

Характеристика каталитической активности *in vitro* рибозима, специфичного к tat-РНК вируса иммунодефицита человека типа I

Л. Н. Бурьяновский*, А. Д. Швед

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

Исследованы основные свойства каталитической активности in vitro рибозима модели «головка молотка», специфичного к tat-РНК вируса иммунодефицита человека типа I. Подтверждена обнаруженная нами ранее абсолютная зависимость активности рибозима от присутствия в реакционной среде спермидина (помимо Mg^{2+}). Определена оптимальная концентрация ионов Mg^{2+} , составившая 5–10 мМ. При определении температурного оптимума реакции, равного 30 °С, выявлено активирующее влияние 20 % формалида при температуре 15 °С. Установлена зависимость эффективности расщепления субстратной РНК от времени реакции.

Каталитически активные РНК впервые обнаружены при изучении аутосплайсинга пре-рРНК у тетраимены [1], а также при изучении жизненного цикла некоторых сателлитных и виroidных РНК растений [2]. К настоящему времени насчитывается несколько классов рибозимов, различающихся по происхождению, структуре каталитических доменов, потребности в низкомолекулярных эффекторах, по характеру и механизмам катализа и т. д. Рибозимы модели «головка молотка» были первыми искусственно синтезированы, охарактеризованы [3] и впоследствии наиболее часто использовались для специфической инактивации различных РНК (иРНК, рРНК, мяРНК, вирусных РНК и т. д.) в самых разнообразных модельных системах. Однако при этом они менее детально изучены, чем, например, рибозим из интрона рРНК тетраимены.

Одним из главных препятствий широкого использования рибозимной методологии является то обстоятельство, что пока еще невозможно заранее предсказать, насколько активным будет тот или иной рибозим в отношении конкретного субстрата, да и будет ли активен вообще. Весьма фрагментарно исследовано влияние нуклеотидной последовательности субстратной РНК, прилегающей непосредственно к сайту расщепления, на уровень каталитической активности рибозима; влияние размера комплементарного участка между рибозимом и субстратом на эффективность расщепления и многое другое. Целью нашей работы было охарактеризовать *in vitro* каталитическую активность рибозима модели «головка молотка», специфичного к участку tat-РНК ВИЧ-I. В качестве каталитического домена была взята

*Correspondence address.

полная нуклеотидная последовательность, приведенная в работе [4], с комплементарными tat-РНК участками размером 9 нуклеотидов (с 5'-конца от сайта расщепления) и 7 нуклеотидов (с 3'-конца от сайта расщепления). В настоящей работе исследована зависимость эффективности расщепления tat-РНК рибозимом от температуры, концентрации ионов магния, времени инкубации.

Материалы и методы. Нуклеотидная последовательность синтетических дезоксиолигонуклеотидов, соответствующих нуклеотидной последовательности рибозима, а также процедуры клонирования рибозима и фрагмента ВИЧ-I, содержащего tat-ген; постановка реакции транскрипции, реакции расщепления tat-РНК *in vitro* — описаны в нашей предыдущей работе [5]. Возможные вариации в постановке реакции расщепления указаны в подписях к рисункам. Эффективность реакции расщепления рассчитывали по формуле:

$$\text{Эффективность} = \left[\frac{(S_{\text{имп/мин}} \text{ субстрата} + P_{\text{имп/мин}} \text{ суммы продуктов})}{P_{\text{имп/мин}} \text{ суммы продуктов}} \right] \cdot 100 \%$$

Результаты и обсуждение. Ранее была показана каталитическая активность сконструированного нами рибозима, выявляющаяся только при добавлении в систему *in vitro* моновалентных катионов и спермидина [5]. Нам не удалось обнаружить активности рибозима непосредственно в транскрипционном буфере без какой-либо очистки РНК-транскриптов субстрата и рибозима, хотя состав этого буфера практически не отличался от такового реакционной смеси, используемой для определения активности рибозима. Возможно, продукты реакции просто не выявлялись на электрофореграмме из-за большого количества примесных полос, интерпретируемых нами как «неполноразмерные транскрипты». Не исключено, что по крайней мере часть таких полос, мигрирующих несколько быстрее субстратной РНК, представляла собой структурные варианты — продукты неполной денатурации субстратной РНК при нанесении на гель. Во всяком случае, собственно субстратная РНК характеризовалась аномальной электрофоретической подвижностью и мигрировала в денатурирующем полиакриламидном геле в зоне, соответствующей размеру ДНК-маркера приблизительно 450—470 нуклеотидов. При этом продукты расщепления мигрировали в полном соответствии с подвижностями ДНК-маркеров (рис. 3, а).

