



УДК 577.112.012.6

## МЕТОДЫ ПОИСКА АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ДЛЯ БЕЛКОВ С ИЗВЕСТНОЙ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ

© 2000 г. Р. П. Евстигнеева, М. Е. Палькеева\*#

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,  
117571, Москва, просп. Вернадского, 86;

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

Поступила в редакцию 10.04.98 г. Принята к печати 11.12.99 г.

Рассмотрены теоретические и экспериментальные методы определения антигенных детерминант белков с известной аминокислотной последовательностью. Проведена систематизация методов на основе используемых теоретических подходов. Приводятся данные по сравнительной оценке эффективности различных предсказательных методов, а также примеры нахождения эпитопов экспериментальным путем для ряда белков.

*Ключевые слова:* белки, аминокислотная последовательность, предсказание антигенной структуры; антигенная детерминанта; эпитопное картирование; пептидные библиотеки.

### СОДЕРЖАНИЕ

Введение.

1. Факторы, влияющие на антигенность белка.
2. Теоретические методы поиска антигенных детерминант белков (предсказание антигенной структуры белка).
  - 2.1. Методы локализации антигенных детерминант, основанные на определении физико-химических свойств полипептидной цепи.
  - 2.2. Статистические методы предсказания вторичной структуры белка.
  - 2.3. Предсказание третичной структуры белка.
  - 2.4. Практическое применение теоретических предсказаний.
  - 2.5. Сравнительная оценка методов предсказания антигенных детерминант.
3. Экспериментальные методы поиска антигенных детерминант.
  - 3.1. Фрагментация комплекса антиген–антитело.
  - 3.2. Генно-инженерные методы.
  - 3.3. Рентгеноструктурный анализ контактных участков антигенного комплекса.

3.4. Использование синтетических пептидов для локализации антигенных детерминант.

Заключение.

### ВВЕДЕНИЕ

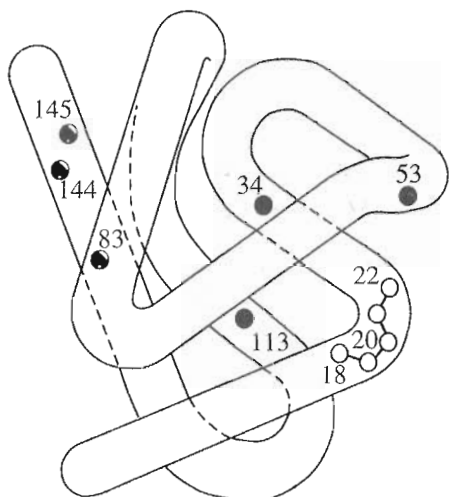
Понимание биологических функций белков – один из центральных вопросов биохимии. Белки реализуют свои функции через связывание с молекулой-мишенью, образуя с ней комплекс. Образование комплекса может быть обратимым (фермент – субстрат), может быть необратимым (гаптоглобин – гемоглобин) или же комплекс может проявлять устойчивость, среднюю между двумя этими крайними состояниями.

В любом случае, определение структурных параметров участка белка, ответственного за его связывание с мишенью, необходимо для понимания способа действия молекулы в целом. Разработка подхода к синтетической имитации фрагмента, определяющего биологическую роль белка, открывает массу возможностей для воспроизведения активности этого белка и манипулирования ею. Особенно большое значение такой подход имеет для изучения антигенных свойств белков при решении иммунологических проблем. Успешная замена белка-антигена синтетическим пептидным фрагментом позволяет создать систему диагностики заболевания, способствует эффективной защите от инфекций путем создания вакцины.

Белок является антигеном, если он способен реагировать с антителами или Т-лимфоцитами. Способность белка индуцировать иммунный ответ организма определяет его иммуногенность [1].

Сокращения: ароС-II – аполипопротеин С-II; ароЕ – аполипопротеин Е;  $B_{\text{норм}}$  – температурный фактор; ELISA – метод твердофазного иммуноферментного анализа;  $\beta_2$ -gpI, gp41 и gp33a – гликопротеины  $\beta_2$ -gp-I, 41 и 33a; HEV – вирус гепатита Е; HIV – вирус иммунодефицита человека; HTLV – вирус Т-клеточного лейкоза; MAP – мультиплетный антигенный пептид; МНС – главный комплекс гистосовместимости; ORF3 – белок вируса гепатита Е; P2-C – белок вируса Коксаки; SCR – структурно-консервативный регион.

# Автор для переписки (тел.: (095) 414-67-16; факс: (095) 414-67-86; e-mail: peptide@cardio.ru).



**Рис. 1.** Аминокислотные остатки, образующие эпитопы в полипептидной цепи миоглобина кашалота [5]. Две конформационные детерминанты, образуемые остатками 34, 53, 113 и 83, 144, 145, распознаются разными моноклональными антителами. На основании реакции с пептидными фрагментами был сделан вывод о том, что участок 18–22 – это часть непрерывного эпитопа.

Иммунный ответ организма, вызываемый действием на него антигена, осуществляется при участии иммунокомпетентных клеток – В- и Т-лимфоцитов. В-Лимфоциты и антитела (иммуноглобулины) распознают антиген, находящийся в нативном виде в физиологической жидкой среде (гуморальный иммунитет). Специфические участки аминокислотной последовательности белка-антигена, с которыми реагируют антитела, называются В-эпитопами. Т-Лимфоциты распознают такие антигены, которые уже претерпели процессинг в клетке и утратили нативную форму. Образующиеся в результате протеолиза пептиды (Т-эпитопы) перемещаются на поверхность антигенпрезентирующей клетки, связываются с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) и становятся доступными для восприятия Т-лимфоцитами (клеточный иммунитет).

Для успешной имитации белка-антигена необходимо прежде всего понимание антигенных свойств *нативной* молекулы, т.е. локализация в последовательности белка участков, взаимодействующих с иммуноглобулинами и В-лимфоцитами. Такие участки были названы антигенными детерминантами, или эпитопами, а те фрагменты гипервариабельной области антитела, которые контактируют с эпитопами, получили название паратопов [2].

Исторически эпитопы были разделены на секвенциальные – отвечающие линейному отрезку полипептидной цепи, и конформационные, включающие в себя аминокислотные остатки, кото-

рые находятся в разных участках полипептидной цепи, но собраны в эпитоп в результате ее упаковки цепи в нативном белке [3]. Атасси подразделил эпитопы на непрерывные и прерывающиеся [4]. На рис. 1 показаны эпитопы разного типа в миоглобине по данным работы [5].

Тот факт, что антитела к белку-антигену способны взаимодействовать также с небольшими линейными пептидами, соответствующими фрагментам его последовательности, подтверждает существование непрерывных эпитопов [6].

Выявление конформационных эпитопов требует рентгеноструктурного исследования комплекса антиген–антитело, что является весьма серьезной задачей, поэтому наибольшее количество информации об антигенной структуре белков основано на сведениях о непрерывных эпитопах. В настоящее время для локализации В-эпитопов предложено значительное количество методов, рассмотрению некоторых из них посвящен данный обзор. Эпитопы, распознаваемые Т-лимфоцитами (Т-эпитопы), изучены хуже, однако проблема их локализации чрезвычайно важна в свете создания противовирусных вакцин. Вопросы поиска Т-эпитопов в обзоре затронуты лишь частично.

## 1. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА АНТИГЕННОСТЬ БЕЛКА

Современная иммунология предлагает двойственную модель узнавания антигена антителом [1]. С одной стороны, реакция антигена с антителом происходит благодаря пространственной комплементарности их молекул, т.е. топографическому соответствию взаимодействующих участков. Комплементарность предполагает, что антигенная детерминанта должна находиться на поверхности белковой глобулы, иначе говоря, должна быть доступна для антитела.

С другой стороны, при взаимодействии антиген–антитело происходит конформационная перестройка в том участке полипептидной цепи, который охватывает детерминанта, что предполагает его подвижность. Такая укладка полипептидной цепи, которая обеспечивает экспонирование антигенных детерминант, соответствует определенной вторичной и третичной структуре белка.

Сворачивание полипептидной цепи белков, функционирующих в основном в водной среде, происходит таким образом, что гидрофобные остатки плотно контактируют друг с другом и оказываются внутри белковой глобулы, а гидрофильные (полярные) группы попадают на поверхность белка. Иначе говоря, неполярные остатки выталкивают воду из первоначально “рыхлого” клубка полипептидной цепи, что приводит к компактности и стабильности гидрофобного ядра, а экспони-



рование полярных групп на поверхности глобулы облегчает гидратацию белка. Стабильная и биологически активная структура белка поддерживается благодаря кооперативности водородных, ионных, дисульфидных связей, ван-дер-ваальсовых сил и гидрофобных взаимодействий [7].

Рассмотренные выше факторы, влияющие на антигенность белка, положены в основу различных методов локализации эпитопов. Условно методы разделены на теоретические и экспериментальные (полуэмпирические).

## 2. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПОИСКА АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ БЕЛКОВ (ПРЕДСКАЗАНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА)

Как уже упоминалось, антигенная детерминанта должна находиться на поверхности белка. Однако выявить поверхностно-локализованные участки возможно только при рентгеноструктурном анализе кристаллов белков, что является особой проблемой. В этой связи широкое распространение получили методы теоретического предсказания антигенных детерминант, использующие только сведения о первичной структуре белков.

Развитие теоретических методов локализации эпитопов стало возможным благодаря прогрессу техники секвенирования ДНК и белков.

В основе теоретических предсказаний лежит установление определенных физико-химических и статистических характеристик участков полипептидной цепи и выяснение корреляции этих характеристик с антигенностью. Такие свойства, как поверхностная доступность, гидрофильность, сегментная подвижность, конформационные статистические параметры, рассчитываются с помощью компьютерных программ для каждого аминокислотного остатка и представляются в виде шкал (профилей), по экстремумам которых выбираются предполагаемые антигенные детерминанты.

Любое теоретическое предсказание начинается с обращения к банкам данных, содержащим сведения об известных белках, таким, как "Atlas of Protein Sequence and Structure" Дэйхофа [8], "Brookhaven Protein Data Bank" [9], "SWISS-PROT" [10] и др. Объем банков данных неуклонно расширяется; в настоящее время число известных аминокислотных последовательностей превышает 100000 [10], однако количество белков с расшифрованной трехмерной структурой составляет всего 15000 [11]. Ниже описаны различные подходы к теоретическому предсказанию антигенных детерминант белков по аминокислотной последовательности.

### 2.1. Методы локализации антигенных детерминант, основанные на определении физико-химических свойств полипептидной цепи

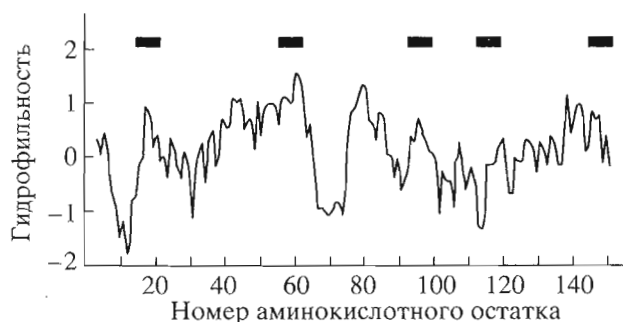
Антигенность белка, как уже упоминалось, обусловлена конкретными физико-химическими свойствами полипептидной цепи, такими, как поверхностная доступность и сегментная подвижность ее отдельных участков. Эти свойства и связанные с ними параметры (температурный фактор, гидрофильность, гидрофобность и т.п.) определяются специальными методами и могут быть представлены в виде профилей, охватывающих всю цепь.

Хопп и Вудс [12] предположили, что участки с повышенной гидрофильностью претендуют на роль антигенных детерминант, так как они локализованы на поверхности белковой глобулы. В предложенном авторами методе [12] каждой аминокислоте в белковой последовательности присваивается индекс гидрофильности, установленный по коэффициентам распределения аминокислот между водной и органической фазами, и далее эти величины усредняются перемещением рамки в 6 а. о. вдоль всей полипептидной цепи. Среднее значение для рамки показывает склонность данного участка к экспонированию. По полученным данным строятся профили гидрофильности и по максимальным пикам профиля выбираются потенциальные антигенные детерминанты. В качестве примера на рис. 2 приведен профиль гидрофильности, полученный для миоглобина путем расчета по методу Хоппа и Вудса [12].

Паркер и др. [13] на основе данных жидкостной хроматографии построили профили гидрофильности для нескольких белков исходя из определения вклада времени удерживания отдельных аминокислот во время удерживания модельных синтетических пептидов общей формулы  $\text{Ac-Gly-X-X-(Leu)}_3\text{-(Lys)}_2\text{-амид}$ , где X – любая из 20 аминокислот. Показано, что данные профили хорошо согласуются с данными об известных эпитопах рассматриваемых белков.

Гидрофобность является также важной характеристикой эпитопов, так как, во-первых, спрятанные гидрофобные участки глобулы могут экспонироваться при антигенном взаимодействии, а во-вторых, существует предположение, что Т-клеточные эпитопы должны встраиваться в гидрофобную мембрану антигенпрезентирующей клетки [1].

Кайт и Дулиттл [14] предложили оценивать гидрофобность (гидрофильность) различных участков белка аналогично методу Хоппа–Вудса; рамка сканирования охватывает 9 а. о., а ее среднее значение показывает склонность данного сегмента к спрятанности или экспонированности.



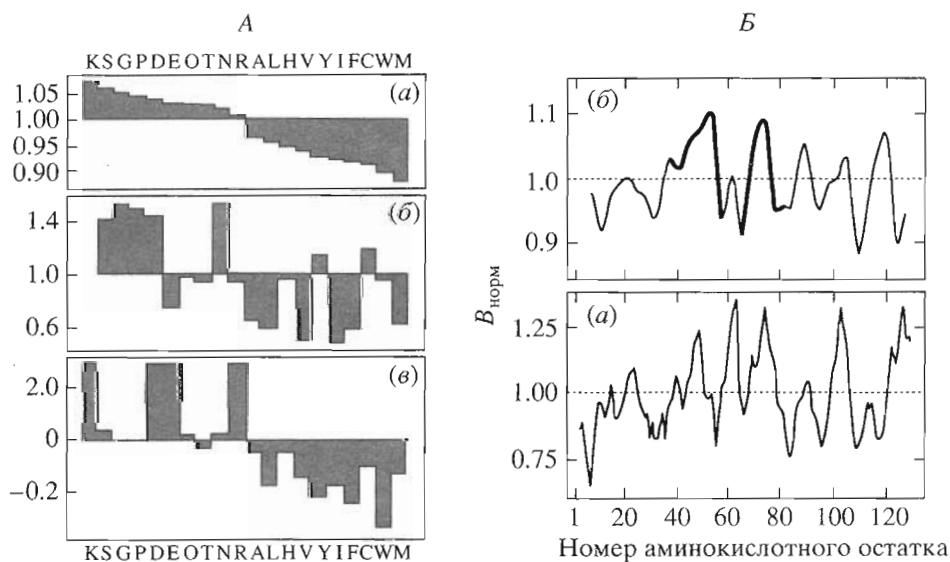
**Рис. 2.** Профиль гидрофильности миоглобина по Хоппу и Вудсу [12]. Черные прямоугольники показывают участки белка, соответствующие экспериментально найденным антигенным детерминантам.

Айзенберг и др. [15] предложили метод предсказания периодичности в чередовании гидрофильных и гидрофобных остатков в полипептиде в зависимости от типа вторичной структуры. Фактор гидрофобности влияет на образование амфипатичной спирали, т.е. такой регулярной вторичной структуры, в которой гидрофильные и гидрофобные остатки находятся на противоположных сторонах спиральных участков полипептидной цепи с определенной периодичностью. Де Лизи и Берзовский [16] предположили, что Т-эпитопы должны иметь вид амфипатичной спирали. Для поиска Т-эпитопов также предложен алгоритм Ротбарда [17].

На использовании фактора гидрофобности построен метод Лима [18], отражающий тенденцию известных белковых структур иметь в составе  $\alpha$ -спиралей гидрофобные остатки в позициях  $i$ ,  $i+3$  или  $i, i+4$ , а для  $\beta$ -складок – в позициях  $i, i+2$ .

Ряд методов ставит в соответствие антигенность и поверхностную локализацию сегментов белка. Паркер и Ходжес [19] предложили идентифицировать в белке полярные трипептидные сегменты, имеющие склонность к локализации на поверхности белковой глобулы (по данным рентгеноструктурного анализа). Было предложено локализовать антигенные детерминанты путем расчета индекса экспонированности участков белка (protruding index) [20].

Рядом исследователей было показано, что антигенность различных участков белка зависит от гибкости сегментов полипептидной цепи [21, 22]. Карплюс и Шульц [23] разработали метод предсказания эпитопов на этой основе. Мерой гибкости цепи в данном методе служит температурный фактор  $S^{\alpha}$ -атома –  $B$ , который определяется из кристаллографических данных для ряда белков. Для каждого из 20 природных аминокислотных остатков при анализе 31 белка значения фактора  $B$  усредняются (нормализуются), давая  $B_{\text{норм}}$ . Кроме того, учитывается влияние соседних остатков. На рис. 3А (а) показан профиль  $B_{\text{норм}}$  для 20 а. о., а также профили конформационных потенциалов по Чоу–Фасману (б) и гидрофильности по Хоппу–Вудсу (в) для этих же остатков. Видно,



**Рис. 3.** Графическая интерпретация метода предсказания гибкости полипептидной цепи по Карплюсу–Шульцу [23]. А. Коэффициенты для отдельных аминокислотных остатков (показаны вверх и вниз): а – средние значения температурного фактора  $B_{\text{норм}}$  для 31 белка из баз данных; б – значения вероятности нахождения во вторичной структуре по методу Чоу–Фасмана [26]; в – индексы гидрофильности по Хоппу–Вудсу [12]. Б. Профили для яичного лизоцима: а – экспериментальные  $B_{\text{норм}}$  по данным рентгеноструктурного анализа; б – профиль подвижности по методу Карплюса–Шульца. Экспериментально найденные антигенные детерминанты выделены жирной линией.



что шкала гибкости значительно отличается от двух других профилей. Авторы, однако, считают, что разработанный ими метод предсказания антигенных детерминант на основе оценки гибкости цепи предлагает принципиально новый подход в дополнение к уже существующим предсказательным методам. В сочетании с несколькими альтернативными методами предсказание гибкости должно способствовать эффективному выбору антигенных детерминант. Из рис. 3Б видно, что экспериментально найденные для лизоцима эпитопы соответствуют участкам этого белка, имеющим максимальную подвижность.

Фреммелем [24] предложен расчет коэффициента корреляции между подвижностью аминокислотного остатка в полипептидной цепи и частотой его мутаций при эволюции белка из белка-предшественника. Автором показано, что в наибольшей степени мутации в белках происходили на поверхности молекулы и в участках с наибольшей подвижностью, что делает очевидным корреляцию подвижности, экспонированности и частоты мутаций остатков с локализацией антигенных детерминант.

Уэллинг и Уэйджер [25] оценили частоту встречаемости остатков каждой из 20 природных аминокислот в известных антигенных детерминантах. Значение антигенности для каждого остатка выводилось из частоты его встречаемости (процентного содержания) в известных антигенных детерминантах. На основании полученных данных была разработана компьютерная программа, графической интерпретацией которой является профиль частоты встречаемости аминокислотных остатков анализируемого белка в составе известных эпитопов, по максимумам профиля выбираются потенциальные антигенные детерминанты.

## 2.2. Статистические методы предсказания вторичной структуры белка

Статистические предсказательные методы, как правило, опираются на предположение о том, что антигенные участки белка расположены во фрагментах с регулярной вторичной структурой –  $\alpha$ -спиральной или  $\beta$ -складчатой.

Метод Чоу и Фасмана [26] основан на результатах статистического анализа 15 известных структур кристаллических белков, проведенного с целью определения конформационных склонностей различных аминокислотных остатков. Разные остатки обладают неодинаковой возможностью (probability) находиться в составе  $\alpha$ -спирали ( $P_\alpha$ ) или  $\beta$ -складчатой структуры ( $P_\beta$ ), которая определяется по формуле  $P = f/f'$ , где  $f = n/m$  ( $n$  – общее число конкретных остатков во всех исследуемых белках,  $m$  – число таких остатков в участках белков с данной конформацией), а  $f'$  – среднее

значение  $f$ , то есть сумма всех  $f$ , деленная на 20 – общее число аминокислот. Значение  $P < 1$  выявляет остатки, весьма редко входящие в данную конформацию, например, Gly ( $P_\alpha = 0.53$ ), Glu ( $P_\beta = 0.26$ ).  $P$ , равное 1, означает, что остаток встречается с одинаковой вероятностью во всех конформациях. Значение  $P > 1$  свидетельствует о сильной склонности к включению в определенную вторичную структуру, например, Glu ( $P_\alpha = 1.53$ ), Met ( $P_\beta = 1.67$ ). Метод предлагает эмпирические правила для группирования остатков по склонности к образованию спирали или складки. В оригинальной работе точность метода определена в 77%, однако, некоторые исследователи считают ее более низкой – 50–55% [7, 27, 28]. Недостатком метода является то, что он не учитывает влияние межостаточных взаимодействий среднего и дальнего порядка на образование вторичной структуры, однако данный метод часто используется в различных компьютерных программах, включающих в себя и другие предсказательные модели.

Гарнье, Осгуртп и Робсон [29] предложили преодолеть указанный недостаток метода Чоу–Фасмана путем учета эффектов соседних аминокислотных остатков. Предложенный ими метод предсказания вторичной структуры основан на теории информации, с помощью которой оценивается частота встречаемости каждого остатка в четырех возможных конформациях полипептидной цепи: спираль, развернутая цепь, обращенный поворот и клубок. Определенная конформация для остатка выбирается по данным КД-спектроскопии для 25 известных белковых структур. Точность предсказания повышается с помощью учета взаимодействия данного остатка с восемью другими справа и слева от него.

Птицын и Финкельштейн [30] применили принцип топологического представления полипептидной цепи, плавающей по гидрофобной поверхности; четыре типа конформаций ( $\alpha$ -спираль,  $\beta$ -складка, петля и  $\beta$ -изгиб) представлены в виде плавающих бревен с различной степенью погружения. Результирующее конформационное состояние полипептидной цепи определяется построением матрицы с помощью коэффициентов, отражающих взаимодействия как близко расположенных аминокислотных остатков, так и взаимодействия среднеудаленных и далеко отстоящих остатков в какой-либо из четырех конформаций. Данный метод в отличие от описанных выше учитывает влияние окружающей среды (растворителя) на укладку полипептидной цепи.

Для предсказания вторичной структуры белка широко используется анализ вероятных конформаций боковых цепей (ротамеров), полученных вращением боковых групп вокруг  $C^\alpha$ -N-скелета.

Найдено, что всего лишь 67 функциональных ротамеров способны охватить весь круг ориентаций боковых групп для 17 из 20 аминокислот, кроме Met, Lys, Arg, имеющих наиболее длинную боковую цепь [31]. Жанином и др. [32] установлено, что различные боковые цепи характеризуются своими предпочтительными значениями двугранных углов вращения  $\chi$ , принимаемыми в соответствии с минимальной свободной энергией. Таким образом, минимизацию свободной энергии всего белка можно рассматривать как функцию свободной энергии боковых цепей и доступности их растворителю [32]. Данный алгоритм нашел свое выражение в профилях “доступности” (accessibility).

