

Влияние рН, ионной силы и ионного состава реакционной среды на эффективность расщепления *in vitro* *tat*-РНК ВИЧ-1 рибозимом модели «головка молотка»

Л. Н. Бурьяновский

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

*Рибозимы модели «головка молотка», как и другие типы рибозимов, являются металлоэнзимами, каталитическая активность которых зависит от наличия ионов двухвалентных металлов в среде. Но если влияние двухвалентных ионов металлов на реакцию расщепления субстрата рибозимом хорошо изучено, то влияние моновалентных катионов не исследовалось хоть сколько-нибудь систематически. В данной работе изучалось влияние моновалентных катионов (H^+ , K^+ , Li^+ , NH_4^+), а также ионов буферной среды на эффективность расщепления *in vitro* *tat*-РНК ВИЧ-1 рибозимом типа «головка молотка». рН-зависимость эффективности реакции имела колоколообразную форму с оптимумом рН 7,0. Ионы K^+ и Li^+ в концентрации 0,1 М стимулировали, а в концентрациях выше 0,2 М — снижали эффективность расщепления. При 0,8 М реакция подавлялась практически полностью. Ионы NH_4^+ оказывали ингибирующее действие при всех исследованных концентрациях. Представленные данные, на взгляд автора, свидетельствуют о специфичности взаимодействий моновалентных катионов с рибозимной РНК, способствующих, или, напротив, препятствующих предпочтительному образованию активной конформации «головки молотка».*

Введение. Рибозимы модели «головка молотка» характеризуются тремя основными структурными особенностями: наличием, во-первых, трех двухцепочечных стеблей; во-вторых, внутреннего одноцепочечного участка и, наконец, в-третьих, 13 консервативных нуклеотидных остатков в составе указанных элементов [1]. Эти детали в совокупности образуют высокоспецифичную структуру, служащую каталитическим центром, способным, подобно каталитическим центрам белковых ферментов, снижать энергию активации в реакции гидролитического расщепления фосфодиэфирной связи в молекуле РНК-субстрата. Полианионная природа молекул РНК, имеющих к тому же в составе оснований множество групп, способных к ионизации, резко отличает РНК-опосредованный катализ от белкового (ферментативного в традиционном значении). К настоящему времени кинетика расщепления субстратной РНК рибозимом типа «головка

молотка» детально исследована [2—4]. Однако в этих работах кинетический анализ проводили с использованием очень коротких РНК-субстратов, тогда как известно, что эффективность расщепления сильно зависит от размера субстрата [5, 6]. Принимая во внимание важное значение ионов одновалентных металлов как в поддержании той или иной конформации, так и в модуляции силы комплементарного взаимодействия нуклеиновых кислот, предпринята попытка качественно охарактеризовать зависимость эффективности расщепления *tat*-РНК рибозимом, описанным ранее [7, 8], от ионной силы и ионного состава раствора. Определена также зависимость каталитической активности от рН.

Материалы и методы. Клонирование ДНК-фрагментов *tat*-гена и рибозима, получение *tat*-РНК-субстрата и рибозима в реакции транскрипции *in vitro*, а также РНК-полимеразы фага Т7 описаны нами ранее [7]. Реакцию расщепления *tat*-РНК рибозимом проводили в 10 мкл реакцион-

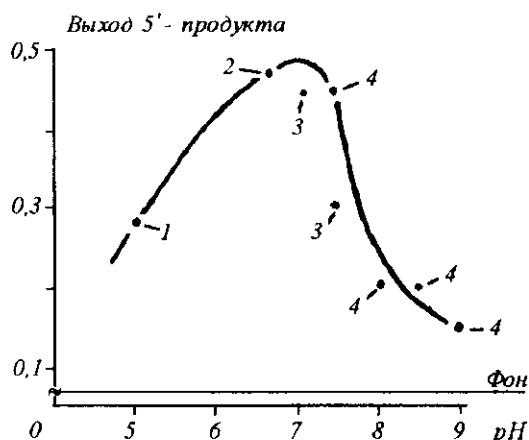


Рис. 1. Зависимость эффективности расщепления *tat*-РНК рибозимом *in vitro* от pH: 1 — 33 мМ Na-цитратный буфер, pH 5,0; 2 — 50 мМ имидазол-HCl, pH 6,6; 3 — 50 мМ K-фосфатный буфер, pH 7,0 и 7,4; 4 — 50 мМ трис-HCl, pH 7,4, 8,0 и 8,5. Реакцию проводили в течение 100 мин при 34 °C

