



ИДК 577.552.42:577.113.6

А. С. Буторин, В. В. Власов, Е. М. Иванова, А. С. Райт,
И. Г. Шипкина, Л. В. Юрченко, Л. А. Якубов

СВЯЗЫВАНИЕ АЛКИЛИРУЮЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ КЛЕТКАМИ В ПРИСУТСТВИИ ДОБАВОК, СТИМУЛИРУЮЩИХ ПРОЦЕСС ТРАНСФЕКЦИИ

Изучено влияние ряда добавок, применяемых для улучшения трансфекции эукариотических клеток нуклеиновыми кислотами, на связывание клетками фибробластов мыши L-929 и асцитной карциномы Кребс-2 [4-(N-2-хлорэтил)-N-метиламинобензил]-5'-[³²P] фосфамида олигонуклеотидов разного состава и длины. Показано, что диметилсульфоксид, ДЭАЭ-декстран и полилизин неэффективны или малоэффективны для увеличения степени связывания. Заметный эффект оказывало соосаждение олигонуклеотидных производных на клетках хлористым кальцием из фосфатного буфера: связывание производных клетками возрастало как минимум на порядок, а уровень специфической модификации нуклеиновых кислот внутри клетки — в шесть раз.

Введение. Полученные к настоящему времени данные о возможности блокирования функций определенных мРНК клеток с помощью производных олигонуклеотидов, комплементарных этим мРНК, указывают на возможность создания эффективных методов регуляции экспрессии генов с помощью таких производных [1—5]. Одним из основных факторов, снижающих эффективность действия олигонуклеотидных производных на клеточные нуклеиновые кислоты, является слабое проникновение полианионов-олигонуклеотидов в клетки [6]. Известно, что эффективность трансфекции эукариотических клеток существенно возрастает при обработке клеток препаратами нуклеиновых кислот в присутствии поликатионов (полилизин и ДЭАЭ-декстран), диметилсульфоксида или если обработка клеток производится в условиях осаждения нуклеиновых кислот фосфатом кальция [7—10]. Можно было ожидать, что аналогичные приемы могут быть использованы для повышения эффективности введения в клетки производных олигонуклеотидов. Целью настоящей работы и было исследование проникновения алкилирующих олигонуклеотидных производных 5'-[³²P]-[4-(N-2-хлорэтил)-N-метиламинобензил]-5'-фосфамидов олигонуклеотидов* в эукариотические клетки при вышеуказанных условиях обработки.

Материалы и методы. В работе использовали НЕРЕС фирмы «Merck» (ФРГ), [4-(N-2-хлорэтил)-N-метиламинобензил]амин, полученный из Новосиб. ин-та орг. химии Сиб. отделения АН СССР, γ -[³²P]аденозинтрифосфат с удельной активностью более 200 ТБк/ммоль производства Ин-та ядер. физики АН УзССР, пластиковые пластины фирмы «Flow Laboratories» (Англия). Олигодезоксирибонуклеотиды d(pApC)_n, d(pT)_n, d(pT)₁₀ синтезированы по описанным ранее методикам [11, 12]. Введение радиоактивной метки в 5'-конец олигонуклеотидов проводили методом обмена в реакции с γ -[³²P]АТФ, катализируемой полинуклеотидкиназой [13]. Присоединение [4-(N-2-хлорэтил)-N-метиламинобензил]амин к 5'-фосфату олигонуклеотида с помощью фосфамидной связи осуществляли, как описано в работе [14]. Алкилирующие производные олигонуклеотидов подвергали дополнительной очистке обращеннофазовой хроматогра-

* Сокращение в тексте CIR-d(pN)_n.

фией на колонке с сорбентом «Nucleosil C-18» фирмы «Macherey-Nagel» (ФРГ) и анализировали гель-электрофорезом в 20 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ).

Алкилирующие производные олигонуклеотидов осаждали хлористым кальцием по методике, описанной в работе [10]. Процент осаждемого реагента определяли по разнице радиоактивности аликвоты супернатанта до и после осаждения.

В работе использовали клетки асцитной карциномы Кребс-2, перевиваемой на мышах линии СС57 ВR, а также перевиваемую культуру клеток фибробластов мышей L-929. Выращивание L-клеток, выделение ядер и изучение связывания олигонуклеотидных производных с клетками проводили, как описано в работе [15]. Одновременно с олигонуклеотидными производными прибавляли 2 М CaCl₂ до концентрации 125 мМ или другие добавки. Для опытов по субклеточному фракционированию клетки выращивали в 50 мл среды до образования монослоя 10⁷ клеток и обрабатывали аналогичным образом. Выделение матричных РНК (мРНК) проводили согласно методике [13].

