



УДК 577.112.083.3

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ
АНТИТЕЛ К GTP-СВЯЗЫВАЮЩЕМУ БЕЛКУ
ИЗ СЕТЧАТКИ ГЛАЗ БЫКА

*Шамборит О. Г., Колосов М. И., Василев Р. Г.,
Липкин В. М., Овчинников Ю. А.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Получены в препаративных количествах пять моноклональных антител против нативного GTP-связывающего белка (трансдуцина) из сетчатки глаз быка. Методом влажных отпечатков (иммуоблоттинг), а также иммуоферментным анализом изолированных α - и γ -субъединиц трансдуцина и комплекса $\beta\gamma$ -субъединиц установлено, что два моноклональных антитела, АЗГ7 и АЗС10, распознают линейные антигенные детерминанты α -субъединицы; два других, АЗЕ4 и ЗВЗ, специфически связываются с γ -субъединицей, а моноклональные антитела 1СЗ взаимодействуют только с нативным трансдуцином. Показано, что оба антитела против α -субъединицы ингибируют GTP-азную активность трансдуцина, а антитела АЗЕ4, ЗВЗ и 1СЗ на нее не влияют.

Свет, воздействуя на фоторецептор позвоночных, инициирует каскад биохимических реакций, приводящий к гиперполяризации цитоплазматической мембраны фоторецепторной клетки. Ряд компонентов этой системы интенсивно изучается в структурном и функциональном плане [1–4]. Показано, что активированный светом родопсин катализирует обмен GTP на связанный с трансдуцином GDP; комплекс трансдуцин–GTP в свою очередь активирует фосфодиэстеразу циклического гуанозинмонофосфата [1, 3]. Таким образом, трансдуцин занимает центральное место в процессе усиления зрительного сигнала. Молекулярная масса белка равна 85 кДа, и он состоит из трех субъединиц. Хроматографией на ω -аминооктилсефарозе трансдуцин удается разделить на два компонента: α -субъединицу — T α (M 39 кДа) и комплекс $\beta\gamma$ -субъединиц — T $\beta\gamma$ (M 36 и 8 кДа) [5, 6]. Показано, что компоненты T α и T $\beta\gamma$ в отдельности не обладают выраженной GTP-азной активностью, способностью к обмену GDP на GTP и средством к родопсину. Реконструкция белка из субъединиц восстанавливает эти его свойства [6]. Известно, что α -субъединица содержит центр связывания гуаниновых нуклеотидов, а комплекс T α с GTP активирует фосфодиэстеразу [3].

Для выяснения механизма зрительной передачи необходимо провести подробное исследование топографии трансдуцина, изучить его взаимодействие с другими белками зрительной системы. Одним из лучших инструментов для такого исследования являются моноклональные антитела. Недавно Витт и др. [7] сообщили о получении моноклональных антител против α -субъединицы трансдуцина из сетчатки глаз лягушки. Показано, что одно из этих антител ингибирует связывание гуаниновых нуклеотидов с трансдуцином [8].

Данная работа посвящена получению и характеристике моноклональных антител к трансдуцину из сетчатки быка. В результате трех независимых гибридизаций были получены 27 стабильных клеточных линий, продуцирующих моноклональные антитела к нативному трансдуцину. Им-

Сокращения: ПААГ — полиакриламидный гель; SDS — додецилсульфат натрия; PBS — изотонический фосфатный буфер, pH 7,4; PBST — PBS, содержащий 0,05% Tween 20; TBS — 20 mM трис-ацетатный буфер с 0,5 M NaCl, pH 7,5.

мунизация животных осуществлялась электрофоретически гомогенным белком, для тестирования антител был использован иммуоферментный метод анализа. Пять гибридом (клоны 3В3, АЗЕ4, АЗГ7, АЗС10 и 1С3) обладали наилучшими характеристиками роста в культуре и высоким титром продуцируемых антител. Они были субклонированы и привиты мышам. Антитела выделяли из асцитной жидкости на иммуносорбенте с белком А либо ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе. Выход антител составлял 3–5 мг из 1 мл асцитной жидкости.

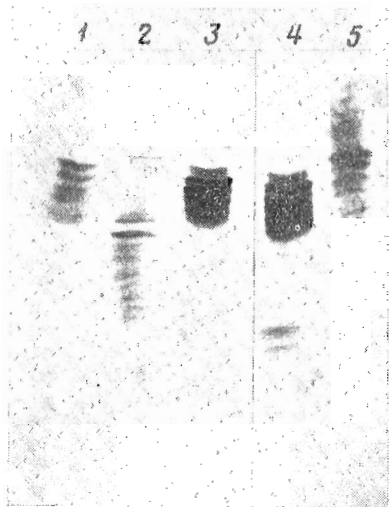


Рис. 1. Изоэлектрофокусирование моноклональных антител против трансдуцина (рН 3,5–10): 1 – 3В3; 2 – 1С3; 3 – АЗГ7; 4 – АЗЕ4; 5 – АЗС10

Гомогенность антител контролировали диск-электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Для характеристики антител использовали два метода: двойную иммунодиффузию по Ухтерлони [9] и иммуоферментный анализ. Оба метода показали, что все полученные моноклональные антитела имеют вид γ_1 , κ . Их моноклональность была подтверждена с помощью аналитического изоэлектрофокусирования (рис. 1).

Для определения специфичности моноклональных антител в отношении субъединиц трансдуцина был проведен иммуоэлектроблоттинг. При электрофорезе трансдуцина в денатурирующих условиях происходит разделение Т α и комплекса Т $\beta\gamma$ -субъединиц. Результаты иммуоэлектроблоттинга после электрофореза в денатурирующих

условиях (рис. 2) свидетельствуют, что моноклональные антитела АЗГ7 и АЗС10 связываются с Т α -субъединицей, а моноклональные антитела 3В3 и АЗЕ4 – с комплексом Т $\beta\gamma$. Моноклональные антитела 1С3 не дают четкой картины взаимодействия.

Был также проведен иммуоэлектроблоттинг после электрофореза трансдуцина в градиенте ПААГ в присутствии SDS (рис. 3). Установлено, что антитела АЗЕ4 направлены против Т γ -субъединицы, антитела АЗГ7 и АЗС10 взаимодействуют с денатурированной Т α -субъединицей, а антитела 1С3 и 3В3 не связываются с денатурированным белком.

Специфичность антител изучалась также путем измерения прямого взаимодействия моноклональных антител с очищенными Т α - и Т γ -субъединицами трансдуцина, а также комплексом Т $\beta\gamma$ -субъединиц. Т α - и Т $\beta\gamma$ -субъединицы были получены при хроматографии трансдуцина на ω -аминооктилсефарозе по методу Фанга [6]. Очищенную Т γ -субъединицу получали диализом денатурированного 8 М гуанидинхлоридом трансдуцина против водного раствора аммиака, при этом Т α - и Т β -субъединицы полностью выпадали в осадок, а Т γ -субъединица оставалась в растворе. Гомогенность субъединиц подтверждена с помощью электрофореза в градиенте ПААГ в присутствии SDS. По данным иммуоферментного анализа, моноклональные антитела 3В3 и АЗЕ4 связываются с Т γ -субъединицей, моноклональные антитела АЗГ7 и АЗС10 – с Т α -субъединицей. В то же время моноклональные антитела 1С3 не взаимодействуют ни с изолированными Т α - и Т γ -, ни с комплексом $\beta\gamma$ -субъединиц, однако связываются с нативным трансдуцином. По-видимому, данные антитела распознают комплексную топографическую детерминанту, образованную всеми тремя субъединицами трансдуцина. С другой стороны, антигенные детерминанты, распознаваемые моноклональными антителами АЗЕ4, АЗГ7 и АЗС10, относятся к антигенным детерминантам линейного типа, поскольку они сохраняются в полипептидных цепях Т α - и Т γ -субъединиц, полученных из денатурированного трансдуцина. Антигенная детерминанта, распозна-

