La transcriptasa reversa del VIH: estudios estructurales y cinéticos

Lic. Alberto Quintero
Laboratorio de Hepatitis y Sida, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel

La transcriptasa reversa (TR) es una polimerasa de ADN, compuesta por dos subunidades, 66 y 51 KDa. Sintetiza ADN usando un ácido nucleico complementario como templado. Esta enzima posee tres actividades distintas: una polimerasa de ADN dependiente de ARN que sintetiza la cadena negativa del ADN proviral, una actividad polimerasa de ADN dependiente de ADN que cataliza la construcción de la hebra positiva y una actividad de RNAsa H. La TR del VIH utiliza un ARN de transferencia (ARNt) específico para llevar a cabo la fabricación del ADN complementario, lo cual induce un cambio de conformación que afecta las actividades de la polimerasa. Diversos investigadores han encontrado que la afinidad del sustrato por la TR del VIH es significativamente alta; la Kd para un dNTP de la TR viral es 4nM, una de las más bajas encontradas para las polimerasas de ADN y posee a su vez valores de procesividad y selectividad de gran magnitud. Distintas evidencias remarcan el hecho de que la TR sufre un cambio conformacional cuando se encuentra acomplejada de la forma E-ADN-dNTP, y que esta acción puede ser inhibida por el apareamiento de un nucleótido incorrecto. La enzima debe acomodar los duplex generados de cada reacción y debido a esto la TR podría no ser capaz de restringir la geometría del apareamiento, como sucede para el resto de las polimerasas, originando la aparición de los diferentes mutantes del VIH. Los inhibidores de la transcriptasa reversa del VIH se pueden agrupar en tres categorías: análogos de nucleósidos, no nucleósidos y oligonucleótidos. Los inhibidores análogos de nucleósidos más utilizados clínicamente son: Lamivudina, Zerit, Retrovir, Videz, AZT o Zidoduvina y Viramune. Los no nucleósidos ya empleados en terapias son: Viramune y Rescriptor. Por todas sus características, la TR del VIH se encuentra catalogada como una de las enzimas de mayor funcionalidad y complejidad que se haya estudiado.

Palabras claves: Actividad polimerasa, ARNt, Afinidad, Selectividad, Procesividad, Conformación, Inhibidores.

Hace apenas 20 años, se anunció que se había aislado un retrovirus el cual era el agente etiológico responsable de causar el Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida., lo que se conoce ahora como SIDA. 5 años más tarde Arthur Korberg en su publicación en el Journal of Biological Chemistry, declaró que poco se sabía acerca de la transcriptasa reversa de este virus, así como también de su modo de integración en el cromosoma del hospedador[1].

Como si se tratara de una respuesta a esta declaración, una gran cantidad de trabajos han sido publicados a lo largo de todos estos años, los cuales involucran tanto el mecanismo de acción de la enzima, como posibles blancos potenciales de acción para inhibidores de la misma.

La transcriptasa reversa (TR) es una polimerasa, sintetiza ADN usando un ácido nucleico complementario como templado. Debido a que utiliza un ARN como molde y sintetiza una hebra de ADN complementaria, es clasificada como una ADN polimerasa dependiente de ARN. Durante el ciclo de vida del virus, esta enzima copia el ARN retroviral en ADN de doble cadena, el cual luego se integra en el ADN nuclear de la célula transformada[2].

Las transcriptasas reversas son bien conocidas por su rol en el ciclo de vida de los retrovirus, sin embargo éstas también se encuentran en otros organismos. Existen TRs que participan en la replicación de transposones en eucariotas tales como, levaduras[3], *Drosophila*[4] y células humanas[5]. Esta enzima se ha convertido en un gran blanco en numerosos estudios que tienen como finalidad

detener la proliferación del VIH (virus de inmunodeficiencia humana) ya que: esta proteína es crucial para la replicación del virus, sus propiedades son muy diferentes a las de las polimerasas celulares y la enzima es activa en el citoplasma celular.

