



УДК 577.322.54

ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОСТЬ ПРОДУКТОВ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА мРНК МЫШИ, КОДИРУЮЩЕЙ НОВЫЙ БЕЛОК ХАМПИНА, ГОМОЛОГИЧНЫЙ БЕЛКУ MSL-1 ДРОЗОФИЛЫ

© 2005 г. Р. И. Дмитриев*, Н. Б. Пестов*^{***}, Т. В. Корнеев*^{***},
А. В. Герасимова*, Х. Жао**^{*}, Н. Н. Модянов**^{*},
М. Б. Костина*, М. И. Шапаронов**[#]

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/110;

**Медицинский колледж Огайо, Департамент фармакологии, сердечно-сосудистой
биологии и метаболических болезней

Поступила в редакцию 23.08.2004 г. Принята к печати 28.02.2005 г.

В геноме ряда млекопитающих обнаружен однокопийный ген, кодирующий белок, названный нами хампином. Поиск гомологов в базах данных обнаружил отдаленный гомолог хампина – хорошо известный белок дрозофилы MSL-1 (male-specific lethal 1). В результате альтернативного сплайсинга образуется несколько структурных вариантов мРНК хампина, кодирующих белки с различным набором доменов. Методом ОТ-ПЦР проанализирована тканеспецифичность экспрессии гена хампина в мышце. Показано, что продукты сплайсинга, кодирующие белки с укороченной N-концевой областью, имеют ограниченную тканевую специфичность и присутствуют только в семенниках. В то же время мРНК остальных вариантов хампина детектируются во всех исследованных тканях организма, имея сравнимый уровень экспрессии. С помощью поликлональных антител, полученных к рекомбинантному хампину мыши, показано, что по крайней мере один из вариантов хампина локализуется преимущественно в ядре. Обсуждаются особенности первичной структуры и возможные функции хампина как члена семейства хампин/MSL-1.

Ключевые слова: белок MSL-1, белок-белковые взаимодействия, альтернативный сплайсинг, β-м-субъединица.

ВВЕДЕНИЕ

Определение структуры ряда геномов животных позволило обнаружить тысячи новых генов, кодирующих белки с неизвестными свойствами. Отсутствие у таких белков очевидной гомологии или вообще какого-либо сходства с известными белками не позволяет выдвинуть хоть сколь угодно обоснованную гипотезу об их функции и определить пути для ее проверки. Изучение свойств и физиологической роли новых генов и кодируемых ими белков – важнейшая, хотя и крайне трудная задача современной протеомики.

Данная работа является начальным этапом изучения функции одного из таких гипотетических белков, родственного хорошо известному белку дрозофилы MSL-1 [1] и названного нами хампином. Белок MSL-1 (male-specific lethal 1, дословно “самец-специфичный летальный-1”) – важный компонент рибонуклеопротеидного комплекса “компенсасомы”, избирательно повышающей активность единственной X-хромосомы самцов, что необходимо для выравнивания уровня транскрипции генов у самцов и самок дрозофилы [2]. В то же время у мыши и человека используются иные механизмы компенсации разницы хромосомного набора: так, у млекопитающих хорошо изучен механизм подавления активности одной X-хромосомы самок [3]. Таким образом, хампин является новым белком с неизвестными структурно-функциональными свойствами. Целью данной работы было определение его первичной структуры и изучение разнообразия вариантов сплайсинга его мРНК.

Сокращения: EST – маркеры экспрессируемых последовательностей; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; M-MLV – вирус мышинной лейкемии Мэлони; X,K-АТФ-аза – (Na⁺,H⁺),K⁺-транспортирующая АТФ-аза; мРНК – матричная РНК; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции; βм-субъединица – β-субъединица семейства X,K-АТФ-аз, специфичная для мышечной ткани.

[#]Автор для переписки (эл. почта: korn@mail.ibch.ru; тел.: (095) 330-65-74).

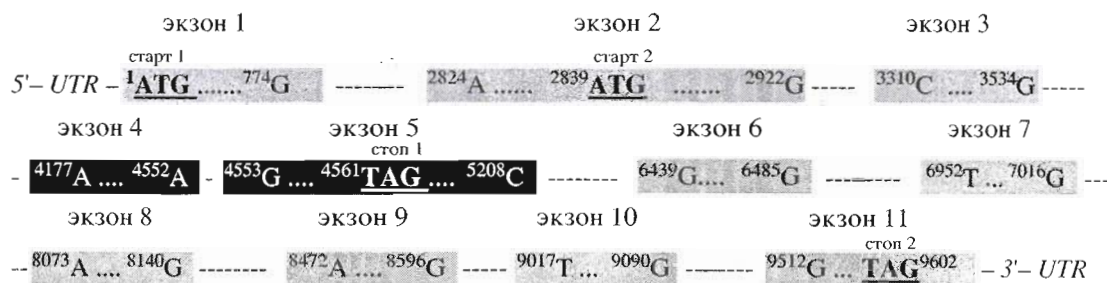


Рис. 1. Схема расположения экзонов на нуклеотидной последовательности гена, кодирующего хампин мыши (4121402D02Rik), полученная на основании сопоставления структуры геномной ДНК со структурами мРНК. Нумерация начинается с первого нуклеотида (А) первого транслируемого кодона ("старт 1") и заканчивается нуклеотидом G последнего стоп-кодона ("стоп 2"). Жирным подчеркнутым шрифтом выделены альтернативные сайты инициации и терминации трансляции. UTR – нетранслируемые участки. Черным цветом выделены экзоны 4 и 5, кодирующие полипептид, идентифицированный при поиске партнеров β m.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фрагмент кДНК неизвестного белка был впервые обнаружен нами при скрининге библиотеки кДНК скелетной мышцы крысы, проведенном при помощи бактериальной двугибридной

