



УДК 577.212.2:577.175.82

## СТРУКТУРА И ХРОМОСОМНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНА НЕЙРОГРАНИНА ЧЕЛОВЕКА

© 1997 г. И. Б. Мерцалов<sup>#</sup>, М. Штумм\*, П. Викар\*,  
С. том Дик\*\*, Э. Гундельфингер\*\*, В. И. Цетлин

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\* Госпиталь Отто фон Гюрике Университета Магдебурга, ФРГ;

\*\* Федеральный институт нейробиологии, Магдебург, ФРГ

Поступила в редакцию 11.07.97 г. Принята к печати 28.08.97 г.

С использованием кДНК нейрогранина человека (hNG) в качестве зонда из геномной фаговой библиотеки выделен фрагмент ДНК (12.5 т.п.о.), содержащий полный ген нейрогранина человека (*hng*), состоящий из четырех экзонов и трех интронов. Первые два экзона включают в себя нуклеотидную последовательность, кодирующую всю 78-членную аминокислотную последовательность нейрогранина. Показано, что в целом геномная организация гена *hng* сходна с организацией гомологичного гена нейрогранина крысы (*rng*). Ген *hng* имеет несколько потенциальных старт-сайтов транскрипции, а промоторный регион характеризуется отсутствием ССААТ- и ТАТА-боксов вблизи и выше старт-сайтов транскрипции. В 5'-фланкирующем регионе гена *hng* обнаружена область, насыщенная АТ-богатыми мотивами, аналогичная области, присутствующей примерно в той же позиции в промоторе гена *rng*. С помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) ген *hng* локализован на 11-й хромосоме в районе 11q23.3–q24.1.

*Ключевые слова:* нейрогранин, RC3, 11-я хромосома человека.

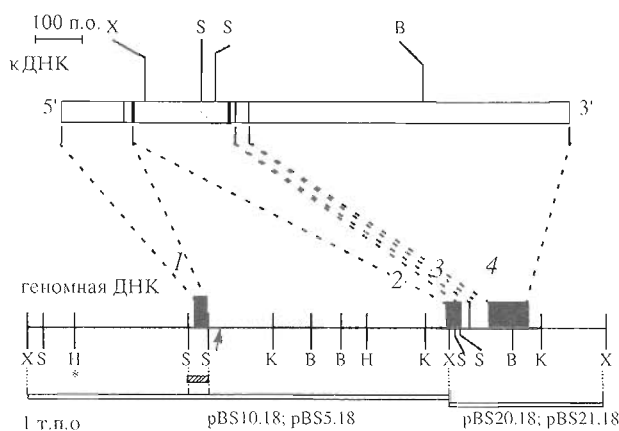
Нейрогранин (NG, другие обозначения – RC3 или P17 [1–3]) – нейроспецифичный белок, состоящий из 78 а.о., обладает способностью связывать кальмодулин в отсутствие ионов кальция и является эндогенным субстратом протеинкиназы С (PKC) [4]. Аминокислотная последовательность средней части молекулы (остатки 30–47) включает в себя кальмодулинсвязывающий и фосфорилируемый домены. Эта консенсусная область, AAHKIQASFRGHXXRKKXK, присутствует также у другого кальмодулинсвязывающего субстрата протеинкиназы С – нейроспецифичного белка нейромодулина (другие обозначения – GAP-43, F1, B50) [5]. В отличие от нейромодулина, который локализован главным образом в пресинаптической мембране аксона и связан с ней посредством пальмитоиллированных цистеиновых остатков в N-концевой области, нейрогранин находится в цитозоле и локализован в дендритах нейронов [6, 7]. Высокий уровень экспрессии гена

нейрогранина обнаруживается в головном мозгу преимущественно в неостриатуме, неокортексе и гиппокампе, а также в обонятельных луковицах [2]. Экспрессия гена нейрогранина регулируется тиреоидным гормоном Т<sub>3</sub> [8, 9], однако в промоторном регионе гена потенциальные сайты связывания регуляторов транскрипции этого типа не обнаружены [9, 10]. Хотя нейрогранин – строго нейроспецифичный белок, он не обнаруживается в нейрональных клеточных линиях, таких, как PC12 и некоторые линии нейробластомы [10], которые способны продуцировать нейрональный маркер GAP-43 – ближайший гомолог нейрогранина [11–13]. Полная нуклеотидная последовательность (13 т.п.о.) гена *rng* нейрогранина крысы, обозначенного авторами как Ng/RC3, была определена в работе [10]. Было обнаружено наличие структурных мотивов в районе до 1.5 т.п.о. выше транскрипционных старт-сайтов генов *rng* и PKC $\gamma$  (протеинкиназа C $\gamma$ ), высокоомологичных у обоих генов, а также область, насыщенная АТ-обогащенными сегментами [10]. Кроме того, показано [10], что конструкции, содержащие промоторную область гена нейрогранина крысы (до 1.5 т.п.о.), способны экспрессироваться в клеточных линиях не нейрональной природы.

