



УДК 577.21

ПРОТЕОМНЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ФУНКЦИИ Sec14p-ПОДОБНОГО БЕЛКА p45

© 2005 г. М. И. Меркулова, В. В. Радченко, Е. В. Ильницкая,
Т. М. Шуваева#, В. М. Липкин

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 15.10.2004 г. Принята к печати 29.10.2004 г.

С целью выяснения функции Sec14p-подобного белка p45 мы предприняли поиск белков, взаимодействующих с белком p45, методом двугибридного скрининга. В результате скрининга дрожжевой библиотеки кДНК легких крысы было идентифицировано 6 белков, специфически активировавших репортерные гены двугибридной системы, и 21 белок, являющийся маловероятным партнером белка p45. Наиболее возможным кандидатом на роль партнера по взаимодействию с p45 является сурфактантный белок С (Sftpc). На основании результатов проведенных экспериментов и ранее полученных данных мы предполагаем, что белок p45 выполняет защитную функцию путем участия в биогенезе мембран клеток.

Ключевые слова: секреторный белок p45, Sec14-домен, дрожжевая двугибридная система, функциональная протеомика.

ВВЕДЕНИЕ

Впервые белок p45 привлек внимание исследователей благодаря своей способности взаимодействовать с антителами, полученными против пептида, соответствующего участку, общему для α -субъединиц всех типов G-белков [1]. В дальнейшем белок p45 был выделен из обонятельного эпителия крысы и охарактеризован как GTP-связывающий белок, обладающий также GTP-азной активностью [2]. Было показано, что содержание белка p45 составляет примерно 2% от всех водорастворимых белков обонятельного эпителия. Полученные данные свидетельствовали о том, что белок p45 играет важную роль в функционировании этой, а возможно и других тканей, и положили начало его комплексным структурно-функциональным исследованиям.

Для выяснения функции белка p45 использовалось несколько подходов. На первом этапе исследований была определена первичная структура белка и выявлено, что он является гомологом дрожжевого белка-переносчика фосфатидилинозитов Sec14p [3]. Для дрожжевого белка Sec14p известна третичная структура [4], и он послужил прототипом нового семейства белковых модулей, получившего название "SEC14-домен" (Smart entry: smart00516) или "CRAL/TRIO-домен" (Pfam entry: pfam00650). SEC14-домен широко распространен в протеомах эукариотических организмов, от

наиболее примитивных из них, таких, как дрожжи, до наиболее сложно устроенных организмов млекопитающих, в том числе человека. Этот новый липидсвязывающий домен обнаружен у транспортных белков [5], у белков, участвующих в трансдукции сигнала [6, 7] и у множества белков с неизвестной функцией. По крайней мере у некоторых белков SEC14-домен определяет их внутриклеточную локализацию [6, 7]. Функциональное исследование белков, содержащих эволюционно древний консервативный SEC14-домен, а также процессов, происходящих с их участием, является одной из новых, малоизученных и перспективных областей молекулярной биологии клетки.

Наличие SEC14-домена у белка p45 позволило предположить, что этот белок выполняет функцию по переносу гидрофобного лиганда [3]. Помимо изучения природы этого лиганда для выяснения функциональной роли p45 в эукариотической клетке было решено применить протеомный подход, а именно идентифицировать белки, с ним взаимодействующие. Одним из наиболее часто используемых в последние годы методов для идентификации белок-белковых взаимодействий является метод двугибридной системы [8], принципы которой разработали Филдс и Сонг, и именно он был применен в наших исследованиях.

Наша задача была облегчена тем, что к этому времени уже была определена тканевая и внутриклеточная локализация исследуемого белка. Наибольшая концентрация белка p45 была обнаружена в поверхностных слоях тканей, имеющих

Автор для переписки (тел.: (095) 336-51-11; факс: (095) 335-71-03; эл. почта: shuvaeva@ibch.ru).

непосредственный контакт с окружающей средой [3]. Более того, белок был локализован в секреторных везикулах клеток этих тканей, а также в секретах, выделяемых клетками во внеклеточное пространство [1–3]. В наших экспериментах (неопубликованные данные) по экспрессии кДНК белка р45 в эукариотических клетках COS-1 мы обнаружили, что белок р45 накапливается в секреторных везикулах и внеклеточном пространстве – среде культивирования трансфицированных клеток. Совпадение этих данных с фактами, отраженными в литературных источниках, позволило сделать вывод о том, что р45 является секреторным белком.

