



УДК 578.833.27.083.3 : 578.74

© 1991 г.

*Н. А. Цехановская, Л. Э. Матвеев, А. Г. Шлетнев,  
С. Г. Рубин, И. В. Сафронов, Е. К. Прессман*

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ АНТИГЕННОГО УЧАСТКА БЕЛКА ОБОЛОЧКИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

*Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР*

Показано, что образующийся при расщеплении бромцианом белка Е оболочки вируса клещевого энцефалита (дальневосточный подтип, штамм Софьин) наиболее крупный фрагмент, являющийся гликопептидом (содержит остатки 78—176, кажущаяся молекулярная масса 14,5 кДа), взаимодействует с 5 из 12 изученных моноклональных антител к белку Е. На основании результатов сравнительного анализа эффективности взаимодействия некоторых моноклональных антител с антителами вирусов дальневосточного и западноевропейского подтипов и сопоставления первичных структур аналогичных пептидов белка Е этих вирусов высказано предположение, что участки связывания этих антител либо включают остатки 89 и (или) 116 белка Е, либо расположены вблизи этих остатков. Изучено влияние денатурирующих агентов, а также восстановления с последующим карбоксиметилированием на антигенные свойства белка Е.

Вирус клещевого энцефалита (КЭ) — один из наиболее патогенных представителей семейства флавивирусов, вирионы которого содержат в своем составе структурные белки М, С и Е, различающиеся по размерам, функциям и локализации в вирионе. По данным ряда авторов, основным иммуногеном вируса КЭ является белок оболочки Е, представляющий собой гликопротеин [1, 2].

Создание генно-инженерных и синтетических вакцин требует детального изучения антигенной структуры вирусных белков. Использование моноклональных антител (МА) позволяет в каком-то приближении решать подобного рода задачи: в частности, в одном случае при помощи МА был построен вариант модели антигенной структуры гликопротеина Е вируса КЭ (западноевропейский подтип, штамм Найдорф) [3], в другом — локализованы «критические» аминокислоты аналогичного белка вируса желтой лихорадки, определяющие его инфекционность [4].

В данной работе проведен электрофоретический анализ бромциановых фрагментов белка Е вируса КЭ (дальневосточный подтип, штамм Софьин [5]) и локализован по крайней мере один из антигенных участков этого белка, а также исследована конформационная устойчивость некоторых эпитопов.

Для фрагментации белка Е использовали бромциан (CNBr), который в кислой среде расщепляет белки по остаткам метионина. Судя по данным гель-электрофореза, при расщеплении восстановленного белка образуются фрагменты, имеющие молекулярные массы (мол. масса) 14,5; 10; 8,5; 6; 4 и 3 кДа, причем фрагмент с *M* 10 кДа, слабо окрашивающийся кумаси R-250, удается достаточно надежно обнаружить лишь путем денситометрирования гелей (рис. 1). Более сложный вид имеют электрофореграммы смеси, образующейся при обработке бромцианом невосстановленного белка. В этом случае выявляется ряд дополнительных фрагментов, представляющих собой, по-видимому, продукты неполного расщепления белка

Принятые сокращения: КЭ — клещевой энцефалит; МА — моноклональные антитела; Con A — конканавалин А; SDS — додецилсульфат натрия.

