



УДК 577.332.083.3

КАРТИРОВАНИЕ ЭПИТОПОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К Ca^{2+} -АТФ-АЗЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ЧЕЛОВЕКА

© 1999 г. Н. Б. Пестов, Т. В. Корнеев, М. Б. Костина, М. И. Шапаронов[#]*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 21.12.98 г. Принята к печати 04.03.99 г.

Перекрывающиеся фрагменты четвертой изоформы Ca^{2+} -АТФ-азы плазматических мембран человека (hPMCA4) и несколько фрагментов первой изоформы (hPMCA1) продуцированы в бактериальных клетках и очищены при помощи металлоаффинной хроматографии. Иммуноферментный анализ полученных фрагментов позволил картировать эпитопы четырех моноклональных антител (2D8, 8B8, 7C8 и 5E6). Эпитоп 2D8 локализован в районе 222–249 (в предполагаемом домене трансдукции), эпитопы 8B8 и 7C8 – в районе 330–353 (в сайте связывания кислых фосфолипидов), эпитоп 5E6 – в районе 791–843 (в предполагаемом шарнирном регионе). 2D8 распознает PMCA1 и PMCA4, в то время как 8B8 и 7C8 специфичны к hPMCA4. Проведено сравнение аминокислотных последовательностей идентифицированных эпитопов и фаговых мимотопов, полученных для исследуемых МА.

Ключевые слова: моноклональные антитела; картирование эпитопов; фаговый дисплей; мембрана; продукция белка; Ca^{2+} -АТФ-аза.

Ca^{2+} -АТФ-аза плазматических мембран (PMCA) – интегральный мембранный белок, транспортирующий ионы кальция из клетки [1–5]. Фермент принадлежит к семейству АТФ-аз Р-типа, состоит из одной полипептидной цепи (*M* 139 кДа), активируется кальмодулином, кислыми фосфолипидами и ограниченным протеолизом. На сегодняшний день известны по крайней мере четыре изоформы PMCA (PMCA1, PMCA2, PMCA3, PMCA4), кодируемые разными генами, причем это разнообразие увеличивается за счет альтернативного сплайсинга. PMCA1 присутствует во всех тканях, в то время как остальные изоформы характерны для определенных органов, преимущественно мозга. Основной объект биохимических исследований, PMCA эритроцитов человека, представлен изоформами 4 и 1.

Существенный прогресс в исследованиях структуры и функции PMCA достигнут благодаря использованию антител. С помощью МА экспериментально подтверждены основные черты теоретической модели трансмембранной организации молекулы PMCA [6–10]. Поли- и моноклональные

антитела успешно использованы для детекции изоформ PMCA в различных тканях [11–13].

Точная локализация эпитопов МА – ключевой момент как в изучении мембранной топологии, так и в экспериментах по иммунохимической детекции различных изоформ. Однако эпитопы большинства описанных ранее МА к PMCA картированы с точностью не более 58 а.о., для чего использовали фрагменты PMCA, синтезированные в клетках млекопитающих [8]. Только для нескольких МА эпитопы были прецизионно (в пределах от 13 до 24 а.о.) картированы с использованием ИФА протеолитических фрагментов и конкурентного анализа синтетических пептидов [9, 13].

В нашей предыдущей работе [14] описан скрининг фаговых библиотек случайных пептидов против нескольких МА к hPMCA и идентифицирован набор пептидов, специфически связывающих эти МА. Однако однозначное выравнивание аминокислотных последовательностей этих пептидов и каких-либо участков PMCA оказалось в то время невозможным.

В настоящей работе мы сообщаем об успешном картировании эпитопов исследуемых МА с использованием фрагментов hPMCA, продуцированных в бактериях. Проведено сравнение результатов такого подхода и фагового дисплея, а также определены изоформно- и видоспецифичности исследуемых МА.

Набор фрагментов hPMCA, почти полностью перекрывающих аминокислотную последовательность hPMCA4, и несколько фрагментов hPMCA1

Сокращения: DTS – клонирование по ди-тринуклеотидным липким концам; PMCA – Ca^{2+} -АТФ-аза плазматических мембран; hPMCA – Ca^{2+} -АТФ-аза плазматических мембран человека; БСА – бычий сывороточный альбумин; МА и пкАТ – моноклональные и поликлональные антитела; ТСБТ – Трис-солевой буфер + Твин-20 (10 г/л) pH 7.4; ФСБ – фосфатно-солевой буфер pH 7.4.

[#] Автор для переписки (факс: (095) 330-64-56; e-mail: shakh@ibch.siobc.ras.ru).

