

ELWIRA LISOWSKA

Instytut Immunologii
i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda
Wrocław

BIAŁKA JAKO ANTYGENY: REAKCJE Z PRZECIWCIAŁAMI I ANALIZA EPITOPÓW

Nie ma dużej przesady w stwierdzeniu, że geny kodują białka, te zaś pełnią wszystkie inne funkcje z produkcją genów włącznie, dzięki swej zdolności selektywnego wiązania się do innych cząsteczek. Mogą to być trwale oddziaływania między jednakowymi lub różnymi cząsteczkami, prowadzące do powstania większych struktur stanowiących tkanki lub fragmenty tkanek. Białka uczestniczące w tych oddziaływaniach nazywamy strukturalnymi. Mogą to być też krótkotrwałe oddziaływania, w wyniku których zachodzą reakcje chemiczne (enzymy), przekazanie sygnału do wnętrza komórki (receptory komórkowe), aktywacja lub hamowanie innych biologicznie czynnych białek (białka regulatorowe) itp. Przykładem swoistego niekowalencyjnego oddziaływania między białkami jest też reakcja antygeny białkowego z przeciwciałem, będąca tematem niniejszego artykułu.

Przeciwciała są jednym z głównych produktów odpowiedzi immunologicznej. Prawidłowo funkcjonujący system immunologiczny jest niezbędnym warunkiem przeżycia w sytuacji nieustannej inwazji na organizm różnych szkodliwych mikroorganizmów (bakterie, wirusy) i cząsteczek. System ten jest regulowany przez różne typy komórek układu immunologicznego i cytokiny przez nie wydzielane. Celem tej regulacji jest utrzymanie procesów immunologicznych na optymalnym poziomie i zachowanie zdolności do odróżniania antygenów własnych od obcych. Przeciwciała mają zdolność swoistego wiązania się z antygenem użytym do immunizacji. Utworzenie tego kompleksu nie niszczy antygeny bezpośrednio, ale umożliwia jego zniszczenie przez inne obronne systemy białkowe (komplement) czy komórkowe (makrofagi). Antygenem może być każda obca dla immunizowanego organizmu struktura (białkowa, cukrowa i wiele innych), ale tutaj ograniczamy się do omówienia antygenów białkowych.

POWSTAWANIE PRZECIWCIAŁ DLA ANTYGENÓW BIAŁKOWYCH

Rozmiar reagujących ze sobą komplementarnych obszarów antygeny i przeciwciała stanowi kilka do kilkunastu reszt aminokwasowych. Zważywszy,

że białko średniej wielkości zbudowane jest z kilkuset aminokwasów, staje się oczywiste, że taka cząsteczka zawiera wiele strukturalnie różnych obszarów (epitopów) mogących reagować z przeciwciałem. W rzeczywistości, średniej wielkości białko użyte jako antygen (tzn. wprowadzone do ustroju drogą pozajelitową) może reagować z tysiącami różnych limfocytów B, mających powierzchniowe immunoglobuliny (receptory komórek B), z miejscami wiążącymi komplementarnymi dla różnych epitopów antygeny. W wyniku tej interakcji, oraz najczęściej na drodze kooperacji z innymi komórkami układu immunologicznego, limfocyty B są indukowane do różnicowania i intensywnego wzrostu, dając klony komórek produkujących i wydzielających przeciwciała. Zważywszy, że jedna komórka produkuje tylko jedno przeciwciało, liczba różnych przeciwciał w surowicy immunizowanego organizmu jest równa liczbie różniących się między sobą indukowanych komórek B. Przeciwciała te różnią się nie tylko rozpoznawaniem różnych epitopów antygeny, ale również powinowactwem oraz elementami struktury poza miejscem wiążącym antygen (różne klasy i podklasy immunoglobulin). Różnorodne przeciwciała są obecne w surowicy poliklonalnej w różnych ilościach i oznaczając ich reakcje z antygenem, wykrywamy przede wszystkim te, które przeważają ilościowo.

Teoretycznie, każdy fragment antygeny białkowego może stanowić epitop. Jednakże większość przeciwciał wykrywanych w surowicy odpornościowej jest skierowana zwykle przeciw niektórym fragmentom antygeny, które uważa się za bardziej immunogenne niż inne. Immunogenność jest bowiem ograniczona do tych fragmentów cząsteczki, które mają budowę obcą dla immunizowanego organizmu, które są dostępne do reakcji z receptorami komórek układu immunologicznego gospodarza, i które znajdują odpowiednie receptory w immunizowanym organizmie. Z tego ostatniego powodu repertuar przeciwciał powstających w wyniku immunizacji zależy nie tylko od antygeny, ale też w pewnym stopniu od immunizowanego organizmu.

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE

Stosunkowo łatwe jest wydzielenie puli przeciwciał z surowicy poliklonalnej przez zastosowanie chromatografii powinowactwa z użyciem antygeny związanego ze stałym nośnikiem. Jednakże uzyskanie indywidualnych przeciwciał z tej puli jest niewykonalne ze względu na duże podobieństwo strukturalne różnych cząsteczek immunoglobulin. Można natomiast wydzielić klony komórkowe wywodzące się z pojedynczej komórki produkującej przeciwciało i każdy z takich klonów staje się producentem określonego przeciwciała. Metoda ta, która dokonała przełomu w immunologii, została wprowadzona przez Köhlera i Milsteina w 1975 r. [12], a jej autorzy otrzymali wraz z Jerne nagrodę Nobla w 1984 r. Komórki śledziony immunizowanego zwierzęcia (najczęściej myszy, rzadziej szczura) hybryduje się z komórkami nowotworowymi w celu zapewnienia im zdolności do nieograniczonego wzros-

tu *in vitro* i wydzielone w selektywnym medium komórki hybridoma używa się do selekcji klonów produkujących interesujące nas przeciwciała [14]. Opracowane zostały również metody otrzymywania ludzkich przeciwciał monoklonalnych, co jest ważne ze względu na możliwość stosowania ich u ludzi bez wywoływania odpowiedzi immunologicznej. Przeciwciała monoklonalne są obecnie powszechnie używane i stanowią reagenty pozwalające na precyzyjne określenie epitopów przez nie rozpoznawanych.

