



УДК 547.962+577.27

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 3'-ФТОР-3'-ДЕЗОКСИАНАЛОГОВ ТРИМЕРА (2'-5')ОЛИГОАДЕНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ С (2'-5')A₃-АНТИТЕЛАМИ: СТЕРЕОХИМИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

© 1999 г. Е. Н. Калиниченко, Т. Л. Подкопаева, И. А. Михайлопуло[#],
М. Келве*, М. Саарма*, Ж. ван де Боогарт**, К. Алтона**

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. Купревича, 5/2, Беларусь;

*Институт химической физики и биофизики АН Эстонии, 200026, Таллинн, Эстония;

**Горлеус лаборатория, Государственный университет Лейдена, Нидерланды

Поступила в редакцию 29.05.98 г. Принята к печати 19.02.99 г.

Мышинные антитела к (2'-5')олигоаденилатам были получены иммунизацией животных тримером (2'-5')олигоадениловой кислоты, конъюгированным через 2',3'-левулиновую группу с бычьим сывороточным альбумином. Реактивность антител с двумя типами аналогов (2'-5')олигоадениловой кислоты, содержащих 9-(3-дезоксидеокси-3-фтор-β-D-ксилофуранозил)аденин и 3'-дезоксидеокси-3'-фтораденозин в различных положениях цепи с мышинными поликлональными антителами к тримеру (2'-5')олигоадениловой кислоты была изучена методом радиоиммунного анализа. Было найдено, что (а) пространственная структура коротких олигонуклеотидов является важным фактором в их узнавании антителами; (б) антитела более чувствительны к модификации 5'-терминального и центрального рибозных фрагментов тримера (2'-5')олигоадениловой кислоты; (в) 3'-гидроксильная группа играет второстепенную роль в формировании антигенной детерминанты.

Ключевые слова: (2'-5')олигоаденилаты, 3'-дезоксидеокси-3'-фтораналоги; анти-(2'-5')A₃-сыворотка, иммунизация; радиоиммунологический анализ.

Антитела к коротким олигонуклеотидам – ценная модельная система для изучения роли различных факторов в процессе белок-нуклеинового взаимодействия. Показано, что критическим фактором в узнавании антителами олигонуклеотидов является природа углеводфосфатного остатка [1–3]. В свою очередь пространственное строение олигонуклеотида определяется главным образом характером фосфодиэфирных связей. Так, с помощью конформационного анализа (2'-5')- и (3'-5')олигомеров, содержащих одинаковые нуклеозиды, были обнаружены существенные различия в их пространственной организации [4]. В результате изучения взаимодействия (3'-5')тринуклеотидов с кроличьей антисывороткой к тримеру (3'-5')олигоадениловой кислоты высказано предположение, что антитела узнают не только последовательность [5], но и трехмерную структуру тримера [6].

В настоящей работе изучена роль конформационных особенностей олигонуклеотидов в узнавании их антителами на примере взаимодействия двух типов аналогов тримера (2'-5')олигоадениловой кислоты, содержащих 9-(3-дезоксидеокси-3-фтор-β-D-ксилофуранозил)аденин (A^F) или 3'-дезоксидеокси-3'-фтораденозин (A_F) в различных положениях цепи с мышинными поликлональными антителами к (2'-5')A₃. 5'-Трифосфорилированные (2'-5')олигоаденилаты и их 5'-дефосфорилированные производные, соответственно rpp(2'-5')A₃ и (2'-5')A₃, участвуют во многих биохимических превращениях в клетках животных, включая один из путей антивирусного действия интерферона [7]. В результате детального конформационного анализа было установлено, что замещение 3'-гидроксильной группы аденозина на атом фтора приводит к потере конформационной подвижности фуранозного цикла, т.е. наиболее заселенной в случае A^F является N-конформация со значительно уплощенным циклом (Φ_N ≈ 30°) по сравнению с изомерной молекулой A_F (Φ_N ≈ 40°), фуранозный цикл которой находится практически полностью в S-конформации [8]. Примечательно, что замещение одного из аденозиновых звеньев (2'-5')тримеров на конформационно жесткий аналог, A^F или A_F, приводит к изменению конформации олигонуклеотидной цепи в целом. Более того, было показано,

