



УДК 577.113.5:577.152

## НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ КДНК И ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНА $\alpha'$ -СУБЪЕДИНИЦЫ ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО GMP КОЛБОЧЕК СЕТЧАТКИ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА

© 1997 г. Е. А. Фещенко, С. Г. Андреева, В. А. Сулова, Т. В. Ракитина, Е. В. Смирнова,  
Н. С. Быстров, В. Е. Заграничный\*, В. М. Липкин\*<sup>#</sup>

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

*\*Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
142292, г. Пушкино, Московская область*

Поступила в редакцию 14.06.96 г.

Из библиотеки кДНК сетчатки глаза человека выделено пять клонов, нуклеотидные последовательности вставок кДНК которых позволили реконструировать полную структуру кДНК  $\alpha'$ -субъединицы фосфодиэстеразы циклического GMP (сGMP-фосфодиэстеразы) колбочек сетчатки глаза человека длиной 3455 п.о. Выведенная из нуклеотидной последовательности кДНК аминокислотная последовательность белка содержит 858 а.о. Рассчитанная молекулярная масса белка составляет 99169 Да. Выявлена существенная гомология между аминокислотной последовательностью  $\alpha'$ -субъединицы сGMP-фосфодиэстеразы колбочек сетчатки глаза человека и соответствующими последовательностями  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\alpha'$ -субъединиц фоторецепторных сGMP-фосфодиэстераз сетчатки глаза быка, мыши, цыпленка и человека. Из геномной библиотеки выделены четыре рекомбинантных бактериофага, вставки ДНК которых позволили реконструировать фрагмент гена  $\alpha'$ -субъединицы сGMP-фосфодиэстеразы колбочек сетчатки глаза человека суммарной длиной 32 т.п.о. Установлены нуклеотидные последовательности 5'-фланкирующей области гена и первых 14 экзонов, кодирующих N-концевую часть белка, с прилегающими к ним участками интронов.

*Ключевые слова: сGMP-фосфодиэстераза, зрительная рецепция, клонирование кДНК, нуклеотидная последовательность, экзон-интрон, Alu-повторы.*

В последнее время все большее внимание уделяется изучению молекулярных механизмов нарушения передачи светового сигнала в фоторецепторных клетках. Часто такие нарушения вызывают тяжелые клинические последствия. Изучение молекулярных механизмов различных патологий, и в первую очередь наследственных, приводящих к нарушению восприятия, передачи и усиления зрительного сигнала, требует детальной информации не только о строении белков, принимающих участие в этих процессах, но и о структуре, организации и хромосомной локализации кодирующих их генов.

Сетчатка глаза человека содержит два типа фоторецепторных клеток – палочки и колбочки. Оба типа клеток ответственны за адсорбцию энергии фотона, ее превращение в нервный импульс и дальнейшую передачу импульса в мозг [1, 2]. Важная роль в восприятии зрительного сигнала принадлежит фоторецепторной сGMP-фосфодиэстеразе. Хотя процессы фототрансдукции, происхо-

дящие в колбочках и палочках, схожи, известны две биохимически различные формы сGMP-фосфодиэстеразы. сGMP-фосфодиэстераза из палочек сетчатки состоит из четырех субъединиц:  $\alpha$  [3],  $\beta$  [4] и двух  $\gamma$  [5]. Каталитические  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы (с молекулярными массами 88 и 84 кДа соответственно) в составе активного димера гидролизуют внутриклеточный сGMP в ответ на активацию светом родопсина, а  $\gamma$ -субъединица (11 кДа) является внутримолекулярным ингибитором фермента [1, 2]. сGMP-фосфодиэстераза колбочек сетчатки состоит из двух идентичных каталитических  $\alpha'$ -субъединиц (по 94 кДа) и трех малых субъединиц (11, 13, 15 кДа) [6].

Установлено, что ряд наследственных дегенеративных заболеваний сетчатки глаза человека (пигментные ретиниты) вызывается дефектами в нескольких генах, экспрессируемых в фоторецепторных клетках. Эти заболевания характеризуются прогрессирующей дегенерацией фоторецепторных клеток, что сначала приводит к потере периферического зрения и ночной слепоте, а впоследствии и к полной потере зрения. Вначале болезнь в основном затрагивает палочки, тогда

<sup>#</sup> Автор для переписки. Тел.: (095) 336-61-66, факс: (095) 310-70-07, e-mail: lipkin@ibch.siocb.ras.ru.

