



УДК 577.112.5

© 1993 В. М. Липкин *, Л. А. Красовская,
А. В. Муранов, А. Н. Пронин *, И. П. Удовиченко,
А. А. Юровская, В. Е. Заграничный

ЛОКАЛИЗАЦИЯ В G_s -БЕЛКЕ УЧАСТКОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С АДЕНИЛАТЦИКЛАЗОЙ С ПОМОЩЬЮ КОНСТРУИРОВАНИЯ G_s/G_0 -ХИМЕРНЫХ ФОРМ

Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, г. Пущино Московской обл.;

* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Ключевые слова: G-белок, аденилатциклаза, химерные белки.

кДНК, кодирующие три типа α -субъединиц GTP-связывающих белков G_s и G_0 (короткой формы α_s с Asp-Ser в положениях 71—72, длинной формы α_s с вставкой 16 аминокислотных остатков вместо Asp-Ser (71—72), обеих из мозга быка, и α_0 из мозжечка быка), а также ряд их химерных форм, полученных методами генной инженерии, клонированы в плазмидный вектор на основе pGEM-2 под контроль промотора фага SP6. Исследован ряд функциональных свойств α -субъединиц, полученных в результате транскрипции и трансляции этих кДНК *in vitro*: активация аденилатциклазы, ADP-рибозилирование коклюшным токсином, ограниченный нуклеотидзависимый трипсинолиз. Картированы участки полипептидной цепи α_s , необходимые для активации аденилатциклазы. Взаимодействующий с эффектором домен α_s включает фрагменты полипептидной цепи 235—294 и 337—356 (координаты по длинной форме α_s).

GTP-связывающие белки (G-белки) играют ключевую роль в трансмембранной передаче биологических сигналов от рецепторов на цитоплазматической мембране к эффекторным белкам [1—3]. Специфичность поведения G-белков в основном определяется их α -субъединицами в составе гетеротримера $\alpha\beta\gamma$. Известно несколько различных типов α -субъединиц: α_s [4], α_0 [5], как минимум три α_i [6] и ряд других [3]. Все эти α -субъединицы проявляют высокую степень гомологии аминокислотной последовательности как между собой, так и с другими GTP-связывающими белками (такими, как продукт протоонкогена *p21ras* и фактор элонгации трансляции EF-Tu [7]), связывают гуаниловые нуклеотиды, взаимодействуют с комплексами своих $\beta\gamma$ -субъединиц, гидролизуют GTP, взаимодействуют с рецепторами и эффекторными белками и т. д. Несмотря на многочисленные исследования [8—14], детальная функциональная топография полипептидных цепей α -субъединиц G-белков в настоящее время далека от окончательного выяснения. Для изучения вопроса о том, какая часть полипептидной цепи α -субъединицы G-белка важна для взаимодействия

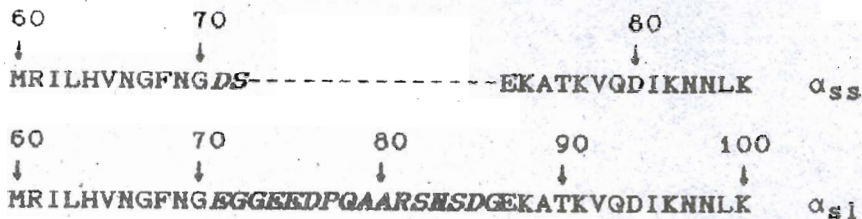


Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей длинной (α_{sl}) и короткой (α_{ss}) сплайсинговых форм α -субъединицы белка G_s из мозга быка [4]

с другим компонентом системы передачи биологического сигнала, перспективным представляется конструирование химерных белков. Этот подход был успешно реализован в ряде недавно опубликованных работ [11, 12, 15—18]. В данной работе описано конструирование α_s/α_0 -химерных генов, экспрессия *in vitro* и исследование функциональных свойств α_s , α_0 и их химерных форм.

