



УДК 547.963.3+577.155.2

СИНТЕТИЧЕСКИЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ. 1. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА КОНЬЮГАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ РНК-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ НА ОСНОВЕ ОСТАТКОВ ЛИЗИНА И РНК-ГИДРОЛИЗУЮЩИЙ ФРАГМЕНТ, НЕСУЩИЙ ОСТАТОК ИМИДАЗОЛА

© 1999 г. Н. С. Ждан*, И. Л. Кузнецова*, А. В. Власов, В. Н. Сильников#, М. А. Зенкова, В. В. Власов

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8;

* Новосибирский государственный университет

Поступила в редакцию 25.12.98 г. Принята к печати 13.04.99 г.

Синтезирована серия РНК-гидролизующих конструкций на основе пептидоподобных молекул, содержащих остатки *L*-лизина, гистамина или метилового эфира гистидина. Показано, что такие конструкции способны эффективно расщеплять РНК при нейтральных значениях рН. Эксперименты проводились с использованием в качестве субстратов *in vitro*-транскрипта тРНК^{Lys} из митохондрий человека и тРНК-подобного фрагмента ТУМV (Turnip Yellow Mosaic Virus) РНК. В оптимальных условиях обе молекулы РНК под действием химических РНКаз количественно деполимеризуются по определенным последовательностям (CA ≥ UA > CG ≧ UC, CC, CU), причем даже при длительной инкубации РНК с соединениями этой серии не наблюдается появления других сайтов или статистического гидролиза РНК. Обнаружена сложная зависимость скорости деполимеризации РНК-субстратов от концентрации ионов одновалентных металлов и концентрации синтетических рибонуклеаз.

Ключевые слова: гидролиз РНК; химические нуклеазы; моделирование активных центров ферментов.

ВВЕДЕНИЕ

Конструирование реагентов, позволяющих исследовать в физиологических условиях пространственную структуру РНК и (или) РНК в составе рибонуклеопротеидных комплексов – актуальная задача современной биоорганической химии. Один из подходов, направленных на решение данной проблемы, заключается в создании небольших синтетических молекул, способных гидролизовать фосфодиэфирные связи в РНК (искусственных РНКаз). Характер деполимеризации рибонуклеиновых кислот под действием таких соединений отражает состояние присутствующего в каждом нуклеотидном звене рибозофосфатного остатка, тем самым давая обширную информацию о вторичной и третичной структуре РНК как в свободном виде, так и в составе белково-нуклеиновых комплексов.

В начале 90-х годов мы провели поиск химических зондов, которые: а) были бы способны

специфично взаимодействовать с одноцепочечными участками РНК в физиологических условиях; б) позволили бы анализировать природные РНК, содержащие модифицированные основания, лабильные в различных химических условиях; в) могли бы быть использованы для изучения РНК-белковых комплексов, вирусных частиц или внутри клеток. Зонды, отвечающие этим требованиям, могут быть созданы путем синтеза относительно простых органических молекул, содержащих функциональные группы, характерные для активных центров рибонуклеаз.

В поисках соединений, способных катализировать расщепление фосфодиэфирных связей РНК, мы попытались осуществить моделирование малыми синтетическими конструкциями активного центра рибонуклеазы А. Ключевую роль в каталитическом центре этого фермента играют два остатка имидазола, принадлежащие гистидину-12 и гистидину-119.

Принципиальная возможность создания искусственных РНКаз путем моделирования активного центра фермента малыми молекулами следует из данных работ Бреслоу, который обнаружил, что 1–2 М имидазольный буфер катализирует гидролиз РНК [1]. Присоединение к циклодекстри-

Сокращения: ТУМV – вирус желтой мозаики турнепса; Pfp – перфторфенил; Im – имидазолил; HEPES – 4-гидроксиэтилпиперазинэтилсульфокислота; Hia – гистамин; Cbz(Ci) – 2-хлорбензилкарбонил.

Автор для переписки (тел.: (3832) 33-37-62; e-mail: silnik@niboch.nsc.ru).

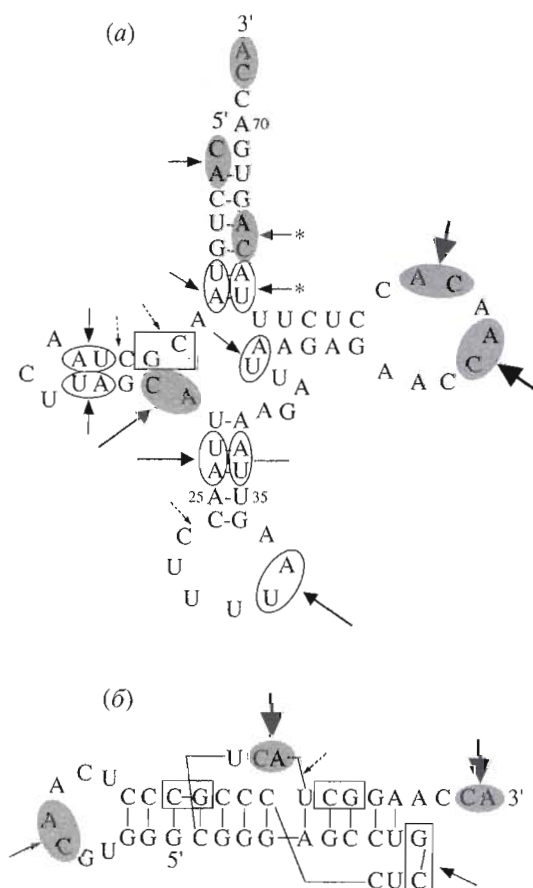


Рис. 1. Вторичная структура *in vitro*-транскрипта тРНК^{Lys} из митохондрий человека с точечной мутацией А9С [9] (а) и *in vitro*-транскрипта тРНК-подобного домена ТУМВ РНК [10] (б). Стрелками обозначены фосфодиэфирные связи, подвергающиеся гидролизу с помощью химических нуклеаз серии L. Размер стрелки коррелирует со степенью гидролиза РНК по данной связи; последовательности СА помечены серыми, а UA – светлыми овалами; последовательности CG обведены прямоугольниками.

(остатки имидазола, amino- или карбоксильные группы в различных сочетаниях). Было показано, что некоторые синтетические конструкции способны эффективно расщеплять РНК при нейтральных рН [8].

