



Modyfikowane, katalityczne kwasy rybonukleinowe

Grażyna Leszczyńska, Elżbieta Sochacka

Instytut Chemii Organicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

Modified catalytic ribonucleic acids

Summary

Over the last decade, modified oligoribonucleotides have emerged as a valuable tool in catalytic RNA studies. The range of incorporated nucleotide analogues includes modifications in the base, sugar or phosphate moieties. The comparisons of the properties of the modified RNA enzymes with unmodified models allow one to draw the conclusions concerning the importance of specific functional groups within the catalytic RNA. In this review, we discuss the selected examples of modified oligonucleotides applications to investigate some aspects of mechanisms and structure/function relationships of small ribozymes (*hammerhead* and *hairpin*). The importance of modifications for the improvement of ribozyme catalytic activity and resistance to nucleases are also presented.

Key words:

modified ribozymes, modified oligonucleotides, site-specific probes, ribozyme structure-function.

1. Wstęp

Od początku lat osiemdziesiątych, kiedy to Cech i wsp. (1) oraz Altman i wsp. (2) odkryli katalityczne właściwości cząsteczek RNA, wiedza o budowie i funkcjonowaniu rybozymów uległa znacznemu wzbogaceniu. We wszechstronnych badaniach zidentyfikowano i scharakteryzowano szereg naturalnych rybozymów takich jak rybozimy samotnące (*self-cleaving ribozymes*) typu głowa młotka (*hammerhead*) (3), typu spinki do włosów (*hairpin*) (3), rybozym wirusa wywołującego zapalenie wątroby typu D (HDV) (4), rybozym VS (*Varkud satellite*) z *Neurospora* (5)

Adres do korespondencji

Elżbieta Sochacka,
Instytut Chemii
Organicznej,
Politechnika Łódzka,
ul. Żeromskiego 116,
90-924 Łódź;
e-mail:
ejsochac@p.lodz.pl

oraz rybozimy zdolne do samodzielnego wycinania się (*self-splicing ribozymes*), do których należą introny grupy I i II (1). Katalitycznymi właściwościami cechuje się również podjednostka RNA wchodząca w skład RNazy P (2), a także małe jądro RNA (snRNA) (6). Ważną grupę katalitycznego RNA może stanowić rybosom (7-9). Każda klasa naturalnych rybozymów charakteryzuje się specyficzną sekwencją centrum katalitycznego utworzonego poprzez aranżację jedno- i/lub dwuniciowych fragmentów RNA oraz określonym mechanizmem działania (10,11). Szerzej zagadnienia dotyczące charakterystyki naturalnych katalitycznych RNA zostały omówione w polskim piśmiennictwie w pracach przeglądowych (12-15).

Należy dodać, że rozwinięta na początku lat dziewięćdziesiątych metoda przyspieszonej ewolucji kwasów nukleinowych *in vitro* (SELEX) (16) pozwoliła wytworzyć kilkadziesiąt innych enzymów RNA tzw. nowych rybozymów zdolnych do katalizowania szeregu różnorodnych przemian biochemicznych i chemicznych (17,18).

Cechy katalitycznych RNA takie jak zdolność do autokatalitycznego rozszczepiania nici RNA, przede wszystkim w układzie *trans*, specyficzność przeprowadzanych reakcji, a także możliwość wielokrotnego udziału w reakcji (*turnover*), przyczyniły się do powstania koncepcji wykorzystania rybozymów jako środków terapeutycznych skierowanych na eliminację cząsteczek RNA niepożądanych w komórce (strategia rybozymowa hamowania ekspresji niepożądanych genów) (19-21).

Szczególne znaczenie dla praktycznego zastosowania rybozymów *in vivo* mają badania prowadzące do zwiększenia ich trwałości w komórce. Najbardziej efektywnym sposobem przeciwdziałania niepożądanego degradacji rybozymów wprowadzanych egzogennie stanowi chemiczna modyfikacja ich struktury, przy czym ważne jest, aby modyfikacje nie pozbawiły rybozymu jego aktywności katalitycznej i nie były toksyczne dla komórki (20,21).

Wprowadzanie modyfikowanych jednostek nukleozydowych w ściśle określone, funkcjonalnie ważne miejsca struktury rybozymów (najczęściej w obrębie centrum katalitycznego) odgrywa niezwykle istotną rolę w badaniach zależności pomiędzy strukturą a funkcją katalitycznych RNA. Wnioski z tych badań mogą stanowić podstawę do projektowania nowych, modyfikowanych rybozymów jako efektywnych narzędzi molekularnych hamujących ekspresję niepożądanych białek.

Odnotowany w ostatnich latach znaczący postęp w metodyce syntezy dłuższych fragmentów RNA, w tym również tych zawierających zmodyfikowane jednostki nukleotydydowe, stwarza realną możliwość totalnej chemicznej bądź chemiczno-enzymatycznej syntezy modyfikowanych rybozymów, zarówno do celów badawczych jak i aplikacyjnych (22-26).

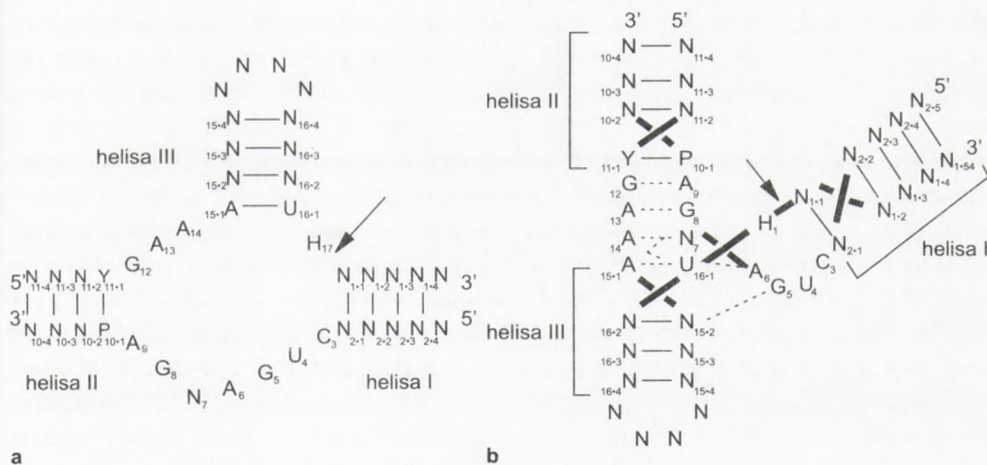
W artykule tym przedstawiamy przykłady zastosowań różnorodnych modyfikacji jednostek nukleotydydowych w badaniach rybozymów typu głowy młotka i spinki do włosów (oligomery RNA o długości kilkudziesięciu reszt nukleotydydowych).

2. Modyfikacje reszt nukleotydowych w badaniach rybozemu typu głowy młotka (*hammerhead*)

2.1. Wprowadzenie

Rybozym typu *hammerhead* jest najmniejszym naturalnie występującym rybozymem (sekwencja około czterdziestu nukleotydów). W jego domenie katalitycznej można wyróżnić trzy obszary o strukturze dwuniciowej (helisy I, II, III określane też jako trzony I, II, III; rys. 1a), ułożone wokół wysoce konserwatywnego, jednoniciowego regionu rdzenia, zawierającego 11 nukleotydów (12,27-29). Sekwencje fragmentów helikalnych są zmienne z wyjątkiem konserwatywnej pary zasad A₁₅₋₁-U₁₆₋₁ w helisie III. Miejsce cięcia łańcucha oligorybonukleotydowego leży między helisą I i III, za sekwencją NUH (H=U,C,A) (rys. 1a) (30). Degradacja wiązania internukleotydowego następuje przez nukleofilowy atak grupy 2'OH na sąsiadujące centrum fosfordiestrowe z uzyskaniem 2',3'-cyklicznego fosforanu 5'-terminalnego oligonukleotydu oraz produktu 3'-końcowego z wolną grupą 5'-OH (31).

