

УДК 577.217.5:577.218:578.821.2

Аймбетов Р.С.¹, Полимбетова Л.², Станбекова Г.², Бисенбаев А.К.¹, Искаков Б.К.²
**ХАРАКТЕРИСТИКА И АМПЛИФИКАЦИЯ ГЕНА АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА
ЧЕЛОВЕКА**

¹Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии
Казахский национальный университет им. аль-Фараби

²Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина ЦБИ КН МОН РК)

Выявлены скрытые сигналы сплайсинга согласно правилам процессинга молекул пре-мРНК в ядрах клеток растений. Проведен подбор оптимального вектора для клонирования κДНК АФПЧ и компьютерное моделирование рекомбинантной кассетной конструкции, содержащей гистидиновую метку (His-tag) на С-конце белка. Проведена амплификация κДНК АФПЧ с помощью реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Альфа-фетопротеин (АФП) - наиболее известный эмбриоспецифический белок, характерный для эмбрионального периода развития всех представителей класса млекопитающих, и, возможно, всех позвоночных. Он является также наиболее известным опухолевым маркером, обнаруживаемым с высокой специфичностью у больных с первичным раком печени и тератокарциномой, а также в 15% случаев острого гепатита, в отдельных случаях рака желудка и панкреатобластомы, хронического гепатита и цирроза печени [1].

Альфа-фетопротеин принадлежит к семейству белков альбуминоидных генов, наряду с сывороточным альбумином, витамин Д-связывающим белком и, обнаруженным относительно недавно, альфа-альбумином (афамин). По химической структуре АФП является гликопротеином, содержащим до 3 - 5 % углеводов. Молекулярная масса этого белка колеблется в пределах 68-73 кДа, в зависимости от содержания углеводов и вида животного, из которого он был выделен [2].

АФП проявляет свойства транспортного белка. Биохимические свойства АФП указывают на его родство с рядом ключевых регуляторных молекул в организме. АФП способен направленно доставлять регуляторные сигналы в клетки, имеющие рецепторы к АФП [3]. Методами биоинформатики – путем сравнения первичных структур АФП и ряда других белков в составе АФП выявлено более двадцати функционально важных участков [4]. Обнаружение в составе альфа-фетопротеина (АФП) множества функционально важных участков позволяет сделать предположение о том, что альфа-фетопротеин является резервуаром биологически активных пептидов, которыми он обеспечивает растущие эмбриональные ткани. В этом может заключаться основное биологическое значение АФП в эмбриогенезе. Показано, что 40-70% раковых клеток имеют специфические рецепторы для АФП. Это открывает возможность использования АФП для направленной доставки терапевтических агентов к раковым клеткам.

Таким образом, имеются веские аргументы о высокой эффективности клинического использования АФПЧ в медицине, в том числе для направленной терапии рака. Однако эти перспективы ограничены из-за существующего дефицита очищенного сывороточного АФПЧ. Создание трансгенных систем продуцентов рекомбинантного АФП является наилучшим подходом для решения этих проблем.

Целью работы является характеристика и амплификация гена альфа-фетопротеина человека (АФПЧ).

Материалы и методы

В качестве материала для выделения нуклеиновых кислот использовали гепатоцеллюлярной карциномы человека линии HepG2. Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей геномного гена и матричной РНК, кодирующих АФПЧ, проводили с помощью компьютерных программ “MicroGenie”, «GeneRunner», «VNTI Viewer», «NetGene2». Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы AMV-RT фирмы “Promega”. Полимеразную цепную реакцию проводили, как описано ранее [5]. Генетические конструкции, содержащие ген АФПЧ получали с применением стандартных методов генетической инженерии. В работе использовали рекомбинантную плазмиду рY-GUS-TMV.

Результаты и их обсуждение

К настоящему времени известна полная нуклеотидная последовательность геномной геномного гена и мРНК. Геномный ген АФПЧ (accession number M16110 в банке генов; entry name EMBL: HSAFP3) имеет длину – 27 553 нуклеотидов и в этом гене содержатся сигналы инициации (промотор) и терминации (поли А - сайт) транскрипции, а также 14 интронов. Ввиду огромной длины и наличия большого число интронов экспрессия геномного гена АФПЧ не представляется возможной в растительных или микробных клетках ни *in vitro* ни *in vivo*.

