Медицинская Иммунология
2008, Т. 10, № 4-5, стр. 327-336
© 2008, СПб РО РААКИ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ ИММУНОГЛОБУЛИНА КЛАССА А И РЕКОМБИНАНТНЫХ ДЕРИВАТОВ РЕЦЕПТОРНОГО BAC БЕЛКА СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ В

Коржуева А.С.[1], Ибрагимова Д.Г.[2], Устинович И.А.[1], Тотолян Артем А.[1], Самойлович М.П.[2], Суворов А.Н.[1]

[1] *НИИ Экспериментальной Медицины РАМН, Санкт-Петербург*
[2] *ФГУ «РНЦРХТ Росмедтехнологий»*

Резюме. Работа посвящена исследованию взаимодействия между иммуноглобулином класса А и рекомбинантными полипептидами Р6, Р7, Р8, созданными на основе поверхностного белка Bac стрептококков группы В, обладающего IgA-рецепторной активностью.

В настоящее время существует потребность в иммунохимических реагентах, строго специфичных в отношении IgA как для создания диагностикумов по детекции уровня IgA в биологических жидкостях, так и для аффинного выделения IgA и его фрагментов.

С целью изучения возможности реализации указанных выше направлений применения протеинов в ходе исследования была определена способность рекомбинантных полипептидов Р6, Р7, Р8, связывающих Fc-область IgA, вступать во взаимодействие с различными формами IgA (сывороточный IgA, секреторный IgA, подклассы сывороточного IgA – IgA1, IgA2) и подтверждена избирательность связывания лиганда.

Выяснено, что строение рекомбинантного деривата Р6, среди трех представленных полипептидов, является оптимальным для осуществления IgA-рецепторной способности.

Определены структурные особенности связывания иммуноглобулина А фрагментами Bac белка: положение сайта связывания на молекуле IgA (приближен к эпитопам трех МкАт), изменчивость структуры данного сайта, а также устойчивость сайта связывания полипептидов Р6, Р7, Р8 к частичному восстановлению дисульфидных связей на молекуле IgA.

Ключевые слова: рекомбинантные полипептиды, стрептококки группы В, рецепторы IgA, Bac белок, иммунохимические реагенты.

Korzhueva A.S., Ibragimova D.G., Ustinovich I.A., Totolian Artem A., Samoilovich M.P., Suvorov A.N.

INTERACTION BETWEEN DIFFERENT MOLECULAR FORMS OF IMMUNOGLOBULIN A AND RECOMBINANT DERIVATIVES POLYPEPTIDES OF BAC RECEPTOR PROTEINS FROM GROUP B STREPTOCOCCI

Abstract. The article concerns interactions between immunoglobulin A and recombinant P6, P7, P8 polypeptides, designed on the basis of externally localized Bac protein of the Group B streptococci, possessing IgA-binding activity.

There is a current demand for immunochemical reagents that are strictly specific for IgA, in order to develop antigenic standards for detection of IgA levels in biological fluids, as well as for affinity purification of IgA and its fragments.

To analyze an opportunity of the abovementioned application ways for these proteins, a special study was

Адрес для переписки:
Суворов Александр Николаевич,
руководитель лаборатории молекулярной генетики патогенных микроорганизмов ГУ ИЭМ РАМН.
197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12.
Тел.: (812) 234-93-19. Тел./факс: (812) 234-94-77.
E-mail: Alexander_suvorov1@hotmail.com

performed to assay an interaction capability of recombinant P6, P7, P8 polypeptides binding to Fc regions of different IgA forms (serum IgA, secretory IgA, subclasses of serum IgA – IgA1, IgA2). Selectivity of ligand binding was specially confirmed.

It was found out that, among three presented polypeptides, the structure of recombinant P6 derivative proved to be optimal for IgA-binding ability of Bac protein.

Structural features of IgA-binding fragments of Bac protein, i.e., binding site position on the IgA molecule (proximity to epitopes for three monoclonal antibodies), variability of the site structure, as well as resistance of binding site for P6, P7, P8 in IgA molecule against partial disulfide bonds reduction. ***(Med. Immunol., vol. 10, N 4-5, pp 327-336)***

Введение

Сведения о бактериальных белках, неиммунно реагирующих с иммуноглобулинами, впервые были описаны в 1966 году на примере белка А *Staphylococcus aureus* [12]. Изучение микробных иммуноглобулин-рецепторных молекул и их участия в патогенезе заболеваний позволяет разрабатывать новые, более совершенные, способы лечения, профилактики и диагностики патологии. Однако на сегодня изучено лишь ограниченное число бактериальных белков, взаимодействующих с Fc-областью IgA. Идентификация таких полноразмерных рецепторных белков и конструирование их производных актуально в связи с необходимостью создания высокоселективных IgA-связывающих агентов, востребованных как в области иммунохимии, так и для прогноза течения заболеваний и оценки общего иммунного статуса пациента путем детекции уровня антител в различных биологических жидкостях. Изучение процесса взаимодействия IgA с бактериальными белками, обладающими IgA-рецепторными свойствами, также вызывает интерес с точки зрения установления роли этих протеинов в патогенезе бактериальных инфекций у человека. К IgA-рецепторным белкам можно отнести Arp и Sir белки стрептококков группы А, SSL7 протеин *Staphylococcus aureus*, а также Bac белок (β-антиген) стрептококков группы В (СГВ). Способность белка Bac высокоселективно связывать IgA, а также особенности его организации, в том числе и наличие области гомологии с суперсемейством иммуноглобулинов эукариот, обусловили его уникальность среди иммуноглобулин-связывающих рецепторов бактерий. IgA-рецепторная активность белка Bac наряду со способностью связывать фактор Н (FH) человека позволяет рассматривать данный протеин как существенный фактор вирулентности СГВ.

