



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 572.2

© 1990 г.

*П. Г. Князев, О. М. Серова, В. И. Бабенко,
И. Ф. Никифорова, А. А. Гольцов*, Г. Ф. Плужникова,
О. В. Плуталов**, Ю. А. Берлин**, Е. И. Шварц**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПРИРОДА ПОВРЕЖДЕНИЙ ОНКОГЕНА *HRAS1*
В КАРЦИНОМАХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА: ТРАНСВЕРСИЯ
 $G \rightarrow T$ В 12-м КОДОНЕ ОДНОГО АЛЛЕЛЯ ПРИ ДЕЛЕЦИИ
ДРУГОГО АЛЛЕЛЯ**

НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова МЗ СССР, Ленинград;

** Ленинградский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова АН СССР,
Гатчина Ленинградской обл.;*

*** Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва*

К числу важнейших молекулярно-генетических нарушений, лежащих в основе развития неоплазм у человека, относятся амплификации, транслокации и делеции аллелей онкогенов [1–3]. Для целого ряда опухолей обнаружена делеция нормальных последовательностей генома, которая демаскирует мутации в протоонкогенах [4]; гены, причастные к возникновению или прогрессии опухоли вследствие утраты ими специализированной функции, относят к рецессивным онкогенам, или антионкогенам (супрессорным генам), поскольку присутствие в клетке хотя бы одного неповрежденного аллеля таких генов достаточно для сдерживания развития малигнизации или метастазирования.

Так, потеря одного из аллелей онкогена *HRAS1*, расположенного в коротком плече 11-й хромосомы, обнаружена примерно у 20% больных [5–7]. До последнего времени оставалось неясным, содержит ли оставшийся аллель онкогена *HRAS1* *ras*-специфические мутации. Как было установлено ранее, точковые мутации в 12-м и 61-м кодонах протоонкогена *HRAS1* превращают его в трансформирующий ген [8, 9]. Целью настоящей работы явился поиск мутаций в 12-м кодоне гена *HRAS1* в ДНК карцином молочной железы (КМЖ) в случаях делеционного повреждения одного из аллелей этого гена.

Ранее *PvuII*-рестрикция ДНК человека и последующая гибридизация по Сазерну [7] с зондом на протоонкоген *HRAS1* позволила выявить различные генотипы [9] (пример приведен на рис. 1, дорожка 2). В настоящей работе из 71 исследованного препарата ДНК первичных КМЖ в 40 случаях обнаружены гетерозиготы с генотипом A1/A2 (аллелю A1 отвечает фрагмент величиной 2,7 т.п.о., а аллелю A2 — 3,8 т.п.о.). Среди них в 10 случаях выявлена тотальная делеция одного из аллелей при сохранении второго (дикого) аллеля. Именно эти образцы мы исследовали на наличие мутации в 12-м кодоне оставшегося аллеля гена *HRAS1*.

Для этого мы использовали полимеразную цепную реакцию синтеза ДНК [11]; примерами служили ранее описанные полинуклеотиды d(GG CAGGAGACCCTGTAGGAG) (праймер 1) и d(CTATTCGTCCACAA

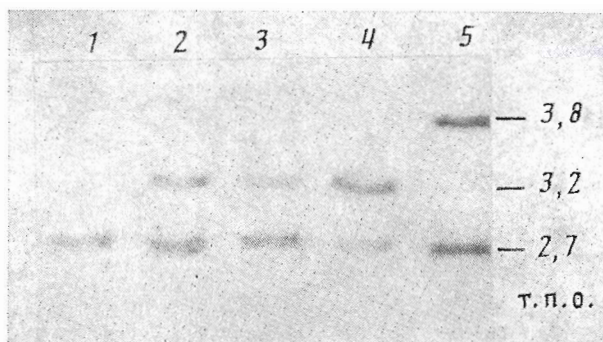


Рис. 1. Гибридизация по Сазерну *Pvu*II-фрагментов ДНК КМЖ молочной железы человека с онкогеном *HRAS1* (в качестве зонда использовали меченую ник-транс-ляцией плазмиду pEJ 6.6 (с-*Ha*-*ras*-1) [10], любезно предоставленную д-ром Р. Вайн-бергом, Кембридж, Массачусетс). Ниже приведены номер дорожки, источник ДНК и генотип клетки по гену *HRAS1*: 1 — КМЖ-12 (A1/A1), 2 — лейкоциты больной КМЖ-9 (A1/A2, нормальные клетки), 3 — КМЖ-9 (A1/a2; делетирован аллель A2; этот же генотип обнаружен в клетках КМЖ-107), 4 — КМЖ-5 (a1/A2; делетирован аллель A1), 5 — КМЖ-31 (A1/A3; часто встречаемое, наряду с генотипом A1/A1, распределение аллелей гена *HRAS1* в злокачественных опухолях человека). Остаточные сигналы гибридизации, соответствующие аллелю A2 (дорожка 3) и A1 (до-рожка 4), обусловлены контаминацией опухоли нормальными клетками. На рисунке указаны размеры аллелей гена *HRAS1* (т. п. о.): A3 (3, 8), A2 (3, 2), A1 (2, 7)

