



УДК 577.217:577.112.5.016

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ КДНК *rab1* ТАБАКА И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКА

© 1997 г. А. В. Андреева[#], Д. Э. Эванс, К. Р. Хос, Д. А. Напье**Университет Оксфорд-Брукс, Оксфорд, Великобритания
BMS, Oxford Brookes University, Oxford, OX30BP, UK;*** Бристольский университет, Исследовательская станция Лонг-Аштон,
Бристоль, Великобритания*

Поступила в редакцию 20.06.96 г.

кДНК, кодирующая малый GTP-связывающий белок Rab1, была выделена из банка, приготовленного из кДНК листьев табака (*Nicotiana tabacum*). Из структуры кДНК *rab1* табака была определена первичная структура этого белка. кДНК *rab1* экспрессирована в *Escherichia coli*, и показано, что очищенный белковый продукт обладает GTP-азной активностью. Создан набор мутантов белка Rab1 с измененными способностями связывать и/или гидролизовать GTP. Получены поликлональные антитела против пептида вблизи С-конца, узнающие этот белок.

Ключевые слова: мономерные (малые) GTP-связывающие белки; табак (Nicotiana tabacum); белок Rab1; секреция.

Малые GTP-связывающие белки играют ключевую роль в регуляции разнообразных клеточных функций, в том числе внутриклеточного мембранного транспорта и секреции (Rab-семейство). В настоящее время в клетках млекопитающих идентифицировано более 25 подсемейств этих белков, причем некоторые из них представлены несколькими изоформами [1]. Разные белки семейства Rab ассоциированы с различными мембранными компонентами клетки. Так, Rab3 и Rab11 преимущественно ассоциированы с синаптическими пузырьками и секреторными гранулами, Rab11 локализован также в транс-сети аппарата Гольджи, Rab 4, 5, 7, 9, 22 и 24 ассоциированы с эндосомами, Rab6 находится в промежуточных цистернах и транс-сети аппарата Гольджи (см. обзоры [2, 3]). На участке между эндоплазматической сетью и аппаратом Гольджи в клетках млекопитающих функционируют по крайней мере три белка Rab: 1A, 1B и 2 [4]. Информация о мембранной локализации белков Rab содержится в их 30–40 С-концевых остатках [5]. Связь гидрофильного Rab-белка с мембраной осуществляется за счет геранилгеранильной модификации консервативных цистеиновых остатков, находящихся вблизи С-конца [6].

Необходимость гидролиза GTP для внутриклеточного транспорта в процессе как экзоцитоза, так и эндоцитоза была показана, в частности, в экспериментах с белками семейства Rab, несущими мутации, затрагивающие участки связывания

GTP/GDP (см. обзор [7]). Для эффективного внутриклеточного транспорта мембранных пузырьков необходим механизм, обеспечивающий доставку каждой транспортной частицы в определенный отдел клетки. Согласно гипотезе Солнера и соавт. [8], нашедшей экспериментальное подтверждение, каждая мембранная транспортная частица несет характерный набор маркеров, обозначающих v-SNARE, узнаваемых специфическими белками (t-SNARE) на акцепторной мембране. Белки Rab-семейства не были обнаружены в составе SNARE-комплекса, хотя в их отсутствие функциональный SNARE-комплекс не образуется [9]. Гипотетическая роль, приписываемая белкам этого семейства, заключается в придании дополнительной специфичности взаимодействию транспортной частицы с соответствующим мембранным компартментом.

В растительных клетках идентифицированы 7 различных подсемейств белков семейства Rab (см. обзоры [3, 10]), и их число будет, вероятно, увеличиваться, хотя вопрос о внутриклеточной локализации и функциях этих белков остается открытым.

Большинство генов (кДНК) белков семейства Rab было идентифицировано либо путем их амплификации методом ПЦР с помощью двух вырожденных праймеров к участкам, кодирующим консервативные районы малых GTP-связывающих белков, либо методом гибридизации с гетерологическими зондами [11]. Первый из этих двух подходов был использован нами при анализе банка кДНК, приготовленного из листьев табака (*Nicotiana tabacum*).

[#] Автор для переписки (тел.: 44/1865/483290; факс: 44/1865/483955; e-mail: p0071233@brookes.ac.uk).

```

1                                     50
MNPEYDYLFKLLLLIGDSGVGKSCLLLRFADDTYLESYISTIGVDFKIRTV
*                                     *
51                                     100
FQDGKTIKLOIWDTAGQERFRITITSSYYRGANGIIVVYDVTQESFNVK
*
101                                    150
QWLSEIDRYASDNVNKILVGNKSDLTANRVVSYETAKAFADEIGIPFLET
*
151                                    203
SAKDANTVEQAFMAMTSAIKNRMASQPANNNSAKPPTVNIIRGQPVTQSGGCCSSTer

```

Рис. 1. Аминокислотная последовательность белка Rab1 табака. Последовательности-маркеры, предложенные для идентификации Rab1 [12, 13], подчеркнуты. Аминокислотные остатки, замененные в мутантных белках Rab1, выделены жирным шрифтом и звездочкой над соответствующим остатком. Последовательность, соответствующая синтетическому пептиду, выбранному для получения антител, отмечена курсивом. Потенциальный сайт гликозилирования показан рамкой.