системы с целью выявления белков, взаимодействующих с β m-субъединицей X,K-АТФ-аз, специфичной для мышечной ткани [4]. Результаты скрининга указывали на то, что эктодомен β m способен связываться *in vivo* с фрагментом гипотетического белка, имеющим структуру

-SSEMEDLPYLSTTEMYLCRWHPPPSPLPLRESSPKKEETVASKA.

Поскольку β m, в отличие от других известных β -субъединиц X,K-АТФ-аз, локализуется во внутриклеточных мембранах, а не в плазматической мембране [5], мы предположили, что белок, кодируемый обнаруженной нами кДНК, связывая β m-субъединицу, мешает ее транслокации к плазматической мембране. По этой причине гипотетический белок был назван нами хампином (от англ. *hamper*, мешать). Последующий и более тщательный анализ показал, что вероятность прямого взаимодействия β m и хампина, которое могло бы играть какую-либо физиологическую роль, крайне мала по нескольким причинам. Во-первых, эктодомен β m экспонирован в люмен (полость) эндоплазматического ретикулума, а анализ структуры хампина указывает на его преимущественно ядерную локализацию. Таким образом, возникает серьезная топологическая проблема для их взаимодействия. Во-вторых, что наиболее важно, не удалось получить подтверждения взаимодействия β m-субъединицы и хампина при использовании дрожжевой двугибридной системы, т.е. альтернативной системы скрининга. В-третьих, расширенный скрининг библиотек кДНК выявил, что эктодомен β m способен взаимодействовать с целым рядом сравнительно коротких пептидов – фрагментов самых разнообразных белков (результаты не представлены). В силу этих причин весьма вероятно, что взаимодействие "фрагмент хампина- β m" является артефактом, лишенным физиологического смысла.

В базах данных нуклеотидных последовательностей (www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink; <http://genome.ucsc.edu> и других) был найден ген, кодирующий неизвестный белок мыши, включающий идентифицированный нами фрагмент хампина. Этот ген, в настоящее время условно называемый 4121402D02Rik, расположен на хромосоме 11 (11qD). По данным компьютерного анализа, он включает 10 интронов и 11 экзонов, а его протяженность составляет около 10 т. п. о. (рис. 1).

В качестве первого шага по характеристике гена хампина было решено провести анализ первичной структуры его продуктов и эффективности его экспрессии в различных тканях. При анализе баз данных маркеров экспрессируемых последовательностей (EST) мы обнаружили по крайней мере четыре варианта мРНК мыши, кодирующие полипептиды разной длины, являющиеся, по-видимому, продуктами альтернативного сплайсинга первичного транскрипта гена хампина. На рис. 2 представлена схема образования вариантов мРНК хампина, разнообразие которых обусловлено использованием различного набора экзонов. На основании предполагаемого числа аминокислотных остатков в белковых продуктах этих мРНК для них предложена следующая номенклатура (см. мини-таблицу на рис. 2): хампин А (экзоны 1, 3, 4, 6–11, 616 а.о.), хампин В (экзоны 1, 3, 4, 7–11; 600 а.о.), хампин С (экзоны 1, 3–5; 463 а.о.) и хампин D (экзоны 2–4, 7–11; 370 а.о.). При этом мы учли, что последовательность,

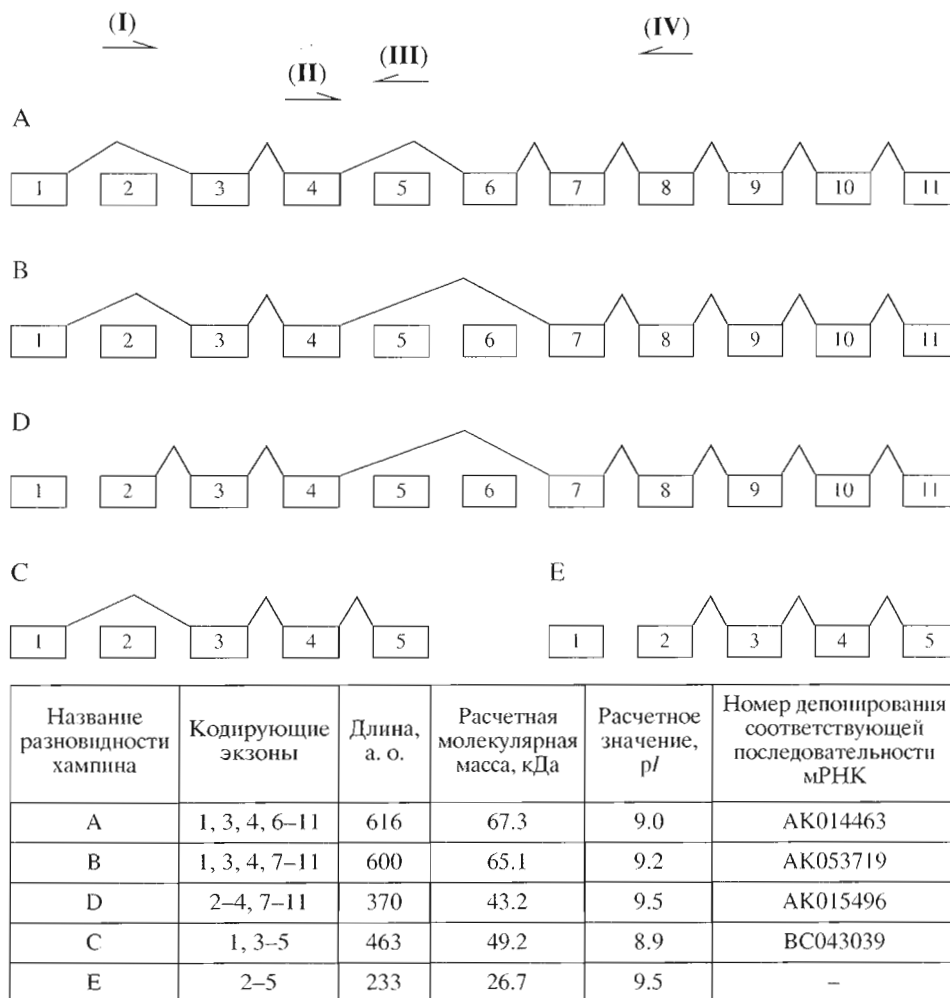


Рис. 2. Схема образования альтернативных продуктов сплайсинга мРНК, кодирующей хампина. Экзоны показаны прямоугольниками. Представлены все обнаруженные варианты мРНК (А–Е), а также указаны (в мини-таблице) теоретические молекулярные массы и изоэлектрические точки белковых продуктов – хампинов А–Е. В верхней части указано положение праймеров, использованных для ОТ-ПЦР.

депонированная в базу данных под номером AK053719, имеет ошибку, приводящую к сдвигу рамки считывания; экзоны 5 и 11 содержат стоп-кодона; кДНК хампина D не содержит последовательности экзона 1, поэтому трансляция этого варианта сплайсинга должна начинаться со стартового кодона 2, а мРНК хампинов А, В и D, по всей видимости, обладают одинаковыми 3'-нетранслируемыми участками (3'-UTR), отличными от такового у мРНК хампина С.

Для определения тканевой специфичности продуктов альтернативного сплайсинга гена хампина мы провели анализ содержания различных вариантов мРНК хампина в тканях мыши с помощью полимеразной цепной реакции после реакции обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). Для этого использовали праймеры, позволяющие выявить продукты сплайсинга (таблица). В качестве

положительного контроля были выбраны праймеры, специфичные к кДНК глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH). Результаты анализа ряда тканей новорожденной и взрослой мыши (рис. 3а) показывают, что мРНК хампина С присутствует во всех исследованных тканях. мРНК хампинов А и В также обнаруживаются во всех тканях, однако интенсивность сигналов сильно варьирует, что указывает на неравномерность их распределения в организме. Транскрипты, кодирующие хампин D, были обнаружены только в семенниках.

Используя пару праймеров (I) и (III), мы показали существование еще одного продукта сплайсинга мРНК, кодирующего хампин E (экзоны 2–5; 233 а.о.), неизвестного ранее из баз данных EST. Этот вариант, самый короткий из обнаруженных, также был выявлен только в семенниках мыши.

Олигонуклеотидные праймеры, использованные для изучения тканеспецифичности экспрессии гена хампина с помощью ОТ-ПЦР*

Вариант сплайсинга мРНК хампина	Использованная пара праймеров	Длина продуктов ПЦР, п. о.
A	(II) + (IV)	391
B	(II) + (IV)	343
C	(II) + (III)	256
D	(I) + (IV)	757
E	(I) + (III)	671

* Последовательности олигонуклеотидов приведены в "Эксперимент. части", а их соответствие эксонам гена хампина показано на рис. 2.

Таким образом, данные ОТ-ПЦР показывают, что разновидности мРНК хампинов А, В и С присутствуют во всех исследованных тканях мыши, причем не было обнаружено зависимости уровня экспрессии гена от возраста организма (рис. 3а). Два других продукта сплайсинга мРНК, соответ-

