

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ  
імені Д. К. ЗАБОЛОТНОГО

*На правах рукопису*

ЄГОРОВ Олег Володимирович

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ  
АНТИСИГНАТУРНИХ  
ОЛІГОНУКЛЕОТИДІВ І ЇХ АНАЛОГІВ  
НА ЖИТТЄДІЯЛЬНІСТЬ МОЛІКУТІВ**

03.00.07 - мікробіологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

**Київ - 1997**

№. 38.363

Дисертацією є рукопис

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

**Науковий керівник** — член-кор. НАН України,  
доктор біологічних наук, професор  
Скрипаль І. Г.

**Офіційні опоненти** — доктор біологічних наук  
Соколов І. Г.  
доктор біологічних наук  
Швед А. Д.

**Провідна організація** — Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України

Захист відбудеться 17 вересня 1997 року о 10<sup>00</sup> годині на засіданні Спеціалізованої Вченої Ради Д 01.81.01. при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України (252143, Київ-143, вул. Заболотного, 154, Інститут мікробіології і вірусології НАН України, зал засідань).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

Автореферат розісланий " \_\_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 1997 р.

**Вчений секретар**  
Спеціалізованої Вченої Ради  
кандидат біологічних наук

**Пуріш Л. М.**

ЛНБ України ім. В. Стефаника

00751200 (F)

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність проблеми.** Молікути — найменші вільно-живучі прокаріотичні організми, багато з яких є збудниками захворювань людини, тварин і рослин. У зв'язку із зростаючою резистентністю патогенних видів молікутів до дії антибіотиків все більш актуальним стає пошук принципово нових біологічно активних сполук, здатних ефективно пригнічувати їх життєдіяльність. Так як молікути мають самий малий розмір геному серед самореплікуючих організмів і всі набори генів, які необхідні для нормального функціонування клітини, представлені в них частіше всього в одній копії, то цим створюється можливість використання унікальних властивостей не тільки їх геному, але й рибонуклеїнових кислот при розробці нових засобів контролю життєдіяльності цих мікроорганізмів з чітко визначеною мішенню дії.

Враховуючи такі особливості молікутів, як відсутність клітинної стінки і механізму синтезу попередників нуклеїнових кислот, джерела яких є екзогенними, одним з перспективних напрямків у створенні засобів, спроможних вибірково пригнічувати життєдіяльність цих мікроорганізмів може бути застосування препаратів на основі антисенсових олігонуклеотидів. Перспективними, на наш погляд, мішенями для атаки в клітинах молікутів ген-направленими біологічно активними речовинами можуть бути унікальні, характерні тільки для окремих груп організмів нуклеотидні послідовності в складі їх 16S рРНК, так звані "сигнатурні" ділянки (Woese et al., 1980).

**Мета і завдання досліджень.** Основна мета даної роботи полягала в одержанні доказів можливості контролювання життєдіяльності молікутів при допомозі олігодезоксирибонуклеотидів і їх аналогів, які являються комплементарними до сигнатурних ділянок 16S рРНК даних

мікроорганізмів (в подальшому ми будемо їх називати антисигнатурними).

Для виконання роботи необхідно було вирішити такі задачі:

1. Провести порівняльне вивчення зв'язування і поглинання клітинами молікутів різноманітних антисигнатурних олігодезоксирибонуклеотидів і їх аналогів.
2. Забезпечити стабільність олігодезоксирибонуклеотидів в процесі їх взаємодії з клітинами молікутів;
3. Розробити методи детекції внутріклітинної інтерналізації олігонуклеотидів і їх похідних.
4. Вивчити дію антисигнатурних олігодезоксирибонуклеотидів і їх аналогів на життєдіяльність клітин молікутів.

**Наукова новизна роботи.** Вперше одержані експериментальні докази активного поглинання коротких (довжиною до 15 нуклеотидів) олігодезоксирибонуклеотидів і їх тіоаналогів клітинами молікутів.

Встановлено, що модифікації олігонуклеотидів по міжнуклеотидним фосфатам забезпечують повну резистентність до розщеплення нуклеазами молікутів.

Вперше здійснено ефективне пригнічення біосинтезу білка в клітинах молікутів тіофосфатними аналогами олігонуклеотидів, які комплементарні до сигнатурних ділянок 16S рРНК цих мікроорганізмів. Показана висока видова специфічність антисигнатурних олігонуклеотидів і їх тіоаналогів в пригніченні процесу трансляції у молікутів. Виявлено ефект адитивності дії при одночасному використанні двох олігонуклеотидів, комплементарних до прилеглих ділянок 16S рРНК.

Пропонується модель механізму пригнічення життєдіяльності молікутів антисигнатурними олігонуклеотидами.

**Практичне значення роботи.** Результати досліджень демонструють перспективність застосування антисенсової технології, яка базується на використанні антисигнатурних олігонуклеотидів в цілях направленої дії на нуклеїнові кислоти в живих клітинах молікутів та створюють підстави для розширення фронту та інтенсифікації робіт в цьому напрямку. Розробкою генонаправлених біологічно активних сполук на основі антисигнатурних олігонуклеотидів започатковується розвиток нового напрямку генної терапії для лікування захворювань, що викликаються різноманітними мікроорганізмами.

**Конкретна особиста участь автора в одержаних результатах.** Робота виконана особисто автором під керівництвом член-кор. НАНУ, д. б. н., професора І. Г. Скрипаля. Культивування клітин молікутів здійснювали сумісно з к. б. н. Л. П. Малиновською. Синтез алкілуючих похідних олігодезоксирибонуклеотидів проводився в Новосибірському інституті біоорганічної хімії СО РАН к. х. н. Є. М. Івановою. Синтез тіоаналогів олігонуклеотидів був здійснений в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України к. х. н. І. Я. Дубеєм, к. х. н. Д. М. Федоряком і в Новосибірському інституті біоорганічної хімії СО РАН к. х. н. Н. В. Амірхановим.

**Апробація роботи.** Матеріали дисертації доповідались та обговорювались на конференції-конкурсі експериментальних робіт молодих вчених Інституту мікробіології та вірусології НАН України (1990, 1991, 1992), щорічної наукової конференції-конкурсі робіт Інституту мікробіології та вірусології НАН України (1991, 1993, 1995, 1996), на ІХ Всесоюзному симпозиумі по цілеспрямованому пошуку лікарських речовин (Рига, 1991), на Всесоюзній школі-конференції "Фізіологія, біохімія і генетика мікроорганізмів — фундаментальна основа біотех-

нології" (Алушта, 1991), на II Міжнародній конференції "СНІД, рак та ретровіруси людини" (Санкт-Петербург, 1993), на I Установчому /VIII/ з'їзді Українського мікробіологічного товариства (Одеса, 1993), на I Національній науково-практичній конференції по проблемам ВІЛ/СНІДу з міжнародною участю (Київ, 1995), на III Міжнародній конференції "СНІД, рак та споріднені проблеми" (Санкт-Петербург, 1995).

