



УДК 577.113.4+577.123.2

## РНК-ФЕРМЕНТЫ

В. М. Кавсан

«Современное общепринятое представление о ферментах настолько тесно связано с представлением об их белковой природе, что если даже и будет открыт какой-либо небелковый макромолекулярный биологический катализатор, то, вероятно, многие будут возражать против зачисления его в категорию «ферментов» [1].

Неслучайно поэтому сообщение группы исследователей из Колорадского университета во главе с Томасом Чеком о том, что единственный интрон пре-рРНК тетрахилены может удаляться и затем циклизоваться, а остающиеся экзоны могут соединяться без участия какого-либо белка, было поистине сенсационным [2].

Оказалось, что все три события, имеющие место при сплайсинге рибосомальной РНК (рРНК) тетрахилены, инициируются одной и той же ассоциированной с РНК активностью и представляют собой серию реакций трансэтерификации, включающих превращение одного фосфоэфира в другой без промежуточного гидролиза. Таким образом, впервые была показана возможность катализа рибонуклеиновой кислотой реакций, происходящих с молекулой РНК. Для обозначения такой рибонуклеиновой кислоты Чек предложил термин «рибозим» [3]. По-видимому, это название можно применить и к другим типам РНК, обладающим каталитическими свойствами.

Реакции самосплайсинга рРНК тетрахилены. Для осуществления этих реакций *in vitro* в реакционной среде обязательно лишь присутствие моновалентных ( $\text{NH}_4^+$  или  $\text{Na}^+$ ), дивалентных ( $\text{Mg}^{++}$  или  $\text{Mn}^{++}$ ) катионов и гуанозинового кофактора (GTP, GDP, GMP или гуанозина). Субстрат — несплайсированная пре-рРНК тетрахилены — может быть получен Ds-Na-фенольной экстракцией из изолированных ядер тетрахилены, инкубированных в условиях, способствующих активности РНК-полимеразы I, но угнетающих сплайсинг [2]. Так же осуществляются реакции «самосплайсинга», когда в качестве субстрата используют пре-рРНК, синтезированную РНК-полимеразой *Escherichia coli in vitro* на матрице рДНК тетрахилены, клонированной в кишечной палочке в составе рекомбинантной плазмиды [3].

Реакции трансэтерификации должны быть изоэнергетическими. Каждая трансэтерификация не вызывает никаких изменений в числе фосфодиэфирных связей, поэтому не требует дополнительного источника энергии в виде расщепления АТФ или GTP. Сплайсинг рРНК может прийти к полному завершению при высокой молярной концентрации гуанозинового кофактора по отношению к пре-рРНК. При использовании GTP он присоединяется без гидролиза к 5'-концу интрона, предоставляя, как и другие гуанозиновые кофакторы, гидроксил для инициации серии из трех переносов (рис. 1). Второй фосфоэфирный перенос высвобождает интрон и соединяет два экзона. Третий перенос превращает интрон в кольцевую молекулу и высвобождает гуанозиновый кофактор. Реакции обратимы; *in vivo* замыкание в кольцо или деградация интрона могут помогать завершению сплайсинга удалением конечного продукта. Реакция циклизации интрона сдвинута вправо, так как происходит с выщеплением пентадекануклеотида [4].

В других реакциях трансэтерификации, катализируемых ДНК-топизомеразами, резолвазами, белком *int* фага  $\lambda$ , фермент-белок, не изменяя свободной энергии реакции, снижает энергетический барьер активации. В случае самосплайсинга активационную энергию реакции трансэтерификации снижает сама структура молекулы РНК. Реакция не происходит при высоких концентрациях денатурирующих агентов (мочевина, формамид). Циклизация интрона полностью подавляется бромистым этидием, интеркалирующим в двуспиральные участки [5]. Картирование вторичной структуры интрона пре-рРНК тетрахимены

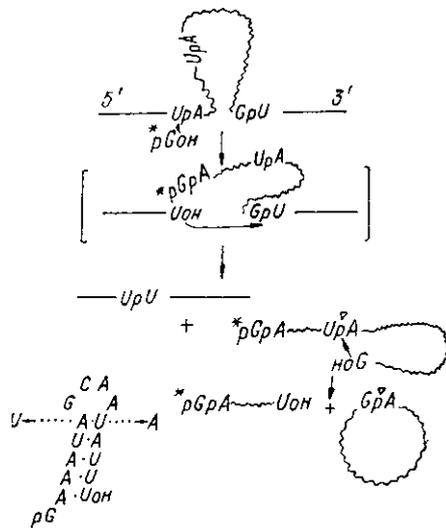


Рис. 1. Модель переноса фосфоэфира при сплайсинге пре-рРНК тетрахимены и циклизации интрона [4]. Сплошная линия — экзоны, волнистая — интрон; звездочкой обозначен меченый гуанозинный кофактор, в этом случае 5'-GMP; треугольником — фосфат, замыкающий кольцо. Квадратные скобки обозначают предполагаемый промежуточный продукт. Внизу — возможная вторичная структура пентадекамера, высвобождающегося при циклизации; стрелки — различия в последовательностях интронов у *T. thermophila* и *T. pigmentosa* 6UM

Fig. 1. Phosphoester transfer model for *Tetrahymena* pre-rRNA splicing and intron cyclization [4]. —, exons; ~~~, intron; \*, labelled guanosine cofactor, in this example 5'-GMP;  $\Delta$ , phosphate that closes the circle. Square brackets denote a postulated intermediate. Below: possible secondary structure of 15-mer released during cyclization;  $\rightarrow$ , sequence differences in the introns of *T. thermophila* and *T. pigmentosa* 6UM

с помощью нуклеазы  $S_1$ , специфически гидролизующей одноцепочечные участки, и компьютерное построение вторичной структуры, исходя из его нуклеотидной последовательности, дали весьма схожие результаты, показав высокую структурированность интрона (рис. 2).

Для реакции обязательно присутствие  $Mg^{++}$ . Ускорение ионами  $Mg^{++}$  гидролиза фосфорных эфиров отмечалось и ранее, однако увеличение скорости реакции было ничтожным по сравнению с возрастанием скорости реакции при самосплайсинге [7]. Возможно, взаимодействуя с  $Mg^{++}$ , интрон пре-рРНК тетрахимены принимает такую структуру, которая способствует переходу фосфата из обычной тетрагональной геометрии во временную тригональную бипирамидную конфигурацию с незанятым одним из апикальных положений и потому подверженным нуклеофильной атаке. К тому же специфическая координация  $Mg^{++}$  увеличивает электрофильность фосфора. Координация  $Mg^{++}$  к одному или более нуклеотидам обеспечивает нужную специфичность. Реакция может происходить по механизму  $S_N2$ -типа, в результате вызывающему инверсию конформации [8].

Возможность получения дискретных молекул пре-рРНК в больших количествах путем транскрипции *in vitro* клонированной рДНК тетрахимены в составе рекомбинантной плазмиды под SP6-промотором позволила обнаружить промежуточные продукты самосплайсинга и подробно описать его этапы [9].

Оказалось, что самосплайсинг осуществляется в два независимых этапа. Сначала пре-рРНК расщепляется ковалентным присоединением гуанозина к 5'-концу интрона с отделением 5'-экзона от G-интрон-3'-экзона, содержащего интактный 3'-сайт сплайсинга [10]. На этом этапе специфическая структура РНК способствует реакции путем организации сайта связывания для гуанозинового кофактора [11]. По-видимому, гуанозин присоединяется к РНК пятью водородными связями с одним или двумя соседними или пятью различными нуклеотидами, сближенными третичной структурой РНК таким образом,

чтобы его 3'-гидроксильная группа была нацелена на атаку фосфата в 5'-сайте сплайсинга пре-рРНК (рис. 3).

