

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
Інститут молекулярної біології і генетики

УДК 575.11.113  
577.21

*В. Шмідт*

Шмідт Валентина Олександрівна

**Вивчення генів рецепторів людини, що активуються  
протеазами**

03.00.03 - молекулярна біологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1997

504

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00751774 (V)

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі Гематології Державного університету  
Університету (м. Стоні Брук, США).

Наукові керівники: Associate Professor, Dr. Wadie F. Bahou, M.D.,  
Державний Нью-Йоркський Університет (м. Стоні Брук,  
США, Нью-Йорк),  
доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН і АМН України  
Кордюм Віталій Арнольдович,  
ІМБіГ НАН України, зав. відділом

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук  
Соломко Олександр Петрович,  
ІМБіГ НАН України, зав. відділом,  
доктор біологічних наук,  
Галкін Анатолій Павлович,  
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,  
зав. відділом.

Провідна установа - Київський Університет ім. Тараса Шевченка,  
кафедра біохімії

Захист відбудеться "23" грудня 1997 року о 10<sup>00</sup> годині  
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.86.01 Інституту молекулярної  
біології і генетики НАН України за адресою: 252143, м. Київ-143, вул.  
Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної  
біології і генетики НАН України.

Автореферат розісланий 15 листопада 1997 року.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук

Лукаш Л. Л.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність проблеми.** Концепція, згідно якої протеази можуть чинити значний вплив на клітинну активацію і проліферацію, призвела до нового розуміння механізмів взаємодії між протеазою і клітиною. Спостереження, що деякі ферменти коагуляції - тромбін, фактор XII та інші серинові протеази безпосередньо активують певні типи клітин, послужили основою для гіпотези, згідно якої деякі клітинні ефекти протеаз можуть реалізовуватись шляхом розщеплення клітинних рецепторів, що активуються внаслідок протеолізу.

Класично, передача інформації клітині здійснюється шляхом оборотного зв'язування ліганду з відповідним рецептором на клітинній мембрані. Виняток з цього правила було знайдено з відкриттям рецептора, який відповідає за клітинні ефекти тромбіна [Vu T.-K. et al., 1991]. Тромбіновий рецептор (TR), а також нещодавно відкритий рецептор PAR-2 [Nystedt S. et al., 1994] мають інший, унікальний механізм активації. Протеаза зв'язується з N-кінцевим екстрацелюлярним доменом рецептора і специфічно необоротно розщеплює його, звільняючи таким чином новий N-кінець, який і являє собою "ліганд" даного рецептора. Новий N-кінець зв'язується з другою екстрацелюлярною петлею рецептора і активує його. Тому TR та PAR-2 виділяють в нову родину рецепторів, що активуються внаслідок протеолізу, в рамках великого класу G-білок зв'язуючих рецепторів, які містять 7 гідрофобних доменів.

Незважаючи на швидке накопичення даних про механізми активації рецепторів TR та PAR-2, мало відомо про молекулярну генетику TR і, особливо, PAR-2. Вивчення молекулярної організації генів даних рецепторів закладає основу для розуміння механізмів регуляції експресії рецепторів цієї родини та їх еволюції, а також ідентифікації нових рецепторів - представників цієї родини, про гіпотетичне існування яких постійно з'являються повідомлення в науковій літературі.

**Мета та завдання дослідження.** Метою даної роботи було клонування генів TR і PAR-2 людини та вивчення їх структурної організації і хромосомної локалізації. Для досягнення цієї мети були поставлені такі завдання:

1. Клонувати ген TR людини та кДНК гену PAR-2 ендотеліальних клітин судин людини.
2. Зробити порівняльну характеристику первинної та екзон/інтронної структури генів TR і PAR-2 людини.
3. Дослідити промоторну область гену TR людини.
4. Одержати фізичну хромосомну карту генів TR та PAR-2 людини і встановити відстань між ними на хромосомі.
5. Створити клітинну модель для вивчення потенційних активаторів PAR-2 на основі зеленого флюоресцентного білка GFP з лідоміна Вікторія

**Наукова новизна та практична цінність роботи.** В роботі вперше було клоновано та охарактеризовано ген TR з геномної ДНК людини і кДНК гену PAR-2, який експресується в ендотеліальних клітинах судин людини. Також вперше було вивчено промоторну область гену TR людини та ідентифіковано ряд промоторних регуляторних елементів.

Вперше було визначено хромосому локалізацію генів TR і PAR-2 людини методами радіаційних соматичних клітинних гібридів та YAC клонів, а також вперше було встановлено фізичну відстань між вищезгаданими генами на хромосомі. Таким чином, дане дослідження робить внесок у вирішення однієї з головних задач проекту "Геном Людини" - встановлення хромосомної локалізації генів цілого геному людини.

Створена унікальна в своєму роді клітинна модель на основі зеленого флюоресцентного білка GFP з *Aequorea victoria* для вивчення потенційних протеаз-активаторів PAR-2.

Одержані результати розширюють існуючі уявлення про роль протеаз в організмі. Існування рецепторів, які специфічно активуються протеазами, демонструє, що протеази, поряд з деструктивними функціями, також відіграють важливу конструктивну роль в організмі, викликаючи специфічну активацію певних типів клітин і, таким чином, здійснюючи регуляцію багатьох фізіологічних процесів в організмі.

Вивчення рецепторів, що активуються протеазами, буде корисним для створення фармакологічних агентів, які регулюють фізіологічні процеси, і відкриває широкі можливості для впливу на клітини *in vivo*. Крім того, оскільки TR і PAR-2 рецептори є життєво важливими, їх вивчення закладає основи для встановлення і характеристики захворювань, з ними пов'язаних. З цієї точки зору вивчення локалізації генів цих рецепторів на хромосомі є особливо важливим для ідентифікації генетичних захворювань, що пов'язані з даним локусом.

Одержані в роботі дані закладають наукову основу для нових підходів до пошуку і клонування нових, ще неохарактеризованих рецепторів цієї родини. Запропонована клітинна модель для вивчення потенційних активаторів PAR-2 на основі GFP може мати широке застосування у вивченні механізму активації рецепторів, локалізації їх в клітині та експресії їх генів *in vivo*. Крім того, створена модель може послужити для ідентифікації нових клітинних рецепторів.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів та їх обговорення, висновків та списку літератури, який включає 240 джерел. Робота викладена на 150 сторінках машинописного тексту і містить 42 рисунки та 4 таблиці.

**Апробація роботи.** Основні результати дисертації доповідались на 37-й щорічній конференції Американського Гематологічного Товариства (Сіетл, США, 2-6 грудня 1995), 38-й щорічній конференції Американського Гематологічного Товариства (Орlando, США, 6-10 грудня 1996), XVI Конгресі Міжнародного Товариства Тромбозу і Гомеостазу (Флоренція, Італія, 6-12 червня 1997).

**Особистий внесок дисертанта.** Весь обсяг експериментальної частини дисертації, пошук та обробка літературних даних виконані автором особисто. Аналіз та обговорення результатів проводилися спільно з науковими керівниками.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В роботі використовувалися ферменти виробництва Stratagene (La Jolla, США) та New England Biolabs, Inc. (Beverly, США). Олігонуклеотидні праймери були синтезовані д-ром G.D'Angelo, SUNY/Stony Brook, США на одноканальному синтезаторі Applied Biosystems (Foster City, США), модель 381 A. Культура клітин яєчника китайського хом'ячка була люб'язно надана д-ром T.Gilliam (Columbia University, New York, США).