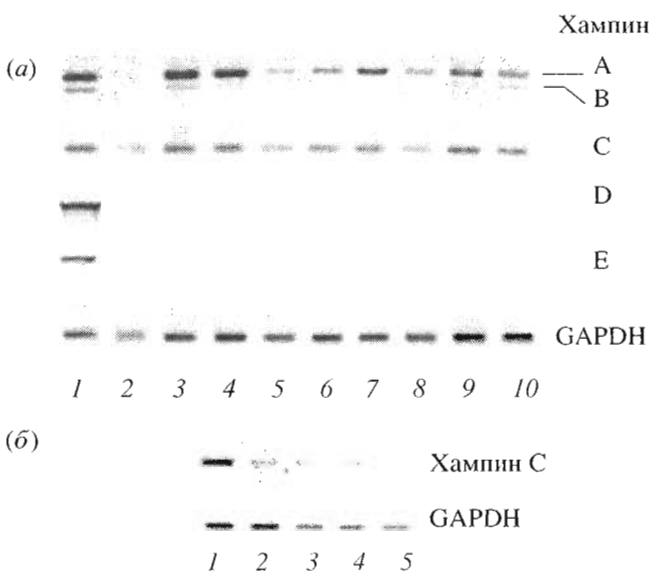


Рис. 3. Электрофоретический анализ продуктов ОТ-ПЦР, полученных на матрице РНК из тканей мыши (а) и человека (б) с парами праймеров, выявляющими продукты альтернативного сплайсинга гена хампина. Показан также анализ продуктов ОТ-ПЦР, проведенной с использованием праймеров, специфичных для мРНК GAPDH (положительный контроль). (а): Ткани мыши: 1 – семенники, 2 – селезенка, 3 – мозг, 4 – почки, 5 – сердце, 6 – скелетные мышцы, 7 – печень, 8 – сердце (новорожденные), 9 – скелетные мышцы (новорожденные), 10 – мозг (новорожденные); (б): ткани человека: 1 – плацента, 2 – скелетные мышцы, 3 – сердце, 4 – семенники, 5 – печень.

ствующие хампинам D и E, обладают высокой тканевой специфичностью и обнаружены исключительно в семенниках. Любопытно, что оба эти полипептида содержат *N*-концевую последовательность, которая кодируется экзоном 2, а не экзоном 1, в противоположность хампинам А, В и С, не имеющим тканевой специфичности.

Мы исследовали также экспрессию гена хампина в тканях человека. В силу ограниченной доступности образцов тканей человека была осуществлена детекция только мРНК хампина С. Результаты ОТ-ПЦР (рис. 3б) с парой праймеров (II) и (III) (таблица) указывают на то, что мРНК, кодирующая хампин С (и, возможно, хампин Е) человека, присутствует во всех исследованных тканях, причем наибольшее содержание наблюдается в плаценте. Таким образом, данные эксперименты не обнаружили существенной разницы в тканеспецифичности мРНК хампина С у мыши и человека.

Следующим этапом работы стала иммунодетекция хампина в тканях мыши. Для этого мы сконструировали плазмидную ДНК, кодирующую полипептид, содержащий последовательность Leu²⁵⁹-Ala⁴⁶³ хампина С, а также гексагистидиновую последовательность в *N*-концевой области. Следует заметить, что за исключением трех *C*-концевых аминокислотных остатков, этот участок присутствует во всех разновидностях хампина мыши. Продукт экспрессии этой плазмидной ДНК в клетках *E. coli* был очищен с помощью металлоаффинной хроматографии. Полученный рекомбинантный белок имел электрофоретическую подвижность, соответствующую расчетным значениям (около 25 кДа, не представлено) и был использован нами в качестве антигена для полу-

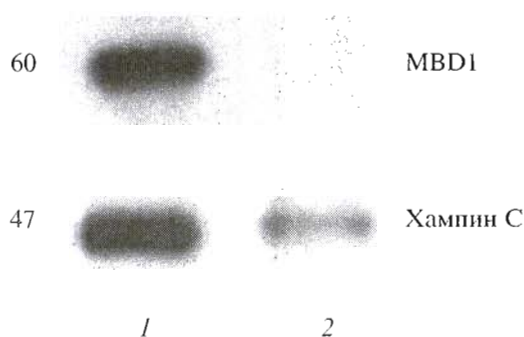


Рис. 4. Иммунодетекция хампина С во фракции ядер печени мыши. Электрофорез в 10% SDS-ПААГ белков ядерной фракции (1) и надосадочной жидкости, обогащенной цитозольными и внеклеточными белками (2), с последующей иммунодетекцией с кроличьими поликлональными антителами против рекомбинантного фрагмента хампина Leu²⁵⁹-Ala⁴⁶³. Показано также распределение маркерного белка ядер – метил-СrG-связывающего белка MBD1. Нанесение – 20 мкг суммарного белка на лунку.



Рис. 5. Аминокислотные последовательности хампинов мыши. Нумерация аминокислотных остатков соответствует хампину А, кодируемому наиболее протяженной мРНК. Показаны аминокислотные остатки других вариантов, отсутствующие в варианте А. Аминокислотные остатки хампинов В, С, D, E, идентичные таковым у варианта А или не показаны, или промаркированы точками. Справа указано приблизительное расположение гипотетических доменов (I, Псс, III и IVpehe). Последовательность Pro-богатого участка выделена курсивом, регион coiled coil подчеркнут пунктирно-штриховой линией, FHA-участок выделен рамкой. Аминокислотные остатки, консервативные для всех позвоночных, выделены жирным шрифтом, остатки консервативных доменов Псс и IVpehe, идентичные как для хампинов позвоночных, так и для хампина пчелы, выделены серым цветом. Те из консервативных остатков, которые присутствуют также и в MSL-1 *D. melanogaster* и *D. pseudoobscura*, выделены черным цветом.

