

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

На правах рукопису

УДК 577.214.3 - 577.113.4

БУР'ЯНОВСЬКИЙ Леонід Миколайович

**ХАРАКТЕРИСТИКА РОЗЩЕПЛЕННЯ IN VITRO
tatРНК ВІЛ-1 РИБОЗИМОМ МОДЕЛІ
“ГОЛОВКА МОЛОТКА”**

03.00.03 - молекулярна біологія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1997

504

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі структури

лот Інституту молекулярної біології і генетики 00751905 (R)

ЛННБ України ім.В.Стефаника



Науковий керівник: кандидат біологічних наук А.Д.Швед.

Офіційні опоненти: член-кореспондент НАНУ і АМНУ,
доктор біологічних наук, професор
В.А.Кордюм,
кандидат біологічних наук О.М.Живолуп.

Провідна установа: Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії
НАН України

Захист дисертації відбудеться 20 травня 1997 року о 10 годині на засіданні спеціалізованої ради Д 01.86.01 в захисту докторських дисертацій в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 252143, м.Київ-143, вул.Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Автореферат розіслано 18.4. 1997 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник

Л. Л. Лукаш

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ Відкриття каталітичних властивостей у полірибонуклеотидів належить до найбільш значних подій у молекулярній біології і біохімії останнього десятиріччя. Це відкриття, що було відзначено Нобелівською премією за 1989 рік, призвело до перегляду уявлень про роль РНК у клітині й, у більш широкому контексті, про можливу роль каталітичних РНК у виникненні життя і у процесах еволюційної адаптації.

Рибозими типу "головка молотка" були першими штучно синтезованими рибозимами, здатними не тільки до природної цис-активності, але й до транс-активності, тобто здатними розщеплювати інші ланцюги РНК. Невеликі розміри та спроможність до транс-активності зумовили привабливість використання рибозимів саме цього типу для розщеплення та інактивації специфічних РНК, в тому числі і в якості противірусного агента. На сьогодні вже накопичено багато повідомлень про успішне використання рибозимів типу "головка молотка" для блокування експресії клітинних та вірусних генів у різних модельних системах *in vitro* та *in vivo*. Але достатньо широкого розповсюдження рибозимна методологія ще не набула, що пов'язано як з певними труднощами на етапах експресії і локалізації рибозимів у клітині, так і з недостатністю вивчення механізмів каталізу розщеплення рибозимом субстрату (РНК-мішені). Дійсно, хоча кінетику реакції розщеплення субстрату рибозимом типу "головка молотка" детально вивчено, але такий аналіз проведено лише для кількох олігорибонуклеотидних субстратів. Відсутність ґрунтовної теорії зумовлює суттєві труднощі в разі екстраполяції цих результатів на величезну різноманітність послідовностей і набагато більші

розміри природних РНК-мішеней та пов'язану з цим відповідну варіабельність частини нуклеотидної послідовності рибозиму, відповідальної за зв'язування РНК-субстрату. Отже, дослідження умов розщеплення кожного нового субстрату відповідним рибозимом розширює і поглиблює розуміння механізмів РНК-опосередкованого каталізу і, таким чином, додає нові факти для створення завершальної теорії.

МЕТА ТА ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ. Метою роботи було вивчення і оптимізація умов розщеплення *tat*РНК ВІЛ-1 рибозимом типу "головка молотка" в системі *in vitro* та дослідження впливу моновалентних катіонів лужних металів і іону амонію, а також іонної сили на ефективність реакції розщеплення. Відповідно до мети було поставлено такі завдання:

1. Клонувати фрагмент гену *tat* і хімічно синтезовану дезоксирибонуклеотидну послідовність рибозиму у складі транскрипційних векторів.

2. Одержати у препаративних кількостях субстратну *tat*РНК і рибозимну РНК у реакціях транскрипції *in vitro*.

3. Створити систему *in vitro* розщеплення *tat*РНК за допомогою рибозиму.

4. Вивчити і оптимізувати умови розщеплення *tat*РНК створеним рибозимом (такі, як залежність від концентрації іонів Mg^{2+} , температури, рН та тривалості інкубації).

5. Дослідити вплив катіонів лужних металів і амонію та іонної сили на ефективність реакції розщеплення *tat*РНК рибозимом.