СГВ является одним из основных возбудителей тяжелых заболеваний человека (патология беременности, сепсис и менингит у новорожденных и детей раннего возраста, остеомиелит, артрит; у взрослых – эндокардит, пиелонефрит, мастит, септицемия, артрит, некротический фасцит, офтальмит и др.), что при недостаточной эффективности мер профилактики создает напряженную эпидемиологическую ситуацию во многих странах [8, 14]. СГВ экспрессируют на своей поверхности большое число иммуногенных протеинов. Этот факт оправдывает использование иммуногенных свойств бактериальных молекул для создания средств профилактики заболеваний стрептококковой этиологии путем включения поверхностных белков и их дериватов в состав вакцинных препаратов против СГВ.

Ранее сотрудниками отдела молекулярной микробиологии НИИЭМ РАМН на основе протективного белка Bac были сконструированы рекомбинантные полипептиды P6, P7, P8, включающие 294, 451, 451 аминокислотный остаток соответственно. Все три полипептида содержали IgA-рецепторную область Bac белка в измененной (у P7) или нативной форме (у P6 и P8). По мнению некоторых исследователей, IgA-связывающий сайт Bac белка включает область из 6 аминокислот MLKKIE, ответственную за проявление поверхностным белком способности связывать IgA [13]. При создании полипептида P7 в области потенциальной антигенной детерминанты была проведена замена двух аминокислот (лизин в положении 225 замещен на аргинин, а глутамат в положении 227 – на глутамин), что привело к изменению этой области на MLKRIQ (табл. 1). Дифференциация полипептидов по строению

ТАБЛИЦА 1. НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ПОЛИПЕПТИДОВ P6, P7, P8

Полипептид	Положение кодирующей области на ДНК Bac, п.н.	Сайт в IgA-связывающей области*	Число аминокислот	Молекулярная масса, kDa
P6	406-1287	MLKKIE	294	34
P7	301-1653	MLKRIQ	451	52
P8	301-1653	MLKKIE	451	52

Примечание. * – последовательности указаны в Protein One-letter code.

позволила предположить различия их свойств, некоторые из которых рассмотрены ниже. Ранее была показана иммуногенность и протективность полипептида P6, что позволило рассматривать его в качестве потенциального компонента вакцины [5, 7].

В настоящей работе проанализирована способность всех трех полипептидов P6, P7, P8 взаимодействовать с различными молекулярными формами IgA, изучена зависимость IgA-связывающих свойств от структуры полипептида-рецептора, а также определены некоторые аспекты неиммунного взаимодействия дериватов с молекулой IgA, что позволило расширить спектр применения рекомбинантных производных Bac белка СГВ, дополнив его вариантами употребления IgA-рецепторных молекул в иммунохимии.

Материалы и методы

Рекомбинантные полипептиды. Рекомбинантные полипептиды P6, P7, P8 созданы ранее на основе поверхностного белка Bac СГВ путем амплификации в ПЦР фрагментов хромосомной ДНК штамма 219/4849 Ibc серотипа и их последовательного клонирования в плазмидном векторе pGEM-T Easy («Promega», США), а затем в системе экспрессионных векторов pQE-30/31/32 (The QIAexpress System, Qiagen, США) в культуре *E. coli* JM 109. Выделение и очистка дериватов Bac белка осуществлена по методикам, описанным ранее [6].

ИФА. Все эксперименты проведены при условиях, близких к равновесным. Во всех опытах для ИФА (прямого, непрямого, ингибиторного, конкурентного варианта ингибирования) использовали планшеты NUNC MaxiSorb («Danemark») с высокой сорбционной активностью. Сенсибилизацию полипептидов P6, P7, P8, разведенных в фосфатно-солевом буфере (ФСР), pH 7,4 до 5 мкг/мл проводили в течение 18 часов при 4°C.

Препараты для различных вариантов ИФА, приготовленные и охарактеризованные ранее, были любезно предоставлены сотрудниками Лаборатории гибридомной технологии ФГУ «РНЦРХТ Росмедтехнологий» [1, 2, 4].

Иммуноглобулины, непосредственно взаимодействующие с антигеном [1]. 1) Меченые пероксидазой хрена моноклональные IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и меченый сывороточный IgG (препарат, содержащий все подклассы IgG в пропорциях, характерных для сыворотки крови). 2) Поликлональный сывороточный IgA (mIgA), меченный пероксидазой хрена (конъюгат). 3) Поликлональный mIgA (66% IgA и 27% IgM), выделенный методом колоночной хроматографии и осажденный сульфатом аммония. Содержание IgA1 и IgA2 в естественных для организма человека пропорциях. 4) Обезжиренное молозиво человека, содержание IgA – 2,5 мг/мл [95% секреторного IgA (SIgA)], общее содержание белка – 20 мг/мл (определено спектрофотометрически при длине волны 280 нм). 5) SIgA, выделенный из молозива человека методом аффинной хроматографии, содержание IgA1 и IgA2 в естественных для организма человека пропорциях. 6) Коллекция из 14 цельных индивидуальных миеломных сывороток пациентов (12 образцов IgA1, 2 образца IgA2). 7) Пулированная сыворотка 200 здоровых доноров (8,8 мг/мл IgG, 1,6 мг/мл IgA).

