

ИСКУССТВЕННЫЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ – НОВЫЙ КЛАСС ВЕЩЕСТВ ДЛЯ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

**Н.Г. Белоглазова, Н.В. Тамкович, П.А. Никитин, И.Л. Кузнецова,
М.А. Зенкова, В.В. Власов**

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

В обзоре рассмотрены строение и биологические свойства новых эффективных катализаторов расщепления РНК – искусственных рибонуклеаз (аРНКаза), конъюгатов 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана и имидазола. Описаны специфичность расщепления РНК этими соединениями, показан потенциал аРНКаза в качестве зондов для исследования вторичной структуры РНК и возможность применения таких катализаторов для контроля пролиферации опухолевых клеток и инактивации РНК-содержащих вирусов.

Введение

Соединения, способные с высокой эффективностью вызывать расщепление РНК в физиологических условиях, представляют большой интерес для решения ряда фундаментальных задач молекулярной биологии, биотехнологии и медицины (Сильников, Власов, 2001; Zenkova, Beloglazova, 2004; Niittymaki, Lonnberg, 2006). Изучение свойств таких соединений, получивших название химических, или искусственных, рибонуклеаз (artificial ribonucleases, аРНКаза), может помочь выявлению роли структурных и динамических факторов, обеспечивающих высокую эффективность катализа, осуществляемого природными ферментами. Вещества, способные расщеплять РНК, могут найти применение для исследования структуры изолированной РНК и РНК в составе комплексов с белками; быть использованы в качестве катализаторов разрушения РНК в ходе биотехнологических процессов. Кроме того, среди соединений, расщепляющих РНК, могут быть обнаружены вещества с противовирусной активностью, поскольку многие вирусы (вирус иммунодефицита человека HIV 1, вирус клещевого энцефалита, вирус гриппа и т. д.) обладают геномами, построенными из РНК. Присоединение РНК-гидролизующих конструкций к олигонуклеотидам открывает

путь к созданию высокоспецифичных препаратов, обладающих свойствами избирательного расщепления определенных РНК. Препараты, действующие на определенные виды нуклеиновых кислот, в ближайшее время станут лекарствами, которые откроют новые возможности для лечения практически любых заболеваний.

Термин «искусственные рибонуклеазы» появился более 10 лет назад для описания широкого спектра разнообразных соединений, обладающих способностью расщеплять фосфодиэфирные связи в РНК случайным образом или специфично к последовательности (Zenkova, Beloglazova, 2004). Простейшей химической рибонуклеазой является концентрированный имидазольный буфер, в котором происходит статистическое расщепление фосфодиэфирных связей в РНК (Breslow, Labelle, 1986; Breslow *et al.*, 1991; Власов и др., 1996). Аналогично природным РНК-гидролизующим ферментам, аРНКаза включают фрагмент, обладающий сродством к РНК (интеркаляторы, биогенные полиамины, катионные структуры, или олигонуклеотиды), и конструкцию, катализирующую расщепление фосфодиэфирных связей РНК. За счет первой части структуры аРНКаза способны связываться с РНК; вторая часть структуры катализирует расщепление РНК при образовании комплекса.

Расщеплять РНК могут многие соединения: комплексы некоторых металлов (лантаноиды, европий, медь, цинк), органические соединения, содержащие низкоосновные аминогруппы и остатки имидазола, а также некоторые природные и синтетические пептиды и полипептиды. Однако эффективность этих соединений невысока и для расщепления ими РНК требуются достаточно жесткие условия. Предпринимались попытки повысить эффективность действия этих соединений путем их присоединения к полиаминам и некоторым другим молекулам, обладающим сродством к РНК (Власов и др., 1998; Сильников, Власов, 2001; Niittymaki, Lonnberg, 2006).

В ИХБФМ СО РАН в течение более чем 10 лет ведутся работы по созданию аРНКаз, разработан и изучен ряд аРНКаз – конъюгатов имидазол-содержащих молекул (гистамин, гистидин) с феназином, спермином (Poduiminogin *et al.*, 1993), с короткими катионными пептидами (Ждан и др., 1999; Zhdan *et al.*, 1999; Кузнецова и др., 2004), 1,4-диазабицикло[2.2.2]октаном (Коневец и др., 1998, 2000, 2002а, б; Beloglazova *et al.*, 1999; Konevets *et al.*, 1999; Зенкова и др., 2000; Giege *et al.*, 2000; Zenkova *et al.*, 2001; Белоглазова и др., 2002), олигонуклеотидами (Zenkova, Beloglazova, 2004 и ссылки в этом обзоре). Среди этих аРНКаз, разработанных в последние годы, особое место занимают соединения общей формулы **ABLkCm** (рис. 1), которые являются высокоэффективными катализаторами реакции трансэтерификации. Изучение свойств этих соединений позволило выявить некоторые структурно-

функциональные отношения в аРНКазах и получить ряд соединений, которые можно уже сегодня использовать в исследованиях, биотехнологии и медицине. Описанию свойств этих соединений посвящен настоящий обзор.