Как показали последующие эксперименты, абсолютно необходимым для проявления каталитической активности рибозима было, помимо ионов Mg^{2+} ,

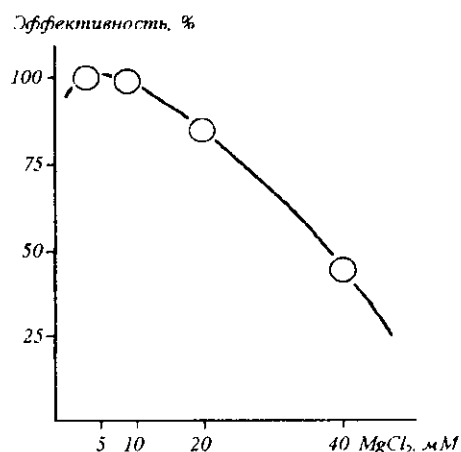
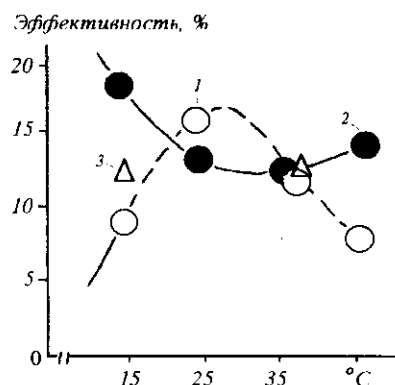


Рис. 1. Зависимость относительной эффективности расщепления субстратной tat-РНК от концентрации ионов Mg^{2+} . Инкубация в течение 1 ч при 35 °С. Молярное соотношение субстрат/рибозим равно 1/20. За 100 % принято значение эффективности при 5 mM Mg^{2+} .

Рис. 2. Зависимость эффективности реакции расщепления tat-РНК от температуры (инкубация в течение 2 ч): 1 — реакционная среда с 2 мМ спермидина, 100 мМ калия хлорида, 50 мМ трис-НСl, рН 7,4 (при 20 °С); 2 — то же, но с добавлением 20 % формамида; 3 — то же, что 2, но с добавлением 0,1 М LiCl



присутствие полиамина спермидина. Добавление ионов K^+ в реакционную смесь не приводило к появлению продуктов реакции, но увеличивало эффективность реакции в среде со спермидином (результаты не показаны). Оптимальная концентрация ионов Mg^{2+} составляла 5 мМ (рис. 1), при увеличении свыше 10 мМ эффективность реакции снижалась. Учитывая, что реакция протекала эффективно даже при концентрациях Mg^{2+} 1—3 мМ, можно заключить, что какое-то количество ионов Mg^{2+} содержалось в препаратах РНК. Это подтверждается также и тем, что расщепление субстратной РНК происходило достаточно эффективно в 50 мМ фосфатном буфере, где ионы Mg^{2+} должны были полностью перейти в нерастворимую форму.

Для минимизации возможного влияния этого «эндогенного» Mg^{2+} активность рибозима определяли, добавляя 10 мМ магний ацетат.

Сконструированный нами рибозим обладал каталитической активностью в широком диапазоне температур (от 15 до 45 °С) с оптимумом в области 30 °С (рис. 2). При добавлении в реакционную смесь формамида до конечной концентрации 20 % эффективность реакции при 15 °С увеличилась вдвое. Это согласуется с нашими представлениями о том, что он должен способствовать диссоциации комплекса рибозима и продуктов реакции при пониженных температурах и тем самым увеличивать эффективность расщепления субстрата. Дальнейшее снижение активирующего влияния формамида при росте температуры также соответствует ожидаемому эффекту, т. е. дестабилизации комплекса субстрат — рибозим при повышенных температурах. Увеличение ионной силы при добавлении 0,1 М LiCl в реакционную смесь практически полностью устраняло влияние формамида (см. рис. 2).

Зависимость эффективности реакции от времени представлена на рис. 3. Кривая зависимости состоит из двух участков: в течение первого часа наклон ее наиболее крутой, т. е. скорость реакции в этом промежутке времени максимальна, затем следует пологий прямолинейный участок. В целом не более 20 % субстрата переходило в продукт за 5 ч реакции при 25 °С. Причины такой невысокой эффективности не совсем ясны. Лишь отчасти это объясняется тем, что данные эксперименты проводили при избытке рибозима, а не субстратной РНК. Кроме того, рибозим в реакционной смеси имел тенденцию к агрегации и, возможно, до половины всего количества рибозима в реакционной смеси было представлено в виде каталитически не активных комплексов (результаты не представлены). Вообще же эффективность на уровне 10—30 % достаточно характерна для рибозимов модели «головка молотка», особенно в случаях с протяженными субстратами (см., например, [6—8]).