ной смеси, содержащей: 50 мМ трис-HCl, pH 7,4 (при 20 °C), 10 мМ уксуснокислый магний, 2 мМ спермидин, 100 мМ KCl, 0,5 мкМ РНК-субстрат и 22 мкМ рибозим. Концентрацию образцов РНК определяли спектрофотометрически по поглощению при 260 нм. Дополнительные компоненты вносили в реакцию в концентрациях, указанных в подписях к рисункам. Реакцию проводили в течение 2 или 3 ч при температуре 25 °C либо как указано в подписях к рисункам. По истечении этого времени к пробам добавляли по 5 мкл смеси, содержащей 92 %-й формамид, 40 мМ ЭДТА, 0,02 %-й ксилोलцианол и 0,02 %-й бромфеноловый синий. Аликвоты по 5 мкл после прогрева при 80 °C (1 мин) наносили на 5 %-й полиакриламидный гель, содержащий 7 М мочевины, 20 %-й формамид и 40 мМ трис-боратный буфер, pH 8,3. По окончании электрофореза гель переносили на бумагу ватман 3М, сушили и проводили автордиографию на рентгеновскую пленку РМ-1. Об эффективности реакции судили по накоплению 5'-продукта расщепления *tat*-РНК (фрагмент 280 нуклеотидов), количество которого определяли сканированием автордиограмм на лазерном денситометре UltraScan XL («LKB», Швеция). 3'-продукт (фрагмент 110 нуклеотидов) не учитывали, поскольку в отсутствие надежного маркера и из-за слабого сигнала не всегда представлялось возможным идентифицировать соответствующую полосу на радиоавтографе.

Результаты и обсуждение. Концентрация ио-

нов водорода существенно влияет на каталитическую активность множества ферментов. А так как структурные основы строения белков-ферментов и нуклеиновых кислот сильно различаются, представляло интерес определить характер pH-зависимости эффективности расщепления *tat*-РНК, достаточно протяженного субстрата, рибозимом модели «головка молотка».

Зависимость каталитической активности рибозима от концентрации ионов водорода, pH, представлена на рис. 1. Как видно, максимальная эффективность реакции наблюдалась при нейтральных значениях pH 7,0—7,2. При увеличении значения pH на одну единицу эффективность реакции снижалась вдвое. Дальнейшее увеличение pH до значения 9,0 еще несколько снижало эффективность реакции и, кроме того, субстратная РНК становилась более подверженной неспецифическому гидролизу. Такое снижение эффективности реакции находится в противоречии с хорошо установленным фактом линейного увеличения скорости реакции расщепления субстрата рибозимом типа «головка молотка» в интервале pH от 5,5 до 9,0 [9, 10]. Поскольку мы не проводили анализа кинетики расщепления *tat*-РНК и не располагаем значениями соответствующих коэффициентов, трудно сказать, какая именно из стадий реакции — ассоциация/диссоциация субстрата, рибозима и продуктов или же стадия химического расщепления — обуславливает указанное противоречие. Исходя из того, что мы проводили реакцию в условиях значительного избытка рибозима над субстратной РНК (приблизительно 40/1), т. е. по однооборотному механизму, можно допустить, что стадии ассоциации/диссоциации не могли быть лимитирующими факторами. Таким образом, остается предположить, что снижение эффективности реакции при слабощелочных значениях pH могло быть связано с конформационными перестройками РНК-субстрата. Это отчасти подтверждается тем обстоятельством, что в работах [9, 10] были использованы очень короткие — 24 и 12 нуклеотидов — субстраты, не способные к образованию вторичных структур, тогда как в данном случае субстратная РНК имела размер 390 нуклеотидов и, естественно, сложную трехмерную структуру. Конформационные изменения протяженного РНК-субстрата, обусловленные дефицитом протонов с ростом pH, возможно, могли бы быть причиной снижения эффективности реакции.

