



УДК 577.112.083.3

## СОХРАНЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ ФРАГМЕНТА Val69–Gly72 БАКТЕРИОРОДОПСИНА ПРИ ЕГО ФУНКЦИОНИРОВАНИИ

© 2002 г. В. С. Пашков\*#, Т. Ю. Мареева\*, Т. А. Балашова\*, А. А. Вычалковский\*,  
Л. В. Самохвалова\*, Л. К. Байдакова\*\*, И. Л. Родионов\*\*, В. А. Несмеянов\*

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

117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\*\* Филиал Института биоорганической химии

им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино Моск. обл.

Поступила в редакцию 29.03.2001 г. Принята к печати 19.06.2001 г.

Изучено воздействие моноклонального антитела (МА) 5В6, продуцированного к солюбилизированному препарату бактериородопсина, на фотоцикл этого белка с целью исследования конформационных перестроек поверхности молекулы бактериородопсина при его функционировании. Методами твердофазного иммуоферментного анализа, пептидного фагового дисплея и спектроскопии <sup>1</sup>H-ЯМР установлено, что эпитоп, распознаваемый МА 5В6, образован участком Val69-Pro-Phe-Gly72, во взаимодействии с антителом участвуют ароматическое кольцо остатка Phe71 и метильные группы остатка Val69. Показано, что МА 5В6 не оказывает существенного влияния на фотоцикл солюбилизованного в Тритоне X-100 бактериородопсина при pH 6.2 и 7.4, что свидетельствует о сохранении конформации и положения фрагмента Val69-Pro-Phe-Gly72 бактериородопсина при его функционировании.

*Ключевые слова:* бактериородопсин; фотоцикл; моноклональные антитела; эпитопный анализ; пептидный фаговый дисплей; ЯМР.

### ВВЕДЕНИЕ

Бактериородопсин (BR) – основной белковый компонент пурпурной мембраны *Halobacterium salinarium* [1]. Благодаря уникальным свойствам и относительно легкой доступности BR привлек внимание многих исследователей (см. обзоры [2–5]), занимавшихся как изучением непосредственно BR, так и использовавших его как модель при разработке новых методов исследования мембранных белков [6].

BR – хромопротеид, состоящий из 248 а.о. (ретинальный хромофор присоединен через основание Шиффа к аминогруппе остатка Lys216). Этот белок использует энергию света для транспорта протонов через мембрану. Цикл протонного транспорта, осуществляемого BR, сопровождается изменениями абсорбции ретинального хромофора, отвечающими образованию и исчезновению по крайней мере пяти отчетливо выраженных промежуточных состояний (K, L, M, N, O) [7]. Высокое разрешение (1.55–2.0 Å), достигнутое для кристаллов, выращенных в кубической липидной фазе, позволило получить детальную информа-

цию о конформации молекулы BR в основном состоянии [8] и на начальной стадии фотоцикла [9], а также определить пространственное строение молекулы мутанта бактериородопсина Asp96Asn в основном состоянии и в состоянии M [10].

Был предложен [10] механизм функционирования молекулы BR в первой половине фотоцикла, в ходе которой происходит депротонирование ретиналя и выброс протона во внеклеточную среду (основное состояние, интермедиаты K, L, M). Функционирование молекулы BR во второй половине фотоцикла, в ходе которой происходит репротонирование ретиналя и связывание протона цитоплазмы, остается пока менее ясным ввиду отсутствия детальной информации о пространственной структуре соответствующих интермедиатов (интермедиаты N и O) и противоречивости данных, полученных разными физико-химическими методами, о времени и характере конформационных перестроек, протекающих в молекуле BR при функционировании [11–15].

Эффективным инструментом исследования пространственной организации молекулы BR являются моноклональные антитела, продуцированные к этому белку или его фрагментам. Так, моноклональные антитела использовались для картирования поверхности BR [16], распознавания цитоплазматической и внеклеточной поверхностей

Сокращения: МА – моноклональное антитело; BR – бактериородопсин; sBR – бактериородопсин, солюбилизированный в Тритоне X-100.

#Автор для переписки (тел.: (095) 335-27-33; факс: (095) 335-71-03; эл. почта: pavv@nmr.ru).

этого белка [17], определения конформации его N-концевого фрагмента [18].

Цель настоящей работы – исследование с помощью моноклональных антител конформационных перестроек поверхности молекулы BR при ее функционировании. Этот подход основан на том, что в составе комплекса антиген-антитело возможности конформационных перестроек эпитопа и прилегающих к нему участков должны быть существенно ограничены за счет высокоаффинного и стереоспецифичного взаимодействия с антителом. Если функционирование BR сопряжено с конформационными изменениями эпитопа, то в комплексе бактериородопсина со специфичным моноклональным антителом будет наблюдаться нарушение механизма функционирования BR. Если же функционирование BR не сопровождается конформационными перестройками эпитопа и прилегающих к нему участков, антитело не будет оказывать воздействия на функционирование BR.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве объекта исследования в настоящей работе использовался солюбилизованный в Тритоне X-100 препарат бактериородопсина (sBR). Правомерность использования препарата sBR для проведения исследований основывается на гидродинамических и оптических данных, согласно которым в данном препарате бактериородопсин находится в мономерной форме, сохраняя свою нативную структуру и фотореакционный цикл [19], а также функциональные свойства [20].

К препарату sBR с помощью стандартной технологии (см. “Эксперимент. часть”) был получен ряд гибридом. Эти гибридомы были тестированы методом твердофазного ИФА на связывание с синтетическим пептидом LGYGLTMVPGGEQN-NH<sub>2</sub> (пептид bc1), отвечающим фрагменту 62–76 бактериородопсина. Согласно рентгеноструктурным данным [8], этот участок полипептидной цепи бактериородопсина (петля BC), соединяющий трансмембранные сегменты B и C, экспонирован

в окружающую среду. Результаты тестирования гибридных клонов, полученных к sBR, методами ИФА и конкурентного ИФА позволили выявить клон 5B6, продуцирующий моноклональное антитело (MA 5B6), распознающее пептид bc1.

