

ДОСЛІДЖЕННЯ КОМПЛЕКСІВ АНТИСЕНС-ОЛІГОНУКЛЕОТИДІВ З НОВОСИНТЕЗОВАНИМИ ОЛІГОЕЛЕКТРОЛІТНИМИ НОСІЯМИ НА ОСНОВІ ДМАЕМ

Н. Мікуш^{1*}, В. Влізло¹, Р. Стойка³, О. Заїченко², Д. Остапів¹, І. Петрух¹

¹Інститут біології тварин НААН України
вул. В. Стуса, 38, Львів 79010, Україна
e-mail: natali.mikush@inenbiol.com.ua

²Університет Львівська політехніка
вул. Шептицьких, 3/4, Львів 79010, Україна

³Інститут біології клітини
вул. Драгоманова, 16, Львів 79010, Україна

Пріонні інфекції спричиняються особливою патологічною формою білка пріона (PrP^C), який є у всіх ссавців. Відомо, що організми, які не містять клітинного пріона, є резистентними до розвитку пріонних інфекцій. Вилучення пріона з організму можна досягнути шляхом блокування трансляції його мРНК без втручання у геном організму. Перешкодою до застосування олігонуклеотидів для зменшення вмісту PrP^C у головному мозку є їх непроникивість через гематоенцефалічний бар'єр, тому актуальною проблемою є створення ефективних методів і засобів керованого транспортування олігонуклеотидів у клітини ЦНС. У статті наведено результати досліджень новосинтезованих полімерних носіїв на основі диметиламіноетилметакрилату в комплексі з антисенс-олігонуклеотидами (асОДН). За результатами досліджень підібрано ефективні послідовності асОДН та їх полімерні носії для інгібування експресії фізіологічного пріона у лабораторних тварин. Встановлено, що використання антисенс-терапії з використанням нових носіїв дає змогу зменшити кількість пріона в організмі на певний час, що може бути використане при лікуванні та профілактиці пріонних інфекцій. Також описані результати досліджень цитотоксичних властивостей новосинтезованих катіоноактивних олігоелектролітів та їх вплив на стан систем організму лабораторних шурів.

Ключові слова: пріон, олігонуклеотид, гематоенцефалічний бар'єр, диметиламіноетилметакрилат, експресія генів.

Існує цілий арсенал засобів, які дають змогу ефективно інгібувати біосинтез потрібних білків. Серед них – антисенс-технологія, що полягає у застосуванні специфічних одноланцюгових олігонуклеотидів, які стерично блокують ділянки мРНК та опосередковують її гідроліз [8]. Варто зазначити, що внаслідок деградації нуклеїнової кислоти за дії нуклеаз вільні олігонуклеотиди не проникають крізь клітинну мембрану, що зумовлює серйозні обмеження на їх застосування *in vivo*. Успішність використання антисенс-технології значною мірою залежить від наявності функціональних носіїв, що особливо актуально в сучасній біології, медицині й ветеринарії [9]. Катіонні синтетичні та природні полімери є зручним інструментом для доставки генетичного матеріалу у клітини, оскільки через електростатичні взаємодії вони ефективно зв'язують негативно заряджені молекули ДНК. Таким чином полімери екранують ДНК від дії гідролізуючих ферментів, відтак продовжують час перебування генетичних конструкцій в організмі та полегшують їхнє проникнення всередину клітини. Цікавими є полімери на основі диметиламіноетилметакрилату (ДМАЕМ). Вони містять третинні аміногрупи та суттєво

підвищують ефективність трансфекції клітин ссавців плазмідною ДНК, однак молекулярні механізми цього процесу до кінця не з'ясовані [1].

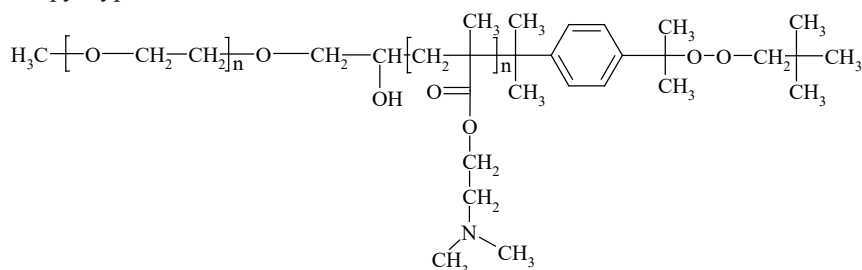
Метою нашої роботи було дослідити три зразки олігоелектролітичних полімерних носіїв та утворення їх кон'югатів з асОДН (антисенс-олігодинуклеотидами), вивчити ефективність системи транспортування даних комплексів, а також їх вплив на мРНК фізіологічного пріона.

