

Получение и характеристика мышинового гена, гомологичного *Npr-1* гену человека, картированному на участке хромосомы 21 q22.3

И. Я. Скрипкина, Л. А. Цыба, Д. Славов¹, С. М. Кваша, К. Гардинер¹, А. В. Рындич

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

¹Институт им. Элеанор Рузвельт
Денвер, Колорадо 80206, США

Получена новая мышинная кДНК и ген, гомологичные гену нового ядерного белка человека (Npr-1), картированному на участке 21-й хромосомы человека q22.3. Определена их полная нуклеотидная последовательность. Геномное секвенирование показало, что мышинный ген Npr-1 состоит из 13 экзонов, расположенных на 14,5 тыс. п. н. Определена структура гена Npr-1 человека, проведен сравнительный анализ генов Npr-1 человека и мыши. Показано, что уровень экспрессии гена Npr-1 в мозге не изменяется на протяжении жизни животного, и экспрессия его в различных тканях нормальных и трисомных мышей идентична.

Введение. Трисомия 21-й хромосомы (НС21) — наиболее распространенная человеческая наследственная анеуплоидия, встречающаяся 1 раз на 700 рождений [1]. В связи с этим, а также и потому, что это — наименьшая из человеческих аутосом, анализ НС21 имел приоритетное значение в Проекте Генома человека [2]. Теломерная область НС21q22.3 ассоциирована с несколькими фенотипами синдрома Дауна, в том числе с врожденным дефектом сердца [3].

Мутации 14 известных генов на 21-й хромосоме были определены как причины нескольких моногенных заболеваний, включая одну из форм болезни Альцгеймера (APP), амиотрофичный склероз (SOD1), аутоиммунное полигландулярное заболевание (AIRE) [4], гомоцистинурию (CBS), а также локус склонности к лейкемии (AML1). В этом районе содержится локус, связанный, возмож-

но, с проявлением множества заболеваний: одной или двух форм несиндромной наследственной глухоты [5, 6]; синдрома Кюбляха [7]; двухполосного эмоционального расстройства [8, 9]; одной из форм голопроэнцефалии (HPE) [10].

Существенным шагом в локализации генов, отвечающих за фенотип синдрома Дауна, стало изучение больных с частичной трисомией 21-й хромосомы, возникающей в результате транслокации или дупликации. Но возможности этого метода были ограничены большой фенотипической вариабельностью среди больных с синдромом Дауна и малым количеством детально охарактеризованных случаев «транслокационного» синдрома Дауна. Полный анализ дефектов развития у больных с синдромом Дауна требует наличия модели, которая сможет предоставить доступ к тканям и клеткам на всех стадиях развития заболевания.

Одной из самых перспективных моделей является мышинная модель синдрома Дауна [11]. Сравнительное картирование генов мышей и человека показало, что 21-я хромосома человека имеет большой участок генетической гомологии с хромосомой

16 мыши, а также меньшие по размеру участки, гомологичные 10-й и 17-й хромосомам мыши. Мышиная модель позволит не только идентифицировать гены, связанные с заболеванием, но и проследить его развитие. Определение названных генов в будущем может дать возможность лечения данного заболевания методом генной терапии.

Изучение некоторых генов, картированных на HC21, и сравнение их генной структуры у человека и мыши определяют исключительный интерес к проведению данного исследования как части детальной характеристики генов, потенциально вовлеченных в развитие синдрома Дауна.

Материалы и методы. *Бактериальные клоны, геномные и кДНК-библиотеки.* В работе использовали «гриды» — нейлоновые фильтры 2424 см (космидная геномная библиотека 129/Ola (Resource Center/Primary Database of the German Human Genome Project, Berlin, Germany) селезенки мыши) с упорядоченно расположенными клонами (около 27648 на каждом) и фаговую (λ gt 10) P5 cbm кДНК библиотеку мыши («Stratagen», США). Клон HUM21ES120 (M13-120) из кДНК библиотеки ClonTech HL 1065a *Homo sapiens* эмбрионального мозга человека [12], любезно предоставленный нам д-ром К. Гардинер, содержит кДНК вставку, предварительно картированную на участке хромосомы 21 q22.3.

Получение препаратов нуклеиновых кислот. РНК из тканей здоровой (нормальной) и трисомной (Ts65Dn) мышей выделяли гуанидинизотиоцианатным методом [13] с использованием реагента Trizol («Gibco BRL», США). Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса или лизисом кипячением [14, 15]. Для извлечения ДНК из агарозы использовали набор реактивов и протокол «GeneClean II» («Bio101», США).

Реакции рестрикции и лигирования. Реакции рестрикции проводили с плазмидной ДНК в концентрации около 1 мкг в 20 мкл реакционной смеси, ферментом и в буферном растворе оптимальной ионной силы и значения pH, согласно рекомендациям фирмы-изготовителя («Fermentas», Литва; «Boehringer Mannheim», Германия; «NEB Biolabs», Англия). В реакции лигирования [14] использовали ДНК-лигазу фага T4 в концентрации 1 ед. Вейса на 10 мкл реакционной смеси («Boehringer Mannheim», «Fermentas»). Реакцию осуществляли при температуре 10—15 °С в течение 12—16 ч или 2—3 ч при 37 °С для ДНК-лигазы фага T4 («Boehringer Mannheim») и при 21 °С в течение 1 ч для ДНК-лигазы фага T4 («Fermentas»).

Трансформация бактериальных клеток плазмидной ДНК. Для приготовления компетентных

клеток использовали XL1 штамм *Escherichia coli* («Stratagene»). Бактерии трансформировали плазмидной ДНК с применением CaCl_2 [17].

Электрофорез нуклеиновых кислот. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили в агарозном геле (0,8—1 %), используя трис-ацетатный электрофорезный буферный раствор и глицериновый буферный раствор для нанесения проб [14]. Электрофорез РНК осуществляли в 1 %-м агарозном геле в присутствии 2,2 М формальдегида («Fluka», Швейцария) [14].