Istotne znaczenie dla poznawania zależności pomiędzy strukturą a aktywnością katalityczną rybozemu *hammerhead* miało rozwiązanie struktury krystalicznych kompleksów enzym-substrat (33-35). W badaniach tych znaczącą rolę odegrały modyfikacje jednostek nukleotydowych wprowadzone w nić oligonukleotydową substratu w celu zabezpieczenia go przed procesem degradacji. Pley i wsp. wykorzystali jako substrat oligomer DNA (33), natomiast Scott i wsp. wbudowali w miejsce cięcia



Rys. 1. Schematy struktury drugorzędowej (a) i trzeciorzędowej (b) rybozemu typu *hammerhead*. System numeracji wg Hertela (32). Miejsce cięcia zaznaczono strzałką. N-dowolny nukleotyd; P = A lub G; Y = U lub C; H = A, C lub U.

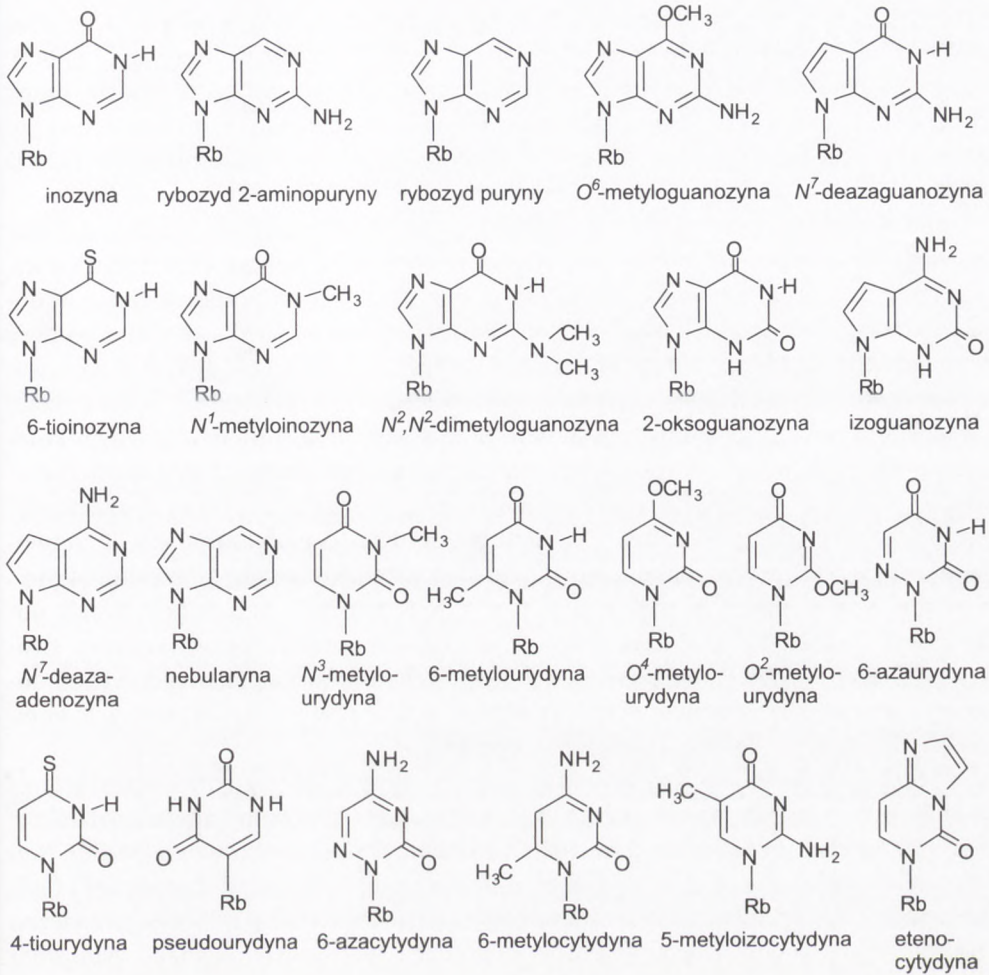
(nukleozyd H_{17}) 2'-*O*-metylocytydynę (34). Ustalona przestrzenna struktura kompleksu enzym-substrat przypomina kształtem literę „Y” (rys. 1b). Wszystkie trzy helisy rybozomu przyjmują standardową konformację typu A. Helisy II i III są kolinearne poprzez połączenie obszarem niekanonicznego parowania pomiędzy zasadami $N_7G_8A_9$ a $A_{14}A_{13}G_{12}$. Kieszeń katalityczną tworzy jednoniciowa sekwencja $C_3U_4G_5A_6$ z charakterystycznym motywem U-skrętu między jednostkami U_4 i G_5 . System wiązań wodorowych stabilizujących U-skręt rybozomu jest analogiczny jak w cząsteczkach tRNA (28,33,36,37).

Trzyczłonowa struktura motywu katalitycznego *hammerhead* stanowi ważny punkt odniesienia dla analizy wyników różnorodnych badań nad strukturalnymi uwarunkowaniami aktywności katalitycznej rybozomu. Wiele z tych badań prowadzonych jest w oparciu na wykorzystaniu modyfikacji jednostek nukleotydowych, wprowadzanych selektywnie w ściśle określone pozycje struktury rybozomu (24-26). Zmiany w strukturze rybozomu mogą być dokonywane przez wykorzystanie szerokiego spektrum modyfikowanych nukleotydów, przy czym modyfikacje obejmują zarówno resztę zasady heterocyklicznej (rys. 2) jak i resztę rybozy (głównie modyfikacje funkcji 2'OH) oraz wiązanie fosfordiestrowe (rys. 3).

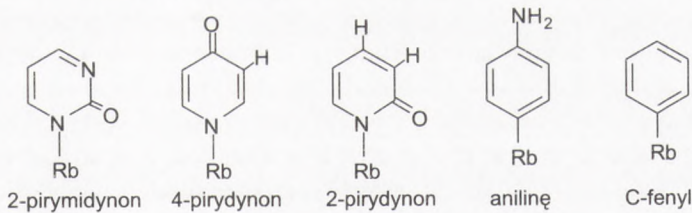
2.2. Zastosowanie modyfikacji reszt nukleotydowych do badania zależności pomiędzy strukturą a funkcją rybozomu *hammerhead*

2.2.1. Badania mechanizmu działania rybozomu; rola jonów metali w katalizie

Modyfikacje w obrębie struktury dwunukleotydu tworzącego degradowane wiązanie fosfordiestrowe ($H_{17}-N_{1-1}$) były szeroko stosowane w badaniach mechanistycznych rybozomów *hammerhead* (31,38,39). Wprowadzenie w miejsce cięcia $H_{17}pN_{1-1}$ reszty tiofosforanowej o zdefiniowanej konfiguracji (R_p lub S_p) pozwoliło stwierdzić, że reakcja degradacji przebiega z inwersją konfiguracji na atomie fosforu (40,41). Fakt, że w badaniach krystalicznych kompleksów enzym-niedegradowalny substrat (33,34) wykazano niezgodność przestrzennej orientacji zrywanego wiązania z wymogami stereochemicznymi reakcji S_N2P , wyraźnie świadczy o konieczności zmian w lokalnej konformacji kompleksu enzym-substrat, które muszą się dokonać pomiędzy stanem podstawowym a stanem przejściowym (10,11,38,39). Wspomniane zmiany konformacyjne znalazły potwierdzenie w badaniach rentgenostrukturalnych przeprowadzonych ostatnio przez Murraya i wsp. (42). Autorzy wykorzystali 5'-*C*-metylo-*tallo*-nukleozyd (rys. 3) jako jednostkę opuszczającą w strukturze degradowanego dwunukleotydu (42). Wprowadzenie tej modyfikacji, ograniczającej znacznie szybkość degradacji nici substratowej, pozwoliło na wychwycenie i analizę kompleksu enzym-substrat bardziej zbliżonego do struktury stanu przejściowego. Zaobserwowano istotne zmiany w orientacji przestrzennej nukleotydu w pozycji 17 w stosunku do ułożenia w stanie podstawowym (42).



