

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БОКОВЫХ ПЕТЕЛЬ РНК К РАСЩЕПЛЕНИЮ ИОНАМИ МЕТАЛЛОВ, ПРИРОДНЫМИ И ИСКУССТВЕННЫМИ РНКазами

И.Л. Кузнецова, М.А. Зенкова, В.В. Власов

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия,
e-mail: irakuzn@yahoo.com

Боковые петли РНК чувствительны к расщеплению под действием широкого спектра соединений и представляют собой привлекательную потенциальную мишень для направленного расщепления РНК в целях инактивации, например, вирусных геномных РНК. В обзоре рассмотрены данные по расщеплению РНК по фосфодиэфирным связям, расположенным в боковых петлях, факторы, влияющие на эффективность этой реакции, и современное состояние проблемы направленного расщепления РНК под действием различных РНК-расщепляющих агентов.

Введение

В последние годы было создано большое число низкомолекулярных соединений, способных расщеплять РНК в физиологических условиях (Morrow, 1994; Trawick *et al.*, 1998; Shinozuka *et al.*, 2001; Zenkova, 2004). Расщепление РНК под действием этих соединений проходит преимущественно по участкам, не занятым в образовании двуспиральных структур: это разнообразные петли, одноцепочечные участки и участки соединения нескольких шпилек – перекрестки. Боковые петли в составе нуклеиновых кислот являются часто встречаемым элементом вторичной структуры и обеспечивают подвижность рибозо-фосфатного остова, необходимую для сворачивания РНК. Эти участки, содержащие нуклеотиды, не имеющие комплементарных оснований в противоположной цепи РНК, играют важную биологическую роль: они определяют третичную структуру РНК (Woese, Gutell, 1989), являются сайтами специфических РНК-белковых взаимодействий (Valegard *et al.*, 1997), а также формируют активные центры рибозимов (Schmidt *et al.*, 1996). В данном обзоре будут рассмотрены работы, посвященные анализу чувствительности фосфодиэфирных связей

в боковых петлях РНК к расщеплению различными соединениями в сравнении с расщеплением других структурных элементов РНК.

Геометрические параметры межнуклеотидных связей и стабильность РНК

Многие рибонуклеазы и рибозимы расщепляют РНК по механизму внутримолекулярного перемещения фосфодиэфирной связи – трансэтерификации (Raines, 1998). Предполагается, что реакция трансэтерификации РНК возможна только в том случае, если атакующий кислород 2'-гидроксильной группы нуклеофила расположен на одной линии (in-line) с 5'-оксианионом уходящей группы, т. е. уходящая группа (кислород 5'-гидроксила), атом фосфора и нуклеофил (кислород 2'-гидроксильной группы) располагаются строго линейно (Soukup, Breaker, 1999). Таким образом, чувствительность фосфодиэфирных связей в боковых петлях РНК к расщеплению по механизму трансэтерификации должна определяться их способностью принимать линейную конформацию. Двучепочечная РНК и РНК в составе РНК : ДНК дуплексов обычно имеет А-форму спирали, в которой 2'-оксианион и 5'-оксианион уходящей группы

расположены таким образом, что образование линейной конформации затруднено. Это обуславливает высокую стабильность двуспиральных участков РНК и РНК : ДНК дуплексов в физиологических условиях по сравнению с одноцепочечными участками РНК, в которых фосфодиэфирные связи подвижны и могут принимать линейную конформацию случайно. Спонтанная реализация линейной конформации фосфодиэфирной связи возможна в том случае, если соответствующий участок структуры РНК обладает достаточной подвижностью. Подвижность боковой петли определяется ее размером и эффективностью стэкинг-взаимодействий нуклеотидов в петле между собой и с «ближайшими соседями» (Soukup, Breaker, 1999).

Согласно расчетам, нуклеотиды в боковой петле РНК могут принимать две основные конформации: быть выпетленными наружу или находиться в стэкинге внутри спирального участка (Portmann *et al.*, 1996; Soukup, Breaker, 1999; Zacharias, Sklenar, 1999; Sudarsanakumar *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000; Xiong *et al.*, 2001). В петлях, состоящих из более чем одного нуклеотида, наблюдается большее разнообразие конформаций, которое возникает вследствие

формирования сети водородных связей и стэкинг-взаимодействий между нуклеотидами внутри петли, а также нуклеотидами в петле и фланкирующими их парами оснований (Diener, Moore, 1998; Wedekind, McKay, 1999). Сегодня невозможно теоретически предсказать чувствительность связей в каждой конкретной петле к расщеплению и, тем более, предложить геометрические параметры для дизайна каталитической группировки, способной селективно расщеплять связи в боковых петлях.

