



УДК 616—006:577.15.022

И. М. Данко, В. И. Прима

РЕПЛИКАЦИЯ ОНКОГЕНА *c-myc* В КЛЕТКАХ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

Проведено седиментационное фракционирование асинхронной клеточной популяции асцитной карциномы Эрлиха по фазам клеточного цикла. Разделение суспензии опухолевых клеток осуществляли при 1 g в 0—0,3 M экспоненциальном градиенте концентрации сахарозы. Из клеток, находящихся в S-фазе, выделены три фракции, соответствующие ранней, средней и поздней S-фазе.

*Изучен временной порядок репликации онкогена *c-myc* в синхронизированных клетках асцитной карциномы Эрлиха. Показано, что репликация онкогена *c-myc* начинается в ранней S-фазе.*

Одним из механизмов регуляции транскрипционной активности генов может быть временной порядок их репликации. Большинство изученных протоонкогенов в пролиферирующих клетках реплицируется в течение первой половины S-фазы. Во второй половине S-фазы происходит репликация онкогенов *N-myc* и *c-Ki-ras* [1]. При структурных перестройках и амплификации генов изменяется как транскрипционная активность гена, так и время его репликации. После структурных перестроек (транслокация хромосом) время репликации онкогена *c-myc* сдвигается с последующим повышением уровня экспрессии этого онкогена [2].

В настоящей работе приводятся данные о репликации онкогена *c-myc* в синхронизированных клетках асцитной карциномы Эрлиха.

Клетки асцитной карциномы Эрлиха брали у животных на 6-е сут после перевивки $1 \cdot 10^7$ асцитных клеток. Суммарную клеточную популяцию фракционировали по фазам клеточного цикла в градиенте плотности сахарозы при 1 g [3]. Из ядер клеток, находящихся в различных фазах цикла, выделяли ДНК и очищали с помощью стандартной методики фенольной депротеинизации [4]. Затем ДНК гидролизовали рестриктазой *HindIII* (20 ед. на 1 мкг ДНК), разделяли в 0,8 %-х гелях агарозы («Sigma», США) и переносили на мембраны Hybond N. Молекулярным зондом служил онкоген *c-myc* в плазмиде *pSVmyc*, меченный [32 P]-dNTP в реакции ник-трансляции. Удельная радиоактивность зонда составляла $(1-2) \cdot 10^8$ имп/мин на 1 мкг ДНК. Гибридизацию осуществляли в течение 48 ч при 42 °C в буфере $6 \times \text{SSC}$, содержащем $5 \times$ раствора Денхардта, 50 % формамида, 10 % декстрансульфата, 100 мкг/мл тимусной ДНК. Фильтры отмывали три раза по 15 мин в растворе $2 \times \text{SSC} - 0,1 \%$ DS-Na при комнатной температуре, затем два раза по 30 мин в растворе такого же состава при 65 °C и один раз (15 мин) в растворе $0,2 \times \text{SSC} - 0,1 \%$ DS-Na при комнатной температуре. Авторадиографию проводили в течение 4—7 сут при —70 °C на рентгеновской пленке РМЛ (Россия) в кассетах с усилвающим экраном. Содержание ДНК определяли спектрофотометрически.

Синхронизация клеточной популяции с помощью осаждения клеток в градиенте плотности сахарозы дает возможность получить одно-

родную популяцию клеток, находящихся в одной фазе клеточного цикла. Седиментограмма типичного фракционирования клеток асцитной карциномы Эрлиха представлена на рис. 1. Используемый метод дает высокий процент синхронизации (86 %) и позволяет выделить несколько фракций клеток, находящихся в одной фазе цикла. Этим способом мы получили три фракции S-фазных клеток, соответствующие ранней, средней и поздней S-фазе, что позволяет более детально изучить про-

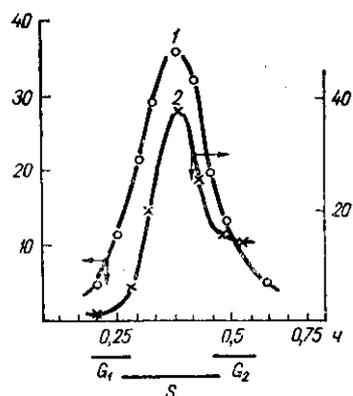


Рис. 1. Седиментограмма клеток асцитной карциномы Эрлиха (1) и включение ^3H -тимидина в ДНК (10^{-3} имп/мин на 10^6 клеток) (2). По оси абсцисс — длительность митотического цикла, нормированная к 1; по оси ординат — количество клеток во фракциях $\cdot 10^{-6}$.