Nukleozydy zawierające w miejscu zasady heterocyklicznej:



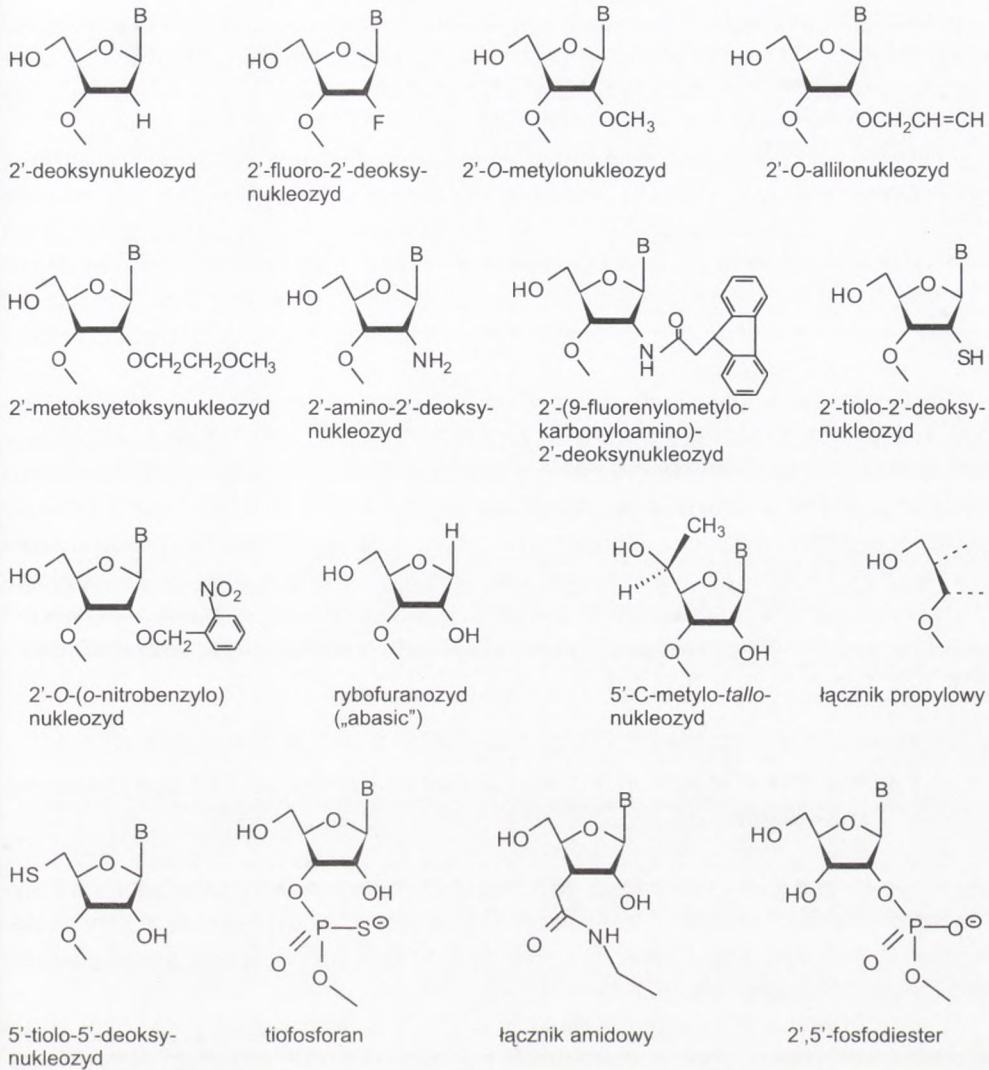
Rys. 2. Modyfikacje zasad purynowych i pirymidynowych.

Innym przykładem, którym można zilustrować możliwość zastosowania modyfikacji do badania mechanizmu katalizy metodami krystalograficznymi jest wykorzystanie syntetycznego oligomeru substratowego, zawierającego w pozycji H₁₇ nukleotyd z funkcją 2'-OH zablockowaną fotolabilną grupą *o*-nitrobenzylową (rys. 2) (43). Laserowa fotoliza tak modyfikowanej cząsteczki RNA powoduje usunięcie grupy ochronnej z funkcji 2'-OH, a następnie hydrolizę wiązania fosfordiestrowego. Strukturę przestrzenną tworzącego się kompleksu można badać techniką TRXRD (*time resolved X-ray diffraction*).

Porównanie danych z badań rentgenostrukturalnych z licznymi rezultatami mapowania struktury rybozomu wykorzystującymi określenie wpływu charakteru i miejsca modyfikacji na aktywność katalityczną enzymu, zostało przedstawione w obszernych pracach przeglądowych (44,45). Istotna zgodność wyników z obu podejść badawczych dotyczy struktury rejonów helikalnych, natomiast modyfikacje wprowadzone w rejon kieszeni katalitycznej i w miejsce cięcia generalnie potwierdzają zmiany konformacyjne pomiędzy stanem podstawowym a stanem aktywnym kompleksu enzym-substrat. Przykładowo, badania przeprowadzone z udziałem szerokiego spektrum modyfikacji reszty nukleotydowej w pozycji H₁₇ (m.in. 6-azacytydyna, 6-metylocytydyna, 6-azaurydyna, 6-metylourydyna, 3-metylourydyna, 5-metylizocytydyna, etenocytydyna, nukleozydy posiadające jako zasadę pierścienie 4-pirydynonu, 2-pirydynonu, 2-pirymidynonu oraz rybofuranozyd pozabawiony zasady nukleinowej, rys. 2) (46) mogą być skorelowane co do wymogów przestrzennych tworzenia wiązań wodorowych, poszerzenia zakresu kąta wiązania glikozydowego i oddziaływań asocjacji warstwowej z wynikami badań rentgenostrukturalnych kompleksu zbliżonego do stanu przejściowego (42).

Wprowadzenie modyfikacji w strukturze rybozomu lub jego nici substratowej wielokrotnie wykorzystywano do zbadania udziału i roli jonów metali dwuwartościowych jako kofaktorów reakcji przecinania wiązania fosfordiestrowego (38,39). Najbardziej użytecznymi modyfikacjami okazały się tiofosforany o zdefiniowanej konfiguracji (R_p i S_p), wprowadzone w miejsce cięcia H₁₇pN₁₋₁ (40,47-52). Niejednoznaczna interpretacja wyników eksperymentów degradacji tak modyfikowanego rybozomu stanowi podstawę interesującej dyskusji dotyczącej koordynacji jonu Mg²⁺ przez atom tlenu *proR* reszty fosforanowej i próby precyzyjnego określenia roli jonów metali dwuwartościowych w katalizie (48,50-53). Ma to szczególnie istotne znaczenie wobec ostatnich doniesień świadczących o tym, że obecność jonów metali dwuwartościowych nie jest bezwarunkowo konieczna dla aktywności katalitycznej rybozomu *hammerhead*; aktywność ta może być zachowana przy wysokim stężeniu jonów metali jednowartościowych. Coraz częściej zatem wyrażany jest pogląd, że jony metalu oprócz funkcji katalitycznych pełnią istotną rolę strukturalną, wpływając na właściwości elektrostatyczne całego układu i uczestnicząc w procesie fałdowania struktury rybozomu prowadzącym do konformacji aktywnej katalitycznie (49,54-57).

Dynamikę konformacji rybozomu pod wpływem zmiany stężenia jonów magnezu potwierdzono metodą pomiaru rezonansowego przeniesienia energii fluorescencji



Rys. 3. Modyfikacje reszty cukrowej i grupy fosforanowej.

