

УДК 577.112.6

Конформационные отличия активных ангиотензинов от их неактивных предшественников

О. Н. Солопова^{1*}, Л. П. Позднякова¹, Н. Е. Варламов¹, М. Н. Боков¹, Е. В. Морозкина²,
Т. А. Ягудин², П. Г. Свешников¹

¹ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения», 117149, Москва, Симферопольский бул., 8

²Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

*E-mail: solopova@msn.com

Поступила в редакцию 28.10.2011 г.

РЕФЕРАТ Вопрос о влиянии аминокислотного окружения определенных участков белка на их конформацию остается малоизученным. На примере ангиотензинов 1, 2 и 3 – метаболитов ангиотензиногена, мы показали, что одни и те же аминокислотные последовательности в составе разных молекул могут иметь существенные конформационные различия. С этой целью получены высокоаффинные моноклональные антитела против ангиотензинов 1, 2 и 3 и изучена их кросс-реактивность между разными ангиотензинами и ангиотензиногеном. Сделан вывод о том, что конформации неактивных молекул – ангиотензина 1 и соответствующего участка ангиотензиногена – сходны между собой, конформации активных ангиотензинов 2 и 3 также сходны между собой, тогда как конформации гомологичных участков у активных и неактивных ангиотензинов существенно отличаются.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА пептиды, конформация, ангиотензины, ангиотензиноген, моноклональные антитела.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Анг1 – ангиотензин 1 человека; Анг2 – ангиотензин 2 человека; Анг3 – ангиотензин 3 человека; ИФА – иммуноферментный анализ; ПААГ – полиакриламидный гель; Hsp70 – белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа; K_d – константа диссоциации.

ВВЕДЕНИЕ

Со времени возникновения в 1975 г. гибридной технологии [1] получено множество моноклональных антител к самым разным субстанциям. Тем не менее потребность в новых антителах не уменьшается: требуются антитела, обладающие заданными свойствами, антитела к определенным эпитопам, а также к вновь открываемым белкам и другим органическим и неорганическим соединениям. Как правило, новые белки удается получить в очень ограниченных количествах, а зачастую их чрезвычайно сложно или даже невозможно выделить в чистом виде, сохранив при этом природную конформацию. Такие белки не могут использоваться для иммунизации при получении антител, поэтому часто единственным выходом оказывается иммунизация синтетическими пептидами, соответствующими определенным участкам желаемого белка. При очевидных преимуществах этот подход не лишен недостатков: в составе белка пептиды имеют значительно меньше степеней свободы, чем в свободном состоянии. В результате антитела против пептидов не всегда способны связывать полноразмерный белок [2].

Классическим примером структурных различий пептидов в составе их белкового предшественника и пептидов в свободном состоянии служит ангиотензиноген человека и его метаболиты – ангиотензины 1, 2 и 3. Ангиотензин 1 (Анг1) – прогормон, который состоит из 10 аминокислотных остатков и образуется из ангиотензиногена в результате отщепления N-концевого пептида [3]. Анг1 не обладает физиологической активностью и служит субстратом для образования активных ангиотензинов 2 и 3. Ангиотензин 2 (Анг2) отличается от ангиотензина 1 отсутствием двух C-концевых аминокислотных остатков, а ангиотензин 3 (Анг3) короче ангиотензина 2 на один N-концевой остаток (рисунки). Анг1 содержит те же аминокислоты, что и Анг2, однако он не способен связываться с рецепторами Анг2 и запускать тем самым эффекторные функции [4]. Наиболее вероятное объяснение этому – конформационные различия ангиотензинов 1 и 2. Для подтверждения этой гипотезы мы получили моноклональные антитела против ангиотензинов 1, 2 и 3 и исследовали их кросс-реактивность в отношении разных ангиотензинов и ангиотензиногена.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ангиотензиноген	Asp	- Arg	- Val	- Tyr	- Ile	- His	- Pro	- Phe	- His	- Leu	- Leu	- Val	- Tyr	- Ser
Ангиотензин 1	Asp	- Arg	- Val	- Tyr	- Ile	- His	- Pro	- Phe	- His	- Leu				
Ангиотензин 2	Asp	- Arg	- Val	- Tyr	- Ile	- His	- Pro	- Phe						
Ангиотензин 3		Arg	- Val	- Tyr	- Ile	- His	- Pro	- Phe						

Аминокислотные последовательности предшественников ангиотензина 2 и его метаболитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы человеческий рекомбинантный ангиотензиноген («Sigma», США), ангиотензины 1, 2 и 3 («American peptide», США), рекомбинантный Hsp70 из *Mycobacterium tuberculosis*, полученный в нашей лаборатории [5], мыши линии BALB/c, линия клеток мышинной миеломы sp2/0.