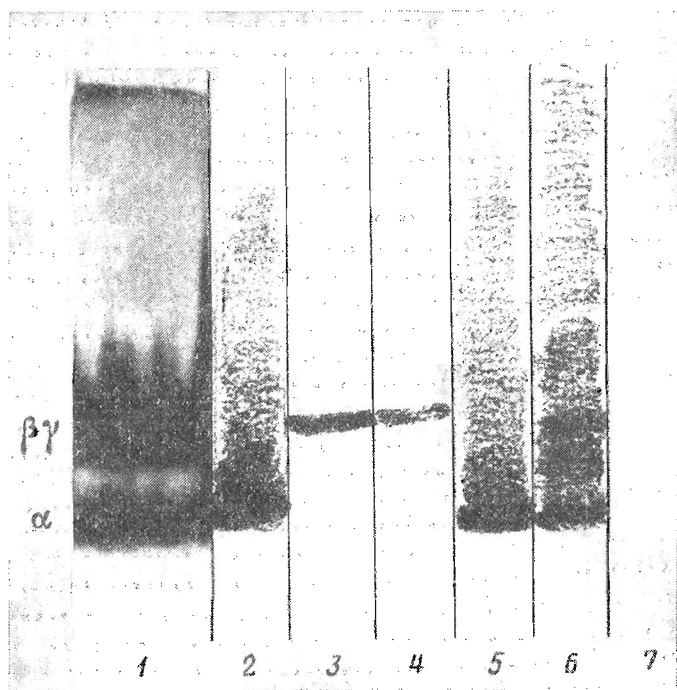


Рис. 2. Иммуноэлектроблоттинг после электрофореза в денатурирующих условиях: 1 — гель, окрашенный кумассей; 2 — нитроцеллюлозный фильтр, проявленный антителами А3Г7; 3 — проявление антителами 3В3; 4 — антителами А3Е4; 5 — антителами А3С10; 6 — антителами 1С3; 7 — нормальными мышиными иммуноглобулинами

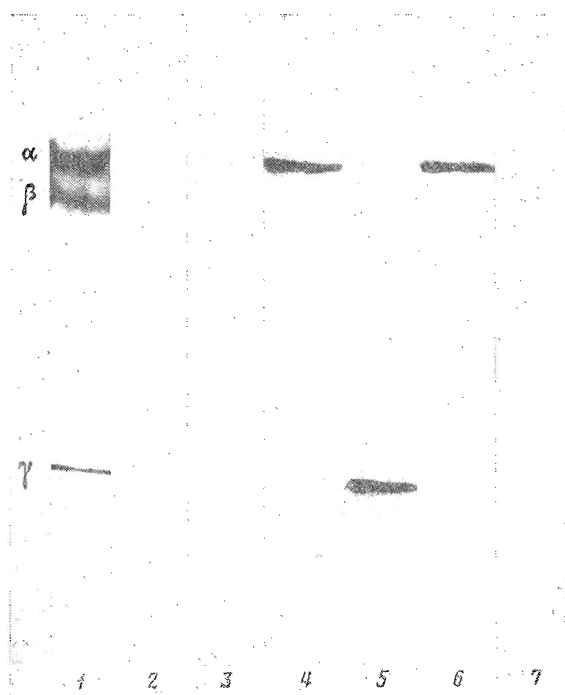


Рис. 3. Иммуноэлектроблоттинг после электрофореза в градиенте ПААГ с SDS: 1 — гель, окрашенный кумассей; 2 — нитроцеллюлозный фильтр, проявленный антителами 3В3; 3 — проявление антителами 1С3; 4 — антителами А3Г7; 5 — антителами А3Е4; 6 — антителами А3С10; 7 — нормальными мышиными иммуноглобулинами

Характеристика моноклональных антител к трансдуцину

Антитела	Линия мышей	Специфичность к субъединицам трансдуцина	Ингибирование GTP-азной активности, %
3В3	Balb/c	Нативная Тγ	0
1С3	C57Bl/6	Нативный трансдуцин	0
А3Г7	Balb/c	Линейная детерминанта Тα	100
А3Е4	»	Тγ	0
А3С10	»	Тα	100

ваемая моноклональными антителами 3В3, не выявляется при денатурации трансдуцина в присутствии SDS и не является линейной.

На основе моноклональных антител 3В3 был приготовлен иммуносорбент, который использовался при выделении трансдуцина.

Препараты моноклональных антител были также охарактеризованы по их влиянию на GTP-азную активность трансдуцина, определяемую по методу Мак-Коннелла [10]. Показано, что антитела А3Г7 и А3С10, специфически взаимодействующие с Тα-субъединицей, взятые в эквимольном соотношении с трансдуцином, полностью подавляют его GTP-азную активность, а моноклональные антитела 3В3, А3Е4 и 1С3 не влияют на GTP-азную активность трансдуцина.

