



УДК 577.29

ОБНАРУЖЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ПРОТООНКОГЕНОВ В ЭПИДЕРМИСЕ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

Е. Р. Забаровский, И. В. Старков, В. Н. Мордовцев, Л. Л. Киселев

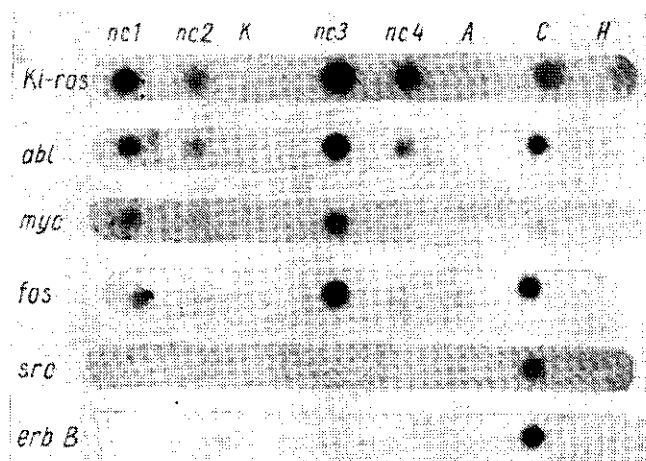
Псориаз известен с глубокой древности и относится к числу наиболее распространенных кожных заболеваний человека. В некоторых странах им страдает 1—3 % населения. В СССР псориаз также является одним из наиболее часто встречающихся дерматозов [1]. Для объяснения причин возникновения псориаза выдвинуто много гипотез, из которых наиболее известны сейчас вирусно-генетическая и аутоиммунная [1—3]. Развитие и распространение в последние годы новых методов молекулярной биологии, а также успехи в области расшифровки молекулярных механизмов ретровирусного канцерогенеза привели к появлению исследований молекулярной природы псориаза [2, 3].

Одна из характерных черт псориаза — активная пролиферация клеток эпидермиса [4]. Выяснение причин, приводящих к ненормально быстрому делению и нарушению дифференцировки кератиноцитов весьма существенно для выяснения этиологии псориаза. Как известно, процесс канцерогенеза — многоступенчатый, и одной из стадий является иммортализация [5], т. е. процесс бесконечного деления клеток. Из эпидермиса больных псориазом удается получить перевиваемые культуры клеток [6], и по некоторым другим характеристикам [4] псориазный эпидермис напоминает иммортализованные клетки. Исходя из этих данных, а также учитывая, что активность клеточных протоонкогенов побуждает клетки к делению, мы впервые исследовали экспрессию протоонкогенов в псориазном эпидермисе.

Использовали представителей различных групп онкогенов: кодирующих рецепторы гормонов и тирозинные протеинкиназы — *v-src* [7], *v-abl* [8] и *v-erbB* [9]; нуклеотид-связывающие мембранные белки — *v-Ki-ras* [10] и ядерные онкобелки — *v-myc* [11] и *v-fos* [12].

ДНК из рекомбинантных плазмид выделяли стандартным методом [13]. Для получения проб, специфичных к онкогенам, ДНК плазмиды обрабатывали соответствующими рестрикционными эндонуклеазами. Фрагменты ДНК, содержащие онкогены, очищали электрофорезом в низкоплавкой агарозе («Sigma», США, тип VII). ^{32}P -меченную ДНК получали ник-трансляцией [13]. Материалом для выделения РНК служили биоптаты эпидермиса пораженной кожи больных псориазом, взятые под местной анестезией. Биоптаты сразу фиксировали жидким азотом и хранили до использования при -70°C . Выделение и очистка РНК описаны ранее [14]. Качество препаратов РНК проверяли электрофорезом в неденатурирующих условиях: присутствие высокомолекулярной РНК и полос рРНК свидетельствовало о том, что РНК при выделении не подвергалась значительной деградации. В среднем из 100 мг псориазного эпидермиса выделяли 35 мкг тотальной РНК, которую использовали для гибридизации. Дот-блот-гибридизацию вели, как рекомендовано [13]. Прегибридизацию проводили 4—12 ч в растворе 77 мМ трис-НСl, рН 8,0, 0,58 М NaCl, 4 мМ ЭДТА, 0,08 % DS-Na, 35 мкг/мл ДНК из молок лосося, 0,3 % фикола, 0,3 % БСА, 0,3 % поливинилпирролидона, 50 %-ного формамида. Гибридизацию вели 18—36 ч в том же растворе, но содержащем 10^6 — 10^7 имп·мин $^{-1}$ ·мл $^{-1}$ меченой ^{32}P радиоактивной пробы. Отмывку фильтров вели в течение 60 мин при 55°C в растворе 1×SSC (150 мМ NaCl и 15 мМ цитрат Na) с 0,1 % DS-Na. В работе использовали нитроцеллюлозные фильтры фирмы «Schleicher and Schull», ФРГ. Радиоавтографию проводили на пленке РМВ при -70°C с применением усиливающего экрана ЭУИ-1 в течение 5 сут.

