

## Влияние ионного состава реакционной среды на образование комплекса короткого транскрипта *tat*-РНК ВИЧ-1 с рибозимом модели «головка молотка» и расщепление транскрипта рибозимом

Е. Ю. Маркелова, Л. Н. Бурьяновский, О. Э. Китама, Е. Ф. Краснова, А. Д. Швед

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

*Связывание рибозима с субстратом происходило только в присутствии ионов  $Mg^{2+}$ . Ионы щелочных металлов, как и ионы аммония, также способствовали образованию комплексов с более замедленной электрофоретической подвижностью, однако это не отражалось на эффективности разрезания субстрата. Расщепление короткого (47 нуклеотидов) транскрипта происходило с эффективностью около 50 % в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  и не зависело от наличия в среде ионов щелочных металлов, в то время как эффективность разрезания длинного (400 нуклеотидов) субстрата, содержащего тот же сайт расщепления, была в несколько раз ниже, а моновалентные катионы вдвое повышали энзиматическую активность рибозима. Подчеркивается, что при планировании работ по конструированию рибозимов необходимо применение более совершенных методических подходов к выявлению доступных сайтов разрезания в последовательностях РНК-субстратов.*

**Введение.** В составе небольших сателлитных и вироидных РНК растений были обнаружены молекулы, способные к самосплайсингу вследствие разрыва фосфодиэфирной связи [1, 2]. Этот класс РНК-молекул с эндорибонуклеазными свойствами назван рибозимами. Структурные исследования каталитического домена таких РНК позволили искусственно создать модель рибозима, получившую название «hammerhead» («головка молотка») [3, 4]. Высокая специфичность действия рибозимов открыла перспективу их использования для подавления экспрессии строго определенных генов, в том числе вирусных. Действительно, в ряде публикаций была показана возможность рибозим-опосредованного подавления репродукции вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в культурах клеток [5, 6].

В предыдущих работах [7—9] мы сконструировали рибозим модели «головка молотка» и с его помощью изучали специфическую деструкцию *in*

*vitro* *tat*-РНК ВИЧ-1 в зависимости от состава реакционной среды, pH, температуры, длительности реакции. Обнаружено, что эффективность разрезания рибозимом молекул РНК-субстрата существенно зависит от условий проведения реакции, однако остается неясным механизм повышения или снижения эффективности, на какое звено реакции его протекания могут влиять изменения условий его протекания: меняется ли конформация молекул рибозима и/или РНК-субстрата либо они отражаются на эффективности образования комплекса рибозим/субстрат, без чего невозможна реализация каталитической реакции. В настоящем сообщении представлены данные по изучению образования комплекса между коротким РНК-субстратом и рибозимом и каталитической активности рибозима в реакционной среде различного ионного состава.

**Материалы и методы.** Ферменты для клонирования получены от фирмы «Ферментас МБИ» (Литва). Использована РНК-полимераза фага T7, выделенная нами из штамма-продуцента UMS-174, содержащего плазмиду *pAR1219* [10].

Дезоксиолигонуклеотиды, соответствующие 15-нуклеотидной последовательности гена *tat* ВИЧ-1, фланкированной сайтами узнавания для рестриктаз *HindIII* и *PstI*, синтезированы О. Л. Каюшиным (Ин-т генетики РАН): 1 (27 н.): 5'-agcttgaaggcagctcagactcactgca-3'; 2 (19 н.): 5'-gtgagtctgactgccttca-3'.

Дезоксиолигонуклеотиды очищали методом электрофореза в денатурирующем 15 %-м ПААГ. После элюции из геля и последовательных экстракциях изобутанолом (2х), фенолом и хлороформом дезоксиолигонуклеотиды осаждали пятью объемами этилового спирта.

Очищенные олигонуклеотиды лигировали с вектором *pGEM4Z* («Promega», Швеция), предварительно расщепленным эндонуклеазами рестрикции *HindIII* и *PstI*, и трансфицировали в клетки *Escherichia coli* JM109 1/10 объема лигазной смеси.