Матеріали та методи

Для досліджень було взято зразки трьох новосинтезованих олігоелектролітичних полімерних носіїв, що здатні зв'язувати асОДН, а саме: PEG-DMAEM-MP-27, PEG-DMAEM-MP-2 та PEG-DMAEM-MP-3.

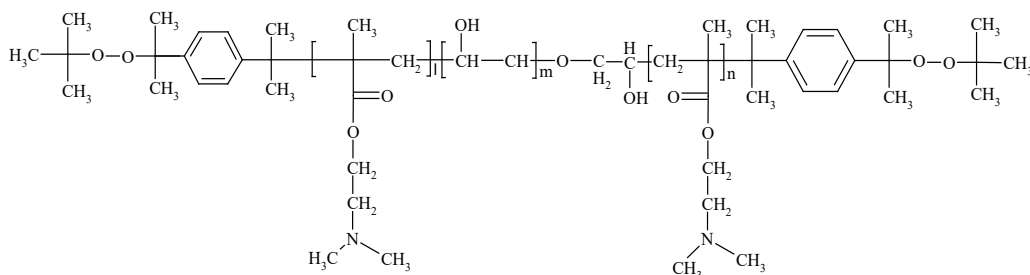
1. PEG-DMAEM-MP-27 (MP-27) – смолоподібна речовина світло-жовтого кольору. Лінійний блок кополімер поліетиленгліколю (ПЕГ) та полідиметиламіноетил метакрилату (поліDMAEM) з кінцевим пероксидвмісним фрагментом. Полімер розчинний у воді в широкому інтервалі значень рН (у т.ч. при фізіологічних значеннях рН середовища), ДМСО. Вміст азоту в полімері 8%, розрахована молярна маса близько 6000 г/моль. Синтез полімера проводився в середовищі ДМФА за наявності пероксидвмісного регулятора росту полімерних ланцюгів (монопероксин, МР), як ініціатор використовували окисно-відновну систему Ce^{4+} – PEG-OH. Полімер додатково очищали від іонів Се (Церій).

Загальна структура:



2. PEG-DMAEM-MP-2 (MP-2) – порошкоподібний полімер коричневого кольору. ПЕГ цього полімеру входить не як кінцевий фрагмент, а як блок посередині між двома блоками поліDMAEMів. Синтез полімера проводився в середовищі ДМФА за наявності пероксидвмісного регулятора росту полімерних ланцюгів (монопероксин, МР), як ініціатор використовували окисно-відновну систему Ce^{4+} – diPEG-OH. Полімер додатково очищався від іонів Церію.

Загальна структура:



3. PEG-DMAEM-MP-3 (MP-3) – Загальна структура аналогічна PEG-DMAEM-MP-2, однак полімер не очищався від іонів Церію.

Як олігонуклеотид було використано асОДН: 5'-TCT GCT GCT CTG ACA ACG C-3', комплементарний до кеп-ділянки мРНК пріона [4].

Приготування комплексів асОДНф та поліДМАЕМ. 6,6 мг поліДМАЕМ розчиняли в 0,01М HCl, встановлювали рН розчину 7,4 0,01М NaOH, доводили об'єм до 10 мл водою. 0,5 мл приготованого розчину поліДМАЕМ змішували із 0,5 мл розчину асОДНф з концентрацією 2 мкг/мл. Інкубували суміш 30 хв за кімнатної температури.

Здатність полімерів (поліДМАЕМ) зв'язувати олігонуклеотиди перевіряли за допомогою електрофорезу у 3% гелі агарози. До розчину ОДН з концентрацією олігонуклеотидів 0,02 мг/мл додавали 1%, 0,5% та 0,05% розчину полімерів. Електрофорез проводили у тріс-боратному буфері з додаванням ЕДТА (89мМ Тріс, 89мМ борної кислоти, 2мМ ЕДТА) за сталої напруги 2V/см. Гель зафарбовували етидію бромідом у концентрації 2 мкг/мл і фотографували в ультрафіолетовому світлі.

Дослідження цитотоксичності поліДМАЕМ проводили з використанням спермій бугаїв. Маркером цитотоксичності полімерів був фізіологічний показник статевих клітин - виживання (год). До 200 мкл суспензії спермій додавали по 10 мкл полімерів у концентраціях 1%, 0,5% та 0,05%. Виживання спермій оцінювали під мікроскопом ($\times 200$) до припинення прямолінійного поступального руху.

