



УДК 577.113.5:577.152

## ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНА $\beta$ -СУБЪЕДИНИЦЫ ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО GMP ЧЕЛОВЕКА

© 1996 г. В. А. Сулова, О. Н. Сулов, Э. Э. Ким, В. М. Липкин<sup>#</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 21.09.95 г.

Из геномной библиотеки выделены два рекомбинантных бактериофага  $\lambda$ , содержащие фрагмент гена  $\beta$ -субъединицы фосфодиэстеразы человека длиной 27.8 т.п.о. Установлена нуклеотидная последовательность 19 экзонов (с 4-го по 22-й), 18 интронов и 3'-фланкирующей области гена. Анализ нуклеотидной последовательности выявил четыре повторяющиеся последовательности *Alu*-семейства и четыре мини-сателлитных участка.

*Ключевые слова:* зрительная рецепция; cGMP, фосфодиэстераза; интрон-экзон; *Alu*-повторы; мини-сателлиты.

Каскад реакций в фоторецепторной клетке, приводящий к преобразованию энергии фотона в нервный импульс, включает функционирование трех белков – родопсина, трансдуцина и фосфодиэстеразы циклического GMP (ФДЭ). Конформационные изменения в молекуле родопсина, вызванные поглощением кванта света, приводят к активации сотен молекул трансдуцина с образованием комплексов  $\alpha$ -субъединицы трансдуцина с GTP, каждый из которых активирует ФДЭ.

ФДЭ из палочек сетчатки состоит из четырех субъединиц:  $\alpha$  (88 кДа),  $\beta$  (84 кДа) и двух  $\gamma$  (11 кДа) [1, 2].  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы выполняют каталитическую функцию, в то время как  $\gamma$ -субъединицы являются внутримолекулярными ингибиторами фермента, причем их ингибиторный эффект снимается при взаимодействии ФДЭ с  $\alpha$ -субъединицей трансдуцина.

В результате активации ФДЭ снижается концентрация внутриклеточного cGMP, что приводит к закрытию большого числа cGMP-зависимых каналов в цитоплазматической мембране фоторецепторной клетки, гиперполяризации цитоплазматической мембраны и возникновению нервного импульса.

В последнее время большое внимание уделяется изучению процессов, ведущих к нарушению передачи светового сигнала в фоторецепторных клетках и вызывающих 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, хромосомной локализации их генов.

Установлено, что одна из форм дегенерации сетчатки у мыши (*rd*-мутация) вызывается дефектом в гене  $\beta$ -субъединицы ФДЭ [3], поэтому определение нуклеотидной последовательности гена  $\beta$ -субъединицы фосфодиэстеразы из сетчатки человека представляет не только научный, но и практический интерес.

Ранее в ИБХ РАН были клонированы кДНК всех трех субъединиц ФДЭ из палочек сетчатки быка, кДНК  $\beta$ -субъединицы ФДЭ из сетчатки человека и определены аминокислотные последовательности соответствующих белков [4–8], а также клонирован ген  $\gamma$ -субъединицы ФДЭ человека и определена его экзон-интронная организация [9]. В этой статье описано клонирование и установление первичной структуры гена  $\beta$ -субъединицы ФДЭ cGMP из сетчатки человека (регистрационные номера банка данных EMBL X90587-X90590).

### Клонирование и определение нуклеотидной последовательности гена $\beta$ -субъединицы ФДЭ человека

С целью выявления фрагментов ДНК, содержащих ген  $\beta$ -субъединицы ФДЭ человека, была проанализирована геномная библиотека предельно доступностью около  $1.5 \times 10^6$  клонов, полученная Р.Л. Алликметсом (ИБХ РАН). Для клонирования (в сайт *Bam*HI вектора  $\lambda$ EMBL3) использовали фрагменты размером 16–20 т.п.о., полученные

<sup>#</sup> Автор для переписки.

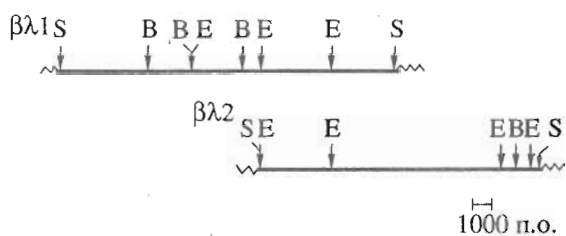


Рис. 1. Физическая карта вставок геномной ДНК в клонх  $\beta\lambda 1$  и  $\beta\lambda 2$ . Ломаная линия – плечи фага  $\lambda$ . Сайты рестрикции: В – *Bam*HI, Е – *Eco*RI, S – *Sal*I.