Ранее мы клонировали кДНК нейрогранина человека (hNG) [14]. В настоящей работе

Сокращения: hNG и rNG – нейрогранин человека и крысы, *hng* и *rng* – соответствующие гены; PKC и PKC $\gamma$  – протеинкиназа С и C $\gamma$ ; FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*; Cy-3 – оранжевый флуоресцентный краситель Cy-3 (Amersham); DAPI – 4,6-диамино-2-фенилиндол; SSC – раствор для гибридизации (состав 20х: 3 М NaCl, 0.3 М цитрат натрия, pH 7.0).

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 330-73-74, факс: (095) 335-57-33).



**Рис. 1.** Рестриктная карта и организация гена нейрогранина человека. Кодировочная белок область кДНК (в верхней части рисунка) представлена в виде затемненного прямоугольника, 5'- и 3'-нетранслируемые районы – в виде незаполненных рамок. Рестриктные сайты эндонуклеазы: X – *XbaI*; S – *SmaI*; H – *HindIII*; K – *KpnI*; B – *BamHI*. Экзоны 1–4 на рестриктной карте изображены черными прямоугольниками. Штриховыми линиями показаны соответствия между схемой кДНК и физической картой гена. В нижней части рисунка прямоугольниками изображены *XbaI*-фрагменты геномной ДНК, клонированные в указанных плазмидах. Заштрихованным прямоугольником выделен фрагмент *SmaI*–*SmaI*, размеры которого (375 п.о.), по нашим данным, отличаются от определенных в работе [17]. Стрелкой указано положение сайта *SmaI* этого фрагмента [17], не подтвержденное в нашей работе. Звездочкой обозначен сайт *HindIII*, который не обнаружен ранее [17].

представлены результаты исследования структурных особенностей гена *hng* и его хромосомного картирования с помощью FISH.

### Клонирование геномной ДНК

Используя  $^{32}\text{P}$ -меченую кДНК hNG в качестве зонда, мы провели скрининг геномной фаговой библиотеки человека (Stratagene, вектор  $\lambda\text{FixII}$ ) и изолировали три клон (рекомбинантные фаги 1HGRC, 2HGRC и 5HGRC), различающиеся размером клонированной ДНК. Рестриктный анализ и саузерн-блот-анализ этих клонов с  $^{32}\text{P}$ -меченой кДНК выявили, что все они имеют в своем составе гибризирующиеся *XbaI*-фрагменты ДНК размером примерно 9 и 3.2 т.п.о. Эти фрагменты были разделены с помощью агарозного гель-электрофореза, выделены из геля и субклонированы в плазмидный вектор pBluescript KS+ (pBS) (Stratagene, США) в двух ориентациях. Плазмидные клоны, содержащие фрагмент 9.0 т.п.о. геномной ДНК, были названы pBS10.18 и pBS5.18; клоны, содержащие фрагмент 3.2 т.п.о., – pBS20.18 и pBS21.18. С помощью рестриктного анализа и саузерн-блот-анализа полученных клонов состав-

лены подробные рестриктные карты соответствующих геномных фрагментов 9.0 и 3.2 т.п.о.

Минимальные фрагменты, гибридизовавшиеся с кДНК hNG, были субклонированы, и их нуклеотидная последовательность полностью определена. Чтобы определить экзон-интронные границы, проведено сравнение нуклеотидной последовательности ранее клонированной кДНК нейрогранина человека [14] с последовательностями геномных фрагментов. В результате объединения рестриктных карт субклонированных фрагментов геномной ДНК и данных секвенирования мы получили суммарную физическую карту примерно 12.5 т.п.о. гена *hng* (рис. 1).

Ген нейрогранина человека состоит из четырех экзонов и трех интронов. На рис. 2 представлены последовательности экзонов 1–4 (обозначены прописными буквами), расположенные между интронами 2 и 3, 5'-фланкирующая область гена до позиции –1098 и частичная нуклеотидная последовательность 1-го интрона. 1-й экзон кодирует пять N-концевых аминокислотных остатков, 2-й – остальные 73 а.о. и включает короткую нуклеотидную последовательность (5 п.о.) после стоп-кодона. Экзоны 3 и 4 содержат последовательности 3'-нетранслируемой области кДНК; их размеры составляют 18 и 805 п.о. соответственно. Примерный размер 1-го интрона (5.2 т.п.о.) был установлен при помощи рестриктного картирования гена. Размеры 2-го и 3-го интронов (235 и 421 п.о. соответственно) определены при помощи прямого секвенирования. Последовательности экзон-интронных стыков всех четырех экзонов соответствуют правилу GT/AG [15] и согласуются с консенсусными последовательностями 5'- и 3'-участков сплайсинга [16] (таблица).