(FRET) (58,59). W badaniach tych wykorzystuje się coraz łatwiej dostępne na drodze chemicznej syntezę oligorybonukleotydy modyfikowane barwnikami fluorescencyjnymi. Stosując technikę usztywnienia struktury rybozemu poprzez utworzenie drogą chemiczną odpowiednich mostków dwusiarczkowych, stwierdzono, że tak zmodyfikowany rybozemu, zbudowany na bazie danych FRET, był zdecydowanie mniej aktywny niż uzyskany w oparciu na danych krystalograficznych (60).

Do badania mechanizmu degradacji wiązania fosfordiestrowego została wykorzystana reszta nukleotydu z funkcją 5'-tiolową (rys. 3). 5'-tiolo-5'-deoksynukleotydy

wprowadzono w obszar degradowanego dwunukleotydu, w pozycję N_{1-1} (nukleotydy opuszczający). W przeprowadzonych badaniach kinetycznych zmodyfikowanego kompleksu enzym-substrat nie otrzymano jednoznacznej odpowiedzi na pytanie czy odejście grupy 5'-OH jest etapem limitującym szybkość degradacji (61-63).

Udział i rolę jonów metali w aktywacji funkcji 2'-OH nukleozydu w pozycji H_{17} , próbowano wyjaśnić stosując syntetyczny oligomer modyfikowany za pomocą 2'-tiolo-2'-deoksynukleozydu (rys. 3) (64,65). Zamiana funkcji 2'-OH na grupę 2'-SH spowodowała zdecydowanie różny przebieg reakcji. Zamiast spodziewanej degradacji wiązania fosfordiestrowego, enzym katalizował atak grupy 2'-SH na sąsiedni węgiel anomeryczny C-1' z uwolnieniem zasady heterocyklicznej i utworzeniem 1,2-episiarczku (64,65).

Do wyjaśnienia roli jonów metali w katalizie wykorzystano również analogi nukleotydy modyfikowane w obrębie zasady heterocyklicznej. Wbudowanie modyfikacji z zasadą heterocykliczną pozbawioną grup funkcyjnych zdolnych do oddziaływania z jonami metalu, a następnie zbadanie aktywności enzymu, daje możliwość określenia miejsc wiązania jonów metali. Ilustracją tego sposobu postępowania mogą być wyniki eksperymentów zamiany reszty cytydyny w pozycji 17 na resztę 1- β -D-rybozydu 2-pyrimidynonu (rys. 2) (66). Obserwowany brak zmiany aktywności katalitycznej modyfikowanego rybozomu świadczy o braku miejsc wiązania jonów Mg^{2+} w obrębie cytozyny 17 (66).

2.2.2. Modyfikacje chemiczne w badaniach jednoniciowego rdzenia kompleksu enzym-substrat

W celu wyjaśnienia zależności między strukturą centrum katalitycznego a funkcją rybozomu *hammerhead* wprowadzono różnorodnie modyfikowane reszty nukleozydów pirymidynowych i purynowych praktycznie w prawie każdą pozycję rejonu rdzenia o zachowawczej sekwencji.

Obszar niekanonicznego parowania się zasad $N_7G_8A_9$ z $A_{14}A_{13}G_{12}$ (rys. 1b) został szczegółowo zbadany przez wykorzystanie fragmentów RNA o sekwencji motywu *hammerhead* zawierających modyfikowane nukleozydy purynowe, m.in. inozynę, nebularynę, rybozyd puryny, rybozyd 2-aminopuryny, 7-deazaguanozynę i 6-metoksyguanozynę (rys. 2) (67-73). Zastosowane modyfikacje ograniczały możliwość tworzenia wiązań wodorowych, na skutek usunięcia egzocyklicznej grupy aminowej, atomu wodoru N^1-H lub modyfikacji pozycji O^6 . Jakkolwiek zaburzenia w parowaniu się zasad, wynikające z wprowadzenia modyfikacji, powodowały znaczne obniżenie aktywności katalitycznej rybozomu. Największy wpływ na zmniejszenie szybkości katalizy wywołało usunięcie tlenu O^6 w jednostce G_8 (100-krotne obniżenie aktywności katalitycznej) i usunięcie atomu wodoru N^1-H w nukleotydach G_8 i G_{12} (50-krotne zmniejszenie efektywności enzymatycznej). Wprowadzenie rybozydu purynowego w pozycje A_{13} i A_{14} zredukowało aktywność katalityczną rybozomu odpowiednio 16- i 19-krotnie.

Wielokrotnie wykorzystywano modyfikację nukleotydów purynowych i pirymidynowych do zbadania oddziaływań występujących w czteronukleotydowej konserwatywnej sekwencji $C_3U_4G_5A_6$. Zastosowano między innymi rybozyd purynowy i 7-deazaguanozynę (rys. 2), które wbudowano w pozycję A_6 . Usunięcie azotu N^7 w rozważanej purynie, wynikające z modyfikacji tej pozycji za pomocą 7-deazaguanozyny, spowodowało 30-krotne obniżenie aktywności katalitycznej rybozemu (71,72).

W badaniach nad rolą funkcji egzoaminowej, tlenu O^6 i atomu wodoru N^1 -H guanozyny G_5 w tworzeniu aktywnego kompleksu enzym-substrat wykorzystano resztę inozyny, rybozidu 2-aminopuryny i 6-metoksyguanozyny (rys. 2). Wykazano, że usunięcie tlenu O^6 lub egzocyklicznej grupy aminowej powoduje 20-krotny spadek aktywności katalitycznej (67-69); natomiast usunięcie atomu wodoru N^1 -H guanozyny G_5 obniża aktywność 50-krotnie (70).

Znaczenie grup funkcyjnych cytydyny w pozycji C_3 oraz urydyny w pozycji U_4 , w tworzeniu aktywnej konformacji enzym-substrat, określono wykorzystując modyfikowane nukleotydy pirymidynowe m.in. β -D-rybozyd 2-pirymidynonu i 4-tiourydynę (66). Pierwsza modyfikacja umożliwiła zbadanie wpływu braku grupy egzoaminowej cytydyny (C_3) oraz atomu wodoru N^1 -H i tlenu O^4 urydyny (U_4), natomiast 4-tiourydyna pozwoliła zbadać znaczenie funkcji O^4 urydyny (rys. 3). Wbudowanie tych modyfikacji spowodowało kilkukrotny spadek aktywności katalitycznej rybozemu (66).

Przedstawione wyniki korelacji struktury zasad heterocyklicznych modyfikowanych rybozymów z danymi kinetycznymi stanowią potwierdzenie wysoce konserwatywnego charakteru reszt nukleotydowych w jednoniciowym rejonie rdzenia katalitycznego (67-73).

2.2.3. Modyfikowane rybozimy *hammerhead* o zwiększonej efektywności katalitycznej i poszerzonej specyficzności substratowej

Możliwość wykorzystania rybozymów *hammerhead* jako narzędzi terapeutycznych wyznaczyła nowy kierunek badań, mających na celu poszukiwanie modyfikowanych rybozymów o zwiększonej efektywności katalitycznej.

Przykładem ilustrującym takie poszukiwania są badania przeprowadzone przez zespół naukowców z Ribozyme Pharmaceutical Inc. (Boulder, Colorado USA) nad modyfikacjami w pozycji N_7 , jedynej nie zachowawczej pozycji w kieszeni katalitycznej rybozemu *hammerhead* (74). Przeprowadzono szczegółowe badania nad wymogami strukturalnymi nukleotydu N_7 , w których wykorzystano szereg podstawień resztami nukleotydów modyfikowanych m.in. 3-metylourydyną, 6-metylourydyną, pseudourydyną, 6-azaurydyną oraz resztami nukleotydów zawierających w miejscu zasady heterocyklicznej 2-pirydynon, 4-pirydynon, anilinę i pierścień benzenowy (rys. 2). W rezultacie otrzymano pięć rybozymów charakteryzujących się zwiększoną

efektywnością katalityczną (74). Wykazywały one również zwiększoną odporność na degradację nukleazami (74). Na podstawie porównania efektywności katalitycznej modyfikowanych rybozymów wysunięto wniosek, że zwiększenie aktywności katalitycznej rybozymów zawierających reszty cytozyny, 3-metylouracylu, 4-pirydynonu, aniliny i pierścień benzenowy jest wywołane stabilizacją aktywnego kompleksu enzym-substrat przez oddziaływania typu asocjacji warstwowej z U_{16-1} , nie zaś tworzeniem wiązań wodorowych wewnątrz katalitycznego rdzenia.

