



УДК 577.214.337

© 1990 г.

Т. Ю. Килессо, Н. Б. Тарусова*, Е. Д. Атражева*,
М. К. Буханова*, С. В. Шулекин, А. Ф. Бобков,
М. М. Гареев, Г. А. Галегов, А. А. Краевский*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ИНГИБИТОРНЫЙ АНАЛИЗ БИОСИНТЕЗА ДНК, КАТАЛИЗИРУЕМОГО ОБРАТНЫМИ ТРАНСКРИПТАЗАМИ РЕТРОВИРУСОВ

Институт вирусологии им. Д. Н. Ивановского, АМН СССР, Москва;

* *Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР, Москва*

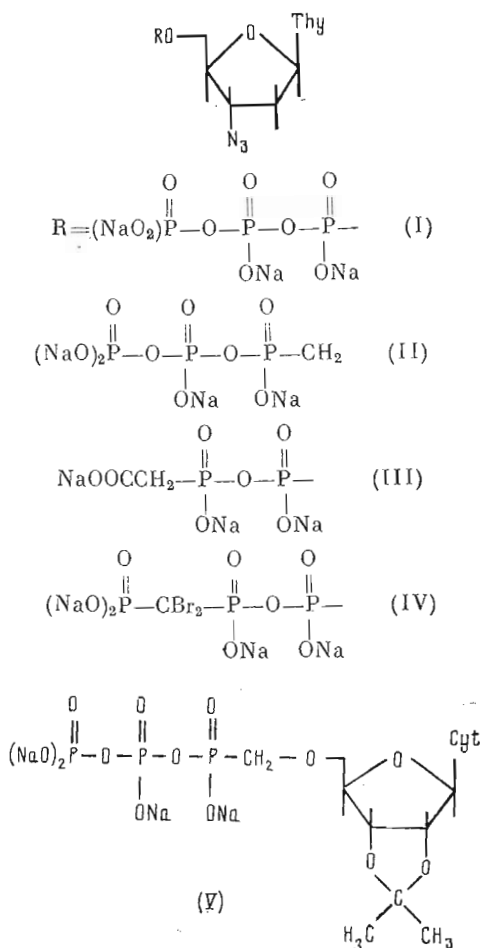
Проведено сравнительное изучение ингибирования биосинтеза ДНК, катализируемого обратной транскриптазой AMV и HIV вирусного и генно-инженерного происхождения. В качестве ингибиторов использовали 3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-трифосфат (I), 3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-метиленфосфонат-дифосфат, 2',3'-О-изопропилиденцитидин-5'-метиленфосфонат-дифосфат, 3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-фосфат-фосфоноацетат, 3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-фосфат-дибромметилен-дифосфонат. Показано, что первое соединение — наиболее активный ингибитор указанных обратных транскриптаз, но если подавление им активности транскриптазы AMV будет в 30—35 раз более высоких концентраций, чем для транскриптазы HIV, то для остальных изученных нами производных это различие составляет 100—200 раз. Только для 2',3'-О-изопропилиденцитидин-5'-метиленфосфонат-дифосфата селективность в отношении изученных обратных транскриптаз невелика. Таким образом, трифосфат (I) более эффективно ингибирует транскриптазу HIV, чем транскриптазу AMV, что еще более выражено у его фосфонатных аналогов.

Доказательство ретровирусной природы HIV определило основное направление в разработке средств терапии синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) [1]. Получивший наибольшую известность лекарственный препарат «Ретровир» (3'-азидо-3'-дезокситимидин) после превращения в клетках в соответствующий 5'-трифосфат (I) [2—5] становится активным и высокоселективным ингибитором биосинтеза ДНК, катализируемого обратной транскриптазой HIV [6, 7]. Эта селективность действия соединения стимулировала последующие исследования по направленной синтезу других аналогов нуклеозидов с селективной антивирусной активностью. Однако их изучение было проведено главным образом на обратных транскриптазах AMV и RSV как наиболее доступных [8, 9]. Поэтому основной акцент делался на различии в субстратных свойствах различных производных по отношению к обратным транскриптазам ретровирусов и ДНК-полимеразам млекопитающих (человека). Практически ничего неизвестно о различиях в субстратной специфичности транскриптаз различных ретровирусов, что представляет несомненный теоретический и практический интерес.

