



УДК 577.113.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК, КОМПЛЕМЕНТАРНОЙ мРНК
ОНКОБЕЛКА p53 МЫШИ

Чумаков П. М.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Злокачественная трансформация клеток часто сопровождается изменением экспрессии клеточного белка с молекулярной массой около 50 000 (p53) [1]. В настоящее время известно, что этот белок играет некую важную роль в процессе вхождения покоящейся клетки в фазу деления [2, 3]. Опытами по клеточной трансфекции генов инженерных конструкций, экспрессирующих p53, установлено, что p53 является онкобелком: 1) при трансфекции в первичные клетки происходит их иммортализация и приобретение восприимчивости к трансформации другим онкогеном — активированным геном *c-Ha-ras* [4–6]; 2) при трансфекции в перевиваемые псевдонормальные клетки (3T3, *rat-1*) отмечается появление туморогенности этих клеток без заметного изменения их морфологии [7], а также способности расти без сыворотки [7, 8]. Кроме того, повышенная экспрессия p53 способствует метастазированию [9]. Механизмы активации p53 остаются невыясненными. Введение мутаций во многие участки кодирующей области гена p53 приводит в некоторых случаях к стабилизации p53 и повышению трансформирующей активности при трансфекции [10]. Таким образом, не исключена возможность активации p53 под действием мутаций *in vivo*. Поэтому нам представляется весьма важным сравнительный анализ структуры кодирующей области гена p53, выделенного из различных источников. К настоящему времени уже опубликовано несколько работ, посвященных изучению первичной структуры кДНК p53 мыши [11–14]. При этом авторы приводят структуры, имеющие некоторые различия. Одной из целей данной работы было установление достоверности этих различий.

Ранее мы впервые клонировали кДНК p53 из линии фибробластов мыши, трансформированных вирусом SV40 [15], позднее получили почти полную копию кДНК p53 из этой линии клеток, клон p2АМО с размером вставки около 1800 п.о.

Определение первичной структуры кДНК вставки клона p2АМО проведено методом химической дегградации по Максаму — Гилберту [16]. Для введения метки использовали рестриктазные сайты, расположенные внутри вставки кДНК или же вне ее, в области полилинкерного сегмента

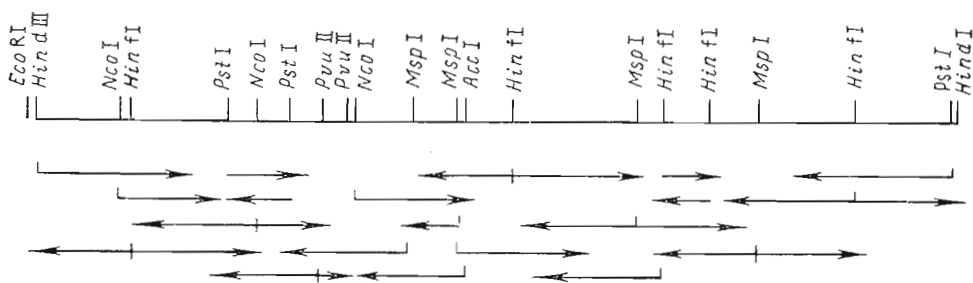


Рис. 1. Рестриктивная карта и стратегия определения первичной структуры кДНК клона p2АМО. Структура определена методом [16] с использованием рестриктивных фрагментов ДНК, меченных с помощью ДНК-полимеразы

10 20 30 40 50 60
 TCCCTCCCA CGTGCTCACC CTGGCTAAAG TTCTGTAGCT TCAGTTTCATT GGGACCATCC TGGCT

70 80 90 100 110 120 130
 GTAGG TAGCGACTAC AGTTAGGGGG CACCTAGCAT TCAGGCCCTC ATCCTCCTCC TTCCCAGCAG

140 150 160 170 180
 GGTGTACGC TTCTCCGAAG ACTGG ATG ACT GCC ATG GAG GAG TCA CAG TCG GAT ATC
 Met Thr Ala Met Glu Glu Ser Gln Ser Asp Ile

190 200 210 220 230 240
 ACG CTC GAG CTC CCT CTG AGC CAG GAG ACA TTT TCA GGC TTA TGG AAA CTA CTT
 Ser Leu Glu Leu Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Gly Leu Trp Lys Leu Leu

