



УДК 578.224.577.112.6:577.27

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИММУНОРЕАКТИВНЫХ ЭПИТОПОВ В БЕЛКАХ, КОДИРУЕМЫХ ГЕНАМИ *gag*, *env* И *pol* Т-ЛИМФОТРОПНОГО ВИРУСА ЧЕЛОВЕКА ТИПА I (HTLV-I) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

© 1995 г. Н. Г. Ярославцева, В. С. Иванов*, Ж. О. Гребенникова*,
Г. В. Корнилаева, Т. А. Пашкова, Л. Д. Чикин*, А. Г. Островский*,
С. М. Андреев**, Р. М. Хайтов**, Э. В. Карамов#

Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, 123181, Москва, ул. Гамалеи, 16;

* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

** Институт иммунологии Минздрава РФ, Москва

Поступила в редакцию 05.12.94 г.

Методом иммуноферментного анализа изучена реактивность 26 синтетических пептидов, представляющих собой последовательности из 12 - 26 аминокислотных остатков, соответствующих фрагментам белков Т-лимфотропного вируса человека типа I (HTLV-I) p19 (ген *gag*), gp46 (ген *env*) и белков, кодируемыи геном *pol* (*pol*-белки), с 31 HTLV-I-позитивной сывороткой. Установлено, что специфической реактивностью, с высокими титрами антител обладают синтетические пептиды 110 - 130 и 100 - 130 (титры до 4050)* белка p19, 174 - 197 (до 800), 186 - 201 (до 4050), 191 - 215 (до 1350), 242 - 257 (до 800), 272 - 292 (до 450) белка gp46. Иммуноактивность 7 пептидов фрагментов *pol*-белков выражена слабо. Сравнительный анализ реактивности перекрывающихся пептидов из белков p19 и gp46 и результатов других авторов позволил уточнить расположение обнаруженных ранее линейных эпитопов в этих белках. Нами идентифицированы новые линейные эпитопы в области 145 - 158, 272 - 277 и 292 - 300 белка gp46 HTLV-I.

Ключевые слова: HTLV-I, структурные белки, синтетические пептиды, иммуноактивные эпитопы, картирование.

Т-Лимфотропный вирус человека типа I (HTLV-I) этиологически ассоциирован с Т-клеточной лейкемией/лимфомой взрослых [1] и хроническими неврологическими заболеваниями – тропическим спастическим парапарезом [2] и HTLV-I-миелопатией [3]. В большинстве случаев инфицированные HTLV-I являются бессимптомными носителями вируса [4]. Гуморальный иммунный ответ к HTLV-I у людей направлен преимущественно против белков p19 и p24, кодируемых *gag*-областью генома [5, 6], гликопротеинов gp21, gp46 и gp61/68 [7, 8] *env*-области и белка p41 *pX*-области вирусного генома [9].

Для идентификации иммунодоминантных участков вирусных белков и их аминокислотных последовательностей широко используются синтетические пептиды, имитирующие фрагменты этих

белков. Некоторые авторы [10 - 15], исследуя различия в специфическом взаимодействии противовирусных антител с синтетическими пептидами, соответствующими перекрывающимся аминокислотным последовательностям p19, gp46 и gp21 вируса HTLV-I, идентифицировали иммуноактивные эпитопы этих белков. В настоящей работе мы изучили взаимодействие 26 синтетических пептидов с последовательностями фрагментов областей белков p19, gp46 и *pol* с коллекцией HTLV-I-позитивных референс-сывороток. Была исследована панель, содержащая 31 сыворотку с охарактеризованным спектром противовирусных антител. В ряде случаев мы подтвердили полученные ранее данные, а также показали присутствие новых дополнительных линейных эпитопов в белках p19 и gp46 HTLV-I.

Результаты исследования сывороток, используемых в качестве позитивных по антителам к HTLV-I, представлены в табл. 1. Все сыворотки продемонстрировали реактивность в тестах агглютинации и иммунофлуоресценции, были положительны в обоих вариантах ИФА (кроме сыворотки № 27) и в подтверждающих тестах

Сокращения: ВИЧ – вирус иммунодефицита человека, XAM – HTLV-I-ассоциированная миеломопатия, ТСП – тропический спастический парапарез, cut off – контрольный уровень отбора положительных результатов в ИФА.

