



УДК 577.112.083.3

© 1994 И. Е. Кашеверов, Т. А. Голознина,
А. В. Яров*, Ю. Н. Уткин, В. И. Цетлин

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РЕЦЕПТОРА ВЕЩЕСТВА P ИЗ МОЗГА КРЫСЫ С АНТИТЕЛАМИ К ЕГО СИНТЕТИЧЕСКИМ ФРАГМЕНТАМ И К ВЕЩЕСТВУ P

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и
Ю. А. Овчинникова, РАН, Москва;

* Инженерный центр пептидных препаратов «Пептос», Москва

Ключевые слова: вещество P; рецептор вещества P; антитела к фрагментам рецептора SP; мембраны мозга крысы; солюбилизация; 3-[(3-холаמידопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат; дисукцинимидилсуберат; блок-А-хроматография.

Синтезированы пептиды, соответствующие фрагментам 55—64, 182—192, 225—236 и 236—245 (P1—P4) рецептора вещества P из мозга крысы. На конъюгаты синтезированных пептидов с KLN получены антитела (Ab1—Ab4), которые очищали аффинной хроматографией на иммобилизованных пептидах. Ни одно из полученных антител не ингибировало связывание радиоактивного производного вещества P ($[^{125}\text{I}]\text{BH-SP}$) с тахикининовыми рецепторами мембран мозга крысы. Взаимодействие антител Ab2 и Ab3 с рецептором обнаружено с помощью конкурентного ИФА. Солюбилизированные SNAP5 мембраны мозга крысы ингибировали связывание этих антител с иммобилизованными P2 и P3. Антитела Ab1—Ab4 не взаимодействуют с солюбилизированным SNAP5 ковалентным комплексом рецептора с $[^{125}\text{I}]\text{BH-SP}$, полученным с использованием бифункционального реагента (DSS). Этот комплекс сохранял способность взаимодействовать с аффинно очищенными антителами к веществу P и был выделен с использованием высокоэффективной гель-хроматографии с последующей хроматографией на блок-А-сепарозе.

Тахикинины млекопитающих — вещество P, нейрокинин А (НКА) и нейрокинин В (НКВ) — обладают широким спектром биологического действия, включая сенсорную передачу в нервной системе, сокращение и расслабление перифери-

Список сокращений: KLN — гемоцианин моллюска *Keyhole limpet*; SP — вещество P; $[^{125}\text{I}]\text{BH-SP}$ — 3-[(3- $[^{125}\text{I}]$)-и-о-4-гидроксифенил)пропионил-Lys³]вещество P; SNAP5 — 3-[(3-холаמידопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат; DSS — дисукцинимидилсуберат; BSA — бычий сывороточный альбумин (фракция 5); SDS — додецилсульфат натрия; AT — антитела; COS — линия почечных клеток африканской зеленой обезьяны, инфицированных вирусом SV40; CHO — клетки яичника китайского хомячка.

| | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 55 | | | | | | | | | 64 | | |
| P1 | (Cys) | Trp | Ile | Ile | Leu | Ala | His | Lys | Arg | Met | Arg | | |
| | | 182 | | | | | | | | | 192 | | |
| P2 | | Ile | Glu | Trp | Pro | Glu | His | Pro | Asn | Arg | Thr | Tyr | |
| | | 225 | | | | | | | | | | 236 | |
| P3 | | Ala | Ser | Glu | Ile | Pro | Gly | Asp | Ser | Ser | Asp | Arg | Tyr |
| | | 236 | | | | | | | | | | | 245 |
| P4 | (Cys) | Tyr | His | Glu | Gln | Val | Ser | Ala | Lys | Arg | Lys | | |

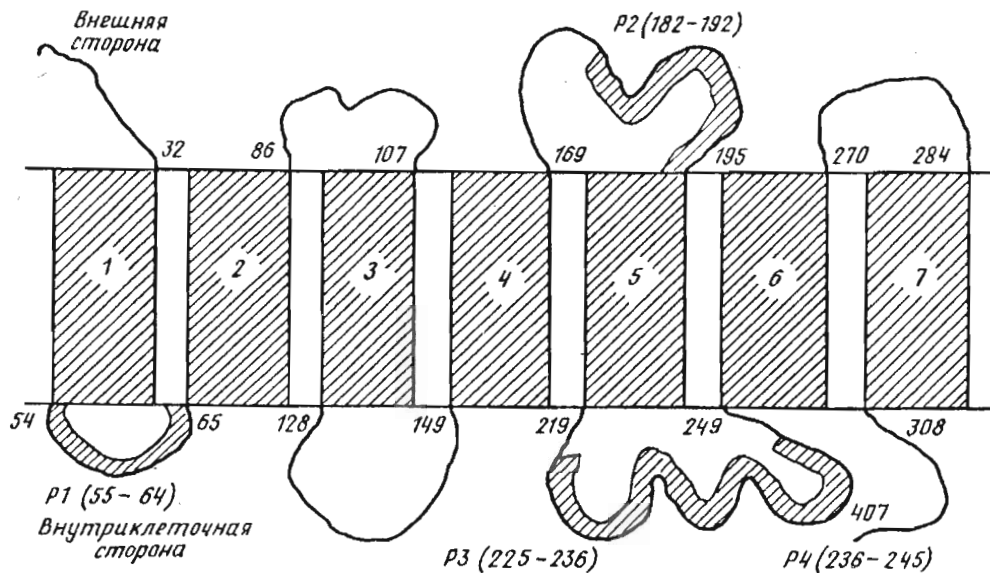


Рис. 1. Модель укладки полипептидной цепи рецептора SP в мембране [6] и расположение в ней фрагментов, которым соответствуют пептиды P1—P4

ческой гладкой мускулатуры, расширение сосудов. Тахикинины могут действовать как факторы роста и посредники между клетками нервной и иммунной систем [1]. Различия первичной структуры этих пептидов отражаются на проявляемых ими свойствах, что подтверждено разнообразными фармакологическими тестами [2, 3]. Биологические свойства тахикининов реализуются в основном посредством взаимодействия с различными типами тахикининовых (нейрокининовых) рецепторов, называемых NK-1, NK-2 и NK-3, проявляющих наибольшую специфичность к веществу P, NKA и NKB соответственно [4].

