

Rybozomy jako narzędzia do kontroli ekspresji genów

Lucyna Woźniak

Centrum Badań Molekularnych
i Makromolekularnych PAN
Łódź

1. Wprowadzenie

Dokonane na początku lat osiemdziesiątych odkrycia Altmana (1), Cecha (2) i Symmonsa (3) demonstrujące właściwości katalityczne niektórych cząsteczek RNA spowodowały ogromny wzrost zainteresowania kwasami rybonukleinowymi, wywołując ożywioną dyskusję na temat roli RNA jako katalizatora oraz nośnika informacji genetycznej w procesach prebiotycznych na Ziemi (4). Stało się jasne, że procesy katalityczne w komórkach żywych nie są wyłącznie związane z białkami, jak powszechnie sądzono od momentu wyodrębnienia i zidentyfikowania pierwszych enzymów (5). W uznaniu wagi tego odkrycia Altman i Cech uhonorowani zostali w 1989 r. Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii (6).

Zjawisko autokatalizy zachodzące w różnych cząsteczkach RNA i prowadzące do rozerwania internukleotydu wiązania fosfodiesterowego jest rozpowszechnione w procesach transkrypcji oraz w posttranskrypcyjnych przemianach eukariotycznych RNA. Cząsteczki rybozymów, czyli kwasów rybonukleinowych o właściwościach katalitycznych różnią się rozmiarami i strukturą drugo- i trzeciorzędową. Najlepiej poznany i opisany przez Cecha intron (IVS pre-rRNA) z *Tetrahymena thermophila* zbudowany jest z ponad 400 nukleotydów, podczas gdy rybozomy typu *hammerhead* zawierają zwykle około 50 nukleotydów, natomiast najmniejsze wirusowe cząsteczki RNA pochodzenia roślinnego, wykazujące właściwości katalityczne, mają nieco ponad 10 par zasad.

W przeglądzie tym ograniczę się do omówienia reakcji rozerwania wiązania internukleotydu, katalizowanego rybozymami, zwracając szczególną uwagę na potencjalne zastosowania rybozymów jako sekwencyjnie specyficznych narzędzi kontroli ekspresji genów. Należy podkreślić, że rybozomy wykazują właściwości wielu różnych typów enzymów i oprócz rozerwania wiązania fosfodiesterowego w kwasach rybonukleinowych, będące efektem występujących po sobie procesów transestryfikacji lub hydrolizy, są w stanie katalizować inne reakcje, w tym także rozerwanie pojedynczego łańcucha DNA (IVS pre-rRNA z *Tetrahymena th.*) (7), hydrolizę wiązań aminoacylowych (funkcja este-

razy aminoacylowej] (8), tworzenie wiązań peptydowych (funkcja transferazy peptydylowej — *Escherichia coli*, *Thermus aq.*) (9) oraz tworzenia wiązań internukleotydowych, wykazując przy tym cechy polimerazy (10) i ligazy (11,12).

2. Przegląd różnych typów rybozymów

2.1. Rybonukleaza P

Historycznie pierwszym opisanym przykładem rybozymu jest komponenta rybonukleinowa (M1) rybonukleazy P (*E. coli*). Rybonukleaza P jest kompleksem białkowo-nukleinowym biorącym udział w hydrolizie dojrzałego 5'-końca cząsteczek tRNA. Proces zachodzący *in vivo* wymaga zarówno M1 RNA jak i komponenty białkowej (C5). Jednak M1 RNA jest w stanie katalizować proces dojrzewania prekursorów tRNA *in vitro* w roztworach o wysokim (60 mM) stężeniu soli magnezu. W tych samych warunkach C5 nie wykazuje właściwości katalitycznych (13,14). W tym procesie białko najprawdopodobniej odgrywa rolę strukturalną, zapewniając utworzenie odpowiedniej struktury trzeciorzędowej, niezbędnej do katalizy. Analogicznie zachowują się kwasy nukleinowe wchodzące w skład nukleaz P innych prokariotów, np. *Bacillus Subtilis* (15) i *Salmonella typhimurium* (16).

Jony magnezu (lub z mniejszą efektywnością jony manganu) biorą udział zarówno w procesie katalizy kwasowo-zasadowej, kompleksując z grupą hydroksylową i wodą, oraz uczestniczą w utworzeniu odpowiedniej struktury trzeciorzędowej, koniecznej do zbliżenia reagentów w centrum aktywnym (17).

