

## Дослідження впливу іонних взаємодій на конформацію рибозиму, специфічного до *tat*-РНК ВІЛ-1, у розчині методом часткового нуклеазного гідролізу

О. Ю. Маркелова, Л. М. Бур'яновський, О. Е. Кітам, К. Ф. Краснова, А. Д. Швед

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

*Методом часткового нуклеазного гідролізу показано, що іонний склад середовища суттєво впливає на третинні взаємодії в молекулі рибозиму, змінюючи його просторову структуру.*

Рибозими — це каталітично активні РНК, які специфічно розщеплюють фосфодієфірний зв'язок в РНК-субстраті. На сьогодні рибозими вважаються перспективним інструментом регуляції експресії генів через їхню здатність селективно інактивувати РНК-мішені в різноманітних системах та в генній терапії. Ефективність рибозимів уже показано в низці експериментів з використанням клітинних моделей [1—4], проте необхідність вивчення перебігу реакції розщеплення в умовах *in vitro* залишається актуальною. Зважаючи на деякі дані літератури стосовно конформаційної динамічності каталітичного коду рибозимів [5], вивчення впливу іонної сили розчину, іонного складу, а також присутності полімерних молекул іонної і неіонної природи на конформацію рибозиму і, як наслідок, на його каталітичну активність, цікаве і з точки зору фундаментальних досліджень зв'язку між структурою та функцією РНК.

Для аналізу впливу іонних взаємодій на конформацію рибозиму використовували рибозим, специфічний до *tat*-РНК ВІЛ-1 (рис. 1), який синтезували за допомогою РНК-полімерази фага T7 методом «*run-off*»-транскрипції плазміди *pGEM4Z-Rz* лінеаризованої рестриктазою *SalI* з наступним очищенням у 10 %-му ПААГ з 7 М сечовиною.

Очищену РНК мітили  $^{32}\text{P}$  за 5'-кінцем. У реакційну суміш додавали 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 100 мМ  $\text{KCl}$ , 2 мМ спермідин, 2 %-й поліетиленгліколь та 50 мМ оцтовокислий амоній. Частковий гідроліз проводили відкаліброваними препаратами рибонуклеаз  $T_1$ ,  $S_1$ , РНКазі А, РНКазі CV. Продукти нуклеазного гідролізу після електрофорезу виявляли як окремі смуги в агарозному гелі.

Найвиразніші результати одержали від гідролізу РНКазою  $T_1$ , які показали, що іони калію, магнію, полікатіону спермідину поодиноці і разом ніяк не змінювали профіль РНКазного гідролізу рибозиму, тобто не впливали на його конформацію (рис. 2). У дослідженнях з використанням техніки захисту від  $T_1$ -рибонуклеазного гідролізу показано [5], що дивалентні катіони  $\text{Mg}^{2+}$  або  $\text{Ca}^{2+}$  підвищували взаємодію пар основ у молекулах рибозимів, які забезпечують сплайсинг перед-мРНК, проте неоднаково діяли на конформаційні зміни двох різних зразків рибозимів даного типу. Отже, не дивно, що в наших експериментах ці катіони не впливали на профіль нуклеазного гідролізу рибозиму типу «голівка молотка», який за структурою відрізняється значно більше від згаданих зразків рибозимів типу інтронів групи I, ніж вони між собою.

Присутність іонів амонію в середовищі спричинювала появу нових сайтів атаки РНКазі  $T_1$  біля нуклеотидів  $G_{16}$ ,  $G_{22}$ , а сайти  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_3$ ,  $G_5$ ,  $G_{10}$ .



Е. Ю. Маркелова, Л. Н. Бурьяновский, О. Э. Китам,  
Е. Ф. Краснова, А. Д. Швед

Исследование влияния ионных взаимодействий на  
конформацию рибозима, специфичного к *tat*-РНК ВИЧ-1,  
в растворе методом частичного нуклеазного гидролиза

Резюме

Методом частичного нуклеазного гидролиза рибозима показано,  
что ионный состав среды существенно влияет на третичные  
взаимодействия в молекуле рибозима, изменяя его про-  
странственную структуру.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Jackson W. H., Jr., Moscoso H., Nechtman J. F., Galileo D. S., Garver F. A. Inhibition of HIV-1 replication by an anti-*tat* hammerhead ribozyme // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1998.—245.—P. 81—84.
2. Michienzi A., Conti L., Varano B., Prislei S., Gessani S., Bozzoni I. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by nuclear chimeric anti-HIV ribozymes in a human T lymphoblastoid cell line // *Hum. Gene Ther.*—1998.—9.—P. 621—628.
3. Trang P., Lee M., Nepomuceno E., Kim J., Zhu H., Liu F. Effective inhibition of human cytomegalovirus gene expression and replication by a ribozyme derived from the catalytic RNA subunit of RNase P from *Escherichia coli* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—97.—P. 5812—5817.
4. Michienzi A., Cagnon L., Bahner I., Rossi J. J. Ribozyme-mediated inhibition of HIV-1 suggests nucleolar trafficking of HIV-1 RNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—97.—P. 8955—8960.
5. Zhang Yi., Leibowitz M. J. Folding of the group I intron ribozyme from the 26S rRNA gene of *Candida albicans* // *Nucl. Acids Res.*—2001.—29.—P. 2644—2653.
6. Wang Y.-X., Lu M., Draper D. E. Specific ammonium ion requirement for functional ribosomal RNA tertiary structure // *Biochemistry.*—1993.—32.—P. 12279—12282.
7. Бурьяновский Л. Н. Влияние pH, ионной силы и ионного состава реакционной среды на эффективность расщепления *in vitro* *tat*-РНК ВИЧ-1 рибозимом модели «головка молотка» // *Биополимеры и клетка.*—1997.—13, № 1.—С. 30—35.
8. Маркелова Е. Ю., Бурьяновский Л. Н., Китам О. Э., Краснова Е. Ф., Швед А. Д. Влияние ионного состава реакционной среды на образование комплекса и расщепление короткого транскрипта *tat*-РНК ВИЧ-1 рибозимом модели «головка молотка» // *Биополимери і клітина.*—2002.—18, № 4.—С. 301—306.
9. Heus H. A., Uhlenbeck O. C., Pardi A. Sequence-dependent structural variations of hammerhead RNA enzymes // *Nucl. Acids Res.*—1990.—18.—P. 1103—1108.
10. Woisard A., Fourrey J.-L., Favre A. Multiple folded conformations of a hammerhead ribozyme domain under cleavage conditions // *J. Mol. Biol.*—1994.—239.—P. 366—370.

УДК 577.214.3, 577.113.4  
Надійшла до редакції 30.01.02