

ХАРАКТЕРИСТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ С ГАЛОFOBНЫМИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

Горбунов Н.П., Костевич В.А., Соколов А.В.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Миелопероксидаза (Мро) – димерная пероксидаза нейтрофилов и моноцитов, каждый протомер димера состоит из легкой и тяжелой цепи, с которой ковалентно связан гем. В результате взаимодействия с пероксидом водорода Соединение I Мро способно окислить хлорид-ион до хлорноватистой кислоты – мощного антимикробного и галогенирующего агента. Ряд социально значимых заболеваний, в том числе атеросклероз, сахарный диабет, хроническая почечная недостаточность, ревматоидный артрит, сопровождается активацией нейтрофилов и моноцитов, секрецией Мро и накоплением галогенированных молекул – биомаркеров галогенирующего стресса. В настоящее время Мро рассматривается в качестве мишени противовоспалительной терапии. Вместе с тем полное подавление активности Мро может грозить развитием инфекций, а также препятствовать нормальному разрешению воспаления. В качестве альтернативного подхода нами рассматривается создание иммуноаффинного сорбента, специфически связывающего избыток Мро. Целью данной работы было получение моноклональных антител, анализ их специфичности и сайта взаимодействия с Мро человека.

С помощью иммунизации мышей препаратом Мро человека и последующей гибридизации лимфоцитов по Милштейну-Келлеру нами была получена гибридома (клон 2F7), продуцирующая моноклональные антитела, интересным свойством которых было разобщение комплекса с Мро в нейтральной среде при повышении концентрации NaCl выше 1 М. Это свойство подтвердилось в условиях твердофазного иммуноферментного анализа и при иммуноаффинной хроматографии Мро на 2F7-агарозе. Полученные антитела 2F7 были названы галофобными.

С целью установления специфичности 2F7 к Мро был проведен Вестерн-блоттинг с образцами белков плазмы крови и экстракта нейтрофильных лейкоцитов, который показал, что 2F7 специфически взаимодействуют с димерной Мро в отсутствие восстановителя в образце, а при восстановлении взаимодействуют с тяжелой цепью Мро. Оказалось, что 2F7 не взаимодействуют с Мро из нейтрофилов крыс, несмотря на 97 % гомологию её первичной последовательности с Мро человека. Модификация Мро флуорескаминам, реагирующим с первичными аминогруппами, отменила взаимодействие с 2F7. Наконец, иммуноаффинная хроматография плазмы крови с добавлением Мро показала, что фермент сорбируется на 2F7-агарозе вместе со своим физиологическим ингибитором, церулоплазмином. Т.е. антитела 2F7 не конкурируют с церулоплазмином за взаимодействие с Мро. Учитывая, что трехмерная структура комплекса Мро и церулоплазмина была установлена с помощью рентгеноструктурного анализа, мы провели анализ возможных сайтов взаимодействия с антителами 2F7, сравнивая отличия между Мро человека и крысы, а также площадки контакта с церулоплазмином в структуре PDB: 4ejx. В результате было выявлено две последовательности, обогащенные катионными аминокислотными остатками: 451LGTVLRNKL460 и 485LKRGKGRVG492. Следующим этапом работы планируется синтез указанных пептидов и анализ их взаимодействия с антителами 2F7.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ – МД-1901.2020.4.