

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного

На правах рукопису

Коробкова Катерина Сергіївна

**Безклітинна система білкового синтезу як модель
для вивчення трансляції у молікутів і відбору
специфічних інгібіторів їх життєдіяльності**

03.00.07. - мікробіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

К и ї в - 1 9 9 7



00752021 (H)

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі мікоплевміології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України.

Науковий керівник: член-кореспондент НАНУ, доктор біологічних наук, професор І.Г.Скрипаль.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор, заслужений діяч науки України
І.Я.Захарова
доктор біологічних наук, професор
С.С.Малота.

Провідна установа: Київська Медична Академія післядипломної освіти МОЗ України.

Захист відбудеться "16" *квітня* 1997 р. о 10-ій годині на засіданні Спеціалізованої Вченої Ради Д 01.81.01 при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України за адресою: 252143, Київ-143, вул.Заболотного,154, зал засідань .

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України.

Автореферат дисертації розісланий "___" _____ 1997 р.

Вчений секретар
Спеціалізованої Вченої Ради
кандидат біологічних наук

Л.М.Пуріш

AB 37.182

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Молікути (клас Mollicutes) є найменшими і найпростішими убіквітними організмами серед прокариот. Вони вилучені практично від всіх живих об'єктів (від рослин до людини) і викликають у них захворювання, які називаються мікоплазмозами. Особливе значення має кофакторна роль молікутів в розвитку захворювання людини на СНІД. Проте ефективних і специфічних засобів боротьби з мікоплазмозами досі не існує. У цьому зв'язку актуальним є пошук нових підходів до контролю життєдіяльності цих мікроорганізмів і для подальшого створення ефективних високоспецифічних антимікоплазмозових засобів.

Виходячи з того, що у складі 16S рРНК молікутів знайдено унікальні послідовності нуклеотидів, так звані, "сигнатурні", є перспективним використати такі ділянки як мішень для пригнічення життєдіяльності цих мікроорганізмів за допомогою антисигнатурних олігонуклеотидів. Проте вивчення впливу таких антисигнатурних олігонуклеотидів безпосередньо в живій клітині молікутів є обмеженим внаслідок дії їх клітинних нуклеаз. Тому ми вважаємо, що на першому етапі дослідження таких речовин доцільно використовувати метод трансляції у безклітинних системах, створених на основі рибосом молікутів. У зв'язку з тим, що лізати клітин молікутів містять велику кількість нуклеаз, необхідно було створити таку систему, де б ці компоненти і інші фактори не впливали негативно на функціонування рибосом молікутів.

Мета і завдання досліджень. Метою даної роботи була роз-

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

робка безклітинної системи трансляції молікутів для вивчення впливу синтетичних антисигнатурних олігонуклеотидів на активність рибосом ахолеплазм в цій системі з наступним відбором найбільш активних з них як перспективних високоспецифічних антимікоплазмових засобів.

Щоб досягти поставленої мети потрібно було вирішити такі завдання:

- одержати рибосоми ахолеплазм, які б відповідали критеріям чистоти і були активні у функціональному відношенні;
- створити систему трансляції *in vitro* на основі рибосом ахолеплазм і оптимізувати її для використання як моделі для вивчення білоксинтезуючої активності молікутів;
- вивчити вплив антисигнатурних олігонуклеотидів, комплементарних унікальним послідовностям 16S рРНК молікутів на активність рибосом ахолеплазм *in vitro* і порівняти з їх ефективністю у живій клітині *A. laidlawii*.

Наукова новизна і практична цінність роботи. Вперше виділено активні у функціональному відношенні рибосоми представників родини *Acholeplasma-taceae*, і на їх основі створено гетерологічну безклітинну систему трансляції.

Гетерологічна система трансляції з використанням еукаріотичних екстрактів і рибосом ахолеплазм, оптимізована за рядом показників: температурою, часом трансляції, а також концентрацією іонів магнію і калію.

Вперше встановлено інгібуючий вплив антисигнатурних олігонуклеотидів, комплементарних унікальним послідовностям 16S рРНК молікутів на активність рибосом ахолеплазм. Показано, що антисенсовий модифікований феназинієм олігонуклеотид,

комплементарний 3'-кінцевій послідовності цієї рРНК найсильніше пригнічував трансляцію в безклітинній системі і в живих клітинах ахолеплазм.

Створена гетерологічна безклітинна система трансляції на основі рибосом молюсків і екстракту зародків пшениці, може, на наш погляд, бути використана як модель для попереднього випробування та відбору інгібіторів, що впливають на життєдіяльність молюсків на рівні активності їх рибосом, з наступним створенням на їх основі нових високоспецифічних антимікоплазмових засобів.

Апробація роботи. Результати дослідження доповідали на II і III Міжнародних Конференціях "СПИД, рак и ретровіруси человека" (Санкт-Петербург, Росія, 1993,1995), VIII З'їзді Українського мікробіологічного товариства (Одеса, 1993) і Конференції молодих вчених, присвяченій 50-річчю Інституту захисту рослин УААН (Київ, 1996).

Публікації. Основні результати дисертаційної роботи викладені у дев'яти друкованих роботах, список яких представлено в кінці автореферату.

Конкретна особиста участь автора в одержаних результатах. Робота виконана особисто автором на базі відділу мікоплазмології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАНУ. Культивування клітин молюсків виконано сумісно з науковим співробітником відділу Л.П.Маліновською, планування і проведення експериментів здійснювалось за допомогою ст.н.сп. Л.П.Панченко, за що висловлюємо їм глибоку подяку.

Структура і об'єм дисертації. Дисертація викладена на 115 сторінках машинописного тексту і містить 22 рисунки і 5

таблиць. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів і їх обговорення (3 розділи), висновків і списку літератури, який включає 163 найменування, а також містить список скорочень і примітку.

