



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.112.5+577.113.5

© 1990 г.

ФОСФОДИЭСТЕРАЗА ЦИКЛИЧЕСКОГО GMP ИЗ СЕТЧАТКИ БЫКА. АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ β -СУБЪЕДИНИЦЫ И НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ СООТВЕТСТВУЮЩЕЙ кДНК

Литкин В. М., Губанов В. В., Храмов Н. В.,

Василевская И. А., Атабекова Н. В., Мурадов Х. Г.,

Шуваева Т. М., Сурина Е. А., Заграничный В. Е., Ли. Т.* #

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва;

* Чикагский университет, США

Изучение механизмов фоторецепции и преобразования светового сигнала в нервный импульс у высших животных требует детальной информации о строении белков, принимающих участие в этих процессах. Ранее с помощью методов белковой химии и геной инженерии нами была изучена первичная структура γ - и α -субъединиц цикло-GMP-фосфодиэстеразы (ФДЭ) из сетчатки быка [1, 2]. В данном сообщении приводятся результаты определения первичной структуры β -субъединицы ФДЭ.

Общая стратегия исследования была аналогична примененной нами в работах [1, 2], при этом использовались клонотекы кДНК, полученные путем инициации синтеза первой цепи кДНК рассеянной затравкой, oligo(dT) или специфическими олигонуклеотидными зондами, синтезированными по установленной частичной структуре кДНК β -субъединицы.

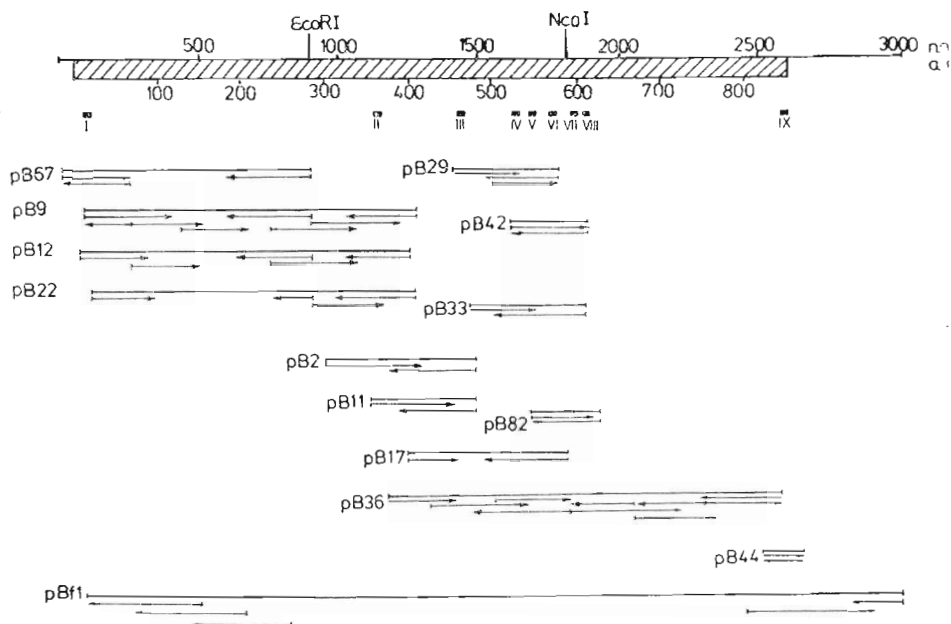


Рис. 1. Частичная рестрикционная карта β -субъединицы фосфодиэстеразы и расположение фрагментов кДНК из выделенных клонов. Черными прямоугольниками обозначены олигонуклеотиды, использованные при получении кДНК и скрининге клонотек. Стрелками отмечены установленные участки последовательностей кДНК клонов

* Работа финансирована Национальным институтом здоровья, грант EY04801.

49- 138 ATG AGC CCC AGT GAG GGG CAG GTG CAC AGG TTC CTG GAC CAG AAC CCC GGC TTC GCG GAC CAG TAC TTT GGG AGG AAG CTG AGC CCG GAG
1- 30 Met Ser Pro Ser Glu Gly Gln Val His Arg Phe Leu Asp Gln Asn Pro Gly Phe Ala Asp Gln Tyr Phe Gly Arg AAG Leu Ser Pro Gly

139- 228 GAT GTG GCC AAT GCC TGC GAG GAC GGG GCG CCC GAG GGC TGC ACC AGC TTC CGA GAG CTG TGC CAG GTG GAG GAG AGC GCG GCC CTG TTC
31- 60 Asp Val Ala Asn Ala Cys Glu Asp Gly Arg Cys Tyr Ser Phe Arg Leu Gly Cys Gln Val Glu Glu Ser Ala Ala Leu Leu

