



УДК 577.152.274'8'112.5

© 1994 И. О. Гайдаров, О. Н. Суслов,
Т. В. Овчинникова, Н. Г. Абдулаев

ГУАНИЛАТКИНАЗА ИЗ СЕТЧАТКИ БЫКА: ВЫДЕЛЕНИЕ, ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА И ЭКСПРЕССИЯ В *E. coli*

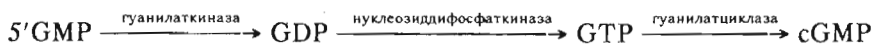
Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и
Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Ключевые слова: зрительная рецепция; сGMP, гуанилаткиназа; клонирование кДНК; экспрессия.

Гуанилаткиназа (КФ 2.7.4.8), катализирующая реакцию $5'GMP + ATP \rightleftharpoons GDP + ADP$, выделена в индивидуальном виде из сетчатки быка. Определена первичная структура белка путем параллельного анализа аминокислотной последовательности ее пептидов и нуклеотидной последовательности соответствующей кДНК. Показано, что подобно аналогичному ферменту из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* аминокислотная последовательность данного белка содержит характерный участок полипептидной цепи, обогащенной остатками глицина, ответственный за связывание АТР. Выявлено, что аминокислотные остатки, участвующие в связывании GMP у гуанилаткиназы из дрожжей, консервативно сохранены у фоторецепторной гуанилаткиназы. Гуанилаткиназа из сетчатки быка экспрессирована в *E. coli* в виде химерного белка. Приведены данные по очистке химерного белка, его расщелению энтеропептидазой, выделению рекомбинантного фермента и его функциональным характеристикам.

В настоящее время достоверно показано, что циклический гуанозинмонофосфат (сGMP) является внутриклеточным мессенджером, регулирующим светозависимую ионную проводимость плазматических мембран фоторецепторных клеток позвоночных [1, 2]. Каскад ферментативных реакций в фоторецепторных клетках, запускаемый фотоизомеризацией родопсина, приводит к гидролизу сGMP до 5'GMP, что вызывает закрытие сGMP-зависимых ионных каналов и гиперполяризацию плазматической мембраны фоторецепторной клетки [3, 4]. Последующий процесс адаптации, т. е. возврат в темновое состояние, непосредственно сопряжен с ресинтезом сGMP. Вследствие этого изучение метаболизма сGMP в фоторецепторной клетке представляет большой интерес.

Процесс ресинтеза сGMP из 5'GMP состоит из ряда ферментативных реакций [5]:



Первой стадией синтеза является фосфотрансферная реакция — катализируемый гуанилаткиназой перенос фосфатной группы с 5'-конца АТР на 5'-конец GMP и приводящий к образованию GDP из 5'GMP [5]. Вторая фосфотрансфе-

Результаты выделения гуанилаткиназы из сетчатки быка

Фракция	Объем, мл	Активность, ед./мл	Содержание белка, мг/мл	Удельная активность, ед./мг	Выход, %
TSK-G3000SW	14	23,9	1,227	19,5	
Mono Q	18	9,3	0,269	31	45
Blue-сефароза	21	4,29	0,013	330	60

разная реакция, катализируемая нуклеозиддифосфаткиназой, приводит к образованию ГТР из GDP [5]. Непосредственно синтез сGMP из ГТР осуществляется Ca^{2+} -зависимой мембраносвязанной гуанилатциклазой [6, 7].

В отличие от гуанилатциклазы, которая активно изучалась в последние годы, гуанилаткиназе и нуклеозиддифосфаткиназе уделялось значительно меньше внимания, хотя они участвуют в синтезе предшественников сGMP и в определенной степени самого сGMP. Фосфотрансферазные реакции, катализируемые этими ферментами, регулируют поставку гуаниновых нуклеотидов не только для процессов сигнальной трансдукции, но также, например, для таких клеточных процессов, как синтез белка, движение везикул и процессы клеточной пролиферации [8]. Интерес к данным ферментам сильно возрос в последние годы после обнаружения генов *dlg* дрозофилы и *nm23* млекопитающих, продукты которых являются структурными аналогами гуанилаткиназы и нуклеозиддифосфаткиназы и участвуют соответственно в процессах злокачественного роста имагинальных дисков дрозофилы [9, 10] и развития злокачественных опухолей у млекопитающих [11].

Данная работа посвящена изучению гуанилаткиназы из сетчатки быка. Гуанилаткиназа является растворимым белком, распределенным по цитоплазматическому пространству фоторецепторных клеток сетчатки. Это было показано Бергером и др. [12] при исследовании микросколов замороженной сетчатки. Также показано, что содержание гуанилаткиназы во внутренних сегментах палочек быка значительно выше, чем в наружных сегментах [12]. В работе [5] было сообщено о выделении гуанилаткиназы как из наружных сегментов палочек быка (НСП), так и из самой сетчатки. Показано, что фермент экстрагируется из НСП в гипотонических и изотонических условиях, а также из НСП, адаптированных к свету и темноте. Общий выход фермента при его выделении из фракции растворимых белков сетчатки оказался намного выше, чем при его выделении из НСП, что согласуется с данными Бергера и др. [12] о локализации гуанилаткиназы.

Для получения достаточных для структурных исследований количеств фермента мы выделяли его из общего экстракта растворимых белков сетчатки быка. За основу мы использовали методику, описанную в работе [5]. Изменения, внесенные нами, позволили повысить выход фермента в процессе очистки. Процедура выделения белка состояла из фракционирования экстракта растворимых белков сетчатки сульфатом аммония и ряда хроматографических операций (гель-фильтрация, ионообменная и аффинная хроматография). На всех этапах фракции, содержащие гуанилаткиназу, идентифицировались путем измерения ферментативной активности спектрофотометрическим методом, предложенным Агарвалом и др. [13]. Метод основан на сопряженном с образованием нуклеозиддифосфатов процессе окисления NADH в присутствии фосфоенолпирувата, пируваткиназы и лактатдегидрогеназы.