* Здесь и в дальнейшем приведены обратные величины разведений.

Автор для переписки.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИММУНОРЕАКТИВНЫХ ЭПИТОПОВ

753

Таблица 1. Характеристики сывороток, содержащих антитела к HTLV-1, в скринирующих и подтверждающих тестах*

Номер сыворотки	Serodia ATLA** (log ₂)	ИФ-*** тест	ИФА на основе вирусного лизата												Иммуноблот											
			MT2	C91/PL**	19	24	28	32	36	42	46	53	61/68	19	24	28	32	36	42	46	53	61/68				
1	9	+	+	2000	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
2	10	+	+	300	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3	9	+	+	600	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
4	8	+	+	300	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
5	11	+	+	300	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
6	11	+	+	2700	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
7	13	+	+	900	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
8	10	+	+	2700	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
9	11	+	+	900	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
10	13	+	+	8100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
11	11	+	+	2700	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
12	8	+	+	900	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
13	7	+	+	200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
14	8	+	+	2700	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
15	12	+	+	900	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
16	7	+	+	300	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
17	7	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
18	10	+	+	200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
19	11	+	+	900	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
20	9	+	+	900	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
21	10	+	+	300	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
22	8	+	+	2700	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
23	10	+	+	300	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
24	11	+	+	900	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
25	11	+	+	200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
26	8	+	+	900	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
27	5	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
28	8	+	+	200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
29	9	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
30	11	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
31	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

* «+» — положительный результат, «-» — отрицательный результат.

** Приведены титры антител.

*** Имунофлуоресцентный тест.

Таблица 2. Реактивность сывороток, содержащих антитела к HTLV-1, в непрямом ИФА на основе синтетических пептидов структурных белков HTLV-1

Структурный белок вируса (ген)	Пептид	Аминокислотная последовательность	Результат ИФА*
p19 (<i>gag</i>)	110 - 130	PPDSDPQIPPPYVEPTAPQVL	31/31 (100)
	118 - 130	(BGGG)PPPYVEPTAPQVL**	26/31 (84)
	118 - 130	PPPYVEPTAPQVL	25/31 (80)
gp46 (<i>env</i>)	100 - 130	PPPSSPHTDPPSDPQIPPPYVEPTAPQVL	31/31 (100)
	85 - 100	FPHWTKKPNRNGGY	0/31 (0)
	140 - 155	NFTQEVSRLNNLHFS	3/31 (10)
	145 - 158	VSRLNNLHFSLC	4/31 (13)
	142 - 162	TQEVSRLNNLHFSKC(Acm)GFPFS	0/31 (0)
	165 - 181	VDAPGYDPFLNTEPS	2/31 (6)
	174 - 197	TFLNTEPSQLPPTAPPLPHSNLW	14/31 (45)
	186 - 201	TAPPPLLPHSNLDHILE	23/31 (74)
	191 - 215	LPHSNLDHILEPSIPWWKSKLTLVQ	26/31 (84)
	223 - 243	YTCIVCIDRASLSTWHVLYSP	1/31 (3)
	230 - 252	DRASLSTWHVLYSPNISVPSSSS	5/31 (16)
	242 - 257	SPNVSVPSSSTPLLY	12/31 (39)
	246 - 266	SPVSSSSTPLLYPSLALPAPH	17/31 (55)
	272 - 292	NWTHCFDPQIQAIVSSPVHNS	16/31 (52)
(pol)	278 - 292	DPQIQAIVSSPCHNS	0/31 (0)
	301 - 316	SPVPTLGSRSRRAVPV	2/31 (6)
	53 - 67	IEPYTGPGNNPVFPV	1/31 (3)
	89 - 103	WLSSSSGPGLPWSSL	0/31 (0)
	120 - 131	FQIPLPKQFQPY	0/31 (0)
	469 - 483	PC(Acm)LFSWGSTSRAAYI	0/31 (0)
	487 - 502	KQILSQRSFPLPPPHK	3/31 (10)
	715 - 728	PSYINTWNGPAYIS	0/31 (0)
	744 - 758	THVPYNPTSSGLVER	0/31 (0)

* Здесь и в табл. 3, 4 приведено отношение числа положительных результатов к общему числу сывороток, в скобках – отношение в процентах.

