

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИСМЫСЛОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ МОДУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ.

В.А. КОЗЛОВ, С.В. СЕННИКОВ

Институт клинической иммунологии СО РАМН, 630099 г.Новосибирск, ул. Ядринцевская,14. Тел. 22-66-27,
факс 22-70-28

В обзоре приводятся литературные данные по механизму действия и использованию антисмысловых олигонуклеотидов для модуляции экспрессии генов цитокинов в гемо и иммунопоэзе. Этот новый подход для ген-направленной модуляции экспрессии генов позволяет анализировать как межклеточные, так и внутриклеточные белковые взаимодействия. Использование этого подхода перспективно как для экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo*, так и для применения их в терапевтических целях.

Ключевые слова: антисмысловые олигонуклеотиды, модуляция экспрессии цитокинов, гемопоэз, эритропоэз.

Введение. В настоящее время является общепризнанной концепция гуморальной природы регуляции иммунопоэза и гемопоэза. Цитокины являются белковыми молекулами, участвующими в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки клеток, а также процессов межклеточных взаимодействий в иммунной и кроветворной системах организма [1]. Кроме того, установлено, что цитокины могут участвовать в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки клеток других тканей, могут выступать в качестве модуляторов в нервной и эндокринной системе, изменяя их функциональное состояние [1,73]. На сегодня известны функциональные свойства и аминокислотная последовательность более 20 различных цитокинов. С помощью цитокин-опосредованного механизма, такие гомеостатические системы организма как кроветворная и иммунная эффективно функционируют и могут быстро и адекватно реагировать на внешние стимулы. Нормальное функционирование иммунной и кроветворной систем возможно только за счет поддержания определенного баланса в продукции цитокинов и экспрессии их рецепторов клетками-мишенями. Экспрессия генов цитокинов может значительно варьировать в зависимости от функционального состояния клеток [56,67]. Как правило, в иммунокомпетентных клетках (лимфоцитах и макрофагах) экспрессия генов основных цитокинов отсутствует или находится на функциональном минимуме, без возможности определения продукции гена. В то же время, экспрессия генов цитокинов индуцируется и/или стимулируется при действии на клетки различных активирующих агентов (митогены, сами цитокины). Так например, при совместном культивировании макрофагов с ЛПС наблюдается индукция экспрессии ИЛ-1 [2]. ИЛ-1 в свою очередь индуцирует синтез ИЛ-2 и ИЛ-4, преактивированными антигеном Т-клетками [33]. Показано, что продукция цитокинов связана с фазами клеточного цикла. В основном, продукция цитокинов определяется в G₀ и G₁ фазах клеточного цикла [1]. Таким образом, при запуске иммунного ответа на определенный антиген или любой другой иммунной реакции, индуцируется синтез целого ряда цитокинов иммунокомпетентными клетками, причем количественные и качественные параметры в экспрессии цитокинов иммунокомпетентными клетками и определяют тип иммунного реагирования, его интенсивность и специфичность. Эта взаимообусловленная продукция цитокинов в ходе развития иммунологической реакции и составляет цитокиновую сеть, которая, позволяет организму, и в частности иммунной системе, адекватно реагировать на внешние и внутренние стимулы. При различных

патологических нарушениях типа злокачественных новообразований, инфекционных болезней, аутоиммунитета, воспаления, аллергии и т.д. продукция цитокинов может иметь патогенетическую роль в результате нарушений нормальных регуляторных взаимодействиях клеток, а также при изменении баланса в продукции цитокинов. Гиперпродукция провоспалительных цитокинов лежит в основе хронического течения аутоиммунных заболеваний, вторичных иммунодефицитов [22-24]. В отдельных случаях цитокины выступают в роли пара- и аутокринных регуляторов опухолевого роста, стимулируя пролиферацию опухолевых клеток [25,50,71].

Экспрессия генов цитокинов, как и других генов, может регулироваться на разных уровнях. На ядерном уровне экспрессия генов может регулироваться на стадии транскрипции (инициация и терминация) и на стадии процессинга ядерной РНК (полиаденилирование, сплайсинг). На цитоплазматическом уровне экспрессия генов может регулироваться за счет изменения стабильности мРНК и за счет эффективности трансляции мРНК. Регуляция экспрессии цитокинов может быть смодулирована на уровне секреции, например моненином или карбоксилцианид м-хлорофенил-гидрозином [44], их биологическая активность может быть нейтрализована антителами или растворимым рецептором. Инактивирующие аналоги могут быть синтезированы, чтобы конкурировать с нормальным медиатором [22,-24,30].

В настоящее время проводятся широкие исследования по изучению регуляции экспрессии генов цитокинов и их рецепторов с помощью эндогенных модуляторов, а также с помощью препаратов ген-направленного действия. Одним из подходов для направленной модуляции экспрессии генов является использование антисмысловых генолигонуклеотидов (АО) к мРНК. Использование АО, представляет новый путь для модулирования продукции цитокинов. Действительно, синтез любого белка с известной последовательностью гена теоретически может быть заингибирован АО к мРНК. В настоящее время эта методология позволяет анализировать место определенного медиатора в межклеточной цитокиновой сети, а также в каскадном запуске регуляторных молекул в клетке. Использование этого подхода возможно как для экспериментальных исследований, так и для применения их в терапевтических целях.

