

ТУШЕНИЕ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ПЕПТИДА NQ21 СТАНДАРТНЫМИ
ТУШИТЕЛЯМИ И ИОНАМИ МАРГАНЦА (II)

Хрусталёва Т.А., Хрусталёв В.В.*

*ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», лаборатория клеточных
технологий;*

**УО «Белорусский государственный медицинский университет», кафедра
общей химии, г. Минск*

Пептид под названием NQ21 был предложен в качестве потенциального антигена для поликомпонентных вакцин против вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ1) (1). Известно, что ВИЧ1 отличается высокой скоростью накопления мутаций. Особенностью пептида NQ21 является то, что

соответствующий ему эпитоп является наименее мутабельным (1). Так, вероятность того, что нуклеотидная замена в участке ДНК, кодирующем этот эпитоп, приведёт к замене аминокислотного остатка в соответствующем фрагменте белка, является минимальной. Об относительно низкой вариабельности этого эпитопа можно судить по данным, доступным на электронном ресурсе <http://chemres.bsmu.by/Data/Seqgp120.htm>.

Антитела, выработанные к пептиду NQ21, должны будут распознавать большинство штаммов ВИЧ1. Действительно, согласно данным иммуноферментного анализа, антитела, способные связывать пептид NQ21, обнаружены в крови 80,22% лиц с впервые выявленной ВИЧ1-инфекцией (1). Если антигенные свойства пептида NQ21 были охарактеризованы в достаточной степени, то его иммуногенные свойства ещё предстоит изучить. Перед тем, как проводить эксперимент по иммунизации лабораторных животных, необходимо решить проблему выбора адъюванта – вещества, увеличивающего интенсивность иммунного ответа на вакцинный антиген (2).

Наиболее часто используемыми адъювантами для пептидных вакцин являются соединения алюминия: гидроксид алюминия ($\text{Al}(\text{OH})_3$), гидроксофосфат алюминия ($(\text{AlOH})_3(\text{PO}_4)_2$), сульфат калия алюминия ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$) и гидроксофосфат-сульфат алюминия ($\text{Al}_2\text{OHPO}_4\text{SO}_4$) (2). Механизм действия этих адъювантов заключается в том, что на их поверхности адсорбируются молекулы пептида. После внутримышечного введения смеси пептида с адъювантом происходит постепенное выделение свободных молекул антигена. Именно пролонгированное взаимодействие иммунной системы с пептидом приводит к повышению титра антител к нему (2). Таким образом, пептид должен быть способен связывать те ионы, из которых состоит адъювант. Только в этом случае будут образовываться достаточно устойчивые комплексы пептида с соответствующим неорганическим соединением.

Актуальность настоящей работы заключается в том, что нами предложен способ подбора адъювантов для синтетических вакцин, основанный на определении наличия сайтов связывания сульфат- и фосфат-ионов на молекулах пептида с помощью модифицированного метода избирательного тушения флюоресценции. Модификация метода заключается в использовании двух буферов (0,1М фосфатного и 0,1М трис-буфера, $\text{pH}=7,4$) для тушения флюоресценции стандартными тушителями (CsCl и KI), а также в использовании хлорида и сульфата марганца (II) в качестве дополнительных тушителей флюоресценции.

Целью исследования явилось выявление наличия сайтов связывания фосфат- и сульфат-ионов на молекуле синтетического пептида NQ21.

Материал и методы исследования

В качестве материала исследования был использован синтетический пептид NQ21, имеющий следующую аминокислотную последовательность: NMWKNNMVEQMHEDIISLWDQ. Пептид был синтезирован с помощью автоматического синтезатора «Symphony» фирмы «Protein technologies, Inc» (США). Соединение прошло необходимый контроль качества: его реальная молярная масса (2662 г/моль) соответствует ожидаемой согласно данным масс-спектрометрии (был использован масс-спектрометр «Shimadzu LCMS-2010»), а степень очистки равна 98,45% по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии (использовался хроматограф «Agilent 1200»).

