



## Uzyskanie przeciwciał monoklonalnych przeciwko związkom izoprenoidowym

Małgorzata Wanke<sup>1</sup>, Anna Porębska<sup>2</sup>, Elżbieta Wałajtys-Rode<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

<sup>2</sup>Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, Warszawa

<sup>3</sup>Instytut Biologii i Ochrony Środowiska

Wyższa Szkoła Pedagogiczna, Rzeszów

### Monoclonal antibodies against isoprenoid compounds

#### Summary

Monoclonal antibodies against isoprenoid compounds were obtained by *in vivo* immunization of Balb/c mice with UQ-10 (ubiquinone-10) incorporated into cholesterol rich particles containing methylated bovine serum albumin (CRP-MBSA) in order to induce a strong immune response. The specificity of antibodies was evaluated by a modified dot-blot technique using Hybond-N<sup>+</sup> membrane (Amersham). Selected antibodies III-5 (IgG3), IV-3 (IgG2b) and VII-11 (IgM) were capable of recognizing different isoprenoid compounds: ubiquinone, plastoquinone, solanesol, dolichol,  $\beta$ -sistosterol but did not react with phospholipids, triacylglycerols or fatty acids. These antibodies may be used in immunoblotting for identifying isoprenoids (e.g. ubiquinone) in partially purified plant extracts after TLC chromatography on glass RP-18 plates (Merck). Immunodetection of isoprenoids was performed using secondary goat anti-mice immunoglobulin antibodies conjugated with biotin, extravidine-AP and BCIP/NBT as substrate.

#### Key words:

monoclonal antibodies, *in vivo* immunization, cholesterol rich particles, isoprenoids, ubiquinone-10, immunoblotting, TCL.

### 1. Wstęp

Związki izoprenoidowe pełnią istotne funkcje biologiczne jako elementy strukturalne błon oddziałujące na ich stabilność i przepuszczalność (cholesterol, dolichol, poliprenole), wpływają

#### Adres do korespondencji

Małgorzata Wanke,  
Instytut Biochemii  
i Biofizyki, Polska  
Akademia Nauk,  
ul. Pawińskiego 5A,  
02-106 Warszawa;  
e-mail:  
małgorzataw@ibb.waw.pl

także na funkcjonowanie komórki biorąc udział w transporcie elektronów przez błony (ubichinon, plastochinon), przekaznictwie sygnałów, działając jako antyutleniacze (ubichinol, karotenoidy, tokoferol, plastochinol) (1,2) i hormony (sterydowe hormony zwierzęce i roślinne). Niezbędne do funkcjonowania komórki okazały się również liniowe polimery izoprenoidowe związane kowalencyjnie z białkami. Prenylacja białek w komórkach jest niezbędna w procesach wzrostu komórek i ich podziałów, wewnątrzkomórkowym transporcie i przekazywaniu sygnałów (3,4).

Określenie miejsca biosyntezy poszczególnych związków izoprenoidowych w komórkach roślinnych nie jest ostatecznie rozwiązane. Zastosowanie metod biochemicznych i genetycznych w badaniach nad miejscem biosyntezy tych związków nie przyniosło dotychczas definitywnego rozstrzygnięcia. Na podstawie części wyników wskazuje się, że niektóre lipidy są biosyntetyzowane bezpośrednio w miejscach ich aktywności biologicznej (5,6), natomiast w przeprowadzonych innych badaniach wskazuje się również na istnienie skomplikowanego mechanizmu transportu lipidów z miejsca ich biosyntezy do obszaru akumulacji (7).

Interesującym uzupełnieniem eksperymentów biochemicznych dotyczących lokalizacji wewnątrzkomórkowej biosyntezy lipidów mogą być badania z użyciem metod immunochemicznych. Pierwszym koniecznym etapem próby wykorzystania tych metod było uzyskanie odpowiednich przeciwciał monoklonalnych.

