

СВОЙСТВА РИБОЗИМА ИЗ *TETRAHYMENA THERMOPHILA*

В статье собраны данные о структуре самосплайсирующегося интрона *Tetrahymena thermophila*, описаны его известные свойства и приведены примеры использования его как в модифицированном, так и в «диком» варианте в качестве рибозима.

Введение. Рибозимы — РНК-молекулы, содержащие каталитический кор, а также расщепляющие и лигирующие РНК-субстрат. Рибозимы могут достигать уровней нормы усиления и специфичности протеиновых энзимов. Некоторые протеиновые энзимы используют кофакторы, в том числе ионы металлов, для улучшения химических реакций. Рибозимы обычно требуют дивалентных катионов для своей активности.

Открытие каталитических РНК вызвало интерес к использованию РНК-энзимов, или «рибозимов», для избирательной деградации специфических РНК-молекул *in vivo* [1—3]. Избирательное разрушение вирусной или клеточной мРНК для устранения патогенных белков имеет потенциальное терапевтическое значение. Избирательность также перспективна для распознавания функции гена, аналогично использованном для этой цели антисенсам [4]. Первый идентифицированный рибозим является самосплайсирующимся интроном большой субъединицы рибосомной РНК реснитчатой простейшей *Tetrahymena thermophila* [5]. Эта РНК является членом филогенетически многообразной семьи интронов, отнесенной к группе I, которая в настоящее время состоит из более чем 100 сиквенированных представителей [6, 7]. Цель обзора — осветить большое количество данных, имеющихся на сегодня, о рибозиме *Tetrahymena*.

Структура. Предшественник большой рибосомной РНК *T. thermophila* содержит 413 нуклеотидов внедряющейся последовательности (IVS), которая может точно сплайсировать себя из фланкирующих экзонов *in vitro* [8]. Форма рибозима *L-21 Sca 1* является укороченной версией *Tetrahymena IVS* РНК с недостающими 21 нуклеотидом на 5'-конце и одним нуклеотидом на 3'-конце, которую использовали в ряде экспериментов. Рибозим *Tetrahymena* отнесен к группе I интронов на основании наличия нескольких коротких высококонсервативных элементов последовательности, определяющих характерные свойства вторичной структуры [9, 10]. Имеется набор 9 спаренных регионов, называемых P1-P9 и являющихся общими для группы I интронов, и ряд других по-разному представленных спаренных регионов.

P1 — первая петля ствола интрона, содержащая 5'-экзон-интрон-границу и внутреннюю направляющую последовательность (IGS), которая представлена гексануклеотидом (GGAGGG). IGS выравнивает 5'-сплайс-сайт для точного сплайсинга и комплементарного связывания с субстратом [18]. Эта последовательность недоступна для расщепления, что свидетельствует о ее расположении в пределах каталитического кора рибозима. Мутации в GGAGGG-последовательности приводят или к снижению сплайсинг-активности, или к изменению специфичности. Филогенетический анализ и сайт-направленный мутагенез подтверждают тот факт, что спаренные регионы P1, P3, P4, P6, P7 и P8 формируют каталитический кор энзима [10, 11] (рис. 1). На основе данных

по расщеплению посредством Fe (II)-EDTA предположено, что регион, соединяющий P4 и P5, не лежит в пределах каталитического кора рибозима [12]. Структурные элементы P2, P2,1 и P9, P9,1; P9,2; P9,2a; могут быть делетированы ювелирным образом без снижения каталитической активности [22]. В результате комбинирования результатов множества делеционных анализов была получена упрощенная вторичная

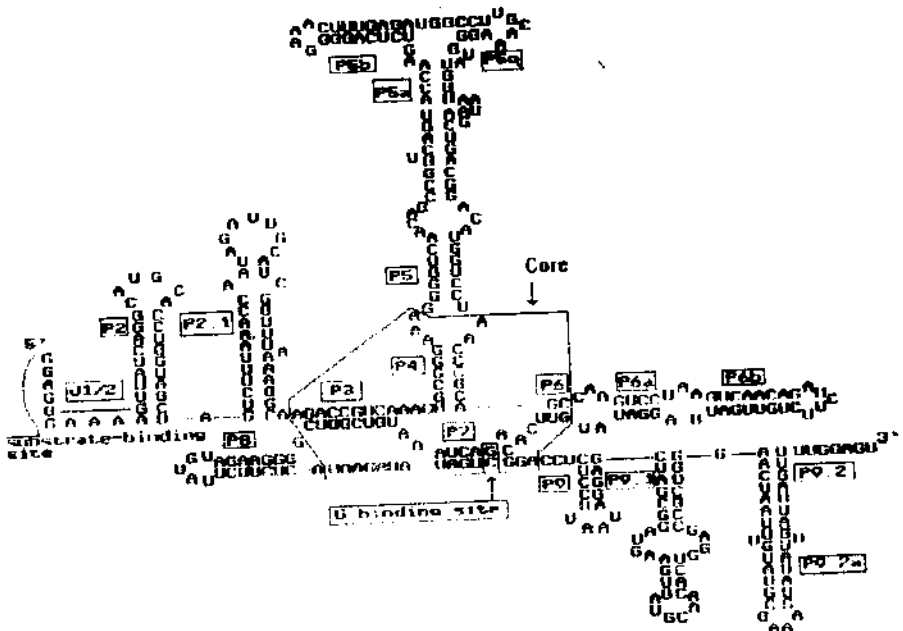
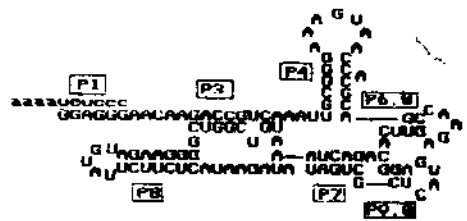


