



УДК 578.264.3:577.112.6.016

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ФРАГМЕНТА
ОНКОБЕЛКА p21^{ras} С КЛЕТОЧНЫМИ БЕЛКАМИ

Чертов О. Ю., Хожлачев А. В., Дейгин В. И.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Синтезирован фрагмент онкобелка p21^{ras}, соответствующий остаткам 35–44 (-Thr-Glu-Asp-Ser-Tyr-Arg-Lys-Glu-Val-).

Обнаружено, что пептид вызывает преципитацию ряда белков из лизата клеток 3T3 Е1 в детергенте Тритон X-100.

Пептид, меченный [¹²⁵I] реагентом Болтона – Хантера, специфически узнает четыре белка с *M* 27 000, 35 000, 50 000 и 85 000 Да. Замечено, что взаиморасположение заряженных аминокислотных остатков во фрагменте 35–44 p21^{ras} «комплементарно» расположению этих остатков в последовательности, узнаваемой тирозинспецифическими протеинкиназами. (-Arg-X-X-Glu-Asp-X-X-Tyr-) Выдвинуто предположение о том, что онкобелки семейства *ras* непосредственно участвуют в регуляции фосфорилирования белков-мишеней этих протеинкиназ. Предложена модель функционирования онкобелков p21^{ras}, из которой следует, что в этих белках должны быть участки, гомологичные последовательностям, узнаваемым тирозинспецифическими киназами. Такие участки действительно имеются во всех онкобелках p21^{ras} (остатки 88–92 и 104–108).

В последнее время большое внимание уделяется изучению молекулярных механизмов злокачественного перерождения клетки. Наиболее значительным достижением является обнаружение в опухолевых клетках генов (онкогенов), способных вызывать у неопухолевых клеток проявление основных свойств злокачественности. В геноме нормальных клеток были обнаружены близкородственные онкогенам протоонкогены, изменения в структуре или экспрессии которых часто ассоциируются с возникновением опухоли человека и животных [1, 2].

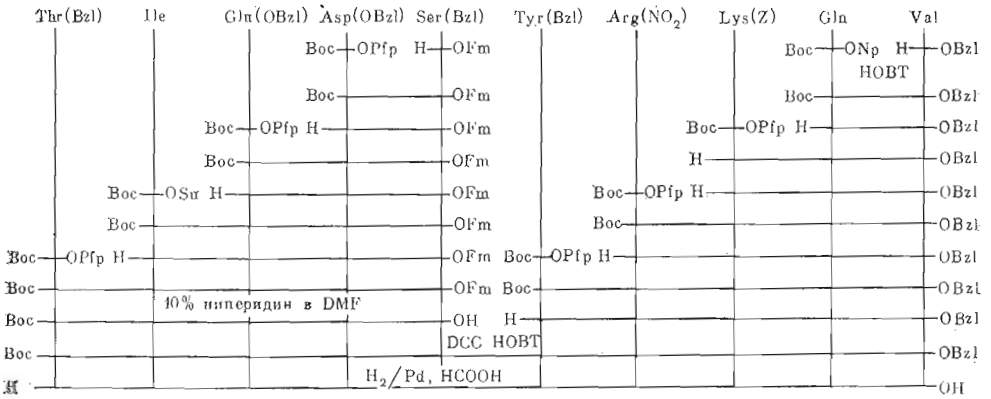
Установлено, что во многих опухолях эпителиального и мезодермального происхождения активированы онкогены семейства *ras* (*Ha-ras*, *Ki-ras* и *N-ras*) [3–8]. Онкогены *ras* кодируют высокомолекулярные белки с молекулярной массой 21 000 Да – p21^{ras} [9, 10, 11]. Показано, что эти белки локализованы на внутренней стороне цитоплазматической мембраны и обладают GTP-азной активностью [12, 13]. Удалось установить, что механизм превращения (активации) протоонкогенов *ras* в трансформирующие онкогены заключается в точечной мутации, результатом которой является замена в соответствующем онкобелке аминокислотного остатка Glu¹² (природа замещающего остатка несущественна) [14, 15].

