

Характеристика нового гена людини hUNC93

В. І. Кашуба^{1, 2, 3}, А. І. Протопопов^{2, 3}, С. М. Кваша^{1, 2},
А. В. Риндич¹, Е. Р. Забаровський^{2, 3, 4}

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

² Центр геномних досліджень, Каролінський інститут
Стокгольм, 17177, Швеція

³ Центр мікробіології та біології пухлин, Каролінський інститут
Стокгольм, 17177, Швеція

⁴ Інститут молекулярної біології ім. В. А. Енгельгардта
Вул. Вавілова, 32, Москва, 117984, Росія

*Ел. пошта: gunditch@imb.org.ua

Нами ідентифіковано новий ген людини hUNC93. Експресію гена виявлено в усіх перевірених тканинах, крім плаценти, при цьому найвищий рівень експресії детектовано в серці та мозку, найменший — у печінці та лейкоцитах. Ген картовано до хромосомної ділянки 11q13. Аналіз виведеної амінокислотної послідовності, яка кодується геном hUNC93, виявив гомологію до білка UNC93 з *Caenorhabditis elegans*, який бере участь у скороченні м'язів.

Вступ. У регуляції функціонування м'язів у *Caenorhabditis elegans* беруть участь п'ять взаємодіючих білків (UNC93, sup9, sup10, sup11 та sup18) [1, 2]. Мутації в гені UNC93 з *C. elegans* викликають порушення регуляції скорочення м'язів, призводячи до так званого фенотипу «гумової смуги» («gumby band») [2]. Цей фенотип характеризується тим, що мутантна тварина може скорочувати м'язи свого тіла, але не здатна регулювати або координувати ці скорочення. Такі мутанти є повільними та слабкими, що типово для *C. elegans* з мутаціями у м'язових білках [3], але вони мають лише незначні дефекти структури тіла. Мутантна тварина з фенотипом «гумової смуги» не здатна до відкладання яєць, що є результатом дефектів м'язів відповідних органів [4].

Автори роботи [1] показали, що фенотип «гумової смуги» спричиняється наявністю абнормального білкового продукту гена UNC93. В той же час повна відсутність будь-якого білкового продукту

гена UNC93 не призводила до фенотипових відхилень від норми. Левін та Хорвітц запропонували модель функціонування продуктів генів UNC93, sup9, sup10, sup11 та sup18 у клітинах м'язів, яка передбачає, що: 1) ці гени функціонують разом у регуляції скорочень м'язів, їхні білкові продукти діють, як єдиний білковий комплекс; 2) фенотип «гумової смуги» спричиняється абнормальними білковими продуктами UNC93, що викликає порушення регуляції скорочень м'язів; 3) відсутність білкових продуктів цих генів не впливає на скорочення м'язів, що можливо пояснити існуванням іншого(их) гена(ів), який(і) здатний(і) виконувати функції білка UNC93 в регуляції скорочення м'язів у *C. elegans* [4].

У цій роботі ідентифіковано ген людини, який є гомологічним гену UNC93 з *C. elegans*, миші, курчати та дрозофіли, визначено рівень експресії цього гена в різних тканинах та його хромосомну локалізацію.

Матеріали та методи. Створення NotI-«зв'язувальних» бібліотек. Для створення бібліотек NotI-«зв'язувальних» клонів геному ДНК з клітинної лінії CBMI-Ral-Sto було рестриковано за допомогою

© В. І. КАШУБА, А. І. ПРОТОПОПОВ,
С. М. КВАША, Р. З. ГІЗАТУЛЛІН, А. В. РИНДИЧ,
Е. Р. ЗАБАРОВСЬКИЙ, 2001

BamHI та лігують саму на себе за допомогою T4 ДНК-лігази при низькій концентрації ДНК. Для елімінації нелігованих лінійних молекул «липкі» кінці було частково добудовано фрагментом Кленова ДНК полімерази I у присутності тільки dGTP та dATP. Після цього ДНК було рестриковано за допомогою *NotI* і лігують з векторами λ SK17 та λ SK22. Щоб перевести бібліотеку в плазмідну форму, λ ДНК рестриковано за допомогою *Sall*, лігують саму на себе та трансформують у DK1 клітини *Escherichia coli* [5].