La RT del VIH posee tres actividades distintas: una polimerasa de ADN dependiente de ARN que sintetiza la cadena negativa del ADN proviral, una actividad polimerasa de ADN dependiente de ADN que cataliza la construcción de la hebra positiva y una actividad de RNAsa H en donde se degrada una porción del híbrido ARN-ADN generando el cebador de ARN usado en la síntesis de la hebra positiva de ADN[6].

Estructura de la TR

La transcriptasa reversa del VIH es una heterodímero de 66 y 51 kDa (usualmente denominados p66 y p51, respectivamente). El polipéptido p51 es derivado de la maduración proteolítica de un precursor p66 por la proteasa viral. Asumiendo que el corte se ejecute a nivel de homodímeros, un delicado mecanismo debe estar involucrado en la maduración del precursor p66/p66 para dar lugar a la polimerasa p66/p51, biológicamente activa.

Aunque ambas porciones poseen los dominios de polimerasa y RNAsa H, sólo la subunidad p66 es la encargada de efectuar todos los pasos catalíticos[7]. El rol preciso de la subunidad p 51 está por determinarse, diversos investigadores la han denominado como una subunidad "silente". Sin embargo, la dimerización de estas porciones es necesaria para que exista la actividad enzimática[8]; de esto se ha planteado que esta acción resulte un blanco atractivo para intervenciones quimioterapeuticas.

El dominio de la polimerasa de la subunidad p66 posee una especie de canal o espacio análogo al fragmento de Klenow de la polimerasa I de ADN de E. coli. Esta hendidura corresponde al sitio en donde interaccionan el cebador y el templado. La subunidad p51, posee una estructura bastante diferente en esta parte, de tal forma que no permite distinguir la hendidura que se percibe en la subunidad p66. Un hecho curioso de las estructuras de ambas polimerasas es que aunque ambas posean una diferencia bastante notable en sus secuencias nucleotídicas, los dos tipos de moléculas presentan este tipo de estructura de hendidura de forma muy similar. Diversos investigadores han postulado que este tipo de conformación es necesario en todas las polimerasas de ADN, así como la presencia de un cebador, o iones metálicos divalentes, por ejemplo.

En general también se ha observado que estas estructuras pueden funcionar como enclaves que permitan sujetar el cebador y el templado en una geometría precisa de tal modo que la polimerización ocurra de modo eficiente[9]. El mismo grupo que enunció lo anterior, propuso además que las dos alfa hélices que se encuentran en esta hendidura, podrían jugar o tener un rol de rieles por donde el templado y el cebador se desplazarían durante la síntesis progresiva de ADN.

Transcriptasa reversa y la proteína de la cápside

La transcriptasa retroviral es codificada por el marco abierto de lectura (ORF, open reading frame, inglés) *pol*, localizado aguas abajo del que codifica para la proteína de la cápside, llamada *gag*. La expresión de pol necesita la síntesis de una poliproteína gag-pol, que es luego madurada en la proteína de la cápside, la proteasa, la transcriptasa reversa y la integrasa. La maduración es catalizada por una proteasa vira[10].

Los retrovirus utilizan dos estrategias para producir una proteína de fusión gag-pol: pueden realizar una lectura a través del codón de terminación en el caso del MoMLV o bien se ejecuta un cambio en el marco de lectura en la dirección -1, como sucede en el VIH[11].

La poliproteína gag-pol es producida en apenas un 5 % comparada con la producción de gag sola. La síntesis de dicha proteína de fusión involucra dos ventajas: en primer lugar, la proteína gag es sintetizada en mucho más cantidad que las proteínas enzimáticas (por 5 moléculas de transcriptasa se producen 100 de la cápside). En segundo lugar la TR puede ser dirigida a las cápsides virales ya que gag codifica para una proteína que enlaza al ARN genómico en el virión. Eso quiere decir que la especificidad de enlazamiento de la TR dentro del virión se ve aumentada en gran medida por la existencia de esta fusión, es por ello que en los retrovirus la transcriptasa reversa depende fuertemente de las proteínas de la cápside en la traducción y su replicación[12].

