

催化 RNA 的结构与功能

吴启家, 黄林, 张翼

武汉大学生命科学学院, 病毒学国家重点实验室, 武汉 430072

E-mail: wuqijia@126.com

收稿日期: 2008-10-21; 接受日期: 2008-12-25

国家自然科学基金(批准号: 30330170)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2005CB724604)资助项目

摘要 在核酶被发现以前, RNA 就因为可以像蛋白质一样折叠成高度有序的结构而被预测可能具有催化的功能. 该猜想在 20 世纪 80 年代得到了证明, 四膜虫的 I 型内含子 RNA 与负责 tRNA 成熟的核糖核酸酶 RNase P 的 RNA 组分被发现具有催化功能. 近年来, 在核酶的结构和功能研究方面取得了很大进展, 包括核糖体在内的多个核酶的高分辨率晶体结构被解析出来. 本文介绍了这方面的最新研究成果.

关键词

核酶
结构
催化

在核酶被发现以前, RNA 分子因被发现可以像蛋白质一样形成高度有序的二级结构而被认为其可能具有催化活性. 此假设在 20 世纪 80 年代, 因 *Tetrahymena* I 型内含子和 RNase P 核酶的发现得到了完全的证实^[1,2]. 核酶(ribonucleic acid enzyme, 简称 ribozyme), 用来指代那些具有催化活性的 RNA 分子, 它与酶(enzyme), 即具有催化功能的蛋白质分子相应而生. 在过去近 30 年中, 有十几种核酶被发现. 根据一级序列的大小不同, 核酶可以被分成小核酶和大核酶. 小核酶包括锤头核酶、发卡核酶、VS (varkud satellite)核酶以及 HDV (hepatitis delta virus)核酶, 它们的序列长度都在 200 个核苷酸以下. RNase P, I 型内含子, II 型内含子以及核糖体属于大核酶, 它们的序列长度从几百到几千核苷酸不等. 而根据其催化的反应的不同, 核酶可以被分成 4 类: 核苷水解核酶(nucleolytic ribozyme), 它们催化的是位点特异性的切割反应; I 型内含子和 II 型内含子催化的都是两步连续的转酯反应, 可以被归为一类; RNase P 在加工 tRNA 成熟时使用的是一个水解反应; 催化肽转移反应的核糖体是最后一类.

核酶在自然界中广泛存在, 在三界生物中都被

发现并参与多种多样的生物学反应. 小核酶主要存在于病毒、类病毒和微卫星的 RNA 基因组中, 加工滚环复制获得的中间产物到基因组长度^[3]. II 型和

I 型内含子在低等真核生物和植物的细胞器基因组中富集存在^[4], 它们的准确剪接对其宿主基因所编码的 RNA 的成熟至关重要^[5,6]. 目前为止, 发现两类核酶在三界生物中普遍存在, 起着看家功能. 一类是负责加工 tRNA 成熟的核糖核酸酶 RNase P (ribonuclease P), 它由蛋白质和 RNA 共同组成, 但其催化功能由 RNA 组分独立完成, 因此称为 RNase P 核酶^[7]. 另外, 在生物体最重要的生物学过程——多肽的合成中, 肽键的形成是由核糖体 RNA 的肽酰转移酶活性催化的, 这意味着核糖体也是一个核酶^[8].

在过去的 26 年中, 科研人员在揭示核酶如何行使酶的功能这一基本的问题上进行了不懈的努力. 在研究核酶的精细结构方面, 核磁共振(NMR)和结晶是两个基本的手段. 直到 1994 年, 即核酶被发现 10 年之后, 第 1 个原子水平的核酶结构(锤头核酶)才被发现^[9]. 从那时起, 特别在最近几年, 在研究核酶催化的结构基础方面取得了巨大的进展. 几乎所

有类型核酶的晶体结构都被解析, 而核糖体的高分辨率的晶体结构也为其 RNA 催化的结构机制提供了直接的证据. 这些晶体结构成功地揭示了核酶催化的结构基础: 虽然不同种属核酶的一级序列及其三级结构是非常不同的, 但是它们的催化大都采用了广义酸碱的催化机制.

本文将讨论在探索核酶高级结构, 以及核酶结构与功能之间关系的研究进展, 也涉及部分核酶在抗病毒方面的应用.

1 核苷水解核酶

1.1 核苷水解核酶的催化

核苷水解核酶催化位点特异性的切割反应将滚环复制的中间产物进行加工成基因组长度. 该切割反应是一个转酯反应, 切割位点处的 2'-羟基攻击其相邻的 3'磷酸, 在 3'末端形成一个 2', 3'环化磷酸, 并在其 5'-末端形成一个自由的羟基^[3]. 该催化反应的化学本质是一个 S_N2 反应(图 1(E)). 首先切割位

