

В. В. Власов, В. Ф. Зарытова, Е. М. Иванова,
Ю. Д. Кренделев, М. Н. Овандер, А. С. Райт

ВЛИЯНИЕ ТЕРМИНАЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ НА ИХ СТАБИЛЬНОСТЬ В КЛЕТКАХ МИКОПЛАЗМ

*Исследовано влияние модификации 5'- и 3'-концевых звеньев дезоксиолигорибонуклеотидов на их стабильность в культуральной среде и в клетках микоплазм *Acholeplasma laidlawii* PG-8 и *Mycoplasma capricolum californica* Kid. Показано, что в среде с 10 % сыворотки лошади все производные стабильны в течение 24 ч. В среде с микоплазмами, а также внутри клеток все незащищенные с 5'-конца олигонуклеотиды быстро разрушаются до мононуклеотидов и дефосфорилируются. В клетках образовавшийся фосфат реутилизируется. Феназиновая или холестериновая группировки на 3'-конце олигонуклеотидов способствуют их стабильности. Производные гетерогенных олигонуклеотидов разрушаются быстрее, чем олиготимидилаты. Модификация олигонуклеотидов по 5'-концу путем образования 5'-фосфамидов препятствует их дефосфорилированию и замедляет деградацию олигонуклеотидов. Последние, защищенные с 3'- и 5'-концов, являются наиболее стабильными по отношению к действию нуклеаз микоплазм.*

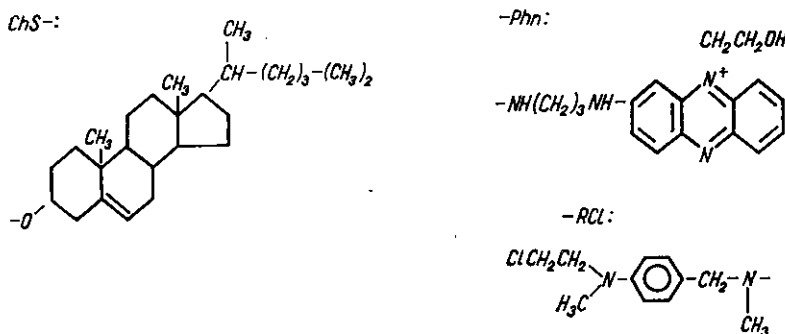
Введение. В настоящее время получены убедительные доказательства возможности ингибирования функций внутриклеточных эукариотических и вирусных нуклеиновых кислот с помощью олигонуклеотидов, комплементарных их определенным участкам [1—3]. По нашему мнению, такой подход может быть весьма перспективным для подавления жизнедеятельности микоплазм. Эти простейшие имеют лишь клеточную мембрану, и производные олигонуклеотидов, вероятно, должны легко в них проникать. Поиск эффективных методов воздействия на микоплазмы весьма актуален. Микоплазмы поражают культуру клеток, они являются возбудителями ряда заболеваний человека [4]. В последнее время получены указания на важную роль микоплазм в развитии заболевания СПИД у людей, инфицированных ВИЧ-1 [5, 6]. Известно, что микоплазмы содержат большое количество нуклеолитических ферментов, поэтому для воздействия на них необходимо использовать модифицированные олигонуклеотидные производные, устойчивые к действию ферментов. Цель настоящей работы заключалась в исследовании взаимодействия олигонуклеотидов и их модифицированных производных с клетками микоплазм и стабильности их в клетках.

Материалы и методы. Клетки референтных штаммов микоплазм *A. laidlawii* PG-8, *M. capricolum californica* Kid, среда СМ ИМВ-72 с 10 % сывороткой лошади были любезно предоставлены И. Г. Скрипалем (Институт микробиологии и вирусологии АН УССР). Олигодезоксирибонуклеотиды рТ₁₀, рN₁₁ синтезированы фосфотриэфирным методом [7]. Холестериновые и феназиновые производные этих олигонуклеотидов получали, как описано в работах [8, 9]. Радиоактивную метку в 5'-конец олигонуклеотидов вводили описанным методом [10]. Присоединение [4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилметиламина к 5'-фосфату олигонуклеотидов осуществляли по методу [11].

Для изучения стабильности производных олигонуклеотидов в клетках микоплазм к культуре клеток ($5 \cdot 10^6$ кл/мл) добавляли производные олигонуклеотидов до конечной концентрации 5 мкМ. Через 1, 2, 4 и 24 ч отбирали пробы, центрифугировали 10 мин (5000 g) и полученные супернатанты анализировали в 20 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с 7 М мочевиной. Осадки трижды отмывали от несвязавшегося реагента раствором 0,28 М NaCl в 0,1 М трис-HCl, pH 8,0. Клетки лизировали в 7 М мочеvine, содержащей 1 % DS-Na, и анализировали в 20 %-ном ПААГ, содержащем 7 М мочеvinу. Степень деградации олигонуклеотидов в клетках оценивали по радиоактивности соответ-

вующей полосы в геле по отношению к общей нанесенной радиоактивности на полоске после электрофореза. Радиоактивность определяли в сцинтилляционном счетчике.

