

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАГОВЫХ ПЕПТИДНЫХ БИБЛИОТЕК ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭПИТОПОВ, УЗНАВАЕМЫХ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИМИ ВИЧ-1 АНТИТЕЛАМИ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ Z13E1, VRC03 И VRC01

*Ильичев А. А. , Чикаев А. Н. , Щербаков Д. Н., Федина Н. В. ,
Бакулина А. Ю. , Карпенко Л. И.*

*ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор», Кольцово, Новосибирская обл., 630559, Россия*

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение 8278 от 10.08.12), РФФИ (грант № 12-04-91452-НИЗ_а и грант № 12-04-31948 мол_а)

Ключевые слова: *фаговый дисплей, эпитопы, антитела, фаговые пептидные библиотеки*

Благодаря работам Дж.Смита в 1985 г. и А. Ильичева в 1989 г. был разработан метод, впоследствии названный фаговым дисплеем, который основан на способности нитчатых бактериофагов M13 экспонировать на поверхности вириона случайные пептидные последовательности в составе белка р3 или р8 без потери инфекционности [1, 2].

Фаговый дисплей получил свое развитие как мощный метод для изучения белок-белковых взаимодействий, обеспечивающий прямую физическую связь между пептидной последовательностью, экспонированной на поверхности бактериофага и фрагментом ДНК, кодирующий данный пептид в фаговом геноме. Комбинаторные фаговые библиотеки состоят из бактериофагов, в ген оболочечных белков которых встраиваются случайные (рандомизированные) олигонуклеотидные последовательности определенной длины. В результате получается пул (библиотека) бактериофагов, экспонирующих рандомизированные последовательности аминокислот в составе одного из поверхностных белков. Библиотеки используются для селекции специфических фагов, взаимодействующих с целевым лигандом. По окончании последнего раунда селекции полипептиды, экспрессированные на поверхности фага, могут быть идентифицированы путем секвенирования ДНК индивидуальных клонов [3].

Технология фагового дисплея достаточно экономична и не требует дорогого оборудования, однако при этом позволяет решить вопросы, которые не всегда удается решить с помощью рентгеноструктурного анализа [4].

Одним из интересных применений технологии фагового дисплея является идентификация эпитопов, узнаваемых антителами, обладающими повышенной эффективностью нейтрализовать вирус иммунодефицита человека (ВИЧ-1). Эти особые антитела были обнаружены у ВИЧ-инфицированных долгожителей относительно недавно и были названы нейтрализующими антителами широкого спектра действия [5]. В настоящее время известно несколько десятков таких антител. Среди них особый интерес представляют моноклональные антитела (МКА) Z13e1, VRC03 и VRC01, для которых показана нейтрализующая активность в отношении 91 % всех известных штаммов ВИЧ-1 [6].

Цель исследования – получить пептиды-имитаторы эпитопов ВИЧ-1, взаимодействующих с антителами Z13e1, VRC03 и VRC01, с использованием фаговых пептидных библиотек.

Материалы и методы

Моноклональные антитела (МКА) VRC01, VRC03 и Z13e1 были получены в рамках программы NIH AIDS Research and Reference Program (США). В работе использовались коммерческие фаговые библиотеки Ph.D-12, Ph.D-7, Ph.D-c7c Phage Display Peptide Library Kit («New England Biolabs», США). Данные наборы содержат комбинаторную библиотеку случайных пептидных фрагментов длиной 12 или 7 аминокислотных остатков соответственно, объединенных с минорным белком оболочки рIII фага М13. Библиотека содержит приблизительно 3×10^9 индивидуальных фаговых клонов.

Аффинная селекция фаговых пептидных библиотек проводилась в соответствии с протоколом, описанным в руководстве к наборам фаговых библиотек («New England Biolabs», США). Проводилось три цикла аффинной селекции, после чего из отобранных индивидуальных бактериофагов выделялась ДНК (в соответствии с рекомендациями производителя фаговой библиотеки) и определялась ее нуклеотидная последовательность. Секвенирование проводили по методу Сэнгера в центре секвенирования ДНК ИХБФМ СО РАН. Иммуноблоттинг (дот блот) бактериофагов с соответствующими МКА проводили по методике, описанной в статье [3].