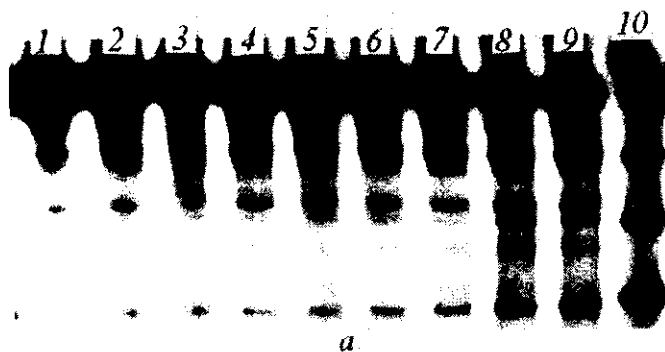
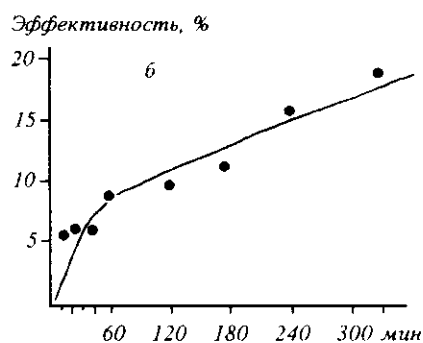


Рис. 3. Зависимость эффективности расщепления *tat*-РНК от времени. Инкубация при 25 °С. Соотношение субстрат/рибозим равно 1/20; а — электрофореграмма разделения продуктов реакции в денатурирующем 6 %-м ПААГ, где дорожки 1—9 представляют продолжительность реакции соответственно 0, 10, 20, 40 мин, 1, 2, 3, 4 и 5,5 ч; дорожка 10 — маркер молекулярной массы, нуклеотиды (плазмида *pBR322*, рестрицированная *Hin*II), денатурированный в течение 5 мин при 93 °С; б — графическое представление зависимости эффективности, приведенной на рис. 3, а



Таким образом, нами исследованы основные характеристики катализа расщепления субстратной *tat*-РНК рибозимом, а именно: спермидин-зависимость, оптимальная концентрация моновалентного иона, оптимальная концентрация ионов Mg^{2+} и зависимость эффективности реакции от времени. Сравнительно низкая эффективность реакции заслуживает более тщательного изучения кинетики процесса и дальнейших поисков возможных путей ее повышения, что и является целью наших последующих экспериментов.

Л. М. Бур'яновський, А. Д. Швед

Характеристика каталітичної активності *in vitro* рибозима, специфічного до *tat*-РНК вірусу імунodefіциту людини типу I

Резюме

Досліджено основні властивості каталітичної активності *in vitro* рибозима моделі «головка молотка», специфічного до *tat*-РНК вірусу імунodefіциту людини типу I. Підтверджено знайдену нами раніше абсолютну залежність активності рибозима від присутності у реакційному середовищі спермідину (окрім Mg^{2+}). Визначено оптимальну концентрацію іонів Mg^{2+} , яка складає 5—10 мМ. При визначенні температурного оптимума реакції, що дорівнює 30 °С, виявлений активуючий вплив 20 % формаміду при температурі 15 °С. Встановлено залежність ефективності розщеплення субстратної РНК від часу протікання реакції.

L. N. Buryanovsky, A. D. Shved

Characterization of catalytic activity *in vitro* of the ribozyme targeted to *tat*-RNA of HIV-1

Summary

Essential properties of catalytic activity *in vitro* of the anti-*tat* RNA (HIV-1) hammerhead ribozyme have been studied. Spermidine-dependencies, discovered by us earlier, has supported. Optimal concentration of magnesium ion were established and was equal 5—10 mM. Temperature optimum of reaction was 30 °C. 20 % formamide has stimulating influence on efficiency of the cleavage at 15 °C. Time-dependence course of efficiency of reaction also were carried out.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kruger K., Grabowski P. J., Zaug A. J. et al. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena* // Cell.—1982.—31, N 1.—P. 147—157.
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. Бурьяновский Л. Н., Швед А. Д. Специфическая деструкция тат-РНК ВИЧ-1 *in vitro* с помощью каталитически активного полирибонуклеотида (рибозима) // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 2.—С. 20—23.
6. Denman R. B. Cleavage of full-length APP mRNA by hammerhead ribozymes // Nucl. Acids Res.—1993.—21, N 17.—P.4119—4125.
7. Pachuk C. J., Yoon K., Moelling K., Coney L. R. Selective cleavage of *bcr-abl* chimeric RNAs by a ribozyme targeted to non-continuous sequences // Ibid.—1994.—22, N 3.—P. 301—307.
8. Sun L. Q., Wang L., Gerlach W. L., Symonds G. Target sequence-specific inhibition of HIV-1 replication by ribozymes directed to tat RNA // Ibid.—1995.—23, N 15.—P. 2909—2913.