Анализ спектров <sup>1</sup>H-ЯМР смесей пептида bc1 и MA 5B6 показал, что MA 5B6 с высокой аффинностью связывает bc1, образуя комплекс, в котором скорость обмена пептида между состояниями – связанным с антителом и свободным, мала (практически неуширенные сигналы свободного пептида появлялись на фоне широких сигналов антитела и/или комплекса пептид-антитело лишь при соотношениях [bc1]/[MA 5B6] > 2). Анализ ядерного эффекта Оверхаузера, возникшего в комплексе bc1–MA 5B6 и перенесенного на сигналы свободного пептида в результате диссоциации комплекса (перенесенный ЯЭО [21]), показал, что ароматическое кольцо единственного в пептиде остатка Phe71 контактирует с поверхностью антитела.

Для определения эпитопной специфичности MA 5B6 был использован метод фагового дисплея. В результате трех раундов аффинной селекции было отобрано 14 фаговых клонов, специфично взаимодействующих с MA 5B6. Анализ последовательностей ДНК этих клонов позволил выявить шесть неидентичных нуклеотидных вставок, отвечающих четырем аминокислотным последовательностям (табл. 1), характерной особенностью которых является наличие остатка Phe (присутствует во всех четырех последовательностях) и следующего за ним остатка Gly (отсутствует лишь в одной последовательности (1)). Остаток Pro70, предшествующий остатку Phe71 в аминокислотной последовательности петли BC, не был обнаружен ни в одной из четырех выведенных аминокислотных последовательностей (табл. 1). Его место занимали гидрофобные аминокислотные остатки, содержащие метильные радикалы (Val, Ile или Ala). Таким образом, результаты, полученные с помощью метода пептидного фагового дисплея, согласуясь с данными спектроскопии ЯМР относительно роли остатка Phe71 во взаимодействии с

**Таблица 1.** Аминокислотные последовательности, выведенные из нуклеотидных последовательностей кодирующих фрагментов вставок фаговых клонов, специфичных к MA 5B6 (№ 1–4), и структура пептида bc2

Номер последовательности	Аминокислотная последовательность*	Число клонов
1	L I – <u>F</u> C V R T V L E X X X X X	1
2	V V I F F E M S L R L V – <u>F</u> G A	2
3	L Q T V – <u>F</u> G V R T Y S N V R P	2
4	G P A – <u>F</u> G L R X X X X X X X X	1
bc2	M V P <u>F</u> G G E Q	–

\* Последовательности выравнены относительно остатка фенилаланина пептида bc2; X отвечает положением, для которых анализ нуклеотидных последовательностей ДНК фаговых клонов не был завершен.

МА 5В6, свидетельствуют о том, что в состав эпитопа входит также остаток Gly72.

Результаты определения эпитопной специфичности МА 5В6 послужили основанием для синтеза более короткого пептида MVPFGGEQ-NH<sub>2</sub> (пептид bc2), соответствующего фрагменту 68–75 бактериородопсина. В этом пептиде остаток Phe71 находится примерно в середине его аминокислотной последовательности. С его помощью мы предполагали методом спектроскопии <sup>1</sup>H-ЯМР уточнить структуру эпитопа, распознаваемого МА 5В6.

Отнесение сигналов пептида bc2 в спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР (табл. 2) было осуществлено на основе DQF-COSY, NOESY и ROESY-спектров раствора bc2 в смеси <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O/<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O = 9/1 с использованием стандартных процедур [22]. Значения констант спин-спинового взаимодействия <sup>3</sup>J<sub>HN-C<sup>α</sup>H</sub> (табл. 2) свидетельствуют о том, что в водном растворе пептид bc2 имеет неупорядоченную конформацию.

Исследование спектров <sup>1</sup>H-ЯМР показало, что, как и для пептида bc1, переход пептида bc2 из связанного с МА 5В6 в свободное состояние и обратно происходит медленно, однако темп этого процесса у пептидов bc1 и bc2 различен. Косвенным подтверждением более быстрой диссоциации пептида bc2 из комплекса с МА 5В6 по сравнению с пептидом bc1 являются меньшее сродство пептида bc2 к МА 5В6, вытекающее из его более низкой способности к ингибированию взаимодействия МА 5В6 с sBR (рис. 1), а также большие величины перенесенного ЯЭО, наблюдавшегося на сигналах пептида bc2. Вследствие низкого темпа диссоциации комплекса МА 5В6–bc2 величины перенесенного ЯЭО, наблюдавшегося на сигналах свободного пептида, оказались малы и, следовательно, трудно детектируемы на фоне интенсивных сигналов от протонов комплекса МА 5В6–bc2. По этой причине для регистрации пере-