Наиболее эффективными стадиями в процессе очистки фермента были гель-фильтрация на высокоэффективной препаративной колонке TSK-G3000SW (таблица, рис. 1) и аффинная хроматография на Blue-сефарозе (таблица). Ионообменная хроматография (рис. 2) только незначительно увеличивала удельную активность белка, но она давала возможность полностью отделить аденилаткиназу, которая не

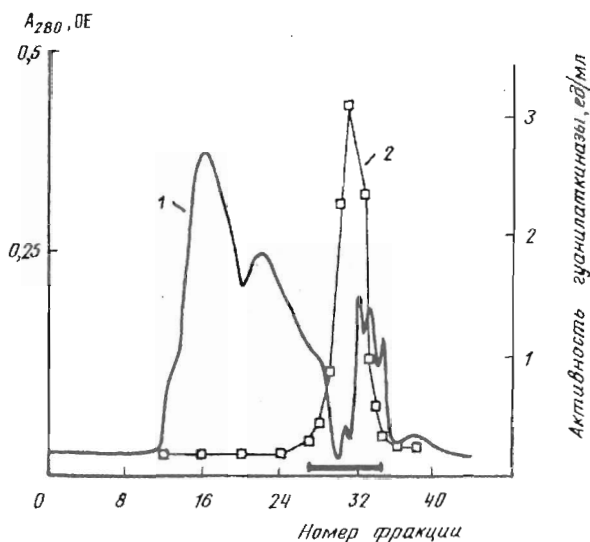


Рис. 1. Гель-фильтрация на колонке TSK-G3000SW фракционированного сульфатом аммония экстракта растворимых белков сетчатки глаз быка. Контроль по поглощению (1) и активности (2). Колонка (2×60 см) уравновешена в 20 мМ (Na, K, H)PO₄ (рН 7,6), 0,02% Na₂S₂O₃. Скорость элюции 180 мл/ч. Объем фракций 6 мл. Отмечены объединенные фракции

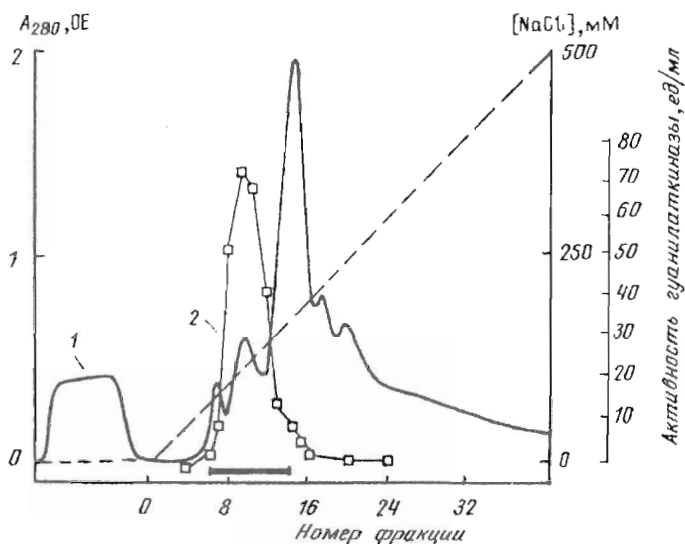


Рис. 2. Ионообменная хроматография на колонке Моно Q HR 10/10 объединенных фракций, полученных после гель-фильтрации (см. рис. 1). Контроль по поглощению (1) и активности (2). Прерывистая линия — градиент концентрации NaCl. Скорость элюции 3 мл/мин. Объем фракций 3 мл. Отмечены объединенные фракции

сорбировалась в данных условиях на колонке. Гуанилаткиназа при этом связывалась с колонкой и затем элюировалась градиентом соли. На последней стадии выделения гуанилаткиназа сорбировалась на Blue-сефарозе и затем специфично элюировалась буфером, содержащим АТФ. Выход белка составил 90 ед. акт. из 100 сетчаток; удельная активность выделенного фермента составила 330 ед./мг белка. Полученный белок после последней стадии (хроматографии на Blue-сефарозе) имеет чистоту не менее 95%. При SDS-электрофорезе в полиакриламидном геле он ведет себя как белок с молекулярной массой 22—23 кДа (рис. 3).

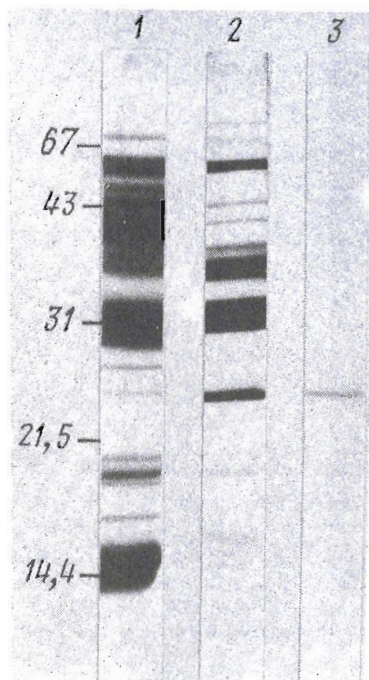


Рис. 3. SDS-электрофорез в полиакриламидном геле (15%) активных фракций, полученных на различных этапах выделения гуанилаткиназы из сетчатки быка: после хроматографии на TSK-G3000SW (1) и на Mono Q (2); препарат гуанилаткиназы, очищенной на Blue-сефарозе (3). Слева указаны молекулярные массы маркерных белков (кДа)

Предварительные результаты по секвенированию белка показали, что его N-концевой аминокислотный остаток блокирован. Природа этой модификации до сих пор неизвестна. Для фрагментации белка был использован протеолиз трипсином. Полученные пептиды очищали методом ВЭЖХ на колонках с обращенной фазой Zorbax C18. Автоматическим секвенированием по методу Эдмана были определены полные или частичные аминокислотные последовательности 13 пептидов, заключающие в себе около 50% полипептидной цепи.

Исходя из аминокислотных последовательностей пептидов EENGKDYFV и DFENAEF и учитывая частоту встречаемости кодонов в клонированных ранее кДНК нескольких белков из сетчатки быка, были синтезированы следующие олигодезоксирибонуклеотидные зонды:

5'GAGGAGAACGGCAAGGACTACTACTTCGT

5'GACTTCATCGAGCACGCGGAGTT

При помощи этих зондов был проведен скрининг библиотеки кДНК из сетчатки быка в векторе λ -ZAP. Среди 10^6 клонов библиотеки было найдено 7, дававших положительные сигналы гибридизации. Анализ этих клонов показал, что все они кодируют гуанилаткиназу из сетчатки глаз быка. Для определения нуклеотидной последовательности был выбран клон, названный pVL8 и содержащий вставку кДНК гуанилаткиназы с максимальной длиной. Рестриктивная карта этой вставки и стратегия определения ее нуклеотидной последовательности показаны на рис. 4. Полученная нуклеотидная последовательность и выведенная из нее аминокислотная последовательность гуанилаткиназы представлены на рис. 5.

