

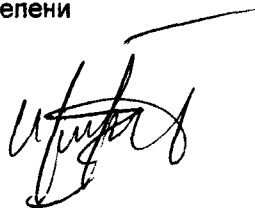
На правах рукописи

КУЗНЕЦОВА ИРИНА ЛЬВОВНА

**РАСЩЕПЛЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ РНК
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ХИМИЧЕСКИХ РИБОНУКЛЕАЗ**

03.00.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук



Новосибирск, 2005 г.

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН (бывший Новосибирский институт биоорганической
химии СО РАН)

Научный руководитель:

д.б.н. Зенкова Марина Аркадьевна

официальные оппоненты:

д.б.н. Меркулова Татьяна Ивановна

к.х.н. Венъяминова Алия Гусейновна

Ведущая организация: Институт физико-химической биологии
им.А.Н.Белозерского (МГУ)

Защита состоится « 3 » июня 2005 г. в 10⁰⁰ часов
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при
Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
по адресу: 630090, Новосибирск-90, пр. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан « 3 » июня 2005 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
д.х.н. Фёдорова О.С.



2006-4
4368

2133961

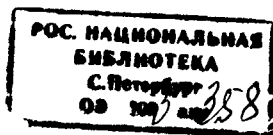
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Молекулы РНК выполняют в организме множество разноплановых функций от переноса генетической информации до катализа биохимических реакций. Геномы вирионов и многих вирусов представляют собой молекулы РНК. В связи с важной биологической ролью РНК, крайне актуальной является задача разработки методов направленного воздействия на РНК с целью регуляции биологических процессов в клетке в терапевтических целях и с целью инактивации геномов вирусов. Интерес также представляет создание низкомолекулярных химических соединений, способных расщеплять РНК по определенным нуклеотидным последовательностям или в пределах определенных элементов структур РНК. Изучение свойств таких соединений, получивших название искусственных или химических рибонуклеаз, может помочь выявить роль факторов, обеспечивающих высокую эффективность катализа, осуществляемого природными ферментами. Кроме того, соединения, способные расщеплять РНК, представляют интерес в качестве реагентов для исследования структуры РНК.

В последние годы было создано большое число низкомолекулярных соединений, способных расщеплять РНК в физиологических условиях, однако, до настоящего времени не удалось получить эффективных конструкций для расщепления РНК, обладающих активностью, близкой к активности природных катализаторов. Сегодня еще не установлены факторы, обуславливающие различия в чувствительности к расщеплению фосфодиэфирных связей в различных нуклеотидных последовательностях. Исследование факторов, определяющих специфичность и эффективность расщепления РНК химическими рибонуклеазами, является актуальным для создания высокоэффективных искусственных рибонуклеаз.

Цель и задачи работы. Целью настоящей работы являлось изучение расщепления структурных элементов РНК искусственными рибонуклеазами различной природы. В ходе исследования решались следующие задачи:

- определение рибонуклеазной активности химических рибонуклеаз, представляющих собой короткие катионные пептиды и соединения на основе 1,4-дизабицикло[2.2.2]октана
- изучение влияния последовательности и пространственной структуры РНК на эффективность реакции трансэтерификации под действием этих химических рибонуклеаз
- изучение расщепления фосфодиэфирных связей в боковых петлях РНК под действием химических рибонуклеаз.



Научная новизна и практическая ценность работы. В ходе выполнения работы проведено систематическое исследование новых химических рибонуклеаз, представляющих собой короткие катионные пептиды, имитирующие активные центры природных рибонуклеаз, и соединения на основе соединенных жестким линкером двух остатков 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана, несущих липофильные фрагменты на четвертизованных атомах азота. Впервые показано, что специфичность расщепления РНК этими соединениями зависит как от структуры РНК-субстрата, так и от структуры самих соединений. Впервые проведено систематическое исследование чувствительности связей боковых петель РНК к расщеплению искусственными рибонуклеазами различной природы. Показано, что в оптимальных условиях достигается селективное расщепление РНК по связям в 4- и 7-звенных петлях.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 8 статей. Результаты работы были представлены на конференциях "Nucleosides, Nucleotides and Their Biological Applications" (Франция, 1998), "Meeting of the Federation of European Biochemical Societies" (Франция, 1999), "Горизонты физико-химической биологии" (Россия, 2000), "Targeting RNA: Artificial Ribonucleases, Conformational Traps and RNA interference" (Россия, 2003), "Entering unexplored world: RNA targeting" (Германия, 2003), "Chemical & Biological Problems of Proteomics" (Россия, 2004), "1st International Symposium on Biomolecules And Related Compounds" (Франция, 2005).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения результатов и их обсуждения и списка цитированной литературы. Работа изложена на 142 страницах, содержит 53 рисунка и 12 таблиц. Библиография включает 180 литературных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Рибонуклеазная активность коротких синтетических катионных пептидов, состоящих из остатков лизина и гистамина

Новые химические рибонуклеазы представляют собой пептидоподобные молекулы (Рис.1), состоящие из каталитического домена, содержащего остаток гистамина, гистидина или метилового эфира гистидина, и РНК-связывающего домена, представляющего собой короткий пептид, состоящий из остатков лизина¹. Соединения, построенные по

¹ Все искусственные рибонуклеазы, использованные данной работе, были синтезированы в ЛОРС ИХБФМ СО РАН.

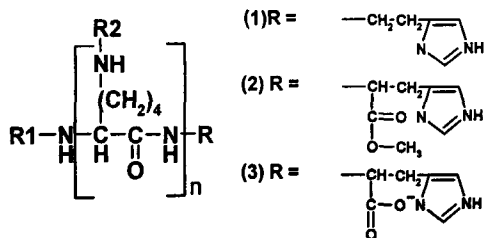


Рис. 1. Химические рибонуклеазы nLm: обозначения и структурные формулы

1L2, 1L3, 1L4,
2L2, 2L3, 3L4:
n = 1, 2, 3;
R1 = H, R2 = H

1L0:
n = 1;
R1 = -BOC,
R2 = -CBZ

данному принципу, были обозначены как химические рибонуклеазы nLm, где m - суммарный положительный заряд соединения при pH 7.0; n - код каталитической группы (1 - гистамин, 2 - метиловый эфир гистидина, 3 - гистидин). L указывает, что РНК связывающий домен состоит из остатков L-лизина. РНК-расщепляющую активность соединений nLm исследовали в экспериментах с [3'-³²P]-меченым *in vitro* транскриптом тРНК-подобного фрагмента TYMV РНК длиной 42 нуклеотида («мини-тРНК»), дрожжевой [3'-³²P]-тРНК^{Phe} и синтетическим декарибонуклеотидом [5'-³²P]-UUCAUGUAAA.

