



УДК 577.322.23

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ.
ОБНАРУЖЕНИЕ БЕЛКА С $M \sim 37$ кДа, СВЯЗЫВАЮЩЕГОСЯ
С ТРИПТОФАНИЛ-ТРНК-СИНТЕТАЗОЙ***Берестень С. Ф., Рубикайте Б. И., Киселев Л. Л.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Для обнаружения белок-белковых взаимодействий предложен метод, включающий в себя разделение смеси полипептидов посредством гель-электрофореза, перенос на нитроцеллюлозный фильтр и выявление взаимодействия с исследуемым меченым полипептидом. Применяя эту процедуру, удалось показать, что триптофанил-ТРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.2) связывается с одним из полипептидов с $M \sim 37$ кДа, содержащимся в лизатах культивируемых клеток млекопитающих.

Белок-белковые взаимодействия наряду с белок-нуклеиновыми взаимодействиями — основной тип контактов между биополимерами в живой природе. К ним относятся взаимодействия между субъединицами ферментов, белками органелл (рибосомы, хромосомы, инфорсомы, цитоскелет и др.), белками вирусов, белковыми антигенами и антителами и т. д. Существуют многочисленные методы, позволяющие регистрировать такие взаимодействия, например иммобилизация одного из партнеров на колонке с последующим извлечением из смеси аффино взаимодействующего с ним белка, методы регистрации комплексов после гель-фильтрации, ультрацентрифугирования и т. д. Эти методы не свободны от недостатков. Одни из них нуждаются в предварительном выделении и очистке взаимодействующих белков, другие весьма трудоемки, третьи требуют относительно много материала. Поэтому разработка методов, позволяющих обнаруживать в сложных смесях (например, лизаты клеток) белок или белки, взаимодействующие с исследуемым белком, весьма актуальна.

В современном иммунохимическом анализе развита техника иммуноблоттинга [1], суть которой сводится к тому, что смесь белков разделяют гель-электрофорезом, переносят на нитроцеллюлозную мембрану и обрабатывают антителами против одного из белков смеси. Комплекс антиген — антитело обнаруживают благодаря тому, что в антитела предварительно вводят радиоактивную или флуоресцентную метку либо проводят дополнительную реакцию со вторыми антителами (против первых), которые выявляют по радиоактивности или иммунохимически. Метод иммуноблоттинга обладает рядом достоинств: он высокочувствителен, удобен для массовых определений, позволяет иметь в очищенном виде только один из взаимодействующих белков.

В этой работе мы показали, что принцип, лежащий в основе метода иммуноблоттинга, может быть успешно использован для обнаружения вообще белок-белковых взаимодействий, когда один из белков (меченый и очищенный) взаимодействует со сложной смесью других белков.

В качестве очищенного белка мы использовали бычью триптофанил-ТРНК-синтетазу (КФ 6.1.1.2, далее ТРС). Выбор этого фермента обусловлен следующим: во-первых, ТРС локализована в цитоплазме на свободных и связанных с мембранами гранулярного эндоплазматического ретикулума полисомах и на внешней стороне ядерной мембраны [2]; во-вторых, ранее мы наблюдали в световой и электронный микроскоп связь ТРС с детергентнерастворимой фракцией клеток, в состав которой в основном входят компоненты цитоскелета [3]. Из этих данных следует, что ТРС в клетке вступает в многочисленные контакты с разными клеточными структурами, и легко допустить, что среди них должны быть и контакты

