

УДК 577.153+577.150.5+612.017.1+612.843

ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА 3,5'-cGMP ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ НАРУЖНЫХ СЕГМЕНТОВ ПАЛОЧЕК СЕТЧАТКИ

ДУМЛЕР И. Л.

Получены моноспецифические антитела к белковому ингибитору 3,5' cGMP фосфодиэстеразы (ФДЭ) наружных сегментов палочек сетчатки (НСП). Оценка специфичности полученных антител проведена по результатам двойной радиальной иммунодиффузии в агаровом геле. Очищенная фракция иммуноглобулинов (IgG) из полученной антисыворотки снимала тормозящее действие ингибитора на ФДЭ и оказывала на фермент активирующий эффект. Действие IgG на ФДЭ в присутствии ингибитора не изменялось при добавлении в инкубационную смесь других белковых модуляторов. Проведена очистка ингибитора методом иммуноаффинной хроматографии на колонке с CNBr-активированной сефарозой 4В, сопряженной с IgG.

Ранее в сетчатке быка был обнаружен новый белок, являющийся ингибитором ФДЭ циклических нуклеотидов (КФ 3. 1. 4. 17) [1, 2]. В дальнейшем было показано, что он сосредоточен непосредственно в фоторецепторных мембранах и относительно прочно связан с ферментом [3], однако при определенных условиях эксперимента может быть отделен от последнего [4].

В настоящее время полагают, что белковый ингибитор играет решающую роль в процессе фотоиндуцированной активации ФДЭ: освещение приводит к снятию его ингибирующего действия [5]. Ингибиторный белок является компонентом белкового комплекса, в состав которого входят и GTP-связывающие белки, передающие сигнал с родопсина на ФДЭ [5, 6]. Механизм взаимодействия GTP-связывающих белков с ингибитором и последнего с ФДЭ неясен; нет единого мнения и в отношении свойств и величины молекулярной массы ингибитора [7, 8], а также его специфичности для ткани сетчатки и роли в процессе активации аденилатциклазы [9].

Удобным и перспективным подходом для решения этих вопросов может быть иммунохимический анализ ингибиторного белка. Попытка получения и характеристики моноспецифических антител к белковому ингибитору ФДЭ составила задачу настоящей работы.

Материалы и методы

Белковый ингибитор выделяли из термостабильной фракции очищенного препарата ФДЭ [4], подвергая ее препаративному электрофо-

резу в блоке ПААГ. Иммунизацию (были использованы 3 кролика) проводили очищенным препаратом ингибитора, вводя подкожно в область спины в 15—20 точек 0,5 мг антигена (в 1 мл 10 мМ трис-НСl буфера, рН 8,0) и 1 мл полного адьюванта Фрейнда. Через три недели кроликов иммунизировали повторно; каждое животное получало по 0,025 мг ингибитора уже без адьюванта. Поддерживающие иммунизации (каждый раз по 0,025 мг антигена) проводили несколько раз в течение пяти месяцев. Кровь отбирали из ушной вены порциями по 20—30 мл. За 5—7 дней до отбора крови животным вводили по 0,025 мг ингибитора.

Иммунные сыворотки получали общепринятым способом [10], разливали их порциями по 1 мл и хранили при температуре—10°, либо при 4° в присутствии консерванта (0,02%-ный азид натрия). В качестве контроля служили преиммунные сыворотки тех же животных.

Очистку фракций IgG осуществляли осаждением сульфатом аммония и последующей хроматографией на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-50 [10]. Иммунодиффузию проводили по Ouchterlony [11], используя 1,5%-ный агаровый гель, содержащий 0,15 М NaCl и 0,02%-ный NaN_3 .

