



УДК 577.152.114*156'132.083.3

АНТИГЕННОЕ КАРТИРОВАНИЕ ЦИТОХРОМА P450 101 (P450cam)© 1998 г. **Е. Ф. Колесанова[#], С. А. Козин, А. И. Арчаков**

Институт биомедицинской химии, РАМН, 119832, Москва, ул. Погодинская, 10

Поступила в редакцию 17.03.98 г. Принята к печати 02.06.98 г.

Методом пептидного сканирования выявлено 18 линейных антигенных участков молекулы цитохрома P450 101 (P450cam) из *Pseudomonas putida*. Эти участки охватывают 30% последовательности белка. В цитохромах P450 из других источников не найдено участков, полностью совпадающих по последовательностям с антигенными участками P450cam. Линейные В-эпитопы P450cam расположены в основном на границах элементов вторичной структуры. 17 из 18 антигенных участков находятся на поверхности молекулы белка и доступны для молекул воды. Многие функционально важные участки или аминокислотные остатки молекулы P450cam совпадают или расположены рядом с выявленными линейными В-эпитопами.

Ключевые слова: цитохром P450; антигенные детерминанты; пептидное сканирование.

Цитохромы P450 (КФ 1.14.14.1) образуют надсемейство гемопротеинов, являющихся ключевыми ферментами метаболизма ксенобиотиков в живых системах [1, 2]. Благодаря своей важной биологической роли данное надсемейство является объектом широких исследований. Надсемейство включает в себя множественные формы цитохромов P450, в значительной степени различающихся по аминокислотному составу, субстратной специфичности, однако имеющие близкие спектральные характеристики и одинаковый механизм катализа. Многие свойства этих белков определяются структурой поверхности их молекул, причем результаты компьютерных предсказаний вторичной и третичной структуры цитохромов P450 указывают на сходство упаковки полипептидных цепей и, следовательно, поверхности их молекул [3–7]. Иммунохимические исследования с использованием моноклональных и поликлональных антител к цитохромам P450 представляют собой важный подход к изучению как индивидуальных, так и общих свойств этих ферментов, включая структурное родство и особенности каталитического действия [8–15], а также позволяют разрабатывать специфичные тесты для определения отдельных цитохромов P450 [8, 10, 12, 13]. Однако, несмотря на многочисленные иммунохимические исследования этих белков, о структуре их антигенных детерминант известно немного [8, 10, 13–15]. Антигенное картирование различных цитохромов P450 с помощью пептидного сканирования (ПЕПСКАН) [14–18], несомненно, является

важным инструментом изучения их структуры, включая гомологию последовательностей, пространственную структуру и расположение молекул фермента в клеточных органеллах.

Цитохром P450cam из *Pseudomonas putida* – один из четырех белков надсемейства P450, чья третичная структура определена методом рентгеноструктурного анализа [19–22]. Многие функционально важные аминокислотные остатки P450cam определены с помощью точечного мутагенеза [23]. В данной работе проведено антигенное картирование цитохрома P450cam методом пептидного сканирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антигенное картирование цитохрома P450cam осуществлено путем изучения связывания кроличьей антисыворотки к этому белку с панелью из 409 перекрывающихся гексапептидов, полностью охватывающих последовательность цитохрома P450cam. Синтез пептидов и изучение их антителосвязывающей активности проведены на полиэтиленовых иглах с привитыми остатками β-аланина [14–18].

Известно, что линейные пептидные В-эпитопы обычно состоят из 3–6 а. о. [24, 25]. Таким образом, использование для антигенного картирования цитохрома P450cam пептидов длиной в 6 а. о. с шагом в один остаток достаточно для определения всех возможных линейных В-эпитопов этих белков [18]. Количество синтезированных на иглах пептидов составило по данным аминокислотного анализа от 40 до 50 нмоль на одну иглу. После 30-кратного ИФА количество пептидов на иглах практически не изменилось.

Антисыворотки против цитохрома P450cam были получены от двух кроликов. Они имели

Сокращения: ПЕПСКАН – пептидное сканирование; CPD – база данных о цитохромах P450 (Cytochrome P450 DataBase); СУР, или P450 – цитохром P450; Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 246-33-75; факс: (095) 245-08-57; e-mail: ekol@medic.ibmh.msk.su).