Стандартными условиями реакции были 50 mM имидазольный буфер pH 7.0, содержащий 0.2 M KCl, 0.1 mM EDTA и 100 мкг/мл суммарной тРНК из *E. coli*. Соединения nLm в концентрации 1 mM способны достаточно эффективно расщеплять все использованные РНК в стандартных условиях за 24 часа. Не выявлено общих корреляций между длиной РНК и скоростью ее расщепления соединениями nLm (Табл. 1). Для соединений 1L0, 2L2, 2L3 и 3L4 скорость расщепления заметно возрастала с увеличением длины субстрата, а для соединений 1L3 и 1L4 - наоборот, падала. Эффективность расщепления мини-тРНК соединениями серии nLm убывает в ряду 2L2 > 1L4 > 1L0, 1L3 > 1L2, 2L3, 3L4; для тРНК^{Phe} это ряд: 2L2 > 1L4, 1L0 > 3L4 >

Таблица 1. Эффективность расщепления РНК соединениями nLm

РНК, длина (нт)	1L0*	1L2	1L3	1L4	2L2	2L3	3L4
мини-тРНК, 42	65	15	31	69	82	11	28
тРНК ^{Phe} , 76	59	0	7	54	96	25	46
ON10, 10	12	0	46	76	0	13	14

*Приведена суммарная степень (%) расщепления РНК за 24 ч. Расщепление РНК проводили в стандартных условиях в присутствии одного из соединений nLm в концентрации 10⁻³ M при 37° С.

функциональными группами в активных центрах природных ферментов. Рибонуклеазную активность трипептидов исследовали в экспериментах с [5'-³²P]-меченым 21-звенным олигорибонуклеотидом 5'-UCGAAUUUCCACAGAAUUCGU-3' (далее ON21) и [3'-³²P]-меченой тРНК^{Leu}, полученной реакцией транскрипции *in vitro*. Реакцию проводили в 50 мМ Трис-НСl pH 7.0 или 50 мМ имидазольном буфере pH 7.0, в присутствии 0.2 М КCl и 0.5 мМ EDTA. Реакционную смесь (10 мкл), содержащую один из буферов, 10⁻⁷ М ON21, 10 мкг/мкл суммарной тРНК из *E.coli* и одну из химических рибонуклеаз в концентрации 1 мМ, инкубировали при 37°C 24 часа.

Эффективность расщепления ON21 трипептидами зависит как от строения соединений, так и от природы буфера, в котором проводится реакция. В имидазольном буфере расщепление РНК протекает более эффективно, чем в Трис-НСl буфере (Табл. 2). Поскольку все синтезированные трипептиды содержали гистидин или гистамин, можно предположить, что в комбинации с имидазолом буфера с некоторой вероятностью могли образоваться пары имидазолов вблизи расщепляемых связей, аналогично тому, как это происходит в каталитическом центре РНКазы А. Как видно из таблицы 2, независимо от типа буфера наибольшей эффективностью в реакции расщепления РНК обладают трипептиды, содержащие в своем составе остатки аргинина (остаток гистидина или гис-

Таблица 2. Эффективность расщепления 21-звенного олигорибонуклеотида (ON21) синтезированными трипептидами и соединением 2L2*

Соединение	Эффективность расщепления, %		Суммарный заряд при pH 7.0
	50 мМ имидазольный буфер	50 мМ Трис-НСl буфер	
KHR	31	17	+4
HKR	55	8	+4
RKHa	31	6	+4
NKHa	1	0	+3
KNHa	2	0	+3
KTHa	10	4	+3
KHa (2L2)	13	9	+2

*Приведена суммарная степень (%) расщепления ON21 за 24 ч. Ошибка эксперимента составляла не более 10%.

тамина присутствует во всех трипептидах): $\text{HKR} > \text{KHR} = \text{RKNa} \gg \text{KNa}$. Значительно более высокая рибонуклеазная активность аргинин-содержащих трипептидов по сравнению с другими трипептидами и описанным ранее дипептидом KNaOMe (2L2) может быть объяснена повышенным родством таких трипептидов к РНК. Однако, как аргинин-содержащие, так и аргинин-несодержащие трипептиды расщепляют tRNA^{Lys} примерно с одинаковой эффективностью - $25 \pm 5\%$ за 24 часа. Специфичность расщепления РНК трипептидами совпадает со специфичностью расщепления соединениями nLm .

3. Рибонуклеазные свойства соединений на основе двух остатков 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана, соединенных жестким линкером, несущих липофильные фрагменты на четвертизованных атомах азота

Соединения **Dxn** состоят из двух одинаковых фрагментов, присоединенных к бензольному кольцу (Рис. 3). Каждый фрагмент состоит из остатка DABCO, несущего алифатические заместители разной длины у четвертичного атома азота. Обозначение **Dxn** показывает, что РНК-связывающим фрагментом является DABCO (**D**), **x** - положение доменов в бензольном кольце (**x** = **o** - орто, **m** - мета, **p** - пара), а **n** указывает на количество метиленовых звеньев в алифатическом заместителе (**n** = 1, 4, 6 или 12). Соединения **Dxn** принципиально отличаются от трипептидов и соединений nLm тем, что в их структуру не входит ни имидазол, ни другие РНК-расщепляющие группы.

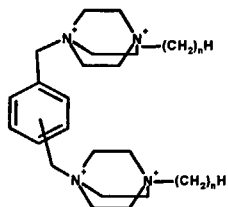


Рис. 3. Структура соединений **Dxn**

Рибонуклеазную активность соединений **Dxn** исследовали в экспериментах с 21-звенным олигорибонуклеотидом (ON21), tRNA^{Phe} из дрожжей, 96-звенным фрагментом HIV1 РНК и 190-звенным фрагментом MDR1 мРНК, полученным реакцией транскрипции *in vitro*, несущими [^{32}P] метку на 5'-конце. Стандартными условиями реакции были 50 мМ Трис-НСl буфер pH 7.0, содержащий 0.2 М KCl, 0.1 мМ EDTA и 10 мкг/мл суммарной tRNA из *E. coli*.

