

Усвоение клетками молликутов антисмысловых аналогов олигодезоксирибонуклеотидов

О. В. Егоров, Л. П. Панченко, И. Г. Скрипаль, Н. В. Амирханов¹

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 154

¹ НПП «Биосан»
630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8

*Исследованы процессы связывания и поглощения клетками *Acholeplasma laidlawii* PG-8, *Mycoplasma fermentans* PG-18 и *M. pneumoniae* FH тиофосфатных, дитиофосфатных и метилфосфонатных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов, комплементарных «сигнатурным» последовательностям 16S рРНК. Обнаружены различия в эффективности связывания данными клетками тиофосфатных и метилфосфонатных аналогов олигонуклеотидов. Так, уровень сорбции тиофосфатов клетками *A. laidlawii* PG-8 превышал долю связавшихся с этими клетками метилфосфонатов более чем в 5 раз. Установлен факт значительного накопления клетками молликутов тио- и дитиофосфатных аналогов олигонуклеотидов. Внутриклеточная концентрация этих соединений у всех изученных микроорганизмов превышала внеклеточную в 10^4 – 10^5 раз. На основе полученных экспериментальных данных сделано предположение о существовании в клетках молликутов двух различных механизмов поглощения аналогов олигонуклеотидов, несущих отрицательный заряд в рибозофосфатном остове, нейонных аналогов.*

Введение. При создании эффективных средств ингибирования функций нуклеиновых кислот в интактных клетках в настоящее время все большее внимание уделяется использованию не природных антисмысловых олигонуклеотидов, а их разнообразных аналогов. Основная задача сводится к тому, чтобы синтезировать олигонуклеотидные аналоги, которые обладали бы: 1) повышенным сродством к нуклеиновым кислотам с сохранением высокой специфичности при их связывании с участком-мишенью; 2) устойчивостью к действию нуклеаз; 3) высокой проницаемостью через клеточную мембрану [1].

Оптимальным способом отбора аналогов олигонуклеотидов, соответствующих перечисленным выше критериям, может быть только испытание таких соединений на живых клетках различных организмов.

Целью настоящей работы было исследование способности клеток отдельных представителей класса *Mollicutes* связывать и поглощать тиофос-

фатные, дитиофосфатные и метилфосфонатные аналоги олигодезоксирибонуклеотидов, комплементарные определенным, так называемым «сигнатурным», участкам 16S рРНК этих микроорганизмов.

Материалы и методы. В работе использовали клетки микоплазм — *Acholeplasma laidlawii* PG-8, *Mycoplasma fermentans* PG-18 и *M. pneumoniae* FH, полученные из коллекции культур микоплазм (г. Орхус, Дания). Клетки молликутов выращивали в среде СМ ИМВ-72 с 10 % сыворотки лошади при температуре 37 °С [2].

Для изучения связывания с клетками микоплазм использовали следующие олигодезоксирибонуклеотидные аналоги (в работе исследованы олигонуклеотиды только дезоксирибонуклеотиды, поэтому префикс «d» перед названием опущен):

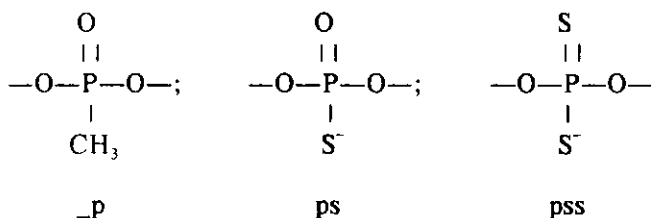
5'-BnzNHp*A_pG_pG_pA_pG_pG_pTpSCH₃-3' — реагент I;

5'-BnzNHp*ApsGpsGpsApsGpsGpsTpSCH₃-3' — реагент II;

5'-BnzNHp*CpsApsTpsTpsGpsTpsGps(Aps)₅-pTpsTpSCH₃-3' — реагент III;

5'-BnzNHp*CpssApsTpssTpssGpssTpssGpss-

(A_{ps})₅TrpssTrpSCH₃-3' — реагент IV;
 5'-p*CpsApsTrpTrpGpsTrpGps(Aps)₅TrpTrpS-
 CH₃-3' — реагент V;
 5'-p*CpsApsTrpssTrpssGpsTrpssGps(Aps)₅-
 TrpssTrpSCH₃-3' — реагент VI;
 где p* — [³²P]-фосфат; Bnz — CH₂C₆H₅;



Уровень сорбции аналогов олигодезоксирибонуклеотидов с клетками молликутов сравнивали с таковым «нормальных» олигодезоксирибонуклеотидов с фосфодиэфирными межнуклеотидными связями, имеющих следующий состав:

5'-BnzNHp*ApGpGpApGpGpTrpSCH₃-3' — реагент VII;
 5'-BnzNHp*CrApTrpTrpGpTrpGp(Ap)₅TrpTrpSCH₃-3' — реагент VIII.