Для приготовления сефарозы 4В, сопряженной с антителами, 1 мл (8,5 мг) очищенной фракции IgG диализовали в течение 24 ч против 0,1 М NaHCO_3 , рН 8,3, содержащего 0,5 М NaCl. Подготовленную стандартным способом CNBr-активированную сефарозу 4В перемешивали с комнатной температуре, затем в течение 16 ч при 4°. После этого суспензию центрифугировали (2000 г, 5 мин) и дважды промывали буфер-блокады оставшихся активных групп сефарозу ресуспензировали в 1 М растворе моноэтаноламина, рН 9,0, и перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Для удаления избытка блокирующего агента и адсорбированного белка сефарозу попеременно промывали (по три раза) десятью объемами 0,1 М ацетатного буфера, содержащего 0,5 М NaCl, и буфера указанного выше состава.

Хроматографию на сефарозе 4В, сопряженной с IgG, проводили, используя колонку (0,5×5 см), уравновешенную тем же буфером. После внесения исследуемой пробы удаляли несвязавшиеся белки элюцией 40 мл буферного раствора. Затем элюировали специфически связанные с IgG белки 20 мл 0,1 М глицил-НСl буфера, рН 2,8. Выходящие с последним буфером фракции сразу же нейтрализовали до рН 8,0.

Электрофорез в блоке ПААГ проводили по методу Laemmli [12]. Получение фракций НСП, экстрактов из них и препаратов ФДЭ, определение ее активности, содержания белка и P_i осуществляли, как описано ранее [3, 4].

Результаты и обсуждение

Оценка специфичности полученной иммунной сыворотки была проведена по результатам двойной радиальной иммунодиффузии в агаро-

вом геле (рис. 1). Очевидно, что в широком интервале разведений антисыворотки (1:100—1:1000) выявлялась единственная полоса преципитации, что свидетельствовало об иммунохимической гомогенности используемого антигена и моноспецифичности образовавшихся антител.

В дальнейшем была проведена очистка фракции IgG из полученной антисыворотки. Чистоту выделяемых в процессе очистки фракций контролировали с помощью электрофореза в блоке ПААГ, содержащего 0,1%-ный додецилсульфат натрия. В результате был получен практически гомогенный препарат IgG, содержавший тяжелые и легкие цепи γ -глобулина, который был использован для проверки его влияния на ак-

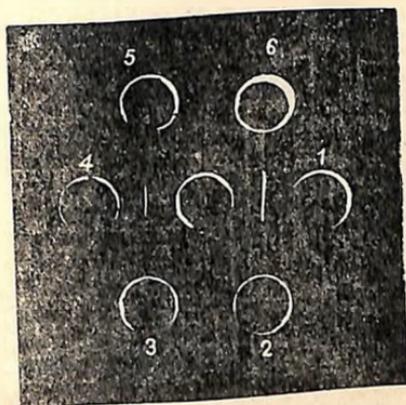


Рис. 1. Иммунодиффузия в агаровом геле препарата антисыворотки. В центре—10 мкл (10 мкг) антигена; 1—5—последовательные двукратные разведения антисыворотки, начиная с 1:128; 6—контроль

тивность ФДЭ. Возрастающие количества IgG инкубировали в 20 мМ трис-HCl буфере, pH 8,0, со стандартным количеством препарата ингибитора (2 мкг) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем добавляли препарат ФДЭ, инкубировали 15 мин, после чего проводили определение его активности. Количество добавляемого к ферменту ингибитора было подобрано таким образом, чтобы величина оказываемого на ФДЭ ингибирования составляла 50%.

Из представленных на рис. 2 данных очевидно, что фракция IgG сивмала тормозящее действие ингибитора и оказывала на ФДЭ активирующий эффект (исходная активность ФДЭ до добавления ингибитора—0,45 ед. опт. плотности). Наблюдаемая зависимость была прямой с насыщением при концентрации добавляемого IgG свыше 30 мкг в пробе. В том же диапазоне концентраций очищенная преиimmunная сыворотка не оказывала какого-либо влияния на фермент.