Настоящее сообщение посвящено сравнительному изучению ингибирования биосинтеза ДНК, катализируемого обратными транскриптазами AMV и HIV вирусного и генно-инженерного происхождения. В качестве ингибиторов использовали различные фосфорные производные 3'-азидо-3'-дезокситимидина и 2',3'-О-изопропилиденцитидина (I)—(V). Ранее показано, что трифосфат (I) и 2',3'-О-изопропилиденцитидин-5'-трифосфат

Сокращения: HIV — вирус иммунодефицита человека (human immunodeficiency virus), RSV — вирус саркомы Рауса (Rause sarcoma virus), AMV — вирус миеобластома птиц (avian myeloblastose virus).

являются селективными ингибиторами синтеза ДНК, катализируемого обратной транскриптазой AMV [8—10].



Исследование производных (I)—(V) проведено по подавлению катализа синтеза oligo(dT) на матрице poly(rA) при внесении в реакционную смесь [³H]dTTP в концентрации 0,8 мкМ. Обратная транскриптаза AMV отечественного производства, транскриптаза HIV вирионная изучалась непосредственно в лизате HIV, выделенного из клеток H9 и H9/IIIB [11]; частично очищенный препарат рекомбинантной транскриптазы HIV, несущий плазмиду pPR6, получен по методу [12].

Как видно из рис. 1, подавление зависит от концентрации трифосфата (I) и несколько слабее для фермента из вируса по сравнению с рекомбинантным. Так, подавление включения [³H]dTTP на 50% для вирусного фермента достигается при концентрации трифосфата (I) 0,04 мкМ (мольное соотношение производного (I) и [³H]dTTP 1 : 20), а для рекомбинантного фермента эти данные соответственно 0,012 мкМ и 1 : 65. Кривая 3 представляет результаты, полученные в опыте, когда катализ проводился смесью примерно одинаковых по активности обеих обратных транскриптаз.

Из рис. 1 можно сделать следующие выводы. Во-первых, обе транскриптазы эффективно катализируют синтез oligo(dT), причем трифосфат (I) является ингибитором этого процесса. Во-вторых, несколько различная чувствительность двух ферментов к ингибитору, возможно, объясняется их разной процессивностью. В-третьих, механизм действия трифосфата (I) представляется нам как терминаторный, ибо другим способом трудно объяснить подавление синтеза на 50% при мольном соотношении ингибитор — субстрат 1 : 20 и 1 : 65. Последний вывод соответствует най-

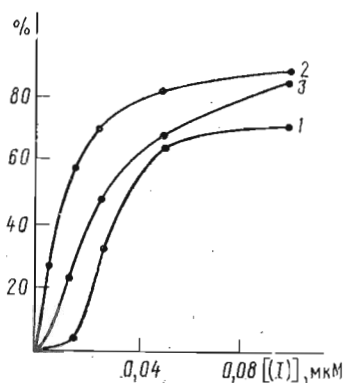


Рис. 1. Ингибирующее действие трифосфата (I) на активность вирусной (1) и рекомбинантной (2) обратной транскриптазы HIV и их смеси в соотношении 1:1 (3). Уровень включения $[^3\text{H}]\text{TMP}$ в кислотонерастворимую фракцию без добавления ингибитора составлял 20 000—60 000 имп./млн