Таким образом, получены и охарактеризованы пять моноклональных антител к трансдуцину (таблица). Два моноклональных антитела, А3Г7 и А3С10, распознают линейные антигенные детерминанты на Тα-субъединице, моноклональные антитела А3Е4 — линейную детерминанту на Тγ-субъединице, моноклональные антитела 3В3 — антигенную детерминанту, имеющуюся только в нативной Тγ-субъединице, а моноклональные антитела 1С3 — комплексную топографическую детерминанту, образованную тремя субъединицами. Вероятно, последние антитела могут быть использованы для определения эффективности реконструкции трансдуцина из субъединиц. Все пять моноклональных антител взаимодействуют с нативным трансдуцином; следовательно, распознаваемые ими антигенные детерминанты расположены на поверхности белковой глобулы. Эти детерминанты могут захватывать участки, ответственные за взаимодействие трансдуцина с другими компонентами цепи передачи зрительного импульса — родопсином и фосфодиэстеразой. В связи с этим изучается влияние моноклональных антител на взаимодействие трансдуцина с указанными белками. Особый интерес с точки зрения исследования механизма функционирования трансдуцина представляет изучение его взаимодействия с антителами А3Г7 и А3С10, подавляющими GTP-азную активность. Прежде всего необходимо выяснить, связываются ли эти антитела непосредственно с каталитическим центром фермента, или они препятствуют процессу образования специфического комплекса трансдуцина с фотоактивированным родопсином, в результате которого происходит активация белка. Локализация антигенных детерминант трансдуцина, распознаваемых этими антителами, позволит получить важную информацию о его функционировании.

Экспериментальная часть

В работе использованы: среда для культивирования клеток RPM1 1640, эмбриональная телячья сыворотка (FCS), компоненты селективной среды НАТ, компоненты селективной среды НТ (Gibco, США), полиэтиленгликоль 1500 и 4000, диметилсульфоксид (Merck, ФРГ), пристан — 2,6,10,14-тетраметилпентадекан (Aldrich, ФРГ), белок-А-сефароза CL-4В, бромциан-сефароза 4В (Pharmacia, Швеция), кроличьи антимышьиные антитела, конъюгированные с пероксидазой из хрена, субстрат пероксидазы 2,2-азиноди (3-этилбензотиазоленсульфокислота) (Sigma, США), HRP-окрашивающий реагент 4-хлор-1-нафтол, листы нитроцеллюлозы Zeta probe (Bio-Rad Lab, США), кроличьи антитела против изотипов мышьиных иммуноглобулинов (Serotec, Швейцария), [γ - 32 P]GTP (Amersham, Англия).

Выделение трансдуцина проводили по модифицированной методике Апльери [11], Т α - и комплекс Т β γ -субъединиц выделяли по методу Фанга [6].

Получение очищенной Т γ -субъединицы трансдуцина. К 1 мл раствора трансдуцина (1 мг) добавляли гуанидинхлорид до концентрации 8 М, затем проводили диализ против водного раствора аммиака (рН 10,0) в течение 2 сут при 20° С. При этом Т α - и Т β -субъединицы трансдуцина выпадали в осадок, а Т γ -субъединица оставалась в растворе. Препарат Т γ -субъединицы получали при центрифугировании образовавшейся суспензии при 8000 об/мин в течение 30 мин. Чистоту полученного препарата определяли электрофоретически в градиенте ПААГ от 4 до 30% в присутствии SDS.

Иммунизация животных, гибридизация, субклонирование. Мышам линий Balb/c и C57Bl/6 внутрибрюшинно вводили по 100 мкг на мышь трансдуцин с полным адъювантом Фрейнда, затем, с интервалом в 2 нед., — 2 раза антиген с неполным адъювантом Фрейнда; четвертый раз проводилась иммунизация без адъюванта.

Гибридомы получали по методу Кёлера и Мильштейна [12] с некоторой модификацией. На 4-й день после последней иммунизации у мышей удаляли селезенку, и суспензию спленоцитов объединяли с суспензией мнеломиных клеток линии Ag8.653.X63 в бессывороточной среде в соотношении от 10:1 до 1:1. Слияние достигалось при добавлении 40% раствора полиэтиленгликоля (*M* 1500 или 4000) к осажденной смеси клеток, из расчета 1 мл на селезенку. После 1 мин инкубации при 37° С смесь клеток отмывали и очень осторожно ресуспендировали в селективной среде NAT-RPMI 1640, дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой, 5 мкМ β -меркаптоэтанола.

Осадок после слияния клеток из одной селезенки суспендировали в 100 мл селективной среды и суспензию разливали в 24-луночные панели Costar по 1 мл в лунку — на фидерный слой (сингенные или аллогенные перитонеальные макрофаги — 10³ на лунку). Через 10–14 дней супернатанты из лунок с клонами тестировали на присутствие антител, специфичных к трансдуцину, методом иммуноферментного анализа. Среду заменяли на HT-RPMI. Часть клеток из лунок, где супернатант дал выраженный положительный ответ, замораживали в среде, содержащей 90% FCS, 10% диметилсульфоксида, а часть клонировали методом предельного разведения в 96-луночных панелях (Greiner) на фидерном слое перитонеальных макрофагов, внося по 30, 300 и 30 000 клеток на панель в одних случаях и по 50, 100 и 10 000 клеток на панель — в других.

