

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 577.112.6 + 57.083.3 + 616–097

А. В. ЛАПКО, Д. Н. КИСЛАЯ, В. П. ГОЛУБОВИЧ

ПЕПТИДНЫЕ АНАЛОГИ ЭПИТОПОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТЕИНА А С ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ КЛАССА G, ИХ СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕЛЕВЫХ СВОЙСТВ*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: gormoshkina@gmail.com, kislaja-dashka@rambler.ru, golubovich@iboch.bas-net.by*

С помощью методов теоретического конформационного анализа отобрана структура и осуществлен синтез тетрапептида формулы Phe–Gln–Phe–Tyr–OMe, аминокислотные остатки которого входят в состав активного центра протеина А, обеспечивающего его связывание с Fc-фрагментом иммуноглобулинов класса G. Активность данного тетрапептида подтверждена исследованиями аффинности связывания с Fc-фрагментом иммуноглобулинов класса G.

Ключевые слова: протеин А, олигопептидный аналог, Fc-фрагмент.

A. V. LAPKO, D. N. KISLAYA, V. P. GOLUBOVICH

PEPTIDE ANALOGUES OF THE EPITOPES OF PROTEIN A INTERACTION WITH IgG ANTIBODIES, THEIR SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF TARGET PROPERTIES*The Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: gormoshkina@gmail.com, kislaja-dashka@rambler.ru, golubovich@iboch.bas-net.by*

Using methods of theoretical conformational analysis, the Phe–Gln–Phe–Tyr–OMe tetrapeptide has been designed and synthesized. Amino acid fragments of this tetrapeptide are present in the active center of protein A, providing its binding with the Fc-fragment of human IgG antibodies. Activity of this tetrapeptide has been confirmed by studies of its binding affinity with Fc-fragment of human IgG antibodies.

Keywords: protein A, oligopeptide analogue, tetrapeptide, Fc-fragment.

Введение. На сегодняшний день одним из весьма актуальных направлений как в биохимии, так и в медицинской практике является разработка методов избирательного удаления патологических компонентов из биологических жидкостей человека. В данном случае для достижения указанной цели перспективным может являться протеин А клеточной стенки *Staphylococcus aureus* (SpA), а именно его активный центр, участвующий во многих биологических защитных функциях этого микроорганизма, включая функцию связывания иммуноглобулинов (Ig). Протеин А – белок массой 42 kDa с пятью повторными областями, богатыми аспарагиновой и глутаминовой кислотами, но не содержащими цистеина [1]. Протеин А связывается с Fc-фрагментом иммуноглобулинов человека и животных, что является защитным механизмом *S. aureus* от опсонофагоцитарного киллинга. Далее SpA ассоциируется с Fab-фрагментом Vh3 IgM. Поперечное связывание В-клеточных рецепторов приводит к активации и клональному росту В клеток и, как следствие, угнетению апоптоза [2].

Протеину А свойственны многие защитные биологические функции, такие как токсическая и канцерогенная. Также для него характерны противогрибковые и противопаразитарные свойства в дополнение к его способности действовать как иммуномодулятор [3]. Стафилококковый протеин А (наряду с другими поверхностными белками) способен вызывать ответ типа Th1, приводящий к выработке цитокинов, таких, как IFN- γ , TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-2 и IL-44 [4].

© Лапко А. В., Кислая Д. Н., Голубович В. П., 2015

Протеин А используется во время микроскопической *in situ* визуализации биологически важных молекул и для очистки антисыворотки, а также в экстракорпоральных терапевтических методах иммуноадсорбции для лечения протеинурии при нефротическом синдроме [5, 6]. Избирательное удаление из крови и других биологических жидкостей иммуноглобулинов, в частности иммуноглобулинов класса G, становится незаменимым в клинической практике для лечения больных с различными видами заболеваний, например аутоиммунных (ревматоидный артрит и системная красная волчанка). В связи с этим изучение активного центра протеина А клеточной стенки *Staphylococcus aureus* представляет определенный интерес для использования его функций в научно-практических целях.