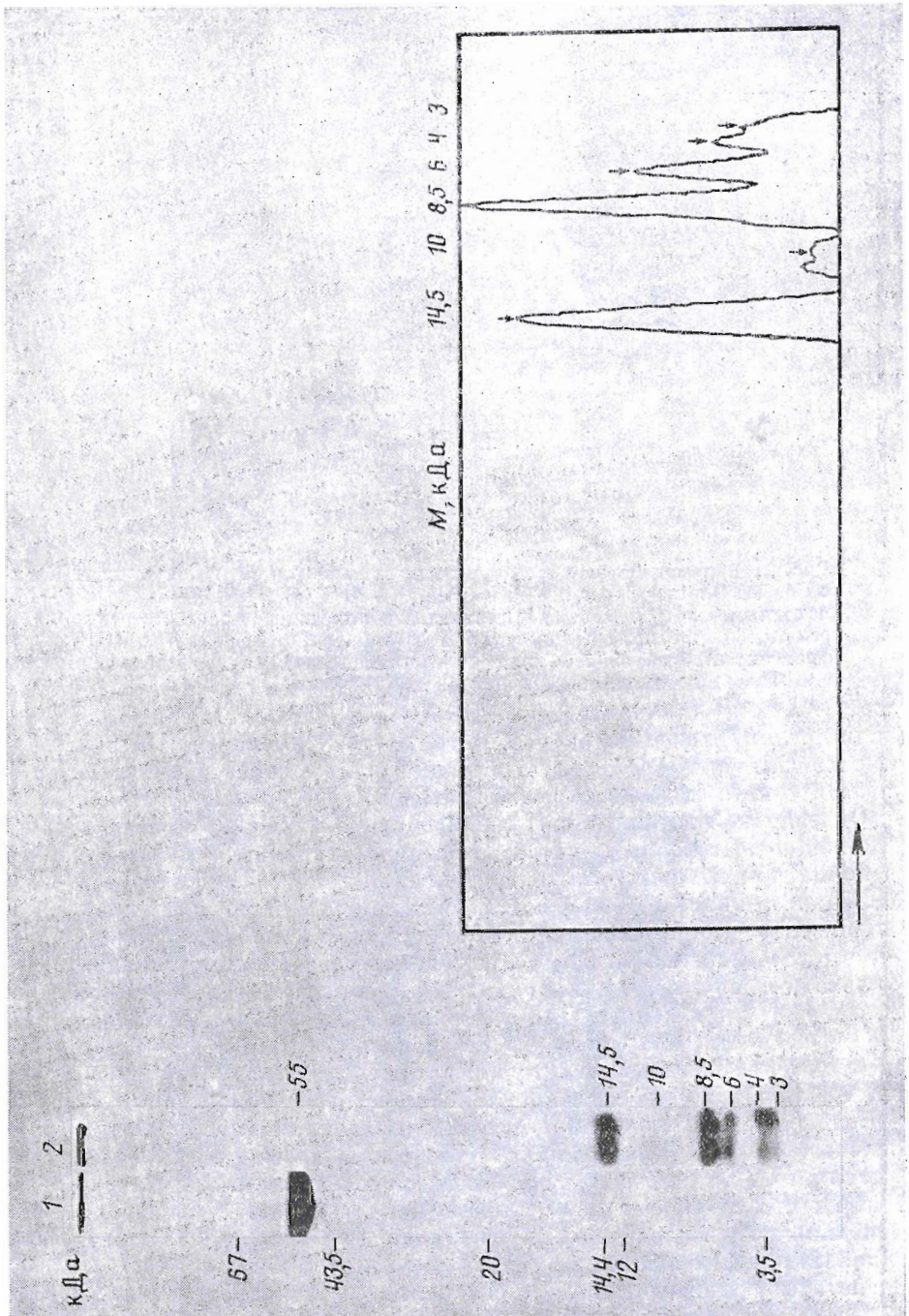


Рис. 1. Электрофорограммы белка Е вируса КЭ (1) и его бромидановых фрагментов (2) в градиентном ПААГ — SDS; слева (сверху вниз) указаны положения белков-маркеров (близкого сывороточного альбумина, овалальбумина, ингибитора трипсина,  $\alpha$ -лактальбумина, цитохрома с и  $\beta$ -цепи инсулина), справа — положения белка Е и его фрагментов. Отдельно приведена денситограмма дорожки 2



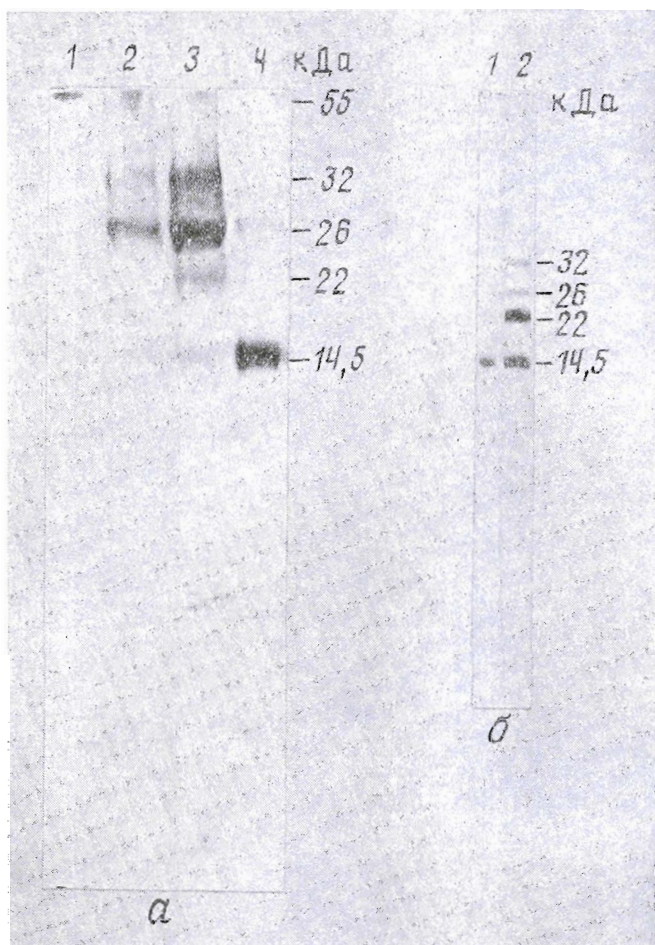


Рис. 2. Взаимодействие бромциановых фрагментов белка Е вируса КЭ с Соп А. Электрофорез в 12,5% (а) и 10—30% (б) ПААГ — SDS; а: 1 — исходный белок Е, 2, 3, 4 — продукты, образующиеся соответственно через 10, 60 мин и 24 ч инкубации восстановленного белка Е с CNBr; б: фрагменты, образующиеся через 24 ч инкубации с CNBr восстановленного (1) и невосстановленного (2) белка Е

(данные не приведены). Скорее всего, это обусловлено наличием в белке не расщепляемых бромцианом остатков сульфоксида метионина [6], образование которых не исключено в ходе его выделения и очистки.