В результате амплификации кДНК методом ПЦР были получены фрагменты длиной около 300 п. о. Они были клонированы и на основании их нуклеотидных последовательностей идентифицированы как фрагменты генов GTP-связывающих белков (данные не приводятся). Один из фрагментов был использован в качестве гибридационно-го зонда для поиска полноразмерного гена в банке кДНК. Среди 2×10^5 фаговых бляшек было найдено 8, давших положительный сигнал гибридизации. Вставки были амплифицированы методом ПЦР с применением двух праймеров, соответствующих фланкирующим районам сайта клонирования в векторе *λgt11*, и клонированы в виде *EcoRI*-фрагментов в векторе pGEM-3Zf(-). Была определена структура кДНК самого протяженного клона, и найдено, что выделенный нами ген (*EMBL X72212*) кодирует белок длиной 203 а. о., содержащий, как и другие малые GTP-связывающие белки, участок связывания и гидролиза GTP.

Аминокислотная последовательность эффекторного домена, используемая в качестве маркера для классификации белков, родственных Ras [12, 13], соответствовала Yp1/Rab1-белкам. Таким образом, обнаруженный ген был определен как ген *rab1* табака. С-Концевой участок белка Rab1 табака содержит два остатка цистеина, за которыми следуют два остатка серина. Такая последовательность является потенциальным субстратом для модификации геранилгеранилтрансферазой типа II [14, 15]. Этот фермент, однако, нуждается также в определенной последовательности вне С-конца и, возможно, чувствителен к конформации субстрата [16].

Некоторые белки Rab млекопитающих (Rab1A, Rab4) фосфорилируются в процессе митоза протеинкиназой p34^{cdc2} [17]. Предполагаемые сайты фосфорилирования (Ser/Thr)-Pro-X-(Lys/Arg) находятся в С-концевых участках этих белков вблизи геранилгеранилируемых остатков Cys,

необходимых для связывания белков Rab с мембранами. Возможно, что фосфорилирование этих участков необходимо для инактивации соответствующих белков в митозе [17]. В аминокислотной последовательности Rab1 табака, как и в других известных Rab1-белках растений, отсутствуют сайты фосфорилирования p34^{cdc2}, хотя сообщалось, что белок, узнаваемый в пыльце *Brassica oleracea* иммунной сывороткой, полученной против Rab1 *Zea mays*, подвергается фосфорилированию *in vivo* [18]. Следует отметить, что на расстоянии 20 а. о. от геранилгеранилируемых остатков Cys в белке Rab1 табака находится потенциальный сайт гликозилирования (Asn-Asn-Ser, рис. 1), отсутствующий в структуре соответствующих участков фосфорилируемых белков Rab млекопитающих (см. аминокислотные последовательности, приведенные в работе [17]). Было бы интересно определить, подвергается ли белок Rab1 табака фосфорилированию и/или гликозилированию, и если да, то на каких стадиях клеточного цикла. Наличие сайтов гликозилирования в С-концевых участках не является общей чертой белков Rab1 растений; потенциальный сайт гликозилирования был замечен нами также в Rab1 *Volvox carteri* (Swiss-Prot P31584).

Для экспрессии в *E. coli* ген *rab1* был клонирован в векторе pET-3a. Количество рекомбинантного белка Rab1 было оценено приблизительно как 10% от суммарного клеточного белка. Рекомбинантный белок из *E. coli* был очищен на DEAE-Sephacryl S-100 (рис. 2) не менее чем до 90% чистоты (чистоту препарата оценивали на основании денситометрии полиакриламидных гелей, окрашенных кумасси G-250). Обычный выход составлял 0.5 мг очищенного белка на 100 мл клеточной культуры.

Последовательность кДНК *rab1* содержит открытую рамку, кодирующую продукт с расчетной молекулярной массой 23 кДа, что находится в

