

УДК: 577.112.573.4

Сравнительный анализ структуры внеклеточных петель главного белка наружной мембраны серотипов E и K *Chlamydia trachomatis* и их антигенности

О.А.Литовченко^{1,2}

¹Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина (Харьков)

²ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины» (Харьков)
olgabelozorova@gmail.com

Анализировали структуры главного белка наружной мембраны (МOMP), его внеклеточных петель и переменных доменов серотипов E и K микроорганизмов *Chlamydia trachomatis* во взаимосвязи с особенностями образования антител к их антигенам. Показано, что ответ антител на антигены переменных доменов в значительной степени определяется характером экспонирования эпитопов в окружающей среде, их гидрофильностью, а также отсутствием экранирования другими внешними петлями. Отсутствие антител против первого и третьего переменных доменов МOMP серотипа E может быть следствием экранирования доменов расположенными рядом третьей и седьмой внеклеточными петлями.

Ключевые слова: *Chlamydia trachomatis*, серотипы E, K, главный белок наружной мембраны, переменные домены, образование антител, модели внешних петель, экранирование.

Порівняльний аналіз структури позаклітинних петель головного білка зовнішньої мембрани серотипів E і K *Chlamydia trachomatis* та їх антигенності

О.А.Литовченко

Аналізували структурні моделі головного білка зовнішньої мембрани мікроорганізмів *Chlamydia trachomatis*, його позаклітинних петель і варіабельних доменів серотипів E і K у зв'язку з особливостями відповіді антитіл на їх антигени. Показано, що утворення антитіл на антигени варіабельних доменів визначається характером експонування епітопів в навколишнє середовище, їх гідрофільністю, а також відсутністю екранування іншими зовнішніми структурами.

Ключові слова: *Chlamydia trachomatis*, серотипи E, K, головний білок зовнішньої мембрани, варіабельні домени, утворення антитіл, моделі зовнішніх петель, екранування.

Comparative analysis of the structure of the extracellular loops of the main outer membrane protein of serotypes E and K of *Chlamydia trachomatis* and their antigenicity

О.А.Lytovchenko

Structural models of the microorganism *Chlamydia trachomatis* main outer membrane protein, its extracellular loops and variable domains of serotype E and K have been analyzed in connection with their ability to induce antibody response. It has been shown that the formation of antibodies to antigens of variable domains is largely determined by degree of their epitopes exposure in the environment, their hydrophilic properties, and the lack of shielding with other structures.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, serotype E, K, main outer membrane protein, variable domains, antibodies formation, models of external loops, shielding.

Введение

Для понимания особенностей строения и функции белков большое значение имеет моделирование пространственной структуры пептидов, исходя из их аминокислотной последовательности. В настоящем исследовании этот метод был применен к внеклеточным петлям главного белка наружной мембраны (МOMP) микроорганизма *Chlamydia trachomatis* для объяснения особенностей образования антител к его антигенам. Основные антигены МOMP, вызывающие

образование антител, локализованы в четырех переменных доменах VDI, VDII, VDIII и VDIV, находящихся соответственно на второй (L2), третьей (L3), пятой (L5) и седьмой (L7) внеклеточных петлях, экспонированных во внеклеточную среду. Первичная структура переменных доменов у различных серотипов хламидий может существенно отличаться (Wang et al., 2006), как и образование антител на их антигены. В настоящей работе проанализирована связь структуры внеклеточных петель (и их переменных доменов) MOMP с их антигенностью для двух серотипов хламидий E и K, которые заметно отличаются по выраженности ответа антител на различные переменные домены. Одновременно с особенностями структуры пептидных цепей анализировали также показатели их гидрофильности, которые широко используются для выявления антигенных эпитопов в пептидах (Hopp, Woods, 1981).

Материалы и методы

Основные структурные элементы MOMP, его внеклеточные петли и их переменные домены рассматривали с позиций модели Wang et al. (2006).

Моделирование всей молекулы MOMP было проведено на основе гомологии с использованием сервера SWISS-MODEL (<http://web.expasy.org>), за основу взята структура порина OmpF *E. coli* (protein data bank accession number 2OMF, chain A). Для определения гомологичных участков и выравнивания последовательностей использовали программу Geneious® Pro 5.6.5.

