



УДК 541.69

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛКИЛИРУЮЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ФИБРОБЛАСТАМИ МЫШЕЙ

В. В. Власов, О. Е. Горохова, Е. М. Иванова, И. В. Кутявин,
Л. В. Юрченко, Л. А. Якубов, М. Н. Абдукаюмов, Ю. С. Скоблов

Введение. Высокая специфичность взаимодействия нуклеиновых кислот с комплементарными им олигонуклеотидами позволяет думать о создании методов направленного воздействия на функции нуклеиновых кислот, основанных на использовании реакционноспособных производных олигонуклеотидов, комплементарных нуклеотидным последовательностям в составе ДНК и РНК [1—3]. Ковалентно связываясь с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами, такие производные должны блокировать их функции. Экспериментально было показано, что реакционноспособные производные олигонуклеотидов, комплементарные вирусным нуклеиновым кислотам, подавляют размножение вирусов в культуре клеток [4], а комплементарные определенным мРНК — блокируют трансляцию последних [5]. Возможность химической модификации нуклеиновых кислот клеток по определенным нуклеотидным последовательностям изучали в экспериментах с олиготимидилатами, несущими на 3'-конце остатки ароматического 2-хлорэтиламина. Было показано, что эти производные проникают в клетки асцитной карциномы Кребс II и модифицируют полиадениловые последовательности клеточных нуклеиновых кислот [6]. В данной работе исследовали взаимодействие с клетками алкилирующих производных олигонуклеотидов, несущих остаток ароматического 2-хлорэтиламина на 5'-концевом фосфате.

Материалы и методы. Олигонуклеотиды, олигонуклеотидные производные. Олигонуклеотиды синтезированы по методу, описанному в работе [7]. Введение ^{32}P -метки проводили обменом концевой фосфата. Введение алкилирующей группировки $\text{ClCH}_2\text{NH}-^*$ по фосфатной группе незащищенных олигонуклеотидов проводили, как описано в работе [8]. Алкилирующие производные очищали обращеннофазовой хроматографией на колонках с сорбентом LiChrosorb S18 . Чистота продуктов и содержание в них реакционноспособных групп составляли не менее 95%. Удельная активность производных по ^{32}P составляла около 7,4 ТБк/ммоль.

Культура клеток. В работе использовали перевиваемую культуру клеток фибробластов мышей L929. Клетки выращивали в пластиковых планшетках фирмы «Flow Laboratory» (США) в среде Игла с 10% сыворотки крупного рогатого скота в атмосфере 5% CO_2 при 37°C. Клетки высаживали в количестве 200 тыс. на лунку с площадью дна 2,0 cm^2 и 40 тыс. на лунку с площадью дна 0,28 cm^2 в объеме среды 1 и 0,2 мл соответственно и использовали в работе двухсуточный монослой 500 или 100 тыс. клеток на лунку.

Определение связывания производных олигонуклеотидов с клетками. Среду из лунок удаляли, клеточный монослой отмывали солевым раствором Хэнкса и вносили в лунку по 200 мкл раствора Хэнкса, содержащего ^{32}P -меченные олигонуклеотидные производные. После инкубации монослой клеток отмывали 5-кратной сменой раствора Хэнкса или 0,025%-ного раствора ЭДТА от несвязавшего-

* Остаток ароматического 2-хлорэтиламина $\text{ClCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_3)\text{NC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NH}-$

ся реагента и клетки снимали 0,25 %-ным раствором трипсина. Связанную с клетками радиоактивность просчитывали в жидкостном сцинтилляционном счетчике в водной суспензии.

Определение интенсивности биосинтеза белка в клетках. Клетки инкубировали с олигонуклеотидными производными в присутствии ^{14}C -гидролизата белка, 37 МБк/мл (ЧССР) в течение 2 ч. По окончании инкубации монослой отмывали раствором Хэнкса, клетки снимали, белки осаждали 5 %-ной холодной ТХУ. Кислотонерастворимый материал переносили на фильтры GF/C («Whatman», Англия) и радиоактивность просчитывали в толуольном сцинтилляторе на сцинтилляционном счетчике.

