

RIBOZIMAS: NEM TODA ENZIMA É UMA PROTEÍNA

Thereza Amélia Soares e Roberto Dias Lins

Centro de Ciências Exatas e da Natureza - Departamento de Química Fundamental-Universidade Federal de Pernambuco
50650-901 - Recife - PE

Recebido em 3/10/94; aceito em 2/3/95

Ribozymes are RNA molecules that contain a catalytic center. They include RNA enzymes as well as self-splicing and self-cleaving RNAs. A literature survey of ribozyme, covering the period between 1982 and 1992, was performed. Thermodynamic and kinetic aspects are discussed, with emphasis on the kinetics folding pathway of ribozyme L - 19 IVS RNA of *Tetrahymena thermophila*.

Keywords: ribozymes; thermodynamic; kinetics folding.

INTRODUÇÃO

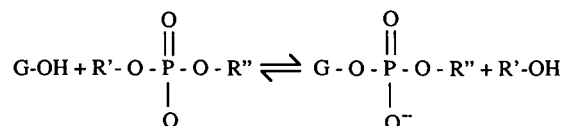
As células vivas, como unidades estruturais e funcionais dos sistemas biológicos, são o centro de todas as reações químicas indispensáveis à vida. Nas condições de temperatura compatíveis com a integridade das células, a maior parte das reações entre moléculas biológicas na ausência de catalisadores seriam extremamente lentas. Para que a cinética destas reações torne-se consistente com a do funcionamento global dos sistemas biológicos é necessário a intermediação de catalisadores que acelerem de forma específica e regulável a velocidade destes processos químicos. Os catalisadores biológicos ou enzimas, são moléculas capazes de catalisar especificamente diversas reações químicas sem sofrer modificações ao final do processo. Após a descoberta da natureza protéica das enzimas^{1,2}, estabeleceu-se na comunidade científica a idéia de que apenas as proteínas possuíam atividade catalítica em sistemas biológicos. A divisão do trabalho celular entre moléculas informacionais - os ácidos nucleicos, e moléculas catalíticas - as proteínas, foi um dogma da bioquímica bem firmado até o início dos anos 80, quando foi descoberto que alguns RNAs, além das atividades de transferência e estocagem informacional, também catalisavam de forma específica diversas reações^{3,4}.

Em 1981, Thomas Cech e colaboradores da Universidade do Colorado em Boulder, descobriram o primeiro RNA com atividade catalítica. A partir de estudos sobre o processamento⁵ do RNA ribossômico 26S em *Tetrahymena thermophila* (Protozoa - Ciliophora), estes pesquisadores observaram que, mesmo em ausência de proteínas, um intron de 414 nucleotídeos catalisava sua própria excisão do RNA precursor, ligando concomitantemente seus exons flanqueadores e originando uma molécula de RNA biologicamente ativa^{3,6}. Em 1983, o grupo de Sidney Altman da Universidade de Yale, em Connecticut, demonstrou que na ribonuclease P de *Escherichia coli*, a subunidade de RNA desempenhava a função catalítica ainda que sem a subunidade protéica ou qualquer outro tipo de proteína^{4,7}. Nesta enzima, o papel da proteína é secundário, ela aumenta a taxa hidrolítica e permite que a reação ocorra em condições fisiológicas⁴.

Desde 1986 novas ribozimas vêm sendo descobertas nos mais diversos organismos vivos, desde vírus a vertebrados⁸. A descoberta das ribozimas resultou em um novo direcionamento das teorias sobre origem da vida⁹, bem como na possibilidade de uso destas moléculas como agentes terapêuticos no controle da expressão viral¹⁰ e oncogênica¹¹. Pela descoberta do RNA catalítico, Thomas Cech e Sidney Altman receberam o prêmio Nobel de química em 1989.