В настоящей работе мы синтезировали серию РНК-гидролизующих конструкций на основе остатков *L*-лизина и изучили влияние строения РНК-связывающего фрагмента искусственных нуклеаз на эффективность гидролиза ими модельных РНК в физиологических условиях. Эксперименты проводились с использованием в качестве субстратов *in vitro*-транскрипта тРНК^{Lys} из митохондрий человека и тРНК-подобного фрагмента РНК вируса желтой мозаики турнепса (ТУМВ-РНК, рис. 1) [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Соединения серии L были синтезированы по схеме, приведенной на рис. 2 (серия *nLm*, где *m* – число положительных зарядов в соединении при рН 7.0; *n* – код гидролитически активной группы: 1 – гистамин, 2 – метиловый эфир гистидина). В качестве РНК-связывающей части химических нуклеаз был выбран *L*-лизин. Использование различных защитных групп по α- и ε-аминогруппам лизина позволяет после связывания первой молекулы лизина с гистамином или метиловым эфиром гистидина наращивать полилизиновую цепь избирательно по α- и (или) ε-аминогруппам, тем самым изменяя количество и пространственное расположение положительных зарядов в конъюгате. Был синтезирован ряд соединений, имеющих суммарный положительный заряд от 0 до 3 и гистамин или метиловый эфир гистидина в РНК-гидролизующей части: 1L0, 1L2, 1L3 и 2L2. Строение всех полученных конъюгатов было подтверждено методами ЯМР и масс-спектрометрии, их гомогенность контролировалась с помощью ТСХ. Гидролитическая активность синтезированных соединений оказалась сопоставимой с описанной ранее конструкцией D2 [7], несущей два положительных заряда в РНК-связывающем фрагменте и метиловый эфир гистидина в РНК-гидролизующей части (рис. 2).

Гидролитическую активность соединений серии L исследовали в экспериментах с [5'-³²P]тРНК^{Lys} (*in vitro*-транскрипт тРНК^{Lys} из митохондрий человека с точечной мутацией А9С, длиной 73 нт [9], далее тРНК^{Lys}) и мини-[3'-³²P]тРНК (*in vitro*-транскрипт тРНК-подобного фрагмента ТУМВ-РНК, длиной 42 нт [10], далее мини-тРНК), в 50 мМ имидазольном буфере, рН 7.0, в присутствии 0.2 М NaCl или KCl. Следует отметить, что для достижения приблизительно одинаковой глубины гидролиза в присутствии РНКаз-миметиков в случае тРНК^{Lys} требовалось 7 ч, а в случае мини-тРНК не менее 18 ч инкубации, что, очевидно,

ну групп, несущих остатки имидазола, позволило получить соединение, способное с высокой эффективностью гидролизовать модельный субстрат – циклофосфат *трет*-бутилпирокатехина [2]. Расщепление РНК в имидазольном буфере протекает наиболее эффективно при рН 7.0, что соответствует механизму гидролиза РНК рибонуклеазой А [3], который предполагает участие в акте катализа одного протонированного и одного непротонированного остатков имидазола.

Ранее нами синтезированы искусственные рибонуклеазы, содержащие в качестве РНК-связывающих фрагментов феназин [4], спермин [5] и бисчетвертичную соль 1,4-диазабигло[2,2,2]октана [6, 7], а в качестве РНК-гидролизующей части – группы, функционирующие в составе активного центра рибонуклеазы и других ферментов, расщепляющих нуклеиновые кислоты