Позднее было обнаружено, что эти аминокислотные замены, практически не влияя на GTP-связывающую способность этих белков [16], сильно снижают их GTP-азную активность [13].

GTP-азная активность, локализация на внутренней стороне цитоплазматической мембраны, а также существенная гомология онкобелков p21^{ras} с GTP-связывающим белком трансдукцином [17, 18], участвующим в передаче зрительного сигнала от светочувствительного белка родопсина к фосфодиэстеразе, позволяет отнести эти белки к группе регуляторных белков, обладающих GTP-азной активностью [18].

В настоящее время имеются убедительные данные, указывающие на функциональную связь ряда онкобелков с полипептидными ростовыми факторами и их рецепторами. Так, продукт онкогена *erbB* гомологичен рецептору эпидермального фактора роста [19], а продукт гена *fms* – рецептору фактора, стимулирующего образование колоний [20]. Онкобелок p28^{src} гомологичен тромбоцитарному ростовому фактору [21]. Прини-

Схема синтеза пептида 35-44



-OPfp - пентафторфенилокси, -OFm - 9-флюорепилметилокси, -ONp - *n*-нитрофенилокси, NOBT - 1-гидроксibenзотриазол, -OSu - сукцинимидоксн

мая во внимание эти данные, можно предположить, что GTP-связывающие онкобелки p21^{ras} (так же как и соответствующие протоонкобелки) участвуют в передаче митотического сигнала от рецептора ростового фактора к внутриклеточной ферментативной системе.

Установление функции онкобелков p21^{ras}, выявление взаимодействующих с ними клеточных белков представляет собой одну из основных проблем в изучении молекулярных механизмов злокачественной трансформации.

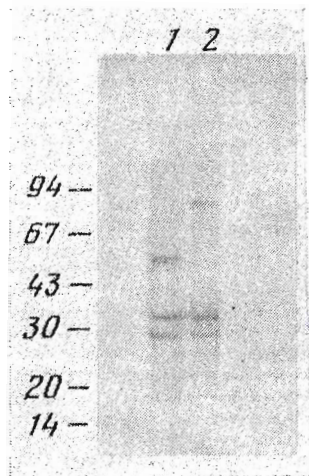
Эффективным подходом к изучению функции белков с установленной первичной структурой может быть использование антител к определенным фрагментам полипептидной цепи, полученным синтетическим путем [22-26]. В качестве фрагмента для получения антител к p21^{ras} мы синтезировали пептид, соответствующий одному из наиболее гидрофильных участков этого белка, - аминокислотной последовательности 35-44 (см. схему). Этот участок идентичен у всех онкобелков p21^{ras} и, возможно, находится вблизи GTP-связывающего центра [27].

Полученные пептидспецифические антитела* не осаждали какие-либо белки из лизата клеток 3Т3 EJ, но неожиданно было обнаружено, что свободный пептид в отсутствие антител вызывает преципитацию каких-то белков из лизата клеток в 1% растворе детергента Тритон X-100. Пептид, преинкубированный со специфическими антителами, преципитации белков не вызывал. Пятичленные фрагменты, соответствующие последовательностям 35-39 и 40-44, ни в отдельности, ни вместе преципитации белков также не вызывали. Следовательно, обнаруженная преципитация вызывается именно десятичленным пептидом. Возможно, что в преципитате наряду с белками, непосредственно взаимодействующими с пептидом, присутствуют и соосаждающиеся белки.