Следующий этап — трансэтерификация между 5'-экзоном и 3'-сайтом сплайсинга. Эта реакция может быть мимикрирована в экспери-

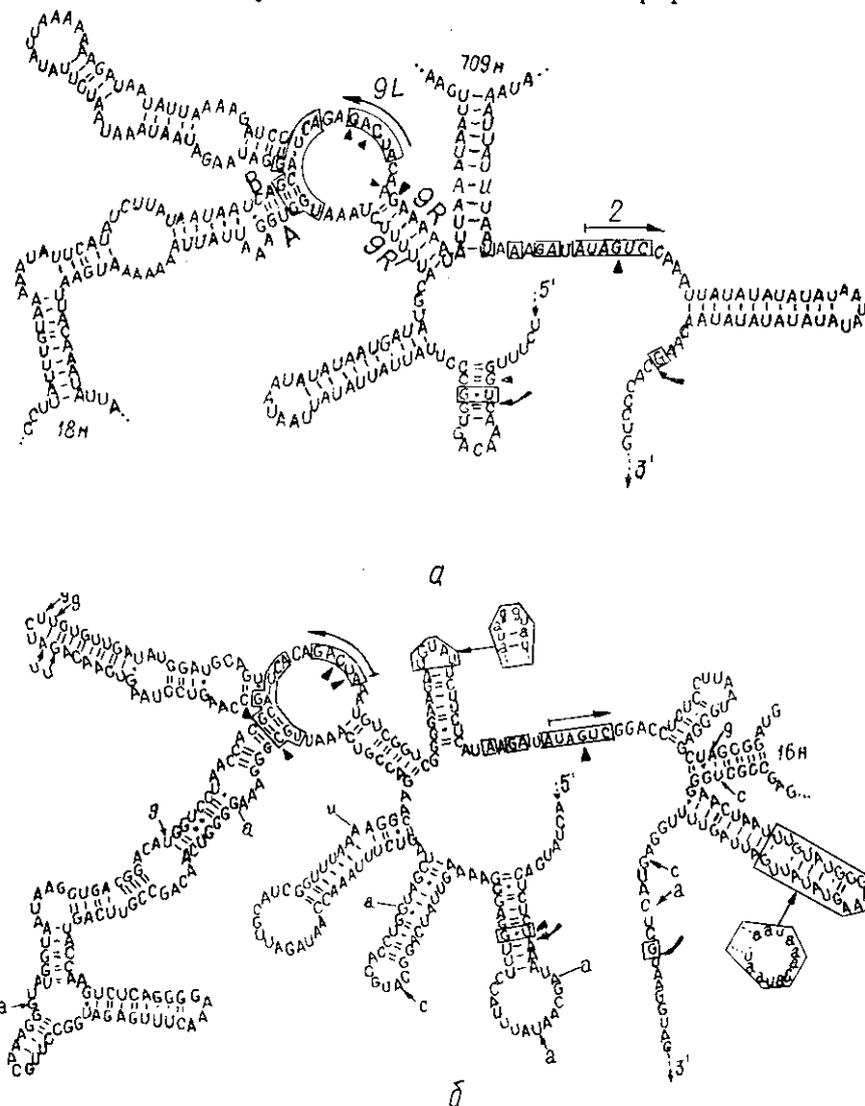


Рис. 2. Модели вторичных структур интронов группы 1 [6]: а — четвертый интрон в пре-мРНК цитохром с-оксидазы митохондрий дрожжей (жирные треугольники указывают места мутаций, нарушающих сплайсинг); б — интроны *T. thermophila* и *T. pigmentosa* (прописные и строчные буквы, взятые в рамку, соответственно). Большие стрелки отмечают сайты сплайсинга. В жирную рамку взяты консервативные участки. Стрелки над элементами последовательностей 9L и 2 указывают установленное взаимодействие между парами оснований в этих моделях на уровне третичных структур

Fig. 2. Secondary structure models of group I introns [6]: а — the fourth intron in the yeast mitochondrial cytochrome oxidase pre-mRNA (solid triangles indicate the sites of splicing-defective mutations in this intron); б — *T. thermophila* (upper case letter) and *T. pigmentosa* (lower case letter) introns. Large arrows designate splice sites. Heavily boxed residues are conservative. The arrows above sequence elements 9L and 2 indicate the established base-pairing interaction which in these models is at the level of tertiary structure

менте: вместо 5'-экзона можно взять олигонуклеотиды UpCpU или даже CpU, представляющие последние нуклеотиды 5'-экзона. Таким образом, для соединения экзонов нет необходимости в предварительной реакции отделения 5'-экзона, т. е. реакции расщепления и соединения — независимые реакции и вторая не следует из первой.

По-видимому, выбор сайта сплайсинга (по меньшей мере 5'-сайта) и сайта циклизации определяется внутренней «гидовой» последовательностью пуринов, комплементарно связывающих олигопиримидиновый участок на 3'-конце 5'-экзона (рис. 4) [12—14]. Как только интрон пре-рРНК тетрахимены освобождается от экзонов, он вступает в каскад реакций циклизации и сайтспецифического гидролиза. Кольцевая форма образуется в результате нуклеофильной атаки 3'-гидроксилом (G<sub>414</sub>) фосфата между 15-м и 16-м нуклеотидами с присоединением 3'-гуанозина в этом месте и отщеплением пентадекануклеотида либо

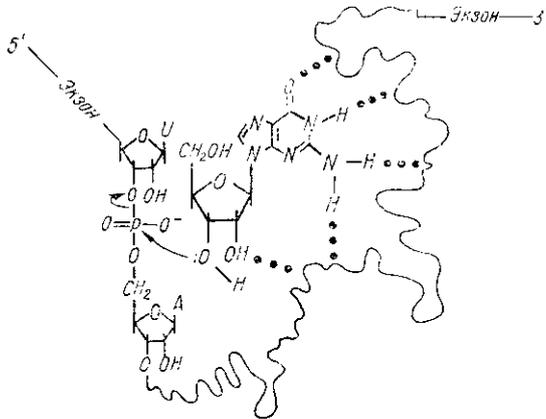
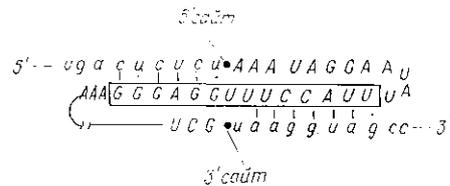


Fig. 3. Model for the guanosine binding site in the *Tetrahymena* intron RNA [11]. The supposed hydrogen bonds (dotted lines) could involve one or two adjacent nucleotides of the RNA or five different nucleotides in very different regions of the RNA chain which are brought into close proximity by the RNA secondary and tertiary structure. In addition to the bases of the RNA, sugars and phosphates could be involved into the hydrogen binding. Also shown is a nucleophilic attack by the 3'-oxygen at the phosphate of the 5' splice site. The resulting transesterification has been proposed to the first step of the splicing reaction

Рис. 4. Модель внутренней «гидовой» последовательности по Дэвису [12, 13]. Строчные буквы — экзоны; прописные — интрон. Внутренняя «гидовая» последовательность взята в рамку

Fig. 4. The internal guide sequence model of Davies et al. [12, 13]. Lower case letters, exons; capital letters, intron. The internal guide sequence is boxed



в результате атаки тем же гидроксилом фосфата между 19-м и 20-м нуклеотидами, что дает минорный продукт с высвобождением 19-членного фрагмента (рис. 5).

У кольцевой формы интрона сохраняются каталитические свойства. Она может специфически гидролизироваться в месте соединения с образованием линейной формы. Реакция рН-зависима, однако в отличие от щелочного гидролиза приводит к образованию 3'-гидроксила и 5'-фосфата на концах продукта. Аналогичная реакция имеет место в 3'-сайте сплайсинга. Здесь тоже атакуемый гидроксилом фосфат находится сразу за G<sub>414</sub>, т. е., по-видимому, обе реакции активируются свернутой соответствующим образом структурой интрона в присутствии ионов Mg<sup>2+</sup>. Реакция сайтспецифического раскрытия кольцевой формы интрона пре-рРНК тетрахимены происходит без участия свободной формы гуанозина и подобно другим реакциям самокатализа требует наличия интактных вторичной и третичной структур молекулы. Однако пока нет химического обоснования повышенной реакционной способности РНК на этом участке.