В настоящее время достаточно широко распространены биоселективные сорбенты, лигандами в которых являются нативный протеин А и В-домен протеина А. Аффинная хроматография с использованием протеина А стала промышленным стандартом для очистки IgG [1]. Однако существуют критические моменты, сопряженные с высокой стоимостью вышеуказанных белков, характеризующихся сложностью и специфичностью выделения и получения [7]. В связи с этим создание небольшого пептидного аналога активного центра протеина А могло бы существенно снизить стоимость и упростить задачу производства гемосорбента на основе олигопептидных лигандов.

Разработка и биохимическое исследование аналогов активного центра протеина А позволит детально изучить функцию связывания протеина А с Fc-фрагментом иммуноглобулинов класса G, даст возможность его использования в качестве лиганда для аффинной хроматографии, а также создать на основе разработанных олигопептидов новые гемосорбенты для применения их в различных медицинских учреждениях для выделения и очистки глобулиновой фракции плазмы крови.

Методы исследования. Реактивы. В работе использовали иммуноферментные наборы «IgG общий – ИФА – БЕСТ» и «Подклассы IgG – ИФА – БЕСТ» («Вектор Бест», Россия).

Конформационное моделирование. Для моделирования укладки полипептидных цепей протеина А и расположения контактов взаимодействия с другими макромолекулами использовали Программу оптимизации структуры белков и расчета конформаций, разработанную на базе лаборатории прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси. Предварительно был проведен поиск искомой биологической макромолекулы в базах данных пространственных структур (UniProtKB/Swiss-Prot database, The Protein Data Bank (PDB)) [8, 9], а также изучение структуры, конформации, сайтов взаимодействия с Fc-фрагментом иммуноглобулина G и собственно аминокислотного состава данного протеина посредством получения файла в pdb-формате для данного комплекса взаимодействия протеина А с Fc-фрагментом иммуноглобулина G (структуры 1FC1, 1FC2). Поиск контактов взаимодействия протеина А с Fc-фрагментом иммуноглобулина G проводили с использованием структуры, полученной с помощью Программы оптимизации структуры белков и расчета конформаций, для чего использовали следующие показатели:

- процент перекрытия аминокислотных остатков различных цепей в области контакта;
- энергия взаимодействия остатков цепей;
- расстояние между C_{α} атомами остатков, участвующих в образовании контакта.

При анализе полученных результатов производился подбор аминокислотной последовательности олигопептидного аналога активного центра протеина А [10].

Синтез олигопептидного аналога. Проведен химический синтез олигопептидного аналога активного центра протеина А состава Phe–Gln–Phe–Tyr–OMe. Основным методом образования пептидной связи был выбран карбодиимидный, в качестве конденсирующего агента использовали диизопропилкарбодимид, противорацемической добавки – 1-оксибензотриазол. Для блокирования α -аминогрупп использовали *tert.* бутилоксикарбонильную защиту. Ее отщепление проводили обработкой пептидов 3,5–5,0 н. раствором HCl в этилацетате. Карбоксильные группы блокировали путем образования метиловых эфиров.

Чистота и структура созданных пептидов подтверждены методами масс-спектрометрии, аминокислотного анализа, ВЭЖХ, ТСХ. Масс-спектры целевых пептидов получали на масс-

спектрометре PE SCIEX API 150EX (Perkin Elmer, США) с использованием Turboionspray источника ионов. Аналитическую ВЭЖХ созданных соединений проводили на хроматографе фирмы Waters (Millenium³², 966 фотодиодный детектор, колонка Vydac 201HS52 RP C18 (2,1-250 мм)). Используемый градиент концентраций от 10 до 40 % ацетонитрила в воде с добавлением 0,1 % TFA; скорость потока – 1 мл/мин.

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках «Сорбфил», Россия. Хроматографические подвижности приведены в системах: (А) – хлороформ/метанол, 6:1; (Б) – хлороформ/метанол, 6:1; (В) – бутанол/уксусная кислота/вода, 40:10:10.

