

## РЕГУЛЯЦИЯ $Ca^{2+}$ -дсРНК ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА, КЛЕТОК HeLa

Р. А. ЗАХАРЯН

$Ca^{2+}$  комплексы дсРНК, поли dA, поли dT, низкомолекулярной РНК дрожжей оказывают достаточно выраженный митогенный эффект на фибробласты человека на ранних стадиях размножения фибробластов в культуре; на более поздних стадиях культивирования клеток  $Ca^{2+}$ -дсРНК стимулирует процесс терминальной дифференцировки, индуцируя синтез группы протеинов, характерных для постмитотической популяции фибробластов человека, претерпевающих процесс терминальной дифференцировки.

$Ca$ -дсРНК оказывает стимулирующее влияние на транскрипцию генов *c-fos* и *c-jun* в фибробластах и HeLa-S-3.

*Երկշղթա ԲՆԲ-ի  $Ca^{2+}$ -կապիտուները, պոլի dT, պոլի dA, դրոժների ցածրմոլեկուլային ԲՆԲ-ն ճյուղարկում են բավական լավ արտահայտված միտոգեն ազդեցություն մարդու ֆիբրոբլաստների վրա և ֆիբրոբլաստային կուլտուրաներում՝ վերջինիս բազմացման վաղ փուլերում: Ավելի ուշ փուլերում  $Ca^{2+}$ -էրկշղ. ԲՆԲ-ի բջիչների կուլտիվացիան առաջ է բերում վերջնական տարրերակում՝ սինթեզելով պրոտեինային խմբեր, որոնք հատուկ են մարդու ֆիբրոբլաստների հետմիտոտիկ պոպուլյացիային. դրանք էլ մտնում են վերջնական տարրերակիչ պրոցեսների մեջ:*

Ca complexes of dsRNA, poli dA, poli dT of low molecular RNA of yeast make enough expressed mitogenic effect on human fibroblasts in early stages of fibroblasts proliferation in culture; in later stages of cell cultivation Ca-dsRNA stimulated the process of terminal differentiation inducing the synthesis of a group of proteins characteristic for postmitotic population of human fibroblasts undergoing the terminal differentiation process.

Ca-dsRNA caused a stimulating effect of *c-fos* and *c-jun* gene transcription in fibroblasts and HeLa-S-3.

*Фибробласты человека—клетки HeLa— $Ca^{2+}$ -дсРНК.*

Антипролиферативный эффект двуспиральной РНК поли(И·Ц), обнаруженный на целом ряде клеточных линий, обусловлен прежде всего активацией системы 2'-5'-олиго-А-РНКазы-1 и дсРНК зависимой протеинкиназы. Он проявляется в достаточно выраженной форме и в условиях отсутствия интерферона на клетках карциномы легкого, HeLa, фибросаркомы. Вместе с тем, как недавно было показано, поли(И·Ц) способен индуцировать митогенный эффект в фибробластах ВА1 В-3Т3 в противоположность антипролиферативному воздействию интерферона, аналогично фактору роста из тромбоцитов [24]. Более того, пролиферативный, митогенный эффект поли(И·Ц) на клетках фибробластов усиливается в присутствии антител к интерферону-В [19]. Последнее обстоятельство свидетельствует в пользу того предположения, что в клетках одних тканей отсутствие интерферона не

препятствует проявлению антипролиферативного эффекта дсРНК, в других — включение воздействия интерферона способствует потемнению пролиферативного эффекта. Ранее нами [1—5], а затем и другими авторами [11, 12, 20, 22] было показано, что реценция нуклеиновых кислот, в том числе и двуспиральных РНК, на плазматической мембране клеток млекопитающих носит высокоспецифический характер и обусловлен взаимодействием различных типов полинуклеотидов с различными рецепторами, молекулами-протеинами на поверхностной мембране клетки.