Организация гена нейрогранина человека в целом сходна с организацией гомологичного гена нейрогранина крысы [10]. Кроме того, кодирующие белок области обладают высокой степенью гомологии, которая достигает 90%. В то же время последовательности, соответствующие 3'-нетранслируемой области кДНК и 5'-фланкирующей области, довольно сильно различаются. В 3'-нетранслируемой области гена *hng* отсутствует пуринобогатый регион, характерный для гена *rng* ( $\text{A}_{34}\text{GA}_4\text{GA}_4\text{GA}_{10}$ ) [2, 10]. В целом для определенной нами частичной последовательности 5'-фланкирующей области гена *hng* (–1098 ... –1) (рис. 2) гомология с соответствующей областью гена крысы составляет менее 65%, однако имеются высокогомологичные участки (–500 ... –1 и –1098 ... –900).

Ко времени окончания настоящей работы появилась публикация, описывающая организацию, структуру и хромосомное картирование гена *hng*, обозначенного авторами *NRGN* [17]. При сравнении наших данных с опубликованными обнаружено большое количество расхождений. Согласно



Нуклеотидные последовательности в районах экзон-интронных стыков (участков сплайсинга) гена нейрогранина человека

Экзон		Последовательности участков сплайсинга*		Интрон	
Номер экзона	Размер, п.о.	5'-Донорная последовательность	3'-Акцепторная последовательность	Номер интрона	Размер, п.о.
		CysThr	GluAsn		
1	160**	TGCACCgtaagtttagaggg	gcttcgccccagGAGAAC	1	5200***
2	227	GGCCAGgtgagggcggg	tggaccgaagaagAACTGA	2	235
3	18	CTAAAGgtaatgaacacgg	tttctctctcagTCCCG	3	421
4	805	Консенсусная последовательность:			
		A a	cccccccc		
		донор: AGgt agt	акцептор: ncagG		
		C g	tttttttt		

\* Нуклеотиды экзона изображены прописными символами, последовательности интронов – строчными.

\*\* Размер 1-го экзона вычислен с учетом данных картирования возможного транскрипционного стартового сайта.

\*\*\* Размер 1-го интрона определен по результатам рестриктового картирования гена, размеры остальных интронов установлены прямым секвенированием.

[17], по данным рестриктового картирования, область геномной ДНК между сайтами *SmaI-SmaI*, содержащая последовательность 1-го экзона, имеет размер 500 п.о., а сайт *SmaI*, картированный в 1-м интроне, находится на расстоянии 100–120 п.о. от границы 1-го экзона. Однако, как следует из определенной нами полной нуклеотидной последовательности указанной области, ее размер составляет 375 п.о. При этом локализация сайта *SmaI* в 5'-фланкирующей области гена совпадает с опубликованными данными, однако сайт *SmaI* в 1-м интроне находится на расстоянии 13 п.о. от границы 1-го экзона (см. рис. 1 и 2). Кроме этого обнаружены многочисленные различия (точечные инсерции и делеции, нуклеотидные замены) при сравнении полученных нами данных с соответствующими регионами опубликованной последовательности (рис. 2). В районе –584 предполагаемого промоторного региона гена, по данным работы [17], имеется фрагмент длиной 38 п.о. (см. рис. 2), который не обнаружен нами при анализе соответствующей области двух независимых клонов. Напротив, также при анализе двух независимых клонов нами установлено наличие последовательности 25 п.о. (gtaccasaggtttctcgtctgta) в области (–644 ... –619), выделенной на рис. 2 серым прямоугольником, гомологичной упомянутому фрагменту 38 п.о. работы [17]. С учетом обнаруженных различий совпадение с опубликованной последовательностью гена нейрогранина человека в определенном нами районе (–1098 ... –1) составляет 93.5%, а для последовательностей 2-го и 3-го интронов – 95%. В опубликованной последовательности [17] 5'-фланкирующей области гена

размером 3 т.п.о. отсутствует рестриктный сайт *HindIII*, наличие которого доказано нами с помощью рестриктового анализа и частичного секвенирования соответствующей области (см. рис. 1). Следует отметить, что все обнаруженные расхождения затрагивают некодирующую область и, возможно, объясняются природной вариабельностью гена *hng*. Сравнение кодирующих регионов гена с последовательностями кДНК, имеющимися в настоящее время в базах данных (EMBL acc: U89165, Y09689; dbEST id: 426332), не выявило каких-либо различий.

