

**Н. А. Ковалев, Е. А. Буракова, В. Н. Сильников, М. А. Зенкова**

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
просп. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия  
E-mail: marzen@niboch.nsc.ru

## **КОМБИНАТОРНЫЕ БИБЛИОТЕКИ ИСКУССТВЕННЫХ РИБОНУКЛЕАЗ**

Синтезированы комбинаторные библиотеки небольших органических соединений, состоящих из бензольного кольца, замещенного двумя остаткам 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана, несущих гидрофобные фрагменты различной длины и структуры на четвертизованных атомах азота и исследована их способность расщеплять модельные РНК. Некоторые из этих соединений, в которых отсутствуют группы, обычно принимающие участие в реакции трансэтерификации, тем не менее проявляют существенную рибонуклеазную активность. Для того чтобы выявить соединения, проявляющие наибольшую рибонуклеазную активность, синтезированы усеченные библиотеки, содержащие все заместители, за исключением одного. Анализ рибонуклеазной активности таких усеченных библиотек соединений позволил идентифицировать наиболее активные соединения, которые отличались от неактивных наличием по крайней мере одного длинного алкильного заместителя у атома азота 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана.

*Ключевые слова:* РНК, расщепление фосфодиэфирных связей, искусственные рибонуклеазы, комбинаторные библиотеки.

Небольшие синтетические соединения, способные с высокой эффективностью расщеплять РНК в физиологических условиях, получили название искусственных или химических рибонуклеаз. Обычно такие соединения представляют собой миметики природных рибонуклеаз, т.е. содержат в своем составе функциональные группы, присутствующие в активных центрах РНКаз [1; 2]. Изучение РНК-расщепляющих свойств этих соединений необходимо как для выявления роли структурных и динамических факторов, обеспечивающих высокую эффективность катализа, осуществляемого природными ферментами, так и для биотехнологических целей [3; 4]. Молекулы небольшого размера, способные неспецифически взаимодействовать с РНК, вызывая ее расщепление, могут быть использованы для изучения пространственной структуры РНК, в том числе и *in situ*, а присоединение таких конструкций к антисмысловым олигонуклеотидам открывает путь к созданию сайт-направленных рибонуклеаз [5–9]. Более того, такие соединения могут найти применение в качестве противовирусных препаратов.

Нами показано [10; 11], что химические рибонуклеазы серии  $ABL_kC_m$ , состоящие из гидрофобного домена (*A*), РНК-связываю-

щего домена (*B*), линкерного домена (*L*) и каталитического домена (*C*), обладают высокой рибонуклеазной активностью и что эта активность определяется структурой соединения [11]. В частности было показано, что существенный вклад в рибонуклеазную активность вносит алифатический заместитель (*A*) у четвертизованного атома азота 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана (домен *B*). Таким образом, возникла идея создания искусственных рибонуклеаз путем конъюгирования гидрофобных и катионных структур в отсутствие групп, способных катализировать трансэтерификацию фосфодиэфирных связей в РНК.

Преследуя цель исследования, нами синтезированы комбинаторные библиотеки соединений, состоящих из бензольного кольца, замещенного двумя остаткам 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана, несущими гидрофобные фрагменты различной длины и структуры на четвертизованных атомах азота, и исследована их способность расщеплять модельные РНК. Для того чтобы выявить соединения, проявляющие наибольшую рибонуклеазную активность, были синтезированы усеченные библиотеки соединений. Анализ рибонуклеазной активности таких усеченных библиотек позволил идентифицировать наиболее активные со-

единения, которые отличались от неактивных наличием по крайней мере одного длинного алкильного заместителя у 1,4-диазабцикло[2.2.2]октана.

### Материал и методы

**Реактивы.** В работе использовали рибонуклеазу T1, T4 полинуклеотидкиназу («Fermentas», Литва), акриламид, ТРИС, LiClO<sub>4</sub>, имидазол, ТЕМЕД, бромфеноловый синий, ксиленцианол, N, N'-метиленбисакриламид персульфат аммония, этилендиаминтетраацетат («Sigma», США). Изотопно-меченый препарат [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-АТФ с удельной активностью более 1 ПБк/моль («Биосан», Россия). Все растворы готовили с использованием воды, очищенной на установке MilliQ. Буферы стерилизовали обработкой диэтилпирикарбонатом (250 мкл DEPC на 1 л раствора, 60 °С, 10 часов) и автоклавировали.

Олигорибонуклеотид ON21 был синтезирован в ИХБФМ СО РАН стандартным фосфитамидным методом на синтезаторе ASM-102U (ТОО «БИОСЦЕТ», Новосибирск) и очищен обращенно-фазовой хроматографией. Чистоту олигонуклеотида тестировали электрофорезом в 12 % ПААГ в денатурирующих условиях, визуализацию в геле проводили с помощью окраски Stains-All.

Структура ON21: r(UCGAAUUCCAC AGAAUUCGU). Курсивом выделен стебель шпильки – двуцепочечный участок – в нативном состоянии.

Комбинаторные библиотеки были получены в реакции  $\alpha, \alpha'$ -дихлорксилола с соответствующими монозамещенными солями 1,4-диазабциклооктана. Реакция получения моно- и бисчетвертичных солей 1,4-диазабциклооктана с высокими выходами описана ранее [12].

**Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях.** Во всех экспериментах для анализа продуктов расщепления ON21 использовали электрофорез в 15 % ПААГ при соотношении акриламид / N, N'-метилен-бисакриламид 20 : 1, в присутствии 8 М мочевины в буфере TBEх1 (0,1 М трисборат, рН 8,3, 2 мМ EDTA), при напряженности электрического поля 35–45 В/см.

**Получение 5'-[<sup>32</sup>P]-меченого олигонуклеотида ON21.** Введение [<sup>32</sup>P]-метки на 5'-конец ON21 проводили в 50 мМ трис-НСl,

рН 7,6, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ DTT, 0,1 мМ спермидин, 0,1 мМ EDTA в присутствии  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-АТФ и T4 полинуклеотидкиназы [13]. Стандартная реакционная смесь объемом 15 мкл содержала 15–25 пмоль ON21, 100–300  $\mu$ Ci  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-АТФ и T4 полинуклеотидкиназу в концентрации 100 е. а./мл. Реакцию проводили при 37 °С в течение 1 часа. По окончании реакции добавляли 15 мкл 8 М мочевины, содержащей 0,025 % бромфенолового синего и 0,025 % ксиленцианола, наносили на 15 % ПААГ и проводили электрофорез в денатурирующих условиях. Визуализацию [<sup>32</sup>P]-меченой РНК в геле проводили с помощью радиоавтографии на рентгеновскую пленку Agfa в течение 1 мин. Полосу РНК вырезали из геля и элюировали 600 мкл 0,3 М ацетата аммония в присутствии фенола и SDS при +4 °С в течение 4-х часов при постоянном перемешивании. Элюированную РНК осаждали тремя объемами этилового спирта. Осадок РНК отделяли центрифугированием (+4 °С, 15 мин, 14 000 об/мин), промывали 80 % этанолом, растворяли в воде и хранили при –20 °С в течение 1–2 недель.

Расщепление ON21 в 2 М имидазольном буфере и с помощью РНКазы T1 проводили как описано в работе [10].

**Расщепление ON21 комбинаторными библиотеками и индивидуальными соединениями.** Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 10 000 имп/мин по Черенкову [<sup>32</sup>P]-меченого олигонуклеотида ON21, 50 мМ Tris-HCl рН 7,2, 0,2 М KCl, 0,1 мМ EDTA, «холодный» (немеченый) олигонуклеотид в концентрации  $5 \times 10^{-6}$  М, комбинаторные библиотеки в концентрации от  $10^{-5}$  до  $5 \times 10^{-3}$  М или соединения Dp12, Dp2/12 в концентрации от  $10^{-5}$  до  $10^{-3}$  М. Реакцию проводили при 37 °С и останавливали после 0–24 часов инкубации осаждением продуктов реакции 100 мкл 2 % раствора LiClO<sub>4</sub> в ацетоне. Осадок ON21 отделяли центрифугированием и растворяли в 5 мкл буфера для нанесения на гель (8 М мочевина, 0,025 % бромфеноловый синий и 0,025 % ксиленцианол). Продукты расщепления олигонуклеотида анализировали электрофорезом в 15 % полиакриламидном геле, содержащем 8 М мочевины. Гель после электрофореза высушивали и анализировали на приборе Molecular Imager («Bio Rad», США).

