



УДК 577.112.6:577.27.083.3

СИНТЕЗ И ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ
АНТИГЕННОЙ ДЕТЕРМИНАНТЫ Н-2D^b-МОЛЕКУЛЫ
ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ МЫШИ

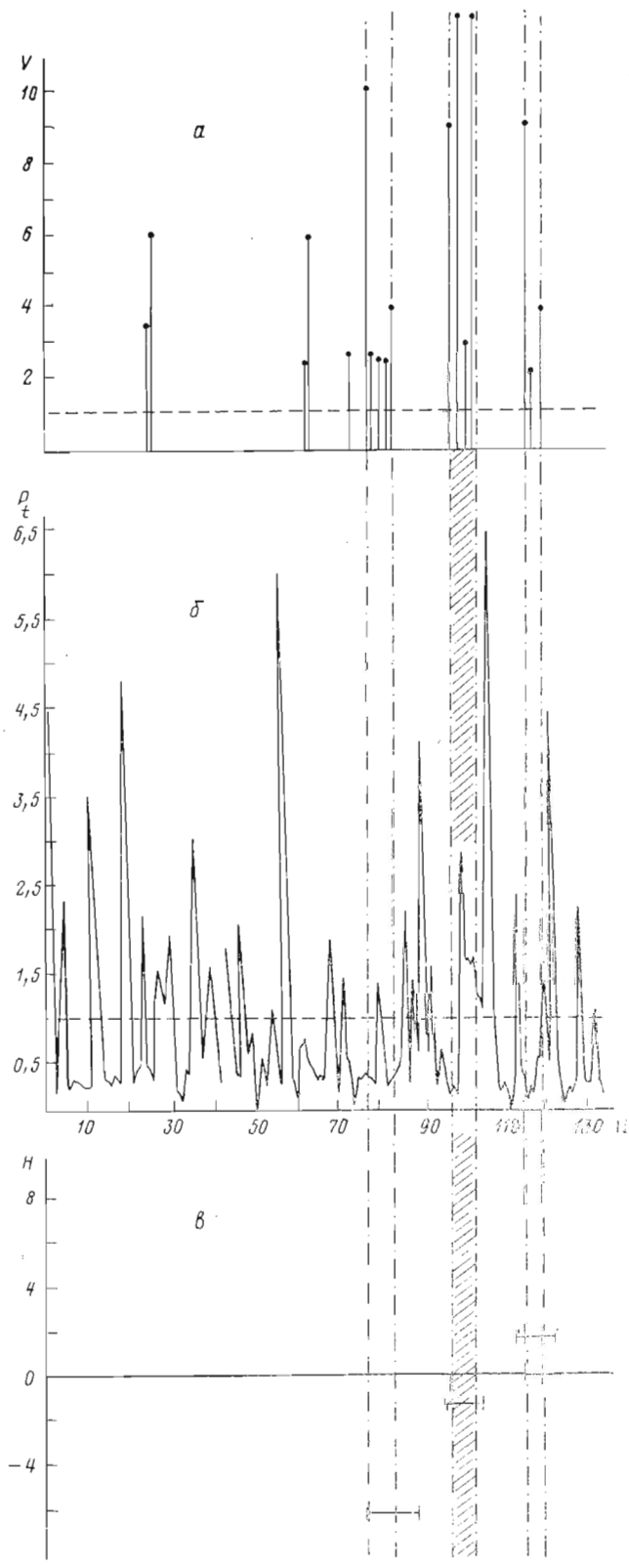
*Юровский В. В., Сафонова Н. Г., Хайдуков С. В.,
Василов Р. Г., Демин В. В.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

На основании анализа первичной структуры антигенов I класса главного комплекса гистосовместимости мыши синтезирован гексапептид Leu-Gln-Gln-Leu-Ser-Gly, гомологичный участку 95–100 тяжелой цепи Н-2D^b-антигена. Синтез гексапептида проводили последовательным наращиванием пептидной цепи, начиная с С-концевого Gly. Получены кроличьи антитела против гексапептида и показано, что они специфически взаимодействуют как с очищенным, так и с находящимся на поверхности клеток Н-2D^b-антигеном. Полученные антитела связываются с лимфоцитами мышей С57BL/6 (гаплотип Н-2^b), но не BALB/c (Н-2^d) или SWA (Н-2^k). Эти данные позволяют предположить, что участок 95–100 может обуславливать серологическое различие между аллелями Н-2-антигенов, т. е. может служить не только ксенотиписической, но и аллотипической детерминантой молекулы Н-2D^b. Это подтверждено взаимодействием гексапептида с аллогенными моноклональными антителами, специфичными к Н-2D^b-антигену.