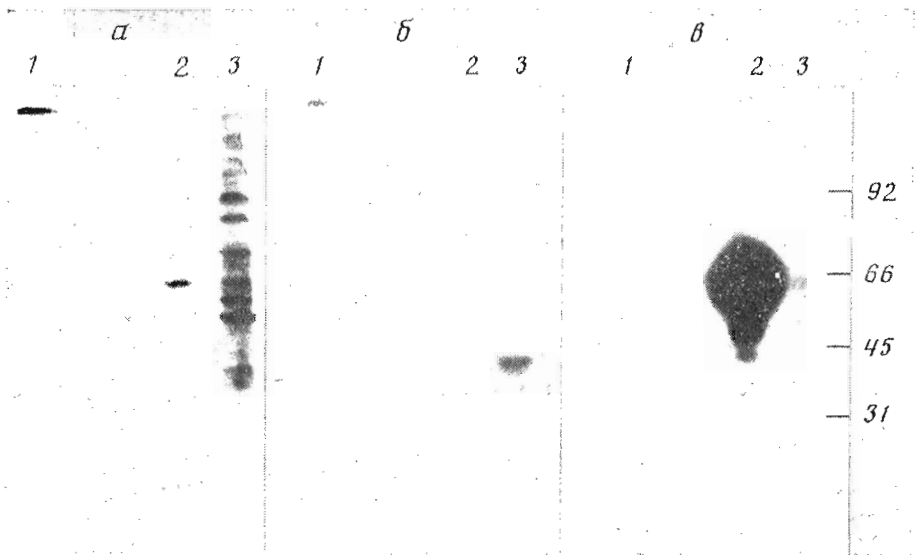


Рис. 1. Анализ лизата клеток P/3 Ag8 653: а — электрофорез в градиентном (7–22%) ПААГ лизата клеток ($5 \cdot 10^5$) (3), моноклональных антител Ам1, 10 мкг (1), и ТРС, 7 мкг (2). Образцы обрабатывали в отсутствие (1) и в присутствии меркаптоэтанола (2, 3). Гель окрашен кумасси после переноса полипептидов на два нитроцеллюлозных фильтра. б и в — обработка нитроцеллюлозных фильтров $[^{125}\text{I}]\text{TRC}$ и $[^{125}\text{I}]\text{AmI}$ соответственно. Цифры справа — положение и размеры (кДа) белков-свидетелей

TRC с белками. В данной работе была сделана попытка найти среди белков лизата клеток животных белки, взаимодействующие с ТРС.

Нами были исследованы лизаты клеток мышей, P/3 Ag8 653, и человека, К 562. Использование гомологичной системы в данном случае не требовалось, поскольку ТРС высших эукариот консервативны, на что указывают данные по иммунохимическому перекрестку кроличьих поликлональных антител [4] и моноклональных антител Ам1 к бычьей ТРС [5] с ТРС из других источников. В ходе отработки метода обнаружения белок-белковых взаимодействий использовали ТРС и полученные нами ранее и охарактеризованные моноклональные антитела Ам1 к ТРС [5, 6].

После электрофоретического разделения клеточного лизата линии P/3 Ag8 653 (рис. 1а) и последующего диффузного переноса на два нитроцеллюлозных фильтра один из фильтров обрабатывали $[^{125}\text{I}]\text{TRC}$ в PBS (0,15 М NaCl, 0,005 М натрийфосфат, pH 7,5) в присутствии 0,2% твина 20. Из рис. 1б видно, что ТРС взаимодействует с Ам1 (дорожка 1), а в клеточном лизате — с полипептидами с $M \sim 37$ кДа (дорожка 3).

На рис. 1в показаны результаты обработки второго фильтра $[^{125}\text{I}]\text{AmI}$: моноклональные антитела взаимодействуют с ТРС быка (дорожка 2) и в очень незначительной степени выявляют полипептид с $M \sim 60$ кДа в лизате клеток (дорожка 3), который, по-видимому, является субъединицей ТРС мыши.

ТРС взаимодействует со своим субстратом — тРНК^{Trp}, поэтому выявленная полоса с $M \sim 37$ кДа может представлять собой тРНК^{Trp}, подвижность которой при использованных условиях электрофореза может совпадать с подвижностью полипептида с $M \sim 37$ кДа. Поэтому в опыте (рис. 2) на дорожку 1 нанесли суммарную дрожжевую тРНК^{Trp}. Ранее было нами показано [7], что дрожжевая тРНК, так же как бычья, компетентно взаимодействует с бычьей ТРС. Однако в данных условиях, взаимодействие тРНК^{Trp} с ТРС не наблюдалось (рис. 2б, в, дорожка 1). Следовательно, полоса с $M \sim 37$ кДа не принадлежит тРНК.

Кроме того, чтобы исключить возможность связывания ТРС с какой-либо другой нуклеиновой кислотой, был поставлен опыт (не показано), в котором лизаты клеток P/3 Ag8 653 перед нанесением на гель обрабатывали ДНКазой и РНКазой. В этих условиях взаимодействие ТРС с

полосой $M \sim 37$ кДа сохранялось. При обработке лизата проназой взаимодействие исчезало, что подтверждает белковую природу полосы с $M \sim 37$ кДа. Следует обратить внимание на то, что связывание ТРС с АмІ может быть в принципе неспецифическим, поскольку АмІ подвергались обработке 2% SDS при 100° С и, несмотря на последующую длительную отмывку фильтра после переноса на него АмІ из геля, конформация активного центра антитела могла быть нарушена. Наблюдаемое связывание ТРС с антителом в этом случае может происходить за счет денатурации иммуноглобулина или контампных частей иммуноглобулинов мыши, т. е. неспецифически. Поэтому в качестве дополнительного контроля (рис. 2а—в, 2) были нанесены моноклональные антитела RT-14 к другому белку — РНК-зависимой ДНК-полимеразе. ТРС не взаимодействует с этими моноклональными антителами, но эффективно взаимодействует с АмІ (рис. 2б, 3). При жесткой обработке фильтра (см. ниже) взаимодействие ТРС с АмІ после электрофореза и переноса на фильтр не выявляется (рис. 2в, 3), тогда как с антителами, нанесенными на фильтр непосредственно перед обработкой («нативные» антитела), сохраняется (пять точек внизу — рис. 2в). По-видимому, связывающий участок антитела АмІ после электрофореза, переноса из геля на фильтр и обработки фильтра в жестких условиях действительно нарушается, но взаимодействие остается специфическим при обработке фильтра в мягких условиях, когда взаимодействия с неспецифическими антителами RT-14 не происходит.

Структура субстрата ТРС — тРНК^{Trp} практически одинакова у позвоночных [8]: аминоксил-тРНК-синтетазы позвоночных одной специфичности полностью взаимозаменяемы, что соответствует также данным по иммунохимическому сходству ТРС [4, 5]. Поэтому можно ожидать, что выявленная полоса $M \sim 37$ кДа будет обнаруживаться в тканях разных видов. Действительно, экстракт из клеток человека также содержит полосу (рис. 2, 5, 8) с $M \sim 37$ кДа, взаимодействующую с ТРС. Клетки обрабатывали буфером с β -меркаптоэтанолом, что приводило к разрыву S—S-связей в полипептидах и могло привести к потере способности некоторых полипептидов к взаимодействию с ТРС. Поэтому в опытах, показанных на рис. 2, клеточные лизаты получали как в присутствии β -меркаптоэтанола (дорожки 7, 8), так и в его отсутствие (дорожки 4, 5).

В эксперименте (рис. 1) мы выявили только один полипептид, взаимодействующий с ТРС. Однако могут существовать и другие полипептиды, связывающиеся с ТРС менее прочно, что удалось обнаружить следующим образом. Один из фильтров после диффузного переноса материала (рис. 2а) обрабатывали [¹²⁵I]ТРС в PBS с 0,1% SDS и 1% тритоном X 100 (жесткая обработка) (рис. 2в), затем PBS с 0,001% твином 20 (мягкая обработка) (рис. 2б).

При мягкой обработке, когда сохраняется взаимодействие с АмІ после переноса из геля, ТРС связывается с несколькими полипептидами с $M \sim 53, 47, 40, 37, 35, 30$ и 28 кДа, причем эти же полипептиды выявляются как в лизате мышечных клеток, так и в лизате клеток человека (рис. 2б, 4, 5, 7, 8). Присутствие β -меркаптоэтанола при обработке клеток не влияет на подвижность полипептидов и эффективность их взаимодействия с [¹²⁵I]ТРС (рис. 2б, 4, 7 и 5, 8).

При обработке фильтра [¹²⁵I]ТРС в жестких условиях связывание сохраняется только с полипептидом с $M \sim 37$ кДа и в незначительной степени с полипептидом с $M \sim 35$ кДа (рис. 2в). Эти полипептиды выявляются ТРС в лизате как человеческих, так и мышечных клеток. Присутствие β -меркаптоэтанола при обработке лизатов также не влияет на эффективность взаимодействия этих полипептидов с ТРС.

