



УДК 616-097:577.112:856:577.112.6.083.3

АНТИТЕЛА ПРОТИВ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ Т-КАДГЕРИНА ПОДАВЛЯЮТ СВЯЗЫВАНИЕ ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ С Т-КАДГЕРИНОМ

© 1999 г. М. В. Сидорова[#], А. С. Молокоедов, А. А. Азьмуко, Д. В. Стамбольский, Н. М. Каширина, В. Н. Бочков, В. А. Ткачук, Ж. Д. Беспалова

Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ,
121552, Москва, 3-я Черепковская, 15а

Поступила в редакцию 15.05.98 г. Принята к печати 27.10.98 г.

Твердофазным методом с использованием Fmoc-методологии осуществлен синтез пептидов последовательности потенциальных антигенных детерминант атипичных липопротеидсвязывающих белков Т-кадгерина (p105) и его предшественника (p130) из гладкомышечных клеток сосудов человека. Полученные пептиды соответствуют участкам 51-61, 140-160, 161-179, 260-271, 340-352, 350-362 и 370-385 аминокислотной последовательности белка p130. Выбор пептидов основывался на результатах компьютерного анализа антигенной структуры белка. Конъюгаты пептидов с пероксидазой хрена были использованы для иммунизации кроликов и мышей. С помощью иммунного блоттинга показано, что антисыворотки против пептидов, соответствующих фрагментам 140-160, 161-179 и 260-271, взаимодействуют с белком p105, выделенным из гладкомышечных клеток сосудов, ранее идентифицированным нами как Т-кадгерин. Эти антисыворотки дозозависимо ингибировали связывание липопротеидов низкой плотности с p105. Полученные данные подтверждают правильность идентификации белка p105 как Т-кадгерина и демонстрируют принципиальную возможность изучения взаимодействия этого белка с ЛНП с помощью ингибирующих связывание противопептидных антител.

Ключевые слова: антигенная детерминанта; Т-кадгерин; синтетические пептиды; твердофазный синтез; конъюгаты.

Липопротеиды низкой плотности – это сложный надмолекулярный комплекс, участвующий в переносе холестерина и других липидов в организме. Накопление атерогенных частиц ЛНП в сосудистой стенке – характерный симптом атеросклероза. Несмотря на обилие посвященных этой теме работ, механизмы проникновения ЛНП в стенки сосудов и их накопления ясны лишь частично. Ранее мы обнаружили в гладкомышечных клетках сосудов человека атипичные липопротеидсвязывающие белки p105 и p130 с молекулярными массами 105 и 130 кДа [1], по лигандной селективности значительно отличающиеся от известных липопротеидных рецепторов [2]. Нам удалось очистить белки p105 и p130 и определить частич-

ные аминокислотные последовательности фрагментов их протеолитического расщепления [3]. Сравнение полученных сиквенсов со структурами, представленными в базах SWISS-PROT и GenBank показало, что аминокислотные последовательности этих фрагментов идентичны последовательности белка Т-кадгерина [4], одного из членов суперсемейства кадгеринов [5] и его предшественника [6, 7]. На рис. 1 представлена аминокислотная последовательность предшественника Т-кадгерина – белка p130 (номер в GenBank L34058). Кадгерины представляют собой экспонированные на поверхности клеток белки, опосредующие кальцийзависимое межклеточное связывание [8]. Принято считать, что специфичность межклеточного узнавания определяется способностью кадгеринов избирательно взаимодействовать с кадгеринами аналогичного типа, расположенными на соседних клетках [8]. Наши данные [2] позволяют предположить, что лигандная селективность кадгеринов является более широкой, чем считалось до сих пор, поскольку Т-кадгерин может связывать не только другие молекулы Т-кадгерина, но и растворимый лиганд – ЛНП. Не исключено, что такое связывание может вносить определенный вклад в накопление липопротеидов в стенке сосуда. Кроме того, полученные нами ранее результаты поз-

Использованы сокращения, рекомендованные комиссией IUPAC-IUB (Eur. J. Biochem. 1984. V. 183. P. 9–37), а также: Acst – ацетамидометил; CH₃CN – ацетонитрил; DCM – дихлорметан; DIC – *N,N*-диизопропилкарбодимид; DMA – *N,N*-диметилацетамид; DMF – *N,N*-диметилформамид; Dod – бис(4-метоксифенил)метил; EDT – 1,2-этандитиол; ESI-MS – масс-спектрометрия с электроспрейным ионным источником; Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил; HOBt – 1-гидроксибензотриазол; Mtg – 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил; NMP – *N*-метилпирролидон; TFA – трифторуксусная кислота; ЛНП – липопротеиды низкой плотности.

[#] Автор для переписки (тел.: 414-67-16; факс: 414-67-86; e-mail: sag@mail.infotel.ru).

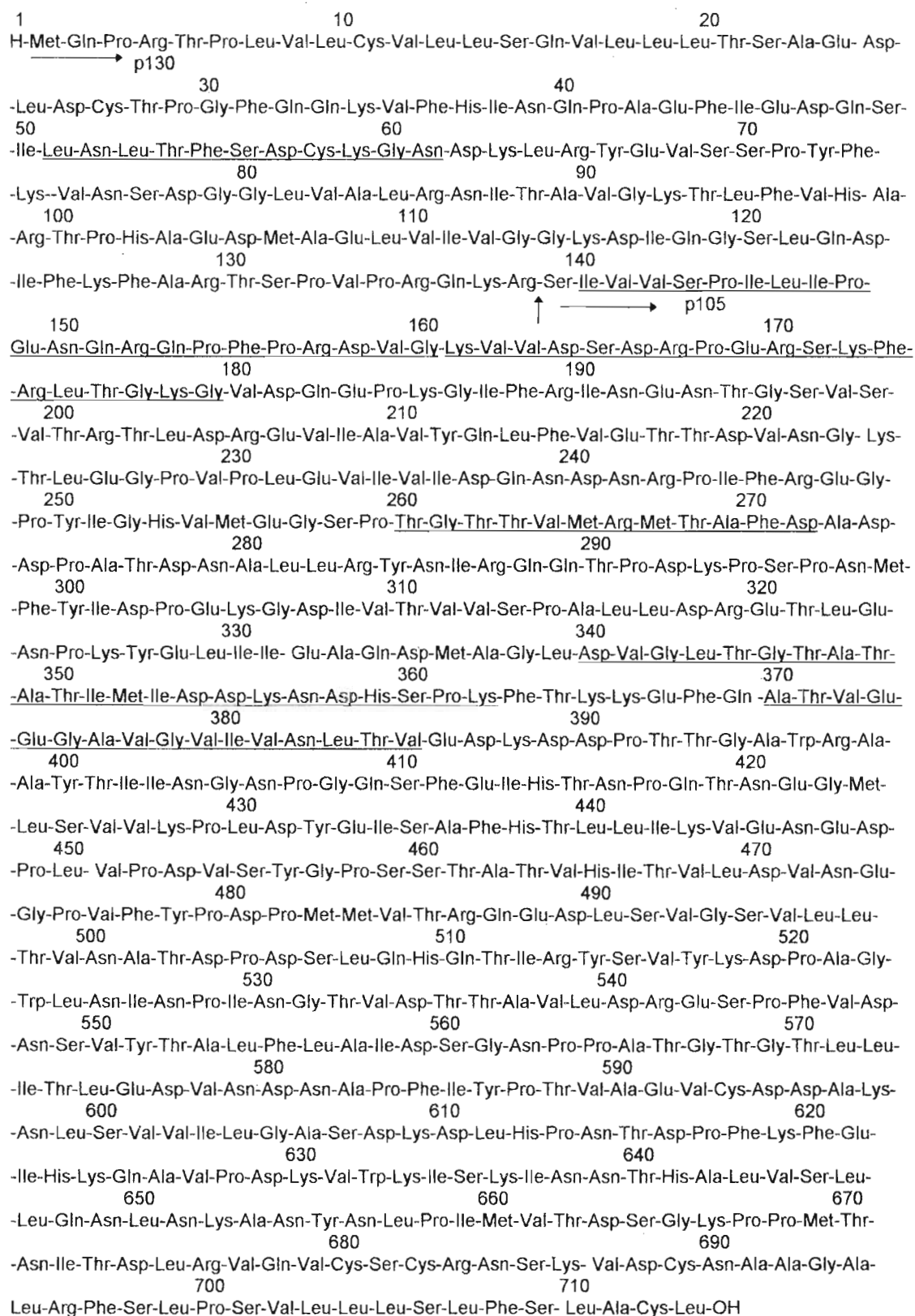


Рис. 1. Аминокислотная последовательность Т-кадгерина (белок p105) и его предшественника (белок p130) (номер регистрации в GenBank L34058). Нумерация аминокислотных остатков соответствует белку p130. Стрелкой показано место протеолитического расщепления белка-предшественника. Подчеркнуты последовательности, соответствующие синтезированным в настоящей работе пептидным фрагментам.