**Публікації.** По темі дисертації опубліковано 15 наукових робіт.

**Структура та об'єм дисертації.** Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури (1 глава), експериментальної частини (2 глави), заключення, висновків і списку цитованої літератури, який включає 245 найменувань. Робота викладена на 207 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 55 рисунками і 11 таблицями.

## ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали і методи досліджень

Об'єктами досліджень були *Mycoplasma fermentans* PG-18, *M. pneumoniae* FH, *M. capricolum* California Kid, *M. hominis* PG-21, *Acholeplasma laidlawii* PG-8, отриманих з колекції Міжнародного центру культур мікоплазм (м. Орхус, Данія), а також *A. laidlawii* var. *granulatum* (штам 118) з колекції культур ІМВ НАНУ.

Молікути вирощували на середовищі СМ ІМВ-72 з 10% сироваткою (Скрипаль, Малиновська, 1984).

Олігодезоксирибонуклеотиди і їх аналоги, комплементарні до певних сигнатурних ділянок 16S рРНК молікутів були синтезовані згідно заданому нами дизайну молекул в Новосибірському інституті біоорганічної хімії СО РАН, Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії

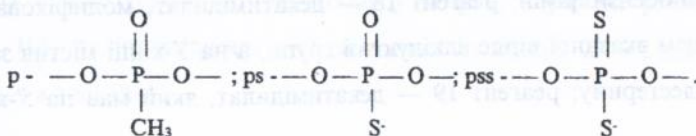
НАН України і Інституті фізіологічної хімії в Майнці (Німеччина)  
(табл. 1).

Таблиця 1.

Структура і нуклеотидний склад синтезованих олігодезоксирибо-  
нуклеотидів і їх аналогів

№ реа- гента	Нуклеотидний склад	Комплемен- тарність до ділянок 16S рРНК
1	5'-BnzNHp*AGGAGGTpSCH <sub>3</sub> -3'	1513-1519 всіх молекутів
2	5'-BnzNHp*ApGpGpApGpGpTpSCH <sub>3</sub> -3'	1513-1519 всіх молекутів
3	5'-BnzNHp*ApsGpsGpsApsGpsGpsTpSCH <sub>3</sub> -3'	1513-1519 всіх молекутів
4	5'-BnzNHp*CATTGTG(A) <sub>5</sub> TTpSCH <sub>3</sub> -3'	355-368 всіх мікоплазм
5	5'-BnzNHp*CpsApsTpsTpsGpsTpsGps(Aps) <sub>5</sub> TpsTp-SCH <sub>3</sub> -3'	355-368 всіх мікоплазм
6	5'-BnzNHp*CpssApssTpsTpsGpssTpsGpss(Apss) <sub>5</sub> TpsTpSCH <sub>3</sub> -3'	355-368 всіх мікоплазм
7	5'-BnzNHpCATTGTG(A) <sub>5</sub> TTpSCH <sub>3</sub> -3'	355-368 всіх мікоплазм
8	5'-CATTGTG(A) <sub>5</sub> TTpSCH <sub>3</sub> -3'	355-368 всіх мікоплазм
9	5'-CpsApsTpsTpsGpsTpsGps(Aps) <sub>5</sub> TpsTp-SCH <sub>3</sub> -3'	355-368 всіх мікоплазм
10	5'-CpssApssTpsTpsGpssTpsGpss(Apss) <sub>5</sub> TpsTpSCH <sub>3</sub> -3'	355-368 всіх мікоплазм
11	5'-BnzNHp*TCTAGCCATTACCTGCTAAApSCH <sub>3</sub> -3'	771-790 M. pneumoniae
12	5'-BnzNHpTCTAGCCATTACCTGCTAAApSCH <sub>3</sub> -3'	771-790 M. pneumoniae
13	5'-CpsApsTpsApsGpsTpsTpsApsG-3'	499-507 всіх молекутів
14	5'-CpsTpsApsTpsGpsTpsApsTpsTpsA-3'	523-532 всіх молекутів

Примітка: p\*— [<sup>32</sup>P]-фосфат; Bnz—CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>. В ряді експериментів використовували метилфосфонатний аналог тетрадекатимідилата 5'-BnzNHp\*Tp(Tp)<sub>12</sub>TpSCH<sub>3</sub>-3' — реагент 15 і тіоаналог 5'-CpsApsCpsTsCpsCpsTpsTpsTpsCpsTps-3', комплементарний рДНК, кодує чий 3'-кінцеву 1510-1522 ділянку 16S рРНК молекутів — реагент 16.



Висновок про алкілювання нуклеїнових кислот і білків в клітинах молюсків робили на підставі ковалентного зв'язування з ними [ $^{32}\text{P}$ ]-мітки декатимідилатів, модифікованих по 5'-кінцю [4-(N-2-хлоретил)-N-метиламінобензил]аміном. Клітинні лізати аналізували в ступінчастому 5%/20%-ному поліакриламідному гелі (ПААГі) з 7 М сечовиною. Ідентифікацію продуктів алкілювання проводили шляхом фарбування гелей фарбою "stains-all" ("Serva").

Цитотоксичну дію антисигнатурних олігонуклеотидів і їх тіоаналогів визначали по їх впливу на процеси трансляції і транскрипції в клітинах певних видів молюсків.

## Результати і їх обговорення

### 1. Дослідження процесів сорбції і поглинання олігодезоксирибонуклеотидів і їх аналогів клітинами молюсків

Основна мета даного дослідження заключалась в оцінці ефективності і селективності пригнічення життєдіяльності молюсків олігодезоксирибонуклеотидами і їх аналогами, комплементарними до сигнатурних ділянок 16S рРНК цих мікроорганізмів. Однак, відсутність будь-яких даних про проникнення в клітини мікоплазм природних і синтетичних олігонуклеотидів поставило нас перед необхідністю проведення попередніх експериментів по вирішенню питань зв'язування і поглинання досліджуваних сполук клітинами молюсків.

Для розв'язування цих завдань використовували  $^{32}\text{P}$ -мічені олігонуклеотиди (рис. 1), умовно позначені як: реагент 17 — декатимідилат, який містив на 5'-кінці алкілюючу групу [4-(N-2-хлоретил)-N-метиламінобензил]амін; реагент 18 — декатимідилат, модифікований за 5'-кінцем вказаної вище алкілюючої групи, а на 3'-кінці містив залишок холестерину; реагент 19 — декатимідилат, який мав на 5'-кінці

вищевказану алкілюючу групу, а на 3'-кінці — поліароматичний залишок N-(2-оксиетил)феназину.