Высокополиморфные антигены I класса главного комплекса гистосовместимости (Н-2K-, D-, L-антигены мыши) играют важную роль в межклеточных взаимодействиях в иммунной системе. Они не только являются мишенями, распознаваемыми антителами и аллореактивными цитолитическими Т-лимфоцитами, но и участвуют в представлении чужеродных антигенов, таких, как вирусные белки, которые распознаются только в сочетании с антигенами I класса главного комплекса гистосовместимости клеток-мишеней. Антигены I класса представляют собой интегральные мембранные гликопротеины и состоят из двух нековалентно связанных полипептидов с молекулярными массами 45 000 и 12 000 Да. Тяжелая цепь — гликопротеин, несет детерминанты, ответственные за аллоспецифичность, и кодируется главным комплексом гистосовместимости, локализованным на 17-й хромосоме мыши. Тяжелая цепь состоит из трех внешних доменов ($\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$), гидрофобной трансмембранной и цитоплазматической частей. Эти домены кодируются отдельными экзонами, разделенными интронами, на 17-й хромосоме [1]. Легкая цепь — сывороточный белок, β_2 -микроглобулин, который не гликозилирован, не содержит аллотипических детерминант и кодируется за пределами главного комплекса гистосовместимости, на 2-й хромосоме. Ассоциация β_2 -микроглобулина с тяжелой цепью необходима для экспрессии антигенов I класса на клеточной поверхности и меняет антигенные характеристики тяжелых цепей молекул Н-2K и D [2].

В настоящее время установлена полная аминокислотная последовательность ряда Н-2-антигенов, а также клонированы некоторые кодирующие их гены [3–6]. В то же время ряд ключевых вопросов, в частности взаимосвязь между антигенными участками и функциональными свойствами Н-2-антигенов, остается перешенным. Исследованиям молекулярной природы функциональных доменов и антигенной структуры Н-2-антигенов мешает отсутствие данных о пространственной структуре этих молекул, а также использование до последнего времени антител, направленных к ограниченному числу структурно неохарактеризованных антигенных детерминант.



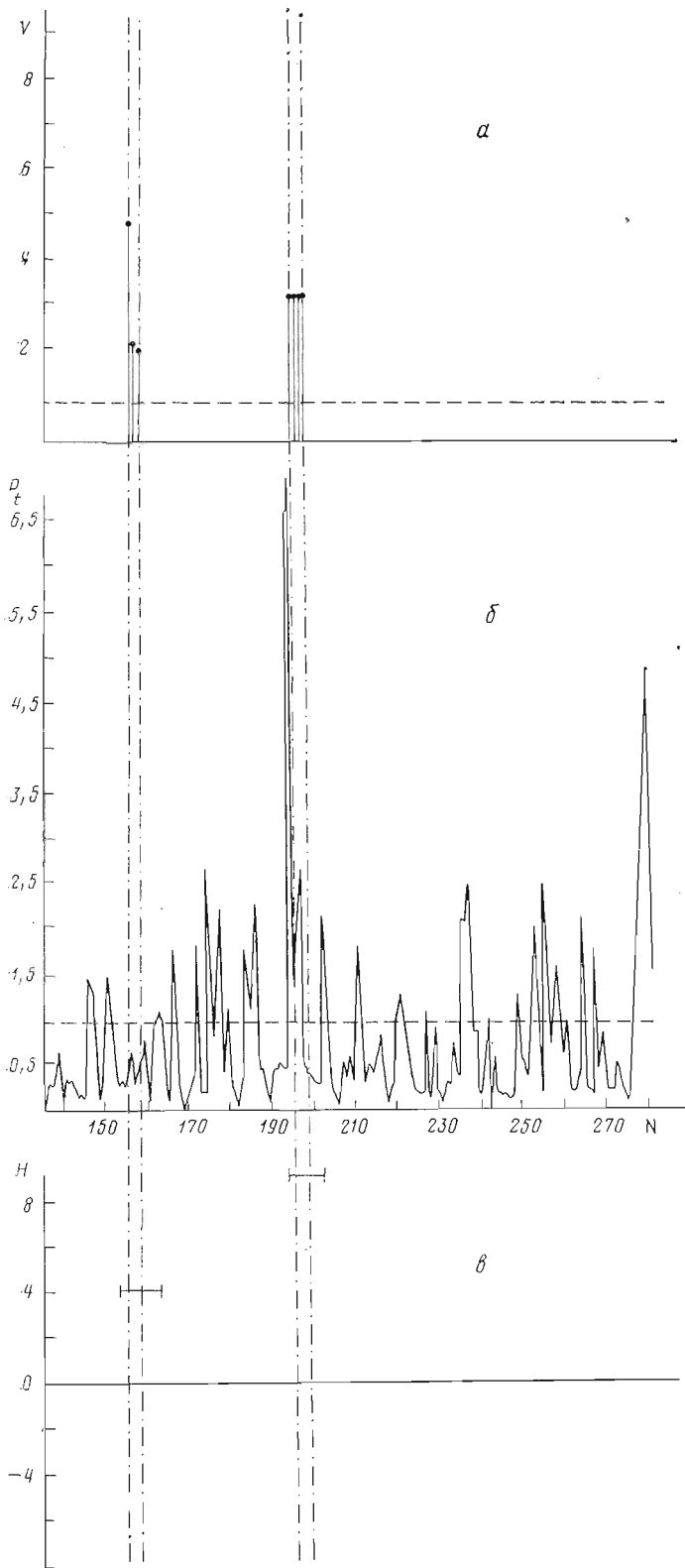


Рис. 1. Анализ первичной структуры антигенов гистосовместимости мыши: *a* — расчет variability (V) отдельных аминокислотных остатков тяжелой цепи H-2-антигенов; *б* — расчет вероятности (P_t) образования тетрапептидных β -изгибов в молекуле H-2D^b; *в* — расчет гидрофильности (H) отдельных участков в молекуле H-2D^b; N — номер аминокислотного остатка. Вертикальными штрихпунктирными линиями показаны участки повышенной variability. Заштрихованный участок соответствует фрагменту, выбранному для синтеза

Недавно для изучения функциональной топографии Н-2-антигенов были использованы два новых подхода. Во-первых, с помощью генной инженерии были получены гибридные молекулы Н-2 и установлено, какие домены ответственны за их определенные функции [7]. Во-вторых, были синтезированы короткие пептиды, соответствующие участкам полипептидной цепи антигенов гистосовместимости мыши и человека, и антителам, полученным к этим пептидам, использованы для функционального изучения Н-2-антигенов [8–11]. Последний подход наиболее перспективен для изучения антигенной структуры белков, а также для создания искусственных молекул, моделирующих их действие (в частности, для конструирования синтетических вакцин).