Механизм действия АО может быть за счет препятствования процессу синтеза белка на разных стадиях. Гибридизация АО с мРНК может приводить к блокированию фиксации и продвижению мРНК на рибосомах [10]. АО могут предотвращать нормальное РНК созревание, а также могут блокировать транспортировку РНК от ядра до цитоплазмы [28]. Кроме того, образование дуплексов РНК с олигонуклеотидами активирует рибонуклеазу H, которая разрезает часть РНК и свободные олигонуклеотиды [21]. Другой механизм действия возможен с каталитической РНК (Рибозим), которая может резать специфическую мРНК [13,40].

Участки ДНК, которые являются временно открытыми в течение транскрипции, могут также быть мишенью для АО [28]. Двойные спирали ДНК могут аналогично взаимодействовать с олигонуклеотидами с образованием триплекса. Этот подход назван стратегией анти-гена [29,52,57]. Таким образом, показано что АО могут действовать как на уровне мРНК, так и на уровне двухцепочечной ДНК.

Для проявления своего специфического эффекта АО необходима определенная длина олигонуклеотида, обеспечивающая специфическое связывание. В среднем она составляет 15-20 оснований [77]. Показано, что АО против с-тус состоящий из 15 оснований специфически ингибирует пролиферацию клеток линии HL-60[34].

Модифицирование олигонуклеотидов. Одним из недостатков АО при использовании их в качестве иммуномодулирующих средств является быстрая деградация олигонуклеотидов под действием нуклеаз и низкий уровень их проникновения в клетку. Если немодифицированный олигонуклеотид инкубировать с

фетальной телячьей сывороткой в оптимальных условиях, то через 15 минут наблюдается деградация олигонуклеотидов [77]. В работе Segal [72] показано, что в бессывороточной среде олигонуклеотиды могут сохраняться в течении 24 часов. Если добавить 10% фетальной эмбриональной сыворотки, инактивированной при 56° С в течении 30 минут, то через 2 часа наблюдается полная деградация олигонуклеотидов. Если сыворотку инактивировать при 66° С в течении 45 минут, то даже при добавлении 20% эмбриональной телячьей сыворотки деградация олигонуклеотидов через 24 часа не наступает. Если же олигонуклеотиды инкубировали в этой сыворотке в присутствии эндотелиальных клеток, то через 24 часа наблюдалась деградация олигонуклеотидов. Чтобы увеличить период полужизни АО, доставку олигонуклеотидов к клеткам мишеням, а также их транспорт в клетки, разрабатываются различные химические модификации олигонуклеотидов.

Наиболее общие модификации - это получение олигодезоксинуклеотидов с модифицированными фосфатными остатками, с модифицированными нуклеозидными основаниями, олигодезоксинуклеотид конъюгаты через 5' и 3' конец, использование фосфатных, а также олигорибонуклеотидных аналогов [77]. Эти модификации олигонуклеотидов могут значительно менять растворимость, биологическую активность, способность активировать рибонуклеазу Н и гибридизоваться с мишенью, а также способность проникать в клетку через мембрану.

Проникновения олигонуклеотидов в клетку. Плазматическая мембрана - естественный барьер для различных белков и нуклеиновых кислот. Чтобы подействовать на мишень, АО должен проникнуть через эту мембрану. Процесс зависит от разных параметров, таких как температура, длина олигонуклеотида, тип химической модификации [20,58]. Кроме того транспорт в клетку и внутриклеточное распределение АО может сильно зависеть от типа клетки [75]. Например, в работе [43] изучали клеточный транспорт, стабильность, внутриклеточное распределение и эффект немодифицированного АО к сайту инициации трансляции мРНК ТФР β1, а также их эффекты на различные функции клеток. Установлено, что концентрация АО в клетке выходит на плато после 8 часов трансфекции (16% меченного олигонуклеотида) и остается фактически постоянным в течении 24 часов. Внутриклеточная концентрация смыслового олигонуклеотида выходит на плато после 2 часов трансфекции (8%), остается стабильным 3 часа и затем падает. После 8 часов трансфекции, последующие 44 часа культивирования без АО внутриклеточный уровень их оставался 8% (внутриклеточный меченный олигонуклеотид), тогда как для смысловых олигонуклеотидов этот уровень был только 1,2%. АО представлены как в цитоплазматической фракции, так и в ядерной фракции, причем в обеих фракциях наблюдался пул АО в гибридизованном виде. В то же время, контрольные смысловые олигонуклеотиды представлены в основном в цитоплазматической фракции и в виде негибридизованного пула. Ни те, ни другие олигонуклеотиды не изменяли уровень мРНК, однако АО к мРНК ТФР β1 (но не смысловые олигонуклеотиды) обуславливали исчезновение иммунореактивного ТФР β1 внутри клеток.

В связи с этим были предложены различные системы для усовершенствования олигонуклеотидного проникновения в клетки. Например, были предложены липосомы [36,51,76]. Липосомы полностью защищают олигонуклеотиды от деградации нуклеазой. Однако использование липосом ограничено из-за недостаточной эффективности герметизации, их короткой полужизни и их неопределенной доставки к мишени. Использование специфических антител к определенным белкам клеточной мембраны в составе липосом увеличивает эффективность и специфичность доставки за счет селекции клеток антителами на поверхности липосом и за счет эффективной доставки олигонуклеотида к нужному типу клеток [47,65]. Использование в качестве

транспортировщика олигонуклеотидов поли-L-лизина и холестерина [11,41,48,49] повышает активность АО [48]. Но поли-L-лизин в дозах выше чем 2μМ цитотоксичен для ряда клеток [46]. В работе Chollet был предложен оригинальный способ направленной доставки АО к мишени. Она была достигнута путем связывания ИЛ-1β с АО. Связанный с олигонуклеотидом ИЛ-1β мутантный белок, сохранял способность связываться с ИЛ-1 рецептором, а АО сохраняли свои гибридизационные свойства [16].