ARN de transferencia como cebador

Como todas las polimerasas de ADN, la TR necesita un cebador o primer para iniciar la síntesis del ADN complementario (ADNc) y en este caso, ésta

utiliza un ARN de transferencia (ARNt) específico para llevar a cabo dicha actividad[13]. Esta ventaja evolutiva sorprendió a muchos investigadores ya que el VIH no tiene que fabricar este cebador sino que lo toma de su hospedador. El ARNt forma un complejo junto con una proteína de la nucleocápside llamada NCp15 codificada por la región GAG y una región del genoma del VIH denominada PBS (sitio de unión del cebador, siglas en inglés). Diversos investigadores han demostrado que la unión de la NCp15 no es necesaria para el reconocimiento de la enzima por el complejo, sin embargo, la presencia de la NCp15 mejora en gran medida los niveles de replicación del VIH[14].

Estudios de interacción entre el ARNt y la TR demostraron que la enzima sufre un cambio de conformación inducido por el cebador y que este cambio afecta tanto a la actividad polimerasa de ADN como a la actividad RNAsa H de la proteína retroviral n(1,30). Un hecho interesante en este paso de la replicación viral es que la TR primero se une al ARNt y luego reconoce al templado[15], lo que no sucede en otros tipos de polimerasas de ADN. Además de esto, la TR del VIH debe seleccionar su cebador específico del total de la población de moléculas de ARNts del hospedador, posiblemente haciendo de éste el paso limitante de la reacción. La polimerasa utiliza como primer natural al ARN de transferencia que porta el aminoácido lisina.

Actividad RNAsa H

Los dominios de actividades polimerasa y de RNAsa H residen dentro de la misma molécula proteica. Por diversos reportes se asume ahora que estas dos actividades están finamente acopladas[16]. Estudios de modelaje a través de la estructura de cristales de TR predicen que 20 pares de bases del híbrido ADN-ARN pueden encontrarse acomodadas entre los sitios activos de la polimerasa y la RNAsa H[17]. La estructura tridimensional de la TR del VIH reveló que existe una separación de sólo 18 nucleótidos entre estos dos sitios[9]. Esta separación es sin lugar a dudas crucial para la replicación del retrovirus, contribuyendo en gran medida a su efectividad.

El cebador de la síntesis de la hebra positiva de ADN se enlaza a los 18 nucleótidos de la región PBS cerca del extremo 5' del ARN del VIH. Durante esta síntesis este cebador es removido por la actividad RNAsa H de la enzima.

Más interesante aún, es que esta distancia (18 pares de bases), debe mantenerse entre estos dos sitios para que se dé el mecanismo de iniciación de la síntesis de la segunda hebra de ADN[18]. Aunque para la síntesis de la hebra negativa de ADN proviral el ARN genómico es degradado en varios fragmentos, solo uno de ellos, de 19 nucleótidos de longitud es el que se usa para por la transcriptasa reversa. Esta longitud pudiera estar relacionada con la distancia mencionada anteriormente.

Enlazamiento del ADN y procesividad

El primer tipo de experimento en realizarse con cualquier polimerasa para el estudio de su sitio activo es la determinación de la Kd o constante de disociación, que nos da una idea de la tendencia que la enzima posee para incorporar a un simple nucleótido. Esta actividad provee una medida directa de la concentración del complejo enzima-ADN (E-ADN) como una función de la concentración de ADN, ya que la reacción de incorporación es mucho más rápida que la disociación del complejo E-ADN.