Клетки асцитной карциномы Кребс-2 (5·10⁶ клеток в 1 мл) инкубировали в растворе Хэнкса, содержащем 0,01 М НЕРЕС, рН 7,2, с мечеными ³²P олигонуклеотидными производными в присутствии различных добавок. По окончании инкубации клетки отмывали пятикратным осаждением (500 g, 15 мин) и ресуспендировали в растворе Хэнкса на холоду (4 °С). Полученный осадок ресуспендировали в растворе Хэнкса и просчитывали на сцинтилляционном счетчике.

Обработка клеток алкилирующими производными олигонуклеотидов, а также определение степени модификации биополимеров алкилирующими реагентами описаны в работе [6].

Для качественного анализа модификации биополимеров клетки подвергали мягкому лизису в присутствии 7 М мочевины и 0,5 %-ного DS-Na («Serva», ФРГ) при нагревании до 90 °С в течение 1—3 мин, а затем аликвоты лизата наносили на двухступенчатый 5—20 %-ный ПААГ в 7 М мочевины. Каждую дорожку геля разрезали и определяли радиоактивность на старте, в 5 %-ном геле, на границе между ступенями и в 20 %-ном геле. Суммарную радиоактивность первых трех образцов считали включившейся в биополимеры. В качестве контроля использовали неактивноспособные производные тех олигонуклеотидов, алкилирующая группировка которых была подвергнута исчерпывающему гидролизу в воде [HORD(pN)_n].

Результаты и обсуждение. В первых экспериментах мы проверили возможность осаждения алкилирующих производных олигонуклеотидов добавленным хлористого кальция в фосфатный буфер до концентрации 125 мМ в условиях, использованных в работе [10], а также измерили уровень связывания этих производных клетками L-929. Результаты приведены в табл. 1.

Как видно из таблицы, осаждение олигонуклеотидных производных хлористым кальцием происходит в растворе Хэнкса лучше, чем в фос-

Таблица 1

Осаждение и связывание клетками L-929 алкилирующих производных олигонуклеотидов в буфере А и растворе Хэнкса в присутствии и отсутствии 125 мМ CaCl₂ (в процентах от количества добавленного в пробу)

Precipitation and uptake by the L-929 cells of the various oligonucleotide derivatives in buffer A and Hanks solution in the presence and in the absence of 125 mM CaCl₂ (in per cents of the derivative added)

Реагент	Концентрация реагента, мМ	Осаждение CaCl ₂		Связывание клетками в растворе Хэнкса	
		в буфере А	в растворе Хэнкса	+CaCl ₂	-CaCl ₂
CIRd(pApC) ₆	0,2	7,5	58,5	—	—
	2,0	17,5	64,0	5,0	1,0
CIRd(pT) ₈	0,2	9,5	19	—	—
	2,0	8,0	18,5	3,0	0,47
CIRd(pT) ₁₆	0,01	29	79	—	—
	0,1	14,5	80,5	7,0	0,48

фатном буфере А (21 мМ НЕРЕС, рН 7,05, 137 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ Na₂HPO₄, 6 мМ глюкоза), использованном авторами работы [10]. При сравнении наших результатов с данными работы [10] оказалось, что наличие алкилирующей группировки на 5'-конце не влияет заметно на степень осаждения и качественную зависимость от длины и состава олигонуклеотидов. Степень связывания олигонуклеотидных производных с клетками L-929 коррелирует со степенью их осаждения фосфатом кальция и подчиняется тем же закономерностям в зависимости от длины олигонуклеотида и его нуклеотидного состава. Наиболее значительное увеличение степени связывания олигонуклеотидного производного с клетками при кальций-фосфатном осаждении наблюдалось в случае гексадекатимидилатного реагента.

Таблица 2

Связывание олигонуклеотидного производного ClRd(pT)₁₆ с клетками в присутствии добавок, улучшающих трансфекцию (концентрация производного в среде 1 мкМ)
Uptake of the oligonucleotide derivative ClRd(pT)₁₆ by the cells in the presence of components facilitating transfection (concentration of the derivative in the medium was 1 μM)

Тип обработки	Относительный уровень связывания от растворенного в среде, %			
	L-929	Кребс-2		
		1,5 ч	0,5 ч	1,5 ч
Контроль (раствор Хэнкса)	1,2	1,2	1,4	2,1
2 %-ый диметилсульфоксид	1,2	1,3	1,5	2,1
ДЭАЭ-декстран, 20 мкл/мл	1,1	2,1	3,4	6,5
Полилизин, 20 мкг/мл	1,7	2,1	2,1	2,1
CaCl ₂ , 12,5 мМ	2,2	—	—	—
CaCl ₂ , 125 мМ	12,0	10,7	15,0	22,0