Далее мы проводили компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей мРНК (кДНК) гена АФПЧ (accession number BC027881 в банке генов; entry name EMBL:BC027881). Длина клонированного кДНК гена составляет 2 098 нуклеотидов и в этом гене содержатся 5'- и 3' нетранслируемые последовательности (5'- и 3' НТП длиной 30 и 157 нуклеотидов соответственно), а также открытая рамка считывания (ОРС длиной 1827 нуклеотидов), кодирующая полипептид с молекулярной массой 68 685 Да.

С целью выяснения содержит ли последовательность кДНК АФПЧ растительные сигналы сплайсинга, нами проведен ее компьютерный анализ с помощью программы NetGene2 v.2.4 по алгоритму, предназначенному для поиска интронов в геномных генах модельного растения *Arabidopsis thaliana*. Этот анализ представляется весьма важным, поскольку присутствие таких молчащих сигналов в транскриптах может привести к альтернативным вариантам сплайсинга и образованию некорректных мРНК [6], которые будут неспособны кодировать функциональный белок АФПЧ. В таблице 1 приведен результат такого анализа. Анализ сигналов сплайсинга предсказал наличие в мРНК АФПЧ 3-х донорных сайтов сплайсинга.

Таблица 1 – Результаты компьютерного анализа по предсказанию наличия сигналов сплайсинга в ядрах клеток растений

Донорные сайты сплайсинга в прямой цепи				
Позиция в направлении 5' → 3'	Фаза	Цепь	Достоверность в долях единицы	5' экзон ^ интрон 3'
518 ^ 519	2	+	0.90	AUCCCUUCCU ^ GUAUGCACCU
973 ^ 974	1	+	0.81	AAACCUGAAG ^ GUCUAUCUCC
1902 ^ 1903	2	+	0.90	CUUUCAUUCG ^ GUGUGAACUU
Акцепторные сайты сплайсинга в прямой цепи				
Позиция в направлении 5' → 3'	Фаза	Цепь	Достоверность в долях единицы	5' экзон ^ интрон 3'
---	---	+	---	----- ^ -----

Обозначения: знаком «^» обозначены точки, где должно происходить расщепление транскрипта в пределах сайта сплайсинга.

Первый (между нуклеотидами 518 и 519) и второй (между нуклеотидами 973 и 974) сайты сплайсинга могут нарушать структуру первичного транскрипта, поэтому необходимо изменить эти сайты сплайсинга в составе кДНК - гена АФПЧ, с тем чтобы, но не нарушить аминокислотную последовательность белка. Следует отметить, что третий сайт сплайсинга (между нуклеотидами 1902 и 1903) находится за пределами открытой рамки считывания (т.е. после стоп кодона) и, поэтому он не будет амплифицирован в кДНК АФПЧ. Акцепторные сайты сплайсинга в прямой цепи не обнаружены.

Прежде чем клонировать ген необходимо решить, какая экспрессия целевого белка необходима – внутриклеточная или экскреторная [7]. Обычно для этих целей используется компьютерный анализ на наличие сигнальных пептидов определяющих внутриклеточную локализацию целевого белка. В нашем случае, результаты компьютерного анализа по предсказанию внутриклеточной локализации белка АФПЧ, показало, что в клетках животных большая часть синтезированного белка АФПЧ должна локализоваться во внешней плазматической мембране и за ее пределами, что хорошо согласуется с тем фактом, что АФПЧ действительно является секретлируемым белком (таблица 2).

Таблица 2 – Сравнение результатов компьютерного анализа по предсказанию внутриклеточной локализации белка АФПЧ в клетках животных и растений

Тип клеток	Внутриклеточные компартменты				
	Внешняя мембрана и секреция	Цитоплазма	Ядро	Эндоплазматический ретикулум	Хлоропласты
Животных	67 %	23 %	5 %	5 %	–
Растений	15 %	14 %	39 %	9 %	23 %

На рисунке 1 представлена аминокислотная последовательность белка АФПЧ в однобуквенной кодировке. Открытая рамка считывания (ОРС) насчитывает 610 кодонов, начиная со стартового AUG-кодона, кодирующего метионин (М) и заканчивая стоп-кодоном (#). Анализ аминокислотной последовательности АФПЧ (609 аминокислот) выявил наличие нативного сигнального пептида с сайтом протеолиза между Arg₁₉ (R) и Thr₂₀ (T).