Opracowano wiele metod pozwalających na uzyskanie przeciwciał poli- lub monoklonalnych przeciwko lipidom i glikolipidom komórkowym, ponieważ są one niezastąpionym narzędziem w badaniach tych biomolekuł, a także znajdują zastosowanie w diagnostyce i terapii. Spośród metod uzyskiwania przeciwciał przeciwko lipidom, bardzo dobre wyniki daje użycie cząsteczek bogatych w cholesterol lub liposomów jako nośników antygenów (8). Crook i wsp. (9) uzyskali przeciwciała poliklonalne o wysokim mianie przeciwko siarczanowi cerebroydu stosując jako nośnik kompleks bogatych w cholesterol cząsteczek z metylowaną albuminą bydlęcą (CRP-MBSA – *cholesterol rich particles and metylated bovine albumine*) podawany królikom dożylnie. Cząsteczki te zawierały distearoilofosfatydylocholinę (DSPC), cholesterol i MBSA oraz siarczan cerebroydu. Uprzednio wykazano, że kompleksy glikolipidów, fosfatydylocholino, cholesterolu i MSBA immunizują zwierzęta powodując uzyskiwanie przeciwciał o wysokim mianie (10). W naszych badaniach zastosowaliśmy zmodyfikowaną procedurę opisaną przez Crooka i wsp. (9), co pozwoliło nam uzyskać monoklonalne przeciwciała przeciwko izoprenoidom.

## 2. Materiał i metody

### 2.1. Przygotowanie antygeny

Antygenem był syntetyczny ubichinon (UQ-10) (Sigma) podawany w cząstkach cholesterolowych zawierających metylowaną albuminą bydlęcą.



Cząsteczki cholesterolowe (CRP) były przygotowane według procedury Crooka i wsp. (9). Do 50 ml wody dodawano kroplami roztwór cholesterolu (40,7 mg w 2,5 ml 100% etanolu) i następnie roztwór distearylofosfatydylocholiny (16,6 mg w 0,6 ml 100% etanolu) energicznie mieszając w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 2,1 mg UQ-10 w 0,1 ml mieszaniny chloroform:metanol (1:1), mieszając. Z uzyskanej mieszaniny odparowano rozpuszczalnik na wyparce (50°C, 2 godz.). Następnie dodawano kroplami roztwór MBSA (20 mg/ml H<sub>2</sub>O) i pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej. Następnego dnia odwirowano (27 000 x, g, 1 godz, 4°C). Uzyskany osad zawieszano w 20 ml soli fizjologicznej za pomocą sonifikacji (15 s, 4°C). Uzyskaną emulsję przechowywano w -20°C. W 1 ml zawiesiny tak przygotowanych cząsteczek cholesterolowych jest 105 µg UQ-10.

## 2.2. Immunizacja

Myszy, dwie 6-tygodniowe samice Balb/c (hodowane za barierą bakteriologiczną w Zakładzie Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych Instytutu Matki Polki w Łodzi) immunizowano metodą *in vivo*, podając jednorazowo 0,5 ml cząsteczek cholesterolowych zawierających 50 µg UQ-10, dootrzewnowo. Szczepienie było powtarzane czterokrotnie w odstępach trzytygodniowych. Ostatnia dawka była podana dożylnie (*booster*) i trzy dni później myszy były zabijane przez translokację, a następnie izolowano ich śledziony.

## 2.3. Uzyskiwanie przeciwciał

Po izolacji splenocytów wykonano fuzję splenocytów z komórkami szpiczaka mysiego SP2/0, standardową metodą z 50% glikolem polietylenowym i 5% DMSO, po czym komórki wysiano na płytki zawierające *feeder layer* i hodowano w różnicującym medium HAT (RPMI-1640 zawierające 10% bydlęcą surowicę płodową, streptomycynę i penicylinę oraz czynnik antymykotyczny PLLO, a także hipoksantynę, aminopterynę i tymidynę). Drugą porcję splenocytów zamrożono w -80°C i przeprowadzono fuzję po rozmrożeniu. Uzyskane hybrydomy klonowano metodą ograniczonego rozcieńczania. W wyniku obu fuzji otrzymano 98 klonów.

## 2.4. Charakterystyka uzyskanych przeciwciał

Klasę uzyskanych przeciwciał oznaczano stosując zestaw do typowania immunoglobulin ISO-2 (Sigma) oraz przeciwciała przeciwko mysim IgM- łańcuch  $\mu$  (Sigma).

Specyficzność uzyskanych przeciwciał oznaczano stosując własną modyfikację metody *dot-blot*. W tym celu wypróbowano różne układy (fazy stałe oraz wtórne przeciwciała).

