



УДК 577.113.6:602.643:54-126

ЕФЕКТИВНИЙ МЕТОД ЗНИЖЕННЯ РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ ПРИОН-ПРОТЕЇНУ *IN VITRO* ТА *IN VIVO* АНТИСЕНС-ОЛІГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДАМИ, КОН'ЮГОВАНИМИ З НОВИМ ОЛІГОЕЛЕКТРОЛІТОМ НА ОСНОВІ ДИМЕТИЛАМІНОЕТИЛМЕТАКРИЛАТУ

Л. А. Іваницька¹, В. В. Стадник², Ю. В. Мартин¹, М. Р. Козак¹,
С. В. Федорова¹, О. В. Штапенко¹, Ю. А. Ржепецький³,
Т. В. Скорохода⁴, О. С. Заїченко⁴, В. В. Влізло¹

¹Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38, Львів 79034, Україна,
e-mail: ivanytska.lyudmyla@gmail.com

²Eotvos Lorand University, Pázmány Péter sétány 1/C. H-1117 Будапешт, Угорщина

³Інститут біології клітини НАН України, вул. М. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна

⁴Національний Університет „Львівська політехніка”,
вул. Ст. Бандери, 12, Львів 79013, Україна

У статті розглянуто деякі аспекти використання нової полімерної сполуки для транспортування антисенс-олігодезоксинуклеотидів (асОДН) у клітини ссавців. Досліджено ДНК-зв'язувальну здатність олігоелектроліта на основі диметиламіноетилметакрилату (поліДМАЕМ). Встановлено, що поліДМАЕМ у концентрації менше 5 мкг/мл не чинить вірогідного цитотоксичного впливу на культуру клітин ембріональних фібробластів мишей і лімфоцитарної лейкемії мишей L1210 та може бути використаний в експериментах *in vitro*. Результати дослідження впливу поліДМАЕМ та його комплексів із асОДН на рівень експресії фізіологічного пріона (PrP^C) у клітинах лінії L1210 свідчать, що застосування різних іммобілізованих асОДН спричиняє зниження вмісту PrP^C на 70–90%. Виявлена здатність поліДМАЕМ знижувати рівень експресії пріон-протеїну на 40% у культурі клітин L1210. Імовірні механізми цього явища дискутуються. Показана можливість успішного застосування кон'югатів асОДН та носія для практично повного пригнічення експресії фізіологічного пріона у селезінці та тонкому кишечнику щурів. В експериментах *in vivo* впливу поліДМАЕМ на вміст PrP^C не виявлено.

Ключові слова: антисенс-олігодезоксинуклеотиди, пригнічення експресії генів, пріон-протеїн, катіоактивні олігоелектроліти.

ВСТУП

Пригнічення експресії гена (англ. gene silencing) може відбуватися внаслідок дії сукупності механізмів, які організм використовує для регуляції роботи власних генів і захисту геному від чужорідного генетичного матеріалу. У молекулярно-біоло-

гічних дослідженнях до залучення цих механізмів вдаються з метою встановлення можливих функцій гена. Конструктивно простіше та безпечніше інгібувати біосинтез певного білка в організмі, особливо багатоклітинному, шляхом посттранскрипційного гідролізу відповідної мРНК.

Існує цілий арсенал засобів, які дають змогу ефективно зруйнувати вибрану мРНК. Серед них – антисенс-технологія, що полягає у застосуванні специфічних одноланцюгових олігонуклеотидів довжиною 15–30 основ, що стерично блокують трансляцію мРНК та опосередковують її гідроліз за дії РНКазі Н [11].

Слід зазначити, що внаслідок деградації нуклеїнової кислоти за дії нуклеаз і їхньої поліаніонної структури вільні олігонуклеотиди не проникають крізь клітинну мембрану, що накладає серйозні обмеження на їх застосування *in vivo*. Успіх використання антисенс-технології значною мірою залежить від наявності відповідних носіїв і засобів для трансфекції *in vivo*, що особливо актуально в сучасній біології, медицині та ветеринарії. Катіонні синтетичні та природні полімери можуть бути зручним інструментом для доставки генетичного матеріалу у клітини, оскільки через електростатичні взаємодії вони ефективно зв'язують негативно заряджені молекули ДНК. Таким чином вони екранують ДНК від дії гідролізуючих ферментів, відтак продовжують час перебування генетичних конструкцій в організмі та полегшують їхнє проникнення всередину клітини.

У нашій роботі мішенню для антисенс-олігонуклеотидів (асОДН) була мРНК фізіологічного (клітинного) пріона. Клітинний пріон (PrP^{C}) – це мембранний білок, який експресується у більшості клітин еукаріотичних організмів. Цей білок є субстратом для утворення високоінфекційної патологічної форми пріон-протеїна (PrP^{Sc}), що зумовлює розвиток трансмісивних спонгіоформних енцефалопатій, які є особливо небезпечними, летальними нейродегенеративними захворюваннями людини і тварин [5]. Функції PrP^{C} не з'ясовані, проте вважається [4,10,7], що він може брати участь у метаболізмі нейротрансмітерів, активації імунних клітин, клітинній адгезії, внутрішньоклітинній сигналізації, обміні Cu^{2+} , антиоксидантній активності, запрограмованій клітинній смерті тощо. У нокаутних за геном фізіологічного пріона тварин не виявлено аномалій у розвитку та функціональному стані організму, тобто механізми адаптації забезпечують нормальний перебіг процесів опосередкованих пріон-протеїном [14]. Тому питання щодо ролі та важливості фізіологічного пріона в організмі ссавців залишається відкритим.