Одновременно нами было показано [6], что интерферон-индуцирующая активность дсРНК в комплексе с  $Ca^{2+}$  возрастает в 4—5 раз, дсРНК в комплексе с  $Ca^{2+}$  отличается от натриевой соли дсРНК более высокой антивирусной активностью, что позднее было подтверждено [7].

В настоящем сообщении представлены результаты изучения влияния  $Ca^{2+}$  комплексов различных типов полинуклеотидов-дсРНК, РНК из дрожжей, поли dA, поли dT — на процессы пролиферации и дифференцировки фибробластов кожи человека, влияние  $Ca$ -дсРНК на транскрипцию протоонкогенов *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* в фибробластах и клетках HeLa-S-3.

**Материал и методика.** Фибробласты человека получены из биопсийного операционного материала кожи, которую обрабатывали описанным методом [15]. Кожу разрезали на фрагменты 1 см<sup>3</sup>, переносили в чашки Петри, заливали средой Игла в модификации Дульбеко, содержащей 20% сыворотки теленка, 500 ед/мл пенициллина, 700 ед/мл стрептомицина и инкубировали при 37° в атмосфере 95%-ного воздуха и 5%-ного  $CO_2$ . Питательную среду меняли еженедельно. Через 3 недели первичную культуру фибробластов обрабатывали 0,05%-ным трипсином и 0,1%-ным ЭДТА [8] и субкультивировали при еженедельном переносе и посеве с плотностью  $10^6$  кл на чашку Петри. В экспериментах использовали мезотипетски активные (до 15 недель культивирования) фибробласты и постмитотические фибробласты, находящиеся в условиях стационарного роста в культуре в течение 6 недель. При изучении влияния полинуклеотидов на процессы пролиферации фибробласты культивировали в среде ДМЕМ + 7% сыворотки теленка.

Клетки HeLa-S-3 выращивали в среде Игла, содержащей 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 1% глутамин (200 мМ) и 15% сыворотки теленка. Использовали клетки HeLa в логарифмической фазе роста, синхронизирующие в поздней G1 и ранней S фазе. Синтез ДНК в культуре HeLa и фибробластов определяли по включению [<sup>3</sup>H]-тимидина в ТХУ-осаждаемый материал клетки.  $5 \times 10^5$  клеток инкубировали с [<sup>3</sup>H]-тимидином (1 мкКю/мл) в течение 5 часов. Затем клетки промывали фосфатным буфером и лизировали в течение 1 часа, 40° буфером, содержащим 1% SDS, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ трие-НСl (рН 7,5), 80 мкг/мл протеинази; к смеси добавляли 100 мкг ДНК и смесь осаждали равным объемом 20%-ной ТХУ при 4°. Осадок, после осаждения, промывали 10%-ной ТХУ при 4° и просчитывали в сцинтилляционном радиочетчике SI-30 (Франция).

Для изучения влияния  $Ca$ -дсРНК на экспрессию генов *c-fos*, *c-jun* и *c-myc* в клетках HeLa последние культивировали до полного монослеса, затем их инкубировали с полинуклеотидами и добавляли 2-аминопури в концентрации 10 мМ.

Для анализа м-РНК к концу периода инкубации клеток с  $Ca^{2+}$ -дсРНК, Са-РНК из дрожжей фибробласты промывали изотоническим раствором NaCl и тотальную РНК выделяли гуанидин-изотиоцианат CsCl методом; м-РНК анализировали по Нортеру [9]; в качестве зонда для м-РНК *c-fos* использовали плазмиду *pc-fos-3* [13]; для идентификации м-РНК *c-myc* использовали экзон-1 гена *c-myc* («Amersham»).

м-РНК с-*jun* идентифицировали [18]; для идентификации м-РНК рецептора эли дермального фактора роста использовали 3'-ClA1 фрагмент м-ДНК гена РЭФР [21]. Пробирки-зонды были мечены [<sup>32</sup>P]-СТР (300 Кю/ммоль; «Amersham») методом нук-трансляции.

