

УДК 577.214

А. В.Красикова (5 курс, каф. БФ), Т. В.Кислякова, к.б.н. (ИНЦ РАН)

НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК ЛИНИИ F9-RAS-1 С РЕГУЛИРУЕМОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ОНКОБЕЛКА C-НА-RAS

Клеточная линия F9 эмбриональной карциномы мыши представляет собой удобную модель для изучения *in vitro* важных процессов, сопровождающих раннее развитие мышино-го эмбриона, в частности процессов дифференцировки клеток и их апоптотической гибели [1]. Для клеток этой линии выявлены основные признаки дифференцировки в направлении первичной и париетальной эндодерм (при добавлении ретиноевой кислоты и дибутирил-цикло-АМФ) и некоторые аспекты программируемой клеточной гибели. Мы предположили, что в регуляции этих событий в клетках линии F9 участвуют Ras-зависимые сигнальные пути, так как плейотропный активатор Ras контролирует пролиферацию, апоптоз и дифференцировку во многих клеточных типах [2, 3].

Для проверки этого предположения в лаборатории методом котрансфекции была получена линия — производная линии F9 — с индуцибельной экспрессией онкогена *c-Ha-ras* и гена люциферазы (под одним промотором). Среди нескольких клонов отобрали клон, демонстрирующий хорошую (с пятикратным увеличением) индукцию люциферазы. Эта сублиния была названа F9-Ras-1. Экспрессия белка *c-Ha-Ras* должна была усиливаться после изъятия из среды культивирования клеток F9-Ras-1 доксициклина, что объясняется используемой нами системой плазмид (Clontech, www.clontech.com). Это предположение мы проверили методом иммуноблоттинга. Таким образом, полученная после селекции клональная линия F9-Ras-1 характеризуется индуцибельной экспрессией экзогенного онкобелка *c-Ha-Ras*.

Ранее было показано, что дифференцировка клеток линии F9 сопровождается увеличением активности эндогенного белка Ras [4]. Мы установили, что избыточная экспрессия онкобелка *c-Ha-Ras* не вызывает дифференцировки клеток линии F9-Ras-1, судя по морфологии клеток, темпам их пролиферации (оценивали методом построения кривых роста) и распределению клеток по фазам клеточного цикла (оценивали методом проточной цитофлюориметрии). Одновременно с приведенными здесь результатами, в нашей лаборатории И. А. Чуйкиным (из неопубликованных данных) методом RT-PCR было показано существенное усиление экспрессии гена *c-fos* при индукции экспрессии онкобелка *c-Ha-Ras* в клетках сублинии F9-Ras-1. Ген *c-fos* является маркером и регулятором дифференцировки клеток F9 [5]. Однако, несмотря на увеличение экспрессии гена *c-fos*, клетки, несущие онкогенный Ras, не приобретают фенотипа дифференцированных клеток. Таким образом, увеличение сигнала, проходящего от белка Ras к гену *c-fos*, в нашем клоне не оказалось достаточным для полноценной дифференцировки клеток. С другой стороны, как онкобелок, Ras обладает свойством нарушать нормальную дифференцировку клеток, приводя к тому, что они практически утрачивают способность дифференцироваться. Мы продемонстрировали, что способность клеток сублинии F9-Ras-1 к дифференцировке, вызываемой ретиноевой кислотой, не меняется под действием онкобелка *c-Ha-Ras*, о чем свидетельствуют характерные морфологические изменения клеток и остановка клеток в фазе G1 клеточного цикла.

Во многих и самых разнообразных случаях показано участие онкогенного белка Ras в регуляции программируемой гибели клеток. Мы показали, что в клетках линии F9 онкобелок

c-Ha-Ras является положительным регулятором апоптоза (апоптотической гибели подвергается некоторая доля клеток) даже в отсутствие каких-либо стрессовых воздействий. На это указывает появление олигонуклеосомной фрагментации ДНК при индукции экспрессии онкогенного c-Ha-Ras в недифференцированных клетках линии F9-Ras-1.

Вывод. В клетках линии F9 экзогенный онкобелок c-Ha-Ras в количествах, недостаточных или чрезмерных для направления клеток F9 на путь дифференцировки, приводит к тому, что некоторая доля клеток вступает в апоптоз.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Sleight M. 1992. Differentiation and proliferation in mouse embryonal carcinoma cells. *BioEssays*. 11: 769-774.
2. Frame S., Balmain A. 2000. Integration of positive and negative growth signals during ras pathway activation in vivo. *Current Opinion in Genetics and Development*. 10: 106-113.
3. Crespo P., Leon J. 2000. Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1613-1636.
4. Verheijen M., Wothuis R., Bos J., Defize L. 1999. The Ras/Erk Pathway Induces Primitive Endoderm but Prevents Parietal Endoderm Differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *JBC*. 274: 1487-1494.
5. Muller R., Wagner E. F. 1984. Differentiation of F9 teratocarcinoma stem cells after transfer of c-fos protooncogenes. *Nature* 311: 438-442.