

Л. В. Патер, В. А. Хрипунов, Г. Б. Квітницька,
В. І. Прима, М. Ю. Оболенська, О. М. Платонов

ЕКСПРЕСІЯ ПРОТООНКОВИХ ГЕНІВ *c-myc* І *c-fos* ПРОТЯГОМ ПЕРШОГО КЛІТИННОГО ЦИКЛУ В РЕГЕНЕРУЮЧІЙ ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ

*Методами гібридизації визначено відносну кількість транскриптів протоонкогенів *c-myc* і *c-fos* в ядерній РНК та полі(А)⁺-РНК цитоплазми гепатоцитів протягом 37 год. після часткової гепатектомії. В ядрі зміни концентрації мРНК для *c-myc* і *c-fos* відбуваються в однаковій послідовності, а в цитоплазмі — зміни мРНК *c-myc* випереджують такі для *c-fos*.*

Характер подібних змін вказує на те, що експресія обох протоонкогенів регулюється як на транскрипційному, так і на посттранскрипційному рівнях.

Вступ. Відомо, що протоонкогени *c-fos* і *c-myc* належать до генів ядерних білків, що діють як фактори транскрипції, та мають відношення до клітинної проліферації, диференціації, неоплазії [1, 2].

Експресія генів *c-fos* і *c-myc* вивчалась на різноманітних клітинах. Найбільший рівень мРНК-транскриптів спостерігали в клітинах, що переходять зі стану спокою до поділу у першій половині G1-періоду [1]. Дані щодо експресії цих протоонкогенів протягом подальшого проходження клітинами свого циклу малочисельні і неповні, а також подаються для різних тварин.

Наше дослідження характеризує зміни рівня РНК-транскриптів в ядерній і цитоплазматичній РНК за час всього клітинного циклу у щурів лінії «Wistar». Як модель масового входу клітин до циклу використовували гепатоцити, стимульовані до поділу частковою гепатектомією.

Значення даної роботи полягає ще й в тому, що вона дозволяє зафіксувати непрямым шляхом посттранскрипційну регуляцію експресії цих генів (а саме: ядерний процесінг, транспорт через мембрану, ядерну деградацію), які й досі недостатньо відомі. Існуючі роботи проведені на ядрах клітин на основі методу «run-on»-транскрипції, що дозволяє вивчити регуляцію експресії генів на рівні лише власне транскрипції і відмітити такі особливості цього процесу, як ініціація, елонгація. Наші дослідження змісту РНК-транскриптів в ядрі і цитоплазмі клітин в якійсь мірі сумують процеси власне транскрипції з посттранскрипційними змінами, що відбуваються в ядрі і цитоплазмі.

Матеріали і методи. Для роботи використовували білих щурів лінії «Wistar», самців, віком 4—5 місяців.

Вхід гепатоцитів до клітинного циклу забезпечували шляхом часткової гепатектомії (ЧГЕ) — видаленням 2/3 печінки [3]. Ушкоджена печінка щурів зазнає регенерації до повного відновлення маси органа. З контрольної печінки тварин і регенеруючої, що відповідає різним термінам регенерації (15, 30 хв; 1, 3, 6, 12, 15, 18, 20, 23, 29, 32 та 37 год.), виділяли ядерну і цитоплазматичну РНК. Як контроль використовували несправжньооперованих тварин та неушкоджених тварин (норма). РНК виділяли гуанідин-ізоціанатним методом з запропонованими нами раніше модифікаціями [4]. Цитоплазматичну РНК пропускали через колонку з oligo(dT)-целюлозою для відокремлення полі(А)⁺-мРНК [5].

Одержані ядерну і матричну РНК після електрофоретичного розділення та вакуумного переносу на нейлонові фільтри [4] аналізували методами Нозерн-блот- та дот-блот-гібридизації [5]. Як зонди для гібридизації використовували *Pst*I-фрагмент онкогена *v-fos* (1,1 тис. п. н.) та *Xba*I-*Sac*I-фрагмент протоонкогена *c-myc* миші (1,0 тис. п. н.), люб'язно надані П. М. Чумаковим (ІМБ РАН).