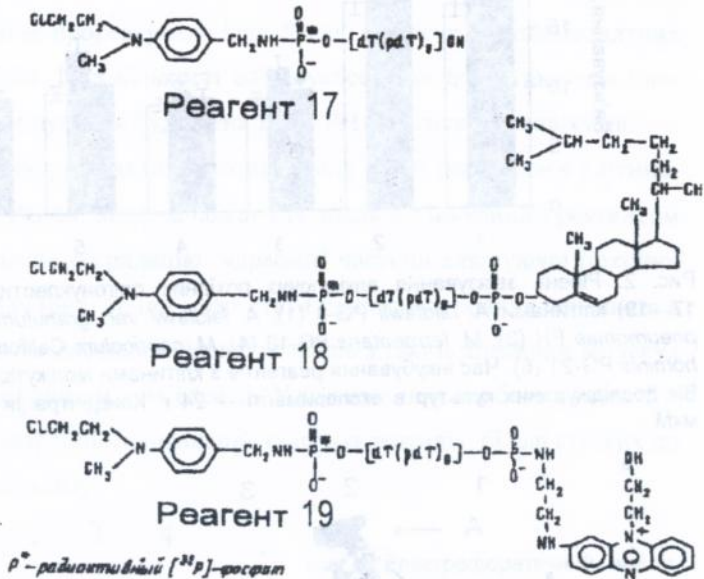


Рис. 1. Алкілючі похідні олігодезоксирибонуклеотидів

В результаті проведених досліджень нами був встановлений не тільки високий рівень сорбції алкілюючих похідних декатимідилатів клітинами молікутів (рис. 2), але й факт проникнення цих сполук в досліджувані клітини, про що свідчило алкілювання РНК і ДНК (рис. 3). Виявлено, що після 2 г інкубації клітин *A. laidlawii* PG-8 з реагентом 19 при його 1 мкМ концентрації в середовищі культивування біля 14% радіоактивності від всього захопленого клітинами радіоактивного матеріалу локалізується на гелі поблизу старту, в районі розміщення ДНК, 10% радіоактивності — в зоні шлейфу білків, 27% радіоактивності — в зоні РНК.

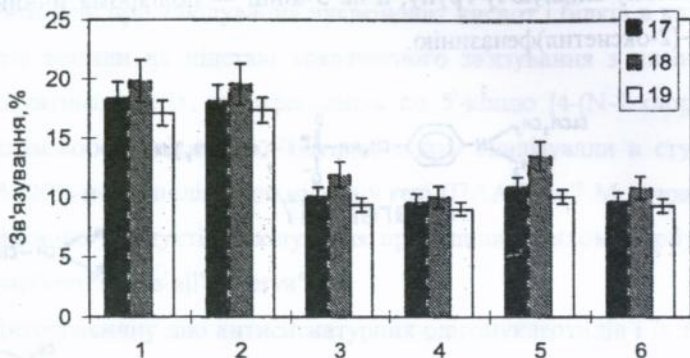


Рис. 2. Рівень зв'язування алкілюючих похідних олігонуклеотидів (реагенти 17—19) клітинами *A. laidlawii* PG-8 (1), *A. laidlawii* var. *granulum* 118 (2), *M. pneumoniae* FH (3), *M. fermentans* PG-18 (4), *M. capricolum* California Kid (5), *M. hominis* PG-21 (6). Час інкубування реагентів з клітинами молікутів 2 г при 37°C. Вік досліджуваних культур в експерименті — 24 г. Концентрація реагентів 0,1 мкМ

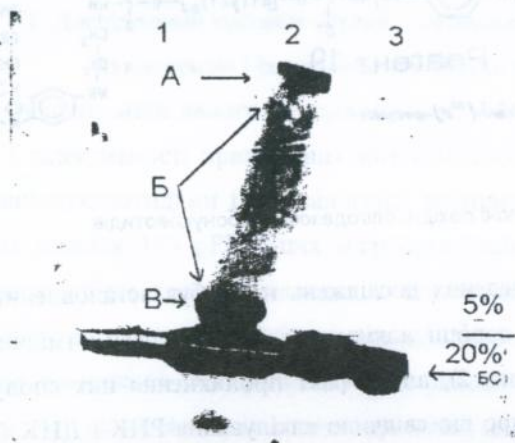


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз міченого [ $^{32}\text{P}$ ] матеріалу, одержаного при взаємодії реагенту 19 з клітинами *A. laidlawii* PG-8 в 5%/20%-ному ПААГі. 1 — вихідний мічений реагент 19; 2 — мічений матеріал, зв'язаний з клітинами після 2 г інкубації з реагентом 19; 3 — той же матеріал, після обробки 5%-ною хлорною кислотою. А — зона фарбування ДНК; Б — зона фарбування білків; В — зона фарбування РНК; БС — бромфеноловий синій

Розрахунки, проведені на основі одержаних результатів свідчать, що при 1 мкМ концентрації реагентів 17—19 в середовищі культивування за 2 г інкубації з цільовими нуклеїновими кислотами в клітинах молікутів встигає прореагувати біля 200000 молекул реакційноздатних олігонуклеотидів. Цієї кількості олігонуклеотидів достатньо для блокування функціонування будь-яких типів РНК в клітинах молікутів.

При аналізі радіоактивного матеріалу, який поглинався клітинами *A. laidlawii* PG-8 і *M. pneumoniae* FH після 2 г інкубації з реагентом 17 ми спостерігали деградацію "адресної" частини алкілюючої похідної олігонуклеотиду (рис. 4), що може стати однією з головних перешкод в застосуванні антисенсових олігонуклеотидів з таким дизайном молекул в якості антимікоплазмових агентів. У зв'язку з цим особлива увага була приділена розробці модифікацій олігонуклеотидів, більш стійких до нуклеазного гідролізу.

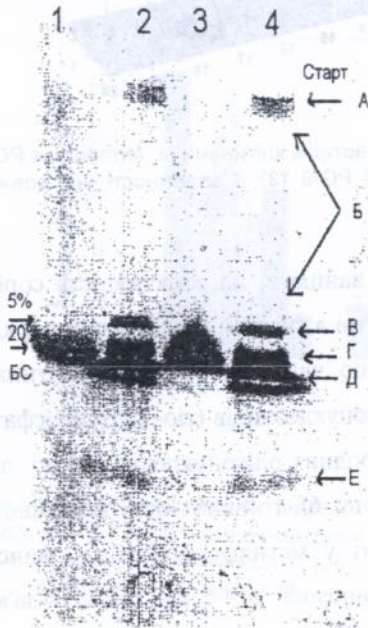


Рис.4. Електрофоретичний аналіз міченого [ $^{32}\text{P}$ ] матеріалу, одержаного при взаємодії реагенту 17 з клітинами молікутів в ступінчастому 5%/20%-ному ПААГзі. 1 — вихідний мічений реагент 17; 2 — мічений матеріал, зв'язаний з клітинами *A. laidlawii* PG-8 після 2 г інкубації з реагентом 17; 3 — мічений матеріал в середовищі культивування після інкубування реагента 17 з клітинами *A. laidlawii* PG-8; 4 — мічений матеріал, зв'язаний з клітинами *M. pneumoniae* FH після 2 г експозиції з реагентом 17. А — зона фарбування ДНК; Б — зона фарбування білків; В — зона фарбування РНК; Г — вихідний реакційноздатний декатимідилат; Д — зона скорочених олігонуклеотидів; Е — неорганічний фосфат; ВС — бромфеноловий синій

Нами було встановлено, що олігонуклеотиди, які мають в складі 7-14 основ, зв'язувались з однаковою ефективністю з клітинами молекулів незалежно від термінальних модифікацій. При подальшому збільшенні нуклеотидного ланцюга спостерігали помітне зниження рівня сорбції (рис. 5).

