

УДК 577.152.114*576¹132.083.3

©Коллектив авторов

**РОЛЬ ОТДЕЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ
ИММУНОДОМИНАНТНОГО НЕПРЕРЫВНОГО ЭПИТОПА
ЦИТОХРОМА P450CAM (CYP101) 312LKKGQ317 В РАСПОЗНАВАНИИ
СПЕЦИФИЧЕСКИМИ АНТИТЕЛАМИ**

С.А. МОШКОВСКИЙ, Д.Н. ЛЕБЕДЕВ, Е.Ф. КОЛЕСАНОВА, А.И. АРЧАКОВ

Институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН
Россия, 119992, Погодинская ул., 10 Москва
тел. (095)246-6980, факс (095)245-0857

Ранее было показано, что участок бактериального цитохрома P450cam (CYP101) 311-318 содержит иммунодоминантный непрерывный В-эпитоп. Для выявления роли отдельных аминокислотных остатков в связывании антител посредством пипинной технологии (Multipin™) синтезированы аналоги антигенного гексапептида 312LKKGQ317 с единичными аминокислотными заменами в каждой позиции. Антитела из трех поликлональных кроличьих антисывороток против P450cam характеризовались сходным взаимодействием с синтезированными пептидами. Показана важная роль остатка G315, любая замена которого приводит к падению связывания специфических антител до фоновых величин. Замены на другие аминокислотные остатки в позициях L312, K313 и D316 влияли на взаимодействие с антителами по разному; лишь некоторые замены были возможны без ущерба для связывания. Остатки K314 и Q317 оказались наименее существенными в плане взаимодействия с антителами.

Полученные результаты соответствуют известным кристаллографическим данным по структуре молекулы P450cam. В участке 312-317 этого белка полипептидная цепь делает поворот, так что доступные для воды атомы боковых групп K313 и D316, атом кислорода остова белковой цепи K314, C α -атом G315 образуют компактный поверхностный кластер – вероятный участок связывания иммуноглобулиновой молекулы. Боковой радикал K314, удаленный от этого кластера, не участвует во взаимодействии с антителом.

Таким образом, непрерывный эпитоп 311-318 цитохрома P450cam может быть признан конформационно-зависимым.

Ключевые слова: пептидное сканирование, непрерывный В-эпитоп, аминокислотные замены, поликлональные антитела.

ВВЕДЕНИЕ. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что короткие пептиды, вплоть до пятичленных, способны служить миметиками крупных белковых антигенов и связывать антибелковые антитела с высокой аффинностью [1-4]. Этот феномен лежит в основе точного определения непрерывных В-эпитопов белка при помощи множественного синтеза коротких (6-10 аминокислотных остатков) пептидов по последовательности исходного антигена. Детальные исследования коротких антигенных пептидов показали разный вклад отдельных остатков в их составе в процесс взаимодействия с антителом [5]. Замена некоторых аминокислотных остатков в В-эпитопе на другие приводит к полной потере способности связывать антитело, тогда как остальные, наоборот, могут быть заменены без существенного падения аффинности. Причем эти не существенные для взаимодействия антител остатки могут находиться не только по краям, но и в середине антигенного пептида. В этих случаях говорят о «функциональной прерывистости» структурно непрерывного эпитопа [2].

С помощью пиновой технологии [1] в работе исследовался вклад отдельных аминокислотных остатков выявленного ранее [6] антигенного гексапептида, соответствующего части полипептидной цепи 312-317 бактериального цитохрома P450cam (CYP 101) с последовательностью LKKGDK. Полученные данные были сопоставлены с пространственной структурой этого участка в нативной молекуле цитохрома, известной по данным рентгеноструктурного анализа [7].

МЕТОДИКА. Исходный гексапептид LKKGDK из последовательности цитохрома P450cam и 25 гексапептидов на основе этой структуры с единичными аминокислотными заменами последовательно в каждой из позиций синтезировали по пиновой технологии (Multipin™, Mimotopes, Австралия), как описано ранее [3, 6, 8-11]. Для составления регламента синтеза использовали программу PepMaker (Chiron, Австралия), стратегию RNET (Replacement Net) [12]. Синтез ковалентно связанных с твердофазным носителем пептидов проводили на блоках полиэтиленовых игл с привитыми остатками β-аланина (Mimotopes, Австралия). Качество синтезированных пептидов контролировали с помощью моноклональных антител мыши к пептиду с последовательностью PLAQ (Mimotopes), синтезированному одновременно со «смысловыми» пептидами. Отрицательным контролем служил также одновременно синтезированный пептид GLAQ. Связывание моноклональных антител с контрольными пептидами определяли ИФА, как описано ранее [3, 12].

