

ПРИРОДНЫЕ РНК: МЕХАНИЗМЫ СПЕЦИФИЧЕСКОГО УЗНАВАНИЯ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Р.Н. Сериков, М.А. Зенкова, В.В. Власов

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия,
e-mail: marzen@niboch.nsc.ru

В работе анализируются закономерности взаимодействия антисмысловых РНК и синтетических олигонуклеотидов с природными РНК. Экспериментальные данные, полученные как зарубежными исследователями, так и авторами обзора, свидетельствуют о важной роли петлевых участков РНК в инициации образования высокоспецифических комплексов между нуклеиновыми кислотами. Показано, что в ряде случаев дополнительная стабилизация комплекса с олигонуклеотидом, расположенным в полностью комплементарном участке, происходит вследствие связывания второй молекулы олигонуклеотида с частично комплементарной последовательностью петли в РНК. Изучение кинетики взаимодействия олигонуклеотида с модельной РНК выявило сложный многостадийный механизм образования комплекса.

Введение

Селективное взаимодействие между различными РНК имеет фундаментальное значение и играет важную роль в регуляции экспрессии генов и жизнедеятельности всех организмов. Примерами такого взаимодействия является образование комплексов мРНК – тРНК, рРНК – мРНК (взаимодействия Шайна-Дальгарно), тРНК – рРНК в процессе трансляции (Doudna, Rath, 2002), димеризация геномных РНК вируса ВИЧ-1 и ретровирусов, праймирование обратной транскрипции РНК ВИЧ-1, протекающей с участием клеточной тРНК^{Lys} (Dardel *et al.*, 1998), регуляция копияности плазмид (del Solar, Espinosa, 2000), взаимодействие IRE (Iron Responsive Element) РНК с мРНК (Gegout *et al.*, 1999). Большая часть перечисленных комплексов основана на сиквенс-специфических взаимодействиях, протекающих с образованием от 3 (кодон – антикодон) до 30 пар оснований (HIV I) (Dardel *et al.*, 1998). Однако образование «классических» Уотсон-Криковских пар оснований часто не определяет селективное взаимодействие между РНК. Разнообразные неканонические пары оснований были найдены в пространственной структуре РНК и в комплексах РНК–РНК (Leontis, Westhof, 2001; Nagaswamy *et al.*, 2002),

например, в интроне группы I из *Tetrahymena thermophila* связывание стебля Р1 и одноцепочечной области J8/7 происходит с образованием водородных связей с участием 2'-ОН группы рибозы (Cate *et al.*, 1996). Известны примеры взаимодействий между РНК, основанные на узнавании пространственной структуры, например, узнавание пре-тРНК РНКазой Р (Christian *et al.*, 2002).

Природные РНК обладают компактной структурой, образованной за счет комплементарных взаимодействий между отдельными участками их последовательности, приводящих к формированию шпилек, и комплементарных взаимодействий между петлями (Battle, Doudna, 2002; Tinoco, 2002). Структура РНК может быть стабилизирована взаимодействиями с ионами металлов (Romer, Hach, 1975; Reid, Cowan, 1990; Cate *et al.*, 1996; Egli *et al.*, 2002) и белками (Mohr *et al.*, 1992; Herschlag, 1995; Xing, Draper 1995). Одноцепочечные последовательности встречаются в РНК редко. Значительные успехи были достигнуты в последние годы в исследовании элементов локальной структуры РНК (шпилек, симметричных и несимметричных петель, псевдоузлов) с помощью ЯМР (Scherr *et al.*, 2000; Battle, Doudna, 2002; Tinoco,

2002). Структура РНК изучается различными химическими (Ehresmann *et al.*, 1987; Maglott, Glick, 1998; Wittberger, 2000; Ofengand *et al.*, 2001; Lindell *et al.*, 2002), физико-химическими (Lietzke *et al.*, 1995; Altman *et al.*, 1999; Lilley, Wilson, 2000; Hoynes *et al.*, 2001; Nordgren *et al.*, 2001) и другими методами (Kjems, Egebjerg, 1998; Ota *et al.*, 1998). Взаимодействие между элементами вторичной структуры РНК обеспечивает формирование биологически активной трехмерной структуры РНК (Chastain, Tinoco, 1991). Шпильки и петли (в составе трехмерной пространственной структуры РНК) являются структурными элементами РНК, которые определяют специфичность ее взаимодействия с белками и другими нуклеиновыми кислотами (Chastain, Tinoco, 1991). Шпильчатые структуры также являются сайтами узнавания для регуляторных белков в таких биохимических процессах, как транскрипция (Yanofsky, 1981; Chan, Landick, 1989) и трансляция (Noller, 1984; Doudna, Rath, 2002). Взаимодействие между определенными шпильками РНК является ключевым этапом при узнавании РНК-мишени природными антисмысловыми РНК (Brunel *et al.*, 2002; Slagter-Jager, Wagner, 2003), а также в процессе димеризации ретровирусных РНК (Dardel *et al.*, 1998; Dirac *et al.*, 2002), приводящем к формированию биологически активного диплоидного генома ретровирусов. Многие данные свидетельствуют о том, что лимитирующей стадией процесса гибридизации двух РНК являются разворачивание структуры молекул РНК и образование протяженного дуплекса (Nomann *et al.*, 1993; Rittner *et al.*, 1993), взаимодействие между петлями обычно инициирует взаимодействие между двумя молекулами РНК (Brunel *et al.*, 2002).

В обзоре будут рассмотрены механизмы взаимодействия РНК между собой и с комплементарными РНК или олигонуклеотидами.

Kissing-комплексы – природные механизмы специфического узнавания РНК

Структурированные петли являются достаточно распространенным структурно-функциональным мотивом природных РНК и часто

выполняют основную роль в обеспечении специфичности РНК–РНК-взаимодействий. Так, взаимодействия петля–петля (loop–loop взаимодействие или kissing-комплекс) инициирует образование комплекса природных антисмысловых РНК с их РНК-мишенями (Eguchi, Itoh, 1991; Gregorian, Crothers, 1995; Gerhart, Wagner, 1998), димеризацию геномных РНК ретровирусов и сборку их нуклеокапсидных частиц (Skripkin *et al.*, 1994; Paillart *et al.*, 1996a, b; Laughrea *et al.*, 1997). Одними из наиболее изученных являются петли GNRA, они найдены в интронах групп I и II, РНКазе Р, рибозимах и рРНК (Correll, Swinger, 2003). Примеры наиболее изученных механизмов взаимодействий между двумя РНК у прокариот, протекающих через образование kissing-комплексов, приведены в табл. 1.

