



УДК 577.112.5

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ GTP-аза СЕМЕЙСТВА *gas* ИЗ СЕТЧАТКИ БЫКА. СТРУКТУРА КДНК И ЕЕ ЭКСПРЕССИЯ В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ

© 1996 г. В. М. Петров[#], С. В. Ткачук, В. М. ЛипкинИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 02.04.96 г.

Из библиотеки кДНК сетчатки быка выделена кДНК, высокоомологичная гену *gas*-подобного белка *gas1* из клеток линии HL-60 человека. Степень гомологии нуклеотидных и аминокислотных последовательностей составила соответственно 90 и 98%. Продукт экспрессии кДНК в клетках *E. coli*, очищенный хроматографически, проявлял GTP-связывающую и GTP-азную активности. Полученные данные позволяют предположить, что белок *gas1* является одним из низкомолекулярных GTP-связывающих белков в фоторецепторных мембранах позвоночных.

Ключевые слова: GTP-связывающие белки, *gas*-подобные белки, экспрессия в *E. coli*.

Значительное количество процессов в эукариотических клетках регулируется белками, способными связывать и гидролизовать GTP. Обширную группу составляют так называемые G-белки – гетеротримерные GTP-азы, которые опосредуют передачу сигнала с рецепторов на эффекторные белки. Эффекторами в различных клетках служат аденилатциклаза, фосфолипаза C, сGMP-зависимая фосфодиэстераза или ионные каналы [1]. Кроме G-белков в клетке присутствуют так называемые низкомолекулярные GTP-азы – мономерные белки с молекулярной массой 20–29 кДа, которые выполняют различные регуляторные функции.

К настоящему времени обнаружено более 50 низкомолекулярных GTP-аз, которые объединены в суперсемейство *gas*-подобных белков в связи со структурной гомологией с онкобелком *gas*. Это суперсемейство включает белки семейств *gas*, *rho*, *rap*, *arf*, *sag* и *gab* млекопитающих, а также высокоомологичные им SEC4- и YPT1-белки из дрожжей [2]. Все *gas*-подобные белки структурно и биохимически сходны между собой и с α -субъединицей G-белков. Их биологическая активность регулируется переходом из неактивного GDP-связанного состояния в активное GTP-связанное с последующим гидролизом GTP и возвращением в исходное состояние. Цикличность этих переходов регулируется тремя классами белков: активаторами GTP-азы (GAP), ингибиторами диссоциации GDP (GDI) и активаторами обмена GDP/GTP

(GDS) [3, 4]. Последние два типа регуляторных белков способны также модулировать взаимодействие низкомолекулярных GTP-аз с мембраной [5]. *gas*-Подобные белки принимают участие в регуляции многих клеточных процессов, таких, как клеточный рост, дифференцировка, организация цитоскелета, передача трансмембранного сигнала, везикулярный транспорт и секреция [6, 7].

Семейство *rho* включает в себя семейства *rho*, *gas* и *Cdc42*. Эти белки обнаруживают значительную структурную гомологию между собой, а также в отличие от других *gas*-подобных белков способны ADP-рибозилироваться экзоэнзимом С3 из *Clostridium botulinum* и С3-подобными трансферазами эукариот [8]. Такая модификация может ингибировать взаимодействие GTP-азы с эффекторным белком или препятствовать ее активации GAP. Кроме того, недавно [8] было показано, что все *rho*-подобные белки моногликозилируются токсинами А и В из *Clostridium difficile*, что приводит к потере ими способности ADP-рибозилироваться, а также взаимодействовать с GAP и, возможно, с эффекторным белком. Различные представители семейств *rho* (*rhoA*, *rhoB*, *rhoC*, *rhoG*) и *gas* (*gas1*, *gas2*, G25P, TC10) были обнаружены в тканях млекопитающих [9–13], а также в дрожжах (CDC42) и растениях (*rho1PS*) [14]. Однако биологическая роль их пока не вполне ясна. В последнее время получены данные, свидетельствующие о том, что *rho*-белки участвуют в организации цитоскелета при передаче трансмембранного сигнала через фосфоинозитол-3-киназу, фосфоинозитол-4,5-киназу и фосфолипазу D [8, 15]. Известно, что

[#] Автор для переписки.

