

REGULACJA AKTYWNOŚCI KATALITYCZNEJ RYBOZYMÓW HDV ORAZ DEOKSYRYBOZYMÓW ZA POMOCĄ ANTYBIOTYKÓW I JONÓW METALI

REGULATION OF THE CATALYTIC ACTIVITY OF
HDV RIBOZYMES AND DEOXYRIBOZYMES WITH
ANTIBIOTICS AND METAL IONS

Jan Wrzesinski, Jerzy Ciesiołka

*Zakład Biochemii RNA, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
e-mail: wrzesinj@ibch.poznan.pl, jerzy.ciesiolka@ibch.poznan.pl*

Pracę dedykujemy pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk

Abstract

Wprowadzenie

1. Struktura rybozymów HDV oraz mechanizm ich działania
2. Oddziaływania antybiotyków z rybozymami HDV
3. Wpływ pH na zdolność antybiotyków do regulacji aktywności katalitycznej rybozymu HDV
4. Degradacja kwasów nukleinowych w obecności bacytracyny
5. Deoksyrybozimy aktywne w obecności jonów kadmu oraz w środowisku o niskiej wartości pH, otrzymane metodą selekcji *in vitro*

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Jan Wrzeński pracuje w Zakładzie Biochemii RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu na stanowisku profesora nadzwyczajnego.

Prof. dr hab. Jerzy Ciesiołka pracuje na stanowisku profesora zwyczajnego w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu oraz jest kierownikiem Zakładu Biochemii RNA.

ABSTRACT

This review article describes the results of a 15-year cooperation between the Department of RNA Biochemistry at the Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences in Poznań and the Medical Chemistry Team of the Faculty of Chemistry at the University of Wrocław, headed by Professor Małgorzata Jeżowska-Bojczuk. A wide spectrum of antibiotics and other low molecular compounds and their complexes with Cu^{2+} ions have been tested as potential inhibitors of the HDV ribozyme catalytic reaction. Unexpectedly, it has been found that a number of compounds, depending on the conditions, exhibit inhibitory or stimulatory properties, i.e. they act as modulators of the RNA catalysis process. It was found that the effect of stimulation / inhibition of the catalytic activity of the HDV ribozyme is closely related to the degree of protonation of the antibiotics under study in given conditions. Their ability to inhibit catalysis also increases after binding the Cu^{2+} cation. In an environment with a higher pH, antibiotics usually stimulate the cleavage reaction, as at least some of their nitrogen centers are allowed to participate in the catalysis reaction, as proton acceptors / donors or a catalytic metal ion coordination site. During the study of one of the antibiotics, bacitracin, it was also observed that it exhibits nucleolytic properties with RNA and DNA molecules. The discovery of the hydrolytic properties of bacitracin extended the potential use of this antibiotic in antiviral therapy with the aim to destroy undesired nucleic acids in the cell. To search for DNAzymes catalyzing RNA hydrolysis, the *in vitro* selection method was used. In the selection experiment aimed at obtaining DNAzymes active in the presence of Cd^{2+} ions, variants belonging to the family of DNAzymes 8–17 previously described in the literature were obtained. Analysis of their properties showed that not only Cd^{2+} but also Zn^{2+} and Mn^{2+} ions support catalysis, therefore the site of catalytic metal ion coordination is not highly specific. The DNAzymes obtained in the second selection experiment showed an optimum of catalytic activity in the pH range of 4.0–4.5 and were inactive at a pH higher than 5.0. Interestingly, they do not require the presence of any divalent metal ions as cofactors in the catalysis reaction. The obtained results broaden the repertoire of DNAzymes which operate under non-physiological conditions and bring new information on the possible mechanisms of reactions catalyzed by nucleic acids.

Keywords: antibiotics, HDV ribozymes, deoxyribozymes, metal ions

Słowa kluczowe: antybiotyki, rybozomy HDV, deoksyrybozomy, jony metali

WPROWADZENIE

Na początku lat 80. XX w. Thomas Cech oraz, niezależnie, Sydney Altman odkryli cząsteczki RNA posiadające właściwości katalityczne [1, 2]. W trakcie badań nad procesem *splicingu*, Cech zauważył, że wycinanie intronów RNA u jednokomórkowego organizmu eukariotycznego *Tetrahymena thermophila* nie wymaga udziału białek [1]. Zatem cząsteczki RNA w specyficznych sytuacjach mogą wykazywać właściwości enzymantyczne. Podobne wnioski sformułował Altman na podstawie obserwacji, że do dojrzewania cząsteczek tRNA przy udziale komponentu RNA RNazy P, wymagana jest tylko obecność jonów magnezu [2]. W późniejszych latach odkryto szereg występujących w naturze rybozymów, m.in. hammerhead [3] i hairpin [4], pochodzące z wirusów roślinnych, VS występujący w transkrypcie mitochondrialnego DNA pleśni *Neuspora crassa* [5] oraz rybozym HDV, znaleziony w wirusie zapalenia wątroby typu D [6]. Wszystkie naturalnie występujące rybozomy posiadają zdolność przecinania łańcucha RNA, a w przypadku rybozomu hairpin - także ligacji fragmentów RNA [7].

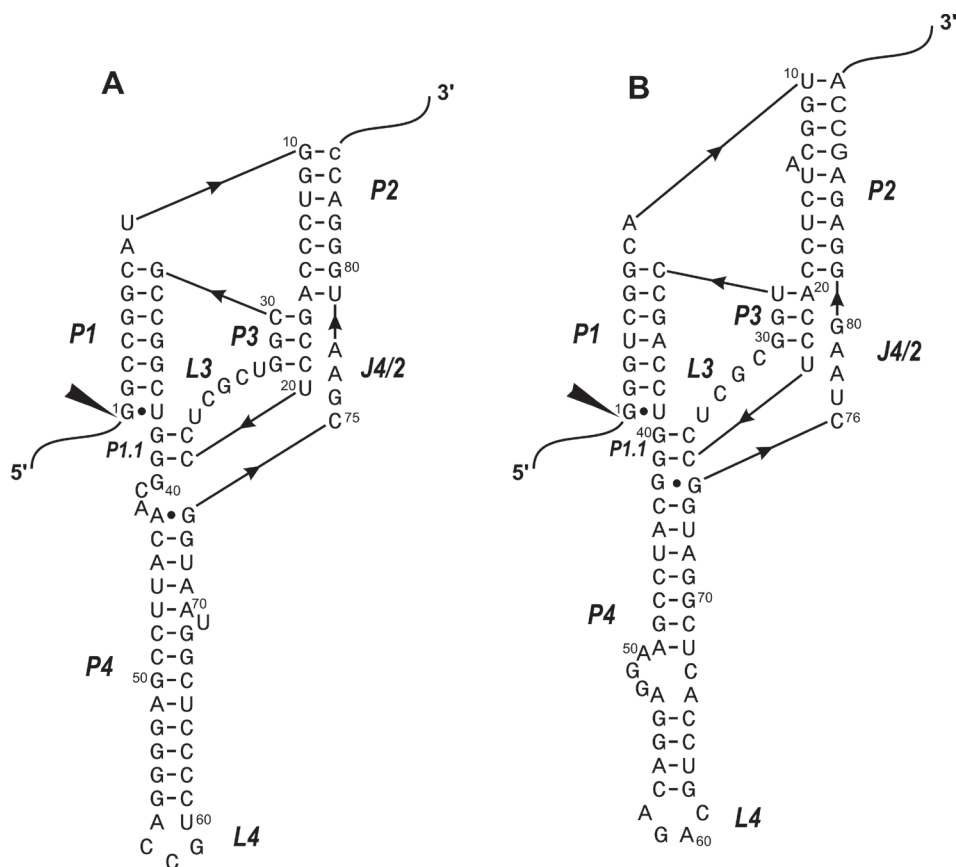
Cechą charakterystyczną cząsteczek RNA, w porównaniu do DNA, jest ich niestabilność. Okres półtrwania cząsteczek RNA waha się od kilku godzin do kilku dni, w zależności od ich składu nukleotydowego, struktury lub warunków środowiska. W przypadku DNA ten czas wynosi około 500 lat. Powstała zatem idea zastąpienia nietrwałej cząsteczki RNA przez DNA i konstrukcji DNAzymów o właściwościach nukleolitycznych, przecinających łańcuch RNA, podobnie do rybozymów, co zostało uwieńczone sukcesem w 1997 roku [8]. Stosując metodę selekcji *in vitro*, Breaker i Joyce znaleźli dwa DNAzomy, nazwane 8-17 i 10-23, wymagające dla swej aktywności hydrolitycznej obecności niektórych jonów metali dwuwartościowych. Ostatnie lata przyniosły wiele doniesień o zastosowaniu DNAzymów, dzięki ich stabilności - w konstrukcji biosensorów do wykrywania jonów metali, w tym jonów metali ciężkich, oraz zastosowaniu terapeutycznym DNAzymów w niszczeniu patogennych RNA w komórce [9].

