

Ribozimas, ¿una nueva estrategia terapéutica?

Ribozymes, a new therapeutic strategy?

BERZAL-HERRANZ, A. y BARROSO DEL JESÚS, A.

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra" (CSIC). Ventanilla, n.º 11. 18001 Granada. España.

RESUMEN

Las ribozimas son moléculas de RNA con actividad catalítica, capaces de catalizar reacciones químicas en el interior celular. En su contexto natural la gran mayoría de las ribozimas descritas llevan a cabo el procesamiento de otras moléculas de RNA. A diferencia de las ribonucleasas proteicas, las ribozimas presentan una gran especificidad de sustrato, esta es la característica en la que se fundamenta la idea de que las ribozimas puedan ser utilizadas como supresores génicos específicos y servir de base para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. La necesidad de disponer de nuevas estrategias terapéuticas se hace más evidente cuando surgen enfermedades contra las cuales los fármacos y terapias empleados no son eficientes. La repercusión social de determinadas enfermedades de difícil o escasa probabilidad de curación (SIDA, Cáncer, etc.), ha agudizado la necesidad de buscar tratamientos alternativos. La actuación directa sobre la información genética responsable de la dolencia, es una de las aproximaciones experimentales en desarrollo. En este sentido, la utilización de ácidos nucleicos como agentes supresores constituye, desde hace algunos años, una línea de investigación importante. Como resultado están surgiendo un conjunto de nuevas tecnologías en torno a conceptos tales como oligonucleótidos *antisense*, ribozimas y triples hélices. Las ribozimas actuarían bloqueando la transmisión de información genética a nivel del RNA mediante la destrucción de genomas RNA (virus RNA) o de mRNAs. El diseño y la aplicación efectiva de ribozimas con nuevas especificidades requiere un profundo conocimiento acerca de estas moléculas así como de sus mecanismos de reconocimiento e interacción con los RNAs sustrato. En este trabajo se describen los RNAs catalíticos mejor caracterizados, así como las diferentes estrategias desarrolladas hasta el momento para la utilización de las ribozimas como inactivadores génicos.

Palabras clave: Ribozimas. RNA Catalítico. Terapia Génica.

ABSTRACT

Ribozymes are RNA molecules endowed with catalytic activity, they are able to catalyze chemical reactions inside the cells. In their natural environment, most of the described ribozymes carry out processing of other RNA molecule. In contrast to the protein ribonucleases, ribozymes exhibit a high-substrate specificity. This feature is the base for the potential use of ribozymes as specific gene suppressors and therefore to

develop new therapeutic agents. The need of new therapeutic strategies is even more significant with the rising of diseases against which the existent drugs and therapies do not show the desirable efficiency. The social repercussions of some diseases of difficult or low probability of control (AIDS, Cancer, etc.), has made more acute the need of looking for alternative treatments. Among the experimental approaches that are being carried out is the direct action on the genetic information responsible of such diseases. On this line, several strategies have emerged in the past few years, mainly based on the use of nucleic acids as specific gene suppressors, e.g. antisense oligonucleotides, ribozymes and triplex helix. The ribozymes would act blocking the transmission of genetic information at the RNA level, mediating destruction of RNA genomes (RNA virus) or mRNAs. A deep understanding of the mechanisms used by these molecules for the recognition and interaction with their RNA substrates as well as of these molecules themselves is necessary for the design and effective application of ribozymes with new specificity. In this work we describe the best characterized catalytic RNAs, as well as the different strategies developed for their use as genetic suppressors.

Key words: Ribozymes. Catalytic RNA. Gene therapy.

Recibido: 15-01-97.

Aceptado: 21-02-97.

BIBLID [0004-2927(1997) 38:2-3; 177-190]

RIBOZIMAS

Las ribozimas son moléculas de RNA con actividad catalítica. Desde su descubrimiento en 1981, la catálisis biológica mediada por RNA se ha encontrado subyacente a diversos procesos biológicos: procesamiento de intrones, mecanismos de replicación de genomas RNA, maduración de tRNAs, incluso se ha propuesto que el RNA ribosómico sea el auténtico catalizador de la formación del enlace peptídico durante el proceso de la traducción. La práctica totalidad de ribozimas de origen natural descritas hasta la fecha catalizan, independientemente del proceso biológico en el que participen, el procesamiento del esqueleto fosfodiéster de otros RNAs. Pueden ser consideradas pues como ribonucleasas que, a diferencia de sus análogas proteicas, presentan una elevada especificidad de reacción. Esta especificidad viene determinada, en todos los casos, por interacciones tipo RNA-RNA entre la ribozima y el sustrato, siendo la misma molécula de RNA responsable tanto del reconocimiento e interacción con el sustrato, como de la acción catalítica propiamente dicha (etapa química de la reacción).

