

**АНТИСЕНСНІ ОЛІГОНУКЛЕОТИДИ – МОЖЛИВІ ЗАСОБИ
ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ПРИОННИХ ІНФЕКЦІЙ**

*В. В. СТАДНИК¹, Л. А. ІЗЮМОВА¹, Ю. А. РЖЕПЕЦЬКИЙ²,
Х. Я. МАЙОР¹, П. І. ВЕРБИЦЬКИЙ¹, В. В. ВЛІЗЛО¹*

¹Інститут біології тварин УААН, Львів, Україна;

²Інститут біології клітини НАН України, Львів;

e-mail: stadnyk@inenbiol.com.ua

Вивчали in vitro та in vivo вплив інкорпорованих у катіонні імуноліпосоми антисенсних олігодезоксирибонуклеотидів (асОДН) на вміст клітинного пріона PrP^C. Показано, що асОДН, які комплементарні до кеп-ділянки, зони стартового кодону та середини відкритої рамки зчитування мРНК PrP^C, здатні знижувати на 80% його вміст у клітинах лінії L1210. Найефективнішими в цьому аспекті виявилися асОДН, комплементарні до кеп-ділянки та відкритої рамки зчитування. Дослідження, проведені in vivo, свідчать, що асОДН зменшують на 60% рівень досліджуваного протеїну в периферичних органах пріонреплікаційної системи щурів, не впливаючи на нього в мозку. Одержані нами результати є підставою для подальших досліджень асОДН з метою використання їх як засобу для профілактики та лікування пріонних інфекцій.

Ключові слова: клітинний пріон, антисенсні олігодезоксинуклеотиди, імуноліпосоми, профілактика пріонних інфекцій.

Пріонні захворювання або трансмісивні спонгіформні енцефалопатії – це фатальні нейродегенеративні хвороби у людини і тварин. Спричинює їх патологічний пріон (PrP^{Sc}) – конформаційно відмінна форма від непатологічного клітинного пріона (PrP^C) [1]. PrP^{Sc} здатен взаємодіяти із PrP^C, зумовлюючи його перетворення на інфекційний, що і є вирішальним чинником у патогенезі пріонних захворювань [2]. На сьогодні ще не створено ефективних засобів лікування таких хворих. Головна стратегія досліджень у цьому напрямі – блокування утворення нових молекул PrP^{Sc} [3], для чого застосовують низку підходів: зниження вмісту у тканинах PrP^C [4], уповільнення його конверсії в патологічний [5] та прискорення деградації останнього [6].

З метою зниження рівня PrP^C у тканинах були спроби використання багатьох сполук, зокрема таких, як сульфат декстрану [7] і полісульфат пентосану [8]; похідні холестеролу [9] та малі інтерферуючі РНК (siRNA) [10]. Також відомі дані щодо істотного впливу модифікованих олігонуклеотидів на пріони. Встановлено, що неспецифічні фосфотіоатмодифіковані олігонуклеотиди (завдяки понад 12–18 нуклеотидів) знижують вміст обох форм пріону у клітинах і подовжують тривалість життя інфікованих тварин [11,12]. Також встановлено, що зазначена модифікація олігодезоксинуклеотидів (ОДН) значно ефективніша, ніж 2'-О-ме-

тилювання [11]. Дію ОДН обумовлено взаємодією з молекулами PrP^C на поверхні клітини [11]. Крім неспецифічних ОДН, досить висока ефективність притаманна CpG ОДН, введення яких тваринам подовжує інкубаційний період захворювання [11]. Водночас ми не виявили в літературі даних стосовно застосування антисенсних ОДН (асОДН) для зниження вмісту PrP^C у клітинах.

За структурою асОДН – це одноланцюгові синтетичні молекули ДНК, завдовжки у 12–35 нуклеотидів, які комплементарні до певних ділянок мРНК. АсОДН здатні модулювати експресію генів шляхом утворення гетеродуплексів із мРНК, внаслідок чого відбувається стеричне блокування трансляції та деградація мРНК, опосередковану РНК-азою H [13]. Такий підхід значно ефективніший порівняно із застосуванням неспецифічних ОДН, оскільки уможливорює вплив на мРНК, кількість копій якої на клітину значно менша порівняно з PrP^C. Саме тому для зниження вмісту клітинного пріона ми вважали доцільним з'ясувати особливості цілеспрямованого транспортування асОДН до мРНК гена пріона тих органів і тканин, клітини яких експресують PrP^C.

