

В. И. Прима, Т. А. Клочко, М. Ю. Оболенская, П. Л. Иванов,
А. П. Рысков, О. М. Платонов

СИНХРОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ *c-fos*- РНК И $B2^+$ мРНК_x В ПРЕРЕПЛИКАТИВНОМ ПЕРИОДЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ У КРЫС

*Исследовалась представленность РНК протоонкогена *c-fos* и мРНК, содержащей повтор $B2$ ($B2^+$ мРНК_x) в ядерной РНК и в цитоплазматической поли(А)⁺РНК клеток регенерирующей печени в период 0—12 ч после частичной гепатэктомии. Судя по результатам гибридизации ДНК—РНК, транскрипты *c-fos* сосредоточены в основном в ядре и концентрация их максимальна к 0,5 и 12 ч регенерации. Напротив, $B2^+$ мРНК_x сосредоточены в поли(А)⁺РНК цитоплазмы и в те же сроки имеет минимальную концентрацию. Различия в экспрессии исследованных генов могут определяться функциональными особенностями кодируемых ими продуктов.*

Цепь биологических событий начального периода регенерации печени приводит к массовому переходу ранее покоившихся клеток в состояние подготовки к делению. Одним из важных звеньев такой цепи является резкое повышение активности ряда генов, продукты которых существенны для перехода $G_0 \rightarrow G_1$, в частности, некоторых ядерных протоонкогенов [1]. Возможно, для этого используются клеточные ресурсы, сохраняемые за счет выключения части генов, кодирующих РНК, характерные для состояния покоя [2]. Как было показано ранее, в пререпликативном периоде регенерации, вызванной частичной гепатэктомией (ЧГЭ), ключевыми в изменении набора ядерных РНК являются моменты 0,5 и 3 ч после ЧГЭ [3]. Представлялось важным выяснить, каковы же слагаемые этого процесса на уровне индивидуальных РНК разного типа.

В настоящей работе сопоставлялись изменения концентраций РНК ядерного протоонкогена *c-fos* [4] и тканеспецифической $B2^+$ мРНК_x [5] в ядре и цитоплазме клеток печени после ЧГЭ. Оказалось, что различия не только локализации основной массы этих РНК, но и наиболее заметные изменения в их концентрациях разнонаправлены, хотя происходят одновременно. Один из моментов резкого изменения концентрации совпадает с ранее отмеченным ключевым сроком — 0,5 ч, другой находится около 12 ч после ЧГЭ.

В опытах использовали РНК, выделенные фенольным методом [3] из ядер или цитоплазмы клеток печени белых крыс в разные сроки периода, предшествующего началу репликации (0—12 ч после ЧГЭ). В качестве контроля служили препараты, выделенные из печени в те же сроки после ложной операции (ЛО). Степень нативности препаратов РНК проверяли с помощью гель-электрофореза по наличию высокомолекулярной РНК и полос рРНК. Поли(А)-содержащую РНК отделяли хроматографией на олиго(dT)-целлюлозе («Serva», ФРГ) [6]. В качестве зондов для гибридизации использовали *Pst*I-фрагмент онкогена *c-fos* (1 100 н. п.) в составе плазмиды *pGEM2*, любезно предоставленный П. А. Чумаковым, и *Pst*I-фрагмент кДНК $B2^+$ мРНК_x (300 н. п.) в составе *pUC19* [5], выделенной стандартным методом [6]. ³²P-меченую зондовую ДНК с удельной активностью порядка 10⁸ имп/(мкг × мин) получали в реакции ник-трансляции [6]. Дот-гибридизацию ДНК—РНК проводили с разным количеством РНК, зафиксированной на нейлоновых фильтрах («Amersham», Англия). Фильтры предгибридизовали в растворе: 50 % формамид, 750 мМ NaCl, 75 мМ цитрат Na, 0,2 % DS-Na, 0,1 % Na₄P₂O₇, 0,1 мг/мл гепарина при 42 °С в течение 1—2 ч. Гибридизацию вели в том же растворе, содержащем 10⁶—10⁷ имп/(мин·мл) меченного ³²P радиоактивного зонда ДНК, при 42 °С в течение 18—24 ч. От несвязавшейся радиоактивной метки фильтры отмывали при 42 °С в растворе 1 × SSC (150 мМ NaCl, 15 мМ цитрат Na) с 0,1 % DS-Na в течение 1 ч. Радиоавтографию проводили с усиливающим экраном ЭУ-В2 на пленке РМВ в течение 1—5 сут.

Пленки с радиоавтографами сканировали на лазерном денситометре («LKB Ultroscaп XL», Швеция). Для повторной гибридизации с другим зондом фильтры полностью отмывали от радиоактивности в двух сменах H₂O по 2 мин при 90 °С. Результаты гибридизации проверяли в серии аналогичных опытов с препаратами РНК из разных выделений.