Получение моноклональных антител против ангиотензинов 1, 2 и 3

Мышей иммунизировали в подушечки задних лап препаратами ангиотензинов, конъюгированных с адъювантным белком Hsp70 из *M. tuberculosis*, как описано ранее [6], дважды с интервалом 2 нед в дозировке 100 мкг конъюгата на одну иммунизацию. Первую иммунизацию проводили используя полный адъювант Фрейнда, вторую – неполный адъювант Фрейнда. На 3-й день после второй иммунизации клеток подколенных лимфоузлов гибридовали с клетками миеломы sp2/0 по стандартной методике [1]. Супернатанты гибридом тестировали с использованием непрямого [7] и конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) [8], позитивные клоны клонировали 2–4 раза, антитела нарабатывали в асцитных жидкостях мышей и выделяли при помощи аффинной хроматографии на белок-G-сефарозе [9]. Чистоту антител контролировали с помощью электрофореза в 12% ПААГ согласно [10].

Характеристика антител

Специфичность полученных антител определяли при помощи прямого и конкурентного ИФА [7, 8]. Аффинность антител против каждой из мишеней оценивали, измеряя константы диссоциации (K_d), как описано в работе Клотца [11] с модификациями Фриге [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ангиотензин 1 человека и мыши, как и ангиотензины 2 и 3, имеют идентичную аминокислотную последовательность [13]. Кроме того, ангиотензины 2 и 3 обладают физиологической активностью и введение их

в организм в дозах, необходимых для иммунизации (10–50 мкг/мышь), приводит к быстрому летальному исходу даже при внутримышечном и подкожном введении. Все это делает ангиотензины крайне неудобными иммуногенами, однако конъюгирование с адъювантным белком Hsp70 из *M. tuberculosis* позволило преодолеть иммунологическую толерантность и устранить токсичность. В результате были получены моноклональные антитела против каждого из ангиотензинов.

Специфичности полученных антител определяли иммуноферментным анализом (табл. 1). Непрямой ИФА выявил взаимодействие антител с сорбированными мишенями. В такой системе часть структурных единиц ангиотензиногена и пептидов оказывается недоступной для антител, а часть – искажена. Методом конкурентного ИФА установлено взаимодействие антител с белком и пептидами в однофазной системе – в растворе, а определение констант диссоциации позволило количественно оценить силу взаимодействия (табл. 2).

Наиболее аффинное антитело, полученное против ангиотензина 1 – AngC11 ($K_d = 1.3 \times 10^{-10}$), практически не связывает сорбированный Ang1, а также не взаимодействует с ангиотензинами 2 и 3 ни в прямом, ни в конкурентном ИФА. В то же время AngC11 узнает ангиотензиноген как сорбированный, так и в растворе. Все это свидетельствует о том, что либо эпитоп этого антитела содержит аминокислотные остатки, которые отщепляются при образовании ангиотензинов 2 и 3, либо структура этого участка у Ang1 и Ang2 и 3 настолько различается, что антитело способно связывать только Ang1.

Антитела, полученные в результате иммунизации ангиотензинами 2 и 3, напротив, узнают только ангиотензины 2 и 3, не делая различий между ними в конкурентном анализе и предпочитая Ang2 в прямом ИФА независимо от того, каким из ангиотензинов (вторым или третьим) проводили иммунизацию. Лучшее узнавание ангиотензина 2 в прямом ИФА легко объяснить лучшей способностью к сорбции Ang2 по сравнению с более коротким и менее ги-

Таблица 1. Взаимодействие антител с ангиотензинами 1, 2 и 3 и ангиотензиногеном в непрямом и конкурентном ИФА

Иммуноген	Антитело	Непрямой ИФА				Конкурентный ИФА			
		А-ген	Анг1	Анг2	Анг3	А-ген	Анг1	Анг2	Анг3
Анг1	AngE9	-	+	-	-	-	+	-	-
	AngC9	+	+	-	-	+	+	±	±
	AngC11	+	±	-	-	+	+	-	-
Анг2	AngIIE7	-	-	+	±	-	-	+	+
Анг3	AngIIIB7	-	-	+	±	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
	AngIIIF7	-	-	+	±	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

Примечание: А-ген – ангиотензиноген, н.о. – не определяли.