Клонирование и мутагенез

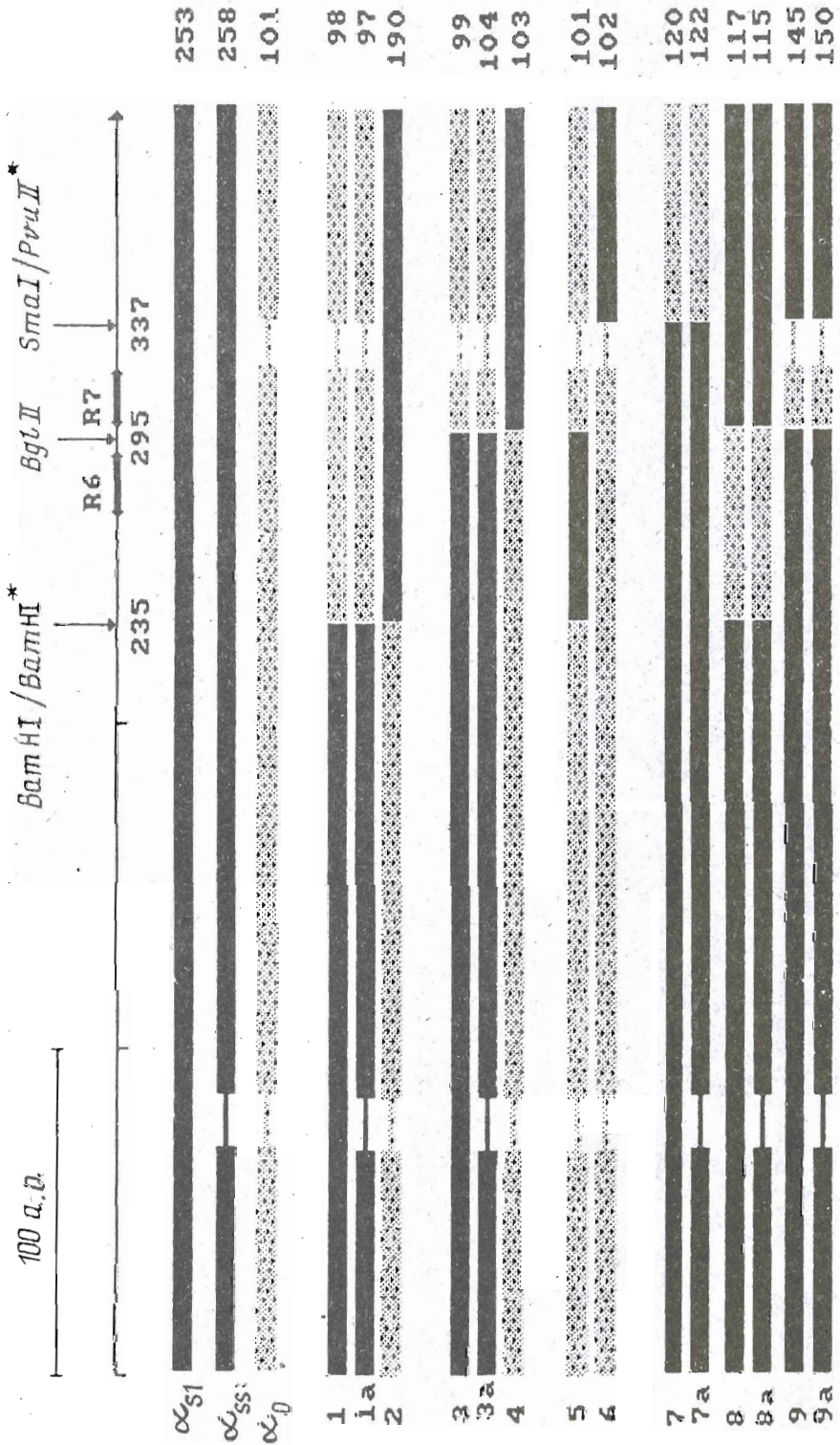
кДНК субъединиц α_s и α_0 выделены из клонотек кДНК из мозга и мозжечка быка соответственно. кДНК короткой (α_{ss}) и длинной (α_{sl}) форм субъединицы α_s (являющиеся результатом альтернативного сплайсинга одной пре-мРНК [4], рис. 1), как и кДНК α_0 [5], были клонированы в плазмидный вектор *pG2S6-I* под контроль промотора фага SP6 с синтетическим рибосомсвязывающим участком [19]. Дополнительные сайты эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Pvu*II вводились в открытую рамку считывания гена α_0 методом олигонуклеотиднаправленного мутагенеза. Введение сайта *Bam*HI в ген α_0 не привело к заменам аминокислотных остатков; в случае введения сайта *Pvu*II произошли замены остатков Glu-298 и Asp-299 на Ala (рис. 2). Последующий анализ функциональной активности продукта этого мутантного гена α_0 не выявил каких-либо отличий от α_0 дикого типа (данные не приведены). кДНК химерных α -субъединиц получали путем взаимной перестановки гомологичных рестриктных фрагментов, как указано в таблице. Схематические масштабные изображения полипептидов, кодируемых генами α_{ss} , α_{sl} , α_0 , а также сконструированными химерными кДНК, приведены на рис. 3, частичные аминокислотные последовательности некоторых химерных α -субъединиц — на рис. 2.

Трансляция *in vitro*

На основе описанных выше плазмидных ДНК синтезировали мРНК с помощью РНК-полимеразы фага SP6. Полученную мРНК транслировали *in vitro* в лизате из ретикулоцитов кролика (LR) и экстракте из зародышей пшеницы (WGE) с добавлением ^{14}C -меченых аминокислот. Оптимальная концентрация мРНК составила 200 мкг на 1 мл трансляционной смеси. Определявшийся по включению радиоактивного предшественника выход продуктов трансляции *in vitro* сильно различался в использовавшихся системах и составил 2—3 мкг на 1 мл LR и 20—30 мкг на 1 мл WGE. По данным гель-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (SDS), в случае трансляции в LR (рис. 4) практически весь синтезированный *de novo* белок был представлен гомогенной полосой с электрофоретической подвижностью, соответствовавшей ожидаемой. В то же время в результате трансляции в WGE образовывалось большое количество продуктов с меньшей, чем ожидалось, молекулярной массой (рис. 4), что могло быть результатом как преждевре-

290	↓	300	↓	310	↓	320	↓	330	↓	340					
RWLR	TISV	ILFL	NKQD	LLAE	KVLAG	SKIED	YFPE	FARYTT	PE	DATPE	RGEDPR	VTRAK	YFIR	DEF	α_{s1}
															Петля R7
260	↓	270	↓	280	↓	290	↓	300	↓						
KFF	IDTS	ILFL	NKQD	LLAE	KVLAG	SKIED	YFPE	FARYTT	PE	DATPE	RGEDPR	VTRAK	YFIR	DEF	α_0
															**
KFF	IDTS	ILFL	NKQD	LLAE	KVLAG	SKIED	YFPE	FARYTT	PE	DATPE	RGEDPR	VTRAK	YFIR	DEF	α_0 /PvuII
260	↓	270	↓	280	↓	290	↓	300	↓						
KFF	IDTS	ILFL	NKQD	LLAE	KVLAG	SKIED	YFPE	FARYTT	PE	DATPE	RGEDPR	VTRAK	YFIR	DEF	Химера 6
															**
290	↓	300	↓	310	↓	320	↓	330	↓	340					
RWLR	TISV	ILFL	NKQD	LLAE	KVLAG	SKIED	YFPE	FARYTT	PE	DATPE	RGEDPR	VTRAK	YFIR	DEF	Химера 7
															*
290	↓	300	↓	310	↓	320	↓	330	↓	330					
RWLR	TISV	ILFL	NKQD	LLAE	KVLAG	SKIED	YFPE	FARYTT	PE	DATPE	RGEDPR	VTRAK	YFIR	DEF	Химера 9
															**

Рис. 2. Аминокислотные последовательности субъединиц α_3 , α_0 и их химер 6, 7 и 9 в области 280—345 α_{s1} . Последовательности, соответствующие α_0 , напечатаны жирным наклонным шрифтом. Звездочками отмечены аминокислотные остатки, появившиеся в результате направленного мутагенеза или конструирования химер