Модели внеклеточных петель MOMP получали с помощью программы PEP-FOLD на сервере <http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/PEP-FOLD/> (Maupetit et al., 2010). При выборе варианта модели основным критерием служила максимальная близость начальной и конечной аминокислот пептидной цепи, что соответствует параллельному расположению внутримембранных β-стрэндов, с которыми внеклеточные петли связаны.

Показатели ответа антител на антигены переменных доменов MOMP получены из обзора (Nunes et al., 2009), интенсивность образования антител к переменному домену характеризовали условным показателем, равным количеству моноклональных антител против эпитопов соответствующего домена, обнаруженных исследователями, работы которых суммированы в Supplementum обзора Nunes et al., 2009.

Анализ гидрофильности пептидов проводили с использованием коэффициентов (Hopp, Woods, 1981). Определяли средний показатель для всей цепи, а также для 7-аминокислотных фрагментов на протяжении всей цепи (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydropathy/>).

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены размеры внеклеточных петель и переменных доменов MOMP серотипов E и K *S. trachomatis*, выраженности ответа антител на их антигены, а также средние показатели гидрофильности.

Таблица 1.

Некоторые характеристики переменных доменов MOMP и их внеклеточных петель серотипов E и K *S. trachomatis*

Показатель	Серо-тип	VDI	VDII	VDIII	VDIV
Выработка антител (количество моноклональных антител против домена, по данным Nunes et al., 2009)	E	0	3	0	13
	K	2	2	2	9
Размеры доменов (количество аминокислот)	E	20	21	12	32
	K	22	22	12	33
Размеры внеклеточных петель (количество аминокислот)	E	30	25	16	32
	K	32	26	16	33
Гидрофильность петель (средний коэффициент, Hopp, Woods, 1981)	E	0,25	0,12	-0,36	0,056
	K	0,19	0,007	-0,41	0,024

Основные антигенные эпитопы MOMP обоих серотипов локализируются на четвертом переменном домене, остальные домены стимулируют выработку антител значительно слабее, при

этом у серотипа Е антитела вырабатываются только против второго варибельного домена, тогда как у серотипа К образование антител происходит в равной степени против антигенов трех первых доменов.

Анализ структуры молекулы MOMP, приведенной на рис. 1, позволяет объяснить значительную антигенную активность четвертого варибельного домена (VDIV) его большими размерами и высокой степенью экспонирования во внеклеточную среду. Остальные внеклеточные петли экспонированы значительно хуже. Хорошее экспонирование сочетается с низким уровнем гидрофильности, что может быть проявлением адаптационного снижения антигенности поверхностных структур, уменьшающего иммунный ответ макроорганизма.

К сожалению, модель всего MOMP, построенная на основе первичной структуры гена *omp1* генотипа F (Wang et al., 2006) и его гомологии с порином *E. coli*, недостаточно точно передает структуры внеклеточных петель. В связи с этим для их более точного моделирования была использована программа PEP-FOLD (Maupetit et al., 2010).