В настоящее время известны нуклеотидные последовательности для всех трех типов рецепторов из различных источников [5—8]. Первой была установлена структура кДНК рецептора NK-2 из кишечника быка. Она была определена с использованием экспрессии мРНК в ооцитах *Xenopus* [5], затем для других рецепторов был использован скрининг кДНК или геномных библиотек с помощью олигонуклеотидных зондов, полноразмерной кДНК рецептора NK-2 или полимеразной цепной реакции [6—8].

Тахикининовые рецепторы различных типов, а также рецепторы одного типа различных видов животных являются высокомолекулярными белками, принадлежащими к суперсемейству G-белокзависимых рецепторов [7]. Это предполагает общий для всего суперсемейства тип укладки полипептидной цепи, состоящей из 7 гидрофобных трансмембранных фрагментов, а также N- и C-концевых доменов на внешней и цитоплазматической сторонах соответственно.

В литературе приводятся данные по исследованию функциональных свойств тахикининовых рецепторов в мембранных препаратах или экспрессированных в ооцитах *Xenopus*, а также в клетках COS и CHO млекопитающих [7—10]. При

этом задача выделения и очистки тахикининовых рецепторов по-прежнему остается актуальной, в частности для решения таких вопросов, как посттрансляционная модификация рецепторов, причины фармакологических различий между ними и т. д. Следует отметить, что проблема выделения тахикининовых рецепторов весьма сложная, так как их содержание в природных источниках не превышает 100 фмоль/мг белка [11—14].

Антитела, полученные к синтетическим пептидам, соответствующим определенным участкам аминокислотной последовательности тахикининовых рецепторов, могут быть использованы для очистки рецепторов, а также для экспериментальной проверки моделей их топографии в мембране. В настоящей работе для этих целей были использованы антитела против синтетических фрагментов рецептора NK-1 из мозга крысы.

На основании алгоритмов, предложенных в работах [15, 16], в аминокислотной последовательности рецептора SP из мозга крысы [6] были выбраны потенциально наиболее иммуногенные экспонированные из мембраны фрагменты 55—64, 182—192, 225—236 и 236—245 (рис. 1). Три последних фрагмента не имеют сколько-нибудь заметной гомологии с известными белками мозга крысы (данные банка последовательностей PIR, V 29.0), а первый идентичен высококонсервативной области для всех подтипов тахикининовых рецепторов [7]. Были синтезированы соответствующие этим последовательностям пептиды P1—P4. Для получения более специфичной пришивки к белку-носителю пептидов, содержащих остаток Lys (P1 и P4), они были удлинены с N-конца на аминокислотный остаток Cys, а для получения конъюгатов использован метод, при котором присоединение пептида происходит по сульфгидрильной группе.

Конъюгатами пептидов P1—P4 с KLH иммунизировали кроликов. Белки полученных антисывороток осаждали 5-кратной обработкой сульфатом аммония, после чего осадок растворяли в воде. Методом твердофазного иммуноферментного анализа определяли титры, используя в качестве исходных растворы с суммарной концентрацией белка ~10 мг/мл. Для фракций, обогащенных антителами к пептидам P1—P4, они составили соответственно 1 : 140 000, 1 : 130 000, 1 : 20 000, 1 : 175 000, что свидетельствует о высоком содержании специфических антител и возможности их применения для дальнейших исследований. Дополнительная очистка некоторых из них проведена с помощью аффинной хроматографии на CN-сефарозе 4B с иммобилизованными пептидами.

Принимая во внимание возможности радиолигандного анализа — наиболее чувствительного метода для проверки наличия взаимодействия между полученными антителами и рецептором SP, определяли способность антител конкурировать с радиоактивным SP за связывание с мембранными препаратами мозга крысы. Наличие ингибирующей активности можно было ожидать в первую очередь у антител Ab2, полученных на пептид, соответствующий фрагменту последовательности, экспонированному, согласно модели, на внешней поверхности клеточной мембраны. Результаты проведенных экспериментов показали, что в концентрации до 26 мкМ ни одно из антител не способно ингибировать связывание [¹²⁵I]BH-SP с мембранами. Чтобы ответить на вопрос, могут ли эти антитела взаимодействовать с рецептором, требовались иные подходы.

Для исследования с помощью ИФА принципиальной возможности узнавания полученными АТ рецептора SP его солюбилизировали в 1% CHAPS по методике, предложенной в работе [13]. Ранее было показано, что 1% CHAPS не снижает эффективности взаимодействия антитела и синтетического антигена.