НАУКОВА НОВИЗНА РОБОТИ. В даній роботі вперше створено рибозим типу "головка молотка", специфічний до сайту розщеплення між 5375 і 5376 нуклеотидами геному ВІЛ-1 ізоляту

ВН10, тобто локалізованого в екзоні 2 гену *tat*. Проведено якісний аналіз умов розщеплення транскрипту *tat*РНК створеним рибозимом, а саме: залежність ефективності реакції від концентрації іонів Mg^{2+} , від рН, температури та тривалості інкубації. Використання подовженого субстрату, близько 400 нуклеотидів завдовжки, в структурному аспекті є певним наближенням до умов взаємодії рибозиму з природною РНК у клітині. Вперше показано абсолютну залежність каталітичної активності рибозиму типу "головка молотка" від наявності спермідину у реакційному середовищі. Вперше виявлено різке зниження ефективності реакції у слабколужному середовищі. Вперше показано різний за рівнем стимулюючий вплив фізіологічних концентрацій катіонів лужних металів на ефективність розщеплення транскрипту *tat*РНК рибозимом типу "головка молотка". Вперше показано інгібуючу дію іонів амонію і підвищених концентрацій (>0.2 М) солей лужних металів на ефективність реакції розщеплення.

ПРАКТИЧНА ЦІННІСТЬ РОБОТИ. Рибозими типу "головка молотка" є цікавим об'єктом не тільки з точки зору дослідження фундаментальних механізмів функціонування РНК, але можуть також мати велике практичне значення, у першу чергу, як інструмент зворотної генетики у генній терапії. Інший аспект практичного застосування рибозимів зумовлений їх високоспецифічною ендорибонуклеазною активністю, що може бути використано у фундаментальних дослідженнях просторових конформацій молекул РНК.

ОСОБИСТИЙ ВНЕСОК АВТОРА полягає у виконанні всього обсягу експериментальної частини дисертації, пошуку та обробці даних літератури, аналізі та інтерпретації отриманих резуль-

татів.

ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВІНОСИТЬСЯ НА ЗАХИСТ: можливість регуляції каталітичної активності рибозиму типу "головка молотка" за рахунок іонних взаємодій з елементами реакційного середовища.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ. Матеріали роботи апробувалися на спільному науковому семінарі відділу структури та функції нуклеїнових кислот і відділу регуляторних механізмів клітини ІМБІГ НАНУ 24 березня 1997 року. За матеріалами дисертації опубліковано 3 статті.

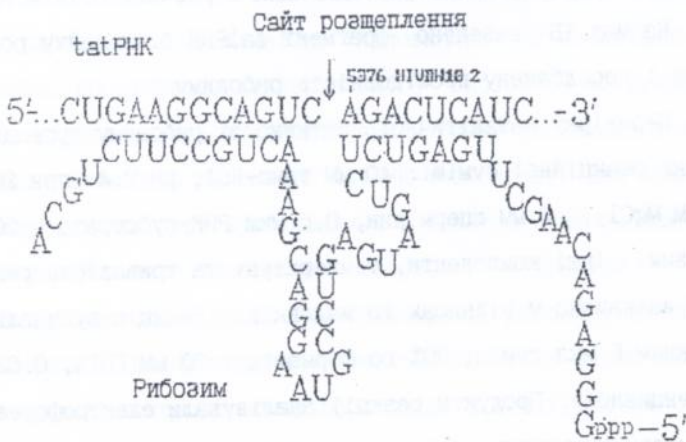
СТРУКТУРА ТА ОБСЯГ ДИСЕРТАЦІЇ. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, експериментальної частини, що складається з методів та результатів дослідження і їх обговорення, і висновків. Роботу викладено на 100 стор. машинописного тексту, ілюстровано 17 малюнками і 1 таблицею. Список цитованої літератури містить 140 джерел.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. РНК-полімераза фагу T7 виділяли з штаму-суперпродуценту HMS174/pAR1219 (Davanloo e.a., 1984). Фрагмент гену *tat* ВІЛ-1 ізоляту ВН10 розміром 384 н.п. (мал.1А), отриманий рестрикцією плазмиди рВН 10 ендонуклеазами *EcoRI* і *Eco47.I* (останній затуплювали фрагментом Кленова ДНК-полімерази I), клонували у векторі рGEM-3Z (Promega) по сайтах *EcoRI* і *SmaI* під промотором T7 РНК-полімерази. Два дезоксиолігонуклеотиди, відповідні нуклеотидній послідовності рибозиму типу "головка молотка", було синтезовано на ДНК-синтезаторі DNA Assembler Special (Pharmacia). Після очистки в 15%-му денатуруючому поліакриламідному гелі і гібридизації дуплекс клонували у транскрипційному векторі

