide, die komplementär zur GAUU-Schleife im Ribozymstrang sind. Die Bindung des Reparaturoligonucleotids in der durch die Dissoziation des 16-mers frei gewordenen Lücke verlängert daher den ursprünglich unterbrochenen Doppelstrang um vier Nucleotide zu einem kontinuierlichen Duplex. Dieses Design sowie ein moderater molarer Überschuss des Reparaturoligonucleotids sollten die Produktbildung begünstigen.

Die Gültigkeit des experimentellen Designs wurde zunächst durch Analyse des Zeitverlaufs der Reaktion überprüft. Dazu wurde ein auf die Gelelektrophorese (im DNA-Sequenzierautomaten) fluoreszenzmarkierter Substrate und Produkte gestützter Assay in Verbindung mit numerischer Peakintegration genutzt (für Details siehe *Experimentelles*).^[7] Die Substrat-RNA wurde mit einer äquimolaren Menge des Ribozyms bei 37°C inkubiert und nach 4 h wurde das Reparaturoligonucleotid (20-mer) in 2,7-fachem Überschuss über das Substrat zugegeben und die Reaktion weitere 2 h bei 37°C belassen. Abbildung 2 zeigt die Originaldaten des Experiments: Nach 4 h werden die charakteristischen Spaltprodukte und noch 24 % der Substrat-RNA detektiert (Bahn 2); die Zugabe des Reparaturoligonucleotids führt zur Bildung neuer Produkte, die als zwei zusätzliche Banden

[*] Dr. S. Müller, R. Welz, K. Bossmann, C. Schmidt
Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-2093-7266
E-mail: s.mueller@chemie.hu-berlin.de

C. Klug, Prof. Dr. H.-J. Fritz
Abteilung Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie
Institut für Mikrobiologie und Genetik
der Georg-August-Universität Göttingen
Grisebachstraße 8, 37077 Göttingen (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

