



УДК 576.315.42

КАРТИРОВАНИЕ ЭПИТОПОВ РЕКОМБИНАНТНОГО ТРАНСПОРТНОГО БЕЛКА ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

© 2005 г. Е. А. Сухачева*, Л. Г. Тюлькина**, Е. М. Каргер***,
А. А. Шевелева**, Н. В. Стратонова*, Ю. Л. Дорохов***

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

**Кафедра вирусологии и Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, 119992,
Москва, Воробьевы горы, МГУ, Москва

Поступила в редакцию 26.11.2004 г. Принята к печати 05.04.2005 г.

Транспортный белок вируса табачной мозаики (tobacco mosaic movement protein, TMV-MP) обеспечивает межклеточный транспорт вирусной РНК через плазмодесмы. Свою функцию MP выполняет во взаимодействии с клеточными факторами на всем пути его внутриклеточного перемещения от места синтеза до плазмодесм клеточных стенок. Конформационное состояние MP при его внутриклеточном движении и выполнении им транспортной функции до сих пор неясно. В настоящей работе мы описываем получение панели мышинных моноклональных антител (МА) к TMV-MP и картирование эпитопов MP. Получены стабильные гибридомные линии, которые продуцируют МА к частично денатурированному рекомбинантному MP (MP_r). МА тестировали с помощью иммуноблоттинга и иммуноферментного анализа при использовании делеционных вариантов MP_r. Определены эпитопы TMV-MP_r, взаимодействующие с конкретными МА.

Ключевые слова: транспортный белок; вирус табачной мозаики; моноклональные антитела.

ВВЕДЕНИЕ

Плазмодесмы в растениях формируют цитоплазматическую сеть, которая обеспечивает межклеточный транспорт макромолекул. Вирусы растений, и прежде всего вирус табачной мозаики (TMV) как наиболее изученный представитель РНК-содержащих вирусов растений, могут быть использованы в качестве модельных объектов в экспериментах по изучению не только роли клеточного и вирусного генома в межклеточном транспорте вирусной РНК в растении, но и общих механизмов транспорта макромолекул. Накапливается все больше фактов, свидетельствующих о

том, что клеточные белки, вовлеченные в нормальный клеточный метаболизм, принимают также участие в репликации и транспорте вирусного генома.

Транспортный белок (MP) TMV отвечает за межклеточный транспорт вирусной РНК [1]. TMV-MP – это фосфопротеин, который состоит из 268 а. о. и отличается высоким содержанием остатков аргинина и лизина. Свои функции MP выполняет в ассоциации с клеточными факторами и в растениях, инфицированных TMV, накапливается в плазмодесмах [2], прочно ассоциирован с мембранами эндоплазматического ретикулума (ER) [3, 4], колокализует с микротрубочками цитоскелета [5]. Для понимания функции MP важным является его способность увеличивать пропускную способность плазмодесм (SEL) [6, 7] и фосфорилироваться клеточными протеинкиназами [8]. TMV-MP обладает способностью неспецифически связывать вирусную РНК, и на этом основании было высказано предположение, получившее широкое распространение, что комплекс вирусная РНК–MP является транспортной формой TMV [9–11].

Конформационное состояние TMV-MP при его функционировании внутри клетки до сих пор не исследованы. В настоящей работе с целью выявления поверхностных детерминант TMV-MP мы описы-

Сокращения: TMV – вирус табачной мозаики, tobacco mosaic virus; МА – моноклональные антитела; MP – транспортный белок, movement protein; MP_r и MP_rΔ – рекомбинантный TMV-MP и его делеционные мутанты; PME – пектинметилэстераза (табака), pectin methylesterase; GFP_r – рекомбинантный зеленый флуоресцентный белок, green fluorescent protein; MP-(1-30)-GFP_r – рекомбинантный гибридный белок, состоящий из N-концевых 30 а. о. TMV-MP, соединенных с аминокислотной последовательностью GFP_r через гексапептидный мостик; НАТ – раствор 10⁻⁴ М гипоксантина, 10⁻⁷ М аминокперина и 1.6 × 10⁻⁵ М тимидина; НТ – раствор 10⁻⁴ М гипоксантина и 1.6 × 10⁻³ М тимидина; ER – эндоплазматический ретикулум, endoplasmic reticulum; РАТ – мышинные поликлональные антитела к TMV-MP_r; PVDF-мембрана – polyvinylidene difluoride membrane; IPTG – изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид.

Автор для переписки (эл. почта: dorokhov@genchce.msu.ru; тел.: (095) 939-33-60).