## Результаты исследования и обсуждение

Индивидуальные вещества комбинаторных библиотек состояли из двух положительно заряженных остатков 1,4-дизабицикло[2.2.2]октана (DABCO), несущих гидрофобные фрагменты различной длины и структуры на четвертизованных атомах азота и присоединенных к бензольному кольцу (рис. 1). В состав библиотек входили соединения, различающиеся по пространственной структуре вследствие различного положения остатков DABCO в бензольном кольце (орто, мета или пара) и по типу и длине заместителей у остатков DABCO. Все гидрофобные заместители были разделены на три группы: группу *S*, которая содержит короткие неразветвленные заместители длиной 2–7 метиленовых звеньев и циклогексильный радикал; группу *L*, содержащую неразветвленные заместители длиной 8–12 метиленовых звеньев; группу *A*, содержащую ароматические заместители или заместители, несущие функциональные группы (гидроксильные группы, галогениды и др.).

Были синтезированы следующие комбинаторные библиотеки: полная библиотека *omp-SLA*, которая содержала все перечисленные заместители во всех трех возможных положениях бензольного кольца; библиотеки *o-SLA*, *m-SLA* и *p-SLA*, содержащие все заместители, но только в одном из положений бензольного кольца (орто, мета или пара соответственно). После анализа рибонуклеазной активности этих библиотек были синтезированы усеченные библиотеки, в которых замещенные остатки DABCO

располагались только в пара-положении бензольного кольца. Таким образом, получены библиотеки *p-S* (далее в тексте *S*), *p-L* (далее *L*), *p-A* (далее *A*), каждая из которых содержала одну группу заместителей.

Рибонуклеазную активность комбинаторных библиотек соединений анализировали при 37 °С и нейтральном рН (50 мМ Tris-HCl буфер, рН 7,2) в присутствии одновалентных катионов (0,2 М KCl) и 0,5 мМ EDTA. В качестве субстрата использовали [5'-<sup>32</sup>P]-меченый 21-звенный синтетический олигорибонуклеотид ON21, концентрация которого в реакционной смеси составляла 5 мМ. Вторичная структура олигонуклеотида ON21 представляла собой шпильку со стеблем, идентичным аминокцепторному стеблю дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup>, а петля UCCACAG соответствовала нуклеотидам 60–66 этой же тРНК. Как показано ранее, эта последовательность (две последовательных СА мотива), чрезвычайно чувствительна к действию различных искусственных рибонуклеаз [10]. В использованных условиях полученные смеси соединений расщепляли ON21 по связям C10-A11 и C12-A13, расположенным в петле шпильки. Эти данные коррелируют с другими работами [14; 15], где показано, что гидрофобные соединения могут расщеплять связи Y–A (где Y – пиримидиновый нуклеотид), находящиеся в одноцепочечных участках РНК.

В первую очередь проанализирована рибонуклеазная активность полной библиотеки *omp-SLA* и библиотек изомеров *o-SLA*, *m-SLA* и *p-SLA*. Реакцию проводили в стандартных условиях в течение 18 часов при

