



УДК 577.152.313*2.01:577.21

**Ser/Thr-ФОСФАТАЗЫ СЕТЧАТКИ БЫКА: ОБНАРУЖЕНИЕ КДНК,
КОДИРУЮЩИХ КАТАЛИТИЧЕСКУЮ СУБЪЕДИНИЦУ
γ-ИЗОФОРМЫ PP2В И ДВА ГОМОЛОГА rdgC/PPEF**© 1998 г. М. А. Кутузов*^{*,**,#}, А. В. Андреева**^{*,**}, Ф. Пажес*^{*,**}, Н. Беннетт*^{*,**}**Лаборатория молекулярной и клеточной биофизики, URA CNRS № 520,**Центр ядерных исследований в Гренобле, Франция;****Университет Оксфорд-Брукс, Оксфорд, Великобритания**Поступила в редакцию 22.08.97 г. Принята к печати 08.10.97 г.*

Экспрессию генов Ser/Thr-фосфатаз класса PP1/2A/2B в сетчатке быка анализировали с помощью ПЦР на кДНК. Были обнаружены мРНК для следующих фосфатаз: PP1 (α- и γ-изоформы), PP2A (α- и β-изоформы), PPV и PP2B (β- и γ-изоформы). γ-Изоформа PP2B ранее считалась специфичной для яичек. Также были обнаружены кДНК двух фосфатаз, родственных rdgC/PPEF. Таким образом, в сетчатке присутствуют мРНК по крайней мере 4 фосфатаз, которые могут регулироваться Ca²⁺.

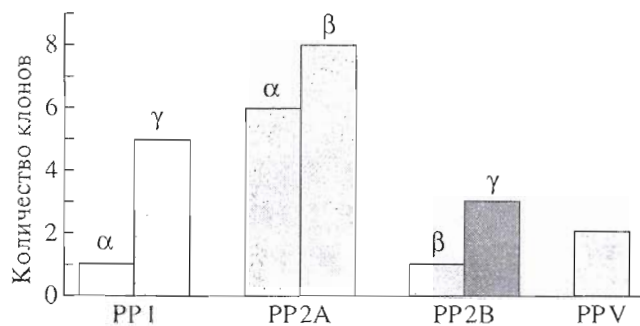
Ключевые слова: фосфорилирование белков, Ser/Thr-фосфатазы, кальцинейрин, тканеспецифичность экспрессии генов.

Фосфорилирование белков играет существенную роль в проведении зрительного сигнала и в световой адаптации. Так, фосфорилирование родопсина родопсинкиназой [1] обеспечивает быстрое прекращение активации трансдуцина [2], необходимое для высокого временного разрешения фоторецептора [3]. Родопсинкиназа, в свою очередь, автофосфорилируется [4], что влияет на некоторые параметры ее активности [5]. Описано также фосфорилирование β-субъединицы трансдуцина [6], γ-субъединицы сGMP-специфической фосфодиэстеразы [7], фосдуцина [8], гуанилатциклазы [9]. Косвенные данные указывают на то, что фосфорилирование может регулировать свойства сGMP-зависимого катионного канала в зрительной клетке [10]. Почти во всех случаях (за исключением трансдуцина и сGMP-зависимого катионного канала) были идентифицированы киназы этих белков. О соответствующих фосфатазах и регуляции их активности известно гораздо меньше. Родопсин дефосфорилируется *in vitro* фосфатазой типа 2A (PP2A) [11, 12] и Ca²⁺-активируемой фосфатазой CAOP [13]. На основании данных ингибиторного анализа и изучения действия очищенных фосфатаз высказывалось предположение о том, что в дефосфорилировании сGMP-зависимого катионного канала играют роль также две фосфатазы – PP1 и PP2A [10]. Ка-

кие именно изоформы фосфатаз принимают участие в этих процессах и как регулируется их активность, в настоящее время неизвестно.