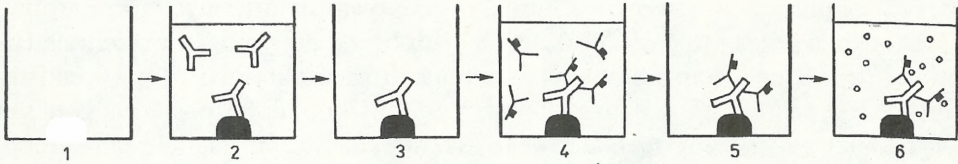
EPITOPY ANTYGENÓW BIAŁKOWYCH W ODNIESIENIU DO STRUKTURY BIAŁEK

Precyzyjne określenie epitopu rozpoznawanego w antygenie białkowym przez przeciwciało wymaga znajomości struktury antygeny. Pierwszorzędową strukturę białka stanowi sekwencja aminokwasów w jego łańcuchu peptydowym. Znajomość sekwencji aminokwasów była ograniczona do stosunkowo niewielkiej liczby białek, gdyż metody pozwalające na jej wyznaczenie były żmudne i pracochłonne. W ostatnich latach, rewolucji w tej dziedzinie dokonało zastosowanie metod inżynierii genetycznej oparte na fakcie, że nieporównywalnie łatwiej jest określić sekwencje kwasów nukleinowych niż białek. Obecnie lawinowo rośnie liczba białek, których sekwencje aminokwasowe określono na podstawie oznaczenia sekwencji kodujących fragmentów genu (cDNA). Jednakże pełna znajomość struktury białka powinna obejmować również poznanie kształtu przestrzennego łańcucha polipeptydowego, czyli konformacji białka. Złożoność struktury przestrzennej białka wynika z oddziaływań między łańcuchami bocznymi aminokwasów wchodzących w jego skład. Pierwszym poziomem tej organizacji przestrzennej jest struktura drugorzędowa, tzn. lokalna organizacja fragmentów łańcucha polipeptydowego (np. α -spirala, struktura β). Ponadto, cały łańcuch polipeptydowy ulega pofałdowaniu, przybierając określony kształt przestrzenny, co stanowi jego strukturę trzeciorzędową. Łańcuchy wielu białek składają się z fragmentów tworzących niezależne struktury przestrzenne, zwane domenami, połączone „ruchoмым” odcinkiem łańcucha. Wiele funkcjonalnych białek ma jeszcze wyższy poziom organizacji, a mianowicie złożone są one z dwóch lub więcej odrębnych łańcuchów polipeptydowych połączonych mostkami dwusiarczkowymi lub oddziaływaniami niekowalencyjnymi. Przykładem mogą być immunoglobuliny zbudowane z dwóch łańcuchów ciężkich (H) i dwóch lekkich (L). Mostki dwusiarczkowe mogą się też tworzyć między resztami cysteiny w tym samym łańcuchu, spinając jego mniej lub bardziej odległe fragmenty, co dodatkowo stabilizuje konformacje cząsteczki. Tutaj również typowym przykładem mogą być białka z rodziny immunoglobulin, których łańcuchy tworzą kilka pętli spiętych mostkami —S—S—. Oprócz sekwencji aminokwasów na strukturę przestrzenną białka mogą mieć wpływ jego potranslacyjne modyfikacje, np. fosforylacja, glikozylacja i inne.

Powyższe skrótowe omówienie zasad budowy przestrzennej białek ma służyć uświadomieniu, że w cząsteczce białka odległe w sekwencji reszty aminokwasowe mogą znajdować się w bliskim sąsiedztwie i wchodzić w skład epitopu rozpoznawanego przez przeciwciało. Takie epitopy nazywane są konformacyjnymi lub nieciągłymi. Niektórzy badacze uważają, że większość epitopów białkowych ma charakter konformacyjny [13]. Zależy to jednak od rodzaju antygeny białkowego, wykazano też bowiem, że przeciwciała rozpoznają w pewnych białkach pojedyncze odcinki sekwencji, zwane epitopami linearnymi lub ciągłymi. Istnieje pogląd, że białka wewnątrzkomórkowe oraz wydzielane z komórek są bardziej prawdopodobnymi kandydatami do posiadania epitopów konformacyjnych, podczas gdy epitopy liniowe są częściej spotykane w białkach membranowych komórek eukariotycznych i bakteryjnych oraz w antygenach kapsydów wirusowych.

METODY OZNACZANIA REAKCJI ANTYGEN – PRZECIWCIAŁO (Ag – Ab)