В исследованиях по модуляции экспрессии генов АО часто встает вопрос о специфичности полученных эффектов. Наиболее часто используемый контроль - это смысловой олигодезоксинуклеотид, который имеет ту же самую последовательность как и мишень мРНК, и поэтому не гибридизуется с ним. Однако, когда в исследованиях используются АО к сайту инициации транскрипции, смысловые олигонуклеотиды, имеющие этот кодон, могут конкурировать с мРНК. Кроме того, смысловые олигодезоксинуклеотиды имеют различный состав оснований по сравнению с АО. Это может быть важно в случае определения пролиферации, потому что деградация внутриклеточных олигодезоксинуклеотидов может приводить к неспецифической супрессии включения [³H]тимидина за счет конкуренции с деградированным тимидином олигодезоксинуклеотидов [55]. Поэтому для оценки пролиферации, контрольные олигонуклеотиды должны иметь тот же самый состав оснований и то же самое местоположение тимидина, что и в АО. Олигодезоксинуклеотид с несколькими несбалансированными основаниями мог бы быть адекватным контролем для специфичности действия АО. Таким образом, последовательность для контрольных олигодезоксинуклеотидов может зависеть от экспериментальной используемой системы, и должна быть тщательно выбрана [74,78]. Кроме того, в качестве контроля используются олигодезоксинуклеотиды со случайной (статистической) последовательностью оснований.

Использование АО для регуляции гомеостата и иммунорегуляции, онкогенеза и воспаления. АО это новый класс препаратов ген-направленного действия, которые благодаря своей специфичности и возможности действовать на уровне отдельного гена имеют большие перспективы для применения как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях. В настоящее время АО находят широкое применение для модуляции экспрессии генов цитокинов и других регуляторных молекул. Цитокины как факторы, регулирующие процессы пролиферации и дифференцировки самых различных клеток, могут выступать в роли как пара-, так и аутокринных регуляторов. Использование нейтрализующих антител не всегда бывает эффективно, так как антитела в отдельных случаях могут просто не иметь доступа к белкам. С другой стороны, с помощью антител нельзя прервать синтез белка, что также ограничивает их применение. В то же время использование АО представляется в этом смысле более эффективным. АО используются для регуляции гомеостата - и иммунорегуляции, для регуляции онкогенеза, воспаления и т.д. Если первые работы были посвящены изучению в основном модуляции экспрессии одного определенного гена, где эффективность воздействия оценивалась с помощью соответствующего функционального теста или с помощью моноклональных антител к белковому продукту гена, то в последнее время появляется все больше работ, где АО используют как очень специфический и точный инструмент для изучения сетевых взаимоотношений цитокинов и других регуляторных белков, в частности, в процессах пролиферации и дифференцировки различных клеток и межклеточных взаимодействиях. В тоже время АО сегодня стали успешно применять для изучения внутриклеточных процессов на уровне вторичных мессенжеров, а также факторов транскрипции других генов цитокинов, которые индуцируются определенным цитокин рецепторным взаимодействием.

В настоящее время в экспериментах *in vivo* и *in vitro* получены достоверные результаты по использованию АО для модуляции экспрессии генов цитокинов ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-14, ТФР β , ФНО α , ГМ-КСФ, КСФ-1, их рецепторов, а также целого ряда онкогенов [12, 16, 25, 27, 32, 37, 39, 43, 45, 62, 72]. В этих работах показано, что эффект их специфичен, что тестировалось по специфической активности супернатанта от обработанных АО клеток и по снижению специфических мРНК и самого белкового продукта.

Широкое применение АО находят при изучении механизмов онкогенеза. В работе Keller [37] изучена роль АО к мРНК ИЛ-6 и к рецептора ИЛ-6 (ИЛ-6Р) в пролиферации ИЛ-6 отвечающей миеломной клеточной линии U-266 и ИЛ-6 не отвечающей RPMI-8226. Показано, что АО к мРНК ИЛ-6 был эффективен при культивировании с линией клеток U-266 при отсутствии ИЛ-6 в культуральной среде и при его добавлении был неэффективен. АО к мРНК ИЛ-6Р был эффективен в обеих ситуациях. АО к мРНК ИЛ-6 и ИЛ-6Р были не эффективны в культуре клеточной линии RPMI 8226. Таким образом показано, что использование АО к мРНК рецептора цитокина бывает эффективнее, чем использование АО к мРНК самого цитокина.

В ряде работ с опухолевыми линиями клеток с помощью АО продемонстрирована аутокринная и паракринная регуляция пролиферации клеток различными цитокинами. Так например, было показано, что рост миеломной клеточной линии человека U-266 регулируется аутокринным способом, так как АО к мРНК ИЛ-6 специфически ингибировал рост миеломной клеточной линии, а нейтрализация антителами к ИЛ-6 не имела эффекта. Таким образом, ИЛ-6 зависимая аутокринная пролиферация клеток миеломы может происходить через внутриклеточные взаимодействия между ИЛ-6 и ИЛ-6Р [50, 71].

Аналогичные данные получены [25] с использованием АО к ИЛ-14 при агрессивной промежуточной лимфоме В-клеточного не Ходжинского типа. Предварительно была показана экспрессия в этих клетках как ИЛ-14, так и рецептора к ИЛ-14. Обнаружено, что АО к мРНК ИЛ-14 блокируют их пролиферацию, что указывает на роль этого цитокина в аутокринной и паракринной пролиферации этих клеток.