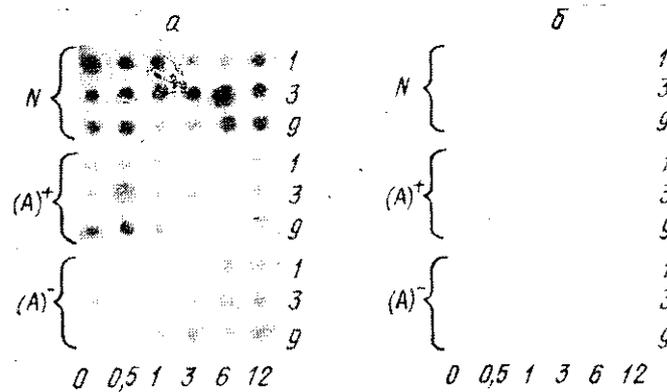


Рис. 1. Гибридизация РНК из регенерирующей (а) и ложнооперированной (б) печени с P³²-меченым α -*fos*-зондом. На фильтры нанесены: ядерная РНК (N), цитоплазматические поли(A)⁺-РНК и поли(A)⁻-РНК. По вертикали указано количество РНК в пятнах (мкг), по горизонтали — время после операции (ч)

Fig. 1. Hybridization of RNA from regenerating (a) and sham operated (b) liver with P³²-labelled α -*fos*-probe. The filters contain in dots: nuclear RNA (N), cytoplasmic poly(A)⁺RNA ((A)⁺) and poly(A)⁻RNA ((A)⁻). Vertical rows — different quantity of RNA, horizontal rows — different time after operation

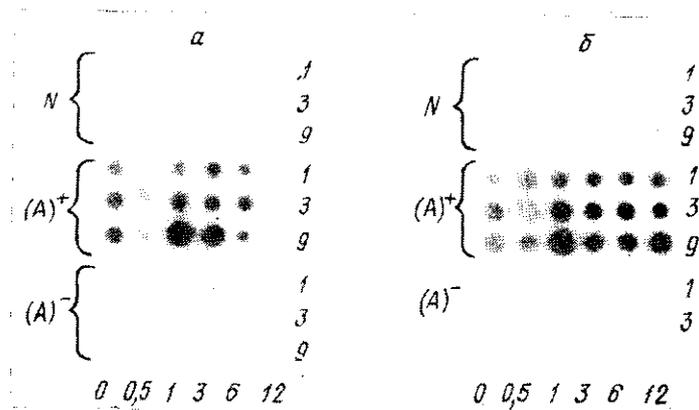


Рис. 2. Гибридизация РНК из регенерирующей (а) и ложнооперированной (б) печени с P³²-меченым B2-мРНК_x зондом. Обозначения, как на рис. 1

Fig. 2. Hybridization of RNA from regenerating (a) and sham operated (b) liver with P³²-labelled B2mRNA_x-probe. The designations (see Fig. 1)

Результаты дот-гибридизации с ³²P-меченым зондом, содержащим α -*fos* ДНК, представлены на рис. 1. Они свидетельствуют о том, что транскрипты с протоонкогена *c-fos* в течение всего изученного периода обнаруживаются в основном в ядрах гепатоцитов с максимальными концентрациями через 0,5 и 12 ч после ЧГЭ. ЛО не вызывает значительного изменения уровня *fos*-транскриптов в клетке. Эти данные близки к приведенным в работе [7].

В известном смысле противоположные результаты были получены при гибридизации РНК с ³²P-меченым зондом, содержащим структурную (т. е. лишённую повтора В2) часть кДНК к B2⁺мРНК_x [5]. Для наглядности сравнения на рис. 2 представлены радиоавтографы тех же

фильтров, которые гибридизовались с зондом *c-fos* (рис. 1) и после полной отмывки от радиоактивности в H_2O регибридизовались с зондом, комплементарным $B2^+mRNA_x$. Как следует из рис. 2, данная РНК в регенерирующей печени, как и после ЛО, представлена в основном полиаденилированными молекулами цитоплазмы. Но в отличие от ЛО ЧГЭ вызывает модуляцию сигнала во времени — максимум гибридизации приходится на 1—3 ч после ЧГЭ с явными спадами через 0,5 и 12 ч после ЧГЭ.