Как известно [8], ТРС состоит из двух субъединиц по 60 кДа каждая, причем субъединицы достаточно легко диссоциируют, не будучи соединены ковалентными связями. Поэтому в принципе возможна ситуация, когда [¹²⁵I]ТРС, обмениваясь на пикроцеллюлозе субъединицей с субъединицей ТРС клеточного лизата, будет выявлять полосу, в которой содержится субъединица ТРС, а не взаимодействующий с ней другой белок.

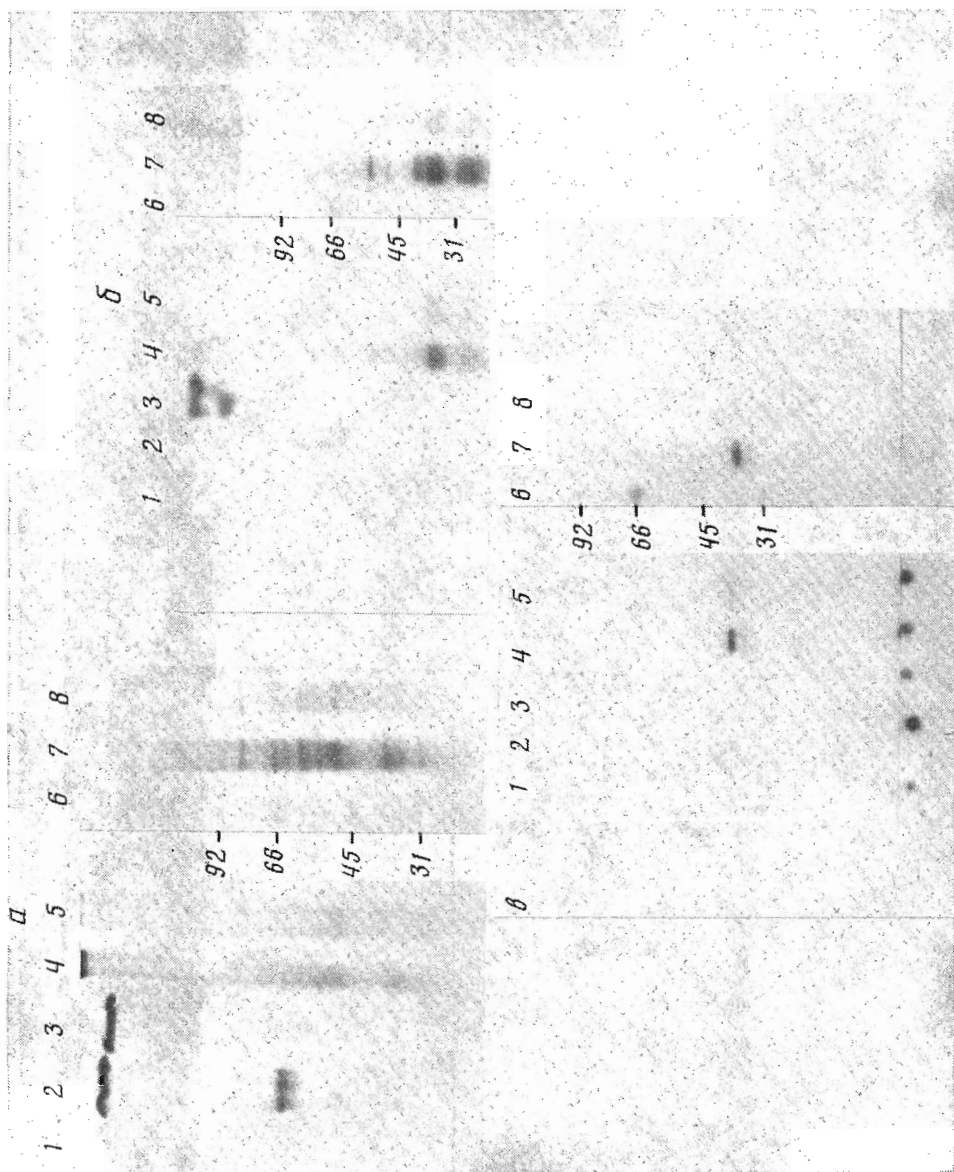


Рис. 2. Анализ лизата клеток Р/3 Ag8 653 и К 562: а — электрофорез в градиентном (7–22%) ПААГ лизата клеток Р/3 Ag8 653 (2·10⁵) (4, 7) и К562 (4·10⁵) (5, 8), суммарной тРНК из дрожжей, 100 мкг (1), моноклональных антител RT-14, 10 мкг (2), моноклональных антител Ам1, 10 мкг (3), белков-свидетелей (6). Образцы обрабатывали в отсутствие (1–5) и в присутствии меркаптоэтанола (6–8). Гель окрашен кумаси после переноса полипептидов на два нитроцеллюлозных фильтра. Обработка фильтров [¹²⁵I]TPC в PBS с 0,001% Tween 20 (6), в PBS с 0,1% SDS и 1% тритоном X 100 (6). Показаны положения и размеры (кДа) белков-свидетелей. Объяснение точек внизу (рис. 2а) см. в тексте

Известные и полученные данные опровергают такую возможность: 1) ТРС не выявляет в данных условиях полосы с $M \sim 60$ кДа (рис. 1б); 2) в присутствии 0,1% SDS субъединицы ТРС диссоциируют, и, следовательно, при отмывках полоса, даже если бы она возникла за счет обмена субъединиц, исчезнет; 3) предположение, что полоса с $M \sim 37$ кДа представляет собой продукт ограниченного протеолиза ТРС, крайне мало вероятно, так как количество материала в полосе с $M \sim 37$ кДа существенно больше, чем количество нативной ТРС в клеточном лизате.

Как видно из описанных выше результатов, примененный в этой работе белок-белковый блоттинг позволил обнаружить белок (или белки), прочно связывающийся с ТРС. То обстоятельство, что из сотен белков, содержащихся в лизатах животных клеток, лишь один обладает свойством прочно связываться с ТРС, указывает не только на неслучайный характер выявленного взаимодействия, но и на возможную существенную биологическую роль этого белка, которая нуждается в отдельном изучении.