Рис. 1. Структура рибозима из *Tetrahymena (L-21 Sca 1)*. Каталитический кор рибозима содержит G-связывающий сайт в P7-дуплексе

структура — модель минимального рибозима *Tetrahymena* (рис. 2). Она представляет собой семь основных дуплексов и нуждается в присутствии 3'-терминального гуанозина и олигопиримидинового субстрата в непосредственной близости от активного сайта молекулы. Кроме того, кор может быть расчленен за счет отделения элементов P4 и P6,0 от P3, P7, P8 и P9,0, как предложено на рис. 3.

Рис. 2. Вторичная структура минимального рибозима из *Tetrahymena*. Олигопиримидиновый субстрат (показан строчными буквами) связан с пуринами, расположенными на 5'-конце молекулы



Цепь J1/2 (—ААА—), соединяющая спаренные области P1 и P2, усиливает связывание субстрата в оптимальном положении с 2'-ОН-группами по отношению к третичным контактам и каталитическому аппарату [13]. Небольшие изменения в длине J1/2-области обуславливают существенное увеличение степени лабильности и специфичности, и из-за этого «корректирования» ограничиваются ферментативные функции интрона (рис. 4). Как показано на рис. 4, k_{ca} (степень лабильности) возрастает пропорционально k^p_d (константа диссоциации продукта) при введении мутаций +2A и -2A; наклон линии равен единице в пределах экспериментальной ошибки.

Мишель и соавт. [14] последовательно локализовали G-сайт в пределах каталитического кора в дуплексе P7. Они доказали наличие H-связи между N₁ — H G-нуклеофила и кето-кислородом G₂₆₄, что объяснило модель, в которой свободный G участвовал в образовании три-

плета со спаренными G₂₆₄ — C₃₁₁ основаниями. Авторы работы [15] доказали контакт G-нуклеофила с A₂₆₅, сравнивая активности мутантных рибозимов с различными нуклеозидными субстратами, в которых Н-связи доноров и акцепторов были направленными (рис. 5). Ярис и соавт. [16] сообщили, что основание 265 «налегает» на нуклеозидный субстрат и может поэтому «прикрывать» нуклеотид-связывающий блок.

Имеется доказательство того, что достигнута стабилизация переходного состояния с помощью рибозима в отсутствие гуанозина [17].
Механизм самосплайсинга. С некоторого времени

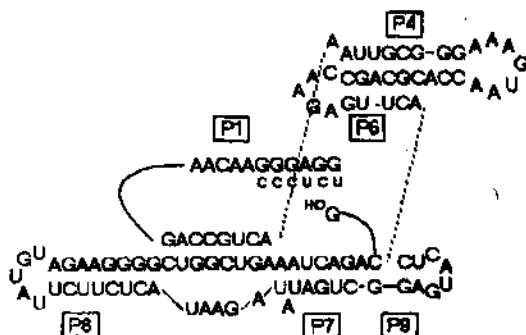
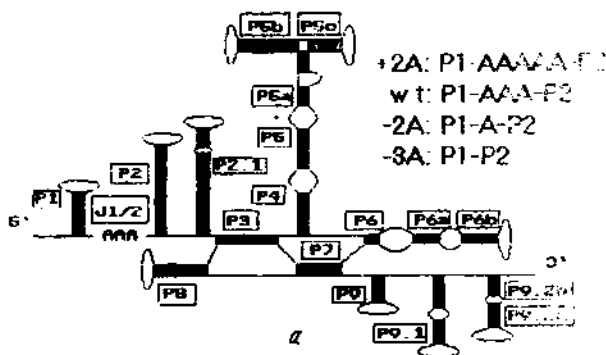


Рис. 3. Модель минимального каталитического ядра рибозима из *Tetrahymena*. Олигопиримидиновый субстрат показан строчными буквами

стал известен механизм, посредством которого интрон самосплайсируется (рис. 6). Гуанозин или одна из его 5'-фосфорилированных форм (G) взаимодействует с гуанозин-связывающим сайтом с помощью «сложенной» РНК интрона. 3'-гидроксил гуанозина расщепляет 5'-сплайс-