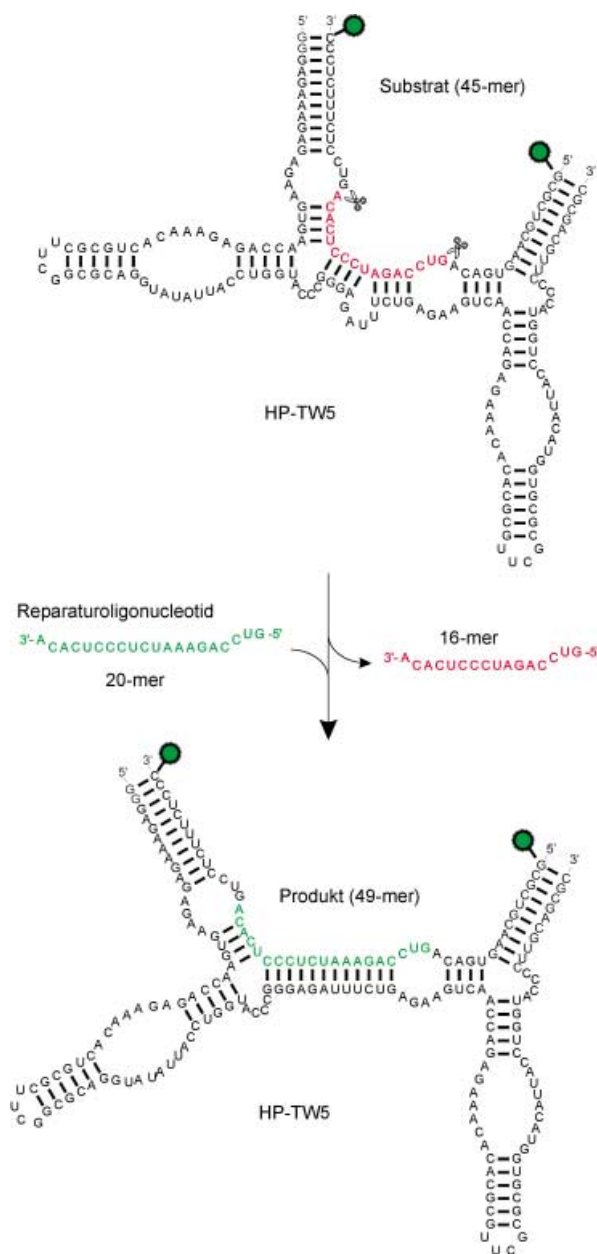


Abbildung 1. Reaktionsschema der durch HP-TW5 unterstützten RNA-Reparatur. Die Substrat-RNA ist mit HP-TW5 hybridisiert (oben) und wird an den beiden mit Schersymbolen gekennzeichneten Stellen spezifisch gespalten. Das Fragment zwischen den beiden Spaltorten (16-mer, rote Buchstaben) wird am Ribozym durch das Reparaturoligonucleotid (20-mer, grüne Buchstaben) ersetzt. Das 20-mer wird schließlich mit den flankierenden Substratsequenzen unter Bildung des HP-TW5/Produkt-Komplexes (unten) ligiert. Die grünen Kugeln symbolisieren 5'- und 3'-terminale Fluoreszenzeinheiten, die für die Detektion genutzt werden (siehe Abbildung 2).

(Bahn 3 und 4) detektiert werden – die 34/35-mer, die durch Ligation des 20-mers mit dem 14- bzw. 15-mer-Spaltprodukt entstehen, und das gewünschte „reparierte“ RNA-Molekül (49-mer), das aus der Ligation des 20-mers mit beiden Fragmenten hervorgeht; nach 2 h sind 10% des Startmaterials in das 49-mer überführt und 5% liegen noch unprozessiert in der Lösung vor (Bahn 3), nach weiteren 24 h bei

Raumtemperatur ist eine weitere Anreicherung der Ligationsprodukte zu beobachten und das Verhältnis von Produkt zu ursprünglichem Substrat hat sich noch vergrößert: 30% der Substrat-RNA sind in das 49-mer überführt worden und 7% liegen unverändert vor (Bahn 4).

Zur Überprüfung der chemischen Identität des 49-mers haben wir dessen Sequenz analysiert (Abbildung 3). Dazu wurde zunächst die Reaktionsmischung eines analogen Experiments (mit fünffacher Menge) durch Gelelektrophorese wie oben beschrieben in die Komponenten getrennt. Das sich entwickelnde Bandenmuster wurde online verfolgt und