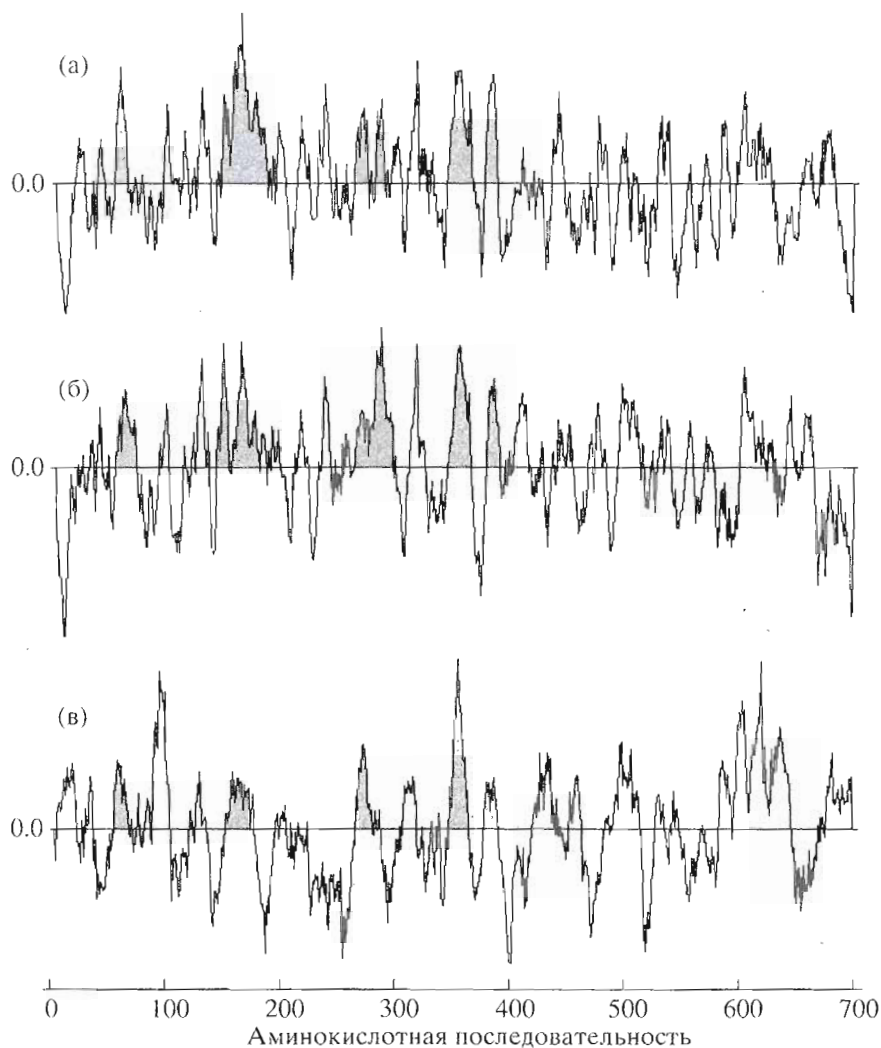


Рис. 2. Анализ антигенной структуры предшественника Т-кадгерина – белка р130 с использованием компьютерных методов: профиль гидрофильности (а), поверхностной доступности (б) и статистической антигенности (в). Выбранные для синтеза участки аминокислотной последовательности белка затемнены.

воляют предположить, что взаимодействие ЛНП с Т-кадгерином может приводить к активации в гладкомышечных клетках сосудов систем внутриклеточной сигнализации, регулирующих сократительную функцию этих клеток, а также их миграцию, пролиферацию и другие процессы, потенциально вовлеченные в атерогенез [9].

Для выяснения роли Т-кадгерина в метаболизме липопротеидов и регуляции систем вторичных посредников необходимы антитела против этого белка. Т-Кадгерин, как и многие другие белки клеточной мембраны, является минорным белком. Поэтому его выделение в количествах, достаточных для иммунизации, представляет определенную сложность. Поскольку в настоящее время для получения антител, взаимодействующих с нативными белками, широко используются синтетические пептиды, моделирующие их антигенные детерминанты, в данной работе нами была предпринята попытка получить антитела про-

тив синтетических пептидных фрагментов Т-кадгерина и изучить их взаимодействие с белком в иммунохимических тестах.

Для анализа антигенной структуры Т-кадгерина и выбора потенциальных антигенных детерминант использованы компьютерные методы, хорошо зарекомендовавшие себя для предсказания линейных эпитопов в белках [10]: метод предсказания гидрофильных участков аминокислотной цепи [11], метод оценки поверхностной доступности [12] и статистический метод, учитывающий встречаемость различных сочетаний аминокислот в известных антигенных детерминантах [13] (рис. 2). Расчет проводился с помощью пакета программ "Peptide Companion". Кроме того, учитывались данные об участках гликозилирования Т-кадгерина [14].

На основе данных компьютерного анализа нами в качестве потенциальных антигенных детер-

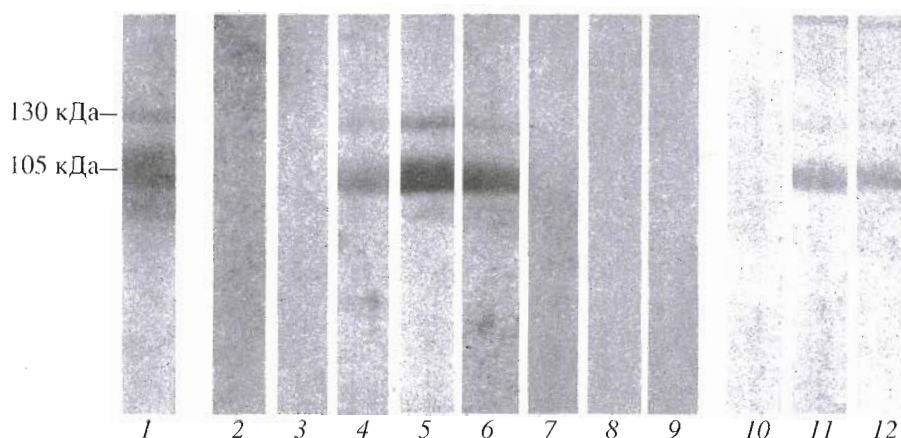


Рис. 3. Иммуный и лигандный (ЛНП) блоттинг с использованием антисывороток против синтетических фрагментов Т-кадгерина. Белки обогащенного препарата Т-кадгерина из аорты человека разделяли гель-электрофорезом в 7% ПААГ и переносили на нитроцеллюлозу. Полученные блоты окрашивали методом лигандного (ЛНП, 100 мкг/мл) блоттинга (1) или проводили иммуноблоттинг с неиммунной сывороткой кролика (2) или мыши (10), а также с кроличьими антисыворотками против пептидов С-51 (3), С-140 (4), С-161 (5), С-260 (6), С-340 (7), С-350 (8), С-370 (9), либо с мышьиными антисыворотками против пептидов С-140 (11) и С-161 (12).

минант были выбраны следующие фрагменты последовательности белка р130:

-Leu⁵¹-Asn-Leu-Thr-Phe-Ser-Asp-Cys-Lys-Gly-Asn⁶¹- С-51;

-Ile¹⁴⁰-Val-Val-Ser-Pro-Ile-Leu-Ile-Pro-Glu-Asn-Gln-Arg-Gln-Pro-Phe-Pro-Arg-Asp-Val-Gly¹⁶⁰- С-140;

-Lys¹⁶¹-Val-Val-Asp-Ser-Asp-Arg-Pro-Glu-Arg-Ser-Lys-Phe-Arg-Leu-Thr-Gly-Lys-Gly¹⁷⁹- С-161;

-Thr²⁶⁰-Gly-Thr-Thr-Val-Met-Arg-Met-Thr-Ala-Phe-Asp²⁷¹- С-260;

-Asp³⁴⁰-Val-Gly-Leu-Thr-Gly-Thr-Ala-Thr-Ala-Thr-Ile-Met³⁵²- С-340;

-Thr³⁵⁰-Ile-Met-Ile-Asp-Asp-Lys-Asn-Asp-His-Ser-Pro-Lys³⁶²- С-350;

-Ala³⁷⁰-Thr-Val-Glu-Glu-Gly-Ala-Val-Gly-Val-Ile-Val-Asn-Leu-Thr-Val³⁸⁵- С-370.

Синтез соответствующих пептидов был проведен автоматическим твердофазным методом с использованием Fmoc-методологии на полимере Ванга (сополимере стирола с 1% дивинилбензола с 4-гидроксиметилфеноксиметильной якорной группой). Содержание стартовых аминокислот на полимере составляло 0.5–0.9 ммоль/г (см. “Эксперимент. часть”). Для блокирования функциональных групп боковых цепей аминокислот применяли следующие защиты: *трет*-бутильную для карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот и гидроксильных групп серина, треонина и тирозина; Вос – для ε-аминогруппы лизина; тригильную – для карбоксамидных функций аспарагина и глутамина и имидазольного кольца гистидина; Mtr – для гуанидиновой функции аргинина и Acм – для сульфгидрильной группы цистеина. Во всех случаях пептидную цепь наращивали по одной аминокислоте. Для создания амидной связи использовали DIC/НОВt-метод. Для заключительного деблокирования и отщепления пепти-

дов от полимера применяли трифторуксусную кислоту со скевенджерами (см. “Эксперимент. часть”). По окончании синтеза пептида С-51* сульфгидрильную группу цистеина не деблокировали. Содержание целевых пептидов в сырых продуктах твердофазного синтеза составляло от 50 до 80% по данным ВЭЖХ. Пептиды, за исключением С-370, очищали препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ до 95–99%-й чистоты. Пептид [Cys(Acm)]С-51 был очищен последовательным применением ВЭЖХ и распределительной хроматографии на сефадексе G-25 в двухфазной системе бутанол–уксусная кислота–вода, 4 : 1 : 5. Высокогидрофобный пептид С-370 удалось очистить до 90%-й чистоты на колонке с сефадексом G-50 в 0.1% водном аммиаке [15]. Выходы пептидов составили от 24 до 51% в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимеру. Пептиды были охарактеризованы данными ТСХ, ВЭЖХ, аминокислотного анализа и масс-спектрометрии (таблица).

Для получения противопептидных антисывороток пептиды конъюгировали с активированной периодатом натрия пероксидазой хрена [16, с. 128–137], и полученными конъюгатами иммунизировали мышей и кроликов.

Для оценки взаимодействия полученных антисывороток с белками р105/р130 применяли метод иммунного (Вестерн-) блоттинга (рис. 3). Для анализа использовали препарат Т-кадгерина из меди аорты человека [3]. Кроличьи антисыворотки против пептидов С-140, С-161 и С-260 (треки 4, 5, 6 на рис. 3 соответственно), а также мышьиные антисыворотки против пептидов С-140 и С-161 (треки 11, 12 на рис. 3) взаимодействовали на блотах с теми же белками, что и ЛНП (трек 1 на рис. 3).

* Нумерация соответствует последовательности белка р130.

Характеристики синтезированных фрагментов Т-кадгерина

Пептид	Фрагмент Т-кадгерина	Выход*, %	ВЭЖХ		ESI-MS, <i>M</i> (Дв) (<i>M</i> _{рас})	Аминокислотный анализ**
			<i>R</i> _t , мин	чистота, %		
[Cys(Асн)] С-51	51–61	23.9	15.5 ⁽¹⁾	99.0	1282.3 (1282.4)	^(a) D 2.64 (3), T 0.76 (1), S 0.60 (1), G 1.00 (1), L 2.00 (2), F 1.01 (1), K 1.00 (1)
С-140	140–160	34.2	12.8 ⁽²⁾	98.8	2374.6 (2374.8)	^(b) D 2.00 (2), S 0.5 (1), E 3.03 (3), G 1.30 (1), V 2.90 (3), I 2.88 (3), L 1.04 (1), F 1.00 (1), R 2.15 (2)
С-161	161–179	50.0	12.0 ⁽¹⁾	98.6	2175.4, 2216 [<i>M</i> + <i>K</i>] (2175.5)	^(a) D 1.97 (2), T 1.20 (1), S 0.93 (1), E 1.08 (1), G 2.36 (2), L 1.00 (1), V 1.76 (2), F 1.02 (1), K 2.93 (3), R 3.07 (3)
С-260	260–271	51.5	16.7 ⁽¹⁾	98.3	1330.2 (1330.5)	^(a) D 1.02 (1), T 3.94 (4), G 0.93 (1), A 0.86 (1), V 1.01 (1), M 2.03 (2), F 1.09 (1), R 1.10 (1)
С-340	340–352	40.8	17.4 ⁽¹⁾	98.9	1250.3 (1250.4)	^(a) D 1.03 (1), T 3.84 (4), G 1.99 (2), A 1.97 (2), V 0.99 (1), M 1.36 (1), I 1.02 (1), L 1.18 (1)
С-350	350–362	37.0	11.8 ⁽³⁾	95.1	– (1513.68)	^(b) D 3.23 (4), T 0.50 (1), S 0.30 (1), M 1.00 (1), I 1.64 (2), H 0.95 (1), K 1.64 (2)
С-370	370–385	46.0	13.9 ⁽⁴⁾	90.0	– (1570.8)	^(b) D 1.22 (1), T 1.46 (2), E 1.85 (2), G 2.00 (2), A 1.61 (2), V 5.14 (5), I 0.90 (1), L 1.28 (1)