Иммобилизация нуклеиновых кислот на мембране. РНК и ДНК из агарозного геля на мембрану (Hybond-N, «AmershamPharmaciaBiotech», Англия/Швеция) переносили по методу [18] в модификации [14]. Мембрану подсушивали на воздухе и иммобилизовали нуклеиновые кислоты УФ-облучением в аппарате «Stratalinker» («Stratagene»).

Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот. Радиоактивно меченные пробы ДНК получали в реакции «олигомечения» [19], используя набор реагентов «RediprimeII» и изотоп [α - ^{32}P]dCTP, согласно рекомендациям фирмы-изготовителя («AmershamPharmaciaBiotech»). Продукт реакции очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-50 («Pharmacia», Швеция) [14]. Специфическую активность пробы измеряли, как описано [14]. Фильтры гибридизовали в растворе общей активностью 108 имп/мл [14] в течение 10—16 ч при 42 °С в устройстве «BellcoGlass» (США). При отмывке фильтров в строгих условиях (65 °С, 30—60 мин) предельная концентрация NaCl составляла 0,03 М, в нестрогих (50 °С, 1,5—2 ч) — 0,3 М.

Анализ нуклеотидных последовательностей. Нуклеотидную последовательность ДНК определяли по методу Сэнгера [20], используя протокол и набор реактивов «USB» (США), а также [α - ^{35}S]dATP («AmershamPharmaciaBiotech»). Нуклеотидные последовательности анализировали с использованием BlastN и BlastX анализа сервера (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Национального Центра Биотехнологической Информации, США (National Center for Biotechnology Information, NCBI) и Центра Геномных Последовательностей Человека, Колледж Медицины (Байлор, США) (Human Genome Sequences Center, <http://www.dot.imgen.bcm.tcm.edu>). Поиск повторов осуществляли с помощью программы RepeatMasker (Human Genome Sequences Center, <http://www.dot.imgen.bcm.tcm.edu>). Поиск функциональных элементов 3'- и 5'-нетранслируемых последовательностей мРНК проводили с помощью программы <http://bigarea.area.ba.cnr.it:8000/EmbIT/> UTRHome, любезно предоставленной д-ром Г. Пезоле.

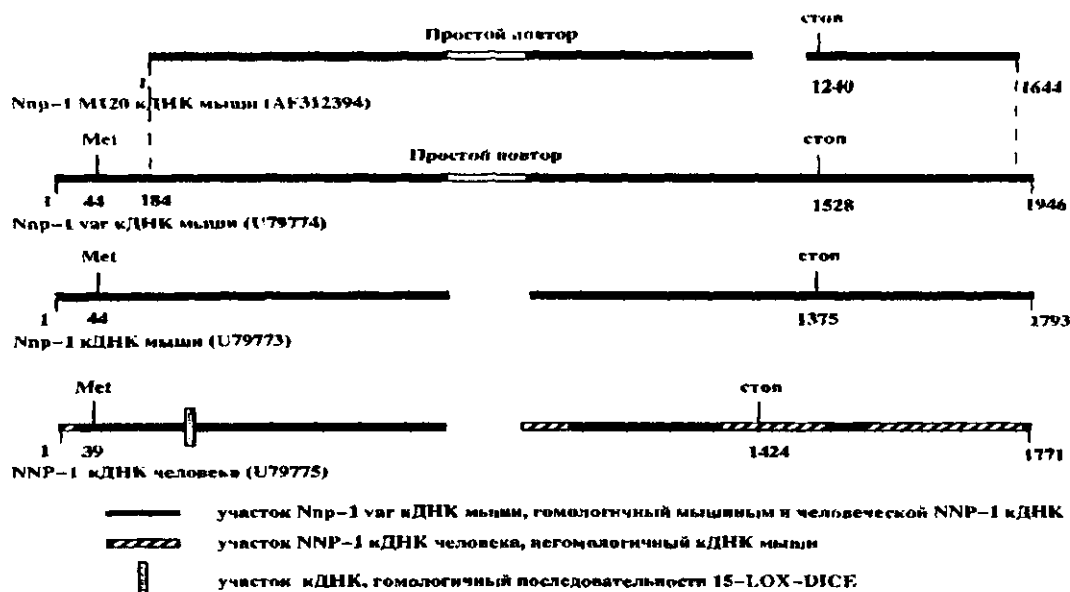


Рис. 1. Схематическое изображение строения транскриптов генов *Nnp-1* человека и мыши

Результаты и обсуждение. Секвенирование вставки клона M13-120 показало, что она представляет собой неполную (длиной 625 п. н., с отсутствием 131 п. н. с 5'-конца и 927 п. н. с 3'-конца) кДНК гена нового ядерного белка (NNP-1) человека, кодирующего белок с молекулярной массой около 52 кДа, состоящий из 461 аминокислотного остатка (а. о.). Локализация этого белка была обнаружена в ядре [21]. Его вторичная структура предполагает образование множественных α -спиралей, являющихся наиболее вероятными мотивами для узнавания ДНК-связывающими белками.

В Genbank'e представлен только один транскрипт гена *Nnp-1* человека (P. № U79775). Кодированный участок кДНК находится с 39 п. н. по 1424 п. н., 5'-нетранслируемый участок состоит из 38 п. н. и 3' UTR — из 227 п. н. *Nnp-1* кДНК человека содержит локус 15-Lox-Dice в транслируемом районе (243—258 п. н.) (рис. 1). Такие участки, находясь в 3' UTR, являются местами связывания с белком 45 кДа, останавливающим трансляцию данной мРНК [22]. Возможно, что и в случае *Nnp-1* этот белок тоже играет определенную роль в регуляции трансляции.

Нозерн-блот-анализ экспрессии гена показал наличие транскрипта около 2 тыс. н. во всех исследуемых тканях человека [21], что свидетельствует о его принадлежности к «housekeeping» генам.

