



НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНКазы Р КОНЪЮГАТЫ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ОЛИГО(*N*-МЕТИЛПИРРОЛОМ) КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

© 2021 г. Н. А. Данилин*, **, А. Л. Матвеев**,
Н. В. Тикунова**, А. Г. Веньямина**, Д. С. Новопашина*, **, #

*Новосибирский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 1

**ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины” СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 27.08.2020 г.

После доработки 01.09.2020 г.

Принята к публикации 06.09.2020 г.

Впервые получены конъюгаты направляющих РНКазы Р олиго(2'-*O*-метилрибо)- и олигодезоксирибонуклеотидов (EGS-олигонуклеотидов) с олиго(*N*-метилпирролом). В модельной системе с использованием флуоресцентно-меченых химически синтезированных РНК-мишеней, соответствующих фрагментам мРНК генов *ftsZ* и *gyrA* *Acinetobacter baumannii*, продемонстрирована способность РНКазы Р расщеплять РНК в присутствии направляющих олигонуклеотидов и их конъюгатов с олиго(*N*-метилпирролом). Введение одного остатка олиго(*N*-метилпиррола) на 5'-конец направляющего EGS-олигодезоксирибонуклеотида значительно повышает эффективность гидролиза РНК-мишени РНКазой Р, а его введение на 5'-конец направляющего EGS-олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) незначительно уменьшает эффективность гидролиза РНК-мишени РНКазой Р. Показано, что присоединение олиго(*N*-метилпиррола) на 5'-конец олигонуклеотидов увеличивает эффективность их проникновения в клетки бактерий.

Ключевые слова: олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды), РНКазы Р, EGS-олигонуклеотиды, олиго(*N*-метилпиррол)

DOI: 10.31857/S0132342321020081

ВВЕДЕНИЕ

Создание принципиально новых антибактериальных препаратов является актуальной задачей современной биоорганической химии, молекулярной биологии и фундаментальной медицины. В настоящее время до конца не решенными остаются проблемы возникновения лекарственной устойчивости бактерий к антимикробным препаратам и побочных эффектов, возникающих при применении антибиотиков [1, 2]. Перспективным подходом к разработке антибактериальных препаратов является создание антисмысловых олигонуклеотидов, мишенью которых являются жизненно важные бактериальные РНК (см., например, [3]). Использование таких олигонуклео-

тидов позволяет блокировать экспрессию соответствующих бактериальных генов и приводить к подавлению роста бактерий.

Ранее было показано, что ключевой фермент созревания тРНК – РНКазы Р, природным субстратом которой является пре-тРНК, – способен гидролизовать РНК-мишень в составе комплекса с комплементарным ей антисмысловым олигонуклеотидом, содержащим ССА-последовательность на 3'-конце [4]. Эта способность РНКазы Р легла в основу EGS-технологии (external guide sequences technology), а соответствующие антисмысловые олигонуклеотиды, направляющие действие РНКазы Р, получили название EGS-олигонуклеотиды [5–7]. Было продемонстрировано, что использование EGS-олигонуклеотидов, направляющих бактериальную РНКазу Р на расщепление мРНК определенных бактериальных генов, позволяет подавить рост бактерий (см., например, [8–10]). В качестве основы для создания EGS-

Сокращения: EGS – внешние направляющие последовательности (external guide sequence); *Flu* – остаток флуоресцеина, *L1* – олиго(*N*-метилпиррол).

Автор для связи (тел.: +7 (383) 363-51-29; факс: +7 (383) 363-51-53; эл. почта: danov@niboch.nsc.ru).

олигонуклеотидов часто используют замкнутые нуклеиновые кислоты (LNA – locked nucleic acid, BNA – bridged nucleic acid) [11, 12], морфолиновые олигонуклеотиды [9, 10, 13–16], олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) и фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды [17]. Одним из подходов к улучшению проникновения олигонуклеотидов в бактерии является их конъюгирование с молекулами-доставщиками (см., например, [18]). В качестве доставляющей группировки мы предлагаем использовать полиамид олиго(*N*-метилпиррол). Олиго(*N*-метилпирролы) являются аналогами пептидных антибиотиков нетропсина и дистамицина. Они положительно заряжены, сиквенс-специфически связываются с малой бороздкой ДНК и способны в отсутствие трансфектанта проникать в эукариотические клетки [19–22].

В данной работе предложено использование направляющих РНКазу Р конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и олигодезоксирибонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) в качестве потенциальных антибактериальных препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве бактериальной мишени нами выбран грамотрицательная бактерия *Acinetobacter baumannii*, вызывающая тяжелые внутрибольничные инфекции [23, 24], отличающаяся высокой устойчивостью к антибиотикам и включенная Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в список наиболее опасных бактерий [25–27]. Мы предлагаем в качестве альтернативы классическим антибиотикам использовать EGS-олигонуклеотиды, способные ингибировать экспрессию жизненно важных генов этой бактерии. В качестве мишени для EGS-олигонуклеотидов были выбраны фрагменты мРНК генов домашнего хозяйства *ftsZ* и *gyrA* *A. baumannii* в области сайта инициации трансляции. Ген *ftsZ* кодирует нуклеотидсвязывающий белок *ftsZ*, играющий ключевую роль при делении прокариот [28]. ДНК-гираза, одна из субъединиц которой кодируется геном *gyrA*, является необходимым элементом процесса репликации бактерий [29]. Ингибирование экспрессии этих важных для жизнедеятельности бактерии генов должно вызывать нарушение жизненного цикла и подавление роста бактерий.

В качестве основы для EGS-олигонуклеотидов нами были выбраны олигодезоксирибонуклеотиды и аналоги олигорибонуклеотидов, содержащих в 2'-положении рибозы 2'-*O*-метильную группу. Олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) полностью устойчивы к действию ДНК- и РНК-специфических нуклеаз, обладают повышенной устойчивостью к действию нуклеаз двойного спектра и способны образовывать стабильные комплексы с РНК-мише-

ню [30, 31]. Ранее было показано, что для эффективного взаимодействия РНКазы Р с комплексом РНК–EGS-олигонуклеотид необходимо наличие четырех немодифицированных рибонуклеотидов с 3'-конца EGS-олигонуклеотида [32–34].

Синтез конъюгатов олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) проводили, используя в качестве исходных 5'-фосфаты олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих четыре немодифицированных рибонуклеотида с 3'-конца, и 5'-фосфатов олигодезоксирибонуклеотидов. Присоединение лиганда проводили путем активации 5'-фосфата олигонуклеотида окислительно-восстановительной парой трифенилфосфин/дипиридилдисульфид ($\text{PPh}_3/(\text{PyS})_2$) в присутствии диметиламинопиридина (DMAP) с последующим взаимодействием с аминопроизводным олиго(*N*-метилпиррола) по аналогии с работой Новашиной с соавт. [35] (схема 1).