Отримані радіоавтографи аналізували денситометруванням на лазерному денситометрі («ЛКВ Ultrosan XL», Швеція).

Для повторної гібридизації з іншим зондом фільтри повністю відмивали від радіоактивності в двох змінах дистильованої води по 2 хв.

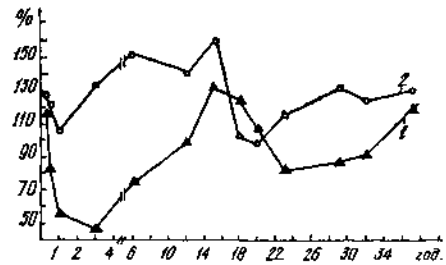


Рис. 1. Інтенсивність гібридизації ядерної РНК з ^{32}P -міченими *c-fos* (1) і *c-myc* (2) зондами в залежності від терміну регенерації. (Почорніння півки радіоавтографів в % до норми)

Рис. 2. Інтенсивність гібридизації цитоплазматичної полі(А)⁺-РНК ^{32}P -міченими *c-fos* (1) і *c-myc* (2) зондами в залежності від терміну регенерації. (Почорніння півки радіоавтографів в % до норми)

при 90 °С. Наведені на графіках дані є середніми з кількох серій вимірювань.

Результати і обговорення. Одне з завдань нашого дослідження — виявлення характеру «взаемовідносин» між двома ядерними протоонкогенами. Генотипна відповідь клітин печінки на гепатектомію і несправжню операцію на першу годину після її проведення для *c-fos*- і *c-myc*-генів схожа.

Очевидно, больовий шок викликає посилену експресію цих генів у перші 30 хв. після операційного втручання.

Для гена *c-fos* у ядерній РНК вже на 15-й хв. спостерігали підвищення рівня мРНК-транскриптів на 20 % з поступовим поверненням до норми на 1-шу год. після ЧГЕ. Рівень *c-myc*-транскриптів досягає максимуму на 30-й хв., але теж знижується через годину після ЧГЕ (рис. 1).

Подальші зміни в рівні транскриптів протоонкогенів характерні для G1-періоду, що триває, за літературними даними, 12 год. [6].

На 1-й год. після операції відбуваються такі зміни в організмі, що спричиняють перехід клітин до стану компетентності, тобто клітини, які перебували в стані спокою протягом тривалого часу, набувають здатності просуватися по клітинному циклу [1, 7].

Рівень *c-fos*-транскриптів у ядрі, що повернувся до норми через 1 год., підвищується через 3 год., і знову спадає трохи нижче норми. У період з 6-ї по 15-ту год. зафіксовано незначні коливання (майже сталий рівень) у ядерній РНК. Зважаючи на наведені далі різкі зміни концентрації *c-fos* в цитоплазмі, відсутність різних коливань у рівні *c-fos* ядерної РНК можна характеризувати як переважну регуляцію експресії на посттранскрипційному рівні. Скоріш за все, це регуляція тривалості існування мРНК-транскриптів через їх швидку деградацію або ж протилежний процес — підвищення стабільності РНК-транскриптів.

Кількість *c-myc*-транскриптів в ядерній РНК теж характеризується піком на 3-й год. регенерації і подальшим сталим рівнем близько норми протягом G1-періоду.

Несправжня операція в G1-періоді не викликає ніяких коливань у ядерній РНК для *c-fos*- і *c-myc*-транскриптів (даних не наведено).

У цитоплазмі регенеруючої печінки відбувається збільшення у складі мРНК *c-myc*-транскриптів на 3-й і 6-й год., а в кінці G1-періоду — зниження (рис. 2).

Зміни кількості полі(А)⁺-транскриптів *c-myc* у цитоплазмі носять випереджаючий характер по відношенню до *c-fos*. Тоді як на 3-й год кількість мРНК *c-myc* досягає майже максимального значення, мРНК *c-fos* — мінімального. Після 6 год. регенерації експресія *c-myc* починає спадати, *c-fos* — зростати.

