



УДК 577.112.083.3

© 1991 г.

*В. А. Скривелис, Ю. П. Бундулис, А. В. Панютин\*,  
Н. Н. Бойтенко\*, В. Е. Лунев\*\*, В. А. Несмеянов\*\*,  
А. Ю. Циманис, Э. Я. Грен*

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ АНТИГЕННОЙ ДЕТЕРМИНАНТЫ  
РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-2, УЗНАВАЕМОЙ  
МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ 13В1**

*Институт молекулярной биологии АН Латвии, Рига;*

*\*НИИ переливания крови МЗ БССР, Минск;*

*\*\*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва*

Предложен подход для примерной локализации антигенной детерминанты интерлейкина-2 человека (IL-2), основанный на ограниченном трипсинолизе рекомбинантного белка, разделении образующихся пептидов по О'Фарреллу, идентификации пептидов, связывающихся с моноклональными антителами к рекомбинантному IL-2, и сравнении экспериментально полученных данных о длине и заряде этих пептидов с данными о теоретически возможных в условиях ограниченного трипсинолиза пептидах. С помощью этого подхода локализована антигенная детерминанта, узнаваемая моноклональными антителами 13В1.

Ранее нами были описаны моноклональные антитела 13В1, полученные к рекомбинантному интерлейкину-2 и не обладающие нейтрализующей активностью [1]. Наличие таких антител, узнающих уникальную аминокислотную последовательность — антигенную детерминанту, открывает перспективу использования иммунохимического подхода к изучению структурно-функциональной организации молекулы человеческого интерлейкина-2.

Широко используемые в практике методы локализации антигенных детерминант для белков с известной последовательностью основаны на определении структуры пептида, образовавшегося в результате ферментативного или химического расщепления белка и не потерявшего способность связываться с этими моноклональными антителами. Кроме того, применяется химическая модификация аминокислотных остатков антигена, вовлекаемых в нативном белке в реакцию с антителом [2—4]. Существует генно-инженерный подход для решения подобной задачи [5]. И наконец, нередко для предсказания потенциальных иммуногенных участков белков используются компьютерные методы [6—8].

В настоящей работе для локализации антигенной детерминанты интерлейкина-2, узнаваемой моноклональными антителами 13В1, нами предлагается подход, основанный на частичном протеолизе рекомбинантного интерлейкина-2, разделении образующихся пептидов по О'Фарреллу [9], идентификации пептидов, связывающихся с антителами, и сравнении экспериментальных данных о длине и заряде пептидов с данными о теоретически возможных в условиях трипсинолиза пептидах.

Молекула интерлейкина-2 человека содержит 11 остатков лизина и 4 остатка аргинина [10]. Однако в условиях ограниченного трипсинолиза белка наблюдается образование ряда устойчивых к протеолизу пептидов, причем в иммуноблоте проявляются пептиды с молекулярными массами 12,0, 6,3, 5,0 и 3,3 кДа, взаимодействующие с антителами 13В1 (рис. 1).

Таким образом, в иммуноблоте появляется яркая зона (явно минорная в окрашенном серебром полиакриламидном геле), соответствующая пептиду с молекулярной массой 5,0 кДа.