#### Картирование транскрипционного стартового сайта

Чтобы определить стартовый сайт транскрипции гена нейрогранина человека, нами проведен анализ poly(A)<sup>+</sup>-РНК из коры головного мозга человека в реакции достраивания с помощью обратной транскриптазы <sup>32</sup>P-меченого 29-членного олигонуклеотидного праймера, соответствующего последовательности кДНК в позиции –77 ... –106. В качестве контроля тот же эксперимент проведен с poly(A)<sup>+</sup>-РНК из мозжечка человека, где экспрессия гена *hng* не обнаруживается. В качестве маркера использовали продукт секвенирования фрагмента *SmaI-SmaI* (–344 ... +31) с тем же <sup>32</sup>P-меченым праймером (рис. 3). Из обнаруженных нескольких возможных стартовых сайтов транскрипции в районе –144 ... –172 (рис. 3) наиболее четко картируется сайт –144 ... –145. Этот сайт хорошо соотносится с размерами 5'-нетранслируемых областей последовательностей полных кДНК *hNG*, имеющихся в компьютерных базах

данных (EMBL ACC: U89165; Y09689; dbEST id: 426332). Возможно, существует и обсуждавшийся в работе [17] сайт транскрипции в позиции -235 от ATG-кодона (ССАСТТС, -237 ... -230), соответствующий Inr-мотиву (PYPYA<sub>+</sub>NT<sub>+</sub>3PYPY) в промоторах, характеризующихся отсутствием ТАТА-бокса [18]. Однако наличие этого сайта транскрипции гена *hng* не было подтверждено авторами экспериментально [17].

#### Анализ 5'-фланкирующей области гена

Используя компьютерную программу TFSEARCH (Japanese Genome Net), мы нашли несколько потенциальных сайтов связывания транскрипционных факторов выше старта инициации транскрипции гена *hng* (позиции -144 ... -172): AP2 (-188 ... -177) и (-257 ... -250), Sp1 (-296 ... -288) и консервативная область (CCCCGCCACCC) перекрывающихся сайтов Sp1-AP2 (позиции -229 ... -218, см. рис. 2), которая определяет основную промоторную активность гена *rng* [10]. В районе (-847 ... -923) мы нашли несколько ТАТА-подобных мотивов (рис. 2), которые располагаются примерно в той же позиции в промоторах генов РКС (протеинкиназа С) и *rng*. Этот регион обладает способностью связывать нейроспецифичный ядерный белок (20 кДа), который, возможно, участвует в регуляции транскрипции этих двух генов [10].

#### Хромосомная локализация гена нейрогранина человека

Для определения хромосомной локализации гена нейрогранина человека мы поместили рекомбинантный фаг 2HGRC (см. раздел "Клонирование геномной ДНК") флуоресцентной меткой Cy-3 в стандартной реакции нук-трансляции и затем гибридизовали меченую ДНК с препаратами метафазных хромосом человека. Флуоресцентные сигналы видны как симметричные точки на двух митотических метафазных хроматидах спаренных 11-х хромосом (рис. 4а) при отсутствии других специфических сигналов. Гибридизация с высоко разрешенными хромосомами позволила локализовать ген более точно в районе 11q23.3-q24.1 (рис. 4б).

Таким образом, ген нейрогранина человека локализован в дистальном регионе длинного плеча