Понижение pH ниже нейтрального значения не так резко сказывалось на эффективности реакции. При pH 5,0 эффективность реакции была вдвое ниже по сравнению с уровнем эффективности при

pH 7,0. Если же принять во внимание ощутимую хелатирующую способность использованного в данном случае цитратного буфера и связанное с этим неизбежное снижение концентрации Mg^{2+} , которое мы никак не компенсировали, можно предположить, что реальная каталитическая активность рибозима при pH 5,0 могла быть даже выше установленного значения. Примечательными являются результаты реакций, проводившихся при pH 6,6 и 7,0. В первом случае в качестве буферного раствора использовали 50 мМ имидазол-HCl, pH 6,6. Известно, что имидазольные кольца гистидина-12 и гистидина-119 играют ключевую роль в гидролизе РНК рибонуклеазой А [11]. Показано также, что имидазольный буфер катализирует расщепление РНК, в частности, полиуридиловой кислоты [12]. Действительно, как видно из рис. 1, эффективность расщепления субстрата в данном буфере несколько выше ожидаемой для данного значения pH. Возможно, это как раз и объясняется некоторым влиянием природы буфера. Отсутствие же следов неспецифической дегградации субстратной РНК свидетельствует о том, что этот процесс протекает весьма слабо при низкой концентрации имидазола и не может интерферировать с каталитической активностью рибозима.

Использование калий-фосфатного буфера для реакций, проводившихся при pH 7,0 и 7,4, также имело целью помимо определения уровня каталитической активности при указанных значениях pH еще и выявление возможного влияния ионов самой буферной системы на протекание реакции. Традиционно используемый трис-буфер содержит первичный амин, являющийся нуклеофилом, который теоретически мог бы участвовать в реакции гидролиза фосфодиэфирной связи и, таким образом, влиять на каталитическую активность рибозима. С использованием фосфатного буфера из реакционной среды устранялось основное количество аминных групп (оставшийся полиамин спермидин не мог быть удален без потери активности рибозима, но его концентрация была существенно ниже концентрации буфера). С другой стороны, в 50 мМ фосфатном буфере все ионы Mg^{2+} должны переходить в нерастворимую форму и, следовательно, исключаться из реакции расщепления. В любом случае ожидалось увидеть более или менее значительное падение каталитической активности рибозима. К нашему удивлению, эффективность реакции в фосфатном буфере при pH 7,0 не отличалась от эффективности реакции, проводимой в трис-буфере (см. рис. 1). Данный результат свидетельствует о том, что, во-первых, аминные группы трис-буфера не участвуют в катализе расщепления рибо-

зимом фосфодиэфирной связи (к настоящему времени считается, что реакции, катализируемые рибозимами типа «головка молотка», осуществляются через «внутренний» нуклеофил — 2'-ОН группу, прилегающую к отщепляемому фосфату, координированному ионом Mg^{2+} ; но в начале наших экспериментов это еще было предметом дискуссии). Во-вторых, этот результат указывает на то, что в реакции участвуют, по-видимому, только весьма тесно контактирующие с РНК ионы Mg^{2+} , не доступные для остатков фосфорной кислоты буфера. В целом, зависимость активности рибозима от pH имеет колоколообразный характер, типичный для реакций, осуществляемых ферментами-белками.

Парадоксальность же приведенных результатов состоит в следующем. Такой характер зависимости означает, что фермент содержит по крайней мере две ионогенные группы, протонирование или депротонирование которых изменяет его активность. В случае белкового фермента это объясняется наличием в белке аминокислотных остатков, содержащих ионогенные группы, способные к ионизации в пределах pH 5—8. Так, карбоксильные группы ионизируются в области pH 3,5—5,0, остатки гистидина — при pH 5,5—7,0, остатки цистеина — при pH 7,5—9,0. В то же время известно, что ионизация оснований в нуклеиновых кислотах имеет место при pH ниже 3,5 и выше 9,0 [13].