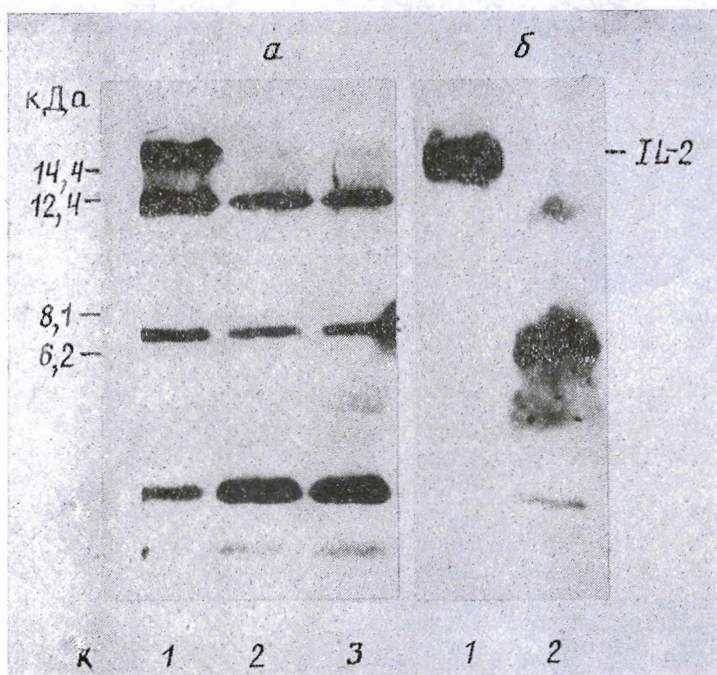


Рис. 1 Анализ продуктов ограниченного трипсинолиза рекомбинантного IL-2: а — электрофорез пептидов, образующихся в результате действия фермента в течение 1 (1), 2 (2) и 5 мин (3), К — белки-маркеры с мол. массами (снизу вверх, кДа): 2,6; 6,2; 8,1; 12,4; 14,4 и 17,8; б — иммуноблотинг рекомбинантного IL-2 (1) и продуктов его 5-минутного трипсинолиза (2) с моноклональными антителами 13В1

Из таблицы, в которой представлены теоретически возможные пептиды, ожидаемые при ограниченном трипсинолизе, следует, что информации о молекулярных массах явно недостаточно для идентификации пептида, несущего антигенную детерминанту. Так, например, в результате ограни-

**Значения молекулярных масс и рI пептидов, образующихся (эксп.) в результате ограниченного трипсинолиза рекомбинантного IL-2 и ожидаемых (теор.) при расщеплении чувствительных к трипсину связей**

Положение в цепи	М, кДа		рI		Положение в цепи	М, кДа		рI		
	теор.	эксп.	теор.	эксп.		теор.	эксп.	теор.	эксп.	
1—98	11,4	12,0	10,2	6,2	1—39	5,0	5,0	10,9	5,4	
34—134	11,8		6,8	5,8	1—44	4,4		10,6		
37—134	11,5		6,1	5,5	11—50	4,8		10,9		
40—134	11,1		5,9	5,2	11—55	5,4		10,6		
45—134	10,5	6,3	5,7	5,3	34—77	5,2	3,3	9,8	4,8	
1—50	5,9		10,9		5,3	37—77		4,9		9,3
1—55	6,4		10,7		40—77	4,7		9,3		
34—84	6,1		10,4		40—84	5,4		9,8		
40—98	7,0		9,3		45—84	4,8		9,3		
45—98	6,4		7,0		56—98	5,0		5,9		
51—98	5,6		5,9		78—121	5,1		5,4		
78—134	6,6		5,4		1—33	3,8		9,8		
85—134	5,7		4,7		1—36	4,1		10,2		
					11—39	3,4		10,2		
			11—44	4,0	10,2					
			45—77	3,9	6,5					
			51—77	3,1	5,4					
			51—84	4,0	6,5					
			56—84	3,5	6,5					
			85—121	4,2	4,7					
			99—134	4,1	4,7					