### 2.3. Предсказание третичной структуры белка

Методы предсказания третичной структуры белка, как правило, не приводят к получению профилей, по которым можно выбрать непрерывные антигенные детерминанты. Однако методы конформационного анализа позволяют получить важную информацию о возможности локализации предполагаемых конформационных детерминант в определенной части белка. С помощью компьютерных программ, по данным теоретического конформационного анализа, можно построить скелет полипептидной цепи исследуемого белка, приближенный к данным рентгеноструктурного анализа.

Определение наиболее близкой к нативной конформации белка предполагает сравнение анализируемого белка с гомологичными ему из банков данных, отнесение исследуемого белка к определенному структурному классу, а также выявление в нем фрагментов, подобных известным пептидным антигенным детерминантам.

За последние несколько лет объем информации о методах предсказания третичной структуры белка значительно возрос. Критической оценке различных предсказательных методов посвящено несколько больших обзоров [33–37].

Среди предсказательных методов можно условно выделить несколько:

- моделирование по гомологии (homology modelling),

- распознавание структурно-консервативных единиц – мотивов,

- выявление аналогий структур двух и более идентичных последовательностей из одного структурного класса (multiple sequence alignments),

- метод распознавания складчатых структур (threading),

- кластерный анализ,

- метод нейронных сетей (neural network, NN).

Следует отметить, что указанные подходы часто применяются в комбинации друг с другом. Подробное рассмотрение методов предсказания третичной структуры белка выходит за рамки

данного обзора, поэтому будут рассмотрены лишь некоторые примеры.

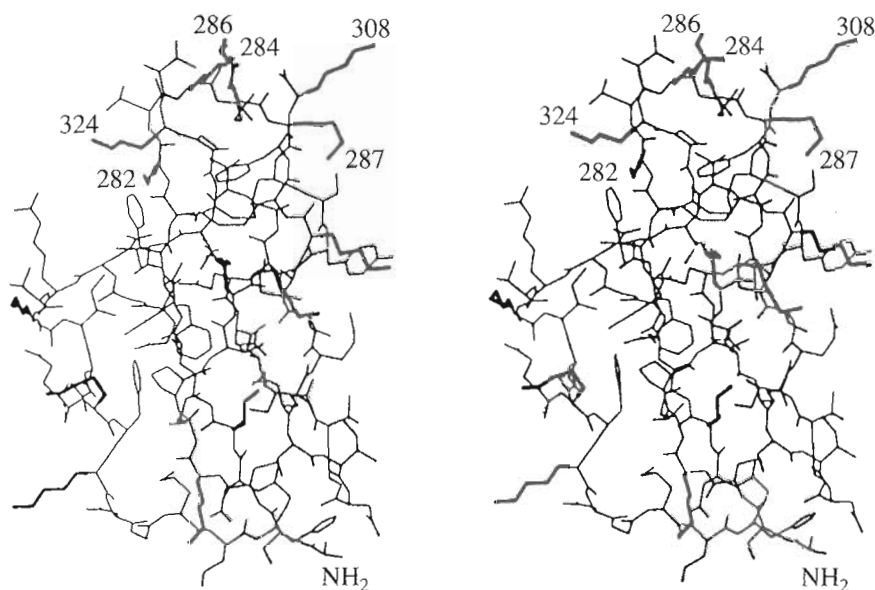
Предсказание третичной структуры белка на основе рассмотрения гидрофобных взаимодействий при укладке фрагментов с различной вторичной структурой друг относительно друга было сделано Чотиа и др. [38] и Кохеном и др. [39].

Сравнение изучаемого белка с другими белками, третичная структура которых известна, проводится по ряду различных параметров. Хопп [40] предложил определять эпитопы белка исходя из ориентации разных участков белковой молекулы на поверхности глобулы – их акрофильности. Профили акрофильности строятся на основании данных о частоте, с которой каждый аминокислотный остаток был обнаружен в экспонированном (акрофильном) состоянии в 49 белках с известными третичными структурами [40].

Новотны и др. [41] использовали контурные карты поверхности белка для объектов с известной третичной структурой, чтобы показать, что наиболее экспонированные участки поверхности соответствуют известным эпитопам этих молекул.

Интересный подход представляет собой идентификация структурно-консервативных регионов (SCR) анализируемой структуры путем сравнения с гомологичными SCR [42]. Для подгонки под SCR-структуру, взятую из базы данных, выбирается фрагмент, содержащий обычно остаток глицина, для которого превращение в другие аминокислоты в ходе эволюции исключено [42]. Для  $C^\alpha$ -атомов SCR рассчитываются скелетные координаты, которые усредняются, давая  $C^\alpha$ -ядро. В работе Бланделла и др. [42] приведен метод сравнения  $C^\alpha$ -ядра анализируемой структуры с общим ядром, включающим в себя свыше 90% аминокислот для белков, имеющих более чем 50% подобие по структуре.

Интересным примером моделирования по гомологии является определение третичной структуры V домена белка  $\beta_2$ -gpI, являющегося в комплексе с отрицательно заряженными фосфолипидами мишенью антифосфолипидных антител при аутоиммунных заболеваниях [43]. Сравнение последовательности V домена этого белка с доменом XVI белка фактора H, имеющего известную третичную структуру, и минимизация свободной энергии привели к структуре, в которой остаток Lys324 в C-концевой части белка и лизиновые остатки в положениях 282, 284, 286 образуют кластер (рис. 4) [44]. Интересно, что этот кластер охватывает участок белка, идентифицированный как сайт связывания с фосфолипидами и антителами к фосфолипидам [44], и C-концевой участок последовательности  $\beta_2$ -гликопротеина-I. Тестирование синтетического пептида, включающего в себя два указанных фрагмента, методом ELISA показало, что он с высокой специфичностью связывается с антителами от больных с антифосфо-



**Рис. 4.** Стереизображение (в двух проекциях) модели домена V белка  $\beta_2$ -гликопротеина-I, полученной с помощью минимизации свободной энергии [43]. Жирными линиями показаны 14 лизиновых остатков домена. Весь пептидный скелет и боковые цепи показаны тонкими линиями. Цифрами обозначены позиции лизиновых остатков, близких к C-концу  $\beta_2$ -gpI (Lys282, Lys284, Lys286, Lys287, Lys308, Lys324).

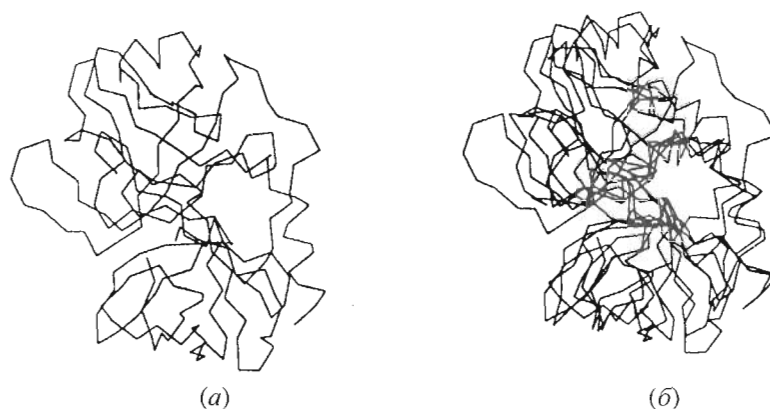
липидным синдромом. Возможно, данные фрагменты входят в состав конформационной антигенной детерминанты [45].

Одним из методов моделирования по гомологии является использование матриц сходства, которые обычно строятся на основе сравнения числа мутаций на ДНК-уровне для конкретного аминокислотного остатка в анализируемой структуре и в гомологичной последовательности [46]. Помимо матрицы мутаций применяется матрица антигенного сходства аминокислотных остатков (ASM), построенная на основе данных по аффинностям контактов аминокислотных остатков между субъединицами олигомерных белков [47]. В работе Ерошкина [47] отмечено, что при использовании матриц мутационного сходства в качестве потенциально антигенно сходных фрагментов фиксируются в основном гидрофобные, иммунологически мало значимые районы и пропускаются гидрофильные, которые стимулируют выработку антител. ASM нацелена в основном на поиск преимущественно гидрофильных антигенно близких фрагментов. При использовании синтетических пептидов для создания противовирусных вакцин может возникнуть проблема антигенного сходства пептида-вакцины с участком какого-либо эндогенного белка; в таком случае вакцинация может стать причиной аутоиммунного заболевания. Например, показано, что пептид белка полимеразы вируса гепатита В, в котором 6 аминокислот из 10 совпали с аминокислотными остатками фрагмента 66–75 основного белка миелина, индуцирует у кроликов аутоиммунные заболевания мозга. ASM позволяет сравнивать последовательность вирусного белка со всеми известными белками организма и выбирать в качестве эпитопов только те участки белка, которые редко или совсем в них не встречаются [47].

Определение гомологичных последовательностей в различных белках, возможно, позволит объяснить причины возникновения патологических аутоиммунных процессов, когда аутоантитела продуцируются организмом к эндогенным белкам в результате сходства антигенных детерминант хозяина с детерминантами белка какого-либо вируса [1]. Так, при анализе глутаматдекарбоксилазы, являющейся аутоантигеном при инсулинзависимом диабете, был обнаружен участок, подобный фрагменту белка P2-C из вируса Коксаки [48]. Полагают, что такое подобие (молекулярная мимикрия) индуцирует пролиферацию антител к глутаматдекарбоксилазе и развитие инсулинзависимого диабета у лиц, генетически чувствительных к воздействию энтеровирусов.

Большинство методов моделирования по гомологии предполагает определение третичной структуры по схожим последовательностям (последовательность узнает структуру). Предложено также использовать обратное подобие, когда по гомологичным структурным образцам находят подобные последовательности (структура узнает последовательность) [49]. Для предсказания третичной структуры белков из одного структурного класса используется поиск коротких консервативных участков – мотивов [35]. Этот метод часто пересекается с выявлением аналогий структур двух и более идентичных последовательностей из





**Рис. 5.** Компьютерное изображение третичной структуры (скелета) трипсина [52]: определенной с помощью рентгеноструктурного анализа (а) и с помощью предсказания методом нейронных сетей (б).

одного структурного класса (multiple sequence alignments) и с кластерным анализом [38].

В последнее время для моделирования третичной структуры белка широкое распространение получил метод распознавания складчатых структур (threading) [33–37]. Этот метод удобен для построения пространственной структуры последовательностей с отдаленной гомологией (<25%). Основная идея данного метода – создание компьютерной программы, которая как бы перемещает изучаемую аминокислотную последовательность в рамках трехмерной структуры известного белка (протягивание нити) и выбирает наилучшую третичную структуру из ряда альтернатив по оптимальным физико-химическим параметрам.

Для предсказания вторичной и третичной структур белка широко применяется метод нейронных сетей (NN) [50–53]. Как таковой, этот метод используется в различных областях науки для анализа экспериментальных данных. Идея искусственного нейрона заключается в выводе одного конечного результата из увязывания большого числа данных в одну процессирующую единицу – нейрон [51]. Группа таких единиц представляет собой нейронную сеть – разветвленную компьютерную программу. В отношении анализа аминокислотных последовательностей, система NN учитывает сразу массу факторов: положение аминокислотного остатка в цепи, принцип минимизации свободной энергии, виды конформаций –  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -складчатые структуры, неупорядоченный клубок; NN проводит соотношение этих данных с параметрами гомологичных структур и построение матриц сходства. Реперными точками в работе NN являются вынужденные, т.е. энергетически выгодные состояния аминокислотных остатков, которые предсказываются статистическими методами.

Использование нейронных сетей позволяет с высокой точностью предсказывать третичную структуру в отсутствие данных рентгенострук-

турного анализа, а построение двухслойных компьютерных систем при отнесении белка к известному структурному классу повышает точность предсказания вторичной и третичной структур до 70.2 [52], 71.7% [53]. На рис. 5 показано, как предсказанная с помощью нейронных сетей третичная структура  $C^\alpha$ -скелета трипсина согласуется с данными рентгеноструктурного анализа [52]. Данный метод позволяет предсказывать, какой вид складчатой структуры будет преобладать в молекуле изучаемого белка.