При изучении В-клеточных линий [54] было установлено, что пролиферация В-клеточных линий, которые продуцировали ИЛ-10, дозозависимо ингибировалась добавлением АО к мРНК ИЛ-10 и не изменялась у В-клеточных линий, которые не продуцируют белка ИЛ-10. Эффект ингибирования пролиферации отменялся добавлением рекомбинантного ИЛ-10. АО к мРНК ИЛ-10 ингибировал как экспрессию мРНК ИЛ-10, так и продукцию белка. В работе [63] авторы получили ингибирование роста малигнизированных СВ5+(В-1) клеток от NZB-мышей (мышинная модель хронической лимфоцитарной лейкемии, при которой продуцируется высокий уровень ИЛ-10 В-1 клетками и В-клетками) АО к мРНК ИЛ-10. АО не только снижает мРНК ИЛ-10, но и продукцию белка.

Подобные работы сделаны также и с ИЛ-1 α , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-9, ИЛ-11, ТНФ α , ГМ-КСФ, КСФ-1, эритропоэтином (ЭПО), ТФР β на различных типах опухолевых клеток человека и мышей [45].

Отдельно можно выделить работу группы исследователей [79] где показан эффект как *in vivo*, так и *in vitro*. Глиомная клеточная линия человека NP-1 экспрессирует мРНК ИЛ-8 и секретирует сам белок ИЛ-8. Введение рекомбинантного ИЛ-8 дозозависимо усиливает пролиферацию клеток линии NP-1. В присутствии антисыворотки против ИЛ-8, опосредуемая ИЛ-8 пролиферация NP-1 клеток ингибировалась. Кроме того NP-1 клеточный рост ингибировался трансфекцией ретровирусной конструкции кодирующей бессмысловой олигонуклеотид к мРНК ИЛ-8 как в моделях *in vivo*, так и *in vitro*.

Таким образом, АО нашли успешное применение в изучении аутокринной и паракринной регуляции пролиферации различных опухолевых линий цитокинами в моделях *in vivo* и *in vitro*.

АО нашли также успешное применение при изучении пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток.

Возможность ингибирования специфических колониестимулирующих факторов АО была показана в работе Segal [72], где было продемонстрировано специфическое подавление экспрессии генов ГМ-КСФ и Г-КСФ в культуре ИЛ-1 стимулированных эндотелиальных клеток АО.

В ряде исследований проведенных под руководством Goldwasser с соавт. [31,62] была изучена роль нескольких цитокинов в гемопоэзе на модели колониеобразования клетками костного мозга в культуре. Было установлено, что АО к мРНК ГМ-КСФ и ЭПО имеют противоположные эффекты. Обработка клеток костного мозга в культуре АО к ЭПО приводит к значительному уменьшению смешанных эритроидных - незритроидных колоний и увеличению незритроидных колоний, тогда как обработка АО к мРНК ГМ-КСФ приводит к противоположному эффекту. АО к мРНК Г-КСФ и М-КСФ не оказывали эффекта на колониеобразование. Интересно отметить, что использование АО к мРНК рецепторов к ГМ-КСФ и ЭПО вызывало аналогичные эффекты. Также показано, что добавление к культуре клеток ГМ-КСФ не отменяло ингибирующего эффекта АО к мРНК ГМ-КСФ на колониеобразование. Эти данные подтверждают гипотезу о внутренней аутокринной регуляции мультипотентных гемопоэтических прекурсорных клеток.

АО успешно применяются для изучения внутриклеточных белковых взаимодействий в пролиферирующих и дифференцирующихся гемопоэтических клетках, для изучения вторичных мессенжеров и факторов транскрипции. Использование АО в таких исследованиях очень перспективно и является уникальным методическим подходом для определения функциональной роли различных внутриклеточных белков. Например, оригинальная работа была выполнена с Raf-1 киназой. Raf-1 киназа это белок 74 кД, локализованный в цитоплазме клеток, который активируется в клетках, стимулированных различными митогенами и факторами роста. Используя с-raf АО, блокирующие Raf-1 экспрессию, авторы показали [38,60], что Raf-1 требуется для пролиферации мышинных фактор-зависимых клеточных линий, стимулированных факторами роста, чьи рецепторы являются членами различных структурных классов: а) семейство гемопоэтических рецепторов, включающих ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, Г-КСФ, ГМ-КСФ и эритропоэтин, б) класс тирозин киназных рецепторов, включающих стил (Styll) фактор и КСФ-1 и с) ИЛ-6, фактор ингибирования лейкемии и онкостатин М, чьи рецепторы включают gp130 субъединицу рецептора. В тесте с колониеобразованием с-raf АО полностью ингибировали колониеобразование неразделенных клеток костного мозга мышей, стимулированных ИЛ-3 или КСФ-1, и частично ингибировали колониеобразование клетками, стимулированными ГМ-КСФ. Кроме того, с-raf АО полностью ингибировали как ИЛ-3, так и ГМ-КСФ индуцированное колониеобразование СД34+ очищенными человеческими предшественниками. Таким образом, Raf-1 киназа требуется для передачи сигнала для пролиферации цитокин-зависимых клеточных линий факторами роста для всех известных классов цитокиновых рецепторов, а также требуется для роста нормальных мышинных и человеческих костно-мозговых предшественников. В другой работе [26] изучалась роль различных изоформ протеинкиназы С в передаче сигналов для пролиферации клеточных линий TS-1 β и TS-1 α , которые поддерживаются в культуре ИЛ-2, ИЛ-4 или ИЛ-9. Ингибирование протеинкиназы С препаратом SF109203X не блокировало ИЛ-4 и ИЛ-9 зависимой пролиферации клеточных линий, но блокировало ИЛ-2 зависимую пролиферацию. Авторы предполагают, что ИЛ-4 и ИЛ-9 не используют для передачи сигнала протеин киназу С и что общая гамма- цепь рецепторов

