



УДК 577.126

НОВЫЙ МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ЛИПИДНОГО ТРАНСПОРТА *in vitro*: БЕЛОК С МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 45 кДа ИЗ ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ КРЫСЫ – СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ПЕРЕНОСЧИК ФОСФАТИДИЛИНОЗИТ-3,4,5-ТРИФОСФАТА

© 2005 г. В. В. Радченко^{*,#}, Т. М. Шуваева^{*}, Е. В. Ильницкая^{*},
В. Е. Третьяков^{**}, 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;

^{**} НИИ физико-химической медицины МЗСР
РФ, Москва

Поступило в редакцию 15.03.2005 г. Принято к печати 16.03.2005 г.

Разработан новый метод изучения липид-белковых взаимодействий *in vitro*, позволяющий исследовать транспортную активность белка по отношению к липидному лиганду (в том числе и в случае, когда тип липида неизвестен). Метод можно классифицировать как вариант распределительной трехфазной хроматографии, включающей две неподвижные фазы (“донорную” и “акцепторную”) и одну подвижную. Исследуемый белок, растворенный в водной подвижной фазе, индуцирует специфическую доставку липида в акцепторный липидный слой. Переносимый липид регистрируется в полученных по методу Фолча липидных экстрактах акцепторного слоя и водной фазы. Продемонстрировано, что секреторный белок с *M* 45 кДа из обонятельного эпителия крысы является переносчиком фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфата. Предложенный подход открывает новые возможности при исследовании липид-белковых взаимодействий *in vitro* и имеет ряд положительных отличий от методов, применяемых ныне для этих целей.

Ключевые слова: липид-белковые взаимодействия, липидпереносящие белки, секреторный белок р45, фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфат.

Динамика обмена липидов, включающая их спонтанное перемещение в мембране и переход в состав новой мембраны при индуцируемом переносе под действием специальных липидпереносящих белков (ЛПБ), играет важную роль в жизнедеятельности клетки. ЛПБ определяют формирование мембранных везикул и соответственно контролируют внутриклеточный транспорт и секрецию [1].

Важный этап установления функции ЛПБ – нахождение их специфического липидного лиганда. Некоторые предположения в этом отношении можно выдвинуть на основе анализа первичной структуры белка, идентифицировав характерные липидсвязывающие домены. Однако решающее значение имеет эксперимент, демонстрирующий взаимодействие ЛПБ с предполагаемым лигандом и свидетельствующий о наличии у исследуемого полипептида транспортной активности.

Существующие методы (см. таблицу) либо указывают только на сам факт связывания ЛПБ с

лигандом на твердой подложке, не демонстрируя его транспортную активность [2], либо требуют введения метки (радиоактивной или флуоресцентной) не только в состав изучаемого липида, но и в акцепторную липосому – для контроля неспецифического переноса лиганда [3, 4]. Необходимость последнего [4] объясняется тем, что донорные и акцепторные липосомы, помещенные в одну емкость, находятся в непосредственном контакте и могут агрегировать.

В данной работе на примере детекции фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфат-переносящей функции 45 кДа-белка из обонятельного эпителия крысы (р45) [7, 8] предложен новый подход к нахождению неизвестных липидных лигандов белков и изучению липидного транспорта *in vitro*.

Приведенный рисунок иллюстрирует предложенный метод. Буквами Д и А на рисунке обозначены резервуары, вмещающие соответственно две неподвижные фазы: “донорную” и “акцепторную”. В качестве резервуаров применяли пустые микроколонки (кат. № #A809B) от системы выделения ДНК Wizard® Plus Minipreps (Promega, США). В качестве основы для неподвижных фаз использовали гладкие стеклянные бусины диаметром 2.5 мм. Для создания стабильного слоя связанной

Сокращения: ПААГ – полиакриламидный гель; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ЛПБ – липидпереносящий белок; BSA – бычий сывороточный альбумин; PtdCho – фосфатидилхолин; PtdIns(3,4,5)P₃ – фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфат.

[#] Автор для переписки (тел.: (095)336-51-11; факс: (095) 335-08-12; эл. почта: radchenko@mail.ibch.ru).

