



ПОИСК ПЕПТИДОВ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ С КОРЕГУЛЯТОРНОЙ МИШЕНЬЮ В7-2

© 2021 г. Е. А. Колосова*, **, #, О. Е. Викторина*, А. И. Шаповал**, Д. Н. Щербаков*, **

*ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Россия, 630559 Новосибирская обл., р.п. Кольцово

**ФГБОУ ВО “Алтайский государственный университет”, Российско-американский противораковый центр, Россия, 656049 Барнаул, просп. Ленина, 61

Поступила в редакцию 02.02.2021 г.

После доработки 20.02.2021 г.

Принята к публикации 21.02.2021 г.

Взаимодействие лигандов В7-1/В7-2 с рецепторами CD28/CTLA-4 играет ключевую роль в регуляции иммунного ответа. Целью настоящего исследования был поиск и изучение пептидов, взаимодействующих с корегуляторной молекулой В7-2 человека. В ходе работы проведены три цикла аффинной селекции и отобраны индивидуальные фаговые клоны, в состав которых входят пептиды с разной степенью взаимодействия с белком В7-2. В результате секвенирования ДНК выбранных фагов получены нуклеотидные последовательности, кодирующие пептиды, специфически связывающиеся с В7-2. Выявленные пептиды могут быть использованы в качестве основы для разработки иммунотерапевтических препаратов для регуляции иммунного ответа при лечении онкологических заболеваний.

Ключевые слова: фаговый дисплей, семейство В7, CD86, онкологические заболевания, иммунотерапия

DOI: 10.31857/S0132342321060117

ВВЕДЕНИЕ

В7 — важная корегуляторная молекула, которая экспрессируется на поверхности антиген-презентирующих клеток (АПК) человека, представлена двумя формами: В7-1 и В7-2. Рецепторы лигандов В7 на поверхности Т-клеток — молекулы CD28/CTLA-4. Взаимодействие В7-1 или В7-2 с CD28 способствует активации Т-клеток, пролиферации и секреции цитокинов. Взаимодействие В7-1 или В7-2 с CTLA-4 снижает активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов [1]. Блокада ко-стимуляторных путей регуляции иммунного ответа может обеспечить эффективную терапию аутоиммунных заболеваний и предотвратить отторжение трансплантатов. Роль блокаторов могут выполнять пептиды, характеризующиеся высокой специфичностью взаимодействия с мишенью и низкой молекулярной массой, что может снижать количество побочных эффектов [2].

Фаговые пептидные библиотеки — один из источников поиска пептидов, способных избирательно взаимодействовать с белками, липидами и углеводами [3]. Для получения пептидов, специ-

фически взаимодействующих с молекулярной мишенью, проводится несколько циклов аффинной селекции бактериофагов из фаговых пептидных библиотек с последующим секвенированием участка ДНК, кодирующего чужеродный пептид.

Цель работы — поиск и изучение пептидов, специфически взаимодействующих с корегуляторной молекулой В7-2, с использованием фаговых пептидных библиотек.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отбор бактериофагов, взаимодействующих с корегуляторной молекулой В7-2. Аффинная селекция подразумевает отбор из фаговой пептидной библиотеки бактериофагов, несущих на своей поверхности чужеродные пептиды, специфически взаимодействующие с мишенью — корегуляторной молекулой В7-2, содержащей Fc-участок IgG1 человека. Селекция осуществляется за счет образования комплекса бактериофага, белка В7-2 и магнитной частицы, на поверхности которой находится белок G, специфически взаимодействующий с Fc-участком IgG1 человека. Элюированную гетерогенную смесь бактериофагов амплифицируют в бактериальной культуре и используют для следующего цикла селекции.

Сокращения: МЧ — магнитные частицы, оцДНК — одноцепочечная ДНК.

Автор для связи: (тел.: +7 (3852) 298-142; эл. почта: kurchanovaea@gmail.com).