чения кроличьих поликлональных антител. С помощью полученной антисыворотки в ядерной фракции печени мыши был выявлен белок (рис. 4) с молекулярной массой около 47 кДа, что соответствует теоретически рассчитанному значению для хампина С (49 кДа). В то же время сигнал, соответствующий хампину А (около 67 кДа), оказался гораздо более слабым (не представлено), что может быть вызвано меньшей стабильностью этого продукта, меньшим его содержанием в клетке или иной внутриклеточной локализацией.

На рис. 5 приведены аминокислотные последовательности хампинов мыши. Анализ первичной структуры хампинов с помощью программы Motif-Scan [7] обнаружил наличие следующих участков: так называемого FHA-участка (Forkhead-associated); разделенного на две части сигнала ядерной локализации NLS BP (Bipartite Nuclear Localization Signal) в последовательности KRHAKLELEDEKRRKRWDI; Pro-богатого региона низкой сложности, почти полностью занимающего N-концевую часть молекулы; и региона coiled-coil, богатого остатками Leu и Gln. В то же время не было обнаружено возможных трансмембранных α -спиральных участков. Наиболее протяженные хампины А и В содержат все вышеуказанные структурные компоненты, а укороченные с C-конца варианты С и E не содержат FHA-участок и сигнал ядерной локализации. Укороченные с N-конца разновидности D и E имеют только небольшой фрагмент coiled-coil и не имеют Pro-богатого региона. Несмотря на такую существенную разницу первичных

структур, значение pI любого из вариантов хампина выше 8.9 (рис. 2).

Нами был проведен тщательный поиск ортологов хампина в базах данных геномных и экспрессированных последовательностей, что позволило реконструировать почти полноразмерные аминокислотные последовательности хампинов курицы (*Gallus gallus*), лягушки (*Xenopus laevis*), некоторых рыб: рыбы-зебры (*Danio rerio*), форели (*Oncorhynchus mykiss*), иглобрюха (*Tetraodon nigroviridis*); а также пчелы (*Apis mellifera*) и отдельные участки хампина малярийного комара (*Anopheles gambiae*). Следует отметить, что поскольку структура N-концевой части хампина чрезвычайно вариабельна, к настоящему моменту не удалось выяснить аминокислотные последовательности N-концевых участков у этих животных. В то же время множественное выравнивание этих последовательностей однозначно выявляет два весьма консервативных участка (рис. 5, жирный шрифт и серый цвет). Нам не удалось обнаружить гомологичных по отношению к хампину мыши последовательностей в геномах бактерий, простейших, грибов, растений и низших животных, таких, как круглые черви (*Caenorhabditis elegans*). Все эти факты, в особенности отсутствие гена хампина у *C. elegans*, позволяют выдвинуть гипотезу об эволюционном происхождении хампина примерно во время отделения ветви истинновторичнополостных животных (*Coelomata*), у которых он в настоящее время и обнаруживается.

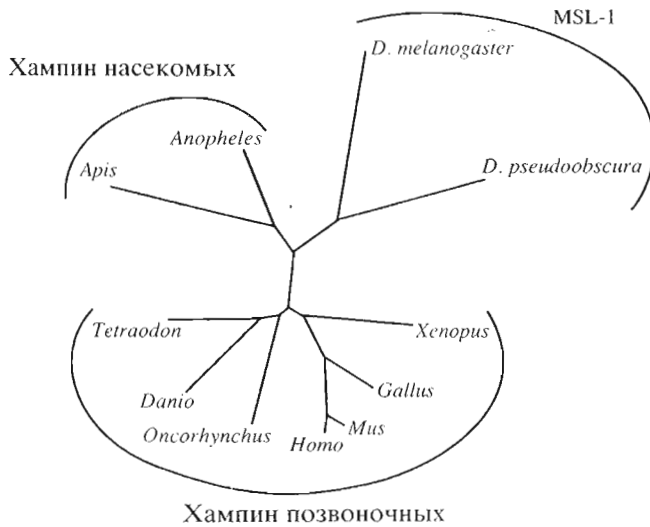


Рис. 6. Гипотетическое филогенетическое древо семейства хампина/MSL-1. Древо получено на основании множественных выравниваний всех доступных аминокислотных последовательностей хампинов и MSL-1, выведенных из нуклеотидных последовательностей геномов (*Apis*, *Anopheles*, *D. pseudoobscura*, *Gallus*, *Tetraodon*), полноразмерных кДНК (*D. melanogaster*, *Homo*, *Mus*) или EST (*Danio*, *Gallus*, *Oncorhynchus*, *Xenopus*). Большинство приведенных латинских названий родов и видов переведены в тексте.

Весьма любопытно, что в геномах двух видов дрозофилы (*D. melanogaster* и *D. pseudoobscura*) вместо гена хампина присутствует ген его гомолога MSL-1, который, в свою очередь, отсутствует в геноме пчелы и, скорее всего, также у малярийного комара. В 2003 г. в теоретической работе по эволюции компонентов компенсаторной системы И. Марин предположил, что гены, родственные *msh-1*, присутствуют у всех насекомых и позвоночных [8]. Согласно этому, хампин также следует именовать MSL-1. Сравнивая первичные структуры этих белков, Марин справедливо отметил присутствие консервативных остатков в районе coiled-coil и в С-концевом участке, который он предложил назвать доменом "pehe". То, что хампин и MSL-1 являются истинными гомологами не может вызывать сомнения. Однако в настоящее время, когда существует возможность сравнить большее количество аминокислотных последовательностей, автоматическое перенесение названия MSL-1 на хампин представляется преждевременным, так как может привести к неправильному пониманию функции последнего.