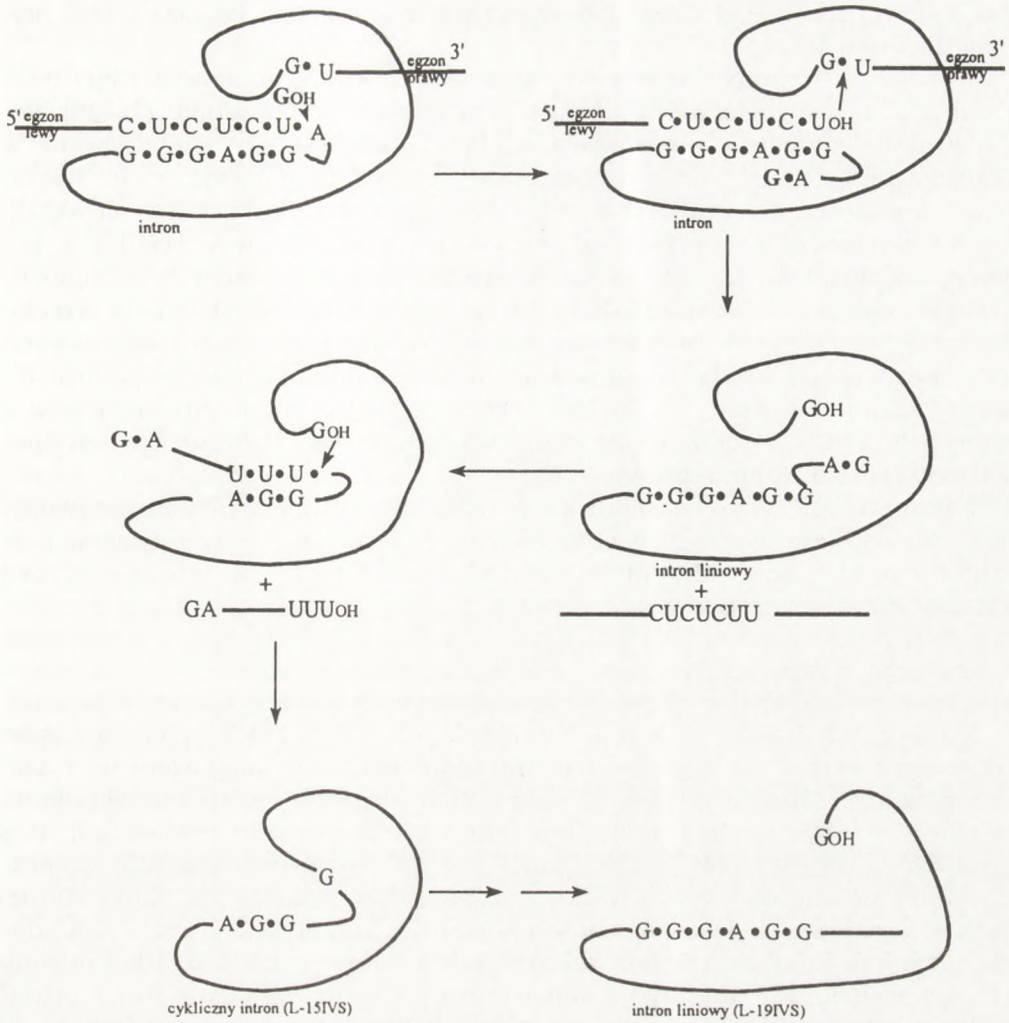
2.2. Autokatalityczne właściwości RNA

Geny eukariotyczne są rozdzielone fragmentami niekodującymi DNA (introny). W wyniku transkrypcji z udziałem polimeraz RNA powstają cząsteczki prekursorowych mRNA, zawierające sekwencje kodujące (egzony) oraz introny, które następnie są usuwane z pre-RNA w wyniku procesu dojrzewania (*splicing*). W wielu przypadkach reakcja dojrzewania jest procesem autokatalitycznym, a RNA w tym procesie wykazuje właściwości katalityczne kilku różnych enzymów m.in. nukleazy, enzymu restrykcyjnego, ligazy lub polimerazy.

2.3. *Tetrahymena* pre-rRNA

Badając proces dojrzewania pre-rRNA pierwotniaka *Tetrahymena th.*, Cech i współ. (18) stwierdzili, że intron (IVS) jest usuwany bez udziału enzymów białkowych. Proces ten przebiega jedynie w obecności jonów magnezu oraz guanozyny lub jej fosforanów (GTP, GDP, GMP), zgodnie z mechanizmem przedstawionym na rys. 1.

Kaskada reakcji jest zapoczątkowana atakiem grupy 3'-hydroksylowej guanozyny lub jej pochodnych na internukleotydowe wiązanie fosfodiesterowe

Rys. 1. Proces dojrzewania pre-rRNA z *Tetrahymena th.*

znajdujące się na 5' końcu intronu, w wyniku czego dochodzi do rozerwania tego wiązania z równoczesnym utworzeniem wiązania pomiędzy guanozyną i 3'-końcem intronu. W następnym etapie transestryfikacji, uwolniona grupa 3'-hydroksylowa znajdująca się na końcu lewego egzonu, atakuje 3' koniec intronu. Proces kończy się ligacją obu egzonów i utworzeniem dojrzałego RNA oraz intronu. Cyklizacja usuwanego intronu zachodzi również w wyniku transestryfikacji, w której grupa 3'-hydroksylowa, znajdująca się w pobliżu 3'-końca intronu atakuje wiązanie internukleotydowe w pobliżu 5'-końca, uwalniając pentaoktamer i tworząc cykliczny RNA (L-ISIVS), związany kowalencyjnie wiązaniem fosfodiesterowym (5' → 3') (19). Końcowym produktem

jest liniowy intron (L-19IVS), o długości pomniejszonej o 19 zasad oraz dojrzały łańcuch RNA.