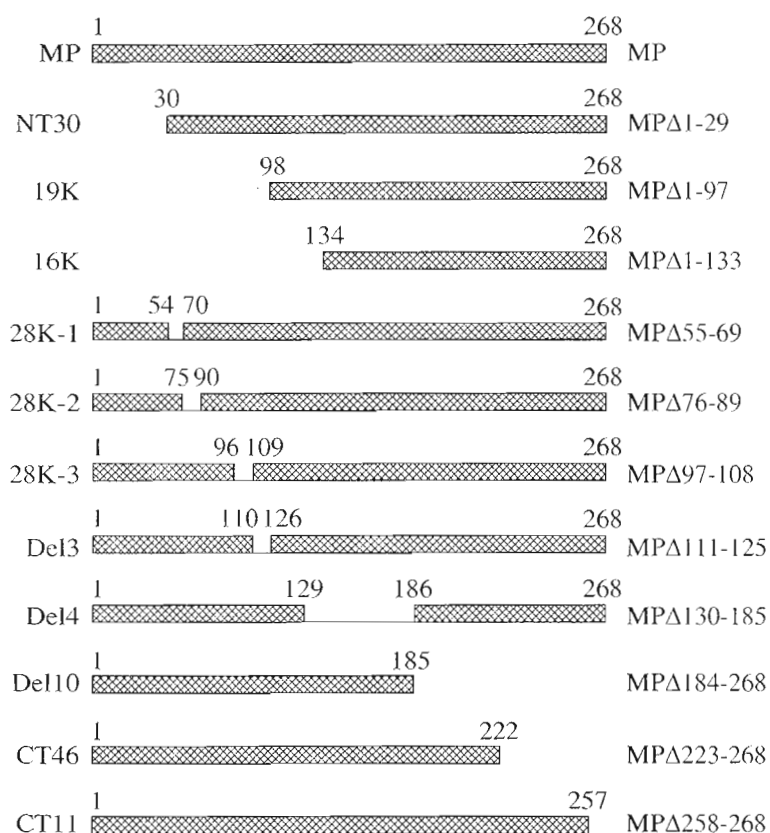


Рис. 1. Схема делеционных мутантов TMV-MP_r, использованных для картирования эпитопов MP моноклональными антителами.

ваем получение панели мышинных моноклональных антител (МА) к рекомбинантному TMV-MP (MP_r) и картирование эпитопов MP_r.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве иммуногена для получения МА к полноразмерному TMV-MP был использован рекомбинантный белок, который, в отличие от природного, не фосфорилирован и, кроме того, содержит на N-конце (His)₆-последовательность. Важно отметить, что рекомбинантный MP в водных растворах ведет себя как гидрофобный легко агрегирующий белок [12]. Поэтому при иммунизации с целью получения МА к линейным детерминантам TMV-MP использовали MP_r, растворенный в 2 М мочеvine.

В результате слияния миеломных клеток линии sp2/0 со спленоцитами иммунной мыши было получено восемь стабильных гибридных линий, которые продуцировали МА к полноразмерному MP_r. Все МА специфически взаимодействовали с гомологичным антигеном в ИФА и в иммуноблоттинге. Для более точной локализации участков связывания полученных МА с MP_r были использованы делеционные варианты MP_r, содержащие

делеции в N-концевом, C-концевом и внутреннем участках (рис. 1). Результаты картирования эпитопов MP_r этими моноклональными антителами представлены в табл. 1 и на рис. 2.

Как следует из представленных данных, на первом этапе работы нам не удалось получить МА специфически взаимодействующих с N-концевой областью MP_r (1–30 а. о.). Поэтому на следующем этапе работы в качестве иммуногена для получения МА к N-концу MP был использован рекомбинантный гибридный белок, состоящий из 30 N-концевых аминокислот TMV-MP, соединенных с аминокислотной последовательностью GFP через мостик из шести дополнительных аминокислот GGEFPR и содержащий (His)₆ на C-конце гибридной молекулы (GFP_r). Было получено 15 гибридных линий, продуцирующих МА, которые специфически взаимодействовали с гибридным белком MP-(1–30)-GFP_r и не узнавали GFP_r (табл. 2). Из 15 МА только четыре оказались специфичными к аминокислотной последовательности MP. Дальнейший анализ МА к MP-(1–30)-GFP_r с использованием дополнительно полученных рекомбинантных белков: MP с шестью гистидинами на C-конце и мутантного MP-(1–30)-GFP (делеция второго аминокислотного остатка) показал, что МА, которые