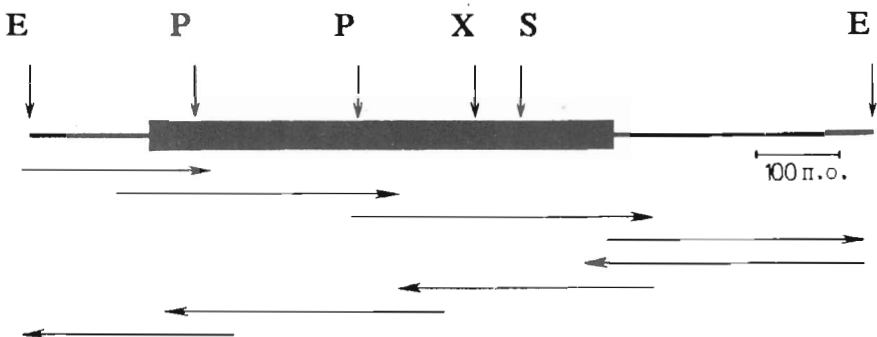


Рис. 4. Рестриктивная карта кДНК гуанилаткиназы и стратегия определения ее нуклеотидной последовательности. Черным прямоугольником выделена кодирующая область. Стрелками под фрагментом показаны направления и протяженность секвенирования. E - *EcoRI*, P - *PstI*, X - *XmaI*, S - *StuI*

Открытая рамка считывания между нуклеотидными основаниями 165 и 759 кодирует полную структуру гуанилаткиназы. Все полные или частичные аминокислотные последовательности, полученные при анализе триптических пептидов (см. выше), кодируются этой открытой рамкой считывания (они подчеркнуты на рис. 5). Триплет ATG (165—167) является иницирующим кодоном, поскольку это первый ATG-кодон нуклеотидной цепи, следующий после нонсенс-кодона TAG (72—74) в той же рамке считывания, что и полипептидная цепь гуанилаткиназы. Терминирующий кодон TGA находится в положении 759—761, а на расстоянии 252 п.о. от него в положении 1012—1017 3'-нетранслируемой области расположен сигнал полиаденилирования AATAAA, после которого через 13 пар оснований начинается poly(A)-последовательность.

Выведенная из нуклеотидной последовательности аминокислотная последовательность фермента содержит 198 аминокислотных остатков. Рассчитанная молекулярная масса белка составляет 21 911 Да, что согласуется с данными SDS-электрофореза. Из-за модификации N-концевой аминокислоты гуанилаткиназы остается неизвестным, подвергается ли этот белок процессингу. К сожалению, не удалось выделить N-концевой пептид фермента из продуктов расщепления трипсином и поэтому природа блокирующей группировки пока не установлена. У гуанилаткиназы из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* наблюдается отщепление N-концевого метионина и ацетилирование следующего остатка серина [14]. Ввиду того что у фоторецепторной гуанилаткиназы за N-концевым остатком метионина также идет остаток серина и учитывая, что ацетилирование N-концевого остатка серина — довольно распространенное явление для эукариотических белков, можно предположить, что аналогичный процесс характерен и для фоторецепторной гуанилаткиназы.

Следует отметить, что до настоящего времени дрожжевой фермент был единственной гуанилаткиназой, для которой известны аминокислотная последовательность и пространственная структура [14—16]. Аминокислотная последовательность гуанилаткиназы из сетчатки быка оказалась на 55% идентична последовательности дрожжевой гуанилаткиназы (рис. 6), что говорит о высокой консервативности фермента в процессе эволюции.

Пространственная структура с разрешением в 2 Å комплекса дрожжевой гуанилаткиназы с ее субстратом GMP была получена Шульцем и др. [15, 16] с помощью рентгеноструктурного анализа. Было показано, что аминокислотные остатки Arg-38, Arg-41, Tyr-50 и Tyr-78 участвуют в образовании водородных связей с фосфатной группой связанного GMP [16]. Все эти аминокислотные остатки, а также аминокислотный остаток Glu-44, образующий солевой мостик с Arg-38, оказались консервативно сохраненными у фоторецепторного фермента. Также полностью консервативными оказались аминокислоты, участвующие в

I	GTGCACTTCTCGGGTGAGGAGCAGCGTTTCCCTCTGTTGAGCAGGTGGTGCGGGCTGCAC	60
6I	TAGGAGGGATTTAAGTGTCTCAGACAGTGGGGAGCAGGCAAGBATTACCACTGTCTCAGCTC	120
12I	AGCCAGTGCAGCCCCAAGCTGAGCACAGAGGCTACTCAGAAGGGATGTCAGGACCAAGGC	180
	M S G P R P	
18I	CCGTTGTCTGAGCGGACCCCTCAGGGGCTGGGAAGAGCACCCCTACTGAAGAAACTCCTGC	240
	<u>V V L S G P S G A G K S T L L K K L L Q</u>	
24I	AGGAACATGGCAGCATCTTTGGCTTCAGCGTGTCCACACGACAAGGGACCCGAGGCCAG	300
	<u>E H G S I F G F S V S H T T R D P R P G</u>	
30I	GAGAGGAGAACGGCAAGATTACTACTTTGTGACCAGGGAGGTGATGCAGCGCGACATTG	360
	<u>E E N G K D Y Y F V T R E V M Q R D I A</u>	
36I	CTGCTGGAGACTTCATCGAGCACGCTGAGTTCTCAGGGAACCTGTATGGGACCAGCAAGG	420
	<u>A G D F I E H A E F S G N L Y G T S K A</u>	
42I	CCGCCGTGCGGGCCGTGCAGGCCATGAACCGCATCTGCGTGTGGACGTGGACCTGCAGG	480
	<u>A V R A V Q A M N R I C V L D V D L Q G</u>	
48I	GCGTGCGCAACATCAAGAAGACCGACCTGCGGCCATCTACATCTTCGTGCAGCGCCCT	540
	<u>V R N I K K T D L R P I Y I F V Q P P S</u>	
54I	CACTGGATGTCCTGGAGCAGCGGCTGCGACAGCGGAACACAGAGACAGAGGAGAGCCTGG	600
	<u>L D V L E Q R L R Q R N T E T E E S L A</u>	
60I	CCAAGCGTCTGGCGGCTGCCCGGGCTGACATGGAGAGCAGCAAGGAGCCCGCCCTGTTG	660
	<u>K R L A A A R A D M E S S K E P G L F D</u>	
66I	ACCTGATCATCGTCAACGACAGTCTGGACAAGGCCTACTGGGCCCTGAAGGAGGCGCTCT	720
	<u>L I I V N D S L D K A Y W A L K E A L S</u>	
72I	CGGAGGAAATAAAGAAGGCCCAAGGCACCTGGTCAGTCCTGAGGAGGCCCGCCAGCTGTGT	780
	<u>E E I K K A Q G T G Q S Ter</u>	
78I	CCTCTCAGGTGGGGCCAGGGCCCTGGCGCCACGTCAGTGGGGCAGAGTTTCTGGCAGT	840
84I	GACTCTGCTCACCCTCAGCTGGGACCCAGAGACAGGGGGCTGCCCCATCTTCCCTCATCCC	900
90I	TCCGTGCTGGAGGACCTTGTCTCTTACCCCATGCCCCACGTCATTTCTAGGCTTCT	960
96I	CCCCACCATGCCCTGCAACCCTTACCCGTGGAAGCCAGGCCAACATCCAAATAAAGAA	1020
102I	CTGCTGGGTAAAAAIAAAAAA IA42	