Wykazano, że proces składania ulega zahamowaniu w podwyższonej temperaturze, w obecności czynników denaturujących i interkalujących (20). Połańdowanie i struktura trzeciorzędowa RNA, umożliwiające umieszczenie w bezpośrednim sąsiedztwie centrum reakcji substratu (G) związanego wiązaniami wodorowymi z centrum aktywnym, mają decydujący wpływ na katalityczną aktywność cząsteczki (21). Struktura ta tworzy się w rezultacie powstawania krótkich dwuniciowych odcinków komplementarnych z fragmentów jednoniciowego łańcucha. Stwierdzono, że stabilizacja struktury trzeciorzędowej następuje wskutek występowania dodatkowych wiązań wodorowych dalekiego zasięgu między zasadami azotowymi. Znajdująca się w pobliżu 5'-końca intronu sekwencja GGAGGG tworzy podwójną nić komplementarną z sekwencją CUCUCU, stanowiącą koniec egzonu lewego, definiując w ten sposób miejsce ataku guanozyny.

Kationy magnezowe biorą udział w reakcjach transestryfikacji aktywując centrum fosforowe poprzez zwiększenie jego elektrofilowości, wymuszając prawidłowe przestrzenne ułożenie reagentów i uczestnicząc w procesie ogólnej katalizy kwasowo-zasadowej.

2.4. Prekursory grupy I

Do tej grupy należy wiele mitochondrialnych mRNA i rRNA pierwotniaków (*Tetrahymena th. IVS rRNA*), bakterii, np. *Agrobacterium tumefaciens* (α) i *Azarcus sp.* (β) (22) oraz grzybów. Część z nich ulega procesowi autoskładania *in vitro*, np. IVS z cytochromu 6 pre-mRNA z *Neurospora crassa* (23), IVS pre-rRNA z drożdży (24), a także mRNA z *Podospora anseriba* (25). Charakteryzują się one podobną strukturą drugorzędową i zawierają około 10 nukleotydów istotnych do zachowania aktywności katalitycznej. Proces składania przebiega analogicznie jak w *Tetrahymena*. Jednak nie wszystkie introny grupy I ulegają autokatalitycznemu wycięciu *in vitro*. Wskazuje to na udział białek w wytworzeniu prawidłowej struktury trzeciorzędowej, niezbędnej do zaistnienia procesu autoskładania (26).

2.5. Prekursory grupy II

Do grupy tej zalicza się głównie introny mitochondrialnych RNA, które posiadają strukturę drugorzędową różną od intronów grupy I. Proces autokatalityczny przebiega bez udziału guanozyny lub innego zewnętrznego substratu nukleotydowego. Wymaga natomiast obecności spermidyny, która najprawdopodobniej pełni funkcję stabilizującą aktywną konformację RNA (27,28).

Intron usuwany jest w postaci lariaty, czyli rozgałęzionego RNA, w którym występuje dodatkowe wiązanie fosfodiesterowe (2' \rightarrow 5'). Nukleozydem znajdującym się w punkcie rozgałęzienia jest adenozyzna. Struktura lariaty jest analogiczna jak w przypadku jądrowego pre-mRNA (29). Mechanizm dojrzewania

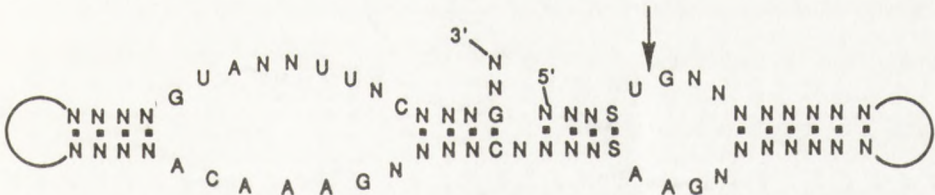
jest podobny do składania prekursorów grupy I. Nukleofilem w pierwszej reakcji transestryfikacji jest grupa 2'-hydroksylowa nukleotydu znajdującego się w łańcuchu (a nie guanozyna), natomiast drugi etap jest w pełni analogiczny dla prekursorów grupy I i II. Warunkiem koniecznym do zainicjowania procesu autokatalitycznego jest odpowiednia struktura przestrzenna pre-mRNA, umożliwiająca wystarczająco bliskie położenie grupy 2'-hydroksylowej nukleotydu tworzącego miejsce rozgałęzienia i końca 5'-eliminowanego lariaty. Prawidłowość rozpoznania 5'-końca zapewnia występowanie sekwencji GUGCG, znajdującej się bezpośrednio na 5'-końcu intronu (30).

