

ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ мРНК ДЛЯ CYP2B В ПЕЧЕНИ КРЫС РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ ВО ВРЕМЯ ИНДУКЦИИ КСЕНОБИОТИКАМИ.

Е.И. ШВАРЦ, Л.Ф. ГУЛЯЕВА, В.В. ЛЯХОВИЧ

Институт молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН, 630117
Новосибирск, 2; факс: (3832)32-31-47; Эл. почта: xeno@imbk.nsk.su

Дот-гибридизацией оценивалось количество мРНК CYP2B1/2 в печени крыс линий Спрэг-Дуули (СД), Брэтелборо (БЛ) и Вистар (В) при индукции изосафролом (ИЗ), арохлором 1254 (АР), фенобарбиталом (ФБ) и трифенилдиоксаном (ТФД). Для изучения динамики накопления мРНК CYP2B1/2 выбраны временные интервалы, соответствующие 18, 48 и 72 часам от начала введения индукторов. Для линий СД и БЛ максимум накопления мРНК во время ФБ индукции достигается к 18 часам. У крыс линии В динамика накопления мРНК была иной и максимум приходится на 48 часов. При введении крысам ТФД максимум накопления мРНК для линий СД и В достигается к 18 часам, для БЛ - к 72 часам. При использовании в качестве индукторов АР и ИЗ разницы в динамике накопления мРНК у всех исследуемых крыс не наблюдается. Впервые показано, что максимум накопления мРНК генов CYP2B1/2 у крыс трех линий, обработанных изосафролом, наблюдается к 18 часам. Таким образом, выявлена как индуктор-зависимая, так и межлинейная разница в динамике накопления мРНК в печени крыс.

Ключевые слова: изосафрол, Арохлор 1254, фенобарбитал, трифенилдиоксан, печень, Спрэг-Дуули, Брэтелборо, Вистар, крысы.

ВВЕДЕНИЕ. Мультигенное сверхсемейство цитохрома Р450 (СУР) катализирует окисление широкого спектра соединений экзогенного и эндогенного происхождения [1,2]. Активность данных ферментов может определяться многими факторами, включая транскрипционные и посттранскрипционные механизмы активации генов [3]. Способность генов СУР к индукции также может влиять на метаболизм различных химических соединений. Различия в структуре и индуцибельности генов некоторых форм цитохрома Р450 могут определять степень риска возникновения онкологических заболеваний, как это показано для CYP1A1 [4,5]. Поскольку многие лекарственные препараты метаболизируются цитохромом Р450, исследование способности соответствующих генов к индукции является одним из перспективных направлений в современной фармакологии.

Подсемейство СУР 2В входит в группу белков, индуцируемых фенобарбиталом (ФБ). Эти ферменты катализируют окисление многих лекарственных препаратов, токсинов и других ксенобиотиков (КС) с самой разнообразной химической структурой [6]. Цитохромы Р450 2В1 и 2В2 печени крыс имеют высокую степень гомологии нуклеотидных последовательностей (до 97%) и кодируются отличными друг от друга, но близко расположенными на одной аутосоме, локусами [7]. Было показано существование четырех аллельных вариантов CYP2B1 и двух аллельных вариантов CYP2B2 [8]. У крыс Кьюджи: (СД) Спрэг-Дуули зарегистрирован низкий уровень экспрессии гена CYP2B2 [9]. Этот дефект обусловлен аутосомной рецессивной точечной мутацией в структурной области гена, которая приводит к дефициту мРНК CYP2B2. При этом не обнаружено нуклеотидных различий в регуляторной области ДНК гена CYP2B2 крыс Кьюджи: (СД) Спрэг-Дуули при сравнении с нормальным CYP2B2 геном. В последние годы появилось

много данных свидетельствующих о том, что в межиндивидуальных различиях активности ферментов, в том числе и СУР могут быть вызваны не только различиями в структуре гена, но и изменениями в регуляции экспрессии генов.

В данной работе мы исследовали динамику накопления мРНК для СУР2В в печени крыс линий Спрэг-Доули (СД), Бретелборо (БЛ) и Вистар (В) во время индукции фенотбарбиталом (ФБ), итрифенилдиоксаном (ТФД).