Поэтому отсутствие, как в работе [9], или снижение, как в нашем случае, каталитической активности рибозима при pH 5,0, на первый взгляд, вряд ли правомерно объяснять протонированием остатков аденина и цитозина, по аналогии с [9]. Очевидно, что колебания значений pH в пределах 5,0—9,0 еще не могут повлиять на стабильность комплекса субстрат — рибозим и тем самым повлечь снижение эффективности реакции. Однако не исключено, что по крайней мере некоторые основания в цепи РНК, к тому же находящиеся в конформационной близости с другими основаниями, могут иметь такой сдвиг кажущегося значения pK_a , который будет обуславливать их ионизацию уже при значениях pH, близких к нейтральному. В таком случае, действительно, отклонения pH на одну — две единицы в ту или иную сторону приводили бы к протонированию/депротонированию таких принципиальных для поддержания конформации оснований, что в свою очередь, вызывало бы нарушение каталитически активной конформации рибозима. Если протонирование оснований цитозина или аденина при pH 5,0 действительно имеет место, то из соотношения концентраций в реакционной смеси рибозима (22 мкМ) и протонов (приблизительно 10 мкМ)

можно ожидать, что даже в случае 100 %-го связывания протонов с единственным титрующимся основанием эффективность реакции не могла уменьшиться более чем вдвое. В случае же двух и более титрующихся оснований падение эффективности реакции должно быть еще меньше. Аналогично, в работе [9] Уленбек использовал рибозим в концентрации 2 пМ и в этом случае, согласно вышеизложенному, следовало бы ожидать практически 100 %-го ингибирования реакции при pH 5,0, что и отмечено автором [9].

Принимая во внимание результаты рентгеноструктурного анализа [14], можно предположить, что цитозины C₃ и C₁₇ и/или аденины A₁₃ и A₁₄ (по нумерации [15]) могут быть такими «критическими» основаниями. С другой стороны, учитывая важную роль водной среды в стабилизации упорядоченных конформаций нуклеиновых кислот [16], все же нельзя исключать и возможности того, что не столько протонирование/депротонирование оснований, сколько глобальные изменения свойств воды как растворителя при изменении pH ответственны за эффективность катализа рибозимом. Об этом может, на наш взгляд, свидетельствовать колоколообразная, хотя и не совсем симметричная, форма pH-зависимости: любые отклонения в ту или иную сторону от нейтрального значения, когда концентрация H⁺ равна концентрации OH⁻, ведут к снижению эффективности реакции. Какое из этих предположений верно, еще предстоит установить.

Ионы таких металлов, как Mg²⁺, Na⁺, K⁺, содержатся в клетке в миллимолярных концентрациях, поэтому нуклеиновые кислоты обычно присутствуют в виде комплексов с ионами металлов. Физико-химические характеристики ионов щелочных металлов и иона аммония, такие как энергия ионизации, сродство к электрону, ионная и электрическая проводимость, коэффициенты диффузии в водных растворах, поверхностное натяжение водных растворов и др., имеют весьма близкие значения. В то же время хорошо известно, что многие белковые ферменты обладают достаточно строгой селективностью по отношению к определенному катиону (или аниону). В связи с этим следующей задачей было определение зависимости эффективности реакции от концентрации и вида солей моновалентных металлов. Как следует из рис. 2, наибольшим стимулирующим эффектом в концентрации 0,1 М характеризовались соли KCl и LiCl, которые наполовину увеличивали выход продукта по сравнению с реакцией, проводившейся в отсутствие соли. Однако в концентрациях выше 0,12—0,15 М отмечалось снижение эффективности реакции. При концентрации этих солей 0,4 М KCl