Активацию 5'-фосфата проводили в диметилсульфоксиде, для чего олигонуклеотид предварительно переводили в цетавлоновую соль. Затем к активированному фосфату олигонуклеотида добавляли олиго(*N*-метилпиррол) и инкубировали при перемешивании при температуре 37°C (схема 1). Через 16 ч реакционную смесь, содержащую конъюгаты с одним и двумя остатками олиго(*N*-метилпиррола), осаждали. Конъюгаты выделяли путем электрофореза в денатурирующем препаративном ПААГ с последующей элюцией и обессоливанием и подтверждали строение методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии (табл. 1).

Аналогичным образом, используя в качестве исходных 5'-фосфаты 3'-флуоресцеинсодержащих олигонуклеотидов, получали конъюгаты 3'-флуоресцеин-меченых EGS-олигонуклеотидов с одним остатком олиго(*N*-метилпиррола) (табл. 1). Строение конъюгатов подтверждали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии. В результате реакции получали смесь моно- и бис-конъюгатов, с последующим выделением их в индивидуальном виде, выходы конъюгатов после выделения в расчете на первое нуклеотидное звено составили 1.1–7.1%. Подвижность конъюгатов при гель-электрофорезе была значительно ниже подвижности исходных олигонуклеотидов и зависела от количества присоединенных лигандов (рис. 1).

При исследовании способности РНКазы Р гидролизировать РНК-мишени в присутствии EGS-олигонуклеотидов и их конъюгатов с олиго(*N*-метилпирролом) в качестве РНК-мишеней нами были использованы два модельных 5'-флуоресцеин-меченых олигорибонуклеотида, представляющие собой фрагменты мРНК генов *ftsZ* и *gyrA* *A. baumannii* (табл. 2) в районе сайта инициации трансляции.

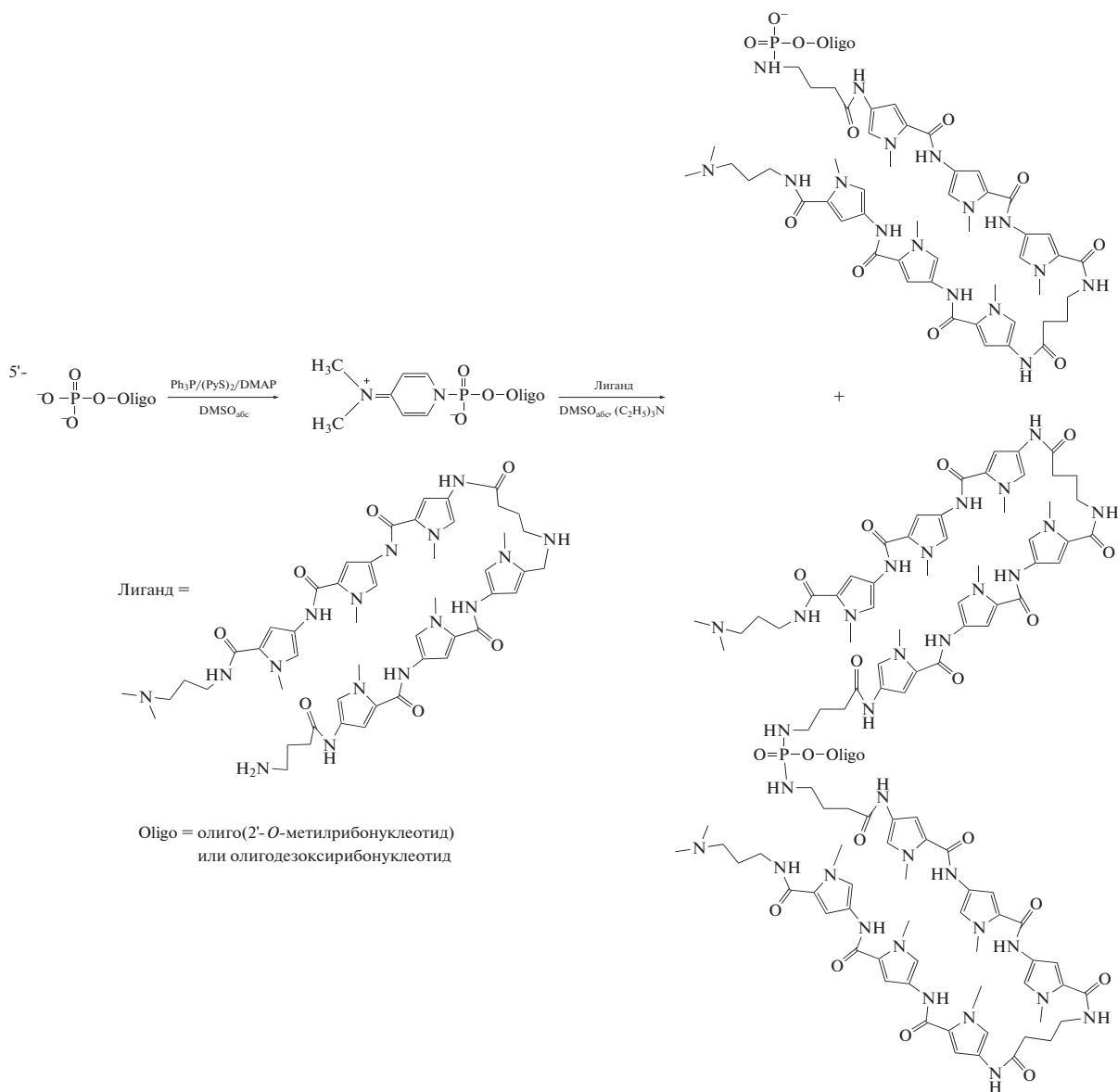


Схема 1. Схема синтеза конъюгатов олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом). PPh₃ – трифенилфосфин, (PyS)₂ – дипиридилдисульфид, DMAP – диметиламинопиридин.

Расщепление РНК-мишеней проводили в присутствии 10-кратного избытка EGS-олигонуклеотидов или их конъюгатов при 37°C. На рис. 2 представлен пример электрофоретического разделения реакционных смесей, полученных в результате расщепления РНК-мишени r24-ftsZ РНКазой Р в присутствии конъюгата *L1-mf*.

При проведении расщепления РНК-мишеней РНКазой Р в присутствии конъюгатов EGS-олигонуклеотидов, содержащих два остатка олиго(*N*-метилпиррола), продуктов гидролиза не регистрировали, на электрофорезе наблюдали комплексы, обладающие меньшей подвижностью в сравнении с исходными РНК-мишенями (*данные не приведены*).

