

УДК 616-018:612.126

А.В.Васин (5 курс, каф. БФ), Н.А.Платонова, к.б.н. (ВНИИЭМ РАМН),
Б.С.Мищенко, к.б.н. (каф. БФ)

КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ МЕДЬСОДЕРЖАЩИХ ФЕРРОКСИДАЗ, УЧАСТВУЮЩИХ В МЕТАБОЛИЗМЕ ЖЕЛЕЗА

Ионы меди и железа, обязательные компоненты пищи и одновременно высокотоксичные агенты для биомолекул, через клеточную мембрану у всех организмов переносятся только в Cu^{1+} - и Fe^{3+} -состояниях. Во внеклеточном компартменте высших эукариотов эти ионы в состояниях Cu^{2+} и Fe^{2+} связаны с транспортерами. У низших эукариотов перенос ионов сопряжен с реакциями окисления-восстановления в трансмембранном оксидо-редуктазном комплексе, локализованном на плазматической мембране [3]. Важную роль в нем играет белок FET3 (медьсодержащая ферроксидаза дрожжей), участвующая в окислении ионов Fe^{2+} . Гомологичный комплекс у высших эукариот, во внеклеточной среде которых нет свободных ионов меди и железа, не известен.

Ранее нами из экспрессионной библиотеки плаценты человека методом иммуноскрининга был изолирован клон фага лямбда-gt11, несущий участок кДНК предполагаемого рецептора церулоплазмينا (ЦП, медьсодержащий гликопротеин сыворотки крови позвоночных, обладающий ферроксидазными свойствами, КФ1.16.3.1.). Было показано, что антитела к электрофоретически чистому препарату рецептора ЦП, изолированному из плазматических мембран эритроцитов человека, перекрестно взаимодействуют с ЦП. Двумерный анализ пептидов полного триптического перевара ЦП и его рецептора подтвердил структурное сходство этих белков. Частичный анализ клонированного фрагмента кДНК предполагаемого рецептора ЦП показал, что он может быть отнесен в группу медьсодержащих трансмембранных ЦП-подобных ферроксидаз. На основе этих результатов было сформулировано рабочее предположение, что рецептор ЦП участвует в гипотетическом оксидо-редуктазном комплексе высших эукариот. Эта гипотеза предусматривает участие в комплексе медьтранспортной АТФазы АТР7А, ЦП крови, рецептора ЦП и рецептора трансферрина, или трансферрина, заякоренного в мембране с помощью гликозилфосфатидилинозитола.

Цель настоящего исследования состояла в сравнительном филогенетическом анализе клонированных фрагментов предполагаемого гена рецептора ЦП. Выравнивание последовательностей проводилось с помощью алгоритма полного динамического программирования с использованием программы *ClustalW* [2]. Филогенетический анализ выровненных последовательностей проводился с использованием пакета программ *PHYLP* [1] методом парных дистанций. Для аминокислотных последовательностей также был применен метод наибольшего правдоподобия (ML) из пакета программ *PAML*. Вычисление значений уровня значимых и незначимых замен между нуклеотидными последовательностями. Анализ проводился методом Yang&Nielsen (2000) с помощью программы *yn00* (пакет программ *PAML*) [4].

Был проведен филогенетический анализ клонированных фрагментов 1 и 2 (асс. по AF211154 и AF211153, соответственно) предполагаемого рецептора церулоплазмينا (ЦП). Фрагмент 1 высоко гомологичен всем известным ЦП-подобным ферроксидазам. Он содержит мононуклеарный ферроксидазный центр, высоко гомологичный и схожий со всеми аналогичными центрами ЦП-подобных ферроксидаз: ЦП человека, ЦП крысы, ЦП мыши, ЦП овцы, гестин (HEPH) человека, гестин мыши, GPI-форма ЦП крысы, рецептор ЦП человека, FET3 и FET5 из *S. cerevisiae*, FIO1 из *S. pombe*.

Нуклеотидная последовательность фрагмента 2 имеет около 70% гомологии с экзоном 16 гена ЦП, но аминокислотная последовательность гомологии не проявляет. Она имеет от-

даленное сходство с трансмембранными доменами других мембранносвязанных ЦП-подобных ферроксидаз. Их амфипатические профили сходны. Последовательность на 90% гомологичная фрагменту 2 была найдена в опубликованной последовательности генома человека на Internet сайте NCBI. Она локализована на хромосоме 3 в области экзона 16 гена ЦП на комплементарной нити. Для выявления биологической значимости вторичной структуры в области 2670...2820 п.н. было проведено межвидовое сравнение мРНК ЦП. Уровень синонимических замен в этой области оказался существенно ниже, а уровень отношения синонимических замен к несинонимическим существенно выше, чем по всей кодирующей области гена ЦП в целом. Эти данные высвечивают роль вторичной структуры в нуклеотидной последовательности на границе экзонов 15 и 16 в посттранскрипционном процессинге пре-мРНК ЦП.

Полученные данные позволяют отнести рецептор ЦП в семейство ЦП-подобных мембранносвязанных ферроксидаз и выдвинуть гипотезу об образовании рецептора ЦП путем тканеспецифического альтернативного сплайсинга первичного продукта транскрипции гена ЦП, в результате которого экзоны 16-19 ЦП замещаются на последовательность, содержащую предсказанный трансмембранный домен.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Felsenstein, J., PHYLIP (Phylogeny inference package), version 3.57c, July, 1995.
2. Thompson, J.P., Higgins, D.G., Gibson, T.J. Clustal W version 1.7, June 1997.
3. Valentine J.S. Gralla E.B. Delivering copper inside yeast and human cells, Science, 1997, 278, 817-818.
4. Yang Z., Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood (PAML), Version 3.0e, University College of London, London, England, 2000.