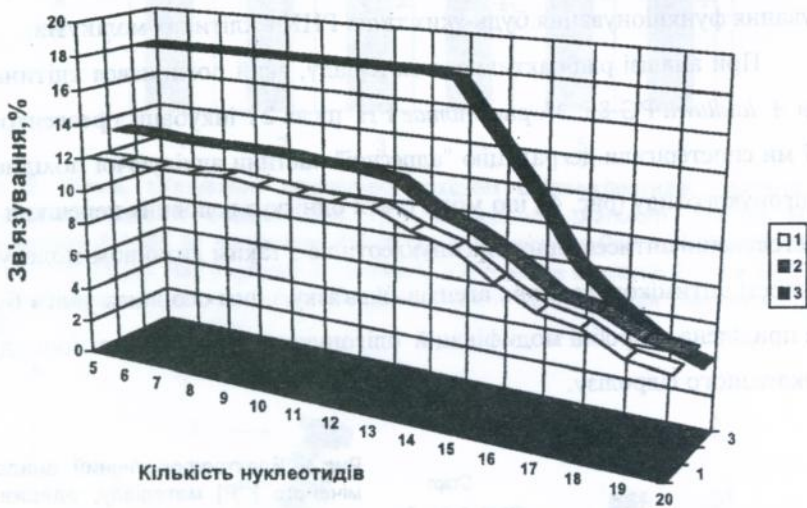


Рис. 5. Зв'язування олігодезоксирибонуклеотидів клітинами *M. fermentans* PG-18 (1), *M. pneumoniae* FH (2), *A. laidlawii* PG-8 (3) в залежності від довжини нуклеотидного ланцюга

Крім довжини нуклеотидного ланцюга, на ефективність сорбції олігонуклеотидів з клітинами молекулів в значній мірі впливає заряд їх цукро-фосфатного скелету. Так, якщо частка сорбованих клітинами молекулів поліаніонних аналогів олігонуклеотидів (тіо- і дітіофосфатів) мало відрізняється від кількості природних олігонуклеотидів, які зв'язувались з тестованими клітинами (рис. 6), то відсутність негативного заряду в рибозо-фосфатному скелеті у метилфосфатних аналогів олігонуклеотидів призводить до зменшення в 4-5 раз рівня їх зв'язування клітинами цих мікроорганізмів. Знайдене явище може пояснюва-

тися наявністю різних механізмів поглинання молікутами неіонних (метилфосфонатних) аналогів і олігонуклеотидів, які мають негативний заряд в вуглецево-фосфатному скелеті (природних олігонуклеотидів і їх тіоаналогів). Частково таке припущення підтверджують також дані про неадекватність дії азиду натрія на процеси зв'язування і поглинання клітинами молікутів метилфосфонатних і тіофосфатних аналогів олігонуклеотидів (рис. 7. А, Б). На підставі цих результатів ми робимо висновок, що поглинання природних олігодезоксирибонуклеотидів і їх тіоаналогів клітинами мікоплазм здійснюється за рахунок активного енергозалежного транспорту, який пригнічується при додаванні в інкубаційну суміш азиду натрія. Проникнення метилфосфонатних аналогів олігонуклеотидів в клітини молікутів може бути лише результатом процесу полегшеної дифузії.

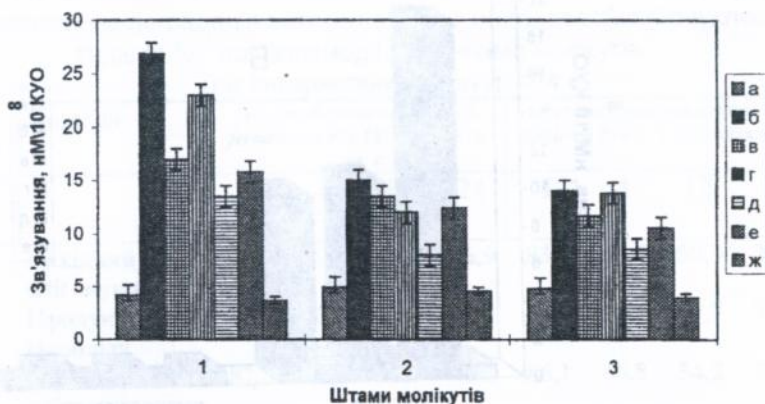


Рис. 6. Сорбція клітинами *A. laidlawii* PG-8 (1), *M. pneumoniae* FH (2), *M. fermentans* PG-18 (3) антисигнатурних олігодезоксирибонуклеотидів і їх аналогів. а — реагент 2, б — реагент 3, в — реагент 1, г — реагент 5, д — реагент 6, е — реагент 4, ж — реагент 15

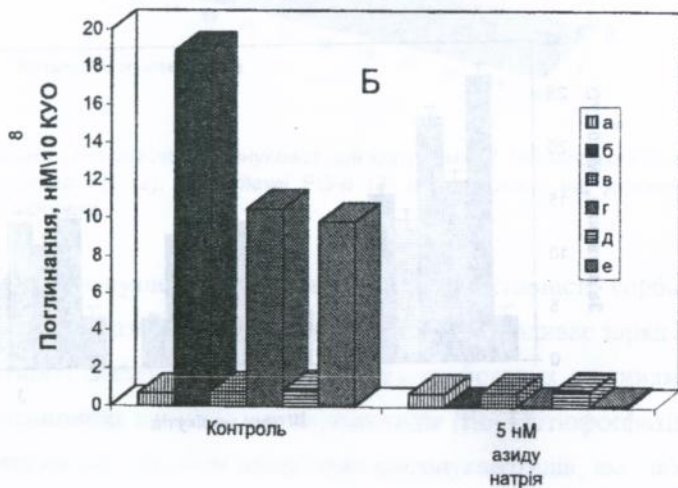
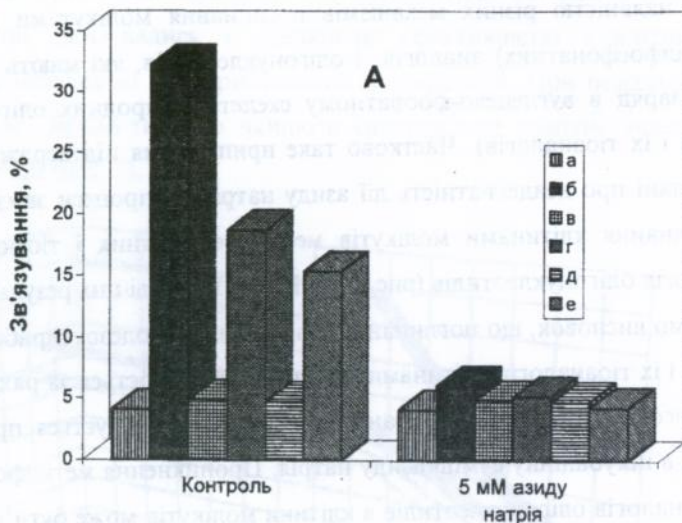


