

З. Ю. Ткачук, А. В. Козлов, Л. В. Ткачук,
Т. И. Филозоф, И. А. Михайлопуло

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПОД ДЕЙСТВИЕМ 2', 5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТОВ

Изучали возможность воздействия некоторых «коровых» 2',5'-олигоаденилатов на структуру нуклеиновых кислот как в культуре клеток, так и *in vitro*. С помощью фермента *S1*-нуклеазы было показано, что данные соединения могут индуцировать появление односпиральных участков в структуре нуклеиновых кислот. причем данные эффекты проявляются на фоне низкого проникновения их в клетки.

Введение. 2',5'-олигоаденилаты (2',5'-А) являются особыми соединениями, участвующими в реализации противовирусного действия интерферона.

Олигоаденилаты в очень низкой концентрации активируют латентную РНКазу *L*, которая, в свою очередь, гидролизует вирусные и клеточные мРНК, рРНК. Тем самым 2',5'-А реализуют противовирусные и антимиотогенные свойства [1], которыми обладают только фосфорилированные олигоаденилаты, поскольку для активации нуклеазы необходимо наличие, как минимум, одной фосфатной группы [2]. В дальнейшем, подвергаясь действию фосфатаз, 2',5'-А превращаются в дефосфорилированные или «коровые» формы. В конечном итоге 2',5'-А гидролизуется фосфодиэстеразой до мономерных продуктов — АМФ и аденозина [3]. Механизм действия 2',5'-А через активацию РНКазы *L* справедлив только для фосфорилированных соединений. В то же время известно, что и «коровым» 2',5'-А присущи антимиотогенные и противовирусные свойства, причем не только по отношению к РНК-, но и к ДНК-содержащим вирусам [4]. Механизм такой активности неизвестен. Было высказано предположение [4] о том, что, проникая в клетки, «коровые» 2',5'-А фосфорилируются и тем самым приобретают способность аффинно связываться и активировать РНКазу *L*. В дальнейшем было продемонстрировано [5], что фосфорилирование коров не происходит и что биологическими свойствами могут обладать продукты ферментативного расщепления 2',5'-А. Но последнее положение не объясняет высокой биологической активности более стабильных химически модифицированных «коровых» 2',5'-А [6].

Ранее [7, 8] мы высказали предположение о том, что «коровые» 2',5'-А могут оказывать прямое действие на структуру нуклеиновых кислот. В данной работе на различных моделях исследовали возможность влияния «коровых» олигоаденилатов на структуру нуклеиновых кислот как *in vitro*, так и на культуре клеток животных.

Материалы и методы. Использовали меченую ^3H -тимидином ДНК фага λ с1857S₇, выделенную из очищенных и концентрированных в градиенте плотности CsCl частиц фага фенольной экстракцией [9]. Синтез 2',5'-олигоаденилатов (таблица) осуществлен, согласно данным [10]. Уровень гидролиза ДНК *S1*-нуклеазой («Calbiochem», США) в присутствии 2',5'-олигонуклеотидов определяли в реакционной смеси, которая содержала 1,2 мкг меченой ДНК, разные концентрации 2',5'-олигонуклеотидов, 15 мкл 0,005 моль/л фосфатного буфера, рН 6,8. Реакционную смесь инкубировали при 37 °С в течение 1 ч, затем вно-

© З. Ю. ТКАЧУК, А. В. КОЗЛОВ, Л. В. ТКАЧУК, Т. И. ФИЛОЗОФ, И. А. МИХАЙЛОПУЛО, 1995

сили 5 мкл нуклеазы *S1* (0,05 ед. акт.) и продолжали инкубацию еще 60 мин. Поскольку при условиях, рекомендованных для работы с нуклеазой *S1* (Na-ацетатный буфер, рН 4,5 и Zn^{2+}), 2',5'-олигоаденилаты не имели статистически достоверного влияния на уровень гидролиза ДНК λ , мы проводили эти исследования в условиях, оптимальных для выявления эффектов 2',5'-олигоаденилатов. Реакцию гидролиза ДНК останавливали, добавляя 5 %-й раствор трихлоруксусной кислоты. Количество 3H -тимидина в негидролизованной ДНК на фильтрах фирмы «Whatman» регистрировали на счетчике «Intertechnique» (Франция).