Таблица 1. Исходные плазмиды, плазмидные вектора для экспрессии и эндонуклеазы рестрикции, использованные для создания необходимых фрагментов hPMCA

Название клона	Координаты, а. о.	Изоформа РМСА	Приготовление вставки для клонирования**	Приготовление вектора для клонирования
pA2*	1–93	4b	ПЦР (4F1–4B93; pVL1393-4a), DTS	pQ30; <i>Bam</i> HI/DTS
pN95	15–267	4b	p5.4c; <i>Bsp</i> RI	pQE31; <i>Sma</i> I
pN33401	15–267	4b	pN95; <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	pQE40; <i>Bgl</i> II/ <i>Hind</i> III
pGJ17	166–682	4b	ПЦР (4F166–4B682; pVL1393-4a), DTS	pQ30; <i>Bam</i> HI/DTS
pG23*	166–371	4b	ПЦР (4F166–4B371; pVL1393-4a), DTS	pQ30; <i>Bam</i> HI/DTS
pN232*	166–480	4b	pGJ17; <i>Hind</i> III	религирование
pN261*	166–238	4b	pG23, <i>Eco</i> ICRI	религирование
pN349*	222–267	4b	pN95, <i>Pst</i> I	pQE30; <i>Pst</i> I
pDU7*	222–249	4b	ПЦР (S1–UJ2; pN349), <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	pQE40; <i>Bgl</i> II/ <i>Hind</i> III
pN279*	237–371	4b	pG23, <i>Eco</i> ICRI/ <i>Hind</i> III	pQE31; <i>Eco</i> ICRI/ <i>Hind</i> III
pN307*	321–371	4b	ПЦР (S1–S4; pG23), <i>Bsp</i> RI/ <i>Hind</i> III	pQE31; <i>Sma</i> I/ <i>Hind</i> III
pBM1*	321–371, V342A	4b	ПЦР (BVAF1–BVAB1, pN307)	религирование
pN30P1*	321–353	4b	pN307, <i>Pst</i> I	религирование
pJK13*	330–480	4b	ПЦР (4F330B–4B682; pVL) <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	pQE30; <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III
pN191*	330–480	4b	pJK13; <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	pQE40; <i>Bgl</i> II/ <i>Hind</i> III
pN2510*	406–682	4b	pGJ17; <i>Sca</i> I/ <i>Pst</i> I	pQE31; <i>Sma</i> I/ <i>Pst</i> I
pV5*	670–843	4b	ПЦР (4F670–4B843), DTS	pQ30; <i>Bam</i> HI/DTS
pN1519	745–924	4b	p12.1; <i>Bgl</i> II/ <i>Zsp</i> 2I	pQE42; <i>Bgl</i> II/ <i>Pst</i> I
pN32A*	791–843	4b	ПЦР (S1–S4; pV5), <i>Bsp</i> RI/ <i>Pst</i> I/ <i>Eco</i> RI	pQE42; <i>Sma</i> I/ <i>Pst</i> I
pN171*	844–1205	4b	pN78; <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	pQE41; <i>Bgl</i> II/ <i>Hind</i> III
pO*	1057–1205	4b	ПЦР, DTS	pQ30; <i>Bam</i> HI/DTS
pAA13*	1–98	1b	ПЦР (1F1–1B98; pR), DTS	pQ30; <i>Bam</i> HI/DTS
pGG6*	170–381	1b	ПЦР (1FBGL–1BHIN; pMM2-16), <i>Bgl</i> II/ <i>Hind</i> III	pQE30; <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III
pSAD1*	170–281	1b	ПЦР (1FBGL–1BHIN; pMM2-16), <i>Bgl</i> II	pQE30; <i>Bam</i> HI
pPG2*	280–381	1b	ПЦР (1FBGL–1BHIN; pMM2-16), <i>Bgl</i> II/ <i>Hind</i> III	pQE30; <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III
pD22	928–1220	1b	ПЦР (1F928–1B1027, pMM2-16), DTS	pQ30; <i>Bam</i> HI/DTS
pN2815*	965–1220	1b	pD22, <i>Sph</i> I	pQE41; <i>Sph</i> I
pE1*	1069–1220	1b	ПЦР, DTS	pQ30; <i>Bam</i> HI/DTS

* Продукты экспрессии конструкций, использованных в ИФА.

** В скобках указаны использованные праймеры и матрицы.

были клонированы в векторы для бактериальной экспрессии с *N*-концевой гексагистидиновой последовательностью (табл. 1). Некоторые фрагменты были сконструированы с использованием уже существующих сайтов рестрикции, совместимыми с сайтами вектора. Фрагменты с четко определенными координатами, представляющие тот или иной цитоплазматический домен, были созданы при помощи клонирования продуктов ПЦР. Некоторые конструкции, содержащие клонированные фрагменты hPMCA, были модифицированы далее при помощи расщепления и религирования или субклонирования меньших фрагментов. Конструкции pO и pE1 описаны ранее [14].