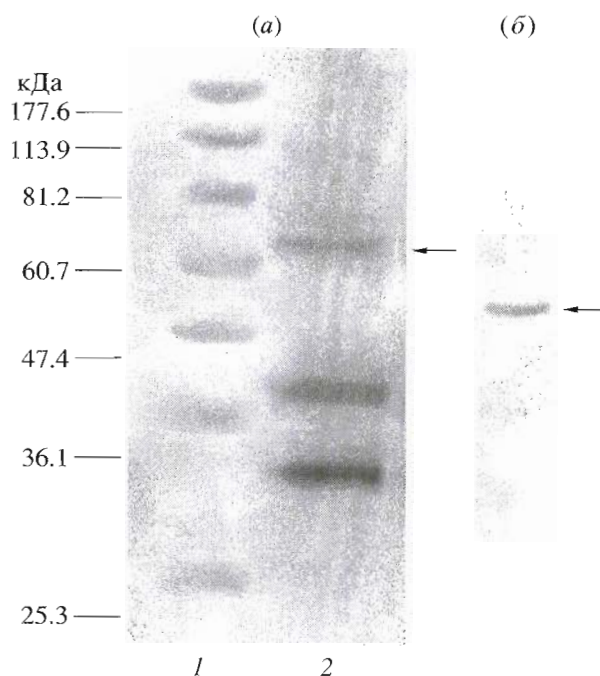
Целью данной работы является поиск белков, взаимодействующих с белком р45 из обонятельного эпителия крысы, методом двугибридной системы. В ходе данной работы мы также получили дополнительную информацию о “ложноположительных” белках, активирующих репортерные гены двугибридной системы, но не являющихся, по нашему мнению, партнерами белка р45.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Белок р45 является токсичным при его получении в клетках Saccharomyces cerevisiae

Первым этапом данной работы было создание генно-инженерной конструкции для синтеза в клетках *S. cerevisiae* рекомбинантного гибридного белка, полипептидная цепь которого, наряду с последовательностью белка р45, содержит на N-конце ДНК-связывающий домен белка GAL4, и изучение процесса экспрессии данной конструкции. Следует отметить, что предпринятые ранее попытки экспрессии полноразмерной кДНК белка р45 в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris* не были успешными (неопубликованные данные). С целью обеспечения устойчивой гетерологичной экспрессии исследуемой кДНК в штамме *S. cerevisiae* Y190 была создана конструкция рAS2-1(р45), содержащая полноразмерный ADH1-промотор, обеспечивающий высокий уровень продукции находящегося под его контролем белка. Методом Вестерн-блоттинга удалось подтвердить экспрессию в клетках кДНК рекомбинантного гибридного белка с молекулярной массой ~67 кДа (рисунки).

Однако оказалось, что при уровне продукции белка р45, определяемом полноразмерным ADH1-промотором, он оказывает токсичное воздействие на клетки *S. cerevisiae*. Это проявлялось в замедленной практически в 2 раза скорости роста Y190/рAS2-1(р45)-трансформантов в жидкой культуре по сравнению со скоростью роста контрольных Y190/рAS2-1-трансформантов. В последующем эксперименте при трансформации одновременно двумя плазмидами рAS2-1(р45) и рACT2 (в



Анализ экспрессии кДНК гибридного белка $M \sim 67$ кДа в клетках штамма *S. cerevisiae* Y190. (а) электрофорез в 12.5% SDS-ПААГ. Суммарные клеточные белки (в клеточном осадке) штамма *S. cerevisiae* Y190, содержащего плазмиду рAS2-1(р45) (2); белки-маркеры (1), слева – их молекулярная масса. Стрелкой указано положение рекомбинантного гибридного белка с $M \sim 67$ кДа. (б) Вестерн-блот суммарных клеточных белков (в клеточном осадке) штамма *S. cerevisiae* Y190, содержащего плазмиду рAS2-1(р45); детекция хемоллюминесцентным методом. Стрелкой указано положение рекомбинантного гибридного белка с $M \sim 67$ кДа.