**Включение [<sup>35</sup>S]-метионина в протсини.** Фибробласты культивировали в [<sup>35</sup>S]-метионинем (200, 400 Кю/ммоль) 18 ч и после лизиса гомогенат (около 10<sup>6</sup> нук/мин) анализировали в двумерном электрофорезе в полиакриламидном геле [16].

Фибробласты человека обрабатывали 10 мкг/мл дс-РНК в течение 18 часов.

В экспериментах использовали Са-дсРНК с мол. массой 1,5×10<sup>6</sup> Дальтон из *Sacharomycetes cerevisiae*, тотальную низкомолекулярную Са-РНК из дрожжей («Calbiochem»); Са<sup>2+</sup>-полидезоксидеин (поли-dA), Са-полидезокситидин (поли-dT) фирмы «Miles», Са<sup>2+</sup>-соль полинуклеотидов получали растворением полинуклеотидов в среде, содержащей 50 мМ СаCl<sub>2</sub>.

**Результаты и обсуждение.** Как видно из табл. 1, 10 мкг/мл Са-дсРНК через 4 ч после воздействия стимулировала включение метил-[<sup>3</sup>H]-тимидина в ДНК митотически активных фибробластов человека (5 недель субкультивирования) на 30%. Аналогичным эффектом обладали Са-РНК из дрожжей. Вместе с тем, поли-dT и поли-dA (по 5 мкг/мл) обладали более выраженным эффектом стимуляции включения тимидина в ДНК, соответственно на 100 и 50%.

*Влияние полинуклеотидов на включение [<sup>3</sup>H]-тимидина в ДНК фибробластов человека и клеток HeLa*

Полинуклеотиды	Фибробласты		Клетки HeLa
	5 недель субкультивирования	15 недель субкультивирования	
[ <sup>3</sup> H]-тимидин нм, мин/10 <sup>6</sup> клеток			
Контроль	48×10 <sup>3</sup>	44×10 <sup>3</sup>	32×10 <sup>3</sup>
Са <sup>2+</sup> -дсРНК	65×10 <sup>3</sup>	38×10 <sup>3</sup>	21×10 <sup>3</sup>
Са <sup>2+</sup> -РНК	62×10 <sup>3</sup>	52×10 <sup>3</sup>	—
Са <sup>2+</sup> -поли dT	97×10 <sup>3</sup>	75×10 <sup>3</sup>	72×10 <sup>3</sup>
Са <sup>2+</sup> -поли dA	79×10 <sup>3</sup>	69×10 <sup>3</sup>	62×10 <sup>3</sup>
Са-дсРНК + 2-см-пуриин (10 мМ)	—	—	13×10 <sup>3</sup>

Одновременно Са-дсРНК и РНК активировали в митотически активных фибробластах процесс транскрипции протоонкогенов с-*fos*, с-*myc*, с-*jun*; активация этих генов наступала уже через 2 ч после воздействия полинуклеотидов (рис. 1). Координированная экспрессия генов с-*fos*, с-*myc*, с-*jun* наблюдалась во многих клетках уже на ранних стадиях митотической стимуляции [17], хотя и в некоторых клетках положительная коррелятивная связь между активацией указанных протоонкогенов и процессами пролиферативного роста не обнаружена [10, 14].

Полученный нами результат свидетельствует о том, что митогенный эффект использованных полинуклеотидов на фибробластах человека сопровождается определенной активацией этих генов.

Несколько иным было влияние Са-дсРНК на рост митотически активных фибробластов человека в относительно поздний период раз-

множения клеток (15 недель субкультивирования). В этом случае Са-деРНК не стимулировал включение тимидина в ДНК, наблюдалось некоторое подавление синтеза ДНК, выключение транскрипции гена *c-myc*, существенно не менялся пониженный уровень транскрипции генов *c-fos*, *c-jun*. Поли dT, поли-dA, РНК дрожжей стимулировали включение тимидина в ДНК соответственно на 75, 30 и 20%.