Антикодоновая петля транспортных РНК является широко известным примером петли, благоприятной для комплементарных взаимодействий, ее структура обеспечивает эффективное связывание с комплементарным участком мРНК (Uhlenbeck, 1972; Scarabino *et al.*, 1999). Не существует подходов для строгой количественной оценки термодинамических потенциалов нуклеотидов, находящихся в петле. В то же время понятно, что наличие специфического стэкинг-взаимодействия между основаниями в какой-либо из частей петли может благоприятствовать гибридизации с комплементарной последовательностью. Это было продемонстрировано в работе Gregorian (1995), в которой исследовались факторы, влияющие на стабильность специфического kissing-комплекса между РНК I и РНК II, регулирующего копийность плазмиды ColE1 *Escherichia coli*. Показано, что для образования kissing-комплекса необходима полная комплементарность оснований в петлях. Замены одной комплементарной пары внутри петли на другую почти не сказываются на эффективности комплексообразования, кроме концевых нуклеотидов петли. Замена или инверсия первого и седьмого нуклеотида приводит к существенным изменениям эффективности комплексообразования.

Анализ подвижности kissing-комплекса в нативном полиакриламидном геле показал формирование А-формы двойной спирали с

Таблица 1

Примеры взаимодействий, которые обуславливают формирование некоторых комплексов антисенс РНК/мРНК (Brunel *et al.*, 2002)

РНК	Мишень	Функция	Механизм связывания	Дополнительные факторы
СорА (из плазмиды IncFII)	<i>repA</i> мРНК	Контроль репликации, ингибирование трансляции	Многостадийный процесс, который инициируется loop-loop взаимодействием, образование полноразмерного дуплекса необязательно	
РНКI (из плазмид IncB и IncIα)	<i>repZ</i> мРНК	Контроль репликации, ингибирование трансляции	Многостадийный процесс, инициируется loop-loop взаимодействием, образование полноразмерного дуплекса необязательно	
РНКI (из плазмиды ColE1)	RNAII (пре-праймер)	Контроль репликации, процессинг праймера	Многостадийный механизм, инициируется loop-loop взаимодействием, образование полноразмерного дуплекса необязательно	Иницирующее взаимодействие стабилизируется Rom белком
РНКI (из плазмид рТ181 и рIP501)	<i>repC</i> мРНК	Контроль репликации, аттенуация транскрипции	Многостадийный механизм, инициируется loop-loop взаимодействием, образование полноразмерного дуплекса необязательно	
РНКI (из плазмиды ColE2)	<i>rep</i> мРНК	Контроль репликации, ингибирование трансляции	Многостадийный механизм, инициируется loop-loop взаимодействием	
РНКII (из плазмиды рAD1)	РНКI	Гибель после сегрегации, ингибирование трансляции	Многостадийный механизм, инициируется loop-loop взаимодействием	
FinP РНК (из плазмиды IncFI/FII)	<i>traJ</i> мРНК	Контроль конъюгации, ингибирование трансляции	Предположительно многостадийный механизм, инициируется loop-loop взаимодействием	Белок FinO стабилизирует РНК FinP и ускоряет взаимодействие FinP-traJ
Sar РНК (бактериофаг P22)	<i>ant</i> мРНК	Переключение лизис/лизогения, ингибирование трансляции	Трёхстадийный механизм, инициируется loop-loop взаимодействием	
OxyS <i>E. coli</i>	<i>fhlA</i> мРНК, <i>rpoS</i> мРНК	Окислительный стресс, ингибирование трансляции, ингибирование синтеза Hfq	Одностадийный механизм.	Hfq ускоряет образование комплекса OxyS-fhl1A
тРНК <i>B. subtilis</i>	мРНК аминоацил-тРНК син-тетаз	Регуляция аминоацил-тРНК синтетаз, антитерминация транскрипции	Одностадийный механизм	Предположительно стабилизация при связывании белка

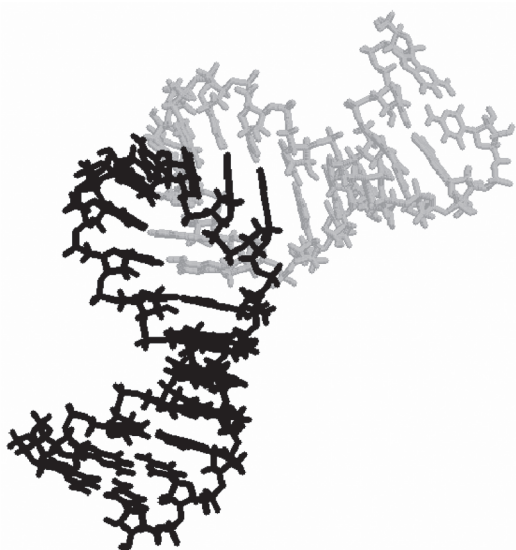


Рис. 1. Структура kissing-комплекса между РНК I и РНК II, полученная с помощью метода ЯМР.

некоторым изгибом относительно оси (Marino *et al.*, 1995). Структура таких kissing-комплексов была детально изучена с помощью метода ЯМР спектроскопии (рис. 1) (Lee, Crothers, 1998). В работах по исследованию влияния олигонуклеотидов на димеризацию *in vitro* транскриптов геномной РНК вируса HIV-1, включающего в себя основания 1-615, показано, что принципиальную роль в образовании kissing-комплекса играет природа рибозофосфатного остова нуклеотидов, находящихся в петле или комплементарных петле (Skripkin *et al.*, 1996). Ингибирование димеризации фрагментов геномной РНК HIV-1 происходило только в том случае, если нуклеотиды, комплементарные петле РНК HIV-1, имели рибозный, а не дезоксирибозный сахарный остов, что свидетельствует о принципиальной необходимости нуклеотидов риборяда для образования kissing-комплекса.