Ефективність транспортування асОДН новими носіями визначали за вмістом фізіологічного пріона в мозку щурів *Rattus norvegicus* var. Alba, лінії Wistar. Для цього було сформовано 4 групи – контрольна і три дослідні, по 3 тварини у кожній. Тваринам дослідних груп у хвостову вену одноразово вводили по 2 мг/кг маси тіла, розчини комплексів асОДН з полімерами МР-2, МР-3 та МР-27. Через 1, 2 та 7 діб від початку експерименту тварин з кожної групи декапітували під легким хлороформним наркозом [6]. Для встановлення впливу комплексів асОДН із поліДМАЕМ проводили Вестерн Блот і оцінювали вміст фізіологічного пріона [5].

Результати і їхнє обговорення

Кон'югація асОДН із новосинтезованими полімерами здійснюється за рахунок ланок диметиламіноетилметакрилату і первинних аміногруп аміноетилметакрилату. При змішуванні розчинів олігонуклеотиди конденсуються з катіоноактивними полімерами, внаслідок цього гідрофільно-гідрофобний баланс систем зміщується в бік більшої гідрофобності [1]. Досліджуючи здатність новосинтезованих полімерних носіїв утворювати комплекси із асОДН, було встановлено, що найкраще утворення комплексів відбувається при 0,5 % концентрації полімерів із розчином асОДН концентрацією 2 мкг/мл. При вивченні взаємодії асОДН з олігоелектролітами виявлено, що утворення комплексів характеризувалося зниженням електрофоретичної рухливості олігонуклеотидів (рис. 1). При цьому зв'язані з поліДМАЕМ олігонуклеотиди характеризувалися нижчою електрофоретичною активністю, порівняно з вільними олігонуклеотидами.

Було виявлено, що полідиметиламіноетилметакрилат є цитотоксичним, хоча сам диметиламіноетилметакрилат – малотоксичний [3]. Вивченням цитотоксичності поліДМАЕМ встановлено, що за використання полімерів МР-2 і МР-3 виживання спермій становить 96 год, полімера МР-27 - 120 год. Отже, МР-27 має нижчу токсичність порівняно з МР-2 та МР-3.

При визначенні впливу комплексів асОДН із поліДМАЕМ на вміст клітинного пріона (PrP^C) у мозку щурів, виявлено, що через добу вміст PrP^C у мозку знижувався. Результати були отримані методом Western-blot аналізу (рис. 2), які проявлялися зменшенням інтенсивності смуги фізіологічного пріону після фіксації результату на фоточутливій плівці.

Через дві доби інтенсивність зафарбування зростала і досягала максимальної інтенсивності через 7 діб, що відповідало рівню інтактних тварин.

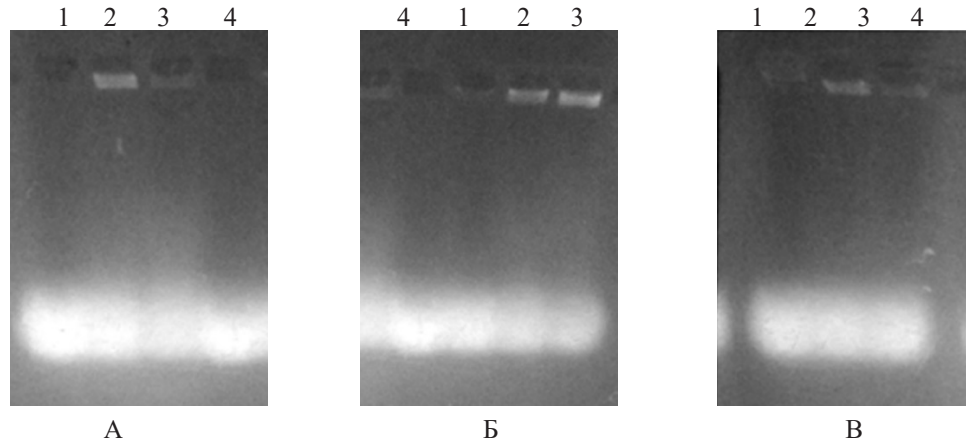


Рис. 1. Електрофореграма зразків асОДН і його комплексів із носіями **MP-2** (А), **MP-3** (Б), **MP-27** (В). Треки: 1 – 1% полімера, 2 – 0,5 %, 3 – 0,1 %, 4 – олігонуклеотид 5'-ССААGGTTCGCCATGAT-3'.