в результате частичного гидролиза высокомолекулярной геномной ДНК из мозга человека рестриктазой *Sau*3A. ДНК фага  $\lambda$  вводили в бактериальные клетки (штамм *E. coli* DP50) при помощи фаговой инфекции.

Рекомбинантные бактериофаги  $\lambda$  идентифицировали наиболее часто применяемым методом гибридизации *in situ* фаговых бляшек [10] в модификации, предложенной в работе [11].

Для первичного скрининга библиотеки в качестве зонда использовали смесь фрагментов кДНК  $\beta$ -субъединицы ФДЭ из палочек сетчатки быка, меченных при помощи ник-трансляции.

Первичный скрининг амплифицированной геномной библиотеки из ДНК мозга человека выявил четыре клонх ( $\beta\lambda 1$ ,  $\beta\lambda 2$ ,  $\beta\lambda 3$  и  $\beta\lambda 4$ ), положительных по данным гибридизации с ник-транслированными фрагментами кДНК  $\beta$ -субъединицы ФДЭ быка. Индивидуальные клонх выделили, проведя несколько последовательных циклов гибридизации.

Фаговую ДНК из индивидуальных клонх выделяли стандартным методом в модификации Забаровского [12].

ДНК фагов подвергали гидролизу эндонуклеазами рестрикции *Eco*RI, *Bam*HI и *Sal*I. Фрагменты ДНК разделяли в 0.7% агарозном геле и переносили на нитроцеллюлозный фильтр по Саузерну [13] для последующей гибридизации. При построении рестриктных карт использовали результаты гибридизации фрагментов фаговых ДНК со специфическими зондами.

*Eco*RI-*Eco*RI-фрагмент вставки клонх  $\beta\lambda 1$  гибридизовался с ник-транслированным фрагментом кДНК  $\beta$ -субъединицы быка, кодирующим N-концевую область белка, а фрагмент *Eco*RI-*Eco*RI клонх  $\beta\lambda 2$  – с зондами, соответствующими центральной и С-концевой областям белка.

Основываясь на этих результатах, мы пришли к выводу, что клонх  $\beta\lambda 1$  содержит часть гена  $\beta$ -субъединицы ФДЭ, соответствующую N-концевой и центральной областям, а клонх  $\beta\lambda 2$  – С-концевой области белка. Вставки этих клонх перекрываются в районах фрагмента *Eco*RI-*Eco*RI длиной 4.2 т.п.о. и частично фрагмента *Eco*RI-*Eco*RI длиной 9.8 т.п.о. (рис. 1).

Фрагменты ДНК клонх  $\beta\lambda 1$  и  $\beta\lambda 2$ , которые гибридизовались с ник-транслированными фрагментами кДНК  $\beta$ -субъединицы ФДЭ быка, были субклонированы в плазмидные векторы рSP65, рUC8, рUC18, рUC19 и подвергнуты детальному рестриктному анализу.

Субклонх в плазмидных векторах рUC18 и рUC19 для секвенирования получали методом направленного клонирования и методом последовательных делеций. В первом случае выделяли и клонировали в векторе индивидуальные рестриктные фрагменты. С помощью такой стратегии установили большую часть структуры. Нуклеотидную последовательность интронов 10, 13 и 21 определили в основном путем секвенирования серии клонх, полученных методом последовательных делеций с использованием экзонуклеазы *Exo*III [14]. Применение этой стратегии секвенирования было вызвано, во-первых, отсутствием в этих интронах подходящих сайтов для субклонирования, а во-вторых, наличием в них тандемных повторов.

Сравнение установленной нуклеотидной последовательности фрагментов *Eco*RI-*Eco*RI размером 4, 4.2 и 9.8 т.п.о. с последовательностью кДНК  $\beta$ -субъединицы ФДЭ быка [6], мыши [3] и человека [7] показало, что клонх  $\beta\lambda 1$  и  $\beta\lambda 2$  содержат 19 экзонов, кодирующих центральную и С-концевую области  $\beta$ -субъединицы ФДЭ сGMP человека (с 238-го по 854-й аминокислотный остаток). Фрагмент *Eco*RI-*Eco*RI размером 9.8 т.п.о. включает терминирующий кодон, а также 650 п.о.