Таким образом, применив метод, основанный на принципе иммуноблоттинга, в котором меченый антиген выявляет специфическое антитело в смеси белков, нам удалось показать, что выбранный нами антиген, являясь внутриклеточным белком, весьма эффективно связывается с одним из полипептидов клеточного лизата. Естественно, описанный подход должен быть применим и к обнаружению других белок-белковых взаимодействий. Мы показали, что белок-белковый блоттинг можно рассматривать как общий метод, в котором иммуноблоттинг является частным случаем. Исследуемый белок можно маркировать ^{125}I , как, например, в этой работе, и биотином, пероксидазой, флуоресцентными метчиками, а также получать меченем *in vivo*.

Согласно нашим предварительным данным, предложенный метод может использоваться и для ориентировочной (грубой) оценки силы связывания взаимодействующих белков. Когда мы в описанных опытах применяли более мягкие условия отмывки нитроцеллюлозного фильтра, то помимо полосы, соответствующей белку с $M \sim 37$ кДа, выявлялось еще несколько дискретных полос, полностью воспроизводимых на разных препаратах лизатов и ТРС. По-видимому, это белки, связывающиеся с ТРС слабее, чем белок с $M \sim 37$ кДа, однако они могут быть изучены и охарактеризованы.

Возможности предложенного метода, как вам кажется, очень широки и многообразны. Однако данная процедура, как вообще любой метод, имеет определенные ограничения: она выявляет взаимодействия, сохраняющиеся в присутствии небольших концентраций ионных и неионных детергентов, которые могут вызывать частичную денатурацию белка или экранирование некоторых заряженных групп.

Авторы благодарят О. О. Фаворову за полезные критические замечания по рукописи статьи.

Экспериментальная часть

Триптофанил-тРНК-синтазу из поджелудочной железы крупного рогатого скота (КФ 6.1.1.2) выделяли как описано [9]. Суммарная тРНК — производства НИКТИ БАВ (Бердск). Линии клеток Р/3 Ag8 653 и К 562 культивировали в среде DMEM с 10% эмбриональной сывороткой (Flow Laboratories, Англия). Перед использованием клетки отмывали 5 раз средой Игла центрифугированием при 300 *g*. Иодирование триптофанил-тРНК-синтазы и моноклональных антител АmI проводили согласно [10]. Белки-маркеры (Pharmacia, Швеция) иодировали [^{125}I]реагентом Болтона и Хантера как рекомендовано в работе [11].