229- 318 GAG CTG GTG CAG CAC ATG CAG GAG AAC GTG AAC ATG CAG GGC CTG GTC TTC AAG ATC CTG CCG GCG CTC TGC TCC ATC CTG CAC GCC GAC
61- 90 Glu Leu Val Gln Asp Met Gln Glu Asn Val Asn Met Glu Arg Val Val Phe Lys Ile Leu Arg Arg Leu Cys Ser Ile Leu His Ala Asp

319- 408 CCG TGC AGC CAC TTC ATG YAC CGC CAG CGC AAC GGT GTG GCC GAG CTC GCC ACC CGC CTC TTC AGG GTG CAG CCC GAC AGC GTC CTG GAG
91- 120 Pro Cys Ser His Phe Met Tyr Arg Gln Arg Asn Gly Val Ala Glu Leu Ala Thr Arg Leu His Ser Phe Ala Asp

409- 498 GAC TGC CTG GTG CCT CCT GAC TCC GAG ATC GTC TTC CCG CTG GAC ATC GGG GTC GTG GGC CAC GTG GCT CAG ACC AAG AAG ATG GTG AAT
121- 150 Asp Cys Leu Val Pro Pro Asp Ser Glu Ile Val Phe Pro Leu Asp Ile Gly Val Val Gly His Val Ala Gln Thr Lys Lys Met Val Asn

499- 588 GTC CAG GAC GTG ATG GAG TGC CCC CAC TTC AGC TCC TTC GCG GAT GAG CTG ACC GAC TAT GTG AGG AGG AAC ATC CTG GCC ACA CCC ATC
151- 180 Val Gln Asp Val Met Glu Cys Pro His Phe Ser Ser Phe Ala Asp Glu Leu Thr Arg Tyr Val Leu His Ser Phe Val Gln Pro Asp Ser Val Leu Glu

589- 678 ATG AAC GGC AAA GAT GTC GTG GCT GTG ATC ATG GCT GTG AAC AAG CTG GAT GGC CCA TGT TTC ACA GTG AAT GAT GAA GAC GTT TTC CTG
181- 210 Met Asn Gln Lys Asp Val Val Ala Val Ile Met Ala Val Asn Lys Leu Asp Gly Pro Cys Phe Thr Val Asn Asp Glu Asp Val Phe Leu

679- 768 AAA TAC CTG AAC TTC GGG ACA TTA AAC CTG AAG ATC TAC CAC TTG AGC TAC CTG CAC AAC TGC GAG ACT CCG CGT GGC CAG GTG CTG CTG
211- 240 Lys Tyr Leu Asn Phe Thr Leu Asn Leu Lys Ile Tyr His Leu Ser Tyr Leu His Asn Asp Gln Ser Met Leu Lys Ser Met Ile Val Asn

769- 858 TGG TCG GCC AAC AAG GTG TTT GAG GAG CTG ACA GAC ATC GAG AGG CAG TTT CAC AAG GCC TTC TAC ACT GTA CCG GCC TAT CTG AAC TGT
241- 270 Trp Ser Ala Asn Lys Val Phe Glu Glu Leu Thr Asp Ile Glu Arg Gln Phe His Lys Val Gln Tyr Thr Val Arg Ala Tyr Leu Asn Arg

859- 948 CAG CGG TAC TCG GTG GGC CTC CTG GAC ATC ACC AAG GAG AAG GAA TTC TTT GAT GTG TGG CCG GTG CTG ATG GGA GAG GCC CAG GCG TAC
271- 300 Asp Arg Tyr Ser Val Gly Leu Leu Asp Met Thr Lys Glu Lys Glu Phe Phe Asp Val Trp Pro Val Leu Met Gly Glu Ala Gln Ala Tyr

949-1038 TCG GGC CCC CGC ACA CCT GAC GGC CGA GAA ATC CTC TTC TAC AAA GTC ATA GAC TAC ATC CTC CAC GGC AAG GAA GAA ATC AAG GTC ATC
301- 330 Val Gln Asp Val Met Glu Cys Pro His Phe Ser Ser Phe Ala Asp Glu Leu Thr Arg Tyr Ile Leu His Gly Lys Glu Asp Ile Lys Asp Ile Leu

1039-1128 CCC TCA CCC CCG GCT GAC CAC TGG GCC CTT GCC AGC GGC CTT CCA ACC TAC GTG GCA GAA AGC GGT TTT ATC TGT AAT ATT ATG AAT GCC
331- 360 Pro Ser Pro Pro Ala Asp His Trp Ala Leu Ala Ser Gly Leu Pro Thr Tyr Val Ala Glu Ser Gly Phe Ile Cys Asn Ile Met Asn Ala