250 260 270 280 290
 CCT CCA GAA GAT ATC CTG CCA TCA CCT CAC TGC ATG GAC GAT CTG TTG CPG CCC
 Pro Pro Glu Asp Ile Leu Pro Ser Pro His Cys Met Asp Asp Leu Leu Leu Pro

** 300 310 320 330 340 350
 CAG GAT GTT GAG GAG TTT TTT GAA GGC CCA AGT GAA GCC CTC CGA CTG TCA GGA
 Gln Asp Val Glu Glu Phe Phe Glu Gly Pro Ser Glu Ala Leu Arg Val Ser Gly

360 370 380 * *** ** 400
 GCT CCT GCA GCA CAG GAC CCT GTC ACC GAG ACC CCT GGG CCA GTG GCC CCT GCC
 Ala Pro Ala Ala Gln Asp Pro Val Thr Glu Thr Pro Gly Pro Val Ala Pro Ala

410 420 430 440 450
 CCA GCC ACT CCA TGG CCC CTG TCA TCT TTT GTC CCT TCT CAA AAA ACT TAC CAG
 Pro Ala Thr Pro Trp Pro Leu Ser Ser Phe Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln

460 470 480 490 500 510
 GGG AAC TAT GGC TTC CAC CTG GGC TTC CTG CAG TCT GGG ACA GCC AAG TCT GTT
 Gly Asn Tyr Gly Phe His Leu Gly Phe Leu Gln Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val

520 530 540 550 * 560
 ATG TGC ACG TAC TCT CCT CCC CTC AAT AAG CTA TTC TGC CAG CTG GCG AAG ACC
 Met Cys Thr Tyr Ser Pro Pro Leu Asn Lys Leu Phe Cys Gln Leu Val Lys Thr

570 580 590 600 610 620
 TGC CCT GTG CAG TTG TGG GTC AGC GCC ACA CCT CCA GCT GGG AGC CGT GTC CGC
 Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Ser Ala Thr Pro Pro Ala Gly Ser Arg Val Arg

630 640 650 * 660 670
 GCC ATG GCC ATC TAC AAG AAG TCA CAG CAC ATG ACG GAG GTC GTG AGA CGC TGC
 Ala Met Ala Ile Tyr Lys Lys Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys

680 690 700 710 720
 CCC CAC CAT GAG CGC TGC TCC GAT GGT GAT GGC CTG GCT CCT CCC CAG CAT CTT
 Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Gly Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln His Leu

730 740 750 760 770 780
 ATC CGG GTG GAA GGA AAT TTG TAT CCC GAG TAT CTG GAA GAC AGC CAG ACT TTT
 Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Tyr Pro Glu Tyr Leu Glu Asp Arg Gln Thr Phe

790 800 810 820 830
 CGC CAC AGC GTG GTG GTA CCT TAT GAG CCA CCC GAG GCC GGC TCT GAG TAT ACC
 Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Ala Gly Ser Glu Tyr Thr

840 850 860 870 * 880 890
 ACC ATC CAC TAC AAG TAC ATG TGT AAT AGC TCC TGC ATG GGG GGC ATG AAC CGC
 Thr Ile His Tyr Lys Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg

900 910 920 930 940
 CGA CCT ATC GTT ACC ATC ATC ACA CTG GAA CAC TCC AGT GGG AAC CTT CTG GGA
 Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly

950 960 970 980 990
 CGG GAC AGC TTT GAG GTT CGT GTT TGT GCC TGC CCT GGG AGA GAC CGC CGT ACA
 Arg Asp Ser Phe Glu Val Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr

1000 1010 1020 1030 1040 1050
 GAA GAA GAA AAT TTC CGC AAA AAG GAA GTC CTT TGC CCT GAA CTG CCC CCA GGG
 Glu Glu Glu Asn Phe Arg Lys Lys Glu Val Leu Cys Pro Glu Leu Pro Pro Gly

1060 1070 1080 1090 1100
 AGC GCA AAG AGA GCG CTG CCC ACC TGC ACA AGC GCC TCT CCC CCG CAA AAG AAA
 Ser Ala Lys Arg Ala Leu Pro Thr Cys Thr Ser Ala Ser Pro Pro Gln Lys Lys