Через 2–3 нед выросшие моноклоны тестировали на продукцию специфических антител (поликлоны собирали и замораживали) и положили на парацели в 24-луночных панелях, затем во флаконах емкостью 50 мл (Greiner) и во флаконах емкостью 250 мл на полной среде RPMI.

Наработанные в культуре гибридомные клетки вводили внутрибрюшинно мышам линии Balb/c или F₁/Balb/c $\times$ C57Bl/6, предварительно получившим внутрибрюшинно по 0,5 мл пристана. Доза гибридомных клеток составляла от 5 $\cdot$ 10⁶ до 10⁷ клеток на мышь.

Асцитную жидкость отбирали, центрифугировали, супернатант использовали для получения моноклональных антител, а клетки замораживали или перевивали другим животным.

Тестирование методом иммуноферментного анализа в твердой фазе. Специальные 96-луночные панели (Dynatech microtiter plate) покрывали раствором антигена: трансдуцин, Т α , Т β γ , Т γ . Использовались концентрации от 50 пг/мл в 50 мкл (в каждую лунку) и выше. После инкубации в течение 1 ч при 37° С или в течение ночи при 4° С растворы антигенов удаляли и промывали лунки изотоническим фосфатным буфером, рН 7,4, содержащим 0,05% твин 20 (PBST). Затем в лунки вносили 1% яичный альбумин на PBST (для насыщения реакционноспособных групп на поверхности панели) и инкубировали 30 мин при 37° С.

После отмывания PBST вносили исследуемые растворы антител (супернатанты от культуры клеток — без разведения, асциты — в разведении

1:100, чистые антитела — 1–3 мкг/мл). Контролями служили препарат нормальных мышинных иммуноглобулинов (отрицательный) и сыворотка крови иммунных мышей (положительный).

Антитела инкубировали с адсорбированными антигенами 1 ч при 37° С или ночь при 4° С, затем панели тщательно промывали (5×5 мин) PBST. В промытые лунки вносили кроличьи антимышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой из хрена в разведении 1:1000 в PBST, и инкубировали 1 ч при 37° С. После тщательного отмывания от конъюгата вносили субстрат пероксидазы в 1% лимонной кислоте, pH 4,5, с 0,01% H₂O₂ и измеряли оптическое поглощение при A₄₆₅ продуктов реакции через 5–15 мин инкубации на спектрофотометре Autoreader MR 580 (Dynatech, Швеция).

Выделение моноклональных антител. Очистку антител на белок-А-сефарозе проводили по методу [13], а выделение антител с помощью ионообменной хроматографии, как описано в работе [14]. Гомогенность антител и трансдукция проверяли электрофоретически в ПААГ по [15]. Аналитическое изоэлектрофокусирование антител осуществляли согласно [16].

Определение вида антител проводили методом двойной иммунодиффузии [9] с использованием антител кролика, специфичных к изотипам иммуноглобулинов мыши, а также методом иммуноферментного анализа, как описано выше.

Иммуноэлектроблоттинг. 1. Трансдукции подвергали диск-электрофорезу в неденатурирующих условиях: 7,5% ПААГ, электродный буфер — 0,05 М трис, 0,2 М глицин, pH 8,3. Белок концентрировали на фильтре Amicon FM10 на холоде до концентрации 30 мкг/мкл. Электрофорез проводили в течение 2,5–3 ч при напряжении 100 В. Затем белок переносили на нитроцеллюлозный фильтр в аппарате для обесцвечивания гелей (Pharmacia, Швеция) в течение 1 ч при напряжении 36 В в буфере, содержащем 0,05 М трис, 0,2 М глицин и 20% (по объему) метанола, pH 8,3. Затем нитроцеллюлозный фильтр тщательно отмывали TBS (20 мМ трис, 500 мМ NaCl, pH 7,5), насыщали активные группы в растворе яичного альбумина в TBS, разрезали фильтр на полоски, которые инкубировали с растворами антител, отмывали, инкубировали с кроличьими антимышинными антителами, конъюгированными с пероксидазой из хрена в разведении 1:1000, отмывали, вносили субстрат пероксидазы (60 мкг субстрата растворяли в 20 мл холодного метанола, затем доводили до 100 мл TBS и добавляли 60 мкл холодной 30% H₂O₂).

