

УДК 577.152.193 577.112.6

ВЛИЯНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СТАБИЛЬНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

О.В. Игнатенко, М.Ю. Рубцова, Т.В. Чередникова, А.М. Егоров

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; e-mail: e-mail: ovig@enzyme.chem.msu.ru)

Изучено влияние трех групп моноклональных антител, специфичных к различным участкам пероксидазы хрена, на каталитическую активность и стабильность фермента в реакции ЕСL и окисления фенолов пероксидом водорода. Показано, что комплексообразование с антителами приводит к увеличению каталитической активности и стабильности пероксидазы, предохраняя ее от инактивации феноксильными радикалами. Было выявлено положительное влияние моноклональных антител 7G на интенсивность хемилюминесценции в реакции ЕСL.

Изучение взаимодействия ферментов со специфическими антителами является актуальным в современной иммунохимии как с точки зрения понимания молекулярных механизмов иммунологического распознавания, так и для прикладного применения иммунохимических методов анализа в биотехнологии и медицине. Образование иммунных комплексов может оказывать влияние на каталитические свойства ферментов, а также на их

стабильность [1]. Пероксидаза из корней хрена (HRP) является удобной модельной системой для исследования механизмов влияния специфического связывания, так как изучена лучше других из суперсемейства растительных пероксидаз [2]. Однако при разработке разных методов анализа могут применяться антитела, комплексообразование с которыми влияет на ферментативную активность и стабильность пероксидазы. Поликлональ-

ные антисыворотки содержат набор антител разной эпитопной специфичности, поэтому их использование не позволяет точно установить механизм влияния комплексообразования на каталитические свойства пероксидазы. Цель данной работы состояла в том, чтобы исследовать взаимодействие панели моноклональных антител (монАт) с различными формами пероксидазы хрена, охарактеризовать их эпитопную специфичность, а также изучить влияние этих антител на каталитические свойства пероксидазы и стабильность в реакции усиленной хемилюминесценции (ECL) [3].

Методы исследования

В работе использовали пероксидазу из корней хрена, RZ = 3,0 ("Biozyme", Великобритания), реагенты и биологические препараты ("Sigma", США). Гибридомы, продуцирующие монАт к изоферменту С пероксидазы хрена, получены по методу, описанному в [4].

Определение специфичности монАт к пероксидазе методом конкурентного ИФА. Для оценки специфичности антитела одного клона адсорбировали на планшетах из полистирола (2 мкг/мл в 0,01 М карбонатном буфере с pH 9,5) в течение 12 ч при 4°. После промывки буфером PBS, содержащим 0,05% Твин-20 (PBST), в лунки добавляли смесь HRP в фиксированной концентрации и антитела другого клона в разной концентрации. Планшет инкубировали в течение 1 ч при 37° и после отмывки определяли ферментативную активность пероксидазы, связавшейся с иммобилизованными антителами, добавляя субстратный раствор (4 мг/мл ортофенилендиамина в 0,01 М Na-цитратном буфере с pH 4,8), содержащий 1 мМ пероксида водорода. Ферментативную реакцию останавливали 4 М раствором серной кислоты.

Химическая модификация HRP. Модификацию пероксидазы проводили обработкой 10 мМ NaIO₄, 0,1 М HCl и кипячением [5]. Препарат апо-пероксидазы получали по методике [6] экстрагированием гемина метилэтилкетонном при pH 2,5.

Влияние монАт на каталитическую активность различных форм HRP. МонАт (10 мкг/мл) инкубировали с пероксидазой хрена ($6,8 \cdot 10^{-10}$ М в PBS) в течение 30 мин при 37°. Затем определяли активность фермента по скорости окисления АБТС.

Влияние монАт на скорость инактивации HRP при окислении *n*-йодфенола. Раствор пероксидазы ($2 \cdot 10^{-8}$ М) инкубировали с монАт (10 мкг/мл) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем эти растворы добавляли к инактивирующей смеси, содержащей 1 мМ *n*-йодфенола и 1 мМ пероксида водорода. Реакцию проводили в 0,2 М боратном буфере (pH 8,5) при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали аликвоты и определяли каталитическую активность HRP по АБТС. Остаточную активность фермента

рассчитывали в процентах относительно активности в нулевой момент времени.

Влияние монАт на активность HRP в ходе реакции ECL. Пероксидазу хрена иммобилизовали на поверхности нейлоновых мембран (Hybond N+, Amersham Int., UK). Затем мембраны инкубировали с монАт 7G (6,7 мМ в TBST) в течение 30 мин при комнатной температуре. После отмывки мембраны смачивали субстратным раствором, содержащим 1 мМ H₂O₂, 1 мМ люминол и 0,5 мМ *n*-йодфенол в 0,1 М боратном буфере (pH 8,5). Интенсивность хемилюминесценции с поверхности мембран измеряли на портативном люминометре (НПП "Иммунотех", Россия).

