



УДК 577.175.82.082.261

КЛОНИРОВАНИЕ кДНК НЕЙРОГРАНИНА ЧЕЛОВЕКА

© 1996 г. И. Б. Мерцалов[#], Э. Гундельфингер*, В. И. Щетлин

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*Институт нейрофизиологии, Магдебург

Поступила в редакцию 27.12.95 г.

С использованием библиотеки кДНК из мозга эмбриона человека клонирована кДНК размером 1.2 т. п. о., кодирующая нейрогранин человека – нейроспецифический эндогенный субстрат протеинкиназы С. Результаты нозерн-блот-анализа мРНК из коры головного мозга человека свидетельствуют о том, что мРНК нейрогранина человека существует в виде единственного мРНК-транскрипта. В этом состоит отличие от гена нейрогранина (*RC3*) крысы, из которого образуется два типа мРНК, различающиеся по длине. кДНК нейрогранина человека и крысы высокогомологичны, а первичные структуры этих белков различаются лишь тремя аминокислотными остатками из общего числа 78. В 3'-нетранслируемой области кДНК нейрогранина человека отсутствует пурин-богатый район, характерный для кДНК нейрогранина крысы.

Ключевые слова: нейрогранин, нуклеотидная последовательность кДНК, протеинкиназа С, кальмодулинсвязывающий домен.

Нейрогранин (другое название – белок RC3) [1, 2] – нейроспецифический белок, способный служить эндогенным субстратом протеинкиназы С. Этот белок в отсутствие ионов кальция связывает кальмодулин [3]. К настоящему времени данные о первичной структуре нейрогранинов имеются благодаря клонированию кДНК белка RC3 крысы [2], а также установлению аминокислотной последовательности нейрогранина быка [1]. Аминокислотная последовательность (78 остатков) включает в себя в средней части молекулы (остатки 30–47) кальмодулинсвязывающий и фосфорилируемый домены. Эта консенсусная область, AAXKIQASFRGHXXRKKXX, присутствует также у другого кальмодулинсвязывающего субстрата протеинкиназы С – нейроспецифического белка нейромодулина (другие названия – GAP-43, F1, B50) [4]. В отличие от нейромодулина, который локализуется главным образом в пресинаптической мембране аксона и ассоциирован с ней посредством пальмитоилированных цистеиновых остатков в N-концевой области, нейрогранин находится в цитозоле и локализован в дендритах нейронов [5].

Фосфорилирование нейрогранина *in vivo* описано при явлении долговременного потенцирования, которое представляет собой модель в изучении процессов обучения и запоминания в головном мозге млекопитающих [6].

В отличие от нейромодулинов нейрогранины являются крайне низко представленными белками [5]. Поскольку со времени установления в 1990 г. структуры кДНК, кодирующей белок RC3 (нейро-

гранин) крысы, не были установлены нуклеотидные последовательности кДНК каких-либо иных нейрогранинов, нам представлялось целесообразным клонирование кДНК нейрогранина человека.

С этой целью мы провели скрининг кДНК-библиотеки мозга человека с помощью ³²P-меченнего олигонуклеотидного зонда 293-27. Этот зонд имеет структуру (5')GTG GCC CCG AAA ACT CGC CTG GAT TTT и комплементарен фрагменту гена RC3 крысы (соответствующему аминокислотной последовательности KIQASFRGH).

Было получено 10 клонов, три из них (RC9, RC6, RC4) (рис. 1) имели вставку примерно 1.2 т. п. о.,

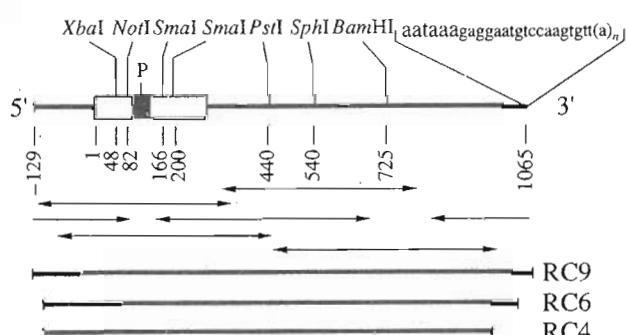


Рис. 1. Структура кДНК нейрогранина человека. Кодирующая область обозначена полым прямоугольником, внутри которого зачернена область, включающая кальмодулинсвязывающий домен и остаток серина, фосфорилируемый протеинкиназой С. Направление секвенирования при анализе структуры указано стрелками. Приведен также сигнал полиаденилирования вместе с примыкающей к нему последовательностью. Жирные линии соответствуют клонам RC9, RC6 и RC4, для которых установлены полные нуклеотидные последовательности.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-73-74, факс: (095) 335-57-33).