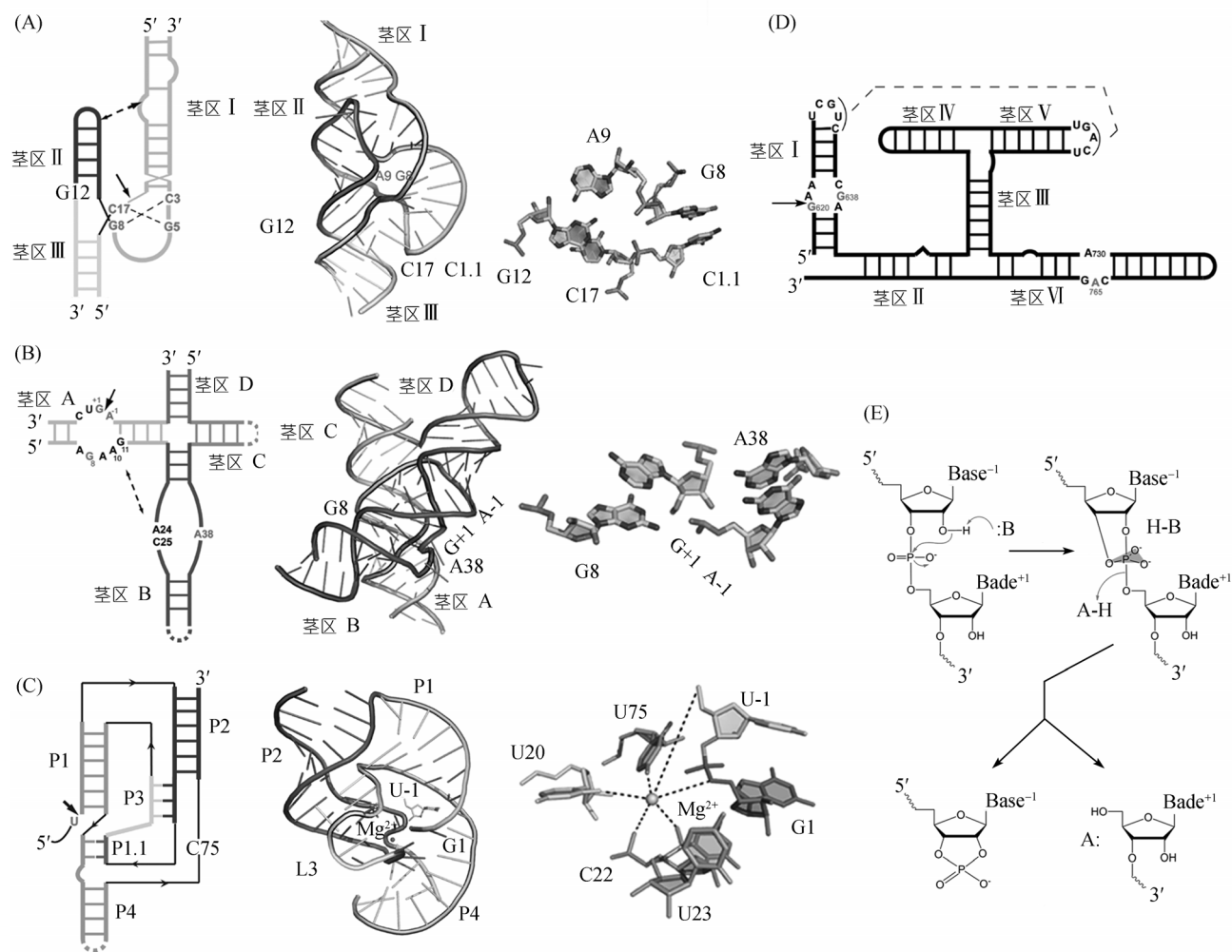


图 1 小核苷水解核酶的结构、活性中心及其催化机制

(A)~(C) 核苷水解核酶的结构和活性中心. 二级结构示意图中各结构域的灰色与三级结构保持一致, 核酶的切割位点用箭头表示(左栏). 三级结构是根据已发表的晶体结构, 用pyMOL软件(0.99)重建(中间栏). 活性中心的原子水平视图是从相应的晶体结构中摘出独立显示(右栏). (A) 锤头核酶, 其三级结构根据PDB文件 2GOZ重建; (B) 发卡核酶, 其三级结构根据PDB文件 1M5K重建. 双向虚线箭头表示这些碱基参与形成核糖拉链; (C) HDV核酶, 三级结构是根据一个C75U突变的核酶的晶体结构(PDB文件 1SJ3)重建; (D) VS核酶的二级结构, 环和环之间的远距配对用虚线标注; (E) 核苷水解核酶的催化机制, A示广义酸; B示广义碱. 双面三棱锥的中间态中 4 个共平面的原子用灰色填充(<http://www.rna.whu.edu.cn/pictures/sup4review.htm>)

点处的 2'羟基被去质子化, 形成的 2'-氧负离子与临近的 3'磷原子形成一个较弱的键, 切割位点处形成一个三棱锥式的中间态, 其中 2'-氧负离子亲核试剂和 5'-离去基团位于三棱锥的两个顶端, 与 3'磷酸处在一条直线上(in-line). 该反应结束后, 切割位点处的 3', 5'磷酸二酯键被打断, 2'-氧负离子与 3'磷酸之间则形成共价键连接^[10,11]. 总体而言, 这些核酶也可以催化这个切割反应的逆反应——连接反应, 利用 5'-羟基作为亲核攻击基团对环化的磷酸进行攻击.

该切割反应是一个广义酸碱反应, 其中需要一个广义碱对 2'-羟基进行去质子化以激活 2'-氧负离子, 以及一个广义酸对离去基团 5'-氧原子进行质子化. 核苷水解核酶之所以这样命名是因为在它们的反应中, 广义酸和广义碱都是核苷, 但 HDV 核酶例外, 它可能使用了一个金属离子作为广义酸或者广义碱^[12].

广义的酸碱反应是核酶的一个普遍机制. 与其他核酶相比, 小核酶的广义酸碱反应有两个独特之处. 其中最大的不同在于它们利用与被攻击的敏感磷原子处在同一个核苷酸中的基团作为亲核攻击基团, 而不是与切割位点很远的碱基(型内含子)或者外源的分子(型内含子、RNase P 和核糖体). 另一个不同在于, 这类核酶使用自身的基团作为广义酸和广义碱, 而其他核酶则使用金属离子作为广义酸和广义碱.

1.2 小核苷水解核酶的结构特征以及活性中心的组成

虽然核苷水解核酶具有不相关的一级序列和三级结构, 它们都需要形成紧密的折叠, 将起功能的核苷酸带到切割位点附近, 从而充当广义碱或广义酸, 激活亲核攻击基团或稳定离去基团.

(1) 锤头核酶. 锤头核酶是一类具有自我切割活性的 RNA, 广泛存在于植物类病毒和寄生虫中, 在滚环复制中催化特定的磷酸二酯键异构化反应. 锤头核酶由 1 个保守的核心和 3 个组装成“锤头”形状的颈区组成. 锤头核酶是第一个得到原子水平分辨率结构的核酶, 该晶体结构显示它的茎区和共轴堆积在一起, 而茎区 则与茎区 形成一个锐角^[9] (图 1(A)左图). 但从该晶体结构中推断出的结构信息与生化数据在很多方面不相吻合, 其中最大的问题

在于该晶体中切割位点处敏感磷原子的定位完全不能满足“in-line”的催化机制^[13]. 所以该晶体结构被认为没有反映核酶的活性结构, 而是反映了一个本底状态(ground state). 这个猜想在 2006 年由一个全长的核酶晶体结构得到了完全的证实^[14] (图 1(A)中图). 在这个晶体结构中, 茎区 和 连接区域序列戊糖骨架的扭曲使切割位点的核苷酸 C17 堆积到茎区 上, 将其置于三茎区连接区域的活性中心内. 碱基 G5 与 C17 的呋喃糖形成氢键, 帮助其定位到适合“in-line”攻击的位点. G12 处在可与 C17 的 2'-氧负离子形成氢键的距离内, 而 G8 则与离去基团 5'-氧原子形成氢键, 暗示这两个碱基分别充当广义碱和广义酸. C3 与 G8 形成 Watson-Crick 碱基配对, 以帮助其定位, 如图 1(A)右图所示. 这个全长核酶的晶体结构解决了以前晶体结构与生化数据的主要冲突^[15].

(2) 发卡核酶. 发卡核酶与锤头核酶类似, 也是在植物病毒卫星 RNA 中发现的, 它可以催化一个可逆的自我切割反应来加工滚环复制的产物. 发卡核酶由 4 个形成四向连接的茎区组成, 分别是茎区 A, B, C 和 D (图 1(B)左图). 茎区 A 和 B 各包含一个内环, 核酶的切割位点位于茎区 A 的内环中. 这两个内环中的序列是高度保守的, 而这 4 个茎区的序列则是高度可变的, 它们的唯一限制就是保持碱基配对^[16]. 在核酶的活性结构中, 茎区 A 和 D 共轴堆积在一起, 而茎区 B 和 C 也是共轴堆积在一起 (图 1(B)中图). 这两个共轴堆积的结构域反向平行排列, 以使茎区 A 和 B 的内环相互作用形成核酶的催化中心. 核酶的催化中心涉及茎区 A 中 A10, G11 与茎区 B 中 A24, C25, 形成的一个复杂的核糖拉链. 以此+1 位的鸟苷酸被挤出 A 内环并插入到 B 内环中, 与 C25 形成一个 Watson-Crick 碱基配对. 这个作用改变了核糖骨架的构象, 使得-1 位腺苷的 2'-氧负离子的定位非常利于亲核攻击. G8 和 A38 并排在核酶的催化中心并与敏感磷原子形成氢键, 说明它们可能分别充当催化中的广义碱和广义酸^[17] (图 1(B)右图).

(3) VS 核酶. VS 核酶在 *Neurospora* 线粒体中非常丰富, 在加工复制中间体中起作用. VS 核酶长度约为 150 nt, 由 6 个茎区组成, 这 6 个茎区形成两个三向连接: 2-3-6 连接和 3-4-5 连接, 如图 1(D)所示. 茎

区的内环中包含了核酶的切割位点, 茎区₁, 和茎区₂共轴堆积在一起, 形成一个长的柱状结构; 茎区₃和茎区₄从这个柱中发散出来. 核酶的连接区域的序列对核酶茎区的共轴堆积至关重要^[18]. 核酶的催化中心位于茎区₁的A730内环中, 而核酶的切割位点位于茎区₂内环中G620之后. 茎区₃末端环中的GUC3碱基可以与茎区₄末端环的GAC形成远距配对^[19], 这个相互作用将核酶的切割位点带到了催化中心处. 由于VS核酶到现在还没有高分辨率的晶体结构, 所以对比其与发卡核酶的相似性, 加上生化数据显示, A765和G638可能参与了核酶的广义酸碱催化, 但目前还不清楚究竟哪个碱基充当广义碱^[20]. G620和A638A之间的“sheared base pair”以及G638同时与A621, A622形成的共享的“sheared base pairs”帮助将待去质子化的2'羟基定位到广义碱附近^[21].