белки *gas1* и *gas2* также принимают участие в формировании внутриклеточной архитектуры, причем было показано, что они взаимодействуют с *gas*- и *rho*-белками и такое взаимодействие носит иерархический характер [16]. Кроме того, в некоторых клетках *gas*-белки регулируют активность NADH-оксидазы и, возможно, фосфолипазы A2 [17]. При исследовании роли *gas*-белков в передаче трансмембранного сигнала в клетках мозга млекопитающих обнаружена серин/треонин-протеинкиназа, с которой взаимодействуют белки *gas1* и CDC42 [18]. Результатом взаимодействия является автофосфорилирование протеинкиназы с переходом ее в активную форму. Кроме того, недавно было показано, что GTP-азы *gas1* и CDC42H участвуют в активации протеинкиназы JNK (c-Jun N-terminal Kinase), которая относится к семейству MAPK-подобных киназ [18]. Известно, что MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) активируется *gas*-белком при действии на клетку различных митогенов, что приводит к активации важных клеточных процессов, включая клеточный рост и дифференцировку. Тот факт, что *gas*-белки (возможно, при участии *rho*-белков) принимают участие в активации MAPK-подобной протеинкиназы, позволяет предположить непосредственное их участие в передаче трансмембранных сигналов и регуляции ключевых процессов в клетке.

Возможное участие *rho*- и *gas*-белков в передаче светового сигнала было показано при исследовании низкомолекулярных GTP-аз в фоторецепторных отделах зрительных клеток быка и кальмара. В фоторецепторных мембранах позвоночных и беспозвоночных было обнаружено несколько низкомолекулярных GTP-связывающих белков, два из которых (*M* 22–24 кДа) ADP-рибозилируются экзоэнзимом С3, что позволяет предположить их принадлежность к семейству *rho* или *gas* [19–22]. Было установлено, что степень ADP-рибозилирования этих белков меняется светозависимым образом подобно изменению степени ADP-рибозилирования трансдуцина при его взаимодействии с фотоактивированным родопсином [19]. Кроме того, нами было показано, что эти субстраты С3 взаимодействуют с фотоактивированным родопсином и у позвоночных и у беспозвоночных [20–22]. Таким образом, появились основания предполагать, что низкомолекулярные GTP-азы семейств *rho* или *gas* каким-то образом участвуют в передаче зрительного сигнала у позвоночных и беспозвоночных.

Данная работа посвящена поиску кДНК белка семейств *gas* в библиотеке кДНК из сетчатки быка, определению ее структуры, а также ее экспрессии в прокариотической системе и биохимической характеристике продукта экспрессии.

Для поиска кДНК *gas*-белка в библиотеке кДНК из сетчатки быка мы использовали олигонуклеотиды

5' CAGGCCATCAAGTGTGTGGTGGTGGG (R1) и

5' TCGCATTTTCTCTTCCCTCTTCTTCACGGGAGG (R2),

специфические для кДНК *rac1* и *rac2* из клеток промиелоцитарной линии HL-60 [23] (рис. 1). С использованием праймеров R1 и R2 кДНК сетчатки быка была амплифицирована методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Величина основного продукта амплификации составила около 600 п.о., что соответствует длине полноразмерного гена *rac*. Фрагмент был клонирован в вектор pBluescript SK, и определение его нуклеотидной последовательности проводили в двух направлениях. Проанализированный фрагмент состоял из 564 п.о., кодирующих 188 аминокислот, что соответствует полипептиду с *M* 21.1 кДа.