Niniejszy artykuł przeglądowy opisuje wyniki 15-letniej współpracy pomiędzy Zakładem Biochemii RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu i Zespołem Chemii Medycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, kierowanym przez Panią Profesor Małgorzatę Jeżowską-Bojczuk. Nasze wspólne badania dotyczyły wpływu wybranych antybiotyków oraz ich kompleksów z jonami miedzi(II) na aktywność katalityczną antygenomowego rybozomu HDV. Podjęliśmy także próbę znalezienia DNAzymów, wykazujących zdolność przecinania cząsteczek RNA w obecności wybranych jonów metali przejściowych.

1. STRUKTURA RYBOZYMÓW HDV ORAZ MECHANIZM ICH DZIAŁANIA

Jedynym rybozymem występującym w organizmie człowieka jest rybozym HDV, nazywany także rybozymem *delta*. Został on znaleziony w wirusie zapalenia

wątroby typu D (ang. *hepatitis delta virus*). Replikacja tego wirusa RNA zachodzi według mechanizmu „toczącego się koła” na terenie jądra komórkowego z udziałem RNA polimerazy II gospodarza [10]. Proces replikacji przebiega na matrycy RNA typu genomowego wirionu i jest syntezowana nić typu antygenomowego. Powstający w wyniku tego procesu transkrypt składa się z wielokrotnie powtarzających się sekwencji genomu wirusa, połączonych ze sobą w formie multimerycznej. Występujący odcinek sekwencji o aktywności rybozymalnej umożliwia przecinanie się formy multimerycznej do form monomerycznych. Linowe odcinki RNA typu antygenomowego ulegają następnie ligacji do formy kolistej i służą jako kolejne matryce do syntezy RNA typu genomowego [11]. Mimo że genom wirusa HDV wykazuje wysoką zmienność i ulega ciągłej ewolucji w trakcie infekcji, odcinek sekwencji nukleotydowej warunkujący autokatalityczne przecinanie się RNA charakteryzuje się bardzo wysoką zachowawczością.



Rysunek 1. Struktury drugorzędowe A) genomowego i B) antygenomowego rybozimu HDV
Figure 1. Secondary structures of A) genomic and B) antigenomic HDV ribozyme

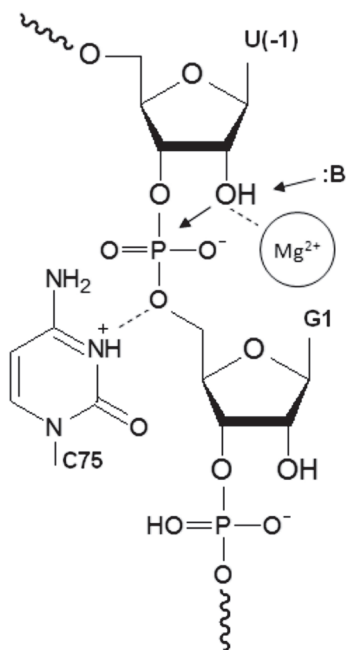
Obydwa rybozomy HDV tworzą strukturę typu pseudowęzła, która zakłada silne upakowanie cząsteczki, polegające na występowaniu większości nukleotydów w regionach dwuniciowych (Rys. 1). Struktura ta złożona jest z czterech regionów dwuniciowych, oznaczonych P1, P2, P3 i P4, regionu jednoniciowego, oznaczonego jako J4/2, oraz dwóch regionów pętlowych, L3 i L4 zamykających regiony P3 i P4. Autokatalityczne przecinanie łańcucha RNA występuje za resztą guanozyny, tworzącą niestandardową parę zasad G-U w regionie P1.

Wyjątkowo upakowana forma cząsteczki rybozomu HDV rodzi pytanie o sposób jego zwijania się w aktywną katalitycznie formę podczas replikacji wirusowego RNA [11]. Nowo powstająca cząsteczka RNA syntetyzowana jest przez polimerazę RNA od końca 5' poprzez przyłączanie kolejnych nukleotydów. Sformułowano dwie hipotezy: pierwszą, że powstająca podczas replikacji nić RNA może tworzyć sekwencyjnie odpowiednie motywy struktury drugorzędowej rybozomu, gdy tylko odpowiedni fragment RNA zostanie zsyntetyzowany (12). Druga hipoteza sugerowała, że multimeryczny transkrypt RNA może pozostawać w nieaktywnej katalitycznej formie i dopiero oddziaływanie z chaperonami RNA może rybozom uaktywnić [13]. Problemem tym zajęliśmy się w Zakładzie Biochemii RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN.

Wykorzystując rybozom HDV typu genomowego, przeprowadziliśmy badania *in vitro* mające na celu modelowanie kolejnych stadiów procesu zwijania się tego rybozomu [14]. Zsyntetyzowano cztery fragmenty rybozomu o wzrastającej długości od końca 5', złożone z nukleotydów 1-43, 1-73, 1-78 i 1-84. Odpowiadały one kolejnym stadiom syntezy regionu rybozymalnego podczas replikacji wirusowego RNA. Do badań struktury otrzymanych fragmentów użyto metody cięć indukowanych jonami Pb^{2+} , trawień nukleazami oraz metod chemicznej modyfikacji DMS oraz hydrazyną. Stwierdzono, że helisy P1 i P4 są tworzone natychmiast, gdy tylko zsyntetyzowany fragment RNA zawiera te elementy struktury. W przypadku regionu P3/L3, tworzy on początkowo strukturę spinki, która w trakcie dalszej elongacji łańcucha RNA ulega przearanżowaniu, co pozwala na utworzenie finalnej struktury rybozomu typu pseudowęzła [14].

