

БИНАРНЫЕ РИБОЗИМЫ «ГОЛОВКА МОЛОТКА»

М.А. Воробьева, Н.А. Ковалев, М.А. Зенкова, А.Г. Венямина, В.В. Власов

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

Быстро развивающимся подходом к регуляции экспрессии генов на уровне мРНК является использование рибозимов, способных эффективно и сайт-специфично расщеплять мРНК. Созданы новые бинарные рибозимы, представленные двумя олигонуклеотидами, которые после связывания с РНК формируют активную структуру типа «головка молотка» с общим дуплексом II без петли-коннектора. Впервые исследован каталитический цикл расщепления РНК бинарным рибозимом в сравнении с аналогичным циклом полноразмерного рибозима. Показано, что бинарные рибозимы обладают лучшим соотношением скоростей ассоциации и диссоциации в каталитическом цикле. Синтезирована серия бинарных рибозимов, направленных на участок мРНК гена множественной лекарственной устойчивости *mdr1* в области инициации трансляции, исследована их расщепляющая активность. Для повышения устойчивости бинарных рибозимов к клеточным нуклеазам использована замена неконсервативных рибонуклеотидов в составе рибозима их 2'-модифицированными аналогами в сочетании с модификацией 3'-концов компонентов рибозима. Показано, что бинарные рибозимы расщепляют протяженный фрагмент MDR1 мРНК более эффективно, чем полноразмерные рибозимы, благодаря улучшенным каталитическим свойствам, а также возможности использовать избыток только одного из компонентов рибозима, который «разворачивает» структурированный участок РНК, ускоряя образование реакционного комплекса.

Разработка подходов к регуляции экспрессии генов на уровне мРНК является актуальной задачей молекулярной биологии, биотехнологии и фундаментальной медицины. Среди таких подходов перспективным является селективное расщепление мРНК определенных генов при помощи каталитических РНК – рибозимов (Grassi *et al.*, 2004; Ribozymes..., 2004). Рибозимы уже нашли широкое применение в области функциональной геномики, а также в качестве основы для создания новых терапевтических препаратов (Schubert, Kugeck, 2004). Рибозим «головка молотка» относится к небольшим по размеру каталитическим РНК и обладает высокой каталитической активностью. В последние годы был достигнут значительный прогресс в области создания рибозимов «головка молотка» с улучшенными свойствами и применения их для ингибирования экспрессии генов (см., например, обзор: Kugeck, 2003). При конструировании искусственных рибозимов для расщепления РНК в биологических системах перед

исследователями встает ряд задач, основными из которых являются минимизация размера рибозимов, повышение их устойчивости в биологических средах и эффективности связывания со структурированными участками РНК при сохранении каталитической активности (см. обзор: Peracchi, 2004). Для того чтобы уменьшить размер рибозимов «головка молотка», было предложено сократить дуплекс II (Tuschl, Eckstein, 1993) или заменить петлю II нуклеотидным линкером (Benseler *et al.*, 1993; Thomson *et al.*, 1993; Fu *et al.*, 1994). Описаны также рибозимные конструкции, в которых дуплекс II и замыкающая его петля заменены последовательностью из нескольких пиримидиновых нуклеотидов – такие минимизированные рибозимы получили название минизимов (McCall *et al.*, 1992; Hendry *et al.*, 1995). Оказалось, однако, что минизимы расщепляют РНК менее эффективно, чем полноразмерные рибозимы. Были сконструированы минизимы, содержащие GC-линкеры и способные образовывать димерные

структуры с общим стеблем II (Amontov, Taira, 1996). Димеры расщепляли РНК более эффективно, чем обычные рибозимы; кроме того, была продемонстрирована возможность создания гетеродимеров для расщепления одной молекулы РНК в двух различных участках (Kuwabara *et al.*, 1996; Tanabe *et al.*, 2000). Рибозимы «головка молотка», разделённые на два фрагмента в области петли II, сохраняли способность к расщеплению РНК, однако активность таких конструкций была значительно снижена по сравнению с полноразмерными рибозимами (Koizumi *et al.*, 1988, 1989, 1996; Koizumi, Ohtsuka, 1992).

Нами был предложен подход к конструированию бинарных рибозимов, представляющих собой два отдельных частично комплементарных олигонуклеотида, способных после «сборки» на РНК-субстрате образовывать каталитически активную структуру «головки молотка» без петли-коннектора (Kuznetsova *et al.*, 2002–2004; Gusseva *et al.*, 2005; Vorobjeva *et al.*, 2005). Замена протяженного олигомера-рибозима двумя отдельными олигонуклеотидами позволяет существенно упростить синтез и выделение рибозимных конструкций. Кроме того, мы предположили, что использование бинарной системы позволит осуществлять «тонкую настройку» каталитической активности рибозима путем изменения соотношения концентраций его компонентов, а также повысить эффективность расщепления РНК за счет более быстрой диссоциации продуктов расщепления от компонентов рибозима. Возможно, что при использовании бинарных рибозимов для воздействия на РНК в биологических системах компоненты рибозима будут проникать в клетку лучше, чем полноразмерный рибозим, имеющий вдвое больший суммарный заряд.

