

УДК 616.006+577.155+576.343

БИОХИМИЯ

Л. Ю. ДЕДЕРЕР, Г. В. КУКУШКИНА, Л. Б. ГОРБАЧЕВА

**НАРУШЕНИЕ СИНТЕЗА И ПРОЦЕССИНГА РНК В КЛЕТКАХ
АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА И ЛЕЙКОЗА
L1210 N-МЕТИЛ-N-НИТРОЗОМОЧЕВИНОЙ**

(Представлено академиком А. А. Баевым 24 XII 1974)

Противоопухолева активность ряда N-алкил-N-нитрозомочевин установлена на широком спектре экспериментальных опухолей, и в настоящее время такие препараты, как N-метил-N-нитрозомочевина (МНМ), 1,3-бис-(2-хлорэтил)-4-нитрозомочевина (БХНМ) и 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-4-нитрозомочевина (ЦГНМ) успешно применяются для лечения больших различными формами рака (1-4).

Ранее в опытах *in vivo* и *in vitro* было показано, что МНМ тормозит синтез ДНК и непосредственно повреждает аппарат трансляции (5-7). Введение МНМ животным-опухоленосителям в малых дозах вызывает существенную активацию синтеза РНК; при увеличении дозы вводимого препарата отмечается глубокое торможение синтеза рРНК и тРНК (5, 8, 9). Наблюдаемые изменения могут быть обусловлены нарушениями синтеза предшественников рРНК и мРНК или же повреждением их последующего процессинга в рРНК и мРНК.

Цель настоящей работы — изучение нарушений синтеза и процессинга РНК в клетках асцитной карциномы Эрлиха (а.к.Э) и лейкоза L1210 *in vivo* и *in vitro* при воздействии МНМ.

Таблица 1

Торможение синтеза РНК в опухолевых клетках при введении МНМ мышам с лейкозом L1210

Фракции РНК	Включение, имп/мин на 1 мг РНК		% к контролю
	контроль	опыт	
пре-рРНК	1465	580	39,5
про-мРНК	7055	1970	27,9
рРНК	4772	1006	21,0
мРНК	5600	1400	25,0
тРНК	5950	3250	54,6

Примечание. Приведенные значения — средние 4 опытов.

Методы выделения РНК-полимеразы и условия РНК-полимеразной реакции описаны ранее (10). Опыты *in vivo* были поставлены на мышах ВDF₁ с лейкозом L1210 весом 18—20 г на 7-й день после прививки 5·10⁵ клеток L1210. МНМ растворялась в 0,9%-ном NaCl непосредственно перед внутрибрюшинным введением в терапевтической дозе однократно 80 мг/кг: 2-¹⁴C-оротовая кислота вводилась по 4 мкС на 1 мыш, актиномицин D вводился в дозе 1,5 мкг/мыш. Животным вводили МНМ или 0,9%-ный NaCl, через 10 мин. — 2-¹⁴C-оротовую кислоту и через 10 или 120 мин. мышей забивали; в некоторых опытах непосредственно перед введением МНМ вводили актиномицин D. ДНК выделяли по Мармuru (11), фракции

РНК выделяли методом термического фракционирования фенолом ⁽¹²⁾. Содержание белка в пробах определяли по Лоури, а РНК — спектрофотометрически по Спириу ⁽¹³⁾.

В табл. 1 представлены результаты опытов по торможению синтеза рРНК и мРНК в клетках лейкоза L1210 после однократного введения МНМ. Введение МНМ в терапевтической дозе мышам-опухоленосителям вызывает глубокое торможение синтеза предшественников рРНК и мРНК и 20% ингибирование процессинга про-РНК в РНК.