* Выходы пептидов приведены в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимеру.

** Гидролиз пептидов проводили 6 н. HCl, содержащей 2% тиогликолевой кислоты при 110°C в течение 24 ч^(a) и 48 ч^(b).

⁽¹⁾ Колонка Ultrasphere ODS, 5 мкм, 4.6 × 250 мм, элюция градиентом концентрации 80% CH₃CN (от 10 до 70% за 30 мин) в 0.1% TFA; скорость потока 1 мл/мин, 220 нм.

⁽²⁾ Колонка Vydac C₁₈, 5 мкм, 4.6 × 250 мм, элюция градиентом концентрации 70% CH₃CN (от 20% до 80% за 30 мин) в 0.05 М КН₂РO₄ рН 3.0; скорость потока 1 мл/мин, 220 нм.

⁽³⁾ см. Условия⁽²⁾, градиент от 10 до 70% за 30 мин.

⁽⁴⁾ Колонка PRP-1, 5 мкм, 4.6 × 250 мм, элюция градиентом концентрации 70% CH₃CN (от 10 до 70% за 30 мин) в 0.02 М КН₂РO₄ рН 9.0; скорость потока 1 мл/мин, 220 нм.

Полное совпадение картины лигандного и иммунного блоттингов мы наблюдали и на препарате мембран культивируемых гладкомышечных клеток человека, а также после разделения белков методом двумерного гель-электрофореза (результаты не показаны). Следует отметить, что среди животных, иммунизированных одним и тем же пептидом, интенсивность иммунного ответа несколько варьировала. Приведенные на рис. 3 данные получены с использованием сывороток с максимальным в данной группе иммунным ответом (т.е. сывороток, дававших максимальную окраску на иммуноблотах).

Судя по данным иммуноблоттинга, пептиды [Cys(Асн)]С-51, С-340, С-350 и С-370 оказались не иммуногенны. Причины этого могут быть различными, но можно отметить, что соответствующие этим пептидам фрагменты расположены ближе к гликозилированным областям Т-кадгерина по сравнению с иммуногенными фрагментами [14]. Не исключено, что гликозилирование соседних участков белка вносит определенный вклад в конформацию эпитопов.

Для проверки принципиальной возможности использования полученных противопептидных антител в экспериментах по исследованию функции белка мы изучили влияние антисывороток на связывание ЛНП из плазмы крови человека [17] с Т-кадгеринном с помощью лигандного блоттинга.

Нам удалось показать, что антисыворотки к пептидам С-140, С-161 и С-260 (в отличие от контрольной сыворотки) дозозависимо подавляли связывание липопропротеидов (рис. 4). Несмотря на то что сыворотки были нормированы на концентрацию общих иммуноглобулинов класса G, их способность вытеснить ЛНП отличалась. Наиболее эффективным ингибитором связывания была сыворотка против пептида С-140, соответствующего N-концевому участку белка p105 (Т-кадгерина) (см. рис. 1). Две другие сыворотки были менее эффективными (рис. 4). Интересно отметить, что подобная закономерность была ранее описана для антител против Е-кадгерина [18]. В этом случае моноклональные антитела к N-концевому участку белка, где, как предполагается, расположен лигандсвязывающий сайт, обладали наибольшим ингибирующим связывание эффектом [18]. Проверка такого объяснения будет являться предметом наших дальнейших исследований.

Таким образом, три из семи рассчитанных и синтезированных нами пептидных фрагментов Т-кадгерина человека обладают антигенными и иммуногенными свойствами, а именно фрагменты 140–160, 161–179 и 260–271. С использованием этих пептидов нам удалось получить антитела, подавляющие связывание ЛНП с белком p105, что показано с помощью лигандного блоттинга. Кроме того, мы подтвердили правильность иден-

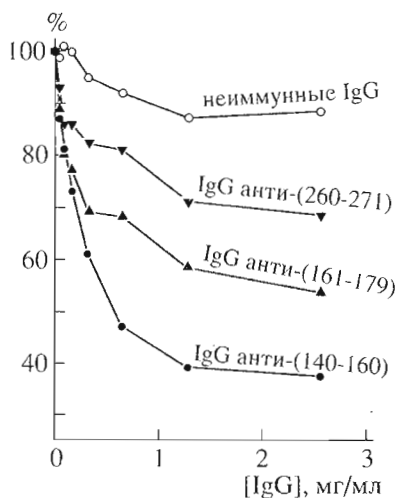


Рис. 4. Ингибирование связывания ЛНП антисыворотками против синтетических фрагментов Т-кадгерина. По оси ординат – связывание ЛНП, % от контроля (связывания без антител).