Сравнительно недавно для предсказания пространственной структуры белка предложены генетические алгоритмы (GA) [54]. GA – это вид компьютерной предсказательной программы, которая предполагает оценку свободной энергии при выборе оптимальной структуры белка не с привлечением методов математической статистики, а с помощью параметров оптимизации сборки гена. Метод представляется перспективным, но пока еще не нашел своего практического применения.

#### 2.4. Практическое применение теоретических предсказаний

Следует отметить, что компьютерные предсказательные программы обычно основаны на нескольких методах. Признано, что программы, использующие давно известные методы, такие, как алгоритмы Хоппа–Вудса [12], Хоппа [40], Чоу–Фасмана [26], Карплюса–Шульца [23], Уэллингга–Уэйджера [25] и др., дают достаточно высокую точность поиска антигенных участков белков, в то время как попытки создать универсальную комплексную программу предсказания складчатой структуры, коррелирующей с биологической активностью, пока еще являются “сизифовым трудом” [30].

С помощью методов Хоппа и Вудса [12] и построения профилей сходства с белками сыворотки крови были найдены эпитопы, отвечающие актив-



ным центрам интерлейкинов [55, 56]. На основе построения амфипатичных моделей был проведен поиск Т-эпитопов вируса гепатита А [57], тестирование соответствующих синтетических пептидов позволило обнаружить участки белка, ответственные за пролиферацию лимфоцитов.

С помощью предсказания по Птицину и Финкельштейну были определены эпитопы белка ORF3 вируса гепатита Е (HEV), два из шести синтезированных пептидов проявили активность в тестах с сыворотками крови больных [58]. Применение методов Хоппа–Вудса [12], Карплюса–Шульца [23], Ротбарда [17] и Птицына–Финкельштейна [30] для анализа антигенной структуры белков вирусов гепатита В и С также оказалось эффективным, это было подтверждено результатами тестирования соответствующих синтетических пептидов [59–61].

В работе [62] обсуждаются методы локализации эпитопов вирусных белков. Для белков вирусов табачной мозаики и гриппа по известным статистическим моделям рассчитаны потенциальные эпитопы, синтезированы соответствующие пептиды. Биологическое тестирование показало, что синтетические пептиды с успехом могут имитировать вируснейтрализующие эпитопы, т.е. участки, которые распознаются и блокируются антителами к вирусу. Последний при этом теряет свою инфекционность.

Примеров успешного применения расчетных методов поиска эпитопов можно привести множество. Однако следует отметить, что некоторые статистические методы неэффективны для определенных белков. Так, столь популярный метод Чоу и Фасмана [26] дает низкую точность при применении его в расчетах вторичной структуры липидсвязывающих белков (аполипопротеинов) [63]. Это объясняется тем, что данный метод при анализе аминокислотной последовательности не учитывает присутствие лиганда (липиды).

Для предсказания структуры белков, вовлеченных в липидный метаболизм, Сегрестом была предложена теория образования амфипатичной спирали [64]. Сегрест с сотр. установили для некоторых белков, что связывание фосфолипида с ними сопровождается изменениями в картине кругового дихроизма и предположили, что липидсвязывающие белки имеют специфические пептидные участки с амфипатичной структурой и  $\alpha$ -спиральной конформацией. Эти участки являются местами прикрепления фосфолипида благодаря гидрофобной внешней стороне спирали. Позднее было установлено, что липопротеины характеризуются наличием в аминокислотной последовательности характерных гидрофобных 11-членных участков, разделенных остатками пролина [65]. Такие участки наиболее отчетливо выявляются при предсказании вторичной структуры липопротеинов методом Кайта–Дулиттла [14]. Этот метод в сочетании с методом Гарнье–Осгуторпа–Робсона [29], ос-

нованным на данных КД-спектроскопии, и некоторыми другими популярен при анализе вторичной структуры липопротеинов и предсказании их антигенных детерминант.

Сложность предсказания антигенных детерминант для липидсвязывающих белков подтверждается примером  $\beta_2$ -gpI, который взаимодействует с отрицательно заряженными фосфолипидами [44]. Установлено, что вторичная структура этого белка в нативном состоянии содержит  $\beta$ -складки (40%),  $\beta$ -повороты (30%),  $\approx 30\%$  неупорядоченного клубка и менее 5%  $\alpha$ -спирали, а после взаимодействия с фосфолипидами содержание  $\alpha$ -спирали повышается до 15 (по данным КД-спектроскопии) [66] или до 27% (по данным FTIR) [67]. Однако участок этого белка, проявивший себя как липидсвязывающий сайт и распознаваемый антителами к фосфолипидам, входит в состав  $\beta$ -складчатой структуры [43] и, по-видимому, взаимодействие  $\beta_2$ -gpI с липидами происходит по механизму, отличному от предложенного Сегрестом [64].

Хорошие предсказательные результаты, подтверждаемые экспериментальными данными, для липопротеинов дает сравнение с гомологичными последовательностями и отнесение к структурным классам. Сравнительно точная пространственная модель HIV-протеиназы была смоделирована с помощью данных методов за два года до установления ее кристаллической структуры [63, 65].

Метод Хоппа и Вудса [12] часто дает хорошие результаты для анализа липопротеинов: так, эпитопы белков, входящих в состав ароЕ, ароС-II и липопротеинов различной плотности, были предсказаны по профилям гидрофильности; соответствующие синтетические пептиды использовались для выработки антител и проявили антигенную активность при тестировании методом ELISA [68].

Показано также, что для предсказания антигенных детерминант липидсвязывающих белков с успехом применимы комплексные методы, использующие гомологическое моделирование и сравнительный анализ в рамках одного структурного класса [37].

### *2.5. Сравнительная оценка методов предсказания антигенных детерминант*

Сравнительная оценка эффективности предсказания проводилась достаточно часто на ранних этапах развития предсказательных методов, когда они еще не были оценены по достоинству [7]. Подробная статистическая оценка эффективности разных предсказательных методов дана в обзоре Регенмортеда [69]. Четыре белка с известными эпитопами выбраны в качестве модельных объектов – лизоцим, миоглобин, миогемеритрин и белок вируса табачной мозаики. Для теоретического предсказания антигенной структуры модельных белков применены восемь методов; по

Значения  $\chi^2$  для четырех белков по 8 профилям предсказания антигенных детерминант [69]

Метод (ссылка)	$\chi^2$			
	миоглобин	белок вируса табачной мозаики	миогемеритрин	лизозим
Хопп и Вудс [12]	19.31	1.43	0.64	2.52
Паркер и др. [19]	19.83	4.09	1.31	15.25
Гарнье и др. [29]	26.37	1.12	0.47	5.01
Кайт и Дулиттл [14]	11.15	0.13	–	21.32
Уэллинг и др. [25]	3.14	0.61	0.08	1.39
Хопп [40]	18.82	5.95	1.80	30.13
Айзенберг и др. [15]	4.54	1.76	0.43	8.81
Карплюс и Шульц [23]	14.29	14.22	0.95	9.14

профилям, полученным с помощью этих методов, рассчитывается усредненная величина  $\chi^2$ , полученная сканированием максимумов профилей и дальнейшим компьютерным расчетом. Результаты представлены в таблице по данным обзора [69].

Чем выше значение  $\chi^2$  в таблице, тем выше точность метода; значение  $\chi^2$  меньше 3.84 считается статистически незначительным (эта величина – нижний предел точности предсказания). Из приведенных данных видно, что наиболее высокий уровень корректного предсказания достигается методами Карплюса–Шульца [23], Паркера–Ходжеса [19] и Хоппа [40].

Оценка точности различных методов в предсказании вторичной структуры 11 гормонов роста млекопитающих приведена в работе [70]. В сравнении с данными кристаллографии, методом Чоу и Фасмана [26] была корректно предсказана вторичная структура 49.9% участков полипептидной цепи, методы Гарнье [29], Кохена [39] достигли 60% точности предсказания, метод Лима [18] – 67.9%. Интересно, что комбинация всех этих методов дала точность 67.9% [70].

### 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ПОИСКА АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ

Экспериментальный подход к поиску антигенных участков белка с известной аминокислотной последовательностью основан на анализе связывания антител с фрагментами антигена, полученными химическим, протеолитическим или генно-инженерным способами. К экспериментальным методам следует также отнести рентгеноструктурные исследования комплекса антиген–антитело.

#### 3.1. Фрагментация комплекса антиген–антитело

Фрагментация антигенного белка предполагает его химическое расщепление по определенным остаткам или ферментативный гидролиз с

целью получения более мелких фрагментов, сохраняющих эпитопную специфичность, и дальнейшее исследование этих фрагментов.

В ранних работах антигенные фрагменты белка получали ограниченным протеолизом комплекса антиген–антитело с последующим хроматографическим разделением смеси пептидных фрагментов, их идентификацией, посадкой на полимерный носитель и тестированием в качестве антигенных детерминант [71, 72]. Такие детерминанты имитировали петлю, выступающую на поверхности белковой молекулы. Села показал, что конъюгаты пептидных фрагментов вирусных антигенов с полимерным носителем, введенные экспериментальным животным, частично защищают от вирусного воздействия [73]. Предложенный способ идентификации антигенных детерминант является одной из концепций создания вакцин. Указанным способом определены границы антигенного участка цитохрома с [74].

Фрагменты гликопротеина из *Trypanosoma brucei* были получены с помощью обработки антигена трипсином и бромцианом, очищены и протестированы методами радиоизотопного иммунного анализа и иммуноблоттинга [75]. Вторичная структура соматотропина и еще девяти регуляторных глобулярных белков была предсказана по Птицыну и Финкельштейну [30]; одновременно проводился иммунный анализ пептидных фрагментов, полученных в результате расщепления белка трипсином [76]. Изучение связывания пептидов со специфическими антителами показало высокую точность теоретического предсказания антигенной структуры данных белков.

Протеолиз и последующий иммуноанализ фрагментов антигенных белков позволяют достоверно локализовать антигенные детерминанты, однако к недостаткам метода следует отнести его трудоемкость и вероятность расщепления полипептидной цепи в районе антигенной детерми-



нанты. Данный метод позволяет определить только непрерывные эпитопы.

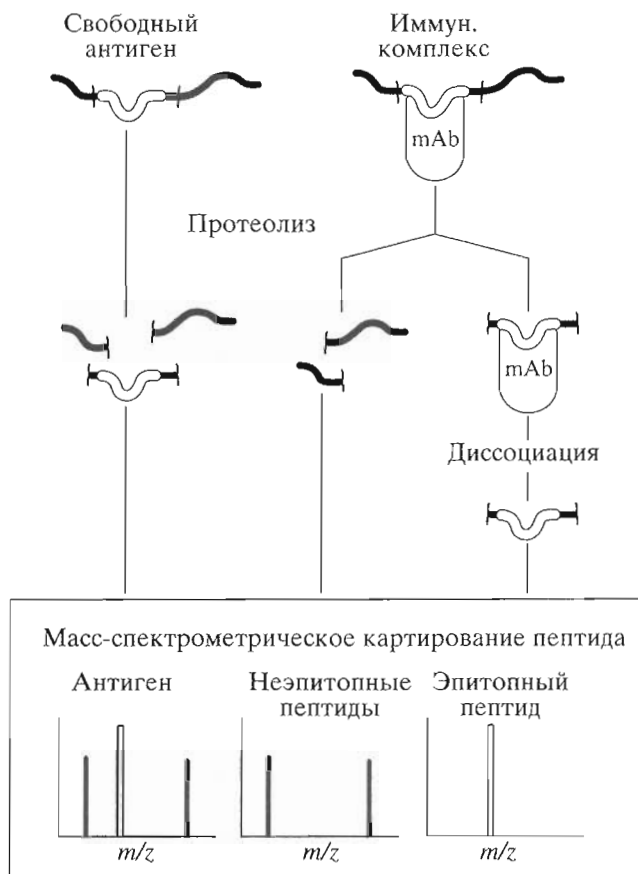
В работе [77] описан способ локализации антигенной детерминанты в С-концевой последовательности белка gpC3a. Синтетический пептид, соответствующий этой последовательности, был связан с иммобилизованным на тозиллактивированной сефарозе моноклональным антителом, иммунный комплекс подвергнут ограниченному протеолизу, далее проводилось прямое определение молекулярной массы пептида, связанного с антителом, методом  $^{252}\text{Cf}$ -плазменно-десорбционной масс-спектрометрии (рис. 6) [77]. Антигенный комплекс разрушали действием 4 М водного раствора  $\text{MgCl}_2$ , пептиды очищали методом ВЭЖХ и идентифицировали с помощью масс-спектрометрии. Авторы считают, что данный метод позволяет наиболее точно определить границы эпитопа.