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктами дослідження були молекути з родини *Acholeplasmataceae*, а саме: типовий штам *A. laidlawii* PG-8 NCTC10116, одержаний з колекції міжнародного центру культур мікоплазм (м. Орхус, Данія), а також *A. laidlawii* var. *granulatum* шт.118, одержаний з колекції відділу мікоплазмології Інституту мікробіології та вірусології НАН України. В роботі також були використані клітини *Escherichia coli* K12 штамми jm 105 і HB 101, одержані з колекції мікроорганізмів відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології НАН України.

Культивування ахолеплазм проводили за методикою Скрипаля і Малиновської (1984). Рибосоми одержували за методом Johnson і Horowitz (1971). Білковий вміст рибосом визначали за методом Bradford (1976), вміст їх РНК визначали за Спіріним (1958). Активність рибосом ахолеплазм у безфакторному полі(У)-залежному синтезі поліфенілаланіну визначали, як описано Зенковою з співавторами (1991).

Для створення гетерологічної безклітинної системи трансляції на основі функціонально активних рибосом ахолеплазм було використано комерційні набори "Трансляція 1" на основі екстракту зародків пшениці (ЕЗП) і "Трансляція 2" на основі лізату ретикулоцитів кроля (ЛРК) ("Біопол", Росія), в яких

діяльність 80S рибосом пригнічували за допомогою експериментально визначених концентрацій актидіону.

Оптимальні значення температури, часу трансляції, а також концентрацій іонів калію і магнію визначали згідно рекомендацій фірми Amersham (США). РНКазну активність в досліджуваному матеріалі визначали експрес-методом (Jeffries, 1957).

Вплив синтетичних олігонуклеотидів на активність рибосом молікутів вивчали, додаючи їх в концентраціях від 0 до 100 нМ в системи безклітинного синтезу білку. В контрольні проби замість олігонуклеотиду вносили рівний об'єм бідистільованої води. В дослідженнях були використані олігонуклеотиди, комплементарні таким ділянкам 16S рРНК молікутів:

N	ПОСЛІДОВНІСТЬ	ОЛІГОНУКЛЕОТИД 5' - 3'
1	1510 - 1521	АГАААГГАГТТТА
2	1510 - 1521	АГАААГГАГТТТPhz
3	1510 - 1521	APhzAAAГТТТТТPhz
4	523 - 532	ЦАТАГТТАГ
5	499 - 507	ЦТАТГТТАТА

Олігонуклеотиди 1-3 та 6-азациитидин були синтезовані в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України. Олігонуклеотиди 4-5 були синтезовані в Інституті біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України. Як контроль використовували олігонуклеотид АТАТГТАТЦ, що не мав комплементарної послідовності-мішені на 16S рРНК молікутів. З метою визначення впливу на трансляцію в живих клітинах ахолеплазм було використано метод Аксенова з співавторами (1987).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Вивчення впливу віку культур ахолеплазм на кількість рибосом, вилучаємих з клітин молюсків.

В процесі вилучення рибосом з ахолеплазм було помічено, що кількість рибосом залежить від віку культури (Рис.1). Встановлено, що у культур ахолеплазм віком від 6 до 30 год. кількість рибосом, що вилучалися, прогресивно підвищувалась, і у віці культури близько 30 год. досягала найвищого значення. Стосовно росту ахолеплазм було знайдено, що від початку їх культивування до досягнення культурою віку 24-30 год. відбувається логарифмічне підвищення кількості колонієутворюючих одиниць (КУО), після чого цей показник стабілізується аж до досягнення культурою віку 60 год., після чого помітно деяке зниження кількості КУО, яка співвідносилась з показником Д640 (Рис.1).

2. Вивчення хімічного складу рибосом.

Одержані препарати рибосом і ешерихій аналізували фізико-хімічними методами для визначення їх чистоти. Результати вивчення хімічного складу рибосом ахолеплазм представлені на Табл.1. Для рибосом *A.laidlawii* PG-8 визначено, що вміст білку склав, у середньому, 39.6%, а вміст РНК - 60.4%; а для *A.laidlawii* var.*granulatum* шт.118 - 39.1 і 60.8% відповідно. Як контрольні були аналізовані рибосоми ешерихій, для яких ці показники склали: *E.coli* JM105 - білок - 40%, РНК - 60%, *E.coli* HB101 - 39.9 і 60.1% відповідно. Кількісне співвідношення РНК до білку склало, приблизно, 1.5:1 як для ахолеплазм, так і для ешерихій. Ці результати підтверджують чистоту виділених препаратів і стверджують універсальність складу 70S рРНК рибосом прокариот.

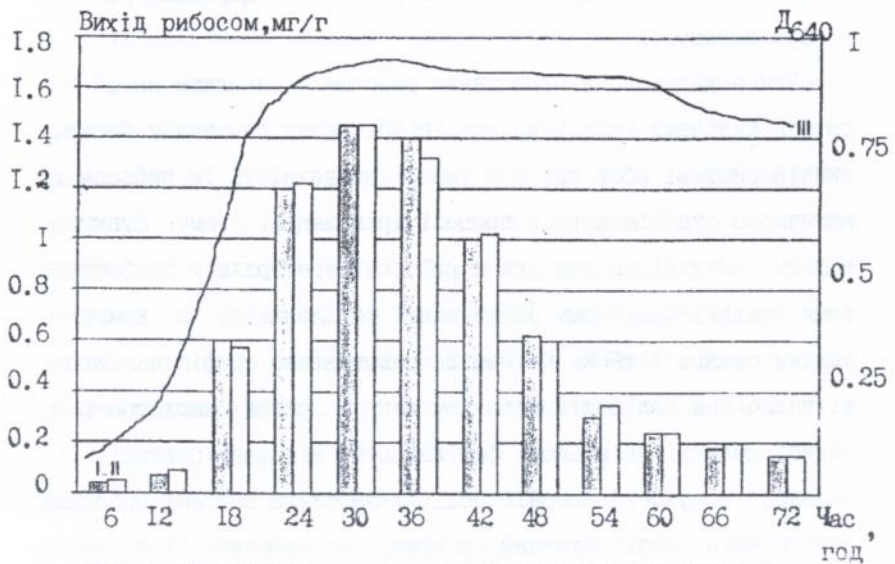


Рис.1. Залежність виходу рибосом і росту клітин ахолеплазм від віку культури

I - *A. laidlawii* var. *granulum* шт.118;

II - *A. laidlawii* PG-8;

III - крива росту *A. laidlawii* PG-8.