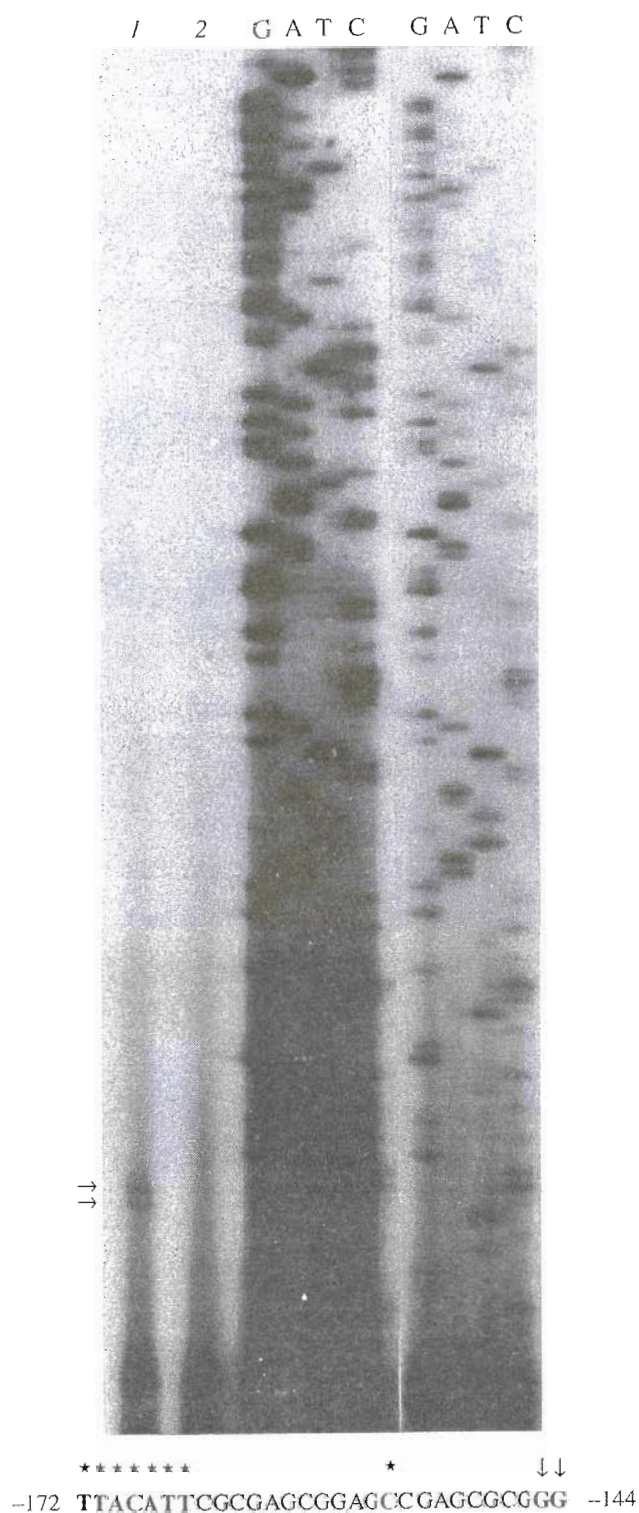


Рис. 3. Картирование сайта транскрипции гена *hng* (анализ poly(A)<sup>+</sup>-РНК в реакции достраивания олигонуклеотидного праймера с помощью обратной транскриптазы). Анализ poly(A)<sup>+</sup>-РНК: 1 – из коры головного мозга человека; 2 – из мозжечка человека (контроль); GATC – маркерный продукт секвенирования анализируемого региона. В нижней части рисунка показана нуклеотидная последовательность (-172 ... -144) гена нейрогранина человека (нумерация соответствует рис. 2). Жирным шрифтом выделены нуклеотиды, картированные как сайты транскрипции. Стрелками обозначены сигналы на радиоавтографе и соответствующие им нуклеотиды последовательности. Звездочками обозначены нуклеотиды, которым соответствуют слабые сигналы (на рисунке не видны).