Рис. 5. Нуклеотидная последовательность кДНК и выведенная из нее аминокислотная последовательность гуанилаткиназы из сетчатки глаза быка. Подчеркнуты последовательности, определенные методами белковой химии, а также сигнал полиаденилирования. Тер — сигнал терминирования трансляции

связывании пуринового кольца GMP через неполярные взаимодействия или водородные связи: Tyr-78, Asp-100, Glu-69; две аминокислоты претерпели консервативную замену (Ile-99 на Val и Ser-80 на Thr) [16]. Сохранена и аминокислота Asp-98, участвующая в связывании моно магния у аденилаткиназ [17]. Было показано, что каталитический центр дрожжевой гуанилаткиназы содержит несколько аргининовых остатков (Arg-131, Arg-135, Arg-146), которые, по всей

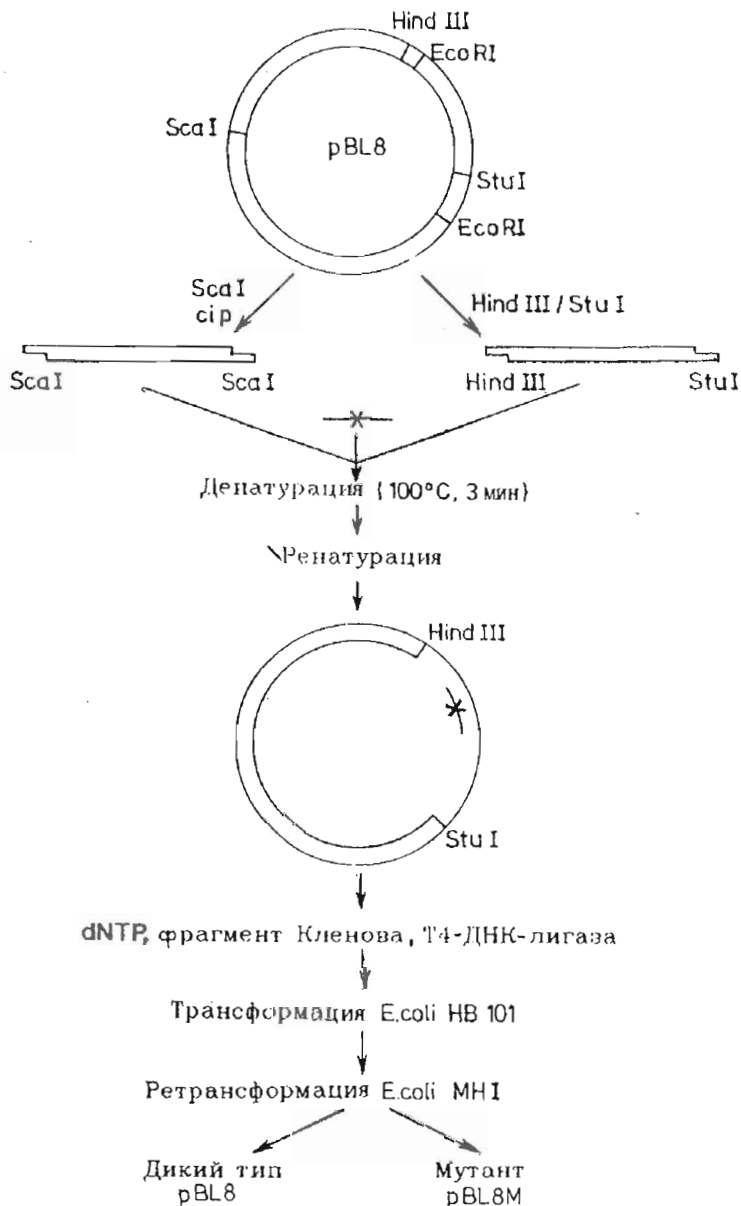


Рис. 7. Схема сайт-направленного мутагенеза кДНК гуанилаткиназы в плазмиде pBL8.; —х— — олигонуклеотидный зонд; cip — щелочная фосфатаза из кишечника теленка

ных структурно-функциональных исследований этого фермента с использованием методов генетической инженерии. В качестве первого шага в этом направлении мы экспрессировали гуанилаткиназу в клетках *E. coli* в виде химерного белка (фрагмент белка А из *St. aureus*)—Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-Ala—гуанилаткиназа. Преимуществами этой системы экспрессии являются легкость выделения экспрессированного химерного белка аффинной хроматографией на IgG-сефарозе, специфичность отщепления фермента энтеропептидазой и простота дальнейшей очистки отщепленной гуанилаткиназы повторной аффинной хроматографией, а также достаточно высокий выход экспрессированного белка для дальнейших