** В – остаток биотина.

(белковом иммуноблоте и радиоиммунопреципитации). Сыворотка № 27 давала отрицательный результат в ИФА на вирусном лизате культуры C91/PL, однако была положительна в случае использования лизата HTLV-I, выращенного на клеточной линии MT-2. В подтверждающих тестах эта сыворотка взаимодействовала с белками – продуктами генов *gag* (p19, p24, p53) и *env* (gp46, gp68). В качестве отрицательных контролей, не содержащих антител к HTLV-I, использовали 20 сывороток здоровых доноров и 10 сывороток ВИЧ-инфицированных. Результаты реактивности 31 сыворотки, содержащей антитела к HTLV-I, в непрямом ИФА на основе синтетических пептидов структурных белков HTLV-I представлены в табл. 2.

Следует отметить, что все исследования по определению иммунореактивных эпитопов синтетических пептидов [10 - 13], а также эксперименты по идентификации эпитопов gp46, антитела к которым способны нейтрализовать HTLV-I-инфекцию [13, 15 - 17], были выполнены на пептидах,

воспроизводящих фрагменты одной и той же аминокислотной последовательности белка gp46, опубликованной ранее [18]. Важные данные по реактивности специфических сывороток с синтетическими пептидами представлены в работах [11] (27 перекрывающихся пептидов gp46 и 15 gp21) и [14], где использованы 4 пептида белка p19, 13 пептидов gp46 и 8 – gp21. Были найдены линейные эпитопы белка gp46, причем не всегда совпадающие. Для анализа полученных нами данных и причины расхождений в указанных выше работах [11, 14] мы приводим табл. 3, 4, где вместе с нашими результатами представлены данные этих работ.

В непрямом ИФА пептиды (100 - 130), (110 - 130), (118 - 130) белка p19 соответственно взаимодействовали с 100, 100, 80% позитивных сывороток (табл. 3). Биотинилированный пептид 118 - 130 реагировал с 84% анти-HTLV-I-сывороток. Титры антител позитивных сывороток для этих пептидов показывают наибольшее значение по сравнению с пептидами из *env*- и pol-белков. Наращивание

Таблица 3. Сравнительные данные по реактивности в непрямом ИФА анти-HTLV-1-сывороток с пептидами из области p19 HTLV-1

Пептид	Аминокислотная последовательность				Результат ИФА	Титры антител в ИФА
	100	110	120	130		
	*	*	*	*		
100 - 130	PPPPSSPTHDPPDSDPQIPPPYVEPTAPQVL				31/31 (100)	150 - 4050
110 - 130	PPDSDPQIPPPYVEPTAPQVL				31/31 (100)	150 - 4050
118 - 130	(Bit-GG G)-PPPYVEPTAPQVL				26/31 (84)	100 - 6400
118 - 130	-----PPPYVEPTAPQVL				25/31 (80)	100 - 4050
	Эпитоп					
	110 - 117	Эпитоп				
	118 - 130					
Данные [14]						
100 - 130	PPPPSSPTHDPPDSDPQIPPPYVEPTAPQVL				69/70 (99)	
106 - 130	-----PTHDPPDSDPQIPPPYVEPTAPQVL				58/70 (83)	
114 - 130	эпитетоп	DPQIPPPYVEPTAPQVL			58/70 (83)	
120 - 130	100 - 105	-----PYVEPTAPQVL			53/70 (76)	
	эпитетоп					
	114 - 119	эпитетоп				
	120 - 130					

аминокислотных остатков с N-конца пептида 118 - 130 белка p19 до 110 - 130 приводит к увеличению антигенных свойств (80 и 100% положительно реагирующих сывороток соответственно). Дальнейшее увеличение длины фрагмента до 100 - 130 не приводит к изменению числа положительно реагирующих анти-HTLV-I-сывороток. Полученные в наших экспериментах результаты по реактивности пептида 100 - 130 коррелируют с данными работ [14, 19] (99 и 100% положительно реагирующих сывороток соответственно), однако расходятся с результатами [14], где увеличение длины фрагмента от 106 - 130 до 100 - 130 приводило к повышению числа положительно реагирующих сывороток от 83 до 99%. Вероятно, область 100 - 110 белка p19 не имеет существенного значения для формирования В-клеточного эпитопа, хотя ранее также были получены противоречивые результаты: 22% (2/9) положительно реагирующих анти-HTLV-I-сывороток с пептидом 102 - 115 [10] и 91% (79/87) с пептидом 102 - 111 [20]. Наши результаты позволяют предположить наличие двух различных линейных эпитетопов на участке 110 - 130 белка p19, расположенных в областях 110 - 117 и 118 - 130.