Таблица 1. Эпитопное картирование TMV-MP_r*

МА к MP _r	Изо- тип	Делеционные мутанты TMV-MP													Эпитоп- ный MP
		MP	CT11	CT46	Del10	Del4	28K-1	28K-2	28K-3	Del3	Nt30	19K	16K	PME	
1E1	IgG1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	186-222
1D8	IgG1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	76-89
1A10	IgG2a	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	223-257
3B10	IgG1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	98-129
4D9	IgG1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	186-222
7C7	IgG1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	98-129
7D9	IgG1	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	258-268
8D12	IgG1	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	258-268

* "+" и "-" – положительная и отрицательная реакция в иммуноблоттинге; PME – негативный контроль.

не взаимодействуют с аминокислотной последовательностью MP, направлены на гексапептидный мостик, соединяющий MP-(1-30)-фрагмент и GFP (данные не приведены).

Таким образом, нами получены МА к N-концевому, C-концевому и внутреннему участкам TMV-MP_r (рис. 3). Это позволит нам в будущем картировать поверхность внутриклеточного MP и изучить его посттрансляционные модификации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали среды DMEM, NAT-DMEM, HT-DMEM, телячью эмбриональную сыворотку, глутамин, адъювант Фрейнда (Life Technologies, США), кроличьи антимышьи антитела, конъюгированные со щелочной фосфатазой, пристан, Твин-20, IPTG, полиакриламид (Sigma, США), полиэтиленгликоль 1500, диметилсульфоксид (Merck, ФРГ), бычий сывороточный альбумин (Serva, ФРГ), белок-G-сефарозу (Pharmacia, Швеция), никель-хелатный сорбент, пластиковые

колонки для очистки рекомбинантных белков (Qiagen, ФРГ), PVDF-мембрану, систему для окрашивания блотов ECL (Amersham), 96-луночные планшеты для иммуноанализа, 24- и 96-луночные планшеты и флаконы для культур клеток (Costar, Нидерланды), кроличьи антитела, специфичные к различным субклассам мышинных МА (Calbiochem).

Дезоксирибоолигонуклеотидные праймеры были синтезированы фирмами "Syntol" (Россия) и "GibcoBRL" (ФРГ). В работе использовали ферменты: эндонуклеазы рестрикции фирм "СибЭнзим" (Новосибирск) и "Fermentas" (Вильнюс), ДНК-лигазу фага T4 фирмы "Fermentas" и *Taq*-полимеразу фирмы "СибЭнзим".

Гены делеционных мутантов TMV-MP_r клонировали в плазмидные вектора фирмы "Qiagen" (ФРГ): pQE-30 по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Pst*I, pQE-60 – по сайтам рестрикции *Nco*I и *Bam*HI, pQE-70 – по сайтам рестрикции *Sph*I и *Bam*HI. При клонировании гена белка в pQE-30 последовательность из шести остатков гистидина находится

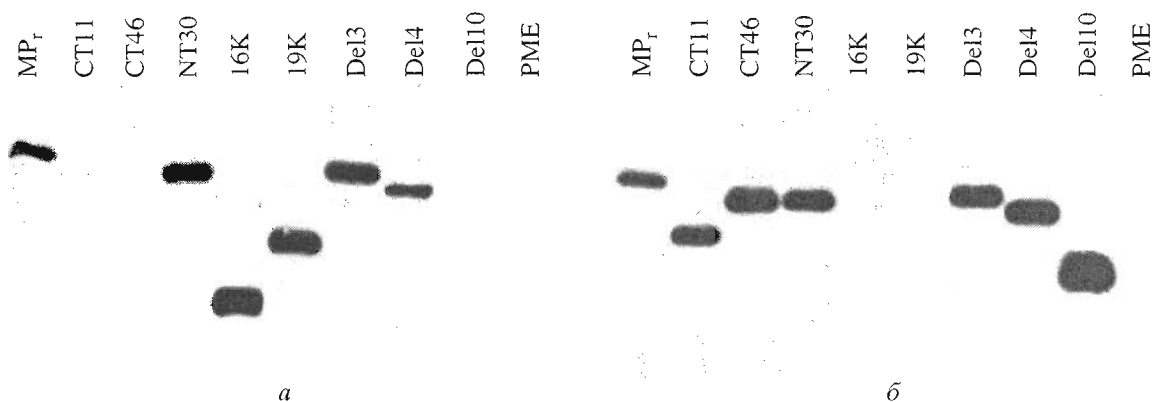


Рис. 2. Иммуноблоттинг (типичная картина), по результатам которого делали вывод о положительной (+) или отрицательной (-) реакции МА с делеционными вариантами TMV-MP_r. Приведены результаты для (а) МА 7D9 (эпитоп 258-268 а. о.) и (б) МА 1D8 (эпитоп 76-89 а. о.).