В результате сравнительного исследования способности РНКазы Р расщеплять модельные РНК-

мишени в составе их дуплексов с конъюгатами EGS-олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и EGS-олигодезоксирибонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) было обнаружено, что введение одного лиганда на 5'-конец направляющего EGS-олигодезоксирибонуклеотида значительно повышает эффективность гидролиза РНК-мишени РНКазой Р, а введение одного лиганда на 5'-конец направляющего EGS-олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) незначительно уменьшает эффективность гидролиза РНК-мишени РНКазой Р (рис. 3). Такая разница, вероятно, связана с различиями в структурах дуплексов РНК-мишеней с олигодезоксирибонуклеотидами и олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидами) и со способностью олиго(*N*-метилпиррола) взаимодействовать с малой бороздкой формирующей

Таблица 1. Синтезированные конъюгаты EGS-олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом)

Шифр	Последовательность (5'-3')	Выход*, %	Молекулярная масса	
			рассчитано	получено**
(<i>LI</i>) ₂ -mf	5'-(<i>LI</i>) ₂ -pA ^m U ^m U ^m C ^m A ^m A ^m A ^m U ^m G ^m A ^m G ^m G ^m C ^m C ^m ACCA	1.1	7973.09	7974.05
<i>L1</i> -mf	5'- <i>L1</i> -pA ^m U ^m U ^m C ^m A ^m A ^m A ^m U ^m G ^m A ^m G ^m G ^m C ^m C ^m ACCA	2.4	6985.97	6983.83
<i>L1</i> -mf- <i>Flu</i>	5'- <i>L1</i> -pA ^m U ^m U ^m C ^m A ^m A ^m A ^m U ^m G ^m A ^m G ^m G ^m C ^m C ^m ACCA- <i>Flu</i>	7.1	7475.44	7476.10
(<i>LI</i>) ₂ -mg	5'-(<i>LI</i>) ₂ -pU ^m U ^m U ^m C ^m C ^m G ^m A ^m U ^m A ^m C ^m G ^m C ^m U ^m C ^m ACCA	2.7	7862.96	7862.01
<i>L1</i> -mg	5'- <i>L1</i> -pU ^m U ^m U ^m C ^m C ^m G ^m A ^m U ^m A ^m C ^m G ^m C ^m U ^m C ^m ACCA	4.5	6875.85	6874.11
<i>L1</i> -mg- <i>Flu</i>	5'- <i>L1</i> -pU ^m U ^m U ^m C ^m C ^m G ^m A ^m U ^m A ^m C ^m G ^m C ^m U ^m C ^m ACCA- <i>Flu</i>	2.3	7033.16	7034.70
(<i>LI</i>) ₂ -df	5'-(<i>LI</i>) ₂ -pATTCAAATGAGGCCACCA	6.8	7530.81	7526.00
<i>L1</i> -df	5'- <i>L1</i> -pATTCAAATGAGGCCACCA	6.3	6543.69	6547.15
<i>L1</i> -df- <i>Flu</i>	5'- <i>L1</i> -pATTCAAATGAGGCCACCA- <i>Flu</i>	1.5	7033.16	7034.70
(<i>LI</i>) ₂ -dg	5'-(<i>LI</i>) ₂ -pTTTCCGATACGCTCACCA	5.3	7448.73	7452.32
<i>L1</i> -dg	5'- <i>L1</i> -pTTTCCGATACGCTCACCA	2.1	6461.61	6461.99
<i>L1</i> -dg- <i>Flu</i>	5'- <i>L1</i> -pTTTCCGATACGCTCACCA- <i>Flu</i>	2.7	6951.08	6952.12

* Выход в расчете на первое нуклеозидное звено.

** По результатам масс-спектрометрического анализа. Обозначения: *L1* – олиго(*N*-метилпиррол); m – олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид); d – олигодезоксирибонуклеотид; f – EGS-олигонуклеотид, направляющий РНКазу Р на мРНК гена *ftsZ*; g – EGS-олигонуклеотид, направляющий РНКазу Р на мРНК гена *gyrA*; *Flu* – остаток флуоресцеина; p – фосфат; N^m – 2'-*O*-метилрибонуклеотид. Структуру конъюгатов см. на схеме 1.

Таблица 2. Последовательности 5'-флуоресцентно-меченых РНК-мишеней

Шифр	Последовательность (5'-3')	Выход*, %
r24-ftsZ	5'- <i>Flu</i> -AGGUC <u>AUG</u> GCCUCAUUUGAAUUUA	45.4
r24-gyrA	5'- <i>Flu</i> -UAUGCA <u>AUG</u> AGCGUAUCGAAAUC	42.0

* Выход в расчете на первое нуклеозидное звено.

Обозначения: *Flu* – остаток флуоресцеина; AUG – сайт инициации трансляции.

шейся двойной спирали. Для обоих типов EGS-олигонуклеотидов эффективность гидролиза РНК мишени r24-ftsZ была выше, чем эффективность гидролиза РНК-мишени r24-gyrA.

Несколько неожиданным для нас оказался результат, полученный на РНК-мишени r24-gyrA. Расщепление этой мишени в присутствии конъюгата EGS-олигодезоксирибонуклеотида с олиго(*N*-метилпирролом) РНКазой Р происходило более эффективно, чем для аналогичного конъюгата EGS-олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) (рис. 4). Возможно, данный эффект связан со значительной термической стабилизацией комплекса EGS-олигодезоксирибонуклеотид–РНК-мишень за счет дополнительного взаимодействия введенного остатка олиго(*N*-метилпиррола) с дуплексом.

Полученные результаты демонстрируют возможность эффективного гидролиза РНК-мишени РНКазой Р в присутствии EGS-олигонуклеотидов и их конъюгатов с олиго(*N*-метилпирролом) *in vitro*.

Для исследования проникновения конъюгатов EGS-олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) в бактерии была использована специально полученная серия их 3'-флуоресцеин-меченых аналогов (табл. 1) и контрольные 3'-флуоресцеин-меченые EGS-олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) (*mf-Flu* и *mg-Flu*) и EGS-олигодезоксирибонуклеотиды (*df-Flu* и *dg-Flu*). Сравнительное исследование проникновения конъюгатов EGS-олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) в клетки бактерий *Escherichia coli* и *Acinetobacter baumannii* методом проточной цитофлуорометрии показало, что введение олиго(*N*-метилпиррола) в большинстве случаев улучшает эффективность проникновения конъюгатов (рис. 5).

Полученные результаты подтверждают перспективность использования созданных в данной работе направляющих РНКазу Р конъюгатов EGS-олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и EGS-олигодезоксирибонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) в качестве потенциальных антибактериальных препаратов.