Синтез РНК рибозима и матрицы проводили методом «cap-off»-транскрипции плазмид *pGEM4Z-Pr* и *pGEM4Z-oligotat*, линейризованных рестриктазой *SalI* («Promega Biotech»). Реакционная смесь, оптимизированная для синтеза коротких РНК-транскриптов, содержала 50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ DTT, рибонуклеотидтрифосфаты (АТР, GTP, UTP, CTP) в концентрации 1,5 мМ каждый, 10 мМ NaCl, 2 мМ спермидин, 50—100 мМ ДНК-матрицу и эквимольное количество T7-РНК-полимеразы. Препаративный синтез проводили в объеме 200 мкл в течение 3 ч при 35 °С, после фенольной депротенинизации реакционную смесь концентрировали этанолом и разделяли синтезированную РНК электрофорезом в 10 %-м ПААГ с 7 М мочевиной в 5 мМ трис-боратном буфере. Электрофорез проводили в аппарате Sequigep («Bio-Rad», США) в течение времени, за которое маркерный краситель ксиленцианол достигал половины длины геля. Полосы РНК визуализировали на пластине флуорохромного кизельгеля при освещении УФ-светом с длиной волны 254 нм. Полосы полноразмерных РНК-транскриптов вырезали из геля, элюировали и концентрировали этанолом. РНК метилили <sup>32</sup>P-α-АТР либо в процессе синтеза, либо по 5'-концу с помощью РНК-лигазы. Каталитическую активность рибозима проверяли в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 40 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и эквимольные количества РНК-субстрата и рибозимной РНК. Перед добавлением MgCl<sub>2</sub> реакционную смесь прогревали в течение 2 мин при температуре 80 °С, охлаждали на льду и после добавления MgCl<sub>2</sub> инкубировали при 34 °С. Дополнительные реагенты добавляли в определенных концентрациях (100 мМ KCl, 100 мМ LiCl, 100 мМ аммоний ацетат, 2 мМ спермидин,

2 %-й полиэтиленгликоль). Реакцию останавливали добавлением 5 мкл смеси 90 %-го формамида, 30 мМ ЭДТА, 0,02 %-го ксиленцианола. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 10 %-м ПААГ с 7 М мочевиной в 50 мМ трис-боратном буфере. Авторадиографию осуществляли при температуре -70 °С. Активность рибозима определяли двумя способами: либо вырезая соответствующие фрагменты из геля и измеряя их радиоактивность по Черенкову, либо анализируя радиоавтографы с помощью программы Totallab, версия 1.10. Эффективность реакции оценивали как количество РНК субстрата, переходящее во фракцию продукта расщепления (сумма радиоактивностей 5'- и 3'-продуктов), или просто по накоплению 5'-продуктов реакции. Влияние ионов щелочных металлов на образование комплекса *tat*-РНК-транскрипта и рибозима изучали в тех же реакционных условиях, после 1 ч инкубации при температуре 35 °С добавляя глицерин до конечной концентрации 7 % и наносили на 10 %-й ПААГ, электрофорез проводили в 40 мМ (0,5х) трис-боратном буфере, рН 8,3, содержащем 100 мМ KCl и 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, при напряжении 150 В и силе тока 15 мА в течение 16—18 ч при 8 °С.

Результаты и обсуждение. Ранее показана каталитическая активность рибозима, расщепляющего *tat*-РНК ВИЧ-1 длиной 400 нуклеотидов [7]. Для изучения влияния катионов на связывание рибозима и субстрата, кинетических характеристик реакции расщепления нами проведено клонирование фрагмента *tat*-гена ВИЧ-1 для получения коротких *tat*-РНК-транскриптов, лишенных существенной вторичной структуры. Для этого был выбран участок последовательности гена *tat* из 15 нуклеотидов, обрамляющих сайт расщепления рибозимом (рис. 1).