Связывание 2',5'-олигоаденилата с клетками осуществляли на культуре клеток фибробластов. Предварительно методом тритиевого обмена получали препарат 3H -2',5'-Аз (уд. акт. 19,6 Ки/мМ). В дальнейшем препарат очищали с помощью ВЭЖХ. Клетки фибробластов ($2 \cdot 10^4$ кл/мл) инкубировали в среде 199 без добавления эмбриональной сыворотки с препаратом 3H -2',5'-Аз. Концентрации меченого препарата составляли 10^{-4} и 10^{-6} моль/л. Время инкубации 60—180 мин. После инкубации клетки дважды центрифугировали в среде 199 при 80 000 об/мин без олигоаденилата. Радиоактивность измеряли в сцинтиллаторе для анализа жидких образцов (Optiphase «Hisafe» 11, «LKB», Швеция). Кроме того, определяли радиоактивность и в надосадочной жидкости для установления количества несвязавшегося с клетками препарата.

Клетки фибробластов (*L*-клетки) выращивали на среде 199 с добавлением 10 %-й эмбриональной сыворотки. После образования монослоя клеток в среду вносили препарат олигоаденилата — 2',5'-АрАрА в концентрациях 10^{-4} , 10^{-8} моль/л. Инкубацию с препаратом проводили в течение 16 ч при 37 °С. Перед снятием монослоя клетки синхронизировали [11]. После инкубации клетки снимали с подложки и трижды отмывали средой без сыворотки. Далее клетки центрифугировали и переносили в окрашивающий буфер следующего состава: 0,1 %-й цитрат натрия, 0,1 %-й NaOH, 50 мкг/мл пропидиум иодида, 1 %-й нонидет 40 (NP-40), 0,5 мг/мл РНКазы. В случае, когда анализировали повреждения внутриклеточной ДНК, суспензию клеток инкубировали с *S1*-нуклеазой в концентрации 400 ед/мл. После окраски в течение 1—2 ч клетки анализировали на проточном микрофлюориметре

Гидролиз S1-нуклеазой односпиральных участков ДНК λ , образовавшихся после воздействия 2',5'-олигоаденилатов и их аналогов

2',5'-олигоаденилат	Количество 3H -ДНК и уровень ее гидролиза, %					
	Контроль, 3H -ДНК	3H -ДНК+S1, 0,05 ед. акт.	3H -ДНК после гидролиза <i>S1</i> (0,05 ед. акт.) при наличии разных концентраций 2', 5'-Ап			
			10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
2',5'-Аз	1278 ± 89,0	1264 ± 104	775 ± 28, <i>td</i> = 5,3, 39 %	846 ± 99, <i>td</i> = 3,2, 33,1 %	826 ± 26, <i>td</i> = 4,9, 34,7 %	989 ± 64, <i>td</i> = 2,6, 21,8 %
2',5'-А2	—	—	930 ± 56, <i>td</i> = 3,7, 26 %	1113 ± 45	1197 ± 26	1192 ± 19
2',5'-А4	—	—	1069 ± 35	941 ± 24, <i>td</i> = 4,4, 25 %	1126 ± 73	1089 ± 43
3'-дезоксидезозин А1	1024 ± 78	1048 ± 78	1266 ± 31	—	1467 ± 88	1375 ± 77
2',5'-3' dAz	—	—	926 ± 53, <i>td</i> = 1,0, 11,6 %	1076 ± 75	928 ± 59, <i>td</i> = 1,0, 11,5 %	897 ± 66, <i>td</i> = 1,48, 15 %
2',5'-А2G	1254 ± 63	1221 ± 61	953 ± 49, <i>td</i> = 3,4, 22 %	1252 ± 105	1195 ± 91	991 ± 35 <i>td</i> = 3,2

FACS-4 («Becton Dickinson») и строили гистограммы интенсивности флюоресценции.