Таблиця 1. Хімічний склад одержаних препаратів рибосом

Культура джерело рибосом	Суша маса, мг	Білок		РНК		РНК/ Білок
		мг/мл	%	мг/мл	%	
<i>E. coli</i> JM 105	1.2	0.48	40.0	0.72	60.0	1.5
<i>E. coli</i> HB 101	1.1	0.44	39.9	0.66	60.1	1.5
<i>A. laidlawii</i> PG 8	1.4	0.55	39.5	0.85	60.4	1.53
<i>A. laidlawii</i> var. <i>granulum</i> шт. 118	1.2	0.47	39.1	0.73	60.9	1.56

3. Визначення функціональної активності одержаних рибосом ахолеплазм.

Для подальшого використання рибосом ахолеплазм як об'єкта для вивчення впливу на них інгібіторних речовин у безклітинній системі обов'язковою умовою є здатність їх рибосом до активного функціонування в процесі трансляції. Тому функціональну активність виділених рибосом перевіряли у безфакторному полі(У)-залежному зв'язуванні фенілаланіну з використанням сумарної тРНК. На Рис.2 представлено графік залежності включення радіоактивного вуглецю у склад кислотонервчинної фракції зв'язаного фенілаланіну від часу реакції. Показано, що у безфакторній полі(У)-залежній системі рибосоми синтезували радіоактивний продукт, що доводить їх функціональну активність і дозволяє використовувати їх для подальшого створення безклітинної системи трансляції.

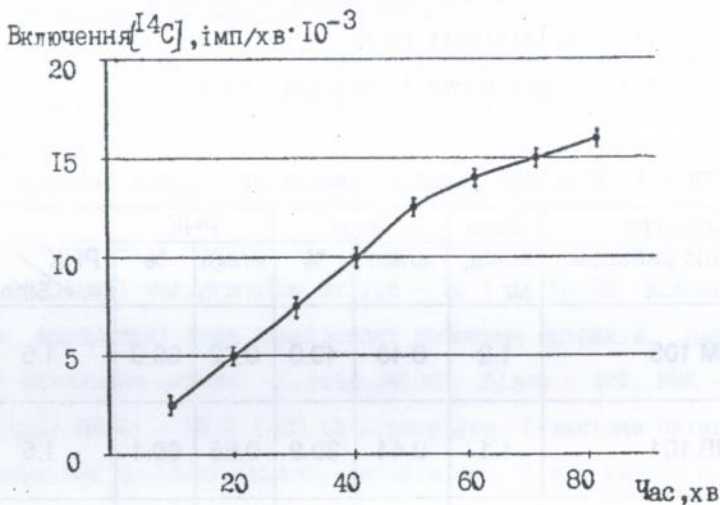


Рис.2. Активність рибосом ахолеплазм у безфакторному полі(У)-залежному зв'язуванні фенілаланіну

4. Еукаріотичні системи трансляції *in vitro* як елемент системи безклітинного синтезу білку для ахолеплазм.

Враховуючи, що системи, побудовані за принципами лізату власних клітин і суміщення транскрипції-трансляції, вміщують ряд таких небажаних компонентів, як клітинні нуклеази і нецільові нуклеїнові кислоти, а також на основі встановленого факту, що рибосоми ахолеплазм виявили активність у безфакторному полі(У)-спрямованому синтезі, ми передбачили, що у даному випадку адекватною моделлю може бути гетерологічна система трансляції *in vitro* на основі 70S рибосом молюсків і лізатів еукаріотичних клітин, позбавлених активності їх рибосом. Для запобігання неспецифічного зв'язування антисенсових олігонуклеотидів еукаріотичними рибосомами, їх активність інгібували за допомогою актидіону, який діє на 60S субчастку рибосоми, і, таким чином, пригнічує ріст еукаріотичних клітин. Для визначення концентрації актидіону, необхідної для пригнічення 80S рибосом, було використано стандартні системи трансляції (Рис.3). Встановлено, що повне інгібування функцій 80S рибосом в системах ЛРК і ЕЗП відбувається при концентрації актидіону 150 і 200 мкг/мл відповідно. У екстракти еукаріотичних клітин, позбавлені активності власних рибосом, вносили одержані чисті препарати функціонально активних рибосом молюсків (Рис.4) і спостерігали їх білоксинтезуючу активність.

5. Вплив віку культури ахолеплазм на трансляційну активність їх рибосом в системі *in vitro*.

Для подальших досліджень трансляції молюсків необхідно було в'яснити, у якому віці культури рибосоми ахолеплазм виявляють найбільшу активність.

Включення [^{14}C], імпл/хв $\cdot 10^{-3}$

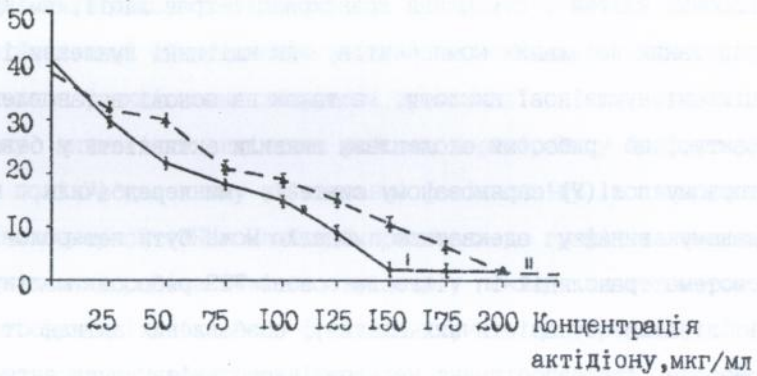


Рис.3. Вплив актідіону на трансляцію у еукаріотичних безклітинних системах

I - система ЛПК;

II - система ЕЗП.