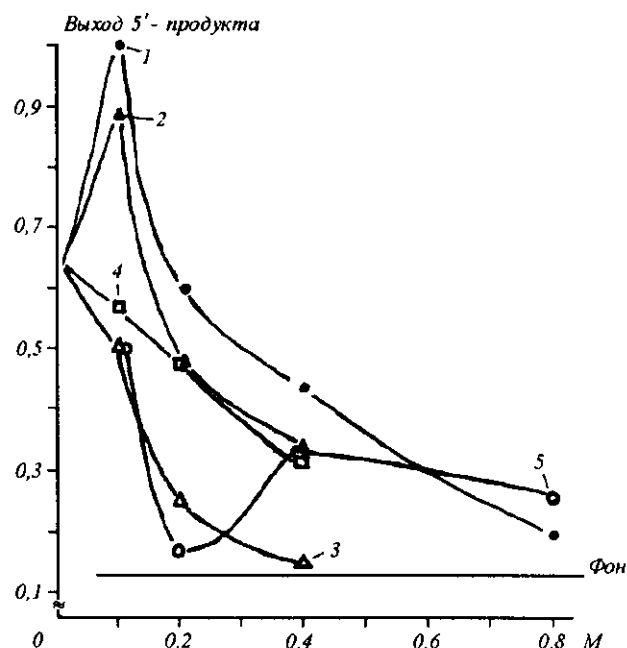


Рис. 2. Зависимость эффективности расщепления *tat*-РНК рибозимом в реакции *in vitro* от концентрации солей: 1 — KCl; 2 — LiCl; 3 — LiClO₄; 4 — NH₄-ацетат; 5 — KCl в присутствии 25 % формамида. Реакцию проводили в течение 120 мин при 34 °С

снижал эффективность реакции на 30 %, а LiCl — на 50 % от эффективности реакции в отсутствие соли. Стимулирующее влияние ионов Li⁺ полностью устранялось, если в качестве аниона использовали ClO₄⁻ (рис. 2, кривая 3). Как известно, перхлорат-ионы обладают хаотропным эффектом, нарушающим структуру воды. Поэтому приведенный результат можно считать подтверждением изложенному выше предположению о возможном влиянии структуры водного окружения на каталитическую активность рибозима. Ионы аммония также оказались скорее «ингибирующими», во всяком случае, в концентрациях выше 0,1 М (рис. 2, кривая 4). Это был несколько неожиданный результат, так как было показано, что ионы аммония, наряду с ионами калия, специфично участвуют в поддержании некоторых трегичных структур в РНК [17]. И поскольку ионы калия увеличивали эффективность расщепления *tat*-РНК рибозимом, ожидалось получить аналогичный эффект в случае ионов аммония. Возможно, именно негативным влиянием ионов аммония были обусловлены неудачи в экспериментах, когда в реакции расщепления использовали РНК-транскрипты, очищенные дву-

кратным переосаждением из 2 М ацетата аммония (результаты не приведены). В целом, при концентрации соли выше 0,6—0,8 М реакция практически не шла.

Ингибирование реакции можно было бы объяснить либо ингибированием этапа химического расщепления, либо, опять-таки, конформационными перестройками субстратной РНК и/или рибозима. Ранее нами было показано, что присутствие в реакционной смеси 25 % формамида не угнетает каталитическую активность рибозима [8]. Из рис. 2 видно, что при добавлении 25 % формамида эффективность реакции при 0,1 и 0,2 М KCl падает вдвое по сравнению со значениями эффективности в отсутствие формамида. Но при концентрациях KCl выше 0,4 М эффективность реакции в отсутствие и в присутствии формамида выравнивалась, а при 0,8 М KCl — была даже несколько выше для реакционной смеси, содержащей формамид. Этот результат свидетельствует о том, что ингибирование реакции высокой концентрацией соли было обусловлено большей «структурированностью» субстратной РНК, затруднявшей стадию связывания субстрата с рибозимом, а не ингибированием собственно расщепления. Такой вывод согласуется с данными работ других авторов, где показана активность рибозима модели «головка молотка» в среде с 1 М NaCl [9] и даже с 1,6 М Li₂SO₄ [14]. Субстратные РНК в этих случаях были очень короткими.

