

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАЗЛИЧНЫХ АНАЛОГОВ 2', 5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТОВ К ДЕЙСТВИЮ ФОСФОДИЭСТЕРАЗ

Методами капиллярного электрофореза и ВЭЖХ изучали устойчивость широкого ряда 2', 5'-олигоаденилатов к действию фосфодиэстераз. Показано, что исходный «кор» 2', 5'-АрАрА в значительной степени гидролизуеться с образованием аденозина, АМФ и 2', 5'-АрА. Модификация сахара по 3'- и 2'-положениям приводит к повышенной стабильности, причем степень ее зависит от типа модификации. Механизм такой устойчивости, по-видимому, связан с нарушением аффинности модифицированных аналогов к фосфодиэстеразе.

Введение. Интерес к изучению 2', 5'-олигоаденилатов связан с их особой ролью в системе функционирования интерферона. Синтез 2', 5'-олигоА в клетках осуществляется в результате активации интерфероном в присутствии dsРНК 2'—5'-олигоаденилатсинтетазы, которая, используя внутриклеточный АТФ, синтезирует соединения типа ррр5 А(2'р5'А)*n* (*n* = 1—14) [1]. Концентрация их незначительна, зависит от функционального состояния организма [2, 3] и среди них преобладают соединения с *n* = 3. Такие олигонуклеотиды специфически связываются и активируют латентную эндорибонуклеазу, РНКазу *L*, которая, в свою очередь, расщепляет мРНК и вирусную РНК [4]. Обычно подобный механизм связывают в основном с α - и β -интерфероном, однако и γ -интерферон способен индуцировать 2'—5'-олигоаденилатсинтетазу, но в меньшей степени [5].

В дальнейшем олигонуклеотиды подвергаются действию фосфатаз с образованием дефосфорилированных или коровых форм, которые гидролизуются фосфодиэстеразами до более простых соединений — аденозина и АМФ.

2', 5'-Олигоаденилаты проявляют противовирусную активность по отношению к значительному ряду вирусов, в том числе и к некоторым ретровирусам [6]. Если механизм действия фосфорилированных 2', 5'-олигоаденилатов описан достаточно подробно, то биологическая роль коровых до конца не выяснена. Из литературы известно только, что механизм их действия не связан с РНКазой *L*, так как для активации фермента необходимо наличие как минимум двух фосфатных групп [7]. В то же время коровые АрАрА обладают значительной антивирусной и антипролиферативной активностью [1] и могут ингибировать активность обратной транскриптазы [6]. На сегодняшний день нет какой-либо общепринятой гипотезы, которая могла бы объяснить биологическое действие коровых олигоаденилатов. В нашей лаборатории было высказано предположение о том, что возможно прямое действие 2', 5'-олигоаденилатов на нуклеиновые кислоты и при этом отмечено изменение структуры нуклеиновой кислоты [8].

Основным недостатком исходных форм 2', 5'-олигоаденилатов в плане их использования как терапевтических препаратов является низкая устойчивость к действию фосфодиэстераз. Для повышения их стабильности синтезируют аналоги с модификациями по различным группам [9]. Кроме того, применяют все возможные переносчики, такие как липосомы и поли-*L*-лизин [10, 11]. В настоящей работе была пред-

принята попытка с помощью ВЭЖХ и капиллярного электрофореза изучить стабильность по отношению к действию фосфодиэстераз коровых 2',5'-олигоаденилатов с различными модификациями *in vitro*.

Материалы и методы. Работу проводили с 2',5'-олигоаденилатами, синтезированными в Ин-те биоорг. химии АН Беларуси. Использовали следующие препараты: аденозин, АМФ, АТФ, ага-АМФ, 3',5'-АрАрА, 2',5'-АрАрА, 2',5'-АрА, 2',5'-АрАрАрА, 2',5'-АрАрагаА, 2',5'-АрАрхулоА, 2',5'-dАрАрА, 2',5'-АрАрSA, 2',5'-АрАрерохуА. Препараты гидролизовали фосфодиэстеразой из змеиного яда («Sigma», США, концентрация 0,02 МЕ/мкл) в буфере, содержащем 20 мМ HEPES (pH 8,0), 33 мМ