Podstawą charakterystyki epitopu jest dysponowanie dogodną metodą oznaczania reakcji antygen – przeciwciało. Zasadą tego pomiaru jest oddzielenie kompleksu Ag – Ab od nadmiaru co najmniej jednego z partnerów reakcji (np. Ab), aby móc oznaczyć jego zawartość w kompleksie. Jest to znacznie ułatwione, jeżeli drugi składnik reakcji (np. Ag) jest przyłączony do stałej fazy. Stałą fazą są najczęściej powierzchnie plastikowe, do których antygen jest wiązany przez adsorpcję. Do wykrycia związanego z unieruchomionym antygenem przeciwciała stosuje się ligandy sprzężone z enzymem (metody immunoenzymatyczne lub ELISA od ang. enzyme-linked immunosorbent assay) lub znakowane izotopem (metody radioimmunologiczne), albo związkami fluorescencyjnymi (ta ostatnia metoda jest najczęściej stosowana do oznaczania wiązania przeciwciała do antygeny na powierzchni komórki). Jednakże, zamiast znakowania każdego badanego przeciwciała, praktyczniej jest użyć metody pośredniej, tzn. stosować znakowany reagent wtórny rozpoznający testowane przeciwciała. Mogą nim być np. poliklonalne przeciwciała (kozy, królicze) anty-Ig mysie, które nadają się do oznaczania wszystkich mysich przeciwciał monoklonalnych. Istnieje ogromna różnorodność ilościowych i jakościowych metod służących do oznaczania reakcji Ag – Ab i ich omawianie wykracza poza ramy tego artykułu. Pozwolę sobie jedynie zilustrować omówione wyżej w skrócie reguły podstawowym wariantem mikro płytkowego testu ELISA, który jest powszechnie używany i jest bardzo przydatny do analizy epitopów (Rys. 1). W metodzie tej stosuje się płytki plastikowe z 96 wgłębieniami, których powierzchnie opłaszczą się antygenem przez zwykłą kilkunastogodzinną inkubację roztworu antygeny (50–100 μ l na jedno wgłębienie, 1–10 μ g/ml). Po usunięciu tego roztworu i przemyciu płytki inkubuje się w jej wgłębieniach roztwór badanego przeciwciała (Ab1), a następnie roztwór drugiego przeciwciała (anty-Ab1) sprzężonego z enzymem. Najczęściej stosowany-



Rys. 1. Schemat płytkowego testu ELISA. Do płytki opłaszczonej antygenem (1) dodaje się roztwór testowanego przeciwciała Ab1 (2) i po odmyciu (3) wprowadza się roztwór drugiego przeciwciała anty-Ab1 sprzężonego z enzymem (4); po kolejnym odmyciu (5) dodaje się roztwór substratu (6) dającego barwny produkt reakcji enzymatycznej

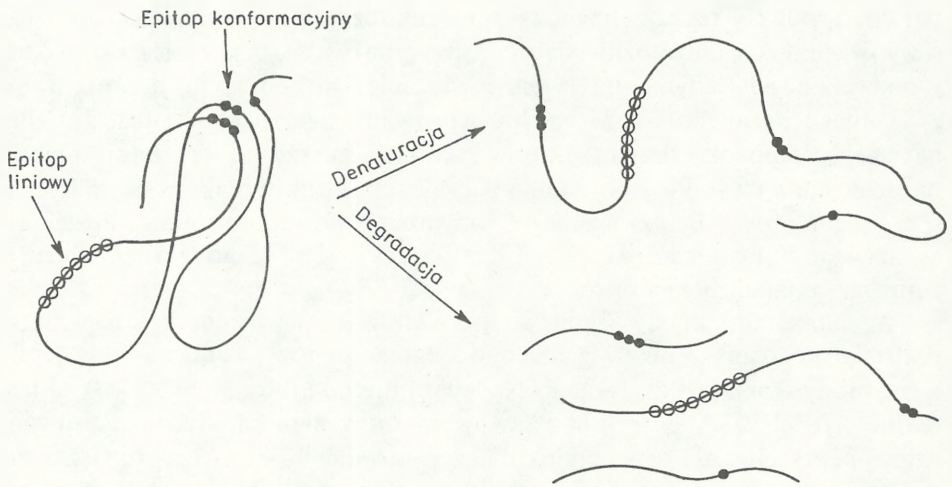
mi enzymami są alkaliczna fosfataza lub peroksydaza chrzanowa, które dają barwne produkty reakcji enzymatycznej. Inkubacje obu przeciwciał odbywają się w warunkach uniemożliwiających „fizyczną” adsorpcję białek do plastiku i pozwalających jedynie na swoiste wiązanie. Po odmyciu nadmiaru niezwiązanego koniugatu Ab2–enzym, wprowadza się roztwór substratu (bezbarnego) i po określonym okresie inkubacji mierzy się w czytniku płytek nasilenie barwy wynikłe z powstania barwnego produktu reakcji enzymatycznej i będące miarą ilości związanego enzymu, a pośrednio miarą ilości Ab1 związanego z antygenem. Test ten jest łatwy i szybki (4–5 godzin) i pozwala na jednoczesną analizę wielu próbek.

W celu charakterystyki epitopu porównuje się wiązanie przeciwciała do podstawowego antygeny z wiązaniem do jego analogów strukturalnych, produktów modyfikacji lub degradacji. Najlepszą metodą w tej sytuacji jest opłaszczanie płytki ELISA jednym podstawowym antygenem i mierzenie hamowania wiązania przeciwciała przez preinkubację jego stałej ilości z różnymi stężeniami porównywanych antygenów. Uzyskuje się w ten sposób krzywe hamowania, które pozwalają na wyznaczenie stężenia inhibitora potrzebnego do zahamowania wiązania przeciwciała w 50%. Metoda hamowania jest lepsza niż porównywanie wiązania do różnych unieruchomionych antygenów, gdyż eliminuje ona możliwe różnice w stopniu wiązania się różnych antygenów do płytki i zmiany konformacji antygeny spowodowane adsorpcją. Ponadto, metoda hamowania umożliwia oznaczenie aktywności niskocząsteczkowych form antygeny (np. jego fragmentów czy syntetycznych peptydów), które nie wiążą się do płytki.

STRATEGIE STOSOWANE DO IDENTYFIKACJI EPITOPÓW ANTYGENÓW BIAŁKOWYCH

Liczne białka zawierają dodatkowe składniki (np. cukry, grupy fosforanowe, hem i inne grupy prostetyczne) związane kowalencyjnie lub niekowalencyjnie z łańcuchem polipeptydowym. W celu sprawdzenia, czy przeciwciała rozpoznaje epitop peptydowy niezależny od potranslacyjnej modyfikacji anty-

geny, dokonuje się modyfikacji lub usunięcia tych dodatkowych składników. Zachowanie przez zmodyfikowane białko zdolności do reakcji z przeciwciałem wskazuje na epitop peptydowy, natomiast utrata aktywności antygenowej świadczy o pośredniej (wpływ na konformację białka) lub bezpośredniej (udział w reakcji z Ab) roli niebiałkowego składnika w epitopie. Jeżeli istnieją wskazówki, że badany epitop jest peptydowy, następnym etapem jest określenie, czy ma on charakter konformacyjny czy liniowy. O konformacyjnym charakterze epitopu świadczy utrata aktywności antygeny po jego denaturacji, fragmentacji proteolitycznej lub chemicznej, lub redukcji mostków dwusiarczkowych, jeśli takie są w antygenie obecne (Rys. 2).