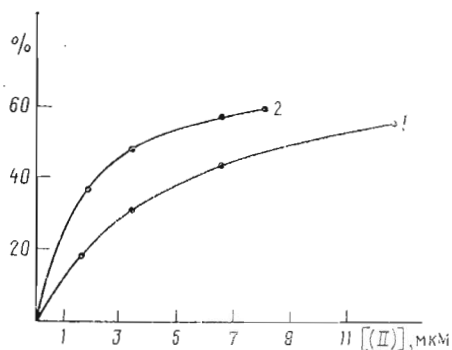


Рис. 2. Ингибирующее действие производного (II) на активность вирусной (1) и рекомбинантной (2) обратной транскриптазы HIV. Уровень включения $[^3\text{H}]\text{TMP}$ в кислотонерастворимую фракцию без добавления ингибитора составлял 6000—36 000 имп./млн

денным ранее данным по действию трифосфата (I) на синтез ДНК, катализируемый обратной транскриптазой AMV [8, 9].

В молекулах изучаемых аналогов (II)—(IV) имеется дополнительная модификация по фосфорным остаткам. Стандартом для изучения их свойств (табл. 1) является трифосфат (I), несущий лишь одну модификацию в молекуле по сравнению с dTTP, свойства которого и механизм действия достаточно хорошо изучены [6—10]. Введение второй модификации в молекулу трифосфата (I) имело целью дополнительно повысить селективность таких соединений к обратным транскриптазам по сравнению с ДНК-полимеразами млекопитающих, так как ранее показано, что дополнительная модификация α -фосфатного остатка действительно увеличивает избирательность [13]. Вторая цель замены фосфатных групп на фосфонатные или карбоксильные группы состоит в том, чтобы повысить проницаемость клетки по отношению к молекулам исследуемых соединений, так как известно, что монофосфонаты диффундируют через клеточные мембраны [14].

Соединение (V), выбранное по той же причине, что и 5'-трифосфат 2',3'-O-изопропилиденцитидина, показало себя как относительно специфичный ингибитор обратной транскриптазы AMV [10].

Как видно из табл. 1, концентрации, при которых соединения (I) — (V) ингибируют синтез на 50%, существенно различаются как для разных ферментов, так и для разных соединений. Трифосфат (I) — наиболее активный ингибитор среди изученных соединений (II)—(V) по отношению к обратным транскриптазам AMV и HIV, как вирусной, так и рекомбинантной. Среди других производных азидотимидина (II)—(IV) самую меньшую ингибиторную активность имело соединение (II) (табл. 1, рис. 2), тогда как дибромметилendisфосфонат (IV) уступал производному (I) только в 3—10 раз. Относительно высокой активностью обладает аналог (III), в котором γ -фосфатная группа замещена на карбоксиметильную; насколько нам известно, аналоги dNTP с γ -карбоксилем вместо фосфатного остатка в качестве субстратов или ингибиторов ДНК-полимераз ранее не применялись.

Необходимо отметить различную чувствительность обратных транскриптаз AMV и HIV к действию ингибиторов. 50%-ное подавление синтеза, катализируемого транскриптазой AMV достигается трифосфатом (I) при концентрации в 30—35 раз более высокой, чем для транскриптазы HIV, тогда как в случае производных (II)—(IV) это различие составляет

Подавление с помощью аналогов нуклеозид-5'-трифосфатов синтеза *oligo(dT)* на матрице *poly(rA)*, катализируемого обратными транскриптазами AMV, HIV, вирусной и генно-инженерной

Номер соединения	Название ингибитора	IC ₅₀ (мкМ) для обратной транскриптазы		
		AMV	HIV вирусной	HIV рекомбинантной
(I)	3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-трифосфат	1,25	0,038	0,012
(II)	3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-метиленфосфонат-дифосфат	390	3,1	4,75
(III)	3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-фосфат-фосфоацетат	124	0,6	0,2
(IV)	3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-фосфат-дибромстилендифосфат	18	0,2	0,04
(V)	2',3'-О-Изопропилиденцитидин-5'-метиленфосфонат-дифосфат	23	9,8	2,5

уже 100—200 раз, и только в случае производного (V) избирательность между этими двумя ферментами невелика и ингибирование несколько сильнее выражено при катализе транскриптазы HIV, чем AMV.