A

5'-GGGCGAAUUCUGCAACAACUGCGUUUUAUCCAUUUUCAGAAUUGGGUGUCG
ACAUAAGCAGAAUAGGCGUUAUCUCGACAGAGGAGCAAGAAAUGGAGCCAGUAG
AUCCUAGACUAGAGCCUGGAAGCAUCCAGGAAGUCAGCCUAAAACUGCUUGUA
CCAAUUGCUAUUGUAAAAAGUGUUGCUUUCAUUGCCAAGUUUGUUUCAUAACAA
AAGCCUUAAGGCAUCUCCUAUGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCUC
CUCAAGGCAGUC*AGACUCAUCAAGUUUCUCUAUCAAAAGCAGUAAGUAGUACAU
GUA AUGCAACCUAUACA AAUAGCAAUAGUAGCAUUAAGUAGUAGCAAUAUAUA
GCAAUAGUUGUGUGGUCGGG-3'

B



Мал.1. А. Нуклеотидна послідовність tatPHK-транскрипту. Ділянки зв'язування рибозиму підкреслено, розщеплюваний зв'-янок відмічено *. В. Фрагмент tatPHK довкола сайту розщеплення і модель вторинної структури рибозиму.

рGEM-4Z. Послідовність клонованих фрагментів перевіряли секвенуванням дідезоксиметодом за F.Sanger, 1977. Препаративну транскрипцію лінеаризованих плазмідних ДНК-матриць проводили у 0.1 мл реакційної суміші такого складу: 40 мМ трис-НСl, рН 8.0, 6 мМ MgCl₂, 0.5 мМ кожного рибонуклеотидтрифосфату, 50 мкКі ³²Р-альфа-АТР, 10 мМ дітіотреїтол, 10 мМ NaCl, 8 мкг ДНК-матриці і 5 мкг Т7 РНК-полімерази. Суміш інкубували протягом 2 годин при 34°C. Реакцію зупиняли додаванням рівного об'єму фенолу. РНК-транскрипти в водній фазі осаджували додаванням 2 М оцтовокислого амонію і 2.5 об'ємів етилового спирту, з послідуочим переосадженням з розчину 0.14 М NaCl.

На мал.1Б наведено фрагмент *tat*РНК біля сайту розщеплення і передбачену послідовність рибозиму.

Перевірку каталітичної активності рибозиму проводили у 10 мкл реакційної суміші: 40 мМ трис-НСl, рН 7.4 (при 20°C), 10 мМ MgCl₂, 2 мМ спермідин, 0.5 мкМ РНК-субстрат, 5-20 мкМ рибозим. Інші компоненти, температуру та тривалість реакції - як зазначено у підписах до малюнків. Реакцію зупиняли додаванням 5 мкл суміші 90%-го формаміду, 30 мМ EDTA, 0.02%-го ксиленианолу. Продукти реакції аналізували електрофорезом у 6%-му денатуруючому поліакриламідному гелі з послідуочною авторадіографією. Активність рибозиму визначали або вимірюючи черенковське випромінення вирізаних з гелю продуктів реакції (у % від похідного субстрату), або денситометрією на лазерному денситометрі UltroScan XL (LKB) відповідних 5'-продуктам смуг на радіоавтографі. В останньому випадку накопичення 5'-продукту виражалось через площу піку смуги 5'-продукту, о.п.х мм (одиниць поглинання х мм). Фон визначався за зразком *tat*РНК, що інкубували у відсутності рибозиму.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Синтез і характеризування РНК-субстрату і рибозиму.

В оптимальних умовах реакції транскрипції вихід повнорозмірного продукту - *tat*РНК розміром 396 нуклеотидів - складав не менше 90-95% за результатами електрофоретичного аналізу у денатуруючому ПААГ.

*tat*РНК-транскрипти характеризувались аномальною електрофоретичною рухомістю і у всіх експериментах мігрували в денатуруючому поліакриламідному гелі в зоні, що відповідала розмірам денатурованого ДНК-маркеру близько 450 - 470 нуклеотидів. Оскільки послідовність ДНК-матриці перевірялась після клонування, можливість "подовшання" її виключається. Крім того, продукти розщеплення *tat*РНК рибозимом мігрували у повній відповідності з положеннями маркеру (показано далі). Можливо, аномальна рухомість *tat*РНК-транскрипту пов'язана з міцними, щоб не бути зруйнованими в денатуруючих умовах під час електрофорезу, елементами вторинної структури.