В табл. 4 представлены четыре области аминокислотной последовательности белка gp46 HTLV-I. Два синтетических пептида, 140 - 155 и 145 - 158, соответствующих фрагменту gp46-(140 - 162), обладают очень слабой реактивностью (10 и 13% соответственно), причем реагирующие сыворотки имеют очень низкие титры антител к этим пептидам. Возможно наличие слабореактивного эпитетопа в области 145 - 158. Доля сывороток, положительно реагирующих с перекрывающимися

пептидами 191 - 215, 186 - 201, 174 - 197, 165 - 181 фрагмента gp46-(165 - 215), составляет 84, 74, 45 и 6% соответственно. Наибольшие титры антител (до 4050) обнаружены для пептида 186 - 201. Наши данные позволяют выделить два линейных эпитетопа в районах 174 - 185 и 186 - 201 белка gp46.

Сопоставление с результатами, полученными в работах [11, 14], показывает, что количество положительно реагирующих с пептидом 176 - 201 сывороток уменьшается по мере его укорачивания с C-конца - 90 (176 - 201), 73 (176 - 199), 45 (174 - 197) и 0% (172 - 194). Таким образом, основная последовательность, формирующая эпитетоп, вероятно, лежит в области 195 - 201. Увеличение длины пептида 186 - 201 до 186 - 209 делает последний, по данным работы [14], полностью нереактивным. Возможно, с удлинением пептида сильно меняется пространственная конфигурация эпитетопа в области 186 - 201. С другой стороны, данные по количеству положительно реагирующих сывороток, полученные в работе [14] для пептида 190 - 209 (0%), сильно отличаются от аналогичных результатов, представленных для этого пептида другими авторами - 43% [11] (из 97 HTLV-I-позитивных сывороток 26 получены от бессимптомных носителей, 25 от больных Т-клеточной лимфомой взрослых и 46 от больных ХАМ/ТСП), а также 100% (17/17) [12] (с сыворотками от больных ХАМ/ГСП). Это позволяет предположить, что большие различия в числе HTLV-I-позитивных сывороток, положительно реагирующих с пептидами из области 186 - 209 белка gp46, могут быть связаны с различиями в формировании панели сывороток, при этом возможно, что наличие антител, взаимодействующих с этими пептидами,

Таблица 4. Окончание

Пептид	Аминокислотная последовательность					Результат ИФА	Титры антител в ИФА
223 - 243 230 - 252 242 - 257 246 - 266	* YTCIVCIDRASLSTWHVLYSP DRFSLSTWHVLYSPNVSVPSSSS SPNVSVPSSSSTPLLY SPVSSSSTPLLYPSLALPAPH	230 * 243 * 252 * 257 * 266	243 * 252 * 257 * 266	243 * 252 * 257 * 266	243 * 252 * 257 * 266	1/31 5/31 12/31 17/31 (3) (16) (39) (55)	50 50 - 100 50 - 800 50 - 450
272 - 292 278 - 292	эпитетоп 247 - 260	272	278	292	*	NWTHCFDPQIQAIVSSPCHNS --- DPQIQAIVSSPCHNS эпитетоп 272 - 277	16/31 0/31 (52) (0)
Данные [4] 230 - 251 230 - 257 242 - 257	DRASLSTWHVLYSPNVSVPSSSS DRASLSTWHVLYSPNVSVPSSSSTPLLY SPNVSVPSSSSTPLLY	230 230 242	251 257 257	230 251 257 257	230 251 257 257	21/70 13/70 (30) (19) (0)	50 - 450
278 - 292 301 - 316	эпитетоп в области 230 - 257	278	292	301	*	79/97 8/83 8/91 0/6 0/33 54/97 (81) (24) (89) (0) (0) (56)	50
Данные [1] 224 - 244 235 - 257 240 - 262 258 - 280 261 - 283 274 - 296	YTCIVCIDRASLSTWHVLYSP LSTWHVLYSPNVSVPSSSSTPLLY VLYSPNVSVPSSSSTPLLYPSLA YPSLALPAPHLTLPPNWTHCFDP LPAPHLTLPPNWTHCFDPQIQ WTHCFDPQIQAIVVSPPHNSLL --- эпитетоп 231 - 237 255 - 260	224 235 240 258 261 274	244 257 262 280 283 296	224 235 240 258 261 274	224 235 240 258 261 274	79/97 8/83 8/91 0/6 0/33 54/97 (81) (24) (89) (0) (0) (56)	50
278 - 292 280 - 303 291 - 312	эпитетоп 282 - 288	278	292	301	*	DPQIQAIVSSPCHNS --- SPVPTLGSSRSRAVPV эпитетоп 293 - 300	0/31 2/31 (0) (6)
Данные [1] 274 - 296 287 - 311 292 - 314	QIQAIVSSPCHNSLLPPFSLSPV NSLLPPFSLSPVPTLGSRSRR WTHCFDPQIQAIVSSPCHNSLL SSPCHNSLLPPFSLSPVPTLGSRSRR --- NSLLPPFSLSPVPTLGSRSRR эпитетоп 282 - 289	274 287 292	296 311 314	274 287 296 311 314	274 287 296 311 314	19/70 37/70 (27) (53)	50