В качестве РНК-субстрата для сравнительного исследования каталитической активности рибозимов была выбрана мРНК гена множественной лекарственной устойчивости *mdr1*. Продукт этого гена Р-гликопротеин отвечает за вывод лекарственных препаратов из клетки и препятствует тем самым химиотерапии злокачественных опухолей (Robert, Jarry, 2003). Мишенью для расщепления был участок MDR1 мРНК в области инициации трансляции, содер-

жащий тринуклеотидную последовательность 5'-GUC-3', наиболее выгодную для расщепления рибозимами «головка молотка» (Shimayama *et al.*, 1995). Согласно данным (Wang *et al.*, 2003), расщепление MDR1 мРНК полноразмерными рибозимами «головка молотка» происходит наиболее эффективно именно в этом участке.

Известно, что от длины субстрат-связывающих участков зависят как стабильность рибозим-субстратного комплекса, так и скорость «освобождения» рибозима из комплекса с продуктами расщепления РНК. Следовательно, длина фланкирующих участков рибозима должна обеспечивать оптимальный баланс двух этих параметров. На основании результатов расщепления модельного синтетического 19-звенного фрагмента MDR1 мРНК (здесь и далее **RNA19**) полноразмерными рибозимами был сделан вывод о том, что 7-нуклеотидные субстрат-связывающие участки обеспечивают в данной системе одновременно и эффективную гибридизацию рибозима с РНК-субстратом, и быструю диссоциацию продуктов расщепления РНК от рибозима.

Бинарные рибозимы, предложенные в данной работе, представлены двумя олигомерами, которые после связывания с РНК формируют структуру «головка молотка» с 7-нуклеотидными стеблями I и III и 4-нуклеотидным стеблем II (рис. 1а).

Каталитическая активность бинарного рибозима (**LRz1+RRz1**) была исследована при различных соотношениях рибозим:РНК в сравнении с активностью аналогичного полноразмерного рибозима **fRRz1**. В условиях избытка как бинарный, так и полноразмерный рибозимы расщепляли РНК с одинаково высокой эффективностью: степень расщепления достигала 90 % уже через 3 минуты после начала реакции (рис. 1б). В условиях недостатка рибозима по отношению к РНК мы наблюдали существенные различия в расщеплении РНК бинарным и полноразмерным рибозимами. При 10-кратном недостатке обоих компонентов рибозима расщепление РНК протекало с меньшей по сравнению с полноразмерным рибозимом эффективностью, и предельная степень расщепления не превышала 20 % (рис. 1в,

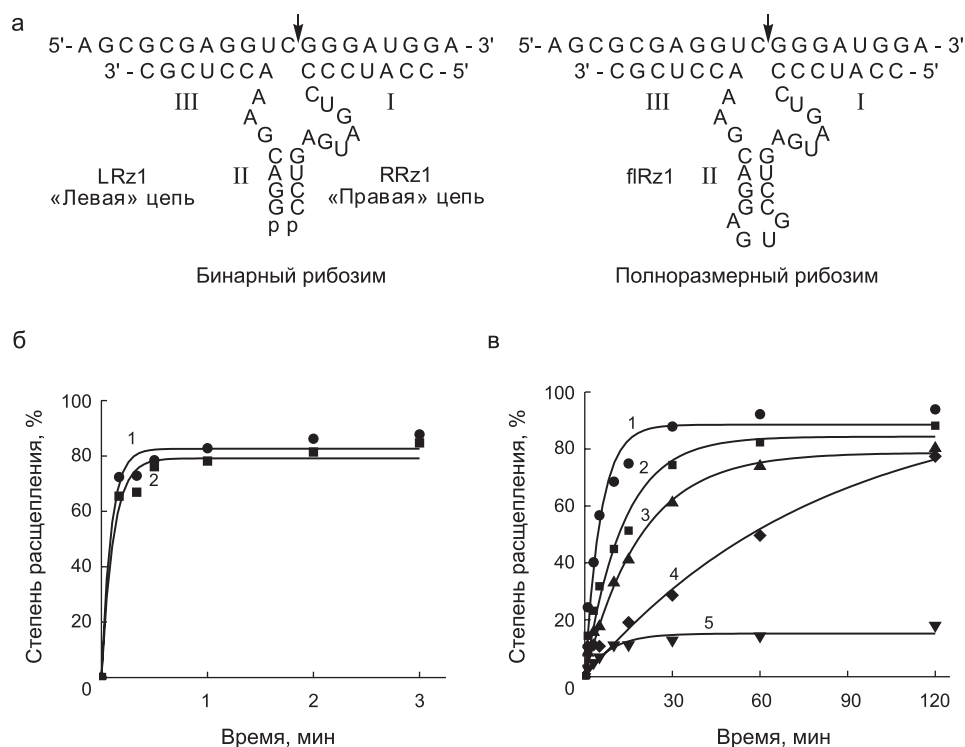


Рис. 1. Расщепление **RNA19** бинарным и полноразмерными рибозимами (**LRz1+RRz1**) и **flRz1**. а – структуры комплексов «бинарный рибозим-РНК» и полноразмерный рибозим-РНК. Стрелкой указан сайт расщепления; б – кинетика расщепления РНК в условиях избытка рибозима. [**flRz1**] = [**RRz1**] = [**LRz1**] = 1 мкМ. Кинетические кривые: 1 – **LRz1+RRz1** (••), 2 – **flRz1** (■•); в – кинетика расщепления РНК в условиях недостатка рибозима. Кинетические кривые: 1 – [**RRz1**] = 100 нМ, [**LRz1**] = 10 нМ (••), 2 – [**RRz1**] = 10 нМ, [**LRz1**] = 100 нМ (■•), 3 – [**flRz1**] = 10 нМ (-▲-), 4 – [**RRz1**] = 40 нМ, [**LRz1**] = 10 нМ (-◆-), 5 – [**RRz1**] = [**LRz1**] = 10 нМ (-▼-). Условия реакции: 37 °С; 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, начальная концентрация РНК 100 нМ.