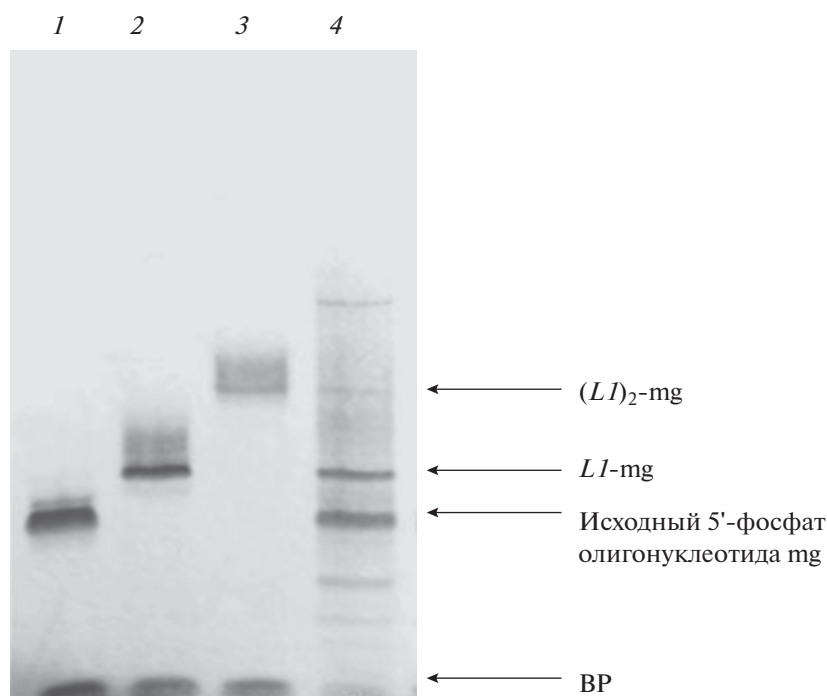


Рис. 1. Электрофореграмма, полученная при анализе исходного олигонуклеотида 5'-p-U^mU^mU^mC^mC^mG^mA^mU^mA^mC^m-G^mC^mU^mC^mАССА (1), выделенных конъюгатов LI -mg, содержащего один остаток олиго(*N*-метилпиррола) (2), и $(LI)_2$ -mg, содержащего два остатка олиго(*N*-метилпиррола) (3), и реакционной смеси при их получении (4). Структуру конъюгатов см. в табл. 1 и на схеме 1. Условия: денатурирующий 15%-ный ПААГ, окрашивание "Stains-all". ВР – бромфеноловый синий.

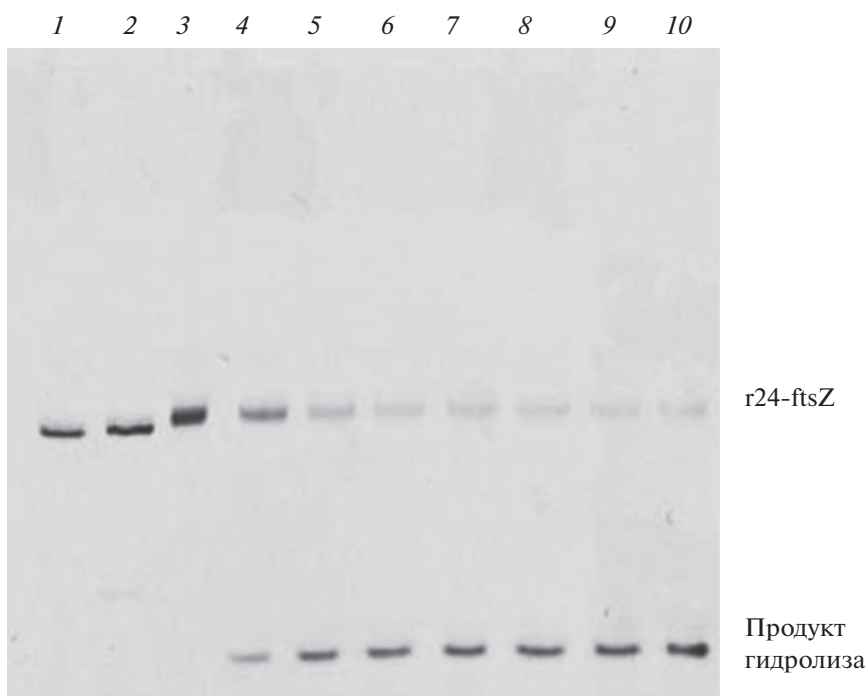


Рис. 2. Электрофореграмма, полученная при разделении продуктов гидролиза 5'-флуоресцеин-меченой РНК-мишени (r24-ftsZ) РНКазой Р в присутствии конъюгата EGS-олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) LI -mf: 1 – контроль без EGS-олигонуклеотида через 0 мин, 2 – контроль без EGS-олигонуклеотида через 60 мин, 3 – контроль без РНКазы Р, 4–10 – реакционная смесь через 2, 5, 10, 15, 30, 60 и 120 мин после начала реакции с ферментом. Условия: 200 нМ РНК М1, 2 мкМ белок С5, 2 мкМ РНК-мишень, 20 мкМ EGS-олигонуклеотид, 10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ MgCl₂, 100 мМ NH₄Cl, 37°C.