Результаты дот-блот-гибридизации представлены на рисунке. Для сравнения использовали РНК, выделенную из нормального эпидермиса человека, не болеющего псориазом (точка *H*), и из эпителия аорты (точка *A*), для учета неспецифической адсорбции радиоактивности нанесен раствор $20\times\text{SSC}$ (точка *K*). На рисунке видно, что в псориазическом эпидермисе резко повышена экспрессия протоонкогенов *myc*, *fos*, *Ki-ras* и *abl*, в то же время по сравнению с нормальным эпидермисом не выявлено значительного изменения в экспрессии протоонкогенов *erbB* и *src*. Экспрессия ряда протоонкогенов в псориазическом эпидермисе примерно соответствует таковой в клетках ретикулосаркомы (точка *C*).



Радиоавтограф дот-блот-гибридизации РНК, выделенной из различных тканей, с меченными ^{32}P вирусными онкогенами *Ki-ras* [10], *abl* [8], *myc* [11], *fos* [12], *src* [7] и *erbB* [9]. В точки *nc1*, *nc2*, *nc3* и *nc4* наносили РНК, выделенную из псориазического эпидермиса от разных больных, в точку *A* — из эпителия аорты, точку *C* — из ретикулосаркомы, *H* — из эпидермиса человека, не болеющего псориазом. Во все точки наносили по 5 мкг РНК, в точку *K* нанесли 150 мкл $20\times\text{SSC}$.

Dot-blot hybridization of RNAs isolated from different tissues with following [^{32}P]labeled oncogenes used as probes: *Ki-ras* [10], *abl* [8], *myc* [11], *fos* [12], *src* [7], and *erbB* [9]. Dots *nc1*, *nc2*, *nc3*, *nc4* contain RNAs isolated from psoriatic plaques of different patients. RNA from aorta epithelium (dot *A*), reticulosarcoma (*C*), and from normal epidermis (*H*). Each dot contains 5 μg of RNA except control (dot *K*) containing 150 μl of $20\times\text{SSC}$.

Между четырьмя использованными образцами псориазического эпидермиса наблюдаются некоторые различия, например, в образце *nc2* слабо экспрессированы *fos* и *myc*, в *nc4* — *myc* и т. д., что может быть связано с действием лечения, фазой развития болезни и другими факторами. Во всех образцах сильно экспрессируются гены мембранных онкобелков, принадлежащих к различным группам — *ras* и *abl*. Интересно, что, как и в большинстве злокачественных опухолей, не экспрессируются *erbB* и *src*. Имеющиеся данные пока не позволяют судить о том, экспрессия какого из онкогенов является первичной, а какого — вторичной и какой из онкогенов вносит основной вклад в поведение и свойства псориазических клеток. В этой связи можно упомянуть о том, что производное ретиноевой кислоты (Ro-10-9359-тигазон) эффективно используется при лечении псориаза [15], а ретиноевая кислота обладает способностью подавлять активность гена *N-myc* [16], отсюда возникает предположение, что активность гена-иммортализатора *myc* может вносить вклад в высокую пролиферативную активность псориазических кератиноцитов.

Полученные данные — свидетельство того, что псориазические и неопластические клетки имеют некоторые общие черты. Активация экспрессии протоонкогенов в псориазическом эпидермисе может являться следствием повышенной пролиферативной активности этих клеток по сравнению с нормальными, однако обратное предположение более вероятно. Активация некоторых протоонкогенов может быть результатом первичной активации одного протоонкогена.

Необходимы дальнейшие опыты по изучению влияния лечения на экспрессию протоонкогенов, а также исследование генетических аллелей этих генов у людей, подверженных и не подверженных псориазу. Предварительные данные подтверждают, что при достижении терапевтического эффекта экспрессия гена *myc* падает. Обнаружение

экспрессии протоонкогенов при псориазе, сделанное в этой работе, меняет взгляды на этиологию этого заболевания и создает предпосылки для поисков новых путей его лечения.