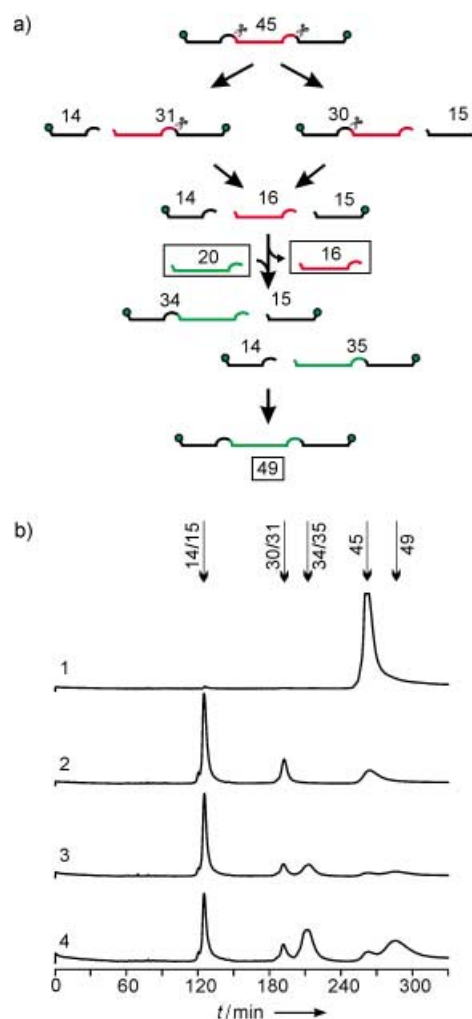


Abbildung 2. a) Fragmentierungs- und Ligationsschema (vgl. auch Abbildung 1). b) Gelelektrophoretischer Assay zur Verfolgung der Reaktion. Bahn 1: Start der Spaltungsreaktion. Bahn 2: Reaktionsmischung nach 4 h bei 37°C (unmittelbar vor der Zugabe des Reparaturoligonucleotids). Bahn 3: Reaktionsmischung 2 h nach der Zugabe des Reparaturoligonucleotids (fortgesetzte Inkubation bei 37°C). Bahn 4: Reaktionsmischung nach weiteren 24 h bei Raumtemperatur. Für weitere Details siehe Text. Man beachte, dass Fragmente, deren Länge sich nur um ein Nucleotid unterscheidet, nicht aufgelöst werden. Gründe sind eine beschleunigende Wirkung der 2',3'-Cyclophosphat-Einheit am 15-mer sowie unterschiedliche Einflüsse der Fluorescingruppe am 5'- oder 3'-Ende. Die Peakhöhen sind durch die Software zur Datenprozessierung standardisiert, sodass die Summe aller Peakflächen in verschiedenen Bahnen nicht konstant ist.

die Elektrophorese gestoppt, sobald der Peak der 49-mer-Bande den Laserstrahl passiert hatte (Abbildung 3a). Die RNA wurde vom Gel eluiert, revers transkribiert und die resultierende cDNA durch PCR amplifiziert, dann geklont und sequenziert (für Details siehe *Experimentelles*). Zum Vergleich wurde eine Probe der Substrat-RNA (ohne vorherige Gelelektrophorese) auf die gleiche Art behandelt. Abbildung 3b zeigt das Ergebnis der gelelektrophoretischen Analyse beider PCR-Produkte. Die Sequenzanalyse lieferte die in Abbildung 3c präsentierten Daten. Vier unabhängige

Klone des 49-mers sind separat mit identischem Ergebnis sequenziert worden (Daten nicht gezeigt). Es ist eindeutig erkennbar, dass das Tetranucleotid AAUC an der vorher festgelegten Position in die Substratsequenz eingefügt wurde.

Die Demonstration der Tragfähigkeit der entworfenen Strategie macht sie zu einem Modell für die Reparatur einer Deletionsmutation auf der RNA-Ebene. Die Sequenz der Ziel-RNA und die Deletion sind zunächst willkürlich festgelegt worden. Das ursprüngliche Hairpin-Ribozym lässt sich jedoch für die Prozessierung verschiedener RNA-Sequenzen

