

**ВПЛИВ АМІТОЗИНУ ТА РЯДУ АЛКАЛОЇДІВ ЧИСТОТІЛУ НА
ТРАНСКРИПЦІЮ *in vitro*.**

Шестакова Т.С., Порубльова Л.В., Пальчиковська Л.Г., Потопальський А.І.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ

e-mail: polary_3@mail.ru

Амітозин, ефективний протипухлинний препарат, є продуктом алкілювання алкалоїдів чистотілу тіофосфамідом (тіотефом). Амітозин проявляє антимітотичну активність подібну алкалоїдам чистотілу, але його протипухлинна дія перевищує сумарний ефект від дії алкалоїдів чистотілу та тіотефу, має більшу специфічність і меншу токсичність [1, 2]. В терапевтичних дозах він вибірково накопичується в ракових клітинах, що в кінцевому рахунку призводить до їхньої загибелі. Проте, структурні характеристики препарату амітозину, як і механізм його дії, до сьогодні ще не досить вивчені.

Так само, як і алкілюючий агент тіотеф, амітозин інгібує біосинтез нуклеїнових кислот [1]. У зв'язку з цим нами було досліджено вплив амітозину та найбільш відомих алкалоїдів чистотілу на процес транскрипції *in vitro*.

ДНК-залежна РНК-полімераза (РНКП) бактеріофагу Т7 на відміну від більшості відомих РНКП є односубодиничною і здатна здійснювати повний цикл транскрипції у відсутності додаткових білкових факторів [3]. Ці властивості ферменту роблять його досить зручною моделлю для дослідження як процесу транскрипції, так і впливу різних факторів, в тому числі і біологічно активних сполук на біосинтез РНК [3, 4]. Слід зазначити, що трьохмірна структура Т7 РНКП має значну подібність з структурами низки різних, і навіть еволюційно далеких ДНК-, РНК-полімераз та зворотніх транскриптаз [3, 5]. Просторові структури полімеризуючих доменів полімераз різних класів досить схожі і, більш того, при відсутності явної гомології у первинній структурі, мають два консервативні мотиви, які є у всіх без винятку ДНК- і РНК-полімеразах [3].

Таким чином, дані щодо впливу біологічно активних речовин на процес транскрипції *in vitro* у безклітинній системі з залученням ДНК-залежної РНК-полімерази бактеріофага Т7 можна у певній мірі екстраполювати і на інші ферменти з подібним типом реакцій, тобто утворення дієфірного зв'язку між 5'-фосфатом рНТФ або дНТФ та 3'-гідроксилем кінцевого нуклеотиду РНК або ДНК продукту [3, 5].

Досліджувані речовини тестувались у концентрації 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Електрофореграма (рис.1), де представлено синтезовані РНК-продукти, ілюструє вплив алкалоїдів та амітозину на процес транскрипції *in vitro* з залученням ДНК-залежної РНК-полімерази бактеріофага Т7. Як видно, гідрохлорид сангвінаріну (1) повністю пригнічує тотальний синтез РНК.

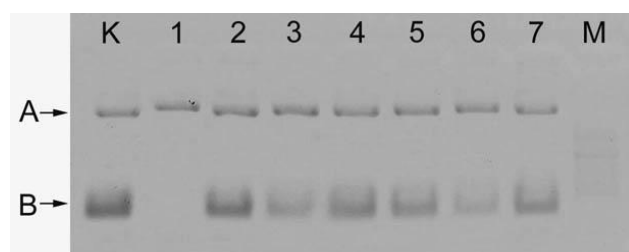


Рис.1. Пригнічення *in vitro* синтезу РНК алкалоїдами чистотілу та амітозину. А –ДНК-матриця; В – синтезована РНК. Алкалоїди і амітозин застосовувались в концентрації 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. К - контроль; 1 – сангвінаріну хлорид; 2 – хелідоніну гідрохлорид; 3 – берберину хлорид; 4 – трибетамід; 5 – амітозин I; 6 – амітозин II; 7 – тіотеф; М – маркер.

