

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 576.8.097.8

©Коллектив авторов

АНТИГЕННАЯ КАРТА ЦИТОЗОЛЬНОГО ДОМЕНА ЦИТОХРОМА *b5*

Е.Ф. Колесанова, С.А. Мошковский, Е.И. Ромашко

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН

119121, Москва, ул. Погодинская, д.10.

тел.: (095) 246-3375; факс: (095) 245-0758; эл. адрес: ekol@ibmh.msk.su

Антитела против цитозольного домена цитохрома *b5* (t-цитохрома *b5*) быка из-за высокой консервативности структуры этого белка у млекопитающих удалось получить только от эволюционно удаленного вида животных - кур. Антигенное картирование t-цитохрома *b5* методом пептидного сканирования выявило в этом белке 8 линейных антигенных участков, что хорошо согласуется с высоким содержанием доступных для воды аминокислотных остатков и поворотов полипептидной цепи в его молекуле. Линейные В-эпитопы t-цитохрома *b5* располагаются, главным образом, в участках, обладающих видоспецифичностью аминокислотной последовательности. В то же время высококонсервативный участок, предположительно ответственный за взаимодействие с цитохромом P450, несмотря на высокую степень поверхностной экспонированности, оказался очень слабо иммуногенным. Это можно объяснить отсутствием Т-хелперной поддержки ответа на участки аминокислотных последовательностей, идентичные собственным белкам организма. Тем не менее, антитела против бычьего t-цитохрома *b5* обладают высокой перекрестной иммунореактивностью в отношении кроличьего полноразмерного цитохрома *b5*, которая обусловлена присутствием одного идентичного линейного В-эпитопа и перекрестного взаимодействия между другими антигенными участками, имеющими незначительные структурные различия.

Ключевые слова: В-эпитопы, антигенное картирование, пептидное сканирование, цитохром *b5*

ВВЕДЕНИЕ. Антитела служат эффективным инструментом исследования белков. Они используются для выявления индивидуальных соединений и групп родственных молекул, выделения и очистки путем иммуноаффинной хроматографии, изучения топографии в составе субклеточных органелл, локализации функционально важных участков, сопоставления родственных и неродственных молекул и различных конформационных форм одного и того же белка. Одной из важных областей молекулярно-биологических исследований, использующих потенциал специфических антител против белковых молекул, является протеомика. В протеомике антитела применяются для селективного извлечения белков из смесей, для идентификации индивидуальных соединений и

АНТИГЕННАЯ КАРТА ЦИТОЗОЛЬНОГО ДОМЕНА ЦИТОХРОМА *b5*

групп родственных белков и для выявления и локализации посттрансляционных модификаций [1-5].

Получение антител к достаточно крупным глобулярным белкам (с молекулярными массами свыше 45 кДа), в значительной степени различающихся аминокислотными (а.к.) последовательностями у разных видов животных, как правило, не составляет больших трудностей. Однако при работе с небольшими белками, да еще обладающими к тому же весьма консервативными структурами, возникают проблемы с наработкой антител. В частности, с трудом удалось получить антитела против цитохрома *c* - высококонсервативного белка с молекулярной массой около 12,5 кДа [6]. К тому же В-эпитопные специфичности антител, полученных от разных особей иммунизируемых животных, сильно различались, что не позволяло говорить о какой-либо стандартизации определения белка с помощью данных антител.

Цитохром *b5* представляет собой также малый белок, заякоренный в мембране [7]. Этот белок имеется во многих клетках и тканях, где он локализуется в различных внутриклеточных мембранах, за исключением внутренней мембраны митохондрий [8]. А.к. последовательность цитозольного домена цитохрома *b5* обладает высокой консервативностью у различных видов высших животных [9]. Нами были получены антитела кур против цитозольного домена цитохрома *b5* быка и методом пептидного сканирования [10-15] определены их В-эпитопные специфичности.