Оказалось, что предварительной обработки белка  $\beta$ -меркаптоэтанолом явно недостаточно для того, чтобы бромциановое расщепление прошло до конца, причем результаты расщепления такого белка, как и невосстановленного, не воспроизводились. Именно этими обстоятельствами был продиктован выбор описанной в «Экспериментальной части» жесткой процедуры восстановления. Поскольку в использованных условиях восстанавливаются не только сульфоксидные группы, но и дисульфидные связи, в дальнейшем для исключения артефактов, обусловленных такой обработкой (в частности, она может привести к повреждению участков связывания со специфическими антителами), проводили сопоставление результатов, полученных для восстановленного и невосстановленного белка Е.

Белок Е является гликопротеином (по данным, полученным для аналогичного белка КЭ штамма Найдорф, мол. масса его углеводной части составляет  $\sim 2,5$  кДа [7]), способным связываться с конканавалином А (Соп А), что открывает возможность использования последнего для локализации углеводсодержащих пептидов в первичной структуре этого белка. Из представленных на рис. 2 результатов видно, что с Соп А взаимодействует единственный продукт полного расщепления белка Е бром-

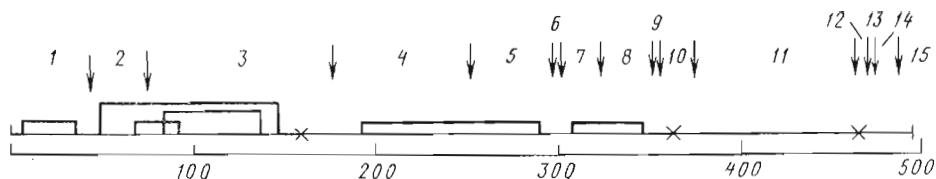


Рис. 3. Линейная карта белка Е вируса КЭ. Цифрами указаны порядковые номера аминокислотных остатков (снизу) и бромциановых пептидов (сверху), стрелками — точки расщепления бромцианом (положения остатков Met). Звездочками отмечены потенциальные сайты гликозилирования, горизонтальными скобками — дисульфидные мостики (по данным работы [12])

цианом — фрагмент с  $M$  14,5 кДа (дорожка 1 на рис. 2б). Этот вывод подтверждается также данными о кинетике накопления этого гликопептида при инкубации белка Е с бромцианом: при расщеплении невозстановленного белка (рис. 2б, дорожка 2), а также при небольшом времени инкубации с бромцианом восстановленного белка (рис. 2а, дорожки 2, 3) образуются дополнительные пептиды, имеющие более высокую молекулярную массу и являющиеся, очевидно, предшественниками ГП-14,5.

Известно, что аминокислотная последовательность белка Е, выведенная на основании первичной структуры соответствующего гена [5], содержит три потенциальных участка гликозилирования, расположенных в трех разных бромциановых пептидах: сайт Asn-Glu-Thr находится в 3-м от N-конца пептиде (координаты 78—176,  $M$  10,6 кДа), сайт Asn-Pro-Thr — в 10-м и 12-м (координаты 359—374 и 371—375,  $M$  1,7 и 0,5 кДа соответственно) (рис. 3). Приведенные данные позволяют локализовать ГП-14,5 на линейной карте белка Е (рис. 3) как третий пептид с координатами 78—176. Наличием углеводной цепи можно объяснить существенное различие в значениях молекулярной массы наиболее крупного бромцианового пептида белка Е, найденной по электрофоретической подвижности (14,5 кДа) и рассчитанной на основании аминокислотной последовательности (10,6 кДа). Следует заметить, что мол. масса аналогичного пептида белка Е вируса КЭ штамма Найдорф, найденная также при помощи электрофореза, отличается от 14,5 кДа и составляет, по данным авторов работы [3], 19 кДа. Вычисленная по недавно опубликованной первичной структуре вируса КЭ штамма Найдорф [8] мол. масса самого крупного бромцианового пептида белка Е этого штамма составляет, как и для штамма Софьин, около 10,5 кДа (без углеводной части). Экспериментально наблюдаемое различие мол. масс аналогичных пептидов связано, по-видимому, с их аномальной подвижностью в различных условиях гелеэлектрофореза, обусловленной наличием углеводных цепей. Предположение авторов работы [3] о затрудненности расщепления белка Е по третьему остатку метионина (см. рис. 3) и образовании продукта неполной фрагментации с координатами 78—252 и  $M$  19 кДа представляется маловероятным, так как соседним С-концевым остатком третьего метионина белка Е вируса КЭ штамма Найдорф, как и штамма Софьин, является Gly (а не Ser или Thr, препятствующие расщеплению бромцианом [9]).