МЕТОДИКА. В работе были использованы крысы-самцы Спрэг-Доули (СД), Бретелборо (БЛ), Вистар (В) весом 180-200г, полученные из вивария ИЦиГ СО РАН. Животным вводили внутрибрюшинно ФБ в 0,9% растворе NaCl (80 мг/кг веса в течение 3 дней), ТФД, арохрол (АР) и изосафрол (ИЗ) - одноразовой инъекцией в растительном масле (10 мг/кг веса, 500 мг/кг веса и 150 мг/кг веса соответственно.) Контролем служили животные, получавшие 0,9% раствор NaCl или растительное масло. Выделение РНК проводили через 18, 48, 72 часа после введения индуктора.

Выделение суммарной мРНК из печени крыс проводили согласно методу, описанному ранее [10]. Определение концентрации суммарной РНК, контроль за качеством полученных препаратов, подготовка проб РНК, дот-гибридизацию проводили как рекомендовано Маниатисом и соавт. [11]. Фильтры после дот-гибридизации отмывали дважды по 30 мин при 65°C в 2хSSC, содержащем 0,1% SDS. Капроновые фильтры с мечеными ³²P РНК экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-К и усиливающим экраном в течение 1-10 суток при -70°C. Результаты дот-гибридизации обрабатывали сканированием рентгеновской пленки на сканере, приспособленном к спектрофотометру Hitachi-557, снабженном X-Y самописцем модели Hitachi-057. Денситограммы были обчислены по площади пиков. Каждый эксперимент повторяли 2-3 раза. У всех линий отношение значений оставалось постоянным.

В качестве ДНК-зондов использовали: 1) кДНК цитохрома Р-450 печени крыс (СУР2В2), клонированную в плазмиде рBR322 (клон е91) [12]. Вставка кДНК размером 1100 пн включает 6 - 9-й экзон и содержит участки, кодирующие консервативный тридекапептид и высококонсервативный район НR2 цитохрома Р-450 [13]. 2) кДНК β-актинового гена, клонированную в плазмиде рUC18 (клон βA1). Вырезанные из векторов фрагменты были помечены [α -³²P] dATP с помощью метода статистической олигонуклеотидной затравки [14]. Удельная радиоактивность зондов составляла 4-6 x 10⁸ имп/мин на мкг.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для исследования динамики накопления мРНК СУР2В у крыс линий В, СД и БЛ. Были выбраны индукторы ФБ-типа - ФБ, ТФД и индукторы смешанного типа - АР и ИЗ. Из литературных данных известно, что максимум накопления мРНК в клетках печени животных в ответ на введение ФБ составляет 18 часов. В то же время, предварительные эксперименты показали, что введение ТФД не приводит к регистрируемому увеличению СУР2В мРНК в данном временном интервале. Что же касается индукции изосафролом, то время, за которое накопление мРНК в клетках печени достигает максимума, неизвестно. Для АР этот временной интервал составляет 18 часов. Учитывая это, мы ввели дополнительные временные интервалы: 48 и 72 часа от времени введения индукторов. Следует заметить, что имеющийся в нашем распоряжении фрагмент кДНК гена СУР2В2 может гибридизоваться и с мРНК СУР2В1 вследствие высокой гомологии этих генов. Таким образом, в данных экспериментах мы оценивали суммарный уровень мРНК для СУР2В1 и 2В2, обозначенный как СУР2В.

Была проведена дот-гибридизация суммарной РНК, выделенной из печени крыс трех линий, индуцированных АР, ИЗ, ФБ и ТФД с мечеными ³²P кДНК цитохрома Р-450 2В2 (клон е91) и кДНК гена β-актина (клон βA1). В печени крыс ген β-актина экспрессируется конститутивно и его экспрессия не зависит от используемых индукторов Р450, что позволяет использовать гибридизацию с клоном βA1 в качестве контроля дот-гибридизации. Для статистической достоверности каждый эксперимент повторялся 2-3 раза. Радиавтографы дот-гибридизации были денситометрированы на спектрофотометре

"Hitachi-557". Данные денситометрии представлены в виде диаграмм зависимости количества мРНК СУР2В (при гибридизации с клоном е91) или мРНК гена β -актина (при гибридизации с клоном β А1) из печени крыс линий СД, БЛ, В, обработанных различными индукторами, от времени введения индукторов. Диаграммы для клона β А1 изображены на рис. 1, а для клона е91 на рис. 2.