С помощью компьютерного моделирования [11] проанализированы вторичные структуры РНК-транскриптов, которые можно получить при клонировании выбранной последовательности в разные транскрипционные векторы и в разные сайты рестрикции. Анализ выявил целесообразность клонирования последовательности в вектор

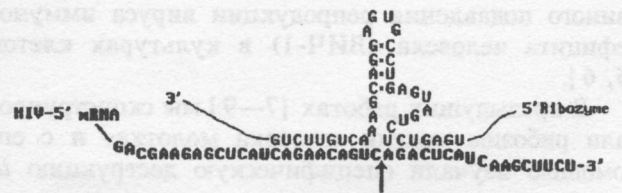


Рис. 1. Последовательность рибозима и фрагмент *tat*-РНК с сайтом разрезания (обозначен стрелкой)

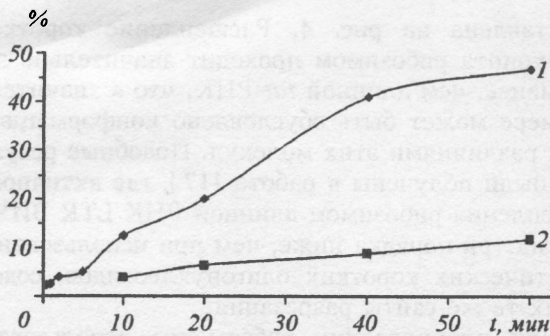


Рис. 2. Эффективность расщепления рибозимом РНК-субстратов разной длины (1 — 47 и 2 — 386 нуклеотидов)

*pGEM4Z* по сайтам *HindIII* и *PstI*. После трансформации компетентных клеток лигазной смесью вектора *pGEM4Z*, расщепленного эндонуклеазами рестрикции *HindIII* и *PstI*, и очищенных олигонуклеотидов, получили три клона, которые, как показала проверка рестриктным анализом, оказались рекомбинантными.

Эксперименты показали, что расщепление рибозимом короткого (47-нуклеотидного) *tat*-РНК-транскрипта происходит в присутствии ионов магния с эффективностью не менее 50 % независимо от наличия каких-либо иных ионов в среде (рис. 2). Известно [9], что добавление в реакционную смесь солей щелочных металлов в физиологических концентрациях (100 мМ) приводило к удваиванию эффективности расщепления. Ионы аммония в такой же концентрации полностью блокировали реакцию.

Из данных работы [12] следует, что ионы калия наряду с ионами аммония специфично участвуют в поддержании некоторых третичных структур в РНК. По-видимому, активирующее (в случае катионов щелочных металлов и спермидина) или ингибирующее (в случае ионов аммония) влияние ионов на расщепление РНК-субстрата рибозимом обусловлено структурными особенностями субстрата, а не рибозима, что и имело место при использовании длинных РНК-транскриптов, способных к образованию сложных вариантов третичной структуры. Короткие транскрипты лишены такой способности, отсюда и отсутствие влияния ионного состава на эффективность реакции их отщепления.

Для выяснения влияния катионов на этапе связывания рибозима с субстратом анализ комплексообразования проводили электрофорезом в нативных условиях. Результаты этих экспериментов показали (рис. 3), что в присутствии ионов магния

РНК-субстрат и рибозим образуют комплекс, электрофоретическая подвижность которого меньше, чем отдельных составляющих. В отсутствие ионов магния образования комплексов не выявлено. Наличие ионов щелочных металлов, калия, лития так же, как и ионов аммония, приводило к образованию другого типа комплекса субстрат/рибозим, имеющего еще меньшую электрофоретическую подвижность. Показано, что NaCl способствует образованию конформации «головка молотка» [13], а различные концентрации соли — большого количества конформеров рибозима [14]. Возможно, именно наличие разных конформеров способствовало образованию комплексов рибозим/субстрат, однако почему в этих условиях не изменяется каталитическая активность рибозима, остается неясным.