МЕТОДИКА. Электрофоретически гомогенные препараты лишенного трансмембранного С-концевого фрагмента, растворимого цитохрома *b5* из печени быка (t-цитохром *b5*, t-*b5*) [16] и полноразмерного цитохрома *b5* из печени кролика [7] любезно предоставлены Д.Р. Давыдовым и Г.П. Кузнецовой (ГУ НИИ БМХ РАМН). 9-Флуоренилметоксикарбонил(Fmoc)- α -L-аминокислоты с защищенными боковыми функциональными группами - препараты фирмы "Novabiochem" (Швейцария). Полиэтиленовые иглы с активированной поверхностью для синтеза неотщепляемых пептидов (NCP Multipins) - продукт фирмы "Chiron Technologies" (Австралия). Антитела кролика к куриным IgY, меченные пероксидазой хрена (рабочее разведение 1:5000) - препарат фирмы "Accurate Chemical & Scientific Corp." (США). 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфонат аммония) (ABTS) и полный адьювант Фрейнда (ПАФ) - реактивы фирмы "Calbiochem" (Швейцария). Для проведения иммуноферментного сорбционного анализа (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) использовали полистирольные 96-луночные планшеты с плоским дном Cliniscan и EIA/RIA фирмы "Labsystems" (Финляндия).

Двух кроликов-самцов породы шиншилла весом 2 кг иммунизировали t-цитохромом *b5* (0,2 мг/животное) 3 раза с интервалом 2 недели, как описано ранее [15]. Кровь забирали из ушной вены через неделю после последней иммунизации. Двух молодых кур породы немецкая рыже-пестрая до вступления в период яйценоскости (возраст 2,5-3 мес) иммунизировали 3 раза с интервалом в 3 недели [17]. Во время первой иммунизации каждой курице вводили подкожно в область шеи в две точки 0,2 мг белка в 1 мл гомогенной эмульсии, полученной смешиванием 1 объема раствора белка (0,4 мг/мл) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ: 0,14 М NaCl, 10 мМ фосфат натрия, pH 7,2) и 1 объема ПАФ. Вторую и третью иммунизации проводили внутримышечно в бедро раствором белка (0,2 мг/мл) в ФСБ. Кровь забирали из подключичной вены на 7-й день после 3-й иммунизации иглой, промытой 0,1%-ным раствором гепарина. Для получения антисыворотки кровь выдерживали 3 ч при 18°C и затем центрифугировали 30 мин при 1000 g. Антисыворотку отбирали и хранили аликвотами по 200 мкл при -20°C. Контрольную сыворотку получали из крови тех же животных, отобранной за неделю до начала иммунизации. Титр антисывороток по отношению к t-цитохрому *b5* определяли методом ELISA.

Гексапептиды, перекрывающиеся пятью а.к. остатками и охватывающие всю а.к. последовательность t-цитохрома *b5* (цитохром *b5*(1-93)) [9], синтезировали на

полиэтиленовых иглах NCP Multipins карбодиимидным методом исходя из Fmoc- α -L-аминокислот, как описано ранее [15]. Пептиды, связывавшие специфические антитела против t-цитохрома *b5*, выявляли методом ELISA с использованием соответствующих антисывороток в разведениях 1:2000, 1:1000 и 1:500. В качестве контроля использовали контрольные сыворотки в тех же разведениях. Связавшиеся с пептидами антитела проявляли с помощью анти-иммуноглобулин G- или Y-видоспецифичных антител, меченных пероксидазой хрена, и смеси субстрата и хромогенного косубстрата (ABTS) пероксидазы. Подробная методика ELISA описана ранее [14]. Результаты ELISA выражали в виде оптической плотности растворов в опытных пробах при 405 нм (A_{405}).