Estos experimentos demuestran que el enlazamiento del ADN a la enzima es altamente específico; en este caso, la Kd es igual a la concentración de la enzima por la concentración del sustrato dividido entre la concentración del complejo enzima sustrato, visto de otro modo:

$$Kd = [E][S] / [ES]$$

En donde [E] es la concentración de la enzima, [S] la del sustrato y [ES] la del complejo enzima sustrato. Por este tipo de relación sabremos entonces que mientras más pequeña numéricamente sea la Kd, mayor será la afinidad del sustrato por la enzima.

Comparando las distintas Kd de diferentes tipos de polimerasas de ADN, diversos investigadores han encontrado que la afinidad del sustrato por la TR del VIH es significativamente alta. La ADN polimerasa II de E.coli posee una Kd de aproximadamente 20 nM, la del bacteriófago T4 se sitúa entre 14 y 15 nM y la del VIH en 4nM[19], esto aumenta la eficiencia replicativa del VIH, sumando efectividad en la producción de nuevos viriones.

La procesividad se define como el número de bases polimerizadas por encuentros de la enzima con el ADN templado y el cebador y puede ser calculada simplemente dividiendo la tasa de polimerización (1/seg) entre la tasa de disociación del complejo enzima sustrato (1/seg).

Procesividad= Kpol / Koff

En donde Kpol es la tasa de polimerización y Koff la tasa de disociación del complejo E-ADN (o ARN)[20].

Bajo estas condiciones del ensayo, se ha podido determinar la procesividad de varias enzimas ADN polimerasas. Por ejemplo, la procesividad de la polimerasa del fago T4 posee un valor de 800 pares de bases y para el caso del VIH, se pueden obtener valores de hasta 1200 pares de bases, estos a la vez representan valores que están por encima de los datos arrojados en los ensayos de la ADN polimerasa II[21].

Afinidad por los nucleótidos: la Kd para los complejos E-ADN-dNTP productivos

El primer paso en la incorporación de un nucleótido es el enlazamiento de un dNTP (desoxinucleótido trifosfato) al complejo E-ADN. Las medidas del efecto del incremento de concentración de un dNTP sobre la tasa de incorporación en un simple experimento de recambio (o como se conoce normalmente, turnover), definen los parámetros cinéticos que gobiernan a la polimerización[19]. La reacción involucra un equilibrio rápido seguido de un paso limitante, de tal forma que la dependencia de la concentración define a la Kd para la formación del complejo E-ADN-dNTP[22].

La constante de disociación en el enlazamiento de un dNTP correcto para el fago T7 es de 20 uM y se encuentra entre las menores si se compara con organismos eucariotas, por ejemplo, la ADN polimerasa humana. Los resultados obtenidos para la polimerasa del VIH son aún menores, la Kd para un dNTP posee un promedio de 5 uM, o sea que un dNTP en el medio celular posee una afinidad mayor por la TR del VIH que por las polimerasas celulares.

La selectividad en el paso de reconocimiento inicial se define por la relación entre la Kd para una base incorrecta y la Kd para un dNTP correcto.

Selectividad =
Kd dNTP incorrecto / Kd dNTP correcto.

Para la polimerasa del fago T7, la selectividad es tan grande que la Kd incorrecta es extremadamente difícil de medir (Kd correcta es de 20 uM y la Kd incorrecta es de aproximadamente 8 mM).

Valores de selectividad similares son encontrados para la TR del VIH, estos se encuentran comprendidos entre 200 y 400, aunque la Kd para un nucleótido correcto es mucho más baja que en el caso anterior.