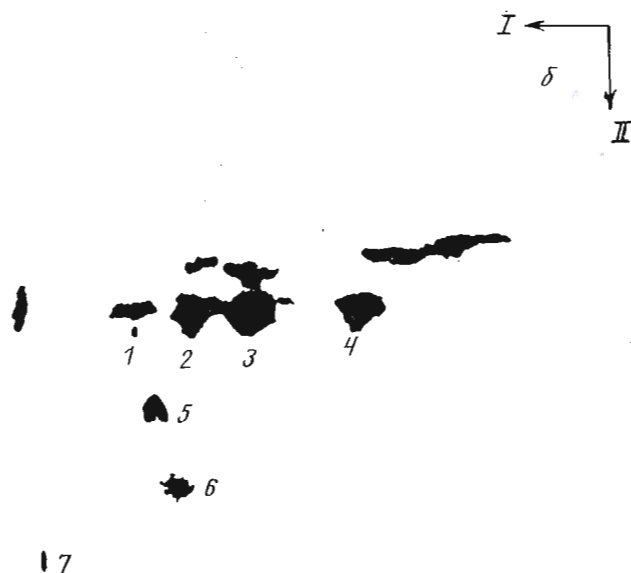
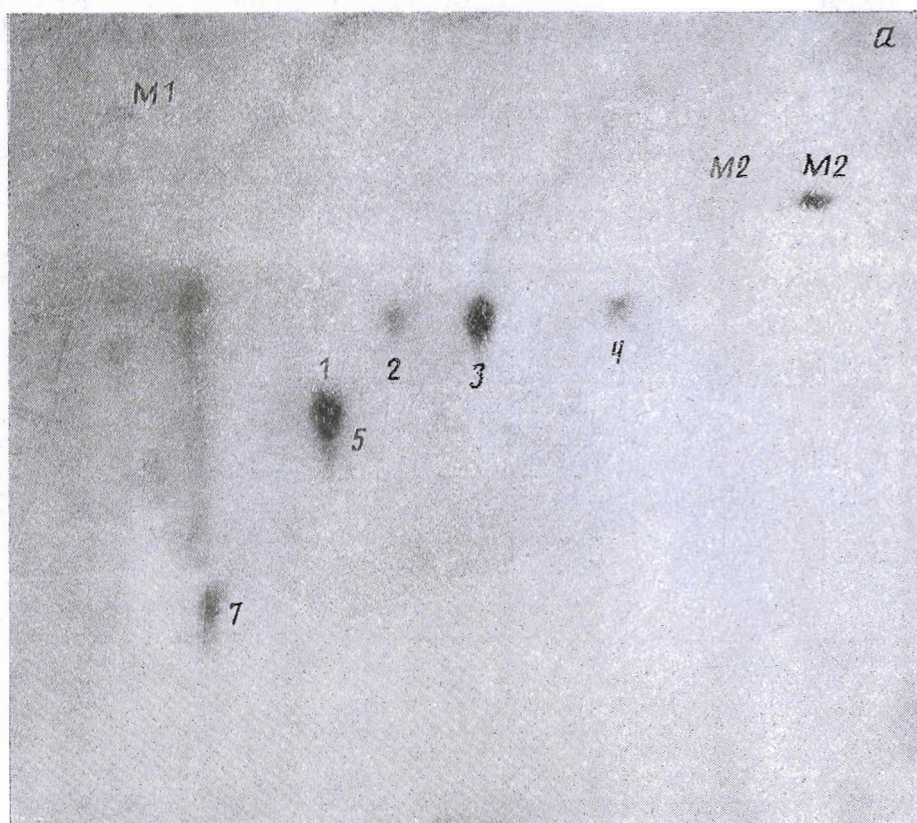


Рис. 2. Двумерное разделение по О'Фарреллу [9] (а) и иммуноблотинг (б) продуктов ограниченного трипсинолиза (5 мин) рекомбинантного IL-2. I — изоэлектрофокусирование, II — электрофорез в ПААГ. Отмечены пептиды с мол. массой 12 (I-4), 6,3 (5), 5,0 (6), 3,3 кДа (7). Используются рI-стандарты (ингибитор трипсина — рI 4,35 (M1) и миоглобин лошади — рI 6,85 (M2) и 7,35 (M3))

ченного трипсинолиза могут образовываться пять пептидов с молекулярной массой  $\sim 12$  кДа, 8 пептидов с молекулярной массой  $\sim 6-7$  кДа и т. д. Однако следует отметить, что рассматриваемые пептиды должны отличаться по значению рI.