(4) HDV核酶. HDV是乙肝病毒(HBV)的一个卫星病毒, 它具有一个长约1700个碱基的环形单链RNA基因组, 其中70%是自身互补的. 由RNA聚合酶驱动的复制产生基因组RNA和反基因组RNA串联体, 两种RNA都编码HDV核酶以将串联体复制产物切割成基因组长度的单元. HDV核酶由5个配对区组成, 分别是P1~P4以及一个2 bp的配对P1.1. 这些配对区形成一个复杂的双交叉的假节: P1和P2形成一个假节, P3和P1.1形成另一个假节, 这两个假节交叉使P1和P1.1之间形成第3个假节. 这5个配对区被组装成两个平行的结构域, 其中P1, P1.1和P4共轴堆积在一起, P2和P3共轴堆积在一起(图1(C)). 这两个结构域并排排列, 通过5个交叉链连接, 并进一步被P1.1固定^[22]. 配对区P1是包含切割位点的底物配对区. 核酶的活性中心包括P1.1, P3和连接区域, 而配对区P1, P2和P4仅仅是稳定活性中心的结构元件^[23]. HDV核酶的催化需要二价金属离子, 二价金属离子可能直接参与核酶的催化. 核酶催化的另一个至关重要的因子是C75(U75). 这两个因子可能在催化中充当广义酸和广义碱, 但哪一个充当广义碱到目前为止还不清楚(图1(C)右图). HDV核酶的第一个晶体结构显示C75与离去基团十分靠近, 说明它可能充当了广义酸^[23]. 后来的多条生化证据支持C75作为广义酸的机制^[24]以及一个水化的金属离子作为广

义碱^[22]. 但是最近的一个晶体结构显示C75与亲核攻击基团靠得非常近, 暗示它可能充当广义碱, 而水化的金属离子充当广义酸^[25]. 所以还需要进一步的研究来区分这两个因子的具体作用.

2 RNase P 核酶

RNase P 是一个由单个 RNA 与一个或多个蛋白质构成的复合体. 复合体中的 RNA 组分是其催化亚基, 所以 RNase P 也是一个核酶. RNase P 在三界生物, 包括古细菌、细菌和真核生物中广泛分布, 在多种 RNA 的成熟中起作用. 与其他核酶相比, RNase P 有一些独特的性质. 首先, RNase P 核酶是以反式方式作用的, 并可以催化多轮反应. 此外, 与其他核酶只能切割自身所在的 RNA 不同, RNase P 可以加工多种底物, 例如所有的 tRNA, 4.5S rRNA 和 tmRNA(tRNA-like 和 mRNA-like RNA).

2.1 RNase P 核酶的催化

RNase P 使用一个水解反应来加工 tRNA 的成熟. 该反应的化学本质也是一个广义酸碱反应. 虽然该核酶已经有几个晶体结构, 但其功能基团在原子水平上的排列还没有被得到, 所以该反应的机制大部分是从生化数据中推断得来的. 反应中的亲核攻击基团被推断是一个被广义碱激活的水分子. 该反应需要3个二价金属离子参与(图2(B)). 离子A作为广义碱对水分子进行去质子化, 形成一个水化的金属离子作为亲核攻击基团起始反应. 离子B在稳定三棱锥中间态中起作用. 前体tRNA切割位点处(N₁)处的2'羟基通过一个水分子结合第3个金属离子C完成对3'离去基团的质子化^[7].

2.2 RNase P 核酶的结构以及活性中心

RNase P 核酶的一级序列和二级结构是非常多样的, 但所有的核酶都具有一系列高度保守的结构元件来组成核心结构. 核酶的核心结构包括5个包含高度保守序列的保守区(conserved region, CR), 分别为CRI-CRV(图2(A)左图). 除了这些共同的核心结构外, 每一个 RNase P 核酶都具有其独特的周边结构, 这些周边结构在每界生物中是进化上保守的. 细菌的 RNase P 长度约330~400 nt, 根据其具有的周边结构可以被分成两个亚类: A-type(Ancstral)和 B-type

(*Bacillus*)^[7]. 古细菌RNase P与细菌长度相当, 但具有不同的周边结构. 真核生物的RNase P长度约为细菌的 2/3, 并缺少很多周边结构元件^[26].

RNase P核酶可以被分成两个独立折叠的结构域(图 2(A)左图). 特异性结构域(S-domain)与前体tRNA的TyC环相互作用, 在底物识别中起作用; 催化结构域(C-domain)则负责前体tRNA接受臂和 3'-CCA的识别, 并催化水解反应^[27]. 核酶的整体结构是一个由共轴堆积的茎区组成的紧密折叠^[7], 这些茎区通过远程对接的方式组装到一起. 这些在空间上相关分布的茎区形成一个特征性的平面来结合前体tRNA^[28]. 核酶的 5 个保守区和P15 以及 3 个共轴堆积的结构域P1-P4-P5, P2-P3 和P8-P9 一起, 形成活性中心^[28,29](图 2(A)右图). P4 是一个在CRI和CRV之间形成的远距离配对, 它对核酶的催化至关重要. 最近的晶体结构显示, P4 螺旋的大沟可以结合 3 个二价金属离子, 但这些金属离子距离活性中心太远, 可能没有直接参与催化^[28]. 而在连接区域结合的两个二价金属离子则与活性中心非常近, 可能参与核酶的催化. 核酶的周边结构分布于核酶的表面并远离活性中心, 它们可以通过远程对接的方式稳定核酶的整体结构^[28].

虽然不同的核酶具有独特的周边结构, RNase P 的整体结构却保持一致, 可能是通过衍生出相应远程相互作用得到维持的. 例如, A型核酶中P12 和P13 的相互作用在B型核酶中被P10.1 和P12 的相互作用所取代. 另一个例子是A型核酶中的P16-P17-P6 结构域, 它在B型核酶中并不存在, 这个结构域参与形成

的三级相互作用在B型核酶中被P5.1 和P15.1 的相互作用维持^[7].

2.3 RNase P 核酶的底物识别

虽然已得到了RNase P核酶的几个晶体结构, 但尚缺少核酶-底物复合物的晶体结构, 所以对底物结合的了解主要来源于生化数据及对tRNA和RNase P 晶体结构的模拟. 前体tRNA上影响结合的决定因素包括其 5'前导序列, 3'-CCA 以及TyC茎环^[27]. 与前面提到的一样, 核酶的折叠包含一个平面对tRNA进行结合. 核酶J5/15 连接区中一个绝对保守的腺苷酸可以与前体tRNA 5'前导序列的-1 位核苷酸相互作用. 对TyC茎环的识别是由核酶的S-结构域完成的, 其P10/11 区域两个高度保守的腺苷酸参与TyC环的入邬作用. 核酶L15 与前体tRNA 3'-CCA的相互作用很早就被发现对水解位点的选择至关重要. 最近的生化数据表明这个相互作用远非碱基配对那么简单. 例如, 该相互作用需要二价金属离子的参与^[30], 而且对可能的配对进行互补突变仍然导致催化活性的下降, 说明该相互作用并非简单的碱基配对^[31].