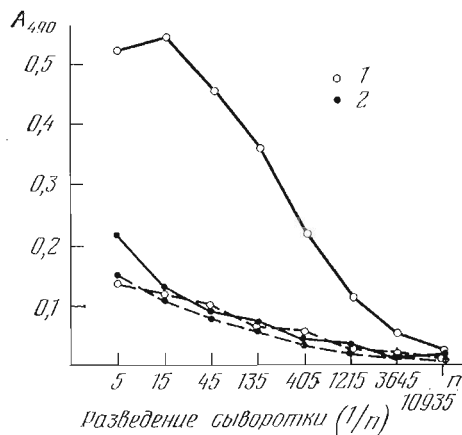


Рис. 2. Кривые иммуноферментного анализа антисыворотки против гексапептида-KLH (1) и нормальной кроличьей сыворотки (2). Сплошной линией показано связывание с конъюгатом гексапептид-овальбумин, пунктирной — связывание с овальбумином

В данной работе описан синтез фрагмента тяжелой цепи Н-2D^b-антигена и исследование структуры этого белка с помощью антител, полученных к пептиду.

Синтез фрагмента Н-2D^b-антигена. На основании расчета вариабельности отдельных аминокислотных остатков тяжелых субъединиц антигенов гистосовместимости мыши [3–6, 12–15] были выявлены пять участков повышенной вариабельности этих молекул (рис. 1а): 77–83, 95–100, 114–119, 155–157 и 195–

198. Большинство участков расположено в двух N-концевых доменах тяжелых цепей. Анализ аминокислотной последовательности Н-2D^b-антигена, проведенный с целью выявления участков, имеющих конформацию β-изгиба, показал (рис. 1б), что вероятность образования такой структуры среди участков повышенной вариабельности (отмечены штрихпунктирными линиями) наиболее высока для участка 95–100 и превышает значение порогового уровня (1,0). Поэтому представлялось вероятным, что участок 95–100 тяжелой цепи Н-2D^b-антигена может располагаться в области антигенной детерминанты, хотя он и не проявляет выраженной гидрофильности (рис. 1в).

Синтез пептида Leu-Gln-Gln-Leu-Ser-Gly, гомологичного последовательности 95–100 Н-2D^b-антигена, был осуществлен методом последовательного наращивания пептидной цепи, начиная с C-конца. Замена остатка Met на Leu в положении 4 проведена с целью создания условий для синтеза более длинных пептидных фрагментов и оправдана структурным сходством остатков Met и Leu, делающим их функционально взаимозаменяемыми [16, 17]. Полученные нами данные подтверждают возможность такой замены (см. ниже).

Иммунохимическое изучение Н-2-антигенов с помощью моноспецифических антител к гексапептиду. Гексапептид был конъюгирован с гемоцианином моллюска фиссуреллы (KLH), и конъюгат использован для иммунизации кролика. Полученная антисыворотка была проверена на связывание с гексапептидом, конъюгированным с овальбумином (рис. 2). Антисыворотка связывается с пептидом с высоким титром (до 2000). Антитела, специфичные к гексапептиду, были аффинно очищены на иммуносорбенте, приготовленном путем иммобилизации гексапептида на Affi-Gel 10.

Представлялось интересным выяснить, связываются ли полученные антитела с нативными молекулами антигенов гистосовместимости. Анализ взаимодействия антител с выделенной надмембранной частью нативного Н-2D^b-антигена [18] показал, что антитела взаимодействуют с этой

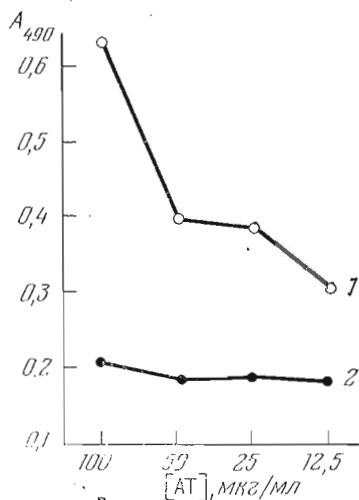


Рис. 3

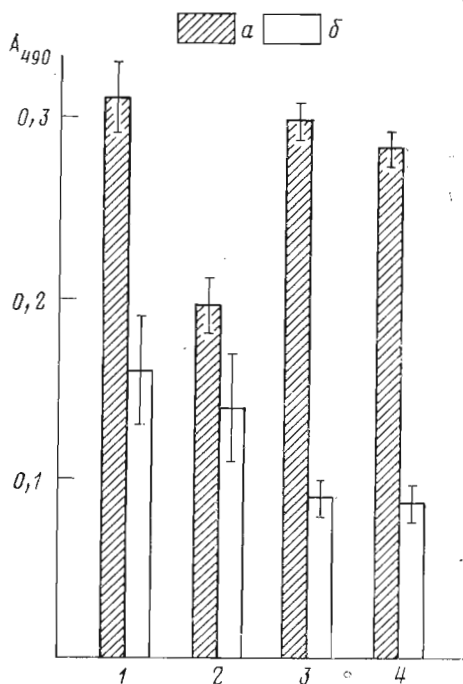


Рис. 4

Рис. 3. Связывание аффинно очищенных антител (АТ) кролика против гексапептида (1) и нормальных иммуноглобулинов кролика (2) с надмембранной частью H-2D^b-антигена, выделенной по методу [18]