В целом же, влияние моновалентных катионов было достаточно монотонным, хотя и характеризовалось определенной специфичностью. На основании представленных данных трудно заключить, на какую из РНК — субстрата или рибозима, — оказывали влияние катионы металлов и аммония. Не исключено, что умеренные концентрации KCl и LiCl активировали рибозим. Показано, что 0,1 М NaCl способствует образованию конформации «головки молотка», идентичной той, которая образуется в присутствии Mg²⁺ [18]. С другой стороны, имеются косвенные данные о том, что NaCl в концентрациях больше 0,2 М может способствовать образованию большего количества конформеров рибозима [19]. Мы полагаем, что выявленная нами избирательность каталитической активности рибозима по отношению к моновалентным катионам отражает специфичность взаимодействий этих катионов с рибозимной РНК, что, в свою очередь, выражается в изменении количества активной конформации «головки молотка». Не исключено, однако, что повышение эффективности расщепления *tat*-РНК рибозимом в присутствии физиологических концентраций таких солей, как KCl и LiCl,

обусловлено увеличением полярности молекул РНК-субстрата, т. е. увеличением площади поверхности фосфатных групп, в результате чего расщепляемая связь становится более доступной для атаки. Известно, что образование двойных спиралей в составе ДНК или РНК может приводить к значительному увеличению площади поверхности фосфатных групп [20].

Ингибирующее влияние высоких концентраций (больше 0,8 М) солей обусловлено конформационными изменениями субстратной РНК, затрудняющими доступность сайта расщепления.

Л. М. Бурьяновский

Вплив рН, іонної сили та іонного складу реакційного середовища на ефективність розщеплення *in vitro* *tat*-РНК ВІЛ-1 рибозимом моделі «головка молотка»

Резюме

*Рибозими типу «головка молотка», як і інші типи рибозимів, є металоензимами і їх активність залежить від присутності іонів дивалентних металів. Однак, якщо вплив іонів дивалентних металів на розщеплення субстрату рибозимом досліджено добре, то дія моновалентних катіонів досі не вивчалась систематично. В наведених роботі проаналізовано вплив моновалентних катіонів (H⁺, K⁺, Li⁺, NH₄⁺) та іонів буферного середовища на ефективність розщеплення *in vitro* *tat*-РНК рибозимом типу «головка молотка». рН-залежність ефективності реакції мала дзвоноподібну форму з оптимумом при рН 7,0. Іони K⁺ і Li⁺ в концентрації 0,1 М стимулювали, а в концентраціях вище 0,2 М — зменшували ефективність розщеплення. При концентрації солей близько 0,8 М реакція пригнічувалася практично повністю. Іони NH₄⁺ виявляли інгібуючу дію при всіх концентраціях, що вивчалися. Ці дані, на погляд автора, можуть свідчити про специфічність взаємодії моновалентних катіонів з рибозимною РНК, що може сприяти або, навпаки, перешкоджати утворенню активної конформації «головки молотка».*

L. N. Buryanovsky

Effect of pH, ionic strength, and ionic composition on efficiency of hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the *tat*-RNA HIV-1 *in vitro*