TERMODINÂMICA DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO

As principais reações catalisadas pelas ribozimas, com exceção da ribonuclease P, cuja catálise ocorre através de um mecanismo hidrolítico, são explicadas pelo modelo de transesterificação ou transferência fosfoéster¹². Este é o caso da ribozima L-19 IVS RNA responsável pelo autoprocessamento do rRNA precursor 26S em *T. thermophila*:



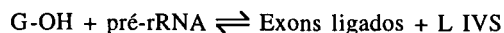
Onde:

G = Guanosina

R' = Exon 5'

R'' = IVS + Exon 3'

A reação de transesterificação independe da degradação de ATP ou GTP, não havendo alteração do número total de ligações ésteres pré-existentes à reação^{13,14}. Assim, é um processo termodinamicamente neutro ($\Delta G^0 \approx 0$)¹⁵. Logo, seria esperado que a reação



atingisse o equilíbrio apresentando uma proporção aproximadamente igual nas concentrações dos produtos e reagentes. Mas a reação prossegue até quase a terminalização completa. Logo, a principal força diretriz para determinação do equilíbrio da reação é a alta concentração de guanosina em relação ao RNA. Assim, considerando-se a equação da energia livre:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \log_e \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

onde:

ΔG = Variação da energia livre

ΔG^0 = Variação padrão da energia livre

R = Constante dos gases

T = Temperatura absoluta

[A] e [B] = concentrações molares dos reagentes (guanossina + RNA precursor)

[C] e [D] = concentrações molares dos produtos (exons ligados + IVS).

Para uma reação isoergônica ($\Delta G^0 = 0$), a mesma poderá ser espontânea com $\Delta G < 0$ se $[A][B] \gg [C][D]$. Mesmo em

altos níveis de [guanosina] e [rRNA precursor], a concentração dos produtos ainda é maior que a concentração do pré-rRNA. Esta condição certamente é verdadeira tanto para experimentos *in vitro* onde há uma proporção de [GTP] = 40-500 μ M para uma concentração de [rRNA precursor] < 0,5 μ M, como para experimentos *in vivo* onde a proporção da mesma é aproximadamente 200 μ M para uma concentração de [rRNA precursor] = 3M¹². Outros fatores adicionais também devem ser considerados no direcionamento da reação para a direita: *in vitro*, estes fatores são a rápida degradação da ribozima, neste caso o próprio intron, e a difusão dos exons para o citoplasma celular, enquanto que *in vitro* a circularização do intron, a qual ocorre essencialmente até a terminalização, remove um dos produtos da reação, levando a mesma para a direita. Para Zaug e Cech¹⁶, as modificações conformacionais da ribozima durante a reação também contribuem para as alterações da energia livre, embora não necessitam ser invocadas para explicar a termodinâmica do processo. A descoberta da reversibilidade desta reação¹⁷ veio dar apoio a esta afirmação, pois como qualquer outro catalisador, a ribozima deve diminuir a energia de ativação para a reação inversa do mesmo valor que diminui para a reação direta.

CINÉTICA E MECANISMO DE REAÇÃO

Sob o ponto de vista do mecanismo, a reação de transesterificação é iniciada pelo ataque nucleofílico da OH-3' da guanosina ao átomo de fósforo da ligação fosfodiéster no sítio de clivagem. Como resultado ocorre a formação de uma extremidade OH-3' e outra extremidade fosfato-5'¹⁸. Esta reação envolve um mecanismo S_N2 em alinhamento com a ligação físsil (do inglês *in line association*), resultando na inversão da configuração do átomo de fósforo¹⁹. A conformação estrutural do sítio de ligação do RNA facilita a clivagem da ligação fosfodiéster específica, posicionando-a em uma orientação favorável à ativação do fósforo tetraédrico para um estado de transição bipiramidal trigonal (figura 1). Sob esta geometria o fósforo tem um dos vértices ocupado pelo O-3' da ligação fosfodiéster que está sofrendo clivagem e o outro vértice desocupado, disponível para o ataque nucleofílico. A coordenação do íon Mg²⁺ ao O-3' da ligação fosfato físsil estabiliza o estado de transição pentavalente do fósforo através da interação com o oxianion resultante da reação de clivagem²⁰. Deste modo, íons metálicos contribuem diretamente para a atividade catalítica da ribozima²¹. Em algumas ribozimas o ataque nucleofílico é iniciado pela OH-2' de uma adenosina constituinte da própria ribozima²², e em outras os produtos da reação são segmentos com extremidades OH-5' e fosfato-3'²³.