Рис. 4. Связывание антител против гексапептида (а) и нормальных иммуноглобулинов кролика (б) с H-2D^b-антигеном: 1 — в отсутствие конкурентного ингибитора; 2 — в присутствии гексапептида (1 мг/мл); 3 — в присутствии пептида II (1 мг/мл); 4 — в присутствии пептида III (1 мг/мл). Концентрация антител и иммуноглобулинов 12,5 мкг/мл

молекулой (рис. 3) и это взаимодействие специфически ингибируется гексапептидом (рис. 4).

С помощью реакции микроцитотоксичности было установлено, что антитела к гексапептиду взаимодействуют со спленоцитами мышей C57BL/6, а также с клетками лимфомы EL-4 (гаплотип H-2^b) (данные не приведены). Следовательно, эти антитела распознают H-2-антигены на поверхности клеток.

Взаимодействие аффинно очищенных антител к гексапептиду с лимфоцитами мышей разных гаплотипов (b, d и k) было исследовано с помощью проточной цитофлуориметрии в системе биотин — авидин (рис. 5). Из представленных результатов следует, что антитела к пептиду специфически связываются с клетками гаплотипа b и не связываются с клетками других гаплотипов (d и k). Это означает, что эпитоп, распознаваемый данными антителами, т. е. участок 95—100, обуславливает серологическое различие между аллелями H-2-антигенов, т. е. может служить не только ксенотипической, но и аллотипической детерминантой молекулы H-2D^b.

Взаимодействие моноклональных антител к H-2D^b-антигену с гексапептидом. Приведенные выше данные позволяют предположить, что исследуемый гексапептид может имитировать аллотипическую детерминанту H-2D^b-антигена. Для проверки этого предположения было исследовано взаимодействие гексапептида с набором аллогенных моноклональных антител, специфичных к молекуле H-2D различных гаплотипов (таблица), с помощью твердофазного иммуоферментного анализа. Результаты анализа (рис. 6) свидетельствуют о том, что из 8 исследованных моноклональных антител специфическим средством к гексапептиду обладают 3 антитела, направленных против H-2D^b-антигена (H141-29,

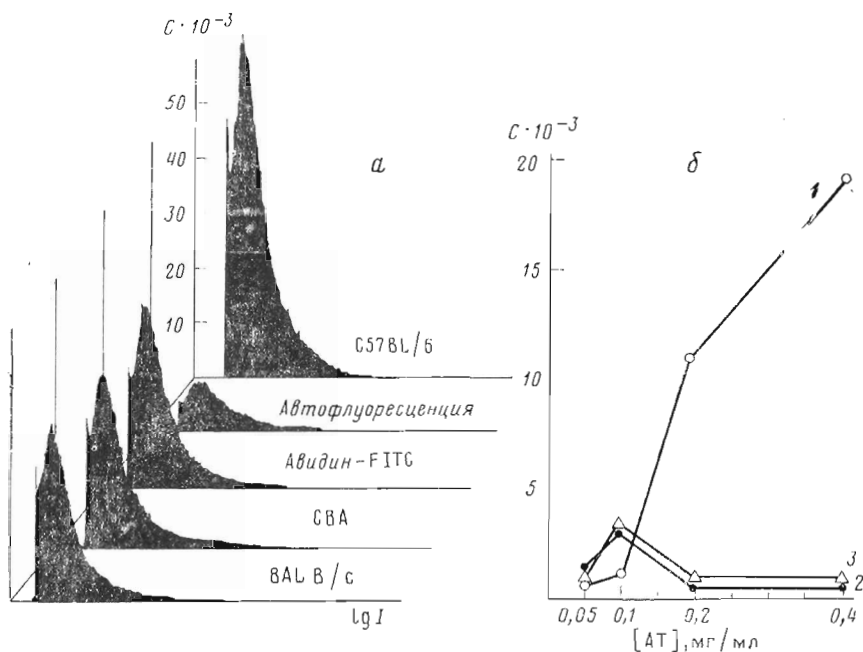


Рис. 5. Анализ H-2-антигенов на поверхности лимфоцитов с помощью антител к гексапептиду проточной цитофлуориметрией: а — гистограммы распределения светящихся клеток; б — зависимость количества окрашенных лимфоцитов от концентрации добавленных антител (АТ) (результаты математической обработки гистограмм). 1 — лимфоциты мышей C57BL/6 (гаплотип H-2^b), 2 — BALB/c (H-2^d), 3 — CVA (H-2^k), I — интенсивность флуоресценции, C — количество светящихся клеток

H141-31 и H142-45). Антитела H141-44 и H142-23, специфичные к молекуле H-2D^k, связываются с гексапептидом не сильнее нормальной мышичьей сыворотки, так же как и остальные исследованные антитела, которые, хотя и взаимодействуют с H-2D^b-антигеном, распознают, по видимому, другие участки на поверхности этой молекулы.