Результаты и обсуждение. Показано, что при низкой ионной силе в нейтральной среде в зоне 0,01—0,5 ед. акт. нуклеазы *S1* существует линейная зависимость между скоростью гидролиза денатурированной ДНК фага λ и концентрацией фермента. В концентрации 0,05 ед. акт. фермент обеспечивает гидролиз до 50 % денатурированной ДНК и не расщепляет нативную ДНК.

Предварительно оценивали ингибирующее действие олигоаденилата на *S1*-нуклеазу.

Влияние 2',5'-Аз на уровень гидролиза ДНК фага λ нуклеазой *S1* изучали в концентрациях 10^{-3} — 10^{-6} моль/л. Показано, что в концентрации 10^{-6} моль/л 2',5'-Аз на 90 % ингибирует активность нуклеазы *S1* в концентрации 0,01 ед. акт. В более высоких концентрациях (0,03 и 0,05 ед. акт.) активность *S1*-нуклеазы в аналогичных условиях ингибировалась соответственно на 33 и 24 %. Увеличение концентрации 2',5'-Аз с 10^{-4} до 10^{-3} моль/л сопровождалось усилением степени гидролиза денатурированной ДНК с 37 до 67 % соответственно для 0,01 и 0,03 ед. акт. Однако 2',5'-Аз ингибирует расщепление плавленной ДНК нуклеазой *S1* в концентрации 0,05 ед. акт.

Таким образом, результаты изучения влияния 2',5'-Аз на степень гидролиза денатурированной ДНК нуклеазой *S1* в условиях линейной скорости реакции свидетельствуют о достаточно сложной картине этого процесса. Вероятно, последнее объясняется тем, что 2',5'-Аз воздействует не только на фермент, но и на вторичную структуру ДНК.

Предположение о способности 2',5'-Аз влиять на вторичную структуру ДНК мы проверили на модели нативной ДНК, которую обрабатывали различными концентрациями 2',5'-Аз, а затем гидролизовали нуклеазой *S1* в концентрации 0,05 ед. акт., при которой наблюдалось ингибирование уровня гидролиза денатурированной ДНК.

Показано, что инкубация 2',5'-Аз с нативной меченой ^3H -тимидином ДНК фага λ (0,005 моль/л Na-фосфатный буфер, pH 6,8) приводит к образованию многочисленных доступных для гидролиза нуклеазой *S1* односпиральных участков ДНК λ (см. таблицу). Степень гидролиза зависит от концентрации 2',5'-Аз. В рамках исследованных концентраций 2',5'-олигоаденилат стимулирует образование от 21,8 до 39 % кислоторастворимого продукта (см. таблицу).

Формированию односпиральных участков при взаимодействии с ДНК способствуют только олигонуклеотиды, поскольку 3'-дезоксиаденозин, служащий контролем, не вызывал образования доступных для нуклеазы *S1* односпиральных участков ДНК (см. таблицу).

Двух- и четырехчленные 2',5'-олигонуклеотиды усиливали гидролиз нативной ДНК нуклеазой *S1*. Однако их активность проявлялась только в очень высокой концентрации — 10^{-3} моль/л 2',5'-АрА и 2',5'-АрАрАрА, при которой были получены соответственно 26 и 25 % кислоторастворимого продукта (см. таблицу).

Таким образом, оптимальным взаимодействием с ДНК характеризуется трехчленный 2',5'-олигоаденилат. Уменьшение или увеличение количества членов сильно уменьшает способность 2',5'-олигоаденилата влиять на вторичную структуру нативной ДНК. Известно, что в живых клетках 2',5'-Аз быстро расщепляется фосфодиэстеразами, а их аналоги проявляют определенную стойкость к расщеплению.

Представляет интерес изучение влияния подобных изменений конфигурации аналогов 2',5'-Аз на их способность взаимодействовать с молекулой меченой ДНК фага λ на примере 2',5'-3'dAz. В результате модификации в исследованных аналогах 2',5'-Аз структура рибозной части молекулы изменяется, что влияет на их пространственную конфигурацию.