Метою нашої роботи було розробити систему транспортування нуклеїнових кислот з використанням нового синтетичного олігоелектролітного носія. Ми також вивчали вплив його кон'югатів із антисенс-олігодезоксинуклеотидами на експресію пріон-протеїна *in vitro* та *in vivo* для створення експериментальних тваринних моделей із „безпріоновим” фенотипом.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженні використано низькомолекулярний катіонактивний водорозчинний полімер (поліДМАЕМ), який складається із ланок диметиламіноетилметакрилату і має вигляд безбарвних прозорих кристалів. Цей полімер стабільний у розчині за фізіологічних значень рН. Отриманий зразок характеризується вузьким молекулярно-масовим розподілом, його молекулярна маса становить ≈ 5000 Да.

ДНК-зв'язувальні властивості поліДМАЕМ перевіряли за допомогою спектрофотометрії в ультрафіолетовій ділянці спектра. Для цього готували розчини, що

містили 50 мкг/мл поліДМАЕМ та різні кількості одноланцюгових коротких (20 нуклеотидів) молекул ДНК. Вимірювали оптичну щільність утворених сумішей при 260 нм.

Дослідження цитотоксичності олігоелектроліта проводили на культурі клітин фібробластів мишей та лімфоцитарної лейкемії мишей L1210.

Для отримання первинної культури ембріональних фібробластів використовували 2 вагітні самки мишей. Тварин утримували у віварії Інституту біології тварин НААН. Експерименти з тваринами проводили згідно з нормами чинного законодавства [2] та відповідно до правил Європейської конвенції про гуманне ставлення до лабораторних тварин [6]. Евтаназію самок здійснювали зміщенням шийних хребців. У плодів відсікали кінцівки, голову та видаляли внутрішні органи. Після цього тіла плодів подрібнювали і переносили у конічні пробірки з 10 мл теплою (37°C) 0,05% трипсину (Invitrogen, США) з 0,02% ЕДТА (Sigma-Aldrich, Німеччина). Інкубували протягом 30 хв за температури 37°C, постійно струшуючи їх. Одержану клітинну суспензію переносили у дві нові пробірки, кожна з яких містила 3 мл сироватки ембріонів ВРХ (РАА, Австрія). Центрифугували вміст із швидкістю 250 об/хв протягом 5 хв, осад ресуспендували у 50 мл свіжого середовища Ігла в модифікації Дюльбекко (РАА, Австрія) з 10% сироватки. $2,5 \times 10^6$ клітин сіяли у 25 мм³ культуральні флакони з 5 мл середовища та 10% сироватки ембріонів ВРХ.

Наступного дня змінювали культуральне середовище на свіже і клітини культивували протягом 72 год. Після утворення моношару клітин кондиційне середовище видаляли. Клітини знімали за допомогою розчину 0,25% трипсину/ЕДТА, дезактивували його додаванням 1 мл фетальної сироватки, піпетували та центрифугували суспензію 10 хв зі швидкістю 3700 об/хв. Початкова посівна концентрація становила $0,5 \times 10^6$ клітин/мл. Фібробласти культивували в чашках Петрі діаметром 4 см (Sarstedt, Німеччина). Клітинну суспензію розводили в об'ємі 2 мл середовища. Вносили 20 мкл розчинів поліДМАЕМ. Концентрація поліДМАЕМ у середовищі становила 0,5 мкг/мл, 5 мкг/мл та 50 мкг/мл відповідно. Через 24 год клітини знімали та підраховували їхню кількість у камері Горяєва.

Клітини лінії L1210 культивували в пластикових 25 мм³ культуральних флаконах (Sarstedt, Німеччина) у модифікованому Дюльбекко середовищі Ігла із 10% сироватки ембріонів ВРХ за температури 37°C та 5% CO₂ до досягнення 40–50% конфлюенту. Суспензію клітин розводили свіжим середовищем до концентрації $0,5 \times 10^6$ клітин/мл, вносили по 200 мкл в лунки 96-лункового пластикового планшета (Sarstedt, Німеччина) та додавали по 2 мкл розчину полімерів. Концентрація полімерів у лунках становила відповідно 0,05 мкг/мл, 0,5 мкг/мл та 5 мкг/мл. Клітини культивували за присутності полімеру протягом 48 год. Цитотоксичний ефект полімеру визначали методом зафарбовування клітин трипановим синім (Sigma-Aldrich, Німеччина). Зафарбовані клітини вважали мертвими.

Приготування комплексів аСОДН та поліДМАЕМ. 6,6 мг поліДМАЕМ розчиняли в 0,01М НСІ, 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 аСОДН (Alpha DNA, Канада) з концентрацією 10 мкмоль/мл. Інкубували суміш 30 хв за кімнатної температури.

Дослідження впливу кон'югатів аСОДН та поліДМАЕМ на рівень експресії фізіологічного пріона *in vitro*. Клітини лінії L1210 культивували у 12 лункових планшетах (Sarstedt, Німеччина). Додавали у лунки 10 мкл аСОДН іммобілізованих з поліДМАЕМ, після чого клітини інкубували 4 та 10 год. Концентрація аСОДН становила 100 нмоль/мл, поліДМАЕМ — 330 нг/мл. Далі клітини відмивали від сере-

довища та лізували у буфері для лізису: 10 мМ Трис-НСІ рН 7,5 (Синбіас, Україна), 150 мМ NaCl (Сфера-Сім, Україна), 5 мМ ЕДТА, 50 мМ NaF (Сфера-Сім, Україна), 1% Тритон Х-100 (Applichem, Німеччина) 1 мМ ортованадат натрію (Синбіас, Україна), 10 мкг/мл лейпептину, 8 мкг/мл апротиніну, 1 мкг/мл пепстатину, 5 мМ бензамідину, 1 мМ фенілметилсульфонілфториду (Applichem, Німеччина).