Компьютерный анализ базы данных Gen Bank показал, что данная кДНК высокогомологична кДНК *gas*-белков из клеток HL-60 человека (рис. 1). Степень гомологии нуклеотидных последовательностей составила соответственно 90 и 83% с кДНК *rac1* и *rac2*. Соответствующая аминокислотная последовательность имела большую гомологию с белком *gas1* (98%), чем с *gas2* (90%). Как видно из рис. 2, *gas1*-белок из сетчатки быка отличается от *gas1* человека на четыре аминокислотных остатка в положениях 109, 152, 153, 175. Однако эти изменения не затрагивают функционально важные регионы, участвующие в связывании и гидролизе GTP, а также во взаимодействии с регуляторными белками. Например, фрагменты GXXXXGK(S/T) и DTAGQE, взаимодействующие с фосфатными группами GTP [24], занимают положения 10–17 и 57–62. Последовательность TKXD (115–118) также консервативна для всех *gas*-белков. Этот участок полипептидной цепи, как известно, служит для увеличения скорости обмена нуклеотидов [25]. Аминокислотные остатки 156–159 (последовательность EXSA), предположительно играющие роль в связывании и диссоциации гуанилового основания [24], консервативны для *gas*- и *gas*-белков. И наконец, эффекторный домен TVFDNY (35–40), участвующий во взаимодействии с GAP-белком [24], высокогомологичен эффекторному участку *rho*-белков, но отличается от соответствующего участка белка *gas*. При использовании зонда R2, специфичного только для *rac*-кДНК, в реакции ПЦР не синтезировались 9 п.о., кодирующих три С-концевых аминокислотных остатка. Однако известно, что С-концевой фрагмент ААХ-ОН (где А – любой алифатический, Х – любой аминокислотный остаток) консервативен для различных *gas*-подобных белков и участвует в их посттрансляционном ацилировании. По гомологии с белком *gas1* человека мы предположили, что *gas*-белок из сетчатки



Рис. 1. Структуры *rac*-кДНК из библиотеки кДНК сетчатки быка (верхняя строка) и *rac1*-кДНК из клеток HL-60 (нижняя строка). Подчеркнуты зонды, использованные для ПЦР. Звездочками отмечены различающиеся нуклеотиды.

быка имеет С-концевую аминокислотную последовательность LLL-ОН.

Ранее было показано, что в мембранах фоторецепторных клеток быка присутствуют белки с *M* 22–24 кДа, которые в присутствии NAD^+ ADP-рибозилируются ADP-рибозилтрансферазой С3 из *C. botulinum*, что характерно для белков семейства rho и *gas* [19, 21]. Таким образом, можно предположить, что один из них (*M* 22 кДа) является белком *gas1*, кДНК которого была обнаружена нами в библиотеке кДНК сетчатки.

Поскольку *gas*-белок из сетчатки быка обладал высокой гомологией с ранее описанным белком *gas1* человека, ожидалось, что продукт экспрессии *rac* ДНК в клетках *E. coli* будет проявлять GTP-связывающую и GTP-азную активности подобно некоторым другим рекомбинантным *gas*-

подобным белкам. В разное время различные представители суперсемейства *gas* (*rho* из *Aplysia californica* [26], G25K [13], *gas* [27] и др.) были получены в клетках *E. coli* как в виде отдельного полипептида, так и в составе химерного белка. Несмотря на то что продукты экспрессии не подвергались посттрансляционному ацилированию в прокариотической системе, белки обладали способностью связывать GDP и GTP, гидролизовать GTP, а также взаимодействовать с белками, регулирующими GDP/GTP-обмен и скорость гидролиза GTP. Мы клонировали продукт ПЦР (600 п.о.) в векторе pIN821 для последующей его экспрессии в клетках *E. coli* в виде химерного белка MBP/*gas*. Этот экспрессирующий вектор был выбран нами, поскольку, по данным предварительных экспериментов, уровень экспрессии в клетках *E. coli* был

```

BO-rac1 *****
HU-rac1 MQAIKCVVVG DGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPVNGLGLWDTAGQ
HU-rac2 *****S*****
          10^      20^      30^      40^      50^      60^

BO-rac1 *****H*****
HU-rac1 EDYDRLRPLSYPQTDVFLICFSLVSPASYENVRAKWFPEVRHHC PSTPIILVGTKL DLRDD
HU-rac2 *****F*****N*****
          70^      80^      90^      100^      110^      120^

BO-rac1 *****AE*****T*****
HU-rac1 KDTIEKLEKELTPITYPQGLAMAKEIGAVKYLECSALTQRGLKTVFDEAIRAVLCPPPVK
HU-rac2 *****A*****L*****DS*****Q*TR
          130^      140^      150^      160^      170^      180^

BO-rac1 *****
HU-rac1 KRKRKCLLL
HU-rac2 QQ**A*S**
          190^

```

Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей белка гас из сетчатки быка (BO-rac1) и белков гас1 и гас2 из клеток HL-60 человека (HU-rac1 и HU-rac2). Поиск гомологичных последовательностей в базе данных Swiss-Prot 31 проводили при помощи программы FASTA. Идентичные аминокислотные остатки обозначены звездочками.