Наши выводы о структурно-функциональном различии MSL-1 и хампина основаны на следующих фактах: во-первых, количество идентичных у обоих белков остатков довольно невелико (рис. 5, выделены черным цветом). Например, в области coiled-coil наблюдается 43% идентичности между

последовательностями хампина мыши и пчелы и только 24% – между хампином пчелы и MSL-1 дрозофилы. Во-вторых, MSL-1 дрозофилы – гораздо более крупный белок, состоящий из более 1000 а.о., и все дополнительные участки его последовательности (например, "кислый" домен) не обнаруживаются в геномах других животных, в том числе и насекомых. В-третьих, MSL-1 имеет низкую степень консервативности внутри одного рода (рис. 6). Таким образом, не забывая об их родстве, следует различать хампин и MSL-1 (рис. 6). Возможно, что MSL-1 является белком, уникальным для одного из таксонов насекомых, включающего род *Drosophila*, но не пчел и малярийного комара. Представляется допустимым выдвинуть гипотезу о том, что ген *msh-1* произошел от гена хампина путем добавления дополнительных экзонов и интенсивной мутации всей новообразованной последовательности.

Сравнение последовательностей хампина, анализ консервативности и предсказание структурно-функциональных элементов дают основания для выделения четырех структурных доменов в молекулах протяженных разновидностей (А и В) хампинов позвоночных (рис. 5): домен I – богатый Pro, чрезвычайно вариабельный, последовательность низкой сложности; домен II – короткий консервативный домен, представляющий собой coiled-coil (в случае MSL-1 – это хорошо известная "лейциновая молния" [1]); домен III – умеренно консервативный; домен IV – консервативный, содержит сигнал ядерной локализации NLS BP и FHA-участок.

Возможно, что домен II участвует в процессах олигомеризации и/или связывания ДНК (как это показано для MSL-1). Наличие домена IV, содержащего участки FHA и NLS BP (см. выше), должно приводить к локализации белка в ядре, но это правило не считается строгим. Так, FHA-участок был первоначально идентифицирован у некоторых факторов транскрипции, а позднее был обнаружен во множестве других белков как эукариот, так и прокариот [9]. В то же время многие белки дрожжей и человека, содержащие такой участок, обнаруживаются в ядре и вовлечены в процессы репарации ДНК [10], остановки клеточного цикла [11] или процессинга гетероядерной мРНК [12]. Показано, что FHA-участок может связывать фосфореонин, фосфосерин и, в некоторых случаях, фосфотирозин [13]. Другие структурные особенности хампина – это наличие Gln- и Glu-богатых регионов в молекуле у хампинов А, В и С. Такие последовательности обнаруживаются во многих ядерных белках, например в ДНК-связывающем белке Zsc человека и мыши [14] или в белке SF3a120, входящем в состав малых ядерных рибонуклеопротеиновых частиц [15]. Таким образом, имеющиеся данные позволяют предположить, что все варианты хампина, особенно содержащие

домен IVpehe (разновидности A, B, D), имеют преимущественно ядерную локализацию. Действительно, представленные на рис. 4 результаты показывают, что в печени мыши наибольшее содержание хампина С приходится на фракцию ядерного осадка, а не пост-ядерный супернатант, обогащенный цитозольными белками.

Различие между хампинами А и В невелико, по-видимому, экзон 6, присутствующий у варианта А, кодирует некий линкер (связующую последовательность) между доменами III и IVpehe. Любопытно, что полученные в данной работе результаты указывают на преобладающее содержание хампина А (по отношению к В) в тканях мыши, в то время как все последовательности, обнаруженные среди EST рыб, земноводных и птиц, соответствуют хампину В, очевидно, наиболее эволюционно древнему.

Особый интерес представляет факт существования альтернативного сплайсинга первичного транскрипта гена хампина, который приводит к образованию набора молекул мРНК, кодирующих разные комбинации доменов белка – это важная черта, не рассмотренная никем ранее. Так, хампины Е и С лишены консервативного домена IVpehe, а у хампинов D и E наблюдается сильно измененный домен IIss, укороченный преимущественно за счет высококонсервативных остатков. Любопытно, что присутствующий у всех разновидностей хампина домен III имеет невысокую степень консервативности и для него пока невозможно высказать каких-либо предположений о структуре и функции. Поэтому особенно важной информацией является наблюдение высокой тканевой специфичности экспрессии гена в отношении коротких вариантов сплайсинга, ограниченной семенниками. Вполне возможно, что разнообразие структуры хампина важно для регуляции процессов сперматогенеза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: дрожжевую (MatchMaker GAL4 Two-Hybrid System 3, BD Biosciences, США) и бактериальную (BacterioMatch II) двугибридные системы с библиотекой кДНК скелетной мышцы крысы (Stratagene, США); эндонуклеазы рестрикции, M-MLV-обратную транскриптазу, ингибитор рибонуклеаз из плаценты человека, ДНК-лигазу фага T4, Трис, мочевины (Promega, США); глицерин, NaCl (Sigma, США); SDS, агарозу, акриламид (Bio-Rad, США); остальные реактивы – отечественного производства градаций “ч. д. а.” и “ос. ч.”.