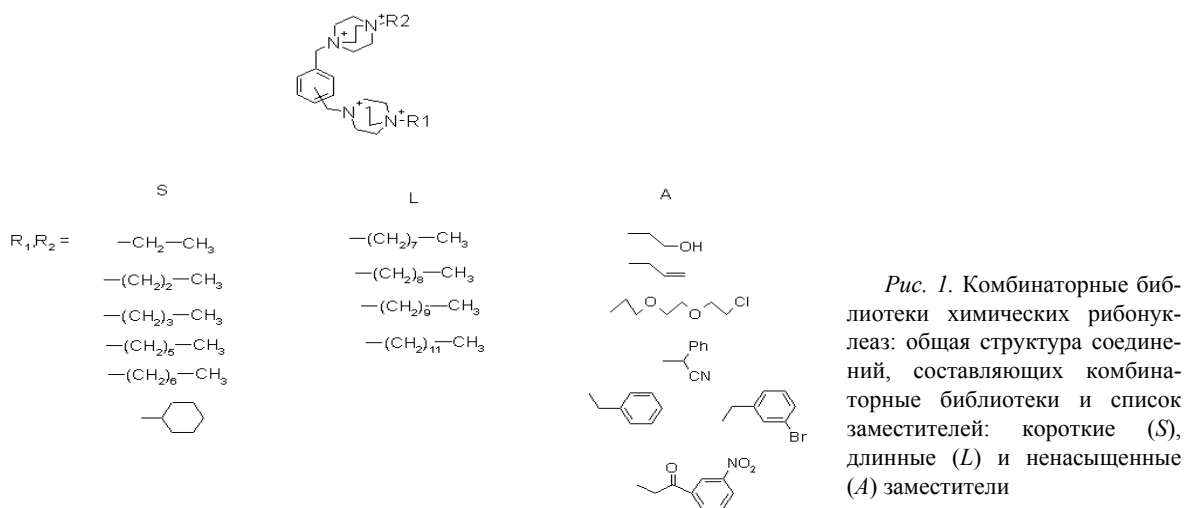


Рис. 1. Комбинаторные библиотеки химических рибонуклеаз: общая структура соединений, составляющих комбинаторные библиотеки и список заместителей: короткие (*S*), длинные (*L*) и ненасыщенные (*A*) заместители

концентрации соединений 10, 50, 100  $\mu\text{M}$ , 1 и 5 мМ, однако достоверное расщепление наблюдалось только при двух наиболее высоких концентрациях соединений, причем при концентрации 5 мМ степень расщепления РНК была примерно в 5 раз выше, чем при концентрации 1 мМ. Степень расщепления ON21 при концентрации каждой из библиотек 5 мМ и времени инкубации 18 часов, составила 30–40 % исходной РНК (рис. 2), причем активность была наибольшей в случае *p-SLA*, в то время как остальные библиотеки проявляли примерно одинаковую рибонуклеазную активность: *p-SLA* > *o-SLA*  $\approx$  *m-SLA*  $\approx$  *omp-SLA*. Основываясь на этом, были исследованы библиотеки, содержащие остатки DABCO только в пара-положении бензольного кольца.

Следующим этапом поиска активных химических рибонуклеаз стало изучение рибонуклеазной активности библиотек, содержащих одновременно не три, а одну или две группы заместителей: *S*, *L*, *A*, *LS*, *LA* и *SA* (все пара-изомеры). Наши данные показали, что структура и длина гидрофобных заместителей определяют рибонуклеазную активность конъюгатов (см. рис. 2). Так, среди библиотек *S*, *L*, *A*, содержащих одну группу заместителей, высокую рибонуклеазную активность проявляла только библиотека *L*, а активность *A* и *S* библиотек была в 6–10 раз ниже.

Эксперименты с библиотеками *SL*, *LA*, *SA*, содержащими две группы заместителей, показали, что библиотека *SA*, не содержащая длинных алифатических заместителей, проявляет низкую рибонуклеазную активность,

в то время как активность библиотек *LA* и *LS* была значительно выше: библиотека *LS* катализировала расщепление 70 % РНК за 18 часов, что являлось наилучшим результатом среди исследованных библиотек.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что наличие хотя бы одного длинного алифатического заместителя у остатка DABCO является необходимым условием для проявления соединениями высокой рибонуклеазной активности.

На следующем этапе идентификации активных химических рибонуклеаз подробно изучены комбинаторные библиотеки, содержащие хотя бы один длинный (8–12 метиленовых звеньев) насыщенный неразветвленный заместитель.