В качестве тушителей флюоресценции были выбраны следующие соли: CsCl, KI, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ и $MnCl_2 \cdot 4H_2O$. Пептид и стандартные тушители (CsCl, KI) разводили в 0,1М фосфатном буфере (без добавления NaCl), pH=7,4. Кроме того, пептид и четыре соли (стандартные тушители и соли марганца) разводили в 0,1М трис·HCl буфере, pH=7,4 («ThermoScientific», США).

Метод тушения флюоресценции включал титрование раствора пептида NQ21 1М раствором соли: 10 порций по 40 мкл и 8 порций по 100 мкл. Относительная интенсивность флюоресценции остатков триптофана измерялась до и в процессе тушения с помощью спектрофлуориметра «Hitachi 650-60» (Япония). Поскольку пептид лишён остатков тирозина, но содержит два остатка триптофана, измерения проводились при длине волны возбуждения 296 нм и длине волны регистрации 350 нм (λ_{max} NQ21 = 350 нм).

Далее строились кривые тушения флюоресценции. По оси X откладывалась концентрация тушителя, по оси Y – относительная интенсивность флюоресценции (исходное значение флюоресценции принималось за единицу). После этого кривые тушения обрабатывались с помощью алгоритма GraphPad Prism 6. Проводился анализ на соответствие полученных графиков кривым двухфазного затухания. Целью такого анализа было отделение статического тушения (за счёт связывания иона пептидом) от динамического (за счёт постоянных столкновений иона-тушителя с остатками триптофана). В результате были найдены точные координаты «точек излома» на всех полученных графиках.

Для моделирования трёхмерной структуры пептида NQ21 использовался сервер SwissModel (<http://swissmodel.expasy.org/>). Моделирование проводилось по шаблону известной 3D-структуры полноразмерного поверхностного белка gp120 ВИЧ1 (идентификатор в Protein Data Bank: 4DVR). В результате моделирования в известную трехмерную структуру фрагмента белка были введены N-концевая аминогруппа и C-концевая карбоксильная группа.

С помощью сервера SITEHOUND (<http://sitehound.sanchezlab.org>) (3) были определены наиболее вероятные области связывания фосфат-ионов пептидом NQ21. С помощью сервера BION (http://compbio.clemson.edu/bion_server/) (4) были определены наиболее вероятные сайты связывания ионов хлора, марганца, калия и натрия.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования нами было проведено сравнение результатов тушения флюоресценции пептида NQ21 в 0,1М фосфатном и 0,1М трис·НСl буфере с помощью стандартных анионного (KI) и катионного (CsCl) тушителей. Как видно на Рис.1, кривые титрования для KI практически одинаковы при использовании как фосфатного, так и трис·НСl буфера. При наибольшей концентрации KI (0,29М) в обоих случаях интенсивность флюоресценции остатков триптофана снизилась на 51% (с учётом разведения). Кривые титрования для CsCl в обоих буферах также практически идентичны друг другу (см. Рис.1). Следует отметить, что при наибольшей концентрации CsCl (0,29М) интенсивность флюоресценции снизилась только на 23%. То есть, йодид-ионы оттушивают флюоресценцию NQ21 примерно в два раза более эффективно, чем катионы цезия.