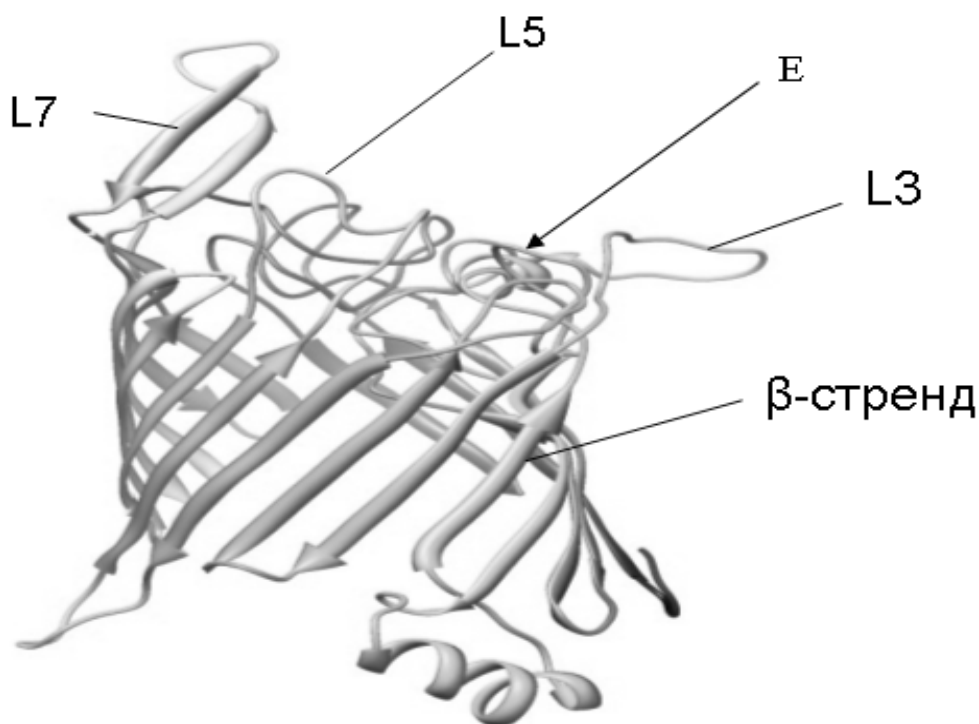


Рис. 1. Модель MOMP. Трансмембранная часть образована гидрофобными β -стрэндами. L3, L5, L7 – третья, пятая и седьмая внеклеточные петли с вторым третьим и четвертым варибельными доменами. В наибольшей степени экспонирована L7 с четвертым варибельным доменом. Видно экранирование второй петли третьей (E)

На рис. 2 приводятся модели второй внеклеточной петли, особенности их структуры позволяют объяснить значительные отличия в антигенности первого варибельного домена серотипов Е и К, которые состоят в отсутствии образования антител против VI серотипа Е при достаточно выраженной реакции на антигены серотипа К.

Особенностью структуры второй внеклеточной петли серотипа Е можно считать компактную свертку и удаленность от поверхности ее цепи, ее экспонирование минимизировано, все это ухудшает представление антигенных детерминант и может обуславливать низкий уровень антителообразования. Варибельный домен серотипа К более развернут, эпитопы верхней части цепи хорошо экспонированы, все это соответствует активной выработке антител, связывающихся с верхней частью молекулы, отмеченной стрелками.

Средний показатель гидрофильности у серотипа Е несколько выше, чем у К, однако при анализе 7-аминокислотных фрагментов оказывается, что у серотипа Е гидрофильные участки находятся в начале и конце цепи, в то время как в центральной части гидрофильность отрицательная. У серотипа К – наоборот, центральная часть, связанная с вариабельным доменом, характеризуется положительной гидрофильностью.

Дополнительным фактором, снижающим ответ на антигены первого вариабельного домена, может быть частичное экранирование его достаточно большой соседней третьей внеклеточной петлей, ее структура представлена на рис. 3. Косвенным подтверждением этого могут быть более высокие средние показатели гидрофильности второй петли по сравнению с другими петлями.