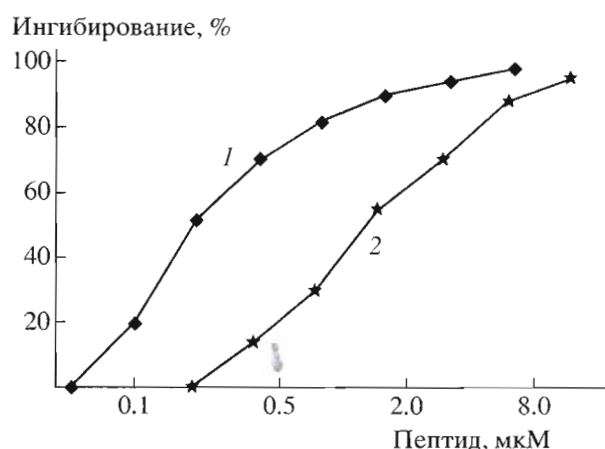


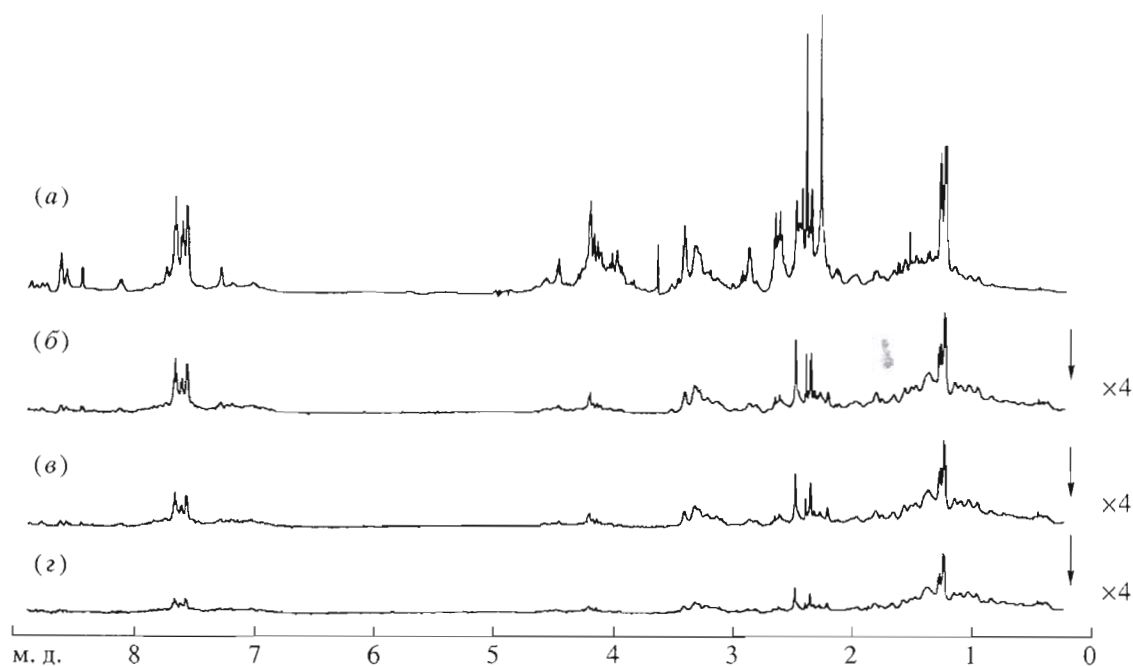
Рис. 1. Конкурентное ингибирование взаимодействия МА 5В6 с sBR в присутствии пептида bc1 (1) и bc2 (2).

несенного ЯЭО использовалась модифицированная импульсная последовательность, позволяющая устранять из спектров ЯЭО быстро релаксирующие широкие сигналы (см. “Эксперимент. часть”, импульсная последовательность (1)).

Спектры ЯЭО смеси пептида bc2 и моноклонального антитела МА 5В6 представлены на рис. 2. Максимальные сигналы в спектрах ЯЭО, наблюдающиеся для протонов ароматического кольца остатка Phe71 (7.34–7.44 м.д.) и метильных групп остатка Val69 (0.98–1.03 м.д.) свидетельствуют о контакте этих групп с протонами антигенсвязывающего центра МА 5В6 (рис. 2, табл. 3). Меньшие величины ЯЭО для сигналов других аминокислотных остатков (табл. 3) показывают, что соответствующие протоны находятся на больших расстояниях от протонов антитела в комплексе МА 5В6–bc2, близкие величины ЯЭО и большие ошибки их измерения не позволяют подразделить эти группы по степени контакта с протонами ан-

Таблица 2. Химические сдвиги и КССВ протонов пептида bc2 в смеси <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O/<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (9/1), pH 3.9, 30°C

Аминокислотный остаток	δ, м.д.					<sup>3</sup> J <sub>HN-C<sup>α</sup>H</sub>
	HN	C <sup>α</sup> H	C <sup>β</sup> H	C <sup>γ</sup> H	Другие	
Met68		4.22	2.19	2.62	C <sup>ε</sup> H <sub>3</sub> 2.14	
Val69	8.56	4.54	2.12	0.98, 1.03		8.1
Pro70		4.42	1.88, 2.25	2.02	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> 3.71, 3.89	
Phe71	8.28	4.60	3.16		C <sup>δ1,2</sup> H 7.34 C <sup>ε1,2</sup> H 7.44 C <sup>ζ</sup> H 7.37	6.4
Gly72	8.36	3.91				5.6, 5.8
Gly73	7.91	3.96				6.0, 6.1
Glu74	8.32	4.39	2.03, 2.16	2.49		7.1
Gln75	8.44	4.34	2.02, 2.16	2.40	N <sup>ε2</sup> H <sub>2</sub> 7.10, 7.57	7.6
-NH <sub>2</sub>					NH <sub>2</sub> 6.83, 7.50	



**Рис. 2.** Спектр сравнения (а) и увеличенные в четыре раза спектры ЯЭО, в которых сигналы от протонов комплекса МА 5В6–bc2 насыщались в течение  $t_1 = 1.5, 0.7$  и  $0.3$  с (б, в, г, соответственно) дополнительным радиочастотным полем. Стрелки показывают место приложения насыщающего радиочастотного поля. Концентрации МА 5В6 и bc2 составляют соответственно  $0.2$  и  $1.0$  мМ, рН  $4.9$ ,  $40^\circ\text{C}$ .

титела. Заслуживает внимания тот факт, что для одной из метильных групп остатка Val69 величина перенесенного ЯЭО существенно больше, чем для другой метильной группы этого остатка (табл. 2). Этот результат хорошо согласуется с данными пептидного фагового дисплея, согласно которым (табл. 1), место, соответствующее положению остатка Val69, может занимать гидрофобный аминокислотный остаток, содержащий одну метильную группу (табл. 1, последовательность номер 4). Таким образом, данные пептидного фагового дисплея и величины перенесенного ЯЭО, взаимно согласуясь и дополняя друг друга, свидетельствуют о том, что эпитоп, распознаваемый