Результаты и обсуждение. В работе изучали стабильность олигонуклеотидов в культуре микоплазм *A. laidlawii* PG-8 и *M. capricolum californica* Kid в зависимости от структуры олигонуклеотидов и от модификации их по 3'-или 5'-концу. Для этого использовали следующие 5'-[³²P]-меченные производные олигонуклеотидов: pT₁₀ (I); pT₁₀pPhn (I-Phn); pTpGpCpTpCpTpGpGpTpTpTpPhn (II-Phn); pT₁₀pChS (I-ChS); pTpGpCpTpCpTpGpGpTpTpTpChS (II-ChS) и их алкилирующие производные: ClR-pT₁₀ (RCl-I); ClR-pT₁₀pPhn (RCl-I-Phn); ClRpTpGpCpTpCpTpGpGpTpTpPhn (RCl-II-Phn); ClR-pT₁₀pChS (RCl-I-ChS); ClRpTpGpCpTpCpTpGpGpTpTpChS (RCl-II-ChS), где



На первом этапе мы исследовали стабильность всех производных олигонуклеотидов в культуральной среде СМ ИМВ-72 с 10 % сыворотки лошади без клеток. Электрофоретический анализ производных олигонуклеотидов в 20 %-ном ПААГ показал, что при инкубации в среде за 24 ч не происходит заметного отщепления [³²P]-метки с 5'-конца олигонуклеотидов или деградации производных.

В среде с клетками микоплазм *M. capricolum* все незащищенные с 5'-конца олигонуклеотиды (I, VI-Phn, II-Phn, I-ChS, II-ChS) быстро дефосфорилируются и разрушаются до мононуклеотидов, как это представлено в табл. 1 для производного I-Phn. На рис. 1 приведены кинетические кривые деградации олигонуклеотидов и их производных в культуральной среде в присутствии *M. capricolum* (условия эксперимента см. в примечании к табл. 1). Видно, что уже за 2 ч в среде практически не остается pT₁₀. Присоединение феназиниевой или холестери-

Таблица 1

Разрушение 5'- [³²P] - меченных производных олигонуклеотидов pT₁₀pPhn (I-Phn) или ClRpT₁₀pPhn (RCl-I-Phn) в среде, инкубированной в присутствии микоплазмы *M. capricolum* при 37°C

Фракция	Доля радиоактивности во фракции, %							
	I-Phn				RCl-I-Phn			
	Время, ч							
	1	2	4	24	1	2	4	24
Биополимеры	1,3	1,4	2	1,8	13	15	15	16
Исходный олигонуклеотид	35	27	20	13	83,6	78	70	52,8
Короткие олигонуклеотиды	62,2	66,7	61	52	2	4,1	11,6	24,2
Ортофосфат	1,5	4,9	17	33,2	1,4	1,9	3,4	7

Примечание. Олигонуклеотиды (5 мкМ) вносили в среду СМ ИМВ-72 с 10 % сыворотки лошади, содержащей *M. capricolum*. Аликвоты среды анализировали электрофоретически (см. «Материалы и методы») и определяли относительное содержание радиоактивных продуктов, соответствующих по электрофоретической подвижности исходному производному и продуктам деградации.

новой группировки к 3'-концу декатимидилата несколько замедляет скорость и глубину деградации (см. рис. 1). Присоединение к 5'-фосфату [4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензил] метиламина защищает олигонуклеотид от дефосфорилирования и деградации. Некоторое количество фосфата проявляется после совместной инкубации RCl-I в среде с *M. capricolum* в течение 24 ч (см. табл. 1, рис. 1). Защита олигонуклеотидов одновременно по 3'- и 5'-концам (RCl-II-Phn, RCl-I-ChS, RCl-II-ChS) значительно ингибирует процесс деградации олигонуклеотидов в среде с *M. capricolum* (см. рис. 1).

