



УДК 547.993:57.083.3+576.357.422.4+577.353.42

АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ЛАТРОТОКСИНА ВЗАИМОДЕЙСТВУЮТ С СИНАПТОСОМАМИ ИЗ МОЗГА КРЫСЫ И МОДИФИЦИРУЮТ ЛАТРОТОКСИНИНДУЦИРОВАННЫЙ ВХОД КАЛЬЦИЯ В СИНАПТОСОМУ

© 1996 г. В. Н. Пашков[#], Г. П. Цюрюпа, Н. Б. Грико, О. В. Булгаков, Н. В. Руденко, Е. Б. Яхнина, Е. В. Гришин

Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142292, Пущино Московской обл.

Поступила в редакцию 14.12.95 г.

В результате гибридизации спленоцитов мышей, иммунизированных α -латротоксином (ЛТ), и клеток миеломной линии P3-X63Ag8.653 получены гибридомные линии, продуцирующие антиидиотипические моноклональные антитела (АМА) к ЛТ. АМА обладают следующими свойствами: 1) связываются с синапсосомами из мозга крысы, 2) не влияют на связывание ЛТ с высокоаффинным рецептором, 3) не взаимодействуют с ЛТ в растворе. При исследовании влияния АМА на ЛТ-индуцируемый вход $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синапсосомы из мозга крысы обнаружено, что некоторые антитела (6,6D11, 11.7B7) в значительной степени ингибируют этот процесс. Полученные данные указывают на существование в пресинаптической мембране еще не идентифицированных компонентов, взаимодействующих с ЛТ. Нарушение взаимодействия ЛТ с этими неизвестными компонентами влияет на ЛТ-индуцируемый вход ионов кальция в синапсосомы.

Ключевые слова: α -латротоксин, антиидиотипические моноклональные антитела, синапсосомы из мозга крысы, кальциевая проницаемость нервной мембраны.

Молекулярные механизмы регулируемого экзоцитоза нейромедиаторов в синапсах нервных клеток интенсивно исследуются в последние годы [1, 2]. Важную роль в этих исследованиях сыграли различные нейротоксины, в частности ЛТ – высокомолекулярный (около 130 кДа) белковый нейротоксин для позвоночных. ЛТ увеличивает проницаемость пресинаптической мембраны нервных клеток для ионов кальция и вызывает ускоренный массивный экзоцитоз нейромедиаторов [3]. В мембранах из мозга млекопитающих (бык, крыса) идентифицирован высокоаффинный рецептор ЛТ [2]. Этот рецептор, локализованный в пресинаптической мембране, взаимодействует с белками синаптических везикул и с определенными кальциевыми каналами [2, 4]. После связывания с ЛТ рецептор неизвестным пока образом запускает процесс экзоцитоза. В то же время на синапсосомах из мозга крысы [5, 6] и на клетках РС 12 [7] с помощью моноклональных антител (МА)

к ЛТ было показано, что одного только связывания ЛТ с высокоаффинным рецептором недостаточно для полного развития всех пресинаптических эффектов ЛТ. В этих экспериментах МА, связываясь с ЛТ, не препятствовали его высокоаффинному взаимодействию с рецептором, но полностью блокировали вызываемое ЛТ повышение проницаемости пресинаптической мембраны для ионов кальция и выброс нейромедиаторов. А одно из МА, полностью ингибируя ЛТ-зависимое повышение проницаемости синапсосом для ионов кальция, в значительной степени сохраняло способность ЛТ вызывать ускоренный выброс нейромедиаторов (ЛТ-индуцируемый кальцийнезависимый выброс нейромедиаторов) [5, 6]. Эти данные предполагают наличие в молекуле ЛТ дополнительных функциональных доменов, отличных от участка высокоаффинного связывания. В свою очередь это означает, что в пресинаптической мембране существуют ранее не идентифицированные компоненты, взаимодействующие с дополнительными функциональными доменами ЛТ.

Для идентификации и выделения этих мембранных белковых компонентов, принимающих

Сокращения: ЛТ – α -латротоксин, МА – моноклональные антитела, АМА – антиидиотипические моноклональные антитела, БСА – бычий сывороточный альбумин.

[#] Автор для переписки.