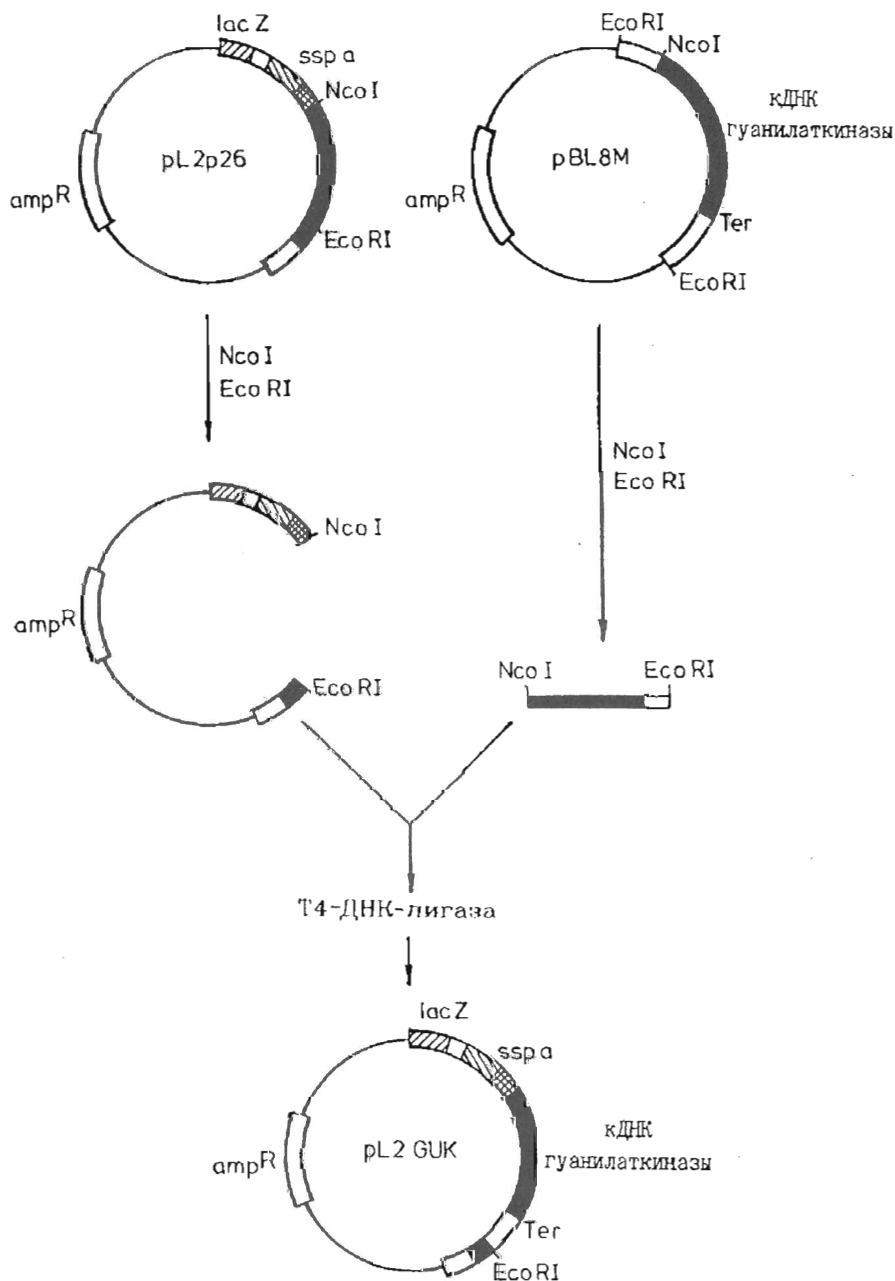


Рис. 8. Конструирование экспрессирующей плазмиды, содержащей кДНК гуанилаткиназы. *ssp a* — фрагмент ДНК, кодирующий IgG-связывающий участок белка А из *Staphylococcus aureus*

исследований фермента. В качестве исходного материала для конструирования экспрессирующей плазмиды была использована плаزمида pL2P26, описанная в работе [20] и полученная на основе плазмиды pUCL2 [21]. Плазмиды pUCL2 и pL2P26 содержат синтетически модифицированный фрагмент, кодирующий участок связывания IgG в белке А. Этот синтетический фрагмент был подобран таким образом, что он содержал сигнальную последовательность, обеспечивающую секрецию гибридного белка; кроме того, была учтена частота встречаемости кодонов у *E. coli* [21].

Анализ рестриктивной карты кДНК гуанилаткиназы показал, что она не содержит удобных сайтов рестрикции для клонирования полноразмерной кодирующей области в экспрессирующую плазмиду. Поэтому было решено методом сайт-направленного мутагенеза получить в области иницирующего кодона кДНК гуанилаткиназы сайт рестрикции *NcoI* для последующего ее клонирования в экспрессирующий вектор по сайтам *NcoI* и *EcoRI*.

Для проведения сайт-направленного мутагенеза был синтезирован олигонуклеотидный зонд (5') СТАСТСАГААГССАТГГСАГГАССА, обеспечивающий создание нужного сайта рестрикции и сохранение рамки считывания при последующем клонировании в экспрессирующий вектор. Был использован плазмидный вариант сайт-направленного мутагенеза (рис. 7), предложенный Фоссом и др. [22]. Следует отметить, что в результате проведенного мутагенеза триплет ТСА, кодирующий остаток серина Ser-2, был заменен на триплет ССА, кодирующий аланин.

Схема конструирования экспрессирующей плазмиды представлена на рис. 8. Плаزمиды рL2P26 [20] и полученная мутантная плаزمиды рВL8М были обработаны рестриктазами *NcoI* и *EcoRI*. Лигирование отщепленного фрагмента кДНК гуанилаткиназы и вектора рL2P26 (*NcoI* — *EcoRI*) привело к получению экспрессирующей плазмиды рL2GUK, содержащей полноразмерную кДНК гуанилаткиназы.

Для экспрессии химерного белка плазмиду рL2GUK трансформировали в *E. coli* (штамм МН-1). Для инициации экспрессии добавляли индуктор *lac*-оперона IPTG, после чего клеточную культуру инкубировали при температуре теплового шока (42° С) для облегчения секреции химерного белка в культуральную среду. SDS-электрофорез и иммуноферментный анализ с использованием антител к фрагменту белка А показали, что химерный белок в основном представлен в культуральной среде. Согласно предварительным данным, около 10—20% экспрессированного химерного белка остается в клетках *E. coli*.

Как было указано выше, химерный белок был сконструирован таким образом, чтобы облегчить его очистку методом аффинной хроматографии на IgG-сефарозе. SDS-электрофорез элюированной с аффинной колонки фракции показал наличие небольших количеств других белков (5—10% от количества химерного белка). Окончательная очистка химерного белка была проведена с помощью аффинной хроматографии на Blue-сефарозе. Общий выход химерного белка составил 5 мг на 1 л супернатанта.

Выделенный белок был подвергнут протеолизу энтеропептидазой по связи Lys-Ala в последовательности Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-Ala, примыкающей к N-концевой последовательности гуанилаткиназы в химерном белке. Для очистки рекомбинантной гуанилаткиназы применялась повторная аффинная хроматография на IgG-сефарозе или аффинная хроматография на Blue-сефарозе [20, 23].

Сравнение природного и рекомбинантного белков методом электрофореза показало их практическую идентичность (рис. 9). Удельная активность рекомбинантного фермента близка к соответствующей величине природного фермента.

