



УДК 577.152.411*17.083.3

© 1991 г.

*Б. Б. Гим, Л. А. Хегай, Т. В. Чередникова *,
Е. М. Гаврилова, А. М. Егоров*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ С ПЕРОКСИДАЗОЙ ИЗ КОРНЕЙ ХРЕНА

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;
Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

В работе представлены результаты исследования свойств четырех типов моноклональных антител к пероксидазе из корней хрена. Определены константы диссоциации и изучен молекулярно-массовый состав иммунных комплексов. Показано, что моноклональные антитела направлены против полипептидной части фермента и распознают различные эпитопы. Приведены результаты расчетов возможных мест локализации антигенных детерминант. Исследовано взаимодействие антител с различными изоферментами пероксидазы.

В последнее время моноклональные антитела приобретают все большее значение в исследованиях структуры и функций ферментов [1]. Одним из интересных объектов является пероксидаза из корней хрена. Моноклональные антитела к пероксидазе нашли широкое применение в разработке так называемых ПАП-методов иммуноферментного анализа [2]. Однако в литературе практически отсутствуют сведения о свойствах антител к ферменту, характере и локализации антигенных детерминант.

В настоящей работе представлены результаты исследования четырех клонов МА к пероксидазе из корней хрена, полученных нами ранее [3]. Все они относятся к подклассу 1 класса IgG (табл. 1).

Величина константы диссоциации имеет большое значение для использования моноклональных антител в ПАП-модификациях (ИФА). На рис. 1 показан пример определения константы диссоциации иммуно-

Таблица 1

Свойства моноклональных антител против пероксидазы

Анти- тело *	K _d , нМ	Состав АТ—Е, моль/моль	Взаимодействие с			Ингиби- рование ак- тивности, %
			доменами перокси- дазы **	апо-Е ***, K _d , нМ	изоферментами	
2С	5±0,2	1:1 1:2	I	4,7±0,3	Щелочные	0
7G	1,6±0,05	2:1 1:1	I	1,5±0,04	»	30
9F	50±1	1:2 1:1	I	49±2	»	0
ЕЗ	2,0±0,1	1:2 1:1	II	1,8±0,15	Щелочные, нейтральные	0

* Получены как описано в [3], все 1-го подкласса класса IgG.

** Определение доменов пероксидазы см. в тексте.

*** Апо-Е — апопероксидаза.

Сокращения: МА — моноклональные антитела; ПАП — пероксидаза — анти-пероксидаза; АТ — антитела; ИФА — иммуноферментный анализ; АВТС — 2,2'-азино бис[3-этилбензотиазолинсульфонат(6)]; ЗФР — калий-фосфатный буфер, рН 7.2-20 мМ, 0,15 М NaCl; ЗФРТ — ЗФР с добавлением 0,02% (по объему) Тритон-Х-100,

Рис. 1. Определение константы диссоциации комплекса пероксидазы из корней хрена с моноклональными антителами (клон ЕЗ) в координатах Скэтчарда. B и F — концентрации связанного и свободного лигандов

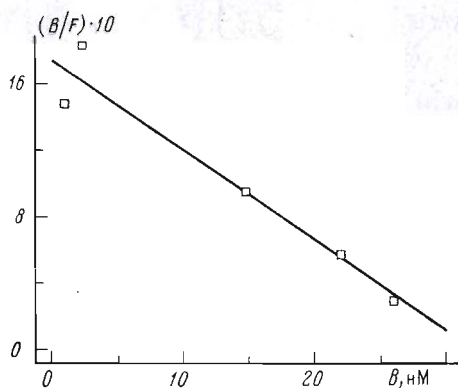


Рис. 1

Рис. 2. Определение молекулярно-массового состава иммунного комплекса клона ЕЗ с пероксидазой гель-фильтрацией на колонке TSK 3000 SW. Начальная концентрация пероксидазы и антител при смешивании по $5 \cdot 10^{-7}$ М. 1 — показания детектора при 280 нм, 2 — при 403 нм (даны в МВ). См. также пояснения в тексте