Расчет доступных для молекул воды а.к. остатков t-цитохрома *b5* был проведен с использованием программного пакета SYBYL ("Tripos", США) и рабочей станции Indigo-2 ("Silicon Graphics", США). Доступными для воды в молекуле белка считали те остатки, у которых площадь поверхности, доступная для обкатки сферой радиусом 1,4 Å [18] в составе структур, определенных и рентгеноструктурным анализом [19], и ЯМР [20], составляла не менее 20% таковой для того же остатка в составе ди- или трипептида. Координаты атомов t-цитохрома *b5* получены из Брукхейвенского банка данных третичных структур белков [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При иммунизации кур цитозольным доменом бычьего цитохрома *b5* удалось получить специфические антитела, взаимодействующие с белком-антигеном, использованным для иммунизации, а также с полноразмерным цитохромом *b5* из микросом печени кролика. Титры анти-цитохром *b5* антител в сыворотках крови иммунизированных кур составляли примерно 1:1500 (анти-t-*b5*) и 1:1000 (анти-полноразмерный *b5*). Антитела же из сыворотки крови кроликов, полученной после иммунизации животных указанным антигеном, практически не взаимодействовали с t-цитохромом *b5* в ходе ELISA. Слабый иммунный ответ на t-цитохром *b5* может объясняться, во-первых, небольшими размерами его молекулы и, следовательно, ограниченным числом Т-хелперных эпитопов, обеспечивающим Т-клеточную поддержку активации В-лимфоцитов и плазматических клеток, и, во-вторых, сходством а.к. последовательностей вводимого белка и цитохрома *b5* иммунизируемого организма, что выражается в возможном запрете на стимуляцию антителообразования к участкам, идентичным таковым в однотипном белке иммунизируемого животного [18]. Действительно, степень идентичности а.к. последовательностей цитозольных фрагментов куриного и бычьего *b5* составляет 60%, а кроличьего и бычьего *b5* - 78%.

Для проведения В-эпитопного картирования специфических антител против t-цитохрома *b5* были синтезированы 88 перекрывающихся пятью а.к. остатками гексапептидов, охватывающих участок 1-93 последовательности микросомального цитохрома *b5* быка. Эти пептиды были прочно связаны амидной связью со спейсером (b-Ala-b-Ala) на поверхности полиэтиленовых игл. На рисунке 1 приведены результаты тестирования пептидов на взаимодействие с антителами из антисывороток кур против t-цитохрома *b5* в разведении 1:1000. Аналогичные результаты получены и для других разведений антисывороток. Специфически взаимодействующими с антителами считали те пептиды, которые достоверно связывали иммуноглобулины G из антисывороток, но не взаимодействовали с IgG преиммунных сывороток. Как видно из рисунка 1В, ряд пептидов взаимодействовал с антителами преиммунной сыворотки курицы №1 (антитела преиммунной сыворотки курицы №2 с пептидами не взаимодействовали; данные не показаны), однако эти пептиды не совпадали с таковыми, связывающими антитела иммунных сывороток. В таблице приведены выявленные антигенные гексапептиды и образуемые ими антигенные участки t-цитохрома *b5*. Как следует из данных рисунка 1 и таблицы, набор В-эпитопных специфичностей (в отношении линейных В-эпитопов) антител против t-цитохрома *b5* в обеих