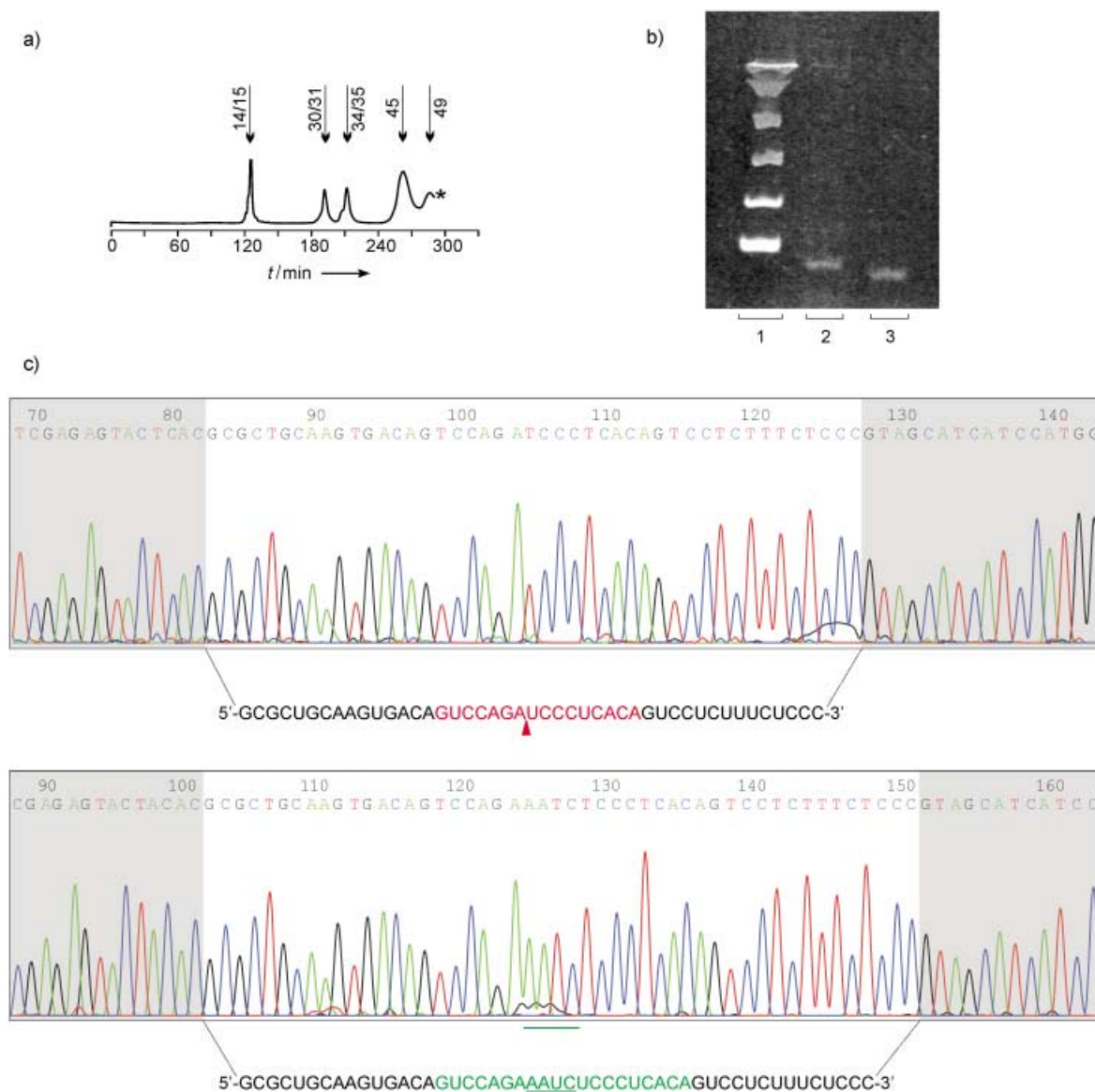


Abbildung 3. Produktanalyse. a) Spur der präparativen Gelelektrophorese der Reaktionsmischung (der Stern markiert den Zeitpunkt des Abbruchs der Gelelektrophorese). b) Gelelektrophoretische Analyse (15-proz. Polyacrylamid) der PCR-Produkte. Bahn 1: Marker-DNAs, von unten: 110, 147, 190, 242, 331 und 404 bp. Bahn 2: PCR-Produkt der cDNA, die durch reverse Transkription aus dem 49-mer gewonnen wurde, das zuvor aus dem in (a) gezeigten präparativen Gel eluiert worden war (erwartete Länge: 96 bp). Bahn 3: PCR-Produkt der von der Substrat-RNA durch reverse Transkription gewonnenen cDNA (erwartete Länge: 92 bp). c) DNA-Sequenzanalyse für die aus dem Substrat (45-mer, oben) und aus dem Produkt der Reparatur (49-mer, unten) generierten PCR-Produkte nach Klonieren in den Vektor pCR4. Das mittlere Fenster zeigt die Sequenz der Substrat- bzw. Produkt-RNA wie unter den jeweiligen Kurven verdeutlicht; die flankierenden Sequenzen stammen von den PCR-Primern. Das 16-mer, das in der Substratsequenz durch die Reparaturreaktion ersetzt wird, ist in Rot angegeben, die Sequenz des zur Reparatur verwendeten 20-mers in Grün. Innerhalb der Substratsequenz markiert der rote Keil den Zielpunkt der RNA-Reparatur, in der Produktsequenz sind die eingefügten Nucleotide unterstrichen.

mit erstaunlicher Flexibilität und Spezifität adaptieren.^[8] Daher sollte es auch möglich sein, Twinribozyme zu entwickeln, die auf genetische Defekte von medizinischer Relevanz zugeschnitten sind. Krankheiten, die durch kurze Deletionen verursacht werden (z. B. cystische Fibrose^[9]), sind die nahe liegenden ersten Ziele. Es besteht jedoch kein Grund zu der Annahme, dass das vorgestellte Reparaturschema auf diese Klasse von Mutationen beschränkt bleibt, obwohl die Reparaturreaktion eventuell für Basenaustausche oder Insertionen weniger favorisiert sein wird und das Reparaturoligonucleotid in höherem Überschuss erfordern könnte.