Высокоочищенный препарат цитохрома P450cam, экспрессированного в *E.coli*, штамм [13] был любезно предоставлен д-ром Г. Уи Бон Хоа из Института физико-химической биологии (Париж, Франция). Антисыворотка кролика №1 к P450cam была получена ранее [6]. Кроличьи антисыворотки к P450cam №2 и №3 получали, иммунизируя двух кроликов породы «шиншилла» весом 1,5-2 кг три раза с интервалом в две недели. Первую иммунизацию проводили подкожно препаратом белка (200 мкг в 0,5 мл 0.9% раствора NaCl), смешанным с равным объемом полного адъюванта Фрейнда (Calbiochem, Швейцария); вторую и третью иммунизации - внутримышечно в оба бедра тем же количеством белка в 1 мл 0.9% раствора NaCl. Кровь отбирали из ушной вены через неделю после последней иммунизации. Контрольную сыворотку получали из крови тех же кроликов, отобранной за неделю до первой иммунизации. Титры антител против P450cam определяли ИФА, как описано ранее [6].

ИФА связанных с иглами пептидов с использованием антисывороток против цитохрома P450cam проводили по ранее описанной методике [12] с небольшими модификациями.

Антисыворотки №1 и №2 использовали в разведении 1:1000, антисыворотку №3 – в разведении 1:2000, что соответствует разведениям, вдвое большим титров соответствующих сывороток. Контрольные сыворотки использовали в разведении 1:1000. Связанные с иглами гексапептиды инкубировали в фосфатно-солевом буфере (145 mM NaCl, 5 mM NaP_i, pH 7,2), содержащем 0,1% (об/об) Tween 20 (PBST) и 50% (об/об) обезжиренного молока (Parmalat, Россия) («суперкоктейль») в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего иглы переносили в лунки иммунологического планшета, содержащие по 175 мкл антисыворотки, разведенной суперкоктейлем. Иглы в растворе антител инкубировали в течение ночи при 4°C, затем промывали 4 раза по 10 мин в фосфатно-солевом буфере (см. выше), содержащем 0,1% (об/об) Tween20. Иглы в течение 1 ч при 37°C инкубировали в растворе антител козы против кроличьих IgG, меченных пероксидазой хрена (Boehringer, Германия; рабочее разведение 1:5000) в PBST, взятом по 175 мкл на лунку планшета. После промывки тем же буфером связывание антител с пептидами визуализировали, помещая иглы в раствор субстрата пероксидазы H₂O₂-ABTS и измеряя поглощение при длине волны 405 нм, как описано ранее [6]. После каждой процедуры ИФА белки, связанные с пептидами на иглах, отмывали обработкой ультразвуком (ультразвуковая мойка m/03m, Finnsonic, Финляндия) в течение 30 мин при 60°C в 0,1 M Na-фосфатном буфере, содержащем 1% (вес/об) додецилсульфата Na и 0,1% (об/об) 2-меркаптоэтанола, после чего иглы с пептидами промывали горячей (60°C) водой и кипящим метанолом.

Полученные данные оптической плотности каждого эксперимента обрабатывали следующим образом. Величину фона рассчитывали как среднее арифметическое оптической плотности в пробах, в которых исследуемые антисыворотки инкубировали с пептидами, заведомо не связывавшими анти-P450cam антитела. Полученную величину фона вычитали из оптической плотности проб, в которых антисыворотки инкубировали с пептидом Ac-(LKKGDQ) и его аналогами.