Cambios conformacionales de la transcriptasa reversa

Las evidencias disponibles indican que la tasa máxima de incorporación de los nucleótidos está limitada por un cambio conformacional en el complejo, justo antes de realizar la catálisis (21). El complejo inicial de enlazamiento sirve para traer al dNTP dentro del sitio catalítico de la polimerasa que involucra un apareamiento con una base del templado. El segundo paso sirve como chequeo adicional en la cual solo la base correcta puede inducir una isomerización rápida del complejo ternario guiando entonces a la catálisis de la reacción de transferencia del fosforil nucleósido. Este cambio conformacional es sólo inhibido por apareamientos de nucleótidos incorrectos, lo cual da una idea de la selectividad de la reacción

Experimentos que prueban el efecto del enlazamiento de dNTPs sobre la tasa de disociación del ADN, han mostrado suficiente evidencia de un cambio que va desde un estado de E-ADN-dNTP hacia otro de complejo "activado", o E'-ADN-dNTP. Para el caso de la TR del VIH se pudo notar que la tasa de disociación del ADN del complejo activado era 10 veces mas pequeña que para el complejo E-ADN-dNTP[20].

Además de esto, el mismo cambio conformacional efectuado por la enzima encierra al cebador, el templado y el dNTP para disminuir la tasa de liberación del dNTP desde el templado, esta idea dió origen a la definición de "estado cerrado" del complejo activado E'-ADN-dNTP.

La selectividad total es una función de la reacción de enlazamiento en dos pasos. El significativo incremento de la selectividad de la polimerasa del fago T7 comparada con la TR del VIH se da en el segundo paso. Para el VIH, este paso contribuye solo en un factor de 80 para la fidelidad de la reacción; el segundo paso es 80 veces más lento en un apareamiento de una base incorrecta a concentraciones saturantes del nucleótido. En contraste, la polimerasa del T7 en su cambio conformacional es extremadamente sensitiva para captar la geometría del nucleótido correcto; la tasa de incorporación de un nucleótido incorrecto es de 2000 a 4000 veces más baja para el T7. Los análisis con análo-

gos de nucleótidos han confirmado que el criterio primario para la selección en el segundo paso es la geometría de cada nucleótido.

La transcriptasa reversa del VIH debe acomodar los duplex generados de cada reacción, es decir las hebras de ARN-ADN y ADN-ADN, las cuales pueden formar una alfa hélice. Debido a esto, la TR podría ser incapaz de restringir la geometría del apareamiento del mismo modo como lo hacen las otras polimerasas de ADN, teniendo esto como consecuencia una mayor tendencia a la incorporación de un nucleótido erróneo y por ende la generación de mutantes.

Selectividad adicional

Parte de la energía intrínseca del enlazamiento del nucleótido debe ser utilizada para inducir un cambio en la conformación de la proteína del estado abierto al estado cerrado. La selectividad adicional es proporcionada por este mecanismo, ya que el cambio conformacional y no las propiedades químicas, es la etapa limitante de la reacción[23].

Una vez que los pasos elementales del ciclo cinético han sido definidos, los parámetros, Kcat y Km pueden ser interpretados directamente, y dadas estas constantes se pueden deducir las características de los parámetros del estado estacionario. Si estos son medidos bajo las condiciones apropiadas durante la síntesis, con la certeza de que la disociación del ADN no limite la tasa neta, entonces la Km es igual a la Kd y la tasa máxima, Kcat, será igual a Kpol. A partir de esto, la selectividad puede ser calculada de la siguiente manera:

$$Kcat/Km = Kpol/Kd$$

De estos cálculos se pudo deducir que la polimerasa del fago T7 procesa 17 residuos en aproximadamente 80 mseg, se estima que la TR del VIH posee valores similares de velocidad de elongación.

Inhibidores enzimáticos y agentes terapéuticos

La emergencia del SIDA y el rol fundamental que juega la TR en la replicación retroviral han hecho de esta enzima un gran blanco en la búsqueda de inhibidores específicos. Sería imposible mencionar en este corto ensayo la gran cantidad de información que se ha generado acerca de los inhibidores de la transcriptasa reversa del VIH. Sin embargo, mencionaremos algunos de ellos, agrupándolos en tres categorías o familias de compuestos.