2.4 蛋白在 RNase P 核酶中的作用

RNase P 是一个核酸-蛋白复合体, 其蛋白组分的存在可以稳定核酶的结构, 或帮助核酶核心结构的形成. RNase P 核酶的蛋白组分在三界生物中差异非常大, 提示蛋白的含量与核酶结构的复杂度有一定的联系: 细菌 RNase P 核酶具有更为复杂的结构, 而 RNA 本身就可以满足催化需要的结构, 所以细菌

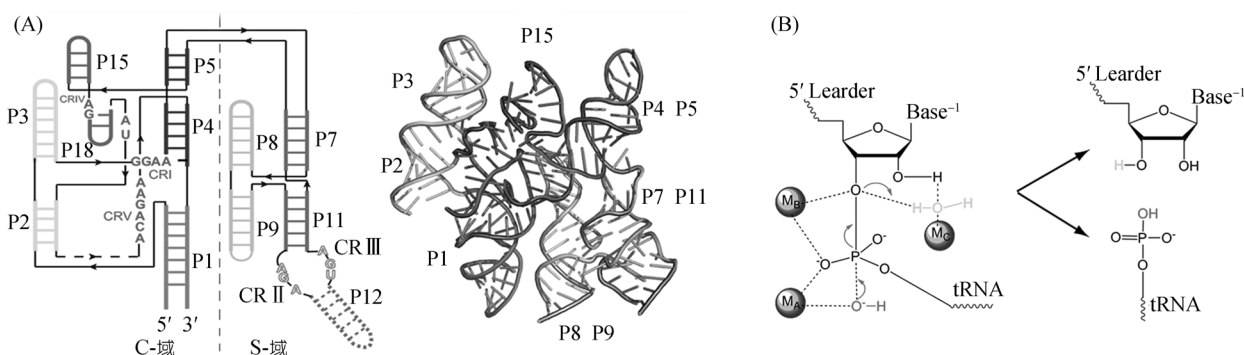


图 2 RNase P 核酶的结构和催化机制

(A) RNase P 的二级(左)和三级(右)结构, 二级结构中用虚线标注的部分表示这些结构域没有被包括在晶体结构中. 三级结构根据PDB文件 2A64 重建; (B) RNase P核酶的催化机制(<http://www.rna.whu.edu.cn/pictures/sup4review.htm>)

RNase P 仅含有约 10% 的蛋白; 真核生物 RNase P 的结构相对简单, 但其蛋白含量达到了 70%^[32]. 所以真核 RNase P 中的蛋白组分可能发挥结构作用, 替代缺失掉的 RNA 结构元件的功能.

3 型内含子

型内含子是一类可以催化自我剪切和外显子连接的 RNA 分子, 在自然界中广泛分布: 从基因上来讲, 它们侵入的基因包括 mRNA, tRNA 和 rRNA 等; 从所处的细胞器来讲, 它们存在于细胞核、线粒体和叶绿体中; 从所处的物种来说, 它们存在于从原核到真核的多种生物中. 型内含子的数目已经超过了 20000 个, 并且仍在增长.

3.1 型内含子的催化

型内含子催化的自我剪接反应是一个连续的两步转酯反应, 包括在 5' 和 3' 剪接位点的顺序切割以及外显子的连接(图 3(C)左图). 第一步切割反应中,

包含 5'-底物的茎区进入到核酶的催化核心中, 将 5' 剪切位点正确定位以接受攻击. 一个外源的鸟苷也被结合到核酶的活性中心, 用其 3' 羟基作为亲核试剂对 5' 剪切位点的磷原子进行攻击. 该反应导致 5' 剪切位点磷酸二酯键的断裂, 在 5' 外显子上形成一个自由的 3' 羟基, 并使外源的鸟苷连接到内含子的 5' 端. 第一步反应完成之后, 核酶经过结构的转换, 将第一步中进行攻击的鸟苷释放, 然后结合内含子末端高度保守的鸟苷. 之后第二步反应起始, 用 5' 外显子上的 3' 自由羟基作为亲核攻击基团对 3' 剪切位点进行攻击. 该反应导致外显子的连接和内含子的释放. 型内含子催化已经在文献^[11,33-35]中被详细阐述.

型内含子催化的化学本质也是一个广义酸碱反应. 至少两个 Mg^{2+} 直接参与了催化过程. 如图 3(C) 右图所示, 在第一步反应中 M_B 结合到外源鸟苷的 3' 羟基上, 作为一个广义碱激活亲核攻击基团. 另一个 Mg^{2+} (M_A) 作为广义酸稳定 3' 离去基团. 在第二步反

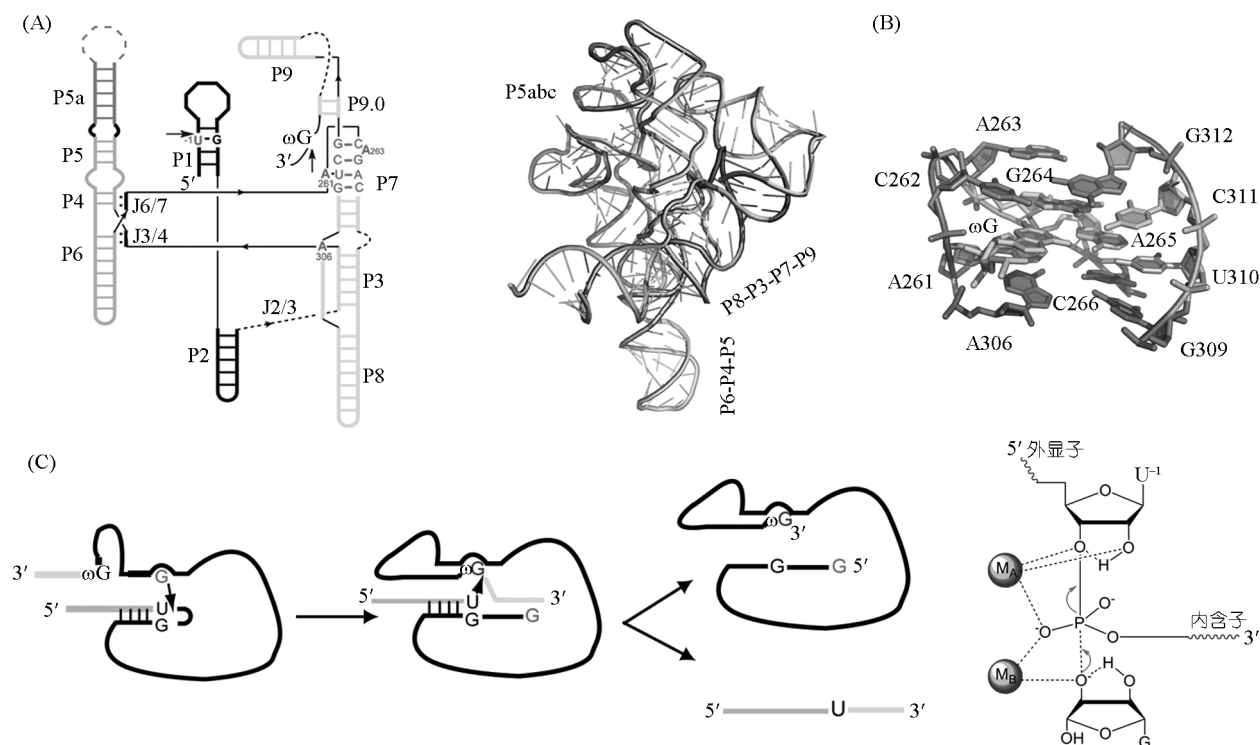


图 3 型内含子的结构和催化机制

(A) 型内含子的二级(左)和三级(右)结构. 二级结构的虚线部分表示这些区域可能包含周边结构. P1 和 P2 没有被包含在晶体结构中. 图示为 *Tetrahymena* 内含子的三级结构, 根据 PDB 文件 1X8W 重建; (B) *Tetrahymena* 内含子的活性中心; (C) 型内含子的自剪接反应(左)和第一步催化的中间态(右)(<http://www.rna.whu.edu.cn/pictures/sup4review.htm>)

应中这两个离子交换角色, M_A 作为广义碱而 M_B 作为广义酸. 催化的中间态在第一步反应中被整合了 Mg^{2+} 的外源鸟苷的 2' 羟基稳定^[36], 在第二步中被一个氢键的网络所稳定^[37].