Матеріали і методи

В експериментах використовували холестерол, фосфатидилхолін, стеариламін, N-гідроксисукцинімідний ефір пальміти-

нової кислоти, деоксихолат натрію (DOX), хемілюмінесцентний субстрат лужної фосфатази (CDP-Star; Sigma-Aldrich, Німеччина). Антитіла SAF-84 (Cayman Chemical, США) і 6H4 (Prionics GmbH, Швейцарія); асОДН (AlphaDNA, Канада); фетальну бичачу сироватку (ФБС) та модифіковане Дюльбекко середовище Ігла (РАА, ДМЕМ; Австрія).

Для створення структурної моделі (дизайну) молекули асОДН використовували спеціальний алгоритм, який включає аналіз вторинної структури мРНК із використанням програми mfold (version 2.0; Macfarlane Burnet Centre, Melbourne, Australia, <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1-2.3.cgi>) та структури асОДН із застосуванням програми GeneRunner (version 3.05; Hastings Software Inc.). Було відібрано 3 послідовності асОДН до мРНК пріону: 5'-TCT GCT GCT CTG ACA ACG C-3' – комплементарного до її кеп-ділянки, 5'-AGT AGC CAA GGT TCG CCA T-3' – комплементарного до стартового кодону та 5'-ATG CTT GAG GTT GGT T-3' – комплементарного до частини відкритої рамки зчитування (ORF).

Приготування ліпосом. Ліпіди – фосфатидилхолін, холестерол і стеариламін (співвідношення 8 : 7 : 1) – розчиняли в 5–10 мл суміші хлороформ–метанол (1 : 1). Розчин випарювали під струменем інертного газу, а висушені ліпіди залишали впродовж ночі у вакуумі. Потім до ліпідів додавали буфер, що містив 10 мМ ацетату натрію, 150 мМ натрію хлориду та 0,5 мг/мл ОДН (рН 4,5). Після 5-хвилинного оброблення ультразвуком одержану суспензію ліпосом з ОДН десятикратно заморожували (-20 °С) протягом 2–3 хв та відтаювали (1–2 хв) при 40 °С.

Пальмітування антитіл. До 100 мкл розчину антитіл SAF-84, який містив 20 мкг IgG, додавали 1 мкл N-гідроксисукцинімідного ефіру пальмітинової кислоти та 20%-ї ДОХ до кінцевої концентрації 2%. Суміш інкубували 9–15 год при 37 °С.

Одержання імуноліпосом та дослідження їхніх властивостей. До 1 мл розчину ліпосом додавали 120 мкл модифікованих антитіл і 27 мкл 20%-го ДОХ. Суміш упродовж 40 год діалізували при кімнатній температурі проти 3 л забуференого фізіологічного розчину, замінюючи його тричі.

Розмір імуноліпосом визначали методом динамічного світлорозсіювання, використовуючи як джерело світла твердофазний лазер із довжиною хвилі $\lambda = 420$ та 620 нм. Діаметр ліпосом обчислювали, застосовуючи рівняння Стокса–Ейнштейна.

Оброблення клітин асОДН. Клітини лінії L1210 культивували при 37 °С в 4-сантиметрових чашках Петрі у середовищі ДМЕМ, що містило 10% ФБС та 5% CO₂, до досягнення 40–50% конфлюенту. До чашок додавали асОДН до концентрації 10 мкМ. Після 4-годинної інкубації клітини відмивали від середовища і лізували в буфері для лізису, який містив 10 мМ трис-НСІ (рН 7,5), 150 мМ NaCl, 5 мМ ЕДТА, 50 мМ NaF, 1% тритону X-100, 1 мМ ортованадату натрію, 10 мкг/мл лейпептину, 8 мкг/мл апротиніну, 1 мкг/мл пепстатину, 5 мМ бензамідину та 1 мМ фенілметилсульфонілфториду.