Сокращения: (2'-5')A₃ и rpp(2'-5')A₃ – аденилил(2'-5')аденилил(2'-5')аденозин и его трифосфат; (2'-5')3'dA₃ – 3'-дезоксидеоксиаденилил(2'-5')-3'-дезоксидеоксиаденилил(2'-5')-3'-дезоксидеоксиаденозин; (2'-5')A₃-Lev – аденилил(2'-5')аденилил(2'-5')[2',3'-O-(2-карбоксиил)этилиден]аденозин; A^F – 9-(3-дезоксидеокси-3-фтор-β-D-ксилофуранозил)аденин; A_F – 3'-дезоксидеокси-3'-фтораденозин; BSA – бычий сывороточный альбумин; РНКазы L – 2-5А-зависимая эндорибонуклеаза.

[#] Автор для переписки (тел./факс: (0172) 648-324; e-mail: igormikh@ns.iboch.ac.by).

Таблица 1. Реактивность мышинных антител к (2'-5')A₃ по отношению к модифицированным (2'-5')олигоаденилатам*

(2'-5')Олигомеры	Антисыворотка	
	I	II
	ID ₅₀	
A ₃	1.0	1.0
3'dA ₃	1.4	**
A ^F AA	3333	100
AA ^F A	267	333
AAA ^F	13.0	10.0
A _F AA	8.0	2.7
AA _F A	3.0	2.0
AAA _F	2.0	1.0

* Индексы различия (ID) рассчитаны делением среднего значения IC₅₀ исследуемого тримера на среднее значение IC₅₀ для (2'-5')A₃; чем выше значение ID, тем менее реактивным является тример к антисыворотке.

** Значение не определено из-за ограниченного количества антисыворотки.

что в тримерах (2'-5')A^FAA и (2'-5')AA^FA гетероциклическое основание ксилозида A^F находится в *син*-конформации относительно гликозидной связи. С биохимической точки зрения интерес представляет тот факт, что существует корреляция между конформационными характеристиками 3'-фтор-3'-дезоксидеокси(2'-5')олигонуклеотидов и их способностью связываться с РНКазой L, а также их повышенной устойчивостью к 2'-5'-фосфодиэстеразе [8, 9]. Эти данные побудили нас изучить взаимодействие 3'-фтор-3'-дезоксидеоксианалогов (2'-5')A₃ с мышинными антителами к (2'-5')A₃.

Для получения мышинных поликлональных антител был использован конъюгат тримера (2'-5')олигоадениловой кислоты с бычьим сывороточным альбумином (BSA) [10, 11]. В результате иммунизации в двух сериях опытов были получены две антисыворотки (I и II), которые обладали низкой, более чем на три порядка, кроссреактивностью с (3'-5')тримером олигоадениловой кислоты, 2'-, 3'- и 5'-АМФ (данные не приведены). Это свидетельствует в пользу критически важного вклада углеводов-(2'-5')фосфатного остова в антигенную детерминанту олигонуклеотида. Взаимодействие тримера (2'-5')олигоадениловой кислоты и его 3'-дезоксидеокси- и 3'-фтор-3'-дезоксидеоксианалогов с антителами было изучено методом радиоиммунного анализа согласно работе [12]. Данные представлены в табл. 1.

3'-Дезоксиаденозиновый (кордицепиновый) аналог (2'-5')A₃ реагирует с антисывороткой I так же хорошо, как и тример (2'-5')A₃; таким образом,

3'-гидроксильная группа в любом нуклеозидном звене не играет существенной роли в узнавании антисывороткой I. Следует отметить, что аналогичной специфичностью в отношении (2'-5')3'dA₃ обладали поликлональные кроличьи антитела, полученные иммунизацией животных конъюгатом BSA с (2'-5')A₃. Конъюгат синтезировали периодатным окислением 2',3'-диольной группы (2'-5')A₃ [1]. Однако антитела, полученные иммунизацией кроликов аналогичным конъюгатом трифосфата (2'-5')A₃ с BSA, обнаружили очень низкую реактивность с 3'-дезоксидеоксиновыми аналогами (2'-5')A₃ [2], что предполагает критически важный вклад рассматриваемой гидроксильной группы в процесс связывания.

