



УДК 577.113.4:577.175.3'13

СИНТЕЗ, КЛОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ДНК, КОМПЛЕМЕНТАРНОЙ мРНК ПРООПИОМЕЛАНКОРТИНА ИЗ ГИПОФИЗА ЧЕЛОВЕКА

Головин С. Я.***, Каргинов В. А.*, Бондарь А. А.,
Беклемишев А. Б.***, Чехранова М. Б.***, Мертвецов Н. П.,
Панков Ю. А.***

Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения Академии наук СССР;

*Институт клинической и экспериментальной медицины Сибирского отделения Академии медицинских наук СССР, Новосибирск;

**Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии, пос. Кольцово Новосибирской обл.;

***Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов Академии медицинских наук СССР, Москва

Проопиомеланокортин (РОМС) является белком-предшественником целого ряда пептидных гормонов гипофиза, таких, как адренотропикотропин (АСТН), β -эндорфин, β -липотропин (β -LPH) и меланотропина (α, β, γ -MSH) [1]. Матричная РНК РОМС в основном синтезируется в передней и промежуточной долях гипофиза, однако она была обнаружена также в некоторых других тканях. Показано, что экспрессия гена РОМС находится под мультигормональным контролем [2]. Ценную информацию о тканевой специфичности синтеза РОМС, о тонких механизмах гормональной регуляции экспрессии гена этого белка можно получить, используя технику рекомбинантных ДНК. Ранее были клонированы и секвенированы ДНК, комплементарные мРНК РОМС быка [3], свиньи [4] и мыши [5], а также фрагменты геномной ДНК, кодирующие РОМС быка [6], человека [7] и крысы [8]. В представленной нами работе впервые осуществлено клонирование и определение первичной структуры ДНК-копии мРНК проопиомеланокортина человека.

Гипофиз человека получали как секционный материал в Институте им. Склифосовского МЗ СССР (Москва) через 12–24 ч после наступления клинической смерти и замораживали в жидком азоте. Суммарную РНК из ткани гипофиза выделяли при помощи фенольной депротеинизации в присутствии гуанидинизотиоцианата или центрифугированием лизированной ткани через подушку 5,7 М CsCl [9]. В последнем случае гуанидинизотиоцианат заменяли 8 М мочевиной. Poly(A)-содержащую мРНК выделяли аффинной хроматографией на poly(U)-сефарозе 4В. Синтез одно- и двухцепочечной комплементарной ДНК (кДНК) проводили при

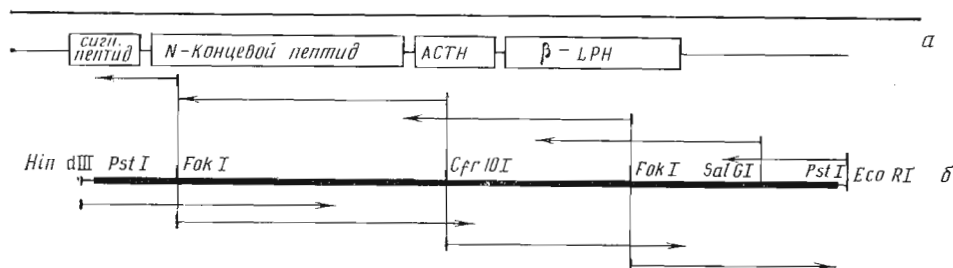


Рис. 1. Функциональная карта мРНК РОМС человека (а) и стратегия секвенирования клонированной кДНК (б)