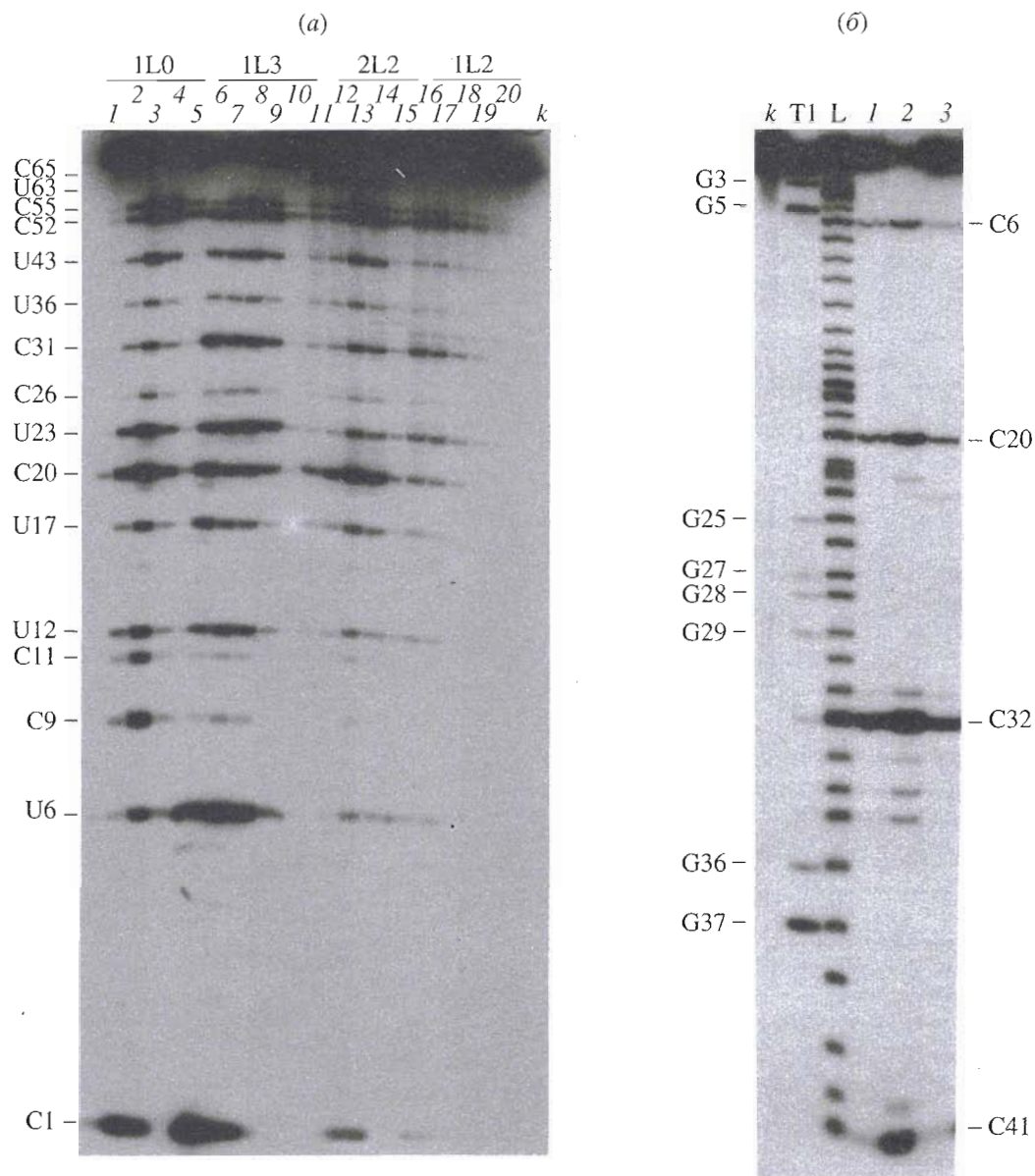


Рис. 3. Анализ продуктов гидролиза тРНК^{Lys} (7 ч, *a*) и мини-тРНК (18 ч, *б*) химическими РНКазами серии L с помощью электрофореза в 15% ПААГ в денатурирующих условиях. (*a*). Для гидролиза использованы 1 мМ соединения 1L0 (дорожки 1–5), 1L3 (6–10); 0,5 мМ 2L2 (11–15), 1 мМ 1L2 (16–23). В каждой серии концентрации NaCl были последовательно 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,6 М. Положение исходной тРНК и основных сайтов гидролиза показано на боковой шкале. (*б*). Для расщепления использовали искусственную нуклеазу 1L2 в концентрации 10^{-4} (1), 5×10^{-4} (2), 10^{-3} М (3). T1 и L – частичный гидролиз мини-тРНК рибонуклеазой T1 в денатурирующих условиях [16] и 2 М имидазолом, рН 7,0, при 90°C соответственно; дорожки 1–3 соответствуют концентрации 1L2 10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} М. Положение основных сайтов гидролиза указано на панели справа. *k* на рис. *a* и *б* – контроль; инкубация РНК-субстратов в отсутствие РНКаза-миметиков.

тогда как скорость гидролиза по связям С20–G21 и С6–А7 значительно ниже. Расщепление связей после U31, А33, U34 и С35 является незначительным и появляется после гидролиза связи С32–А33. Локализация всех сайтов гидролиза молекулы тРНК^{Lys} и мини-тРНК соединениями серии L приведена на рис. 1.

Представленные на рис. 4 количественные данные по эффективности гидролиза тРНК^{Lys} и

мини-тРНК химическими рибонуклеазами в зависимости от их концентрации свидетельствуют, что все синтезированные молекулы способны эффективно гидролизовать РНК-субстрат. При оптимальной концентрации РНКаза-миметика обе молекулы РНК деполимеризуются под действием этих соединений количественно, причем даже при длительной инкубации РНК с соединениями серии L не наблюдается появления дополни-

тельных сайтов или статистического гидролиза РНК (предварительные данные, не приводятся).

Зависимость эффективности гидролиза РНК от концентрации синтетических РНКаз имеет сложный характер. Для соединений 1L0, 1L3 и 2L2 скорость гидролиза возрастает с увеличением концентрации конъюгата, однако характер этой зависимости в отношении мини-тРНК и тРНК^{Lys} различается. Для соединения 1L2, так же как и для ранее изученных соединений серии D (D2) [7], наблюдается колоколообразная зависимость эффективности гидролиза от концентрации конъюгата. Различия в концентрационной зависимости, по-видимому, объясняются совокупным действием различных факторов: пространственной структурой РНК-субстрата, эффективностью связывания искусственных нуклеаз с субстратом и взаимодействием реакционноспособных групп (имидазол синтетической конструкции и имидазол буфера) с межнуклеотидным фосфатом. Влияние пространственной структуры РНК-субстрата наглядно проявляется в случае конформационно подвижного транскрипта тРНК^{Lys} [9]. В наших условиях, когда реакция проводится в отсутствие ионов магния, стабилизирующих пространственную структуру тРНК, для всех заряженных синтетических конструкций серии L наблюдается резкое увеличение скорости гидролиза этой тРНК при достижении определенной концентрации конъюгата, что может быть объяснено разворачиванием молекулы тРНК^{Lys}. Мини-тРНК характеризуется более жесткой, мало подвижной структурой [10] и имеет доступные сайты гидролиза только в одноцепочечных участках. Для нее наблюдается монотонное возрастание эффективности гидролиза РНК с увеличением концентрации реагентов. Колоколообразная концентрационная зависимость для соединения 1L2, как и для реагентов серии D, может быть объяснена тем, что их катионные группировки обладают повышенным сродством к фосфатам. При достижении определенной плотности таких группировок на РНК фосфаты становятся недоступными для контакта с остатками имидазола. Эффективность гидролиза реагентами серии D различных РНК-субстратов [6, 7] начинает резко падать при достижении концентрации синтетической РНКазы, соответствующей соотношению реагент-фосфодиэфирная связь субстрата 2–2.5 : 1, что отражает, по-видимому, сродство химической конструкции к фосфатам РНК.

Полное ингибирование гидролиза РНК соединениями серии L и D2, наблюдаемое в 50 мМ фосфатном буфере, является еще одним доказательством взаимодействия катионных группировок РНКазы-миметиков с РНК: в присутствии высокой (по сравнению с РНК-субстратом) концентрации фосфат-аниона: РНКазы-миметики преимущественно связываются с фосфат-анионом