Эти данные являются еще одним доказательством специфичности полученных антител по отношению к белку-ингибитору. Наблюдаемая при добавлении IgG активация ФДЭ может быть объяснена взаимодействием антител не только с добавляемым в пробы антигеном, но и с эн-

догенным ингибитором, содержащимся в используемом препарате фермента. Полученные результаты подтверждают представление о том, что ФДЭ в НСП находится в частично заблокированном состоянии [4].

Известно, что активность ФДЭ разных тканей находится под контролем иных, отличных по ряду свойств от ингибитора, модуляторных белков [13]. Могут ли эти белки, в частности кальмодулин (схема выделения которого подобна схеме выделения ингибитора) и тропонин I, оказывающий также тормозящий эффект на ФДЭ [14], взаимодействовать с антителами, выработанными к ингибитору?

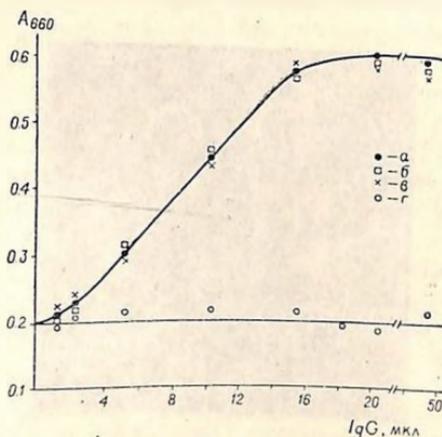


Рис. 2. Влияние IgG на активность ФДЭ; а—в пробы добавлен ингибитор (2 мкг); б—в пробы добавлен ингибитор (2 мкг) и тропонин I (10 мкг); в—в пробы добавлен ингибитор (2 мкг) и кальмодулин (10 мкг); г—контроль (вместо IgG добавлена преципитационная сыворотка). По оси ординат—активность ФДЭ в ед. опт. плотности при 660 нм; по оси абсцисс—содержание IgG в пробе, мкл

Для ответа на этот вопрос в ряд проб одновременно с ингибитором и IgG добавляли кальмодулин и тропонин I (рис. 2). Оказалось, что добавление этих белков не влияло на эффект, оказываемый на ФДЭ фракцией IgG, что свидетельствует об отсутствии конкурентных взаимоотношений между кальмодулином, тропонином I и ингибитором при связывании последним антител.

Для дополнительной проверки специфичности полученных антител проводили аффинную хроматографию на колонке с CNBr-активированной сефарозой 4В, сопряженной с IgG, экстракта НСП, содержащего ФДЭ, ингибитор и ряд других белков. Из результатов, представленных на рис. 3, а, следует, что с колонки элюировались два основных пика белка. Первый пик соответствовал несорбированному белку, второй мог быть элюирован при pH 2.8; он содержал белки, специфически связанные с IgG. Фракции, соответствующие каждому из пиков, объединяли и проверяли их влияние на активность ФДЭ. Предварительно фракции выдерживали 3 мин при 90°, что позволяло инактивировать

фермент, элюируемый с колонки, и не влияло на активность ингибитора, учитывая его термостабильность [1, 2]. Очевидно (рис. 3, б), что фракция несорбировавшихся на колонке белков не изменяла активность ФДЭ, в то время как специфически связавшаяся фракция обуславливала почти полное ингибирование активности фермента. Следует полагать, что эта фракция содержит чистый ингибиторный белок, оказывающий на ФДЭ присущий ему эффект.