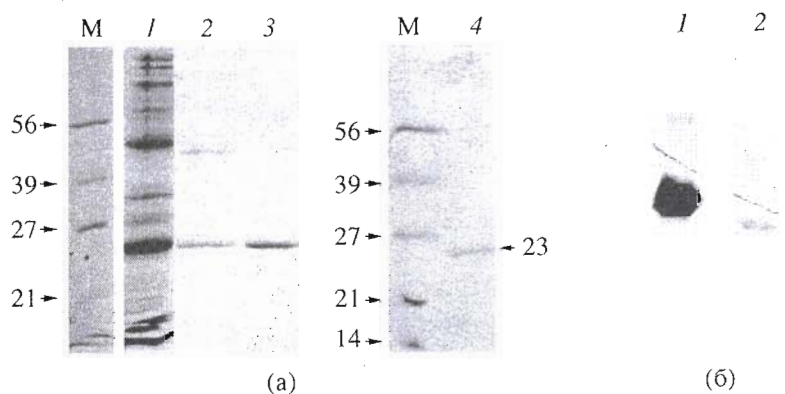


Рис. 2. Очистка и иммунодетекция рекомбинантного белка Rab1 табака. (а) – очистка рекомбинантного Rab1 из *E. coli*: 1 – суммарный бактериальный белок; 2 и 3 – фракции, содержащие Rab1 после гель-фильтрации на Sephacryl S-100; 4 – очищенный Rab1 после ионообменной хроматографии на колонке DEAE-Sepharose 6B; М – маркеры молекулярной массы, кДа. (б) – иммуноочечение: очищенный белок ((а), дорожка 4) после электрофореза в 15% ПААГ (1) или в 12.5% ПААГ (2) переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану обрабатывали анти-Rab1-сывороткой (1) или моноклональными антителами Т7. Разная интенсивность полос в дорожках 1 и 2 обусловлена разными способами детекции (люминесцентная методика и Protoblot system соответственно; см. “Экспер. часть”).

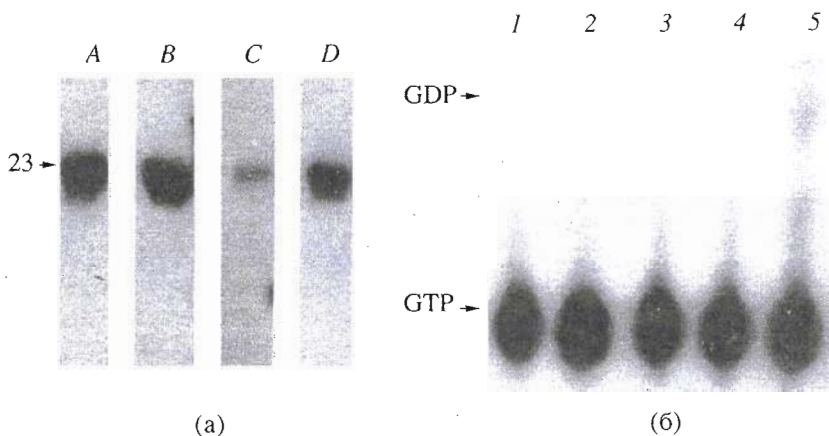


Рис. 3. Функциональное тестирование рекомбинантного белка Rab1 табака. (а) – связывание GTP: тотальный белок, приготовленный из индуцированных клеток *E. coli*, экспрессирующих Rab1 (дорожка А), и очищенный белок (дорожки В–D) кипятили в течение 3 мин в присутствии 3% SDS и 5% β-меркаптоэтанола, разделяли электрофорезом в 15% ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Мембраны инкубировали с [α-³²P]GTP в отсутствие конкурентных субстратов (дорожки А и В) или в присутствии 100-кратного избытка GDP (дорожка С) или ATP (дорожка D). Радиоактивные полосы визуализировали автордиографией. (б) – гидролиз GTP: очищенный рекомбинантный Rab1 (5 мкг) инкубировали при 37°C в течение 30 мин в присутствии 10 мкМ [α-³²P]GTP и 2 мМ EDTA. GTP-азную активность инициировали добавлением MgCl₂ до конечной концентрации 10 мМ. Аликвоты отбирали в начальный момент (1) и через 0.5 (2), 1 (3), 2 (4) и 3 ч (5) и анализировали с помощью ТСХ [20]. Радиоактивные полосы визуализировали автордиографией.

хорошем соответствии с относительной молекулярной массой рекомбинантного белка. Белок, синтезированный в *E. coli*, не обладает липидной модификацией, необходимой для эффективного связывания с мембранами, однако, введенный в эукариотическую клетку, он модифицируется и может быть использован в экспериментах по микроинъекции [19]. Чтобы отличить инъецированный рекомбинантный белок от природного, имеющегося в растительной клетке, к N-концу синтезированного в *E. coli* белка Rab1 был присо-

единен пептид, эффективно узнаваемый антителами Т7 на вестерн-блоте.

Как было упомянуто выше, все белки Rab содержат участки, образующие нуклеотидсвязывающий домен. Способность рекомбинантного белка связывать GTP была подтверждена экспериментально. Автордиограмма (рис. 3а) показывает присутствие 23-кДа GTP-связывающего белка в индуцированных клетках *E. coli* (дорожка А): этот белок отсутствовал в экстрактах неиндуцированных клеток (данные не приводятся). Специфичность связывания GTP рекомбинантным белком

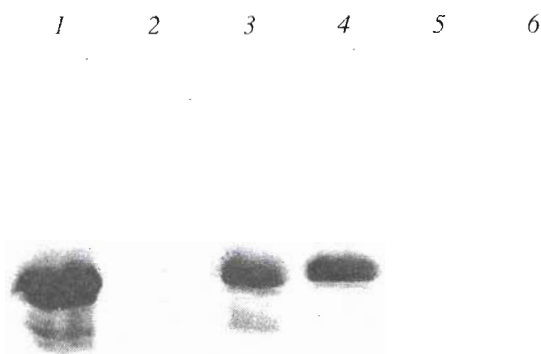


Рис. 4. Функциональное тестирование рекомбинантных мутантов Rab1 табака. Тотальный белок, приготовленный из индуцированных клеток *E. coli*, продуцирующих природный белок (1; положительный контроль), мутанты Ser22Asn (2), Thr40Ala (3), Gln67Leu (4), Asn121Ile (5) и тотальный белок, приготовленный из бактериальных клеток, не синтезирующих Rab1 табака (6; отрицательный контроль), разделяли в 15% ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Мембраны инкубировали с $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ в присутствии 100-кратного избытка АТР. Радиоактивные полосы визуализировали автордиографией.