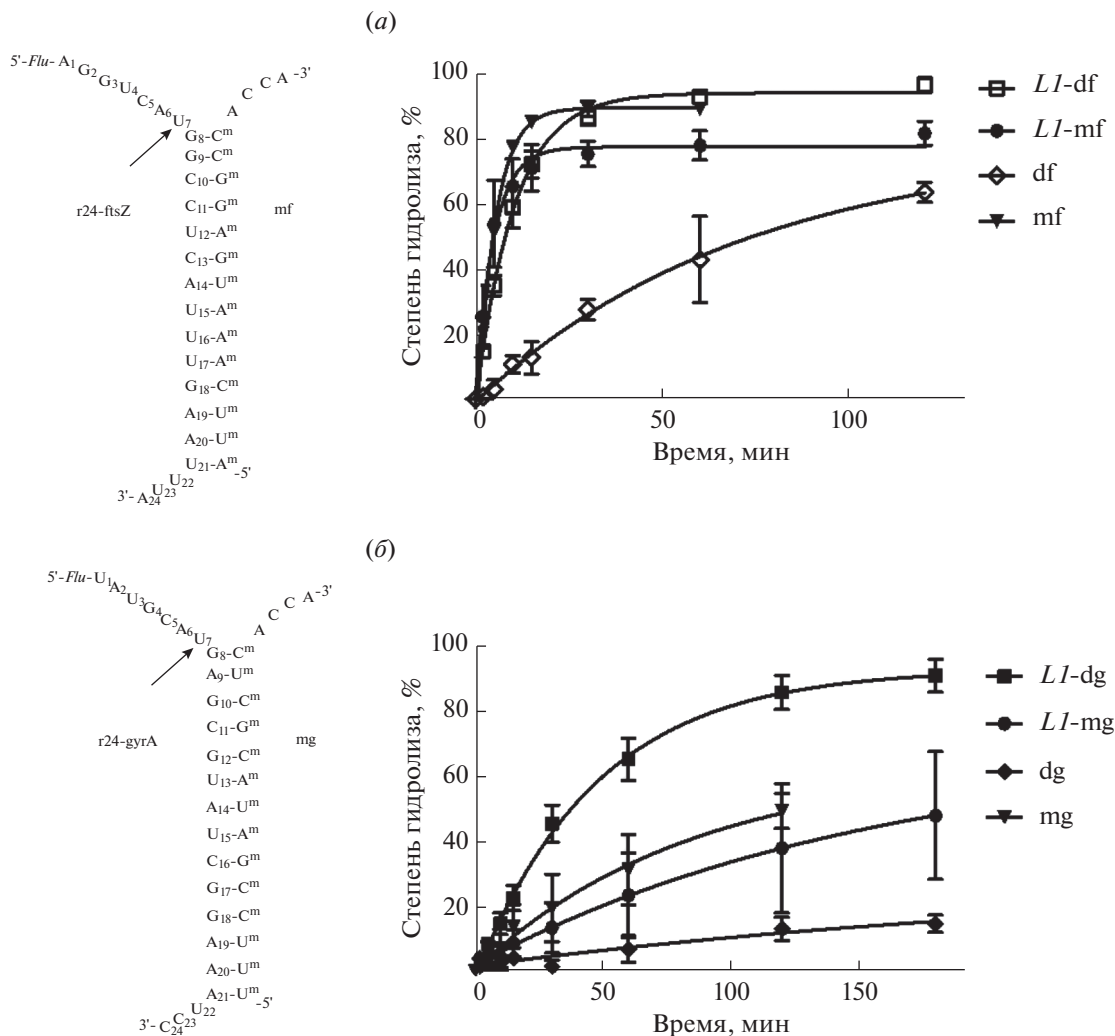


Рис. 3. Кривые расщепления 5'-флуоресцеин-меченых РНК-мишеней r24-ftsZ (а) и r24-gyrA (б) РНКазой Р в присутствии направляющих олигодезоксирибонуклеотидов (df и dg) и (2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (mf и mg), а также их 5'-конъюгатов с олиго(*N*-метилпирролом) (*L1*-df, *L1*-dg, *L1*-mf и *L1*-mg). Условия: 200 нМ РНК М1, 2 мкМ белок С5, 2 мкМ флуоресцентно-меченая РНК-мишень, 20 мкМ EGS-олигонуклеотид, 10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ MgCl₂, 100 мМ NH₄Cl, 37°C. Данные получены путем усреднения результатов как минимум трех экспериментов. За 100% принимали полное превращение РНК-мишени в продукты гидролиза. Стрелкой указан сайт расщепления РНК-мишени РНКазой Р.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы следующие реактивы: перхлорат натрия, *N*-метилимидазол (Acros Organics, США); 5-этилтио-1*H*-тетразол (Biosset, Россия); СРG-полимеры с присоединенным первым нуклеозидным звеном, фосфитамиды *N*-ацетилзащищенных 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-метилрибонуклеотидов, *N*-ацетилзащищенных 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-третбутилдиметилсилилрибонуклеозидов, *N*-ацетилзащищенных 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-дезоксирибонуклеотидов (ChemGenes, США); фосфитамида 2-[2-(4,4'-диметокситритилокси)этилсульфонил]этанола, фосфитамида 1-диметокситритилокси-2-(*N*-

тиомочевина-(ди-*O*-пivaloил-флуоресцеин)-4-аминобутил)-пропанола, модифицированный СРG-полимерный носитель с флуоресцеином (Glen Research, США); краситель "Stains-all", персульфат аммония, дихлоруксусная кислота, 2,6-лутидин, трифенилфосфин, 4-(*N,N*-диметил)аминопиридин, 2,2'-дипиридилдисульфид, цетилтриметиламмоний бромид, *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин (Fluka, Швейцария); мочевины, 40%-ный водный раствор метиламина (Merck, Германия); молекулярные сита Тrap-RacTM Molecular Sieve Bag 3 Å (Millipore, США); пиридин, ацетон, тетрагидрофуран, ацетонитрил (Panreac, Испания); ксиленцианол FF, бромфеноловый синий (Serva, Германия); Na₂EDTA

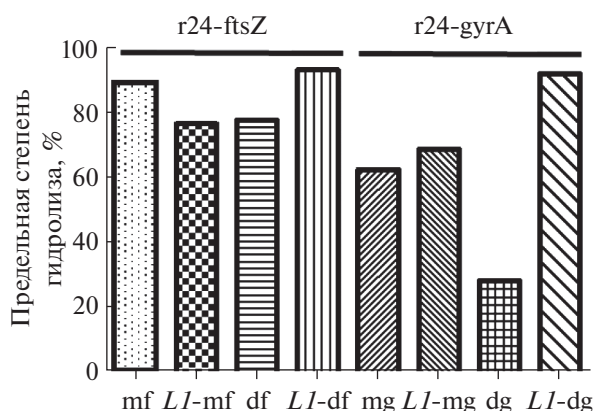


Рис. 4. Предельная степень гидролиза модельных РНК-мишеней r24-ftsZ и r24-gyrA в присутствии соответствующих EGS-олигодезоксирибонуклеотидов (df и dg), EGS-олиго(2'-O-метилрибонуклеотидов) (mf и mg), а также их 5'-конъюгатов с олиго(*N*-метилпирролом) (L1-df, L1-dg, L1-mf и L1-mg). Предельная степень гидролиза рассчитывали по уравнению (1) (см. "Эксперим. часть"), принимая за 100% полное превращение РНК-мишени в продукты гидролиза.

(Amresco, США); акриламид, *N,N'*-метиленисакриламид, пропионовый ангидрид (Acros Organics, Бельгия); трис(гидроксиметил)аминометан, триэтиламин, триэтиламинтригидрофторид, этокситриметилсилан, хлорид магния (Sigma-Aldrich, США); хлористый метилен, йод кристаллический (Криохром, Россия), а также другие реактивы и растворители отечественного и зарубежного производства.

Олиго(*N*-метилпиррол) был получен с.н.с. В.А. Рябининым и в.н.с. А.Н. Синяковым, лаборатория биоорганической химии ферментов Ин-

ститута химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН [35].

Для ферментативных реакций использовали РНКазу Р *E. coli* (К.Ф. 3.1.26.5), компоненты которой получены в лаборатории биоорганической химии ферментов Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН: каталитически активная РНК М1 синтезирована по методике, описанной в работе Guerrier-Takada et al. [36], и любезно предоставлена д.х.н. Н.А. Моор, а белковый кофактор С5 получен по протоколу, приведенному в работе Guerrier-Takada et al. [37], и любезно предоставлен д.б.н. С.Н. Ходыревой.

В работе использовали следующие приборы: спектрофотометр Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США), термостатируемый шейкер Thermomixer F1.5 (Eppendorf, Германия), центрифуги MiniSpin plus и Centrifuge 5415R (Eppendorf, Германия), Speed-Vac Concentrator SVC-100H (Savant, США), термостатируемый шейкер (Bioer, США), камеру для вертикального электрофореза (Хеликон, Россия), прибор для сушки гелей Gel Dryer B35 (Bio-Rad, США).