3.2 型内含子的结构

型内含子在序列上差异很大, 从几百个核苷酸到几千个核苷酸都有分布. 但是所有的型内含子都具有一个由 P1~P9 的 9 个保守的配对区组成的高度保守的二级结构^[38](图 3(A)左图). 这 9 个配对区组织成 3 个结构域: P1~P2 结构域、P4~P6 结构域和 P3~P9 结构域, 每个结构域中的配对区都是共轴堆积在一起的. P1 是底物配对区, 包含了核酶的 5' 剪切位点. P3 和 P7 形成一个对核酶催化至关重要的假节结构. 核酶的三级结构是一个紧密的折叠, 其中 P4~P6 结构域充当结构的骨架, 而 P3~P9 结构域紧密包裹在 P4~P6 结构域的周围(图 3(A)右图). 核酶的 3 个结构域由保守的连接区连接, 这些连接区在核酶整体结构的组装以及活性中心的形成中起到重要的作用. 双链连接区域可能通过小沟-小沟相互作用介导结构域之间的组装. 单链连接区排在结构域的周边, 提供一个互补的面, 帮助结构域之间的组装. 例如 J3/4 和 J6/7 可以同 P4~P6 结构域形成碱基三联配, 促进 P4~P6 与 P3~P9 之间的组装^[39-42](图 3(A)左图).

除了这 9 个保守的配对区外, 大多数型内含子还具有至少一个额外的结构域, 被称为周边结构, 例如 *Tetrahymena* 内含子中的 P5abc, P2.1 和 P9.1-P9.2 等. 这些周边结构主要是通过形成各种三级相互作用稳定核酶的核心结构, 它们的缺失总体来讲会降低但不会消除核酶的剪接活性^[43,44]. 但是某些周边结构对核酶的活性却是必需的. 例如 *Candida* 内含子中的 P2.1, 其根部配对可以与 P3 和 P6 形成一个三螺旋连配的结构, 该结构对核酶催化核心的紧密形成起至关重要的作用^[45].

3.3 型内含子的底物识别

在型内含子核酶的催化中, 5' 和 3' 外显子必须在催化核心正确定位, 使它们的敏感磷原子与亲核试剂足够靠近. 5' 外显子的定位首先是由内含子中的内部引导序列(IGS)决定的, 它可以与 5' 外显子进行

碱基配对, 形成底物茎区 P1(图 3(A)左图). 核酶的 5' 剪切位点是 P1 中的一个 GU 配对, 它在催化核心的定位是由多个因素共同决定的. 首先, P1 与 P2 是共轴堆积的, 而在活性结构中, P2 与 P8 通过小沟-小沟相互作用结合到一起, 所以 P1 的定位也就因此而决定^[46]. 其次, J2/3 和 J8/7 作用于 P1~P2 结构域的小沟^[47]. 最后, 剪切位点的 GU 配对通过与 J4/5 的 A-minor 作用插入到 P4~P6 结构域^[40]. 这些作用一起将 5' 剪切位点固定到核酶的活性中心.

内含子 3' 末端是一个保守的鸟苷, 在第二步反应中, 这个残基必须进入到核酶的活性中心接受攻击, 所以 3' 剪切位点就是由这个鸟苷决定的. 两个元件参与 3' 剪切位点的旋转, 首先是一个非常短的远距配对 P9.0. 它是由 P7 下游序列和内含子末端鸟苷上游的序列配对形成的^[48]. 这个远距离配对将内含子的末端鸟苷带到距离活性中心所在的 P7 很近的位置上. 另一个因素是 P10, 这是一个由 3' 外显子和部分 IGS 序列形成的配对, 这个作用进一步将 3' 剪切位点定位到活性中心上^[49].

3.4 型内含子的活性中心

型内含子的活性中心位于其 P7 茎区, 它可以在第一步反应中结合一个外源的鸟苷作为亲核试剂发动攻击, 也可以结合内含子的末端鸟苷, 在第二步反应中接受攻击. 该活性中心是由 4 层碱基三联配构成的^[50]. 在 *Tetrahymena* 内含子中, 鸟苷(外源鸟苷或末端鸟苷)与 P7 配对区的 G264-C311 配对形成一个共平面的碱基三联配(G-triple)(图 3(B)). 这个三联配被夹在其他 3 层碱基三联配中. 在其上方, C262 与 G312 配对, 而 A263 与 G312 的小沟形成氢键, 形成第 1 层碱基三联配. 碱基 C262 正好位于 G-triple 中鸟苷嘌呤环正上方, 可能通过碱基堆积稳定鸟苷的结合. 在 G-triple 下方, A261 作用于 A256-U310 配对的大沟, 形成第 3 层碱基三联配. 最后 A306 碱基的 Hoogsteen 边作用于 C266-G309 的大沟, 形成第 4 层碱基三联配^[50]. 该活性中心可以结合两个二价金属离子充当广义酸和广义碱, 分别对亲核攻击基团进行去质子化和 3' 离去基团进行质子化.

4 型内含子

型内含子是另一类大核酶, 序列长度在

400~1000 个核苷酸之间. 它可以在没有蛋白质帮助的条件下完成自身从前体 RNA 中的切割和外显子的连接. 型内含子的另一个独特之处在于, 它可以以 DNA 为底物进行切割. 型内含子主要存在于细胞器基因组中, 在细菌基因组中也有发现.

4.1 型内含子的催化

型内含子的催化机制与剪接体内含子完全一致, 所以被认为是剪接体内含子的祖先^[51]. 型内含子的剪接也是一个连续的两步转酯反应(图 4(C)左图). 在第一步剪切中, 内含子分支位点的内源腺苷的 2'羟基对 5'剪切位点进行亲核攻击. 该反应导致 5'剪切位点的切割, 形成一个套马索结构的内含子, 并在断裂的 5'外显子上形成一个自由的 3'羟基. 反应结束后, 5'外显子被固定在原处, 并在第二步剪切反应中, 用其自由的 3'羟基对 3'剪切位点进行亲核攻击, 得到连接的外显子并释放套马索结构的内含子^[5].

除了两个特征, 型内含子催化的化学机制与型内含子几乎相同(图 4(C)右图). 首先, 型内含子利用一个内含子内部的腺苷攻击 5'剪切位点, 用其 2'羟基作为亲核攻击基团; 其次, 与型内含子中剪切位点处的 2'羟基参与稳定中间态不同, 该基团在型内含子中是自由的^[52].

4.2 型内含子的结构

除了结构域 V(Domain 5, D5)中的保守序列外, 型内含子的一级序列是高度变化的, 但它们都可以形成一个高度保守的二级结构. 该结构由 D1~D6 的 6 个结构域组成(图 4(A)), D1 包含了识别两端外显子以及分支位点亲和攻击试剂的必要信息^[53]. D2 和 D3 是核酶完全活性的必要组成部分, 它们的连接区域(J2/3)是活性中心的一部分^[54]. D4 通常编码一个大的可读框, 对核酶的折叠和催化没有作用^[55]. D5 是型内含子中最为保守的区域, 它直接参与活性中心