Імуноблот-аналіз. У лізатах вимірювали концентрацію білка за методом Лоурі [9]. Для вирівнювання концентрацій загального білка зразки розводили буфером: 25 мМ Трис-НСІ, 150 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl (Синбіас, Україна), рН 7,4. Далі проводили електрофоретичне розділення білків лізатів клітин у системі Леммлі [8] у 12% поліакриламідному гелі. Перенесення білків із поліакриламідного гелю на полівінілдіфторидну мембрану здійснювали у камері для трансферу Transblot (Bio Rad, США). По закінченні переносу білків мембрану інкубували 1 год за кімнатної температури у 5% знежиреному молоці: 5% сухе знежирене молоко (Rovema, Польща), 50 мМ Трис-НСІ, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween 20 (Dako, Данія). Для детекції фізіологічного пріона використовували мишачі антитіла 6Н4 (Prionics, Швейцарія) у розведенні 1:5000. Із першими антитілами мембрану інкубували 12 год за температури +4°C. На наступному етапі проводили інкубацію мембрани з антитілами до імуноглобулінів миші, кон'югованими з лужною фосфатазою (Sigma-Aldrich, Німеччина) в розведенні 1:10 000. Детекцію імунних комплексів здійснювали з використанням хемілюмінесцентного субстрату для лужної фосфатази CDP-Star (Sigma-Aldrich, Німеччина). Візуалізацію сигналу проводили за допомогою рентгенівської плівки ECL HyperFilm (Amersham, США) та набору для проявлення плівок (Kodak, США). Для контролю кількості нанесеного матеріалу проводили імуноблотинг білків мембрани з антитілами до β -актину (Sigma-Aldrich, Німеччина). Детекцію імунних комплексів здійснювали згідно з методикою, описаною вище.

Дослідження здатності поліДМАЕМ транспортувати аСОДН *in vivo*. Статевозрілим щурам *Rattus norvegicus* var. Alba, лінії Wistar, вагою 250–300 г, внутрішньовенно вводили комплекс поліДМАЕМ і аСОДН. Доза аСОДН становила 1 мкмоль/кг ваги тварини.

Через 48 год після ін'єкції тварин декапітували під ефірним наркозом і відбирали тканини селезінки й тонкого кишечника для імуногістохімії.

Відбір проб проводили так: тонкий кишечник – середина клубової кишки, селезінку – поперечний розріз правої частини. Шматочки тканин товщиною від 0,3 до 0,5 см фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну та заливали в парафін. Органи фіксували згідно зі стандартною методикою підготовки гістологічних препаратів [1].

Для проведення імуногістохімічної детекції пріона у підготованих зразках їх депарафінізували за такою схемою: ксилол 1 – 5 хв; ксилол 2 – 5 хв; ксилол-спирт – 5 хв; 100% спирт – 3 хв; 96% спирт 1 – 3 хв; 96% спирт 2 – 3 хв; 80% спирт – 3 хв; 70% спирт – 3 хв; H₂O – 1 хв. Для відновлення антигенних детермінант пріона використовували інкубацію регідратованих зрізів у 10 мМ цитратному буфері (рН 6,0) протягом 5 хв за температури 100°C. Після відновлення антигену проводили інгібування активності ендогенної лужної фосфатази шляхом інкубування зрізів у 0,3 н НСІ протягом 10 хв за кімнатної температури. Залишки кислоти змивали водою. Наступним етапом було блокування сайтів неспецифічного зв'язування антитіл. Для цього використовували 10% знежирене молоко, розчинене в буфері складу: 50 мМ Трис-НСІ, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween 20, рН 7,4–7,5. Зрізи інкубували у вологій камері з блокуючим розчином 30 хв. Далі зрізи інкубували 1 год з першими антитілами 6Н4 (Prionics, Швейцарія), розведеними 1:1000 у 5% молоці. Перші антитіла відмива-

ли трічі по 5 хв у буфері (50 мМ Трис–HCl, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,4–7,5). Для виявлення комплексу пріон-антитіло використовували кон'югат антитіл до імуноглобулінів миші з декстраном (Dako, Данія), інкубація 30 хв при кімнатній температурі. Далі застосовували кон'югат специфічного полімеру із лужною фосфатазою (Dako, Данія), зрізи інкубували 30 хв. Для візуалізації пріона зрізи інкубували зі субстратом для лужної фосфатази „Permanent Red” (Dako, Данія) протягом 20 хв. Далі зрізи забарвлювали гематоксиліном Майєра та заключали в середовище для їх зберігання (Dako, Данія). Фізіологічний пріон детектується у вигляді червоно-малинових плям. Цитоплазма клітин зафарбована у блакитний колір, ядра клітин – у синій.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Катіонактивні синтетичні та природні сполуки ліпідної або полімерної природи часто застосовують як засоби транспортування генетичного матеріалу у клітини. Серед полімерних матеріалів значна увага привернута до водорозчинних олігоелектролітів завдяки вдалому поєднанню фізико-хімічних властивостей високомолекулярних сполук і електролітів. Основні проблеми, що виникають при розробці нових цільових систем транспортування нуклеїнових кислот, – це токсичність носіїв, особливо синтетичних, необхідність подолання біологічних бар'єрів, контроль за їхньою орієнтацією на патологічні клітини, вивільнення терапевтичного чинника та їх видалення з організму, необхідність подолати природну стійкість клітин у результаті введення чужорідних сполук, можуть бути успішно вирішені шляхом послідовного синтезу та застосування сполук з відомою структурою, молекулярною масою і функціональністю.