*Dot-blot* wykonywano nanosząc na błonę (nitroceluloza Bio-Rad, Hybond-N<sup>+</sup> Amersham) lub płytkę do TLC (szklane z żelem silikonowym, RP-18 Merck) 3 µg antygeny UQ-10 (chloroform:metanol 1:1) na miejsce. Po wysuszeniu blokowano błony lub płytki TBS/T zawierającym 3% BSA. Następnie nanoszono po 4 µg supernatantów badanych hodowli hybrydom. Jako kontrole stosowano supernatanty zawierające przeciwciała przeciwko białkowym antygenom. Inkubowano przez noc w 4°C. Po trzykrotnym płukaniu w TBS/T przeprowadzano reakcję z wtórnymi przeciwciałami (koniugat przeciwciał przeciwko mysim immunoglobulinom z fosfatazą alkaliczną (AP) lub koniugat przeciwciał przeciwko mysim immunoglobulinom z biotyną i ekstrawidyny-AP) i przeprowadzano reakcję barwną według instrukcji producenta. Jako substrat stosowano BCIP/NBT (Sigma).

Immunobloting lipidów rozdzielonych metodą chromatografii cienkowsarstwowej przeprowadzano stosując supernatant hodowli hybrydom jako źródło pierwotnych przeciwciał przeciwko UQ-10. Blokowanie przeprowadzano stosując TBS/T z 3% BSA. Płukania wykonywano trzykrotnie z TBS/T. Inkubację z wtórnym przeciwciałem i wywoływanie reakcji barwnej wykonywano zgodnie z instrukcją producenta (Sigma).

## 2.5. Przygotowanie ekstraktu roślinnego

Ekstrakt roślinny przygotowano z 4 g liści *Ficus mix* stosując aceton:heksan (1:1), ekstrakt wstępnie oczyszczono na kolumnie wypełnionej złożem Silica gel (230-400 mesh). Elucję prowadzono stosując 20% eter etylu w heksanie.

## 2.6. Analiza chromatograficzna lipidów (TLC)

Płytki RP-18 (Merck) do chromatografii cienkowsarstwowej w fazie odwróconej rozwijano dwukrotnie w acetonie. Standardy wywoływano parami jodu.

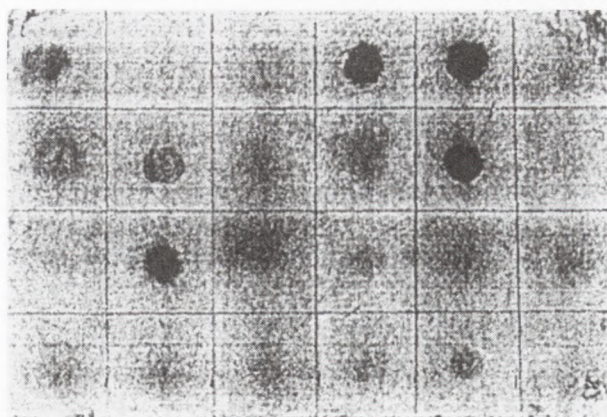
## 3. Wyniki i dyskusja

### 3.1. Oznaczanie specyficzności uzyskanych przeciwciał

W wyniku fuzji uzyskano 16 hybrydom produkujących immunoglobuliny: 9 klasy IgM, i 7 klasy IgG (IgG2b, IgG2a i IgG3).

Specyficzność uzyskanych przeciwciał monoklonalnych sprawdzano metodą *dot-blot* w modyfikacji własnej. Najbardziej zadowalające wyniki uzyskano stosując jako fazę stałą błonę Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham) oraz jako wtórne przeciwciała koniu-





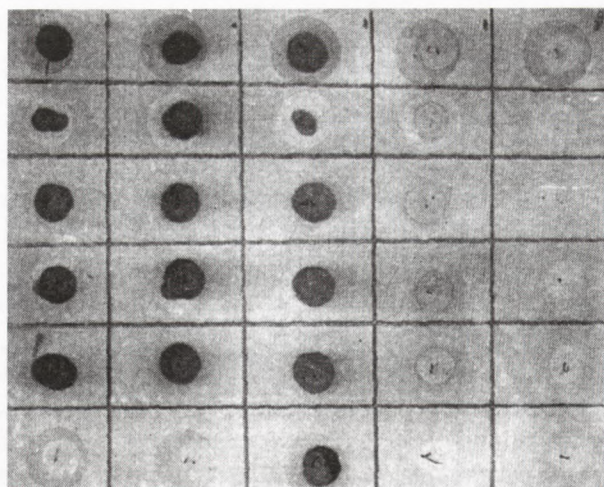
III-4	III-2	III-1	III-5 +++	IV-3 +++	IV-6
V-1	V-3 ++	VI-2	VI-3	VII-11 +++	VII-12
I-2	VII-7 ++	VII-12	VII-13	K1	K1
K2	K2	K3	K3	∅	∅

