



УДК 616—006:577.15.022

І. М. Данко, В. І. Прима

## РЕПЛІКАЦІЯ ОНКОГЕНА *c-myc* У КЛІТИНАХ АСЦИТНОЇ КАРЦИНОМИ ЕРЛІХА

Проведено седиментаційне фракціонування асинхронної клітинної популяції асцитної карциноми Ерліха за фазами клітинного циклу. Розподіл суспензії пухлинних клітин здійснювали за 1 g у 0—0,3 M експоненціальному градієнті концентрації сахарози. З клітин, що знаходилися у S-фазі, виділено три фракції, які відповідали ранній, середній та пізній S-фазі.

Вивчено часовий порядок реплікації онкогена *c-myc* у синхронізованих клітинах асцитної карциноми Ерліха. Показано, що реплікація онкогена *c-myc* починається у ранній S-фазі.

Одним з механізмів регуляції транскрипційної активності генів може бути часовий порядок їх реплікації. Більшість вивчених протоонкогенів у проліферуючих клітинах реплікується протягом першої половини S-фазі. У другій половині S-фазі відбувається реплікація онкогенів *N-myc* і *c-Ki-ras* [1]. За структурних перебудов та ампліфікації генів змінюється як транскрипційна активність гена, так і час його реплікації. Після структурних перебудов (транслокація хромосом) час реплікації онкогена *c-myc* зсувається з наступним підвищенням рівня його експресії [2].

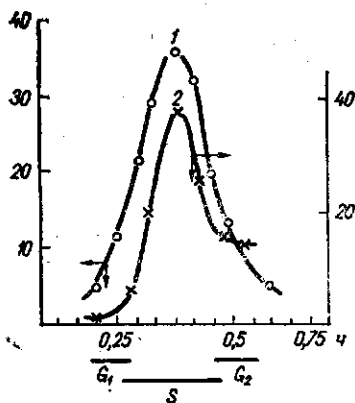
У цій роботі наводяться дані про реплікацію онкогена *c-myc* у синхронізованих клітинах асцитної карциноми Ерліха.

Клітини асцитної карциноми Ерліха брали у тварин на 6-у добу після перещеплення  $1 \cdot 10^7$  асцитних клітин. Сумарну клітинну популяцію фракціонували за фазами клітинного циклу у градієнті щільності сахарози за 1 g [3]. З ядер клітин, які знаходилися у різних фазах циклу, виділяли ДНК й очищали за допомогою стандартної методики фенольної депротейнізації [4]. Потім ДНК гідролізували рестриктазою *HindIII* (20 од. на 1 мкг ДНК), розділяли у 0,8 % -х гелях агарози («Sigma», США) і переносили на мембрани Hybond N. Молекулярним зондом був онкоген *c-myc* у плазміді *pSVmyc*, мічений [ $^{32}$ P]-dNTP у реакції нік-трансляції. Питома радіоактивність зонда складала  $(1-2) \cdot 10^9$  імп/хв на 1 мкг ДНК. Гібридизацію здійснювали протягом 48 год при 42 °C у буфері  $6 \times \text{SSC}$ , який містив  $5 \times$  розчину Денхардта, 50 % формаміду, 10 % декстрансульфату, 100 мкг/мл тимусної ДНК. Фільтри відмивали тричі по 15 хв у розчині  $2 \times \text{SSC}$  — 0,1 % DS-Na при кімнатній температурі, потім двічі по 30 хв у розчині того ж складу при 65 °C і один раз (15 хв) у розчині  $0,2 \times \text{SSC}$  — 0,1 % DS-Na при кімнатній температурі. Авторадіографію провадили протягом 4—7 діб при —70 °C на рентгенівській плівці РМЛ (Росія) у касетах з посилюючим екраном. Вміст ДНК визначали спектрофотометрично.