Рис. 7. Вплив азиду натрія на зв'язування (А) і поглинання (Б) метилфосфонатних і тіофосфонатних аналогів олігонуклеотидів (реагенти 2 і 3) клітинами *A. laidlawii* PG-8 (а, б), *M. pneumoniae* FH (в, г) і *M. fermentans* PG-18 (д, е)

## 2. Стійкість олігонуклеотидів з термінальними модифікаціями і їх тіоаналогів до нуклеазного гідролізу при взаємодії цих сполук з клітинами молюсків

В дослідженнях стабільності антисигнатурних олігонуклеотидів і їх аналогів в процесі взаємодії цих сполук з клітинами мікоплазм і ахлеплазм використовували тіж реагенти, які застосовувались при вивченні зв'язування і поглинання клітинами даних мікроорганізмів (табл.1).

В результаті проведених досліджень встановлено, що при термінальній модифікації олігонуклеотидів після тривалої інкубації з клітинами молюсків спостерігається їх деградація (табл. 2), в той час як тіоаналоги олігонуклеотидів проявили практично повну резистентність до дії нуклеаз на протязі 3 діб їх експозиції з клітинами молюсків (рис.8).

Таблиця 2.  
Внутріклітинна деградація антисигнатурних олігодезоксирибонуклеотидів (в %) при взаємодії з клітинами молюсків  
(вік використаних культур - 24 г)

Реагенти	Фракція	Час інкубування клітин <i>M. fermentans</i> PG-18 з реагентами, г				Час інкубування клітин <i>A. laidlawii</i> PG-8 з реагентами, г			
		1	4	12	24	1	4	12	24
1	Вихідний олігонуклеотид	85,4	69,7	56,8	36,9	83,2	63,4	50,3	20,3
	Продукти гідролізу	14,6	30,3	43,2	63,1	16,8	36,6	49,7	79,7
4	Вихідний олігонуклеотид	87,6	71,4	58,7	40,2	86,1	66,8	54,2	27,5
	Продукти гідролізу	12,4	28,6	41,3	59,8	13,9	33,2	45,8	72,5

Враховуючи активне поглинання клітинами молюсків тіофосфатних аналогів олігонуклеотидів і їх високу стійкість до дії нуклеаз, ми в подальших дослідженнях використовували тільки ці сполуки.

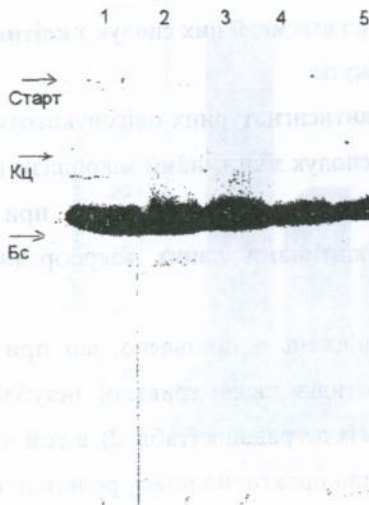


Рис. 8. Радиоавтограф електрофоретичного розподілу в 20%-ному ПААГ з 7 М сечовиною тіофосфатного аналога олігонуклеотида (реагент 5), який виявлено після 24 г інкубації з клітинами *A. laidlawii* PG-8 (2) і *M. fermentans* PG-18 (3) і дітіофосфатного аналога олігонуклеотида (реагент 6), зв'язаного після 24 г експозиції з клітинами *A. laidlawii* PG-8 (4) і *M. fermentans* PG-18 (5). 1 — вихідний мічений реагент 5 (контроль); Кц — ксиллоціанол; Бс — бромфеноловий синій

### 3. Вплив антисигнатурних олігодезоксирибонуклеотидів і їх тіоаналогів на процес трансляції в клітинах молюсків

Мішенями для вивчення механізму дії олігодезоксирибонуклеотидів і їх тіоаналогів було вибрано сигнатурні послідовності в молекулі 16S рРНК молюсків. Аналіз розташування сигнатурних ділянок на молекулі 16S рРНК, властивих тільки для молюсків, показав, що вони задіяні у формуванні спіральних структур типу "шпильок", які є місцем впізнавання і взаємодії цієї нуклеїнової кислоти з рибосомальними білками. На підставі цього нами було зроблено припущення, що при дії олігонуклеотидів, комплементарних сигнатурним ділянкам 16S рРНК можна викликати різноманітні порушення в функціонуванні цієї молекули.

Перевірка впливу антисигнатурних олігонуклеотидів і їх тіоаналогів, які приведені в таблиці 1, на інтенсивність синтезу білка в клітинах молюсків показала, що найбільш ефективне інгібування процесу

трансляції (до 70%) в усіх тестованих штаммах молікутів спостерігалось при дії 9- і 10-ланковими тіофосфатними аналогами олігонуклеотидів, комплементарних ділянкам 499-507 і 523-532 16S рРНК цих мікроорганізмів (рис. 9). Можливо, дана обставина обумовлена функціональною важливістю даних послідовностей: "шпилька", яка формується в цьому районі 16S рРНК служить місцем впізнавання і взаємодії з рибосомальним білком S4, який називають ще "серцевинним", так як він перший з усіх рибосомальних білків зв'язується з молекулою 16S рРНК і практично визначає увесь процес самоскладання 30S субодиниці. Дослідження антитрансляційної активності реагентів 7-10 показало високу селективність дії цих антисигнатурних олігонуклеотидів і їх тіоаналогів. Всі вони пригнічували білковий синтез тільки в клітинах мікоплазм, не впливаючи на цей процес в клітинах ахолоплазм (рис. 9). Ще більш високу специфічність проявляв реагент 12, який пригнічував процес трансляції виключно в клітинах *M. pneumoniae* FH (рис. 9).

Виявлена різна ступінь чутливості клітин мікоплазм і ахолоплазм до дії антисигнатурних тіоаналогів олігонуклеотидів в залежності від їх концентрації в середовищі. Так, при інкубації клітин *A. laidlawii* PG-8 на протязі 4 г з реагентами 13 і 14 помітне пригнічення процесу біосинтезу білків спостерігалось при 500 нМ концентрації тіоаналогів в культуральному середовищі, тоді як для клітин *M. fermentans* PG-18 інгібуючий ефект відмічається вже при 250 нМ концентрації цих реагентів (рис. 10).