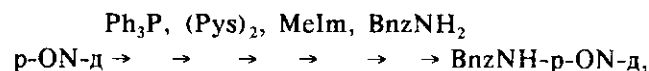
Реагенты I, II, VII комплементарны последовательности Шайна-Дальгарно прокариотической 16S рРНК; реагенты III—VI, VIII — последовательности 355—368 16S рРНК микоплазм, уреоплазм и спироплазм. В ряде экспериментов использовали бензиламидное производное метилфосфонатного аналога тетрадекатимидилата: 5'-BnzNHp*T_p(T_p)₁₂TrpSCH₃-3' — реагент IX;

Природные олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали твердофазным Н-фосфонатным методом [3]; тио- и дитиофосфатные аналоги олигодезоксирибонуклеотидов — блочным методом в растворе по модифицированной триэфирной методике [4] с использованием мономеров, защищенных по межнуклеотидным фосфатам и аминогруппам экзотических оснований. После удаления всех защитных групп целевой тиофосфат выделяли ионообменной хроматографией, а дитиофосфат — препаративным гель-электрофорезом в 20 %-м ПААГ, содержащем 7 М мочевины. Наличие межнуклеотидной тио- и дитиофосфатных групп в соединениях доказана методом ³¹P-ЯМР спектроскопии. Спектры записывали на спектрометре AC-200 («Bruker», Германия) в 50 %-м метаноле. Метилфосфонатные аналоги олигонуклеотидов (реагент I, IX) синтезировали по аналогии с описанной методикой [5]. Синтезированные олигонуклеотиды с фосфодиэфирными межнуклеотидными связями метили ³²P, как описано [6].

Фосфорилирование и введение [³²P]-метки в

метилфосфонатные, тио- и дитиофосфатные аналоги олигонуклеотидов проводили согласно описанной методике [5]. Реакционную смесь объемом 150—500 мкл, содержащую 0,05 М трис-HCl (рН 9,6), 0,01 М MgSO₄, 5 мМ дитиотреитол, 20 мкМ спермидин, 0,1 мМ ЭДТА, 50—150 нМ метилфосфонатный или тиофосфатный аналог, 1 нМ [γ -³²P]-АТФ (0,5—1 мКи), 100—300 нМ АТФ и 20 ед. активности Т4-полинуклеотидкиназы, инкубировали в течение 3—4 ч при 37 °С. [³²P]-меченный продукт выделяли препаративным гель-электрофорезом в 20 %-м ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

5'-Бензиламидные производные олигонуклеотидов и их аналоги получали аналогично описанной методике [7] по следующей схеме:



где p-ON-д — 5'-фосфорилированный олигонуклеотид; Ph₃P — трифенилфосфин; (Pys)₂ — 2,2'-дипиридилдисульфид; MeIm — N-метилимидазол; BnzNH₂ — бензиламид.

Исходные природные олигодезоксирибонуклеотиды и их аналоги переводили вначале в цетавлоновые соли. Для этого 2 ОЕ каждого из вышеуказанных олигонуклеотидов растворяли в 20 мкл воды, добавляли 5—8 мкл 8 %-го раствора цетилтриметиламмонийбромида и осадок триметилацетилловых солей олигонуклеотидов и их аналогов осаждали центрифугированием. Осадок промывали 20 мкл воды, сушили в вакууме над P₂O₅ и растворяли в 40 мкл диметилформамида (ДМФА). Затем последовательно добавляли 5 мкл 0,5 М раствора 2,2'-дипиридилдисульфида в абсолютном ДМФА, 5 мкл 0,5 М раствора трифенилфосфина в ДМФА. Через 10 мин в реакционную смесь добавляли 5 мкл 0,5 М раствора бензиламина в ДМФА, выдерживали 20 мин при 20 °С и осаждали олигонуклеотидное производное добавлением 1 мл 2 %-го раствора LiClO₄ в ацетоне, осадок промывали ацетоном. Полученные таким образом производные природных олигонуклеотидов и их аналогов очищали последовательно ионообменной хроматографией на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой DE-32 (1,5 × 16 см) в градиенте концентрации KН₂РO₄, рН 7,5 (0—0,3 М, 600 мл, 30 мл/ч), и высокоэффективной обращеннофазовой хроматографией на колонках с сорбентом Lichrosorb C18. Выход бензиламидных производных составил 80—90 %.

Связывание антисмысловых аналогов олигонуклеотидов с природной фосфодиэфирной связью и их аналогов клетками молликутов исследовали, как описано [8]. Кинетические кривые связывания

меченых аналогов олигодезоксирибонуклеотидов клеткам микоплазм в зависимости от возраста культур получали по аналогии с описанной методикой [9].