Таблица 1. Титры образцов фаговых суспензий после различных циклов аффинной селекции против рекомбинантного белка В7-2

Образец	Титр, БОЕ/мл		
	1-й цикл	2-й цикл	3-й цикл
Элюат	10^4	10^4	10^5
Амплификат	10^{10}	10^{11}	10^9

Таблица 2. Выявленные последовательности и встречаемость пептидов, взаимодействующих с рекомбинантным белком В7-2

Номер фагового клона	Аминокислотная последовательность	Встречаемость, %
1	CLARCLGRC	66.7
2	CPSASSQLTC	11.1
6	АНIEVVSP	11.1
8	QMPALMQQ	11.1

В работе использовали фаговую пептидную библиотеку GerLab на основе нитчатого бактериофага fd. Для отбора бактериофагов, взаимодействующих с рекомбинантным белком В7-2 человека (SinoBiological, КНР), были проведены три цикла аффинной селекции. Для отслеживания обогащения популяции фагов после каждого цикла определяли биологический титр бактериофагов, элюированных с магнитных частиц, и после их амплификации в бактериальной культуре по методу Грация [4]. После 2-го цикла наблюдалось увеличение титра бактериофагов в элюате. После 3-го цикла увеличения титра не происходило, что, возможно, свидетельствует о достижении предела насыщения популяции фагов. Изменение титра бактериофагов на протяжении трех циклов аффинной селекции, в результате которых были получены бактериофаги, обладающие наибольшим сродством к мишени В7-2, отражено в табл. 1.

С чашек Петри, содержащих единичные бляшки фагового элюата 3-го цикла, отобрали девять клонов для выделения ДНК и последующего секвенирования участка ДНК, кодирующего чужеродный пептид.

Идентификация аминокислотных последовательностей пептидов. Секвенированные участки ДНК, кодирующие чужеродные пептиды девяти клонов, анализировали с помощью программы BioEdit 7.2 и далее переводили их в аминокислотные последовательности. Аминокислотная последовательность CLAACLGAC представлена в 66.7% анализированных фаговых клонов, в то время как последовательности CPSASSGLTC,

QMPALMQQ и АНIGVVSP – в 11.1% клонов (табл. 2).

В дальнейшей работе использовали клоны фагов № 1, 2, 6 и 8, которые несут на своей поверхности четыре уникальных чужеродных пептида, взаимодействующих с белком В7-2.

Иммунохимические свойства отобранных пептидов. Иммунохимические свойства пептидов четырех фаговых клонов анализировали методами иммуноблоттинга и иммуноферментного анализа.

Результаты иммуноблоттинга представлены на рис. 1. Наибольшее значение оптической плотности, равное 50, наблюдалось у клона № 1 (пептид CLARCLGRC). У клонов № 6 (пептид АНIEVVSP) и № 8 (пептид QMPALMQQ) оптическая плотность была ниже и составила 44 и 23 соответственно, что свидетельствует о меньшей аффинности этих пептидов к рекомбинантному белку В7-2. У клона № 2 (пептид CPSASSQLTC) оптическая плотность составила –10, следовательно, данный пептид не связывается с рекомбинантным белком В7-2. Значения оптической плотности у положительного и отрицательного контролей составили 173 и 0 соответственно.

Результаты ИФА представлены на рис. 2. Наибольшие значения оптической плотности наблюдались у клонов № 1 (пептид CLARCLGRC) и № 6 (пептид АНIEVVSP): 0.83 ± 0.02 и 0.86 ± 0.03 соответственно, что подтверждает высокое сродство данных пептидов к рекомбинантному белку В7-2. ИФА с клонами № 2 и 4 показал низкое специфическое взаимодействие с мишенью В7-2 (0.06 ± 0.00 и 0.09 ± 0.01 соответственно).