En su contexto natural, la mayoría de las ribozimas (salvo la RNase P) catalizan reacciones intramoleculares. Como consecuencia, no pueden ser consideradas como verdaderas enzimas dado que se ven modificadas en el curso de la reacción y además no pueden procesar más de una molécula, aquella de la que forman parte. Sin embargo, tras un exhaustivo estudio de los

RNAs originales se ha conseguido aislar los dominios catalíticos, demostrándose además que conservan intacta su actividad y que por tanto son perfectamente capaces de procesar sustratos aportados en *trans*. Bajo estas circunstancias las ribozimas se comportan como auténticos enzimas, no se alteran durante la catálisis, y además, una única molécula es capaz de procesar múltiples sustratos.

Por lo general en las ribozimas, las secuencias responsables del reconocimiento del sustrato no están directamente implicadas en la etapa química de la reacción. Esto posibilita el hecho de que podamos alterar dichas secuencias con el objeto de dirigir selectivamente la ribozima frente a sustratos predeterminados. La capacidad de generar ribozimas con nuevas especificidades nos abre las puertas de su futura utilización como agentes supresores en el tratamiento de enfermedades actualmente de difícil o escasa probabilidad de curación con los fármacos de los que se dispone. De hecho, ya se ha iniciado la investigación con el fin de optimizar el uso de ribozimas como inactivadores génicos. En estos estudios se están utilizando diferentes tipos de RNAs catalíticos. A continuación se describen brevemente los más representativos.

RIBOZIMA HAIRPIN

El dominio catalítico responsable del procesamiento de la hebra de polaridad negativa del RNA satélite del virus de las manchas en anillo del tabaco [(-)sTRSV] se conoce como ribozima Hairpin. *In vivo* juega un papel fundamental en el proceso de replicación de este RNA. Fue descrita por primera vez en 1989 por Hampel y Tritz (1). Los trabajos llevados a cabo por este y otros grupos permitieron delimitar la mínima porción del RNA catalítico original capaz de conservar la actividad. El dominio catalítico consta de 50 nucleótidos (50 nt) y utiliza como sustrato una molécula de 14 nt. El mecanismo de reacción es dependiente de iones Mg^{2+} y consiste en una transesterificación que origina productos con extremos 5' OH y 2' 3' fosfato cíclico. Esta reacción química no es exclusiva de la ribozima tipo hairpin puesto que su mecanismo es coincidente con el de otros RNAs catalíticos como los denominados pequeños (Hammerhead, HDV). Además, la ribozima hairpin ostenta la capacidad de catalizar la reacción inversa, es decir, la ligazón de sus propios productos de corte (2).

Tras numerosas tentativas fallidas para modificar la especificidad de la ribozima fue necesario un análisis sistemático del complejo Ribozima-Sustrato con el fin de obtener más información acerca de nucleótidos esenciales, estructura secundaria, y en lo posible, contactos terciarios. La estrategia de elección para estudios de esta naturaleza es comúnmente la mutagénesis dirigida, sin embargo, ésta por lo general se basa en estudios filogenéticos

preliminares que suelen revelar secuencias conservadas y por tanto particularmente interesantes. La carencia de secuencias análogas en el caso de la ribozima tipo hairpin (únicamente tres motivos similares en la naturaleza) hace muy laborioso el análisis indiscriminado de la molécula mediante mutagénesis. Por este motivo se desarrolló una nueva herramienta para el estudio simultáneo de miles de variantes basada en el concepto de la selección *in vitro* (2).

La aplicación en este campo de la selección molecular *in vitro* es factible gracias a la naturaleza de los RNAs catalíticos. Dado que son ácidos nucleicos, su secuencia de bases nitrogenadas tiene la capacidad de codificar información genética (genotipo), pero además, las ribozimas expresan de forma directa su propio fenotipo a través de la catálisis de una reacción química. La posesión simultánea de ambas características las hace susceptibles de sufrir procesos de evolución y selección, aunque, a diferencia de lo que ocurre para los seres vivos, estos procesos operan en un sistema totalmente extracelular. Para el estudio sistemático de una molécula predeterminada con una función ya establecida es más frecuente la utilización de técnicas de selección, mientras que la evolución *in vitro* (que implica la introducción de nueva variabilidad genética en cada ronda de selección) es preferentemente empleada cuando se persigue la obtención de moléculas con nuevas actividades (3). La pauta a seguir en el desarrollo de estrategias de esta naturaleza es generalmente similar: Se introducen aleatoriamente mutaciones en las regiones objeto de estudio y se somete a la población de variantes resultante a la presión selectiva de ser recuperadas únicamente aquellas moléculas que mantengan la actividad y que por tanto catalicen la reacción deseada. Estudiando las moléculas no recuperadas se determinan las mutaciones que bien de forma aislada, bien en combinación con otras, no son toleradas. Del conjunto de moléculas recuperadas se puede obtener información acerca de posiciones esenciales, regiones que no presentan requerimientos de secuencia estrictos e incluso acerca de aspectos estructurales (estructura secundaria fundamentalmente).

