



УДК 577.152.31\*264'14 : 577.113.4

© 1990 г.

*В. Г. Метелев, Н. Ф. Крыльцова\*, А. А. Пурмаль\*,  
З. А. Шабарова\**

## ГИБРИДНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ РНК.

I. ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ЗОНДЫ ДЛЯ РЕГИОСПЕЦИФИЧЕСКОГО  
РАСЩЕПЛЕНИЯ РНК

*Межфакультетская проблемная научно-исследовательская  
лаборатория молекулярной биологии и биоорганической  
химии им. А. Н. Белозерского и \*химический факультет Московского  
государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Предложены новые зонды для высокоспецифического расщепления РНК гибридазой (РНКазой Н). Показано, что при обработке РНКазой Н гетеродуплекса, образованного фрагментом 5S рРНК и d(ACCACCGCGCT), гидролизуется сайт-специфически 8 фосфодиэфирных связей в РНК. Замена дезоксирибозитидинов в положении 5, 6, 8, 10 зонда на 2'-О-метилцитидин приводит к направленному и единичному (региоспецифическому) расщеплению.

В настоящее время внимание исследователей привлекает конструирование и синтез новых типов модифицированных олигонуклеотидных зондов для направленного воздействия на процессы, протекающие с участием нуклеиновых кислот. Модификацией отдельных узлов сахара-фосфатного остова были получены и успешно использованы, например, зонды с повышенной устойчивостью к клеточным нуклеазам, способные лучше проникать через клеточные мембраны (см. обзор [1]). Недавно предложены химерные зонды для повышения селективности расщепления РНК РНКазой Н. В отличие от использованных ранее олигодезоксирибонуклеотидных зондов, позволяющих проводить сайт-специфический гидролиз РНК РНКазой Н [2, 3], они представляют собой олигонуклеотиды, в которых 5'-концевым является олигодезоксирибонуклеотидный блок, а 3'-концевым — олигорибонуклеотидный [4, 5] или 2'-О-метилрибонуклеотидный [6]. Образующийся в этом случае при взаимодействии с РНК гетеродуплекс состоит из олигорибо-олигорибо- и олигорибо-олигодезоксирибонуклеотидных фрагментов, но только последний гидролизуется РНКазой Н, и число гидролизуемых связей в РНК сокращается. Таким образом, использование протяженного химерного зонда позволяет не только направить гидролиз РНК РНКазой Н в определенный район РНК, но и сократить число расщеплений, проводить региоспецифический (расщепление одной фосфодиэфирной связи) гидролиз.

Настоящая работа является продолжением поиска оптимальных структур зондов для высокоспецифического расщепления РНК РНКазой Н на основе олигодезоксирибонуклеотидов с минимальным числом модификаций сахара-фосфатного остова зонда. На примере гидролиза фрагментов 5S рРНК в присутствии направляющих гидролиз d(ACCACCGCGCT) (I) и d(ACCA)<sup>\*</sup>CCd<sup>\*</sup>GCd<sup>\*</sup>GCT<sup>\*</sup>(II) показано, что частичная замена дезоксирибонуклеотидов (четыре остатков dC в 11-мере (I)) на 2'-О-метилцитидин эквивалентна введению протяженного олиго-2'-О-метилрибонуклеотидного фрагмента в зонд и обеспечивает региоспецифичность расщепления

\* C — 2'-О-метилцитидин.

Рис. 1. Выделение  
 $d(A^{**}C^{**}S^{*}C^{*}dG^{*}C^{*}dG^{*}C^{*}T^{*})$  ВЭЖХ  
 из реакционной смеси после  
 удаления защитных групп. Ус-  
 ловия и состав буферов А  
 и Б — см. в «Экспер. части»