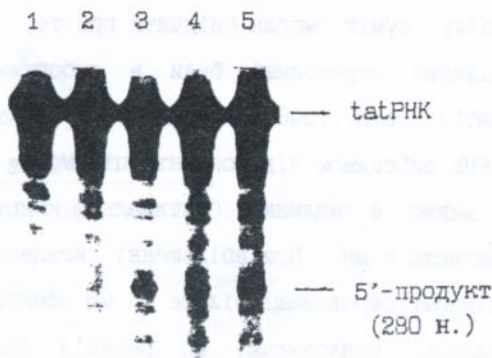
Вихід повнорозмірного РНК-транскрипту рибозиму довжиною 54 нуклеотиди в оптимальних умовах складав не менше 95% за результатами електрофоретичного аналізу в денатуруючому ПААГ, де рибозимна РНК мігрувала однією смугою у відповідній з положеннями маркерів зоні. Але на авторадіограмах в експериментах вивчення каталітичних властивостей рибозим виявлявся двома, або навіть трьома смугами, що розміщувалися послідовно на незначній відстані. Здатність до агрегації молекул РНК добре відома, і схильність до утворення асоціатів (димерів і мультимерів) і агрегатів деякими рибозимами типу "головка молотка" (Neus e.a., 1990; Fedor, Uhlenbeck, 1990), а також типу "шпилька" (Hegg, Fedor, 1995) було показано. Не

виключено, що поява додаткових смуг (асоціатів) на електрофореграмах була пов'язана не стільки з підвищеними концентраціями рибозиму в реакціях розщеплення, скільки з присутністю спермідину в реакційному середовищі, що й зумовлювало комплексоутворення.

Характеризація каталітичної активності рибозиму. При еквімолярних концентраціях субстрату і рибозиму, так само як і при значному надлишку субстратної РНК, - тобто в умовах, відповідних багатообертовому типу кінетики реакції, - каталітичної активності спочатку не було виявлено. Лише при 10-40 -кратному надлишку рибозиму над субстратною РНК і у присутності 2 мМ спермідину в реакційному середовищі було можливим розщеплення *tat*РНК (мал.2, дор.1-3). Ефективність реакції складала 10-15%. Додавання 100 мМ КСl у реакційну суміш не призводило до появи продуктів реакції у відсутності спермідину, але сумісне додавання 2 мМ спермідину з 100 мМ КСl подвоювало ефективність реакції порівняно з реакцією в присутності лише спермідину (мал.2, дор.4 і 5).

Таким чином, вперше показано активуючу дію спермідину на рибозим типу "головка молотка" у реакції розщеплення подовженого РНК-субстрату.

Ефективність реакції розщеплення транскрипту *tat*РНК (390 н.) створеним рибозимом у присутності 2 мМ спермідину і 0.1 М КСl складала близько 25 - 30% за 180 хв. при 28°C (мал.2, дор.5). Молярне співвідношення субстрат/рибозим становило 1/40. Цей результат цілком узгоджується з даними літератури як щодо ефективності реакції розщеплення довгих субстратів, що звичайно коливається у межах 5 - 50% за декілька годин, так і стосовно стехіометрії субстрат/рибо-



Мал. 2 Електрофоретичний аналіз продуктів реакції розщеплення tatРНК рибозимом *in vitro*:

- 1 - tatРНК без додавання рибозиму;
- 2 - tatРНК+рибозим, трис-НСl, рН 7.4, 10 мМ MgCl₂;
- 3 - те саме, що 2, плюс 2 мМ спермідин;
- 4 - те саме, що 2, плюс 100 мМ KCl;
- 5 - те саме, що 3, плюс 100 мМ KCl.

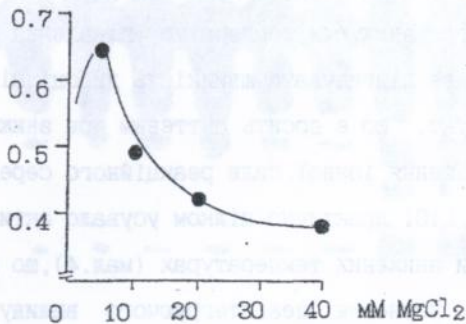
Реакція тривала 3 год. при 28°C; співвідношення субстрат/рибозим приблизно дорівнювало 1/40.

вим, необхідної для таких реакцій, що звичайно складає у межах 1/3 - 1/100.