на *N*-конце, при клонировании в рQE-60 и рQE-70 – на *C*-конце рекомбинантного белка. Получение MP_r описано нами ранее [13]. Гены *C*-концевых делеционных мутантов MP_r были получены методом ПЦР на матрице рQE-MP [12] с использованием общего прямого праймера P1 (табл. 3) и обратных праймеров: P3 в случае СТ11, P4 в случае СТ46 и P5 в случае Del10. Гены *N*-концевых делеционных мутантов MP_r были также получены методом ПЦР на матрице рQE-MP с использованием прямых праймеров: P6 для NT30, P7 для 19K и P8 для 16K и общего обратного праймера P2. Гены мутантов TMV- MP_r с внутренними делециями были получены методом перекрывающейся ПЦР. Для этого на матрице рQE-MP была поставлена ПЦР с двумя парами праймеров: P1 и P9, а также P10 и P2 в случае Del3, P1 и P11, а также P12 и P2 в случае 28K-1, P1 и P13, а также P14 и P2 в случае 28K-2, P1 и P15, а также P16 и P2 в случае 28K-3. На основе двух продуктов ПЦР были поставлены новые ПЦР с праймерами P1 и P2 и продукты, получившиеся в результате последних ПЦР, были клонированы в рQE-30 по уникальным сайтам *Bam*HI и *Pst*I.

Ген рекомбинантного GFP был получен методом ПЦР на матрице рFF-IRES-MP-GFP (плазмида была любезно предоставлена Е.В. Скуратором (МГУ, Москва)) с прямого P17- и обратного P18-праймеров и клонирован в рQE-30 по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Pst*I – (*His*)₆-GFP_r. Две составные части гена гибридного белка MP_r -(1–30)-GFP_r были получены методом ПЦР на матрице рFF-IRES-MP-GFP с соответствующих пар праймеров: P19 и P20 для MP_r -(1–30) и P20 и P21 для GFP. Последовательность нуклеотидов для гексапептидного мостика заложена в праймерах P21 и P22 (табл. 3, отмечено полужирным шрифтом). Продукты реакции лигировали с восстановлением *Eco*RI-сайта и клонировали в рQE-70 по сайтам рестрикции *Sph*I и *Bam*HI.

Ген гибридного мутантного белка MP_r -(1–30)-GFP_r (отличается от MP_r -(1–30)-GFP делецией второго аминокислотного остатка) был получен методом ПЦР на матрице MP_r -(1–30)-GFP_r с использованием праймеров P23 и P22 и клонирован в рQE-70 по сайтам рестрикции *Nco*I и *Bam*HI. Ген рекомбинантного TMV- MP_r с шестью остатками гистидина на *C*-конце был получен методом ПЦР на матрице рFF-IRES-MP-GFP с использованием праймеров P23 и P24 и клонирован в рQE-60 по сайтам рестрикции *Nco*I и *Bam*HI. Все ампликоны

Таблица 2. Отбор МА, специфичных к *N*-концевому фрагменту TMV- MP_r *

МА к MP_r -(1–30)-GFP _r	Изотип МА	Методы тестирования МА					
		ИФА		Иммуноблоттинг			
		MP_r -(1–30)-GFP _r	TMV- MP_r	MP_r -(1–30)-GFP _r	TMV- MP_r	19K	GFP _r
1E4	IgG1	+	+	+	+	–	–
1E5	IgG2b	+	–	+	–	–	–
1B6	IgG2b	+	+	+	+	–	–
1F3	н.о.	+	–	+	+	–	–
2E9	н.о.	+	–	+	–	–	–
2H11	н.о.	+	–	+	–	–	–
3B11	н.о.	+	–	+	–	–	–
3D1	н.о.	+	–	+	–	–	–
3G1	н.о.	+	–	+	–	–	–
3E1	н.о.	+	–	+	–	–	–
3F12	н.о.	+	–	+	–	–	–
4A3	IgG1	+	+	+	+	–	–
4F4	н.о.	+	–	+	–	–	–
5B12	IgG2b	+	–	+	–	–	–
5D8	н.о.	+	–	+	–	–	–

* “+” и “–” положительная и отрицательная реакция в иммуноблоттинге; н.о. – не определяли.