Прямая иммобилизация солюбилизированных препаратов рецептора на иммунологической планшете (твердая фаза) исключалась из-за крайне малого содержания в них участков связывания SP (10—60 фмоль/мг мембранного белка [11—14]), вследствие чего чувствительность метода могла быть недостаточной для обнаружения рецептора. Наиболее подходящим для наших целей оказался конкурентный вариант ИФА. При отработке условий иммобилизации было показано, что синтетические пептиды P1, P2, P3 при облучении их ультрафиолетом

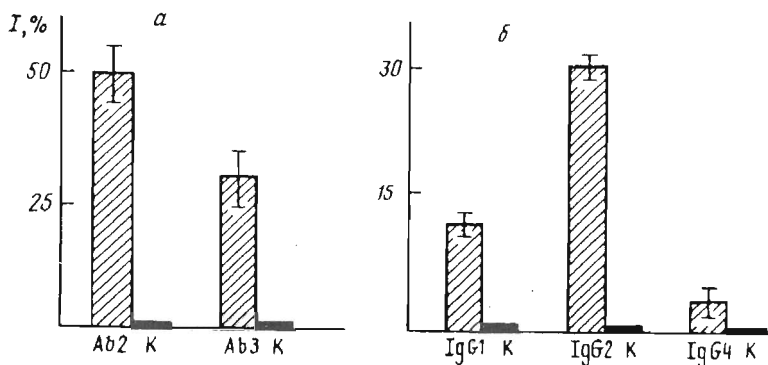


Рис. 2. Влияние солюбилизированных препаратов мембран мозга крысы на взаимодействие пептидов Р1—Р4 и соответствующих антител: а — аффинно очищенных антител Ab2 и Ab3 (соотношение рецептор — АТ = 2 : 1); б — фракций, обогащенных иммуноглобулинами, полученными на пептиды Р1, Р2, Р4 (IgG1, IgG2, IgG4 (концентрация белка в 1-м и 3-м случае 1 мкг/мл, во 2-м 150 нг/мл). В контроле (К) вместо антипептидных антител использованы обогащенные иммуноглобулинами фракции интактного кролика в аналогичных концентрациях

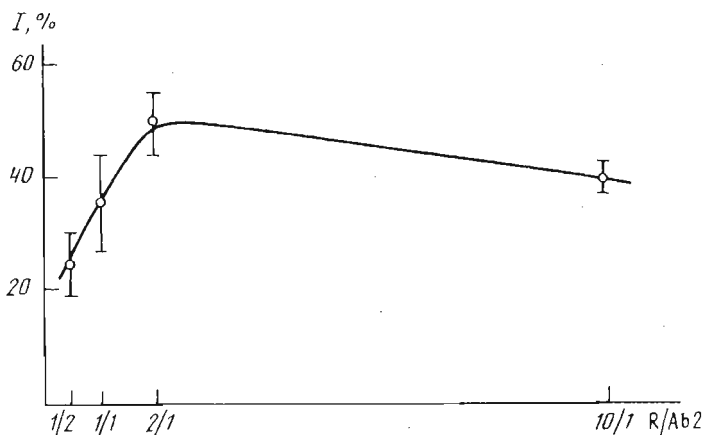


Рис. 3. Зависимость эффективности взаимодействия иммобилизованного пептида Р2 и аффинно очищенных антител Ab2 от соотношения солюбилизованный рецептор (R) — Ab2. Степень ингибирования (%) вычислена по уменьшению величины оптического поглощения в опыте по сравнению с контролем, где Ab2 преинкубировались без солюбилизатора. Каждая точка на графике представлена как среднее значение \pm стандартная ошибка, $n = 4$

достаточно хорошо взаимодействуют с твердой фазой. Время нанесения на планшету при этом сокращается до 15 мин. Пептид Р4 не удалось таким способом иммобилизовать на подложке, поэтому пришлось воспользоваться конъюгатом Р4 с БСА. В качестве растворимого антигена, конкурирующего за АТ, «узнающие» антиген твердой фазы, использовали солюбилизированные препараты мембран мозга крысы. Полагая, что в 1 мг солюбилизованного мембранного белка содержится ~60 фмоль рецептора SP [14], и учитывая объем одной пробы (100 мкл), подобрали оптимальные количества АТ. Для солюбилизованных 1% CHAPS препаратов мембран диапазон приемлемых концентраций для аффинно очищенных антител составил 10—100 нг/мл, для обогащенных иммуноглобулинами фракций — 80—1000 нг/мл.

В подобранных условиях исследовали способность солюбилизованных препаратов рецептора конкурировать с обогащенными иммуноглобулинами фракциями или с аффинно очищенными антителами за связывание с соответствующими пептидами, иммобилизованными на планшете (см. рис. 2, 3). Степень ингиби-

рования солюбилизатом эффективности взаимодействия антител и антигена твердой фазы вычислялась по уменьшению показаний оптического поглощения (λ 492 нм) при внесении в лунку с иммобилизованным антигеном комплементарных АТ, предварительно проинкубированных с солюбилизатом, по сравнению с контролем, не содержащим солюбилизата. В случае аффинно очищенных антител Ab2 и Ab3 (рис. 2а) ингибирование составило соответственно 50 ± 5 и $31 \pm 4\%$ (результат представлен как среднее \pm стандартная ошибка, $n = 4$) при соотношении компонентов (рецептор — АТ) в растворе 2 : 1 (соотношение вычисляли, исходя из концентрации белка в солюбилизованных мембранах, количества рецептора SP на 1 мг мембранного белка (см. выше) и концентрации АТ). При тестировании в конкурентном ИФА обогащенных иммуноглобулинами фракций к пептидам P1, P2, P4 (рис. 2б) выяснилось, что наибольшее действие ($31,0 \pm 0,6\%$, $n = 3$) солюбилизат оказывал на фракцию к пептиду P2, концентрация белка при этом составила 150 нг/мл. Те же препараты солюбилизата в случае фракций к пептидам P1 и P4 ингибировали образование комплекса АГ — АТ значительно хуже — на 12 ± 1 и $3,5 \pm 1,5\%$ ($n = 2$) соответственно, причем этот эффект начинал наблюдаться при концентрации белка во фракциях от 1 мкг/мл.