Два других потенциальных гликопептида не обнаруживаются в наших условиях, несмотря на использование геля с высокой степенью сшивки (акриламид —  $N,N$ -метиленбисакриламид = 10 : 1), рекомендуемого для разделения коротких пептидов (рис. 2а). Не исключено, что углеводные цепи этих гликопептидов не содержат специфических остатков, взаимодействующих с Con A.

Антигенные свойства различных препаратов белка Е и его бромциановых фрагментов изучали при помощи панели из 12 МА. Все МА взаимодействуют в условиях DOT-анализа [10] с препаратом нативного белка Е, находящимся в виде «розеток» (кроме белка Е в состав «розеток» может входить и другой мембранный белок М [11]) (рис. 4а), однако в условиях иммуноблоттинга с белком Е реагируют лишь 5 МА: 4А6, 5Г6, 5С5, 3В7 и 1Е11 (весьма слабо) (рис. 4б). Это связано, по-видимому, с различ-



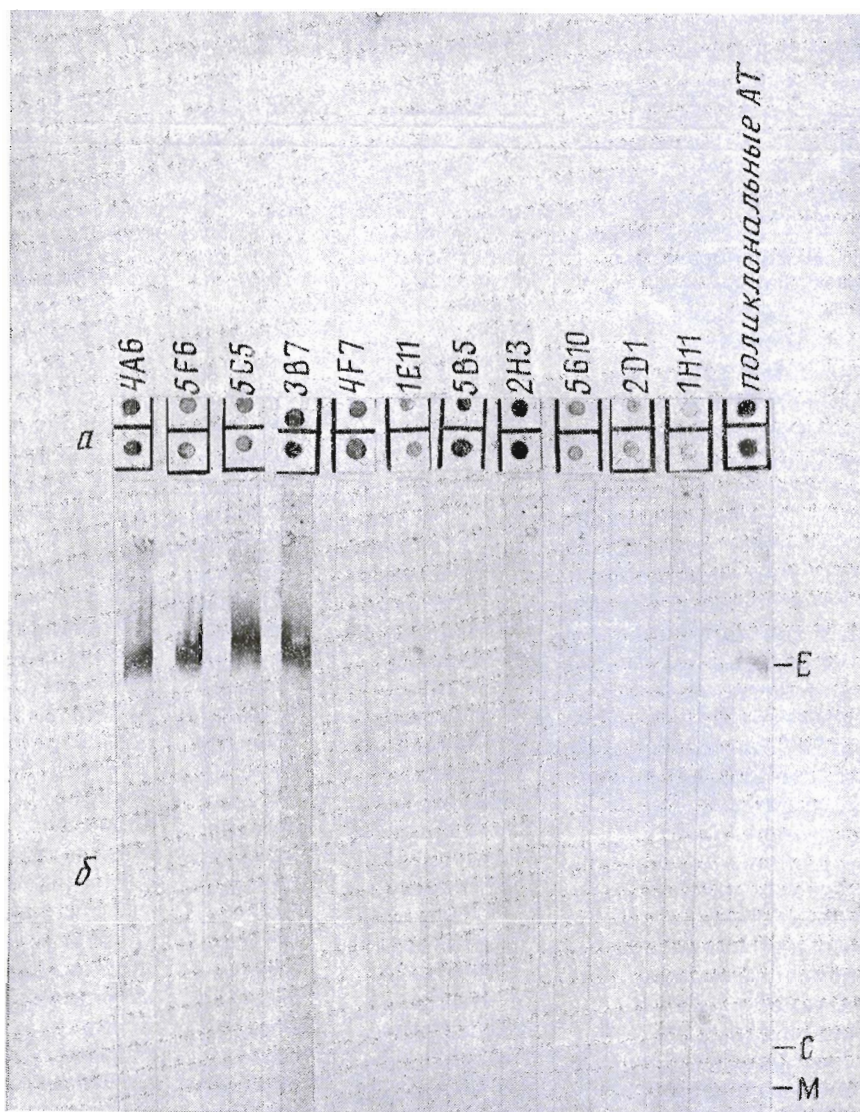


Рис. 4. Взаимодействие МА с белками вируса КЭ в условиях DOT-анализа (а) и иммуноблоттинга (б). а — «розетки» белка Е; в каждую точку нанесено по 0,2 мкл раствора белка Е в буфере А (концентрация 50 мкг/мл); б — вирусные белки Е, С и М; электроперенос с 15% ПААГ — SDS. Указаны наименования клонов и положения структурных белков Е (55 кДа), С (14 кДа) и М (8 кДа)

ной устойчивостью эпитопов к действию денатурирующих агентов (мочевина, SDS), используемых при проведении гель-электрофореза.