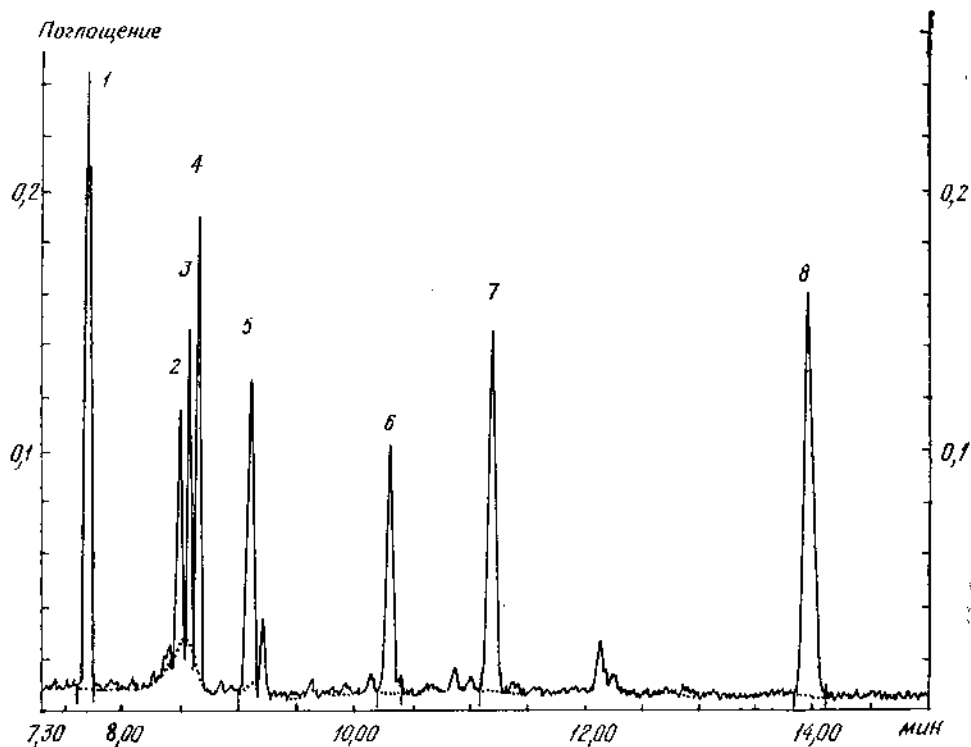


Рис. 1. Капиллярный электрофорез различных аналогов олигоаденилатов: 1 — аденозин; 2 — 2',5'-АрАрхулоА; 3 — 2',5'-АрАрлихоА; 4 — 2',5'-АрАрерохуА; 5 — 2',5'-АрА; 6 — 2',5'-АрАрА; 7 — 2',5'-АрАрАрА; 8 — 3',5'-АрАрА

NH_4Cl , 2,5 мМ Mg-ацетат и 1 мМ дитиотреитол («Serva», ФРГ). Пробы (50 мкл) с олигоаденилатами отбирали через определенные промежутки времени, прогревали на кипящей водяной бане в течение 2—3 мин, охлаждали до 4 °С и центрифугировали при 20 000 об/мин. Вначале 2',5'-АрАрА гидролизовали в различных концентрациях в течение 60 мин и определяли ту из них, при которой 50 % продукта разлагается. Эту концентрацию (0,02 МЕ/мл) использовали в дальнейших исследованиях. Продукты гидролиза анализировали с помощью ВЭЖХ и капиллярного электрофореза. Предварительно все пробы фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. В работе применяли хроматограф фирмы «Beckman» (Gold System), обращеннофазовую колонку C18 и следующие буферные системы: А — 50 мМ ацетат аммония; В — А+80 % CH_3CN (pH 4,5). Скорость потока 0,7 мл/мин, детекция при 254 нм. Электрофорез проводили с использованием системы Р/АСТ 2000 («Beckman», США). Электролитами служили 100 мМ борно-боратный буфер, pH 8,0 (буфер 1) и 100 мМ бора-боратный буфер, pH 9,0 (буфер 2). Детекцию осуществляли при 254 нм, использовали кварцевый капилляр с внутренним диаметром 75 мкм.

Результаты и обсуждение. Для успешного анализа 2',5'-олигоаденилатов, их аналогов и продуктов ферментативного гидролиза нами были подобраны условия их разделения с помощью капиллярного электрофореза (буферы 1, 2). Так, на рис. 1 представлена электрофореграмма смеси различных маркерных соединений, в том числе олигоаденилатов. В данных условиях (буферная система 1) успешно можно разделить олигоаденилаты с различным содержанием адениновых остатков — 2',5'-АрАр, 2',5'-АрАрА, 2',5'-АрАрАрА (пики 5—7, рис. 1).