Строение и свойства аРНКаз **ABLkCm**

аРНКазы **ABLkCm** были синтезированы научным сотрудником ЛОС ИХБФМ СО РАН Д.А. Коневцом по схеме, использующей стандартные приемы пептидной химии, и охарактеризованы с помощью ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Синтез соединений **ABLkCm** был опубликован в работах (Коневец и др., 1998; Konevets *et al.*, 1999; Зенкова и др., 2000а). В основу строения данных соединений был положен принцип блочной организации, т. е. объединение в конъюгате молекул, обладающих сродством к РНК, и конструкций, способных катализировать расщепление фосфодиэфирных связей в РНК. Соединения **ABLkCm** состояли из четырех блоков: **A**, **B**, **L** и **Cm**, которые по аналогии с белковыми катализаторами далее будут называться доменами (рис. 1). Каталитический домен **C** содержит остаток имидазола (гистамина, **C1**), имидазол и сложноэфирную группу (метилэфир гистидина, **C2**) или имидазол и карбоксильную группу (гистидин, **C3**). Имидазольные и карбоксильные группы часто встречаются в активных центрах природных рибонуклеаз и обеспечивают их каталитическую активность (Shindo *et al.*, 1976; Nishikawa *et al.*, 1987). Использование остатков имидазола

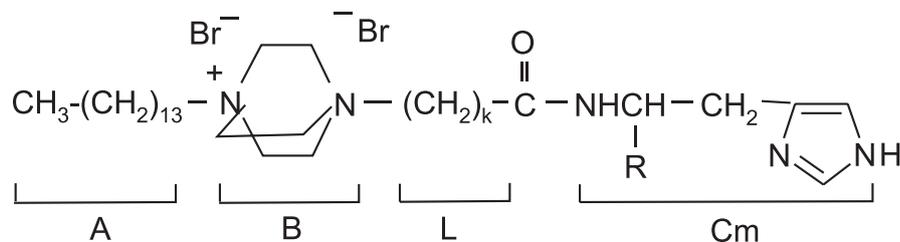


Рис. 1. Химические рибонуклеазы **ABLkCm**.

A – липофильный остаток, **B** – РНК-связывающий фрагмент – замещенный 1,4-диазабицикло[2.2.2]октан, **L** – линкер ($k = 1, 3, 5$), **C** – каталитический фрагмент ($m = 1$, $R = \text{H}$ – гистамин; $m = 2$, $R = \text{CO}_2\text{CH}_3$ – метилэфир гистидина; $m = 3$, $R = \text{CO}_2\text{H}$ – гистидин).

в каталитическом центре аРНКаз было определено, во-первых, тем, что две имидазольные группы, His 12 и His 119, составляют основу активного центра панкреатической рибонуклеазы А (Wlodawer *et al.*, 1983), во-вторых, результатами исследований, в которых была показана способность концентрированного 1–2 М нейтрального имидазольного буфера статистически расщеплять фосфодиэфирные связи в РНК (Breslow *et al.*, 1996). РНК-связывающий домен соединений **ABLkCm** был представлен бисчетвертичной солью 1,4-диазабцикло[2.2.2]октана. 1,4-диазабцикло[2.2.2]октан несет два положительных заряда на четвертичных атомах азота, что обеспечивает средство соединений к отрицательно заряженным межнуклеотидным фосфатным группам РНК. Линкер **L**, соединяющий каталитический **C** и РНК-связывающий **B**-участки, был образован несколькими метиленовыми (от одной до пяти) группами. Полиметиленовый линкер определяет расстояние между РНК-расщепляющим и РНК-связывающим доменами, а также ориентацию каталитического фрагмента относительно сахарофосфатного остова РНК. Гидрофобный домен **A** был введен в структуру конъюгатов с целью предотвращения кооперативного связывания катионных структур соединений с РНК, а также для облегчения проникновения молекул искусственных рибонуклеаз через клеточные мембраны при проведении в перспективе экспериментов с культивируемыми линиями эукариотических клеток.

Стратегия синтеза данных соединений была разработана таким образом, чтобы все структурные параметры конъюгатов (состав каталитического центра, длину линкера, суммарный заряд молекулы и длину липофильного фрагмента) можно было легко модифицировать, не затрагивая катионный РНК-связывающий домен (Коневец и др., 2002б).

Наибольшее число исследований было выполнено с использованием аРНКаз **ABL3Cm** (Коневец и др., 1998, 2000, 2002а, б; Beloglazova *et al.*, 1999; Konevets *et al.*, 1999; Giege *et al.*, 2000; Зенкова и др., 2000а; Zenkova *et al.*, 2001). Рибонуклеазная активность соединений **ABL3Cm** была исследована в реакции

расщепления модельных РНК, обладающих разной длиной и сложностью вторичной структуры: синтетического декарибонуклеотида UUCAUGUAAA, природной дрожжевой тРНК^{Phc}, дрожжевых тРНК^{Phc} и тРНК^{Asp} и М2 РНК вируса гриппа, полученных транскрипцией *in vitro*. Использование такого набора модельных РНК было необходимо для проведения детального изучения специфичности и эффективности действия соединений и выявления факторов, определяющих эффективность расщепления фосфодиэфирных связей в РНК. Олигорибонуклеотид UUCAUGUAAA не обладал определенной вторичной структурой и содержал три связи Руг-Рц, которые потенциально могут быть мишенями для аРНКаз. Выбор перечисленных тРНК был обусловлен, во-первых, тем фактором, что их пространственная структура детально изучена и включает элементы структуры, типичные для большинства РНК (Romby *et al.*, 1987; Chastian, Tinoco, 1991; Patel, 1998). Во-вторых, согласно опубликованным данным, расщепление этих тРНК под действием как природных ферментов, так и химических рибонуклеаз происходило по 5–6 основным положениям (Poduminogin *et al.*, 1993; Vlassov *et al.*, 1995), что позволяет провести количественный анализ кинетики расщепления. Для оценки потенциала аРНКаз **ABL3Cm** как зондов для исследования пространственной структуры были выбраны митохондриальные тРНК^{Lys} человека, природная и мутантная, вторичные структуры которых принципиально различаются (Helm *et al.*, 1999), и полноразмерная М2 мРНК вируса гриппа, пространственная структура которой не известна.