Рибонуклеазная активность соединений **Dxn** зависит от их структуры. Степень расщепления ON21 соединениями **Dxn** строго зависит от длины алифатического заместителя (Рис. 4). Очевидно, что алифатический остаток играет основную роль в рибонуклеазной активности соединений **Dxn**. Соединения **Dx1**, содержащие два остатка DABCO, способных связываться с РНК, но не содержащие гидрофобный остаток, практически не способны расщеплять РНК, а **Dp4** слабо (2 5%)

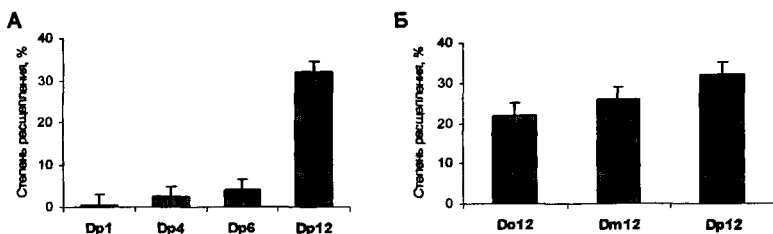


Рис. 4. Влияние длины алифатического заместителя (А) и положения замещенных остатков DABCO в бензольном кольце (Б) на эффективность расщепления олигорибонуклеотида ON21. Расщепление ON21 проводили в присутствии соединений Dxp в концентрации 10 мкМ в течении 4 часов.

расщепляет ON21. При концентрации 10 мкМ **Dp6** в 2 раза активнее **Dp4**, а при увеличении длины алифатического заместителя до 12 метиленовых звеньев (соединение **Dp12**) степень расщепления возрастает в 8 раз (Рис. 4А). Соединения, в которых остатки DABCO располагались наиболее удаленно друг от друга (пара-изомеры (**Dpn**)), расщепляли РНК активнее мета- (**Dmn**) и орто-изомеров (**Don**) (Рис. 4Б).

В тРНК^{Phe} наиболее чувствительными к расщеплению соединениями Dxp являются три СА связи: C13-A14, C61-A62, C63-A64, которые также чувствительны к расщеплению и другими природными и химическими расщепляющими агентами (Рис. 5). Однако, в отличие от соединений nLm и трипептидов, в этом случае одновременно происходит расщепление и по другим связям в тРНК^{Phe}, хотя и с меньшей эффективностью. Расщеплению подвергаются фосфодиэфирные связи как в одноцепочечных фрагментах, так и в составе несовершенных стеблей шпилек. Аналогичные результаты были получены и для других РНК-субстратов, различающихся последовательностью и структурой. Все фосфодиэфирные связи в составе СА и UA последовательностей во всех исследованных РНК расщепляются

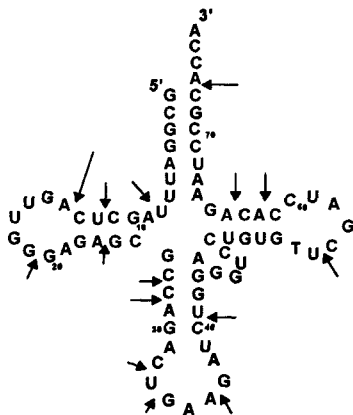


Рис. 5. Расщепление [5'-³²P]-мРНК^{Phe} под действием соединения Dxp. Длина стрелки соответствует степени расщепления по данной связи.

под действием соединений **Dxn**. Примерно половина CC, CG и CU связей и одна из трех UC связей были чувствительны к этому соединению. Из 9 встречавшихся UG связей и 14 GG связей расщепление наблюдалось только в антикодонной и D-петлях тРНК^{Phe}, соответственно. Четыре AG связи из 21: две в тРНК^{Phe} и две в MDR1 мРНК расщеплялись соединением **Dxn**, все они находились в петлях РНК, две из них находились в составе идентичных последовательностей AGAG, а две другие – в составе мотивов AGAU и AGCU.

Расщепление РНК другими исследованными соединениями (nLm и трипептидами) происходит преимущественно по одноцепочечным участкам и участкам с нестабильной структурой, поскольку фосфодиэфирные связи в этих участках могут легко принимать конформацию близкую к линейной при физио-логических условиях. Соединения **Dxn** способны расщеплять, хотя и с меньшей эффективностью, связи и в двуцепочечных участках РНК. Возможно, связывание положительно заряженных остатков DABCO с межнуклеотидными фосфатами и гидрофобные взаимодействия, олигометиленовых заместителей обуславливают разрыхление (плавление) двуцепочечных участков РНК.

На основании полученных данных можно заключить, что соединения **Dxn** способны эффективно расщеплять РНК; их рибонуклеазная активность зависит от строения и падает в ряду **Dx12 > Dx6 > Dx4 > Dx1** и **Dpn > Dmn ≥ Don**. Соединения **Dxn** расщепляют РНК как в одноцепочечных, так и в двуцепочечных участках преимущественно по C-X и U-X последовательностям, однако причина эффективного расщепления РНК по двуцепочечным участкам пока не выяснена.

4. Направленное расщепление РНК химическими рибонуклеазами по фосфодиэфирным связям в боковых петлях

Известно, что боковые петли в РНК имеют уникальную вторичную и третичную структуру, а выпетленные связи в РНК расщепляются многими химическими рибонуклеазами с высокой эффективностью. Данная часть работы посвящена поиску боковых петель РНК, в которых расщепление химическими рибонуклеазами проходит более эффективно по сравнению с расщеплением в других структурных элементах РНК.

Чувствительность фосфодиэфирных связей в составе различных элементов вторичной структуры к расщеплению под действием химических рибонуклеаз исследовали в экспериментах с 96-звенным фрагментом РНК белка М2 вируса гриппа (далее М2-96 РНК) (Рис. 6А). Известно, что две рядом расположенные Ру-А связи в составе одноцепочечной РНК чрезвычайно чувствительны к действию различных расщепляющих конструкций. Мы предположили, что боковая петля, которая будет

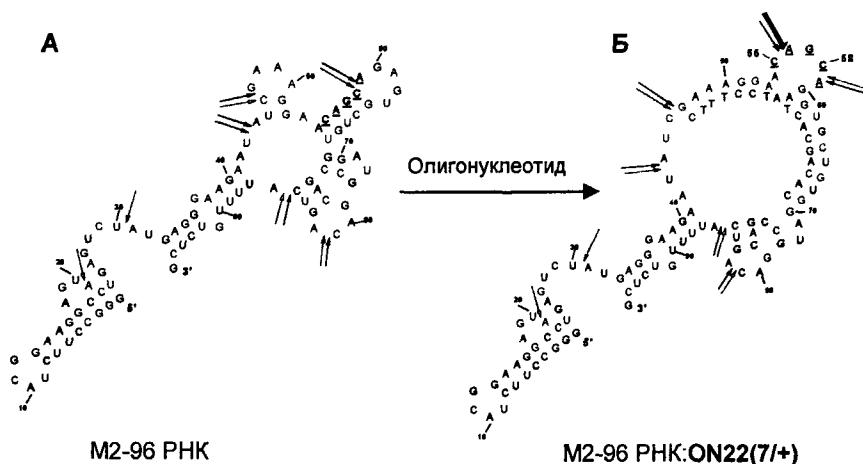


Рис. 6. Вторичная структура M2-96 РНК (А) и ее комплекса с олигодезоксирибонуклеотидом, образующим боковую петлю (Б). Стрелки указывают сайты расщепления M2-96 РНК соединением ABL4C3 в отсутствие (серые) и присутствии (черные) 10 мМ Mg^{2+} .