Interesującym przykładem możliwości modulowania działania rybozymu poprzez wprowadzenie modyfikacji była dokonana przez grupę Sproata zmiana specyficzności substratowej enzymu, z rozpoznawanej przez enzym sekwencji $N_{16-2}U_{16-1}H_{17}$ (gdzie H mogą być A, C, U) na $N_{16-2}C_{16-1}H_{17}$. Zamianę U_{16-1} na resztę cytydy powiązano z wprowadzeniem reszty inozyny w miejsce A_{15-1} (75,76). Podstawą do takiej modyfikacji rybozymu były dane z badań struktury krystalicznej kompleksu enzym-substrat, w których wykazano, że konserwatywna para $A_{15-1}-U_{16-1}$ jest parą niekanoniczną i zawiera tylko jedno wiązanie wodorowe między grupą 4-ketonową reszt urydyny i 6-aminową adenozy. Zastąpienie zatem pary $A_{15-1}-U_{16-1}$ parą $I_{15-1}-C_{16-1}$, w obrębie której tworzy się pojedyncze wiązanie wodorowe (w tym przypadku między grupą 4-aminową C_{16-1} a 6-ketonową I_{15-1}), pozwoliło na otrzymanie rybozymu o aktywności katalitycznej zbliżonej do analogu niemodyfikowanego. Ponadto grupa Sproata przeprowadziła szczegółowe badania nad strukturalnymi wymogami pary $I_{15-1}-C_{16-1}$ wprowadzając w pozycję 15·1, m.in. resztę 6-tioinozyny, 1-metyloinozyny, guanozyny, N,N-dimetyloguanozyny oraz 2-oksoguanozyny (rys. 2) (76). Spośród wymienionych reszt nukleotydowych 6-tioinozyna, która uniemożliwia utworzenie wiązania wodorowego z C_{16-1} , powodowała aż 10-krotne obniżenie aktywności katalitycznej rybozymu, natomiast wywodząca się z 1-metyloinozyny w pozycji 15·1 sprawiła, że rybozym był nieaktywny. Wszystkie inne zaburzenia w strukturze inozyny jak brak atomu wodoru N^1-H , modyfikacja pozycji C^2 czy uprotonowanie atomu azotu N^3 , w niewielkim stopniu obniżały aktywność katalityczną enzymu. Warto podkreślić, że różnorodne modyfikacje wbudowane w pozycję U_{16-1} (1- β -D-rybozyd 2-pirymidynonu, 4-tiourydyna (66)) lub A_{15-1} (rybonukleozyd purynowy (68), izoguanozyna (77)) ograniczające możliwość tworzenia wiązania wodorowego w parze $A_{15-1}-U_{16-1}$ powodowały całkowitą inhibicję lub kilkukrotne obniżenie szybkości katalizy (66,68,77).

2.3. Zastosowanie modyfikacji reszt nukleotydowych do zwiększenia stabilności rybozymu typu *hammerhead* w medium komórkowym

Projektowanie rybozymów o zwiększonej odporności na degradację nukleazami jest szczególnie istotne w kontekście ich wykorzystania jako potencjalnych terapeutyków (19,20).

W celu przeciwdziałania niekorzystnej degradacji nukleolitycznej rybozymów najszerzej stosuje się modyfikacje łańcucha fosforocukrowego poprzez zamianę

jednostek rybo- na deoksynukleotydy, wprowadzenie podstawników w pozycje 2' reszt rybozy lub wykorzystanie różnorodnych analogów wiązania fosfordiestrowego (20).

Spośród modyfikacji pozbawiających rybozym wolnych grup 2'-OH najczęściej stosowane jest wprowadzenie 2'-deoksynukleotydów lub 2'-fluoro-2'-deoksy-, 2'-amino-2'-deoksy-, 2'-*O*-metylo- i 2'-metoksyetoksynukleotydów (rys. 3) (78-82).

Dla poprawienia trwałości enzymu w komórce z powodzeniem wykorzystano rybozomy zawierające modyfikacje w obrębie grupy fosfordiestrowej (tiofosforany, łączniki amidowe i 2',5'-fosforany, rys. 3). Najbardziej efektywne w procesie hamowania ekspresji niepożądanych genów i stabilne w warunkach fizjologicznych okazały się rybozomy, w których kilka (rzadziej jedna) z grup fosfordiestrowych zostało podstawionych tiofosforanami (78,83-87). Powszechną strategią zwiększania trwałości enzymu na degradację nukleolityczną jest wprowadzanie w sekwencji rybozomu obu typów modyfikacji, modyfikacji grupy 2'-OH reszty cukrowej (najczęściej nukleozyd 2'-fluoro-2'-deoksy-pyrimidynowy) oraz terminalnie zlokalizowanych tiofosforanów (78). W eksperymentach, w których wykorzystuje się wymienione modyfikacje rybozomów stwierdzono ograniczenie ekspresji genu kodującego lucyferazę (88) oraz cięcie określonych pozycji w sekwencji HIV-1 LTR-mRNA (89).

Zastąpienie wszystkich wiązań 3',5'-fosfordiestrowych w helisach I, II i III rybozomu za pomocą nienaturalnych wiązań 2',5'-fosfordiestrowych (90) pozwoliło otrzymać rybozym o cechach zwiększonej odporności na degradację nukleolityczną i o aktywności katalitycznej porównywalnej z niemodyfikowanym analogiem. Warto zauważyć, że umieszczenie 2',5'-fosfordiestru w nici substratu, w miejscu hydroлизованego wiązania internukleotydowego również zwiększyło odporność oligomeru na RNazy (90), ale rybozym nie wykazywał aktywności katalitycznej wobec tak modyfikowanego substratu; wcześniej podobny rezultat uzyskano dla modyfikowanego 2',5'-fosfordiestrem substratowego odpowiednika rybozomu *hairpin* (91).

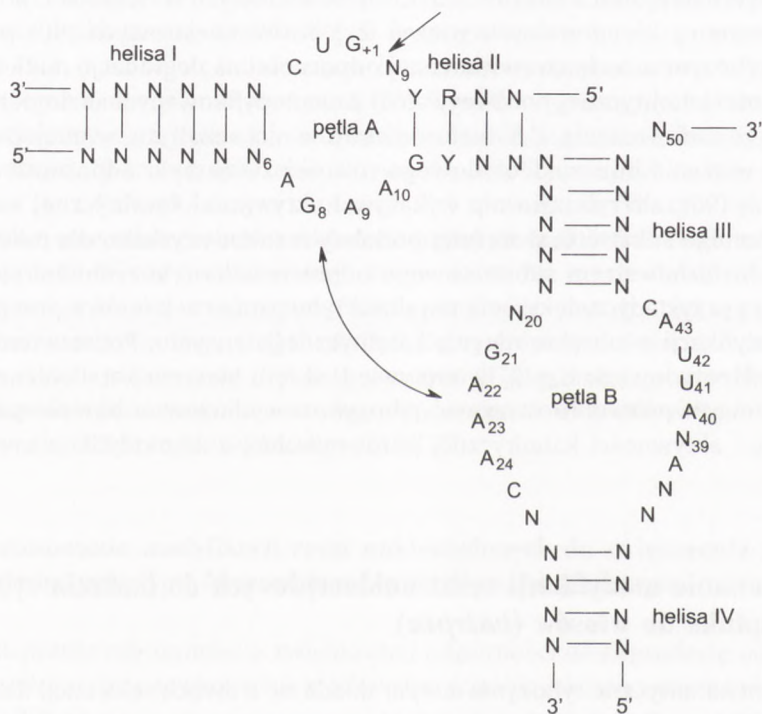
Znane są przykłady zwiększania trwałości rybozomów w komórce przez umieszczenie modyfikacji w obrębie rdzenia katalitycznego enzymu. Podstawienie wiązania internukleotydowego U₄pG₅ (w motywie U-skrętu kieszeni katalitycznej) wiązaniem amidowym pozwoliło otrzymać rybozym o wydłużonym okresie półtrwania w komórce i aktywności katalitycznej porównywalnej z niemodyfikowanym analogiem (92).