Полиэтиленгликоль в концентрации 2 % в присутствии ионов магния не оказывал влияния на конформацию рибозима (по данным ограниченного нуклеазного гидролиза, результаты которого будут представлены отдельной публикацией), однако заметно стимулировал образование комплекса субстрат/рибозим. Вероятно, этим и объясняется его активирующее влияние на реакцию расщепления *tat*-РНК рибозимом.

Несколько иначе действуют на РНК ионы аммония: в их присутствии не только образуется комплекс рибозима с субстратом, но и изменяется конформация молекул РНК.

Эффекты влияния моно- ( $\text{Na}^+$ ), ди- ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), а также поликатионов (спермин, спермидин) на скорость расщепления рибозимом РНК-мишеней сильно разнятся в разных экспериментальных работах, и часто это влияние изменяется в зависимости от условий проведения реакции. Так, показано [15], что моновалентные, дивалентные ионы металлов, а также поликатион спермин при нейтральных значениях pH блокировали реакцию рибозимного расщепления субстрата, однако при низких значениях pH (4,0—4,2) в том же составе среды проявлялась наибольшая активность металлоэнзима. Более того, показано, что реакция разрезания субстрата вообще может осуществляться без добавления дивалентных ионов металла. Изменение активности рибозима при различных pH авторы связывают с изменениями конформации молекул РНК вследствие протонирования других сайтов либо их денатурации.

В недавно опубликованном обзоре [16] проведен анализ множества работ по исследованию активности рибозимов, где отмечено, что механизмы каталитической активности этих металлоэнзимов различны и определяются архитектурой каждого индивидуального рибозима и условиями реакции.



Рис. 3. Влияние ионного состава реакционной среды на образование комплекса субстрат—рибозим (K — комплекс, P — рибозим, С — субстрат)

Авторы подчеркивают также несомненный факт того, что каталитические РНК со слабофункционирующими группами в физиологических условиях, соединяясь с ионами металлов, могут мобилизовать свой энзиматический потенциал. То есть считается, что многие рибозимы способны использовать дивалентные ионы как ко-факторы и стабилизаторы их высокоупорядоченной структуры, способствующей реализации каталитической активности металлоэнзимов.

Ранее нами показано [7], что как при значительном избытке *tat*-РНК-субстрата (т. е. в условиях, отвечающих многооборотному типу кинетики реакции), так и при эквимоллярных концентрациях длинной субстратной РНК и рибозима каталитической активности не было выявлено, тогда как реакция расщепления коротких *tat*-РНК-транскриптов проходила в условиях эквимоллярности или небольшого избытка количества субстрата. Далее реакции проводили при соотношении субстрат/рибозим 1/1 или 2/1, кинетика реакции расщепления

представлена на рис. 4. Расщепление короткого транскрипта рибозимом проходит значительно эффективнее, чем длинной *tat*-РНК, что в значительной мере может быть обусловлено конформационными различиями этих молекул. Подобные результаты были получены в работе [17], где активность расщепления рибозимом длинной РНК LTR ВИЧ-1 была на три порядка ниже, чем при использовании синтетических коротких олигонуклеотидов, содержащих те же сайты разрезания.

При планировании работы мы использовали компьютерный подход [11] для анализа вторичной структуры РНК-мишени. Авторы упомянутой работы [17] анализировали вторичную структуру РНК-транскриптов тем же методом, что и мы, и получили сходные результаты. То есть опыт эксплуатации данного метода не обеспечивает однозначного решения проблемы доступности для рибозима избранных сайтов разрезания, о чем уже речь шла в ряде публикаций [18, 19].