кривая 5). Однако достаточно было увеличить концентрацию только одной из цепей бинарного рибозима, чтобы эффективность расщепления заметно возросла (см., например, рис. 1в, кривая 4). При этом общая концентрация бинарного рибозима была ограничена концентрацией второй цепи и по-прежнему составляла одну десятую от концентрации РНК. При эквимольном соотношении концентраций «избыточной» цепи рибозима и РНК-субстрата начальная скорость и предельная степень расщепления РНК бинарным рибозимом были выше, чем в случае полноразмерного рибозима. Этот эффект мы наблюдали при повышении концентрации как «правой», так и «левой» цепи рибозима, однако более выгодным оказалось использование избытка «правой» цепи (рис. 1в, кривые 1–3).

Повышение эффективности расщепления при росте концентрации лишь одной из цепей

объясняется, как мы предполагаем, особенностями взаимодействия бинарного рибозима с РНК-субстратом и продуктами расщепления. Поскольку бинарный рибозим состоит из двух отдельных олигомеров, в процессе ассоциации рибозим-субстратного комплекса сначала, очевидно, образуется комплекс одного из компонентов рибозима с субстратом, к которому присоединяется затем второй компонент бинарного рибозима. Это было продемонстрировано методом нативного гель-электрофореза с использованием нерасщепляемого аналога РНК-субстрата (рис. 2).

Другим отличием каталитического цикла бинарного рибозима в сравнении с циклом полноразмерного рибозима «головка молотка» является диссоциация продуктов расщепления РНК-субстрата. Расщепление межнуклеотидной связи изменяет структуру комплекса,

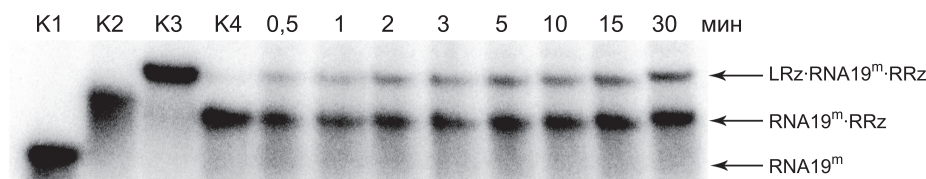


Рис. 2. Исследование «сборки» тройного комплекса «бинарный рибозим – субстрат» методом нативного гель-электрофореза.

Дорожка K1 – нерасщепляемый аналог РНК-субстрата, содержащий в сайте расщепления 2'-О-метилцитидин (**RNA19^m**), K2 – комплекс **LRz1-RNA19^m**, K3 – комплекс **LRz1-RNA19^m-RRz1**, K4 – комплекс **RRz1-RNA19^m**, дорожки 0,5, ..., 15 – комплексы, образующиеся после инкубации в течение указанного времени. Условия реакции: 25 °С, 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 10 нМ **LRz1**, 50 нМ **RRz1**, 50 нМ [³²P] **RNA19^m**.

и неканонические связи, существовавшие в рибозим-субстратном комплексе между нуклеотидами каталитического кода (Tanner, 1999), не стабилизируют больше дуплекс II. Этот тетра-нуклеотидный дуплекс обладает меньшей стабильностью, чем более протяженные дуплексы I и III, и поэтому диссоциирует первым, после чего остаются два отдельных комплекса продуктов расщепления с соответствующими компонентами рибозима, которые диссоциируют независимо друг от друга. С учетом сделанных предположений каталитический цикл бинарного рибозима можно представить следующим образом (рис. 3а).

Каталитический цикл полноразмерного рибозима «головка молотка» (рис. 3б) описан

в серии работ (Fedor, Uhlenbeck, 1992; Hertel *et al.*, 1994; Hertel, Uhlenbeck, 1995; Stage-Zimmermann, Uhlenbeck, 1998). Для того чтобы выявить различия во взаимодействии бинарных и полноразмерных рибозимов с РНК, мы исследовали кинетику различных стадий этого взаимодействия. Поскольку константы расщепления фосфодиэфирной связи для бинарного и полноразмерного рибозимов имеют близкие значения (21 мин⁻¹ и 16 мин⁻¹ соответственно) (Kuznetsova *et al.*, 2004), для выявления различий во взаимодействии бинарного и полноразмерного рибозимов с РНК необходимо было исследовать стадии ассоциации рибозим-субстратного комплекса и диссоциации продуктов реакции от рибозима (табл. 1).