Ферменти, які використано для створення бібліотеки, одержано з «Boehringer Mannheim» (Німеччина). Усі молекулярно-біологічні та мікробіологічні методи виконані згідно із стандартами [6].

Молекулярне клонування гена *hUNC93* людини. Для отримання фрагмента гена *hUNC93* здійснено скринінг серцевої кДНКової фагової бібліотеки («Stratagene», США), використовуючи клон EST AA632247 людини як зонд. Для скринінгу кДНКової фагової бібліотеки висіяно 1 млн фагових бляшок на 20 чашок Петрі діаметром 145 мм (50 000 фагових бляшок на чашку Петрі). З кожної чашки Петрі знято по дві репліки на мембрану Hybond XL. Кожну мембрану інкубували в денатуруючому розчині (1,5 М NaCl та 0,5 М NaOH) протягом 2—5 хв та в нейтралізуючому розчині (1 М трис-HCl, pH 8,0, 1,5 М NaCl) протягом 5 хв. ДНК зафіксовано до мембрани прогріванням у вакуумі при температурі 80 °C протягом 2 год. Гібридизацію проводили протягом 14—16 год при температурі 65 °C в розчині, який містив 5 × розчин Денхардта, 5 × SSC, 0,5 % SDS, 100 мкг денатурованої ДНК сперми лосося на 1 мл розчину. Після гібридизації фільтри відмивалися двічі протягом 30 хв при 60 °C у розчині, який містив 2 × SSC та 0,1 % SDS, та двічі — протягом 30 хв при 60 °C у розчині, який містив 0,2 SSC та 0,1 % SDS.

Для отримання фрагмента гена *hUNC93*, що містить повну відкриту рамку зчитування, використано полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). ПЛР проводили в 50 мкл розчину, який містив 10 нг кДНК з набору реактивів «Marathon ready cDNA» («Clontech», США), 5 мкл буфера 3 з набору реактивів «Expand long template PCR system» («Boehringer Mannheim»), 3 мкл 2 мМ dNTP, 1 мкл кожного з 10 мкМ праймерів і 0,5 мкл суміші Taq ДНК-полімерази та Pwo ДНК-полімерази з набору реактивів «Expand long template PCR system» («Boehringer Mannheim»). Цикли ПЛР були такі: 40 циклів з 30 с денатурації при 95 °C та 3 хв елонгації при 68 °C. Цикли починалися 1,5 хв денатурації при 95 °C. В усіх експериментах вико-

ристано машину ПЛР Gene Amp PCR System 2400 («Perkin Elmer», США).

Продукт ПЛР елювали з агарозного гелю за допомогою набору реактивів «QIAquick gel extraction kit» («Qiagen», Німеччина) та клонували за допомогою набору реактивів «TOPO TA cloning kit for sequencing» («Invitrogen», США). Плазмідну ДНК ізолювали, використовуючи набір реактивів «GFX micro plasmid prep kit» («AmershamPharmaciaBiotech», Швеція). Секвенування здійснювали з використанням набору реактивів «ABI Prism Big-Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit» («Perkin Elmer») та секвенатора ABI 310 Sequencer згідно з протоколом виробника.

Для проведення 3'-RACE використано набір реактивів «Marathon ready cDNA» («Clontech»), два специфічних для гена *hUNC93* людини праймери 3'-RACE1 (5'-GACTGGACTCAGCACACTCCTGGGAATC-3') та 3'-RACE2 (5'-CGGTTACCGCTACTTGGAGGAGGACAAC-3') з двома універсальними праймерами AP1 та AP2 згідно з протоколом виробника.

ПЛР виконували, як описано вище.

Визначення експресії та хромосомної локалізації гена *hUNC93* людини. Для визначення рівня експресії гена *hUNC93* в різних тканинах використовували Нозерн-блот гібридизацію з MTN фільтром («Clontech»). Фільтр гібридували протягом 14—16 год при температурі 42 °C в розчині, який містив 50 % формаміду, 5 × розчин Денхардта, 5 × SSC, 0,5 % SDS, 100 мкг денатурованої ДНК сперми лосося на 1 мл розчину. Після гібридизації фільтр відмивали протягом 20 хв при кімнатній температурі у розчині, що містив 2 × SSC та 0,1 % SDS, та протягом 20 хв при 50 °C у розчині, який містив 0,2 × SSC та 0,1 % SDS. Для визначення гібридизаційних сигналів використовували рентгенівську плівку «Kodak» (США).