дропфильным Анг3. Ни одно из антител против Анг2 и Анг3 не узнает ангиотензин 1 и ангиотензиноген ни в одном варианте иммуноферментного анализа, несмотря на то, что и Анг1, и ангиотензиноген содержат аминокислотные последовательности, входящие в состав ангиотензинов 2 и 3.

ВЫВОДЫ

Суммируя полученные результаты, можно сделать следующие выводы:

1. ангиотензин 1 в свободном виде и в составе ангиотензиногена имеет одинаковую конформацию;
2. отщепление от Анг1 двух аминокислотных остатков существенно меняет конформационную структуру всего пептида, образовавшийся ангиотензин 2 конформационно отличается от участков с идентичными аминокислотными последовательностями в составе ангиотензина 1 и ангиотензиногена;
3. отщепление одного аминокислотного остатка от ангиотензина 2 не изменяет существенно конформационную структуру пептида; конформация образовавшегося в результате ангиотензина 3 сходна с конформацией ангиотензина 2 и совершенно отличается от конформации соответствующих участков Анг1 и ангиотензиногена;
4. используя короткие пептиды для получения моноклональных антител против белков, нужно учитывать возможность полного преобразования антигенных детерминант белка, синтезированных в виде пептидов; пептиды, сорбированные на твердой фазе, также могут иметь существенные конформационные отличия от растворимых пептидов с той же аминокислотной последовательностью.

Таблица 2. Константы диссоциации (K_d) для антител против ангиотензинов 1 и 2 с разными мишенями

Антитело	K_d , М			
	А-ген	Анг1	Анг2	Анг3
AngE9	$>10^{-5}$	4.7×10^{-7}	$>10^{-5}$	$>10^{-5}$
AngC9	4.0×10^{-8}	7.7×10^{-9}	3.0×10^{-5}	3.0×10^{-5}
AngC11	1.25×10^{-8}	1.3×10^{-10}	5.5×10^{-6}	2.3×10^{-5}
AngIIE7	$>10^{-5}$	$>10^{-5}$	6.0×10^{-7}	2.0×10^{-6}

от растворимых пептидов с той же аминокислотной последовательностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Превращение неактивных ангиотензина 1 и ангиотензиногена в их активные Анг2 и Анг3 сопровождается существенной конформационной перестройкой соответствующих участков пептидной или белковой молекулы. ●

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 16.512.12.2012 «Создание штаммов-продуцентов рекомбинантных гуманизированных Fab-фрагментов к фактору некроза опухоли альфа и предшественникам активных ангиотензинов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kohler G., Milstein C. // *Nature*. 1975. V. 256. P. 495–497.
2. Свешников П.Г., Малайцев В.В., Богданова И.М., Солопова О.Н. Введение в молекулярную иммунологию и гибридную технологию. М.: МГУ, 2006.
3. de Gasparo M., Catt K.J., Inagami T., Wright J.W., Unger T. // *Pharmacol. Rev.* 2000. V. 52. P. 415–472.
4. Boucher R., Demassieux S., Garcia R., Genest J. // *Circ. Res.* 1977. V. 41. P. 26–29.
5. WO2005/028510. Methods, Kits and Compositions for the Developments and Use of Monoclonal Antibodies Specific to Antigens of Low Immunogenicity. Patent USA. 2005.
6. Свешников П.Г., Городецкая С.Б., Шемчукова О.Б., Солопова О.Н., Боков М.Н., Варламов Н.Е., Ульянов А.М., Лютова Е.М., Киселев В.И., Бударина С.О., Ашрафян Л.А. // *Молекул. медицина*. 2009. V. 4. P. 45–50.
7. Engvall E., Perlmann P. // *Immunochemistry*. 1971. V. 8. № 9. P. 871–874.
8. Engvall E., Jonsson K., Perlmann P. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1971. V. 251. № 3. P. 427–434.
9. Jungbauer A., Tauer C., Reiter M., Purtscher M., Wenisch E., Steindl F., Buchacher A., Katinger H. // *J. Chromatogr.* 1989. V. 476. P. 257–268.
10. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
11. Klotz I.M. *The Proteins* / Eds Neurath H., Bailey K. N.Y.: Acad. Press, 1953. V. 1. P. 727.
12. Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E. // *J. Immunol. Methods*. 1985. V. 77. P. 305–319.
13. Clouston W.M., Evans B.A., Haralambidis J., Richards R.I. // *Genomics*. 1988. V. 2. P. 240–248.