не ответственна за активацию протеин киназы С. Кроме того, CF109203X индуцировал апоптоз в клетках культивируемых с ИЛ-2, но не с ИЛ-4 и ИЛ-9. С использованием АО к различным изоформам протеин киназы С установлено, что зета -и эпсилон -изоформы участвуют в передаче сигнала с высокоаффинного ИЛ-2 рецептора, а бета - и зета- в передаче сигнала с ИЛ-2 рецептора со средней аффинностью. Таким образом с помощью ингибитора протеинкиназы С и АО к изоформам протеинкиназы С авторами установлено, что бета зета и эпсилон изоформы протеин киназы С участвуют в передаче ИЛ-2 опосредуемого пролиферативного сигнала, в отличие от ИЛ-4 и ИЛ-9.

АО применяются также для изучения функциональной роли различных транскрипционных факторов. В работе [69] изучали интерферон регуляторный фактор (ИРФ)-1, который является основным транскрипционным фактором индуцируемым не только ИФН γ , но и другими цитокинами, включая и ФНО α . ИФН γ и ФНО α ингибируют гемопоэз *in vitro*. После обработки клеток костного мозга ИФН γ и ФНО α наблюдается увеличение экспрессии ИРФ-1, причем после обработки ИФН γ более выраженное. Наоборот, экспрессия ИРФ-2, который экспрессируется постоянно, не изменялась. Если СД34+ клетки обрабатывали ИФН γ или ФНО α и АО к ИРФ-1, то супрессивный эффект на колониеобразование СД34+ клетками, обработанными ИФН γ , частично отменялся, в то время как эффект ФНО α не отменялся. Авторами обнаружено, что АО подавляли как продукцию белка, так и мРНК ИРФ-1. На основании этих исследований авторы предполагают, что ингибиторный эффект на гемопоэз ИФН- γ и ФНО- α опосредуется через различные механизмы. Для ИФН γ ИРФ-1 активирует клеточные гены, ответственные за ИФН γ супрессивный эффект. В работе [42] изучали функциональную роль факторов транскрипции GATA-2, NF-E2 и GATA-1 в индуцированной факторами роста пролиферации и дифференцировки ранних гемопоэтических предшественников в эритроидном и гранулоцитарном направлении. GATA-2 мРНК и белок уже экспрессируются в покоящихся ранних гемопоэтических предшественниках и он быстро возрастает в течении 3 часов после стимуляции фактором роста, но затем уменьшается в ходе эритроидной и гранулоцитарной дифференцировки. NF-E2 и GATA-1 мРНК и их белки хотя не определяются в покоящихся ранних гемопоэтических предшественниках, постепенно индуцируются в течении 24-48 часов как в эритроидной, так и в гранулоцитарной культуре клеток. При дальнейшем культивировании в процессе созревания клеток оба транскрипционных фактора накапливаются в клетках эритроидного ростка и супрессируются в гранулоцитарном. Ранние гемопоэтические предшественники обрабатывались АО к факторам транскрипции. Ингибирование АО экспрессии генов GATA-2 вызывало уменьшение как эритроидных, так и гранулоцит-моноцитарных клонов, тогда как ингибирование АО экспрессии генов NF-E2 или GATA-1 индуцировало селективное повреждение эритроидного колониеобразования. Эти результаты указывают на ключевую роль транскрипционного фактора GATA-2 в ранней стадии пролиферации и дифференцировки ранних гемопоэтических предшественников, в транскрипционных факторов NF-E2 и GATA-1 в эритроидной дифференцировке.

Таким образом, использование АО позволяет селективно ингибировать экспрессию внутриклеточных белков и проводить тонкие исследования по изучению их места во внутриклеточных белковых взаимодействиях. На сегодня этот подход является фактически единственным, позволяющим проводить изучение функциональной роли внутриклеточных белков на живых клетках.

Широкое применение АО находят в изучении механизмов воспаления, при котором цитокиновые механизмы играют важную роль. Продукция провоспалительного цитокина ИЛ-1 β ингибируется АО в ЛПС стимулированных мононуклеарных клетках периферической крови [53]. Также продемонстрирована способность АО к ингибированию экспрессии таких провоспалительных цитокинов как ИЛ-8 и ФНО- α

[39,82]. Burch и др. продемонстрировали способность АО ингибировать экспрессию ИЛ-1 рецептора (ИЛ-1R) как в человеческих, так и в мышинных ИЛ-1 стимулированных фибробластах. Авторы также продемонстрировали возможность использования этих АО *in vivo* на мышах. Подкожное введение АО к мышинному мРНК ИЛ-1R заметно ингибировало инфильтрацию нейтрофилами в ответ на последующее введение ИЛ-1 [12]. Терапевтическое использование АО при воспалении, также было предложено с ИЛ-8. АО к мРНК ИЛ-8 специфически блокируют продукцию моноцитами как в моделях *in vivo*, так и *in vitro* [39]. В работе [61] у мышей индуцировалось хроническое интестинальное воспаление введением 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты, которое характеризовалось трансмуральным грануломатозным колитом, схожим по ряду характеристик с болезнью Крона у человека. Авторы показали увеличение у этих мышей транскрипционного фактора NF-каппа В р65 белка. Местное введение АО к этому фактору отменяло клинические и гистологические признаки колита у этих мышей и было более эффективно, чем введение глюкокортикоидов.

