

Боковые петли РНК — мишени для селективного расщепления ионами металлов и органическими соединениями

И.Л.Кузнецова, М.А.Зенкова, В.В.Власов

Институт химической биологии и фундаментальной медицины

Сибирского отделения Российской академии наук

630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8, факс (383)333–3677

Приведены результаты исследования структуры боковых петель РНК. Рассмотрено расщепление фосфодиэфирных связей, расположенных в боковых петлях РНК. Большое внимание уделено факторам, влияющим на эффективность такого расщепления. Обсуждено современное состояние проблемы направленного расщепления РНК под действием различных реагентов.

Библиография — 101 ссылка.

Оглавление

I. Введение	305
II. Структура боковых петель РНК	306
III. Расщепление фосфодиэфирных связей в составе боковых петель РНК	309
IV. Заключение	314

I. Введение

Молекулы РНК обычно представляют собой одонитевые полинуклеотидные цепи со сложной пространственной структурой (третичной структурой), стабилизированной за счет образования водородных связей между комплементарными или частично комплементарными последовательностями (уотсон-криковские комплементарные пары), за счет стэкинг-взаимодействий между петлями, а также за счет связывания петель с ионами металлов.^{1–3} Сочетание разнообразных взаимодействий приводит к уникальной упаковке РНК, которую можно сравнить со сложной упаковкой белков.

Типичными элементами вторичной структуры РНК являются короткие боковые двухспиральные участки, или стебли, и одноцепочечные участки четырех видов: одноцепочечный фрагмент, петля шпильки, внутренняя петля (симметричная или асимметричная) и перекресток.¹

Боковые петли являются частным случаем асимметричной внутренней петли и представляют собой участок структуры РНК, в котором соседние стебли находятся в стэкинг-взаимодействии. Боковые петли — часто встречающийся элемент вторичной структуры; они обеспечивают подвижность рибозо-фосфатного остова, необходимую для сворачивания РНК. Боковые участки РНК, которые содержат нуклеотиды, не имеющие комплементарных оснований в противоположной цепи РНК, играют важную биологическую роль. Они определяют третичную структуру РНК,⁴ являются сайтами специфических РНК-белковых взаимодействий,^{5,6} а также формируют активные центры рибозимов.^{7,8}

Наиболее хорошо изучены и охарактеризованы боковые петли, состоящие из одного основания. Однозвенные петли, содержащие остаток аденозина, наиболее часто встречаются в природных РНК. Выпуклые остатки аденозина (bulge A) являются специфическими сайтами связывания белков, например в рибосомных РНК *E. coli* (5S рРНК — белок L18 и 16S рРНК — белок S8),^{9,10} а также в операторной области мРНК, кодирующих белки капсида бактериофага MS2.⁵ Уридинсодержащие однозвенные петли также были обнаружены во многих РНК. Например, такая петля расположена в каталитическом центре РНКазы Р,^{11,12} в составе высокоаффинного сайта связывания белка Rev с HIV-1 РНК^{13,14} и Таг-белка с HIV-2 РНК.¹⁵ Однозвенные петли, содержащие остатки цитозина или гуанина, встречаются намного реже, однако такие петли играют важную роль в организации третичной структуры природных РНК.^{16,17}

В последние годы было синтезировано большое число низкомолекулярных соединений, способных расщеплять РНК в физиологических условиях (рН 7.0, 37°C).^{18–25} Расщепление РНК под действием этих соединений проходит преимущественно по участкам, не занятым в образовании двухспиральных структур. Наиболее хорошо изучено рас-

И.Л.Кузнецова. Кандидат биологических наук, младший научный сотрудник ИХБФМ СО РАН. Телефон: (383)333–3761, e-mail: irakuzn@yahoo.com

Область научных интересов: искусственные рибонуклеазы, структура и расщепление РНК.

М.А.Зенкова. Доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник того же института. Телефон: (383)333–3761, e-mail: marzen@niboch.nsc.ru

Область научных интересов: химия и биохимия нуклеиновых кислот, расщепление РНК, сайт-направленная модификация, регуляция экспрессии генов.

В.В.Власов. Академик, директор ИХБФМ СО РАН.

Телефон: (383)333–3328, e-mail: valentin.vlassov@niboch.nsc.ru

Область научных интересов: химия и биохимия нуклеиновых кислот, биотехнология и вирусология, клеточные технологии.

Дата поступления 6 октября 2006 г.

щепление РНК по апикальным петлям шпилек. Закономерности расщепления РНК по связям в боковых петлях изучены несколько хуже, хотя боковые петли имеют ряд преимуществ при использовании их в качестве мишени для избирательного разрушения РНК. Такими мишенями могут быть как боковые петли в составе природных РНК, так и боковые петли, искусственно сформированные в РНК путем гибридизации этой РНК с частично комплементарными ей олигонуклеотидными фрагментами ДНК или РНК.

II. Структура боковых петель РНК

1. Методы исследования структуры боковых петель в ДНК- и РНК-дуплексах

Наиболее распространенным методом исследования структуры ДНК- и РНК-дуплексов является рентгеноструктурный анализ.^{26–28} Несмотря на высокую точность метода, РСА нуклеиновых кислот позволяет только приблизительно оценить общие структурные параметры дуплекса. Построение же по этим параметрам удовлетворительной структурной модели невозможно без привлечения данных, полученных другими методами. Так, расчеты потенциальной энергии позволяют получить общее представление о внутренней подвижности молекулы РНК. Из спектроскопических методов наиболее часто применяется метод ЯМР.^{29–31} Анализ структуры нуклеиновых кислот с использованием спектроскопии ЯМР дает представление о динамической структуре молекул в растворе и дополняет данные РСА, которые носят несколько ограниченный характер вследствие статического состояния объекта. Влияние петлевых фрагментов на третичную структуру РНК анализируют с помощью метода задержки в геле,³² методов переноса энергии флуоресценции (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)³³ и индуцированного электрическим полем временного двулучепреломления (Transient Electric Birefringence, ТЕВ).³⁴ Классификация структурных элементов РНК и их встречаемость в изученных с помощью методов РСА и ЯМР природных и синтетических РНК доступна в сети Интернет в базе данных структурных элементов РНК (SCOR: Structural Classification of RNA, <http://scor.lbl.gov/index.html>).

2. Структуры боковых петель, состоящих из одного основания

Однуклеотидные боковые петли появляются в РНК в том случае, когда один нуклеотид в полинуклеотидной цепи не имеет комплементарного основания и располагается между двумя классическими уотсон-криковскими или неканоническими парами оснований.³⁵ Такой неспаренный нуклеотид может находиться в двух основных конформациях: либо располагаться вне спирали, т.е. быть вывернутым наружу (рис. 1, *b*), либо находиться внутри спирали в стэкинг-взаимодействиях с прилегающими основаниями (рис. 1, *a*).³⁶ Конформация выпетленного нуклеотида зависит как от типа азотистого основания самого нуклеотида, так и от типа оснований ближайших соседей. Известны случаи, когда одни и те же боковые петли существуют в разных конформациях, которые меняются под влиянием межмолекулярных взаимодействий.

Согласно базе данных SCOR, в структурах РНК, исследованных с помощью методов ЯМР и РСА, было обнаружено около 30 однуклеотидных аденинсодержащих боковых петель; в 11 из них аденозин находился внутри спирали, а в остальных был вывернут наружу. Метод РСА^{13, 28, 37–41} обычно показывает, что в кристалле выпетленный аденозин находится вне спирали РНК (рис. 2), в то время как метод ЯМР^{42–45} свидетельствует, что такой аденозин находится

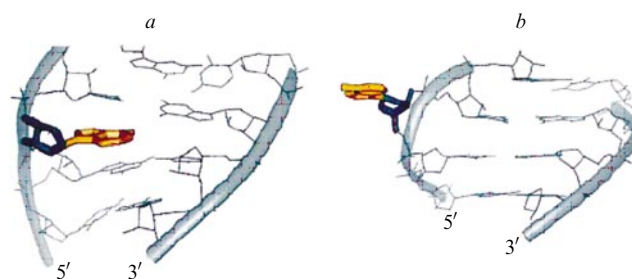


Рис. 1. Трехмерная структура двойной спирали РНК, содержащей однозвенную боковую петлю, которая находится в стэкинг-взаимодействии с прилегающими основаниями (*a*) или вывернута наружу из спирали (*b*).³⁶

внутри спирали и участвует в стэкинг-взаимодействиях с прилегающими основаниями. По-видимому, выпетленный аденозин обладает высокой подвижностью, его положение в каждый момент времени определяют внутри- и межмолекулярные взаимодействия. Таким образом, расхождение данных можно объяснить различными условиями, в которых находилась РНК при проведении анализа: в растворе (в случае ЯМР-экспериментов) или в твердой фазе (в случае РСА).

В кристалле структура дуплекса стабилизирована межмолекулярными связями, возможны также межмолекулярные стэкинг-взаимодействия между основаниями вывернутых наружу нуклеотидов, расположенных в различных дуплексах. Еще одной причиной реализации вывернутой наружу конформации у выпетленного аденозина в кристалле может быть использование при кристаллизации ионов двухвалентных металлов, например Mg^{2+} , которые способны стабилизировать именно такую структуру.³⁸ Исследования структуры дуплексов с помощью ЯМР проводятся в растворе, где молекулы РНК принимают наиболее энергетически выгодную конформацию. Этой конформацией является дуплекс с выпетленным аденозином, ориентированным внутрь спирали. Высокая подвижность выпетленного аденозина приводит к тому, что исследователи получают разные конформа-

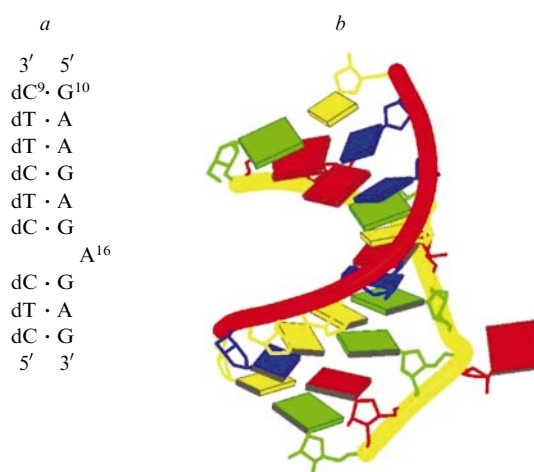


Рис. 2. Последовательность (*a*) и пространственная структура (*b*) РНК-ДНК-дуплекса, содержащего однозвенную боковую А-петлю.²⁸

Здесь и далее зеленым цветом показаны основания G, красным — A, желтым — C и синим (или голубым) — основания U. Код PDB для структуры bulge A — 1EFO (<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1EFO>).