Показано, что модификация рибозной части молекулы 2',5'-Аз значительно изменяет способность аналога влиять на вторичную структуру ДНК. Статистически достоверное увеличение степени гидролиза

ДНК фага λ (15 %) было получено только при взаимодействии 2',5'-3'dAz в концентрации 10^{-6} моль/л. Замена аденина гуанином в третьем члене молекулы также понижает активность этого соединения по отношению к ДНК (см. таблицу).

На рис. 1 представлены данные по связыванию ^3H -2',5'-Az с клетками фибробластов. Показано, что связывание носит концентрационный характер. Кроме того, оно зависит и от времени инкубации. Так, максимальное связывание наблюдается только при инкубации в течение 60 мин (рис. 1), увеличение же времени инкубации до 280 мин вызывает снижение связывания с клетками, составляющее только 18—20 % от величины, регистрируемой при часовой инкубации. По-видимому, это обусловлено ферментативным гидролизом препарата ^3H -2',5'-Az. Анализ несвязавшегося материала (^3H -2',5'-Az) в надосадочной жид-

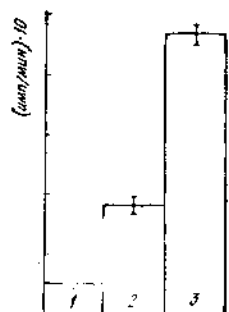


Рис. 1. Связывание ^3H -2',5'-Az с клетками фибробластов: 1 — контроль ($506,7 \pm 8,5$); 2 — 2',5'-Az, $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л ($1796,5 \pm 47,5$); 3 — 2',5'-Az, $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л ($4698 \pm 30,6$)

кости показал, что с клетками связывается только 2—4 % олигодезилатов от их общего количества, внесенного в клеточную суспензию. Это подтверждает данные об очень низком проникновении «коровых» 2',5'-A

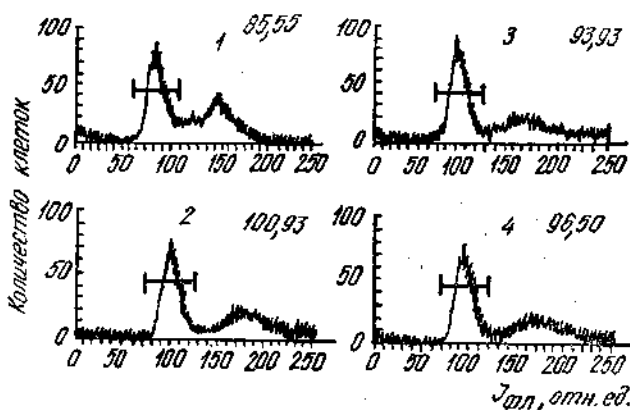


Рис. 2. Гистограмма распределения интенсивности флуоресценции клеток с пропидиум иодидом после инкубации клеток с 2',5'-ArArA: 1 — контроль; 2 — 2',5'-ArArA — 10^{-3} моль/л; 3 — 2',5'-ArArA — 10^{-5} моль/л; 4 — 2',5'-ArArA — 10^{-8} моль/л

в клетки. Но в то же время даже такие низкие концентрации обладают довольно выраженным биологическим эффектом как *in vitro*, так и *in vivo* [12].

Возможность влияния экзогенных 2',5'-ArArA на структуру внутриклеточной ДНК изучали на модели культуры клеток. Об изменении структуры ДНК судили по изменению интенсивности флуоресценции зонда пропидиум иодида. Данный зонд интеркалирует между парами оснований ДНК, и модификации во вторичной структуре приводят к изменению квантового выхода флуоресценции.

Вначале анализировали общую флуоресценцию клеток после инкубации их с 2',5'-ArArA. Было показано, что при концентрации 2',5'-ArArA 10^{-3} моль/л интенсивность флуоресценции увеличивается на 20 % по сравнению с контролем, тогда как при более низких концентрациях (10^{-6} и 10^{-8} моль/л) интенсивность флуоресценции практически не изменяется (рис. 2).

