

Библиотеки пептидов и эпитопы

Проверила: Жусупова А.И.
Выполнили: Каби К.К.
Карипбаева Р.К.
Группа: Бт14-15р

Общие сведения

- В организме многие биологические процессы (например, регуляция транскрипции генов под действием различных белковых факторов, взаимодействие белковых лигандов с рецепторами на поверхности клеток, специфическое связывание антигенов антителами) регулируются специфическими белок-белковыми или белково-нуклеиновыми взаимодействиями. Поэтому понимание молекулярных механизмов взаимодействия белковых лигандов с рецепторами имеет большое фундаментальное и прикладное значение.

Общие сведения

- Разработка новых лекарственных препаратов белковой природы начинается с идентификации исходной последовательности аминокислот, обладающей требуемой биологической активностью (так называемая **основная последовательность**). Однако пептиды с основной последовательностью аминокислот могут обладать и нежелательными биологическими свойствами: низкой активностью, токсичностью, малой стабильностью в организме и т.п.

Библиотеки пептидов

- До появления библиотек пептидов улучшение их биологических свойств осуществляли путем последовательного синтеза большого числа аналогов и проверкой их биологической активности, что требовало больших затрат времени и средств. С помощью автоматических синтезаторов стало возможным создавать за короткое время тысячи **различных пептидов**.

- Методы **направленного мутагенеза** также позволили расширить число белков, получаемых одновременно и последовательно тестируемых на биологическую активность. Разработанные подходы к созданию библиотек пептидов привели к получению миллионов последовательностей аминокислот, требуемых для проведения эффективного скрининга с целью выявления среди них пептидов, максимально удовлетворяющих предъявляемым критериям.
- **Библиотеки пептидов** используются для исследования взаимодействия антител с антигенами, получения новых ингибиторов ферментов и антимикробных агентов, конструирования молекул, обладающих требуемой биологической активностью, для придания новых свойств белкам, например, антителам.

Библиотеки пептидов: химический синтез

- При **химическом синтезе**, после присоединения очередных аминокислот в индивидуальных реакционных смесях, к пептидам, иммобилизованным на микроносителях, содержимое всех реакционных смесей объединяют и разделяют на новые порции, которые используют на следующей стадии присоединения новых аминокислотных остатков. После проведения ряда таких этапов оказываются синтезированными пептиды, содержащие последовательности использованных в синтезе аминокислот во всевозможных случайных сочетаниях.

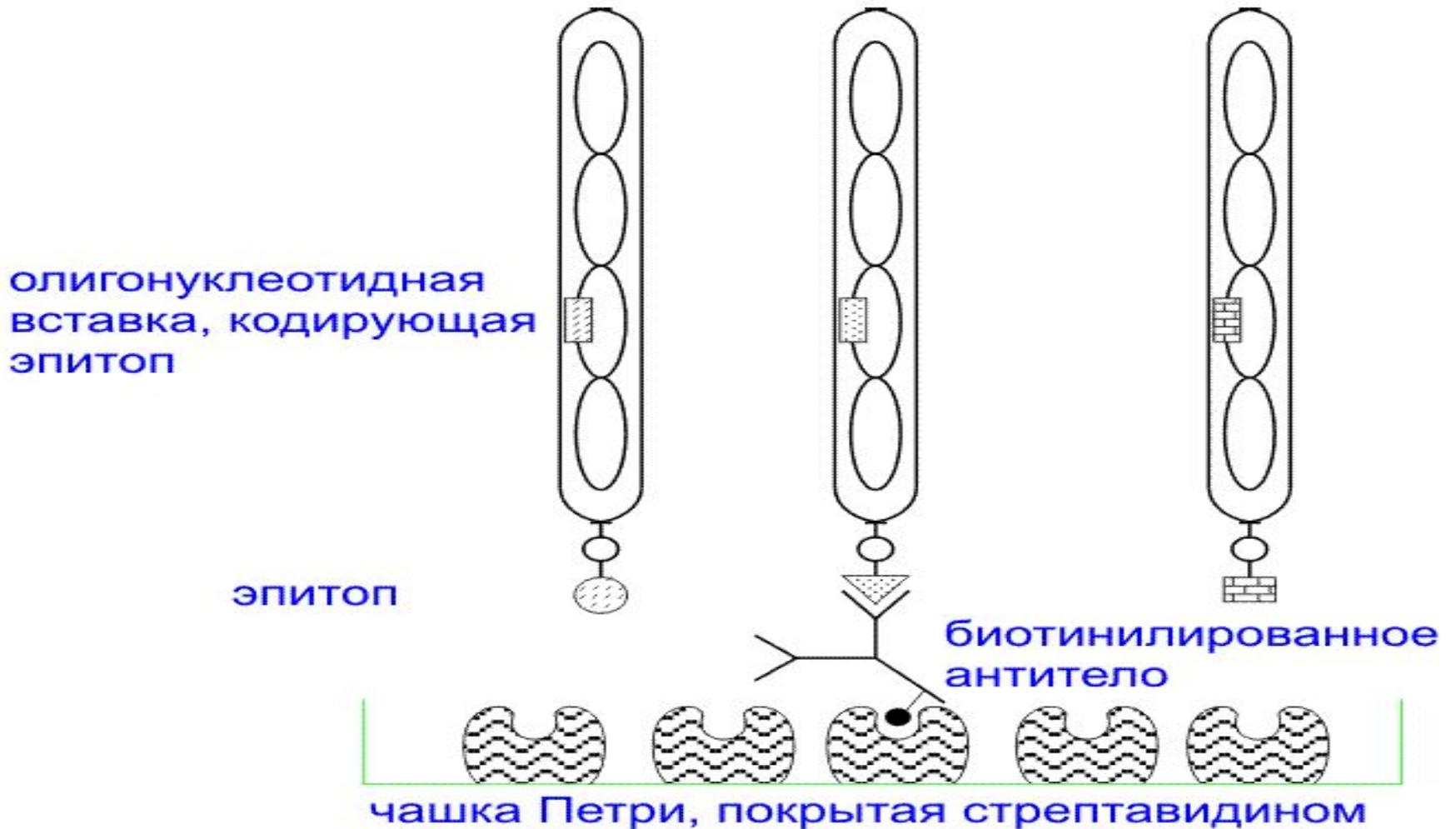
Библиотеки пептидов: твердофазный синтез