Для выявления белков, специфически взаимодействующих с пептидом, мы подвергли преципитировавшие белки, а также белки нефракционированного лизата электрофорезу в полиакриламидном геле в присутствии SDS. Затем белки с пластины геля электрофоретически перенесли на нитроцеллюлозную мембрану. После подавления неспецифической сорбции мембраны альбумином ее инкубировали в растворе пептида, меченного радиоактивным реагентом Болтона - Хантера, и подвергли радиоавтографии. Из рис. 1 видно, что в случае нефракционированного лизата пептид связался с белками молекулярной массы 27 000, 35 000 и 50 000 Да, а в случае белков преципитата - с белками 27 000, 35 000 и 85 000. Мы предполагаем, что взаимодействие пептида с этими белками не случайно, а отражает функциональную связь самого белка p21^{ras} с данными

* Данные по получению антител и их характеристике будут опубликованы отдельно.

Рис. 1. Результат блоттинга радиоактивно меченым пептидом (см. «Экспериментальную часть») белков лизата (1) и белков, преципитированных из лизата под действием пептида (2). Слева отмечено положение и молекулярные массы стандартных белков (кДа)



белками. Хотя о природе и функции выявленных таким образом белков мы ничего не знаем, можно высказать некоторые предположения.

Известно, что значительная часть онкобелков — продукты генов *src*, *fps*, *fms*, *fgr*, *abl*, *yes* — обладают тирозинспецифичной протеинкиназной активностью [1, 2], по-видимому, необходимой для их трансформирующей способности. Эти онкобелки гомологичны рецептору эпидермального фактора роста, цитоплазматическая часть которого также обладает протеинкиназной активностью. Сравнение участков аутофосфорилирования онкобелков-протеинкиназ (таблица) указывает на то, что взаиморасположение заряженных остатков (Arg, Glu, Asp), а также модифицируемого остатка тирозина более консервативно, чем природа других остатков. В этой связи нам представляется заслуживающей интереса «комплементарность» расположения заряженных аминокислотных остатков в последовательностях, узнаваемых протеинкиназами, и в последовательности 35—44 онкобелков $p21^{ras}$ (таблица). Благодаря этой «комплементарности» между соответствующими участками фосфорилируемых белков и участком 35—44 онкобелков $p21^{ras}$ возможно сильное взаимодействие. Далее, логично предположить, что онкобелки $p21^{ras}$ непосредственно участвуют в регуляции фосфорилирования белков-мишеней протеинкиназ, связываясь с ними или выходя из комплекса, в зависимости от того, в каком состоянии находится $p21^{ras}$: инактивированном или активированном.

Наши предположения о функционировании белков $p21^{ras}$ суммированы в виде модели, приведенной на рис. 2. Данная модель подразумевает два направления передачи митогенного сигнала онкобелком $p21^{ras}$: мемб-

Аминокислотная последовательность участков аутофосфорилирования онкобелков — тирозинспецифических протеинкиназ и «комплементарного» участка $p21^{ras}$

Онкоген	Аминокислотная последовательность продукта	Ссылка
<i>src</i>	407 416 -Leu-Ala-Arg-Leu-Ile-Glu-Asp-Asn-Glu-Tyr-	[28]
	544 553 -Leu-Ala-Arg-Leu-Ile-Glu-Asp-Asn-Glu-Tyr-	
<i>fgr</i>	756 765 -Met-Ser-Arg-Gln-Glu-Glu-Asp-Gly-Val-Tyr-	[29]
<i>fps</i>	691 700 -Leu-Ala-Arg-Leu-Ile-Glu-Asp-Asn-Glu-Tyr-	[30]
<i>yes</i>	35 44 -Thr-Ile-Glu-Asp-Ser-Tyr-Arg-Lys-Gln-Val-	[31]
<i>ras</i>		[8, 10]