Modele struktur drugorzędowych rybozomów HDV zostały potwierdzone przez wyniki chemicznej modyfikacji oraz cięcia nukleazami [15]. Jednakże decydujące było rozwiązanie w końcu lat 90. struktury rybozomu HDV typu genomowego w kryształach [16]. Analiza krystalograficzna pokazała silne upakowanie struktury poprzez utworzenie dwóch pseudowęzłów z zaangażowaniem helisy P1 oraz nowej helisy P1.1 powstałej przez oddziaływanie regionu jednoniciowego J1/4 z pętlą L3. Co ciekawe, oddalone w strukturze drugorzędowej nukleozydy G1 oraz C75, w strukturze trzeciorzędowej rybozomu tworzą miejsce katalityczne podobne do miejsc katalitycznych enzymów białkowych. Centrum katalityczne stabilizowane jest przez szereg oddziaływań, takich jak: oddziaływania warstwowe, powodujące przemieszczenie C75 w głąb rdzenia struktury, jak i szereg wiązań wodorowych, stabilizujących położenie katalitycznej reszty C75 [16, 17].

Rozwiązanie kolejnych struktur krystalograficznych rybozomu HDV pozwoliło na zaproponowanie mechanizmu autokatalitycznego przecięcia łańcucha RNA przez rybozym [18] (Rys. 2). Reszta cytydyny w pozycji 75 jest protonowana i tworzy wiązanie wodorowe z 5' atomem tlenu wiązania fosfodiesterowego reszty guanozyny w pozycji 1 (Rys. 2). Aktywny jon metalu koordynuje do atomu *pro*-Rp tlenu reszty G1 i grupy 2' hydroksylowej reszty urydyny w pozycji (-1). Wiązanie jonu metalu do czynnika nukleofilowego ułatwia deprotonację przez zasadę B. Protonowana reszta C75 oraz jon Mg^{2+} stabilizują fosforan w stanie przejściowym, powstały poprzez atak nukleofilowy zjonizowanej grupy $2'O^-$ reszty U(-1). Końcowym etapem przedstawionej reakcji transestryfikacji jest utworzenie 2'3'-cyklicznego fosforanu na reszcie U(-1) i grupy 5' hydroksylowej na G1. Efektywność reakcji przecięcia łańcucha RNA przez rybozym HDV zależy od dwóch czynników, obecności wybranych jonów metali dwuwartościowych oraz odpowiedniej aranżacji miejsca katalitycznego, zapewniającego atak *in line* grupy $2'O^-$ na atom fosforu. Wymaga to ustawienia atomów $2'O-P-5'O$ w jednej linii.



Rysunek 2. Mechanizm auto-katalitycznego przecięcia antygenomowego rybozomu HDV
 Figure 2. Mechanism of auto-catalytic cleavage of HDV ribozyme

Nasze badania z zastosowaniem wariantów antygenomowego rybozomu HDV, działającego w formie *cis* oraz *trans*, wykazały ich największą aktywność w obecności 1 mM stężenia jonów Mg^{2+} oraz Mn^{2+} [19]. Ponadto, zauważono wyższą aktywność wariantów *cis*, w porównaniu do form *trans*. Dla innych jonów metali, rybozym HDV był aktywny w obecności jonów Co^{2+} oraz Sr^{2+} . Natomiast w warunkach

zblizonych do fizjologicznych, rybozym był nieaktywny w obecności jonów jedno-wartościowych oraz spermidyny.

Testowanie wpływu struktury miejsca katalitycznego na aktywność antygenomowego rybozymu HDV umożliwiła metoda selekcji *in vitro* [20]. Skonstruowana biblioteka kombinatoryczna zawierała ok. $4,3 \times 10^9$ różnych wariantów tego rybozymu. Zawierała 16 pozycji typu *random*, to jest każdy z czterech nukleotydów występował z równym prawdopodobieństwem w tych pozycjach, w regionach P1.1, L3 oraz J4/2 (Rys. 1). W wyniku selekcji otrzymano szereg aktywnych katalitycznie wariantów rybozymu HDV. Jedna trzecia wariantów zawierała pojedynczą mutację G80U, która nie obniżała efektywności reakcji cięcia łańcucha RNA. Ponadto, co trzeci wariant zawierał mutację reszty C76, która bierze udział w mechanizmie katalizy RNA, identycznie jak C75 w rybozymie HDV typu genomowego (Rys. 2). Okazało się, że C76 w antygenomowym rybozymie HDV można zastąpić innym nukleotydem, lecz w sąsiedniej pozycji 77 musi występować reszta cytydyny. Wyznaczona stała szybkości reakcji cięcia (k_{obs}) jest jednak znacznie niższa niż dla rybozymu typu dzikiego. Świadczy to o unikalności miejsca katalitycznego rybozymu HDV [20].

2. ODDZIAŁYWANIA ANTYBIOTYKÓW Z RYBOZYMAMI HDV

Rozpoczynając współpracę z zespołem prof. M. Jeżowskiej-Bojczuk postanowiliśmy skoncentrować się na dwóch zagadnieniach: poszukiwaniach antybiotyków regulujących właściwości katalityczne antygenomowego rybozymu HDV oraz wykorzystując wieloletnie doświadczenie zespołu Pani Profesor w badaniach koordynacji jonów metali do antybiotyków sprawdzić, jak koordynacja jonów Cu^{2+} wpływa na zdolność antybiotyków do regulacji aktywności katalitycznej tego rybozymu.

Wiadomo, że związki niskocząsteczkowe wiążą się do różnych cząsteczek RNA (tRNA, rRNA, rybozomy oraz aptamery). Wielu badaczy zwróciło szczególną uwagę na oddziaływanie RNA z antybiotykami. Szereg antybiotyków wiąże się do rybosomalnego 16S rRNA, wpływając na przebieg translacji [21]. Antybiotyki oddziałują także z wieloma rybozymami. Antybiotyk aminoglikozydowy – neomycyna, inhibuje aktywność katalityczną rybozymów: intronów grupy I, RNazy P, hammerhead, hairpin czy też HDV. Z drugiej strony, kanamycyna działa bardzo specyficznie i inhibuje wyłącznie aktywność katalityczną rybozymu RNazy P [22].

Przetestowaliśmy aktywność katalityczną antygenomowego rybozymu HDV, w obecności szeregu antybiotyków o bardzo różnej strukturze i właściwościach chemicznych (Tab. 1). Okazało się, że istnieją trzy grupy antybiotyków [23]. Takie, które nie inhibują reakcji cięcia i podobne właściwości posiadają ich kompleksy z jonami Cu^{2+} . Do grupy tej należą amikacyna bądź kanamycyna. Dla neomycyny oraz jej kompleksu z jonami Cu^{2+} obserwuje się silny ich wpływ na reakcję cięcia. Natomiast w przypadku sisomycyny, wankomycyny i aktynomyny D, inhibicję aktywności katalitycznej rybozymu HDV obserwowano tylko w obecności kompleksów tych

antybiotyków z jonami Cu^{2+} . Stała K_i była niższa około trzykrotnie dla kompleksów sisomycyny i vankomycyny. Największe różnice, ponad 35-krotne w wartościach K_i , zaobserwowano dla kompleksu aktynomycyny D z jonami Cu^{2+} w porównaniu do nieskompleksowanego antybiotyku. Wyznaczone wartości wynosiły 33 i 1270 μM , dla reakcji cięcia w obecności jonów Mg^{2+} . Wartość K_i dla kompleksu aktynomycyny D z jonami Cu^{2+} była porównywalna z wartościami K_i dla innych antybiotyków, będących silnymi inhibitorami reakcji katalitycznego cięcia, zachodzącej w różnych rybozymach [22]. Należy podkreślić, że wolne jony Cu^{2+} nie miały wpływu na aktywność katalityczną badanego rybozemu HDV.