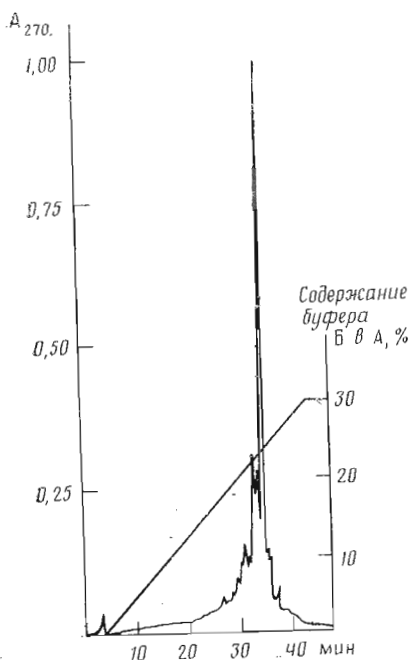


Рис. 1

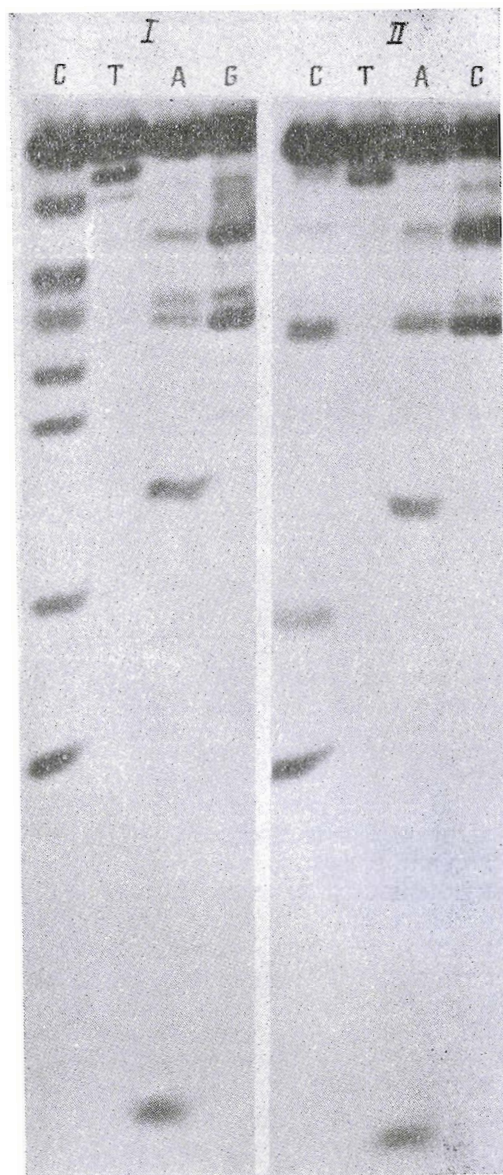


Рис. 2

РНК РНКазой Н. При этом предложенная нами модификация олигонуклеотидного зонда существенно упрощает его химический синтез.

Синтез олигомера (II) был описан ранее [7]. Для выделения его из реакционной смеси после удаления защитных групп использована ВЭЖХ. Нуклеотидный материал основного пика (рис. 1) обессолен и использован в дальнейших опытах без дополнительной очистки. Первичная структура зондов подтверждена сравнением анализов по методу Максама — Гилберта соединений (I) и (II) (рис. 2): в случае модифицированного зонда (II), как и следовало ожидать, отсутствуют расщепления олигонуклеотидной цепи в положениях 5, 6, 8 и 10, соответствующих остатку 2'-О-метилцитидина.

Структура гибридных дуплексов (1—4), которые подвергались действию РНКазы Н\*, приведена на рис. 3. РНК мишени представляют собой фрагменты 5S РНК: 1—41 (дуплексы 1 и 2) и 1—36 (дуплексы 3 и 4).

\* РНКазы Н (КФ 3.1.26.4), называемая также гибридазой, действует на РНК в дуплексе РНК-ДНК.