Расщепление боковых петель РНК ионами металлов

Среди ионов двухвалентных металлов ионы свинца наиболее эффективно расщепляют РНК в физиологических условиях (Brown *et al.*, 1983). При скрининге расщепления олигорибонуклеотидов, образующих боковые петли длиной 1–4 нуклеотида (рис. 1а) под действием Pb^{2+} , олигорибонуклеотиды различались длиной и последовательностью петли и фланкирующими ее основаниями (Ciesiolka *et al.*, 1998).

Однозвенные петли, содержащие аденин, фланкированные G : C-парами с обеих сторон,

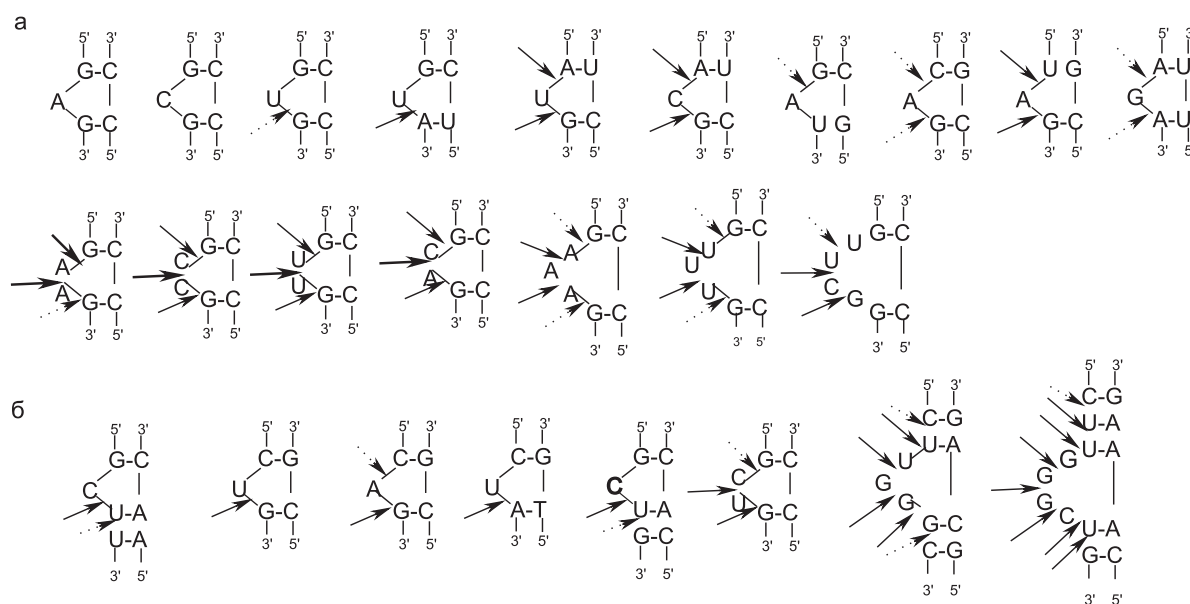


Рис. 1. Чувствительность фосфодиэфирных связей в боковых петлях РНК к расщеплению (а) ионами Pb^{2+} (Ciesiolka *et al.*, 1998) и (б) ионами Mg^{2+} (Husken *et al.*, 1996). Интенсивность расщепления по каждой связи соответствует толщине стрелки.

не расщеплялись ионами Pb^{2+} . Замена фланкирующих пар показала, что эффективность расщепления в петле зависит от последовательности петли и прилегающих к ней оснований: если с 5'-стороны от петли находится уридин (U:A- или U:G-пары), то расщепление в петле проходит более эффективно по сравнению с петлей, фланкированной с 5'-стороны цитидином или гуанозином (G:C- или C:G-парами). Этот факт авторы объясняют различиями в стэкинг-взаимодействии выпетленного основания с фланкирующими его основаниями. Известно, что эффективность стэкинг-взаимодействий падает в ряду $Pu-Pu > Py-Pu > Pu-Py$, причем основание с 5'-стороны вносит наибольший вклад в стэкинг-взаимодействия. В случае если основание в петле находится в стэкинге с соседними основаниями, фосфодиэфирные связи нуклеотида в петле принимают конформацию, подобную конформации в двуцепочечной РНК, и становятся малочувствительными к расщеплению. Двухзвенные боковые петли (UU, CC, AA и CA), расположенные между двумя G:C-парами оснований, подвергались расщеплению ионами Pb^{2+} в одинаковой степени: расщеплению подвергались все три фосфодиэфирные связи, расположенные в петле, причем наиболее эффективно расщеплялась связь в середине петли. Такая же закономерность наблюдалась и для трехзвенных боковых петель. Сравнение расщепления РНК в боковых петлях и петлях шпильки, содержащих одинаковые последовательности, показало, что чувствительность к расщеплению этих структурных элементов сильно различается. Так, последовательность UUCG стабильна и не подвергается расщеплению в составе апикальной петли шпильки, но становится очень чувствительна к расщеплению ионами Pb^{2+} в составе боковой петли.