2.6. Jądrowy pre-mRNA

Proces składania pre-mRNA, podobnie jak intronów grupy II, odbywa się z utworzeniem rozgałęzionej struktury –lariaty. Sekwencje istotne znajdują się na 5'-końcu, na 3'-końcu oraz w sąsiedztwie tworzącego się rozgałęzienia. Składanie wymaga jednak czynników zewnętrznych — IIsnRPNs — (małych jądrowych rybonukleoprotein) spełniających funkcje strukturalne i katalityczne. Zidentyfikowano szereg snRPNs o wysokim stopniu konserwatywności sekwencji RNA, które biorą udział w procesie składania jądrowego pre-mRNA, głównie w procesie rozpoznawania sekwencji uczestniczących w procesie katalizy (31). Przyjmuje się, że snRPNs wymagają obecności części białkowej i RNA do prawidłowego funkcjonowania, a zawarty w nich RNA nie wykazuje właściwości katalitycznych (32).

2.7. Rybozomy typu *hairpin* (szpilka do włosów)

Ujemna (-)nić RNA wirusa mozaiki tytoniowej (*Tobacco Ringspot Virus* — TRSV) zawiera fragment, który ma zdolność do autokatalitycznej hydrolizy oraz ligacji, podobną jak rybozomy typu *hammerhead*. W zasadniczy sposób różni się on sekwencją fragmentów istotnych, niezbędnych do zachowania właściwości katalitycznych oraz strukturą trzeciorzędową (33,34). W (-) TRSV RNA minimalna długość sekwencji katalitycznej wynosi 50 nukleotydów, natomiast substrat nie może być krótszy niż 14 nukleotydów (35). Substrat i część katalityczna tworzą strukturę składającą się z dwóch helikalnych



Rys. 2. Struktura drugorzędowa rybozomu typu *hairpin*. Strzałka wskazuje miejsce rozcięcia łańcucha RNA. N — oznacza nukleozydy nieistotne (dowolna zasada); S-C lub G.

czna składa się z 55 nukleotydów i jest w stanie w sposób efektywny ulegać autokatalitycznemu rozerwaniu łańcucha (*cis*-reakcja). Wyróżnić w niej można fragment o właściwościach enzymatycznych, zawierający większość sekwencji istotnych dla funkcji katalitycznej oraz część stanowiącą substrat dla reakcji enzymatycznej, w której występuje jedynie kilka istotnych zasad. Obie części oddziałują ze sobą w wyniku parowania się komplementarnych nukleotydów (N i N'), a całość składa się z trzech rejonów dwuniciowych oraz pętli jednoniciowej (rys. 3).

Helikalne odcinki dwuniciowe I – III tworzą się w wyniku oddziaływań nukleotydów N i N' (fragmenty nieistotne, oznaczające dowolne nukleotydy). Na rysunku zaznaczono również pojedynczą pętlę wewnętrzną utworzoną przez niesparowane nukleotydy i zawierającą sekwencje istotne dla aktywności katalitycznej (44,45). Wykorzystując techniki znakowania za pomocą ^{32}P oraz modyfikowane zasady (2'-deoksy-6-tioinozyna- $\text{I}_{(\text{S})}$), wykazano powstawanie wiązania pomiędzy $\text{I}_{(\text{S})}$ wbudowaną do trypletu rozpoznającego $\text{G}(\text{I}_{(\text{S})})\text{C}$ i jedną z urydyn znajdujących się w pętli, wskazujące na występowanie pofałdowań (struktury trzeciorzędowej) w rybozymach typu *hammerhead* (46).

Sekwencja istotna, określająca miejsce rozcięcia łańcucha RNA składa się z trypletu GUX (X=C,U lub A). Rozerwanie łańcucha następuje w pozycji 3'— w stosunku do GUX. W wyniku tej degradacji powstaje 5'-fragment zawierający 2',3'-cykliczny fosforan oraz 3'-fragment zawierający 5'-grupę hydroksylową.

Ze względu na stosunkowo niewielkie rozmiary (co stwarza możliwość syntezy oraz modyfikacji na drodze chemicznej) oraz wysoką specyficzność substratową (47 – 51), rybozomy typu *hammerhead* są najczęściej stosowane do badań zarówno mechanizmów reakcji jak i w celach aplikacyjnych. W licznych pracach wskazano na możliwość dalszego uproszczenia struktury i zmniejszenia liczby nukleotydów, przy równoczesnym zachowaniu wysokiej aktywności katalitycznej (52 – 57).