Результаты и их обсуждение

Определение специфичности монАт методом конкурентного ИФА. В работе была исследована специфичность 8 типов монАт, направленных против щелочных изоферментов пероксидазы хрена методом конкурентного твердофазного ИФА. Результаты конкурентного анализа позволяют условно разделить все исследованные монАт, по крайней мере, на три группы. Антитела I и III групп распознают различные участки молекулы и не конкурируют друг с другом, антитела II группы конкурируют с антителами из I и III групп и, видимо, связываются с перекрывающимися участками белка. Расположение участков связывания различных монАт друг относительно друга на молекуле пероксидазы хрена схематически представлено на рис. 1.

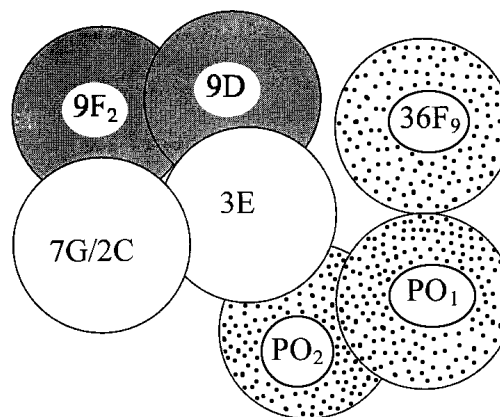


Рис. 1. Взаимное расположение участков связывания антител различных клонов на молекуле пероксидазы согласно данным конкурентного анализа

Связывание монАт с рекомбинантной, денатурированной, химически модифицированной и апо-пероксидазой хрена. Все тестированные монАт взаимодействовали в той или иной степени с рекомбинантной пероксидазой, следовательно, все они специфичны к белковой части фермента. Однако для антител III группы (36F₉, PO₁ и PO₂) и 3E наблюдалось значительное увеличение связывания с рекомбинантным белком, в то время как антитела I группы (9F₂ и 9D)

Т а б л и ц а 1

Взаимодействие моноклональных антител с пероксидазой, модифицированной различными методами, рекомбинантной и апо-пероксидазой (за 100 % принято связывание с нативной пероксидазой хрена)

Антитела		Нативная HRP, обработанная			Апо-HRP, %	Рек-HRP, %
		10 mM NaJO ₄ , %	0,1 M HCl, %	кипячение, %		
I	9F ₂	96	10	15	46	32
	9D	89	22	25	42	25
II	7G	120	9	9	12	87
	2C	101	16	21	15	94
	3E	155	12	9	16	180
III	36F ₉	103	86	88	230	200
	PO ₂	111	48	43	82	142
	PO ₁	96	160	120	170	212

Т а б л и ц а 2

Влияние различных моноклональных антител на каталитическую активность пероксидазы хрена в реакции окисления АБТС

Mc Abs	HRP activity, %
7G	205
9F ₂	191
9D	191
36F ₉	100
3E	145

лучше связывались с нативной пероксидазой (табл. 1). Можно предположить, что эпитопы для антител 9F₂ и 9D включают в себя как участок полипептидной цепи, так и углеводный фрагмент или его часть. Чувствительными к кипячению и к обработке кислотой оказались эпитопы, взаимодействующие с антителами I (9F₂ и 9D) и особенно II группы (7G, 2C, 3E) (табл. 1). Это свидетельствует о том, что антигенные детерминанты, к которым специфичны антитела I и II групп, являются конформационно-зависимыми, т.е. принадлежат к элементам третичной структуры и сближены в пространстве только при условии сохранения нативной конформации белка. Эпитопы, с которыми связываются антитела III группы (36F₉, PO₁ и PO₂), наименее подвержены влия-

нию разрушающих реагентов. По всей вероятности эпитопы, которые распознаются этими антителами, относятся либо к полностью линейным эпитопам, т.е. состоящим из последовательных участков полипептидной цепи, либо к наиболее стабильным элементам вторичной структуры.

Влияние монАт на каталитическую активность HRP в ходе реакции окисления АБТС пероксидом водорода. Было обнаружено, что добавление избытка некоторых монАт (7G, 9F₂, 9D) к раствору пероксидазы способствуют увеличению каталитической активности фермента (табл. 2). Ни один из исследованных клонов не оказывал ингибирующего влияния на каталитическую активность HRP.

Были определены каталитические параметры (K_m , V_{\max}) для окисления АБТС H₂O₂, катализируемого HRP в комплексе с монАт. Эксперименты проводили в условиях избытка антител (100-кратный относительно пероксидазы), когда практически весь фермент находился в виде комплекса с антителами.

Установлено, что значение K_m практически не меняется, т.е. образование иммунного комплекса не влияет на связывание субстрата в активном центре фермента. Значение V_{\max} увеличивается примерно в 2 раза при катализе пероксидазой в комплексе с антителами 7G. Это, по-видимому, обусловлено определенными изменениями в структуре пероксидазы при образовании иммунного комплекса.