Rys. 1. Oznaczenie specyficzności uzyskanych przeciwciał monoklonalnych metodą *dot-blot* z zastosowaniem błony Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham). Reakcję barwną wywoływano stosując wtórne przeciwciała przeciwko immunoglobulinom mysim sprzężone z biotyną i ekstrawidynę z fosfatazą alkaliczną. Jako substrat stosowano BCIP/NBT. Wystąpienie zabarwienia świadczy o pozytywnej reakcji.

gat przeciwko mysim immunoglobulinom z biotyną i ekstrawidynę sprzężoną z fosfatazą alkaliczną. Reakcję barwną przeprowadzano stosując jako substrat dla alkalicznej fosfatazy układ BCIP/NBT (Sigma). Wystąpienie barwnej plamy świadczy o pozytywnej reakcji (rys. 1). Następujące hybrydomy produkują przeciwciała reagujące z UQ-10: III-5 (IgG3), IV-3 (IgG2b) oraz VII-11, VII-7 i V-3 (wszystkie klasy IgM).

### 3.2. Oznaczenie specyficzności antygenowej wytypowanych 5 przeciwciał

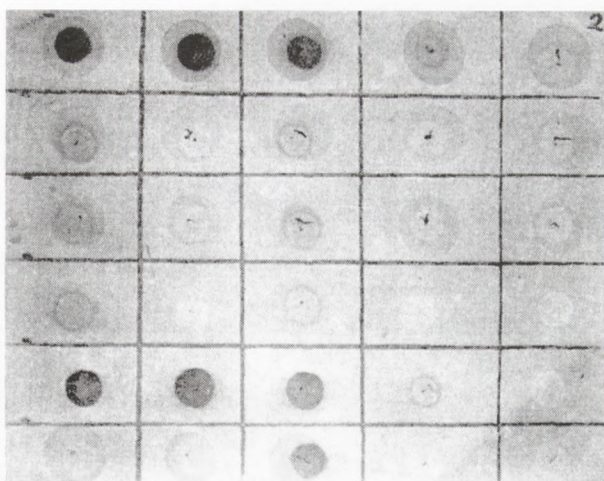
Opisaną metodą *dot-blot*, stosując analogiczny układ jak do sprawdzania specyficzności przeciwciał i nanosząc po 3 µg badanych lipidów (chloroform:metanol 1:1) na miejsce wykazano, że wytypowane przeciwciała reagują z ubichinonem (UQ), plastoquinonem (PQ), solanezolem, dolicholem i beta-sistosterolem; nie wykazują natomiast reakcji z kwasami tłuszczowymi, triacyloglicerolem i fosfolipidami (rys. 2 i 3).



III-5	IV-3	VII-11	VII-7	V-3
UQ	UQ	UQ	UQ+	UQ
+++	+++	+++		+
PQ	PQ	PQ	PQ	PQ
+++	+++	+++	+	+
solanazol	solanazol	solanazol	solanazol	solanazol
+++	+++	+++	++	+
dolichol	dolichol	dolichol	dolichol	dolichol
+++	+++	+++	+	+
$\beta$ -sistosterol	$\beta$ -sistosterol	$\beta$ -sistosterol	$\beta$ -sistosterol	$\beta$ -sistosterol
+++	+++	+++	+	+
K1	K2	K3	∅	∅

Rys. 2. Oznaczenie specyficzności wytypowanych przeciwciał: III-5, VII-11, IV-3, VII-7 i V-3 wobec innych związków lipidowych: ubichinon (UQ), plastochinon (PQ), solanazol, dolichol i  $\beta$ -sistosterol. Reakcję barwną wywoływano w układzie identycznym jak na rys. 1. Wystąpienie zabarwienia świadczy o pozytywnej reakcji.



