

УДК 577.212.3

**УТОЧНЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ И ИНТРОННО-ЭКЗОННОЙ
СТРУКТУРЫ ГЕНА АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ*****Rattus norvegicus****Н.И. Ланник, Д.С. Тарасов, К.А. Петров, Э.А. Бухараева,
Е.Е. Никольский, А.А. Ризванов***Аннотация**

Целью настоящего исследования являлось уточнение нуклеотидной последовательности и анализ структуры гена ацетилхолинэстеразы (АХЭ) *Rattus norvegicus*. При выполнении проекта «Геном крысы» (NW_001084677,1) была получена последовательность гена АХЭ крысы. При анализе этой последовательности обнаружены пробы длины 229 нуклеотидов с 5'-конца и 391 нуклеотидов с 3'-конца гена АХЭ. В ходе экспериментов также определена первичная нуклеотидная последовательность и проведен анализ недостающих участков гена. Компьютерная модель структуры гена АХЭ *R. norvegicus* создана на основе множественного выравнивания, анализа банка данных EST-последовательностей с помощью методов биоинформатики.

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза, альтернативный сплайсинг, ПЦР, секвенирование.

Введение

Ацетилхолинэстераза (ацетилхолин – ацетилгидролаза, АХЭ, К.Ф. 3,1,1,7) – каталитический фермент, входящий в семейство сериновых гидролаз и играющий ключевую роль в процессе передачи возбуждения в холинэргических синапсах путем гидролиза ацетилхолина с образованием холина и уксусной кислоты. Следует отметить, что в нейромышечном синапсе АХЭ находится в высоких концентрациях и ее уровень регулируется как различными нейрональными факторами, так и гормонами [1]. Данный фермент можно обнаружить не только в нейронах и мышечных волокнах, но и в широком спектре тканей и клеточных типов, например в эритроцитах, эукариотических линиях клеток, мозговом слое надпочечников и овариальных фолликулах. В процессе эмбриогенеза АХЭ выявляется в тканях, происходящих из эктодермы, энтодермы и мезодермы. Однако биологическая роль АХЭ не ограничивается холинэргической передачей. Хорошо известно, что у высших позвоночных помимо основной функции АХЭ также вовлечена в процесс клеточной адгезии, пролиферации, роста аксонов различных типов нейронов, включая нехолинэргические, регулирует апоптоз и ингибирует пролиферацию мультипотентных стволовых клеток [2].

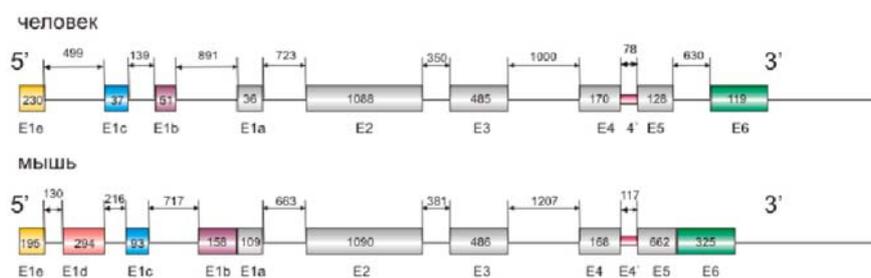


Рис. 1. Структура гена АХЭ человека и мыши

С каждым годом круг изучаемых организмов в данной области исследования расширяется, и на настоящий момент в базе данных нуклеотидных последовательностей (GenBank) представлены фрагменты нуклеотидной последовательности гена АХЭ как для беспозвоночных (*Boophilus microplus* (AJ223965,1)), так и для высших организмов (*Felis catus* (NM_001009203.1), *Equus caballus* (XM_001498951,1)). Что касается млекопитающих, полные нуклеотидные последовательности гена известны для небольшого числа представителей данного типа (*Homo Sapiens* (NC_000007:c100332370-100325551), *Mus musculus* (AF312033), *Pan troglodytes* (AC190224,3|:7058-13884), *Bos taurus* (NC_007326:36088600-36095400) и *Macaca mulatta* (NC_007860:c48188300-48181200)). Наиболее подробно структура гена АХЭ изучена на примере гена домового мыши (*Mus musculus*) [3, 4] и человека (*Homo sapiens*) [5] (рис. 1).