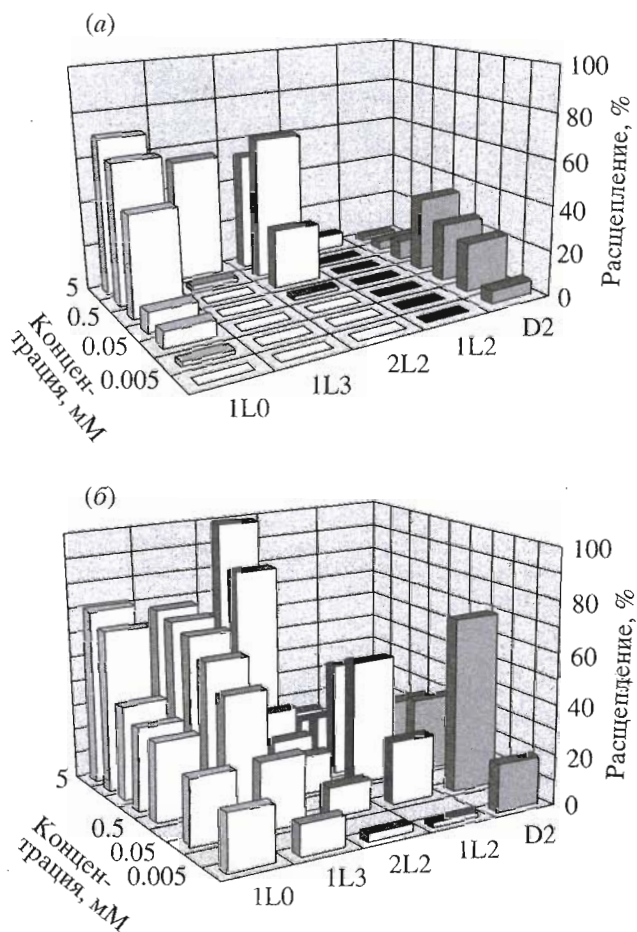


Рис. 4. Зависимость суммарной степени деполимеризации *in vitro*-транскрипта тРНК^{Lys} (а) и *in vitro*-транскрипта мини-тРНК (б) искусственными рибонуклеазами серии L и D (D2) от их концентраций. Условия гидролиза: 50 мМ имидазольный буфер, pH 7.0, содержащий 0.2 М NaCl (а) или 0.2 М KCl (б), 0.5 мМ EDTA, 100 мкг/мл суммарной дрожжевой тРНК, 37°C, 7 ч (а) или 18 ч (б). Ошибка эксперимента не превышала 10%. На диаграмме приведены усредненные данные, полученные из трех экспериментов для каждого из субстратов.

буфера, а не с фосфатами РНК. При замене имидазольного буфера на 50 мМ HEPES (pH 7.0), на 50 мМ какодилатный буфер или 50 мМ Трис-НСl (pH 7.2) наблюдается эффективный гидролиз РНК. Общая скорость деполимеризации падает в ряду: имидазол > какодилат > HEPES ≈ Трис-НСl ≫ фосфатный буфер, причем эффективность гидролиза РНК в растворе HEPES ниже, чем в имидазольном буфере, приблизительно на 30–35%.

При изменении концентрации NaCl от 0 до 0.6 М наблюдается различный характер связывания реагентов с РНК-субстратом (рис. 5). При увеличении ионной силы раствора от 0 до 0.2 М начинают подавляться электростатические взаимодействия РНКазы-миметиков с РНК. В случае

Чувствительность фосфодиэфирных связей в тРНК^{Lys} (а) и мини-тРНК (б) к гидролизу химическими рибонуклеазами серии L*

Последовательность	Число связей в РНК				1L0		1L2		1L3		2L2	
	общее		гидролизуемых		а	б	а	б	а	б	а	б
	а	б	а	б								
CA	6	3	4(5**)	3	53	82	53	87	52	85	55	82
UA	8	0	7(8**)	0	40	0	42	0	42	0	40	0
CG	1	3	1	1	3	18	1	23	2	15	1	18
UG	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CU	6	3	1	0	2	0	1	0	2	0	1	0
UU	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CC	4	7	1	0	2	0	3	0	2	0	3	0
UC	1	5	0	1	0	<1	0	<0	0	<1	0	<1

* Приведена суммарная степень гидролиза РНК по данной последовательности (%). Приведены усредненные данные трех независимых экспериментов; ошибка эксперимента не превышала 10%.

** Только для 2L2.

1L0, содержащего гидрофобные группы, увеличение ионной силы раствора приводит к более прочному связыванию реагента с субстратом и возрастанию его гидролитической активности (оптимум концентрации NaCl составляет 0.2 M). Для соединения D2 на начальном этапе возрастания концентрации NaCl усиление гидрофобного взаимодействия компенсируется уменьшением электростатического взаимодействия (0–0.1 M NaCl), затем гидрофобные взаимодействия начинают преобладать и эффективность гидролиза возрастает (0.1–0.2 M NaCl). Дальнейшее возрастание концентрации NaCl приводит к блокированию взаимодействия имидазольных остатков РНК-за-миметиков с сахарофосфатным остовом и снижению степени гидролиза, независимо от образования комплекса реагент–субстрат.

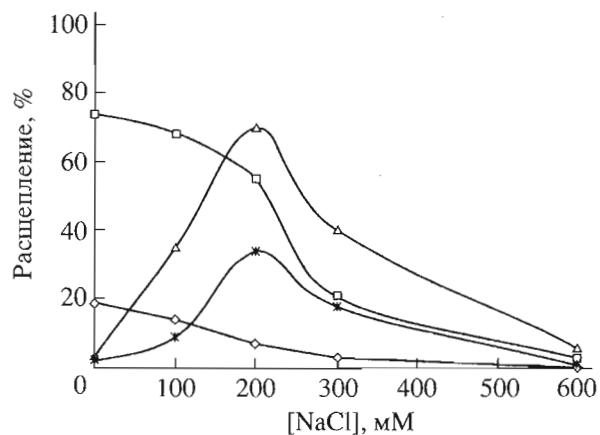


Рис. 5. Зависимость от концентрации NaCl эффективности гидролиза *in vitro*-транскрипта тРНК^{Lys} искусственными нуклеазами серии L и соединением D2.

Данные по специфичности, направленности и эффективности гидролиза РНК соединениями серии L приведены в таблице. Все синтетические конструкции проявляют сходную специфичность по отношению к фосфодиэфирным связям в различных последовательностях. С наиболее высокой эффективностью происходит расщепление связей в P_{up}-P_{up}-сайтах (CA ≥ UA > CG ≫ UC, CC, CU). Расщепление по P_{up}-P_{up}-связям не наблюдалось. Существенное влияние на эффективность гидролиза оказывает пространственная структура РНК. Так, в жестко структурированной мини-тРНК только 4 фосфодиэфирные связи чувствительны к гидролизу химическими нуклеазами. В этой молекуле есть три CA-последовательности, находящиеся в петлях, по которым происходит гидролиз (от 82 до 87% общей степени деполимеризации этой РНК). При этом фосфодиэфирная связь C32–A33 является основным участком гидролиза: более 80% расщепления РНК приходится на эту связь (100% – все три CpA-последовательности). Из трех сайтов CG гидролизу подвергается только один C20–G21, на долю которого приходится 15–23% суммарной степени деполимеризации мини-тРНК. Все подвергающиеся гидролизу сайты локализованы в петлевых участках структуры. Даже при длительной инкубации не появляется заметного количества новых более коротких фрагментов РНК, соответствующих вторичному гидролизу молекулы мини-РНК (рис. 6а).