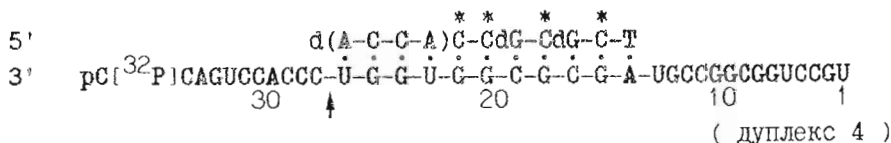
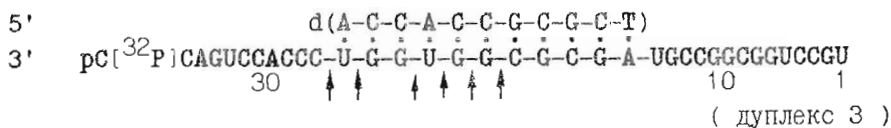
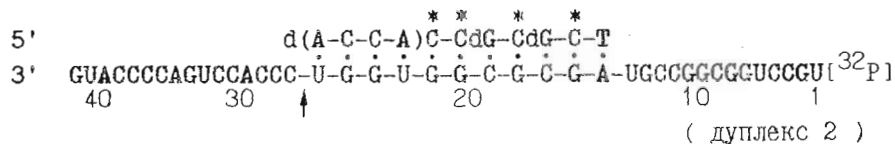
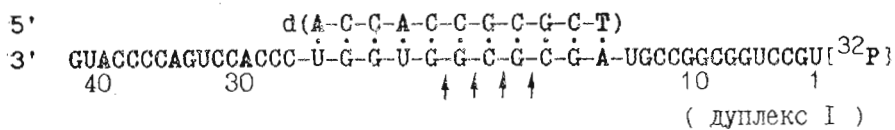


Рис. 3. Структура гибридных дуплексов. Стрелками отмечены гидролизуемые РНКазой Н фосфодиэфирные связи

Для доказательства региоспецифичности гидролиза РНК в эти фрагменты вводили 5'-концевую метку с помощью  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$  и Т4-полинуклеотидкиназы или 3'-концевую метку с помощью  $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{pCp}$  и Т4-РНК-лигазы. <sup>32</sup>P-меченые продукты гидролиза анализировали гель-электрофорезом в ПААГ. Как видно из рис. 4 и 5, использование обычного дезоксирибонуклеотидного зонда (I) приводит к множественному гидролизу РНК. Гидролизуется с разной эффективностью 8 фосфодиэфирных связей: C<sup>17</sup>-G<sup>18</sup>, G<sup>18</sup>-C<sup>19</sup>, C<sup>19</sup>-G<sup>20</sup>, G<sup>20</sup>-G<sup>21</sup>, G<sup>21</sup>-U<sup>22</sup>, U<sup>22</sup>-G<sup>23</sup>, G<sup>24</sup>-U<sup>25</sup>, U<sup>25</sup>-C<sup>26</sup>. В случае же зонда (II) наблюдается резкое повышение селективности расщепления — гидролизуется только одна связь между U<sup>25</sup> и C<sup>26</sup>, т. е. первая межнуклеотидная связь РНК вне дуплекса в 3'-направлении.

Едиичное расщепление между U<sup>25</sup>-C<sup>26</sup> наблюдалось как для 5'-, так и для 3'-меченых фрагментов РНК. Таким образом, замена dC в дезоксирибонуклеотиде (I) в положениях 5, 6, 8, 10 на 2'-О-метилцитидин блокирует множественное расщепление РНК соответствующего дуплекса и обеспечивает региоспецифическое расщепление.

Следует отметить, что в использованных условиях гидролиз РНК РНКазой Н в дуплексе 1 заканчивается за 10 мин (рис. 4), тогда как в дуплексе 2 за 1 ч гидролизуется около 80% РНК, т. е. повышение специфичности процесса гидролиза РНК сопровождается некоторым понижением его эффективности. Это можно объяснить сокращением истинного гибридного дуплекса (4-звенного в случае модифицированного зонда (II)) в отличие от 11-звенного в случае зонда (I) или уменьшением устойчивости гетеродуплекса 2, содержащего модифицированный зонд (II). Отметим, что при использовании в качестве зонда d(ACCACC) нет региоспецифического расщепления РНК (рис. 5, 3) и, кроме того, гидролиз протекает крайне неэффективно, возможно, из-за того, что в этом случае образуется слабый комплекс с РНК.