Удельное вращение определяли на спектрополяриметре J-20 («Jasco», Япония), температуры плавления – на приборе Кофлера.

Определение функциональной активности тетрапептидного аналога методом иммуноферментного анализа. В качестве функциональной оценки связывания синтезированного тетрапептидного аналога активного центра протеина А *Staphylococcus aureus* с Fc-фрагментом иммуноглобулинов использовался иммуноферментный анализ. Для этого в качестве иммуноферментной тест-системы применяли наборы «IgG общий – ИФА – БЕСТ» и «подклассы IgG – ИФА – БЕСТ» фирмы «Вектор Бест» (Новосибирск, Россия), предназначенные для иммуноферментного определения концентраций общего иммуноглобулина класса G (IgG) и общих IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 в сыворотке крови и других биологических жидкостях человека.

На первом этапе работы определяли: имеется ли связывание исследуемого тетрапептида с Fc-фрагментом общего IgG. Для этого использовали твердофазный метод иммуноанализа, основанный на принципе «сэндвич» (двухцентровый иммуноанализ) [11].

Непосредственно перед проведением анализа получали искомым комплекс тетрапептида с Fc-фрагментом общего IgG в различных молярных соотношениях 4:1; 2:1; 1:1; 0,5:1; 0,25:1; 0,125:1; 0,064:1 соответственно. При этом применяли рабочий буфер из набора, образцы тетрапептида с известной концентрацией и IgG с концентрацией 1 мг/мл. Данный комплекс инкубировали при 37С° в течение 30 мин. Параллельно был проведен иммуноферментный анализ без предварительного получения комплекса «тетрапептид-иммуноглобулин». Образцы IgG и тетрапептида вносили в тест-систему по отдельности с интервалом в 30 мин с инкубацией при 37С°.

Дальнейший анализ проводили в две стадии. На первой стадии калибровочные образцы с известной концентрацией IgG и анализируемые образцы комплекса тетрапептид–Fc-фрагмент IgG, а также контрольные образцы (нулевой контроль и контрольный образец IgG, инкубированный без тетрапептида) инкубировали в лунках стрипированного планшета с иммобилизованными моноклональными антителами (MAb) к IgG. Затем планшет отмывали промывочным буфером. На второй стадии, связавшийся в лунках IgG и комплекс IgG–тетрапептид обрабатывали конъюгатом MAb к легким (лямбда и каппа) цепям иммуноглобулинов человека с пероксидазой. После отмывания избытка конъюгата образовавшиеся иммунные комплексы «иммобилизованные MAb–IgG–конъюгат» выявлялись ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода в присутствии хромогена (тетраметилбензидина). После остановки пероксидазной реакции стоп-реагентом результаты учитывались фотометрически.

Для дальнейшего исследования связывания тетрапептида с Fc-фрагментом IgG и конкретизации результатов использовали иммуноферментный набор на подклассы IgG. Используемый иммуноферментный тест на подклассы IgG, так же как и на общий IgG, основывается на двухцентровом иммуноанализе. На предварительной стадии получали комплекс тетрапептида с Fc-фрагментом IgG в тех же молярных соотношениях, что и для иммуноанализа на общий IgG и при тех же условиях (37С°, 30 мин). При этом основываясь на литературных данных по относительному содержанию подклассов IgG в исследуемом образце, был произведен перерасчет концентрации IgG и тетрапептида [12]. Так, для исследования, проводимого для подклассов IgG2–IgG4, была использована концентрация в 10 раз больше (10 мг/мл), чем для IgG1, доля которого от общего IgG в процентном соотношении превышает остальные подклассы.

Анализ проводился в две стадии. На первой стадии калибровочные образцы с известными концентрациями IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и исследуемые образцы инкубировались в лунках стрипированного планшета с иммобилизованными моноклональными антителами к подклассам IgG.