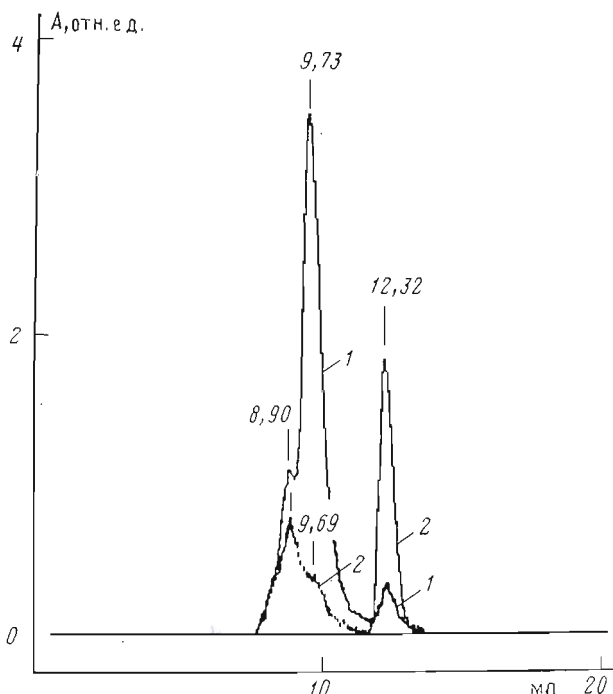


Рис. 2

го комплекса методом твердофазного ИФА. Для МА, характеризующихся одним значением константы связывания, зависимость в координатах Скэтчарда имеет вид прямой линии.

Молекулярный состав иммунных комплексов изучали методом высокоэффективной гель-фильтрации. Эксперименты проводились в условиях избытка либо фермента (Е), либо антител или примерно в эквимольном их соотношении. Для комплекса фермента с клоном ЕЗ (рис. 2) пик с объемом выхода 8,9 мл и молекулярной массой 260 000 Да можно отнести к комплексу АТ — Е состава 1 : 2, второй пик — 9,69 мл (молекулярная масса 210 000 Да), различаемый только как плечо при детекции на 403 нм, — к комплексу состава 1 : 1. Пики при 9,73 и 12,32 мл совпадают с пиками, полученными при гель-фильтрации свободных антител и пероксидазы соответственно. Из данных табл. 1 видно, что все клоны антител способны образовывать комплексы АТ — Е состава 1 : 1 и 1 : 2. Этот факт можно объяснить, учитывая бивалентность антител и сравнительно небольшие размеры пероксидазы (радиус 29 Å), позволяющие двум молекулам фермента независимо связываться с двумя Fab-фрагментами антител. Моноклональные антитела 7G, взятые в избытке, образуют комплексы

Внутренняя гомология в первичной последовательности пероксидазы *

3						9	34			37	181					186
Thr	Pro	Thr	Phe	Tyr	Asn	Asn	Ala	Ser	Ile	Leu	Met	Asp	Arg	Leu	Tyr	Asn
—	—	—	Ile	Phe	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Met	Gly	—
225						231	51			54	281					286

* В нижней строке приведены лишь стлечающиеся аминокислотные остатки.

состава 2 : 1. Это говорит о возможном присутствии в молекуле пероксидазы повторяющихся антигенных детерминант. Расчеты внутренней гомологии показывают, что в полипептидной цепи фермента имеется несколько областей полной или частичной гомологии (табл. 2). Кроме того, антитела могут быть направлены против структурно подобных гликозидных остатков фермента (см. ниже).

Клоны антител были проверены на ингибирование ферментативной активности. Ранее сообщалось [3], что некоторые МА к пероксидазе ингибируют ее активность в реакции усиленной хемилюминесценции (совместного окисления люминола и *n*-иодфенола). Из изученных нами клонов только 7G в небольшой степени (до 30%) ингибировал активность фермента.