была исследована путем добавления 100-кратного молярного избытка конкурирующих нуклеотидов. GTP и GDP успешно конкурировали с $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, тогда как АТР существенно не влиял на связывание, что указывает на специфичность связывания GTP и GDP (дорожки B, C и D).

Очищенный рекомбинантный белок был тестирован на его способность гидролизовать GTP. Белок Rab1 инкубировали с $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, наблюдая за образованием $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GDP}$ (рис. 3б). GTP-азная активность Rab1 табака была весьма низка и сравнима с таковой для Rab1 млекопитающих [21].

Таким образом, было показано, что полученный нами рекомбинантный белок способен специфично связывать и гидролизовать GTP. Эти результаты получены на рекомбинантном белке, отличающемся от нативного отсутствием геранилгеранилирования и наличием N-концевого эпитопа (см. выше), и согласуются с опубликованными ранее данными о том, что ни структура N-конца, ни посттрансляционные модификации существенно не влияют на связывание и гидролиз GTP малыми G-белками [22, 23].

Домены малых G-белков, связывающих гуаниновые нуклеотиды, содержат три участка связывания фосфата/ Mg^{2+} и три участка связывания гуанинового основания. Мутации, введенные в эти участки, позволяют получить белки с измененны-

ми параметрами связывания и/или гидролиза GTP. Инъекция в клетку таких мутантных белков или их внутриклеточный синтез могут дать ценную информацию о функционировании соответствующего G-белка *in vivo*; этот подход был успешно применен для изучения функций ряда изоформ белков Rab в клетках млекопитающих и дрожжей [7, 24, 25].

Мы ввели 4 мутации в нуклеотидсвязывающий домен Rab1 табака (рис. 1). Первая из них, Ser22Asn, затрагивает участок, имеющийся у всех GTP-связывающих белков, а также АТР-аз и киназ [26]. Ser22 белка Rab1 табака соответствует остатку Ser17 белка H-Ras, координирующему γ -фосфат GTP и ион Mg^{2+} . Замена этого остатка снижает аффинность к GTP, не влияя на связывание GDP, и приводит к тому, что белок постоянно находится в GDP-связанной форме. Другим существенным для активности остатком является Thr40, участвующий в октаэдрической координации иона Mg^{2+} и в стабилизации γ -фосфата. Аналог этого остатка у белков Ras важен для конформационного перехода, связанного с гидролизом GTP [27]. Мы ввели в Rab1 табака замену Thr40 на Ala; эта мутация, не нарушая связывание GTP, блокирует взаимодействие G-белков с эффекторами. Третья мутация, Gln67Leu, должна снижать GTP-азную активность Rab1, поскольку этот остаток необходим для связывания молекулы воды, участвующей в катализе. Остаток Asn116 в белке Ras взаимодействует с тремя участками нуклеотидсвязывающего домена; замена этого остатка лишает белок способности связывать не только GTP, но и GDP. Соответствующая мутация (Asn121Ile) была введена нами в Rab1 табака.

Мутантные белки были синтезированы в *E. coli*, и их способность связывать GTP была протестирована, как описано выше для белка дикого типа. Полученные результаты соответствовали предсказанным свойствам мутантных белков (рис. 4).

Для получения поликлональных антител, узнающих Rab1 табака, нами был выбран пептид AKPPTVNIRGQPVTQ, соответствующий последовательности вблизи C-конца Rab1, наиболее варибельной среди белков этого семейства [3]. Полученные антитела специфически узнавали белок с молекулярной массой 23 кДа в тотальных экстрактах клеток *E. coli*, продуцирующих Rab1 (рис. 2б, дорожка 1) при отсутствии сигнала в контролях с преиммунной сывороткой, а также с неиндуцированными клетками *E. coli*, трансформированными той же плазмидой (данные не приводятся). Моноклональные tag-антитела T7, узнающие N-концевые последовательности рекомбинантных белков, гены которых клонированы в векторе pET-3a (см. инструкцию производителя), также узнавали белок с молекулярной массой 23 кДа,