образовываться в M2-96 РНК вследствие гибридизации с олигонуклеотидом, содержащая последовательность $C_{55}AGCA_{59}$ (соответствующая последовательности $C_{256}AGCA_{260}$ в M2 РНК), будет гиперчувствительна к расщеплению. Для создания боковых петель проводили гибридизацию M2-96 РНК с олигодезоксирибонуклеотидами (длиной 15 - 18 нт), частично комплементарными данной РНК (Рис. 6). Олигонуклеотиды были обозначены $ONm(n/\pm)$, где m – порядковый номер олигонуклеотида, n – длина искусственной петли, которую олигонуклеотид образует в M2-96 РНК; + или – показывает наличие или отсутствие некомплементарного аденозина в олигонуклеотиде напротив искусственной петли в РНК (Рис. 7). При гибридизации с этими олигонуклеотидами в РНК должны образовываться боковые петли длиной от 1 до 7 нуклеотидов. Для каждой петли определенной длины было исследовано 2 или 3 варианта последовательности: петли длиной до 4 нуклеотидов содержали либо связь $C_{55}-A_{56}$, либо связь $C_{58}-A_{59}$; более длинные петли содержали обе эти связи (за исключением петли, образуемой $ON17(5/-)$) и различались между собой положением последовательности $C_{55}ACCA_{59}$ в петле. В качестве контроля использовался олигонуклеотид $ON1(0)$, полностью комплементарный последовательности 50–65 M2-96 РНК.

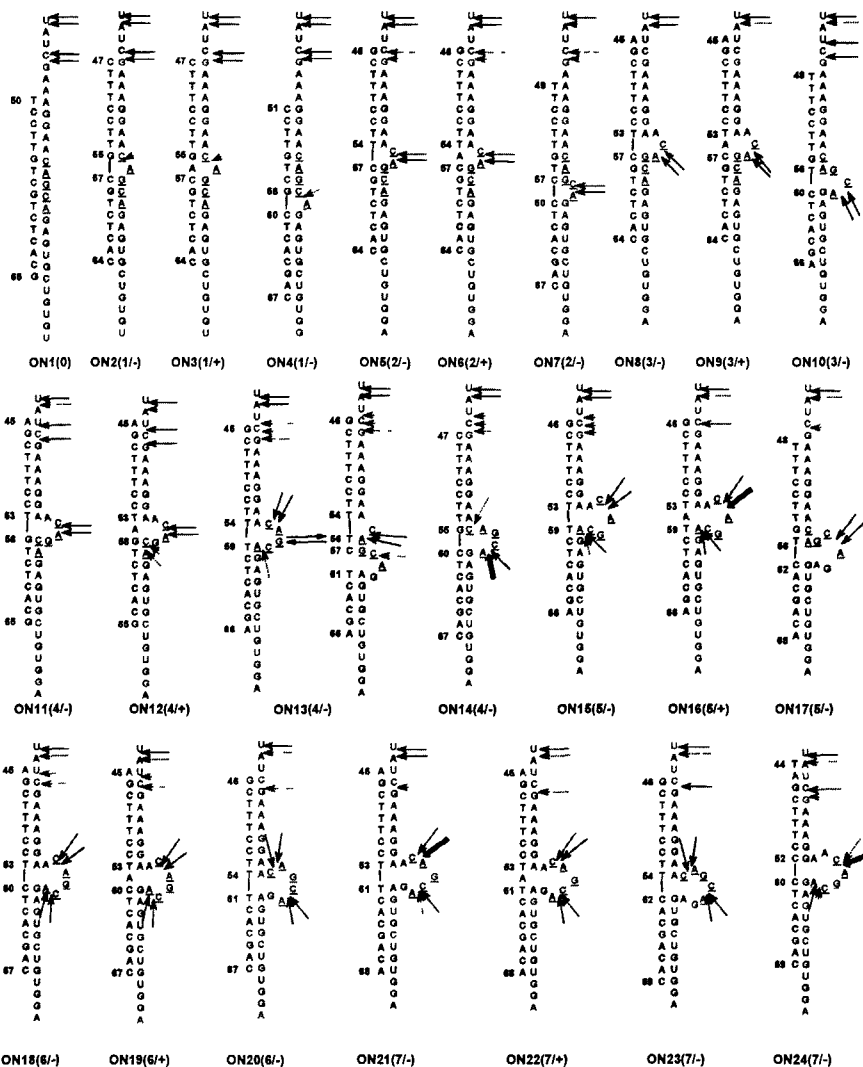


Рис. 7. Структуры и последовательности искусственных боковых петель, формирующихся в комплексах M2-96 РНК:олигонуклеотид ON(m/±). Стрелки указывают на связи, расщепляемые соединением ABL4C3 в отсутствие (серые) и в присутствии (черные) Mg^{2+} . Толщина стрелок соответствует степени расщепления по данной связи.

4.1. Образование искусственных петель

Была изучена способность олигонуклеотидов образовывать комплекс с M2-96 РНК и формировать в ней боковую петлю заданной длины. Образование комплекса проводили в условиях, аналогичных условиям, в которых изучали расщепление РНК химическими рибонуклеазами: $[5' \text{-}^{32}\text{P}]\text{-M2-96 РНК}$ (10^{-7} М) инкубировали с олигонуклеотидами (10^{-6} М) в 50 мМ Трис-НСl буфере рН 7.0, содержащем 0.2 М КCl, 0.1 мМ EDTA при 37°C .

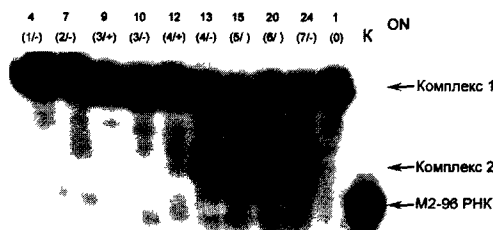


Рис. 8. Связывание олигонуклеотидов с M2-96 РНК. M2-96 РНК (10^7 М) инкубировали с соответствующим олигонуклеотидом (10^6 М) в течение 1 ч при 37°C , затем анализировали с помощью электрофореза в нативном 10% ПААГ. Дорожка К – контроль, инкубация M2-96 РНК в отсутствие олигонуклеотида. Положение нативной и связанной с олигонуклеотидом M2-96 РНК показано справа.