Пероксидаза является сложной молекулой, состоящей из полипептидной части (308 аминокислотных остатков), простетической группы (протомем IX) и углеводного компонента, составляющего по массе до 20% [4]. Поэтому представляло интерес выяснить, к какому именно компоненту получены МА. С этой целью изучали связывание антител с производными фермента.

Константы диссоциации комплексов МА с апопероксидазой (пероксидаза без простетической группы) незначимо отличались от величин, характеризующих взаимодействие нативного фермента с антителами (см. табл. 1). По-видимому, антигенные структуры апофермента и нативного фермента различаются незначительно. Эти данные подтверждают ранние наблюдения о количественной преципитации апопероксидазы поликлональными антителами против пероксидазы [5].

Для проверки предположения о специфичности антител к углеводному фрагменту пероксидазы были проведены эксперименты по их конкурентному связыванию с гликопептидами фермента, полученными с помощью протеиназы из *Streptomyces griseus*. Гликопептиды не конкурировали с нативной пероксидазой за связывание ни с одним из клонов МА.

Таким образом, полученные данные говорят в пользу того, что МА направлены против белкового компонента пероксидазы.

Данные по мягкому протеолитическому расщеплению апопероксидазы папаином свидетельствуют о наличии в молекуле фермента двух доменов [4]. Первый домен, включающий в себя N- и C-концевые участки фермента, объединяет аминокислотные остатки с 1-го по 150-й и с 265-го по 308-й. Второй домен включает аминокислотные остатки со 160-го по 224-й. Эксперименты, проведенные с протеолитическими фрагментами пероксидазы, полученными в условиях, описанных ранее для образования пептидов, составляющих домены фермента, позволили установить, к какому именно домену направлены МА. Пептиды разделялись с помощью SDS-электрофореза, затем связывание каждого из них с МА проверялось методом иммуноблоттинга (рис. 3). По данным денситометрии, около 80% полученной смеси пептидов составляют два фрагмента с молекулярными массами около 34 и 8 кДа. Эти величины близки к молекулярным массам фрагментов, составляющих два домена пероксидазы (33 780 и 6895 Да соответственно), а в сумме дают значение 42 000 Да, близкое к значению молекулярной массы нативной пероксидазы. Из рис. 3 видно, что три клона антител взаимодействуют с первым доменом пероксидазы, в то время как клон ЕЗ связывается со вторым.

Нами были проведены расчеты расположения антигенных детерминант в молекуле пероксидазы согласно шкалам Хоппа — Вуда [6] (с ус-

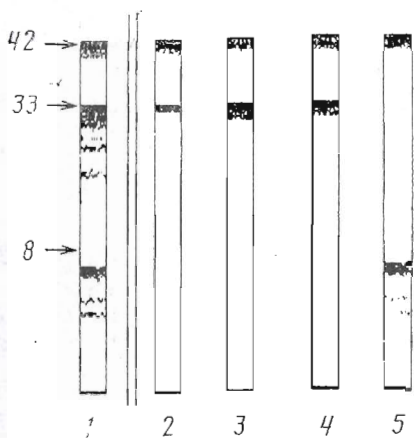


Рис. 3

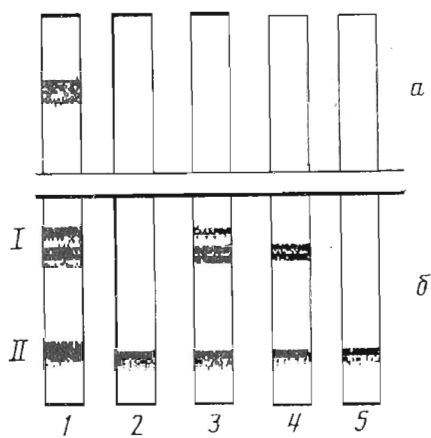


Рис. 4

Рис. 3. Блоттинг с окрашиванием по белку (I) и иммуноблоттинг после SDS-электрофореза папаиновых фрагментов пероксидазы с использованием моноклональных антител 9 F (2), 7 G (3), 2 C (4), E3 (5). Слева цифрами со стрелками показаны молекулярные массы, вычисленные по положению маркерных белков