АНТИГЕННАЯ КАРТА ЦИТОЗОЛЬНОГО ДОМЕНА ЦИТОХРОМА *b5*

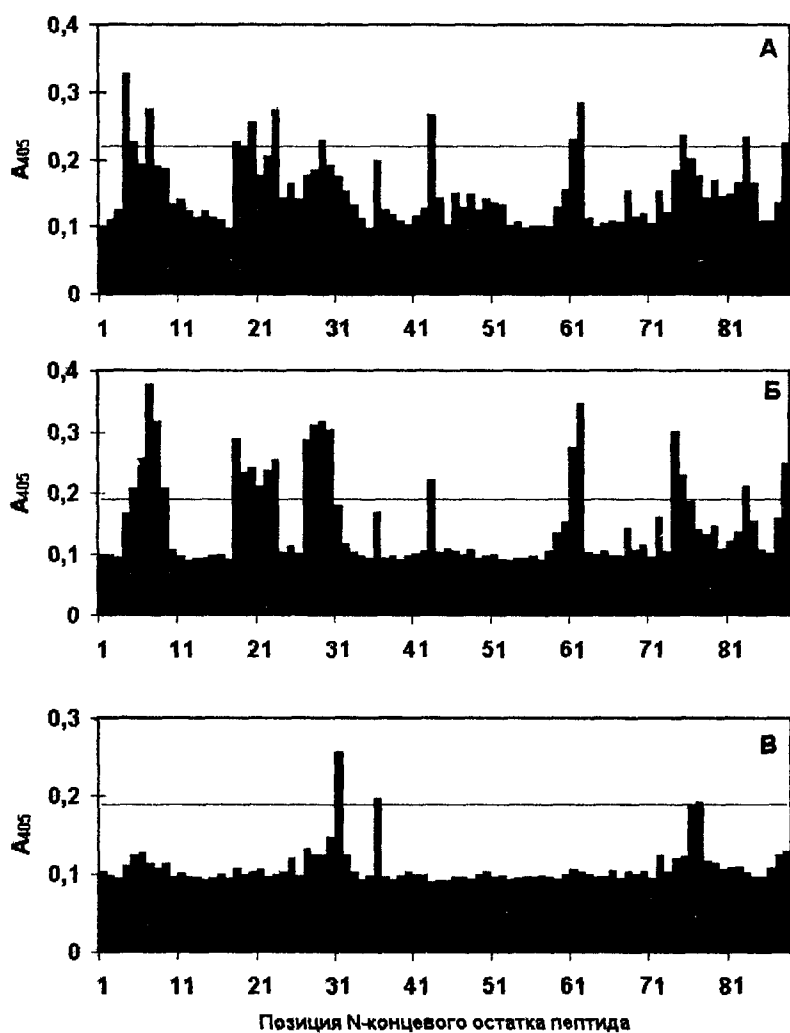


Рисунок 1.

Результаты ELISA гексапептидов последовательности *t-b5* с антителами куриных антисывороток №1 (А) и №2 (Б) против *t*-цитохрома *b5* и преиммунной сыворотки №1 (В). Разведения антисывороток: 1:1000; преиммунной сыворотки: 1:500.

антисыворотках кур почти одинаков.

Поскольку молекула *t*-цитохрома *b5* практически вся доступна для молекул воды в растворе и не содержит протяженных участков с упорядоченной структурой [9, 19-21], нет смысла в сопоставлении расположения линейных В-эпитопов этого белка и доступных для воды аминокислотных остатков, а также поворотов белковой цепи. Практически все найденные антигенные детерминанты располагаются в местах поворотов и содержат в своем составе доступные для воды группы атомов. Однако сопоставление расположения линейных В-эпитопов *t*-цитохрома *b5* и консервативных (для микросомальных *b5* высших животных) и переменных, то есть различающихся у *t-b5* разных животных, а.к. остатков показывает, что подавляющее большинство переменных а.к. остатков *t*-цитохрома *b5* находится в составе непрерывных антигенных участков (рис. 2). Это вполне понятно, так как на стимулирование образования антител к определенным консервативным областям может быть наложен запрет в силу их высокого сходства или идентичности с белками организма-реципиента. Единственным исключением является гексапептид 43-48 HPGGEE. Этот фрагмент

Калесанова и др.

Таблица. Гексапептидные фрагменты бычьего t-цитохрома b5, обладающие антигенной активностью, и образуемые ими антигенные участки.

№ анти- генного участка	№ антигенного гексапептида	Положение в пос- ледовательности цитохрома t-b5	Пептид	Связывание с антителами из антисывороток кур	
				№1	№2
1	1	4-9	SSKAVK	+	-
1	2	5-10	SKAVKY	+	+
1	3	6-11	KAVKYY	-	+
1	4	7-12	AVKYYT	+	+
1	5	8-13	VKYYTL	-	+
1	6	9-14	KYYTLE	-	+
2	7	18-23	KHNNSK	-	+
2	8	19-24	HNNSKS	+	+
2	9	20-25	NNSKST	+	+
2	10	21-26	NSKSTW	+	+
2	11	22-27	SKSTWL	+	+
2	12	23-28	KSTWLI	+	+
3	13	27-32	LILHYK	+	+
3	14	28-33	ILHYKV	+	+
3	15	29-34	LHYKVY	+	+
3	16	30-35	HYKVYD	+	+
4	17	43-48	HPGGEE	+	-
5	18	61-66	DFEDVG	+	+
5	19	62-67	FEDVGH	+	+
6	20	74-79	LSKTFI	-	+
6	21	75-80	SKTFII	+	+
7	22	83-88	LHPDDR	+	+
8	23	88-93	RSKITK	+	+