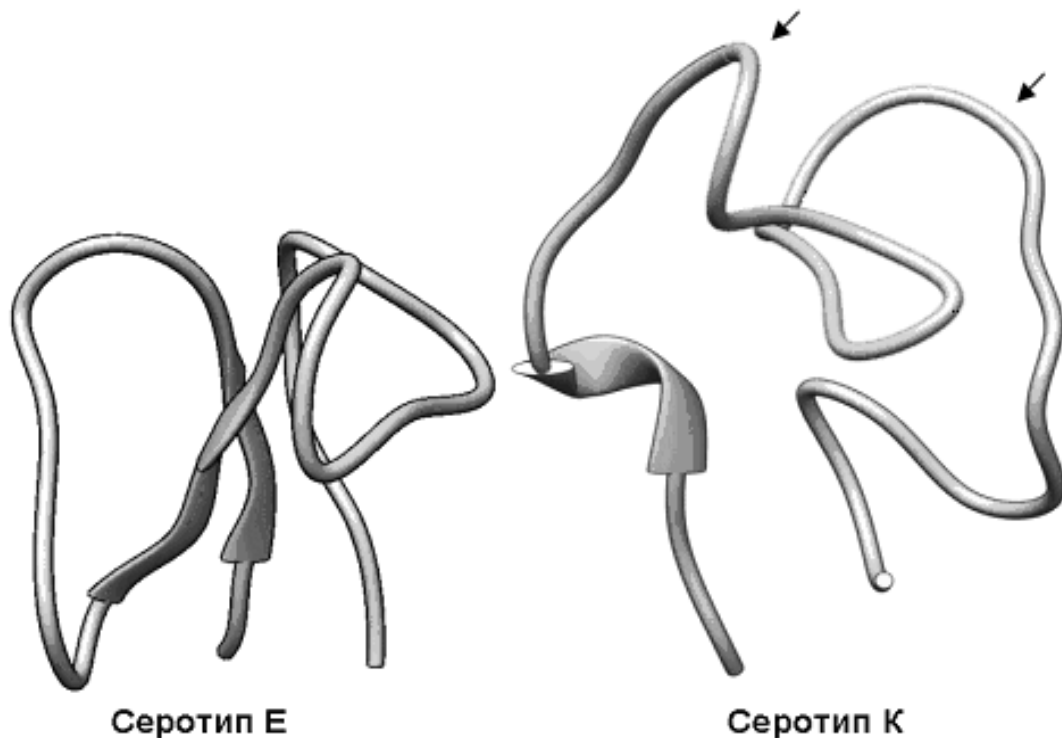


Рис. 2. Структура второй внеклеточной петли серотипов Е и К. Серотип К характеризуется более высокой и развернутой структурой, что определяет более активное образование антител к его антигенам. Участок, связывающий антитела, ограничен стрелками

Можно отметить, что у серотипа Е третья петля развернута и поднята вверх, тогда как у серотипа К она образует компактную свернутую несколько раз спираль, высота которой невелика. В соответствии с этим экранирующий эффект третьей петли на эпитопы первого вариабельного домена в случае серотипа Е более выражен, чем у серотипа К.

Более высокая, хорошо экспонированная третья внеклеточная петля серотипа Е вызывает несколько больший ответ антител, чем у серотипа К, что хорошо отражается показателями гидрофильности – почти на всем диапазоне гидрофильность петли серотипа Е выше, чем у серотипа К.

Третий вариабельный домен имеет сравнительно небольшие размеры (рис. 4). При большом сходстве структуры, у серотипа Е она более развернута, что способствует лучшему представлению антигенных детерминант. Отсутствие выраженного иммунного ответа на эпитопы третьего вариабельного домена серотипа Е коррелирует с его отрицательным показателем гидрофильности.

Как и в случае первого вариабельного домена, важным дополнительным фактором, который может блокировать образование антител против третьего вариабельного домена, является соседство большой седьмой петли, структура ее для генотипов Е и К приведена на рис. 5.