AATGG) (праймер 2), позволяющие амплифицировать *in vitro* участок 1-го экзона гена *HRAS1* длиной 145 п.о. [12]. Праймеры были синтезиро-ваны модифицированным фосфамидитным методом [13]. Амплификацию проводили в 100 мкл смеси, содержащей наряду со стандартными компо-нентами [14] по 50 нг праймеров и 200 нг ДНК. После денатурации (7 мин при 96° С) и отжига (2 мин при 55° С) добавляли 3 ед. акт. ДНК-поли-меразы *Thermus thermophilus* [14] и проводили синтез 2 мин при 72° С. После 30 циклов амплификации ДНК анализировали электрофорезом в 6% ПААГ.

Амплифицируемый участок гена *HRAS1* в норме содержит два *Msp*I-сайта [15] (см. рис. 2а), так что при *Msp*I-гидролизе продукта амплифи-кации образуется три фрагмента длиной 25, 56 и 64 п.о. Один из этих сайтов, расположенный в кодирующей области гена *HRAS1*, перекрыва-ется с 12-м кодоном и исчезает в случае точковой замены 1-го или 2-го звена этого кодона. В результате наблюдается изменение характера *Msp*I-гидролиза — вместо трех образуются лишь два фрагмента размером 25 и 120 п.о. Образование фрагмента 120 п.о., свидетельствующее о мутации в 12-м кодоне оставшегося аллеля гена *HRAS1*, мы наблюдали при *Msp*I-гидролизе продуктов амплификации ДНК ряда карцином человека (КМЖ-5, КМЖ-9 и КМЖ-107; рис. 2б, дорожки 2, 4 и 6 соответственно).

Для выяснения молекулярной природы изменения в 12-м кодоне гена *HRAS1* был проведен структурный анализ этих продуктов амплификации по методу Максама — Гилберта [16] (в этом случае при проведении поли-меразной реакции праймер № 1 предварительно метилил [³²P]фосфатом по 5'-конду с помощью [γ-³²P]АТР и Т4-полннуклеотидкиназы, что приво-дило к асимметричному мечению дуплексного продукта амплификации). На рис. 3 представлен результат определения нуклеотидной последова-тельности участка *HRAS1* в районе 12-го кодона в ДНК КМЖ-5: оказа-лось, что этот кодон (выделен прямоугольником) имеет структуру GTC вместо GGC, ранее определенной в диком аллеле этого гена [15]. Такую же трансверсию G→T в 12-м кодоне оставшегося аллеля гена *HRAS1* мы обнаружили в ДНК КМЖ-9 и КМЖ-107 (данные не представлены). Ра-нее эта трансверсия была идентифицирована в онкогене *HRAS1* опухоли мочевого пузыря человека [8, 15].

Таким образом, среди 10 случаев делеции аллеля гена *HRAS1* карци-ном молочной железы человека в 3 случаях выявлена точковая мутация в 12-м кодоне оставшегося аллеля, а именно трансверсия G→T, которая, по