3. Zastosowanie modyfikacji reszt nukleotydowych do badania rybozomu typu spinka do włosów (*hairpin*)

Centrum katalityczne rybozomu *hairpin* składa się z dwóch sekwencji RNA: katalitycznego RNA o długości 50 nukleotydów oraz substratowego RNA o długości 14 nukleotydów (rys. 4). Między katalizatorem a substratem tworzą się dwa obszary parowania się zasad: helisa I (6 par zasad) i helisa II (4 pary zasad). Pozostałe dwa re-

jony helikalne umieszczone są w obrębie enzymu. Sekwencja helis I i II może być dowolnie zmieniana pod warunkiem zachowania parowania się zasad. Miejsce cięcia substratowego oligomeru RNA leży w czteronukleotydowej sekwencji NGUC (N = dowolny nukleotyd), w obrębie dinukleotydu NpG (93).

W wyniku degradacji wiązania fosfordiestrowego za pomocą rybozomu *hairpin* uzyskuje się produkty analogiczne jak dla rybozomu *hammerhead* (11,31,38,39,94). W badaniach mechanizmu działania rybozomu *hairpin* przeprowadzonych z zastosowaniem tiofosforanów o zdefiniowanej konfiguracji, umieszczonych w miejscu cięcia wykazano, że jony metali nie uczestniczą w procesie zrywania wiązania internukleotydowego (95-99). Rybozom *hairpin* zachowuje swoją aktywność w obecności kompleksu $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, poliamin i antybiotyków aminoglikozydowych w środowisku pozbawionym jonów magnezu (95-97,100). W eksperymentach tych wskazuje się, że jony metali nie biorą bezpośredniego udziału w procesie katalizy. Na podstawie rozwiązanej ostatnio struktury trzeciorzędowej krystalicznego rybozomu *hairpin* zaproponowano, że funkcję kwasowo-zasadowego katalizatora degradacji wiązania internukleotydowego pełnią prawdopodobnie reszty adeniny znajdujące się w centrum aktywnym enzymu (101).



Rys. 4. Struktura drugorzędowa rybozomu typu *hairpin*. Miejsce degradacji wiązania fosfordiestrowego zaznaczono strzałką. Oddziaływanie pętli A i B w aktywnym kompleksie enzym-substrat zaznaczono podwójną strzałką. N-dowolny nukleotyd, R-puryna, Y-piryminy.

Aktywność katalityczna rybozomu *hairpin* w znacznym stopniu zależy od przyjęcia przez cząsteczkę enzymu odpowiedniej konformacji, w której możliwe jest oddziaływanie pomiędzy domenami A i B. Dynamika konformacji enzymu spowodowana wpływem jonów metali i innych kofaktorów była analizowana metodą FRET (102), wykorzystującą oligomery modyfikowane barwnikami fluorescencyjnymi oraz poprzez usztywnienie struktury w oparciu na odpowiednich modyfikacjach dwusiarczkami (103).

Istotną rolę w badaniach zależności pomiędzy strukturą i funkcją rybozomu typu *hairpin* odegrały modyfikowane, syntetyczne rybonukleotydy, przy czym liczba szczegółowych danych eksperymentalnych jest mniejsza niż dla rybozomu *hammerhead*. Najszerzej wykorzystywane były modyfikacje w obrębie zasad heterocyklicznych. Na ich podstawie wykazano, że wszystkie grupy funkcyjne krytyczne dla aktywności kompleksu enzym-substrat są zlokalizowane w obszarze pętli A i pętli B (104-106). Obszar niekanonicznego parowania się zasad $G_{21}-A_{43}$, $A_{22}-U_{42}$ i $A_{23}-A_{40}$ wewnątrz pętli B został zbadany przez wykorzystanie fragmentów RNA modyfikowanych nukleozydami purynowymi ograniczającymi możliwość tworzenia wiązań wodorowych (m.in. inozyna, N^7 -deazaguanozyna, O^6 -metyloguanozyna, rys. 2) (107-109). Interesującą modyfikacją wprowadzoną w pętlę B rybozomu był łącznik propylowy (rys. 3) (110). Jest to modyfikacja obejmująca jedynie fragment pierścienia cukrowego i pozwala utrzymać właściwą liczbę wiązań między dwiema sąsiednimi grupami fosforanowymi. Umieszczenie takiej modyfikacji w sekwencji rybozomu, a następnie zbadanie jego aktywności, daje możliwość określenia czy reszta danego nukleotydu jest jedynie elementem struktury czy również bierze udział w utrzymaniu aktywnej konformacji kompleksu enzym-substrat (110).

Różnorodnie modyfikowane puryny wprowadzono w pozycję G_{+1} substratowego obszaru pętli A (111,112). Spośród 2-aminopuryny, N^7 -deazaguanozyny, inozyny i O^6 -metyloguanozyny (rys. 2) największy wpływ na obniżenie aktywności rybozomu miały dwie ostatnie modyfikacje (usunięcie grupy egzoaminowej w reszcie guaniny). Szczególnie drastyczny efekt wywołało wprowadzenie reszty inozyny, powodujące 1000-krotne zmniejszenia aktywności enzymu (111,112).

Do analizy wpływu grup funkcyjnych istotnych dla aktywności enzymu intensywnie wykorzystywane były również modyfikowane pochodne nukleozydów pirymidynowych. Grasby i wsp. zsyntetyzowali kilkanaście modyfikowanych oligomerów, w których każdą z reszt nukleozydów pirymidynowych, krytycznych dla utworzenia aktywnej struktury kompleksu enzym-substrat, zastąpili modyfikowanym analogiem, m.in. wykorzystali resztę 4-tiourydy, O^4 -metylourydy, O^2 -metylourydy i 1- β -D-rybozydu 2-pirymidynonu (rys. 2) (113). Na podstawie wyznaczonych parametrów kinetycznych autorzy wykazali, że każda z reszt pirymidynowych U_{41} , U_{42} i C_{25} odgrywa istotną rolę w stabilizacji struktury trzeciorzędowej motywu *hairpin*. Usunięcie atomu wodoru N^3-H w pozycji U_{41} i U_{42} , grupy egzoaminowej z C_{25} oraz wprowadzenie modyfikacji w obrębie funkcji 4-ketonowej U_{42} zmniejsza szybkość katalizy (113).

Do identyfikacji grup funkcyjnych istotnych dla aktywności enzymu intensywnie wykorzystywane były również 2'-deoksy i 2'-O-metylonukleozydy pirymidynowe i purynowe (rys. 3) (114). Modyfikacja grupy 2'-OH w pozycji A₁₀ lub G₁₁ pętli A czy reszt nukleozydów A₂₄ lub C₂₅ pętli B wpływa na obniżenie aktywności enzymatycznej rybozomu *hairpin*.

W dotychczasowych badaniach rybozomu *hairpin* wyraźnie wskazuje się na uwarunkowane wieloma czynnikami zmiany konformacyjne w strukturze rybozomu jako na zjawisko o podstawowym znaczeniu dla jego aktywności katalitycznej (95-97). Osiągnięcie przez kompleks enzym-substrat aktywnej katalitycznej konformacji umożliwia degradację wiązania fosfordiestrowego, prawdopodobnie bez katalitycznego udziału jonów metali dwuwartościowych (11,94).