Для гібридизації *in situ* (FISH) застосовано нормальні метафазні хромосоми, як описано Протоповим [7]. Проаналізовано 60 клітин на стадії метафази.

Результати і обговорення. *NotI*-«зв'язувальний» клон NL1-304 виявив 97 % ідентичності протягом 40 п. н. до клону EST людини (реєстраційний номер у GenBank AA632247). Скринінг серцевої кДНКової бібліотеки клоном EST AA632247 ідентифікував шість позитивних клонів, які було ізолювано і секвеновано. Найбільший клон містив відкриту рамку зчитування розміром 1791 п. н.

Для визначення 3'-кінця гена використано 3'-RACE з набором реактивів «Marathon ready cDNA» («Clontech»). Один специфічний продукт розміром

1 M E A E P P L Y P M A G A A G P Q G
 1 GACTCCGGGGCGACCCGCCGAGTCCGCGAGTAGTTCGGGCCATGGAGGCGGAGCCGCCGCTCTACCCGATGGCGGGGGCTGCGGGGCCGACGGG

19 D E D L L G V P D G P E A P L D E L V G A Y P N Y N E E E E E R
 96 GACGAGGACCTGCTCGGGGTCCCGGACGGGCCGAGGCCCGCTGGAGGAGTGGTGGGGCGGTACCCCACTACACGAGGAGGAGGAGGAGCGC

51 R Y Y R R K R L G V L K N V L A A S A G G M L T Y G V Y L G L L
 192 CGTACTACCGCCGAAGCGCTGGGGCTGCTCAAGAACGTGCTGGTGCAGCGCCGGGGCATGCTCACCTACGGCGTCTACCTGGGCTCCTG

83 Q M Q L I L H Y D E T Y R E V K Y G N M G L P D I D S K M L M G
 288 CAGATGCAGCTGATCCTGCACTACGACGAGACCTACCGGAGGTGAAGTATGGCAACATGGGGCTGCCCGCATCGACAGCAAAATGCTGATGGG

115 I N V T P I A A L L Y T P V L I R F F G T K W M M F L A V G I Y
 384 ATCAACGTGACTCCCATCGCCGCTGCTCTACACACCTGTGCTCATCAGGTTTTTTGGAAACGAAGTGGATGATGTCTCTCGCTGTGGGCATCTAC

147 A L F V S T N Y W E R Y Y T L V P S A V A L G M A I V P L W A S
 480 GCCCTCTTTGCTCCACCAACTACTGGGAGCGCTACTACAGCTGTGCCCTCGGCTGTGGCCCTGGGCATGGCCATCGTGCCTCTTTGGGCTTCC

179 M G N Y I T R M A Q K Y H E Y S H Y K E Q D G Q G M K Q R P P R
 576 ATGGGCAACTACATCACCAGGATGGCGCAGAAGTACCATGAGTACTCCCACTACAAGGAGCAGGATGGCGAGGGATGAAGCAGCGGCCCTCCGCGG

211 G S H A P Y L L V F Q A I F Y S F F H L S F A C A Q L P M I Y F
 672 GGCTCCACGGGCCCTATCTCTGGTCTTCCAAGCCATCTTCTACAGCTTCTCCATCTGAGCTTCGGCTGCGCCAGCTGCCATGATTATTTC

243 L N H Y L Y D L N H T L Y N V Q S C G T N S H G I L S G F N K T
 768 CTGAACCACTACTGTATGACCTGAACCACACGCTGTACAATGTGCAGAGCTGGCCACCAACAGCCAGGGATCCTCAGCGGCTTCAACAAGACG

275 V L R T L P R S G N L I V V E S V L M A V A F L A M L L V L G L
 864 GTTCTGGGGAGCTCCCGGGAGCGGAACCTCATTGTGGTGGAGAGGCTGCTCATGGCAGTGGCCCTCCTGGCCATGCTGCTGGTGGGTTG

307 C G A A Y R P T E E I D L R S V G W G N I F Q L P F K H V R D Y
 960 TCGGGAGCCGCTTACCGGCCACGGAGGATCGATCTGGCAGCGTGGGCTGGGCAACATCTTCCAGCTGCCCTTCAAGCAGCTCGCTGACTAC