Характеристики некоторых методов изучения свойств ЛПБ и липидного транспорта

Метод	Цели эксперимента	Достоинства и недостатки
Нанесение липидов на поверхности твердого носителя (как правило, нитроцеллюлозы) с последующей обработкой раствором изучаемого ЛПБ [2] Искусственные липосомы [3, 4, 5]	Отметить факт связывания нанесенного липида с исследуемым белком [2] Отметить связывание ЛПБ с липидом, входящим в состав липосом [3], либо установить факт перемещения липида из донорной липосомы в акцепторную, индуцируемого исследуемым белком [4, 5]	Наиболее прост. Как правило, тестируются липиды из имеющегося набора. Возможно использование меченого белка. Результаты могут быть неоднозначны. Не дает информации о наличии у белка липидпереносящей активности Метод более точно моделирует естественные условия. Отмечается как липидсвязывающая, так и липидпереносящая активность белка. Как правило, для контроля неспецифического переноса при слиянии липосом [5], необходимо использовать два типа метки: меченый переносимый лиганд и меченый липид в составе донорной липосомы
Искусственные монослойные и/или бислойные мембраны [6]	Доказать, что исследуемый белок специфически связывается с липидом и/или удаляет его из мембраны. В последнем случае, как правило, комплекс гидрофобного лиганда с белком переходит в раствор	Позволяет доказать как липидсвязывающую, так и липидпереносящую активность. Есть возможность приблизительно оценить константу связывания белка с лигандом
Предложенный метод	Доказать липидсвязывающую и липидпереносящую активность исследуемого белка. Выявить лиганд из смеси липидов и идентифицировать его в донорном слое. Тестирование белоксодержащих фракций на способность индуцировать перенос исследуемого липида с последующим определением неизвестного белка	Позволяет доказать как липидсвязывающую, так и липидпереносящую активность. Есть возможность приблизительно оценить константу связывания белка с лигандом. Возможен поиск и идентификация лиганда в составе липидных смесей. Возможно тестирование белоксодержащих фракций на способность индуцировать перенос конкретного липида с последующим определением белка

воды на их поверхность наносили гидрофильный полимер, представляющий собой 10% ПААГ с сополимеризованным ПЭГ40000 (10% от массы акриламида) в SET-буфере состава: 0.25 М сахараза, 1 мМ EDTA и 10 мМ Трис-HCl, pH 7.4. Подготовленными таким образом бусинами заполняли резервуары. Оставшееся свободным от бусин пространство в каждом резервуаре заполняли специальным раствором липидов в смеси органических растворителей, один из которых смешивается с водой, а другой не смешивается (метанол-хлороформ, 1 : 4). Раствор для резервуара Д содержал фосфатидилхолин (PtdCho) и фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфат (PtdIns(3,4,5)P₃) в соотношении 10 : 1 (для описанного эксперимента соответственно 100 мкг : 10 мкг). Раствор для резервуара А содержал только PtdCho (100 мкг).

Липидный слой формируется на границе раздела фаз воды и органического растворителя. После нанесения липидов и формирования слоев каждую часть системы независимо промывали 10 объемами SET-буфера. Затем обе части герметично соединяли через пористый фильтр, предотвращающий непосредственный контакт бусин. В ходе эксперимента через собранную систему пропускали 50 нМ раствор р45 в SET-буфере. Этот раствор представлял собой подвижную фазу В. Скорость потока ≈ 5 сво-

бодных объемов системы в час (~10 мл/ч при 30°C). Направление циркуляции подвижной фазы показано на схеме черными стрелками.

Через 1 ч водную фазу сливали и систему разбирали. Предварительно промытые 3 объемами SET-буфера бусины, заполнявшие резервуары А и Д, а также собранную водную фазу В экстрагировали согласно методу Фолча [9]. Полученные таким образом липидные фракции (обозначенные далее эА, эД и эВ) исследовали по методике [2], используя для детекции фосфатидилинозита связывающийся с ним р45. Обнаружение р45 на нитроцеллюлозных фильтрах осуществляли с помощью моноклональных антител к этому белку и фотолюминесцентной системы (ECL Amersham Biosciences, Великобритания).