4. Uwagi końcowe

W prowadzonych od dwudziestu lat badaniach nad katalitycznymi RNA, zarówno podstawowych jak i aplikacyjnych, modyfikowane oligonukleotydy odegrały istotną rolę jako specyficzne narzędzia molekularne do poznawania zależności pomiędzy strukturą rybozymów a ich aktywnością katalityczną. Wkład ten jest szczególnie znaczący w badaniach najmniejszych częścieczek katalitycznych RNA – rybozymów *hammerhead* i *hairpin*.

Dalszy rozwój chemii modyfikowanych nukleotydów, metod syntezy dłuższych oligorybonukleotydów jak również metod specyficznego wbudowywania modyfikowanych jednostek w łańcuch RNA bez wątplenia poszerzy zakres możliwości badania katalitycznych RNA. Modyfikowane rybozomy mają również szansę stać się efektywnymi terapeutykami w hamowaniu ekspresji genów białek niepożądanych w komórce.

Praca była finansowana z funduszu grantu KBN nr PBZ-KBN-059/T09/07.

Literatura

1. Kruger K., Grabowski P. J., Zaug A. J., Sands J., Gottschling D. E., Cech T. R., (1982), *Cell*, 31, 147-157.
2. Guerrier-Tanaka C., Gardiner K., Marsh T., Pace N., Altman S., (1983), *Cell*, 35, 849-857.
3. Uhlenbeck O. C., (1987), *Nature*, 328, 596-600.
4. Wu H. N., Lin Y. J., Lin F. P., Makino S., Chang M. F., Lai M. M., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 1831-1835.
5. Saville B. J., Collins R. A., (1990), *Cell*, 61, 685-696.
6. Valadkhan S., Manley J. L., (2001), *Nature*, 413, 701-707.
7. Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P. B., Steitz T. A., (2000), *Science*, 289, 920-930.
8. Polacek N., Gaynor M., Yassin A., Mankin A. S., (2001), *Nature*, 411, 498-501.
9. Moore P. B., Steitz T. A., (2002), *Nature*, 418, 229-235.

10. Carola Ch., Eckstein F., (1999), *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3, 274-283.
11. Doudna J. A., Cech T. R., (2002), *Nature*, 418, 222-228.
12. Chachulska A. M., (1992), *Postępy Biochemii*, 38, 64-74.
13. Jakubowicz M., (1992), *Postępy Biochemii*, 38, 164-171.
14. Kierzek R., (1996), *Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej*, red. Barciszewski J., Lastowski K., Twardowski T., 137-185, wyd. Sorus, Poznań
15. Nawrot B., (2002), *Na pograniczu chemii i biologii*, red. Barciszewski J., Koroniak H., Wyd. Nauk. UAM, t. V, 26-52.
16. Tuerk C., Gold L., (1990), *Science*, 249, 505-510.
17. Jaschke A., Seeling B., (2000), *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4, 247-262.
18. Jaschke A., Frauendorf C., Hausch F., (1999), *Synlett.*, 825-833.
19. Kuwabara T., Warashina M., Tanabe T., Tani K., Asano S., Taira K., (1997), *Nucleic Acids Res.*, 25, 3074-81.
20. Bramlage B., Luzi E., Eckstein F., (1998), *Trends Biotech. Sci.*, 16, 434-438.
21. Sullenger B. A., Gilboa E., (2002), *Nature*, 418, 252-258.
22. Vinayak R., (1997), *Chemical synthesis, analysis and purification of ribozymes*, in: *Ribozyme Protocols*, Ed. P. C. Turner, Humana Press, Totowa, NJ, 51-58.
23. Wincott F. E., Usman N., (1997), *A practical method for the production of RNA and ribozymes*, in: *Ribozyme Protocols*, Ed. P. C. Turner, Humana Press, Totowa, NJ, 59-68.
24. Grasby J. A., Gait M. J., (1994), *Biochimie*, 76, 1223-1234.
25. Earnshaw D. J., Gait M. J., (1998), *Biopolymers*, 48, 39-54.
26. Verma S., Eckstein F., (1998), *Ann. Rev. Biochem.*, 67, 99-134.
27. Hutchins C. J., Rathjen P. D., Forster A. C., Symons R. H., (1986), *Nucleic Acids Res.*, 14, 3627-3640.
28. Ruffner D. E., Stormo G. D., Uhlenbeck O. C., (1990), *Biochemistry*, 29, 10695-10702.
29. McKay D. B., (1996), *RNA*, 2, 395-403.
30. Sigurdsson S. T., Eckstein F., (1995), *Trends Biotech. Sci.*, 13, 286-289.
31. Zhou D. M., Taira K., (1998), *Chem. Rev.*, 98, 991-1022.
32. Hertel K. J., Pardi A., Uhlenbeck O. C., Koizumi M., Ohtsuka E., Uesugi S., Cedergren R., Eckstein F., Gerlach W. L., Hodgson R., Symons R. H., (1992), *Nucleic Acids Res.*, 20, 3252-3257.
33. Pley H., Flaherty K. M., McKay D. B., (1994), *Nature*, 372, 68-74.
34. Scott W. G., Finch J. T., Klug A., (1995), *Cell*, 81, 991-1002.
35. Scott W. G., Murray J. B., Arnold J. R., Stoddard B. I., Klug A., (1996), *Science*, 274, 2065-2069.
36. Buzayan J. M., Hampel A., Bruening G., (1986), *Nucleic Acids Res.*, 14, 9729-9236.
37. Dahm S. C., Uhlenbeck O. C., (1990), *Biochimie*, 72, 819-823.
38. Takagi Y., Warashina M., Stec W. J., Yoshinari K., Taira K., (2001), *Nucleic Acids Res.*, 29, 1815-1834.
39. Kuimelis R. G., McLaughlin L. W., (1998), *Chem. Rev.*, 98, 1027-1044.
40. Slim G., Gait M. J., (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19, 1183-1188.
41. van Tol H., Bazayan J. M., Feldstein P. A., Ecstein F., Breuning G., (1990), *Nucleic Acids Res.*, 18, 1971-1975.
42. Murray J. B., Terwey D. P., Maloney L., Karpeisky A., Usman N., Beigelman L., Scott W. G., (1998), *Cell.*, 92, 665-673.
43. Chaulk S. G., MacMillan A. M., (1998), *Nucleic Acids Res.*, 26, 3173-3178.
44. Sigurdsson S. T., Thomson J. B., Eckstein F., (1998), *Small ribozymes*, in: *RNA Structure and Function*, Ed. Simons R. W., Grunberg-Manago M., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 339-376.
45. Thomson J. B., Tuschl T., Eckstein F., (1996), *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Eds. Eckstein F., Lilley D. M. J., Springer-Verlag, Berlin, 173-196.
46. Baidya N., Ammons G. E., Matulic-Adamic J., Karpeisky A. M., Beigelman L., Uhlenbeck O. C., (1997), *RNA*, 3, 1135-1142.
47. Koizumi M., Ohtsuka E., (1991), *Biochemistry*, 30, 5145-5150.
48. Dahm S. A. C., Uhlenbeck O. C., (1991), *Biochemistry*, 30, 9464-9469.
49. Murray J. B., Seyhan A. A., Walter N. G., Burke J. M., Scott W. G., (1998), *Chem. Biol.*, 5, 587-595.
50. Scott E. C., Uhlenbeck O. C., (1999), *Nucleic Acids Res.*, 27, 479-484.