Известно, что протяжённые антисмысловые РНК, комплементарные области первых кодонов генов *tat* и *rev* вируса HIV-1, эффективно ингибируют размножение вируса (Homann *et al.*, 1993; Rittner *et al.*, 1993). Оказалось, что в антисмысловой РНК без потери ингибирующей активности могут быть удалены фрагменты длиной в несколько сот оснований, а самой короткой антисмысловой РНК, ингибирующей размножение вируса HIV-1, оказалась 69-звен-

ная РНК ($\alpha Y69$). Анализ структуры минимальной РНК и ее более длинных аналогов, также проявляющих ингибирующее действие, обнаружил Y-подобную структуру с петлями размером 5 и 10 оснований на концах Y. Подобный структурный элемент был обнаружен также и в 645-звенном фрагменте вирусной РНК (SR6), содержащем участок, комплементарный $\alpha Y69$ РНК. Анализ мутантных РНК, полученных из $\alpha Y69$ РНК (Homann *et al.*, 1993; Rittner *et al.*, 1993), показал, что решающую роль в процессе комплексообразования играет 10-звенная петля. Замены оснований в этой петле приводили почти к 10-кратному снижению константы скорости ассоциации двух РНК, в то время как замены в стеблях не оказывали большого влияния на скорость гибридизации. Это связано, видимо, с тем, что для образования kissing-комплекса между $\alpha Y69$ РНК и SR6 РНК, который является промежуточным в образовании полноразмерного дуплекса, необходима полная комплементарность петель. Мутантные РНК, в которых стебли были дестабилизированы, гибридизовались с HIV-1 РНК с большей скоростью, и, наоборот, стабилизация стеблей шпилек существенно замедляла процесс комплексообразования.

Таким образом, наличие петель в составе природных РНК может способствовать эффективной гибридизации с ними олигонуклеотидов, особенно рибо-ряда. Этот факт может объясняться как высокой стабильностью РНК/РНК дуплекса между комплементарными участками петель, так и особой внутренней структурой РНК петель, участвующих в образовании kissing-комплекса.

Взаимодействие олигонуклеотидов с РНК

Взаимодействие олигонуклеотидов с природными РНК в значительной степени отличается от гибридизации с синтетическими неструктурированными олигонуклеотидами (Bloomfield *et al.*, 1974; Cantor, Schimmel, 1980; Chastain, Tinoco, 1991). Наличие сложно организованной пространственной структуры у природных РНК предполагает, что часть участков связывания будет вовлечена во внутримолекулярные взаимодействия и будет недоступна

для непосредственного формирования Уотсон-Криковских комплементарных пар. Сложность пространственной структуры природных РНК требует учета большого количества параметров, необходимых для точного предсказания эффективности гибридизации олигонуклеотидов, комплементарных различным участкам РНК. В данном разделе будут рассмотрены работы, в которых было исследовано влияние структуры модельных РНК на их гибридизацию с олигонуклеотидами. Наибольшая часть исследований проводилась с использованием различных тРНК (Schimmel *et al.*, 1972; Uhlenbeck, 1972; Pulikowska, 1988; Kumazawa *et al.*, 1992; Utz *et al.*, 1994; Bulygin *et al.*, 1998; Scarabino *et al.*, 1999) и модельных РНК различной длины, полученных транскрипцией *in vitro* (Горшкова и др., 1986; Vary, 1987; Зенкова и др., 1990; Wetmur, 1991; Lima *et al.*, 1992; Stull *et al.*, 1992; Schwille *et al.*, 1996; Stull *et al.*, 1996; Bruice, Lima, 1997; Hjelstuen *et al.*, 1998; Aupeix *et al.*, 1999; Aupeix, Toulme, 1999). Основной задачей большинства перечисленных работ было изучение возможности гибридизации олигонуклеотидов с определенной РНК *in vitro*, а не выявление закономерностей взаимодействия олигонуклеотидов с природными РНК.

Влияние структуры модельной РНК-шпильки на гибридизацию с комплементарными

олигонуклеотидами изучали в работах (Lima *et al.*, 1992; Bruice, Lima, 1997). Использование простой модели – 47-звенной РНК шпильки, представляющей собой фрагмент *Ha-ras* мРНК, позволило авторам детально проанализировать влияние структуры РНК на процесс гибридизации с олигонуклеотидами (рис. 2).

Для двух олигонуклеотидов, комплементарных 5'-части петли шпильки, определенные константы ассоциации K_A^h были равны (с точностью до порядка величины) значениям K_A^s этих олигонуклеотидов с 10-звенными одноцепочечными олигонуклеотидами. Напротив, связывание олигонуклеотидов с участками РНК, находящимися в стебле, и участком, расположенным в 3'-части петли, было малоэффективным: значение K_A^h было на 5–6 порядков величин ниже, чем значение K_A^s , соответствующее взаимодействию с короткими одноцепочечными олигонуклеотидами. Авторы работы полагают, что такие различия в эффективности гибридизации олигонуклеотидов связаны со структурированностью петли: нуклеотиды 5'-части петли находятся в стэкинг-взаимодействии друг с другом и образуют конформацию, предпочтительную для образования комплементарных пар с олигонуклеотидом (рис. 2). Напротив, 3'-часть петли не обладает упорядоченной, удобной для гибридизации структурой и должна, по-видимо-

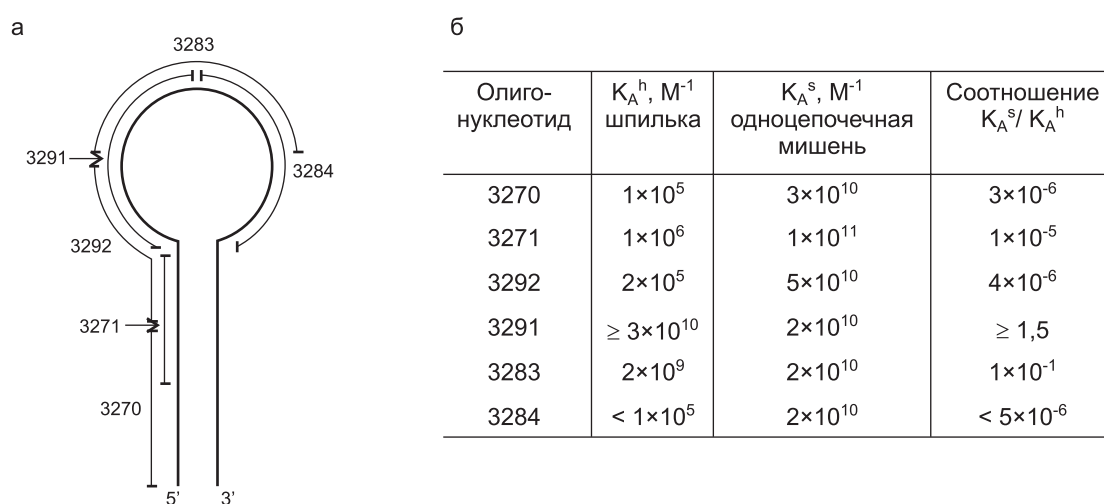


Рис. 2. 47-звенная шпилька *Ha-ras* и комплементарные к ней олигонуклеотиды. Номера 10-звенных олигонуклеотидов приведены в соответствии с работой (Lima *et al.*, 1992) (а). Константы связывания олигонуклеотидов с 47-звенной шпилькой (K_A^h) и одноцепочечными 10-звенными олигонуклеотидами (K_A^s) (б).