Клони TR і PAR-2 генів людини були одержані в результаті скрінінгу геномної бібліотеки людини, клонованої в бактеріофаг  $\lambda$ EMBL-3 і люб'язно наданої д-ром W.Schubach, SUNY/Stony Brook, США, або клонованої в бактеріофаг P1 (Genomic Systems, Inc., St.Louis, США), та бібліотеки кДНК ендотеліальних клітин судин людини, клонованої в бактеріофаг  $\lambda$ gt11, виробництва Stratagene, відповідно. Скрінінг проводився за методом, описаним в [Sambrook J., et al., 1988]. Клонування виконували за загальноприйнятими методами, використовуючи вектори pBluescript (Stratagene) та M13mp18 (Sigma), первинну нуклеотидну послідовність визначали сіквенуванням дідезоксі-методом за [Sanger F., et al., 1977].

Для аналізу експресії генів TR і PAR-2 в різних типах клітин людини використовували Нозерн-блоттінг на нейлонових мембранах (Schleicher & Schuell, Keene, США) та зворотню транскрипцію-PCR (RT-PCR) [Ausubel F., et al., 1995]. Полімеразна ланцюгова реакція проводилася з використанням *Thermus aquaticus* (taq) ДНК-полімерази (Boehringer Mannheim GmbH, Німеччина) на ДНК-термоамліфікаторі (Coy Laboratory Products, Ann Arbor, США).

Сайт ініціації транскрипції визначали за допомогою реакції нарощування праймера (Primer Extension Reaction) [Ausubel F., et al., 1995]. Аналіз промоторної області гену TR людини виконували з використанням бази даних сервера Національного Інституту Здоров'я (NIH, Washington D.C., США, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) та бази даних TRANSFAC, версія 2.3.

Для створення фізичної карти генів TR і PAR-2 були використані панелі радіаційних гібридів Stanford G3 та Stanford TNG3 (Research Genetics, Huntsville, США) з розрішаючою здатністю 500 кв та 100 кв, відповідно. Панелі радіаційних гібридів являють собою набір гібридних клонів клітин хом'ячка з ділянками хромосом людини, одержаних внаслідок опромінення хромосом людини летальною дозою рентгенівського випромінювання. В кожній панелі представлений повний геном людини. Скрінінг панелей проводився за допомогою PCR з відповідними, специфічними до генів TR і PAR-2 та найближчих до них генетичних маркерів, праймерами. Продукти PCR аналізували електрофорезом в 3%-ному агарозному гелі, забарвленому бромістим етідієм. Статистичну обробку даних здійснювали з використанням пакету програм Центра Геному Людини Станфордського Університету (<http://shgc.stanford.edu/rhserver/info.html>) [Cox D., et al., 1990], а також програми RHMAP, версія 2.02 [Boehnke M., et al., 1991].

ДНК YAC клонів аналізували за допомогою електрофорезу в інвертованому електричному полі (варіант пульс-електрофорезу) на апараті Switchback™ pulse controller (Hoeffer Scientific Instruments, США).

Для створення клітинної моделі на основі зеленого флюоресцентного білка GFP з *Aequorea victoria* був використаний плазмідний вектор pEGFP-C1, адаптований для експресії в клітинах ссавців,  $\lambda$  збудження = 488 нм,  $\lambda$  емісії = 507 нм (Clontech Laboratories, Inc., St.Louis, США). Трансфекція COS-1 клітин нірки африканської зеленої мартишки ДНК людини, клонованої в pEGFP-C1 вектор, здійснювалась за кальцій-фосфатним та DEAE-декстрановим методами [Sambrook J., et al., 1988]. На 2-й - 3-й день після трансфекції експресія аналізувалась за допомогою флюоресцентної та конфокальної мікроскопії. Флюоресцентну мікроскопію виконували на мікроскопі Nikon Diaphoto (Японія). Конфокальну скануючу мікроскопію проводили на системі Noran Odyssey (Middleton, США), з'єднаною з системою MetaMorph Imaging (Universal Imaging, США). Мікроскопія проводилася за участю д-ра D. Colflesh (SUNY, США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

### Молекулярна характеристика гену тромбінового рецептора людини.

#### *Одержання геномних клонів, які містять ген TR людини.*

Спочатку, для аналізу структури гену TR людини використовували геномну ДНК людини та два кДНК зонди, які містили нуклеотиди 222 - 1502 (5'ORF) та 1503 - 3111 (3'UT) кДНК TR людини [Vu T.-K. et al., 1991], відповідно. Геномна ДНК піддавалась розщепленню рестриктазами і блоти-дуплікати гібридувались за Саузерном з двома зондами - 5'ORF та 3'UT. При використанні зонду 5'ORF, який містить екзон 1 та початок екзону 2 гену TR (Рис. 1, А) та зонду 3'UT, який містить більшу частину кодуючої послідовності екзону 2 гену TR (Рис. 1,

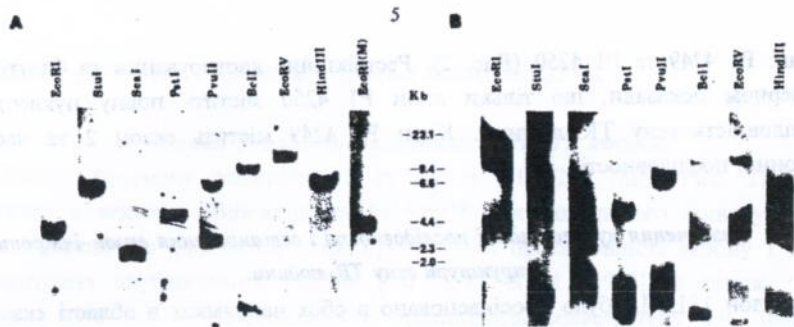
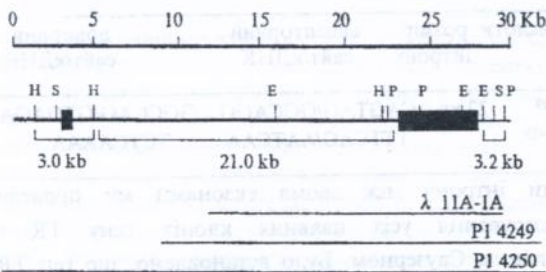


Рис. 1. Аналіз геномної ДНК за Саузерном з TR зондами 5'ORF (А) та 3'UT (В). Розмір фрагментів вказано в тисячах нуклеотидних пар (кв).

В), спостерігали наявність лише 1-2 гібридизаційних фрагментів, більшість яких мала розмір 4.4 - 9 кв, для кожної рестриктази. Ці дані дозволяють припустити, що ген TR характеризується обмеженою складністю та порівняно невеликим розміром. Такі характеристики відповідають іншим, описаним раніше, генам представників класу G-білок зв'язуючих рецепторів.

