

САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ КАТИОНОВ И АНИОНОВ НА ПЕПТИДЕ NY25: ПОДБОР АДЬЮВАНТА ДЛЯ СИНТЕТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

Т.А. Хрусталёва¹, В.В. Хрусталёв², Е.В. Барковский²

¹Институт физиологии НАН Беларуси;

²Белорусский государственный медицинский университет

Пептид NY25 является фрагментом гемагглютинина «пандемического» вируса гриппа H1N1, начавшего свою циркуляцию в человеческой популяции с 2009 года. Этот фрагмент содержит В-клеточный конформационный эпитоп, является наименее мутабельным и достаточно консервативным по сравнению с другими антигенными фрагментами того же поверхностного вирусного белка [1]. Использование короткого синтетического пептида вместо полноразмерного белка должно быть более безопасным и менее затратным методом иммунопрофилактики. Одним из этапов работы над созданием вакцинного пептида является подбор адьюванта — вещества, усиливающего иммунный ответ. Наиболее часто в качестве адьювантов используются соли алюминия (гидроксофосфат алюминия, сульфат калия алюминия, гидроксофосфат сульфат алюминия). Эффективность их работы напрямую зависит от способности пептида связываться с соответствующими анионами.

Актуальность исследования обусловлена необходимостью снижения общей суммы затрат на выполнение исследований синтетических пептидов, являющихся кандидатами для включения в состав вакцин.

Цель работы — выявление сайтов связывания катионов и анионов на пептиде NY25 с помощью метода избирательного тушения флюоресценции с использованием солей марганца (II) и компьютерных алгоритмов для биоинформатического анализа.

Материал и методы. В качестве материала использовался высокоочищенный (степень очистки 97,41% по результатам ВЭЖХ на хроматографе «Agilent 1200») пептид NY25, синтезированный на автоматическом синтезаторе «Symphony» (Protein Technologies, Inc) с молярной массой 2965 г/моль (по результатам масс-спектрометрии на «Shimadzu LCMS-2010») и аминокислотной последовательностью

«NLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFY». Модель трехмерной структуры пептида была получена с помощью сервера Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) с использованием трехмерной структуры полноразмерного гемагглютинина (3AL4) [2] в качестве шаблона.

Модифицированная нами методика избирательного тушения флюоресценции заключалась в использовании 0,1М фосфатного буфера (рН=7,4) для экспериментов по тушению флюоресценции пептида растворами KI и CsCl, а затем 0,1М трис•HCl буфера (рН=7,4) для повторения экспериментов с KI и CsCl, а также для проведения тушения флюоресценции пептида растворами MnCl₂ и MnSO₄. Относительную интенсивность флюоресценции измеряли с помощью спектрофлюориметра «Hitachi 65060». Для выявления сайтов связывания ионов натрия, калия, марганца и хлора на модели пептида NY25 использовался алгоритм BION [3], для выявления сайтов связывания фосфат-ионов — алгоритм SITEHOUND [4].

Результаты и их обсуждение. На рисунке 1а изображены кривые титрования пептида NY25 в двух разных буферах: в трис•HCl буфере и в фосфатном буфере (рН=7,4). KI оттушивал тирозиновую флюоресценцию пептида NY25 в трис•HCl буфере лучше (на 22% с учетом разведения при концентрации соли 0,04М), чем в фосфатном (на 15,7% с учетом разведения при той же концентрации соли). Необходимо отметить, что обе кривые титрования не являются линейными. Излом на кривой титрования пептида с помощью KI в трис•HCl буфере находится при концентрации 0,04М, на кривой титрования той же солью в фосфатном буфере — при концентрации 0,15М. Эти данные свидетельствуют о том, что фосфат-ионы препятствуют связыванию йодид-ионов при низких концентрациях соли (до 0,15М). На кривую тушения флюоресценции пептида NY25 с использованием CsCl наличие или отсутствие фосфат-ионов не влияло (рисунок 1а). Насыщение пептида ионами Cs⁺ произошло при концентрации соли, равной 0,05М. После этого кривые титрования были практически параллельны линии разведения. KI оттушивал флюоресценцию NY25 лучше, чем CsCl (на 44,4% при наиболее высокой концентрации йодид-ионов и только на 20,2% при наибольшей концентрации ионов Cs⁺).