В работе (Husken *et al.*, 1996) была изучена чувствительность связей в боковых петлях РНК к расщеплению ионами магния. Образование боковых петель длиной 1–4 нуклеотида в 5'-концевой области 132-звенной РНК индуцировали гибридизацией с олигодезоксирибонуклеотидами. Известно, что ионы магния в концентрации 2,5 мМ в слабощелочных условиях (рН 8,0) при температуре 60 °С

способны эффективно расщеплять РНК по одноцепочечным участкам (Husken *et al.*, 1996). Все боковые петли в составе комплексов РНК: олигонуклеотид расщеплялись ионами Mg^{2+} (рис. 1б). В однонуклеотидных боковых петлях расщепление проходило преимущественно по фосфодиэфирным связям с 3'-стороны от выпетленных нуклеотидов. С 5'-стороны от выпетленных нуклеотидов наблюдалось менее интенсивное расщепление. Появление сайтов вторичного расщепления с 5'-стороны боковой петли авторы объяснили повышением подвижности петлевого нуклеотида после завершения расщепления наиболее чувствительной связи (первичного расщепления). В случаях, когда с 3'-стороны боковую петлю фланкировали A:U(T)-пары, вторичные сайты расщепления наблюдались и в участках, занятых в комплексе с олигонуклеотидом, что объясняется пониженной стабильностью гетеродуплекса с точечным разрывом. Однако, в отличие от расщепления боковых петель ионами Pb^{2+} , все однозвенные петли расщеплялись ионами магния с одинаковой интенсивностью вне зависимости от типа основания в петле и фланкирующих его пар оснований. При увеличении длины искусственной петли до 2–4 нуклеотидов наряду с первичным расщеплением по фосфодиэфирной связи с 3'-стороны петли интенсивное расщепление происходило и с 5'-стороны петли и в двуцепочечном участке, прилегающем к петле. Следует отметить, что наряду с расщеплением в искусственных боковых петлях расщепление проходило и по всем остальным одноцепочечным участкам в составе 132-звенной РНК. Сравнение расщепления РНК в боковых петлях с расщеплением в искусственных мисматчах показало, что в отличие от боковых петель, в случае мисматчей происходит индукция расщепления последовательностей, фланкирующих мисматч.

Расщепление боковых петель ионами Zn^{2+} исследовали, используя в качестве субстрата 2'-О-метильные олигорибонуклеотиды, содержащие боковые петли длиной 1–5 нуклеотидов, в которых одно из звеньев в петле не содержало 2'-О-модификацию. Поскольку 2'-О-метильные олигорибонуклеотиды не расщепляются РНК-

расщепляющими агентами, такие модельные РНК позволили авторам проанализировать чувствительность фосфодиэфирных связей в боковых петлях по отдельности. Наиболее эффективное расщепление наблюдалось в случае пятизвенной боковой петли, содержащей немодифицированный уридин (rU) в центре. Связь, образованная этим уридином, расщеплялась в два раза быстрее, чем аналогичная связь в составе полностью одноцепочечного олигорибонуклеотида. 4- и 3-звенные петли, содержащие либо рибоаденозин, либо рибоуридин в апикальной позиции, расщеплялись ионами Zn^{2+} примерно с такой же скоростью. В случае 1- и 2-звенных боковых петель наблюдалось резкое падение скорости расщепления. Компьютерный анализ структуры олигорибонуклеотидов, содержащих боковые петли, показал, что 5-звенные петли с рибонуклеотидом в апикальной позиции или ближе к 5'-концу петли имеют одинаковую конформацию, в которой все нуклеотиды находятся внутри спирали. Такая же структура была получена и для 2-звенной петли, однако скорости расщепления для 5-звенной петли с рибонуклеотидом ближе к 5'-концу петли и 2-звенной петли были ниже по сравнению с 5-звенной петлей с апикальным рибонуклеотидом в 3 и 6 раз соответственно. Значения параметров геометрии фосфодиэфирных связей, полученные из экспериментов по моделированию, для всех типов петель сильно отличались от значений, характерных для линейной конформации. Авторы заключили, что наиболее важным аспектом, определяющим чувствительность фосфодиэфирных связей к расщеплению, является их подвижность.

Таким образом, можно сделать вывод, что большинство боковых петель в РНК или в РНК : ДНК-комплексах способны расщепляться ионами двухвалентных металлов, причем направленность расщепления отличается от расщепления мисматчей и апикальных петель шпилек. Расщепление носит статистический характер: расщепляются связи, расположенные с 3'- и в некоторых случаях с 5'-стороны от всех нуклеотидов в петлях, кроме того, могут подвергаться расщеплению связи вблизи боковой петли, но входящие в состав РНК : ДНК-дуплекса.

Расщепление РНК в боковых петлях чаще всего не влияет на характер (интенсивность) расщепления по другим одноцепочечным участкам в составе РНК.