Ein alternatives System zur Korrektur von RNA-Sequenzen beruht auf dem Einsatz *trans*-spleißender Ribozyme, die sich von Intron-RNAs der Gruppe I ableiten.^[4a] Im Gegensatz zu diesem System, das ein sehr großes prozessierendes Ribozym erfordert, das mit dem rekonstituierenden Nucleotidsegment und der gesamten mRNA stromabwärts von der Mutation fusioniert ist, beruht die hier eingeführte Twinribozym-Methode auf einem kleinen Ribozym und einem kleinen Reparaturoligonucleotid. Der große Vorteil besteht in der Möglichkeit des Austausches kleiner „Flicken“ von RNA-Sequenz, sodass prinzipiell jede zugängliche Zielsequenz mit derselben einfachen Maschinerie angesprochen werden kann. Wir erwarten, dass dieser entscheidende und hier neu eingeführte Aspekt die Entwicklungsmöglichkeiten der RNA-Reparatur innerhalb künftiger gentherapeutischer Ansätze deutlich verstärkt.

Experimentelles

Synthese des Twinribozyms HP-TW5, des Substrats und des Reparaturoligonucleotids: Das Twinribozym wurde mit T7-RNA-Polymerase von einem doppelsträngigen DNA-Templat transkribiert.^[7b] Das Templat (Gesamtlänge: 158 bp) wurde aus zwei synthetischen DNAs (BioTeZ, Deutschland) generiert, jede DNA war 97 Nucleotide lang: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAGAGAG AAG TGA-ACCAGAGAAACACTGCGCTTCGGCGCAGGTATATTACC-TGGTACCCGGGAGATTCTGAGA-3' und 5'-GCGCTGCAAGGGGTACCAGGTAATGTACCAACGCGCAACGCGTGTGTTTCTCTGTTGACTTCTCAGAAATCTCCCGGTACCA-GGTAATATACCTG-3'. Die beiden Stränge weisen an ihren 3'-Enden 36 komplementäre Basen auf (fett gedruckte Buchstaben). Um falsches Hybridisieren zu verhindern, wurden zwei kurze DNA-Stränge zugesetzt: 5'-TTCTCTGGTTCACTT-3' und 5'-TACATACCTGGTAC-3' (BioTeZ). Diese kurzen Stränge sind jeweils zu einer Region auf einem der beiden langen DNA-Stränge außerhalb des 36 bp überspannenden Primer/Templat-Duplexes komplementär (kursive Buchstaben). Die enzymatische Auffüllreaktion wurde mit DNA-Polymerase I (MBI Fermentas) durchgeführt. Zu Details der Reaktionsbedingungen und der Produktisolierung siehe Lit. [7b].

Das RNA-Substrat wurde am Synthesautomaten (Gene Assembler Special, Amersham Pharmacia Biotech) synthetisiert, mit Fluorescein endmarkiert und wie beschrieben^[10] gereinigt. Das Reparaturoligonucleotid mit endständiger 2',3'-Cyclophosphat-Einheit wurde aus dem chemisch synthetisierten 29-mer 5'-GUCCAGAAAUCUCCCUCACAGUCCUCU UU-3' durch Spaltung mit einem Wildtyp-Hairpin-Ribozym (HP-WTTL, für Struktur und Reaktionsbedingungen siehe Lit. [11]) erhalten. Das Produkt wurde wie bei den Transkripten beschrieben gereinigt.

Reparaturassay: 4 µL einer 1 µM Stammlösung des Ribozyms wurden zu 8 µL einer 100 mM Stammlösung von Tris-HCl, pH 7.5, gegeben. Die Mischung wurde 1 min auf 90°C erhitzt und anschlie-

bend 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µL einer 50 mM MgCl₂-Lösung und 0.8 µL einer 50 mM Lösung von Spermin wurde die Mischung weitere 15 min bei 37°C gehalten und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 2 µL einer 2 µM Stammlösung des Substrats gestartet. Nach 4 h wurden 1.2 µL einer 9 µM Lösung des Reparaturoligonucleotids (20-mer) hinzugefügt, sodass folgende Endkonzentrationen vorlagen: 200 nM Ribozym, 200 nM Substrat, 40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 2 mM Spermin und 540 nM Reparaturoligonucleotid. In Zeitabständen wie in Abbildung 2b gezeigt wurden der Reaktionsmischung 2 µL Aliquote entnommen und zu 4 µL einer Lösung von 7 M Harnstoff und 50 mM EDTA pipettiert, um die Reaktion zu stoppen. Die Proben wurden mit einem A.L.F.-DNA-Sequenzierautomaten (Amersham Pharmacia Biotech) analysiert und die Daten mit der A.L.F.-Fragment-Manager-Software prozessiert.^[7b]