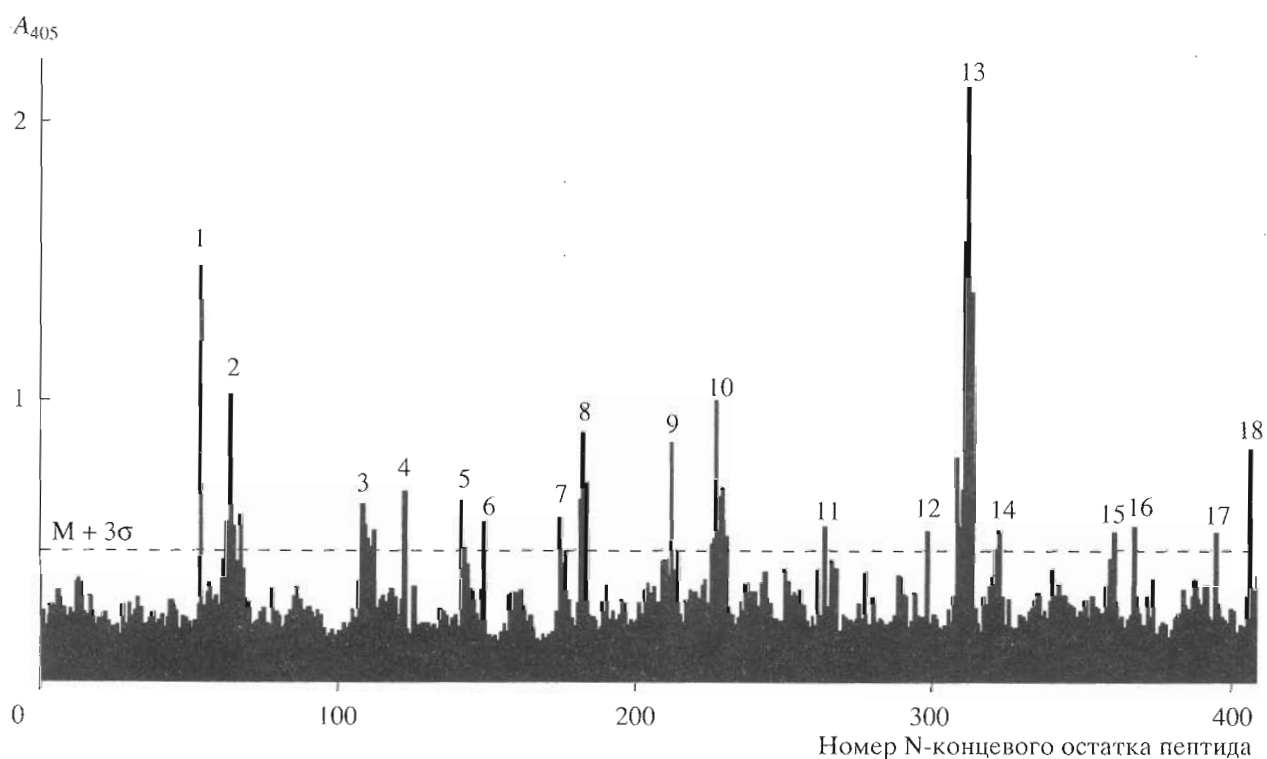


Рис.1. Взаимодействие гексапептидов из последовательности цитохрома P450cam с кроличьей антисывороткой к цитохрому P450cam при разведении 1 : 1000. Пунктиром показана линия отсечения статистически недостоверных величин связывания антител ($M + 3\sigma$ – см. эксперим. часть).

одинаковый титр по отношению к цитохрому P450cam, равный 1 : 4000, и были объединены в соотношении 1 : 1. Контрольные сыворотки, взятые от тех же животных до иммунизации, не реагировали в ИФА с P450cam вплоть до разведения 1 : 100; эти сыворотки от двух кроликов также объединили в соотношении 1 : 1.

Результаты ИФА связывания гексапептидными фрагментами цитохрома P450cam иммуноглобулинов из антисыворотки, разведенной 1 : 1000, приведены на рис. 1. Аналогичным образом были получены результаты для других разведений антисыворотки (данные не приведены). Показано, что при взаимодействии пептидов с контрольной сывороткой средняя величина A_{405} не превышала фоновой и составляла 0.075 – 0.100 OE_{405} . Гексапептиды, связывание которых с антителами превышало фоновые значения более чем на 3σ (см. эксперим. часть), считались обладающими антигенной активностью (таблица). При более низких разведениях антисыворотки (1 : 400 и 1 : 700) были выявлены те же самые антигенные гексапептиды, что и при разведении 1 : 1000 (данные не приведены).

Анализ расположения в аминокислотной последовательности белка приведенных в таблице антигенных пептидов позволяет сгруппировать их в 18 линейных антигенных участков протяжен-

ностью от 6 до 11 а. о. (см. таблицу). Видно, что при увеличении концентрации антисыворотки от разведения 1 : 4000 до разведения 1 : 1000 возрастает число обнаруживаемых антигенных гексапептидов, тогда как дальнейшее увеличение концентрации антисыворотки до разведения 1 : 400, как сказано выше, не приводит к выявлению новых антигенных пептидов. Таким образом, разведение антисыворотки 1 : 1000 является оптимальным для обнаружения всех возможных линейных антигенных участков цитохрома P450cam. Эти участки включают в себя 128 а. о., что составляет 31% последовательности P450cam.

Из таблицы видно, что линейные B-эпитопы цитохрома P450cam обладают неодинаковым иммуногенным потенциалом. Иммунодоминантным является участок 311–318 (QLKKGQI), поскольку к нему образуются антитела наиболее высокой avidности, а участки VI (149–154 NFTEDY) и XIV (322–327 QMLSGL) являются значительно менее иммуногенными.

В последовательностях цитохромов P450 из других источников не найдено участков, полностью идентичных выявленным антигенным гексапептидам P450cam. Это неудивительно, поскольку между P450cam и другими членами надсемейства P450 (в том числе и бактериальными P450) существует весьма слабая гомология после-