Поиск белок-белковых взаимодействий βм-субъединицы в двугибридных системах. Фрагмент кДНК, кодирующий эктодомен βм, амплифицировали, используя кДНК новорожденной

мышы в качестве матрицы. Продукт ПЦР клонировали в вектор pBT – для бактериальной системы “BacterioMatch II” и в вектор pGBKT7, кодирующий ДНК-связывающий домен GAL4 – для дрожжевой системы MatchMaker GAL4 Two-Hybrid System 3. Поиск возможных белок-белковых взаимодействий эктодомена субъединицы βм мышы в бактериальной двугибридной системе проводили, используя библиотеку кДНК скелетной мышцы крысы в векторе pTRG (Stratagene, США), в среде LB с карбенициллином в концентрации 250 мг/л (селективная среда) согласно рекомендациям производителя. Из полученных колоний выделяли плазмиды и проводили их тестирование с целью исключения ложноположительных реакций. Для этого получали котрансформанты выделенных плазмид с pBT-βм и с pBT без вставки, а затем сравнивали скорость их роста на селективной среде. Последовательность хампина мышы (фрагмент 267–616 а. о. хампина А) клонировали в вектор pGAD, который кодирует ДНК-активирующий домен GAL4. Проводили трансформацию дрожжевых клеток штамма AH109 и сравнивали скорость роста котрансформантов pGBK-βм/pGAD-хампин, pGBK/pGAD-хампин и pGBK-βм/pGAD на селективных средах, дефицитных по гистидину или гистидину и аденину.

Анализ экспрессии гена хампина в тканях мышы и человека с помощью ОТ-ПЦР. Для детекции транскриптов хампина в тканях мышы использовали праймеры (5' → 3'): ATCCCTAGCAGCACAGACGACGAC (смысловый, экзон 2) (I), GCTCCAGTTGTGCATGCCTCTTTG (антисмысловый, экзон 8) (IV), GAGCAAGTGTCTCTATGCT (антисмысловый, экзон 5) (III) и GAGGAGCCAAGAAACCCAGAAAA (смысловый, экзон 4) (II). В качестве положительного контроля использовали праймеры, специфичные к мРНК глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (5' → 3'): ATGCCTCCTGCACCACCAACTG (смысловый) и GTAGAGGCAGGGATGATGTTCTGG (антисмысловый). Для амплификации хампина в тканях человека использовали праймеры (II) и (III).

Суммарную клеточную РНК из тканей выделяли с помощью набора SV Total RNA Isolation System (Promega, США) в соответствии с рекомендуемым протоколом производителя. Для синтеза первых цепей кДНК к 2 мкг полученной РНК добавляли 500 нг (dT)₁₂₋₁₈, денатурировали при 70°C в течение 3 мин. Смесь помещали в лед, добавляли 40 ед. акт. ингибитора рибонуклеаз из плаценты человека, буфер для обратной транскриптазы M-MLV, dNTP до концентрации каждого 0.4 мМ, 200 ед. акт. обратной транскриптазы M-MLV. После инкубации в течение 2 ч при 37°C нуклеиновые кислоты последовательно очищали от белков с помощью экстракций смесью фенол-хлороформ (1 : 1), хлороформом и

осаждали этанолом. Полученный осадок ресуспендировали в 50 мкл воды.

Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле в присутствии этидий бромиды и клонировали в вектор pGEM-T (Promega, США) для определения их нуклеотидной последовательности с помощью набора Thermo Sequenase II Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences, США).

Продукция рекомбинантного фрагмента хампина С в клетках бактерий. Для амплификации фрагмента, кодирующего фрагмент Leu²⁵⁰-Ala⁴⁶³ хампина С, использовали праймеры (5' → 3'): GATCG-GATCCCTCCTTGCTCGGATTGAAC (смысловой) и GATCAAGCTTACTATGCCTTACTTGCTACAGTC (антисмысловой), содержащие участки узнавания рестриктаз *Bam*HI и *Hind*III (выделены жирным шрифтом). В качестве матрицы применяли кДНК семенников и печени мыши. Продукт ПЦР клонировали в плазмидную ДНК pQE41 (Qiagen, Германия). Скрининг положительных колоний, выращивание клеток, продуцирующих фрагмент хампина, в жидкой среде и очистку рекомбинантного белка с помощью металлохелатной хроматографии на Ni²⁺-NTA-агарозе проводили как описано ранее в [16]. Препараты очищенных белков анализировали с помощью электрофореза в 15%-ном ПААГ.

Получение антисыворотки к фрагменту хампина С. Кроликам вводили подкожно 70 мкг рекомбинантного белка, эмульгированного в полном адъюванте Фрейнда и фосфатно-солевым буфере (1 : 1). На 22-е и 43-е сут повторяли инъекцию с неполным адъювантом Фрейнда. Кровь отбирали на 53-е сут, полученную сыворотку тестировали с помощью метода ELISA как описано в работе [16].