связано с диагнозом и/или стадией заболевания, вызываемого HTLV-I.

Центральный фрагмент аминокислотной последовательности gp46-(223 - 292) с достаточно высокими титрами противовирусных антител к наиболее реактивным пептидам представлен в табл. 4. Обнаруженное число сывороток, положительно реагирующих с пептидом 242 - 257 (39%), существенно отличается от данных работы [14] - 0%. Ранее [15] была продемонстрирована 100%-ная (52/52) реактивность пептида gp46-(242 - 257) HTLV-I с сыворотками HTLV-I-инфицированных и показано, что эта последовательность формирует основной иммунодоминантный эпипот оболочки HTLV-I, у которого полностью отсутствует перекрестная реактивность с сыворотками HTLV-II-инфицированных. Согласно этим данным, пептид gp46-(191 - 215) HTLV-I связывает 92% (48/52) анти-HTLV-I- и 8.5% (3/35) анти-HTLV-II-сывороток. Это дает основание считать наши результаты по реактивности пептида 242 - 257 более достоверными.

В области 223 - 292 белка gp46 нами выделены два эпипота - 247 - 260 и 272 - 277. Сопоставление наших данных о реактивности двух пептидов C-концевого фрагмента - gp-(247 - 260) и gp-(278 - 316) (0 и 6% положительно реагирующих сывороток соответственно) с данными работ [14, 11] (табл. 4) позволяет предположить наличие еще одного эпипота в области 293 - 301 либо важность этого участка для формирования пространственной структуры эпипотов 282 - 289 и 308 - 314, обнаруженных в работе [11].

Синтетические пептиды, имитирующие фрагменты pol-белка HTLV-I, обладают очень слабой реактивностью с сыворотками (табл. 2). Из 7 исследованных пептидов только 2 (482 - 502 и 53 - 67) взаимодействовали с 10 (3/31) и 3% (1/31) сывороток, причем кратность превышения уровня величины cut off для этих сывороток оказалась не более 2.5 (для сравнения: 22-кратное превышение уровня cut off для ряда сывороток с пептидом p19-(110 - 130) и 15-кратное превышение с пептидом gp46-(186 - 201)).

Таким образом, в результате проведенных исследований 4 пептидов последовательности белка p19, 15 пептидов - gp46 и 7 пептидов pol-области HTLV-I установлено, что высокоспецифической реактивностью с анти-HTLV-I-сыворотками обладают синтетические пептиды 110 - 130 и 100 - 130 белка p19 (титры до 4050), пептиды 174 - 197 (титр до 800), 186 - 201 (титр до 4050), 191 - 215 (титр до 1350) и 242 - 257 (титр до 800), 272 - 292 (титр до 450) белка gp46. Реактивность пептидов, соответствующих pol-области HTLV-I, слабо выражена.