1110 1120 1130 1140 1150
 AAA CCA CTT GAT GGA GAG TAT TTC ACC CTC AAG ATC CGC GGG CGT AAA CGC TTC
 Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Lys Ile Arg Gly Arg Lys Arg Phe

 160 1170 1180 1190 1200 1210
 GAG ATG TTC CGG GAG CTG AAT GAG GCC TTA GAG TTA AAG GAT GCC CAT GCT ACA
 Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala His Ala Thr

 1220 1230 1240 1250 1260
 GAG GAG TCT GGA GAC AGC AGG GCT CAC TCC AGC TAC CTG AAG ACC AAG AAG GGC
 Glu Glu Ser Gly Asp Ser Arg Ala His Ser Ser Tyr Leu Lys Thr Lys Lys Gly

 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 CAG TCT ACT TCC CGC CAT AAA AAA ACA ATG GTC AAG AAA GTG GGG CCT GAC TCA
 Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Thr Met Val Lys Lys Val Gly Pro Asp Ser

 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 GAC TGA STGCCSTCTGC ATCCCSTCCC CATCACCAGC STCCCSTCT CTTGCTGTGTC TTATGACT
 Asp TER

 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 TC AGGGCTGAGA CACAATCCTC CCGGTCCTTT CTGCTGCCTT TTTTACCTTG TAGCTAGGGC TC

 1450 1460 1470 1480 1490 1500 * 1510
 AGCCCCCT CTCTGAGTAG TGGTTCCTGG CCCAAGTTGG GCAATAGGTT GATAGTTGTT AGGTCTC

 1520 1530 1540 1550 1560 1570
 TGC TGGCCCAGCG AAATTCTATC CAGCCAGTTG TTGCACCCTG GCACCTACAA TCAAATCTCA C

 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640
 CCTACCCCA CACCSTGTAA GATTCTATCT TGGGCCCTCA TAGGGTCCAT ATCCTCCAGC GCCTAC

 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 TTTC STTCCATCT GCAAAGCCTG TCTGCATTTA TCCACCCCCC ACCSTGTCTC CCTCTTTTTT

 1710** * 1720 1730 1740 1750 1760
 TTTTTTTTCAC CCSTTTTAT ATATCAATTT CCTATTTTAC AATAAAATTT TGTATCACT TAAA

 1780
 AAAAAAAAAACCCCCCCTC

Рис. 2. Первичная структура кДНК клона р2АМО; приведена соответствующая аминокислотная последовательность, кодируемая в единственной протяженной открытой рамке трансляции. Звездочками отмечены расхождения с данными других авторов по первичной структуре кДНК р53 [11–14]. TER – терминирующий кодон

плазмиды рSP64 [17], служившей вектором при создании клона р2АМО. Кроме того, отдельные внутренние фрагменты кДНК были субклонированы в плазмиде рSP64 и мечены с использованием сайтов полилинкера. На рис. 1 показана схема секвенирования. Вся структура была прочитана по обоим цепям со значительными перекрытиями. На рис. 2 представлена полная первичная структура кДНК вставки р2АМО протяженностью 1768 п.о. и прилегающие к ним участки гомополимерной ДНК — остаток 3'-концевой poly(A) протяженностью 12 п.о., а также сегменты oligo(dC), введенные искусственно с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы при клонировании кДНК. Размер oligo(dC) составлял 11 и 9 п.о. соответственно на 5'- и 3'-концах кДНК. Клонированный сегмент кДНК включает всю область, кодирующую белок из 390 аминокислот (1173 п.о., включая терминирующий кодон), 155 п.о., соответствующие 5'-концевой нетранслируемой области, и 440 п.о., соответствующие всей 3'-концевой нетранслируемой области. Сравнение с ранее опубликованными структурами других авторов (рис. 2) свидетельствует, что лишь один нуклеотид (замена С/Т в положении 1507 в нетранслируемой области) в изучаемой кДНК не соответствовал ни одной из опубликованных структур кДНК мыши из различных линий клеток. По-видимому, большая часть наблюдаемых расхождений объясняется ошибками секвенирования, допущенными разными авторами. Особенно это наглядно там, где нами выявлено несоответствие с опубликованной структурой кДНК линии SVT2 [11], так как источником наших клонов была та же линия клеток. Однако не исключено, что некоторые замены, отмеченные авторами в других линиях клеток (например, F9 [12] или Meth-A [11]), действитель-