339 R L R H L V P F F I Y S G F E V L F A C T G I A L G Y G V C S V
 1056 CGCCTGCGCCACCTCGTGCCTTTCTTTATCTACAGCGGCTTCCAGGCTCTTTGCTGCACTGGTATCGCCTTGGGCTATGGCTGTGCTCGGTG

371 G L E R L A Y L L V A Y S L G A S A A S L L G L L G L W L P R P
 1152 GGGCTGGAGCGGCTGGCTTACCTCCTCGTGGCTTACAGCCTGGCGCCTCAGCCGCTCCTCCTGGGCTGCTGGGCTGTGGCTGCCACGCCCC

403 V P L V A G A G V H L L L T F I L F F W A P V P R V L Q H S W I
 1248 GTGCCCTGGTGGCGGAGCAGGGTGCACCTGCTGCTCACCCTCCTTTCTGGCCCTGTGCTCGGGTCTGCAACACAGCTGGATC

435 L Y V A A A L W G V G S A L N K T G L S T L L G I L Y E D K E R
 1344 CTCTATGTGGCAGTGCCTTTGGGGTGTGGGCAGTGCCTGAACAAGACTGGACTCAGCACACTCCTGGGAATCTGTACGAAGACAAGGAGAGA

467 Q D F I F T I Y H W W Q A V A I F T V Y L G S S L H M K A K L A
 1440 CAGGACTTCATCTTACCATCTACCCTGGTGGCAGGCTGTGGCCATCTTACCGTGTACCTGGGCTCGAGCTGCACATGAAGCTAAGCTGGCG

499 V L L V T L V A A A V S Y L R I E Q K L R R G V A P R Q P R I P
 1536 GTGCTGTGGTACGCTGGTGGCGGCCGGTCTCTACCTGCGGATTGAGCAGAAGCTGCGGGGGGCGTGGCCCCGCCAGCCCCGCATCCCC

531 R P Q H K V R G Y R Y L E E D N S D E S D A E G G E H G D G A E E
 1632 CGGCCCCAGCACAGGTGCGCGTTACCGCTACTTGGAGGAGGACAACTCGGACGAGAGCGACGCGGAGGGCGAGCATGGGGACGGCGCGGAGGAG

563 E A P P A G P R P G P E P A G L G R R P C P Y E Q A Q G G D G P
 1728 GAGGCGCGCCCGCAGGGCCAGGCTGGCCCCGAGCCCGCTGGACTCGGGCCCGGCCCTGCCCTACGAACAGGCGCAGGGGGGAGACGGGCCG

595 E E Q *
 1824 GAGGAGAGTGAAGGGCCGCTGGTCCCCGACTCAGCCTCCCTCCTCGCCGGCTCAGTTTACCACGTCTGAGGTGGGGGGACCCCTCCGAGT

1920 CCGCGCTGTCTTCAAAGGCCCTGTCTCCCTCCCGAGCTTGGGGACGCCCCCTCCAGAGCCAGGTCACTCCGGGCTTCCGACGCCCTCC
 2016 AAGCGGAGTGGAGCCTTGGGAACCCCTGGCCAAAGCAGGAGGTTGGAATAACAGCTGAAACCCCGGGCCCTTAGCACGCGCCCGAGCGCCG
 2112 GAGCACGGTCAGGGTCTTCTTGGGACCCGGCCCTCCAGATCCCCACAGCTTTCGGCCCGGACCCGGGCGGCTGTGAGCGCACTTGGCACCCT
 2208 CTATCCCAGGGTCCGCGGAGGCCACGATTTTACAGAAAATGAGCAATAAGAGATTTTGTACTGTCAAAA 2282

Рис. 1. Нуклеотидна та виведена амінокислотна послідовності *hUNC93* людини. Відкрита рамка зчитування знаходиться між 42—1832 п. н. Трансмембранні ділянки, які були розраховані за допомогою програми TMpred. Знаком «>» показано внутрішньо-зовнішні трансмембранні спіралі, знаком «<» — зовнішньо-внутрішні трансмембранні спіралі. Межі екзонів позначено вертикальними стрілочками. Підкреслено сайт поліаденілювання

630 п. н. отримано за допомогою специфічних праймерів 3'-RACE1 і 3'-RACE2 та універсальних праймерів AP1 і AP2 («Clontech»). Цей продукт було елюйовано з гелю і клоновано. Три клони було секвеновано. Аналіз нуклеотидної послідовності показав, що 3'-кінець гена *hUNC93* людини має ланцюжок полі(A), який складається з 28 аденінових нуклеотидів. Типовий сайт поліаденілювання передує ланцюжку полі(A) і знаходиться на відстані 16 п. н. від нього (рис. 1).