Nas reações catalisadas pelas ribozimas, o grupamento OH-2' da ribose desempenha diversas funções relacionadas ao mecanismo de reação desta molécula². Assim, quando a OH-2' não participa diretamente da reação como nucleófilo, participa promovendo o aumento da reatividade do grupamento OH-3' vizinho: o oxigênio do grupamento OH-2' facilita a deprotonação

do grupamento OH-3'. Além disso, a capacidade do grupo OH-2' formar pontes de hidrogênio tanto com átomos receptores de hidrogênio como doadores, permite ao RNA uma maior versatilidade na formação de estruturas terciárias. A partir destas propriedades intrínsecas do grupo OH-2' da ribose, é possível concluir que muito provavelmente o DNA seria um catalisador bem menos eficiente que o RNA, caso existissem catalisadores com esta composição.

As ribozimas desempenham atividades enzimáticas muito diversificadas^{24,25}. As propriedades cinéticas destas reações se ajustam ao modelo de Michaelis-Menten que prevê o comportamento cinético em enzimas:



onde a velocidade V da reação é dada por

$$V = k_3 [R_T] \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (2)$$

Em altas concentrações do substrato ([S] >> K_M) a razão $\frac{[S]}{[S] + K_M} \cong 1$, e a velocidade da reação é máxima. Isto é:

$$V_{MAX} = k_3 [R_T] \quad (3)$$

Aplicando a equação (3) na equação (2), chegamos a equação de Michaelis-Menten:

$$V = V_{MAX} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (4)$$

A equação de Michaelis-Menten justifica amplamente as relações entre concentração do substrato e da enzima e velocidade da reação observadas para as ribozimas¹⁶. A ribozima L-19 IVS RNA apresenta características típicas da catálise enzimática clássica: um alto grau de especificidade pelo substrato, cinética de saturação de Michaelis-Menten e susceptibilidade à inibição competitiva. Contudo, são as ribozimas catalisadores eficientes?

Durante o autoprocessamento do rRNA precursor de *T. thermophila*, a ribozima L-19 IVS RNA atua como um catalisador intramolecular, acelerando a velocidade desta reação em até 10¹⁰ vezes a velocidade da reação não catalisada¹⁶. A reação é altamente específica como é demonstrado pelo requerimento estrito do cofator guanosina²⁶ e da sequência de oligopirimidinas que antecede o sítio de processamento 5'²⁷. A ribozima L-19 IVS RNA catalisa a clivagem-ligação (*splicing*) de pentacitidilato (C₅) com K_M = 42 μ M, k_{cat} = 2min⁻¹ e k_{cat}/K_M = 10³M⁻¹s⁻¹¹⁶. Os valores de K_M para enzimas protéicas variam amplamente. Em sua maioria, K_M assume valores entre 10⁻¹ e 10³M²⁸. Desta