тельно отражают существование полиморфизма или мутаций. Наиболее существенное расхождение в структуре касается участка, кодирующего 389–398 п.о., который, согласно одной из работ [14], содержал на три нуклеотида меньше и кодировал три различающиеся аминокислоты. Одним из объяснений этому может быть истинное различие данной области в клоне, выделенном из линии SVA31-E7 [14]. Для проверки этой возможности мы провели S1-анализ РНК из линий SVT2 и SVA31-E7 с помощью клона р2АМО и не обнаружили каких-либо различий (результат не показан), хотя столь существенные расхождения структуры должны были сказаться на результатах анализа. Кроме того, если структура этого участка кДНК в клоне, полученном в работе [14], отличается, то это должно повлечь за собой появление дополнительного *Ball*-сайта (TGGCCA). Однако проверка этой возможности показала, что плазида, описанная в работе [14], содержит только один *Ball*-сайт. Нам кажется, что различия структур объясняются компрессией, ведущей к ошибочной расшифровке последовательности.

Детальное секвенирование кДНК р53 из других источников нормальных и опухолевых клеток необходимо для выявления возможных различий в кодирующей области, что будет способствовать пониманию механизмов активации онкогена р53.

ЛИТЕРАТУРА

1. Crawford L. V. // *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1983. V. 25. P. 1–50.
2. Mercer W. E., Nelson D., De Leo A. B., Old L. V., Baserga R. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. P. 6309–6312.
3. Mercer W. E., Avignolo C., Baserga R. // *Molec. Cell. Biol.* 1984. V. 4. P. 276–281.
4. Eliyahu D., Raz A., Gruss P., Givol D., Oren M. // *Nature.* 1984. V. 312. P. 646–649.
5. Parada L. F., Land H., Weinberg R. A., Wolf D., Rotter V. // *Nature.* 1984. V. 312. P. 649–651.
6. Jenkins J. R., Rudge K., Currie G. A. // *Nature.* 1984. V. 312. P. 651–654.
7. Kelekar A., Cole M. D. // *Molec. Cell. Biol.* 1986. V. 6. P. 7–14.
8. Eliyahu D., Michalovitz D., Oren M. // *Nature.* 1985. V. 316. P. 158–160.
9. Wolf D., Harris N., Rotter V. // *Cell.* 1984. V. 38. P. 119–126.
10. Jenkins J. R., Rudge K., Chumakov P., Currie G. A. // *Nature.* 1985. V. 317. P. 816–818.
11. Zakut-Houri R., Oren M., Bienz B., Lavie V., Hazum S., Givol D. // *Nature.* 1983. V. 306. P. 594–597.
12. Pennica D., Goeddel D. V., Hayflick J. S., Reich N., Anderson C. W., Levine A. J. // *Virology.* 1984. V. 134. P. 477–482.
13. Bienz B., Zakut-Houri R., Givol D., Oren M. // *EMBO J.* 1984. V. 3. P. 2179–2183.
14. Jenkins J. R., Rudge K., Redmond S., Wade-Evans A. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. P. 5609–5625.
15. Чумаков П. М., Поцова В. С., Георгиев Г. П. // *Докл. АН СССР.* 1982. Т. 267. С. 1272–1275.
16. Mazam A. M., Gilbert W. // *Meth. Enzymol.* 1980. V. 65. P. 499–560.
17. Melton D. A., Krieg P. A., Rebagliati M. R., Maniatis T., Zinn K., Green M. R. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. P. 7035–7056.

Поступило в редакцию
13.11.1987

PRIMARY STRUCTURE OF DNA COMPLEMENTARY TO MURINE ONCOPROTEIN p53 mRNA

CHUMAKOV P. M.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Nucleotide sequencing of cDNA clone specific for murine oncoprotein p53 from the SVTZ all line has revealed nucleotide changes as compared with previously published structures of p53 cDNA originated from other cell lines.