Химические рибонуклеазы **ABL3Cm** обладали ярко выраженной рибонуклеазной активностью, а расщепление фосфодиэфирных связей в РНК под действием соединений носило неслучайный характер. В составе синтетического олигорибонуклеотида UUC₃A₄UGU₇A₈AA расщеплению подвергались только две фосфодиэфирные связи, C₃-A₄ и U₇-A₈, расположенные в Руг-Рц-последовательностях. Эти же связи в олигорибонуклеотиде подвергались расщеплению при действии на него РНКазы А. Скорости расщепления связей в CpA- и UpA-последова-

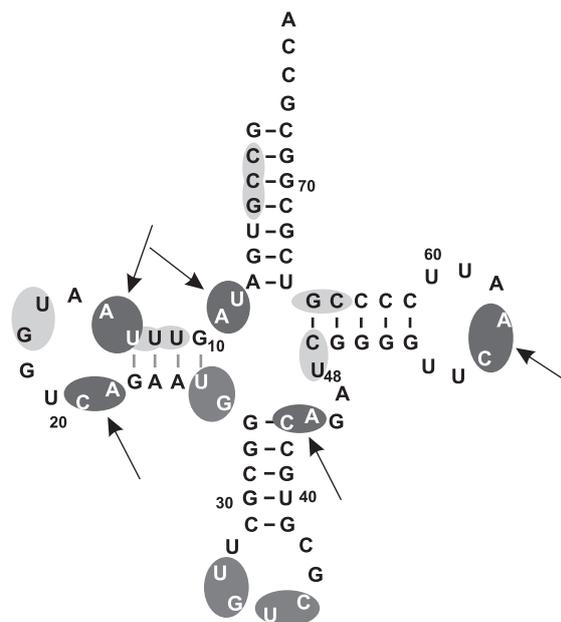


Рис. 3. Вторичная структура дрожжевой тРНК^{Asp}, полученной транскрипцией *in vitro*.

Стрелками указаны фосфодиэфирные связи, расщепляющиеся под действием аРНКаза **ABL3Cm**; серым цветом выделены положения гидролиза под действием РНКазы А (интенсивность цвета отражает интенсивность гидролиза).

ло, что гидролизу подвергаются в основном динуклеозидмонофосфаты CpA и UpA (Witzel, 1965), причем скорость расщепления связи в UpA-мотивах была в 1,5–2 раза выше, чем в CpA (Kierzek, 1992a, b; Bibillo *et al.*, 1999), и сильно зависит как от основания, фланкирующего расщепляемую связь, так и от вторичной структуры РНК: спонтанный гидролиз РНК происходит, в основном, в Py-A-последовательностях, расположенных в одноцепочечных участках (Dock-Bregeon, Moras, 1987; Mikkola *et al.*, 2001). Скорость расщепления фосфодиэфирных связей в UpA- или CpA-мотивах существенно зависит от прилегающих оснований и значительно увеличивается, если с 3'-стороны Py-A-мотива располагается пуриновое основание ($G > A$) (Witzel, 1965; Bibillo *et al.*, 1999).

Сегодня механизм спонтанного гидролиза РНК не выяснен, однако структурные ограничения, характерные для данной реакции, позволяют предположить, что неэнзиматический гидролиз РНК протекает по механизму трансэтерификации (Kierzek, 1992a; Ushler *et al.*, 1970a, b). В одноцепочечных участках РНК нуж-

ная ориентация функциональных групп может быть достигнута за счет локальной подвижности фосфодиэфирных связей (Stone *et al.*, 1986; Dock-Bregeon, Moras, 1987; Oivanen *et al.*, 1998). Повышенная подвижность фосфодиэфирной связи в Py-A-мотиве может быть следствием ограниченных стэкинг-взаимодействий между пиримидиновым и пуриновым основаниями, если пиримидин располагается с 5'-стороны (Magda *et al.*, 1997). Возможно, повышенная чувствительность связей в CpA- и UpA-последовательностях к гидролизу определяется их большей подвижностью, а также повышенной электрофильностью атома фосфора в этих мотивах (Kierzek, 1992a, b).

Соединения **ABL3Cm** были синтезированы как конструкции, функционально имитирующие панкреатическую рибонуклеазу А. Первой стадией расщепления РНК под действием РНКазы А является реакция переэтерификации или трансфосфорилирования (Wlodaver *et al.*, 1983; Nishikawa *et al.*, 1987; Raines, 2004). На этом этапе 2'-гидроксильная группа рибозы атакует межнуклеотидный фосфат с образованием циклического 2',3'-циклофосфата и 5'-гидроксильной группы. Вторая стадия включает гидролиз циклического 2',3'-циклофосфата, полученного на первой стадии. Расщепление РНК, катализируемое РНКазой А, протекает всегда с образованием 3'-фосфата и 5'-ОН-группы в сайте расщепления. В экспериментах, направленных на установление механизма, по которому протекает расщепление связей в РНК под действием соединений **ABL3Cm**, было показано, что продукты расщепления РНК имеют на 5'-конце свободную гидроксильную группу. В дальнейшем были получены данные, свидетельствующие о том, что под действием химических рибонуклеаз в сайте расщепления образуется 2',3'-циклофосфат. Таким образом, синтетические рибонуклеазы серии **ABL3Cm** не только обладают специфичностью, сходной с таковой для РНКазы А, но и в результате реакции с РНК дают продукты гидролиза, аналогичные продуктам, получаемым под воздействием природного фермента (Белоглазова и др., 2002).

Изучение зависимости эффективности расщепления РНК под действием РНКазы А

и соединений **ABLkCm** от pH показало, что как для природного фермента, так и для искусственных рибонуклеаз данные зависимости имеют выраженную колоколообразную форму, оптимумы которых приходятся на области нейтральных значений pH = 6–7. Такое совпадение оптимальных значений pH-зависимости является важным свидетельством в пользу того, что механизмы расщепления фосфодиэфирных связей РНК аРНКазами **ABL3Cm** и природным ферментом принципиально не различаются (Zenkova *et al.*, 2001).