Для більш детальної характеристики структури гену TR була поставлена задача виділення клонів з геномної ДНК людини, які б містили весь ген TR. Ця задача вирішувалась двома шляхами. Спочатку, геномні клони одержували в результаті скрінінгу геномної бібліотеки людини, клонованої в бактеріофаг  $\lambda$ EMBL, зондом, який містив повну кодуєчу послідовність (1 - 2200 нп) гену TR. Цей зонд було одержано шляхом RT-PCR з використанням праймерів, специфічних до кДНК TR, та РНК ендотеліальних клітин судин людини як



матриці. В результаті скрінінгу було виділено геномний клон довжиною 18 кв ( $\lambda$ 11A-1A на Рис. 2). Аналіз за Саузерном підтвердив, що даний фрагмент ДНК містить більшу частину кодуєчої послідовності гену TR, включаючи екзон 2, а також інтронну послідовність. Було встановлено, що клон  $\lambda$ 11A-

Рис. 2. Схема структурної організації гену TR людини та геномних клонів, що містять ген TR. Н - *HindIII*, S - *Sall*, E - *EcoRV*, P - *PvuII*. Екзони позначено прямокутниками.

1A не містить екзон 1 та 5'-нетранслюєму промоторну область.

Альтернативно була використана інша методика - скрінінг геномної бібліотеки людини, клонованої в бактеріофаг P1. Скрінінг цієї бібліотеки проводили за допомогою PCR з праймерами, специфічними до 705 - 728 н.п. та 1106 - 1082 н.п. кДНК TR, відповідно. В результаті було одержано 2 геномних

клони: P1 4249 та P1 4250 (Рис. 2). Рестрикційне картирування та блоттінг за Саузерном показали, що тільки клон P1 4250 містить повну нуклеотидну послідовність гену TR людини. Клон P1 4249 містить екзон 2 та частину інтронної послідовності.

**Визначення нуклеотидної послідовності і встановлення екзон-інтронної структури гену TR людини.**

Клон  $\lambda$ 11A-1A було просіквенено в обох напрямках в області екзону 2. Було показано, що геномна кодуєча послідовність TR цілком збігається з опублікованою раніше послідовністю кДНК [Vu T.-K. et al., 1991] за винятком двох замін: нуклеотиди 935 - 936 CG  $\rightarrow$  GC, при цьому Leu<sup>237</sup> залишається без змін, а Val<sup>238</sup> змінюється на Leu<sup>238</sup>. Цей факт може пояснюватись тканиноспецифічними особливостями структури гену TR.

Для встановлення точної екзон-інтронної структури гену TR людини за допомогою комп'ютерного аналізу були визначені сайти сплайсінгу і, відповідно, межі екзонів та інтронів цього гену. Як показано в Таблиці 1, визначені нами екзон-інтронні межі відповідають загальноприйнятим правилам сплайсінгу [Mount S., 1982]. Перший сайт сплайсінгу гену TR для єдиного інтрону знаходиться відразу після Pro<sup>29</sup> амінокислотної послідовності TR. Другий сайт знаходиться перед Glu<sup>30</sup>.

**Таблиця 1**

Екзон-інтронна структура гену TR людини.

екзон	положення в н.п.	розмір в н.п.	амінокислоти	розмір інтрону	акцепторний сайт/кДНК	.....	донорний сайт/кДНК
1	5' $\rightarrow$ 312	438	Met <sup>1</sup> -Pro <sup>29</sup>	22 кв	CAGTAG/GGCAGG....	GGCCAG/GTGAGA	
2	313 $\rightarrow$ 3480	3167	Glu <sup>30</sup> -Thr <sup>425</sup>		TTTCAG/AATCAA.....	TCTCAAAA	

Для визначення довжини інтрону між двома екзонами ми провели розгорнуте рестрикційне картирування усіх наявних клонів гену TR з послідуочим аналізом фрагментів за Саузерном. Було встановлено, що ген TR містить лише 2 сайти розщеплення *Sall* (див. Рис. 2). Також було встановлено, що інтрон, розташований між двома екзонами, *Sall* сайта не має. За допомогою гібридизації за Саузерном з кДНК зондом, який містить повну кодуєчу послідовність TR людини, було показано, що в результаті розщеплення клону P1 4250 по *Sall* сайту звільнюється лише один фрагмент розміром  $\approx$  26 кв, який гібридується з даним зондом. Зважаючи на розташування *Sall* сайтів та розмір екзону 2 гену TR, можна оцінити розмір його інтрону як 22 кв.

Таким чином, нами було встановлено, що розмір гену TR людини становлює 27 кв, і він складається з двох екзонів (438 н.п. та 3167 н.п.,

відповідно), роз'єднаних великим інтроном довжиною 22 кв.

### Аналіз 5'-промоторної області гену TR людини.

*HindIII* фрагмент довжиною 3 кв клону P1 4250 (див. Рис. 2) було клоновано в вектори pBluescript та M13mp18 для подальшого сіквенування. Аналіз показав, що клонована нами нуклеотидна послідовність екзону 1 гену TR ідентична опублікованій раніше [Vu T.-K. et al., 1991], а також було одержано 1590 н.п. 5'-нетранслюємої промоторної області гену TR, раніше неопублікованих (Рис. 3).

Для більш повної характеристики гену TR людини в даній роботі визначали сайт ініціації транскрипції цього гену за методом нарощування праймера. Для