Следовательно, при определенных концентрациях 2',5'-ArArA происходят изменения в структуре внутриклеточной ДНК, при которых увеличивается число сайтов связывания для молекул пропидиум иодида.

Для выявления возможности повреждения внутриклеточной ДНК клетки обрабатывали *S1* нуклеазой. Данный фермент гидролизует только одноцепочечные участки ДНК. Было показано, что в случае инкубации клеток интенсивность их флюоресценции резко снижается (рис. 3). Так, при концентрации 2',5'-АрАрА 10^{-3} моль/л общая интенсивность флюоресценции составляет 36 %, а при концентрации

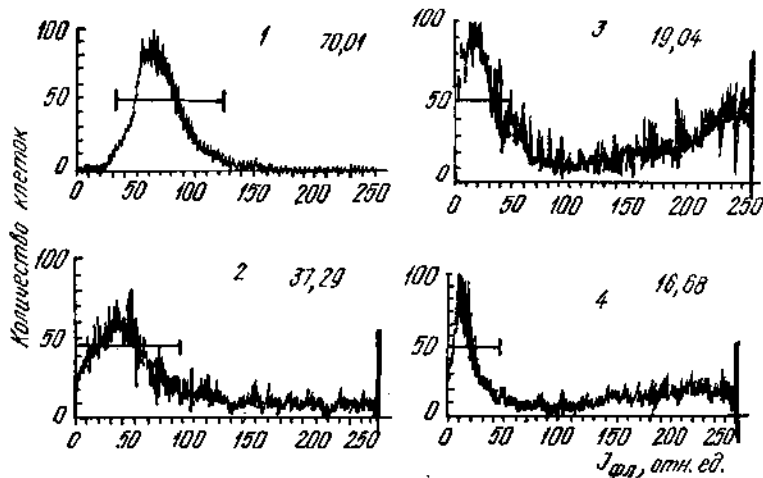


Рис. 3. Гистограмма распределения интенсивности флюоресценции клеток с пропидиум иодидом после инкубации клеток с 2', 5'-АрАрА и последующей обработкой их *S1*-нуклеазой (см. «Материалы и методы»): 1 — контроль; 2 — 2', 5'-АрАрА — 10^{-3} моль/л; 3 — 2', 5'-АрАрА — 10^{-5} моль/л; 4 — 2', 5'-АрАрА — 10^{-8} моль/л

10^{-5} моль/л — 27 % от контрольного уровня. При концентрациях 10^{-6} и 10^{-8} моль/л изменений в интенсивности флюоресценции не обнаружено.

Поскольку субстратом для *S1*-нуклеазы являются односпиральные участки в ДНК, то можно предположить, что одной из мишеней действия 2',5'-А в клетках могут быть и нуклеиновые кислоты.

Исходя из приведенные выше результатов, полученных в экспериментах на модели *S1*-нуклеаза — выделенная и внутриклеточная ДНК, можно предположить, что антимиотогенное и противовирусное действие (в том числе и для ДНК-содержащих вирусов) может быть связано с непосредственным воздействием на нуклеиновые кислоты без активации РНКазы *L*.

Косвенно это подтверждается в экспериментах [12], где было показано, что интерферон (а 2',5'-А является медиатором интерферона) при некоторых концентрациях вызывает повреждение ДНК в клетках [13].

Следовательно, в экспериментах как с выделенной ДНК, так и на культуре клеток показано, что 2',5'-олигоаденилаты могут влиять на структуру нуклеиновой кислоты, в результате чего и способны проявиться антимиотогенные свойства препарата. Причем данные эффекты наблюдаются даже при относительно низком проникновении их в клетки.

З. Ю. Ткачук, О. В. Козлов, Л. В. Ткачук, Т. І. Філозов, І. О. Михайлопуло

ВИЗНАЧЕННЯ СТРУКТУРНИХ ЗМІН НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ ПІД ДІЄЮ 2',5'-ОЛІГОАДЕНІЛАТІВ

Резюме

Вивчали можливість дії деяких «скорових» 2',5'-олігоаденилатів на структуру нуклеїнових кислот як в культурі клітин, так і *in vitro*. З використанням ферменту *S1*-нуклеази було показано, що згадані сполуки можуть індукувати появу односпіральних ділянок у структурі нуклеїнових кислот, причому дані ефекти спостерігаються на фоні дуже низького проникнення їх до клітин.