Выявляющие молекулы. 1) Моноклональные антитела (МкАт) для выявления IgG, меченные пероксидазой хрена (обозначенные как 3D3) [4]. 2) Конъюгат МкАт с пероксидазой хрена против κ-легких цепей и конъюгат МкАт с пероксидазой хрена против λ-цепей (выявляющие молекулы против κ- и λ-цепей получали смешиванием указанных конъюгатов) [2]. 3) Панель из 9 МкАт, 8 из которых направлены к детерминантам, экспрессированным исключительно на иммуноглобулинах класса А, а одно МкАт (2B5) – к эпитопу, характерному только для IgA1. 4) Афинно очищенные поликлональные антитела кролика против иммуноглобулинов мыши, меченные пероксидазой хрена (RαM*POx).

Приготовление разведенных препаратов иммуноглобулинов и выявляющих антител выполняли с применением 10% раствора эмбриональной коровьей сыворотки в промывочном трис-буферном растворе, содержащем 0,05% твин-20 (РП), pH 7,4-7,5. Несвязавшиеся реагенты удаляли трехкратным промыванием планшетов РП, pH 7,4-7,5.

Активность пероксидазы хрена (ферментная метка) определяли с использованием субстрата, состоящего из ортофенилендиамина и цитрат-фосфатного буферного раствора с перекисью pH 5,0, реакцию останавливали добавлением 2N серной кислоты. Детекцию оптической плотности (OD) осуществляли при длине волны 492 нм на спектрофотометре.

Сравнительный анализ взаимодействия полипептидов P6, P7, P8 с mIgA и SIgA проведен в непрямом ИФА при условии равенства концентраций препаратов IgA (уравнены по массе).

При изучении взаимодействия полипептидов с подклассами IgA, представленными миеломными образцами IgA1(κ+λ) и IgA2(κ+λ) (в каждом случае смесь сывороток, содержащих парапротеины с κ- и λ-легкими цепями), использовали по пять разведений образца каждого подкласса IgA (от 1 : 1000 до 1 : 1 000 000).

Положение сайта связывания полипептидов P6, P7, P8 на молекуле IgA определяли с использованием двух вариантов ИФА:

1) предварительное связывание меченого IgA с МкАт с последующим переносом на адсорбированные полипептиды P6, P7, P8 (ингибиторный ИФА);

2) связывание mIgA (пул сывороток здоровых доноров) с адсорбированными протеинами P6, P7, P8 и последующее взаимодействие с МкАт (непрямой ИФА). Выявление немеченых МкАт проводили мечеными поликлональными антителами кролика.

Влияние восстановления дисульфидных связей в молекуле IgA на ее взаимодействие с полипептидами P6, P8 исследовали в конкурентном ингибиторном ИФА. Источниками немеченого IgA служили mIgA и чигаин. В соотношении 1 : 1 смешивали меченый нативный IgA (1/10 000) и нативный или обработанный восстанавливающим агентом (как описано ниже) немеченый IgA (40 мкг/мл). Далее смесь добавляли к адсорбированным полипептидам и инкубировали в течение 2,5 часов при комнатной температуре (около 22°C).

Нативный электрофорез в агарозном геле проводили как это изложено в [3].

Восстановление дисульфидных связей в молекуле IgA. Чигаин и поликлональный mIgA подвергались обработке 0,01M ДТТ в 0,4M Tris-HCl, pH8,3 при 24°C в течение 2,5 часов с последующим алкилированием образующихся SH-групп 0,022 M йодоацетамидом при 0°C в течение 30 минут.

Результаты

Оценка селективности взаимодействия полипептидов P6, P7, P8 с IgA и влияние адсорбции полипептидов на это взаимодействие

Избирательность взаимодействия изучаемых антигенов с IgA оценивали в прямом ИФА. Предварительно показано отсутствие связывания адсорбированными дериватами β-антигена как с поликлональным IgG, так и с моноклональными образцами IgG с первого по четвертый подкласс (доверительная вероятность различий в связывании протеинами P6, P7, P8 иммуноглобулина A и иммуноглобулина G – $p > 0,5$, результаты не приводятся).

С целью анализа влияния адсорбции полипептидов P6, P7, P8 на реализацию ими IgA-рецепторной активности использовали ингибиторный ИФА. По полученным значениям OD рассчитывали процент ингибирования каждым из трех антигенов, находящимся в растворе, взаимодействия меченного IgA с адсорбированными рекомбинантными молекулами P6, P7, P8. Наибольший ингибиторный эффект отмечен у P6 и P8 – в пределах 70-90% (рис. 1). Слабая IgA-рецепторная активность адсорбированного полипептида P7 не допускала однозначное заключение об ингибиторной способности протеина в растворе. Данные, полученные при проведении прямого ИФА, показали способность иммобилизованных на твердой фазе белков P6, P8 связывать mIgA человека, меченный пероксидазой хрена. Таким образом, рекомбинантные молекулы P6 и P8 обладали IgA-рецепторной способностью как в адсорбированном состоянии, так и в растворе.