Summary

*The hammerhead ribozymes like other types of ribozymes are metalloenzymes, and their activity strongly depend on divalent metal ion presence. While influence of divalent metal ions on the cleavage of substrate by the hammerhead ribozymes was well characterized, effect of monovalent cations was not analysed systematically. In the present work influence of monovalent cations (H⁺, K⁺, Li⁺, NH₄⁺) and buffer ions on efficiency of the *tat*-RNA cleavage *in vitro* by hammerhead ribozyme was characterized. pH-dependence was shown to be bell-shaped with an optimum at pH 7.0. Both K⁺ and Li⁺ ions at concentration 0.1 M increased, and at concentrations higher 0.2 M decreased efficiency of cleavage. At concentration 0.8 M reaction seemed to be completely blocked. NH₄⁺ ions had inhibitory effect at all concentrations tested. The data presented here suggest specificity of interactions of monovalent cations with ribozyme RNA, that might promote, or vice versa, prevent forming active hammerhead conformation.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sheldon C. C., Jeffries A. C., Davies C., Symons R. H. RNA self-cleavage by the hammerhead structure / Nucl. Acids and Mol. Biol.—1990.—4.—P. 227—242.
2. Fedor M. J., Uhlenbeck O. C. Substrate sequence effects on «hammerhead» RNA catalytic efficiency // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1990.—87, N 5.—P. 1668—1672.
3. Fedor M. J., Uhlenbeck O. C. Kinetics of intermolecular cleavage by hammerhead ribozymes // Biochemistry.—1992.—31, N 48.—P. 12042—12054.
4. Hertel K. J., Uhlenbeck O. C. The internal equilibrium of the hammerhead ribozyme reaction // Ibid.—1995.—34, N 5.—P. 1744—1749.
5. Heidenreich O., Eckstein F. Hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the long terminal repeat RNA of human immunodeficiency virus type I // J. Biol. Chem.—1992.—267, N 3.—P. 1904—1909.
6. Ellis J., Rogers J. Design and specificity of hammerhead ribozymes against calretinin mRNA // Nucl. Acids Res.—1993.—21, N 22.—P. 5171—5178.
7. Бурьяновский Л. Н., Швед А. Д. Специфическая деструкция *tat*-РНК ВИЧ-1 *in vitro* с помощью каталитически активного полирибонуклеотида (рибозима) // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 2.—С. 20—23.
8. Бурьяновский Л. Н., Швед А. Д. Характеристика каталитической активности рибозима, специфичного к *tat*РНК вируса иммунодефицита человека типа I // Там же.—№ 6.—С. 69—73.
9. Uhlenbeck O. C. A small catalytic oligoribonucleotide // Nature.—1987.—328, N 6131.—P. 596—600.
10. Dahm S. C., Derrick W. B., Uhlenbeck O. C. Evidence for the role of solvated metal hydroxide in the hammerhead cleavage mechanism // Biochemistry.—1993.—32, N 48.—P. 13040—13045.
11. Breslow R., Xu R. Recognition and catalysis in nucleic acid chemistry // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1993.—90, N 4.—P. 1201—1207.
12. Breslow R., Labelle M. Sequential general base-acid catalysis in the hydrolysis of RNA by imidazole // J. Amer. Chem. Soc.—1986.—108, N 10.—P. 2655—2659.
13. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.—М.: Мир, 1987.—С. 124—129.
14. Pley H. W., Flaherty K. M., McKay D. B. Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme // Nature.—1994.—372, N 6501.—P. 68—74.
15. Hertel K. J., Pardi A., Uhlenbeck O. C. et al. Numbering system for the hammerhead // Nucl. Acids Res.—1992.—20, N 12.—P. 3252.
16. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия.—М.: Мир, 1985.—Т. 1.—С. 309.
17. Draper D. E., Xing Y., Laing L. G. Thermodynamics of RNA unfolding: Stabilization of a ribosomal RNA tertiary structure by thiostrepton and ammonium ion // J. Mol. Biol.—1995.—249, N 2.—P. 231—238.
18. Heus H. A., Uhlenbeck O. C., Pardi A. Sequence-dependent structural variations of hammerhead RNA enzymes // Nucl. Acids Res.—1990.—18, N 5.—P. 1103—1108.
19. Woisard A., Fourrey J.-L., Favre A. Multiple folded conformations of a hammerhead ribozyme domain under cleavage conditions // J. Mol. Biol.—1994.—239, N 3.—P. 366—370.
20. Alden C. J., Kim S.-H. Solvent-accessible surfaces of nucleic acids // Ibid.—1979.—132.—P. 411—434.

УДК 577.214.3-577.113.4
Поступила в редакцию 14.11.96.