Поскольку конформация антигенных детерминант играет важную роль в их взаимодействии с антителами, было изучено влияние денатурации под действием хлорида гуанидиния и мочевины и восстановления S—S-связей с последующим карбоксиметилированием на антигенные свойства белка Е. Из приведенных на рис. 5 данных видно, что в результате любой из таких обработок белок Е полностью утрачивает способность взаимодействовать с МА 1H11, 5B5, 2H3, 5G10 и 2D1; МА 4A6, 5F6, 5H9, 3B7 и 5C5 реагируют с денатурированным антигеном, но не взаимодействуют с карбоксиметилированным белком; и наконец, МА 4F7 и 1E11 связываются как с денатурированным, так и с карбоксиметилированным белком Е.

Следует заметить, что даже при сохранении способности препаратов денатурированного или карбоксиметилированного белка Е взаимодействовать с МА наблюдается уменьшение эффективности связывания по

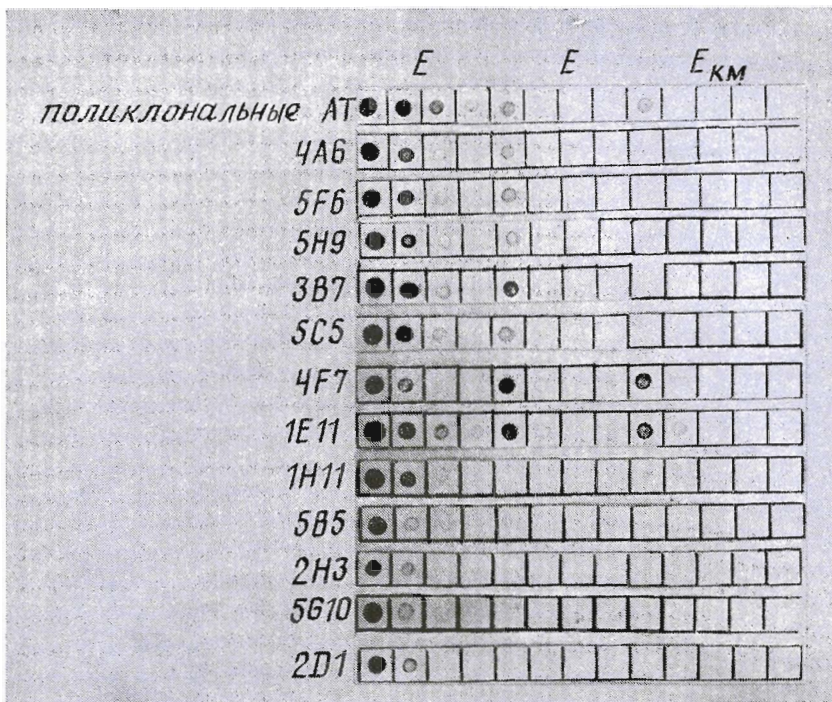


Рис. 5. Взаимодействие МА с нативным (E), денатурированным (E<sub>D</sub>) и карбоксиметилированным (E<sub>CM</sub>) белком E в условиях DOT-анализа. Вертикальные столбцы — нанесено по 0,2 мкл раствора белка E в трехкратных последовательных разведениях (по 4 точки, слева направо; исходная концентрация антигена 150 мкг/мл). Слева указаны наименования клонов

сравнению с нативным белком. Возможно, это является следствием неполной денатурации белка или частичной его ренатурации после удаления денатурирующих и модифицирующих агентов.

В дальнейшем топологическая модель антигенных детерминант, выявляемых данным набором МА, видимо, позволит сделать вывод о конформационной стабильности антигенных участков белка E, тогда как в этой работе на основании изложенных данных можно сделать заключение о стабильности лишь отдельных эпитопов. Если часть эпитопов денатурирует необратимо (2D1, 5G10, 2H3, 1H11), то другие сохраняют способность связывать МА даже в условиях разрушения S—S-мостиков (1E11, 4F7). Промежуточное состояние занимают сайты связывания МА 4A6, 5F6, 5H9, 3B7 и 5C5, обратимо денатурирующие, но не сохраняющиеся при разрушении S—S-мостиков.

На рис. 6 показаны результаты взаимодействия МА с бромциановыми фрагментами белка E в условиях иммуноблоттинга. Видно, что иммунохимическую активность проявляет лишь ГП-14,5. В опытах с невосстановленным перед расщеплением белком E кроме этого фрагмента с МА способны реагировать и более крупные пептиды, которые на основании этих данных можно считать предшественниками ГП-14,5. Интересно, что все МА, направленные к устойчивым к денатурации эпитопам белка E и реагирующие с ним в условиях иммуноблоттинга, взаимодействуют в этих условиях и с его бромциановым фрагментом ГП-14,5. Следовательно, остатки Met не являются точками разрыва соответствующих этим МА эпитопов, а также не служат «критическими» для взаимодействия в случае их расположения на границах эпитопов.