### 3.2. Генно-инженерные методы

Для поиска антигенных участков белка применяют также методы генной инженерии, такие, как сайт-направленный мутагенез белка-антигена и получение пептидных фрагментов антигенных белков с помощью клонированных ДНК.

Основными инструментами генной инженерии являются рестриктазы – ферменты, расщепляющие ДНК в строго определенных участках, и векторы клонирования – небольшие кольцевые молекулы бактериальной ДНК, чаще всего плазмиды, способные к репликации (экспрессии) в бактериальных клетках под контролем своих собственных регуляторных элементов [78]. Клонирование ДНК, т.е. конструирование химерных молекул в составе вектора, позволяет получить большое количество идентичных молекул рекомбинантной ДНК, которые можно охарактеризовать.

Располагая аминокислотной последовательностью белка и набором синтетических олигонуклеотидов, последовательность которых соответствует небольшому участку белка, можно создать так называемую библиотеку кДНК. Этот процесс начинается с выделения тотальной мРНК ткани, затем проводится обратная транскрипция мРНК в двухцепочечную кДНК, включающую в себя и ДНК, кодирующую исследуемый фрагмент белка. Далее можно проводить биосинтез фрагментов белка с помощью специально сконструированных экспрессирующих векторов либо выполнить скрининг кДНК с помощью меченых синтетических олигонуклеотидов. Последующая визуализация специфических фрагментов ДНК или белка, отвечающих антигенным участкам, среди тысяч примесных молекул проводится с помощью совокупности методов, получивших название блоттинг (скрининг зондами или антителами).



**Рис. 6.** Схема поиска эпитопов белка gpC3a с применением масс-спектрометрии [77]. Использование иммобилизованного моноклонального антитела позволяет разделить неэпитопные и эпитопные пептиды после ограниченного протеолиза иммунного комплекса. Молекулярные ионы неэпитопных и эпитопных протеолитических пептидов показаны темными и светлыми полосами соответственно.

Сайт-направленный мутагенез предполагает биосинтез фрагментов с заменами аминокислот [79]. Изучение активности этих фрагментов в связывании с антителами, позволяет определить, какие аминокислоты в последовательности критичны для антигенности белка. Возможен также биосинтез мутантов белка с отсутствием целых доменов для определения их вклада в антигенность всей молекулы. Для белка  $\beta_2\text{-gpI}$ , который, как уже упоминалось, является антигеном в комплексе с отрицательно заряженными фосфолипидами, были получены мутанты, лишенные V (С-концевого) домена, путем экспрессии в клеточной системе бакуловируса насекомых [80]. Мутант, состоящий из I, II, III и IV доменов, реагировал с антителами к фосфолипидам в отсутствие фосфолипида, а мутант белка, включающий в себя I, II и III домены, не проявил антигенной активности. Поскольку известно, что в V домене находится фосфолипидсвязывающий сайт [44], ав-



торы предполагают, что эпитопы  $\beta_2$ -gpI должны экспонироваться в его IV домене, после соединения белка с фосфолипидом через V домен [80].

Клонирование пептидных фрагментов антигенов с помощью рекомбинантной ДНК применяется для поиска эпитопов в белках, в частности белках HIV [81]. Антигенные фрагменты выделяют путем скрининга моноклональными антителами, разделяют и идентифицируют пептиды. Этим способом были получены шесть пептидов – потенциальных эпитопов белка *Mycobacterium leprae*, один из них в тестах проявил связывание с антителами и может быть использован в создании вакцины [82].

С помощью кДНК белка  $\beta_2$ -gpI были выведены его аминокислотная и нуклеотидная последовательности и проведено сравнение с гомологичным белком фактора H, относящегося к семейству комплементарных контрольных белков [83]. Это сравнение позволило уточнить расположение дисульфидных мостиков в V домене  $\beta_2$ -gpI, где, как полагают, расположены антигенные детерминанты белка [43]. Интересно, что предложенная схема дисульфидных мостиков V домена согласуется с экспериментальными данными. Так, синтетический пептид, соответствующий участку Phe-Cys-Lys-Asn-Lys-Glu-Lys-Lys-Cys-Ser – предполагаемому эпитопу из V домена белка – с блокированными с помощью защитных групп функциями цистеина, проявил высокую антигенную активность в ELISA, в то время как циклический аналог данного пептида с дисульфидной связью, не соответствующей предложенной схеме, реагировал с антителами значительно слабее [84].

### 3.3. Рентгеноструктурный анализ контактных участков антигенного комплекса

Рентгеноструктурный анализ как метод изучения антигенных взаимодействий применяется в основном для установления строения участков связывания крупных молекул, таких, как МНС [85], иммуноглобулины [86]. Полученные кристаллографические данные позволяют определить расположение аминокислотных остатков, входящих в эпитоп. Однако данный метод применим лишь для кристаллизующихся белков и для высокоаффинных моноклональных антител, способных оставаться связанными с кристаллом [87]. Лавер с соавт. [88] считают единственно достоверным методом определения структуры антигенных детерминант получение комплекса антигена с Fab-фрагментом моноклонального антитела, кристаллизацию полученного комплекса и его изучение с помощью рентгеноструктурного анализа. Подобная работа была проделана, на-

пример, для лизоцима [89] и гемагглютинаина вируса гриппа [90].

### 3.4. Использование синтетических пептидов для локализации антигенных детерминант

В 70-е годы рядом исследователей показано, что антисыворотки к некоторым синтетическим пептидам, соответствующим коротким линейным участкам полипептидной цепи белка-антигена, хорошо реагируют с нативным белком [91–93]. Однако также установлено, что возникает перекрестная реактивность антител к нативному белку и к пептидам, не соответствующим эпитопам. Был сделан вывод о том, что число иммуногенных участков в белке меньше, чем число антигенных [93].

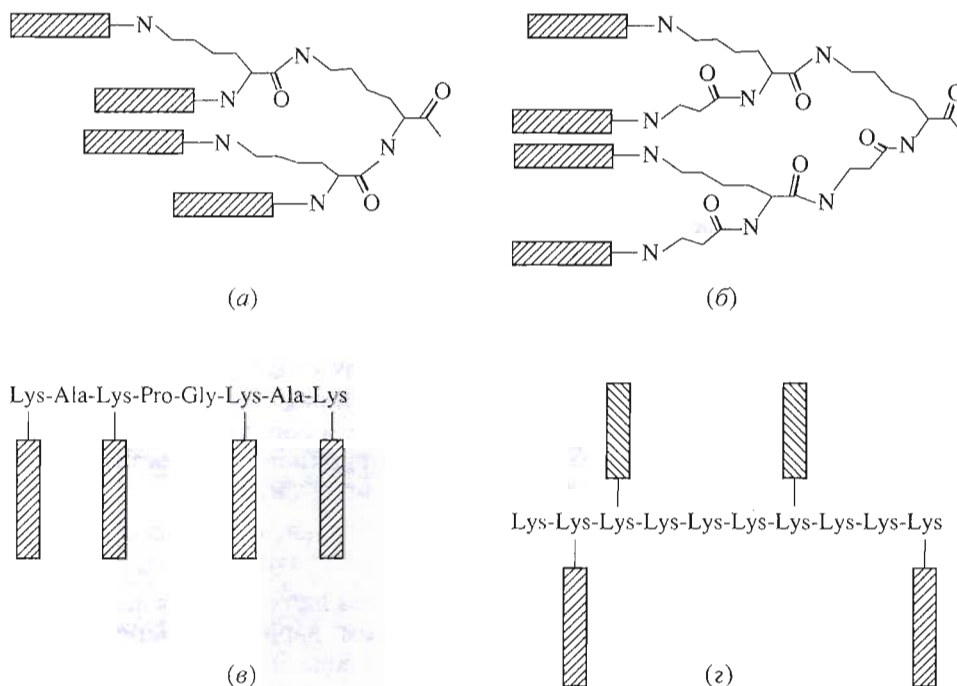
Тот факт, что пептиды могут реагировать с антителами в ELISA, привел к широкому применению синтетических пептидов в поиске антигенных детерминант.

Этот подход привлекателен, т.к. получить пептидный антиген технологически проще, чем белковый, а существующие предсказательные методы позволяют определить потенциальные антигенные детерминанты. Выбор пептидных фрагментов осуществляют в основном с помощью теоретических предсказаний. Тестирование синтетических пептидов в качестве потенциальных антигенных детерминант достаточно быстро осуществляется методом ELISA.

Так, при поиске T-эпитопов цитохрома с изучались синтетические пептиды, соответствующие пептидным продуктам протеолиза этого белка в организме [94–96]. С помощью метода ELISA были обнаружены иммунологически активные фрагменты. Интересно, что последующий анализ антигенной структуры цитохрома с с помощью методов Хоппа–Вудса [12], Карплюса–Шульда [23] и Ротбарда [17] выявил участки белка, почти соответствующие ранее синтезированным пептидам.

Использование пептидов для иммунного анализа и иммунизации сопряжено с рядом трудностей. С одной стороны, пептиды плохо сорбируются на пластике при тестировании их методом ELISA, с другой стороны, молекулярная масса пептида мала для индуцирования полноценного иммунного ответа и выработки антител [97]. Кроме того, эпитопы в нативном белке имеют в основном конформационный характер, антитела могут не распознать небольшой линейный пептид со случайной конформацией.

В этой связи был разработан ряд методов для повышения антигенности синтетических пептидов. Молекулярную массу синтетического антигена повышают конъюгацией его с высокомолекулярными веществами – белками, полисахаридами, искусственными высокомолекулярными



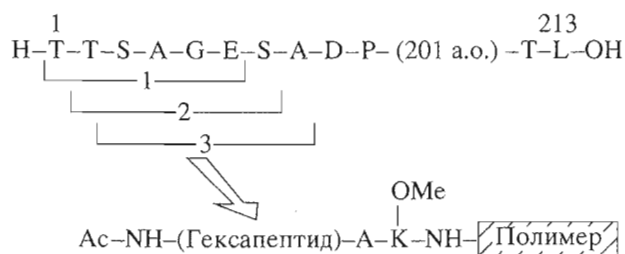
**Рис. 7.** Мультиплетные антигенные пептиды на каскадной или линейной лизиновой матрице [99]: (а) каскадный и асимметричный МАР с разветвленной лизиновой матрицей; (б) каскадный и симметричный МАР с разветвленным Lys-βAla; (в) линейно разветвленный МАР; (г) матрицей является полилизин. Заштрихованные прямоугольники соответствуют антигенным пептидам.