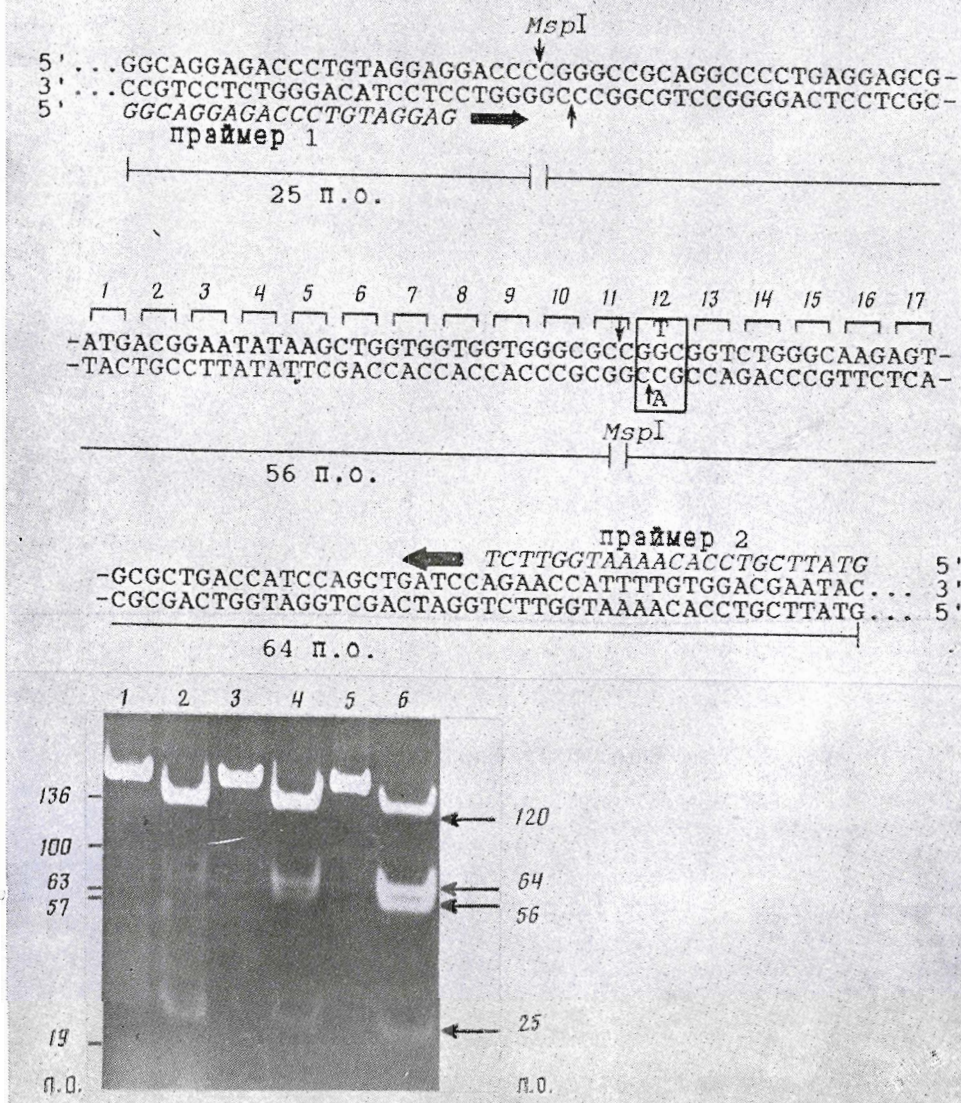


Рис. 2. Амплификация участка аллелей онкогена *HRAS1*. а – нуклеотидные последовательности фрагмента ДНК [8] и праймеров для амплификации [12] (указано направление элонгации), положение *MspI*-сайтов (приведены размеры *MspI*-фрагментов) и первых 17 кодонов 1-го экзона гена *HRAS1*. Рамкой выделен 12-й кодон, в котором трансверсия G→T обуславливает ликвидацию одного *MspI*-сайта и замену Gly→Val в продукте *HRAS1* – белке p21. б – рестриктивный (*MspI*) анализ продуктов амплификации (электрофорез в 6% ПААГ, окрашивание бромистым этидием). Дорожки 1, 3, 5 – продукты амплификации ДНК КМЖ-5, КМЖ-9 и КМЖ-107, дорожки 2, 4, 6 – соответственно их *MspI*-гидролизаты. Слева указаны положения *AluI*-фрагментов ДНК pBR322 (стандарт), справа – положения фрагментов амплифицированных участков после расщепления рестриктазой *MspI*

данным для опухоли другой локализации [8, 15], сопровождается превращением протоонкогена в онкоген. Это означает, что утрата в геноме опухолевой клетки неповрежденного аллеля гена, осуществляющего физиологическую функцию в транспорте митогенного сигнала, резко усиливает трансформирующие свойства продукта, кодируемого мутантным аллелем. Полученные нами данные впервые свидетельствуют о том, что утрата дикого аллеля гена *HRAS1* демаскирует мутантный аллель, поэтому этот ген может быть отнесен к рецессивным онкогенам (генам, супрессиру-

