



УДК 577.152.363\*10.05:575.117.2

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ УБАИНЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ $H^+,K^+$ -АТФ-АЗЫ В ЭПИДЕРМИСЕ КОЖИ КРЫСЫ

© 2002 г. Л. Г. Романова\*, С. В. Новоселов\*\*,  
М. В. Егоров\*, М. Б. Костина\*, М. И. Шапаронов\*\*

\* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\*\* Институт биофизики клетки РАН, Пуцдино Московской обл.

Поступила в редакцию 27.07.2001 г. Принята к печати 28.08.2001 г.

С помощью гибридизации РНК *in situ* и иммуногистохимии проведена сравнительная локализация  $Na^+,K^+$ -АТФ-азы и убаинчувствительной  $H^+,K^+$ -АТФ-азы в коже крысы.  $Na^+,K^+$ -АТФ-аза детектируется преимущественно в базальном слое эпителия, тогда как убаинчувствительная  $H^+,K^+$ -АТФ-аза – в зернистом и шиповатом слоях. Таким образом, гены данных АТФ-аз экспрессируются эпителиальными клетками на разных стадиях их развития. Выдвинута гипотеза об участии убаинчувствительной  $H^+,K^+$ -АТФ-азы в поддержании рН кожного покрова. С использованием зондов, специфичных к мРНК полноразмерной  $\alpha$ -субъединицы убаинчувствительной  $H^+,K^+$ -АТФ-азы и ее укороченной формы, установлено одинаковое распределение в коже мРНК обоих вариантов.

*Ключевые слова:* иммуногистохимия; гибридизация РНК *in situ*; убаинчувствительная  $H^+,K^+$ -АТФ-аза;  $Na^+,K^+$ -АТФ-аза; эпителий кожи.

### ВВЕДЕНИЕ

$H^+,K^+$ -АТФ-азы входят в группу ионотранспортирующих АТФ-аз Р-типа. Белки этого семейства катализируют АТФ-зависимый транспорт ионов калия внутрь клетки в обмен на протоны или ионы натрия. Ферменты представляют собой гетеродимеры и состоят из двух субъединиц: каталитической  $\alpha$ -субъединицы и сильно гликозилированной регуляторной  $\beta$ -субъединицы. Каталитические субъединицы  $H^+,K^+$ -АТФ-аз кодируются семейством родственных генов [1].

По функциональным и структурным свойствам  $H^+,K^+$ -АТФ-азы (КФ 3.6.3.10) разделяются на три группы: различные изоформы  $Na^+,K^+$ -АТФ-азы, выполняющей такие необходимые клеточные функции, как поддержание ионного гомеостаза клетки и формирование мембранного потенциала;  $H^+,K^+$ -АТФ-аза слизистой оболочки желудка, закисляющая желудочный сок;  $H^+,K^+$ -АТФ-азы нежелудочного типа, физиологическая роль которых остается до настоящего времени невыясненной.