Tabela 1. Badane antybiotyki i związki niskocząsteczkowe:
Table 1. Tested antibiotics and low molecular-weight compounds

Antybiotyki aminoglikozydowe:	Leki przeciwgrzybicze:
higromycyna B	flukonazol
amikacyna	
apramycyna	Związki niskocząsteczkowe:
neomycyna	pochodne koniugatów heminali z 1,2,4 triazolami
sisomycyna	puromycyna
kasugomycyna	
Antybiotyki peptydowe:	
kapreomycyna	oraz kompleksy tych wszystkich związków z jonami Cu^{2+}
bacytracyna	
aktynomycyna D	
ristomycyna	
ramoplanina	
blastycydyna S	
fleomycyna	
kolistyna	
wiomycyna	
gramicydyna	
Antybiotyki β-laktamowe:	
amoksycylina	

Interesujące zjawisko zaobserwowano dla ristomycyny, apramycyny i amoksycyliny, antybiotyków należących do różnych grup antybiotyków, odpowiednio: glikopeptydowych, glikozydowych oraz β -laktamów [24]. Przy niskich 100 μM stężeniach antybiotyków obserwowano wzrost aktywności katalitycznej antygenomowego rybozemu HDV, przy 300 μM stężeniu antybiotyków ten efekt zanikał, natomiast przy 300 μM stężeniu kompleksów tych antybiotyków z jonami Cu^{2+}

występowała silna inhibicja. Wykazano także, że koniugaty heminali z 1,2,4-triazolami, związkami o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym, są nową klasą związków niskocząsteczkowych, które mogą inhibować aktywność katalityczną rybozomu HDV [25]. Efektywność inhibicji tych pochodnych heminali zależy od ich struktury i nawet blisko spokrewnione izomery mają różny wpływ na aktywność katalityczną rybozomu. To wskazuje, że miejsce wiązania tego ligandu w rybozynie może rozróżniać poszczególne izomery.

W celu ustalenia mechanizmu inhibicji własności katalitycznych antygenomowego rybozomu HDV typu *trans*, w obecności antybiotyków, użyto dwóch oligonukleotydowych substratów RNA, które zawierały w pozycji (-1) cytydynę oraz 2'-deoksytydynę [26]. Grupa 2' OH cytydyny jest niezbędna w mechanizmie reakcji autokatalitycznego cięcia rybozomu HDV (Rys. 2). Pierwszy substrat ulegał przecięciu z wysoką efektywnością i odzwierciedlał konformację rybozomu HDV po reakcji cięcia. Natomiast drugi substrat związany z rybozynie odpowiadał jego konformacji przed reakcją cięcia. Obydwa modelowe rybozomy HDV, przed i po reakcji cięcia, poddano mapowaniu struktury RNA w obecności wybranych antybiotyków: neomycyny, amikacyny oraz aktynomycyny D oraz ich kompleksów z jonami Cu^{2+} . Jak wspomniano powyżej, neomycyna i jej kompleks z jonami Cu^{2+} oraz kompleks aktynomycyna D- Cu^{2+} były silnymi inhibitorami rybozomu. Natomiast wolna amikacyna oraz w kompleksie, a także nieskompleksowana aktynomycyna D, nie miały wpływu na przebieg reakcji autokatalitycznego cięcia nici RNA. Do mapowania struktury rybozomu użyto metodę cięcia jonami Pb^{2+} i nukleazami oraz metodę SHAPE. Wykazano, że w obydwu modelowych rybozomach neomycyna oraz jej kompleks są ulokowane w „kieszeni” utworzonej przez regiony P1.1 oraz J4/2. Ponadto, podobny rozkład modyfikacji w obydwu formach rybozomu HDV dla neomycyny oraz jej kompleksu wskazuje na bardzo podobny sposób oddziaływań RNA-antybiotyk. Natomiast dane mapowania amikacyny wskazują na wiązanie antybiotyku oraz jej kompleksu w pętli L3 obydwu form rybozomu HDV. Dla kompleksu aktynomycyna D- Cu^{2+} zaobserwowano zmiany w rozkładzie miejsc trawień w trzonach P4 i P2 wyłącznie dla rybozomu HDV z substratem zawierającym deoksytydynę w miejscu jego przecięcia. Prawdopodobnie, dodatkowy ładunek dodatni kompleksu aktynomycyna D- Cu^{2+} zwiększa jego powinowactwo do trzonów P4 i P2. Wyznaczono także wartości K_d charakteryzujące wiązanie badanych antybiotyków lub ich kompleksów z jonami Cu^{2+} do rybozomu, które mieszczą się w zakresie 8–136 μM i mogą być ustawione w następującej kolejności: neomycyna B- Cu^{2+} , aktynomycyna D- Cu^{2+} , neomycyna B, aktynomycyna D, amikacyna- Cu^{2+} , amikacyna [26]. Ta kolejność zgadza się doskonale z wcześniej badanym wpływem tych antybiotyków na inhibicję aktywności katalitycznej rybozomu HDV [27].

Lokalizację badanych antybiotyków w rybozynie HDV typu antygenomowego potwierdzono metodą modelowania komputerowego. Do modelowania wykorzystano modele krystalograficzne rybozomu HDV [16, 17]. Antybiotyki aminoglikozydowe: neomycyna B oraz amikacyna zajmują podobne miejsca w strukturze rybo-

zymu HDV, kieszeń utworzoną przez regiony J4/2, P2 oraz P3. Jednakże położenie neomycyny B różni się nieco od amikacyny, gdyż neomycyna oddziałuje z katalityczną resztą C76, zaangażowaną w mechanizm autokatalitycznego cięcia rybozomu (Rys. 2). Dla aktynomycyny modelowanie komputerowe pokazało dwa miejsca wiązania antybiotyku do struktury rybozomu, odpowiednio w trzonach P2 i P4. Choć te miejsca wiązania antybiotyku wydają się być oddalone od kieszeni katalitycznej utworzonej przez reszty U(-1) i C76, to kompleks aktynomycyna D-Cu²⁺ silnie wpływa na aktywność rybozomu HDV. Najprawdopodobniej, dodatkowy ładunek dodatni zwiększa powinowactwo kompleksu do trzonu P4, powodując takie zmiany konformacyjne rybozomu, które czynią go nieaktywnym katalitycznie.

3. WPŁYW pH NA ZDOLNOŚĆ ANTYBIOTYKÓW DO REGULACJI AKTYWNOŚCI KATALITYCZNEJ RYBOZYMU HDV

Wcześniejsze badania wykazały, że zdolności koordynacyjne antybiotyków w stosunku do jonów metali silnie zależą od wartości pH środowiska [28]. Protonowane grupy aminowe w cząsteczkach antybiotyków zmieniają ich powinowactwo do jonów Cu²⁺. W trakcie prowadzonych badań określiliśmy wpływ wartości pH środowiska reakcji na auto-katalityczne przecięcie rybozomu HDV. Jako modele wybraliśmy dwa antybiotyki peptydowe: kapreomycynę oraz wiomycynę, należące do rodziny antybiotyków tuberamycyny.

Kapreomycyna i wiomycyna są używane jako leki przeciwgruźlicze i wykazują podobny mechanizm działania [29]. W rybosomach *Thermus. thermophilus* obydwa antybiotyki są położone w szczelinie pomiędzy dwoma podjednostkami rybosomalnymi i oddziałują z 16S oraz 23S rRNA, blokując proces translokacji. Ponadto, wiomycyna posiada podwójną aktywność w katalizie RNA, inhibując aktywność katalityczną intronów grupy I, natomiast dla rybozomu VS zaobserwowano wzrost jego aktywności w obecności tego antybiotyku [30, 31]. Wpływ tych antybiotyków oraz ich kompleksów z jonami Cu²⁺ na reakcję autokatalitycznego przecięcia oligonukleotydowego substratu antygenomowego rybozomu HDV, działającego w wersji *trans*, jest podobny [32, 33]. Przy stężeniach, 0,20–75 mM dla kapreomycyny i 0,2 mM dla wiomycyny zaobserwowano 2-3 krotną stymulację reakcji katalizy RNA, przy wyższych stężeniach inhibicję. Podobny efekt występował w przypadku kompleksów tych antybiotyków z jonami Cu²⁺, przy 0,2 mM stężeniu kompleksów występowała stymulacja reakcji katalizy, natomiast przy 0,5 mM stężeniu kompleksu wiomycyna-Cu²⁺ – silna inhibicja.