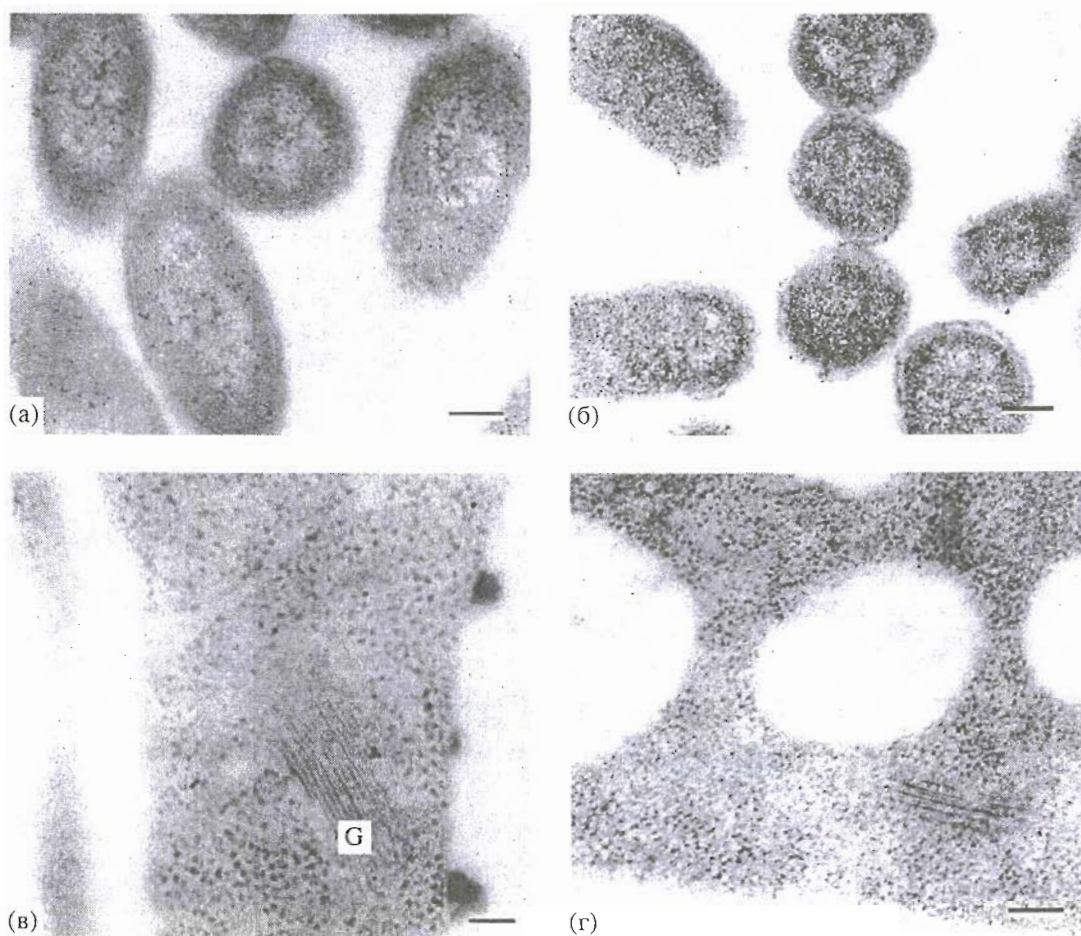


Рис. 5. Электронно-микроскопическая иммулокализация белка Rab1 табака. (а) – мечение золотом Rab1, показывающее распределение рекомбинантного белка в *E. coli*; (б) – мечение контрольных клеток *E. coli*, не продуцирующих Rab1; (в) – суспензионная культура клеток табака, заключенная в смолу при низкой температуре (см. “Экспер. часть”), меченная Rab1-сывороткой. Распределение белка преимущественно цитоплазматическое. (г) – контрольные клетки, обработанные преиimmunной сывороткой перед мечением вторичными антителами, конъюгированными с золотом. На электронограммах указан масштаб: (а), (б), (в) – 200 нм, (г) – 100 нм. G – цистерны Гольджи.

подтверждая его идентичность с продуктом клонированного гена *rab1* (рис. 2б, дорожка 2).

Стабильность антигенной последовательности (AKPPTVNIRGQPVTQ) в процессе фиксации и пригодность кроличьей сыворотки, полученной против синтетического пептида, для локализации Rab1 с помощью электронной микроскопии были проверены на клетках *E. coli*, продуцирующих Rab1 табака и заключенных в смолу при низкой температуре (рис. 5). Метка была обнаружена только в клетках, синтезирующих рекомбинантный белок (рис. 5а). Контрольные клетки остались немечеными (рис. 5б), как и продуцирующие Rab1-белок клетки, обработанные преиimmunной сывороткой или только вторичными антителами (данные не приводятся). Эти результаты показывают, что антигенные свойства Rab1 сохраняются при соответствующей подготовке материала для электронной микроскопии. Значительный уровень метки в клетках, экспрессирующих Rab1, под-

тверждает пригодность сыворотки для электронной микроскопии.