Иная картина наблюдается для *in vitro*-транскрипта тРНК^{Lys}. Гидролиз в этой РНК на 90% происходит в UA- и CA-последовательностях. В отличие от мини-тРНК, для тРНК^{Lys} наблюдается почти равномерный гидролиз по всем UA- и CA-последовательностям (5–10% суммарной сте-

пени гидролиза на каждую гидролизуемую фосфодиэфирную связь). Колебание степени расщепления между одинаковыми последовательностями может быть объяснено влиянием двух факторов: накоплением более коротких фрагментов гидролиза за счет вторичных разрывов РНК и различной эффективностью связывания искусственных РНКаз с различными участками РНК. Первое предположение подтверждается данными по кинетике накопления продуктов гидролиза по последовательностям С1-А, U6-А, С52-А и С55-А (рис. 6б). Как видно из рис. 6б, после 24 ч инкубации длинные фрагменты РНК почти полностью исчезают из реакционной смеси, а после 50 ч доминирующим остается только продукт гидролиза по С1-А-участку (32 P-метка находится на 5'-конце тРНК^{Lys}).

Влияние сродства определенных пространственных элементов структуры РНК к различным искусственным РНКазам отражается на результатах расщепления тРНК^{Lys} реагентами 1L0, 1L2 1L3 и 2L2. Для первых трех конструкций наблюдается полное совпадение сайтов гидролиза. Для соединения 2L2 появляются две новые точки гидролиза U63-А и С65-А, на которые приходится около 5–7% суммарной деполимеризации РНК. При этом скорость гидролиза по другим сайтам РНК остается такой же, как и для остальных конструкций серии L.

Распределение участков РНК, гидролизуемых исследованными конъюгатами L-серии, свидетельствует о чувствительности синтезированных соединений к пространственной структуре РНК. Все реагенты, хотя и с разной скоростью, расщепляют фосфодиэфирные связи в СА- и UA-последовательностях, находящихся в одноцепочечных участках РНК. Интенсивному гидролизу подвергаются фосфодиэфирные связи, локализованные в областях резких изгибов РНК (С9-Г10, С20-А21, С26-С27 для тРНК^{Lys} и С20-Г21 в случае мини-тРНК). Следует отметить, что хотя исследованные синтетические конструкции обладают различными РНК-связывающими фрагментами, все эти соединения с максимальной эффективностью гидролизуют связи в последовательностях UA, СА, СГ. При этом нет никаких оснований предполагать наличие предпочтительного связывания искусственных нуклеаз в первую очередь с фосфатами данных мотивов перед другими межнуклеотидными фосфатами. Повышенная чувствительность последовательности (5')-Pur-Pur-(3') к гидролизу РНКазми хорошо известна [11]. Именно такие мотивы являются точками спонтанного гидролиза РНК. Природа повышенной чувствительности фосфодиэфирных связей в последовательностях СрА и UrА к гидролизу до сих пор не вполне понятна. Изучение спонтанного гидролиза РНК на модельных соединениях показало, что гидролиз фосфодиэфирных связей в UrА-мотиве в

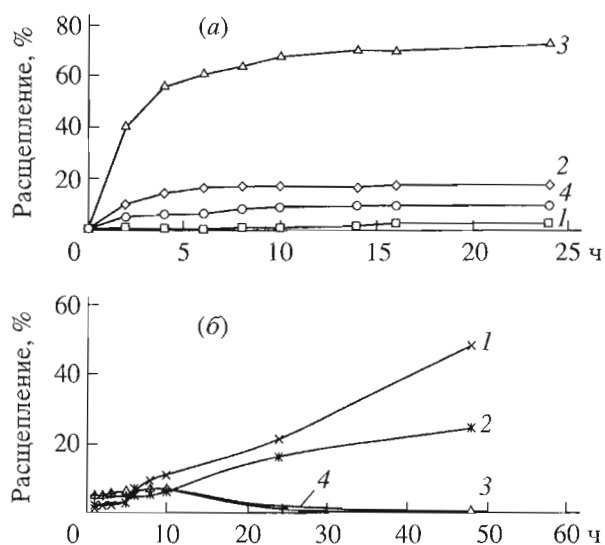


Рис. 6. Кинетика гидролиза мини-тРНК (а) и тРНК^{Lys} (б) соединениями 2L2 (а) и 1L2 (б) в 50 мМ имидазольном буфере, рН 7.0, при 37°С. Приведены данные по гидролизу фосфодиэфирных связей (а): С6–А7 (1), С20–Г21 (2), С32–А33 (3), С41–А42 (4). (б): С1–А2 (1), U6–А7 (2), С52–А53 (3), С55–А56 (4).

1.5–2 раза выше, чем в СрА, и сильно зависит от пространственной структуры РНК и от прилегающих нуклеотидов.

Таким образом, различия в структурной направленности гидролиза молекулы РНК, по-видимому, связаны с повышенной лабильностью фосфодиэфирной связи в Pur-Pur-мотивах, находящихся в одноцепочечных конформационно подвижных участках РНК.

РНК-расщепляющие соединения, описанные в данной работе, представляют собой новое семейство зондов для исследования конформации РНК в мягких условиях, в которых сохраняется нативная структура природных РНК. Синтезированные конъюгаты остатков лизина с имидазолом, моделирующие активный центр РНКазы А и содержащие РНК-связывающий и РНК-гидролизующий домены, имеют ряд преимуществ при использовании в качестве структурных зондов по сравнению с ферментом. Известно, что РНКазы А изменяет при связывании структуру РНК и в некоторых случаях легко расщепляет РНК по Pur-Pur-последовательностям в двуцепочечных участках молекулы.