Включення [^{14}C] імпл/хв $\cdot 10^{-3}$

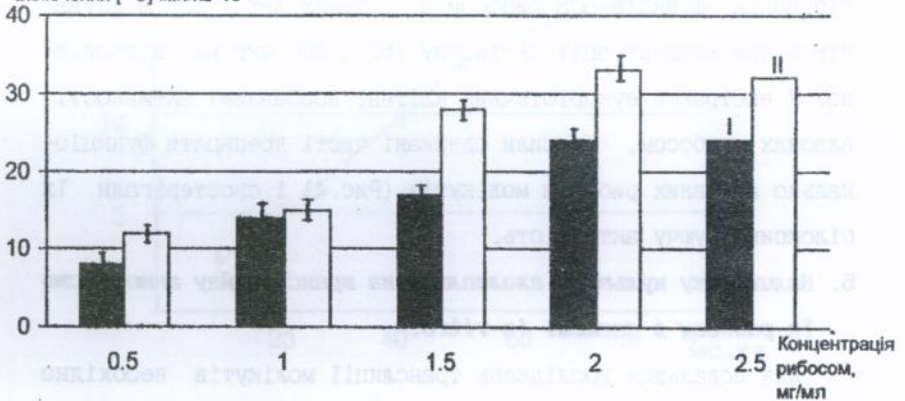


Рис.4. Активність рибосом ахолеплазм у екстракті зародків пшениці

У ході досліджень було встановлено, що трансляційна активність рибосом ахолеплазм підвищувалась при набуванні культурою віку 16-20 год., а при культивуванні протягом 18-24 год. досягала максимального рівня (Рис.5). При порівнянні одержаних даних з максимальним виходом рибосом і динамікою росту молікутів, було встановлено, що рибосоми ахолеплазм в системі трансляції *in vitro* найбільш активні при досягненні культурою віку 20-22 год., що відповідає логарифмічній фазі росту клітин і найвищим показникам їх білоксинтезуючої активності. Отже, це підтверджує адекватність гетерологічної безклітинної системи трансляції на основі рибосом ахолеплазм і "безрибосомного" екстракту зародків пшениці для вивчення білоксинтезуючої функції рибосом молікутів.

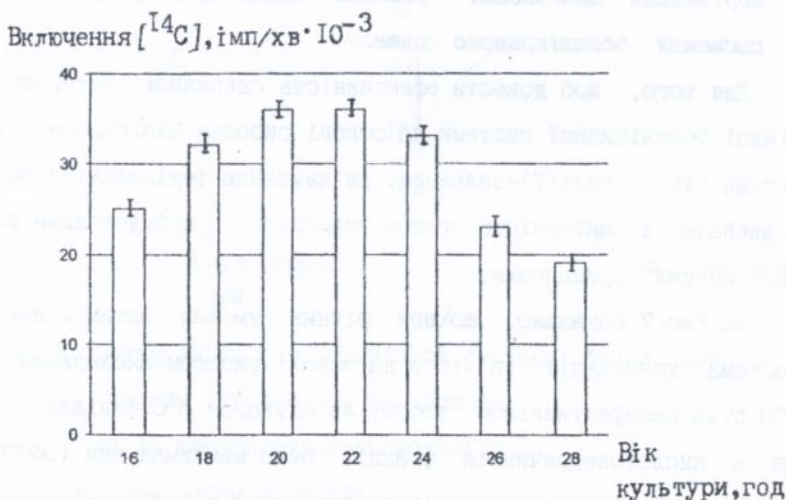


Рис.5. Вплив віку культури ахолеплазм на трансляційну активність їх рибосом в гетерологічній безклітинній системі

6. Оптимізація безклітинної системи для найкращої трансляції рибосомами ахолеплазм.

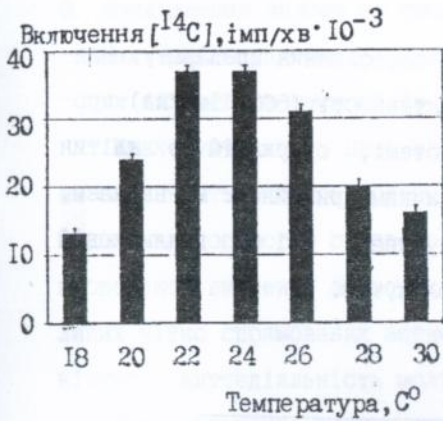
У зв'язку з нестандартністю створеної нами системи, а також враховуючи те, що метою нашої роботи було підібрати специфічні, чітко спрямовані засоби проти молікутів, які діють на рівні білоксинтезуючого апарату, у завдання дослідження входило підібрати умови, в яких рибосоми молікутів були б найактивнішими і відкритими для дії таких речовин.

Після одержання попередніх даних стосовно активності рибосом ахолеплазм в умовах *in vitro*, було визначено, що оптимальними умовами функціонування рибосом ахолеплазм у екстракті зародків пшениці були: температура трансляції - 23⁰С, тривалість реакції - 70 хв, концентрації іонів магнію і калію - 5 мМ і 150 мМ відповідно (Рис.6).