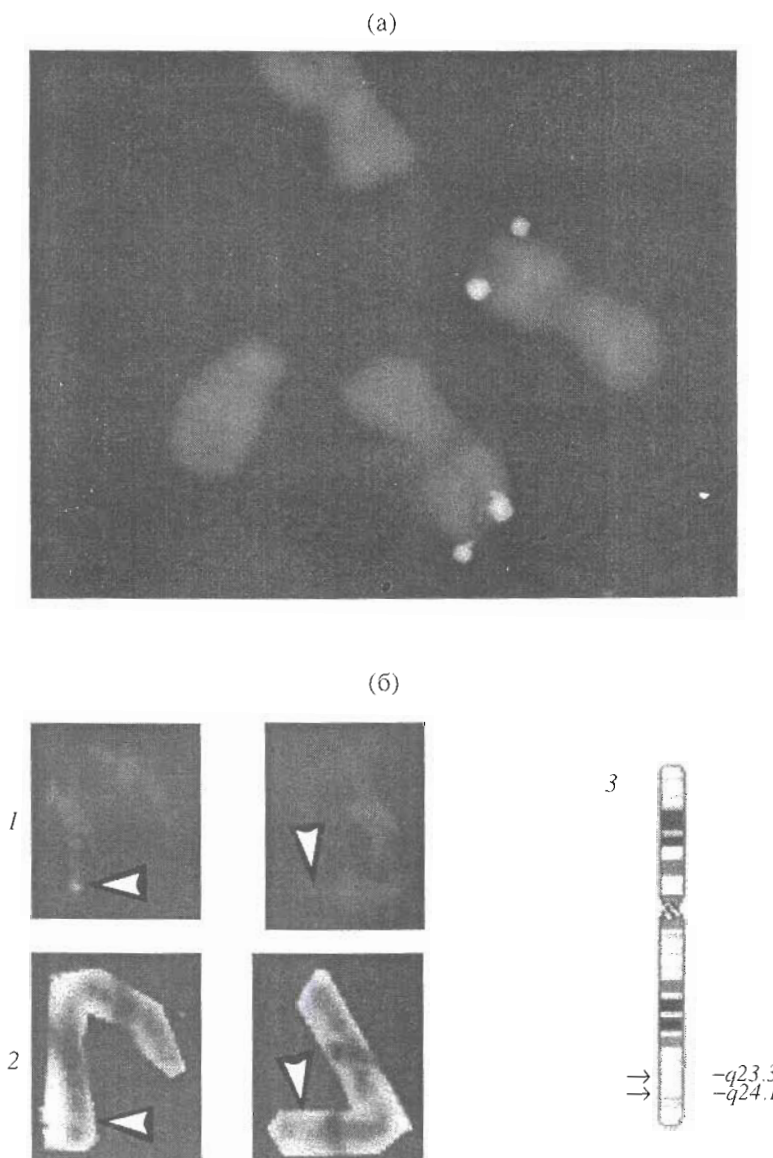


Рис. 4. Картирование гена нейрогранина человека на 11-й хромосоме. (а) – частичная метафаза, окрашенная DAPI. Видны гибридационные сигналы Су-меченого *hng* на 11-й хромосоме (11q23–q24). (б) – гибридационные сигналы на высокоразрешенных хромосомах в районе 11q23.3–q24.1. На темном поле белыми стрелками показана локализация гибридационных сигналов. 1 – DAPI-окрашенные хромосомы; 2 – DAPI-окрашенные инвертированные хромосомы; 3 – цитогенетическая карта 11-й хромосомы человека. Стрелками показано соответствие сигналов FISH району 11q23.3–q24.1.

ча 11-й хромосомы (11q23.3–q24.1). Этот результат согласуется с картированием гена *hng* в том же регионе (11q24) с помощью другого метода – ПЦР-скрининга радиоактивной гибридационной панели [17]. Хромосома 11 содержит большое количество генов, экспрессирующихся в мозгу человека [19]. Наиболее близко к картированной нами области находится ген *NCAM* (11q23.3), который играет важную роль в развитии и функционировании нервной системы [20]. Кроме того, ген Charcot-Marie-Tooth, тип 4b (CMT4B), – ауто-сомная рецессивная нейропатология, связанная с

демиелинизацией, находится в локусе 11q23 [21]. Пациенты с терминальными делециями длинного плеча 11-й хромосомы (синдром Якобсона OMIM 147791) также имеют anomalies нервной системы (умственная и двигательная заторможенность, ненормальная миелинизация), что доказывает отсутствие важных генов, необходимых для правильного функционирования нервной системы [22]. Поэтому можно предположить, что концевой регион хромосомы 11q содержит большое количество генов, важных для правильного развития и функционирования нервной системы.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Выделение и анализ геномных клонов.** Геномную библиотеку человека в фаговом векторе  $\lambda$ FixII (Stratagene, США,  $10^6$  рекомбинантов) рассевали, переносили на нитроцеллюлозные фильтры и скринировали гибридизацией с  $^{32}$ P-меченой кДНК hNG в гибридизационном буфере (500 мМ натрий-фосфат, pH 7.2; 7% SDS; 1 мМ EDTA). Отмывку проводили в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 6.5, при 65°C 3 раза по 15 мин. Из отобранных положительно гибридизовавшихся фаговых клонов была выделена ДНК, которую затем иммобилизовали на нитроцеллюлозных мембранах (дот-блот) и анализировали при помощи гибридизации с 5'- и 3'-фрагментами кДНК для того, чтобы реконструировать полноразмерный ген. Крупные перекрывающиеся фрагменты ДНК клонировали в плазмидный вектор pBluescript KS+ (Stratagene, США). Проводили подробное рестриктивное картирование плазмидных клонов и их частичное секвенирование. Нуклеотидную последовательность определяли по Сэнгеру с ДНК-полимеразой фага T7 (Pharmacia) и меткой  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ , используя набор реактивов и протокол реакции фирмы Pharmacia. Строение GC-богатых районов было уточнено повторным секвенированием с 7-деза-дGTP.