тификации [3] белка p105 как Т-кадгерина и продемонстрировали принципиальную возможность изучения функции этого белка (взаимодействия с ЛНП) с помощью ингибирующего связывание противопептидных антител.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы производные *L*-аминокислот (Bachem, Швейцария), фенол (Merck, Германия), EDT, DIC, HOBT (Fluka, Швейцария). Для синтеза применяли *N*-метилпирролидон, дихлорметан, пиперидин, метанол и трифторуксусную кислоту (Applied Biosystems, США). Аналитическую ВЭЖХ проводили на колонках Ultrasphere ODS (Beckman, США) (5 мкм, 4,6 × 250 мм); PRP-1 (Hamilton, Англия) (5 мкм, 4,6 × 250 мм) и Vydac C₁₈ (Sigma, США) (5 мкм, 4,6 × 250 мм) на хроматографе фирмы Gilson (Франция). Системы элюентов см. таблицу. Пептиды детектировали при 220 нм. Препаративную ВЭЖХ проводили на приборе Beckman (США). Пептиды детектировали при 226 нм и элюировали градиентом концентрации ацетонитрила в 0.1% TFA. Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил фирмы Technopharm (РФ). Для разделительной хроматографии применяли сефадексы G-25 и G-50 fine (Pharmacia, Швеция). Для аминокислотного анализа пептиды гидролизовали 6 н. HCl, содержащей 2% тиогликолевой кислоты, 24 или 48 ч при 110°C. Аминокислотный состав гидролизатов определяли на автоматическом анализаторе Biotronik 5001 (Германия). Масс-спектры снимали на квадрупольном масс-спектрометре Finnigan MAT TSQ 700 (Германия) с электроспрейным (API) ионным источником (Finnigan MAT).

Твердофазный синтез пептидов C-51, C-140, C-161, C-260 и C-340 проводили на автоматичес-

ком пептидном синтезаторе Applied Biosystems, модель 431A. В каждом случае исходили из 0.1 ммоль Fmoc-аминоацилполимера (Bachem, Швейцария). Для синтеза использовали следующие количества аминокислот (в скобках приведено содержание соответствующих стартовых аминокислот):

C-51 0.11 г Fmoc-Asn(Dod)-(P) (0.9 ммоль Fmoc-Asn(Dod)/г);

C-140 и C-161 по 0.15 г Fmoc-Gly-(P) (0.66 ммоль Fmoc-Gly/г);

C-260 0.17 г Fmoc-Asp(OBu')-(P) (0.59 ммоль Fmoc-Asp(OBu')/г);

C-340 0.15 г Fmoc-Met-(P) (0.67 ммоль Fmoc-Met/г), где (P) – сополимер стирола с 1% дивинилбензола с 4-гидроксиметилфеноксиметильной якорной группой.

Пептиды синтезировали по стандартной программе для однократной конденсации Fmoc-аминокислот в режиме "small scale". Согласно этой программе синтетический цикл включал 20-минутную активацию 1 ммоль присоединяемой аминокислоты в присутствии эквивалентных количеств DIC и HOBT в NMP, деблокирование α-аминогрупп 20% раствором пиперидина в NMP в течение 20 мин, конденсацию с 1 ммоль (10-кратным избытком) ацилирующего агента в NMP в течение 37 мин и все необходимые промежуточные промывки пептидилполимера.

Пептиды C-350 и C-370 синтезировали на автоматическом пептидном синтезаторе Milligen BioSearch 9600 (США) исходя из 0.5 г Fmoc-Lys(Boc)-(P) (0.67 ммоль Fmoc-Lys(Boc)/г) и 0.5 г Fmoc-Val-(P) (0.57 ммоль Fmoc-Val/г) соответственно. Синтез проводили по стандартной для данного прибора программе, включающей 20-минутную активацию 2.23 ммоль (для C-350) и 1.60 ммоль (для C-370) присоединяемой Fmoc-аминокислоты в присутствии эквивалентных количеств DIC и HOBT в смеси DMA-DCM, 1 : 1, деблокирование α-аминогрупп 30% раствором пиперидина в смеси DMA-толуол, 1 : 1 в течение 10 мин, конденсацию с 6.7-кратным избытком активированной аминокислоты в смеси DMA-DCM, 1 : 1 в течение 1 ч и все необходимые промежуточные промывки пептидилполимеров.

Для заключительного деблокирования и отщепления пептидов от носителя соответствующие пептидилполимеры суспендировали в 10 мл подходящей деблокирующей смеси и перемешивали при 20°C, при этом применяли следующие смеси: для C-51 и C-370 TFA-фенол (9.5 : 0.5), 3 ч; для C-140, C-161 и C-260 TFA-тиоанизол-EDT-анизол (8.1 : 0.45 : 0.3 : 0.15), 5–8 ч; для C-340 и C-350 TFA-фенол-H₂O-тиоанизол-EDT (8.25 : 0.5 : 0.5 : 0.25), 2 ч. Смола отфильтровывали, промывали TFA

(2 × 1 мл), фильтрат упаривали до объема 3–5 мл и прибавляли 100 мл сухого эфира или этилацетата в случае метионинсодержащих пептидов. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром и этилацетатом, сушили.