Los datos obtenidos mediante el uso de técnicas de esta naturaleza, en combinación con los estudios más tradicionales de mutagénesis, han permitido establecer los modelos estructurales y requerimientos de secuencia de algunos RNAs catalíticos (fig. 1).

En lo que respecta a la ribozima hairpin, se han identificado 15 nucleótidos en la ribozima y uno en el sustrato esenciales para la actividad catalítica, así como cuatro regiones de doble banda necesarias para la catálisis (4, 5).

El gran volumen de información estructural y de secuencia obtenida a lo largo de los últimos años, ha permitido sentar las bases para el diseño de ribozimas tipo hairpin con nuevas especificidades. Estas ribozimas han sido empleadas como supresores génicos en numerosos ensayos, tanto *in vitro* como en cultivos celulares. El RNA del HIV ha sido una de las dianas más frecuentemente utilizadas en ensayos de inactivación por RNAs catalíticos.

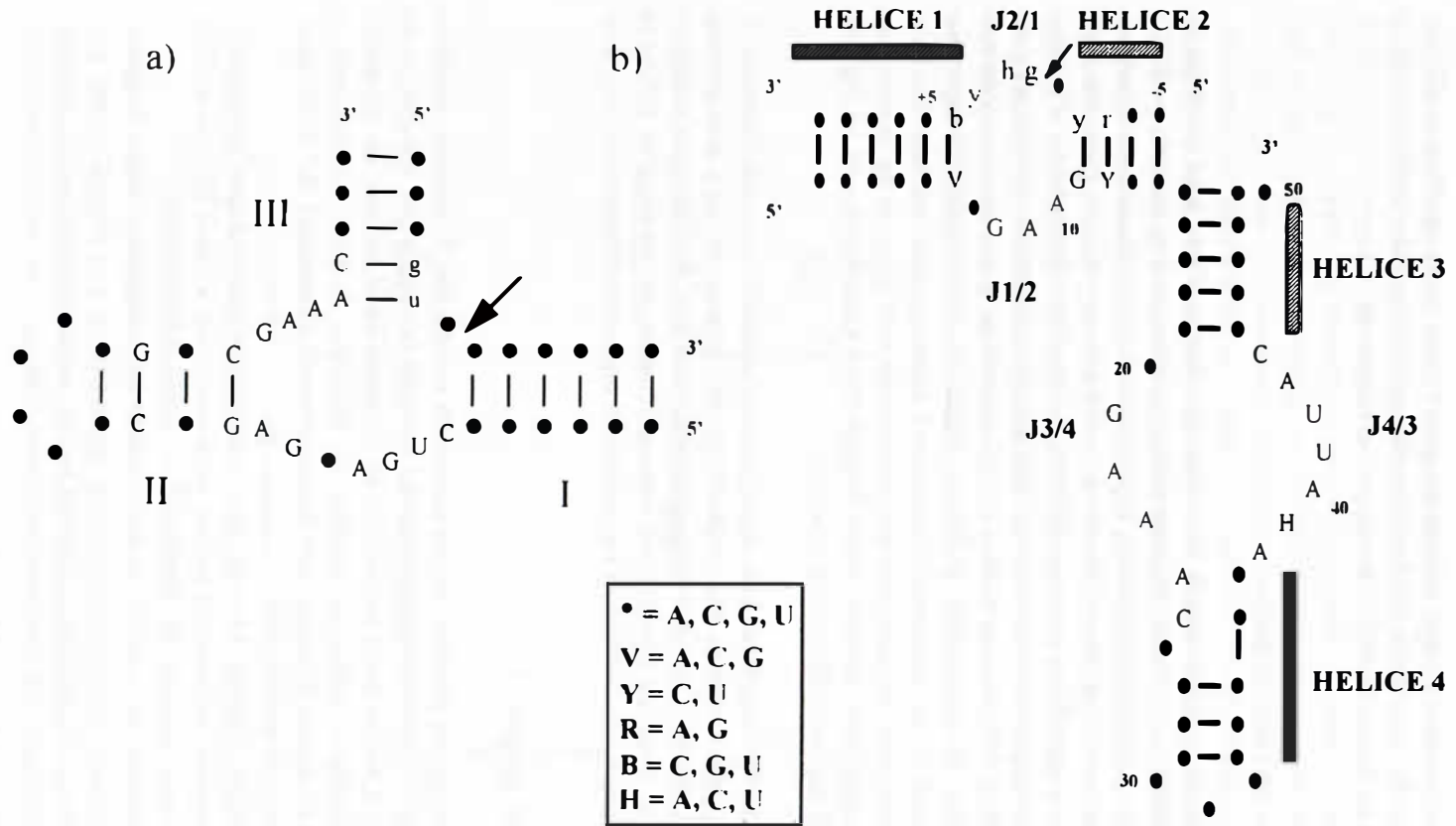


Fig. 1.—Requerimientos estructurales y de secuencia de los complejos ribozima-sustrato para los dominios catalíticos tipo hammerhead (a) y tipo hairpin (b). Estos requerimientos han sido determinados mediante técnicas de selección *in vitro* y análisis mutacional. Las flechas indican los sitios de procesamiento de las moléculas sustrato. Las secuencias correspondientes a las ribozimas están representadas con letras mayúsculas y las correspondientes a los sustratos con minúsculas.