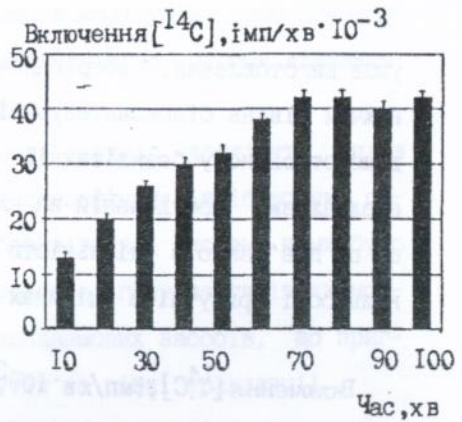
7. Порівняння активності рибосом ахолеплазм у різних системах безклітинного синтезу.

Для того, щоб довести ефективність одержаної гетерологічної безклітинної системи на основі рибосом ахолеплазм, її активність по полі(У)-залежному зв'язуванню фенілаланіну порівнювали з активністю систем трансляції, побудованими за "класичними" принципами.

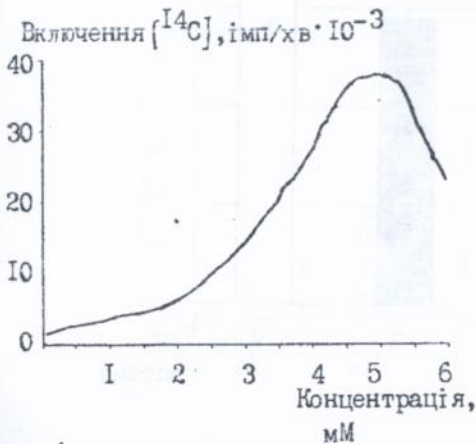
На Рис.7 показано, що при рівних умовах оптимізована система трансляції *in vitro* на основі рибосом ахолеплазм і ЕЗП була найефективнішою, тобто, зв'язування ¹⁴С-фенілаланіна в кислотонерозчинній фракції було максимальним (36000 імп/хв). Декілька менший рівень включення міченої амінокислоти (28000 імп/хв) відмічали у системі, аналогічній за складом, проте з використанням комерційної суміші для трансляції (ЕЗП), що, можливо, пояснюється впливом тривалості і



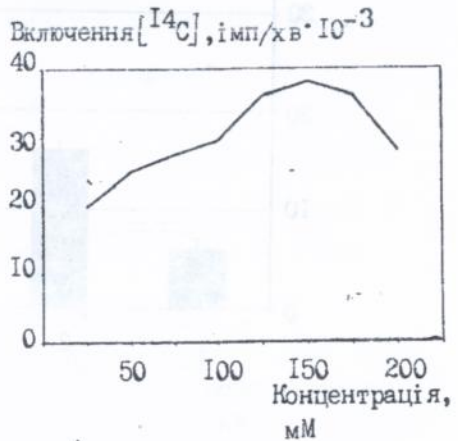
а/



б/



в/



г/

Рис.6. Оптимізація гетерологічної системи безклітинного синтезу для рибосом ахолеплазм:

- а) за температурою трансляції;
- б) за часом реакції;
- в) за концентрацією іонів магнію;
- г) за концентрацією іонів калію.

умов виготовлення, зберігання і пересилання препарату. Найнижчий рівень білоксинтезуючої активності (6000 імп/хв) продемонстровано у безклітинній системі, одержаній з клітин ахолеплазм, побудованій за класичним принципом. Ми вважаємо, що це пов'язано з діяльністю нуклеаз, які у надлишковій кількості присутні в клітинах молюсків.

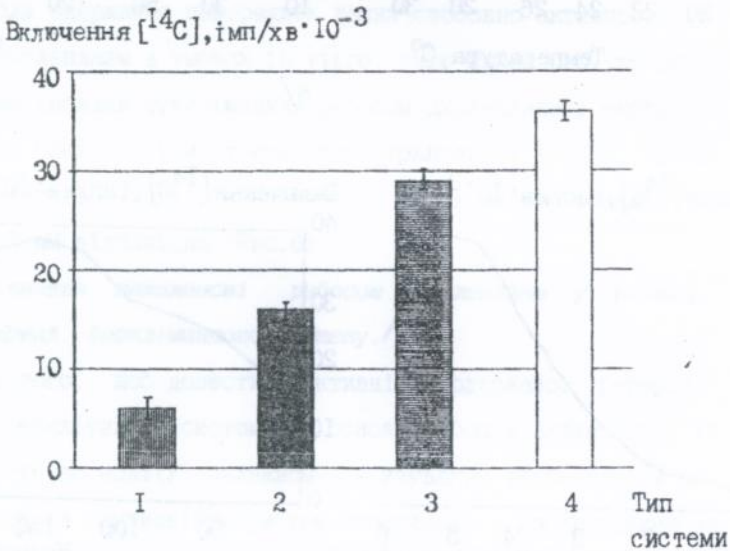


Рис.7. Полифенилаланин-синтезуюча активність рибосом ахолеплазм у різних системах трансляції *in vitro*

- 1 - класична лізатна система;
- 2 - система безфакторного синтезу;
- 3 - комерційна система ЕЗП з рибосомами ахолеплазм;
- 4 - реконструйована і оптимізована система ЕЗП з рибосомами ахолеплазм.

8. Дослідження впливу на трансляцію молекулів антисигнатурних олігонуклеотидів, комплементарних різним ділянкам їх 16S рРНК в системі *in vitro*.

Враховуючи, що у наше завдання входило дослідити вплив на активність рибосом молекулів специфічних інгібіторних речовин, за допомогою створеної безклітинної системи нами було проведено вивчення антисигнатурних олігонуклеотидів як можливих чітко спрямованих антимікоплазмових засобів, що пригнічують життєдіяльність молекулів на рівні трансляції.