составе этого вектора находилась коммерчески доступная библиотека кДНК легких крысы (Clontech, США)) эффективность котрансформации (число колониеобразующих единиц в пересчете на 1 мкг обеих плазмид) составляла около 10^2 и была на 2 порядка ниже эффективности контрольной котрансформации штамма Y190 плазмидами рAS2-1 и рACT2, которая составляла около 10^4 . Поскольку при двугибридном скрининге было необходимо получить не менее 10^6 котрансформантов, мы должны были добиться большей эффективности котрансформации. С этой целью мы решили переклонировать кДНК белка р45 в вектор рGBT9, содержащий усеченный ADH1-промотор, обеспечивающий меньший уровень экспрессии находящегося под его контролем белка, и тем самым добиться большей жизнеспособности трансформированных клеток и, как следствие, большей эффективности котрансформации. И действительно, при трансформации одновременно двумя плазмидами рGBT9(р45) и рACT2 эффективность котрансформации составляла около 10^4 , как и в случае с контрольными плазмидами.

Таблица 1. Белки – кандидаты на роль функциональных партнеров белка p45 *in vivo*, отобранные в результате двугибридного скрининга

Название белка	Номер доступа соответствующей кДНК в базе данных GenBank и положение участка этой кДНК, идентифицированного с помощью программы BLAST	Локализация белков	Функции белка
Сурфактантный белок С	NM_017342 8–587	Секретируются во внеклеточное пространство	Защитная; ассоциированный с липидами белок
Секретоглобин	NM_013051 14–463		Защитная; модулятор воспалительных процессов
Лиганд 5 хемокина	NM_031116 1–278		Защитная; участвует в хемотаксисе, медиатор воспалительных процессов
Активатор 2 пресенилина человека	NM_172341 194–510	Мембранные белки	Компонент гамма-секретазного комплекса, участвующего в протеолизе ряда мембранных белков
Эндоглин	BC029080 2060–2551		Компонент рецепторного комплекса трансформирующего ростового фактора бета 1
Белок 1, дифференциально-экспрессирующийся в ядре мозжечка мыши	XM_215930 535–1013		Неизвестна

Кандидаты на роль белков, взаимодействующих с белком p45 *in vivo*

Изначально белок p45 был выделен из обонятельного эпителия крысы [1, 2], поэтому с целью обнаружения его белковых партнеров было бы наиболее оптимально исследовать библиотеку кДНК именно этого органа. Однако в дальнейшем было показано, что уровень синтеза белка p45 высок во всех тканях, контактирующих с кислородом воздуха, в том числе и в легких [3]. С учетом этого, а также того, что библиотека кДНК обонятельного эпителия коммерчески не доступна, для поиска белков-партнеров было решено использовать библиотеку кДНК легких крысы в составе вектора pACT2, сконструированную для двугибридной системы (Clontech, США). В качестве приманки (bait) при скрининге библиотеки мы использовали плазмиду pGBT9(p45), содержащую кДНК полно-размерного белка p45.

Предварительные эксперименты показали, что белок p45 сам по себе не активирует репортерные системы *HIS3* и *lacZ* и поэтому поиск его партнеров может быть осуществлен с помощью двугибридного скрининга. В результате была проанализирована библиотека кДНК из легких крысы представительностью около 7×10^6 дрожжевых клонов, полученных в результате котрансформации штамма Y190 плазмидами pGBT9(p45) и суммарной кДНК из легких крысы, клонированной в составе вектора pACT2. Дрожжевые позитивные клоны (28 клонов), отобранные по способности активировать *HIS3*- и *lacZ*-репортерные системы,

послужили источником кДНК белков, являющихся предположительными партнерами белка p45. Была определена частичная нуклеотидная последовательность отобранных кДНК в составе вектора pACT2, и проведен поиск гомологичных структур в базе данных GenBank с помощью программы BLAST. Полученные данные приведены в табл. 1 и 2.