Імуноблот-аналіз. У лізатах методом Лоурі вимірювали концентрацію протеїну. До аліквоти надосадової рідини додавали однаковий за об'ємом буфер Леммлі (Sigma, Німеччина). Зразки протягом 5 хв прогрівали при 95 °С, після чого протеїни фракціонували методом електрофорезу в 5–18%-у градієнтному поліакриламідному гелі та приводили електроблотинг їх на PVDF-мембрану (Millipore, США). Для контролю перенесення і визначення відносної молекулярної маси протеїнів використовували набір маркерів SeaBlue Plus2 (Invitrogen, США). Після електроблотингу мембрану протягом 60 хв блокували, інкубуючи її у 5%-у знежиреному молоці, розведеного забуференим фізіологічним розчином, до якого додавали 0,01%-й твін-20 (ЗФРТ). Оброблені у такий спосіб мембрани 90 хв інкубували з моноклональними анти-PrP-антитілами 6H4 (Prionics, Швейцарія) у ЗФРТ (співвідношення – 1 : 2000) та 30 хв із поліклональними козячими антимишачими антитілами, кон'югованими з лужною фосфатазою (Sigma, США) у ЗФРТ (співвідношення – 1 : 5000). Детекцію імунних комплексів здійснювали з використанням комерційного розчину субстрату для лужної фосфатази – CDP-Star (Tropix, Велика Британія). Для візуалізації застосовували рентгенівську плівку ECL HyperFilm (Amersham, США) та набір реактивів, якими їх проявляли (Kodak). Кількість нанесеного матеріалу контролювали, здійснюючи блотинг мембрани з антитілами до β -актину, імунні комплекси детектували як описано вище.

Результати та обговорення

Застосування методу заморожування–відтаювання зразків уможливило отримання мультиламелярних ліпосом із приєднаними до їхньої поверхні антипріоновими антитілами (рис. 1, А). Використовуючи метод динамічного світлорозсіювання, ми виявили, що уяв-

ний гідродинамічний діаметр досліджуваних катіонних ліпосом становить 420 нм (рис. 1). Такий діаметр цих структур був прийнятним, оскільки розміри досліджуваних клітин (спленоцитів та епітеліальних клітин тонкого кишечника), на порядок перевищували імуноліпосоми.

При інкубації клітин L1210 з асОДН, інкорпорованих в імуноліпосомах, було встановлено, що всі три досліджувані послідовності нуклеотидів сприяють зменшенню вмісту PrP^C (рис. 2), а також зниженню рівня його експресії в середньому на 80% ($P < 0,05$). Однак, як впливає з рис. 2, асОДН, комплементарний до ділянки стартового кодону мРНК PrP^C, виявився менш активним щодо експресії PrP^C, інгібуючи її лише на 60–70% ($P < 0,01$) порівняно із двома іншими послідовностями, ефект яких становить 75–90% ($P < 0,01$).

Вестерн-блотинг експресії PrP^C після введення щурам інкорпорованих у катіонні імуноліпосоми асОДН (1 ммоль/мг живої маси) свідчить, що всі досліджувані асОДН не впливають на рівень експресії PrP^C у головному мозку тварин (рис. 3, А). У селезінці ефективними виявилися асОДН до ділянок стартового кодону та кепу мРНК PrP^C, які знижували рівень експресії досліджуваного протеїну майже на 60–80% ($P < 0,01$), тоді як асОДН до ділянки ORF мРНК PrP^C зумовлює лише тенденцію до пригнічення експресії останнього (рис. 3, Б). У тонкому кишечнику після введення тваринам асОДН спостерігається пригнічення експресії PrP^C, причому всі 3 сполуки вірогідно зменшують його вміст на 50–80% (рис. 3, В). Але в кишечнику, на відміну від експресії цього пріона в селезінці, найістотніший вплив має олігонуклеотид, комплементарний до ORF мРНК PrP^C. При цьому слід відзначити, що асОДН, комплементарний до ділянки старто-