Для оценки термической устойчивости образующихся гетеродуплек-

Рис. 4. Авторадиограмма разделения в 20% ПААГ<sup>1</sup> продуктов гидролиза 5'-<sup>32</sup>P-меченого фрагмента 1—41 5S рРНК (дорожки 2—5 — в дуплексе 1; дорожки 6—9 — в дуплексе 2) после инкубации с РНКазой Н в течение 3, 10, 30, 70 мин соответственно; дорожка 1 — маркер [5'-<sup>32</sup>P]pGGGAGCGGG†GGUCC

Рис. 5. Авторадиограмма разделения в 20% ПААГ<sup>1</sup> продуктов гидролиза 3'-<sup>32</sup>P-меченого фрагмента 1—36 5S рРНК после инкубации с РНКазой Н в течение 30 мин (дорожки: 1 — 3'-<sup>32</sup>P-меченый фрагмент 1—36 5S рРНК; 2 — в дуплексе 4; 3 — в присутствии d(ACCACC); 4 — в дуплексе 3; 5 — в присутствии d(GGACCACCGCG); 6 — 3'-<sup>32</sup>P-меченого фрагмента; 1—36 5S рРНК после ограниченного щелочного гидролиза; 7 — маркер [5'-<sup>32</sup>P]pGGGAGCGGG†GGUCC



Рис. 4

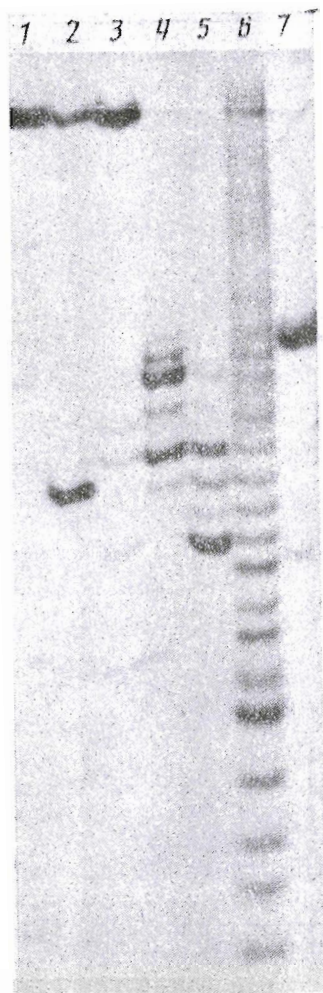


Рис. 5

сов 1—4 и влияния введенных модификаций в сахаро-фосфатном остове зонда на структуру двойной спирали были получены модельные дуплексы 5—8 (таблица), имеющие ту же нуклеотидную последовательность двухцепочечной части, что и дуплексы 1—4 (рис. 3). Методы УФ- и КД-спектроскопии дали возможность выяснить, как влияют модификации зонда на геометрию и термодинамические параметры дуплекса в целом. Кривые плавления дуплексов 5—8 приведены на рис. 6, а значения гипохромии (% *h*) и температуры плавления — в таблице. Как видно из рис. 6, плавление происходит в узком интервале температур, что свидетельствует о кооперативности этого процесса. Замена четырех остатков dC на остатки 2'-О-метилцитидина практически не влияет на гипохромия, но меняет температуру плавления в ДНК-дуплексах (дуплексы 5, 6, рис. 6 и таблица). Это приводит к снижению температуры плавления; в гибридных РНК-ДНК-дуплексах (дуплексы 7, 8, рис. 6 и таблица) она, напротив, возрастает при использовании модифицированного зонда (II). Эти результаты согласуются с литературными данными. Так, в работе [8] показано, что нона-2'-О-метилрибонуклеотид образует с РНК дуплекс, который имеет температуру плавления на 16° С выше, чем дуплекс с соответствующим дезоксианалогом.

Данные спектров КД свидетельствуют о конформационных изменениях, индуцированных указанными выше модификациями сахаро-фосфатно-