Как известно, один из HTLV-I-нейтрализующих эпипотов локализован на участке 191 - 196

белка gp46 [16]. Более того, была установлена способность этого пептида вызывать образование HTLV-I-нейтрализующих антител у кроликов и наличие в человеческой анти-HTLV-I-сыворотке антител, реактивных с пептидом 191 - 196 или близких к нему (187 - 200) [16]. Эта область соответствует пептиду 186 - 201 белка gp46, для которого нами получено высокое число (74%) положительно реагирующих сывороток и наибольшие титры антител из всех исследованных в данной работе пептидов белка gp46 (до 4050). Часть сывороток (8/31) не содержала антител к пептиду 186 - 201, причем в двух сыворотках полностью отсутствовали антитела к пептидам белка gp46. В связи с этим интересно исследовать, на какой стадии HTLV-I-инфекции у инфицированных появляются антитела к эпипоту gp46-(186 - 201), а также изучить, существует ли корреляция между титрами антител к этому пептиду и клиникой заболевания, вызванного HTLV-I.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сыворотки от пациентов с HTLV-I-инфекцией (31 образец), положительные в коммерческом тесте агглютинации "Serodia HTLV-I" (Fujirebio inc) и в тесте иммунофлуоресценции (табл. 1) были любезно предоставлены д-ром Нишиока из Службы Красного Креста (Япония). Все сыворотки исследованы нами на наличие антител к HTLV-I в непрямом ИФА и в подтверждающих тестах - иммуноблоте и радиоиммунопреципитации.

В качестве контрольных образцов, отрицательных на содержание антител к HTLV-I, при постановке ИФА на основе синтетических пептидов использовали 20 сывороток здоровых доноров и 10 сывороток ВИЧ-инфицированных пациентов из коллекции Центра ВОЗ по СПИД НИИ вирусологии РАМН.

Твердофазный ИФА на основе вирусного лизата

При постановке твердофазного непрямого ИФА на основе вирусного лизата HTLV-I разрушенный ультразвуком, очищенный вирус, полученный из культуральной жидкости вируспродуцирующих клеточных линий MT2 и C91/PL, сорбировали на твердую fazу в течение 12 - 16 ч при 4°C в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4 (ФСБ), содержащем 70% этилового спирта. Свободные участки твердой fazы блокировали раствором 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в ФСБ с 0.1% твин-20. Образцы сывороток инкубировали 1 ч в разведении 1 : 100 при 37°C. В планшеты вносили конъюгат кроличьих антител против иммуноглобулинов человека с пероксидазой. В качестве субстрата использовали орто-фенилендиамин. Результаты регистрировали спектрофотометрически при длине волн 492 нм. Для

интерпретации результатов вычисляли величину cut off по формуле $\text{cut off} = 2.4 \times A_{\text{cp}}$ (A_{cp} – среднее значение оптического поглощения для 10 сывороток, не содержащих антител к HTLV-I). Испытуемую сыворотку считали положительной, если соответствующее ей оптическое поглощение больше величины cut off. За титр антител в ИФА принимали максимальное разведение сыворотки, при котором значение оптического поглощения для данного разведения сыворотки еще превышало величину cut off.

Белковый иммуноблот

При проведении белкового иммуноблota в качестве источника белков HTLV-I использовали смесь лизатов вируспродуцирующих клеток C91/PL и суспензии вируса, полученной концентрированием вируса в течение 2 ч из культуральной жидкости культуры C91/PL при 100000g и 4°C. Электрофорез проводили в 10% ПААГ, содержащем додецилсульфат Na, по методу Laemmli [21]. Разделенные белки переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану методом полусухого электрофоретического переноса. Мембрану блокировали в течение 2 ч при 20 °C раствором 5% обезжиренного молока и 10% лошадиной сыворотки в ФСБ, содержащем 0.1% твин-20. Стрипсы инкубировали 16 - 18 ч при 4°C с сыворотками в разведении 1 : 40, а затем с конъюгатом кроличьих антител против иммуноглобулинов человека с пероксидазой. Сыворотки считали положительными, если они содержали антитела как к структурным белкам гена gag (p19 и/или p24), так и к гликопротеинам оболочки, кодируемым геном env (gp46 или gp61/68).