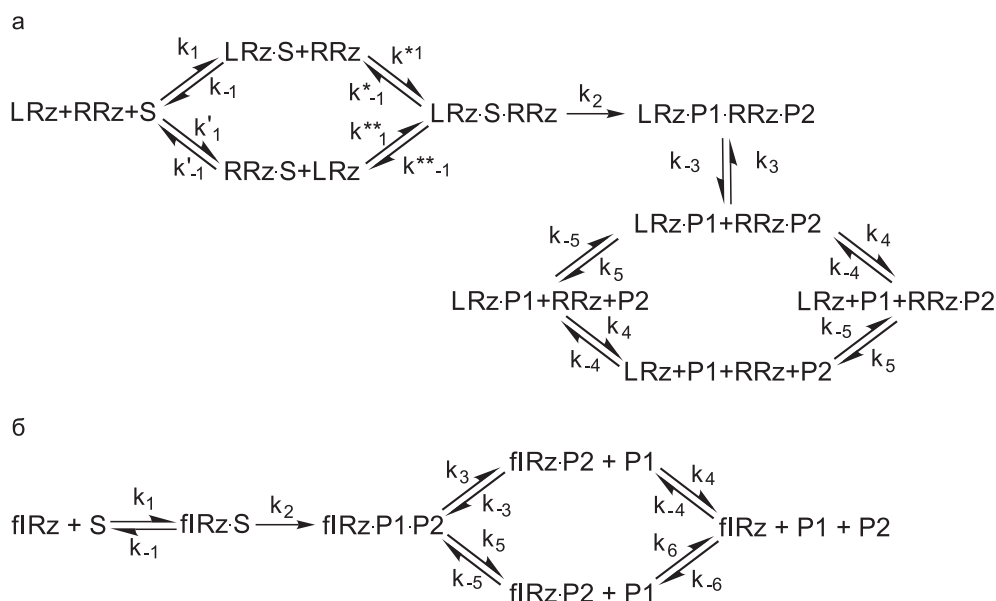


Рис. 3. Кинетические циклы бинарного (а) и полноразмерного (б) рибозимов.

S – РНК-субстрат, P1, P2 – продукты расщепления, flRz – полноразмерный рибозим, LRz, RRz – «левый» и «правый» компоненты бинарного рибозима соответственно.

Было показано, что ассоциация комплекса рибозим-РНК происходит примерно с одинаковой скоростью как для бинарного, так и для полноразмерного рибозимов. При этом присоединение «левой» цепи рибозима как к РНК-субстрату, так и к комплексу второй цепи с субстратом происходит несколько быстрее, чем присоединение «правой» цепи. Обратная реакция диссоциации рибозим-субстратного комплекса в случае бинарного рибозима протекает в 2 раза быстрее, чем в случае полноразмерного. Однако скорость расщепления фосфодиэфирной связи в РНК в таком комплексе приблизительно на 3 порядка величин превышает скорость диссоциации рибозима

Таблица 1

Кинетические константы скорости основных стадий каталитических циклов бинарного и полноразмерного рибозимов

Образование рибозим-субстратного комплекса	
Компоненты комплекса	Константа скорости ассоциации, мкМ ⁻¹ ·мин ⁻¹
fRz+S	51 ± 8
LRz+S	88 ± 16
RRz+S	62 ± 8
LRz·S+RRz	45 ± 4
RRz·S+LRz	62 ± 2
Диссоциация рибозим-субстратного комплекса	
Комплекс	Константа скорости диссоциации, мин ⁻¹
fRz·S	0,012 ± 0,002 ¹⁾
LRz·S·RRz	0,020 ± 0,003 ²⁾
Диссоциация продуктов расщепления от рибозима	
Продукты диссоциации	Константа скорости диссоциации, мин ⁻¹
fRz·P2+P1	0,15 ± 0,03
fRz+P1	0,44 ± 0,05
LRz+P1	— ³⁾
fRz·P1+P2	0,07 ± 0,01
fRz+P2	0,10 ± 0,01
RRz+P2	0,04 ± 0,01

¹⁾ k_{-1} ; ²⁾ k_{-1}^{**} (см. рис. 3а); ³⁾ Диссоциация протекает настолько быстро, что уже через 10 секунд после начала реакции не удается наблюдать комплекс **LRz·P1**.

из комплекса с субстратом и, следовательно, снижение стабильности рибозим-субстратного комплекса при переходе от полноразмерного рибозима к бинарному не должно существенно понижать эффективность расщепления РНК. На стадии диссоциации продуктов расщепления от рибозима оба компонента бинарного рибозима диссоциируют из комплексов быстрее, чем полноразмерный рибозим, причем максимально быстро диссоциирует комплекс «левого» компонента рибозима с 5'-концевым продуктом расщепления **LRz·P1**.

Полученные результаты хорошо коррелируют с данными по расщеплению РНК (см. рис. 1в, кривые 1, 2): использование в каталитическом режиме недостатка «левой» цепи рибозима при эквивалентном соотношении «правой» цепи и субстрата позволяет добиться максимальной эффективности расщепления, превосходящей эффективность расщепления РНК полноразмерным рибозимом. Сравнительный анализ каталитических циклов бинарного и полноразмерного рибозима показывает, что причиной такого эффекта является сочетание высокой скорости ассоциации «левой» цепи **LRz** с комплексом **RRz·S**, независимой диссоциации продуктов реакции от рибозима и максимально быстрого освобождения «левой» цепи из комплекса с продуктом расщепления **LRz·P1**. Для использования бинарных рибозимов как агентов для воздействия на мРНК в клетке необходимо было повысить стабильность бинарных рибозимов к клеточным нуклеазам при сохранении высокой каталитической активности. Для защиты бинарных рибозимов от эндонуклеолитического расщепления мы использовали селективную 2'-модификацию рибонуклеотидов (рис. 4а). Рибонуклеотиды РНК-узнающих участков и стебля II, а также неконсервативные рибонуклеотиды каталитического кора были заменены 2'-О-метилрибонуклеотидами. Для защиты остатков уридина в полуконсервативных положениях 4 и 7 была использована 2'-О-метильная группа (**LRz2+RRz2**) либо 2'-аминогруппа (**LRz3+RRz3**) (рис. 4а). Согласно литературным данным (Beigelman *et al.*, 1995), в случае полноразмерных рибозимов такие модификации каталитического кора делают рибозимы