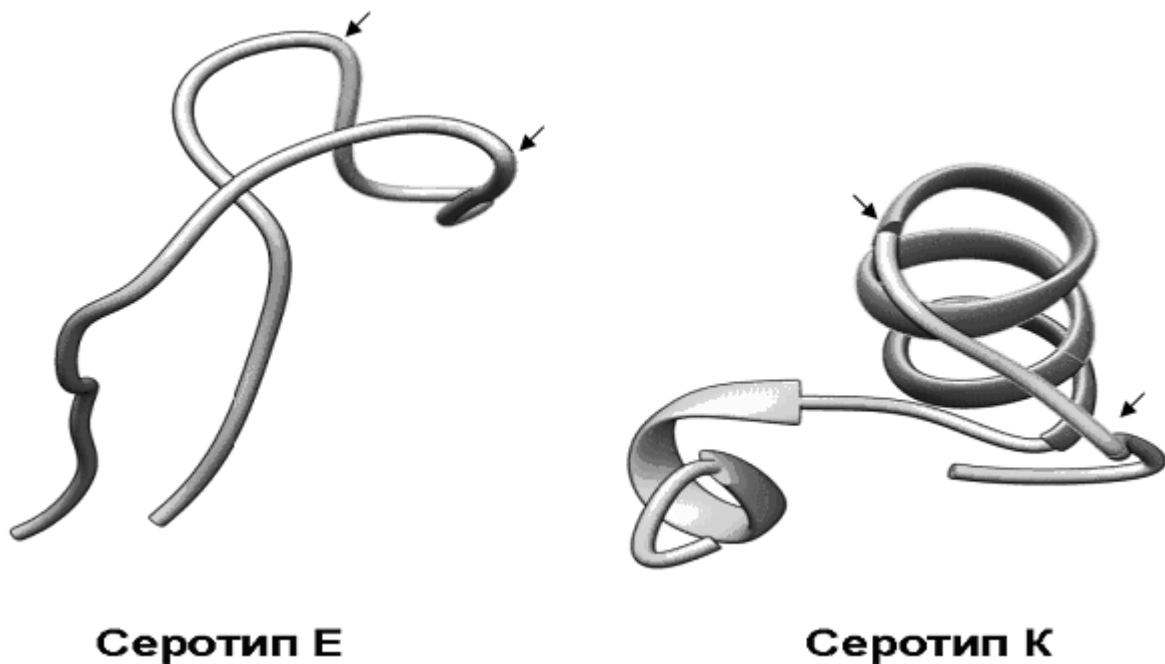


Рис. 3. Сравнительная характеристика третьей внеклеточной петли MOMP (с вторым переменным доменом) серотипов Е и К. Участки, связывающиеся с антителами, отмечены стрелками

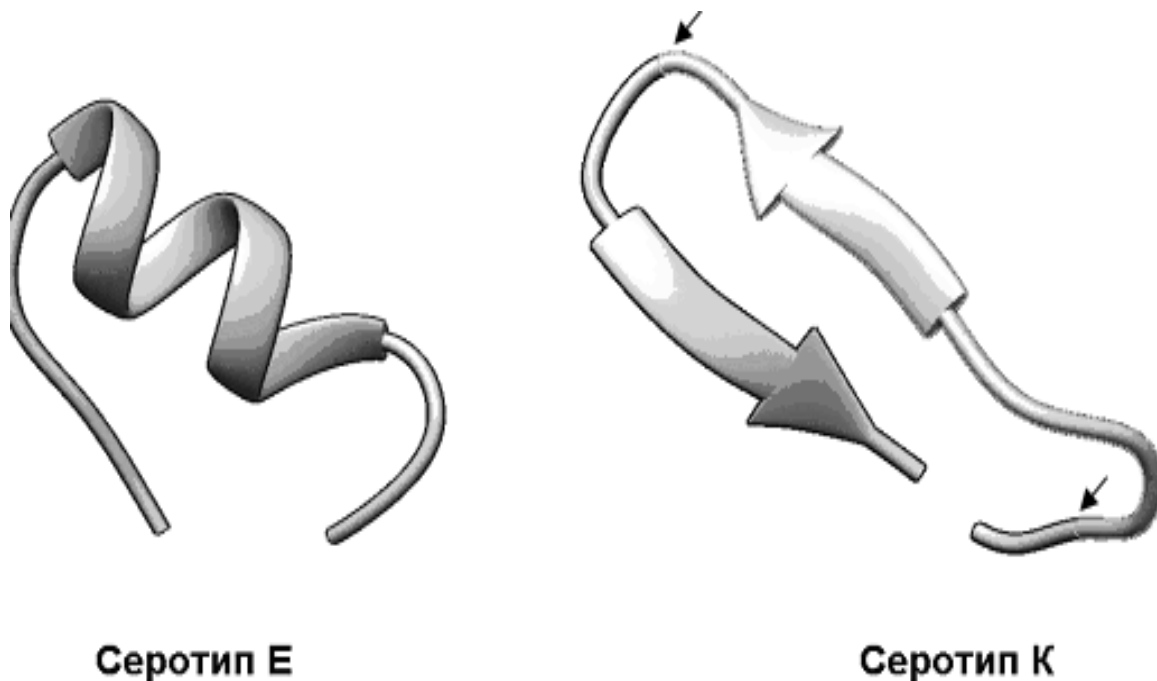


Рис. 4. Сравнительная характеристика пятой внеклеточной петли MOMP с третьим переменным доменом серотипов Е и К. Участок, связывающийся с антителами, отмечен стрелками