Связывание полипептидами P6, P7, P8 различных молекулярных форм IgA

Для достижения большей объективности в оценке особенностей взаимодействия IgA и полипептидов P6, P7, P8 использовали две различных постановки ИФА – прямой и непрямой твердофазный ИФА. Анализ IgA-рецепторной способности методом прямого ИФА показал, что все исследуемые белки обладают ею в отношении меченного mIgA, причем количе-

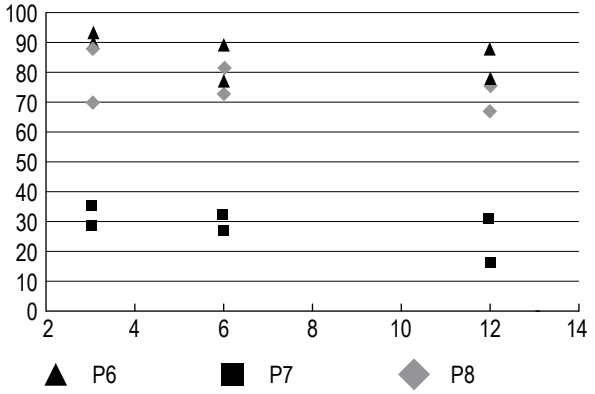

Рисунок 1. Связывание сывороточного меченного IgA полипептидами P6, P7, P8 в растворе

Примечания: по оси абсцисс – разведение меченного сывороточного IgA, тыс. раз; по оси ординат – ингибирование, %.

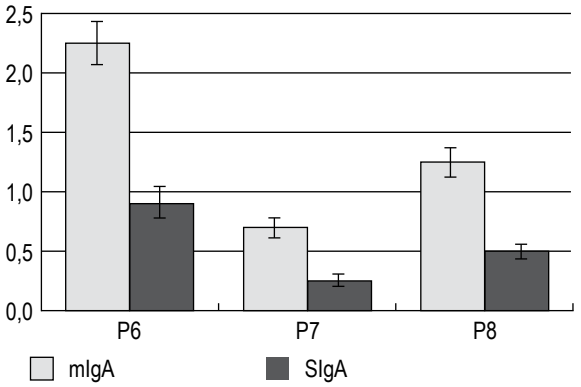

Рисунок 2. Сравнение эффективности связывания полипептидов P6, P7, P8 с сывороточным IgA (mIgA) и секреторным IgA (SIgA)

Примечания: по оси абсцисс – полипептиды P6, P7, P8; по оси ординат – оптическая плотность (OD_{492}).

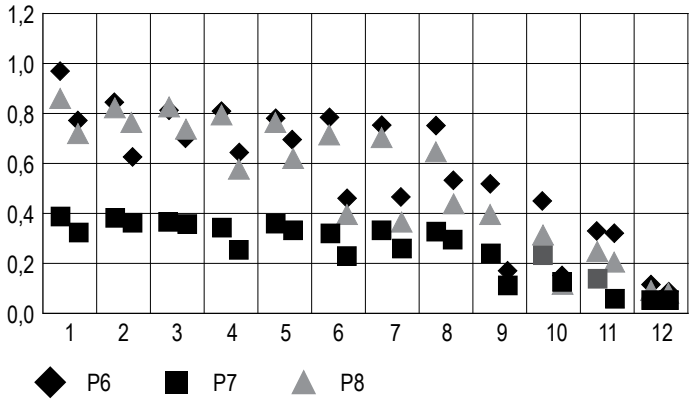

Рисунок 3. Взаимодействие рекомбинантных полипептидов Р6, Р7, Р8 с миеломными IgA1 и IgA2

Примечания: по оси абсцисс – миеломные IgA (1-10 образцы IgA1, 11-12 образцы IgA2), использовано по два разведения – 1 : 10 000, 1 : 100 000; по оси ординат – оптическая плотность (OD_{492}).

ство лиганда, связанного протеином Р6 выше, чем у Р8 (статистическая достоверность различий отмечена при разведении препарата IgA в 3000 раз), а эффективность взаимодействия Р7 с молекулой антитела минимальна (данные не приводятся).

Эти результаты получили подтверждение после постановки непрямого твердофазного ИФА на адсорбированных рекомбинантных протеинах. С целью определить влияние молекулярной формы IgA на распознавание лиганда рецепторными молекулами Р6, Р7 и Р8 в качестве источника иммуноглобулина использовали поликлональные препараты mIgA и очищенного SIgA из молозива. Как видно из рисунка 2, полипептид Р6 эффективнее, чем Р8, способен связывать как mIgA, так и SIgA. Взаимодействие рекомбинантного протеина Р7 с рассматриваемыми молекулярными формами IgA оказалось значительно слабее в сравнении с Р6, Р8. При сопоставлении связывания mIgA и SIgA полипептидами Р6, Р7, Р8 отмечено, что рецепторная активность в отношении SIgA протеинами проявляется гораздо хуже, соответственно в 2,2, 2,9 и 2,4 раза. Вероятно, секреторный компонент экранирует часть поверхности α-цепей IgA, тем генерируя стерические препятствия полипептидам.

Особенности взаимодействия подклассов mIgA и изучаемых антигенов исследовали методом непрямого ИФА на адсорбированных рекомбинантных полипептидах Р6, Р7, Р8. Источниками IgA послужили миеломные сывороточные образцы IgA1(κ+λ) и IgA2(κ+λ). Показано для полипептидов Р6, Р7, Р8, что IgA1 связывается достоверно эффективнее, чем IgA2 ($p > 0,95$, данные не приводятся).

ТАБЛИЦА 2. ЭФФЕКТИВНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ПОЛИПЕПТИДАМИ Р6, Р7, Р8 РАЗЛИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ IgA

Метод ИФА	Молекулярые формы IgA			Отношение оптических плотностей, отражающих эффективность связывания IgA одним полипептидом по сравнению с другим		
				Р6 по сравнению с Р8	Р6 по сравнению с Р7	Р8 по сравнению с Р7
прямой ИФА	mIgA	П	IgA человека, меченный пероксидазой хрена	1,33	3,36	2,62
непрямой ИФА	mIgA	П	Немеченый IgA человека	1,49	3,34	2,74
непрямой ИФА	mIgA	П	IgA1(κ+λ)	1,02	2,03	2,01
	mIgA	П	IgA2(κ+λ)	1,09	1,82	1,87
	mIgA	М	IgA1, 10 индивидуальных миеломных образцов	1,13	3,74	3,31
	mIgA	М	IgA2, 2 индивидуальных миеломных образца	1,17	4,07	3,18
	SIgA			1,89	3,45	1,87

Примечание. mIgA – сывороточный IgA; П – поликлональный препарат; М – моноклональный препарат.