Рис. 3. Модель места присоединения гуанозинового кофактора к интрону пре-рРНК тетрахимены [11]. Предполагаемые водородные связи (точки) могут соединять гуанозин с одним или двумя соседними нуклеотидами РНК либо с пятью различными нуклеотидами различных районов цепи РНК, расположенными вблизи друг от друга, благодаря вторичной и третичной структурам. В образовании подобных связей могут участвовать как основания, так и сахара и фосфаты этих нуклеотидов. Стрелкой показана нуклеофильная атака 3'-кислородом фосфата 5'-участка сплайсинга. Результат такой атаки — трансэтерификация — первый этап реакции сплайсинга



структуру, во многом обусловленную короткими, весьма консервативными внутренними участками (рис. 2). В экспериментах с обработкой интеркалирующими красителями [17], использованием олигонуклеотидного мутагена (цит. по [11]) и введением одиночных мутаций [18—20] удалось показать, что консервативные внутренние спаривающиеся участки А·В, 9L·2 образуют центральное ядро части структуры, не участвующей в сближении сайтов сплайсинга, но отвечающей за ферментативную активность.

Интроны 1-й группы обнаруживаются после выщепления как в линейной, так и кольцевой формах. Линейные структуры этих интронов имеют на 5'-конце не кодирующийся в геноме остаток гуанозина, который отщепляется при превращении линейной формы интрона в циклическую [21]. Для некоторых из них (в частности, интрона пре-рРНК, третьего и пятого интронов пре-мРНК цитохром *c*-оксидазы митохондрий дрожжей [22], первого интрона пре-мРНК цитохрома *b* нейроспоры [23]) показана способность к самосплайсингу в пробирке.

Имеет ли место самосплайсинг РНК *in vivo*? Скорее всего, имеет. Однако скорость реакций примерно на два порядка выше, чем *in vitro*, по-видимому, за счет специфических белков, которые могут стабилизировать третичную структуру РНК, благоприятствуя точности и высокой скорости сплайсинга [24]. Такие реакции могут происходить как в эукариотических, так и прокариотических организмах, несмотря на возможное присутствие рибосом на исходной РНК. Так, когда интрон гена рРНК тетрахимены встроили в ген  $\beta$ -галактозидазы *E. coli* и в составе рекомбинантной плазмиды ввели в кишечную палочку, он удалялся при сплайсинге мРНК со скоростью, достаточной для определения активности функциональной  $\beta$ -галактозидазы [20].

Возможность самосплайсинга у прокариот обнаружена не только на модельном объекте. Единственный интрон гена тимидилатсинтазы фага Т4 кишечной палочки удаляется аутокаталитически как *in vitro* так и *in vivo* в присутствии ионов  $Mg^{++}$  и гуанозинового кофактора. Он обнаруживается в линейной и кольцевой формах и содержит консервативные участки, характерные для интронов 1-й группы [25, 26]. Возможно, что интрон еще одного мозаичного гена фага Т4 (гена рибонуклеотидредуктазы [27]) также выщепляется аутокаталитически.

А как же интроны 2-й группы? Эти интроны встречаются в оргanelлах реже, чем интроны 1-й группы. 3'-концевые последовательности этих интронов обладают значительной гомологией, а на 5'-концах они имеют общий мотив  $G_{10}A G_{11}C U G$ . В противоположность интронам 1-й группы здесь нет никаких консервативных последовательностей во внутренних участках. Однако они также могут, по-видимому, давать ряд подобных спариваний оснований, которые могут служить коровой частью функциональной вторичной структуры [12, 13, 28, 29]. Интроны 2-й группы обнаруживаются в кольцевой форме, но в противоположность интронам 1-й группы они не могут быть полностью считаны обратной транскриптазой ввиду образования лассоподобной структуры [30, 31].

Тем не менее некоторые интроны этой группы (интрон *a15c* пре-мРНК субъединицы I цитохром *c*-оксидазы [30, 31], интрон *b11* пре-мРНК апоцитохрома *b* [32] митохондрий дрожжей) могут выщепляться аутокаталитически *in vitro*. Остающиеся после этого экзоны подвергаются правильному лигированию. В отличие от интронов 1-й группы сплайсинг интронов 2-й группы не зависит от гуанозина.

Несмотря на некоторые различия, выявляется общность механизмов обоих типов самосплайсинга интронов 1-й и 2-й групп. Общее число фосфодиэфирных связей консервативно в обеих реакциях, и они не требуют экзогенного источника энергии для образования продуктов лигирования. Нуклеотидный кофактор, необходимый для 1-й группы интронов, служит в качестве акцептора в начальной реакции трансэтерификации. Критический аспект его структуры — основание, а также 3'- и 2'-гидроксилы рибозы, а в 5'-позиции могут находиться как

фосфат, так и гидроксил [33, 34]. Для интронов 2-й группы аналогия может быть в использовании в качестве акцептора 2'-гидроксила соответствующего нуклеотида у 3'-конца интронной последовательности [30]. Эта модель предполагает, что фосфат 5'-сайта сплайсинга становится 2'—5'-фосфодиэфиром и что фосфат присоединяющегося экзона имеет происхождение из 3'-сайта сплайсинга. Таким образом, две фосфодиэфирные связи на интрон-экзонных границах замещаются двумя новыми и, значит, реакция должна быть изоэнергетической.

Аутокатализ при сплайсинге ядерных пре-мРНК. Консервация концевых последовательностей и образование лассоподобных структур после выщепления роднят интроны органелл 2-й группы с интронами ядерных пре-мРНК. Консенсусные последовательности 5'-концов у них подобны: 5' ... GU<sup>A</sup><sub>6</sub>AG в ядерных пре-мРНК [34] и 5' ... GU<sup>A</sup>GC<sup>U</sup>G у интронов 2-й группы [35]. Образование лассо в ядерных интронах дрожжей включает 5'-G-остаток интрона и A-остаток консенсусной последовательности UACUAAC, размещенной впереди 3'-сайта сплайсинга [36]. В случае митохондриальных интронов образование лассо также включает 5'-G-остаток олигонуклеотида UACUAAC в том же положении по отношению к 3'-сайту сплайсинга [33].

Хотя в отличие от интронов 1-й и 2-й групп интроны ядерных пре-мРНК не имеют активности для самосплайсинга *in vitro* и для их удаления необходимо образование комплекса, включающего трансдействующие факторы, можно думать, что выщепляющиеся интроны, участвующие в реакции самосплайсинга, представляют собой более старый тип, сохранившийся в организмах. Ядерные же интроны модифицировались таким образом, что их выщепление теперь зависит от трансдействующих факторов [37].

Таким образом, интроны 2-й группы органелл могут быть как бы переходным этапом от участвующих в реакции самосплайсинга интронов к интронам ядерных пре-мРНК. Действительно, реакции самосплайсинга в митохондриях *in vitro* протекают медленней и приводят к выщеплению только малой фракции интронов, в то время как выщепление их *in vivo* происходит быстро и полностью. По-видимому, и здесь какие-то трансдействующие факторы могут принимать участие в сплайсинге: ядерные мутации компенсируют мутации в последовательности интрона; интроны содержат открытые рамки считывания, экспрессия которых является пререквизитом для выщепления соответствующего интрона [16, 36]. Для интронов 1-й группы нейроспоры вообще показано, что хотя их удаление происходит с помощью тех же реакций трансэтерификации, *in vitro* оно невозможно в отсутствие специфических рибонуклеопротеидных частиц или соответствующих растворимых фракций белка [38].

Сплайсинг мРНК в ядре также может идти путем трансэтерификации [34]. Зависимость этих реакций от АТФ может быть обусловлена тем, что необходима дополнительная энергия на каком-то этапе сборки рибонуклеопротеида, но не при лигировании РНК [38]. Катализ при этом может осуществляться *in trans* молекулами няРНК [39]. Белковые компоненты гяРНК и няРНК могут играть структурирующую роль, аналогичную той, которая предполагалась для митохондриальных матюраз.