Фракционирование клеточных компонентов проводили по методу, описанному в [9], ядра выделяли с использованием детергента NP-40 согласно [10].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены кинетические кривые связывания с клетками олигонуклеотида $(\text{pT})_9$, производного этого нуклеотида $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pT})_9$ и полученного из этого производного выдерживанием в водном растворе неактивного аналога $\text{HORCH}_2(\text{pT})_9$. Видно, что ароматические группировки ClRCH_2NH — и HORCH_2NH — существенно увеличивают способность олигонуклеотида связываться с клетками в данных условиях. Процесс связывания олигонуклеотида и его производных клетками завершается выходом на плато в течение 2 ч. Высота плато зависит от концентрации олигонуклеотидного производного в среде, при этом характер кривых связывания остается неизменным в широком интервале концентраций от 0,01 до 100 мкМ. При замене инкубационной среды на среду, не содержащую реагента, наблюдалось освобождение олигонуклеотидного производного из клеток. За 1 ч клетки отдают в среду до половины, а за 2 ч — до 70 % захваченного олигонуклеотидного производного.

Процесс поглощения производных клетками является активным, так как азид натрия, 2-дезоксиглюкоза и цитохалазин В в concentra-

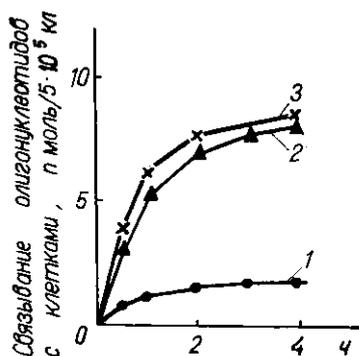


Рис. 1. Связывание олигонуклеотида $(\text{pT})_9$ и его производных мышинными клетками L929: 1 — $(\text{pT})_9$; 2 — $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pT})_9$; 3 — $\text{HORCH}_2\text{NH}(\text{pT})_9$. Концентрация производных 0,15 мкМ в среде Игла.

Fig. 1. Uptake of oligonucleotide $(\text{pT})_9$ and of its derivatives by mouse cells L929: 1 — $(\text{pT})_9$; 2 — $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pT})_9$; 3 — $\text{HORCH}_2\text{NH}(\text{pT})_9$. Concentration of oligonucleotide derivatives 0.15 μM , Eagle medium.

циях 5 мМ, 50 мкМ и 50 мкг/мл соответственно ингибируют связывание $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pT})_{16}$ с клетками в 2,5—3 раза.

На рис. 2, а показана зависимость предельного уровня связывания $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pT})_{16}$ с клетками от концентрации этого производного в среде. При концентрации производного в среде 0,5—1 мкМ кривая выходит на плато и далее, после 5—10 мкМ, приближается к наклонной прямой, выходящей из начала координат. Зависимость доли производного, связанного с клетками, от количества производного, внесенного в среду, показано на рис. 2, в. Видно, что относительное количество захваченного клетками производного меняется с 12 до 2 % в интервале концентрации производного в среде от 0,01 до 2 мкМ. При более высоких концентрациях эффективность связывания производного клетками составляет 0,3—1 % и соответствует включению в них маркера жидкостного типа эндоцитоза ^3H -поливинилпирролидона [11].

Полученные результаты могут быть объяснены в рамках модели захвата олигонуклеотидных производных путем эндоцитоза. Выход кри-

вых связывания олигонуклеотидных производных с клетками на плато, по-видимому, связан с тем, что примерно через 2 ч наступает равновесие между эндоцитозом и экзоцитозом захваченных клеткой производных. При низких концентрациях олигонуклеотидного производного возрастает относительная роль адсорбционного типа эндоцитоза, что приводит к относительному увеличению уровня связывания (рис. 2, б). Было замечено также, что олигонуклеотидное производное в узком интервале концентраций (около 1 мкМ) стимулирует пиноцитоз. В соответствии с изложенным, концентрационная зависимость связывания