Oligonucleótidos

Esta clase de moléculas pueden inhibir la síntesis de ADN vía transcripción reversa de manera sentido o antisentido. La sensibilidad exquisita que muestra la polimerasa viral por los oligonucleótidos puede relacionarse o parecerse a las inhibiciones que se observan para los ARNts o fragmentos de ellos en la síntesis del ADN viral[24]. La posibilidad de dirigir moléculas que se parezcan a los sustratos naturales de muchas enzimas contra los sitios activos de las mismas es una facultad que ha sido considerablemente explotada. Para el caso de los oligonucleótidos se han usado derivados de oligofosforotioles y ditioatos que corresponden a las porciones de los ARNts que interaccionan con la enzima.

La estrategia antisentido, basada en la formación de un heteroduplex complementario y estable, ha sido también utilizada para silenciar la expresión de genes en eucariotas. Aunque este tipo de metodología es relativamente nueva en el campo de la virología, los resultados han sido buenos, en el caso del VIH se han observado fuertes inhibiciones cuando se incuban células que han sido infectadas con VIH tipo 1 con oligodesoxinucleótidos complementarios a regiones específicas del genoma viral[25]. También se ha documentado que la actividad RNAsa H se inhibe mediante el uso de estos compuestos[26].

Análogos de nucleósidos

Los nucleósidos inhibidores de la transcriptasa reversa (NITR) fueron los primeros agentes antivirales que se usaron a nivel clínico. Su eficacia como antiretrovirales ha sido bien establecida y a pesar de las emergencias de cepas resistentes, se encuentran aún entre las drogas de mayor importancia en el tratamiento de la enfermedad. Sorprendentemente, el aislamiento de la arabinofuranosiltimina y el arabinofuranosil de la esponja caribeña *Cryptotheca crypta,* guió a una eventual investigación de los efectos antivirales de los nucleósidos[27]. Alguno de ellos ya han sido aprobados por la FDA (food and drugs administrations, US) para su uso terapéutico, entre ellos se encuentran el 3TC (Lamivudina), Zalcitavina (HIVID), Zidodu-vina o AZT (Retrovir), ddI (Videx) y d4T (Zerit). Los

NITR son prodrogas, los cuales son trofosforilados por kiansas celulares parta luego funcionar como inhibidores competitivos y terminadores de las cadenas en formación[28].

Compuestos inhibidores no nucleósidos

El primer inhibidor de la TR de tipo no nucleósido (NNITR) que se identificó fue la Nevirapina (Viramune), la cual fue aislada de una librería de antagonistas de receptores muscarínicos[29]. En los años siguientes ésta, junto con la Delvaviridina (Rescriptor) fueron aprobadas por la FDA.

Estudios cinéticos han mostrado que estos tipos de compuestos no interaccionan con la TR de manera competitiva. Investigaciones en cristalografía del complejo Nevirapina-TR demostraron que la droga se enlaza a la enzima en un sitio diferente al cual interaccionan el cebador y los dNTPs, apoyando la idea de una inhibición de tipo no competitiva[30].

Por todas estas características encontradas en esta proteína, diversos investigadores la han catalogado como una super enzima, la cual puede realizar un trabajo equivalente a algunos complejos enzimáticos encontrados en gran cantidad de organismos. La TR del VIH, posee gran eficiencia, procesividad y selectividad y realiza las diversas polimerizaciones dentro de la cápside viral, lo que la ubica dentro de la categoría de las enzimas de mayor multifuncionalidad que se haya estudiado en el campo de la bioquímica y biología molecular.