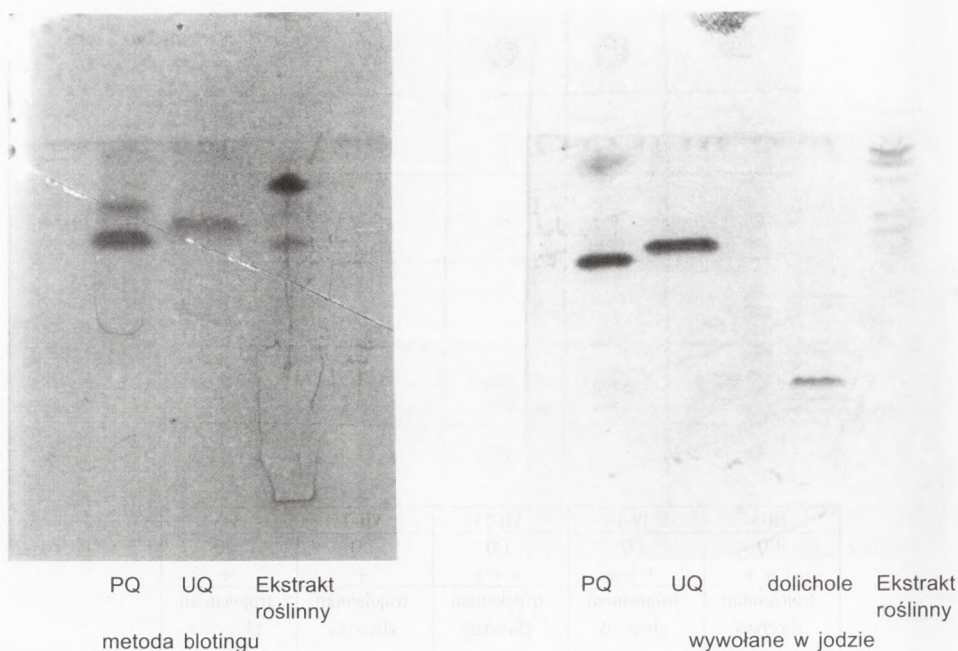


III-5	IV-3	VII-11	VII-7	V-3
UQ +++	UQ +++	UQ +++	UQ +	UQ +
trójoleinian gliceryny -	trójoleinian gliceryny -	trójoleinian gliceryny -	trójoleinian gliceryny -	trójoleinian gliceryny -
kwas olejowy -	kwas olejowy -	kwas olejowy -	kwas olejowy -	kwas olejowy -
PC -	PC -	PC -	PC -	PC -
PQ +++	PQ +++	PQ +++	PQ +	PQ +
K1	K2	K3	∅	∅

Rys. 3. Oznaczenie specyficzności wytypowanych przeciwciał: III-5, VII-11, IV-3, VII-7 i V-3 wobec trójoleinianu gliceryny, kwasu olejowego i fosfatydylocholiny (PC). Reakcję barwną wywoływano w układzie identycznym jak na rys. 1. Wystąpienie zabarwienia świadczy o pozytywnej reakcji.

### 3.3. Zastosowanie wytypowanych przeciwciał do identyfikacji izoprenoidów w naturalnych ekstraktach roślinnych

Po stwierdzeniu, że standardy izoprenoidów dają specyficzną reakcję z uzyskanymi przeciwciałami na płytkach TLC (płytki szklane z żelem silikonowym RP-18, Merck), zastosowano metodę immunoblotingu do identyfikacji tych pochodnych. Trzy z wytypowanych przeciwciał (III-5, IV-3, VII-11) zostały zastosowane do identyfikacji związków izoprenoidowych w naturalnych ekstraktach roślinnych rozdzielonych metodą TLC w fazie odwróconej. Po przeprowadzeniu rozdzielania ekstraktu



Rys. 4. Zastosowanie wytypowanych przeciwciał (III-5, IV-3, VII-11) do identyfikacji izoprenoidów rozdzielonych metodą chromatografii cienkowarstwowej. Immunoblotting wykonano stosując identyczny układ jak to opisano na rys. 1.

przez dwukrotne rozwijanie w acetonie, na płytce TCL przeprowadzano reakcję immunoblotingu z przeciwciałami w analogicznym układzie jak to zostało opisane dla metody *dot-blot*. Płytkę inkubowano z supernatantem hodowli hybrydom rozcieńczonym 1:1 w TBS/T przez 2 godziny w temperaturze pokojowej z mieszaniem. Blokowanie (TBS/T zawierający 3% BSA), płukanie (TBS/T) i inkubację z wtórnym przeciwciałem (1:5000) w układzie biotylna-ekstrawidyna-AP oraz wywoływanie reakcji barwnej z BCIP/NBT wykonano zgodnie z instrukcją producenta (Sigma). Pozycję naniesionych standardów identyfikowano parami jodu. Wywołany blot jest pokazany na rysunku 4.