му, претерпеть значительные конформационные перестройки, для того, чтобы гибридизация с комплементарным олигонуклеотидом стала возможной.

Аналогичные данные были получены и в опытах с библиотеками олигонуклеотидов (Vruice, Lima, 1997). Было показано, что наиболее доступным для гибридизации с олигонуклеотидами участком 47-звенного фрагмента *Ha-ras* мРНК является 5'-часть петли. Более того, структурированность 5'-части петли (за счет стэкинг-взаимодействий оснований РНК) позволяет комплементарному олигонуклеотиду гибридизоваться с ней даже более эффективно, чем с линейным синтетическим олигонуклеотидом.

Известно, что 23S и 28S рибосомные РНК содержат участок α -сарциновой петли, кото-

рый представляется перспективной мишенью в разработке антисмысловых олигонуклеотидов, обладающих селективным антибактериальным или антимикотическим действием (Bohun, Twardowski, 1993; Noller *et al.*, 1995). Было подробно исследовано взаимодействие семи 15-звенных олигонуклеотидов с участком 2638–2682 α -сарциновой петли 23S рРНК *E. coli* (рис. 3) (Petyuk *et al.*, 2004). Сайты гибридизации олигонуклеотидов сдвинуты на 5 нуклеотидов и расположены симметрично относительно α -сарциновой петли: S1 – симметричен S7, S2 – S6, S3 – S5 соответственно. Олигонуклеотид S4 комплементарен непосредственно участку α -сарциновой петли.

Олигонуклеотид S3 образует один комплекс с РНК, а в случае олигонуклеотидов S4–S5,

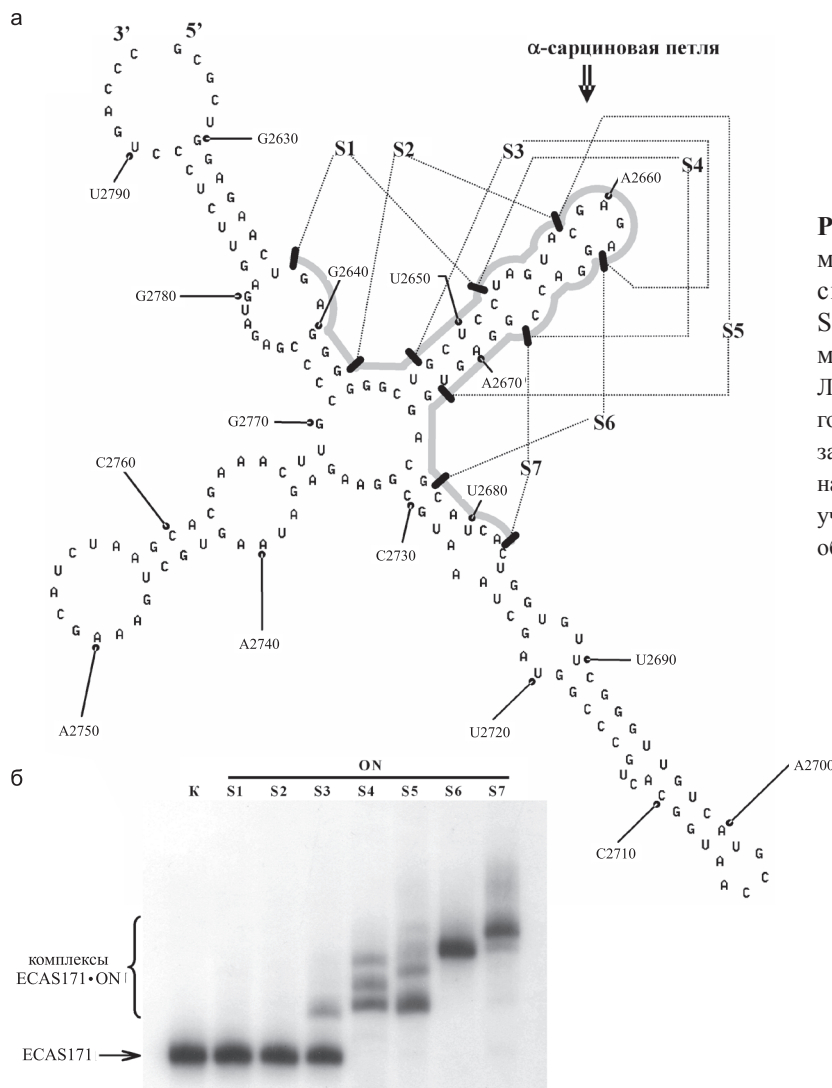


Рис. 3. Вторичная структура фрагмента РНК ECAS171 (а); анализ связывания олигонуклеотидов S1–S7 с фрагментом 23S рРНК методом задержки в геле (б).

Линией указан участок связывания олигонуклеотидов S1–S7. Штрихами показана разбивка сайта комплементации на 5 нуклеотидные участки. Границы участков связывания олигонуклеотидов обозначены прерывистыми линиями.

кроме основного комплекса с электрофоретической подвижностью, сходной с комплексом РНК•S3, образуется несколько комплексов с меньшей электрофоретической подвижностью (рис. 3). Олигонуклеотиды S6 и S7 образуют с фрагментом 23S рРНК один основной комплекс с аномально низкой электрофоретической подвижностью, а вклад дополнительных минорных комплексов незначителен. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что минорные комплексы формируются в результате дополнительного связывания еще одного или нескольких олигонуклеотидов в частично комплементарных сайтах. Пониженная электрофоретическая подвижность основных комплексов, образуемых олигонуклеотидами S6 и S7, а также появление полосы с более высокой электрофоретической подвижностью при использовании буфера с низкой ионной силой свидетельствуют о том, что в данных условиях происходит образование агрегированных (двойных) комплексов. Аналогичная ситуация была обнаружена при изучении взаимодействия олигонуклеотидов тРНК^{Phe} у дрожжей (Petyuk *et al.*, 1999a, b). В последнем случае первая молекула олигонуклеотида гибридизовалась в «правильном» комплементарном сайте, при этом происходило разворачивание структуры РНК. Вторая молекула олигонуклеотида связывалась с образованием несовершенного гетеродуплекса с полученным одноцепочечным участком РНК вблизи участка полной комплементарности олигонуклеотида. Кроме того, такие двойные комплексы дополнительно были стабилизированы за счет стэкинга. В случае фрагмента 23S рРНК при гибридизации олигонуклеотидов S6 и S7 в «правильном» сайте потенциально могут образоваться достаточно протяженные одноцепочечные участки длиной в 19 и 24 нуклеотида соответственно, с которыми и происходит формирование несовершенных комплексов (Petyuk *et al.*, 2004).