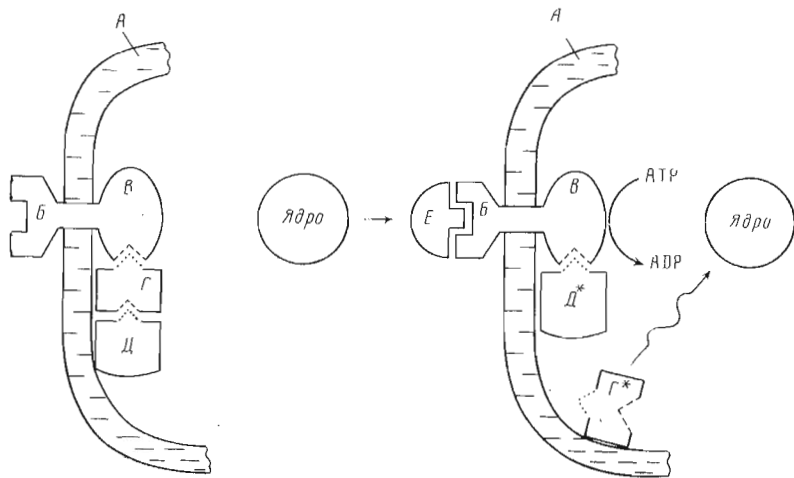


Рис. 2. Модель функционирования онкобелка $p21^{ras}$. А — цитоплазматическая мембрана. Б-В — рецептор фактора роста, где В — цитоплазматическая протеинкиназная часть рецептора. Г — белок $p21^{ras}$, связанный с GTP, Г* — белок $p21^{ras}$, связанный с GTP, Д — белок-мишень протеинкиназы, Д* — белок, фосфорилированный по остатку тирозина, Е — фактор роста. Изогнутой стрелкой показана активация белком $p21^{ras}$ неизвестной ферментной системы; пунктиром обозначен участок, узнаваемый протеинкиназами и содержащий в случае белка-мишени протеинкиназ остаток тирозина; штриховой линией — «комплементарный» ему участок

ранное (регуляция фосфорилирования мембранных белков и соответственно изменение их свойств) и ядерное (активация неизвестной ферментативной системы). Из модели также следует, что в белке $p21^{ras}$ должен существовать участок, взаимодействующий с протеинкиназной частью рецептора и гомологичный последовательности, узнаваемой этой протеинкиназой (-Arg-X-X-Glu-Asp-). Действительно, во всех онкобелках $p21^{ras}$

есть сходные аминокислотные последовательности: $\text{-Lys-Ser-Phe-Glu-Asp-}$ ^{88 92} и $\text{-Lys-Asp-Ser-Glu-Asp-}$ ^{104 108} в $p21^{Ki-ras}$ [3]; $\text{-Lys-Ser-Phe-Glu-Asp-}$ ^{88 92} и $\text{-Lys-Asp-Ser-Asp-Asp-}$ ¹⁰⁸ в $p21^{Ha-ras}$ [11]; $\text{-Lys-Ser-Phe-Ala-Asp-}$ ^{88 92} и $\text{Lys-Asp-Ser-Asp-Asp-}$ ¹⁰⁴ в $p21^{N-ras}$ [9]. Это можно рассматривать как подтверждение правомерности наших рассуждений.

Экспериментальная часть

В работе использовали детергент Тритон X-100 (Fluka, Швейцария), SDS (Bio-Rad, США), сефадекс G-15 и полиакриламидные пластинки для электрофореза PAA 4/30 (Pharmacia, Швеция), трис и EDTA (Serva; ФРГ), фенолметилсульфонилфторид (Calbiochem, США), [¹²⁵I]реагент (2000 Ки/ммоль) Болтона — Хантера (Amersham, Великобритания), среду DMEM для культивирования клеток, сыворотку новорожденного теленка и Нерес (Gibco, Великобритания), нитроцеллюлозную мембрану BA-85 (Schleicher-Schüll, ФРГ), а также бычий сывороточный альбумин (фракция V) (Sigma, США).