как колбочки менее подвержены разрушению, но с течением времени происходит полная дегенерация всех типов фоторецепторных клеток. Было показано, что некоторые случаи пигментных ретинитов обусловлены мутациями в генах родопсина [7–10], периферина [11–14],  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц cGMP-фосфодиэстеразы палочек сетчатки глаза человека [15–17]. Вполне вероятно, что мутации в гене, кодирующем  $\alpha$ '-субъединицу cGMP-фосфодиэстеразы колбочек сетчатки глаза человека, также могут быть ответственны за некоторые формы наследственной дегенерации сетчатки. Поэтому определение нуклеотидной последовательности кДНК, а также гена  $\alpha$ '-субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы колбочек сетчатки глаза человека представляет не только научный, но и практический интерес.

Ранее в ИБХ РАН были клонированы кДНК всех трех субъединиц cGMP-фосфодиэстеразы палочек сетчатки глаза быка, кДНК  $\beta$ -субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы сетчатки человека и определены аминокислотные последовательности соответствующих белков [3–5, 18], а также клонированы гены  $\gamma$ - [19] и  $\beta$ -субъединиц [20] cGMP-фосфодиэстеразы палочек сетчатки глаза человека и определена их экзон-интронная организация. Здесь мы описываем клонирование и установление первичной структуры кДНК и фрагментов гена  $\alpha$ '-субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы колбочек сетчатки глаза человека.

#### КЛОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ кДНК И ФРАГМЕНТА ГЕНА $\alpha$ '-СУБЪЕДИНИЦЫ cGMP-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

В ходе исследования была проанализирована амплифицированная библиотека кДНК сетчатки глаза человека, созданная на основе бактериофага  $\lambda$ gt10, с представительностью около  $2 \times 10^6$  клонов. В качестве зонда для скрининга клонотеки использовали смесь фрагментов кДНК  $\alpha$ '-субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы колбочек сетчатки глаза быка [21], меченных ник-трансляцией в присутствии [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP. Индивидуальные клоны выделяли в нескольких последовательных циклах гибридизации. В результате было получено четыре индивидуальных бактериофага ( $\alpha$ 'g1,  $\alpha$ 'g3.1,  $\alpha$ 'g37 и  $\alpha$ 'g45), дающих положительный сигнал гибридизации (рис. 1).

Фрагменты кДНК из выделенных фагов были субклонированы в плазмиду rSP65 для рестриктового анализа и определения нуклеотидных последовательностей. Сравнение нуклеотидных последовательностей этих вставок кДНК и выведенных из них аминокислотных последовательностей с соответствующими структурами  $\alpha$ '-субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы колбочек сетчатки гла-

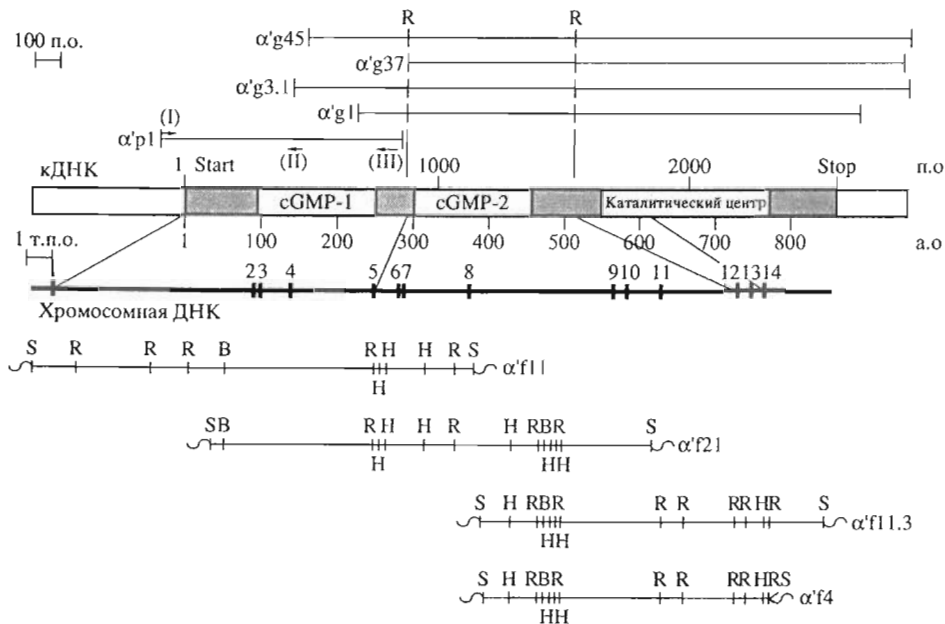
за быка [21] и цыпленка [22] показало, что в проанализированных клонотеках отсутствует информация о 147 N-концевых аминокислотных остатках и 5'-нетранслируемой области мРНК.

Параллельно с клонированием кДНК проводили, используя тот же зонд, поиск гена  $\alpha$ '-субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы колбочек сетчатки глаза человека в геномной библиотеке, созданной на основе бактериофага  $\lambda$ FIX, с представительностью  $1.6 \times 10^6$  клонов. В результате скрининга геномной клонотеки были выявлены четыре клонотеки, дававшие положительный сигнал гибридизации с радиоактивно меченными фрагментами кДНК  $\alpha$ '-субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы быка.

В экспериментах по картированию с помощью рестриктаз было обнаружено, что клоны  $\alpha$ 'f11 и  $\alpha$ 'f21 содержат фрагмент гена  $\alpha$ '-субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы человека, кодирующий N-концевую область белка. Клоны  $\alpha$ 'f11.3 и  $\alpha$ 'f4 содержат часть гена  $\alpha$ '-субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы, соответствующую центральной области белка, и частично перекрываются с клоном  $\alpha$ 'f21 (рис. 1). Фрагменты ДНК фагов  $\alpha$ 'f11,  $\alpha$ 'f21,  $\alpha$ 'f11.3 и  $\alpha$ 'f4, дающие положительные сигналы гибридизации с фрагментами кДНК  $\alpha$ '-субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы быка, были субклонированы в плазмидный вектор rSP65 для детального рестриктового анализа и определения нуклеотидных последовательностей.

Сравнение установленных нуклеотидных последовательностей субклонированных фрагментов геномных клонов с определенными нами ранее последовательностями кДНК  $\alpha$ '-субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы человека, а также быка [21] и со структурой гена  $\beta$ -субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы человека [20] показало, что вставки клонов  $\alpha$ 'f11,  $\alpha$ 'f21,  $\alpha$ 'f11.3 и  $\alpha$ 'f4 содержат в совокупности фрагмент гена  $\alpha$ '-субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы человека длиной 32 т.п.о., который включает 5'-фланкирующую область и 14 первых экзонов, кодирующих 615 N-концевых аминокислотных остатков (рис. 1).

Информация, полученная при определении структуры гена, позволила клонировать недостающий 5'-концевой фрагмент кДНК  $\alpha$ '-субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы человека при помощи ПЦР. В качестве матрицы для ПЦР использовали тотальную ДНК, выделенную из рекомбинантных фагов клонотеки кДНК сетчатки человека. В качестве праймеров использовали олигонуклеотиды (I) (5' CACCAGGATGAATTTCTTTC) и (II) (5' CTTGGTTCATGTCCAGCAGT), синтезированные на основании установленной последовательности 5'-фланкирующей области гена и частичной структуры кДНК  $\alpha$ '-субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы человека. Полученный после амплификации фрагмент ДНК имел