ции выпетленного аденозина в составе одинаковых РНК-дуплексов.^{27, 46, 47}

Для того чтобы понять, какую конформацию будет иметь выпетленный аденозин в зависимости от его окружения, была предпринята попытка определить наиболее энергетически выгодную конформацию методами компьютерного моделирования.^{48, 49} В работе⁴⁹ был использован иерархический метод для исследования разнообразных стерически возможных низкоэнергетических конформаций однонуклеотидной боковой петли. В основе метода лежит предположение, что за конформационную деформацию двойной спирали ответственны петля и прилегающие к ней пары оснований. Компьютерное моделирование и расчеты всех возможных конформаций проводили для шестизвенных РНК-дуплексов, содержащих один выпетленный аденозин. Наименьшей энергией обладал дуплекс, в котором выпетленный аденозин находился внутри спирали в стэкинг-взаимодействии с соседними нуклеотидами. Более высокие значения энергии Гиббса были получены для РНК-дуплексов, в которых выпетленный аденозин находился внутри спирали и образовывал триплекс с парой оснований, находящихся на 5'-конце (по малой бороздке). Наибольшей энергией, по расчетам авторов, обладали дуплексы с вывернутым наружу аденозином. Следует отметить, что для аналогичных ДНК-дуплексов, содержащих выпетленный аденозин, была получена несколько иная закономерность. Стэкинг-конформация выпетленного аденозина также была наиболее энергетически выгодной, однако следующим в ряду по увеличению энергии Гиббса оказался конформер с вывернутым наружу выпетленным аденозином, а конформер, в котором выпетленный аденозин образует триплекс, была наименее выгодной.

Однозвенные боковые петли, содержащие гуанозин (bulge G), изучены значительно хуже. В структуре всех исследованных дуплексов, содержащих выпетленный гуанозин, этот нуклеозид был вывернут наружу.^{16, 50, 51} В природных РНК выпетленный гуанозин был обнаружен в области α -сарциновой петли 23–28 рРНК, где он образует так называемый G-петлевой мотив (G-bulged motif).¹⁶ Этот мотив находится в несовершенном стебле 29-звенной шпильки в последовательности 5'GGAACC·3'CAUGACU, где выпет-

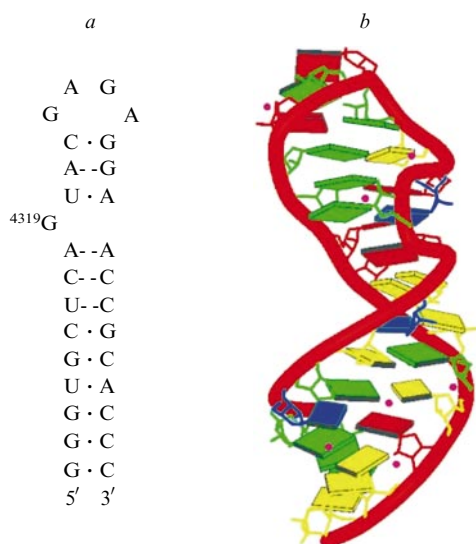


Рис. 3. Последовательность (*a*) и пространственная структура (*b*) α -сарциновой петли 28 S рРНК крысы, содержащей однозвенную боковую G-петлю.¹⁶

Код PDB для структуры bulge G — 430D (<http://www.rcsb.org/pdb/expose.do?structureId=430D>).

ленный гуанозин (выделен жирным шрифтом) фланкирован неканоническими парами оснований А-А, С-С и U-С (рис. 3).

G-Петлевые мотивы играют важную биологическую роль (взаимодействие с α -сарцином и фактором элонгации G). Они были найдены в составе рРНК большой субъединицы рибосом крысы и *E. coli*, а также в Е-петле 5 S рРНК лягушки *Xenopus laevis*.^{9, 16, 52–54} Особенность структуры G-петлевого мотива состоит в том, что выпетленный гуанозин с 5'-стороны фланкирован неканонической пурин-пуринной парой оснований А-А, а с 3'-стороны образует триплекс G·U·A с соседней парой оснований (см. рис. 3). Это приводит к расширению большой бороздки спирали РНК на 5 Å, при этом глубина бороздки остается стандартной для А-формы РНК.¹⁶ Результаты анализа мутантных 28 S рРНК показали, что консервативный выпетленный гуанозин, позволяющий РНК свернуться в уникальную третичную структуру, абсолютно необходим в составе α -сарциновой шпильки для проявления рРНК ее биологической активности (связывание с фактором элонгации).¹⁶

Согласно данным PCA, уридин в составе однонуклеотидных боковых петель (bulge U) в большинстве случаев вывернут наружу, причем он не просто вывернут наружу относительно спирали, а образует сложную внутримолекулярную структуру, например, может быть загнут в малую бороздку.^{13, 55} Основной особенностью такой конформации выпетленного уридина является то, что она поддерживается внутримолекулярными (а не межмолекулярными) взаимодействиями, а именно образованием водородных связей с прилегающими нуклеотидами или непосредственно, или опосредованно через аква-мостики. Загнутый в малую бороздку выпетленный уридин изменяет конформацию прилегающих к нему нуклеотидов. Угол поворота спирали около такой петли увеличивается до 50° (over-twist).⁵⁵ Единственный выпетленный уридин, находящийся в стэкинг-конформации внутри спирали, был обнаружен в рибозиме (рис. 4).⁵⁶ Интересно, что замена этого уридина на любой другой нуклеозид не меняет активности рибозима, что не характерно для одноцепочечных участков каталитических РНК.⁵³

В составе 5 S рРНК была обнаружена консервативная однозвенная петля, состоящая из цитидина (bulge C).^{17, 57} Детальное исследование структуры этой петли было проведено в составе восьмизвенного РНК-дуплекса (рис. 5), соот-

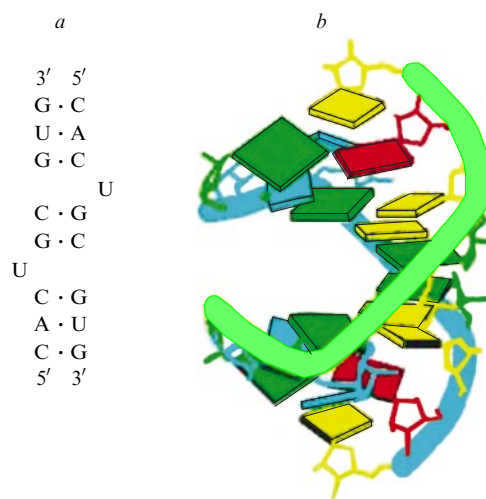


Рис. 4. Последовательность (*a*) и пространственная структура (*b*) дуплекса, содержащего выпетленный уридин.⁵⁶

Код PDB для bulge U — 1J9H (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1J9H>).

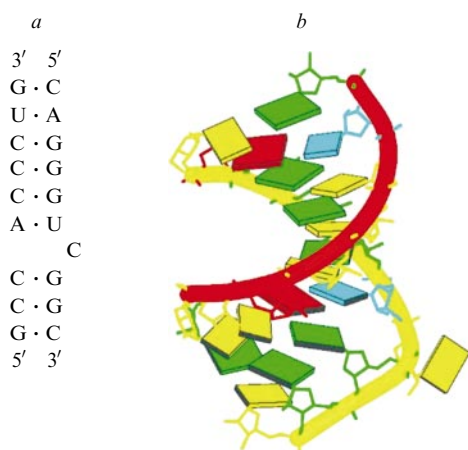


Рис. 5. Последовательность (a) и пространственная структура (b) дуплекса, содержащего выпетленный цитозин.¹⁷ Код PDB для bulge C — DQH1 (<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1DQH>).

ветствующего области спирали II 5S рРНК лягушки *X. laevis*.⁵¹ Кристаллы дуплекса были изучены с разрешением 2.2 и 1.7 Å. Оказалось, что в обоих кристаллах выпетленный цитидин вывернут наружу, а ось спирали отклоняется от прямой на угол меньше, чем 10°. В кристаллах, изученных с разрешением 2.2 Å, выпетленное основание было загнуто к 3'-концу дуплекса, а в кристаллах, изученных с разрешением 1.7 Å, — к 5'-концу. Авторы объясняют наличие двух конформаций выпетленного цитидина его подвижностью. Аналогично выпетленному уридину выпетленный цитидин участвует в кристалле в образовании нескольких межмолекулярных водородных связей с нуклеотидами близлежащих дуплексов, а также в стэкинг-взаимодействиях с пуриновыми основаниями.