Анализ той же аминокислотной последовательности (рисунок 1), проведенный по алгоритму, характерному для клеток растений, предсказал совсем другую компартиментализацию АФПЧ: большая часть синтезированного белка ожидается в ядре и хлоропластах, а секретироваться из клеток будут не более 15% белка.

В связи с этим для клонирования гена АФПЧ необходимы эксперименты по *in vitro*-мутагенезу кДНК-гена АФПЧ, с тем чтобы заменить его собственный сигнальный пептид на аналогичную последовательность от растительного секретлируемого белка.

Необходимо отметить, что секреция белка, как правило, более предпочтительна, так как облегчает последующую его очистку. В связи с этим, нами проведен химический синтез и очистка олигонуклеотидов для клонирования сигнального пептида растительного секретлируемого белка с целью обеспечить апопластную локализацию рекомбинантного АФПЧ. Последовательности этих олигонуклеотидов приведены на рисунке 2-В.

Как видно из рисунка 2 – А для амплификации были использованы два олигонуклеотидных праймера: смысловой праймер, содержащий сайт узнавания рестриктазой NcoI (подчеркнут), и антисмысловый праймер, содержащий сайт XhoI (подчеркнут) и растительный сигнальный пептид для обеспечения апопластной локализации.

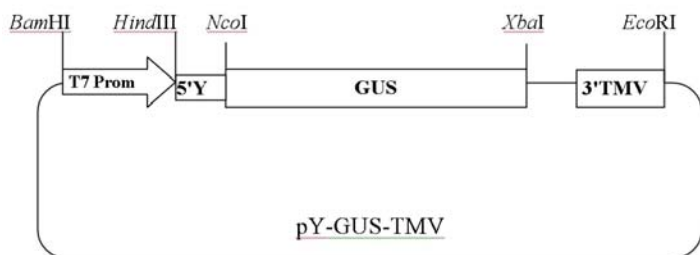
1	M KWVESIFLI FLLNFTESR*TLHRNEYGIAS ILDSYQCTAE	40
41	ISLADLATIF FAQFVQEATY KEVSKMVKDA LTAIEKPTGD	80
81	EQSSGCLENQ LPAFLEELCH EKEILEKYGH SDCCSQSEEG	120
121	RHNCFLAHKK PTPASIPLFQ VPEPVTSC EA YEEDRETFMN	160
161	KFIYEIARRH PFLYAPTILL WAARYDKIIP SCCKAENAVE	200
201	CFQTKAATVT KELRESSLLN QHACAVMKNF GTRTFQAITV	240
241	TKLSQKFTKV NFTEIQKLV L DVAHVHEHCC RGDVLDCLQD	280
281	GEKIMSYICS QQDTLSNKIT ECCKLTTLER GQCIIHAEND	320
321	EKPEGLSPNL NRFLGDRDFN QFSSGEKNIF LASFVHEYSR	360
361	RHPQLAVSVI LRVAKGYQEL LEKCFQTENP LECQDKGEEE	400
401	LQKYIQESQA LAKRSCGLFQ KLGEYYLQNA FLVAYTKKAP	440
441	QLTSSELMAI TRKMAATAAT CCQLSEDKLL ACGEGAADII	480
481	IGHLCIRHEM TPVNPVGVC CTSSYANRRP CFSSLVVDET	520
521	YVPPAFSDDK FIFHKDLCQA QGVALQTMKQ EFLINLVKQK	560
561	PQITEEQLEA VIADFSGLLE KCCQGQEQEV CFAEEGQKLI	600
601	SKTRAAALGV#	610

Обозначения: первая аминокислота – метионин (М) выделена жирным шрифтом и одинарным подчеркиванием. Место отщепления сигнального пептида указано звездочкой (*). Знаком # обозначено положение стоп-кодона. Цифрами указаны положения аминокислот начиная с N-конца.

Рисунок 1 - Аминокислотная последовательность альфа-фетопротеина человека

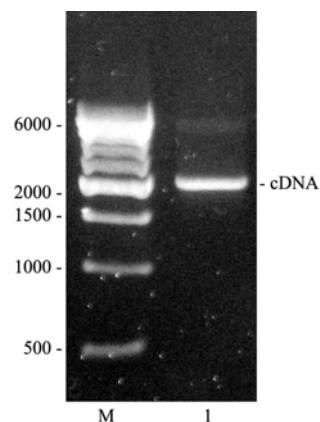
Анализ той же аминокислотной последовательности (рисунок 1), проведенный по алгоритму, характерному для клеток растений, предсказал совсем другую компартиментализацию АФПЧ:

проводить замены регуляторных элементов, контролирующих экспрессию целевого гена. Эти векторы также, выгодно отличались от существующих рекомбинантных конструкций тем, что ввели в их состав разработанные нами ранее трансляционные энхансеры (усилители), которые локализуются в пределах 5'- и 3'-нетранслируемых последовательностей мРНК [8]. Корректность сборки полученных векторов была доказана рестрикционным анализом (данные не показаны).