**Анализ poly(A)<sup>+</sup>-РНК с помощью реакции достраивания олигонуклеотидного праймера.** Этот эксперимент проведен с  $^{32}$ P-меченым синтетическим олигонуклеотидным праймером (5') GCTCTGGGGCAGTCCGGCCGCCAGCCGACC, гомологичным последовательности (-77 ... -106) (рис. 2) 5'-области гена нейроглиина человека. 10 пмоль праймера метили по 5'-концу с помощью T4-полинуклеотидкиназы и  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , очищали от невключившейся метки хроматографией на колонке с сефадексом G-50 (Pharmacia) и затем высушивали под вакуумом. 5 мкг poly(A)<sup>+</sup>-РНК выделенных из тотальной РНК коры головного мозга и мозжечка человека отжигали в 20 мкл буфера (250 мМ трис-НСl, pH 8.3; 15 мМ MgCl<sub>2</sub>; 375 мМ KCl) с меченым праймером в течение 4 ч при 58°C. Сразу после отжига добавляли 10 мкл 0.1 М DTT, 5 мкл 10 мМ dNTP и доводили объем до 100 мкл стерильной деионизированной H<sub>2</sub>O. В реакционную смесь добавляли 400 ед. обратной транскриптазы M-MuLV (Super Script II, Gibco, BRL) и инкубировали 50 мин при 42°C. По окончании реакции смесь переосаждали 96% этанолом с добавлением 10 мкг тРНК в качестве соосадителя. К сухому осадку добавляли буфер для нанесения (95% формамид; 0.02% бромфеноловый синий; 0.02% ксиллолцианол), денатурировали 5 мин при 80°C и разделяли в 5% денатурирующем ПААГ с 8 М мочевиной.

**Определение хромосомной локализации гена нейроглиина человека.** Препараты хромосом получены из стимулированных фитогемагглютинином культур лимфоцитов крови. Высокоразрешенные хромосомы получены после синхронизации метотрексатом.

**Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH).** В качестве зонда была использована ДНК фага (FixII-вектор, Stratagene, США), содержащая фрагмент геномной ДНК человека (18 т.п.о.) с полной последовательностью гена *hng*. Для мечения пробы использован стандартный протокол ник-трансляции (Gibco BRL Nick Translation System): 1 мкг ДНК метили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 0.2 мМ dATP, dGTP, dTTP и 2.5 нмоль Су-3-dCTP (Amersham). Меченую ДНК дважды переосаждали этанолом с добавлением измельченной ультразвуком ДНК из спермы лосося в качестве соосадителя. Осадок ДНК растворяли в 20 мкл гибридизационного раствора, содержащего 10% декстрансульфата, 50% деионизованного формамида в 2xSSC, до концентрации 50 нг/мкл (исходный раствор) и хранили при -20°C.

Гибридизацию in situ проводили по следующему протоколу: препараты с фиксированными лимфоцитами были обработаны 2xSSC в течение 30 мин, затем обезвожены последовательно в 70, 80 и 95% этаноле (по 2 мин в каждом растворе). Для денатурации препараты ДНК инкубировали 2 мин в 70% растворе формамида в 2xSSC при 72°C. Далее обезвоживали последовательно в охлажденных растворах 70, 80 и 95% спирта и высушивали на воздухе.

**Хромосомная подавляющая in situ гибридизация (CISS).** Меченую пробу ДНК растворяли в гибридизационном растворе (концентрации 10 нг/мкл) и добавляли 50-кратный избыток Cot-1 DNA (Gibco BRL). Этот раствор выдерживали 10 мин при 70°C и охлаждали на льду, затем нагревали 45 мин до 37°C и наслаивали на препараты (5 мкл пробы на покровное стекло размером 18 × 18 мм). Гибридизацию проводили в течение 18 ч при 37°C. Далее препараты выдерживали 15 мин в 50% растворе формамида в 2xSSC при 43°C и слабым перемешивании, затем 8 мин в 2xSSC при 37°C. Препараты короткое время инкубировали в 2xSSC при комнатной температуре и добавляли раствор, препятствующий затуханию флуоресценции, - Vecta-Shield (Vector Laboratories, Inc., США), содержащий 0.1 мкг/мл DAPI (Serva) для окрашивания.

Для микроскопии использовали фотомикроскоп DMRB/E (Leica) с фильтрами: A (Leica) для DAPI-флуоресценции и N2 (Leica) - для Су-3-сигналов. Использовали иммерсионную оптическую систему Plan-Neofluar 100x/1.30 (Leica). Снимки получены на микроскопе Axiophot (Zeiss), оборудованном цифровой камерой Hamamatsu Photonics

C5985 с пакетом программ IKOS3 (Metasystems) для обработки цифровых снимков.

Частичная нуклеотидная последовательность гена нейрогранина человека, представленная в настоящей работе, депонирована в базе данных EMBL/GenBank под номерами Y15058 и Y15059.