Продукция фрагментов, представляющих собой гидрофильные участки РМСА, проходила с высоким уровнем в клетках *E. coli*, что позволило произвести их эффективную очистку с помощью металлоаффинной хроматографии в денатурирующих условиях (рис. 1). Напротив, индукция экспрессии фрагментов, содержащих трансмембранные участки, приводила к остановке роста клеток, зачастую с их частичным лизисом и низкой продукцией белка, который невозможно было обнаружить при помощи гель-электрофореза клеточных лизатов. Выход и чистота таких фрагментов обычно оказывались неудовлетворительными. Эти проблемы были частично решены при помо-

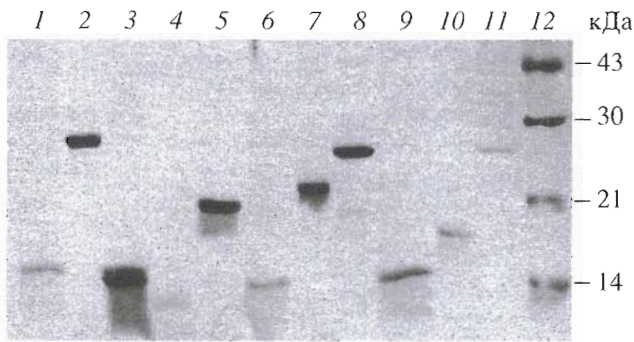


Рис. 1. Электрофореграмма в 15% ПААГ очищенных фрагментов hPMCA (1–8 – hPMCA4, 9–11 – hPMCA1). 1 – продукт конструкции pA2, 2 – pG23, 3 – pN261, 4 – pN349, 5 – pN279, 6 – pN307, 7 – pV5, 8 – pO, 9 – pAA13, 10 – pSAD1, 11 – pE1, 12 – стандарты молекулярной массы. Количество нанесенного белка соответствует выделенному из 50 мкл исходной культуры клеток.

щи присоединения фрагментов к С-концу дегидрофолатредуктазы и введения детергентов во время очистки. Экспрессия конструкции pN33401 все же не дала удовлетворительных результатов.

Результаты экспериментов ИФА по связыванию МА с различными фрагментами РМСА показаны на рис. 2. В качестве положительного контроля использовали поликлональные кури-

ные антитела к hPMCA эритроцитов и биотинилированный кальмодулин, который реагирует с С-концевым доменом фермента.

Эпитоп антитела 2D8 находится в районе 222–249 (в данной работе используются координаты hPMCA4b) [14]. Дальнейшая фрагментация (конструкции pN261 и pN279, содержащие участки 222–238 и 237–249, соответственно, табл. 1) приводит к потере взаимодействия с МА 2D8. Особенностью этого эпитопа с функциональной точки зрения является его расположение в гипотетическом домене трансдукции [15], ответственном за сопряжение гидролиза АТФ и переноса ионов кальция. Моделирование вторичной структуры говорит о том, что данный регион представляет собой пучок β -листоков [16]. МА 2D8 реагирует с фрагментами hPMCA1 и hPMCA4, а также и с РМСА, выделенной из эритроцитов кролика. Учитывая высокую консервативность этого участка, можно достаточно обоснованно предполагать, что МА 2D8 способно распознавать все изоформы РМСА различных видов животных.

Эпитоп МА 5Е6 находится в пределах 791–843 аминокислотной последовательности hPMCA. Это консервативный участок; 5Е6 реагирует и с РМСА эритроцитов кролика. Для картирования эпитопа МА 5Е6 применен также фаговый дисплей. В результате идентифицированы два пента-