Рис. 4. Результаты иммуноблоттинга поли- (I) и моноклональных (9F — 2, E3 — 3, 7G — 4, 2C — 5) антител с кислыми (а), нейтральными (I) и щелочными (II) формами (б) пероксидазы

реднением по 6 аминокислотным остаткам) и Карплуса и Шульца (с усреднением по 7 аминокислотным остаткам [7]). Шкала Хоппа — Вуда связывает антигенность белка с гидрофильностью соответствующих участков его поверхности. Шкала Карплуса и Шульца основана на значениях атомного температурного фактора (или так называемого В-фактора), получаемого из данных ЯМР-спектроскопии и связанного с локальной мобильностью участков полипептидной цепи. По данным табл. 3 можно выделить три гексапептида, характеризующихся наибольшей гидрофильностью. По крайней мере два из них — с 62-й по 67-ю и с 24-й по 29-ю аминокислоту — совпадают с участками максимальной гибкости (табл. 4). В то же время ни один из рассчитанных гомологичных участков последовательности пероксидазы (табл. 1) не предсказан в качестве антигенной детерминанты. В связи с этим отметим, что обсуждаемые выше алгоритмы расчета антигенной структуры имеют ограниченную мощность и предсказывают не более 45% антигенных детерминант [8].

Изучено связывание антител с изоферментами пероксидазы. К настоящему моменту известно около 30 изоферментов пероксидазы, которые обычно классифицируют на кислые, щелочные и нейтральные формы [9]. Они различаются между собой как по аминокислотному составу, так и по содержанию углеводного компонента. Для иммунизации мышей был использован препарат фермента, состоявший из различных изоформ пероксидазы, однако при скрининге МА [3] нами выделялись клоны, связывающиеся с щелочным изоферментом С, для которого известна полная аминокислотная последовательность [4] и клонирован соответствующий ген [10]. Изоферменты пероксидазы выделяли изоэлектрофокусированием препарата, содержащего все формы фермента. Затем связывание изоформ с МА проверяли методом иммуноблоттинга. Результаты иммуноблоттинга с использованием поли- и моноклональных антител (рис. 4) свидетельствуют, что поликлональные антитела связываются со всеми изоформами пероксидазы, среди моноклональных антител клоны E3 и 7G связываются с нейтральными изоформами и ни один из клонов не реагирует с кислыми пероксидазами. Отсутствие перекрестных реакций с кислыми изоформами фермента позволяет использовать полученные МА в цитохимических экспериментах, изучении физиологической роли различных изоферментов пероксидазы.

При исследовании нескольких типов МА важно выяснить, направ-

Таблица 3

Гексапептиды аминокислотной последовательности пероксидазы, характеризующиеся максимальными средними индексами гидрофильности (рассчитано по методике [8])

Гексапептид	Средняя гидрофильность
⁷² ArgThrGluLysAspAla ⁶⁷	1,85
²¹ AsnGluLeuArgSerAsp ²⁹	1,28
¹²³ ArgArgAspSerLeuGln ¹²⁸	1,28

Таблица 4

Гептапептиды аминокислотной последовательности пероксидазы, характеризующиеся максимальной локальной подвижностью (рассчитано по методике [8])

Гептапептид	B
²⁹¹ ThrGlyThrGlnGlyGlnIle ²⁹⁷	1,106
¹⁵⁷ LeuAsnArgSerSerAspLeu ¹⁶³	1,088
²³⁷ LeuGluGluGlnLysGlyLeu ²⁴³	1,082
²⁶⁷ AlaAsnSerThrGlnThrPhe ²⁷³	1,079
²¹⁴ IleGlnSerAspGlnGluLeu ²⁵⁰	1,07
⁵⁵ LeuAspAsnThrThrSerPhe ⁶¹	1,064
⁶¹ PheArgThrGluLysAspAla ⁶	1,062
²⁵ GluLeuArgSerAspProArg ³¹	1,06
²⁵¹ PheSerSerProAsnAlaThr ²⁵⁷	1,055
¹⁸⁷ PheSerAsnThrGlyLeuPro ¹⁹³	1,051

лены ли они к одному и тому же или к разным эпитопам на поверхности белка. В случае пероксидазы это интересно и с практической точки зрения, так как МА, обладающие разной специфичностью, могут быть использованы в амплифицированном варианте ПАП-метода. Мы изучали одновременное связывание различных МА с пероксидазой методом конкурентного анализа (табл. 5).