**Рис. 1.** Схема κДНК и фрагмента гена  $\alpha'$ -субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы колбочек сетчатки глаза человека и относительное расположение клонированных фрагментов ДНК исследованных клонов. Вверху: κДНК-клоны  $\alpha'g45$ ,  $\alpha'g37$ ,  $\alpha'g3.1$ ,  $\alpha'g1$  и  $\alpha'p1$ . На схеме κДНК затемнена кодирующая  $\alpha'$ -субъединицу область, более светлым выделены функциональные домены: каталитический центр гидролиза циклических нуклеотидов и участки некаталитического связывания cGMP (cGMP-1 и cGMP-2). Белые прямоугольники на схеме κДНК соответствуют 5'- и 3'-нетранслируемым областям. Цифры над схемой κДНК указывают нумерацию нуклеотидных звеньев, под схемой – нумерацию аминокислотных остатков в соответствующей последовательности белка. Стрелками обозначены положения олигодезоксирибонуклеотидных праймеров (I) и (II), использованных для синтеза ПЦР-фрагментов κДНК, и зонда (III) для отбора содержащих их клонов. В нижней части рисунка показаны экзон-интронная организация исследованного фрагмента гена  $\alpha'$ -субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы человека и физические карты вставок хромосомной ДНК в клонках  $\alpha'f11$ ,  $\alpha'f21$ ,  $\alpha'f11.3$  и  $\alpha'f4$ . Черными прямоугольниками показаны экзоны 1–14 (вне масштаба). R – *EcoRI*, B – *BamHI*, H – *HindIII*, S – *SalI*. Тонкими вертикальными и наклонными линиями показаны соответствия между схемой κДНК и физической картой гена (слева направо: иницирующий кодон, сайты *EcoRI* в экзонах 5 и 12, 3'-конец экзона 14).

ожидаемую длину и был клонирован в плазмиду pSP65 по сайту *HindII*. Отбор рекомбинантных клонов производили при помощи олигодезоксирибонуклеотида (II) (5' САСАТСССААТСТССААТG). В результате были получены два клон,  $\alpha'p1$  и  $\alpha'p2$  (рис. 1). Анализ нуклеотидных последовательностей вставок κДНК этих клонов показал их полную идентичность: оба они кодируют 147 N-концевых аминокислотных остатков  $\alpha'$ -субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы человека.

**АНАЛИЗ И РЕКОНСТРУКЦИЯ  
ПОЛНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ κДНК  
И ВЫВЕДЕННОЙ ИЗ НЕЕ  
АМИНОКИСЛОТНОЙ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ  
 $\alpha'$ -СУБЪЕДИНИЦЫ  
cGMP-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА**

Определение нуклеотидных последовательностей κДНК-клонов  $\alpha'g1$ ,  $\alpha'g3.1$ ,  $\alpha'g37$ ,  $\alpha'g45$  и  $\alpha'p1$  и вставок ДНК генетических клонов  $\alpha'f11$ ,  $\alpha'f21$ ,  $\alpha'f11.3$  и  $\alpha'f4$  (рис. 1) позволило реконструировать

полноразмерную κДНК  $\alpha'$ -субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы колбочек сетчатки глаза человека длиной 3455 п.о. (рис. 2) с иницирующим кодоном в положении 1–3 и терминирующим в положении 2575–2577. Структурный анализ выявил: 1) два потенциальных ТАТА-мотива (ТААТ), находящихся в положениях –232 и –267; 2) два ССААТ-мотива, находящихся в положениях –421 и –431; 3) потенциальный сайт полиаденилирования, находящийся в положении 2742–2747.

К окончанию нашей работы были опубликованы данные об организации гена  $\alpha'$ -субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы человека, включая нуклеотидные последовательности всех экзонов [23]. Сравнительный анализ установленной нами структуры κДНК  $\alpha'$ -субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы колбочек сетчатки глаза человека со структурами, приведенными в работе [23], показал наличие ряда точечных замен как в кодирующей, так и в нетранслируемых областях κДНК (рис. 2). Четыре замены являются значимыми и вызывают изменения трех аминокислотных остатков: 1) в положении 116 Asp (GAT) вместо Val (GTA); 2) в положении 270 Thr (ACA) вместо Ser (TCA);





Рис. 3. Физическая карта 5'-концевой части гена  $\alpha'$ -субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы колбочек сетчатки глаза человека. Все обозначения соответствуют рис. 1. Рестриктивные сайты, совпадающие с описанными в работе [23], показаны снизу. Сайты рестриктаз, уникальные для описываемой здесь структуры, показаны сверху. Серыми прямоугольниками отмечены участки с установленной последовательностью ДНК.