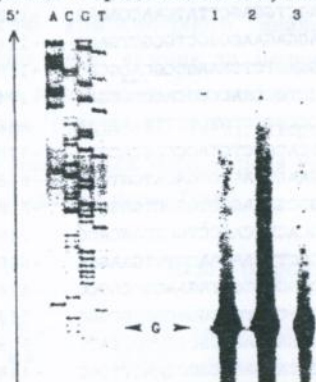
-1467	<u>AAGCTT</u> TATTTAACTGGGTAAGTCTCCGCAATTTAGTGATCAACTTCTATGTACAACAAGGT	-1408
-1407	ACTGTCCSTTTGAGGATGATGGGAGAATACAGGGGAAGAACGAAATCGCCTCTGATCGTACT	-1348
-1347	TCTCCACGGATGTAAGTGTCCGGGCTCTAGTGGGGAAATGATACCTTCGTGCGAAATTCA	-1288
-1287	CTTTAAAAAAGGCTTAGAAAACCTGACCACCGGCTCTCAGCTGCAGCTTATCAACCACAG	-1228
-1227	AACTCCGAATATGCCCGCACATCAGTCTGCTGGGTTAAGAGGAGAAGGGGCTGCGCTGAGC	-1168
-1167	TTTCCTAGAAAACAGTATTGGGGACCCATTTCTCTGTTGGAGTCTGAAAGGGCGCACGCAC	-1108
-1107	CAGAGCCAGTGGCAAAGCAACTTAAGCTGCAGGCTCCTCCTGCCACCCCGACCGCGAC	-1048
-1047	GCCCTGGGGGCCCTTAGCAGACTGCCAAGCGAGTGTCCCGCCCTGTGCCCTGAATTTA	-988
-987	GCCAAACTCCTTTAATATCAATGGCCCTGGCGGGTGAATTCACGCTGTACCCCGCACTTT	-928
-927	AGGAGCTGAGGCAGGAGGATCGCTTGAGGCCAGCAGTGAATTAGCCGGACATGGTGGC	-868
-867	GCGCGCCTTCTGTGGTCCCAGGTAATCGGGAGGCTGGGGCGAAAGGGTGGCCTGAGCCA	-808
-807	GGGAGATCGAGGCTGCAGTGCAGCGTGTGGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGCGACAGG	-748
-747	GCAAGACCTGCCTCAAAAACAAAACAACTGTAATATCGCTTCAAGAACGTGTGAAGGA	-688
-687	CACTTGGAAAGTTACCAGGCCATTTCTCTCTGGGCGCCCGCGGCCCTAGAACCGCGGCC	-628
-627	TCACCGGCAGACGGCGGCCCTCCTCCAGATGCGCAGGTGACCCCGCGGGCGCGCGGG	-568
-567	AAAGGGAAGAATCCGCGAGGCGCGCGGGGGGAAGCGGGGAGAACCGCTTCTCCTATT	-508
-507	CCACTCGCAGTTCGCTGTGGGGGAAACAGATGCCCGCGCTATGAAACGCTAATCTTCGC	-448
-447	GAAATAAGAGAGAGCGTATAAAAGTTCAAGAATTCTGTCCAGACTCAAGGGCCTTTTCTC	-388
-387	ATTTAGGGGCAACCCTGTCACTACATCATAAACTTTAAATCCGTGATCCCCACGTTACA	-328
-327	AAAGCAGAAGTCCCTTTTAGACTTTAGCGAAAACCTGAACTTTGCCGGTGTCCACACGG	-268
-267	AGGGAGGGAGGACGGGAGGCCACGCCAGGGCTGCGGGGCTGCAGGGCGTGGACGCATCCT	-208
-207	GGCGGGGGCGTCCACTGTCGACGCTCCACATCCCAGGAGGGTGCAGACACCGCGGGAA	-148
-147	GCAGCCTGGAGCCGTGCGCCCACTCCAAGGACCCGCGCACTGTGAGTCACTGACAGCT	-88
-87	TCGCGAATCAACGGTGCACAGAGGAAAAAATCTCTCAITTTGCACTTCTAGCGCCGCACTG	-28
-27	CCGGCGCCAGGGCCCCCAGTAGGGCAAGGGGGGGCGCACAGAGCCAGAGGGGCTTGC	33
34	GAGCGCGGCTGAGGACCGCGGGGAGGGGGCGCCGAGCGGCTCCAGCGCAGAGACTCTC	93
94	ACTGCACGCCGAGGGCCCTTCTCTGCTCGGCCCCGG	131

Рис. 3. Первинна нуклеотидна послідовність промоторної області гену TR людини. Сайти *HindIII* та *SalI* підкреслено та виділено курсивом і підкреслено, відповідно. Нумерація здійснюється відносно сайту ініціації транскрипції (позначеного жирним підкресленим G). Ця послідовність була внесена нами в базу даних GenBank за номером U35634.

цього паралельно було використано два 30-ти нуклеотидних праймери, які входили до складу екзону 1 гену TR. Як матрицю було використано РНК з

ендотеліальних клітин судин людини та з HEL клітин (лімфобласт-подібні еритроїдні клітини). Раніше, за допомогою Нозерн-блоттингу, було показано, що обидві клітинні лінії експресують TR. Як показано на Рис. 4, ідентичний продукт реакції спостерігали при використанні як сумарної РНК, так і мРНК обох клітинних ліній. Було встановлено, що сайт ініціації транскрипції гену TR людини припадає на гуанідин в положенні 351 н.п. від першого АТГ кодону в 5'-сторону. Використання двох нуклеотидних праймерів дало однаковий результат. Визначене положення цього сайту добре узгоджується з канонічним акцепторним сайтом сплайсінгу [Mount S., 1982], що надало нам змогу емпірично встановити 5'-межу першого екзону гену TR людини.

Потрібно також сказати, що в деяких випадках на радіоавтографії спостерігалось декілька менш інтенсивних продуктів реакції нарощування праймера. Це дає нам підставу припустити, що визначений сайт ініціації транскрипції є преобладаючим, але не унікальним.

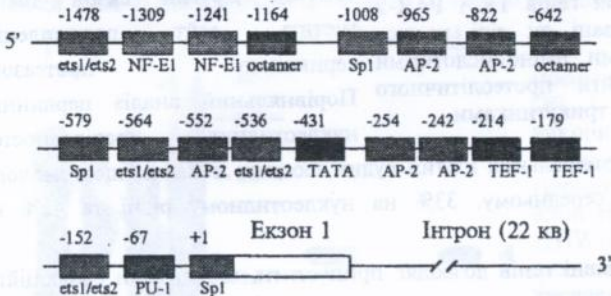


**Рис. 4.** Визначення сайту ініціації транскрипції гену TR людини шляхом реакції нарощування праймера. 1 - сумарна РНК з ендотеліальних клітин судин людини, 2 - сумарна РНК з HEL клітин, 3 - мРНК з HEL клітин. Реакція сіквенування *HindIII* фрагменту клону P1 4250 (містить 5'-промоторну область гену TR) тим же праймером, що був використаний в реакції нарощування праймера, забезпечувала стандарти розміру для продуктів цієї реакції. Сайт ініціації транскрипції позначено стрілками.

В подальшому, клонована 5'-промоторна область гену TR людини була досліджена на наявність потенційних сайтів зв'язування з різноманітними факторами транскрипції. Було показано, що промотор гену TR людини не має ТАТА-бокса або бокса Хогнеса ( $T_{82}A_{97}T_{93}A_{85}A_{63}/T_{37}A_{83}A_{50}/T_{33}$ ) - регуляторної послідовності, яка представлена в 80% еукаріотичних промоторах для РНК-полімерази II і яка звичайно розташована на відстані 19-27 н.п. від сайту ініціації транскрипції. Хоча канонічна послідовність ТАТАААА спостерігається в промоторі гену TR людини в положенні -431 → -425 н.п. (Рис. 5), її значення для ініціації транскрипції неясне, оскільки функціональні ТАТА-бокси на такій відстані від сайту ініціації транскрипції незвичайні для еукаріотів. СААТ-бокс (GGC/TCAATCT) також не був ідентифікований в промоторі гену TR людини в звичайній позиції -70 ± -80 н.п. від точки ініціації транскрипції.

Подальший аналіз нуклеотидної послідовності промоторної області гену TR людини виявив такі потенційні регуляторні елементи (Рис. 5). Було знайдено 3 GGCGG послідовності (або GC-бокси), які є сайтами зв'язування білка -

фактора транскрипції Sp1. Раніше було показано [Ishii S., et al., 1986], що GC-бокс, найближчий до точки ініціації транскрипції, є достатнім для забезпечення повної транскрипційної активності генів, промотори яких не мають ТАТА-боксу. Також було знайдено 5 AP-2 регуляторних елементів, 5 послідовностей, що відповідають сайтам зв'язування факторів транскрипції, які належать до *ets* родини, 2 TEF-1 елементи (transcription enhancer factor-1), 2 сайти зв'язування



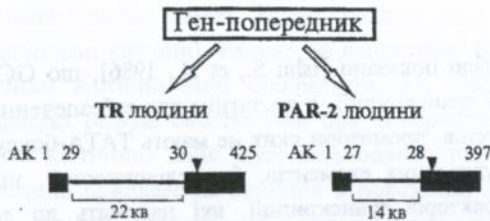
для білка NF-E1 (erythroid nuclear factor protein) та 2 октамірних послідовностей, специфічних для мегакаріоцитів (Рис. 5). Роль цих послідовностей в тканиноспецифічній регуляції експресії гену TR поки що неохарактеризовано.