Интерес к гуанилаткиназам резко возрос в последнее время в связи с обнаружением белков — структурных аналогов гуанилаткиназы, играющих важную регуляторную роль в различных клеточных процессах. Недавно было обнаружено, что ген-супрессор *dlg* опухоли дрозофилы, мутации которого вызывают злокачественное перерождение имагинальных дисков мухи, кодирует продукт *dlg-A*, C-концевая область которого высокоомологична дрожжевой гуанилаткиназе [9, 10]. По структурному сходству с различными белками аминокислотную последовательность *dlg-A* можно разбить на три домена. N-Концевой домен белка имеет высокое сходство с рядом белков цитоскелета [9]. Полагают, что этот домен участвует в связывании *dlg-A* с цитоскелетом имагинальных дисков [9]. Следующий за ним домен имеет высокое структурное сходство с SH3-последовательностями (*src-homology 3*), идентифицированными ранее у тирозинкиназ (семейства *src*) нерецепторных белков, а также у некоторых других белков,

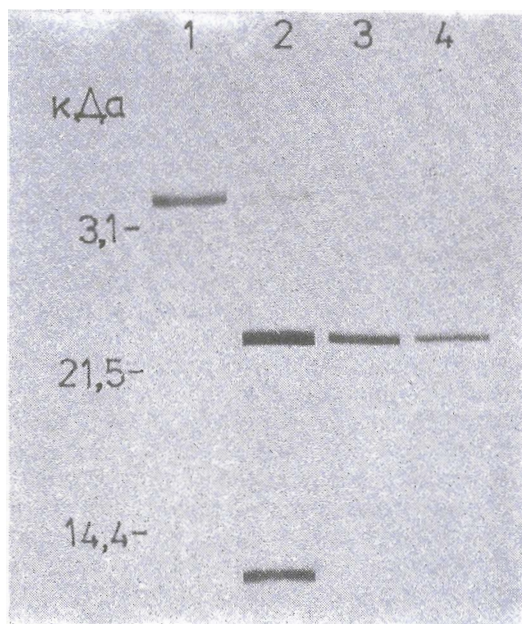


Рис. 9. SDS-электрофорез в полиакриламидном геле (15%) экспрессированного химерного белка (1); химерного белка, расщепленного энтеропептидазой (2); очищенной рекомбинантной гуанилаткиназы (3); гуанилаткиназы из сетчатки глаз быка (4)

вовлеченных в процессы сигнальной трансдукции [9]. Считают, что SH3-домен также принимает участие в связывании dlG-A с цитоскелетом или же модулирует активность его каталитического домена [9, 10]. Третий, С-концевой домен имеет высокое сходство с гуанилаткиназами (рис. 6). Все аминокислоты, участвующие в связывании GMP у дрожжевой гуанилаткиназы, оказались консервативно сохранены у dlG-A. Полагают, что функция гена *dlg* как супрессора опухоли связана именно с предполагаемой гуанилаткиназной активностью его продукта dlG-A, которая является критической в поддержании определенного уровня гуаниновых нуклеотидов в клетке [9]. Иммунохимическими методами показано, что dlG-A локализован в районе септальных сочленений имагинальных дисков дрозофилы. Продукты гена *dlg* могут участвовать в cGMP-опосредованном процессе сигнальной трансдукции, вовлеченном в контроль пролиферации эпителиальных клеток и происходящем у септальных сочленений, или же участвовать в регуляции GTP-связывающих белков, в частности $p21^{ras}$ [9, 10].

Модель действия гена *dlg*, предложенная Брайантом и Вудом, предполагает, что влияние мутаций в гене *dlg* на клеточную пролиферацию связано с их потенциальным влиянием на уровни содержания GDP и GTP, которые, как известно, контролируют активность белка $p21^{ras}$, вовлеченного в процесс контроля пролиферации [9]. У *dlg*-мутантов уровень GDP может быть снижен, по крайней мере в районе септальных сочленений. Это, в свою очередь, может приводить к уменьшению нагрузки $p21^{ras}$ молекулами GDP и, возможно, к увеличенной его нагрузке молекулами GTP, поступающими из других клеточных источников независимо от локального процесса его ресинтеза. Известно, что рецессивные мутации в гене *awd* дрозофилы, кодирующем нуклеозиддифосфаткиназу, вызывают недоразвитие ее имагинальных дисков [11]. Это может быть объяснено тем, что в случае мутаций в гене *awd* уровень GDP может возрастать, в то время как уровень GTP — уменьшаться. Таким образом, по крайней мере в районе септальных сочленений соотношение уровней GTP : GDP должно быть

высоким в случае *dlg*-мутантов и низким в случае *awd*-мутантов. Так как $p21^{ras}$ активируется при высоком соотношении GTP:GDP, этим можно объяснить избыточную клеточную пролиферацию у *dlg*-мутантов и недостаточную пролиферацию у *awd*-мутантов.

Недавно у человека и крысы были обнаружены белки с неизвестной пока функцией, являющиеся структурными аналогами *dlg*-А. Это основной пальмитилированный мембранный белок из эритроцитов человека *p55* [24] и синапс-ассоциированный белок *SAP90* из мозжечка крысы [25]. Сравнение аминокислотных последовательностей *SAP90*, *dlg*-А и *p55* в области гуанилаткиназных доменов представлено на рис. 6. Полагают, что возможные функции *p55* и *SAP90* также связаны с GTP- или cGMP-регулируемыми процессами сигнальной трансдукции [9, 25].

Однако следует сказать, что ни для одного из этих белков не было показано наличие гуанилаткиназной активности. Кроме того, участки *dlg*-А, *p55* и *SAP90*, подобные гуанилаткиназе, не содержат целого АТР-связывающего Gly-участка. В связи с этим представляет большой интерес изучение наличия ферментативной активности у фоторецепторной гуанилаткиназы с прерванной Gly-последовательностью. Также было бы интересно узнать, связаны ли какие-либо дисфункции фоторецепторных клеток с нарушением функции гуанилаткиназы.

Наличие кДНК и эффективной экспрессирующей системы вместе с данными по пространственной структуре дрожжевого фермента [15, 16] делает в настоящее время возможными дальнейшие структурно-функциональные исследования гуанилаткиназы с использованием молекулярно-биологических и биофизических методов.