Rys. 2. Liniowe i konformacyjne epitopy białek. Zachowanie epitopu liniowego i rozpad epitopu konformacyjnego w wyniku denaturacji lub fragmentacji antygeny białkowego

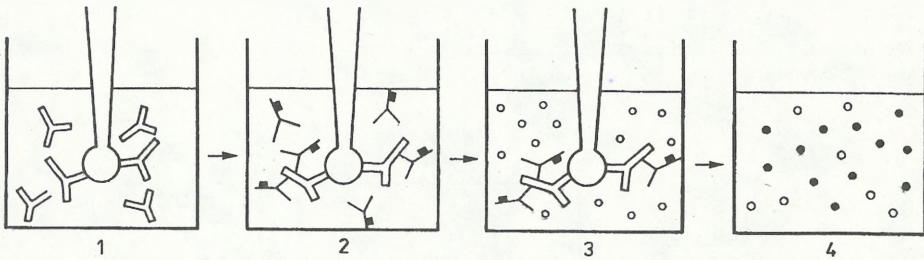
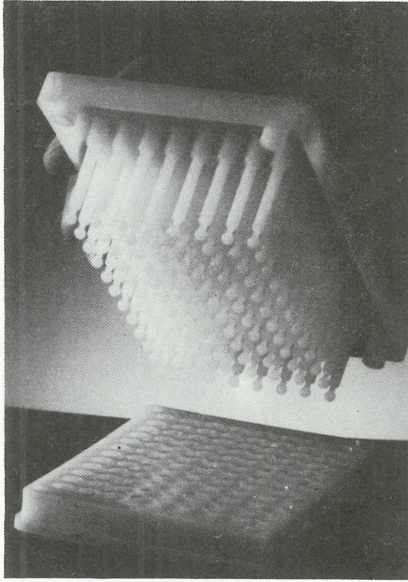
Epitopy konformacyjne, które są najczęstsze, są niestety znacznie trudniejsze do identyfikacji niż liniowe. Pewnych informacji o tym, jakie reszty aminokwasowe uczestniczą w epitopie, może dostarczyć badanie efektu ich modyfikacji na aktywność antygenową. Metoda ta ma jednak ograniczoną wartość, gdyż (i) wiele reszt aminokwasowych nie poddaje się modyfikacjom, (ii) reakcje modyfikacji chemicznych często nie są swoiste, (iii) oraz utrata aktywności w efekcie modyfikacji nie zawsze świadczy o bezpośrednim udziale modyfikowanego ugrupowania w reakcji z przeciwciałem. Na obecnym etapie rozwoju metod biologii molekularnej stosuje się też porównanie aktywności analogów antygeny otrzymanych w wyniku mutacji prowadzących do zmian określonych aminokwasów lub delecji odcinka łańcucha polipeptydowego. Wykorzystuje się też naturalne analogi, np. warianty genetyczne antygeny, lub ten sam typ białka pochodzący z różnych gatunków. Można też badać udział

niektórych aminokwasów antygeny w reakcji z przeciwciałem metodami spektralnymi (np. fluorescencyjnymi). Jednakże nawet w przypadku antygeny o znanej strukturze pierwszorzędowej i przestrzennej metody te dostarczają fragmentarycznych informacji i jedyną metodą umożliwiającą bezpośrednią identyfikację reagujących ze sobą obszarów Ag i Ab jest krystalografia rentgenowska [3, 5, 13, 26]. Metoda ta ma jednak również poważne ograniczenia: wymaga kosztownej i wysoce specjalistycznej aparatury oraz otrzymania kompleksów Ag—fragment Fab przeciwciała w formie krystalicznej. Z tych powodów analizowano dotąd tą metodą tylko kilka przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciw lizozymowi i neuraminidazie wirusa grypy. Badania te dostarczyły informacji o rozmiarze i kształcie powierzchni antygeny i przeciwciała, będącej w bezpośrednim kontakcie (zawsze kilkaset Å²), i pozwoliły na identyfikację reszt aminokwasowych antygeny obecnych w tej „kontaktowej” powierzchni. Na reszty te, których jest kilkanaście, składa się kilka krótkich sekwencji liniowych, usytuowanych w różnych fragmentach łańcucha polipeptydowego, oraz dodatkowe pojedyncze reszty aminokwasowe. Stwierdzono ściśle dopasowanie przestrzenne reagujących ze sobą obszarów Ag i Ab, co jest w zgodzie z tworzeniem tych kompleksów przez wiązania wymagające bliskiego kontaktu, tzn. wodorowe, hydrofobowe, Van der Waalsa. Tylko w niektórych kompleksach Ag—Ab istotną rolę odgrywają wiązania jonowe między kwaśnymi i zasadowymi resztami aminokwasowymi antygeny i przeciwciała. Powstało pytanie, czy reagujące ze sobą obszary Ag i Ab mają sztywne pasujące do siebie kształty (zasada zamka i klucza), czy też to dopasowanie przestrzenne jest indukowane w trakcie tworzenia kompleksu. Analiza rentgenowska struktury przestrzennej wolnego antygeny białkowego i tegoż antygeny w kompleksie z fragmentem Fab lub wolnego fragmentu Fab i jego kompleksu z niskocząsteczkowym antygenem (peptydy, progesteron) wykazała w większości przypadków niewielkie przesunięcia przestrzenne w regionie wiążącym, zarówno antygeny jak i przeciwciała, wskazując na indukowane dopasowanie się reagujących ze sobą obszarów. Dobrą ilustracją tego problemu jest też wykonane 20 lat temu proste doświadczenie z przeciwciałami poliklonalnymi przeciw natywnej mioglobinie (białko barwne zawierające hem i żelazo) i przeciw apomioglobinie (białko bezbarwne pozbawione hemu i żelaza) [1]. Oba antygeny różnią się nieznacznie konformacją. Przeciwciała anty-mioglobina dawały brunatny precypitat z tym antygenem i reagowały słabo z apomioglobina, wskazując konformacyjny charakter większości rozpoznawanych epitopów. Natomiast przeciwciała anty-apomioglobina zmieszane z natywną (brunatną) mioglobina dawały biały precypitat. Można sobie wyobrazić, że reakcja z przeciwciałem indukowała w mioglobinie konformację apomioglobiny, co powodowało usunięcie hemu i żelaza z kompleksu. Rosnąca obecnie liczba badań kompleksów Ag—Fab metodą krystalografii rentgenowskiej pozwoli na wyciąganie pewnych ogólnych wniosków z większym prawdopodobieństwem.