Высокая специфичность Ab2 и возможность работать с достаточно низкими их концентрациями (до 10 нг/мл) позволили определить зависимость эффективности взаимодействия АТ с пептидом P2, иммобилизованным на твердой фазе, от соотношения количеств рецептора и АТ (рис. 3). График построен по результатам нескольких экспериментов. В каждом случае солюбилизат получали заново, и количество белка в нем могло варьировать от 6,0 до 13 мг/мл; следовательно, не было постоянным и число участков связывания SP в пробах. И хотя для графика взяты средние значения, зависимость ингибирования от концентрации солюбилизованного рецептора SP прослеживается четко.

В работе Парнета и др. [17] было описано получение антител на синтетические пептиды, соответствующие экстрацеллюлярным доменам бычьего рецептора NK-2, и проведено исследование их взаимодействия с рецептором NK-1-типа. При этом было обнаружено, что антитела против второго и четвертого экстрацеллюлярных доменов (рис. 1) заметно ингибировали связывание радиоактивного SP с его рецептором в панкреатических клетках AR42J и лимфобластах IM9 человека. В то же время антитела к первому и третьему доменам практически не оказывали никакого эффекта на связывание SP, что согласуется с нашими данными об отсутствии влияния антитела Ab2 на взаимодействие радиоактивного SP с мембранами мозга крысы.

Анализ полученных нами данных свидетельствует о наибольшем сродстве антипептидных антител с фрагментом аминокислотной последовательности рецептора SP 182—192 и в меньшей степени — с фрагментом 225—236. Нами была предпринята попытка использовать антитела Ab2 и Ab3 для выделения рецептора SP. Вследствие уже упоминавшегося низкого содержания тахикининовых рецепторов в различных тканях и чрезвычайно быстрой потери SP-связывающей активности солюбилизованными препаратами мы предполагали использовать эти антитела для выделения и характеристики комплекса рецептора с ковалентно присоединенным йодированным SP, обладающим высокой удельной радиоактивностью. Отсутствие конкуренции между антителами и [125 I]BH-SP за связывание с рецептором позволяло надеяться, что они будут эффективно взаимодействовать с солюбилизованным ковалентным комплексом. Следует отметить, что образующие дисукцинимидилсубератом поперечные шивки рецептора с [125 I]BH-SP или [3 H]SP ранее были использованы для характеристики молекулярной массы SP рецепторов в лимфобластах IM-9 человека и мембранах мозга крысы [18, 19].

Для проверки взаимодействия с антителами мы использовали фракцию SP рецептора с ковалентно присоединенным [125 I]BH-SP, выделенную с помощью высокоэффективной гель-хроматографии в модифицированных условиях работы [13].

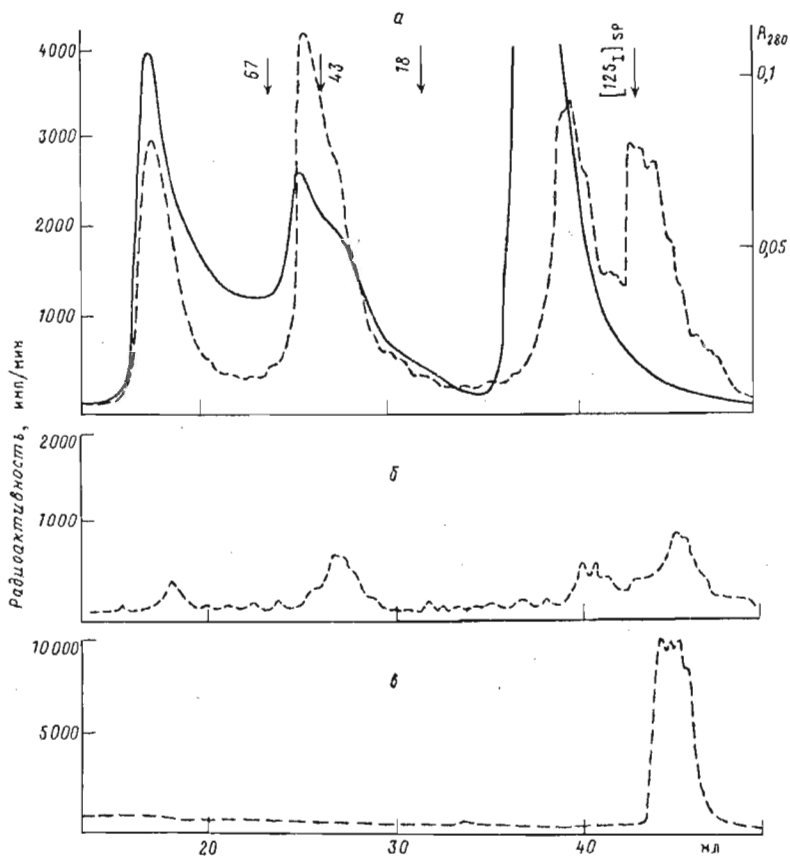


Рис. 4. Профили гель-хроматографии препаратов мембран мозга крысы после их взаимодействия с $[^{125}\text{I}]\text{BH-SP}$, обработки 1 мМ DSS и солиubilизации 1% CHAPS (а). Связывание в присутствии 1000-кратного избытка немеченого пептида (б). Ковалентная пришивка 1 мМ DSS не проводилась (в). Использовались две последовательно соединенные колонки Protein Pak 300SW (7,5 × 300 мм) и Sphergel-TSK 3000SW (7,5 × 600 мм). Элюция осуществлялась в 50 мМ трис-НСl-буфере, рН 7,5, содержащем 0,5% CHAPS, 50 мМ NaCl, 10 мМ MnCl₂, при скорости 0,4 мл/мин. Поглощение (λ 280 нм) показано сплошной линией, радиоактивность во фракциях (объем фракций ~0,4 мл) — штриховой. Цифры у стрелок — молекулярные массы (кДа) маркерных белков, элюирующихся в указанном месте