На второй стадии связавшиеся в лунках IgG1–IgG4/комплекс IgG1–IgG4 обрабатывали конъюгатом МАb к подклассам IgG с пероксидазой (конъюгат МАb и иммобилизованные в лунках планшета МАb специфичны к разным участкам молекул подклассов IgG). После отмывания избытка конъюгата образовавшиеся иммунные комплексы «иммобилизованные МАb–IgG1–IgG4/комплекс IgG1–IgG4–конъюгат» выявляли ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода в присутствии хромогена (тетраметилбензидина). Интенсивность окраски хромогена пропорциональна концентрациям IgG1–IgG4 в анализируемом образце. После остановки пероксидазной реакции стоп-реагентом результаты учитываются фотометрически.

Конформационное моделирование. Анализ возможных аминокислотных последовательностей для синтеза олигопептидного аналога части активного центра связывания протеина *A Staphylococcus aureus* и Fc-фрагмента IgG посредством Программы оптимизации структуры белков и расчета конформаций проводился в несколько этапов. На начальной стадии определялся максимальный процент взаимодействия каждого аминокислотного остатка цепи протеина А с аминокислотной последовательностью Fc-фрагмента иммуноглобулинов класса G. Исходя из полученных результатов, отобраны следующие аминокислоты: изолейцин-253, серин-254, глутамин-311, аспарагин-434, тирозин-275, фенилаланин-287, фенилаланин-286 и глутамин-302. Энергия взаимодействия для этих аминокислотных остатков также находится в пределах, удовлетворяющих условию образования достаточно прочного контакта между взаимодействующими цепями. Конечным этапом определения олигопептида являлся подбор последовательностей аминокислот таких, чтобы расстояние между C_α атомами, участвующих в образовании контакта, было минимальным и полученный тетрапептид был наименьшей длины.

Определены возможные варианты последовательности аминокислот для синтеза олигопептидного аналога части активного центра связывания протеина *A Staphylococcus aureus* и Fc-фрагмента IgG. Исходя из полученных результатов, имеют наименьшую длину и, следовательно, могут быть использованы для синтеза олигопептида следующие аминокислотные последовательности:

Phe266–Gln302–Phe287–Tyr275
Tyr275–Phe287–Gln302–Phe266
Gln311–Ile253–Ser254–Asn434
Ser254–Ile253–Gln311–Asn434

Синтез олигопептидного аналога. Смоделированный тетрапептидный аналог состава Phe–Gln–Phe–Tyr–ОМе был синтезирован с помощью классических методов пептидного синтеза. Предложенная схема синтеза тетрапептида Phe–Gln–Phe–Tyr–ОМе наиболее оптимальна и имеет высокий выход целевого продукта (42,7 %).

Определение функциональной активности тетрапептидного аналога методом иммуноферментного анализа. При проведении качественной оценки функции связывания синтезированного тетрапептидного аналога активного центра протеина *A Staphylococcus aureus* с Fc-фрагментом иммуноглобулинов с помощью иммуноанализа рассматривалось, что блокированный тетрапептидом Fc-фрагмент IgG не будет связываться с иммобилизованными антителами, характеризующимися аффинностью к Fc-фрагменту. В данном случае определяемая концентрация IgG в комплексе с тетрапептидом будет обратно пропорциональна проценту ингибирования Fc-участка антитела, т. е. чем выше полученные значения концентрации IgG, тем менее интенсивно связывание тетрапептида с Fc-фрагментом. Интенсивность окраски хромогена при этом пропорциональна концентрации IgG в анализируемом образце и обратно пропорциональна количеству образовавшегося комплекса антитела с тетрапептидом. В результате проведения иммуноанализа была отмечена определенная зависимость значений процента связывания IgG с иммобилизованными моноклональными антителами в присутствии тетрапептида в различных соотношениях. Так, было установлено, что при увеличении молярного соотношения в сторону IgG процент ингибирования Fc-участка также растет и достигает плато при соотношении 1:1 (рис. 1).