1129-1218 CCT GCC CAC GAA ATG TTC AAT TTT CAG GAG GGG CCT CTG GAC GAC TCT GGG TGG ATC GTC AAG AAC GTC CTC TCC ATG CCC ATC GTC AAC
361- 390 Pro Ala Asp Glu Met Phe Asn Phe Gln Glu Gly Pro Leu Asp Asp Ser Gly Trp Ile Val Lys Asn Val Leu Lys Ser Met Ile Val Asn

1219-1308 AAG AAG GAG GAG ATC GTG GGG GTC GCG ACA TTT TAC AAC AGG AAG GAC GGG AAG CCC TTC GAT GAG CAG GAT GAA GTC CTG ATG GAG TCT
391- 420 Lys Lys Glu Glu Ile Val Gly Val Ala Thr Phe Tyr Asn Arg Lys Asp Gly Lys Pro Phe Asp Glu Gln Asp Glu Val Leu Met Glu Ser

1309-1398 CTC ACA GAC TTC CTG GGC TGG TCG GTG CTG AAC ACT GAC ACC TAC CAG AAG ATC AAC CTG GAG AAC CCG AAG CAG ATC GCC CAG GAC
421- 450 Leu Thr Gln Phe Leu Thr Phe Ser Val Leu Asn Thr Asp Thr Tyr Asp Lys Met Asn Lys Leu Glu Asn Arg Lys Asp Ile Ala Gln Asp

1399-1488 ATG GTC CTG TAC CAC GTG AGA TGT GAC AGA GAG GAA ATC CAG CTG ATC CTG CCA ACC AGA GAA CCG CTC GGG AAG GAG CCT GCC GAC TGC
451- 480 Met Val Leu Tyr His Val Arg Cys Asp Arg Glu Glu Ile Gln Leu Ile Leu Pro Thr Arg Glu Arg Leu Gly Lys Glu Pro Ala Asp Cys

1489-1578 GAG GAG CAC GAG CTG GGG AAA ATC CTG GAA GTG CTG CCG GGA CCC GCC AAG TTC GAC TAT GAG TTC GAG TTC TCG GAG CTG CAG GAG TGC
481- 510 Glu Glu Asp Glu Leu Gly Lys Ile Leu Glu Val Leu Pro Gly Pro Ala Lys Phe Asp Ile Tyr Glu Phe His Phe Ser Asp Leu Glu Cys

1579-1668 ACG GAA CTG GAG CTG GTC AAA TGC GGT ATC CAG ATG TAC TAT GAG CTG GGT GTG GTT CGA AAG TTC CAG ATC CCC CAG GAG GTC CTG GTG
511- 540 Thr Glu Leu Glu Leu Val Lys Cys Gly Ile Gln Met Tyr Tyr Glu Leu Gly Val Leu Thr Tyr Glu Leu Val Leu Thr Val Leu

1669-1758 CGG TTC CTG TTC TCC GTG AGC AAG GGC TAC AGG AGA ATC ACC TAC CAC AAC TGG CGC CAC GGC TTC AAC GTG GCC CAG ACC ATG TTC ACG
541- 570 Arg Phe Leu Phe Ser Val Ser Lys Gly Tyr Arg Arg Ile Thr Tyr His Asn Trp Arg His Gly Phe Asn Val Ala Gln Thr Met Phe Thr

1759-1848 CTG CTC ATG ACA GGC AAG CTG AAG AGC TAC TAC ACG GAC CTG GAG GCC TTT GCC ATG GTG ACT GCC GGC CTG TGC CAT GAC ATT GAC CAT
571- 600 Leu Leu Met Thr Gln Lys Glu Tyr Thr Asp Leu Glu Ala Phe Ala Met Val Lys Glu Ser Ser Ile Leu Arg Arg His Leu Asp His

1849-1938 CCG GGC ACC AAT AAC CTC TAC CAG ATG AAG TCC CAG AAC CCT TTA GCC AAG CTC CAC GGC TCC TCG ATT TTG GAG CGA CAC CAC CTG GAG
601- 630 Arg Gly Thr Asn Asn Leu Tyr Gln Met Lys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Lys Leu His Gly Ser Ser Ile Leu Arg Arg His Leu Glu

1939-2028 TTC GGG AAG TTC CTG CTC TCC GAG ACC CTG AAC ATC TAC CAG AAC CTG AAC CCG CCG CAG CAC GAG CTG ATC CAC CTC ATG GAC
631- 660 Phe Gly Lys Phe Leu Ser Ser Glu Thr Leu Asn Ile Tyr Gln Asn Leu Asn Arg Arg Gln His Glu His Val Ile His Leu Met Asp