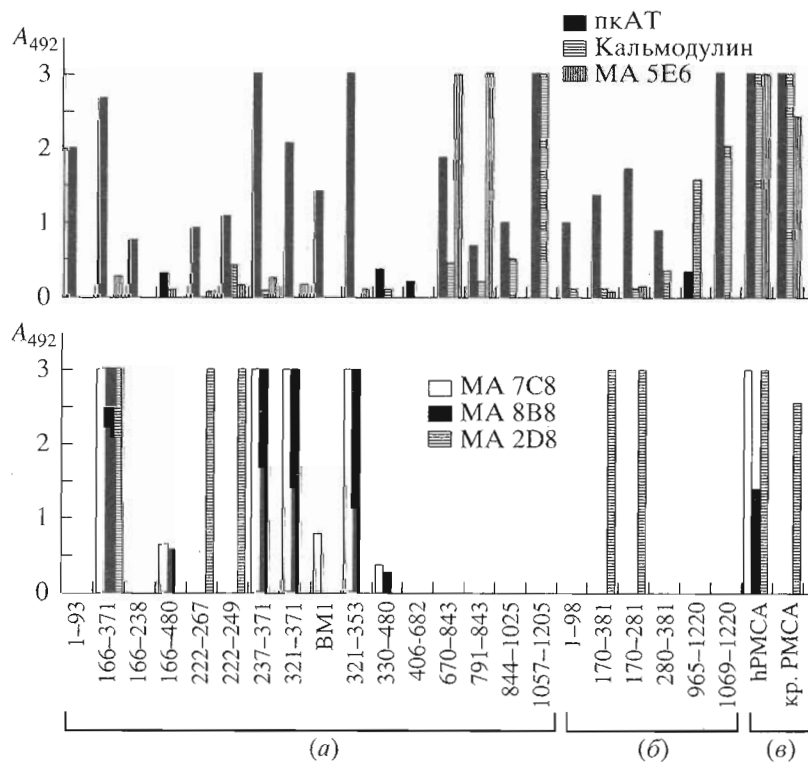


Рис. 2. Взаимодействие моно- и поликлональных антител и кальмодулина с фрагментами hPMCA1 и hPMCA4 в непрямом ИФА. Слева направо: фрагменты hPMCA4 (а); фрагменты hPMCA1 (б); РМСА эритроцитов человека и кролика (кр.) (в).

			D	K	R	x	<u>V</u>	I	R	x	R		Консенсус фаговых мимотопов	
335-	E	E	K	D	K	K	A	<u>V</u>	K	V	P	K	K	hPMCA4
335-	E	E	K	E	K	K	A	S	K	G	P	K	K	PMCA4 крысы
345-	D	E	K	D	K	K	K	A	N	L	P	K	K	hPMCA1
371-	D	-	-	D	R	K	K	A	S	M	H	K	K	hPMCA2
343-	E	E	R	E	K	K	K	A	N	A	P	K	K	hPMCA3

Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей консенсуса фаговых мимотопов MA 8B8 [14] и фрагментов четырех изоформ hPMCA и PMCA4 крысы. Выделены идентичные аминокислотные остатки. Остаток Val342 hPMCA4 подчеркнут.

декапептидных клона, специфически связывающих MA 5E6: GLFVGSWGVGSAENP и QWGLSLFVSPYPVIML. Выравнивание этих последовательностей дает три типа консенсуса (LFV, GSXXV, WGX₅₋₆P), которые все же не могут быть однозначно выравнены ни с каким фрагментом PMCA. Существование нескольких типов консенсуса фаговых пептидов позволяет предположить, что эпитоп имеет интегральную природу, т.е. MA 5E6 реагирует с двумя пространственно сближенными участками в пределах локализованного фрагмента. Детальная идентификация такого эпитопа представляет собой нетривиальную задачу (например, эпитоп MA 1B4 к переносчику лактозы был определен только при помощи сканирующего мутагенеза всех остатков фермента [17]).

MA 8B8 и 7C8 реагируют с одним и тем же фрагментом hPMCA (330–353), который перекрывается с сайтом связывания кислых фосфолипидов [18, 19]. Однако полученные для MA 8B8 и 7C8 фаговые мимотопы [14] совершенно различны, следовательно специфичность этих MA также различна, несмотря на перекрывание их эпитопов в аминокислотной последовательности hPMCA. Эти MA распознают четвертую, но не первую изоформу и, кроме того, не реагируют с PMCA эритроцитов кролика (рис. 1). Выравнивание консенсуса фаговых мимотопов MA 8B8 [14] с некоторыми известными аминокислотными последовательностями этого участка PMCA показано на рис. 3. При этом важно отметить, что ключевыми остатками эпитопа являются D, K и V. Роль последнего подтверждена при помощи сайт-направленного мутагенеза. Мутация V342A (конструкция pBM1, табл. 1) приводит к прекращению связывания MA 8B8, в то время как для MA 7C8 взаимодействие сохраняется. В этом положении именно остаток валина характерен для аминокислотной последовательности hPMCA4, в то время как остаток аланина – для других изоформ и PMCA4 крысы [20], поэтому 8B8 следует считать изоформно- и видоспецифичным MA (хотя нельзя полностью исключить возможность реактивности с изоформами

hPMCA2 и hPMCA3). В то же время идентифицированный эпитоп не позволяет произвести сколько-нибудь убедительного выравнивания с фаговыми мимотопами MA 7C8 [14]. Интересно, что такое выравнивание вполне может быть произведено с C-концевым кальмодулинсвязывающим фрагментом hPMCA [14], с которым антитело совершенно не реагирует. Известно, что кальмодулин с низкой аффинностью распознает синтетический пептид, представляющий собой часть фосфолипидсвязывающего сайта [21]. Таким образом, пространственная структура этих участков (предположительно это α -спирали) может быть сходной. Также обращает на себя внимание тот факт, что наличие двух дополнительных регуляторных участков – характерная структурная черта PMCA, отличающая ее, например, от Ca²⁺-АТФ-азы саркоэндоплазматического ретикула.

Как можно использовать результаты картирования эпитопов в исследованиях структуры PMCA? Не вызывает сомнения расположение эпитопов во внутриклеточных доменах, как было сообщено ранее [6]. Можно также предположить, что идентифицированные эпитопы MA экспонированы на поверхность нативного фермента по крайней мере в некоторых конформационных состояниях. Ранее не было отмечено значимого влияния MA на АТФ-азную активность PMCA [6], но было бы интересно изучить влияние MA 2D8 на транспорт ионов, а также влияние MA 7C8 и 8B8 на активацию PMCA кислыми фосфолипидами.