Образование искусственных петель в комплексах M2-96 РНК с олигонуклеотидами изучали с помощью метода задержки в геле и пробинга структуры комплексов РНКазой Н, РНКазой А и 2 М имидазольным буфером рН 7.0. Анализ гибридизации олигонуклеотидов с M2-96 РНК с помощью метода задержки в геле показал, что образуется 1 комплекс в случае олигонуклеотидов, формирующих боковые 1 – 4-звенные петли в РНК и 2 комплекса, отличающихся электрофоретической подвижностью, в случае формирования более длинных петель (Рис. 8).

Расщепление комплексов М2-96 РНК:олигонуклеотид РНКазой N проходит точно по связям М2-96 РНК, комплементарным олигонуклеотидам (Рис. 9). Однако, в случае формирования боковых петель длиной более 4

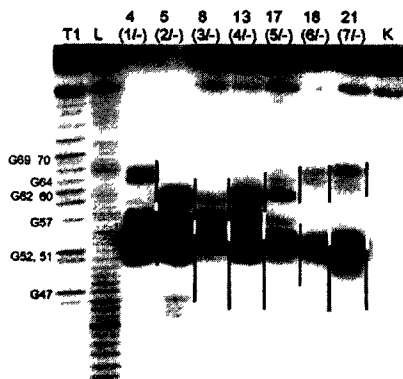


Рис. 9. Пробинг структуры комплексов M2-96 РНК:олигонуклеотид РНКазой Н. Дорожка К – расщепление M2-96 РНКазой Н. Дорожки L и T1 – расщепление РНК 2 М имидазольным буфером и РНКазой T1 в денатурирующих условиях, соответственно. Линии справа от каждой дорожки обозначают теоретическую область РНК:ДНК дуплекса.

звеньев, более слабое расщепление наблюдается и по связям, соответствующим связыванию 5'-«плеча» олигонуклеотида. Эти данные свидетельствуют о слабой гибридизации 5'-части этих олигонуклеотидов с комплементарной последовательностью М2-96 РНК. Эти данные согласуются с результатами, полученными методом задержки в геле. По-видимому, комплекс 2 соответствует состоянию, когда только 3'-«плечо» олигонуклеотида связано с РНК, а наблюдаемое слабое расщепление РНК РНКазой Н в 3'-области дуплексов соответствует состоянию полного связывания обоих «плеч» олигонуклеотида, т.е. комплексу 1. Расщепление комплексов М2-96 РНК:олигонуклеотид РНКазой А и 2 М имидазольным буфером подтвердило это предположение. Было сделано заключение, что петли длиной до четырех звеньев формируются строго в соответствии с законами комплементарности, а олигонуклеотиды, которые должны формировать более длинные петли в РНК, образуют «дышащие» комплексы, в которых 5'-часть олигонуклеотида слабо связана с РНК.

4.2. Расщепление фосфодиэфирных связей в искусственных петлях соединениями KHR, 2L2, Dp12 и ABL4C3

Для изучения чувствительности боковых петель к расщеплению были использованы наиболее активные соединения из серий искусственных рибонуклеаз **Dxp** и коротких катионных пептидов: **Dp12**, **2L2** и **KHR**, а также ранее изученная в нашей лаборатории химическая рибонуклеаза **ABL4C3** (Рис. 10). Анализ чувствительности фосфодиэфирных связей в искусственных петлях к РНК-расщепляющим соединениям проводили по общей схеме: 10^{-7} М [5'- 32 P]-М2-96 РНК инкубировали с соответствующим олигонуклеотидом (10^{-6} М) в 50 мМ Трис-НСl буфере рН 7.0, содержащем 0.2 М КCl, 0.5 мМ EDTA и 0.1 мкг/мкл РНК-носителя. Через 1 час к реакционной смеси добавляли одну из химических рибонуклеаз до оптимальной концентрации (10 мкМ **Dp12**, 0.5 мМ **ABL4C3**, 1 мМ **2L2** и 1 мМ **KHR**) и инкубировали комплекс в присутствии соединения в течение 8 - 24 ч при 37°C.

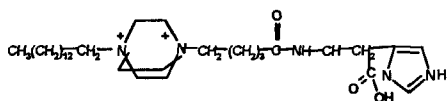


Рис. 10. Структура химической рибонуклеазы **ABL4C3**.

Как видно из рисунка 11, во всех случаях в отсутствие олигонуклеотидов М2-96 РНК расщепляется по трем основным сайтам: U20-A21, U30-A31 и U43-A44 (дорожка К1 на рис. 11). Менее интенсивное расщепление проходит по фосфодиэфирным связям после A21, C22, U24, U28, C29, U32, G33 и C46. Чувствительность к расщеплению связей C55-A56 и C58-A59, расположенных в нативной М2-96 РНК в стебле шпильки, зависит от типа