51. Cunningham L. A., Li J., Lu Y., (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 4518-4519.
52. Wang S., Karbstein K., Peracchi A., Beigelman L., Herschlag D., (1999), *Biochemistry*, 38, 14363-14378.
53. Zhou D. M., Kumar P. K. R., Zhang L. H., Taira K., (1996), *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 8969-8970.
54. Murray J. B., Dunham C. M., Scott W. G., (2002), *J. Mol. Biol.*, 315, 121-130.
55. O'Rear J. L., Wang S., Feig A. L., Beigelman L., Uhlenbeck O. C., Herschlag D., (2001), *RNA* 7(4), 537-545.
56. Murray J. B., Scott W. G., (2000), *J. Mol. Biol.*, 296, 33-41.
57. Curtis E. A., Bartel D. P., (2001), *RNA*, 7, 546-552.
58. Tuschl T., Gohlke C., Jovin T., Westhof E., Eckstein F., (1994), *Science*, 266, 785-789.
59. Bassi G. S., Murchie A. I. H., Lilley D. M. J., (1996), *RNA*, 2, 756-768.
60. Sigurdsson S., Tuschl T., Eckstein F., (1995), *RNA*, 1, 575-583.
61. Zhou D. M., Usman N., Wincott F. E., Matulic-Adamic J., Orita M., Zhang L. H., Komiyama M., Kumar P. K. R., Taira K., (1996), *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 5862-5866.
62. Kuimelis R. G., McLaughlin L. W., (1996), *Biochemistry*, 35, 5308-5317.
63. Zhou D. M., Zhang L. H., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 14343-14348.
64. Hamm M. L., Schwans J. P., Piccirilli J. A., (2000), *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 4223-4224.
65. Hamm M. L., Nicolici D., Breemen R. B., Piccirilli J. A., (2000), *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 12069-12078.
66. Murray J. B., Adams C. J., Arnold J. R. P., Stockley P. G., (1995), *BioChem. J.*, 311, 487-494.
67. Tuschl T., Ng M. M. P., Peiken W., Benseler F., Eckstein F., (1993), *Biochemistry*, 32, 11658-11668.
68. Fu D. J., Sharanabasava B. R., McLaughlin L. W., (1993), *Biochemistry*, 32, 10629-10637.
69. Fu D. J., McLaughlin L. W., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3985-3986.
70. Grasby J. A., Butler P. J. G., Gait M. J., (1993), *Nucleic Acids Res.*, 21, 4444-4450.
71. Fu D. J., McLaughlin L. W., (1992), *Biochemistry*, 31, 10941-10949.
72. Seela F., Mersmann K., Grasby J. A., Gait M. J., (1993), *Helv. Chim. Acta*, 76, 1809-1820.
73. Woisard A., Favre A., Clivio P., Fourrey J. L., (1992), *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 10072-10074.
74. Burgin A. B., Gonzalez C., Matulic-Adamic J., Karpeisky A. M., Usman N., McSwiggen J. A., Beigelman L., (1996), *Biochemistry*, 35, 14090-14097.
75. Ludwig J., Blaschke M., Sproat B. S., (1998), *Nucleic Acids Res.*, 26, 2279-2285.
76. Ludwig J., Blaschke M., Dunkel M., Ross K., Sproat B. S., (1999), *Nucleosides & Nucleotides*, 18, 1519-1520.
77. Ng M. M. P., Benseler F., Tuschl T., Eckstein F., (1994), *Biochemistry*, 33, 12119-12126.
78. Engels J. W., Scherr M., Ganser A., Grez M., Wittmann V., (1998), *Nucleosides & Nucleotides*, 17, 1685-1696.
79. Jarvis T. C., Alby L. J., Beaudry A. A., Wincott F. E., Beigelman L., McSwiggen J. A., Stinchcomb D. T., (1996), *RNA*, 2, 419-428.
80. Jarvis T. C., Wincott F. E., Alby L. J., McSwiggen J. A., Beigelman L., Gustofson J., Drenzo A., Arthur M., Matulic-Adamic J., Karpeisky A., Gonzalez C., Woolf T. M., Usman N., Stinchcomb D. T., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271, 29107-29112.
81. Scherr M., Grez M., Ganser A., Engels J. W., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 14304-14313.
82. Citti L., Eckstein F., Capecchi B., Mariani L., Nevischi S., Poggi A., Rainaldi G., (1999), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 9, 125-133.
83. Zhang X., Yamada R., Shimayama T., Imada K., Uchiyama T., Hattori T., (1996), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 229, 466-471.
84. Wang Q., Bashar M., Hansen C., Asundi J., Robishaw J. D., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 26040-26048.
85. Kitajima I., Hanyu N., Soejima Y., Hirano R., Arahira S., Yamaoka S., Yamada R., Maruyama I., Kaneda Y. J., (1997), *Biol. Chem.*, 272, 27099-27106.
86. Flores M. V. C., Atkins D., Wade D., O'Sullivan W. J., Stewart T. S., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 16940-16945.
87. Zhang X., Iwatani Y., Shimayama T., Yamada R., Koito A., Xu Y., Sakai H., Uchiyama T., Hattori T., (1998), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 8, 441-450.
88. Bramlage B., Alefelder S., Marschall P., Eckstein F., (1999), *Nucleic Acids Res.*, 27, 3159-3167.
89. Bramlage B., Luzi E., Eckstein F., (2000), *Nucleic Acids Res.*, 28, 4059-4067.

90. Burlina F., Fourrey J. L., Lefort V., Favre A., (1999), *Tetrahedron Lett.*, 40, 4559-4562.
91. Feldstein P. A., Buzayan J. M., van Tol H., de Bear H., Cough G. R., Gilham P. T., Bruening G., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2623-2627.
92. Dunkel M., Reither V., (2000), *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 19, 749-756.
93. Hampel A., Tritz R., Hick M., Cruz P., (1990), *Nucleic Acids Res.*, 18, 299-304.
94. Walter N. G., Burke J. M., (1998), *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2, 24-30.
95. Hampel A., Cowan J. A., (1997), *Chem. Biol.*, 4, 513-517.
96. Nesbitt S., Hegg L. A., Fedor M. J., (1997), *Chem. Biol.*, 4, 619-630.
97. Young K. J., Gill F., Grasby J. A., (1997), *Nucleic Acids Res.*, 25, 3760-3766.
98. Young K. J., Gill F., Grasby J. A., (1996), *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 61, S268-S270.
99. Chowrira B. M., Burke J. M., (1991), *Biochemistry*, 30, 8518-8522.
100. Earnshaw D. J., Gait M. J., (1998), *Nucleic Acids Res.*, 26, 5551-5561.
101. Rupert P. B., Ferre-D'Amare A. R., (2001), *Nature*, 410, 780-786.
102. Walter N. G., Hampel K. J., Brown K. M., Burke J. M., (1998), *EMBO*, 17, 2378-2391.
103. Earnshaw D. J., Masquida B., Müller S., Sigurdsson S. T., Eckstein F., Westhof E., Gait M. J., (1997), *J. Mol. Biol.*, 274, 197-212.
104. Berzal-Herranz A., Joseph S., Chowrira B. M., Butcher S. E., Burke J. M., (1993), *EMBO J.*, 12, 2567-2574.
105. Joseph S., Burke J. M., (1993), *J. Biol. Chem.*, 268, 24515-24518.
106. Anderson P., Monforte J., Tritz R., Nesbitt S., Hearst J., Hampel A., (1994), *Nucleic Acids Res.*, 22, 1096-1100.
107. Earnshaw D. J., Gait M. J., (1997), *Antisense Nucl. Acid Drug Develop.*, 7, 403-411.
108. Butcher S. E., Burke J. M., (1994), *J. Mol. Biol.*, 244, 52-63.
109. Butcher S. E., Burke J. M., (1994), *Biochemistry*, 33, 992-999.
110. Schmidt S., Beigelman L., Karpeisky A., Usman N., Sorensen U. S., Gait M. J., (1996), *Nucleic Acids Res.*, 24, 573-581.
111. Grasby J., Mermann K., Singh M., Gait M. J., (1995), *Biochemistry*, 34, 4068-4076.
112. Chowrira B. M., Burke J. M., (1991), *Nature*, 354, 320-322.
113. Young K. J., Vyle J. S., Pickering T. J., Cohen M. A., Holmes S. C., Markel O., Grasby J. A., (1999), *J. Mol. Biol.*, 288, 853-866.
114. Chowrira B. M., Berzal-Herranz A., Keller C. F., Burke J. M., (1993), *J. Biol. Chem.*, 268, 19458-19462.