	C	
→	сигнальный пептид	
CysSerArgSerGlyAlaLeuLeuLeuAlaLeuLeuLeuGlnAlaSerMetGluValArg		20
TGCAGCCGCTCGGGGGCCCTGTTGCTGGCCTTGCTGCTTCAGGCCCTCCATGGAAGTGGCT		61
↙	N-концевой пептид	
GlyTrpCysLeuGluSerSerGlnCysGlnAspLeuThrThrGluSerAsnLeuLeuGlu		40
GGCTGGTGCCTGGAGAGCAGCCAGTGTCAAGACCTCACACGGAAGCAACCTGCTGGAG		121
CysIleArgAlaCysLysProAspLeuSerAlaGluThrProMetPheProGlyAsnGly		-60
TGCATCCGGGCTGCAAGCCGACCTCTCGGCCGAGACTCCCATGTTCCCGGAAATGGC		181
AspGluGlnProLeuThrGluAsnProArgLysTyrValMetGlyHisPheArgTrpAsp		80
GACGAGCAGCCTCTGACCGAGAACCCTCGGAAGTACGTCATGGGCCACTTCCGCTGGGAC		241
ArgPheGlyArgArgAsnSerSerSerSerGlySerSerGlyAlaGlyGlnLysArgGlu		100
CGATTCCGGCCGCGCCAACAGCAGCAGCAGCGGCAGCAGCGGCAGGGCAGAGCGCGAG		301
AspValSerAlaGlyGluAspCysGlyProLeuProGluGlyGlyProGluProArgSer		120
GACGTCTCAGCGGGCGAAGACTGCGGCCCGCTGCCTGAGGGCGGCCCGAGCCCCGACGC		361
↙	N-концевой пептид	
↘	ACTH	
AspGlyAlaLysProGlyProArgGluGlyLysArgSerTyrSerMetGluHisPheArg		140
GATGGTGCCAAGCCGGGCCCCGCGCAGGGCCAAAGCGCTCCTACTCCATGGAGCACTTCCGC		421
TrpGlyLysProValGlyLysLysArgArgProValLysValTyrProAsnGlyAlaGlu		160
TGGGGCAAGCCGGTGGGCAAGAAGCGGCGCCAGTGAAGGTGTACCCTAACGGCGCCGAG		481
↙	ACTH	
↘	β-LPH	
AspGluSerAlaGluAlaPheProLeuGluPheLysArgGluLeuThrGlyGlnArgLeu		180
GACGAGTCGGCCGAGGCCCTTCCCCTGGAGTTCAAGAGGGAGCTGACTGGCCAGCGACTC		541
ArgGluGlyAspGlyProAspGlyProAlaAspAspGlyAlaGlyAlaGlnAlaAspLeu		200
CGGGAGGGAGATGGCCCCGACGGCCCTGCCGATGACGGCGCAGGGGCCAGGCCGACCTG		601
GluHisSerLeuLeuValAlaAlaGluLysLysAspGluGlyProTyrArgMetGluHis		220
GAGCACAGCCTGCTGGTGGCGGCCGAGAAGAAGGACAGAGGGCCCCCTACAGGATGGAGCAC		661
PheArgTrpGlySerProProLysAspLysArgTyrGlyGlyPheMetThrSerGluLys		240
TTCCGCTGGGGCAGCCCCGCCAAGGACAAAGCGCTACGGCGGTTTCATGACCTCCGAGAAG		721
SerGlnThrProLeuValThrLeuPheLysAsnAlaIleIleLysAsnAlaTyrLysLys		260
AGCCAGACGCCCTGGTGACGCTGTTCAAAAACGCCATCATCAAGAAGCCCTACAAGAAG		781
↙	β-LPH	
GlyGlu***		263
GGCGAGTGAGGGCACAGCGGGCCCCAGGGCTACCCTCCCCAGGAGGTGACCCCCAAAGC		841
CCCTTGCTCTCCCTGCCCTGCTGCCGCTCCCAGCCTGGGGGTCGTGGCAGATAATCA		901
GCCTCTTA		909

Рис. 2. Первичная структура ДНК, комплементарной мРНК РОМС человека, и кодируемая ею аминокислотная последовательность. Прямоугольниками выделены потенциальные сайты процессинга РОМС

помощи обратной транскриптазы. Клонирование кДНК РОМС человека в плазмиде pBR322 осуществляли по стандартной схеме [9], используя для трансформации штамм *E. coli* JC5183. Поиск клонов, содержащих кДНК РОМС, проводили путем гибридизации колоний с синтетическим