С помощью РСА изучена структура однозвенных петель в составе РНК·ДНК-дуплекса на примере гомопиримидин·гомопуринового гетеродуплекса d(C¹TCCTCTC⁹)·r(G¹⁰AAGAGA¹⁶GAG¹⁹), содержащего выпетленный аденозин (выделен жирным шрифтом) (см. рис. 2).²⁸ Оказалось, что выпетленный аденозин находится в вывернутой наружу конформации, причем его рибозное кольцо располагается почти перпендикулярно по отношению к оси спирали. Сопоставление структуры этого дуплекса со структурой РНК·ДНК-дуплекса идентичной последовательности, но не содержащего выпетленный аденозин, показало, что наличие боковой петли очень мало влияет на угол излома оси спирали РНК·ДНК-дуплекса (6°). Такое поведение выпетленного аденозина в РНК·ДНК-дуплексе сильно отличается от поведения выпетленного аденозина в РНК·РНК- и ДНК·ДНК-дуплексах. В кристалле выпетленный аденозин (A¹⁶) образует триплекс (C⁹·G¹⁰)·A¹⁶ с концевой парой оснований C⁹·G¹⁰ соседней молекулы гетеродуплекса за счет межмолекулярных водородных связей.

3. Структура петель, содержащих более одного нуклеотида

Выше уже отмечалось, что одной из природных функций петлей является организация третичной структуры РНК, а именно ориентация двух прилегающих двухцепочечных участков РНК относительно друг друга.^{1,58} Общие закономерности влияния длины боковой петли и ее нуклеотидного состава на структуру РНК были получены в работах^{32–34,59}, посвященных электрофоретической подвижности РНК·РНК-дуплексов, содержащих боковую петлю. Анализ

гомо-А- и гомо-У-петель, содержащих от 1 до 7 нуклеотидов, показал, что при увеличении длины петли электрофоретическая подвижность дуплексов уменьшается,³² причем дуплексы с U_n-петлями всегда обладали большей электрофоретической подвижностью, чем дуплексы с A_n-петлями.⁵⁹

Данные РСА по изменению угла излома оси спирали, содержащей боковую петлю, были подтверждены данными, полученными методами FRET³³ и TEB.³⁴ Оказалось, что угол излома зависит от двух параметров — длины петли (при увеличении количества нуклеотидов в петле угол излома увеличивается) и ее нуклеотидного состава (петли, содержащие главным образом пуриновые основания, изгибают ось спирали меньше, чем петли, содержащие пиримидиновые основания).³⁴

Данные РСА и спектроскопии ЯМР показали, что боковые петли, состоящие из нескольких нуклеотидов, обычно стабилизированы сложной системой межмолекулярных водородных связей, внутри- и межмолекулярными стэкинг-взаимодействиями, а также взаимодействиями с ионами металлов.^{38,51,60–62} Многообразие нуклеотидного состава и окружения боковых петель, состоящих из нескольких нуклеотидов, обуславливает бесконечное многообразие их структурных форм. На сегодняшний день установлены структуры двух мотивов с определенной последовательностью и структурой: G-петли в составе α-сарциновой шпильки рРНК, описанной выше, и структура «kink-turn» или «K-turn», т.е. «изгиб с поворотом». Структуру K-turn имеет трехзвенная боковая петля, фланкированная с 5'-конца двумя G·C-парами, а с 3'-конца — двумя или тремя неканоническими G·-A-парами.⁵¹ В результате ось спирали в месте петли изгибается на 120° (рис. 6). Мотивы K-turn играют важную биологическую роль: в 23S рРНК было обнаружено пять мотивов K-turn, и все они являлись сайтами связывания рибосомных белков.

Таким образом, анализируя данные, полученные с помощью методов РСА и ЯМР, можно сказать, что для однозвенных уридиновых, гуанозиновых и цитидиновых боковых петель более характерна вывернутая наружу конформация, чем встраивание (стэкинг) внутрь спирали. Боковые однонуклеотидные аденозиновые петли обладают большей подвижностью и могут находиться в разных конформациях. Двухцепочечные участки РНК, содержащие боковые петли, имеют высокую подвижность. Так, большая бороздка А-спирали в области петли расширена (преимущественно с 5'-стороны от петли), что делает ее доступной для взаимодействия с другими молекулами. Кроме того, наблюдается изгиб оси

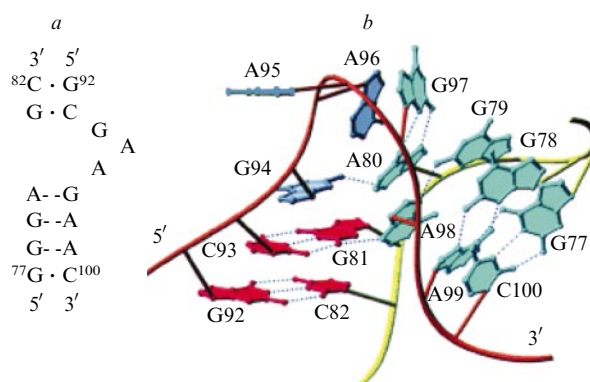


Рис. 6. Последовательность (a) и пространственная структура (b) мотива K-turn на примере фрагмента связывания белка 23S рРНК *H. Marismortui*.⁵¹ Пары G·C на 5'-конце обозначены красным цветом, а пары G·-A на 3'-конце — зеленым, нуклеотиды в петле — синим цветом.

спирали в области петли. Известно большое количество всевозможных боковых петель, содержащих несколько нуклеотидных остатков, однако, за исключением мотива K-turn, не найдено четких закономерностей, позволяющих предсказать пространственную структуру петли произвольной нуклеотидной последовательности.

III. Расщепление фосфодиэфирных связей в составе боковых петель РНК

1. Геометрические параметры межнуклеотидных связей и стабильность РНК

Расщепление РНК проходит преимущественно по одноцепочечным участкам (петлям шпильки, мисматчам, внутренним и боковым петлям, перекресткам, одноцепочечным фрагментам), однако из-за сложности вторичной и третичной структуры природных РНК сложно определить, какие именно связи и в каких последовательностях расщепляются быстрее. Многие рибозимы, природные и искусственные рибонуклеазы расщепляют РНК по механизму внутримолекулярного перемещения фосфодиэфирной связи — трансэтерификации.⁶³ Предполагается, что реакция трансэтерификации РНК возможна только в том случае, когда атакующий атом кислорода 2'-гидроксильной группы нуклеофила расположен на одной линии с 5'-оксанионом уходящей группы, т.е. уходящая группа (атом кислорода 5'-гидроксила), атом фосфора и нуклеофил (атом кислорода 2'-гидроксильной группы) располагаются строго линейно.⁶⁴

Двухцепочечная РНК и РНК в составе РНК·ДНК-дуплексов обычно имеют А-форму спирали, в которой 2'-оксанион и 5'-оксанион уходящей группы расположены таким образом, что образование линейной конформации затруднено. Это обуславливает большую стабильность двухспиральных участков РНК и РНК·ДНК-дуплексов по сравнению с одноцепочечными участками РНК, в которых фосфодиэфирные связи подвижны и могут принимать линейную конфигурацию самопроизвольно. Таким образом, скорость расщепления фосфодиэфирных связей в боковых петлях РНК должна определяться их способностью принимать линейную конфигурацию. Спонтанная реализация линейной конфигурации фосфодиэфирной связи возможна в том случае, когда соответствующий участок структуры РНК обладает достаточной подвижностью. Подвижность боковой петли определяется ее размером, нуклеотидной последовательностью и эффективностью внутри- и межмолекулярных стэкинг-взаимодействий оснований.⁶⁴

Сегодня невозможно теоретически предсказать чувствительность связей в каждой конкретной боковой петле РНК к расщеплению и, тем более, предложить геометрические параметры для дизайна каталитической группировки, способной селективно их расщеплять. Несмотря на то что для всех новых соединений, проявляющих рибонуклеазную активность, всегда определяют специфичность их действия по отношению к структуре РНК, систематические исследования зависимости направленности и эффективности расщепления от первичной и вторичной структуры РНК до настоящего времени проведены главным образом для ионов двухвалентных металлов.^{65–70}

2. Расщепление боковых петель РНК ионами металлов

Расщепление РНК под действием ионов металлов или металлокомплексов может протекать либо по механизму трансэтерификации,^{71,72} либо по механизму металлзависимой окислительно-восстановительной реакции.^{73,74} Многие металлы катализируют расщепление межнуклеотидных фосфо-

диэфирных связей в РНК.^{75,76} Сначала образуются олигомеры, содержащие 2',3'-циклофосфат на 3'-конце, который далее гидролизует до смеси 2'- и 3'-фосфатов (например, под действием ионов Zn^{2+})⁷⁷ либо только до 3'-фосфата (например, под действием ионов Pb^{2+}).⁷⁸

Среди ионов двухвалентных металлов ионы свинца наиболее эффективно расщепляют РНК в физиологических условиях.⁷⁹ В работе⁶⁷ проведен анализ расщепления различных олигорибонуклеотидов, содержащих боковые петли разной длины, под действием ионов свинца (рис. 7,а). Олигорибонуклеотиды различались не только длиной, при-