Поглощение аналогов олигодезоксирибонуклеотидов клетками микоплазм изучали, сравнивая содержание меченых реагентов, оставшихся в среде культивирования, с количеством этих реагентов, обнаруживаемых в клеточных лизатах. Клетки микоплазм после инкубации с мечеными аналогами олигонуклеотидов трижды отмывали 0,28 М раствором NaCl, ресуспендировали в 1/10 объема ТЕ-буфера (0,125 М трис-HCl, pH 8,0, 0,01 М ЭДТА) и лизировали, добавляя DS-Na до 1%. После удаления экстракцией хлороформом белков из клеточного лизата подсчитывали радиоактивный материал в органической и водной фазах. Содержание радиоактивного материала в водной фазе принимали за количество меченых реагентов, поглощаемых клетками микоплазм.

Результаты и обсуждение. В первых сериях экспериментов была исследована кинетика сорбции метилфосфонатных, тиофосфатных и дитиофосфатных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов, комплементарных определенным участкам 16S рРНК молликутов с клетками *A. laidlawii* PG-8. При этом установлено, что основная доля из вносимых в питательную среду реагентов II—IV в концентрации 100 нМ связывается с клетками этого молликута при 37 °С в течение 1 ч, тогда как кинетика связывания реагента I была более длительная и достигала 3 ч (рис. 1). Уровень сорбции олигонуклеотидных аналогов клетками *A. laidlawii* PG-8 был различен: доля связавшихся тио- и дитиофосфатных аналогов олигонуклеотидов клетками этого молликута значительно превышала количество свя-

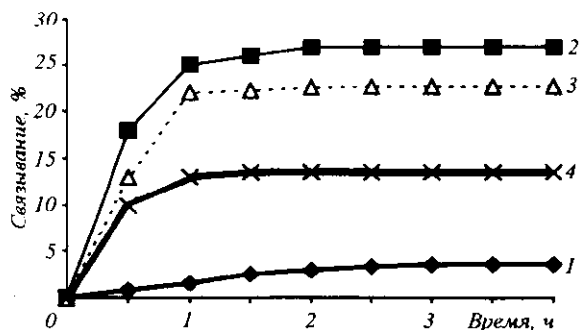


Рис. 1. Кинетика связывания реагентов I (1), II (2), III (3), IV (4) клетками *A. laidlawii* PG-8

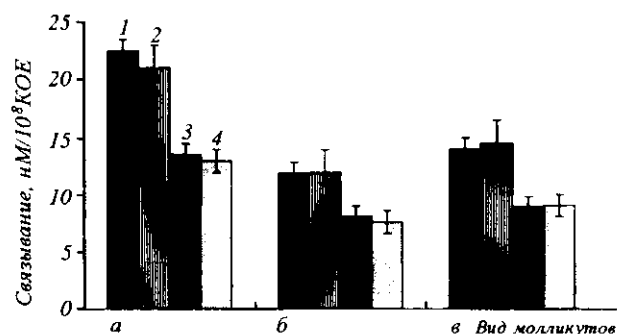


Рис. 2. Влияние защиты 5'-концевого меченого фосфата бензиламидной группировкой на уровень связывания тио- и дитиофосфатов клетками *A. laidlawii* PG-8 (а), *M. pneumoniae* FH (б), *M. fermentans* PG-18 (в): 1 — реагент III; 2 — реагент V; 3 — реагент IV; 4 — реагент VI

завшихся метилфосфонатных аналогов. Такая же закономерность наблюдалась и при инкубации данных реагентов с клетками *M. pneumoniae* FH и *M. fermentans* PG-18.

Ранее Замечником [10] установлено, что фосфоноэстеразная активность в эукариотических клетках заметно превосходит эндонуклеазную. У представителей класса *Mollicutes* также обнаружена значительная фосфатазная активность [11]. Поэтому как в приведенных выше экспериментах по исследованию кинетики сорбции антисмысловых аналогов олигонуклеотидов, так и во всех последующих мы использовали олигонуклеотидные производные, несущие на 5'-конце бензиламидные группировки для защиты 5'-концевого меченого фосфата от действия фосфатаз. Сравнение процессов сорбции тиоаналогов олигонуклеотидов с бензиламидной группой на 5'-конце (реагенты III, VI) и тиоаналогов с обычным фосфолированным 5'-концом (реагенты V, VI) продемонстрировало отсутствие заметных отличий в уровне связывания этих реагентов клетками молликутов (рис. 2).