3) в положении 565 Arg (CGG) вместо Gln (CAG). Остальные нуклеотидные замены не являются значимыми: A<sup>1098</sup> вместо G и C<sup>2485</sup> вместо A.

Кроме того, нами были обнаружены единичные отличия в нуклеотидных последовательностях клонированных нами ПЦР-фрагментов по сравнению со структурами, присутствующими в ДНК геномных клонов. Во вставках кДНК клонов  $\alpha'$ p1 и  $\alpha'$ p2, как и в структуре, приведенной в работе [23], в положении 252 находится остаток аденозина, а в геномных клонах в этом же положении был обнаружен остаток гуанозина, который приводит к появлению дополнительного сайта эндонуклеазы рестрикции *Pst*I. Другое отличие вставок кДНК клонов  $\alpha'$ p1 и  $\alpha'$ p2 от структуры гена, как опубликованной в работе [23], так и установленной нами, состоит в замене цитидина в положении 282 на тимидин.

В структурах 5'- и 3'-нетранслируемых областей кДНК нами также были выявлены некоторые отличия по сравнению с последовательностями, приводимыми в работе [23]. По данным этих авторов, в положениях -551, -603 и -605 кДНК отсутствуют остатки аденозина, и наоборот, между остатками T<sup>2818</sup> и A<sup>2819</sup> ими был обнаружен остаток цитидина. Кроме того, имеют место четыре точечные замены: в положении -312 (по нашим данным, С вместо G), в положении -306 (А вместо Т), в положении -195 (G вместо С) и в положении 2861 (Т вместо А).

Выведенная из нуклеотидной последовательности кДНК аминокислотная последовательность белка содержит 858 аминокислотных остатков. Рассчитанная молекулярная масса белка составляет 99169 Да. Аминокислотная последовательность  $\alpha'$ -субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы колбочек сетчатки глаза человека имеет 89.1 и 82.7% гомологии с  $\alpha'$ -субъединицами cGMP-фосфодиэстераз колбочек сетчатки глаз быка [21] и цыпленка [22]; 63.8, 63.5 и 62.7% гомологии с  $\alpha'$ -субъединицами cGMP-фосфодиэстераз палочек сетчатки глаз человека [24], быка [3] и мыши [25]; 64.5, 64.6 и 64.8% гомологии с  $\beta'$ -субъединицами cGMP-фосфодиэстераз палочек сетчатки глаз человека [7], быка [4] и мыши [25] соответственно.

Как и в  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\alpha'$ -субъединицах cGMP-фосфодиэстеразы сетчатки глаза быка, в  $\alpha'$ -субъедини-

це cGMP-фосфодиэстеразы колбочек сетчатки глаза человека найдено два участка внутренней гомологии, которые формируют центры некаталитического связывания cGMP (аминокислотные остатки 94-255 и 300-468). Каталитический центр  $\alpha'$ -субъединицы [4] локализован на участке полипептидной цепи, имеющем координаты 560-783. На С-конце белка выявлена каноническая последовательность SAAX (С - цистеин, А - алифатическая аминокислота, X - любая аминокислота), которая является сигналом изопренилирования [26].

#### ОРГАНИЗАЦИЯ КЛОНИРОВАННОГО ФРАГМЕНТА ГЕНА $\alpha'$ -СУБЪЕДИНИЦЫ cGMP-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

На рис. 1 приведена физическая карта вставок геномной ДНК клонов  $\alpha'$ f11,  $\alpha'$ f21,  $\alpha'$ f11.3 и  $\alpha'$ f4 и экзон-интронная организация исследуемого фрагмента гена  $\alpha'$ -субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы человека (см. также [27]).