Катіонний характер засобів трансфекції клітин переважно реалізується через наявність первинних аміногруп або кватернізованого азоту. Такий локалізований позитивний заряд молекул часто є причиною їхньої високої токсичності й імуногенності [12]. Тому ми в наших дослідженнях спробували мінімізувати побічні ефекти, використовуючи олігоелектроліт із третинними аміногрупами, що, втім, не перешкоджає його зв'язуванню із негативно зарядженою ДНК. Підтвердженням цього служить крива оптичної густини розчину поліДМАЕМ за різної концентрації ДНК у ньому (рис. 1). Профіль кривої свідчить про екранування полімером ароматичних груп нуклеотидів. Коли ж олігоелектроліт повністю насичується нуклеїновою кислотою і утворюється комплекс між ДНК і полімером, у розчині з'являється вільна ДНК, що викликає різке зростання оптичної густини після додавання наступної аліквоти ДНК. Встановлено, що 1 мкг поліДМАЕМ зв'язується із $8 \pm 1,0$ нмоль ДНК (коротких 20 нуклеотидних молекул).

На наступному етапі дослідження було перевірено цитостатичний і цитотоксичний ефекти полідиметиламіноетилметакрилату на культурі клітин фібробластів мишей (рис. 2).

Показано, що у концентрації 0,5 мкг/мл і 5 мкг/мл поліДМАЕМ не має вірогідного цитостатичного та цитотоксичного ефектів. Водночас інкубація клітин у середовищі, яке містило 50 мкг/мл поліДМАЕМ, викликала пригнічення росту фібробластів удвічі ($p < 0,01$) та значне зростання кількості мертвих клітин ($p < 0,01$, рис. 2), порівняно з контролем і поліДМАЕМ у концентраціях 0,5 та 5 мкг/мл. Таким чином, встановлено, що концентрація поліДМАЕМ нижче 5 мкг/мл середовища є безпечною для застосування в культурі клітин.

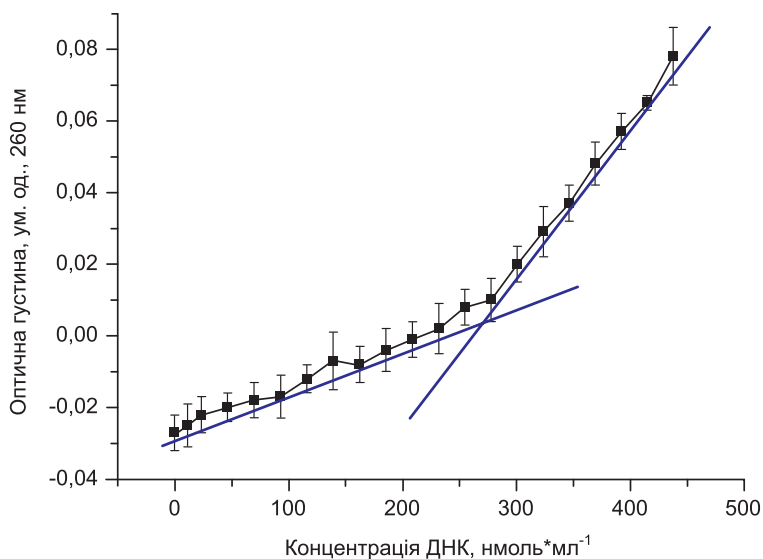


Рис. 1. Утворення кон'югатів між ДНК і поліДМАЕМ. Перетин дотичних вказує на концентрацію ДНК, за якої утворюється комплекс між ДНК та олігоелектролітом

Fig. 1. Formation of conjugates between DNA and polyDMAEM. The intersection of tangents indicates the concentration of DNA at which the complex between DNA and oligoelectrolyte is formed

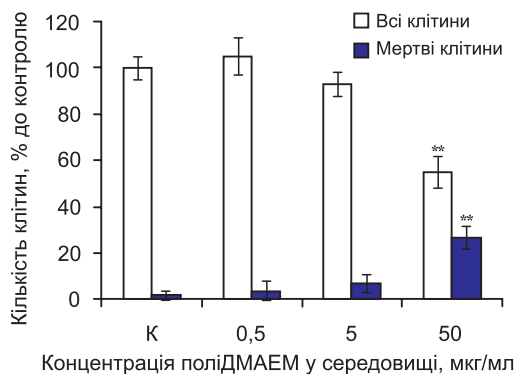


Рис. 2. Вплив поліДМАЕМ на ріст і життєздатність фібробластів мишей. Тривалість інкубації 24 год. ** – $p \leq 0,01$

Fig. 2. Effect of polyDMAEM on growth and viability of mouse fibroblasts. Duration of incubation – 24 hrs. ** – $p \leq 0,01$

У подальших дослідженнях використовували культуру клітин лейкомічних В-лімфоцитів мишей, яка характеризується високим проліферативним потенціалом і значним базовим рівнем експресії фізіологічного пріона. Ця культура є суспензійною, тому, можливо, більш чутливою до дії ксенобіотиків, ніж моношарові іморталізовані лінії. Отже, доцільно було дослідити вплив поліДМАЕМ на клітини лінії L1210 (рис. 3).