Какие подходы – комбинаторные или систематические – наиболее продуктивны в картировании эпитопов MA? Использованный в данной работе последовательный синтез фрагментов антигена довольно трудоемок, но позволил получить однозначные результаты. Кроме того, продуцированные фрагменты могут быть использованы и для других целей.

Обсуждая комбинаторные подходы, нужно отметить, что с учетом стоимости фаговый дисплей более выгоден. Использование больших случайных библиотек всегда позволяет идентифициро-

вать пептиды, специфически взаимодействующие с антителом. Однако они очень часто (по литературным данным около половины) не могут быть однозначно выравнены с аминокислотной последовательностью исходного антигена. Возможно, что для АТР-аз Р-типа это особенно характерно; например, истинный эпитоп МА к α -субъединице Na^+ , K^+ -АТР-азы также не соответствует фаговым пептидам [22]. Из исследуемых в данной работе МА три из четырех имеют мимотопы с полностью несоответствующими истинному эпитопу аминокислотными последовательностями (МА 2D8, 5E6, 7C8). Например, для фаговых мимотопов МА 2D8 обязательно наличие двух остатков триптофана или фенилаланина [14], в то время как в истинном эпитопе нет ни одного ароматического остатка. Это говорит о том, что к интерпретации результатов фагового дисплея надо подходить с осторожностью. Факторы, влияющие на результаты экспериментов по идентификации эпитопов при помощи фагового дисплея, рассмотрены ранее [14]. Однако молекулярная природа распознавания антителами негомологичных аминокислотных последовательностей представлялась не совсем ясной до недавнего времени. Например, можно было бы предположить, что мимотопы имитируют поверхность истинного эпитопа. Однако недавно при помощи рентгеноструктурного анализа комплексов антиген-антитело показано, что эпитоп и мимотоп контактируют с разными аминокислотными остатками антигенсвязывающего центра [23]. Это сообщение прекращает дискуссию о природе так называемых полиспецифичных антител [24, 25]. Каждое антитело по своей природе полиспецифично и имеет потенциальную возможность связывать молекулы с существенно различной геометрией.

Возвращаясь к проблеме эффективного картирования эпитопов, нужно отметить, что использование комбинаторных подходов (фагового дисплея и других) позволяет выделить ключевые аминокислотные остатки внутри эпитопа (как в случае 8В8) и определить изоформы- и видоспецифичность исследуемых МА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: эндонуклеазы рестрикции (Amersham, Великобритания; Promega, США и СибЭнзим Лтд, Новосибирск), ДНК-лигазу фага Т4 (Promega, США), PEG-8000, фосфатидилхолин, конъюгаты ферментов с антителами (Sigma, США), штамм *E. coli* SG13009[pREP4], плазмидные вектора серии pQE, NTA-Ni²⁺-агарозу, наборы "QiaQuick" и "QiaEx II" (Qiagen, США), набор для секвенирования ДНК "Sequenase version 2.0 sequencing kit" (Amersham, Великобритания), реактивы для электрофореза, Тритон X-100 (Bio-Rad, США), тетрациклин и тРНК (Boehringer

Mannheim, Германия). Олигонуклеотиды синтезированы фосфорамидитным методом и очищены в ПААГ. Плазмиды p12.1, p5.4c, pMM2-16 и pVL1393-4a, содержащие кДНК hPMCA [26, 27], любезно предоставлены Э. Штрейлером.

PMCA эритроцитов выделяли по описанной ранее методике [28] с модификациями. Эритроциты кролика или человека промывали 4 раза ФСБ и лизировали 10 объемами холодного лизис-буфера (5 mM Трис-НСl, 5 mM Na-фосфат, 1 mM EDTA, 100 mM параметилсульфонилфторид (PMSF), 1 mM 2-меркаптоэтанол, 0.1% метанол, pH 7.4). "Тени" эритроцитов концентрировали при помощи тангенциальной микрофльтрации на приборе "Pellicon" (Millipore, США) с PVDF-мембраной (размер пор 0.22 мкм) и промывали 10 объемами лизис-буфера, 3 объемами ФСБ и 4 объемами раствора А (20 mM Na-HEPES, 130 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM дитиотреит, pH 7.4). После этого "тени" концентрировали до концентрации белка 6 мг/мл. Затем при помешивании на льду добавляли CaCl₂ до 50 мкМ и добавляли раствор Тритона X-100 до 0.5%. Потом центрифугировали в роторе Ti-45 (Beckman, США) при 26000 об/мин в течение 1 ч. Супернатант фильтровали через несколько слоев марли, добавляли яичный фосфатидилхолин (60%) до 0.1% и наносили на колонку с кальмодулин-сефарозой. Колонку промывали в течение ночи раствором В (раствор А с добавлением 40 мкМ CaCl₂, 10% глицерина и 0.05% фосфатидилхолина), затем промывали 5 объемами колонки раствора С (раствор А с добавлением 2 мкМ CaCl₂, 10% глицерина и 0.05% хроматографически очищенного (95%) фосфатидилхолина). PMCA элюировали раствором С с добавлением 2 mM EDTA и хранили в жидком азоте.