Структурный состав белков α_{sl} , α_{ss} , α_0 и их химерных форм

Белок	Сайт рестрикции, по которому получена химера			Номера АК-остатков в химере, полученные из			Размер химеры, а.о.
	α_{sl}	α_{ss}	α_0	α_{sl}	α_{ss}	α_0	
α_{sl}	—	—	—	1—394	—	—	394
α_{ss}	—	—	—	—	1—380	—	380
α_0	—	—	—	—	—	1—354	354
1	<i>Bam</i> HI	—	<i>Bam</i> HI *	1—234	—	213—354	376
1a	—	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI *	—	1—220	213—354	362
2	<i>Bam</i> HI	—	<i>Bam</i> HI *	235—394	—	1—212	372
3	<i>Bgl</i> II	—	<i>Bgl</i> II	1—294	—	273—354	376
3a	—	<i>Bgl</i> II	<i>Bgl</i> II	—	1—280	273—354	362
4	<i>Bgl</i> II	—	<i>Bgl</i> II	295—394	—	1—272	372
5	<i>Bam</i> HI <i>Bgl</i> II	—	<i>Bam</i> HI * <i>Bgl</i> II	235—294	—	1—212 273—354	354
6	<i>Sma</i> I	—	<i>Pvu</i> II *	337—394	—	1—298	357
7	<i>Sma</i> I	—	<i>Pvu</i> II *	1—335	—	300—354	391
7a	—	<i>Sma</i> I	<i>Pvu</i> II *	—	1—321	300—354	377
8	<i>Bam</i> HI <i>Bgl</i> II	—	<i>Bam</i> HI * <i>Bgl</i> II	1—234 295—394	—	213—272	394
8a	<i>Bgl</i> II	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI * <i>Bgl</i> II	295—394	1—220	213—272	380
9	<i>Bgl</i> II <i>Sma</i> I	—	<i>Bgl</i> II <i>Pvu</i> II *	1—294 337—394	—	273—298	379
9a	<i>Sma</i> I	<i>Bgl</i> II	<i>Bgl</i> II <i>Pvu</i> II *	337—394	1—280	273—298	365

* Сайты эндонуклеаз рестрикции, введенные в ген α_0 методом олигонуклеотиднаправленного мутагенеза.

менной терминации трансляции, так и ее инициации с внутренних кодонов метионина. Таким образом, трансляция α -субъединиц G-белков *in vitro* в WGE гораздо менее специфична, чем в LR. Эффективность трансляции мРНК химерных α -субъединиц была аналогична таковой в случае α_{ss} , α_{sl} и α_0 (данные не приведены).

Рис. 3. Схематическое масштабное изображение субъединиц α_{sl} , α_{ss} , α_0 и сконструированных на их основе химерных α -субъединиц G-белков и данные об активации ими аденилатциклазы. Гомологичные участки выровнены друг относительно друга. Тонкими линиями обозначены пропуски в структуре. Координаты соответствуют аминокислотной последовательности α_{sl} . Области, предположительно формирующие петли R6 и R7 [7], обозначены на координатной линейке. Сайты эндонуклеаз рестрикции в кодирующей последовательности кДНК, использовавшиеся для конструирования химер, обозначены над координатной линейкой (звездочкой отмечены сайты, введенные в кДНК α_0 методом олигонуклеотиднаправленного мутагенеза, см. таблицу). Цифры справа соответствуют уровню активации аденилатциклазы (%). За 100% активации принят базальный уровень активности аденилатциклазы в контрольном эксперименте, составивший 620 пмоль сАМР/(мг белка · мин)

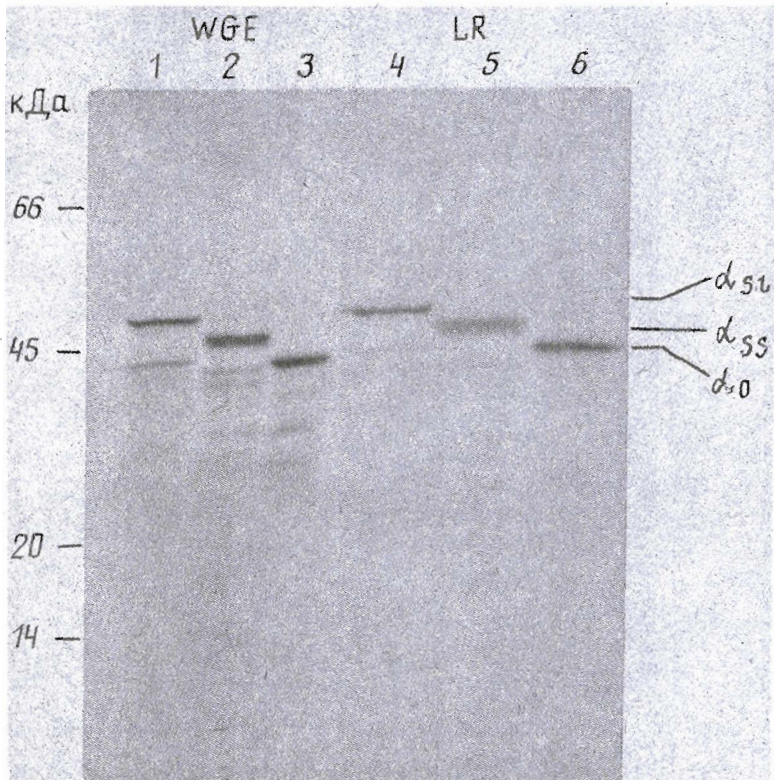


Рис. 4. Авторадиограмма полиакриламидного геля после электрофоретического разделения в присутствии SDS ^{14}C -меченых продуктов трансляции *in vitro* мРНК α -субъединиц G-белков. α_{si} (1,4), α_{ss} (2,5) и α_0 (3,6) в WGE и LR

Определение влияния на аденилатциклазу транслированных *in vitro* субъединицы α_s и химерных α -субъединиц

Препарат свободной от эндогенного белка G_s аденилатциклазы из мозга быка с базальной активностью фермента 620 пмоль сАМР/(мг белка · мин) активировался при добавлении G_s . Зависимость активности аденилатциклазы от количества добавленного G_s имела вид типичной кривой насыщения с выходом на плато при активности 6000 пмоль сАМР/(мг белка · мин) при добавлении 100 нг G_s . Достоверно определялись нанограммовые количества G_s . Влияние на активность аденилатциклазы субъединицы α_s и химерных α -субъединиц, полученных в результате трансляции *in vitro*, определялось непосредственно в аликвотах трансляционной смеси. Наблюдалась активация аденилатциклазы гуанилилимидодифосфатом (Gpp(NH)p) или NaF при добавлении транслированного *in vitro* белка α_s (рис. 5). Сплайсинговые формы α_s (α_{ss} и α_{si}) практически не различались по способности к активации. Активация транслированными *in vitro* α_s была в 3—5 раз выше базального уровня при использовании LR и лишь в 1,5—2 раза выше в случае трансляции в WGE. Ни одна из этих трансляционных смесей (WGE и LR) без добавления мРНК α_s не активировала аденилатциклазу. Выход функционально активных α_s составил 2—3 мкг на 1 мл трансляционной смеси для обеих использовавшихся систем (LR и WGE). Таким образом, около 90% G-белка, синтезированного в WGE, функционально неактивно, в то время как практически весь синтезированный в LR *de novo* белок

А, опт. ед.