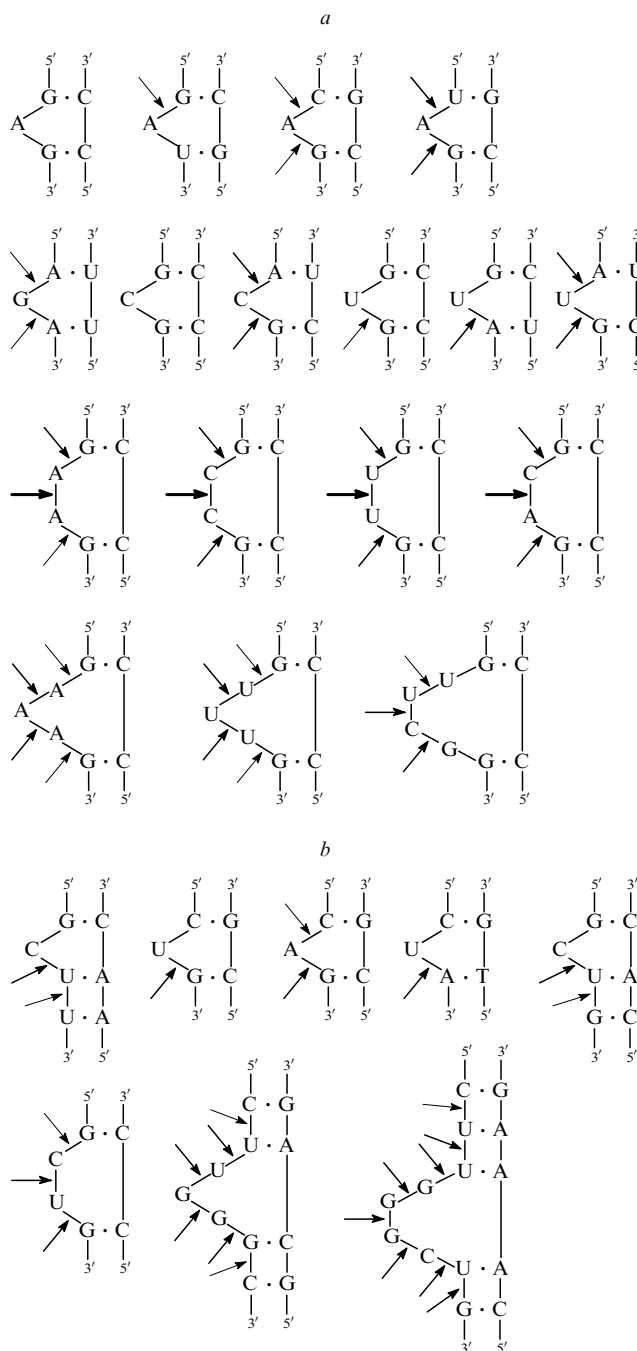


Рис. 7. Чувствительность фосфодиэфирных связей в боковых петлях РНК к расщеплению ионами свинца (а)⁶⁷ и ионами магния (б).⁶⁸ Толщина стрелки соответствует эффективности расщепления данной фосфодиэфирной связи.

родой и последовательностью нуклеотидов в петле, но и фланкирующими ее основаниями. Однозвенные аденин-содержащие петли, фланкированные G·C-парами с обеих сторон, не расщеплялись ионами Pb^{2+} . Замена пары G·C с 5'-стороны на пару U·A или U·G способствовала расщеплению фосфодиэфирной связи в петле. Этот факт авторы объясняют различиями в стэкинг-взаимодействиях выпетленного основания с фланкирующими его основаниями. Известно, что эффективность стэкинг-взаимодействий падает в ряду $Pu \cdot Pu > Py \cdot Pu > Py \cdot Py$,⁸⁰ причем основание, находящееся с 5'-стороны от петли, вносит наибольший вклад. В случае, если основание в петле находится в стэкинг-взаимодействии с соседними основаниями, фосфодиэфирные связи нуклеотида в петле принимают конфигурацию, подобную их конфигурации в двухцепочечной РНК, и становятся малочувствительными к расщеплению.

Все изученные олигорибонуклеотиды с двухзвенными боковыми петлями (AA, CC, UU и CA), расположенными между двумя G·C-парами оснований, подвергались расщеплению ионами Pb^{2+} , причем расщеплялись все три фосфодиэфирные связи в петле. Наиболее эффективно расщеплялась связь в середине петли. Такая же закономерность наблюдалась и для трехзвенных боковых петель. Чувствительность фосфодиэфирных связей в боковых петлях и в петлях шпильки, содержащих одинаковые последовательности нуклеотидов, к расщеплению ионами металлов сильно различается. Так, последовательность UUCG в составе апикальной петли шпильки стабильна и не подвергается расщеплению, в то время как в составе боковой петли она легко расщепляется ионами свинца.⁶⁷

В работе⁶⁸ изучена чувствительность фосфодиэфирных связей в боковых петлях РНК к расщеплению ионами магния. Образование боковых петель длиной в 1–4 нуклеотида в 5'-концевой области 132-звенной РНК индуцировали гибридизацией с олигодезоксирибонуклеотидами. Найдено, что ионы магния в концентрации $2.5 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ в слабощелочных растворах (рН 8.0) при 60°C способны расщеплять РНК по одноцепочечным участкам,⁶⁸ причем расщепляются все боковые петли в составе комплексов РНК·олигонуклеотид (рис. 7,б).

В однонуклеотидных боковых петлях расщепление происходит преимущественно по фосфодиэфирным связям с 3'-стороны от выпетленных нуклеотидов, тогда как расщепление тех же связей с 5'-стороны от выпетленных нуклеотидов менее эффективно. Появление сайтов вторичного расщепления с 5'-стороны от боковой петли авторы объяснили повышением подвижности выпетленного нуклеотида после завершения расщепления наиболее чувствительной связи (первичного расщепления). В тех случаях, когда с 3'-стороны боковую петлю фланкировали пары A·U(T), вторичные сайты расщепления наблюдались и в местах комплексообразования с олигодезоксирибонуклеотидом, что объясняется пониженной стабильностью гетеродуплекса с точечным разрывом.

В отличие от ионов свинца ионы магния расщепляли все однозвенные петли с одинаковой эффективностью независимо от типа основания в петле и фланкирующих его пар оснований. При увеличении длины искусственной петли до 2–4 нуклеотидов наряду с первичным расщеплением РНК по фосфодиэфирной связи с 3'-стороны петли наблюдалось также интенсивное расщепление аналогичной связи в двухцепочечном участке, прилегающем к петле с 5'-стороны. Следует отметить, что наряду с расщеплением фосфодиэфирных связей в искусственных боковых петлях проходило расщепление этих связей и во всех остальных одноцепочечных участках в составе 132-звенной РНК. Сравнение расщепления фосфодиэфирных связей РНК в боковых петлях с расщеплением в искусственных мисматчах показало, что в отличие от

боковых петель в случае мисматчей происходит индукция расщепления последовательностей, фланкирующих мисматч.⁶⁸

В работе⁸¹ изучено расщепление ионами цинка фосфодиэфирных связей в 1–5-звенных боковых петлях 2'-O-метилрибоолигонуклеотида, в котором только одно из звеньев не было модифицировано по 2'-положению. Поскольку 2'-O-метилрибоолигонуклеотиды не расщепляются по механизму трансэтерификации, использование таких модельных РНК позволило авторам проанализировать чувствительность каждой фосфодиэфирной связи в боковых петлях в отдельности. Наиболее эффективно расщеплялась фосфодиэфирная связь, образованная немодифицированным уридином (rU), который находился в центре пятизвенной боковой петли. Эта связь расщеплялась в два раза быстрее, чем аналогичная связь в составе полностью одноцепочечного олигорибонуклеотида. Четырех- и трехзвенные петли, содержащие рибоаденозин или рибоуридин в апикальной позиции, расщеплялись ионами цинка примерно с такой же скоростью. В случае одно- и двухзвенных боковых петель наблюдалось резкое падение скорости расщепления.

Компьютерное моделирование⁸¹ структуры олигорибонуклеотидов, содержащих боковые петли, показал, что пятизвенные петли с рибозеном, находящимся в апикальном положении или расположенным ближе к 5'-стороне петли, имеют одинаковую конформацию, в которой все нуклеотиды находятся внутри спирали. Аналогичную структуру имеют и двухзвенные петли. Скорости расщепления двух- и пятизвенной петли, в которой рибонуклеотид располагался ближе к 5'-концу, были соответственно в 3 и 6 раз ниже, чем скорость расщепления пятизвенной петли с рибозеном, находящимся в апикальном положении. Геометрические параметры фосфодиэфирных связей, полученные методами молекулярной динамики для всех типов петель, сильно отличались от параметров, характерных для линейной конфигурации этой связи.⁸¹ Авторы считают, что наиболее важной характеристикой, определяющей чувствительность фосфодиэфирных связей в петле к расщеплению, является их подвижность.

Из рассмотренного выше материала следует, что большинство боковых петель в РНК и РНК·ДНК-комплексах способны расщепляться ионами двухвалентных металлов, причем расщепление боковых петель отличается от расщепления мисматчей и апикальных петель шпильки. Расщепление боковых петель носит статистический характер: расщепляются фосфодиэфирные связи, расположенные с 3'-стороны (в некоторых случаях с 5'-стороны) от петли. Кроме того, расщеплению могут подвергаться некоторые фосфодиэфирные связи в РНК·ДНК-дуплексе, находящиеся вблизи боковой петли. Расщепление РНК по связям в боковых петлях в большинстве случаев не влияет на характер (полноту) расщепления фосфодиэфирных связей других участков РНК.

3. Расщепление искусственных боковых петель РНК конъюгатами олигонуклеотидов с комплексами металлов

Одним из перспективных подходов к избирательному повреждению выбранной РНК является ее расщепление под действием конъюгатов антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих РНК-расщепляющие группы. Первые конъюгаты с РНК-расщепляющей группой, ковалентно присоединенной к 5'-концу олигонуклеотида, были получены в середине 1990-х годов.^{82,83} Они расщепляли РНК-мишень по связям, расположенным в одноцепочечном участке с 3'-стороны от гетеродуплекса. Однако описанные в работах^{82,83} конъюгаты не могли расщеплять РНК в каталитическом режиме вследствие медленной диссоциации комплекса конъюгата с продуктом расщепления. Для расщепления

РНК в каталитическом режиме необходимо, чтобы комплекс РНК·конъюгат был стабильнее комплекса продукт расщепления·конъюгат. Другими словами, расщепление РНК должно происходить в составе дуплекса РНК·олигонуклеотид. Однако такой дуплекс является плохим субстратом для расщепления, так как в нем каталитическая (имидазол- или металлсодержащая) группа оказывается в области двухспиральной РНК.^{84–86}

Решением этой проблемы может стать создание в РНК искусственных боковых петель путем гибридизации с частично комплементарным олигонуклеотидом, содержащим РНК-расщепляющие группы. Впервые такой подход был осуществлен Ханером и сотр.⁸⁶ Они использовали олигодезоксирибонуклеотиды, которые содержали в середине последовательности тимидин, модифицированный макрокомплексом La^{3+} или Eu^{3+} (рис. 8,а). Такие конъюгаты при связывании с РНК индуцировали в ней формирование двухзвенных боковых петель AA или GA. При этом модифицированный тимидин, несущий металлокомплекс, располагался не точно напротив искусственной боковой петли в РНК-мишени, а на 4 нуклеотида ближе к 3'- или 5'-концу РНК, что позволяло РНК-расщепляющей группе приблизиться к выпетленным связям со стороны либо малой, либо большой бороздки дуплекса.