Известно, что условные рибозимы могут разрезать РНК-транскрипты после *NUH* сайтов, где *N* — любой нуклеотид, *H* — любой нуклеотид, кроме G [20, 21]. Отсюда случайно выбранный РНК-транскрипт должен содержать в среднем один рибозим-специфический сайт разрезания на 5,3 нуклеотида. Казалось бы, что при такой частоте встречаемости сайтов для рибозим-каталитической активности не составляет труда выбрать подходящий в качестве мишени. Однако молекулы РНК свертываются в сложные структуры, делая недоступными последовательности для связывания рибозима и маскируя уязвимые для него сайты. Поэтому в последние 10 лет для повышения эффективности разрезания РНК-мишеней разрабатывались разные подходы [18, 19, 22—26] к выбору доступных для рибозимов сайтов, однако их несовершенство стало очевидным в процессе экспериментальной проработки, а подход, основанный на использовании сотен олигонуклеотидных зондов [22], — чрезмерно громоздкий и осуществляется по принципу проб и ошибок, что в совокупности являет собой значительное препятствие для множества рядовых лабораторий.

Недавно опубликованы довольно убедительные данные [27] по выявлению рибозим-доступных сайтов с помощью нацеленных на упомянутый выше *NUH*-триплет 12 олигонуклеотидных зондов (по числу возможных комбинаций *NUH*-триплета). Если эффективность этого подхода будет подтверждена экспериментально, то он вполне сможет претендовать на качество уникального инструмента поиска рибозим-доступных сайтов, что значительно упростит протокол конструирования эффективных рибозимов.

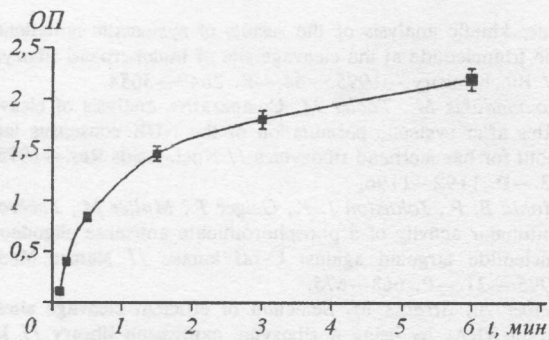


Рис. 4. Кинетика накопления 5'-продукта при расщеплении рибозимом *tat*-РНК длиной 47 нуклеотидов.  $P = V_0(1 - e^{-kt})/k$ , где  $[k] = \text{мин}^{-1}$ ;  $[V_0] = \text{отн. ед./мин}$

Анализируя полученные ранее [7—9] и приведенные здесь результаты, следует признать, что использованный нами компьютерный метод определения вторичной структуры РНК-субстрата нельзя назвать подходящим для поиска доступного сайта разрезания, вследствие чего, по-видимому, и не удалось добиться высокой каталитической активности созданного рибозима на длинном РНК-транскрипте. Короткие же молекулы РНК-субстрата, вероятно, не свертываются в структуры, маскирующие сайт разрезания, что проявилось в ускорении процесса формирования комплекса рибозим/субстрат и повышении активности рибозима. И если в предыдущей работе [9] трудно было заключить, на какую из РНК — субстрата или рибозима — оказывали влияние катионы металлов и аммония, то приведенные здесь данные убеждают, что ионное окружение молекул РНК-субстрата обуславливает доступность (или маскировку) рибозим-специфических сайтов разрезания.

O. Yu. Markelova, L. M. Buryanovsky, O. E. Kitam, K. F. Krasnova, A. D. Shved

Effect of medium ionic composition on cleavage activity and formation of complex between hammerhead ribozyme and short HIV-1 *tat*-RNA

#### Summary

The hammerhead ribozyme/substrate binding strongly required  $Mg^{2+}$  cations, though monovalent cations also helped the complex formation, resulting in the appearance of products with lowered electrophoretic mobility. A ribozyme cleaved short (47 nt) HIV-1 *tat*-RNA transcripts under *in vitro* conditions with efficiency of about 50%. This reaction required ions of  $Mg^{2+}$  and did not depend on the presence of monovalent metal cations. The efficiency of cleavage of long (400 nt) HIV-1 *tat*-RNA transcripts, containing the same cleavage sites, was essentially lower, but the presence of monovalent metal cations twice enhanced the cleavage products formation. It is also emphasized that the modern methods are required to identify accessible sites in RNA for optimal cleavage efficiency of ham-

merhead ribozymes. Problems and perspectives of methods of targeted gene modifications in mammalian developmental studies.