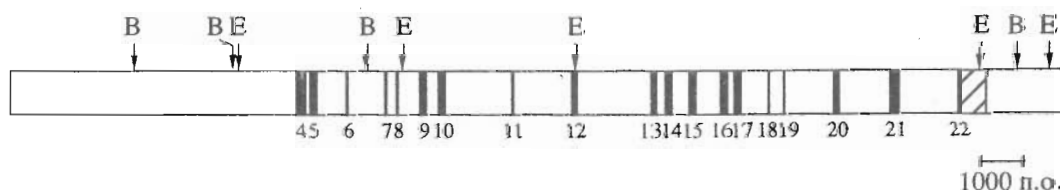


Рис. 2. Организация исследуемого фрагмента гена  $\beta$ -субъединицы ФДЭ человека. Вертикальными полосками показаны экзоны. Цифры под картой указывают номера экзонов. Заштрихованный прямоугольник соответствует 3'-нетранслируемой области. Стрелками отмечены сайты рестрикции *Bam*I (В) и *Eco*RI (Е).

3'-фланкирующей области, однако не содержит сайт полиаденилирования. Чтобы получить полную информацию о 3'-фланкирующей области гена, из клона  $\beta\lambda 2$  субклонировали фрагмент *EcoRI-BamHI* (850 п.о.), структурный анализ которого выявил несколько потенциальных сайтов полиаденилирования – "ААТААА".

Таким образом, вставки фагов  $\beta\lambda 1$  и  $\beta\lambda 2$  содержат фрагмент гена  $\beta$ -субъединицы длиной 27.8 т.п.о., включающий 19 экзонов и 3'-фланкирующую область (рис. 2). На основании того, что фрагменты *SaI-BamHI* (5.2 т.п.о.) и *EcoRI-BamHI* (2.5 т.п.о.) вставки фага  $\beta\lambda 1$  не гибридизовались с ник-транслированным фрагментом клона рВ9, кодирующим N-концевую область белка, и по аналогии с организацией гена  $\beta$ -субъединицы мышцы [3] мы предположили, что в клонированных нами фрагментах гена  $\beta$ -субъединицы ФДЭ человека отсутствуют три первых экзона.

На рис. 3 приведена нуклеотидная последовательность экзонов фрагмента гена  $\beta$ -субъедини-

цы фоторецепторной ФДЭ человека, а также соответствующая ей аминокислотная последовательность белка.

#### Экзон-интронная организация гена $\beta$ -субъединицы ФДЭ человека

Как показано в табл. 1, все интрон-экзонные границы, кроме донорного участка 20-го интрона, соответствуют правилу GT/AG [15] и согласуются с консенсусными последовательностями 5'- и 3'-участков сплайсинга [16]. Донорный участок сплайсинга 20-го интрона содержит GC, а не GT, но в целом совпадает с консенсусом, что, по-видимому, компенсирует отсутствие GT. У многих генов на расстоянии 10–40 нуклеотидов от 3'-конца интрона выявляется еще одна общая последовательность  $\begin{matrix} C & C & A & C \\ N & T & A & C \\ T & T & G & T \end{matrix}$ , которая наряду с 5'-донорным и 3'-акцепторным участками вовлечена в

Таблица 1. Участки сплайсинга исследуемого фрагмента гена  $\beta$ -субъединицы ФДЭ человека

Номер экзона	Размер экзона	5'-Донорный участок сплайсинга	Номер интрона	Размер интрона	3'-Акцепторный участок сплайсинга*
4	141	AGAAG gtagg	4	87	gtgagggtgggagcccacaggcccacaggtgtgccccctccctccag GTGCT
5	75	GCCGG gtagt	5	669	ccaggtcccgcagtgaccgccccaccctcaccttctctgcccag GAATT
6	65	ATTCC gtaagt	6	1044	agagcttggccaggcagccccccgaccagtgctctctgcttctcag GAAAT
7	67	GCTTT gtagt	7	240	catccagcccggcgtggcctatctgaccctgctctgcccacag CACAC
8	48	TTCAG gtatct	8	573	gccttccgctgttttgatgaaatcgttttctgatgcttttctcag ATTTG
9	150	TGGAG gtaagc	9	325	agggccagcctcaggcggagctcagctctggaccgctcccgcag GAAGG
10	144	TCCTG gtgagg	10	1520	gggcgcgccgggagcgcagcggcagtgacactgcccctccctccag TCCCT
11	66	TCCTG gtaaga	11	1450	ccacatgcgaagctctttctcgtgacacatctgtgtctctgtgtag CCAAC
12	147	AGGAG gtggga	12	1800	gggctgtggcaggccaacctccctcagcccacaatccctcccacag AAGGA
13	108	TCATG gtacgt	13	264	cttacacgcttcccgcggagccctgtgtcctctcggctccccag GTCCCT
14	110	ATGAA gtaggc	14	477	cctgtctggagccaggaccgggtgagcaaggtggccctgtctctacag ACCGG
15	88	AGGAG gttggt	15	576	ccaagggcaggtcccacgggctcactccaccacctgtgtaacag GTCCC
16	101	TTCAA gtgagc	16	242	tgagaggtgccgagcgcctgacgcgctgggcataacctccgcag ACCCT
17	108	GTCAT gtgagc	17	657	ctccacacttgtcccactgcacctccctgttccctgggttcag GAAGA
18	64	GCAAG gttaga	18	310	cctcaggagacgcccactcagcactcgtcccggttgtgtctgtag GGCCA
19	75	CCATT gtagt	19	1198	gcgtgggctcagagctccacagacagctgacctctgtgctccctccag GTCGC
20	84	ACAAG gcgagt	20	1238	ctgacctcctggctactgttctcccgcctctgttctctcccaccag CCTAT
21	151	GAAAG gtctgg	21	1374	agagcaggcaggacaggactggtggtgacttctcactcccctcag GAGTT
22	62				gtgtgcacaggtggttccactcaccatctctgtcttctcttgcag TAGGC
Консенсусные последовательности:					Петля: (c/t)n(c/t)t(a/g)a(c/t)
Донор: (A/C)AG gt(a/g)agt					Акцептор: (c/t)(c/t)(c/t)(c/t)(c/t)(c/t)(c/t)(c/t)ncag