Действительно, как отмечает Чек [40], сплайсинг рРНК и мРНК, содержащих интроны 1-й группы, и сплайсинг мРНК в ядрах клеток высших организмов имеют много общего. Оба являются двухэтапными механизмами: сначала происходит расщепление в 5'-сайте сплайсинга, затем расщепление в 3'-сайте. При этом образуются только продукты с 5'-фосфатным и 3'-гидроксильным концами. В обоих случаях каждый из двух этапов включает как расщепление, так и лигирование, что не приводит к изменению числа фосфодиэфирных связей. Хотя вторые стадии в обеих системах, по-видимому, полностью идентичны, первый этап при выщеплении интронов 1-й группы включает нуклеофильную атаку 3'-гидроксильной группой гуанозинового нуклеотида, привязан-

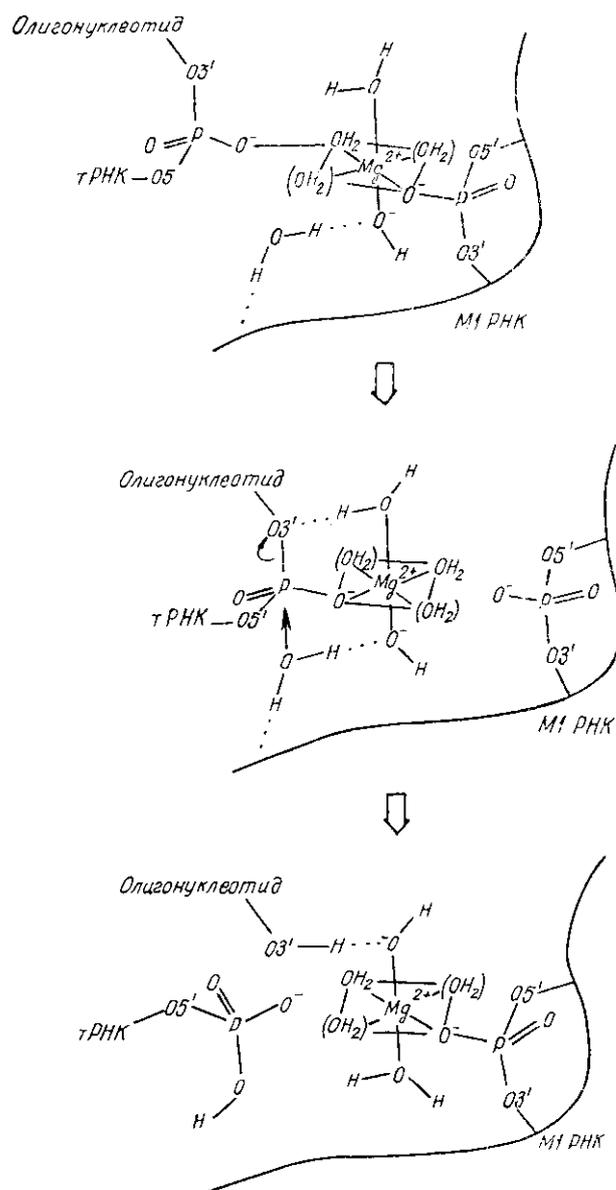


Рис. 6. Предполагаемый механизм гидролиза предшественника тРНК рибонуклеиновым компонентом (M1 РНК) РНКазы Р [51]. Реакция катализируется комплексом  $Mg-H_2O$ , изначально присоединенным к фосфату M1 РНК.  $Mg^{2+}$  формально показан как гексакоординатный, но может быть также тетракоординатным, как указано в скобках около двух экваториальных водных лигандов. В верхней части рисунка молекула воды из раствора, которая примет участие в гидролизе, ориентирована водородной связью на атомы O или N в M1 РНК. В средней и нижней частях рисунка субстрат (предшественник тРНК) связан молекулой воды, присоединенной к M1 РНК, и проходит через промежуточное состояние перед отщеплением «лишнего» олигонуклеотида и добавлением OH к его O5'-концевому фосфату. После указанных этапов реакции образование молекулой воды растворителя связи между осевыми лигандами  $Mg^{2+}$  высвобождает фермент для следующего цикла

Fig. 6. Proposed mechanism of tRNA precursor hydrolysis by M1 RNA of RNase P [51]. The reaction is catalyzed by the  $Mg-H_2O$  complex that is initially bound to a phosphate of M1 RNA.  $Mg^{2+}$  is formally shown as hexacoordinated, but may be also tetraordinated as indicated by the parentheses around the two equatorial water ligands. In the top panel a water molecule from the solvent that will participate in hydrolysis is positioned by a hydrogen bond to an O or N atom in M1 RNA. In the middle and bottom panels the tRNA precursor substrate is bound by the molecule attached to M1 RNA and passes through a transition state prior to cleavage of the «extra» oligonucleotide and addition of OH to its O5'-terminal phosphate. After the reaction steps shown here, a solvent water chain between the axial ligands of  $Mg^{2+}$  releases the enzyme for the next cycle

ного к РНК, тогда как первая стадия при сплайсинге ядерных мРНК заключается в нуклеофильной атаке 2'-гидроксилом нуклеотида внутри цепи РНК для образования лассо, что чрезвычайно напоминает первый этап при выщеплении интронов 2-й группы. Обнаружение наряду с кольцевыми формами лассоподобных форм при выщеплении одного и того же интрона (пре-рРНК митохондрий дрожжей), характерного представителя 1-й группы, указывает на возможность протекания двух типов реакций трансэтерификации для одной и той же структуры РНК: сплайсинг с добавлением гуанозина и образованием лассо. Таким образом, возможно, что реакции сплайсинга всех РНК, за исключением разве только некоторых тРНК, эволюционно родственны между собой.

Участие рибозимов в других реакциях процесса РНК. Практически одновременно с открытием самосплайсинга рРНК тетрахимены группой сотрудников во главе с Сиднеем Альтманом в Йельском ун-те были обнаружены каталитические свойства РНК-компонента рибонуклеазы Р.

*In vivo* этот фермент способствует созреванию 5'-конца молекул тРНК, расщепляя связь Р—О3' с образованием 5'-фосфатного и 3'-гидроксильного концов. У всех до сих пор исследованных организмов этот фермент состоит из двух субъединиц, одна из которых РНК, другая — белок, и обе необходимы для активности *in vivo* [41, 42].

Белковый компонент РНКазы Р (белок С5) очищают аффинной хроматографией на иммобилизованном РНК-компоненте [43]. Активная РНКаза Р может быть реконструирована из соответствующих белков и РНКовых компонентов *E. coli* и клеток *HeLa* [44] или клеток *Bacillus subtilis* [45].

Оказалось, что РНК-компонент (М1 РНК) РНКазы Р *E. coli* [46] и других микроорганизмов [47, 48] при некоторых условиях может сам по себе проявлять каталитическую активность [44, 45]. У кишечной палочки эта М1 РНК состоит из 377 нуклеотидов и содержит активный центр в области 5'-конца. Удаление 120 нуклеотидов с 3'-конца ингибировало не полностью, а удаление 70 нуклеотидов с 5'-конца полностью ингибировало активность. Оба конца нужны для сохранения полной активности [49]. Более точное картирование активного центра затруднено, так как, по-видимому, в его формировании принимают участие разные районы молекулы.

Реакция сильно зависит от структуры РНК и присутствия двухвалентных катионов ( $Mg^{++}$  или  $Mn^{++}$ ), при этом не требуется дополнительной энергии вследствие гидролиза нуклеозидтрифосфата и в результате образуется продукт с 3'-гидроксильным и 5'-фосфатным концами, чем напоминает реакции интронов 1-й группы. Однако модификации 3'-гидроксила не оказывают влияния на активность [50, 51], что отличает реакции М1 РНК от реакций интронов 1-й группы, требующих наличия 3'-гидроксила РНКовой цепи или 3'-гидроксила свободной молекулы гуанозина.