Локализацию антигенных детерминант на модели третичной структуры молекулы проводили с использованием программы WebLabViewerLite (Molecular Simulations Inc., <http://www.msi.com>). Определение доступности для молекул воды аминокислотных остатков цитохрома P450cam проводили с помощью программы ONIX, разработанной в Институте биомедицинской химии РАН [14]. Доступность для молекул воды определяли как вероятность физического контакта между сферой с радиусом, равным радиусу Ван-дер-Ваальса для данного атома (в составе молекулы), и катящейся по поверхности молекулы сферой с радиусом 0,14 нм (радиус молекулы воды). Поверхность сферы, соответствующей каждому атому, разбивали на 642 равных сегмента и подсчитывали число сегментов, контактирующих со сферой с радиусом молекулы воды. Атом или группа атомов считались доступными для молекулы воды, если не менее 10% их поверхности в составе молекулы контактировали со сферой радиусом 0,14 нм [15]. Координаты атомов цитохрома P450cam и сведения об элементах вторичной структуры этого белка получены из Брукгейвенского банка данных третичных структур белков (<http://www.rcsb.org>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Все используемые для антигенного картирования кроличьи сыворотки №1–3 против цитохрома P450cam в ИФА с гексапептидами, перекрывающими всю последовательность этого белка, характеризовались значимым связыванием антител с пептидами, соответствующими участку 311-318 [6, 16], поэтому данный непрерывный антигенный участок был признан иммунодоминантным. Кроме того, этот антигенный участок является специфичным для холо-формы фермента, так как антитела против апо-P450cam не взаимодействовали с соответствующими гексапептидами [16]. IgG из контрольных сывороток не связывались с пептидами, перекрывающими район 311-318.

При исследовании связывания антител из этих антисывороток с аналогами пептида Ac-(312LKKGDQ317), имеющими единичные аминокислотные замены, в качестве внутреннего контроля использовали связывание с исходным пептидом. Как видно из рис.1, антисыворотки №2 и №3 содержат набор антител, обладающих более строгой специфичностью по отношению к исходному пептиду, по сравнению с антителами из антисыворотки №1, так как в среднем связывание антител из сыворотки №1 с пептидами-аналогами выше, чем соответствующие значения для антисывороток №2 и №3. Однако в целом требования к первичной структуре В-эпитопа у антител из разных сывороток сходны.