Синтез декапептида *N*-Thr-Ile-Glu-Asp-Ser-Tyr-Arg-Lys-Gln-Val-OH (I) осуществили классическим методом в растворе с использованием стратегии максимального блокирования остатков трифункциональных аминокислот группировками бензильного типа (схема). Последовательность 35—44 разбили на два пентапептидных фрагмента, которые синтезировали ступенчатым наращиванием цепи, преимущественно с использованием пентафторфениловых эфиров. Для защиты карбоксильной группы серина применили флуоренилметильную группу [32], которую удалили 10% раствором пиперидина в DMF. Конденсацию фрагментов провели DCC/НОВТ-методом и полученный защищенный декапептид гидрировали в муравьиной кислоте над палладиевой чернью. В этих условиях одно-

временно удалялись все защитные группы, включая и N-концевую Вос-группу. После гидрирования пептид растворяли в смеси *n*-бутанол — H₂O, водный слой отделяли и очищали на колонке с силсорбсом C₁₈ в режиме обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (0,05% трифторуксусная кислота, градиент ацетонитрила от 10 до 50%) с помощью жидкостного хроматографа Altex, модель 334 (США). Основной пик соответствовал декапептиду.

Аминокислотный анализ пептида после гидролиза в 5,7 н. HCl (110° С, 24 ч) дал следующие результаты: Asp 1,04, Thr 1,00, Ser 0,92, Glu 2,14, Val 1,06, Ile 0,99, Tyr 0,91, Lys 1,27, Arg 1,06.

Введение метки в пептид с помощью [¹²⁵I] реагента Болтона — Хантера. 30 мкл (0,15 мкКи) раствора реактива Болтона — Хантера в бензоле упарили на роторном испарителе. Затем в пробирку внесли 25 мкл (12,5 мкг) раствора пептида в 0,1 М боратном буфере, pH 8,5. После 15 мин инкубации на ледяной бане в пробирку добавили 170 мкл 0,65 М раствора глицина в 0,1 М боратном буфере, pH 8,5, для связывания непрореагировавшего реагента. После 5 мин инкубации смесь наносили на колонку объемом 0,8 мл с сефадексом G-15, уравновешенным буфером Б (см. далее). Радиоактивность полученных фракций (0,3 мл) определяли с помощью γ-счетчика. Первый пик, содержащий радиоактивность, использовали для блоттинга.

Культивирование клеток и их лизис. Клетки 3Т3 EJ, представляющие собой мышиные фибробласты N1H 3Т3, трансформированные человеческим онкогеном EJ, были предоставлены Е. М. Луканидиным (ИМБ АН СССР). Клетки культивировали на среде DMEM, содержащей 10% сыворотки новорожденного теленка в 10 мМ Перес, pH 7,4, в атмосфере 5% CO₂ при 37° С. Клетки рассаживали каждые 3—5 сут. 2·10⁶ клеток инкубировали 15 мин при 4° С в 3 мл буфера, содержащего 0,05 М трис-HCl (pH 7,4), 0,125 М NaCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 1% Тритон X-100, 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид, 4,5 мг/л пепстатина (буфер А). Затем суспензию гомогенизировали трехкратным пропусканием через иглу шприца и подвергали центрифугированию (18 000 об/мин, 25 мин, ротор GA-21). Образец белков (не содержащий солей) для электрофоретического анализа получали осаждением 200—250 мкл лизата (80~100 мкг белка) пятью объемами охлажденного ацетона.

Преципитация белков пептидом. К лизату клеток добавляли раствор пептида в буфере А до конечной концентрации 0,1 мг/мл. Пробирки с лизатом оставляли на 40—60 мин при 5° С. Затем осадок собирали центрифугированием (20 мин, 4000 g). Аналогично осуществляли процесс преципитации белков пептидом 35—44, преинкубированным с антителами, и пептидами 35—39 и 40—44.