\* Подчеркнуты последовательности, участвующие в образовании петли.

GTGCTGCTGTGGTCCGGCCAAACAAGGTGTTTGAGGAGCTGACGGACATCGAGAGGCAGTTC	60
V L L W S A N K V F E E L T D I E R Q F	257
⇨ экзон 4	
CACAAGGCCCTTCTACACGGTGC GGCCCTACCTCAACTGCGAGCGG <sup>В</sup> ACTCCGTGGGCCCTC	120
H K A F Y T V R A Y L N C E R Y S V G L	277
CTGGACATGACCAAGGAGAAG GAATTTTTTTGACGTGTGGTCTGTGCTGATGGGAGAGTCC	180
L D M T K E K E F F D V W S V L M G E S	297
экзон 4 ⇨ ⇨ экзон 5	
CAGCCGTACTCGGGCCCCACGCACGCC <sup>Т</sup> GATGGCCGG GAAATTGTCTTCTACAAAGTGATC	240
Q P Y S G P R T P D G R E I V F Y K V I	317
экзон 5 ⇨ ⇨ экзон 6	
GACTACATCCTCCACGGCAAGGAGGAGATCAAGGTCATTCC CACACCCTCAGCCGATCAC	300
D Y I L H G K E E I K V I P T P S A D H	337
экзон 6 ⇨ ⇨ экзон 7	
TGGGCCCTGGCCAGCGGCCCTTCCAAGCTACGTGGCAGAAAGCGGCTTT ATTTGTAACATC	360
W A L A S G L P S Y V A E S G F I C N I	357
экзон 7 ⇨ ⇨ экзон 8	
ATGAATGCTTCCGCTGACGAAATGTTCAAATTTTCAG GAAGGGGCCCTGGACGACTCCGGG	420
M N A S A D E M F K F Q E G A L D D S G	377
экзон 8 ⇨ ⇨ экзон 9	
TGGCTCATCAAGAATGTGCTGTCCATGCCCATCGTCAACAAGAAGGAGGAGATTGTGGGA	480
W L I K N V L S M P I V N K K E E I V G	397
GTCGCCACATTTTACAACAGGAAAGACGGGAAGCCCTTTGACCAACAGGACGAGGTTCTC	540
V A T F Y N R K D G K P F D E Q D E V L	417
ATGGAG TCCCTGACACAGTTCCTGGGCTGGTCAGTGAACACCGACACCTACGACAAG	600
M E S L T Q F L G W S V M N T D T Y D K	437
экзон 9 ⇨ ⇨ экзон 10	
ATGAACAAGCTGGAGAACC <sup>Г</sup> CAAGGACATCGCACAGGACATGGTCCTTTACCACGTGAAG	660
M N K L E N R K D I A Q D M V L Y H V K	457
TGGCAGAGGGACGAGATCCAGCTCATCCTG CCAACCAGAGCGCGCCTGGGGAAGGAGCCT	720
C D R D E I Q L I L P T R A R L G K E P	477
экзон 10 ⇨ ⇨ экзон 11	
GCTGACTGCGATGAGGACGAGCTGGGCGAAATCCTG AAGGAGGAGCTGCCAGGGCCCACC	780
A D C D E D E L G E I L K E E L P G P T	497
экзон 11 ⇨ ⇨ экзон 12	
ACATTTGACATCTACGAATTC <sup>С</sup> ACTTCTCTGACCTGGAGTGCACCGA <sup>А</sup> ACTGGACCTGGTC	840
T F D I Y E F H F S D L E C T E L D L V	517
AAATGTGGCATCCAGATGTA <sup>С</sup> TACGAGCTGGGCGTGGTCCGAAAGTTCCAGATCCCCCAG	900
K C G I Q M Y Y E L G V V R K F Q I P Q	537
экзон 12	
GAG GTCCCTGGTCCGGTTCCTGTCTCCATCAGCAAAGG <sup>Т</sup> TACCGGAGAATCACCTACCAC	960
E V L V R F L F S I S K G Y R R I T Y H	557
⇨ ⇨ экзон 13	
AACTGGCGCCACGGCTTCAACCTGGCCAGACGATGTTACGCTGCTCATG ACCGGCAAA	1020
N W R H G F N V A Q T M F T L L M T G K	577
экзон 13 ⇨ ⇨ экзон 14	