На примере фрагмента 23S рРНК, тРНК^{Phe} и ряда других моделей (Зенкова и др., 1990; Zenkova *et al.*, 1995; Petyuk *et al.*, 1999a, b, 2004) было показано, что характерным для взаимодействия РНК с олигонуклеотидами является образование частично комплементарных

комплексов. Для изучения их роли во взаимодействии олигонуклеотидов с РНК было проведено детальное изучение механизма взаимодействия олигонуклеотидов с природной РНК с помощью комбинации методов остановленной струи («stopped-flow») и резонансного переноса энергии флуоресценции (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) (Lilley, 2000; Klostermeier, Millar, 2001, 2002). Для проведения эксперимента к 3'-концевому остатку рибозы тРНК^{Phe}, полученной реакцией транскрипции *in vitro*, была присоединена флуоресцентная метка (N-(флуоресцеинил-6)-тиокарбамоил этилендиамин) с помощью метода, описанного в работе Д. Прудникова А. Мирзабекова (Proudnikov, Mirzabekov, 1996). К олигонуклеотиду был присоединён акцептор энергии DABCYL (рис. 4а) по стандартной процедуре с использованием окислительно-восстановительной пары $\text{Py}_2\text{S}_2 - \text{Ph}_3\text{P}$ для активации 5'-концевого фосфата (Zarytova *et al.*, 1993).

На рис. 4б показан механизм взаимодействия олигонуклеотида с дрожжевой тРНК^{Phe}, предложенный на основании данных по изучению кинетики взаимодействия. Гибридизация тРНК с олигонуклеотидом происходит в четыре этапа. В процессе образования комплекса с тРНК участвуют две молекулы олигонуклеотида, тогда как конечный гетеродуплекс содержит всего одну молекулу олигонуклеотида, связанную в полностью комплементарном участке тРНК. Первым этапом является взаимодействие между основаниями олигонуклеотида 1D и основаниями в ТЧС-петле с образованием нестабильного комплекса TGGTGCG/ACCUAGC (подчеркнута последовательность олигонуклеотида, курсивом выделен мисматч). Образование комплекса олигонуклеотида с последовательностью в ТЧС-петле вызывает дестабилизацию аминокцепторного стебля и, возможно, ТЧС-стебля тРНК, делая структуру этих стеблей, находящихся в коаксиальном стэкинге друг с другом, более подвижной, «дышащей». Вслед за этим начинается формирование «правильного» промежуточного комплекса между второй молекулой олигонуклеотида и ставшим более доступным одноцепочечным участком на 3'-конце тРНК (3'ACCAC5'), формирование

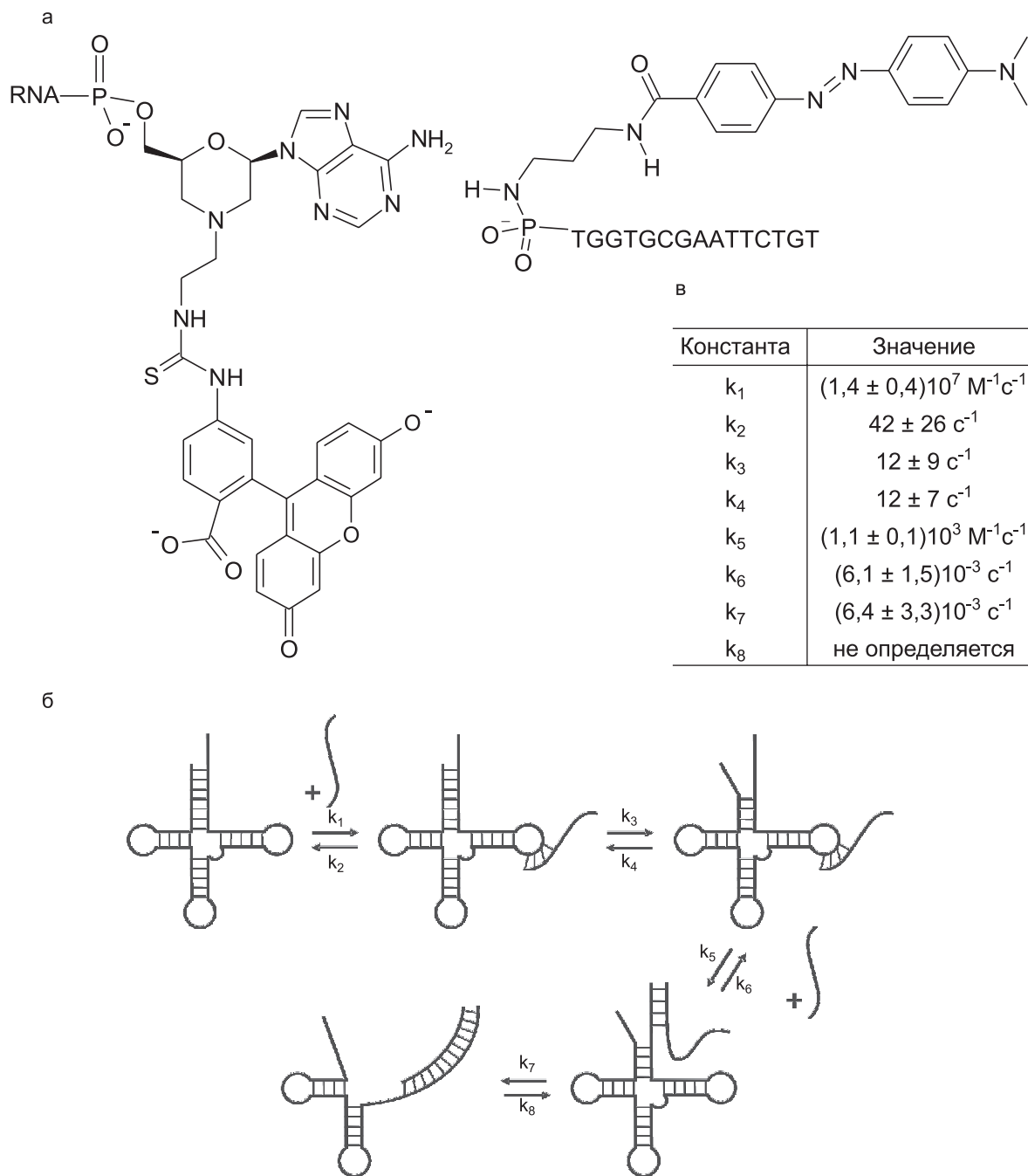


Рис. 4. Структуры соединений, использованные для изучения механизма внедрения олигонуклеотида в структуру РНК (а); механизм взаимодействия олигонуклеотида 1D с дрожжевой тРНК^{Phe} (б); рассчитанные в соответствии с предложенным механизмом значения констант скорости k_1 - k_8 (в).