+2A: P1-AA-AA-P2
 wt: P1-AA-P2
 -2A: P1-A-P2
 -3A: P1-P2

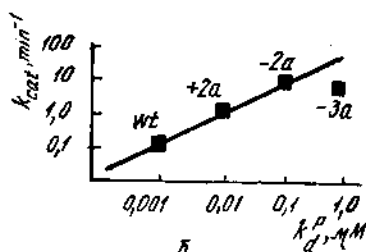


Рис. 4. Мутации в области J1/2: а — сайт-специфический мутагенез области J1/2, соединяющей 5'-эксон-интронный сайт, продуцирует рибозимы +2А, -2А; б — отношение между k_{cat} и K_d для «дикого» типа и мутантных рибозимов

сайт, перенося диэфирные связи, что приводит к связыванию G с 5'-концом интрона за счет нормальной 3',5'-фосфодиэстеразной связи. Расщепленный 5'-конец сохраняет связь с интроном из-за нековалентных взаимодействий, включая спаривание с IGS интрона. В этой точке в результате конформационных изменений поставляется новый гуанозин, который непосредственно предшествует 3'-сплайс-сайту, внутри G-сайта [6, 8, 14]. 3'-гидроксил-группа 5'-эксона затем «атакует» атом фосфора в 3'-сплайс-сайте. Эта вторая реакция трансэтерификации, являющаяся обратным аналогом первого шага, приводит к выщеплению интрона и ковалентному лигированию экзонов (см. рис. 6). Выщеплен-

ная IVS может подвергаться серии реакций циклизации с освобождением 15—19 нуклеотидов с 5'-конца экзона в зависимости от условий реакции [25]. Кольцевание осуществляется при шпильчатой структуре, образованной между 5'-концом интрона и IGS [26]. Интронный кор, узнавая эту структуру, производит атаку с помощью 3'-концевого гуанозина интрона другой фосфодиэстеразной связи. В процессе кольце-

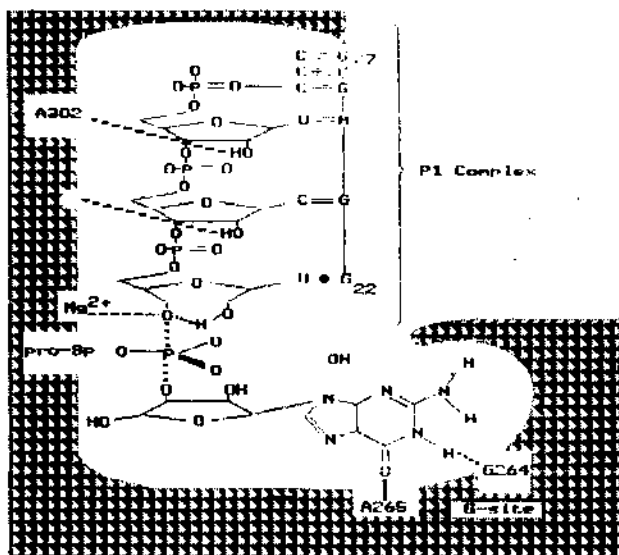


Рис. 5. Взаимодействие рибозима с субстратом в переходном состоянии. Трехмерная структура рибозима представлена заштрихованной областью. Связь P=O, обозначенная жирной линией, частично сформирована и частично оборвана в переходном состоянии

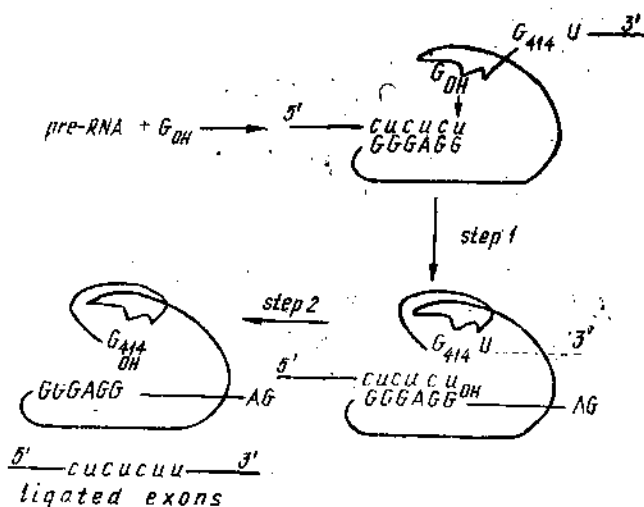


Рис. 6. Самосплайсинг интрона из *Tetrahymena*

вания может происходить рециклизация за счет сайт-специфического гидролиза [28, 29], и в результате линейные РНК-молекулы способны к рекольцеванию в других сайтах.

Ферментативные свойства рибозима *T. thermophila*. Самосплайсируемый интрон *Tetrahymena* представляет интерес благодаря тому, что он катализирует различные реакции по фосфоэфирному переносу. Сечем и соавт. в серии экспериментов продемонстрированы свойства рибозима, сходные со свойствами таких ферментов, как рибонуклеаза, фосфотрансфераза, кислая фосфатаза и РНК-рестриктаза [7, 19].