Как показано на схеме, в случае отрицательных контролей (когда подвижная водная фаза не содержала белок, либо вместо р45 использовали 50 нМ BSA) в липидных экстрактах эВ и эА PtdIns(3,4,5)P₃ не обнаруживался. Сорбция р45 в точках нанесения липидных экстрактов после эксперимента, т.е. когда в подвижной фазе присутствовал р45, свидетельствовала о наличии в этих фракциях PtdIns(3,4,5)P₃. Таким образом, показано, что во время эксперимента р45 индуцировал перераспределение PtdIns(3,4,5)P₃ между ре-

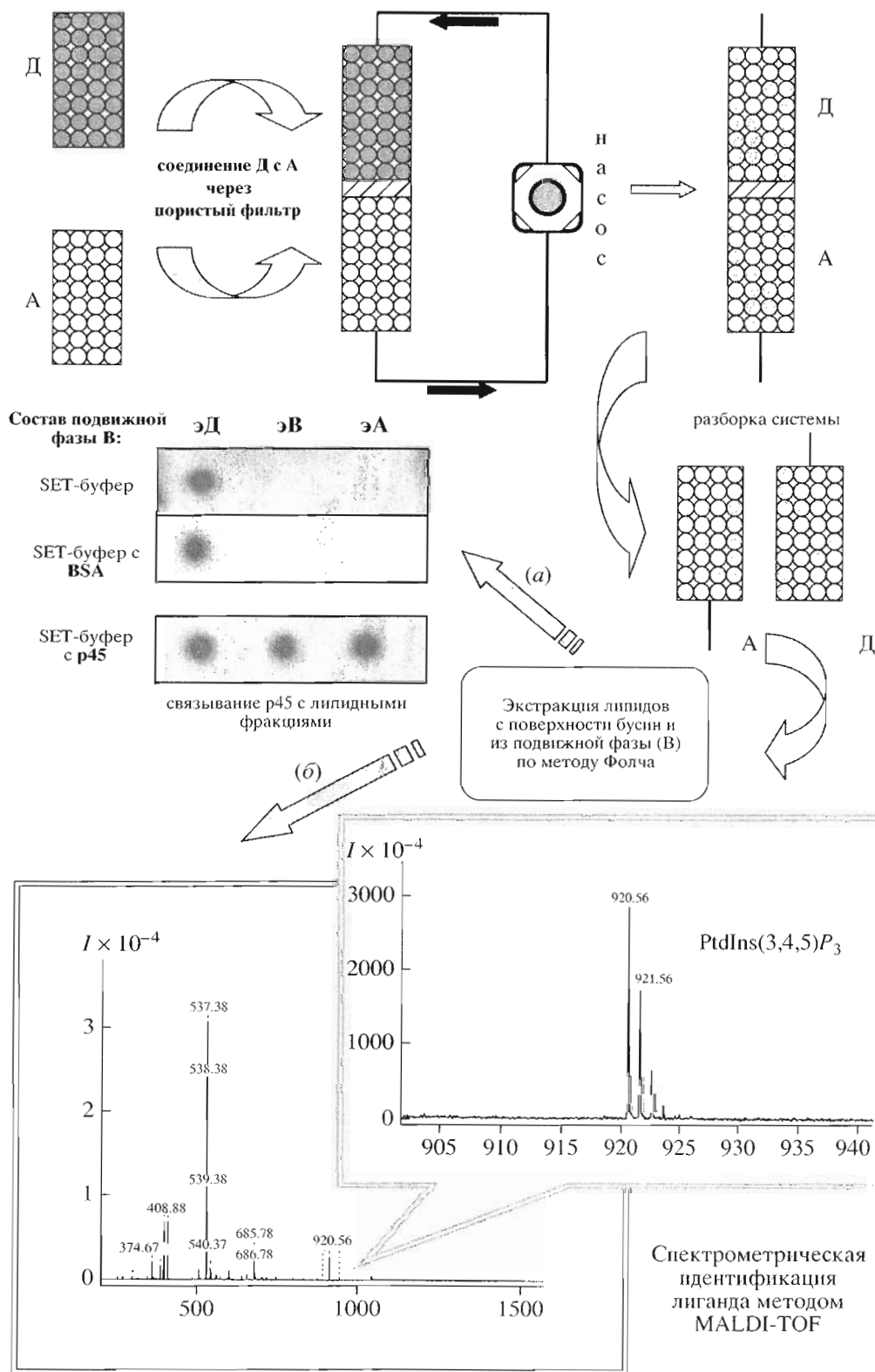


Схема предложенного метода изучения липид-белковых взаимодействий *in vitro*. Показаны результаты обнаружения PtdIns(3,4,5)P₃ в липидных экстрактах эА, эД, эВ, полученных по методу Фолча из акцепторной и донорной фаз и из водной фазы, по методу [2] (а). В нижней части рисунка приведен масс-спектр липидного экстракта эА. На выноске справа часть масс-спектра с пиком, соответствующим фосфатидилинозиттрифосфату, показана крупно (б). Д – резервуар, содержащий донорную фазу; А – резервуар, содержащий акцепторную фазу. эД, эА и эВ – соответственно липидные фракции экстрактов по методу Фолча Д, А и подвижной водной фазы В.