Дослідження пригнічення білкового синтезу реагентами 13 і 14 в клітинах *A. laidlawii* PG-8 в залежності від їх віку показало, що ефективність інгібування трансляції тіоаналогами олігонуклеотидів залежить від фізіологічної активності клітин і вмісту в живильному середовищі екзогенних джерел нуклеїнових кислот (НК), які здатні конкуру-

вати з використаними тіоаналогами в процесах їх сорбції і поглинання цими клітинами (рис. 11).

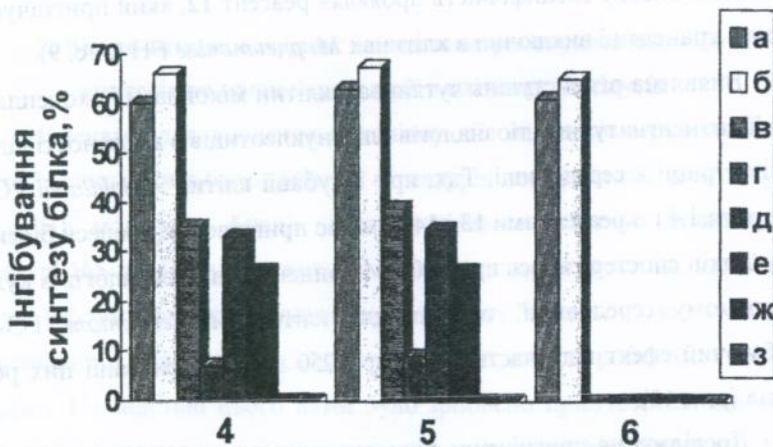
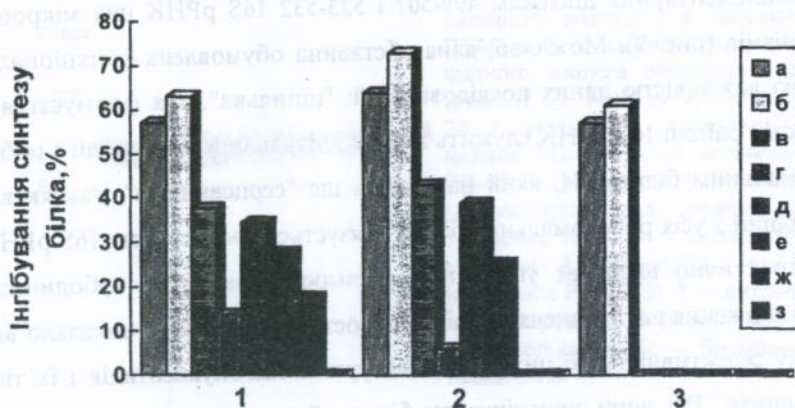


Рис. 9. Вплив олігодезоксирибонуклеотидів і їх тіоаналогів, комплементарних різноміснним сигнатурним ділянкам 16S рРНК молекулів на синтез білка в клітинах цих мікроорганізмів. 1 — *M. pneumoniae* FH; 2 — *M. fermentans* PG-18; 3 — *A. laidlawii* PG-8; 4 — *M. capricolum* California Kid; 5 — *M. hominis* PG-21; 6 — *A. laidlawii* var. *granulum* 118. а — реагент 13; б — реагент 14; в — реагент 7; г — реагент 8; д — реагент 9; е — реагент 10; ж — реагент 12; з — реагент 16

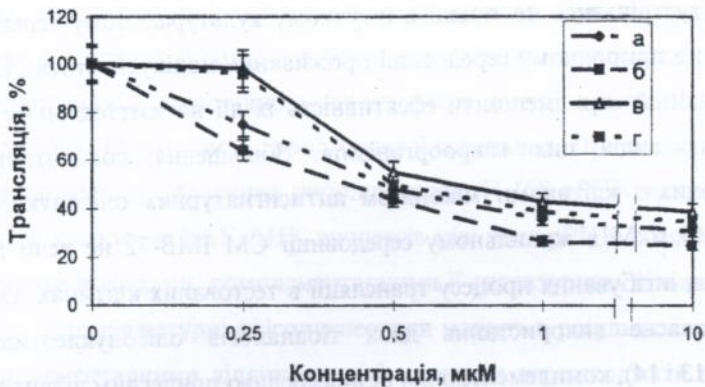


Рис. 10. Інгибування процесу трансляції в клітинах молюсків в залежності від концентрації тиофосфатних аналогів олігодезоксирибонуклеотидів, які внесені в культуральне середовище: а — клітини *M. fermentans* PG-18 з реагентом 13; б — клітини *M. fermentans* PG-18 з реагентом 14; в — клітини *A. laidlawii* PG-8 з реагентом 13; г — клітини *A. laidlawii* PG-8 з реагентом 14



Рис. 11. Інгибування синтезу білка в клітинах *A. laidlawii* PG-8 тіоаналогами олігонуклеотидів в залежності від віку культури. а — реагентом 13; б — реагентом 14; в — вміст екзогенних джерел нуклеїнових кислот

Високий вміст екзогенних джерел НК та їх попередників, можливо, може зустрічатись не тільки в штучному культуральному середовищі, але і в природному середовищі проживання молікутів *in vivo*, що може в значній мірі зменшити ефективність їх дії на життєдіяльність патогенних видів цих мікроорганізмів. Збільшення концентрації взаємодіючих з клітинами мікоплазм антисигнатурних олігонуклеотидів до 10 мкМ в живильному середовищі СМ ІМВ-72 не вело до підвищення інгібування процесу трансляції в тестованих клітинах. Однак, одночасне використання двох тіоаналогів олігонуклеотидів (реагенти 13 і 14), комплементарних безпосередньо прилеглим ділянкам (499-507 і 523-532) в послідовності 16S рРНК практично повністю інгібує синтез білка в клітинах молікутів (рис. 12).

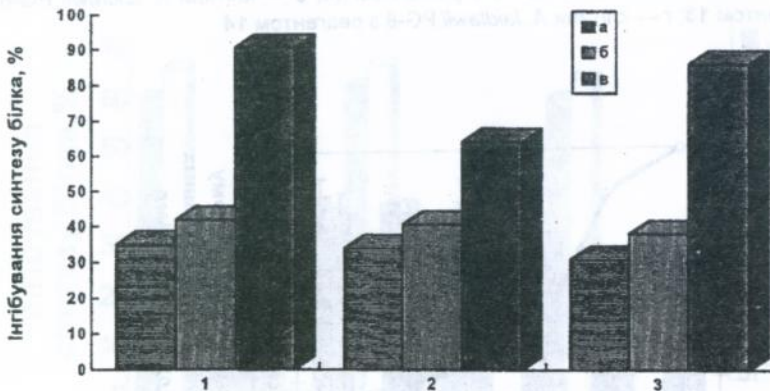


Рис. 12. Підвищення ефективності інгібування трансляції в клітинах *M. pneumoniae* FH (1), *M. fermentans* PG-18 (2), *A. laidlawii* PG-8 (3) при одночасному використанні реагентів 13 і 14 (в). а — інгібування білкового синтезу при внесенні в культуральне середовище реагента 13; б — при доданні реагента 14. Вік культур молікутів — 24 г