Таблица 2

Торможение синтеза РНК-продукта рифампицином AF/05 и МНМ

Состав проб	Включение ¹⁴ C-ЦМФ в пмоц. за 15 мин. на 1 мг белка	% к контролю
Полная проба с нативной ДНК	200	100
+рифампицин AF/05 (20 мкг/мл)	200	100
+рифампицин AF/05 (50 мкг/мл)	108	54,0
+рифампицин AF/05 (100 мкг/мл)	44,5	22,3
+МНМ (100 мкг/мл)	128	64,0
+рифампицин AF/05 (50 мкг/мл) + +МНМ (100 мкг/мл)	114	57,0

Примечание. Приведенные значения — средние из 3 опытов.

Недавно было показано, что близкие по структуре N-алкил-N-нитрозомочевины, такие как БХНМ и ЦГНМ, существенно различаются по характеру воздействия на синтез ядерных РНК и на их процессинг в культуре клеток HeLa и L1210 ^(14, 15): БХНМ практически не действует на синтез про-рРНК и про-мРНК в ядре, значительно ингибируя их процессинг; ЦГНМ ингибирует синтез пре-рРНК в ядрышке и процессинг в рРНК, не влияя на синтез про-мРНК.

Таким образом, МНМ *in vivo*, в отличие от БХНМ и ЦГНМ, ингибирует синтез про-мРНК и, так же как и ЦГНМ, тормозит синтез и процессинг рРНК.

Отмечая существенное нарушение процессинга в опухолевых клетках при воздействии БХНМ и ЦГНМ, Капп и др. ⁽¹⁵⁾ считают, что эффект не коррелирует с противоопухолевой активностью этих препаратов, так как МНМ, которая в опытах на культуре клеток не влияла на процессинг пре-рРНК, тем не менее обладает высокой противоопухолевой активностью. В отличие от опытов на культуре лейкозных клеток, нами *in vivo* на мышах с лейкозом L1210 получено 20% торможение процессинга пре-рРНК.

Приведенные данные позволяют предположить, что существует определенное соответствие между противоопухолевой активностью N-алкил-N-нитрозомочевин и ингибированием процессинга, так как МНМ обладает значительно меньшей противоопухолевой эффективностью по сравнению с БХНМ и ЦГНМ в отношении лейкоза L1210 ^(2, 16).

Ранее была разработана и охарактеризована система ДНК-зависимого синтеза РНК и было показано, что МНМ непосредственно действует на фермент РНК-полимеразу и ингибирует образование комплекса ДНК — фермент и инициацию транскрипции ⁽¹⁰⁾. Об ингибировании инициации свидетельствуют также и опыты, представленные в табл. 2.

Как известно, некоторые производные рифампицина, такие как рифампицин AF/05, AF/013 и AF/021, ингибируют транскрипцию у эукариотов на стадии инициации ⁽¹⁷⁾. Добавление МНМ к инкубационной среде, содержащей рифампицин AF/05, не усиливает его ингибирующий эффект.

N-алкил-*N*-нитрозомочевины, в отличие от классических алкилирующих агентов, способны не только алкилировать, но и карбомоилировать белки, и, может быть, как раз с этим связано их инактивирующее действие на фермент РНК-полимеразу. Изоцианаты (продукты разложения БХНМ) карбомоилируют белки клеток лейкоза L1210 (18).

Таблица 3

Влияние KNCО (100 мкг/мл) на активность РНК-полимеразы а.к.Э.

Состав проб	Включение ¹⁴ C-УМФ в п. мол. за 15 мин. на 1 мг белка	% к контролю
Полная проба с нативной ДНК	190	100
+ KNCО	170	89,5
Преинкубация ДНК с KNCО, 10 мин.	168	88,4
Преинкубация РНК-полимеразы с KNCО, 10 мин.	152	80,0
ДНК + РНК-полимераза, преинкубация 5 мин., затем добавлен KNCО	199	105,0

Примечание. Приведенные значения — средние 4 опытов.

В табл. 3 приведены результаты опытов по ингибированию калиевой солью изоциановой кислоты — промежуточным продуктом разложения МНМ — синтеза РНК в РНК-полимеразной реакции.