Влияние монАт на стабильность пероксидазы хрена в ходе реакции усиленной хемилюминесценции и индивидуального окисления *n*-йодфенола. Было изучено влияние различных антител на стабильность пероксидазы в ходе окисления *n*-йодфенола пероксидом водорода. Мы установили, что образование иммунных комплексов с антителами также способно оказывать положительный эффект на операционную

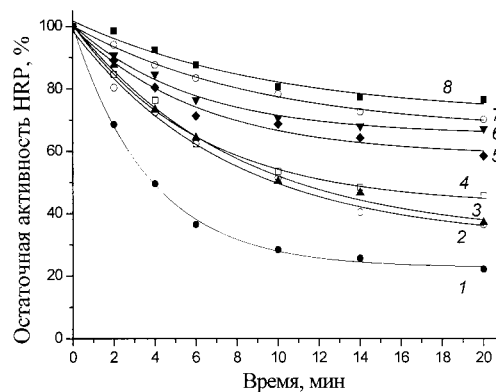


Рис. 2. Влияние моноклональных антител на скорость инактивации пероксидазы хрена в процессе окисления *n*-йодфенола: 1 — без антител, 2 — 3E, 3 — PO₁, 4 — 36F₉, 5 — PO₂, 6 — 9D, 7 — 9F₂, 8 — 7G

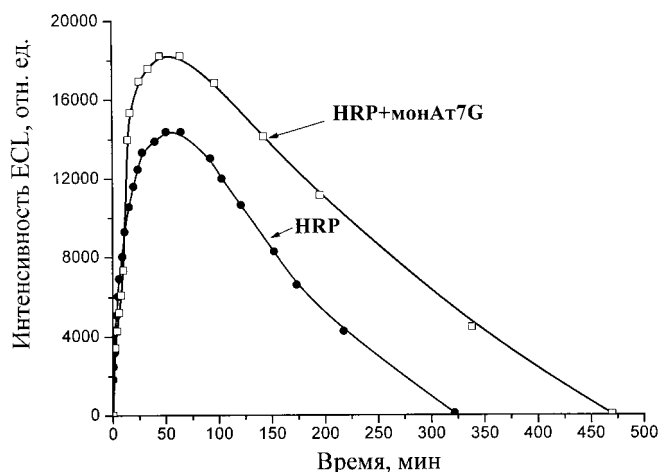


Рис. 3. Влияние моноклональных антител 7G на интенсивность реакции ECL

Значения каталитических параметров реакции окисления АБТС, катализируемой пероксидазой хрена в комплексе с антителами

Антитела	K_m , мМ	$V_{\text{макс}}$, мМ·с ⁻¹
без антител	3,1	2,43
9D	2,9	3,53
7G	3,2	4,61
36F ₉	3,2	2,54

стабильность нативной и рекомбинантной пероксидазы в реакции окисления *n*-йодфенола.

Способность монАт предохранять фермент от инактивации зависела от типа антител. Максимальный эффект стабилизации был установлен для антител 7G (II группа), 9F₂ и 9D (I группа). Возможно, это также обусловлено специфическим связыванием данного типа антител в участке, либо наиболее чувствительном к действию феноксильных радикалов, образующихся в ходе окисления и модифицирующих белковую часть молекулы пероксидазы, либо расположенном в непосредственной близости от участков образования инактивирующих радикалов.

Для изучения влияния моноклональных антител на интенсивность хемилюминесценции в ходе реакции ECL HRP была иммобилизована на поверхности нейлона. После инкубации с моноклональными антителами нейлоновую мембрану отмывали, что позволило отделить образовавшиеся иммунные комплексы от несвязавшихся антител. Было выявлено положительное влияние моноклональных антител 7G как на максимальную интенсивность хемилюминесценции, так и на общее

светоиспускание. В присутствии антител 7G максимальная интенсивность увеличивается в 1,3 раза, а общая светосумма в 1,7 раз. Такой стабилизирующий эффект может быть использован для увеличения чувствительности в различных методах хемилюминесцентного анализа с пероксидазой хрена в качестве метки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cinader B.* Methods in Immunology and Immunichemistry. Enzyme-antibody interactions / Eds. C.A. Williams, Chase M. N.Y., 1977. V. 4. P. 313.
2. *Veitch, N.C., Smith A.T.* Advances in inorganic chemistry. 2001. **51**. P. 107.
3. *Thorpe G.H.G., Kricka L.J.* Enhanced chemiluminescent assays for horseradish peroxidase: characteristics and applications. / Bioluminescence and Chemiluminescence: New Perspectives. Chichester: J. Wiley, 1987. P. 199.
4. *Чередникова, Т.В., Аммосова Т.Н., Тумова Н.А., Егоров А.М.* // Биотехнология. 1994. **2**. P. 12.
5. *Homan W.L., van Kalshoven H., Kolk A.H.J., Musgrave A., Schuring F., van den Ende H.* // Planta. 1987. **170**. P. 328.
6. *Yonetani T.* // J. Biol. Chem. 1967. **242**. P. 5008.

Поступила в редакцию 25.10.02