Одной из наиболее важных характеристик природных ферментов является их способность осуществлять процесс в каталитическом режиме. Каталитический характер расщепления РНК, протекающего под действием соединений **ABL3Cm**, был доказан экспериментально. На основании полученных данных было определено, что одна молекула соединения **ABL3C3** за 18 часов способна расщепить более 150 фосфодиэфирных связей в РНК. Полученные данные позволили заключить, что синтезированные аРНКазы **ABLkCm** катализируют расщепление РНК в условиях многооборотной реакции, но, в отличие от природной РНКазы А, не образуют прочного комплекса с РНК субстратом.

Оказалось, что аРНКазы **ABLkCm**, в отличие от природной РНКазы А, малочувствительны к природе буферных растворов. Как и ожидалось, с наибольшей скоростью расщепление РНК протекает в имидазольном буфере. Скорость расщепления РНК под действием аРНКаз в НЕРЕС, фосфатном буфере, 6 М мочеvine с НЕРЕС или в 4 М гуанидинизотиоционате + 50 мМ НЕРЕС была только в 1,5 раза ниже, чем в имидазольном буфере. Скорость расщепления РНК в трис-НСI и какодилатном буферах была сопоставима со скоростью ее расщепления в имидазольном буфере. В отличие от аРНКаз активность РНКазы А сильно зависит от природы буфера: значительное ингибирование активности РНКазы А наблюдалось в фосфатном буфере и в присутствии 4 М гуанидина (Zenkova *et al.*, 2001). Следует отметить, что замена реакционного буфера не влияет на позиционную направленность реакции расщепления. Способность аРНКаз катализировать

расщепление фосфодиэфирных связей в РНК со сравнимой эффективностью в разных буферных условиях, включая денатурирующие условия, без изменения специфичности расщепления (СрА- и УрА-последовательности) позволяет рассматривать их как перспективные зонды с широкими возможностями для исследования пространственной структуры РНК в растворе (Giege *et al.*, 2000; Zenkova *et al.*, 2001).

Использование аРНКаз для изучения вторичной структуры РНК в растворе

Перспективным практическим приложением аРНКаз является их использование в качестве зондов при исследовании вторичной структуры РНК в растворе. С этой целью часто используется РНКазы А, недостатком которой (как и некоторых других природных рибонуклеаз) является некоторое разворачивание структуры РНК при связывании с ней фермента, что искажает результаты эксперимента. Кроме того, природные ферменты недостаточно стабильны и это осложняет их применение в условиях производства и при хранении.

Выбор *in vitro* транскриптов митохондриальных тРНК^{Lys}, дикого типа (Kwt) и содержащего замену (A9 → C) (Kgw) в качестве моделей для изучения возможности применения синтетических рибонуклеаз **ABL3Cm** в качестве структурных зондов объясняется особенностями их вторичной структуры. *In vitro* транскрипт Kwt соответствует природной тРНК^{Lys} из митохондрий человека, а РНК Kgw представляет собой его мутантную форму (рис. 4). Последовательности РНК Kwt и Kgw отличаются основанием, находящимся в 9-м положении: в случае Kgw в этой позиции была сделана замена А → С. Пространственная структура этих РНК была изучена с использованием широкого спектра химических и ферментативных зондов. Было показано, что однонуклеотидная замена А9 → С вызывает глобальное изменение вторичной структуры (Helm *et al.*, 1998): вторичная структура РНК Kwt в низкосолевых условиях представляет собой шпильку, тогда как РНК Kgw «свернута» в виде классического клеверного листа. В результате мутации и перестройки

наиболее существенным из которых было расщепление фосфодиэфирной связи C_9-G_{10} в Kgw, которое отсутствовало в случае Kwt (A_9-G_{10}). Аналогичным образом происходило расщепление этих связей под действием РНКазы А. Наблюдались различия в интенсивности расщепления отдельных фосфодиэфирных связей в РНК Kwt и Kgw под действием соединения **ABL3C3**. В частности, реакционная способность связей, расположенных после оснований U_{12} и A_{20} , была выше в Kwt по сравнению с Kgw, видимо, вследствие того, что эти связи в РНК Kwt находятся в одноцепочечных районах и более доступны для соединений серии **ABL3Cm**. Расщепление связей после U_{43} , U_{23} , и U_6 в РНК Kwt протекало менее интенсивно, чем в Kgw. Усиление или снижение чувствительности этих связей к расщеплению под действием соединения **ABL3C3** полностью коррелировало с их положением во вторичной структуре: с большей интенсивностью подвергались расщеплению связи, расположенные в одноцепочечных участках, а затем – в области перекрещивания стеблей и участках, примыкающих к этой области (рис. 4). В целом расщепление этих РНК соединением **ABL3C3** происходило в последовательностях Ру-Рц, расположенных в одноцепочечных участках, и специфичность расщепления совпадала со специфичностью гидролиза под действием РНКазы А.