Обычно реакции, включающие атаку гидроксилом эфиров фосфорной кислоты, катализируются белками. Боковые цепи аминокислотных остатков могут осуществлять механизм обмена протона, что приводит к активации молекулы воды и способствует атаке этерифицированного фосфата. Можно предположить, что пре-тРНК связывается с РНКовым компонентом РНКазы Р наподобие того, как связывается субстрат с поверхностью белка и что некоторые группы нуклеиновой кислоты могут влиять на нуклеофильность воды (рис. 6). Гидратированный  $Mg^{++}$  — координатный комплекс — представляет привлекательную геометрию для реакции. Предполагается, что гексакоординатный ион  $Mg^{++}$  присоединяется к каталитическому сайту на М1 РНК и что гидроксильный лиганд иона магния  $[Mg(OH_2)_5OH]^+$  действует как общее основание при ускорении гидролиза субстратной РНК [51].

РНКовая субъединица РНКазы отвечает всем критериям понятия «фермент»: 1) увеличивает скорость реакции со снижением энергии

активации; 2) имеет высокую специфичность по отношению к субстрату и образуемому продукту; 3) не повреждается в реакции, т. е. одна молекула может катализировать реакцию многих молекул субстрата:  $M1 \text{ РНК}^0 \rightleftharpoons M1 \text{ РНК} (1)$ ;  $M1 \text{ РНК} + \text{пре-тРНК} \rightleftharpoons [M1 \text{ РНК}^* - \text{пре-тРНК}] \rightarrow M1 \text{ РНК} + \text{продукт} (2)$ .

Интронная РНК тетрахимены — истинный фермент. Оказалось, что все вышеперечисленные требования к «истинному» ферменту удовлетворяют свойства укороченной на 19 нуклеотидов формы интрона, выщепленного из пре-рРНК тетрахимены [7].

Хотя, как было описано выше, свернутая структура молекулы при самосплайсинге рРНК тетрахимены обуславливает высокоспецифиче-

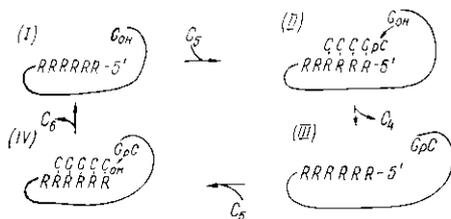


Рис. 7. Механизм полимеризации цитидиловой кислоты рибозимом — *L-19*-фрагментом интрона пре-рРНК тетрахимены [52]. Сам рибозим (I) показан с «олигопиримидиновым» местом связывания (RRRRRR — шесть пуринов) около его 5'-конца и гуанозином в положении 414 (G<sub>414</sub>) со свободным 3'-гидроксильной группой. Сложная свернутая структура кора представлена кривой линией

Fig. 7. Proposed mechanism of polymerization of cytidilic acid by a real ribozyme, the *L-19* fragment of *Tetrahymena* pre-rRNA intron [52]. The ribozyme (I) is shown with the «oligopyrimidine» binding site (RRRRRR, 6 purines) near its 5'-end and guanosine-414 (G<sub>414</sub>) with a free 3'-hydroxyl group

ские интрамолекулярные реакции расщепления — лигирования, намного их ускоряя, и, кроме того, обуславливает серии реакций сплайсинга, циклизации, разрыва и снова циклизации, показывая, что активный центр сохраняется в каждой реакции, тем не менее при этом процессе пре-рРНК не сохраняется в активной форме, т. е. не может считаться истинным ферментом.

После самосплайсинга рРНК тетрахимены выщепленный интрон подвергается целой серии РНК-опосредованных реакций циклизации и сайтспецифического гидролиза, конечным продуктом которых является линейная молекула РНК, представляющая собой укороченный на 19 нуклеотидов выщепленный интрон (*L-19*). Поскольку далее реакции с этим продуктом не продолжались, было высказано предположение, что все потенциально реакционные сайты на молекуле, которые могут быть достигнуты ее активным центром (как интрамолекулярный субстрат), уже удалены. Добавлением различных субстратов к такой РНК было показано, что она способна катализировать расщепление и присоединение различных олигонуклеотидных субстратов, в частности, превращая олигонуклеотид рС<sub>5</sub> (или любой рС<sub>n</sub> ≥ 4) в поли(С) с  $K_M = 42 \text{ мкМ}$  и  $R_{cat} = 2 \text{ мин}^{-1}$ . Реакция специфична: идет очень плохо с олиго(дС) и совсем не идет с олиго(А) или олиго(дГ).

На рис. 7 показана схема такой реакции [52]. РНК (*L-19*) катализирует расщепление и присоединение олиго(С) последовательно от первого этапа к четвертому. Энзим присоединяет субстрат Уотсон — Криковскими связями с образованием нековалентного энзим-субстратного комплекса (II). Нуклеофильная атака G<sub>414</sub> приводит к образованию ковалентного энзим-субстратного промежуточного соединения (III). Если в качестве субстрата используется пентануклеотид С<sub>5</sub>, ковалентное промежуточное соединение нагружается одним нуклеотидом; если субстрат большей длины, к 3'-концу G<sub>414</sub> присоединится олигонуклеотид.

Реакции трансэтерификации обратимы. Если продукт С<sub>4</sub> вновь присоединяется к ферменту, он может атаковаться фермент-субстратным комплексом, и тогда вновь восстановится первоначальный материал. В начале реакции, однако, концентрация С<sub>5</sub> намного выше, чем С<sub>4</sub>: если С<sub>5</sub> присоединяется и атакуется этим комплексом, получается

$C_6$  и высвобождается фермент:  $2C_5 \rightarrow C_6 + C_4$ . Образующиеся при этом продукты — субстраты для следующих реакций:  $C_6 + C_5 \rightarrow C_7 + C_4$  и  $C_4 + C_5 \rightarrow C_3 + C_6$ . Отсутствие продуктов  $< C_3$  объясняется резким уменьшением связывания с внутренней матрицей.

Таким образом, РНК (*L-19*) ведет себя как фермент, обладающий нуклеотидилтрансферазной [поли(С)-полимеразной] и фосфодиэстеразной (рибонуклеазной) активностями.

Обе ферментативные активности были описаны при изучении самосплайсинга. Так, нуклеотидилтрансферазная активность используется при циклизации интрона и лигировании экзонов, а рибонуклеазная реакция родственна сайтспецифическому гидролизу интронной РНК.

Кроме этих активностей, укороченный на 19 нуклеотидов интрон рРНК тетрахимены обладает также фосфотрансферазной активностью, специфичной для 3'-концевого фосфата олигоцитидиловой кислоты и других олигопиримидинов. Фосфат при этом легко переносится на олигопиримидиновый акцептор. При кислых значениях рН он медленно переносится в воду, т. е. эта РНК обладает также активностью кислой фосфатазы [53]. Наличие фосфотрансферазной или фосфатазной активностей не предполагалось ранее, поскольку никаких 3'-концов не образуется при самосплайсинге пре-рРНК, так что требуемый субстрат даже не присутствует во время биологической реакции. Трансфосфорилирование отличается от других катализируемых этой РНК-молекулой реакций тем, что субстратом служит фосфомоноэфир, а не фосфодизфир. По-видимому, исследователи только начинают понимать, как РНК катализирует перенос фосфата.

РНК-катализируемая репликация РНК. Реакция образования поли(С) из олигонуклеотидов, катализируемая укороченным интроном пре-рРНК тетрахимены, хотя, на первый взгляд, и отличается от современной РНК-полимеразной реакции, имеет с ней общие принципиальные черты [52].

1. Высокая консервативность в отношении О—Р-связей в системе; только рибозим использует в качестве субстрата  $C_5$  вместо СТР. Он включает единицы рС в 3'-конец растущей цепи и высвобождает  $C_4$ , аналогично высвобождению пиррофосфата в реакции, катализируемой РНК-полимеразой.