этого метастабильного комплекса инициирует начало внутримолекулярной перегруппировки, приводящей к формированию полноразмерного гетеродуплекса тРНК•1D путем последовательного вытеснения из взаимодействия цепи тРНК, комплементарной участку связывания олиго-

нуклеотида. Характеристические времена для этой последней стадии взаимодействия хорошо коррелируют с аналогичными величинами, полученными с помощью метода задержки в геле и методом пробинга структуры РНК в процессе гибридизации с олигонуклеотидом (Petyuk *et*

al., 1999a, b). По-видимому, подробную схему взаимодействия удалось получить благодаря исключительной стабильности структуры тРНК (Uhlenbeck, 1972; Romby *et al.*, 1987; Petyuk *et al.*, 1999a, b), которая способствует более медленному формированию как полноразмерного гетеродуплекса, так и промежуточных комплексов. В случае использования других РНК в качестве мишеней с менее прочной пространственной структурой промежуточные комплексы могут образовываться слишком быстро, из-за чего они не регистрируются. Проведенное позже компьютерное моделирование подтвердило предложенную на основе экспериментальных данных схему взаимодействия, показав, что первичное частично комплементарное взаимодействие с олигонуклеотидом способствует формированию полноразмерного дуплекса.

Заключение

В последнее время находится всё большее количество экспериментальных подтверждений того, что в физиологических условиях процесс взаимодействия олигонуклеотидов со структурированными РНК является многостадийным. Полученные данные однозначно демонстрируют возможность внедрения олигонуклеотидов даже в стабильные высокоструктурированные участки мРНК в физиологических условиях в присутствии ионов магния, при этом эффективность процесса определяется в основном стабильностью структуры РНК в участке связывания и степенью изменения структуры РНК.

Обнаружено, что наиболее эффективно связывающиеся со своими мишенями олигонуклеотиды, помимо образования полноразмерных дуплексов, обладают способностью к формированию частично комплементарных комплексов, что ранее считалось более характерным для РНК-РНК-взаимодействий. Формирование таких несовершенных комплексов происходит в благоприятных условиях, т. е. олигонуклеотид, связывающийся с выбранной последовательностью, выполняет роль структурного триггера и создает в РНК одноцепочечные участки, связывание с которыми и эффективная модификация по которым происходят в составе малопрочных

комплексов, но в термодинамически благоприятных условиях. Учёт таких факторов при поиске последовательностей новых агентов для генной терапии может помочь исследователям в их более эффективной разработке

Литература

- Горшкова И.И., Зенкова М.А., Карпова Г.Г. и др. Комплементарноадресованная модификация 16S рРНК *Escherichia coli* с помощью 2'3'-0-[4-N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]бензилиденовых производных олигодезоксирибонуклеотидов. I. Кинетические параметры алкилирования // Молекуляр. биология. 1986. Т. 20. С. 1084–1097.
- Зенкова М.А., Карпова Г.Г., Левина А.С. и др. Комплементарно-адресованная модификация 16S рРНК *Escherichia coli* с помощью 2'3'-0-[4-N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]бензилиденовых производных олигодезоксирибонуклеотидов. IV. Идентификация сайтов связывания алкилирующих производных олигонуклеотидов (pACCTTGTT)rA, d(pTTACGACT)rU, d(TTGCTCCCC)rA с 16S рРНК // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 788–800.
- Altman R.K., Schwoppe I., Sarracino D.A. *et al.* Selection of modified oligonucleotides with increased target affinity via MALDI-monitored nuclease survival assays // J. Comb. Chem. 1999. V. 1. P. 493–508.
- Aupeix K., Le Tinevez R., Toulme J.J. Binding of oligopyrimidines to the RNA hairpin responsible for the ribosome gag-pol frameshift in HIV-1 // FEBS Lett. 1999. V. 449. P. 169–174.
- Aupeix K., Toulme J.J. Binding of chemically-modified oligonucleotides to the double-stranded stem of an RNA hairpin // Nucleosides, Nucleotides. 1999. V. 18. P. 1647–1650.
- Battle D.J., Doudna J.A. Specificity of RNA-RNA helix recognition // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 11676–11681.
- Bloomfield V., Crothers D., Tinoco I.Jr. Physical Chemistry of Nucleic Acids. N.Y.: Harper and Row, 1974.
- Bohun E., Twardowski T. alpha-Sarcin domain is a fragment of 23S and 26S rRNA strategic for ribosome function // Acta Biochim. Pol. 1993. V. 40. № 1. P. 12–16.
- Bruice T.W., Lima W.F. Control of complexity constraints on combinatorial screening for preferred oligonucleotide hybridization sites on structured RNA // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 5004–5019.
- Brunel C., Marquet R., Romby P., Ehresmann C. RNA loop-loop interactions as dynamic functional motifs // Biochimie. 2002. V. 84. P. 925–944.