Образцы белков растворяли в 20—30 мкл раствора, содержащего 5 мМ фосфат натрия (pH 7,0) 1% SDS, 5% β-меркаптоэтанол. В одну лунку наносили 8—10 мкл полученного раствора. Электрофорез проводили на градиентных (4—30%) полиакриламидных пластинах в буферном растворе, содержащем 55 мМ NaH₂PO₄, 25 мМ NaOH и 0,1% SDS, при напряжении 80—100 В в течение 3 ч в приборе для электрофореза GE-4 (Pharmacia, Швеция).

После электрофореза белки с пластины полиакриламидного геля электрофоретически переносили на нитроцеллюлозную мембрану BA-85 в приборе для обесцвечивания гелей GD-4 (Pharmacia, Швеция), у которого один из анодов был отключен. Электроперенос осуществляли в буфере, содержащем 20 мМ NaH₂PO₄, оттитрованном NaOH до pH 8,0 (3 ч, 400 мА, 7—8 В/см). Затем для подавления неспецифической сорбции нитроцеллюлозную мембрану инкубировали 1 ч при 40° С в растворе, содержащем 0,02 М трис-HCl (pH 7,4), 0,125 М NaCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 0,05% Тритон X-100, 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид (буфер Б) и 5% бычьего сывороточного альбумина. Далее мембрану инкубировали 1,5 ч в 10 мл буфера Б, содержащего 100 мкг пептида, меченого [¹²⁵I]реагентом Болтона — Хантера. После этого мембрану промывали буфером Б дважды по 10 мин (200 мл) и один раз 5 мин (100 мл).

После просушивания мембраны на воздухе она подвергалась авторадиографии.