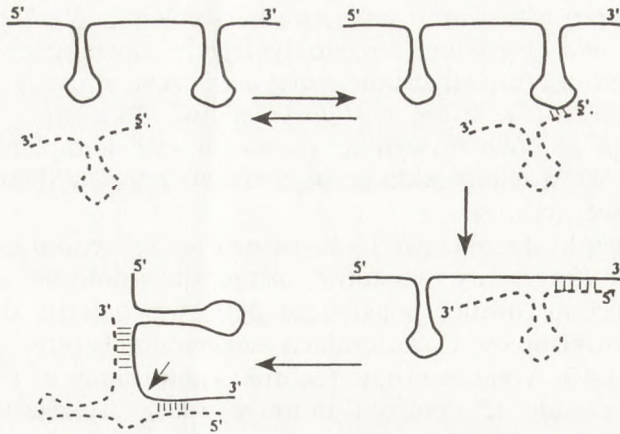
3. Wykorzystanie rybozymów do kontroli ekspresji genów

Stosowanie rybozymów jako sekwencyjnie zależnych terapeutyków, skutecznie blokujących ekspresję genów, wymaga m.in.:

- uzyskania cząsteczek wystarczająco trwałych w środowisku reakcji,
- wydajnego transportu rybozomu do sekwencji docelowej,
- selektywności w stosunku do wybranej sekwencji docelowej.

Model oddziaływania pomiędzy substratem (sekwencją docelową) i rybozymem przedstawiony jest na rys. 4.

Zgodnie z zaproponowanym przez Tomizawę modelem, pierwszy etap jest reakcją odwracalną i polega na utworzeniu kompleksu komplementarnego pomiędzy nukleotydami sekwencji docelowej i fragmentem rybozomu. W rezultacie zmian konformacyjnych obu reagentów, w etapie drugim następuje tworzenie dalszych struktur dwuniciowych i degradacja substratu w pozycji 5' do sekwencji rozpoznającej GUX.



Rys. 4. Model oddziaływań antysensowych pomiędzy rybozymbem (linia przerywana) i sekwencją docelową (linia ciągła).

4. Modyfikacje chemiczne rybozymbów

W komórce łańcuch RNA narażony jest na działanie licznych enzymów hydrolitycznych. *In vivo* trwałość łańcucha RNA zwiększona jest dzięki występowaniu specjalnych sekwencji flankujących (na 5' i 3'-końcu), które w reakcjach katalitycznych nie oddziałują z substratem. Jednak zbyt rozbudowana struktura drugorzędowa sekwencji flankujących (zwiększanie liczby N i N') może spowodować spadek aktywności katalitycznej. Modyfikacje wprowadzane do łańcucha RNA na drodze syntezy chemicznej mają na celu zwiększenie odporności na działanie enzymów nukleolitycznych oraz pozwalają wyjaśnić rolę poszczególnych zasad w procesie katalizy oraz w tworzeniu struktur wyższego rzędu, odpowiedzialnych za aktywność katalityczną. Wprowadzanie reszt deoksyrybonukleinowych (chimery RNA/DNA) do sekwencji istotnych w procesie katalitycznym (centrum aktywne) powoduje obniżenie aktywności w porównaniu z naturalnymi rybozymbami o tej samej sekwencji, co wskazuje na istotną rolę grup 2'-hydroksylowych w tej reakcji (59). Zamiana rybonukleotydów na deoksyrybonukleotydy powoduje zmiany konformacyjne w obszarze niesparowanych fragmentów cząsteczek. Wykazano, że przejście od β -struktury helisy w przypadku RNA do α -struktury, gdy modyfikacja obejmowała wymianę RNA na DNA poza centrum aktywnym, nie powodowało widocznej zmiany aktywności katalitycznej (60,61).

Wprowadzenie tiofosforanów (czyli zastąpienie siarką jednego z niemoistkowych atomów tlenu wiązania internukleotydu) do regionu zawierającego sekwencje istotne centralnej pętli jednoniciowej pozwoliło na otrzymanie rybozymbów odpornych na działanie endonukleaz (62,63), które ponadto charakteryzowały się stosunkowo wysoką aktywnością katalityczną. Rybozymb

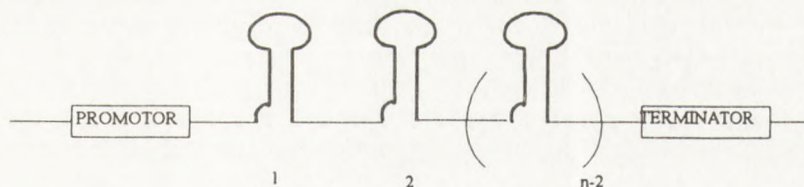
(antiHIV), modyfikowane za pomocą tiofosforanów w obszarach nieistotnych katalitycznie wykazały siedmiokrotnie wyższą aktywność niż analogiczne 32-mery RNA ($K_{\text{kat}} = 27 \text{ min}^{-1}$) oraz ponad 10 razy wyższą trwałość nukleolityczną w serum ludzkim (64). Te obiecujące rezultaty wskazują na celowość i możliwość wykorzystania struktur chimerycznych zachowujących właściwości katalityczne.

Zastosowanie tiofosforanów wiąże się z wprowadzeniem centrum chiralnego na atomie fosforu w modyfikowanej cząsteczce. Można sądzić, że izomery R_p i S_p różnią się właściwościami i w konsekwencji rybozomy zawierające modyfikacje w postaci stereoregularnych „all R_p ” lub „all S_p ” tiofosforanów mogą również wykazywać zróżnicowaną aktywność katalityczną (65).