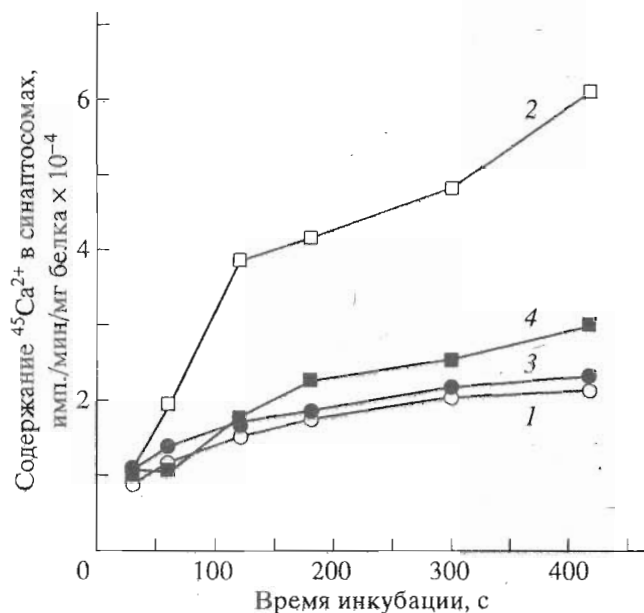


Рис. 1. Изменение ЛТ-индуцируемого входа $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синапсосомы, предварительно инкубированные с антителами 6.6D11. Концентрация антитела при инкубации с синапсосомами 2.5×10^{-7} М. 1 – IgM мыши; 2 – ЛТ в присутствии IgM мыши; 3 – антитела 6.6D11; 4 – ЛТ в присутствии антитела 6.6D11. Приведены усредненные данные 3 экспериментов.

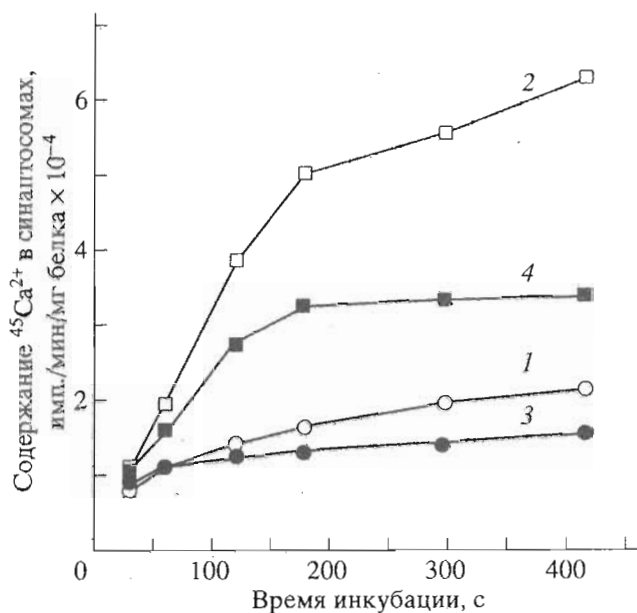


Рис. 2. Изменение ЛТ-индуцируемого входа $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синапсосомы, предварительно инкубированные с антителами 11.7B7. Концентрация антитела при инкубации с синапсосомами 1.8×10^{-6} М. 1 – IgG мыши; 2 – ЛТ в присутствии IgG мыши; 3 – антитела 11.7B7; 4 – ЛТ в присутствии антитела 11.7B7. Приведены усредненные данные 4 экспериментов.

участие во взаимодействии с ЛТ после его связывания с высокоаффинным рецептором, мы предлагаем подход, основанный на использовании антиидиотипических моноклональных антител (АМА) против ЛТ. В иммунизированном ЛТ животном АМА могут вырабатываться [8, 9] против идиотипических антител, узнающих дополнительные структурные или функциональные домены ЛТ. Некоторые из АМА могут влиять на функциональные эффекты ЛТ.

В настоящей работе описано получение АМА против ЛТ, способных взаимодействовать с компонентами пресинаптической мембраны и влиять на ЛТ-индуцируемый вход ионов кальция в синапсосомы из мозга крысы.

Основываясь на работах [8, 9], можно было предполагать, что АМА к функционально значимым участкам молекулы ЛТ могут имитировать их пространственную структуру и связываться с соответствующими акцепторами на пресинаптической мембране. Для получения таких МА мышей иммунизировали ЛТ в течение длительного времени. АМА в сыворотке (или культуральной среде гибридом) выявляли по связыванию с синапсосомами из мозга крысы. В результате проведения нескольких независимых гибридизаций спленоцитов иммунных мышей с клетками миеломы получили около 20 гибридом, продуцирую-

щих АМА к ЛТ. Наиболее хорошо растущие и стабильные гибридомы были наработаны в виде асцитной опухоли в мышцах линии BALB/c, и антитела выделены из асцитов различными методами. Эти МА не связывались с ЛТ в растворе, а при инкубации с синапсосомами не влияли на взаимодействие ЛТ с высокоаффинным рецептором.