Слід зауважити, що величина інгібування синтезу фізіологічного пріона відрізнялась і залежала від використаного комплексу асОДН з поліДМАЕМ. Найвищу інтенсивність впливу на вміст фізіологічного пріона проявляв комплекс асОДН з поліДМАЕМ MP27.

Таким чином, введення в організм щурів новосинтезованих поліДМАЕМ у комплексі з асОДН характеризуються здатністю знижувати вміст фізіологічного пріона в мозку. Найбільший ефект на зниження фізіологічного пріона мав комплекс асОДН з носієм MP-27, який проявлявся вже через добу після його застосування (рис. 2).

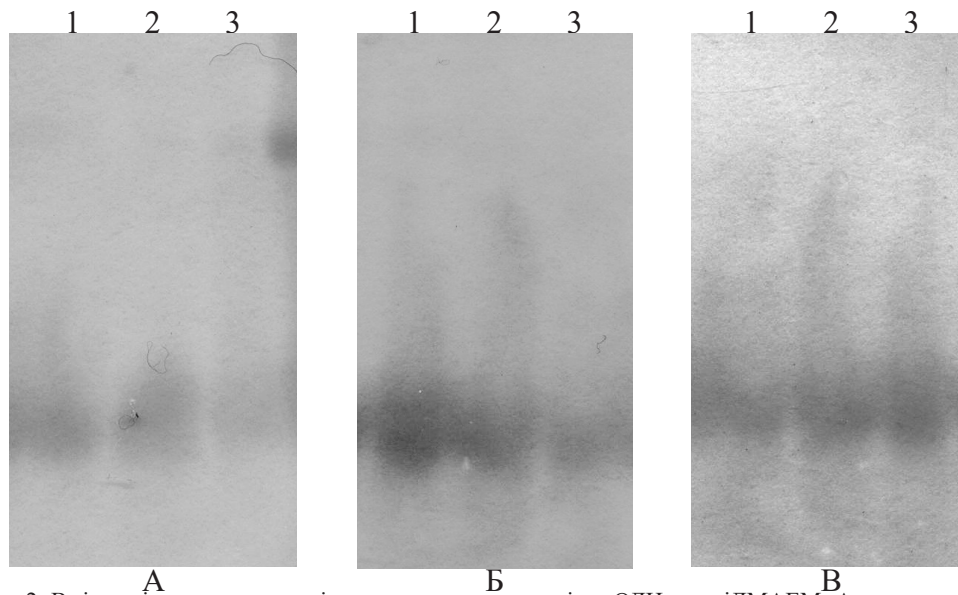


Рис. 2. Вміст пріона в мозку щурів за введення комплексів асОДН з поліДМАЕМ: А – перша доба, Б – друга доба, В – сьома доба (1 – комплекс з MP3, 2 – комплекс з MP2, 3 – комплекс з MP27).

Синтезовані поліДМАЕМ здатні зв'язувати олігонуклеотиди. Серед трьох новосинтезованих полімерів найнижчою цитотоксичністю характеризувався полімер

MP27. Введення комплексів асОДН з поліДМАЕМ в організм щурів через добу призводить до зниження вмісту фізіологічного пріона їх мозку. Дія кон'югатів є тимчасовою, що зручно для проведення наукових досліджень із вивчення ролі пріона або за такою ж схемою іншого білка.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Іваницька Л. А., Стадник В. В., Мартин Ю. В. та ін. Ефективний метод зниження рівня експресії пріона *in vitro* та *in vivo* антисенс-олігодезоксинуклеотидами, кон'югованими із новим олігоелектролітом на основі ДМАЕМ // Біол. студії. 2011. Т. 5. N. 3. С. 77–88.
2. Іваницька Л. А., Заиченко О. С., Влізло В. В. та ін. Ингибирование экспрессии пріона *in vivo* с помощью антисенс-олігодезоксинуклеотидов // Биология – наука XXI века: 15 Междунар. Пушчинская школа – конф. молодых ученых (18–22 апреля, 2011): сб. материалов конф. Пушино, Российская Федерация, 2011. С. 179.
3. Burnette W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radioiodinated protein A // Anal. Biochem. 1981. Vol. 112. P. 195–203.
4. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasburg: Council of Europe. 1986. 52 p.
5. Friberg K., Bennett F., Giles K., Freier S. Intracerebral Infusion of Antisense Oligonucleotides Into Prion-infected Mice // Published online 7 February 2012.
6. Hanks C. T., Hanks C. T., Strawn S. E., Watana J. C. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts // J. Dent. Res. 1991. Vol. 70. N 11. P. 1450–1455.
7. Jonathan K., Corey R. Gene silencing by siRNAs and antisense oligonucleotides in the laboratory and the clinic // J. PMC Feb. 2014. P. 55–67.
8. Jones R. A., Poniris M. R. pDMAEMA is internalised by endocytosis but does not physically disrupt endosomes // J. Control Release. 2004. Vol. 96. N 3. P. 379–391.
9. White M. D., White M. D., Mallucci G. R. Therapy for prion diseases: Insights from the use of RNA interference // Prion. 2009. Vol. 3. N 3. P. 121–128.