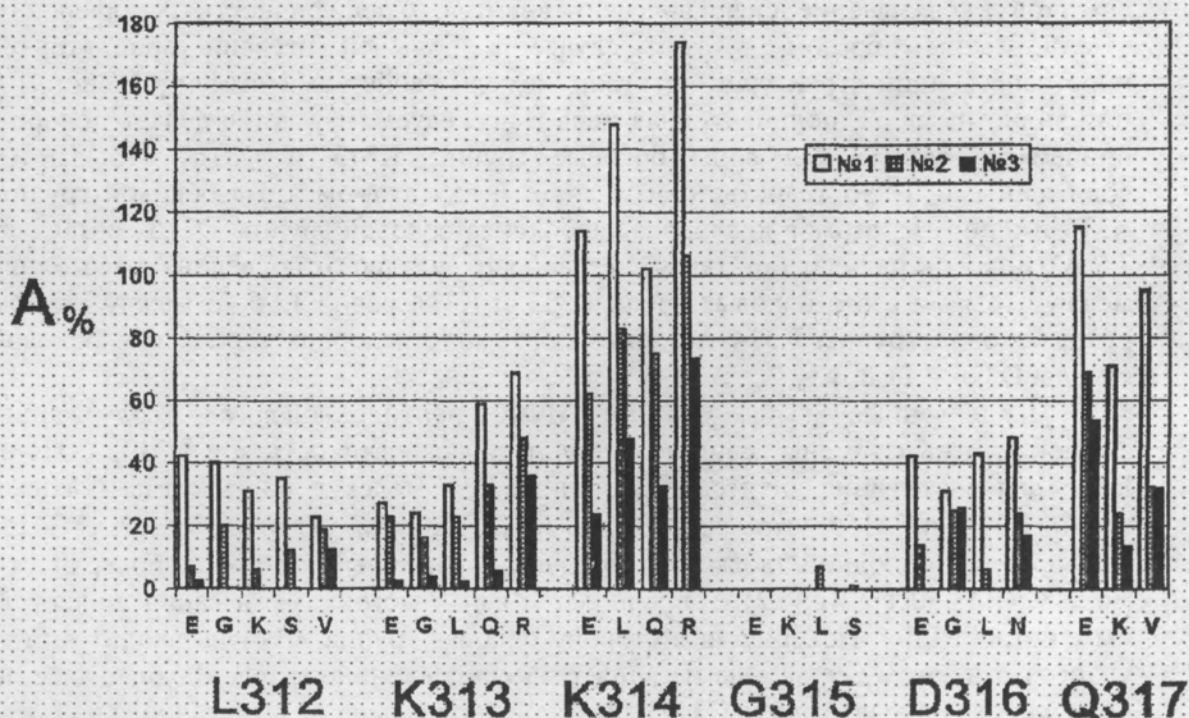


Рисунок 1.

Влияние единичных аминокислотных замен в гексапептиде Ac-LKKGDQ на связывание антител из кроличьих сывороток №1–3 против P450cam. По оси ординат показана относительная эффективность связывания аналогов Ac-LKKGDQ по сравнению с исходным пептидом (A%). По оси абсцисс крупным шрифтом указаны аминокислотные остатки исходного пептида, подлежащие замене; мелким шрифтом указаны аминокислотные замены в пептиде.

По значимости для распознавания специфическими антителами аминокислотные остатки гексапептида LKKGDQ можно разделить на три группы. В первую входит остаток глицина №315, замена которого во всех случаях приводит к снижению связывания до фоновых величин. В этой позиции появление боковой группы любого объема отрицательно сказывается на связывании антитела. Вторая по значимости группа включает остатки L312, K313 и D316, замена которых приводит к снижению связывания, но последнее, как правило, превышает фон. В позиции K313 имеет значение не столько объем, сколько заряд боковой группы, поскольку замена лизина на аргинин почти не приводит к снижению степени связывания. К третьей группе остатков, которые можно заменять без особого ущерба для распознавания, относятся K314 и Q317.

Таким образом, с точки зрения участия боковых групп аминокислотных остатков в распознавании антителами, структурно непрерывный эпитоп цитохрома P450cam, имитируемый пептидом LKKGDQ, проявляет свойство «функционально прерывистого» [2], поскольку боковая группа остатка лизина №314, находящегося в его середине, по-видимому, не участвует в связывании специфического антитела.

Различия в главном комплексе гистосовместимости и предсуществующем наборе иммуноглобулиновых рецепторов трех индивидов, чьи сыворотки применяли в настоящей работе, существенно не повлияли на вклад отдельных остатков в связывание специфических антител. Специфичность гуморального ответа, таким образом, в этом случае в большей степени продиктована пространственной структурой антигена, нежели свойствами иммунной системы. Как видно из рис.2, полипептидная цепь в исследуемом участке делает поворот, причем доступные для воды боковые группы K313 и D316 оказываются сближенными в пространстве (расстояние между атомом азота боковой группы K313 и одним из атомов кислорода карбоксила боковой группы D316 составляет 7,9 Å). Боковой радикал остатка K314, наоборот, удален от последних: расстояние между атомами азота боковых групп K313 и K314 равно 12,6 Å; между атомом азота боковой группы K314 и одним из атомов кислорода карбоксила боковой группы D316 – 11,8 Å.

Приведенные выше данные ИФА пептидов-аналогов, содержащих аминокислотные замены, свидетельствуют о важности остатков K313, G315 и D316 для связывания антитела. Доступные для молекул воды атомы боковых групп K313 и D316, атом кислорода K314, α -атом углерода остатка G315, лежащие почти в одной плоскости, образуют компактный кластер на поверхности молекулы P450cam (рис.2) – предполагаемый участок связывания молекулы иммуноглобулина. Повернутая в сторону боковая группа K314 не входит в этот участок, и поэтому ее замена не влияет на связывание антител. Находящаяся на поверхности боковая группа Q317 также заметно удалена от выделенного на рис.2 кластера. Показана важная роль в связывании антител остатка L312, погруженного вглубь белковой молекулы, но механизм этого остается неясным; возможно, этот остаток важен для формирования «правильной» структуры пептида на игле при взаимодействии с антителами.