Замещение одной из 3'-гидроксильных групп тримера (2'-5')A₃ на атом фтора в отличие от замещения (2'-5')3'dA₃ приводит к значительным изменениям реактивности олигомеров (табл. 1). Наиболее интересным результатом исследования является зависимость реактивности антител от конфигурации атома фтора и нахождения модифицированного нуклеозида в цепи олигомера. Тримеры *рибо*-конфигурации, содержащие атом фтора, несколько менее реактивны, чем (2'-5')A₃. Напротив, замена 3'-гидроксильной группы на атом фтора в *ксило*-конфигурации приводит к значительному изменению реактивности в зависимости от положения модифицированного нуклеозида в цепи. Модификация 5'-терминального и центрального нуклеозида сопровождается уменьшением реактивности поликлональных антител более чем на два порядка, тогда как аналогичная модификация 2'-терминального аденозина снижает реактивность приблизительно на порядок.

Учитывая наши данные по реактивности (2'-5')3'dA₃, индексы различия ID₅₀ фтордезоксидеоксианалогов (2'-5')A₃ должны отражать их конформационные особенности. Реактивности изомеров в каждой паре фтордезоксидеоксианалогов (*рибо*- и *ксило*-) сильно различаются. Как отмечалось выше, замещение 3'-гидроксильной группы аденозина на атом фтора приводит к существенной потере $S \rightleftharpoons N$ -конформационной подвижности фуранозного кольца и эти особенности *ксило*- и *рибо*-фтордезоксинуклеозидов отражаются на состоянии олигомерной молекулы [8]. Следует заметить, что $S \rightleftharpoons N$ -конформационное равновесие немодифицированных аденозиновых остатков остается практически одинаковым как для тримера (2'-5')A₃, так и в олигомерах, содержащих A^F либо A_F. Другими словами, кооперативность, по-видимому, отсутствует.

Мы полагаем, что пространственное строение тримеров (2'-5')A^FAA и (2'-5')AA^FA, определяемая влиянием *N*-конформации фуранозного кольца и

син-ориентации гетерооснования вокруг гликозидной связи в A^F , является неблагоприятным для взаимодействия с изученными антителами. Следует заметить, что в случае тримера $(2'-5')A_3$ фуранозный цикл находится в динамичном $S \leftrightarrow N$ -равновесии с преимущественной *анти*-ориентацией всех адениновых оснований [8]. Можно также предполагать, что антитела узнают тример в S -конформации углеводных фрагментов, что согласуется с доминирующей S -конформацией остатков 3'-дезокси-3'-фторадеозина. Это предположение, однако, не согласуется с данными по конформационному анализу кордицепинового $(2'-5')$ тримера, для которого было установлено преимущественное заселение N -конформации [13]. По-видимому, конформационная жесткость фуранозного цикла A^F наряду с *син*-ориентацией основания приводит к низкой реактивности к антителам. Эта ситуация имеет определенную аналогию со связыванием с РНКазой L бромированных аналогов трифосфата $(2'-5')A_3$, где для эффективного взаимодействия с ферментом необходима *анти*-ориентация гетероциклического основания 5'-терминального фрагмента [14].

Стереохимические особенности фтордезоксисаналогов $(2'-5')A_3$ находят свое отражение в КД-спектрах изученных $(2'-5')$ олигонуклеотидов тримеров. Форма полос КД-спектров всех фтордезоксисаналогов похожа на форму полос $(2'-5')A_3$ [4], однако амплитуды эффекта Коттона существенно различаются в зависимости от положения модифицированного нуклеозида и от конфигурации атома фтора (рис. 1 и 2; табл. 2). Эти различия, как и в случае реактивности антител, являются наибольшими в случае *ксило*-фтордезоксисолигомеров $(2'-5')A^F AA$ и $(2'-5')AA^F A$, а также олигомера $(2'-5')AAA_F$. Последний результат с учетом данных по реактивности антител представляется неожиданным и свидетельствует об отсутствии прямой корреляции между КД и сродством к антителам. Следует также отметить, что данные по гипохромизму не коррелируются с данными по КД.