2029-2118 ATC GCC ATC ATC GCC ACA GAC CTG GGC CTC TAC TTC AAA AAA AGG ACA ATG TTC CAG AAG ATT GTG GAT GAG TCC AAG AAC TAC GAG GAC
661-690 Ile Ala Ile Ile Ala Thr Asp Leu Ala Leu Tyr Phe Lys Lys Arg Thr Met Phe Gln Lys Ile Val Asp Asp Ser Lys Asn Tyr Glu Asp

2119-2208 AGG AAG AGC TGG GTG GAG TAC CTG TCC TTG GAG ACC ACG AGG AAG GAG ATC GTC ATG GCC ATG ATG ATG ACG GCA TGT GAC CTG TCT GCC
691- 720 Arg Lys Ser Trp Val Glu Tyr Leu Ser Leu Glu Thr Thr Arg Lys Glu Ile Val Met Ala Met Met Met Thr Ala Cys Asp Leu Ser Ala

2209-2298 ATC ACC AAG CCC TGG GAA GTC CAG AGC AAG GTT GCT CTG CTG GTG GCA GCT GAG TTC TGG GAG CAA GGG GAC TTG GAG AGG ACG GTT CTG
721- 750 Ile Thr Lys Pro Trp Glu Val Gln Ser Lys Val Ala Met Tyr Thr Asp Leu Val Ala Ala Glu Phe Trp Glu Gln Gly Asp Leu Glu Arg Thr Val Leu

2299-2388 GAT CAG CAG CCC ATC CCA ATG ATG GAC CGG AAC AAG GCA GCT GAG CTC CCC AAG CTA CAG GTC GCC TTC ATC GAC TTC GTG TGC GCG TTT
751- 780 Asp Gln Gln Pro Ile Pro Met Met Asp Arg Asn Lys Ala Ala Glu Leu Pro Lys Leu Gln Val Gly Phe Ile Asp Phe Val Cys Thr Phe

2389-2478 GTG TAC AAG GAG TTC TCC CGC TTC CAC GAG GAG ATC CTG CCC ATG TTT GAC CGG CTG CAG AAC AAC AGG AAG GAG TGG AAG GCC TTG GAG
781- 810 Val Tyr Lys Glu Phe Ser Arg Phe His Glu Glu Leu Pro Met Phe Asp Arg Leu Gln Asn Arg Asp Leu Glu Tyr Asp Leu Tyr Lys Ala Leu Ala

2479-2568 GAT GAG TAC GAA GCC AAG GTG AAG GCC CTG GAG GAG CAG CAG AAG AAA GAG ACG ACG GCC AAG AAA GTG GGC ACA GAA ATC TGC AAG GCC
811- 840 Asp Glu Tyr Glu Ala Lys Val Lys Ala Leu Glu Glu Asp Gln Lys Glu Thr Thr Ala Lys Lys Val Gly Thr Glu Ile Cys Asn Glu

2569-2674 GGC CCG GCA CCC CGC TGT TCT ACC TGC CGC ATC CTC TGA GCGGGTCCCTGGCCCTCCCCACACCCACCACCCCGCTGGACCCCGCCTTAACCACTGGTACA
841- 852 Gly Pro Ala Pro Arg Ser Ser Tyr Cys Arg Ile Leu TER

2675-2793 AGAGGTAGGGAGCCTGAGAAATGACTGAAGACCAATTTGGATACTTTGAACCTTTTTAAGGCTTGTGTTTTTAACTAAAGCCATGACCAATGATCTGAACAGTGTAGCCACC

2794-2912 TTACCTTACCCTCATCCAACTTTGGATACATAATCACACCACCGAGATCTGTGAGCTGTGTGCCAGAGCAGTGGGTGAATATGTTCCACACTGCACATGTGTTTATGTGTATAC

2913-3014 AAGTGGAGTTTGGATACATGATGCCAGTTCCTCATCTGGTGTAGCAACAAATATGTGAATGAAATTTAGCAATAATCAAAAAGAAAAAATAAAAAA

Рис. 2. Первичная структура кДНК β-субъединицы фосфоэстеразы и соответствующая ей аминокислотная последовательность. Подчеркнуты аминокислотные последовательности, структура которых установлена анализом пептидов, полученных при расщеплении бромцианом и трипсином