Ранее вторичная структура различных лизиновых тРНК в растворе была исследована с помощью ферментативных (нуклеаза S1, рибонуклеаза T1, T2, U2 и V1) и химических зондов (Pb^{2+} , имидазол, DMS, DEPC и кетоксаль), которые выявили структурные различия транскриптов природной тРНК^{Lys} и ее мутанта (Helm *et al.*, 1998; 1999). Результаты, полученные с помощью пробинга аРНКазы, во многом совпадают с данными работы (Helm *et al.*, 1999). В частности, основания A_7 , A_8 и A_9 в Kwt РНК не проявляли чувствительности к РНКазе U2, которая гидролизует связи после остатков аденина, находящихся в неспаренном состоянии (Ehresmann *et al.*, 1987). В то же время в Kgw РНК в участке расположения A_7 и A_8 наблюдались сайты, достаточно чувствительные к расщеплению этой же РНКазой, что

свидетельствует о более слабом вовлечении этих оснований в формирование АССА-стебля. Аналогичные изменения чувствительности связи U_6-A_7 к расщеплению были выявлены с помощью аРНКазы **ABL3C3**: при переходе от РНК Kwt к Kgw интенсивность расщепления в этом мотиве заметно возрастает, что также подтверждает отсутствие прочных Уотсон-Криковских взаимодействий в этом участке Kgw РНК (рис. 4). Прямой химический пробинг РНК с помощью DMS и DEPC выявил значительные различия в реакционной способности ряда оснований, в том числе и A_9 . Так, основание A_9 , которое в структуре Kwt образует комплементарную пару с U_{61} (рис. 4а), не подвергалось модификации этими соединениями, в то время как реакционная способность по отношению к DMS основания C_9 в Kgw РНК была высокой. Это же структурное отличие было выявлено и при помощи соединения **ABL3C3**, которое в соответствии со своей специфичностью вызывало расщепление связи C_9-G_{10} в акцепторном стебле РНК Kgw и не расщепляло связь A_9-G_{10} , расположенную в районе перекрестка в РНК Kwt. Чувствительность фосфодиэфирной связи $U_{12}-C$ к действию аРНКазы **ABL3C3** в Kgw была существенно выше, чем в Kwt, что также совпадало с данными работы (Helm *et al.*, 1998), авторы которой показали усиление реакционной способности оснований в этом участке структуры как по отношению к имидазолу, так и солям Pb^{2+} , обладающим родством к одноцепочечным районам РНК. Различия в чувствительности других связей, выявленные с помощью соединения **ABL3C3**, были не столь существенными, но также коррелировали с данными пробинга.

Митохондриальные тРНК^{Lys}, как известно, содержат больше А и U оснований по сравнению с другими тРНК (Schuster *et al.*, 1994). Вследствие этого данные тРНК могут формировать большой набор альтернативных вторичных структур, характеризующихся близкими значениями свободной энергии. В случае природных тРНК^{Lys} вторичная структура стабилизируется, главным образом, за счет модифицированных оснований, которые отсутствуют в *in vitro* транскриптах. Таким образом, полученные данные

свидетельствуют о высокой чувствительности искусственных РНКаз **ABL3Cm** ко вторичной структуре РНК в растворе, а специфичность расщепления РНК соединениями **ABL3Cm** полностью совпадает со специфичностью расщепления под действием РНКазы А и других химических и ферментативных зондов.

Потенциал аРНКаз **ABL3Cm** как зондов для исследования вторичной структуры РНК в растворе был исследован в экспериментах по изучению вторичной структуры *in vitro* транскрипта мРНК белка М2 вируса гриппа, данные о которой в литературе отсутствуют. Интерес к структуре этой РНК был вызван ее биологической значимостью. М2 мРНК кодирует мембранный вирусный белок М2, который интересен, в первую очередь, своей способностью вызывать иммунный ответ, подобно двум другим поверхностным белкам вируса гриппа – гемагглютинину и нейраминидазе, и высокой его консервативностью среди других вирусных полипептидов (Ito *et al.*, 1991; Slepishkin *et al.*, 1995; Kilborne, 1999). Кроме того, лекарственная устойчивость вируса гриппа обусловлена мутациями именно в белке М2 (Hay *et al.*, 1985; Pinto *et al.*, 1992; Duff *et al.*, 1994). Роль этого белка в жизненном цикле вируса гриппа и его инвариантность делают кодирующую его мРНК перспективной мишенью для разработки антивирусных препаратов на основе антисмысловых олигонуклеотидов.

Специфичность расщепления М2 РНК соединениями **ABL3Cm** совпадала с данными, полученными в экспериментах с другими модельными РНК, несмотря на существенные различия в их последовательностях и структуре. Основному расщеплению в М2 РНК подвергались фосфодиэфирные связи, расположенные в СА- и UA-мотивах, и в меньшей степени в других последовательностях. Интересно отметить, что практически все СА-связи, присутствующие в последовательности РНК, подвергались расщеплению реагентами. В ряде случаев наблюдалось дополнительное расщепление фосфодиэфирных связей, расположенных с 5'-стороны от гидролизуемой СА-последовательности, к таким случаям можно отнести гидролиз связей между G-C (G₆₉, G₇₄, G₁₆₇), U-C (U₈₂, U₁₆₁, U₂₈₅)

и А-С (A₁₆₈, A₂₈₁). Данные сайты расщепления, по всей вероятности, являются вторичными и образуются вследствие экзонуклеазной активности соединений **ABL3Cm**. Указанные последовательности также эффективно расщеплялись под действием рибонуклеаз Т1 и ONE. В целом специфичность расщепления М2 РНК соединениями **ABL3Cm** коррелировала с расщеплением структурными рибонуклеазами Т1 и ONE. Добавление в реакционную смесь ионов Mg²⁺ не влияло на специфичность расщепления М2 РНК аРНКазами **ABL3Cm**, но вызвало увеличение скорости расщепления РНК в 4–6 раз. Такое увеличение скорости расщепления, во-первых, могло быть связано со стабилизацией пространственной структуры РНК, происходящей под влиянием ионов Mg²⁺, в результате чего чувствительные к действию реагентов фосфодиэфирные связи стали более доступны действию реагентов. Во-вторых, в присутствии ионов магния мог произойти сдвиг равновесия в сторону одной из возможных структур, приобретаемой молекулой М2 РНК в растворе.