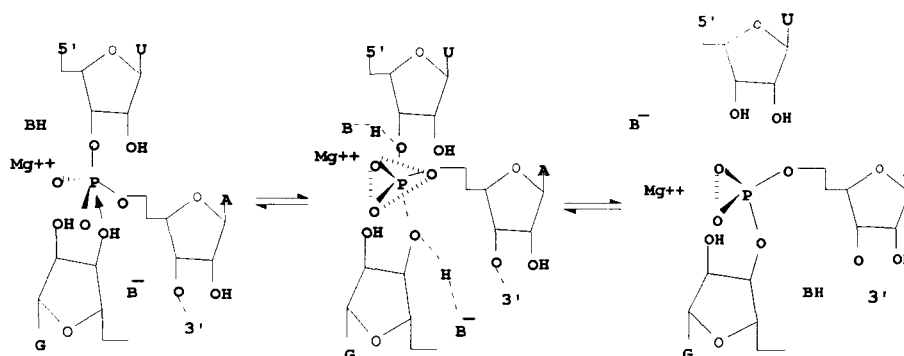


Figura 1. Mecanismo da reação de transesterificação para a ribozima L-19-IVS RNA (modificado de Cech, 1987).

forma o valor de K_M para o L = 19 IVS RNA está dentro do intervalo de variação encontrado em enzimas protéicas. No entanto, k_{cat} e k_{cat}/K_M têm valores inferiores à média dos valores encontrados na maioria das enzimas²⁸. Não obstante, $k_{cat} = 2\text{min}^{-1}$ ainda está dentro do intervalo de variação de k_{cat} em enzimas protéicas que reconhecem sequências específicas de bases, catalizando sua clivagem ou iniciando sua polimerização. Por exemplo, a endoribonuclease de restrição ECO I possui uma $k_{cat} = 1\text{min}^{-1}$ - 18min^{-1} ²⁹ e a ribonuclease P tem $k_{cat} = 2\text{min}^{-1}$ ⁴. Além disso, o aumento da velocidade de reação em 10^{10} vezes acima da velocidade de hidrólise alcalina pelo L-19 IVS está bem dentro do âmbito de aceleração apresentado por enzimas protéicas¹².

É importante ressaltar que os parâmetros cinéticos até aqui descritos para reações catalisadas por RNAs foram obtidos em experimentos *in vitro*. Existem evidências que *in vivo* o auto-processamento catalisado por RNA ocorre com uma velocidade de reação bem maior e com o auxílio de proteínas¹⁴. Este fenômeno tem sido estudado principalmente em *Neurospora crassa* e *Sacharomyces cerevisiae*, onde proteínas, cuja função específica é a facilitação da reação de processamento, foram isoladas.

As ribozimas e enzimas compartilham outras características além daquelas previstas pelo modelo de Michaelis-Menten. Sob o aspecto estrutural muitos princípios que emergiram dos estudos sobre proteínas são aplicáveis aos RNAs. Assim, as ribozimas possuem uma estrutura primária formada pela sequência nucleotídica, uma estrutura secundária resultante do pareamento entre sequências complementares localizadas em regiões relativamente próximas na sequência primária, e uma estrutura terciária, produto de interações eletrostáticas entre regiões distantes entre si na sequência primária.

Ao contrário das enzimas, para as quais em muitos casos é conhecida a estrutura tridimensional, inclusive dos sítios ativos, muito pouco se sabe a respeito da estrutura tridimensional das ribozimas. Bons modelos para a estrutura secundária e terciária de ribozimas foram construídos a partir de análises bioquímicas e filogenéticas^{27,30}. Nestes modelos, como em proteínas, o centro ativo é uma entidade tridimensional onde o substrato liga-se por múltiplas atrações fracas. Em geral as ribozimas reconhecem seus substratos através de complementaridade de bases, onde as interações envolvidas são pontes de hidrogênio. A alta especificidade destas macromoléculas é determinada pela exigência de pelo menos três nucleotídeos para o reconhecimento do sítio de clivagem. Em uma solução com 2,5 M de uréia ou 15% de formaldeído, a ribozima L-19 IVS RNA é capaz de diferenciar substratos de RNA cujas sequências de reconhecimento diferem em apenas uma base¹². Isto torna as ribozimas mais específicas que enzimas como as ribonucleases protéicas que clivam RNAs de cadeia única. Estas ribonucleases reconhecem apenas mono ou dinucleotídeos, de modo que apresentam uma menor capacidade discriminatória de substratos cujas sequências são semelhantes às das ribozimas. Em proteínas, as pontes de hidrogênio também determinam um alto grau de especificidade ao complexo enzima-substrato, além de constituírem, como nos RNAs, o principal tipo de interação envolvida na formação de estruturas secundárias.