На рис. 1 приведены данные для индукции АР, для остальных индукторов получена аналогичная картина. В качестве сравнения на этой диаграмме приведено максимальное (между тремя линиями крыс) контрольное значение мРНК СУР2В. Из рис. 1 видно, что количество мРНК гена β -актина не зависит ни от времени, через которое вводили индуктор, ни от линии крыс. Кроме этого, для всех используемых индукторов диаграммы оказались одинаковыми. Таким образом, дот-гибридизацию с клоном β А1, мы использовали в качестве контроля. Как видно из диаграммы 2, у крыс, обработанных АР и ИЗ (А,Б) не наблюдается достоверных различий в уровне мРНК в исследуемые временные интервалы. Следует отметить, что в литературе нет данных о времени, за которое уровень мРНК достигает максимума в печени крыс, обработанных ИЗ. Нами показано, что этот временной интервал соответствует 18 часам от начала введения индуктора, что совпадает с таковым для ФБ. Для ФБ и ТФД (рис. 2, В,Г) видны отчетливые различия в динамике накопления мРНК у крыс исследуемых линий. Для линий СД и БЛ максимум накопления мРНК во время ФБ индукции достигается к 18 часам, после чего происходит резкое её снижение. Для линии В уровень мРНК достигает максимального значения к 48 часам после введения индуктора, затем к 72 часам происходит незначительное его снижение. При введении крысам ТФД максимум накопления мРНК для линий СД и В достигается к 18 часам, для БЛ - к 72 часам. Эти результаты свидетельствуют о существовании различий в динамике накопления мРНК у крыс данных линий, обработанных индукторами ФБ-типа.

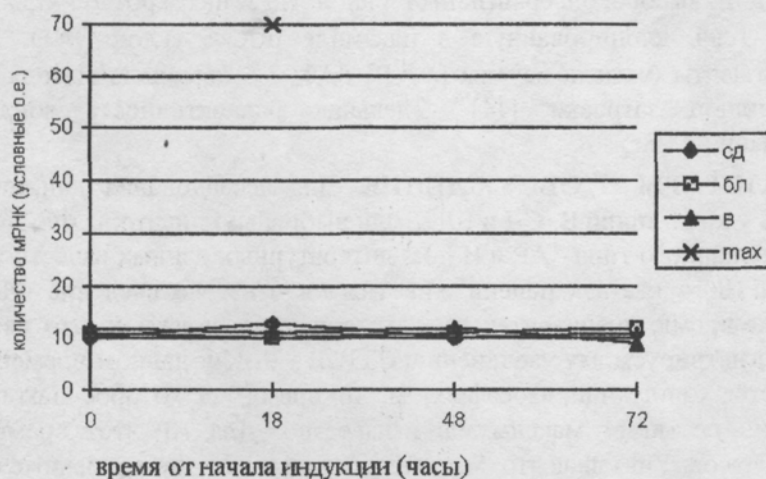


Рисунок 1.

Уровень накопления мРНК гена β -актина у крыс линий СД, БЛ, В, обработанных АР. max - максимальное (между тремя линиями крыс) контрольное значение мРНК СУР2В. Ось абсцисс - время от введения индукторов (часы). Ось ординат - количество мРНК (в условных единицах).

Представлены данные одного из трех экспериментов.