Известно, что ген АХЭ человека расположен в хромосоме 7q22, мыши – в 5-й и крысы – в 12-й хромосоме. АХЭ является высоко полиморфным ферментом благодаря тому, что регуляция происходит как на транскрипционном, посттранскрипционном, так и трансляционном уровнях.

Последовательности экзонов 5'-конца – 2-й, 3-й и 4-й – ответственны за каталитические свойства, в то время как экзоны 3'-конца – 5-й и 6-й – за расположение АХЭ в ткани [6]. Ацетилхолинэстераза существует в виде множественных молекулярных форм, имеющих одинаковые каталитические свойства, но значительно различающихся характером сборки субъединиц, скоростью седиментации, а также типом ассоциации с клеточной мембраной [7]. Описаны 3 канонические изоформы, отличающиеся по вариабельности С-конца и возникающие в процессе альтернативного сплайсинга. Каталитический домен образуется путем сплайсинга 2-го, 3-го и 4-го экзонов. При сплайсинге с 5-м экзоном образуется изоформа с гликофосфатидилинозитольным концом (GPI), которую можно обнаружить в гематопоетической системе, а именно в тромбоцитах и эритроцитах. В результате сплайсинга с 6-м экзоном возникает С-концевая последовательность, которая образует АХЭ, локализирующуюся преимущественно в мышцах и мозге (изоформа Т). Это так называемая синаптическая форма АХЭ. С-концевая последовательность обуславливает образование как амфифильных (G1a, G2a и G4a), так и асимметричных мономеров, димеров и тетрамеров, которые могут взаимодействовать с якорными белками *ColQ* и *PRiMA*, а также растворимого тетрамера (G4na).

В дополнение к 3'-альтернативному сплайсингу, который приводит к образованию фермента с различными вариантами С-конца, происходит также альтерна-

тивный сплайсинг 5'-конца [8]. Роль этих альтернативных вариантов до конца не изучена. Включение нуклеотидной последовательности экзона E1d при альтернативном сплайсинге может приводить к образованию N-формы ацетилхолинэстеразы в результате встраивания дополнительных аминокислот в последовательность белка, что предположительно предотвращает отщепление с N-конца фермента сигнального пептида, который в этом случае может стать частью трансмембранного домена.

Последовательность гена ацетилхолинэстеразы крысы, полученная в ходе выполнения проекта «Геном крысы» (NW_001084677,1), содержит пробелы длиной 229 нуклеотидов с 5'-конца и 391 нуклеотидов с 3'-конца. Согласно базе данных нуклеотидных последовательностей, эти пробелы закрываются фрагментом геномной ДНК (AF134349) и фрагментом пре-мРНК (AY555735). В связи со значимостью данных участков для альтернативного сплайсинга целью настоящей работы явилось определение нуклеотидной последовательности гена ацетилхолинэстеразы крысы, содержащего пробелы, и сравнительный филогенетический анализ с соответствующими последовательностями гена мыши и человека.

1. Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали белых беспородных крыс. Геномную ДНК выделяли из гомогената поперечнополосатых скелетных мышц с использованием набора EZ-10 Spin Column Genomic DNA Kit, Animal Samples (Bio Basic Inc., США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

Аmplификацию исследуемых фрагментов ДНК проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл тотальной ДНК, 4 мМ MgCl₂, 10 мМ каждого dNTP, 0.4 мМ прямого и обратного праймеров, 10 мкл 5× Green buffer для ПЦР и 2.5 ед./мкл Taq-полимеразы (Promega, США). Амплификацию осуществляли 35-кратным повторением стадий в такой последовательности: денатурация 30 с при 94 °С, отжиг 30 с при 59 °С и элонгация 2 мин при 72 °С на автоматическом термоциклере MJ Mini (BioRad, Сингапур). Для амплификации фрагмента гена АХЭ использовали следующую комбинацию праймеров:

rAChE-FirstN-F(5'-CACTATGTGGCCTGGCTTCT-3')/rAChE-FirstN-R(5'-TCTTCCAATGTCCCCAGACT-3')

и

rAChE-SecN-F(5'-TTCGGCGGCTCTAACTACAT-3')/rAChE-SecN-R(5'-GCCCAAACATGCAGAAGAT-3').

Данные праймеры разработаны нами на основании нуклеотидной последовательности NW_001084677,1 гена АХЭ крысы с использованием программного пакета Lasergene 5,03 (DNASTAR Inc., США)

Продукты ПЦР-реакции анализировали при помощи электрофореза в 1%-ном агарозном геле с окраской ДНК бромистым этидием. Фрагменты ДНК необходимой длины вырезали из геля и очищали с помощью набора EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (Bio Basic Inc.) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Секвенирование очищенных продуктов ПЦР осуществляли с помощью ПЦР-праймеров, набора для секвенирования ABI PRISM BigDye Terminator v3,1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems, США). Анализ сиквенсных хроматограмм и ассемблинг проводили с использованием программы SeqMan, входящей в программный пакет Lasergene 5,03 (DNASTAR Inc., США).

Выравнивание последовательности гена АХЭ крысы и мыши (глобальное выравнивание, алгоритм Нидлмана – Вунша) осуществляли с помощью алгоритма needle из пакета EMBOSS [9] с использованием штрафа за вставку 10,0, матрицы сходства EDNAFULL. Анализ EST-последовательностей проводили по базе данных UniGene [10] с помощью программы ASPIC [11]¹ для поиска потенциальных сайтов сплайсинга использовали программу ASSP [12].

2. Результаты и их обсуждение

В результате секвенирования были получены нуклеотидные последовательности длиной 1019 п.н. для 5'-конца и 847 п.н. для 3'-конца гена АХЭ крысы, которые полностью перекрыли пробелы в последовательности гена АХЭ 12-й хромосомы NW_001084677,1. В результате предварительного анализа в программе DNA STAR (США) обнаружено, что пробел на С'-конце находится в области экзона 1d, захватывает экзон 1с и, соответственно, интрон, находящийся между ними. В то время как пробел на N'-конце расположен в области 5-го экзона. Полученные нуклеотидные последовательности были депонированы в базу данных GeneBank (GQ338831, GQ338832).

2.1. Структура гена ацетилхолинэстеразы крысы. Для выявления порядкового (линейного) расположения экзонов и интронов в гене АХЭ крысы было проведено глобальное выравнивание (алгоритм Нидлмана – Вунша) последовательности ДНК данного гена с последовательностью гена мыши. Выравнивание показало, что эти последовательности являются гомологичными на 84,5%.

В результате выравнивания и попарного сравнения нуклеотидных последовательностей гена АХЭ крысы и мыши нами обнаружены нуклеотидные замены, а также вставки и делеции. Общее число замен в нуклеотидной последовательности экзонов гена АХЭ крысы составило 115 п.н., число вставок – 34 п.н., делеций – 13 п.н. Наличие делеции в нуклеотидной последовательности гена, соответствующей границе экзона E1d гена мыши, не позволяет по данному выравниванию определить границу экзона E1d.

Несмотря на то что построенная модель представляется адекватной, исходя исключительно из данных выравнивания последовательностей невозможно сделать окончательных выводов о структуре гена. В связи с этим мы провели изучение возможных продуктов альтернативного сплайсинга гена путем выравнивания последовательности ДНК гена и соответствующих фрагментов экспрессированных последовательностей [13]. Поиск в базе данных UniGene позволил найти 36 фрагментов экспрессированных последовательностей (EST-последовательностей) для гена АХЭ крысы. На основании этих данных с помощью программы ASIC был получен прогноз возможных интронов и экзонов с данными относительных позиций начала и конца в нуклеотидной последовательности гена (табл. 1).