вектор pY-GUS-TMV размером около 5 тпн содержит в своем составе промотор бактериофага Т7 (Т7 Prom), 5'-НТП Y-вируса картофеля (5'Y), ген β-глюкуронидазы (GUS) и 3'-НТП вируса табачной мозаики (3'TMV).

Рисунок 3 – Схематичное изображение вектора pY-GUS-TMV



1 – продукт последовательных реакций РОТ и ПЦР; М – маркерные ДНК, размеры которых указаны в нуклеотидах слева. Справа указано положение кДНК АФПЧ.

Рисунок 4 - Амплификация кДНК АФПЧ

кДНК, кодирующий АФПЧ, получали методом ОТ - ПЦР, используя в качестве матрицы геномную ДНК гепатоцеллюлярной карциномы человека линии НерG2. Для амплификации были использованы олигонуклеотидные праймера указанные на рисунке 2.

Результаты этих экспериментов показаны на рисунке 2. Из приведенной электрофореграммы видно, что главным продуктом амплификации является кДНК с ожидаемым размером около 2000 пар нуклеотидов, которая, по всей видимости, кодирует белок АФПЧ.

В результате проведенных исследований проведен компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей геномного гена АФПЧ. Выявлены скрытые сигналы сплайсинга согласно правилам процессинга молекул пре-мРНК в ядрах клеток растений. Обнаружены донорные сайты сплайсинга в пределах белок-кодирующей области, а также в регуляторных сегментах общей рекомбинантной кассеты, предназначенной для экспрессии данного гена в растениях. Анализ аминокислотной последовательности АФПЧ выявил наличие нативного сигнального пептида (СП) с сайтом протеолиза между Arg₁₉ и Thr₂₀. Однако этот сигнальный пептид не может обеспечивать секрецию АФПЧ из клеток растений. Проведен подбор оптимального вектора для клонирования кДНК АФПЧ и компьютерное моделирование рекомбинантной кассетной конструкции, содержащей гистидиновую метку (His-tag) на С-конце белка. Проведена амплификация кДНК АФПЧ с помощью реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Проведен электрофоретический анализ продуктов амплификации кДНК АФПЧ.

Литература

- 1 Abelev G. Alpha-fetoprotein: 25 years of study // *Tumor Biol.* 1989. V. 10. P. 63-74.
- 2 Torres J.M., Darracq N., Uriel J. Membrane proteins from lymphoblastoid cells showing cross-affinity for alpha-fetoprotein and albumin. Isolation and characterization // *Biochim.Biophys. Acta.* 1992. v.1159. P. 60-66.
- 3 Nunez E.A. Biological role of alpha-fetoprotein in the endocrinological field: data and hypotheses. // *Tumor Biol.* 1994. v. 15. P. 63-72.
- 4 Mizejewski GJ Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants // *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.).* 2001. v 226 (5): 377-408.
- 5 Аймбетов Р.С., Полимбетова Н.С., Бисенбаев А.К., Искаков Б.К. Амплификация гена альфа-фетопротейна человека для экспрессии в трансгенных растениях// *Вестник КазНУ. Серия биолог.* - 2008. - №1(36). - С. 89-90.

6 Brown J. W. S. and Simpson C. G. *Splice site selection in plant pre-mRNA splicing* . // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1998.v.49: 77-95 .

7 Punchapat S., Norene B. and Hugh S. M. *A plant signal peptide–hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells* // *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2003. v.100 (5). 2209–2214.

8 Akbergenov R., Zhanybekova S., Polimbetova N., Madin K., Hohn T., Iskakov B. *Complementary interaction between the central domain of 18S rRNA and the 5' untranslated region of mRNA enhances translation efficiency in plants* // In: "Cell-Free Protein Expression", Ed. J.R. Swartz, Springer-Verlag. - 2003. - P. 199-208.