В настоящее время отсутствуют экспериментальные данные по внутриклеточной локализации Rab1 в растительной клетке. В клетках млекопитающих он был локализован в цис-Гольджи, промежуточных отделах аппарата Гольджи либо в сети пре-Гольджи [28, 29]. Распределение этого белка носит клеткоспецифичный характер [29]. Результаты, полученные нами на суспензионной культуре клеток табака методом электронной микроскопии с использованием антител, меченых золотом, свидетельствуют о преимущественном цитоплазматическом распределении белка Rab1, хотя отдельные частицы золота были ассоциированы с мембранами Гольджи (рис. 5в) и изредка с ядерным матриксом (данные не приводятся). В секретирующих преимущественно углеводы растительных клетках уровень мембранного транспорта от эндоплазматического ретикулума к аппарату

Гольджи низок, что, по-видимому, объясняет относительно низкий уровень мечения золотом. Тот факт, что аналогичная методика позволила показать высокий уровень мечения этого белка в клетках *E. coli*, продуцирующих Rab1, но не в контрольных клетках (рис. 5а, 5б) позволяет говорить о специфичности мечения в табачных клетках. Эксперименты по выяснению внутриклеточного распределения и функции этого белка в растительной клетке продолжаются.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Скрининг банка кДНК табака, клонирование и другие методики рекомбинантной ДНК. Банк кДНК, приготовленный из листьев *Nicotiana tabacum*, сконструированный в λ gt11, был любезно предоставлен доктором К. Смарт (Кембриджский университет). Этот банк был использован в качестве матрицы при амплификации методом ПЦР с помощью двух вырожденных праймеров, соответствующих консервативным участкам малых GTP-связывающих белков (WDTAGQ и ETSAKD):

(5') GGAATTCGGGAT/CACNGCNGGNCAA/GGA

(5') GGAATTCAGTCT/CTTNGCNGANGTT/CTC

Амплификацию проводили в течение 35 циклов по следующей программе: 94°C, 1 мин; 50°C, 1 мин; 72°C, 1 мин. Нуклеотидную последовательность определяли с использованием Sequenase kit (USB) согласно прилагаемым инструкциям. Скрининг банка кДНК для нахождения полноразмерного клона проводили согласно описанным методам [30]. Искомый ген был клонирован в виде *EcoRI*-фрагмента в векторе pGEM-3Zf(-) (Promega), и его нуклеотидная последовательность была определена по обеим цепям. Для создания *VamNI*-сайта непосредственно перед АТГ-кодоном гена *rab1* в качестве прямого праймера был использован олигонуклеотид (5') CGGGATCCATGAATCCGAGTATGA, в качестве обратного – (5') CAGGAAACAGCTATGAC. После проведения ПЦР смесь была обработана *VamNI*. Фрагмент ожидаемой длины был очищен электрофорезом в агарозном геле и клонирован в дефосфорилированном векторе pET-3a (Novagen). Направленный мутагенез осуществляли с использованием Mutagenesis kit (BioRad) согласно прилагаемым инструкциям с олигонуклеотидами следующей структуры (5' → 3'):

CGTTGGGAAaасTGCTTTCTCTGAGG

(мутация Ser22Asn);

ATAAGCgCTATTGGAGTTG

(мутация Thr40Ala);

GCTGGACtAGAACGCTTTA

(мутация Gln67Leu);

CGGGAtCAAGTCTGACSTT

(мутация Asn121Ile);

мутированный триплет выделен жирным шрифтом, замены обозначены маленькой буквой.

Синтез белка Rab1 в бактериальной системе и его очистка. Клетки штамма *E. coli* BL21 (DE3) были трансформированы рекомбинантной плазмидой, содержащей ген в нужной ориентации. Бактериальная культура выращивалась в 100 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина до оптического поглощения A_{600} , равного 0.6, экспрессия была индуцирована 0.4 мМ изопропилтио- β -D-галактопиранозидом. Бактериальную массу собирали центрифугированием (5000g, 5 мин), осадок ресуспендировали в 10 мл холодного буфера 50 мМ трис-HCl (pH 8.0 при 25°C) с 2 мМ EDTA, клетки разрушали обработкой ультразвуком 3 раза по 45 с при 0°C. После центрифугирования (15000g, 30 мин) супернатант доводили сульфатом аммония до 60% насыщения. Преципитат собирали центрифугированием, растворяли в 2 мл буфера А (50 мМ трис-HCl, pH 7.8, 1 мМ EDTA, 10 мМ MgCl₂, 200 мМ NaCl, 0.1 мМ GDP, 1 мМ дитиотреит, 0.1 мМ фенолметилсульфонилфторид (PMSF)) и наносили на гель-фильтрационную колонку (1 × 90 см) Sephacryl S-100, уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили со скоростью 6 мл/ч и собирали фракции по 2 мл. Фракции, содержащие Rab1-белок, объединяли, разводили в 50 мМ трис-HCl, pH 7.6, содержащем 10 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит, 0.1 мМ PMSF, до конечной концентрации NaCl 30 мМ и наносили на колонку DEAE-Sephrose 6B, уравновешенную тем же буфером. Белки элюировали линейным градиентом 300–400 мМ NaCl в этом же буфере. Фракции, содержащие Rab1-белок, объединяли и осаждали сульфатом аммония при 60% насыщения. Преципитат ресуспендировали в 1 мл буфера В (буфер А без GDP и NaCl) и диализовали против 3 л того же буфера при 4°C в течение ночи. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда [31].