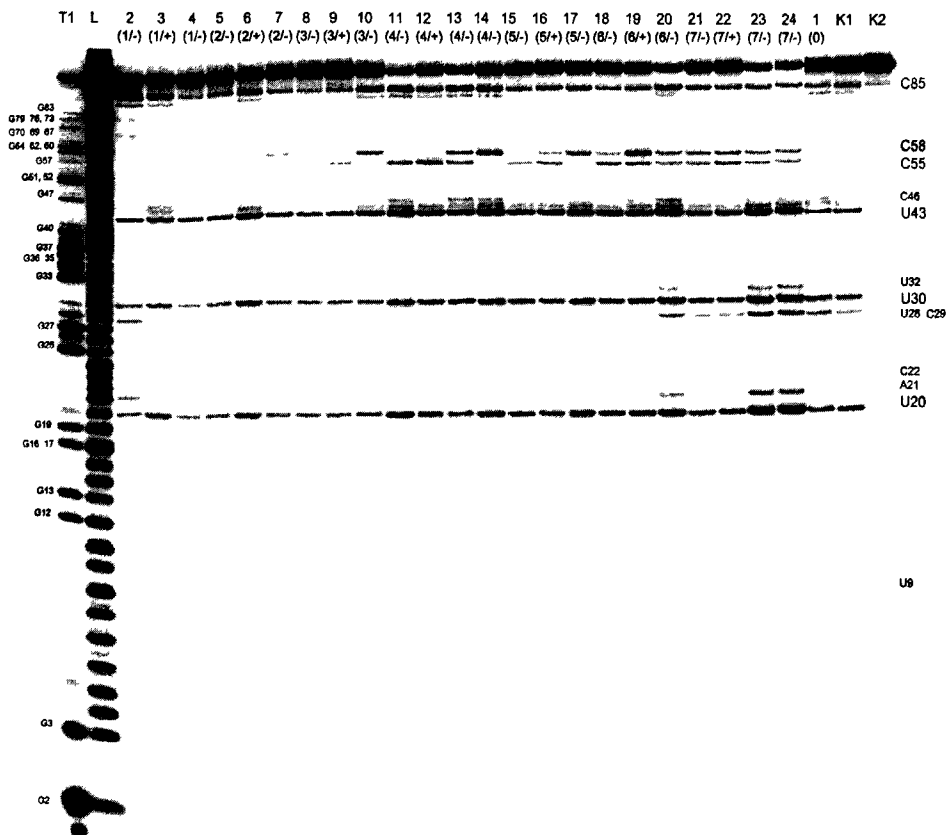


Рис. 11. Расщепление комплексов M2-96 РНК:ОН соединением KHR. Радиоавтограф 18% денатурирующего ПААГ после разделения продуктов расщепления $[5'-^{32}P]$ -M2-96 РНК. Дорожки K1 – контроль, расщепление M2-96 РНК в отсутствие олигонуклеотида; K2 – инкубация M2-96 РНК в отсутствие соединения KHR. Дорожки L и T1 – расщепление РНК 2 М имидазолом и РНКазой T1 в денатурирующих условиях, соответственно. Номера олигонуклеотидов обозначены сверху над дорожками. Связи, расщепляемые РНКазой T1 и KHR, обозначены слева и справа от геля, соответственно.

РНК-расщепляющего агента: в случае соединений **ABL4C3** и **KHR** степень расщепления РНК по этим связям в 2 - 5 раз меньше, чем в среднем по основным сайтам, а в случае соединения **Dp12** степень расщепления по этим связям была примерно равной расщеплению по связям U20-A21 и U30-A31. Очевидно, это объясняется повышенной способностью

соединения **Dp12** расщеплять РНК по связям в двуцепочечных участках. В присутствии контрольного олигонуклеотида **ON1(0)**, полностью комплементарного последовательности 50-65 М2-96 РНК, происходит полное ингибирование расщепления по связям C55-A56 и C58-A59. Боковые петли, образованные в присутствии всех остальных олигонуклеотидов, расщепляются исследованными соединениями, причем расщепление РНК происходит строго по связям C55-A56 и/или C58-A59 в петле. Соединение **2L2** не проявляет повышенной чувствительности к фосфодиэфирным связям в боковых петлях в комплексах М2-96 РНК с олигонуклеотидами. Степень расщепления по связям C55-A56 и C58-A59 во всех комплексах РНК:олигонуклеотид была одинаковой и не отличалась от контроля (М2-96 РНК в свободном состоянии).

Для того чтобы оценить, насколько чувствительность фосфодиэфирных связей в искусственных боковых петлях отличается от остальных связей, расщепляемых в М2-96 РНК, мы ввели понятие «селективность» - отношение степени расщепления РНК по связям в искусственной боковой петле к суммарной степени расщепления РНК в данном комплексе. Значения селективности расщепления РНК соединением **KHR** для всех исследованных комплексов представлены на рис. 12. Как видно из гистограммы, чувствительность связей к расщеплению увеличивается с увеличением длины петли. В комплексах, где олигонуклеотид содержит некомплементарный аденозин напротив петли (**ONm(n/+)**), селективность расщепления всегда выше, чем в комплексах **ONn(m/-)**. Надо отметить, что связывание олигонуклеотидов, содержащих дополнительный аденозин, не отличается от связывания олигонуклеотида без некомплементарного аденозина. Следовательно, разница в селективности расщепления в петле может быть обусловлена более гибкой структурой петли, образующейся напротив дополнительного аденозина, которая является более предпочтительной для реакции трансэтерификации. Петли длиной до 3

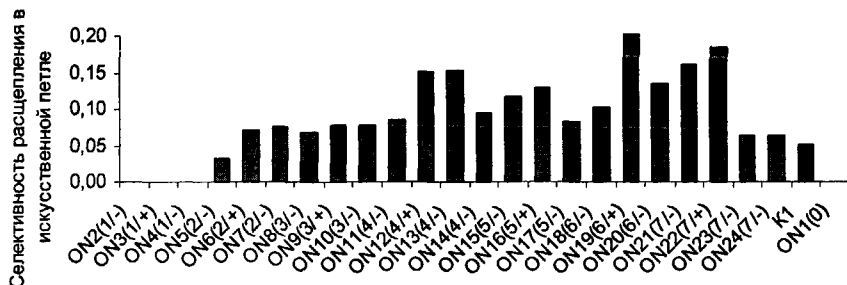


Рис. 12. Селективность расщепления комплексов М2-96 РНК:ОН соединением KHR.

нуклеотидов содержали только один СА мотив, часть 4- и 5-звенных петель также содержала одну СА связь (**ON11(4/-)**, **ON12(4/+)** и **ON17(5/-)**), а остальные 4- и 5-звенные петли – обе СА связи (**ON13(4/-)**, **ON14(4/-)**, **ON15(5/-)** и **ON16(5/+)**), причем одно из оснований последовательности CAGCA (С или А) находилось в составе РНК:ДНК дуплекса 6 и 7-Звенные петли содержали обе C55-A56 и C58-A59 связи в петле. Максимальная селективность расщепления (0.15) одной СА связи наблюдалась в случае четырехзвенной петли, содержащей C55-A56 связь в апикальном положении (комплекс М2-96 РНК:**ON12(4/+)**). Присутствие в петле второго СА мотива увеличивает селективность расщепления в петле до 0.21 (комплекс РНК с **ON19(6/+)**). Такие же закономерности были получены и для соединений **Dp12** и **ABL4C3**. Чувствительность фосфодиэфирных связей, расположенных в боковой петле, к расщеплению химическими рибонуклеазами возрастает в ряду **2L2 < KHR < Dp12 < ABL4C3**. В случае соединения **ABL4C3** селективность расщепления в 7-звенной петле достигает значения 0.5. Эти данные отражают зависимость чувствительности различных типов соединений к вторичной структуре РНК. Трипептиды и соединения **nLm**, обладающие слабым родством к РНК, не способны селективно расщеплять выпетленные фосфодиэфирные связи, в то время как соединения, содержащие остаток DABCO, лучше расщепляют связи в петлях, чем остальные связи в РНК. Наибольшая степень расщепления наблюдается в случае фосфодиэфирной связи, расположенной в 4-звенной петле, а в случае комплексов с 7-звенной петлей половина суммарной степени расщепления РНК приходится на две СА связи, расположенные в петле.