Дія цього олігоелектроліта характеризується помірною цитотоксичністю – кількість мертвих клітин у популяції не більше 15%, що характерно для малотоксичних речовин. На 48-му год характер впливу поліДМАЕМ стає очікуваним – найбільша концентрація спричиняє зростання кількості трипанпозитивних клітин до 14,2% порівняно з контролем.

Враховуючи ці та попередні результати щодо взаємодії ОДН з поліДМАЕМ, вирішили використати даний полімер для доставки антисенс-олігонуклеотидів у клітини з метою інгібування трансляції мРНК фізіологічного пріона. Для інгібування було обрано три ділянки мРНК: кеп, старт-кодон і ділянка у зоні відкритої рамки зчитування (ВРЗ), до яких було підібрано відповідні асОДН [3].

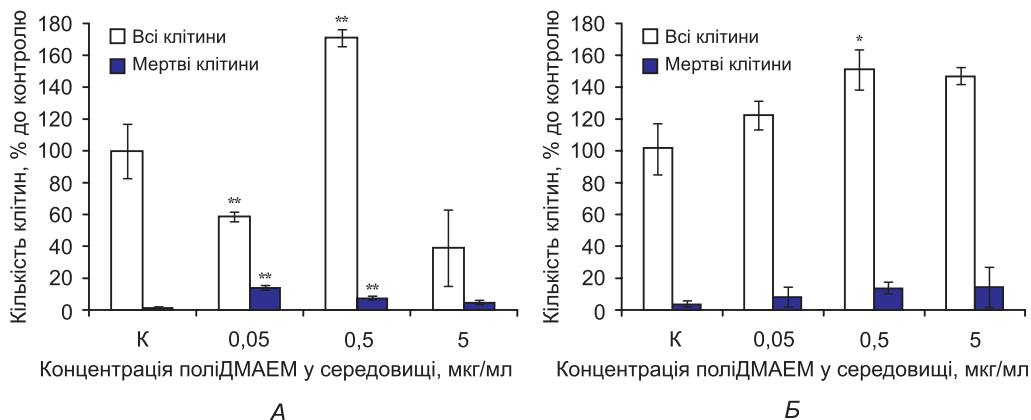


Рис. 3. Вплив поліДМАЕМ на ріст і життєздатність клітин лінії L1210. А – тривалість інкубації 24 год, Б – 48 год. * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$

Fig. 3. Effect of polyDMAEM on growth and viability of L1210 cells. А – duration of incubation – 24 hrs, Б – 48 hrs. * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$

Після інкубування клітин лінії L1210 з комплексом асОДН-поліДМАЕМ було проведено імуноблот-аналіз рівня клітинного пріона (рис. 4). Встановлено, що всі три послідовності асОДН ефективно знижували вміст клітинного пріона. Якщо на 4-ту год інкубування найбільш ефективним був асОДН, комплементарний до старт-кодону мРНК пріон-протеїна, то на 10-ту год – до відкритої рамки зчитування.

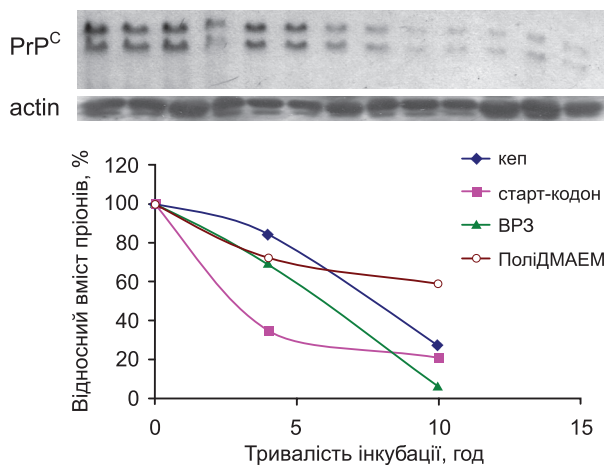


Рис. 4. Вплив асОДН і поліДМАЕМ на рівень експресії клітинного пріона у клітинах лінії L1210

Fig. 4. AsODNs and polyDMAEM action on the expression of cellular prion level in L1210 cells

Несподіваним був той факт, що й сам поліДМАЕМ виявився здатним знижувати вміст пріон-протеїна. Хоча його динаміка інгібування експресії фізіологічного пріона на 4-ту і 10-ту год була дещо гіршою, порівняно з асОДН і становила 60%

від початкового рівня експресії, тоді як застосування поліДМАЕМ у комплексі з різними асОДН спричиняло зниження вмісту клітинного пріона на 70–90%. Імовірним механізмом дії поліДМАЕМ може бути інтерналізація пріонів з поверхні клітини у процесі ендцитозу полімера. Очевидно, цей механізм є неспецифічним. Слід вказати і на друге можливе пояснення цього факту. Дослідження С. Супатапоне та ін. [13] показують, що деякі високомолекулярні поліаміни, зокрема дендримери четвертого порядку, здатні знижувати вміст патологічного пріона у хронічно інфікованій клітинній лінії ScN2a. Механізм цього явища не з'ясований, а терапевтичний потенціал використання цих поліамінів як засобів профілактики та лікування пріонних інфекцій не доведений.