В табл. 2 приведены результаты определения уровня связывания L-клетками и клетками асцитной карциномы Кребс-2 наиболее хорошо осаждаемого фосфатом кальция олигонуклеотидного производного ClRd(pT)₁₆ при разных временах инкубации в присутствии различных добавок, улучшающих трансфекцию эукариотических клеток нуклеиновыми кислотами. Из таблицы видно, что диметилсульфоксид, ДЭАЭ-декстран и полилизин неэффективны или малоэффективны для повышения связывания олигонуклеотидного производного. В более высоких концентрациях, чем указано в таблице, эти добавки были токсичны и вызывали гибель клеток. Заметный эффект на связывание олигонуклеотидных производных клетками оказывал лишь хлористый кальций. Чтобы выяснить, действительно ли наблюдаемые эффекты связаны с увеличением количества реагентов, проникающих в клетки, мы провели электрофорез лизатов клеток, обработанных производными [³²P]ClRd(pT)₁₆ в присутствии и отсутствии CaCl₂. Видно, что существенное количество радиоактивности включается во фракцию биополимеров и в том и в другом случае. Суммарная радиоактивность, связавшаяся с клетками, в присутствии хлористого кальция оказалась в семь раз выше, чем без него, однако в первом случае (+CaCl₂) в области биополимеров содержалось около трети радиоактивности, а во втором (—CaCl₂) — около двух третей (табл. 3). Следовательно, увеличение уровня модификации биополимеров в результате обработки клеток хлористым кальцием можно оценить как трехкратное.

Факт модификации, а не реутилизации радиоактивного фосфора доказывали кислотной обработкой радиоактивных биополимеров, при этом происходил гидролиз фосфамидной связи и вся радиоактивность после электрофореза оказывалась в зоне исходного олигонуклеотида. (Результаты не приведены.)

Из клеток, обработанных олигонуклеотидным реагентом, была выделена РНК. Для этого клетки лизировали NP-40, разделяли цитоплазматическую фракцию и фракцию ядер. Распределение радиоактивности между ядром и цитоплазмой в обоих случаях было примерно одинаковым. Из цитоплазматической фракции была выделена суммарная РНК, а затем хроматографией на олиго(dT)-целлюлозе — поли(А)-содержащая мРНК (поли(А)⁺-мРНК). В каждом случае определен уровень модификации мРНК в молях алкилирующего агента на моль нуклеотида. Как видно из табл. 4, уровень неспецифической модификации РНК повышался в три раза, а уровень специфической — в шесть раз.

Таблица 3

Алкилирование биополимеров в клетках L-929 реагентом ClRd(pT)₁₆ по данным электрофореза клеточных лизатов в двухступенчатом 5—20 %-ном ПААГ с мочевиной
Alkylation of biopolymers in L-929 cells by ClRd(pT)₁₆ as estimated from counting of the gel slices

Участок гели	-CaCl ₂		+CaCl ₂	
	Радиоактивность, имп/мин	Доля радиоактивности во фракции биополимеров	Радиоактивность, имп/мин	Доля радиоактивности во фракции биополимеров
Старт	950		2880	
5 %-ный гель	803	64 %	2036	31 %
Граница	370		2037	
20 %-ный гель	1187		15490	

Таблица 4

Модификация мРНК при обработке клеток реагентом ClRd(pT)₁₆ в присутствии и отсутствие CaCl₂
mRNA modification after treatment with the oligonucleotide derivative ClRd(pT)₁₆ in the presence and in the absence of CaCl₂

Показатель	-CaCl ₂	+CaCl ₂
Суммарная радиоактивность в пробе, имп/мин, по Черенкову	9·10 ⁷	9·10 ⁷
Связалось с клетками, % от содержания в пробе	0,17	2,9
Уровень модификации РНК, моль/моль нуклеотида:		
суммарная РНК	5,7·10 ⁻⁶	1,6·10 ⁻⁵
поли(А) ⁺ -мРНК	1,9·10 ⁻⁵	1,1·10 ⁻⁴

Примечание. Концентрация ClRd(pT)₁₆ — 4,5 мкМ, количество клеток в пробе — 5·10⁶, инкубация — 3 ч при 37 °С.