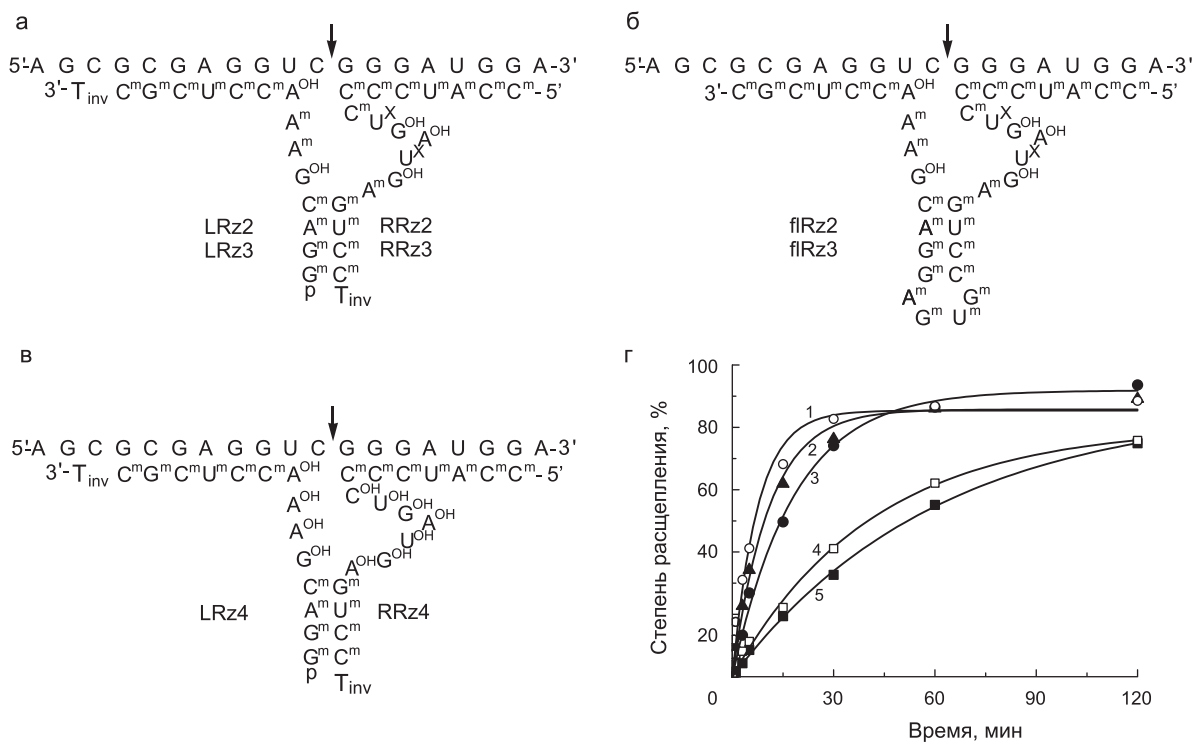


Рис. 4. Расщепление 19-звенного фрагмента MDR1 мРНК (**RNA19**) модифицированными бинарными и полноразмерными рибозимами.

а – комплексы модифицированных бинарных рибозимов (**LRz2+RRz2**) ($X = 2'-OCH_3$) и (**LRz3+RRz3**) ($X = 2'-NH_2$) с РНК. б – комплексы модифицированных полноразмерных рибозимов flRz2 ($X = 2'-OCH_3$) и flRz3 ($X = 2'-NH_2$) с РНК. в – комплекс с РНК бинарного рибозима (**LRz4+RRz4**) с немодифицированным каталитическим кором, содержащего 2'-модификации в субстрат-узнающих доменах и стебле II. г – расщепление **RNA19**. Условия расщепления: 37 °С; 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, начальная концентрация **RNA19** 100 нМ, [RRz] = 100 нМ, [LRz] = 20 нМ, [flRz] = 20 нМ. Кривые расщепления: 1 – flRz3 (○-○-), 2 – (LRz4+RRz4) (-▲-), 3 – (LRz3+RRz3) (-●-), 4 – flRz2 (-□-), 5 – (LRz2+RRz2) (-■-). Обозначения: N^m – 2'-О-метилрибонуклеотид, T_{inv} – остаток тимидина, присоединенный 3'-3' фосфодиэфирной связью. Сайт расщепления указан стрелкой.

устойчивыми к действию нуклеаз, незначительно снижая при этом каталитическую активность. Для оценки влияния 2'-модификаций каталитического кора на активность бинарных рибозимов был создан рибозим с немодифицированным каталитическим кором (**LRz4+RRz4**) (рис. 4в). Для защиты обоих компонентов бинарного рибозима от действия 3'-экзонуклеаз во всех случаях было использовано введение дополнительного остатка тимидина, присоединенного 3'-3'-фосфодиэфирной связью (Novorashina *et al.*, 2001).

Замена всех неконсервативных рибонуклеотидов их 2'-модифицированными аналогами в сочетании с защитой 3'-концов обоих компонентов бинарных рибозимов (**LRz2+RRz2**) и (**LRz3+RRz3**) делает их устойчивыми в культуральной среде, содержащей 10 % эмб-

риональной телячьей сыворотки. Компоненты аналогичного бинарного рибозима с незащищенными рибонуклеотидами каталитического кора (**LRz4+RRz4**) подвергались в этих условиях деградации.