Антитела. Анти-PMCA МА [6] продуцировали в асцитах мышей и очищали при помощи выщелачивания сульфатом аммония и хроматографии на протеин-А-агарозе [29]. Для получения специфичных антител анти-M13 бактериофаг дикого типа выделяли из культурального супернатанта двойным осаждением PEG-8000 [30] с последующей гель-фльтрацией на сефакриле S1000 в ФСБ с дополнительным осаждением PEG-8000. 100 мкг очищенного бактериофага в полном адьюванте Фрейндта (1 : 1) вводили кроликам подкожно, через три месяца проводили бустерную инъекцию фагом без адьюванта. Поликлональные анти-PMCA-антитела получали при помощи внутримышечных инъекций 100 мкг PMCA в полном адьюванте Фрейндта (1 : 1) курам-молодкам с последующими ежемесячными инъекциями 100 мкг PMCA в неполном адьюванте (1 : 1). Иммуноглобулины выделяли из яичного желтка осаждением декстрансульфатом и сульфатом натрия [31].

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в ПЦР

Праймер	Структура (5' → 3')
1B1027	<u>ATCGTTA</u> ACCAAACGCACAATTAT
1B98	<u>ATCGTTAAAAGG</u> TTTTGGCTTTTAGG
1BHN	<u>CTGTAAGCTTAA</u> GACATCAACAGACCTGCTT
1F1	<u>ATCGATGGGCG</u> ACATGGCAAACAAC
1F928	<u>ATCGATGATGA</u> AGAATATTTTG
1FBGL	<u>TGGTGAGATCT</u> ACAGCTTTC AATGACTGAGAG
4B371	<u>ATCGTTAAG</u> ACATGAGCAGACCGGC
4B682	<u>ATCGTTAAATAG</u> CATCTGGCACCTCTG
4B843	<u>ATCGTTAGA</u> AACCTGGAGATGCTGTC
4B93	<u>ATCGTTAGAA</u> AGTCTTGGGCTTTT
4F1	<u>ATCGATGACGA</u> ACCCATCAGAC
4F166	<u>ATCGACTGCCT</u> TTAATGATTGGA
4F330B	<u>CACTGGATCCG</u> AGGGAATCGACAATGAGG
4F670	<u>ATCGATTGAGG</u> ACCCTGTGCGC
BVAB1	<u>CTGCCCTCT</u> TGTCCTTTTC
BVAF1	<u>CCAAGGTGCCT</u> AAAAAGG
S1	<u>GCGTATCACG</u> AGGCCCTTTTCG
S4	<u>CATTA</u> CTGGATCTATCAACAGG
UJ2	<u>CACGAAGCTT</u> ACAGGGACTTCTTGACATGG

Подчеркнуты сайты рестрикции и 5'-последовательность для клонирования по методу DTS. Праймеры S1 и S4 комплементарны векторам pQE.

Генно-инженерные конструкции. Клонированные фрагменты hPMCA показаны в табл. 1, а использованные для этого олигонуклеотиды – в табл. 2. Продукты ПЦР или плазмиды обрабатывали соответствующими рестриктазами, разделяли электрофорезом в агарозе, выделяли при помощи набора для экстракции ДНК из геля “QiaEx II” и лигировали. Для клонирования по методу DTS фрагменты ПЦР очищали на колонках “QiaQuick” и обрабатывали ДНК-полимеразой фага T4 в присутствии dCTP, снова очищали на колонках “QiaQuick” и лигировали с плазмидой pQE30, предварительно обработанной рестриктазой *Bam*HI и фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I в присутствии dGTP. К лигазным смесям добавляли 2 мкг дрожжевой tPHK, экстрагировали фенолом и хлороформом, осаждали спиртом, растворяли в воде и использовали для электротрансформации клеток *E. coli* штамма SG13009[pREP4]. Поиск нужных колоний осуществляли при помощи ПЦР с праймерами S1 или S4 и другим праймером, комплементарным желаемой вставке. Правильность полученных конст-

рукций проверяли при помощи секвенирования ДНК по методу Сэнгера [32].

Производство белка в клетках *E. coli*. Клетки SG13009[pREP4], несущие соответствующие плазмиды, выращивали в 100 мл среды LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), при 37°C и встряхивании при 250 об/мин до значения A_{600} 0.4–0.8. Добавляли изопропил-β-D-тиогактопиранозид до 1 мМ и инкубировали еще 4–5 ч, измеряя оптическое поглощение для оценки токсичности рекомбинантных белков.