Получение антител. Пептид (AKPPTVNIR-GQPVTQ), соответствующий последовательности вблизи С-конца Rab1, был синтезирован на автоматическом пептидном синтезаторе (NovaSyn Crystal) в Лаборатории синтетических пептидов (Университет Оксфорд-Брукс) и использован для получения сыворотки. Чистота пептида была проверена с помощью масс-спектрометрии и ВЭЖХ. Пептид был конъюгирован с малеимид-активированным гемоцианином (Imject, Pierce and Warriner, Великобритания) согласно инструкциям производителя. Антитела получали в соответствии с лицензией 30/00930 Министерства внутренних дел Великобритании. Кролики были иммунизированы 250 мкг пептидного конъюгата в Imject Alum (Pierce and Warriner, Великобритания) в течение 3 месяцев с месячными интервалами. Титр, определенный методом твердофазного иммуноферментного

анализа с пептидом в качестве антигена, составил 1 : 5000.

Вестерн-блот-анализ. Белки разделяли электрофорезом в 12.5 или 15% полиакриламидных гелях [32] и переносили на нитроцеллюлозную мембрану полусухим блоттингом. Мембраны блокировали в солевом фосфатном буфере (PBS), содержащем 0.1% Твин 20 (PBST) и 5% BSA, затем инкубировали 1 ч с моноклональными антителами Т7 (Novagen) (разведение 1 / 1000) или сывороткой против синтетического пептида (разведение 1/5000). После трех отмывок в PBST фильтры инкубировали 30 мин с поликлональными антимышиными антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой (Sigma) (разведение 1/30000), или с поликлональными антикроличьиными антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой (Sigma) (разведение 1/150000) соответственно. После трех отмывок PBST фильтры проявляли с помощью Promega Protoblot System. Время проявления варьировало от 30 с до 5 мин. Связывание антител с рекомбинантным белком детектировали также по усовершенствованной люминесцентной методике (Amersham), согласно инструкциям производителя.

Определение GTP-связывающей и GTP-азной активностей. Анализ GTP-связывания проводили на грубом бактериальном экстракте, полученном из индуцированных и неиндуцированных клеток, или на очищенном белке по методу [20]. GTP-азную активность очищенного белка определяли так, как описано в работе [20].

Электронная микроскопия и иммуномечение. Индуцированные и контрольные клетки *E. coli* (т.е. продуцирующие и не продуцирующие Rab1 соответственно) фиксировали в течение 1 ч в смеси 1% параформальдегида и 1% глутарового альдегида в 0.1 М 1,4-пиперазиндиэтансульфоновой кислоте (PIPES, Sigma), pH 7.0. После отмывки PIPES-буфером клетки обезвоживали с постепенным понижением температуры последовательно в 10 и 20% этаноле по 10 мин при комнатной температуре, в 30% этаноле 1 ч при 0°C, в 50, 75, 90% и абсолютном этаноле по 1 ч при -20°C, а затем насыщали смесью этанол-смола LR White resin (London Resin Co., Великобритания), 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3, в течение 1 ч, после чего насыщали смолой дважды по 12 ч. Затем смолу полимеризовали в ультрафиолетовом свете в течение 24 ч при 20°C и 15 ч при 4°C. Суспензионную культуру клеток табака (линии ВУ2) обрабатывали аналогично. Срезы получали на ультрамикротоме RMC MT7000 и собирали на никелевые сеточки.

Для иммуномечения срезы инкубировали 10 мин в блокирующем растворе: 1% бычий сывороточный альбумин и 0.1% Твин 20 в 0.1 М трис-солевом буфере (TBS), pH 7.4. Срезы обрабатывали сывороткой против Rab1, разведенной TBS в соот-

ношении 1 : 300, 1 ч при комнатной температуре, отмывали 3 раза в блокирующем растворе по 10 мин и метили 10-нм золотом, конъюгированным с антикроличьей козьей сывороткой (British BioCell, Cardiff, Великобритания). После отмывок в буфере и дистиллированной воде срезы окрашивали последовательно 0.5% уранилацетатом и цитратом свинца. Изображение получали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Jeol 1200 EXII. Контрольные срезы обрабатывали по аналогичной схеме преиммунной сывороткой (вместо первичных антител) или только вторичными антителами.

Частично материалы данной работы были представлены в виде докладов на XXII конференции молодых ученых Французского общества биохимии и молекулярной биологии (Гренобль, Франция, 1995) и на ежегодной конференции Британского общества экспериментальной биологии (Ланкастер, Великобритания, 1996), а также опубликованы в виде кратких сообщений [33, 34].