Рис. 3. Нуклеотидная последовательность экзонов 4–22 гена  $\beta$ -субъединицы ФДЭ из сетчатки человека и выведенная из нее аминокислотная последовательность белка. Подчеркнуты потенциальные сайты полиадеенирования (ААТААА) и *Alu*-повтор.

CTGAAGAGCTACTACACGGACCTGGAGGCCTTCGCCATGGTGACAGCCGGCCTGTGCCAT	1080
L K S Y Y T D L E A F A M V T A G L C H	597
GACATCGACCACCGCGGCACCAACAACCTGTACCAGATGAA GTCCCAGAACCCCTTGGCT	1140
D I D H R G T N N L Y Q M K S Q N P L A	617
ЭКЗОН 14 ⇨ ⇩ ЭКЗОН 15	
AAGCTCCACGGCTCCTCGATTTTGGAGCGGCACCACCTGGAGTTTGGGAAGTTCCCTGCTC	1200
K L H G S S I L E R H H L E F G K F L L	637
TCGGAGGAG ACCCTGAACATCTACCAGAACCTGAACCGCGGCAGCACGACGACGTGATC	1260
S E E T L N I Y Q N L N R R Q H E H V I	657
ЭКЗОН 15 ⇨ ⇩ ЭКЗОН 16	
CACCTGATGGACATCGCCATCATCGCCACGGACCTGGCCCTGTACTTCAA GAAGAGAGCG	1320
H L M D I A I I A T D L A L Y F K K R A	677
ЭКЗОН 16 ⇨ ⇩ ЭКЗОН 17	
ATGTTTCAGAAGATCGTGGATGAGTCCAAGAACTACCAGGACAAGAAGAGCTGGGTGGAG	1380
M F Q K I V D E S K N Y Q D K K S W V E	697
TACCTGTCCCTGGAGACGACCCGGAAGGAGATCGTCAT GGCCATGATGATGACAGCCCTGC	1440
Y L S L E T T R K E I V M A M M M T A C	717
ЭКЗОН 17 ⇨ ⇩ ЭКЗОН 18	
GACCTGTCTGCCATACCAAGCCCTGGGAAGTCCAGAGCAAG GTCGCACTTCTCGTGGCT	1500
D L S A I T K P W E V Q S K V A L L V A	737
ЭКЗОН 18 ⇨ ⇩ ЭКЗОН 19	
GCTGAGTTCTGGGAGCAAGGTGACTTGGAAAGGACAGTCTTGGATCAGCAGCCCATT CCT	1560
A E F W E Q G D L E R T V L D Q Q P I P	757
ЭКЗОН 19 ⇨ ⇩ ЭКЗОН 20	
ATGATGGACCGGAACAAGGCGCGGAGCTCCCCAAGCTGCAAGTGGGCTTCATCGACTTC	1620
M M D R N K A A E L P K L Q V G F I D F	777
GTGTGCACATTCGTGTACAAG GAGTTCCTCTCGTTTCCACGAAGAGATCCTGCCCATGTT	1680
V C T F V Y K E F S R F H E E I L P M F	797
ЭКЗОН 20 ⇨ ⇩ ЭКЗОН 21	
GACCGACTGCAGAACAATAGGAAAGAGTGGAAAGGCGCTGGCTGATGAGTATGAGGCCAAA	1740
D R L Q N N R K E W K A L A D E Y E A K	817
GTGAAGGCTCTGGAGGAGAAGGAGGAGGAGGAGGGTGGCAGCCAAGAAAAG TAGGCACA	1800
V K A L E E K E E E E R V A A K K V G T	837
ЭКЗОН 21 ⇨ ⇩ ЭКЗОН 22	
GAAATTTGCAATGGCGGCCAGCACCCAAGTCTTCAACCTGCTGTATCCTGTGAGCACTG	1860
E I C N G G P A P K S S T C C I L *	854
GTCCCCTGGGGACCCTATGGCTCCCCTCAATCTTCACCCACTAGGATTTGGGTTCTGCCTG	1920
TGGCTATTTGCTACAAGAGGTTAGGAAGCCCAAGAAAATGACTGAAGATCATTCTGGATA	1980
TTTTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGATGGAGTCTTGCTCTGTCACCCAGGCTGG	2040
AGTGCCGTGGCAGATCTCAGCTCACTGCAACCTCCACCTCCAGGTTCAAGCGATTCTC	2100
GTGCCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGACTACAGCGCCACCACCACACATGGCTAATTT	2160
TTGTATTTTCAGTACAGATGGGGTTTACCATAATGGGCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGA	2220
CCTCAGGTGATCACCCGCTCAGCTTCTGAAAGTCTGGGATTACAGGCATGAGCCACCA	2280
CGCCCAGCCTGTTTTTATAAACTGAAGCCAACCTGTGAATAAACTGTAGCCTACATTACTC	2340
ATCCATTTTTGGATAGTTACCAC TGGGAGACCTTTGAAAAGGGTCCATGAACTCTGAAAT	2400
CACTGAGAACATTTGCAGCCACACATGTACATATGTGTACACAGGTAGACAGATGGACAC	2460
AGGCCGTTTCTCATCCAGTTTAGGAAAACACACATGCTCAGGAATTCAGAATAAAATAAA	2520
CAGAAAAC TACTTGCCCAT TATCTGTGGTAAAATGATAGCGGAACGCACACTACATTTGA	2580
CCCATCAGAAAATCTGCCAGAGAGGTCAAGGCCATGAGTAAAGCGGCCATCCAACCTCA	2640
GTGGTCTGAGCGGAAATGATCTGTAATAAACACCATGTAGAGTGGCTCTG	2690