- Библиотеки пептидов получают с помощью твердофазного синтеза пептидов, при котором на каждой стадии химического присоединения очередной аминокислоты к растущим пептидным цепям используют эквимольные смеси всех или некоторых аминокислот-предшественников. На конечной стадии синтеза проводят отделение пептидов от носителя, т.е. перевод их в растворимую форму.

Библиотеки пептидов: скрининг

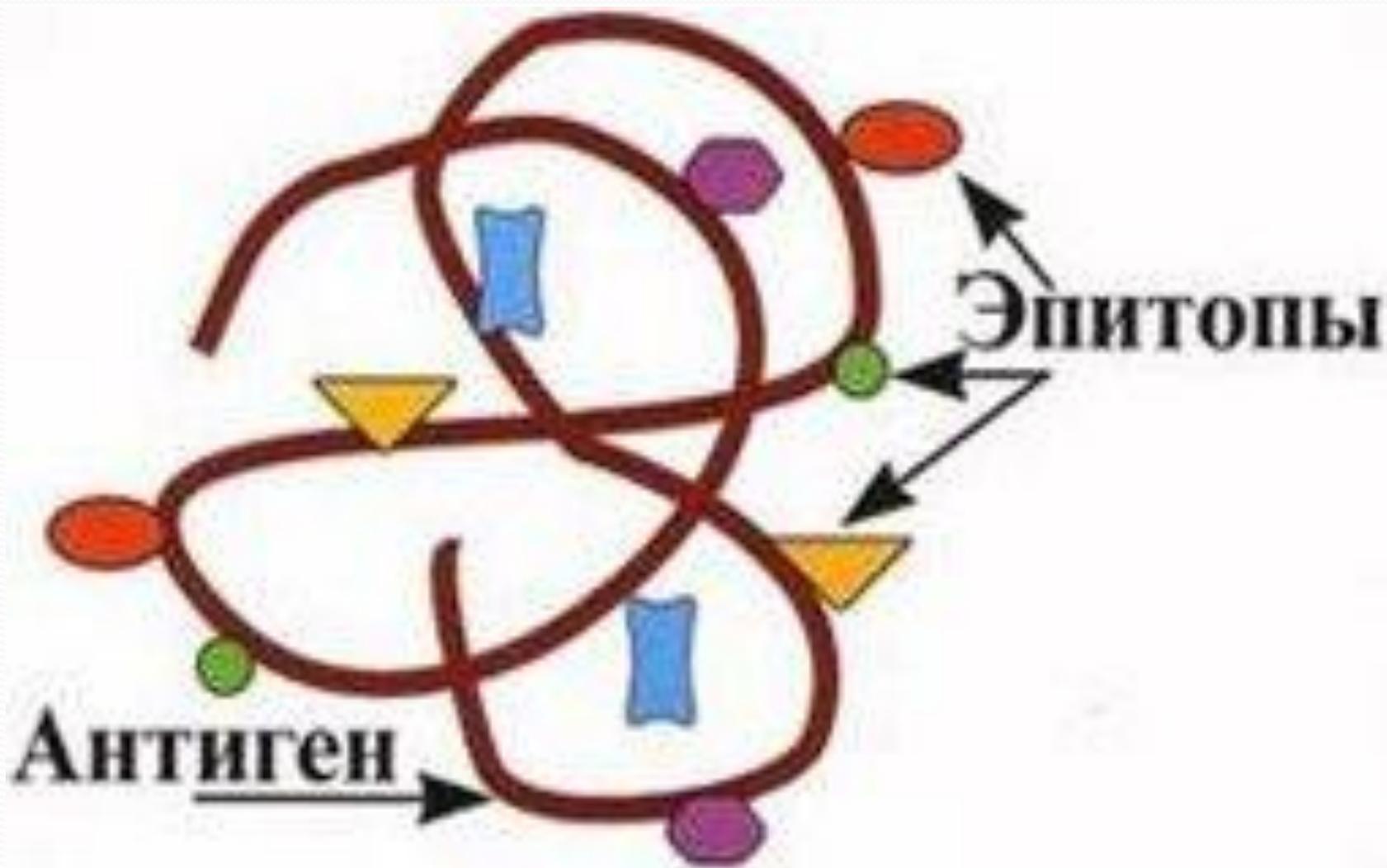
- Для выделения пептидов, имитирующих определенные эпитопы, используют биотинилированные моноклональные антитела соответствующей специфичности, которые иммобилизуют на твердой подложке с помощью стрептавидина. Фаговые частицы, экспрессирующие на своей поверхности соответствующие эпитопы, взаимодействуют с антителами и задерживаются подложкой, тогда как другие рекомбинантные фаговые частицы удаляются в процессе промывания. Задержанные на подложке фаговые частицы далее элюируют кислотой, индивидуальные клоны размножают в бактериальных клетках и экспрессированные на них эпитопы исследуют по различным критериям.