Результаты исследования связывания аналогов олигодезоксирибонуклеотидов с различными представителями класса *Mollicutes* представлены на рис. 3. Нами установлено, что клетки отдельных представителей класса *Mollicutes* в различной степени сорбировали олигонуклеотидные аналоги в зависимости от их модификации. Наивысший уровень связывания олигомеров наблюдался у всех изученных штаммов микоплазм при инкубировании их с тиофосфатными аналогами. Так, для клеток *A. laidlawii* PG-8 он составил 26 нМ на 10^8 КОЕ при

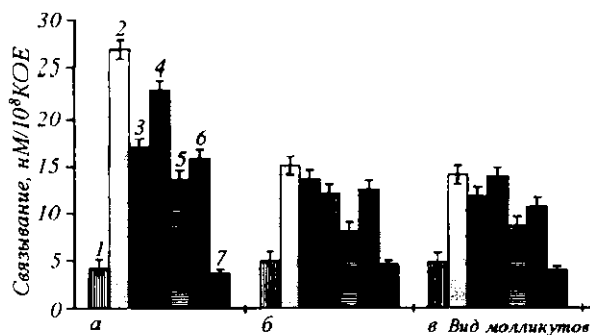


Рис. 3. Сорбция клетками *A. laidlawii* PG-8 (а), *M. pneumoniae* FH (б), *M. fermentans* PG-18 (в) антисмысловых олигодезоксирибонуклеотидов и их аналогов: 1 — реагент I; 2 — II; 3 — VII; 4 — III; 5 — IV; 6 — VIII; 7 — IX (клетки молликутов, применяемые в данном эксперименте, находились в стадии логарифмического роста, время инкубирования с реагентами составляло 4 ч, концентрация используемых олигонуклеотидов в питательной среде равнялась 100 нМ)

использовании 7-звенных тиоаналогов (реагент II) и 22 нМ на 10^8 КОЕ в случае использования 14-звенных тиофосфатов (реагент III), что значительно превосходило количество сорбировавшихся этими же клетками природных олигодезоксирибонуклеотидов (реагенты VII, VIII), дитиофосфатных (реагент IV) и метилфосфонатных аналогов олигонуклеотидов (реагенты I, IX) (см. рис. 3). Доля связавшихся тиофосфатных аналогов олигонуклеотидов клетками *M. fermentans* PG-18 и *M. pneumoniae* FH практически не отличалась от таковой природных олигодезоксирибонуклеотидов и лишь незначительно превосходила уровень связывания дитиофосфатов (см. рис. 3). Уровень связывания метилфосфонатных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов у всех трех изученных видов молликутов был незначителен и не превышал 5 нМ на 10^8 КОЕ при инкубировании клеток как с 7-звенными, так и с тетрадекатимидилатными метилфосфонатными аналогами олигонуклеотидов. Увеличение нуклеотидной цепи у всех изученных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов с 7 до 14 нуклеотидных оснований практически не сказывалось на уровне их связывания с клетками микоплазм. Нами не обнаружены различия в уровне сорбции метилфосфонатных аналогов олигонуклеотидов клетками молликутов в зависимости от их видовой или родовой принадлежности, тогда как при исследовании сорбции тио- и дитиофосфатных аналогов наблюдаются заметные отличия в связывании этих реагентов клетками представителей родов *Acholeplasma* и *Mycoplasma*. Так, количество связавшихся тиоана-

логов (реагенты II и III) с клетками *A. laidlawii* PG-8 почти в два раза превышало таковое тиофосфатов клетками *M. fermentans* PG-18 и *M. pneumoniae* FH (см. рис. 3).

Уровень связывания клетками *A. laidlawii* PG-8 дитиофосфатов и природных олигонуклеотидов был также значительно выше, чем у *M. pneumoniae* FH и *M. fermentans* PG-18. Возможно, обнаруженные различия в связывании антисмысловых тиоаналогов и природных олигонуклеотидов клетками *A. laidlawii* PG-8 и остальными представителями рода *Mycoplasma* обусловлены их биохимическими и физиологическими особенностями. В пользу предположения о наличии зависимости между общей физиологической активностью и уровнем связывания тиоаналогов свидетельствует тот факт, что интенсивность роста на среде СМ ИМВ-72 у штаммов, относящихся к роду *Mycoplasma*, была намного ниже, чем у клеток *A. laidlawii* PG-8 (рис. 4). Кроме того, обнаруживаются значительные различия в связывании тиоаналогов клетками молликутов в зависимости от их возраста. Наиболее активно все изучаемые тио- и дитиоаналоги (реагенты II—IV) связывались клетками молликутов, находящимися в возрасте от 24 до 36 ч, но при достижении этими клетками фазы стационарного роста уровень сорбции, в частности реагента II, резко снижался (см. рис. 4). Такая же картина наблюдалась при связывании клетками молликутов реагентов III и IV. Тогда как уровень сорбции метилфосфонатных аналогов (реагенты I, IX) был одинаков как для клеток молликутов, находящихся в фазе логарифмического роста, так и для клеток, находящихся в фазе стационарного роста (см. рис. 4).