Из приведенных результатов можно сделать вывод о конформационной устойчивости некоторых антигенных детерминант ГП-14,5. Этот гликопептид находится между 78-м и 176-м аминокислотными остатками белка E и взаимодействует с МА 4A6, 5F6, 5H9, 3B7 и 5C5. Присутствие ряда эпитопов в этом регионе не противоречит теоретическим предска-



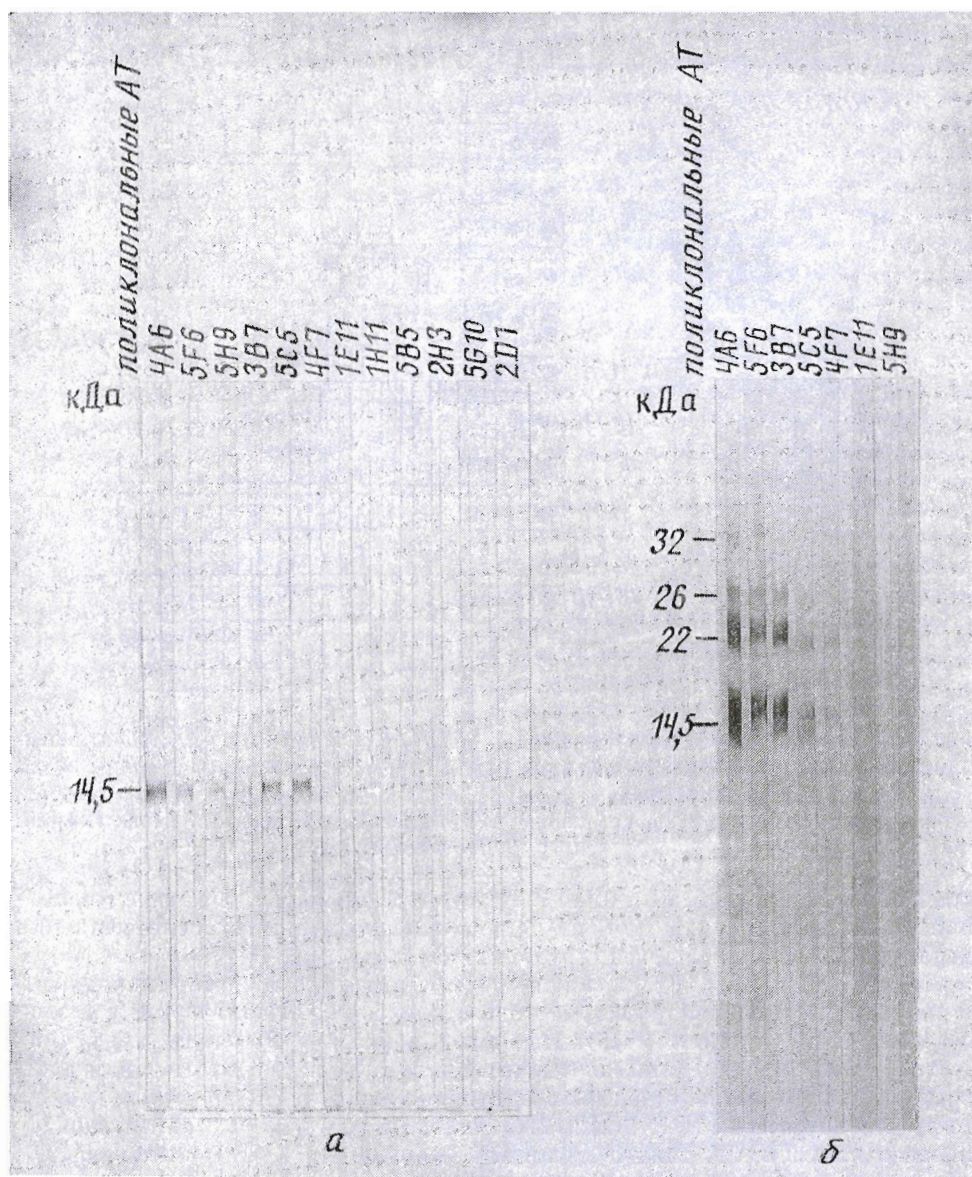


Рис. 6. Иммуноблот бромциановых фрагментов восстановленного (а) и невосстановленного (б) белка Е (электроперенос с 10–30% ПААГ — SDS). Сверху указаны наименования клонов

заниям, основанным на анализе гидрофильности первичной структуры белка Е, согласно которым некоторые антигенные детерминанты могут быть локализованы в районе 60–69 и 122–129 аминокислотных остатков для белка Е вируса КЭ [11] и в районе 1–120 для белка Е вируса Западного Нила [12].