Авторы благодарят М.А. Кутузова (ИБХ РАН) за помощь в очистке рекомбинантного белка и в подготовке русской версии рукописи. Ультрамикротом MT7000 был предоставлен RMC Inc. Д.Э. Эванс имеет грант Королевского общества с 1983 г. (University Research Fellowship).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wagner A.C.C., Strowski M.Z., Goke B., Willams J.A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 207. P. 950–956.
2. Zerial M., Stenmark H. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993. V. 5. P. 613–620.
3. Verma D.P.S., Choong-III C., Hong Z. // *Plant Physiol.* 1994. V. 106. P. 1–6.
4. Tisdale E.J., Bourne J.R., Khosravi-Far R., Der C.J., Balch W.E. // *J. Cell Biol.* 1992. V. 119. P. 749–761.
5. Chavrier P., Gorvel J.-P., Stelzer E., Simons K., Gruenberg J., Zerial M. // *Nature.* 1991. V. 353. P. 769–772.
6. Takai Y., Kaibuchi K., Kikuchi A., Kawata M. // *Int. Rev. Cytol.* 1992. V. 133. P. 187–230.
7. Nuoffer C., Balch W.E. // *Annu. Rev. Biochem.* 1994a. V. 63. P. 949–990.
8. Söllner T., Whiteheart S.W., Brunner M., Erdjument-Bromage H., Geromanos S., Tempst P., Rothman J.E. // *Nature.* 1993. V. 362. P. 318–324.
9. Sögaard M., Tani K., Ye R.R., Geromanos S., Tempst P., Kirchhausen T., Rothman J.E., Söllner T. // *Cell.* 1994. V. 78. P. 937–943.
10. Staehelin L., Moore I. // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1995. V. 46. P. 261–288.
11. Ma H. // *Plant Mol. Biol.* 1994. V. 2. P. 1611–1636.
12. Haubruck H., Engelke U., Mertins P., Gallwitz D. // *EMBO J.* 1990. V. 9. P. 1957–1962.
13. Moore I., Scell J., Palme K. // *Trends Biochem. Sci.* 1995. V. 20. P. 10–12.

14. Moores S.L., Schaber M.D., Mosser S.D., Rands E., O'Hara M.B. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 14603–14610.
15. Seabra M.C., Goldstein J.L., Sudhof T.C., Brown M.C. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 14497–14503.
16. Khosravi-Far R., Clark G.J., Abe K. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 24363–24368.
17. Bailly E., McCaffrey M., Touchot N., Zahraoui A., Goud B., Bornens M. // Nature. 1991. V. 350. P. 715–718.
18. Hiscock S.J., Miller J.A.A., Moore I., Doughty J., Dickinson H.G. // J. Exp. Bot. 1996. V. 47. P. 14.
19. Willson B.S., Nuoffer C., Meinkoth J.L., McCaffery M., Feramisco J.R., Balch W.E., Farquhar M.G. // J. Cell Biol. 1994. V. 125. P. 557–571.
20. Tavitian A., Zahraoui A. // Meth. Enzymol. 1992. V. 219. P. 387–397.
21. Zahraoui A., Touchot N., Chardian P., Tavitian A. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 12394–12401.
22. Li G., Stahl P.D. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 24475–24480.
23. Yang C., Mollat P., Chaffote A., McCaffrey M., Cabanié L., Goud B. // Eur. J. Biochem. 1993. V. 217. P. 1027–1037.
24. Nuoffer C., Davidson H.W., Matteson J., Meinkoth J., Balch W.E. // J. Cell Biol. 1994. V. 125. P. 225–237.
25. Wagner P., Molenaar C.T.M., Rauh A.J.G., Brokel R., Schmitt H.D., Gallwitz D. // EMBO J. 1987. V. 6. P. 2373–2379.
26. Valencia A., Chardin P., Wittinghofer A., Sander C. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 4648–4654.
27. Milburn M.V., Tong L., deVos A.M., Brunger A., Yamai-zumi Z., Nishimura S., Kim S.-H. // Science. 1990. V. 247. P. 939–945.
28. Segev N., Mulholland J., Botstein D. // Cell. 1988. V. 52. P. 915–924.
29. Saraste J., Lahtinen U., Gould B. // J. Cell Sci. 1995. V. 108. P. 1541–1552.
30. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
31. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
32. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
33. Andreeva A.V., Evans D.E., Hawes C.R., Napier J. // Eur. J. Cell Biol. 1995. Supplement. P. 74.
34. Andreeva A.V., Evans D.E., Hawes C.R., Napier J. // J. Exp. Bot. 1996. V. 47. Supplement. P. 26.

Tobacco *rab1* cDNA Cloning and Expression and Structure-Functional Analysis of the Rab1 Protein

A. V. Andreeva*, D. E. Evans*, C. R. Hawes*, and J. A. Napier**

* BMS, Oxford Brookes University, Oxford OX3 0BP, UK

** University of Bristol, Long Ashton Research Station, Bristol, UK

Abstract—*rab1* cDNA coding for a small GTP binding protein Rab1 was isolated from cDNA library of tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves. The primary structure of this protein was deduced from the *rab1* structure. Tobacco *rab1* cDNA was expressed in *Escherichia coli*, and the product was purified and shown to exhibit GTPase activity. A set of Rab1 mutants with altered GTP binding and/or GTPase activities was obtained. Polyclonal anti-peptide antibodies were raised against a sequence in the C-terminal region of the tobacco Rab1 capable of recognizing this protein.

Key words: monomeric (small) GTP binding proteins, tobacco, *Nicotiana tabacum*, Rab1 protein, secretion.