Как видно из кинетических параметров расщепления РНК в условиях избытка рибозимов (табл. 2), введение 2'-модификаций в область субстрат-узнающих доменов и стебля II рибозима (**LRz4+RRz4**) не влияет ни на стабильность рибозим-субстратного комплекса, ни на константу расщепления фосфодиэфирной связи k_{cat} : значения этих параметров для (**LRz4+RRz4**) и немодифицированного рибозима (**LRz1+RRz1**) практически совпадают.

Дополнительная модификация каталитического кора несколько снижает константу расщепления фосфодиэфирной связи в РНК

Таблица 2
Кинетические параметры расщепления синтетического субстрата **RNA19** в условиях избытка бинарных рибозимов

Рибозим	K_M , нМ	k_{cat} , мин ⁻¹	k_{cat}/K_M , мин ⁻¹ ·мМ ⁻¹
(LRz1+RRz1)	893±169	21,5±1,7	24
(LRz2+RRz2)	449±168	0,8±0,1	1,8
(LRz3+RRz3)	296±73	4,2±0,3	14
(LRz4+RRz4)	830±237	22,2±2,5	27

рибозимами (LRz2+RRz2) и (LRz3+RRz3), возможно, из-за частичного искажения структуры активного центра рибозима. При этом рибозим

(LRz3+RRz3), содержащий в положениях 4 и 7 2'-аминоуридин, более активен, чем рибозим (LRz2+RRz2), содержащий в этих же положениях 2'-О-метилуридин, что объясняется, скорее всего, способностью 2'-аминогруппы образовывать водородные связи, необходимые для формирования «правильной» структуры активного центра рибозима (Beigelman *et al.*, 1995).

Эффективность расщепления РНК в каталитическом режиме (рис. 4г) также зависела от типа модификации каталитического кода. При сравнении эффективности расщепления РНК модифицированными бинарными рибозимами (LRz2+RRz2) и (LRz3+RRz3) и полноразмерными рибозимами flRz2 и flRz3, содержащими

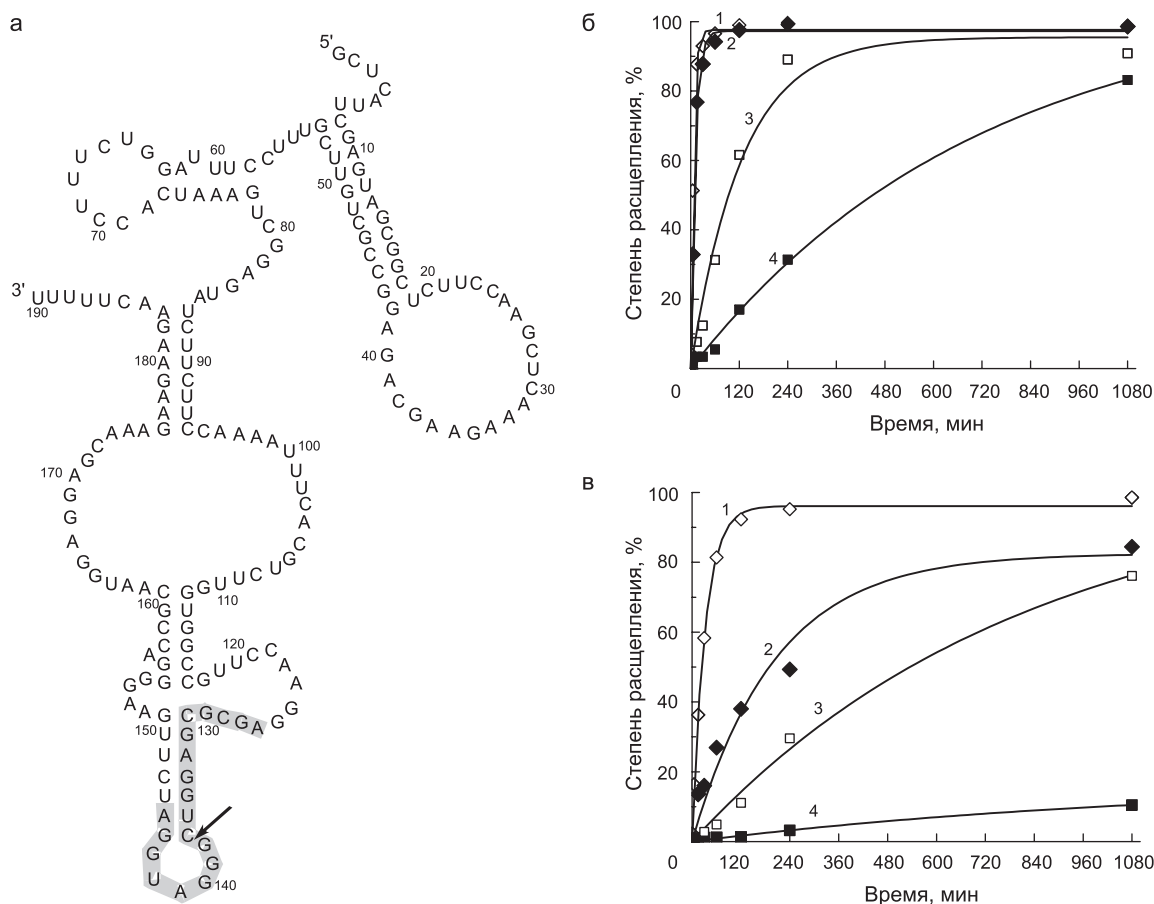


Рис. 5. Расщепление 190-звенного 5'-концевого фрагмента MDR1 мРНК (RNA19) модифицированными бинарными и полноразмерными рибозимами.