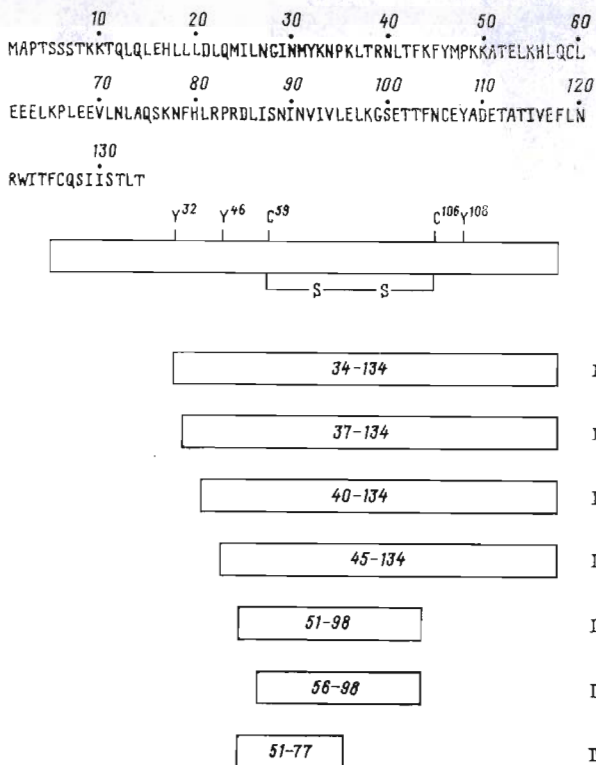


Рис. 3. Первичная структура зрелого интерлейкина-2 человека и схематическое изображение пептидов, образующихся в результате его ограниченного трипсинолиза и реагирующих с моноклональными антителами 13В1. Указано расположение остатков тирозина и цистеина

При двумерном разделении по О'Фарреллу оказалось, что пептиды с молекулярной массой 6,3, 5,0 и 3,3 кДа, образующиеся при ограниченном трипсинолизе рекомбинантного интерлейкина-2, являются индивидуальными пептидами и имеют значения  $rI$  5,3, 5,4 и 4,8 соответственно в отличие от продукта с молекулярной массой 12 кДа, являющегося смесью пептидов с различающимися значениями  $rI$  (6,2; 5,8; 5,5 и 5,2). Все эти пептиды связываются с антителами 13В1 (рис. 2а, б).

Сравнение теоретически рассчитанных и экспериментально определенных значений  $rI$  рассматриваемых пептидов (таблица) показывает, что четыре больших пептида, вероятно, представляют собой фрагменты 34—134 (1); 37—134 (2), 40—134 (3) и 45—134 (4). Таким образом, фрагментация рекомбинантного интерлейкина-2 начинается атакой фермента — трипсина на N-конец молекулы, что в принципе согласуется с теоретическими расчетами, проведенными С. Г. Галактионовым (Всесоюзный научно-исследовательский и проектно-конструкторский институт микробиологических производств, Минск, неопубликованные данные).

Труднее идентифицировать малые пептиды. Анализ первичной структуры интерлейкина-2 человека указывает на присутствие в молекуле трех остатков тирозина в положениях 32, 46 и 108 [10]. Электрофоретическое разделение продуктов ограниченного трипсинолиза интерлейкина-2, меченных радиоактивным иодом, и последующее их окрашивание и авторадиографирование, а также перенос пептидов на нитроцеллюлозу и иммуноблоттинг позволяют сделать однозначный вывод о том, что малые пептиды, связывающиеся с антителами 13В1, не содержат остатка тирозина. Таким образом, из вышеприведенных данных следует, что реагирующие с антителами пептиды с молекулярной массой 6,3 и 5,0 кДа не могут быть N- и C-концевыми триптических пептидами, имеющими остатки тирозина в положениях 32, 46 и 108. В таком случае пептиды с молекулярными массами 6,3 и 5,0 кДа, которые связываются с моноклональными ан-

тителами, могут быть идентифицированы как пептиды 51—98 и 56—98, а значит, устанавливается левая граница антигенной детерминанты — остаток гистидина в положении 56. Далее, значение  $pI$  (эксп. 4,8) для пептида с массой  $\sim 3,3$  кДа делает вероятной правую границу детерминанты по остатку лизина в положении 77 (рис. 3, таблица).

И это значит, что антигенная детерминанта, узнаваемая моноклональными антителами 13В1, лежит на участке молекулы интерлейкина-2 от 56-й по 77-ю аминокислоту со следующей первичной структурой:



Этот район как потенциальную антигенную детерминанту предсказывают профили гидрофильности по Хоппу и Вудсу [6].

Согласно данным рентгеноструктурного анализа, две трети аминокислотной последовательности молекулы интерлейкина-2 входит в состав семи  $\alpha$ -спиральных сегментов [11]. Известно, что сегмент 118—134 образует амфипатическую  $\alpha$ -спираль, функциональная важность которой недавно показана [12].