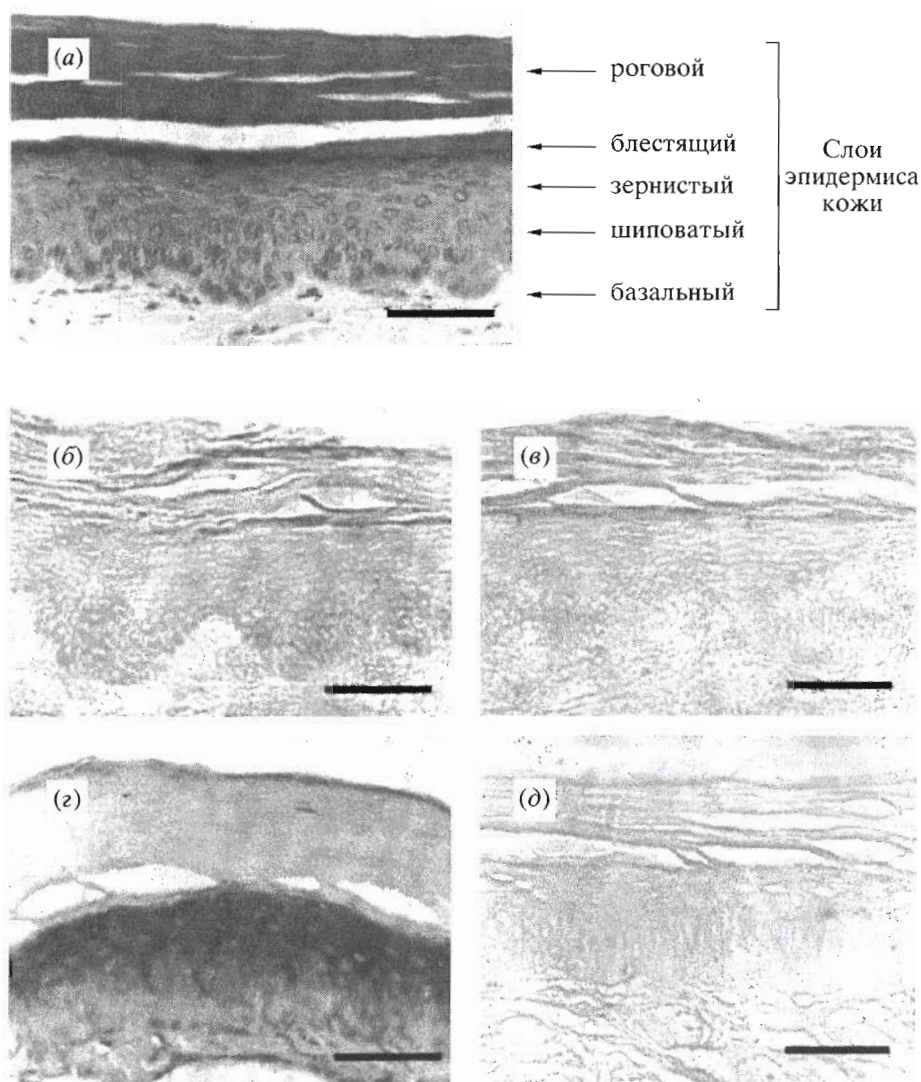
Убаинчувствительная  $H^+,K^+$ -АТФ-аза крысы относится к последней группе  $H^+,K^+$ -АТФ-аз [2]. На сегодняшний день нуклеотидные последовательности, кодирующие  $\alpha$ -субъединицы  $H^+,K^+$ -АТФ-аз нежелудочного типа, известны для человека [3] и

нескольких видов животных: морской свинки [4], кролика (GenBank AF023128) и лягушки [5].

Гомология аминокислотных последовательностей  $\alpha$ -субъединиц  $H^+,K^+$ -АТФ-аз нежелудочного типа с аминокислотными последовательностями  $\alpha$ -субъединиц  $Na^+,K^+$ -АТФ-азы составляет 65% и такова же с  $\alpha$ -субъединицей  $H^+,K^+$ -АТФ-азы желудка [2]. Были исследованы функциональные свойства каталитической субъединицы фермента крысы при ее совместной продукции с различными  $\beta$ -субъединицами в эукариотических системах экспрессии. Результаты этих исследований показали, что нежелудочная  $H^+,K^+$ -АТФ-аза проявляет уникальное специфическое отношение к известным ингибиторам  $H^+,K^+$ -АТФ-аз: сердечному гликозиду убаину и Sch-28080, относящемуся к группе замещенных имидазо-(1,2- $\alpha$ )-пиридинов. Известно, что  $Na^+,K^+$ -АТФ-аза ингибируется убаином, но нечувствительна к Sch-28080 [6]. В то же время Sch-28080 ингибирует  $H^+,K^+$ -АТФ-азу желудка, однако убаин не оказывает влияния на ее активность [7]. Для нежелудочной  $H^+,K^+$ -АТФ-азы крысы характерно проявление чувствительности к убаину, но в меньшей степени, чем для  $Na^+,K^+$ -АТФ-азы, а Sch-28080 практически не оказывает ингибирующего эффекта на ее активность [8–12].