Человеческий ген NNP-1 первоначально был картирован на 15 тыс. п. н. ДНК хромосомы

HC21q22.3 между маркерами D2S1459 и D2S1953, располагаясь приблизительно на 25 тыс. п. н. ниже гена цистатина В (*Cstb*) [23, 24]. В базе данных найден белок *Caenorhabditis elegans* и YD78 *Saccharomyces cerevisiae*, имеющие гомологию с белком NNP-1 человека 58 и 54 % соответственно. Кроме того, на 21-й хромосоме человека был картирован *Nnp-1*-подобный ген, белок которого состоит из 762 а. о., имеющий 80 % подобности с N-концом NNP-1 белка. Он расположен на 75 тыс. п. н. выше *Nnp-1* и, возможно, является геном-паралогом *Nnp-1*. Последовательность человеческого гена *Nnp-1* была неизвестна, но известно предполагаемое количество экзонов и предположительный размер интронов [21].

Проанализировав имеющуюся в Genbank'e геномную ДНК-последовательность AP001053 длиной 161920 п. н., мы определили, что *Nnp-1* ген человека занимает 14,51 тыс. п. н. этой последовательности (31439—45948 п. н.). Он содержит не 14 (как полагали авторы [21]), а 13 экзонов, а предполагаемые ранее 8-й и 9-й экзоны — это один непрерываемый экзон.

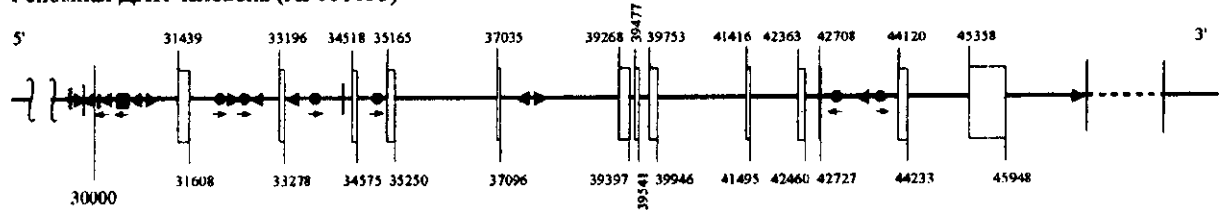
Нами уточнены размеры экзонов и интронов *Nnp-1* гена человека (табл. 1, рис. 2). Используя программу Repeat Masker, проанализированы последовательности гена *Nnp-1* человека на наличие повторов. Они встречаются в интронных последовательностях и составляют 17,13 % общей длины интронов (10,43 % — SINE/Alu, 3,93 % — DNAel/MER1_тип; 1,63 % — DNAel//MER2_тип;

Таблица 1
Экзон-интронные последовательности Npr-1 гена человека

Экзон	3'-сайт интрона	5'-сайт интрона	Подобность экзонов/интронов человека и мыши, %	Размер экзона (п. н.)	Наличие повторов в интронах	Размер интрона (п. н.)
1	GGC CAG gtt ggc	78,7 (149)/38,1 ^{RP} (256) 42,5 (138)	170	SINE/Alu, DNA/MER1_тип	1587
2	atg cag GTG CAG gt gag	78,0/46,8 (249)	83	SINE/Alu, DNA/MER1_тип	1239
3	aca cag GAA CGC gt gag	86,2/40,6 (251)	58	SINE/MIR, DNA/MER1_тип	589
4	tcc cag AGC ATG gt gag	84,6/40 (434)	86	—	1784
5	tca aag CTC AAG gt ggt	67,1/37	62	SINE/Alu	2171
6	cct cag ACA GAG gt gag	85,7/30	130	—	79
7	ceg tag CTT GGA gt aag	86,0/38,2	65	—	211
8	cct cag TTC CAG gt ggg	44,1 ^{RP} /43,1 ^{RP} (311) 60,5 41,5 (399)	194	—	1469
9	ttc cag GCT CAG gt ggg	66,2/42	80	—	867
10	aaa cag TTT GAA gt gag	85,7/44,5 (190)	98	—	247
11	ttt cag GCT GAG gt gag	85,0/28,1/36,9 (458)	20	SINE/Alu, DNA/MER1_тип	1392
12	tct cag GCA GCA gt agg	68,9/35,6 (862)	114	—	1124
13	tgt cag GCA GGG	43,8/37,8 (173—179), (591—455 del)	591	—	—

Примечание. RP — процент подобности последовательностей определяли с учетом повторов, входящих в эту последовательность.

Геномная ДНК человека (AP001053)



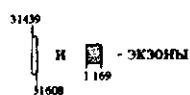
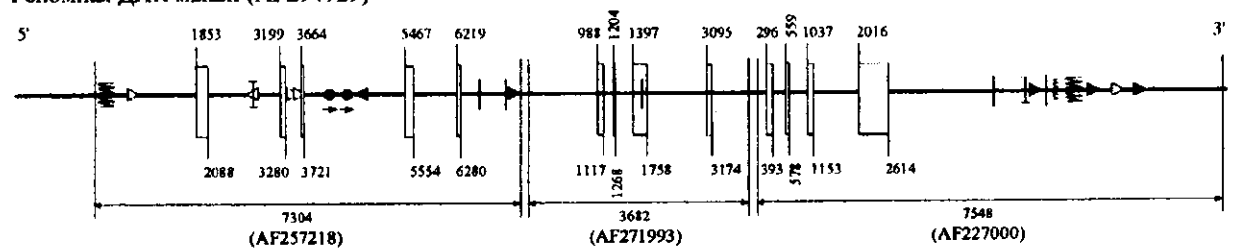
Npr-1 кДНК человека



Npr-1 var кДНК мыши



Геномная ДНК мыши (AF294729)



[-] - простой повтор; > - B2 и B4 повтор; > - Sine/Alu повтор; ● - DNA/MER1-тип,
[-] - повтор низкой сложности; ■ - LINE/L1 повтор; ▬ - LTR; ← - направление повтора.

Рис. 2. Строение генов Npr-1 человека и мыши

0,901 % — SINE/MIR; 0,24 % — простой повтор). С помощью программ TESS, TSSW, TSSG, NNSSP/Eukaryotic был исследован 5'-фланкирующий участок гена *Nnp-1* на наличие промоторной области и сайтов связывания с факторами транскрипции. В области 52 п. н. от начала мРНК найден предполагаемый промотор и сайты связывания транскрипционных факторов для него (CREB, 47 кДа, VSATF_01, VSCREB_04, CRB-BP1, S00978, S01003, S00802, S00974, MEF2). В позиции -313 п. н. начинается область SINE/*Alu*-повторов (с LINE/L1 и LTR/MaLR повторами), содержащая большое количество сайтов связывания транскрипционных факторов и являющаяся, очевидно, усилителем экспрессии этого гена.

3'-фланкирующий участок гена *Nnp-1* человека длиной 893 п. н. (от конца последнего экзона) не имеет повторов.

Ген *Cstb*, граничащий с *Nnp-1*-геном с 5'-конца, расположен на расстоянии 13,228 тыс. п. н. от него, а не 25 тыс. п. н., как предполагалось ранее [23, 24].

С 3'-конца гена *Nnp-1* близкорасположенных последовательностей генов не было найдено (поиск последовательностей — BlastN в BCM). Анализируя ДНК-клон AP001053 и перекрывающийся с ним другой геномный ДНК-клон AP001054, было найдено, что на расстоянии 254,203 тыс. п. н. от гена *Nnp-1* начинается 5' UTR TMEM1-гена, а на расстоянии 337,738 тыс. п. н. — 5' UTR PWP2-гена от 3'-конца *Nnp-1* гена человека. На расстоянии 178,574 тыс. п. н. от него обнаружена геномная последовательность, имеющая 100 %-ю непрерывную гомологию с кДНК-клоном EUROIMAGE 180147 неидентифицированного гена (Aufreay и др. неопубликованные данные), являющаяся, возможно, MYL6P псевдогеном [25].

Локализация человеческого гена *Nnp-1* в области HC21q22.3 соответствует участку мышинной хромосомы (MMU) 10.

Мышиная кДНК гена *Nnp-1* получена в результате скрининга фаговой (*λgt10*) P5 cbt кДНК-библиотеки мыши («Stratagene»). В качестве зонда использовали человеческую кДНК M13-120. Мышиная кДНК (M120 кДНК) субклонирована в *pBluescript SK+*, определена ее полная нуклеотидная последовательность (1644 п. н., AF312394). Анализ полученной нуклеотидной последовательности показал, что мышинная M120 кДНК гомологична *Mus. musculus Nnp-1* var кДНК (1946 п. н., P. № U79774) и отличается от нее отсутствием 192 п. н. с 5'-конца и 108 п. н. в транскрибируемом районе с сохранением рамки считывания, а также имеет простой повтор длиной 182 п. н. в 8-м экзоне в

отличие от *Nnp-1 Mus. musculus* кДНК U79773 (1793 п. н.) и кДНК U79775 человека (рис. 1, 3).

По имеющимся литературным данным [21], мышинный *Nnp-1* ген экспрессируется во всех мышинных тканях на разных стадиях эмбриогенеза. Мы определили экспрессию мышинного *Nnp-1* гена в тканях взрослых мышей (нормальных и трисомных) методом Нозерн-блот-гибридизации. В качестве зонда была использована полученная нами кДНК мыши M120. Во всех образцах обнаруживается транскрипт размером около 2 тыс. н., что соответствует данным литературы [21]. В тканях 20-недельных мышей наблюдается высокая степень экспрессии в яичках, меньше — в печени и почках (рис. 4). Высокий уровень экспрессии также отмечен в мозге животных в возрасте от 30 дней до 20 недель (рис. 5). Сигнал одинаковой интенсивности выявлен для тотальной РНК из тканей нормальной и трисомной (Ts65Dn) мыши.

Клон M120 кДНК мыши мы использовали как зонд для поиска клонов в геномной космидной библиотеке селезенки мыши. В результате скрининга отобраны 17 космид, из которых для работы взяты три: M120-17, M120-24 и M120-26. Саузерн-гибридизация этих космид с 5'- и 3'-концами кДНК M120 показала, что космиды M120-24 и M120-26 содержат 5'-конец гена, космида M120-17 — 3'-конец. Геномные фрагменты, дающие сигналы при гибридизации с мышинной кДНК M120, были субклонированы (рис. 6) и определена их нуклеотидная последовательность (зарегистрированные номера в базе данных Genbank'a — AF169622, AF169623, AF16924, AF257218, AF271993, AF227000). Сравнение перекрывающихся последовательностей и дополнительное секвенирование позволили установить полную нуклеотидную последовательность *Nnp-1* гена мыши (20074 п. н., P. № AF294729) (рис. 2, 6).

Имеющаяся мышинная геномная последовательность проанализирована нами для определения экзонов (программа DNASTAR, BlastN), повторов (Repeat Masker) (табл. 2), промоторной области и сайтов связывания транскрипционных факторов (TESS, TSSW, TSSG, NNSSP/Eukaryotic).

Далее проведено сравнение человеческой и мышинной последовательностей *Nnp-1* генов (табл. 1). Размер экзонов этих последовательностей весьма близок, а то и одинаков, а вот интронов — различный. В большинстве случаев мышинные интроны имеют меньший размер (исключение составляет 3-й интрон). Величина экзонов практически одинакова (кроме 13-го, содержащего стоп-кодон и 3' UTR). Повторы встречаются в тех же мышинных интронах (кроме 11-го и 8-го) и подобных типов:

Nnp-1 var κДНК мыши	1	<u>MVPGVPLPPEIOLAORLAGNEOVTRDRALRKLKRYIERSORATGGFTPD</u>	50
Nnp-1 κДНК мыши	1	<u>MVPGVPLPPEIOLAORLAGNEOVTRDRALRKLKRYIERSORATGGFTPD</u>	50
M120 κДНК мыши	1	<u>MVPGVPLPPEIOLAORLAGNEOVTRDRALRKLKRYIERSORATGGFTPD</u>	50
NNP-1 κДНК человека	1	<u>MYSRVQLPPEIOLAORLAGNEOVTRDRAVRKLKRYIVARTORAAGGFTHD</u>	50
51		<u>ELLKVVWKGIFYCMWMODKPLQOEEELGRTIAOLVHAFHTTEAOHOELKAFWOTMIREWVGIDRLRLDKFYM</u>	120
51		<u>ELLKVVWKGIFYCMWMODKPLQOEEELGRTIAOLVHAFHTTEAOHOELKAFWOTMIREWVGIDRLRLDKFYM</u>	120
51		<u>ELLKVVWKGIFYCMWMODKPLQOEEELGRTIAOLVHAFHTTEAOHOELKAFWOTMIREWVGIDRLRLDKFYM</u>	120
51		<u>ELLKVVWKGIFYCMWMODKPLQOEEELGRTISOLVHAFOTTEAOHLFLQAFWOTMNREWTGIDRLRLDKFYM</u>	120
121		<u>LMRMVLSSESLKAVKARGWDEROIEOLLELLTTEILNPDSOAPSGVKSHEIFLEELAKVGAAELTADON</u>	190
121		<u>LMRMVLSSESLKAVKARGWDEROIEOLLELLTTEILNPDSOAPSGVKSHEIFLEELAKVGAAELTADON</u>	190
121		<u>LMRMVLSSESLKAVKARGWDEROIEOLLELLTTEILNPDSOAPSGVKSHEIFLEELAKVGAAELTADON</u>	190
121		<u>LMRMVLSSESLKAVKARGWDEROIEOLLELLTTEILNPDSOAPSGVKSHEIFLEELAKVGAAELTADON</u>	190
191		<u>LOFIDPFCOIAARTKDSOVLHKIIOSIFOTIVEOAPLAIEDIMNELDTOSGEGEASDGGDDGEASDGGDDGE</u>	260
191		<u>LOFIDPFCOIAARTKDSOVLHKIIOSIFOTIVEOAPLAIEDIMNELDTOSGEGEASDGGDDGEASDGGDDGE</u>	260
191		<u>LOFIDPFCOIAARTKDSOVLHKIIOSIFOTIVEOAPLAIEDIMNELDTOSGEGEASDGGDDGEASDGGDDGE</u>	260
191		<u>LKFIDPFCRIAARTKDSLVLNNITRGIFETIVEOAPLAIEDLLNELDTODEE-VASDSDES-----</u>	250
261		<u>ASDDDDGEASDGGDGDVADSDSDGADDDGDVSDGGDNDDEGDSNKSSEGEODLODTPPKKLPAGTAH</u>	330
253		<u>-----DDSDEA-----SEGEODLODTPPKKLPAGTAH</u>	279
261		<u>ASDDDDGEASDGGDGDVADSDSDGADDDGDVSDGGDNDDEGDSNKSSEGEODLODTPPKKLPAGTAH</u>	330
251		<u>-----SEGG-----ERGDALSQKRSEKPPAGSIC</u>	274
331		<u>RAGPEADKEQAWDDEENAGPVLQFDYFALANRLFKLASROSTPSONRKRLYKVIOKLRELGGTFPEDDV</u>	400
280		<u>RAGPEADKEQAWDDEENAGPVLQFDYFALANRLFKLASROSTPSONRKRLYKVIOKLRELGGTFPEDDV</u>	349
331		<u>RAGPEADKEQAWDDEENAGPVLQFDYFALANRLFKLASROSTPSONRKRLYKVIOKLRELGGTFPEDDV</u>	400
275		<u>RAEPEAGEEQAGDDRDSGGPVLQFDYFAVANRLFEMASROSTPSONRKRLYKVIKQLDLAGGIFPEDEI</u>	344
401		<u>PEKAYKKMLEGRRERK-KKKKRLPKPOPONKEAGSEAESSADPGPGRKRKRNRKTDEKAGOGGPPGKRR</u>	469
350		<u>PEKAYKKMLEGRRERK-KKKKRLPKPOPONKEAGSEAESSADPGPGRKRKRNRKTDEKAGOGGPPGKRR</u>	418
401		<u>PEKAYKKMLEGRRERK-KKKKRLPKPOPONKEAGSEAESSADPGPGRKRKR-----</u>	451
345		<u>PEKACRRLEGRROKTKKOKRLRLQOERGKGEKEPPSPGMERKRSRRRGVGDPEARAEAGEQPGTAE</u>	414
470		<u>KPGAR--AKGAGAOQPKKRIOSSOSAE</u>	494aa
419		<u>KPGAR--AKGAGAOQPKKRIOSSOSAE-----</u>	443aa
452		<u>-----IOSSOSAE-----</u>	459aa
415		<u>RALLRDQPRGRGQRGARQRRRTPRPLTSARAKAANVQEPKKKKRRE</u>	461aa

Рис. 3. Сравнение белковых последовательностей *Nnp-1* var κДНК мыши (U79774), *Nnp-1* κДНК мыши (U79773), M120 κДНК мыши (AF312394) и *Nnp-1* κДНК человека (U79775).