Рис. 3. Окончание.

$\beta$ MS8    **ACACACCCCTGGGAGGCCGTGACGGCGGCCCC**  
 $\beta$ MS10L **TCTGGGGCAGGGGCAGGTCTCTCCAGGGGTCACCCAGGGGTCAAGGC**  
 $\beta$ MS10S **TCTGGGGTGGGGGCAGGTCACCCAGGGGTCAAGGC**  
 $\beta$ MS12    **ATAAATGGATGGATGGGTGGGTGGGCCAATGGTAGTTGGATGGTTGG**  
 $\beta$ MS21    **GCTGCTCCCACTACCCCAT**

Рис. 4. Консенсусные нуклеотидные последовательности мономеров тандемных повторов гена  $\beta$ -субъединицы ФДЭ человека. Подчеркнуты тандемные повторы в гомологичных мономерах  $\beta$ MS10L и  $\beta$ MS10S.

сплайсинг про-мРНК [17]. Эта последовательность обнаружена на расстоянии 10–39 нуклеотидов от 3'-границ 18 интронов (с 4-го по 21-й) гена  $\beta$ -субъединицы ФДЭ человека.

#### Повторяющиеся последовательности гена $\beta$ -субъединицы ФДЭ человека

Анализ установленной нуклеотидной последовательности гена  $\beta$ -субъединицы ФДЭ человека выявил ряд повторяющихся последовательностей.

В исследуемом фрагменте гена идентифицированы четыре *Alu*-повтора: по одному в интронах 14 и 17 и два в 3'-фланкирующей области гена. *Alu*-повторы интронов имеют прямую ориентацию, в 3'-фланкирующем участке гена они расположены в обратной ориентации. Интересно, что С-концевая область гена относительно обогащена *Alu*-повторами, так как эти повторяющиеся элементы встречаются в геноме в среднем один раз на каждые 4 т.п.о. [18]. Сравнение нуклеотидных последовательностей идентифицированных *Alu*-повторов с консенсусной последовательностью, выведенной в работе [19], показало, что степень их идентичности составляет 69–90%. В соответствии с предложенной в работе [19] классификацией *Alu*-1-элемент гомологичен более древнему J-подсемейству, в то время как другие три *Alu*-повтора относятся к более современному S-подсемейству. Из 24 динуклеотидов CpG консенсусной последовательности в *Alu*-1-элементе сохранились только 2, в *Alu*-2 – 13, в *Alu*-3 – 6 и в *Alu*-4 – 2 динуклеотида CpG, что, вероятно, вызвано их превращением в динуклеотиды TpG и CpA в результате спонтанного дезаминирования 5-метилцитозина.

В нуклеотидных последовательностях, фланкирующих *Alu*-элементы, обнаружены прямые повторы длиной от 4 до 18 п.о.