К более конкретным предположениям о локализации некоторых эпитопов структурного гликопротеина вируса КЭ в ГП-14,5 можно прийти путем сопоставления первичных структур аналогичных гликопептидов вируса КЭ дальневосточного [5] и западноевропейского подтипов [8] и анализа результатов титрования МА соответствующими антигенами. Эти гликопептиды отличаются друг от друга тремя заменами, из которых существенными представляются замены в положениях 89 (Ser на Gly) и 116 (Thr на Ala), а несущественной, практически равноценной является замена в положении 168 (Val на Ile). Взаимодействующие с ГП-14,5 МА способны дискриминировать антигены дальневосточного (штамм Софбин)

и западноевропейского (штамм 256) подтипов: эффективность связывания МА 4А6, 5F6, 5Н9 и 5С5 с антигеном штамма 256 на 1,5—2 порядка ниже, чем с антигеном штамма Софьин [13]. Эти данные позволяют предположить, что сайты связывания исследованных антигенов с указанными антителами включают точки аминокислотных замен или расположены в непосредственной близости от них. Вероятно, это предположение можно распространить и на другие антитела к вирусу КЭ, так как уровень стабильности антигенной структуры вирусных изолятов различных географических зон Европы довольно высок [14], а первичная структура дальневосточного и западноевропейского подтипов весьма консервативна [5, 8]. ГП-14,5 представляет собой фрагмент белка Е, включающий часть консервативной области структуры, стабилизированной S—S-мостиками, и вариабельный участок, не содержащий цистеиновых остатков, если судить по структурным характеристикам аналогичного пептида белка Е вируса Западного Нила [12]. Замена «критических» аминокислот именно в консервативной части гликопептида приводит лишь к снижению эффективности его взаимодействия с МА, тогда как в результате восстановления и последующего карбоксиметилирования белок Е полностью утрачивает способность связывать эти МА. Последнее может быть обусловлено такими конформационными изменениями белковой молекулы, при которых этот антигенный сайт становится недоступным для МА. Данное обстоятельство не позволяет нам сделать вывод о характере выявляемой детерминанты, несмотря на однозначность ее локализации.

### Экспериментальная часть

В работе использовали вирус КЭ дальневосточного подтипа (штамм Софьин). Процедуры выделения и очистки белка Е, а также получения «розеток» описаны в работе [15]. DOT-анализ проводили в соответствии с ранее предложенной нами методикой [10].

*Моноклональные антитела.* Схема иммунизации, условия гибридизации и некоторые характеристики полученных МА приведены в предшествующей работе [16].

*Расщепление белка Е бромцианом.* Для восстановления белка Е его раствор (0,2—1 мг/мл) в 0,02 М трис-НСl-буфере, рН 8,5, содержащем 0,15 М NaCl, 1 мМ EDTA и 0,01% NaN<sub>3</sub> (буфер А), инкубировали 48 ч при 50° С в присутствии 1 М дитиотреита (Reanal, Венгрия) [7]. Белок осаждали 10% ТХУ при 0° С, осадок дважды промывали холодным ацетоном и растворяли в 70% муравьиной кислоте, содержащей 5 мМ дитиотреит (концентрация белка 3—5 мг/мл). Расщепление бромцианом проводили, инкубируя полученный раствор белка с равным объемом 0,2 М CNBr (Sigma, США) в 70% HCOOH в течение 24 ч в темноте при 20° С [17]. Реакцию останавливали путем разбавления инкубационной смеси водой в 10 раз; фрагменты белка Е лиофилизировали.

Белок Е денатурировали 5 М хлоридом гуанидиния (Serva, ФРГ) и 2 М мочевиной. Восстановление и карбоксиметилирование выполняли как описано в работе [3].

Электрофорез проводили в 12,5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ПААГ — SDS; соотношение акриламида и N,N-метиленбисакриламида 10 : 1) [18] или в градиентном (10—30%) ПААГ — SDS (соотношение мономеров 20 : 1), содержащем 7 М мочевины, в диск-системе [19]. Образцы растворяли в буфере, содержащем 1% SDS, 5 М мочевины и 0,2 М дитиотреит, и перед нанесением прогревали 2 мин при 100° С. Гели окрашивали кумасси R-250 и сканировали на лазерном денситометре Ultrosan XL (LKB, Швеция).

*Иммуноблоттинг.* Электроперенос белка Е и его бромциановых фрагментов на нитроцеллюлозные мембраны (0,4 мкм; Schleicher und Schüll, ФРГ) проводили согласно работе [20] на приборе Transphore (LKB, Швеция) в течение 7 ч, после чего мембраны инкубировали 2 ч при 37° С в 0,5% растворе желатина в буфере А и хранили при 4° С в этом же растворе. Для иммунодетекции антигенов нитроцеллюлозные полоски выдерживали



3 ч при 20° С в содержащих МА асцитных жидкостях, разбавленных в 1000 раз вышеуказанным буфером. Не связавшиеся МА отмывали 0,05 % раствором твина-20 (Serva, ФРГ) в буфере А, затем мембраны инкубировали 1 ч с козьими IgG против IgM или IgG мыши (в зависимости от класса МА), конъюгированными с пероксидазой хрена, и после отмывки мембран тем же буфером комплекс проявляли путем обработки раствором H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в присутствии хромогена 4-хлор-1-нафтаола (Aldrich, США).