4.3. Расщепление комплексов М2-96 РНК:олигонуклеотид соединениями ABL4C3, Dp12 и KHR в присутствии 10 мМ MgCl₂

На рис. 13 показан анализ продуктов расщепления комплексов М2-96 РНК:**ON**, формирующих 1-, 4- и 7-звенные петли, соединениями **ABL4C3**, в присутствии и в отсутствие 10 мМ MgCl₂. Добавление ионов магния снижает суммарную степень расщепления РНК: в этих условиях расщепление по связям U43-G44 и C46-G47 происходит значительно слабее, чем в отсутствие ионов магния, а по остальным связям (U20-A21 и U30-A31) расщепления в этих условиях почти не наблюдается (в случае искусственных РНКаз) или становится значительно слабее (в случае РНКазы А), что, видимо, отражает стабилизацию структуры М2-96 РНК. Фосфодиэфирная связь в искусственной петле длиной 1 нуклеотид (комплекс М2-96:**ON3(1/+)**) не расщепляется ни в присутствии, ни в отсутствие MgCl₂ ни искусственными РНКазами, ни РНКазой А. В случае 4- и 7-звенных петель, в присутствии 10 мМ MgCl₂ наблюдается эффективное расщепление РНК по выпетленным C55-A56 и/или C58-59 связям.

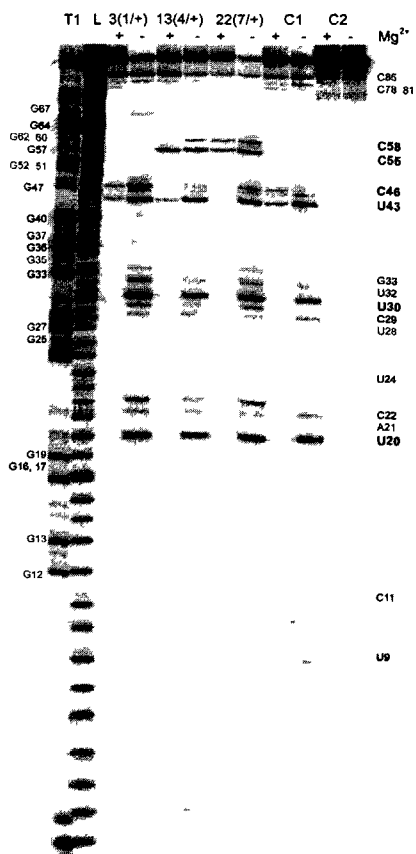


Рис. 13. Сравнение расщепления комплексов M2-96 РНК:ОН соединением ABL4C3 в присутствии (+) и в отсутствие (-) 10 мМ $MgCl_2$. Радиоавтограф 18% денатурирующего ПААГ после разделения продуктов расщепления $[5\text{-}^{32}P]$ M2-96 РНК. Дорожка C1 – инкубация M2-96 РНК в отсутствие олигонуклеотидов, дорожка C2 – инкубация M2-96 РНК в отсутствие соединения ABL4C3. Дорожки L и T1 – расщепление РНК 2 М имидазолом и РНКазой T1 в денатурирующих условиях, соответственно. Номера олигонуклеотидов обозначены сверху над дорожками. Связи, расщепляемые РНКазой T1 и соединениями, обозначены слева и справа от радиоавтографа, соответственно.

Значения селективности расщепления M2-96 РНК для 4- и 7-звенных петель в отсутствие и в присутствии $MgCl_2$ приведены на рис. 12. Как видно из представленных данных, селективность расщепления, наблюдаемая в присутствии $MgCl_2$, превышает соответствующие значения в отсутствие $MgCl_2$ для искусственных РНКаз и не отличается для РНКазы А. Для соединения KHR в присутствии ионов магния наблюдается падение эффективности расщепления РНК в 2

раза в комплексе с ON12(4/+), однако селективность расщепления при этом немного увеличивается. В комплексе с семизвенной петлей суммарная степень расщепления M2-96 РНК соединением KHR немного возрастает, и также несколько увеличивается селективность расщепления по связям в петле. Таким образом, РНКазы А и соединения KHR, имитирующие активный центр РНКазы А, проявляют низкую эффективность расщепления по связям в боковых петлях. Для соединений Dp12 и ABL4C3 суммарная степень расщепления РНК в присутствии ионов магния также снижается в 2 – 3 раза в сравнении с расщеплением в отсутствие ионов магния. Расщепление M2-96 РНК в присутствии ионов магния происходит только по связям U43-G44 и C46-G47 и выпетленным C55-A56 и/или C58-59 связям. В комплексах M2-96 РНК с олигонуклеотидами ON12(4/+) и ON22(7/+) выпетленные связи расщепляются соединением Dp12 с такой же эффективностью, что и связи U43-G44 и C46-G47. В случае соединения

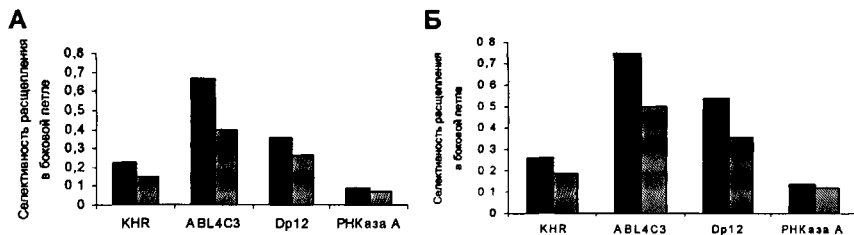


Рис. 14. Селективность расщепления РНК по связям искусственных 4 звенных (комплекс M2-96 РНК:ON12(4/+)) (А) и 7 звенных (комплекс M2-96 РНК:ON22(7/+)) (Б) боковых петлях в присутствии (черные столбцы) и в отсутствие (штрихованные столбцы) 10 мМ $MgCl_2$. Селективность расщепления определяли как отношение степени расщепления M2-96 РНК в искусственной боковой петле к суммарной степени расщепления M2-96 РНК.

ABL4C3 степень расщепления по каждой СА связи в петле в присутствии $MgCl_2$ примерно в 2 раза выше, чем степень расщепления связи U43-G44 или C46-G47, и, следовательно, селективность расщепления возрастает до значений 0.68 и 0.75 в 4- и 7-звенных петлях, соответственно (Рис. 14). Таким образом, образование 4- и 7-звенных искусственных петель в M2-96 РНК полностью изменяет направленность расщепления РНК соединением **ABL4C3**.

На сегодняшний день существует два основных подхода к направленному расщеплению РНК химическими РНКазами: (1) конъюгаты РНК-расщепляющей конструкции с антисмысловым олигонуклеотидом и (2) бинарные системы, состоящие из низкомолекулярной РНК-расщепляющей конструкции и комплементарного олигонуклеотида, несущего группировку, повышающую чувствительность определенного участка или связей РНК к расщеплению. Направленное расщепление РНК в такой системе было продемонстрировано для короткой модельной РНК (36 нт), в которой все связи, за исключением целевой, были защищены комплементарным комплексом с олигонуклеотидом.