Очистка пептидов. Пептид [Cys(Asm)]C-51 (0.07 г) растворяли в 5 мл 10% AsOH и хроматографировали на колонке (10 × 250 мм) с Ultrasphege ODS, 10 мкм. Элюцию проводили градиентом концентрации CH₃CN в 0.1% TFA от 0 до 10% за 5 мин далее 0.5% в минуту со скоростью потока 2 мл/мин. Фракции, соответствовавшие целевому продукту, объединяли, упаривали и лиофилизовали. Полученное вещество (0.045 г) растворяли в 1.5 мл органической фазы системы *n*-бутанол–AsOH–вода, 4 : 1 : 5 и хроматографировали на колонке (20 × 350 мм) с сефадексом G-25 fine, уравновешенным водной фазой той же системы. Элюцию проводили органической фазой указанной системы со скоростью 18 мл/ч. Фракции, содержащие целевой продукт (контроль ТСХ) объединяли, упаривали, растворяли в 5 мл деионизованной воды и лиофилизовали. Получено 0.028 г (23.9% в расчете на стартовую аминокислоту – аспарагин, присоединенную к полимеру).

Пептиды C-140, C-260, C-340 и C-350 (0.10–0.15 г) растворяли в 10–20 мл 10% AsOH и хроматографировали на колонке (25 × 250 мм) с Диасорбом-C₁₆T, 10 мкм. Элюцию проводили градиентом концентрации (0.5% в минуту) CH₃CN в 0.1% TFA со скоростью потока 12 мл/мин. Фракции, соответствующие целевым продуктам, объединяли, упаривали, остаток растворяли в воде и лиофилизовали. Пептид C-161 хроматографировали на колонке (16 × 250 мм) Vydac C₁₈, 10 мкм, элюируя градиентом концентрации CH₃CN в 0.1% TFA от 0 до 10% за 5 мин, далее 0.5% в минуту. Скорость элюции – 4 мл/мин. Фракции, соответствовавшие целевому продукту, объединяли, ацетонитрил упаривали, остаток разбавляли водой и лиофилизовали. Пептид C-370 (100 мг) растворяли при нагревании в метаноле и осаждали водой. Осадок отфильтровывали, промывали водой, эфиром и сушили. Полученное вещество растворяли в 10 мл 0.1% водного аммиака и хроматографировали на колонке (26 × 800 мм) с сефадексом G-50, элюируя пептид 0.1% водным аммиаком со скоростью 25 мл/ч. Выходы и характеристики полученных пептидов приведены в таблице.

Иммунизация мышей. Пептиды C-140 и C-161 конъюгировали с пероксидазой хрена, активированной периодатом натрия в соотношении 1 мг пептида на 4 мг пероксидазы [16, с. 128–137]. Для иммунизации были использованы мыши весом 18–20 г. Иммунизацию проводили внутрибрюшинно по 160 мкг конъюгата с интервалом 2 недели. Для первой инъекции использовали антиген, эмульгированный в полном адъюванте Фрейнда, в дальнейшем применяли неполный адъювант. Забор крови для получения иммунных антисыворо-

ток и проведения иммунохимических исследований проводили из хвостовой вены через неделю после 4-й инъекции.

Иммунизация кроликов. Пептиды [Cys(Asm)]C-51, C-140, C-161, C-260, C-340, C-350 и C-370 конъюгировали с обработанной периодатом натрия пероксидазой хрена в соотношении 1 мг пептида на 4 мг белка-носителя [16, с. 128–137]. Для иммунизации были использованы молодые кролики весом 1.5–2 кг. Иммунизацию проводили подкожно в область паховых и подлопаточных лимфатических узлов по 1 мг конъюгата на иммунизацию с интервалом в 10 суток. 1 мг конъюгата, растворенного в 1 мл изотонического раствора, эмульгировали в равном объеме адъюванта Фрейнда. Для первой иммунизации использовали полный адъювант, а для трех последующих – неполный. Каждым пептидом было иммунизировано три животных. Забор крови для получения иммунных антисывороток проводили из ушной вены.

Полученные кроличьи и мышьи антисыворотки тестировали с помощью иммунного блоттинга [1].

Иммунный и лигандный блоттинг. Для тестирования антисывороток методом иммунного блоттинга использовали препарат Т-кадгерина, полученный из мембран меди аорты человека путем солюбилизации белков детергентом CHAPS (3-[(3-холамидопропил)диметиламмония]-1-пропансульфонатом) и их последовательного фракционирования ионообменной (DEAE-Toyorearl) и металл (Zn²⁺)-хелатной хроматографией по методике [3]. Полученный препарат представлял собой сложную смесь мембранных белков с содержанием Т-кадгерина 0.5% от массы общего белка.

Препарат белков, содержащий Т-кадгерин, разделяли электрофорезом в 7% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия по методу [19]. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану электроблоттингом по методике [20]. Инкубацию блотов с антисыворотками против синтезированных пептидов и детекцию связавшихся антител проводили по стандартным процедурам иммуноблоттинга [16, с. 471–510]. Для калибровки применяли смесь стандартов молекулярных масс фирмы Bio-Rad (США), содержащую овальбумин (45 кДа), сывороточный альбумин (66 кДа), β-галактозидазу (116 кДа) и тяжелую цепь миозина (205 кДа) [1–3].

Липопротеиды для проведения лигандного блоттинга выделяли из плазмы крови человека путем последовательного центрифугирования в растворах бромида натрия различной плотности [9, 17]. Использованная нами фракция ЛНП обладала плавучей плотностью 1.019–1.063 г/мл. Концентрацию ЛНП (по белку) определяли методом Лоури в присутствии 1% додецилсульфата натрия, в качестве стандарта применяли бычий сывороточный альбумин. При проведении лигандного блоттинга вместо антисывороток использовали

ЛНП (в концентрации 100 мкг/мл), связывание которых с белками определяли с помощью антител к ЛНП и вторых антивидовых IgG-антител, конъюгированных с пероксидазой хрена.