Действительно, на той части 3D структуры гемагглютинина вируса «испанки» 1918 г., которой гомологична последовательность пептида NY25, есть сайт связывания фосфата [5]. В связывании принимают участие Arg116, Glu120 и Lys123 [5]. В пептиде NY25 место Lys123 занимает аргинин. NH₂ группа N-концевого остатка аспарагина пептида NY25 может служить третьим связывателем фосфат-иона (вместо Arg116, который не был включен в состав пептида). По данным предсказания сервера SITEHOUND на N-конце пептида действительно находится наиболее «горячая» область для связывания фосфат-ионов. (рисунок 1б). Фосфат-ион, скоординированный в этой области пептида (в непосредственной близости от третьего в полипептидной цепи остатка тирозина — Tyr3) действительно может снижать эффективность тушения флюоресценции.

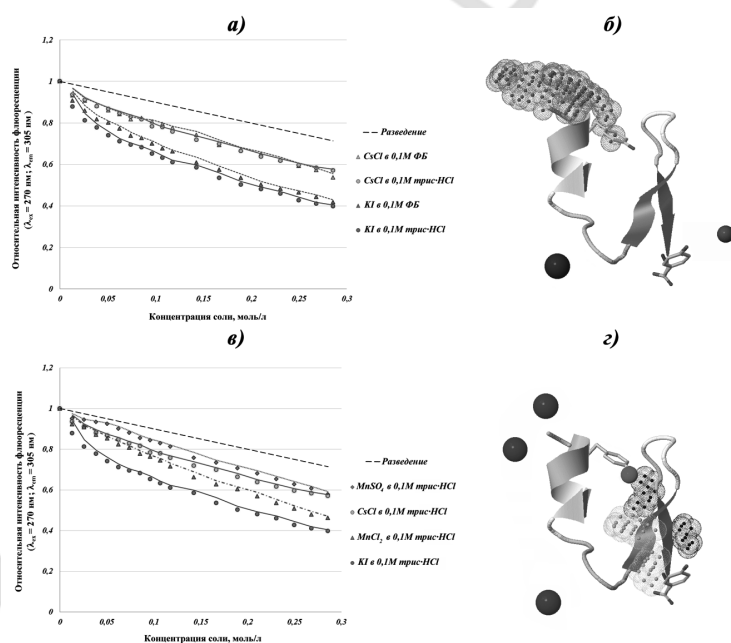


Рисунок — Кривые тушения флюоресценции пептида NY25 в трис•HCl и фосфатном буфере (ФБ) стандартными тушителями (а); 3D-модель пептида NY25 с наиболее вероятной областью связывания фосфат-ионов, со связанными ионами йода (большая сфера) и цезия (малая сфера), выделенными остатками триптофана (б); кривые тушения флюоресценции пептида NY25 в трис•HCl буфере с помощью MnSO₄, CsCl, MnCl₂ и KI (в); 3D-модель пептида NY25 с вероятной областью связывания сульфат-ионов, связанными ионами хлора (большие сферы) и марганца (малая сфера) (г)

По данным предсказания BION-сервера, хлорид-ионы могут быть связаны в трех областях пептида NY25: два — в наиболее горячей области связывания фосфат-ионов, третий — в районе петли между альфа-спиралью и бета-тяжом (рисунок 1б). Поскольку сайты связывания йодид-ионов должны перекрываться с таковыми для хлорид-ионов, можно предположить, что в обоих буферах йодид-ионы координируются в районе петли между альфа-спиралью и бета-тяжом, оттушивая флюоресценцию С-концевого тирозина (на расстоянии 13,4 ангстрем). В трис•НСl буфере йодид-ионы должны более свободно оттушивать флюоресценцию остатка Туг3 (на расстоянии 8,3 ангстрем).

Наиболее вероятный сайт связывания катионов Na⁺ и K⁺ на пептиде NY25 по результатам BION расположен у С-конца. Непосредственный связыватель катионов — Glu23. Если катионы Cs⁺ проявляют свойства, подобные свойствам катионам Na⁺ и K⁺, то при титровании CsCl тушение флюоресценции обусловлено связыванием соответствующих катионов Glu23 на расстоянии 8,7 ангстрем от Туг25 (рисунок 1б).