Конъюгаты олигонуклеотидов, комплементарные 32-звенной РНК-мишени (за исключением двух нуклеотидов, образующих боковую петлю в РНК), эффективно расщепляли фосфодиэфирные связи в этой петле и около нее (степень расщепления 92%, 16 ч), причем конъюгаты, содержащие комплекс Eu^{3+} (см. рис. 8,а), расщепляли РНК более эффективно, чем конъюгаты, содержащие комплекс La^{3+} .

Эксперименты показали, что наиболее выгодным является такое положение модифицированного нуклеозида, несущего РНК-расщепляющую группу, когда оно обеспечивает расщепление через малую бороздку гетеродуплекса.⁸⁶ Интересно, что конъюгат, в котором комплекс Eu^{3+} был ковалентно присоединен к 5'-концу олигонуклеотида, фор-

мирующего боковую петлю в РНК, также эффективно расщеплял РНК по фосфодиэфирным связям в боковой петле. Следует отметить, что в этом случае при связывании РНК с конъюгатом формировался свободный 10-звенный одноцепочечный участок в области 5'-конца конъюгата, который подвергался расщеплению в незначительной степени. В основном расщепление происходило по связям в области искусственной боковой петли. Приведенные данные показывают, что фосфодиэфирные связи в петле более чувствительны к расщеплению, чем фосфодиэфирные связи в других одноцепочечных фрагментах РНК. Это, по-видимому, связано с более выгодной для протекания реакций трансэтерификации конфигурацией фосфодиэфирных связей в боковой петле по сравнению с их конфигурацией в одноцепочечных участках РНК.

Расщепление РНК конъюгатом олигодезоксирибонуклеотида с комплексом Eu^{3+} протекало эффективно, однако реакция шла не в каталитическом режиме. Замена олигодезоксирибонуклеотида на 2'-метоксиэтоксильные производные, обладающие более высоким сродством к РНК, позволила уменьшить длину антисмыслового олигонуклеотида в два раза.⁸⁷ Конъюгат такого 10-звенного олигонуклеотида с комплексом Eu^{3+} расщеплял 23-звенную РНК-мишень в каталитическом режиме: одна молекула конъюгата была способна расщепить в физиологических условиях 39 молекул РНК за 64 ч.⁸⁸

К другому типу РНК-расщепляющих конъюгатов относятся олигонуклеотиды, в которых один нуклеотид модифицирован фенантролиновыми (рис. 8,б) или терпиридиновыми комплексами Cu^{2+} или Zn^{2+} . В работе⁸⁹ продемонстрирована возможность направленного расщепления РНК по фосфодиэфирной связи в искусственной однозвенной петле конъюгатами олигонуклеотидов, содержащих в качестве одного из звеньев сериол, модифицированный фенантролиновыми или терпиридиновыми комплексами Cu^{2+} . В отличие от конъюгатов, описанных в работе⁸⁶, в рассматриваемых конъюгатах комплексы металлов были

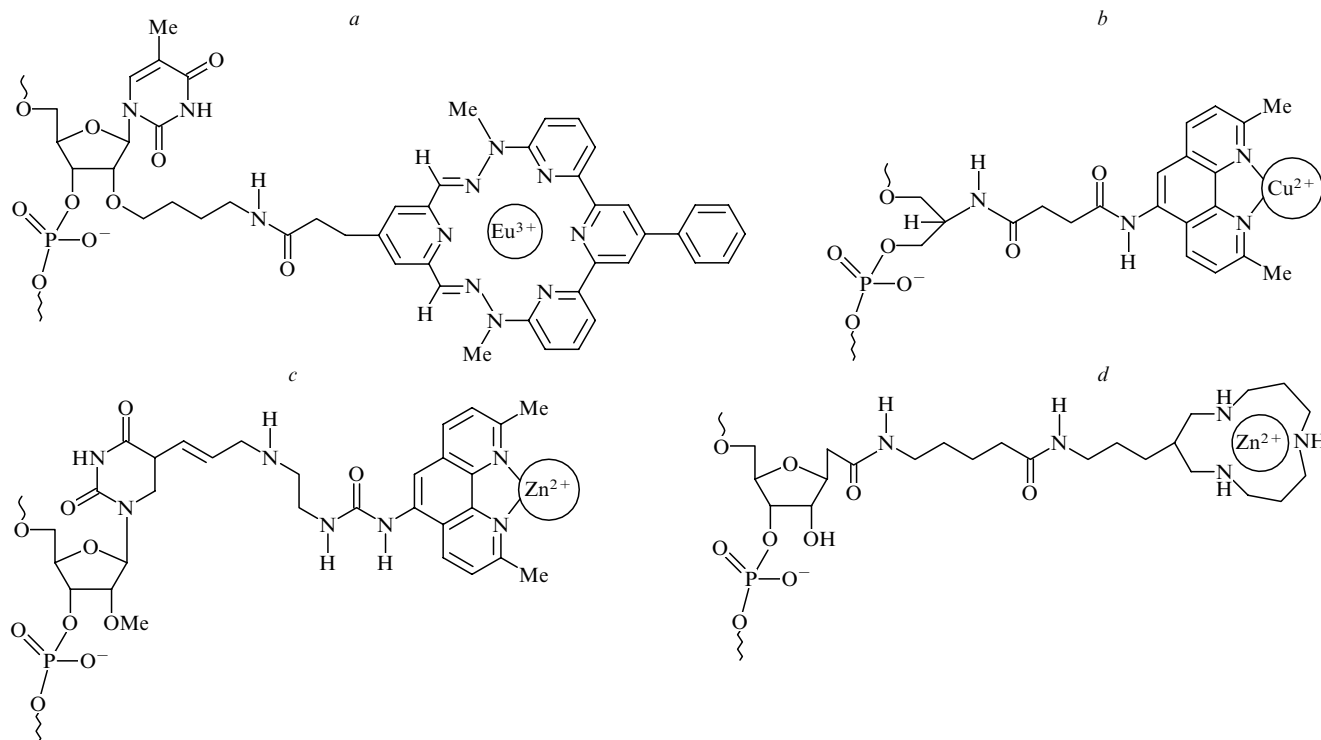


Рис. 8. Строение модифицированных нуклеотидных звеньев, содержащих РНК-расщепляющую группу.^{86, 89, 91, 92}

присоединены не к рибозе, а к ее аналогу (серинолу), встроенному в рибозофосфатный остов антисмыслового олигонуклеотида.⁸⁹ Такая ненуклеотидная вставка располагалась непосредственно напротив искусственной петли РНК. В зависимости от типа комплекса меди эффективность расщепления падала в ряду 2,9-диметил-*o*-фенантролиновый комплекс $\gg$ терпиридиновый комплекс $>$ *o*-фенантролиновый комплекс. В случае 2,9-диметил-*o*-фенантролинового комплекса степень направленного расщепления 159-звенной РНК достигала 80%. К сожалению, авторы не смогли перевести эту реакцию в каталитический режим: эффективное расщепление РНК наблюдалось лишь при 500-кратном избытке конъюгата по отношению к РНК-субстрату.

Стромберг с сотр.^{90,91} были синтезированы 2'-*O*-метилрибоолигонуклеотиды, содержащие в середине нуклеотидной последовательности модифицированный остаток уридина (рис. 8,с) или цитидина, несущий 2,9-диметилфенантролиновый комплекс цинка. Используемые олигорибонуклеотиды были комплементарны исследуемой РНК, за исключением нуклеотидов, входящих в состав боковых гомо-А-петель длиной от 1 до 5 нуклеотидов. Такие конъюгаты расщепляли РНК по фосфодиэфирным связям в боковых петлях длиной от 2 до 5 нуклеотидов в каталитическом режиме, при этом однозвенные петли не расщеплялись.

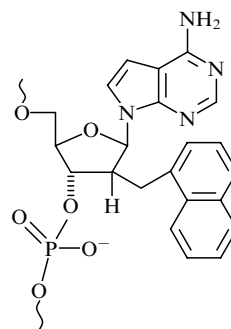
В отличие от конъюгатов олигонуклеотидов с макроциклическими комплексами Ln^{3+} , которые расщепляли РНК по фосфодиэфирным связям в петле и около нее, конъюгаты с комплексами цинка расщепляли РНК только по связям в петле.⁹⁰ Скорость реакции расщепления зависела от длины искусственной боковой петли и от способа присоединения 2,9-диметилфенантролинового комплекса Zn^{2+} к антисмысловому олигонуклеотиду. Наиболее эффективно расщеплялись четырехзвенные боковые АААА-петли, причем фосфодиэфирные связи между первыми тремя аденозинами расщеплялись значительно быстрее, чем последняя связь в петле.