Хорошее разделение получается и в случае 3',5'-АрАрА и 2',5'-АрАрА (пики 8, 5, рис. 1). Сложнее разделить аналоги 2',5'-Аз с раз-

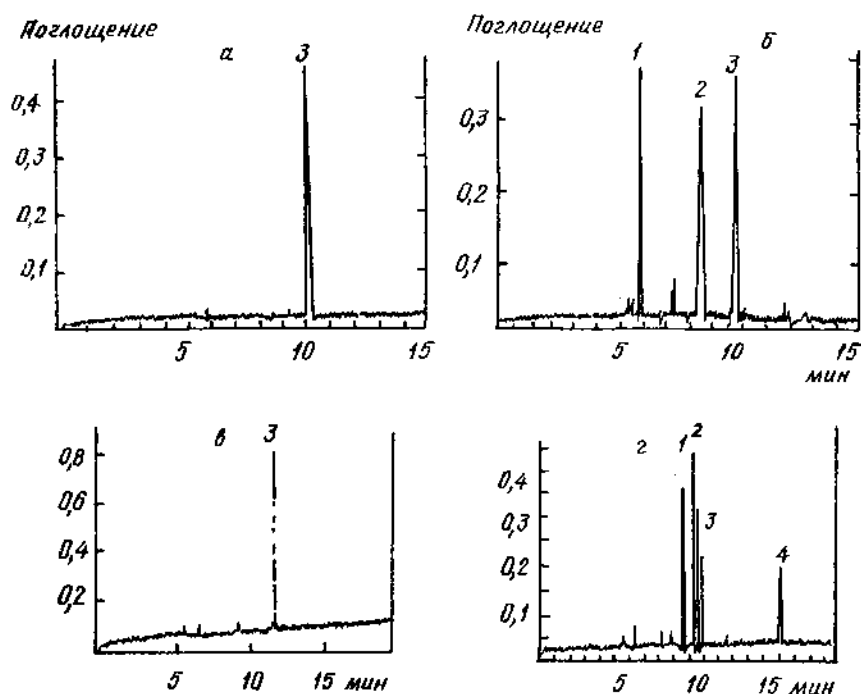
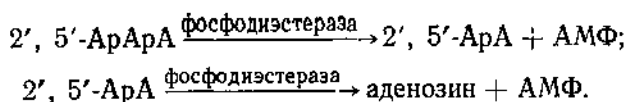


Рис. 2. Разделение продуктов ферментативного гидролиза 2',5'-АрАрА в различных буферных системах (а, б — буфер 1, в, г — буфер 2): 1 — аденозин; 2 — 2',5'-АрА; 3 — 2',5'-АрАрА; 4 — АМФ

личными модификациями по углеводной части. Анализировали следующие соединения: 2',5'-АрАрхуА (пик 2, рис. 1), 2',5'-АрАрлихА (пик 3, рис. 1) и 2',5'-АрАрерохуА (пик 4, рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что время выхода пиков в значительной степени отличается от такового исходного «кора» (пик 5, рис. 1), но все же пики расположены достаточно близко друг от друга, что может вызывать определенные трудности при их исследовании в сложных, многокомпонентных системах, особенно если там присутствуют модифицированные аналоги.

Продукты гидролиза изучали на примере 2',5'-АрАрА. На рис. 2 представлена электрофореграмма 2',5'-АрАрА после осуществления ферментативного гидролиза в буфере 1 (см. Материалы и методы). В данном случае происходит четкое разделение всех продуктов (аденозин — пик 1; 2',5'-АрА — пик 2; 2',5'-АрАрА — пик 3). При изменении состава электрофоретического буфера (буфер 2) наблюдается качественно несколько иная картина определяемых продуктов гидролиза. При сравнении полученной электрофореграммы (рис. 2) с маркерными соединениями видно, что олигоаденилат расщепляется с образованием следующих продуктов: аденозин (пик 1, рис. 2), 2',5'-АрА (пик 2, рис. 2), 2',5'-АрАрА (пик 3, рис. 3) и АМФ (пик 4, рис. 2). Следовательно, применение буфера 2 дает возможность получать достоверную картину ферментативного гидролиза олигоаденилатов.