Номер дуплекса	Олигонуклеотидный гетеродуплекс	Т. пл., °C	% h
5	$5' \quad d(A-C-C-A-C-C-G-C-G-C-T)$ $3' \quad (C-C-C-T-G-G-T-G-G-C-G-C-G-A-T-G)d$	62	16,7
6	$5' \quad d(A-C-C-A) \overset{*}{C} \overset{*}{C} dG \overset{*}{C} dG \overset{*}{C} T$ $3' \quad (C-C-C-T-G-G-T-G-G-C-G-C-G-A-T-G)d$	59	14
7	$5' \quad d(A-C-C-A-C-C-G-C-G-C-T)$ $3' \quad C-C-U-G-G-U-G-G-C-G-C-G-A-G-G-G$	65	14
8	$5' \quad d(A-C-C-A) \overset{*}{C} \overset{*}{C} dG \overset{*}{C} dG \overset{*}{C} T$ $3' \quad C-C-U-G-G-U-G-G-C-G-C-G-A-G-G-G$	71	13
9	$5' \quad A-Cd(C-A-C-C)G-C-G-C-U$ $3' \quad (C-C-C-T-G-G-T-G-G-C-G-C-G-A-T-G)d$	—	—

то остова зондов. Анализ спектров КД ДНК дуплексов 5 и 6 (рис. 7) показывает, что введение в один из тяжёлых остатков 2'-О-метилцитидина привело к появлению элементов А-формы двойной спирали в дуплексе 6: увеличилась амплитуда положительной полосы, точки нулевого перехода сместились в сторону коротких волн. Для сравнения на рис. 7 приведен спектр КД дуплекса 9 (см. таблицу), имеющего протяженный олигорибонуклеотидный фрагмент: спектры дуплексов 6 и 9 практически полностью совпадают. Известно, что 2'-гидроксил (а тем более 2'-О-метильная группа) придает значительную жесткость С3'-эндо(N)-конформации сахарного кольца [9]; вследствие этого в дуплексе 9 появляется А-форма. Идентичность спектров КД дуплексов 6 и 9 позволяет предположить, что замена четырех остатков dC на остатки 2'-О-метилрибозитидина эквивалентна введению протяженного рибонуклеотидного блока. По-видимому, в гетеродуплексах 2 и 4 (см. рис. 3) имеются как ДНК-РНК-, так и РНК-РНК-дуплексы, которые узнаются или не узнаются РНКазой Н. Очевидно, что именно сокращение узнаваемого РНКазой Н фрагмента в случае модифицированного олигонуклеотидного зонда приводит к региоспецифическому расщеплению по связи U<sup>25</sup>-G<sup>26</sup>.

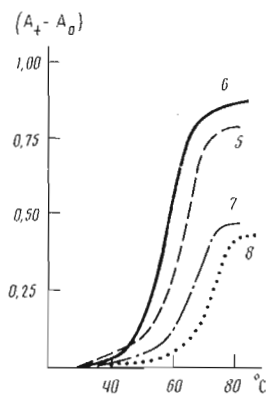


Рис. 6. Кривые плавления в буфере С дуплексов 5—8.  $c_0 = 0,3 \cdot 10^{-4}$  М

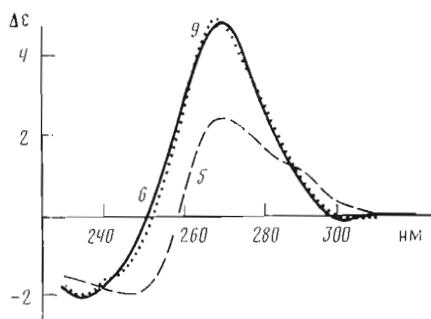


Рис. 7. Спектры КД дуплексов 5, 6 и 9. Условия см. в подпункте к рис. 6. Температура 20° С

В продолжение данной работы в нашей лаборатории осуществлен синтез ряда зондов с направленной заменой 2'-дезоксирибонуклеотидных звеньев на 2'-О-метил-, 2'-F- [10], 2'-ОН-звенья (также закрепляющих С3'-эндо(N)-конформацию сахарного кольца [9]) для поиска оптимальных структур зондов на основе олигодезоксирибонуклеотидов. Можно предположить, что использование таких зондов позволит повысить точность расщепления РНК-мишеней, уменьшить «неспецифический» фон, который возникает при высокой гомологии смысловой нуклеотидной последовательности РНК-мишени и других РНК, присутствующих в системе, так как олигорибо-олигодезоксирибонуклеотидный гетеродуплекс с соответствующими модификациями отдельных дезоксирибонуклеотидных звеньев (как впервые продемонстрировано в данной работе) внутри двутяжевого участка не подвержен атаке РНКазой Н, а обеспечивает гидролиз фосфодиэфирной связи в РНК, соседней с 3'-концом этого двутяжевого участка гетеродуплекса.