На основі одержаних результатів нами запропонована модель можливих механізмів дії олігонуклеотидів і їх тіоаналогів, комплемен-

тарних сигнатурним ділянкам 16S рРНК (рис. 13). Відповідно цієї моделі антисигнатурні олігонуклеотиди можуть пригнічувати синтез білка в клітинах молюсків в результаті уотсон-кріківського комплексоутворення з відповідною сигнатурною послідовністю 16S рРНК, блокуючи, таким чином, просторове її складання. При цьому можливе гідролітичне розщеплення рибонуклеазою Н 16S рРНК молюсків внаслідок утворення РНК/ДНК дуплексів між цією рРНК і олігодезоксирибонуклеотидами, комплементарними її сигнатурним ділянкам. Крім того, антисигнатурні олігонуклеотиди можуть в результаті взаємодії з комплементарними ділянками цієї молекули перешкоджати зв'язуванню з нею рибосомальних білків і, відповідно, блокувати самоскладання 30S субодиниці рибосом молюсків.

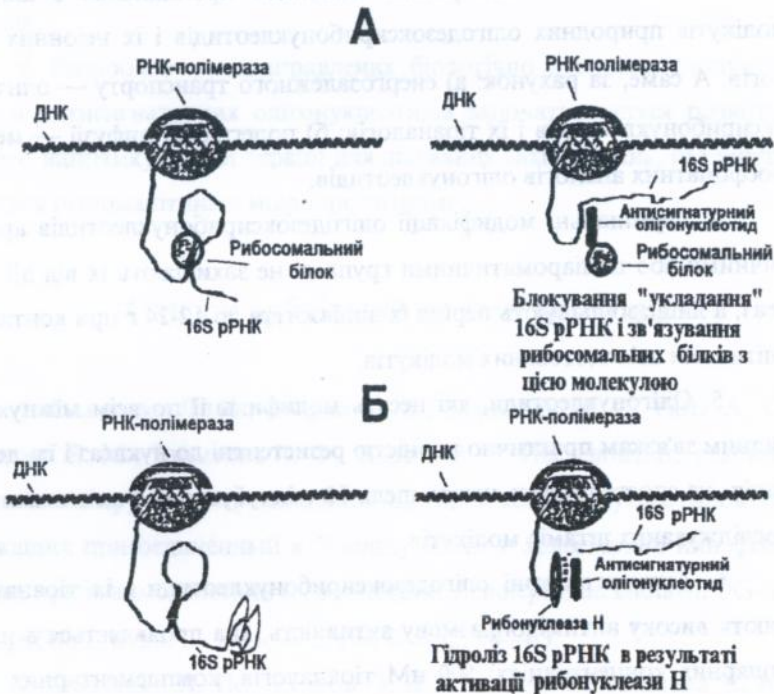


Рис. 13. Запропонований механізм дії олігодезоксирибонуклеотидів, комплементарних сигнатурним ділянкам 16S рРНК молюсків

## ВИСНОВКИ

1. Вперше встановлено, що синтетичні олігодезоксирибонуклеотиди і їх тіоаналоги з довжиною нуклеотидного ланцюга до 15 основ ефективно сорбуються клітинами молікутів незалежно від відмінностей в модифікації їх 5',3'-кінців. Кінетика і рівень цього процесу залежать від температури, віку культур та кількості екзогенних нуклеїнових кислот в поживному середовищі.

2. Олігонуклеотиди здатні проникати з культурального середовища в клітини молікутів, де їх накопичення може перевищувати позаклітинну концентрацію в  $10^4$ — $10^5$  разів і біля 60% з них взаємодіє з цільовими нуклеїновими кислотами.

3. Встановлено два різних механізми проникнення в клітини молікутів природних олігодезоксирибонуклеотидів і їх неіонних аналогів. А саме, за рахунок: а) енергозалежного транспорту — олігодезоксирибонуклеотидів і їх тіоаналогів; б) полегшеної дифузії — метилфосфонатних аналогів олігонуклеотидів.

4. Термінальні модифікації олігодезоксирибонуклеотидів ароматичними або поліароматичними групами не захищають їх від дії нуклеаз, а лише збільшують період їх напівжиття до 12-24 г при контакті з клітинами всіх тестованих молікутів.

5. Олігонуклеотиди, які несуть модифікації по всім міжнуклеотидним зв'язкам практично повністю резистентні до нуклеаз і їх деградація не спостерігалась навіть після 72 г інкубування з клітинами всіх досліджуваних штамів молікутів.

6. Антисигнатурні олігодезоксирибонуклеотиди і їх тіоаналоги мають високу антимікоплазмову активність, яка проявляється в наномолярних концентраціях: 500 нМ тіоаналогів, комплементарних 499-507 або 523-532 ділянкам 16S рРНК молікутів знижували біосинтез білка в їх клітинах на 60-70%, а повне блокування синтезу білка було

досягнуто одночасним використанням двох таких олігонуклеотидів, комплементарних безпосередньо прилеглим ділянкам 16S рРНК.

7. Антисигнатурні олігонуклеотиди проявляють виключно високу селективність дії і, в залежності від нуклеотидного складу їх молекул, пригнічують процес трансляції в клітинах представників лише одного роду або виду молюсків.

8. На основі отриманих даних розроблено модель пригнічення трансляції в клітинах молюсків антисигнатурними олігонуклеотидами, яка передбачає два механізми їх дії: а) блокування місця посадки "серцевинних" рибосомальних білків на 16S рРНК і виключення процесу самозбирання 30S субодиниці рибосоми і б) руйнування 16S рРНК рибонуклеазою Н внаслідок утворення на цій молекулі РНК/ДНК дуплексів.

9. Розробкою генонаправлених біологічно активних сполук на основі антисигнатурних олігонуклеотидів започатковується розвиток нового напрямку генної терапії для лікування захворювань, що викликаються різноманітними мікроорганізмами.

## Список публікацій по темі дисертації

1. Панченко Л. П., Егоров О. В., Скрипаль И. Г., Райт А. С., Иванова Е. М., Зарытова В. Ф., Власов В. В. Исследование стабильности алкилирующих производных олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих присоединенный к 3'-концу остаток холестерина или феназиния, при взаимодействии их с клетками *Acholeplasma laidlawii* PG-8 // Микробиол. журн. — 1991. — 53, № 4. — С. 58—63.

2. Панченко Л. П., Егоров О. В., Райт А. С., Иванова Е. М., Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф., Власов В. В., Скрипаль И. Г. Взаимодействие алкилирующих производных олигодезоксирибонуклеоти-

дов и их метилфосфонатных аналогов с клетками микоплазм // Микробиол. журн. — 1991. — 53, № 4. — С. 63—68.