Олигодезоксирибонуклеотиды, олигорибонуклеотиды и их модифицированные аналоги были синтезированы с использованием соответствующих мономерных синтонов и полимерных носителей твердофазным фосфитамидным методом на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе АСМ-800 (Биосет, Россия) по оптимизированным для данного прибора протоколам в лаборатории химии РНК Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Деблокирование олигонуклеотидов проводили в стандартных условиях. Выделение олигорибонуклеотидов и их мо-

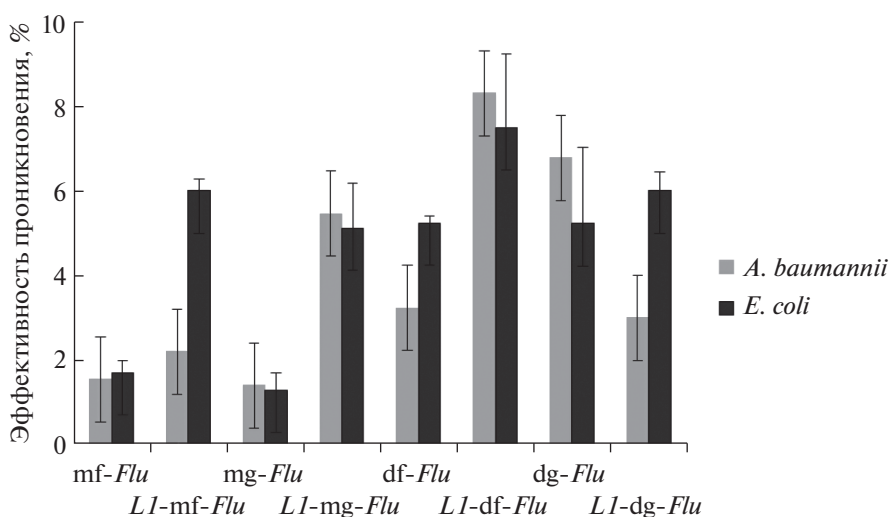


Рис. 5. Эффективность проникновения (%) 5'-конъюгатов направляющих олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом), содержащих остаток флуоресцеина на 3'-конце, в *A. baumannii* и *E. coli* по данным проточной цитофлуориметрии.

дифицированных аналогов проводили методом препаративного гель-электрофореза.

Все водные растворы были приготовлены с использованием деионизованной воды (с удельным сопротивлением 18×10^6 Ом/см), полученной с помощью прибора Millipore Simplicity System (Millipore, США).

Олигонуклеотиды, их конъюгаты и производные осаждали из водных растворов в виде натриевых солей десятикратным объемом 2%-ного раствора NaClO_4 в ацетоне. Супернатант после центрифугирования отбирали, осадок промывали ацетоном и высушивали на воздухе.

Расчет коэффициентов молярного поглощения. Значения молярных коэффициентов поглощения для 2'-*O*-метилрибонуклеотидов при 260 нм принимали равными соответствующим молярным коэффициентам поглощения для рибонуклеотидов. Молярные коэффициенты поглощения флуоресцентно-меченых производных олигонуклеотидов считали равными сумме значений молярных коэффициентов поглощения олигонуклеотидов и молярного коэффициента поглощения флуоресцеина, присоединенного к олигомеру ($20900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при 260 нм). Молярный коэффициент олиго(*N*-метилпиррола) — $36610 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при 260 нм [35]. Молярные коэффициенты были рассчитаны с учетом гипохромного эффекта в программном пакете OligoAnalyzer 3.1.

Аналитический гель-электрофорез в денатурирующих условиях. Анализ гомогенности олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов проводили методом гель-электрофореза в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (акриламид : *N,N'*-метиленбисакриламид (30 : 0.5), 8 М мочевины, 50 мМ Трис- H_3BO_3 , pH 8.3, 0.1 мМ Na_2EDTA) при напряжении 50 В/см и толщине геля 0.4 мм. К олигонуклеотидным образцам (~0.05 о.е.) для нанесения на гель добавляли 4–5 мкл раствора 8 М мочевины, содержавшего 0.05% ксиленианолового голубого и 0.05% бромфенолового синего. Для визуализации олигонуклеотидов и их производных использовали раствор, приготовленный из 50 мг красителя “Stains-all” и 100 мл смеси формамид : вода (1 : 1). После прокрашивания гели высушивали в течение 40–70 мин на приборе GelDryer 583 (Bio-Rad, США).

Выделение олигонуклеотидов и их конъюгатов препаративным гель-электрофорезом. Деблокированные олигонуклеотиды, их конъюгаты и производные выделяли с помощью препаративного электрофореза в 15%-ном ПААГ в указанных выше условиях, при толщине геля 0.4 мм. После электрофореза гель визуализировали в УФ-свете с использованием пластин DC-Alufohlen Kieselgel 60 F₂₅₄, а в случае флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов ориентировались на соответствующую окрашенную полосу. Участки геля, содержащие про-

дукт, вырезали и проводили элюцию нуклеотидного материала из ПААГ 0.3 М водным раствором NaClO_4 в течение 16 ч при 25°C. Обессоливание олигонуклеотидов проводили на фазе C18 (Waters, США).

Строение полученных олигонуклеотидов подтверждали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометра REFLEX III (Bruker Daltonics, Германия; Центр коллективного пользования Центра масс-спектрометрического анализа Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН).

Синтез конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих остатки олиго(*N*-метилпиррола) на 5'-конце. 5'-Фосфат олигонуклеотида в количестве 20 ОЕ₂₆₀ осаждали в виде цетилтриметиламмониевой соли, добавляя 8%-ный водный раствор бромид цетилтриметиламмония порциями 10, 5, 3 и далее по 1 мкл до прекращения выделения осадка. Осадок олигонуклеотида сушили в течение часа в вакууме в эксикаторе с P_2O_5 . К осадку добавляли 5 мг (41 мкмоль) DMAP в 50 мкл DMSO_{abc} , 5.3 мг $(\text{PyS})_2$ (25 мкмоль) в 25 мкл DMSO_{abc} и 6.8 мг Ph_3P (25 мкмоль) в 25 мкл DMSO_{abc} и перемешивали в течение 15 мин при температуре 37°C. Затем добавляли раствор 1 мг (1 мкмоль) олиго(*N*-метилпиррола) в 105 мкл смеси TEA : DMSO_{abc} (1 : 20). Реакцию проводили при перемешивании при температуре 37°C в течение 16 ч. Реакционную смесь осаждали в виде натриевой соли.

Приготовление раствора холофермента РНКазы Р. Раствор РНК М1 инкубировали в течение 5 мин при 65°C, затем медленно охлаждали до комнатной температуры в течение 30 мин. После этого готовили свежий раствор белка С5 в буфере, содержавшем 10 мМ Трис- HCl (pH 7.5), 10 мМ MgCl_2 , 100 мМ NH_4Cl , смешивали растворы РНК М1 и белка С5 и инкубировали их в течение 5 мин при 37°C. Использовали 10-кратный избыток белка С5 по отношению к РНК М1, концентрацию холофермента принимали равной концентрации РНК М1. Полученный раствор холофермента РНКазы Р сразу же использовали для проведения требуемых реакций.