На рис. 4 представлены профили гель-филтраций высокого разрешения трех различных солиubilизированных образцов мембран мозга. Первые два были получены после инкубации мембран с $[^{125}\text{I}]\text{BH-SP}$ (второй образец — в присутствии 1000-кратного избытка немеченого пептида) и удаления несвязавшегося пептида с последующей обработкой 1 мМ DSS. Для третьего образца после инкубации мембран с радиоактивным лигандом ковалентная пришивка DSS не проводилась. Гель-филтрация выявила два пика радиоактивности. Один из них выходит в высокомолекулярной области, другой (более интенсивный) — в области примерно 50 кДа. Полное отсутствие этих радиоактивных пиков в образце, не обработанном бифункциональным реагентом, позволяет говорить об успешном ковалентном мечении рецептора радиоактивным лигандом в присутствии DSS. Для дальнейшей работы использовали фракции, образующие второй радиоактивный пик, которые концентрировались на вакуумной центрифуге.

Для анализа взаимодействия антител с ковалентно меченным рецептором использовали аффинную хроматографию на колонке с белок-А-сефарозой. Молярная концентрация антител в опыте была на порядок больше возможной рассчитанной концентрации рецептора SP. После инкубации антител с меченой

Соотношение радиоактивность/белок в процессе выделения радиоактивного комплекса рецептор — лиганд *

| Стадии очистки | Радиоактивность, имп/мин | Белок (по Брэдфорд), мкг | Соотношение, имп/мин · мкг |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Исходный солиоблизат | 2575 | 67 | 38 |
| Пик после гель-фильтрации | 9140 | 245 | 37 |
| Не сорбировавшаяся радиоактивность | 6675 | 205 | 33 |
| Сорбировавшаяся радиоактивность | 4100 | 11 | 373 |

* Представлены результаты одного из экспериментов. На разных стадиях очистки измерялась радиоактивность аликвот, произвольных по объему, удобному для определения в них содержания белка.

солюбилизированной фракцией реакционная смесь наносилась на колонку с белок-А-сефарозой. Молярная концентрация активных молекул белка А по крайней мере в 10 раз превышала концентрацию антител в смеси, так что все молекулы антител, в том числе и образовавшие комплекс с рецептором, должны были сорбироваться на носителе. Непровзаимодействовавшие с белком А соединения элюировали и определяли содержание радиоактивного вещества, оставшегося на носителе. Таким методом была проверена способность к взаимодействию с ковалентно меченым рецептором SP аффинно очищенных антител Ab2 и Ab3, а также обогащенных иммуноглобулинами фракций Ab1 и Ab4.

Во всех случаях количество радиоактивности, остающееся на колонке с белок-А-сефарозой, составляло менее 1% общей радиоактивности, внесенной на колонку. Так как для антител Ab2 и Ab3 мы наблюдали конкуренцию с солюбилизованными препаратами мембран за связывание с соответствующими пептидами, можно заключить, что полученные отрицательные результаты вызваны, по-видимому, изменениями молекулы рецептора, возникающими при обработке DSS.

Параллельно с антителами против синтетических фрагментов SP-рецептора в экспериментах с солюбилизованными радиоактивно мечеными препаратами мы также использовали ранее полученные аффинно очищенные антитела против SP [20]. Их инкубировали с меченым солюбилизованным лиганд-рецепторным комплексом, после чего смесь наносили на колонку с белок-А-сефарозой. Было обнаружено, что после элюирования буфером иммобилизованного на колонке препарата около 25—45% радиоактивной материи по расчету от суммарной внесенной на колонку радиоактивности остается связанной с аффинным носителем. Сорбированная радиоактивность более чем на 90% элюировалась при обработке сорбента 2% SDS. Полученную таким образом фракцию хроматографировали на трех последовательно соединенных гель-фильтрационных колонках. При этом вещество, содержащее радиоактивность, элюировалось широким пиком, точно повторяющим профиль поглощения при 280 нм, максимум которого соответствовал молекулярной массе около 80 кДа.

Способность крупной молекулы иммуноглобулина взаимодействовать со своим антигеном, ковалентно связанным в солюбилизованном лиганд-рецепторном комплексе, указывает на «незаглубленность» активного центра рецептора в исследуемой модельной системе. Полученный положительный результат в случае антител к SP позволяет высказать предположение о возможной экспонированности пептида в комплексе, образующемся при эндогенном связывании лиганда с рецептором. Подтверждение этому можно найти в недавно опубликованной работе [21], где с помощью методов направленного мутагенеза показано важное значение N-концевого фрагмента рецептора NK-1 для связывания SP.

Мы провели предварительную оценку степени очистки полученного SP-свя-

зывающего компонента. С этой целью на каждом этапе эксперимента определялось соотношение радиоактивности к количеству белка. Такие данные были получены для исходного солюбилизованного препарата мозга крысы перед гель-фильтрацией, для полученного после гель-фильтрации второго пика перед нанесением на белок-А-сефарозу, а также для не сорбировавшегося на носителе радиоактивного вещества и радиоактивной фракции, элюированной с носителя 2% SDS и диализованной против 0,1% SDS.