SINE/B2-B4 (4,78 %); DNA/MER1-тип (2,87 %); SINE/B1 (4,55 %); простой повтор (0,55 %), повтор низкой сложности (0,24 %). Мы имеем 1839 п. н. 5'-фланкирующей последовательности мышино-го *Nnp-1* гена. В -1158 п. н. от начала мРНК находится SINE/B2 повтор, а в -1687 — LTR/MaLR повтор. Повторы мышино-го гена нахо-

дятся значительно дальше от 5'-конца мРНК, чем у человеческого гена. Не удалось найти у мышино-го *Nnp-1* гена предполагаемую промоторную область, хотя последовательности этих генов с -178-го до 0-го (для мышино-го) и с -171-го до 0-го (для человеческого) нуклеотида имеют 58,9 % гомологии и общий сайт связывания транскрипционного

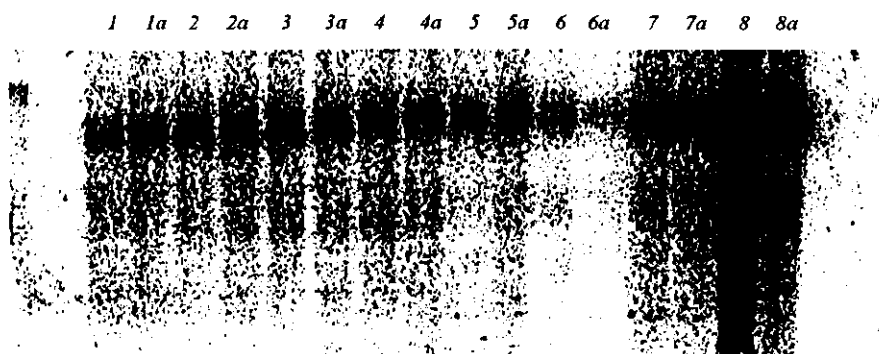


Рис. 4. Нозерн-блот анализ экспрессии гена *Nnp-1* мыши в различных тканях: 1—8 — РНК нормальной (здоровой) мыши; 1a—8a — РНК трисомной (Ts65Dn) мыши. Нанесение РНК из тканей: 1, 1a — печень; 2, 2a — почки; 3, 3a — легкие; 4, 4a — селезенка; 5, 5a — сердце; 6, 6a — тимус; 7, 7a — мышцы; 8, 8a — яички

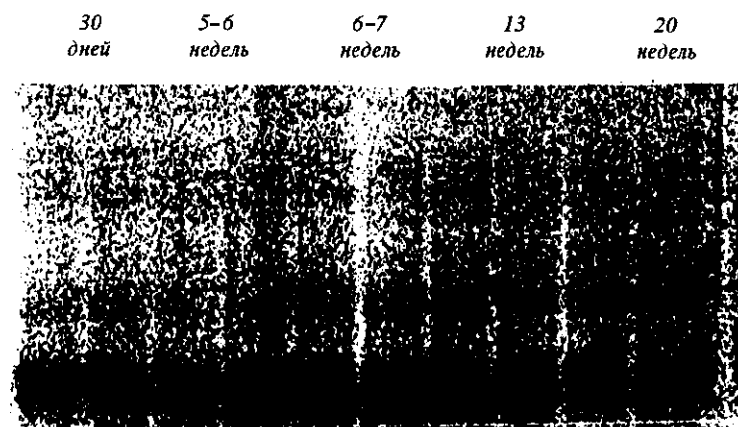


Рис. 5. Нозерн-блот анализ экспрессии гена *Nnp-1* мыши в тканях мозга. Стадии развития мозга мыши, из которого была выделена РНК, указаны сверху. В первых столбиках расположены РНК нормальной (здоровой) мыши, во вторых — РНК трисомной (Ts65Dn) мыши

фактора CREB, но участок, где находится предполагаемая промоторная область человеческого гена (-52 п. н.), не имеет гомологии с мышинной последовательностью. 5'-фланкирующая область имеет много сайтов связывания транскрипционных факторов, наиболее вероятные из которых Prd, CREB, c/EB α , myogenic, CACC-binding factor $\times 3$, NF-Kappa $\times 3$, C-Rel, RelA, TTF1 и др. Область с -220 по +600, включающая экзон 1 и часть интрона 1, содержит большой процент G+C (62,2 %) и большое количество CpG. Это, а также экспрессия данного гена во всех тканях, дающая основание причислить его к «housekeeping» генам, объясняют возможность отсутствия выраженных ТАТА или ССААТ последовательностей [26]. 3'-фланкирующая область мышинного гена *Nnp-1*, не «занятая» повторами, еще больше по размеру, чем у челове-

ческого *NNP-1* (2485 п. н. — мышинного, 893 п. н. — человеческого). 3'-фланкирующая последовательность гена человека имеет два участка последовательностей, каждый из которых (или часть его) имеет гомологию с двумя участками мышинной 3'-фланкирующей последовательности (37,6—46,7 %) (360—480 п. н. человеческого гена с 10—93 и 160—227 п. н. мышинного и 542—800 п. н. человеческого гена с 250—498 и 590—670 п. н. мышинного от 3'-конца последнего экзона).

Таким образом, в результате нашей работы найдена мышинная кДНК, гомологичная человеческой кДНК гена *Nnp-1*, находящегося в участке, критичном для синдрома Дауна. Кроме того, обнаруженная нами кДНК охарактеризована и проведено ее сравнение с имеющимися в Genbank'e кДНК человека и мыши. Выявлена последовательность