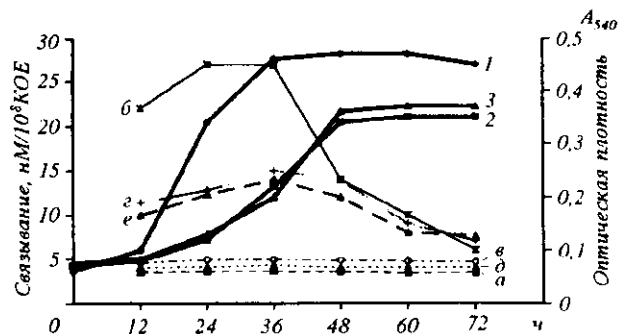


Рис. 4. Зависимость количества связанных с клетками микоплазм аналогов антисмысловых олигонуклеотидов от возраста клеточных культур. Связывание реагентов I и II клетками *A. laidlawii* PG-8 (а, б), *M. pneumoniae* FH (в, г), *M. fermentans* PG-18 (д, е). Ростовая активность клеток *A. laidlawii* PG-8 (1); *M. pneumoniae* FH (2); *M. fermentans* PG-18 (3)

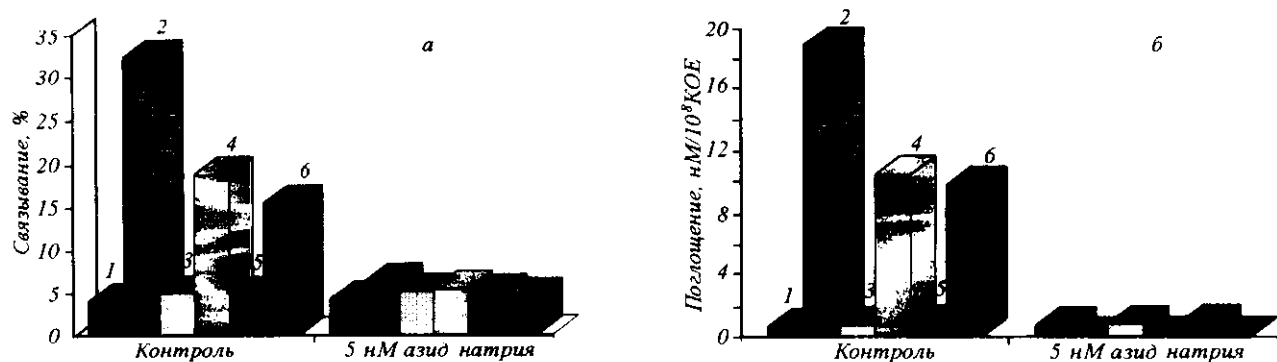


Рис. 5. Влияние азид натрия на связывание (а) и поглощение (б) метилфосфонатных и тиофосфонатных аналогов олигонуклеотидов (реагенты I и II) клетками *A. laidlawii* PG-8 (1, 2), *M. pneumoniae* FH (3, 4), *M. fermentans* PG-18 (5, 6)

Обнаруженные нами отличия в интенсивности связывания клетками молликутов тиофосфатов и метилфосфонатов абсолютно не совпадают с утвердившимися представлениями о том, что у олигонуклеотидных аналогов, у которых гидрофильность снижается за счет уменьшения отрицательного заряда в межнуклеотидных фосфатах, повышается способность связываться с мембранами и проникать сквозь них. Отметим, что результаты, демонстрирующие увеличение связывания и проникновения неионных аналогов олигонуклеотидов, получены в основном на липосомах [12] или на эукариотических клетках [13]. У молликутов из-за отсутствия механизма синтеза предшественников нуклеиновых кислот и наличия острой потребности в получении экзогенных источников этих соединений, вероятно, существует специфический механизм поглощения как нуклеотидов, так и небольших их олигомеров. Поэтому прямое сопоставление данных об усваивании олигонуклеотидов и их разнообразных аналогов клетками эукариот и клетками молликутов неправомерно.

Проведенные нами ранее исследования способности поглощения клетками микоплазм природных олигонуклеотидов, модифицированных как гидрофобными, так и гидрофильными группировками по 5' и 3'-концам, показали отсутствие различий в характере и уровне сорбции таких соединений этими микроорганизмами [6, 8, 9]. В отличие от этого представленные в настоящей работе данные демонстрируют существенную разницу в процессе связывания и поглощения клетками молликутов аналогов олигонуклеотидов с заряженными межнуклеотидными фосфатами (тиофосфонатных, дитиофосфонатных) и их неионных аналогов (метилфосфонатных).

Как известно [14], основную роль в процессах облегченной диффузии и активном транспорте через клеточную мембрану органических соединений играют белки, участвующие в рецепции и переносе этих веществ.