При исследовании способности АМА к ЛТ модифицировать ЛТ-индуцируемое повышение проницаемости синапсосом для ионов кальция было обнаружено, что некоторые антитела оказывают существенное влияние на этот процесс. На рис. 1 и 2 приведены результаты экспериментов с антителами 6.6D11 (изотип IgM) и 11.7B7 (изотип IgG). Не влияя на вход $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синапсосомы, эти антитела в значительной степени ингибировали ЛТ-индуцируемое повышение входа $^{45}\text{Ca}^{2+}$. На рис. 3 показаны результаты действия некоторых изученных к настоящему времени АМА к ЛТ на ЛТ-индуцируемый вход $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синапсосомы.

Таким образом, нами получены МА, способные взаимодействовать с неизвестными компонентами пресинаптической мембраны. Эти МА не препятствуют связыванию ЛТ с высокоаффинным рецептором, но в значительной степени влияют на способность ЛТ повышать проницаемость

пресинаптической мембраны для ионов кальция. Полученные в настоящей работе и предыдущих исследованиях [5, 6] данные показывают, что в ЛТ существуют участки, взаимодействующие с другими компонентами пресинаптической мембраны, отличными от высокоаффинного рецептора. Не исключено, что изучение этих взаимодействий поможет объяснить все многообразие функциональной активности ЛТ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали миелому РЗ-Х63Аg8.653 (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), культуральную среду RPMI 1640, эмбриональную телячью сыворотку, другие среды, добавки и реактивы для работы с культурами клеток (Sigma, США, или Flow, Великобритания), полиэтиленгликоль 3000–3700, адьюванты Фрейнда, пристан (Sigma, США), диметилсульфоксид (Merck, Германия), Na^{125}I (ГИПХ "Прикладная химия", Санкт-Петербург), $^{45}\text{CaCl}_2$ (Amersham, Англия), реагенты для электрофореза (Bio-Rad, США).

Для иммунизации использовали самок мышей линии BALB/c трехмесячного возраста. Животных иммунизировали внутривенно 0.2 мл эмульсии, состоящей из смеси равных объемов полного адьюванта Фрейнда и раствора, содержащего 4–5 мкг ЛТ. Далее с периодичностью в 2–3 нед мышам инъецировали таким же количеством антигена в неполном адьюванте Фрейнда в течение 4–10 мес. За 7 дней до гибридизации у мышам брали кровь из хвостовой вены и определяли наличие антиидиотипических антител в сыворотке. За 3 дня до гибридизации мышам вводили внутривенно 5–10 мкг ЛТ в солевом фосфатном буфере без адьюванта.

Гибридизация и получение гибридом, продуцирующих МА. Спленциты иммунной мыши (10^8 клеток) гибридизовали с миеломой РЗ-Х63Аg8.653 (10^7 клеток) по стандартной методике [10] в 50% растворе полиэтиленгликоля, содержащего 10% диметилсульфоксида. Клетки распределяли по восьми 96-луночным планшетам. В ходе культивирования гибридом использовали 20% эмбриональную телячью сыворотку. Гибридомы клонировали минимум дважды методом лимитирующего разведения. Положительные клоны наращивали в виде асцитов в мышах линии BALB/c.

МА выделяли из асцитной жидкости, используя высаливание сульфатом аммония, аффинную хроматографию на белок-G-сефарозе, хроматографию на Mono Q Superose и гидроксилпатите. Чистота полученных антител составляла не менее 90% (по данным анализа препарата антител