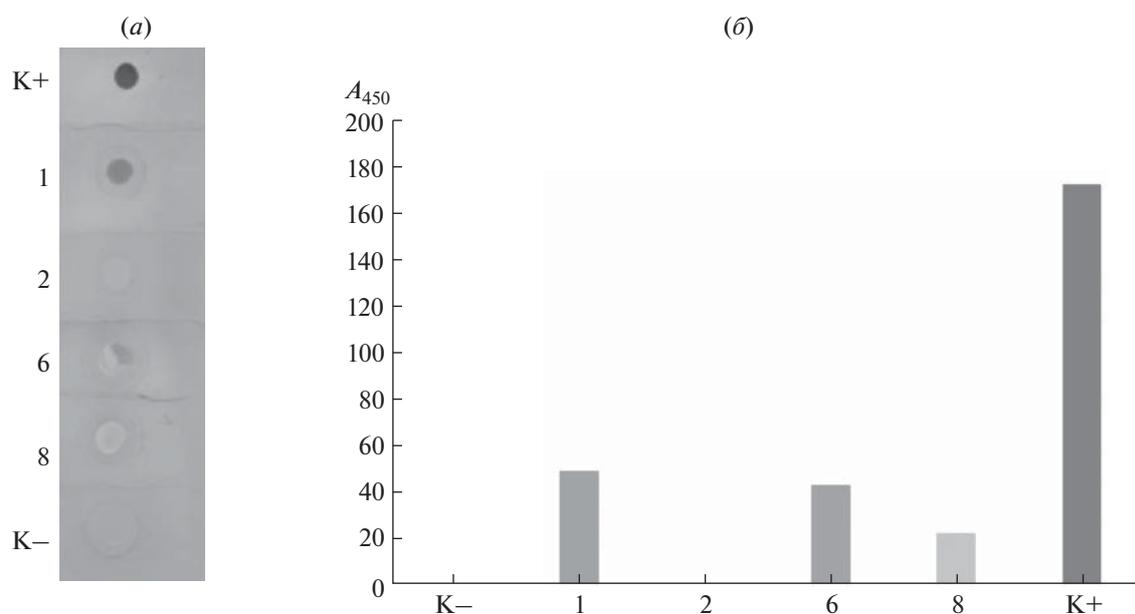


Рис. 1. Иммуноблот-гибридизация исследуемых фаговых клонов № 1, 2, 6 и 8 с рекомбинантным белком V7-2. (а) – Мембрана дот-блота; (б) – гистограмма значений оптической плотности. Положительный контроль (К+) – рекомбинантный белок V7-2, отрицательный контроль (К-) – бактериофаг fd, не содержащий чужеродную вставку.