В это же время нами были получены данные о локализации белка p45 во внеклеточном пространстве и секреторных везикулах (неопубликованные данные). Это позволило нам сделать предположение о том, что среди выявленного с помощью двугибридного скрининга множества кандидатов на роль белков-партнеров по взаимодействию наиболее вероятными партнерами белка p45 являются секретируемые и мембранные белки. После анализа структуры, свойств и внутриклеточной локализации белков, идентифицированных в результате двугибридного скрининга, мы выбрали шесть наиболее вероятных кандидатов на роль партнеров белка p45 (табл. 1), три из которых являются секретируемыми, три – мембранными. Остальные же белки, по-видимому, напрямую не взаимодействуют с белком p45, и в нашем случае вероятнее всего просто активируют экспрессию репортерных генов. Таким образом, проведенный двугибридный скрининг и последующий анализ полученных результатов, позволил сконцентрировать наше внимание на шести белках. Функции пяти из них достаточно хорошо изучены, и обнаруженное в двугибридной системе взаимодействие одного или нескольких из этих белков с

Таблица 2. Белки – маловероятные партнеры белка р45

Группы белков со схожими функциями	Название белка	Номер доступа соответствующей кДНК в базе данных GenBank и участок этой кДНК, идентифицированный с помощью программы BLAST
Белки, имеющие участки для взаимодействия с нуклеиновыми кислотами (в том числе транскрипционные факторы)	Прогестининдуцируемый белок	NM_053989 2550–2788
	Семейство H2A гистона, белок X	BC010336 443–533
	ETF-подобный фактор-2а	D87966 1764–2292
	Регуляторный фактор X, 3	BC017598 454–582
	Транскрибционный фактор 3	XM_215460 1–351
	РНК-полимеразы В	
Рибосомные белки	Гипотетический, содержащий U1-подобный цинковый палец и РНК-узнающий регион мотив S16	BC025499 2667–2771
	S16	X17665 22–413
	S13	X17665 105–544
	L14	NM_130432 31–524
Митохондриальные белки	6.4-кДа субъединица убиквитин-цитохром С редуктазы	NM_022949 43–652
	Субъединица IV цитохром С оксидазы	BC034408 23–296
Белки, участвующие в транспорте и метаболизме нуклеотидов	Белок, подобный ингибитору протеинкиназы С	X15029 15–518
	Гипотетическая рибокиназоподобная структура, содержащая белок	XM_231925 32–547
Белки регуляции клеточного цикла	Белок 1, ассоциированный с циклинзависимой киназой 2	AK003048 18–496
	Цистеин/глицин-богатый белок 1	NM_013812 143–662
Белки цитоскелета	Альдегидредуктаза	NM_017148 4–595
Другие белки	Альдолаза А	AY207463 55–552
	α-Протимозин	M14420 584–1160
	Липокортин V	NM_021740 4–412
	Плексин В2-подобный белок	AF051895 23–682
	ECRG-2-подобный белок	XM_243652 5297–5676
		XM_217268 75–672

белком р45 (при его подтверждении в последующих экспериментах) позволит получить новую информацию о свойствах и функции белка р45.

Из приведенных в табл. 1 белков наиболее интересным кандидатом на роль партнера по взаимодействию с р45 является белок С (Sftpc), находящийся в существенных количествах, так же как и р45, исключительно в тканях, непосредственно контактирующих с окружающей средой [9]. Впервые белок Sftpc был выделен из бронхиально-легочной жидкости и обладал свойством инициировать формирование поверхностной пленки из смесей фосфолипидов [9]. Этот белок с $M 5$ кДа образуется из более длинного предшественника и содержит гидрофобный участок, определяющий его взаимодействие с липидами. Как и некоторые

другие сурфактантные белки, Sftpc обеспечивает стабильность легочных альвеол путем понижения силы поверхностного напряжения на границе воздух–вода [9]. Мутации в гене этого белка связаны с серьезными легочными заболеваниями [10]. Как и Sftpc и другие сурфактантные белки, белок р45 может принимать участие в формировании мембран клеток, имеющих непосредственный контакт с окружающей средой, выполняя тем самым защитную функцию.

Поскольку белок р45 локализован в обязательном эпителии, который, контактируя с окружающей средой, является еще и нервной тканью, то можно предположить, что р45 выполняет и более специфическую функцию, например, участвует в перирецепторном этапе трансдукции обо-

нительного сигнала, т.е. до того, как сигнальная молекула свяжется с рецептором.

Ответ на вопрос о выполнении белком р45 более специфических функций, может быть получен путем поиска в обонятельном эпителии нейроспецифических белков, участвующих в передаче обонятельного сигнала и взаимодействующих с белком р45. В пользу того, что белок р45 может выполнять нейроспецифическую функцию говорит тот факт, что один из белков, содержащих SEC14-домен, кайтаксин (cautaxin), играет важную роль в функционировании нервной системы. Мутации этого домена являются причиной одной из разновидностей врожденной атаксии, заболевания нервной системы, связанного с нарушением координации движений [11].