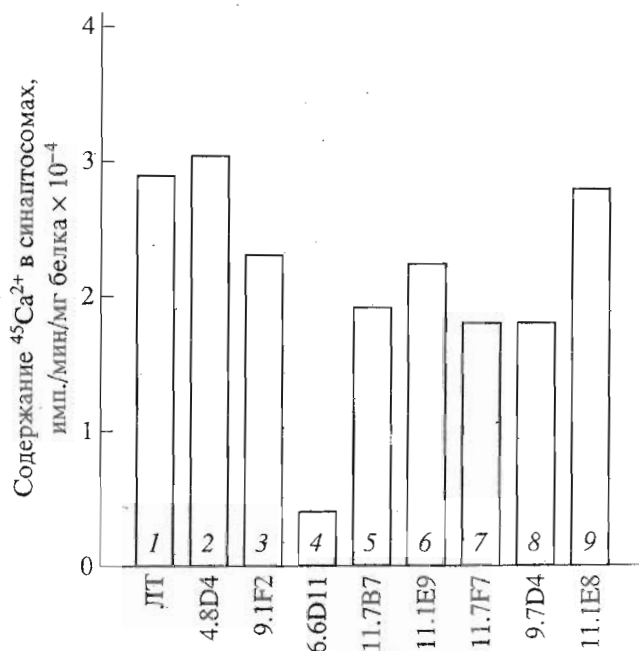


Рис. 3. Изменение ЛТ-индуцируемого входа $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синапсосомы, предварительно инкубированные с АМА. По оси ординат – содержание $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синапсосомах через 3 мин после добавления ЛТ за вычетом входа $^{45}\text{Ca}^{2+}$ под действием только антител в отсутствие ЛТ. 1 – ЛТ или ЛТ после инкубации синапсосом с иммуноглобулинами из сыворотки неиммунизированных мышам; 2–9 – ЛТ после инкубации синапсосом с указанными АМА. Во всех случаях приведены усредненные данные 2–4 экспериментов.

после электрофоретического разделения в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и β -меркаптоэтанолом).

Синапсосомы из мозга крысы получали по методу [11]. Суспензию синапсосом в 0.8 М сахарозе медленно разбавляли в 4 раза модифицированным буфером Кребса 1 (МБК1) (145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgSO_4 , 1 мМ Na_2HPO_4 , 0.02 мМ CaCl_2 , 10 мМ α -D-глюкоза, 10 мМ HEPES-NaOH, pH 7.4) и осаждали в течение 20 мин центрифугированием при 9000g. Осадок синапсосом ресуспендировали в требуемом буфере и хранили на льду до использования (не более 1.5 ч).

ЛТ-индуцируемый вход $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синапсосомы. Кальциевую проницаемость синапсосом оценивали по входу $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Синапсосомы (2–4 мг белка) в 0.4 мл МБК1 инкубировали 15 мин при 37°C. Затем суспензию синапсосом вносили, быстро перемешивая, в другую пробирку, термостатируемую при 37°C с 4 мл МБК1, содержащего $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (3.1 мкМ, 5 мкКи) и, если требовалось, ЛТ (10^{-8} М). Через определенные интервалы времени отбирали аликвоты по 0.4 мл и отделяли синапсосомы от $^{45}\text{Ca}^{2+}$

фильтрованием через фильтры GF/C. Фильтры промывали три раза 3 мл буферного раствора, содержащего 0.5 М NaCl и 20 мМ трис-HCl, pH 7.4. Радиоактивность фильтров определяли в сцинтилляторе "Тритозол" [12] на сцинтилляционном счетчике Beckman-6800.

Тестируемые АМА к ЛТ добавляли к суспензии синаптосом в начале инкубации в концентрациях 3×10^{-7} – 2×10^{-6} М. В качестве контроля использовали IgG или IgM из сыворотки неиммунизированных мышей.

Латротоксин выделяли иммуноаффинной хроматографией по методу [13].

Получение радиоактивных производных ЛТ и антител осуществляли по [14]. Удельная радиоактивность препаратов составляла 400–800 Ки/ммоль.

Тестирование культуральных сред гибридом на наличие АМА к ЛТ (связывание антител с синаптосомами). К 80 мкл культуральной среды гибридом (использовали 96-луночные круглодонные планшеты для иммунологических реакций) добавляли 10 мкл суспензии синаптосом (исходная концентрация синаптосомного белка 8–10 мг/мл) в МБК2 (как МБК1, но содержащий 1.2 мМ CaCl₂) и инкубировали 10 мин при перемешивании при 37°C. Синаптосомы осаждали центрифугированием и промывали МБК2, содержащим 0.2% БСА (МБК2/БСА). Осадок ресуспендировали в 90 мкл МБК2/БСА, вносили в суспензию 10 мкл меченных иодом-125 кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши (конечная концентрация меченых антител 3×10^{-7} М) и инкубировали 10 мин при 37°C. Синаптосомы отделяли от несвязавшихся меченых антител фильтрованием на фильтрах GF/C. Фильтры промывали 2 раза 3 мл раствора МБК2/БСА и определяли их радиоактивность. Если радиоактивность фильтров превышала в 3–4 раза радиоактивность отрицательных контрольных проб, то считали, что культуральная среда данной гибридомы содержит АМА к ЛТ.