высоким, а последующее выделение в один-два этапа позволяло получить этот белок в высокоочищенном состоянии с высоким выходом. В индуцированных клетках *E. coli* синтезировался полипептид с M 65 кДа (рис. 3), причем в контрольном эксперименте молекулярная масса синтезированного полипептида составила 43 кДа (фрагмент мальтозосвязывающего белка МВР). Следует отметить высокий уровень экспрессии при использовании данной конструкции – в 1 мл клеточной суспензии содержалось более 100 мкг химерного белка, который присутствовал практически пол-

ностью в цитоплазматической фракции и не агрегировал в тела включения (данные не приведены).

Продукт экспрессии выделяли из клеточного гомогената в аналитическом варианте на сорбенте с иммобилизованной амилозой. В препаративном варианте белки цитоплазмы разделяли на колонке с DEAE-Toyopearl, после чего фракции, содержащие химерный белок, дополнительно очищали на амилозном сорбенте. Таким образом, химерный белок был получен в высокоочищенном состоянии. Белок гас отделяли от мальтозосвязывающего фрагмента, добавляя фактор Ха, который

специфически расщеплял связь R-Q в последовательности IEGRQ (Q является N-концевым аминокислотным остатком белка *gas*).

Как показал электрофоретический анализ (рис. 3), в результате протеолиза образуются два полипептида с *M* 43 и 22 кДа, что соответствует величинам мальтозосвязывающего фрагмента и *gas*-белка. Кроме того, N-концевая аминокислотная последовательность полипептида с *M* 22 кДа (QAICK) была идентична N-концевой последовательности белка *gas1*.

Для выявления GTP-связывающей активности химерный белок и *gas*-белок инкубировали в присутствии $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ в растворах с Mg^{2+} и без Mg^{2+} . Как было показано ранее, около 80% *gas*-белка присутствует после экспрессии в клетках *E. coli* в GDP-связанной форме [28], причем в присутствии Mg^{2+} комплекс *gas*-GDP стабилен и скорость GDP/GTP-обмена низка ($\tau_{1/2} \sim 20$ мин). Однако в отсутствие Mg или при его низких концентрациях (0.5 мкМ) скорость обмена резко возрастает ($\tau_{1/2} \sim 30$ с). В присутствии Mg^{2+} рекомбинантный *gas*-белок связывал $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ как в свободном виде, так и в составе химерного белка (рис. 4), причем скорость обмена GDP/ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ у *gas*-белка была выше. При добавлении в инкубационную среду избытка EDTA время обмена GDP на GTP значительно уменьшилось, и уже через 1 мин количество связанного $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ приблизительно равнялось количеству добавленного *gas*-белка (данные не приведены).

Другой важной характеристикой *gas*-подобных белков является способность гидролизовать GTP, причем скорость гидролиза GTP влияет на время жизни функционально активной GTP-связанной формы белка. По сравнению с G-белками скорость гидролиза GTP *gas*-подобными белками невелика (0.002–0.005 моль/мин). Исключение составляют белки семейства *gas1*, GTP-азная активность которых примерно в 100 раз выше [29]. Мы измеряли GTP-азную активность рекомбинантного *gas*-белка и химерного белка по уменьшению их количества в $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ -связанной форме в процессе инкубации. Оба белка обладали примерно одинаковой GTP-азной активностью, т.е. мальтозосвязывающий фрагмент химерного белка не влиял на скорость гидролиза GTP *gas*-белком (рис. 5). Способность белка *gas1* эффективно связывать и гидролизовать GTP была также показана при его экспрессии в составе белка глутатион-S-трансфераза/*gas1* в клетках *E. coli* [30]. Кроме того, GTP-азная активность этого белка усиливалась в присутствии *n*-химерина, который является GAP-белком для rho- и *gas*-белков [30]. Следовательно, низкомолекулярные GTP-азы в составе различных химерных белков могут активно использоваться при исследовании внутриклеточных процессов, протекающих с участием