Zbadaliśmy także wpływ pH środowiska na przebieg reakcji cięcia rybozomu HDV w obecności kapreomycyny, wiomycyny oraz ich kompleksów z jonami Cu²⁺ [32, 33]. Struktura kapreomycyny i wiomycyny jest niemal identyczna, zatem można oczekiwać podobnych ich właściwości podczas protonacji. Kapreomycyna zawiera cztery centra protonacji o wartościach pKa od 6,23 do 11,37, zatem można ją zdefiniować jako kwas o ogólnym wzorze H₄L [28]. Natomiast wiomy-

cybę posiadającą trzy centra protonacji – jako kwas H_3L . Zasadnicza różnica we wpływie kapreomycyny i wiomycyny na aktywność katalityczną rybozomu HDV dotyczy ich kompleksów. W pH 5,5 i 6,5 kompleks kapreomycyny całkowicie inhibuje aktywność rybozomu, podczas gdy kompleks wiomycyny nie posiada takich właściwości. Ponadto, w pH 7,5 wiomycyna stymuluje aktywność katalityczną rybozomu HDV dwukrotnie lepiej niż kapreomycyna. Interesujące, odkryte przez nas zjawisko stymulacji aktywności katalitycznej rybozomu HDV, może być wyjaśnione w dwojaki sposób. Po pierwsze, badane antybiotyki ułatwiają tworzenie kompleksu substrat-rybozym dla rybozomu w wersji *trans*. Inna możliwość, to ich udział w rearanżacji struktury rybozomu do bardziej aktywnej w reakcji cięcia substratu. Mechanizm ten był sugerowany wcześniej dla wyjaśnienia wpływu wiomycyny na aktywność rybozomu VS i pierwsza z rozważanych możliwości była decydująca [31]. Jak wspomniano powyżej, kapreomycyna i wiomycyna posiadają cztery lub trzy miejsca protonacji. Wiomycyna nie posiada pierwszorzędowej grupy aminowej reszty kwasu α,β -diaminopropionowego o wartości pK_a 6,23. Ponieważ wiomycyna i kapreomycyna mają podobny wpływ na reakcję cięcia rybozomu HDV, zatem w pH 5,5 oraz 6,5 protonacja tej grupy nie odgrywa większej roli. Natomiast występuje w tych warunkach pH silny wpływ kompleksu kapreomycyna- Cu^{2+} na reakcję cięcia. Z wcześniejszych badań grupy prof. M. Jeżowskiej-Bojczuk wynika, że w tym zakresie pH w roztworze istnieje głównie kompleks CuH_3L , zatem to on jest odpowiedzialny za inhibicję rybozomu HDV [28]. Z drugiej strony, w pH 5,5 oraz 6,5 kompleks wiomycyna- Cu^{2+} nie miał wpływu na właściwości katalityczne rybozomu HDV. Zatem, występujący w tych warunkach kompleks typu CuL jest niezdolny do modulowania aktywności katalitycznej rybozomu HDV [33].

Do identyfikacji miejsc wiązania wiomycyny w strukturze antygenomowego rybozomu HDV użyliśmy metodę modelowania molekularnego, stosując jako model wyjściowy strukturę krystalograficzną rybozomu typu genomowego. Wcześniejsze badania w roztworze sugerowały bardzo podobną bądź identyczną strukturę obydwu rybozomów [6]. Wyniki modelowania molekularnego sugerują istnienie dwóch różnych miejsc wiązania wiomycyny w strukturze rybozomu HDV. Pierwsze występuje pomiędzy trzonem P2 oraz pętlą L3. Drugie miejsce wiązania wiomycyny jest zlokalizowane w głębokiej szczelinie utworzonej w strukturze przez trzony P1, P2 oraz P3. Podobne miejsce wiązania było sugerowane dla kompleksu wiomycyna- Cu^{2+} , gdyż wielkość szczeliny $10 \times 20 \text{ \AA}$ umożliwia ulokowanie tam antybiotyku bądź jego kompleksu. Także inne antybiotyki peptydowe, jak kapreomycyna oraz kompleks kapreomycyna- Cu^{2+} , można zadokować w to miejsce. Precyzyjna analiza wyników modelowania molekularnego pokazała oddziaływanie wiomycyny z resztami A14/U15 w trzonie P2 oraz G3/U4 w trzonie P1. Dodatkowo, wiomycyna tworzy wiązanie wodorowe z resztą U32 w trzonie P3 oraz oddziałuje z resztą U77 z regionu pseudowęzła J4/2, który jest zaangażowany w tworzenie miejsca katalitycznego. Ważność struktury pseudowęzła potwierdziła struktura aptameru wiążącego wiomycynę [34]. Jego obecność jest konieczna dla efektywnego wiązania wiomycyny przez ten aptamer.

4. DEGRADACJA KWASÓW NUKLEINOWYCH W OBECNOŚCI BACYTRACYN

Prowadzone wcześniej przez obie nasze grupy badania wiązania neomycyny B do drożdżowego tRNA^{Phe} pokazały, że wyszczepienie hipermodyfikowanej zasady Y (wyozyiny) zlokalizowanej w pozycji 37 pętli antykodonu tRNA pozwala efektywnie przeciąć łańcuch polinukleotydu w obecności 1 μM stężenia tego antybiotyku [35]. Zatem przypadkowa depurynacja w łańcuchu RNA, w obecności nawet niskiego stężenia antybiotyków, może prowadzić do zniszczenia funkcjonalnych RNA. Może to być ważny, niepożądany efekt wiązania antybiotyków do cząsteczek RNA.

Podczas analizy wpływu bacytracyny na funkcjonowanie rybozemu HDV, nieoczekiwanie okazało się, że degradowuje ona łańcuch RNA [36]. Cząsteczka tego cyklicznego antybiotyku polipeptydowego składa się z 10 aminokwasów: L-izoleucyna, L-leucyna, D-fenylalanina, L-cysteina, kwas L- i D-asparaginowy, D-glutaminowy, L-histydyna, L-lizyna i D-ornityna. Co ciekawe, bacytracyna degradowuje także jednoniciowe cząsteczki DNA. Zatem antybiotyk ten wykazuje podobieństwo do enzymów degradowujących kwasy nukleinowe, takich jak rybonukleaza T_1 lub nukleaza S_1 . Degradacja cząsteczek RNA występuje preferencyjnie po resztach guaniny, przy czym w przeciętym łańcuchu RNA grupa fosforanowa pozostaje na końcu 3'. Przypomina to zatem degradację RNA za pomocą nukleazy T_1 . Ponadto, degradacja RNA, której ulegają cząsteczki o zwartej strukturze jak: rybozym HDV oraz drożdżowy tRNA^{Phe}, przebiega efektywnie już przy niskich stężeniach antybiotyku rzędu 5 μM i nie wymaga obecności jonów metali. Bacetracyna należy do niewielu związków degradowujących DNA, jednak w porównaniu do degradacji RNA, wymaga 10-krotnie wyższego stężenia i obecności jonów metali dwuwartościowych: Mg^{2+} , Mn^{2+} lub Zn^{2+} . Antybiotyk ten specyficznie degradowuje łańcuch DNA po resztach cytozyny, pozostawiając grupę fosforanową na końcu 5' łańcucha, podobnie jak nukleaza S_1 . W przeciwieństwie do enzymów białkowych, antybiotyk nie traci właściwości degradowacyjnych RNA i DNA nawet po inkubacji w 100°C.

