



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.214.3

© 1992 г. А. А. Баринцов, А. Б. Курятов, И. Б. Мерцалов,  
Л. О. Марцен, В. И. Цетлин

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ УЧАСТКА ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВЕЩЕСТВА Р  
В ГЕНОМНОЙ ДНК ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ  
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва*

Вещество Р и родственные пептиды образуют семейство так называемых тахикининов (нейрокининов), обладающих широким спектром биологической активности: эти пептиды влияют на сократимость гладкой мускулатуры, выполняют роль нейромедиаторов, участвуют в проведении болевых сигналов, оказывают влияние на уровень классических нейромедиаторов и цитокинов (см. обзоры [1, 2]). Преобладающая часть перечисленных эффектов на нервную и иммунную системы реализуется благодаря взаимодействиям с тахикининовыми рецепторами. В настоящее время различают три основных типа тахикининовых рецепторов — НК-1, НК-2 и НК-3, которые проявляют наиболее высокую специфичность соответственно к веществу Р, нейрокинину А (синоним: вещество К) и нейрокинину В (синоним: нейромедин К) [3]. Функциональные исследования и установленные нуклеотидные последовательности генов всех трех типов белков [4–8] свидетельствуют об их принадлежности к семейству G-белокзависимых рецепторов.

Для выяснения структурно-функциональных взаимоотношений тахикининовых рецепторов несомненный интерес представляет установление структур возможно большего количества белков этого семейства, в том числе и рецепторов человека. Эта задача крайне сложна из-за чрезвычайно низкого содержания как соответствующих мРНК, так и экспрессированных рецепторов. Следует отметить, что ни один из тахикининовых рецепторов как белок не был выделен в индивидуальном виде, а первая нуклеотидная последовательность гена рецептора (НК-2 из кишечника быка) была установлена с использованием функциональной экспрессии in oocytis *Xenopus* [4]. Попытки нескольких лабораторий использовать олигонуклеотидные зонды, сконструированные на основе этой последовательности, для идентификации новых представителей тахикининовых рецепторов оказались безуспешными; любопытно, что при этом была установлена последовательность G-белокзависимого рецептора капабиновдов [9].

Появление метода полимеразной цепной реакции (ПЦР или амплификации *in vitro*) (см. обзор [10]), значительно упростило идентификацию и установление структур генов, принадлежащих к одному семейству. Так, недавно с помощью ПЦР и праймеров, синтезированных на основе нуклеотидной последовательности гена рецептора НК-2 из кишеч-

ника быка, при использовании мРНК из трахеи человека был получен фрагмент кДНК, давший затем возможность идентифицировать в геномной библиотеке ДНК человека клон полноразмерного рецептора NK-2 [8].

В настоящей работе ПЦР использована для идентификации гена рецептора вещества Р (рецептора NK-1) в геноме человека. Нами были синтезированы пары праймеров, нуклеотидные последовательности которых идентичны участкам консервативных областей ДНК рецептора вещества Р из мозга крысы. В рамках существующих моделей пространственной организации тахикининовых рецепторов [7] эти участки отвечают аминокислотным последовательностям трансмембранных фрагментов.

Аmplификация проводилась на матрице геномной ДНК из мозга человека, предварительно обработанной рестриктазой *EcoRI* в следующих условиях: денатурация (93° С, 30 с), отжиг (55° С, 3 мин), элонгация (74° С, 2 мин), интервал между сменами температур цикла — 30 с, количество циклов — 25.

Полученные продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл.

Положительные результаты были получены при использовании пары олигонуклеотидных праймеров spS3 и spA4:

spS3 5' ACSTTCGCCATCTGCTGGCTGCCCT 3'

spA4 5' GCCAGGTAGACCTGCTGGATGAACTT 3'

Фрагменты, близкие по размерам к теоретически ожидаемым (~100 п. о.), сорбировали в агарозном геле на бумагу NA-45 (Schleicher und Schüll). Элюция проводилась в 100 мкл буфера: 1 mM EDTA, 10 mM трис-HCl (pH 7,4), 1 M NaCl. Выделенные фрагменты достраивались до тупых концов фрагментом Кленова в стандартных условиях — в присутствии четырех dNTP, в среднесолевым рестриктазном буфере (10 mM трис-HCl (pH 7,4), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM дитиотреит) — 30 мин при 37° С. Затем образцы прогревались при 70° С 10 мин. Клонирование осуществлялось по рестрикционному сайту *EcoRV* в экспрессирующийся вектор pBlue script II (Stratagene, USA). Это фагмидный вектор, разработанный для процедур клонирования, секвенирования, наработки РНК-транскриптов *in vitro*, сайт-специфического мутагенеза и генетического картирования. При клонировании и выделении ДНК использовали штамм *E. coli* XL-1 Blue. Были отсеквенированы пять независимых клонов с длиной вставки 87—94 п. о., последовательности которых идентичны в области перекрытия. Приведенная ниже последовательность отвечает клону с наибольшей длиной вставки.

