

## СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

### Специфическая деструкция *tat*-РНК ВИЧ-1 *in vitro* с помощью каталитически активного полирибонуклеотида (рибозима)

Л. Н. Бурьяновский\*, А. Д. Швед

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
252143 Киев, ул. Академика Заболотного, 150

---

*Представлены данные по расщеплению *tat*-РНК ВИЧ-1 *in vitro* с помощью рибозима модели «головка молотка». Описываемый рибозим проявлял магний-зависимую каталитическую активность только в присутствии моновалентных катионов и полиаминов.*

---

**Введение.** Рибозимы представляют собой молекулы РНК, обладающие разнообразными каталитическими активностями и, в частности, способностью разрывать фосфодиэфирную связь в молекулах РНК-субстрата [1]. Первоначально молекулы РНК с такими свойствами были обнаружены в составе небольших сателлитных и виroidных РНК растений [2]. Впоследствии была продемонстрирована возможность разделения субстратной и каталитически активной частей рибозима на две полирибонуклеотидные цепи и способность такого «искусственного» рибозима к межмолекулярному (*in trans*) разрезанию РНК-субстрата [3]. Анализ вероятной вторичной структуры позволил авторам работы [4] создать модель рибозима «головка молотка», универсальность и эффективность которой нашли убедительное подтверждение в модельных экспериментах *in vitro*. Эта работа послужила основанием для многочисленных исследований по практическому применению рибозимов для подавления экспрессии различных генов *in vitro* и *in vivo*. Несомненный интерес представляла перспектива использования рибозимов в качестве антивирусного агента. Так, в нескольких работах была показана возможность рибозим-опосредованного подавления репродукции вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в различных культурах клеток человека [5, 6]. Не всегда, однако, использование рибозима было эффективно [7], что указывает на необходимость дальнейших фундаментальных исследований в этой области.

В настоящей работе представлены данные по специфической деструкции *tat*-РНК вируса ВИЧ-1 с помощью синтетического рибозима по модели «головка молотка» в системе *in vitro*. Показана биологическая активность рибозима в физиологических условиях.

**Материалы и методы.** Ферменты для клонирования получены от фирмы

---

\*Correspondence address.

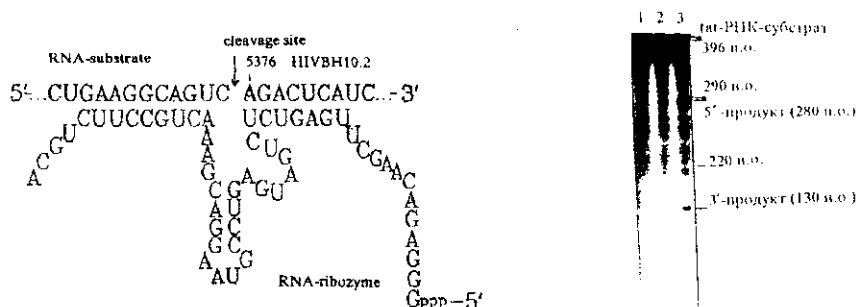


Рис. 1. Фрагмент *tat*-РНК у сайта расщепления и последовательность рибозимной РНК

Рис. 2. Анализ продуктов расщепления *tat*-РНК рибозимом в денатурирующем 6 %-м полиакриламидном геле: 1 — инкубация *tat*-РНК в отсутствие рибозима; 2 — инкубация *tat*-РНК с рибозимом при добавлении 125 мМ калия ацетата; 3 — то же при добавлении 200 мМ калия ацетата и 2 мМ спермидина. Положения маркерных фрагментов, РНК-субстрата и продуктов реакции указаны справа

«Ферментас МБИ» (Вильнюс, Литва). РНК-полимераза фага Т7 выделена в нашей лаборатории из штамма-продуцента HMS-174, содержащего плазмиду *pAR1219* [8], по оригинальной методике. Дезоксиолигонуклеотиды, соответствующие последовательности рибозима (рис. 1), синтезированы на ДНК-синтезаторе DNA Assembler Special фирмы «Фармация» (Швеция). После очистки в 15 %-м денатурирующем полиакриламидном геле и гибридизации полученный дезоксиолигонуклеотидный дуплекс клонировали в транскрипционном векторе *pGEM-4Z* (Promega) по сайтам *HindIII* и *PstI*. Фрагмент *tat*-гена размером 384 пары нуклеотидов (п. н.), полученный в результате рестрикции плазмиды *pBH10* [9] эндонуклеазами *EcoRI* и *Eco47.I*, клонировали в векторе *pGEM-3Z* по сайтам *EcoRI* и *SmaI*.