полиэлектролитами [71, 73, 97]. Перечисленные способы вносят дополнительную неопределенность как в структуру, так и в свойства полученных конъюгатов. В 1989 г. Тамом предложен новый тип синтетических антигенов – мультиплетные антигенные пептиды (МАР) [98], которые представляют собой мультивалентное ядро, чаще всего лизиновое, к которому присоединено несколько копий пептида (рис. 7) [99]. Такие конструкции имитируют небольшой белок с молекулярной массой более 10 кДа, причем доля пептидного антигена в них составляет около 80% массы всей конструкции. Мультиплетные комплексы высокоспецифичны в реакции с антителами, их преимуществом является также антигенная инертность лизинового ядра. Мультиплетные антигены оказались эффективны при поиске эпитопов, распознаваемых антителами с низкой аффинностью, либо эпитопов, скрытых в нативном белке [99]. Так, при анализе антигенной структуры белка β<sub>2</sub>-gpI, реагирующего с антифосфолипидными антителами аутоиммунного происхождения, с помощью ряда теоретических методов был выявлен один из потенциальных эпитопов. Соответствующий синтетический пептид проявил наибольшую активность в конкурентных тестах методом ELISA, однако связывания этого пептида с аутоиммунными антителами в отсутствие конкурента не наблюдалось. Будучи вклю-

ченным в состав МАР, пептид реагировал с аутоиммунными антителами, подобно нативному белку β<sub>2</sub>-gpI [100].

В настоящее время наиболее технологичным методом экспериментального поиска антигенных детерминант в последовательности белка является метод пептидного сканирования. Общая стратегия антигенного картирования белков с использованием перекрывающихся синтетических пептидов, охватывающих всю последовательность изучаемого белка, была предложена Атасси [72, 101, 102] и развита Гейсенем и др. [103]. В основе метода лежит имитация конформационного эпитопа путем использования сконструированного пептида, пришитого на полимерную поверхность. Пептид конструируется на основе рентгеноструктурных представлений о комплементарном связывающем регионе белка-антигена и должен содержать аминокислоты, входящие в этот регион (хотя в нативном белке они могут быть не связаны пептидными связями), причем расстояние C<sup>α</sup>-C<sup>α</sup> в синтетическом пептиде должно соответствовать расстоянию между этими аминокислотами в комплементарном участке антигена-антитела [101]. Данный подход как бы имитирует “прерывающуюся” антигенную детерминанту, в которой аминокислоты являются “углами” складчатой структуры, выступающими на поверхности и распознаваемыми антителами. Такая имитация про-





**Рис. 8.** Схема синтеза перекрывающихся гексапептидов из последовательности 213-членного белка оболочки (VP1) вируса ящура (FMDV), тип  $O_1$  на твердой фазе в методе "perscan" [103]. Каждый из гексапептидов синтезируют на отдельной полиэтиленовой игле с дипептидным спейсером. Пептиды пронумерованы в соответствии с позицией *N*-концевой аминокислоты в последовательности белка. После синтеза, оставаясь связанными с иглами, пептиды доступны для скрининга антителами.

водилась на основе изучения лизоцима, миоглобина и сывороточного альбумина, некоторые непрерывные эпитопы которых найдены [4, 5, 102]. Описанная конструкция представляет собой своеобразный спейсер, на который можно наносить антитела и определять границы эпитопа в линейной последовательности белка. Таким способом были успешно определены новые антигенные детерминанты лизоцима, миоглобина кита и сывороточного альбумина.

Группой Гейсена [103] была предложена модификация метода, позволяющая вести синтез перекрывающихся пептидов непосредственно на твердой фазе и сразу же тестировать методом ELISA без снятия с носителя.

Метод пептидного сканирования (perscan) основан на использовании в качестве твердофазного носителя для синтезируемых линейных пептидов полиэтиленовых игл, собранных в блоки по 96 штук с габаритами стандартных иммунологических планшетов. Поверхность игл содержит спейсер (ножку), например, -Ala-Lys(OMe)-, на котором синтезируется заданный пептид путем наращивания аминокислотных остатков с *C*-конца. По окончании синтеза пептиды остаются прочно связанными с иглами и могут быть использованы в экспериментах до 50 раз.

Основные стадии метода:

формирование списка пептидов;

синтез пептидов на иглах;

иммуноферментный сорбционный анализ синтезированных пептидов (ELISA);

обработка экспериментальных данных с помощью компьютера.

Выбор пептидов проводится с помощью теоретического предсказания и предполагает три варианта:

1. Выбор рамки определенной длины (содержащей определенное число аминокислотных остатков), передвигающейся по полипептидной последовательности с шагом определенной длины. При этом будут синтезироваться перекрывающиеся пептиды, охватывающие всю последовательность белка (рис. 8) [103]. Такой способ позволяет провести полное антигенное картирование белка.

2. Задание замены аминокислотных остатков в определенных положениях исследуемого пептида. Этот способ позволяет выяснить роль отдельных аминокислотных остатков во взаимодействии антиген-антитело.

3. Составление списка пептидов по выбору экспериментатора.

Синтез пептидов, связанных с иглами, ведется в ручном варианте твердофазного пептидного синтеза; как было сказано выше, аминокислоты наращиваются с *C*-конца через спейсер, внедренный в поверхность игл. Синтез ведется с использованием активированных эфиров, по окончании его  $\alpha$ -аминогруппа и боковые функциональные группы пептида деблокируются, а сам пептид остается прочно связанным с поверхностью иглы и не может быть снят с нее без разрушения. В последующем иммуноферментном твердофазном анализе пептиды, пришитые к иглам, играют роль твердой фазы и непосредственно обрабатываются препаратом антител.

Следует отметить, что при изучении антигенной активности пептидов методами иммуноферментного анализа возникает перекрестная реактивность антител к разным пептидным фрагментам, а также неспецифические взаимодействия. Влияние этих факторов можно минимизировать с помощью постановки эксперимента с контрольной инактивной сывороткой и блокированием мест неспецифического связывания.

Таким образом, метод пептидного сканирования соединяет в себе преимущества хорошо разработанных, высокотехнологичных методов синтеза и анализа пептидов.

Позже Гейсеном и сотр. [104] была разработана стратегия мимотопов – прерывающихся антигенных детерминант. Создание мимотопа включает в себя конструирование линейного пептида, содержащего аминокислотные остатки из удаленных непрерывных эпитопов, распознаваемых антителами. Таким образом, мимотоп имитирует конформационную антигенную детерминанту.

Развитие технологии мимотопов привело к созданию так называемых пептидных библиотек [105–113]. Создание пептидной библиотеки пред-



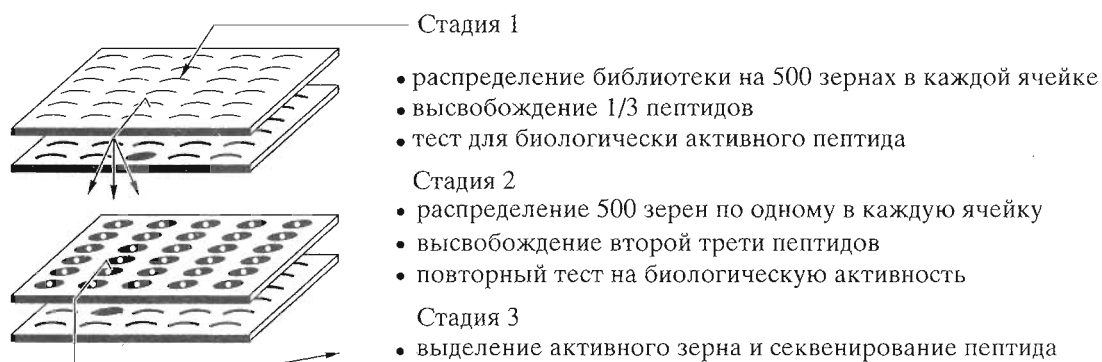


Рис. 9. Схема биологического тестирования пептидной библиотеки с двухстадийным высвобождением частей библиотеки [109].

полагает одновременный твердофазный синтез от сотен до миллионов разных пептидов, имеющих случайную последовательность с включением заданных аминокислотных остатков. Эти остатки при распознавании антителами позволяют выявить конформационный эпитоп. В настоящее время существует несколько технологий создания пептидных библиотек. Все они имеют общий принцип – с помощью комбинаторики задается число различных сочетаний аминокислот и проводится твердофазный синтез, однако принципы размножения пептидов различны.

Хоутен [105] предложил синтезировать 40–80 пептидов одновременно на 40–80 порциях полимера в микропористых полипропиленовых пакетиках; пептид можно выделять в свободном виде и анализировать. Такая технология позволяет синтезировать 260 различных 13-членных пептидов менее чем за 4 недели. Синтез пептидных смесей с различными комбинациями аминокислотных остатков позволяет существенно увеличить количество продуктов [106].

Храби и сотр. [107–109] создают комбинаторные пептидные библиотеки с помощью синтеза на поверхности нерастворимых зерен, по принципу “одно зерно – один пептид”. Размножение библиотеки производится либо путем деления полимера на порции определенным образом (“сплит-синтез”) [108], либо с использованием зерен с “ножками” трех типов [109]. Первая часть библиотеки отщепляется от “ножки” первого типа переводом ее в дикетопиперазин; вторая – высвобождается под действием водного раствора NaOH или паров аммиака; раствор, содержащий пептиды, фильтруется на 96-луночные планшеты для проведения биологических тестов (рис. 9) [109]. Аминокислотная последовательность пептида, образующего последнюю треть библиотеки, определяется с помощью деградации по Эдману. Этим методом определены конформационные эпитопы β-эндорфина и гликопротеина IIb/IIIa [109].

Фурка с сотр. [110] предложил синтез пептидной библиотеки, исходя из Boc-Ala-полимера и трех последовательных стадий присоединения:

разделение полимера на три порции;

деблокирование и присоединение к порциям остатков глутаминовой кислоты, фенилаланина и лизина;

перемешивание порций.

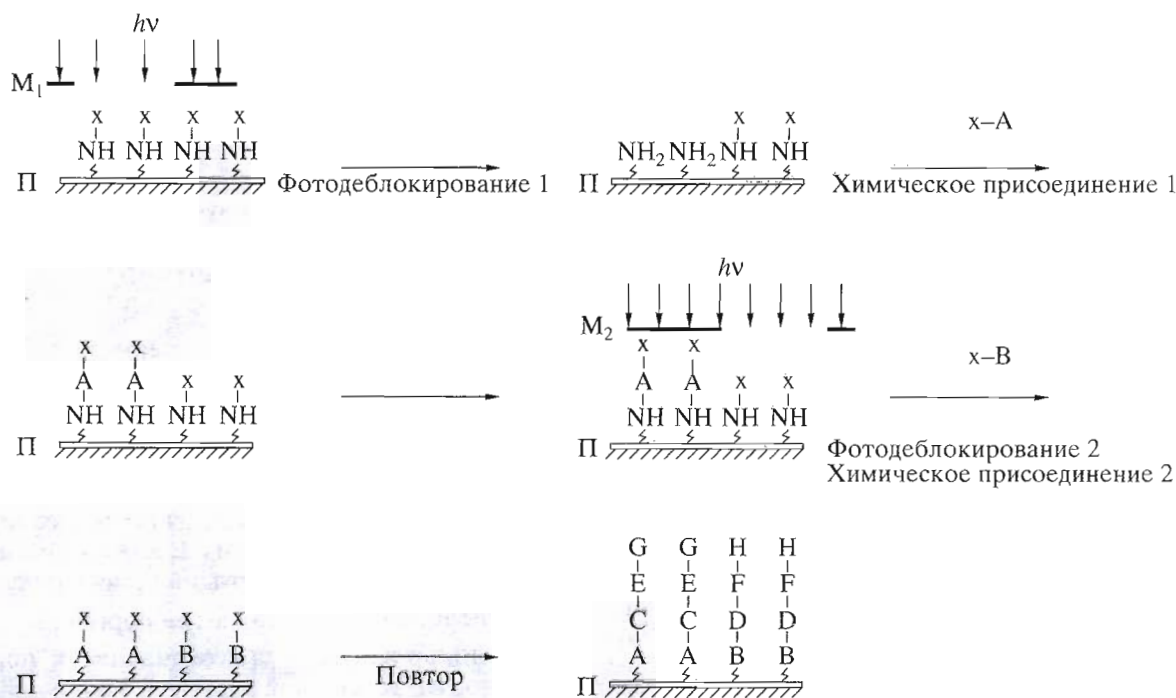
Данный способ позволил синтезировать и охарактеризовать 180 смесей пентапептидов, используя всего 15 присоединений [110].