С помощью осаждения сульфатом аммония комплекса ¹²⁵I-меченого гексапептида с антителом H141-29 и анализа по Скэтчарду была определена константа связывания этого антитела с гексапептидом — $1,3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (рис. 7). Эта величина лишь на порядок меньше константы взаимодействия моноклональных антител с антигенами гистосовместимости [20], что свидетельствует о гомологичности пространственной структуры антигенной детерминанты, распознаваемой антителом H141-29 в молекуле H-2D^b-антигена, и исследуемого гексапептида в растворе. Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что участок 95–100 тяжелой цепи H-2D^b-антигена является аллотипической детерминантой этой молекулы.

Представлялось интересным сравнить полученные данные с результатами работы [21], в которой исследовалась топография антигенных

Краткая характеристика моноклональных антител, исследованных на связывание с гексапептидом [19]

Антитело	Класс (или подкласс) иммуноглобулинов	Специфичность
H141-11	μκ	анти-H-2K ^{k,q,b} D ^b
H141-29	μκ	анти-H-2D ^b
H141-30	γ ₂ κ	анти-H-2D ^b
H141-31	γ ₂ κ	анти-H-2D ^b
H141-44	μκ	анти-H-2D ^k
H141-51	μκ	анти-H-2D ^{b,q}
H142-23	γ _{2b} κ	анти-H-2K ^{k,a,s,b} D ^k
H142-45	γ _{2b} κ	анти-H-2K ^{k,b,q} D ^{b,k}

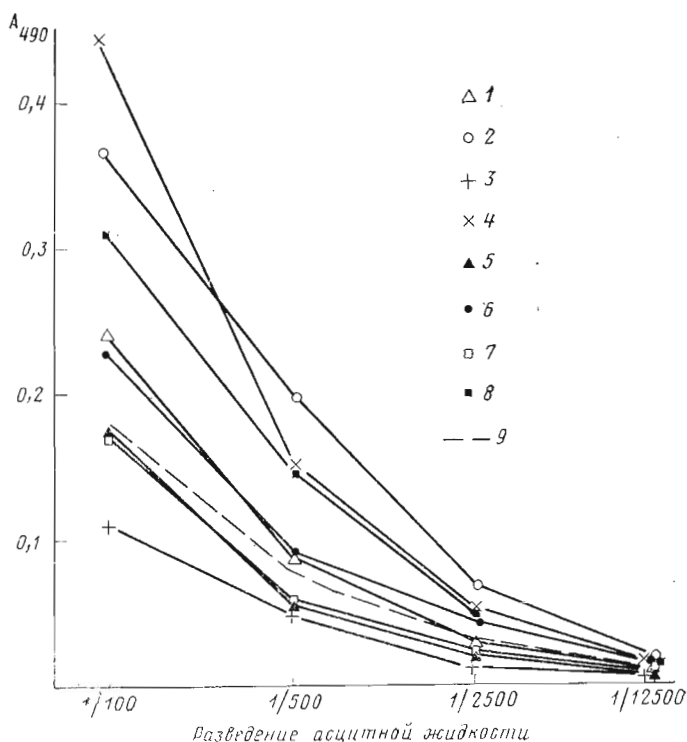


Рис. 6. Кривые иммуноферментного анализа связывания асцитов Н141-11 (1), Н141-29 (2), Н141-30 (3), Н141-31 (4), Н141-44 (5), Н141-51 (6), Н142-23 (7), Н142-45 (8) и нормальной мышечной сыворотки (9) с конъюгатом гексапептид-овальбумин. Кривые связывания асцитов с овальбумином не приведены; они во всех случаях не превышают связывания нормальной мышечной сыворотки

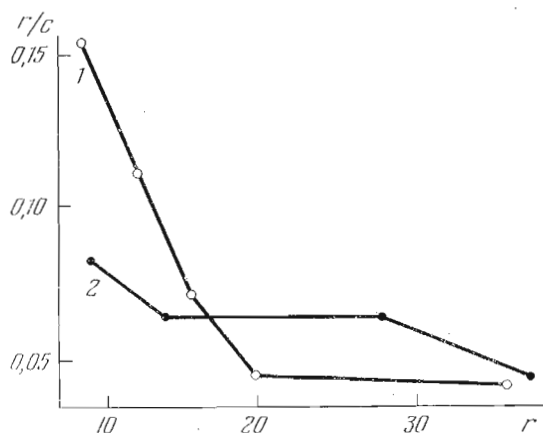


Рис. 7. Анализ связывания моноклональных антител Н141-29 (1) и нормальных мышечных иммуноглобулинов (2) с $[^{125}\text{I}]$ гексапептидом по методу Скэтчарда. с — концентрация добавленного $[^{125}\text{I}]$ гексапептида (нМ), г — концентрация связанного $[^{125}\text{I}]$ гексапептида (нМ)

детерминант молекулы Н-2К^b с помощью взаимодействия моноклональных антител с Н-2К^b-мутантами, а также конкурентного связывания моноклональных антител. Было показано, что аллоантигенные детерминанты молекулы Н-2К^b сгруппированы в три кластера: первый включает остатки приблизительно со 155-го по 165-й, второй — 77–89, а третий (с которым связывается и антитело Н142-45) расположен между ними и, возможно, частично перекрывается со вторым. Можно предположить, что моноклональное антитело Н142-45 распознает один и тот же участок (или перекрывающиеся последовательности) у антигенов Н-2К^b и Н-2D^b.