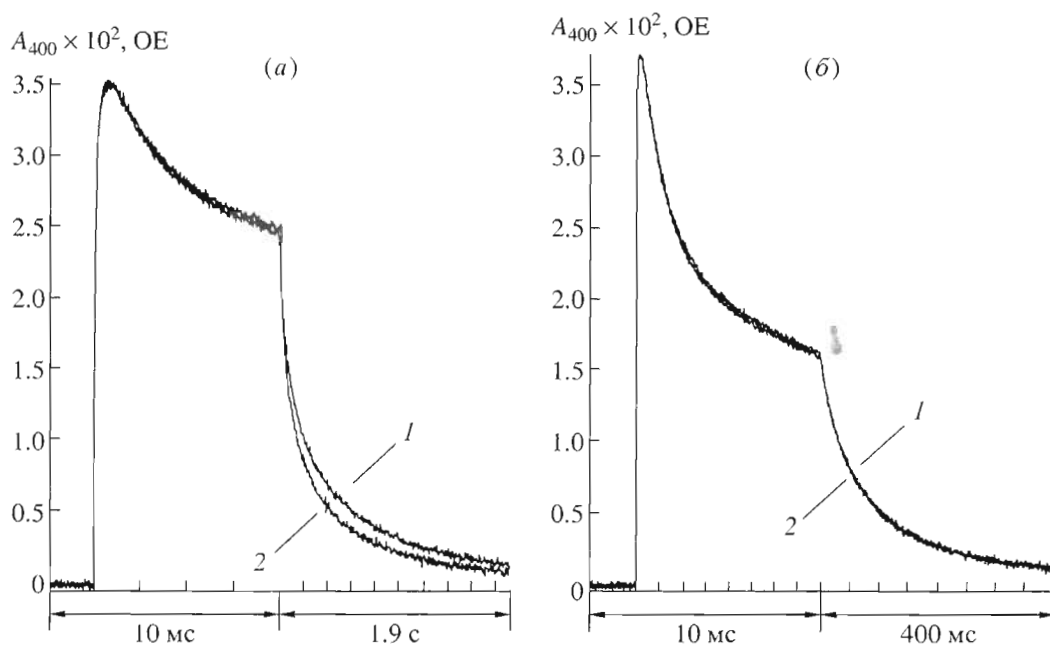
МА 5В6, образован остатками Val69-Pro-Phe-Gly72 и что в связывании с антителом участвуют ароматическое кольцо остатка Phe71 и метильные группы остатка Val69, причем одна из метильных групп вносит более существенный вклад в связывание с МА, чем другая.

Согласно рентгеноструктурным данным [8], в BR, находящемся в основном состоянии, остаток Gly72 располагается в изгибе антипараллельной  $\beta$ -структуры, а фрагмент Val69-Pro-Phe71 входит в состав одной из ветвей этой  $\beta$ -структуры, причем ароматическое кольцо остатка Phe71 и метильные группы остатка Val69 экспонированы в окружающую среду и пространственно сближе-

**Таблица 3.** Перенесенный ЯЭО ( $100 \times (I_{F1} - I_{F2})/I_{F1}$ )\*, наблюдавшийся на сигналах свободного пептида bc2 при облучении радиочастотным полем сигналов от протонов комплекса bc2–МА 5В6 ( $0.18$  м.д.) в течение времени  $t_1$  [МА 5В6]/[bc2] =  $1/5$ , рН  $4.9$ ,  $40^\circ\text{C}$

$t_1, \text{c}$	Met68	Val69		Phe71			Gly73	Gly72	Glu74, Gln75	Glu74	Gln75	Gln75		
	$\text{C}^\epsilon\text{H}_3$	NH	$\text{C}^{\gamma 1,2}\text{H}_3$		NH	$\text{C}^{\delta 1,2}\text{H}$	$\text{C}^{\epsilon 1,2}\text{H}$	$\text{C}^\zeta\text{H}$	$\text{C}^\alpha\text{H}_2$	NH	NH	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$	$\text{N}^{\epsilon 21}\text{H}$
0.3 с	0.6	5.8	4.7	8.8	2.5	3.0	3.2	1.4	1.4	3.3	1.3	1.1	1.5	2.3
0.7 с	2.2	10.2	7.6	12.6	4	8.1	7.8	5.5	3.6	7.3	3.7	2.4	2.9	3.8
1.5 с	5.5	11.9	9.6	15.1	5.8	14.4	14.2	9.4	5.7	6.1	5.1	4.2	4.7	5.6

\*  $I_{F2}$  – интенсивность сигнала протонов свободного пептида при облучении радиочастотным полем сигналов протонов комплекса пептид-антитело;  $I_{F1}$  – интенсивность сигнала пептида в спектре сравнения (радиочастотное поле прикладывалось к свободному от сигналов краю спектра).



**Рис. 3.** Кинетика фотоиндуцированных изменений оптической плотности на длине волны 400 нм sBR (4.8 мкМ), инициированных импульсом лазера, в отсутствие (2) и в присутствии 5.4 мкМ антитела МА 5В6 (1), при рН 7.4 (а) и рН 6.2 (б), 19°C.

ны. Такое строение участка Val69-Pro-Phe-Gly72 хорошо согласуется с результатами определения эпитопной специфичности МА 5В6 и свидетельствует о том, что данное антитело распознает BR, находящийся в основном состоянии.

Как уже отмечалось в разделе “Введение”, молекула BR при функционировании претерпевает конформационные перестройки, сопровождающиеся изменениями абсорбции ретиналя. Это обстоятельство было использовано в настоящей работе для исследования функционирования бактериородопсина в комплексе BR–МА 5В6, в котором изменения положения и конформации фрагмента Val69-Pro-Phe-Gly72 бактериородопсина должны быть существенно ограничены молекулой антитела.

Сопоставление спектров поглощения до и после добавления МА 5В6 к солюбилизованному в Тритоне X-100 бактериородопсину (sBR) показало, что образование комплекса sBR–МА 5В6 не оказывает заметного воздействия на абсорбцию ретиналя. Этот результат согласуется со сделанным выше выводом о том, что МА 5В6 специфично к BR, находящемуся в основном состоянии.

Воздействие МА 5В6 на фотоцикл sBR было исследовано при значениях рН среды, близких к физиологическим (6.2 и 7.4). Результаты этого исследования, приведенные на рис. 3, показывают, что присутствие антитела не приводит к изменению фотоцикла sBR. Исключение составляют лишь его заключительные стадии при рН 7.4, когда присутствие антитела слегка ускоряет релакса-

цию оптических изменений (рис. 3а). Сохранение для фрагмента Val69-Pro-Phe-Gly72 конформации и положения в молекуле BR в первую половину фотоцикла согласуется с данными рентгеноструктурного анализа молекулы мутанта бактериородопсина Asp96Asn [10]. Что касается второй половины фотоцикла BR, то, к сожалению, имеющиеся в литературе сведения позволяют лишь косвенно подтвердить данные настоящей работы. Так, идентичность фотоцикла sBR и комплекса sBR–МА 5В6 при рН 6.2, свидетельствующая об отсутствии конформационных перестроек фрагмента Val69-Gly72 при функционировании BR согласуется с данными спектроскопии ЭПР, согласно которым [23] при функционировании мутанта бактериородопсина Gly72Cys подвижность спиновой метки, введенной на боковую цепь остатка 72, не меняется. Бактериородопсин, у которого в результате обработки папаином был удален фрагмент Met68-Gly72 [24], а также содержащие делеции в петле ВС мутанты бактериородопсина ( $\Delta$ Thr67-Glu74 или  $\Delta$ Gly65-Gln75 [25]), сохраняли способность генерации трансмембранного потенциала под влиянием света. Изменения функциональной активности этих препаратов авторы работы [25] объясняли уменьшением конформационной стабильности мутантов в результате модификации первичной структуры.

Полученные нами данные пока не позволяют однозначно объяснить, почему при рН 7.4 присутствие МА 5В6 вызывает небольшое ускорение заключительных стадий фотоцикла sBR. Возможно,

что этот эффект – следствие изменения приемлемого рН, являющегося результатом связывания указанного антитела с sBR. Не исключено также, что этот эффект обусловлен солюбилизацией бактериородопсина в детергенте. Известно [26, 27], что при рН > 9 молекула бактериородопсина претерпевает щелочной переход, приводящий к увеличению продолжительности существования состояния N. У солюбилизированного в Тритоне X-100 бактериородопсина граница этого перехода смещена в сторону меньших значений рН более чем на две единицы [28]. Возможно, динамические конформационные перестройки молекул sBR в процессе фотоцикла при рН 7.4 имеют более глобальный характер, чем при рН 6.2, и затрагивают петлю BC sBR. Эти изменения будут затруднены в комплексе sBR–МА 5B6, где заключительные стадии фотоцикла протекают несколько быстрее, чем в sBR. Не исключено также, что МА 5B6, взаимодействуя с молекулой бактериородопсина, стабилизирует такую ее конформацию, в которой заключительные стадии фотоцикла протекают несколько быстрее, чем в sBR. Какова бы ни была природа ускорения заключительных стадий фотоцикла sBR в присутствии МА 5B6 при рН 7.4, эти изменения незначительны.

Таким образом, результаты настоящей работы показывают, что фиксация с помощью МА 5B6 конформации и положения в молекуле sBR антигенного эпитопа не оказывает существенного влияния на функционирование молекулы бактериородопсина. Этот факт дает веские основания полагать, что и при функционировании нативной молекулы бактериородопсина конформация и положение в молекуле BR фрагмента Val69-Pro-Phe-Gly72 также остаются неизменными.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: L-аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия и Novabiochem, Швейцария); N-гидроксибензотриазол (HOBT), о-фенилендиамин, N-гидрокси-сукцинимидный эфир биотина, Тритон X-100, 2,4,10,14-тетраметилпентадекан, NEPES, MES (Sigma, США);  $^2\text{H}_2\text{O}$  (Изотоп, Россия); конъюгат кроличьих антител к иммуноглобулинам мыши с пероксидазой хрена (Dakopatts, Дания); желатин, полиэтиленгликоль 6000 (Serva, Германия); 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилмочевину (TBTU) (Novabiochem, Швейцария); n-метилбензгидриламинопластирол (PRF, Япония); N,N'-дициклогексилкарбодиимид (DCC), Твин-20 (Fergak, Германия); N-метилморфолин, HF, нингидрин (Fluka, Швейцария); акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, TEMED, персульфат аммония, кумасси R-250 (Bio-Rad, США); DEAE-целлюлозу DE52 (Whatman, Англия); каприловую кислоту (Applied Biosystems, США); ацетат натрия

двухводный, уксусную кислоту (Pierce, США); глицин, бычий сывороточный альбумин (BSA) (Amersco, США); бактоагар, пептон-140, дрожжевой экстракт (Life Technologies Gibco BRL, Шотландия); 96-луночные планшеты для ИФА (Nunc, Дания).

**Синтез пептидов.** Пептиды Leu-Gly-Tyr-Gly-Leu-Thr-Met-Val-Pro-Phe-Gly-Gly-Glu-Gln-Asn-NH<sub>2</sub> (bc1) и Met-Val-Pro-Phe-Gly-Gly-Glu-Gln75-NH<sub>2</sub> (bc2), соответствующие фрагментам бактериородопсина 62–76 и 68–75, были синтезированы с применением Boc/Bzl-стратегии [29] в проточном твердофазном реакторе с непрерывной регистрацией изменения объема пептидилполимера (светлографический мониторинг), согласно описанному ранее протоколу [30]. В качестве полимерного носителя использовали n-метилбензгидриламинопластирол (нагрузка 0.61 мг-экв. NH<sub>2</sub>/г), а TBTU в присутствии HOBT и N-метилморфолина [31] применяли как конденсирующий агент для всех аминокислот, кроме Boc-Asn и Boc-Arg(Tos), которые присоединяли методом DCC/HOBT [35]. Полноту присоединения каждого аминокислотного остатка контролировали по качественному нингидриновому тесту [32]. Пептиды отщепляли от полимерной подложки жидким фтористым водородом по методике [33] и хроматографировали на колонке с сефадексом G-10 (1.6 × 70 см, элюирование 1 н. АсОН). Все пептиды охарактеризованы данными аминокислотного анализа, используя высокоэффективный аминокислотный анализатор LC 5001 (Biotronik, Германия) и MALDI-TOF-масс-спектрометрии (VISION 2000, Thermo Bioanalysis Corp., Англия).

**Получение МА.** Гибридома 5B6 была получена с помощью стандартной технологии [34] в результате гибридизации спленоцитов мыши, трехкратно иммунизированной препаратом sBR, с клетками миеломы X63Ag8653 и последующего двукратного клонирования методом лимитирующих разведений. Для наработки препаративных количеств МА 5B6 клетки гибридомы вводили внутривенно мышам Balb/c (10<sup>6</sup> клеток на мышь), получившим за 2 недели до этого инъекцию 0.5 мл 2,4,10,14-тетраметилпентадекана. Через 10–20 сут у мышей с хорошо выраженной опухолью проводили отбор асцитной жидкости, осветляли ее центрифугированием (600g, 10 мин). Очистка МА 5B6 (IgG1) осуществлена путем осаждения загрязняющих белков каприловой кислотой с последующей сорбцией остаточных примесей на DEAE-целлюлозе DE-52 [35]. Препараты МА 5B6 концентрировали на мембране Amicon YM-30 до 30 мг/мл, анализировали электрофорезом в 10% SDS-ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях [36], их активность оценивали с помощью твердофазного ИФА.

**Имуноферментный анализ.** Для проведения твердофазного ИФА препарат sBR (2 мкг/мл) в

0.01 М фосфатно-солевом буфере, содержащем 0.15 М NaCl (PBS, pH 7.4), вносили по 50 мкл в лунки 96-луночного микропланшета и высушивали в течение ночи при 37°C. Свободные сайты блокировали добавлением в каждую лунку 200 мкл 0.1% раствора желатина в PBS. После трехкратной отмывки PBS, содержащем 0.05% Твина-20 (PBS-T), планшет последовательно инкубировали по 1 ч с препаратом МА 5В6 в серийных двукратных разведениях и с пероксидазным конъюгатом антител кролика против иммуноглобулинов мыши, разведенным 1 : 1000 в PBS. Планшет отмывали и вносили в лунки по 100 мкл раствора *o*-фенилендиамина (1 мг/мл) в 1% цитратном буфере (pH 4.5), содержащем 0.05% перекиси водорода. Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 100 мкл на лунку 1 М серной кислоты. Интенсивность реакции оценивали по величине оптического поглощения при 492 нм.

При проведении конкурентного твердофазного ИФА препарат sBR сорбировали как описано выше. Затем в лунки микропланшета вносили по 50 мкл раствора пептида bc1 в серийных двукратных разведениях в PBS и по 50 мкл препарата МА 5В6 в PBS в требуемом разведении. Планшет инкубировали 1–1.5 ч при комнатной температуре, отмывали и далее анализ проводили как описано выше для твердофазного ИФА. Степень ингибирования (*I*, %) рассчитывали по формуле:

$$I = 100 \times (A_0 - A_n) / A_0,$$

где  $A_0$  и  $A_n$  – оптическое поглощение при 492 нм образцов, не содержащих и содержащих пептид bc1, соответственно.

**Фаговый дисплей** проводили, используя модифицированную методику Смита [37]. МА 5В6 биотинилировали по методу [38]. В первом раунде селекции в чашку Петри диаметром 35 мм вносили 1 мл 0.1 М NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.6) и 10 мкл раствора стрептавидина в воде (1 мг/мл) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем свободные сайты блокировали раствором BSA (5 мг/мл), содержащим 0.1 мкг/мл стрептавидина (1 ч при 4°C). Чашки отмывали раствором PBS-T шесть раз, наливая и сразу же выливая раствор, и переходили к биоэппинингу. Для этого чашки инкубировали сначала в течение ночи при 4°C с 400 мкл раствора биотинилированного МА 5В6 в PBS-T (20 мкг/мл), а затем с фагами, составляющими библиотеку (10<sup>11</sup> вирионов). После 4 ч инкубации при встряхивании при комнатной температуре чашки отмывали 10 раз PBS-T. Связавшиеся фаги элюировали 400 мкл 0.1 М глицинового буфера, pH 2.2, в течение 10 мин. Элюат собирали и нейтрализовали добавлением 75 мкл 1 М Трис-HCl, pH 9.1. Препарат фага, полученный в ходе первого раунда, инкубировали последовательно на двух чашках Петри, покрытых BSA (10 мг/мл в PBS) в течение 2 ч (отрицательный отбор). Элюатом инфици-

ровали 100 мкл свежеприготовленной культуры бактерий *E. coli* K91Kan, выращенной до величины  $A_{600}$  1.2–1.5 в среде “Terrific broth” [39]. Смесь переносили в избыточный объем среды LB, содержащей 50 мг/мл канамицина, инкубировали на качалке (35 мин при 37°C), добавляли тетрациклин до конечной концентрации 20 мкг/мл и растили культуру в течение ночи при тех же условиях. Выделение и очистку фагов из культуральных супернатантов производили при помощи двукратного осаждения полиэтиленгликолем 6000 [39]. При проведении второго и третьего раундов селекции в пробирке объемом 1.5 мл предварительно проводили реакцию взаимодействия 100 мкл амплифицированного элюата фага, полученного после первого и второго раундов селекции соответственно, с биотинилированным МА 5В6 в течение ночи при 4°C. Конечная концентрация антитела для второго и третьего раундов составляла 100 и 0.1 нМ соответственно. Прореагировавшую смесь переносили на чашку Петри с сорбированным стрептавидином и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. После интенсивной 10-кратной отмывки чашки PBS-T связавшиеся фаги элюировали и амплифицировали как в первом раунде. После третьего раунда селекции культуру K91Kan, трансдуцированную фагом, высевали в низкой плотности на чашки с LB-агаром, содержащим 100 мкг/мл канамицина и 20 мкг/мл тетрациклина, и выращивали в течение ночи при 37°C [40]. Отобранные наугад колонии бактерий выращивали в 10 мл среды LB с тетрациклином (20 мкг/мл), очищали фаг как описано выше и проверяли на способность связываться с МА 5В6 в твердофазном ИФА. Для этого МА 5В6 сорбировали в объеме 100 мкл (10 мкг/мл в PBS, pH 7.4) в лунках 96-луночного микропланшета. После забивки свободных сайтов 0.1% раствором желатина планшет инкубировали последовательно с препаратом очищенного фага, взятого в серийных десятикратных разведениях (отрицательным контролем служили лунки без антигена), с поликлональными кроличьими антителами против фага M13 и, наконец, с пероксидазным конъюгатом свинных антител, специфичных к иммуноглобулинам кролика, разведенным 1 : 1000 в PBS. В качестве хромогенного субстрата использовали *o*-фенилендиамин. Интенсивность реакции оценивали по величине оптического поглощения образцов при длине волны 492 нм.

#### Определение структуры нуклеотидных вставок.

Для определения структуры нуклеотидной вставки выделяли одноцепочечную фаговую ДНК [39] и проводили частичное секвенирование с использованием <sup>32</sup>P-меченого праймера (5')TGAATTTTCTGTATGAGG и набора “Sequenase version 2.0 sequencing kit” (Amersham, Англия) по рекомендации производителя.

**Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР** (600 МГц) были зарегистрированы на спектрометре UNITY 600 (Varian, США) в ампулах, имеющих внешний диаметр 5 мм. Подавление сигнала воды в спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР осуществлялось с помощью цикла импульсов WATERGATE [41]. Спектры DQF-COSY, NOESY (время смешивания компонентов намагниченности 0.3 с) и ROESY (время смешивания компонентов намагниченности 0.7 с) пептида bc2 получены, используя 4.6 мМ раствор пептида в смеси  $^1\text{H}_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O} = 9/1$ , pH 3.9 и 30°C. Спектры MA 5B6 и смесей (MA 5B6/bc1 или bc2) сняты в буфере PBS (0.14 М NaCl, 1.5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 2.7 мМ KCl), к которому были добавлены  $\text{NaN}_3$  (до концентрации 0.01 М), тяжелая вода до соотношения  $^1\text{H}_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O} = 9/1$ . Концентрация MA 5B6 составляла 0.2 мМ.

Регистрация перенесенного ЯЭО на сигналах свободного пептида, возникшего в результате насыщения сигналов от протонов антитела дополнительным радиочастотным полем, выполнена с использованием импульсной последовательности [42]  $[t_3 - t_{1(F1, F2)} - t_2 - 90^\circ - (t_4 - 180^\circ - t_4)_m - \text{WG} - \text{AQ}]_n$  (1) где  $t_3 = 3-4$  с – релаксационная пауза;  $t_{1(F1, F2)} = 0.3-1.5$  с – продолжительность включения радиочастотного поля ( $\gamma\text{H}_2 = 60$  Гц), прикладываемого к сигналам от протонов антитела (F2) или свободному от сигналов краю спектральной области (F1);  $t_2 = 2$  мс;  $90^\circ$  и  $180^\circ$  – неселективные радиочастотные импульсы высокой мощности;  $t_4 = 981$  мкс;  $m = 6-10$  – количество повторений цикла  $(t_4 - 180^\circ - t_4)$ , предназначенного для устранения из спектров быстро релаксирующих широких сигналов; WG – цикл импульсов WATERGATE [41], подавляющий сигнал протонов воды; AQ = 1.5 с – время регистрации спада сигнала свободной индукции;  $n = 3000-6000$  – количество повторений импульсной последовательности для увеличения соотношения сигнал/шум в двух результирующих спектрах ((F1) и (F2)), вычитание которых дает спектр ЯЭО.

Для изменения pH исследуемых образцов использовали 0.1 и 1.0 М растворы HCl и KOH. Значения химических сдвигов протонов приведены относительно DSS (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонат натрия), химический сдвиг которого  $\delta_{\text{DSS}} = 0$  м.д.

**Спектры поглощения и кинетика фотоиндуцированных изменений оптической плотности** исследованы с использованием солюбилизованного препарата бактериородопсина (sBR), полученного инкубацией в течение 1 сут пурпурных мембран с 2% раствором Тритона X-100, содержащим 100 мМ NaCl, 5 мМ HEPES, pH 7.4. Кинетика фотоиндуцированных изменений оптической плотности sBR исследована на однолучевой импульсной спектрофотометрической установке, сконструированной и установленной в институте

физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского. Фотоцикл инициировали импульсом неодимового лазера ( $\lambda$  532 нм, энергия импульса 10 мДж, длительность импульса 30 нс), регистрация кинетики фотоиндуцированных изменений оптической плотности проведена на длине волны 400 нм. Спектры поглощения регистрировали в диапазоне 350–700 нм с помощью спектрофотометра U-3400 (Hitachi, Япония). Спектры поглощения и кинетику фотоиндуцированных изменений оптической плотности записывали, используя 2 мл раствора sBR, до и после добавления к исследуемому образцу 50 мкл раствора MA 5B6. Сопоставление полученных данных выполнено с учетом изменения концентрации sBR при добавлении MA 5B6. Значения pH среды исследуемых образцов контролировали с помощью pH-метра и в случае необходимости доводили до нужной величины (7.4 или 6.2), используя 1 М растворы HCl или NaOH. Концентрации компонентов раствора sBR, использованного для регистрации спектров поглощения и кинетики фотоиндуцированных изменений оптической плотности, составляли: 4.8 мкМ sBR, 100 мМ NaCl, а также 50 мМ HEPES (pH 7.4) или 50 мМ MES (pH 6.2). Концентрации компонентов раствора MA 5B6, добавляемого в кювету с sBR, составляли: 0.22 мМ MA 5B6, 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.15 М NaCl, 0.01 М  $\text{NaN}_3$ .

Авторы выражают благодарность Л.В. Жемаевой (ИБХ) за участие в получении клона, продуцирующего MA 5B6, проф. Дж. Смиту (Университет Миссури, США) за предоставленные фаговые библиотеки и А.Д. Каулену (НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского) за регистрацию спектров поглощения и кинетики фотоиндуцированных изменений оптической плотности препаратов sBR.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 97-04-48655 и № 98-04-48705).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stoeckenius W., Lozier R.H., Bogomoli R.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1979. V. 505. P. 215–278.
2. Lanyi J.K. // *Int. Rev. Cytol.* 1999. V. 187. P. 161–202.
3. Haupts U., Tittor J., Oesterhelt D. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1999. V. 28. P. 367–399.
4. Herberle J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1458. P. 135–147.
5. Subramaniam S. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999. V. 9. P. 462–468.
6. Yeagle P.L., Salloum A., Chopra A., Bhawsar N., Ali L., Kuzmanovski G., Alderfer J.L., Albert A.D. // *J. Peptide Res.* 2000. V. 55. P. 455–465.
7. Lozier R.H., Bogomolni R.A., Stoeckenius W. // *Biophys. J.* 1975. V. 15. P. 955–962.
8. Luecke H., Schobert B., Richter H.-T., Cartailler J.-P., Lanyi J.K. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 291. P. 899–911.



9. Edman K., Nollert P., Royant A., Belrhali H., Pebay-Peyroula E., Hajdu J., Neutze R., Landau E.M. // *Nature*. 1999. V. 401. P. 822–826.
10. Luecke H., Schobert B., Richter H.-T., Cartailler J.-P., Lanyi J.K. // *Science*. 1999. V. 286. P. 255–260.
11. Braiman M.S., Bousche O., Rothschild K.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 2388–2392.
12. Hessling B., Souvignier G., Gerwert K. // *Biophys. J.* 1993. V. 65. P. 1929–1941.
13. Thorgeirsson T.E., Xiao W., Brown L.S., Needleman R., Lanyi J.K., Shin Y.-K. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 273. P. 951–957.
14. Subramaniam S., Gerstein M., Oesterhelt D., Henderson R. // *EMBO J.* 1993. V. 12. P. 1–8.
15. Vonk J. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 5870–5878.
16. Ovchinnikov Yu.A., Abdulaev N.G., Vasilov R.G., Vturina I.Yu., Kuryatov A.B., Kiselev A.V. // *FEBS Lett.* 1985. V. 179. P. 343–350.
17. Yamaguchi N., Jinbo Y., Arai M., Koyama K. // *FEBS Lett.* 1993. V. 324. P. 287–292.
18. Pashkov V.S., Balashova T.A., Zhemaeva L.V., Sikilinda N.N., Kutuzov M.A., Abdulaev N.G., Arseniev A.S. // *FEBS Lett.* 1996. V. 381. P. 119–122.
19. Reyens J.A., Stoeckenius W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. P. 2803–2804.
20. Marinetti T., Mauzerall D. // *Biophys. J.* 1986. V. 50. P. 405–415.
21. Ni F. // *Prog. NMR Spectroscopy*. 1994. V. 26. P. 517–606.
22. Clore G.M., Gronenborn A.M. // *Prog. NMR Spectroscopy*. 1991. V. 23. P. 43–92.
23. Steinhoff H.-J., Mollaaghababa R., Altenbach C., Hideg K., Krebs M., Khorana H.G., Hubbelt W.L. // *Science*. 1994. V. 266. P. 105–107.
24. Abdulaev N.G., Feigina M.Yu., Kiselev A.V., Ovchinnikov Yu.A., Drachev L.A., Kaulen A.D., Khitrina L.V., Skulachev V.P. // *FEBS Lett.* 1978. V. 90. P. 190–194.
25. Gilles-Gonzalez M.A., Engelman D.M., Khorana H.G. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 8545–8550.
26. Maeda A., Ogura T., Kitagawa T. // *Biochemistry*. 1986. V. 25. P. 2793–2803.
27. Váró G., Lanyi J.K. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. P. 2241–2250.
28. Drachev L.A., Dracheva S.V., Kaulen A.D. // *FEBS Lett.* 1993. V. 332. P. 67–70.
29. Stewart J.M., Young J.D. *Solid Phase Peptide Synthesis*. 2<sup>nd</sup>. Rockford, IL: Pierce Chem. Co., 1984.
30. Rodionov I.L., Baru M.B., Ivanov V.T. // *Peptide Res.* 1992. V. 5. P. 119–125.
31. Reid G.E., Simpson R.J. // *Anal. Biochem.* 1992. V. 200. P. 301–309.
32. Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D. // *Anal. Biochem.* 1970. V. 34. P. 595–598.
33. Tam J.P., Heath W.F., Merrifield R.B. // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1983. V. 21. P. 57–65.
34. Kohler G., Milstein C. // *Nature*. 1975. V. 256. P. 495–497.
35. Steinbuch M., Audran R. // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1969. V. 134. P. 279–284.
36. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
37. Smith G.P., Scott J.K. // *Meth. Enzymol.* 1993. V. 217. P. 228–257.
38. Vilija P., Krohn K., Tuohimaa P. // *J. Immunol. Methods*. 1985. V. 76. P. 73–83.
39. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
40. Scott J.K., Smith G.P. // *Science*. 1990. V. 249. P. 386–390.
41. Píotto M., Saudek V., Sclenář V. // *J. Biol. NMR*. 1992. V. 2. P. 661–665.
42. Балашихова Т.А., Пащков В.С., Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Мареева Т.Ю., Петрова Е.Э., Несмеянов В.А., Иванов В.Т. // *Биоорган. химия*. 1991. Т. 17. С. 1470–1486.

## Bacteriorhodopsin Retains the Conformation of Val69–Gly72 Fragment during Functioning

**V. S. Pashkov<sup>#\*</sup>, T. Yu. Mareeva\*, T. A. Balashova\*, A. A. Vychalkovskii\*,  
L. V. Samokhvalova\*, L. K. Baidakova\*\*, I. L. Rodionov\*\*, V. A. Nesmeyanov\***

<sup>#</sup> Phone: +7 (095) 335-2733; fax: +7 (095) 335-7103; e-mail: pavs@nmr.ru

<sup>\*</sup>Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

<sup>\*\*</sup>Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (Pushchino Branch), Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 6, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

Effect of the monoclonal antibody (MAb) 5B6 produced to the solubilized preparation of bacteriorhodopsin on the protein photocycle was studied to examine conformational rearrangements on the surface of functioning bacteriorhodopsin molecule. Using the methods of solid phase enzyme immunoassay, peptide phage display, and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, we demonstrated that the epitope recognized by MAb 5B6 is the Val69–Pro-Phe-Gly72 fragment of the protein, with the aromatic ring of Phe71 and the methyl groups of Val69 participating in the binding. MAb 5B6 exerted no significant effect on the photocycle of bacteriorhodopsin solubilized in Triton X-100 at pH 6.2 and 7.4, which suggested that, when functioning, bacteriorhodopsin retains the conformation and position of its Val69–Pro-Phe-Gly72 fragment. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* bacteriorhodopsin, epitope analysis, monoclonal antibodies, peptide phage display, photocycle, NMR