Интересно, что клон 7G, будучи сорбированным на микропланшете, не конкурирует за связывание с другими клонами. Однако, находясь в растворе, он эффективно препятствует связыванию. Этот факт можно объяснить тем, что клон 7G способен образовывать с ферментом комплексы состава 2 : 1 (см. выше) и стерически затруднять доступ других антител к пероксидазе. Полученные данные позволяют утверждать, что МА распознают четыре различных эпитопа.

Экспериментальная часть

В работе были использованы пероксидаза из корней хрена (КФ 1.11.1.7), RZ* не менее 3,0, активность 820 ед./мг (НПО «Биолар», СССР), ABTS, диаммониевая соль (Serva), диаминобензидин, люминол, метаперодат натрия (Sigma), *n*-подфенол, перекись водорода, кислоты, щелочи, соли, компоненты буферных растворов марок ос. ч. и ч. д. а. (Союзреактив).

* $RZ = A_{403}/A_{280}$.

Конкуренция моноклональных антител за связывание с пероксидазой

Сорбированный клон	Тестируемый клон			
	2С	7G	9F	3E
2С	+	+	-	-
7G	-	+	-	-
9F	-	+	+	-
3E	-	+	-	+

Мышинные моноклональные антитела к пероксидазе получали и очищали как описано в предыдущей работе [3].

Активность пероксидазы определяли по скорости окисления АВТС [2] и в хемилюминесцентной реакции окисления люминола и *n*-иодфенола [3].

Концентрацию иммуноглобулинов и пероксидазы определяли спектрофотометрически, используя значения молярных коэффициентов поглощения: $\varepsilon_{278}^{1\%} = 1,3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [2], $\varepsilon_{403} = 9,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [12].

Для хроматографирования использовали систему FPLC (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Швеция) с двумя детекторами (280 и 405 нм) для одновременного слежения за элюцией белковых фракций и фракций, содержащих пероксидазу. Колонка (7,5 × 300 мм) TSK G3000SW, ЗФР, скорость потока 1 мл/мин.

Изоэлектрофокусирование, SDS-электрофорез, иммуноблоттинг осуществляли на установках и с использованием реактивов Bio-Rad по предлагаемым фирмой методикам. Окрашивание пероксидазы по активности на PVDF-мембране (Millipore, Франция) проводили с помощью диаминобензидина [11]. Для сканирования результатов электрофореза использовали отражательный спектрофотометр CS-9000 (Shimadzu, Япония).

Подкласс моноклональных антител определяли непрямым ИФА с использованием антисывороток кролика, специфичных к подклассам IgG мыши («Биоконтроль», ВОИЦ АМН СССР).

Константы диссоциации комплексов пероксидазы и апопероксидазы с моноклональными антителами определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа как описано ранее [12].

Для определения молекулярного состава комплексов пероксидазы с МА на колонку для гель-фильтрации наносили предварительно проинкубированную (4° С, 14 ч, ЗФР) смесь антител с пероксидазой, взятых в мольном отношении (АТ : Е) 1 : 25, 1 : 1, 20 : 1 для каждого из типов МА.

Ингибирование ферментативной активности изучали, варьируя концентрацию МА в широком диапазоне, как описано ранее [3].

Апопероксидазу получали экстракцией гемина в кислой среде метилэтилкетаном [13].

Гликопептиды пероксидазы получали протеолитическим расщеплением апофермента протеназой из *Streptomyces griseus* (Sigma) как описано в работе [5]. Фракции, содержащие гликопептиды, определяли методом Дюбуа [14].