Провоспалительные факторы индуцируют экспрессию в клетках адгезивных молекул на эндотелиальных клетках. АО эффективно ингибирует экспрессию межклеточной адгезивной молекулы-1, сосудистой клеточной адгезивной молекулы-1 и E-селектина в человеческих umbilical эндотелиальных клетках [9,10,15].

Другие белки такие как перфорин, протимозин А, активирующий фосфолипазу А₂ белок, фосфолипаза А₂, которые играют важную роль в воспалении, ингибируются АО [3,6,10,17,70].

Таким образом, в этих работах показано, что с помощью АО можно регулировать экспрессию белков, участвующих в воспалении, а также отменять развитие воспалительной реакции *in vivo*.

В ряде работ уделяется большое внимание разработке подходов для регуляции функциональной активности Тх1 и Тх2 лимфоцитов с помощью АО [27,32,81]. Этот подход представляется перспективным для коррекции развития иммунологических реакций по определенному типу. Известно, что Тх1 лимфоциты участвуют в реализации иммунного ответа по типу гиперчувствительности замедленного типа и продуцируют такие цитокины как ИЛ-2 и ИФН-γ. Тх2 лимфоциты участвуют в реализации гуморального иммунного ответа и продуцируют ИЛ-4, ИЛ-10 и ИЛ-5 [59,66]. Показано, что АО к мРНК ИЛ-2 ингибируют пролиферацию Тх1, но не действуют на пролиферацию Тх2 клеток. АО к мРНК ИЛ-4 блокируют пролиферацию Тх2, но не блокируют пролиферацию Тх1 клеток [27]. Антиген-индуцированная пролиферация или ИЛ-5 секреция из Тх2-клона не изменяется в присутствии АО к мРНК ИЛ-4 [32]. Эффекты АО отменялись добавлением ИЛ-2 для Тх1 клонов и ИЛ-4 для Тх2 клонов [27], что указывает на участие этих цитокинов в аутокринной регуляции этих клонов ИЛ-2 и ИЛ-4 соответственно. В работе Zudiaga с соавт. показано, что моноклональные антитела к ИЛ4, только частично блокируют пролиферацию Тх2 и что при добавлении к ним ИЛ-4 происходит продукция ИЛ-1α в его активной форме в отсутствии антигенпрезентирующих клеток. Моноклональные антитела к ИЛ-1α или к ИЛ-1R или АО к мРНК ИЛ-1α ингибируют пролиферацию активированных Тх2 клеток. Кроме того, ТН1 клетки не производят ИЛ-1α и их рост от него не зависит [81]. Таким образом, ИЛ-1α, наряду с ИЛ-4 необходим для пролиферации и дифференцировки Тх2, но не Тх1 клеток. В работе [68] была продемонстрирована существенная роль ИЛ-4 в реакции замедленной гиперчувствительности замедленного типа вызванной тринитрохлорбензолом. Введение мышам моноклональных антител к ИЛ-4, но не контрольных антител уменьшало контактную чувствительность на 75%. Обработка иммунных клеток лимфоузлов АО к мРНК ИЛ-4 ингибирует их способность к системному переносу контактной чувствительности. Перенос также блокируется

введением антител к ИЛ-4 реципиенту. В этих экспериментах показано, что АО могут менять функциональное состояние клеток при их переносе интактным реципиентам.

Таким образом, использование АО эффективно для модуляции экспрессии генов цитокинов в иммунокомпетентных клетках, в том числе в клетках Tх1 и Tх2. Их использование эффективно при ЛАК-терапии для селективной ингибции экспрессии отдельных цитокинов.

Использование АО как терапевтических препаратов. Использование АО возможно не только для изучения межклеточных и внутриклеточных белковых взаимодействий, но и в качестве терапевтических агентов [78]. Фармакокинетический анализ олигонуклеотидов показывает [35], что введение модифицированного меченного олигонуклеотида приводит к самому высокому его накоплению в почке и в печени, и к меньшему в селезенке и в мышцах; накопление в мозге не отмечено. Большая часть олигодезоксинуклеотидов быстро выводится с мочой [4,14,18,19,80]. Следует подчеркнуть, что на мышах при дозе введения фосфортиоат олигодезоксинуклеотида 100µg в сутки в течение 14 дней [4,64] не наблюдалась никакая токсичность. Клинические испытания на человеке начались при патологиях, где никакая лучшая терапия не может быть предложена. После экспериментального изучения на животных (приматы и крысы) Bauever и др. вводили фосфортиоат олигодезоксинуклеотид к мРНК р53 при человеческой острой миелойдной лейкемии (AML), устойчивой к химиотерапии. Никаких токсических эффектов не наблюдалось при дозе в 0,05 мг/Кг/час (общая доза 700 мг) [7,8]. Agrawal и Tang оценивали фосфортиоат олигодезоксинуклеотид против gag РНК у ВИЧ пациентах [5]. В моделях с животными *in vivo*, как указывалось выше, также получены положительные результаты. Клиническое применение АО только начинается и сейчас трудно говорить насколько эффективно и широко их можно использовать. Тем не менее, основываясь на приведенных работах, можно предположить, что использование АО будет эффективно для селективной модуляции экспрессии генов цитокинов в иммунокомпетентных клетках *in vitro* при адоптивной клеточной терапии.