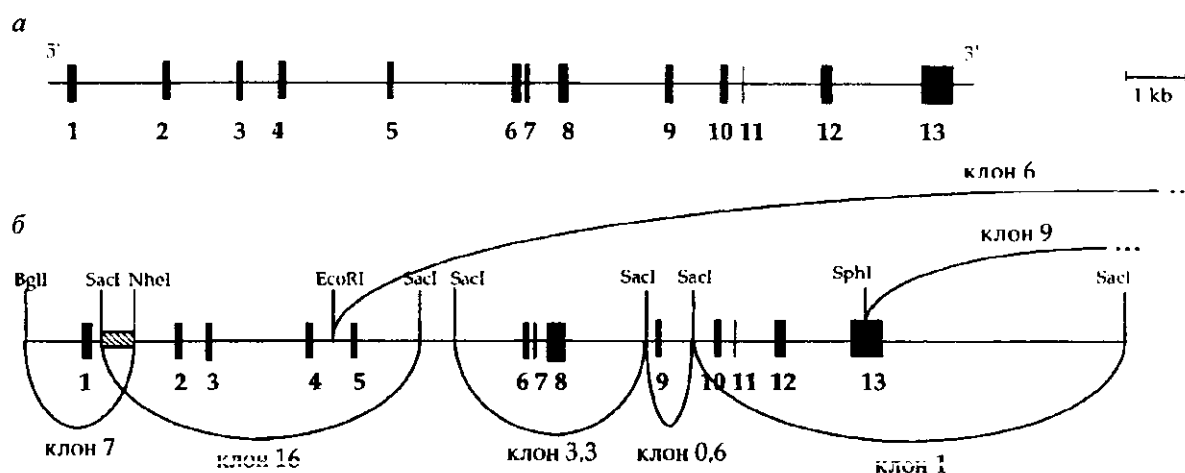


Рис. 6. Стратегия определения полной нуклеотидной последовательности гена *Nnp-1* мыши (AF294729): 1 — субклонирование фрагмента космиды M120-24, гибридизующегося с 5'-концом кДНК M120, определение его полной нуклеотидной последовательности (клон 16); 2 — субклонирование фрагментов космиды M120-17, дающих сигнал при гибридизации с 3'-концом кДНК M120, определение их нуклеотидных последовательностей (клоны 1, 9); 3 — определение мышинных геномных фрагментов, содержащих 5'-конец гена *Nnp-1* и 5'-фланкирующую область, при помощи Саузерн-блот-гибридизации космид M120-24, M120-26. В качестве зонда была использована последовательность (*SacI-NheI*) первого интрона, не содержащая повторов. Субклонирование гибридизующегося фрагмента и определение его полной нуклеотидной последовательности (клон 7); 4 — определение нуклеотидной последовательности перекрывающихся участков между *SacI* клонами 16 и 3,3; 3,3 и 0,6; 0,6 и 1. Частичное секвенирование клона б: а — схема строения гена *NNP-1* человека; б — схема строения гена *Nnp-1* мыши

Таблица 2
Экзон-интронные последовательности *NNP-1* гена мыши

Экзон	3'-сайт интрона	5'-сайт интрона	Размер экзона (п. н.)	Наличие повторов в интронах	Размер интрона (п. н.)
1	CCA...	... CAG gt acg	176	Sine/B2-B4	1170
2	atg cag GTG	... GCAA gt ggg	83	Sine/B2-B4	382
3	tca cag GGAA	... CAC gt gag	58	DNA/MER1_тип, SINE/B1	1745
4	ccc tag AGC	... ATG gt gag	86	—	664
5	ccc tag CTC	... GAG gt agg	62	SINE/B1; простой повтор; повтор низкой сложности, Sine/B2-B4	2720
6	ctt cag ACA	... GAG gt gag	130	—	86
7	cca cag CTC	... GGA gt agg	65	—	128
8	cct cag TTC	... CAG gt gag	362 (137—317 Rp)	Sine/B1	1336
9	ttt tag GCA	... CAG gt agg	80	—	797
10	aag cag TTT	... AAA gt agg	98	—	165
11	ttt cag GCT	... CAG gt gag	20	—	458
12	tct cag GCA	... AAG gt gga	117	—	862
13	... cca cag CGC CAC	599	—	

гена *Nnp-1* мыши. Охарактеризованы последовательности мышинового и человеческого генов. Уточнены количество и размеры экзонов и интронов человеческого гена *Nnp-1* и определены их параметры для мышинового гена. Определено окружение гена *Nnp-1* человека, осуществлены анализ фланкирующих областей мышинового и человеческого генов и их сравнение между собой. Полученные характеристики *Nnp-1* гена человека и мыши важны для изучения влияния этого гена на развитие синдрома Дауна у мышей как модели для изучения данного заболевания у людей.

И. Я. Скрипкина, Л. О. Цыба, Д. Славов, С. М. Кваша,
К. Гардинер, А. В. Риндич

Отримання і характеристика гена миші, гомологічного *Nnp-1* гену людини, картованому на ділянці хромосоми 21 q22.3

Резюме

Отримано нову мишачу кДНК і ген, гомологічні гену нового ядерного білка людини (*NNP-1*), картованому на ділянці 21-ї хромосоми людини q22.3. Визначено їхню повну нуклеотидну послідовність. Геномне секвенування показало, що ген *Nnp-1* миші має 13 екзонів, розташованих на 14,5 тис. п. н. Визначено структуру гена *NNP-1* людини, здійснено порівняльний аналіз генів *NNP-1* людини і миші. Показано, що рівень експресії гена *Nnp-1* в мозку миші не змінюється протягом життя тварини, і експресія його в різних тканинах нормальних та трисомних мишей ідентична.

I. Ya. Skripkina, L. A. Tsyba, D. Slavov, S. M. Kvasha,
K. Gardiner, A. V. Rynditch

Identification and characterization of mouse homologue of human *Nnp-1* gene localized in 21q22.3