а – вторичная структура фрагмента MDR1 мРНК. Участок связывания рибозимов с RNA19 выделен серым цветом, сайт расщепления указан стрелкой. б – расщепление RNA19 в условиях избытка рибозимов: [RRz] = [LRz] = [flRz] = 1 мкМ. в - расщепление RNA19 в каталитическом режиме: [RRz] = 0,5 мкМ, [LRz] = 0,1 мкМ, [flRz] = 0,1 мкМ. Условия расщепления: 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 37 °С, начальная концентрация РНК 0,5 мкМ. Кривые расщепления: 1 – (LRz3+RRz3) (◊-), 2 – flRz3 (◆-), 3 – (LRz2+RRz2) (◻-), 4 – flRz2 (◼-).

аналогичный набор 2'-модификаций, было показано, что ход кривых и общая эффективность расщепления одинаковы для бинарных и полноразмерных рибозимов.

Способность модифицированных бинарных рибозимов эффективно расщеплять протяженные структурированные РНК была продемонстрирована на 190-звенном 5'-концевом фрагменте MDR1 мРНК (рис. 5а).

Показано, что все исследованные рибозимы расщепляют в протяженном РНК-транскрипте единственную фосфодиэфирную связь C127-G128. В условиях избытка рибозима (рис. 5б) модифицированный бинарный рибозим (**LRz3+RRz3**), содержащий 2'-аминоуридин в положениях 4 и 7, и соответствующий полноразмерный рибозим **fLRz3** расщепляли РНК с одинаковой эффективностью. Модифицированный бинарный рибозим (**LRz2+RRz2**), содержащий 2'-О-метилуридин в положениях 4 и 7, был в этих условиях заметно активнее полноразмерного аналога **fLRz2**. При расщеплении РНК в каталитическом режиме (рис. 5в) различия между бинарными и полноразмерными рибозимами стали ещё более заметными: оба бинарных рибозима расщепляли 190-звенный РНК-субстрат с высокой эффективностью, а для полноразмерных рибозимов было отмечено существенное снижение эффективности расщепления. Можно предположить, что использование бинарных рибозимов для расщепления протяженной структурированной РНК является более выгодным благодаря оптимальному соотношению скоростей ассоциации рибозим-субстратного комплекса и диссоциации продуктов расщепления от рибозима. Кроме того, при использовании избытка одной из цепей бинарного рибозима этот олигомер играет роль эффектора. Он разворачивает структурированную РНК и облегчает тем самым присоединение второго компонента рибозима. Второй компонент, находящийся в недостатке, быстро присоединяется к РНК, а после расщепления быстро диссоциирует от продукта, обеспечивая тем самым многооборотность реакции.

Полученные результаты позволяют считать предложенную стратегию конструирования и созданные на ее основе бинарные рибозимы

перспективными для подавления экспрессии генов на уровне мРНК.

Работа поддержана грантами РФФИ № 05-04-48341, ФЦНТП РИ-012/001/254, СО РАН в поддержку молодых ученых, а также Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Происхождение и эволюция биосферы».

Литература

- Amontov S.V., Taira K. Hammerhead minizymes with high cleavage activity: A dimeric structure as the active conformation of minizymes // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. V. 118. № 7. P. 1624–1628.
- Beigelman L., Mcswiggen J.A., Draper K.G. *et al.* Chemical modification of hammerhead ribozymes. Catalytic activity and nuclease resistance // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 43. P. 25702–25708.
- Benseler F., Fu D., Ludwig J., Mclaughlin L.W. Hammerhead-like molecules containing non-nucleoside linkers as active RNA catalysts // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. V. 115. № 18. P. 8483–8484.
- Fedor M.J., Uhlenbeck O.C. Kinetics of intermolecular cleavage by hammerhead ribozymes // *Biochemistry.* 1992. V. 31. № 48. P. 12042–12054.
- Fu D., Benseler F., Mclaughlin L.W. Hammerhead ribozymes containing non-nucleoside linkers are active RNA catalysts // *J. Am. Chem. Soc.* 1994. V. 116. № 11. P. 4591–4598.
- Grassi G., Dawson P., Guarneri G. *et al.* Therapeutic potential of hammerhead ribozymes in the treatment of hyper-proliferative diseases // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2004. V. 5. № 4. P. 369–386.
- Gusseva E., Vorobjeva M., Venyaminova A., Vlassov V. Kinetic aspects of the binary ribozymes-RNA interaction // *International Conference on Chemical Biology. Novosibirsk, Russia, 2–7 July 2005.*
- Hendry P., McCall M.J., Santiago F.S., Jennings P.A. *In vitro* activity of minimised hammerhead ribozymes // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. № 19. P. 3922–3927.
- Hertel K.J., Herschlag D., Uhlenbeck O.C. A kinetic and thermodynamic framework for the hammerhead ribozyme reaction // *Biochemistry.* 1994. V. 33. № 11. P. 3374.
- Hertel K.J., Uhlenbeck O.C. The internal equilibrium of the hammerhead ribozyme reaction // *Biochemistry.* 1995. V. 34. № 5. P. 1744–1749.
- Koizumi M., Shigenori I., Ohtsuka E. Cleavage of specific sites of RNA by designed ribozymes // *FEBS Lett.* 1988. V. 239. № 2. P. 285–288.
- Koizumi M., Hayase Y., Shigenori I., *et al.* Design of RNA enzymes distinguishing a single base mutation