-129	agcagagctgctgttcggcgccggctggcggccgactgcccc	-83
agagccccaccggcaccacacagaccccaccccgccctgcgccagccttcgcccc		-24
1 Met Asp Cys Cys Thr Glu Asn Ala Cys		9
gcagaggaccccccacaccagc atg gac tgc acc gag aac gcc tgc		27
Ser Lys Pro Asp Asp Asp Ile Leu Asp Ile Pro Leu Asp Asp Pro		24
tcc aag ccg gac gac gac att cta gac atc ccg ctg gac gat ccc		72
Gly Ala Asn Ala Ala Ala Lys Ile Gln Ala Ser Phe Arg Gly		39
ggc gcc aac gcg gcc gcc aaa atc cag gcg agt ttt cgg ggc		117
His Met Ala Arg Lys Lys Ile Lys Ser Gly Glu Arg Gly Arg Lys		54
cac atg gcg aag aag ata aag agc gga gag cgc ggc cgg aag		162
Gly Pro Gly Pro Gly Gly Pgo Gly Gly Ala Gly Val Ala Arg Gly		69
ggc ccg ggc cct ggg ggg cct ggc gga gct ggg gtg gcc cgg gga		207
Gly Ala Gly Gly Gly Pro Ser Gly Asp *		78
gac gcg ggc ggc ggc ccc agc gga gac tag gccagaactgagcattttca		257
aagtcccgaggagagatggatgccgcgtcccttcgcagcgcacgacttccctgcgt		317
gtttgtgacccttcctgcccagcaacctgcgcagctacaggagccctgcgtcccaag		377
actccctcacccaggcaggctccgcggagtcgcgtgagtcgcgtgcgtcccttttagtt		437
tctgcagtcttagtatggtccccatttgccttcactccacccacccataaccatgcgc		497
tcccaatcttccttctttgcttctgcgcacacttcgcgcacccatgcgcgtctg		557
cctccgcagcctcagtgcgtttctgcgcgcactgcggagggcgcctaagcgtcacc		617
aagcacactcactaaagaaaaacgagttttcggtctgtgcgcagctaaaaggggcg		677
ccctacatctccgtgccactccgcggccagcctagcccaagactttggatccggggcga		737
gatgaaggaaagagggttgtttgggttcggacgacccttgctgcgtggaaagagaagt		797
ccctatcccacacctgcctgtcacgttccctcccttcccaagcgcactgttggggca		857
gcctctccagctcttgatgcacaaacgcgcgcgcgcgcactggtaggaggag		917
tcttccacggccccccccccccctgtcggtccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc		977
gctgtggccgaaagggtttctgatctccgtgtgcacgtgtgactgtgctgggttggaaatgt		1037
gaacaataaagaggaatgtccaagtgtt (a)n		1065

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность кДНК нейрогранина человека и выведенная из нее аминокислотная последовательность белка. Подчеркнут сигнал полиаденилирования (AATAAA). Звездочкой отмечен вероятный стоп-кодон.

соответствующую ожидаемому размеру детектируемой мРНК нейрогранина (нозерн-блот-анализ, см. ниже рис. 4), и были секвенированы. Клон RC9 отличался от двух других наибольшим размером клонированной кДНК, которая имела более длинные poly(A)-фрагмент и 5'-нетранслируемую область (рис. 2).

Нейрогранины человека и крысы содержат 78 аминокислотных остатков и различаются между собой всего тремя аминокислотными заменами (рис. 3). В аминокислотной последовательности нейрогранина быка первые несколько N-концевых остатков были определены авторами предположительно [1], что несколько затрудняет сравнение

	1				
I	MDCCTENACSKPDDDILDIPPLDDPGANAAA A K I QASFRGHMARKKIKSGE				50
II	MDCCTESACSKPDDDILDIPPLDDPGANAAA A K I QASFRGHMARKKIKSGE				50
III	(MCT) ESACSCPDDDILDIPPLDDPGANAAA A K I QASFRGHMARKKIKSGE				
	51				
	RGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGPSGD	78			
	CGRKKGPGPGGPGGAGGGARGGAGGGPSGD	78			
	RGRKGPGPGGPGGAGGGARGGAGGGPSGG				

Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей нейрогрина человека (I), крысы (II) и быка (III). Последовательность первых трех остатков в нейрогрине быка приведена авторами как вероятная. Идентичные остатки в нейрогринах из различных источников соединены двумя точками. Подчеркнут кальмодулинсвязывающий домен белков. Сигнал фосфорилирования для протеинкиназы С выделен жирным шрифтом.