Для проведения конкурентного анализа на плашку сорбировали один из клонов МА (концентрация 10 мкг/мл в ЗФР, 14 ч, 4° С). Затем в лунки добавляли тестируемые антитела или гликопептиды (концентрации в диапазоне 10—0,04 и 1—0,004 мкг/мл соответственно) и в качестве контроля бычий сывороточный альбумин; далее добавляли раствор пероксидазы (10⁻¹⁰ М, ЗФРТ). После инкубации (2 ч, 37° С) и отмывки ЗФРТ измеряли активность связавшейся пероксидазы по скорости окисления АВТС. Результаты выражали полуколичественно, по разности

оптической плотности в присутствии и в отсутствие конкурирующего агента.

Фрагменты апопероксидазы, составляющие домены фермента, получали инкубацией с папаином, как описано в работе [4].

При исследовании взаимодействия доменов пероксидазы с моноклональными антителами образцы апофермента и его папаиновых фрагментов вместе с маркерами молекулярного веса подвергались SDS-Page-электрофорезу для разделения по молекулярным массам. Затем с помощью процедуры электроблоттинга пептиды переносились на PVDF-мембрану. Часть полосок окрашивалась по белку, другие были использованы для проверки связывания отдельных пептидов с моноклональными антителами методом иммуноблоттинга с помощью конъюгата пероксидазы с антивидовыми антителами кролика против IgG белой мыши.

Расчеты расположения антигенных детерминант проводили по программе «PC/Genie» (Genofit). Поиск внутренних гомологий осуществляли с помощью программы «MicroGenie» (Beckman), используя аминокислотную последовательность пероксидазы (изофермент C), определенную Веллиндером [4].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ким Б. Б. // Гибридная технология и применение моноклональных антител в медицине и биотехнологии. Т. 20. Биотехнология / Ред. Егоров А. М. М.: ВИНТИ, 1989.
2. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays. Elsevier, 1985. P. 278.
3. Колосова Л. В., Ким Б. Б., Черединова Т. В., Садванова Г. Г., Гаврилова Е. М., Егорова А. М. // Биохимия. 1988. Т. 53. № 11. С. 1858—1863.
4. Wellinder K. G. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 96. P. 483—502.
5. Conroy J. M., Salter R. D. // Mol. Immunol. 1982. V. 19. № 5. P. 659—663.
6. Hopp T. P., Wood K. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 157. № 2. P. 105—132.
7. Karplus P. A., Schulz G. E. // Naturwissenschaften. 1985. B. 72. № 4. S. 212—213.
8. Van Regenmortel M. V. H., de Marcillac G. D. // Immunol. Lett. 1988. V. 17. № 2. P. 95—108.
9. Hoyle M. C. // Plant Physiol. 1978. V. 60. P. 787—793.
10. Fujiyama K., Takemura H., Shibayama N., Kobayashi K., Choi J. K., Shinmyo A., Takano M., Yamada Y., Okada H. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 173. P. 681—687.
11. Stott D. I. // J. Immunol. Methods. 1989. V. 119. P. 153—187.
12. Ким Б. Б., Дикова Е. В., Гаврилова Е. М., Егоров А. М. // Иммунология. 1989. № 4. С. 31—35.
13. Yonetani T. // J. Biol. Chem. 1967. V. 242. P. 5008—5011.
14. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. // Analyt. Chem. 1956. V. 28. P. 350—356.

Поступила в редакцию
6.XII.1989

После доработки
17.V.1990

B. B. KIM, L. A. HEGAY, T. V. TCHEREDNIKOVA *,
Ye. M. GAVRILOVA, A. M. YEGOROV

INTERACTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES WITH HORSE-RADISH PEROXIDASE

M. V. Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department;

* A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Properties of four types of monoclonal antibodies to horse-radish peroxidase were investigated. The dissociation constants and molecular-weight composition of the immune complexes were determined. The antibodies are shown to be directed to different epitopes on the polipeptide chain. Results of the theoretical prediction of the epitope localisation are presented. The interaction between the antibodies and peroxidase isozymers were studied.