Тест радиоиммунопреципитации

При постановке радиоиммунопреципитации образцы сывороток инкубировали с ^{125}I -меченными вирусными белками HTLV-I. Предварительно вирус, содержащийся в культуральной жидкости после культивирования клеточной линии MT-2, концентрировали с помощью ультрацентрифугирования и очищали в градиенте концентрации сахараозы (20 - 60%) согласно методике, описанной ранее [22]. Иммунные комплексы, образовавшиеся после инкубации сывороток с ^{125}I -меченными вирусными белками, связывали протеин-A-сепарозой (фирмы Pharmacia) и после отмычки пробы анализировали методом электрофореза по Laemmli [21] с последующим авторадиографированием.

Синтетические пептиды

Синтетические пептиды воспроизводят фрагменты аминокислотной последовательности структурных белков HTLV-I [18]. Для предсказания вероятных антигенных детерминант (B-эпипотов) были проанализированы белки, кодируемые генами env, gag и pol HTLV-I. Были рассчитаны профи-

ли гидрофильности [23], антигенности [24], подвижности основной цепи [25] и вероятная вторичная структура. В качестве кандидатов в B-эпипоты рассматривались фрагменты белков, которым соответствовали максимальные пики профилей и участки с вероятным образованием β-изгибов. В случае оболочечных белков исключались из рассмотрения места возможного N-гликозилирования.

Пептиды были синтезированы твердофазным методом на автоматическом синтезаторе Milligen/Bioscience 9600 (США) с использованием аминокислот. Для защиты трифункциональных аминокислот использовали группы бензильного типа. Карбоксильные группы C-концевых остатков были заменены на амидные как более соответствующие пептидной связи в белковой цепи. Деблокирование пептидов осуществляли обработкой жидким фтороводородом с различными добавками. Очищали пептиды с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Индивидуальность синтетических пептидов была доказана данными аминокислотного анализа, масс-спектрометрическими (методом FAB) и аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ.

ИФА на основе синтетических пептидов

Пептиды в концентрациях 10 мкг/мл сорбировали 16 - 18 ч при 4°C на планшеты "Costar" для ИФА в бикарбонатном буфере, pH 9.6. Свободные участки твердой фазы блокировали 2% раствором BSA в ФСБ с 0.1% твин-20 (1 ч, 37°C). Образцы сывороток инкубировали 2 ч при 37°C в разведении 1 : 50. В планшеты вносили конъюгат пероксидазы и кроличьих антител против иммуноглобулинов человека (фирмы "Диа-М"), в качестве субстрата использовали орто-фенилендиамин. Для интерпретации результатов вычисляли величину cut off, используя распределение Стьюдента с n степенями свободы:

$$\text{cut off} = \bar{x} + t_w \frac{\sigma}{\sqrt{n}}; \quad \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}},$$

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i,$$

где x_i – значения оптического поглощения для сывороток, не содержащих антител к HTLV-1; n – число сывороток, t_w – квантиль для распределения Стьюдента уровня $w = 0.99$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Yoshida M., Miyoshi I., Hinuma Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 2031 - 2035.
- Gessain A., Vernant J.C., Maurs L., Barin F., Geur O., Calender A., de The G. // Lancet. 1985. V. 2. P. 407 - 410.