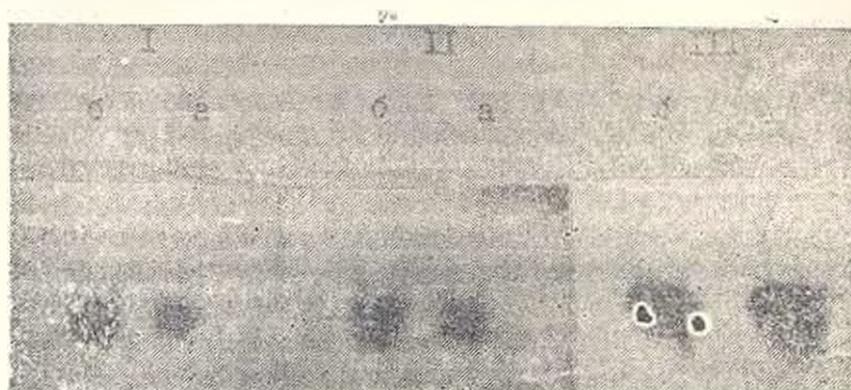


Рис. 1. Идентификация транскриптов гена *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* в митотически активных (5 недель субкультивирования) фибробластах кожи человека через 2 ч после воздействия Са-деРНК. I—*c-fos*, а—контроль, б—Са-деРНК; II—*c-myc*, а—контроль, б—Са-деРНК; III—*c-jun*, а—контроль, б—Са-деРНК.

Изучение профиля синтезируемых белков (рис. 2) показало, что в митотически активных фибробластах человека (15 недель субкультивирования) сохраняется в основном тот же профиль синтезируемых

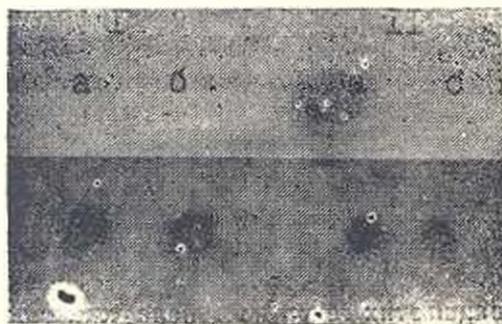


Рис. 2. Идентификация транскриптов гена *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* в фибробластах. I—*c-fos*, а—контроль, б—Са-деРНК; II—*c-jun*, а—контроль, б—Са-деРНК.

белков, что и в митотически активных фибробластах, субкультивированных в течение 7 недель [8]; вместе с тем под влиянием Са-деРНК наблюдалась индукция синтеза группы протеинов с мол. массами 45—35 кД, характерных для постмитотической популяции фибробластов человека, претерпевающих процесс терминальной дифференцировки (3 недели культивирования в условиях стационарного роста).