Analiza epitopu jest znacznie prostsza, jeśli ma on charakter liniowy, tzn. jest tworzony przez jeden określony odcinek sekwencji polipeptydu. Wstępnej lokalizacji tego epitopu można dokonać przez pomiar aktywności antygenowej fragmentów białka otrzymanych przez degradację proteolityczną lub chemiczną. Zastosowanie kilku metod degradacji rozcinających łańcuch polipeptydowy w różnych miejscach pozwala na ściślejszą lokalizację epitopu. Metoda ta jest szczególnie przydatna, jeśli sekwencja aminokwasowa antygeny i pozycje degradowanych wiązań peptydowych są znane. Zwykle jednak zidentyfikowany aktywny fragment antygeny jest większy od epitopu i dalej nie znamy rozmiaru epitopu, jego ścisłej lokalizacji, ani tego jakie reszty aminokwasowe są najważniejsze dla reakcji z przeciwciałem. Podobnie jak w przypadku epitopów konformacyjnych, można podjąć próby identyfikacji niektórych reszt przez badanie efektu ich modyfikacji na reakcję z przeciwciałem, ale jak omówiono powyżej, metoda ta nie zawsze jest skuteczna. Najpełniejszej informacji o epitopie sekwencyjnym dostarcza zastosowanie syntetycznych peptydów, których sekwencje można odpowiednio zaprogramować. Jednakże, mimo dużego postępu i automatyzacji metod syntezy peptydów, otrzymanie i tradycyjne testowanie (np. przez hamowanie przeciwciała w teście ELISA) dużej ich liczby jest pracochłonne i kosztowne. Przełomu w tej dziedzinie dokonały nowe, niekonwencjonalne metody otrzymywania peptydów i ich stosowania do analizy epitopów. Metody te są omówione poniżej.

ANALIZA EPITOPÓW ZA POMOCĄ SYNTETYCZNYCH PEPTYDÓW ZWIĄZANYCH Z FAZĄ STAŁĄ

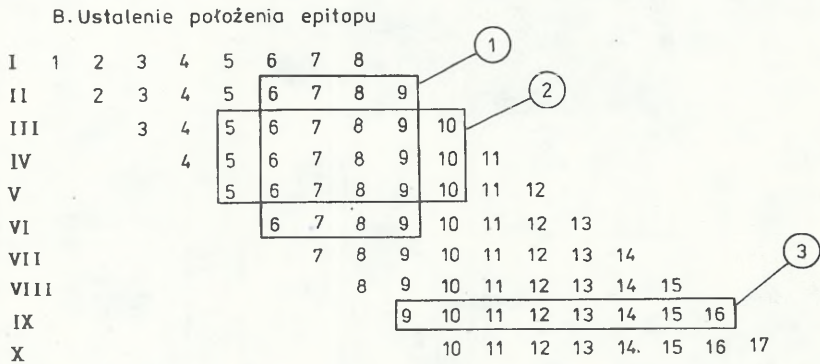
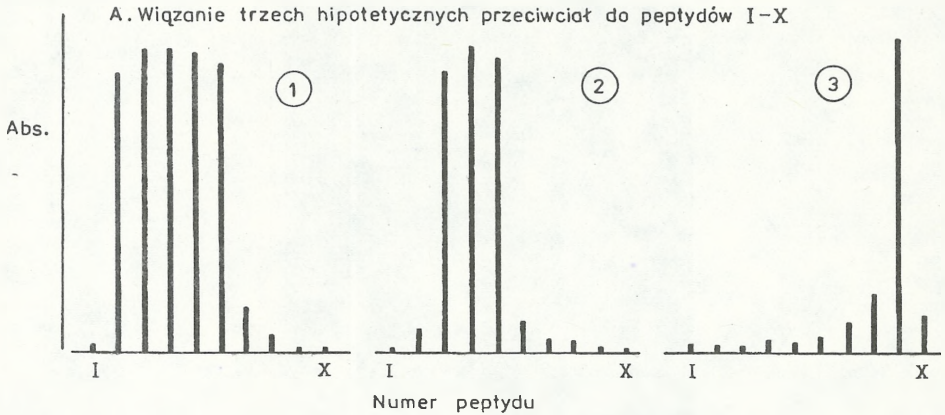
Nowymi elementami tej metody, wprowadzonej przez G e y s e n a i wsp. [7], są: (i) możliwość jednoczesnej syntezy dużej liczby peptydów związanych z fazą stałą oraz (ii) możliwość ich wielokrotnego używania w formie unieruchomionej do badania wiązania przeciwciał. W metodzie tej stosuje się bolce polietylenowe (kształtem przypominające grubą szpilkę, ang. pin), które na swej powierzchni mają grupy chemiczne pozwalające na przyłączenie aminokwasu przez grupę karboksylową, i które przymocowuje się do segmentów dających się zestawić w płytkę odpowiadającą rozmiarem płytce ELISA (Rys. 3). Dokonuje się na tych bolcach syntezy peptydów przez ich zanurzenie w roztworach odpowiednich pochodnych aminokwasów stosowanych w klasycznej syntezie peptydów, umieszczonych we wgłębieniu płytki. Ponieważ przyłączenie jednego aminokwasu zajmuje 1 dobę, można w ten sposób w ciągu kilku do kilkunastu dni (zależnie od długości peptydów) otrzymać na jednej płytce 96 peptydów. Następnie, bolce zawierające na swej powierzchni peptydy stosuje się do testowania wiązania przeciwciał metodą immunoenzymatyczną przez ich kolejne zanurzenie w roztworach: (i) testowanego przeciwciała (Ab1), (ii) drugiego przeciwciała anty-Ab1 sprzężonego z enzymem, (iii) substratu