С использованием капиллярного электрофореза возможно более четкое разделение по сравнению с ВЭЖХ. Исходя из данных, полученных как с помощью ВЭЖХ, так и капиллярного электрофореза, общую схему гидролиза исходного 2',5'-АрАрА можно выразить следующим образом:



На рис. 3 представлены результаты ферментативного гидролиза различных 2',5'-олигоаденилатов и их аналогов, свидетельствующие с низкой стабильности исходного препарата 2',5'-АрАрА. Модификация по

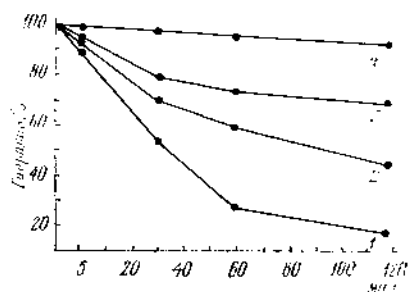
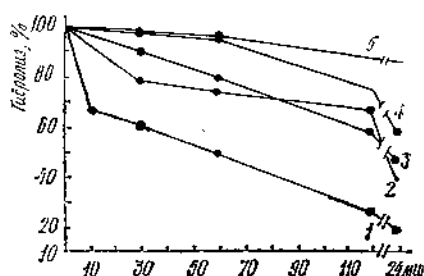


Рис. 3. Кинетика ферментативного гидролиза различных аналогов 2',5'-олигоаденилатов, полученная с помощью ВЭЖХ: 1 — 2',5'-АрАрА; 2 — 2',5'-АрАрхулоА; 3 — 2',5'-АрАрСаА; 4 — 2',5'-АрАрАгаА; 5 — 2',5'-АрАрерохуА

Рис. 4. Кинетика ферментативного гидролиза различных олигоаденилатов. Анализ с помощью капиллярного электрофореза: 1 — 2',5'-АрАрА; 2 — 2',5'-АрАрхулоА; 3 — 2',5'-АрАрАгаА; 4 — 2',5'-АрАрерохуА

концевому сахару ведет к увеличению устойчивости, причем степень ее зависит от типа модификации. Так, 2',5'-АрАрхулоА обладает несколько большей устойчивостью по сравнению с исходным кором, но в то же время уступает другим аналогам. Нами определено, что в ряду исследуемых препаратов наиболее стабильными являются эпокси-, далее идут 2',5'-АрАрАгаА, 2',5'-АрАрСаА, 2',5'-АрАрхулоА, 2',5'-АрАрА. Из полученных хроматографических данных по гидролизу некоторых олигоаденилатов видно, что исходный кор 2',5'-АрАрА через 60 мин инкубации с ферментом подвергается 50 %-му гидролизу, тогда как модифицированные аналоги за этот период и в таких же условиях гидролизуются на 27 % (2',5'-АрАрхулоА) и 20 % (2',5'-АрАрАгаА). В то же время эпоксипроизводное (2',5'-АрАрерохуА) оказалось наиболее стабильным аналогом при длительной инкубации с ферментом. При этом модификация по фосфатной связи между вторым и третьим аденозином в тримере 2',5'-АрАрСаА не вызывает более значительного повышения стабильности по сравнению с углеводными модификациями.

Аналогичные результаты получены и при использовании капиллярного электрофореза (рис. 4). В этом случае 50 %-й гидролиз исходного кора наступает уже через 3 мин инкубации, тогда как другие препараты, и в первую очередь эпоксипроизводное, проявляют значительную устойчивость к действию фосфодиэстераз. Как видно из представленных данных, наиболее критическим моментом в процессе приобретения устойчивости к действию фосфодиэстеразы является структура сахарного остатка в олигоаденилате. На рис. 5 приведены формулы исследуемых препаратов. Так, модификация сахарного остатка по 3'-положению последнего аденозина является решающей для стабильности при действии фосфодиэстеразы. По-видимому, вследствие модификации нарушается аффинность олигоаденилата к ферменту, причем степень ее зависит от структуры сахарного остатка во 2-м и 3-м аденозине тримера [12].

Кроме того, введение S-группы вместо кислорода в фосфате (рис. 5) также в определенной мере повышает стабильность, но меньше, чем по сахарному остатку. С другой стороны, известно [7], что модификация по аденину не влияет на устойчивость к действию ферментов.