после клонирования в рQE-30, рQE-60 и рQE-70 были секвенированы с целью идентификации. Ген делеционного мутанта TMV- MP_r Del4 любезно предоставил докт. В. Цитовский (State University of New York). Рекомбинантными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* штамма M15 (DIAGEN) и индуцировали экспрессию клонированного гена при помощи IPTG. (*His*)₆-содержащие рекомбинантные белки выделяли хроматографией на никель-хелатном сорбенте [14] с последующим электрофоретическим анализом в полиакриламидном геле [15].

Иммунизацию мышей, получение стабильных гибридных клонов и образцов асцитной жидкости, изотипирование МА, ИФА проводили по стандартным методикам, изложенным в работах [16, 17]. МА из асцитной жидкости выделяли путем осаждения полунасыщенным раствором сульфата аммония с последующей аффинной хроматогра-

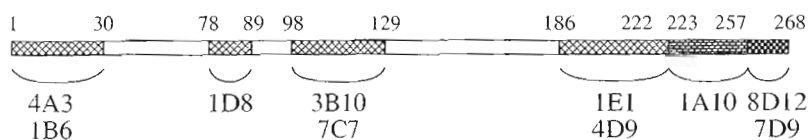


Рис. 3. Соответствие полученных МА эпитопам MP_r .

Таблица 3. Последовательность олигонуклеотидных праймеров, используемых в работе

Обозначение	Название	Структура олигонуклеотида* (5' → 3')
P1	<i>Bam</i> HI-pQE-MP(+)	AAGGATCCACGGAGTAGTTGTTAAAGGAAAAGTGAAT <i>Bam</i> HI
P2	<i>Pst</i> I-pQE-MP(-)	GTCGACCTGCGAGTTAAACGAATCCGATTCGGCGGAC <i>Pst</i> I
P3	CT11(-)	ATGCACTGCAAGTTAATCATCATCGATTAAATTATTC <i>Pst</i> I
P4	CT46(-)	ATCGACCTGCGAGTTAATTGCGGACATCACTCTTTTCCGG <i>Pst</i> I
P5	Del10(-)	ATCGACCTGCGAGTTATCCGGTCTCTCACTTTGTAATCTT <i>Pst</i> I
P6	NT30(+)	AAGGATCCGTAAGAGTGTATGTGTCC <i>Bam</i> HI
P7	19K(+)	AAGGATCCATCGAAGAGCGGACGAGGCCACT <i>Bam</i> HI
P8	16K(+)	AAGGATCCATCAAAAACGTCCTGGCAAGTTTA <i>Bam</i> HI
P9	Del3(-)	CTGGGTGGTTATAGCTGTGTAGTAAGATCC
P10	Del3(+)	GGATCTTACTACACAGCTATAACCAACCAG
P11	28K-1(-)	CCAAACCGCGTTCACCTTGACATAAGAC
P12	28K-1(+)	CAGAGGTGAACGCCGGTTTGGTCTGTCACGGG
P13	28K-2(-)	ACAGACACACCGTGAAGACCAACCGGC
P14	28K-2(+)	GGTCGTACGGTGTGTCTGGTGAACAAGG
P15	28K-3(-)	GCTGCTGTGTACCTTTGTCTCACAGACACAC
P16	28K-3(+)	GGACAAAGGTACACAGCAGCTGCAAG
P17	GFP(+)(w/o start)	TTTGGATCCATAGAACGGGGCCCAAGTGAAGCAAGGGGAGGAGCTGT <i>Bam</i> HI <i>Apa</i> I
P18	GFP(-)(w stop)	TTTTCTGCAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC <i>Pst</i> I
P19	<i>Sph</i> I-MP(+)	TTTTGCATGCTTGGCTCTAGTTGTTAAAGG <i>Sph</i> I
P20	<i>Eco</i> RI-MP(-)	TTTTGAATTCCTCCAGGGGTAACAATCGTCGG <i>Eco</i> RI
P21	<i>Eco</i> RI-GFP(+)(w/o start)	TTTTGAATTCCTAGAGTGAAGCAAGGGCGAGGAGCTG <i>Eco</i> RI
P22	<i>Bam</i> HI-GFP(-)(w/o stop)	TTTTGGATCCATACTCTGCGGGCCCTCGCTGTACAGCTCGTCCATGCC <i>Bam</i> HI <i>Apa</i> I
P23	<i>Nco</i> I-MP(+)	ATCGCCATGGCTCTAGTTGTTAAAGGAAAAGTG <i>Nco</i> I
P24	<i>Bam</i> HI-MP(-)	ATCGGGATCCAAACGAATCCGATTCGGCGGACAG <i>Bam</i> HI

* Подчеркнуты сайты рестрикции соответствующих эндонуклеаз.