Авторы искренне благодарят И. М. Чумакова за ценные советы при проведении работы и замечания по рукописи, А. Н. Гуляеву и Л. М. Костикову — за участие в некоторых экспериментах, А. М. Мелкова — за предоставление субклонированного онкогена *v-erbB*.

EVALUATION OF PROTO-ONCOGENE EXPRESSION IN EPIDERMIS OF PSORIATIC PATIENTS

E. R. Zabarovsky, I. V. Starkov, V. N. Mordovtsev, L. L. Kisselev

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow
Central Research Institute of Dermatology and Venerology,
Ministry of Public Health, USSR, Moscow

Summary

RNAs isolated from the epidermis of psoriatic patients were dot-blot hybridized with viral oncogenes (*fos*, *myc*, *src*, *erbB*, *Ki-ras* and *abl*). The RNAs from epidermis of the nonpsoriatic patient and from aorta epithelium were used for comparison. The data show that the expression of protooncogenes *Ki-ras*, *abl*, *fos* and *myc* significantly increased in psoriatic plaques. These results open new ways for the analysis of etiology of psoriasis and its cure.

1. *Псориаз* / Под ред. С. И. Довжанского.— Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 1976.— 283 с.
2. *Virological studies on psoriatic lymphocytes* / J. J. Guilhou, H. Vannerrau, D. Theunyk et al. // *Psoriasis proc. third int. symp.* / Eds E. M. Farber, A. Cox.— New York; London: Grune and Stratton, 1982.— P. 251—252.
3. *Iversen O.-J., Nissen-Meyer J., Dalen A. B.* Characterization of virus-like particles from a psoriatic with respect to the possible presence of particle-associated RNA-directed DNA polymerase // *Acta pathol. et microbiol. scand. B.*—1983.—**91**, N 6.— P. 413—417.
4. *Van Scott E. J., Ekel T. M.* Kinetic of hyperplasia in psoriasis // *Arch. Dermatol.*—1963.—**88**, N 4.— P. 373—379.
5. *Land H., Parada L. F., Weiberg R. A.* Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes // *Nature.*—1983.—**304**, N 5928.— P. 596—601.
6. *Iversen O.-J., Dalen A. B.* Particles from psoriatic urine and tissue culture have common antigenic properties // *Acta pathol. et microbiol. scand. B.*—1983.—**91**, N 5.— P. 343—349.
7. *Амбарцумян Н. С., Татосян А. Г., Ениколопов Г. Н.* Молекулярное клонирование фрагментов ДНК вируса саркомы Рауса // *Молекуляр. биология.*—1982.—**16**, № 6.— С. 1183—1188.
8. *Structure of the Abelson murine leukemia virus genome and the homologous cellular gene: studies with cloned viral DNA* / S. P. Goff, E. Gilboa, O. N. Witte, D. Baltimore // *Cell.*—1980.—**22**, N 3.— P. 777—785.
9. *Molecular cloning of the avian erythroblastosis virus genome and recovery of oncogenic virus by transfection of chicken cells* / B. Vennstrom, L. Fanshier, C. Moscovici, J. M. Bishop // *J. Virol.*—1980.—**36**, N 2.— P. 575—585.
10. *The p21 src genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes* / R. W. Ellis, D. DeFeo, T. Y. Shin et al. // *Nature.*—1981.—**292**, N 5823.— P. 506—511.
11. *Molecular cloning of the avian myelocytomatosis virus genome, and recovery of infectious virus by transfection of chicken cells* / B. Vennstrom, C. Moscovici, H. M. Goodman, J. M. Bishop // *J. Virol.*—1981.—**39**, N 2.— P. 625—631.
12. *FBI murine osteosarcoma virus; identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA* / T. Curran, G. Peters, C. Van Beveren et al. // *Ibid.*—1982.—**44**, N 2.— P. 674—682.
13. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д.* Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1985.— 479 с.
14. *Human nucleotide sequences related to the transforming gene of murine sarcoma virus: studies with cloned viral and cellular DNAs* / I. M. Chumakov, E. R. Zabarovsky, V. S. Prassolov et al. // *Gene.*—1982.—**17**, N 1.— P. 19—26.
15. *Retinoids, a new class of compounds with prophylactic and therapeutic activities in oncology and dermatology* / H. Mayer, W. Bollag, R. Hänni, R. Rüegg // *Experientia.*—1978.—**34**, N 9.— P. 1105—1109.