Utilizando una ribozima tipo hairpin dirigida contra la región 5' no codificante del RNA de este virus, se han logrado porcentajes de inhibición de la replicación de hasta un 80% en cultivos celulares (6, 7).

RIBOZIMA HAMMERHEAD

Se denomina genéricamente ribozimas tipo hammerhead a un conjunto de dominios catalíticos, estructuralmente análogos, presentes en numerosos RNAs generalmente patógenos de plantas, especialmente en los llamados virusoides. Catalizan una reacción intramolecular de corte en una posición perfectamente determinada dentro de su genoma de RNA. La reacción depende de la presencia de iones magnesio y consiste en una transesterificación que genera productos 5' OH y 2' 3' fosfato cíclico (8). El avance en el conocimiento de este RNA catalítico ha progresado de forma paralela al de la ribozima hairpin por lo que muchos de los argumentos expuestos anteriormente son también aplicables en este caso: Se ha delimitado el dominio catalítico, se ha demostrado que puede catalizar el corte en *trans* de otro RNA (substrato) y se ha logrado modificar la especificidad de la ribozima.

Es el motivo catalítico más ampliamente utilizado en experimentos de inactivación génica debido a su pequeño tamaño (aprox. 35 nt) y a su elevada eficiencia catalítica. Las estrategias utilizadas con este dominio son semejantes a las de la ribozima tipo hairpin, consiguiéndose inactivación de RNAs *in vitro*, en cultivos celulares (9-11) e incluso en organismos superiores (12, 13).

RIBOZIMAS GRUPO I

La información genética no se encuentra codificada de manera continua en el genoma. Existen interrupciones del mensaje ocupadas por secuencias no codificantes. Cuando estas secuencias se disponen en el interior de un marco abierto de lectura reciben el nombre de intrones. Aunque los intrones se transcriben de forma primaria, son posteriormente eliminados del RNA mensajero durante su maduración.

Las ribozimas Grupo I son un tipo particular de intrones que, en ausencia total de proteínas catalizan su propio procesamiento, lo cual implica no solo su escisión sino también la ligazón de los exones flanqueantes.

El mecanismo de reacción es dependiente de guanosina e iones magnesio y consiste en dos transesterificaciones consecutivas que liberan, como productos finales de la reacción, el intrón unido covalentemente por su extremo 5' a la guanosina y los dos exones ligados (14).

En la primera etapa del proceso, la molécula de guanosina unida previamente al centro activo del intrón, inicia, por mediación de su grupo 3' hidroxilo, el ataque al enlace fosfodiéster existente entre el último nucleótido del exón 1 y el primer nucleótido del propio intrón. A pesar de la destrucción del enlace, el exón 1 permanece asociado al intrón por apareamiento de bases, es decir, por una interacción no covalente. Durante el curso de la reacción la guanosina es adicionada al extremo 5' del intrón. En la segunda etapa es atacado el lugar de procesamiento en 3', es decir, el punto de unión entre el intrón y el exón 2. La reacción es prácticamente idéntica a la catalizada en el primer corte, aunque en esta ocasión el grupo químicamente activo es el 3' OH del exón 1, que queda libre después de la primera reacción. Tras esta segunda transesterificación se liberan los dos exones ligados y el intrón con la guanosina en su extremo 5' (fig.2). La reacción descrita es, en su totalidad reversible por lo que el intrón es capaz de integrarse específicamente entre los dos exones (15).