Как видно из таблицы, достигнуто 10—15-кратное обогащение белковой фракции рецептором вещества Р.

Следует отметить, что степень очистки того же порядка была получена для рецептора SP из мозга свиньи с использованием аффинной хроматографии на различных лектинах [22]. При подготовке нашей работы к печати появилось сообщение Наката и др. [23] о достижении высокой степени очистки рецептора NK-1 из мозга крысы с помощью аффинной хроматографии на SP-сефарозе в дигитонине. Очевидно, в дальнейшей работе по очистке и характеристике тахикининовых рецепторов найдут применение антитела против различных синтетических фрагментов рецепторов, а также адсорбенты на основе природных тахикининов и антител к ним.

Экспериментальная часть

В работе были использованы следующие реактивы: вещество Р (SP; НПО «Вектор», Россия); трис[гидроксиметил]аминометан, бычий сывороточный альбумин (фракция 5), бацитрацин, глицин, додецилсульфат натрия, CHAPS (Serva, ФРГ); $MnCl_2$ (Ferak, ФРГ); фенолметилсульфонилфторид, гемоцианин моллюска *Keyhole limpet*, полный адъювант Фрейнда (Calbiochem, США); лейпептин (Peptide Institute Inc., Япония); водорастворимый 2-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (EDAC), protein assay (реагент Брэдфорда, Bio-Rad, США); конъюгат козлиных антител и пероксидазы хрена, неполный адъювант Фрейнда (Sigma, США); Tween-20, диметилсульфоксид (Fluka, Швейцария); 25% водный раствор глутарового альдегида (Reanal, Венгрия); белок-А-сефароза CL-4B, СН-активированная сефароза 4B (Pharmacia, Швеция); таблетированный орто-фенилдиамин (OPD) (2 мг хромогена в 1 таблетке) (центр «Интермед», Москва).

Выделение мембран из мозга крысы, определение в них белка, синтез радиоактивного производного вещества Р ($[^{125}I]BH-SP$) и анализ его связывания с мембранами проводили по методике [14].

Синтез пептидов твердофазным методом проводили на хлорметилированном сополимере стирола с 1% дивинилбензола «Bio-Beads» SX-1 фирмы Bio-Rad с содержанием 1,34 мэкв/г активного хлора. Для защиты боковых функций трифункциональных аминокислот использовали: бензиловые эфиры (Tyr, Ser, Thr), тозилную группу (Arg), бензилоксикарбонильную группу (Lys), циклогексильные эфиры (Asp, Glu), ацетамидометильную группу (Cys), формильную группу (Trp). N^α-Аминогруппу блокировали трет-бутилоксикарбонильной защитой. Присоединение первой аминокислоты к полимеру осуществляли с помощью цезиевых солей методом Гизина [24]. Содержание С-концевой аминокислоты составляло от 0,96 до 1,20 мэкв/г.

За полной проходимости конденсаций следили с помощью количественного нингидринового теста Кайзера [25]. Синтез проводили в неавтоматизированном варианте в стеклянном реакторе, используя следующий протокол для каждого синтетического цикла: 1) CH_2Cl_2 (2 × 1 мин); 2) CH_2Cl_2 — TFA, 1 : 1 (1 мин); 3) CH_2Cl_2 — TFA, 1 : 1 (30 мин); 4) CH_2Cl_2 (5 × 1 мин); 5) DIEA (диизопропилэтиламин) — CH_2Cl_2 , 5 : 95 (2 × 2 мин); 6) CH_2Cl_2 (3 × 1 мин); 7) 3 экв. симметричного ангидрида Вос-аминокислоты в CH_2Cl_2 (2 ч); 8) CH_2Cl_2 (3 × 1 мин); 9) DIEA — CH_2Cl_2 , 5 : 95 (2 × 2 мин); 10) CH_2Cl_2 (2 × 1 мин); 11) DMF (2 × 1 мин); 12) 3 экв. гидроксibenзотриазолового эфира Вос-аминокислоты в DMF (2 ч);

13) DMF (2 × 1 мин); 14) CH₂Cl₂ (2 × 1 мин); 15) ацилирование смесью уксусный ангидрид — пиридин, 1 : 1 (2 ч); 16) CH₂Cl₂ (3 × 1 мин).

Отщепление пептидов от полимера проводили обработкой жидким фтористым водородом с различными добавками [26]. Очистку пептидов проводили в два этапа: сначала обессоливание на колонке с сефадексом G-10 в 0,1 М уксусной кислоте, затем — ВЭЖХ на колонке (2,4 × 25 см) с диасорбом 130 С—16/Е в градиенте от 10 до 40% ацетонитрила в 0,4% растворе пиридинацетата.

Индивидуальность пептидов подтверждена данными аминокислотного анализа и масс-спектрометрии (метод FAB, прибор Kratos MS 50 TC), экспериментальные величины M^+ для пептидов P1, P2, P3 и P4 соответствовали теоретическим.

Получение антител и их очистка. Для пептидов P2 и P3: 2 мг пептида и 2 мг KLH растворяли в 0,5 мл PBS (8 мМ Na₂HPO₄, 1,5 мМ KH₂PO₄, 0,137 М NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7,4), при перемешивании добавляли по каплям (за 30 мин) 0,5 мл 0,25% раствора глутарового альдегида в PBS и оставляли при перемешивании 18 ч при комнатной температуре. Для пептидов P1 и P4 синтез конъюгатов с KLH проводили с использованием *m*-малеимидобензил-N-гидроксисукцинимидного эфира по методике, предложенной в работе [27]. Полученные конъюгаты пептидов P1—P4 с KLH диализовали против PBS и использовали для иммунизации из расчета 1 мг исходного пептида на 1 кролика.