Таким чином, використовуючи різні методи (скринінг кДНКової бібліотеки та 3'-RACE), отримано 2282 п. н. нового гена людини (рис. 1).

Аналіз експресії гена *hUNC93* за допомогою Нозерн-блот гібридизації показав, що цей ген експресується в усіх перевірених тканинах, крім плаценти. Найвищий рівень експресії гена *hUNC93* виявлено в серці та мозку, а найменший — в печінці та лейкоцитах. Отримано один транскрипт на рівні 2,4 тис. н. (рис. 2).

Виведена амінокислотна послідовність, яка кодується ідентифікованим геном, складається з 597 амінокислотних залишків. Молекулярна маса цього потенційного білка становить 66,6 кДа (рис. 1). Цей білок людини виявив гомологію до білка UNC93 з *C. elegans* (21 % протягом 487 амінокислотних залишків) (реєстраційний номер у GenBank Z81449). На основі цієї гомології новий ген людини названо *hUNC93*. Виведена амінокислотна послідовність, що кодується геном *hUNC93* людини, на 86 % ідентична протягом 118 амінокислотних залишків білку UNC93 миші (реєстраційний номер у GenBank U89424). Крім цього, потенційний білок *hUNC93* людини виявив 62 % ідентичності протягом 275 амінокислотних залишків до білка UNC93 курчати (реєстраційний номер у GenBank AJ271977), 22 % ідентичності протягом 478 амінокислотних залишків до білка UNC93 дрозофіли (реєстраційний номер у GenBank AF145657) та 31 % ідентичності протягом 63 амінокислотних залишків до гіпотетичного білка з *Arabidopsis thaliana* (реєстраційний номер у GenBank AC016661). Таким чином, ген *hUNC93* людини кодує консервативний білок, який ідентифікований у широкому колі організмів.

У виведеній амінокислотній послідовності, яка кодується геном *hUNC93* людини, знайдено потенційний трансмембранний домен з 11 трансмембранними спіральними ділянками. Це дозволяє припустити, що ген *hUNC93* кодує білок, асоційований з мембраною.

Показано, що UNC93 з *C. elegans* є м'язовий білок, асоційований з мембраною, який бере участь у регуляції м'язових скорочень [8]. Мутації в гені

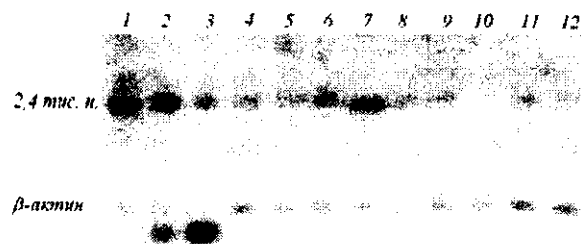


Рис. 2. Радиоавтограф Нозерн-блот гібридизації для генів *hUNC93* та β -актину людини. MTN фільтр («Clontech», США) містив 2 мкг мРНК з наступних тканин: 1 — мозок; 2 — серце; 3 — скелетні м'язи; 4 — товстий кишечник; 5 — тимус; 6 — селезінка; 7 — нирки; 8 — печінка; 9 — тонкий кишечник; 10 — плацента; 11 — легені; 12 — лейкоцити. Для гена *hUNC93* людини виявлено один транскрипт на рівні 2,4 тис. нуклеотидів

UNC93 з *C. elegans* призводили до повільних некоординованих рухів [8]. Звідси пішла назва «UNC» (UNCordinated). Враховуючи гомологію до *UNC93* з *C. elegans*, зроблено припущення, що ген *hUNC93* людини також бере участь у функціонуванні м'язів.