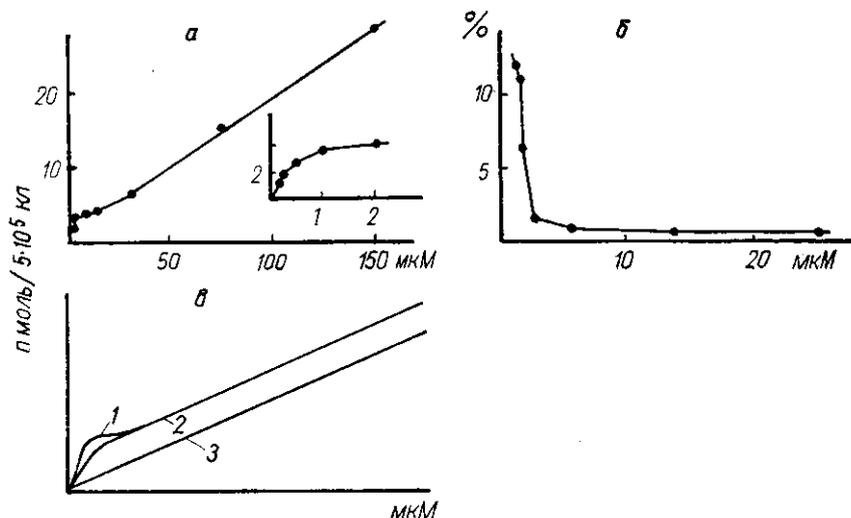


Рис. 2. Зависимость уровня предельного связывания $\text{CIRCH}_2\text{NH}(\text{pT})_{16}$ с фибробластами мыши от концентрации производного в среде: а — связывание $\text{CIRCH}_2\text{NH}(\text{pT})_{16}$ клетками; б — зависимость связывания $\text{CIRCH}_2\text{NH}(\text{pT})_{16}$ от внесенного в реакционную смесь производного; в — предполагаемая схема участия клеточных процессов в связывании: 1 — область стимуляции эндоцитоза; 2 — адсорбционный эндоцитоз; 3 — жидкостный эндоцитоз.

Fig. 2. Dependence of plateau level of $\text{CIRCH}_2\text{NH}(\text{pT})_{16}$ uptake by mouse fibroblasts on the concentration of the derivative in the incubation medium: а — uptake of $\text{CIRCH}_2\text{NH}(\text{pT})_{16}$ by cells; б — uptake of $\text{CIRCH}_2\text{NH}(\text{pT})_{16}$, per cent of the derivative introduced into the medium; в — hypothetical scheme of processes involved in the oligonucleotide derivatives uptake: 1 — stimulation of endocytosis by the derivatives; 2 — absorption endocytosis; 3 — pinocytosis.

олигонуклеотидных производных, по-видимому, представляет сумму трех процессов. Общий наклон кривой при высоких концентрациях производных определяется интенсивностью жидкостного эндоцитоза. В области более низких концентраций вид кривой определяется также интенсивностью захвата производных клетками по механизму адсорбционного эндоцитоза и стимулирующей эндоцитоза определенными концентрациями производных (рис. 2, в).

Следует отметить, что взаимодействие с олигонуклеотидными производными существенно зависит от состояния клеток. Так, при увеличении плотности монослоя от $8 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^5$ на 1 см^2 уровень связывания производных $\text{CIRCH}_2\text{NH}(\text{pApC})_3$ и $\text{CIRCH}_2\text{NH}(\text{pT})_{16}$ в расчете на одну клетку снижался в 3 раза.

В процессе инкубации с реагентами клетки полностью сохраняли жизнеспособность по данным определения интенсивности белкового синтеза: инкубация клеток в течение 4 ч в среде, содержащей $\text{CIRCH}_2\text{NH}(\text{pT})_9$, практически не снижала скорость включения в белок ^{14}C -аминокислот.

Для получения информации о распределении олигонуклеотидных производных внутри клеток последние инкубировали с ^{32}P - $\text{CIRCH}_2\text{NH}(\text{pT})_{16}$ в течение 3,5 ч, разрушали, разделяли клеточные компоненты и определяли содержание в них радиоактивного материала. Оказалось, что 17—20 % поглощенного клетками производного содержится в клеточ-

ных ядрах, а во фракции, содержащей митохондрии, лизосомы и другие везикулярные образования, находится около 50 % радиоактивного материала.

Для определения олигонуклеотидного производного, ковалентно связанного с клеточными биополимерами, клетки лизировали 50 %-ным формамидом, содержащим 0,5 %-ный DS-Na (25 мкл/1 млн клеток), и разделяли продукты в ступенчатом 4—20 %-ном полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевины. Оказалось, что после 6 ч инкубации клеток с $\text{CIRCH}_2\text{NH}(\text{pT})_{16}$ около 40 % радиоактивности локализуется на геле вблизи старта, в районе расположения ДНК и белков; 20 % радиоактивного материала — в зоне, соответствующей 10S—40S РНК, и 20—30 % — в зоне олигонуклеотидного производного. Радиоактивный материал в зоне, соответствующей биополимерам, не является клеточными нуклеиновыми кислотами, меченными за счет реутилизации ^{32}P , отщепленного от производного. В отдельных опытах было показано, что олигонуклеотид, меченный ^{32}P по 5'-концу, лишь частично дефосфорилируется в клетке за 2 ч инкубации, а меченое производное $\text{CIRCH}_2\text{NH}(\text{pT})_{16}$ за это время практически не разрушается.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что основная часть олигонуклеотидных производных, связывающихся с клетками, оказывается внутри клеток, в том числе в ядре, и эффективно модифицирует клеточные биополимеры.