Для поиска клонов, содержащих кДНК β -субъединицы, наряду со скринингом с помощью олигонуклеотидных зондов использовали иммуноскрининг, проводимый по методу [3]. Анализ $5 \cdot 10^6$ рекомбинантов позволил обнаружить клон рВ9 (рис. 1), дающий положительный сигнал с поликлональными антителами на суммарный препарат ФДЭ. В аминокислотной последовательности, выведенной из структуры кДНК этого клона, были идентифицированы участки, структура которых совпадала с последовательностями пептидов $\beta 1$ (Val-Asn-Val-Gln-Asp-Val-Met) и $\beta 2$ (Asn-Gly-Lys-Asp-Val-Val-Ala-Val-Ile-Met), выделенных из смеси продуктов бромцианового расщепления β -субъединицы, полученной в гомогенном состоянии с помощью электроэлюции из полиакриламидного геля [2], и отсутствующих в аналогичной смеси α -субъединицы. Следовательно, кДНК клона рВ9 кодирует фрагмент β -субъединицы фермента.

При скрининге клоноклеток с помощью олигонуклеотидных зондов I—IX, синтезированных по установленным нами последовательностям кДНК клонов рВ9, рВ2, рВ17 и рВ36, были выявлены клоны, в сумме включающие всю кДНК β -субъединицы ФДЭ. Нуклеотидные последовательности этих фрагментов кДНК и выведенная из них аминокислотная последовательность не совпадали с соответствующими последовательностями α -субъединицы ФДЭ и ее кДНК, но были высокогомологичны им. В то же время структура ряда пептидов, выделенных из гидролизатов смеси α - и β -субъединиц и не относящихся к α -субъединице [2], совпадала с аминокислотной последовательностью, выведенной из структуры фрагментов кДНК этих клонов.

Параллельно в клонотеке кДНК, полученной в векторе λ Zap (Stratagene), был обнаружен клон рВ11, включающий практически всю кДНК β -субъединицы, за исключением небольшого 5'-концевого участка.

Анализ первичных структур всех исследованных клонов позволил нам установить полную нуклеотидную последовательность кДНК β -субъединицы ФДЭ (рис. 2). Выведенная из нуклеотидной последовательности кДНК аминокислотная последовательность β -субъединицы содержит 852 аминокислотных остатка. Молекулярная масса белка 98 291 Да.

Сравнение структур α - и β -субъединиц ФДЭ позволило обнаружить высокую гомологию этих белков (71%), при этом наиболее консервативными являются участки активных центров этих субъединиц (514—795 α -субъединицы и 511—792 β -субъединицы, гомология 86%).

Высокая гомология структур кДНК и аминокислотных последовательностей α - и β -субъединиц может свидетельствовать о наличии у них общего предшественника.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Овчинников Ю. А., Губанов В. В., Храмов Н. В., Ахмедов Н. Б., Заграничный В. Е., Ищенко К. А., Мурадов Х. Г., Баринов А. А., Бондаренко В. А., Кумарев В. П., Кобзев В. Ф., Липкин В. М. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 288. № 6. С. 1505—1507.
2. Овчинников Ю. А., Губанов В. В., Храмов Н. В., Ахмедов Н. Б., Ищенко К. А., Заграничный В. Е., Василевская Н. А., Ракипина Т. В., Арабскова Н. В., Баринов А. А., Мурадов Х. Г., Шуваева Т. М., Быстров Н. С., Северцова И. В., Липкин В. М. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 296. № 2. С. 487—491.
3. Hsu P.-L., Hsu S.-M., Appella E. // Gene Anal. Techn. 1985. V. 2. P. 30—36.
4. Ovchinnikov Yu. A., Gubanov V. V., Khramtsov N. V., Ishchenko K. A., Zagranichny V. E., Muradov Kh. G., Shuvaeva T. M., Lipkin V. M. // FEBS Lett. 1987. V. 223. № 1. P. 169—173.

Поступило в редакцию 28.VIII.1989

CYCLIC GMP PHOSPHODIESTERASE FROM BOVINE RETINA. AMINO ACID SEQUENCE OF THE β -SUBUNIT AND NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE CORRESPONDING cDNA

LIPKIN V. M., GUBANOV V. V., KHRAMTSOV N. V., VASILEVSKAYA I. A.,
ATABEKOVA N. V., MURADOV K. G., SHUVAEVA T. M., SURINA E. A.,
ZAGRANICHNY V. E., LI T.*

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow,* The University of Chicago, Chicago, USA

Primary structure of β -subunit of the cyclic GMP phosphodiesterase has been determined by the parallel analysis of the protein amino acid sequence and the corresponding cDNA nucleotide sequence. The β -subunit contains 852 amino acid residues, its molecular mass is 98291 Da. A significant homology is found between β - and α -subunit of the cGMP phosphodiesterase.