Иммунизацию, отбор крови, очистку антисывороток и выделение по известным методикам аффинно очищенных антител Ab2 и Ab3 проводили в тех же условиях, что и при получении аффинно очищенных антител против SP [20].

Аффинные носители для получения антипептидных антител Ab2 и Ab3 синтезировали, используя СН-активированную сефарозу 4В и пептиды P2 и P3 соответственно, по стандартной методике, рекомендованной фирмой Pharmacia. Фракции, обогащенные иммуноглобулинами, тестировали в твердофазном ИФА [28], антигеном служили конъюгаты пептидов с БСА, полученные аналогично конъюгатам соответствующих пептидов с KLH.

Анализ ингибирования антителами связывания [¹²⁵I]BH-SP с мембранами мозга крысы проводили в 200 мкл 50 мМ трис-HCl-буфера (pH 7,4), содержащего 3 мМ MnCl₂, 10 мкг/мл фенолметилсульфонилфторида, 40 мкг/мл бацитрацина, 4 мкг/мл лейпептина и 200 мкг/мл БСА (буфер А). Антитела (как аффинно очищенные, так и в составе обогащенной иммуноглобулинами фракции) предварительно инкубировались с мембранами в течение ночи при 4° С. Связывание радиоактивного лиганда при концентрации 0,3—0,5 нМ осуществлялось в течение 30 мин при комнатной температуре. Неспецифическое связывание определяется в присутствии 5 мкМ SP.

Конкурентный иммуоферментный анализ солюбилизата мембран мозга крысы проводили в 96-луночных иммунологических планшетах EIA/RIA COSTAR (flat bottom, high binding). Для промывания лунок и разведения соответствующих специфических антител брали PBS, содержащий 0,1% Твин-20 (PBS-T). В лунки планшеты помещали по 100 мкл раствора пептида (P1, P2, P3) в PBS (*c* ~ 0,1 мг/мл) и выдерживали 15 мин под УФ-лампой (2011 Macgrovue, LKB). Для P4: конъюгат P4-БСА растворяли в 0,1 М бикарбонатном буфере, pH 9,0 (в 1 мл раствора содержалось ~0,1 мг пептида) и помещали по 100 мкл в лунки на 18 ч при 4° С. После удаления антигена лунки промывали (3 раза по 2 мин), в четвертый раз буфер оставляли в планшете на 40 мин при 22° С. Затем в лунки вносили 100 мкл либо солюбилизата, преинкубированного в течение 18 ч при 4° С со специфическими антителами, либо 100 мкл раствора специфических антител в том же буфере, который использовался для солюбилизации мембран. В контроле специфические антитела были заменены на иммуноглобулины неиммунизированного кролика (преиммунные IgG). Планшету инкубировали 1 ч при 37° С, промывали 4 раза по 2 мин и вносили в лунки по 100 мкл раствора конъюгата антивидовых антител с пероксидазой хрена (разведение 1 : 1000), содержащего 0,1% БСА. Планшету выдерживали 50 мин при 37° С. Промыв лунки 4 раза по 2 мин,

заливали в них по 100 мкл раствора субстрата (2 таблетки *орто*-фенилендиамина, 10 мкл H₂O₂, 10 мл 1% натрий-цитратного буфера, pH 4,5). Через 30 мин в каждую лунку добавляли по 100 мкл 2 н. H₂SO₄. Оптическое поглощение измеряли на фотометре Titertek Multiskan Plus MK II при λ 492 нм.

Для получения ковалентного комплекса рецептора SP и [¹²⁵I]BH-SP после 30-минутной инкубации пептида с мембранами мозга крысы в буфере А (20° С) и быстрой 2-кратной промывки PBS на центрифуге Eppendorf осадок суспендировали в 200 мкл PBS в присутствии 1 мМ DSS (0,1 М раствор в диметилсульфоксиде) и выдерживали 1 ч при 0° С. После удаления избытка DSS 2-кратным центрифугированием мембраны солюбилизировали 1% CHAPS по методике [13].

Условия гель-фильтрации солюбилизированных препаратов мембран мозга крысы (~1,5—2 мл) приведены в подписи к рис. 4.

Аффинная хроматография на белок-А-сефарозе. Солюбилизированный комплекс рецептора с SP после гель-фильтрации (второй радиоактивный пик) инкубировали с 10-кратным избытком антител в течение ночи при 4° С, после чего реакционную смесь нанесли на колонку с белок-А-сефарозой и выдерживали при осторожном перемешивании 90 мин (20° С). Далее промывали колонку 10-кратным объемом буфера и определяли радиоактивность, оставшуюся на носителе.