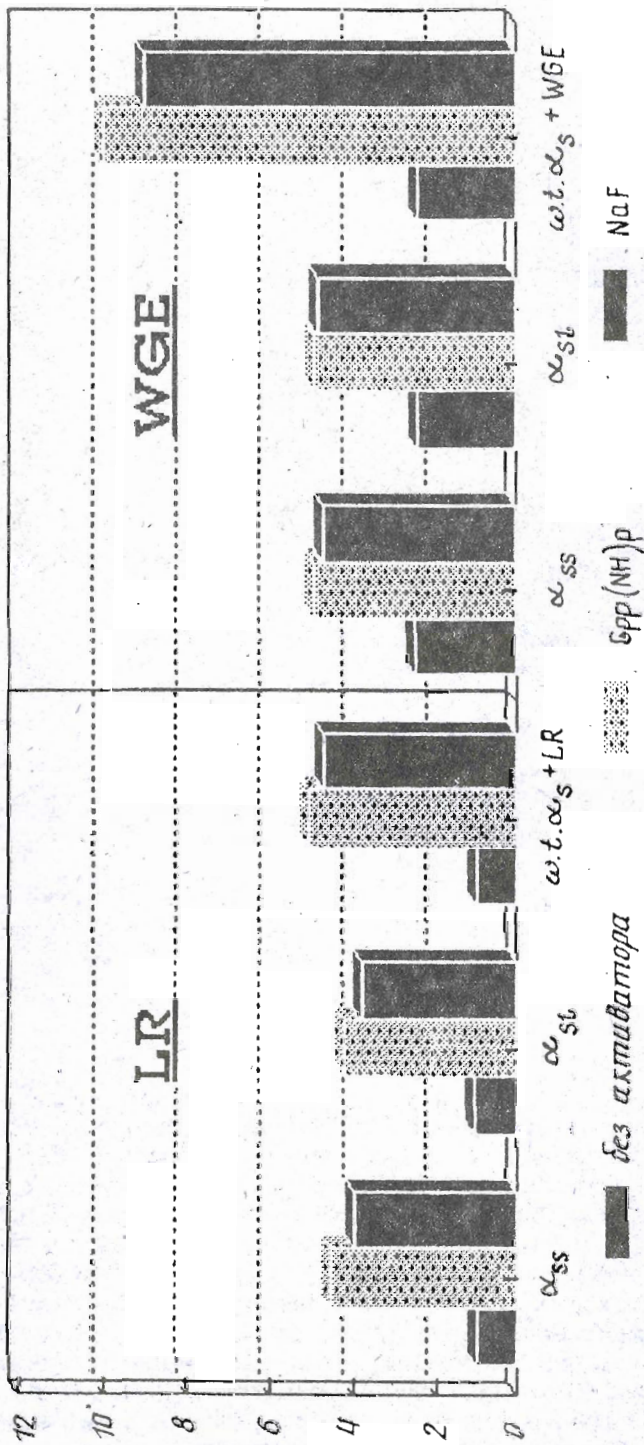


Рис. 5. Влияние α_{s1} и α_{ss} синтезированных в разных системах трансляции (LR и WGE), на активацию очищенной от эндогенного C_s аденилатциклазы в отсутствие активаторов и в присутствии $Gpp(NH)p$ или NaF, w. t. α_s — α -субъединица C_s , выделенная из мозга быка (добавлялась в качестве контроля к трансляционным смесям без мРНК в концентрации 2 мкг/мл). По оси ординат — активность аденилатциклазы в относительных единицах. Базальная активность (1 отн. ед.) составила 620 пкмоль cAMP/(мг белка · мин)

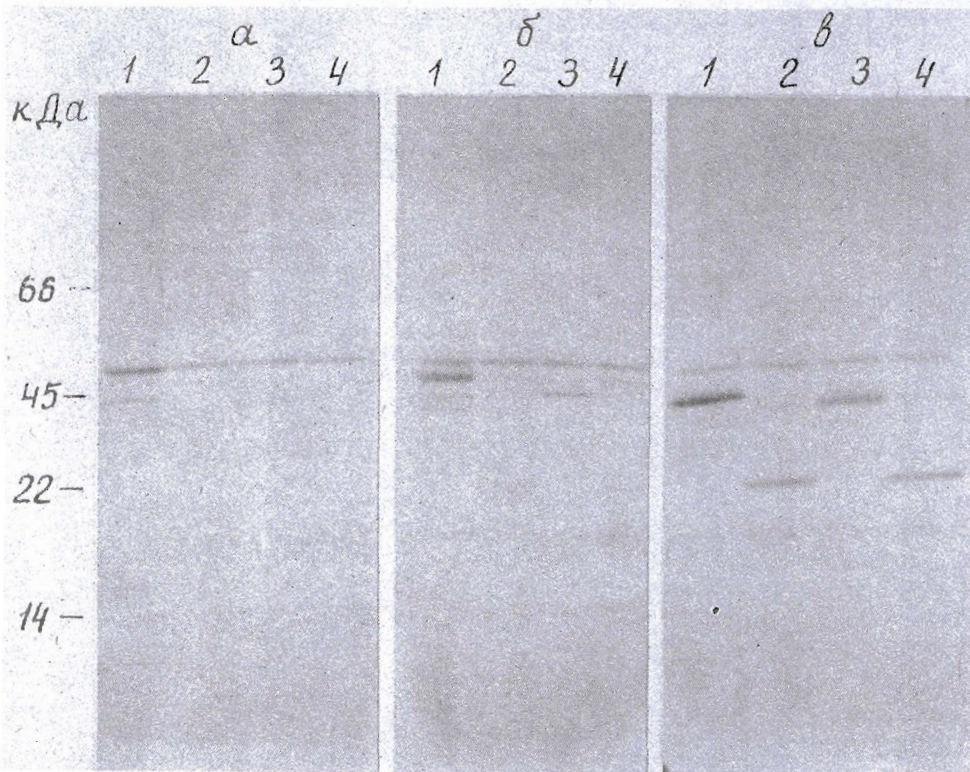


Рис. 6. Авторадиограмма нитроцеллюлозной мембраны после переноса ^{14}C -меченых электрофоретически разделенных в полиакриламидном геле в присутствии SDS продуктов ограниченного трипсинового протеолиза транслированных в LR α -субъединиц G-белков α_{ss} (а), α_{sl} (б) и α_0 (в), проведенного в присутствии 10^{-4} M GDP (2), $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (3) или GTP (4); 1 — контроль (без добавления трипсина)

представлен полностью функционально активными α_s . Способность сконструированных химерных α -субъединиц G-белков активировать аденилатциклазу приведена на рис. 3.