1 11 21 31 41
 51 61 71 81 91
 SSKAVK YKYYTL NNSKSTW LILHYKVY LHYKVYD
 FEDVGH LSKTFI LHPDDR RSKITK

Рисунок 2.

Соотношение антигенной карты и консервативных а.к. остатков t-цитохрома b5. А.к. остатки в составе антигенных участков обозначены прописными буквами, консервативные а.к. остатки выделены серым цветом.

входит в состав участка 32-56, предположительно ответственного за взаимодействие с цитохромами P450 и потому высококонсервативного. Высокая консервативность а.к. последовательности этого участка, возможно, служит причиной его низкой иммуногенности, несмотря на локализацию на поверхности молекулы и высокое содержание доступных для воды групп атомов [19-21].

Следует отметить, что ряд антигенных участков содержит всего 1-2 переменных остатка, и это поднимает вопрос о возможности перекрестной иммунореактивности между различными цитохромами b5. Действительно, титр антител в сыворотке крови иммунных кур был практически одинаков как в отношении бычьего t-цитохрома b5, так и в отношении полиразмерного кроличьего b5, и этот факт нельзя объяснить наличием только одного полностью идентичного В-эпитопа 43-48 HPGGEE. Были синтезированы 7 перекрывающихся гексапептидов, охватывающих участки 18-24 KHNNSKS и 26-35 WLILHYKVYD бычьего t-b5, но содержащих единичные замены в положениях 21 N→H и 31 Y→H, которые превращают эти пептиды во фрагменты кроличьего цитохрома b5. Результаты ELISA гексапептидных фрагментов кроличьего b5 на

АНТИГЕННАЯ КАРТА ЦИТОЗОЛЬНОГО ДОМЕНА ЦИТОХРОМА *b5*

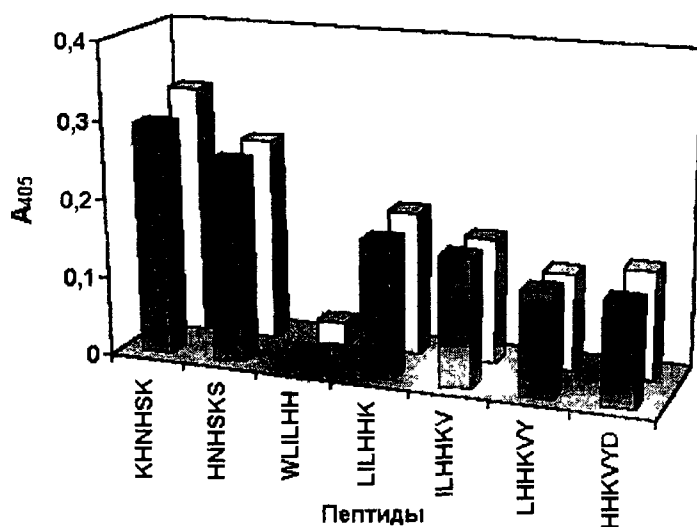


Рисунок 3.

Результаты ELISA гексапептидных фрагментов кроличьего цитохрома *b5*, содержащих единичные а.к. замены по сравнению с бычьим *t-b5*, с антисывороткой против бычьего *t*-цитохрома *b5*. По оси абсцисс обозначены а.к. последовательности пептидов кроличьего *b5*, соответствующие величины A405 - серые столбики. Белые столбики - величины A405 пептидов-аналогов - фрагментов бычьего *t-b5*.