Схема отбора фагов, обладающих требуемыми эпитопами



ЭПИТОПЫ

- **Эпитоп** [греч. *epi* — на, над, сверх и *topos* — место, местность] — группа аминокислотных остатков белкового антигена или участок полисахаридной цепи, которые взаимодействуют со специфичными антителами. Одна макромолекула (антиген) может содержать много различных Э., каждый из которых способен стимулировать продукцию различных специфичных антител.
- Эпитоп - это та часть антигена , которая взаимодействует с паратопом . Эпитопы часто включают аминокислотные остатки, которые находятся далеко друг от друга в первичной последовательности, но собраны в один эпитоп в результате упаковки полипептидной цепи в нативном белке.



Библиотеки пептидов: применение

- В одном из исследований, проведенных с использованием пептидных библиотек, из библиотеки были выделены пептиды, последовательность аминокислот в которых резко отличалась от последовательности аминокислот истинного **эпитопа** исследуемого антигена. Тем не менее, такой пептид прочно связывался со специфическими антителами и конкурировал за связывание с природным антигеном. Это позволило сделать вывод о возможности существования **мимотопов** - коротких пептидов, имитирующих природные эпитопы, последовательности аминокислот которых существенно различаются между собой. Удалось установить канонические последовательности аминокислот пептидов, имитирующих эпитопы природных белков, а среди них идентифицировать аминокислотные остатки, играющие ключевую роль во взаимодействии антиген-антитело.