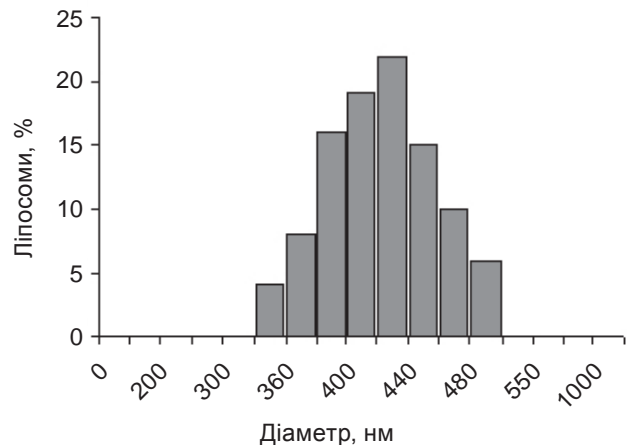


Рис. 1. Розподіл катіонних ліпосом за розмірами

вого кодону мРНК PrP^C, який найсильніше інгібує трансляцію мРНК у селезінці, у тонкому кишечнику виявляється найменш ефективним (рис. 2).

Застосування специфічних асОДН для лікування багатьох захворювань у людини і тварин надзвичайно перспективне. Про це свідчать роботи, присвячені використанню їх в терапії раку [15], рестенозу [16], цитомегаловірусної інфекції у хворих на СНІД [17] тощо. Що стосується пріонних інфекцій, то в опублікованих роботах лише описано неспецифічний вплив вироджених послідовностей асОДН [11], дія яких, імовірно, подібна до сульфатованих поліаніонів. Водночас спроб цілеспрямованого впливу асОДН на мРНК PrP^C в літературі нами не виявлено. Доведено, що за відсутності PrP^C спостерігається резистентність тварин до пріонних інфекцій [18]. Однак зрозуміло, що для лікування людини застосування методу «нокауту» генів неможливе. Саме тому на сьогодні актуальними є дослідження, які спрямо-

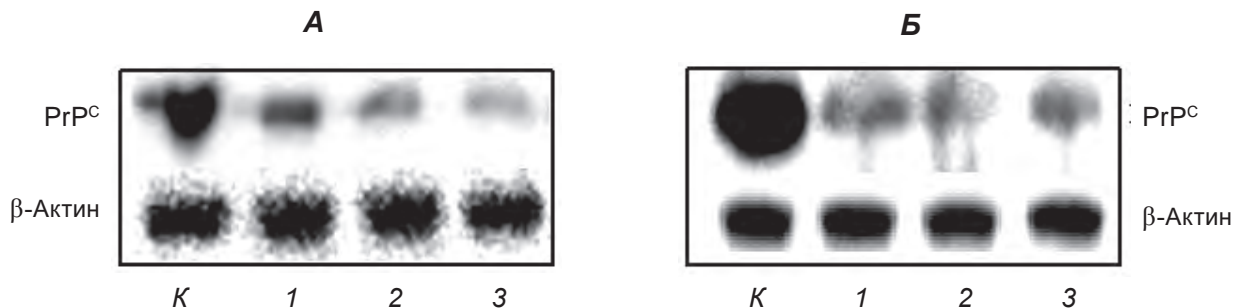


Рис. 2. Вплив асОДН на експресію PrP^C у клітинах L1210: А – лізати клітин, одержані в стандартному буфері лізису; Б – лізати клітин, одержані в стандартному буфері лізису з додаванням до нього 1%-го NP-40 та 1%-го ДОХ. Позначення: К – контроль; 1–3 – асОДН, комплементарні до ділянки стартового кодону мРНК гена Prnp, до кеп-ділянки та відкритої рамки зчитування (ORF) відповідно