Результаты исследования по сопоставлению IgA-рецепторной активности полипептидов P6, P7, P8 в отношении различных молекулярных форм IgA и его подклассов сведены в таблицу 2.

Консервативность структуры сайта связывания полипептидов P6, P7, P8

Для оценки степени изменчивости сайта связывания с полипептидами P6, P7 и P8 на молекуле IgA, возникающей по причине мутаций генов, кодирующих тяжелые цепи миеломного IgA, был проведен анализ взаимодействия этих полипептидов с 10 индивидуальными парапротеинами IgA1 и 2 образцами IgA2 посредством непрямого ИФА. Выявление IgA1 или IgA2, связавшихся с иммобилизованными молекулами белков, проводили с помощью меченных МкАт против легких цепей. Результаты представлены на точечной диаграмме в порядке убывания значений оптической плотности (рис. 3). У 10 представленных индивидуальных миеломных IgA1 связывание с рекомбинантными белками прослеживается достаточно четко, за исключением двух образцов под номерами 9 и 10, у которых взаимодействие с P6, P7, P8 более слабое ($p > 0,5$). Электрофорез IgA1- и IgA2-миеломных сывороток в агарозном геле показал наличие М-пиков во всех сыворотках и различия по физико-химическим свойствам между парапротеинами (данные не приводятся).

Изучение положения сайта связывания полипептидов на молекуле IgA с помощью МкАт

С целью определения положения сайта связывания необходимо было оценить взаимную локализацию участков молекулы, с которыми связывается коллекция МкАт и рекомбинантные полипептиды. В работе использовали панель из 9 меченных пероксидазой хрена МкАт, связывающих различные антигенные детерминанты, находящихся только на иммуноглобулинах А-класса. В связи с этим было осуществлено два варианта постановки ИФА: ингибиторный и непрямой ИФА.

Ингибиторный ИФА позволил выявить среди МкАт реагенты, интерферирующие с полипептидами за связывание с IgA – это МкАт 1B12, 1H9, 3B4, способные снижать на 60-90% IgA-рецепторную активность производных Вас белка P6, P7, P8 (рис. 4).

Второй вариант постановки ИФА показал, что предварительное связывание IgA с P6, P7, P8 в основном не препятствовало связыванию МкАт с IgA – ингибирование было не значительным и составляло не более 30-40% (данные не приводятся).

Изучение влияния восстановления дисульфидных связей в молекуле IgA на ее взаимодействие с полипептидами P6, P8

Для получения данных об относительной стабильности структуры сайта связывания белков P6, P8, локализованного на молекуле IgA, использована коллекция МкАт. Проведено сопоставление устойчивости эпитопов МкАт на молекуле IgA и сайта связывания полипептидов в условиях восстановления дисульфидных связей между α-цепями IgA. Денатурирующая обработка препарата mIgA и обезжиренного молозива (SIgA) привела к частичному изменению третичной структуры молекул IgA, что повлекло за собой снижение способности МкАт взаимодействовать с некоторыми конформационными эпитопами МкАт на молекуле IgA. Для эпитопов МкАт 1H9 и 1B12 было отмечено снижение связывания антителами после частичного восстановления дисульфидных связей на IgA. На вы-

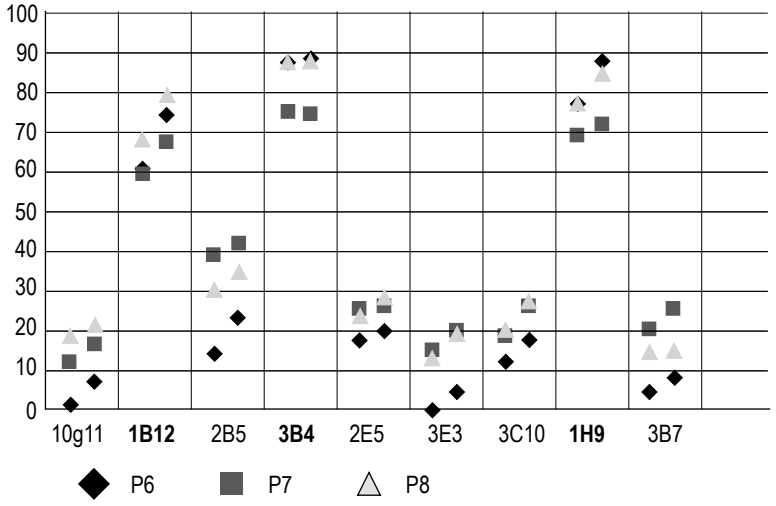

Рисунок 4. Ингибирование МкАт связывания сывороточного меченного IgA с P6, P7, P8

Примечания: по оси абсцисс – шифры МкАт (использованы в двух концентрациях 10 и 50 γ); по оси ординат – ингибирование, %.

явление эпитопа 3B4 денатурация IgA не оказала влияния (данные не приводятся).