- Bulygin K., Malygin A., Karpova G., Westermann P. Site-specific modification of 4.5S RNA apical domain by complementary oligodeoxynucleotides carrying an alkylating group // *Eur. J. Biochem.* 1998. V. 251. P. 175–180.
- Cantor C.R., Schimmel P.R. *Biophysical Chemistry. Part III: The Behavior of Biological Macromolecules.* N.Y.: W. H. Freeman and Co., 1980.
- Cate J.H., Gooding A.R., Podell E. *et al.* Crystal structure of a group I ribozyme domain: principles of RNA packing // *Science.* 1996. V. 273. P. 1678–1685.
- Chan C.L., Landick R. The *Salmonella typhimurium his* operon leader region contains an RNA hairpin-dependent transcription pause site. Mechanistic implications of the effect on pausing of altered RNA hairpins // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 20796–20804.
- Chastain M., Tinoco I., Jr. Structural elements in RNA // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 1991. V. 41. P. 131–177.
- Christian E.L., Zahler N.H., Kaye N.M., Harris M.E. Analysis of substrate recognition by the ribonucleo-protein endonuclease RNase P // *Methods.* 2002. V. 28. P. 307–322.
- Correll C.C., Swinger K. Common and distinctive features of GNRA tetraloops based on a GUAA tetraloop structure at 1.4 Å resolution // *RNA.* 2003. V. 9. P. 355–363.
- Dardel F., Marquet R., Ehresmann C. *et al.* Solution studies of the dimerization initiation site of HIV-1 genomic RNA // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 3567–3571.
- del Solar G, Espinosa M. Plasmid copy number control: an ever-growing story // *Mol. Microbiol.* 2000. V. 37. № 3. P. 492–500.
- Dirac A.M., Huthoff H., Kjems J., Berkhout B. Requirements for RNA heterodimerization of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2 genomes // *J. Gen. Virol.* 2002. V. 83. P. 2533–2542.
- Doudna J.A., Rath V.L. Structure and function of the eukaryotic ribosome: the next frontier // *Cell.* 2002. V. 109. P. 153–156.
- Egli M., Minasov G., Su L., Rich A. Metal ions and flexibility in a viral RNA pseudoknot at atomic resolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 4302–4307.
- Eguchi Y., Itoh T., Tomizawa J. Antisense RNA // *Annu. Rev. Biochem.* 1991. V. 60. P. 631–652.
- Ehresmann C., Baudin F., Mougél M. *et al.* Probing the structure of RNAs in solution // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. P. 9109–9128.
- Gegout V., Schlegl J., Schlager B. *et al.* Ligand-induced structural alterations in human iron regulatory protein-1 revealed by protein footprinting // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 21. P. 15052–15058.
- Gerhart E., Wagner H., Brantl S. Kissing and RNA stability in antisense control of plasmid replication // *Trends Biochem. Sci.* 1998. V. 23. P. 451–454.
- Gregorian R.S. Jr., Crothers D.M. Determinants of RNA hairpin loop-loop complex stability // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 248. P. 968–984.
- Herschlag D. RNA chaperones and the RNA folding problem // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 20871–20874.
- Hjelstuen O.K., Maelandsmo G.M., Tonnesen H.H. *et al.* Hybridization of a ⁹⁹Tcm-labelled oligodeoxynucleotide to CAPL RNA // *Nucl. Med. Commun.* 1998. V. 19. P. 803–812.
- Homann M., Rittner K., Sczakiel G. Complementary large loops determine the rate of RNA duplex formation *in vitro* in the case of an effective antisense RNA directed against the human immunodeficiency virus type 1 // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 233. P. 7–15.
- Hoyne P.R., Benson L.M., Veenstra T.D. *et al.* RNA-RNA noncovalent interactions investigated by microspray ionization mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001. V. 15. P. 1539–1547.
- Kjems J., Egebjerg J. Modern methods for probing RNA structure // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1998. V. 9. P. 59–65.
- Klostermeier D., Millar D.P. Time-resolved fluorescence resonance energy transfer: a versatile tool for the analysis of nucleic acids // *Biopolymers.* 2001–2002. V. 61. № 3. P. 159–179.
- Kumazawa Y., Yokogawa T., Tsurui H. *et al.* Effect of the higher-order structure of tRNAs on the stability of hybrids with oligodeoxyribonucleotides: separation of tRNA by an efficient solution hybridization // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. P. 2223–2232.
- Laughrea M., Jette L., Mak J. *et al.* Mutations in the kissing-loop hairpin of human immunodeficiency virus type 1 reduce viral infectivity as well as genomic RNA packaging and dimerization // *J. Virol.* 1997. V. 71. P. 3397–3406.
- Lee A.J., Crothers D.M. The solution structure of an RNA loop-loop complex: the ColE1 inverted loop sequence // *Structure.* 1998. V. 6. № 8. P. 993–1005.
- Leontis N.B., Westhof E. Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs // *RNA.* 2001. V. 7. P. 499–512.
- Lietzke S.E., Barnes C.L., Kundrot C.E. Crystallization and structure determination of RNA // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1995. V. 5. P. 645–649.
- Lilley D.M. Structures of helical junctions in nucleic acids // *Qu. Rev. Biophys.* 2000. V. 33. № 2. P. 109–159.
- Lilley D.M., Wilson T.J. Fluorescence resonance energy