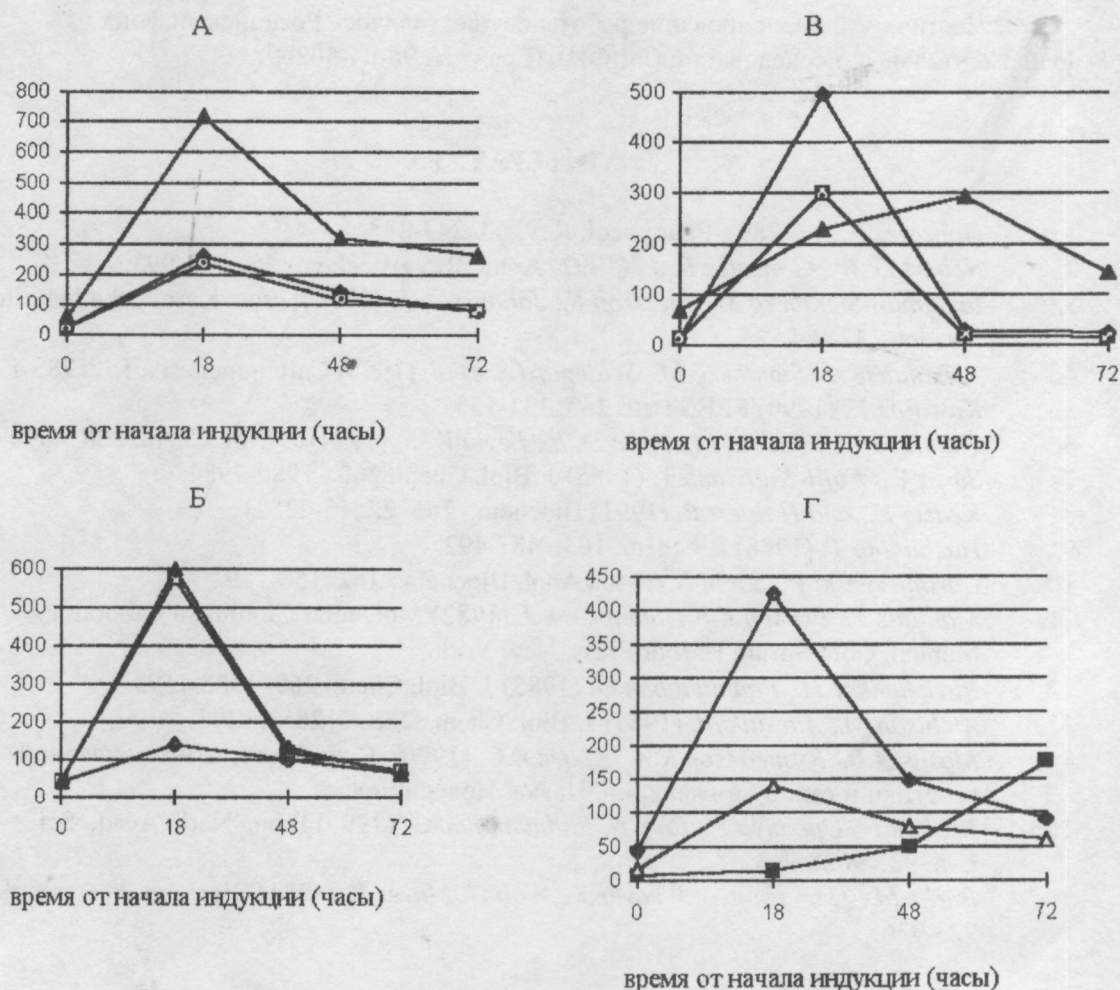


Рисунок 2

Уровень накопления мРНК генов CYP2B2 у крыс линий СД, БЛ, В, обработанных различными индукторами. Ось абсцисс - время от введения индукторов (часы). Ось ординат - количество мРНК (в условных единицах).

А - индукция АР, Б - индукция ИЗ, В - индукция ФБ, Г - индукция ТФД. Представлены данные одного из трех экспериментов.