Ограниченный нуклеотидзависимый протеолиз субъединиц α_{ss} , α_{sl} и α_0

Ограниченный трипсिनный протеолиз G-белков в присутствии гуаниловых нуклеотидов или их аналогов является надежным способом подтверждения нативности их конформации. Так, выделенный из мозжечка быка белок α_0 с кажущейся молекулярной массой 39 кДа при действии трипсина в присутствии 10^{-4} M негидролизующих аналогов GTP образует практически со 100% выходом полипептид массой 37 кДа и в тех же условиях, но в присутствии GDP — два менее стабильных продукта с массами 20 и 14 кДа [5]. В отсутствие гуаниловых нуклеотидов в процессе протеолиза наблюдается неспецифическая деградация α_0 . На рис. 6 представлены результаты экспериментов по ограниченному протеолизу α_{ss} , α_{sl} и α_0 , синтезированных *in vitro* в LR. Лишь незначительная часть полученного в результате трансляции в WGE α_0 образовывала при трипсинолизе продукт с массой 37 кДа в присутствии гуанозин-5'- γ -тиотрифосфата ($\text{GTP}\gamma\text{S}$) и продукт с массой 20 кДа в присутствии GDP (данные не приведены). С другой стороны, практически весь продукт с массой 39 кДа в результате трансляции мРНК α_0 *in vitro* в системе LR конвертировался в полипептид с молекулярной

массой 37 кДа при ограниченном протеолизе трипсином в присутствии GTP γ S и в продукт с молекулярной массой 20 кДа в присутствии GTP или GDP (рис. 6). Это подтверждает, что транслированный в LR α_0 имеет нативную конформацию и связывает гуаниловые нуклеотиды аналогично природному α_0 . Отсутствие в гидролизате трипсином в присутствии GDP полипептида с молекулярной массой 14 кДа можно объяснить низким сродством этого продукта к нитроцеллюлозе, его большей лабильностью и низкой удельной радиоактивностью. Ограниченный протеолиз трипсином продуктов трансляции мРНК α_{s1} и α_{s3} в аналогичных условиях также дает специфические пептиды, разные в зависимости от добавленно-го гуанилового нуклеотида, что свидетельствует о нативности их конформации (рис. 6).

ADP-рибозилирование транслированного in vitro белка α_0 коклюшным токсином

Транслированный in vitro белок α_0 является субстратом ADP-рибозилирования коклюшным токсином (данные не приведены), что свидетельствует не только о нативности его конформации и способности связывать и гидролизовать GTP, но и о взаимодействии с комплексом $\beta\gamma$ -субъединиц. К сожалению, как WGE, так и LR ингибируют реакцию переноса ADP-рибозы на α -субъединицу G-белка, что сильно затрудняет количественную оценку выхода нативного α_0 в процессе трансляции in vitro. Однако ориентировочный выход нативного α_0 был приблизительно одинаков в случае обеих систем (WGE и LR) и был не ниже 2 мкг/мл, что согласуется с оценками, проведенными другими методами (см. выше). Таким образом, основная часть получаемых в процессе трансляции in vitro α -субъединиц G-белков представлена нативными молекулами в случае LR и ненативными в случае WGE.

Участки полипептидной цепи субъединицы α_s , принимаящие участие во взаимодействии с аденилатциклазой

Степени активации аденилатциклазы химерами 1, 1a и 2 (рис. 3) указывают на важность С-концевой части белка α_s в регуляции активности аденилатциклазы. Замена N-концевой части α_{s1} (аминокислотные остатки 1—234) гомологичной ей областью α_0 (1—200, химера 2) практически не влияет на способность гибридной молекулы активировать аденилатциклазу, в то время как аналогичная замена С-конца α_s (химеры 1 и 1a) приводит к полной потере этой способности. Сходные результаты были получены Борном [18] в исследованиях аналогичных химер, С-концевая часть которых была заменена соответствующим участком α -субъединицы G $_1$ -белка. В то же время Джонсон [18] показал, что замещение на С-конце α_s 38 аминокислотных остатков (357—394) гомологичной областью α_1 не влияло на стимуляцию гибридной молекулой аденилатциклазы. Таким образом, район α_s между аминокислотными остатками 235 и 356, по-видимому, содержит все детерминанты взаимодействия с аденилатциклазой. Следует отметить, что в этом районе находится еще один функционально важный для α_s (равно как и для других G-белков) участок: консервативный G-4-район, принимающий участие в связывании GTP [20]. Поэтому при интерпретации стимулирующих свойств химерных α -субъединиц важно исключить влияние замен на способность химер связывать GTP и подвергаться GTP-индуцированному конформационному изменению, которое сопровождает стимуляцию эффекторного белка. Как описано выше, связывание α -субъединицами негидролизуемых аналогов GTP предотвращает их расщепление трипсином по консервативному остатку аргинина (Arg-232 в случае α_s) и может служить надежным критерием сохранения белковой молекулой нативной конформации [21—23]. Обработка химерных белков трипсином давала характерные для нативной молекулы продукты протеолиза: в отсутствие GTP γ S трипсин гидролизывал мутантные белки до мелких фрагментов, но в присутствии GTP γ S

отщеплял лишь короткий пептид с их N-конца, оставляя большую часть молекулы интактной (данные не приведены).

При дальнейшей детализации участков взаимодействия субъединицы α_s с аденилатциклазой мы руководствовались моделью пространственной структуры α -субъединиц G-белков, предложенной Холлбруком и Кимом [7] на основании сопоставления аминокислотных последовательностей пяти G-белков с последовательностью кодируемого протоонкогена *p21ras* полипептида, трехмерная структура которого в GDP-связанной форме установлена. Согласно этой модели, последовательности петель R6 или R7 — наиболее вероятные участки взаимодействия с эффекторным белком. Для субъединицы α_{s1} (координатами которой будем оперировать в дальнейшем) границы этих районов совпадают с последовательностями 272—282 (R6) и 310—319 (R7). Изучение влияния этих участков на стимулирующую аденилатциклазу активность гибридных белков позволило разделить полученные химеры на две группы (рис. 3): активирующие аденилатциклазу (7, 7a, 8, 8a, 9 и 9a) и не активирующие ее (3, 3a, 4, 5 и 6).