É possível perceber que para ambos os catalisadores há uma estreita relação entre estrutura e função. A atividade catalítica está na dependência de uma estrutura conformacionalmente específica. Em RNAs estas estruturas cataliticamente ativas parecem ser constituídas por domínios formados pelo empilhamento de hélices e estabilizados por interações terciárias entre domínios³¹. Acredita-se que o enovelamento em RNAs ocorra segundo o **modelo hierárquico**³², isto é, inicialmente são formadas hélices individuais, as quais, através de interações de curto alcance, reagrupam-se constituindo os domínios. Estes, então, interagem entre si, resultando na estrutura terciária ativa. Tanto as interações quanto a estabilização da

estrutura terciária dependem da ligação específica de um cátion divalente, comumente o Mg^{+2} ³³. Nos elementos de estrutura secundária o enovelamento ocorre de forma independente, estando estes elementos estruturais presentes nos primeiros intermediários cinéticos do processo de enovelamento global³².

O modelo hierárquico de enovelamento apresenta uma clara correlação com o processo de enovelamento demonstrado para proteínas com multidomínios. Nestas moléculas, a formação dos domínios estruturais antecede a sua associação na estrutura terciária final, indicando um grau significativo de estabilidade intrínseca na ausência de interações com o restante da proteína³⁴. Em proteínas, a estabilidade estrutural é resultante basicamente de interações terciárias e de interações hidrofóbicas no interior da molécula³⁵ e as estruturas secundárias que se agrupam formando os domínios são pouco estáveis como unidades estruturais independentes. Em RNAs, são as estruturas secundárias as principais responsáveis pela estabilização da estrutura ativa, enquanto as interações terciárias são fracas e, em sua maioria, dependentes de cátions divalentes. Apesar da divergência quanto ao nível estrutural responsável pela estabilização da estrutura final, para as duas macromoléculas parece existir uma relação de equivalência entre as unidades que enovelam independentemente sob o aspecto cinético, e a estrutura termodinamicamente mais estável. Para RNAs, as menores unidades estruturais que apresentam enovelamento independente são grupos de cadeias helicoidais estabilizadas por pareamento de bases, enquanto que em proteínas as menores unidades estruturais correspondem a pequenos domínios secundários estabilizados por interações terciárias.

GLOSSÁRIO DOS TERMOS BIOLÓGICOS UTILIZADOS NESTE ARTIGO

- Exon Sequência gênica no DNA de eucariontes que codifica proteínas.
- Intron Sequência gênica no DNA de eucariontes, de função incerta, que não codifica proteínas;
- IVS RNA .. Segmento do RNA ribossômico 26S de *T. thermophila*, cuja sequência nucleotídica é transcrita a partir de um intron constituinte do gene codificante deste RNA, e que é capaz de catalisar sua própria excisão do RNA precursor. Esta é uma abreviatura da designação inglesa *Intervening Sequence RNA* para esta estrutura;
- tRNA RNA de transferência;
- mRNA RNA mensageiro;
- rRNA RNA ribossômico.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. Ricardo de Carvalho Ferreira pela orientação e sugestões na elaboração deste artigo e ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Sumner, J.; *J. Biol. Chem.* (1926), **69**, 435.
- Northrop, J. H.; *J. Gen. Physiol.* (1930), **13**, 739; *Biol. Revs.* (1935), **10**, 263282.
- Cech, T. R.; Zaug, A. J.; Grabowski, P.J.; *Cell* (1981), **27**, 487.
- Guerrier-Takada, C.; Gardiner, K.; Marsh, T. L.; Pace, N.; Altman, S.; *Cell* (1983), **35**, 849.
- Em eucariotas, a maioria dos genes apresentam suas sequências codificantes de proteínas (exons), intercaladas por sequências de função desconhecida. Estas sequências de DNA que não codificam proteínas são chamadas **introns** ou **sequências intervenientes** (IVS). Durante a transcrição do DNA em RNA, tanto os exons como os