Система *poly(rA)·oligo(dT)*, используемая в этих опытах, удобна для тестирования обратных транскриптаз даже в присутствии других ДНК-полимераз, но не очень характерна для количественного выявления свойств субстратных ингибиторов ДНК-полимераз, так как параметры спирали *poly(rA)·oligo(dT)* существенно отличаются от природного комплекса РНК·ДНК.

Экспериментальная часть

3'-Азидо-3'-дезокситимидин-5'-метиленфосфонат-дифосфат (II), 2',3'-О-изопропилиденцитидин-5'-метиленфосфонат-дифосфат (V) синтезированы из морфолидов соответствующих 5'-метиленфосфонатов в соответствии с методиками [14]. Константы соединений указаны в табл. 2. Соединения (III), (IV) были получены из 3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-фосфата и соответствующих фосфоновых кислот обычным имидазолидным методом.

В работе использовалась обратная транскриптаза AMV отечественного производства с уд. акт. 10 ед./мкл.

Частично очищенный препарат рекомбинантной обратной транскриптазы HIV получали из экстракта клеток *E. coli* (DH5α : F⁻, *end* A1, *hsd* R17 (r⁻; m⁺), *sup* E44, *thi* — 1, λ⁻, *rec*A1, *gyr* A96, *rel* A1 Δ (*arg* F — *lac* zga), V169, φ 80d, *lac* Z Δ M25 (штамм получен от члена-кор. АН СССР Свердлова Е. Д., ИВХ АН СССР), несущих плазмиду pPR6, которая детерминирует синтез протеиназы, полимеразы и части эндонуклеазы [15]. Клетки выращивали 18 ч (37° С) в полноценной среде следующего состава: 1% бакто-триптона, 0,5% дрожжевого экстракта и 0,5% NaCl — при постоянном перемешивании. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин на холоде и ресуспендировали в 1/200 первоначального объема в буфере, содержащем 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 10% сахарозы, 0,3 M NaCl. Ресуспендированные клетки обрабатывали 30 мин при 0° С лизоцимом (1 мг/мл). Полученные сферобласты лизировали добавлением NP-40 до конечной концентрации 0,2% и комплекс ДНК — белок осаждали спустя 5 мин добавлением NaCl до конечной концентрации 1 M. Лизаты клеток центрифугировали при 120 000 g (30 мин, 4° С). Супернатант диализовали против 1000-кратного объема буфера следующего состава: 5 мМ трис-HCl (pH 7,0), 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 0,1% NP-40. К диализату добавляли глицерин до концентрации 10%. Диализованный лизат клеток *E. coli*, содержащих плазмиду pPR6, служил источником рекомбинантной обратной транскриптазы HIV.

Характеристики аналогов трифосфатов

Номер соединения	* R_f	λ_{\max} , нм (ϵ) при рН 1	¹ H-ЯМР-спектры, δ , м.д. (J, Гц) **					
			H ₆	H ₅ или C5—CH ₃	H1'	H2' а,б	H3', H4', H5' а, б	CH-P и прочие
(II)	0,20	267 (9 600)	7,54д (0,5)	1,95д (0,5)	6,18т (6,0)	2,60м	3,70—4,80м	3,68д (8,6)
(III)	0,50	267 (9 600)	7,61д (0,5)	1,86д (0,5)	6,08т (6,0)	2,55м	4,1—4,4м	2,91д (21)
(IV)	0,18	267 (9 600)	7,60д (0,5)	1,85д (0,5)	6,10т (6,0)	2,60м	4,0—4,4м	
(V)	0,20	279 (13 200)	7,83д (8,0)	6,03д (8,0)	5,8д (<1)	4,88т (<1)	3,6—3,75м	3,75д (8,6) 1,30с, 1,50с

* Пластинки PEI-целлюлозы, 1 М LiCl.

** Прибор Varian XL-100-15 (США), рабочая частота 100 МГц, растворы в D₂O. Сокращения: с — синглет, д — дублет, т — триплет, м — мультиплет.