Функциональные свойства химерных белков второй группы (отсутствие активации аденилатциклазы) показывают, что ни одна из этих петель, находясь в составе гибридной молекулы даже как часть более протяженной последовательности, не сообщает им способности к активации в той мере, в какой ею обладает химера 2 (рис. 3), и, следовательно, ни одна из этих петель не является конкретным участком взаимодействия с аденилатциклазой. Вероятно, существует несколько контактирующих с аденилатциклазой сайтов на α_s , которые разнесены в линейной последовательности области 235—356.

В то же время белки α_s , в которых одна из петель (R6 или R7) была замещена гомологичной последовательностью α_0 (химеры 8, 8a, 9 и 9a), проявили сниженные (правда, до различной степени) стимулирующие свойства.

Данные по активации аденилатциклазы химерами 7 и 7a заставляют обратить внимание на участок α_0 337—356 (рис. 3), находящийся между петлей R7 и последними 38 C-концевыми аминокислотными остатками, которые, как было показано [16], не существенны для активации. Из рис. 3 видно, что стимулирующая активность снижена у четырех α_s , в которых замещены разные аминокислотных последовательностей (235—294 у химер 8 и 8a и 337—356 у 7 и 7a) тем не менее вызывает практически одинаковый эффект. Это позволяет предположить, что участки α_s 235—294 и 337—356 в равной степени существуют для взаимодействия с аденилатциклазой. В пользу такого предположения свидетельствует и тот факт, что в химерах 5 и 6 ни участок α_s 235—294, ни участок α_s 337—356 в отдельности не сообщают химерному полипептиду способности активировать аденилатциклазу. К тому же относительно высокая в сравнении со всеми другими активность химер 9 и 9a, содержащих оба этих участка, позволяет сделать вывод об их совместном участии в образовании взаимодействующего с эффекторным белком домена.

Участок 295—336, содержащий предполагаемую петлю R7, по-видимому, не является существенно важным для взаимодействия с аденилатциклазой. Тот факт, что замещение этого участка в белке α_s (химеры 9 и 9a, рис. 2 и 3) все же вызывает некоторое снижение в уровне активации, можно объяснить достаточно высоким различием последовательностей α_s и α_0 в этой области. В белке α_s в этом участке имеется вставка длиной 13 аминокислотных остатков (324—336, рис. 2), не имеющая гомологии ни с одним из известных G-белков. Отсюда следуют два возможных предположения: либо эта последовательность все же необходима для активации аденилатциклазы, но непосредственно с ней не контактирует, либо в этом участке полипептидные цепи α_s и α_0 принимают разные конформации, что не может не повлиять на конформации соседних участков, непосредственно взаимодействующих с аденилатциклазой.

В этой связи интересно сравнить наши данные с данными, недавно опубликованными группой Гилмана [13]: ими было показано, что делеция этих 13 аминокислотных остатков в α_{ss} приводит к нарушению нативной конформации

молекулы и, как следствие, к полной потере способности активировать аденилатциклазу в препарате мембран клеточной линии лимфомы S49сус⁻ (дефицитной по α_s). В нашем случае (химеры 9 и 9a, рис. 2) делеция этих 13 аминокислотных остатков с одновременным замещением прилежащего с N-концевой стороны фрагмента 297—323 гомологичной последовательностью белка α_0 привела лишь к незначительному снижению уровня активации по сравнению с рекомбинантным α_s (в 1,6 раза).

Таким образом, сравнение функциональных активностей созданных мутантных белков позволяет сделать вывод о роли двух участков полипептидной цепи субъединицы α_s (235—294 и 337—356) в образовании домена, ответственного за взаимодействие с аденилатциклазой. Следует отметить, что границы установленных нами районов перекрываются с группами аминокислотных остатков, выявленных в исследованиях Берлот и Борна [12]. Применяв метод гомологсканирующего мутагенеза, авторы заменили по возможности все (63 из 78) неидентичные аминокислотные остатки в районе 235—356 α_s соответствующими остатками α_{12} и тестировали полученные мутантные белки в клетках линии COS-7 на способность стимулировать синтез сАМР. Этот подход позволил авторам обозначить четыре кластера аминокислотных остатков, замены которых приводили к снижению уровня синтеза сАМР. Три из них, I (Q236, N239 и D240), II (N261 и Q262) и III (W277, R280, L282, T284 и I285), совпадают с нашим участком 235—294, а IV (S349 — R356) — с нашим участком 337—356. Здесь необходимо обратить внимание на то, что напрямую сравнивать полученные нами результаты с результатами Берлота и Борна [12] нужно с известной степенью осторожности. Эффекторным белком, как α_s , так и α_0 , является аденилатциклаза, в то время как, по последним данным [24], α_0 действует на Ca^{2+} -канал в цитоплазматической мембране. При этом известно, что α_0 с аденилатциклазой никак не взаимодействует [25]. Таким образом, в работе [12] выявлены аминокислотные остатки α_s , замена которых ведет к нарушению активации аденилатциклазы этим белком, в то время как картированные нами области полипептидной цепи α_s по необходимости обширнее, поскольку они формируют полный домен, взаимодействующий с эффекторным белком.

Поскольку гомология первичной структуры дает основания считать, что α -субъединицы G-белков обладают в целом одинаковой пространственной структурой, можно предположить, что взаимодействующие с эффекторным белком аминокислотные остатки α -субъединиц других G-белков будут обнаружены в районах, соответствующих областям 235—294 и 337—256 α_s . В этом отношении интересны результаты, полученные Хэмм с соавт. [14]: ими показано, что синтетический пептид, соответствующий фрагменту 293—314 α_1 (α -субъединицы трансдуцина, G-белка зрительного каскада с фосфодиэстеразой сGMP в качестве эффекторного белка) и гомологичный участку 337—356 α_{si} , активирует фосфодиэстеразу в той же степени, как и нативный трансдуцин.

Полученные в нашей работе результаты говорят об одинаковой способности двух транслированных *in vitro* форм α_s , длинной (α_{sl}) и короткой (α_{ss}), активировать аденилатциклазу. Это показывают эксперименты как с рекомбинантными белками дикого типа, так и с парами химерных молекул (7 и 7a, 8 и 8a, 9 и 9a — различия составляют лишь 2—5%). Возможно, биологическая роль совместного присутствия различных сплайсинговых форм α_s в клетках (притом в тканеспецифических стехиометрических соотношениях [26], динамически сопряженных с клеточной дифференцировкой [27]) будет выяснена при изучении других биохимических свойств этих белков: GTP-азной активности, сродства к гуаниловым нуклеотидам, взаимодействия с γ -субъединицами и т. п.