Залежність ефективності розщеплення tatРНК від концентрації іонів магнію. Необхідність додавання спермидину в реакційну суміш могла свідчити про те, що іони магнію в реакційному середовищі були в субоптимальній концентрації (Bratty e.a.,1993). Залежність ефективності розщеплення tatРНК рибозимом від концентрації $MgCl_2$ наведено на мал.3. Як видно з малюнка, оптимальна концентрація іонів магнію становила 5 мМ. При збільшенні концентрації $MgCl_2$ в реакційному середовищі більше 10 мМ ефективність реакції зменшувалась. Враховуючи, що реакція йшла досить ефективно навіть при концентраціях іонів магнію 1-3 мМ (дані не наводяться), можна зробити висновок, що якась кількість іонів магнію містилась у препаратах РНК. Тож, хоча максимальна ефективність реакції розщеплення tatРНК спостерігалась при 5 мМ $MgCl_2$, але, щоб зменшити можливий вплив "ендогенного" Mg^{2+} в препаратах РНК, реакцію розщеплення проводили у присутності 10 мМ $MgCl_2$.

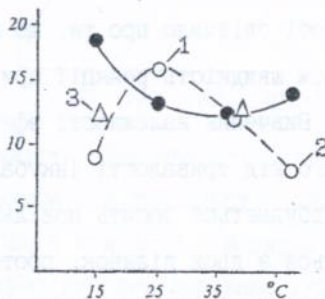
Залежність ефективності розщеплення tatРНК від температури інкубації. Результати дослідження впливу температури інкубації на ефективність розщеплення tatРНК рибозимом *in vitro* наведено на мал.4. Як видно з малюнка, створений рибозим виявляв каталітичну активність у широкому діапазоні температур - від 15° до 45° С, з оптимумом близько 30° С. При додаванні у реакційну суміш 20 % (кінцева концентрація) формаміду ефективність реакції при 15° С підвищувалась вдвічі порівняно з відповідним значенням у відсутності формаміду. Це цілком узгоджується з вихідним припущенням про те, що

Накопичення 5'-продукту,
(о.п.) x мм



Мал.3. Залежність ефективності розщеплення *tat*РНК рибозимом від концентрації іонів Mg⁺⁺.
Інкубація протягом 60 хв. при 35° С.
Співвідношення субстрат/рибозим = 1/20.

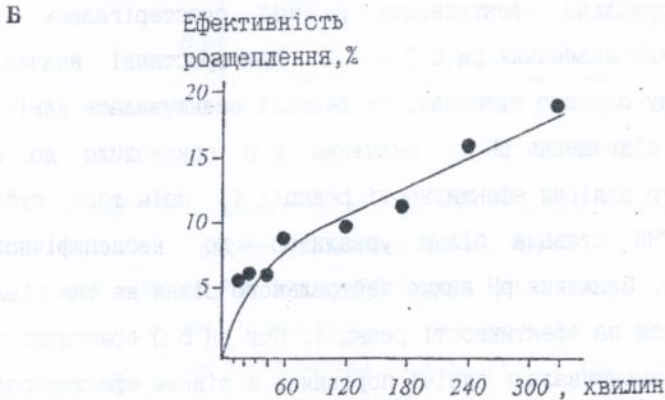
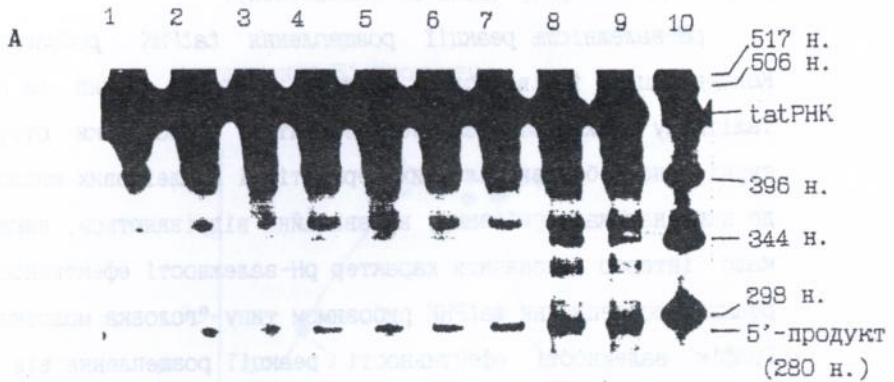
Ефективність
розщеплення, %



Мал. 4. Залежність ефективності розщеплення *tat*РНК рибозимом від температури. Інкубація протягом 120 хв.
1 - реакційна суміш з 2 мм спермідину, 100 мм KCl, трис-HCl, рН 7.4 (при 20° С);
2 - те ж, що 1, але з додаванням 20 % формаміду;
3 - те ж, що 2, але з додаванням 100 мм LiCl.