В качестве контроля использовали лизаты нетрансформированных клеток *E. coli*. Активность рекомбинантной обратной транскриптазы HIV выражали как отношение включения [³H]ТМР к объему лизата. Обычно активность рекомбинантной обратной транскриптазы HIV составляла 50 000 — 300 000 импульсов на 1 мкл лизата за 1 мин счета. Для реакционной смеси, как правило, использовали лизат в разведении 1 : 40.

Источником вирусной обратной транскриптазы HIV служил лизат вирусных частиц. Для получения суспензии вирусных частиц клетки линии Н9 и Н9/IIIV, полученные от Р. Галло (Национальный онкологический институт, США) [11], выращивали на среде RPMI-1640, содержащей 200 ед./л инсулина, 0,4% сахарозы, 2% β -меркаптоэтанола, 10 мМ NEPER, 0,6 мг/мл L-глутамина. Клетки Н9 и Н9/IIIV смешивали в соотношении 1 : 2 и продолжали культивировать в той же среде в течение 5—7 сут. Наличие вируса контролировали с помощью электронной микроскопии и иммуноблоттинга. Культуральную жидкость отделяли от клеток центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин при 4° С. Вирус выделяли из культуральной жидкости по известной методике [16]. 20 мл надосадочной жидкости наслаивали на 15 мл 20% раствора сахарозы в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,5) и центрифугировали при 100 000g при 4° С. Образовавшийся осадок ресуспендировали в 150 мкл лизирующего раствора, состоящего из 50% глицерина и 50% буфера следующего состава: 15 мМ трис-НСl (рН 7,5), 150 мМ КСl, 1 мМ дитиотреит, 0,4% тритона X-100.

Активность обратной транскриптазы HIV выражали как отношение включения [³H]ТМР к объему лизата вирусных частиц. Как правило, эта цифра составляла 10 000—30 000 импульсов на 1 мкл лизата за 1 мин счета. Для реакционной смеси обычно использовали лизат вирусных частиц в разведении 1 : 2. Активность обратных транскриптаз AMV и HIV определяли по ранее описанной методике [8, 16]. Для определения активности транскриптазы AMV применяли инкубационную смесь следующего состава: 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 100 мМ КСl, 10 мМ MgCl₂, 3 мМ EDTA, 0,02% тритона X-100, 1—2 ед. акт. транскриптазы AMV, в качестве матрицы использовали 0,2 мкг/мл poly(rA)·oligo(dT)₁₂₋₁₈. Общий объем пробы 25 мкл. Состав инкубационной смеси при определении активности вирусной и рекомбинантной транскриптазы HIV следующий: 50 мМ трис-НСl (рН 8,3), 80 мМ КСl, 10 мМ MgCl₂, 3 мМ дитиотреит, 0,3 мМ EDTA, 0,02% тритона X-100, в качестве матрицы использовали 0,2 мкг/мл poly(rA)·oligo(dT)₁₂₋₁₈, 5 мкл лизата соответствующего разведения. Общий объем пробы составлял 25 мкл. В обоих случаях реакцию инициировали добавлением в инкубационную смесь [³H]ТТР в количестве 1,25 мкКи на пробу (уд. акт. 60 Ки/ммоль). Пробы инкубировали 1 ч при 37° С. Аликвоту инкубационной смеси наносили на бумагу Whatman 1 ММ, подсушивали,