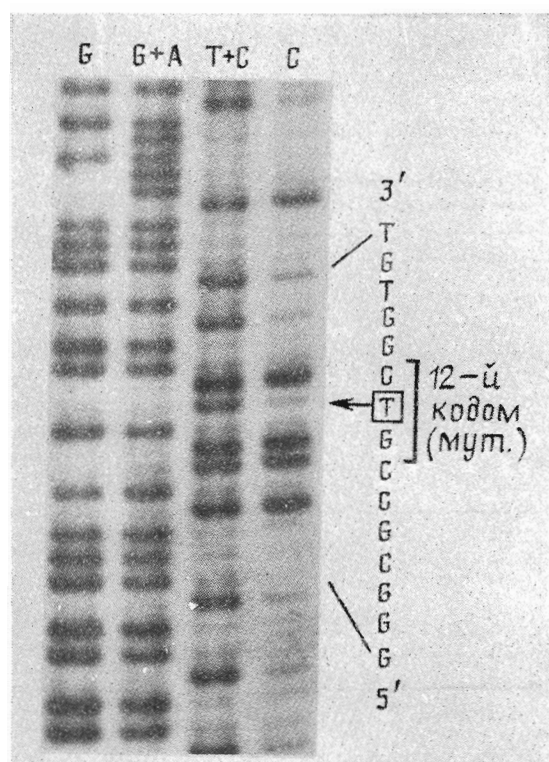


Рис. 3. Секвенирование по Максему – Гилберту фрагмента аллеля гена *HRAS1*, содержащего 12-й кодон с трансверсией G→T (радиоавтография электрофореза в 8% ПААГ)

пим рост опухоли). Обоснование супрессирующей роли немутантного продукта гена *HRAS1* – белка p21 явится предметом дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fearon E. R., Vogelstein B., Feinberg A. P. // *Nature*. 1984. V. 309. № 5964. P. 176–178.
2. Cavenee W. K., Dryja T. P., Phillips R. A., Benedict W. F., Godbout R., Gallie B. L., Murphree A. L., Strong L. C., White R. L. // *Nature*. 1983. V. 305. № 5937. P. 779–784.
3. Koufos A., Hansen M. F., Copeland N. G., Jenkins N. A., Lampkin B. C., Cavenee W. K. // *Nature*. 1985. V. 316. № 6026. P. 330–334.
4. Lee E. Y.-H. P., To H., Shew J.-Y., Bookstein R., Scully P., Lee W.-H. // *Science*. 1988. V. 241. № 4862. P. 218–221.
5. Theillet C., Lidereau R., Escot C., Hutzell P., Brunet M., Gest J., Schlom J., Callahan R. // *Cancer Res*. 1986. V. 46. № 9. P. 4776–4781.
6. Ali I. U., Lidereau R., Theillet C., Callahan R. // *Science*. 1987. V. 238. № 4824. P. 185–188.
7. Knyazev P. G., Nikiforova I. F., Serova O. M., Novikov L. B., Pluzhnikova G. F., Abramov A. M., Seitz I. F. // *Modern Trends in Leukemia IX*. Springer: Heidelberg, 1989. P. 433–435.
8. Tabin C. J., Bradley S. M., Bargmann C. I., Weinberg R. A., Papageorge A. G., Scolnick E. M., Dhar R., Lowy D. R., Chang E. H. // *Nature*. 1982. V. 300. № 5888. P. 143–149.
9. Князев П. Г., Шеффер Р., Виллике К., Сейц И. Ф. // *Докл. АН СССР*. 1985. Т. 283. № 4. С. 1011–1013.
10. Shih C., Weinberg R. A. // *Cell*. 1982. V. 29. № 1. P. 161–169.
11. Vosberg H.-P. // *Hum. Genet*. 1989. V. 83. № 1. P. 1–15.
12. Stevens C. W., Monoharan T. H., Fahl W. E. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. № 9. P. 3875–3879.
13. Sinha N. D., Biernat J., McManus J., Köster H. // *Nucl. Acids Res*. 1984. V. 12. № 11. P. 4539–4557.
14. Шеварц Е. Н., Кабоев О. К., Гольцов А. А., Виноградов С. В., Лебедев Е. Н., Берлин Ю. А. // *Биоорг. химия*. 1988. Т. 14. № 11. С. 1577–1579.

15. Reddy E. P. // Science. 1983. V. 220. № 4601. P. 1061-1063.

16. Maxam A., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560-564.

Поступила в редакцию
14.XI.1989

P. G. KNYAZEV, O. M. SEROVA, V. I. BABENKO, I. F. NIKIFOROVA,
A. A. GOL'TSOV *, G. F. PLUZHNIKOVA, O. V. PLUTALOV **,
Yu. A. BERLIN **, E. I. SCHWARTZ *

**MOLECULAR NATURE OF LEISIONS OF THE *HRAS1* ONCOGENE
IN HUMAN BREAST CARCINOMAS: G → T TRANSVERSION IN THE
12th CODON OF ONE ALLELE WITH THE OTHER ALLELE DELETED**

*N. N. Petrov Institute of Oncology, Ministry of Health of the USSR,
Leningrad;*

** B. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics, Academy of Sciences of the USSR,
Gatchina, Leningrad Region;*

*** M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

In study of human breast carcinomas, molecular nature of a mutation in one allele of the *HRAS1* gene leading to malignization in case of the second allele being deleted is shown to be G→T transversion in the 12th codon of the gene.