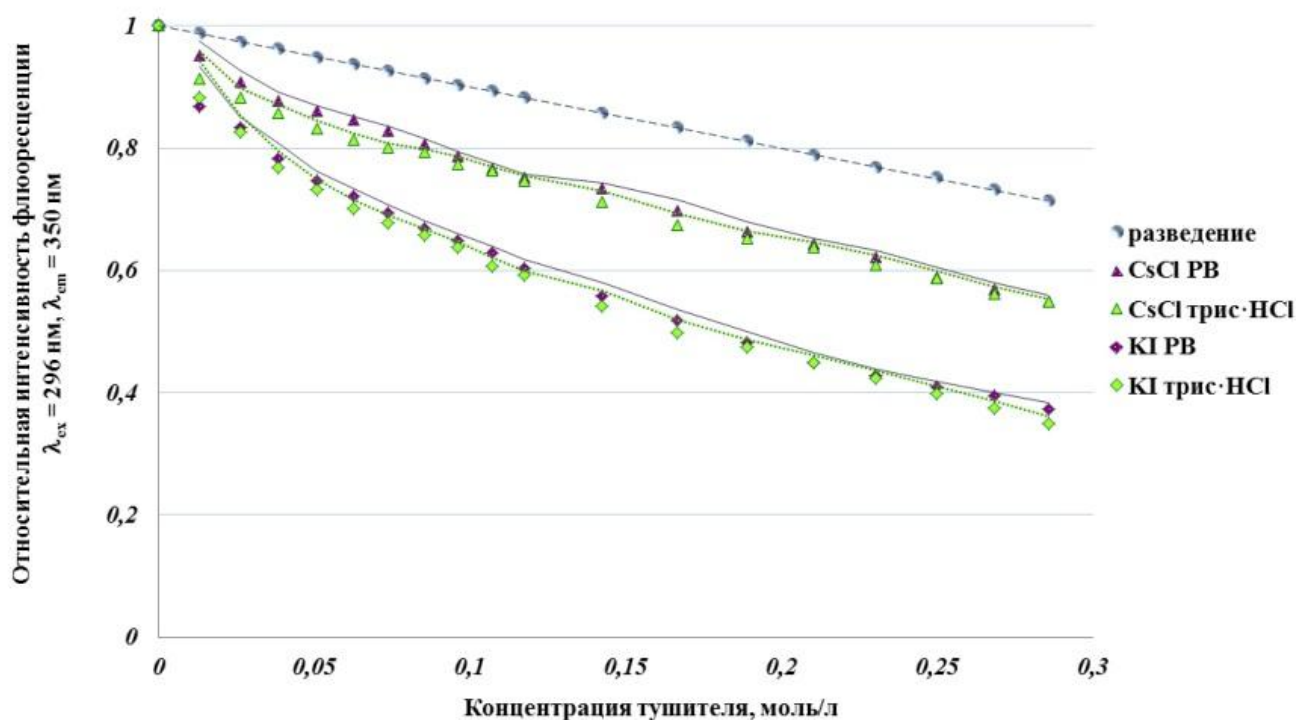


Рисунок 1 – Кривые титрования пептида NQ21 растворами стандартных тушителей флуоресценции (CsCl и KI) в 0,1М фосфатном (PB) и 0,1М трис·HCl буфере, pH=7,4

Согласно данным SITEHOUND (3), наиболее вероятные области связывания фосфат-ионов находятся в районе N-конца пептида (см. Рис.2а). Действительно, в этом районе расположена аминокислотная группа единственного остатка лизина, а также N-концевая аминокислотная группа.

Согласно данным BION (4), существует только одно возможное положение хлорид-иона на молекуле пептида NQ21 – в непосредственной близости от аминокислотной группы остатка лизина (см. Рис.2б).

Итак, анионы должны связываться исключительно с N-концом пептида, в котором расположен один из двух остатков триптофана. Если бы фосфат-ионы образовывали достаточно устойчивый комплекс с этой областью пептида, йодид-ионы не смогли бы их вытеснить. В таком случае йодид-ионы оттушивали бы флуоресценцию этого остатка триптофана слабее в фосфатном буфере, чем в трис·HCl буфере, чего в реальности не наблюдается. Это говорит о том, что фосфат-ионы не образуют устойчивый комплекс с пептидом NQ21.

Связывание фосфат-ионов может снижать эффективность оттушивания флуоресценции ионами цезия при условии, если сайты их связывания частично перекрываются. В случае с NQ21 такой феномен не наблюдался.