Rys. 3. Pomiar wiązania przeciwciała do syntetycznych peptydów przyłączonych do polietylenowych bolców. Bolce inkubuje się kolejno we wgłębieniach płytki ELISA zawierających 1 – roztwór badanego przeciwciała Ab1, 2 – roztwór drugiego przeciwciała anty-Ab1 sprzężonego z enzymem, 3 – roztwór substratu enzymu; po wyjęciu płytki z bolcami (4) odczytuje się reakcję barwną

enzymu (Rys. 3). Po wykonaniu testu usuwa się z bolców związane przeciwciała roztworem siarczanu dodecyłu (SDS) i są one gotowe do następnego testu. Metoda ta w sposób decydujący rozwiązuje problem pracochłonności, ale niestety w mniejszym stopniu problem kosztów, ponieważ handlowo dostępne zestawy zawierające potrzebne materiały, reagenty i program komputerowy są obecnie bardzo drogie. Mimo to metoda ta jest stosowana w wielu laboratoriach [4, 9, 10, 16, 17, 23, 25].

Pierwszym etapem analizy antygeny, którego sekwencja jest znana, jest lokalizacja epitopu w łańcuchu polipeptydowym. W tym celu syntezuje się komplet „zachodzących na siebie” peptydów „pokrywających” sekwencję całego antygeny lub jego fragmentu, w którym wstępnie został zlokalizowany



Rys. 4. Lokalizacja epitopów liniowych w łańcuchu polipeptydowym antygeny za pomocą unieruchomionych „zachodzących na siebie” syntetycznych peptydów. Podano przykład 10 oktapeptydów (cyfry arabskie odpowiadają resztom aminokwasowym w tych pozycjach) „pokrywających” sekwencję 17 kolejnych reszt aminokwasowych w antygenie. Peptydy te testuje się na wiązanie przeciwciała, przykłady możliwych wyników pokazane są w górnej części ryciny. Jeżeli przeciwciało reaguje z peptydami II-VI (przykład 1) rozpoznaje ono epitop tetrapeptydowy 6-7-8-9; przeciwciało reagujące z peptydami III-V (przykład 2) jest skierowane na epitop heksapeptydowy 5-6-7-8-9-10; przeciwciało, które reaguje tylko z peptydem IX (przykład 3) rozpoznaje epitop oktapeptydowy 9-10-11-12-13-14-15-16 lub dłuższy, co można sprawdzić syntezując dłuższe peptydy

epitop. Pomiar wiązania przeciwciała do tych peptydów umożliwia ustalenie dokładnej lokalizacji i długości epitopu (Rys. 4). Dalszych informacji może dostarczyć synteza różnych analogów sekwencji stanowiącej epitop. Jeżeli epitop nie jest zbyt długi, można wykonać pełną „analizę zastąpieniową”, w której każdy z aminokwasów epitopu jest zastępowany wszystkimi innymi aminokwasami. Zważywszy, że w skład białek wchodzi 20 różnych aminokwasów, wymaga to syntezy $n \times 19$ peptydów, gdzie n jest liczbą reszt aminokwasowych w epitopie. W wyniku takiej analizy okazuje się, że nie wszystkie

reszty aminokwasowe w epitopie są jednakowo ważne dla reakcji z przeciwciałem. Aminokwasy, których zastąpienie przez jakikolwiek inny aminokwas powoduje utratę aktywności peptydu, odgrywają decydującą rolę w wiązaniu przeciwciała. Ponadto, w epitopach zwykle są obecne aminokwasy, które można zastąpić niektórymi lub wszystkimi innymi aminokwasami. Wynika z tego, że niesłuszne jest nazywanie wszystkich epitopów liniowych ciągłymi, ponieważ mogą one również zawierać reszty aminokwasowe nieistotne dla reakcji z przeciwciałem. Analizowane dotąd epitopy liniowe dla kilkudziesięciu przeciwciał monoklonalnych zawierały od czterech do kilkunastu reszt aminokwasowych. G e y s e n i wsp. [8] podzielili reszty aminokwasowe epitopów liniowych na dwie grupy, I (0–9 możliwych zastąpień) i II (10–19 możliwych zastąpień). Autorzy ci, analizując ponad 100 epitopów dla różnych przeciwciał monoklonalnych i poliklonalnych, wyliczyli, że średnio w jednym epitopie występuje 4,2 reszt grupy I.