Для выявления заместителей, в наибольшей степени ответственных за проявление рибонуклеазной активности, использован подход усеченных библиотек. Этот подход состоит в исключении одного из *n* заместителей из реакционной смеси и создание усеченной библиотеки с *n* – 1 заместителями, и соответственно создание *n* подобных усеченных библиотек. Так, например, для библиотеки *L* были созданы следующие усеченные библиотеки: *L-8*, *L-9*, *L-10* и *L-12*, в процессе синтеза которых из реакционной смеси были исключены соответственно окта-, нона-, дека- и додекаметиленовые заместители. Для *LS*-библиотеки (*n* = 10) необходимо было синтезировать и проанализировать 10 усеченных библиотек, что являлось очень трудоемким процессом. Поэтому была синтезирована

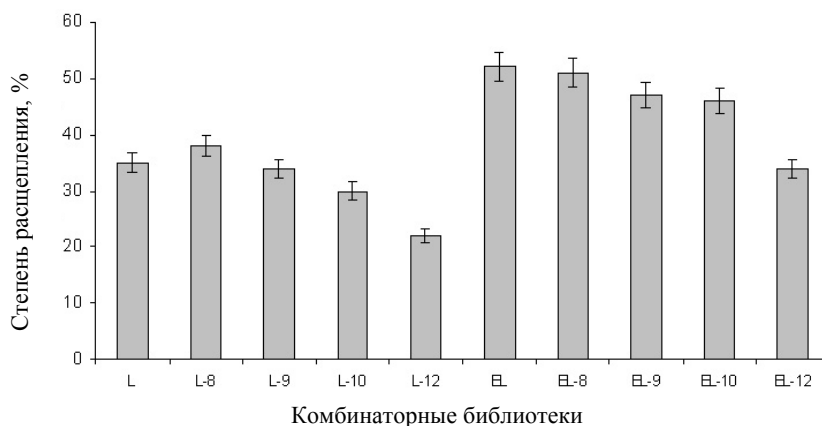


Рис. 2. Рибонуклеазная активность комбинаторных библиотек.

Зависимость активности соединений от расположения заместителей в бензольном кольце: орто (o), мета (m) или пара (p). Эффект наличия различных заместителей (*S*, *L* и *A*) в библиотеках на рибонуклеазную активность. Условия реакции: ON21 (5  $\mu\text{M}$ ) инкубировали в стандартных условиях в присутствии одной из комбинаторных библиотек (1 мМ) в течение 18 часов при 37  $^{\circ}\text{C}$

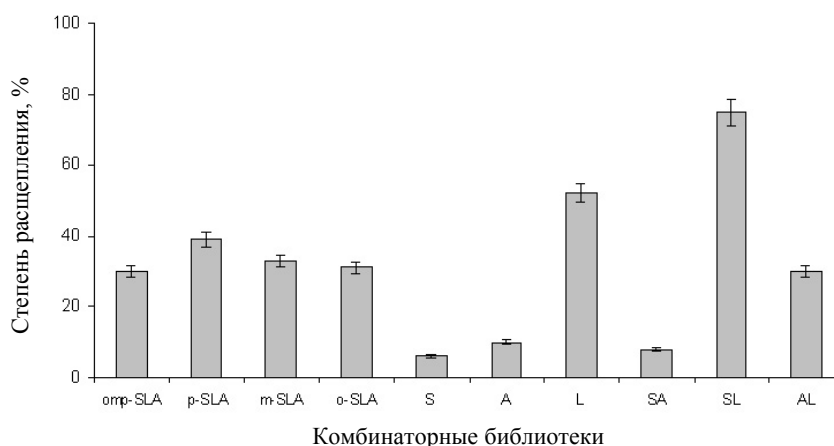


Рис. 3. Рибонуклеазная активность усеченных *L*- и *EL*-библиотек.

Условия реакции: ON21 (5  $\mu$ M) инкубировали в стандартных условиях в присутствии одной из комбинаторных библиотек (0,1 mM) в течение 8 часов при 37 °C

предельная библиотека *EL*, содержащая в качестве одного из заместителей DABCO этильный радикал (*E*), а в качестве другого – один из *L*-заместителей. Таким образом, для *EL*, так же как и для *L*-библиотеки ( $n = 4$ ) и соответственно для *EL* были синтезированы усеченные библиотеки *EL-8*, *EL-9*, *EL-10* и *EL-12*.