Созданные искусственные нуклеазы могут быть использованы для сравнения структуры мутантных тРНК и других природных РНК. Эффективность гидролиза РНК предложенными соединениями позволяет рассматривать эти молекулы как прототип реакционноспособных групп для создания второго поколения антисмысловых олигонуклеотидных производных, которые могут

найти применение для инактивации РНК в ген-направленной терапии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реактивы: DCC, N^α-Вос-N^ε-(Cbz(Cl))-L-лизин (Sigma, США), метиловый эфир гистидина, гистамин (Fluka, Швейцария), пентафторфенол (ОПХ НИОХ, Россия), имидазол (Boehringer Mannheim, Германия). Растворители DMF, метанол, этиловый эфир, хлороформ, этилацетат, петролейный эфир были очищены по стандартным методикам [11].

Радиоизотопномеченные препараты: [γ -³²P]АТФ (3000 Ки/ммоль; Amersham, Англия) и 5'-[³²P]рСр (3000 Ки/ммоль; Биосан, Россия). В работе использовали РНКазу Т1, РНК-лигазу фага Т4 (Boehringer Mannheim, Германия), бактериальную щелочную фосфатазу (Amersham, Англия), Т4-полинуклеотидкиназу (Biolabs, Франция).

Воду очищали с помощью системы Milli-Q (Millipore, США). Все буферные растворы фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры с размером пор 0.22 мкм (Millipore, США). Для ТСХ применяли пластинки с тонким слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором (Eastman Kodak, США) и системы растворителей: хлороформ-метанол, 9 : 1 (А); метанол-водный аммиак, 100 : 2 (Б); *трет*-бутиловый спирт-метиэтилкетон-муравьиная кислота - вода, 40 : 30 : 15 : 15 (В). Спектры ¹H-ЯМР для растворов веществ в дейтерометаноле (где не указано особо) записаны на спектрометре Bruker WP-200-SY (200 МГц), внутренний стандарт - Me₄Si. Приведены хим. сдвиги в шкале δ и КССВ (J, Гц). Масс-спектры получены на спектрометре VISION 2000 MALDI.

Вос-Lys(Cbz(Cl))-OPfp (I). К охлажденному до 0°C раствору 2.07 г (5 ммоль) N^α-Вос-N^ε-(Cbz(Cl))-L-лизина и 1.01 г (5.5 ммоль) пентафторфенола в 10 мл сухого этилацетата при перемешивании прибавили охлажденный до 0°C раствор 1.14 г (5.6 ммоль) DCC в 10 мл сухого этилацетата. Температуру реакционной смеси плавно (за 2 ч) повысили до комнатной. Реакционную смесь отфильтровали от дициклогексилмочевины и растворитель упарили досуха. Сухой остаток растерли с 20 мл петролейного эфира. Образовавшийся осадок отфильтровали. Выход соединения (I) 2.75 г (95%), т. пл. 105–106°C, R_f 0.84 (А). Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃): 1.44 (9H, с, C(CH₃)₃); 1.84 (6H, м, (CH₂)₃-CH); 3.23 (2H, т, NH-CH₂, J 6); 4.60 (1H, м, CH); 5.20 (2H, с, CH₂-C₆H₅); 7.32 (4H, м, CH_{аром}).

Вос-Lys(Cbz(Cl))-Hia (II) [1L0]. К суспензии 184 мг (1 ммоль) дигидрохлорида гистамина и 0.31 мл (1.1 ммоль) триэтиламина в 2 мл сухого DMF прибавили при перемешивании раствор 581 мг (1 ммоль) соединения (I) в 2 мл хлорофор-

ма. Через 20 ч реакционную смесь отфильтровали, осадок промыли хлороформом (2 × 10 мл). Объединенный фильтрат упарили в вакууме, маслообразный остаток промыли 10 мл 0.1 н. раствором Na₂CO₃, водой (2 × 5 мл). После высушивания в вакууме выход соединения (II) 471 мг (93%), т. пл. 48–53°C, R_f 0.67 (А). Спектр ¹H-ЯМР: 1.46 (9H, с, C(CH₃)₃); 1.5 (6H, м, (CH₂)₃-CH); 2.80 (2H, т, CH₂-Im, J 6.5); 3.14 (2H, т, OCO-NH-CH₂, J 6.5); 3.46 (2H, т, CH₂-CH₂-Im, J 6.5); 3.95 (1H, дд, CH₂-CH-CH, J 5); 5.20 (2H, с, CH₂-C₆H₅); 6.68 (1H, д, H(5), J 0.8); 7.41 (4H, м, CH_{аром}); 7.62 (1H, д, H(2), J 1).

Lys(Cbz(Cl))-Hia · 2HCl (III). К 508 мг (1 ммоль) соединения (II) прибавили 1.5 мл 6 н. раствора HCl в сухом метаноле. Реакционную смесь выдержали в течение 3 ч при комнатной температуре, растворитель упарили досуха. Для удаления HCl провели трехкратную обработку сухим метанолом (растворение-упаривание, 3 × 5 мл). Выход соединения (III) составил 471 мг (98%), т. пл. 180–190°C, R_f 0.81 (Б). Спектр ¹H-ЯМР: 1.65 (6H, 3м, CH₂-(CH₂)₃); 3.00 (2H, т, CH₂-Im, J 6.5); 3.16 (2H, т, OCO-NH-CH₂, J 6.5); 3.58 (2H, м, CH₂-CH₂-Im); 3.85 (1H, т, CH₂-CH, J 6.5); 5.23 (2H, с, CH₂-C₆H₅); 7.44 (5H, м, 4H, CH_{аром}, 1H, H(5)); 8.88 (1H, д, H(2), J 1).

Вос-Lys(Cbz(Cl))-Lys(Cbz(Cl))-Hia (IV). К суспензии 481 мг (1 ммоль) дигидрохлорида соединения (III) в 1 мл сухого DMF при перемешивании последовательно прибавили 0.31 мл (1.1 ммоль) триэтиламина и раствор 581 мг (1 ммоль) соединения (I) в 1 мл хлороформа. Через 20 ч реакционную смесь отфильтровали, хлороформ отогнали в вакууме. Остаток промыли холодной водой (3 × 5 мл, 6°C). После высушивания в вакууме выход соединения (IV) 499 мг (62%), т. пл. 164–174°C, R_f 0.74 (А). Спектр ¹H-ЯМР: 1.46 (9H, с, C(CH₃)₃); 1.58 (12H, м, (CH₂)₃-CH); 2.80 (2H, т, CH₂-Im, J 6.5); 3.16 (4H, дд, OCO-NH-CH₂, J 6); 3.45 (2H, дд, CH₂-CH₂-Im, J 7); 4.03 (1H, дд, CH(NH)-CO, J 5); 4.28 (1H, дд, CH(CO)-NH, J 6); 5.20 (4H, с, CH₂-C₆H₅); 6.83 (1H, с, H(5)); 7.38 (8H, м, CH_{аром}); 7.55 (1H, с, H(2)).