В проведенной работе изучена устойчивость широкого ряда 2',5'-олигоаденилатов как известных ранее, так и вновь синтезированных. Отобраны наиболее устойчивые к действию фосфодиэстеразы аналоги, которые необходимо в дальнейшем проанализировать и с точки зрения

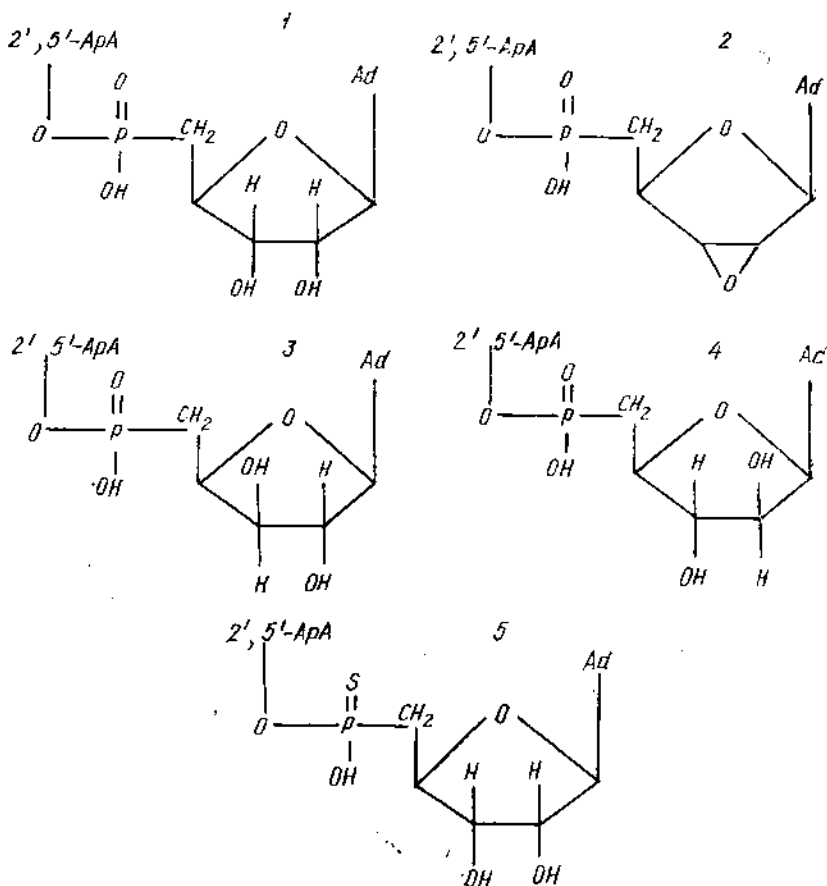


Рис. 5. Структурные формулы исследуемых олигоаденилатов: 1 — 2',5'-ApApA; 2 — 2',5'-ApAперохиА; 3 — 2',5'-ApАxyлоА; 4 — 2',5'-ApAparaA; 5 — 2',5'-ApApSa

биологической активности. Показано, что устойчивость олигоаденилатов определяется в первую очередь типом модификации сахарного остатка 3-го аденозина. Что касается действия дефосфорилированных (коровых) тримеров, то высказывалось предположение о том, что биологическое действие связано с возможностью их фосфорилирования уже после проникновения в клетки [12]. Но данные эти не подтвердились и обсуждалась вероятность того, что биологическим действием обладают продукты фосфодиэстеразного гидролиза 2',5'-олигоаденилатов [13], в связи с чем представляется важным изучение не только кинетики гидролиза, но и продуктов гидролиза исследуемых соединений. При этом, как нам кажется, данное предположение не объясняет в полной мере высокую биологическую активность стабильных аналогов коровых 2',5'-олигоаденилатов и, по-видимому, существует другой механизм их действия, связанный с прямым влиянием на определенные молекулярные структуры.

ВИВЧЕННЯ СТІЙКОСТІ РІЗНИХ АНАЛОГІВ
2',5'-ОЛІГОАДЕНІЛАТІВ ДО ДІЇ ФОСФОДІЕСТЕРАЗ

Резюме

Розглянуто питання, пов'язані зі збільшенням стійкості деяких 2',5'-олігоаденілатів до дії фосфодіестераз. Відомо, що ці сполуки володіють виразною противірусною та антимитогенною активністю. З іншого боку, 2',5'-олігоаденілати в значній мірі піддаються впливові клітинних фосфодіестераз, що знижує їх ефективність як хіміопрепаратів. Для підвищення стабільності 2',5'-олігоаденілатів синтезують хімічно модифіковані аналоги.