Расщепление флуоресцентно-меченых модельных РНК-мишеней РНКазой Р в присутствии направляющих олигонуклеотидов. Реакцию проводили в 20 мкл раствора, содержавшего 10 мМ Трис- HCl (pH 7.5), 10 мМ MgCl_2 , 100 мМ NH_4Cl , 0.2 мкМ РНК М1, 2 мкМ белок С5. Контрольный раствор содержал все компоненты, кроме РНК М1 и белка С5. Готовили 10 мкл раствора РНК-субстрата, содержавшего 20 мкМ флуоресцентно-меченую РНК-мишень и 200 мкМ направляющий олигонуклеотид. Предварительно для разрушения устойчивых вторичных структур, образо-

вавшихся при хранении РНК, и образования комплекса РНК-мишени с направляющим олигонуклеотидом раствор РНК-субстрата инкубировали 2 мин при 90°C, затем охлаждали 5 мин при 25°C. Для начала реакции добавляли к приготовленной реакционной смеси холофермента РНКазы Р раствор субстрата. Через 0, 2, 5, 10, 15, 30, 60, 120 и 180 мин отбирали из реакционной смеси пробы объемом 2 мкл и смешивали их с 4 мкл денатурирующего буфера для нанесения (по 0.05% ксиленианолювого голубого и бромфенолового синего в 8 М мочеvine). Продукты реакции анализировали электрофорезом в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Гель сканировали с использованием системы визуализации гелей Quantum St5 (Vilber Lourmat, Франция) и полученное изображение обрабатывали в программном пакете Quantity One (Bio-Rad, США).

Расчет кинетических параметров расщепления РНК-субстрата РНКазой Р. Данные, полученные по результатам расщепления РНК-субстрата РНКазой Р, обрабатывали в программе Microsoft Excel. Долю продукта реакции рассчитывали как отношение интенсивности полосы, соответствующей продукту реакции, к суммарной интенсивности полос, соответствующих РНК-субстрату и продукту реакции. Расчет проводили с использованием программного обеспечения Graph Pad Prizm 7.00.159 по уравнению для реакции псевдопервого порядка:

$$f_a = Pl(1 - e^{-k_{obs}t}), \quad (1)$$

где f_a – доля продукта реакции, Pl – доля продукта при переходе реакции в стационарную фазу (предельная степень расщепления), k_{obs} – константа реакции псевдопервого порядка, t – время реакции.

Исследование проникновения 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) в бактериальные клетки. Исследование проникновения 3'-флуоресцентно-меченых конъюгатов EGS-олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) в клетки проводили на культурах *E. coli* и *A. baumannii*. Ночную культуру бактериальных клеток разводили в 100 раз ростовой средой LB (лизогенный бульон, среда Лурия–Бертани) и инкубировали клетки ($3-5 \times 10^6$ кл./мл) в течение 2 ч при 37°C до достижения OD_{600} 0.35. Культуру клеток готовили в экспоненциальной фазе роста ($5-6 \times 10^6$ кл./мл), клетки осаждали центрифугированием при 4000 g в течение 4 мин и ресуспендировали в среде LB, содержащей конъюгат. Конечные концентрации конъюгатов в среде составляли 0.2 или 1 мкМ. Клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C при качании в темноте. Клетки осаждали центрифугированием при 4000 g в течение 4 мин и добавляли 100 мкл 0.9%-ного раствора NaCl. Клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл 4%-ного раствора формальдегида в фос-

фатном буфере и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре при качании. Затем клетки трижды промывали стерильным фосфатным буфером и инкубировали с 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) в течение дополнительных 15 мин. Проточную цитометрию проводили с использованием прибора NovoCyte (ACEA Biosciences, США).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность профессору Сиднею Альтману (Sidney Altman) за инициацию исследований в области EGS-технологий в нашем институте, доктору Донне Весоловски (Donna Wesolowski) за любезно предоставленные плазмиды для получения компонентов холофермента РНКазы Р, к.х.н. В.А. Рябинину и к.х.н. А.Н. Синякову за синтез и выделение олиго(*N*-метилпиррола), к.х.н. А.А. Черноусову за регистрацию масс-спектров, а также д.б.н. С.Н. Ходыревой и д.х.н. Н.А. Моор за наработку и выделение белка C5 и РНК M1 соответственно.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта базового бюджетного финансирования Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы № АААА-А17-117020210021-7.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания проведенных кем-либо из авторов данной статьи экспериментов с использованием животных или привлечением людей в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Llor C., Bjerrum L. // Ther. Adv. Drug Saf. 2014. V. 5. P. 229–241. <https://doi.org/10.1177/2042098614554919>
2. Guidry C.A., Mansfield S.A., Cook C.H., Sawyer R.G. // Surg. Clin. North Am. 2014. V. 94. P. 1195–1218. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2014.08.010>
3. Bai H., Xue X., Hou Z., Zhou Y., Meng J., Luo X. // Curr. Drug Discov. Technol. 2010. V. 7. P. 76–85. <https://doi.org/10.2174/157016310793180594>
4. Walker S.C., Engelke D.R. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2006. V. 41. P. 77–102. <https://doi.org/10.1080/10409230600602634>
5. Förster A.C., Altman S. // Science. 1990. V. 249. P. 783–786. <https://doi.org/10.1126/science.1697102>