Анализ рибонуклеазной активности усеченных библиотек (рис. 3) показал, что рибонуклеазная активность соединений уменьшается с увеличением длины исключаемого гидрофобного заместителя. Наиболее активными были библиотеки *L-8* и *EL-8*, а *L-12* и *EL-12* проявляли наименьшую рибонуклеазную активность. Иначе говоря, додекаметиленовые заместители вносят наибольший, а октаметиленовые – наименьший вклад в рибонуклеазную активность соединений. Кроме того, библиотека *EL* активнее библиотеки *L* приблизительно в 1,5 раза. Подобное же соотношение наблюдается и в случае соответствующих усеченных библиотек *EL-x* и *L-x*.

Таким образом, по крайней мере один додекаметиленовый заместитель у четвертизованного атома азота DABCO необходим в структуре соединений для обеспечения их высокой рибонуклеазной активности. Тогда как заместитель у второго остатка DABCO может быть длиной от 2 до 12 метиленовых звеньев. Мы синтезировали два соединения: *Dp12* – содержит два додекаметиленовых заместителя, *Dp2/12* – содержит один додекаметиленовый и один этильный заместитель в качестве наиболее активных представителей комбинаторных

библиотек *L* и *EL*. Эти соединения эффективно расщепляли ON21 по связям C10—A11 и C12—A13 (рис. 4, *a*). Прослеживается корреляция между предпочтительно расщепляемой связью и структурой рибонуклеазы. Так, библиотека *EL* и наиболее активный ее представитель – соединение *Dp2/12* – предпочтительно расщепляют олигонуклеотид ON21 по связи C10—A11, в то же время библиотека *L* и ее представитель – соединение *Dp12* – предпочтительно расщепляют ON21 по связи C12—A13.

В процессе отбора наиболее активных индивидуальных соединений из комбинаторных библиотек произошел большой скачок в сторону увеличения их рибонуклеазной активности. Так, наиболее полная библиотека *omp-SLA* расщепляет ON21 на 5 % за 4 часа (первичные данные не приведены), тогда как соединение *Dp2/12* – на 40 % за 4 часа, т. е. активность выросла на порядок. Кроме того, концентрация, при которой наблюдается наибольшая рибонуклеазная активность индивидуальных соединений, на 2–3 порядка ниже, чем исходная концентрация комбинаторной библиотеки *omp-SLA* (рис. 4, *b*). Оптимальная концентрация для соединения *Dp12* приблизительно на полтора порядка ниже, чем для *Dp2/12*, что свидетельствует о том, что добавление еще одного длинного насыщенного алкильного заместителя заметно понижает активную концентрацию, однако практически не влияет на активность искусственной рибонуклеазы.