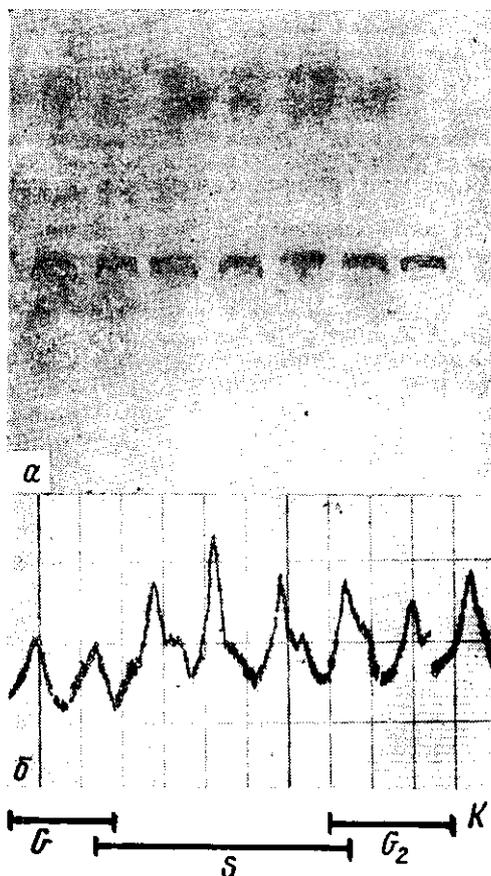


Рис. 2. Гибридизация ^{32}P -меченного онкогена *c-myc* с ДНК ядер клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла (а), и фрагмент денситограммы (б). К — ДНК ядер исходных клеток.

цесс репликации отдельных генов в S-фазе. Тем более, что гены различной природы отличаются по времени репликации.

В настоящей работе мы изучили временной порядок репликации онкогена *c-myc* в клетках асцитной карциномы Эрлиха, в которых этот ген активно транскрибируется. Протонкоген *c-myc* кодирует белок, играющий важную роль в регуляции транскрипционной активности и репликации ДНК [5]. Гибридизация ДНК из ядер клеток, находящихся в разных фазах цикла, с ^{32}P -зондом онкогена *c-myc* регистрируется на всех этапах цикла (рис. 2), но интенсивность полос существенно меняется. Редупликация онкогена *c-myc* отмечается с началом S-фазы. В результате число копий онкогена *c-myc* в пересчете на весь геном заметно возрастает. В середине и второй половине S-фазы удваивается остальная часть генома, в результате чего удельный вес последовательностей, комплементарных онкогену *c-myc*, несколько снижается.

Таким образом, проведено фракционирование клеток асцитной карциномы Эрлиха по фазам клеточного цикла и изучено время репликации онкогена *c-myc*.

Summary. Sedimentational fractionation of asynchronous Ehrlich ascitic cells population was carried out according to cell cycle phases. Separation of tumor cells suspension was carried out under 1 g in 0—0,3 M sucrose concentration gradient. Cells,

situated in S phase, were selected to 3 fractions in early, middle and late S phase respectively.

It was studied temporal order replications of synchronized Ehrlich ascitic cells. It was shown that the replication of oncogene *c-myc* beginning in early S phase.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Replication of proto-oncogenes early during the S phase in mammalian cell lines/* M. A. Iqbal, J. Chinsky, V. Didamo, C. L. Schildkraut // *Nucl. Acids Res.*— 1987.— 15, N 1.— P. 87—103.
2. *Changes in gene position are accompanied by a change in time of replication/* R. E. Calza, L. A. Eckhardt, T. del Giudice, C. L. Schildkraut // *Cell.*— 1984.— 36, N 3.— P. 689—696.
3. *Кавецкий Р. Е., Казьмин С. Д. Энергетика митотического цикла клеток рака Эрлиха // Докл. АН СССР.*— 1973.— 212, № 5.— С. 1217—1219.
4. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.*— М.: Мир, 1984.— 480 с.
5. *Cell specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet derived growth factor/* K. Kelly, B. H. Cochran, Ch. Stiles, Ph. Leder // *Cell.*— 1983.— 35, N 3.— P. 603—610.

Ин-т проблем онкологии и радиологии
им. Р. Е. Кавецкого АН Украины, Киев

Получено 12.02.92

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев