



УДК 577.332.083.3

ФАГОВЫЕ МИМОТОПЫ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К Ca^{2+} -АТФ-азе ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

© 1996 г. Н. Б. Пестов, Т. В. Гусакова, М. Б. Костина, М. И. Шахпаронов[#]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 09.02.96 г.

Проведен скрининг библиотек случайных пентадека- и гексапептидов, экспрессированных на поверхности бактериофага, против четырех моноклональных антител (МА) к Ca^{2+} -АТФ-азе плазматических мембран человека. В результате отбора получены фаги, специфически связывающиеся с антителами, и определены аминокислотные последовательности экспрессированных пептидов (мимотопов). Мимотопы трех антител (8В8, 2D8, F9) не могут быть соотнесены с каким-либо участком последовательности Ca^{2+} -АТФ-азы плазматических мембран. Пентадекапептиды для МА 7С8 имеют определенное сходство с участком $\text{Glu}^{1097}\text{-Arg}^{1113}$, входящим в сайт связывания кальмодулина. Однако не удалось продемонстрировать связывание МА 7С8 с рекомбинантным фрагментом $\text{Leu}^{1069}\text{-Leu}^{1220}$. Таким образом, вопрос о реальной структуре этого эпитопа остается открытым. Данная работа является первым этапом исследования, посвященного изучению топографии Ca^{2+} -АТФ-азы плазматических мембран при помощи моноклональных антител и метода фагового дисплея.

Ключевые слова: Ca^{2+} -АТФ-аза, бактериофаг, белковая экспрессия, мимотоп, моноклональные антитела, ПЦР, фаговый дисплей, эпитоп.

Ca^{2+} -АТФ-аза плазматических мембран (далее Ca^{2+} -АТФ-аза) – интегральный мембранный белок, транспортирующий ионы кальция за пределы клетки. Фермент активируется кальмодулином, а также при ограниченном протеолизе – трипсином или кальпаином [1]. Объектом пристального изучения является трансмембранная организация этого белка, содержащего 1200 а. о. Наибольший прогресс в этой области достигнут благодаря применению моноклональных антител. Так, Адамс с соавт. [2] локализовали эпитопы нескольких МА при помощи ИФА делеционных мутантов Ca^{2+} -АТФ-азы (с точностью $\pm 50\text{--}100$ а. о.).

В другом случае эпитоп МА локализовали, проанализировав аминокислотные последовательности протеолитических фрагментов Ca^{2+} -АТФ-азы, реагирующих с МА. Ориентацию этого эпитопа в нативном ферменте определяли по связыванию ^{125}I -меченых антител с интактными клетками и инвертированными мембранными пузырьками [3]. Благодаря этим исследованиям теоретически предложенная модель укладки полипептидной цепи

Ca^{2+} -АТФ-азы подтверждена для участка 1–783, в то время как топография участка 783–1070 остается малоисследованной.

В последнее время широкое развитие получил новый метод быстрого скрининга больших библиотек белков и пептидов – фаговый дисплей [4, 5]. Обычно для этих целей используют нитчатый бактериофаг, который позволяет встраивать в N-концевую часть минорного белка оболочки рIII как короткие пептиды [6–8], так и белки различной длины (например, антитела [9, 10]). Фаги, составляющие библиотеку, инкубируют с исследуемым веществом (обычно иммобилизованным на твердой фазе) и связавшиеся фаги амплифицируют в клетках *E. coli*. Как правило, проводят несколько туров отбора, после чего определяют нуклеотидные последовательности вставок.

Среди разнообразных применений фагового дисплея весьма привлекательным оказалось определение с высокой точностью эпитопов МА. Для этого использовали случайные библиотеки пептидов [11–20] или библиотеку фрагментов исследуемого белка [21].

В данной работе для характеристики четырех МА против Ca^{2+} -АТФ-азы [22] был использован фаговый дисплей библиотек случайных гекса- или пентадекапептидов (любезно предоставлены проф. Дж. Смитом [6]). В разных турах отбора

Сокращения: РМСА – Ca^{2+} -АТФ-аза плазматических мембран; МА – моноклональное антитело; ФСБ – фосфатно-солевой буфер, pH 7.4; ФСБТ – ФСБ + твин-20 (10 г/л); ФСБА – ФСБ + азид натрия (0.2 г/л); БСА – бычий сывороточный альбумин.

[#] Автор для переписки.

F9	Число клонов	2D8	Число клонов
LLLSSP	1	WRLWDL	1
FALLVE	1	WEVWDL	1
FAIIVE	1	G DVWDP	1
WALLR	1	WEVWAL	2
SFACIV	1		
PFAYVV	1	RACPRDFFDPFCKVL	5
DGLPFAIRPLMLWLA	1	WDΘΩDL консенсус	
RNSAVYPSVPFSFVV	2		
консенсус PFAΘΘV			
8B8		7C8	
IRARFL	1	FRGAF L	2
DVTVVD	1	YRGVFL	1
DKRYVD	1	WRGVFF	1
DKRSVS	1	WRGPF S	1
YNDGRCVSCIGARRA	1	RAVYAH	1
YNDGRCVTCIGCSSA	1		
HLCTSSDK_PVIRFRD	1	WRDPFLSIGSNRH	5
HLCSSCDK_PVIRFRD	1		
VDGRPLFHNFVAVRSS	1		
консенсус DKRPVIRXR		ΩRGVFL консенсус	

Рис. 1. Аминокислотные последовательности, выведенные из нуклеотидных последовательностей вставок клонов, отобранных в процессе фагового дисплея. Указано количество идентифицированных клонов. Жирным шрифтом отмечены аминокислотные остатки, совпадающие не менее чем в 2/3 клонов (без учета их частоты). В консенсусы также включены остатки, встречающиеся в более чем 1/3 клонов (курсив). Θ – гидрофобные остатки (C, F, I, L, M, V, W, Y), Ω – ароматические (F, W, Y).

применялись различные варианты методики: связывание фагов с МА, иммобилизованными на твердой фазе – планшетах для ИФА (первый тур); инкубация фагов с МА в растворе с последующим связыванием антител с иммобилизованным белком А (второй тур); взаимодействие фагов с биотинилированными МА и связывание со стрептавидином (третий тур). В первом и втором турах дополнительно проводился отрицательный отбор с использованием смеси МА, отличных от исследуемого. Разнообразие процедур отбора в разных турах и отрицательный отбор были необходимы для того, чтобы исключить отбор фаговых клонов, связывающихся не с паратопами МА, а с их

константными доменами, веществами для блокирования неспецифической сорбции (например, БСА), собственно материалом планшетов и т. д.

Результаты титрования фагов в процессе отбора (таблица) свидетельствуют о том, что отрицательный отбор исключает незначительную долю клонов. Возможно, что в фаговых библиотеках вообще отсутствуют клоны, хорошо связывающиеся с константными доменами иммуноглобулинов.

Для всех МА были определены последовательности вставок нескольких клонов из последнего тура отбора (четвертый тур для пентадекапептидов и третий для гексапептидов соответственно) (рис. 1). Во всех случаях можно вывести

Титрование бактериофагов в процессе отбора (единицы трансдукции)*

МА	1-й тур			2-й тур			3-й тур		4-й тур	
	in	out1	out2	in	out1	out2	in	out	in	out
F9	1 × 10 ¹⁰	5 × 10 ⁶	2 × 10 ⁶	2 × 10 ⁹	3 × 10 ⁵	3 × 10 ⁵	8 × 10 ⁸	1 × 10 ⁴		
8B8	1 × 10 ¹⁰	6 × 10 ⁵	1 × 10 ⁵	2 × 10 ⁹	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁵	6 × 10 ⁸	4 × 10 ⁵	2 × 10 ⁷	9 × 10 ⁵
2D8	1 × 10 ¹⁰	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁵	2 × 10 ⁹	9 × 10 ⁵	9 × 10 ⁵	1 × 10 ⁹	3 × 10 ⁵	3 × 10 ⁷	2 × 10 ⁵
7C8	1 × 10 ¹⁰	3 × 10 ⁵	3 × 10 ⁵	2 × 10 ⁹	5 × 10 ⁵	5 × 10 ⁵	2 × 10 ⁹	1 × 10 ⁴	3 × 10 ⁷	3 × 10 ⁵
7C8 по альтернативному методу	1 × 10 ¹⁰	2 × 10 ⁷		3 × 10 ¹⁰	5 × 10 ⁵		5 × 10 ¹⁰	2 × 10 ⁸		

* in – количество введенных фагов; out1 – получено фагов, связавшихся с антителом; out2 – количество фагов после отрицательного отбора.

	Число клонов	Примечание
hPMCA1b -- R -----		
hPMCA4 D M E L R R G Q I L W F R G L N R		
Клон 7 Q S S A G Q L L V F R S S S R	1	“Положительные”
Клон 1 W R D P F L G S I G S N R N H	5	
Клон 6 W R G V F I T G C M V L I V W	1	“Отрицательные”
Клон 8 A R E Y G T R F S L I G G Y A	1	

Рис. 2. Аминокислотные последовательности вставок клонов, отобранных по альтернативной методике фагового дисплея против антитела 7C8, и соотнесение с последовательностью Ca²⁺-АТФ-азы. Указано количество идентифицированных клонов. Жирным шрифтом отмечены остатки, совпадающие с Ca²⁺-АТФ-азой.

консенсус, общий для гекса- и пентадекапептидов. Интересно, что взаимозаменяемыми могут быть такие остатки, как Leu и Ile, Gly и Lys, Asp и Gly, Arg, Glu и Asp. В случае MA 7C8 и 2D8 все вставки, соответствующие идентифицированным 15-членным пептидам, были одинаковыми.

К сожалению, в аминокислотной последовательности Ca²⁺-АТФ-азы (анализировались последовательности изоформ Ca²⁺-АТФ-азы hPMCA1b и hPMCA4, содержащихся в эритроцитах человека [1]) не было обнаружено участков, которые можно недвусмысленно соотнести с фаговыми мимотопами всех четырех антител (учитывалось также, что идентифицированные пептиды находятся в составе белка рIII – ADGAN₆₋₁₅GAAGA...). Таким образом, на первый взгляд нельзя сделать обоснованного заключения о природе взаимодействия антитело–Ca²⁺-АТФ-аза.

Чтобы проверить, не являются ли полученные результаты артефактами (например, из-за биотинилирования МА), а также исключить возможность пропуска положительных клонов в первом туре отбора, был проведен повторный эксперимент по фаговому дисплею с одним из антител, выбранных наугад (7C8), и библиотекой 15-членных пептидов. В работе [23], где описана систематическая оптимизация условий фагового дисплея, отмечалось, что в первом туре выделение всех позитивных клонов может быть затруднено. Авторы обнаружили, что для мягкого отбора в первом туре лучше всего подходит вариант методики с использованием лиганда, иммобилизованного на агарозе. Поэтому в повторном эксперименте мы сначала инкубировали МА с фагами, а затем с протеин-G-агарозой и амплифицировали фаги, связавшиеся с ней. Действительно, отношение исходного и конечного титра фагов сравнительно невысоко (таблица, “7C8 по альтернативному методу”), что обеспечивает полный отбор положительных клонов в первом туре. Последующие (второй и третий) туры в данном случае были проведены с МА на твердой фазе.

После каждого тура альтернативного эксперимента колонии бактерий, инфицированных фагом, анализировали при помощи иммуноблоттинга. В исходной библиотеке положительных клонов не обнаружено (<0.2%). После первого тура отбора их количество достигло 0.4%, после второго – 90%, после третьего – 78%. Таким образом, происходит быстрый отбор клонов, положительных на иммуноблоте. Принимая во внимание скорость отбора позитивных клонов, общее разнообразие библиотеки пентадекапептидов можно оценить как 10⁷ при условии равной представленности клонов. Кроме того, во всех случаях совпадения выведенной аминокислотной последовательности совпадала также и нуклеотидная последовательность вставок. Таким образом, использованная библиотека имела меньший размер, чем по оценке при ее получении (10⁸ [6]), так как в общей сложности она была подвергнута трем амплификациям.

На рис. 2 показаны аминокислотные последовательности вставок “положительных” и “отрицательных” клонов, а также их соотнесение со структурой Ca²⁺-АТФ-азы. Важно отметить, что две различные процедуры фагового дисплея дают сходный результат (рис. 1 и клон 1 на рис. 2), но только благодаря иммуноблоттингу с колоний идентифицирован положительный клон 7, без которого было бы невозможно сделать указанное соотнесение. Интересно, что и “отрицательные” клоны имеют некоторые черты сходства с “положительными”. Во всех пептидах наблюдается определенное структурное сходство с показанным участком последовательности Ca²⁺-АТФ-азы (1097–1113 для hPMCA1b и 1083–1099 для hPMCA4). Каждый пептид совпадает с последовательностью Ca²⁺-АТФ-азы частично, взаимно дополняя друг друга. Возможно, это отражает кооперативность связывания отдельных участков 7C8 с Ca²⁺-АТФ-азой. Необходимо подчеркнуть, что этот участок входит в сайт связывания кальмодулина [24].

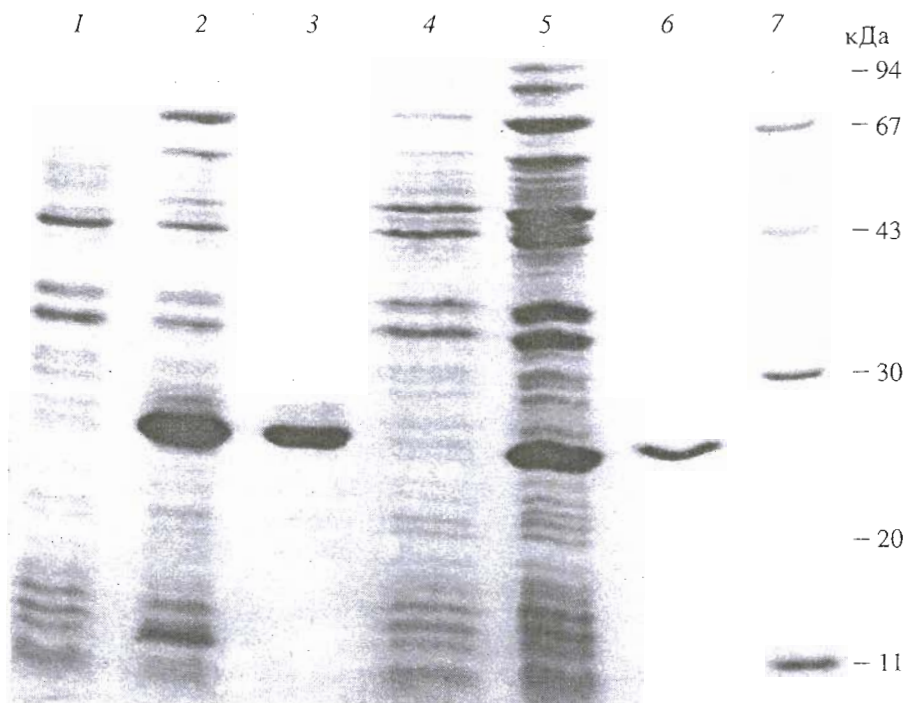


Рис. 3. Белковая экспрессия кДНК, соответствующих С-концевым фрагментам Ca^{2+} -АТФ-азы. 1 – белки *E. coli* до индукции экспрессии hPMCA4; 2 – после индукции; 3 – очищенный фрагмент hPMCA4; 4–6 – аналогично для hPMCA1b; 7 – стандарты молекулярной массы.

Чтобы увидеть, не является ли структурное сходство выведенных пептидных последовательностей с указанным участком случайным, а также для анализа реактивности различных изоформ осуществлена белковая экспрессия кДНК, соответствующей С-концевым фрагментам Ca^{2+} -АТФ-азы плазматических мембран человека (изоформы hPMCA1b (Leu¹⁰⁶⁹–Leu¹²²⁰) и hPMCA4 (Leu¹⁰⁵⁷–Leu¹²⁰⁵)). Электрофореграмма белков *E. coli* до и после индукции, а также очищенных металлоаффинной хроматографией продуктов (рис. 3) показывает, что они имеют аномальную подвижность в системе Лэммли (26 кДа вместо расчетных 18.5 кДа). Выход очищенного белка составил 12 и 3.6 мг с 1 г биомассы для изоформ hPMCA4 и hPMCA1b соответственно. Слот-блот-ИФА полученных белков с МА 7С8 и кальмодулином (рис. 4) свидетельствует о том, что последний хорошо реагирует с этими белками; следовательно, продукты экспрессии функционально полноценны. Однако взаимодействия МА 7С8 с этими фрагментами не было выявлено.

Кроме того, были предприняты попытки исследовать возможность влияния кальмодулина на связывание МА 7С8 и Ca^{2+} -АТФ-азы в ИФА, а также на связывание ¹²⁵I-меченого антитела с препаратом плазматических мембран (тенями эритроцитов). В обоих случаях не было замечено существенного эффекта (результаты не показаны), т.е. кальмодулин и МА 7С8 не конкурируют за взаимодействие как с очищенной Ca^{2+} -АТФ-азой, так и с ферментом в нативной мембране. Поэтому совпадение последовательностей фаговых пептидов и Ca^{2+} -АТФ-азы (рис. 2) либо следует считать кажущимся, либо этот эпитоп только

ны), т.е. кальмодулин и МА 7С8 не конкурируют за взаимодействие как с очищенной Ca^{2+} -АТФ-азой, так и с ферментом в нативной мембране. Поэтому совпадение последовательностей фаговых пептидов и Ca^{2+} -АТФ-азы (рис. 2) либо следует считать кажущимся, либо этот эпитоп только

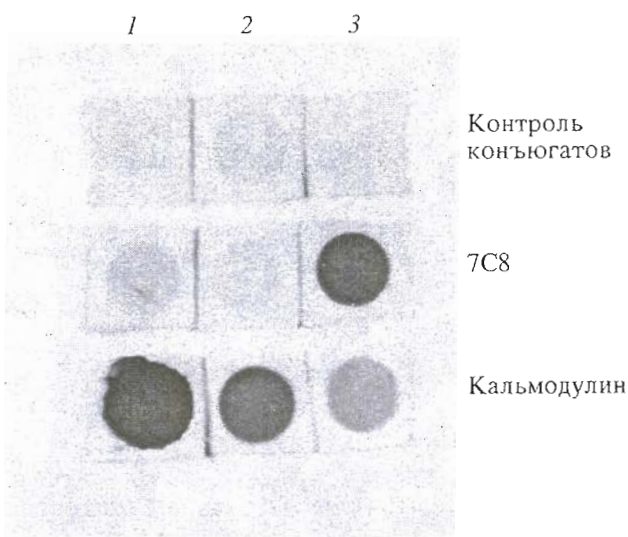


Рис. 4. Слот-блот-ИФА С-концевых фрагментов hPMCA1b (1), hPMCA4 (2) и Ca^{2+} -АТФ-азы эритроцитов человека (3).

в какой-то специфической конформации доступны для антитела.

Таким образом, в результате скрининга библиотек гекса- и пентадекапептидов методом фагового дисплея против четырех МА были получены фаги, специфически связывающиеся с антителами. Это в очередной раз раскрывает возможности фагового дисплея для быстрого поиска пептидов, способных реагировать с тем или иным веществом.

Почему фаговые мимотопы МА в одних случаях соотносятся с аминокислотной последовательностью исходного антигена [6, 11, 12, 15–20], а в других – нет (данная работа, [6, 12, 17, 19, 20])?

Прежде всего, эпитопы МА могут иметь интегральную природу, т.е. быть образованными из двух участков первичной структуры. В таком случае любые идентифицированные пептиды только имитируют оригинальный эпитоп, определение которого представляет собой нетривиальную задачу. В качестве примера можно привести работу [13], в которой удалось объяснить результаты скрининга фаговой библиотеки против МА к Н-субъединице ферритина только благодаря тому, что трехмерная структура этого белка уже была известна.

Возможности используемых в настоящее время вариантов фагового дисплея также лимитированы рядом факторов:

1) ограниченное разнообразие библиотек длинных пептидов;

2) влияние белка оболочки рIII, прежде всего соседних аминокислотных остатков, на конформацию вставки. Это хорошо видно для большинства мимотопов МА 7С8 и 2D8 (рис. 1), в которых идентичные аминокислоты занимают одинаковое положение. Здесь также интересно отметить, что консенсус пептидов для 7С8 (рис. 1) присутствует в самом белке оболочки рIII (FRGVFA);

3) некоторые пептиды могут связываться с антителом лучше, чем пептиды с последовательностью, идентичной натуральному эпитопу;

4) мультивалентность используемого варианта фагового дисплея: в бактериофаге примерно пять копий минорного белка оболочки. Например, в одном случае показано [16], что антитело связывается с синтетическим пептидом, соответствующим фаговому мимотопу, только если этот пептид синтезирован в виде “разветвленного” полимера;

5) образование дисульфидных связей в белке рIII при образовании фаговых частиц в периплазме *E. coli*.

Для дальнейшей характеристики используемых в данной работе МА мы планируем в будущем применить фаговый дисплей библиотеки фрагментов кДНК Са²⁺-АТФ-азы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали тетрациклин (Boehringer-Mannheim, Австрия), протеин-А-сефарозу (Pharmacia, Швеция), протеин-G-агарозу, диаминобензидин, PEG 8000, набор для очистки ДНК “NucleiClean”, конъюгаты пероксидазы хрена с антимышиным IgG и стрептавидином (Sigma, США), БСА (Serva, Германия), желатин (Bio-Rad, США), NTA-Ni-агарозу, плазмидный вектор pQE30 и штамм SG13009[pREP4] (QIAGEN, США), ДНК-полимеразу фага Т4 (Amersham, Великобритания). Другие реактивы – отечественного производства. Коровье молоко обезжиривали при помощи центрифугирования (20000g, 1 ч). Анализ аминокислотных и нуклеотидных последовательностей выполняли при помощи пакета программ “DNASTAR”.

Са²⁺-АТФ-азу эритроцитов человека и кальмодулин выделяли как описано [25]. Олигонуклеотиды синтезированы Н.С. Быстровым (ИБХ РАН, Москва).

Мышиные моноклональные антитела против Са²⁺-АТФ-азы эритроцитов человека [22] выделяли из асцитных жидкостей при помощи хроматографии на протеин-А-сефарозе.

Биотинилирование МА и кальмодулина. К 300 мкг белка в 0.75 мл 0.1 М NaHCO₃ добавляли 1 мг пентафторфенилового эфира биотина в 10 мкл DMF и перемешивали 14 ч, добавляли 0.75 мл 4 М гидрохлорида 2-аминоэтанола (рН 9.1). Через 2 ч обессоливали гель-фильтрацией на сефадексе G25 в ФСБ (кальмодулин диализовали против 0.1 mM CaCl₂).

Для фагового дисплея за основу взяты рекомендации проф. Дж. Смита [26]. В первом туре антитела разводили ФСБА до 0.5 мг/мл и инкубировали в течение ночи в 2–4 лунках планшетов для ИФА (Flow) при 4°C (здесь и далее инкубационный объем – 100 мкл на лунку). Затем инкубировали 1 ч с 10 г/л БСА в ФСБ, промывали ФСБТ и добавляли в ФСБТ фаги, составляющие библиотеку. После 4 ч инкубации при встряхивании при комнатной температуре быстро промывали 10 раз ФСБТ; наливая и сразу же выливая раствор, и элюировали связавшиеся фаги инкубацией в течение 10 мин в 0.1 М цитрате натрия (рН 2.2), содержащем 1 г/л БСА и фенолового красный (10 мг/л). Элюат собирали и нейтрализовали добавлением незабуференного раствора трис (200 г/л) до бледно-красной окраски. Затем элюат инкубировали последовательно по 1 ч в трех лунках, на которых была иммобилизована смесь всех указанных в данной работе МА, за исключением того, против которого в этот момент проводился скрининг (отрицательный отбор). Элюатом инфицировали свежеприготовленную культуру клеток K91kan, выращенную до величины A₆₀₀ 1.4–1.7 в среде

“Terrific broth” [27], в течение 10 мин при комнатной температуре без перемешивания. Смесь переносили в избыточный объем среды LB с канамицином (50 мкг/мл), инкубировали на качалке (35 мин при 37°C), добавляли тетрациклин до концентрации 20 мкг/мл и растили в течение ночи. Количество фагов определяли титрованием единиц трансдукции [6]. Выделение и очистку фагов из культуральных супернатантов производили при помощи двукратного осаждения полиэтиленгликолем [27].

Для второго тура отбора в лунках иммобилизовали протеин А (100 мкг/мл), после промывки ФСБ обрабатывали смесью молока с ФСБТ (1 : 9). Фаги из первого тура в смеси молоко-ФСБТ (1 : 9) инкубировали со смесью разных МА (50 мкг/мл), а затем по 1 ч последовательно в двух лунках с протеином А при 4°C. Добавляли интересующие МА (50 мкг/мл), инкубировали 1 ч при комнатной температуре и 2 ч в лунках с протеином А при 4°C. Лунки промывали ФСБТ, фаги элюировали и амплифицировали так же, как и в первом туре.

Для третьего тура биотинилированные МА (конечная концентрация 30 мкг/мл) инкубировали 6 ч при 4°C с фагами из второго тура в ФСБ, содержащем 0.2 мг/мл тритона X-100 и 0.5 мг/мл желатина, и переносили в лунки с закрепленным стрептавидином (2 мкг на лунку с послеиммобилизационной обработкой желатином (0.5 мг/мл)). После 20 мин инкубации лунки промывали, фаги амплифицировали и выделяли так же, как в первом туре. Колонии инфицированных бактерий отбирали наугад, выращивали в 2 мл среды LB с тетрациклином (20 мкг/мл), выделяли одноцепочечную ДНК [27] и секвенировали с использованием ³²P-меченого праймера TGAATTTTCTGTA-TGAGG и набора “Sequenase version 2.0 sequencing kit” (Amersham) по рекомендациям производителя.

Альтернативный протокол фагового дисплея. МА (250 мкг) инкубировали 20 ч при 4°C в 3 мл ФСБ с фагами, составляющими библиотеку. К смеси добавляли 25 мкл суспензии протеин-G-агарозы и перемешивали 3 ч. Сорбент осаждали низкоскоростным центрифугированием, промывали 2 раза 1 мл ФСБ и элюировали связавшиеся фаги 10 мин при комнатной температуре. Элюат нейтрализовали и использовали для инфицирования клеток *E. coli*. Второй и третий туры проводили так же, как первый тур в предыдущем протоколе скрининга. Чашки с колониями, инфицированными фагами, использовали для иммуноблоттинга на нитроцеллюлозных фильтрах по стандартной методике [27].

Белковая экспрессия и анализ фрагментов ДНК, соответствующих С-концевым фрагментам Са²⁺-АТР-азы. Амплификацию ДНК, кодирующей С-концевые фрагменты Са²⁺-АТР-азы,

проводили при помощи ПЦР с праймерами FC1 (ATCGCTCAAAGAAGCTGGTCAT), BC1 (ATCGTCAGAGTGATGTTTCCAA) (для изоформы hPMCA1b) и FC4 (ATCGCTGAAGGAGGCTGGG-CAT), BC4 (ATCGTTAAACTGATGTCTCTAG) (для изоформы hPMCA4) и матрицами pMM2-16 [28] и p12.1 [29] (для изоформ hPMCA1b и hPMCA4 соответственно), любезно предоставленными проф. Э. Стрелером. Продукты амплификации очищали при помощи набора NucleiClean, обрабатывали ДНК-полимеразой фага T4 в присутствии dCTP, снова чистили на NucleiClean и лигировали с вектором для экспрессии pQE30, расщепленным BamHI и обработанным ДНК-полимеразой Taq в присутствии dGTP. Полученной плазмидой трансформировали клетки SG13009 [pREP4]. Скрининг колоний, содержащих вставку в правильной ориентации, осуществляли при помощи ПЦР с праймерами BC1 (или BC4) и GAATTCAT-TAAAGAGGAGAAA (прямой праймер для секвенирования). Нарботку и очистку белка осуществляли по рекомендациям фирмы-производителя с некоторыми модификациями. Клетки *E. coli* выращивали при 37°C в среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и канамицин (50 мкг/мл), до величины A₆₀₀ 0.6–0.7; добавляли изопропил-β-D-тиогалактопиранозид до концентрации 1 мМ и инкубировали еще 3 ч. Клетки осаждали центрифугированием и перемешивали 2 ч при комнатной температуре с буфером А (6 М гуанидин-НСl, 10 мМ трис-НСl, 100 мМ Na-фосфат, 2 мМ β-меркаптоэтанол, рН 8.0) из расчета 10 мл на 1 г биомассы. Лизат центрифугировали 30 мин при 35000g, супернатант инкубировали 30 мин с NTA-Ni-агарозой (1 мл на 1 г биомассы) и наносили на фильтр с пористой пластинкой, промывали буфером А (10 мл/г) и буфером В (8 М мочевины, 10 мМ трис, 100 мМ Na-фосфат, 2 мМ β-меркаптоэтанол, рН 6.3), затем белок элюировали буфером В, содержащим 250 мМ (5 мл/г) имидазол, и диализовали против ФСБ. Электрофорез белков в ПААГ проводили как описано [30]. Раствор наносили на нитроцеллюлозную мембрану при помощи аппарата для слот-блота из расчета 10 мкг белка на лунку и высушивали на воздухе. Мембрану обрабатывали ФСБ с 1% молоком, инкубировали с МА или биотинилированным кальмодулином в ФСБ с 50 мкМ MgCl₂ и 50 мкМ CaCl₂, затем с конъюгатами пероксидазы с антимышиными антителами или стрептавидином соответственно, проявляли диаминобензидином [27].

Авторы выражают признательность Дж. Смитту за предоставленные фаговые библиотеки и рекомендации по их использованию, Н.С. Быстрову за синтез олигонуклеотидов и Н.Н. Модянову за плодотворное обсуждение работы.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 95-04-13297а и 95-04-12245а), International Science Foundation (M4N000) и Министерства науки (программа "Белковая инженерия").