Выделение ядер из печени мыши проводили, как описано ранее [17], с небольшими изменениями: печень четырех мышей измельчали и гомогенизировали с помощью гомогенизатора Даунса (со слабо притертым пестиком) в буфере для гомогенизации: 50 mM Трис-НСl, рН 7.4, 0.25 M сахароза, 5 mM MgCl₂, 100 мкМ фенилметансульфонилфторид (PMSF). Гомогенат фильтровали через несколько слоев марли и центрифугировали при 1000 g 10 мин. Пост-ядерный супернатант сохраняли, а грубый ядерный осадок ресуспендировали в буфере для гомогенизации, содержащем 2.2 M сахарозу и осаждали при 100000 g 2 ч (угловой ротор). Полученный осадок промывали буфером для гомогенизации и осаждали центрифугированием при 1000 g 10 мин.

Иммуноблоттинг. Суммарный белок фракций (20 мкг) разделяли электрофорезом в 10% ПААГ, переносили на поливинилидендифторидную мем-

брану и окрашивали с помощью антител к хампину как описано ранее [17].

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 03-04-49046, 04-04-49413, 03-04-49059) и Национального института здоровья (грант HL-36573).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Palmer M.J., Mergner V.A., Richman R., Manning J.E., Kuroda M.I., Lucchesi J.C. // *Genetics*. 1993. V. 134. P. 545–557.
2. Fagegaltier D., Baker B.S. // *PLoS Biol*. 2004. V. 2. e341.
3. Meyer B.J. // *Trends Genet*. 2000. V. 16. P. 247–253.
4. Pestov N., Korneenko T., Zhao H., Adams G., Shakhparonov M., Modyanov N. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2000. V. 277. P. 430–435.
5. Zhao H., Pestov N., Korneenko T., Shakhparonov M., Modyanov N. // *Amer. J. Physiol. Cell Physiol*. 2004. V. 286. P. C757–C767.
6. Mammalian Gene Collection (MGC) Program Team // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 16899–16903.
7. Falquet L., Pagni M., Bucher P., Hulo N., Sigrist C.J., Hofmann K., Bairoch A. // *Nucl. Acids Res*. 2002. V. 30. P. 235–238.
8. Marin I. // *J. Mol. Evol*. 2003. V. 56. P. 527–539.
9. Li J., Lee G., van Doren S.R., Walker J.C. // *J. Cell Sci*. 2000. V. 113. P. 4143–4149.
10. Xu X., Stern D.F. // *J. Biol. Chem*. 2003. V. 278. P. 8795–8803.
11. Sueishi M., Takagi M., Yoneda Y. // *J. Biol. Chem*. 2000. V. 275. P. 28888–28892.
12. Boudrez A., Beullens M., Groenen P., van Eynde A., Vulsteke V., Jagiello I., Murray M., Krainer A.R., Stalmans W., Bollen M. // *J. Biol. Chem*. 2000. V. 275. P. 25411–25417.
13. Liao H., Byeon I.J., Tsai M.D. // *J. Mol. Biol*. 1999. V. 294. P. 1041–1049.
14. Varrault A., Ciani E., Apiou F., Bilanges B., Hoffmann A., Pantaloni C., Bockaert J., Spengler D., Journot L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 8835–8840.
15. Will C.L., Hennig U., Achsel T., Gentzel M., Wilm M., Luhrmann R. // *EMBO J*. 2002. V. 21. P. 4978–4988.
16. Пестов Н.Б., Гусакова Т.В., Костина М.Б., Шахпаронов М.И. // *Биоорганическая химия*. 1996. Т. 22. С. 664–670.
17. Дмитриев Р.И., Пестов Н.Б., Корнеенко Т.В., Сорокина Е.С., Казьмин А.А., Костина М.Б., Шахпаронов М.И. // *Биол. мембраны*. 2003. Т. 20. С. 480–485.

Tissue Specificity of Alternative Splicing of Transcripts Encoding Hampin, a New Mouse Protein Homologous to the *Drosophila* MSL-1 Protein

R. I. Dmitriev¹, N. B. Pestov^{1,2}, T. V. Korneenko^{1,2}, A. V. Gerasimova¹, H. Zhao²,
N. N. Modyanov², M. B. Kostina¹, and M. I. Shakhparonov^{1#}

Phone: (095) 330-6574; e-mail: korn@mail.ibch.ru

¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

² Department of Pharmacology, Cardiovascular Biology, and Metabolic Diseases,
Medical College of Ohio, 3000 Arlington Ave., Toledo, OH 43614 USA

A number of mammalian genomes have one gene copy encoding the protein that we named hampin. A search in a number of databases revealed a distant homologue, the well-known *Drosophila* protein MSL-1 (male-specific lethal 1). An alternative splicing of mRNA led to a significant diversity of structural hampin variants with different domain compositions. We analyzed the tissue-specific expression of five mouse hampin variants using RT-PCR. Two variants encoding hampin proteins with truncated *N* termini were shown to have a restricted tissue specificity: they are exclusively expressed in the testes. The mRNAs of other hampin variants were detected in all the tested tissues at comparable levels. We obtained polyclonal antibodies to the recombinant hampin and used them to demonstrate that at least one of the variants is predominantly localized in the nucleus. The specific features of the hampin primary structure and its possible functions as a member of the hampin/MSL-1 family of proteins are discussed. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: alternative splicing, MSL-1, protein–protein interactions, β m-subunit