В качестве подтверждения результатов анализа проводилось исследование ряда контрольных образцов. Контрольные образцы исследуемого IgG и IgG из набора показали значения, соот-

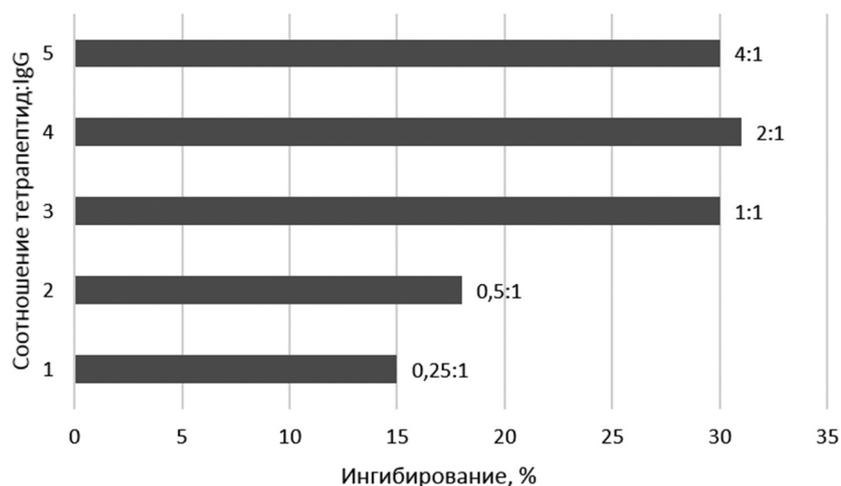


Рис. 1. Зависимость значений ингибирования Fc-фрагмента IgG в присутствии тетрапептида в различных молярных соотношениях

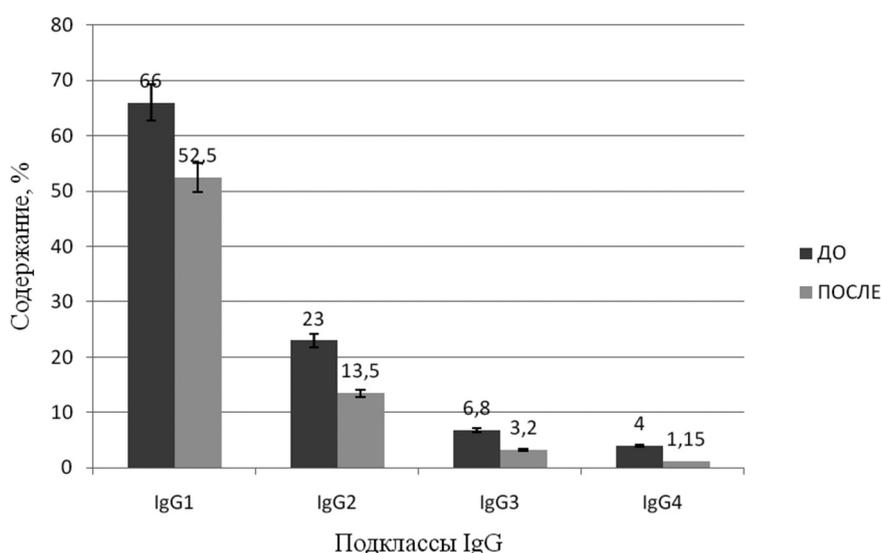


Рис. 2. Изменение относительного содержания подклассов IgG до и после образования комплекса с тетрапептидом

ветствующие исходным. Также было отмечено, что взаимодействия тетрапептида с моноклональными антителами (как с иммобилизованными, так и мечеными пероксидазой) не наблюдается.

Для образца без предварительного образования комплекса «тетрапептид-IgG» было установлено, что ингибирование Fc-участка было значительно меньше, чем для предварительно полученного комплекса «тетрапептид-Fc-фрагмент IgG». Незначительное ингибирование в этом случае может быть обусловлено недостаточным временем взаимодействия тетрапептида с иммуноглобулином, а также неспецифическим взаимодействием тетрапептида с иммобилизованными и мечеными антителами.