16. Thiele C. J., Reynolds C. P., Israel M. A. Decreased expression of *N-myc* precedes retinoid-acid induced morphological differentiation of human neuroblastoma // *Nature*.— 1985.—313, N 6001.— P. 406—409.

Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва
Центр. н.-и. кожно-венеролог. ин-т МЗ СССР, Москва

Получено 12.01.86

УДК 577.152

ГЕНЫ ПУРИНОВОГО БИОСИНТЕЗА ДРОЖЖЕЙ СОДЕРЖАТ РЕГУЛЯТОРНЫЕ СИГНАЛЫ СИСТЕМЫ ОБЩЕГО КОНТРОЛЯ БИОСИНТЕЗА АМИНОКИСЛОТ

А. Н. Мясников, М. Н. Смирнов

В последние годы значительный интерес привлекает исследование механизмов регуляции биосинтеза ферментов анаболизма аминокислот в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* [1]. Для нескольких групп ферментов, каждая из которых обеспечивает синтез одной или двух-трех метаболически тесно связанных аминокислот, показано наличие двух систем такой регуляции: специфической, заключающейся в усилении биосинтеза ферментов анаболизма определенной аминокислоты в ответ на голодание по этой аминокислоте, а также неспецифического регуляторного механизма, при посредстве которого недостаток одной аминокислоты приводит к усилению продукции ферментов биосинтеза большой группы аминокислот. В литературе этот механизм получил название «общего контроля биосинтеза аминокислот» [1]. Идентифицирован ряд генов, участвующих в этой регуляторной системе, причем ключевым среди них оказался ген *GCN4*. Этот ген транскрибируется в мРНК необычного строения, скорость трансляции которой усиливается в условиях аминокислотного голодания [2, 3]. Белок — продукт гена *GCN4* — непосредственно связывается с регуляторными участками промоторов многих генов аминокислотного анаболизма, узнавая в них короткую последовательность нуклеотидов TGAСТС, и активирует транскрипцию этих генов [4, 5].

Значительно слабее изучена регуляция экспрессии генов, обеспечивающих биосинтез пуриновых нуклеотидов в дрожжах [1]. Только для одного гена пуринового биосинтеза — гена *ADE4* показано, что уровень его транскрипции регулируется концентрацией аденина в питательной среде [6]. Предположив, что гены пуринового биосинтеза также могут иметь общую систему координированной регуляции, мы провели сравнение нуклеотидных последовательностей промоторных областей этих генов для выделения в них повторяющихся участков — кандидатов на роль сайтов узнавания гипотетического регуляторного белка.

В настоящее время известна нуклеотидная последовательность трех генов пуринового биосинтеза: *ADE4* [6], *ADE2* [7], а также *ADE1*. Структура последнего установлена нами и полностью публикуется отдельно. Нуклеотидная последовательность промоторной области гена *ADE1* приведена на схеме 1. Представлена кодирующая нить ДНК. Нумерация нуклеотидных остатков от предполагаемого АТГ-кодона. Фрагмент, повторяющийся в промоторах генов пуринового биосинтеза, выделен.

```
ТАТТС АСGAGTCAGT СТGACTCTTG СGAGAGATGA — 20
GGATGТААТА АТАСТААТСТ СGAAGATGCC АТСТААТАСА ТАТАGACATA —151
ТАТАТАТАТА ТАТАТАТАСА ТТСТАТАТАТ ТСТТАСССAG АТТСТТТGAG —101
GТАAGACGGT TGGGТТТТAT СТТТТGСAGT TGGAСТATT АAGAACAATC —51
GAATCATAAG САТТGСТТАС ААAGAАТАСА САТАСGAAAT АТТААСGATA АТG
```

Поиск совпадающих фрагментов в промоторных областях трех перечисленных генов позволил выделить консервативный фрагмент TGAСТCTT, встречающийся во всех трех промоторах (в гене *ADE2* он повторяется дважды), причем этот фрагмент всегда обнаруживается на расстоянии от 150 до 350 п. о. от АТГ-кодона, т. е. как раз в том районе, где обычно обнаруживаются регуляторные участки дрожжевых промоторов. На схеме 2 представлены консервативные участки в промоторах генов пуринового биосинтеза. Приведены также участок промотора гена *HIS1*, содержащий идентичный