Недавно с помощью генной инженерии были получены гибридные молекулы Н-2-антигенов и показано, что аллотипические детерминанты этих молекул расположены в $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -доменах, причем для большинства детерминант необходимо наличие одновременно обоих сиогенных доменов [7]. На основании этого авторы пришли к заключению, что эпитопы антигенов I класса являются конформационно зависимыми. Из наших данных следует, что аллотипическая детерминанта Н-2D^b-антигена, распознаваемая антителом Н141-29, линейна и расположена на участке соединения $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -доменов.

Методический подход, использованный в данной работе и основанный на синтезе олигопептидов, имитирующих предполагаемые антигенные детерминанты, в настоящее время начинает широко применяться для изучения структуры и функции белков иммунной системы, таких, как продукты главного комплекса гистосовместимости [8—11], иммуноглобулины [22], интерферон [23], гемагглютинин вируса гриппа [24]. Это связано, в частности, с тем, что антигенные детерминанты этих белков являются, по-видимому, участками, ответственными за их основные функции. Поэтому синтетические антигенные детерминанты Н-2-молекул могут быть использованы для моделирования их активности в таких процессах, как иммунологическое распознавание, идиотипическая регуляция иммунного ответа, индукция иммунологической толерантности и т. п. Перспективным представляется также использование синтетических антигенных детерминант и моноклональных антител для получения иммунных комплексов с целью изучения структуры антигенсвязывающих центров иммуноглобулинов.

Экспериментальная часть

Синтез пептида. Выбор синтезируемой последовательности основывался на анализе первичной структуры тяжелой цепи Н-2D^b-антигена мыши [4] по методу Чоу и Фасмана [25], позволяющему рассчитывать вероятность образования тетрапептидных β -изгибов (P_t) как произведение частот встречаемости аминокислотных остатков в каждой из четырех позиций, и по методу Хопса и Вудса [26], позволяющему оценивать относительную гидрофильность (H) различных участков полипептидной цепи. При сравнении первичных структур тяжелых цепей антигена Н-2D^b и других антигенов гистосовместимости I класса была рассчитана вариабельность (V) отдельных участков по формуле Бу и Кабата [27]:

$$V = N_A / N_B,$$

где N_A — число различных аминокислот, встречающихся в данной позиции; N_B — частота наиболее распространенной аминокислоты в этой позиции.

Выбранный гексапептид Leu-Gln-Gln-Leu-Ser-Gly был синтезирован методом последовательного наращивания пептидной цепи, начиная с С-концевого глицина. В ходе синтеза была применена тактика максимальной защиты полифункциональных аминокислот гидрофобными группировками бензильного типа. Для защиты концевой СООН-группы глицина был использован этиловый эфир; для временного блокирования α -аминогруппы использовали Вос-группировку; гидроксильную группу серина бензилировали. Для образования пептидных связей применяли методы смешанных ангидридов, питрофениловых и N-оксисулцинимидных эфиров. Очистку защищенного гексапептида осуществляли адсорбционной хроматографией на силикагеле. Снятие защитных группировок проводили в несколько стадий. Этиловый эфир с СООН-группы удаляли омылением; бензильную защиту серина снимали каталитическим гидрированием. Для снятия Вос-группировки использовали трифторуксусную кислоту в различных растворителях (хлороформ, хлористый метилен, вода). Очистку деблокированного гексапептида осуществляли ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-сефадексе G-25. Гомогенность синтезиро-

ванного пептида подтверждена ТСХ, аминокислотным анализом и определением N-концевой аминокислоты.

Иммобилизация пептида на белковом носителе. Полученный гексапептид иммобилизовали по NH_2 -группе лейцина на гемоцианине моллюска фиссуреллы (KLH) (Sigma, США) по методике [28]. 2 мг пептида растворяли в 2 мл натрий-фосфатного буфера (0,1 М, pH 7,0), содержащего 15 мг KLH. Затем добавляли 1 мл 21 мМ водного раствора глутаральдегида по каплям в течение 1 ч при 20° С. Смесь выдерживали 14 ч и диализовали против натрий-фосфатного буфера. Аналогичным образом иммобилизовали гексапептид на овальбумине. Степень иммобилизации, оцениваемая по поглощению при 206 нм диализирующего буфера, составляла 70–80%.

Получение моноспецифических кроличьих антител против гексапептида. Для получения антисыворотки кролика иммунизировали подкожно с интервалами в 2 недели. Для первичной иммунизации было взято 200 мкг конъюгата гексапептид-КЛН в полном адъюванте Фрейнда, для второй и третьей иммунизации — по 100 мкг конъюгата в неполном адъюванте. Кровь брали из ушной вены через 10 сут после третьей иммунизации. Сыворотку получали путем центрифугирования 15 мин при 1600 g после выдерживания крови при 4° С в течение 2 ч.