Таким образом, в настоящей работе впервые показано, что пространственное строение коротких олигонуклеотидов, определяемое в первую очередь структурой углеводно-(2'-5')фосфатного остова, является важным фактором в их узнавании поликлональными мышинными антителами. При присоединении гаптена к иммуногену через 2'-терминальный рибозный остаток антитела более чувствительны к модификации 5'-терминального и среднего рибозных фрагментов $(2'-5')A_3$, а именно главный эпитоп узнавания включает оба адениновых гетероцикла с *анти*-ориентацией гликозидных связей (ср. с данными работ [1, 2, 6]). 3'-Гидроксильная группа играет, по-видимому,

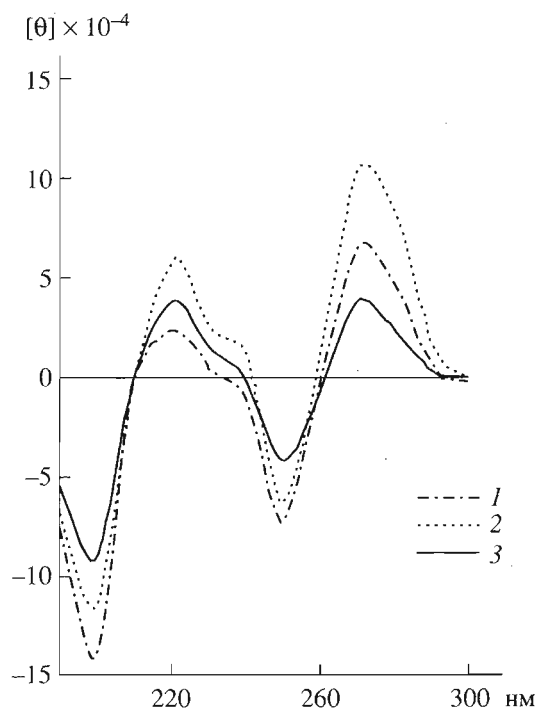


Рис. 1. КД-спектры *ксило*-фтордезоксисаналогов тримера $(2'-5')A_3$ – $A^F AA$ (1), $AA^F A$ (2), AAA^F (3) в 0.01 М фосфатном буфере (pH 7.0).

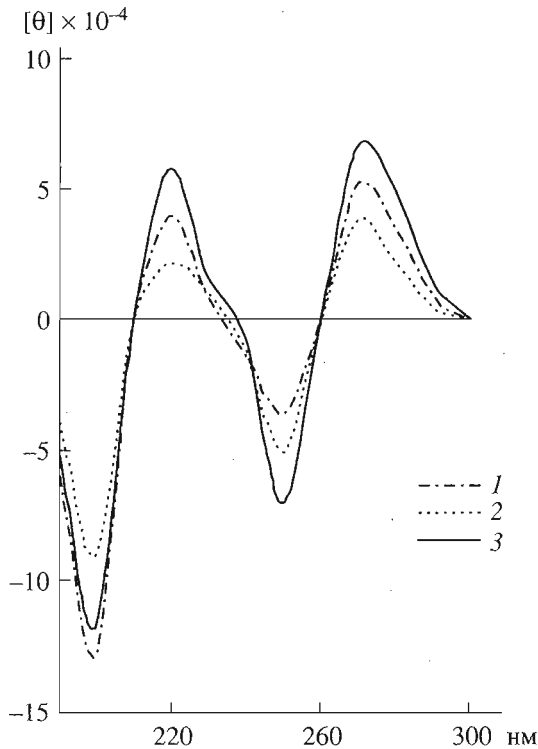


Рис. 2. КД-спектры *рибо*-фтордезоксисаналогов тримера $(2'-5')A_3$ – $A^F AA$ (1), $AA^F A$ (2), AAA^F (3) в 0.01 М фосфатном буфере (pH 7.0).

Таблица 2. Данные КД-спектроскопии и величины гипохромизма 3'-фтордезоксиналогов (2'-5')A₃

(2'-5')Олигомеры	Гипохромизм, %	КД*		
		λ, нм	[θ] × 10 ⁻³	λ, нм, θ = 0
A ^F AA	19	270	+65.4	290, 259
		250	-72.3	233, 214
		218	+23.8	
AA ^F A	7.5	270	+101.7	300, 257
		250	-67.0	238, 212
		218	+58.5	
AAA ^F	16	270	+39.0	283, 262
		249	-41.9	225, 218
		220	+39.1	
A _F AA	16	270	+52.1	294, 259
		250	-35.5	237, 213
		219	+40.2	
AA _F A	20	270	+37.9	305, 259
		250	-49.1	237, 214
		221	+22.3	
AAA _F	25	270	+65.8	249, 259
		249	-70.2	237, 212
		219	+57.5	

* Все спектры имели плечо в области 230–240 нм.