Согласно полученным данным, использованные полинуклеотиды

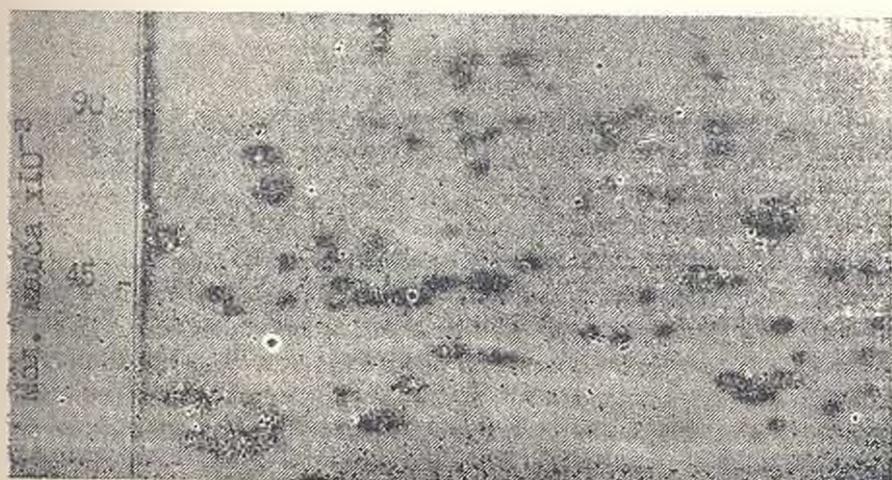
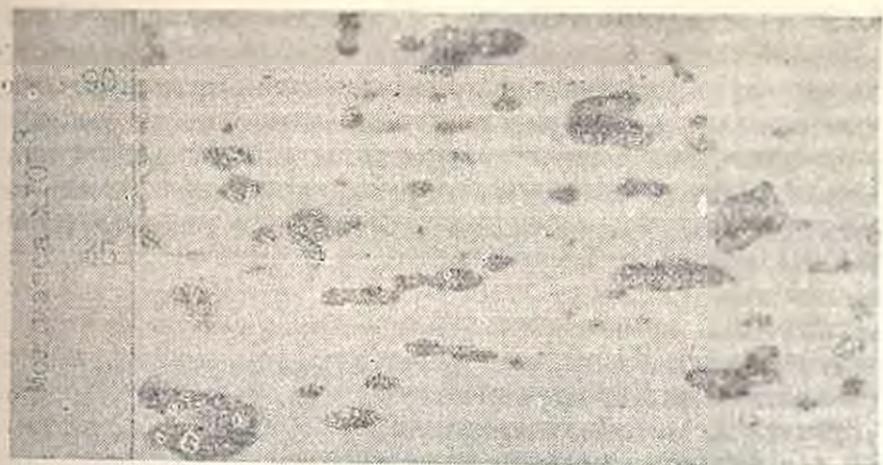


Рис. 3. Идентификация в двумерном 15% ПААГ электрофорезе  $[^{35}\text{S}]$ -меченых протеинов митотически активных фибробластов (15 недель субкультивирования) до и после воздействия  $\text{C}\alpha$ -дРНК (автордиография). I—контроль, II—после воздействия  $\text{C}\alpha$ -дРНК, III— $[^{35}\text{S}]$ -меченые протеины постмитотической популяции фибробластов (3 недели культивирования в условиях стационарного роста) ИЭФ в градиенте рН 3—10, 7500 V/г, слева направо.

оказывают различное влияние на процессы пролиферации фибробластов человека. Поли dA, поли dT, РНК дрожжей стимулируют процесс пролиферации фибробластов независимо от периода культивирования клеток. Са-дсРНК повышает синтез ДНК в фибробластах на ранних стадиях размножения, на более поздних же стадиях культивирования клеток он стимулирует синтез протеннов, характерных для стадий терминальной дифференцировки фибробластов кожи человека.

Синтетические и природные полинуклеотиды различной структуры неодинаково влияют на пролиферацию трансформированных эпителлиальных клеток HeLa-S-3 (табл. 1). ДсРНК в концентрации 10 мкг/мл к 4 ч воздействия ингибировал на 25% включение [<sup>3</sup>H]-тимидина в ДНК HeLa, Са-дсРНК подавлял синтез ДНК на 40%. Поли dA, поли dT стимулировали включение тимидина в ДНК клеток HeLa.

ДсРНК не влияла на активность изучаемых протоонкогенов в течение 30 мин и 3 ч воздействия. Са-дсРНК только через 4 ч вызывала активацию транскрипции генов c-fos, c-jun, не индуцируя активность гена c-myc (рис. 4).