Экспериментальная часть

В работе использовали: акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, персульфат аммония, N,N,N',N'-тетраметилендиамин, додецилсульфат натрия (SDS), β -меркаптоэтанол, набор белков для электрофореза (LMW-Kit) (Bio-Rad, США); ацетонитрил (артикул 30), трис(гидроксиметил)аминометан (Merck, ФРГ); изопропил- β -D-тиогаляктопиранозид (IPTG), Na_2 -EDTA, ампициллин (Serva, ФРГ); кумасси R-250 (Sigma, США); N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновая кислота) (HEPES; Fluka, Швейцария); $MgCl_2$, трипсин (Serva, ФРГ); триптон, дрожжевой экстракт, агар (Difco, США); Blue-сефарозу CL-6B, IgG-сефарозу 6FF, аденозинтрифосфат (АТР) (Pharmacia, Швеция); эндонуклеазы рестрикции *EcoRI*, *StuI*, *HindIII*, *XmaI*, *PstI*, *StuI*, *NcoI*, ДНК-лигазу фага T4, полинуклеотидкиназу фага T4, щелочную фосфатазу из *E. coli* (BAP) и кишечника теленка (CIP), фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, 5'-гуанозинмонофосфат (GMP), пируваткиназу, лактатдегидрогеназу, фосфоенолпируват, никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (NADH) (Boehringer Mannheim, ФРГ). Все остальные реагенты имели квалификацию ос.ч.

Спектрофотометрическое определение активности гуанилаткиназы. Активность гуанилаткиназы определяли методом, предложенным Агарвалом и др. [13]. Состав реакционной смеси (конечный объем 1 мл): 50 мМ трис-HCl (pH 8,0), 250 мМ KCl, 10 мМ $MgCl_2$, 1,5 мМ фосфоенолпируват, 2 мМ АТР, 0,25 мМ NADH, 2,5 ед. акт. пируваткиназы, 3,3 ед. акт. лактатдегидрогеназы. Реакционную смесь инкубировали при 30° С. После добавления GMP до концентрации 1 мМ и образца регистрировали уменьшение поглощения реакционной смеси при 340 нм на спектрофотометре Jasco Model 7850 (Япония) в течение 5—10 мин. Грубые фракции анализировались дважды; второе измерение проводили без добавления GMP для определения фонового падения поглощения за счет интерферирующих реакций. За 1 ед. акт. фермента принимали количество белка, катализирующее образование 1 мкмоль GDP в 1 мин (что соответствует окислению 2 мкмоль NADH).

Выделение гуанилаткиназы из сетчатки быка. 100 размороженных сетчаток быка при темном красном свете суспендировали в 150 мл буфера А для экстракции

растворимых белков сетчатки (10 мМ (Na, K, H)PO₄, pH 7,6; 0,2 мМ MgCl₂; 0,2 мМ EGTA; 0,2 мМ PMSF; 0,02% NaN₃) и перемешивали 30 мин при 4° С. Затем добавлялись NaCl и MgCl₂ до конечной концентрации 150 и 4 мМ соответственно и продолжали перемешивание еще 30 мин. После этого центрифугировали суспензию (2×20 мин) при 20 000 об/мин для полного удаления мембранного материала. Далее всю работу проводили на свету. К супернатанту добавляли насыщенный раствор сульфата аммония до его конечной концентрации 50%. Полученную суспензию перемешивали 2 ч при 4° С и затем центрифугировали. К отобранному супернатанту опять добавляли насыщенный раствор сульфата аммония до конечной концентрации 75% и перемешивали в течение ночи при 4° С. После центрифугирования осадок растворяли в 20 мл буфера А и полученный раствор центрифугировали (100 000g, 1 ч). Затем образец порциями по 3 мл наносили на колонку для гель-фильтрации TSK-G3000SW, уравновешенную буфером, содержащим 20 мМ (Na, K, H)PO₄, pH 7,6, и 0,02% NaN₃ (рис. 1).

Фракции, проявляющие гуанилаткиназную активность, объединяли, добавляли насыщенный раствор сульфата аммония до конечной концентрации 75%. Полученный в результате последующего центрифугирования осадок растворяли в 12 мл буфера 20 мМ трис-HCl, pH 8,0. Образец очищали от остатков сульфата аммония на колонке PD-10 (Pharmacia, Швеция). Полученный образец хроматографировали на колонке для анионообменной хроматографии Mono Q HR10/10 (Pharmacia) на хроматографе FPLC-System (Pharmacia). Колонка была уравновешена в 10 мМ трис-HCl, pH 8,0.

Белок элюировали в градиенте концентрации NaCl (0—500 мМ) в том же буфере (рис. 2). Активные фракции объединяли, разбавляли в 5 раз водой и наносили на колонку (1,5×6 см) для аффинной хроматографии с Blue-сефарозой CL-6B (Pharmacia), уравновешенную буфером С (2 мМ HEPES, pH 7,0). Затем колонку промывали пятью объемами буфера Р (10 мМ HEPES, pH 7,0; 1 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl). Элюцию гуанилаткиназы осуществляли буфером Р, содержащим 1 мМ АТФ. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [26]; SDS-электрофорез по Леммли проводили согласно [27].

Расщепление белка трипсином и выделение полученных пептидов. Расщепление 10 нмоль гуанилаткиназы трипсином проводили в течение ночи при 37° С в буфере 100 мМ NH₄HCO₃ (pH 7,7), 1 мМ дитиотреит при отношении фермент — белок 1:30 (по весу). Пептиды разделяли методом ВЭЖХ на колонках с обращенной фазой Zorbax C18 на хроматографе Altex, модель 332 (Altex, США) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0—80%) в 0,1% трифторуксусной кислоте.

Клонирование и определение нуклеотидной последовательности кДНК гуанилаткиназы. Все операции с банком кДНК в векторе λ-ZAP проводили в соответствии с рекомендациями изготовителя [28]. Работу с ДНК осуществляли стандартными методами [29]. Нуклеотидную последовательность определяли по методу Сэнгера с использованием набора Sequenase version 2,0 (USB, США) на двухцепочечной матрице, руководствуясь рекомендациями изготовителя.

Экспрессия гена гуанилаткиназы в E. coli. Для экспрессии гена гуанилаткиназы в *E. coli* применялась система, описанная в работах [20, 21]. Для введения сайта рестрикции NcoI в область иницирующего кодона кДНК гуанилаткиназы использовался сайт-направленный мутагенез. Мутагенез проводили по методу, описанному в работе [22] (см. рис. 7). Полученную мутантную плазмиду pBL8M подвергали рестрикции по сайтам EcoRI и NcoI. Лигирование выделенного фрагмента кДНК с вектором pL2P26 (NcoI — EcoRI), описанным в работе [20], позволило получить плазмиду pL2GUK (рис. 8). Для получения химерного белка плазмиду pL2GUK трансформировали в *E. coli* (штамм MH-1) и единичной колонией заражали 5 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина. Культуру выращивали в течение ночи при 37° С. Ночную культуру (50—100 мкл) переносили в 200 мл среды LB с ампициллином (50 мкг/мл) и выращивали при 37° С и

интенсивной аэрации, пока оптическое поглощение A_{600} не достигало 0,8—1,0. Затем добавляли индуктор *lac*-оперона IPTG до 1 mM и инкубировали 3 ч при тех же условиях. Затем температуру повышали до 42° C и продолжали инкубацию в течение ночи. Клетки осаждали центрифугированием и супернатант использовали для выделения химерного белка.