второстепенную роль в формировании антигенной детерминанты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез фторзамещенных тримеров опубликован ранее в работах [8, 9]. Тример (2'-5')олигоадениловой кислоты и его кордицепиновый аналог (2'-5')3'dA₃ синтезированы как описано в работах [15, 16]. УФ-спектры записаны на спектрофотометре Specord UV-VIS (Carl Zeiss, Германия). КД-спектры записаны на спектрофотометре J-20 (JASCO, Япония) в 2 мм кюветах в 0.01 М фосфатном буфере (рН 7.0) при 20°C. Данные по КД вычислены из молярного коэффициента поглощения каждого тримера с учетом гипохромизма (табл. 2). Гипохромизм определялся ферментативно с использованием фосфодиэстеразы змеиного яда (Boehringer Mannheim, Германия) как описано в работе [17]; данные суммированы в табл. 2. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) проводилась на хроматографе Bruker LC 31 (Bruker, Германия) на колонке Zorbax ODS C18 (4.6 × 150 мм) в линейном градиенте концентрации буфера А (50 мМ (NH₄)H₂PO₄, рН 7.0) в раствор Б (MeOH-H₂O, 1 : 1) (25 мин) и на хроматографе Altex (Altex, США) на колонке Ultra-

sphere ODS (4.6 × 250 мм) с использованием того же градиента (70 мин).

Иммунизация мышей и радиоиммунологический анализ. Тример (2'-5')олигоадениловой кислоты, несущий в 2'-терминальном аденозине (2-карбокситил)этилиденную группу, (2'-5')A₃-Lev, конъюгировали с BSA как описано в работе [11]. Конъюгирование приводило к замещению 4.27 моль гаптенных групп, (2'-5')A₃-Lev на моль BSA, определенное по УФ-поглощению конъюгата с использованием молярного коэффициента поглощения (2'-5')A₃ ε₂₅₉ 35800 (гипохромизм 23%). Мыши линии BALB/c иммунизировались интраперитонеально 200 мг конъюгата в 200 мкл 0.85% изотонического раствора хлористого натрия, эмульгированного в равном объеме полного адъюванта Фрейнда. Через две недели процедуру повторяли с неполным адъювантом Фрейнда. Последующие инъекции 200 мг (2'-5')A₃-Lev-BSA в неполном адъюванте Фрейнда (200 мкл) выполняли с месячным интервалом в течение 6 месяцев. Иммуническую сыворотку готовили центрифугированием крови при 400 g в течение 5 мин.

После добавления равного объема глицерина образцы сыворотки хранили при -20°C. В радиоиммунном анализе использовали антисыворотку индивидуальной мыши, разбавленную в 100 раз изотоническим раствором.

Радиоактивная проба (2'-5')A₃-3' [³²P]p5'C3'p была синтезирована и очищена как описано в работе [12], все разбавления делали в Трис-HCl-буферном растворе (рН 7.6). Для каждого олигонуклеотида определяли концентрацию (средние значения трех-пяти экспериментов), необходимую для вытеснения 50% меченого лиганда из комплекса с антителами (IC₅₀). Значения IC₅₀ для (2'-5')A₃ составляли 3 × 10⁻⁹ и 3 × 10⁻⁸ М с антисыворотками I и II соответственно. Данные суммированы в табл. 1 в виде индекса различия, ID₅₀, вычисленного делением значения IC₅₀ исследуемого аналога на значение IC₅₀ для (2'-5')A₃. Чем выше ID₅₀, тем менее реактивен тример с антисывороткой.

Авторы благодарны д. х. н. Квасюку Е.И. и к. х. н. Кулак Т.И. за предоставление конъюгата (2'-5')A₃-Lev-BSA. Авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность Фонду им. А. фон Гумбольдта (Бонн-Бан-Годесберг, Германия) за частичную финансовую поддержку настоящего исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sawai H., Shinomiya T. // J. Biochem. (Tokyo). 1982. V. 92. P. 1723–1730.
2. Johnston M.I., Imai J., Lesiak K., Torrence P.F. // Biochemistry. 1983. V. 22. P. 3453–3460.