Враховуючи результати експериментів із застосування поліДМАЕМ для транспортування асОДН *in vitro*, ми використали комплекси поліДМАЕМ із асОДН для зниження вмісту фізіологічного пріона *in vivo*. Наші попередні дослідження вказують, що найбільш доцільно застосовувати суміш обраних асОДН [3]. Після ін'єкцій запропонованих композицій поліДМАЕМ і асОДН провели імуногістохімічний аналіз експресії фізіологічного пріона в основних пріонреплікуючих органах – селезінці (рис. 5) і тонкому кишечнику (рис. 6)

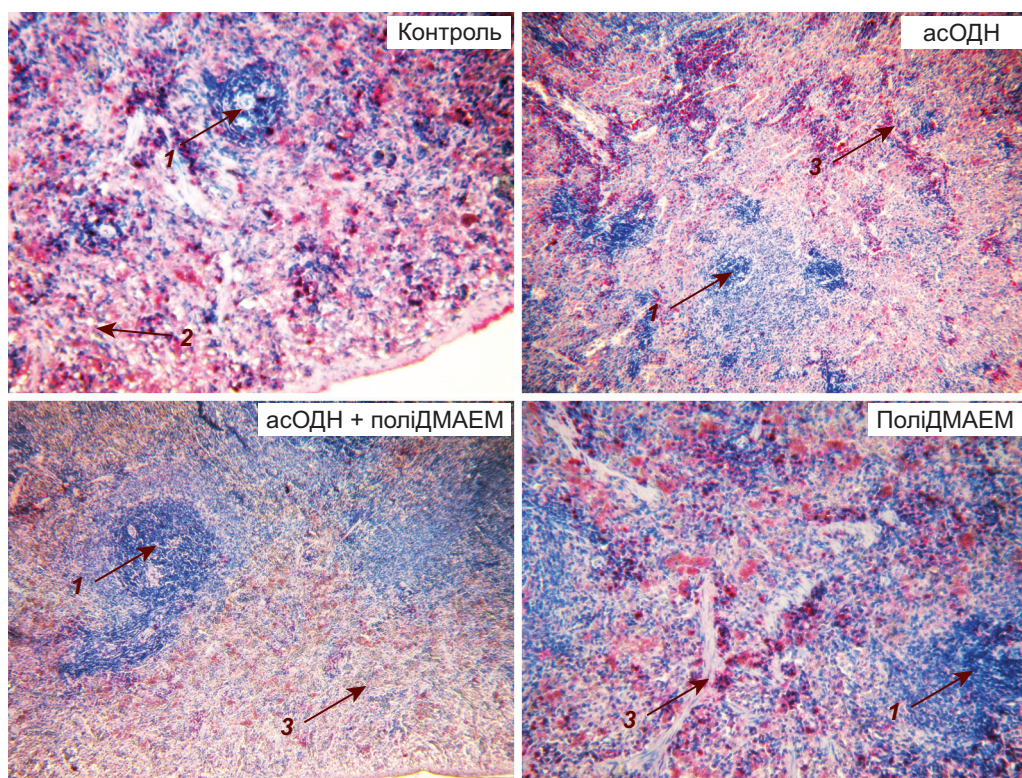


Рис. 5. Імуногістохімічний аналіз експресії фізіологічного пріона у тканині селезінки лабораторних щурів, 200×. Позначення: 1 – лімфатичний фолікул, 2 – паренхіма, 3 – трабекула. Пріонпозитивні клітини зафарбовані в червоно-малиновий колір

Fig. 5. Immunohistochemistry of cellular prion expression in the spleen of laboratory rats, 200×. Denotation: 1 – splenic nodule, 2 – parenchyma, 3 – trabeculum. Prion-positive cells are indicated in crimson colour