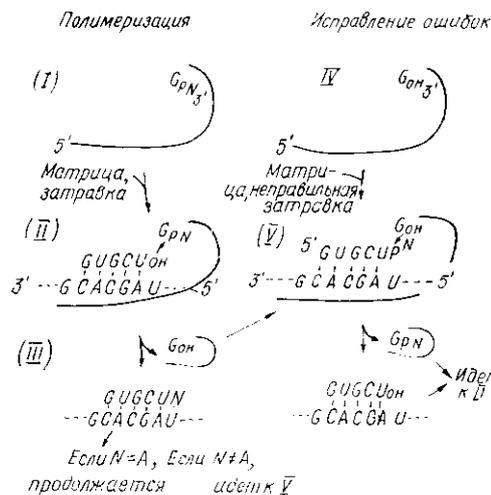
2. Удлинение цепи имеет полярность  $5' \rightarrow 3'$ , все продукты имеют 3'-ОН, ковалентные связи — исключительно  $3' \rightarrow 5'$ -фосфодизфирные.

Олиго(С), использующийся в качестве субстрата, узнается (G)-богатой внутренней последовательностью, которая является частью «гидовой» последовательности при самосплайсинге. Таким образом, этот участок представляет как бы «внутреннюю матрицу» при полимеризации олигоцитидиловой кислоты. Введя мутации в эту «гидовую» последовательность, можно изменить ее специфичность для иных 5'-экзонных последовательностей [14]. С другой стороны, другие интроны 1-й группы узнают очень различающиеся последовательности 5'-экзонов, поскольку имеют различные внутренние «гидовые» последовательности. Следовательно, как и РНК-полимеразы, рибозимы имеют различную субстратную специфичность.

Эффективная современная РНК-полимераза, кроме способности включать все четыре нуклеотида в растущую цепь, должна использовать экзогенную матрицу, т. е. копировать цепи любой длины и последовательности. Такая способность полимеризовать РНК по типу матричного синтеза остается пока для рибозимов только предположительной.

Возможно, что укороченный интрон рибосомальной РНК тетрахимены оставляет активность, если его внутренняя «гидовая» последовательность отделена от каталитического участка. Если эта внутренняя направляющая последовательность очень точно ориентирована по отношению к критической консервативной последовательности и 3'-гуанозину, то после ее удаления молекула может соединяться с экзогенной матрицей с образованием активного комплекса.

На рис. 8 показан предполагаемый механизм матричной РНК-полимеразной реакции, катализируемой рибозимом [52]. Рибозим здесь имеет нуклеотид N, присоединенный к 3'-концевому гуанозину (I) и нековалентно соединен с экзогенной матрицей, помещенной в место, которое обычно занято внутренней направляющей последовательностью (II). Рибозим скользит по этой матрице либо может то присоединяться к ней, то отсоединяться. Если в растворе имеется набор тетра- или пентануклеотидов случайной последовательности, один из них может



комплементарно связываться с матрицей, соединенной с активированным нуклеотидом N. С помощью трансэтерификации нуклеотид N переместится с элимина на олигонуклеотид (III). Если это основание N спаривается с соответствующим основанием матрицы, присоединяется другой заряженный рибозим, и элонгация цепи продолжается. Если

Рис. 8. Гипотетический механизм матричной полимеризации РНК гипотетическим рибозимом [52] (см. текст)

Fig. 8. Hypothetical mechanisms of template-dependent RNA polymerization by hypothetical ribozyme [52] (explanations in the text)

спаривания не происходит, то праймер будет очень плохой атакующей группой для дальнейшей полимеризации, зато очень хорошим реагентом для зарядки фермента нуклеотидом N. Таким образом, обратимость процесса обеспечивает равновесие и в то же время точность матричной полимеризации.

**Рибозимы и вириды.** Еще до открытия явления самосплайсинга высказывались предположения о возможных информационных функциях выщепленных интронных последовательностей [54]. Выщепление в кольцевой форме особенно интригующе, поскольку можно ожидать повышения стабильности такой РНК к воздействию экзонуклеаз. И хотя обнаружено, что существование выщепленного интрона рибосомальной РНК тетрахимены весьма непродолжительно [55], эти результаты не могут исключить возможности того, что некоторые выщепленные интроны могут иметь повышенную стабильность и выполнять какую-то функцию.

Недавно было обнаружено, что вириды (одноцепочечные кольцевые РНК, патогенные для растений) и вирусоиды (ковалентно замкнутые одноцепочечные сателлитные РНК растений) имеют общие консервативные участки с интронами 1-й группы. Они содержат характерную для интронов ядерных генов рРНК и митохондриальных генов рРНК и мРНК филогенетически консервированную последовательность из 16 нуклеотидов, а также три набора спаривающихся консервативных последовательностей. Эта консервативность в равной мере отмечается у виридов и вирусоидов, хотя общая гомология между ними невелика [56]. Эти факты дали основание утверждать, что вириды и вирусоиды представляют собой выщепившиеся когда-то интроны [57].

Хотя в репликации виридов предполагалось участие обратной транскриптазы, промежуточные ДНК-продукты не были обнаружены в специально поставленных экспериментах [58]. По-видимому, репликация их полностью обеспечивается клеточными белками, поскольку нет никаких данных о кодировании полипептидов виридами [58]. Предполагается, что репликация виридов происходит по принципу «катящегося колеса», на что указывает присутствие в инфицированных растениях молекул виридной РНК (+) и комплементарной ей

РНК (—) значительно длиннее, чем сама единица вириона [59, 60]. Важным этапом этого механизма является специфический процессинг (или расщепление) плюс и минус РНК-молекул большей молекулярной массы с образованием линейных вирионных мономеров и последующим лигированием в кольцевые мономеры [61, 62].

Оказалось, что плюс и минус РНК-молекулы, синтезированные *in vitro* РНК-полимеразой фага SP6 на матрице клонированной кДНК, подвергаются саморасщеплению без участия какого-либо белка. Реакция имеет место при транскрипции и инкубации очищенных транскриптов (рН 8,0 и 37 °С) в присутствии ионов  $Mg^{++}$  с образованием 3'-концевого-2',3'-циклического фосфата и 5'-концевой гидроксильной группы [63, 64].

**З а к л ю ч е н и е.** В 1968 г. на основании знания множественности функций рибонуклеиновых кислот — тРНК, рРНК, мРНК — Крик сделал вывод, что РНК — ранний компонент в эволюции и что сохранение информации в виде ДНК развилось позже [65]. Извечная проблема яйца и курицы: что раньше — белок или нуклеиновая кислота, похоже, решается в пользу РНК. Не исключено, что РНК-катализируемые процессы чрезвычайно древние, возможно, первые биологические каталитические процессы. В ранних примитивных системах каталитическая функция РНК могла быть предназначена для репликации РНК. Такой довольно простой процесс может осуществляться в системе, содержащей только РНК и рибонуклеотиды.

Обладая расщепляюще-лигирующей активностью, специфичной к синтезируемому продукту, такая репликативная система могла развиться в систему самосплайсинга [66]. Возможно, появление трансдействующего фактора — пРНК — из этой же самосплайсирующейся РНК дало развитие системы, с которой мы встречаемся при сплайсинге пре-мРНК высших организмов. Подобным образом могли развиться другие этапы процессинга на 3'- и 5'-концах пре-РНК.

С реакциями, катализируемыми РНК, связывают само появление интронов, которые могли возникнуть в результате обратных реакций самосплайсинга, т. е. инсерцией вырезанного при самосплайсинге интрона в другую РНК. Как показали Сулливан и Чек [67], такая реакция разрешена термодинамически и она действительно может иметь место. Матричная РНК с инсерцированным интроном может быть транскрибирована в пре-кДНК и затем интегрирована в гомологичный участок хромосомы либо в гомологичный путем генной конверсии. Кодирование интронами 2-й группы матюраз, способствующих сплайсингу, и наличие у них же последовательностей, гомологичных гену *rol*, кодирующему ревертазу у ретровирусов, — залог возможности такого процесса [67]. Обратная его сторона — удаление интронов из ортологичных генов представлена в строении процессированных генов [68].

Возникновение белковой машинерии всегда оставалось загадкой. Как считают, соответствующее расположение тРНК-овых субстратов и матричной РНК играет основную роль в белковом синтезе. Каталитическая функция при этом могла бы осуществляться другими молекулами РНК, например рРНК. Согласно этой гипотезе, рибосомальные белки улучшают и поддерживают структуру и активность транслирующего аппарата, который в основе своей — РНК-овая машина [69].