Мы предполагаем, что основополагающим моментом в узнавании клетками микоплазм олигонуклеотидов служит именно их заряженный рибозофосфатный остов. Поэтому и столь существенны различия в связывании клетками молликутов гидрофобных и гидрофильных аналогов олигонуклеотидов, которые можно объяснить различными механизмами связывания этими микроорганизмами неионных аналогов (метилфосфонатных) и олигонуклеотидов, имеющих отрицательный заряд на фосфатных остатках (тиофосфатов, дитиофосфатов и олигонуклеотидов с фосфодиэфирными связями). Косвенно такое предположение подтверждают данные о неадекватном действии азид натрия на процессы сорбции и поглощения клетками молликутов метилфосфонатных аналогов и тиоаналогов (рис. 5, а, б). При добавлении в среду 5 мМ азид натрия уровень связывания тиоаналогов с клетками *A. laidlawii* PG-8 уменьшался почти в 5 раз, а доля связавшихся с клетками *M. pneumoniae* FH и *M. fermentans* PG-18 тиофосфатов снижалась с 19 до 5 %, тогда как уровень сорбции клетками этих молликутов метилфосфонатных аналогов олигонуклеотидов при внесении в среду культивирования NaN_3 оставался неизменным для всех используемых штаммов молликутов (рис. 5, а). Внесение в среду культивирования 5 мМ NaN_3 приводит к полному угнетению поглощения тиофосфатов клетками молликутов, но почти не влияет процесс поглощения ими метилфосфонатных аналогов олигонуклеотидов (рис. 5, б). Мы предполагаем, что

Сравнение концентраций аналогов олигонуклеотидов в среде и в клетках микоплазм

Реагент	Штамм микоплазм	Концентрация реагента в среде, мкМ	Концентрация клеток в среде, 10^6 /мл	Количество реагента, связанного клетками, %	Количество реагента, связанного клетками, нМ/10 ⁶ клеток	Внутриклеточная концентрация реагента, мМ
II	<i>A. laidlawii</i> PG-8	0,1	1,20	32,3	26,9	2,88
		0,5	1,20	14,5	60,4	6,47
		1	1,20	10,1	84,2	9,02
II	<i>M. pneumoniae</i> FN	0,1	1,25	18,8	15,0	1,61
		0,5	1,25	11,1	44,4	4,76
		1	1,25	8,5	68,0	7,29
II	<i>M. fermentans</i> PG-18	0,1	1,10	15,4	14,0	1,50
		0,5	1,10	10,3	46,8	5,01
		1	1,10	7,1	64,5	6,91
III	<i>A. laidlawii</i> PG-8	0,1	1,20	27,6	23,0	2,46
		0,5	1,20	11,8	49,2	5,27
		1	1,20	9,4	78,3	8,39
III	<i>M. pneumoniae</i> FN	0,1	1,25	15,0	12,0	1,28
		0,5	1,25	8,9	36,5	3,91
		1	1,25	7,3	58,4	6,25
III	<i>M. fermentans</i> PG-18	0,1	1,10	15,2	13,5	1,48
		0,5	1,10	8,6	39,1	4,19
		1	1,10	6,2	56,4	6,04
IV	<i>A. laidlawii</i> PG-8	0,1	1,20	16,2	13,5	1,45
		0,5	1,20	10,3	42,9	4,59
		1	1,20	8,9	74,2	7,95
IV	<i>M. pneumoniae</i> FN	0,1	1,25	10,0	8,0	0,86
		0,5	1,25	7,5	30,0	3,21
		1	1,25	6,1	48,8	5,23
IV	<i>M. fermentans</i> PG-18	0,1	1,10	9,5	8,6	0,93
		0,5	1,10	7,4	33,6	3,60
		1	1,10	5,7	51,8	5,55

поглощение природных олигодезоксирибонуклеотидов, исследованное нами ранее [8], и их тиоаналогов клетками микоплазм осуществляется за счет активного АТФ-зависимого транспорта, подавляющегося, вероятно, при добавлении в инкубационную смесь азида натрия. Проникновение метилфосфонатных аналогов олигонуклеотидов в клетки молликутов, возможно, является результатом облегченной диффузии, а довольно высокий уровень сорбции клетками этих неионных аналогов можно объяснить значительной гидрофобностью таких производных, поэтому уровень связывания и поглощения данными микроорганизмами метилфосфонатов остается практически неизменным как в отсутствие, так и в присутствии азида натрия в среде культивирования.