При визначенні впливу антисигнатурних олігонуклеотидів, комплементарних ділянкам 16S рРНК молекулів різної локаліза-

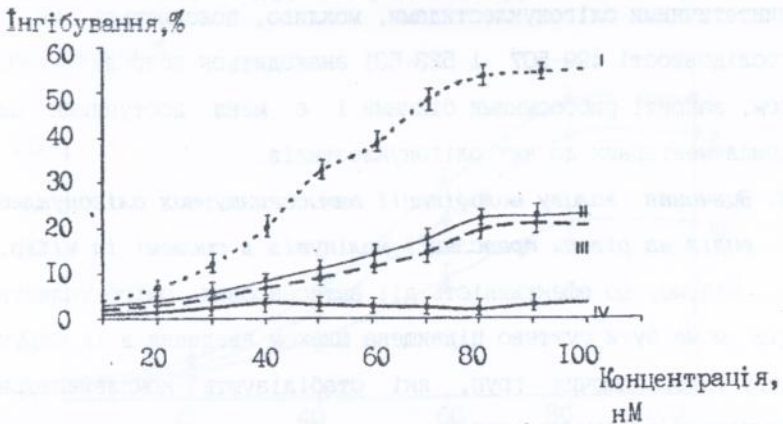


Рис.8. Вплив антисигнатурних олігонуклеотидів, комплементарних різним послідовностям 16S рРНК молекулів, на активність рибосом ахолеплазм в системі *in vitro*

- I - олігонуклеотид, комплементарний ділянці 1510-1521;
- II - олігонуклеотид, комплементарний ділянці 523-531;
- III - олігонуклеотид, комплементарний ділянці 499-507;
- IV - олігонуклеотид, що не має комплементарного аналога на 16S рРНК молекулів.

ції, було встановлено, що олігонуклеотид, комплементарний 3'-кінцевій послідовності 16S рРНК в області нуклеотидів 1509-1521 виявляв більш сильний інгібуючий ефект на активність рибосом ахолеплазм відносно синтезу поліфенілаланіна (53%), ніж олігонуклеотиди, комплементарні послідовностям 499-507 і 523-531, розміщених у середній частині ланцюга 16S рРНК (19 і 21% відповідно) при однаковій їх концентрації. При використанні олігонуклеотида, який не мав комплементарної послідовності-мішені на 16S рРНК ахолеплазм, жодних змін рівня трансляції у безклітинній системі не було зареєстровано (Рис.8).

Така значна різниця у гальмуванні процесів трансляції синтетичними олігонуклеотидами, можливо, пояснюється тим, що послідовності 499-507 і 523-531 знаходяться всередині рибосом, закриті рибосомними білками і є менш доступними для комплементарних до них олігонуклеотидів.

9. Вивчення впливу модифікації антисигнальних олігонуклеотидів на рівень трансляції молекулів в системі *in vitro*.

Відомо, що ефективність дії антисенсових олігонуклеотидів може бути суттєво підвищена шляхом введення в їх структуру інтеркалюючих груп, які стабілізують комплементарні комплекси олігонуклеотидів.

Нами було проведено дослідження впливу феназинових похідних олігонуклеотида, комплементарного 3'-кінцевій послідовності 16S рРНК ахолеплазм, на процес трансляції синтетичної полі(U)-матриці в системі *in vitro*, створеній на основі рибосом молекулів (Рис.9).

З одержаних даних видно, що при однаковій концентрації найбільш ефективне інгібування активності рибосом ахолеп-

лазм, яке досягає 60%, спостерігали при взаємодії їх з олігонуклеотидом, який містив інтеркалюючу групу у 3'-положенні. Декілька менший рівень інгібування трансляції (53%) відмічено при використанні немодифікованого олігонуклеотида, а найменший ефект (до 35%) - при дії олігонуклеотида з двома феназиновими вставками (на 3'- і 5'-кінцях).

Отже, для інгібування трансляції в безклітинній системі створеній на основі рибосом ахолеплазм, серед випробуваних олігонуклеотидів найбільш ефективним інгібітором білкового синтезу виявився антисигнатурний олігонуклеотид, комплементарний 3'-кінцю 16S рРНК молікутів, з одною феназиною вставкою. З одного боку, інтеркалююча група забезпечує необ-

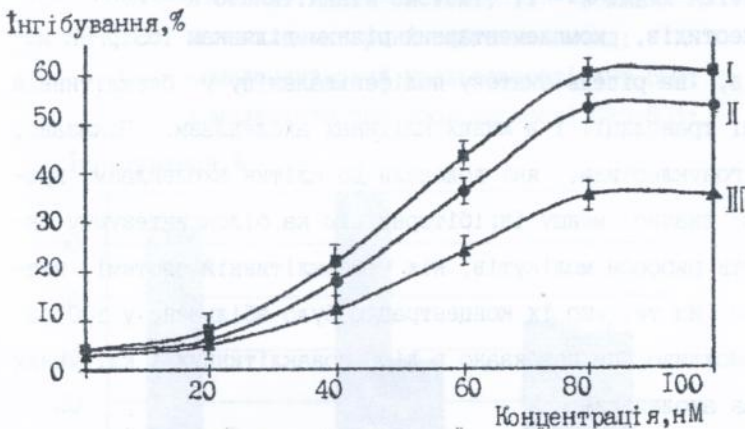


Рис. 9. Вплив феназинових модифікацій антисигнатурного олігонуклеотида, комплементарного 3'-кінцевій послідовності 16S рРНК молікутів на активність рибосом ахолеплазм в гетерологічній безклітинній системі

- I - олігонуклеотид з однією феназиною вставкою;
- II - немодифікований олігонуклеотид;
- III - олігонуклеотид з двома феназиновими вставками.

хідний захист від нуклеазної активності системи і підвищує стабільність комплексу, а з іншого - довжина ділянки активного зв'язування є достатньою для найбільш повного пригнічення трансляції.

10. Порівняння ефективності пригнічення трансляції антисигнатурними олігонуклеотидами в безклітинній гетерологічній системі і в живих клітинах ахолеплазм.

Ефективність олігонуклеотидів, що проявили інгібуючу активність відносно функціонування рибосом ахолеплазм у безклітинній системі трансляції, порівнювали з їх ефективністю в живих клітинах.