Summary

The latent signals of splice site according to rules of processing of pre-mRNA in nucleus of plant cells was revealed. Optimal vector for cloning cDNA of HAFP and computer modeling of recombinant constructions design containing his-tag on the C - end of protein has been carried out. Amplification cDNA of HAFP by RT – PCR has been carried out.

Тұжырым

Өсімдік қдлеткасының ядросындағы пре-мРНҚ молекуласының процессингі заңдылығы негізінде жасырын сплайсинг сигналдары айқындалды. Адам альфа-фетопротеин генінің қДНҚ-сын клондауға қажет оптимальды вектор таңдалыны, белоктың С – соңында гистидинтің таңба бар (His-tag) рекомбинантты конструкция компьютерлік жолмен сипатталды. Адам альфа-фетопротеин қДНҚ – сы кері транскрипция және тізбекті полимеразалық реакция арқылы бөлініп алынды.

Байқошқарова С.Б.

ДЕНЕДЕН ТЫС ҰРЫҚТАНДЫРУ БАҒДАРЛАМАСЫНДА АНЕУПЛОИДТЫ АБЕРРАЦИЯЛАРДЫ АНЫҚТАУ

(«Экомед» адам ағзасынан тыс ұрықтандыру емханасы)

FISH-диагностиканы жүргізу барысында анықталған анеуплоидиялардың жиілігі мен кейбір физиологиялық факторлар арасында тәуелділік бар екендігі белгілі болды, сонымен қатар олардың жиілігіне репродуктивтік анамнездің әсер ететіндігі анықталды.

1967 жылы R.Edwards және R.Gardner клиникалық тәжірибеде бірінші рет имплантацияға дейінгі генетикалық диагностика (ИГД) әдісін қоян эмбрионының жынысын анықтау үшін қолданды [1]. Сол кездің өзінде ИГД-ны адамда генетикалық аурулардың тұқым қуалауын шектеу үшін пайдалану ойлары туындаған болатын. 80 ж. аяғында осы әдісті тұқым қуалаушылық ауруларды өзінің ұрпағына берілу қаупі жоғары ерлі-зайыпты жұптарға көмектесу мақсатында қолданылды [2,3,4].

90 ж. басында қарай, жеке жасушалардағы мутацияларды анықтауға мүмкіндік беретін, полимеразды тізбектік реакция (ПТР) әдісі ойлап табылды [5]. 1990 ж. бірінші болып адамға ПТР әдісін имплантацияға дейінгі генетикалық диагностика жүргізу мақсатында А.Handyside және оның әріптестері қолданған. Олар Х-хромосомасымен тіркескен аурулары бар ерлі-зайыпты жұптардың эмбриондарының жынысын анықтау мақсатында, ПТР әдісінің негізінде Y-хромосомасын сипаттайтын нуклеотидтердің спецификалық тізбектерін зерттеген болатын [6]. Бірақ эмбриондарды анықтау барысында жалған диагноз қою қаупі бар болғандықтан ПТР-дан біртіндеп *in situ* жағдайындағы флуоресценттік гибридизация (FISH) жасау әдісіне ауыса бастады. Бұл әдістің артықшылығы Х және Y-хромосомаларын бір уақытта анықтауға болады. Осының арқасында эмбриондардың тек жынысын анықтаумен ғана емес, сонымен қатар жыныс хромосомаларының анеуплоидиясын да анықтауға мүмкіншілік туады [7].

Бүгінгі күні генетикалық аномалиялары бар балаларды туу қаупі бар, әйелдер тобын анықтайтын скринингтік бағдарламалардың елеулі дәрежеде жетілдірілуіне қарамастан, жаңа жағдайлар мәселелердің жаңа шешімін талап етеді. Бедеулікке шалдыққан ерлі-зайыпты жұптарға ИГД жүргізу арқылы, қосалқы репродуктивтік технологиялардың көмегімен олардың емделуін елеулі дәрежеде жоғарлатуға болады. Сонымен қатар тұқым қуалайтын аурулары бар балалардың туылуын шектеуге мүмкіндік береді [8,9]. Инвазивті пренатальдық диагностика әдістерінің көмегімен ұрықтың генетикалық ауруларын анықтағанда, жүктілікті тоқтату қажеттілігі пайда болуы мүмкін. Ал имплантацияға дейінгі генетикалық диагностика әдісі бастапқыдан сау эмбриондармен жүкті болуды көздейді.