Использование искусственных рибонуклеаз для пробинга вторичной структуры РНК в растворе является одним из интересных и важных их практических применений. Недостаток традиционно используемых для этой цели природных ферментов заключается в том, что они недостаточно стабильны и работают в узком диапазоне условий. Данные, описанные в этом разделе, показывают, что аРНКазы **ABL3Cm** обладают высокой чувствительностью ко вторичной структуре РНК-мишени и дают основания рассматривать их в качестве перспективных структурных зондов со специфичностью РНКазы А, но при этом обладающих гораздо меньшим размером и более высокой стабильностью, чем природный фермент.

Антипролиферативные и противовирусные свойства аРНКаз

Хорошо известна способность секреторных рибонуклеаз оказывать токсическое действие на опухолевые клетки и сдерживать рост опу-

холей (Youle, D'Alessio, 1997; Haigis *et al.*, 2003; Costanzi *et al.*, 2005). Более того, цитотоксичные рибонуклеазы рассматриваются специалистами как новый подход в противоопухолевой терапии. В частности, онконаза, гомолог панкреатической РНКазы А, находится уже в 3-й фазе клинических испытаний как противоопухолевый препарат для комплексной терапии злокачественной мезотелиомы (Costanzi *et al.*, 2005). Исследование биологических свойств аРНКаз показало, что эти соединения проявляют цитотоксичность по отношению к эукариотическим клеткам различных линий опухолевой и неопухолевой природы: MDCK, HEK 293, HeLa, SK-NMC, KB-3-1, значение IC_{50} для соединений **ABL3Cm** лежат в диапазоне 7–10 мкМ.

Противовирусную активность аРНКаз исследовали на примере подавления размножения вируса гриппа A/WSN/33 в клетках MDCK (Beloglazova *et al.*, 2006). аРНКазы оказались эффективными противовирусными агентами и в концентрации 5 мкМ снижали уровень синтеза вирусспецифических белков на 80–85 %. Тем не менее значение химиотерапевтического индекса для этих соединений не превышало 10, что не позволило использовать их для подавления репродукции вируса гриппа непосредственно. Более перспективным оказалось использование аРНКаз для инактивации генома вируса гриппа *in vitro*. Идея необратимой инактивации геномной РНК или ДНК вирусов с помощью химических соединений была впервые высказана в работах (Budowsky, Zalesskaya, 1996; Budowsky, 2004), где была продемонстрирована возможность избирательной модификации ДНК и РНК в составе вирионов соответствующих вирусов и показано, что в результате обработки происходит необратимое нарушение молекулярных функций геномной ДНК или РНК, выражающееся в снижении инфекционного титра вирусов.

Наши исследования показали, что вирус гриппа после обработки аРНКазами оказывает значительно меньший цитопатический эффект на эукариотические клетки по сравнению с нативным (необработанным) вирусом. Для оценки способности обработанного аРНКазами вируса гриппа к репликации *in vivo* им инфицировали

8-недельных самок мышей линии Balb/C интраназально, а в качестве контроля использовали вирус, инкубированный в отсутствие аРНКазы, и нативный вирус. Оказалось, что нативный вирус и вирус, инкубированный в отсутствие аРНКазы, обладают одинаковой патогенностью для животных, а вирус, инактивированный искусственной рибонуклеазой, не вызывает инфекции у животных, что следовало из данных по измерению веса животных, их общему состоянию и выживаемости. Это наблюдение было подтверждено данными титрования экстрактов ткани легкого в культуре клеток. Значение инфекционного титра вируса в ткани легких мышей в группах, инфицированных контрольным и нативным вирусами, было порядка 5,5–6 lg(TCID₅₀)/г ткани, в то время как вирус, инактивированный аРНКазой используемым методом, не определялся, что означает его полную инактивацию.

Таким образом, аРНКазы, впервые полученные в ИХБФМ СО РАН, обладают высокой стабильностью и эффективно расщепляют РНК в широком диапазоне условий, в том числе и в физиологических условиях, в клетках и в вирионах, но не взаимодействуют с другими биополимерами. Эти соединения, способные инактивировать РНК-содержащие вирусы и вызывать при попадании в клетку расщепление внутриклеточных РНК, могут послужить основой принципиально новых противовирусных препаратов для лечения заболеваний, вызываемых РНК-содержащими вирусами.

Работа поддержана грантами программ фундаментальных исследований РАН «Молекулярная и клеточная биология», «Фундаментальные науки – медицине», грантом СО РАН в поддержку молодых ученых № 95; Интеграционными проектами СО РАН №20, № 5.11; РФФИ № 05-04-49109, РФФИ № 05-04-48985, ГК № 02.442.11.7571.

Литература

Белоглазова Н.Г., Миронова Н.Л., Коневец Д.А. и др. Кинетические параметры гидролиза CpA и UpA последовательностей в составе рибоолигонуклео-