Белки – маловероятные партнеры белка р45

В ходе проведенного нами двугибридного скрининга найден 21 белок (табл. 2), предположительно не являющиеся функциональными партнерами белка р45 в двугибридной системе. Такое заключение было сделано исходя из известных свойств этих белков. Среди них наиболее широко представлены белки, имеющие участки для взаимодействия с нуклеиновыми кислотами (в том числе транскрипционные факторы) (шесть белков), в меньшей степени – рибосомные белки (три белка), митохондриальные белки (два белка) и белки, участвующие в транспорте и метаболизме нуклеотидов (два белка).

Для некоторых из белков (например, рибосомных, митохондриальных и белков цитоскелета), скорее всего не взаимодействующих с белком р45, способность к активации двугибридной системы была показана ранее в других работах (www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrap-InWork.html), для большинства же белков, приведенных в табл. 2, литературных данных об этом найдено не было, и, вероятно, данное свойство у исследованных полипептидов обнаружено нами впервые. С другой стороны, известно, что белки теплового шока часто дают “ложноположительный” сигнал при двугибридном скрининге [12], однако нами подобных белков найдено не было.

Причины появления таких сигналов могут быть различными. В одних случаях ложный белок-партнер активирует экспрессию репортерного гена напрямую, а в других – активация может происходить за счет не прямых метаболических эффектов [13]. Так, было показано, например, что некоторые белки изменяют проницаемость клеточной стенки дрожжей, что, в свою очередь, влияет на чувствительность в тесте на β -галактозидазную активность. Некоторые белки цитоскелета при экспрессии в дрожжах вызывают гибель клеток и опосредуют неспецифическую активацию β -га-

лактозидазы [13]. Кроме того, ситуация осложняется тем, что при сверхэкспрессии в *S. cerevisiae* гибридные белки могут приобретать совершенно новые свойства, отличные от свойств исходных полипептидов. Сверхэкспрессированные гибридные белки могут влиять на жизнеспособность, скорость роста и проницаемость клеточной стенки дрожжевых клеток, что, в конечном счете, может приводить к неспецифической активации репортерных систем.

Интересно, что некоторые из белков, способных активировать двугибридную систему, но являющихся маловероятными партнерами белка р45 (например, белок 1 ассоциированный с циклин-зависимой киназой 2 (CDK2, cyclin-dependent kinase 2)-associated protein 1) [14], альдолаза А (aldolase A) [15], липокортин V (lipocortin V) [16], плексин B2 (plexin B2) [17], субъединица IV цитохром С оксидазы (cytochrome C oxidase subunit IV) [18]), были отобраны в результате двугибридных скринингов, проводимых другими исследователями, и, по их данным, по-видимому, действительно проявляли специфические белок-белковые взаимодействия с белками-“приманками”, поскольку им удалось подтвердить обнаруженное взаимодействие также и независимыми методами.

В плане проводящихся в последнее время исследований белок-белковых взаимодействий в масштабе всего протеома элиминирование “ложноположительных” сигналов становится первоочередной задачей [19]. Одним из подходов к ее решению может быть создание баз данных белков, которые активируют двугибридную систему, но являются маловероятными партнерами исследуемого белка. Примером небольшой базы данных по подобным белкам может служить табл. 2. Приводимые нами данные о 21 белке могут быть приняты во внимание другими исследователями при анализе обнаруженных в результате двугибридного скрининга белок-белковых взаимодействий.

Белок-белковые взаимодействия определяют большинство процессов, лежащих в основе функционирования клетки. После завершения крупномасштабных проектов по секвенированию геномов нескольких организмов стало возможным решение задачи по созданию карт белок-белковых взаимодействий этих организмов – интерактомов [20]. Наиболее сложным является построение интерактомов человека и других млекопитающих, при создании которых широко применяется дрожжевая двугибридная система [20, 21]. Появление “ложноположительных” сигналов является серьезным ограничением этого метода, поэтому обнаруженные взаимодействия обязательно должны быть подтверждены, по крайней мере, еще одним независимым методом [19, 22].