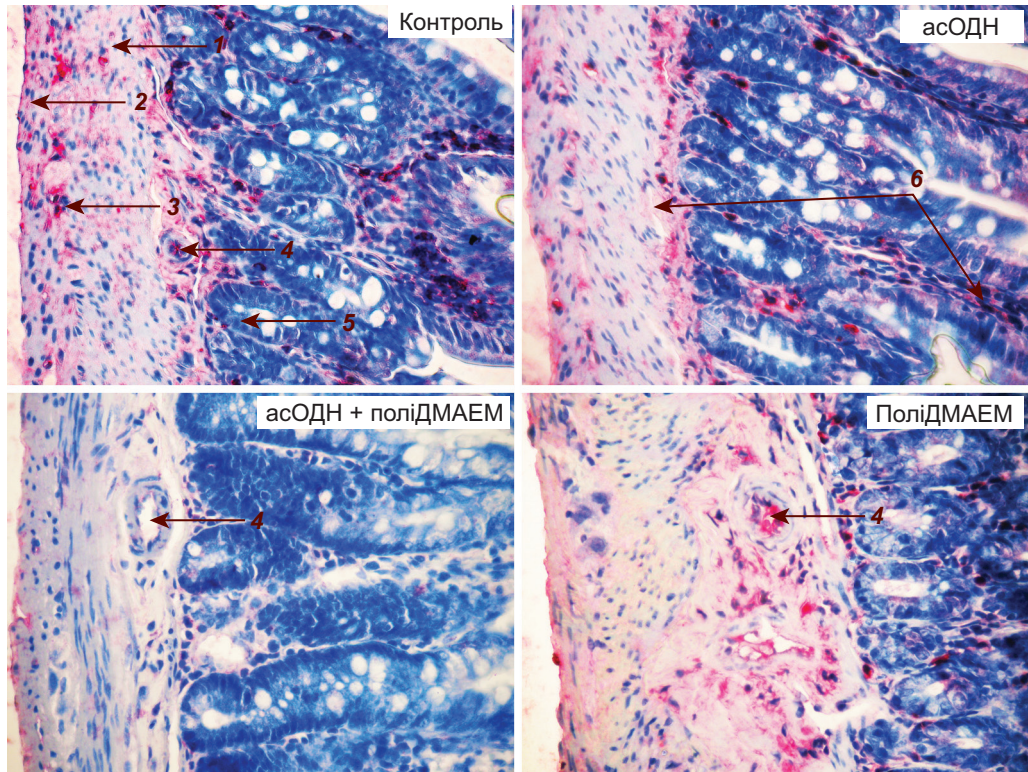


Рис. 6. Імуногістохімічний аналіз експресії фізіологічного пріона у тканині тонкого кишечника лабораторних щурів, 400×. Позначення: 1 – внутрішній м'язовий шар, 2 – зовнішній м'язовий шар, 3 – сплетіння Ауєрбаха, 4 – артеріальна судина, 5 – крипта, 6 – власна пластинка слизової оболонки. Пріон-позитивні клітини зафарбовані в червоно-малиновий колір

Fig. 6. Immunohistochemistry of cellular prion expression in the intestine of laboratory rats, 400×. Denotation: 1 – muscularis inner layer, 2 – muscularis outer layer, 3 – Auerbach's plexus, 3 – arterial vessel, 5 – crypt, 6 – lamina propria. Prion-positive cells are indicated in crimson colour

У селезінці щурів контрольної групи, а також тих, що отримували асОДН і поліДМАЕМ, відповідно, інтенсивне забарвлення, яке вказує на наявність пріонів, локалізується у паренхімі. Лімфатичні вузли не зафарбовуються. Інтенсивно забарвлені у червоний колір ділянки містяться вздовж трабекул. У селезінці щурів, яким вводили асОДН у комплексі із поліДМАЕМ, значно зменшена інтенсивність забарвлення в навколофолікулярних ділянках червоної пульпи, а також уздовж трабекул не детектується пріон-протеїн.

На зрізах тонкого кишечника тварин усіх груп, окрім щурів, яким вводили асОДН, кон'юговані із поліДМАЕМ, інтенсивне забарвлення спостерігали у нервових клітинах між внутрішнім і зовнішнім шарами м'язових клітин. Кластери пріон-позитивних клітин колокалізуються зі сплетінням Ауєрбаха. У кишечних ворсинках пріон-протеїн локалізується на поверхні дендритних фолікулярних клітин, а також у власній пластинці слизової оболонки, між криптами. За дії асОДН у комплексі з поліДМАЕМ вміст пріон-протеїна знижується практично повністю, червоного забарвлення не спостерігається в серозній, м'язовій оболонці та у ворсинках тонкого кишечника. Цікавою є відсутність пріон-позитивних клітин усередині судин.

В експериментах *in vivo* не виявлено впливу поліДМАЕМ на вміст фізіологічно-пріона в досліджуваних тканинах.

Селезінка і тонкий кишечник експресують пріон-протеїн у великій кількості. Саме ці органи, в першу чергу, задіяні в реплікації патологічного пріона задовго до його проникнення в центральну нервову систему. Однак досі не встановлено, яку роль відіграє цей висококонсервативний за структурою білок у цих тканинах. Успішне інгібування експресії пріон-протеїна у пріон-реплікуючих органах є важливим завданням фундаментальних досліджень. Разом з тим висловлюються думки [15], що такий підхід може бути використаний для профілактики та боротьби з пріонними інфекціями.

Отже, іммобілізація антисенс-олігодезоксинуклеотидів на поліДМАЕМ сприяє їх ефективному використанню *in vivo*, на відміну від нативних аСОДН. Отримані результати на різних органах і тканинах, а також типах клітин, дають підстави стверджувати про універсальність запропонованої системи транспортування коротких нуклеїнових кислот. Наші результати є підґрунтям для подальшої роботи, спрямованої на довготривале інгібування експресії пріон-протеїна у пріон-реплікуючих органах ссавців.

ПОДЯКИ

Автори вдячні Західноукраїнському центру біомедичних досліджень за фінансову підтримку.

1. *Іванов І. Ф., Ковальський П. А. Цитологія, гистологія, ембріологія.* Москва: Колос, 1976. 447 с.
2. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України. **Відомості Верховної Ради України**, 2006; 27: 230.
3. *Стадник В. В., Майор Х. Я., Ізюмова Л. А.* Дизайн антисенс-олігодезоксинуклеотидів для інгібування трансляції мРНК гена *Prnp*. **Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин НААН**, 2008; 9 (1–2): 62–66.
4. *Cashman N. R., Loertscher R., Nalbantoglu J. et al.* Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. **Cell**, 1990; 61: 185–192.
5. *Chesebro B.* Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. **British Medical Bulletin**, 2003; 66: 1–20.
6. **European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.** Strasburg: Council of Europe, 1986. 52 p.
7. *Kim B. H., Lee H. G., Choi J. K. et al.* The cellular prion protein (PrPC) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation. **Brain Res. Mol. Brain Res**, 2004; 124 (1): 40–50.
8. *Laemmli U. K.* Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, 1970; 227(5259): 680–685.
9. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, 1951; 193 (1): 265–275.
10. *Mazzoni I. E., Ledebur H. C. Jr., Paramithiotis E., Cashman N.* Lymphoid signal transduction mechanisms linked to cellular prion protein. **Biochem. Cell Biol**, 2005; 83 (5): 644–653.
11. *Sahu N. K., Shilakari G., Nayak A., Kohli D. V.* Antisense technology: a selective tool for gene expression regulation and gene targeting. **Curr. Pharm. Biotechnol**, 2007; 5: 291–304.
12. *Sakurai H., Kawabata K., Sakurai F. et al.* Innate immune response induced by gene delivery vectors International. **J. of Pharmaceutics**, 2008; 354: 9–15.