Был проведен компьютерный поиск моно-, ди- и тринуклеотидных повторов в гене  $\beta$ -субъединицы ФДЭ человека. В центральной области гена, в

интронах 5 и 11, обнаружено несколько участков, содержащих пурин-пиримидиновые последовательности  $(dC-dA)_n \cdot (dG-dT)_n$  (табл. 2). В интроне 5 локализованы две  $d(GT)_n$ -последовательности длиной 16 и 19 п.о. В интроне 11 находятся несколько протяженных участков пурин-пиримидиновой последовательности с небольшими нарушениями, самый большой из них имеет общую длину 106 п.о. Интересно, что на долю динуклеотида dGT (или dCA) приходится большая часть структуры интрона 11. Предполагают, что подобные структуры могут образовывать левозакрученную Z-форму ДНК [20], которая негативно влияет на транскрипцию [21]. Существует предположение, что эти повторяющиеся последовательности играют роль в генетической рекомбинации [22].

Центральная и 3'-концевая области гена  $\beta$ -субъединицы фосфодиэстеразы человека содержат четыре мини-сателлитных участка. Они находятся в интронах 8, 10, 12 и 21. На рис. 4

Таблица 2. Динуклеотидные повторяющиеся последовательности гена  $\beta$ -субъединицы ФДЭ cGMP человека

Повторяющийся элемент	Количество повторов	Общая длина повторяющегося элемента, п.о.	Место локализации – интрон
GT	9.5	19	5
GT	8	16	5
GT	7	14	11
$(CA)_n \cdot (GT)_n$	43	106	11
$(CA)_n \cdot (GT)_n$	19	42	11
$(CA)_n \cdot (GT)_n$	17	36	11
$(CA)_n \cdot (GT)_n$	12	24	11
$(CA)_n \cdot (GT)_n$	9.5	22	11
$(CA)_n \cdot (GT)_n$	11	24	11
$(CA)_n \cdot (GT)_n$	11	23	11
GT	6	12	11

приведена консенсусная последовательность номера каждого мини-сателлита. Мини-сателлит в интроне 8 состоит из 4 повторов длиной 32 п.о., мини-сателлит, обнаруженный в интроне 12, – из 9 полных длиной 47 п.о. и одного неполного tandemного повтора и имеет длину 448 п.о. В интроне 21 мини-сателлит длиной 735 п.о. состоит из более коротких tandemных повторов длиной 19 п.о.

В то время как повторы в каждом из этих двух мини-сателлитов более чем на 90% гомологичны и различаются лишь небольшими делециями, вставками и заменами нуклеотидов, мини-сателлит в интроне 10 имеет более сложную структуру. Он состоит из двух гомологичных повторов, каждый из которых, в свою очередь, содержит tandemный повтор с консенсусом AGGGG-CA-GG. Более длинный мономер  $\beta$ MS10L рассматриваемого мини-сателлита имеет три такие последовательности, а более короткий  $\beta$ MS10S – две.

В последнее время мини-сателлитные локусы генома человека интенсивно исследуются. Многие локусы генома, содержащие tandemные повторы, гипервариабельны. Благодаря высокому уровню полиморфизма мини-сателлитные участки являются наиболее информативными генетическими маркерами и широко используются в генетическом анализе [23, 24]. Считают, что многие мини-сателлитные локусы являются горячими точками митотической и мейотической рекомбинаций [25].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: трис, цитрат натрия, хлорид магния, DMSO, муравьиную кислоту, ацетат натрия, хлорид кальция, уксусную кислоту,  $\beta$ -меркаптоэтанол (Merck, ФРГ); агарозу, N,N'-метиленбисакриламид, акриламид, SDS, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), нитроцеллюлозу Trans-Blot transfer medium (Bio-Rad, США); EDTA, тритон X-100, борную кислоту (Serva, ФРГ); бромфеноловый синий, ксилолцианоловый голубой (Koch-Light, Англия); дитиотреит, бромистый этидий, поливинилпирролидон, фикоколл-400, глицерин, бычий сывороточный альбумин (Sigma, США), триптон, дрожжевой экстракт, бакто-агар (Difco, США); тРНК, 2'-дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP) (Boehringer-Mannheim, ФРГ); мочевины (Pierce, США); DEAE-бумагу DE-81, DEAE-целлюлозу DE-52, ватман 3MM (Whatman, Англия); нитроцеллюлозные фильтры BA 85 (Schleicher und Schüll, ФРГ); мембрану Biodyne™ (Pall, США); мембрану Nubond-N™ (Amersham, Англия).

Для приготовления буферных и других растворов использовали отечественные реактивы квалификации ос. ч. или х. ч.