Экспрессия генов  $\alpha$ -субъединиц нежелудочных  $H^+,K^+$ -АТФ-аз является тканеспецифичной, причем у различных видов она имеет сходный ха-

# Автор для переписки (эл. почта: shakh@ibch.ru; тел.: (095) 330-65-74; факс: (095) 330-64-56).



Линейки 50 мкм

Иммуногистохимическая локализация Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы и гибридизация *in situ* РНК α-субъединицы убаинчувствительной H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы в коже крысы. Морфология кожи крысы при окрашивании среза гематоксилин-эозином (а); иммуногистохимическая локализация Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы (б); отрицательный контроль – инкубация без первичных антител (в); гибридизация *in situ* РНК α-субъединицы убаинчувствительной H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы с использованием антисмыслового зонда (г); отрицательный контроль – гибридизация со смысловым зондом (д).

рактир [13]. У человека соответствующая мРНК была детектирована в мозге, почке и коже [1, 14, 15], а у крысы была обнаружена в таких органах, как мозг, кожа, дистальный отдел кишечника, почка, мочевой пузырь, легкие, некоторые отделы урогенитальной системы. Детальное исследование экспрессии этих генов методом обратной транскрипции-ПЦР в тканях млекопитающих показало, что наиболее значительный уровень экспрессии наблюдается у различных животных в прямой кишке, почке и коже, а у крысы также в препуциальной и коагулирующей железах [13].

Недавно было обнаружено существование двух разных вариантов сплайсинга мРНК α-субъединицы убаинчувствительной H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы (далее просто H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-аза) крысы [16], результатом

чего является наличие двух транскриптов, один из которых короче другого примерно на 110 а.о. с N-конца. Интересно, что именно эта область полипептидной цепи каталитических субъединиц H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-аз наименее консервативна и предположительно оказывает существенное влияние на каталитические свойства фермента [17, 18]. Тем не менее в настоящее время показано, что каталитические свойства укороченной и полноразмерной форм белка сходны. Присутствие альтернативного транскрипта показано методом Нозерн-блоттинга в дистальном отделе кишечника и почке, однако он не был обнаружен в скелетных мышцах, мозге, сердце, желудке, селезенке, печени, семенниках и легких [16].

Олигонуклеотидные праймеры, использованные для клонирования фрагментов кДНК  $\alpha$ -субъединицы убаинчувствительной  $H^+, K^+$ -АТФ-азы крысы. Подчеркнуты сайты рестрикции

Олигонуклеотид	Структура олигонуклеотида (5' $\rightarrow$ 3')
NR-1	ACTAGGATCCATGCGCCGAAAACAGAAATT <i>Bam</i> HI
NR-2	TCCTTCGAGCACCATCTGCTTGAGGAACCTG <i>Xho</i> I
RG-CL	ACTAGGATCCCAGCTGGCCATCTACTCTTACC <i>Bam</i> HI
BAU-CL	TCCTTCGAGGGCACAGCCACAAACCAGTACT <i>Xho</i> I

Цель настоящей работы – исследование относительного распределения  $H^+, K^+$ -АТФ-азы и  $Na^+, K^+$ -АТФ-азы в коже крысы методами иммуногистохимии и гибридизации РНК *in situ*. Кожа представляет собой орган с четко выраженной морфологией отдельных эпителиальных слоев, клетки каждого из которых находятся на различных стадиях дифференцировки, от росткового базального слоя до состоящего из мертвых кератиноцитов рогового слоя [19, 20] (рисунок а). Данные о том, в каком именно эпителиальном слое локализована  $H^+, K^+$ -АТФ-аза, могут прояснить вопрос о ее физиологической роли в коже. Кроме того, в нашу задачу входило исследовать распределение в различных слоях кожи мРНК, кодирующих полноразмерную и укороченную формы каталитической субъединицы  $H^+, K^+$ -АТФ-азы, поскольку до настоящего времени не было обнаружено значительных функциональных различий между этими формами фермента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие высокоспецифичных поликлональных антител к С-концевому фрагменту  $^{1012}$ Lys-Glu-Thr-Tyr-Tyr $^{1016}$ , консервативному для всех изоформ  $\alpha$ -субъединицы  $Na^+, K^+$ -АТФ-азы [21], позволило провести локализацию этого белка методом иммуногистохимии. Гистологические срезы кожи крысы были приготовлены при помощи стандартных процедур [22]. После ингибирования эндогенной пероксидазы проводилась последовательная обработка срезов первичными антителами и соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой. В качестве контролей использовали срезы, инкубированные без вторичных антител, либо только с буфером для детекции. К сожалению, не удалось добиться полного удаления фонового окрашивания, вероятно, из-за недостаточного ингибирования эндогенной пероксидазы. Тем не менее можно однозначно говорить о том, что концентрация  $Na^+, K^+$ -АТФ-азы наиболее высока в базальном слое и постепенно понижается от базального к зернистому слою (рисунок б).

Из-за отсутствия специфичных антител к  $H^+, K^+$ -АТФ-азе крысы для исследования уровня экспрессии соответствующего гена был использован метод гибридизации РНК *in situ*. Для гибридизации было сконструировано два зонда: первый – на основании последовательности мРНК, кодирующей N-концевые 110 а.о., и второй – на основании структуры фрагмента мРНК с координатами 2580–3020, что позволяло детектировать только полноразмерный транскрипт в первом случае и общий пул транскриптов – во втором. кДНК кожи крысы была получена обратной транскрипцией на фракции суммарной РНК с использованием набора случайных шестичленных праймеров. Участок кДНК с координатами 1–330 амплифицировали методом ПЦР с помощью праймеров NR-1 и NR-2, а участок с координатами 2580–3020 – с помощью праймеров RG-CL и BAU-CL (таблица). Продукт ПЦР обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Xho*I и клонировали по этим сайтам в вектор pBluescript SK<sup>-</sup>. Таким образом, ДНК-вставка оказывалась ограниченной промоторными областями для РНК-полимераз фагов T3 и T7.

Полученные плазмиды служили матрицами для синтеза РНК-зондов методом транскрипции *in vitro*. Реакцию проводили на плазмидных матрицах, предварительно линейаризованных по сайту *Bam*HI для получения антисмысловой РНК при помощи T7-РНК-полимеразы и по сайту *Xho*I для смысловой РНК при помощи T3-РНК-полимеразы. Смысловой РНК-зонд был использован в качестве отрицательного контроля. Смесь рибонуклеотидов для транскрипции содержала флуоресцеин-11-УТР, в результате чего РНК-зонды оказывались мечеными по этому основанию.

После инкубации срезов с зондами детекция проводилась следующим образом: срезы последовательно обрабатывали раствором, блокирующим эндогенную фосфатазу, антителами против флуоресцеин-11-УТР, конъюгированными с щелочной фосфатазой, и соответствующими субстратами. В качестве контрольных образцов использовали срезы, гибридные со смысловой РНК; срезы, предварительно обработанные РНКазой А; гибридизацию с буфером без РНК-

зондов; инкубацию с буфером для гибридизации без зонда; гибридизацию с зондом рАМ18-lus к мРНК лизоцима. Был также использован контроль, где срезы не обрабатывали антителами. Контроли показали отсутствие неспецифического связывания зондов, правильный выбор условий отмывки несвязавшегося зонда и полное ингибирование активности эндогенной фосфатазы. На рисунке д представлена контрольная гибридизация со смысловым РНК-зондом. В остальных контролях наблюдалась аналогичная картина (данные не представлены).

В экспериментах по гибридизации были получены следующие результаты: мРНК  $\alpha$ -субъединицы  $H^+, K^+$ -АТФ-азы локализована в шиповатом и зернистом слоях эпителия (рисунок г), причем данное распределение наблюдается в случае использования обоих зондов. Таким образом, мРНК укороченной и полноразмерной форм каталитической субъединицы фермента присутствуют в эпителии кожи и, кроме того, синтезируются в одних и тех же клетках.

Полученные данные свидетельствуют о том, что локализация  $H^+, K^+$ -АТФ-азы и  $Na^+, K^+$ -АТФ-азы в коже крысы различна.  $Na^+, K^+$ -АТФ-аза в большей степени присутствует в базальном слое эпителия, в то время как ген  $\alpha$ -субъединицы  $H^+, K^+$ -АТФ-азы экспрессируется преимущественно в шиповатом и зернистом слоях.

Базальный слой является ростковым, его клетки интенсивно делятся, и за счет этого происходит обновление эпидермиса. В более высоких слоях клетки начинают постепенно дифференцироваться, и в каждом морфологически выделенном слое находятся на различных стадиях этого процесса. В конечном итоге дифференцировка приводит к накоплению кератина, ороговению эпителиоцитов и их отмиранию [19, 20]. Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что синтез основных пулов  $H^+, K^+$ -АТФ-азы и  $Na^+, K^+$ -АТФ-азы происходит на разных этапах дифференцировки клеток эпителия кожи.

Тем не менее остается неясным, какой физиологический смысл имеет активность гена каталитической субъединицы  $H^+, K^+$ -АТФ-азы именно в верхних слоях эпидермиса. Наиболее простым кажется предположение о том, что этот фермент участвует в формировании так называемой кислотной мантии кожного покрова. Значение рН поверхности нормальной кожи варьирует в пределах 4.5–5.5 [23–25] и играет важную физиологическую роль. рН внеклеточного пространства дермы слабощелочной, и наиболее значительное его понижение происходит именно в зернистом слое эпителия. Кислая реакция поверхности кожи является одним из важных факторов, которые определяют ее бактерицидные и защитные функции [26]. При изменении этого параметра возможно изменение состава микробиологической среды на поверхности кожи и возникновение раз-

личных заболеваний. Кроме того, поддержание кислой среды необходимо для функционирования различных ферментов, таких, как сфингомиелиназа и  $\beta$ -глюкоцереброзидаза, участвующих в формировании защитного липидного слоя на поверхности кожи [27]. Известно также, что восстановление защитных функций кожи происходит только при кислотном значении рН, но не нейтральном или щелочном [27]. Таким образом, возможно участие  $H^+, K^+$ -АТФ-азы в поддержании рН кожного покрова в комплексе с другими рН-регулирующими системами, например, такими, как лактатная буферная система кожи [28].

Однако  $H^+, K^+$ -АТФ-аза может выполнять в коже и другую функцию. Кожа является органом, постоянно находящимся в контакте с окружающей средой, т.е. эпителиоциты (особенно верхних слоев эпидермиса) подвергаются воздействию различных вредных для жизнедеятельности клетки факторов, таких, как токсичные химические соединения, излучение, механические нагрузки. В результате интенсивных окислительно-восстановительных реакций, протекающих в клетках, происходит значительное закисление цитоплазмы, поэтому одним из защитных механизмов может быть вывод избыточных протонов с помощью  $H^+, K^+$ -АТФ-азы, а также ее участие в регуляции рН и ионного состава цитозоля вместе с  $Na^+/H^+$ - и  $Cl^-/HCO_3^-$ -обменниками [29, 30].

К сожалению, исследование физиологической роли  $H^+, K^+$ -АТФ-азы затруднено низким содержанием этого белка даже в тех тканях, где экспрессия его гена наиболее высока. Однако именно этот факт говорит о чрезвычайно специализированной функции этого фермента, поэтому для выяснения роли  $H^+, K^+$ -АТФ-азы в клетках и тканях необходимы дальнейшие детальные исследования ее распределения в других тканях. Возможно также анализ экспрессии гена и ее регуляции в различных модельных системах *in vitro* с использованием культур клеток, в частности кератиноцитов. Кроме того, интересные результаты могут дать эксперименты по методу "knock-out" гена  $H^+, K^+$ -АТФ-азы млекопитающих.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы: набор для выделения суммарной РНК "SV Total RNA Isolation System", набор для выделения плазмидной ДНК "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System", обратную транскриптазу вируса мышинного лейкоза Мелони, смесь случайных шести-членных праймеров, ингибитор РНКаз RNasin, ДНК-лигазу фага T4, протеинкиназу K, РНКазу, штамм *E. coli* JM109 (Promega, США); ингибитор РНКаз RNaseZAP (Sigma, США); эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI и *Xho*I (Amersham, Великобритания); *Taq*-полимеразу (лаб. биотехнологии ИБХ

РАН); набор для выделения ДНК из геля "QIAEX II" (QIAGEN, Германия); плазмидный вектор pBlue-script SK<sup>-</sup> (Stratagene, США); набор для гибридизации РНК *in situ* "RNA color kit for non-radioactive *in situ* hybridization" (Amersham, Великобритания); конъюгат пероксидазы хрена с антикроличьими IgG (BioRad, США); препаративные и покровные стекла (Fisher, США); Histoplast-S (Serva, Германия); прибор для электропорации *E. coli* Pulser (BioRad, США); световой микроскоп (Zeiss, Германия).

**Иммуногистохимия.** Животные были перфузированы. Отобранные образцы тканей были обезвожены в этаноле и залиты в Histoplast-S. Срезы толщиной 5–6 мкм были приготовлены на микротоме и помещены на препаративные микроскопические стекла. Далее срезы депарафинизировали в ксилоле 10 мин и проводили через растворы спирта понижающей концентрации (100, 90, 80, 60, 30%) по 3 мин. Для инактивации эндогенной пероксидазы срезы инкубировали в 3% растворе перекиси водорода в течение 5 мин и далее обрабатывали 2% раствором эмбриональной коровьей сыворотки в PBS (10 мМ фосфатный буфер, pH 7.5, 2.7 мМ KCl, 137 мМ NaCl) в течение 20 мин. После промывки срезов в PBS сначала проводили инкубацию с первичными антителами против Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы в разведении 1 : 200 в течение 1 ч, а затем со вторичными антикроличьими антителами, конъюгированными с пероксидазой. Детекцию осуществляли в буфере, содержащем 10 мМ фосфат натрия pH 7.5, 0.15 М NaCl с 0.5 мг/мл 3',3'-диаминобензидина и 0.015% перекиси водорода. Результаты анализировали на световом микроскопе Zeiss, оборудованном фотокамерой.

**Получение кДНК кожи крысы.** Животные были убиты методом декапитации под анестезией. Суммарная РНК кожи была получена из 100 мг ткани с использованием "SV Total RNA Isolation System" в соответствии с инструкцией производителя. Для обратной транскрипции брали 1 мкг РНК, 100 нг случайных шестичленных праймеров, 20 ед. ингибитора РНКаз RNasin, 20 ед. акт. обратной транскриптазы. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл, реакцию проводили при 37°C в течение 1.5 ч. Фермент ингибировали при 95°C 5 мин. Реакционную смесь доводили до 100 мкл стерильной водой Milli-Q.

**Клонирование фрагментов гена  $\alpha$ -субъединицы  $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы.** Для амплификации фрагментов гена  $\alpha$ -субъединицы  $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы использовали праймеры RG-CL и BAU-CL и NR-1 и NR-2 на матрице кДНК кожи крысы. Продукты ПЦР и вектор pBlue-script SK<sup>-</sup> обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Xho*I, разделяли методом электрофореза в 1% агарозном геле с последующей очисткой соответствующих продуктов рестрикции из геля набором "QIAEX II" в соответствии с инструкцией производителя. Фрагменты ПЦР лигировали с ДНК вектора с помощью ДНК-лигазы фага T4, лигазную смесь экстрагировали

фенолом и хлороформом с последующим высаливанием этиловым спиртом, осадок растворяли в воде. Трансформацию клеток JM109 продуктом реакции лигирования проводили методом электропорации. Отбор положительных клонов производили при помощи ПЦР со стандартных праймеров на промоторные области вектора T3 и T7 и праймеров, комплементарных клонируемым фрагментам. Структура вставок ДНК была проверена секвенированием в обоих направлениях по методу Сэнгера [31].

**Приготовление зондов для гибридизации.** РНК-зонды получали методом транскрипции *in vitro* с помощью набора "RNA color kit for non-radioactive *in situ* hybridization" (Amersham, Великобритания). В реакцию брали 1 мкг ДНК вектора, несущего нужный ДНК-фрагмент и линейризованного по сайту *Bam*HI или *Xho*I, 25 ед. акт. T3-или T7-РНК-полимеразы для смыслового и анти-смыслового зондов соответственно, 20 ед. ингибитора РНКаз из плаценты человека, смесь нуклеотидов (GTP, CTP, ATP и флуоресцеин-11-UTP) в концентрации, указанной производителем. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл, реакцию проводили при 37°C в течение 2 ч. Реакционную смесь разделяли на аликвоты и хранили при -70°C.

**Подготовка гистологических срезов к гибридизации.** Гистологические срезы были приготовлены так же, как для иммуногистохимии. При подготовке срезов для гибридизации были использованы следующие обработки: ксилол 10 мин, растворы этилового спирта понижающей концентрации (100, 90, 80, 60, 30%) по 3 мин. Далее срезы были обработаны раствором 0.2 М HCl в течение 20 мин, 2xSSC (20xSSC 3 М NaCl, 0.3 М цитрат натрия, pH 7.0) 10 мин, 0.1xSSC 30 мин при 50°C.

Для удаления маскирующих белков срезы обрабатывали раствором протеинкиназы К с концентрацией 1 мкг/мл 30 мин при 37°C. Одна партия контрольных срезов подвергалась обработке РНКазой (100 мкг/мл) в течение 30 мин при 37°C. Стекла были фиксированы в растворе 4% формальдегида в течение 20 мин и после промывки в PBS помещены для снижения фона в буфер, содержащий 25 мМ ацетангидрид, 100 мМ триэтанолламин на 10 мин. Обработка завершалась обезвоживанием в серии растворов спирта возрастающей концентрации.

**Гибридизация *in situ*.** Подготовленные срезы покрывали раствором, содержащим РНК-зонд в концентрации 600 нг/мл. В качестве отрицательного контроля часть срезов была гибридизована со смысловой цепью зонда. Гибридизацию проводили в течение ночи при 55°C. Отмывку от несвязавшегося зонда проводили последовательно в следующих растворах: 1xSSC с 0.1% SDS по 5 мин, 0.2xSSC с 0.1% SDS при 55°C 10 мин.

Детекцию гибридизованного зонда на срезах проводили с помощью набора "RNA color kit for non-radioactive *in situ* hybridization" (Amersham, Ве-