Предложен оригинальный метод создания пептидной библиотеки с использованием принципа фотолитографии, заимствованного из микроэлектроники [111]. К полимеру пришиваются аминокислоты с фотолабильной нитровератрилоксикарбонильной защитной группой (NVOC); использование бинарного маскирования позволяет через отверстия отщеплять защиты в нужных участках цепи, остальные продолжают наращиваться (рис. 10) [111].

Параллельно с пептидными идет развитие фаговых библиотек, в которых пептидные детерминанты клонируются в фаговой векторной системе [112]. Результатом создания такой библиотеки является смесь миллионов коротких пептидов, последовательности которых определяются секвенированием соответствующего кодирующего участка вирусной ДНК. В последнее время применение фаговых пептидных библиотек расширяется [113].

С помощью технологии пептидного сканирования были определены кластеры иммунореактивных пептидов из белков цитохрома c [114], вируса гепатита C [115].

Экспериментальные методы анализа антигенной структуры белка позволяют оценить как минимальные размеры эпитопа, так и вклад отдельных аминокислот в антигенность определенного участка. Гейсен и др. использовали набор синте-



**Рис. 10.** Схематическое изображение концепции светонаправленного синтеза пептидной библиотеки [111]. Полимерная поверхность  $\Pi$  содержит аминогруппы, блокированные фотолабильной защитной группой  $x$  (например, NVOC). Облучение специфических участков через литографическую маску  $M_1$  приводит к снятию защиты с этих участков. Экспонированные аминогруппы готовы к наращиванию пептидной цепи твердофазным методом.  $A$  – первый присоединяемый блок (аминокислота, пептид или нуклеотид), который содержит фотолабильную защитную группу  $x$ . Другая маска  $M_2$  используется для деблокирования следующего участка полимера. Второму защищенному блоку  $x-B$  присоединяется к вновь экспонированным аминогруппам. Повторяющиеся циклы фотодеблокирования и присоединения выполняются для получения продукта нужной структуры.

тических пептидов – фрагментов вирусных белков для идентификации эпитопов к антителам при вирусных инфекциях человека и антителам иммунизированных вирусными сыворотками животных [116]. В пептидах, проявивших себя как антигенные эпитопы, были произведены замены первой аминокислоты на близкую по свойствам, полученные аналоги тестировали методом ELISA. Результаты были сведены в матрицу замещения. Оказалось, что лишь 4–5 аминокислот в эпитопе влияют на специфичность и обеспечивают энергию связывания. Это говорит о том, что основное влияние на антигенность участка последовательности оказывают боковые цепи, позволяющие антигену подвергаться конформационной перестройке одновременно с тем, что антитело также изменяется в присутствии антигена.

В настоящее время замены или делеции индивидуальных аминокислотных остатков в активных центрах антигенных детерминант – действенный метод определения границ эпитопов различных белков. При изучении антигенных свойств перекрывающихся пептидов из последовательности трансмембранного gp41 из HIV-1 применялись замены и делеции аминокислот [117], а также модификация остатков трифункциональных

аминокислот, в частности, ацетилирование  $\epsilon$ -аминогруппы лизина [118].

Гипотеза взаимной перестройки антигена и антитела положена в основу изучения антигенных свойств  $\beta_2$ -гликопротеина-I из плазмы, состоящего из 326 а.о. и вовлеченного в возникновение аутоиммунных заболеваний [119]. Полагают, что он становится антигеном в результате такого взаимодействия с отрицательно заряженными фосфолипидами, при котором и фосфолипиды, и белок претерпевают конформационные изменения; антитела направлены либо к белку, либо к комплексу белок-фосфолипид.

Белок  $\beta_2$ -gp-I, подвергнутый ферментативному расщеплению между Lys317 и Thr318, не проявил связывающей активности в биологических тестах, таким образом, ответственным за биологическую активность оказался его C-концевой V домен. Один из покрывающих этот домен синтетических пептидов, SKNKEKКC с высоким положительным зарядом, способен связываться с антителами к фосфолипидам в ELISA, конкурируя с самим  $\beta_2$ -gp-I и, по-видимому, является эпитопом фосфолипидного связывания и, возможно, антигенной детерминантой [44, 119, 120]. Для выясне-



ния роли лизиновых остатков данного пептида в реакции как с фосфолипидом, так и с антителами, в аналогичных тестах исследовали гептализин. Он проявил значительно большую активность в связывании с фосфолипидом по сравнению с оригинальным пептидом, но не реагировал с антителами к фосфолипидам [45]. Для выяснения специфичности последовательности SKNKEKKS исследовались аналоги соответствующего пептида, в которых цистеиновые остатки были заменены на серин [44]. Полученные аналоги слабо реагировали с антителами [45]. Участие лизиновых остатков данной последовательности в связывании с антителами оценивалось путем замещения их на остатки глутаминовой кислоты [121], а также с помощью замены первого лизина на аргинин [84]. Все полученные аналоги при тестировании методом ELISA проявили значительно меньшую активность в реакции с антителами или вообще не реагировали с ними, что свидетельствует как о роли положительного заряда данной последовательности, так и о специфической роли отдельных аминокислотных остатков в реакции с антителами [84].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск антигенных детерминант белков – кропотливый труд, начинающийся с подробного теоретического анализа данных, которыми обладает исследователь. Однако высокий уровень развития искусственного интеллекта, с одной стороны, и современных методов синтеза пептидов – потенциальных эпитопов, с другой, привел к существенному ускорению процесса поиска. Задача имитации природных эпитопов нативных белков вполне разрешима.

В настоящее время созданы и действуют диагностические системы высокого качества на основе синтетических пептидов, соответствующих антигенным детерминантам белков HIV [122, 123], вируса гепатита С [124]. Скрининг синтетических пептидов, соответствующих антигенным детерминантам белка вируса Т-клеточного лейкоза (HTLV-I) с помощью панели сывороток, позволил отобрать наиболее диагностически значимые фрагменты, пригодные для серодиагностики HTLV-I [125]. На основе синтетического пептида, соответствующего фрагменту белка вируса ящура, создана вакцина [126]. Приведенные примеры говорят о том, что комплексное применение расчетных и экспериментальных методов анализа белковых структур, учет всех связей природной молекулы позволяют добиться практических результатов в расшифровке сложных биологических объектов.

Авторы выражают благодарность к.х.н. С.М. Андрееву (ГНЦ – Институт иммунологии МЗ РФ) за ценную консультативную помощь.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поём А. Основы иммунологии. М.: Мир, 1991.
2. Jerne N. // Annu. Rev. Microbiol. 1960. V. 14. P. 341–358.
3. Sela M. // Science. 1969. V. 166. P. 1365–1374.
4. Atassi M., Smith J. // Immunochemistry. 1978. V. 15. P. 909–936.
5. Benjamin D., Berzofsky J., East I., Gurd F., Hannum C., Leach S., Margoliash E., Michael J., Miller A., Prager E., Reichlen M., Sercarz E., Smith-Gill S., Todd P., Wilson A. // Ann. Rev. Immunol. 1984. V. 2. P. 67–101.
6. Lerner R. // Nature. 1982. V. 299. P. 592–596.
7. Шульц Г., Шурмер Р. Принципы структурной организации белков. М.: Мир, 1982.
8. Dayhoff M. Atlas of Protein Sequence and Structure. Washington: National Biomedical Research Foundation, 1978. V. 5. Suppl. 3.
9. Bernstein F., Koetzle T., Williams G., Meyer E., Brice M., Rodger J., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M. // J. Mol. Biol. 1977. V. 112. P. 535–542.
10. Bairoch A., Apweiler R. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 31–36.
11. Shneider R., de Daruvar A., Sander C. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 226–230.
12. Hopp T., Woods K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 3824–3828.
13. Parker J., Guo D., Hodges R. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 5425–5432.
14. Kyte J., Doolittle R. // J. Mol. Biol. 1982. V. 157. P. 105–132.
15. Eisenberg D., Weiss R., Terwilliger T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 140–144.
16. DeLisi C., Berzofsky J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 7048–7052.
17. Rothbard I. // Ann. Inst. Paster. Virol. 1986. V. 137E. P. 518–522.
18. Lim V. // J. Mol. Biol. 1974. V. 88. P. 873.
19. Parker J., Hodges R. // Peptide Res. 1991. V. 4. P. 347–363.
20. Thornton J., Edwards M., Taylor W., Barlow D. // EMBO J. 1986. V. 5. P. 409–413.
21. Westhof E., Altschuh D., Moras D., Bloomer A., Mondragon A., Klug A., van Regenmortel M. // Nature. 1984. V. 311. P. 123–126.
22. Tainer J., Gerzoff E., Alexander H., Houghten R., Olson A., Lerner R., Hendricson W. // Nature. 1984. V. 312. P. 127–134.
23. Karplus P., Schulz G. // Naturwissenschaften. 1985. V. 72. P. 212–213.
24. Frömmel C. // J. Theor. Biol. 1988. V. 132. P. 171–177.
25. Welling G., Weijer W., Zee R., Welling-Wester S. // FEBS Lett. 1985. V. 188. P. 215–218.