Способность нативного или восстановленного IgA конкурировать с меченным IgA, ингибируя связывание последнего с адсорбированными полипептидами P6, P8, определяли в конкурентном ингибиторном ИФА. Восстановление дисульфидных связей на молекуле IgA не ухудшило связывание лиганда с изучаемыми антигенами, а привело к незначительному усилению способности белков P6 и P8 связывать антитела с измененной конформацией (рис. 5 – данные для mIgA; аналогичные результаты для SIgA не указаны). Данный результат демонстрирует устойчивость сайта связывания с рекомбинантными белками на молекуле IgA к восстановлению дисульфидных связей.

Обсуждение

Способность к высокоселективному связыванию IgA определила интерес исследователей к поверхностному белку Bac. Изучению IgA-рецепторных свойств Bac белка посвящено большое число работ, начиная с 1984 года. Рекомбинантные полипептиды P6, P7, P8, полученные методами генетической инженерии, предположительно, должны обладать свойствами, характерными для их прототипа – иммуногенностью, выработкой протективных антител, селективным взаимодействием с молекулами IgA, что позволило бы определить перспективу применения производных Bac белка. Тем не менее, как показывает практика создания рекомбинантных пептидов и полипептидов на основе полноразмерного белка Bac, дифференциация производных по длине, сохранности и положению области MLKKIE относительно C-конца значительно влияет на их свойства [5]. Настоящее исследование посвящено анализу особенностей и структурных аспектов взаимодействия IgA с полипептидами P6, P7, P8.

Как указано ранее, два производных (P6, P8) Bac белка содержат последовательность из шести аминокислот MLKKIE, роль которой не ясна: создает ли гексапептид оптимальную конфигурацию для взаимодействия или непосредственно участвует в связывании Fc-области IgA. Этот вопрос выходит за рамки проведенного исследования, однако установлено, что полипептид P7 (содержит измененную последовательность MLKRIQ) обладает существенно более слабой способностью к связыванию всех рассмотренных молекулярных форм IgA. Ранее были получены данные, свидетельствующие об отсутствии изменения IgA-рецепторной активности рекомбинантного 20 kDa пептида, в MLKKIE-последовательности которого замещены две аминокислоты [11]. Результаты настоящей работы свидетельствуют о сильном изменении иммуноглобулин-связывающих свойств полипептида, полностью идентичного рекомбинантному протеину P8 за исключением двух аминокислотных замен, что подтверждает важное значение гексапептида MLKKIE в реализации IgA-рецепторной активности белками.

Bac белок имеет несколько антигенных детерминант, в том числе и в N-терминальной области, что показано рядом авторов [5, 16]. По-видимому, полипептид P7, созданный на основе N-терминальной области белка Bac, можно рассматривать как наиболее приемлемый кандидат в состав вакцины из-за низкого уровня связывания IgA и наличия антигенных свойств.

Установлена оптимальная структура IgA-связывающего полипептида среди трех исследуемых антигенов. Она принадлежит рекомбинантному деривату P6, укороченному по сравнению с P8 с обоих концов. В ранее опубликованных работах указано на зависимость IgA-рецепторных свойств от длины рекомбинантного протеина – с увеличением количества аминокислот в последовательности возрастает успешность взаимодействия с лигандом [5]. В данном исследовании показано, что полипептид P6, несмотря на меньший размер, обладает преимуществом перед P8 в связывании IgA. Это можно объяснить отсутствием у P8 оптимальной конформации или стерическими затруднениями, вызванными взаимодействием с IgA молекулы большого размера.

Показано, что исследуемые свойства белка Bac характерны и для его рекомбинантных производных, хотя в связи с различиями в строении и пространственной конфигурации последних выражены в разной мере.

Все три полипептида обладают способностью к селективному связыванию IgA в любом из использованных вариантов постановки ИФА. Такой результат закономерен, если распростра-

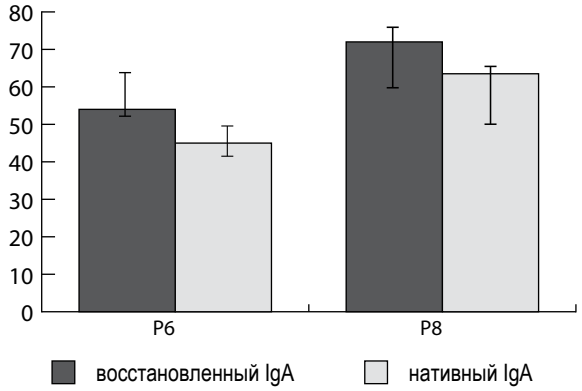

Рисунок 5. Влияние восстановления дисульфидных связей сывороточного IgA на взаимодействие с рекомбинантными полипептидами P6 и P8

Примечания: по оси абсцисс – полипептиды P6, P8; по оси ординат – ингибирование, %.

нить свойства белка Bac с IgA-рецепторной способностью на его рекомбинантные дериваты [15, 17].

Была проанализирована способность P6, P7, P8 взаимодействовать с mIgA и SIgA. По данным ряда исследователей, Bac белок обладает слабо выраженной способностью к связыванию SIgA, существование взаимодействия с которым необходимо для реализации биологических функций СГВ [10]. В условиях равенства концентраций лиганда (по массе) продемонстрировано, что уровень связывания полипептидами P6, P7, P8 сывороточного парапротеина выше, чем секреторного.

Установлена способность полипептидов P6 и P8 вступать во взаимодействие с IgA как в растворе, так и в адсорбированном состоянии. Это справедливо и для Bac белка, свойства которого в связанном состоянии отличны от таковых в растворе [9].

Также исследовано различие в связывании полипептидами P6, P7, P8 двух подклассов IgA1 и IgA2. Оказалось, что количество связавшегося IgA1 с любым из полипептидов выше, чем IgA2, что вероятно связано с особенностями конфигурации IgA2. Ранее эта особенность была выявлена для полноразмерного белка Bac, преимущественно связывающего первый подкласс IgA [15].