Таким чином, протягом G1-періоду для мРНК *c-myc* типові значні зміни на посттранскрипційному рівні. На 6-й год. спостерігається підвищення їх концентрації в цитоплазмі до 150 % від норми у так званій точці V (входу), коли клітина, що перетинає цю точку, вже не може бути зупиненою в G1/S-переході клітинного циклу [1]. Кількість мРНК *c-fos* лише починає зростати в цитоплазмі у цей строк регенерації.

Суттєві зміни в ядерній і цитоплазматичній РНК відбуваються для транскриптів *c-fos* і *c-myc* також в S-фазі і далі. S-фаза клітинного циклу має пік на 23-й год. (середина S-фази), що показано за включенням радіоактивного тимідину та підвищеною експресією топоізомери [1, 6, 7].

У ядерній РНК максимальні значення кількості транскриптів з *c-fos* припадають на 18—24-ту год., тобто на середину S-фази, а далі знижуються. Експресія *c-myc* здійснюється аналогічно. У цитоплазмі в цей період, як і в попередній, коливання експресії *c-fos*- і *c-myc*-генів відбуваються зі зсувом. Але на термін 37 год. знову припадає підвищення експресії обох генів. Скоріше за все — це новий G1-період майбутнього клітинного циклу.

Логічно припустити, що у відповідь на ЧГЕ організм щурів відповідає поєднанням двох процесів: заживленням травм, спричинених хірургічним втручанням, і регенерацією печінки, яка зумовлена необхідністю відновлення маси органу для виконання його функції.

Для розділення ефекту процесів, які мають відношення до заживлення травм і власне росту, ми використовували регенеруючу печінку щурів і печінку тварин, які перенесли несправжню операцію, для контролю брали печінку нормальних тварин.

Внаслідок хірургічного втручання як при регенерації, так і несправжній операції спостерігається миттєве включення геному. В обох випадках і в ядерній, і в цитоплазматичній РНК ця реакція однакова. Вона характеризується різким підвищенням рівня мРНК протоонкогенів відразу після операції і зниженням до норми або й нижче норми через годину після операції.

Далі, у випадку регенерації, протягом перших 6 год. після операції змінюється кількість мРНК-транскриптів. При несправжній операції вона залишається майже на одному рівні, що свідчить про специфічність цих процесів для клітин, стимульованих до поділу.

Характер регуляції експресії геному у генів *c-fos* і *c-myc* схожий у ядрі. Йому властиві підйом на 3-й год. регенерації і наступне збереження концентрації РНК протоонкогенів на одному рівні протягом 12 год. Як було показано раніше, саме на 3-й год. після ЧГЕ відбувається різке зменшення активності основної маси геному гелатоцитів і за рахунок цього посилення експресії найважливіших в цей період генів [8, 9]. Транскрипти протоонкогенів проникають у цитоплазму з різною швидкістю. *c-myc* мРНК з'являється в цитоплазмі першою, і на 3-й год. її кількість вже починає збільшуватися; рівень *c-fos* мРНК-транскриптів підвищується на 6-й год. регенерації. В період 1—3 год. після стимулювання до проліферації клітини набувають стану компетентності до G0/G1-переходу. Тому, на наш погляд, *c-myc* дає більший вклад в приведення клітини до цього стану. Максимум активності *c-myc*-протоонкогена припадає на 6-ту год. Це відповідає критичній точці G1/S-переходу, після чого вже неможлива зупинка клітини в стані спокою [1].

Загальна тенденція, характерна для двох генів,— це зростання їх активності протягом G1-періоду. Однак, якщо на кінець G1 рівень *c-myc* мРНК спадає, то *c-fos*, навпаки,— збільшується.

Найбільшого рівня експресія *c-myc* і *c-fos* досягає на початку S-фази. Протоонкоген *c-myc* більш чутливий до проходження гепатоцитів по клітинному циклу, і його мРНК в цитоплазмі знову дає невеликий пік на 29-й год. регенерації, що відповідає S/G2-переходу.