Расщепление боковых петель РНК РНКазой А и искусственными РНКазами

Ранее было показано, что расщепление РНК в физиологических условиях ($pH = 7,0$, $37\text{ }^{\circ}C$) проходит эффективно в присутствии небольших синтетических конструкций, имитирующих активные центры природных РНКаз (Podyminogin *et al.*, 1993; Zenkova *et al.*, 2001; Mironova *et al.*, 2004). Наиболее простым из таких агентов является имидазол, имитирующий остатки гистидина активного центра РНКазы А, который в концентрации 1 М статистически расщепляет фосфодиэфирные РНК по одноцепочечным участкам (Breslow, Labelle, 1986). Более сложные молекулы, имитирующие РНКазу А (искусственные РНКазы), обычно содержат РНК-связывающий фрагмент, представленный, например, интеркалятором, катионными структурами или олигонуклеотидом (Tung *et al.*, 1992; Podyminogin *et al.*, 1993; Beloglazova *et al.*, 2004). В работах Ждан и др. (1999) и Кузнецова и др. (2004) была исследована чувствительность боковых петель РНК к расщеплению имидазолом, короткими катионными пептидами, имитирующими активный центр РНКазы А, и искусственными РНКазами на основе 1,4-диазабигло[2.2.2]октана, несущего олигометиленовые фрагменты на четвертизованных атомах азота (Koval'ov *et al.*, 2004). В качестве РНК-мишени был использован 96-звенный фрагмент М2 РНК вируса гриппа, в которой формировали боковые петли различной длины (от 1 до 7 нуклеотидов), и последовательности с помощью гибридизации этой РНК с частично комплементарными олигонуклеотидами (рис. 2), аналогично работе Husken *et al.* (1996). Авторы показали, что характер расщепления боковых петель РНК имидазолом совпадает с расщеплением ионами металлов: расщепляются все фосфодиэфирные связи в боковой петле, а также все остальные одноцепочечные участки РНК. Однако, в отличие от расщепле-

ния ионами магния, в коротких боковых петлях (< 5 звеньев) расщепления около петли (в двуцепочечном участке) не наблюдалось. В случае боковых петель длиной от 5 до 7 нуклеотидов расщепление имидазолом проходило как в петле, так и в прилегающих участках. Возможно, это связано с тем, что в случае коротких петель олигонуклеотиды образуют прочный комплекс с РНК, в случае более длинных петель образуются менее прочные, «дышащие» комплексы, в которых РНК заметное время находятся в диссоциированном состоянии.

РНКаза А расщепляет такие боковые петли РНК по фосфодиэфирным связям в СрА-мотивах (рис. 3), за исключением однозвенных боковых петель. Кроме связей в боковых петлях, расщеплению РНКазой А подвергались связи в СрА-мотивах в остальных одноцепочечных участках РНК. Аналогичный характер расщепления наблюдался и для искусственных РНКаз. При этом степень расщепления фосфодиэфирных связей в петле варьировала в зависимости от длины и нуклеотидной последовательности петли. Для того чтобы оценить, насколько чувствительность фосфодиэфирных связей в искусственных боковых петлях отличается от чувствительности остальных связей

в этой РНК, было введено понятие «селективность» – отношение степени расщепления РНК по связям в боковой петле к суммарной степени расщепления РНК в данном комплексе. Оказалось, что значение селективности расщепления зависит от типа искусственной РНКазы (рис. 4). Природная РНКаза А расщепляет боковые петли РНК с низкой селективностью не выше 0,1. Другими словами, расщепление по связям в петле происходит с более низкой или сходной эффективностью, как и по остальным расщепляемым фосфодиэфирным связям РНК. Селективность расщепления РНКазомиметиками, представляющими собой короткие катионные пептиды, имитирующие активный центр РНКазы А и РНКазы Т1, также была невысокой (рис. 4). В случае соединений, содержащих остаток 1,4-диазабиглицикло[2.2.2]октана (**Dp12** (Koval'ov *et al.*, 2004), **ABL4C3** (Konevets *et al.*, 1999)), селективность расщепления была наибольшей. Максимальная селективность расщепления одной СА связи (0,4) наблюдалась в случае четырехзвенной петли, содержащей СА-связь в апикальном положении. Присутствие в петле второго СА-мотива увеличивало селективность расщепления в петле до 0,5. Интересно, что в комплексах, где олигонук-