Для определения соответствия между отобранными последовательностями пептидов и антигеном gp120 использовались сервер Pepitope (<http://pepitope.tau.ac.il/>) и собственное программное обеспечение. Также использовалась разработанная нами программа pdMap, написанная на языке python с использованием библиотеки BioPython [7]. Она реализует аналогичный метод, но вместо пар остатков используются отдельные остатки, а район поиска эпитопа на антигене задается пользователем.

Результаты и обсуждения

Пептиды-имитаторы эпитопа ВИЧ-1, узнаваемые МКА VRC01

МКА VRC01 принадлежат к классу IgG₁, несут легкую цепь типа κ (каппа) и взаимодействуют с областью белка gp120, являющейся сайтом связывания вируса с CD4-клетками. VRC01 обладают нейтрализующей активностью против большинства субтипов ВИЧ-1 [6].

Отбор фаговых клонов, специфично связывающихся с антителами VRC01. Методика аффинной селекции (биоэ́ннинг) позволяет отбирать из пептидной библиотеки бактериофагов те из них, которые несут пептиды, обладающие наибольшим сродством к молекулам-мишеням. На первом этапе МКА иммобилизуются на пластиковой поверхности планшетов, после чего к ним добавляется фаговая пептидная библиотека. Далее, после наступления кинетического равновесия, несвязавшиеся с антителами фаги отмываются промывочным буфером, оставшиеся специфично связанные фаговые клоны элюируются и размножаются для нового цикла селекции. Обычно достаточно проведения трех раундов аффинной селекции, чтобы получить обогащенную популяцию фагов, содержащих целевые последовательности. Из обогащенной таким образом фаговой библиотеки после проведения нескольких раундов аффинной селекции отбирают индивидуальные фаговые клоны и определяют специфичность их связывания с соответствующими МКА с помощью ИФА или иммуноблоттинга. Аминокислотный состав специфичных к МКА пептидов, расположенных на поверхности фаговых частиц, определяют путем секвенирования фаговых ДНК в кодирующей пептид области.

Было проведено два независимых эксперимента, включающих 3 раунда аффинной селекции, с использованием антител VRC01 и библиотеки Ph.D-12. В результате отобраны индивидуальные фаговые клоны и определены структуры их рандомизированных вставок (табл. 1).

Таблица 1 - Аминокислотные последовательности, узнаваемые МКА VRC01, отобранные из фаговых пептидных библиотек. Цветом выделены совпадающие аминокислотные остатки (общие структурные мотивы)

Номер фагового клона	Количество повторов	Аминокислотная последовательность экспонированного пептида
36	2	---HPQTDTAVKVAL---
37	2	---GSYSVTDMVPGG---
35	1	---GEERAMMWDAWA---
28	1	--AWTMTDNALWLFQ---
13	1	---ANFNENADPSQT---
10	1	---ITQADVWAWDTS---
54	2	---VTLGELVSWPAE---
66	2	---TTFDILDYWTSN---
43	1	---LSIADLYRWNTS---
15	5	---VSWPELYKWTWS---
16	1	---ITAPELYAWFGS---
65	1	---ITLPELHAWEKN---
3	2	---ITNAELTNWNG---
4	1	---MDLAELSNWPHA---
49	1	---LTMEELTRWSVY---
63	1	---ITIQEITAWPES---
42	1	---LTNQELLTWTAY---
26	1	---LEMQHFMDVTFW---
22	2	---NRPDSAQFWLHH---
51	1	WQIQEYWPMDHN
8	2	---WNGGWTSAQVHT---
14	2	-----WDMHLYWHQPMT
59	1	---SPGLNKPVQLVQ---