6. *Davies-Sala C., Soler-Bistué A., Bonomo R.A., Zorreguieta A., Tolmasky M.E.* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2015. V. 1354. P. 98–110.
<https://doi.org/10.1111/nyas.12755>
7. *Derksen M., Mertens V., Pruijn G.J.* // *Biomolecules.* 2015. V. 5. P. 3029–3050.
<https://doi.org/10.3390/biom5043029>
8. *Lundblad E.W., Altman S.* // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 27. P. 212–221.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.03.003>
9. *Wesolowski D., Tae H.S., Gandotra N., Llopis P., Shen N., Altman S.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 16582–16587.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1112561108>
10. *Wesolowski D., Alonso D., Altman S.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 8686–8689.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1306911110>
11. *Soler Bistué A.J.C., Martín F.A., Vozza N., Ha H., Joaquin J.C., Zorreguieta A., Tolmasky M.E.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 13230–13235.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0906529106>
12. *Jackson A., Jani S., Sala C.D., Soler-Bistué A.J., Zorreguieta A., Tolmasky M.E.* // *Biol. Methods Protoc.* 2016. V. 1. P. bpw001.
<https://doi.org/10.1093/biomethods/bpw001>
13. *Shen N., Ko J., Xiao G., Wesolowski D., Shan G., Geller B., Izadjoo M., Altman S.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 8163–8168.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0903491106>
14. *Augagneur Y., Wesolowski D., Tae H.S., Altman S., Ben Mamoun C.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 6235–6240.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1203516109>
15. *Sala C.D., Soler-Bistué A.J.C., Korrapun L., Zorreguieta A., Tolmasky M.E.* // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. e47690.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047690>
16. *Sawyer A.J., Wesolowski D., Gandotra N., Stojadinovic A., Izadjoo M., Altman S., Kyriakides T.R.* // *Int. J. Pharm.* 2013. V. 453. P. 651–655.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.041>
17. *Danilin N.A., Koroleva L.S., Novopashina D.S., Venyaminova A.G.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 825–832.
<https://doi.org/10.1134/S106816201906013X>
18. *Jani S., Jackson A., Davies-Sala C., Chiem K., Soler-Bistué A., Zorreguieta A., Tolmasky M.E.* // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1737. P. 89–98.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7634-8_6
19. *Ahmad A., Ranjan S., Zhang W., Zou J., Pyykkö I., Kinunen P.K.J.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1848. P. 544–553.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.11.008>
20. *Kawamoto Y., Bando T., Sugiyama H.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2018. V. 26. P. 1393–1411.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.01.026>
21. *Lin J., Nagase H.* // *Biomolecules.* 2020. V. 10. P. 544.
<https://doi.org/10.3390/biom10040544>
22. *Dervan P.B., Doss R.M., Marques M.A.* // *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents.* 2005. V. 5. P. 373–387.
<https://doi.org/10.2174/1568011054222346>
23. *Wong D., Nielsen T.B., Bonomo R.A., Pantapalangkoor P., Luna B., Spellberg B.* // *Clin. Microbiol. Rev.* 2017. V. 30. P. 409–447.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16>
24. *Harding C.M., Hennon S.W., Feldman M.F.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2018. V. 16. P. 91–102.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>
25. *Doi Y., Bonomo R.A., Hooper D.C., Kaye K.S., Johnson J.R., Clancy C.J., Thaden J.T., Stryjewski M.E., van Duin D.* // *Clin. Infect. Dis.* 2017. V. 64 (Suppl. 1). P. S30–S35.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciw829>
26. *Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet D.L., Pulcini C., Kahlmeter G., Kluytmans J., Carmeli Y., Ouellette M., Outterson K., Patel J., Cavalieri M., Mcox E., Rhouchens C.R., Grayson L., Hansen P., Singh N., Theuretzbacher U., Magrini N., and the WHO Pathogens Priority List Working Group Aboderin A.O., Al-Abri S.S., Jalil N.A., Benzonana N., Bhattacharya S., Brink A.J., Burkert F.R., Cars O., Cornaglia G., Dyar O.J., Wfriedrich A.W., Gales A.C., Gandra S., Giske C.G., Goff D.A., Goossens H., Gottlieb T., Blanco M.G., Hryniewicz W., Kattula D., Jinks T., Skanj S.S., Kerr L., Kieny M.-P., Kim Y.S., Kozlov R.S., Labarca J., Laxminarayan R., Leder K., Leibovici L., Levy-Hara G., Littman J., Malhotra-Kumar S., Manchanda V., Moja L., Ndoye B., Pan A., Paterson D.L., Paul M., Qiu H., Ramon-Pardo P., Rodriguez-Baño J., Sanguinetti M., Sengupta S., Sharland M., Si-Mehand M., Silver L.L., Song W., Steinbakk M., Thomsen J., Thwaites G.E., van der Meer J.W.M., Vinh N.V., Vega S., Villegas M.V., Wechsler-Fördös A., Wertheim H.F.L., Wesangula E., Woodford N., Oyilmaz F.O., Zorzet A.* // *Lancet. Infect. Dis.* 2018. V. 18. P. 318–327.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
27. *Tacconelli E., Magrini N.* // *Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics.* Geneva: World Health Organization, 2018.
28. *Вишняков И.Е., Борхсениус С.Н.* // *Цитология.* 2007. Т. 49. С. 421–429. [*Vishnyakov I.E., Borchsenius S.N.* // *Cell Tissue Biol.* 2007. V. 1. P. 206–214.]
<https://doi.org/10.1134/S1990519X07030029>
29. *Сидоренко С.В., Тишков В.И.* // *Усп. биол. химии.* 2004. Т. 44. С. 263–306.
30. *Cummins L.L., Owens S.R., Risen L.M., Lesnik E.A., Freier S.M., McGee D., Guinasso C.J., Cook P.D.* // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. P. 2019–2024.
<https://doi.org/10.1093/nar/23.11.2019>
31. *Boutorine A.S., Venyaminova A.G., Repkova M.N., Sergeyeva Z.A., Pyshnyi D.V.* // *Biochimie.* 1994. V. 76. P. 23–32.
[https://doi.org/10.1016/0300-9084\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0300-9084(94)90059-0)
32. *Новопашина Д.С., Назаров А.С., Воробьева М.А., Купрюшкин М.С., Давыдова А.С., Ломзов А.А., Пышный Д.В., Альтман С., Веньяминова А.Г.* // *Мол. биология.* 2018. Т. 52. С. 1045–1054. [*Novopashina D.S., Nazarov A.S., Vorobjeva M.A., Kuprushkin M.S., Davydova A.S., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Altman S., Venyaminova A.G.* // *Mol. Biol.* 2018. V. 52. P. 905–912.]
<https://doi.org/10.1134/S0026893318060134>

33. Jiang X., Sunkara N., Lu S., Liu F. // *Methods Mol. Biol.* 2014. V. 1103. P. 45–56.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-730-3_4
34. Perreault J.P., Altman S. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 226. P. 399–409.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90955-j](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90955-j)
35. Новопашина Д.С., Сinyaков А.Н., Рябинин В.А., Перруо Л., Жиованнанжели К., Веньяминова А.Г., Буторин А.С. // *Биоорг. химия.* 2013. Т. 39. С. 159–174. [*Novopashina D.S., Sinyakov A.N., Ryabinin V.A., Perrouault L., Giovannangeli C., Venyaminova A.G., Boutine A.S.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2013. V. 39. P. 138–152.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162013010081>
36. Guerrier-Takada C., Lumelsky N., Altman S. // *Science.* 1989. V. 246. P. 1578–1584.
<https://doi.org/10.1126/science.2480641>
37. Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N., Altman S. // *Cell.* 1983. V. 35. P. 849–857.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90117-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90117-4)

Conjugates of Guiding RNase P Oligonucleotides with Oligo(*N*-Methylpyrrole) as Prospective Antibacterial Agents

N. A. Danilin*, **, A. L. Matveev**, N. V. Tikunova**,
 A. G. Venyaminova**, and D. S. Novopashina*, **, #

#Phone: +7 (383) 363-51-29; fax: +7 (383) 363-51-53; e-mail: danov@niboch.nsc.ru

*Novosibirsk State University, ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090 Russia

**Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

The conjugates of guiding RNase P oligo(2'-*O*-methylribonucleotides) and oligodeoxyribonucleotides (EGS-oligonucleotides) with oligo(*N*-methylpyrrole) were synthesized for the first time. The ability of RNase P to hydrolyze RNA in the presence of EGS-oligonucleotides and their conjugates with oligo(*N*-methylpyrrole) was demonstrated in model systems using fluorescein labelled chemically synthesized oligoribonucleotides corresponded to the fragments of mRNA of *ftsZ* and *gyrA* genes of *Acinetobacter baumannii*. It has been shown that hydrolysis of RNA by RNase P occurs more effective in the presence of the conjugates than in the case of non-modified oligodeoxyribonucleotides. Introduction of oligo(*N*-methylpyrrole) in EGS-oligo(2'-*O*-methylribonucleotides) does not change significantly the effectiveness of hydrolysis. The enhancement of penetration ability as the result of oligo(*N*-methylpyrrole) attachment to 5'-terminus was demonstrated.

Keywords: oligo(2'-*O*-methylribonucleotides), bacterial RNase P, EGS-oligonucleotides, oligo(*N*-methylpyrrole)