взаимодействие с антителами против бычьего *t-b5* приведены на рисунке 3. Видно, что единичные замены а.к. остатков не влияют на связывание гексапептидов с антителами, следовательно, непрерывные антигенные участки 18-24 и 27-35, несмотря на эти замены, вместе с идентичным участком 43-48, а также некоторыми другими участками с незначительными различиями в первичной структуре (не более двух различающихся а.к. остатков) способны обеспечивать перекрестную иммунореактивность между кроличьим и бычьим цитохромами *b5*.

Таким образом, несмотря на высокую степень сходства а.к. последовательностей цитозольного домена митохондриального цитохрома *b5* у разных видов животных, удалось получить антитела к данному белку. Однако для получения антител против бычьего *t-b5* пришлось иммунизировать кур, эволюционно удаленных животных, относящихся к другому классу - классу птиц. Попытка получить антитела к бычьему цитохрому *b5* у кроликов успехом не увенчалась. Вероятная причина этого - 78%-ная идентичность а.к. последовательностей *t-b5* кролика и быка, что проявляется и в высокой степени их иммунологической идентичности, выражающейся в наличии перекрестных иммунных реакций как между целыми белками, так и между отдельными В-эпитопами, различающимися единичными аминокислотными остатками. На примере данного белка видно, что по достижении полипептидом определенной длины эффективность иммунного ответа и набор специфичностей антител против него зависят не от длины, а от степени сходства а.к. последовательностей данного белка и белков организма-реципиента. При высокой степени их сходства имеет место и сходство Т-хелперных эпитопов, что приводит к отсутствию достаточной Т-хелперной поддержки антителопродукции В-лимфоцитами за счет отсутствия Т-лимфоцитов, активируемых фрагментами собственных белков, слабому иммунному ответу и ограниченному В-эпитопному репертуару. Кроме цитохрома *b5*, подобное явление наблюдалось и в случае цитохрома *c*, к которому авторам так и не удалось получить антител с хоть сколько-нибудь воспроизводимым набором В-эпитопных специфичностей, притом белок приходилось модифицировать путем межмолекулярных сшивок для получения иммунного ответа [6]. У эволюционно

удаленных видов животных сходство структур однотипных белков ниже, и выше вероятность эффективного иммунного ответа на такие белки [22]. В целом набор гексапептидных фрагментов t-b5, взаимодействующих с антителами из сывороток крови кур, был достаточно велик - 23 гексапептида, образующих 8 линейных антигенных участков, что составляет 2/3 последовательности молекулы. Из этого следует, что при иммунизации эволюционно удаленных животных возможно успешное получение антител против белков с низкой видоспецифичностью а.к. последовательностей с получением набора антител с разнообразной В-эпитопной специфичностью. При этом антитела будут образовываться преимущественно к различающимся участкам а.к. последовательности белка, однако различия только в одном-двух а.к. остатках в составе В-эпитопов могут приводить и к образованию антител, перекрестно реагирующих с однотипными белками из других организмов. Результаты В-эпитопного картирования белков можно будет использовать для целенаправленного получения как высокоспецифических антител для селективной идентификации индивидуальных белков, так и группоспецифических антител для выявления родственных молекул.

