

УДК 577

С.А.Клотченко (5 курс, каф. БФ), А.В.Васин, (асп., каф. БФ),
Н.А.Платонова, к.б.н., в.н.с. (НИИЭМ РАМН)

ЭКСПРЕССИЯ УЧАСТКА ПСЕВДОГЕНА В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ HuTu80

У млекопитающих одним из ключевых участников переноса железа через клеточные мембраны и транспорта неклеточной меди является медьсодержащий гликопротеин церулоплазмин (ЦП, КФ 1.16.3.1). Хотя выявлено несколько белковых форм ЦП, описаны только две молекулярные формы ЦП-мРНК, являющиеся продуктами уникального гена. Это ЦП-мРНК, кодирующая секреторный ЦП, и ЦП-мРНК, приобретающая сигнал присоединения к гликозилфосфатидилинозитоловому (GPI) якорю в ходе альтернативного сплайсинга. К тому же, помимо плазматической мембраны в клетке существуют компартменты (например, митохондрии), перенос ионов железа в которые, вероятно, сопряжен с ферроксидазной реакцией. Для установления возможности существования ЦП-подобного белка в митохондриях млекопитающих мы использовали методы компьютерного и биохимического анализа, результаты которых представлены в данной работе.

В работе был проведен компьютерный анализ последовательности псевдогена ЦП, (ас. по. NG_001106 в базе данных GenBank). Транслирование этой последовательности с помощью программы Gene Runner выявило во второй рамке считывания транслирующуюся нуклеотидную последовательность, которой соответствует аминокислотная последовательность длиной 328 а.о., содержащая на N-конце сигнал доставки в митохондрии (СДМ). В целом, нуклеотидная последовательность псевдогена соответствует кДНК ЦП, начиная с 8 экзона, первые 99 нуклеотидов которого отсутствуют, по 19 экзон включительно. По сравнению с мРНК ЦП в последовательности псевдогена полностью делетирован участок, соответствующий экзону 11 гена ЦП, при этом рамка считывания не нарушается. Также делетированы 17 нуклеотидов в участке, соответствующем концу экзона 17 гена ЦП, расположенном за стоп-кодом. В участке псевдогена ЦП, соответствующем экзону 12 гена ЦП, присутствует вставка из 4 нуклеотидов. Псевдоген ЦП содержит стоп-кодон в “экзоне” 17, таким образом, “экзоны” 18 и 19 оказываются в нетранслируемой зоне, однако, они сохраняют высокую гомологию с геном ЦП. Сопоставление последовательностей гомологичных экзонов ЦП и соответствующих им участков псевдогена показало, что “экзоны” транслируемой части псевдогена характеризуются высокой (93%) идентичностью с ЦП. 3'-нетранслируемая область (3'-UTR) псевдогена ЦП практически полностью совпадает с 3'-UTR ЦП-мРНК (4 замены на 150 нуклеотидов). Первые 52 нуклеотида 5'-концевого участка последовательности псевдогена содержат почти половину всех нуклеотидных замен (31 из 76). На 5'-конце последовательности псевдогена ЦП на расстояниях, близких к консенсусным, были выявлены последовательности, близкие к консенсусам ТАТА-бокса, сигнала экпирования и СААТ-бокса. Эти данные позволяют предположить наличие потенциальной промоторной последовательности. Предсказанный промотор, по сравнению с соответствующим участком ЦП, содержит 3 из 6 нуклеотидных замен, приходящихся на ТАТА-бокс и инициатор, что позволяет предположить, что именно эти мутации в этой бывшей части структурного гена ЦП приводят к появлению потенциального промотора. Первый транскрибируемый нуклеотид по последовательности псевдогена имеет координату +343.

Выравненные аминокислотные последовательности псевдогена ЦП и ЦП содержат 46 аминокислотных замен, причем половина этих замен приходится на первые 40 а.о. Такое большое число замен по сравнению с нуклеотидными последовательностями соответствующих областей связано, по-видимому, с наличием 4-нуклеотидной вставки, в результате чего в псевдогене появляется аминокислотная последовательность, несовпадающая с ЦП. Именно этому участку соответствует N-концевая часть предсказанного СДМ. Таким образом, теоретически данная аминокислотная последовательность состоит из 303 а.о., 40 из которых входят в СДМ. Девять аминокислотных остатков на С-концевом участке СДМ совпадают с аминокислотной последовательностью ЦП. В гомологичной ЦП части *псевдо*ЦП 9 из 15 замен а.о. являются значимыми. Вычисленная аминокислотная последовательность, как и гомологичный участок ЦП, не содержит ни одного сайта гликозилирования. К тому же, в *псевдо*ЦП не сохраняется ни один из медь-связывающих центров ЦП. Поиск потенциальных медьсвязывающих мотивов, характерных для медьтранспортных белков (Cu-АТФазы и Cu-шапероны), в последовательности предполагаемого продукта псевдогена ЦП не дал результата. Однако в *псевдо*ЦП присутствует мотив Гис-Х-Гис, характерный для медьзависимых оксидаз.

Таким образом, предполагаемый *псевдо*ЦП, потенциальная оксидаза, содержащая в центре молекулы медьсвязывающий мотив Гис-Х-Гис, состоит из 303 аминокислот, на N-конце содержит СДМ, молекулярная масса “зрелого” *псевдо*ЦП может составлять примерно 30 кДа.

Методом обратной транскрипции, сопряженной с полимеразной цепной реакцией, показано, что в культивируемых клетках человека линий HepG2 и HuTu 80 присутствует продукт транскрипции псевдогена ЦП. В клетках линии HuTu 80 продукты транскрипции гена ЦП, кодирующие секреторную или связанную с плазматической мембраной молекулярные формы ЦП, не выявлены. Методом иммуноблоттинга во фракции митохондрий и внутренних мембран, полученных из клеток линии HuTu 80, найдены полипептиды ЦП с молекулярной массой около 30 кДа.

Данные, представленные в работе, позволяют однозначно считать, что у человека на участке генома, занимаемом псевдогеном ЦП, возникла последовательность, содержащая все элементы, характерные для эукариотического гена класса II. Его предполагаемым белковым продуктом может быть митохондриальный ЦП-подобный белок. Этот ген проявляет активность в некоторых культивируемых клетках. Однако его способность экспрессироваться *in vivo* остается не изученной.