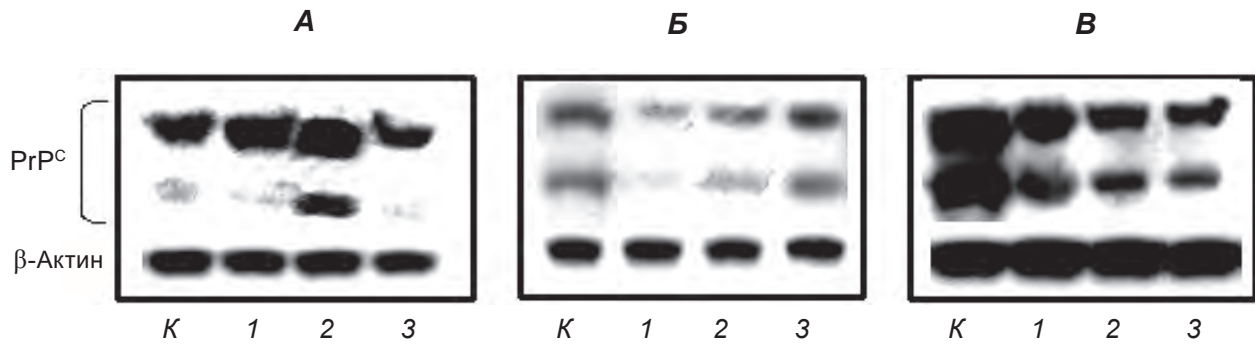


Рис. 3. Вплив асОДН на експресію PrP^C в органах пріонреплікувальної системи щурів: А – мозок, Б – селезінка, В – тонкий кишечник. К – контроль; 1 – 3 – асОДН, які комплементарні до ділянки стартового кодону мРНК гену Prnp, до його кеп-ділянки та відкритої рамки зчитування (ORF) відповідно

вано на зниження рівня експресії PrP^C іншими методами.

У наших експериментах для транспортування асОДН до клітин було застосовано катіонні ліпосоми, що обумовлено високою здатністю їх порівняно з іншими типами носіїв до комплексоутворення з нуклеїновими кислотами. Для зменшення рівня неспецифічного зв'язування асОДН і посилення цілеспрямованого ми приєднали моноклональні антипріонові антитіла, щоб забезпечити асоціацію та злиття імуноліпосом з тими клітинами, на поверхні яких містяться молекули PrP^C. Наші дослідження свідчать про високу ефективність асОДН для зниження *in vitro* експресії PrP^C у клітинах лінії L1210. Досить позитивні результати ми отримали також в експериментах, проведених *in vivo*, хоча і дещо несподівані. Так, у однакових асОДН, комплементарних до ділянок стартового кодону та ORF мРНК PrP^C, у селезінці та в тонкому кишечнику виявлено протилежну дію. Конкретно пояснити, чим це обумовлено, наразі неможливо, але такий ефект, імовірно, може спричинюватися неоднаковою здатністю поглинання ліпосом відповідними клітинами, що, у свою чергу, залежить від кількості молекул PrP^C, який є їхнім рецептором. У головному мозку вірогідного зниження рівня експресії PrP^C нами не виявлено, що, очевидно, пов'язано з неможливістю подолання імуноліпосомами гемато-енцефалічного бар'єра. Однак це не є критичним чинником для застосування асОДН у комплексі з імуноліпосомами, оскільки відомо, що на початкових стадіях захворювання відбувається істотне накопичення PrP^{Sc} в периферичних органах пріонреплікувальної системи, передусім у селезінці та тонкому кишечнику [19,20].

Отже, наведені дані свідчать, що нами вперше виявлено зниження експресії клітинного пріона за дії асОДН, яке відкриває потенційну можливість використання асОДН для профілактики та терапії пріонних інфекцій у людей та тварин.

Автори висловлюють подяку доц. О. Заїченку та канд. хім. наук Н. Мітіній Національного університету «Львівська політехніка» за допомогу, надану при вимірюванні розмірів ліпосом. Роботу було підтримано грантом WUBMRC (West-Ukrainian Biomedical Research Center).

АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ – ВОЗМОЖНЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ПРИОННЫХ ИНФЕКЦИЙ

В. В. Стадник¹, Л. А. Изюмова¹,
Ю. А. Ржепецкий², Х. Я. Майор¹,
П. И. Вербицкий¹, В. В. Влизло¹

¹Институт биологии животных
УААН, Львов, Украина;

²Институт биологии клетки НАН Украины, Львов;
e-mail: stadnyk@inenbiol.com.ua

Исучено влияние антисмысловых олигодезоксирибонуклеотидов (асОДН), инкорпорированных в катионные иммунолипосомы, на экспрессию физиологического приона *in vitro* и *in vivo*. Было показано, что асОДН, комплементарные к кэп-зоне, зоне стартового кодона и середине открытой рамки считывания мРНК клеточного приона (PrP^C), снижают его экспрессию на 80% в клетках линии L1210 и на 60% в пріонреплицирующих органах крыс. Данные результаты свидетельствуют о перс-

пективності досліджень асОДН з метою використання їх в якості засобів профілактики і лікування прионних інфекцій.

