НЕЙРОХИМИЯ
т. 7, № 3, 1988

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 547.963.3

ОБНАРУЖЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ *Ki-ras* ПОДОБНЫХ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПРОТООНКОГЕНА *ras* В КЛЕТКАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

СКОБЕЛЕВА Н. А., АМБАРЦУМЯН Н. С., ЗАХАРЯН Р. А.
Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

В геноме всех исследованных к настоящему времени эукариотических организмов содержится по крайней мере по одному представителю семейства генов *ras* [1, 2]. Эти гены были выявлены впервые как трансформирующие гены онкогенных вирусов саркомы крыс Харви и Кирстен (Ki-MSV, Ha-MSV). Мутантные гены семейства *ras* способны трансформировать фибробласты к опухолевому фенотипу [3]. Эволюционная консервативность генов, как и их трансформирующая активность, характерные для мутантных вариантов, позволяют предположить, что гены семейства *ras* играют существенную роль в пролиферации клеток и их дифференцировке в организме [4]. Транскрипция каждого протоонкогена, видимо, контролируется независимо в каждой ткани, поэтому уровни транскрипции различных онкогенов в тканях сильно варьируют. Показано, что гены семейства *ras* дифференциально экспрессируются в различных тканях мыши [5].

При инфекции культуры нервных клеток Ki- и Ha-MSV приостанавливается рост клеток и индуцируется их дифференцировка [6]. Обнаруживаются *ras*-специфические транскрипты и в дифференцированной нервной ткани у *D. melanogaster* [7]. В нервных тканях как млекопитающих, так и *D. melanogaster*, показан также высокий уровень экспрессии другого протоонкогена—*c-src* [8, 9]. Можно предположить, что некоторые протоонкогены играют определенную роль в поддержании дифференцированного статуса нервных клеток.

Целью настоящей работы было исследование возможности транскрипции последовательностей протоонкогена ras в клетках мозга крысы.

В работе были использованы dNTP («Amersham», Англия), [^{32}P]-dNTP—(В О «Изотоп», Ташкент), агароза, трис, хлорамфеникол, лизоцим, бромид этидия («Sigma», США), нитроцеллюлозные фильт-

тры («Millipore», США), GF/C фильтры («Whatman», Англия), сефадекс G-50, fine («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция), дрожжевой экстракт, триптон, агар («Difco», США), ДНК-полимераза I из *E. coli*, рестриктазы (П/О «Фермент», Вильнюс) и другие реактивы аналитической чистоты.

Выделение из мозга крысы свободных полисом и полисомной РНК, получение поли(А)$^+$РНК описано ранее [10]. На поли(А)$^+$РНК—матрице, выделенной из мозга крысы, синтезированы структурные гены, последовательным действием ревертазы, ДНК-полимеразы I и S1 нуклеазы. Полученные структурные гены клонированы в векторе pBR 322 методом дГ—дЦ коннекторов по участку узнавания рестрикционной эндонуклеазой Pst1 [11].

Рекомбинантные клоны анализировали с помощью метода гибридизации колоний, используя в качестве «молекулярного зонда» меченный в системе ник-трансляции 1 кб. фрагмент *Ki-ras*-гена (У. А. $2 \cdot 10^8$ имп/мин/мкг), полученный из плазмиды Hi-Hi-3 [12] при обработке рестриктазой EcoR1 и элюированный из низкоплавкой агарозы. Из 1,5 тысяч проанализированных клонов методом гибридизации колоний выявлено 2 клона, содержащих последовательности ДНК, гибридизирующиеся с этим «молекулярным зондом». Из одного гибридизующегося клона выделена и очищена плазмидная ДНК, обозначенная нами как плазмида pRK-1.

Метод клонирования структурных генов с помощью дГ—дЦ коннекторов по участку узнавания рестриктазой Pst1 удобен тем, что встроенная в плазмиду ДНК может быть вышеплена из рекомбинантной плазмиды с помощью этой же рестриктазы, что свидетельствует о восстановлении участка узнавания рестриктазы Pst1 по обеим сторонам от вставки ДНК. После обработки рекомбинантной плазмиды pRK-1 рестриктазой Pst1 и электрофореза в 1%-ной агарозе полученных продуктов рестрикции обнаруживается вышеплающийся фрагмент ДНК, размером ~ 450 пар оснований (п. о.) (рис. 1, *а*).

Доказательством того, что фрагмент, образующийся при обработке плазмиды pRK-1 рестриктазой Pst1, действительно содержит *Ki-ras*-подобные последовательности, служат опыты по блот-гибридизации этого фрагмента с [^{32}P]ДНК, синтезированной в системе ник-трансляции по матрице *Ki-ras* фрагмента, выделенного из плазмиды Hi-Hi-3 (рис. 1, *г*).

Обработка плазмиды pRK-1 рестриктазами EcoR1, Pvu11 и Sa1G1 показала, что во встроенной ДНК нет участков узнавания для рестриктаз EcoR1 и Sa1G1, тогда как рестриктаза Pvu11 отщепляет от встроенной ДНК фрагмент размером ~ 60 пар оснований (рис. 1, *б*).