В ближайшее время мы планируем подтвердить взаимодействие белка р45 с белками-канди-

датами на роль партнеров с использованием независимых методов – коиммунопреципитации и конфокальной микроскопии. Эти эксперименты позволят определить, взаимодействуют ли предполагаемые партнеры в клетках млекопитающих *in vivo* и подтвердить наши предположения о функции белка р45, механизме его действия в разных типах клеток и определить его место в клеточных процессах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реактивы. Для приготовления буферных и других растворов использовали реактивы отечественного производства, имеющие квалификацию “ос.ч.” или “х.ч.” и импортные реактивы производства фирм “Serva” (Германия) и “Sigma” (США). Для приготовления сред использовали триптон, пептон, дрожжевой экстракт, бакто-агар (Difco, США); дрожжевые азотистые основания, смеси аминокислот, декстрозу (Sigma, США). В работе использовали ферменты модификации ДНК фирм “MBI Fermentas” (Литва), “Promega” (США), “Roche” (Германия); набор реактивов для выделения плазмидной ДНК “Wizard Plus Minipreps DNA Purification System” (Promega, США); набор реактивов для очистки ДНК из агарозных гелей “UltraClean DNA Purification Kit” (Mo Bio Laboratories, США); вторичные антитела Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) – HRP Conjugate – фирмы “Bio-Rad” (США); предварительно окрашенные маркеры молекулярных масс белка “Benchmark™ Pre-Stained Protein Ladder” (MBI Fermentas, Литва); “ECL Western blotting detection reagents” (Amersham, США); красители бромфеноловый синий, бромистый этидий, “Brilliant Blue R” (Sigma, США); мембраны Hybond-N и Hybond-ECL (Amersham, США); ватман (Whatman, Англия); стеклянные шарики размером 425–600 мкм (Sigma, США).

Штаммы бактериальных и дрожжевых культур. Штамм DH5α *E. coli* (Life Technologies, США) использовали для наработки плазмидной ДНК и трансформации при клонировании. Двугибридный скрининг был проведен на штамме Y190 дрожжей *S. cerevisiae* (Clontech, США).

Плазмидные конструкции. Работу с рекомбинантными ДНК осуществляли стандартными методами [23]. Фрагмент кДНК белка р45, предназначенный для клонирования с сохранением рамки считывания в векторе для двугибридной системы, был получен методом ПЦР с использованием в качестве праймеров олигонуклеотидов, в последовательности которых были введены точечные замены для создания соответствующих сайтов рестрикции. В качестве прямого праймера использовали (5')СТС АGC CCG GGG AGT GGC CGA G (подчеркнут сайт рестриктазы *XmaI*), в качестве обратного – (5')АTG GGT CGA CCT AGA TAG GGG TG (подчеркнут сайт рестриктазы *SalI*). Матрицей

для проведения ПЦР служила полученная ранее в лаборатории плазида рSP65(р45) [3], содержащая последовательность кДНК 45-кДа белка. После обработки соответствующими рестриктазами кДНК белка р45 была клонирована в плазмиду рAS2-1 (Clontech, США) по сайтам *XmaI-SalI*. Сконструированная плазида рAS2-1(р45) содержала под контролем полноразмерного АДН1-промотора открытую рамку считывания, включающую в себя инициаторный АТГ-кодон, последовательность, кодирующую ДНК-связывающий домен белка GAL4 (остатки 1–147), полноразмерную кДНК белка р45 и стоп-кодон TAG. Плазида рGBT9(р45) была получена путем клонирования по сайтам *XmaI-SalI* фрагмента плазмиды рAS2-1(р45), содержащего кДНК белка р45, в плазмиду рGBT9 (Clontech, США) с усеченным АДН1-промотором.

Нуклеотидная последовательность всех полученных конструкций, использованных в последующих экспериментах, была подтверждена путем секвенирования по методу Сэнгера. Секвенирование проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer.