По данным BION (4) наиболее вероятные сайты связывания катионов расположены на C-конце пептида NQ21. Три наиболее вероятных сайта

совпадают для катионов марганца (II), калия и натрия, в связывании которых в первую очередь должны участвовать остатки Glu13, Asp14 и Asp20 (см. Рис.2в). Есть ли разница в кривых тушения флюоресценции для CsCl, MnCl₂ и MnSO₄? Судя по Рис.3, MnCl₂ оттушивает флюоресценцию пептида NQ21 несколько более интенсивно (на 31% с учётом разведения), чем CsCl (на 23%). Более того, MnSO₄ оттушивает флюоресценцию интенсивнее (на 38% с учётом разведения), чем MnCl₂.

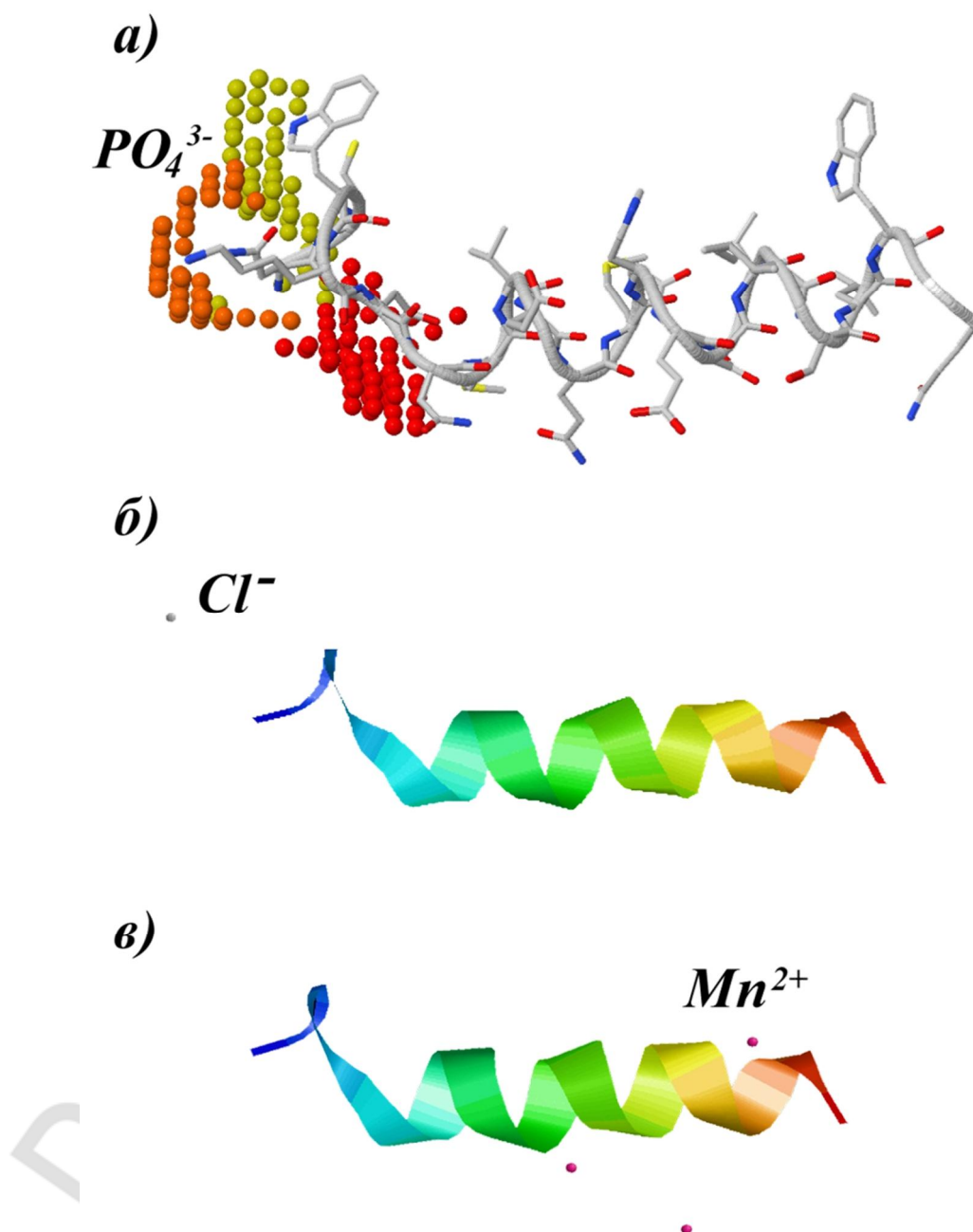


Рисунок 2 – Модель трёхмерного строения пептида NQ21 с предсказанными областями связывания фосфат-ионов (а), сайтами связывания хлорид-иона (б) и ионов марганца (II) (в)

На Рис.3 заметно, что первые пять порций CsCl, MnCl₂ и MnSO₄ снижали интенсивность флюоресценции в одинаковой степени, после чего на кривой титрования для CsCl появился «излом», который был зафиксирован с помощью метода двухфазного затухания при концентрации соли, равной 0,08М. До этой точки молекулы NQ21 связывали ионы цезия. Непосредственно в этой точке произошло насыщение всех возможных сайтов связывания, после чего наступила фаза динамического тушения.

На кривой титрования для MnCl₂ «излом» фиксируется при концентрации тушителя, равной 0,19М. Этот факт свидетельствует о том, что в присутствии хлорид-ионов с пептидом NQ21 связываются, как минимум, два иона марганца. Один ион Mn(II) координируется теми же остатками, что и ион цезия. Вторым ион координируется по анион-зависимому механизму. Действительно, хлорид-ион может связываться с N-концевой частью NQ21 (см. Рис.2б). Впоследствии этот хлорид-ион может участвовать в электростатическом притяжении и координации второго иона марганца(II).