Стаття: надійшла до редакції 27.08.15

доопрацьована 14.01.16

прийнята до друку 25.01.16

RESEARCHING OF COMPLEXES ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES WITH THE NEWLY-SYNTHESED CARRIERS BASED ON DMEM

N. Mikush¹, V. Vlizlo¹, O. Zaichenko², R. Stoyka³, D. Ostapiv¹, I. Petruh¹

¹Institute of Animal Biology, NAAS of Ukraine
38, V. Stus St., Lviv 79034, Ukraine
e-mail: natali.mikysh@inenbiol.com.ua

²Universitet Lviv Polytechnic
¾, Sheptitskyi St., Lviv 79010, Ukraine

³Institute of Cell Biology
16, Dragomanov St., Lviv 79010, Ukraine

Prion infections are caused by specific pathological form of the prion protein, which is present in all mammals. It is known that organisms that do not contain the cellular prion

are resistant to the development of prion infections. Prion removal from organism can be achieved by blocking the translation of its mRNA without intervention into the genome. An obstacle to the use of oligonucleotides for the reduction of PrPC in brain is their impermeability through the blood-brain barrier, so the actual problem is to provide effective methods and means upravlyaeniya transport oligonucleotides into cells of the CNS. The article contains results of researching, the newly-synthesized polymeric carriers based on dimethylaminoethyl methacrylate in conjunction with antisense oligonucleotides (asODN). According to the research have been selected effective sequence asODN and polymeric carriers for inhibiting expression of the physiological prion in lab animals. Was established, that using of new polymers carriers reduces the amount of prion in organism for a certain time, which can be used in the treatment and prevention of prion infections. Also have been described the results studies of cytotoxic properties of the newly-synthesized cationic-active polyelectrolytes and their impact on the systems of the organism laboratory rats.

Keywords: prion, oligonucleotide, brain barrier, dimethylaminoethyl methacrylate, gene expression.

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ АНТИСЕНС-ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С НОВО-СИНТЕЗИРОВАННЫМИ ОЛИГОЭЛЕКТРОЛИТНЫМИ НОСИТЕЛЯМИ НА ОСНОВАНИИ ДМАЕМ

Н. Мікуш¹, В. Влізло¹, Р. Стойка³, О. Заиченко², Д. Остапів¹, И. Петрух¹

¹Институт биологии животных НААН Украины

ул. В.Стуса, 38, Львов 79010, Украина

e-mail: natali.mikysh@inenbiol.com.ua

²Университет Львовская политехника

ул. Шептицкого, 3/4, Львов 79010, Украина

³Институт биологии клетки

ул. Драгоманова, 16, Львов 79010, Украина

Прионные инфекции вызываются особой патологической формой белка приона, который присутствует во всех млекопитающих. Известно, что организмы, которые не содержат клеточного приона, резистентны к развитию прионных инфекций. Удаление приона из организма можно достичь путем блокирования трансляции его мРНК без вмешательства в геном организма. Препятствием к применению олигонуклеотидов для уменьшения содержания PrPC в головном мозге является их непроницаемость сквозь гематоэнцефалический барьер, поэтому актуальной проблемой является создание эффективных методов и средств управления транспортировкой олигонуклеотидов в клетки ЦНС. В статье приведены результаты исследований новосинтезированных полимерных носителей на основе диметиламиноэтилметакрилата в комплексе с антисенс-олигонуклеотидами (асОДН). По результатам исследований подобраны эффективные последовательности асОДН и их полимерные носители для ингибирования экспрессии физиологического приона у лабораторных животных. Установлено, что использование антисенс-терапии с использованием новых носителей позволяет уменьшить количество приона в организме на определенное время, что может быть использовано при лечении и профилактике прионных инфекций. Также описаны результаты исследований цитотоксических свойств новосинтезированных катион-активных олигоэлектролитов и их влияние на состояние систем организма лабораторных крыс.

Ключевые слова: прион, олигонуклеотид, гематоэнцефалический барьер, диметиламиноэтилметакрилат, экспрессия генов.