На Рис.10 представлено результати порівняння інгібіторного ефекта немодифікованих феназином антисигнатурних олігонуклеотидів, комплементарних різним ділянкам 16S рРНК молекулів, на рівень синтезу поліфенілаланіну у безклітинній системі трансляції і в живих клітинах ахолеплазм. Показано, що олігонуклеотида, які додавали до клітин ахолеплазм, проявляли значно меншу інгібіторну дію на білоксинтезуючу активність рибосом молекулів, ніж у безклітинній системі, незважаючи на те, що їх концентрацію було збільшено у 100 разів. Можливо, це пов'язано з дією позаклітинних і клітинних нуклеаз ахолеплазм.

Результати дослідження ефективності феназинових похідних олігонуклеотида, комплементарного 3'-кінцевій послідовності 1510-1521 16S рРНК молекулів, представлено на Рис.11. Показано, що в умовах *in vivo* під дією олігонуклеотидів спостерігається ефект інгібування синтезу міченого білкового продукту, який підвищується пропорційно кількості феназинових груп, які було введено до складу олігонуклеотиду. Ми вважа-

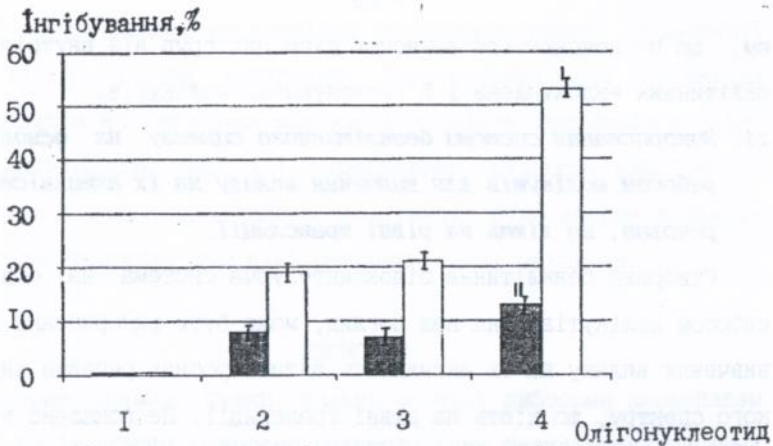


Рис.10. Ефективність інгібування активності рибосом ахолеплазм антисигнатурними олігонуклеотидами, комплементарними різним послідовностям 16S рРНК молікутів

- I - в безклітинній системі; II - в живих клітинах;
- 1 - некомплементарний олігонуклеотид;
- 2 - комплементарний послідовності 499-507;
- 3 - комплементарний послідовності 523-531;

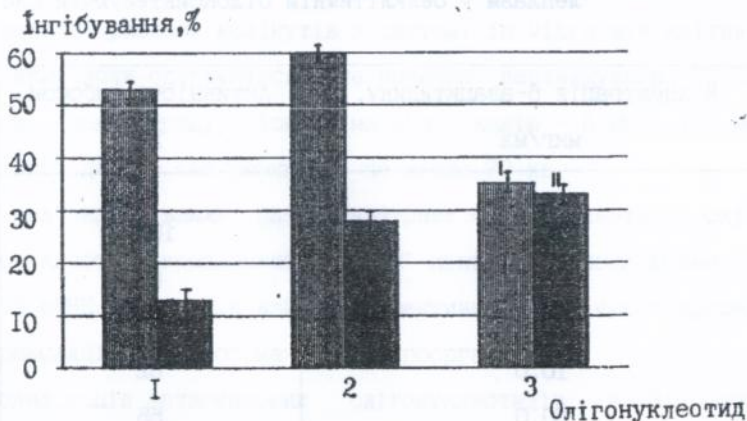


Рис.11. Вплив феназинових модифікацій олігонуклеотидів на ефективність інгібування трансляції у молікутів

- I - в безклітинній системі; II - в живих клітинах;
- 1 - немодифікований олігонуклеотид;
- 2 - олігонуклеотид з однією феназиною вставкою;
- 3 - олігонуклеотид з двома феназиновими вставками.

ем, що це пояснюється захисною дією цих груп від внутрішнь-оклітинних ендонуклеаз і 5'-екзонуклеаз молекулів.

11. Використання системи безклітинного синтезу на основі рибосом молекулів для вивчення впливу на їх активність речовин, що діють на рівні трансляції.

Створена безклітинна білоксинтезуюча система на основі рибосом молекулів, на наш погляд, може бути використана для вивчення впливу на їх активність антимікробних речовин широкого спектру, що діють на рівні трансляції. Це показано нами на прикладі 6-азацитину. У Табл.2 представлено результати вивчення впливу 6-азацитину на активність трансляції полі(У)-матриці у безклітинній системі на основі рибосом ахолеплазм і екстракту зародків пшениці. Зростаючі концентрації

Таблиця 2. Вплив 6-азацитину на активність рибосом ахолеплазм у безклітинній білоксинтезуючій системі

Концентрація 6-азацитину, мкг/мл	Активність рибосом, %
0	100
2.5	80
5.0	77
10.0	62
20.0	55
30.0	43
60.0	38
75.0	20
100.0	0

6-АЦ прогресивно і пропорційно інгібували процес трансляції *in vitro*, і при досягненні його концентрації 100 мкг/мл трансляція на рибосомах молюсків повністю припинялась. Окрім антитрансляційної дії 6-азацитину відносно рибосом молюсків в результаті даного дослідження було вперше встановлено антимікробну дію цієї речовини та її механізм.