Полученные в настоящей работе данные, а также данные исследования взаимодействия алкилирующих олигонуклеотидных производных с клетками асцитной карциномы Кребс II [6] свидетельствуют о том, что производные олигонуклеотидов, несущие остаток ароматического 2-хлорэтиламина, проникают в клетки млекопитающих по механизму эндоцитоза. Олигонуклеотидные производные стабильны в клетках в течение времени, необходимого для завершения их химических превращений, и эффективно модифицируют клеточные биополимеры.

INTERACTION OF ALKYLATING OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES WITH MOUSE FIBROBLASTS

*V. V. Vlassov, O. E. Gorokhova, E. M. Ivanova, I. V. Kutyavin,
L. V. Yurchenko, L. A. Yakubov, M. N. Abdukayumov, Yu. S. Skoblov*

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk
Experimental Unit, Institute of Nuclear Physics,
Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

Summary

Interaction of ^{32}P labelled oligonucleotides and alkylating oligonucleotide derivatives carrying aromatic 2-chloroethylamine residues with mouse fibroblasts *L929* has been investigated. At high concentrations of oligonucleotide derivatives in the culture medium, their uptake by the cells can be ascribed to pinocytosis. At low concentrations (less than $2\mu\text{M}$) the efficiency of the uptake is much higher, in particular in the case of the derivatives carrying 2-chloroethylamino groups, most probably due to their absorption on the cells. The binding kinetics plateaus are given 2 hours after incubation at 37°C . Alkylating oligonucleotide derivatives taken up by the cells efficiently modify cellular biopolymers and remain undegraded in cells 3 hours after incubation at 37°C . The derivatives show no cytotoxic action at the concentrations used.

1. Гринсва Н. И. Химическое алкилирование в специфичных комплексах как метод исследования структуры и функций нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов // Биохимия.— 1977.—42, № 2.— С. 370—374.
2. Кнорре Д. Г., Власов В. В. Олигонуклеотиды и их производные как биологически активные вещества // Вестник АН СССР.— 1983.— № 12.— С. 74—81.
3. Summerton J. Intracellular inactivation of specific nucleotide sequences: a general approach to the treatment of viral diseases and virally-mediated cancers // J. Theor. Biol.— 1979.—78, N 1.— P. 77—99.

4. *Возможность* блокирования гриппозной инфекции с помощью алкилирующих производных олигонуклеотидов / В. В. Власов, В. В. Горн, И. В. Кутявин и др. // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.—1984.— № 11.— С. 36—41.
5. *Подавление* синтеза иммуноглобулина в клетках миеломы МОРС-21 алкилирующим производным олигонуклеотида, комплементарного мРНК, кодирующей легкую цепь иммуноглобулина / В. В. Власов, А. А. Годовиков, В. Ф. Зарытова и др. // Докл. АН СССР.—1984.—276, № 5.— С. 1263—1265.
6. *Направленная* модификация полиадениловых фрагментов информационной РНК в клетках асцитной карциномы Кребса-2 алкилирующим производным новатимидилуридина / Е. М. Иванова, Г. Г. Карпова, Д. Г. Кнорре и др. // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 3.— С. 613—619.
7. *Горн В. В., Зарытова В. Ф., Ярмолинская Е. В.* Полуавтоматический твердофазный триэфирный синтез олигодезоксирибонуклеотидов с активацией фосфатного компонента на полимерном носителе // Биоорг. химия.—1984.—9, № 11.— С. 1511—1517.
8. *Мишенина Г. Ф., Салуков В. В., Шубина Т. Н.* Селективная модификация монозамещенных фосфатных групп в 5-моно- и полифосфатах нуклеозидов и олигонуклеотидов // Там же.—1979.—5, № 6.— С. 886—893.
9. *Zwerner R. K., Wise K. S., Action R. T.* Harvesting the products of cell growth // Meth. Enzymol.—1979.—58.— P. 221—229.
10. *Primary* organization of the nucleosome core particles. Sequential arrangement of histones along DNA / V. V. Shick, A. V. Belyavsky, S. G. Bavykin, A. D. Mirzabekov // J. Mol. Biol.—1980.—139, N 3.— P. 491—517.
11. *Roberts A. V. S., Williams K. E., Lloyd J. B.* The pinocytosis of ¹²⁵I-labelled poly(vinylpyrrolidone), ¹⁴C sucrose and colloidal ¹⁹⁸Au gold by rat yolk sac cultured *in vitro* // Biochem J.—1977.—168, N 2.— P. 239—244.

Ин-т биоорг. химии СО АН СССР, Новосибирск
 Опытное предприятие
 Ин-та ядер. физики АН УзССР, Ташкент

Получено 15.11.85