Интересным представлялось дополнить информацию о взаимодействии IgA с дериватами Bac белка данными о положении сайта связывания полипептидов P6, P7, P8, его консервативности и устойчивости.

Определено положение сайта связывания белков на молекуле IgA. При использовании ингибиторного ИФА нами выявлены три МкАт, конкурирующие с полипептидами за связывание с IgA. Были рассмотрены три предположения относительно причины конкуренции. Во-первых, МкАт могут распознавать тот же участок IgA, который связывают рекомбинантные протеины P6, P7, P8, препятствуя таким образом взаимодействию рекомбинантных полипептидов с их антигенными детерминантами на молекуле IgA. Во-вторых, существует вероятность, что МкАт распознают участок лиганда, топографически приближенный к сайту связывания P6, P7, P8. При реализации такого варианта, образование комплекса одного из МкАт с меченым IgA привело бы к возникновению стерических трудностей, препятствующих последующему связыванию полипептидов с IgA. В-третьих, МкАт при взаимодействии с IgA могут вызывать конформационные изменения этой молекулы-лиганда, которые изменяют сайт связывания. Эти модификации IgA препятствуют в дальнейшем взаимодействию белков P6, P7, P8 с иммуноглобулином.

Результаты ингибиторного ИФА, на первый взгляд, противоречат результатам, полученным после постановки непрямого ИФА – предварительное связывание IgA полипептидами не препятствовало последующему его взаимодействию с МкАт.

Одной из гипотез, объясняющих такое несоответствие, может быть ранее высказанное предположение о близком расположении эпитопов, связывающих МкАт (3B4, 1H9, 1B12), и участков связывания полипептидов на IgA. Основанием послужили результаты непрямого ИФА, свидетельствующие о принципиальной возможности одновременного связывания любого из трех МкАт 1B12, 1H9, 3B4 и любого из полипептидов P6, P7, P8 с молекулой IgA.

Противоречивость данных объясняют еще две гипотезы, допускающие, что участки связывания полипептидов и МкАт могут как совпадать, так и быть топографически приближены друг к другу.

Если допустить, что аффинитет к МкАт с IgA выше такового у полипептидов к IgA, то следствием будет смещение равновесия взаимодействий в сторону образования комплекса IgA-МкАт. Смещение равновесия приведет к значительному подавлению связывания IgA с адсорбированными полипептидами в условиях ингибиторного ИФА и всего лишь частично снизит количество образующихся комплексов IgA-МкАт в непрямом ИФА.

Возможно также, что на каждой мономерной молекуле IgA существует два симметричных участка связывания МкАт и полипептидов. Тогда, в случае ингибиторного ИФА, МкАт в растворе будут блокировать оба участка связывания на IgA, предотвращая дальнейшее взаимодействие IgA с иммобилизованными полипептидами. При непрямом ИФА адсорбированные полипептиды будут связывать только один сайт, позволяя МкАт из раствора взаимодействовать с другим симметричным сайтом.

Консервативность участка связывания полипептидов P6, P7, P8 на IgA оценивали при помощи десяти индивидуальных миеломных парапротеинов IgA1. В связи с малой распространенностью случаев IgA2-миелом и трудностями, связанными с очисткой препаратов IgA2, в работу было включено только два сывороточных образца этого подкласса. Показано, что сайт изменчив в индивидуальных парапротеинах.

При анализе влияния частичной денатурации IgA на взаимодействие с рекомбинантными полипептидами P6, P7 и P8 проводили разрушение дисульфидных связей между α-цепями, при условии сохранения всех остальных видов связей, в том числе нековалентных взаимодействий между фрагментами молекулы. Это привело к разруше-

нию конформации эпитопов, которые связывают МкАт 3В4, 1Н9, 1В12, что повлекло ухудшение связывания рассматриваемых МкАт с молекулой IgA. Полипептиды после взаимодействия с препаратом, обработанным дитиотреитолом, проявляют более выраженную IgA-рецепторную активность по сравнению с необработанным IgA. Это свидетельствует о сохранности сайта связывания полипептидов в условиях, приводящих к разрушению конформационных эпитопов для связи с МкАт. Таким образом, результаты опыта по восстановлению дисульфидных связей подтверждают высказанное ранее предположение, что участки связывания МкАт 3В4, 1Н9, 1В12 и сайт связывания полипептидов P6, P7, P8 являются разными участками молекулы IgA.

Три МкАт (3В4, 1Н9, 1В12), участки связывания которых на IgA топографически приближены к сайту связывания производных Bac белка (P6, P7, P8), могут быть использованы для анализа взаимоотношений Fc-рецепторов стрептококков и человека. Это связано с тем, что сайт связывания рецептора человека FcαRI перекрывается с сайтом связывания белка Bac, причем Bac белок ингибирует функции указанного рецептора [18].

Таким образом, охарактеризованы IgA-рецепторные свойства рекомбинантных дериватов белка Bac. Полипептиды P6, P7, P8 селективно связывают mIgA и SIgA, а также оба подкласса сывороточного IgA1 и IgA2. IgA-рецепторные свойства исследуемых производных белка СГВ коррелируют со свойствами, характерными для полноразмерного Bac белка. В то же время, особенности структуры каждого из трех полипептидов определяют различия между ними по IgA-связывающей активности. Установлено, что полипептид P6, содержащий область MLKKIE в нативной форме, наиболее эффективно связывал IgA. Обнаруженная особенность полипептида, обладающего меньшим размером по сравнению с полипептидом P8, указывает на отсутствие прямой зависимости между размером деривата белка Bac и его IgA связывающей активностью. Показано также на примере P7, что при замещении двух аминокислот в указанном сайте IgA-рецепторная активность проявляется существенно хуже.