Summary

New mouse cDNA and gene homologous to human Novel Nuclear Protein (*NNP-1*) gene, mapped on q22.3 region of human chromosome 21, have been obtained and sequenced. Genomic sequencing has revealed that mouse *Nnp-1* gene consisted of 13 exons distributed by 14.5 kb. The structure of human *NNP-1* gene has been determined and comparative analysis of human and mouse *NNP-1* genes has been fulfilled. It has been shown that the level of expression of mouse *Nnp-1* gene in brain was not changed during the life cycle of the animal, and the expression of *Nnp-1* gene in different tissues of normal and trisomic Ts65Dn mice were identical.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Hassold T., Abruzzo M., Adkins K., Griffin D., Merrill M., Millie E., Saker D., Shen J., Zaragoza M. Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology // *Environ. Mol. Mutagen.*—1996.—28, N 3.—P. 167—175.
- Antonarakis S. E. 10 years of Genomics, chromosome 21, and Down syndrome // *Genomics.*—1998.—51.—P. 1—16.
- Korenberg J. R., Chen X. N., Schipper R., Sun Z., Gonsky R., Gerwehr S., Carpenter N., Daumer C., Dignan P., Distech C., Graham J. M., Jr., Hugdins L., McGillivray B., Miyazaki K., Ogasawara N., Pakk J. P., Pagon R., Puschel S., Sack G., Say B., Schuffenhauer S., Soukup S., Yamanaka T. Down syndrome phenotypes: The consequences of chromosomal imbalance // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1994.—91.—P. 4997—5001.
- Aaltonen J., Bjorses P., Sandkuijl L., Perheentupa J., Peltonen L. An autosomal locus causing autoimmune disease: Autoimmune polyglandular disease type I assigned to chromosome // *Nat. Genet.*—1994.—8, N 1.—P. 83—87.
- Veske A., Oehlmann R., Younus F., Mohyuddin A., Muller-Myhsok B., Mehdi S., Gal A. Autosomal recessive non-syndromic deafness locus (DFNB8) maps on chromosome 21q22 in a large consanguineous kindred from Pakistan // *Hum. Mol. Genet.*—1996.—5.—P. 165—168.
- Bonne-Tamir B., DeStefano A. L., Briggs C. E., Adair R., Franklyn B., Weiss S., Korostishevsky M., Frydman M., Baldwin C. T., Farrer L. A. Linkage of congenital recessive deafness (gene DFNB10) to chromosome 21q22.3 // *Amer. J. Hum. Genet.*—1996.—58, N 6.—P. 1254—1259.
- Sertie A. L., Quimby M., Moriera E. S., Murray J., Zatz M., Antonarakis S. E., Passo-Bueno M. R. A gene which causes severe ocular alteration and occipital encephalocele (Knobloch syndrome) is mapped to 21q22.3 // *Hum. Mol. Genet.*—1996.—5.—P. 843—847.
- Straub R. E., Lehner T., Luo Y., Loth J. E., Shao W., Sharpe L., Alexander J. R., Das K., Simon R., Fiere R. R. A possible vulnerability locus for bipolar affective disorder on chromosome 21q22.3 // *Nat. Genet.*—1994.—8.—P. 291—296.
- Detera-Wadleigh S. D., Badner J. A., Goldin L. R., Berrettini W. H., Sanders A.R., Rollins D. Y., Turner G., Moses T., Haerian H., Muniec J. I., Nurnberger J. R., Gerson E. S. Affected-sib-pair analysis reveal support of prior evidence for a susceptibility locus for bipolar disorder, on 21q // *Amer. J. Hum. Genet.*—1996.—58, N 6.—P. 1279—1285.
- Muenke M., Bone L. J., Mitchel H. F., Hart I., Walton K., Hall-Johnson K., Ippel E. F., Dietz-Band J., Kvaloy K., Fan C. M. Affected-sib-pair analysis reveal support of prior evidence for a susceptibility locus for bipolar disorder, on 21q // *Amer. J. Hum. Genet.*—1995.—57, N 5.—P. 1074—1079.
- Reeves R., Irving N. G., Moran T. H., Wohn A., Kitt C., Sisodia S., Schmidt C., Bronson R. T., Davison M. T. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits // *Nature Genet.*—1995.—11.—P. 177—184.
- Cheng J. F., Boyartchuk V., Zhu Y. Isolation and mapping of human chromosome 21 cDNA: progress in constructing a chromosome 21 expression map // *Genomics.*—1994.—23.—P. 75—84.
- Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem.*—1987.—162.—P. 156.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—479 с.
- Holmes D. S., Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids // *Anal. Biochem.*—1981.—114.—P. 193.
- Birnboim H. C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA // *Meth. Enzymol.*—1983.—100.—P. 243—255.
- Mandel M. et al., Nitroso group exchange as a way of activation of nitrosamines by bacteria // *Nature.*—1977.—267, N 5608.—P. 248—249.
- Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // *J. Mol. Biol.*—1975.—98, N 3.—P. 503—517.
- Feinberg A. P., Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity // *Anal. Biochem.*—1983.—132.—P. 6—13.

20. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74, N 12.—P. 5463—5467.
21. Jansen E., Meulemans S. M. P., Orlans I. C. R., Van de Ven W. J. M. The NNP-1 Gene (D21S2056E), which encodes a novel nuclear protein, maps in close proximity to the cystatin B gene within the EPM1 and APECED critical region on 21q22.3 // *Genomics.*—1997.—42.—P. 336—341.
22. Ostareck-Lederer A., Ostareck-Lederer A., Ostareck D. H., Standart N., Thiele B. J. Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region // *EMBO J.*—1994.—13, N 6.—P. 1476—1481
23. Stone N. E., Fan J. B., Willour V., Pennacchio L. A., Warrington J. A., Hu A., de la Chapelle A., Lehesjoki A. E., Cox D. R., Myers R. M. Construction of a 750-kb bacterial clone contig and restriction map in the region of human chromosome 21 containing the progressive myoclonus epilepsy gene // *Genome Res.*—1996.—6, N 3.—P. 218—225.
24. Wiltshire T., Pletcher M., Cole S. E., Villanueva M., Birren B., Lehoczky J., Dewar K., Reeves R. H. Perfect conserved linkage across the entire mouse chromosome 10 region homologous to human chromosome 21 // *Genome Res.*—1999.—9.—P. 1214—1222.
25. Hattori M., Fujiyama A., Taylor T. D., Watanabe H., Yada T., Park H. S., Toyoda A., Ishii K., Totoki Y., Choi D. K., Soeda E., Ohki M., Takagi T., Sakaki Y., Taudien S., Blechschmidt K., Polley A., Menzel U., Delabar J., Kumpf K., Lehmann R., Patterson D., Reichwald K., Rump A., Schillhabel M., Schudy A. et al. The DNA sequence of human chromosome 21 // *Nature.*—2000.—405, N 6784.—P. 311—319.
26. Nagamine K., Kudoh J., Minoshima S., Kawasaki K., Asakawa S., Ito F., Shimizu N. Genomic organization and complete nucleotide sequence of the human PWP2 gene on chromosome 21 // *Genomics.*—1997.—42.—P. 528—531.

УДК 577.212.3

Поступила в редакцию 21.12.98