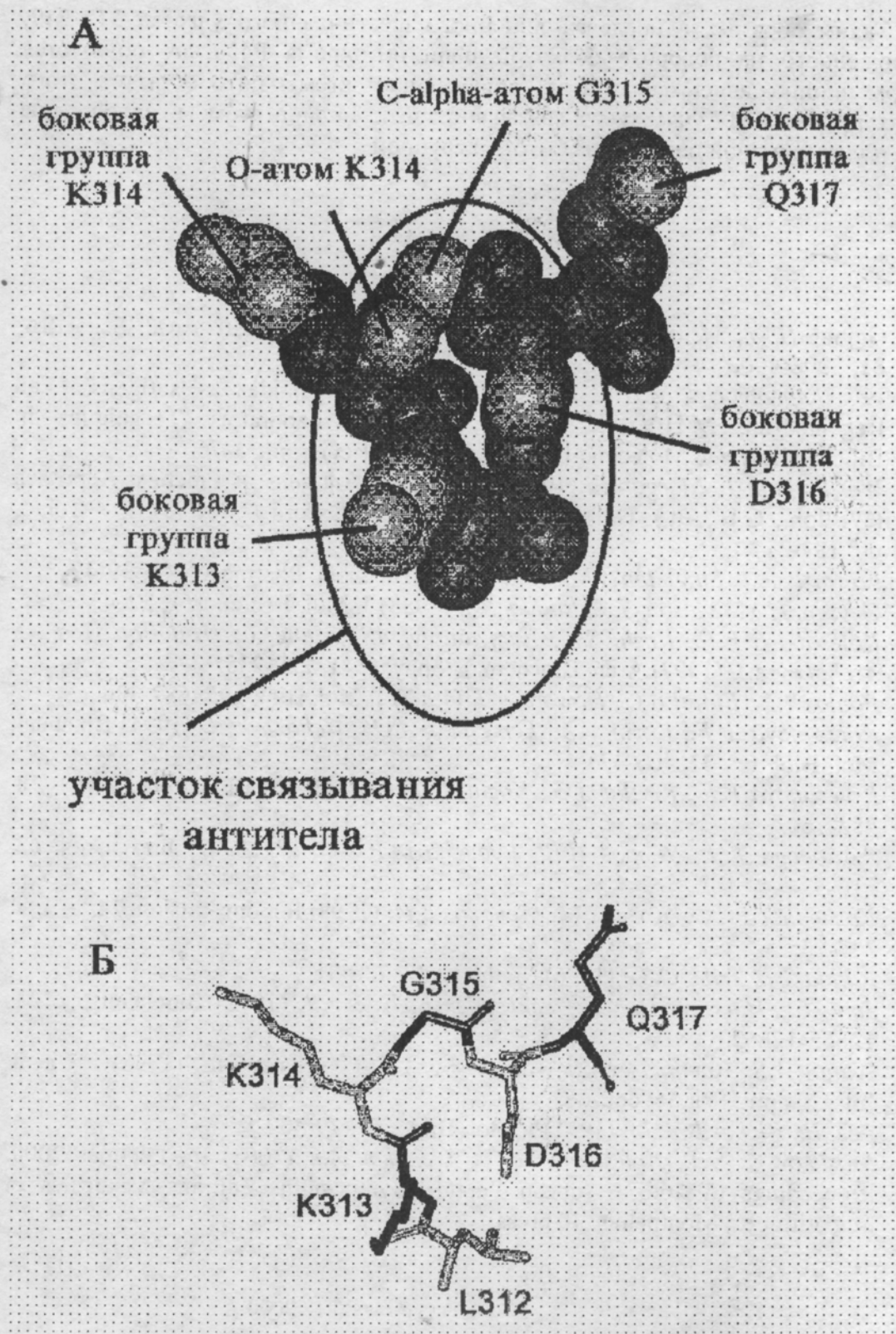


Рисунок 2.

Трехмерная структура участка Р450сат 312LKKGDQ317 по данным рентгеноструктурного анализа [7]. А. Доступные для воды атомы показаны серым, погруженные внутрь белковой глобулы – черным. Б. Контрастно выделены отдельные аминокислотные остатки.