Оптическая плотность радиоавтографов РНК из регенерирующей печени (средние из трех измерений, в % к норме)

The optical density of autoradiographs over the dots containing RNAs from regenerating liver (averaged on the 3 measurements, in % of normal)

Тип РНК	Время после ЧГЭ, ч					
	0 (норма)	0,5	1	3	6	12
<i>c-fos</i>						
Ядерная	100±21	127±11	93±19	86±12	116±24	136±7
Поли(А) ⁺ цитоплазматическая	100±17	193±17	95±9	84±14	71±11	116±9
кДНК к $B2^+mRNA_x$						
Ядерная	100±23	85±17	147±16	127±18	149±17	67±3
Поли(А) ⁺ цитоплазматическая	100±5	32±6	86±14	87±9	51±9	16±2

Результаты денситометрии радиоавтографов для фильтров с РНК из регенерирующей печени представлены в таблице.

Известно, что РНК, считанная с протоонкогена *c-fos*, накапливается в клетках эмбриональных тканей [8], а белок *c-fos* является регулятором транскрипции многих генов в клетках, стимулированных к делению [9]. С другой стороны, $B2^+mRNA_x$ является тканеспецифической РНК, наблюдаемой только в печени и почках грызунов. Попытки обнаружить ее в поли(А)⁺мРНК широкого набора изучавшихся опухолей (в том числе гепатомы) не дали результата [10]. Таким образом, в раннем периоде регенерации печени, предшествующем репликации, наблюдаются значительные изменения активности генов, продукты которых считаются характерными или для делящихся, или для высокоспециализированных интактных клеток, причем величины сигналов для них колеблются в противофазе. Существует ли причинная связь между этими процессами и каковы в таком случае механизмы их координации, еще подлежит выяснению.

SYNCHRONOUS CHANGES OF C-FOS RNA AND $B2^+mRNA_x$ CONCENTRATIONS DURING PREREPLICATIVE PERIOD IN REGENERATING RAT LIVER

V. I. Prima, T. A. Clochko, M. Yu. Obolenskaya, P. L. Ivanov,
A. P. Ryskov, O. M. Platonov

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev;
Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

The relative abundance of *c-fos* RNA and mRNA containing repetitive sequence $B2^+$ ($B2^+mRNA_x$) has been studied in nuclear and poly(A)⁺ cytoplasmic RNA of regenerating liver during 0-12 h after partial hepatectomy. The data of DNA-RNA hybridization reveal that *c-fos* transcripts are mainly localized in nucleus and their relative abundance is maximal 0.5 and 1.2 h after operation. On the contrary $B2^+mRNA_x$ is mainly local-

zed in poly(A)⁺ cytoplasmic RNA and its concentration is the lowest in the same periods after operation. The differences in the investigated gene expression are possibly connected with functional peculiarities of terminal products of both genes.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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. Частичное ограничение экспрессии генома — компонент перестройки его работы в регенерирующей печени млекопитающих / М. Ю. Оболенская, В. И. Прима, Т. Б. Герасимова, О. М. Платонов // *Биополимеры и клетка.*—1989.—5, № 2.—С. 79—88.
3. Ядерные РНК на раннем этапе регенерации печени / М. Ю. Оболенская, В. И. Прима, И. А. Куликовская, О. М. Платонов // Там же.—1987.—3, № 1.—С. 27—35.
4. *FBI* murine osteosarcoma virus; identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA / T. Curran, G. Peters, C. Van Beveren et al. // *J. Virol.*—1982.—44, N 2.—P. 674—682.
5. Mouse ubiquitous B2 repeat in polysomal and cytoplasmic poly(A)⁺ RNAs: unidirectional orientation and 3'-end localization / A. P. Ryskov, P. L. Ivanov, D. A. Kramarov, G. P. Georgiev // *Nucl. Acids Res.*—1983.—11, N 18.—P. 6541—6558.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1985.—479 с.
7. Expression of *c-fos*, *c-myc* and *hsp70* genes at early stages of the regenerating of rat liver / E. Biesiada, J. Wisniewski, Z. Krawczyk, M. Chorazy // *Bull. Pol. Acad. Sci. Biol. Sci.*—1987.—35, N 7—9.—P. 165—171.
8. Müller R., Verma I. M., Adamson E. D. Expression of *c-onc* genes: *c-fos* transcripts accumulate to high levels during development of mouse placenta, yolk sac and amnion // *EMBO J.*—1983.—2, N 5.—P. 679—684.
9. Sassone-Corsi P., Sisson J. C., Verma I. M. Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene *fos* // *Nature.*—1988.—334, N 6180.—P. 314—319.
10. Некоординированная экспрессия В2⁺мРНК_х и других типов В2-содержащих поли(А)⁺РНК в различных тканях мыши / П. Л. Иванов, О. Н. Токарская, Д. А. Крамаров и др. // *Молекуляр. биология.*—1985.—19, № 2.—С. 333—339.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН УССР, Киев
Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва

Получено 27.04.89