Для обнаружения гликопептидов на нитроцеллюлозных мембранах при помощи конъюгата Con A (Serva, ФРГ) с пероксидазой использовали метод, описанный в работе [21].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heinz F. X., Tuma W., Kunz Ch. // *Infect. and Immun.* 1981. V. 33. № 2. P. 250—257.
2. Чумаков М. П., Рубин С. Г., Кусов Ю. Ю., Семашко И. В., Сальников Я. А., Прессман Е. К., Цехановская Н. А. // *Вопр. вирусологии.* 1984. Т. 29. № 6. С. 701—705.
3. Mandl C. W., Guirakhoo F., Holzmann H., Heinz F. X. // *J. Virol.* 1989. V. 63. № 2. P. 564—571.
4. Lobigs M., Dalgarno L., Schlesinger J. J., Weir R. C. // *Virology.* 1987. V. 161. № 2. P. 474—478.
5. Yamshchikov V. F., Pletnev A. G. // *Nucl. Acids Res.* 1988. V. 16. № 15. P. 7750.
6. Houghten R. A., Li G. H. // *Meth. Enzymol.* 1983. V. 91. Part. 1. P. 549—558.
7. Wincler G., Heinz F. X., Kunz Ch. // *Virology.* 1987. V. 159. № 1. P. 237—243.
8. Mandl C. W., Heinz F. X., Kunz Ch. // *Virology.* 1988. V. 166. № 1. P. 197—205.
9. Titani K., Hermodson M. A., Ericsson L. H., Walsh K. A., Neurath H. // *Biochemistry.* 1972. V. 11. № 8. P. 2427—2435.
10. Матвеев Л. Э., Караванов А. С., Рубин С. Г., Семашко И. В., Цехановская Н. А., Прессман Е. К. // *Вопр. вирусологии.* 1989. Т. 34. № 4. С. 488—491.
11. Pletnev A. G., Yamshchikov V. F., Blinov V. M. // *FEBS Lett.* 1986. V. 200. № 2. P. 317—321.
12. Novak T., Wengler G. // *Virology.* 1987. V. 156. № 1. P. 127—137.
13. Караванов А. С., Матвеев Л. Э., Рубин С. Г., Семашко И. В., Цехановская Н. А., Прессман Е. К. // *Вопр. вирусологии.* 1990. Т. 35. № 2. С. 140—143.
14. Guirakhoo F., Radda A. G., Heinz F. X., Kunz Ch. // *J. Gen. Virol.* 1987. V. 68. Part 4. P. 859—864.
15. Чумаков М. П., Кусов Ю. Ю., Рубин С. Г., Семашко И. В., Сальников Я. А., Рейнгольд В. А., Прессман Е. К., Цехановская Н. А. // *Вопр. вирусологии.* 1984. Т. 29. № 6. С. 694—701.
16. Матвеев Л. Э., Годовиков А. А., Караванов А. С., Плетнев А. Г., Рубин С. Г., Семашко И. В., Цехановская Н. А., Чумаков М. П., Прессман Е. К. // *Вопр. вирусологии.* 1989. Т. 34. № 6. С. 694—697.
17. Gross E. // *Meth. Enzymol.* 1967. V. 41. P. 238—255.
18. Swank R. T., Munkres K. D. // *Anal. Biochem.* 1971. V. 39. № 2. P. 462—477.
19. Laemmli U. K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
20. Towbin H., Stachelin T., Gordon G. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. № 9. P. 4350—4354.
21. Cless E. // *Anal. Biochem.* 1982. V. 127. № 2. P. 389—394.

Поступила в редакцию  
26.X.1989

После доработки  
24.V.1990

N. A. TSEKHANOVSKAYA, L. E. MATVEEV, A. G. PLETNEV, [S. G. RUBIN],  
I. V. SAFRONOV, E. K. PRESSMAN

#### LOCALIZATION OF ANTIGENIC REGION OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS ENVELOPE GLYCOPROTEIN USING MONOCLONAL ANTIBODIES

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,  
Academy of Sciences of the USSR*

The largest cyanogen bromide fragment (GP-14,5; coordinates 78—176) of E protein belonging to the envelope of the tick-borne encephalitis (TBE) virus (Far Eastern subtype, strain Sofjin) interacted with five out of twelve E-specific monoclonal antibodies (MAbs). Having compared efficiencies of some MAbs binding to the antigens of TBE viruses of Far Eastern and West European subtypes and primary structures of analogous peptides of these viruses, we suggested the epitopes of these MAbs to be located in the vicinity of 89 and/or 116-th amino acid residues of E protein. Effect of denaturing agents and reduction followed by carboxymethylation on the protein E antigenic properties was studied.