Антигенные гексапептиды и антигенные участки цитохрома P450cam

Номер гексапептида	Антигенный участок	Расположение	Структура	Разведение антисыворотки*		
				1 : 1000	1 : 2000	1 : 4000
1	I	54–59	VWTRCN	+++	++	++
2	II	63–68	WIATRG	+	+	+
3	II	64–69	IATRGQ	++	+	++
4	II	65–70	ATRGQL	+	+	+
5	II	67–72	RGQLIR	+	+	+
6	III	108–113	QRQFRA	+	+	+
7	III	109–114	RQFRAL	+	+	–
8	III	110–115	QFRALA	+	+	–
9	III	111–116	FRALAN	+	+	–
10	III	112–117	RALANQ	+	+	+
11	IV	122–127	PVVDKL	+	+	–
12	V	141–146	SLRPQG	+	++	+
13	VI	149–154	NFTEDY	+	–	–
14	VII	174–179	IPHLKY	+	+	+
15	VIII	181–186	TDQMTR	+	–	–
16	VIII	182–187	DQMTRP	++	+	–
17	VIII	183–188	QMTRPD	+	–	–
18	IX	212–217	RQKPGT	+	+	+
19	X	225–230	NGQVNG	+	–	–
20	X	226–231	GQVNGR	+	+	+
21	X	227–232	QVNGRP	++	+++	++
22	X	228–233	VNGRPI	+	++	+
23	X	229–234	NGRPIT	+	++	+
24	X	230–235	GRPITS	+	++	+
25	XI	263–268	FLAKSP	+	+	+
26	XII	298–303	GRILTS	+	+	+
27	XIII	308–313	HGVQLK	+	+	+
28	XIII	309–314	GVQLKK	+	+	+
29	XIII	310–315	VQLKKG	+	+	+
30	XIII	311–316	QLKKGD	+++	+++	+++
31	XIII	312–317	LKKGDDQ	+++	+++	+++
32	XIII	313–318	KKGDQI	+++	+	++
33	XIV	322–327	QMLSGL	+	–	–
34	XV	360–365	QHLARR	+	+	+
35	XVI	367–372	IIVTLK	+	+	+
36	XVII	395–400	IVSGVQ	+	+	+
37	XVIII	407–412	DPATTK	++	+	++

* “–” $A_{405} < (M + 3\sigma)$, “+” $(M + 3\sigma) < A_{405} < 2(M + 3\sigma)$, “++” $2(M + 3\sigma) < A_{405} < 3(M + 3\sigma)$, “+++” $A_{405} > 3(M + 3\sigma)$ (расчет M и σ в эксперимент. части).

довательностей: при парном выравнивании идентичность составляет не более 25% [26]. Однако три пентапептидных фрагмента антигенных участков P450cam найдены в составе последователь-

ностей других цитохромов P450: 299–303 RILTS – в микросомальном P450 2C20 обезьяны, 312–316 LKKGDD – в другом бактериальном P450 106A1 из *Bacillus megaterium* и 313–317 KKGDDQ – в цитохро-

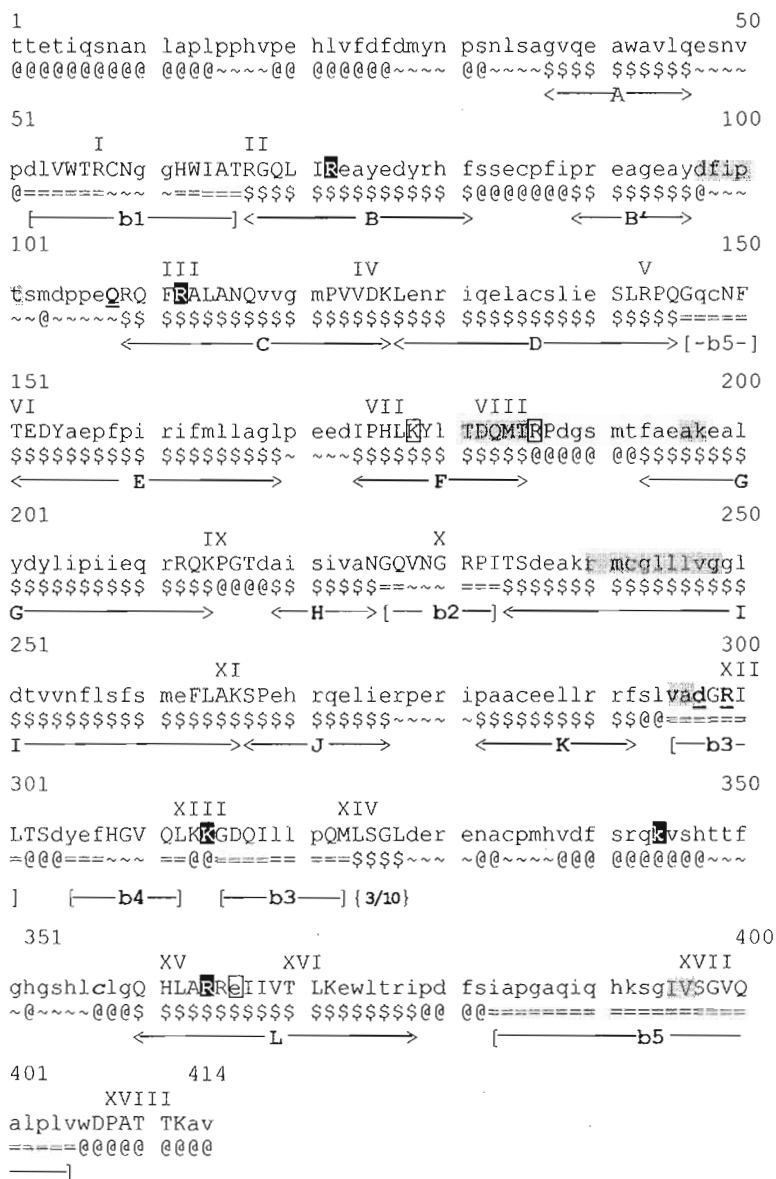


Рис. 2. Расположение линейных антигенных участков относительно элементов вторичной структуры и функционально важных областей в молекуле цитохрома P450cam. Аминокислотные остатки, входящие в состав антигенных участков, обозначены заглавными буквами; номера антигенных участков указаны римскими цифрами. Остатки в составе α -спирали отмечены \$, в составе 3/10-спирали - 3/10, в составе β -структуры - =, поворотов - ~, клубков и петель - @. α -Спираль и β -складчатые слои в молекуле P450cam обозначены буквами и цифрами в соответствии с работой [19]. Выделены функционально важные группы: аксиальный лиганд гема Cys357 - жирным курсивом, остатки, взаимодействующие с пропионатными группами гема - жирным шрифтом с подчеркиванием, остатки, участвующие в транслокации протона - прямоугольной рамкой, остатки, ответственные за взаимодействие с путидаредоксином - белыми буквами на черном фоне, субстратсвязывающие участки - черными буквами на сером фоне.