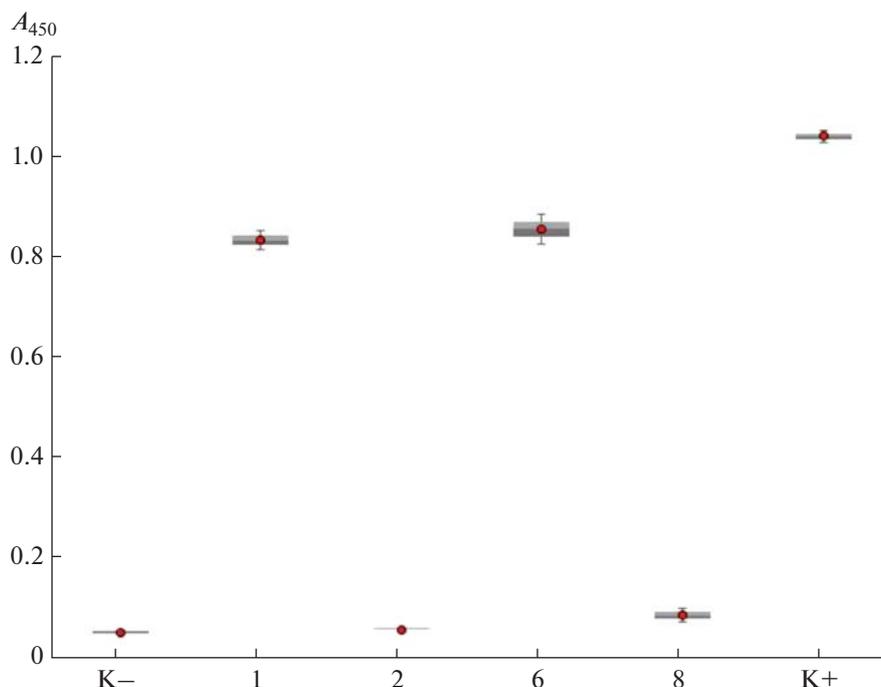


Рис. 2. Иммуноферментный анализ фаговых клонов № 1, 2, 6 и 8 с рекомбинантным белком V7-2. Положительный контроль (К+) – рекомбинантный белок V7-2, отрицательный контроль (К-) – бактериофаг fd, не содержащий чужеродную вставку.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рекомбинантный белок V7-2. В работе использовали коммерческий рекомбинантный белок, состоящий из внеклеточного домена (Met1-His239) белка V7-2 человека и Fc-участка IgG1 че-

ловека (Pro100-Lys330) с 6His-меткой на C-конце (Sino Biological, КНР).

Фаговая пептидная библиотека. Использованная в данной работе фаговая пептидная библиотека GerLab на основе нитчатого бактериофага fd

была получена из лаборатории профессора Дж.М. Гершони [5]. Она состояла из смеси восьми фаговых пептидных библиотек, изготовленных на основе фагмидного вектора типа р88 и экспонирующих в составе главного поверхностного белка рVIII чужеродные рандомизированные пептиды длиной 6, 8, 10, 12 а.о., а также пептиды, замкнутые в петлю.

Аффинная селекция пептидов из фаговой пептидной библиотеки. Аффинную селекцию фаговой библиотеки против рекомбинантного белка В7-2, включающую три цикла, проводили с помощью магнитных частиц (МЧ) Dynabeads™ Protein G (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США), представляющих собой однородные суперпарамагнитные шарики размером 2.8 мкм.

Селекцию начинали с промывки МЧ промывочным раствором (0.1%-ный полисорбат 20 в Трис-буферном растворе). Затем добавляли 1 мл блокирующего раствора (5%-ный бычий сывороточный альбумин (БСА) в Трис-буферном растворе) и оставляли на 1 ч при 4°C. В это время смешивали фаговую библиотеку и рекомбинантный белок В7-2 в промывочном растворе и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Полученную смесь добавляли к промытым МЧ, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Образованный комплекс МЧ–фаг–мишень отмывали от несвязавшихся бактериофагов, связавшихся же фаги элюировали. Далее удаляли МЧ и добавляли нейтрализующий раствор (1 М Трис-НСl). Полученный элюат (50 мкл) инокулировали в 5 мл культуры, измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Nano-Photometer N50 (Implen, Германия) при длине волны 600 нм (она составляла 0.6) и инкубировали в течение ночи при 37°C.

Титрование бактериофагов, амплификацию элюата и наработку индивидуальных фаговых клонов проводили в соответствии с руководством производителя (Ph.D.™ Phage Display Libraries Instruction Manual; NEB, США) [6] с использованием штамма *E. coli* DH5αF' + (NEB, США).

Выделение одноцепочечной ДНК бактериофагов библиотеки. В 500 мкл суспензии бактериофага добавляли 100 мкл иодидного буферного раствора и 250 мкл 96%-ного этилового спирта, ресуспендировали осадок, инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Далее осаждали оцДНК центрифугированием в течение 10 мин при 13000 g и 4°C. Супернатант удаляли, осадок промывали 500 мкл 70%-ного этилового спирта. Снова осаждали оцДНК центрифугированием в течение 10 мин при 13000 g и 4°C. Далее высушивали осадок оцДНК в вакууме и растворяли в 30 мкл дистиллированной воды [7].