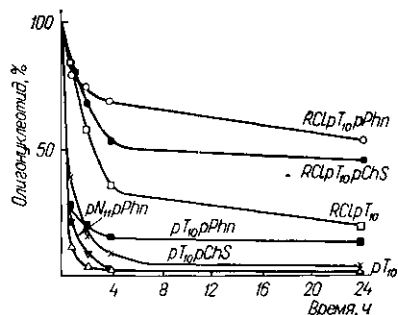


Рис. 1

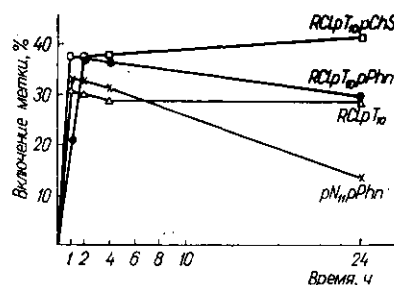


Рис. 2

В экспериментах с клетками *A. laidlawii* PG-8 были получены аналогичные результаты. Так, после 24 ч инкубации в среде с *A. laidlawii* PG-8 остается 2,5; 21; 8; 10; 6 % недеградировавших олигонуклеотидов I, I-Phn, II-Phn, I-ChS, II-ChS соответственно. Наиболее стабильными в среде с *A. laidlawii* остаются олигонуклеотиды, защищенные по 3'- и 5'-концам одновременно: RCl-I-Phn, RCl-I-ChS. После 24 ч инкубации RCl-I, RCl-I-Phn и RCl-I-ChS в среде с *A. laidlawii* остаются недеградированными 20, 48, 38 % производных олигонуклеотидов соответственно. Производные гетерогенных олигонуклеотидов RCl-II-ChS и RCl-II-Phn деградируют быстрее: после 24 ч инкубации исходных соединений остаются 26 и 32 % соответственно.

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что при инкубации 5'-[³²P]-меченного производного декатимидилата RCl-I-Phn в среде с *M. capricolum* происходит включение радиоактивной метки во фракцию биополимеров среды, по-видимому, за счет их алкилирования. Аналогичные результаты были получены при инкубации всех реакционноспособных производных RCl-I, RCl-I-Phn, RCl-II-Phn, RCl-I-ChS, RCl-II-ChS в среде с *M. capricolum* и *A. laidlawii*.

Результаты исследования деградации олигонуклеотидов внутри клеток микоплазмы *M. capricolum* приведены в табл. 2. Состав продуктов деградации I-Phn внутри клеток микоплазм такой же, как и в среде. Однако феназиное производное декатимидилата разрушается в клетках быстрее, чем в среде (см. табл. 1 и 2). Уже через 1 ч инкубации олигонуклеотид I-Phn внутри клеток разрушается на 64 % до коротких олигонуклеотидов и фосфата. Фосфат в клетках быстро реутилизируется, что видно по накоплению радиоактивной метки во фракции биополимеров (см. табл. 2). Реакционноспособное производное RCl-I-Phn в клетках *M. capricolum* стабильно в течение 24 ч (см. табл. 2). Однако часть радиоактивной метки (около 30 %) обнаруживается во фракции клеточных биополимеров уже через 1—2 ч инкубации. Данные по включению метки в биополимеры *M. capricolum* при инкубации с RCl-I, RCl-I-Phn, RCl-II-Phn, RCl-I-ChS, RCl-II-ChS представлены на рис. 2. Характер включения радиоактивной метки в клеточные биополимеры, а именно: быстрое накопление метки во фракции (2—4 ч) коррелирует со скоростью ионизации RCl и превращения его в реакционноспособный этиленаммониевый катион [12]. Этот факт позволяет предположить не только реутилизацию биополимеров вну-

три клетки, но и алкилирование биополимеров реакционноспособными производными олигонуклеотидов.

Таким образом, олигонуклеотиды с незащищенным 5'-концевым фосфатом быстро разрушаются в среде с микоплазмами и внутри их до коротких олигонуклеотидов и дефосфорилируются. Модификация по 3'-концевым звеньям олигонуклеотидов делает их более стабильными как в среде с микоплазмами, так и внутри клеток. Модификация олигонуклеотидов по 5'-концу путем образования 5'-фосфамидов более

Таблица 2

Распределение радиоактивности по фракциям, выделенным из клеток микоплазмы *M. capricolum* после инкубации с 5'-[³²P]-мечеными производными олигонуклеотидов I-Phn или RCl-I-Phn (5 мкМ) при 37°C

Фракция	Доля радиоактивности во фракции, %							
	I-Phn				RCl-I-Phn			
	Время, ч							
	1	2	4	24	1	2	4	24
Биополимеры	9,5	12,8	19	29,5	22	36,3	36	30,3
Исходный олигонуклеотид	29	8	12	6	71	57	50	48,4
Короткие олигонуклеотиды	53,4	51,7	40	24	3,6	3,7	8,8	11,3
Ортофосфат	8,1	17,5	29	40,5	3,4	3	4,2	10

Примечание. Клетки отмывали, лизировали и анализировали электрофоретически, как указано в разделе «Материалы и методы» и в примечании к табл. 1.

эффективно защищает олигонуклеотиды от деградации, чем модификация по 3'-концу. Наиболее стабильными оказываются олигонуклеотиды, модифицированные одновременно по 3'- и 5'-концам.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности существенного повышения стабильности фосфодизфирных олигонуклеотидов в культуральной среде с микоплазмами и внутри клеток путем введения модифицирующих группировок по 5'- и 3'-концевым нуклеотидным звеньям.