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что при проведении иммуноферментного анализа образуется устойчивый комплекс Fc-фрагмента иммуноглобулина G и синтезированного тетрапептида. Таким образом, тетрапептид Phe-Gln-Phe-Tyr-OMe является функционально активным в отношении Fc-фрагмента иммуноглобулина G.

При проведении исследования эффективности связывания различных подклассов IgG изучаемым тетрапептидом показана достаточно высокая степень связывающей активности тетрапептида по отношению ко всем подклассам. Так, процент ингибирования Fc-фрагмента подклассов IgG возрастает от IgG1 до IgG4 и составляет: IgG1 – 20,45 %; IgG2 – 41,3; IgG3 – 52,94; IgG4 –

71,25 %. Это может быть обусловлено высокой аффинностью тетрапептида к Fc-фрагменту IgG, так как именно в зависимости от типа тяжелой цепи иммуноглобулины класса G подразделяются на 4 подкласса. Данные по этому типу иммуноанализа представлены на гистограмме, отражающей изменение относительного содержания подклассов IgG до и после образования комплекса с тетрапептидом (рис. 2).

Заключение. В результате проведенных с помощью Программы оптимизации структуры белков и расчета конформаций исследований установлено, что тетрапептид Ph-Gln-Phe-Tyr-OMe предположительно является участком активного центра протеина A для связывания Fc-фрагмента иммуноглобулинов класса G, для получения которого разработана оптимальная схема химического синтеза. Проведено исследование одной из важнейших функциональных характеристик полученного тетрапептида, а именно его связывание с Fc-фрагментом иммуноглобулинов класса G. Полученные данные показывают, что тетрапептид является функционально активным в отношении общего IgG и его подклассов.

Список использованной литературы

1. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity / M. Graille [et al.] // PNAS. – 2000. – Т. 97, № 10. – С. 5399–5404.
2. Protein A-specific monoclonal antibodies and prevention of *Staphylococcus aureus* disease in mice / H. K. Kim [et al.] // Infection and Immunity. – 2012. – Т. 80, № 10. – С. 3460–3470.
3. Protection of apoptotic cell death by protein / P. K. Ray [et al.] // Apoptosis. – 2000. – Т. 5, № 6. – С. 509–514.
4. Protein A of *Staphylococcus aureus* evokes Th1 type response in mice / P. Sinha [et al.] // Immunol. Lett. – 1999. – Т. 67, № 3. – С. 157–165.
5. Braun, N. Immunoabsorption as a tool for the immunomodulation of the humoral and cellular immune system in autoimmune disease / N. Braun, T. Risler // Ther. Apher. – 1999. – Т. 3, № 3. – С. 240–245.
6. Effect of protein A immunoabsorption in nephrotic syndrome of various etiologies / V. L. Esnault [et al.] // J. Am. Soc. Nephrol. – 1999. – Т. 10, № 9. – С. 2014–2017.
7. Duggleby, C. J. Cloning and expression of the *Staphylococcus aureus* protein A gene in *Escherichia coli* / C. J. Duggleby, S. A. Jones // Nucleic Acids Research. – 1983. – Т. 11, № 10. – С. 3065–3076.
8. UniProt KB [Electronic resource]. – Mode of access: [http:// www.uniprot.org/uniprot/P38507](http://www.uniprot.org/uniprot/P38507). – Date of access: 19.04.2015.
9. RCSB Protein Data Bank [Electronic resource]. – Mode of access: [http:// www.pdb.org/pdb/explore.do? structureId=1FC2](http://www.pdb.org/pdb/explore.do?structureId=1FC2). – Date of access: 19.04.2015.
10. Comprehensive 3D-modeling of allergenic proteins and amino acid composition of potential conformational IgE epitopes / N. Oezguen [et al.] // Mol. Immunol. – 2008. – Т. 45, № 14. – С. 3740–3747.
11. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров [и др.]. – М., 1991.
12. IgG subclass profiles in normal human sera of antibodies specific to five kinds of microbial antigens / A. Hjelholt [et al.] // Pathog. Dis. – 2013. – Т. 67, № 3. – С. 206–213.

Поступила в редакцию 29.05.2015