Выделение моноспецифических антител из антисыворотки проводили аффинной хроматографией на иммуносорбенте, приготовленном путем иммобилизации 10 мг гексапептида на 2,5 мл Affi-Gel 10 (Bio-Rad, США) по методике [29]. На колонку с иммуносорбентом, уравновешенным натрий-фосфатным буфером, содержащим 0,15 М NaCl (PBS), нанесли 5 мл антисыворотки и элюировали несвязавшийся материал PBS. Специфически связавшиеся антитела элюировали тем же буфером, но содержащим 1 М NaCl, и концентрировали с помощью насадки CX 10 (Millipore, США). Выход — 473 мкг аффинно очищенных антител.

Моноклональные антитела. Гибридомные линии, продуцирующие моноклональные антитела против антигенов гистосовместимости мыши, получены из лаборатории Г. Хэммерлинга (Гейдельберг, ФРГ). Гибридомы пассировали на мышцах линии BALB/c. Моноклональные антитела выделяли из асцитной жидкости мышей по методу [30]. Анализ иммуноглобулинов проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [31].

Надмембранную часть H-2D^b-антигена выделяли с помощью папаинового гидролиза из клеток лимфомы EL-4, как описано ранее [18].

Твердофазный иммуноферментный анализ проводили по методике [18]. При конкурентном анализе одновременно с антителами против гексапептида добавляли 10 мкл гексапептида в концентрации 1 мг/мл или то же количество негомологичных пептидов, имеющих строение Glu-Pro-Gln-Val-Tyr (пептид II) и Arg-Pro-Asp-Val-Tyr (пептид III), полученных из Института органического синтеза АН ЛатвССР. В качестве субстрата для пероксидазы использовали о-фенилендиамин и измеряли поглощение продуктов реакции при 490 нм на приборе MicroELISA Auto Reader MR580 (Dynatech, США).

Тестирование антител против гексапептида непрямой иммунофлуоресценцией. Аффинно очищенные антитела кролика против гексапептида конъюгировали с биотином по методу [32]. По тому же методу получали конъюгат авидин-флуоресцеинизотиопианат (FITC). Флуоресцентное окрашивание лимфоцитов селезенки проводили по модифицированной методике [33] следующим образом. Селезенку мышей C57BL/6, BALB/c или SWA гомогенизировали и отмывали спленocytes 2 раза средой 199. Лимфоциты отделяли центрифугированием в градиенте Ficoll-Paque (Pharmacia, Швеция) при 450 g в течение 30 мин и затем дважды отмывали PBS, содержащим 10% сыворотки новорожденного теленка (NBCS) (Gibco, США). К 100 мкл суспензии, содержащей 10⁶ клеток, добавляли 10 мкл антител, конъюгированных с биотином, в различных концентрациях. После 30 мин инкубации при 20° С добавляли 1 мл холодного PBS, содержащего 10% NBCS, наслаивали суспензию на 5 мл

100% NBCS и центрифугировали 15 мин при 200 g. Супернатант тщательно удаляли и добавляли к клеткам 100 мкл PBS, содержащего 10% NBCS, и 5 мкл конъюгата авидин-FITC. После 30 мин инкубации отмывали клетки аналогичным образом.

Для анализа окрашенных клеток использовали цитофлуориметр EPICS-5 (Coultronics, Франция), оборудованный лазером Spectra Physics 164-05 (США). Измерение интенсивности флуоресценции проводили при мощности лазера 600 мВт с длиной волны возбуждения 488 нм по логарифмическому каналу со скоростью анализа 2560 клеток в секунду, с ограничением по светорассеянию.

Определение константы связывания моноклональных антител с гексапептидом. Гексапептид был помечен ^{125}I по NH_2 -концу с помощью реагента Болтона — Хантера [34]. Удельная радиоактивность [^{125}I] гексапептида 34 473 имп/(мин·пмоль). Связывание моноклональных антител с пептидом определяли по модифицированному методу Фарра [35] следующим образом. К 40 мкл антител (0,1 мкг/мл) добавляли 20 мкл [^{125}I] гексапептида в различных концентрациях и инкубировали 1 ч при 37°С и 1 ч при 4°С. Затем к инкубационной смеси добавляли 140 мкл сыворотки крупного рогатого скота и осаждали иммуноглобулины насыщенным раствором сульфата аммония, доводя его концентрацию до 50%. Центрифугировали 15 мин при 3000 g и осадок промывали 2 раза 50% сульфатом аммония, после чего измеряли радиоактивность осадка на счетчике CompuGamma (ЛКВ, Швеция). Расчет константы связывания антител с пептидом проводили по методу Скэтчарда [36].