В целом можно заключить, что АО находят широкое применение в экспериментальных исследованиях в качестве специфического и точного метода для изучения сложных цитокин-рецепторных взаимодействий между клетками, аутокринной регуляции, а также для изучения внутриклеточных белковых взаимодействий в частности вторичных мессенжеров и факторов транскрипции.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., Воробьев А.А.// Эндогенные иммуномодуляторы- СПб: Гиппократ,1992.- 256с.
2. Кетлинский С.А., Конусова В.А., Симбирцев А.С.и др.//Бюл. Экспер. Биол. Мед.- 1988.- N11.-Стр.657-660.
3. Acha-Orbea H., Scarpellino L., Hertig S. et al. // EMBO J. - 1990. - Vol. 9. - P.3815-3820.
4. Agrawal S, Temsarnani J, Tang J Y. // Proc. Acad. Sci. USA. - 1991. Vol.88. - P.7595-7599.
5. Agrawal S, Tang J Y. // Antisense Res. Dev. - 1992. - Vol. 2. P.261-266.
6. Barbour S.E, Dennis E.A. // J. Biol. Chem. - 1993. - Vol.268. - P.21875-21882.
7. Bayever E, Iversen P, Smith I. et al. // Antisense Res. Dev. - 1992. - Vol.2. - P.109-110.
8. Bayever E, Iversen P.I, Bishop M.R. et al. // Antisense Res. Dev. - 1993. - Vol.3. - P.383-390.
9. Bennet C F, Contion T P, Grimm S. et al. // J. Immunol. - 1994. - Vol.152. - P. 3530-3540.
10. Boiziau C, Kurfurst R, Cazenave C. et al. // Nucleic Acids Res. - 1991. - Vol.I9. - P.1113-1119.
11. Boutorin A.S, Guskova L.V, Ivanova E.M. et al.. // FEBS Lett, - 1989. - Vol.254. - P.129-132.
12. Burch R.M., Mahan L.C. // J. Clin. Invest. - 1991. - Vol.88. - P.1190-1196.
13. Castanotto D, Rossi JJ, Deshler JO.// Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.-1992.-Vol.2.-: 331-357.
14. Chen T.L, Miller P.S, Ts'o P.O, Colvin O.M.// Drug Metab. Dispos. - 1990. - Vol.18. - P.815-818.
15. Chiang M.Y., Chan H., Zounes M.A. et al.// J. Biol. Chem. - 1991. - Vol. 266. - P.18162-18171.
16. Chollet A. Nucleosides Nucleotides. -1990. Vol. 9. - P.957-966.
17. Clark M.A, Ozgur L.E, Conway T.M. et al.// Proc.Natl.Acad.USA. - 1991. Vol.88. - P.5418-5422.
18. Cossum P.A, Sasmor H, Dellinger D. et al.// J. Pharmacol. Exp. Ther. - 1993. - Vol.267. - P.1181-1190.
19. Cossum P.A, Truong L, Owens S.R. et al.// J. Pharmacol. Exp. Ther. - 1994. - Vol.269. P.89-94.
20. Crooke R.M. // Anticancer Drug Des. - 1991. - Vol.6. P.609-646.
21. Dash P, Lotan I, Knapp M. et al.// Proc. Natl Acad. Sci. USA. - 1987. - Vol.84. - P.7896-7900.
22. Debets R, Savelkoul H.F.J. // Immunol. Today. - 1994. - Vol.15. P.455-458.
23. Dinarello C A. // Eur. Cytokine Net. - 1992. - Vol.3. -P.7-17.
24. Feldmann M. 1991. (Review) Eur. Cytokine Net. Vol.2. P.5-9.
25. Ford R., Tamayo A., Martin B. et al.// Blood. - 1995. - Vol.86. P.283-293.
26. Gomez J., Pitton C., Garcia A. et al.// Exp. Cell. Res. - 1995. - Vol.218. - P.105-113.
27. Harel-Bellan A., Durum S., Muegge K. et al.// J. Exp Med. - 1988. - Vol.168. - P.2309-2318.
28. Helene C, Toulme J.J.// Biochim. Biophys. Acta. - 1990. -Vol.1049. - P.99-125.
29. Helene C. // Anticancer Drug Des. - 1991. - Vol.6. - P.569-584.
30. Henderson B., Blake S. // Trends Pharmacol. Sci. - 1992. - Vol.13. P.145.
31. Hermine O., Beru N., Pech N., Goldwasser E. // Blood. - 1991. - Vol.78. - P.2253-2260.