Преинкубация фермента с KNCО приводит к 20% торможению синтеза рРНК. Добавление KNCО в инкубационную смесь после образования комплекса ДНК — фермент не вызывает никакого эффекта. Изоцианаты легко реагируют с аминок группами белков с образованием наиболее стабильных карбомоилированных производных (10). Можно предположить, что взаимодействие МНМ с аминок группами РНК-полимеразы вносит определенный вклад в торможение синтеза РНК-продукта. Следует иметь в виду, что торможение синтеза РНК *in vivo* может быть обусловлено ингибированием синтеза фермента РНК-полимеразы, так как МНМ непосредственно повреждает аппарат трансляции, воздействуя как на полирибосомы, так и на растворимые факторы клеточного сока (6). С другой стороны, в отличие от опытов *in vitro* (10), при введении МНМ мышам-опухоленосителям с а.к.Э. активность ДНК-матрицы в РНК-полимеразной системе заметно уменьшается: уже через 1 час после введения МНМ в дозе 80 мг/кг синтез РНК-продукта тормозится на 30%. Обращает на себя внимание также более глубокое торможение (до 80%) синтеза предшественников рРНК и мРНК *in vivo* в опытах на мышах с лейкозом L1210 (табл. 1) и с а.к.Э. (5) по сравнению с *in vitro*. В РНК-полимеразной системе ингибирование синтеза про-рРНК никогда не превышало 40% (табл. 2). Неадекватность эффектов может быть связана частично с воздействием МНМ на процессинг про-рРНК, который не учитывается в РНК-полимеразной реакции, а также с возможным влиянием этого препарата *in vivo* на синтез белковых регуляторных факторов транскрипции.

Авторы выражают благодарность академику Н. М. Эмануэлю за внимание и интерес к работе.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
20 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. М. Эмануэль, Е. М. Вермель и др., ДАН, т. 163, 483 (1965). ² F. M. Schabel jr., T. P. Johnston et al., Cancer Res., v. 23, 725 (1963). ³ N. M. Emanuel, E. M. Vermel et al., Cancer Chemother. Rep., v. 58, 135 (1974). ⁴ S. K. Carter, J. W. Newman, Cancer Chemother. Rep., Part 3, v. 1, 115 (1968). ⁵ L. B. Gorbacheva, G. V. Kukushkina, Biochem. Pharm., v. 19, 1561 (1970). ⁶ M. I. Lerman, O. Yu. Abakimova et al., Cancer Res., v. 34, 1536 (1974). ⁷ P. Kleihus, P. N. Magee, Biochem. J., v. 146, 303 (1973). ⁸ G. R. Gale, Biochem. J., v. 14, 1707 (1965). ⁹ G. P. Wheeler, B. J. Bowdon, Cancer Res., v. 25, 1770 (1965). ¹⁰ L. B. Gorbacheva, L. G. Mitskevich, G. V. Kukushkina, Studia Biophys., v. 31/32, 437 (1972). ¹¹ J. A. Marmur, J. Mol. Biol., v. 3, 208 (1961). ¹² М. И. Лерман, В. Л. Мангьева, Г. П. Георгиев, Биохимия, т. 29, 518 (1964). ¹³ А. С. Спирун, Биохимия, т. 23, 656 (1958). ¹⁴ H. T. Abelson, D. Kaplan, S. Penman, Biochim. et biophys. acta, v. 349, 389 (1974). ¹⁵ H. E. Kann jr., K. W. Kohn et al., Cancer Res., v. 34, 1982 (1974). ¹⁶ А. Голдин, Матер. II совместного советско-американского совещания по химиотерапии опухолей, М., 1974. ¹⁷ M. Meilhac, Z. Tysper, P. Chambon, Europ. J. Biochem., v. 28, 291 (1972). ¹⁸ C. J. Cheng, S. Fujimura et al., Cancer Res., v. 32, 22 (1972). ¹⁹ G. R. Stark, J. Biol. Chem., v. 239, 1411 (1964).