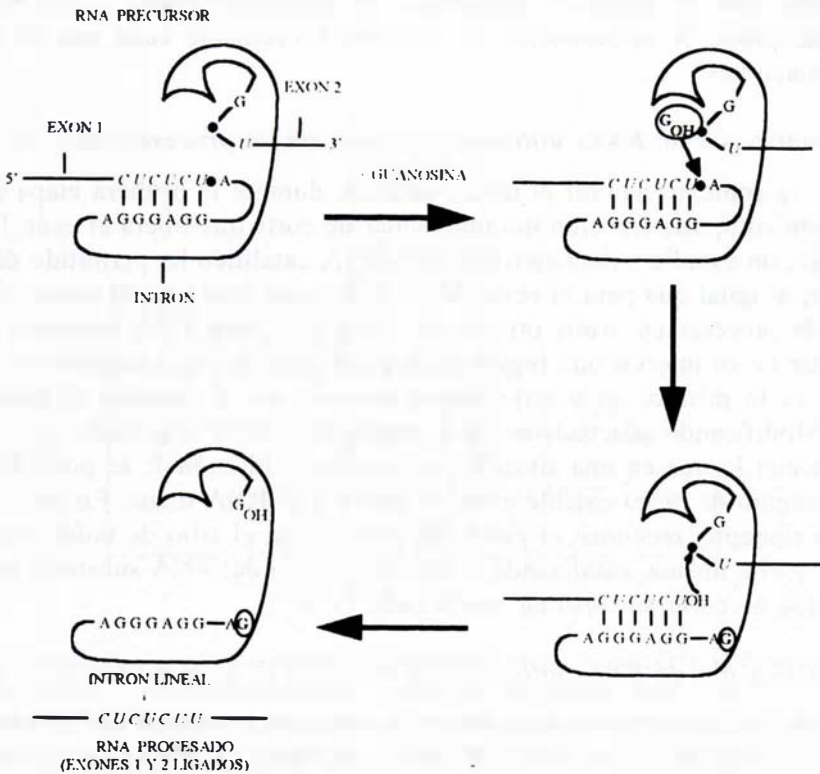


Fig. 2.—Principales etapas en el procesamiento de los intrones grupo I. En cursiva se indican las secuencias correspondientes a los exones 1 y 2. La guanosina de origen exógeno, imprescindible para la catálisis, se representa incluida en un círculo.

El primer RNA catalítico que se describió fue un intrón grupo I presente en el precursor del RNA ribosómico de la subunidad grande de los ribosomas de *Tetrahymena thermophila* (16). Análisis filogenéticos y mutacionales han permitido definir un modelo de estructura secundaria en el que destacan elementos estructurales (P1, P2 hasta P10) y de secuencia (P, Q, R y S) altamente conservados y necesarios para la catálisis (fig.3a). La especificidad de secuencia del ribozima viene dada por las interacciones establecidas entre la región 5' del intrón y cada uno de los exones (fig.3b). La reacción en 5' está bien caracterizada y el corte se produce, salvo raras excepciones, inmediatamente después de un par G-U muy conservado. Del procesamiento en 3' se tienen menos datos aunque lo que si se conoce es la necesidad de una guanosina en el extremo 3' del intrón.

La mayoría de los ensayos encaminados a la utilización de los intrones grupo I como inactivadores o modificadores génicos se han llevado a cabo empleando como modelo experimental la ribozima grupo I de *Tetrahymena thermophila*. En términos generales, se han establecido tres estrategias diferenciadas para el diseño y aplicación de ribozimas grupo I con nuevas especificidades. A continuación se describe brevemente cada una de estas aproximaciones:

a) *Inactivación de RNAs utilizando la reacción de procesamiento en 5'.*

En su contexto natural el intrón cataliza, durante la primera etapa de su procesamiento, una reacción intramolecular de corte que libera el exón 1. Sin embargo, un estudio exhaustivo con este RNA catalítico ha permitido definir y aislar, al igual que para el resto de las ribozimas descritas, el centro activo capaz de procesar en *trans* otro RNA. Para ello, este RNA sustrato debe presentar en su interior una región análoga al sitio de procesamiento en 5', o lo que es lo mismo, un uracilo inmediatamente en 3' respecto al punto de corte. Modificando adecuadamente la región del intrón implicada en la interacción con lo que en una situación natural sería el exón 1, se posibilita un apareamiento de bases estable entre el intrón y el RNA diana. En esta situación la ribozima reconoce el punto de corte como el sitio de unión entre el exón 1 y ella misma, catalizando el procesamiento del RNA sustrato en dos productos de corte sin resultar modificada (17).

b) *Inactivación de RNAs utilizando la reacción de procesamiento en 3'.*

Como se ha apuntado anteriormente, la reacción catalizada por los intrones grupo I es totalmente reversible. El intrón es capaz de integrarse específicamente en el mismo punto del que fue escindido dado que las zonas de interacción P1 y P10 le permiten reconocer el sitio de unión entre el exón 1 y el exón 2. En primer lugar el extremo 3' del intrón ataca la unión existente