**Рис. 5.** Схема потенційних регуляторних елементів промоторної області гену TR людини. Цифрами позначено їх положення в нуклеотидних парах відносно сайту ініціації транскрипції (+1).

### Вивчення структури кДНК гену PAR-2 рецептора ендотеліальних клітин судин людини.

Попередньо нами було показано, що PAR-2 функціонально експресується в ендотеліальних клітинах судин людини. За допомогою Нозерн-блоттингу було ідентифіковано транскрипт PAR-2 розміром 3.5 кв, що повністю відповідає даним S. Nystedt. кДНК гену PAR-2 ендотеліальних клітин людини було одержано шляхом скрінювання бібліотеки кДНК з ендотеліальних клітин судин людини, клонованої в бактеріофаг  $\lambda$ gt11. Для скрінінгу використовували зонд, специфічний до 898 н.п. з екзону 2 гену PAR-2 миші [Nystedt S., et al., 1995], одержаний шляхом PCR геномної бібліотеки миші (Clontech, США). Внаслідок скрінінгу було одержано 7 перекриваючихся кДНК клонів з розміром вставки від 2.5 до 3.5 кв у складі  $\lambda$ gt11 вектора. Всі вказані фрагменти було переклоновано в плазмідний вектор pBluescript для подальшого аналізу їх нуклеотидної послідовності. Порівняльний комп'ютерний аналіз нуклеотидних послідовностей показав їх ідентичність з раніше опублікованою послідовністю геномної ДНК PAR-2 людини [Nystedt S., et al., 1994]. Крім того, нами було одержано 1462 н.п. додаткової, ще неопублікованої нуклеотидної послідовності 3'-нетранслюємої області гену PAR-2 людини.

Таким чином, крім однакового механізму активації, TR і PAR-2 рецептори людини мають схожу структуру генів (Рис. 6). Так, кожний з генів складається



**Рис. 6.** Схема структури генів TR і PAR-2 людини. Екзони показані як сірі прямокутники з відповідними амінокислотними залишками (АК). Сайти протеолітичного розщеплення позначені трикутниками.

кДНК TR і PAR-2 ендотеліальних клітин судин людини показав, що гомологія між ними складає, в середньому, 33% на нуклеотидному рівні та 42% на амінокислотному рівні.

Така схожість на рівні генів дозволяє припустити, що ці гени еволюційно походять від єдиного гена - попередника і є лише першими відкритими представниками нової родини рецепторів, які активуються протеазами.

#### Генетичне та фізичне картування генів тромбінового рецептору і PAR-2 людини.

Раніше нашою лабораторією за допомогою FISH-аналізу вперше було локалізовано ген TR людини на 5-й хромосомі, в області 5q13 [Bahou W., et al., 1993]. Ми припускали, що ген PAR-2 повинен знаходитися в цій ж хромосомній області. Для перевірки цього припущення було використано метод соматичних клітинних гібридів. Гібридна ДНК з різних клонів клітин яєчника китайського хом'ячка, які містили фрагменти хромосоми 5 людини, використовувалась для аналізу за Саузерном. Клон ННW105 містив цілу, непорушену хромосому 5 людини, клон ННW213 містив одну хромосому 5, в якій 95% довгого q плеча було ділетовано, та клон ННW2064 містив одну хромосому 5 з ділецією в області 5q11.2 → 5q13.3. Як контроль використовували сумарну геномну ДНК людини. Блот за Саузерном з використанням кДНК TR як зонду (Рис. 7, В) підтвердив наявність одного позитивного фрагменту в геномній ДНК та клоні ННW105. Клоні ННW213 і ННW2064 були негативними, з чого було зроблено висновок, що ген TR локалізується в області 5q13 у вигляді одного локуса. Цей експеримент підтвердив дані FISH аналізу.

Аналогічна картина гібридизації спостерігалась на блоті з цими ж ДНК та з PAR-2 кДНК зондом (Рис. 7, А). Таким чином, було встановлено, що обидва гени - TR та PAR-2 присутні в одній області хромосоми 5 людини, 5q11.2 - 5q13.3.

з двох екзонів, роз'єднаних великим інтроном, і більша частина кодуючої послідовності міститься в більшому другому екзоні, тоді як перший екзон кодує менш як 30 амінокислотних залишків (29 - для TR, 27 - для PAR-2). Другий екзон також містить сайт розщеплення сериною протеазою. Порівняльний аналіз первинних нуклеотидних послідовностей

Для більш точного визначення відстані між генами TR і PAR-2 на хромосомі 5 була використана нова методика картирування генів за допомогою панелей радіаційних гібридів (RH). ДНК з 83 RH клонів панелі G3 були ампліфіковані шляхом PCR з олігонуклеотидними праймерами, специфічними до генів TR та PAR-2 людини. Кожний клон аналізували на наявність або відсутність продукту PCR очікуваного розміру. 10% клонів дали позитивний результат з обома парами праймерів. Клон, які б містили тільки ген TR або тільки PAR-2, ідентифіковані не були. З такого результату витікає, що гени TR і

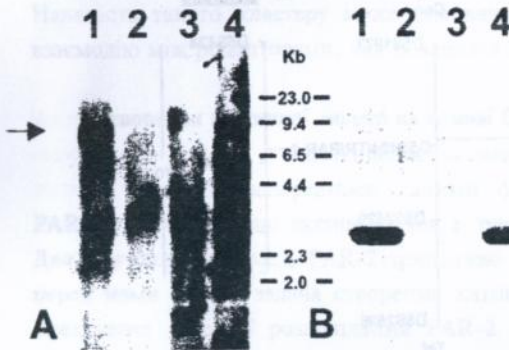


Рис. 7. Встановлення хромосомної локалізації генів TR (B) і PAR-2 (A) людини з використанням соматичних клітинних гібридів та гібридизації за Саузерном. 1 - клон NHW105, 2 - NHW213, 3 - NHW1064, 4 - генерна ДНК людини. Розмір фрагментів в тисячах нуклеотидних пар (кв) вказано між блотами. Позитивні фрагменти позначені стрілками.

PAR-2 розташовані дуже близько один до одного, принаймні в межах розрішальної здатності RH панелі G3 (500 кв), та що ці гени сусіджують з однаковими генетичними маркерами геному.

Дані, одержані з RH сервера Станфордського Центру Геному Людини, показали, що найближчим генетичним маркером є D5S424 маркер D5S424. Більш віддаленими від генів TR і PAR-2 є маркери D5S1977, D5S2529 та D5S2596.