Ген *hUNC93* людини локалізовано до хромосомної ділянки 11q13, він знаходиться в межах клону PAC RP5-901A4 людини. Цей локус асоційований з багатьма хворобами, деякі з яких пов'язані з функцією м'язів. Так, спінальна м'язова атрофія картована до цієї хромосомної ділянки [9].

Таким чином, у результаті роботи ідентифіковано новий ген людини *hUNC93*, встановлено рівень експресії цього гена в різних тканинах, визначено його хромосому локалізацію та показано потенційну роль цього гена у функціонуванні м'язів.

V. I. Kashuba, A. I. Protopopov, S. M. Kvasha, A. V. Rynditch, E. R. Zabarovsky

Characterization of a novel human gene *hUNC93*

Summary

We have identified a novel human gene *hUNC93*. The expression of human *hUNC93* gene was detected in all tested tissues, but placenta, with the highest level observed in heart and brain and the lowest — in liver and leukocytes. The gene was mapped to chromosomal band 11q13. The predicted amino acid sequence of human *hUNC93* is related to the *UNC93* protein of *Caenorhabditis elegans*, which play an important role in the muscle contraction.

В. И. Кашуба, А. И. Протопопов, С. М. Кваша, А. В. Рындич, Е. Р. Забаровский

Характеристика нового гена человека *hUNC93*

Резюме

Нами был идентифицирован новый ген человека *hUNC93*.

Экспрессия гена выявлена во всех исследуемых тканях, кроме плаценты, при этом наивысший уровень экспрессии обнаружен в сердце и мозге, а наименьший — в печени и лейкоцитах. Ген картирован к хромосомной полосе 11q13. Анализ выведенной аминокислотной последовательности, кодируемой геном hUNC93 человека, выявил гомологию к белку UNC93 из *Caenorhabditis elegans*, который принимает участие в сокращении мышц.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Greenwald I. S., Horvitz H. R. Dominant suppressors of a muscle mutant define an essential gene of *Caenorhabditis elegans* // *Genetics*.—1982.—101.—P. 211—225.
2. Greenwald I. S., Horvitz H. R. A visible allele of the muscle gene sup-10 X of *C. elegans* // *Genetics*.—1986.—113.—P. 63—72.
3. Waterston R. H., Hirsh D., Lane T. R. Dominant mutations affecting muscle structure in *Caenorhabditis elegans* that map near the actin gene cluster // *J. Mol. Biol.*—1984.—180.—P. 473—496.
4. Greenwald I. S., Horvitz H. R. unc93 (e1500): a behavioral mutant of *Caenorhabditis elegans* that defines a gene with a wild-type phenotype // *Genetics*.—1980.—96.—P. 147—164.
5. Zabarovsky E. R., Allikmets R., Kholodnyuk I., Zabarovska V. I., Paulsson N., Bannikov V. M., Kashuba V. I., Dean M., Kisselev L. L., Klein G. Construction of representative NotI linking libraries specific for the total human genome and for human chromosome 3 // *Genomics*.—1994.—20.—P. 312—316.
6. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.—New York: Cold Spring Harbour Lab. press, 1989.
7. Protopopov A. I., Gizatullin R. Z., Vorobieva N. V., Protopopova M. V., Kiss C., Kashuba V. I., Klein G., Kisselev L. L., Grafodatsky A. S., Zabarovsky E. R. High resolution FISH mapping of 50 NotI linking clones homologous to fenes and cDNAs on human chromosome 3 // *Chromosome Res.*—1996.—4.—P. 443—447.
8. Levin J. Z., Horvitz H. R. The *Caenorhabditis elegans* UNC-93 gene encodes a putative transmembrane protein that regulates muscle contraction // *J. Cell Biol.*—1992.—117, N 1.—P. 143—155.
9. Grohman K., Wienker T. F., Saar K., Rudnik-Schoneborn S., Stoltenburg-Didinger G., Rossi R., Novelli G., Nurnberg G., Pfeufer A., Wirth B., Reis A., Zerres K., Hubner C. Diaphragmatic spinal muscular atrophy with respiratory distress is heterogeneous, and one form is linked to chromosome 11q13-q21 // *Amer. J. Hum. Genet.*—1999.—65, N 5.—P. 1459—1462.

УДК 577.113.5

Надійшла до редакції 22.01.2001