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carafoli E. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 2115–2118.
2. Adamo H.P., Caride A.J., Penniston J.T. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 14244–14249.
3. Feschenko M.S., Zvaritch E.I., Hofmann F., Shakhparonov M.I., Modyanov N.N., Vorherr T., Carafoli E. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 4097–4101.
4. Gallop M.A., Barrett R.W., Dower W.J., Fodor S.P.A., Gordon E.M. // *J. Med. Chem.* 1994. V. 37. P. 1233–1251.
5. Fink L.M., Hsu P.-L. // *Virchows Arch.* 1994. V. 424. P. 1–6.
6. Scott J.K., Smith G.P. // *Science.* 1990. V. 249. P. 386–390.
7. Devlin J.J., Panganiban L.C., Devlin P.E. // *Science.* 1990. V. 249. P. 404–406.
8. Cwirla S., Peters E.A., Barrett R.W., Dower R.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. P. 6378–6382.
9. McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J. // *Nature.* 1990. V. 348. P. 552–554.
10. Johnson K.S., Chiswell D.J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1993. V. 3. P. 564–571.
11. Germaschewski V., Murray K. // *J. Med. Virol.* 1995. V. 45. P. 300–305.
12. Sun Y., Ball W.J., Jr. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1994. V. 1207. P. 236–248.
13. Luzzago A., Felici F., Tramontano A., Pessi A., Cortese R. // *Gene.* 1993. V. 128. P. 51–57.
14. Miceli R.M., DeGraaf M.E., Fischer H.D. // *J. Immunol. Meth.* 1994. V. 167. P. 279–287.
15. Stephen C.W., Lane D.P. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 225. P. 577–583.
16. Yao Z.-J., Kao M.C.C., Loh K.-C., Chung M.C.M. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1995. V. 127. P. 93–98.
17. Stephen C.W., Helminen P., Lane D.P. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 248. P. 58–78.
18. Böttger V., Böttger A., Lane E.B., Spruce B.A. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 247. P. 932–946.
19. McConnell S.J., Kendall M.L., Reilly T.M., Hoess R.H. // *Gene.* 1994. V. 151. P. 115–118.
20. Böttger V., Stasiak P.S., Harrison D.L., Mellerick D.M., Lane E.B. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 231. P. 475–485.
21. Wang L.-F., Du Plessis D.H., White J.R., Hyatt A.D., Eaton B.T. // *J. Immun. Meth.* 1995. V. 178. P. 1–12.
22. Фещенко М.С., Зварич Е.И., Шахпаронов М.И., Модянов Н.Н. // *Биол. мембраны.* 1991. Т. 8. С. 1237–1247.
23. Kretzschmar T., Zimmermann C., Geiser M. // *Anal. Biochem.* 1995. V. 224. P. 413–419.
24. James P., Maeda M., Fischter R., Verma A.K., Krebs J., Penniston J.T., Carafoli E. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 2905–2910.
25. Penniston J.T., Filoteo A.G., McDonough C.S., Carafoli E. // *Meth. Enzymol.* 1988. V. 157. P. 340–360.
26. Smith G.P., Scott J.K. // *Meth. Enzymol.* 1993. V. 217. P. 228–257.
27. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
28. 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.
29. 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.
30. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.

Phage Mimotopes for Monoclonal Antibodies Against Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase

N. B. Pestov, T. V. Gusakova, M. B. Kostina, and M. I. Shakhparonov

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

Abstract.—Libraries of random phage-displayed pentadeca- and hexapeptides were screened with the use of four monoclonal antibodies against the human plasma membrane Ca²⁺-ATPase. Bacteriophages specifically binding the antibodies were selected, and the amino acid sequences of the expressed peptides (mimotopes) were determined. Mimotopes for three antibodies (8B8, 2D8, F9) did not correspond to the Ca²⁺-ATPase sequence. Pentadecapeptides for the 7C8 antibodies displayed similarity to the fragment Glu¹⁰⁹⁷-Arg¹¹¹³ of the Ca²⁺-ATPase calmodulin-binding site. However, these antibodies failed to bind recombinant fragment Leu¹⁰⁶⁹-Leu¹²²⁰, therefore, the structure of this epitope remains obscure. This work opens a series of studies of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase structure by means of monoclonal antibodies and the phage display method.

Key words: Ca²⁺-ATPase, bacteriophage, protein expression, mimotopes, monoclonal antibodies, polymerase chain reaction, phage display, epitope.