#### 4. Dyskusja

Przeciwciała poli- i monoklonalne stanowią niezastąpione narzędzie w badaniach podstawowych, diagnostyce i terapii. Dlatego w ostatnich latach obserwuje się ogromny wzrost wytwarzania specyficznych przeciwciał przeciwko cząsteczkom o niskiej immunogenności, toksycznym lub immunosupresyjnym. Niewątpliwie przysz-



łość należy do inżynierii genetycznej, ale wciąż jeszcze wiele przeciwciał jest wytwarzanych klasycznymi metodami przez immunizację *in vivo*. Bardzo istotna jest w tym procesie droga podania antygeny i opracowanie techniki uzyskiwania liposomów lub cząsteczek cholesterolowych zawierających antygen; to stanowiło niewątpliwy przełom (8). W dwadzieścia lat po wykryciu działania liposomów jako adiuwantu została zarejestrowana pierwsza ludzka szczepionka skonstruowana na bazie liposomów (przeciwko żółtacze zakaźnej A) (11,12). Struktura kompleksu CRP-MBSA nie jest znana. Zawartość cholesterolu w CRP jest zbyt wysoka, aby mógł włączyć się do dwuwarstwy lipidowej. W obecności fosfatydylocholino i MBSA cząsteczki cholesterolowe są immunogenne niezależnie czy są podane w obecności lub bez adiuwantu (13,14). Opracowana przez Crooka (9) modyfikacja uzyskiwania cząsteczek cholesterolowych pozwoliła nam na uzyskanie przeciwciał monoklonalnych przeciwko izoprenoidom po zastosowaniu UQ-10 włączonego do CRP jako antygeny. Należy tu podkreślić niewątpliwie mniejszy koszt tej metody w porównaniu ze stosowaniem liposomów, podczas gdy w przeprowadzonych porównawczych badaniach wykazano równą efektywność obu systemów (9). Wykazaliśmy również, że uzyskane przeciwciała mogą być stosowane do identyfikacji izoprenoidów metodą immunoblotingu w ekstraktach materiału roślinnego, po rozdzieleniu na płytkach TLC, co stanowi łatwą i selektywną metodę w porównaniu do innych stosowanych technik.

Praca finansowana częściowo z grantu promotorskiego KBN 6 P04A 025 19. (M.W.)

## Literatura

1. Hundall T., Forsmark-Andrée P., Ernster L., Andersson B., (1995), Arch. Biochem. Biophys., 324, 117-122.
2. Ernster L., Dallner G., (1995), Biochim. Biophys. Acta, 1271, 195-204.
3. Rodr guez-Concepcion M., Yalovsky S., Gruissem W., (1999), Plant Mol. Biol., 39 (5), 865-870.
4. Sinensky M., (2000), Biochim. Biophys. Acta, 1484 (2-3), 93-106.
5. Soll J., Schultz G., Joyard J., Douce R., Block M., (1985), Arch. Biochem. Biophys., 238, 290-299.
6. Lütke-Brinkhaus F., Liedvogel B., Kleining H., (1984), Eur. J. Biochem., 141, 537-541.
7. Wanke M., Swiezewska E., Dallner G., (2000), Biochim. Biophys. Acta, 1463, 188-194.
8. Gregoriadis G., (1995), Trends Biotechnol., 13, 527-537.
9. Crook S. J., Steward R., Boggs J. M., Vistnes A. I., Zalc B., (1987), Mol. Immunol., 11, 1135-1143.
10. Lingwood C., Murray R., Schachter H., (1980), J. Immunol., 124, 769-775.
11. Alving C. R., (1991), J. Immunol. Methods, 140, 1-13.
12. Gluck R., (1994), Biologicals, 22, 347-351.
13. Coulon-Morelec M. J., Faure M., Marechal J., (1968), Anns. Inst. Pasteur, Paris, 114, 775-782.
14. Zalc B., Jacque C., Radin N. S., Dupouey P., (1977), Immunochemistry, 14, 775-784.