O. Ю. Маркелова, Л. М. Бурьяновский, О. Е. Китам, К. Ф. Краснова, А. Д. Швед

Вплив іонного складу реакційного середовища на утворення комплексу короткого транскрипта *tat*-РНК ВІЛ-1 з рибозимом моделі «головка молотка» і розщеплення транскрипта рибозимом

#### Резюме

Зв'язування рибозиму з субстратом відбувалося лише за присутності іонів  $Mg^{2+}$ . Іони лужних металів, як і іони амонію, також сприяли утворенню комплексів з меншою рухливістю в електрофорезі, проте це не відбивалося на ефективності розщеплення субстрату. Розщеплення короткого (47 нуклеотидів) транскрипта відбувалося з ефективністю біля 50% у присутності іонів  $Mg^{2+}$  і не залежало від наявності в середовищі іонів лужних металів, у той час як ефективність розрізання подовженого субстрату (400 нуклеотидів), що містить той самий сайт розщеплення, була в кілька разів нижчою, а моновалентні катіони двічі підвищували ензиматичну активність рибозиму. Підкреслюється, що при плануванні роботи з конструювання рибозимів необхідне використання більш досконалих методичних підходів до виявлення доступних сайтів розрізання в послідовностях РНК-субстратів.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cech T. R. The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes // Science.—1987.—236.—P. 1532—1539.
- Hutchins C. J., Rathjen P. D., Foster A. C., Symons R. H. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid // Nucl. Acids Res.—1986.—14.—P. 3627—3640.
- Uhlenbeck O. C. A small catalytic oligoribonucleotide // Nature.—1987.—328.—P. 596—600.
- Haseloff J., Gerlach W. L. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities // Nature—1988.—334.—P. 585—591.
- Chen Ch.-J., Banerjee A. C., Harmison G. G., Haglund K., Schubert M. Multitarget-ribozyme directed to cleave at up to nine highly conserved HIV-1 env RNA regions inhibits HIV-1 replication potential effectiveness against most presently sequenced HIV-1 isolates // Nucl. Acids Res.—1992.—20.—P. 4581—4589.
- Sun L. Q., Warrylow D., Wang L. Ribozyme-mediated suppression of Moloney murine leukemia virus and human immunodeficiency virus type 1 replication in permissive cell lines // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1994.—91.—P. 9715—9719.
- Бурьяновский Л. Н., Швед А. Д. Специфическая деструкция *tat*-РНК ВИЧ-1 *in vitro* с помощью каталитически активного полирибонуклеотида (рибозима) // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 1.—С. 20—23.
- Бурьяновский Л. Н., Швед А. Д. Характеристика каталитической активности *in vitro* рибозима, специфичного к *tat*-РНК вируса иммунодефицита человека типа I // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 1.—С. 69—74.
- Бурьяновский Л. Н. Влияние рН, ионной силы и ионного состава реакционной среды на эффективность расщепления *in vitro* *tat*-РНК ВИЧ-1 рибозимом модели «головка молотка» // Биополимеры и клетка.—1997.—13, № 1.—С. 30—35.
- Davanloo P., Rosenberg A. N., Dunn J. J., Studier F. W. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase // Virology.—1984.—81.—P. 2035—2039.