Локализованная нами детерминанта покрывает  $\alpha$ -спиральный сегмент 67—79, который не предсказывается как амфипатическая структура (рис. 4а). Расчеты, проведенные для укороченных с С-конца фрагментов рассматриваемой  $\alpha$ -спирали, выделяют участок 67—76 с явно выраженными амфипатическими свойствами (рис. 4г). Гидрофильная часть такой спирали может быть экспонирована на поверхности молекулы.

И наконец, детерминанта включает в себя и так называемый пептид р84, который по своей аминокислотной последовательности соответствует району 60—73 молекулы интерлейкина-2 [13]. Известно, что антитела к пептиду р84 взаимодействуют с интерлейкином-2 [14].

Нами установлено, что в иммуноблоттинге антитела к пептиду р84 и 13В1 взаимодействуют с одними и теми же пептидами, образующимися в результате ограниченного трипсинолиза рекомбинантного интерлейкина-2, что подтверждает сделанный нами вывод о локализации антигенной детерминанты.

Авторы благодарят А. Бреде (Институт молекулярной биологии АН Латвии, Рига) за проведенные расчеты амфипатичности  $\alpha$ -спиралей интерлейкина-2.

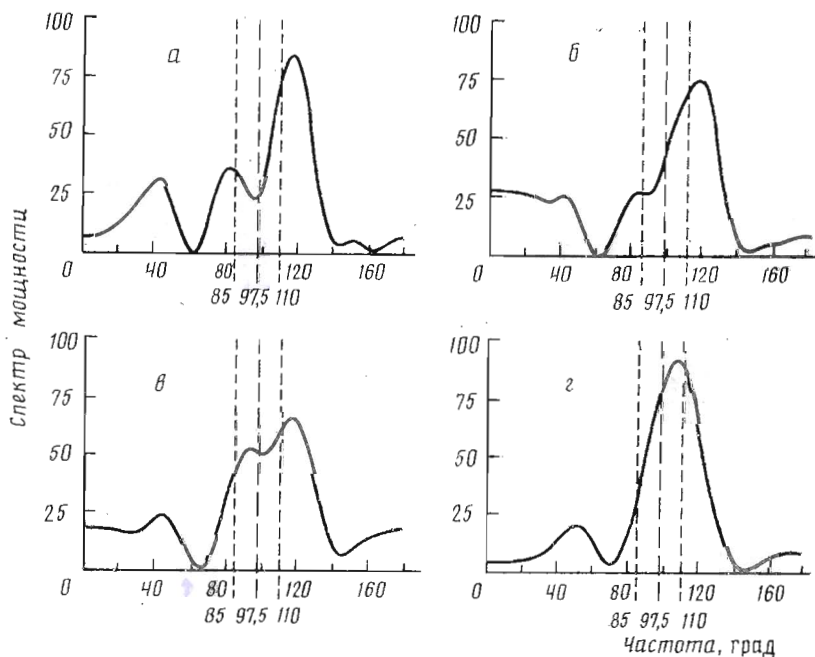


Рис. 4. Амфипатические свойства  $\alpha$ -спирального участка 67—79 (а) и его укороченных с С-конца фрагментов: 67—78 (б), 67—77 (в) и 67—76 (г)



## Экспериментальная часть

В работе использованы электрофоретически чистый рекомбинантный интерлейкин-2 человека (Экспериментальный завод Института органического синтеза АН Латвии), трипсин (Worthington, США), амфолины рН 3,5—10 (LKB, Швеция).

Расчеты значений  $pI$  проводили по программе IBI DNA/Protein Sequence Analysis System.

Расчеты амфипатичности  $\alpha$ -спиралей осуществлены по программе HELICES, разработанной на основе алгоритма, предложенного в работе [15].

Ограниченный трипсинолиз осуществляли в фосфатном буфере (рН 7,2) при 37° С в течение 1, 2 и 5 мин. Концентрация белка 1 мг/мл, фермент-субстратное соотношение 1 : 50. Протеолиз останавливали добавлением 8 объемов ацетона. Осажденный осадок сушили и после обработки 1% раствором додецилсульфата натрия и восстановления дисульфидного мостика  $\beta$ -меркаптоэтанолом продукты ограниченного трипсинолиза разделяли в 15—30% градиентном полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия [16]. Гели окрашивали серебром.