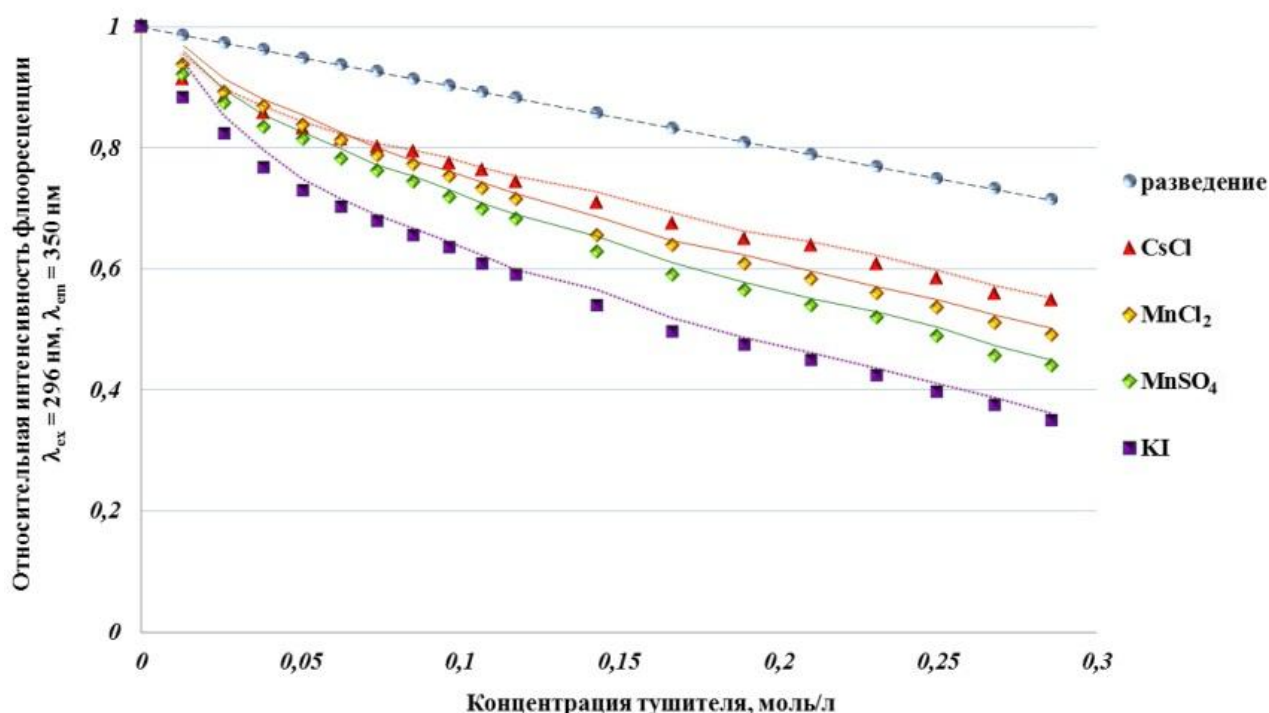


Рисунок 3 – Кривые титрования пептида NQ21 растворами CsCl, KI, MnCl₂ и MnSO₄ в 0,1М трис·HCl буфере, pH=7,4

На кривой титрования для MnSO₄ «излом» был зафиксирован с помощью программы GraphPad Prism 6 при концентрации тушителя 0,16М. Это означает, что сульфат-ион связывается с пептидом NQ21, и, более того, второй ион марганца координируется с сульфат-ионом при меньшей концентрации по

сравнению с хлорид-ионом. Следует учесть, что в исходном растворе сайт связывания аниона мог быть уже занят хлорид-ионом из трис·НСl буфера. Это говорит о том, что сульфат-ион способен вытеснять хлорид-ион из этого сайта.

На Рис.3 чётко прослеживается следующая закономерность: чем сильнее данный ион оттушивает флюоресценцию, тем быстрее наступает «излом» на кривой титрования. Действительно, для йодид-иона «излом» на кривой титрования расположен при концентрации тушителя 0,03М.

Выводы

Предложен способ выявления сайтов связывания сульфат- и фосфат-ионов на вакцинных пептидах с помощью методики избирательного тушения флюоресценции с использованием стандартных тушителей в двух буферах (в фосфатном буфере и трис·НСl буфере, рН=7,4) и солей марганца (II) – сульфата и хлорида (их использование возможно только в трис·НСl буфере, рН=7,4). Предложенный способ использован для подбора адьюванта в процессе испытаний компонента синтетической вакцины против ВИЧ1.

Поскольку сайт связывания фосфат-иона на пептиде NQ21 отсутствует, использование гидроксофосфата алюминия в качестве адьюванта для усиления его иммуногенных свойств является нецелесообразным.

Использование сульфата калия алюминия или гидроксофосфата-сульфата алюминия в качестве адьюванта является целесообразным, поскольку на данном пептиде существует сайт связывания сульфат-иона.

Литература

1. A method for estimation of immunogenic determinants mutability: case studies of HIV1 gp120 and diphtheria toxin / V. V. Khrustalev [et al.] // Journal of Integrated OMICS. – 2011. – Vol. 1. – P. 236–252.
2. Effect of Alternative Aluminum Adjuvants on the Absorption and Immunogenicity of HPV16 L1 VLPs in Mice / M. J. Caulfield [et al.] // Human Vaccines. – 2007. – Vol. 3. – P. 139-146.
3. Hernandez, M. SITEHOUND-web: a server for ligand binding site identification in protein structures / M. Hernandez, D. Ghersi, R. Sanchez // Nucleic Acids Research. – 2009. - Vol. 37. – P. W413–W416.
4. Predicting nonspecific ion binding using DelPhi / M. Petukh [et al.] // Biophysical Journal. – 2012. – Vol. 102. – P. 2885–2893.