В заключение необходимо отметить, что в качестве систем экспрессии химерных α -субъединиц G-белков и определения их функциональной активности нами были использованы трансляция и тестирование *in vitro*, тогда как в работах зарубежных коллег химерные конструкции экспрессировались *in vivo* [12, 15—18], причем в ряде случаев и их биохимические свойства определялись косвенно, по

уровню сАМР в экспрессирующих клетках [12]. Обе системы имеют свои преимущества и недостатки, исследования белков в каждой из них, и сравнение полученных результатов представляют отдельный интерес. Тем более показательно, что полученные нами и зарубежными коллегами данные согласуются друг с другом, что свидетельствует о перспективности трансляции *in vitro* для структурно-функциональных исследований G-белков.

Экспериментальная часть

кДНК субъединиц α_s и α_0 G-белков клонировали из клонотек кДНК аналогично описанному [28]. Все манипуляции с ДНК проводили по стандартным методикам, описанным в работе [29]. Олигонуклеотиднаправленный мутагенез осуществляли по методике набора для мутагенеза (Amersham, Англия). Для введения сайтов эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Pvu*II в открытую рамку считывания гена α_0 использовали олигодезоксирибонуклеотиды, соответственно (5')AGAAGTGGATCCATAGCTTTCGAGG и (5')ACSTATGCAGCTGCCGCCGCCT, синтезированные с помощью автоматического синтезатора 380A (Applied Biosystems, США). Во всех случаях мутагенеза и конструирования химерных генов полная нуклеотидная последовательность кДНК в открытой рамке считывания определялась модифицированным методом Сэнгера [30].

Транскрипцию *in vitro* осуществляли с помощью РНК-полимеразы фага SP6, выделенной по методу [31]. Транскрипцию и трансляцию *in vitro* в WGE проводили как описано [19, 32]. Трансляцию *in vitro* в LR осуществляли по методике [33] с изменениями. Смесь для трансляции содержала 25 мМ HEPES (pH 7,5), 80 мМ KCl, 400 мкМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит, 1,2 мМ АТР, 80 мкМ GTP, 8 мМ креатинфосфат, 80 мкг/мл креатинфосфокиназы, 100 ед./мл ингибитора РНКаз из плаценты человека, 0,1 мкг/мл лейпептина, 0,1 мкг/мл ингибитора трипсина из сои, 50 мкмоль/л каждой из 20 аминокислот, 200 мкг/мл мРНК и 60% LR, выделенного по методике [19]. Трансляцию вели 1 ч при 30° С. Для получения радиоактивно-меченых продуктов трансляции в трансляционные смеси добавляли [¹⁴C]лейцин с удельной активностью 0,2 Ки/ммоль (Amersham, Англия) вместо нерадиоактивного предшественника. Продукты трансляции анализировали гель-электрофорезом в присутствии SDS [34] с последующей радиоавтографией геля.

Для определения активности препарат аденилатциклазы, свободной от эндогенного G_s, выделяли как описано [35]. 20 мкл этого препарата, разведенного в соотношении 1 : 3 раствором, содержащим 25 мМ трис-НСl (pH 7,8), 15 мМ MgCl₂, 0,2 М сахарозу, 0,1% Луброл РХ, 1 мМ EDTA (pH 7,8), 0,35 мг/мл фосфолипидов (P3544 фирмы Sigma, США) и 4 · 10⁻⁴ М Gpp(NH)_p или NaF, добавляли к 20 мкл раствора, содержащего G_s или обладающие его активностью полипептиды и 3,3 · 10⁻⁵ М форсколин (для повышения базальной активности аденилатциклазы). Смесь инкубировали 30 мин при 30° С, после чего в ней определяли активность аденилатциклазы как описано [36].

Предшественник для АДФ-рибозилирования коклюшным токсином, [³²P]никотинамидаденидинуклеотид ([³²P]NAD), синтезировали по методике [37]. Коклюшный токсин предварительно активировали 15 мин при 37° С инкубацией в растворе, содержащем 20 мМ трис-НСl (pH 8,0), 5 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреит, 2 · 10⁻⁴ М АТР. Реакционная смесь объемом 20—30 мкл содержала 20 мМ трис-НСl (pH 8,0), 10 мМ дитиотреит, 0,1% Луброла РХ, 10⁻⁴ М GDP, 2 · 10⁻⁴ М АТР, 10⁻⁴ М [³²P]NAD (около 10⁶ имп/мин), 0,1—0,3 мкг токсина, 5 мкл трансляционной смеси LR (10—20 нг α_0) и 0,5—1 мкг комплекса $\beta\gamma$ -субъединиц [38]. По окончании реакции (30° С, 1 ч) белки осаждали ацетоном и анализировали гель-электрофорезом в присутствии SDS с последующей автордиографией высушенного геля.

Для проведения ограниченного трипсинового протеолиза G-белков трипсин обрабатывали специфическим ингибитором химотрипсина, L-1-хлор-3-(4-тозиламида)-4-фенил-2-бутанолом, в концентрации 5 мг/мл. Реакционная смесь объемом 36 мкл содержала 10 мкл LR после трансляции мРНК α -субъединицы

(около 20 нг нативного G-белка), 0,02 М трис-НСl (рН 8,0), 0,01 М MgCl₂, 0,075% Луброла РХ, 0,75 мМ дитиотреит, 0,75 мМ EDTA, 0,833% трипсина и 0,83 мМ GTP, GTPγS или GDP. После 30 мин инкубации при 30° С добавляли соевый ингибитор до концентрации 38,5 мкг/мл и продолжали инкубацию при той же температуре еще 5 мин. Смесь высушивали, продукты протеолиза разделяли гель-электрофорезом в присутствии SDS, переносили на нитроцеллюлозу и анализировали с помощью автордиографии.