формамід повинен сприяти деструктуризації РНК-субстрату і, тим самим, більшій досяжності сайту розщеплення для рибозиму і, по-друге, знижуючи температуру плавлення дуплексів, формамід повинен підвищувати швидкість дисоціації комплексу рибозим-продукт, що є досить суттєвим при знижених температурах. Збільшення іонної сили реакційного середовища додаванням 100 мМ LiCl практично цілком усувало активуючу дію формаміду при знижених температурах (мал.4), що можна інтерпретувати як усунення дезінтегруючого впливу формаміду на РНК-субстрат підвищенням концентрації моновалентних катіонів.

Залежність ефективності розщеплення tatРНК in vitro від тривалості інкубації. Необхідність додавання великого надлишку рибозиму відносно субстрату - їх співвідношення в реакційній суміші звичайно складало 10/1 або 40/1 - зумовлювало, як раніше відзначалось, однообертвий тип кінетики реакції. Це саме по собі свідчило про те, що швидкість реакції має бути меншою, ніж швидкість реакції при багатообертвому механізмі кінетики. Вивчення залежності ефективності розщеплення *tatРНК in vitro* від тривалості інкубації показало, що, дійсно, реакція відбувається досить повільно (мал.5). Крива залежності складається з двох ділянок: протягом першої години її нахил є найбільш стрімким, тобто швидкість реакції на цьому відрізку часу була максимальною, а далі іде похилий прямолінійний відрізок. В цілому, близько 20% субстрату переходило у фракцію продукту за 5 годин реакції при 25° С. Збільшення тривалості інкубації до 14 годин подвоювало ефективність реакції порівняно з 5-ма годинами, але при цьому відмічався вже досить значний рівень неспецифічної дегра-



Мал. 5. Залежність ефективності розщеплення tat-PHK рибозимом від тривалості інкубації.

Інкубація при 25°C. Молярне співвідношення субстрат/рибозим дорівнює 1/20.

A - електрофореграма розділення продуктів реакції, де доріжки 1 - 9 відображають тривалість реакції відповідно 0, 10, 20, 40, 60, 120, 180, 240, 330 хв; доріжка 10 - маркер (плазмідна рBR 322, рестрикована Ninf I і денатурована 5 хв. при 100°C);

B - кількісна графічна інтерпретація.

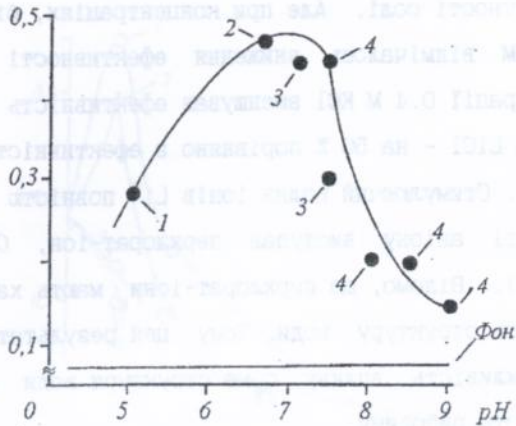
дації РНК-субстрату (дані не наводяться).

pH-залежність реакції розщеплення tat РНК рибозимом.

Концентрація іонів водню виявляє суттєвий вплив на каталітичну активність багатьох ферментів. А оскільки структурні основи будови білкових ферментів і нуклеїнових кислот, до яких належать рибозими, надзвичайно відрізняються, викликало інтерес визначити характер pH -залежності ефективності реакції розщеплення tat РНК рибозимом типу "головка молотка". Графік залежності ефективності реакції розщеплення від pH реакційного середовища наведено на мал.6. Як видно з малюнка, максимальна ефективність реакції спостерігалась при нейтральних значеннях pH 6.9 - 7.2. При зростанні значення pH на одну одиницю ефективність реакції зменшувалась вдвічі. Подальше підвищення pH до значення 9.0 призводило до ще значнішого падіння ефективності реакції і, крім того, субстратна РНК ставала більш уразливою до неспецифічного гідролізу. Зниження pH нижче нейтрального рівня не так різко відбивалося на ефективності реакції. При pH 5.0 ефективність реакції зменшувалась вдвічі порівняно з рівнем ефективності при pH 7.0 (мал.6). Якщо ж прийняти до уваги досить значні хелатуючі властивості використаного у даному випадку цитратного буферу і пов'язане з цим неминуче зниження концентрації Mg^{2+} , яке ніяк не було компенсовано, то можна припустити, що реальна каталітична активність при pH 5.0 була дещо вищою за визначений рівень.