Индивидуальные соединения *Dp12* и *Dp2/12* эффективно расщепляют РНК, од-

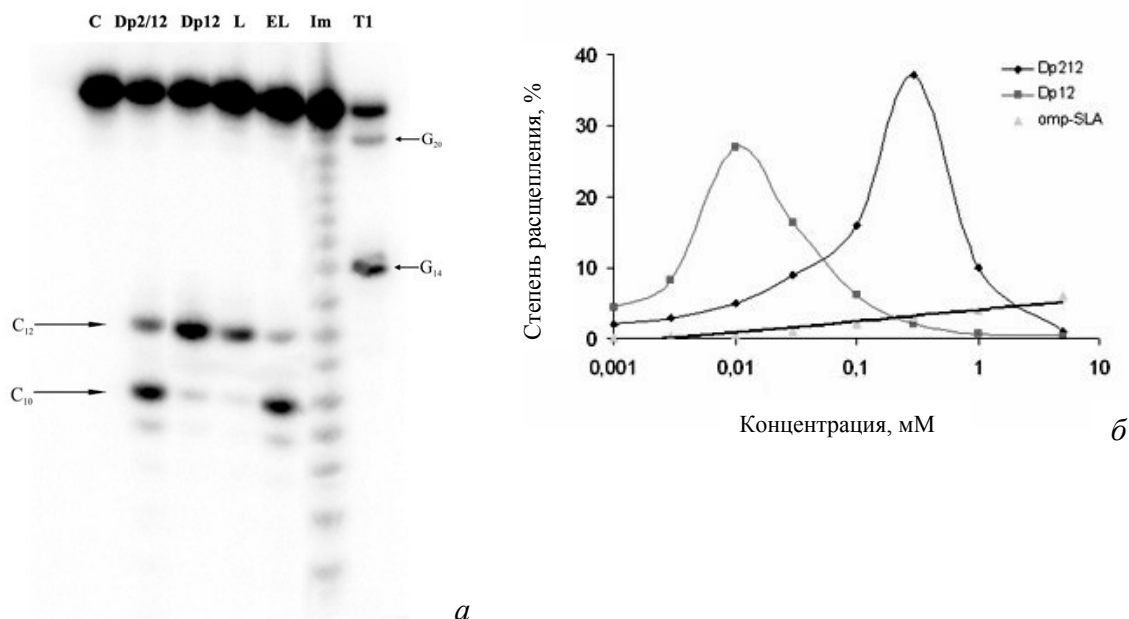


Рис. 4. Рибонуклеазная активность соединений *Dp12* и *Dp2/12*:

*a* – специфичность расщепления ON21 библиотеками и индивидуальными соединениями. Радиоавтограф 15 % денатурирующего ПААГ после разделения продуктов расщепления ON21. Дорожки: *C* – контроль, *Im* и *T1* – частичное расщепление РНК в 2 М имидазольном буфере, pH 7,0 и РНКазой *T1* в денатурирующих условиях. Дорожки *Dp12*, *Dp2/12*, *L*, *EL* – продукты расщепления ON21 соответствующими соединениями. Условия реакций:  $[5^{32}\text{P}]$  – ON21 инкубировали с одним из индивидуальных соединений или библиотек (концентрация *Dp2/12* – 0,3 мМ, *Dp12* – 10 мкМ, *L* – 0,1 мМ, *EL* – 0,1 мМ) в течение 4 часов при 37 °С;

*б* – концентрационные зависимости расщепления ON21 *Dp12*, *Dp2/12* и *omp-SLA*. Условия реакций:  $[5^{32}\text{P}]$  – ON21 инкубировали в присутствии одного из соединений или библиотек в течение 4 часов при 37 °С

нако в их структуре отсутствуют группы, традиционно участвующие в катализе реакции трансэтерификации. Каков же предполагаемый механизм расщепления РНК гидрофобными соединениями? Нами показано, и это коррелирует с данными литературы [14; 15], что гидрофобные соединения расщепляют РНК по связям Y—A, которые наиболее склонны к самопроизвольному расщеплению в водных растворах. Можно предположить, что рибонуклеазы *Dp2/12* и *Dp12*, содержащие положительно заряженные остатки DABCO, связываются с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом РНК и меняют его конформацию вследствие взаимодействия алифатических заместителей между собой, что приводит к «изгибу» РНК. Подобный изгиб фосфодиэфирных связей приводит к увеличению скорости их спонтанного расщепления в растворе. При этом идет увеличение скорости саморасщепления всех типов связей, однако за время инкубации (4–18 часов) наблюдается расщепление только наиболее лабильных связей РНК – С—А и U—А, находящихся в одноцепочечных участках.

## Заключение

Проанализированы комбинаторные библиотеки химических рибонуклеаз, различающихся пространственной структурой (положением остатков DABCO в бензольном кольце), строением и длиной гидрофобных заместителей. В результате анализа выявлено, что наибольшую рибонуклеазную активность проявляют соединения, в которых остатки DABCO находятся в паре-положении. Показано, что для проявления высокой рибонуклеазной активности необходим хотя бы один додекаметиленовый заместитель у четвертизованного атома азота остатков DABCO. В результате идентифицированы два соединения: *Dp12* и *Dp2/12*, проявляющих высокую рибонуклеазную активность.