Представляют интерес некоторые различия в построенной нами физической карте фрагмента гена  $\alpha'$ -субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы человека по сравнению с данными, приводимыми в работе [23] (рис. 3). Эти различия затрагивают интроны 1, 8, 11, 12 и 14. Так, по сравнению с опубликованной в работе [23] структурой длина 1-го интрона больше на 1300 п.о., и он содержит сайт *Vam*NI. Существенно различаются рестриктивные карты 8-го интрона, эти различия касаются участков узнавания эндонуклеаз рестрикции *Vam*NI, *Eco*RI и *Hind*III (рис. 3). Интрон 11, по нашим данным, на 3 т.п.о. длиннее, а интрон 12, наоборот, короче (более чем на 2 т.п.о.), чем указано в работе [23]. Длина интрона 14 по нашим данным не менее 2500 п.о., тогда как по данным [23] он короче и не содержит участка узнавания рестриктазы *Eco*RI. Обнаруженные нами различия физической карты гена подтверждены в каждом случае рестриктивным картированием и частичным секвенированием как минимум двух независимых клонов (рис. 1 и 3). Причиной выявленных различий может служить природный полиморфизм гена  $\alpha'$ -субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы колбочек сетчатки человека.

Данные об экзон-интронных границах собраны в табл. 1. Из нее видно, что все участки сплайсинга



**Таблица 2.** Повторяющиеся последовательности Alu-семейства исследуемого фрагмента гена  $\alpha'$ -субъединицы сGMP-фосфодиэстеразы колбочек сетчатки глаза человека\*

Номер повтора	Номер интрона	Процент гомологии с консенсусной последовательностью Alu-повтора [31]	Нуклеотидные последовательности, фланкирующие Alu-повтор**
Alu-1	7	90.3	<u>AAAAGCTAGATG</u> [Alu] A <sub>23</sub> <u>AAAAGCTAGATG</u>
Alu-2	8	87.2	<u>AAgtAGCATGCCCA</u> [Alu] A <sub>27</sub> <u>TAAAcAGC</u>
Alu-3	8	88.1	<u>AGAAAA</u> [Alu] A <sub>11</sub> <u>AGAAA</u>
Alu-4	14	81.5	<u>CAAGaAtcT</u> [Alu] A <sub>7</sub> <u>TAAAAAATAAAAAACAAGtAcaT</u>

\* Все Alu-повторы S-подсемейства [31].

\*\* Подчеркнуты прямые повторы, их несовершенные участки напечатаны строчными буквами. Полиадениновые последовательности, непосредственно примыкающие к 3'-концам Alu-повторов (указываемых как [Alu]), обозначены буквой А с индексом, соответствующим количеству адениновых остатков.

фага T4, наборы для ник-трансляции и мечения 3'-выступающих концов (Amersham, Англия); ДНК-лигаза фага T4, ДНК-полимераза I *E. coli*, РНКазы А, лизоцим яичного белка, щелочная фосфатаза из кишечника телят (Promega, США); протеиназа К (Serva, Германия); Taq-ДНК-полимераза (Perkin-Elmer-Cetus, США); плазмида pSP65 (Promega, США). Для приготовления буферных и других растворов применяли отечественные реактивы квалификации ос. ч. или х. ч.

В работе использовали библиотеку кДНК из сетчатки глаза человека, полученную путем клонирования кДНК размером от 0.7 до 3.7 т.п.о. по сайту EcoRI вектора  $\lambda$ gt10. Анализировали также геномную библиотеку, полученную в результате клонирования по сайту XhoI вектора  $\lambda$ FIX продуктов частичного гидролиза рестриктазой Sau3A тотальной геномной ДНК человека размером 16–20 т.п.о. ДНК фага  $\lambda$  вводили в клетки *E. coli* (штамм DP50) при помощи фаговой инфекции. Рекомбинантные бактериофаги идентифицировали наиболее часто применяемым методом гибридизации фаговых бляшек in situ [32] в модификации, предложенной в работе [33]. Фаговую ДНК из индивидуальных клонов выделяли стандартным методом в модификации Забаровского [34]. Перенос ДНК на нитроцеллюлозные фильтры осуществляли по Саузерну [35]. ДНК фагов подвергали гидролизу эндонуклеазами рестрикции EcoRI, BamHI, HindIII и SalI. Рестрикционные фрагменты разделяли в 0.7% агарозном геле и переносили на нитроцеллюлозный фильтр для последующей гибридизации. При построении рестриктных карт использовали результаты гибридизации фрагментов фаговых ДНК с фрагментами кДНК  $\alpha'$ -субъединицы сGMP-фосфодиэстеразы быка и человека, кодирующими различные области белка, а также с синтетическими олигонуклеотидами зондами.