Таким образом, в пределах линейного шестичленного участка 312–317, расположенного на повороте белковой цепи цитохрома P450cam, образуется конформационно-зависимый эпитоп, включающий атомы пяти остатков этого пептида, причем К314 участвует в связывании антител лишь атомом кислорода из остова полипептидной цепи, но не боковой группой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Geysen H.M., Meloen R.H., Barteling S.J. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3998-4002.
2. Van Regenmortel M.H.V. (1999) In: *Synthetic peptides as antigens*. (Van Regenmortel, M.H.V. & Mueller, S., eds). *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular biology*, vol. 28. Elsevier, pp. 1-76.
3. Worthington J., Morgan K. (1994) In: *Peptide Antigens. A Practical Approach* (Wisdom, G.B., ed.). Oxford University Press, Oxford - New York - Tokio, pp. 181-217.
4. Edwards R.J., Singleton A.M. et. al. (1995) *Biochem. Pharmacol.* **49**, 39-47.
5. Geysen, H.M., Mason, T.J., Rodda, S.J. (1988) *J. Mol. Recognit.* **1**, 32-41
6. Kolesanova E.F., Kozin S.A., Rumyantsev, A.B., Jung, C., Hui Bon Hoa, G. Archakov A.I. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **341**, 229-235.
7. Poulos T.L., Finzel B.C., Howard A.J. (1987) *J. Mol. Biol.* **195**, 687-700.
8. Kolesanova, E.F., Kozin, S.A., Lemesko, A.O., Archakov A.I. (1994) *Biochem. Mol. Biol. Int.* **32**, 465-473.
9. Kolesanova E.F., Kiselar J.G., Kozin S.A. et. al. (1996) *Biochimie (Paris)*. **78**, 752-762.
10. Аммосова Т.Н., Упоров И.В., Рубцова М.Ю. et. al. (1997) *Биохимия*, **62**, 516-524.
11. Колесанова Е.Ф., Козин С.А., Арчаков А.И. (1998) *Биоорг. химия*. **24**, 747-755.
12. Rodda S.J., Tribbick G. (1996) *Methods*. **9**, 473-481.
13. Jung C., Hui Bon Hoa G., Schroeder K.-L. et. al. (1992) *Biochemistry*, **31**, 12855-12862.
14. Ivanov A.S., Rumjantsev A.B., Skvortsov, V.S., Archakov A.I. (1996) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **36**, 660-663.
15. Lee, B., Richards, F.M. (1971) *J. Mol. Biol.* **55**, 379-400
16. Moshkovskii S.A., Kolesanova E.F., Archakov A.I. (2001) In: *Peptides 2000. Proceedings of 26th European Peptide Symposium*. Editions Medicales et Scientifiques, Montpellier, in press.

Поступила 25.12.2000.

**ROLE OF SINGLE AMINO ACID RESIDUES OF THE IMMUNODOMINANT
CONTINUOUS B-EPIOTOPE OF CYTOCHROME P450CAM 312LKKGDQ317 IN
RECOGNITION BY SPECIFIC ANTIBODIES**

S.A. MOSHKOVSKII, D.N. LEBEDEV, E.F. KOLESANOVA, A.I. ARCHAKOV

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS
10, Pogodinskaya Str., Moscow, 119992 Russia
phone (095)246-6980, fax (095)245-0857

As it has been shown previously the site 311-318 of bacterial cytochrome P450cam (CYP101) contains an immunodominant continuous B-epitope. In order to investigate the role of single amino acid residues in antibody binding antigenic hexapeptide 312LKKGDQ317 analogues including single amino acid replacements were synthesized using Multipin™ technology. Antibodies from three anti-P450cam polyclonal rabbit sera interacted similarly to these peptides. The residue G315 was found to play a significant role in antibody recognition; any replacement leads there to considerable decrease of antibody binding. Residues L312, K313 and D316 occurred to be partly replaceable, whereas K314 and Q317 were not essential in recognition.

These results correspond to known spatial structure of P450cam molecule. In its 312-317 site the polypeptide chain makes a turn and so some water-accessible atoms form a compact surface cluster including side chain atoms of K313 and D316, O-atom of K314 and C α -atom of G315, which present reliable Ig binding site. Side chain of K314 outlying from this cluster does not participate in the interaction.

The received data permit to consider that the continuous epitope 312-317 of P450cam is conformationally dependent.

Key words: peptide scanning, continuous B-epitope, amino acid replacement, polyclonal antibody