Подход к направленному расщеплению, предложенный в данной работе, основан на том, чтобы искусственно повысить чувствительность фосфодиэфирных связей РНК за счет их выпетливания. Наши исследования показали, что в 4 – 7-звенных петлях происходит расщепление РНК со скоростью в несколько раз превышающей расщепление фосфодиэфирных связей в остальной части молекулы. Таким образом, с помощью бинарной системы, состоящей из частично комплементарного олигонуклеотида и химической рибонуклеазы **ABL4C3** было достигнуто селективное расщепление РНК в петлях длиной 4 – 7

оснований. Направленное расщепление РНК происходит, видимо, вследствие создания напряжения в петле, необходимого для эффективного протекания реакции трасэтерификации, и стабилизации остальной структуры РНК, что делает ее малочувствительной к расщеплению по остальным связям, кроме боковой петли.

ВЫВОДЫ

1. Исследовано расщепление различных РНК, отличающихся размером и характером пространственной структуры, новыми соединениями, представляющими собой короткие катионные пептиды, имитирующие активный центр РНКазы А, и химические конструкции на основе двух остатков 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана, несущих липофильные фрагменты на четвертизованных атомах азота (соединения **Dxn**). Показано, что

- короткие катионные пептиды расщепляют РНК в физиологических условиях преимущественно по фосфодиэфирным связям в СА и UA мотивах, расположенных в одноцепочечных участках и участках с напряженной структурой;

- в случае коротких синтетических РНК мишеней наблюдается корреляция между рибонуклеазной активностью катионных пептидов и их суммарным положительным зарядом. В случае природных РНК дипептид **КНа** (соединение **2L2**) и трипептид **HKR** проявляют наиболее высокую рибонуклеазную активность, а корреляции между суммарным положительным зарядом соединений и их рибонуклеазной активностью не обнаружена;

- соединения **Dxn** с наибольшей эффективностью расщепляют фосфодиэфирные связи в СА и UA мотивах как в одноцепочечных, так и в двуцепочечных участках РНК, и с несколько меньшей эффективностью связи в CC, CU, CG, UG, UC, AG и GG мотивах;

- рибонуклеазная активность соединений **Dxn** возрастает с увеличением длины олигометилового фрагмента и зависит от положения замещенных остатков диазабициклооктана в бензольном кольце: рибонуклеазная активность падает в ряду пара > мета > орто изомеров.

2. Впервые систематически изучена чувствительность к расщеплению фосфодиэфирных связей в 1 – 7-звенных боковых петлях, формируемых в РНК путем гибридизации с олигонуклеотидами, под действием различных соединений: трипептидов (**KHR**), соединений на основе 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана (**Dp12**) и его конъюгатов с имидазолом (**ABL4C3**). Показано, что

- эффективность расщепления РНК зависит от длины боковой петли, положения в ней расщепляемой фосфодизфирной связи и от природы РНК-связывающего фрагмента химической рибонуклеазы (1,4-диазабицикло[2.2.2]октан или катионный пептид) Однозвенные боковые петли не расщепляются искусственными рибонуклеазами. В отсутствие ионов Mg^{2+} наиболее эффективному расщеплению всеми соединениями, подвергается фосфодизфирная связь в СА мотиве, расположенном в апикальном положении в петлях длиной 4, 6 и 7 оснований, причем для соединения **ABL4C3** (конъюгата 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана и имидазола) скорость расщепления в этих боковых петлях была в 2 - 3 раза выше, чем скорость расщепления в остальных участках молекулы РНК.

- в присутствии ионов Mg^{2+} , под действием соединений на основе 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана (**Dp12**) и имидазола (**ABL4C3**) наблюдается преимущественное расщепление РНК по связям в 4- и 7-звенных петлях, которое достигает 55% и 75% от общей степени расщепления РНК, соответственно. На основании полученных данных предложена бинарная система для селективного расщепления РНК, состоящая из олигонуклеотида, формирующего боковую петлю в РНК, и соединения **ABL4C3**.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Kuznetsova I.L., Zenkova M.A., Gross H.J. and Vlassov V.V. Enhanced RNA cleavage within bulge-loops by an artificial ribonuclease // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. P. 1201-1212.
2. Koval'ov N., Kuznetsova I., Burakova E., Silnikov V., Zenkova M. and Vlassov V. Ribonuclease activity of cationic structures conjugated to lipophilic groups // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 2004. V. 23. P. 977-982.
3. Kuznetsova I., Tuzikov F., Tuzikova N., Tamkovich N., Zenkova M. and Vlassov V. The role of hydrophobic interactions in catalysis of RNA cleavage by 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane based artificial ribonucleases // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 2004. V. 23. P. 907-914.
4. Кузнецова И.Л., Ждан Н.С., Зенкова М.А., Власов В.В., Сильников В.Н. Искусственные рибонуклеазы. 5. Синтез и рибонуклеазная активность трипептидов, состоящих из аминокислот, формирующих каталитические центры природных рибонуклеаз // *Известия Академии Наук. Серия Химическая.* 2004 Т. 53. С. 435-442.
5. Kuznetsova I.L. and Sil'nikov V.N. Small ribonuclease mimics. "Artificial Ribonucleases", Ed. Marina A. Zenkova in *Nucleic Acids and Molecular Biology*, 2004. V. 13. P. 111-128. Springer Verlag.
6. Кузнецова И.Л., Зенкова М.А., Власов В.В. Направленное расщепление по фосфодиэфирным связям в искусственных боковых петлях // *Материалы конференции молодых ученых СО РАН.* 2004. С. 53-56.
7. Zhdan N.S., Kuznetsova I.L., Zenkova M.A., Vlassov A.V., Silnikov V.N., Giege R., Vlassov V.V. Synthesis and characterization of artificial ribonucleases // *Nucleosides and Nucleotides.* 1999. V. 18. P. 1491-1492.
8. Ждан Н.С., Кузнецова И.Л., Власов А.В., Сильников В.Н., Зенкова М.А., Власов В.В. Синтетические рибонуклеазы. 1. Синтез и свойства искусственных рибонуклеаз, содержащих РНК-связывающий фрагмент на основе остатков лизина // *Биоорган. химия.* 1999. Т. 25, С. 723-732.

Подписано к печати "28" апреля 2005г.

Тираж 100 экз. Заказ № 1441.

Отпечатано "Документ-Сервис", 630090,
Новосибирск, Институтская 4/1, тел. 356-600

№ - 89 4 1

РНБ Русский фонд

2006-4
4368