5. Synteza rybozymów *in vivo*

Wiele wirusów (np. HIV-1), które cechują się wysoką częstotliwością mutacji, stanowi trudny cel terapii genowych (antysensowych, rybozomy) ze względu na duże prawdopodobieństwo szybkich zmian w genomie i łatwość wytwarzania mutantów odpornych na stosowany terapeutyk (66). Jednym z zaproponowanych rozwiązań jest generowanie rybozymów *in vivo*, w wyniku ekspresji z wykorzystaniem matrycy DNA. Strategię taką wykorzystano m.in. do badań inhibicji wirusa HIV-1 *in vitro* oraz w komórkach ludzkich (HeLa CD⁺). W wyniku ekspresji rybozymu o sekwencji docelowej przeciw HIV-1 *gag*RNA, nastąpił w komórkach zainfekowanych HIV-1 wyraźny spadek poziomu antygeny p24, kodowanego przez region *gag*RNA (67). Systemem transkrypcyjnym najczęściej wykorzystanym w tych eksperymentach był sDNA wirusa mozaiki tytoniowej (STobRV), zligowany na 3'-końcu wirusa mozaiki stołklosy (BMV) (68).

Opracowano szereg systemów transkrypcyjnych umożliwiających syntezę rybozymów *in vivo* (69,70). Wykorzystanie transkrypcji przebiegającej zgodnie z mechanizmem obracającego się koła (*rolling circle*) replikacji wirusów pozwoliło na wprowadzenie do kolistego templaty DNA genu szeregu rybozymów (rys. 5), które zostały wbudowane pomiędzy promotorem i terminatorem (71).



Rys. 5. Układ n rybozymów wbudowany do systemu ekspresji pomiędzy promotorem i sekwencją terminalną.

6. Wybór sekwencji docelowej

W próbach wykorzystania rybozymów jednym z najistotniejszych problemów jest, podobnie jak w technologii antysensowej, wybór odpowiedniej sekwencji docelowej. Jeśli jest ona zbyt krótka, wówczas rybozym może atakować również inny RNA i traci swą sekwencyjną specyficzność. W przypadku zbyt długiej sekwencji, uwolnienie produktu degradacji następuje wolno i w związku z tym katalityczna efektywność rybozymu jest niska. Powodem obniżenia specyficzności rybozymu może być również utworzenie trwałych dupleksów (lub struktur wyższego rzędu) z komplementarnymi fragmentami sekwencji innej niż docelowa (72). Wyników uzyskanych *in vitro* nie daje się w bezpośredni sposób wykorzystać w próbach *in vivo*, ze względu na występującą w komórkach złożoność oddziaływań pomiędzy oligonukleotydami i białkami. Stwierdzono np., że krótkie transkrypty RNA, zawierające sekwencje rybozymowe, nie wykazywały właściwości katalitycznych przeciw genom CAT mRNA w komórkach małych COSI, prawdopodobnie z powodu szybkiej degradacji nukleolitycznej. Natomiast uzyskane w wyniku ekspresji w 3' regionie genu lucyferazy mRNA okazały się aktywnymi inhibitorami (73).

Badania nad optymalną wielkością rybozymów *in vivo* są dopiero w stadium początkowym i pomocne tu są doświadczenia uzyskane w strategii antysensowej. Można przypuszczać, że substraty o długości 12 – 20 nukleotydów stanowią optimum sekwencji docelowych w komórkach ludzkich (74). Ostatnio opublikowane wyniki potwierdziły takie założenie. Optymalny stosunek k_{kat}/K_M (37°C) *in vitro* uzyskano, gdy długość dupleksu substrat/rybozym wyniosła 12 nukleotydów, natomiast wydłużenie dupleksu do 17 par zasad zmniejszyło wydatnie aktywność rybozymu, prawdopodobnie z powodu zbyt wolnej dysocjacji rybozymu po reakcji (75).

Trwałość RNA w komórce i odporność na działanie nukleaz jest wynikiem oddziaływania z białkami, które ochraniając cząsteczkę kwasu RNA mogą powodować *in vivo* ograniczoną dostępność do sekwencji docelowej (73,75). Rybozym w komórce współzawodniczy w procesie kompleksowania z sekwencją docelową z innymi składnikami komórki i to powoduje, że *in vivo* stężenia rybozymu konieczne do efektywnej inhibicji ekspresji genów są stosunkowo wysokie (76). Otrzymane w wyniku transkrypcji *in vitro* rybozomy, zaprojektowane przeciwko RNA czynnika martwicy komórkowej (TNF- α), okazały się aktywne zarówno *in vitro* i *in vivo*, chociaż ich aktywność *in vivo* była osłabiona obecnością terminatora transkrypcji T7 na 3'-końcu rybozymu (77). Terminator transkrypcji T7 zawierał również rybozym przeciw fragmentowi kodującemu integrzę HIV-1 w *E. coli* (78).