ме P450 из дрожжей *Candida maltosa*. Наличие этих общих фрагментов указывает на возможное существование перекрестной иммунореактивности между этими белками. Существование подобной перекрестной иммунореактивности между эволюционно удаленными цитохромами P450 было показано на примере P450 из *Euglena gracilis*, который взаимодействовал с антителами, полу-

ченными против микросомальных цитохромов P450 крысы [27].

На рис. 2 показано расположение линейных антигенных детерминант P450cam относительно элементов вторичной структуры этого белка. Видно, что многие линейные B-эпитопы расположены в местах перехода от одного элемента вторичной структуры к другому (участки I-VI, VIII-XIV). Ряд найденных B-эпитопов совпадает с поворота-

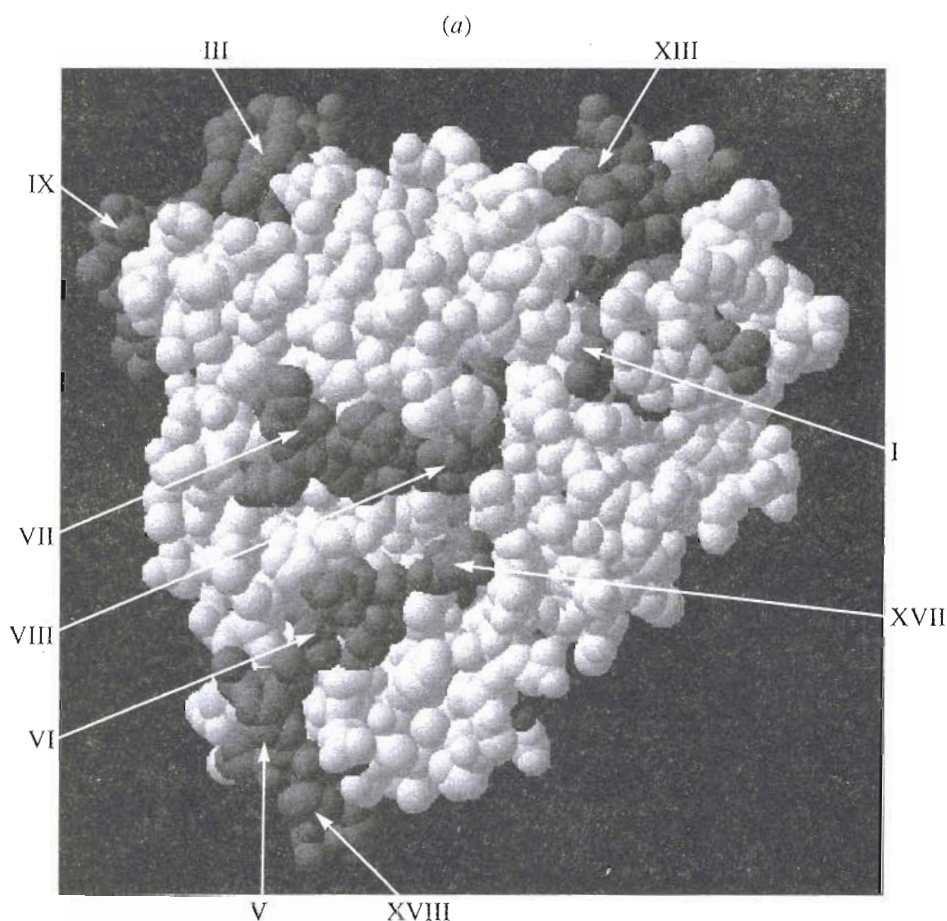


Рис. 3а. Расположение линейных антигенных участков цитохрома P450cam относительно поверхности молекулы. Темно-серым цветом отмечены атомы, входящие в состав В-эпитопов, светло-серым – атомы вне В-эпитопов. Стрелками с римскими цифрами указаны местоположение и номер антигенного участка. Показаны вид спереди (а), сзади (б), сверху (в) и снизу (г).

ми, поверхностными петлями (участки I, VIII, X и XIII) и участками с неупорядоченной структурой (участки IX, XVIII). Аналогичные данные были получены при анализе расположения определенных с помощью ПЕПСКАН линейных В-эпитопов другого белка с известной пространственной структурой – дигидрофолатредуктазы [28]. Мы предполагаем, что расположение на границах перехода одного элемента вторичной структуры в другой является общим свойством линейных антигенных детерминант.

Визуализация линейных антигенных детерминант цитохрома P450cam на модели третичной структуры этого белка с помощью программы ONIX [29] показывает (рис. 3, а–г), что почти все найденные В-эпитопы расположены на поверхности молекулы белка и полностью или частично доступны для молекул воды. Антигенные участки IV, V и IX практически полностью доступны для воды; содержание доступных для воды аминокислотных остатков в 11 участках $\geq 50\%$; участки II, XVI и XVII содержат от 30 до 49% доступных для

воды остатков. Только одна антигенная детерминанта XIV (322–327 QMLSGI) расположена в глубине молекулы P450cam и недоступна для молекул воды. Аналогичные результаты получены при анализе расположения линейных В-эпитопов дигидрофолатредуктазы и миогемэритрина относительно поверхности молекул этих белков: большинство В-эпитопов находятся на поверхности молекул [17, 28], и только один из них (в случае дигидрофолатредуктазы) расположен внутри белковой глобулы. Участки, недоступные для молекул воды, все же обладают небольшой гидрофильностью и могут оказаться на поверхности в результате изменения конформации белка или его частичного протеолиза. Вероятно, недоступность для молекул воды является причиной низкой иммуногенности антигенного участка XIV цитохрома P450cam, так как этот участок становится доступным для молекул воды и иммуноглобулинов только после частичного разворачивания молекулы белка.