ВИСНОВКИ

1. Вперше одержано функціонально активні рибосоми ахолеплазм і на їх основі створено гетерологічну безклітинну систему трансляції.
2. Встановлено, що система трансляції *in vitro* на основі рибосом ахолеплазм і екстракту зародків пшениці є більш ефективною порівняно з аналогічною білоксинтезуючою системою з молюсків, побудованою за класичними принципами.
3. Визначено, що для найбільш ефективної трансляційної активності рибосом молюсків в системі *in vitro* вік клітин, з яких вони одержуються, не повинен перевищувати 20-22 год, концентрації іонів магнію і калію - 5 мМ і 150 мМ відповідно, а час реакції - не менше 70 хв.
4. Серед випробуваних антисигнатурних олігонуклеотидів олігонуклеотид, комплементарний 3'-кінцевій послідовності 16S рРНК молюсків найбільш ефективно пригнічував процес трансляції на рибосомах цих мікроорганізмів.
5. Модифікація антисенсових олігонуклеотидів з 3'- або 3'-5'-кінців інтеркалюючими групами (феназинієм) підсилює їх інгібуючий вплив на трансляцію в живих клітинах молюсків і захищає їх від дії клітинних нуклеаз.
6. Безклітинну гетерологічну систему трансляції, створену на

основі рибосом молікутів і екстракту зародків пшениці можна використовувати для випробування і відбору речовин з антитрансляційною активністю відносно рибосом цих мікроорганізмів, що показано на прикладі 6-азацитидину.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Коробкова Е.С., Панченко Л.П., Скрипаль І.Г. Получение рибосом ахолеплазм и исследование их физико-химических характеристик //Микробиол.журн.- 1992.- 54, №6.- С.41-45.
2. Коробкова Е.С. Бесклеточная система трансляции на основе рибосом молликутов//Микробиол.журн.-1993.-55,№6.-С.24-28.
3. Скрипаль І.Г., Бабичев В.В., Безуглый С.В., Егоров О.В., Коробкова Е.С., Малиновская Л.П., Панченко Л.П., Токовенко И.П., Шаламай А.С., Алексеева И.В. Ингибиторное действие 6-азацитидина на молликуты и его предполагаемый механизм // Микробиол.журн.- 1993.- 55, №2.- С.99-104.
4. Коробкова Е.С., Панченко Л.П., Шаламай А.С., Скрипаль І.Г. Способность олигодезоксирибонуклеотидов, комплементарных 3'-концу 16S рРНК молликутов подавлять трансляцию на их рибосомах в системе *in vitro* // Микробиол.журн.- 1995.- 57, №3.- С.30-36.
5. Skripal' I.G., Babichev V.V., Panchenko L.P., Yegorov O.V., Korobkova K.S., Dubey I.Y., Fedoryak D.M., Shalamay A.S. Antisignature oligonucleotides and their analogs as inhibitors of mollicutes- cofactors of HIV // Микробиол.журн.- 1997.- 59, №2, С.3-9.
6. Коробкова Е.С. Исследование свойств рибосом фитопатогенных микоплазм / Матер. конф. молодых ученых "Актуальные проблемы физиологии растений и генетики", Киев.-1992.-С.83.

7. Skripal' I.G., Babitchev V.V., Bezugly S.V., Shalamai A.S., Korobkova E.S. 6-Azacytidin as inhibitor of Mycoplasma, including AIDS-associated one / Abstracts of the 2-nd International conference "AIDS, Cancer and Human Retroviruses", 1993.- St.Petersburg, P.37-38.
8. Коробкова Е.С. Ингибирование трансляции в системе in vitro на рибосомах молликутов синтетическим олигонуклеотидом / Матер.І установчого (VIII) з'їзду Українського мікробіологічного товариства, Одеса // Мікробіол журн.- 1994.- 56, №4.- С.64.
9. Korobkova E.S. A cell-free translating system based on the Mollicute ribosomes as a model for selection of inhibitors of AIDS-associated mycoplasmas / Abstracts of the 3-rd International conference "AIDS, Cancer and Human Retroviruses", 1995.- St.Petersburg, P.43.

Коробкова Е.С.

Бесклеточная система белкового синтеза как модель для изучения трансляции у молликутов и отбора специфических ингибиторов их жизнедеятельности

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.07.-микробиология. Институт микробиологии и вирусологии им.Д.К.Заболотного НАН Украины, Киев, 1997.

Защищается работа, содержащая результаты исследований по созданию бесклеточной системы трансляции на основе рибосом молликутов. Впервые показано, что рибосомы ахолеплазм активны в экстрактах эукариотических клеток, в которых деятельность 80S рибосом подавлена при помощи актидиона. Установле-

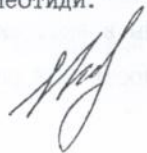
но, что антисмысловые олигонуклеотиды, комплементарные сиг-
натурным последовательностям 16S рРНК молликутов, специфи-
чески подавляют трансляцию in vitro и в живых клетках ахо-
леплазм. Показано, что гетерологичная белоксинтезирующая
система на основе рибосом ахолеплазм может служить моделью
для изучения влияния различных ингибирующих веществ на транс-
ляцию у молликутов.

Korobkova E.S.

***Cell-free translation system as a model to study of
Mollicute's translation and selection of their life
activity inhibitors***

The dissertation presents the results of researches to
creation of the cell-free translation system based on
Mollicutes ribosomes. First it was shown that Acholeplasma's
ribosomes was active in the translation system consisted of
eucaryotic cells extracts in which the 80S ribosomes were
supressed by actidion. Antisense oligonucleotides complement
to signature sequences of the Mollicutes 16S rRNA as
registered to specifically stamp out the translation both
in the in vitro system and leaving cells of Acholeplasma.
It was demonstated that heterologic cell-free system might
be used as a model to study of various supressing substances
effect on the translation of Mollicutes.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: молікути, рибосоми, безклітинна білоксинтезу-
юча система, антисенсові олігонуклеотиди.



Підписано до друку 13.02.97р. Формат 60x84/16.
Ум. друк. арк. 1,0. Обл.-вид. арк. 1,0.
Наклад 100. Зам. 75.

Відділ оперативної поліграфії
Центру Міжнародної освіти
227-12-75, 227-37-86

435207

AB 37.182
AB 37.182