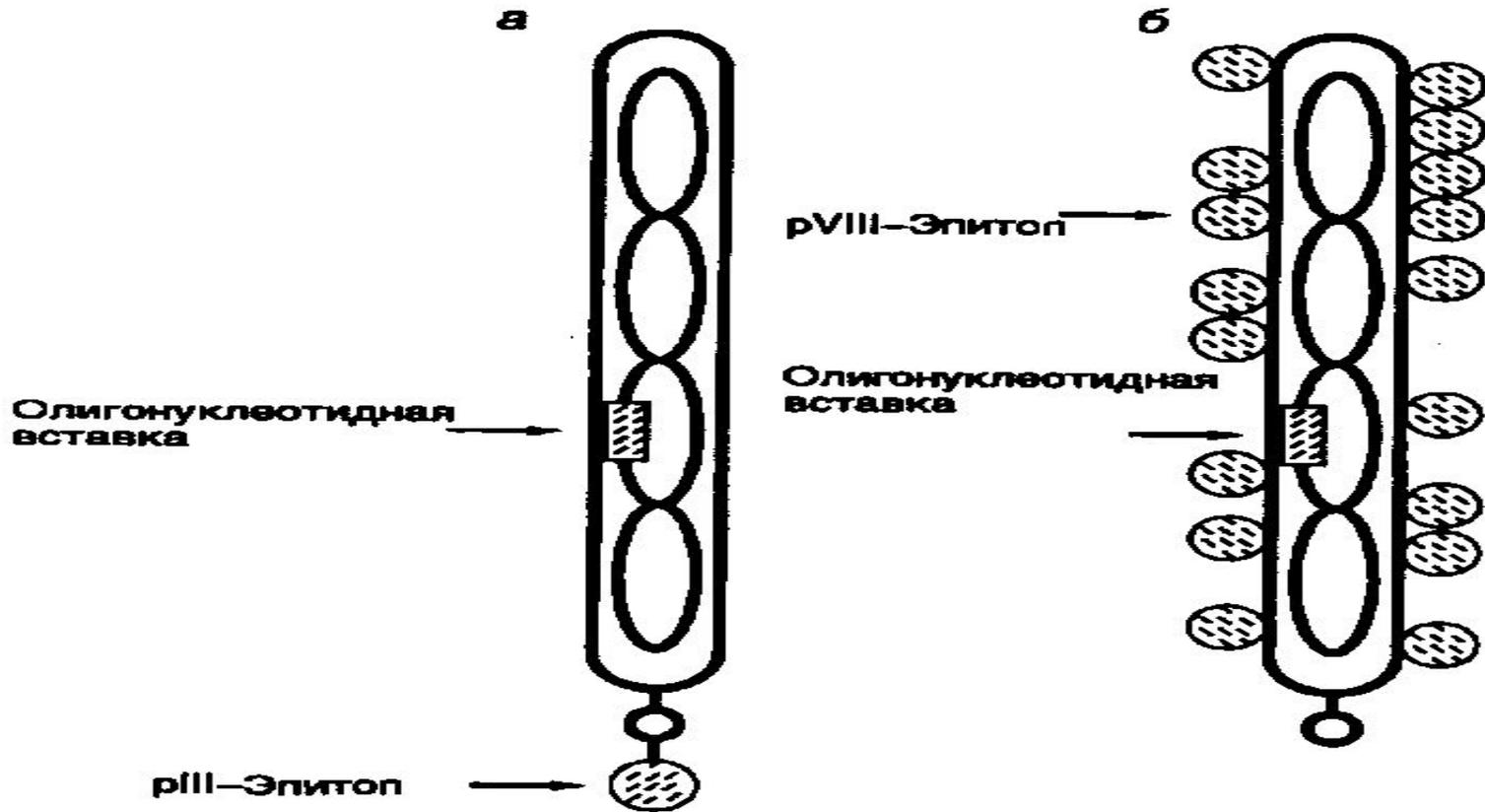
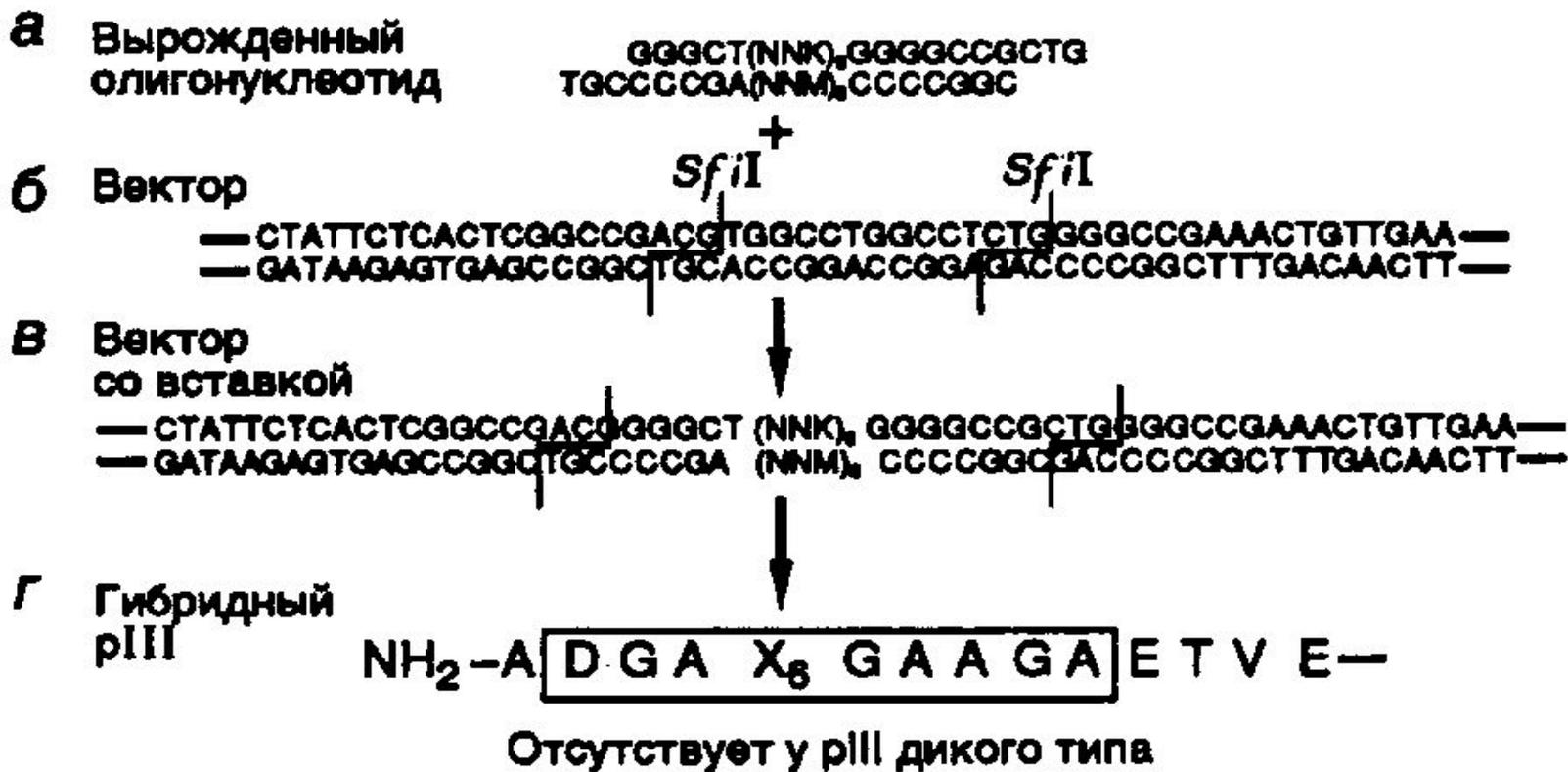