В случае 2,5S РНК, нуклеиновокислотного компонента 1,4- $\alpha$ -D-глюкан:1,4- $\alpha$ -D-глюкан-6- $\alpha$ -(1,4- $\alpha$ -глюкано)-трансферазы из мышцы кролика, впервые была показана способность молекулы нуклеиновой кислоты катализировать реакцию с субстратом, не являющимся нуклеиновой кислотой [70]. Подобной ферментативной активностью обладал и большой фрагмент, представляющий среднюю часть 2,5S РНК, полученной после ее гидролиза РНКазой А [71].

Нужно подчеркнуть, что современные рибозимы не представляют собой умирающих ископаемых. Напротив, участие рибозима в самосплайсинге по специфичности не уступает, а может быть и превосходит

белковые ферменты. Хотя число оборотов этого рибозима невелико по отношению ко многим ферментативным реакциям, оно тем не менее представляет огромное увеличение скорости по сравнению с некатализируемыми реакциями гидролиза других фосфодиэфиров [72]. Скорость гидролиза рибозимов на 12 порядков выше скорости гидролиза диметилфосфатов и на 10 порядков выше теоретически рассчитанного гидролиза нормальной фосфодиэфирной связи РНК [41]. Таким образом, относительно малая распространенность рибозимов в природе сегодня объясняется скорее ограниченностью их многосторонности, чем дефицитом их точности и эффективности.

Автор выражает благодарность И. П. Семеняженко за помощь в подготовке этой статьи.

## RNA-ENZYMES

V. M. Kausan

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

### Summary

RNA molecules which have catalytic properties are called ribozymes. They were first discovered when studying splicing of *Tetrahymena* large rRNA, and later it appeared that fungal rRNAs and mitochondrial mRNAs as well as T<sub>4</sub> phage mRNA are spliced in the same manner. The present-day data permit suggesting that similar processes may be basic for splicing of all pre-mRNAs bearing introns excluding, probably, some pre-tRNAs. As it has been shown both steps in splicing occur by transesterification, an exchange of phosphate esters, that produces no net change in the number of ester linkages. The ability of RNA molecules to serve as a catalyst of other reactions, including maturation of 5'-end in tRNAs, viroid formation, has emerged. The possible role of ribonucleic acids in catalysis of RNA-polymerization and of biosynthesis of polypeptides in ribosomes is discussed. The review depicts modern state of studies aimed at evaluating the catalytic functions of RNAs.

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты.— М.: Мир, 1982.— Т. 1.—392 с.
2. Cech T. R., Zaig A. J., Grabowski P. J. *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence // Cell.— 1981.—27, N 3.— P. 487—496.
3. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena* / K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaig et al. // Ibid.— 1982.—31, N 1.— P. 147—157.
4. Zaig A. J., Grabowski P. J., Cech T. R. Autocatalytic cyclization of an excised intervening sequence RNA is a cleavage-ligation reaction // Nature.— 1983.—301, N 5901.— P. 578—583.
5. Cech T. R. Self-splicing RNA — implication for evolution // Int. Rev. Cytol.— 1985.— 93.— P. 3—22.
6. Secondary structure of the *Tetrahymena* ribosomal RNA intervening sequence: structural homology with fungal mitochondrial intervening sequences / T. R. Cech, N. K. Tanner, J. J. Tinoco et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1983.—80, N 3.— P. 3903—3907.
7. Zaig A. J., Cech T. R. The intervening sequence RNA of *Tetrahymena* is an enzyme // Science.— 1986.—231, N 4737.— P. 470—475.
8. Zaig A. J., Kent J. R., Cech T. R. Reaction of the intervening sequence of the *Tetrahymena* ribosomal RNA precursor: pH dependence of cyclization and site-specific hydrolysis // Biochemistry.— 1985.—24, N 22.— P. 6211—6218.
9. Inoue T., Sullivan F. X., Cech T. R. New reactions of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena* and the mechanisms of self-splicing // J. Mol. Biol.— 1986.—189, N 1.— P. 143—167.
10. Kister K.-P., Eckert W. A. Characterization of an authentic intermediate in the self-splicing process of ribosomal precursor RNA in macronuclei of *Tetrahymena thermophila* // Nucl. Acids Res.— 1987.—15, N 5.— P. 1905—1921.
11. Cech T. R., Bass B. L. Biological catalysis by RNA // Annu. Rev. Biochem.— 1986.— 55.— P. 599—629.
12. Making ends meet: a model for RNA splicing in mitochondria / R. W. Davies, R. B. Waring, J. A. Ray et al. // Nature.— 1982.—300, N 5894.— P. 719—724.
13. Waring R. B., Davies R. W. Assessment of a model for intron RNA secondary structure relevant to RNA self-splicing // Gene.— 1984.—28, N 3.— P. 277—291.

14. 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, N 2.—P. 207—216.
15. Szostak J. W. Enzymatic activity of the conserved core of a group I self-splicing intron // Nature.—1986.—322, N 6074.—P. 83—86.
16. Кавсан В. М. Сплайсинг I. // Молекуляр. биология.—1986.—20, № 1.—С. 5—20.
17. Tanner N., Cech T. Self-catalyzed cyclization of the intervening sequence RNA of *Tetrahymena*: inhibition by intercalating dyes // Nucl. Acids Res.—1985.—13, N 21.—P. 7741—7759.
18. Been M. D., Cech T. R. Sites of circularization of the *Tetrahymena* rRNA IVS are determined by sequence and influenced by position and secondary structure // Ibid.—N 23.—P. 8389—8408.
19. Sequence requirements for self-splicing of the *Tetrahymena thermophila* preribosomal RNA / Y. V. Price, G. I. Kieff, Y. R. Kent et al. // Ibid.—N 6.—P. 1871—1891.
20. Price J. V., Cech T. R. Coupling of *Tetrahymena* ribosomal RNA splicing to  $\beta$ -galactosidase expression in *Escherichia coli* // Science.—1985.—228, N 4700.—P. 719—722.
21. Garriga G., Lambowitz A. M. RNA splicing in *Neurospora mitochondria*. The large rRNA intron contains a noncoded 5'-terminal guanosine residue // J. Biol. Chem.—1983.—258, N 24.—P. 14745—14761.
22. Van der Horst J., Tabak H. E. Self-splicing of yeast mitochondrial ribosomal and messenger RNA precursors // Cell.—1985.—40, N 4.—P. 759—766.
23. Garriga G., Lambowitz A. M. RNA splicing in *Neurospora mitochondria*: self-splicing of a mitochondrial intron *in vitro* // Ibid.—1984.—39, N 3.—P. 631—641.
24. Transcription and splicing of the ribosomal-RNA precursor of *Tetrahymena* / T. R. Cech, A. J. Zaug, P. J. Grabowski et al. // rDNA. Cell Nucleus / Eds H. Busch, G. Rothblum.—New York: Acad. press, 1982.—Vol. 10.—P. 171—203.
25. Characterization of the intron in the phage T<sub>4</sub> thymidilate synthase gene and evidence for its self-excision from the primary transcript / F. K. Chu, G. F. Maley, D. K. West et al. // Cell.—1986.—45, N 2.—P. 157—166.
26. Starzyk R. M. Prokaryotic messenger RNA processing // Trends Biochem. Sci.—1986.—11, N 2.—P. 60.
27. The bacteriophage T<sub>4</sub> gene for the small subunit of ribonucleotide reductase contains an intron / B. M. Sjöberg, S. Hahne, C. Z. Mathews et al. // EMBO J.—1986.—5, N 8.—P. 2031—2037.
28. Schmelzer C., Schmidt C., Schweyen R. J. Identification of splicing signals in introns of yeast mitochondrial split genes: mutational alterations in intron *bII* and secondary structures in related introns // Nucl. Acids Res.—1982.—10, N 21.—P. 6797—6819.
29. Determination of functional domains in intron *bII* of yeast mitochondria: mutations and nuclear suppressors / C. Schmelzer, C. Schmidt, K. May et al. // EMBO J.—1983.—2, N 8.—P. 2047—2054.
30. A self splicing RNA excises an intron lariat / C. L. Peebles, P. S. Perlman, K. L. Mecklenburg et al. // Cell.—1986.—44, N 2.—P. 213—223.
31. Excised group II introns in yeast mitochondria are lariats and can be formed by self-splicing *in vitro* / R. van der Veen, A. C. Arnberg, G. van der Horst et al. // Ibid.—P. 225—234.
32. Schmelzer C., Schweyen R. J. Self-splicing of group II introns *in vitro*: mapping of the branch point and mutational inhibition of lariat formation // Ibid.—46, N 4.—P. 557—565.
33. Arnberg A. C., van der Horst G., Tabak H. F. Formation of lariats and circles in self-splicing of the precursor to the large ribosomal RNA of yeast mitochondria // Ibid.—44, N 2.—P. 235—242.
34. Cech T. R. RNA splicing: three themes with variations // Ibid.—1983.—34, N 3.—P. 713—716.
35. Michel F., Dujon B. Conservation of RNA secondary structures in two intron families including mitochondrial chloroplast- and nuclearencoded members // EMBO J.—1983.—2, N 1.—P. 33—38.
36. Кавсан В. М. Сплайсинг II // Молекуляр. биология.—1986.—20, № 6.—С. 1451—1470.
37. Гуськова Л. И., Липецкая И. Я., Мазин А. Л. Большой интерес к маленьким РНК // Там же.—1985.—19, № 2.—С. 571—575.
38. Garriga G., Lambowitz A. M. Protein dependent splicing of the group I intron in ribonucleoprotein particles and soluble fractions // Cell.—1986.—46, N 5.—P. 669—680.
39. Busch H., Reddy R. Functional aspects of small nuclear RNAs // Nuclear envelope structure and RNA maturation / Eds E. A. Smuckler et al.—New York: Alan R. Liss Inc., 1985.—P. 235—259.
40. Cech T. R. The generality of self-splicing RNA: relationship to nuclear mRNA splicing // Cell.—1986.—44, N 2.—P. 207—210.
41. *Escherichia coli* RNase P has a required RNA component *in vivo* / R. Kole, M. F. Bae, B. C. Stark, S. Altman // Ibid.—1980.—19, N 4.—P. 881—887.
42. Венкстери Т. В. Гены тРНК про- и эукариот. 2. Экспрессия генов и процессинг генных продуктов // Молекуляр. биология.—1985.—19, № 6.—С. 1445—1456.
43. Vioque A., Altman S. Affinity chromatography with an immobilized RNA enzyme // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 16.—P. 5904—5909.
44. Gold H. A., Altman S. Reconstitution of RNase P activity using inactive subunits from *E. coli* and *HeLa* cells // Cell.—1986.—44, N 2.—P. 243—249.