Ингибирование связывания ЛНП антителами против синтетических пептидов. Равные количества (50 мкг) обогащенного препарата Т-кадгерина, полученного как указано выше, разделяли электрофорезом, переносили на нитроцеллюлозу и инкубировали в присутствии ЛНП фиксированной концентрации (40 мкг/мл) и общего IgG возрастающих концентраций (от 0 до 2.5 мг/мл). Концентрацию иммуноглобулинов класса G определяли с помощью иммуноферментного анализа, используя в качестве стандарта препарат IgG кролика фирмы Sigma (США). Количество связанных ЛНП определяли с помощью конъюгированных с пероксидазой хрена анти-ЛНП иммуноглобулинов и последующего сканирования блотов с помощью Hewlett Packard Scanjet 4P и программного обеспечения SigmaGel.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuzmenko Y.S., Bochkov V.N., Philippova M.P., Tkachuk V.A., Resink T.J. // *Biochem. J.* 1994. V. 303. P. 281–287.
2. Bochkov V.N., Tkachuk V.A., Philippova M.P., Stambolsky D.V., Buhler F.R., Resink T.J. // *Biochem. J.* 1996. V. 317. P. 297–304.
3. Tkachuk V.A., Bochkov V.N., Philippova M.P., Stambolsky D.V., Kuzmenko Y.S., Sidorova M.V., Molokoedov A.S., Spirov V.G., Resink T.J. // *FEBS Lett.* 1998. V. 421 (3). P. 208–212.
4. Ranscht B., Dours-Zimmermann M.T. // *Neuron.* 1991. V. 17. P. 391–402.
5. Grunwald G.B. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993. V. 5. P. 797–805.
6. Kuzmenko Y.S., Stambolsky D.V., Kern F., Bochkov V.N., Tkachuk V.A., Resink T.J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 246. P. 489–494.
7. Stambolsky D.V., Kuzmenko Y.S., Philippova M.P., Bochkov V.N., Bespalova Zh.D., Azmuko A.A., Kashirina N.M., Vlasik T.N., Tkachuk V.A., Resink T.J. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1998 (In press).
8. Takeichi M. // *Science.* 1991. V. 251. P. 1451–1455.
9. Bochkov V.N., Tkachuk V.A., Kuzmenko Y.S., Borisova Y.L., Buhler F.R., Resink T.J. // *Mol. Pharmacol.* 1994. V. 45. P. 262–270.
10. Van Regenmortel M.H.V. // *Synthetic Peptides in Biology and Medicine* / Eds K. Alitalo, P. Partanen, A. Vaheri. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1985. P. 67–74.
11. Hopp T., Woods K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 2141–2145.
12. Jahnin J. // *Nature.* 1979. V. 277. P. 491.
13. Welling G., Weijer W., van der Zee R., Welling-Westler S. // *FEBS Lett.* 1985. V. 188. P. 215–218.
14. Tanihara H., Sano K., Heimark R.L., St.-John T., Suzuki S. // *Cell Adhes. Commun.* 1994. V. 2. P. 15–26.
15. Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д., Бушуев В.Н. // *Биоорг. химия.* 1997. Т. 23. С. 46–55.
16. Harlow E., Lane D. // *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1988.
17. Havel R.J., Eder H.A., Bragdon H.H. // *J. Clin. Invest.* 1955. V. 34. P. 1345–1353.
18. Nose A., Tsuji K., Takeichi M. // *Cell.* 1990. V. 61. P. 147–155.
19. Laemmli U. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
20. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. P. 4350–4354.

Antibodies to Synthetic Peptide Fragments of T-Cadherin as Inhibitors of T-Cadherin Binding to Low Density Lipoproteins

M. V. Sidorova[#], A. S. Molokoedov, A. A. Azmuko, D. V. Stambolskii, N. M. Kashirina, V. N. Bochkov, V. A. Tkachuk, and Zh. D. Bespalova

Russian Cardiological Research and Production Association, Russian Ministry of Health, ul. Tret'ya Cherepkovskaya 15a, Moscow, 121552 Russia

Potential antigenic determinants of the atypical lipoprotein-binding proteins T-cadherin (p105) and its precursor (p130) from cells of human smooth muscles were synthesized by the solid phase method according to the Fmoc-scheme. These corresponded to the 51–61, 140–160, 161–179, 260–271, 340–352, 350–362, and 370–385 sequences of p130 and were chosen on the basis of computer analysis of its antigenic structure. The conjugates of the peptides with horseradish peroxidase were used for the immunization of mice and rabbits. Antisera against the peptides corresponding to the 140–160, 161–179, and 260–271 sequences of p105 were shown by immunoblotting to react with p105, which we isolated from the vascular cells of smooth muscles and earlier identified as T-cadherin. These antisera inhibited the binding of low density lipoproteins with p105 in a dose-dependent manner. These results confirmed the identification of the p105 protein as T-cadherin and demonstrated the fundamental possibility of studying the interaction of this protein with low density lipoproteins by using antipeptide antibodies that inhibit binding.

Key words: antigenic determinant; T-cadherin, synthetic peptides; solid phase synthesis; conjugates

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 414-6716; fax: +7 (095) 414-6786; e-mail: sag@mail.infotel.ru.