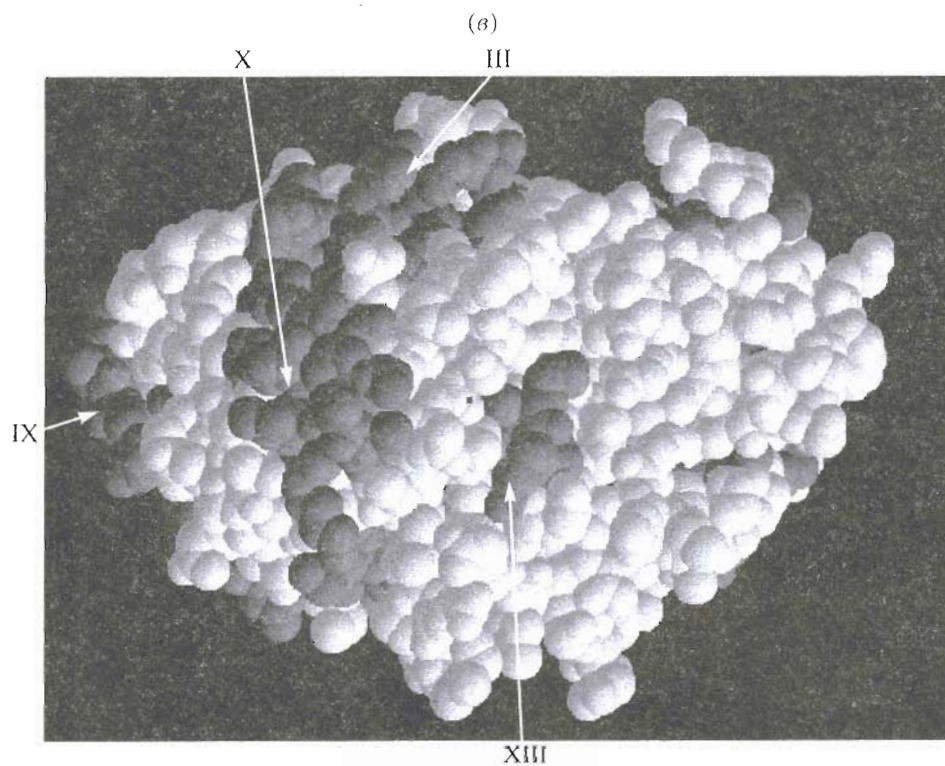
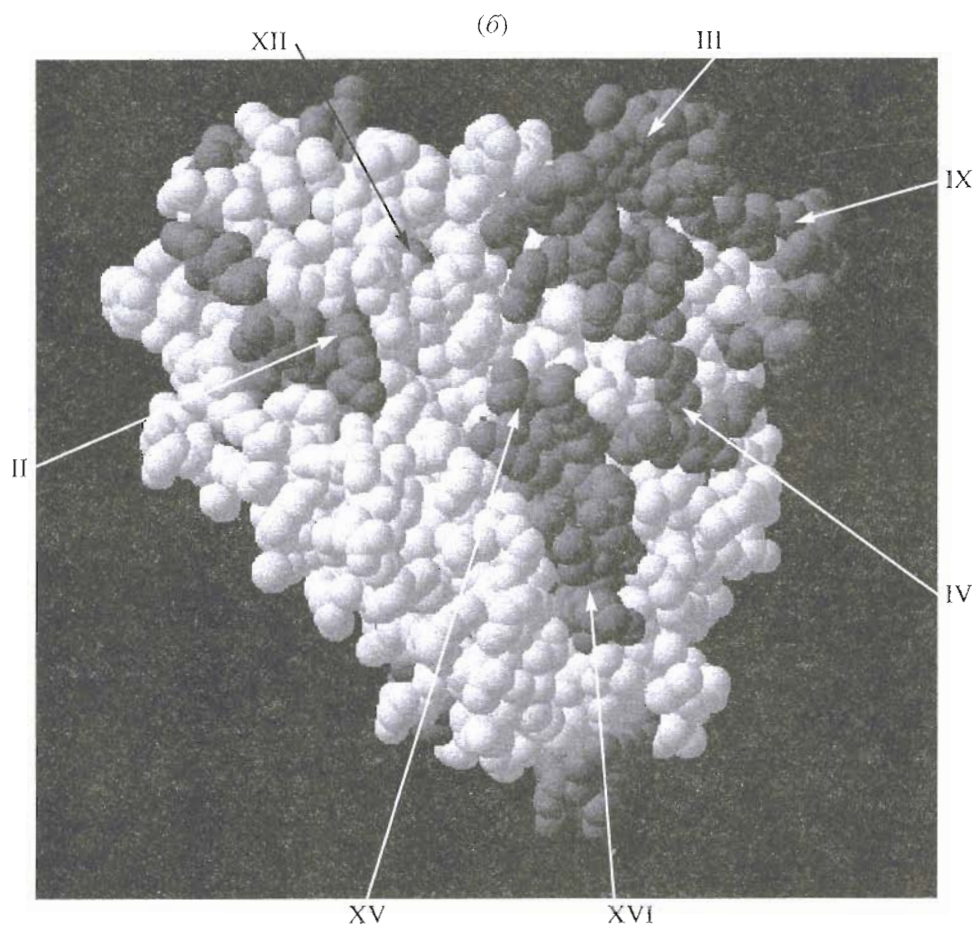


Рис. 3б, в (продолжение).