Щоб встановити порядок розташування TR, PAR-2 та D5S424, була використана друга RH панель - TNG3, яка має більш високу розрішальну здатність (100 кв). Було показано, що найбільш імовірний порядок розташування маркерів на хромосомі 5 людини є D5S424(PAR-2/TR) - D5S1977 - D5S2529. Завдяки використанню панелі TNG3, стало можливим розділити маркери TR, PAR-2 та D5S424 й запропонувати їх найбільш імовірне взаємне розташування на хромосомі 5 як D5S424 - PAR-2 - TR (Рис. 8). Використовуючи RH панель TNG3 відстань між генами TR і PAR-2 була оцінена як 110-120 кв.

Для перевірки даних RH картирування було використано методику фізичного картирування генів за допомогою YAC клонів. YAC клони на основі штучних хромосом дріжджів є зручними системами для клонування великих (>1 Мв) фрагментів геномної ДНК. В результаті комп'ютерного пошуку в базі даних Whitehead Institute/MIT Центру Досліджень Геному (США) було встановлено, що найближчий до генів TR і PAR-2 генетичний маркер D5S424 міститься у

комерційно доступних YAC клонах 798D11 та 907F6. Ці клони містили вставки геномної ДНК людини розміром 1420 й 1490 кв відповідно. Шляхом PCR та блотінгу за Саузерном було встановлено, що лише клон 798D11 містив обидва гени - TR та PAR-2. Таким чином, клон 798D11 був зручним для визначення відстані між цими генами на хромосомі 5 людини.

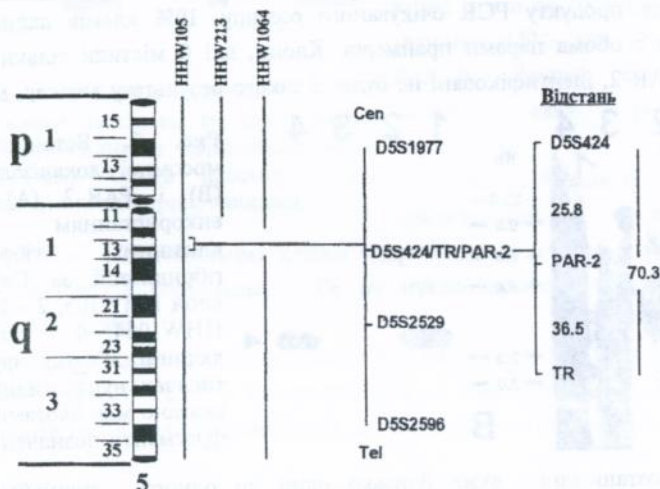


Рис. 8. Схема хромосоми 5 людини з розташуванням та відстанями для генів TR і PAR-2 та найближчих генетичних маркерів за даними соматичних клітинних гібридів (ННВ) та RH панелі TNG3. ННВ гібридні клони зображено вертикальними лініями. Відстані виражені в сентіреях (сР). Для панелі TNG3 1 сР відповідає 3-6 кв.

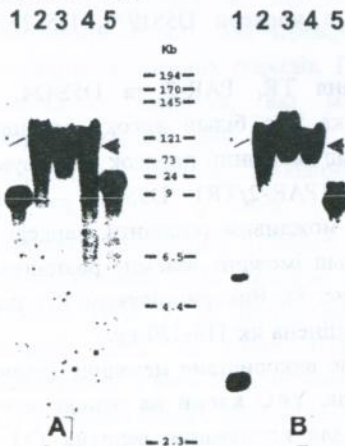


Рис. 9. Гібридизація за Саузерном клону YAC 798D11, використовуючи PAR-2 (А) та TR кДНК (В) як зонди. 1 - *EcoRI*, 2 - *NotI*, 3 - *PvuII*, 4 - *XhoI*, 5 - *XbaI*. Стандарти розмірів ДНК-фрагментів розташовані між блотами.

ДНК YAC клону 798D11 піддавалася розщепленню рестриктазами (в тому числі й рідкорозщеплюючими) з тим, щоб, по можливості, одержати фрагмент мінімального розміру, який містив би обидва досліджуємі гени. Після розділення на гелі шляхом електрофорезу в інвертованому електричному полі фрагменти ДНК аналізували за допомогою блотінгу за Саузерном. На Рис. 9 зображено два блоти-дуплікати, які були згібридизовані з повними кодуючими послідовностями генів TR та PAR-2 людини, відповідно. Видно, що *XhoI* та

*NotI* фрагменти клону 798D11 ( $\approx 90$  кв та  $\approx 120$  кв, відповідно, позначені стрілками) містять в собі кодуючі послідовності обох генів, показуючи таким чином, що відстань на хромосомі між генами TR і PAR-2 складає, щонайбільше, 100 кв. Маючи на увазі встановлений розмір обох генів (TR  $\approx 27$  кв, PAR-2  $\approx 22$  кв) можна вивести, що гени TR і PAR-2 можуть бути розташовані на значно меншому віддаленні один від одного, ніж 100 кв.

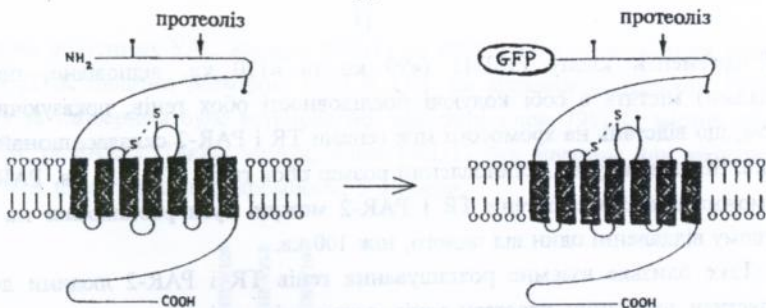
Таке близьке взаємне розташування генів TR і PAR-2 людини дозволяє припустити існування кластеру генів рецепторів, які активуються протеазами. Наявність такого кластеру може зумовлювати функціональну або регуляторну взаємодію між рецепторами, яка розвилася внаслідок еволюції.

### Створення клітинної моделі на основі GFP з *Aequorea victoria* для вивчення потенційних активаторів PAR-2.

За нашими попередніми даними фізіологічною протеазою-активатором PAR-2 є триптаза, що експресується в тучних клітинах [Mirza H., et al., 1997]. Для вивчення активації PAR-2 триптазою та іншими потенційними агоністами перед нами стояла задача створення клітинної моделі, зручної для швидкої та ефективної детекції розщеплення PAR-2. Для вирішення цієї задачі великий інтерес являв собою нещодавно охарактеризований зелений флюоресцентний білок GFP з медузи *Aequorea victoria* [Chalfie M., et al., 1994]. GFP став маркерною молекулою, яка зробила революцію в методах моніторингу експресії генів і локалізації білків *in vivo* та *in situ*. Оскільки для флюоресценції GFP не потребує екзогенних субстратів або кофакторів, експресія GFP може бути використана в системах для детекції експресії генів та транспорту їх продуктів в живих організмах в реальному часі.