- тида под действием соединений, функционально имитирующих рибонуклеазу А // Молекуляр. биология. 2002. Т. 36. № 6. С. 1068–1073.
- Власов А.В., Власов В.В., Жьеже Р. Катализируемый имидазолом гидролиз РНК как реакция для исследования вторичной структуры РНК и комплексов РНК с олигонуклеотидами // Докл. РАН. 1996. Т. 349. С. 411–413.
- Власов В.В., Сильников В.Н., Зенкова М.А. Химические рибонуклеазы // Молекуляр. биология. 1998. Т. 32. № 1. С. 62–70.
- 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 // Биоорган. химия. 1999. Т. 25. № 10. С. 723–732.
- Зенкова М.А., Власов А.В., Коневец Д.А. и др. Химические рибонуклеазы 2. Синтез и РНК-гидролизующая активность химических рибонуклеаз – конъюгатов 1,4-диазабицикло[2.2.2]-октана, несущих различный суммарный положительный заряд // Биоорган. химия. 2000а. Т. 26. С. 610–616.
- Зенкова М.А., Чумакова Н.Л., Власов А.В. и др. Химические рибонуклеазы, функционально имитирующие активный центр РНКазы А // Молекуляр. биология. 2000б. Т. 34. № 3. С. 456–460.
- Коневец Д.А., Зенкова М.А., Сильников В.Н., Власов В.В. Синтетические молекулы, катализирующие гидролиз РНК // Докл. РАН. 1998. № 4. С. 554–558
- Коневец Д.А., Бек И.Е., Сильников В.Н. и др. Химические рибонуклеазы 3. Синтез органических катализаторов гидролиза фосфодиэфирных связей на основе бис-четвертичных аммониевых солей 1,4-диазабицикло[2.2.2]-октана // Биоорган. химия. 2000. Т. 26. № 11. С. 852–861.
- Коневец Д.А., Миронова Н.Л., Бек И.Э. и др. Химические рибонуклеазы 4. Анализ доменной структуры химических рибонуклеаз на основе конъюгатов 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана // Биоорган. химия. 2002а. Т. 28. С. 367–378.
- Коневец Д.А., Бек И.Э., Шишкин Г.В. и др. Конструирование и синтез искусственных рибонуклеаз на основе 1, 4-диазабицикло[2.2.2]октана и имидазола // Изв. РАН. Сер. химическая. 2002б. Т. 7. С. 1014–1024.
- 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. химическая. 2004. Т. 53. № 3. С. 435–442.
- Сильников В.Н., Власов В.В. Конструирование реагентов для направленного расщепления рибонуклеиновых кислот // Усп. химии. 2001. Т. 70. С. 562–580.
- Beloglazova N., Nikitin P., Vinogradov I. *et al.* A new way of RNA viruses inactivation // Nature Letters. 2006. (submitted for publication).
- Beloglazova N., Vlassov A., Konevets D. *et al.* Mechanism and specificity of RNA cleavage by chemical ribonucleases // Nucleosides, Nucleotides. 1999. V. 18. P. 1463–1465.
- Bibillo A., Ziomek K., Figlerowicz M., Kierzek R. Nonenzymatic hydrolysis of oligoribonucleotides. V. The element affecting the process of self-hydrolysis // Acta Biochim. Polon. 1999. V. 46. P. 145–153.
- Breslow R., Labelle M. Sequential general base-acid catalysis in the hydrolysis of RNA by imidazole // J. Am. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 2655–2659.
- Breslow R., Anslyn E., Huang D.-L. Ribonuclease mimics // Tetrahedron. 1991. V. 47. P. 2365–2376.
- Breslow R., Dong S.D., Webb Y., Xu R. Further studies on the buffer-catalyzed cleavage and isomerization of uridyluridine. Medium and ionic strength effects on catalysis by morpholine, imidazole, and acetate buffers help clarify the mechanisms involved and their relationship to the mechanism used by the enzyme ribonuclease and by a ribonuclease mimic // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. P. 6588–6600.
- Budowsky E.I., Zalesskaya M.A., Nepomnyashchaya N.M., Kostyanovski R.G. Principles of selective inactivation of the viral genome: dependence of the rate of viral RNA modification on the number of protonizable groups in ethyleneimine oligomers // Vac. Res. 1996. V. 5. P. 29–39.
- Budowsky E.I. Methods and compositions for the selective modification of nucleic acids. 2004. Pat. 20040053316. USA.
- Chastain M., Tinoco I., Jr. Structural elements in RNA // Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 1991. V. 41. P. 131–177.
- Costanzi J., Sidransky D., Navon A., Goldsweig H. Ribonucleases as a novel pro-apoptotic anticancer strategy: review of the preclinical and clinical data for ranpirnase // Cancer Invest. 2005. V. 23. P. 643–650.
- Dock-Bregeon A.C., Moras D. Conformational changes and dynamics of tRNAs: evidence from hydrolysis patterns // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1987. V. LII. P. 113–121.
- Duff K.C., Gilchrist P.J., Saxena A.M., Bradshaw J.P. Neutron diffraction reveals the site of amantadine blockade in the influenza A M2 ion channel // Virology. 1994. V. 202. № 1. P. 287–293.
- Ehresmann C., Baudin F., Mougél M. *et al.* Probing the structure of RNAs in solution // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. P. 9109–9128.