*Вплив моновалентних катіонів на ефективність розщеплення tat РНК рибозимом *in vitro*.* Вплив різних іонів двовалентних і перехідних металів на каталітичну активність рибозимів типу "головка молотка" добре вивчено (Dahm, Uhlenbeck, 1991).

Накопичення Б'-продукту,
(о.п.) x мм



Мал. 6. Залежність від рН ефективності розщеплення *tatPHK* рибозимом *in vitro*.

- 1 - 33 мМ Na-цитратний буфер, рН 5,0;
- 2 - 50 мМ імідазол-HCl, рН 6,6;
- 3 - 50 мМ K-фосфатний буфер, рН 7,0 або 7,4;
- 4 - 50 мМ трис-HCl, рН 7,4, 8,0 або 8,5.

Реакція тривала 100 хв. при 34° С.

Навпаки, дія іонів лужних металів зовсім не вивчалась, хоча моновалентні катіони металів теоретично можуть приймати участь якщо не безпосередньо у каталізі, то принаймні у стабілізації вторинної і третинної структур рибозиму.

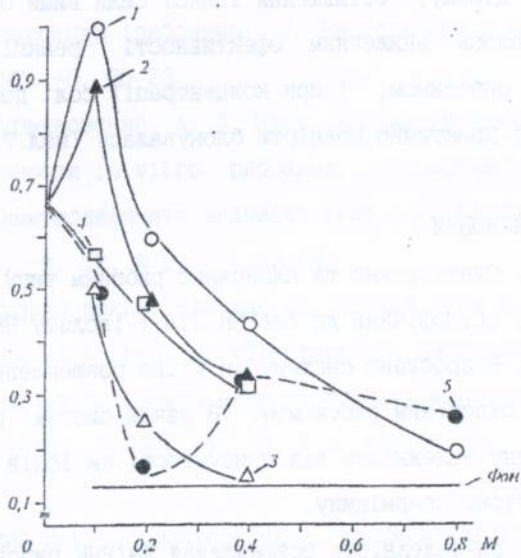
Як видно з малюнка 7, найбільший стимулюючий ефект

спостерігався при додаванні в реакційну суміш солей KCl і LiCl в концентраціях 0.1 М. При цьому накопичення 5'-продукту збільшувалось удвічі порівняно з реакцією, що проводилась у відсутності солі. Але при концентраціях, більших від 0.12 - 0.15 М відмічалось зниження ефективності реакції. При концентрації 0.4 М KCl зменшував ефективність розщеплення на 30 %, а LiCl - на 50 % порівняно з ефективністю у відсутності солі. Стимулюючий вплив іонів Li^+ повністю усувався, якщо в якості аніону виступав перхлорат-іон, ClO_4^- (мал. 7, крива 3). Відомо, що перхлорат-іони мають хаотропну дію і порушують структуру води. Тому цей результат може свідчити про важливість впливу саме структури води на каталітичну активність рибозиму.

Іони Na^+ виявляли менший вплив на розщеплення рибозимом *tat*РНК порівняно з іонами K^+ і Li^+ (дані не наводяться). Тож, за здатністю підвищувати ефективність розщеплення *tat*РНК рибозимом іони лужних металів можуть бути розташовані в черзі: $\text{K}^+ > \text{Li}^+ > \text{Na}^+$.

Іони амонію виявляли інгібуючий вплив, в усякому випадку, в концентраціях, вищих за 0.1 М (мал.7, крива 4). Це в деякій мірі несподіваний результат, оскільки відомо (Wang e.a., 1993), що іони амонію, як і іони калію, специфічно приймають участь у створенні і підтримці одного з елементів третинної структури у складі рРНК, який за розмірами і вторинною структурою практично повністю відтворює структуру "головки молотка" за винятком консервативних нуклеотидів. І оскільки іони калію в концентрації 0.1 М підвищували ефективність розщеплення *tat*РНК, очікувалось отримати аналогічний ефект також і у випадку іонів амонію. З іншого боку,

Накопичення 5'-продукту,
(о.п.) x мм



Мал.7. Залежність ефективності розщеплення tatРНК рибозимом від концентрації солей

1 - KCl ;

2 - LiCl ;

3 - LiClO₄;

4 - NH₄C₂H₃O₂;

5 - KCl у присутності 25 % формаміду.

Реакцію проводили протягом 120 хв. при 25° С.

отриманий результат підтверджує результати щодо інгібуючої дії неоміцину на каталітичну активність рибозиму типу "головка молотка" (Cluet-d'Orval e.a., 1995).

В цілому, збільшення іонної сили вище 0.1-0.2 М супроводжувалось зниженням ефективності реакції розщеплення *tat*РНК рибозимом, і при концентрації солі понад 0.6 - 0.8 М реакція практично повністю блокувалась (мал.7).