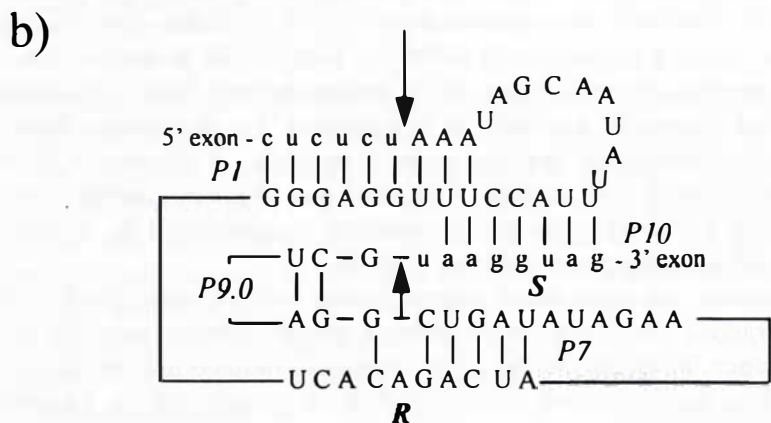
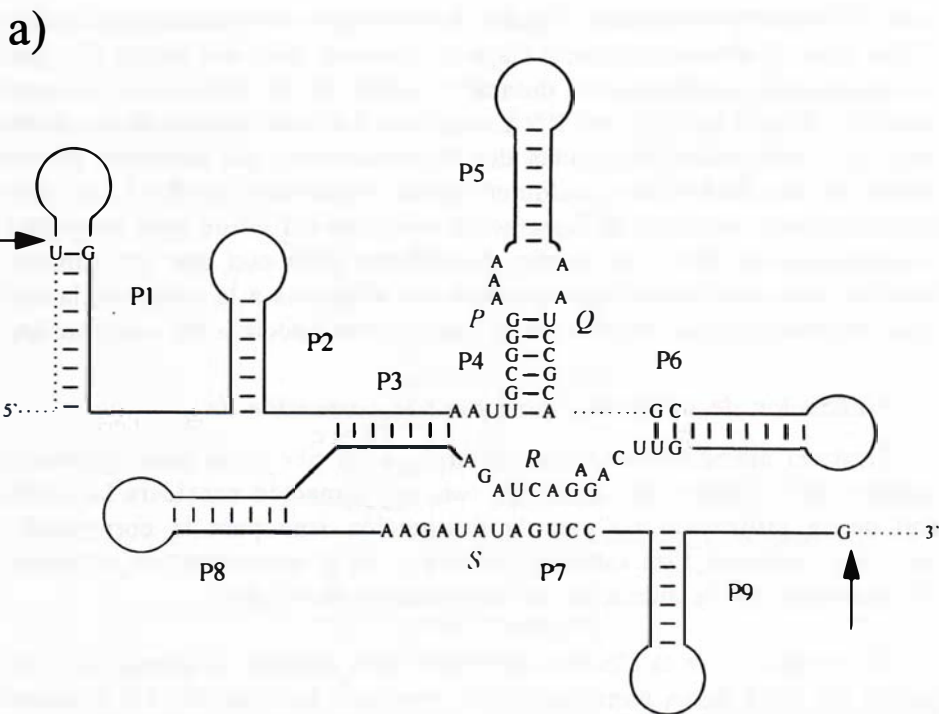


Fig. 3.—Estructura secundaria consenso de los intrones grupo I según (21). a) Representación bidimensional de la estructura secundaria consenso de los intrones grupo I. P1-P9: elementos estructurales de doble cadena conservados. Los elementos de secuencia conservados P, Q, R y S se representan con las secuencias nucleotídicas más comunes. Las flechas indican los sitios de procesamiento en 3' y 5'. b) En esta figura se muestran más detalladamente las interacciones de la región 5' del intrón grupo I con ambos exones. Interacción P1 con el exón 5' e interacción P10 con el exón 3'. La interacción P9.0 posibilita el acercamiento de la zona de procesamiento en 3' al centro activo del intrón. P7, R y S como anteriormente.

entre los exones, rompiendo el enlace y uniéndose covalentemente al extremo 5' del exón 2. En una segunda etapa el extremo libre del intrón (5') queda ligado al exón 1 liberándose durante el curso de la reacción la guanosina existente en esta posición del RNA catalítico. La modificación de las secuencias en 5' del intrón encargadas del reconocimiento del sustrato permiten dirigir la ribozima contra cualquier región o molécula de RNA. A efectos prácticos no es necesaria la integración completa del intrón para conseguir la inactivación del RNA de interés, bastará tan solo con que se culmine la primera etapa del proceso que conduce por si misma a la rotura de la molécula sustrato en dos fragmentos y como consecuencia a su inactivación.

c) *Utilización de ribozimas tipo I para la corrección de mensajes.*

Hasta el momento nos hemos referido a las ribozimas como potenciales inactivadores génicos. Sin embargo, esta aproximación considera la posibilidad de su utilización no para la destrucción sino para la corrección de mensajes erróneos. Esta estrategia sería útil en el tratamiento de enfermedades causadas por la alteración en la secuencia de un gen.