13. Supattapone S., Wille H., Uyechi L. et al. Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. **J. Virol**, 2001; 75(7):3453–3461.
14. Weissmann C., Flechsig E. PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. **British Medical Bulletin**, 2003; 66: 43–60.
15. White M. D., Mallucci G. R. Therapy for prion diseases: Insights from the use of RNA interference. **Prion**, 2009; 3(3):121–8.

EFFICIENT METHOD OF PRION GENE SILENCING *IN VITRO* AND *IN VIVO* BY ANTISENSE-OLIGODEOXYNUCLEOTIDES CONJUGATED WITH NEW DIMETHYLAMINOETHYLMETHACRYLATE OLIGOELECTROLITE

L. A. Ivanytska¹, V. V. Stadnyk², Yu. V. Martyn¹, M. R. Kozak¹,
S. V. Fedorova¹, O. V. Shtapenko¹, Yu. A. Rzhetsky³,
T. V. Skorokhoda⁴, O. S. Zaichenko⁴, V. V. Vlizlo¹

¹Institute of Animal Biology of NAAS, 38, V. Stus St., Lviv 79034, Ukraine,
e-mail: ivanytska.lyudmyla@gmail.com

²Eotvos Lorand University, Pázmány Péter sétány 1/C. H-1117 Budapest, Hungary

³Institute of Cell Biology of NAS of Ukraine, 14–16, M. Dragomanov St., Lviv 79005, Ukraine

⁴Lviv Polytechnic National University, 12, St. Bandera St., Lviv 79013, Ukraine

The paper presents some issues of utilizing novel polymeric compound for improving antisense-oligonucleotides delivery to mammalian cells. DNA-binding ability of dimethylaminoethylmethacrylate oligoelectrolite was tested. It was estimated that polyDMAEM in concentration less than 5 µg/ml did not induce cytotoxic effects in mouse embryonic fibroblasts and cells of L1210 line and could be used in *in vitro* studies. The study of polyDMAEM and its complexes with asODNs action on the cellular prion (PrP^C) expression level evinced that different immobilized asODNs caused reduction of PrP^C content by 70–90% in L1210 cells. It was found that polyDMAEM is able to decrease PrP^C content by 40 % in L1210 cells by itself. Possible mechanisms of such influence are discussed. A possibility of successful using asODNs and carrier conjugates for cellular prion gene silencing in rat spleen and intestine is shown. Effects of polyDMAEM action on PrP^C content has not been ascertained *in vivo*.

Keywords: antisense-oligodeoxynucleotides, gene silencing, prion, cationic oligoelectrolytes.

ЭФЕКТИВНЫЙ МЕТОД СНИЖЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ПРИОН-ПРОТЕИНА *IN VITRO* И *IN VIVO* АНТИСЕНС-ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДАМИ, КОНЪЮГИРОВАННЫМИ С НОВЫМ ОЛИГОЭЛЕКТРОЛИТОМ НА ОСНОВЕ ДИМЕТИЛАМИНОЭТИЛМЕТАКРИЛАТА

Л. А. Иваницкая¹, В. В. Стадник², Ю. В. Мартын¹, М. Р. Козак¹,
С. В. Федорова¹, О. В. Штапенко¹, Ю. А. Ржепецкий³,
Т. В. Скорохода⁴, А. С. Заиченко⁴, В. В. Влизло¹

¹Институт биологии животных НААН, ул. В. Стуса, 38, Львов 79034, Украина,
e-mail: ivanytska.lyudmyla@gmail.com

²Eotvos Lorand University, Pázmány Péter sétány 1/C. H-1117 Будапешт, Венгрия

³Институт биологии клетки НАН Украины
ул. М. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина

⁴Национальный Университет „Львовская политехника”,
ул. Ст. Бандеры, 12, Львов 79013, Украина

В статье рассмотрены некоторые аспекты использования нового полимерного вещества для доставки антисенс-олигодезоксинуклеотидов (асОДН) в клетки млекопитающих. Исследованы ДНК-связывающие свойства олигоэлектrolита на основе диметиламиноэтилметакрилата. Установлено, что полиДМАЭМ в концентрации менее 5 мкг/мл не оказывает цитотоксического действия на культуру эмбриональных фибробластов мышей и клетки лимфоцитарной лейкемии мышей линии L1210 и может использоваться в экспериментах *in vitro*. Результаты исследования влияния полиДМАЭМ и его комплексов с асОДН на уровень экспрессии физиологического приона (PrP^C) в клетках линии L1210 свидетельствуют, что применение разных иммобилизованных асОДН приводит к снижению содержания PrP^C на 70–90%. Обнаружена способность полиДМАЭМ снижать уровень экспрессии прион-протеина на 40% в культуре клеток L1210. Возможные механизмы этого явления дискутируются. Показана возможность успешного использования конъюгатов асОДН и носителя для практически полного подавления экспрессии физиологического приона в селезенке и тонком кишечнике крыс. В экспериментах *in vivo* влияния полиДМАЭМ на содержание PrP^C не обнаружено.

Ключевые слова: антисенс-олигодезоксинуклеотиды, подавление экспрессии генов, прион-протеин, катионактивные олигоэлектrolиты.

Одержано: 14.11.2011