3. Егоров О. В., Панченко Л. П., Скрипаль И. Г., Малиновская Л. П., Райт А. С., Иванова Е. М., Власов В. В. Эффективность связывания реакционноспособных олигодезоксирибонуклеотидов клетками различных представителей класса Mollicutes обусловлена возрастом культур // Микробиол. журн. — 1992. — 54, № 2. — С. 65—70.

4. Егоров О. В., Панченко Л. П., Скрипаль И. Г. Исследование сорбции антисмысловых олигодезоксирибонуклеотидов клетками микоплазм // Микробиол. журн. — 1996. — 58, № 3. — С. 30—37.

5. Егоров О. В., Скрипаль И. Г., Дубей И. Я., Федоряк О. Д., Федоряк Д. М. Ингибирование тиофосфатными аналогами олигодезоксирибонуклеотидов трансляции *in vivo* у молликутов // Микробиол. журн. — 1996. — 58, № 4. — С. 11—19.

6. Егоров О. В., Панченко Л. П., Скрипаль И. Г., Амирханов Н. В. Связывание и поглощение клетками молликутов антисигнатурных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов // Микробиол. журн. — 1996. — 58, № 6. — С. 18—29.

7. Егоров О. В. Модификация межнуклеотидных связей антисигнатурных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов как способ повышения их устойчивости к нуклеазному расщеплению в клетках молликутов // Микробиол. журн. — 1997. — 59, № 1. — С. 31—36.

8. 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—11.

9. Егоров О. В., Панченко Л. П., Скрипаль И. Г., Амирханов Н. В. Усвоение клетками молликутов антисмысловых аналогов олигодез-

оксирибонуклеотидов // Биополимеры и клетка. — 1997. — 13, № 2. — С. 1—8.

10. Панченко Л. П., Егоров О. В., Райт А. С., Скрипаль И. Г., Власов В. В. Исследование алкилирующих производных олигонуклеотидов как средств подавления жизнедеятельности микоплазм // IX Всесоюзный симпозиум по целенаправленному изысканию лекарственных веществ (Рига, январь 1991 г.): Тез. докл. — Рига, 1991. — С. 6.

11. Егоров О. В., Панченко Л. П., Райт А. С., Скрипаль И. Г., Власов В. В. Взаимодействие алкилирующих производных олигонуклеотидов с клетками микоплазм // IX Всесоюзный симпозиум по целенаправленному изысканию лекарственных веществ (Рига, январь 1991 г.): Тез. докл. — Рига, 1991. — С. 92.

12. Panchenko, L., Egorov, O. Effect of antisense oligonucleotides on vital activity of mycoplasmas associated with AIDS // 2-nd International conference "AIDS, Cancer and Human Retroviruses" (St.-Petersburg, November 1993): Abstracts. — St.-Petersburg, 1993. — P. 38.

13. Панченко Л. П., Егоров О. В. Влияние антисмысловых олигонуклеотидов на жизнедеятельность микоплазм // Матеріали I установчого (VIII) з'їзду українського мікробіологічного товариства (Одеса, вересень 1993): Микробиол. журн. — 1994. — 56, № 4. — С. 76.

14. Панченко Л. П., Егоров О. В., Скрипаль И. Г. Пошук інгібіторів життєдіяльності мікоплазм, причетних до захворювань на СНІД// I Національна науково-практична конференція з проблем ВІЛ/СНІДу з міжнародною участю (Київ, січень 1995): Збірник тез. — Київ, 1995. — С. 64.

15. Panchenko, L., Babichev, V., Egorov, O., Skripal, I. Influence of antisense oligodeoxyribonucleotides on transcription process at AIDS-associate mycoplasmas. 3-nd International conference "AIDS, Cancer and

related diseases" (St-Petersburg, May 1995): Abstracts. — St.-Petersburg, 1995. — P. 86.

## АННОТАЦИЯ

Егоров О. В. Исследование влияния антисигнатурных олигонуклеотидов и их аналогов на жизнедеятельность молликутов.

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 исследования процессов связывания и поглощения клетками молликутов олигодезоксирибонуклеотидов и их тио-, дитиофосфатных и метилфосфонатных аналогов, комплементарных сигнатурным последовательностям 16S рРНК. Установлен факт значительного накопления клетками молликутов антисигнатурных олигонуклеотидов и их тиоаналогов. Внутриклеточная концентрация этих соединений у всех изученных микроорганизмов превышала их внеклеточную в  $10^4$ — $10^5$  раз. Изучено влияние модификаций по 5'-, 3'-концам и межнуклеотидным связям антисигнатурных олигонуклеотидов на их устойчивость к нуклеазному расщеплению в клетках молликутов. Обнаружено значительное повышение стабильности в исследованных клетках тио- и дитиофосфатных аналогов олигонуклеотидов. Показано, что при концентрации 0,5—1 мкМ тиоаналогов олигонуклеотидов, комплементарных участкам 16S рРНК, ответственных за связывание с рибосомальным белком S4, снижается синтез белков в клетках молликутов до 90%. Предложена модель механизмов блокирования антисигнатурными олигонуклеотидами процесса трансляции в клетках молликутов.

## SUMMARY

### Yegorov O.V. Research of effect of antisignature oligonucleotides and their analogues on vital activity of mollicutes.

The Thesis presented for a Philosophy Doctor degree in a speciality 03.00.07 — microbiology. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Kiev, 1997.

Subject for defending is the thesis to present results of investigation of processes of absorption and uptake of oligodeoxynucleotides and their phosphorothio-, phosphorodithioate and methylphosphonate analogues, which are complementary to signature 16S rRNA sequences by cells of mollicutes. The fact of significant accumulation of antisignature oligonucleotides and their thioanalogues by cells of mollicutes have been established. The intracellular concentration of these compounds in all investigated microorganisms exceeded extracellular one  $10^4$ — $10^5$  time. Modification in 5',3'-ends and internucleotide bonds of antisignature oligonucleotides have been studied for their resistance to nuclease cleavage in cells of mollicutes. Considerable increase of stability in investigated cells of phosphorothio- and phosphorodithioate analogues of oligonucleotides has been detected. It is shown, that concentration of antisignature phosphorothioate analogues of oligonucleotides, complementary to the sites of 16S rRNA responsible for binding with ribosomal protein S4 being 0,5—1  $\mu$ M synthesis of proteins in cells of mollicutes decreases to 90 %. A model of mechanisms of blocking of the process of translation in cells of mollicutes by antisignature oligonucleotides has been offered.

**Ключові слова:** молекути, антисигнатурні олігонуклеотиди, зв'язування, поглинання, інгібування життєдіяльності.

1123856

АВ 38.363

---

Підписано до друку 03.07.97р. Формат 60x84/16.  
Ум. друк. арк.1,0. Обл.-вид. арк. 1,0.  
Наклад 100. Зам. 228.

---

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