Кривая титрования для MnCl₂ вплоть до концентрации 0,05М дублирует таковую для CsCl (рисунок 1в). После этого кривая титрования для CsCl становится параллельной линии разведения, а для MnCl₂ процесс статического тушения флюоресценции продолжается. При наибольшей концентрации тушителя MnCl₂ снизил интенсивность флюоресценции до 64,8% (с учетом разведения). Подобный результат тушения флюоресценции ближе к таковому для анионного тушителя (KI), чем для катионного (CsCl).

Объяснить полученные результаты можно тем, что катионы марганца связываются с пептидом NY25 не только в общем для положительно заряженных ионов сайте (рисунок 1б), но и в дополнительном (рисунок 1г). Дополнительный сайт, судя по результатам BION, расположен в непосредственной близости от сайтов связывания хлорид-ионов на N-конце пептида. Хлорид-ионы, по всей видимости, способствуют связыванию ионов марганца в дополнительном сайте и оттушиванию флюоресценцию Туг3 (на расстоянии 9,1 ангстрем). Ионы Cs⁺ не могут связываться с описанным выше сайтом, поскольку менее склонны к образованию координационных связей, по сравнению с ионами Mn²⁺. Кривая титрования для MnSO₄ значительно отличается от таковой для MnCl₂. Вплоть до концентрации, равной 0,05М, ионы марганца практически не оттушивали флюоресценцию пептида NY25 (рисунок 1в). Объяснить это можно тем, что сульфат-ионы блокировали общий сайт для связывания катионов (рисунок 1г). Сервер SITEHOUND предсказал в районе бета-шпильки «холодные» сайты связывания для фосфат-ионов, которые могли занять анионы сульфата (рисунок 1г).

При более высокой концентрации MnSO₄ (выше 0,05М) эффективность тушения флюоресценции стала возрастать. Наклон кривой титрования для MnSO₄ при высоких концентрациях соли примерно такой же, как у кривой титрования для MnCl₂. Это говорит о том, что для ионов марганца в присутствии сульфат-ионов до ступен исключительно дополнительный сайт связывания (рисунок 1г).

Заключение. Как фосфат-, так и сульфат-ионы способны связываться с пептидом NY25, снижая эффективность тушения флюоресценции за счет конкуренции с анионным (йодид-ионами) и катионным тушителем (ионами марганца), соответственно.

Наиболее эффективным адьювантом для пептида NY25 должен быть гидроксифосфат-сульфат алюминия.

Предложенный нами метод тушения флюоресценции антигенных пептидов в фосфатном и трис•НСl буфере с использованием стандартных тушителей (KI и CsCl) и двух солей марганца (MnCl₂ и MnSO₄) может быть использован на этапе подбора адьювантов в процессе работы над созданием синтетических вакцин.

BINDING SITES FOR CATIONS AND ANIONS ON THE NY25 PEPTIDE: ADJUVANT SELECTION FOR A SYNTHETIC VACCINE

T.A. Khrustaleva, V.V. Khrustalev, E.V. Barkovsky

In this study we approved existence of phosphate and sulfate binding sites on the synthetic NY25 peptide with the help of fluorescence quenching methodology modified by us. Adjuvant containing both phosphate and sulfate anions (aluminum hydroxyphosphate sulfate) has been recommended for experiments on immunization by the NY25 peptide corresponding to the less mutable B-cellular epitope of H1N1 “swine-origin” Influenza virus.

Литература

1. Современные проблемы биохимии. Методы исследований: учеб. пособие / Е.В. Барковский [и др.]; под ред. А.А. Чиркина. — Минск: Выш. шк., 2013. — 491 с.
2. Crystal structure of the swine-origin A (H1N1)-2009 influenza A virus hemagglutinin (HA) reveals similar antigenicity to that of the 1918 pandemic virus / W. Zhang [et al.] // Protein Cell. — 2010. — Vol. 1. — P. 459–467.
3. Predicting nonspecific ion binding using DelPhi / M. Petukh [et al.] // Biophys. J. — 2012. — Vol. 102. — P. 2885–2893.
4. Hernandez, M. SITEHOUND-web: a server for ligand binding site identification in protein structures / M. Hernandez, D. Ghersi, R. Sanchez, // Nucl. Acids Res. — 2009. — Vol. 37. — P. 413–416.
5. Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 Influenza virus / J. Stevens [et al.] / Sci. — 2004. — Vol. 303. — 1866–1870.