Stosując wyżej opisaną metodę syntezy peptydów, można też podjąć próbę charakterystyki epitopu reagującego z przeciwciałem skierowanym przeciw białku o nieznannej sekwencji aminokwasów [6]. Zaczyna się w tym celu od syntezy na każdym bolcu mieszanki, np. oktapeptydów, które w 6 pozycjach zawierają różne aminokwasy (stosuje się na tych etapach mieszankę pochodnych wszystkich aminokwasów do syntezy), a w dwóch określonych pozycjach, np. 3 i 4, określoną parę aminokwasów, co przy 20 aminokwasach stanowi 400 kombinacji. Sekwencja dwupeptydowa obecna w peptydach o najwyższej aktywności jest dalej rozbudowywana do trójpeptydu przez dodanie każdego z aminokwasów do N- i C-końca dwupeptydu, co stanowi 40 nowych peptydów. Sekwencję trójpeptydową najaktywniejszego z tych 40 peptydów poszerza się dalej w myśl tej samej reguły i w ten sposób można dojść do dłuższej sekwencji wykazującej silną reakcję z przeciwciałem. Wprowadzanie dodatkowych elementów do syntezowanych w ten sposób peptydów, np. wstawianie β -alaniny umożliwiającej przegięcie peptydu, stwarza możliwości syntezy peptydu imitującego epitop konformacyjny. Wydedukowane tą metodą struktury nazywa się mimotopami, ponieważ nie muszą być one całkowicie identyczne z epitopem obecnym w antygenie białkowym. Konstrukcja mimotopów metodą syntezy peptydów wykonywana była w celu wykazania różnych możliwości tej metody, ale jest to zbyt skomplikowana technika do szerszego praktycznego zastosowania.

PEPTYDY SYNTEZOWANE PRZEZ FAGI

Nowym alternatywnym podejściem do analizy peptydowych ligandów (w tym epitopów dla przeciwciał) jest synteza sekwencji peptydowych w bakteriofagach [2, 20]. Syntezuje się w tym celu mieszaninę oligonukleotydów mogących kodować wszystkie możliwe sekwencje peptydu o określonej długości. Za pomocą technik inżynierii genetycznej wstawia się te oligonukleotydy do genu

fagowego (używano w tym celu głównie genu III). Ponieważ każdy fag zawiera „wstawkę” jednego z oligonukleotydów, wyraża on na powierzchni tylko jedną z sekwencji peptydowych, zawartą w N-końcowym fragmencie białka powierzchniowego pIII, będącego produktem genu III. Z mieszaniny fagów zawierających dziesiątki milionów różnych „wstawionych” sekwencji peptydowych izoluje się za pomocą techniki powinowactwa te, które wiążą się z badanym przeciwciałem (fagi + przeciwciało sprzężone z biotyną, absorpcja do płytki opłaszczonej streptawidyną). Adherentne fagi namnaża się w *Escherichia coli* i kilkakrotnie powtarza się ich frakcjonowanie z użyciem przeciwciała. Z frakcji fagów reagujących z przeciwciałem izoluje się indywidualne kolonie i oznacza się w tych fagach sekwencję odpowiedniego odcinka DNA, co prowadzi do ustalenia sekwencji peptydu reagującego z przeciwciałem. Stosując przeciwciała rozpoznające zidentyfikowany wcześniej epitop, wykazano, że metoda ta może być użyta do identyfikacji mimotopów bez znajomości sekwencji aminokwasowej antygeny i bez wstępnych informacji o swoistości przeciwciała. Rozwój i coraz szersze stosowanie metod biologii molekularnej otwiera więc zupełnie nowe możliwości analizy epitopów, jak i wyznaczania struktury peptydowych ligandów dla innych układów.

W JAKIM CELU ANALIZUJE SIĘ EPITOPY ANTYGENÓW BIAŁKOWYCH?

Badania te mają zarówno aspekt poznawczy, jak i praktyczny. Analiza epitopów prowadzi do poznania mechanizmów ważnej biologicznie reakcji Ag—Ab, a mianowicie do określenia wielkości obszarów reagujących ze sobą, reszt aminokwasowych uczestniczących w oddziaływaniach, typu tych oddziaływań, zmian konformacyjnych i energetycznych towarzyszących reakcji [3, 5, 8, 13, 15, 26]. Analiza licznych epitopów białkowych pozwala na ustalenie zależności między immunogennością i strukturą i stwarza możliwości przewidywania immunogenności określonych obszarów antygeny białkowego na podstawie znajomości jego pierwszorzędowej i przestrzennej budowy [19]. Znajomość struktury epitopów i mimotopów (tzn. struktur reagujących krzyżowo z przeciwciałem) dostarcza też możliwości modulacji właściwości immunogennych i antygenowych białka, co może znaleźć zastosowanie w medycynie. Przez odpowiednie modyfikacje struktury antygeny można zwiększyć jego immunogenność, jeżeli antygen stosowany jest np. jako szczepionka, lub też zmniejszyć immunogenność, jeżeli białko stosowane jest jako lek lub reagent immunodiagnostyczny *in vivo* i odpowiedź immunologiczna jest niepożądana.

Tematem szerokich badań jest zastosowanie syntetycznych peptydów do wywołania produkcji przeciwciał, które reagują z białkiem zawierającym tę sekwencję peptydową [11, 18, 21, 22, 24]. Zastosowanie peptydów nie mających właściwości patogennych jest bowiem najbezpieczniejszym rozwiązaniem przy

sporządzaniu szczepionek przeciwko patogennym białkom. Znajomość epitopów antygeny białkowego jest potrzebna do wyboru odpowiednich sekwencji peptydowych stosowanych jako immunogeny.

Ponadto, przeciwciała monoklonalne i poliklonalne są szeroko stosowane w diagnostyce i prognostyce medycznej, a także w terapii pewnych chorób. Dokładna znajomość epitopów rozpoznawanych przez te przeciwciała czyni z nich bardziej precyzyjne reagenty i pozwala niejednokrotnie na wyciąganie dalej idących wniosków z wykonanych badań. Niepodważalna jest też wartość przeciwciał o dobrze scharakteryzowanej swoistości w badaniach medycyny sądowej i w innych dziedzinach nie związanych bezpośrednio z immunologią.

Podsumowując, analiza epitopów nie tylko przyczynia się do lepszego zrozumienia procesów immunologicznych, ale również stwarza możliwości nowych rozwiązań aplikacyjnych w medycynie i biotechnologii.