## Список литературы

1. Raines R. T. Ribonuclease A // Chem. Rev. 1998. Vol. 98. P. 1045–1066.
2. Hartley R. W. Homology between prokaryotic and eukaryotic ribonucleases // J. Mol. Evol. 1980. Vol. 15. P. 355–358.

3. *Artificial Nucleases, Nucleic Acids and Molecular Biology* / Ed. M. Zenkova. Springer-Verlag, 2004. Vol. 13.
4. Niittymäki T., Lonnerberg H. Artificial ribonucleases // *Org. Biomol. Chem.* 2006. Vol. 4. P. 15–25.
5. Cleavage of yeast tRNAPhe with complementary oligonucleotide conjugated to a small ribonuclease mimic / N. G. Beloglazova, V. N. Silnikov, M. A. Zenkova et al. // *FEBS Lett.* 2000. Vol. 487. P. 277.
6. Sequence-specific artificial ribonucleases. I. Bis-imidazole-containing oligonucleotide conjugates prepared using precursor-based strategy / N. G. Beloglazova, M. M. Fabiani, M. A. Zenkova et al. // *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32. P. 3887–3897.
7. Zenkova M. A., Beloglazova N. G. Artificial Nucleases in: *Nucleic Acids and Molecular Biology*. Springer-Verlag, 2004. Vol. 13. P. 189–221.
8. Synthesis and in vitro evaluation of PNA-peptide-DETA conjugates as potential cell penetrating artificial ribonucleases / L. Petersen, M. C. de Koning, P. van Kuik-Romeijn et al. // *Bioconjug. Chem.* 2004. Vol. 15. P. 576–582.
9. Site-specific cleavage of RNA by a metal-free artificial nuclease attached to antisense oligonucleotides / C. Gnaccarini, S. Peter, U. Scheffer et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128. P. 8063–8067.
10. Химические рибонуклеазы 4. Анализ доменной структуры химических рибонуклеаз на основе конъюгатов 1,4-дизабицикло[2.2.2]октана / Д. А. Коневец, Н. Л. Миронова, И. Э. Бекк и др. // *Биоорг. химия*. 2002. Т. 28. С. 367–378.
11. RNA cleavage by 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane-imidazole conjugates / M. Zenkova, N. Beloglazova, V. Silnikov et al. // *Methods Enzymol.* 2001. Vol. 341. P. 468–490.
12. Burakova E. A., Silnikov V. N. Molecular design of artificial ribonucleases using electrostatic interaction // *Nucleos. Nucleot. Nucl.* 2004. Vol. 23. P. 915–920.
13. Tyulkina L. G., Mankin A. S. Inhibition of ribonuclease contaminations in preparation of T4 RNA Ligase, polynucleotide kinase and bacterial alkaline phosphatase with bentonine // *Analytical biochem.* 1984. Vol. 138. P. 285–290.
14. Van Tol H., Gross H. J. Non-enzymatic excision of pre-tRNA introns // *EMBO J.* 1989. Vol. 8. P. 293–300.
15. Riepe A. et al. Enhancement of RNA self-cleavage by micellar catalysis / A. Riepe, H. Beier, H. J. Gross // *FEBS Lett.* 1999. Vol. 457. P. 193–199.

Материал поступил в редколлегию 04.08.2006

N. A. Kovalev, E. A. Burakova, V. N. Silnikov, M. A. Zenkova

### Combinatorial libraries of artificial ribonucleases

Combinatorial libraries of small organic compounds containing benzene ring substituted with two residues of bis quaternary salt of diazabicyclo[2.2.2]octane bearing hydrophobic fragments of different length and structure at quaternized nitrogen atoms were synthesized and assessed for cleavage of model RNA. Some of these compounds, lacking traditional functionalities involved in transesterification reaction, exhibit pronounced RNA cleavage activity. To identify the compounds displayed the highest ribonuclease activity, truncated libraries, containing compounds lacking one of substituents were synthesized. Analysis of ribonuclease activity of such truncated libraries of compounds resulted in identification of the most active compounds, which are differed from nonactive by the presence of at least one long oligomethylene substituent at the nitrogen atom of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane.

**Keywords:** RNA, phosphodiester bonds cleavage, artificial ribonucleases, combinatorial libraries.