Препаративную транскрипцию линейаризованных ДНК-матриц проводили в 100 мкл реакционной смеси следующего состава: 40 мМ трис-НСl, рН 7,5, 6 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ каждого рибонуклеотидтрифосфата (АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ), 50 мкКи <sup>32</sup>P- $\alpha$ -АТФ, 10 мМ дитиотреитол, 10 мМ NaCl, 5 мкг плазмидной ДНК-матрицы и 10 мкг РНК-полимеразы фага Т7. Реакцию осуществляли в течение 90 мин при 34 °С и останавливали добавлением равного объема фенола. РНК-транскрипт осаждали добавлением 2 М аммония ацетата и 2,5 объема этанола.

Каталитическую активность рибозима проверяли в 10 мкл реакционной смеси следующего состава: 40 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мкМ РНК-субстрат, 8 мкМ рибозимной РНК, калия ацетат и спермидин, как указано в подписи к рис. 2. Перед добавлением MgCl<sub>2</sub> реакционную смесь прогревали в течение 2 мин при 80 °С, охлаждали на льду и после добавления MgCl<sub>2</sub> инкубировали при 34 °С (60 мин). Реакцию останавливали добавлением 5 мкл смеси 90 %-го формамида, 30 мМ ЭДТА и 0,02 %-го ксиленицианола. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 6 %-м полиакриламидном геле, содержащем 8 М мочевины и 0,09 М трис-боратный буфер. Авторадиографию осуществляли при -70 °С. Активность рибозима определяли, измеряя черенковское излучение продуктов реакции, вырезанных из геля.

Результаты и обсуждение Мы сконструировали рибозим, специфичный к участку первого экспрессирующегося экзона *tat*-РНК (точка расщепления соответствует позиции 5375 п. н. последовательности ВИЧ-1 изолята ВН

10,2 [9] ), основываясь на модели «головка молотка» (рис. 1). Выбор конкретной модели обусловлен, во-первых, небольшими размерами рибозимных РНК этого типа и, следовательно, требуемых синтетических дезоксиолигонуклеотидов и, во-вторых, тем, что эта модель наиболее широко опробована в системах *in vitro* и *in vivo* [10, 11]. За некоторыми исключениями, эта модель рибозима успешно функционировала с различной степенью эффективности в экспериментах по деструкции РНК-мишеней и супрессии разнообразных генов [12—14]. Тем не менее, нам не удалось выявить каталитической активности сконструированного рибозима в реакционных условиях, характерных для рибозимов этого типа: 50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, температура 45—50 °С, 60 мин, при эквиволярном соотношении РНК-субстрата и рибозима. Более того, продукты реакции не обнаруживались в этих условиях даже при существенном увеличении длительности инкубации (2 ч при 50 °С или 14 ч при 34 °С). Отсутствие каталитической активности рибозима могло быть обусловлено, в частности, тем, что последовательность рибозима, комплементарная субстратной РНК (рис. 1), — в сумме она составляла 16 п. н. — была слишком коротка для поддержания комплементарной структуры при повышенных температурах. Однако ни при 34, ни при 20 °С нам не удалось выявить каталитическую активность рибозима в указанных реакционных условиях.

Добавление в реакционную смесь моновалентных катионов (калия хлорида, калия ацетата) в физиологических концентрациях (100—300 мМ) приводило к активизации каталитической способности рибозима, и при восьмикратном избытке рибозимной РНК по отношению к РНК-субстрату эффективность реакции составляла около 10 % (рис. 2, дорожка 2). Добавление спермидина в концентрациях 1—5 мМ при тех же условиях давало тот же результат. Совместное добавление в реакционную смесь моновалентных катионов и спермидина удваивало эффективность реакции (рис. 2, дорожка 3). При этом около 20 % исходной субстратной *tat*-РНК переходило в продукты реакции: 5'-фрагмент размером 280 н. о. и 3'-фрагмент размером 116 н. о.