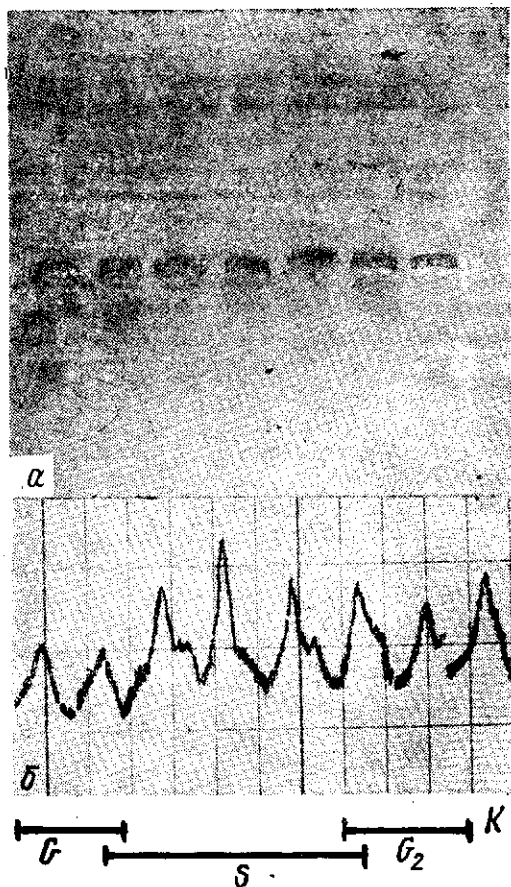
Синхронізація клітинної популяції за допомогою осаджування клітин у градієнті щільності сахарози дає можливість отримати однорідну популяцію клітин, які знаходяться в одній фазі клітинного циклу. Седиментограма типового фракціонування клітин асцитної карциноми

Ерліха наведена на мал. 1. Метод, яким ми користувалися, дає високий процент синхронізації (86 %) і дозволяє виділити декілька фракцій клітин, що знаходяться у одній фазі циклу. Цим засобом ми отримали три фракції S-фазових клітин, які відповідали ранній, середній та пізній S-фазі, що дозволяє більш детально вивчити процес реплікації окремих генів у S-фазі. Тим більше, що гени різної природи відрізняються за часом реплікації.

У цій роботі ми вивчили часовий порядок реплікації онкогена *c-myc* у клітинах асцитної карциноми Ерліха, в яких цей ген активно



Мал. 1. Седиментограма клітин асцитної карциноми Ерліха (1) та включення  $^3\text{H}$ -тимідину до ДНК ( $10^{-3}$  імп/хв на  $10^6$  клітин) (2). Вісь абсцис — тривалість мітотичного циклу, нормована до 1; вісь ординат — кількість клітин у фракціях  $\cdot 10^6$



Мал. 2. Гібридизація  $^{32}\text{P}$ -міченого онкогена *c-myc* з ДНК ядер клітин, які знаходяться у різних фазах клітинного циклу (а), та фрагмент денситограми (б). К — ДНК ядер вихідних клітин.

транскрибується. Протоонкоген *c-myc* кодує білок, що відіграє важливу роль у регуляції транскрипційної активності та реплікації ДНК [5]. Гібридизація ДНК з ядер клітин, які знаходяться у різних фазах циклу, з  $^{32}\text{P}$ -зондом онкогена *c-myc* реєструється на усіх етапах циклу (мал. 2), але інтенсивність смуг істотно змінюється. Редуплікація онкогена *c-myc* відмічається з початком S-фази. В результаті кількість копій онкогена *c-myc* у перерахунку на весь геном помітно зростає. У середині і другій половині S-фази подвоюється решта геному, в результаті чого питома вага послідовностей, що комплементарні онкогену *c-myc*, дещо знижується.

Таким чином, проведено фракціонування клітин асцитної карциноми Ерліха за фазами клітинного циклу та вивчено час реплікації онкогена *c-myc*.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Replication of proto-oncogenes early during the S phase in mammalian cell lines/ M. A. Igbal, 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 онкології і радіобіології  
ім. Р. Є. Кавецького АН України, Київ  
Ин-т молекуляр. біології і генетики АН України, Київ

Одержано 12.02.92