El extremo 5' de la ribozima se diseña para permitir la interacción con la región del RNA diana inmediatamente anterior a la mutación. En el extremo 3' se dispone una secuencia de RNA que se comportará durante la reacción como el exón 2. Este exón se correspondería con la secuencia correcta análoga a la de la región a reparar en el sustrato. Establecida la interacción, el intrón cataliza en *trans* el primer paso de su procesamiento, como consecuencia se escinde el fragmento portador de la mutación. En un segundo paso la ribozima une covalentemente los dos exones, es decir, el fragmento 5' del RNA sustrato (exón 1) y la secuencia correcta que él mismo portaba en su extremo 3' (exón 2). Como resultado se produce la sustitución de la región mutada reparándose el mensaje genético (fig. 4).

Este mecanismo no es un mero planteamiento teórico, sino que ha sido llevado a la práctica con éxito en un sistema simple eubacteriano. En este trabajo se consigue la reparación del RNA mensajero mutado del péptido a de la β -galactosidasa recuperándose la actividad de la proteína en las bacterias defectivas mutantes (18).

RIBONUCLEASA P

La RNase P es una ribonucleoproteína esencial para el crecimiento celular dado que participa activamente en la biosíntesis de los RNAs transferentes. Está ampliamente distribuida a lo largo de la escala filogenética, habiéndose

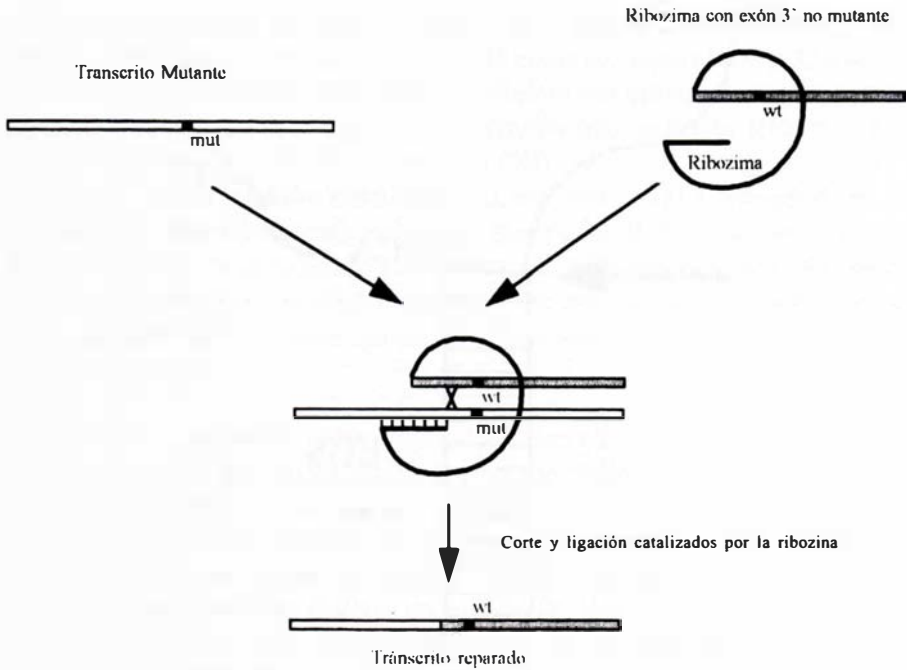


Fig. 4.—Mecanismo de escisión y reparación de mRNAs mediado por ribozimas grupo I. Figura modificada a partir de (18).

encontrado en todos aquellos organismos en los que se la ha buscado. Es por consiguiente operativa tanto en células procariontas como eucariotas.

A pesar de que uno de sus componentes es proteico, la actividad catalítica reside en el RNA (RNA M1) o al menos así se ha demostrado *in vitro* para ciertos sistemas eubacterianos (19). Es la única ribozima bien caracterizada cuyo comportamiento natural es la catálisis de una reacción en *trans*.

El reconocimiento del sustrato se basa en aspectos estructurales más que de secuencia, aunque resulta imprescindible la presencia de un triplete CCA en el extremo 3' del RNA sustrato. Además es necesario que la región inmediatamente anterior a este triplete se halle implicada en la formación de una estructura de doble hélice. Dicha secuencia recibe el nombre de *External Guide Sequence* (EGS) (fig. 5). El conjunto de la estructura reconocida por la RNase P se corresponde con la del brazo aceptor de los tRNAs.

La reacción catalizada consiste en una transesterificación que origina productos 5'-P y 3' OH y que tiene como consecuencia la escisión del fragmento 5' del tRNA inmaduro para generar de esta manera la molécula biológicamente activa.

Dado que la RNase P está presente de forma natural en todos los tipos

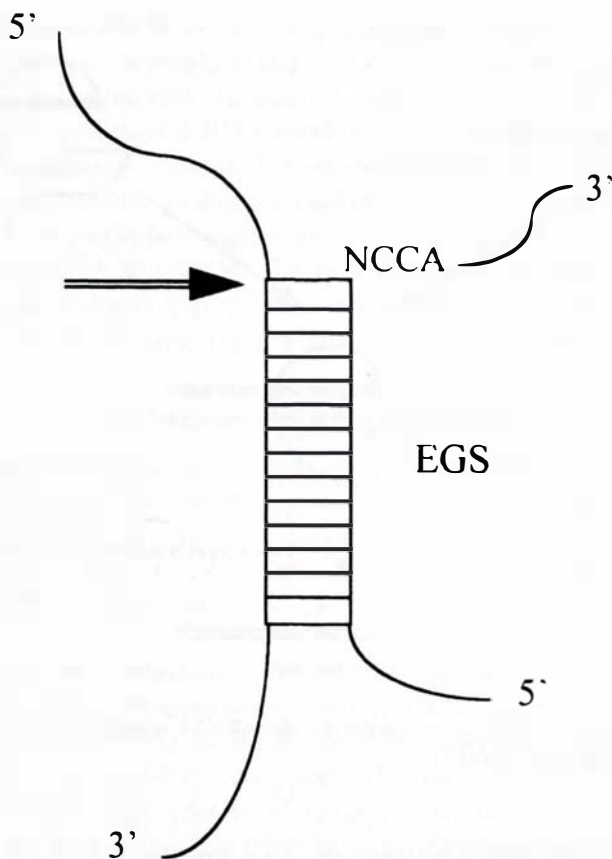


Fig. 5.—Reconocimiento de sustrato por la RNase P. La flecha indica el sitio de corte del RNA diana. EGS: External Guide Sequence. Figura tomada de (22).

celulares, coexistiría con los posibles RNAs diana y no sería necesaria su administración en caso de utilizarse como agente terapéutico. Sin embargo, para que la RNase P pueda reconocer el RNA a inactivar debe generarse en este último una estructura análoga a la que presentan los RNAs transferentes en su brazo aceptor. Es necesario pues, diseñar e introducir en las células a tratar una molécula de RNA (EGS) de secuencia complementaria a la región diana del RNA sustrato y portadora del triplete CCA en su extremo 3'. Tras la interacción de ambas moléculas la estructura generada podría “confundir” a la RNase P, de manera que ésta catalizara el corte de la molécula como si de un pre-tRNA se tratara. Desafortunadamente, esta aproximación no elude la problemática subyacente a la introducción y localización de un ácido

nucleico exógeno en las células diana. Sin embargo, cuenta con una enorme ventaja, dado que el interior celular es el contexto natural de la RNase P, será en este ambiente donde desarrolle su máxima actividad catalítica. Existen ya algunos trabajos en los que se ha utilizado con éxito la RNase P para la inactivación *in vitro* de RNAs modelo (20).

Como se ha podido comprobar existe una amplia variedad de RNAs catalíticos y aproximaciones sobre los que poder trabajar e investigar con el fin de lograr el desarrollo de protocolos terapéuticos eficaces. Sin embargo, todavía son muchos los obstáculos a salvar por lo que el camino se prevee largo aunque esperanzador. Entre los principales problemas a solventar se pueden destacar:

- Diseñar y optimizar estrategias de búsqueda y selección que permitan determinar de una forma rápida y eficaz la mejor ribozima y la mejor diana para la inactivación de un RNA dado.
- Desarrollar la metodología adecuada para la introducción de ácidos nucleicos exógenos en las células eucariotas. Dichas técnicas deberían proporcionar, en el compartimento celular en el que se requiera, una concentración de catalizador suficiente para conseguir el efecto deseado.
- Conseguir preparaciones de ribozimas que mejoren la estabilidad de estas sustancias en el interior celular, ya sea mediante la utilización de nucleótidos químicamente modificados, la formación de complejos RNA-proteínas, etc ...
- Determinar las dosis terapéuticas eficaces, así como la posible toxicidad que se pueda derivar de una elevada concentración intracelular de la ribozima.
- Ampliar el espectro de substratos frente a los que las ribozimas muestren actividad catalítica. Este requisito impuesto por la variabilidad genética es particularmente importante en el caso de los genomas virales de RNA.

Todos y cada uno de estos problemas están siendo abordados en la actualidad, y los resultados obtenidos, aunque no definitivos son esperanzadores. Por todo ello se piensa que en un futuro no muy lejano la tecnología de las ribozimas podrá dar respuesta a algunas de las enfermedades para las cuales los fármacos y terapias actuales no se consideran suficientemente eficaces.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HAMPEL, A., TRITZ, R.: *Biochemistry* (1989), **28**:4929-4933.
- (2) BERZAL-HERRANZ, A., JOSEPH, S., BURKE, J. M.: *Genes Dev* (1992), **6**:129-134.
- (3) WILSON, C., SZOSTAK, J. W.: *Nature* (1995), **374**:777-782.
- (4) BERZAL-HERRANZ, A., JOSEPH, S., CHOWRIRA, B. M., BUTCHER, S. E., BURKE, J. M.: *EMBO* (1993), **12**:2567-2574.