11. Zuker M., Jaeger J., Turner D. A comparison of optimal and suboptimal RNA secondary structures predicted by free energy minimization with structures determined by phylogenetic comparison // Nucl. Acids Res.—1991.—19.—P. 2707—2714.
12. Draper D. E., Xing Y., Laing L. G. Thermodynamics of RNA unfolding: Stabilization of a ribosomal RNA tertiary structure by thiostrepton and ammonium ion // J. Mol. Biol.—1995.—249.—P. 231—238.
13. Heus H. A., Uhlenbeck O. C., Pardi A. Sequence-dependent structural variations of hammerhead RNA enzymes // Nucl. Acids Res.—1990.—18.—P. 1103—1108.
14. Woisard A., Fourrey J.-L., Favre A. Multiple folded conformations of a hammerhead ribozyme domain under cleavage conditions // J. Mol. Biol.—1994.—239.—P. 366—370.
15. Jayasena V. K., Gold L. *In vitro* selection of self-cleaving RNAs with a low pH optimum // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1997.—94.—P. 10612—10617.
16. Takagi Y., Warashina M., Stec W. J., Yoshinari K., Taira K. Recent advances in the elucidation of the mechanisms of actin of ribozymes // Nucl. Acids Res.—2001.—29.—P. 1815—1834.
17. Heidenreich O., Eckstein F. Hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the long terminal repeat RNA of human immunodeficiency virus type 1 // J. Biol. Chem.—1992.—267.—P. 1904—1909.
18. Birikh K., Berlin Y., Soreq H., Eckstein F. Probing accessible sites for ribozymes on human acetylcholinesterase RNA // RNA.—1997.—3.—P. 429—437.
19. Matveeva O., Felden B., Audin S., Gesteland R. F., Atkins J. F. A rapid *in vitro* method for obtaining RNA accessibility patterns for complementary DNA probes: correlation with an intracellular pattern and known RNA structures // Nucl. Acids Res.—1997.—25.—P. 5010—5016.
20. Shimayama T., Nishikawa S., Taira K. Generality of the NUX rule: kinetic analysis of the results of systematic mutations in the trinucleotide at the cleavage site of hammerhead ribozyme // Biochemistry.—1995.—34.—P. 3649—3654.
21. Zoumadakis M., Tabler M. Comparative analysis of cleavage rates after systemic permutation of the NUX consensus target motif for hammerhead ribozymes // Nucl. Acids Res.—1995.—23.—P. 1192—1196.
22. Monia B. P., Johnston J. F., Geiger T., Muller M., Fabbro D. Antitumor activity of a phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotide targeted against C-raf kinase // Nature Med.—1995.—21.—P. 668—675.
23. Leiber A., Strauss M. Selection of efficient cleavage sites in target RNAs by using a ribozyme expression library // Mol. and Cell. Biol.—1995.—15.—P. 540—551.
24. Yu Q., Pecchia D. B., Kingsley S. I., Heckman J. F., Burke J. M. Cleavage of highly structured viral RNA molecules by combinatorial libraries of hairpin ribozymes. The most effective ribozymes are not predicted by substrate selection rules // J. Biol. Chem.—1998.—273.—P. 23524—23533.
25. Zu Putlitz J., Yu Q., Burke J. M., Wards J. R. Combinatorial screening and intracellular antiviral activity of hairpin ribozymes directed against hepatitis B virus // J. Virol.—1999.—73.—P. 5381—5387.
26. Pierse M. L., Ruffner D. E. Construction of a directed hammerhead ribozyme library: towards the identification of optimal target sites for antisense-mediated gene inhibition // Nucl. Acids Res.—1998.—26.—P. 5093—5101.
27. Mir A. A., Lockett T. J., Hendry P. Identifying ribozyme-accessible sites using NUH triplet-targeting gapmers // Nucl. Acids Res.—2001.—29.—P. 1906—1914.

УДК 577.214.3, 577.113.4  
Надійшла до редакції 07.08.01