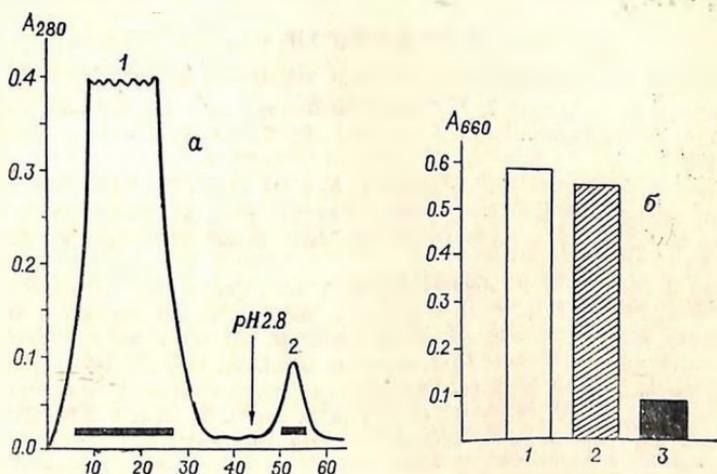


Рис. 3. Хроматография водорастворимого экстракта белков НСП на колонке с CNBr-активированной сефарозой 4В, сопряженной с IgG. а—профиль элюции белков на колонке. По оси ординат—выход белка в ед. опт. плотности при 280 нм. По оси абсцисс—номера фракций. Стрелкой указано начало элюции глициновым буфером (рН 2,8); б—влияние фракций, элюированных с колонки, на активность ФДЭ. По оси ординат—активность ФДЭ в ед. опт. плотности при 660 нм. 1—контроль; 2—добавлена фракция несорбировавшихся на колонке белков (пик 1); 3—добавлена фракция белков, специфически связавшихся на колонке (пик 2)

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о возможности получения моноспецифических антител к белку-ингибитору ФДЭ, которые могут быть использованы для изучения свойств, локализации и функциональной значимости ингибиторного белка.

IMMUNOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF PROTEIN INHIBITOR OF CYCLIC GMP PHOSPHODIESTERASE FROM RETINA RODS' OUTER SEGMENTS

DUMLER I. L.

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

The monoclonal antibodies to the protein inhibitor of cyclic GMP phosphodiesterase of retina rods' outer segments have been obtained. The specificity of this antibodies was determined by means of double

immunodiffusion technique. The purified fraction of immunoglobulins G from antisera removed the inhibitory action of the protein inhibitor and moreover activated the enzyme. The effect of immunoglobulins G on the phosphodiesterase did not change after addition of other protein modulators to the incubation media. The purification of the protein inhibitor was performed by immunoaffinity chromatography on the column with CNBr-activated Sepharose 4B coupled with immunoglobulins G.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Думлер И. Л., Этингоф Р. Н. ДАН СССР, 213. 1197—1201, 1973.
2. Dumler I. L., Etingof R. N. Biochim. et Biophys. Acta, 429, 474—484, 1976.
3. Etingof R. N., Furaev V. V., Dumler I. L. FEBS 12 Meeting Dresden, 54, 71—80, 1978.
4. Думлер И. Л., Фураев В. В., Этингоф Р. Н. ДАН СССР, 253, 1504—1508, 1980.
5. Sitaramaya A., Virmaux N., Mandel P. Exp. Eye Res., 25, 163—169, 1977.
6. Fung B. R., Hurley J. B., Stryer L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 152—156, 1981.
7. Baehr W., Devlin M. J., Applebury M. L. J. Biol. Chem., 254, 11669—11677, 1979.
8. Stryer L., Hurley J. B., Fung B. K. Trends Biochem. Sci., 6, 245—247, 1981.
9. Bitensky M. W., Wheeler M. A., Rasenick M. M., Yamazaki A., Stein P. J., Halliday K. R., Wheeler G. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3408—3412, 1982.
10. Харбоу Н., Ингильд А.—В кн.: Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу (под ред. Н. Аксельсена, Я. Крелля, Б. Векке), М., Мир, с. 200—203, 1977.
11. Ouchterlony O. Acta Path. Scand., 32, 231—240, 1953.
12. Laemmli U. K. Nature, 227, 680—685, 1970.
13. Scharff O. Cell Calcium, 2, 1, 28, 1981.
14. Фураев В. В., Думлер И. Л., Казимирский А. Н., Этингоф Р. Н. ДАН СССР, 243, 247—250, 1978.

Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР,
Ленинград

Поступила 1. IV 1983