Produktanalyse: Der Reparaturassay wurde mit der fünffachen Substanzmenge wiederholt (alle anderen Parameter waren unverändert). Die Reaktionsmischung wurde gleichmäßig in den 40 Auftragungstaschen eines Polyacrylamidgels verteilt (das entspricht etwa derselben Menge pro Tasche wie im analytischen Experiment). Der Elektrophoreseverlauf wurde online verfolgt und die Elektrophorese gestoppt, sobald die langsamste Bande den Laserstrahl passiert hatte. Auf der Höhe des Photodiodenarrays wurde ein ca. 4 mm breites Band über die gesamte Breite des Gels ausgeschnitten. Ungefähr ein Zehntel dieses Gelbands wurde abgetrennt und in ein 2-mL-Eppendorfgefäß überführt. Der Gefäßboden und der Deckel waren mit Löchern versehen, und ein Stück BT1-Membran (Schleicher&Schuell, Deutschland) wurde unter den Deckel geklemmt. Das Eppendorfgefäß wurde 140 min in einem Biotrap-Gerät (Schleicher&Schuell) mit dem Deckel zur Katode bei 120 mA gehalten und so die RNA vom Gel auf die Membran elektroeluiert.

Zur reversen Transkription wurde die BT1-Membran zusammen mit 48 µL H₂O und 1.5 µL Primer RREP1 RT (5'-Biotinyl-GGG-AGA AAG AGG AC, 10 µM) 90 s auf 98°C erhitzt und anschließend 10 min bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 6 µL zehnfach konzentriertem RT-Puffer (500 mM Tris-HCl, pH 8.3, 400 mM KCl, 10 mM DTT), 1.5 µL AMV Reverse Transcriptase „Enhanced“ (Sigma, Deutschland) und 3 µL dNTPs (jeweils 2.5 mM) wurde die Mischung 1 h bei 42°C inkubiert. Danach wurde das BT1-Membranstück in eine PCR-Mischung aus 55 µL H₂O, 10 µL DTT (100 mM), 8 µL dNTPs (jeweils 2.5 mM), 5 µL Primer RREP1 UP (5'-CACGGTGTCTCGAGAGTACTACACGCGCTGCAAGTGACA, 10 µM), 5 µL Primer RREP1 LO (5'-GAGATATACCATGGATGATGCTACGGGAGAAAGAGGAC, 10 µM), 10 µL zehnfach konzentriertem PCR-Puffer und 1 µL Ampli-Taq-Lösung (Perkin-Elmer, Deutschland) überführt. Die Buchstaben im Normaldruck sind die Substrat/Produktsequenzen, die das während der Reparaturreaktion auszutauschende Mittelstück flankieren. Die Temperaturzyklen für die PCR waren wie folgt: 2 min 94°C, 1 min 45°C, 1 min 72°C (2 Anfangszyklen); 1 min 94°C, 1 min 70°C, 30 s 72°C (zusätzliche 35 Zyklen). Nach dem letzten Zyklus wurde die Temperatur weitere 10 min bei 72°C belassen. Analysiert wurde das Reaktionsprodukt in einem 12-proz. denaturierenden Polyacrylamidgel. Das PCR-Produkt wurde mithilfe des TOPO-TA-Cloning-Kits (Invitrogen) in einen pCR4-Vektor von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) ligiert. Die anschließende Transformation von 50 µL TOP10-Zellen (Invitrogen) erfolgte durch Elektroporation.^[12] Vier unabhängige Klone wurden gepickt und einer DNA-Sequenzanalyse (ABI-Prism-377-DNA-Sequenzierautomat) unterzogen. Die gleiche Prozedur, allerdings ohne präparative Gelelektrophorese, wurde mit der Substrat-RNA (45-mer) durchgeführt.