Сравнение различных путей ковалентного присоединения 2,9-диметилфенантролинового комплекса цинка к гетероциклическим основаниям показало, что наиболее выгодным является присоединение по положению С(5) урацила (см. рис. 8,с). Такое расположение комплекса, по-видимому, дает возможность максимально приблизить ион Zn^{2+} к межузельным связям в петле. Для увеличения эффективности расщепления РНК был синтезирован конъюгат, который содержал два нуклеотида, модифицированных 2,9-диметилфенантролиновым комплексом Zn^{2+} , — в середине и на 5'-конце олигонуклеотидной цепи. К удивлению, наличие второй РНК-расщепляющей группы привело к резкому снижению степени расщепления РНК, что авторы объяснили стерическими факторами.⁹⁰

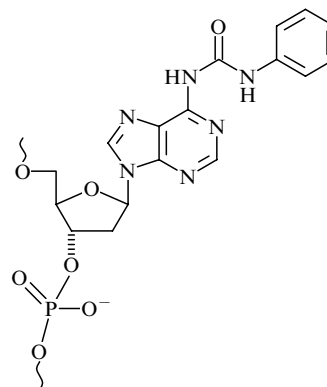
Конъюгаты олигонуклеотидов с фенантролиновыми комплексами цинка эффективно расщепляли РНК уже при 4-кратном избытке РНК по отношению к конъюгату. Однако ввиду слабого комплексообразования ионов Zn^{2+} с фенантролином для эффективного протекания реакции был необходим 25-кратный избыток ионов Zn^{2+} в реакционной смеси. Для того чтобы снизить концентрацию ионов Zn^{2+} в реакционной смеси, фенантролиновые комплексы цинка были заменены на комплексы макроциклических полиаминов, в частности, на 1,5,9-триазациклодец-3-ильные (аза-краун) комплексы цинка (рис. 8,д),⁹² которые в растворе в 4 раза стабильнее фенантролиновых комплексов. Такие конъюгаты также расщепляли олигорибонуклеотиды по фосфодиэфирным связям в искусственной боковой петле, однако скорость реакции была на порядок ниже, чем при использовании конъюгатов, содержащих фенантролиновые комплексы.

Стромберг и сотр.⁹³ выдвинули идею об использовании для расщепления РНК антисмысловых олигонуклеотидов,

несущих не только РНК-расщепляющую группу, но и группу, уменьшающую подвижность боковой петли РНК. Они обнаружили, что олигонуклеотиды, содержащие 2'-(1-нафтилметил)-2'-дезокситуберцидин, могут специфически стабилизировать искусственные боковые петли.



Другие авторы использовали производное аденозина, содержащее остаток фенолмочевины в положении 6 гетероциклического основания.⁹⁴



Такой модифицированный аденозин обладает повышенной способностью к стэкинг-взаимодействию с прилегающими основаниями спирали и по размерам соответствует комплементарной паре А·Т. Когда этот нуклеозид находится в дуплексе, он выталкивает расположенный напротив нуклеотид наружу из спирали. Фосфодиэфирные связи, расположенные с 3'- и 5'-сторон от таких вывернутых наружу нуклеотидов, расщепляются ионами магния с большей скоростью, чем фосфодиэфирные связи в однозвенной петле или мисматче. Конъюгаты, которые содержат одновременно и нуклеозиды (аденозин), несущие стабилизирующие петлю группы, и нуклеозиды, несущие РНК-расщепляющую группу, в настоящее время находятся в стадии разработки.

4. Расщепление боковых петель РНКазой А и искусственными РНКазами

Ранее было показано, что в физиологических условиях расщепление РНК эффективно проходит в присутствии небольших синтетических олигонуклеотидов, несущих РНК-расщепляющие группы. Такие олигонуклеотиды имитируют активные центры природных РНКаз.^{21,22,25} Наиболее простым РНК-расщепляющим соединением является имидазол, в концентрированных растворах которого (1 или 2 М) происходит статистическое расщепление РНК по фосфодиэфирным связям, находящимся в одноцепочечных участках.⁶⁹ Более сложные РНК-расщепляющие соединения (искусственные РНКазы, artificial ribonucleases, далее аРНКазы) обычно содержат РНК-связывающий фрагмент, которым может служить, например, интеркалятор, катионная структура или олигонуклеотид.^{21,22,24,95}

В работах^{96,97} была исследована чувствительность боковых петель РНК к имидазолу, РНКазе А и различным аРНКазам. В качестве РНК-мишени был использован 96-звенный фрагмент М2 РНК вируса гриппа, в котором боковые петли различной длины (от 1 до 7 нуклеотидов) и последовательности формировали с помощью гибридизации этого фрагмента РНК с частично комплементарными олигонуклеотидами (рис. 9), аналогично тому, как это было сделано в работе⁶⁸.

Авторы показали, что характер расщепления боковых петель РНК имидазолом аналогичен расщеплению ионами металлов: расщепляются все фосфодиэфирные связи в боковой петле, а также все связи в одноцепочечных участках РНК. Однако в отличие от расщепления РНК ионами магния в этом случае расщепления прилегающих к петле (< 5 звеньев) связей не наблюдалось. Расщепление РНК, содержащих более длинные боковые петли (длиной от 5 до 7 нуклеотидов), имидазолом проходило по фосфодиэфирным связям как в петле, так и в прилегающих участках. Возможно, это связано с тем, что комплексы олигонуклеотидов с РНК, содержащими короткие петли, более прочные, чем комплексы с РНК, содержащими более длинные петли. В последних РНК заметное время находятся в диссоциированном состоянии («дышащие» комплексы).⁹⁶

Природная РНКаз А расщепляет РНК по фосфодиэфирным связям во всех боковых петлях за исключением однозвенных. Кроме связей в боковых петлях расщеплению РНКазой А подвергаются связи и в других одноцепочечных участках РНК. Аналогичный характер расщепления наблюдался и для аРНКаз. При этом степень расщепления фосфодиэфирных связей в петле зависела от длины и нуклеотидной последовательности петли.

Для того чтобы оценить, насколько чувствительность фосфодиэфирных связей в искусственных боковых петлях отличается от чувствительности остальных фосфодиэфир-

ных связей, было введено понятие «селективность» — отношение степени расщепления РНК по связям в боковой петле к суммарной степени расщепления РНК по другим фосфодиэфирным связям в данном комплексе. Оказалось, что селективность расщепления зависит от типа аРНКазы. Природная РНКаз А расщепляет связи в боковых петлях РНК с низкой селективностью (не выше 0.1); другими словами, расщепление по связям в петле происходит с более низкой или сходной скоростью, что и по остальным расщепляемым фосфодиэфирным связям РНК.

Селективность расщепления РНК искусственными РНКазами, представляющими собой короткие катионные пептиды, также была невысокой.⁹⁷ Наибольшая селективность расщепления наблюдалась при использовании аРНКаз, содержащих остаток 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана.^{98,99} С максимальной селективностью (0.4) расщеплялась фосфодиэфирная связь между нуклеотидами СА, входящими в состав четырехзвенной петли. Расщепляемая фосфодиэфирная связь находилась в апикальном положении. Присутствие в петле второго мотива СА увеличивало селективность расщепления по фосфодиэфирным связям в петле до 0.5.

Интересно, что в комплексах РНК·олигонуклеотид, в которых олигонуклеотид содержал некомплементарный аденозин напротив боковой петли в РНК, селективность расщепления была всегда выше, чем в комплексах с олигонуклеотидами, не содержащими такого некомплементарного основания. Следует отметить, что связывание олигонуклеотидов, содержащих дополнительный аденозин, с РНК, согласно данным гель-шифт анализа, не отличалось от связывания олигонуклеотидов без некомплементарного аденозина.⁹⁶ Следовательно, повышенная селективность расщепления в этом случае может быть обусловлена более гибкой структурой петли, которая и определяет эффективность реакции трансэтерификации. Таким образом, искусственные рибонуклеазы, содержащие остаток 1,4-диазаби-

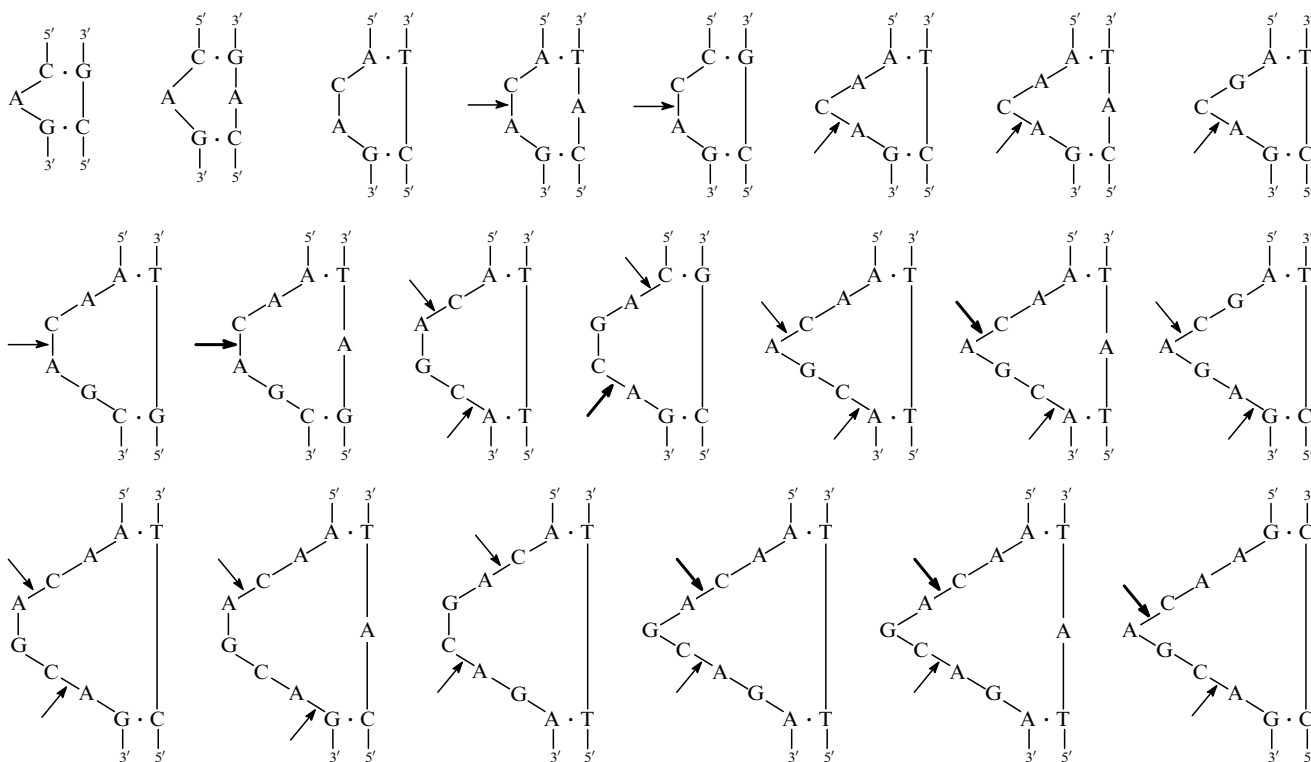


Рис. 9. Чувствительность фосфодиэфирных связей в боковых петлях РНК к расщеплению искусственными РНКазами (толщина стрелки соответствует эффективности расщепления данной фосфодиэфирной связи).^{96,97}

цикло[2.2.2]октана, в отличие от коротких катионных пептидов, предпочтительно расщепляют связи в петлях.