Фермент, способный катализировать фосфотрансферазные реакции на РНК-субстратах, является потенциальной РНК-лигазой. Интрон катализирует ограниченное лигирование коротких РНК праймеров, связанных с последовательностью в пределах интрона. Праймеры могут иметь длину ~15 нуклеотидов. Даун установил, что модифицированная

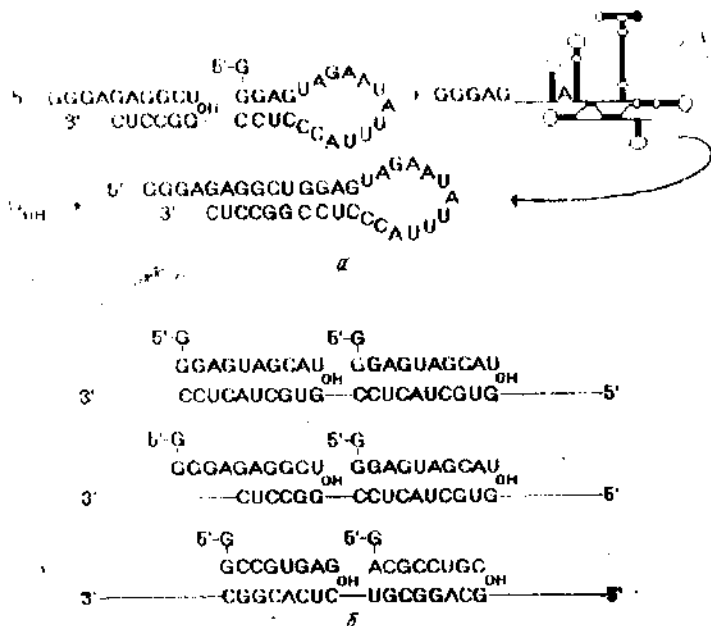
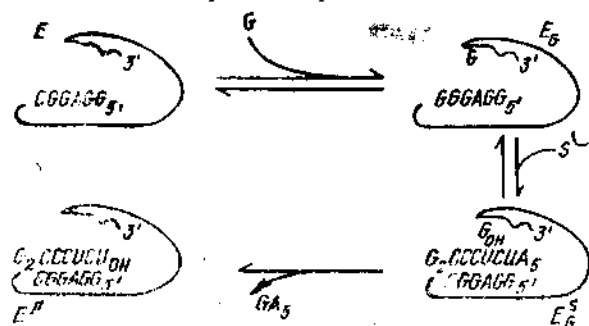


Рис. 7. Направленное лигирование олигонуклеотидов: а — регенерация независимой шпильки P1 посредством модифицированного интрона из *Tetrahymena*; б — субстраты для трех различных вариантов лигирования олигонуклеотидов

версия рибозима может катализировать эффективную регенерацию расщепленной шпильки P1 с освобождением гуанозина (рис. 7, а). Было показано, что в различных системах только определенные комбинации некомплементарных пар U-C и C-A позволяют производить эффективное лигирование. Одним из условий тестирования было присутствие в реакции 5 мМ спермидина. Это привело к эффектив-



но из условий тестирования было присутствие в реакции 5 мМ спермидина. Это привело к эффектив-

Рис. 8. Эндонуклеазная реакция рибозима (E). G — гуанозин; S — олигонуклеотидный субстрат; P — продукт расщепления, включающий 5'-нуклеотиды до сайта реакции

ному лигированию многочисленных субстратов с комплементарными и некомплементарными парами в сайте лигирования (рис. 7, б).

Укороченные формы интронов 1-й группы катализируют расщепление или лигирование экзогенных РНК- или ДНК-субстратов с максимальной скоростью [7, 19, 20, 21] (рис. 8). Расщепление может осуществляться посредством трансэстерификации с использованием G в качестве нуклеофила или гидролизом с помощью H₂O или OH⁻, с перемещением G как нуклеофила. Самосплайсирующие интроны группы 1 могут воздействовать на экзон-интронную связь без узнающей последовательности [23]. Это предположение подтверждает реакция по трансплайсингу, проведенная между субстратом (содержащим две шпильки P1, P2 и часть P2,1) и интроном, у которого на 5'-конце отсутствовали первые две шпильки (рис. 9).

Благодаря тому, что рибозим *T. thermophila* содержит каталитический кор, реагирующий с фосфатными группами, было предположено, что этот кор может включать подходящий набор каталитических групп для возможной аналогичной реакции при карбоновом центре. Писсирилли [30] проверил способность интрона к каталитической реакции с аминокислотными эфирами. В реакции с фосфатными эфирами нуклеофил атакует фосфатный атом «в линию» (рис. 10, а), параллельную лабильной связи фосфор — кислород. Карбоксилированные эфиры подвергаются видоизмененной нуклеофильной атаке. Первый шаг сопровождается соединением нуклеофила с двойной

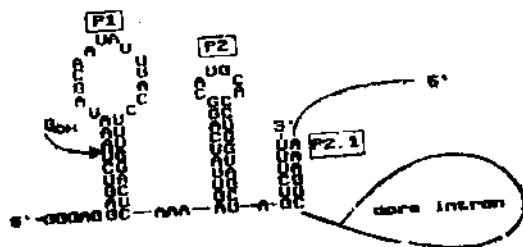


Рис. 9. Реакция транссплайсинга. Субстрат содержит две шпильки P1 и P2, а также часть шпильки P2.1. Интронный кор простирается от 3'-конца P2.1 дуплекса через P7

связью $C=O$ посредством ортогональной атаки, дающей четвертичный интермедиат (рис. 10, б). Второй шаг характеризуется исключением отсеченной группы.