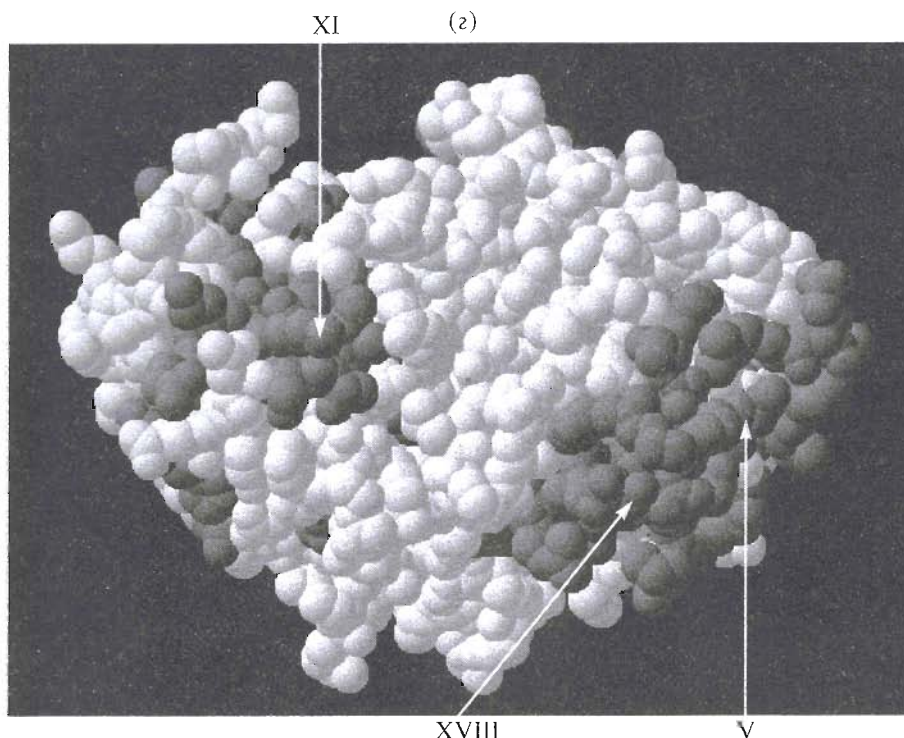


Рис. 3г (окончание).

Из рис. 3 также видно, что некоторые найденные линейные В-эпитопы цитохрома P450cam образуют кластеры на поверхности молекулы, причем в состав этих кластеров входят линейные антигенные участки, далеко отстоящие друг от друга в аминокислотной последовательности. Такие кластеры образованы антигенными участками III и X, IV, XV и XVI, V и XVIII, VI и XVII. Кластеры представляют собой иммуногенные области поверхности молекулы белка, а входящие в их состав линейные антигенные участки могут оказаться фрагментами конформационных эпитопов.

Из рис. 2 видно, что ряд функционально важных остатков входит в состав антигенных участков или располагается вблизи них, и в первую очередь это относится к аминокислотным остаткам, ответственным за взаимодействие с путидаредоксином (Arg^{72} , Arg^{112} , Lys^{314} и Arg^{364} [23]), которые находятся на поверхности молекулы. К числу функционально важных остатков, совпадающих с линейными В-эпитопами P450cam, относятся также остатки, участвующие в транслокации протона и в связывании пропионатных групп гема. Неудивительно, что большинство известных субстратсвязывающих участков P450cam не совпадает с антигенными детерминантами, поскольку первые располагаются главным образом внутри белковой глобулы. Исключением является участок 181–186 (TDQMTR), расположен-

ный над входом в активный центр фермента, и фрагмент $\text{He}^{395}\text{-Val}^{396}$.

Таким образом, использование метода ПЕПСКАН позволило выявить линейные антигенные детерминанты цитохрома P450cam. В других цитохромах P450 не обнаружено последовательностей, полностью идентичных В-эпитомам P450cam, однако наличие участков со сходными последовательностями может явиться причиной перекрестных иммунохимических реакций. Показано, что линейные антигенные детерминанты располагаются главным образом на границах между различными элементами вторичной структуры, а также находятся на поверхности молекулы белка и содержат в основном доступные для молекул воды аминокислотные остатки. Этот результат позволит использовать данные антигенного картирования других цитохромов P450, в частности митохондриальных, для компьютерного моделирования их пространственных структур. Совпадение антигенных детерминант с некоторыми функционально важными регионами создаст основу для дальнейшего исследования последних с помощью моноспецифических антипептидных антител.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез пептидов. Синтезировано 409 перекрывающихся гексапептидов с шагом в один ами-