У результаті досліджень показано, що найстабільнішими аналогами є епокси-похідні 2',5'-олігоаденілатів.

A. V. Kozlov, Z. Yu. Tkachuk

STUDY OF 2',5'-OLIGOADENYLATES ANALOGUES
STABILITY TO THE ACTION OF PHOSPHODIESTERASES

Summary

A wide variety of 2',5'-oligoadenylates stability to the action of phosphodiesterases was studied by capillary electrophoresis and HPLC. The original 2',5'-ApApA «core» was shown to be considerably hydrolyzed and adenosine, AMP and 2',5'-ApA were formed. Sugar modification by 3' and 2' position results in the stability increase, the degree of stability depending on the type of modification. The mechanism of this stability is probably bound with the modified analogues affinity to phosphodiesterase defect.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Torrence P. F., Lesiak K., Imai J. et al. 2',5'-Oligoadenylates: their role in interferon action and their potential as chemotherapeutic agents // *Nucleosides, nucleotides and their biological application*.—New York: Acad. press, 1983.—P. 67—115.
2. Marti J., Roux D., Favero J. et al. Characterization of a novel 2',5'-oligoadenylate in stimulated lymphocytes // *Nucleosides and Nucleotides*.—1988.—7, N 4.—P. 479—495.
3. Heari W. G., Johnston M. I. Accumulation of 2',5'-oligoadenylates in encephalomyocarditis virus-infected mice // *J. Virol.*—1987.—61, N 5.—P. 1586—1592.
4. Bosworth B. T., Maclachlan N. I., Johnston M. J. Induction of the 2-5A system by interferon and transmissible gastroenteritis virus // *J. Interferon Res.*—1989.—9, N 2.—P. 731—739.
5. Floyd-Smith G. (2'-5')An+dependent endoribonuclease enzyme levels are regulated by IFN β , IFN γ , and cell culture condition // *J. Cell. Biochem.*—1988.—38, N 1.—P. 13—21.
6. Muller W. E. G., Weiler B. E., Charubala R. et al. Cordycepin analogues of 2',5'-oligoadenylate inhibit human immunodeficiency virus infection via inhibition of reverse transcriptase // *Biochemistry*.—1991.—30, N 8.—P. 2027—2033.
7. White J. C., Williams R. W., Johnston M. I. Raman spectroscopy of interferon-induced 2',5'-linked oligoadenylates // *Ibid.*—1987.—N 1.—P. 7737—7742.
8. Ткачук З. Ю., Козлов А. В., Гасан А. И. и др. Влияние (2'-5') олигоаденилатов на структуру полинуклеотидов // *Докл. Акад. Наук УССР. Сер. В.*—1990.—№ 6.—С. 81—86.
9. Vaupard B., Bisbat O., Silhol M. et al. Increased stability and antiviral activity of 2'-O-phosphoglycerol derivatives of (2'-5')oligo(adenylate). Roles of phosphodiesterase and phosphotases in (2'-5')oligo(adenylate) catabolism // *Eur. J. Biochem.*—1984.—142, N 2.—P. 291—298.
10. Correia M., Jumouille J. C., Rentier B. Liposome-mediated cellular internalization of (pA3) // *Arch. Int. Physiol. et Biochem.*—1986.—94, N 1.—B10.
11. Leonetti J.-P., Degols G., Milhaud P. Antiviral activity of antisense oligonucleotides linked to poly(L-lysine): target on genomic RNA and/or mRNA of vesicular stomatitis virus // *Nucleosides and Nucleotides*.—1989.—8, N 5—6.—P. 825—828.
12. Tominaga A., Sarro S., Kohno S. et al. Antiviral effects of 2',5'-oligoadenylates (2-5As), and related compounds // *Microbiol. Immunol.*—1990.—34, N 9.—P. 737—747.
13. Torrence P. F., Imai J., Lesiak K. et al. Strategies in the design of oligonucleotides as potential antiviral agents // *Target for the design of antiviral agents: Proc. NATO Adv. Study*.—1983.—P. 259—285.