Экспрессия кДНК белка р45 в клетках *S. cerevisiae* и ее детекция методом Вестерн-блоттинга. Трансформацию компетентных клеток *S. cerevisiae* Y190 осуществляли по литий-ацетатному методу [24]. Трансформированные клетки наращивали в минимальной жидкой среде при 30°C до достижения значения оптического поглощения A_{600} , равного 1.5–2.0. Получали клеточный осадок центрифугированием. Приготовление белкового экстракта из клеточного осадка проводили методом Принтена и Спраге [25] с модификациями. Клетки обрабатывали полным лизирующим буферным раствором (состав: 100 мкл концентрированного лизирующего буферного раствора (8 М мочевины; 5% SDS; 40 мМ Трис-НСl, рН 6.8; 0.1 мМ EDTA; 0.4 мг/мл бромфенолового синего; дистиллированная вода); 1 мкл 2-меркаптоэтанол; 5 мкл фенилметансульфонилфторида), нагревали при 70°C и интенсивно перемешивали со стеклянными шариками, центрифугировали. Супернатант собирали, кипятили. Подготовленные образцы наносили на гель для электрофореза (рисунок, а): стандарт, суммарные клеточные белки. SDS-ПААГ-электрофорез проводили в 12.5% ПААГ по методу Лэммли [26]. В качестве маркера использовали смесь предварительно окрашенных белков разных молекулярных масс. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли методом мокрого электроблоттинга [27]. На рисунке, б представлены результаты экспрессии кДНК рекомбинантного гибридного белка с молекулярной массой, приблизительно равной 67 кДа. Обработку мембраны проводили по стандартной схеме [28]. В качестве

первичных антител использовали поликлональные антитела кролика, полученные к натуральному белку р45 крысы как было описано ранее [2]. Детекцию белка осуществляли хемоллюминесцентным методом с использованием набора реактивов фирмы "Amersham" (США) (см. "Материалы и реактивы") согласно рекомендациям изготовителя. В культуральной жидкости после культивирования штамма *S. cerevisiae* Y190, содержащего плазмиду рAS2-1(р45), при проявлении гибридный белок обнаружен не был.

Двугибридный скрининг и анализ отобранных клонов. В работе использовали коммерчески доступную двугибридную систему, основанную на GAL4-зависимой активации репортерных генов и состоящую из штамма Y190 и плазмид рAS2-1 и рACT2 (Clontech, США). Скрининг плазмидной библиотеки кДНК легких крысы в составе вектора рACT2 (The Rat Lung Matchmaker cDNA Library (Clontech, США)) проводили согласно рекомендациям изготовителя. В основном процедура сводилась к следующему: амплификацию библиотеки и препаративное выделение плазмидной ДНК осуществляли стандартными методами [23]. Котрансформацию дрожжевых клеток штамма Y190 плазмидами рGBT9(р45) и суммарной кДНК из легких крысы, клонированной в составе вектора рACT2, проводили по литий-ацетатному методу [24]. Котрансформанты выращивали при 30°C в течение 10–14 сут на чашках с минимальной селективной средой, не содержащей лейцина, триптофана и гистидина, в присутствии 45 мМ 3-амино-1,2,4-триазола – конкурентного ингибитора дрожжевого белка His3p [29]. Полученные колонии пересевали на новые чашки, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и анализировали на способность активировать репортерный ген *lacZ*. Из дрожжевых клонов с активированными репортерными генами *HIS3* и *lacZ*, отобранных в результате двугибридной селекции, выделяли плазмидную ДНК. Секвенирование плазмид проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer. Поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank осуществляли с помощью программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Наличие консервативных доменов в аминокислотных последовательностях определяли с использованием базы данных консервативных доменов (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотруднику ИБХ РАН Н.С. Быстрову за синтез олигонуклеотидных зондов и Межинститутскому Центру коллективного пользования "ГЕНОМ" ИМБ РАН