Использование 2-аминопурина, специфического ингибитора процесса транскрипции генов c-fos, c-jun [23], совместно с Са-дсРНК существенно, на 60%, ингибировало включение тимидина в ДНК. Полученная корреляция свидетельствует о возможной роли продуктов экспрессии генов c-fos, c-jun как отрицательных регуляторов, сдерживающих по типу обратной связи антипролиферативный эффект дсРНК на клетки HeLa. Полученные результаты свидетельствуют о том, что Са-формы полинуклеотидов, РНК дрожжей оказывают достаточно выраженное митогенное влияние на фибробласты человека, Са-дсРНК повышает в определенной степени синтез ДНК в фибро-

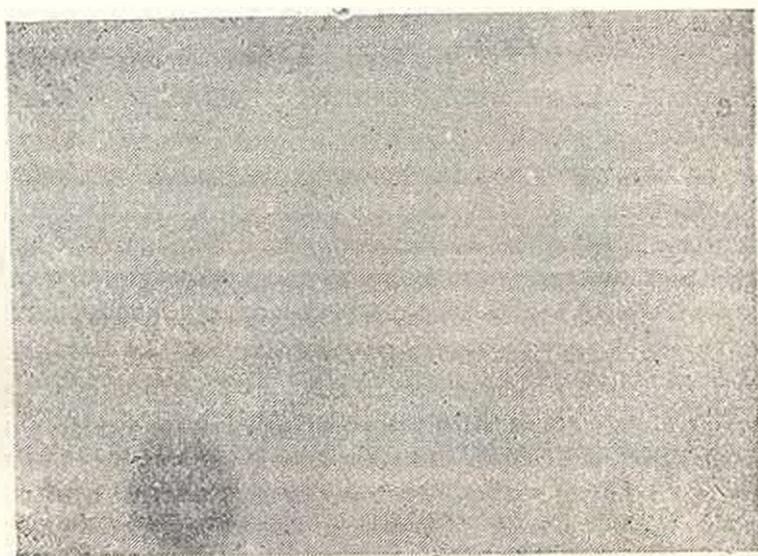


Рис. 4а.

бластах на равных стадиях размножения в культуре; на более поздних стадиях культивирования клеток Са-дсРНК стимулирует процесс терминальной дифференцировки; комбинированное применение Са-дсРНК с Са-поли, dA, Са-поли dT может быть использовано в клинической медицине в целях стимуляции процессов пролиферации и терминальной дифференцировки фибробластов и эпителиальных клеток и заживления ран различной этиологии, особенно в случаях торможения и вялого протекания терминальной дифференцировки фибробластов и клеток эпителия.

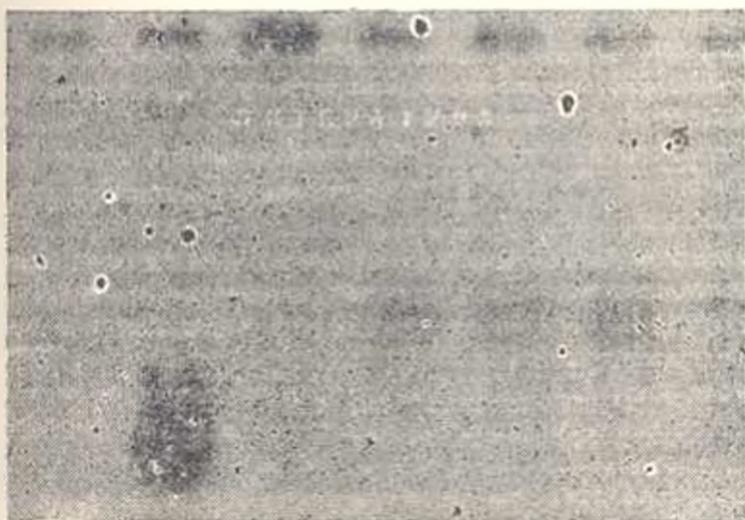


Рис. 4. б. Идентификация транскриптов гена *c-fos* (а), *c-jun* (б) в клетках HeLa под воздействием Са<sup>2+</sup>-дсРНК. Справа налево: 1—контроль, м-РНК выделена из клеток HeLa, культивировавшихся до полного монослоя; 2, 3—положительный контроль индукции в HeLa синтеза м-РНК гена *c-fos* (а) и *c-jun* (б), под воздействием гормонов: эпидермального фактора роста (ЭФР) через 30 мин и 4ч; 4, 5—воздействие дсРНК через 30 мин и 4ч; 6, 7—воздействие Са<sup>2+</sup>-дсРНК через 30 мин и 4ч; м-РНК *c-fos* (а) и м-РНК *c-jun* (б) (2,2 г п. о.).