Контроль выделения оцДНК проводили разделением нуклеиновых кислот в 1%-ном агарозном геле.

Секвенирование. Секвенирование нуклеотидных последовательностей, кодирующих чужеродные пептиды, специфически взаимодействующие с В7-2, проводили в ЦКП “Геномика” (Новосибирский Академгородок) на капиллярном секвенаторе ABI 3130XL (Genetic Analyser, Applied Biosystems, США) с помощью секвенирующего праймера -96gIII (5'-НО-СССТСАТАGТТАGCG-ТААСG-3') в концентрации 1 пМ.

Иммуноблоттинг (дот-блот). На нитроцеллюлозную мембрану однократно наносили фаговые клоны (1 мкл, 10⁸ вирионов) и высушивали на воздухе. В качестве отрицательного контроля (К-) использовали бактериофаг fd (1 мкл, 10⁸ вирионов), не содержащий чужеродной вставки; в качестве положительного контроля (К+) – рекомбинантный белок В7-2 (Sino Biological, КНР; 1 мкл, 2.5 мкг/мл). Целлюлозу инкубировали с блокирующим Трис-буферным раствором (15 мл), содержащим 1% БСА и 0.1% полисорбата 20, для предотвращения неспецифического взаимодействия [8].

После трехкратной промывки Трис-буферным раствором с 0.1% полисорбата 20 наносили 1.5 мл рекомбинантного белка В7-2 (2.5 мкг/мл) в блокирующем растворе и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин.

После трехкратной промывки промывочным раствором наносили 15 мл раствора антител козы против Fc-участка IgG человека, конъюгированных с щелочной фосфатазой (Invitrogen, США), в рабочем разведении 1 : 5000 в блокирующем растворе и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин.

После трехкратной промывки Трис-буферным раствором с 0.1% полисорбата 20 наносили смесь 5-бром-4-хлор-3-индолил-фосфата (BCIP, 0.21 мг/мл) и нитросинего тетразолия (NBT, 0.42 мг/мл в воде) объемом 15 мл, инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте.

После трехкратной промывки водой нитроцеллюлозную мембрану высушивали на воздухе в недоступном для света месте. Сигналы на мембране переводили в компьютерное изображение с помощью приложения ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Иммуноферментный анализ (ИФА). Для ИФА использовали среднесорбционные 96-луночные планшеты (Jet Biofil, КНР). В лунки вносили по 100 мкл раствора рекомбинантного белка В7-2 (Sino Biological, КНР) в концентрации 2.5 мкг/мл в Трис-буферном растворе (рН 8.6) и сорбировали

ли при 4°C в течение ночи. Затем блокировали сайты неспецифического связывания добавлением 200 мкл Трис-буферного раствора (рН 7.0), содержащего 5% БСА, инкубировали в термошейкере для планшетов PST-60HL (BioSan, Латвия) при 37°C и 200 об./мин в течение 2 ч. После удаления блокирующего раствора в лунки вносили бактериофаги (100 мкл в блокирующем растворе, 10⁸ вирионов) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. В качестве отрицательного контроля (К-) использовали бактериофаг fd (100 мкл в блокирующем растворе, 10⁸ вирионов), не содержащий чужеродной вставки; в качестве положительного контроля (К+) – рекомбинантный белок В7-2 (Sino Biological, КНР; 100 мкл, 2.5 мкг/мл). После трехкратной промывки промывочным раствором, содержащим Трис-буферный раствор с 0.5% полисорбата 20, добавляли 100 мкл конъюгата моноклонального антитела против нитчатого бактериофага М13 (GE Healthcare Life Sciences, США), меченого пероксидазой хрена, в выбранном рабочем разведении 1 : 5000 и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После шестикратной промывки промывочным раствором в лунки добавляли субстрат на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ; Sigma-Aldrich, США). Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М серной кислоты в каждую лунку.