Авторы выражают искреннюю благодарность В. Н. Сергееву за проведенный анализ первичной структуры синтетических олигонуклеотидов, В. К. Потапову и А. А. Елову за предоставленные олигонуклеотиды.

### Экспериментальная часть

В работе использовали акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, персульфат аммония, N,N,N,N'-тетраметилэтилендиамин (Reanal, Венгрия), MgCl<sub>2</sub>, ацетонитрил (Merck, ФРГ), дитиотреит, трис, EDTA (Serva, ФРГ), бромфеноловый синий и ксиленцианол (BDH, Англия), ацетат аммония отечественного производства квалификации ос. ч.; [5'-<sup>32</sup>P]pCp и [γ-<sup>32</sup>P]-АТР («Изотоп», СССР).

РНК-лигаза *E. coli*, полинуклеотидкиназа фага Т4 получены из НПО «Фермент» (Вильнюс, СССР); РНКаза Н *E. coli* (20 000 ед. акт.\*/ml) получена из НПО «Биолар» (Олайн, СССР).

Олигонуклеотид d(ACCA)<sup>\*\*</sup>CCd<sup>\*\*</sup>GCd<sup>\*\*</sup>GC<sup>\*\*</sup>T (II) синтезирован гидрофосфорильным твердофазным методом на автоматическом синтезаторе «Singen» (ЧССР) [7]; d(ACCACC), d(ACCACCGCGCT) (I), d(GTAGCGCGGTGGTCCC) получены фосфитамидным твердофазным методом на автоматическом синтезаторе «Виктория-4М» (СССР) [11]; ACd(CACC)GCGCU любезно представлен нам В. К. Потаповым. Фрагменты 5S рРНК из *E. coli* получали гидролизом РНК, как описано в [12]. GGGAGCGCGGUGGUCC, любезно предоставленный А. А. Еловым, был синтезирован им транскрипцией синтетической матрицы с помощью РНК-полимеразы фага Т7 [13].

После удаления защитных групп олигонуклеотиды выделяли ВЭЖХ на колонке (0,46 × 25 см) с носителем Octadecyl-Si 100 (10 ммк; Serva, ФРГ). Буфер А — 0,1 М ацетат аммония, буфер Б — 0,1 М ацетат аммония в 40% ацетонитриле. Условия разделений: буфер А — 3 мин, далее от А к Б за 40 мин, скорость 1 мл/мин, 45° С. Нуклеотидный материал основных пиков обессоливали многократным упариванием с 50% этанолом при 50° С. Гомогенность выделенных олигонуклеотидов подтверждена электрофорезом в 20% ПААГ после введения [5'-<sup>32</sup>P]фосфата, с помощью [γ-<sup>32</sup>P]АТР и Т4-полинуклеотидкиназы.

Состав реакционной смеси при гидролизе фрагментов рРНК РНКазой Н: 0,02 М трис-НСl (рН 7,9), 0,3 М NaCl, 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ дитиотреит, 1 мМ EDTA (буфер С), 0,05 ОЕ<sub>260</sub> олигонуклеотидного зонда, 0,001—0,002 ОЕ<sub>260</sub> меченого фрагмента РНК (20 000—100 000 имп/мин), 12 ед. акт. РНКазы Н. Объем смеси 10 мкл, пробы по 2 мкл отбирались через 3, 10, 30 и 70 мин после добавления фермента. Реакцию прекращали добавлением 2,5 мкл формамида, продукты гидролиза анализировали электрофорезом в 20% ПААГ с последующей радиоавтографией. Положе-

\* За единицу активности принято такое количество фермента, которое катализирует получение 1 пмоль кислоторастворимого нуклеотидного материала за 20 мин при 37° С при использовании в качестве субстрата <sup>14</sup>C-меченой poly(rA)·poly(dT).

ние расщепляемых фосфодиэфирных связей определяли путем сравнения электрофоретической подвижности продуктов гидролиза с подвижностью  $[5'-^{32}\text{P}]\text{pGGGAGCGCGGUGGUC}$  (контроль) и продуктов частичного щелочного гидролиза меченых фрагментов 1—41 и 1—36 5S рРНК.