Специфичность. Специфичность рибозима *Tetrahymena* может изменяться в ограниченной области. «Дикий» тип рибозима разрезает длинные РНК-молекулы после тетрауклеотидного консенсуса CUCU,

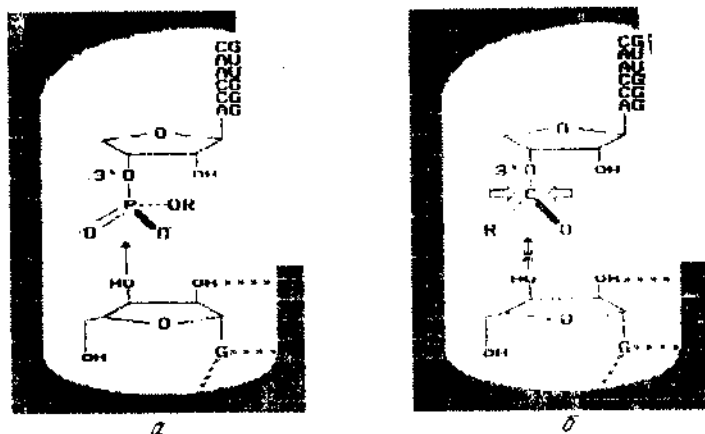


Рис. 10. Выравнивание субстрата и гуанозина на рибозиме: а — в эндонуклеазной реакции; б — в эстеразной реакции. Тонкой стрелкой (а) представлен наиболее выгодный путь для нуклеофила в линию с 3'-кислородо-фосфатной связью. Для карбоксилированных эфиров [6] наиболее подходящее направление нуклеофильной атаки ортогональное (показано широкой стрелкой)

не требуя 3'-последовательности для расщепления сайта. Варианты рибозима *Tetrahymena*, содержащие замсны в IGS в позициях 23, 24, 25, расщепляют соответствующие им субстраты. Для эффективной специфичности сплайсинга РНК должна принимать такую вторичную структуру, как у P1-региона, иная вторичная структура вызывает расщепление в некорректном сайте [24]; рибозим способен катализировать реакцию трансэстерификации в пределах «окна» трех спаренных оснований стержня P1, сайт расщепления избирается узнаванием некомплементарной пары (U·G или C·A) в пределах «окна». Норма расщепления зависит от модифицированного способа спаривания возле реактивного фосфата. Некомплементарные пары, образуя дуплекс, располагаются иначе в большой и малой бороздах, но не нарушают геометрии (рис. 11). Чувствительное к расщеплению «окно» в P1 может быть определено изменением расположения стержня P1 относительно актив-

ного сайта рибозима. Вероятно, что основание Р1-стержня взаимодействует с частью рибозима и свободно фиксируется по отношению к активному сайту. Некомплементарные пары в позициях 4, 5, 6 от основания стержня могут быть одинаково чувствительными к атаке, что свидетельствует о гибкости рибозима (см. рис. 9).

Повышая длину IGS (т. е. количество оснований, комплементарных РНК-мишени) можно повысить специфичность, потому что удлиненная узнающая последовательность снижает вероятность нахождения

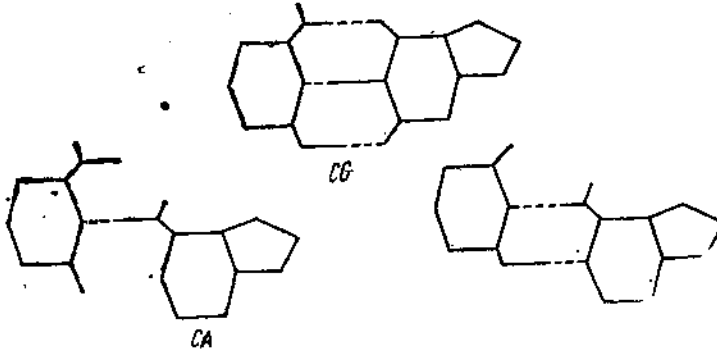


Рис. 11. Геометрия спариваний оснований. Прерывистыми линиями обозначены водородные связи

последовательности-мишени даже с одной или двумя заменами. Однако при определенном количестве спаренных оснований увеличение их числа понижает специфичность [31]. На рис. 12 представлен профиль свободной энергетической реакции формирования дуплексов рибозимов,

имеющих короткие (E1) и длинные (E2) IGS с корректными (C_к) и некорректными (C_н) субстратами. Несмотря на разницу в длине IGS этих рибозимов, разница энергий связывания разных субстратов обоими рибозимами приблизительно одинакова.