Mechanizm działania bacytracyny w degradacji kwasów nukleinowych nie został dokładnie poznany. W przypadku rybonukleazy T_1 , przecięcie łańcucha RNA przebiega według mechanizmu katalizy kwasowo-zasadowej [37]. W proponowanym mechanizmie dwie reszty histydyny His40 oraz His92 działają jako kwas, natomiast reszta Glu58 działa jako zasada, co potwierdziły badania krystalograficzne. Również RNaza A, enzym efektywnie degradowujący cząsteczki RNA, wymaga dwóch histydyn, mianowicie His12 i His119, do utworzenia 2'3'-cyklicznego fosforanu, reszta Lys41 stabilizuje stan przejściowy [38]. Także 30-aminokwasowy peptyd pochodzący z N-końca palca cynkowego wymaga obecności pierścienia imidazolowego do aktywności rybonukleazy, jednakże jest on nieaktywny w stosunku do DNA [39]. Co ciekawe, wyznaczona wartość stałej szybkości reakcji cięcia dla tego peptydu jest 20-krotnie niższa niż dla bacytracyny. Podsumowując, podobne produkty cięcia oraz obecność histydyny w pozycji 10 bacytracyny czynią mechanizm

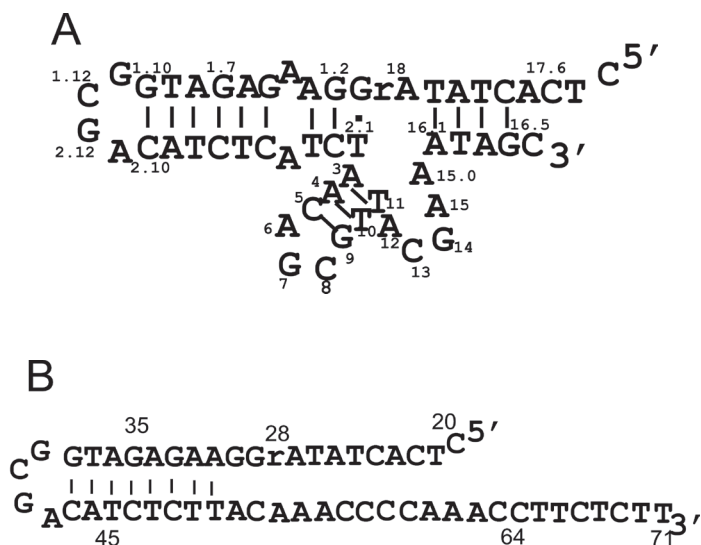
hydrolityczny obserwowany dla RNazy T_1 wysoce prawdopodobny także dla bacytracyny. Natomiast w przypadku degradacji DNA mechanizm działania bacytracyny pozostaje niewyjaśniony. Najprostszą sugestią jest mechanizm reakcji wolnorodnikowej, jednakże w tym przypadku mechanizm ten nie ma miejsca. Obecność bacytracyny i H_2O_2 nie miała wpływu na degradację DNA [36, 37].

5. DEOKSYRYBOZYMY AKTYWNE W OBECNOŚCI JONÓW KADMU ORAZ W ŚRODOWISKU O NISKIEJ WARTOŚCI PH OTRZYMANE METODĄ SELEKCJI *IN VITRO*

W trakcie realizowanego wspólnie z prof. M. Jeżowską-Bojczuk jednego z zadań projektu „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne” w ramach Wrocławskiego Centrum Badań EIT+, podjęliśmy próbę otrzymania DNAzymów aktywnych w obecności jonów Cd^{2+} [40]. Jony Cd^{2+} należą do najbardziej toksycznych jonów metali z uwagi na zastępowanie jonów Zn^{2+} i Ca^{2+} w enzymach, co czyni je nieaktywnymi. Do poszukiwania DNAzymów aktywnych w obecności jonów Cd^{2+} wykorzystano metodę selekcji *in vitro*. Przygotowana biblioteka kombinatoryczna DNAzymów zawierała 23-nukleotydowy odcinek typu *random*, co odpowiadało 7×10^{13} różnych wariantów. Uzyskane w wyniku selekcji wszystkie aktywne katalitycznie DNAzyny należały do często spotykanej wśród DNAzymów rodziny DNAzymów 8–17 (Rys. 3a). Otrzymane DNAzyny preferowały jony Cd^{2+} , ale były aktywne w obecności jonów Mn^{2+} i Zn^{2+} , co oznacza, że miejsce koordynacji katalitycznych jonów metali nie jest wysoce specyficzne. Należy dodać, że także wcześniej uzyskane DNAzyny wykazywały szeroką specyficzność w stosunku do jonów metali [41]. Można zatem sądzić, że otrzymanie DNAzymów aktywnych tylko w obecności jednego rodzaju jonu metalu jest bardzo trudne lub niemożliwe. W naszym przypadku, wzięwszy pod uwagę aktywność katalityczną oraz selektywność, wariant 1/VIIWS wykazuje najlepsze właściwości (Rys. 3a). Ponadto, uzyskane DNAzyny były mniej aktywne w podwyższonej temperaturze, co sugeruje zmiany ich struktury przy podwyższaniu temperatury. Co ciekawe, dla jednego z wariantów, DNAzymu 15XWS, w podwyższonej temperaturze występuje nie tylko obniżenie jego aktywności, ale także zmiana preferencji w stosunku do jonów metali wymaganych do katalizy [40].

Postanowiliśmy zbadać, jak zmiany sekwencji nukleotydowej mogą wpływać na zmiany aktywności katalitycznej wybranych DNAzymów. Zwróciliśmy uwagę na zachowawcze elementy występujące w DNAzymach 8–17: nukleotyd w pozycji 12 oraz trzy pary zasad w strukturze „spinki do włosów”. Obecność puryny w pozycji 12 okazała się kluczowa dla zachowania aktywności DNAzymu 1/VIIWS, natomiast miała mały wpływ na jego preferencje co do wyboru jonów metali. Przeprowadzono także mutagenezę par zasad występujących w strukturze „spinki do włosów”. Wymiana środkowej pary zasad z A-T na C-G powodowała wzrost aktywności DNAzymu dla jonów Zn^{2+} , spadek dla jonów Mn^{2+} oraz nie zmieniła aktywności

dla jonów Cd^{2+} . Oznacza to, że wspomniane pary zasad określają właściwości katalityczne DNAzemu 1/VIIWS [40]. Wcześniejsze badania sugerowały, że wśród wspomnianych trzech par zasad, dla zachowania aktywności DNAzemu 8–17 wymagane są dwie pary typu G-C [42]. Później wykazano, że motyw zawierający jedną parę, a nawet brak pary zasad G-C jest wystarczający. Obserwacje te są zbliżone z naszymi, gdyż DNAzym 1/VII zawierający jedną parę zasad G-C w motywie „spinki do włosów” zachowuje aktywność katalityczną.