Авторы выражают благодарность Д.Р. Давыдову и Г.П. Кузнецовой (ГУ НИИ БМХ РАМН) за предоставление препаратов соответственно бычьего t-цитохрома b5 и полноразмерного кроличьего цитохрома b5, В.С. Скворцову (ГУ НИИ БМХ РАМН) за помощь в работе с программным пакетом SYBYL.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 98-04-48684.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burgess R.R., Thompson N.E. (2002) Curr. Opin. Biotechnol. **13**(4), 304-308.
2. Natsume T., Taoka M., Manki H., Isobe T., Mikoshiba K. (2002) Proteomics, **2**(9), 1247-1253.
3. Stoll D., Templin M.F., Schrenk M., Traub P.C., Vohringer C.F., Joos T.O. (2002) Front. Biosci. **7**, 13-32.
4. Madoz-Gurpide J., Wang H., Misek D.E., Brichory F., Hanash S.M. (2001) Proteomics, **1**(10), 1279-1287.
5. Ducret A., Desponts, Desmarais S., Gresser M.J., Ramachandran C. (2000) Electrophoresis, **21**(11), 2196-2208.
6. Schwab C., Twardek A., Lo T.P., Brayer G.D., Bossard H.R. (1993) Protein Sci. **2**(2), 175-182.
7. Spatz L., Strittmatter P. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**(3), 1042-1046.
8. Archakov A.I., Bachmanova G.I. (1990) Cytochrome P450 and Active Oxygen, Taylor & Francis, London-New York-Philadelphia.
9. Swiss-Prot: <http://us.expasy.org/sprot/>
10. Geysen H.M., Meloan R.H., Barteling S.J (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**(5), 3998-4002.
11. Worthington J., Morgan K. (1994) in: Peptide Antigens. A Practical Approach (G.B. Wisdom ed.) Oxford University Press, Oxford-New York-Tokyo, pp.181-217.
12. Kolesanova E.F., Kiselar J.G., Jung C., Kozin S.A., Hui Bon Hoa G., Archakov A.I. (1996) Biochimie, **78**(8/9), 752-762.
13. Kolesanova E.F., Kozin S.A., Rumyantsev A.B., Jung C., Hui Bon Hoa G., Archakov A.I. (1997) Arch. Biochem. Biophys. **341**(2), 229-237.
14. Колесанова Е.Ф., Козин С.А., Арчаков А.И. (1998) Биоорг. химия, **24**(10), 747-755.
15. Moshkovskii S.A., Kolesanova E.F., Archakov A.I. (2002) Arch. Biochem. Biophys. **398**(2), 269-274.

16. *Mauk M.R., Mauk A.G., Weber P.C., Matthew J.B.* (1986) *Biochemistry*, **25**(22), 7085-7091.
17. *Амброзиус Х.* (1987) в кн.: Иммунологические методы (под ред. Х.Фримель), Медицина, М., с.9-19.
18. *Lee B., Richards F.M.* (1971) *J. Mol. Biol.* **55**(3), 379-400.
19. *Durley R.C.E., Mathews F.S.* (1996) *Acta Crystallogr. Sect. D*, **52**(1), 65-76.
20. *Muskett F.W., Kelly G.P., Whitford D.* (1996) *J. Mol. Biol.* **258**(1), 172-189.
21. Protein DataBank: <http://www.rcsb.org/pdb/>
22. *Ройт А., Бростовф Д., Мейл Д.* (2000) Основы иммунологии (пер. с англ.), Мир, М., с. 258-274.

Поступила 23.02.2003.

ANTIGENIC MAP OF CYTOCHROME B5 CYTOSOLIC DOMAIN

E.F. Kolesanova, E.I. Romashko, S.A. Moshkovskii

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, 10 Pogodinskaya ul., Moscow, 119121 Russia; e-mail: ekol@ibmh.msk.su

Because of the high conservativity of cytochrome *b5* cytosolic domain (t-cytochrome *b5*) among mammalian species the antibodies against bovine t-cytochrome *b5* were successfully obtained only from evolutionary distant species (chicken). Antigenic mapping of t-cytochrome *b5* by the peptide scanning method showed the presence of a large set of linear B-epitopes of this protein. This is well consistent with high content of water-accessible amino acid residues and polypeptide chain turns in its molecule. Linear B-epitopes of t-cytochrome *b5* are presumably located in sites with species specificity of the amino acid sequence, despite of the high-degree surface exposure of the highly conservative site, which is probably responsible for the interaction with cytochrome P450. It can be explained by the absence of the effective T-helper support of the antibody response to amino acid sequence sites that are identical to own proteins of an organism. Nevertheless, antibodies against bovine t-cytochrome *b5* possess high cross-reactivity with regard to rabbit full-sized cytochrome *b5* because of the presence of one identical linear B-epitope and cross-interactions between other antigenic sites with minor structural differences.

Keywords: B-epitopes, antigenic mapping, peptide scanning, cytochrome *b5*