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции фирм “Фермент” (Литва), Reanal (Венгрия), Pharmacia (Швеция), Amersham (Англия) и Boehringer-Mannheim (ФРГ); фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, полинуклеотидкиназу фага T4, нуклеазу из проростков золотистой фасоли, наборы для ник-трансляции и для мечения 3'-выступающих концов фирмы Amersham (Англия); ДНК-лигазу фага E4, ДНК-полимеразу I *E. coli*, РНКазу А, лизоцим яичного белка, щелочную фосфатазу из кишечника телят (CIP; Boehringer-Mannheim, ФРГ), протеиназу К (Serva, ФРГ); плазмиды pSP65, pUC8, pUC18, pUC19 (Promega, США).

Работу с ДНК осуществляли стандартными методами [13]. Серии делеционных производных клонов получали по методу [14] с использованием набора “Erase-a-Base System” (Promega, США). Нуклеотидную последовательность определяли методом Сэнгера на двухцепочечной матрице [26], используя набор “Sequence version 2.0” (USB, США), согласно рекомендациям изготовителя, и методом Максама–Гилберта в твердофазном варианте, как описано в работе [27].

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 93-04-7310), Международного научного фонда (MU5000 и MU5300) и Государственной научно-технической программы РФ “Новейшие методы биоинженерии”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baehr W., Delvin M.J., Applebury M.L. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 11669–11677.
2. Deterre P., Bigay J., Forquet F., Robert M., Chabre M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 2424–2428.
3. Pittler S.J., Baehr W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 8322–8326.
4. 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.
5. Ovchinnikov Yu.A., Gubanov V.V., Khramtsov N.V., Ischenko K.A., Zagranichny V.E., Muradov K.G., Shuvaeva T.M., Lipkin V.M. // FEBS Lett. 1987. V. 223. P. 169–173.
6. 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.
7. Храмов Н.В., Феценко Е.А., Сулова В.А., Терпугов Б.Е., Ракитина Т.В., Атабекова Н.В., Шмуклер Б.Е., Липкин В.М. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. С. 1551–1554.
8. Khramtsov N.V., Feschenko E.F., 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.

9. Пириев Н.И., Пуришко В.А., Храмов Н.В., Липкин В.М. // Докл. АН СССР. 1990. Т. 315. С. 229–231.
10. Benton W.D., Davis R.W. // Science. 1977. V. 196. P. 180–182.
11. Woo S.L.C. // Methods Enzymol. 1979. V. 68. P. 389–395.
12. Забаровский Е.П., Турина О.В. // Молекуляр. биология. 1988. Т. 22. С. 1451–1455.
13. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. // Molecular Cloning. A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor, 1982.
14. Henikoff S. // Gene. 1984. V. 28. P. 357.
15. Breathnach R., Chambon P. // Annu. Rev. Biochem. 1981. V. 50. P. 349–383.
16. Mount S.M. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. P. 459–472.
17. Reed R., Maniatis T. // Genes Dev. 1988. V. 2. P. 1268–1276.
18. Hwu H.R., Roberts J.W., Davidson E.H., Britten R.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 3875–3879.
19. Jurka J., Smith T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 4775–4778.
20. Nordheim A., Rich A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 1821–1825.
21. Naylor L.H., Clark E.M. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 1595–1601.
22. Pardue M.L., Lowenhaupt K., Rich A., Nordheim A. // EMBO J. 1987. V. 6. P. 1781–1789.
23. Armour J.A., Jeffreys A.J. // Curr. Opin. Genet. Dev. 1992. V. 2. P. 850–856.
24. Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kunlin E., White R. // Science. 1987. V. 235. P. 1616–1622.
25. Блисковский В.В. // Молекуляр. биология. 1992. Т. 26. С. 965–982.
26. Tabor S., Richardson C.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 4767–4771.
27. Chuvpilo S.A., Kravchenko V.V. // FEBS Lett. 1984. V. 179. P. 34–36.

## Structural Organization of the Human cGMP Photoreceptor Phosphodiesterase $\beta$ -Subunit Gene

V. A. Suslova, O. N. Suslov, E. E. Kim, and V. M. Lipkin<sup>1</sup>

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7, Moscow, 117871 Russia*

**Abstract**—Two recombinant bacteriophage  $\lambda$  clones encoding a 27.8-kb fragment of the human phosphodiesterase  $\beta$ -subunit gene were isolated from a human genomic library. The nucleotide sequences of 19 exons (from the 4th to 22nd), 18 introns, and the 3'-flanking region were determined. The analysis of the nucleotide sequence of the phosphodiesterase  $\beta$ -subunit gene revealed four *Alu* repeats and four minisatellite regions.

*Key words:* visual reception, cGMP, phosphodiesterase, intron; exon, *Alu* repeats, minisatellite DNA.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.