Авторы признательны акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание и помощь при выполнении этой работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Weinberg R. A.* Trends in Biochem. Sci., 1984, v. 8, № 100, p. 272-275.
2. *Bishop J. M.* Cell, 1985, v. 42, № 1, p. 23-38.
3. *Capon D., Seeburg P., McGrath J., Hayfick J., Edman V., Levinson A., Goeddel D.* Nature, 1983, v. 304, № 5926, p. 507-513.
4. *Hall A., Marshall C., Spurr N., Weiss R.* Nature, 1983, v. 303, № 5916, p. 396-399.
5. *Brown R., Marshall C., Pennie C., Hall A.* EMBO J., 1984, v. 3, № 6, p. 1321-1326.
6. *Fujita J., Yoshida O., Yasia Y., Rhim J., Hatanaka M., Aaronson S.* Nature, 1984, v. 309, № 5967, p. 464-466.
7. *Balmain A.* Brit. J. Cancer, 1985, v. 51, p. 1-7.
8. *Yasia Y., Srivastava K., Dunn C., Rhim J., Reddy E., Aaronson S.* Nature, 1983, v. 303, № 5920, p. 775-778.
9. *Taparowsky E., Shimizu K., Goldfarb M., Wigler M.* Cell, 1983, v. 34, № 2, p. 581-586.
10. *Dhar R., Ellis R., Shih T., Oroszlan S., Shapiro B., Maizel J., Lowy D., Scolnick E.* Science, 1982, v. 217, № 4563, p. 46-49.
11. *Tsuguda N., Ryder T., Ohtsubo E.* Science, 1982, v. 217, № 4563, p. 49-50.
12. *Papageorge A., Lowy D., Scolnick E. J.* Virol., 1982, v. 44, № 2, p. 509-518.
13. *McGrath J., Capon D., Goeddel D., Levinson A.* Nature, 1984, v. 310, № 5978, p. 644-648.
14. *Tabin C., Bradley S., Bargmann C., Weinberg R., Papageorge A., Scolnick E., Dhar R., Lowy D., Chang E.* Nature, 1982, v. 300, № 5887, p. 143-149.
15. *Reddy E., Reynolds E., Santos E., Barbacid M.* Nature, 1982, v. 300, № 5887, p. 149-152.
16. *Finkel T., Der C., Cooper J. M.* Cell, 1984, v. 37, № 1, p. 151-158.
17. *Tanabe T., Nukada T., Nishikawa Y., Sugimoto K., Suzuki H., Takahashi H., Noda M., Haga T., Ichiyama A., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H., Numa S.* Nature, 1985, v. 315, № 6016, p. 242-245.
18. *Gilman A. G.* Cell, 1984, v. 36, № 3, p. 577-580.
19. *Downward J., Yarden Y., Mayes E., Scrace G., Totty N., Stockwell P., Ullrich A., Schlessinger J., Waterfield M.* Nature, 1984, v. 307, № 5985, p. 521-530.
20. *Newmark P.* Nature, 1985, v. 316, № 6036, p. 681.
21. *Waterfield M., Scrace G., Whittle N., Stroobant P., Johnsson A., Wasteson A., Westermark B., Heldin C.-H., Jung San Huang, Deuel T.* Nature, 1983, v. 304, № 5923, p. 35-39.
22. *Sen S., Houghten R., Sherr C., Sen A.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, № 5, p. 1246-1250.
23. *Bowle W., Lipsick J., Reddy E., Baluda M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, № 10, p. 2834-2838.
24. *Gallick G., Brown D., Murphy E., Arlinghaus R.* In: Modern approaches to vaccines/Eds Chanock R., Lerner R. N. A.: Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, 1984, p. 407-415.
25. *Shaffhausen B., Benjamin T., Pike L., Casnellie J., Krebs E. J.* Biol. Chem., 1982, v. 257, № 21, p. 12467-12470.
26. *Tamura T., Bauer H., Berr C., Pipkin R.* Cell, 1983, v. 34, № 2, p. 587-596.
27. *Wierenga R., Hol W.* Nature, 1983, v. 302, № 5911, p. 842-844.
28. *Schwartz D., Tizard R., Gilbert W.* Cell, 1983, v. 32, № 3, p. 853-869.
29. *Naharro G., Robbins R., Reddy E.* Science, 1984, v. 223, № 4631, p. 63-66.
30. *Opperman H., Lewinson A., Levintow L., Varmus H., Bishop J. M.* Virology, 1981, v. 113, № 2, p. 736-751.
31. *Kitamura N., Kitamura A., Toyoshima K., Hiragama Y., Yosida M.* Nature, 1982, v. 297, № 5863, p. 205-208.
32. *Bednarek M., Bodanszky M.* Int. J. Peptide and Protein Res., 1983, v. 21, № 2, p. 196-201.

Поступила в редакцию
12.II.1986
После доработки
26.III.1986

INTERACTION OF A SYNTHETIC FRAGMENT OF p21^{ras}
WITH CELLULAR PROTEINS

CHERTOV O. Yu., KHOKHLACHEV A. V., DEIGIN V. I.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

A decapeptide corresponding to residues 35-44(-Thr-Ile-Glu-Asp-Ser-Tyr-Arg-Lys-Gln-Val-) of p21^{ras} was synthesized. It was found that peptide causes precipitation of some proteins from the Triton X-100 lysate of NIH 3T3 EJ cells. SDS-PAGE demonstrated the presence of many proteins in this precipitate. The peptide labeled with [¹²⁵I]Bolton-Hunter reagent specifically recognized four proteins of M.W. 27, 35, 50 and 85 kDa.

The order of charged amino acid residues in the fragment 35-44 of p21^{ras} is «complementary» to that of the substrate sequence of tyrosine-specific protein kinases (-Arg-X-X-Glu-Asp-X-X-Tyr-). It is suggested that p21^{ras} proteins directly regulate phosphorylation of the target proteins of these kinases. A model for functioning of p21^{ras} proteins predicts the presence in their structure of certain sites homologous to sequences recognizable by tyrosine-specific kinases. Indeed two such sites are present in the sequences of all p21^{ras} proteins, namely the residues 88-92 and 104-108.