Rysunek 3. Struktura drugorzędowa DNAzymów A) Dz1/VIIWS aktywnego w obecności jonów Cd^{2+} oraz B) Dz27WS aktywnego w niskim pH. Symbol rA oznacza ryboadenozynę

Figure 3. Secondary structure of DNAzymes A) Dz1/VIIWS active in the presence of Cd^{2+} and B) Dz27WS active at low pH. The symbol rA denotes riboadenosine

W kolejnym etapie podjęliśmy próbę selekcji DNAzymów, stosując podczas selekcji obniżone pH rzędu 4,5 [43] (Rys. 3b). Wszystkie uzyskane DNAzemy wykazywały optimum aktywności katalitycznej w zakresie pH 4,0–4,5 i były nieaktywne przy pH wyższym niż 5,0. Jak wspomniano, DNAzemy scharakteryzowane przez nas wcześniej wymagały do swej aktywności obecności niektórych jonów metali dwuwartościowych [43]. Natomiast otrzymane DNAzemy aktywne w niskim pH oraz ich warianty nie wymagają obecności żadnych jonów metali, jako kofaktorów w reakcji katalizy. W niskich wartościach pH, w których prowadzono selekcję *in vitro*, występuje w kwasach nukleinowych rozległa protonacja zasad, głównie pozycji N1 adeniny oraz N3 cytozyny. W tych warunkach, protonowane zasady mogą zastępować jony metali w cięciu RNA przebiegającym według mechanizmu katalizy kwasowo-zasadowej. Ponadto, mogą brać udział w procesach zwijania DNAzemu w aktywną katalitycznie strukturę. Badania wybranych DNAzymów technikami spektralnymi, UV oraz CD wykazały duże zmiany w ich strukturze w zakresie

pH 4,0–4,5, co pokrywa się z warunkami sprzyjającymi ich najwyższej aktywności katalitycznej. W wersji *trans* otrzymane DNAzemy, podobnie jak w wersji *cis* były najbardziej aktywne w pH około 4,5. Mutageneza miejsca cięcia wykazała znacznie wyższą aktywność w przypadku obecności puryn niż pirymidyn. Co ciekawe, znaczny spadek aktywności DNAzemu w wersji *trans* obserwowano, gdy w miejscu cięcia zamiast jednego nukleotydu typu rybo występowały dwa. Wytłumaczeniem tej obserwacji może być oddziaływanie drugiego nukleotydu z kompleksem substrat-DNAzym lub zmiany struktury substratu skutkujące niższą efektywnością cięcia. Potwierdzeniem tej sugestii są wyniki mutagenezy czterech wybranych pozycji w nici enzymu. Zmiany te skutkują zanikiem aktywności katalitycznej DNAzymów. Wynika z tego, że pH-zależne DNAzemy wymagają bardzo specyficznej architektury i są katalitycznie aktywne w ściśle określonych warunkach pH [43].

Istnieje zapotrzebowanie na nowe DNAzemy, które mogą funkcjonować w skrajnych warunkach: wysokiej temperaturze, niskim lub wysokim pH, w obecności jonów metali ciężkich. Dużą zaletą opisanych przez nas DNAzymów jest to, że są one nieaktywne przy wartościach pH zbliżonych do fizjologicznych oraz w obecności jedno- i dwuwartościowych jonów metali. Czynnikiem „uruchamiającym” ich aktywność katalityczną jest obniżenie wartości pH do zakresu 4,0–4,5. Te pH-zależne DNAzemy mogą być wykorzystane jako kasety molekularne w biotechnologii lub nanotechnologii, lub jako specyficzne narzędzia molekularne, takie jak biosensory. Takie kasety pozwalają na zmiany pod wpływem warunków środowiska i tylko ta kasetka może być wycięta z większej struktury DNA przez obniżenie wartości pH. Ponadto, *trans*-działające warianty pH-zależnych DNAzymów są stosunkowo małe, o wielkości 31 nukleotydów, co znacznie upraszcza ich syntezę i wykorzystanie. Wreszcie, pH-zależne DNAzemy mogą być stosowane do monitorowania zmian wartości pH w komórkach podczas procesów metabolicznych [43].

UWAGI KOŃCOWE

W ramach współpracy pomiędzy Zakładem Biochemii RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu oraz Zespołem Chemii Medycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, kierowanym przez Panią Profesor Małgorzatę Jeżowską-Bojczuk, przebadano szerokie spektrum antybiotyków oraz innych związków niskocząsteczkowych i ich kompleksów z jonami Cu^{2+} , jako potencjalnych inhibitorów reakcji katalizy rybozymów HDV. Nieoczekiwanie, okazało się, że szereg badanych związków, w zależności od warunków, wykazuje właściwości inhibujące lub stymulujące reakcję, czyli działają jako modulatory procesu katalizy RNA. Jest to obserwacja bardzo istotna, wskazująca, że również w przypadku innych procesów przebiegających z udziałem antybiotyków, zmienione warunki środowiska mogą w istotny sposób modulować ich właściwości.

Stwierdzono, że efekt stymulacji/inhibicji aktywności katalitycznej rybozymu HDV jest ściśle związany ze stopniem protonacji badanych antybiotyków w danych

warunkach. Zdolność do inhibicji wzrasta przy tym ze zwiększeniem ładunku antybiotyku np. po związaniu kationu metalu. Natomiast w środowisku o wyższym pH antybiotyki zazwyczaj stymulują reakcję cięcia, gdyż jak można sądzić, wolne są przynajmniej niektóre ich centra azotowe, zdolne do uczestniczenia w reakcji katalizy, jako akceptory-donory protonu bądź miejsca koordynacji katalitycznego jonu metalu. Ważną rolę odgrywa przy tym położenie antybiotyków w cząsteczce rybozymu oraz to, jak ułożone są ich grupy funkcyjne w obrębie jego centrum katalitycznego.

W trakcie badań jednego z antybiotyków – bacytracyny, jako potencjalnego inhibitora reakcji katalizy rybozymów HDV, zaobserwowano, że wykazuje on właściwości nukleolityczne. Bacytracyna jest nukleazą degradującą obydwa rodzaje kwasów nukleinowych, RNA i DNA. Zdolność bacytracyny do degradowania cząsteczek RNA była obserwacją zaskakującą, bowiem szereg antybiotyków pochodzących z różnych grup terapeutycznych, badanych wcześniej, nie wykazywało podobnych właściwości. Bardzo ważne jest to, że degradacja RNA zachodzi już przy niskim stężeniu antybiotyku, w zakresie mikromolarnym, porównywalnym ze stężeniami, jakie oznaczono w osoczu krwi pacjentów poddawanych leczeniu tym lekiem. Odkrycie hydrolitycznych właściwości bacytracyny rozszerzyło także potencjalne zastosowania tego antybiotyku w terapii antywirusowej, do niszczenia w komórce niepożądanych kwasów nukleinowych.