Нуклеотидную последовательность определяли по методу Сэнгера на двухцепочечной матрице [36], используя набор "Sequence version 2.0" фир-

мы USB (США) согласно рекомендациям изготовителя. ПЦР проводили с использованием набора для Taq-ДНК-полимеразы фирмы Perkin-Elmer-Cetus (США). Остальные манипуляции с ДНК осуществляли стандартными методами [35].

Описываемая в этой работе нуклеотидная последовательность депонирована в базе данных EMBL/GeneBank под номером X94354.

Библиотека кДНК сетчатки глаза человека в  $\lambda$ gt10 была получена от д-ра J. Nathans (Johns Hopkins University, США), кДНК  $\alpha'$ -субъединицы сGMP-фосфодиэстеразы сетчатки глаза быка [21] – от проф. M. Applebury (Harvard Medical School, США), библиотека геномной ДНК человека в  $\lambda$ FIX – от Д. Смирнова (ИБХ РАН), за что авторы выражают им свою признательность.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 96-04-48816), Международного научного фонда (MU5000 и MU5300) и Государственной научно-технической программы РФ "Новейшие методы биоинженерии". Работа В. Заграничного поддержана международной программой Медицинского института Ховарда Хьюза.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stryer L. // Ann. Rev. Neurosci. 1986. V. 9. P. 87–119.
2. Fung B.K.-K., Hurley J.B., Stryer L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 152–156.
3. Ovchinnikov Yu.A., Gubanov V.V., Khramtsov N.V., Ishchenko K.A., Zagranichny V.E., Muradov K.G., Shuvaeva T.M., Lipkin V.M. // FEBS Lett. 1987. V. 223. P. 169–173.
4. Lipkin V.M., Khramtsov N.V., Vasilevskaya I.A., Atabekova N.V., Muradov K.G., Gubanov V.V., Li T., Johnston J.P., Volpp K.J., Applebury M.L. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 12955–12959.
5. Ovchinnikov Yu.A., Lipkin V.M., Kumarev V.P., Gubanov V.V., Khramtsov N.V., Akhmedov N.B., Zagranichny V.E., Muradov K.G. // FEBS Lett. 1986. V. 204. P. 288–292.