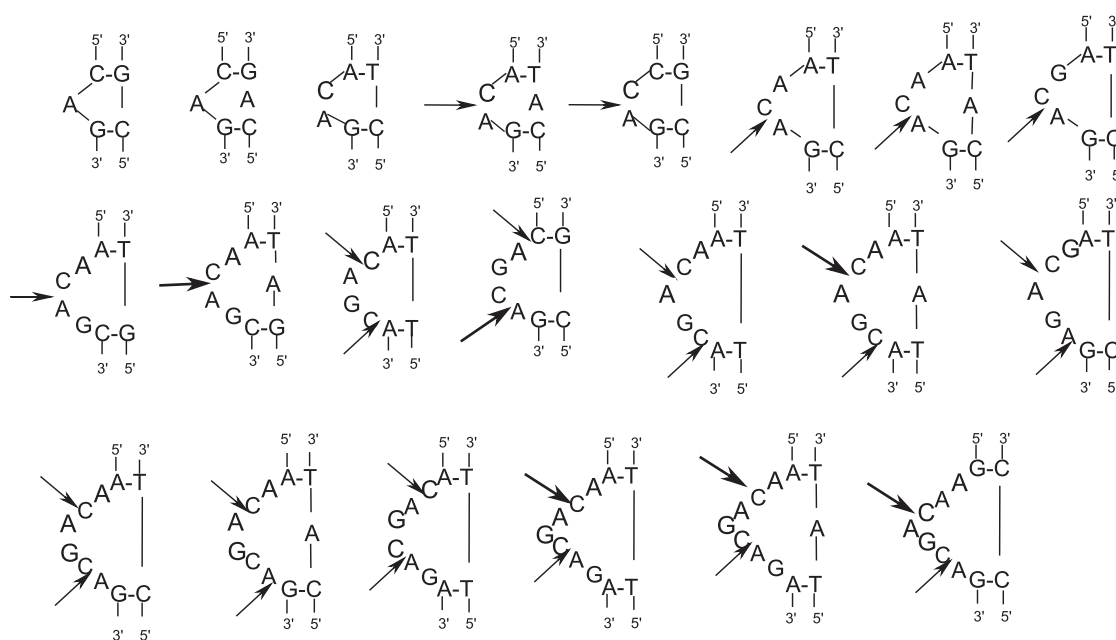


Рис. 2. Чувствительность фосфодиэфирных связей в боковых петлях РНК к расщеплению искусственными РНКазами и РНКазой А (Kuznetsova *et al.*, 2005).

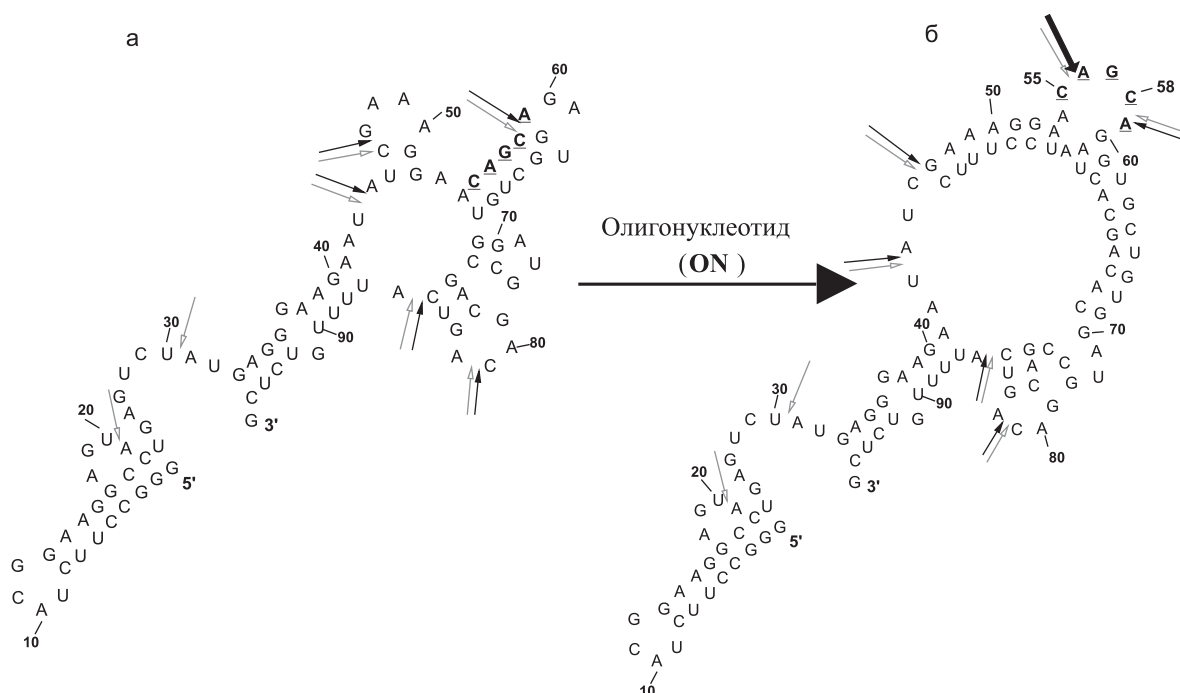


Рис. 3. Вторичная структура 96-звенного фрагмента М2 РНК вируса гриппа (а) и его комплекса с олигодезоксирибонуклеотидом, образующим боковую петлю (б) (Kuznetsova *et al.*, 2005). Стрелки указывают сайты расщепления М2-96 РНК соединением АBL4С3 в отсутствие (серые) и в присутствии (черные) 10 мМ Mg²⁺. Толщина стрелок соответствует интенсивности расщепления по данной связи.