нокислотный остаток, полностью охватывающих последовательность цитохрома P450cam. Гексапептиды, прочно связанные с полиэтиленовыми иглами с пришитой β -аланиновой «ножкой» (Cambridge Research Biochemicals, Англия), синтезировали методом активированных эфиров исходя из пентафторфениловых эфиров N^α-Fmoc-L-аминокислот (Cambridge Research Biochemicals, Англия) в присутствии 1-гидроксibenзотриазола (Merck, ФРГ), как описано ранее [14, 15, 18]. По окончании синтеза N-концевые α -аминогруппы пептидов ацетилировали уксусным ангидридом, затем снимали защиту с боковых функциональных групп аминокислотных остатков [14, 15, 18]. Регламент синтеза составляли с помощью программного продукта PEPCAN фирмы Cambridge Research Biochemicals (Англия). Синтез проводили вручную в 96-луночных полипропиленовых планшетах (Costar, США). Пептиды 56–61 (TRCNGG), 88–93 (IPREAG), 141–146 (SLRPQG), 187–192 (PDGSMT), 305–310 (YEFHGV), 376–381 (RIPDFS) были синтезированы в двух экземплярах, один из которых подвергали кислотному гидролизу с последующим аминокислотным анализом для проверки правильности синтеза и определения количества пептида на игле. Три первых пептида из указанных выше подвергали аминокислотному анализу до начала ИФА, а три последних – после 30 циклов ИФА.

Получение антисывороток. Высокоочищенный препарат цитохрома P450cam [31] был любезно предоставлен д-ром Г. Уи Бон Хоа из Института физико-химической биологии (Париж, Франция). Кроличью антисыворотку к P450cam получали, иммунизируя двух кроликов породы «шиншилла» весом 1,5–2 кг четыре раза с интервалом в две недели. Первую и третью иммунизации проводили подкожно препаратом белка (200 мкг в 0,5 мл 0,9% раствора NaCl), смешанным с равным объемом полного адьюванта Фрейнда (Calbiochem, Швейцария); вторую и четвертую иммунизации – внутримышечно в оба бедра тем же количеством белка в 1 мл 0,9% раствора NaCl. Кровь отбирали из ушной вены через неделю после последней иммунизации. Контрольную сыворотку получали из крови тех же кроликов, отобранной за неделю до первой иммунизации.

ИФА связанных с иглами пептидов. ИФА с использованием антисывороток против цитохрома P450cam проводили по ранее описанной методике [14–18]. Антисыворотки разводили в 400, 700, 1000, 2000 и 4000 раз фосфатно-солевым буфером (145 mM NaCl, 5 mM Na₂P, pH 7.2), содержащим 0,1% Твина 20 и 2% бычьего сывороточного альбумина. В качестве контроля использовали сыворотку тех же животных, полученную до иммунизации, в таких же разведениях, что и антисыворотку. В качестве вторичных антител использовали меченные пероксидазой антитела к им-

муноглобулинам кролика («Диа-М», Москва; рабочее разведение 1:1000). Сразу после окончания синтеза и в дальнейшем перед каждым циклом ИФА пептиды отмывали обработкой ультразвуком (ультразвуковая баня «Finnsonic», Финляндия) в 0,1 M NaP буфере, pH 7.2, содержащем 1% додецилсульфата натрия и 0,1% 2-меркаптоэтанола, при температуре 60°C, далее дважды водой той же температуры и затем кипящим метанолом [14, 15, 18].

Статистическая обработка результатов ИФА связанных с иглами пептидов. Результаты ИФА обрабатывали и представляли в виде графиков с помощью программы «SigmaPlot» (Jandel Scientific, США). Величину A_{405} , соответствующую линии отсека значимых величин от фоновых, определяли следующим образом: из всей совокупности значений A_{405} отбирали 90% наименьших, рассчитывали среднее значение A_{405} (M) этой выборки и величину среднеквадратичного отклонения σ [18]. За высоту линии отсека принимали значение A_{405} , равное $M + 3\sigma$ [18]. Расчет проводили для каждого эксперимента в отдельности.

Поиск последовательностей, соответствующих линейным В-эпитопам P450cam в аминокислотных последовательностях других цитохромов P450 проводили с помощью базы данных цитохромов P450 (Cytochrome P450 Database; CPD) [26], используя функцию поиска пептидных мотивов. База данных CPD, созданная в Институте биомедицинской химии РАН, содержит свыше 500 аминокислотных последовательностей белков этого надсемейства, сведения об их источниках, свойствах, а также возможности для обработки имеющейся информации; она постоянно пополняется.