ВИСНОВКИ

1. Синтезовано та клоновано рибозим типу "головка молотка", специфічний до *tat*РНК ВІЛ-1 ізоляту ВН10.

2. Розроблено систему *in vitro* розщеплення транскрипту *tat*РНК створеним рибозимом. В даній системі рибозим виявляє абсолютну залежність від присутності як іонів Mg^{2+} , так і полікатіону спермідину.

3. рН-залежність розщеплення *tat*РНК рибозимом характеризується різким падінням ефективності реакції у слабколужному середовищі.

4. Іони лужних металів у фізіологічних концентраціях (0.1 М) мають різний стимулюючий вплив на ефективність реакції. За рівнем дії вони можуть бути розташовані у черговості: $K^+ > Li^+ > Na^+$.

5. Виявлено інгібуючий вплив іонів амонію на ефективність розщеплення *tat*РНК рибозимом.

6. Збільшення іонної сили понад 0.2 М пригнічує, а понад 0.8 М - цілком блокує розщеплення *tat*РНК рибозимом.

7. Отримані дані свідчать про важливість для каталітичної активності рибозиму іонних взаємодій, за рахунок яких може здійснюватись її регуляція.

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, НАДРУКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Л. Н. Бурьяновский, А. Д. Швед. Специфическая деструкция tat-РНК ВИЧ-1 *in vitro* с помощью каталитически активного полирибонуклеотида (рибозима). // Биополимеры и клетка. -1996. - т.12, N2. -С. 20-23.

2. Л. Н. Бурьяновский, А. Д. Швед. Характеристика каталитической активности *in vitro* рибозима, специфического к tat-РНК вируса иммунодефицита человека типа I // Биополимеры и клетка. -1996, -т. 12, N 6. -С. 69-73.

3. Л. Н. Бурьяновский. Влияние pH, ионной силы и ионного состава реакционной среды на эффективность расщепления *in vitro* tatРНК ВИЧ-1 рибозимом модели "головка молотка". // Биополимеры и клетка, -1997, -т. 13, N 1. -С. 30-35.

АНОТАЦІЇ

Бурьяновский Л.Н. Характеристика расщепления *in vitro* tatРНК ВИЧ-1 рибозимом модели "головка молотка". Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 - молекулярная биология. Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 1997 г. Защищаются 3 печатные работы, посвященные изучению расщепления в системе *in vitro* транскрипта (400 н.) tatРНК ВИЧ-1 рибозимом модели "головка молотка". Показана абсолютная зависимость каталитической активности рибозима не только от наличия Mg^{2+} , но и от наличия спермидина в реакционной среде. Выявлено различное по степени воздействия ($K^+ > Li^+ > Na^+$) стимулирующее влияние физиологических концентраций катионов щелочных металлов на эффективность расщепления. Ионы аммония ингибировали реакцию при всех исследованных концентрациях. Повышение pH выше значений 7.5 или концентрации соли выше

0.2 М снижало эффективность расщепления *tat*РНК. Эти данные свидетельствуют о важности ионных взаимодействий для каталитической активности рибозима типа "головка молотка".

Buryanovsky L.N. Characterization of in vitro cleavage of the HIV-1 *tat*RNA by using the hammerhead ribozyme. Dissertation thesis for Candidate of Science Degree on speciality 03.00.03 - molecular biology. Institute of Molecular Biology and Genetics, NASU, Kiyv, 1997. The three printed papers are defended, in which data on in vitro cleavage of 400 nt transcript of the HIV-1 *tat*RNA by using hammerhead ribozyme have been presented. Ribozyme catalytic activity shown strong dependence on both Mg^{2+} and spermidine presence. The alkaline metal ions at physiological concentrations (0.1 M) had different stimulatory effect on *tat*RNA cleavage and may be ranged in the row: $K^+ > Li^+ > Na^+$. NH_4^+ ions decreased cleavage at all concentrations tested. Raising pH above 7.5 or salt concentrations above 0.2 M reduced efficiency of *tat*RNA cleavage. These data suggest importance of ionic interaction for catalytic activity of the hammerhead ribozyme.

Ключові слова: РНК, рибозим.

Підписано до друку 16.04.97р. Формат 60x84/16.
Ум. друк. арк. 1,0. Обл.-вид. арк. 1,0.
Наклад 100. Зам. 128.

Відділ оперативної поліграфії
Центру Міжнародної освіти
227-12-75, 227-37-86

AB 37.464