¹ См. также <http://aspic.algo.disco.unimib.it/aspic-devel>.

Табл. 1

Результаты анализа продуктов альтернативного сплайсинга с помощью базы данных EST-последовательностей

Элемент	Относительная позиция начала	Относительная позиция конца
интрон 1	-1571	-27
интрон 2	-1571	-24
интрон 3	1067	1430
интрон 4	1916	3311
интрон 5	3482	4274
экзон 1	-1645	-1572
экзон 2	-1641	-1572
экзон 3	-26	1066
экзон 4	-23	472
экзон 5	1431	1915
экзон 6	3222	3481
экзон 7	4275	4616

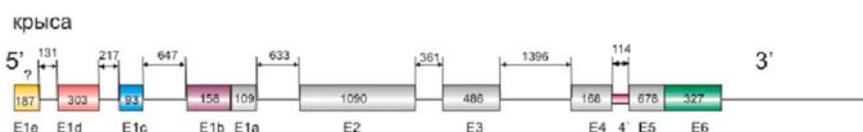


Рис. 2. Структура гена АХЭ крысы

Из альтернативных экзонов 5'-конца в гене крысы подтверждается только существование экзона E1e – ему соответствует 1-й экзон в результатах анализа (на 18 нуклеотидов короче, чем следует из модели полученной путем выравнивания). Отсутствие других 5'-экзонов в результатах анализа может объясняться небольшим количеством EST-последовательностей для гена АХЭ крысы, имеющих в базе данных. Кроме того, подтверждается наличие и позиции экзонов E2, E3, E4 и E6.

В результате поиска потенциальных сайтов сплайсинга с помощью программы ASSP выявлены донорные сайты после экзонов E1d, E1c и E1a, что может служить косвенным подтверждением верности определения границ этих экзонов.

На основании полученных результатов была построена модель структуры гена АХЭ крысы (рис. 2). Данная модель отличается от последовательности гена АХЭ мыши лишь разницей в количестве нуклеотидов как интронной, так и экзонной областей. При сравнении с моделью гена АХЭ человека помимо разницы в количественном соотношении нуклеотидов в структуре гена АХЭ крысы отсутствует интрон, расположенный между 5-м и 6-м экзоном.

3. Выводы

Уточнена нуклеотидная последовательность гена ацетилхолинэстеразы крысы путем секвенирования двух пробелов в нуклеотидной последовательности NW_001084677.1, полученной в ходе реализации проекта генома крысы.

Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в базу данных GeneBank (GQ338831, GQ338832).

На основании выравнивания последовательности гена ацетилхолинэстеразы мыши и крысы построена модель экзон-интронной структуры гена крысы, которая уточнена с помощью анализа информации о фрагментах экспрессированных последовательностей и поиска потенциальных сайтов сплайсинга.

Авторы выражают благодарность профессору Черновой Ольге Александровне за помощь в подготовке рукописи статьи.

Работа частично финансировалась грантами Российского фонда фундаментальных исследований и государственным контрактом ФЦП Федерального агентства по науке и инновациям. Работа А.А. Ризванова также финансировалась реинтеграционным грантом НАТО NR.RIG.983007.

Работа частично выполнена на оборудовании Регионального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов (РЦКП ФХИ) Казанского (Приволжского) федерального университета.

Summary

N.I. Lannik, D.S. Tarasov, K.A. Petrov, E.A. Bukharaeva, E.E. Nikolskii, A.A. Rizvanov. Specification of Primary Nucleotide Sequence and Exon-Intron Structure of *Rattus norvegicus* Acetylcholinesterase Gene.