Do poszukiwania DNAzymów katalizujących hydrolizę RNA wykorzystano metodę selekcji *in vitro*. W eksperymencie selekcji, mającym na celu otrzymanie DNAzymów aktywnych w obecności jonów Cd^{2+} , otrzymano warianty należące do wcześniej opisanej w literaturze rodziny DNAzymów 8–17. Analiza ich właściwości w obecności szerokiego spektrum jonów dwuwartościowych pokazała, że nie tylko jony Cd^{2+} , ale także Zn^{2+} i Mn^{2+} wspierają katalizę. Oznacza to, że miejsce koordynacji jonów metali nie jest wysoce specyficzne i że selekcja DNAzymów aktywnych tylko w obecności jednego rodzaju jonu metalu jest bardzo trudna lub niemożliwa. DNAzyny otrzymane w drugim eksperymencie selekcji wykazywały optimum aktywności katalitycznej w zakresie pH 4,0–4,5 i były nieaktywne przy pH wyższym niż 5,0. Co interesujące, nie wymagają obecności żadnych jonów metali, jako kofaktorów w reakcji katalizy. Przypuszczalnie, w niskich wartościach pH protonowane zasady mogą zastępować jony metali w cięciu RNA, przebiegającym według mechanizmu katalizy kwasowo-zasadowej. Otrzymane wyniki poszerzają repertuar DNAzymów, które działają w warunkach niefizjologicznych i przynoszą nowe informacje na temat możliwych mechanizmów reakcji katalizowanych przez kwasy nukleinowe.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy artykułu pragną podziękować pracownikom Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu oraz Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, zaangażowanym w realizację przedstawionych badań za wieloletnią współpracę.

Ponadto, dziękujemy Komitetowi Badań Naukowych, Narodowemu Centrum Nauki oraz Wrocławskiemu Centrum Badań EIT+ za wsparcie finansowe. Publikacja współfinansowana ze środków przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach dotacji KNOW.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K. Kruger, P. Grabowski, A. Zaug, J. Sands, E. Gottschling, T. Cech, *Cell*, 1982, **31**, 147.
- [2] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell*, 1983, **35**, 849.
- [3] R. Symons, *Annu. Rev. Biochem.*, 1992, **61**, 641.
- [4] J. Buzayan, W. Gerlach, G. Bruening, *Nature*, 1986, **323**, 349.
- [5] B. Saville, R. Collins, *Cell*, 1990, **61**, 685.
- [6] I.-H. Shih, M. Been, *Annu. Rev. Biochem.*, 2002, **71**, 887.
- [7] R. Jimenez, J. Polanco, A. Lupták, *Trends Biochem. Sci.*, 2015, **40**, 649.
- [8] R. Breaker, G. Joyce, *Chem. Biol.*, 1995, **2**, 655.
- [9] D. Baum, S. Silverman, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008, **65**, 2156.
- [10] M. Kuo, L. Sharmeen, G. Dinter-Gottlieb, *J. Taylor J. Virol.*, 1988, **62**, 4439.
- [11] M. Łęgievicz, J. Ciesiołka, *Post. Biochemii*, 2004, **50**, 19.
- [12] M. Lai, *Annu. Rev. Biochem.*, 1995, **64**, 259.
- [13] D. Lazinski, *J. Taylor, RNA*, 1995, **1**, 225.
- [14] M. Matysiak, J. Wrzesinski, J. Ciesiołka, *J. Mol. Biol.*, **291**, 283.
- [15] A. Perrota, M. Been, *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**, 6821.
- [16] A. Ferré-D'Amaré, K. Zhou, J. Doudna, *Nature*, 1998, **395**, 567.
- [17] A. Ke, K. Zhou, F. Ding, J. Cate, J. Doudna, *Nature*, 2004 **429**, 201.
- [18] B. Golden, *Biochemistry*, 2011 **50**, 9424.
- [19] J. Wrzesinski, M. Łęgievicz, B. Smólska, J. Ciesiołka, *Nucleic Acids Res.*, 2001, **29**, 4482.
- [20] M. Łęgievicz, A. Wichłacz, B. Brzezicha, J. Ciesiołka, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 1270.
- [21] A. Yonath, *Annu. Rev. Biochem.*, 2005, **74**, 649.
- [22] F. Walter, Q. Vicens, E. Westhof, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1999, **3**, 694.
- [23] J. Wrzesinski, M. Brzezowska, W. Szczepanik, M. Jeżowska-Bojczuk, J. Ciesiołka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, **349**, 1394.
- [24] N. Gaggelli, J. Nagaj, W. Szczepanik, J. Ciesiołka, J. Wrzesinski, A. Górńska, E. Gaggelli, G. Valensin, M. Jeżowska-Bojczuk, *J. Inorg. Biochem.*, 2013, **124**, 26.
- [25] M. Wrońska, J. Wrzesinski, M. Jeżowska-Bojczuk, W. Szczepanik, R. Starosta, M. Barys, Z. Ciunik, J. Ciesiołka, *J. Inorg. Chem.*, 2012, **108**, 62.
- [26] J. Wrzesinski, L. Błaszczuk, M. Wrońska, A. Kasproicz, K. Stokowa-Sołtys, J. Nagaj, M. Szafraniec, T. Kulinski, M. Jeżowska-Bojczuk, *J. Ciesiołka, FEBS J*, 2013, **280**, 2652.
- [27] J. Rogers, A. Chang, U. von Ahsen, R. Schroeder, J. Davies, *J. Mol. Biol.*, 1996, **259**, 916.
- [28] E. Gaggelli, N. Gaggelli, E. Molteni, G. Valensin, D. Balenci, M. Wrońska, W. Szczepanik, J. Nagaj, J. Skąła, M. Jeżowska-Bojczuk, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 9830.
- [29] R. Stanley, G. Blaha, R. Grodzicki, M. Strickler, T. Steitz, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2010, **17**, 289.
- [30] H. Wank, J. Rogers, J. Davies and R. Schroeder, *J. Mol. Biol.*, 1994, **236**, 1001.
- [31] J. Olive, D. De Abreu, T. Rastogi, A. Andersen, A. Mittermaier, T. Beattie, R. Collins, *EMBO J*, 1995, **14**, 3247.
- [32] M. Szafraniec, K. Stokowa-Sołtys, J. Nagaj, A. Kasproicz, J. Wrzesinski, M. Jeżowska-Bojczuk, *J. Ciesiołka, Dalton Trans.*, 2012 **41**, 9728.

- [33] K. Stokowa-Sołtys, N. Nuno, M. Barbosa, A. Kasproicz, R. Wieczorek, N. Gaggelli, D. Gaggelli, G. Valensin, J. Wrzesinski, J. Ciesiołka, T. Kuliński, W. Szczepanik, M. Jeżowska-Bojczuk, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 8645.
- [34] M. Wallis, B. Streicher, H. Wankl, U. von Ahsen, E. Clod, S. Wallace, M. Famulok, R. Schroeder, *Chem. Biol.*, 1997, **4**, 357.
- [35] J. Wrzesinski, W. Szczepanik, J. Ciesiołka, M. Jeżowska-Bojczuk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, **331**, 267.
- [36] J. Ciesiołka, M. Jeżowska-Bojczuk, J. Wrzesiński, K. Stokowa-Sołtys, J. Nagaj, A. Kasproicz, L. Błaszczuk, W. Szczepanik, *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, **1840**, 1782.
- [37] J. Steyaert, *Eur. J. Biochem.*, 1997, **247**, 1.
- [38] C. Cuchillo, M. Nogués, R. Raines, *Biochemistry*, 2011, **50**, 7835.
- [39] W. Lima, S. Crooke, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, **96**, 10010.
- [40] A. Kasproicz, K. Stokowa-Sołtys, J. Wrzesiński, M. Jeżowska-Bojczuk, J. Ciesiołka, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 8138.
- [41] A. Peracchi, M. Bonaccio, M. Clerici, *J. Mol. Biol.*, 2005, **352**, 783.
- [42] S. Santoro, G. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, **94**, 4262.
- [43] A. Kasproicz, K. Stokowa-Sołtys, M. Jeżowska-Bojczuk, J. Wrzesinski, J. Ciesiołka, *Chemistry-Open*, 2017, **6**, 46.

Praca wpłynęła do Redakcji 4 czerwca 2018