3. Johnston M.I., Imai J., Lesiak K., Jacobsen H., Sawai H., Torrence P.F. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. P. 4710–4718.
4. Doornbos J., Den Hartog J.A.J., van Boom J.H., Altona C. // *Eur. J. Biochem.* 1981. V. 116. P. 403–412.
5. Suck D., Manor P.C., Germain G., Schwalbe C.H., Weimann G., Saenger W. // *Nature. New Biology (London)*. 1973. V. 246. P. 161–163.
6. D'Alisa R.M., Erlanger B.F. // *Biochemistry*. 1974. V. 13. P. 3575–3579.
7. Torrence P.F. // *Biological Response Modifiers. New Approaches to Disease Intervention / Eds P.F. Torrence*. Orlando: Academic Press, 1985. P. 77–105.
8. Van den Boogaart J.E., Kalinichenko E.N., Podkopaeva T.L., Mikhailopulo I.A., Altona C. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 221. P. 759–768.
9. Kalinichenko E.N., Podkopaeva T.L., Kelve M., Saarma M., Mikhailopulo I.A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990. V. 167. P. 20–26.
10. Kvasyuk E.I., Kulak T.I., Zaitseva G.V., Mikhailopulo I.A., Charubala R., Pfeleiderer W. // *Tetrahedron Lett.* 1984. V. 25. P. 3683–3686.
11. Квасюк Е.И., Кулак Т.И., Зайцева Г.В., Михайлопуло И.А., Пфляйдерер В. // *Биоорганич. химия*. 1984. Т. 10. С. 506–514.
12. Knight M., Cayley P.J., Silvermann R.H., Wreschner D.H., Gilbert C.S., Brown R.E., Kerr I.M. // *Nature (London)*. 1980. V. 288. P. 189–192.
13. Doornbos J., Charubala R., Pfeleiderer W., Altona C. // *Nucl. Acids Res.* 1983. V. 11. P. 4569–4582.
14. Van den Hoogen Y.Th., Hilgersom G.M.A., Brozda D., Lesiak K., Torrence P.F., Altona C. // *Eur. J. Biochem.* 1989. V. 182. P. 629–637.
15. Квасюк Е.И., Кулак Т.И., Калиниченко Е.Н., Подкopaева Т.Л., Михайлопуло И.А., Пфляйдерер В. // *Биоорганич. химия*. 1985. Т. 11. С. 1227–1238.
16. Kvasyuk E.I., Kulak T.I., Khrpach N.B., Mikhailopulo I.A., Uhlmann E., Charubala R., Pfeleiderer W. // *Synthesis*. 1987. № 6. P. 535–541.
17. Huss S., Gosselin G., Pompon A., Imbach J.-L. // *Nucleosides Nucleotides*. 1986. V. 5. P. 275–300.

The Stereochemical Aspect of the Interaction of 3'-Fluoro-3'-deoxy Analogues of the (2'-5')Oligoadenylic Acid Trimer with (2'-5')A₃ Antibodies

E. N. Kalinichenko*, T. L. Podkopaeva*, I. A. Mikhailopulo**, M. Kelve**,
M. Saarma**, J. van den Boogaart***, and C. Altona***

*Institute of Bioorganic Chemistry, Belarussian Academy of Sciences, ul. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

**Institute of Chemical Physics and Biophysics, Estonian Academy of Sciences, Tallinn, 200026 Estonia

***Gorlaeus Laboratories, Leiden University, Leiden, the Netherlands

Mouse antibodies to (2'-5')oligoadenylates were obtained by the immunization of animals with the (2'-5')oligoadenylic acid trimer conjugated with bovine serum albumin through a 2',3'-levulinic acid residue. Using radioimmunoassay, the reactivity of mouse polyclonal antibodies to the (2'-5')oligoadenylic acid trimer was studied for the trimer analogues containing 9-(3-deoxy-3-fluoro-β-D-xylofuranosyl)adenine and 3'-deoxy-3'-fluoro-adenosine in various positions of the chain. It was found that (a) the three-dimensional structure of short oligonucleotides is an important factor in the antibody recognition; (b) antibodies are more sensitive to modifications of the 5'-terminal and central ribose fragments of the (2'-5')oligoadenylic acid trimer; (c) the 3'-hydroxyl group plays a secondary role in the formation of the antigen determinant.

Key words: anti(2'-5')A₃ serum, 3'-deoxy-3'-fluoro analogues, immunization, (2'-5')oligoadenylates, radioimmunoassay

To whom correspondence should be addressed; phone/fax: +7 (0172) 648-324; e-mail: igormikh@ns.iboch.ac.by.