Ингибирование связывания ЛТ с синаптосомами. К 80 мкл МБК2/БСА, содержащего 2–5 мкг АМА к ЛТ, добавляли 10 мкл синаптосом (исходная концентрация синаптосомного белка 8–10 мг/мл) и инкубировали при перемешивании 10 мин при 37°C. Синаптосомы осаждали и промывали МБК2/БСА. Осадок ресуспендировали в 90 мкл МБК2/БСА и добавляли 10 мкл [¹²⁵I]ЛТ (конечная концентрация 0.5×10^{-9} М). После 10 мин инкубации при перемешивании синаптосомы отделяли от несвязавшегося [¹²⁵I]ЛТ фильтрованием через фильтры GF/C и просчитывали радиоактивность фильтров. В качестве отрицательного контроля ис-

пользовали иммуноглобулины из сыворотки неиммунизированной мыши.

Связывание АМА к ЛТ с [¹²⁵I]ЛТ. АМА (5 мкг) и [¹²⁵I]ЛТ (конечная концентрация 1×10^{-9} М) в 100 мкл МБК2/БСА инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Затем к раствору добавляли 10 мкл суспензии белок-А-сефароза (5 мг/мл геля), насыщенной кроличьими антителами против иммуноглобулинов мыши, и инкубировали 15 мин при перемешивании. Твердую фазу отделяли центрифугированием, промывали 2 раза МБК2/БСА и просчитывали радиоактивность осадка. В качестве положительного контроля использовали МА к ЛТ [5], в качестве отрицательного – IgG (или IgM) из сыворотки неиммунизированных мышей.

Аналитические процедуры. Количество белка определяли по модифицированному методу Лоури [15]. Концентрацию антител дополнительно определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм. Аналитический денатурирующий электрофорез в восстанавливающих условиях в полиакриламидном геле проводили по Лэммли [16].

Данная работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 95-04-11551а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sudhof T.C.* // Nature. 1995. V. 375. P. 645–653.
2. *Petrenko A.G.* // FEBS Lett. 1993. V. 325. P. 81–85.
3. *Rosenthal L., Meldolesi J.* // Pharmacol. Ther. 1989. V. 42. P. 115–134.
4. *O'Connor V., Shamotienko O., Grishin E., Betz H.* // FEBS Lett. 1993. V. 326. P. 255–260.
5. *Pashkov V., Grico N., Tsurupa G., Storchak L., Shatursky O., Himmelreich N., Grishin E.* // Neuroscience. 1993. V. 56. P. 695–701.
6. *Storchak L., Pashkov V., Pozdnyakova N., Himmelreich N., Grishin E.* // FEBS Lett. 1994. V. 351. P. 267–270.
7. *Cattaneo A., Grasso A.* // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 2730–2736.
8. *Jerne N.K.* // Ann. Immunol. (Paris). 1974. V. 125. P. 373–389.
9. *Cleveland W., Erlander B.* // Meth. Enzymol. 1986. V. 121. P. 95–107.
10. *Farekas G.S., Scheidegger D.* // J. Immunol. Meth. 1980. V. 35. P. 1–21.

11. Hajos F. // Brain Res. 1975. V. 93. P. 485–489.
12. Fricke U. // Anal. Biochem. 1975. V. 63. P. 555–558.
13. Пашков В.Н., Ковалевская Г.И., Красноперов В.Г., Булгаков О.В. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 1281–1283.
14. Greenwood F., Hunter W., Glover J. // Biochem. J. 1963. V. 89. P. 114–123.
15. Коваленко В.А., Пашков В.Н., Гришин Е.В. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. С. 1828–1837.
16. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

Anti-Idiotypic Monoclonal Antibodies against Latrotoxin Interact with Rat Brain Synaptosomes and Modify Latrotoxin-Induced Influx of Calcium into Synaptosomes

V. N. Pashkov,¹ G. P. Tsyuryupa, N. B. Grico, O. V. Bulgakov, N. V. Rudenko, E. B. Yakhnina, and E. V. Grishin

*Branch of the Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia*

Abstract—Hybridoma lines producing anti-idiotypic monoclonal antibodies (AImAbs) were prepared by fusing splenocytes of mice immunized with α -latrotoxin (LT) and P3-X63Ag8.653 myeloma line cells. AImAbs (1) bind to the rat brain synaptosomes, (2) do not affect the LT binding to the high-affinity receptor, and (3) do not react with LT in solution. The effect of AImAbs on the LT-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into rat brain synaptosomes was studied. Some antibodies (6.6D11 and 11.7B7) were found to strongly inhibit this process. The results obtained indicate that the presynaptic membrane contains unidentified components interacting with LT. The distortion of the interaction of LT with these unknown components affects the LT-induced calcium influx into synaptosomes.

Key words: α -latrotoxin, anti-idiotypic monoclonal antibodies, rat brain synaptosomes, calcium permeability of neuron membrane.

¹ To whom correspondence should be addressed.