Referencias

1. Kornberg, A. (1998). DNA replication. Journal of Biological Chemistry. 263:1-4
2. Temin, H y Mizutani, S. (1970). RNA- directed DNA polimerase in virions of Rous Sarcoma virus. Nature. 226: 1211-1213.
3. Garfinkel, D.J., Boeke, J.D., Fink, G.R.. (1985). Cell. 42:507-517.
4. Ivanov, V. A., Melkinov, A., Siunov, A. V., Fodor, I.I., Lyin, Y.V. (1991)EMBO Journal. 10: 2489-2495.
5. Dombroski, B.A., Mathias, S.L., Nanthakumar, E., Scott, A., Kazazian, H. (1991). Sciense. 294: 1805-1808.
6. Ben-Artzi, H., Zeelon, E., Le-Grice, S., Gorecki, M., Panet, A. (1992). Nucelic Acids Research. 20: 5115-5118.
7. Tanese, N., Goff, S. (1998). PNAS USA. 85: 1777-1781.
8. Restle, T., Muller, B., Goody, R. (1990).Journal of Biological Chemistry. 265: 8986-8988.
9. Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R., Clark, A., Lu, X., Tantillo, C., William, R., Kramer, G., Ferris, A., Clark, P., Hizi, A., Hughes, S, Arnold, E. (1993). PNAS USA. 49: 6320-6324.
10. Schwartz, D., Tizard, R, Gilbert, W. (1983). Cell. 32: 853-869.
11. Wilson, W., Braddock, M., Adams, D., Rathjen, P., Kingsman, S., Kingsman, A. (1988). Cell. 55: 1159-1169.
12. Gorelick, R., Henderson, L., Hanser, J., Rein, A. (1988)PNAS USA. 85: 8420-8424.
13. Litvak, S., Araya, A. (1982) Trens Biochemistry Sciense. 7: 361-364.
14. Darlix, J. (1991) Bulletin of Institute Pasteur. 89:211-242.
15. Majumdar, C., Abbots, J., Broder, S., Wilson, S. (1988). Journal of Biological Chemistry. 263: 15657-15665.
16. Gopalakrishnam, V., Peliska, J., Benkovic, S., (1991). PNAS USA. 89: 10763-10767.
17. Kolstaed, L., WangJ., Friedman, J., Rice, P., Steitz, T. (1992). Sciense. 256: 1783-1790.
18. Tarrago-Litvak, L., Andreola, ML., Nevinski, GA., Sarih-Cottin, L., Litvak, S. (1994). 8 (8): 497-503.
19. Kuchta, R.,Benkovic, P.,Mizrahi, V., Jonhson, K., Benkovic, S. (1987) Biochemistry. 26: 8410-8417.
20. Kati, V., Jonhson, A., Jerva, L., Anderson, S. (1992). Journal of Biological Chemistry. 267: 25988-25997.
21. Jonhson, K.A. (1993) Annual Reviews of Biochemistry. 62: 685-713.
22. Jonhson, K.A. (1992) Enzimes. 20:1-61.
23. Fersht, A., Knill-Jones, J., Tsui, W. (1982). Journal of Molecular Biology. 156:37-51.
24. Bordier, B., Tarrago-Litvak, L., Sallafranque- Andreola, M., Robert, D., Tharaud, D., Fournier, M., Barr, P., Litvak, S., Sarih-Cottin, L. (1990)Nucleic Acids Research. 18. 429-436.
25. Zamecnik, P., goochild, J., Taguchi, Y., Sarin, P. (1986). PNAS. 83: 4143-4146.
26. Bordier, B., Helene, C., Barr, P., Litvak, S., Sarih-Cottin, L. (1992). Nucleic Acids Research. 20: 5999-6006.
27. Majundar, C., Abbots, J., Broder, S., Stein, C., Cohen, J., Wilson, S. (1989) Biochemistry. 28: 1340-1346.
28. Nevinsky, G., Andreola, M.,Jamkovoy, M.,Levina, A., Tarrago-Litvak, L., Tharaud, D., Litvak, S. (1992). European Journal of Biochemistry. 207:351-358.
29. Sobol, R., suhadolnik, R., Kumar, A., Lee, B., Hatfield, D., Wilson, S.(1991) Biochemistry. 30:10623-10631.
30. Hostomsky, Z., Hudson, G, Rahmati, S., Hostomska, Z. (1992) Nucleic Acids Research. 20: 5819-5824.