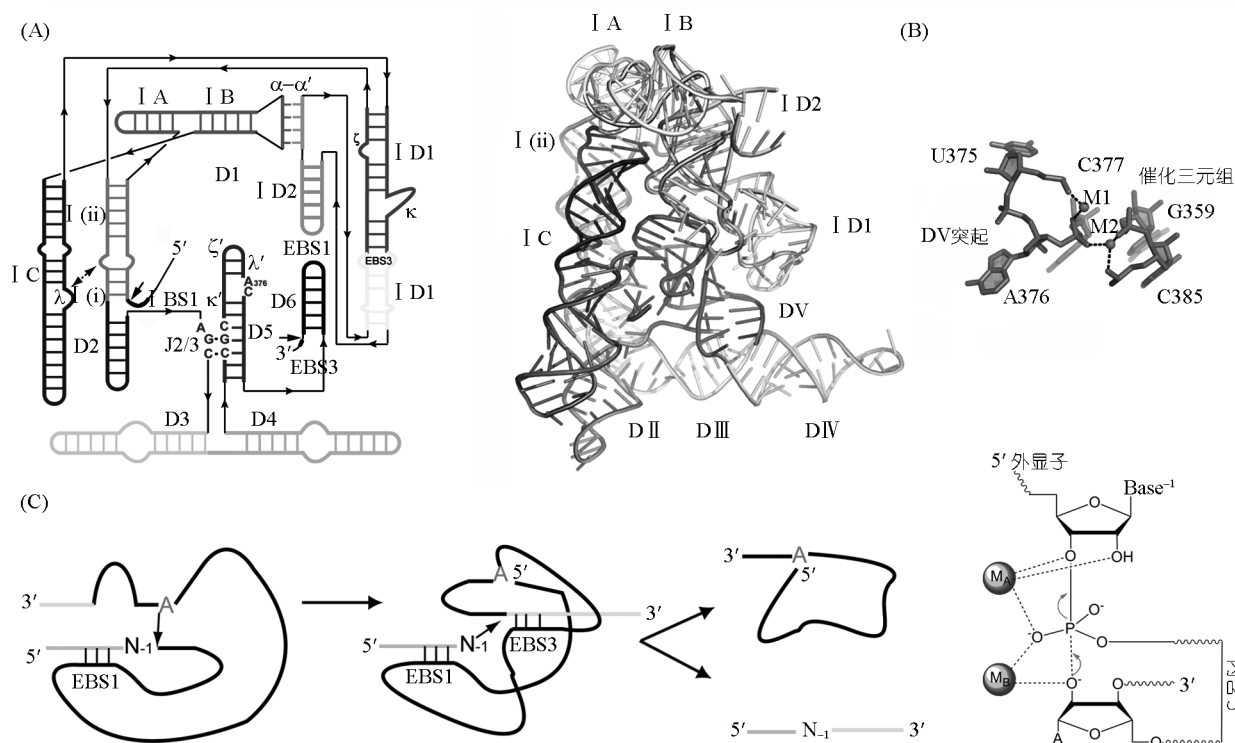


图 4 型内含子的结构和催化机制

(A) 型内含子的二级(左)和三级(右)结构. 图示为一个 C 内含子的三级结构, 根据 PDB 文件 3BWP 重建; (B) 型内含子的活性中心; (C) 型内含子的自剪接反应(左)和第一步催化的中间态(右)(<http://www.rna.whu.edu.cn/pictures/sup4review.htm>)

的形成, 并提供核酶催化的功能基团^[56]. D6 包含分支位点腺苷, 它的 2'羟基在第一步剪切反应中充当亲核攻击基团^[53].

根据其不同的结构特征, 型内含子可以分为 A, B 和 C 3 个亚类. 一个 C 核酶的晶体结构最近被解析. 如图 4(A)右图所示, 型内含子的活性结构是 6 个结构域的紧密组装, 其中 D1 充当整个结构的骨架, 为外显子的结合和活性中心的形成提供一个预先形成的外部沟. 在结构的上方, D1 的 A 和 B 茎区共轴堆积在一起. 处在左方的 (i), (ii) 和 D 也是一样. 结构域的 C 茎区与堆积的 (i)-(ii)-D 靠得很近并平行排列. 在右方, 结合底物的结构域 D1 和 D2 紧密地靠在一起. D3 和 D4 在底部共轴堆积在一起. 这些结构域将保守的结构域 V 包裹在中间. D6 虽然被包含在此晶体中, 但并不可见. 但在该晶体中有合适的空间, D6 被认为位于 D5 旁边的缝隙中^[57].

4.3 型内含子的底物识别

型内含子底物的识别是由内含子和外显子的相互作用, 主要是碱基配对决定的. A 和 B 内含子在底物的识别上具有更多的共性. 它们的 5'-底物是由两个 6 bp 的 Watson-Crick 配对, 称为 IBS1 (intron binding sequence)-EBS1 (exon binding sequence) 和 IBS2-EBS2 的相互作用进行识别的^[53,58]. 而 5'剪接位点的选择则是由内含子的核心决定的, 特异性的识别 EBS1 末端单链和双链交界处的磷酸二酯键(图 4(A)左图). A 和 B 内含子 3'底物的识别则是不同的.

A 内含子通过一个称为 δ - δ' 的 Watson-Crick 碱基配对对 3'底物进行识别, 而 B 内含子则是通过内含子 EBS3 与外显子 IBS3 的配对进行 3'底物的识别^[59,60].

C 内含子的 5'底物的识别与 A 和 B 内含子非常不同. 同上文所述, C 内含子的 EBS1-IBS1 配对非常短, 并且缺少 EBS2-IBS2 配对^[57,58]. C 内含子 3'底物的识别与 B 内含子非常相似, 都是使用 EBS3-IBS3 的配对完成的^[58](图 4(A)左图).

4.4 型内含子的活性中心

核酶的活性中心涉及到 3 个主要的结构域 D1,

D5, D6 和一个重要的 J2/3 连接. 其中 D1 结合底物, D6 提供第一步反应中的亲核攻击基团, D5 和 J2/3 是催化的区域. 活性中心的形成是一个对 6 个结构域进行重组的过程. 除了作为核酶折叠的骨架的功能外, 结构域 通过 ϵ - ϵ' 以及 D5 相互作用 κ - κ' , ζ - ζ' 和 λ - λ' , 将两端的剪切位点固定到活性中心^[61,62]. 分支位点腺苷的定位是通过它周边的多嘧啶序列与 D1 环区序列的非标准碱基配对决定的^[63].

结构域 V 是内含子中最保守的结构域, 对催化非常重要. D5 的大部分序列都参与形成保证 D5 正确定位的三级相互作用, 例如 κ - κ' , ζ - ζ' 以及 λ - λ' . D5 上参与催化的功能基团是所谓的“催化三碱基”以及 D5 中的突起^[64,65]. 在折叠的核酶中, 这两个基团靠得很近, 可能是一同发挥作用的. D5 上同时还具有直接参与催化过程的金属离子的结合位点^[57](图 4(B)).

D2 与 D3 之间的连接 J2/3 是活性中心的重要组成部分, 但其具体的作用直到最近 *Oceanobacillus iheyensis* 的晶体结构被解析出来后才被了解. 它与 D5 的突起以及“催化三碱基”成一个三螺旋连配的结构(图 4(A)右图), 将催化必需的内含子残基带到一起^[57].

5 核糖体是一个核酶

核糖体是在三界生物中广泛存在的最重要的生物大分子, 它催化肽基转移反应来将 mRNA 翻译成蛋白质. 核糖体由 2/3 的 RNA 和 1/3 的蛋白组成^[66]. 核糖体大亚基与底物及其产物的复合物的晶体结构显示, 只有 RNA 处在肽键合成的位置. 共有 3 个 RNA 基团处于可以与进行亲核进攻的底物氨基基团形成氢键的距离内: P 位点 tRNA 上 76 位腺苷的 2'羟基, 23S rRNA 中 A2486 的 N3 基团, 以及 A2486 的 2'羟基^[67,68]. 这些氢键可能对底物氨基基团进行亲核攻击的定位有关, 或者更为重要的是, 直接参与催化. 在过去的几年中多个高分辨率的 ribosome-mRNA- tRNA 复合物的晶体结构被解析出来, 揭示了核糖体催化的结构基础^[69-71]. 大亚基核糖体的晶体结构显示, 没有蛋白组分位于距离肽键合成位点 18 Å 以内的距离, 因此排除掉了蛋白因子在该反应中起作用的可能性^[67]. 所以蛋白对催化没有任何作用, 而 RNA 是完成肽键转移的唯一组分, 即核糖体是一个基于 RNA 的酶, 即核酶.