ELWIRA LISOWSKA

PROTEINS AS ANTIGENS: REACTIONS WITH ANTIBODIES AND ANALYSIS OF EPITOPES

S u m m a r y

The following problems are shortly reviewed: induction of humoral response against protein antigens, linear and conformational epitopes of proteins in the context of protein structure, strategies used for identification of epitopes, including the PEPSCAN method. The approaches to identification of epitope-mimicking structures (mimotopes) in the proteins of an unknown amino-acid sequence with the use of multipin peptide synthesis or peptide library on phages are also described.

LITERATURA*

1. Crumpton M. J. — *Protein Antigens. The molecular bases of antigenicity and immunogenicity.* [w] *The Antigens*, vol. 2 (Sela M., red.), s. 1–79, 1974.
2. Cwirła S. E., Peters E. A., Barrett R. W., Dower W. J. — *Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 6378–6382, 1990.
3. Davies D. R., Padlan E. A., Sheriff S. — *Antibody Antigen Complexes.* *Ann. Rev. Biochem.* 59, 439–473, 1990.
4. Duk M., Czerwiński M., Lisowska E. — *Identification of an epitope recognized by the monoclonal antibody PEP80 in the C-terminal cytoplasmic fragment of glycophorin A.* *Hybridoma*, 11, 181–189, 1992.
5. Getzoff E. D., Tainer J. A., Lerner R. A., Geysen H. M. — *The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens.* *Adv. Immunol.* 43, 1–97, 1988.

* Z powodu bardzo obszernej literatury dotyczącej omawianego tematu oparto się głównie na opracowaniach przeglądowych, podając jedynie nieliczne prace doświadczalne jako przykłady.

6. Geysen H. M., Rodda S. J., Mason T. J. — *A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant*. *Molec. Immunol.* 23, 709–715, 1986.
7. Geysen H. M., Rodda S. J., Mason T. J., Tribbick G., Schoofs P. G. — *Strategies for epitope analysis using peptide synthesis*. *J. Immunol. Meth.* 102, 259–274, 1987.
8. Geysen H. M., Mason T. J., Rodda S. J. — *Cognitive Features of Continuous Antigenic Determinants*. *J. Molec. Recogn.* 1, 32–41, 1988.
9. Horsfall A. C., Hay F. C., Soltys A. J., Jones M. G. — *Epitope Mapping*. *Immunol. Today* 12, 211–213, 1991.
10. Janvier B., Archinard P., Mandrand B., Gaudeau A., Barin F. — *Linear B cell epitopes of the major core protein of human immunodeficiency virus types 1 and 2*. *J. Virol.* 64, 4258–4263, 1990.
11. Kara U., Pye D., Lord R., Pam C., Gauld H., Geysen M., Jones G., Stenzel D., Kidson C., Saul A. — *Immune response to a synthetic peptide corresponding to an epitope of a parasitophorous vacuole membrane antigen from Plasmodium falciparum*. *J. Immunol.* 143, 1334–1339, 1989.
12. Köhler G., Milstein C. — *Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature* 256, 495–497, 1975.
13. Laver W. G., Air G. M., Webster R. G., Smith-Gill S. J. — *Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities*. *Cell* 61, 553–556, 1990.
14. Lisowska E. — *Przeciwciała monoklonalne i ich zastosowania w badaniach biochemicznych*. *Post. Biochem.* 32, 5–13, 1986.
15. Nowotny J. — *Protein antigenicity: a thermodynamic approach*. *Mol. Immunol.* 28, 201–207, 1991.
16. Ralston S., Hoepflich P., Akita R. — *Identification and synthesis of the epitope for a human monoclonal antibody which can neutralize human T cell leukemia/lymphotropic virus type I*. *J. Biol. Chem.* 264, 16343–16346, 1989.
17. Ramarany R., Jones G., Lord R. — *Characterisation of an inhibitory monoclonal antibody-defined epitope on a malaria vaccine candidate antigen*. *Immunol. Lett.* 23, 305–310, 1990.
18. Van Regenmortel M. H. V. — *Antigenic cross-reactivity between proteins and peptides: new insights and applications*. *TIBS* 12, 237–240, 1987.
19. Van Regenmortel M. H. V., Daney de Marcillac G. — *An assessment of prediction methods for locating continuous epitopes in proteins*. *Immunol. Lett.* 17, 95–108, 1988.
20. Scott J. K., Smith P. — *Searching for peptide ligands with an epitope library*. *Science* 249, 386–390, 1990.
21. Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Green N., Lerner R. A. — *Synthetic peptide immunogens as vaccines*. *Ann. Rev. Microbiol.* 37, 351–371, 1983.
22. Spangler B. D. — *Binding to native proteins by antipeptide monoclonal antibodies*. *J. Immunol.* 146, 1591–1595, 1991.
23. Tindle R. W., Smith J. A., Geysen H. M., Selvey L. A., Frazer I. H. — *Identification of B epitopes in human papillomavirus type 16E7 open reading frame protein*. *J. Gen. Virol.* 71, 1347–1354, 1990.
24. Traish A. M., Wotiz H. H. — *Monoclonal and polyclonal antibodies to human progesterone receptor peptide (533–547) recognize a specific site in unactivated (85) and activated (45) progesterone receptor and distinguish between intact and proteolyzed receptor*. *Endocrinology* 127, 1167–1175, 1990.
25. Waśniowska K., Duk M., Czerwiński M., Steuden I., Duś D., Radzikowski C., Bartosz-Bechowski H., Konopińska D.,

- Lisowska E. — *Analysis of peptidic epitopes recognized by the three monoclonal antibodies specific for the same region of glycophorin A but showing different properties.* *Molec. Immunol.*, 29, 783–791, 1992.
26. Wilson I. A., Stanfield R. L., Rini J. M., Arevalo J. H., Schulze-Gahmen U., Fremont D. H., Stura E. A. — *Structural aspects of antibodies and antibody-antigen complexes.* [w] *Catalytic Antibodies* (Chadwick D. J., red.), Wiley, Chichester, s. 13–39, 1991.