Определены некоторые структурные аспекты взаимодействия IgA с полипептидами. Выявлена топографическая близость сайта связывания полипептидов на молекуле IgA с участками связывания МкАт 3В4, 1Н9, 1В12. Установлена устойчивость сайта связывания протеинов P6, P7, P8 к частичному восстановлению дисульфидных связей, а также его изменчивость среди миеломных IgA.

Изученные особенности во взаимодействии с IgA открывают широкие перспективы практического применения рекомбинантных полипептидов P6, P7, P8 при создании диагностикумов по определению уровня иммуноглобулина А, а также в качестве IgA-связывающих иммунохимических реагентов для аффинного выделения IgA и его фрагментов.

Список литературы

1. Грязева И.В., Климович В.Б. Моноклональные антитела и тест-системы для выявления секреторного IgA и свободного секреторного компонента // Мед. иммунология. – 1999. – Т. 1, № 3-4. – С. 59.

2. Грязева И.В., Климович В.Б., Пашкова С.Ф. Моноклональные антитела к легким цепям иммуноглобулинов человека и их применение в иммуноанализе // Иммунология. – 1994. – № 3. – С. 31-37.

3. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки: Пер. с англ. А.Н. Маца / Под ред. Р.С. Незлина. – М.: Мир, 1976. – 356 с.

4. Климович В.Б., Самойлович М.П., Крутецкая И.Ю., Пашкова С.Ф. Моноклональные антитела против подклассов IgG человека. Эпитопная специфичность и применение в иммуноанализе // Иммунология. – 1998. – № 3. – С. 30-32.

5. Мерингова Л.Ф., Леонтьева Г.Ф., Устинович И.А., Грабовская К.Б., Суворов А.Н., Тотолян Артем А. Сравнительное изучение антигенных и иммуногенных свойств рекомбинантных полипептидов – фрагментов белка ВАС стрептококка группы В // Мед. иммунология. – 2004. – Т. 6, № 6. – С. 493-498.

6. Устинович И.А. Изучение области связывания IgA на рекомбинантном ВАС белке стрептококка группы В: Дисс. ... канд. биол. наук. – СПб., 2000. – 109 с.

7. Леонтьева Г.Ф., Суворов А.Н., Мерингова Л.Ф., Грабовская К.Б., Устинович И.А., Тотолян А.А. Экспериментальная оценка рекомбинантных полипетидов как вакцины против стрептококков группы В // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 2. – С. 35-40.

8. Areschoung T., Lindahl G., Stålhammar-Carlemalm M. Surfase proteins of Streptococcus agalactiae and related proteins in other bacterial pathogens // Clin. Microbiol. Rev. – 2005. – Vol. 18, N 1. – P. 102-127.

9. Brady L.J., Boyle M. Identification of non-immunoglobulin A-Fc-binding forms and low-molecular-weight secreted forms of the group B streptococcal β antigen // Infect. Immun. – 1989. – Vol. 57, N 5. – P. 1573-1581.

10. Lindahl G., Akeström B., Vaerman J.-P., Stenberg L. Characterization of an IgA receptor from group B streptococci: specificity for serum IgA // Eur. J. Immunol. – 1990. – Vol. 20, N 10. – P. 2241-2247.

11. Suvorov A., Ustinovitch I., Meringova L., Grabovskaya K., Leontieva G., Vorobieva E., Totolian A. Construction of recombinant polypeptides based on beta antigen C (Bac) protein & their usage for protection against group B streptococcal infection // Indian J. Med. Res. – 2004. – N 119 (Suppl). – P. 228-232.

12. Forsgren A., Sjöquist J. «Protein A» from S. aureus. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin // J. Immunol. – 1966. – Vol. 97, N 6. – P. 822-827.

13. Jerlström P.J., Talay S.R., Valentin-Weigand P., Timmis K.N., Chhatwal G.S. Identification of an Immunoglobulin A binding motif located in the β-antigen of the C protein complex of group B streptococci // Infect. Immun. – 1996. – Vol. 64, N 7. – P. 2787-2793.

14. Mitchell T.J. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis // Nat. Rev. Microbiol. – 2003. – Vol. 1, N 3. – P. 219-230.

15. Anthony B.F., Concepcion N.F., Puentes S.M., Payne N.R. Nonimmune binding of human immunoglobulin A to type II group B streptococci // Infect. Immun. – 1990. – Vol. 58, N 6. – P. 1789-1795.

16. Yang H.H., Madoff L.C., Guttormsen H.K., Liu Y.D., Paoletti L.C. Recombinant group B streptococcus Beta C protein and a variant with the deletion of its immunoglobulin A-binding site are protective mouse maternal vaccines and effective carriers in conjugate vaccines // Infect. Immun. – 2007. – Vol. 75, N 7. – P. 3455-3461.

17. Russell-Jones G.J., Gotschlich E.C., Blake M.S. A surface receptor specific for human IgA on group B streptococci possessing the Ibc protein antigen // J. Exp. Med. – 1984. – Vol. 160. – P. 1467-1475.

18. Pleass R.J., Areschoug T., Lindahl G., Woof J.M. Streptococcal IgA-binding proteins bind in the Cα2-Cα3 interdomain region and inhibit binding of IgA to human CD89 // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276, N 11. – P. 8197-8204.

поступила в редакцию 08.06.2008
принята к печати 11.06.2008