- Giege R., Felden B., Zenkova M.A. *et al.* Cleavage of RNA with synthetic ribonuclease mimics // *Methods Enzymol.* 2000. V. 318. P. 147–165.
- Haigis M.C., Kurten E.L., Raines R.T. Ribonucleases inhibitor as an intracellular sentry // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. P. 1024–1032.
- Hay A.J., Wolstenholme A.J., Skehel J.J., Smith M.H. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine // *The EMBO J.* 1985. V. 5. P. 3021–3024.
- Helm M., Brulé H., Degoul F. *et al.* The presence of modified nucleotides is required for cloverleaf folding of a human mitochondrial tRNA // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 1636–1643.
- Helm M., Giege R., Florentz C. A Watson-Crick base-pair-disrupting methyl group (m1A9) is sufficient for cloverleaf folding of human mitochondrial tRNA^{Lys} // *Biochemistry.* 1999. V. 38. P. 13338–13346.
- Hosaka H., Sakade I., Sakamoto K. *et al.* Sequence-specific cleavage of oligoribonucleotide capable of forming a stem and loop structure // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 20090–20094.
- Ito T., Gorman O.T., Kawaoka Y. *et al.* Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins // *J. Virol.* 1991. V. 65. P. 5491–5498.
- Kierzek R. Nonenzymatic hydrolysis of oligoribonucleotides // *Nucl. Acids Res.* 1992a. V. 20. P. 5079–5084.
- Kierzek R. Hydrolysis of oligoribonucleotides: influence of sequence and length // *Nucl. Acids Res.* 1992b. V. 20. P. 5073–5077.
- Kilbourne E.D. What are the prospects for a universal influenza vaccine? // *Nature Medicine.* 1999. V. 5. № 10. P. 1119.
- Konevets D.A., Beck I.E., Beloglazova N.G. *et al.* Artificial ribonucleases: synthesis and RNA cleaving properties of cationic conjugates bearing imidazole residues // *Tetrahedron.* 1999. V. 55. P. 503–514.
- Magda D., Wright M., Crofts S. *et al.* Metal complex conjugates of antisense DNA which display ribozyme-like activity // *J. Am. Chem. Soc.* 1997. V. 119. P. 6947–6948.
- Mikkola S., Kaukinen U., Lonnberg H. The effect of secondary structure on cleavage of the phosphodiester bonds of RNA // *Cell Biochem. Biophys.* 2001. V. 34. P. 95–119.
- Niittymäki T., Lonnberg H. Artificial ribonucleases // *Org. Biomol. Chem.* 2006. V. 4. P. 15–25.
- Nishikawa S., Morioka H., Kim H.J. *et al.* Two histidine residues are essential for ribonuclease T1 activity as is the case for ribonuclease A // *Biochemistry.* 1987. V. 26. P. 8620–8624.
- Oivanen M., Kuusela S., Lonnberg H. Kinetics and mechanisms for the cleavage and isomerization of the phosphodiester bonds of RNA by bronsted acids and bases // *Chem. Rev.* 1998. V. 98. P. 961–990.
- Patel D.J. Molecular insights into the RNA world // *Biopolymers.* 1998. V. 48. P. 97–100.
- Pinto L.H., Holsinger L.J., Lamb R.A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity // *Cell.* 1992. V. 69. P. 517–528.
- 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. P. 5950–5956.
- Raines R.T. Active site of Ribonuclease A. // *Artificial Nucleases/* Ed. M.A. Zenkova. *Nucl. Acids and Mol. Biol.:* Springer Verlag, 2004. V. 13.
- 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.
- Schuster P., Fontana W., Stadler P.F., Hofacker I.L. From sequences to shapes and back: a case study in RNA secondary structures // *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1994. V. 255. № 1344. P. 279–284.
- Shindo H., Hayes M.B., Cohen J.S. Nuclear magnetic resonance titration curves of histidine ring protons. A direct assignment of the resonances of the active site histidine residues of ribonuclease // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. P. 2644–2647.
- Slepishkin V.A., Katz J.M., Black R.A. *et al.* Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein // *Vaccine.* 1995. V. 13. № 15. P. 1399–1402.
- Stone M.P., Winkle S.A., Borer P.N. 13C-NMR of ribosyl ApApA, ApApG and ApUpG // *J. Biomol. Sh. Dyn.* 1986. V. 3. P. 767–781.
- Usher D.A., Richardson D.I. Jr, Eckstein F. Absolute stereochemistry of the second step of ribonuclease action // *Nature.* 1970a. V. 228. P. 663–665.
- Usher D.A., Richardson D.I. Jr, Oakenfull D.G. Models of ribonuclease action. II. Specific acid, specific base, and neutral pathways for hydrolysis of a nucleotide diester analog // *J. Am. Chem. Soc.* 1970b. V. 92. P. 4699–4712.
- Vlassov V.V., Zuber G., Felden B. *et al.* Cleavage of tRNA with imidazole and spermine imidazole constructs: a new approach for probing RNA structure // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. P. 3161–3167.
- Wlodawer A., Miller M., Sjolín L. Active-site of RNase – neutron-diffraction study of a complex with uridine vanadate, a transition-state analog // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983. V. 80. P. 3628–3631.
- Witzel H. RNA self-cleavage // *Progr. Nucl. Acids Res.* 1965. V. 2. P. 221–258.
- Youle R.J., D'Alessio G. *Anitumor RNases // Ribonucleases: Structure and Functions/* Eds G. D'Alessio, J.F. Ri

- ordan. N.Y.: Academic Press, 1997. P. 491–514.
- Zhdan N.S., Kuznetsova I.L., Zenkova M.A. *et al.* Synthesis and characterization of artificial ribonucleases // *Nucleosides, Nucleotides*. 1999. V. 18. P. 1491–1492.
- Zenkova M.A., Sil'nikov V.N., Beloglazova N.G. *et al.* RNA Cleaving 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane-imidazole conjugates // *Methods Enzymol.* 2001. V. 341. P. 468–490.
- Zenkova M., Beloglazova N. Site-specific artificial ribonucleases: conjugates of oligonucleotides with catalytic groups // *Artificial Nucleases* / Ed. M.A. Zenkova. *Nucl. Acids and Mol. Biol.*: Springer Verlag, 2004. V. 13. P. 189–222.

ARTIFICIAL RIBONUCLEASES – A NEW CLASS OF COMPOUNDS FOR BIOLOGY AND MEDICINE

**N.G. Beloglazova, N.V. Tamkovich, P.A. Nikitin, I.L. Kuznetsova,
M.A. Zenkova, V.V. Vlassov**

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

Summary

Biological properties of newly designed effective artificial ribonucleases (aRNases) – conjugates of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane and imidazole are reviewed. Specificity of RNA cleavage and possibility to use aRNases as probes for investigation RNA secondary structure in solution are shown. Potential of aRNases as anticancer, antiviral agents and aRNases-based method for inactivation of RNA viruses is considered.