Температурную зависимость УФ-поглощения комплексов измеряли на спектрофотометре SE 599 Cecil (Англия) с термостатированным кювето-держателем и контроллером температуры SE 247 при непрерывном повышении температуры со скоростью  $0,5^\circ\text{C}/\text{мин}$  (длина оптического пути 10 мм). КД-спектры снимали на дихрографе Jouan-III (Франция) при комнатной температуре.

Концентрацию олигонуклеотидов ( $c_0$ ) определяли спектрофотометрически, принимая величину  $\varepsilon_{260}$  олигонуклеотида равной сумме  $\varepsilon_{260}$  составляющих их мономеров. Изучение комплексообразования проводили в буфере С.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marcus-Secura C. J. // *Anal. Biochem.* 1988. V. 172. № 1. P. 289—295.
2. Stepanova O. B., Metelev V. G., Chichkova N. V., Smirnov V. D., Rodionova N. P., Atabekov J. G., Bogdanov A. A., Shabarova Z. A. // *FEBS Lett.* 1979. V. 103. № 1. P. 197—199.
3. Donis-Keller H. // *Nucl. Acids Res.* 1979. V. 7. № 1. P. 179—192.
4. Метелев В. Г., Крынецкая И. Ф., Заякина Г. В., Родионова Н. П., Тюлькина Л. Г., Атабеков К. И., Карпова О. В., Атабеков И. Г., Шабарова З. А. // *Биоорган. химия.* 1987. Т. 13. № 10. С. 1425—1427.
5. Metelev V. G., Zayakina G. V., Ryabushenko I. L., Krynetskaya N. F., Romanova E. A., Oretskaya T. S., Shabarova Z. A. // *FEBS Lett.* 1988. V. 226. № 2. P. 232—234.
6. Inoue H., Hayase Y., Iwai S., Ohtsuka E. // *FEBS Lett.* 1987. V. 215. № 2. P. 327—330.
7. Metelev V. G., Krynetskaya N. F., Purmal A. A., Shabarova Z. A., Tocik Z., Arnold L., Smrt I. // *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1990. In press.
8. Inoue H., Hayase Y., Imura A., Iwai S., Miura K., Ohtsuka E. // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. № 15. P. 6131—6139.
9. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987. С. 69—82.
10. Krug A., Krynetskaya N. F., Metelev V. G., Cech D., Shabarova Z. A. // *Biochem. Biomed. Acta.* 1990. In press.
11. Грязнов С. М., Потапов В. К., Метелев В. Г., Елов А. А., Пурмаль А. А., Шабарова З. А. // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. № 7. С. 989—991.
12. Крынецкая И. Ф., Сухолинов В. В., Рейнтамм Т. Г., Метелев В. Г., Шабарова З. А. // *Вестн. МГУ. Сер. 2 «Химия».* 1990. Т. 31. № 3.
13. Елов А. А., Волков Е. М., Рейнтамм Т. Г., Орецкая Т. С., Шабарова З. А. // *Биоорган. химия.* 1989. Т. 15. № 2. С. 159—165.

Поступила в редакцию  
4.V.1989.

После доработки  
8.VII.1989.

V. G. METELEV, N. F. KRYNETSKAYA\*, A. A. PURMAL\*, Z. A. SHABAROVA\*  
THE RNA CLEAVAGE BY HYBRIDASE. I. OLIGONUCLEOTIDE PROBES  
FOR REGIOSPECIFIC RNA CLEAVAGE

A. N. Belozersky Laboratory and Chemical Department\*, M. V. Lomonosov  
Moscow State University

New oligonucleotide probes for regiospecific cleavage of RNA molecules by hybridase (RNase II) are suggested. RNase H from *E. coli* is shown to site-specifically split eight phosphodiester bonds in RNA in the heteroduplex, formed by 5S rRNA and d(AACCACGCGCT). The partial substitution of deoxycytidines in position 5, 6, 8, 10 of the probe by 2'-O-methylcytidines leads to unique (regiospecific) RNA cleavage between U<sup>25</sup> and C<sup>26</sup>.