Амітозин I, тіотеф, берберину хлорид та амітозин II інгібують роботу Т7 РНК полімерази не повністю, але в значній мірі. Незначне інгібування спостерігалось у випадку хелідонін гідрохлориду та трибетаміду.

Як відомо, алкалоїди чистотілу – берберин і сангвінарін мають плоску багатоядерну ангулярну структуру і здатні інтеркалювати в ДНК[6, 7]. Причому, сангвінарін цілком інтеркалює в ДНК і міцно з нею зв'язується [7], тоді як берберин однією частиною молекули взаємодіє з ДНК, а інша її частина здатна до взаємодії з білком [6, 8]. Цілковите інгібування транскрипції сангвінарином, можливо, є наслідком його інтеркаляції в ДНК-матрицю, про що свідчить також помітна зміна її рухливості - смуга на доріжці 1 розташована вище ніж на інших доріжках. Така взаємодія алкалоїду сангвінаріну з ДНК-матрицею унеможливує утворення продуктивного комплексу ДНК – фермент. Дещо слабшим інгібітором РНК полімерази є

берберину хлорид, який, на відміну від сангвінаруну, гірше зв'язується з ДНК і тільки частково інтеркалюється в неї [7].

Таким чином, в наших дослідженнях спостерігалася певна кореляція між рівнем пригнічення алкалоїдами чистотілу і амітозином процесу транскрипції та їхньою здатністю до взаємодії з ДНК. Амітозин, який є продуктом алкілування суміші алкалоїдів, слабше пригнічує синтез РНК, ніж мінорний алкалоїд чистотілу сангвінарин, але сильніше, ніж один з головних його алкалоїдів - хелідонін. Скоріше всього, вклад в таку активність амітозину вносить не тільки відносний вміст алкалоїдів, але й алкілування останніх, що змінює їхній характер взаємодії з ДНК.

Подальші дослідження стосуються більш чіткого з'ясування взаємодії алкалоїдів амітозину як з ДНК, так і ферментом та залежності пригнічення синтезу РНК від концентрації інгібіторів.

1. *Потопальський А.И.* Препарати чистотела в биологии и медицине // Киев: Наукова думка, 1992. – 240 с.
2. *Потопальський А.И., Петличная Л.И., Ивасивка С.В.* Барбарис и его препараты в биологии и медицине // Киев: Наукова думка, 1989. – С. 155-160.
3. *Туницкая В.Л., Кочетков С.Н.* Структурно-функциональный анализ РНК-полимеразы бактериофага Т7. // Биохимия . – 2002. – Т 67, вып. 10. – С.1360-1373.
4. *Пальчиковська Л.Г., Платонов М.О., Алексеева І.В., Швед А.Д.* Композитні біорегулятори на основі похідних феназин-1-карбонової кислоти і триазинів. Синтез та структурні характеристики // Біополімери і клітина. – 2003. – **19**. – С. 281-286.
5. *Sousa R., Chung J.J., Rose J.H., Wang B.-C.* Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution // Nature. - 1993. – **364**. – P.593-595.

6. Davidson M.W., Lopp I., Alexander S., Wilson W.D. The interaction of plant alkaloids with DNA. II. Berberinium chloride // *Nucleic Acids Res.* – 1977. – **4**. - P. 2697-2712.
7. Saran A., Srivastava S., Coutinho E., Maiti M. ¹H NMR investigation of the interaction of berberine and sanguinarine with DNA // *Indian. J. Biochem. Biophys.* – 1995. – **32**. - P.74-77.
8. Li T.K., Bathory E., LaVoie E.J., Srinivasan A.R., Olson W.K., Sauers R.R., Liu L.F., Pilch D.S. Human topoisomerase I poisoning by protoberberines: potential roles for both drug-DNA and drug-enzyme interactions // *Biochemistry.* – 2000. – **39**. – P. 7107-7116.