зервуарами Д и А в системе (на схеме это отражено появлением серого окрашивания резервуара А и уменьшением интенсивности серого цвета в резервуаре Д).

Были разработаны условия для точной масс-спектрометрической идентификации переносимого лиганда во фракциях ЭВ и ЭА с использованием прибора Reflex IV (Bruker Daltonic, Германия) методом MALDI-TOF в рефлекторном режиме. Во фракции, полученной при экстракции липидов с поверхности бусин из резервуара А, как и ожидалось, наряду с пиком, соответствующим PtdCho (m/z 537.38), был также обнаружен пик, соответствующий PtdIns(3,4,5) P_3 (m/z 920.56). На выноске справа этот пик показан крупно (см. рисунок). Присутствие в масс-спектре фракции ЭВ только уникального пика с m/z 920.56, соответствующего молекулярной массе переносимого лиганда, указывало на наличие в ней PtdIns(3,4,5) P_3 , связываемого p45 (не показано).

Данная работа поддержана грантами CRDF RB1-2338-MO-02, НШ-31204.3, РФФИ № 02-04-48364 и грантом по молекулярной и клеточной биологии Президиума РАН № 200 101.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции: Пер. с англ. М.: Мир, 1997.
2. Deak M., Csamayor A., Currie R.A., Downes C.P., Alessia D.R. // FEBS Lett. 1999. V. 451. P. 220–226.
3. Ishii M., Fujita S., Yamada M., Hosaka Y., Kurachi Y. // Biochem. J. 2005. V. 385. P. 65–73.
4. Komatsu H., Bouma B., Wirtz K.W., Taraschi T.F., Janes N. // Biochem. J. 2000. V. 348. P. 667–673.
5. Kasper A.M., Helmkamp Jr., G.M. // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 146–151.
6. Demel R.A., Wirtz K.W.A., Kamp H.H., van Kessel G.W.S.M., van Deenen L.L.M. // Nature. New Biology. 1973. V. 246. P. 102–105.
7. 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.
8. Меркулова М.М., Радченко В.В., Ильницкая Е.В., Шубаева Т.М., Липкин В.М. // Биоорганич. химия. 2005. Т. 31. С. 280–287.
9. Folch J., Less M., Sloane G. // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497–509.

A New Method for Studying the *in vitro* Lipid Transport: the 45-kDa Protein from the Rat Olfactory Epithelium is a Specific Carrier of Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate

V. V. Radchenko^{*,#}, T. M. Shuvaeva^{*}, E. V. Il'nitskaya^{*}, V. E. Tret'yakov^{**}, and V. M. Lipkin^{*}

[#]Phone: (095) 336-5111; fax: (095) 335-0812; e-mail: radchenko@mail.ibch.ru

^{*}Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**}Research Institute of Physicochemical Medicine, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Malaya Pirogovskaya ul. 1a, Moscow, 119992 Russia

A new method for studying the lipid–protein interactions *in vitro* is developed. It enables the study of the transporting activity of a protein toward a lipid ligand, including the case with an unknown lipid type. The method can be considered as a variant of partition three-phase chromatography with two stationary (donor and acceptor) phases and one mobile phase. The protein under study is dissolved in an aqueous mobile phase and induces a specific delivery of a lipid to the acceptor lipid layer. The transported lipid is identified in the Folch lipid extracts from the acceptor layer and aqueous phase. The secretory protein with M 45 kDa from the rat olfactory epithelium is shown to be a carrier of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. Our approach opens up new possibilities in the study of lipid–protein interactions *in vitro* and has a number of advantages over the methods now used for these purposes. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: lipid–protein interactions, lipid-transporting proteins, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate, secretory protein p45

Сдано в набор 29.03.2005 г.

Подписано к печати 26.05.2005 г.

Формат бумаги 60 × 88^{1/8}

Цифровая печать

Усл. печ. л. 14.0

Усл. кр.-отт. 3.7 тыс.

Уч.-изд. л. 14.0

Бум. л. 7.0

Тираж 257 экз.

Зак. 374

Учредители: Российская академия наук,
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Адрес издателя: 117997, Москва, Профсоюзная ул., 90

Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерперриодика”

Отпечатано в ППП “Типография “Наука”, 121099, Москва, Шубинский пер., 6