- introns têm suas sequências nucleotídicas expressas como uma molécula chamada RNA precursor. Para que o RNA precursor se torne funcional, executando funções específicas como rRNA, mRNA ou tRNA, deve ser submetido a reações de clivagem e junção extremamente específicas, denominada processamento (do inglês *splicing*). Através do processamento, os introns são excisados precisamente da molécula de RNA precursor, e os exons são ligados, formando uma molécula contínua e biologicamente ativa (ver glossário de termos de biologia molecular usados neste texto).
6. Kruger, K.; Grabowski, P. J.; Zaug, A. J.; Sands, J.; Gottchling, D. E.; Cech, T. R.; *Cell* (1982), **31**, 147.
 7. Guerrier-Takada, C.; Altman, S.; *Science* (1984), **223**, 285.
 8. Peebles, C. L.; Mecklenburg, K. L.; Pelrman, P. S.; Tabor, J.; Cheng, H. L.; *Cell* (1986), **44**, 213; Garriga, G.; Lambowitz, A. M.; *Cell* (1984), **39**, 631; Van der Horst, G.; Tabak, F.; *Cell* (1985), **40**, 759; Patrono, S.; Lewin, A. S.; *Mol. Cell. Biol.* (1988), **8**, 2567; Chu, F.; Maley, G. F.; West, D. K.; Belfort, M.; Maley, F.; *Cell* (1986), **45**, 157; Epstein, L. M.; Gall, J. G.; *Cell* (1987), **48**, 535; Wu, H. N.; Lai, M. M. C.; *Science* (1989), **243**, 652; Chen, P. J.; Kalpana, G.; Goldberg, J.; Mason, W.; Werner, B.; Gerin, J.; Taylor, J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986), **83**, 8774; Prody, G. A.; Bakos, J. T.; Buzayan, J. M.; Schneider, I. R.; Bruening, G.; *Science* (1986), **231**, 1577.
 9. Sharp, P. A.; *Cell* (1985), **42**, 397; Gilbert, W.; (1986), *Nature*, **319**, 618; Lahva, N.; *J. Theor. Biol.* (1991), **151**, 531; Ferreira, R.; Coutinho, K.; *J. Theor. Biol.* (1993), **164**, 291; Orgel, L.; *J. Theor. Biol.* (1986), **123**, 127; Zielinsk, W. S.; Orgel, L. E.; *Nature* (1987), **327**, 346.
 10. Sarver, N.; Cantin, E. M.; Chang, P. S.; Zaia, J. A.; Ladne, P. A.; Stephens, D. A.; Rossi, J. J.; *Science* (1990), **247**, 1222; Haseloff, J.; Gerlach, W. L.; *Nature* (1988), **334**, 585; Cameron, F. H.; Jennings, P. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989), **86**, 9139.
 11. Scanlon, K. J.; Jiao, L.; Funato, T.; Wang, W.; Tone, T.; Rossi, J. J.; Kashani-Sabet, M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991), **88**, 10591.
 12. Cech, T. R.; *Science* (1987), **263**, 1532.
 13. Been, M. D.; Cech, T. R.; *Nucleic Acids Res.* (1985), **13**, 8389; Cech, T. R.; Bass, B. L.; *Ann. Rev. Biochem.* (1986), **55**, 599.
 14. Cech, T.R.; *Ann. Rev. Biochem.* (1990), **59**, 543.
 15. Westheimer, F. H.; *Nature* (1986), **319**, 534.
 16. Zaug, A. J.; Cech, T. R.; *Science* (1986), **231**, 470.