фией на белок-G-сепарозе по прилагаемой изготовителем инструкции, иммуноблоттинг осуществляли по стандартной методике, изложенной в руководстве [18].

Для определения эпитопа MP_r , взаимодействующего с конкретным МА в иммуноблоттинге, полноразмерный MP_r (в качестве положительно-контроля), делеционные варианты MP_r и рекомбинантную РМЕ (в качестве отрицательного контроля) разделяли электрофорезом в 12% полиакриламидном геле и переносили на PVDF-мембрану. Для дальнейшего окрашивания антителами использовали асцитную жидкость в разведении 1 : 10000. Типичная картина иммуноблоттинга представлена на рис. 2. Результаты эпитопного картирования МА представлены в табл. 1 и на рис. 3.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа была поддержана грантом РФФИ № 04-48490-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heinlein M., Epel B.L. // Intern. Review of Cytology. 2004. V. 235. P. 93–164.
2. Tomenius K., Clapham D., Meshi T. // Virology. 1987. V. 160. P. 363–371.
3. Heinlein M., Padgett H.S., Gens J.S., Pickard B.G., Casper S.J., Epel B.L., Beachy R.N. // Cell. 1998. V. 10. P. 1107–1120.
4. Reachel C., Beachy R.N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 11169–11174.
5. McLean B.G., Zupan J., Zambryski P.C. // Plant Cell. 1995. V. 7. P. 2101–2114.
6. Deom C.M., Oliver M.J., Beachy R.N. // Science. 1987. V. 237. P. 384–389.
7. Wolf S., Deom C.M., Beachy R.N., Lucas W.J. // Science. 1989. V. 246. P. 377–379.
8. Citovsky V., McLean B.G., Zupan J.R., Zambryski P. // Genes. Dev. 1993. V. 7. P. 397–411.
9. Atabekov J.G., Dorokhov Yu.L. // Adv. Virus Res. 1984. V. 29. P. 313–364.
10. Citovsky V., Knorr D., Schuster G., Zambryski P. // Cell. 1990. V. 60. P. 637–647.
11. Citovsky V., Wong M.L., Shaw A.L., Venkataram Prasad B.V., Zambryski P. // Plant Cell. 1992. V. 4. P. 397–411.
12. Brill L.M., Nunn R.S., Kahn T.W., Yeager M., Beachy R.N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 7112–7117.
13. Иванов К.И., Иванов П.А., Тимофеева Е.К., Ефимов В.А., Дорохов Ю.Л. // Биооргани. химия. 1994. Т. 20. С. 751–757.
14. Hochuli E., Dobeli H., Schacher A. // J. Chromatogr. 1987. V. 411. P. 177–184.
15. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
16. Harlow E., Lane D. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1988.
17. Сухачева Е.А., Новиков В.К., Амбросова С.М. // Биооргани. химия. 1994. Т. 20. С. 1060–1069.
18. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.

Mapping of Epitopes of the Recombinant Movement Protein of the Tobacco Mosaic Virus with the Use of Monoclonal Antibodies

E. A. Sukhacheva*, L. G. Tul'kina**, E. M. Karger**,
A. A. Sheveleva**, N. V. Stratonova*, and Yu. L. Dorokhov***

#Phone: +7 (095) 939-3360; e-mail: dorokhov@genebee.msu.ru

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,

Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Virology Department and Belozerskii Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

The movement protein (MP) of the tobacco mosaic virus (TMV) provides the intercellular transport of the viral RNA through plasmodesmata. The MP fulfills its function while interacting with host cell factors over the whole path of its intracellular movement from the subcellular site of its synthesis to the plasmodesmata of cellular walls. The MP conformation during its intracellular movement and fulfillment of the transport function still remains unknown. In this study, we describe the preparation of murine monoclonal antibodies (MAs) to TMV MP and mapping of the MP epitopes. Stable hybridoma lines that produce MAs to the partially denatured recombinant MP (MP_r) were obtained. MAs were tested by immunoblotting and ELISA with the use of deletion variants of MP_r . The epitopes of TMV MP_r that recognize specific MAs were determined. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: movement protein, tobacco mosaic virus, monoclonal antibodies