Очистка химерного белка. К супернатанту добавляли концентрированную HCl до pH 7,4 и наносили его при скорости потока 3 мл/мин на колонку (2,5×3 см) с IgG-сефарозой 6FF. IgG-сефарозу 6FF предварительно обрабатывали согласно инструкции производителя. Химерный белок элюировали при той же скорости потока 0,5 M ацетатом аммония, pH 3,4, путем диализа переводили в 10 mM трис-HCl, pH 7,0, и наносили на колонку с Blue-сефарозой CL-6B, уравновешенную в 1 mM HEPES (pH 7,0) с 1 mM MgCl₂. Химерный белок элюировали тем же буфером, содержащим 1 M NaCl.

Расщепление химерного белка энтеропептидазой и выделение рекомбинантного фермента. Фракции с очищенным химерным белком диализовали против 20 mM трис-HCl, pH 8,0, добавляли энтеропептидазу до молярного соотношения химерный белок — энтеропептидаза 60:1 и инкубировали 10 ч при 37° C. Экспрессированную гуанилаткиназу, полученную после расщепления химерного белка, очищали от фрагмента белка А аффинной хроматографией на IgG-сефарозе 6FF при указанных выше условиях.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института биоорганической химии РАН (Москва): канд. хим. наук Б. Е. Шмуклеру за предоставление плазмиды pL2P26 и ценные практические советы; канд. хим. наук Е. Н. Чертовой за помощь в секвенировании пептидов; канд. хим. наук Н. С. Быстрову за синтез олигонуклеотидных зондов; канд. хим. наук А. Г. Михайловой за предоставление энтеропептидазы, а также проф. М. Апплберри (Department of Ophthalmology, University of Chicago, USA) за предоставленную библиотеку кДНК из сетчатки быка в бактериофаге λ -ZAP.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fesenko E. E., Kolesnikov S. S., Lubarsky A. L.//Nature. 1985. V. 313. № 6000. P. 310—313.
2. Miller W. H.//Current Topics in Membranes and Transport. 1981. V. 15. P. 441—446.
3. Liebman P. A., Park K. R., Dratz E. A.//Annu. Rev. Physiol. 1987. V. 49. P. 775—791.
4. Stryer L.//J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 17. P. 10711—10714.
5. Hall S. W., Kuhn H.//Eur. J. Biochem. 1986. V. 161. № 3. P. 551—556.
6. Fleischmann D., Denisevich M.//Biochemistry. 1979. V. 18. № 23. P. 5060—5066.
7. Koch K. W.//Trends Biochem. Sci. 1992. V. 17. № 8. P. 307—311.
8. Boume H. R., Sanders D. A., McCormick F.//Nature. 1990. V. 348. № 6297. P. 125—132.
9. Woods D. F., Bryant P. J.//Cell. 1991. V. 66. № 3. P. 451—454.
10. Bryant P. J., Woods D. F.//Cell. 1992. V. 68. № 3. P. 621—622.
11. Steeg P. S., Bevilacqua G., Kopper L.//J. Nat. Cancer Inst. 1988. V. 80. № 3. P. 200—204.
12. Berger S. J., Devries G. W., Carter J. G., Schultz D., Passonneau P. N., Lowry O. H., Fercudelli J. A.//J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 6. P. 3128—3133.
13. Agarwal K. C., Miech R. P., Parks R. E.//Meth. Enzymol. 1978. V. 51. P. 483—490.
14. Berger A., Schiltz E., Schulz G. E.//Eur. J. Biochem. 1989. V. 184. № 2. P. 433—443.
15. Konrad M.//J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 25652—25655.
16. Stehle T., Schulz G. E.//J. Mol. Biol. 1992. V. 224. № 36. P. 1127—1141.
17. Egner U., Tomasselli A. G., Schulz G. E.//J. Mol. Biol. 1987. V. 195. № 3. P. 649—658.
18. Lipman D. J., Person W. R.//Stence. 1985. V. 227. № 4693. P. 1435—1441.
19. Schulz G. E.//Curr. Opin. Struct. Biol. 1992. V. 2. P. 61—67.
20. Кутузов М. А., Шмуклер Б. Е., Сулов О. Н., Заргаров А. А., Абдулаев Н. Г.//Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. № 12. С. 623—634.
21. Ефимов В. А., Бурякова А. А., Полушин Н. Н., Пашкова И. Н., Дмитракова Е. В., Чахмахчева О. Г.//Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 499—507.
22. Foss K., McClain W. H.//Gene. 1987. V. 59. № 3. P. 285—290.

23. Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Филиппов С. А., Чувпило С. А., Коробко В. Г., Воротынцева Т. Н., Бессмертная Л. Я., Михайлова А. Г., Америк А. Ю., Антонов В. К. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 119—121.
24. Ruff P., Speicher D. W., Husain-Chishti A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 15. P. 6595—6599.
25. Kistner U., Wenzel R. M., Veh R. W., Cases-Langhoff C., Garner A. M., Appeltauer U., Voss B., Gundelfinger E. D., Garner C. C. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 7. P. 4580—4583.
26. Bradford M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1. P. 248—254.
27. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
28. Short J. M., Fernandez J. M., Sorge J. A., Huse W. D. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 15. P. 7583—7599.
29. Маниатис Е., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.

Поступила в редакцию
29.VII.1993

После доработки
16.XI.1993

I. O. Gaidarov, O. N. Suslov, T. V. Ovchinnikova, N. G. Abdulaev

**GUANYLATE KINASE FROM BOVINE RETINA:
PURIFICATION, PRIMARY STRUCTURE AND EXPRESSION
IN *E. coli***

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

Guanylate kinase (EC 2.7.4.8), catalysing the reaction $GMP + ATP = GDP + ADP$, was purified to homogeneity from bovine retina. Primary structure of the enzyme was determined by parallel analyses of amino acid sequences of its peptides and nucleotide sequence of the corresponding cDNA. It is shown that the bovine retinal guanylate kinase like the analogous enzyme from yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains a characteristic glycine-rich motif, involved in ATP binding. All of the amino acids, involved in GMP binding in the yeast enzyme, are conserved or conservatively substituted in the bovine retinal guanylate kinase. The bovine retinal enzyme was expressed in *E. coli* as a fusion protein. Data are presented on the purification of the fusion protein, its digestion by enteropeptidase, purification of the recombinant enzyme and its functional characteristics.