Характеристика антигенных свойств отобранных клонов. Специфичность связывания выделенных бактериофагов с МКА подтверждали с помощью дот-блот анализа. Результаты взаимодействия фаговых клонов с МКА VRC01 представлены на рис. 1. Показано, что фаготопы № 15, 16, 26, 28, 36, 42, 49, 63 и 65 связываются с МКА VRC01 с наибольшей аффинностью. Большинство полученных фаговых клонов экспонируют пептиды, которые содержат общий мотив вида UOXXJUXXWXXX, где X – любой аминокислотный остаток; U – гидрофобный неароматический (Leu, Ile либо Val); O – Ser либо Thr; J – отрицательно заряженный (Asp либо Glu).

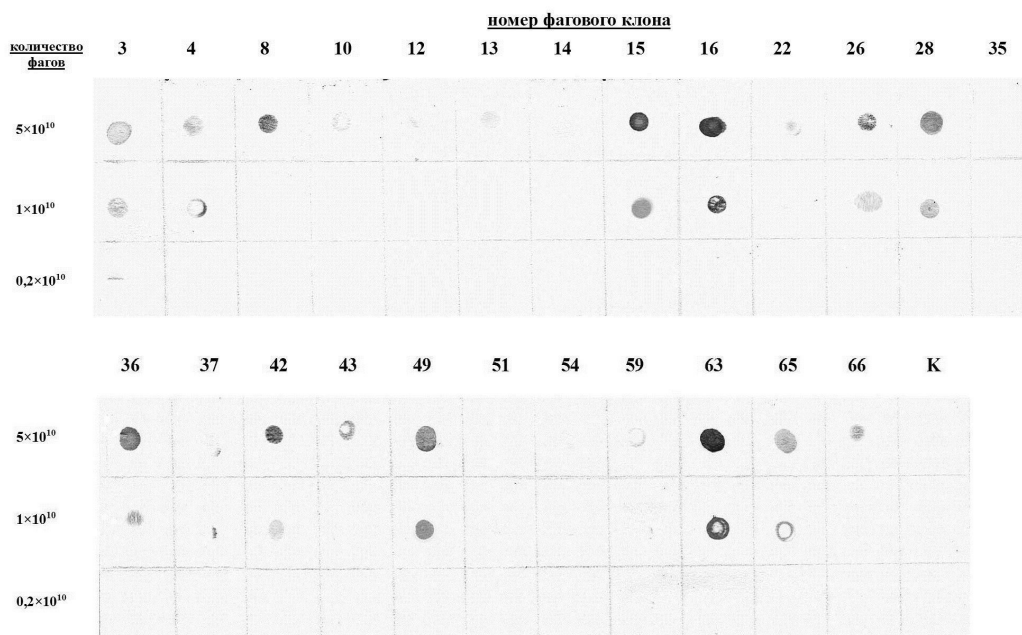


Рис. 1 - Иммуноблот-гибридизация исследуемых фаговых клонов с антителами VRC01.

На нитроцеллюлозную мембрану наносили последовательные пятикратные разведения фаговых частиц, суспендированных в 2 мкл PBS

Идентификация района связывания пептидов с VRC01. С целью определения возможного района связывания пептидов с VRC01 нами проанализирована структура комплекса антитела VRC01 с gp120, которая получена методом рентгеноструктурного анализа. В данном комплексе в структуре gp120 отсутствуют петли V3 и V1 / V2, так как они препятствуют кристаллизации gp120. В состав эпитопа входят следующие фрагменты gp120: остатки 123, 124 и 198 (остаток 198 в структуре следует непосредственно за 124, это район удаленной петли V1 / V2), районы 276–283 (петля D), 365–371 (CD4-связывающая петля), 427–430, 455–474 (петля V5). Мы предположили, что найденные методом фагового дисплея пептиды способны имитировать какие-либо фрагменты эпитопа VRC01 на поверхности gp120.

