

УДК 577.21

С.А.Клотченко (6 курс, каф. БФ), Л.В.Пучкова, д.б.н., проф.

## ПРОВЕРКА ИНФОРМАЦИОННОЙ ЁМКОСТИ ПРИРОДНОГО ГЕНА ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Медь и железо необходимы клеткам практически всех организмов, так как их ионы входят в качестве кофакторов в активные центры нескольких десятков ферментов, участвующих в жизненно важных процессах. В то же время, в свободном состоянии оба эти иона являются токсичными агентами для всех типов биомолекул, так как вызывают образование гидроксильных радикалов. Безопасный перенос ионов меди и железа по внутриклеточным и внеклеточным каналам осуществляют взаимосвязанные между собой системы: метаболическая система меди (МСМ) и метаболическая система железа (МСЖ). Генетические дефекты в них, как и неблагоприятные экологические факторы, приводят к дефициту или к избытку этих ионов в клетках различных органов, что, в свою очередь, становится причиной развития тяжёлых нейродегенеративных заболеваний.

Центральным участником МСМ и МСЖ является церулоплазмин (ЦП, ферро- $O_2$ -оксидоредуктаза, КФ 1.16.3.1.), гликопротеин  $\alpha_2$ -глобулиновой фракции плазмы крови позвоночных, на долю которого приходится до 95% внеклеточной меди. В результате анализа аминокислотных структур ЦП, принадлежащих различным классам позвоночных, была обнаружена их высокая консервативность. ЦП всех позвоночных состоят из единственной полипептидной цепи. Длина зрелого полипептида у человека (*Homo sapiens*) составляет 1046, а у крысы (*Rattus norvegicus*) — 1040 аминокислотных остатков (а.о.). Природный ген ЦП является уникальным геном. Он имеет длину около 50 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) и содержит 19 экзонов длиной от 17 до 255 п.н. и 18 интронов от 0.36 до 10.2 т.п.н. В то же время, его белковые продукты представлены различными тканеспецифическими молекулярными формами, механизм образования которых ещё мало изучен.

У человека и крысы известны две молекулярные формы ЦП-мРНК, программирующие синтез секреторного ЦП и ЦП, связанного с клеточной мембраной через гликозилфосфатидилинозитоловый якорь (ГФИ-ЦП). Обе ЦП-мРНК образуются из общего первичного транскрипта в результате альтернативного сплайсинга. Длина мРНК, кодирующей секреторный ЦП человека, составляет 3321 н., крысы — 3700 н. Таким образом, количество идентифицированных самостоятельных молекулярных форм ЦП-мРНК гораздо меньше, чем известных изоформ ЦП. Современные представления о возможности формирования различных молекулярных форм мРНК на основе информации, содержащейся в единственной последовательности ДНК, позволяют предположить, что ген ЦП может содержать информацию о более чем двух, уже известных, молекулярных формах мРНК.

С целью определения потенциальных кодирующих возможностей природного гена ЦП был проведён сравнительный компьютерный анализ некодирующих участков гена ЦП разных видов позвоночных. Для достижения этой цели в работе использовались стационарные компьютерные программы Clustal W (version 1.7) и программный пакет PHYLIP 3.6, открытая база данных GenBank, а также компьютерные программы в интернете: ORF Finder, BLAST, MitoProt II 1.0a4, MOTIF и PSORT. Структура хромосомных генов ЦП известна только у человека, крысы и мыши, поэтому сравнение велось между этими тремя

видами. В результате проведённого анализа было показано, что в интроне 8 гена ЦП человека и в интроне 2 гена ЦП крысы присутствуют потенциальные промоторы.

Оказалось, что только один потенциальный промотор в интроне 8 гена ЦП человека в единственной рамке считывания программирует синтез полипептидной цепи длиной 582 а.о. (1746 н.), которая начинается с метионина, полностью соответствует ЦП человека с 502 а.о. и имеет на N-конце 18 а.о., которых нет в ЦП. Анализ N-концевой последовательности предполагаемого ЦП человека с помощью программы PSORT, предсказывающей сигналы сортировки, показал, что эта последовательность обеспечивает белку цитоплазматическую локализацию. Ранее в экспериментах с метаболическим мечением белков нами было показано, что в культивируемых клетках линии CV-1 *de novo* синтезируется цитозольный ЦП-подобный белок с молекулярной массой, примерно соответствующей предсказываемому белку.