- transfer as a structural tool for nucleic acids // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2000. V. 4. P. 507–517.
- Lima W.F., Monia B.P., Ecker D.J., Freier S.M. Implication of RNA structure on antisense oligonucleotide hybridization kinetics // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 12055–12061.
- Lindell M., Romby P., Wagner E.G. Lead(II) as a probe for investigating RNA structure in vivo // *RNA.* 2002. V. 8. P. 534–541.
- Maglott E.J., Glick G.D. Probing structural elements in RNA using engineered disulfide cross-links // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 1301–1308.
- Marino J.P., Gregorian R.S. Jr., Czankovszki G., Crothers D.M. Bent helix formation between RNA hairpins with complementary loops // *Science.* 1995. V. 268. P. 1448–1454.
- Mohr G., Zhang A., Gianelos J.A. *et al.* The neurospora CYT-18 protein suppresses defects in the phage T4 td intron by stabilizing the catalytically active structure of the intron core // *Cell.* 1992. V. 69. P. 483–494.
- Nagaswamy U., Larios-Sanz M., Hury J. *et al.* NCIR: a database of non-canonical interactions in known RNA structures // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. P. 395–397.
- Noller H.F. Structure of ribosomal RNA // *Annu. Rev. Biochem.* 1984. V. 53. P. 119–162.
- Noller H.F., Green R., Heilek G. *et al.* Structure and function of ribosomal RNA // *Biochem. Cell Biol.* 1995. V. 73. № 11/12. P. 997–1009.
- Nordgren S., Slagter J., Wagner G.H. Real time kinetic studies of the interaction between folded antisense and target RNAs using surface plasmon resonance // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 310. P. 1125–1134.
- Ofengand J., Del Campo M., Kaya Y. Mapping pseudouridines in RNA molecules // *Methods.* 2001. V. 25. P. 365–373.
- Ota N., Hirano K., Warashina M. *et al.* Determination of interactions between structured nucleic acids by fluorescence resonance energy transfer (FRET): selection of target sites for functional nucleic acids // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 735–743.
- Paillart J.C., Berthoux L., Ottmann M. *et al.* A dual role of the putative RNA dimerization initiation site of human immunodeficiency virus type 1 in genomic RNA packaging and proviral DNA synthesis // *J. Virol.* 1996a. V. 70. P. 8348–8354.
- Paillart J.C., Skripkin E., Ehresmann B. *et al.* A loop-loop «kissing» complex is the essential part of the dimer linkage of genomic HIV-1 RNA // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1996b. V. 93. P. 5572–5577.
- Petyuk V.A., Serikov R.N., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Hybridization of antisense oligonucleotides with alpha-sarcin loop region of *Escherichia coli* 23S rRNA // *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids.* 2004. V. 23. № 6/7. P. 895–906.
- Petyuk V.A., Zenkova M.A., Giege R., Vlassov V.V. Hybridization of antisense oligonucleotides with the 3' part of tRNA(Phe) // *FEBS Lett.* 1999a. V. 444. № 2/3. P. 217–221.
- Petyuk V., Zenkova M., Giege R., Vlassov V. Interaction of complementary oligonucleotides with the 3'-end of yeast tRNA(Phe) // *Nucleosides Nucleotides.* 1999b. V. 18. № 6/7. P. 1459–1461.
- Proudnikov D., Mirzabekov A. Chemical methods of DNA and RNA fluorescent labeling // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 4535–4542.
- Pulikowska J., Wlodarczyk A., Kraszewski A. *et al.* The inhibitory effect of oligodeoxynucleotides complementary to different fragments of tRNA structure on the enzymatic binding of Phe-tRNA to poly-U-programmed eukaryotic ribosomes // *Biofactors.* 1988. V. 1. P. 193–196.
- Reid S.S., Cowan J.A. Biostructural chemistry of magnesium ion: characterization of the weak binding sites on tRNA(Phe)(yeast). Implications for conformational change and activity // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 6025–6032.
- Rittner K., Burmester C., Sczakiel G. *In vitro* selection of fast-hybridizing and effective antisense RNAs directed against the human immunodeficiency virus type 1 // *Nucl. Acids. Res.* 1993. V. 21. P. 1381–1387.
- Romby P., Moras D., Dumas P. *et al.* Comparison of the tertiary structure of yeast tRNA(Asp) and tRNA(Phe) in solution. Chemical modification study of the bases // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 195. P. 193–204.
- Romer R., Hach R. tRNA conformation and magnesium binding. A study of a yeast phenylalanine-specific tRNA by a fluorescent indicator and differential melting curves // *Eur. J. Biochem.* 1975. V. 55. P. 271–284.
- Scarabino D., Crisari A., Lorenzini S. *et al.* tRNA prefers to kiss // *The EMBO J.* 1999. V. 18. P. 4571–4578.
- Scherr M., Rossi J.J., Sczakiel G., Patzel V. RNA accessibility prediction: a theoretical approach is consistent with experimental studies in cell extracts // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. P. 2455–2461.
- Schimmel P.R., Uhlenbeck O.C., Lewis J.B. *et al.* Binding of complementary oligonucleotides to free and aminoacyl transfer ribonucleic acid synthetase bound transfer ribonucleic acid // *Biochemistry.* 1972. V. 11. P. 642–646.
- Schwille P., Oehlenschlaeger F., Walter N.G. Quantitative hybridization kinetics of DNA probes to RNA in solution followed by diffusional fluorescence correlation analysis // *Biochemistry.* 1996. V. 35. P. 10182–10193.
- Skripkin E., Paillart J.C., Marquet R. *et al.* Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization *in vitro* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 4945–4949.

- Skripkin E., Paillart J.C., Marquet R. *et al.* Mechanisms of inhibition of *in vitro* dimerization of HIV type I RNA by sense and antisense oligonucleotides // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 46. P. 28812–28817.
- Slagter-Jager J.G., Wagner E.G. Loop swapping in an antisense RNA/target RNA pair changes directionality of helix progression // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 37. P. 35558–35563.
- Stull R.A., Taylor L.A., Szoka F.C. Jr. Predicting antisense oligonucleotide inhibitory efficacy: a computational approach using histograms and thermodynamic indices // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. P. 3501–3508.
- Stull R.A., Zon G., Szoka F.C. Jr. An *in vitro* messenger RNA binding assay as a tool for identifying hybridization-competent antisense oligonucleotides // *Antisense Nucl. Acid Drug. Dev.* 1996. V. 6. P. 221–228.
- Tinoco I., Jr. Physical chemistry of nucleic acids // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2002. V. 53. P. 1–15.
- Uhlenbeck O.C. Complementary oligonucleotide binding to transfer RNA // *J. Mol. Biol.* 1972. V. 65. P. 25–41.
- Utz E.D., Siravo-Sagraves G.M., Trewyn R.W., Morgan C.J. Detection of human tRNAs with antisense oligonucleotides // *Anal. Biochem.* 1994. V. 216. P. 110–117.
- Vary C.P. A homogeneous nucleic acid hybridization assay based on strand displacement // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. P. 6883–6897.
- Wetmur J.G. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1991. V. 26. P. 227–259.
- Wittberger D., Berens C., Hammann C. *et al.* Evaluation of uranyl photocleavage as a probe to monitor ion binding and flexibility in RNAs // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 300. P. 339–352.
- Xing Y., Draper D.E. Stabilization of a ribosomal RNA tertiary structure by ribosomal protein L11 // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 249. P. 319–331.
- Yanofsky C. Attenuation in the control of expression of bacterial operons // *Nature.* 1981. V. 289. P. 751–758.
- Zarytova V.F., Sergeyev D.S., Godovikova T.S. Synthesis of bleomycin A5 oligonucleotide derivatives and site-specific cleavage of the DNA target // *Bioconjug. Chem.* 1993. V. 4. P. 189–193.
- Zenkova M., Ehresmann C., Caillet J. *et al.* A novel approach to introduce site-directed specific cross-links within RNA-protein complexes. Application to the *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase/translational operator complex // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 231. № 3. P. 726–735.

NATURAL RNAs: MECHANISMS OF SPECIFIC RECOGNITION AND INTERACTION

R.N. Serikov, M.A. Zenkova, V.V. Vlassov

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: marzen@niboch.nsc.ru

Summary

In the present article principles of interaction of antisense RNAs and synthetic oligonucleotides with natural RNAs are analyzed. Many experimental data obtained both by foreign authors and the authors of this review indicate an important function of RNA loop regions in initiation of formation of highly specific complexes between nucleic acids. In a number of cases additional stabilization of the complex RNA-oligonucleotide is shown to take place due to binding of the second oligonucleotide molecule within partially complementary RNA loop sequence. Investigation of kinetics of oligonucleotide binding with model RNA revealed a multi-step formation of this complex.