DETECTION OF STRUCTURAL CHANGES OF NUCLEIC ACIDS
UNDER THE ACTION OF 2',5'-OLIGOADENYLATES

Summary

The possibility of certain core 2',5'-oligoadenylates effect on the structure of nucleic acids was studied in cell culture *in vitro*. These compounds were shown to induce single-helical regions rise in the structure of nucleic acids using *S1* nuclease enzyme. These effects are accompanied by their low penetration into the cells.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johnston M. I., Torrence P. E. The role of interferon-induced proteins, double-stranded RNA and 2',5'-oligoadenylate in the interferon-mediated inhibition of viral translation // *Interferon: mechanisms of production and action*.— Amsterdam: Elsevier Sci. Publ. Co., 1984.— Vol. 3.— P. 189—298.
2. Torrence P. F., Brozda D., Alster D. et al. Only one 5'-hydroxyl group of ppp5'A2'p5'A2'p3'A(2—5A) is required for activation of the 2—5A dependent endonuclease // *J. Biol. Chem.*—1988.—263, N 3.— P. 1131—1139.
3. Козлов О. В., Ткачук З. Ю., Король Л. С. Вивчення гідролізу і продуктів розщеплення «кору» 2',5'-олігоаденілату // *Укр. біохім. журн.*—1993.—65, № 2.— С. 35—42.
4. Eppstein D. A., Schryver B. B., Marcsh Y. V. et al. Dephosphorylated core of 2'—5'-oligoadenylate exerts its antimitogenic effect through mechanisms different from the 2'—5' A-dependent endonuclease // *J. Interferon Res.*—1983.—3, N 3.— P. 305—311.
5. Suchadolnik R. J., Doeson P. W., Devash G. 2'—5' adenylyate cordycepin trimer cores metabolic stability and evidence for antimitogenesis without 5-rephosphorylation // *Nucleosides and Nucleotides*.—1983.—2, N 4.— P. 351—356.
6. Pauwels R., DeClerq E., Balzarini I. Biological activity of new 2—5A analogues // *Chemica Scripta*.—1986.—26, N 1.— P. 141—145.
7. Ткачук З. Ю., Козлов А. В., Гасан А. И. и др. Влияние (2'—5')-олигоаденилатов на структуру полинуклеотидов // *Докл. АН УССР. Б.*—1990.—№ 6.— С. 81—84.
8. Ткачук З. Ю., Ткачук Л. В., Мацука Г. Х. Розщеплення синтетичних полінуклеотидів під впливом «кору» (2'—5')олигоаденілату // *Доп. АН України*.—1993.—№ 4.— С. 154—160.
9. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.— М.: Мир, 1976.— 307 с.
10. Квасюк Е. И., Кудак Т. И., Калиниченко Е. Н. и др. Химический синтез (2'—5')олигонуклеотидов, аналогов (2'—5')олигоаденилатовой кислоты // *Биоорг. химия*.—1985.—11, № 9.— С. 1227—1238.
11. Roti J. L., Wright W. D., Higashikubo R., Dethlefsen L. A. DNase I sensitivity of nuclear DNA measured by flow cytometry // *Cytometry*.—1985.—6.— P. 101—108.
12. Meurs E., Krause D., Robert N., Silverman R. H. The 2—5A system in control and interferon-treated K/Balb cells infected with encephalomyocarditis virus // *The 2—5A system: molecular and clinical aspects of the interferon-regulated pathway*.— New York: Liss, 1985.— P. 21—22.
13. Suchadolnik R. J., Sawada Y., Gabriel J. Accumulation of low molecular weight DNA and changes in chromatin structure in HeLa cells treated with human fibroblast interferon // *J. Biol. Chem.*—1984.—259, N 8.— P. 4764—4769.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
НАН Украины, Киев
Ин-т биоорг. химии АН Беларуси, Минск

Получено 25.07.94