Можно предположить, что различия в динамике накопления мРНК могут быть обусловлены изменениями в регуляции экспрессии его гена. Молекулярный механизм регуляции экспрессии гена CYP2B2 до конца не изучен. Подманабан с соавторами [15] показали наличие в регуляторной области последовательностей, расположенных в областях: (-69 / -98) и (-126 / -160)- позитивный и негативный элементы соответственно. Эти последовательности специфически связывают белковые факторы транскрипции. Таким образом, изменения на уровне регуляции экспрессии должны, по-видимому, проявляться в изменении характера связывания факторов с данными регуляторными элементами. Подобное предположение было высказано для CYP1A1, когда были показаны различия в его экспрессии в клеточных линиях карциномы молочной железы человека [16]. Можно предположить, что выявленные нами различия в динамике накопления мРНК CYP2B2, зависящие от типа индуктора и линии крыс, связаны с различным взаимодействием факторов транскрипции с регуляторной областью гена CYP2B2.

Частичное финансирование работы осуществлялось Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ), (Грант № 96-04-50209).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gonzalez F. J.* (1989). *Pharmacol. Rev.* **40**, 243-288.
2. *Nebert D. W., Gonzalez F. J.* (1997) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 943-993.
3. *Ingelman-Sundberg M., Eliasson E., Johansson I.* (1990) *Proc. Karolinska Institute. Sweden*, **12**, 1-15.
4. *Alexandrie A., Sundberg M., Seidegard S. et al.* (1994) *Carcinogenesis*. **15**. 1785-1790.
5. *Kawajiri K.* (1990) *FEBS Lett.* **263**. 131-133.
6. *Thomas P. E., Reik L. M., Ryan D. E., Levin W. J.* (1994) *J. Biol. Chem.* **258**. 4590-4598.
7. *Suwa Y., Fujii-Kutiyama Y.* (1985) *J. Biol. Chem.* **260**. 7980-7984.
8. *Kedzie K., and Halpert R.* (1991) *Biochem.* **266** 22515-22521.
9. *Hashimoto T.* (1988) *Biochem.* **103**. 487-492.
10. *Chromczynski P., Sachi N.* (1987) *Anal. Biochem.* **162** 156-159.
11. *Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.* (1982) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York.
12. *Ravishankar H., Padmanaban G.* (1985) *J. Biol. Chem.* **260** 1588-1593.
13. *Atchison M., Adesnik M.* (1983) *J. Biol. Chem.* **258** 11285-11295.
14. *Мазин А.В., Кузнецов К.А., Краев А.С.* (1990) В кн. *Методы молекулярной генетики и геной инженерии*. Наука. Новосибирск.
15. *Rrabnu L., Upadnya P., Ram N. Padmanaban G.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*. **92**. 9628-9632.
16. *Burke M., Thompson S., Weaver R., Wolf C. Mayer R.* (1984) *Biochem. Pharmacol.* **48** 923-936.

DYNAMICS OF CYP2B mRNA LEVELS IN LIVER OF DIFFERENT STRAIN RATS DURING INDUCTION OF XENOBIOTICS.

E.I. SCHWARTZ, L.F. GULYAEVA, V.V. LYAKHONICH.

Institute of Molecular Pathology and Ecological Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, 630117 Novosibirsk, ul. Timakova 2, fax: (3832)32-31-47,
E-mail: xeno@imbk.nsk.su

The transcription level of CYP2B1/2 gene in the liver of Sprague-Dowley (SD), Brattleboro (BL) and Wistar (W) rats treated with isosafrol (IS), Arochlor 1254 (AC), phenobarbital (PB) and triphenyldioxane (TPD) was studied. The quantity of CYP2B1/2 mRNA was assessed by dot-blot analysis at 18, 48 and 72 hours after inducers administration. The mRNA level in SD and BL rats treated with PB reached its maximum by 18 hours followed by fast decline. For W strain the amount of mRNA reached maximum by 48 hours after treatment. After TPD treatment this parameter for SD, W rats reached maximum by 18 hours, while for BL - 72 hours. No differences in the mRNA amount in rats treated with IS and AC were detected. We are not aware of any other data concerning the dynamics of CYP2B1/2 mRNA accumulation during IS-induction. We showed that in this case a maximum of mRNA was reached by 18 hours. Thus, we revealed inducer- and strain - dependent of differences in mRNA accumulation dynamics.

Key Words: isosafrol, Arochlor 1254, phenobarbital, triphenyldioxan, liver, Sprague-Dowley, Brattleboro, Wistar, rats.