Локализация антигенных детерминант на модели третичной структуры молекулы и определение доступности для молекул воды аминокислотных остатков цитохрома P450cam проводили на IBM-PC AT-486 с помощью программы ONIX, разработанной в Институте биомедицинской химии РАН [29]. Доступность для молекул воды определяли как вероятность физического контакта между сферой с радиусом, равным радиусу Ван-дер-Ваальса для данного атома (в составе молекулы), и катящейся по поверхности молекулы сферой с радиусом 0,14 нм (радиус молекулы воды) [17]. Поверхность сферы, соответствующей каждому атому, разбивали на 642 равных сегмента и подсчитывали число сегментов, контактирующих со сферой с радиусом молекулы воды. Атом или группа атомов считались доступными для молекулы воды, если не менее 10% их поверхности контактировали со сферой радиусом 0,14 нм. Координаты атомов цитохрома P450cam и сведения об элементах вторичной структуры этого белка получены из Брукгейвенского банка данных третичных структур белков [32].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы приносят глубокую благодарность д-ру Г. Уи Бон Хоа (Институт физико-химической биологии, Париж, Франция) за предоставленный препарат цитохрома P450cam и заведующему лабораторией молекулярно-графического конструирования лекарств ИБМХ РАМН д.б.н. Иванову А.С. за предоставление программы ONIX. Работа выполнена при поддержке грантов Международного научного фонда (МК000), Российского фонда фундаментальных исследований (№ 93-04-6227) и Министерства науки и технологий РФ (№ 04.03.02).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Black S.D., Coon M.J. // *Adv. Enzymol.* V. 60. P. 35–81.
2. Archakov A.I., Bachmanova G.I. // *Cytochrome P450 and Active Oxygen.* London, New York, Philadelphia: Taylor & Francis, 1990.
3. Gotoh O. // *Cytochrome P450: Biochemistry and Biophysics* / Eds A.I. Archakov, G.I. Bachmanova. Moscow: INCO-TNC, 1992. P. 686–691.
4. Degtyarenko K.N., Archakov A.I. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1993. V. 31. P. 1071–1080.
5. Tretiakov V.E., Degtyarenko K.N., Uvarov V.Yu., Archakov A.I. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1989. V. 275. P. 429–439.
6. Poulos T.L. // *Methods Enzymol.* 1991. V. 206. P. 11–30.
7. Graham-Lorens S.E., Peterson J.A. // *Methods Enzymol.* 1996. V. 272. P. 315–326.
8. Thomas P.E., Reidy J., Reik L.M., Ryan D.E., Koop D.R., Levin W. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1984. V. 235. P. 239–253.
9. De Lemos-Chiarandini C., Frey A.B., Sabatini D.D., Kreibich G. // *J. Cell Biol.* 1987. V. 104. P. 209–219.
10. Edwards R.J., Murray B.P., Boobis A.R. // *Methods Enzymol.* 1991. V. 206. P. 220–233.
11. Kronbach T., Johnson E.F. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 6215–6220.
12. Edwards R.J., Murray B.P., Murray S., Singleton A.M., Davies D.S., Boobis A.R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1161. P. 38–46.
13. Edwards R.J., Murray B.P., Singleton A.M., Davies D.S., Boobis A.R. // *Biochem. Pharmacol.* 1993. V. 46. P. 213–220.
14. Kolesanova E.F., Kozin S.A., Lemeshko A.O., Archakov A.I. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1994. V. 32. P. 465–473.
15. Аммосова Т.Н., Упоров И.В., Рубцова М.Ю., Игнатенко О.В., Егоров А.М., Колесанова Е.Ф., Арчаков А.И. // *Биохимия.* 1997. Т. 62. Вып. 4. С. 516–524.
16. Geysen H.M., Meloen R.H., Barteling S.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. P. 3998–4002.
17. Geysen H.M., Tainer J.A., Rodda S.J., Mason T.J., Alexander H., Getzoff E.D., Lerner R.A. // *Science.* 1987. V. 235. P. 1184–1190.
18. Worthington J., Morgan K. // *Peptide Antigens. A Practical Approach* / Ed. G.B. Wisdom. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1994. P. 181–217.
19. Poulos T.L., Finzel B.C., Howard A.J. // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 195. P. 687–700.
20. Ravichandran K.G., Boddupalli S.S., Hasemann C.A., Peterson J.A., Deisenhofer J. // *Science.* 1993. V. 261. P. 731–736.
21. Hasemann C.A., Ravichandran K.G., Peterson J.A., Deisenhofer J. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 236. P. 1169–1185.
22. Cupp-Vickery J.-R., Poulos T.L. // *Nature Struct. Biol.* 1995. V. 2. P. 144–153.
23. Sligar S.G., Filipovic D., Stayton P.S. // *Methods Enzymol.* 1991. V. 206. P. 31–50.
24. Novotny J., Brucoleri R.E., Saul F.A. // *Biochemistry.* 1989. V. 28. P. 4735–4742.
25. Padlan E.A., Silvertown E.W., Sheriff S., Cohen G.H., Smith-Gill S.J., Davies D.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 5938–5942.
26. Archakov A.I., Bachmanova G.I. // *Cytochrome P450 and Active Oxygen.* London, New York, Philadelphia: Taylor & Francis, 1990. Suppl.
27. Briand J., Julistiono H., Beaune P., Flinois J.P., Dewaziers I., Leroux J.P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1203. P. 199–204.
28. Tan X., Ratnam M., Huang S., Smith P.L., Freisheim J.H. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 8022–8026.
29. Ivanov A.S., Rumjantsev A.B., Skvortsov V.S., Archakov A.I. // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1996. V. 36. P. 660–663.
30. Laughton C.A., Neidle S., Zvelebil M.J.J.M., Sternberg M.J.E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990. V. 171. P. 1160–1167.
31. Jung C., Hui Bon Hoa G., Schroeder K.-L., Simon M. & Doucet J.P. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 12855–12862.
32. Abola E.E., Berstein F.C., Bryant S.H., Koetzle T.F., Weng J. // *Data commission of the International Union of Crystallography* /Eds F.H. Allen, G. Bergerhoff, R. Sievers. Bonn, Cambridge, Chester, 1987. P. 107–132.

Antigenic Mapping of Cytochrome P450 101 (P450cam)

E. F. Kolesanova[#], S. A. Kozin, and A. I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul. 10, Moscow, 119832 Russia

Eighteen linear antigenic sites were found in cytochrome P450 101 (P450cam) from *Pseudomonas putida* by the peptide scanning method. These sites accounted for about 30% of the protein sequence. We found no sequences that completely coincided with the antigenic sites of P450cam in cytochromes P450 from other sources. The linear B-epitopes of P540cam were mainly localized on the boundaries separating the elements of the secondary structure. Seventeen of eighteen antigenic sites were found to be on the protein surface and accessible to water molecules. Many functionally important sites or amino acid residues of the P450cam molecule coincided or were in close proximity to the linear B-epitopes found.

Key words: cytochrome P450, antigenic determinants, peptide scanning

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 246-3375; fax: +7 (095) 245-0857; e-mail: ekol@ibmh.msk.su.