Сервер Pepitope не смог правильно определить соответствие пептидов и gp120, все найденные варианты лежали за пределами известного эпитопа. Причиной этого могут быть особенности структуры эпитопа либо пептидной библиотеки.

Программа pdMap обнаружила наилучшее соответствие консенсусной последовательности пептидов с gp120 в районе CD4-связывающей петли. Поиск соответствующего района gp120 был изначально ограничен остатками, входящими в состав эпитопа антитела VRC01. На рис. 2 представлено выравнивание фрагмента gp120 с пептидами из клонов, взаимодействие которых с VRC01 подтверждено методом иммуноблоттинга. В литературе отмечено, что остатки Asp368 и Ile371 входят в число пяти ключевых остатков, вносящих наибольший вклад в связывание gp120 с VRC01 (Wu et al., 2012). Эпитоп VRC01 не включает в себя ни одного бокового радикала триптофана, фенилаланина или тирозина, поэтому С-концевая половина пептидов XXWXXX, по всей видимости, не имитирует районы gp120, а связывается с антителом каким-то другим образом.

15	---VSWPE---LYKWTWS
16	---ITAPE---LYAWFGS
26	LEMQHFM---VTFW---
28	--AWTMTD--NALWFQ-
42	---LTNQE---LLTWTAY
49	---LTMEE---LTRWSVY
63	---ITIQE---ITAWPES
65	---ITLPE---LHAWEKN
cons	---UOXXJ---UXXWXXX
gp120	----SGGDLEI-----

Рис. 2 - Выравнивание пептидов из клонов, показавших наибольшую аффинность связывания в иммуноблоттинге с VRC01 и фрагмента 365-371 gp120.

Выделены а.о., соответствующие консенсусной последовательности

Чтобы подтвердить возможность связывания пептидов с антителом VCR01 в районе взаимодействия с CD4-связывающей петлей, нами построена модель фрагмента пептида VSWPELYKWTWS из наиболее распространенного клона отобранного в результате аффинной селекции. В результате выявлено, что фрагмент SWPEL способен имитировать район 365–371 gp120 без каких-либо стерических ограничений (рис. 3).

Пептиды-имитаторы эпитопа ВИЧ-1, узнаваемые МКА VRC03

С использованием антител VRC03 в качестве молекулы-мишени после проведения процедуры аффинной селекции из пептидных библиотек Ph.D-12, Ph.D-C7C и Ph.D-7 было отобрано 68, 20 и 12 фаговых клонов соответственно. Секвенирование и последующий компьютерный анализ с использованием онлайн инструмента MimoDB позволили выявить уникальные аминокислотные последовательности среди пептидов, полученных с помощью всех трех библиотек (табл. 2). При сравнении пептидных последовательностей, полученных с помощью библиотек Ph.D-12 и Ph.D-C7C были выявлены критические для связывания аминокислоты P (Pro) и L(Leu). Таким образом, общий мотив выглядит следующим образом: P (Pro), X, L(Leu)/V(Val). В результате аффинной селекции из библиотеки Ph.D-7 был получен несколько отличный мотив вида P(Pro)/L(Leu)/A(Ala), W(Trp), Y(Tyr), K (Lys)/R(Arg), L(Leu)/V(Val)/I(Ile), P (Pro). При сравнении пептидных последовательностей, полученных с помощью библиотек Ph.D-12 и Ph.D-C7C были выявлены критические для связывания аминокислоты P (Pro) и L(Leu).

Т.о., общий мотив выглядит следующим образом: P (Pro), X, L(Leu)/V(Val). В результате аффинной селекции из библиотеки Ph.D-7 был получен несколько отличный мотив вида P(Pro)/L(Leu)/A(Ala), W(Trp), Y(Tyr), K (Lys)/R(Arg), L(Leu)/V(Val)/I(Ile), P (Pro).