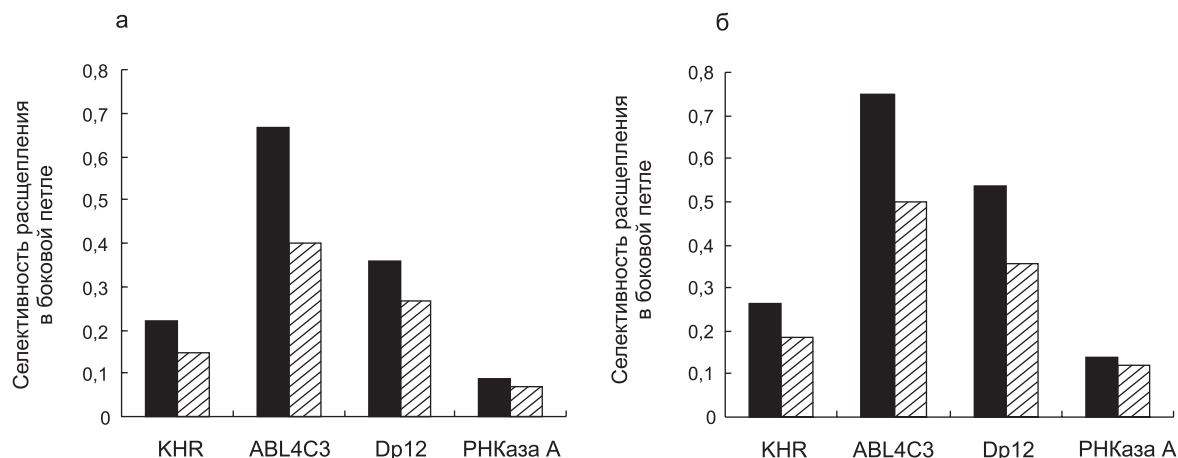


Рис. 4. Селективность расщепления РНК по связям в искусственных 4-звенных (а) и 7-звенных (б) боковых петлях в присутствии (черные столбцы) и в отсутствие (штрихованные столбцы) 10 мМ MgCl₂.

леотид содержит некомплементарный аденозин напротив петли, селективность расщепления была всегда выше, чем в комплексах с олигонуклеотидами, не содержащими такого некомплементарного основания. Следует отметить, что связывание олигонуклеотидов, содержащих дополнительный аденозин, согласно данным

гель-шифт анализа, не отличалось от связывания олигонуклеотида без некомплементарного аденозина (Kuznetsova *et al.*, 2005). Следовательно, повышенная селективность расщепления в петлях может быть обусловлена более гибкой в этом случае структурой петли, которая и определяет эффективность реакции трансэтерификации.

Таким образом, короткие катионные пептиды не способны селективно расщеплять выпетленные фосфодиэфирные связи, в то время как соединения, содержащие остаток DAVCO в качестве РНК-связывающего фрагмента, лучше расщепляют связи в петлях, чем остальные связи в РНК. Для этих соединений наибольшая степень расщепления наблюдается в случае фосфодиэфирной связи, расположенной в 4-звенной петле, а в случае 7-звенной петли половина суммарной степени расщепления РНК приходится на две СА связи, расположенные в петле.

Расщепление боковых петель РНК искусственными РНКазами в присутствии ионов магния

Известно, что ионы Mg^{2+} стабилизируют структуру РНК, снижая ее подвижность. С одной стороны, повышение стабильности структуры РНК обычно приводит к снижению эффективности ее расщепления различными расщепляющими агентами. С другой стороны, известно, что ионы магния стабилизируют такие структурные элементы РНК, как петли. Представлялось интересным выявить влияние ионов магния на селективность расщепления M2-96 РНК по связям в боковых петлях.

Добавление ионов магния снижает суммарную степень расщепления 96-звенной РНК: в этих условиях расщепление по связям в апикальных петлях шпилек становится значительно слабее или почти не наблюдается. Фосфодиэфирная связь в искусственной петле длиной 1 нуклеотид (не расщепляется ни в присутствии, ни в отсутствие $MgCl_2$ ни искусственными РНКазами, ни РНКазой А. В случае более длинных боковых петель характер расщепления РНК меняется в зависимости от типа РНК-расщепляющего агента. Для природной РНКазы А и коротких катионных пептидов практически не наблюдается повышения селективности расщепления при добавлении ионов магния. Однако присутствие 10 мМ $MgCl_2$ принципиально меняет паттерн расщепления комплексов РНК: олигонуклеотид соединениями, содержащими 1,4-диазабицикло[2.2.2]октан. Расщеплению подвергаются преимущественно СА-связи

в боковых петлях, в то время как расщепление по другим связям подавляется. Значения селективности расщепления боковых петель РНК для 4- и 7-звенных петель возрастают до значений 0,68 и 0,75 соответственно (рис. 4). Таким образом, образование 4- и 7-звенных искусственных петель в M2-96 РНК полностью изменяет направленность расщепления РНК соединениями, содержащими остаток 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана.