Авторы выражают благодарность Dr. H. Neitzel и Н. Тоеппес (Институт генетики человека, Вирхов-госпиталь, Берлин) за предоставленную возможность работы с системой цифровой обработки снимков.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baudier J., Deloulme J.C., Van Dorsselaer A., Black D., Matthes H.W.D. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 229–237.
2. Watson J.B., Battenberg E.F., Wong K.K., Bloom F.E., Sutcliffe J.G. // J. Neurosci. Res. 1990. V. 26. P. 397–408.
3. Klann E., Chen S., Sweatt J.D. // J. Neurochem. 1992. V. 58. P. 1576–1579.
4. Deloulme J.C., Sensenbrenner M., Baudier J. // FEBS Lett. 1991. V. 282. P. 183–188.
5. Coggins P.J., Zwiers H. // J. Neurochem. 1991. V. 56. P. 1095–1106.
6. Repressa A., Deloulme J.C., Sendebrenner M., Ben-Ari Y., Baudier J. // J. Neurosci. 1990. V. 10. P. 3782–3792.
7. Watson J.B., Sutcliffe J.G., Fisher R.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 8581–8585.
8. Piosik P.A., van Groenigen M., Ponne N.J., Bolhaus P.A., Bass F. // Brain Res. Mol. 1996. V. 29. P. 119–130.
9. Iniguez M.A., de Leces L., Guadano-Ferraz A., Morte B., Gerendasy D., Sutcliffe J.G., Bernal J. // Endocrinology. 1996. V. 137. P. 1032–1041.
10. Sato T., Xiao D., Li H., Huang F.L., Huang K. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 10314–10322.
11. Karns L.R., Shi-Hung Ng, Freeman J.A., Fishman M.C. // Science. 1987. V. 236. P. 597–600.
12. Gribkoff V.A., Hammang J.P., Baetge E.E. // Mol. Brain Res. 1995. V. 30. P. 29–36.
13. Rose S.D., Cook H.W., Palmer F.B., Ridgway N.D., Byers D.M. // J. Neurochem. 1994. V. 63(6). P. 2314–2323.
14. Мерцалов И.Б., Гундельфингер Э., Цетлин В.И. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 366–369.
15. Yavahery R., Khachi A., Lo K., Zenie-Gregory B., Smale S. // Mol. Cell. Biol. 1994. V. 14. P. 116–127.
16. Breathnach R., Chambon P. // Annu. Rev. Biochem. 1981. V. 50. P. 349–383.
17. Martinez de Aretza C., Jurado L.P., Bernal J., Coloma A. // Genomics. 1997. V. 41. P. 243–249.
18. Mount S.M. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. P. 459–472.
19. Slorach E.M., Polymeropoulos M.H., Evans K.L., Seawright A., Fletcher J.M., Porteous D.J., Brookes A.J. // Cytogenet. Cell. Genet. 1995. V. 70. P. 71–75.
20. Bruemendorf T., Rathjen F.G. Protein Profile. L.: Acad. Press, 1995. V. 2. P. 963–1108.
21. Bolino A., Brancolini V., Bono F., Bruni A., Gambardella A., Romeo G., Quattrone A., Devoto M. // Hum. Mol. Genet. 1996. V. 5. P. 1051–1054.
22. Pivnick E.K., Velagaleti G.V.N., Wilroy R.S., Smith M.E., Rose S.R., Tipton R.E., Tharapel A.T. // J. Med. Genet. 1996. V. 33. P. 772–778.

## The Structure and Chromosomal Localization of the Human Neurogranin Gene

I. B. Mertsalov\*, M. Stumm\*\*, P. Wieacker\*\*,  
S. tom Dieck\*\*\*, E. Gundelfinger\*\*\*, and V. I. Tsetlin\*

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

\*\*Otto-von-Guerike Hospital, Magdeburg University, FGR

\*\*\*Federal Institute for Neurobiology, Magdeburg, FGR

A 12.5-kb DNA fragment containing the entire human neurogranin gene (*hng*) was isolated from the genomic phage library using the human neurogranin (hNG) cDNA as a probe. The gene consists of four exons and three introns. The first two exons include the nucleotide sequence that encodes the complete 78-amino acid sequence of neurogranin. It is shown that the genome organization of *hng* is essentially similar to that of the homologous rat neurogranin gene (*rng*). The *hng* gene has several potential transcription start sites, and the promoter region is characterized by the absence of the CCAAT and TATA boxes in the proximal region upstream from the transcription start sites. The 5'-flanking region of *hng* has a domain with multiple AT-rich motifs, which is similar to the region present nearly at the same position in the promoter of *rng*. It was shown by fluorescence *in situ* hybridization that *hng* is located on chromosome 11 in the region 11q23.3–q24.1.

Key words: neurogranin, RC3, human chromosome 11