Электрофорез проводили по методу Лэммли [12] в градиентном полиакриламидном геле (7–22%). Образцы перед нанесением обрабатывали буфером как в присутствии β -меркаптоэтанола, так и без него. Лизаты готовили из расчета 100 мкл этого буфера на $3 \cdot 10^6$ клеток. Радиоблоттинг проводили согласно [13].

После электрофореза полипептиды переносили на два нитроцеллюлозных фильтра BA85 (Schleicher und Schüll, ФРГ) и гель окрашивали кумассей G-250 (Sigma, США). Фильтры после отмывки PBS (0,15 M NaCl, 0,005 M фосфат натрия, pH 7,5) инкубировали 1 ч в PBS с 0,3% твином 20 (Ferak, Зап. Берлин), после чего обрабатывали [^{125}I]ТРС или [^{125}I]АmI 3 ч в объеме 10 мл (для ТРС — 10^5 имп./(мин·мл), уд. акт. 10^5 имп./(мин·мкг), для АmI — $3 \cdot 10^5$ имп./(мин·мл), уд. акт. $3 \cdot 10^5$ имп./(мин·

-мкг) в буфере, содержащем PBS с 0,001 или 0,2% твином 20 или с 0,1% SDS (Sigma, США) и 1% тритоном X100 (Ferak, Зап. Берлин). После отмывки фильтра 5–7 раз соответствующим буфером его автордиографировали 5–16 ч с рентгеновской пленкой РМВ или РТ-1 (Свема).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gershoni J., Palade G. E.* // *Anal. Biochem.* 1983. V. 131. № 1. P. 1–15.
2. *Палей Е. Л., Баранов В. Н., Зиновьев Н. Е., Киселев Л. Л.* // Биополимеры и клетка. 1985. Т. 1. № 2. С. 70–79.
3. *Палей Е. Л., Баранов В. Н., Киселев Л. Л.* // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1987. № 7.
4. *Scheinker V. Sh., Beresten S. F., Mazo A. M., Ambartsumyan N. S., Rokhlin O. V., Favorova O. O., Kisselev L. L.* // *Eur. J. Biochem.* 1979. V. 97. № 2. P. 529–540.
5. *Заргарова Т. А., Берестень С. Ф., Фаворова О. О., Киселев Л. Л.* // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. № 6. С. 1484–1487.
6. *Берестень С. Ф., Заргарова Т. А., Костров С. В., Фаворова О. О.* // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. № 5. С. 1407–1419.
7. *Beresten S. F., Scheinker V. Sh., Favorova O. O., Kisselev L. L.* // *Eur. J. Biochem.* 1983. V. 136. № 3. P. 559–570.
8. *Gauss D. H., Sprinzl M.* A supplement to *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. r1 – r58.
9. *Kisselev L. L., Favorova O. O., Kovaleva G. K.* // *Meth. Enzymol.* 1979. V. 59. Part G. P. 234–257.
10. *Bale W. F., Helmkamp R. W., Izzo M. I., Contreras M. A., Spar L. L.* // *Proc. Soc. Exptl Biol. and Med.* 1966. V. 122. P. 407–414.
11. *Bolton A. E.* Radioiodination techniques, 1977, Review 18 L: The Radiochemical Centre, Amersham. P. 49–54.
12. *Laemmli U. K.* // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
13. *Берестень С. Ф., Рубикайте В. И., Казаков В. К.* // Биополимеры и клетка. 1987. Т. 3. № 2. С. 59–65.

Поступила в редакцию
5.III.1987

A METHOD FOR DETECTING PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS. IDENTIFICATION OF A ~ 37 kDa PROTEIN, BINDING TRYPTOPHANYL-tRNA SYNTHETASE

BERESTEN S. F., RUBIKAITE B. I., KISSELEV L. L.

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

A procedure for detecting protein-protein interactions is proposed. It is based on blotting of electrophoretically separated protein mixtures followed by detection of the proteins interacting with a given ^{125}I -labelled protein used as a probe. Application of this approach to lysates of cultured mammalian cells enabled us to reveal a unique 37 kDa polypeptide interacting with ^{125}I -labelled bovine tryptophanyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.2).