Ключеві слова: клітинний прион, антисмыслові олигодезоксинуклеотиди, іммуноліпосоми, профілактика прионних захворювань.

ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES AS POTENTIAL DRUGS FOR PROPHYLAXIS OF PRION INFECTIONS

V. V. Stadnyk¹, L. A. Izyumova¹,
Yu. A. Rzhеpeckyy², Ch. Ya. Mayor¹,
P. I. Verbitskyi¹, V. V. Vlizlo¹

¹Institute of Animal Biology Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Lviv, Ukraine;

²Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv;
e-mail: stadnyk@inenbiol.com.ua

S u m m a r y

Prion mRNA translation inhibition by antisense oligodeoxynucleotides (asODN) incorporated into immunoliposomes was investigated. It was shown that asODN complementary to cap region, start-codon region and a part of open reading frame can decrease the prion expression by 80% in L1210 cell line and by 60% in prion-replicating organs of laboratory rats. These results give grounds for further research asODN to be used as a means of prevention and treatment of prion infections.

Key words: cellular prion, antisense oligodeoxynucleotides, immunoliposomes, prion infections prevention.

1. Bolton D. C., Bendheim P. E., Marmorstein A. D. et al. // Arch. Biochem. Biophys. – 1987. – **258**. – P. 579–590.
2. Oesch B., Westaway D., Walchli M. et al. // Cell. – 1985. – **40**. – P. 735–746.

3. Stewart L. A., Rydzewska L. H., Keogh G. F. et al. // Neurology. – 2008. – **70**. – P. 1272–1281.
4. Nicoll A. J., Collinge J. // Infect. Disord. Drug Targets. – 2009. – **9**. – P. 48–57.
5. Prior M., Lehmann S., Sy M.S. et al. // J. Virol. – 2007. – **81**. – P. 1195–11207.
6. Park S. J., Kim N. H., Jeong B. H. et al. // Brain Res. – 2008. – **31**. – P. 172–180.
7. Caughey B., Raymond G. J. // J. Virol. – 1993. – **67**. – P. 643–650.
8. Влізло В. В., Стадник В. В., Майор Х. Я. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**. – С. 33–39.
9. Gilch S., Nunziante M., Ertmer A. et al. // Vet. Microbiol. – 2007. – **123**. – P. 377–386.
10. White M. D., Farmer M., Mirabile I. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – **105**. – P. 10238–10243.
11. Kocisko D. A., Vaillant A., Lee K. S. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – **50**. – P. 1034–1044.
12. Karpuj M. V., Giles K., Gelibter-Niv S. et al. // Mol. Med. – 2007. – **13**. – P. 190–198.
13. Sahu N. K., Shilakari G., Nayak A. et al. // Curr. Pharm. Biotechnol. – 2007. – **5**. – P. 291–304.
14. Takahashi M., Inafuku K., Miyagi T. et al. // J. Oleo Sci. – 2006. – **56**. – P. 35–42.
15. Gewirtz A. M. // Anti-Cancer Drug Des. – 1997. – **12**. – P. 341–358.
16. Lee M., Simon A. D., Stein C. A. et al. // Antisense Nucl. Acid Drug Dev. – 1999. – **9**. – P. 487–492.
17. Grillone L. R., Lanz R. // Drugs Today. – 2001. – **37**. – P. 245–255.
18. Weissmann C., Flechsig E. // Br. Med. Bull. – 2003. – **66**. – P. 43–60.
19. Andréoletti O., Berthon P., Marc D. et al. // J. Gen. Virol. – 2000. – **81**. – P. 3115–3126.
20. Beringue V., Demoy M., Lasmézas C. I. et al. // J. Pathol. – 2000. – **190**. – P. 495–502.

Отримано 09.06.2009