



УДК 577.175.82.082.261

КЛОНИРОВАНИЕ КДНК НЕЙРОГРАНИНА ЧЕЛОВЕКА

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

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 высокомологичны, а первичные структуры этих белков различаются лишь тремя аминокислотными остатками из общего числа 78. В 3'-нетранслируемой области кДНК нейрогранина человека отсутствует пуриновый 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, ААХКИQASFRGHXXRKKXK, 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-меченого 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.,

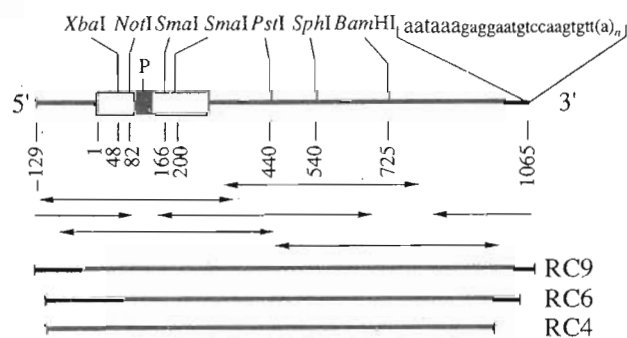


Рис. 1. Структура кДНК нейрогранина человека. Кодирующая область обозначена полым прямоугольником, внутри которого зачернена область, включающая кальмодулинсвязывающий домен и остаток серина, фосфорилируемый протеинкиназой С. Направление секвенирования при анализе структуры указано стрелками. Приведен 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).

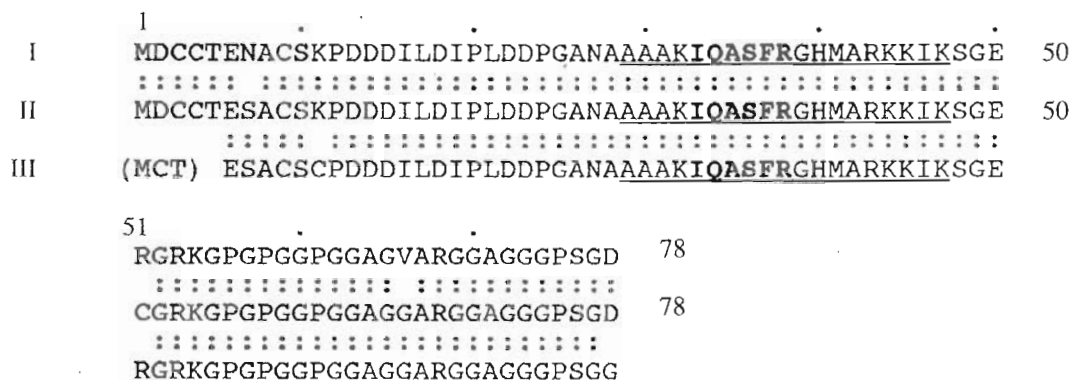


Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей нейрогранина человека (I), крысы (II) и быка (III). Последовательность первых трех остатков в нейрогранине быка приведена авторами как вероятная. Идентичные остатки в нейрогранинах из различных источников соединены двумя точками. Подчеркнут кальмодулинсвязывающий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

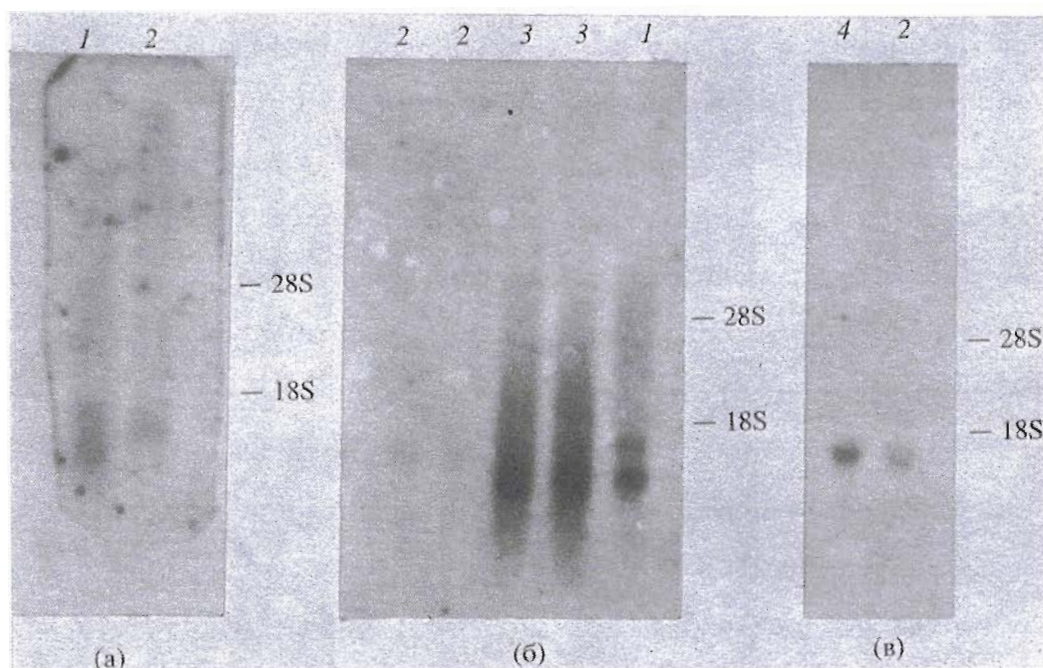


Рис. 4. Нозерн-блот-анализ мРНК из коры головного мозга крысы (1, 3) и человека (2, 4). 20 (1, 2) и 40 мкг мРНК (3, 4) разделяли в 1,2% формальдегидном агарозном геле, переносили на мембраны Gene Screen plus (Du Pont, США) и гибридизовали с 32 P-мечеными олигонуклеотидным зондом 293-27 (а), кДНК нейрогранина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

первичных структур. Если не учитывать N-концевой фрагмент в нейрогранине быка, нейрогранин человека имеет различия в три аминокислотных остатка по сравнению с нейрограгином быка. Последний имеет столько же отличий и от нейрогранина крысы. В положении 51 в нейрогранинах человека и быка находятся остатки аргинина, а в нейрогранине 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. Полу-

ченные нами данные свидетельствуют о высокой консервативности первичной структуры нейрограгинов.

Данные нозерн-блот-анализа мРНК из мозга крысы в работе [2] показывают, что существуют два типа мРНК нейрогранина 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 нейрогранина человека.

Сравнение 3'-нетранслируемых областей кДНК нейрогранина человека и крысы показывает, что сразу после стоп-кодона и перед poly(A)-хвостом существуют высокомолекулярные для обоих генов области. У кДНК нейрогранина человека отсутствует в 3'-области пуринобогатый регион (A₃₄GA₄GA₄GA₁₀), присутствующий в кДНК нейрогранина крысы. В кодирующей области кДНК нейрогранина человека и крысы имеют высокую степень гомологии, которая достигает 90%.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Библиотеку кДНК из мозга эмбрионов человека в фаговом векторе λgt10 (кДНК-вставка по EcoRI-сайтам, Clontech) скринировали ³²P-меченым олигонуклеотидным зондом 293-27 (5')GTG GCC CCG AAA ACT CGC CTG GAT TTT в гибридационном буфере 500 mM Na-фосфат, pH 7.2; 7% SDS; 1 mM EDTA. Отмывка проводилась в 50 mM 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 нейрогранина (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 M NaCl, 50 mM Na-фосфат, pH 7.4, 5 mM EDTA), раствор Денхардта (5x: 0.01% фикола, 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., Dorselaer A.V., Black D., Mathes 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., Zwiars 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.