Lys-Lys-Hia-4HBr (V) [1L3]. К раствору 804 мг (1 ммоль) соединения (IV) в 0.5 мл ледяной уксусной кислоты прибавили 0.5 мл раствора 36% HBr в ледяной уксусной кислоте и оставили на 6 ч. Реакционную смесь вылили в 6 мл сухого эфира. Выпавший маслообразный продукт переосадили сухим эфиром из сухого метанола. Выход соединения (V) составил 352 мг (51%), т. пл. 100–110°C, R_f 0.37 (В). Спектр ¹H-ЯМР: 1.75 (12H, 3м, (CH₂)₃-CH); 3.00 (6H, м, 4H, NH-CH₂, 2H, CH₂-Im); 3.55 (2H, м, CH₂-CH₂-Im); 4.18 (1H, т, CH(CO)-NH₂, J 6); 4.34 (1H, т, CH(NH)-CO, J 7); 7.49 (1H, с, H(5)); 8.90 (1H, д, H(2), J 1).

Вос-Lys(Cbz(Cl))-His-OMe (VI). К суспензии 242 мг (1 ммоль) дигидрохлорида метилового эфира *L*-гистидина в 5 мл сухого DMF при перемешивании последовательно прибавили 0.31 мл (1.1 ммоль) триэтиламина и раствор 581 мг (1 ммоль) соединения (I) в 2 мл хлороформа. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 20 ч. Выпавший осадок отфильтровали, промыли хлороформом. Объединенный фильтрат упарили. К маслообразному остатку прибавили 25 мл воды и выдерживали при 6°C 15 ч. Водную фазу, содержащую незначительное количество соединения (VI), отделили декантацией, маслообразный осадок промыли водой (2 × 5 мл). После высушивания в вакууме соединение (VI) использовали в последующих реакциях без дополнительной очистки. Объединенную водную фазу подкислили 0.1 н. HCl до pH ~ 3–4. Пентафторфенол экстрагировали эфиром (3 × 5 мл), водную часть подщелочили 0.1 н. раствором Na₂CO₃ до pH ~ 9. Выпавший осадок отфильтровали, высушили в вакууме. Суммарный выход соединения (VI) 526 мг (93%), т. пл. 127–130°C, *R*_f 0.74 (A). Спектр ¹H-ЯМР: 1.45 (9H, с, C(CH₃)₃); 1.45 (6H, м, (CH₂)₃-CH); 3.05 (1H, с, CH₂-CH-CO); 3.20 (3H, т, OCH₃, *J* 6.5); 3.33 (2H, т, NH-CH₂, *J* 6.5); 3.77 (2H, с, CH₂-Im); 4.00 (1H, т, NH-CH(COOCH₃), *J* 6.5); 5.20 (2H, с, CH₂-C₆H₅); 7.40 (5H, м, 4H, CH_{аром}, 1H, H(5)); 8.86 (1H, с, H(2)).

Вос-Lys(Cbz(Cl))-His-OMe · 3HBr (VII) [2L2]. К раствору 566 мг (1 ммоль) соединения (VI) в 0.5 мл ледяной уксусной кислоты прибавили 0.5 мл раствора 36% HBr в ледяной уксусной кислоте и оставили на 6 ч. Выделение проводили аналогично соединению (V). Выход целевого продукта 486 мг (90%), т. пл. 113–125°C, *R*_f 0.80 (B). Спектр ¹H-ЯМР: 1.85 (6H, 3м, (CH₂)₃-CH); 3.05 (2H, т, CH₂-Im, *J* 6.5); 3.35 (2H, м, NH₂-CH₂); 3.80 (3H, с, OCH₃); 4.13 (1H, т, CH-NH₂, *J* 6.3); 4.90 (1H, м, NH-CH-CH₂); 7.54 (1H, с, H(5)); 8.90 (1H, д, H(2), *J* 1).

Lys-His · 3HBr (VIII) [1L2]. К раствору 506 мг (1 ммоль) соединения (II) в 0.5 мл ледяной уксусной кислоты прибавили 0.5 мл раствора 36% HBr в ледяной уксусной кислоте и оставили на 6 ч. Выделение проводили аналогично соединению (V). Выход продукта составил 289 мг (60%), т.пл. 110–115°C. *R*_f 0.26 (B). Спектр ¹H-ЯМР: 1.77 (3м, 6H, (CH₂)₃-CH); 3.05 (к, 4H, 2H, NH₂-CH₂, 2H, CH₂-Im, *J* 7); 3.63 (дд, 2H, CH₂-CH₂-Im, *J* 7); 4.02 (т, 1H, CH₂-CH, *J* 6.5); 7.48 (с, 1H, H(5)); 8.88 (с, 1H, H(2)).

РНК-модели. *in vitro*-Транскрипт тРНК^{Lys} из митохондрий человека с точечной мутацией А9С любезно предоставлен М. Хельмом (М. Helm, ИВС, Страсбург, Франция). *in vitro*-Транскрипт тРНК-подобной структуры ТУМV-РНК длиной 42 нт был получен с помощью T7-транскрипции как описано в работе [13].

Мечение тРНК^{Lys} и мини-тРНК. Введение ³²P-метки по 5'- и 3'-концам модельных РНК проводили согласно работам [14, 15]. При введении метки по 5'-концу транскрипт тРНК^{Lys} предварительно подвергали дефосфорилированию с помощью бактериальной щелочной фосфатазы и затем проводили фосфорилирование РНК с помощью [γ-³²P]АТР и T4-полиинуклеотидкиназы.

Для дефосфорилирования 320 пмоль РНК (8 мкг тРНК) инкубировали в 50 мкл 50 мМ Трис-HCl, pH 8.1, содержащего 7% формамид и 0.2% SDS, при 60°C в течение 5 мин. Далее реакционную смесь охладил в лед, добавили бактериальную щелочную фосфатазу (1 ед. акт.) и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Реакцию остановили с помощью фенольной экстракции с последующим осаждением этанолом.