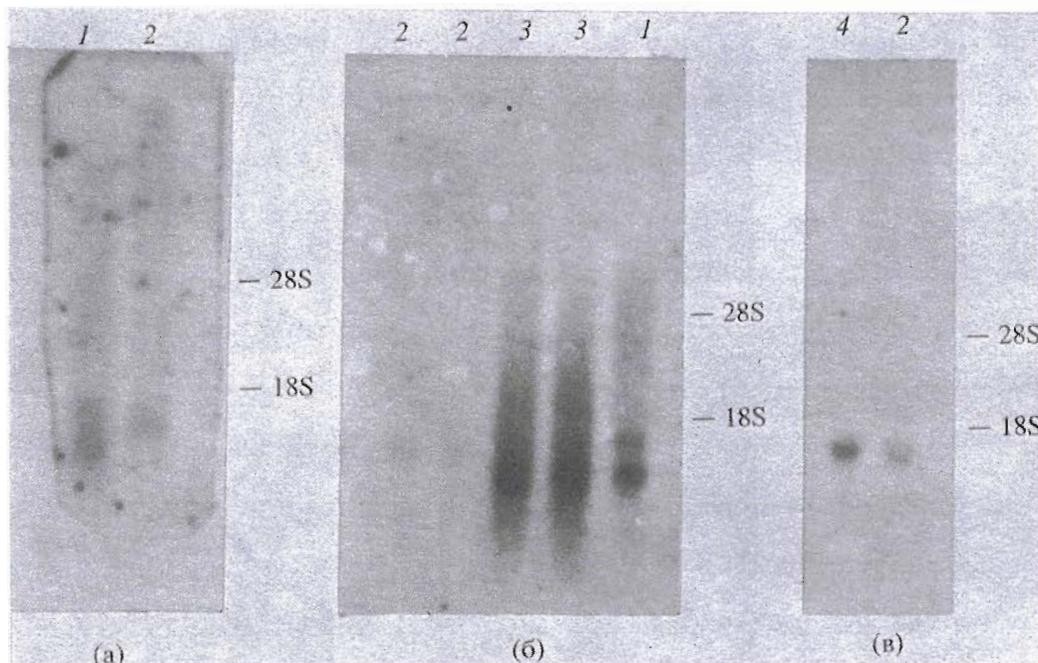


Рис. 4. Нозерн-блот-анализ мРНК из коры головного мозга крысы (1, 3) и человека (2, 4). 20 (1, 2) и 40 мкг мРНК (3, 4) разделяли в 1,2% формальдегидном агарозном геле, переносили на мембранны Gene Screen plus (Du Pont, США) и гибридизовали с ³²P-меченными олигонуклеотидным зондом 293-27 (а), кДНК нейрогрина крысы (б) и человека (в). В качестве маркеров служили рибосомные РНК 18S и 28S.

первичных структур. Если не учитывать N-концевой фрагмент в нейрогрине быка, нейрогрин человека имеет различия в три аминокислотных остатка по сравнению с нейрогрином быка. Последний имеет столько же отличий и от нейрогрина крысы. В положении 51 в нейрогринах человека и быка находятся остатки аргинина, а в нейогрине крысы – остаток цистеина. Аминокислотные различия наблюдаются в N- и C-концевых фрагментах (функциональная роль которых неизвестна) и не затрагивают центральный домен, включающий сайты фосфорилирования протеинкиназой С и связывания кальмодулина. Получ-

ченные нами данные свидетельствуют о высокой консервативности первичной структуры нейрогринов.

Данные нозерн-блот-анализа мРНК из мозга крысы в работе [2] показывают, что существуют два типа мРНК нейрогрина крысы, различающихся длиной 3'-нетранслируемой области. Полученные нами результаты нозерн-блот-анализа мРНК из коры головного мозга человека с зондом 293-27, а затем и с клонированной кДНК (рис. 4) свидетельствуют о существовании только одного вида транскрипта гена нейрогрина человека.