5. Расщепление боковых петель РНК искусственными РНКазами в присутствии ионов магния

Известно, что ионы Mg^{2+} стабилизируют структуру РНК, уменьшая ее подвижность,¹⁰⁰ что приводит к снижению эффективности расщепления РНК различными агентами. В то же время ионы магния стабилизируют такие структурные элементы РНК, как петли. При добавлении ионов магния суммарная степень расщепления М2-96 РНК искусственными РНКазами снижалась. Однако в присутствии 10 ммоль $\cdot$ л⁻¹ $MgCl_2$ комплексы РНК $\cdot$ олигонуклеотид расщеплялись аРНКазами, содержащими 1,4-дизабицикло[2.2.2]октан, преимущественно по связям в боковых петлях, в то время как расщепление по другим участкам в значительной степени подавлялось.^{96,97} Селективность расщепления четырех- и семизвенных петель возрастала в присутствии ионов магния до 0.68 и 0.75 соответственно, т.е. образование боковых петель в РНК полностью изменяло направленность ее расщепления аРНКазами, содержащими 1,4-дизабицикло[2.2.2]октан. Ни для РНКазы А, ни для коротких катионных пептидов не наблюдалось повышения селективности расщепления в присутствии ионов магния.⁹⁷

Эти данные коррелируют с данными РСА для однозвенной А-петли в составе дуплекса (r(GCG)d(ATATA)r(CGC))₂. Найдено, что в присутствии ионов Mg^{2+} фосфодиэфирная связь аденозина в петле принимает конфигурацию, близкую к линейной, в отличие от конфигурации, наблюдаемой в кристалле, полученном в присутствии спермидина.⁴¹ По-видимому, ионы Mg^{2+} способны стабилизировать линейную конфигурацию фосфодиэфирной связи в боковой петле, облегчающую протекание реакции трансэтерификации.

IV. Заключение

Идея создания специфических катализаторов расщепления РНК многие годы привлекает внимание специалистов. Теоретически установлено, что олигонуклеотиды, содержащие РНК-расщепляющие группы и способные формировать искусственные боковые петли в комплементарной им последовательности РНК, способны к селективной инактивации РНК в каталитическом режиме и не требуют участия в реакции дополнительных ферментов или кофакторов. Однако реализация этого подхода на практике оказалась сложной задачей. Чувствительность фосфодиэфирных связей в боковой петле зависит не только от ее размера и последовательности нуклеотидов, но и от типа РНК-расщепляющей группы. РНК-Расщепляющая группа должна не только быть эффективным катализатором расщепления, но и оптимально располагаться по отношению к расщепляемой связи. Одним из требований к олигонуклеотидной части конъюгата является то, что ДНК $\cdot$ РНК-комплекс должен быть достаточно прочным до расщепления и легко диссоциировать после расщепления. При переходе к длинным РНК эта задача осложняется поиском участков РНК, доступных для комплексообразования с олигонуклеотидом. Таким образом, создание эффективных искусственных РНКаз, направленно расщепляющих РНК, требует комплексного подхода.

На сегодняшний день существуют два основных подхода к направленному расщеплению РНК искусственными РНКазами. Первый основан на синтезе антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих РНК-расщепляющие группы (см. раздел III.3). Второй подход заключается в создании бинарных систем, состоящих из низкомолекулярной РНК-расщепляющей конструкции и комплементарного олигонуклеотида. Последний содержит группировку, повышаю-

щую чувствительность определенного участка или определенных связей РНК к расщеплению.^{96,97,101} Впервые направленное расщепление РНК с использованием такой системы было продемонстрировано на короткой 36-звенной модельной РНК, в которой все связи, за исключением той, которую расщепляли, были защищены комплексообразованием с комплементарным олигонуклеотидом.⁹³

Подход, предложенный в работе⁹⁶, основан на искусственном повышении чувствительности фосфодиэфирных связей РНК к расщеплению за счет их выпетливания. Исследования показали, что в присутствии ионов магния под действием аРНКаз в (4–7)-звенных боковых петлях, сформированных в РНК гибридизацией с частично комплементарным олигонуклеотидом, происходит избирательное расщепление фосфодиэфирных связей со скоростью, в несколько раз превышающей скорость расщепления этих связей в остальной части молекулы РНК. Селективное расщепление РНК происходит, по-видимому, вследствие создания в петле напряжения, необходимого для эффективного протекания реакции трансэтерификации, и стабилизации структуры остальной части молекулы РНК под действием ионов магния. Это делает молекулу РНК малочувствительной к расщеплению по всем связям, кроме связей в боковой петле.^{96,97} Таким образом, с помощью бинарной системы, состоящей из частично комплементарного РНК олигонуклеотида и аРНКазы, удалось достичь селективного расщепления РНК по фосфодиэфирным связям в боковых петлях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 05-04-49109), программ фундаментальных исследований Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология», «Фундаментальные науки — медицине», ФЦНТП (гранты РИ-012/001/254; РИ-19.0/001/826) и Сибирского отделения Российской академии наук (грант в поддержку молодых ученых), а также Фонда содействия отечественной науке (грант «Кандидаты наук РАН»).

Литература

1. R.T.Batey, R.P.Rambo, J.A.Doudna. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **38**, 2326 (1999)
2. J.D.Robertus, J.E.Ladner, J.T.Finch, D.Rhodes, R.S.Brown, B.F.Clark, A.Klug. *Nature (London)*, **250**, 546 (1974)
3. A.M.Pyle. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **7**, 679 (2002)
4. C.R.Woese, R.R.Gutell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3119 (1989)
5. K.Valegard, J.B.Murray, N.J.Stonehouse, S.van den Worm, P.G.Stockley, L.Liljas. *J. Mol. Biol.*, **270**, 724 (1997)
6. G.L.Olsen, T.E.Edwards, P.Deka, G.Varani, S.T.Sigurdsson, G.P.Drobny. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 3447 (2005)
7. S.Schmidt, L.Beigelman, A.Karpeisky, N.Usman, U.S.Sorensen, M.J.Gait. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 573 (1996)
8. T.Tanaka, T.Ando, S.Haga, Y.Kikuchi. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **68**, 1388 (2004)
9. B.Wimberly, G.Varani, I.Tinoco Jr. *Biochemistry*, **32**, 1078 (1993)
10. H.Moine, C.Cachia, E.Westhof, B.Ehresmann, C.Ehresmann. *RNA*, **3**, 255 (1997)
11. M.Schmitz, I.Tinoco Jr. *RNA*, **6**, 1212 (2000)
12. D.N.Frank, A.E.Ellington, N.R.Pace. *RNA*, **2**, 1179 (1996)
13. J.A.Ippolito, T.A.Steitz. *J. Mol. Biol.*, **295**, 711 (2000)
14. S.Iwai, C.Pritchard, D.A.Mann, J.Karn, M.J.Gait. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 6465 (1992)
15. J.D.Puglisi, R.Tan, B.J.Calnan, A.D.Frankel, J.R.Williamson. *Science*, **257**, 76 (1992)
16. C.C.Correll, A.Munishkin, Y.L.Chan, Z.Ren, I.G.Wool, T.A.Steitz. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13436 (1998)
17. Y.Xiong, M.Sundaralingam. *RNA*, **6**, 1316 (2000)
18. B.N.Trawick, A.T.Daniher, J.K.Bashkin. *Chem. Rev.*, **98**, 939 (1998)
19. J.R.Morrow. *Adv. Inorg. Biochem.*, **9**, 41 (1994)