Для створення такої моделі у нас виникла ідея клонувати ген GFP з 5'-кінця гену PAR-2 людини без порушення рамок зчитування з тим, щоби в результаті експресувався химерний білок з GFP на N-кінці та PAR-2 на C-кінці (Рис. 10). Таким чином, ми припускали, що оскільки PAR-2 є трансмембранним рецептором, наш химерний білок буде вбудовуватись в клітинну мембрану, при цьому GFP буде спрямований в навколочітинне середовище. При використанні флюоресцентної мікроскопії, на мембранах клітин, які експресують таку GFP/PAR-2 конструкцію, при опроміненні їх ультрафіолетовим світлом буде спостерігатися флюоресценція на довжині хвилі 507 нм, що відповідає зеленій області світла. У випадку активації, тобто розщеплення PAR-2 протеазою в сайті Arg<sup>36</sup>/Ser<sup>37</sup>, 36 N-кінцевих амінокислотних залишків PAR-2 разом з GFP будуть відщеплюватись і, відповідно, флюоресценція на клітинній мембрані буде зникати.

Як джерело гену GFP нами був використаний плазмідний вектор pEGFP-C1. КДНК генів PAR-2 та мутантного (з заміною Arg<sup>36</sup>→Ala<sup>36</sup>) нерозщеплюемого

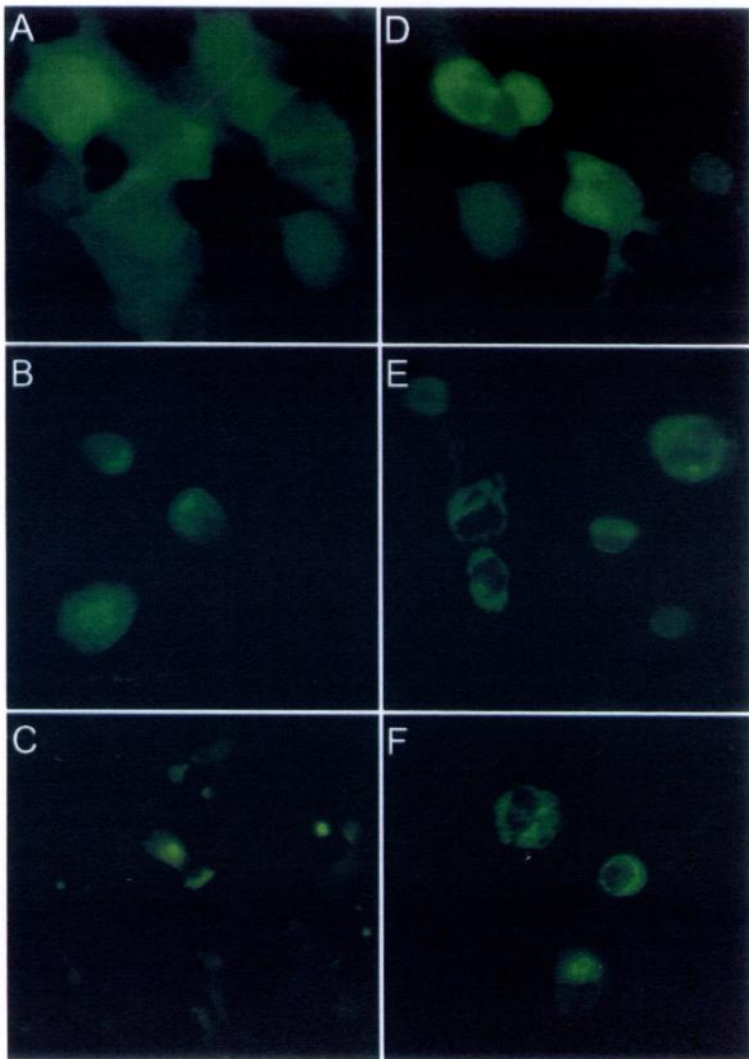


**Рис. 10.** Схема клітинної моделі для вивчення активаторів PAR-2 на основі білка GFP. Трансmemбранні домени PAR-2 позначені прямокутниками. Сайти глікозування позначені шпильками.

PAR-2 людини були клоновані в pEGFP-C1 вектор по *EcoRI* сайту таким чином, що кодуючі послідовності GFP і PAR-2 були в одній рамці зчитування. Обом конструкціями, а також вектором без вставки в якості позитивного контролю було трансфєковано COS-1 клітинну культуру. Було показано, що клітини, трансфєковані кожною з цих конструкцій, експресують GFP, хоча інтенсивність флюоресценції поступалася позитивному контролю (Рис 11, А, В, С). Незважаючи на те, що PAR-2 є трансmemбранним рецептором та клонована у вектор кДНК PAR-2 містить послідовність для сигнального пептиду (перші 25 амінокислотних залишків), який необхідний для транспорту білка і його вбудовування в мембрану, ми не спостерігали флюоресценції на мембрані клітин, трансфєкованих PAR-2/pEGFP-C1 та мутантним PAR-2/pEGFP-C1. Експресований химерний білок GFP/PAR-2 залишався в ядрі та цитоплазмі клітин (Рис. 11, В, С).

Для забезпечення нормального процесінга PAR-2 і його вбудови в мембрану, вирішено було клонувати деякий сигнальний пептид попереду гену GFP і дослідити вбудову такої нової конструкції в клітинну мембрану. Найбільш придатним та доступним кандидатом було визнано природний сигнальний пептид PAR-2 людини. ДНК, що кодує цей пептид, була одержана шляхом PCR з праймерами, специфічними до 1-18 н.п. та 75-58 н.п. кДНК PAR-2 людини, які також містили вбудовані *AgeI* сайти для полегшення клонування. ДНК синтезованого сигнального пептиду була клонована по *AgeI* сайту перед геном GFP в конструкції PAR-2/pEGFP-C1, мутантний PAR-2/pEGFP-C1 та вектор pEGFP-C1 так, щоб рамки зчитування GFP та сигнального пептиду (SP) збігалися.

Клітини COS-1 були трансфєковані конструкціями PAR-2/pEGFP-C1+SP, мутантним PAR-2/pEGFP-C1+SP та pEGFP-C1+SP. За допомогою скануючої конфокальної мікроскопії було показано, що в клітинах, трансфєкованих PAR-2/pEGFP-C1+SP або мутантним PAR-2/pEGFP-C1+SP, через 36-48 годин після трансфєкції спостерігається інтенсивна флюоресценція на мембрані з різким



**Рис. 11.** COS-1 клітини, трансфоровані pEGFP-C1 (A), PAR-2/pEGFP-C1 (B), мутантним PAR-2/pEGFP-C1 (C), pEGFP-C1+SP (D), PAR-2/pEGFP-C1+SP (E) та мутантним PAR-2/pEGFP-C1+SP (F).

зниженням флюоресценції цитоплазми (Рис. 11, Е, F). В той же час в контрольних клітинах флюоресценції на мембрані не спостерігалось (Рис. 11, D). Це може свідчити про те, що клонований сигнальний пептид є функціональним та забезпечує вбудову химерного білка GFP/PAR-2 в клітинну мембрану, що й призводить до виходу GFP на поверхню клітини.

Запропонована клітинна модель може знайти широке застосування для вивчення потенційних активаторів PAR-2 та інших представників родини рецепторів, що активуються протеазами, активний пошук яких триває.