З початком нового клітинного циклу і його G1-періоду знову спостерігається зростання кількості мРНК обох генів.

Таким чином, ранні гени *c-fos* і *c-myc* безпосередньо забезпечують перехід клітини зі стану спокою G0 до поділу, проходження клітиною точки G1/S-переходу, ініціюють початок синтезу ДНК. Аналіз зміни рівня мРНК показує, що «траєкторія» *c-fos* при проходженні клітинного циклу дещо відстає від такої *c-myc*. Відмінна картина зміни кількості транскриптів обох генів протягом клітинного циклу свідчить про те, що вони можуть відігравати різну роль в проходженні клітиною свого циклу через вплив на різні групи генів.

Роль посттранскрипційного рівня регуляції (а саме: ядерно-цитоплазматичного транспорту, тривалості життя мРНК протоонкогенів) на ранніх етапах регенерації більша, ніж регуляції на рівні процесів власне транскрипції і ядерного процесінгу. Одним з свідчень цього є те, що зростання кількості мРНК в цитоплазмі не відповідає підвищенню їх рівня в ядрі. Хоча на 6—12-й год. регенерації рівень *c-fos*- і *c-myc*-транскриптів у ядрі сталий, для цитоплазматичної мРНК характерне різке збільшення їх кількості, що можна пояснити посиленням транспорту з ядра або підвищенням стабільності цих молекул.

L. V. Pater, V. A. Chripunov, A. B. Kvitnitskaya,
V. I. Prima, M. Yu. Obolenskaya, O. M. Platonov

THE EXPRESSION OF PROTOONCOGENES C-MYC AND C-FOS DURING THE FIRST CELL CYCLE IN REGENERATING RAT LIVER

Summary

The relative amount of transcripts of protooncogenes *c-myc* and *c-fos* was detected by hybridization methods in nuclear RNA and poly(A)containing cytoplasmic RNA of hepatocytes during 37 hours after partial hepatectomy. The changes of mRNA concentrations are the same for *c-fos* and *c-myc* in the nucleus but are displaced to each other in the cytoplasm. The character of these changes indicate that regulation of expression of the two protooncogenes proceeds both on transcriptional and posttranscriptional levels.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Denhardt D. T., Edwards D. R., Parfett C. L. J. Gene expression during the mammalian cell cycle // Biochim. et biophys. acta.— 1986.— 865, N 1.— P. 83—125.
2. Hunter T. Cooperation between oncogenes // Cell.— 1991.— 64, N 2.— P. 249—270.
3. Higgins G. M., Anderson R. M. Experimental pathology of the liver. 1. Restoration of the liver of white rat following partial surgical removal // Arch. Pathol.— 1931.— 12, N 2.— P. 186—202.
4. Патер Л. В., Хрипунов В. А., Прима В. И. Модификация методов выделения РНК с гуанидинийтотиоцианатом и вакуумный перенос на мембраны улучшают возможности анализа высокополимерных транскриптов из клеток животных // Биополимеры и клетка.— 1991.— 7, N 1.— С. 70—75.
5. Маннатиус Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1985.
6. Grisham J. W. Morphological study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating liver: autoradiography with H-thymidine // Cancer Res.— 1962.— 22, N 5.— P. 842—849.
7. Епифанова О. И., Терских В. В. Покоящиеся клетки.— М.: Наука, 1983.— 176 с.
8. Прима В. И., Лищица Э. Г., Платонов О. М. Особенности транскрипции ядерного генома на ранних стадиях регенерации печени. Экспрессия фракций ДНК с различной частотой повторения последовательностей // Биохимия.— 1982.— 47, N 1.
9. Оболенская М. Ю., Прима В. И., Герасимова Т. Б., Платонов О. М. Частичное ограничение экспрессии генома — компонент перестройки его работы в регенерирующей печени млекопитающих // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 2.

Ін-т молекуляр. біології і генетики АН України, Київ

Одержано 23.11.93