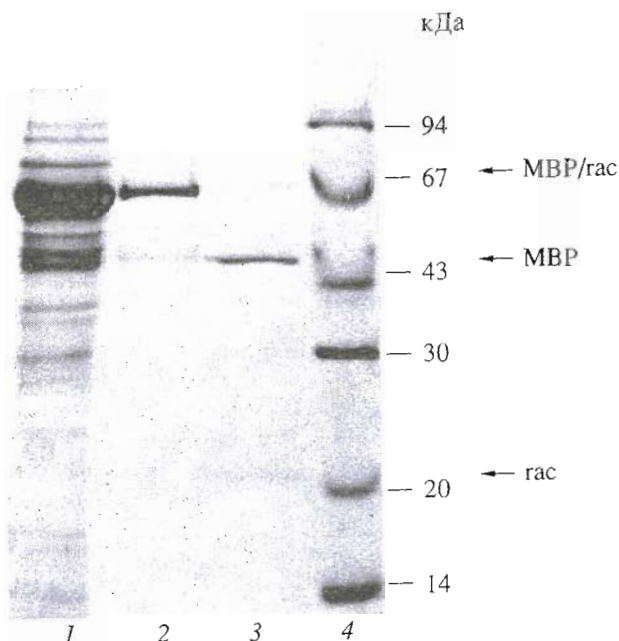


Рис. 3. Электрофоретический анализ продуктов экспрессии *gas*-кДНК быка в клетках *E. coli* на разных стадиях очистки. *gas*-кДНК из сетчатки экспрессировали в клетках *E. coli* и продукт экспрессии выделяли из клеточного лизата, как описано в "Экспериментальной части". Приведены данные электрофореза в 12% ПААГ. 1 – клеточный лизат *E. coli*, содержащий белок MBP/*gas* (цитоплазматическая фракция), 2 – MBP/*gas* после очистки на DEAE-Toyopearl, 3 – MBP/*gas* после протеолиза фактором Ха, 4 – белковые стандарты молекулярных весов (LMW, Pharmacia).

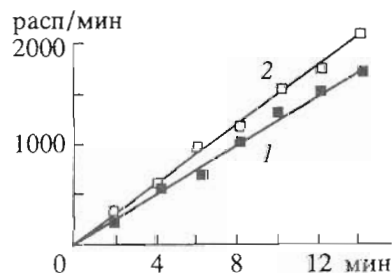


Рис. 4. GTP-связывающая активность MBP/*gas*- (1) и *gas*-белков (2) после экспрессии в клетках *E. coli*. По оси ординат – количество $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, связанной с белком; измеряли после фильтрования на нитроцеллюлозной мембране через определенные промежуточные времени. Приведены усредненные данные двух экспериментов.

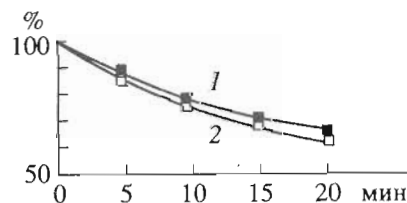


Рис. 5. GTP-азная активность рекомбинантных MBP/*gas*- (1) и *gas*-белков (2). По оси ординат – остаточное количество $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, связанного с белком. Приведены усредненные данные двух экспериментов.

gas-подобных белков. А способность химерных белков связываться с различными аффинными сорбентами может служить дополнительным инструментом при поиске и изучении белков, взаимодействующих с низкомолекулярными GTP-азами.

Таким образом, в библиотеке кДНК из сетчатки быка нами обнаружена кДНК, высокоомологичная гену белка *gas1* из клеток линии HL-60 и соответствующая полипептиду с *M* 21.1 кДа, также высокоомологичному белку *gas1*. Эти данные позволяют предположить, что один из субстратов ADP-рибозилтрансферазы С3 (*M* 22 кДа), обнаруженный нами ранее в мембранах фоторецепторных клеток позвоночных и беспозвоночных [21], является белком *gas1*. Продукт экспрессии *gas*-ДНК в клетках *E. coli* (*M* 22 кДа) проявлял способность связывать и гидролизовать GTP, что позволяет использовать его при исследовании роли низкомолекулярных GTP-аз в зрительном процессе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались

реактивы: бактотриптон, дрожжевой экстракт, бактоагар (Difco), KCl, MgCl₂, MgSO₄, CaCl₂, MnCl₂, формальдегид, формамид, глюкоза (Merck), SDS, Твин-20, Тритон-X100 (Bio-Rad), трис, поливинилпирролидон, БСА, диэтилпирикарбонат, лаурилсаркозин (ICN), EDTA, β-меркаптоэтанол, IPTG (Serva), oligo(dT)-целлюлоза, (dT)₁₂₋₁₈, "рассеянная" затравка, дезоксирибонуклеозид- и дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты (Pharmacia), гуанидинизотиоцианат, MOPS (Fluka), глицерин (Gibco BRL), мочевины, дитиотреит (USB), агароза SeaKem (FMC), 3,3'-диаминобензидин, ампициллин, тетрациклин (Sigma), кумасси R250, Ponceau S (BDH);

радиоактивные препараты (Обнинск): [γ -³²P]ATP (5000 Ки/ммоль), [α -³²P]dATP (3000 Ки/ммоль), [α -³²P]GTP (3000 Ки/ммоль), [γ -³²P]GTP (5000 Ки/ммоль);

рестриктазы производства Fermentas, Bio-Labs, Stratagene;

ферменты для синтеза кДНК (USB); T4-ДНК-лигаза, щелочная фосфатаза, T4-полинуклеотидкиназа, Taq-ДНК-полимераза (Perkin-Elmer); T7-ДНК-полимераза (секвенза 2.0), лизоцим, РНКаза А (USB), а также реактивы отечественного производства, имеющие квалификацию ос. ч. или ч. д. а.

Клонирование *gas*-кДНК из сетчатки быка

Тотальную РНК из сетчатки быка выделяли по стандартной методике, разработанной для выделения интактной РНК из тканей, богатых рибонуклеазами [31]. Полиаденилированные РНК вы-

деляли при помощи аффинной хроматографии на олиго(dT)-целлюлозе [32].

Синтез первой цепи кДНК и проведение ПЦР. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 0.1 М трис-НСl (рН 8.3), 0.14 М KCl, 0.01 М MgCl₂, 0.025 М β-меркаптоэтанол, по 1 ммоль каждого из dNTP, 1.6 мкг oligo(dT) либо 300 нг рассеянной затравки, 1 мкг poly(A)⁺-РНК и 20 ед. акт. обратной транскриптазы. Смесь инкубировали 1 ч при 42°C. Аналитический эксперимент проводили аналогично, но с использованием 4 пМ [α -³²P]dATP для последующего контроля эффективности синтеза и определения длины синтезированных продуктов электрофорезом в формальдегид-агарозном геле.

Полученную первую цепь кДНК использовали как матрицу для проведения ПЦР. Амплификацию осуществляли в 100 мкл буфера (50 мМ KCl, 10 мМ трис-НСl (рН 8.3), 1.5 мМ MgCl₂, 0.001% желатин, 200 мкМ dNTP, 1 мкМ праймеры R1 и R2, 2 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы) в течение 35 циклов в следующем режиме: денатурация – 94°C, 1 мин; отжиг праймеров – 60°C, 1 мин; полимеризация – 72°C, 2 мин. ПЦР проводили на амплификаторе DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer, США) с применением "горячего" старта.

Клонирование и определение структуры кДНК

Продукты ПЦР наносили на 2% агарозный гель и после проведения электрофореза выделяли фрагмент ДНК (около 600 п.о.), используя набор GeneClean фирмы Bio101 по методике, рекомендованной изготовителем. Для удаления 5'-концевого нуклеотида и фосфорилирования ДНК обрабатывали полинуклеотидкиназой фага T4 и фрагментом Кленова по стандартной методике [33]. Полученную ДНК клонировали в вектор pBlue-script SK (Stratagene), предварительно обработанный рестриктазой *Sma*I и дефосфорилированной бактериальной щелочной фосфатазой. Структуру клонированного фрагмента определяли по методу Сенгера [34] с помощью набора Sequenase version 2 фирмы USB. В качестве затравок использовали праймеры: M13 (-20), обратный M13, R1, R2. Для экспрессии *gas*-кДНК продукт ПЦР клонировали в вектор pIN821 [35], содержащий регулируемый *P_{lac}*, с которого транскрибируется химерный ген *malE-lacZa*. Клонирование проводили по сайту расщепления рестриктазы *Stu*I.