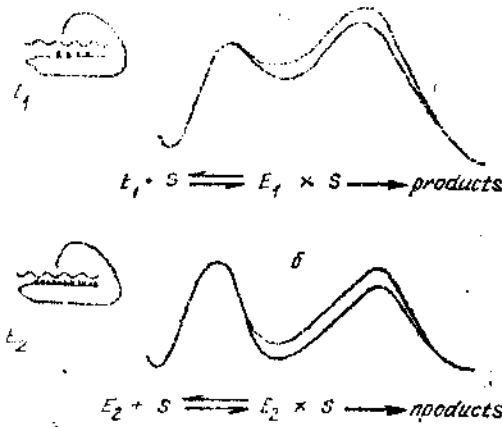


Рис. 12. Профили свободных энергий реакций рибозимов (E) с соответствующими (сплошная линия) и несоответствующими (точечная линия) субстратами

Идентификация потенциальных РНК субстратов обусловлена идентификационным индексом:

$$Ии = \frac{(k_{cat}/K_M)_{n0}}{\sum_{x=0}^n N (k_{cat}/K_M)_{nx}}$$

где n — число нуклеотидов в IGS, x — число некомплементарных нуклеотидов). Ии представляет норму расщепления РНК-мишени относительно остальных РНК-молекул. На рис. 13, а, толстой линией изображен Ии реакций рибозимов, имеющих IGS длиной $n=1-15$ нуклеотидов, с пулом РНК длиной $n=15$ нуклеотидов. Максимум идентификации в данном примере отмечен для IGS длиной $n=7$, несмотря на то, что IGS с $n=15$ необходима для формирования совершенного дуплекса только с одним типом РНК из пула. Максимум на рис. 13, а, — это значение скорости расщепления РНК-мишеней, приближающееся к

верхнему пределу $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, который является формой выражения уровня связывания (рис. 13, б). Дальнейшее увеличение длины IGS только повышает скорость расщепления некорректной РНК, понижая при этом распознавание.

Рибозим с длиной IGS $n=7$, для которого отмечен максимум Ин, расщепляет некорректную РНК в 10^5 раз чаще, чем корректный субстрат. Эта несоответствующая РНК образует два класса: а) около половины некорректных расщеплений происходит на РНК, образующих правильные дуплексы с IGS, но некомплементарных снаружи этого региона и поэтому расщепляющихся как РНК-мишени; б) другая половина некорректных расщеплений осуществляется на РНК, формирующих дуплексы с IGS, содержащих одну или более замен.

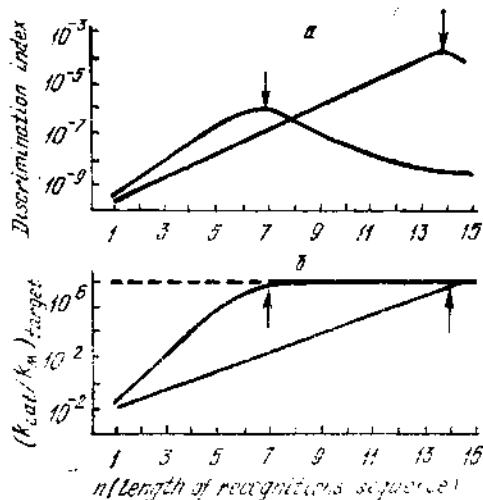


Рис. 13. Идентификационный индекс (а) и k_{cat}/K_M (б) для расщепления РНК-мишени. Данные подсчитаны для каждой пары оснований. $E=2k_{cat}/\text{моль}$ (тонкая линия) или $E=1 k_{cat}/\text{моль}$ (толстая линия). Пунктирная линия (б) представляет верхний лимит k_{cat}/K_M скорости связывания ($k_{on} = 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$)

При последующем добавлении нуклеотидов в IGS рибозима Ин через определенный промежуток времени начинает снижаться. Принципом, лежащим в основе подобного распределения, является предварительное равномерное связывание рибозима с субстратом перед расщеплением для возможности идентификации различных родственных связей. В том случае, когда диссоциация РНК-субстрата слишком медленная или расщепление происходит быстрее равномерного связывания, специфичность довольно низкая.

Рибозим *Tetrahymena* можно использовать для расщепления однопитчатых субстратов ДНК, но при высокой температуре (50°C) и концентрации MgCl_2 50 мМ. Кинетический анализ продемонстрировал, что даже при температуре выше 50°C эта реакция является неэффективной по сравнению с обычной реакцией с РНК-субстратом. При физиологических условиях (37°C , 10 мМ MgCl_2) реакция расщепления ДНК почти не тестируется. Беадри [32] показал, что индивидуальные мутации, вызванные направленным мутагенезом, приводят к оптимизации активности расщепления ДНК по сравнению с «диким» типом.