6 结论及展望

核酶是具有催化活性的分子, 与蛋白质酶一样, 它们必须折叠成高度有序的三级结构才可行使它们的功能. 折叠的最终目标是将亲核攻击基团和敏感磷原子带到一起并激活它们. 核苷水解核酶的亲核攻击基团和敏感磷原子位于同一个核苷酸内部, 而且它们具有相对简单的结构, 所以它们的活性结构可以比较容易的形成. 对于大核酶来说, 它们的亲核攻击基团和敏感磷原子或者距离很远, 或者处于不同的分子内, 所以它们对切割位点的识别以及它们将底物置于活性中心的过程更为复杂, 金属离子或蛋白因子通常是必要的. 例如, 镁离子对 RNase P 核酶结合底物, 以及稳定其带有大量静电的活性中心非常重要^[27]. 大部分 型内含子都需要蛋白因子来帮助其折叠^[22]. 并且大核酶如 RNase P, 型内含子和 型内含子都是金属酶, 金属离子之间参与它们的催化过程.

根据核酶催化的最基本的反应, 通常是位点特异性切割或连接反应, 以及大部分核酶都可以进行反式作用的特点, 核酶可以被用于基因治疗, 通过切

割目的基因的 mRNA 或者挽救失去功能的基因^[73]. 小核酶尤其是发卡核酶和锤头核酶, 在其阻断 RNA 病毒或逆转录病毒, 如 HBV, HCV 及 HIV 的复制方面得到了详尽的尝试^[74,75]. 型内含子被用来挽救异常基因. 通过将正常 RNA 连接在内含子的 5' 或者 3' 末端, 核酶的连接活性可以将异常 RNA 替换为正常 RNA^[76]. 型内含子由于可以加工 DNA 底物, 作用更为显著. 型内含子中, 剪切位点处的 2' 羟基在催化的过程中不需要参与稳定中间态, 所以 DNA 底物也可以被识别. 这赋予了 型内含子在基因治疗中非常好的潜力. 但是同时核酶介导的基因治疗又有许多严重的缺点. 首先, 将核酶 RNA 导入细胞内是一个很大的挑战. 而且, 核酶 RNA 在体内不稳定, 极大地限制了核酶在基因治疗中的应用; 其次, 核酶作用的特异性也是限制核酶应用的大问题. 核酶通常通过碱基配对识别其剪切位点, 但是微小的错配可以被很多核酶所容许. 最后, 核酶作用的目标 RNA 可能包裹在复杂的 RNA 结构中, 或者因蛋白保护而被封闭, 这些因素都会阻止核酶接触目标 RNA. 所以, 核酶介导的基因治疗在应用之前还需要进行更深入的研究.

参考文献

- 1 Kruger K, Grabowski P J, Zaug A J, et al. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*, 1982, 31(1): 147—157 [\[DOI\]](#)
- 2 Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, et al. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 1983, 35(3 Pt 2): 849—857 [\[DOI\]](#)
- 3 Butcher S E. Structure and function of the small ribozymes. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11(3): 315—320 [\[DOI\]](#)
- 4 Zhou Y, Lu C, Wu Q J, et al. GISSD: group I intron sequence and structure database. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(Database issue): D31—37 [\[DOI\]](#)
- 5 Fedorova O, Zingler N. Group I introns: structure, folding and splicing mechanism. *Biol Chem*, 2007, 388(7): 665—678 [\[DOI\]](#)
- 6 Haugen P, Simon D M, Bhattacharya D. The natural history of group I introns. *Trends Genet*, 2005, 21(2): 111—119 [\[DOI\]](#)
- 7 Kazantsev A V, Pace N R. Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4(10): 729—740 [\[DOI\]](#)
- 8 Cech T R. Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science*, 2000, 289(5481): 878—879 [\[DOI\]](#)
- 9 Pley H W, Flaherty K M, McKay D B. Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature*, 1994, 372(6501): 68—74 [\[DOI\]](#)
- 10 Lilley D M. The origins of RNA catalysis in ribozymes. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(9): 495—501 [\[DOI\]](#)
- 11 Lilley D M. Structure, folding and mechanisms of ribozymes. *Curr Opin Struct Biol*, 2005, 15(3): 313—323 [\[DOI\]](#)
- 12 Nakano S, Chadalavada D M, Bevilacqua P C. General acid-base catalysis in the mechanism of a hepatitis delta virus ribozyme. *Science*, 2000, 287(5457): 1493—1497 [\[DOI\]](#)
- 13 McKay D B. Structure and function of the hammerhead ribozyme: an unfinished story. *RNA*, 1996, 2(5): 395—403
- 14 Martick M, Scott W G. Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell*, 2006, 126(2): 309—320 [\[DOI\]](#)
- 15 Nelson J A, Uhlenbeck O C. When to believe what you see. *Mol Cell*, 2006, 23(4): 447—450 [\[DOI\]](#)

- 16 Walter N G, Burke J M. The hairpin ribozyme: structure, assembly and catalysis. *Curr Opin Chem Biol*, 1998, 2(1): 24—30^[DOI]
- 17 Rupert P B, Ferre-D'Amare A R. Crystal structure of a hairpin ribozyme-inhibitor complex with implications for catalysis. *Nature*, 2001, 410(6830): 780—786^[DOI]
- 18 Lafontaine D A, Norman D G, Lilley D M. Structure, folding and activity of the VS ribozyme: importance of the 2-3-6 helical junction. *EMBO J*, 2001, 20(6): 1415—1424^[DOI]
- 19 Andersen A A, Collins R A. Rearrangement of a stable RNA secondary structure during VS ribozyme catalysis. *Mol Cell*, 2000, 5(3): 469—478^[DOI]
- 20 Hiley S L, Sood V D, Fan J, et al. 4-thio-U cross-linking identifies the active site of the VS ribozyme. *Embo J*, 2002, 21(17): 4691—4698^[DOI]
- 21 Hoffmann B, Mitchell G T, Gendron P, et al. NMR structure of the active conformation of the *Varkud* satellite ribozyme cleavage site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(12): 7003—7008^[DOI]
- 22 Perrotta A T, Been M D. A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of *hepatitis delta virus* RNA. *Nature*, 1991, 350(6317): 434—436^[DOI]
- 23 Ferre-D'Amare A R, Zhou K, Doudna J A. Crystal structure of a *hepatitis delta virus* ribozyme. *Nature*, 1998, 395(6702): 567—574^[DOI]
- 24 Das S R, Piccirilli J A. General acid catalysis by the *hepatitis delta virus* ribozyme. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(1): 45—52^[DOI]
- 25 Ke A, Zhou K, Ding F, et al. A conformational switch controls *hepatitis delta virus* ribozyme catalysis. *Nature*, 2004, 429(6988): 201—205^[DOI]
- 26 Xiao S, Scott F, Fierke C A, et al. Eukaryotic ribonuclease P: a plurality of ribonucleoprotein enzymes. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 165—189^[DOI]
- 27 Harris M E, Christian E L. Recent insights into the structure and function of the ribonucleoprotein enzyme ribonuclease P. *Curr Opin Struct Biol*, 2003, 13(3): 325—333^[DOI]
- 28 Kazantsev A V, Krivenko A A, Harrington D J, et al. Crystal structure of a bacterial ribonuclease P RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(38): 13392—13397^[DOI]
- 29 Torres-Larios A, Swinger K K, Krasilnikov A S, et al. Crystal structure of the RNA component of bacterial ribonuclease P. *Nature*, 2005, 437(7058): 584—587^[DOI]
- 30 Brannvall M, Kikovska E, Kirsebom L. Cross talk between the +73/294 interaction and the cleavage site in RNase P RNA mediated cleavage. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 5418—5429^[DOI]
- 31 Busch S, Kirsebom L, Notbohm H, et al. Differential role of the intermolecular base-pairs G292-C(75) and G293-C(74) in the reaction catalyzed by *Escherichia coli* RNase P RNA. *J Mol Biol*, 2000, 299: 941—951^[DOI]
- 32 Evans D, Marquez S M, Pace N R. RNase P: interface of the RNA and protein worlds. *Trends Biochem Sci*, 2006, 31(6): 333—341^[DOI]
- 33 Cech T R. Self-splicing of group I introns. *Annu Rev Biochem*, 1990, 59: 543—568^[DOI]
- 34 Doherty E A, Doudna J A. Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 597—615^[DOI]
- 35 Scott W G. Ribozymes. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17(3): 280—286^[DOI]
- 36 Shan S, Yoshida A, Sun S, et al. Three metal ions at the active site of the *Tetrahymena* group I ribozyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(22): 12299—12304^[DOI]
- 37 Strobel S, Ortoleva-Donnelly L. A hydrogen-bonding triad stabilizes the chemical transition state of a group I ribozyme. *Chem Biol*, 1999, 6(3): 153—165^[DOI]
- 38 Michel F, Westhof E. Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J Mol Biol*, 1990, 216(3): 585—610^[DOI]
- 39 Adams P L, Stahley M R, Kosek A B, et al. Crystal structure of a self-splicing group I intron with both exons. *Nature*, 2004, 430(6995): 45—50^[DOI]
- 40 Cate J H, Gooding A R, Podell E, et al. Crystal structure of a group I ribozyme domain: principles of RNA packing. *Science*, 1996, 273(5282): 1678—1685^[DOI]
- 41 Golden B L, Gooding A R, Podell E R, et al. A preorganized active site in the crystal structure of the *Tetrahymena* ribozyme. *Science*, 1998, 282(5387): 259—264^[DOI]
- 42 Golden B L, Kim H, Chase E. Crystal structure of a phage *Twort* group I ribozyme-product complex. *Nat Struct Mol Biol*, 2005,