Металлоаффинную хроматографию в денатурирующих условиях проводили как описано ранее [14, 33]. Для фрагментов, которые предположительно содержат трансмембранные участки (конструкции pN33401, pGJ17, pN232, pJK13, pN191, pN1519, pN171, pD22 и pN2815), использовали модифицированный метод. Клетки, осажденные из 100 мл индуцированной культуры, лизировали 1 ч в 10 мл буфера AM (6 М гуанидин-HCl, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 1% Тритон X-100, 0.1 М Na-фосфат, 0.01 М Трис-HCl, pH 8.0) и центрифугировали 30 мин при 70000 g. Осветленный супернатант инкубировали 30 мин при перемешивании с 0.5 мл NTA-Ni²⁺-агарозы. Затем сорбент промывали 20 мл буфера B (8 М мочевины, 0.1 М Na-фосфат, 0.01 М Трис-HCl, pH 6.2) и связанный белок элюировали тем же буфером, содержащим 200 мМ имидазол-HCl и 0.1% SDS. Элюат диализовали в течение ночи при 4°C против ФСБ, содержащего 2 мМ β-меркаптоэтанол и 20% этанол.

Фаговый дисплей. Использовали упрощенный вариант описанного ранее метода [34]. В 1 лунке планшета для ИФА иммобилизовали 0.5 мкг антитела в 100 мкл ФСБ, блокировали добавлением 100 мкл 0.1% желатина в ФСБ, отмывали ТСБТ и добавляли смесь фаговых библиотек 6- и 15-меров [34]. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре планшет промывали 10 раз ТСБТ с интенсивным перемешиванием и быстрой сменой буфера. Связавшиеся фаги элюировали инкубацией 10 мин в 0.1 М цитрате натрия, pH 2.2 с 0.1% БСА и 0.001% фенолового красного. Элюат собирали и нейтрализовали добавлением раствора Трис-основания. Элюированные фаги амплифицировали в клетках K91kan [14]. После двух туров селекции индивидуальные клоны выращивали в 10 мл жидкой среды. Очистку бактериофага для фагового ИФА и выделения ДНК проводили при помощи двукратного осаждения PEG-8000 из культуральных супернатантов.

Иммуноферментный анализ. Антиген сорбировали в планшетах для ИФА из расчета 1.0 мкг/лунку (по 100 мкл) в смеси ФСБ и метанол 10 : 1 (нерастворимые белки сначала солибилизировали в минимальном объеме 6 М гуанидина-HCl) 1 ч при 37°C на шейкере. Неспецифическое связывание блокировали 0.2% БСА в ФСБ 1 ч. Затем промыв-

вали 4 раза ТСБТ (при использовании кальмодулина в ТСБТ добавляли по 50 мкМ CaCl_2 и MgCl_2). Инкубировали с растворами антител в ТСБТ (для куриных поликлональных антител добавляли 0.1% обезжиренного молока) 1 ч при комнатной температуре; промывали ТСБТ, инкубировали с антивидовыми конъюгатами вторичных антител с пероксидазой 30 мин при комнатной температуре, снова промывали ТСБТ и выдерживали 10 мин при комнатной температуре в растворе 1 мг/мл орто-фенилендиамина в 0.1 М цитратном буфере, рН 5.0, с 0.08% (по объему) 30% H_2O_2 . Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0.1 М серной кислоты.

Для фагового ИФА очищенные МА сорбировали в планшетах из расчета 1.0 мкг/лунку в 100 мкл ФСБ. Неспецифическое связывание блокировали добавлением 0.2% БСА в ФСБ в течение 1 ч и промывали 4 раза ТСБТ. Затем последовательно инкубировали в ТСБТ при комнатной температуре и встряхивании 2 ч с бактериофагом, выделенным из 100 мкл культурального супернатанта, 30 мин с кроличьей сывороткой против фага М13, 30 мин с конъюгатом антикроличьих антител с пероксидазой. Между инкубациями тщательно промывали планшеты ТСБТ; проявляли орто-фенилендиамином как указано выше.

Авторы выражают признательность сотрудникам ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН Н.С. Быстрову за синтез олигонуклеотидов, Л.Г. Романовой и М.В. Егорову за продукцию и очистку нескольких фрагментов hPMCA, В.Д. Сачкову за сбор крови кроликов и Т.И. Муравьевой за выделение кальмодулина из мозга быка, а также Дж. Смиту (Университет Миссури, США) за предоставленные фаговые библиотеки и Е. Штрейлеру (Клиника Мэйо, США) за плазмиды, содержащие кДНК hPMCA.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 96-04-50349 и 98-04-48408), International Science Foundation (grant M4N300) и Министерства науки (программа "Белковая инженерия").

