

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 кору 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.

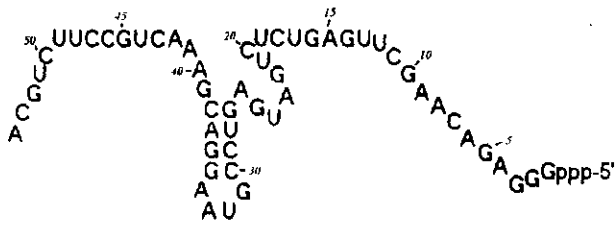
Для аналізу впливу іонних взаємодій на конформацію рибозиму використовували рибозим, специфічний до *tat*-РНК ВІЛ-1 (рис. 1), який синтезували за допомогою РНК-полімерази фага T7 методом «*run-off*»-транскрипції плазмиди *pGEM4Z-Rz*, лінеаризованої рестриктазою *SalI* з наступним очищенням у 10 %-му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

Очищену РНК мітили ^{32}P за 5'-кінцем. У реакційну суміш додавали 5 мМ MgCl_2 , 100 мМ 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, полікатиону спермідину поодиноці і разом ніяк не змінювали профілю 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 Mg^{2+} або 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 «головка 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} .

© О. Ю. МАРКЕЛОВА, Л. М. БУР'ЯНОВСЬКИЙ, О. Е. КІТАМ, К. Ф. КРАСНОВА, А. Д. ШВЕД, 2002

Рис. 1. Структура рибозиму, специфічного до *tat*-РНК ВІЛ-1

G_{14} , G_{25} та G_{45} ставали вразливішими, тобто більш експонованими у розчин. Це свідчить про те, що іони амонію значно змінюють третинні взаємодії в молекулі рибозиму, надаючи їй іншої просторової структури.

Про суттєвий стабілізуючий вплив іонів амонію на третинну структуру фрагмента рибосомної РНК йшлося в роботі [6], де показано, що одного іона NH_4^+ було достатньо для фолдингу цього фрагмента в таку конформацію, яка забезпечувала ефективність зв'язування РНК з певними лігандами — набагато вищу, ніж за присутності іонів Na^+ , K^+ та Cs^+ .

Раніше показано [7], що додавання у реакційне середовище солей лужних металів призводило до підвищення ефективності розщеплення субстрату рибозимом, а іони амонію блокували ферментативну активність останнього. В подальшому [8] ми припустили, що й активуючий вплив катіонів лужних металів, і пригнічуюча дія іонів амонію є наслідком структурних перебудов саме субстрату, а не рибозиму. При вивченні процесу зв'язування рибозиму з субстратом показано також, що іони амонію сприяють появі комплексів, електрофоретична рухливість яких суттєво відрізняється від подібних утворень за відсутності іонів NH_4^+ .

Досліди з часткового нуклеазного гідролізу показали, що іони амонію помітно впливають на конформацію саме рибозиму, отже, тепер можна вважати зрозумілим, що втрата його каталітичної активності у присутності іонів амонію обумовлена змінами в процесі фолдингу молекул рибозиму.

Дещо подібно діяв і 2 %-й поліетиленгліколь: за його присутності також з'являлися два нових сайти атаки РНКаз T_1 — G_{16} , G_{22} та значно посилювався сайт G_{25} . Але в цьому випадку практично не змінювалася доступність інших, більш віддалених від кору, ділянок рибозиму. Це можна інтерпретувати так, що поліетиленгліколь ніяк не впливає на структуру ділянок рибозиму, відповідальних

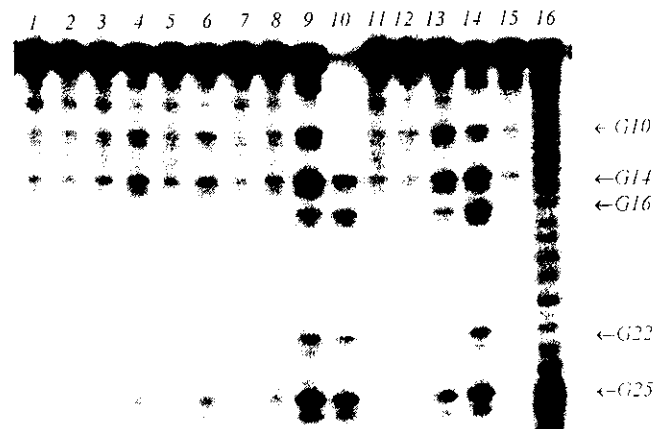


Рис. 2. Частковий гідроліз *tat*-РНК рибозиму РНКазою T_1 (1—14 — за присутності трису; непарні і парні цифри — 1 і 10 хв відповідно): 1, 2 — 50 мМ трис-НСІ, рН 7,5; 3, 4 — Mg; 5, 6 — КСІ; 7, 8 — спермідин; 9, 10 — NH_4Ac ; 11, 12 — Mg + КСІ + спермідин; 13, 14 — Mg + КСІ + спермідин + 2 %-й поліетиленгліколь; 15 — гідроліз T_1 -РНКазою в денатуруючих умовах; 16 — OH^- -гідроліз

за зв'язування із субстратом («плечей» рибозиму), але якимось чином дещо «розрихлює» каталітичну корову частину молекули.

Отже, дані, одержані з використанням різних методичних підходів (вивчення зв'язування та утворення комплексів рибозим/субстрат, нуклеазний гідроліз, залежність каталітичної активності рибозиму від складу реакційного середовища *in vitro*), свідчать, що іонний склад середовища впливає не лише на РНК-транскрипти субстрату, але й структура рибозиму під дією варіацій іонного оточення може утворювати низку конформерів, що, доречі, було показано [9, 10] на прикладі дії різних концентрацій $NaCl$.

Напевне, саме варіаціями умов проведення реакції, що впливають на конформацію її РНК-компонентів, пояснюється та строкатість даних стосовно каталітичної активності рибозимів, яка тривалий час спостерігається в різних публікаціях.

O. Yu. Markelova, L. N. Buryanovsky, O. E. Kitam,
K. F. Krasnova, A. D. Shved

Influence of ion interactions on the conformation of ribozyme specific to HIV-1 *tat*-RNA in solution

Summary

Using the method of partial nuclease hydrolysis it was shown that the medium ion composition essentially influenced tertiary interactions in the ribozyme molecule and changed its spatial structure.

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 пространственную 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 рН, 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