7. Porównanie rybozymów i innych sekwencyjnie zależnych inhibitorów ekspresji genów

Wykorzystanie katalitycznych właściwości RNA w połączeniu z identyfikacją na drodze oddziaływań komplementarnych sekwencji docelowych może stanowić bardzo efektywny system kontroli ekspresji genów *in vivo*. Opisano szereg przypadków, w których aktywność rybozymu wielokrotnie przewyższała aktywność antysensową (79).

Odwracalność procesu wiązania rybozymu z substratem powinna pozwolić na znaczne obniżenie ilości RNA koniecznej do pożądanego efektu inhibicji. Dotychczasowe rezultaty wskazują jednak na złożoność oddziaływań rybozymu z innymi składnikami komórki i konieczność bardzo precyzyjnego doboru sekwencji docelowych, aby można uzyskać wysoką aktywność katalityczną (80,81). Prowadzone bardzo intensywnie badania nad poznaniem natury oddziaływań katalitycznych i wyselekcjonowaniem najistotniejszych czynników decydujących o aktywności katalitycznej *cis* i *trans* pozwalają mieć nadzieję na wykorzystanie rybozymów w niedalekiej już przyszłości (82,83).

Literatura

1. Altman S., (1989), *Adv. Enzymol.*, 62, 1.
2. Cech T.R., (1989), *Biochem. Int.*, 18, 7.
3. Symmons R.H., (1989), *Trends Biochem. Sci.*, 14, 445.
4. Orgel L.E., (1986), *J. Theor. Biol.*, 123, 127.
5. Pierwszym wyodrębnionym i oczyszczonym enzymem była ureaza otrzymana przez J.B. Sumnera w 1926 r.
6. Cech T.R., (1990), *Angew. Chem. Int. Ed.*, 29, 796.
7. Robertson D.L., Joyce G.F., (1990), *Science*, 399, 405.
8. Piccirilli J.A., McConnell T.S., Zaug A.J., Noller H.F., Cech T.R., (1992), *Science*, 256, 1420.
9. Noller H.F., Hoffarth V., Zimniak L., (1992), *Science*, 256, 1416.
10. Been M.D., Cech T.R., (1988), *Science*, 239, 1412.
11. Zaug A.J., Cech T.R., (1986), *Science*, 231, 470.
12. Komatsu Y., Koizumi M., Sekiguchi A., Ohtsuka E., (1993), *Nucl. Acids. Res.*, 21, 185.
13. Guerrier-Takada C., Gardiner K., Mrsh T., Pace N., Altman S., (1983), *Cell*, 35, 849.
14. Guerrier-Takada C., Altman S., (1984), *Science*, 223, 285.
15. Gardiner K.J., Marsh T.L., Pace N. R., (1985), *J. Biol. Chem.*, 260, 5415.
16. Baer M., Altman S., (1985), *Science*, 228, 999.
17. Guerrier-Takada C., Haydock K., Allen L., Altman S., (1986), *Biochemistry*, 25, 1509.
18. Cech T.R., (1990), *Annun. Rev. Biochem.*, 59, 543.
19. Zaug A.J., Grabowski P.J., Cech T.R., (1983), *Nature*, 301, 578.
20. Tanner N.K., Cech T.R., (1985), *Nucl. Acids Res.*, 13, 7741.
21. Pyle A.M., Murhpy F.L., Cech T.R., (1992), *Nature*, 358, 123.
22. Reinhold-Hurek B., Shub D.A., (1992), *Nature*, 357, 173.
23. Garriga G., Lambonitz A.M., (1984), *Cell*, 39, 631.