Eingegangen am 22. November 2002 [Z50611]

Stichwörter: Basendeletionen · Gentherapie · Ribozyme · RNA

-
- [1] a) A. R. van der Krol, J. N. Mol, A. R. Stuitje, *Biotechniques* **1988**, 6, 958–976; b) B. A. Sullenger, T. C. Lee, C. A. Smith, G. E. Ungers, E. Gilboa, *Mol. Cell. Biol.* **1990**, 10, 6512–6523.
- [2] a) S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, 411, 494–498; b) G. Sui, C. Soohoo, B. Affar el, F. Gay, Y. Shi, W. C. Forrester, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 5515–5520; c) M. Miyagishi, K. Taira, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 497–500; d) N. S. Lee, T. Dohjima, G. Bauer, H. Li, M. J. Li, A. Ehsani, P. Salvaterra, J. Rossi, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 500–505; e) C. P. Paul, P. D. Good, I. Winer, D. R. Engelke, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 505–508.
- [3] a) G. Bauer, P. Valdez, K. Kearns, I. Bahner, S. F. Wen, J. A. Zaia, D. B. Kohn, *Blood* **1997**, 89, 2259–2267; b) F. Wong-Staal, E. M. Poeschla, D. J. Looney, *Hum. Gene Ther.* **1998**, 9, 2407–2425; c) R. G. Amado, R. T. Mitsuyasu, G. Symonds, J. D. Rosenblatt, J. Zack, L. Q. Sun, M. Miller, J. Ely, W. Gerlach, *Hum. Gene Ther.* **1999**, 10, 2255–2270; d) N. Usman, L. M. Blatt, *J. Clin. Invest.* **2000**, 106, 1197–1202; e) P. A. Pavco, K. S. Bouhana, A. M. Gallegos, A. Agrawal, K. S. Blanchard, S. L. Grimm, K. L. Jensen, L. E. Andrews, F. E. Wincott, P. A. Pitot, R. J. Tressler, C. Cushman, M. A. Reynolds, T. J. Parry, *Clin. Cancer Res.* **2000**, 6, 2094–2103; f) D. G. Macejak, K. L. Jensen, S. F. Jamison, K. Domenico, E. C. Roberts, N. Chaudhary, I. von Carlowitz, L. Bellon, M. J. Tong, A. Conrad, P. A. Pavco, L. M. Blatt, *Hepatology* **2000**, 31, 769–776.
- [4] a) B. A. Sullenger, T. R. Cech, *Nature* **1994**, 371, 619–622; b) J. T. Jones, S. W. Lee, B. A. Sullenger, *Nat. Med.* **1996**, 2, 643–648; c) L. A. Phylactou, C. Darrah, M. J. Wood, *Nat. Genet.* **1998**, 18, 378–381; d) T. Watanabe, B. A. Sullenger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 8490–8494; e) N. Lan, R. P. Howrey, S. W. Lee, C. A. Smith, B. A. Sullenger, *Science* **1998**, 280, 1593–1596.
- [5] a) P. A. Feldstein, J. M. Buzayan, G. Bruening, *Gene* **1989**, 82, 53–61; b) A. Hampel, R. Tritz, *Biochemistry* **1989**, 28, 4929–4933.
- [6] X. Zhuang, H. Kim, M. J. Pereira, H. P. Babcock, N. G. Walter, S. Chu, *Science* **2002**, 296, 1473–1476.
- [7] a) W. Gläsner, R. Merkl, S. Schmidt, D. Cech, H.-J. Fritz, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1992**, 373, 1223–1225; b) C. Schmidt, R. Welz, S. Müller, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 886–894.
- [8] A. Berzal-Herranz, S. Joseph, J. M. Burke, *Genes Dev.* **1992**, 6, 129–134.
- [9] J. R. Riordan, J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou, M. L. Drumm, M. C. Iannuzzi, F. S. Collins, L. C. Tsui, *Science* **1989**, 245, 1066–1073.
- [10] R. Welz, S. Müller, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 795–797.
- [11] R. Welz, C. Schmidt, S. Müller, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 283, 648–654.
- [12] W. J. Dower, J. F. Miller, C. W. Ragsdale, *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16, 6127–6145.
-