Сравнение 3'-нетранслируемых областей кДНК нейрографина человека и крысы показывает, что сразу после стоп-кодона и перед poly(A)-хвостом существуют высокогомологичные для обоих генов области. У кДНК нейрографина человека отсутствует в 3'-области пуринобогащенный регион ($A_{34}GA_4GA_4GA_{10}$), присутствующий в кДНК нейрографина крысы. В кодирующей области кДНК нейрографина человека и крысы имеют высокую степень гомологии, которая достигает 90%.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Библиотеку кДНК из мозга эмбрионов человека в фаговом векторе λ gt10 (кДНК-вставка по EcoRI-сайтам, Clontech) скринировали 32 P-меченым олигонуклеотидным зондом 293-27 (5')GTG GCC CCG AAA ACT CGC CTG GAT TTT в гибридизационном буфере 500 мМ Na-фосфат, pH 7.2; 7% SDS; 1 мМ EDTA. Отмывка проводилась в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 6.5, при 50°C три раза по 15 мин. Было выделено 10 фаговых клонов. Вставки кДНК (клоны RC9, RC6 и RC4), близкие по размеру мРНК нейрографина (рис. 4), были переклонированы в плазмидный вектор pBluescript KS+ (Stratagene, США) по EcoRI-сайтам. Наибольший размер ДНК имеет клон RC9. Клоны были секвенированы по Сенгеру с помощью дидезокситерминирующей системы с ДНК-полимеразой T7 (Pharmacia).

Нозерн-блот-анализ. Тотальная РНК была выделена из коры головного мозга человека и крысы с использованием гуанидинтиоцианатного буфера [7]. Фракция poly(A)-РНК была выделена аффинной хроматографией на oligo(dT)-целлюлозе (Pharmacia, Швеция), разделена в 1.2% формальдегидном агарозном геле и перенесена на мембрану Gene Screen Plus (Du Pont, США).

Гибридизацию проводили в растворе, содержащем 50% формамид, буфер SSPE (5x: 0.9 М NaCl, 50 мМ Na-фосфат, pH 7.4, 5 мМ EDTA), раствор Денхардта (5x: 0.01% фикол, 0.01% поливинилпирролидон, 0.01% БСА) и 0.1% SDS [7]. Отмывку проводили трижды в буфере: SSC (0.1x), 0.1% SDS при 45°C.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baudier J., Deloulme J.C., Dorsselaer A.V., Black D., Matthes H.W.D. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 229–237.
2. Watson J.B., Battenberg E.F., Wong K.K., Bloom F.E., Sutcliffe J.G. // *J. Neurosci. Res.* 1990. V. 26. P. 397–408.
3. Deloulme J.C., Sensenbrenner M., Baudier J. // *FEBS Lett.* 1991. V. 282. P. 183–188.
4. Coggins P.J., Zwiers H. // *J. Neurochem.* 1991. V. 56. P. 1095–1106.
5. Represa A., Deloulme J.C., Sensenbrenner M., Ben-Ari Y., Baudier J. // *J. Neurosci.* 1990. V. 12. P. 3782–3792.
6. Klann E., Chen S.-J., Sweatt J.D. // *J. Neurochem.* 1992. V. 58. P. 1576–1579.
7. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* N.Y.: Cold Spring Harbor, 1989.

Cloning of cDNA for Human Neurogranin

I. B. Mertsalov*,¹ E. Gundelfinger**, and V. I. Tsetlin*

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia

**Institute of Neurophysiology, Magdeburg, Germany

Abstract—By using the human fetal brain library, a 1.2-kb cDNA coding for human neurogranin, a neurospecific endogenous substrate of protein kinase C, was cloned. The results of the Northern blot analysis of the human brain cortex mRNA show that the human neurogranin mRNA exists as a single transcript. Its gene thereby differs from the rat neurogranin gene (RC3), which was shown to produce two mRNAs of different lengths. cDNAs of the human and rat neurogranins show a 70% homology, whereas the protein sequences only differ in three amino acid residues out of the total of 78. The 3'-untranslated region of the human neurogranin cDNA lacks the purine-rich stretch characteristic of the rat neurogranin cDNA.

Key words: neurogranin, cDNA nucleotide sequence, protein kinase C, calmodulin-binding domain.

¹ To whom correspondence should be addressed.