Резюме

Досліджено вплив модифікації 5'- і 3'-кінцевих ланок дезоксирибонуклеотидів на їх стабільність в культуральному середовищі та клітинах микоплазм *Acholeplasma laidlawii* PG-8 і *Mycoplasma capricolum californica* Kid. Показано, що в середовищі з 10 % сироватки коня всі похідні стабільні на протязі 24 год. В середовищі з микоплазмами, а також всередині клітин всі незахищені з 5'-кінця олігонуклеотиди швидко руйнуються до мононуклеотидів і дефосфорилуються. В клітинах утворений фосфат реутілізується. Феназінієва або холестерінова групи на 3'-кінці олігонуклеотидів перешкоджають його руйнуванню. Похідні від гетерогенних олігонуклеотидів руйнуються швидше, ніж оліготимідилати. Модифікація олігонуклеотидів по 5'-кінцю шляхом утворення 5'-фосфамідів перешкоджає їх дефосфорилуванню та уповільнює деградацію олігонуклеотидів. Останні, захищені з 3'- та 5'-кінців, є найбільш стабільними по відношенню до дії нуклеаз микоплазм.

Summary

The effect of modification of terminal groups of deoxyribooligonucleotides on their stability in culture medium and mycoplasma cells *A. laidlawii* PG-8 and *M. capricolum* California kid has been investigated. The oligonucleotides and their derivatives were stable in culture medium with 10 % horse serum during 24 hours. In the medium with mycoplasmas, orthophosphates were rapidly removed from the 5'-ends and the oligonucleotides degraded to mononucleotides. In the cells, the scission of 5'-phosphomonoester bonds was accompanied by reutilization of the phosphate. Attachment of the cholesterol or phenazinium residues to oligonucleotides 3'- or 5'-ends protected them from nucleases. The modification of oligonucleotides 5'-ends by 5'-phosphoramides formation, protect the oligonucleotides from dephosphorylation and slower the degradation down. Oligonucleotides protected from 3'- or 5'-ends are more stable to mycoplasma nucleases.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Reactive oligonucleotide derivatives as tools for site specific modification of biopolymers* / D. G. Knorre, V. V. Vlassov, V. F. Zarytova, A. V. Lebedev // *Sov. Sci. Rev.*—1989.—12, N 5.—P. 271—339.
2. *Cholesterol-conjugated oligonucleotides: Synthesis, properties, and activity as inhibitor of replication of human immunodeficiency virus in cell culture* / R. L. Letsinger, G. Zhang, D. L. Sun et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1989.—86, N 17.—P. 6553—6556.
3. *Uhlmann E., Peyman A. Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principles* // *Chem. Rev.*—1990.—90, N 4.—P. 543—584.
4. *Stanbridge E. J., Reff M. E. The mycoplasmas* / Eds M. F. Barile, S. Razin.—New York: Acad. press, 1979.—Vol. 1.—P. 159.
5. *Identification of Mycoplasma incognitus infection in patients with AIDS an immunohistochemical, in situ hybridization and ultrastructural study* / S. C. Lo, M. S. Dawson, D. M. Wong et al. // *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*—1989.—N 41.—P. 601—616.
6. *Mycoplasma can enhance HIV replication in vitro: a possible cofactor responsible for the progression of AIDS* / Md. I. II. Chowdhury, T. Munakata, Y. Koyanagi et al. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1990.—170, N 3.—P. 1365—1370.
7. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. Синтез олигонуклеотидов в хлороформе триэфирным методом* // *Биоорг. химия.*—1983.—9, № 4.—С. 516—521.
8. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Часовских М. Н. Синтезы, свойства производных олигонуклеотидов, содержащих стероидные группы* // Там же.—1990.—16, № 5.—С. 610—616.
9. *Модификация нуклеиновых кислот в стабилизированных комплементарных комплексах. Сообщ. 3* / В. Ф. Зарытова, Е. М. Иванова, И. В. Кутявин и др. // *Изв. Сиб. отд-ния АН СССР.*—1989.—№ 6.—С. 3—9.
10. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.*—М.: Мир, 1984.—136 с.
11. *Активные производные олигонуклеотидов с цвиттер-ионной концевой фосфатной группой для конструирования аффинных реагентов и зондов* / Т. С. Годовикова, В. Ф. Зарытова, Т. В. Мальцева, Л. М. Халимская // *Биоорг. химия.*—1989.—15, № 9.—С. 1246—1252.
12. *Кинетика ионизации С-Cl связи в 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензил-5'-фосфамидах нуклеозидов и олигонуклеотидов* / Н. И. Гринева, Т. С. Ломакина, Н. Г. Тигеева, Т. А. Чимитова // Там же.—1977.—3, № 2.—С. 210—214.

Новосиб. ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР
Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 04.02.91