МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.23

Р. А. Захарян, П. А. Казарян, А. С. Агабалян,
академик НАН Армении К. Г. Карагезян

Стимуляция Ca^{2+} -дсРНК синтеза цАМФ и ингибирование
транскрипции гена "шус" в клетках лимфосаркомы Плиссе

(Представлено 22/III 1996)

Как известно, двухспиральные рибонуклеиновые кислоты (дсРНК) оказывают стимулирующее воздействие на первичный и вторичный иммунные ответы, а также имеют индуцирующее влияние на эндогенный синтез интерферона. Показано, что противоопухолевый и противовирусный эффекты дсРНК реализуются через синтез интерферона и ряд активирующихся при этом биохимических реакций, находящихся в зависимости, по крайней мере, от двух основных факторов: 1) повышения уровня 2-5 олигоаденилата, оказывающего активирующее действие на латентную дсРНК-зависимую РНК-азу и 2) индукции активности дсРНК-зависимой протеинкиназы, фосфорилирующей субъединицу фактора инициации процесса элонгации ELF (1,2).

На основании проведенных нами ранее исследований было установлено, что под действием дсРНК отмечаются: а) существенное повышение активности процесса фосфорилирования белков плазматической мембраны; б) интенсификация трансмембранных токов экстрацеллюлярного Ca^{2+} , в) повышение функциональной активности фосфолипазы A_2 , катализирующей процесс деацилирования фосфолипидов — глицеридов с увеличением пула лизоформ этих соединений и полиеновых неэстерифицированных жирных кислот, наделенных иммунномодулирующими свойствами (3-6). Было также выявлено, что в лейкоцитах лимфобластах человека, изученных *in vitro*, биохимические сдвиги, индуцируемые интерфероном и дсРНК, сопровождаются активированием механизмов запрограммированной гибели клеток и, как результат, повышением активности Ca^{2+} — Mg^{2+} — зависимой эндонуклеазы, фрагментирующей дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) хроматина по межнуклеосомным участкам, и гибелью лимфобластов, на фоне истощения клеток АТФ и ДПН. Активация отмеченной выше эндонуклеазы наступает в результате транслокации цитозольного Ca^{2+} в ядра лимфобластов с участием кальмодулина (7,8).

Исследование активности системы циклазы цАМФ-протеинкиназы А, Ca^{2+} – активируемой системы, включая активность протеинкиназы-С и активности сопряженных с этими системами генов в процессе индукции механизмов запрограммированной гибели онкотрансформированных клеток, является важным в понимании механизмов регрессии опухолей и повышения эффективности используемых в онкологической практике терапевтических средств.

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния препарата кальциевой соли дсРНК (Са-дсРНК) с молекулярной массой $1,5 \times 10^6$ дальтон (Д), выделенной из киллерного штамма *Sacharomyses cerevisiae* (9), на процесс размножения клеток лимфосаркомы Плиссе, уровень цАМФ и экспрессию протоонкогена c-тус.

В работе использовали первичную культуру клеток лимфосаркомы Плиссе (в каждой пробе находилось около 5×10^4 клеток), которая содержалась в среде RPMI-1640, содержащей 2 мМ глутамина, 10 % сыворотки теленка, 500 ед/мл пенициллина и 700 ед/мл стрептомицина. Эффекты препарата РНК оценивались по истечении 48 ч инкубации клеток при $37^\circ C$ и 5 % CO_2 . О выживаемости клеток судили по степени интенсивности окрашиваемости их трипановым синим.

Уровень транскрипции "с-тус" гена характеризовали по "Нортериблот" анализу тотальной фракции м-РНК, выделенной из клеток лимфосаркомы Плиссе через 4 ч после воздействия дсРНК. С целью идентификации был использован экзон-1 гена "с-тус" (фирма Amersham, Англия). Пробы-зонды были мечены P^{32} СТР (300 Ки/мМ, фирма Amersham, Англия) методом НИК-трансляции.

Концентрацию циклического АМФ (цАМФ) клеток определяли радиоиммунным методом. Спустя 4 ч после воздействия дсРНК клетки переносили в полипропиленовую пробирку с 70 % раствором эталона. После 5 с пребывания в жидком азоте пробирки переносили на 5 мин в кипящую водяную баню, клетки удаляли, а лиофилизированный супернатант использовали в радиоиммунологическом анализе с применением стандартного набора реактивов фирмы Amersham.

Как явствует из табл. 1, кальциевая соль дсРНК в концентрации 15 мкг/мл оказывает примерно 50 % ингибирующее действие на процесс размножения клеток лимфосаркомы Плиссе.

В то же время при этом не обнаруживается сколько-нибудь токсического эффекта на функциональное состояние исследованных клеток (табл. 2).

Приведенный фактический материал является доказательством ингибирующего влияния Ca^{2+} – дсРНК в условиях *in vitro* на процесс деления и размножения клеток лимфосаркомы Плиссе, не проявляя при этом значительных деструктивных воздействий на генетический аппарат. Примечательно, что спустя 4 ч после воздействия препарата наблюдается значительное, почти девятикратное повышение содержания цАМФ, составляющее приблизительно $18,3 \pm 2,6$ р/мол/ 10^7 клеток, против $2,1 \pm 0,1$ р/мол/ 10^7 клеток в контроле.