26. Chou P., Fasman G. // *Biochemistry*. 1974. V. 13. P. 222–245.
27. Nishikawa K. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1983. V. 748. P. 285.
28. Kabsch W., Sander C. // *FEBS Lett.* 1983. V. 155. P. 179.
29. Garnier J., Osguthorpe D., Robson B. // *J. Mol. Biol.* 1978. V. 120. P. 97–120.
30. Ptitsyn O., Finkelstein A. // *Biopolymers*. 1983. V. 22. P. 15–25.
31. Ponder J., Richards F. // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 193. P. 775–791.
32. Janin J., Wodak S., Levitt M., Maigret B. // *J. Mol. Biol.* 1978. V. 125. P. 357–386.
33. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. N.Y.: Wiley-Liss, Inc., 1995. V. 23. № 3 (Special Issue).
34. Eisenhaber F., Persson B., Argos P. // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995. V. 30. P. 1–94.
35. Bork P., Koonin E. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996. V. 6. P. 366–376.
36. Fisher D., Rice D., Bowie J., Eisenberg D. // *FASEB J.* 1996. V. 10. P. 126–136.
37. Rost B., O'Donoghue S. // *Comput. Appl. Biosci.* 1997. V. 13. P. 345–356.
38. Chotia C., Levitt M., Richardson D. // *J. Mol. Biol.* 1981. V. 138. P. 321.
39. Cohen F., Sternberg M., Taylor W. // *J. Mol. Biol.* 1982. V. 156. P. 821.
40. Hopp T. // *Synthetic Peptides in Biology and Medicine* / Eds K. Alitalo, P. Partanen, A. Vaheri. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1985. P. 3–11.
41. Novotny J., Handschumacher M., Haber E., Brucoleri R., Carlson W., Fanning D., Smith J., Rose G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986. V. 83. P. 226–230.
42. Blundell T., Sibanda B., Sternberg M., Thornton J. // *Nature*. 1987. V. 326. P. 347–352.
43. Steinkasserer A., Barlow P., Willis A., Kertesz Z., Campbell I., Sim R., Norman D. // *FEBS Lett.* 1992. V. 313. P. 193–197.
44. Hunt J., Krilis S. // *J. Immunol.* 1994. V. 152. P. 653–659.
45. Wang M., Kandiah D., Ichikawa K., Khamashta M., Hedges G., Koike T., Roubey R., Krilis S. // *J. Immunol.* 1995. V. 155. P. 1629–1636.
46. Smith T., Waterman M. // *J. Mol. Biol.* 1981. V. 147. P. 195–197.
47. Ерошкин А.М. // *Молекул. биология*. 1988. Т. 22. С. 635–644.
48. Atkinson M., Bowman M., Campbell L., Darrow B., Kaufman D., Maclaren N. // *J. Clin. Invest.* 1994. V. 94. P. 2125–2129.
49. Preißner R., Goede A., Michalski E., Frömmel C. // *FEBS Lett.* 1997. V. 414. P. 425–429.
50. Han K., Baker D. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 251. P. 176–187.
51. Petersen S., Bohr H., Fredholm H., Lautrup B. // *Tibtech*. 1990. V. 8. P. 304–308.
52. Bohr H., Bohr J., Brunak S., Cotterill R., Fredholm H., Lautrup B., Petersen S. // *FEBS Lett.* 1990. V. 261. P. 43–46.
53. Rost B., Sander C. // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 232. P. 584–599.
54. Pedersen J., Moulton J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996. V. 6. P. 227–231.
55. Gruikshank W., Lim K., Theodore A., Cook J., Fine G., Weller P., Center D. // *J. Immunol.* 1996. V. 157. P. 5240–5248.
56. Колобов А.А., Колодкин Н.И. // *Микробиол. пром-сть*. 1988. № 9. С. 8–9.
57. Кулик Л.Н., Иванов В.С., Габриэлян А.Э., Чикин Л.Д., Иванов В.Т. // *Биоорг. химия*. 1993. Т. 19. С. 1169–1176.
58. Семилетов Ю.А., Дементьев Е.В., Яшина Т.Л., Фаворов М.О., Шибнев В.А. // *Биоорг. химия*. 1995. Т. 21. С. 156–157.
59. Желтухина Г.А., Прокуронова Е.И., Евстигнеева Р.П., Смирнов В.Д., Семилетов Ю.А., Калинина Т.И., Худяков Ю.Е. // *Биоорг. химия*. 1990. Т. 16. С. 34–40.
60. Прокуронова Е.И., Хлебникова И.Н., Желтухина Г.А., Семилетов Ю.А., Карпова В.А., Калинина Т.И., Евстигнеева Р.П., Худяков Ю.Е., Павлюченкова Р.П., Смирнов В.Д. // *Биоорг. химия*. 1991. Т. 17. С. 150–159.
61. Евстигнеева Р.П., Прокуронова Е.И., Желтухина Г.А., Григорьев Д.Н., Ниязатов А.А. // *Докл. АН*. 1994. Т. 339. С. 489–492.
62. Van Regenmortel M. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1992. V. 100. P. 483–487.
63. Boguski M., Freeman M., Elshourbagy N., Taylor J., Gordon J. // *J. of Lipid Res.* 1986. V. 27. P. 1011–1034.
64. Segrest J., Jackson R., Morrisett J., Gotto A. // *FEBS Lett.* 1974. V. 38. P. 247–253.
65. Boguski M. // *J. of Lipid Res.* 1992. V. 33. P. 957–974.
66. Walsh M., Watzlawick H., Putnam F., Schmidt K., Brossmer R. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. P. 6250–6257.
67. Harris E., Borchman D., Pierangeli S. // *Lupus*. 1994. V. 3. P. 313.
68. Gesquiere J., Delpierre C., Tartar A. // *Clin. Chem.* 1985. V. 31. P. 784–785.
69. Van Regenmortel M., de Margillac G. // *Immunol. Lett.* 1988. V. 17. P. 95–108.
70. Ermacora M., Rivero J. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1988. V. 32. P. 223–229.
71. Arnon R., Sela M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1969. V. 62. P. 163–170.
72. Atassi M. // *Immunochem.* 1975. V. 12. P. 423–438.
73. Sela M. // *Biopolymers*. 1983. V. 22. P. 415–424.
74. Jemerson R., Paterson V. // *Science*. 1986. V. 232. P. 1001–1004.
75. Miller E., Allan L., Turner M. // *Molek. and Biochem. Parasitol.* 1984. V. 13. P. 309–322.
76. Rodionov M., Galaktionov S., Akhrem A. // *FEBS Lett.* 1987. V. 223. P. 402–404.
77. Suskau D., Köhl J., Karwath G., Schneider K., Casaretto M., Bitter-Suermann D., Przybylski M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. V. 87. P. 9848–9852.
78. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. *Биохимия человека*. Т. 2. М.: Мир, 1993. С. 36–47.

79. Shortle D., Maio D., Nathans D. // *An. Rev. Genetics*. 1981. V. 15. P. 265–294.
80. Matsuura E., Igarashi M., Igarashi Y., Ichikawa K., Koike T. // *Lupus*. 1994. V. 3. P. 313.
81. Windheuser M., Tegtmeyer G., Wood C. // *J. Virol*. 1989. V. 63. P. 4064–4068.
82. Mehra V., Sweetser D., Young R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986. V. 83. P. 7013–7017.
83. Steinkasserer A., Estaller C., Weiss E., Sim R., Day A. // *Biochem. J.* 1991. V. 277. P. 387–391.
84. Евстигнеева Р.П., Беспалова Ж.Д., Палькеева М.Е. // Докл. РАН. 1998. Т. 360. С. 829–833.
85. Bjorkman P., Saper M., Samraoui B., Bennett W., Strominger J., Wiley D. // *Nature*. 1987. V. 329. P. 506–512.
86. Amit A., Mariuzza R., Phillips S., Poljak V. // *Science*. 1986. V. 233. P. 747–753.
87. Van Regenmortel M. // *Synthetic Peptides in Biology and Medicine* / Eds K. Alitalo, P. Partanen, A. Vaheri. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1985. P. 67–74.
88. Laver W., Air G., Webster R., Smith-Gill S. // *Cell*. 1990. V. 61. P. 553–556.
89. Padlan E., Silverton E., Sheriff S., Cohen G., Smith-Gill S., Davis D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. P. 5938–5942.
90. Wiley D., Wilson I., Skehel J. // *Nature*. 1981. V. 289. P. 373–378.
91. Arnon R., Maron E., Sela M., Anfinsen C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1971. V. 68. P. 1450.
92. Benjamin E., Michaeli D., Young J. // *Curr. Topics in Microbiol Immunol*. 1972. V. 58. P. 85–134.
93. Green N., Alexander H., Olson O., Alexander S., Shinnick T., Sutcliffe L., Lerner R. // *Cell*. 1982. V. 28. P. 477–487.
94. Скок М.В., Комиссаренко С.В., Федорова Н.Ф., Васильева Г.А., Евстигнеева Р.П. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 270. С. 1259–1264.
95. Скок М.В., Комиссаренко С.В., Чудновец В.С., Евстигнеева Р.П. // Докл. АН Укр. ССР. 1988. № 9. С. 76–79.
96. Komissarenko S., Skok M., Kavoon E., Chudnovets V., Evstigneeva R. // *Ann. Inst. Pasteur. Immunol*. 1988. V. 139. P. 517–530.
97. Петров Р.В. Иммунология. М.: Медицина, 1983.
98. Tam J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 85. P. 5409–5413.
99. Tam J. // *J. Immunol. Meth*. 1996. V. 196. P. 17–32.
100. Палькеева М.Е., Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Кузнецова Т.В., Тищенко В.А., Кобылянский А.Г., Беспалова Ж.Д., Насонов Е.Л., Евстигнеева Р.П. // *Биоорг. химия*. 1998. Т. 24. С. 502–508.
101. Atassi M. // *Mol. and Cell. Biochem*. 1980. V. 32. P. 21–43.
102. Atassi M. // *Eur. J. Biochem*. 1984. V. 145. P. 1–20.
103. Geysen H., Meloan R., Barteling S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. P. 3998–4002.
104. Geysen H., Rodda S., Mason T. // *Synthetic Peptides as Antigens. Ciba Foundation Symposium*. 119. / Eds R. Porter, J. Wheelan. N.Y.: Wiley, 1986. P. 131–149.
105. Houghten R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985. V. 82. P. 5131–5135.
106. Houghten R., Pinilla C., Blondelle S., Appel J., Dooley C., Cuervo J. // *Nature*. 1991. V. 354. P. 84–86.
107. Hruby V., Al-Obeidi F., Kazmierski W. // *Biochem. J.* 1990. V. 268. P. 246–262.
108. Lam K., Salmon S., Hersh E., Hruby V., Kazmierski W., Knapp R. // *Nature*. 1991. V. 354. P. 82–84.
109. Salmon S., Lam K., Lebl M., Kandola A., Khattri R., Wade S., Pátek M., Kocis P., Krchnák V., Thorpe D., Felder S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 11708–11712.
110. Furka A., Sebestyen F., Asgedom M., Dibo G. // *Int. J. Peptide Protein Res*. 1991. V. 37. P. 487–493.
111. Fodor S., Read J., Pirrung C., Stryer L., Lu A., Solas D. // *Science*. 1991. V. 251. P. 767–773.
112. Scott J., Smith G. // *Science*. 1990. V. 249. P. 386–390.
113. *Combinatorial Libraries. Synthesis, Screening and Application Potencial* / Ed. R. Cortese. Berlin, N.Y.: Walter de Gruyter, 1996. 230 p.
114. Savola R., Schwab C., Bosshard H. // *J. of Immunol. Methods*. 1991. V. 141. P. 245–252.
115. Ching W., Wychowski C., Beash M., Wang H., Davies C., Carl M., Bradley D., Alter H., Feinstone S., Shin J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. P. 3190–3194.
116. Geysen H., Mason T., Rodda S. // *J. of Mol. Recognition*. 1988. V. 1. P. 38–41.
117. Norrby E., Biberfeld G., Johnson P., Parks D., Houghten A., Lerner R. // *AIDS Res. Hum. Retrovirus*. 1989. V. 5. P. 487–493.
118. Andreev S., Meshcheryakova D., Vafina M., Az'muko A., Sidorova M., Khaitov R. // *Biomedical Science*. 1991. V. 2. P. 271–278.
119. Hunt J., Simpson R., Krilis S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 2141–2145.
120. Палькеева М.Е., Сидорова М.В., Кузнецова Т.В., Кобылянский А.Г., Тищенко В.А., Насонов Е.Л., Беспалова Ж.Д., Евстигнеева Р.П. // *Биоорг. химия*. 1996. Т. 22. С. 678–685.
121. Sheng Y., Šali A., Herzog H., Lahnstein J., Krilis S. // *J. Immunol*. 1996. V. 158. P. 3744–3751.
122. Gnann J., Schwimmbeck P., Nelson J., Brad Truax A., Oldstone M. // *J. Infectious Diseases*. 1987. V. 156. P. 261–267.
123. Narvanen A., Korkolainen M., Suni J. // *J. Med. Virol*. 1988. V. 26. P. 111–118.
124. Kotwal G., Baroudy B., Kuramoto I., McDonald F., Schiff G., Holland P., Zeldis J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. P. 4486–4489.
125. Расули А.М., Сеньюта Н.Б., Клепиков Н.Н., Андреев С.М., Павлиш О.А., Сырцев А.В., Сидорова М.В., Вафина М.Г., Азьмуко А.А., Степина В.Н., Хаитов Р.М., Гурцевич В.Э. // *Иммунология*. 1994. № 2. С. 42–47.
126. Volpina O., Yarov A., Zhmak M., Kuprianova M., Chepurkin A., Toloknov A., Ivanov V. // *Vaccine*. 1996. V. 14. P. 1375–1380.



## Methods of Locating Antigenic Determinants of Proteins with Known Primary Structures

R. P. Evstigneeva\* and M. E. Pal'keeva\*\*#

\*Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

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

Theoretical and experimental methods for locating antigenic determinants of proteins with known amino acid sequences are discussed. These methods are systematized on the basis of the theoretical approaches applied, and the efficiency of various predictive methods is compared. Some examples of experimental epitope determination for a number of proteins are given.

*Key words: epitope mapping; peptide libraries; proteins, amino acid sequence, antigenic structure prediction*

---

# To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 414-6716; e-mail: peptide@cardio.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 4. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.