6. Gillespie P.G., Beavo J.A. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 8133–8141.
7. Dryja T.P., McGee T.L., Reichel E., Hahn L.B., Crowley G.S., Yandel D.W., Sandberg M.A., Berson E.L. // *Nature*. 1990. V. 343. P. 364–366.
8. Dryja T.P., Hahn L.B., Crowley G.S., McGee T.L., Berson E.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 9370–9374.
9. Keen T.J., Inglehearn C.F., Lester D.H., Bashir R., Jay M., Bird A.C., Jay B., Bhattacharya S.S. // *Genomics*. 1991. V. 11. P. 199–205.
10. Sung C.H., Davenport C.M., Hennessey J.R., Nowakowski R., Fishman G., Gouras P., Nathans J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 6481–6485.
11. Farrar J.L., Kenna P., Jordan S.A., Kumar-Singh R., Humphries M.M., Sharp E.M., Sheils D.M. // *Nature*. 1991. V. 354. P. 478–480.
12. Kajiwara K., Hahn L.B., Mukai S., Travis G.H., Berson E.L., Dryja T.P. // *Nature*. 1991. V. 354. P. 480–483.
13. Nichols B.E., Sheffield V.C., Vanderburgh K., Drack A.V., Kimura A.E., Stone E.M. // *Nature Genet.* 1993. V. 3. P. 202–207.
14. Wells J., Wroblewski J., Keen J., Inglehearn C., Jubb C., Eskstein A., Jay M., Arden G., Bhattacharya S., Fitzke F., Bird A. // *Nature Genet.* 1993. V. 3. P. 213–218.
15. McLaughlin M.E., Sandberg M.A., Berson E.L., Dryja T.P. // *Nature Genet.* 1993. V. 4. P. 130–134.
16. Danciger M., Blaney J., Gao Y.-Q., Zhao D.Y., Heckenlively J.R., Jacobson S.G., Farber D.B. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995. V. 36. P. 3816.
17. Huang S.H., Huang X., Pittler S.J., Oliveria L., Berson E.L., Dryja T.P. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995. V. 36. P. 825.
18. Khramtsov N.V., Feshchenko E.A., Suslova V.A., Shmukler B.E., Terpugov B.E., Rakitina T.V., Atabekova N.V., Lipkin V.M. // *FEBS Lett.* 1993. V. 327. P. 275–278.
19. Piriev N.I., Khramtsov N.V., Lipkin V.M. // *Gene*. 1994. V. 151. P. 297–301.
20. Суслова В.А., Суслов О.Н., Ким Э.Э., Лункин В.М. // *Биоорган. химия*. 1996. Т. 22. С. 256–263.
21. Li T., Volpp K., Applebury M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. V. 87. P. 293–297.
22. Semple-Rowland S.L., Green D.A. // *Experimental Eye Res.* 1994. V. 59. P. 365–372.
23. Piriev N.I., Viczian A.S., Ye J., Kerner B., Korenberg J.R., Farber D.B. // *Genomics*. 1995. V. 28. P. 429–435.
24. Pittler S.J., Baehr W., Wasmuth J.J., McConnell D.G., Champagne M.S., VanTuinen P., Ledbetter D., Davis R.L. // *Genomics*. 1990. V. 6. P. 272–283.
25. Baehr W., Champagne M.S., Lee A.K., Pittler S.J. // *FEBS Lett.* 1991. V. 278. P. 107–114.
26. Maltese W.A. // *FASEB J.* 1990. V. 4. P. 3319–3328.
27. Feshchenko E.A., Andreeva S.G., Suslova V.A., Smirnova E.V., Zagranichny V.E., Lipkin V.M. // *FEBS Lett.* 1996. V. 381. P. 149–152.
28. Breathnach R., Chambon P. // *Annu. Rev. Biochem.* 1981. V. 50. P. 349–383.
29. Mount S.M. // *Nucl. Acids Res.* 1982. V. 10. P. 459–472.
30. Reed R., Maniatis T. // *Genes Dev.* 1988. V. 2. P. 1268–1276.
31. Jurka J., Smith T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. P. 4775–4778.
32. Benton W.D., Davis R.W. // *Science*. 1977. V. 196. P. 180–182.
33. Woo S.L.C. // *Methods Enzymol.* 1979. V. 68. P. 389–395.
34. Забаровский Е.П., Турина О.В. // *Молекуляр. биология*. 1988. Т. 22. С. 1451–1455.
35. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. *Молекулярное клонирование*. Пер. с англ. М.: Мир, 1984.
36. Henikoff S. // *Gene*. 1984. V. 28. P. 357.

## cDNA Sequence and Gene Organization of Human Cone-specific cGMP Phosphodiesterase $\alpha'$ -Subunit

E. A. Feshchenko, S. G. Andreeva, V. A. Suslova, T. V. Rakitina, E. V. Smirnova,  
N. S. Bystrov, V. E. Zagranichnyi\*, and V. M. Lipkin\*

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

\*Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
Pushchino, Moscow region, 142292 Russia

**Abstract**—Five clones were isolated from a human retina cDNA library whose cDNA inserts allowed reconstruction of the total sequence of the human cone cGMP phosphodiesterase  $\alpha'$ -subunit cDNA comprising 3455 bp. The protein's deduced sequence contains 858 amino acid residues with molecular mass 99 169 Da. A substantial homology was revealed between the amino acid sequence of the human cones cGMP-phosphodiesterase  $\alpha'$ -subunit and the corresponding sequences of  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\alpha'$  subunits of visual cGMP-phosphodiesterase of bovine, murine, chicken and human retinas. Four recombinant bacteriophages were isolated from a genomic library whose inserts made it possible to reconstruct a 32-kb fragment of the human cones cGMP-phosphodiesterase  $\alpha'$ -subunit gene. 5'-Flanking region of the gene and first 14 exons, encoding an N-terminal segment of the protein, along with the adjacent intron segments were sequenced.

*Key words:* cyclic GMP-phosphodiesterase, visual reception, cDNA cloning, nucleotide sequence, exon-intron, Alu-repeats.