 17. Sullivan, F. X.; Cech, T. R.; *Cell* (1985), **42**, 639; Woodson, S. A.; Cech, T. R.; *Cell* (1989), **57**, 335.
 18. Cech, T. R.; *Sci. Am.* (1986), **255**, 76.
 19. McSwiggen, J. A.; Cech, T. R.; *Science* (1989), **244**, 679; Rajagopall, J.; Doudna, J. A.; Szostak, J. W.; *Science* (1989), **244**, 692.
 20. Cech, T. R.; Herschlag, D.; Piccirilli, J. A.; Pyle, A. M.; *J. Biol. Chem.* (1992), **267**, 17479.
 21. Piccirilli, J. A.; Vyle, J. S.; Caruthers, M. H.; Cech, T. R.; *Nature* (1993), **361**, 85.
 22. Schmelzer, C.; Schweyen, R. J.; *Cell* (1986), **46**, 557.
 23. Symons, R. H.; *TIBS* (1989), **14**, 445.
 24. Zaug, A. J.; Been, M. D.; Cech, T. R.; *Nature* (1986), **324**, 429; Herschlag, D.; Cech, T. R.; *Nature* (1990), **344**, 405; Robertson, D. L.; Joyce, G. F.; *Nature* (1990), **344**, 467; Zaug, A. J.; Cech, T. R.; *Biochemistry* (1986), **25**, 4478; Altman, S.; *Cell* (1984), **36**, 273; Szostak, J. W.; *Nature* (1986), **322**, 83.
 25. Piccirilli, J. A.; McConnel, T. S.; Zaug, A. J.; Noller, H. F.; Cech, T.R.; *Science* (1992), **256**, 1420; Noller, H. F.; Hoffarth, V.; Zmniak, L.; *Science* (1992), **256**, 1416.
 26. Zaug, A. J.; Grabowski, P.J.; Cech, T. R.; *Nature* (1983), **30**, 578.
 27. Davies, R. W.; Waring, R. B.; Ray, J.A.; Brown, T.A.; Scazzocchio, C.; *Nature* (1982), **300**, 719; Michell, F.; Jacquier, A.; Dujon, B.; *Biochimie* (1982), **64**, 867.
 28. Stryer, L.; Bioquímica. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (1992).
 29. Modrich, P.; Zabel, D.; *J. Biol. Chem.* (1976), **251**, 5866.
 30. Kim, S. H.; Cech, T. R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987), **84**, 8788; Michel, F.; Hanna, M.; Green, R.; Bartel, D. P.; Szostak, J. W.; *Nature* (1989), **342**, 391; Michel, F.; Ellington, A. D.; Couture, S.; Szostak, J. W.; *Nature* (1990), **347**, 578; Michel, F.; Westhof, E.; *J. Mol. Biol.* (1990), **216**, 585.
 31. Soares, T. A.; (1994) Monografia de Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco "Ribozimas, Aspectos Estruturais, Funcionais e Catalíticos". 97 pags.
 32. Zarrinkar, P. P.; Williamson, J. R.; *Science* (1994), **265**, 918.
 33. Pyle, A. M.; *Science* (1993), **261**, 709.
 34. Englander, S. W.; *Science* (1993), **262**, 848; Jennings, P. A.; Wright, P. E.; *ibid.*; p. 892; Mayo, S. L.; Baldwin, R. L.; *ibid.*; p.873; Miranker, A.; Robinson, C. V.; Radford, S. E.; Aplin, R. T.; Dobson, C. M.; *ibid.*; p.896; Mathews, C. R.; *Ann. Rev. Biochem.* (1993), **62**, 653.
 35. Dyson, H. J.; Wright, P. E.; *Curr. Opin. Struct. Biol.* (1993), **3**, 60; Dobson, C. M.; *Curr. Biol.* (1994), **4**, 636.