Выделение химерного белка из клеток *E. coli*

Препаративный вариант. 500 мл клеточной суспензии охлаждали 30 мин на льду и осаждали клетки центрифугированием (10000g, 15 мин). Осажденные клетки хранили при –20°C или использовали немедленно. Для этого осадок ресуспендировали в

25 мл буфера (50 мМ трис-НСl (рН 7.5), 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 1 мМ PMSF) и разрушали клетки при помощи ультразвукового дезинтегратора VirSonic (VirTis, США) (трижды по 30 с при 50% от максимальной мощности). Гомогенат центрифугировали 30 мин при 20000g. Супернатант аккуратно сливали, а осадок ресуспендировали в 25 мл того же буфера и повторяли процедуру разрушения клеток и центрифугирования. Супернатанты объединяли и наносили на колонку (2.5 × 10 см) с DEAE-Toyopearl (Toyo-Soda), уравновешенную буфером (50 мМ трис-НСl (рН 7.5), 1 мМ дитиотреит, 1 мМ MgCl₂). После этого колонку промывали 200 мл того же буфера и элюировали белки градиентом концентрации NaCl. Фракции, содержащие полипептид с M 65 кДа (150–200 мМ NaCl), объединяли и хранили в 50% глицерине при –20°C. При необходимости химерный белок дополнительно очищали аффинной хроматографией, как описано ниже.

Аналитический вариант. Клетки из 5 мл суспензии осаждали и разрушали, как описано выше. Клеточный супернатант наносили на колонку (1 × 5 см) с аффинным сорбентом на основе амилозы ("amylose resin", New England Biolabs), уравновешенную буфером (50 мМ трис-НСl (рН 7.5), 0.5 М NaCl, 1 мМ дитиотреит, 1 мМ MgCl₂). Затем колонку промывали 15 мл того же буфера и элюировали связавшийся белок буфером с 10 мМ мальтозой.

Протеолиз химерного белка фактором Ха. Белок после аффинного сорбента диализовали против буфера (50 мМ трис-НСl (рН 7.5), 1 мМ дитиотреит, 2 мМ CaCl₂) и концентрировали до 1 мг/мл ультрафильтрацией на мембране PM-10. Добавляли фактор Ха (New England Biolabs; 1 : 100 по весу) и инкубировали 12–16 ч при 37°C.

Измерение GTP-связывающей активности химерного и гас-белка осуществляли по модифицированному методу [30]. К 50 мкл буфера (50 мМ трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ MgCl₂, 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 1 мМ дитиотреит, 10 мкМ GTP) добавляли 1 мкКи [α -³²P]GTP (5000 Ки/ммоль) и 50 пмоль белка. Реакцию проводили при 4°C. Через определенные промежутки времени на нитроцеллюлозные фильтры наносили по 10 мкл реакционной смеси и промывали 10 мл того же буфера, но без GTP. Фильтры автордиографировали в течение ночи, а затем разрезали и определяли количество связавшейся радиоактивности при помощи сцинтилляционного счетчика.

Измерение GTP-азной активности рекомбинантных белков проводили по методу [29]. К 50 мкл буфера (50 мМ трис-НСl (рН 7.5), 20 мМ EDTA, 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 1 мМ дитиотреит, 10 мкМ GTP) добавляли 1 мкКи [γ -³²P]GTP (5000 Ки/ммоль), 100 пмоль белка и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Затем от-

бирали по 10 мкл реакционной смеси в пробирки с 100 мкл буфера (50 мМ трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ MgCl₂) и инкубировали при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени реакционную смесь из пробирок наносили на нитроцеллюлозные фильтры и промывали 10 мл этого буфера. Количество [γ -³²P]GTP, связанного с белком, определяли при помощи сцинтилляционного счетчика.

Электрофоретическое разделение белков осуществляли по методу Лэммли [36] в 12% ПААГ. Количество белка измеряли по методу Брэдфорда [37].

Авторы благодарят А.Е. Дергачева за выделение РНК из сетчатки быка, а также Н.С. Быстрова за синтез олигонуклеотидных зондов.