Гель-фильтрацию фракции, элюируемой с белок-А-сефарозы 2% SDS, проводили на трех последовательно соединенных колонках Spherogel-TSK GSWP (7,5 × 75 мм), Spherogel-TSK 4000SW (7,5 × 600 мм) и Ultrapac TSK 3000SW (7,5 × 600 мм), уравновешенных 6 мМ трис-HCl-буфером (pH 6,8), содержащим 0,1% SDS.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McGillis J. P., Mitsuhashi M., Payan D. G. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1990. V. 594. P. 85—94.
2. Maggio J. E. // Ann. Rev. Neurosci. 1988. V. 11. P. 13—28.
3. Regoli D., Drapeau G., Dion S., D'Orleans-Juste P. // Life Sci. 1987. V. 40. P. 109—117.
4. Buck S. H., Bursner E. // Physiol. Rev. 1987. V. 67. P. 1117—1142.
5. Masu Y., Nakayama K., Tamaki H., Harada Y., Kuno M., Nakanishi S. // Nature. 1987. V. 329. № 6142. P. 836—838.
6. Yokota Y., Sasai Y., Tanaka K., Fujiwara T., Tsuchida K., Shigemoto R., Kakizuka A., Ohkubo H., Nakanishi S. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 30. P. 17649—17652.
7. Shigemoto R., Yokota Y., Tsuchida K., Nakanishi S. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 2. P. 623—628.
8. Graham A., Hopkins B., Powell S. J., Danks P., Briggs I. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1991. V. 177. № 1. P. 8—16.
9. Mantyh P. W., Vigna S. R., Maggio J. E. // Meth. Neurosci. 1991. V. 5. P. 404—425.
10. Eistetter H. R., Church D. J., Mills A., Godfrey P. P., Capponi A. M., Brewster R., Schulz M.-F., Kawashima E., Arkinstall S. J. // Cell Regul. 1991. V. 2. P. 767—779.
11. Hanley M. R., Sandberg B. E., Lee C. M., Iversen L. L., Brundish D. E., Wade R. // Nature. 1980. V. 286. № 5785. P. 810—812.
12. Viger A., Beaujouan J. C., Torrens Y., Glowinski J. // J. Neurochem. 1983. V. 40. № 4. P. 1030—1039.
13. Nakata Y., Tanaka H., Morishima Y., Segawa T. // J. Neurochem. 1988. V. 50. № 2. P. 522—527.
14. Лазакевич Е. М., Мутуле И. Э., Уткин Ю. П., Цетлин В. И. // Биооргани. химия. 1988. Т. 14. № 3. С. 313—317.
15. Welling G. W., Weijer W. J., van der Zee R., Welling-Wester S. // FEBS Lett. 1985. V. 188. № 2. P. 215—218.
16. Hopp T. P., Woods K. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 6. P. 3824—3828.
17. Parnet P., Mitsuhashi M., Turck C. W., Kerdelhue B., Payan D. G. // Brain, Behavior, and Immunity. 1991. V. 5. № 1. P. 73—78.
18. Payan D. G., McGillis J. P., Organist M. L. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 30. P. 14321—14329.
19. Nakata Y., Hiraoaka C., Segawa T. // Eur. J. Pharmacol. 1988. V. 152. P. 171—174.

20. Головнина Т. А., Кашеверов И. Е., Плаксин Д. Ю., Якунина Н. Б., Коваленко В. А., Уткин Ю. Н., Цетлин В. И. // Биоорганич. химия. 1992. Т. 18. № 7. С. 932—941.
21. Fong T. M., Yu H., Huang R.-R. C., Strader C. D. // Biochemistry. 1992. V. 31. № 47. P. 11806—11811.
22. Liu Y. F., Quirion R. // J. Neurochem. 1991. V. 57. № 6. P. 1944—1950.
23. Nakata Y., Takamatsu H., Kuroyanagi N., Nishio H., Segawa T., Akizawa T., Hirai Y., Akiyama M. // Jap. J. Pharmacol. 1992. V. 59. P. 313—319.
24. Gisin B. F. // Helv. chim. acta. 1973. V. 56. P. 1477—1482.
25. Sarin V. K., Kent S. B. II., Tam J. P., Merrifield R. B. // Anal. Biochem. 1981. V. 117. № 1. P. 147—157.
26. Яров А. В., Гельфанов В. М., Гречанинова Л. А., Суровой А. Ю., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Луговской А. А., Дрягалин И. И., Иванощенков В. И., Бурдов А. И. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1193—1205.
27. Green N., Alexander H., Olson A., Alexander S., Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R. A. // Cell. 1982. V. 28. P. 477—487.
28. Clark R., Engvall E. Enzyme-linked Immunoassay (ELISA). Theoretical and Practical Aspects. Enzyme-immunoassay / Ed. E. T. Maggio. Boca Raton, Florida, 1981. P. 167—179.

Поступила в редакцию
19.VII.1993

После доработки
30.XII.1993

I. E. Kasheverov, T. A. Golovnina, A. V. Yarov ,
Yu. N. Utkin, V. I. Tsetlin*

A STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN THE RAT BRAIN SUBSTANCE P RECEPTOR AND THE ANTIBODIES AGAINST ITS SYNTHETIC FRAGMENTS AND SUBSTANCE P

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow;
Peptide Engineering Centre «Peptos», Moscow*

The peptides which correspond to the fragments 55—64, 182—192, 225—236 and 236—245 (P1—P4, respectively) of the rat brain substance P receptor were synthesized. Antibodies (Ab1—Ab4, respectively) against the KLH-conjugates of these peptides were raised and purified by affinity chromatography. None of the antibodies inhibited the Bolton—Hunter labelled substance P, [¹²⁵I]BH—SP, binding to the rat brain membranes. On the other hand, Ab2 and Ab3 recognition of the SP receptor was found in ELISA experiments: the CHAPS — solubilized rat brain membranes could inhibit binding of these antibodies to the immobilized P2 and P3. Antibodies Ab1—Ab4 did not interact with the CHAPS — solubilized DSS cross-linked complex of the [¹²⁵I]BH—SP and SP receptor. However, this complex retained the capacity of interacting with the affinity — purified antibodies against SP and was purified by sequential gel-permeation HPLC and protein A — chromatography.