Рибозим как металлоэнзим. Для активности рибозима *Tetrahymena* необходимы или Mg^{2+} , или Mn^{2+} (2 мМ при 42°C). Другие дивалентные катионы (Ca^{2+} , Ba^{2+} и Sr^{2+}) и полиамины требуются в меньшей мере, они не обеспечивают измеримой активности [34]. В связи с этим можно предположить, что дивалентные катионы по-разному способствуют катализу: некоторые из них вызывают конформационные изменения рибозима, при этом моновалентные (даже в очень высоких концентрациях) этого сделать не могут: влияние же ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} , вероятно, более специфично в активном сайте.

Закключение. Открытие ряда каталитических функций рибозима *Tetrahymena* вызвало огромный интерес к его использованию. Такие активности, как рибонуклеазная, фосфотрансферазная, кислотнo-фосфатазная, РНК-лигазная, аминоксил-эстеразная, могут применяться в реакциях *in vitro* для модификации и репарации РНК-субстратов. *In vivo* эта РНК может быть исследована в перспективе для регуляции биосинтеза нуклеиновых кислот и белков на различных уровнях. Ри-

білим *Tetrahymena* содеожит тья каталитических груп, оппеделяющих его свойства. Одно из них, представляющее огромный интерес,— это способность к катализу в транс-положении, т. е. обеспечение расщепления автономного дуплекса, содеожашего последовательность-мишень. Такая эндонуклеазная активность имеет большое значение для генотерапевтического использования рибозима в качестве разрушителя ДНК- и РНК-содеожаших вирусом.

Е. С. Федоренко, Д. М. Иродов, В. А. Кордюм

ВЛАСТИВОСТІ РИБОЗИМА З TETRAHYMENA THERMOPHILA

Резюме

Рибозими—молекули РНК, які містять каталітичний кор та спричиняють розщеплення і лігування РНК-субстрату. Рибозими здатні досягати рівней норми посилення та специфічності, як у протеїнових ензимів. Деякі протеїнові ензими використовують кофактори, у тому числі іони металів, для покращання хімічних реакцій. Рибозими, як правило, потребують дивалентних катіонів для своєї активності.

Відкриття каталітичних РНК викликало інтерес в плані використання РНК-ензимів, або «рибозимів», для вибіркової деградації специфічних РНК-молекул *in vivo*. Вибіркове руйнування вірусної або клітинної мРНК для усунення патогенних білків має потенційне терапевтичне застосування. Вибірковість також перспективна для розпізнавання функції гена, аналогічно використаним для цієї мети антисенсам. Перший ідентифікований рибозим являє собою самосплайсуючий інтрон великої субодиниці рибосомної РНК в'їчатої протістої *T. thermophila*. Ця РНК є членом філогенетично багатобразної родини інтронів, яка одержала назву групи I і складається на сьогодні з більш ніж 100 сиквенованийих представників.

Мета огляду—висвітлити велику кількість даних, існуючих на цей час, про рибозим *Tetrahymena*.

E. S. Fedorenko, D. M. Irodov, V. A. Kordium

PROPERTIES OF RIBOZYME FROM TETRAHYMENA THERMOPHILA

Summary

Ribozymes are RNA molecules that contain a catalytic core and promote cleavage and ligation substrat RNA. Ribozymes can attain levels of rate enhancement and specificity similar to those of protein enzymes. Some protein enzymes use cofactors including metal ions to facilitate chemical reactions. Ribozymes generally require divalent cations for their activity.

The discovery of catalytic RNA has created interest in using RNA enzymes, or «ribozymes», to target the degradation of specific RNA molecules *in vivo*. Targeted destruction of viral or cellular mRNA, to eliminate the formation of a protein that is deleterious in a disease state, has potential therapeutic utility. Targeting also has potential utility for identification of gene fанction, analogous to experiments using antisense oligonucleotides.

The first ribozyme identified was the self-splicing intron of the large subunit ribosomal RNA of the ciliated protozoan, *Tetrahymena thermophila*. This RNA is a member of a phylogenetically diverse family of introns called group I, wich now consists of more than 100 sequenced examples. The purpose of this review is to integrate a great number data available now about *Tetrahymena ribozyme*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cech T. R. Ribozymes and their medical implication // J. Amer. Med. Assoc.—1988.—260.—P. 3030—3034.
2. Haseloff J., Gertach W. L. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities // Nature.—1988.—334.—P. 585—594.
3. Rossi J. J., Sarver N. RNA enzymes (ribozymes) as antiviral therapeutic agents // Trends Biotechnol.—1990.—8.—P. 179—183.
4. Colman A. Antisense strategies in cell and developmental biology // J. Cell Sci.—1990.—97.—P. 399—409.