- 12(1): 82—89[DOI]
- 43 Engelhardt M A, Doherty E A, Knitt D S, et al. The P5abc peripheral element facilitates preorganization of the *tetrahymena* group I ribozyme for catalysis. *Biochemistry*, 2000, 39(10): 2639—2651[DOI]
 - 44 Johnson T H, Tijerina P, Chadee A B, et al. Structural specificity conferred by a group RNA peripheral element. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(29): 10176—10181[DOI]
 - 45 Xiao M, Li T, Yuan X, et al. A peripheral element assembles the compact core structure essential for group intron self-splicing. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(14): 4602—4611[DOI]
 - 46 Pichler A, Schroeder R. Folding problems of the 5' splice site containing the P1 stem of the group thymidylate synthase intron: substrate binding inhibition *in vitro* and mis-splicing *in vivo*. *J Biol Chem*, 2002, 277(20): 17987—17993[DOI]
 - 47 Szewczak A A, Ortoleva-Donnelly L, Ryder S P, et al. A minor groove RNA triple helix within the catalytic core of a group intron. *Nat Struct Biol*, 1998, 5(12): 1037—1042[DOI]
 - 48 Burke J M, Esherrick J S, Burfeind W R, et al. A 3' splice site-binding sequence in the catalytic core of a group intron. *Nature*, 1990, 344(6261): 80—82[DOI]
 - 49 Chowrira B M, Berzal-Herranz A, Burke J M. Novel system for analysis of group 3' splice site reactions based on functional trans-interaction of the P1/P10 reaction helix with the ribozyme's catalytic core. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(5): 849—855[DOI]
 - 50 Guo F, Gooding A R, Cech T R. Structure of the *Tetrahymena* ribozyme: base triple sandwich and metal ion at the active site. *Mol Cell*, 2004, 16(3): 351—362
 - 51 Zhaxybayeva O, Gogarten J P. Spliceosomal introns: new insights into their evolution. *Curr Biol*, 2003, 13(19): R764—766[DOI]
 - 52 Griffin E A, Qin Z, Michels W J, et al. Group intron ribozymes that cleave DNA and RNA linkages with similar efficiency, and lack contacts with substrate 2'-hydroxyl groups. *Chem Biol*, 1995, 2(11): 761—770[DOI]
 - 53 Qin P Z, Pyle A M. The architectural organization and mechanistic function of group intron structural elements. *Curr Opin Struct Biol*, 1998, 8(3): 301—308[DOI]
 - 54 de Lencastre A, Pyle A M. Three essential and conserved regions of the group intron are proximal to the 5'-splice site. *RNA*, 2008, 14(1): 11—24[DOI]
 - 55 Wank H, SanFilippo J, Singh R N, et al. A reverse transcriptase/maturase promotes splicing by binding at its own coding segment in a group intron RNA. *Mol Cell*, 1999, 4(2): 239—250[DOI]
 - 56 Schmidt U, Podar M, Stahl U, et al. Mutations of the two-nucleotide bulge of D5 of a group intron block splicing *in vitro* and *in vivo*: phenotypes and suppressor mutations. *RNA*, 1996, 2(11): 1161—1172
 - 57 Toor N, Keating K S, Taylor S D, et al. Crystal structure of a self-spliced group intron. *Science*, 2008, 320(5872): 77—82[DOI]
 - 58 Toor N, Robart A R, Christianson J, et al. Self-splicing of a group C intron: 5' exon recognition and alternative 5' splicing events implicate the stem-loop motif of a transcriptional terminator. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(22): 6461—6471[DOI]
 - 59 Costa M, Michel F, Westhof E. A three-dimensional perspective on exon binding by a group self-splicing intron. *EMBO J*, 2000, 19: 12
 - 60 Jacquier A, Jacquesson-Breuleux N. Splice site selection and role of the lariat in a group intron. *J Mol Biol*, 1991, 219(3): 415—428[DOI]
 - 61 Boudvillain M, Pyle A M. Defining functional groups, core structural features and inter-domain tertiary contacts essential for group intron self-splicing: a NAIM analysis. *EMBO J*, 1998, 17(23): 7091—7104[DOI]
 - 62 Costa M, Michel F. Frequent use of the same tertiary motif by self-folding RNAs. *EMBO J*, 1995, 14(6): 1276—1285
 - 63 Hamill S, Pyle A M. The receptor for branch-site docking within a group intron active site. *Mol Cell*, 2006, 23(6): 831—840[DOI]
 - 64 Abramovitz D L, Friedman R A, Pyle A M. Catalytic role of 2'-hydroxyl groups within a group intron active site. *Science*, 1996, 271(5254): 1410—1413[DOI]
 - 65 Konforti B B, Abramovitz D L, Duarte C M, et al. Ribozyme catalysis from the major groove of group intron domain 5. *Mol Cell*, 1998, 1(3): 433—441[DOI]
 - 66 Ban N, Nissen P, Hansen J, et al. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, 2000, 289(5481): 905—920[DOI]
 - 67 Nissen P, Hansen J, Ban N, et al. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, 2000, 289(5481): 920—930[DOI]
 - 68 Noller H F. RNA structure: reading the ribosome. *Science*, 2005, 309(5740): 1508—1514[DOI]

- 69 Schuwirth B S, Borovinskaya M A, Hau C W, et al. Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*, 2005, 310(5749): 827—834[[DOI](#)]
- 70 Korostelev A, Trakhanov S, Laurberg M, et al. Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements. *Cell*, 2006, 126(6): 1065—1077[[DOI](#)]
- 71 Selmer M, Dunham C M, Murphy F V, et al. Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*, 2006, 313(5795): 1935—1942[[DOI](#)]
- 72 Dai L, Zimmerly S. ORF-less and reverse-transcriptase-encoding group 1 introns in archaeobacteria, with a pattern of homing into related group 1 intron ORFs. *RNA*, 2003, 9(1): 14—19[[DOI](#)]
- 73 Lewin A S, Hauswirth W W. Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med*, 2001, 7(5): 221—228[[DOI](#)]
- 74 Welch P J, Yei S, Barber J R. Ribozyme gene therapy for *hepatitis C* virus infection. *Clin Diagn Virol*, 1998, 10(2-3): 163—171[[DOI](#)]
- 75 Duarte E A, Leavitt M C, Yamada O, et al. Hairpin ribozyme gene therapy for AIDS. *Methods Mol Biol*, 1997, 74: 459—468
- 76 Watanabe T, Sullenger B A. Induction of wild-type p53 activity in human cancer cells by ribozymes that repair mutant p53 transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(15): 8490—8494[[DOI](#)]