Нами была предпринята попытка охарактеризовать композиционный состав Ser/Thr-фосфатаз в сетчатке быка. Для оценки уровней экспрессии генов Ser/Thr-фосфатаз класса PP1/2A/2B и их изоформ мы использовали ПЦР на кДНК сетчаток. Выделение мРНК и синтез комплементарной цепи кДНК с использованием гексануклеотидных праймеров проводили с помощью наборов "The mRNA Isolation System" (Gibco) и "First strand cDNA synthesis" (Pharmacia) соответственно согласно инструкциям фирм-производителей. Праймеры соответствовали двум наиболее консервативным участкам первичной структуры фосфатаз этого класса: V(I)TVCGDV(I)(L)HG и GDY(F)VDRGY(K) [14] (эксперимент А) или VFNGDY(F)V (эксперимент В). Последовательность В была выбрана как консервативная среди большинства фосфатаз rdgC/PPT подкласса [15]. Нуклеотидные последовательности сравнивали с имеющимися в банках данных, используя алгоритм BLAST [16] (программное обеспечение NCBI на Internet: <http://expasy.hcuge.ch/cgibin/BLAST.pl>). Это позволило однозначно идентифицировать все секвенированные фрагменты кДНК фосфатаз, полученные в эксперименте А (27 клонов). Структуры кДНК фосфатаз PP2A_α и PP2B_α для быка известны. В остальных случаях наблюдалась высокая степень сходства (89–100%) по нуклеотидным последовательностям и 100%-ная идентичность по аминокислотным последова-

Автор для переписки (BMS, Oxford Brookes University, Gipsy Lane Campus, Headington, Oxford OX3 0BP, U. K.; тел.: (44) 1865 483290; факс: (44) 1865 483955).



Представленность клонов, несущих фрагменты кДНК Ser/Thr-фосфатаз сетчатки быка.

тельностью с соответствующими фосфатазами других видов млекопитающих (данные не приведены).

Секвенирование полученных клонов показало (рисунок), что наиболее представленными являются фрагменты кДНК PP2A (α- и β-изоформы). Была также детектирована экспрессия в сетчатке генов фосфатаз PP1 (α- и γ-изоформы), PPV и PP2B (β- и γ-изоформы). Некоторые из фосфатаз, известных для млекопитающих (PPX, PP5, а также изоформы PP1_β, PP2B_α – см. ссылки в работе [17]), детектированы не были, что, вероятно, говорит о низких уровнях экспрессии их генов в сетчатке.

Неожиданностью явилось обнаружение в сетчатке быка кДНК γ-изоформы PP2B (кальциейрина). PP2B_γ была открыта как изоформа, специфичная для яичек, и ее мРНК не была ранее детектирована в других органах и тканях [18, 19]. Высказывалось предположение [18] о возможной идентичности фосфатазы PP2B_γ и особой формы кальциейрина, обнаруженной в жгутиках сперматозоидов, которая может регулировать их подвижность [20]. Следует отметить, что с эволюционной точки зрения наружные сегменты зрительных клеток представляют собой специализированные реснички [21], органеллы, морфологически родственные жгутикам [22]. В яичках были детектированы транскрипты обонятельных рецепторов, а некоторые компоненты систем проведения обонятельного и зрительного сигналов были локализованы иммуногистохимически в сперматозоидах на разных стадиях их развития [23–26]. Обнаружение в настоящей работе в сетчатке мРНК кальциейрина, “специфичного для яичек”, также свидетельствует о возможном сходстве путей проведения сигнала в сперматозоидах с таковыми в зрительных и обонятельных клетках и указывает на вероятную существенную роль γ-изоформы фосфатазы PP2B в этих системах.

Еще больший интерес представляют результаты эксперимента В. Среди 7 полученных фраг-