олигонуклеотидом 5'ТТСАТГАССТССГА3', кодирующим участок β-эндорфина. Рестрикционный анализ выделенных гибридных плазмид показал наличие вставок размером 400–900 п.о. С целью облегчения секвенирования одна из них длиной 900 п.о. была переклонирована в плазмиду рUC 8. Полученная гибридная плазида рUC-ПРОМС 1 использовалась для определения первичной структуры кДНК ПРОМС методом Максама — Гилберта [10]. На рис. 1 и 2 приведены стратегия секвенирования и первичная структура ДНК, комплементарной мРНК ПРОМС человека. Расшифрованная нуклеотидная последовательность кодирует полную аминокислотную последовательность белка ПРОМС. Кроме того, она содержит большую часть 3'-концевой нетранслируемой области мРНК и 60 оснований, кодирующих сигнальный пептид (рис. 2). Определенная нами последовательность нуклеотидов кДНК ПРОМС полностью совпадает с последовательностью, приведенной Такахашии и др. [7], которые вывели первичную структуру мРНК ПРОМС человека, используя расшифрованную ими нуклеотидную последовательность участка геномной ДНК, кодирующей ПРОМС. Полученную в настоящей работе кДНК предполагается использовать в качестве зонда для изучения регуляции синтеза мРНК ПРОМС в различных тканях организма, а также для создания генно-инженерных продуцентов ПРОМС и продуктов его процессинга.

Авторы статьи приносят благодарность С. Х. Дегтяреву и Н. А. Нете-совой за любезно предоставленные препараты рестриктазы *FokI* и ДНК полимеразы I (фрагмент Кленова).

ЛИТЕРАТУРА

1. Imura H., Kato Y., Nakai Y. et al. J. Endocr., 1985, v. 107, № 1, p. 147–157.
2. Vale W., Vaughan J., Jamamoto G., Rivier J., Rivier C. Endocrinology, 1983, v. 113, № 3, p. 1121–1131.
3. Nakanishi S., Inoue A., Kita T. et al. Nature, 1979, v. 278, № 5703, p. 423–427.
4. Baleau G., Barbeau C., Jeannotte L., Chretien M., Droin J. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 22, p. 8063–8071.
5. Notake M., Tobimatsu T., Watanabe Y. et al. FEBS Lett., 1983, v. 156, № 1, p. 67–71.
6. Nakanishi S., Teranishi Y., Watanabe Y. Eur. J. Biochem., 1981, v. 115, № 2, p. 429–438.
7. Takahashi H., Hakamata Y., Watanabe Y. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 19, p. 6847–6858.
8. Drouin J., Chamberland M., Charron J., Jeannotte L., Newer M. FEBS Lett., 1985, v. 193, № 1, p. 54–58.
9. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.: Cold Spring Harbor, 1982.
10. Maxam A. M., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560–564.

Поступило в редакцию
31.VII.1986

SYNTHESIS, CLONING, AND SEQUENCING OF DNA COMPLEMENTARY TO HUMAN PITUITARY PROOPIOMELANOCORTINE mRNA

GOLOVIN S. Y.**, KARGINOV V. A.*, BONDAR A. A., BECLEMISCHEV A. B.**,
CHEKHRANOVA M. K.***, MERTVETSOV N. P., PANKOV Y. A.***

Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the Academy
of Sciences of the USSR, Novosibirsk: *Institute of Clinical and
Experimental Medicine, Siberian Branch of the Academy of Medical
Sciences of the USSR, Novosibirsk: **All-Union Research Institute
of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk Region;

*** Institute of Experimental Endocrinology and Chemistry of Hormones,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

cDNA coding for the human proopiomelanocortine (POMC) has been cloned and sequenced. It codes for full size amino acid sequence of POMC and furthermore, contains most part of the 3'-terminal noncoding mRNA region and 60 nucleotides coding for signal peptide.