## ВИСНОВКИ

1. Клоновано та охарактеризовано ген тромбінового рецептору людини. Показано, що він складається з двох екзонів, роз'єднаних інтроном довжиною 22 кв; більша частина кодуючої послідовності та сайт розщеплення тромбіном містяться у другому екзоні.

2. Охарактеризовано промотор гену тромбінового рецептора (TR) людини. Промотор цього гену не містить регуляторних TATA- та CAT-боксів, домінуючий сайт ініціації транскрипції знаходиться в положенні -351 н.п. відносно першого ATG кодону.

3. Вивчено структуру кДНК гену PAR-2 ендотеліальних клітин судин людини й встановлено її гомологію зі структурою кДНК гену TR людини.

4. Гени TR та PAR-2 людини локалізовані на хромосомі 5, в області 5q13, відстань між ними складає максимально 100 кв в межах точності використаних методів.

5. TR та PAR-2 є першими охарактеризованими представниками родини рецепторів, які активуються протеазами. Схожа структурна організація генів цих рецепторів та їх близьке розташування на хромосомі дозволяють говорити про наявність кластеру генів таких рецепторів, які виникли, певно, внаслідок дуплікації одного гена-попередника.

6. Запропоновано клітинну модель для вивчення потенційних протеаз-активаторів PAR-2 та інших рецепторів цієї родини з використанням зеленого флюоресцентного білка (GFP) з *Aequorea victoria*.

## ПЕРЕЛІК РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Schmidt V.A., Vitale E., Bahou W.F. Genomic cloning and characterization of the human thrombin receptor gene // Journal of Biological Chemistry.- 1996.- 271(16).- P.9307-9312.

2. Bahou W.F., Schmidt V.A. Molecular characterization of proteolytically activated receptors: insights from the thrombin receptor and proteinase activated receptor-2 (PAR-2) genes // Platelets.- 1996.- 7.- P.253-260.

3. Schmidt V.A., Nierman W.C., Feldblyum T.V., Maglott D.R., Bahou W.F. The human thrombin receptor and proteinase activated receptor-2 genes are tightly

linked on chromosome 5q13 // *British Journal of Haematology*.- 1997.-97.- P.523-529.

4. Schmidt V.A., Demetrick D., Bahou W.F. Genomic cloning and characterization of the human thrombin receptor gene: evidence for a novel gene family that includes PAR-2 // *Abstr. of 37th Annual ASH meeting, Seattle, USA.- 1995.- P.455a.*

5. Schmidt V.A., Nierman W.C., Feldblyum T.V., Maglott D.R., Bahou W.F. The human thrombin receptor and proteinase activated receptor-2 genes are tightly linked on chromosome 5Q13 // *Abstr. of 38th Annual ASH meeting, Orlando, USA.- 1996.- P.519a.*

6. Mirza H., Schmidt V.A., Jesty J., Bahou W.F. Proteinase activated receptor-2-mediated mitogenic response is induced by human mast cell tryptases // *Abstr. of 38th Annual ASH meeting, Orlando, USA.- 1996.- P.466a.*

7. Schmidt V.A., Nierman W.C., Feldblyum T.V., Maglott D.R., Bahou W.F. The tight linkage between human thrombin receptor and proteinase activated receptor-2 genes at 5q13 suggests the presence of a gene cluster of proteolytically activated receptors // *Abstr. of XVIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Florence, Italy.- 1997.- P.604.*

**Шмідт В.О. Вивчення генів рецепторів людини, що активуються протеазами.-** Рукопис. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 - молекулярна біологія.- Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 1997.

Геномне клонування та характеристика генів тромбінового рецептора (TR) і рецептора-2, що активується внаслідок протеолізу, (PAR-2) людини показали, що обидва гени схоже організовані у складі геному та містять два екзони, роз'єднані великим інтроном. В ході аналізу 5'-промоторної області гену TR людини було ідентифіковано ряд потенційних регуляторних елементів. Генетичне та фізичне картирування з використанням панелей радіаційних гібридів (RH) і штучних хромосом дріжджів (YAC) дозволило нам встановити, що гени TR і PAR-2 людини розташовані на хромосомі 5, в області 5q13, на відстані менш як 100 кв один від одного. Ці дані дозволяють припустити, що гени TR і PAR-2 виникли внаслідок дуплікації від одного гена-попередника. Запропонована клітинна модель на основі PAR-2 людини та білка GFP з *Aequorea victoria* може знайти широке застосування для вивчення механізмів активації рецепторів, їх локалізації в клітині та експресії їх генів.

**Ключові слова:** тромбіновий рецептор, PAR-2, промоторна область, фізичне картирування, радіаційні гібриди, YAC, GFP.

**Шмидт В.А. Изучение генов протеолитически активируемых рецепторов человека.**- Рукопись. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 - молекулярная биология, Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 1997.

Геномное клонирование и характеристика генов тромбинового рецептора (TR) и протеолитически активируемого рецептора-2 (PAR-2) человека показали, что оба гена сходно организованы в составе генома и содержат два экзона, разделенные большим интроном. В ходе анализа 5'-промоторной области гена TR человека был идентифицирован ряд потенциальных регуляторных элементов. Генетическое и физическое картирование с использованием панелей радиационных гибридов (RH) и искусственных хромосом дрожжей (YAC) позволило нам установить, что гены TR и PAR-2 человека расположены на хромосоме 5, в области 5q13, на расстоянии менее 100 кв друг от друга. Эти данные позволяют предположить, что гены TR и PAR-2 возникли в результате дупликации от одного гена-предшественника. Предложенная клеточная модель на основе PAR-2 человека и белка GFP из *Aequorea victoria* может найти широкое применение для изучения механизмов активации рецепторов, их локализации в клетке и экспрессии их генов.

**Ключевые слова:** тромбиновый рецептор, PAR-2, промоторная область, физическое картирование, радиационные гибриды, YAC, GFP.

**Schmidt V.A. Study of the human proteolytically activated receptors genes.** - Manuscript. Thesis for a degree of Doctor of Philosophy (Ph.D.) in Biology, specialty 03.00.03 - Molecular Biology.- Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1997.

Genomic cloning and characterization of the human thrombin receptor (TR) and proteolytically activated receptor-2 (PAR-2) genes established that both genes are of limited complexity, are similar organized within the human genome and containing two exons separated by a large intron. Analysis of the 5'-promoter region of the human TR gene revealed potential regulatory elements. Genetic and physical mapping using radiation hybrid (RH) panels and yeast artificial chromosomes (YAC's) allowed us to establish that the human TR and PAR-2 genes are localized on chromosome 5, region 5q13, and are separated by less than 100 kb. These data suggest that TR and PAR-2 genes arose from a gene duplication event from a common ancestral gene. Constructed cell model based on human PAR-2 and GFP from *Aequorea victoria* may be a useful tool for the study of receptors activation mechanism, their localization in the cells and expression of their genes.

**Key words:** thrombin receptor, PAR-2, promoter region, physical mapping, radiation hybrids, YAC, GFP.





---

Підписано до друку 12.11.97р. Формат 60х90/16.  
Ум. друк. арк.1.0, Обл.-вид. арк. 0,8.  
Наклад 100. Зам. 294.

---

Відділ оперативної поліграфії  
Центру Міжнародної освіти  
227-12-75, 227-37-86

12 1599

AB 38.828