The purpose of this study was to specify the nucleotide sequence and structure of the acetylcholinesterase (AChE) gene of *Rattus norvegicus*. During an analysis of rat genomic DNA sequence data obtained in the course of the project Rat Genome Sequencing Consortium (RGSC) (NW_001084677,1), the authors found gaps of 229 nucleotides at the 5'-end and 391 nucleotides at the 3'-end of AChE gene. These gaps were sequenced and analysed. A computer model of *R. norvegicus* AChE gene structure was developed based on multiple alignment, analysis of EST-sequences database, and using methods of bioinformatics.

Key words: acetylcholinesterase, alternative splicing, PCR, sequencing.

Литература

1. *Brank M., Zajc-Kreft K., Komel R.* Biogenesis of acetylcholinesterase in impaired, although its mRNA level remains normal, in the glucocorticoid-treated rat skeletal muscle // *Eur. J. Biochem.* – 1998. – V. 251. – P. 374–381.
2. *Thullbery M., Cox H., Schule T., Thompson C., George K.* Differential localization of Acetylcholinesterase in neuronal and non-neuronal cells // *J. Cell. Biochem.* – 2005. – V. 96. – P. 599–610.
3. *Li Y., Camp S., Rachinsky T., Getman D., Taylor P.* Gene Structure of Mammalian Acetylcholinesterase // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266, No 34. – P. 23083–23090.
4. *Li Y., Camp S., Rachinsky T., Getman D., Taylor P.* Promoter elements and transcriptional control of Mouse Acetylcholinesterase gene // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268, No 5. – P. 3563–3572.
5. *Getman D.K., Eubanks J.H., Camp S., Evans G.A., Taylor P.* The human gene encoding acetylcholinesterase is located in the long arm of chromosome 7 // *Am. J. Hum. Genet.* – 1992. – V. 51. – P. 170–177.

6. *Camp S., Zhang L., Marquez M., Torre B., Long J., Bucht G., Taylor P.* AChE gene modification in transgenic animals: Functional consequences of selected exon and regulatory region deletion // *Chem. Biol. Interact.* – 2005. – V. 157–158. – P. 79–86.
7. *Li Y., Camp S., Rachinsky T.L., Getman D., Taylor P.* Gene structure of mammalian acetylcholinesterase // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266. – P. 23083–23090.
8. *Meshorer E., Toiber D., Zure D., Sahly I., Dori A., Cagnano E., Schreiber L., Grisaru D., Francois T., Soreq H.* Combinatorial complexity of 5' alternative acetylcholinesterase transcripts and products // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279, No 28. – P. 29740–29751.
9. *Rice P., Longden I., Bleasby A.* EMBOSS. The European Molecular Biology Open Software Suite // *Trends Genet.* – 2000. – V. 16. – P. 276–277.
10. *Pontius J.U., Wagner L., Schuler G.D.* UniGene: a unified view of the transcriptome // *The NCBI Handbook.* – Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information, 2003. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21083/pdf/ch21.pdf>, свободный.
11. *Bonizzoni P., Rizzi R., Pesole G.* ASPIC: a novel method to predict the exon-intron structure of a gene that is optimally compatible to a set of transcript sequences // *BMC Bioinformatics.* – 2005. – V. 6. – P. 244-1–244-16.
12. *Wang M., Marín A.* Characterization and prediction of alternative splice sites // *Gene.* – 2006. – V. 366. – P. 219–227.
13. *Grasso C., Modrek B., Xing Y., Lee C.* Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences using partial order multiple sequence alignment graphs // *Nucl. Acid. Res.* – 2001. – V. 29. – P. 2850–2859.

Поступила в редакцию
23.11.10

Ланник Наталья Ивановна – аспирант кафедры генетики Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Natalya.lannik@gmail.com

Тарасов Денис Станиславович – кандидат биологических наук, инженер кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: dtarasov@mntech.ru

Петров Константин Андреевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН,

E-mail: kpetrov@mail.ru

Бухараева Элла Ахметовна – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

E-mail: ellyab@mail.ru

Никольский Евгений Евгеньевич – доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, профессор Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

E-mail: eenik1947@mail.ru

Ризванов Альберт Анатольевич – доктор биологических наук, доцент кафедры генетики Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: rizvanov@gmail.com