Авторы выражают искреннюю благодарность Ю. А. Овчинникову и В. Т. Иванову за ценные критические замечания и постоянное внимание к данной работе, а также П. В. Костецкому за помощь при анализе первичной структуры H-2D^b-антигена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Steinmetz M., Moore K. W., Frelinger J. G., Sher B. T., Shen F.-W., Boyse E. A., Hood L. Cell, 1981, v. 25, № 3, p. 683–692.
2. Yokoyama K., Nathenson S. G. J. Immunol., 1983, v. 130, № 3, p. 1419–1425.
3. Coligan J. E., Kindt T. J., Uehara H., Martinko J., Nathenson S. G. Nature, 1981, v. 291, № 5810, p. 35–39.
4. Reyes A. A., Schödl M., Wallace R. B. Immunogenetics, 1982, v. 16, № 1, p. 1–9.
5. Kvist S., Roberts L., Dobberstein B. EMBO J., 1983, v. 2, № 2, p. 245–254.
6. Arnold B., Burgert H.-G., Archibald A. L., Kvist S. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 24, p. 9473–9487.
7. Arnold B., Burgert H.-G., Hamann U., Hämmerling G., Kees U., Kvist S. Cell, 1984, v. 38, № 1, p. 79–87.
8. Singh B., Fraga E., Widtman J. J. Cell. Biochem., 1984, Abstr. Suppl. 8A, p. 154.
9. Church W. R., Walker L. E., Houghten R. A., Reisfeld R. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, № 1, p. 255–258.
10. Chersi A., Schulz G., Houghten R. A. Mol. Immunol., 1984, v. 21, № 10, p. 847–852.
11. Rougon G., Ceard B., Van Rietschoten J., Jordan B., Barbet J. Mol. Immunol., 1984, v. 21, № 6, p. 461–468.
12. Coligan J. E., Kindt T. J., Nairn R., Nathenson S. G., Sachs D. H., Hansen T. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 2, p. 1134–1138.
13. Nairn R., Nathenson S. G., Coligan J. E. Eur. J. Immunol., 1980, v. 10, № 7, p. 495–503.
14. Nairn R., Nathenson S. G., Coligan J. E. Biochemistry, 1981, v. 20, № 16, p. 4739–4745.
15. Nairn R., Yamaga K., Nathenson S. G. Ann. Rev. Genet., 1980, v. 14, p. 241–277.
16. Moroder L., Göhring W., Nyfeler R., Scharf R., Thamm P., Wendlberger G. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1983, B. 364, № 2, C. 157–171.
17. Brown E., Sheppard R. C., Williams B. J. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1983, № 6, p. 1161–1167.
18. Юровский В. В., Василов П. Г. Биол. мембраны, 1984, т. 1, № 8, с. 814–822.
19. Lemke H., Hämmerling G. J., Hämmerling U. Immunol. Rev., 1979, v. 47, p. 175–206.
20. Trucco M., de Petris S. In: Immunological Methods/Ed. Lefkovits I., Pernis B. N.Y.: Acad. Press, 1981, v. 2, p. 1–26.
21. Hämmerling G. J., Rüsck E., Tada N., Kimura S., Hämmerling U. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 15, p. 4737–4741.
22. Chen P. P., Houghten R. A., Fong S., Rhodes G. H., Gilbertson T. A., Vaughan J. H., Lerner R. A., Carson D. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 6, p. 1784–1788.
23. Chow T. P., DeGrado W. F., Knight E., Jr. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 19, p. 12220–12225.

24. Shapira M., Jibson M., Muller G., Arnon R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 8, p. 2461-2465.
25. Chou P. Y., Fasman G. D. Adv. Enzymol., 1978, v. 47, p. 45-148.
26. Hopp T. P., Woods K. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 6, p. 3824-3828.
27. Wu T. T., Kabat E. A. J. Exp. Med., 1970, v. 132, № 2, p. 211-250.
28. Pfaff E., Mussgay M., Böhm H. O., Schulz G. E., Schaller H. EMBO J., 1982, v. 1, № 7, p. 869-874.
29. Materials, Equipment and Systems for Chromatography, Electrophoresis, Immunochemistry and HPLC. Richmond: Bio-Rad Laboratories, 1981, p. 48.
30. Parham P. In: Methods in Enzymology. V. 92, pt. E/Ed. Langone J. J., Van Vunakis H. N.Y. Acad. Press, 1983, p. 110-138.
31. Laemmli U. K. Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680-685.
32. Wilchek M., Bayer E. Immunology Today, 1984, v. 5, № 2, p. 39-43.
33. Thomas K., Engers H. D., Cerottini J.-C., Brunner K. T. Eur. J. Immunol., 1976, v. 6, № 4, p. 257-262.
34. Bolton A. E., Hunter W. M. Biochem. J., 1973, v. 133, № 3, p. 529-538.
35. Hudson L., Hay F. C. Practical Immunology. Oxford: Blackwell Sci. Publ., 1980, p. 96-98.
36. Scatchard G. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1949, v. 51, Art 4, p. 660-672.

Поступила в редакцию
28.VI.1985

SYNTHESIS AND IMMUNOCHEMICAL STUDY OF AN ANTIGENIC DETERMINANT OF H-2D^b MOLECULE OF THE MURINE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX

YUROVSKY V. V., SAFONOVA N. G., KHAIDUKOV S. V.,
VASILOV R. G., DEMIN V. V.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Primary structure of murine class I histocompatibility antigens has been analysed to select possible antigenic determinant. Hexapeptide Leu-Gln-Gln-Leu-Ser-Gly, homologous to the region 95-100 of the H-2D^b antigen heavy chain, was synthesised by stepwise elongation of peptide chain beginning from the COOH-terminal Gly. Rabbit anti-hexapeptide antibodies were obtained and shown to interact specifically with purified H-2D^b antigen as well as with the native antigen on cell surface. These antibodies bind to lymphocytes of H-2^b haplotype (C57BL/6 mice) but not H-2^d (BALB/c) or H-2^k (CBA). These data suggest that the region 95-100 is responsible for serologic differences between the alleles of H-2 antigens, i. e. it may be a xenotypic as well as an allotypic antigenic determinant. The latter was confirmed by study of interaction of the hexapeptide with allogeneic monoclonal antibodies specific to H-2D^b antigen.