Таким образом, для алкилирующих производных олигонуклеотидов использование диметилсульфоксида, полилизина и ДЭАЭ-декстрана в отличие от нуклеиновых кислот высокой степени полимерности оказалось неэффективным. Существенное повышение уровня захвата олигонуклеотидных производных наблюдалось при обработке клеток хлористым кальцием в присутствии фосфатного буфера. Эта процедура соосаждения олигонуклеотидных производных с клетками может найти свое применение для направленного воздействия на биополимеры клеток *in vivo*.

Авторы выражают благодарность М. Н. Абдукаюмову, Ю. С. Скоблову и И. В. Рабинову за опытные препараты γ-[³²P]АТФ вида В с объемной активностью 37 ГБк/мл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knorre D. G., Vlassov V. V. Complementary addressed (sequence-specific) modification of nucleic acids // Progr. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.—1985.—32.—P. 291—322.
2. Zamecnic P. C., Stephenson M. L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1978.—75, N 1.—P. 280—284.
3. Stephenson M. L., Zamecnic P. C. Inhibition of Rous sarcoma virus RNA translation by a specific oligonucleotide // Ibid.—P. 285—288.
4. Подавление синтеза иммуноглобулина в клетках миеломы МОРС-21 алкилирующими производными 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.
5. Anti-messenger oligonucleotides: specific inhibition of rabbit β -globin synthesis in wheat germ extracts and Xenopus oocytes / C. Cazenave, N. Lorean, J. J. Toulme, C. Helene // Biochimie.—1986.—68, N 9.—P. 1063—1069.
6. Направленная модификация полиадениловых фрагментов информационной РНК в клетках асцитной карциномы Кребс-2 алкилирующим производным понатимидилуридина / Е. М. Иванова, Г. Г. Карпова, Д. Г. Кнорре и др. // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 3.—С. 613—619.
7. Juliano R., Mayhew E. Interaction of polynucleotides with cultured mammalian cells // Exp. Cell Res.—1972.—73, N 1.—P. 3—12.
8. Warden D., Thorne H. V. The infectivity of polyoma virus DNA for mouse embryo cells in the presence of diethyl-aminoethyl-dextran // J. Gen. Virol.—1968.—3, N 4.—P. 371—377.
9. Graham F. L., van der Eb A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA // Virology.—1973.—52, N 2.—P. 456—467.
10. Stenberg K., Obers B., Chattopadhyaya J. B. Precipitation of nucleotides by calcium phosphate // Biochim. et biophys. acta.—1982.—697, N 2.—P. 170—173.
11. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. Синтез олигонуклеотидов в хлороформе триэфирным методом // Биоорг. химия.—1983.—9, № 4.—С. 516—521.
12. Бауцк Е. В., Горн В. В., Лебедев А. В. Унифицированный вариант твердофазного триэфирного синтеза 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов на основе β -цианэтиловых п-хлорфениловых эфиров N-ацилнуклеозид-5'-фосфатов // Там же.—1985.—11, № 6.—С. 815—820.
13. Маннатиц Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—479 с.
14. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. Реакционноспособные фосфамиды моно- и динуклеотидов // Биоорг. химия.—1986.—12, № 4.—С. 475—481.
15. Взаимодействие алкилирующих производных олигонуклеотидов с фибробластами мышей / В. В. Власов, О. Е. Горохова, Е. М. Иванова и др. // Биополимеры и клетка.—1986.—2, № 6.—С. 323—327.

Ин-т биоорг. химии Сиб. отделения АН СССР,
Новосибирск

Получено 15.02.88

UPTAKE OF OLIGONUCLEOTIDE ALKYLATING DERIVATIVES BY THE CELLS IN THE PRESENCE OF SUBSTANCES STIMULATING TRANSFECTION

A. S. Boutorin, V. V. Vlassov, E. M. Ivanova, A. S. Ryle,
I. V. Yurchenko, I. G. Shishkina, L. A. Yakubov

Institute of Bioorganic Chemistry,
Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences, Novosibirsk

Summary

The effect of components facilitating transfection on the uptake of the alkylating 4-(N-2-chloroethyl-(N-methylamino)-benzyl 5'-[32 P]phosphamides of oligodeoxyribonucleotides of various length and structure by the L-929 mouse fibroblasts and Krebs-2 ascite carcinoma cells was investigated. Dimethylsulfoxide, DEAE-dextran and polylysine had a little or no effect on the uptake. Substantial effect has been observed when oligonucleotide derivatives were coprecipitated with the cells by calcium chloride from the phosphate buffer. Uptake of the derivatives by cells increased at least by one order of magnitude and the level of nucleic acids specific modification within the cells—by factor of 6.