Автор благодарит проф. Шинизу Н. и Гама Ш. (Япония) за помощь в получении некоторых экспериментальных данных и в обсуждении результатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Габриелян А. Г., Абрамян А. Г., Захарян Р. А. ДАН СССР, 298, 5, 1260—1263.
2. Захарян Р. А. Тез. докл. IV двустороннего симп. СССР—ФРГ. Структура и транскрипция генома, 19. Ереван, 1981.
3. Захарян Р. А., Карамелян К. Г. В сб. Структура и функция белков и нуклеиновых кислот. Мат-лы VI двустороннего симп. СССР—Франция, 132, 1982.
4. Захарян Р. А., Габриелян А. А., Севобатян Н. А. Митозомик, 8, 1, 31—34, 1980.
5. Захарян Р. А., Сисоян В. А., Арабаджян А. Г. Биол. журн. Армения, 12, 9:10, 923—926, 1979.
6. Рухляк Л. А., Захарян Р. А. В сб. Лекарственные и биологически активные вещества в микроэлектронике и генетике, 89—94, 1976.

7. Соколов Т. М., Редомская Н. А., Антонов А. Ю., Суетина И. А., Ершов Ф. И., Трехбратская И. К., Мирская Л. Л. В сб. Изучение индуктора интерферона—двухцепочечной РНК в различных биологических системах. Рига, 47—53, 1989.
8. Bayreuther K., Rodemann H. P., Hommel R., Dittmann K., Söbier M., Francis P. I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5112—5116, 1988.
9. Calotta F., Lampugnani M. G., Polentatuttil N., Dejano E., Mantovani A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 157, 1101—1110, 1989.
10. Coughlin S. R., Lee W. M. F., Williams P. W., Giels M. G., Williams C. T. Cell, 43, 243—251, 1985.
11. Gabor G., Bennett R. M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 3, 1034—103, 1984.
12. Loke S. L., Stein C. A., Zhang X. H., Mori K., Nakanishi M., Subasinghe C., Cohen K. S., Neckers L. M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 3474—3478, 1989.
13. Mitchell R. L., Zokas R. D., Yerna I. M. Cell, 40, 209—217, 1985.
14. Owen T. A., Cosenza S. C., Soprano K. J. J. Biol. Chem., 262, 1511—1517, 1987.
15. Rodemann H. P., Bayreuter K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5130—5134, 1984.
16. Rodemann H. P., Bayreuter K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2086—2090, 1986.
17. Rollins B. Z., Stiles C. D. in vitro Cell Dev. Biol., 24, 81—84, 1988.
18. Ryseck R. R., Hiral S. I., Yantv M., Bravo R. Nature, 331, 535—537, 1988.
19. Vitcek K., Kohase M., Henriksen-De Stefano J. Cell. Physiol., 150, 37—43, 1987.
20. Yakubov L. A., Deeva E. A., Zarytova V. E., Ivanova E. M., Rytv A. S., Yurchenko L. V., Vlассov V. V. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6451—6458, 1989.
21. Yamada H., Koizumi S., Kimura M., Shimizu N. Exp. Cell Research, 184, 90—98, 1989.
22. Yoshida I., Azuma M., Kawai H., Fisher H. W., Suzutani T., Sakuma T. J. of Interferon Research (in press), 1989.
23. Zinn K., Keller A., Whittemore T. M., Mantatis T. Science, 240, 210—213, 1988.
24. Zullo J. N., Cochran B. H., Huang A. S., Stiles C. J. D. Cell, 43, 793—800, 1985.

Поступило 12.VIII 1990 г.