Отметим, что на наличие различных рецепторно-опосредованных механизмов в связывании гидрофобных аналогов и природных олигонуклеотидов

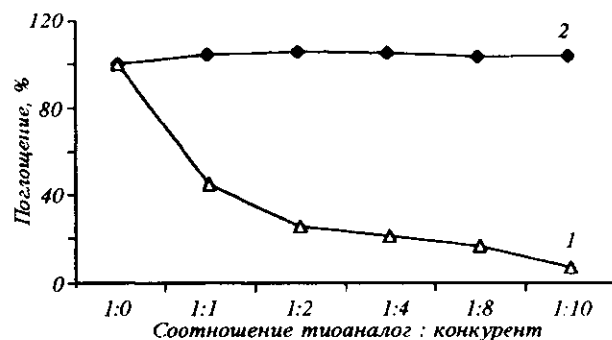


Рис. 6. Влияние природных олигонуклеотидов (1) и метилфосфонатных аналогов (2) на поглощение клетками *A. laidlawii* PG-8 тиофосфатов (реагент II)

в клетках эукариот указывали Лок с соавт. [15], обнаружившие, что внесение в среду культивирования наряду с природными олигодезоксирибонуклеотидами их метилфосфонатных аналогов не влияло на проникновение природных олигонуклеотидов, тогда как добавление тиофосфонатных аналогов снижало поглощение миелоидными клетками олигонуклеотидов с фосфодиэфирными связями в результате их конкурентного ингибирования тиоаналогами.

Мы также установили факт подавления процесса поглощения тиоаналогов клетками *A. laidlawii* PG-8 при одновременном внесении в инкубационную среду меченых тиофосфатов и «холодных» природных олигодезоксирибонуклеотидов: при 10-кратном избытке последних уровень поглощения клетками *A. laidlawii* PG-8 меченых тиофосфатов снижался до 0. Тогда как при добавлении в среду культивирования одновременно меченых тиофосфатов и метилфосфонатов не приводило к снижению усваивания тиоаналогов этим микроорганизмом (рис. 6).

Очень важным показателем перспективности использования тиоаналогов олигодезоксирибонуклеотидов как нового средства борьбы с патогенными молликутами, к которому не может быть адаптации у таких патогенов, является факт значительного накопления этих соединений в их клетках. Более 75 % общего количества связавшихся с клетками молликутов тиофосфатов обнаруживалось внутриклеточно. В таблице приведены результаты поглощения тиоаналогов клетками *A. laidlawii* PG-8, *M. pneumoniae* FH, *M. fermentans* PG-18. Мы рассчитали, что объем одной клетки молликута равен в среднем $0,07 \text{ ам}^3$ (размер клетки молликута колеблется от 0,33 до 1 мкм в диаметре [16]). Как видно из приведенных данных, внутриклеточная концентрация реагентов II—IV в клетках у всех изученных штаммов молликутов варьировала в пределах 1—8 мМ, тогда как концентрация этих реагентов в окружающей среде колебалась от 100 до 1000 нМ.

Таким образом, концентрация меченых тиоаналогов олигонуклеотидов в клетке превышала их концентрацию вне клетки в 10^4 — 10^5 раз. Данные, представленные в таблице, подтверждают наши предположения о существовании у молликутов механизма активного транспорта из внешней среды олигонуклеотидов или их аналогов, имеющих отрицательный заряд в рибозофосфонатном остове. Явление активного транспорта олигонуклеотидов извне внутрь клетки нехарактерно для всех других организмов, с которыми исследователи работали ранее [1].

Полученные результаты дают основание предположить также, что на эффективность активного поглощения природных олигонуклеотидов или их аналогов клетками молликутов из окружающей среды основное влияние оказывает заряд их межнуклеотидных фосфонатных групп. Нами обнаружен факт существенного накопления тиофосфонатных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов в клетках микоплазм, что позволяет надеяться на получение ощутимых терапевтических эффектов для подавления микоплазмозов при использовании даже наномолярных количеств тиофосфонатных аналогов олигонуклеотидов.

О. В. Егоров, Л. П. Панченко, I. Г. Скрипаль, Н. В. Амирханов
Засвоєння клітинами молікутів антисенсових аналогів
олігодезоксирибонуклеотидів

Резюме

Досліджено процеси зв'язування і поглинання клітинами *Acholeplasma laidlawii* PG-8, *Mycoplasma fermentans* PG-18 і *M. pneumoniae* FH тиофосфонатних, дитіофосфонатних та метилфосфонатних аналогів олигодезоксирибонуклеотидів, комплементарних «сигнатурним» послідовностям 16S рРНК. Виявлено відмінності в ефективності зв'язування даними клітинами тиофосфонатних та метилфосфонатних аналогів олигонуклеотидів. Так, рівень сорбції тиофосфонатних аналогів більше ніж в 5 разів. Встановлено факт значного накоплення клітинами молікутів тіо- і дитіофосфонатних аналогів вивчених олигонуклеотидів. Внутрішньоклітинна концентрація цих сполук у досліджених штамів молікутів перевищувала позаклітинну в 10^4 — 10^5 разів. На основі отриманих експериментальних даних зроблено припущення про наявність у клітинах молікутів двох різних механізмів поглинання аналогів олигонуклеотидів, що несуть від'ємний заряд в рибозофосфонатному остові, та нейтральних аналогів.