Методом блот-гибридизации проведен анализ РНК, выделенных из мозга крысы. Для этого РНК, выделенная из свободных полисом мозга крыс, разгонялась электрофорезом в 1,2%-ной агарозе, содержащей формальдегид, после чего продукты электрофореза переносили на нитроцеллюлозный фильтр [14] и гибридизовали с [^{32}P]ДНК, меченной в системе ник-трансляции по матрице плазмидной ДНК pRK-1 и Hi-Hi-3 (рис. 2). При гибридизации с двумя плазмидами выявлены

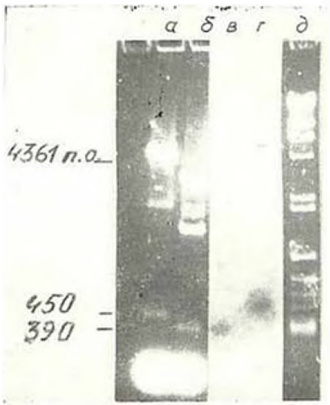

Рис. 1. Электрофорез в 1%-ной агарозе плазмиды pRK-1 после расщепления рестриктазой PstI (*а*), PstI + PvuII (*б*). После электрофореза фрагменты ДНК переносили на нитроцеллюлозный фильтр и проводили гибридизацию по Southern [13]. Гибридизация меченой [^{32}P] ДНК Ki-ras с плазмидой pRK-1, обработанной рестриктазами PstI+PvuII (*в*) и PstI (*г*). В качестве маркеров использованы фрагменты ДНК фага λ, после обработки рестриктазой HindIII, ДНК ФХ-174 RF после обработки рестриктазой HincII (*д*)

Рис. 2. Определение размеров РНК, гибридизующихся с [^{32}P]-ДНК плазмиды Hi-Hi-3 (*а*) и pRK-1 (*б*), после электрофореза в 1,2%-ной агарозе с формальдегидом и переноса РНК на нитроцеллюлозный фильтр. В качестве маркеров использованы 28S, 18S и 5S рРНК кб (тысяча оснований)

2 зоны гибридизации РНК в районе ~ 4,0 и 2,0 кб. Ранее было показано, что в процессе развития мышиных эмбрионов происходит транскрипция 2-х с—*ras-Ki* мРНК, размеры которых соответствуют 2,0 и 4,4 кб. [15]. Совпадение размеров РНК, гибридизующихся с плазмидами pRK-1 и Hi-Hi-3 указывает на то, что выделенный нами клон действительно содержит *Ki-ras*-подобные последовательности.

Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что в клетках мозга крысы происходит транскрипция протоонкогена *Ki-ras*, и нами получена плазмида, содержащая *Ki-ras*-подобные последовательности ДНК. Дальнейший анализ первичной структуры ДНК плазмиды pRK-1 позволит идентифицировать ген, возможно, относящийся к семейству генов *ras*.

DETERMINATION OF TRANSCRIPTION OF *ras* PROTOONCOGENE NUCLEOTIDE SEQUENCES SIMILAR TO K_i-*ras* IN RAT BRAIN CELLS

SKOBELEVA N. A., HAMBARTSUMYAN N. S., ZAKHARYAN R. A.
Institute of Experimental Biology Armenian Acad. Sci., Yerevan

A cDNA clone containing sequences similar to K_i-*ras* was isolated from rat brain cDNA library. In rat brain cells the sequences of protooncogene K_i-*ras* were proposed to be transcribed and a recombinant plasmid containig such sequences was obtained.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Shilo W., Weinberg R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci. v. 78, № 11, p. 6789—6792, 1981.
2. *Lowy D., Williamsen B.* Cancer Surv, v. 5, № 2, p. 275—289, 1986.
3. *Bishop J. M.* Science, v. 235, № 4790, p. 305—311, 1987.
4. *Slamon D. J., Cline M. J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci. v. 81, № 22, p. 7141—7146, 1986.
5. *Spandidos D. A., Dimitrov I.* Biosci. Repts. v. 5, № 12, p. 1035—1039, 1985.
6. *Noda M., Ko M., Ogura A., Liu W., Amano T., Takano A., Ikawa J.* Nature, v. 318, № 6012, p. 73—75, 1985.
7. *Segal D., Shilo B. Z.* Mol. and Cell. Biol. v. 6, № 6, p. 2241—2248, 1986.
8. *Brugge J. S., Cotton P. C., Queral A. E., Barrett S. N., Nonner D., Keane R. W.* Nature, v. 316, № 6028, p. 554—557, 1985.
9. *Martines R., Mathey-Prevot B., Bernards A., Baltimore D.* Science, v. 237, № 4813, p. 411—415, 1987.
10. *Скобелева Н. А., Бухман В. А., Захарян Р. А., Назарян К. Б., Казарян Б. А.* Нейрохимия, т. 3, № 3, с. 280—283, 1984.
11. *Скобелева Н. А., Захарян Р. А., Назарян К. Б., Казарян Б. А.* Нейрохимия, т. 6, № 6, с. 506—511, 1987.
12. *Ellis R. W., DeFeo D., Shih T. Y., Gonde M. A., Young H. A., Tsuchida N., Lowy D. R., Scolnick E. M.* Nature, v. 292, № 5708, p. 505—511, 1981.
13. *Southern E. M.* J. Mol. Biol., v. 98, № 3, p. 503—517, 1975.
14. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* Molecular Cloning: a Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), 1982.
15. *Muller R., Slamon D. J., Adamson E. D., Tremblay J. M., Muller D., Cline M. J., Verma J.* Molec. Cell. Biol., v. 3, № 3, p. 1062—1069, 1983.

Поступила 28. III 1988