Анализ полученного фрагмента

CGCCATCTGCTGGCTGCCCTCCACATCTTCTCTCCCTCGCCSTACATCAACCCAGATCTCTACSTGAA

-----spS3----->

VI

GAAGTTCATCCAGCAGGTCTACCTG

<-----spA4

[-----VII-----]

показал его совпадение с участком 771—864 нуклеотидной последовательности рецептора вещества Р из мозга крысы, за исключением одной за-

1	A	I	C	W	L	P	Y	H	Y	Y	F	I	L	T	A	I	Y	Q	Q	L	N	E	W	K	Y	I	Q	Q	V	Y	L	A
2	A	I	C	W	L	P	Y	H	L	Y	F	I	L	G	T	F	Q	F	D	I	Y	C	H	K	F	I	Q	Q	V	Y	L	A
3	A	I	C	W	L	P	Y	H	L	Y	F	I	L	G	T	F	Q	F	D	I	Y	C	H	K	F	I	Q	Q	V	Y	L	A
4	A	I	C	W	L	P	Y	H	L	Y	F	I	L	G	S	F	Q	E	D	I	Y	C	H	K	F	I	Q	Q	V	Y	L	A
5	A	I	C	W	L	P	F	H	V	F	F	L	L	P	Y	I	N	P	D	L	Y	L	K	K	F	I	Q	Q	V	Y	L	A
6	A	I	C	W	L	P	F	H	I	F	F	L	L	P	Y	I	N	P	D	L	Y	L	K	K	F	I	Q	Q	V	Y	L	A

----- VI ----- | ----- VII -----

Сравнение аминокислотных последовательностей фрагментов тахикининовых рецепторов: 1 – рецептор NK-3 из мозга крысы [7]; 2, 3, 4 – рецепторы NK-2 из мозга крысы, быка и человека [5, 4, 8]; 5 – рецептор NK-1 из мозга крысы [6]; 6 – фрагмент рецептора NK-1 человека, проанализированный в настоящей работе. В рамку заключены гомологичные участки

мены – G<sup>796</sup> на А (выделена жирным шрифтом, римскими цифрами обозначены границы трансмембранных фрагментов в соответствующей аминокислотной последовательности), т. е. замены Val на Ile в аминокислотной последовательности (рисунок).

Интересно, что так же, как и в случае рецептора NK-2 человека [8], в нуклеотидной последовательности, кодирующей трансмембранные фрагменты VI и VII, отсутствуют интроны.

Сравнение имеющихся в литературе полных аминокислотных последовательностей тахикининовых рецепторов (см. [7]) показывает, что из трансмембранных фрагментов наиболее консервативен для всего семейства фрагмент VII. Входящие в него остатки, как правило, инвариантны (идентичны) в рецепторах одного типа из разных источников. Это видно и из рисунка для приведенной части фрагмента VII. Более высокая вариабельность характерна для фрагмента VI, и именно здесь локализуется обнаруженное нами отличие (Val – Ile). Петля, соединяющая трансмембранные фрагменты VI и VII, вообще не содержит остатков, инвариантных во всех подтипах рецепторов. С другой стороны, из рисунка видно, что для рецепторов одного подтипа из разных источников (например, NK-2 из крысы, быка и человека) последовательность в пределах этой петли достаточно инвариантна. Следует упомянуть и высокую степень гомологии внутри других семейств G-белокзависимых рецепторов ( $\alpha$ - и  $\beta$ -адренергических, мускариновых, ацетилхолиновых и др.), однако гомология между представителями разных семейств даже в области трансмембранных фрагментов, как правило, не превышает 35%. Таким образом, изложенные литературные данные и анализ рисунка позволяют сделать вывод о том, что установленная нами нуклеотидная последовательность отвечает тахикининовым рецепторам и является фрагментом гена рецептора вещества P.

Авторы выражают благодарность Н. С. Быстрову за синтез олигонуклеотидных зондов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pernow B. // Pharmacol. Rev. 1983. V. 35 № 2. P. 85–141.
2. Kimball E. S. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1989. V. 594. P. 293–308.
3. Quirion R., Dam T. V. // Reg. peptides. 1988. V. 22. P. 18–25.
4. Masu Y., Nakayama K., Tamaki H., Harada Y., Kuno M., Nakanishi S. // Nature. 1987. V. 329. № 6142. P. 836–838.
5. Sasai Y., Nakanishi S. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1989. V. 165. № 2. P. 695–702.

6. Yokota Y., Sasai Y., Tanaka K., Fujiwara T., Tsuchida K., Shigemoto R., Kakizuka A., Ohkubo H., Nakanishi S. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 30. P. 17649-17652.
7. Shigemoto R., Yokota Y., Tsuchida K., Nakanishi S. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 2. P. 623-628.
8. Gerard N. P., Eddy P. L., Jr., Shows T. B., Gerard C. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 33. P. 20455-20462.
9. Matsuda L. A., Lolait S. J., Brownstein M. J., Young A. C., Bonner T. I. // *Nature.* 1990. V. 346. № 6284. P. 561-564.
10. Bloch W. // *Biochemistry.* 1991. V. 30. № 11. P. 2735-2745.
11. Lefkowitz R. J. // *Nature.* 1991. V. 351. № 6325. P. 353-354.

Поступило в редакцию  
15.I.1992

A. A. BARINOV, A. B. KURYATOV, I. B. MERTSALOV, L. O. MARTSEN,  
V. I. TSETLIN

**IDENTIFICATION OF A FRAGMENT OF THE SUBSTANCE P RECEPTOR  
GENE IN HUMAN GENOMIC DNA WITH THE AID OF POLYMERASE  
CHAIN REACTION**

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
Moscow*

Polymerase chain reaction was applied to human genomic DNA using primers corresponding to the rat substance P receptor cDNA. As a result, a fragment of 94 b. p. was isolated identical to the fragment 771-864 of the above-mentioned cDNA, with the exception of the G<sup>796</sup>→A substitution (Val→Ile in the amino acid sequence). A comparison of the established sequence with the published structures of tachykinin receptors of NK-1, NK-2 and NK-3 types allows its assignment to the substance P receptor (NK-1 tachykinin receptor) gene detected in the human genome.