Фосфорилирование РНК. Инкубировали 320 пмоль РНК, 20 мкКи [γ-³²P]АТР и 20 ед. акт. T4-полиинуклеотидкиназы в 15 мкл 80 мМ Трис-HCl (pH 8.1), содержащего 8 мМ MgCl₂, 4 мМ дитиозерит и 0.1 мМ спермидин, при 37°C в течение 30 мин. Для введения ³²P-метки на 3'-конец мини-тРНК реакционную смесь объемом 15 мкл, содержащую 200 пмоль мини-тРНК, 10 мМ NEPER-KOH (pH 7.5), 2 мМ MgCl₂, 0.4 мМ дитиотреит, 2 мкг/мл бычьего сыровоточного альбумина, 0.1 мМ АТР, 10% DMSO, 10 ед. акт. T4-РНК-лигазы и 20 МБк [³²P]pCp, инкубировали при 4°C в течение 18 ч. По окончании реакции добавили 15 мкл 8 М мочевины и выделили меченую РНК с помощью электрофореза в 8% денатурирующем ПААГ. Визуализацию ³²P-меченой РНК в геле проводили с помощью радиоавтографии на рентгеновскую пленку Кодак в течение 1 мин. Полосу РНК вырезали из геля и элюировали двумя порциями по 300 мкл 0.5 М ацетата аммония, содержащего 1% SDS, 1 мМ EDTA. Элюированную РНК осадил этиловым спиртом и растворил в воде.

Расщепление РНК химическими конструкциями проводили при 37°C в течение 7 ч для транскрипта тРНК^{Lys} и 18 ч для мини-тРНК в реакционной смеси объемом 10 мкл, содержащей 50 мМ имидазольный буфер (pH 7.0), 0.1–0.6 М NaCl (для тРНК^{Lys}) и 0.2 М KCl (для мини-тРНК), 0.5 мМ EDTA, 0.1 мг/мл тРНК-носителя, и соединения 1L0, 1L2, 1L3 и 2L2 в концентрации 5 × 10⁻⁴–5 × 10⁻³ М. Реакцию остановили осаждением РНК 2% раствором LiClO₄ в ацетоне (150 мкл). Осадок отделили центрифугированием, промыли 300 мкл ацетона и растворили для нанесения на гель в 5 мкл буфера, содержащего 4 М мочевины, 0.025% бромфенолового синего и 0.025% ксиленианола. Продукты расщепления РНК анализировали электрофорезом в 15% ПААГ, содержащем 8 М мочевины. Электрофорез проводили при 1200 В в течение 1.5–2.5 ч. Гель после электрофореза высушили, радиоавтографировали; полосы, соответствующие

шие продуктам реакции, вырезали из геля и определяли их радиоактивность по методу Черенкова на счетчике Minibeta (ЛКВ, Швеция). Гидролизуемые связи идентифицировали сравнением с данными частичного гидролиза РНК РНКазой Т1 в денатурирующих условиях и статистического гидролиза имидазолом [16].

Настоящая работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований № 96-03-32361 и № 96-15-97732, грантом INTAS № 96-1418 и грантом Минобразования РФ в области фундаментального естествознания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bresslow R., Labelle M. // J. Am. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 2655–2659.
2. Bresslow R., Doherty J.B., Guillot G., Lipsey C. // J. Am. Chem. Soc. 1978. V. 100. P. 3227–3229.
3. Schultz L.W., Quirk D.J., Raines R.T. // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 8886–8898.
4. Podymingogin M.A., Vlassov V.V., Giege R. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 5950–5956.
5. Vlassov V.V., Zuber G., Felden B., Behr J.-P., Giege R. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 3161–3167.
6. Коневец Д.А., Зенкова М.А., Сильников В.Н., Власов В.В. // Докл. РАН. 1998. Т. 360. С. 554–558.
7. Konevets D., Beck I., Beloglazova N., Sulimenkov I., Sil'nikov V., Zenkova M., Shishkin G., Vlassov V. // Tetrahedron. 1999. V. 55. P. 503–512.
8. Сильников В.Н., Лукьянчук Н.П., Шишкин Г.В., Жьеже Р., Власов В.В. // Докл. РАН. 1999. (в печати).
9. Helm M., Brule H., Degoul F., Cepanec S., Leroux J.-P., Giege R., Florentz C. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 1636–1643.
10. Rudinger J., Florentz C., Giege R. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 1865–1870.
11. Kierzek R. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 5073–5077.
12. Герикович А.А., Кубурев В.К. Синтез пептидов. Реагенты и методы. Киев: Наукова думка, 1987.
13. Rudinger J., Florentz C., Giege R. // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 5031–5037.
14. Tyulkina L.G., Mankin A.S. // Analyt. Biochem. 1984. V. 138. P. 285–290.
15. Vlassov V., Kern D., Romby P., Giege R., Ebel J.-P. // Eur. J. Biochem. 1983. V. 132. P. 537–544.
16. Власов А.В., Власов В.В., Жьеже Р. // Докл. РАН. 1996. Т. 349. С. 411–413.

Artificial Ribonucleases. 1. Synthesis and Properties of Conjugates Containing an RNA-binding Fragment with Lys Residues and an RNA-hydrolyzing Fragment with Imidazole Residue

N. S. Zhdan**, I. L. Kuznetsova**, A. V. Vlassov*,
V. N. Sil'nikov**, M. A. Zenkova*, and V. V. Vlassov*

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

**Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

A series of RNA-hydrolyzing constructions was synthesized on the basis of peptide-like molecules containing residues of *L*-lysine, histamine and histidine methyl ester. These were shown to hydrolyze RNA effectively at neutral pH values. The *in vitro* transcript of tRNA^{Lys} from human mitochondria and a tRNA-like fragment of RNA of Turnip Yellow Mosaic Virus were used in the experiments. Our chemical RNases quantitatively depolymerize some definite sequences (CA ≥ UA > CG ≧ UC, CC, or CU) in both RNA molecules under optimum conditions. Moreover, no other sites were affected and no statistical hydrolysis was observed even after prolonged RNA incubation with the compounds of this series. The depolymerization rate of the RNA substrates exhibits a complex dependence on the concentration of ions of monovalent metals and on the concentration of the artificial ribonucleases.

Key words: RNA hydrolysis, chemical nucleases, modeling of enzyme active sites

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (3832) 33-3762; e-mail: silnik@niboch.nsc.ru.