32. Hikida M., Haruna K.I., Ohmori H. // Immunol. Lett. - 1992. Vol.34. - P.297-302.
33. Ho S.N., Abraham R.T., Nilson A. et al.// J.Immunol. - 1987. - V.139. - P.1532-1540.
34. Holt J.T., Redner R.L., Nienhus A.W. // Mol. Cell. Biol. - 1988. - Vol.8. - P.963
35. Iversen P.// In: Crooke ST, Lebleu B, Eds. Antisense Research and applications. New York. CRC Press Inc. - 1993. - P.461
36. Juliano R L, Akhtar S.// Antisense Res. Dev. - 1992. - Vol.2. - P.165-175.
37. Keller E.T., Ershler W.B. // J.Immunol. - 1995. - Vol.154. P. 4091-4098.
38. Keller J.R., Ruscetti F., Heidecker G. et al.// Curr.Top.Microbiol.Immunol. -1996. - Vol.211. P. 43-53.
39. Koch A.E., Polverini P.J., Kunkel S.L. et al.// Science. - 1992. - Vol.258. - P.1798-1801.
40. Koizumi M., Iwai S., Ohtsuka E. // FEBS Lett. - 1988. - Vol.239. - P.285-288.
41. Krieg A., Tonkinson J., Matson S. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1993. - Vol.90. P.1048-1052.
42. Labbaye C., Valtieri M., Barberi T. et al. // J.Clin.Invest. - 1995. - Vol.95. - P.2346-2358.
43. Le-Roy C., Leduque P., Dubois P.M.// J.Biol.Chem. - 1996. - Vol.271, P.11027-11033.
44. Lee C.L.Y., Lee S.H.S., Jay F.T., Rozee K.R.// Immunology - 1990. -Vol.70. - P. 94-99.
45. Lefebvre-d' Hellencourt C., Diaw L., Guenounou M.// Eur.Cytokine Netw. - 1995. - Vol.6. - P.7-19.
46. Leonetti J.P, Rayner B., Lemaitre M. et al.// Gene. - 1988. - Vol.72. - P.323-332.
47. Leonetti J.P, Machy P., Degols G. et al.// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1990. - Vol.87. - P.2448-2451.
48. Leonetti J.P, Degols G, Lebleu B.// Bioconj. Chem. - 1990. - Vol.1. - P.149-153.
49. Letsinger R.L., Zhang G., Sun D.K. et al.// Proc. Natl. Acad. Sci.USA. - 1989. - Vol.86. - P.6553-6556
58. Miller PS, McParland K.B, Jayuraman K, Ts'o Po. // Biochemistry. - 1981 -Vol.20. - P.1874-1880.
59. Mosmann T.R., Coffman R.L.// Ann. Rev. Immunol. - 1989. - Vol.7. - P.145-173.
60. Muszynski K.W., Ruscetti F.W., Heidecker G. et al.// J-Exp-Med. - 1995 - Vol.181. P.2189-2199.
61. Neurath MF, Pettersson S, Meyer-zum-Buschenfelde KH.et al.// Nat-Med. - 1996 Vol.2. - P.998-1004.
62. Pech N., Hermine O., Goldwasser E.// Blood. - 1993. - Vol.82. - P.1502-1506.
63. Peng B., Mehta N.H., Fernandes H. Et al// Leuk-Res. - 1995. - Vol.19. - P.159-167.
64. Ratajczak M.Z., Kant J.A., Luger S.M. et al.// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -1992. -Vol.89. - P.11823-7.
65. Renneisen K, Leserman L.D., Matthes E. et al.// J. Biol . Chem . - 1990. - Vol.265. - P.16337-16342.
66. Romagnani S. // Eur. Cytokine Netw. 1994. - Vol.5. - P.7-12.
67. Rus V., Svetic A., Nguyen Ph. et al.// J.Immunol. - 1995. Vol.155. - P.2398-2406.
68. Salerno A., Dieli F., Sireci G. et al.// Immunology. - 1995. - Vol. 84. - P.404-409.
69. Sato T., Selleri C., Young N.S., Maciejewski J.P.// Blood. - 1995 - Vol. 86. P. 3373-3380.
70. Sburlati AR, Manrow RE, Berger SL. 1991. Proc. Natl. Acad. USA. 88:253-257.
71. Schwab G., Siegall C.B., Aarden L.A. et al.// Blood. - 1991 - Vol.77. P.587-593.
72. Segal G.M., Smith T.D., Heinrich M.C. et al.// Blood. - 1992. - Vol.80. - P.609-616.
73. Sei Y., Vitkovic L., Yokoyama M.M.// Neuroimmunomodulation. - 1995. - Vol.2. - P.121-133.
74. Stein C.A., Krieg A.M. // Antisense Res. Dev. - 1994. Vol.4. - P.67-69.
75. Temsamani J., Kubert M., Tang J. et al.// Antisense Res.Dev. - 1994. - Vol.4. - P.35-42.
76. Thierry A.R., Dritschilo A. // Nucleic Acids Res. - 1992. - Vol.20. - P.5691-5698.

77. *Uhlmann E., Peyman A. // Chemical Reviews. - 1990. Vol.90. - P.543-584.*
78. *Wagner R W. // Nature. - 1994. - Vol.372. - P.333-335.*
79. *Yamanaka R., Tanaka R., Yoshida S. et al.// J.Neurooncol. - 1995. Vol.25. - P.59-65.*
80. *Zendegui J.G., Vusquez K.M. Tinsley J.H. et al.// Nucleic Acids Res. - 1992. -Vol.20. - P.307-314.*
81. *Zubiaga A.M., Munoz E., Huber B.T. // J. Immunol. - 1991. - Vol.146. - P.3849-3856.*
82. *Zucali J.R., Moreb J. // In: Molecular and cellular biology of cytokines. - Wiley-liss Inc., - 1990. - P. 315.*

THE USE OF ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES FOR MODULATION OF CYTOKINE GENE EXPRESSION.

V.A. Kozlov, S.V. Sennikov

Institute of Clinical Immunology, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk

The review summarizes literature data on the mechanism of action and the use of antisense oligonucleotides for modulation of cytokine gene expression in haemo- and immunopoesis. This new approach for gene-directed modulation of the gene expression allows to analyze both intercellular and intracellular protein interaction. Use of this approach is prospective for both experimental researches in vivo and in vitro and application in therapeutic purposes.

Key words: antisense oligonucleotides, modulation of cytokine gene expression, haemopoiesis, immunopoesis