2. Трансдукции подвергали электрофорезу в градиенте ПААГ от 4 до 30% в боратном буфере, pH 8,2, в течение 2 ч. Гель промывали и проводили процедуру блоттинга, как описано выше.

Полоски нитроцеллюлозы обрабатывали в стеклянных чашках Петри.

Получение иммуносорбента на основе моноклональных антител 3В3. Препарат гомогенных антител 3В3 в концентрации 5,5 мг/мл по Брэдфорд [17] связывали с бромцитоактивированной сефарозой 4В по стандартной методике [18] в 0,1 М NaHCO₃, 0,5 М NaCl, pH 8,3. К полученному сорбенту добавляли препарат неочищенного трансдуктина. Смесь оставляли на ночь при 4° С и медленным покачиванием, затем центрифугировали, супернатант отбрасывали и сохраняли для анализа. Сорбент промывали дважды тем же буфером, переносили в 0,2 М глициновый буфер, pH 2,5, и центрифугировали. Элюат нейтрализовали 0,1 М трисом и сорбент еще дважды промывали глициновым буфером, а затем все фракции диализовали против PBS и анализировали электрофорезом в ПААГ с SDS.

Определение GTP-азной активности трансдуктина проводили по методу Мак-Копнелла.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fung B. K.-K., Stryer L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 5, p. 2500–2504.
2. Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1982, v. 148, № 2, p. 179–191.
3. Fung B. K.-K., Hurley J. B., Stryer L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 1, p. 152–156.
4. Ovchinnikov Yu. A., Lipkin V. M., Shuvaeva T. M., Bogachuk A. P., Shemyakin V. V. FEBS Lett., 1985, v. 179, № 1, p. 107–110.

5. Kühn H. *Nature*, 1980, v. 283, № 7, p. 587-589.
6. Fung B. K.-K. *J. Biol. Chem.*, 1983, v. 258, № 17, p. 10495-10502.
7. Witt P. L., Hamm H. E., Bownds D. J. *Gen. Physiol.*, 1984, v. 84, № 8, p. 251-263.
8. Hamm H. E., Bownds D. J. *Gen. Physiol.*, 1984, v. 84, № 8, p. 265-280.
9. Ouchterlony O. In: *Progress in Allergy*/Ed. Kallos P. Basel: Karger, 1958, v. 5, p. 1-78.
10. Kohnken R. E., Eadie D. M., Revsin A., McConnell D. G. *J. Biol. Chem.*, 1981, v. 256, № 23, p. 12502-12509.
11. Baehr W., Morita E. A., Swanson R. J., Applbury M. L. *J. Biol. Chem.*, 1982, v. 257, № 11, p. 6452-6460.
12. Köhler G., Milstein C. *Nature*, 1975, v. 256, № 5516, p. 498-501.
13. Hudson L., Hay F. C. In: *Practical immunology*. Oxford, 1980.
14. Garvey J. C., Cremer N. E., Sussdorf D. H. In: *Methods in immunology*/Eds Benjamin W. A., Reading M. A. Oxford, 1977.
15. Laemmli U. K. *Nature*, 1970, v. 227, № 5259, p. 680-687.
16. Winter A., Ek K., Anderson U. V. LKB application, 1977, Note 250.
17. Bradford E. C. *Anal. Biochem.*, 1976, v. 72, № 1, p. 248-254.
18. *Affinity Chromatography. Principles and methods*. Pharmacia Fine Chem., 1979, p. 8-15.

Поступила в редакцию
23.VII.1985

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST GTP-BINDING PROTEIN FROM BOVINE RETINA

SHAMBORANT O. G., KOLOSOV M. I., VASILOV R. G., LIPKIN V. M.,
OVCHINNIKOV Ye. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Five monoclonal antibodies against the native GTP-binding protein (transducin) from bovine retina have been prepared. By immunoblotting and immunoenzymatic analysis of the isolated α - and γ -subunits of transducin and the $\beta\gamma$ -subunit complex it was determined that two monoclonal antibodies A3G7 and A3C10 recognize linear antigenic determinants on the α -subunit, two other, A3E4 and 3B3, bound specifically to the γ -subunit, and monoclonal antibodies 1C3 interact only with native transducin. Both antibodies against the α -subunit inhibited transducin GTPase activity, whereas antibodies A3E4, 3B3 and 1C3 did not affect it.