O. V. Yegorov, L. P. Panchenko, I. G. Skripal, N. V. Amir Khanov

Uptake the mollicute cells of the analogs of antisense oligodeoxynucleotides

Summary

Processes of absorption and uptake by cells of *Acholeplasma laidlawii* PG-8, *Mycoplasma fermentans* PG-18 and *Mycoplasma pneumoniae* FH of phosphorothioate, phosphorodithioate and methylphosphonate analogs of oligodeoxynucleotides which are complementary to «signature» 16S rRNA sequences have been investigated. Distinctions in efficiency of absorption by given cells of phosphorothioate and methylphosphonate analogs of oligonucleotides are found out. So, the level sorption of thioates by the cells of *A. laidlawii* PG-8 exceeded a share binding with these cells of methylphosphonates more than in 5 times. A fact of significant accumulation by the mollicute cells of thio- and dithioate analogs of oligonucleotides is established. The intracellular concentration of these compounds of all investigated microorganisms exceeded them extracellular in 10^4 — 10^5 time. On the basis of received of experimental data the assumption of existence in mollicute cells two of various gears of uptake of analogs of oligonucleotides bearing by negative charge in sugar-phosphate backbone and neutral oligonucleotide analogs is stated.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ulmann E., Reytan A.* Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle // *Chem. Revs.*—1990.—90, N 4.—P. 543—584.
2. *Скрипаль И. Г., Малиновская Л. П.* Среда СМ ИМВ-72 для выделения и культивирования фитопатогенных микоплазм // *Микробиол. журн.*—1984.—46, № 2.—С. 71—75.
3. *Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D.* Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates // *Nucl. Acids Res.*—1886.—14, N 13.—P. 5399—5407.
4. *Yau E. K., Ma Y. X., Caruthers M. H.* Synthesis of internucleotide phosphate analogues // *Tetrahedron Lett.*—1990.—31, N 14.—P. 1953—1956.
5. *Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф.* Реакционноспособные производные олигонуклеотидов, содержащие метилфосфонатные группы. 2. Синтез стереорегуляторных октатимидилатов, содержащих алкилирующий остаток 4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензиламина и чередующиеся метилфосфонатные остатки // *Биоорг. химия.*—1989.—15, № 2.—С. 267—276.
6. *Егоров О. В., Панченко Л. П., Скрипаль И. Г.* Исследование сорбции антисмысловых олигодезоксирибонуклеотидов клетками микоплазм // *Микробиол. журн.*—1996.—58, № 3.—С. 30—37.
7. *Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М.* Реакционноспособные фосфамиды моно- и динуклеотидов // *Биоорг. химия.*—1986.—12, № 4.—С. 475—481.
8. *Панченко Л. П., Егоров О. В., Райт А. С. и др.* Взаимодействие алкилирующих производных олигодезоксирибонуклеотидов и их метилфосфатных аналогов с клетками микоплазм // *Микробиол. журн.*—1991.—53, № 4.—С. 63—68.
9. *Егоров О. В., Панченко Л. П., Скрипаль И. Г. и др.* Эффективность связывания реакционноспособных олигодезоксирибонуклеотидов клетками различных представителей класса *Mollicutes* обусловлена возрастом культур // *Там же.*—1992.—54, № 2.—С. 65—70.
10. *Zamecnic P. C., Goodshild J., Taguchi Y. et al.* Inhibition of replication and expression of human T-cell lymphotropic virus type III in cultured cells by exogenous synthetic oligonucleotides complementary to viral RNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83, N 6.—P. 4143—4146.
11. *Rasin S.* The mycoplasmas // *Microbiol. Rev.*—1978.—8, N 2.—P. 414—470.
12. *Akhtar S., Basu S., Wickstom E. et al.* Penetration of oligonucleotides into liposomes // *Nucl. Acids Res.*—1991.—19, N 5.—P. 5551—5559.
13. *Miller P. S.* Biochemical and biological effects of nonionic nucleic acid methylphosphonates // *Oligonucleotides. Antisense inhibitors of gene expression* / Ed. J. S. Cohen.—London: MacMillan press, 1989.—P. 79—95.
14. *Кагава Я.* Биомембраны.—М.: Высш. шк., 1985.—303 с.
15. *Loke S. L., Stein C. A., Zhang X. H. et al.* Characterization of oligonucleotide transport into living cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1989.—86, N 5.—P. 3474—3478.
16. *Maniloff J., Morowitz H. J.* Cell biology of the mycoplasmas // *Bacter. Rev.*—1972.—36, N 3.—P. 263—290.

УДК 579.22:577.113.6
Поступила в редакцию 31.07.96