- in RNA // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 17. P. 7059–7071.
- Koizumi M., Ohtsuka E. Design of ribozymes distinguishing a point mutation in *c-ha-ras* mRNA // Antisense RNA and DNA / Ed. J. Murray. N.Y.: Wiley-Liss, Inc., 1992. P. 373–381.
- Koizumi M., Ohta T., Komatsu Y., Ohtsuka E. Cleavage of short RNAs containing higher ordered structures by hammerhead ribozymes // Nucleosides, Nucleotides. 1996. V. 15. № 1/3. P. 505–517.
- Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications // Eur. J. Biochem. 2003. V. 270. № 8. P. 1628–1644.
- Kuwabara T., Amontov S.V., Warashina M. *et al.* Characterization of several kinds of dimer minizyme: Simultaneous cleavage at two sites in HIV-1 tat mRNA by dimer minizymes // Nucl. Acids Res. 1996. V. 24. № 12. P. 2302–2310.
- Kuznetsova M., Fokina A., Lukin M. *et al.* Catalytic DNA and RNA for targeting MDR1 mRNA // XIV Intern. Roundtable. Nucleosides, Nucleotides and Their Biological Applications. Leuven, Belgium, 10–14 September, 2002.
- Kuznetsova M., Fokina A., Lukin M. *et al.* Catalytic DNA and RNA for targeting MDR1 mRNA // Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids. 2003. V. 23. № 5/8. P. 1521–1523.
- Kuznetsova M., Novopashina D., Repkova M. *et al.* Binary hammerhead ribozymes with high cleavage activity // Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids. 2004. V. 23. № 6/7. P. 1037–1042.
- McCall M.J., Hendry P., Jennings P.A. Minimal sequence requirements for ribozyme activity // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. № 13. P. 5710–5714.
- Novopashina D., Kuznetsova M., Venyaminova A. 2'-O-modified oligoribonucleotides with terminal 3'-3'-internucleotide linkage and their derivatives // Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids. 2001. V. 20. № 4-7. P. 903–907.
- Peracchi A. Prospects for antiviral ribozymes and deoxyribozymes // Rev. Med. Virol. 2004. V. 14. № 1. P. 47–64.
- Ribozymes and siRNA protocols / Ed. M. Sioud. Totowa: Humana Press Inc., 2004.
- Robert J., Jarry C. Multidrug resistance reversal agents // J. Med. Chem. 2003. V. 46. № 23. P. 4805–4817.
- Schubert S., Kurreck J. Ribozyme- and deoxyribozyme-strategies for medical applications // Curr. Drug Targets. 2004. V. 5. № 8. P. 667–681.
- Shimayama T., Nishikawa S., Taira K. Generality of the nux rule: Kinetic analysis of the results of systematic mutations in the trinucleotide at the cleavage site of hammerhead ribozymes // Biochemistry. 1995. V. 34. № 11. P. 3649–3654.
- Stage-Zimmermann T.K., Uhlenbeck O.C. Hammerhead ribozyme kinetics // RNA. 1998. V. 4. № 8. P. 875–889.
- Tanabe T., Takata I., Kuwabara T. *et al.* Maxizymes, novel allosterically controllable ribozymes, can be designed to cleave various substrates // Biomacromolecules. 2000. V. 1. № 1. P. 108–117.
- Tanner N.K. Ribozymes: The characteristics and properties of catalytic RNAs // FEMS Microbiol. Rev. 1999. V. 23. № 3. P. 257.
- Thomson J.B., Tuschl T., Eckstein F. Activity of hammerhead ribozymes containing non-nucleotidic linkers // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. № 24. P. 5600–5603.
- Tuschl T., Eckstein F. Hammerhead ribozymes: Importance of stem-loop II for activity // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. № 15. P. 6991–6994.
- Vorobjeva M., Gusseva E., Repkova M. *et al.* Modified binary hammerhead ribozymes with high catalytic activity // Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids. 2005. V. 24. № 5/7. P. 1105–1109.
- Wang H., Chen X.-P., Qiu F.-Z. Overcoming multi-drug resistance by anti-mdr1 ribozyme // World J. Gastroenterol. 2003. V. 9. № 7. P. 1444–1449.

BINARY HAMMERHEAD RIBOZYMES

M. Vorobjeva, N. Kovalev, M. Zenkova, A. Venyaminova, V. Vlassov

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

Summary

A prospective approach to the regulation of gene expression at the mRNA level is the use of ribozymes capable to cleave mRNA effectively and site specifically. We have designed new binary hammerhead ribozymes built of two oligonucleotides which form hammerhead-like structure lacking tetraloop, when bound to RNA target. For the first time the catalytic cycle of RNA cleavage by the binary ribozyme was investigated in comparison with the cycle of full-length ribozyme. Binary ribozymes were shown to possess a better ratio of association and dissociation rates upon catalytic cycle. A series of binary ribozymes targeting translation initiation region of multiple drug resistance gene *mdr1* mRNA was synthesized and tested in terms of catalytic activity. To improve the nuclease resistance of binary ribozymes we used a replacement of non-conservative ribonucleotides by their 2'-modified analogs together with modification of 3'-end of each strand. It is demonstrated that binary ribozymes cleave extended RNA fragment more efficiently than full-length ribozymes due to improved catalytic properties and a possibility to use the excess of one of the ribozyme strand, which can serve as unfolding oligonucleotide and facilitate productive complex formation.