ликобритания) в соответствии с инструкцией производителя. Окрашенные срезы промывали в воде, покрывали гистохимической смолой и анализировали на световом микроскопе Zeiss.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 98-04-48408).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Modyanov N.N., Petrukhin K.E., Sverdlov V.E., Grishin A.V., Orlova M.Y., Kostina M.B., Makarevich O.I., Broude N.E., Monastyrskaya G.S., Sverdlov E.D. // FEBS Lett. 1991. V. 278. P. 91–94.
2. Crowson M.S., Shull G.E. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 13740–13748.
3. Grishin A.V., Sverdlov V.E., Kostina M.B., Modyanov N.N. // FEBS Lett. 1994. V. 349. P. 144–150.
4. Asano S., Hoshina S., Nakaie Y., Watanabe T., Sato M., Suzuki Y., Takeguchi N. // Am. J. Physiol. 1995. V. 275. P. C669–C674.
5. Jaisser F., Horisberger J.-D., Rossier B.C. // Pflugers Arch. 1993. V. 425. P. 446–452.
6. Lingrel J.B., Kuntzweiler T. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 19659–19662.
7. Keeling D.J., Laing S.M., Senn-Bilfinger J. // Biochem. Pharmacol. 1988. V. 37. P. 2231–2236.
8. Modyanov N.N., Mathews P.M., Grishin A.V., Beguin P., Beggah A.T., Rossier B.C., Horisberger J.-D., Geering K. // Am. J. Physiol. 1995. V. 269(4 Pt 1). P. C992–997.
9. Jaisser F., Horisberger J.-D., Geering K., Rossier B.C. // J. Cell. Biol. 1993. V. 123(6 Pt 1). P. 1421–1429.
10. Codina J., Kone B.C., Delmas-Mata J.T., DuBose T.D. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 29759–29763.
11. Cougnon M., Planelles G., Crowson M.S., Shull G.E., Rossier B.C., Jaisser F. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 7277–7280.
12. Grishin A.V., Bevensee M.O., Modyanov N.N., Rajendran V., Boron W.F., Caplan M.J. // Am. J. Physiol. 1996. V. 271(3 Pt 2). P. F539–551.
13. Pestov N.B., Romanova L.G., Korneenko T.V., Egorov M.V., Kostina M.B., Sverdlov V.E., Askari A., Shkharonov M.I., Modyanov N.N. // FEBS Lett. 1998. V. 440. P. 320–324.
14. Takeyasu K., Lemas V., Fambrough D.M. // Am. J. Physiol. 1990. V. 259(4 Pt 1). P. C619–630.
15. Sverdlov V.E., Kostina M.B., Modyanov N.N. // Genomics. 1996. V. 32. P. 317–327.
16. Kone B.C., Higham S.C. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 2543–2552.
17. Fisone G., Cheng S.X., Nairn A.C., Czernik A.J., Hemmings H.C., Hoog J.O., Bertorello A.M., Bergman T., Jornvall H. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 9368–9373.
18. Bertorello A.M., Aperia A., Walaas S.J., Nairn A.C., Greengard P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 11359–11362.
19. Шубникова Е.А. Эпителиальные ткани. М.: Изд-во Московского ун-та, 1996.
20. Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А. Гистология. М.: Медицина, 1989.
21. Bayer R. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 2251–2256.
22. Novoselov S.V., Peshenko I.V., Popov V.I., Novoselov V.I., Bystrova M.F., Evdokimov V.J., Kamzhalov S.S., Merkulova M.I., Shuvaeva T.M., Lipkin V.M., Fesenko E.E. // Cell Tissue Res. 1999. V. 298. P. 471–480.
23. Dikstein S., Zlotogorski A. // Acta Derm. Venereol. Suppl. 1994. V. 185. P. 18–20.
24. Heuss E. // Menschen. Monatsschr. Prakt. Dermatol. 1892. V. 14. P. 343.
25. Zlotogorski A. // Arch. Dermatol. Res. 1987. V. 279. P. 198–401.
26. Игнатова О.В., Берлин А.А., Пак З.П., Попов И.Г. // Косм. биол. авиакосм. мед. 1989. Т. 23. С. 15–19.
27. Mauro T., Grayson S., Gao W., Man W., Kriehuber E., Behne M., Feingold K., Elias P. // Arch. Dermatol. Res. 1998. V. 290. P. 215–222.
28. Harvey B.J., Ehrenfeld J. // Ciba Found. Symp. 1988. V. 139. P. 139–164.
29. Osypow J.C., Gleeson D., Loble R.W., Pemberton P.W., McMahon R.F. // Exp. Physiol. 1994. V. 79. P. 723–739.
30. Behrendt H., Green M. Patterns of Skin pH. Springfield, 1971.
31. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.

## Expression of the Catalytic Subunit of Ouabain-sensitive H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the Rat Skin Epidermis

L. G. Romanova\*, S. V. Novoselov\*\*, M. V. Egorov\*, M. B. Kostina\*, and M. I. Shkharonov\*\*

\*Phone: +7 (095) 330-6574; fax: +7 (095) 330-6456; e-mail: shakh@ibch.ru

\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

\*\*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

A comparative localization of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and ouabain-sensitive H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in rat skin was performed using *in situ* RNA hybridization and immunohistochemistry. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase was predominantly detected in the basal layer of epithelium, whereas the ouabain-sensitive H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, in the granular and prickle cell layers. The genes of these ATPases are thus expressed in epithelial cells at different stages of their development. The hypothesis was advanced that the ouabain-sensitive H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is involved in maintaining the skin pH value. The probes specific to the mRNAs of the full-size  $\alpha$ -subunit of the ouabain-sensitive H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and its truncated form were used to establish a similar distribution of both mRNA variants in skin. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: immunohistochemistry, *in situ* RNA hybridization, ouabain-sensitive H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, pH, skin epithelium