Детекцию результатов проводили на планшетном фотометре iMark (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм. Вычисляли средние значения оптической плотности и ошибки средних значений ($M \pm S.E.$), по полученным данным строили диаграммы с указанием величин стандартного отклонения [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения трех циклов аффинной селекции с использованием фаговой пептидной библиотеки GerLab и коммерческого рекомбинантного белка В7-2 были отобраны четыре уникальные последовательности пептидов, взаимодействующих с корегуляторным белком В7-2 человека. С использованием методов иммуноблоттинга и ИФА показано, что фаговые клоны № 1 (пептид CLARCLGRC) и № 6 (пептид АНIEVVSP) обладают наибольшим сродством к рекомбинантному белку В7-2, в то время как у фаговых клонов № 2 (пептид CPSASSQLTC) и № 8 (пептид QMPALMQQ) отсутствует специфическое взаимодействие с мишенью.

Выявленные пептиды с высоким сродством к корегуляторному белку В7-2 человека могут послужить основой для расчета и конструирования искусственных иммуногенов с целью их последу-

ющего использования при разработке иммунотерапевтических средств для лечения онкологических заболеваний.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 19-44-220008, 17-54-33003) и государственного задания Минобрнауки России (№ FZMW-2020-0007).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шаповал А.И., Шаповал С.П., Щербакова Н.С., Щербаков Д.Н. // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 348–364. [Chapoval A.I., Chapoval S.P., Shcherbakova N.S., Shcherbakov D.N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 225–240.] <https://doi.org/10.1134/S0132342319040110>
2. Титов М.И. // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2013. № 4. С. 86–102.
3. Урбан И.Г., Мосмайер М.А., Босма Т., Прасслер Й. // Патент RU2702087С2, опубл. 03.10.2019.
4. Боргоякова М.Б., Ильичев А.А. // Бактериофаги. Практикум по молекулярной вирусологии. Учеб.-метод. пособие. Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т, 2013. С. 44.
5. Ruykin A., Ashkenazy H., Weiss-Ottolenghi Y., Piller C., Pupko T., Gershoni J.M. // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. P. 52. <https://doi.org/10.1093/nar/gky077>
6. Ph.DTM Phage Display Libraries. Instructional Manual. New England BioLabs Inc. 44 p.
7. Wilson R.K. // Biotechniques. 1993. V. 15. P. 414–416, 418–420, 422.
8. Reitinger S., Petriv I., Mehr K., Hansen C.L., Withers S.G. // J. Virol. Methods. 2012. V. 185. P. 171–174. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.06.021>
9. Щербакова Н.С., Чикаев А.Н., Карпенко Л.И. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012. № 1. С. 20–25.

Search for Peptides Specifically Binding with B7-2 Costimulatory Molecule

E. A. Kolosova^{*, **, #}, O. E. Viktorina^{*}, A. I. Chapoval^{**}, and D. N. Shcherbakov^{*, **}

[#]Phone: +7 (385) 229-81-42; e-mail: kurchanovaea@gmail.com

^{*}State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, r.p. Kol'tsovo, Novosibirskaya obl., 630559 Russia

^{**}Russian-American Anti-Cancer Center, Altai State University, prosp. Lenina 61, Barnaul, 656049 Russia

The interaction of B7-1/B7-2 ligands with CD28/CTLA-4 receptors plays a key role in the regulation of the immune response. The aim of this study was to find and study peptides that interact with the human B7-2 molecule. In the course of the work, three rounds of affinity selection were carried out and individual phage clones were selected, which include peptides with varying degrees of interaction with the co-regulatory target B7-2. As a result of DNA sequencing of selected phages, nucleotide sequences encoding peptides that specifically bind to B7-2 were obtained. The identified peptides can be used as a basis for the development of immunotherapeutic drugs for regulating the immune response in the treatment of oncological diseases.

Keywords: phage display, family B7, CD86, oncological diseases, immunotherapy