Пептиды-имитаторы эпитопа ВИЧ-1, узнаваемые МКА Z13e1

В результате аффинной селекции с использованием антител Z13e1 было отобрано

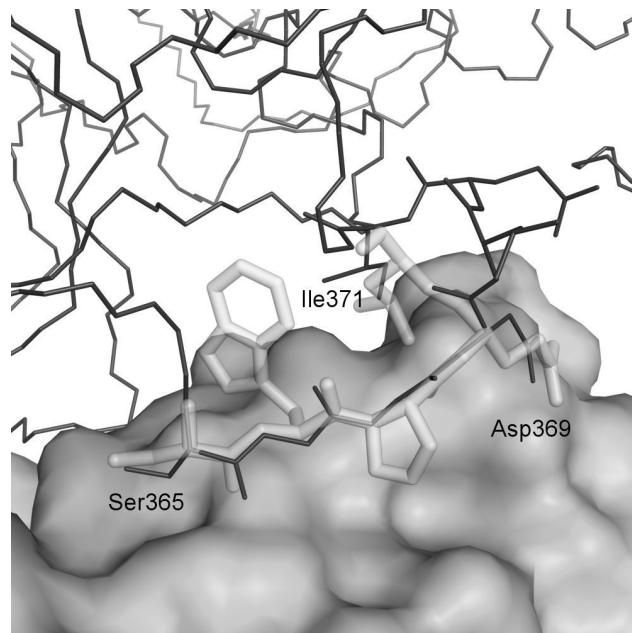


Рис. 3 - Модель взаимодействия фрагмента пептида SWPEL с VRC01. Антитело показано в виде поверхности, gp120 – в виде линии, соединяющей атомы основной цепи, у фрагмента 365–371 показаны боковые радикалы, пептид изображен толстой полупрозрачной линией.

Таблица 2 - Уникальные аминокислотные последовательности, полученные для моноклонального антитела широкого спектра действия VRC03

12 мерная библиотека	c7c мерная библиотека	7 мерная библиотека
SVPSLKTWEQQQ	CSSNPILKC	TAWWKIP
IQPVLGIVPSRD	CSQQNPRLC	SLWYRIP
LWPPNLHAWVP	CKFPNLTHC	IPWYRVP
TPMVERNINAAD		QPWYQVK
		VPWYRLS
		TTGAPFW
		HVLT PWR
		GTPRHWY

60 фаговых клонов из библиотеки Ph.D-12 и 10 клонов из Ph.D-7. Секвенирование и последующий компьютерный анализ позволили выявить уникальные аминокислотные последовательности среди пептидов, полученных с помощью этих библиотек (табл. 3). Специфичность связывания всех полученных бактериофагов с МКА Z13e1 подтверждали с помощью Вестерн-блот анализа. Результаты взаимодействия антител и фаговых клонов, отобранных в результате аффинной селекции из библиотеки Ph.D-12, приведены на рис. 4. В результате было показано, что из всех фаготопов с наибольшей аффинностью с МКА Z13e1 связываются фаги №1, 7, 9 3, 23, 2, 28, 25, 37, 24, полученные в результате проведения биоэппинга с использованием фаговой библиотеки Ph.D-12. При сравнении пептидных последовательностей был выявлен мотив длиной 6 а.о. следующего вида: N(Asn), Y(Tyr)/W(Trp), X, D(Asp), I(Ile)/L(Leu)/V(Val), T(Thr). Полученную пептидную последовательность сравнили с литературными данными об аминокислотной последовательности эпитопа на поверхности gp41, с которым связывается МКА Z13e1 [8].