5. Kruger K., Cech T. R. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena* // *Cell*.—1982.—31.—P. 147—157.
6. Been M. D., Ferrotta A. T. Group I intron self-splicing with adenosine: evidence for a single nucleoside-binding site // *Science*.—1991.—252.—P. 434—437.
7. Zaug A. G., Cech T. R. The intervening sequence RNA of *Tetrahymena* // *Ibid.*.—1980.—231.—P. 470—475.
8. Inoue T., Sullivan F. X., Cech T. R. New reactions of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena* and the mechanism of self-splicing // *J. Mol. Biol.*.—1980.—189.—P. 143—160.
9. Davies R. W., Waring R. B., Ray J. A. et al. Making ends meet: a model for RNA splicing in fungal mitochondria // *Nature*.—1982.—300.—P. 719—724.
10. Burke J. M. Molecular genetics of group I introns: RNA structures and protein factors required for splicing (a review) // *Gene*.—1988.—73.—P. 213—234.
11. Cech T. R. Conserved sequences and structures of group I introns: building an active site for RNA catalysis (a review) // *Ibid.*.—P. 259—271.
12. Latham J. A., Cech T. R. Defining the inside and outside of a catalytic RNA molecule // *Science*.—1989.—245.—P. 276—282.
13. Young B., Herschlag D., Cech T. R. Mutations in a nonconserved sequence of the *Tetrahymena* ribozyme increase activity and specificity // *Cell*.—1991.—67.—P. 1007—1019.
14. Michel F. The guanosine binding site of the *Tetrahymena* ribozyme // *Nature*.—1989.—342.—P. 391—395.
15. Yarus M., Illangsekere M., Christian E. An axial binding site in the *Tetrahymena* precursor RNA // *J. Mol. Biol.*.—1991.—222.—P. 995—1012.
16. Yarus M., Majerfeld I. Co-optimization of ribozyme substrate stacking and L-arginine binding // *Ibid.*.—1992.—225.—P. 945—949.
17. Herschlag D., Cech T. R. Catalysis of RNA cleavage by the *Tetrahymena thermophila* ribozyme. 2. Kinetic description of the reaction of an RNA substrate complementary to the active site // *Biochemistry*.—1990.—29.—P. 10159—10171.
18. Been M. D., Cech T. R. One binding site determines sequence specificity of *Tetrahymena* pre-rRNA self-splicing, trans-splicing and RNA enzyme activity // *Cell*.—1986.—47.—P. 207—216.
19. Zaug A. J., Been M. D., Cech T. R. The *Tetrahymena* ribozyme acts like an RNA restriction endonuclease (Published erratum appears in *Nature* 1987 Feb 12—18; 325 (6105: 646) // *Nature*.—1986.—324.—P. 429—433.
20. Doudna J. A., Cormach B. P., Szostak J. W. RNA-catalysed synthesis of complementary-strand RNA // *Ibid.*.—1989.—339.—P. 519—522.
21. Robertson D. L., Joyce G. F. Selection *in vitro* of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA // *Ibid.*.—1990.—344.—P. 407—408.
22. Beaudry A. A., Joyce G. F. Minimum secondary structure requirements for catalytic activity of a self-splicing group I intron // *Biochemistry*.—1990.—29.—P. 6534—6539.
23. Doudna J. A., Cormach B. P., Szostak J. W. RNA structure, not sequence, determines the 5'-splice-site specificity of a group I intron // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1989.—86.—P. 7402—7406.
24. Doudna J. A., Gerber A. S., Cherry J. M., Szostak J. W. Genetic dissection of an RNA enzyme // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*.—1987.—52.—P. 173—180.
25. Zaug A. J., Grabowski P. J., Cech T. R. Autocatalytic cyclization of an excised intervening sequence RNA is a cleavage-ligation reaction // *Nature*.—1983.—301.—P. 578—583.
26. Been M. D., Cech T. R. Selection of circularization sites in a group I IVS RNA requires multiple alignments of an internal template-like sequence // *Cell*.—1987.—50.—P. 951—961.
27. Inoue T., Sullivan F. X., Cech T. R. New reactions of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena* and the mechanism of self-splicing // *J. Mol. Biol.*.—1986.—189.—P. 143—165.
28. Zaug A. J., Kent J. R., Cech T. R. A labile phosphodiester bond at the ligation function in a circular intervening sequence RNA // *Science*.—1984.—224.—P. 574—578.
29. Zaug A. J., Kent J. R., Cech T. R. Reactions of the intervening sequence of the *Tetrahymena* ribosomal ribonucleic acid precursor: pH dependence of cyclization and site-specific hydrolysis // *Biochemistry*.—1985.—24.—P. 6211—6218.
30. Piccirilli A. J., McConell S. T., Zaug A. J. et al. Aminoacyl esterase activity of the *Tetrahymena* ribozyme // *Science*.—1992.—256.—P. 1420—1424.
31. Herschlag D. Implications of ribozyme kinetics for targeting the cleavage of specific RNA molecules *in vivo*: more isn't always better // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1991.—88.—P. 6921—6925.
32. Beaudry A. A., Joyce G. F. Directed evolution of an RNA enzyme // *Science*.—1992.—257.—P. 635—641.
33. Murphy F. L., Cech T. R. Alteration of substrate specificity for the endoribonucleolytic cleavage of RNA by the *Tetrahymena* ribozyme // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1989.—86.—P. 9218—9222.
34. Celander D. W., Cech T. R. Visualizing the higher order folding of a catalytic RNA molecule // *Science*.—1991.—25.—P. 401—407.