Данная работа финансировалась Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 93-04-7310).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gilman A. // Annu. Rev. Biochem. 1987. V. 56. P. 615–649.
2. Lamarche N., Hall A. // Trends Genet. 1994. V. 10. P. 436–440.
3. Hall A. // Cell. 1990. V. 61. P. 921–923.
4. Martin G., Yatani A., Clark R., Conroy L., Polakis P., Brown A., McCormick F. // Science. 1992. V. 255. P. 192–194.
5. Takai Y., Kaibuchi K., Kikuchi A., Kawata M. // Int. Rev. Cytol. 1991. V. 133. P. 187–230.
6. Hall A. // Annu. Rev. Cell Biol. 1994. V. 10. P. 31–54.
7. Ridley A.J., Hall A. // Cell. 1992. V. 70. P. 389–399.
8. Aktories K., Just I. // Trends Cell Biol. 1995. V. 5. P. 415–418.
9. Disbury J., Weber R., Booch G., Evans T., Syderman R. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 16378–16382.
10. Yeramian P., Chadrin P., Madaule P., Tavitian A. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 5. P. 1869.
11. Chadrin P., Madaule P., Tavitian A. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 2717.
12. Munemitsu S., Innis M., Clark R., McCormick F., Ullrich A., Polakis P. // Mol. Cell Biol. 1990. V. 10. P. 5977–5982.
13. Shinjo K., Koland J.G., Hart M.J., Narasimhan V., Johnson D., Evans T., Cerione R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 9853–9857.
14. Yang Z., Watson J.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 8732–8736.
15. Bokoch G., Der C.J. // FASEB J. 1993. V. 7. P. 750–759.
16. Nobes C., Hall A. // Cell. 1995. V. 81. P. 53–62.
17. Knaus U., Heyworth P., Evans T., Curnette J., Bokoch C. // Science. 1991. V. 254. P. 1512–1515.
18. Coso O., Chiariello M., Yu J.C., Teramoto H., Crespo P., Xu N., Miki T., Gutkind J.S. // Cell. 1995. V. 81. P. 1137–1146.

19. Wieland T., Ulibarri I., Aktories K., Gierschik P., Jakobs K. // FEBS Lett. 1990. V. 263. P. 195–198.
20. Wieland T., Ulibarri I., Gierschik P., Hall A., Aktories K., Jakobs K. // FEBS Lett. 1992. V. 274. P. 111–114.
21. Петров В.М., Артамонов И.Д., Баскаков И.В., Соловьева О.В., Липкин В.М. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 498–505.
22. Petrov V., Artamonov I., Lipkin V. // FEBS Lett. 1994. V. 337. P. 274–276.
23. Disbury J., Weber R., Booch G., Evans T., Syndermann R. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 16025–16028.
24. Valencia A., Chadrin P., Wittinghofen A., Scander C. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 4637–4648.
25. Menard L., Tomhave E., Gasey P., Uhing R., Snyderman R., Disbury J. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 206. P. 537–546.
26. Anderson P., Lacal J. // Mol. Cell. Biol. 1987. V. 7. P. 3620–3628.
27. Lacal J., Anderson P., Aaronson S. // EMBO J. 1986. V. 5. P. 679–687.
28. Hall A., Self A. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 10963–10965.
29. Diekmann D., Brill S., Garrett M., Totty N., Hsuan J., Monfries C., Hall C., Lim L., Hall A. // Nature. 1991. V. 351. P. 400–402.
30. Chen W., Lim H., Lim L. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 320–324.
31. Yaung J.D.-E., Leaog L.G., Liu C.C., Damiano A., Wall D.A., Cohn Z.A. // Cell. 1986. V. 47. P. 183–193.
32. Aviv H., Leder P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1974. V. 69. P. 1408–1412.
33. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
34. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
35. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. N.Y.: John Wiley and Sons, 1990.
36. Laemmli U. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
37. Bradford M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.

Small GTP-binding Protein of the Rac Family from Bovine Retina. cDNA Structure and Expression in a Prokaryotic System

V. M. Petrov*, S. V. Tkachuk, and V. M. Lipkin

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia*

Abstract—cDNA with a high degree of homology to the *rac1* gene of the Ras-like protein from the HL-60 cell line was isolated from a bovine retina cDNA library. The homologies of the nucleotide and deduced amino acid sequences were 90 and 98%, respectively. The product of cDNA expression in *E. coli* cells purified by chromatography displayed GTP-binding and GTPase activities. The data suggest that the Rac1 protein is one of the low-molecular GTP-binding proteins in photoreceptor membranes of vertebrates.

Key words: GTP-binding proteins, Ras-like proteins, expression in *E. coli*.