Схема экспрессии пептидных эпитопов на поверхности оболочки нитевидных колифагов

- Пептидные эпитопы находятся в составе гибридных полипептидных цепей минорного белка рIII (а) или основного белка рVIII вирусной оболочки (б). Стрелки указывают положение кодирующих эпитопы олигонуклеотидных фрагментов в геноме бактериофага, а также положение самих эпитопов. В составе полипептида рIII (а) показана только одна копия эпитопа (на самом деле их число достигает 4-5)
- В наиболее хорошо разработанной системе, позволяющей конструировать библиотеки пептидов генно-инженерными методами, используют небольшой нитевидный колифаг f1 и два его белка: основной и минорный белки оболочки рVIII и рIII. In vivo оба белка синтезируются в виде полипептидных цепей с короткими N-концевыми сигнальными последовательностями, которые отщепляются сигнальной пептидазой во время их созревания после переноса к внутренней части бактериальной мембраны. Зрелые белки встраиваются в оболочку бактериофага в процессе ее сборки. При этом белок рVIII образует основную оболочку бактериофага, тогда как четыре или пять молекул рIII ассоциированы с концевой частью вириона и обеспечивают взаимодействие вирусных частиц с половыми ворсинками клеток *E. coli*

Схема конструирования рекомбинантного вирусного генома, содержащего вставки вырожденных олигонуклеотидов, для получения библиотеки эпитопов



- Одним из приложений библиотек пептидов является **идентификация пептидных лигандов, имитирующих "структурные" эпитопы**, образующиеся на поверхности белковых глобул в результате сворачивания их полипептидных цепей, что сопровождается пространственным сближением аминокислотных остатков, расположенных на значительном расстоянии друг от друга.
- С помощью пептидных библиотек возможна **идентификация пептидных аналогов различных эпитопов небелковой природы**.
- Возможно использование пептидных библиотек для получения новых лекарственных препаратов, создания диагностических средств и производства эффективных вакцин.
- С использованием библиотеки эпитопов можно получить **пептидные маркеры**, с помощью которых было бы возможно следить за специфичностью аутоантител во время развития патологического процесса и определять специфичность аутоантител при заболеваниях неизвестной этиологии.