Таким образом, сконструированный нами рибозим проявлял каталитическую активность при физиологических условиях (рН, ионная сила, температура, присутствие полиаминов), хотя эффективность реакции была все же невелика даже в условиях восьмикратного избытка рибозима.

Работа финансировалась из Государственного фонда фундаментальных исследований при ГКНТ Украины, регистрационный № 5.3/189.

*Л. М. Бур'яновський, А. Д. Швед*

Специфічна деструкція *tat*-РНК ВІЛ-1 *in vitro* за допомогою каталітично активного полірибонуклеотиду (рибозима)

Резюме

*Наведено дані стосовно розщеплення *tat*-РНК ВІЛ-1 *in vitro* за допомогою рибозима моделі «головка молотка». Згаданий рибозим виявляв магній-залежну каталітичну активність лише у присутності моновалентних катіонів поліамінів.*

*L. N. Buryanovsky, A. D. Schved*

*In vitro* specific cleavage of HIV-1 *tat*-RNA by catalytically active polyribonucleotide, ribozyme

Summary

*The hammerhead type ribozyme-mediated cleavage of *tat*-RNA of human immunodeficiency virus type 1 data are presented. The ribozyme activity was appeared in magnesium-dependent manner at moderate temperature in the presence of monovalent cations and/or polyamines.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cech T. R. The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes // *Science*.—1987.—236, N 4808.—P. 1532—1539.
2. Hutchins C. J., Rathjen P. D., Foster A. C., Symons R. H. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid // *Nucl. Acids Res.*—1986.—14, N 9.—P. 3627—3640.
3. Uhlenbeck O. C. A small catalytic oligoribonucleotide // *Nature*.—1987.—328, N 6131.—P. 596—600.
4. Haseloff J., Gerlach W. L. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities // *Ibid.*—1988.—334, N 6831.—P. 585—591.
5. Chen Ch.-J., Banerjee A. C., Harmison G. G. et al. Multitarget-ribozyme directed to cleave at up to nine highly conserved HIV-1 env RNA regions inhibits HIV-1 replication potential effectiveness against most presently sequenced HIV-1 isolates // *Nucl. Acids Res.*—1992.—20, N 17.—P. 4581—4589.
6. Sun L. Q., Warrylow D., Wang L. et al. Ribozyme-mediated suppression of Moloney murine leukemia virus and human immunodeficiency virus type 1 replication in permissive cell lines // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1994.—91, N 21.—P. 9715—9719.
7. Stevelo K. M. Inhibition of replication of HIV-1 by retroviral vectors expressing *tat*-antisense and anti-*tat*-ribozyme RNA // *Virology*.—1992.—190, N 1.—P. 176—183.
8. Davanloo P., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Studier F. W. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase // *Ibid.*—1984.—81.—P. 2035—2039.
9. Ratner L., Haseltine W., Patarca R. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III // *Nature*.—1985.—313.—P. 277—284.
10. Bratty J., Chartrand P., Ferbeyre G., Cedergren R. The hammerhead RNA domain, a model ribozyme // *Biochim. et biophys. acta*.—1993.—N 1216.—P. 345—359.
11. Bertrand E., Pictet R., Grange T. Can hammerhead ribozymes be efficient tools to inactivate gene function? // *Nucl. Acids Res.*—1994.—22, N 3.—P. 293—300.
12. Steinecke P., Herget T., Schreier P. H. Expression of chimeric ribozyme gene results in endonucleolytic cleavage of target mRNA and a concomitant reduction of gene expression *in vivo* // *The EMBO J.*—1992.—11, N 4.—P. 1525—1530.
13. Sioud M., Forre O. Prefomed ribozyme destroys tumor necrosis factor mRNA in human cells // *J. Mol. Biol.*—1991.—223, N 4.—P. 831—835.
14. Ha J., Kim K. H. Inhibition of fatty acid synthesis by expression of an acetyl-CoA carboxylase-specific ribozyme gene // *Proc. Nat. Acad. Sci.*—1994.—91, N 21.—P. 9951—9955.