(<http://www.genome-centre.narod.ru/>), организованно при поддержке РФФИ (грант № 00-04-55000), за секвенирование ДНК. Данная работа поддержана грантами CRDF RB1-2338-MO-02 и РФФИ № 02-04-48364.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Novoselov V.I., Peshenko I.V., Evdokimov V.J., Nikolaev J.V., Matveeva E.A., Fesenko E.E. // FEBS Lett. 1994. V. 353. P. 286–288.
2. Novoselov V.I., Peshenko I.V., Evdokimov V.A., Nikolaev J.V., Matveeva E.A., Fesenko E.E. // Chem. Senses. 1996. V. 21. P. 181–188.
3. Merkulova M.I., Andreeva S.G., Shuvaeva T.M., Novoselov S.V., Peshenko I.V., Bystrova M.F., Novoselov V.I., Fesenko E.E., Lipkin V.M. // FEBS Lett. 1999. V. 450. P. 126–130.
4. Sh B., Phillips S.E., Bankaitis V.A., Luo M. // Nature. 1998. V. 391. P. 506–510.
5. Sato Y., Arai H., Miyata A., Tokita S., Yamamoto K., Tanabe T., Inoue K. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 17705–17710.
6. Huynh H., Bottini N., William S., Cherepanov V., Musumeci L., Saito K., Bruckner S., Vachon E., Wang X., Kruger J., Chow C.W., Pellecchia M., Monosov E., Greer P.A., Trimble W., Downey G.P., Mustelin T. // Nat. Cell Biol. 2004. V. 6. P. 831–839.
7. Ueda S., Kataoka T., Satoh T. // Cell Signal. 2004. V. 16. P. 899–906.
8. Fields S., Song O. // Nature. 1998. V. 340. P. 245–246.
9. Warr R.G., Hawgood S., Buckley D.I., Crisp T.M., Schilling J., Benson B.J., Ballard P.L., Clements J.A., White R.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 7915–7919.
10. Nogue L.M., Dunbar A.E. 3rd, Wert S.E., Askin F., Hamvas A., Whitsett J.A. // N. Engl. J. Med. 2001. V. 344. P. 573–579.
11. Bomar J.M., Benke P.J., Slattery E.L., Puttagunta R., Taylor L.P., Seong E., Nystuen A., Chen W., Albin R.L., Patel P.D., Kittles R.A., Sheffield V.C., Burmeister M. // Nat. Genet. 2003. V. 35. P. 264–269.
12. Bartel P., Chien C.T., Sternglanz R., Fields S. // Biotechniques. 1993. V. 14. P. 920–924.
13. Serebriiskii I., Estojak J., Berman M., Golemis E.A. // Biotechniques. 2000. V. 28. P. 328–336.
14. Buajeeb W., Zhang X., Ohyama H., Han D., Surarit R., Kim Y., Wong D.T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. V. 315. P. 998–1003.
15. Lu M., Holliday L.S., Zhang L., Dunn W.A. Jr., Gluck S.L. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 30407–30413.
16. Wen Y., Edelman J.L., Kang T., Sachs G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. V. 258. P. 713–721.
17. Elkon H., Don J., Melamed E., Ziv I., Shirvan A., Offen D. // J. Mol. Neurosci. 2002. V. 18. P. 229–238.
18. Perrot V., Vazquez-Prado J., Gutkind J.S. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 43115–43120.
19. Legrain P., Selig L. // FEBS Lett. 2000. V. 480. P. 32–36.
20. Causier B. // Mass Spectrom. Rev. 2004. V. 23. P. 350–367.

21. Ito T., Chiba T., Ozawa R., Yoshida M., Hattori M., Sakaki Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 4569–4574.
22. Serebriiskii I.G., Golemis E.A. // Methods Mol. Biol. 2001. V. 177. P. 123–134.
23. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor; New York; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
24. Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A. // J. Bacteriol. 1983. V. 153. P. 163–168.
25. Printen J.A., Sprague G.F. Jr. // Genetics. 1994. V. 138. P. 609–619.
26. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
27. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 4350–4354.
28. Harlow E., Lane D. Antibodies (A Laboratory Manual). Cold Spring Harbor; New York; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1988.
29. Durfee T., Becherer K., Chen P.L., Yeh S.H., Yang Y., Kilburn A.E., Lee W.H., Elledge S.J. // Genes Dev. 1993. V. 7. P. 555–569.

A Proteomic Approach to Study of the Function of the Sec14p-Like p45 Protein

M. I. Merkulova, V. V. Radchenko, E. V. Il'nitskaya,
T. M. Shuvaeva[#], and V. M. Lipkin

[#]Phone: +7 (095) 336-5111; fax: +7 (095) 335-7103; e-mail: shuvaeva@ibch.ru
Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

We undertook a search for proteins interacting with protein p45 by the method of two-hybrid screening in order to determine the function of the Sec14p-like protein p45. A screening of the yeast library of rat lung cDNA, six proteins specifically activating the reporter genes of a two-hybrid system and 21 unlikely protein partners of protein p45 were identified. The most likely candidate for the role of a p45 partner is the surfactant protein C (Sftpc). These results and previous studies led us to the hypothesis that protein p45 fulfills its protective function by participating in the biogenesis of cell membranes. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: secreted protein p45, Sec14 domain, yeast two-hybrid system, functional proteomics