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carafoli E. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 2115–2118.
2. Carafoli E. // Experientia. 1996. V. 52. P. 1091–1100.
3. Møller J.V., Juul B., le Maire M. // Biochim. Biophys. Acta. 1996. V. 1286. P. 1–51.
4. Lehotský J. // Mol. Chem. Neuropathol. 1995. V. 25. P. 175–187.
5. Penniston J.T., Enyedi A. // J. Membrane Biol. 1998. V. 165. P. 101–109.
6. Феценко М.С., Зварич Е.И., Шахпаронов М.И., Модянов Н.Н. // Биол. мембраны. 1991. Т. 12. С. 1237–1247.
7. Caride A.J., Gorski J.P., Penniston J.T. // Biochem. J. 1988. V. 255. P. 663–670.
8. Adamo H.P., Caride A.J., Penniston J.T. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 14244–14249.
9. Feschenko M.S., Zvaritch E.I., Hoffmann F., Shakhparonov M.I., Modyanov N.N., Vorherr T., Carafoli E. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 4097–4101.
10. Verbist J., Wuytack F., Raeymaekers L., van Leuven F., Cassiman J.-J., Casteels R. // Biochem. J. 1986. V. 240. P. 633–640.
11. Stauffer T.P., Guerini D., Carafoli E. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 12184–12190.
12. Crouch J.J., Schulte B.A. // Hearing Res. 1995. V. 92. P. 112–119.
13. Caride A.J., Filoteo A.G., Enyedi A., Verma A.K., Penniston J.T. // Biochem. J. 1996. V. 316. P. 353–359.
14. Пестов Н.Б., Гусакова Т.В., Костина М.Б., Шахпаронов М.И. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 664–670.
15. Clarke D.M., Loo T.W., MacLennan D.H. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 14088–14092.
16. MacLennan D.H., Brandl C.J., Korczak B., Green N.M. // Nature. 1985. V. 316. P. 696–700.
17. Sun J., Wu J., Carrasco N., Kaback H.R. // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 990–998.
18. Zvaritch E.I., James P., Vorherr T., Falchetto R., Modyanov N.N., Carafoli E. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 8070–8076.
19. Brodin P., Falchetto R., Vorherr T., Carafoli E. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 204. P. 939–946.
20. Keeton T.P., Shull G.E. // Biochem. J. 1995. V. 306. P. 779–785.
21. Filoteo A.G., Enyedi A., Penniston J.T. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 11800–11805.
22. Pacholczyk T., Sweadner K.T. // Protein Sci. 1997. V. 6. P. 1537–1548.
23. Keitel T., Kramer A., Wessner H., Scholz C., Schneider-Mergener J., Hohne W. // Cell. 1997. V. 91. P. 811–820.
24. Wing M.G. // Clin. Exp. Immunol. 1995. V. 99. P. 313–315.
25. Avrameas S., Ternynck T. // Res. Immunol. 1995. V. 146. P. 235–248.
26. Adamo H.P., Verma A.K., Sanders M.A., Heim R., Salisbury J.L., Wieben E.D., Penniston J.T. // Biochem. J. 1992. V. 285. P. 791–797.
27. Strehler E.E., James P., Fischer R., Heim R., Vorherr T., Filoteo A.G., Penniston J.T., Carafoli E. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 2835–2842.
28. Niggli V., Penniston J., Carafoli E. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 9955–9958.
29. Harlow E., Lane D. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. P. 557–590.
30. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

31. Celis J. Cell Biology: A Laboratory Handbook. San Diego: Academic Press Inc., 1994.
32. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
33. Корнеевко Т.В., Пестов Н.Б., Егоров М.В., Иванова М.В., Костина М.Б., Шахпаронов М.И. // Биоорг. химия. 1997. Т. 23. С. 800–804.
34. Scott J.K., Smith G.P. // Science. 1990. V. 249. P. 386–390.

Epitope Mapping for Monoclonal Antibodies to Ca²⁺-ATPase from Human Plasma Membranes

N. B. Pestov, T. V. Korneenko, M. B. Kostina, and M. I. Shakhparonov[#]

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

Overlapping fragments of the fourth isoform of human plasma membrane Ca²⁺-ATPase (hPMCA4) and several fragments of hPMCA1 were expressed in bacterial cells and purified by metal affinity chromatography. Enzyme immunoassays of the fragments helped map epitopes for 4 monoclonal antibodies (2D8, 8B8, 7C8 and 5E6). The epitope for 2D8 was localized within the 222–249 site (i.e., in the putative transduction domain), the epitopes for 8B8 and 7C8 were localized within the 330–353 site, in which phospholipids are presumably bound, and the 5E6 epitope was found within the 791–843 site, where the putative hinge region is situated. 2D8 recognizes hPMCA1 and hPMCA4 isoforms, while 8B8 and 7C8 are specific for hPMCA4. The amino acid sequences of these epitopes and phage-displayed mimotopes were compared.

Key words: epitope mapping, monoclonal antibodies, phage display, membrane, protein expression, Ca²⁺-ATPase

[#] To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 330-6456; e-mail: shakh@ibch.siobc.ras.ru.