Таблица 1

Влияние Са-дсРНК на размножение клеток лимфосаркомы Плиссе *in vitro* (исходное количество клеток 5×10^4 , 48 ч, 37°C, 5% CO₂)

Конечная концентрация Са-дсРНК, мкг/мл	Число клеток/мл
0	$1,9 \times 10^5$
0	$1,8 \times 10^5$
1,5	$1,82 \times 10^5$
1,5	$1,95 \times 10^5$
3,0	$1,85 \times 10^5$
3,0	$1,70 \times 10^5$
6,0	$1,55 \times 10^5$
6,0	$1,18 \times 10^5$
15,0	$0,98 \times 10^5$
15,0	$1,20 \times 10^5$
25,0	$0,75 \times 10^5$
25,0	$0,60 \times 10^5$

Таблица 2

Жизнеспособность клеток лимфосаркомы Плиссе после воздействия Са-дсРНК (IC₅₀ 15 мкг/мл, 48 ч, 37°C, 5% CO₂)

№	Число живых клеток	Число погибших клеток	Общее количество клеток
1	398 (90,5 %)	42 (9,5 %)	440 (100 %)
2	326 (92,1 %)	28 (7,9 %)	352 (100 %)
3	266 (92,4 %)	22 (7,6 %)	288 (100 %)

Нарушения в сбалансированности между активностями протеинкиназы-А и протеинкиназы-С, с одной стороны, и активностью сопряженных с ними генов, с другой, рассматриваются как один из важных этапов запуска процессов онкотрансформации, равно как и коррекция их сбалансированности — как один из этапов реверс-трансформации опухолевых клеток в нормальные. Координированная экспрессия протоонкогенов: генов *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* и активация этих генов наблюдается во многих клетках уже на ранних стадиях митотического деления и стимуляции. Между тем следует отметить также, что в некоторых клетках описанная выше положительная коррелятивная связь между активацией указанных протоонкогенов и процессами пролиферативного роста не была обнаружена.

Идентификация транскриптов гена "с-мус", отраженная в условиях нашего эксперимента, свидетельствует о понижении уровня его транскрипции, развивающейся в результате воздействия Са²⁺ — дсРНК.

Полученные результаты позволяют предположить, что отмеченный выше цитостатический эффект Са²⁺ — дсРНК комплексов, по-видимому,

реализуется на исследованные лимфобласты через активацию системы цАМФ.

Не исключено, что с повышением концентрации цАМФ происходит прямое ингибирование интенсивности течения процесса образования диацилглицерина и как следствие ингибирования снижение уровня транскрипции протоонкогенов, вовлеченных в процессы митотической стимуляции. Допускается существование и других механизмов ингибирования процесса транскрипции гена "с-мус", включая и прямое воздействие продуктов трансляции генов, активируемых в условиях индукции дсРНК процессов терминальной дифференциации на процессы транскрипции гена "с-мус".

Республиканский гематологический центр
Министерства здравоохранения РА
Институт молекулярной биологии НАН Армении

Ռ. Ա. ՉԱՔԱՐՅԱՆ, Պ. Ա. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Ա. Ս. ԱՂԱԲԱԼՅԱՆ,
Հայաստանի ԳԱԱ ակադեմիկոս Կ. Գ. ՂԱՄԱԳՅՈՉՅԱՆ

Ֆիզիկական ԱՄՖ-ի սինթեզի և "myc" գենի տրանսկրիպցիայի ինհիբիցիայի
խթանումը Ca^{2+} -եպ-ՌՆՆԹ-ով Պլիսեի լիմֆոսարկոմայի բջիջներում

Ուսումնասիրված է Ca^{2+} -երկպարույր ՌՆՆԹ-ի (Ca^{2+} -եպ-ՌՆՆԹ) ազդեցությունը ԱՄՖ-ի սինթեզի և "myc" գենի տրանսկրիպցիայի գործընթացների վրա Պլիսեի լիմֆոսարկոմայի բջիջներում: Ցույց է տրված, որ պատրաստուկի միանվագ ներարկումը խթանում է ԱՄՖ-ի սինթեզը և "myc" գենի տրանսկրիպցիայի ինհիբիցիան: Ստացված տվյալները թույլ են տալիս ենթադրելու, որ Ca^{2+} -եպ-ՌՆՆԹ-ի վերոհիշյալ դրական ազդեցությունը լիմֆոսարկոմայի վրա իրականացվում է ցիկլիկ ԱՄՖ-ի ակտիվացման միջոցով:

ЛИТЕРАТУРА-ՓՐԱՎԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ W. K. Roberts, A. Hovanessian, Nature, v. 264, p. 477-482 (1976). ² P. Leblen, C. C. Sen, PNAJ, p. 3107-3111 (1976). ³ К. Г. Карагезян, Р. А. Захарян, С. С. Овакьян, Биол. журн. Армении, т. 40, № 12, с. 979-985. ⁴ Р. А. Захарян и др. в кн.: Метаболическая регуляция функции мембран, мат. симп. 1986, с. 189-196, Ереван, 1990. ⁵ К. Г. Карагезян, Р. А. Захарян, С. С. Овакьян, 19th Meeting of FEBS, Abstract book, № 10397, 1989. ⁶ R. A. Zakharian, K. G. Karageyzian, ISF-IOCI World Congress 1988, Abstract book 3, p. 12, Tokyo, 1988. ⁷ R. A. Zakharian, Annual Meeting of the Inter Sol. Interferon Research. Abstract book, 1-85, USA, 1990. ⁸ Р. А. Захарян и др., ДАН СССР, т. 320, № 4. ⁹ Р. А. Захарян и др., Экспериментальная онкология, т. 7, № 3, с. 54-56 (1985).