ментов кДНК фосфатаз аминокислотные последовательности 2 фрагментов (KLDDLFLIFKNGLPSTNPY) были на 90% идентичны (86% для нуклеотидных последовательностей) соответствующему фрагменту обнаруженной недавно фосфатазы PPEF человека, локализованной в сенсорных нейронах [26]. Аминокислотные последовательности остальных 5 клонов (QLDDLIFIFYKNGLPSPERA Y) оказались на 66% идентичны PPEF (58% для нуклеотидной последовательности) и были обозначены нами как фрагменты PPEF-2. Следует отметить, что PPEF человека, как и родственная ей фосфатаза дрозофилы *rdgC*, имеет Ca²⁺-связывающий регуляторный район [26]. Это дает нам основание предполагать, что обе фосфатазы сетчатки быка, гомологичные PPEF, могут регулироваться кальцием. Обнаружение в сетчатке быка двух гомологов PPEF показывает, что эти фосфатазы могут быть представлены мультигенным семейством у млекопитающих. Таким образом, в сетчатке быка имеются по крайней мере 4 фосфатазы, активность которых может регулироваться кальцием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kühn H. // Nature. 1974. V. 250. P. 588–590.
2. Wilden U., Hall S.W., Kühn H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 1174–1178.
3. Bennett N., Sitaramayya A. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 1710–1715.
4. Buczylo J., Gutmann C., Palczewski K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 2568–2572.
5. Palczewski K., Ohguro H., Premont R.T., Inglese J. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 15294–15298.
6. Wieland T., Ulibarri I., Gierschik P., Jakobs K.H. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 196. P. 707–716.
7. Udovichenko I.P., Cunnick J., Gonzalez K., Yakhnin A., Takemoto D.J. // Biochem. J. 1996. V. 317. P. 291–295.
8. Wilkins J.F., Bitensky M.W., Willardson B.M. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 19232–19237.
9. Aparicio J.G., Applebury M.I. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 27083–27089.
10. Gordon S.E., Brautigan D.L., Zimmerman A.L. // Neuron. 1992. V. 9. P. 739–748.
11. Palczewski K., Hargrave P.A., McDowell J.H., Ingebritsen T.S. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 415–419.
12. Fowles C., Akhtar M., Cohen P. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 9385–9391.
13. Kutuzov M.A., Bennett N. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 238. P. 613–622.
14. Chen M.X., Chen Y.H., Cohen P.T.W. // FEBS Lett. 1992. V. 306. P. 54–58.
15. Андреева А.В., Эванс Д.Э., Хос К.Р., Беннетт Н., Кутузов М.А. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. С. 486–491.
16. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // J. Mol. Biol. 1990. V. 215. P. 403–410.

17. Barton G.J., Cohen P.T.W., Barford D. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 220. P. 225–237.
18. Muramatsu T., Giri P.R., Higuchi S., Kincaid R.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. P. 529–533.
19. Muramatsu T., Kincaid R.L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. V. 188. P. 265–271.
20. Tash J.S., Krinks M., Patel J., Means R.L., Klee C.B., Means A.R. // *J. Cell Biol.* 1988. V. 106. P. 1625–1633.
21. Ronlich P. // *Cell Tissue Res.* 1975. V. 161. P. 421–430.
22. Gibbons I.R. // *J. Cell Biol.* 1981. V. 91. P. 107s–124s.
23. Weyand I., Godde M., Frings S., Weiner J., Müller F., Altenhofen W., Hatt H., Kaupp U.B. // *Nature.* 1994. V. 368. P. 859–863.
24. Vanderhaeghen P., Schurmans S., Vassart G., Parmentier M. // *J. Cell Biol.* 1993. V. 123. P. 1441–1452.
25. Walensky L.D., Roskams A.J., Lefkowitz R.J., Snyder S.H., Ronnett G.V. // *Mol. Med.* 1995. V. 1. P. 130–141.
26. Montini E., Rugarli E.I., van de Vosse E., Andolfi G., Mariani M., Puca A.A., Consales G.G., den Dunnen J.T., Ballabio A., Franco B. // *Hum. Mol. Genet.* 1997. V. 6. P. 1137–1145.

Ser/Thr-Phosphatases of Bovine Retina: Detection of cDNA Encoding the Catalytic Subunit PP2B of γ -Isoform and Two rdgC/PPEF Homologues

M. A. Kutuzov***, A. V. Andreeva**, F. Pages*, and N. Bennett*

*Laboratoire de Biophysique Moléculaire & Cellulaire, URA CNRS 520,
Département de Biologie Moléculaire et Structurale, Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble, France

**School of Biological and Molecular Sciences, Oxford Brookes University, Oxford, United Kingdom

The expression of genes for Ser/Thr phosphatases of the PP1/2A/2B class in the bovine retina was analyzed using PCR on cDNA. The mRNAs were found for the following phosphatases: PP1 (α - and γ -isoforms), PP2A (α - and β -isoforms), PPV, and PP2B (β - and γ -isoforms). Earlier, PP2B γ -isoform was considered testis-specific. cDNAs of two phosphatases related to rdgC/PPEF were also detected. Thus, there are mRNAs of at least four phosphatases in retina that may be regulated by Ca^{2+} .

Key words: protein phosphorylation, Ser/Thr-phosphatases, calcineurin, tissue specificity of gene expression