3. Osame M., Usuku K., Izumo S., Ijishi N., Amitani H., Igata A., Matsumoto M., Tara M. // Lancet. 1986. V. 1. P. 1031 - 1032.
4. Murphy E.L., Hanchard B., Figueroa J.P., Gibbs W.N., Lofters W.C., Campbell M., Goldert J.J., Blattner W.A. // Int. J. Cancer. 1989. V. 43. P. 250 - 253.
5. Quroff R., Faney K.A., Maeda M., Nakao Y., Ito Y., Qallo R.C. // Virology. 1982. V. 122. P. 297 - 305.
6. Kalyanazarman V.S., Sarngadharan M.Q., Bunn P.A., Minna J.D., Qallo R.C. // Nature. 1981. V. 294. P. 271 - 280.
7. Schneider J., Yamanoto N., Hinuma Y., Hunsmann Q. // Virology. 1984. V. 132. P. 1 - 11.
8. Lee T.M., Coligan J.E., Homona T., McLane M.F., Tachibana N., Essex M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 3856 - 3860.
9. Lee T.M., Coligan J.E., Sodorski J.Q., Haseltine W.A., Salahuddin S.Z., Wong-Staal F., Qallo R.C., Essex M. // Science. 1984. V. 226. P. 57 - 61.
10. Palker T.J., Scearce R.M., Copeland T.D., Oroszlan S., Haynes B.F. // J. Immunol. 1986. V. 136. P. 2393 - 2397.
11. Horal P., Hall W.W., Svennerholm B., Lycke J., Jeansson S., Rymo L., Kaplan M.H., Vahlne A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 5754 - 5758.
12. Jacobson S., Reuben J.S., Streilein R.D., Palker T.J. // J. Immunol. 1991. V. 146. P. 1155 - 1162.
13. Kuroki M.K., Nakamura N., Itoyama Y., Tanaka Y., Shiraki H., Baba E., Esaki T., Tatsumoto T., Nagabushi S., Nakano S., Nino Y. // J. Immunol. 1992. V. 149. P. 940 - 948.
14. Расули А.М., Клепиков Н.Н., Андреев С.М., Сидорова М.В., Вафина М.Г., Сеннета М.Б., Павлыши О.А., Сырцев А.В., Гурцевич В.Э. // Молекулярная биология. 1993. Т. 27. С. 880 - 887.
15. Lal R.B., Rudolf D.L., Lairmore M.D., Khabbaz R.F., Qarfield M., Coligan J.E., Folks T.M. // J. Infect. Dis. 1991. V. 163. P. 41 - 46.
16. Tanaka Y., Zeng L., Shiraki H., Shida H., Tozawa H. // J. Immunol. 1991. V. 147. P. 354 - 360.
17. Ralston S., Hoeprich P., Akita R. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 16343 - 16346.
18. Seiki M., Hattori S., Hirayama Y., Yoshida M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 3618 - 3622.
19. Kuroda N., Washitani Y., Shiraki H., Kiyokawa H., Ohno M., Sato H., Maeda Y. // Int. J. Cancer. 1990. V. 45. P. 865 - 868.
20. Lal R.B., Rudolf D.L., Griffis K.P., Kitamura K., Honda M., Coligan J.E., Folks T.M. // J. Virol. 1991. V. 65. P. 1870 - 1876.
21. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680 - 685.
22. Карапов Э.В., Лукашов В.В., Слепушкин А.А., Чаплинская С.А., Горбачева А.П., Руднева И.В. // Иммунология. 1992. С. 15 - 18.
23. Hopp T.P., Woods K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 3824 - 3828.
24. Welling G.W., Weijer W.J., van der Zee R., Welling-Wester S. // FEBS Lett. 1985. V. 188. P. 215 - 218.
25. Karplus P.A., Schulz G.E. // Naturwissenschaften. 1985. V. 120. P. 97 - 120.

Detection of Immunoreactive Epitopes in Proteins Encoded by *gag*, *env*, and *pol* Genes of Human T-Lymphotropic Virus Type I Using Synthetic Peptides

N. G. Yaroslavtseva*, V. S. Ivanov**, Zh. O. Grebennikova**,
 G. V. Kornilaeva*, T. A. Pashkova*, L. D. Chikin**, A. G. Ostrovskii**,
 S. M. Andreev***, R. M. Khaitov***, and E. V. Karamov*¹

* Ivanovskii Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Gamalei 16, Moscow, 123181 Russia

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

*** Institute of Immunology, Ministry of Public Health, Moscow, Russia

Abstract – Reactivity of 26 synthetic peptides that comprise 12 to 26 amino acid residues corresponding to segments of the *gag* p19, *env* gp46, and *pol* proteins of human T-lymphotropic virus type I toward 31 positive sera was studied using enzyme-linked immunosorbent assay. Specific reactivity with high titers of antibodies (presented in reciprocal dilution values) was detected for the synthetic peptides corresponding to fragments 110 - 130 and 100 - 130 (titers up to 4050) of p19, 174 - 197 (up to 800), 186 - 201 (up to 4050), 191 - 215 (up to 1350), 242 - 257 (up to 800), and 272 - 292 (up to 450) of gp46. Immunoreactivity of seven peptides, fragments of pol-proteins, was weak. New linear epitopes in the regions 145 - 158, 272 - 277, and 292 - 300 of gp46 were detected. In addition, location of the known linear epitopes in p19 and gp46 was refined on the basis of comparative study of overlapping peptides from these proteins.

Key words: human T-lymphotropic virus type I, structural proteins, synthetic peptides, immunoreactive epitopes, epitope mapping.

¹ To whom correspondence should be addressed.