Чувствительность фосфодиэфирных связей в боковых петлях к расщеплению по механизму трансэтерификации определяется их способностью принимать линейную конформацию. Согласно данным РСА однозвенной А-петли в составе дуплекса $(d(GCG)r(A)d(TATACGC))_2$ в присутствии ионов Mg^{2+} фосфодиэфирная связь петлевого аденозина принимает конформацию, близкую к линейной, в отличие от конформации, наблюдаемой в кристалле, полученном в присутствии спермидина. По-видимому, ионы Mg^{2+} способны стабилизировать структуру боковой петли, облегчающую протекание реакции трансэтерификации.

Заключение

Существует два основных подхода к направленному расщеплению РНК химическими РНКазми: (1) конъюгаты РНК-расщепляющей конструкции с антисмысловым олигонуклеотидом и (2) бинарные системы, состоящие из низкомолекулярной РНК-расщепляющей конструкции и комплементарного олигонуклеотида, несущего группировку, повышающую чувствительность определенного участка или связей РНК к расщеплению. Направленное расщепление РНК в такой системе было продемонстрировано для короткой модельной РНК (36 нт), в которой все связи, за исключением целевой, были защищены комплементарным комплексом с олигонуклеотидом.

Подход к направленному расщеплению, предложенный в работе Кузнецовой и др. (Kuznetsova *et al.*, 2005), основан на том, чтобы искусственно повысить чувствительность фосфодиэфирных связей РНК за счет их выпетливания. Исследования показали, что в 4–7-звенных

петлях происходит расщепление РНК со скоростью, в несколько раз превышающей расщепление фосфодиэфирных связей в остальной части молекулы. С помощью бинарной системы, состоящей из частично комплементарного олигонуклеотида и химической рибонуклеазы, можно достигнуть селективного расщепления РНК в петлях длиной 4–7 оснований. Направленное расщепление РНК происходит, видимо, вследствие создания напряжения в петле, необходимого для эффективного протекания реакции трансэтерификации и стабилизации остальной структуры РНК, что делает ее малочувствительной к расщеплению по остальным связям, кроме боковой петли.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 05-04-49109, программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», гранта ФЦНТП РИ-012/001/254, гранта СО РАН в поддержку молодых ученых и гранта «Кандидаты наук РАН» Фонда содействия отечественной науке.

Литература

- Ждан Н.С., Кузнецова И.Л., Власов А.В. и др. Синтетические рибонуклеазы 1. Синтез и свойства искусственных рибонуклеаз, содержащих РНК-связывающий фрагмент на основе остатков лизина // *Биоорганическая химия*. 1999. V. 25. № 723-732.
- Кузнецова И.Л., Ждан Н.С., Зенкова М.А. и др. Искусственные рибонуклеазы. 5. Синтез и рибонуклеазная активность трипептидов, состоящих из аминокислот, формирующих каталитические центры природных рибонуклеаз // *Изв. РАН. Сер. хим.* 2004. V. 53. № 435-442.
- Beloglazova N.G., Fabani M.M., Zenkova M.A. *et al.* Sequence-specific artificial ribonucleases. I. Bis-imidazole-containing oligonucleotide conjugates prepared using precursor-based strategy // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. № 13. P. 3887–3897.
- Breslow K., Labelle M. Sequential general base-acid catalysis in the hydrolysis of RNA by imidazole // *J. Am. Chem. Soc.* 1986. V. 108. № 2655-2659.
- Brown R.S., Hingerty B.E., Dewan J.C., Klug A. Pb(II)-catalysed cleavage of the sugar-phosphate backbone of yeast tRNAPhe – implications for lead toxicity and self-splicing RNA // *Nature*. 1983. V. 303. № 5917. P. 543–546.
- Ciesiolka J., Michalowski D., Wrzesinski J. *et al.* Patterns of cleavages induced by lead ions in defined RNA secondary structure motifs // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 275. № 2. P. 211–220.
- Diener J.L., Moore P.B. Solution structure of a substrate for the archaeal pre-tRNA splicing endonucleases: the bulge-helix-bulge motif // *Mol. Cell*. 1998. V. 1. № 6. P. 883–894.
- Husken D., Goodall G., Blommers M.J. *et al.* Creating RNA bulges: cleavage of RNA in RNA/DNA duplexes by metal ion catalysis // *Biochemistry*. 1996. V. 35. № 51. P. 16591–16600.
- Konevets D., Beck I., Beloglazova N. *et al.* Artificial ribonucleases: synthesis and RNA cleaving properties of cationic conjugates bearing imidazole residues // *Tetrahedron*. 1999. V. 55. № 503-512.
- Koval'ov N., Kuznetsova I., Burakova E. *et al.* Ribonuclease activity of cationic structures conjugated to lipophilic groups // *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*. 2004. V. 23. № 6/7. P. 977–981.
- Kuznetsova I.L., Zenkova M.A., Gross H.J., Vlassov V.V. Enhanced RNA cleavage within bulge-loops by an artificial ribonuclease // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 4. P. 1201–1212.
- Mironova N.L., Pyshnyi D.V., Ivanova E.M. *et al.* Covalently attached oligodeoxyribonucleotides induce RNase activity of a short peptide and modulate its base specificity // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. № 6. P. 1928–1936.
- Morrow J.R. Artificial ribonucleases // *Adv. Inorg. Biochem.* 1994. V. 9. № 41-74.
- Podyminogin M.A., Vlassov V.V., Giege R. Synthetic RNA-cleaving molecules mimicking ribonuclease A active center. Design and cleavage of tRNA transcripts // *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. № 25. P. 5950–5956.
- Portmann S., Grimm S., Workman C. *et al.* Crystal structures of an A-form duplex with single-adenosine bulges and a conformational basis for site-specific RNA self-cleavage // *Chem. Biol.* 1996. V. 3. № 3. P. 173–184.
- Raines R.T. Ribonuclease A // *Chem. Rev.* 1998. V. 98. № 1045-1065.
- Schmidt S., Beigelman L., Karpeisky A. *et al.* Base and sugar requirements for RNA cleavage of essential nucleoside residues in internal loop B of the hairpin ribozyme: implications for secondary structure // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. № 4. P. 573–581.
- Shinozuka K., Nakashima Y., Shimizu K., Sawai H. Synthesis and characterization of polyamine-based biomimetic catalysts as artificial ribonuclease // *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*. 2001. V. 20. № 1/2. P. 117–130.