24. Van der Horst G., Tabak H.F., (1985), Cell, 40, 759.
25. Michel F., Cummings D.J., (1985), Curr. Genet., 10, 69.
26. Cech T.R., Tanner N.K., Tinoco J.Jr., Weir B.R., Zuker M., Perlman P.S., (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 3903.
27. Peebles C.L., Mecklenburg K.L., Perlman P.S., Tabor J., Cheng H.L., (1986), Cell, 44, 213.
28. Van der Veen R., Arnberg A.C., Van der Horst G., Bonen L., Tabak H.F., Grivek L.A., (1986), Cell, 44, 225.
29. Bass B.B., Cech T.R., (1984), Nature, 308, 820.
30. Cech T.R., (1986), Cell, 44, 207.
31. Argetsinger Steitz J., (1988), Scientific American, 258, 36.
32. Cech T.R., Bass B.L., (1986), Ann. Rev. Biochem., 55, 599.
33. Komatsu Y., Moizumi M., Sehiguchi A., Ohtsuka E., (1993), Nucleic Acids Res., 21, 185.
34. Anderson P., Monforte J., Tritz R., Nesbitt S., Hearst J., Hampel A., (1994), Nucleic Acids Res., 22, 1096.
35. Hampel A., Tritz R., (1983), Biochemistry, 28, 4929.
36. Hampel A., Tritz R., Hicks M., Gruz P., (1990), Nucleic Acids Res., 18, 299.
37. Anderson P., Monforte J., Tritz R., Nesbitt S., Hearst J., Hampel A., (1994), Nucleic Acids Res., 22, 1096.
38. Wu H.N., Lin Y.J., Lin F.P., Makino S., Chang M.F., Lai M.M., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1831.
39. Wu H.N., Lai M.M., (1989), Science, 243, 652.
40. Thill G., Blumenfeld M., Lescure F., Vasseur M., (1991), Nucl. Acids Res., 23, 6519.
41. Perrotta A.T., Been M.D., (1991), Nature, 350, 434.
42. Rosenstein S.P., Been M.D., (1991), Nucl. Acids Res., 19, 5409.
43. Perrotta A.T., Been M.D., (1992), 31, 16.
44. Hasetoff J., Gerlach W., (1988), Nature, 334, 585.
45. Ruftner D.E., Stormo G.D., Uhlenbeck O.C., (1990), Biochemistry, 29, 10695.
46. Woisard A., Favre A., Ceivio P., Fourrey J.-C., (1992), J. Am. Chem. Soc., 114, 10072.
47. Forster A.C., Symons R.H., (1987), Cell, 50, 9.
48. Uhlenbeck O.C., (1987), Nature, 328, 596.
49. Koizumi M., Iwai S., Ohtsuka E., (1988), FEBS Lett., 228, 228.
50. Fedor M., Uhlenbeck O.C., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1668.
51. Taira K., Nishikawa S., (1992), in: *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA*, Eds. Erickson R.P., Izant J., Raven Book, Nowy Jork.
52. Cotten M., Birnstiel M.L., (1989), EMBO J., 8, 3861.
53. Cameron F.H., Jennings P.A., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9139.
54. Saxena S.K., Ackerman E.J., (1990), J. Biol. Chem., 265, 17106.
55. Perriman R., Delves A., Gerlach W.L., (1992), Gene, 113, 157.
56. Xing Z., Whitton J.L., (1992), J. Virol., 66, 361.
57. McCall M.J., Hendry P., Jennings P.A., (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5710.
58. Tomizawa J., (1984), Cell, 40, 527.
59. Rossi J.J., Elkins D., Taylor N., Zaia J., Sullivan S., Deshler J.O., (1991), *Antisense Res. and Devel.*, 1, 285.
60. Nishikawa S., et al., (1991), in: *Fundamental Investigations on the Creation of Bifunctional Materials*, Eds. Okamura S., et al., Kogaku-doijn, Kyoto, 109.
61. Yang J.H., Perrelault J.P., Labuda D., Usman N., Cedergren R., (1990), *Biochemistry*, 29, 11156.
62. Pieken W.A., Olsen D.B., Benseler F., Aurup H., Eckstein F., (1991), *Science*, 253, 314.
63. Williams D.M., Pieken W.A., Eckstein F., (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 918.

64. Shimayawa T., Nishikawa F., Nishikawa S., Taira K., (1993), Nucl. Acids Res., 21, 2605.
65. Stec W.J., Grajkowski A., Koziolkiewicz M., Uznański B., (1991), Nucl. Acids Res., 19, 5883.
66. Dropulic B., Liu N.H., Martin M.A., Jeang K.T., (1992), J. Virol., 66, 1432.
67. Sarver N., Cantin E.M., Chang P.S., Zaia J.A., Ladne P.A., Stephens D.A., Rossi J.J., (1990), Science, 242, 1222.
68. Drianott A.M., Bujarski J.J., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 4823.
69. Cotten M., Birnstiel M.L., (1989), EMBO J., 8, 3861.
70. Taira K., Oda M., Shinshi H., Maeda H., Furukawa K., (1990), Protein Engineering, 733.
71. Taira K., Nakagawa K., Nishikawa S., Furukawa K., (1991), Nucl. Acids Res., 19, 5125.
72. Herschlag D., (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 6921.
73. Cameron F.H., Jennings P.A., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9139.
74. Sarin P.S., Sun D., Zamechnik P.C., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5507.
75. Bertrand E., Pictet R., Grange T., (1994), Nucl. Acids Res., 22, 293.
76. Chuat J.C., Galibert F., (1990), Biochem. Biophys. Res., 162, 1025.
77. Sioud M., Natvig J.B., Fore O., (1992), J. Mol. Biol., 223, 831.
78. Sioud M., Drlica K., (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 7303.
79. Steinecke P., Herget T., Schreirer P.H., (1992), EMBO J., 11, 1525.
80. Saxena S.K., Ackerman E.J., (1991), J. Biol. Chem., 265, 17106.
81. Paolella G., Sproat B.S., Lamond A.I., (1992), EMBO J., 11, 1913.
82. Pachuk C.J., Yoon K., Moelling K., Conney L.R., (1994), Nucl. Acids Res., 22, 301.
83. Pan T., Uhlenbeck O.C., (1992), Biochemistry, 31, 3887.

Ribozymes — tools for inhibition of gene expression

Summary

Catalytic properties of RNA are presented. Their potential use as gene expression inhibitors is discussed.

Key words:

catalytic RNA, ribozymes.

Adres dla korespondencji:

Lucyna A. Woźniak, Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź.