БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 19 * № 6 * 1993

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.112.5

© *1993 Б. Е. Шмуклер, Д. В. Зубов, Н. Г. Абдулаев*

ОБНАРУЖЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МЕМБРАННОЙ ФОРМЫ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ ТИПА GC-B В СЕТЧАТКЕ БЫКА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Каскад ферментативных реакций в фоторецепторных клетках позвоночных, запускаемый фотоизомеризацией ретиналя, приводит к гидролизу внутриклеточного мессенджера, гуанозин-3′,5′-циклического монофосфата (cGMP), что вызывает закрытие cGMP-зависимых каналов и гиперполяризацию плазматической мембраны [1]. Возврат в темновое состояние непосредственно сопряжен с ресинтезом cGMP, осуществляемым гуанилатциклазой (GC). Наружные сегменты палочек сетчатки позвоночных содержат мембранную форму гуанилатциклазы, которая в отличие от других GC активируется понижением концентрации Ca^{2+} [2].

Попытки выделить фермент для структурных исследований столкнулись со значительными сложностями [3—6]. По этой причине структурные исследования гуанилатциклаз из сетчатки быка было решено проводить генно-инженерными методами.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей клонированных ранее мембраносвязанных гуанилатциклаз показывает, что в области каталитического домена имеются высокогомологичные участки [7]. На основании этих последовательностей и с учетом частоты встречаемости кодонов в клонированных ранее кДНК нескольких белков из сетчатки быка были синтезированы олигодезоксирибонуклеотидные зонды

(5′) TACAAGGT$^{G}_{C}$GAGACCATCGG$^{G}_{C}$GACGCCTACATGGT (I) и

(5′) TACTGCCTGTTCGG$^{G}_{C}$GACACCGT$^{G}_{C}$AACACCGC (II), соответствующие аминокислотным консенсусам YKVETIGDAYMV и YCLFGDTVNTA. При помощи этих зондов был проведен скрининг библиотеки кДНК из сетчатки быка в векторе λ-ZAP [8]. Среди $1{,}5\cdot10^6$ клонов библиотеки были найдены и проанализированы 37, дававших положительные сигналы гибридизации. Анализ показал, что только два клона (λGC15 и λGC30) содержат вставки, кодирующие фрагменты мембраносвязанной гуанилатциклазы, имеющие примерно 99% гомологии с аминокислотными последовательностями соответствующих фрагментов гуанилатциклаз типа GC-B из крысы и человека [9, 10]. Суммарная длина определенной нуклеотидной последовательности составила 1737 п.о., причем 238 принадлежат 3′-нетранслируемой области кДНК, а 1499 кодируют 498 аминокислотных остатков, которые соответствуют аминокислотным остаткам 528—1025 в структурах GC-B крысы и человека (рис. 1 и 2). По сравнению с GC-B крысы и человека выведенная нами аминокислотная последовательность содержит три замены: в позициях 618 (Ser → Ala), 936 (Ile → Leu) и 1022 (Pro → Ala) на участке длиной 498 аминокислотных остатков. Кроме того, по сравнению с GC-B крысы имеются

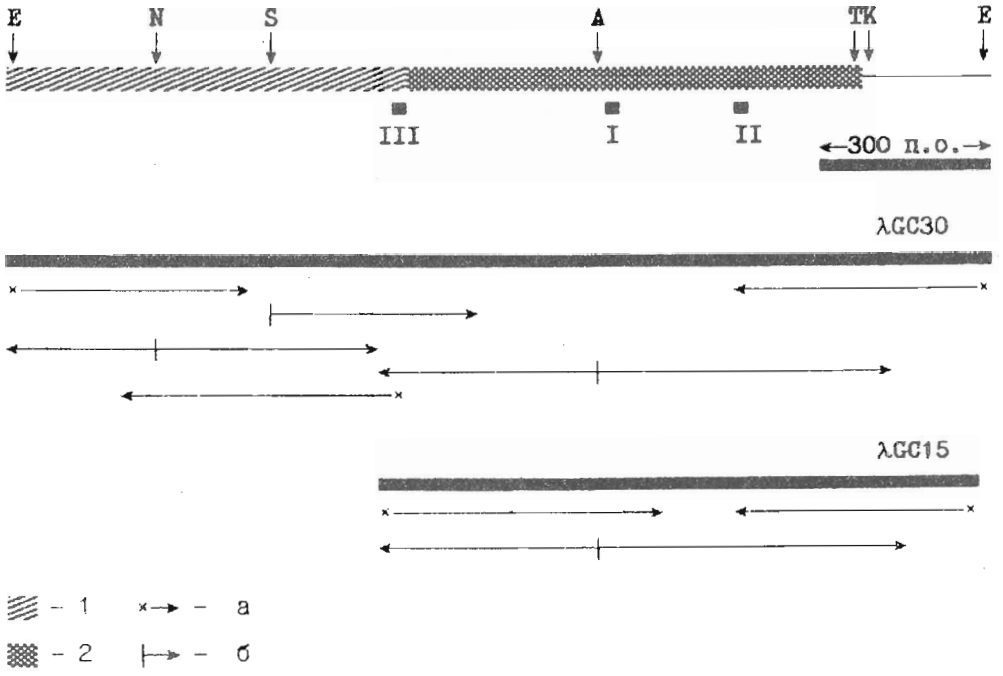

Рис. 1. Локализация вставок из выделенных клонов на рестриктной карте 3′-концевой и центральной части кДНК гуанилатциклазы и стратегия определения нуклеотидной последовательности. 1 — протеинкиназный домен GC, 2 — каталитический домен GC. Стрелками под фрагментами кДНК показаны направления и протяженность секвенирования по методу Сэнгера (а) и по методу Максама — Гилберта (б). A — *Acc*I, E — *Eco*RI, K — *Kpn*I, N — *Nco*I, S — *Sph*I, T — терминатор трансляции. Квадраты I—III обозначают положения нуклеотидных зондов, использованных в работе

еще замены в позициях 689 (Ala → Gly) и 752 (Tyr → Ala). Нуклеотидная последовательность кДНК GC-B из сетчатки быка имеет 89,5% гомологии с кДНК GC-B крысы и 94,0% с кДНК GC-B человека, в то время как аминокислотные последовательности GC-B крысы и человека различаются лишь в позициях 689 и 752, а гомология их нуклеотидных последовательностей составляет 91,0%.

Повторный скрининг этой же библиотеки с использованием вставки клона λGC30 в качестве ник-транслированного зонда позволил выявить еще 18 клонов, которые также давали сигнал гибридизации с олигонуклеотидным зондом (5′) AGCGGCGAATGAAGCCCTTAATCTGT (III) (рис. 1), соответствующим участку низкой гомологии между аминокислотными последовательностями различных форм мембранных гуанилатциклаз [10—12]. Результаты данных гибридизаций позволяют сделать вывод, что вставки кДНК всех этих клонов кодируют фрагменты гуанилатциклазы формы GC-B. Определение концевых нуклеотидных последовательностей наиболее длинных вставок кДНК из трех клонов показало, что они идентичны клону λGC30.

Полученные нами результаты делают очевидным тот факт, что в клетках сетчатки быка экспрессируется мембраносвязанная гуанилатциклаза формы GC-B, а другие формы гуанилатциклаз нами не обнаружены. В то же время недавно было показано, что в сетчатке крысы экспрессируется мембранная гуанилатциклаза типа GC-A [13], гомологичная ранее описанным GC-A-формам гуанилатциклаз, которые являются рецепторами для натрийуретических пептидов [11, 14, 15]. Кроме того, недавно была клонирована особая форма гуанилатциклазы из сетчатки человека, названная авторами retGC [12], которая обладает примерно одинаковым уровнем гомологии как с GC-A, так и с GC-B и, будучи экспрес-

```
 528    I K H V N K K R I E L T R Q V L F E L K H M R D V Q F N H
   1    CCATCAAGCATGTGAATAAGAAGCGCATCGAGCTGACCCGGCAGGTTCTGTTTGAACTGAAACATATGAGAGATGTTCAGTTTAACCAT

 557    L T R F I G A C I D P P N I C I V T E Y C P R G S L Q D I L
  90    CTCACTCGCTTCATTGGTGCCTGCATAGACCCTCCCAACATTTGCATTGTCACCGAGTATTGTCCTCGTGGGAGTTTACAGGATATTCTG

 587    E N D S I N L D W M F R Y S L I N D L V K G M A F L H N S I
 180    GAAAATGACAGCATCAACCTGGACTGGATGTTTCGTTATTCACTCATTAATGACCTTGTTAAGGGCATGGCCTTTCTCCATAACAGCATT

 617    I A S H G S L K S S N C V V D S R F V L K I T D Y G L A S F
 270    ATTGCATCCCATGGGAGTCTCAAGTCCTCAAACTGTGTGGTGGATAGTCGTTTCGTGCTCAAAATCACAGACTATGGCCTGGCCAGCTTC

 647    R S T A E P D D S H A L Y A K K L W T A P E L L S G N P L P
 360    CGATCAACTGCTGAACCTGATGACAGCCATGCCCTCTATGCCAAGAAGCTGTGGACTGCCCCAGAACTGCTCAGTGGGAACCCCCTGCCA

 677    T T G M Q K A D V Y S F G I I L Q E I A L R S G P F Y L E G
 450    ACCACAGGCATGCAGAAGGCTGATGTCTATAGCTTTGGGATCATCTTACAGGAGATAGCACTTCGCAGTGGGCCTTTCTACTTGGAGGGC

 707    L D L S P K E I V Q K V R N G Q R P Y F R P S I D R T Q L N
 540    CTGGATCTCAGCCCCAAAGAGATTGTCCAGAAGGTCCGAAATGGTCAGCGGCCTTATTTCCGGCCAAGTATTGACCGGACGCAACTGAAT

 737    E E L V L L M E R C W A Q D P A E R P D F G Q I K G F I R R
 630    GAAGAGCTAGTTTTGCTGATGGAGCGATGTTGGGCCCAGGACCCAGCTGAACGACCAGACTTTGGACAGATTAAGGGCTTCATTCGCCGC

 767    F N K E G G T S I L D N L L L R M E Q Y A N N L E K L V E E
 720    TTTAACAAGGAAGGAGGCACCAGTATATTGGACAACCTCCTGTTGCGCATGGAGCAGTATGCCAACAACCTGGAGAAGCTGGTGGAGGAG

 797    R T Q A Y L E E K R K A E A L L Y Q I L P H S V A E Q L K R
 810    CGCACACAGGCCTACCTGGAGGAGAAACGCAAGGCTGAGGCTCTGCTCTACCAAATTCTACCCCATTCAGTGGCAGAGCAGTTAAAACGG

 827    G E T V Q A E A F D S V T I Y F S D I V G F T A L S A E S T
 900    GGAGAGACTGTACAGGCTGAGGCCTTTGACAGCGTTACCATTTACTTCAGTGACATCGTTGGCTTCACAGCTTTGTCGGCAGAGAGCACC

 857    P N Q V V T L L N D L Y T C F D A I I D N F D V Y K V E T I
 990    CCCATGCAGGTGGTGACACTTCTTAACGATCTATATACATGCTTCGATGCCATAATTGACAACTTTGACGTCTACAAGGTAGAGACGATT

 887    G D A Y M V V S G L P G R N G Q R H A P E I A R M A L A L L
1080    GGAGATGCCTACATGGTGGTATCTGGTCTCCCAGGCAGAAATGGTCAGCGTCATGCCCCAGAAATTGCTCGTATGGCCCTGGCATTACTG

 917    D A V S S F R I R H R P H D Q L R L R L G V H T G P V C A G
1170    GATGCAGTTTCTTCCTTCCGCATCCGCCACCGACCCCATGACCAACTGCGGCTACGACTAGGGGTCCACACAGGGCCCGTCTGTGCTGGG

 947    V V G L K M P R Y C L F G D T V N T A S R M E S N G Q A L K
1260    GTCGTTGGCCTGAAGATGCCCCGCTATTGTCTCTTTGGAGACACAGTGAACACTGCTTCCCGAATGGAGTCTAACGGTCAAGCCCTGAAG

 977    I H V S S T T K D A L D E L G C F Q L E L R G D V E M K G K
1350    ATTCATGTCTCCTCTACCACCAAGGATGCCCTGGATGAACTTGGATGCTTCCAGCTAGAGCTTCGAGGGGATGTGGAGATGAAGGGAAAA

1007    G K N R T Y W L L G E R K G P A G L L Ter
1440    GGAAAGATGCGAACTTATTGGCTCCTAGGAGAGCGGAAAGGACCTGCTGGGCTCCTATAAACCCTACTTCTTCCCAAGTCAGACAGTCCC

1530    CTGCTGCTGGTACCTGGGTGGGCAGTAGCCATCATCTCTCCACACATCAGAAGTGGACATTGTCACATGAGATGGAAATCAACATGCATA

1620    AAACCCCCACCTTATATGGAAGCTGTTGCCCTTTGCAGCTCAGTCTTGTACATATACCTGTCCCTCTCTGGCCTGGTCTCCTTCCTCCCT

1710    ATCTTCTGTAAATATCTGTATCTAGACC
```

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность клонированных фрагментов кДНК гуанилатциклазы из сетчатки быка и соответствующая ей аминокислотная последовательность (регистрационный номер EMBL-банка данных X66865). Нумерация аминокислотных остатков приведена в координатах GC-B из мозга человека [9]

сированной в культуре клеток человека, не стимулировалась известными натрийуретическими пептидами, имея при этом относительно высокий базальный уровень гуанилатциклазной активности.

В совокупности все эти данные ставят вопрос: является ли экспрессия в сетчатках быка, крысы и человека различных форм гуанилатциклаз выражением видоспецифичности или обнаруженные формы доминантны для соответствующих видов, но другие формы гуанилатциклаз также экспрессируются, хотя пока не идентифицированы. Ранее было показано, что в мозге крысы и человека экс-

прессируются две формы мембраносвязанных гуанилатциклаз — GC-A и GC-B [9—11, 14], причем форма GC-B доминантна в мозге крысы [9]. Так как сетчатка — часть центральной нервной системы, естественно ожидать присутствия обеих этих форм гуанилатциклаз в этой ткани. Кроме того, поскольку гибридизацией in situ была показана тканеспецифичность retGC для сетчатки приматов [12], можно говорить о том, что в сетчатке млекопитающих экспрессируются несколько форм мембраносвязанных гуанилатциклаз. В связи с этим особую важность приобретает изучение как локализации гуанилатциклаз в различных типах клеток сетчатки, так и регуляции гуанилатциклазной активности в фоторецепторных клетках позвоночных.

Авторы выражают глубокую благодарность Н. С. Быстрову за синтез олигонуклеотидных зондов и И. В. Храмцову за ценные советы и помощь в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Liebman P. A., Parker K. R., Dratz E. A.*//Annu. Rev. Physiol. 1987. V. 49. P. 765—791.
2. *Koch K.-W., Stryer L.*//Nature. 1988. V. 334. № 6177. P. 64—66.
3. *Koch K.-W.*//J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 13. P. 8634—8637.
4. *Hayashi F., Yamazaki A.*//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 11. P. 4746—4750.
5. *Horio Y., Murad F.*//J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 6. P. 3411—3415.
6. *Hakki S., Sitaramayya A.*//Biochemistry. 1990. V. 29. № 4. P. 1088—1094.
7. *Koesling D., Bohme E., Schultz G.*//FASEB J. 1991. V. 5. № 13. P. 2785—2791.
8. *Lipkin V. M. et al.*//J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 22. P. 12 955—12 959.
9. *Schulz S., Singh S., Bellet R. A., Singh G., Tubb D. J., Chin H., Garbers D. L.*//Cell. 1989. V. 58. № 6. P. 1155—1162.
10. *Chang M., Lowe D. G., Lewis R. H., Chen E., Goeddel D. V.*//Nature. 1989. V. 341. № 6237. P. 68—72.
11. *Lowe D. G., Chang M. S., Hellmiss R., Chen E., Singh S., Garbers D. L., Goeddel D. V.*//EMBO J. 1989. V. 8. № 5. P. 1377—1384.
12. *Shyjan A. W., Sauvage F. J., Gillet N. A., Goeddel D. V.*//Neuron. 1992. V. 9. № 5. P. 727—737.
13. *Kutty R. K., Fletcher T. R., Chader G. J., Krishna G.*//Biochem. and Biophys. Res. Communs. 1992. V. 182. № 2. P. 851—857.
14. *Chinkers M., Garbers D. L., Chang M.-S., Lowe D. G., Chin H., Goeddel D. V., Schulz S.*//Nature. 1989. V. 338. № 6210. P. 78—83.
15. *Chinkers M., Garbers D. L.*//Annu. Rev. Biochem. 1991. V. 60. P. 553—575.

Поступила в редакцию
3.III.1993

B. E. Shmukler, D. V. Zubov, N. G. Abdulaev

DETECTION OF EXPRESSION OF THE MEMBRANE-BOUND GUANYLATE CYCLASE GC-B IN BOVINE RETINA

M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

cDNA clones encoding the central and C-terminal parts of a membrane-bound guanylate cyclase (GC) were isolated from the λZAP bovine retinal library. All of the analysed recombinants appeared to carry inserts encoding the gyanylate cyclase GC-B. Analysis of the determined nucleotide and deduced amino acid sequences showed extremely high level of homology to the sequences of known GC-B. The results indicate that a mRNA for GC-B is expressed in the bovine retina.