- Soukup G.A., Breaker R.R. Engineering precision RNA molecular switches // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. № 7. P. 3584–3589.
- Sudarsanakumar C., Xiong Y., Sundaralingam M. Crystal structure of an adenine bulge in the RNA chain of a DNA. RNA hybrid, d(CTCCTCTTC).r(gaagagagag) // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 299. № 1. P. 103–112.
- Trawick B.N., Daniher A.T., Bashkin J.K. Inorganic mimics of ribonucleases and ribozymes: from random cleavage to sequence-specific chemistry to catalytic antisense drugs // *Chem. Rev.* 1998. V. 98. № 939-960.
- Tung C.H., Wei Z., Leibowitz M.J., Stein S. Design of peptide-acridine mimics of ribonuclease activity // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. № 7114-7118.
- Valegard K., Murray J.B., Stonehouse N.J., *et al.* The three-dimensional structures of two complexes between recombinant MS2 capsids and RNA operator fragments reveal sequence-specific protein-RNA interactions // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 270. № 5. P. 724–738.
- Wedekind J.E., McKay D.B. Crystal structure of a lead-dependent ribozyme revealing metal binding sites relevant to catalysis // *Nat. Struct. Biol.* 1999. V. 6. № 3. P. 261–268.
- Wimberly B.T., Brodersen D.E., Clemons W.M. Jr. *et al.* Structure of the 30S ribosomal subunit // *Nature*. 2000. V. 407. № 6802. P. 327–339.
- Woese C.R., Gutell R.R. Evidence for several higher order structural elements in ribosomal RNA // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. № 9. P. 3119–3122.
- Xiong Y., Deng J., Sudarsanakumar C., Sundaralingam M. Crystal structure of an RNA duplex r(gugucgac)(2) with uridine bulges // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 313. № 3. P. 573–582.
- Zacharias M., Sklenar H. Conformational analysis of single-base bulges in A-form DNA and RNA using a hierarchical approach and energetic evaluation with a continuum solvent model // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 289. № 2. P. 261–275.
- Zenkova M., Beloglazova N., Sil'nikov V. *et al.* RNA cleavage by 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane-imidazole conjugates // *Methods Enzymol.* 2001. V. 341. № 468-490.
- Zenkova M.A. *Artificial Nucleases*. Springer Verlag, 2004.

CLEAVAGE OF RNA BULGE-LOOPS BY METAL IONS, NATURAL AND ARTIFICIAL RIBONUCLEASES

I.L. Kuznetsova, M.A. Zenkova, V.V. Vlassov

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: irakuzn@yahoo.com

Summary

RNA bulge-loops are known as sites of cleavage by many RNases and RNA cleaving compounds and for this purpose are attractive targets for site-specific RNA cleavage to inactivate for example genome RNA of pathogen viruses. In this review factors that influence on the rate and selectivity of RNA cleavage within bulge loops are analyzed, and the recent data on cleavage of RNA bulges by various RNA-cleaving agents are compared.