При двумерном разделении сначала осуществляли изоэлектрическое фокусирование (18 ч, 400 В) в 5% полиакриламидном геле (Т-5, С-4), используя в качестве катодного буфера 20 мМ NaOH, а в качестве анодного — 10 мМ  $H_3PO_4$ , и предфокусирование 15 мин при напряжении 200 В, 30 мин при 300 В и 1 ч при 100 В [17]. Во втором направлении пептиды разделяли в 15—30% градиентном геле.

Перенос пептидов на нитроцеллюлозу и иммунодетекцию осуществляли по методикам, описанным в работах [18, 19]. Окрашивание проводили с помощью *o*-фенилендиамина.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Панютин А. В., Войтенко Н. Н., Шидловская Е. А., Циманис А. Ю., Бундулис Ю. П., Скривелус В. А. // Итоги науки и техники. Серия «Иммунология». М., 1988. Т. 26. С. 72—75.
2. Грачев М. А., Зеленин С. М., Лактионов П. П., Рошке В. В. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 81—88.
3. Костров С. В., Черновская Т. В., Ходова О. М., Борухов С. И., Рывжавская А. С., Изотова Л. С., Стронгин А. Я. // Биохимия. 1985. Т. 50. Вып. 11. С. 1859—1865.
4. Kimura K., Mason T. L., Khorana H. G. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 6. P. 2859—2867.
5. Nunberg J. H., Rodgers G., Gilbert J. H., Snead R. M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 12. P. 3675—3679.
6. Hopp T. P., Woods K. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 2. P. 569—573.
7. Karplus P. A., Schulz G. E. // Naturwissenschaften. 1985. B. 72. № 4. S. 212—213.
8. Parker J. M. R., Guo D., Hodges R. S. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 4. P. 5425—5432.
9. O'Farrell P. H. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 10. P. 4007—4021.
10. Taniguchi T., Matsui H., Fujita T., Takaoka S., Kashima N., Yoshimoto R., Hamuro J. // Nature. 1983. V. 302. № 5908. P. 305—310.
11. Brandhuber B. J., Boone T., Kenney W. C., McKay D. B. // Science. 1987. V. 238. № 4834. P. 1707—1709.
12. Landgraf B., Cohen F. E., Smith K. A., Gadski R., Ciardelli T. L. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 2. P. 816—822.
13. Altman A., Cardenas J. M., Houghten R. A., Dixon F. J., Theofilopoulos A. N. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 7. P. 2176—2180.
14. Онопrienko Л. В., Михалева И. И., Лунев В. Е., Несмеянов В. А., Иванов В. Т. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 7. С. 908—921.
15. Cornette J. L., Cease K. B., Margalit H., Spouge J. L., Berzofsky J. A., DeLisi C. // J. Mol. Biol. 1987. V. 195. № 3. P. 659—685.
16. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
17. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М.: Наука, 1983. С. 20—48.
18. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 9. P. 4350—4354.
19. Bio-Rad Laboratories. Immun-Blot Instruction Manual. 1985. P. 1—13.

Поступила в редакцию  
21.VI.1990  
После доработки  
29.XI.1990

V. A. SKRIVELIS, Yu. P. BUNDULIS, A. V. PANYUTICH \*,  
N. N. VOITENOK \*, V. E. LUNEV \*\*, V. A. NESMEYANOV \*\*, A. Yu. TSIMANIS, E. J. GREN

LOCALIZATION OF THE RECOMBINANT HUMAN INTERLEUKIN-2 ANTIGENIC  
DETERMINANT RECOGNIZED BY THE MONOCLONAL ANTIBODY 13B1

*Institute of Molecular Biology, Latvian Academy of Sciences, Riga:*

*\* Byelorussian Institute of Blood Transfusion and Haematology, Minsk:*

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

We suggest a simple approach to localization of antigenic determinants for the monoclonal antibody 13B1 raised against recombinant human interleukin-2. The approach is based on the limited trypsin proteolysis, peptide separation by the O'Farrell method and identification of the peptides, interacting with monoclonal antibodies, and comparison of the charge and length of these peptides with the corresponding values of theoretically possible peptides.