



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.112.5

© 1992 г. Н. В. Храпцов, Е. А. Фещенко, В. А. Сулова,  
Б. Е. Терпугов, Т. В. Ракутина, Н. В. Атабекова,  
Б. Е. Шмукаер, В. М. Липкин

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КДНК И ГЕНА  $\beta$ -СУБЪЕДИНИЦЫ  
ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ cGMP ИЗ СЕТЧАТКИ ЧЕЛОВЕКА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва

В последнее время все большее внимание уделяется изучению молекулярных механизмов нарушения передачи светового сигнала в фоторецепторных клетках. Часто такие нарушения вызывают тяжелые клинические последствия. Так, существует предположение, что причина одной из форм дегенерации сетчатки у мыши (rd-мутация) — появление дефектного гена  $\beta$ -субъединицы фоторецепторной фосфодиэстеразы циклического GMP (ФДЭ). Мутация заключается в замене триплета TAC, кодирующего тирозин в 347-м положении аминокислотной цепи, на терминирующий кодон TAA [1]. Поэтому определение нуклеотидной последовательности кДНК, а также гена  $\beta$ -субъединицы ФДЭ из сетчатки человека представляет не только научный, но и практический интерес.

ФДЭ из палочек сетчатки состоит из четырех субъединиц:  $\alpha$  (88 кДа);  $\beta$  (84 кДа) и двух  $\gamma$  (11 кДа) [2, 3].  $\alpha$ - и  $\beta$ -Субъединицы выполняют каталитическую функцию, в то время как  $\gamma$ -субъединица является внутренним ингибитором фермента, причем ингибирующий эффект  $\gamma$ -субъединицы снимается при ее взаимодействии с  $\alpha$ -субъединицей трансдуцина.

Ранее методами белковой химии и генной инженерии нами были определены первичные структуры  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц ФДЭ из сетчатки быка [4–6], а также структура и организация гена  $\gamma$ -субъединицы ФДЭ из сетчатки человека [7, 8].

В данном сообщении описано клонирование и установление первичной структуры кДНК  $\beta$ -субъединицы ФДЭ человека (регистрационный номер EMBL-банка данных X66142), а также клонирование части гена этого белка. Мы использовали стратегию и методологию исследования, описанные в работе [9].

В результате скрининга клонотеки кДНК ( $1,2 \cdot 10^6$  клонов) из сетчатки человека (фирма Clontech)  $^{32}$ P-меченым олигодезоксирибонуклеотидным зондом (5')ATGAATGCCCTGCCGACGAAATGTTCAAT (I) (участок кДНК  $\beta$ -субъединицы ФДЭ быка с 1120-й до 1149-й п. о.), а также с помощью  $^{32}$ P-меченого ник-трансляционной фрагмента *NcoI*–*HindIII* длиной 1211 п. о. из кДНК  $\beta$ -субъединицы быка были выявлены два фага ( $\beta\lambda 20$  и  $\beta\lambda 10$ ), давшие положительные сигналы гибридизации. Анализ нуклеотидных последовательностей вставок кДНК этих фагов и выведенных из них аминокислотных последовательностей показал, что, вероятно, они расположены «стык в стык» и кодируют N- и C-концевые части белка. Центральный фрагмент кДНК  $\beta$ -субъединицы ФДЭ был получен полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Матрицей для ПЦР служила тотальная

CCACCATGAGCCTCAGTGGAGAGCCGGCCGAGCTTCTGGACAGAACCCGGATTTGCCCGCCAGTACTTTGGGAAGAACTGAGCCCTGAGAAATGTGGCGCCGCTGGAGGAC	119
M S L S E E Q A R S F L D Q N P D F A R Q Y F G K K L S P E N V G R G C E D	38
GGGTGCCCGCAGTCGGACAGCCTCCGGGACCTCGCCAGGTGGAGGAGACGCGCCCTGCTGGAGCTGGTCAGGATATGCAAGGAGACCAACATGGAGCGCTGGCTTCAAG	
G C P P C D S L R D L C V O E E S T A L L E L V Q D M O E S I N M E R V N V F K	
GTCTGGCGCCCTCTGACAGCCTCTGACGGCCGACCGCTGCAGCTCTTCATGTACCCAGCGCAACGGCTGGCCGAGCTGGCCACAGGCTTTTCAGCGTGCAAGCCGACAGCGTC	359
V L R R L C T L L Q A D R C S L F M Y R Q R N G V A E L A T R L F S V Q P D S V	118
CTGGAGACTGCCTGGTCCCGCCGAGATCGTCTCCCACTGGACATCGGGCTGCTGGCCACGCTGGCTCAGACCAAAAAAGATGGTGAACGTGGAGGAGCTGGCCGAGTGCCT	
L E D L V P P D S E I V F P L D I G V L G H V A Q T K M H N V E D V A E C P	
CACCTTCAGCTCATTGTCTGACGAGCTCACTGACACAGCAAGAATATGCTGGCCACACCATCATGAATGGCAAGAGCTGCTGGCGGTGATCATGGCAATGAACAAGCTCAACGGC	599
H F S S F A D E L T D Y K T K N M L A T P I M N G K D V V A V I M A V N K L N G	198
CCATTTCTCACCAGGCAAGACGAAGTGTCTTGAATACCTGAAATTTGCCACGTTGTACCTGAAGATCATACCATGACCTCCCAACACTGGCAGACGGCCGCGCGCCAGGTG	
P F F T S E D E D V F L K Y L N F A T L Y L K I Y H L Y L K I Y H L N C E T R R Q V	
CTGCTGGTGGCCCAACAGGTTTGGAGACTGACGGACATCGAGAGGAGTCCACAAAGCCTCTACACGGTGGCGGCTACCTCAACTGGCAGCGGTACTCCGTGGCCCTCTG	839
L L W S A N K V F E E L T D I E R O F H K A F Y T V R A Y L N C E R Y S V G L L	298
GACATGACCAAGGAGAAATTTTCAGCTGTGGCTGATGGAGAGTCCACGCCACTCGGCCACCGCCGCTGATGGCCGCAATGTCTCTCACAAGTGTATGAC	
D M T K E K E F F D V H S V L M G E S Q P Y S G P R T P D G R E I V F Y K V I D	
TACATCTCCACGCAAGGAGGAGATCAAGTGCATCCCAACCCCTACGCCGATCACTGGCCCTGGCCAGCGGCTTCCAACTGACCTGGCCAGAAAGCGCTTTATTTGAACATCATG	1079
Y I L H G K E E I K V I P T P S A D H W A L A S G L P S Y V A E S G F I C N I M	358
AATGCTCCCGTGCAGAAATTTCAAATTTACAGGAAGGGCCCTGGACGACTCGGGTGGCTCATCAAGAATGTGCTTCATGCCCTCAGCAAGAAAGGAGGAGATGTGGGAGTC	
N A S A D E M F K F Q E G A L D D S G W L I K N V L S M P I V N K K E E I V G V	
GCCACATTTTACACAGCAAGACGGGAAAGCCCTTTGACCAACAGGAGAGTCTCATGAGTCCCTGCACACAGTTCCTGGCGTGCATGATGAACACCCAGCACTACGCAAGATG	1319
A T F Y N R K D G K P F D E Q D E V L M E S L T Q F L G W S V M N T D T Y D K M	438
AACAGTCCAGATGATCAGCAGCTGCGACAGGACATGGTCTTTAGCAGCTGAAGTGGCAGCGGACAGATCCAGCTCATCTGCCACAGGAGCGCCGCTGGGAGGAGGCTCTCT	
N K L E N R K D I A Q D M V L Y H V K C D R D E I Q L I L P T R A R L G K E P A	
GACTGGCATGAGGACGAGCTGGCGAAATCTTGAAGCAGGAGCTGCCAGGGCCCAACACATTTGACATACGAATTCACATCTCTGACCTGGAGTGCACCGCACTGAGCTGGTCAA	1559
C D D E D E L G E I L K E E L P T T F D I Y E F H F S D L E C T E L D L V K	518
TGCGCATCCAGATGATCAGCAGCTGGCGGAAATCTTGAAGCAGGAGCTGCCAGGGCCCAACACATTTGACATACGAATTCACATCTCTGACCTGGAGTGCACCGCACTGAGCTGGTCAA	
C G I O M Y Y E L G V V R K F Q I P Q E V L V R F L F S I S K G Y R R I T Y H N	
TGGCCGACGGCTTCAAGCTGGCCGAGAGATGTCACCGCTCTCATGACCGCAAACTGAAGAGCTACTACAGGCACTGGAGGCCCTTCGCCATGTGACAGCGCCGCTGCGCATGAC	1799
H R H G F N V A Q T H F T L L M T G K L K S Y Y T D L E A F M V T A G L C H D	598
ATCGACACCGCCGCAACAGCAGCTGACAGATGAAGTCCCAAGAACCCCTTGGCTAGCTCCAGCTCCGATTTTGGAGGCGCAACCTGGAGTTTGGGAAGTCTGCCTCG	
I D H R G T T H N L Y Q M K S Q N P L A K L H G S S I L E R H H L E F G K F L L S	
GAGGAGACCTGCAATCATCAGCAAGCTGACCGCCGCGGAGCAGCAGCAGTGAATCACTGATGGACATCGCCATCATCCAGGAGCCTGGCCCTGTACTCAAGAGAGAGCGATG	2039
E E T L N I Y Q N L Y R Q N F L R H E N V I H L M D I A I A T D L A L Y F K K R A M	679
TTTCAAGATCGTGGATGCTCAAGAATACAGGAGCAAGAAGAGCTGGGTGGATACCTGCTCCCTGGAGACAGCCGCAAGAGATGCTATGGCCATGATGACAGCTGGCAG	
F O K I V D E S K T V M Y Q D K K S W V E Y L S L E T T R K E I V M A N M M T A C D	
CTGCTGCCATCACCAGGCTGGGAAGTCCAGAGCAAGTCCCACTTCTCGTGGCTGCTGAGTCTGGGAGCAAGGTGACTTGGAAAGGACAGTCTGGATCAGCAGCCTATCCTATG	2279
L S A I T K P W E V L K S V A L L V A E F H E O G D L E R T V L D Q O P I M	750
ATGACCCGCAACAGGCGCCGAGCTCCCAAGCTGCAAGTGGGCTTCATGCACTCTGTTGTCACATTCGTGTACAGGAGTCTCTGCTTCCACGAAGAGATCTCCGCAATGTCGAC	
M D R N K K A A E L P K L Q V G F I D F V C T F V Y K E F S R F H E E I L P M F D	
CCAGCTGCAGCAAAATGGAAGACTGGAAGGCGCTGGCTGATGAGTATGAGCCCAAGTGAAGGCTTGGAGGAGAGCAGGAGGAGGCTGGAGGAGCAAGAAATGAGGACAGAA	2519
R L Q N R R K E N K A L D E Y E A K V K A L E E K E E E R V A A K K V G T E	830
ATTGCAATGGCGCCAGCAACCAAGTCTTCAACTGCTGTATCTGTTGAGCACTGGCCGCTGGGACATATGCTCCCTCAATCTTCCACCACAGGATTTGGGTTGCTGTGCTGT	2579
I E N G G P A P K S T S C I L *	854
ATTGCTACAAAGACTAGGAAGCCCAAGAAATGACTGAAGATCTTGGATATTTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGATGGAGCTTGCCTGTCAACCAGGCT	
GGATGCGCTGCCAGATCTAGCTCACTGCAACCTCCCACTCCCAAGCTTCAAGGATCTCGTGCCTCAGCCT	2833

Первичная структура кДНК β-субъединицы cGMP фосфодиэстеразы из сетчатки человека и соответствующая ей аминокислотная последовательность

ДНК, выделенная из рекомбинантных фагов клонотеки кДНК сетчатки человека. В качестве праймеров использовали синтетические олигонуклеотидные зонды (I) (см. выше) и (5')GTTGCAGATTTCTGTG-CCCACCTTTCTT (II) (участок кДНК β-субъединицы ФДЭ быка с 2542-й п. о. по 2568-ю п. о.). В результате были получены клоны βр1.4 и βр2.5, нуклеотидные последовательности которых оказались идентичными. Вставки кДНК этих клонов кодируют центральную часть β-субъединицы ФДЭ и перекрывают место стыка фрагментов кДНК из клонов βλ20 и βλ10.

Таким образом, определение нуклеотидной последовательности кДНК клонов βλ20, βλ10 и βр1.4 позволяло реконструировать структуру кДНК β-субъединицы ФДЭ из сетчатки человека длиной 2833 п. о. (рисунок), где инициирующий кодон находится в положении 6—8 п. о., а терминирующий — в положении 2568—2570 п. о. Выведенная из нуклеотидной последовательности аминокислотная последовательность белка содержит



854 аминокислотных остатка. Рассчитанная молекулярная масса белка составляет 98 416 Да. Белок характеризуется наличием большого количества отрицательно заряженных аминокислотных остатков и имеет рассчитанную изоэлектрическую точку 5,08. Аминокислотная последовательность  $\beta$ -субъединицы ФДЭ человека имеет 91,1 и 92,4% гомологии с  $\beta$ -субъединицами ФДЭ быка [5] и мыши [10] соответственно; 71,9, 72 и 71,1% гомологии с  $\alpha$ -субъединицами ФДЭ человека [11], быка [4] и мыши [10] соответственно и 63,2% гомологии с  $\alpha'$ -субъединицей ФДЭ из колбочек сетчатки быка [12]. Наименее консервативны N- и C-концевые фрагменты (аминокислотные остатки 1–85 и 825–854), наиболее консервативна область с 556-й до 778-й аминокислоты, где, вероятно, находится каталитический центр фермента.

Параллельно с клонированием кДНК  $\beta$ -субъединицы ФДЭ из сетчатки человека в геномной клонотеке при помощи  $^{32}\text{P}$ -меченых фрагментов кДНК  $\beta$ -субъединицы ФДЭ быка были выявлены два фага, перекрывающиеся вставки которых содержат фрагмент гена  $\beta$ -субъединицы ФДЭ человека длиной 26 т. п. о. Гибридизационный анализ с использованием синтетических олигонуклеотидных зондов, а также частичное определение нуклеотидной последовательности и сравнение ее с определенной нами структурой кДНК показали, что этот участок ДНК содержит 19 экзонов гена, первичная структура которых полностью совпадает со структурой кДНК. Среди них локализован экзон, в мышинном аналоге которого обнаружена *gd*-мутация, приводящая к дегенерации сетчатки мыши. Определена первичная структура примыкающих к этому экзону интронных участков гена, что позволит выяснить, встречаются ли такие типы мутаций у человека. По аналогии с организацией гена  $\beta$ -субъединицы ФДЭ мыши [4] можно предположить, что в клонированных нами фрагментах гена ФДЭ человека отсутствуют первые три экзона.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pittler S. J., Baehr W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 19. P. 8322–8326.
2. Baehr W., Delvin M. J., Applebury M. L. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 22. P. 11669–11677.
3. Deterre P., Bigay J., Forquet F., Robert M., Chabre M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 8. P. 2424–2428.
4. Ovchinnikov Yu. A., Gubanov V. Y., Khrantsov N. V., Ischenko K. A., Zagranichny V. E., Muradov K. G., Shuvaeva T. M., Lipkin V. M. // FEBS Lett. 1987. V. 223. № 1. P. 169–173.
5. Lipkin V. M., Khrantsov N. V., Vasilevskaya I. A., Atabekova N. Y., Muradov K. G., Gubanov V. V., Li T., Johnson J. P., Volpp K. J., Applebury M. L. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 22. P. 12955–12959.
6. Ovchinnikov Ya. A., Lipkin V. M., Kumarev V. P., Gubanov V. V., Khrantsov N. V., Akhmedov N. B., Zagranichny V. E., Muradov K. G. // FEBS Lett. 1986. V. 204. № 2. P. 288–292.
7. Липкин В. М., Пуришко В. А., Храпцова Н. В., Липкин В. М. // Докл. АН СССР. 1990. Т. 315. № 1. С. 229–231.
8. Piriev N. I., Khrantsov N. V., Lipkin V. M. // Biomed. Sci. 1992. In Press.
9. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. // Molecular Cloning. A Laboratory Manual. N. Y.: Cold Spring Harbor, 1982.
10. Baehr W., Champagne M. S., Lee A. K., Pittler S. J. // FEBS Lett. 1991. V. 278. № 1. P. 107–114.
11. Pittler S. J., Baehr W., Wasmuth J. J., McConnell D. G., Champagne M. S., VanTasselen P., Ledbetter D., Davis R. L. // Genomics. 1990. V. 6. № 2. P. 272–283.
12. Li T., Volpp K., Applebury M. L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 1. P. 293–297.

Поступило в редакцию  
10. VIII. 1992

N. V. KHRAMTSOV, E. A. FESHCHENRO, V. A. SUSLOVA, B. E. TERPUGOV,  
T. V. RAKITINA, N. V. ATABEKOVA, B. E. SHMUKLER, V. M. LIPKIN

**STRUCTURAL STUDIES OF cDNA AND GENE FOR THE CYCLIC GMP  
PHOSPHODIESTERASE FROM HUMAN RETINA**

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

cDNA clones encoding the  $\beta$ -subunit of the photoreceptor cGMP phosphodiesterase (PDE) were isolated from a human retinal library. The encoded polypeptide has 854 amino acid residues with calculated molecular mass of 98416 Da. Alignment of the deduced amino acid sequence with the previously analysed  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\alpha'$ -subunits of the bovine and mouse PDEs demonstrates highly significant similarities.

We have also isolated, from a genomic library, two overlapping recombinant  $\lambda$  phage clones containing 26 kb of the human PDE  $\beta$ -subunit gene. The cloning of the human gene and the knowledge of its genomic organization will allow the rapid assessment of the role of this gene in the causation of human retinopathies.