Таблица 3 - Уникальные аминокислотные последовательности, полученные для моноклонального антитела широкого спектра действия Z13e1

12 мерная библиотека	7 мерная библиотека
EWTNWLDTNLA	LVDLSAE
GIKNWDVTGDW	VDLKGHN
SQSLNWDITSP	DFSGHMH
TARDYNWIDLTG	TSQVISY
SWNWRDITMLSL	
F PANWRDITDLA	
TSWYNWSDITLR	
SPHAENWVDVTT	
TYHNYSDITFAL	
RHHENYTDITRE	
SHTLNFLDLTST	
LPMLNFLDLTDL	
IPPLNHFDLTRY	
SSWLDYHDLTNM	
WTKDHNLDITV	
YGPLNYDITDD	
DANPWFNVDVVT	
SHMMDLNNLDLT	
HHNLNVHDLTRL	
SPRLNNVDITEL	
NWNTRDITQILK	
WINKNLYDITTK	
GMLFSLNYNDIT	
DLNHHDITSDKY	

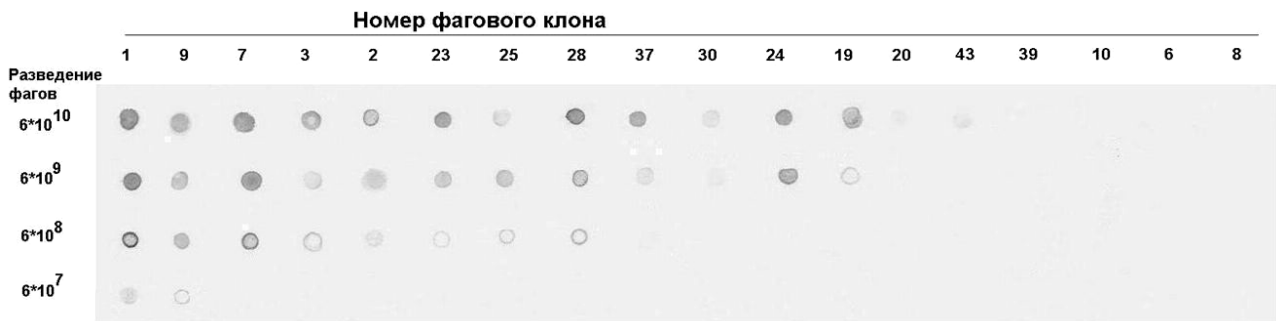


Рис. 4 - Результат Вестерн-блот анализа фаговых клонов с антителами Z13e1. На нитроцеллюлозную мембрану наносили последовательные десятикратные разведения фаговых частиц, суспендированных в 2 мкл PBS. В качестве отрицательного контроля был использован бактериофаг №8, не содержащий искусственную пептидную вставку.

Данный эпитоп является линейным, в его состав входят следующие а.о. : WNWFDITN. Было обнаружено, что последовательность gp41 ВИЧ-1 почти полностью совпадает с мотивом отобранных фаговых пептидов. Единственным заметным отличием отбираемых фаговых пептидов является очень низкая встречаемость F (фенилаланина) в позиции между W и D. В то же время в данной позиции он присутствует в пептидных вставках, экспонированных в составе поверхностного белка фаговых частиц. Возможно, это связано с тем, что регион gp41 находится в альфа-спиральной конформации, и данный аминокислотный остаток находится на противоположной стороне альфа-спирали, максимально удаленной от антигенсвязывающего участка антитела. Поэтому нахождение в этой позиции фенилаланина не является строгим. Эти результаты свидетельствуют о том, что с использованием фагового дисплея получены пептиды имитаторы эпитопа gp 41, с которыми связывается МКА Z13e1.