фиксируют в 5% CCl_3COOH , кислоторастворимый материал отмывали 10 мМ раствором пиродифосфата натрия в 1 мМ HCl . Включение [^3H]ТТР определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике SI-30 Intertechnique (Франция). В качестве контроля использовали лизат неинфицированных клеток Н9, приготовленный аналогичным образом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coffin J., Haase A., Levy J. A., Montagnier L., Oroszlan S., Teich N., Temin H., Toyoshima K., Jarmus H., Vogt P., Weiss R. // Science. 1986. V. 232. P. 697—703.
2. DeClercq E., Holy A., Rosenberg J., Sakuma T., Balzarini J., Maudgal P. C. // Nature. 1986. V. 323. № 6087. P. 464—466.
3. De Clercq E. // J. Med. Chem. 1986. V. 29. № 9. P. 1562—1569.
4. Галегов Г. А., Корнеева М. Н., Носик Д. Н., Килессо Т. Ю., Краевский А. А., Куханова М. К., Жданов В. М. // Молекулярн. биология. 1988. Т. 22. С. 802—806.
5. Яркован Р., Мицця Х., Бродер С. // В мире науки. 1988. № 12. С. 78—87.
6. Mitsuya H., Weinhold K. J., Furman P. A., St. Clair M. H., Lehrman S. N., Gallo R. C., Bolognesi D., Barry D. W., Broder S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 20. P. 7096—7100.
7. Furman P. A., Fyle J. A., St. Clair M. H., Weinhold K., Rideout J. L., Freeman G. A., Nusinoff-Lehrman S., Bolognesi D. P., Broder S., Mitsuya H., Barry D. W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 21. P. 8333—8337.
8. Chidgeavadze Z. G., Beabelashvilli R. Sh., Kravetsky A. A., Kukhanova M. K. // Biochim. et biophys. acta. 1986. V. 868. № 2. P. 145—152.
9. Краевский А. А., Куханова М. К., Атражес А. М., Чиджавадзе З. Г., Бибилашвили Р. Ш. // Молекулярн. биология. 1987. Т. 21. № 1. С. 33—38.
10. Чиджавадзе З. Г., Бибилашвили Р. Ш., Розовская Т. А., Атражес А. М., Тарусова Н. Б., Мишасян Ш. Х., Дяткина Н. Б., Атражес А. М., Папчизин А. В., Краевский А. А. // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. № 6. С. 1716—1724.
11. Popovic M., Sarngadharan M. G., Read E., Gallo R. C. // Science. 1984. V. 224. P. 497—502.
12. Farmerie W. G., Loeb D. D., Casavant N. C., Hutchison C. A., Edgell M. H., Swanstrom R. // Science. 1987. V. 236. P. 305—308.
13. Атражес А. М., Дяткина Н. Б., Краевский А. А., Куханова М. К., Чиджавадзе З. Г., Бибилашвили Р. Ш. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1045—1052.
14. Holy A., Rosenberg J. // Coll. Czech. Chem. Commun. 1987. V. 52. № 11. P. 2792—2800.
15. Гараев М. М., Шуленин С. В., Царева И. В., Ситникова Ю. Б., Бобков А. Ф. // Фундаментальные и прикладные вопросы СПИД, вирусных гепатитов и гриппа. М., 1988. С. 17.
16. Hoffman A. P., Vanapour B., Levy J. A. // Virology. 1985. V. 147. № 1. P. 326—335.

Поступила в редакцию
7.IV.1989

T. G. KILESSO, N. B. TARUSOVA*, E. D. ATRAZHEVA*, M. K. KUKHANOVA*,
S. V. SHULENIN, A. Ph. BOBKOV, M. M. GARAEV, G. A. GALEGOV, A. A. KRAYEVSKY*

COMPARATIVE INHIBITION ANALYSIS OF DNA BIOSYNTHESIS CATALYZED BY RETROVIRUS REVERTASES

*D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow;*

**V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Comparative study of DNA biosynthesis inhibition, catalyzed by avian myeloblastose virus (AMV) reverse transcriptase (RT), human immunodeficiency virus (HIV) recombinant and native RT, has been performed. 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine 5'-triphosphate (AzTTP); 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine 5'-methylene phosphonate-diphosphate; 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine 5'-phosphate-phosphonoacetate; 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine 5'-phosphate-dibromomethylene phosphonate; 2',3'-O-isopropylidene cytidine 5'-methylene phosphonate-diphosphate (rc-iP-MPDP) were used as inhibitors. AzTTP proved to be the most active inhibitor (its activity against HIV RT is higher than against AMV RT), although not selective as the phosphonates; only rc-iP-MPDP has low selectivity.