20. K.Shinozuka, Y.Nakashima, K.Shimizu, H.Sawai. *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, **20**, 117 (2001)
21. M.A.Podyminogin, V.V.Vlassov, R.Giege. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5950 (1993)
22. M.Zenkova, N.Beloglazova, V.Sil'nikov, V.Vlassov, R.Giege. *Methods Enzymol.*, **341**, 468 (2001)
23. M.Perello, B.Barbier, A.Brack. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **38**, 154 (1991)
24. C.H.Tung, Z.Wei, M.J.Leibowitz, S.Stein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7114 (1992)
25. N.L.Mironova, D.V.Pyshnyi, E.M.Ivanova, M.A.Zenkova, H.J.Gross, V.V.Vlassov. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1928 (2004)
26. В.Зенгер. *Принципы структурной организации нуклеиновых кислот*. Мир, Москва, 1987
27. L.Joshua-Tor, F.Frolow, E.Appella, H.Hope, D.Rabinovich, J.L.Sussman. *J. Mol. Biol.*, **225**, 397 (1992)
28. C.Sudarsanakumar, Y.Xiong, M.Sundaralingam. *J. Mol. Biol.*, **299**, 103 (2000)
29. M.W.Kalnik, D.G.Norman, M.G.Zagorski, P.F.Swann, D.J.Patel. *Biochemistry*, **28**, 294 (1989)
30. M.A.Rosen, D.Live, D.J.Patel. *Biochemistry*, **31**, 4004 (1992)
31. U.Dornberger, A.Hillisch, F.A.Gollmick, H.Fritzsche, S.Diekman. *Biochemistry*, **38**, 12860 (1999)
32. A.Bhattacharyya, D.M.Lilley. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 6821 (1989)
33. D.M.Lilley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7140 (1995)
34. M.Zacharias, P.J.Hagerman. *J. Mol. Biol.*, **247**, 486 (1995)
35. T.Hermann, D.J.Patel. *Structure*, **8**, R47 (2000)
36. T.Hermann, D.J.Patel. *J. Mol. Biol.*, **294**, 829 (1999)
37. Y.T.van den Hoogen, A.A.van Beuzekom, E.de Vroom, G.A.van der Marel, J.H.van Boom, C.Altona. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 5013 (1988)
38. J.H.Cate, A.R.Gooding, E.Podell, K.Zhou, B.L.Golden, C.E.Kundrot, T.R.Cech, J.A.Doudna. *Science*, **273**, 1678 (1996)
39. B.L.Golden, A.R.Gooding, E.R.Podell, T.R.Cech. *Science*, **282**, 259 (1998)
40. S.H.van den Worm, N.J.Stonehouse, K.Valegard, J.B.Murray, C.Walton, K.Fridborg, P.G.Stockley, L.Liljas. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1345 (1998)
41. S.Portmann, S.Grimm, C.Workman, N.Usman, M.Egli. *Chem. Biol.*, **3**, 173 (1996)
42. J.S.Smith, E.P.Nikonowicz. *Biochemistry*, **37**, 13486 (1998)
43. P.N.Borer, Y.Lin, S.Wang, M.W.Roggenbuck, J.M.Gott, O.C.Uhlenbeck, I.Pelczar. *Biochemistry*, **34**, 6488 (1995)
44. L.Jiang, A.K.Suri, R.Fiala, D.J.Patel. *Chem. Biol.*, **4**, 35 (1997)
45. L.Varani, M.Hasegawa, M.G.Spillantini, M.J.Smith, J.R.Murrell, B.Ghetti, A.Klug, M.Goedert, G.Varani. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8229 (1999)
46. L.Joshua-Tor, D.Rabinovich, H.Hope, F.Frolow, E.Appella, J.L.Sussman. *Nature (London)*, **334**, 82 (1988)
47. V.Tereshko, S.T.Wallace, N.Usman, F.E.Wincott, M.Egli. *RNA*, **7**, 405 (2001)
48. W.D.Cornell, P.Cieplak, C.I.Bayley, I.R.Gould, K.M.Merz, D.M.Ferguson, D.C.Spellmeyer, T.Fox, J.W.Caldwell, P.A.Kollman. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5179 (1995)
49. M.Zacharias, H.Sklenar. *J. Mol. Biol.*, **289**, 261 (1999)
50. B.T.Wimberly, D.E.Brodersen, W.M.Clemons Jr., R.J.Morgan-Warren, A.P.Carter, C.Vonrhein, T.Hartsch, V.Ramakrishnan. *Nature (London)*, **407**, 327 (2000)
51. D.J.Klein, T.M.Schmeing, P.B.Moore, T.A.Steitz. *EMBO J.*, **20**, 4214 (2001)
52. K.Segerson, P.B.Moore. *RNA*, **4**, 1203 (1998)
53. A.A.Szewczak, P.B.Moore. *J. Mol. Biol.*, **247**, 81 (1995)
54. A.A.Szewczak, P.B.Moore, Y.L.Chang, I.G.Wool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9581 (1993)
55. Y.Xiong, J.Deng, C.Sudarsanakumar, M.Sundaralingam. *J. Mol. Biol.*, **313**, 573 (2001)
56. S.E.Butcher, F.H.Allain, J.Feigon. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 212 (1999)
57. O.Theunissen, F.Rudt, U.Guddat, H.Mentzel, T.Pieler. *Cell (Cambridge)*, **71**, 679 (1992)
58. J.R.Wyatt, I.Tinoco Jr. In *RNA Structural Elements and RNA Function. The RNA World*. (Eds R.F.Gesteland, J.F.Atkins). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1993. P. 465
59. K.J.Luecke, I.Tinoco Jr. *Biochemistry*, **35**, 11677 (1996)
60. J.A.Ippolito, T.A.Steitz. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9819 (1998)
61. J.H.Cate, R.L.Hanna, J.A.Doudna. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 553 (1997)
62. J.M.Ogle, D.E.Brodersen, W.M.Clemons Jr., M.J.Tarry, A.P.Carter, V.Ramakrishnan. *Science*, **292**, 897 (2001)
63. R.T.Raines. *Chem. Rev.*, **98**, 1045 (1998)
64. G.A.Soukup, R.R.Breaker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3584 (1999)
65. I.Zagorowska, S.Kuusela, H.Lonnberg. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3392 (1998)
66. H.Hosaka, I.Sakabe, K.Sakamoto, S.Yokoyama, H.Takaku. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20090 (1994)
67. J.Ciesiolka, D.Michalowski, J.Wrzesinski, J.Krajewski, W.J.Krzyszosiak. *J. Mol. Biol.*, **275**, 211 (1998)
68. D.Husken, G.Goodall, M.J.Blommers, W.Jahnke, J.Hall, R.Haner, H.E.Moser. *Biochemistry*, **35**, 16591 (1996)
69. K.Breslow, M.Labelle. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2655 (1986)
70. A.Bibillo, M.Figlerowicz, K.Ziomek, R.Kierzek. *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, **19**, 977 (2000)
71. G.L.Eichhorn. In *Inorganic Biochemistry. Vol. 2*. (Ed. G.L.Eichhorn). Elsevier, Amsterdam, 1973. P. 1210
72. *Органическая химия нуклеиновых кислот*. (Под ред. Н.К.Кочеткова, Э.Л.Будовского). Химия, Москва, 1970
73. D.W.Celander, T.R.Cech. *Biochemistry*, **29**, 1355 (1990)
74. C.E.Holmes, B.J.Carter, S.M.Hecht. *Biochemistry*, **32**, 4293 (1993)
75. J.Sumaoka, M.Yashiro, K.Komiyama. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1707 (1992)
76. S.A.Kazakov. In *Bioorganic Chemistry. Nucleic Acids. Pt. 1*. (Ed. S.M.Hecht). Oxford University Press, New York, 1995. P. 244
77. R.Breslow, D.-L.Huang. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4080 (1991)
78. W.R.Farkas. *Biochim. Biophys. Acta*, **155**, 401 (1968)
79. R.S.Brown, B.E.Hingerty, J.C.Dewan, A.Klug. *Nature (London)*, **303**, 543 (1983)
80. W.Saenger. *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag, New York, 1984
81. U.Kaukinen, L.Bieleki, S.Mikola, R.W.Adamiak, H.T.Lonnberg. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1024 (2001)
82. V.Vlassov, T.Abramova, T.Godovikova, R.Giege, V.Silnikov. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **7**, 39 (1997)
83. J.Hall, D.Husken, U.Pieles, H.E.Moser, R.Haner. *Chem. Biol.*, **1**, 185 (1994)
84. M.A.Reynolds, T.A.Beck, P.B.Say, D.A.Schwartz, B.P.Dwyer, W.J.Daily, M.M.Vaghefi, M.D.Metzler, R.E.Klem, L.J.Arnold. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 760 (1996)
85. K.Kolasa, J.Morrow, A.Sharma. *Inorg. Chem.*, **32**, 3983 (1993)
86. J.Hall, D.Husken, R.Haner. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3522 (1996)
87. A.De Mesmaeker, R.Haner, P.Martin, H.E.Moser. *Acc. Chem. Res.*, **28**, 366 (1995)
88. R.Haner, J.Hall, A.Pfutzer, D.Husken. *Pure Appl. Chem.*, **70**, 111 (1998)
89. W.C.Putnam, A.T.Daniher, B.N.Trawick, J.K.Bashkin. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2199 (2001)
90. H.Astrom, R.Stromberg. *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 1901 (2004)
91. H.Astrom, N.H.Williams, R.Stromberg. *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 1461 (2003)
92. T.Niittymaki, H.Lonnberg. *Bioconjugate Chem.*, **15**, 1275 (2004)
93. A.Madder, R.Ehrl, R.Stromberg. *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, **22**, 1289 (2003)
94. S.Nakano, Y.Uotani, K.Uenishi, M.Fujii, N.Sugimoto. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 518 (2005)
95. N.G.Beloglazova, M.M.Fabani, M.A.Zenkova, E.V.Bichenkova, N.N.Polushin, V.V.Sil'nikov, K.T.Douglas, V.V.Vlassov. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 3887 (2004)
96. I.L.Kuznetsova, M.A.Zenkova, H.J.Gross, V.V.Vlassov. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 1201 (2005)
97. И.Л.Кузнецова, М.А.Зенкова, В.В.Власов. *Изв. АН. Сер. хим.*, 1236 (2006)

98. N.Koval'ov, I.Kuznetsova, E.Burakova, V.Sil'nikov, M.Zenkova, V.Vlassov. *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, **23**, 977 (2004)
99. D.Konevets, I.Beck, N.Beloglazova, I.Sulimenkov, V.Sil'nikov, M.Zenkova, G.Shishkin, V.Vlassov. *Tetrahedron*, **55**, 503 (1999)
100. V.K.Misra, D.E.Draper. *Biopolymers*, **48**, 113 (1998)
101. A.Kuzuya, R.Mizoguchi, T.Sasayama, J.M.Zhou, M.Komiyama. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 1430 (2004)

RNA BULGES AS A TARGET FOR SELECTIVE CLEAVAGE BY METAL IONS AND ORGANIC COMPOUNDS

I.L.Kuznetsova, M.A.Zenkova, V.V.Vlassov

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

8, Prosp. Acad. Lavrentieva, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax +7(383)333–3677

The results of studies of the structure of RNA bulges are given. Cleavage of the phosphodiester bonds located in the bulges of RNA is considered. The attention is focused on the factors influencing the efficiency of this cleavage. The state-of-the-art of the problem of targeted RNA cleavage induced by various reagents is discussed.

Bibliography — 101 references.

Received 6th October 2006