Библиографический список

1. Smith G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface // *Science*. – 1985. – V. 228(4705). – P. 1315–1317.
2. Ильичев А.А., Миненкова О.О., Татьков С.И., Карпышев Н.Н., Ерошкин А.М., Петренко В.А., Сандахчиев Л.С. Получение жизнеспособного варианта фага M13 со встроенным чужеродным пептидом в основной белок оболочки // *Доклады Академии Наук*. – 1989. – Т.307. – 481-483.
3. Smith G. P., Scott J. K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage // *Methods in enzymology*. 1993. Vol. 217. P. 228–257.
4. Zolla-Pazner S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies // *Nat. Rev. Immunol*. 2004. Vol. 4, № 3. P. 199–210.
5. Mascola J. R., Montefiori D. C. The Role of Antibodies in HIV Vaccines // *Annual Review Immunology*. 2010. Vol. 28. P. 413–444.
6. Wu X., Wang C., O’Dell S., Li Y., Keele B. F., Yang Z., Imamichi H., Doria-Rose N., Hoxie J. A., Connors M., Shaw G. M., Wyatt R. T., Mascola J. R. Selection Pressure on HIV-1 Envelope by Broadly Neutralizing Antibodies to the Conserved CD4-Binding Site // *J. Virol*. 2012. Vol. 86, № 10. P. 5844–5856.
7. Cock P. J., Antao T., Chang J. T., Chapman B. A., Cox C. J., Dalke A., Friedberg I., Hamelryck T., Kauff F., Wilczynski B., Hoon M. J. de. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics // *Bioinformatics*. 2009. Vol. 25, № 11. P. 1422–1423.
8. Zwick M.B., Bonnycastle L.L., Menendez A., Irving M.B., Barbas C.F. 3rd, Parren P.W.,

Burton D.R., Scott J.K. Identification and characterization of a peptide that specifically binds the human, broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody b12 // J. Virol. – 2001. – V. 75(14). - P. 6692-9.

УДК 578.81

ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ ФАГОВ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБРАЗЦОВ КАРТОФЕЛЯ

*Андрійчук Е.Н. , кандидат биологических наук
Киевский национальный университет им. Тараса Шевченка, Украина
+380675045549, aom502@ukr.net*

Ключевые слова: Бактериофаги, фитопатогенные бактерии, литическая активность, БОЕ.

*Работа посвящена исследованиям фагов фитопатогенных бактерий *X. axonopodis* pv. *beticola* 7325, *Pseudomonas fluorescens* 8573, *Raenibacillus polytuxa* 9034 с целью изучения их влияния на патогенную микрофлору. Изучено морфологию негативных колоний, определен спектр литической активности фагов до 20 штаммов бактерий. За особенностями строения фаги были отнесены к таксономическим группам.*

Введение. При выращивании и хранении сельскохозяйственных продуктов специалисты постоянно сталкиваются с проблемой поражения растений бактериальными заболеваниями. В связи с длительным использованием химических средств для защиты растений в Украине, чрезвычайно важной является задача разработки новых, экологически чистых средств защиты растений. Традиционные методы химической защиты растений не позволяют избирательно воздействовать на отдельные микроорганизмы, не уничтожая нормальную микрофлору агроценозов. Бактериофаги (вирусы бактерий) не имеют этого существенного недостатка. Проявляя специфичность и поражая только определенные группы бактерий, фаги предотвращают как распространение инфекционных заболеваний у растений, так и истощение черноземов. Внедрение новой экологически обоснованной системы ведения сельского хозяйства и защиты растений является важной научной задачей, что позволит получить полноценную конкурентоспособную продукцию сельскохозяйственного производства без остатков ядохимикатов. Их основным преимуществом является безопасность для человека и окружающей среды, а также более дешевое производство.

Целью работы было - получить и охарактеризовать изоляты фагов к бактериям - патогенов *Solanum tuberosum* и проведение их сравнительного анализа для дальнейшей разработки высокоэффективного и экологически безопасного антибактериального препарата на основе вирусов микроорганизмов для борьбы с бактериальными болезнями растений.

Материалы и методы исследований. Объектом исследований были изоляты фагов, выделены к *X. axonopodis* pv. *beticola* 7325- туберкулез сахарной свеклы; *Pseudomonas fluorescens* 8573- мягкая гниль; *Raenibacillus polytuxa* 9034 - гниль картофеля. В работе использовали индикаторные культуры фитопатогенных бактерий, полученных из коллекции музея Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, отдела фитопатогенных бактерий (штаммы: *X. axonopodis* pv. *beticola* 7325; *Pseudomonas fluorescens*