Аналогично было предсказано существование альтернативной формы крысиной ЦП-мРНК, кодирующей синтез полипептидной цепи длиной 953 а.о. (2859 н.). Предположительно точка инициации транскрипции этой ЦП-мРНК лежит внутри интрона 2 гена ЦП крысы. В результате образуется изоформа мРНК, полностью соответствующая ЦП-мРНК крысы с экзона 3, программирующая полипептид, на N-конце которого содержится дополнительный участок длиной 25 а.о., начинающийся с метионина. Предполагаемый продукт трансляции предсказанной мРНК не содержит известных сигналов сортировки. Ранее нами было показано, что иммунореактивные полипептиды ЦП присутствуют в митохондриях крысы, выделенных из мозга, печени, семенников и молочной железы. В митохондриях ЦП локализован в матриксе и во внутренних мембранах, его молекулярная масса соответствует негликозилированной форме белка. Таким образом, предсказанная молекулярная форма может соответствовать ранее найденному митохондриальному ЦП.

Экспериментальный поиск предсказанных альтернативных форм ЦП-мРНК был проведён на клеточных линиях человека А 431 (эпидермоидная карцинома), НЕР-2 (эпидермоидная карцинома гортани), НЕР G2 (карцинома печени), HUTU 80 (аденокарцинома двенадцатиперстной кишки), К-562 (хроническая миелогенная лейкемия), U-937 (гистиоцитарная лимфома) и различных органах беспородных белых крыс.

В экспериментах использовали кДНК, полученные в результате реакции обратной транскрипции на препаратах тотальной РНК, которые выделяли из культивируемых клеток человека и органов крысы с использованием реагента TRIZOL (TriPure Isolation Reagent, фирмы Boehringer Mannheim, Германия) в полном соответствии с инструкцией производителя. Чистоту и нативность полученных препаратов РНК контролировали с помощью спектрофотометрического и электрофоретического анализа. Полученные препараты РНК по данным электрофореза в 1% агарозном геле не содержали примесей ДНК и продуктов дегградации РНК. При этом все препараты РНК обеспечивали образование ПЦР-продукта на мРНК  $\beta$ -актина как матрице, что служило показателем прохождения ОТ-ПЦР. Для этого были использованы специально подобранные 20-нуклеотидные праймеры на  $\beta$ -актин, специфичные как для человека, так и для крысы: 5'-gaagatcctgaccgagcgtg-3' (прямой) и 5'-agcactgtgtggcatagag-3' (обратный).

Для выявления предсказанных изоформ ЦП-мРНК методом ПЦР-анализа на полученных кДНК были подобраны 2 пары специфичных праймеров.

Для выявления предполагаемого продукта гена ЦП человека были подобраны 0-нуклеотидные праймеры: 5'-gaccacgtagaagcacc-3' (прямой) и 5'-ccttgcacatagtgagacc-3' (обратный). Ожидаемый амплификат — 465 п.н. (интрон 08-экзон 09-экзон 10-экзон 11), геномный продукт 11948 п.н. (интрон 08-экзон 09-интрон 09-экзон 10-интрон 10-экзон 11).

Для выявления предполагаемого продукта гена ЦП крысы были подобраны 30-нуклеотидные праймеры 5'-tccttcaactatgttcaaatgtgctcctt-3' (прямой) и 5'-tcattgtctttatcgactttctctggttca-3' (обратный). Ожидаемый продукт – 414 п.н. (интрон 02-экзон 03-экзон 04), геномный продукт – 1159 п.н. (интрон 02-экзон 03-интрон 03-экзон 04). Предсказанные амплификаты были обнаружены в препаратах РНК, выделенных из печени крысы. Полученные данные используются для оценки информационной ёмкости природного гена ЦП млекопитающих.