Авторы выражают признательность А. А. Бухарову (ФИБХ РАН, Пушкино) и В. З. Слепаку (Калифорнийский университет, США) за помощь на отдельных этапах работы, В. Л. Воейкову (МГУ, Москва) за плодотворное обсуждение результатов. Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Геном человека».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johnson G. L., Dhanasekaran N. // *Endo. Rev.* 1989. V. 10. P. 317—333.
2. Stryer L., Bourne H. // *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1986. V. 2. P. 391—419.
3. Simon M., Strathman M., Gautam N. // *Science.* 1991. V. 252. № 5007. P. 802—808.
4. Robishaw J. D., Smigel M., Gilman A. G. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. № 21. P. 9587—9590.
5. Ovchinnikov Yu. A., Slepak V. Z., Pronin A. N., Shlensky N. B., Voetkov V. L., Lipkin V. M. // *FEBS Lett.* 1987. V. 226. № 1. P. 91—95.
6. Itoh H., Toyama R., Kozasa T., Tsukamoto T., Matsuoka M., Kaziro Y. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 14. P. 6656—6664.
7. Hollbrook S. R., Kim S.-H. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. № 6. P. 1751—1755.
8. Landis C. A., Masters S. B., Spada A., Pace A. M., Bourne H. R., Vallar L. // *Nature.* 1989. V. 340. № 6236. P. 692—696.
9. Masters S. B., Miller R. T., Chi M.-H., Chang Fu.-H., Beiderman B., Lopez N. G., Bourne H. R. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 26. P. 15467—15474.
10. Woon C. W., Heasley L., Osawa S., Johnson G. L. // *Biochemistry.* 1989. V. 28. № 11. P. 4547—4551.
11. Липкин В. М., Бухаров А. А., Красовская Л. А., Муранов А. В., Пронин А. Н., Скиба Н. П., Юровская А. А., Заграничный В. Е. // Сенсорные системы. 1992. Т. 6. № 3. С. 43—46.
12. Berlot C., Bourne H. // *Cell.* 1992. V. 68. № 5. P. 911—922.
13. Itoh H., Gilman A. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 24. P. 16226—16231.
14. Rarick H., Artemyev N., Hamm H. // *Science.* 1992. V. 256. № 5058. P. 1031—1033.
15. Osawa S., Dhanasekaran N., Woon C. W., Johnson G. L. // *Cell.* 1990. V. 63. № 4. P. 697—706.
16. Woon C. W., Soparkar S., Heasley L., Johnson G. L. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 10. P. 5687—5693.
17. Osawa S., Heasley L. E., Dhanasekaran N., Gupta S. K., Woon C. W., Berlot C., Johnson G. L. // *Mol. Cell Biol.* 1990. V. 10. P. 2931—2940.
18. Masters S. B., Sullivan K. A., Miller R. T., Beiderman B., Lopez N. G., Ramachandran J., Bourne H. R. // *Science.* 1988. V. 241. № 4864. P. 448—451.
19. Zozulya S. A., Gurevich V. V., Zvyaga T. A., Shirokova E. P., Dumler T. L., Garnovskaya M. N., Natochin M. Yu., Shmukler B. E., Badalov P. R. // *Prot. Eng.* 1990. V. 3. № 5. P. 453—458.
20. Bourne H., Sanders D., McCormick F. // *Nature.* 1991. V. 349. № 6305. P. 117—127.
21. Fung B. K.-K., Nash C. R. // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. № 17. P. 10503—10510.
22. Hurley J. B., Simon M. J., Teplow D. B., Robishaw J. D., Gilman A. // *Science.* 1984. V. 226. № 4676. P. 860—862.
23. Miller R. T., Masters S. B., Sullivan K. A., Beiderman B., Bourne H. R. // *Nature.* 1988. V. 334. № 6184. P. 712—715.
24. Hesheler J., Rosenthal W., Trauwein W., Schultz G. // *Nature.* 1987. V. 325. № 6103. P. 445—447.
25. Воейков В. Л., Слепак В. З., Пронин А. Н. // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. № 11. P. 1105—1115.
26. Mumby S., Kahn R., Manning D., Gilman F. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. № 2. P. 265—269.
27. Larner A., Ross T. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. № 18. P. 9551—9557.
28. Ovchinnikov Yu. A., Gubanov V. V., Khrantsov N. V., Ishchenko K. A., Zagranichny V. E., Muradov K. G., Shuvaeva T. M., Lipkin V. M. // *FEBS Lett.* 1987. V. 223. P. 169—173.

29. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. // *Molecular Cloning*. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
30. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. № 12. P. 5463—5467.
31. Zozulya S. A., Shirokova E. P., Gurevich V. V., Kharitonov S. I., Udovichenko I. P., Zvyaga T. A., Natchin M. Yu., Badalov P. R. // *Patent Application USSR*. 1988. № 443—2063/31—13/078837.
32. Erickson A. H., Blobel G. // *Meth. Enzymol.* 1983. V. 96. P. 38—49.
33. Jackson R. J., Hunt T. // *Meth. Enzymol.* 1983. V. 96. P. 50—75.
34. Laemmli U. K. // *Nature*. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
35. Strittmatter S., Neer E. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1980. V. 77. № 11. P. 6344—6348.
36. Salomon Y., Londos C., Rodbell M. // *Anal. Biochem.* 1974. V. 58. № 2. P. 541—548.
37. Cassel D., Pfeuffer T. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1978. V. 75. № 6. P. 2669—2673.
38. Bokoch G., Katada T., Northop J., Ui M., Gilman A. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. № 6. P. 3560—3567.

Поступила в редакцию
6.V.1993

V. M. Lipkin *, *L. A. Krasovskaya*, *A. V. Mouranov*,
A. N. Pronin *, *I. P. Udovichenko*, *A. A. Yurovskaya*,
V. E. Zagranichny

LOCALIZATION OF THE G_s-PROTEIN SITES INTERACTING WITH ADENYLYL CYCLASE BY G_s/G₀ CHIMERAS DESIGN

*Branch of M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region;*

* *M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

cDNAs coding for three types of α -subunits of GTP-binding proteins G_s and G₀ (a short form of α_s with Asp-Ser in positions 71 and 72, a long form of α_s with the insertion of 16 amino acid residues instead of Asp-Ser (71—72) — both from bovine brain, and α_0 from bovine cerebellum) as well as some chimeric α_s/α_0 genes were cloned into a modified pGEM-2 plasmid vector under the control of the SP6 promoter. All the genes were *in vitro* transcribed and translated, and some functional properties of the resulting proteins were determined, such as adenylyl cyclase activation, ADP-ribosylation with pertussis toxin, limited nucleotide-dependent trypsin proteolysis. Parts of the α_s polypeptide chain necessary for the activation of adenylyl cyclase were mapped. The α_s domain interacting with adenylyl cyclase is formed by the α_s polypeptide chain fragments 235—294 and 337—356 (numbering as of the α_s long form).