45. *The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme* / C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh et al. // *Ibid.*—1983.—35, N 4.—P. 849—857.
46. *Guerrier-Takada C., Altman S. Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription in vitro* // *Science.*—1984.—223, N 4633.—P. 285—286.
47. *Two RNA species co-purify with RNase P from the fission yeast Schizosaccharomyces pombe* / G. Krupp, B. Cherayil, D. Frendewey et al. // *EMBO J.*—1986.—5, N 7.—P. 1697—1704.
48. *Baer M., Altman S. A catalytic RNA and its gene from Salmonella typhimurium* // *Science.*—1985.—223, N 4702.—P. 999—1002.
49. *Guerrier-Takada C., Altman S. M1 RNA with large terminal deletions retains its catalytic activity* // *Cell.*—1986.—45, N 2.—P. 177—183.
50. *Marsh T. L., Pace N. R. Ribonuclease P catalysis differs from ribosomal RNA self-splicing* // *Science.*—1985.—229, N 4708.—P. 79—81.
51. *Metal ion requirements and other aspects of the reaction catalyzed by M1 RNA, the RNA subunit of ribonuclease P from E. coli* / C. Guerrier-Takada, K. Haydock, Z. Allen, S. Altman // *Biochemistry.*—1986.—25, N 7.—P. 1509—1515.
52. *Cech T. R. A model for the RNA-catalyzed replication of RNA* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83, N 12.—P. 4360—4364.
53. *Zaug A. I., Cech T. R. The Tetrahymena intervening sequence ribonucleic acid enzyme is a phosphotransferase and an acid phosphatase* // *Biochemistry.*—1986.—25, N 16.—P. 4478—4482.
54. *Crick F. Split genes and RNA splicing* // *Science.*—1979.—204, N 4390.—P. 264—272.
55. *Brehm S., Cech T. Fate of an intervening sequence ribonucleic acid: excision and cyclization of the Tetrahymena ribosomal acid intervening sequence in vivo* // *Biochemistry.*—1983.—22, N 10.—P. 2390—2398.
56. *Dinter-Gottlieb G. Viroids and virusoids are related to group I introns* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83, N 11.—P. 6250—6255.
57. *Dinter-Gottlieb G., Cech T. R. Viroids contain homologies with the Tetrahymena IVS and may resemble group I introns in structure RNA processing* / Ed. M. Mothews.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1981.—P. 37.
58. *Riesner D., Gross H. Y. Viroids* // *Ann. Rev. Biochem.*—1985.—54.—P. 531—564.
59. *Branch A. D., Robertson H. D. A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs* // *Science.*—1985.—223, N 4635.—P. 450—455.
60. *A revised replication cycle for viroids—the role of longer than unit length RNA in viroid replication* / M. Ishikawa, T. Meshi, T. Ohno et al. // *Mol. and Gen. Genet.*—1984.—196, N 3.—P. 421—428.
61. *Owens R. A., Diener T. O. RNA intermediates in Potato Spindle tuber viroid replication* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1982.—79, N 1.—P. 113—117.
62. *Oligomers of avocado sunblotch viroid are found in infected avocado leaves* / G. Bruning, A. R. Gould, P. J. Murphy, R. H. Symons // *FEBS Lett.*—1982.—148, N 1.—P. 71—78.
63. *Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid* / C. J. Hutchins, P. D. Rathjen, A. C. Forster, R. H. Symons // *Nucl. Acids Res.*—1986.—14, N 9.—P. 3527—3641.
64. *Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA* / G. A. Prody, I. T. Bakos, I. M. Buzayan et al. // *Science.*—1986.—231, N 4745.—P. 1577—1580.
65. *Crick F. M. C. The origin of the genetic code* // *J. Mol. Biol.*—1968.—38, N 2.—P. 367—379.
66. *Sharp Ph. A. On the origin of RNA splicing and introns* // *Cell.*—1985.—42, N 2.—P. 397—400.
67. *Michel F., Lung B. Mitochondrial class 2 introns encode proteins related to the reverse transcriptases of retroviruses* // *Nature.*—1985.—316, N 6029.—P. 641—642.
68. *Кавсан В. М. Пробессированные гены* // *Цитология и генетика.*—1987.—21, № 2.—С. 143—152.
69. *Cech T. R. RNA as an enzyme* // *Sci. Amer.*—1986.—255, N 5.—P. 64—76.
70. *Catalytic activity of the nucleic acid component of the 1,4- $\alpha$ -glucan branching enzyme from rabbit muscles* / T. A. Shvedova, G. A. Korneeva, V. A. Otroshchenko, T. V. Venkster // *Nucl. Acids Res.*—1987.—15, N 4.—P. 1745—1753.
71. *Каталитическая активность нуклеинового компонента изомеразы амилозы мышц кролика* / Т. А. Шведова, Г. А. Корнеева, В. А. Отрошенко, Т. В. Венкстер // *Докл. АН СССР.*—1986.—289, № 6.—С. 1514—1516.
72. *Orgel L. E. RNA catalysis and the origins of life* // *J. Theor. Biol.*—1986.—123, N 2.—P. 127—149.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 24.08.87