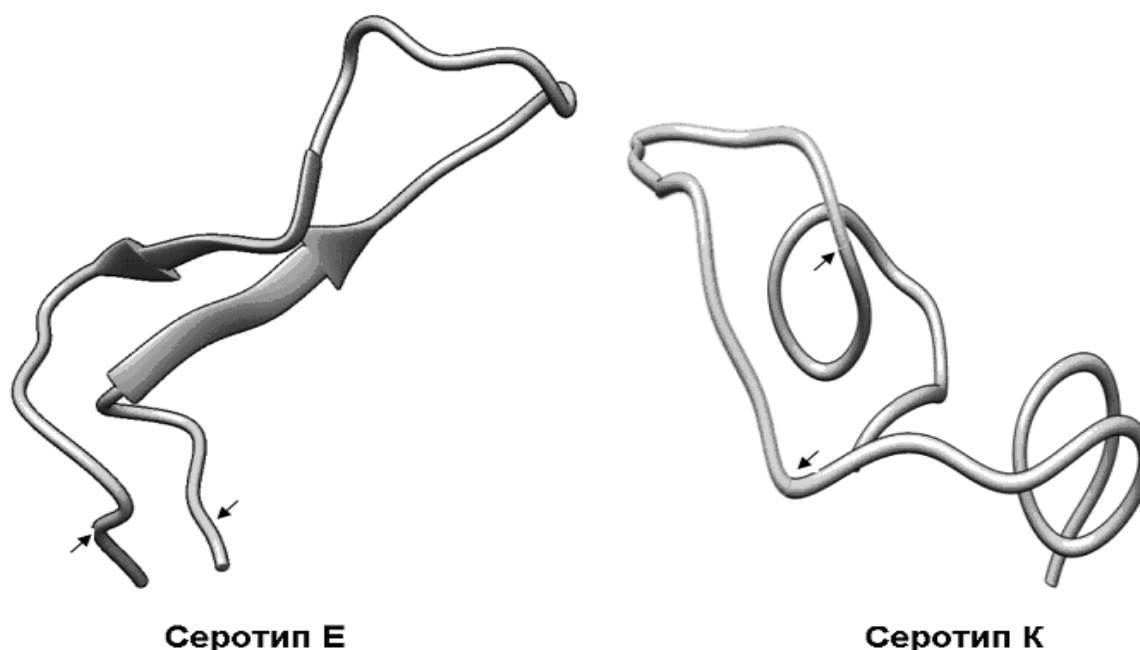


Рис. 5. Сравнительная характеристика седьмой внеклеточной петли MOMP (с четвертым переменным доменом) серотипов Е и К. Границы участков, связывающихся с антителами, отмечены стрелками, у серотипа Е антитела связываются со всем участком домена, почти совпадающим с петлей

У генотипа Е она более приподнята и ориентирована в сторону третьего переменного домена. Это обеспечивает ей возможность более эффективно экранировать соседний третий переменный домен. У серотипа К седьмая петля образует в нижней части кольца, снижающие ее высоту, кроме того, она ориентирована в сторону от третьего переменного домена, что обеспечивает более эффективное его экспонирование и способствует образованию антител против его эпитопов.

Таким образом, анализ структуры переменных доменов внеклеточных петель MOMP серотипов Е и К позволяет более четко понять причины различной выраженности ответа антител на их переменные домены. Отсутствие образования антител против первого и третьего переменных доменов серотипа Е можно объяснить более компактной структурой этих цепей и более выраженным экранированием их эпитопов находящимися рядом третьей и седьмой внеклеточными петлями.

Проведенный анализ свидетельствует о том, что интенсивность ответа антител на антигены пептидов в значительной степени определяется характером их экспонирования в окружающую среду, она положительно коррелирует с показателями гидрофильности 7-аминокислотных фрагментов цепи. Большое влияние на нее оказывает также экранирование эпитопов расположенными рядом структурами.

Необходимо отметить, что наблюдаемое у серотипа Е представление всего лишь двух, а не четырех, как у К, антигенов переменных доменов, может обеспечить данному серотипу дополнительные преимущества в адаптации к защитным механизмам макроорганизма. Данный серотип в большинстве изученных регионов мира имеет наибольшую распространенность и характеризуется наименьшей частотой мутаций в гене MOMP. В проведенных нами ранее исследованиях показано, что в Северо-восточном регионе Украины частота серотипа Е составляет 25%, а К – 5% (Литовченко, 2010). Возможно, частично это связано с ограниченностью спектра антигенных эпитопов переменных доменов, на которые вырабатываются антитела, что может снижать их повреждающий эффект на процессы жизнедеятельности хламидий.

Выводы

Особенности образования антител на антигены вариабельных доменов MOMP генотипов E и K определяются структурой соответствующих пептидных цепей и степенью их экспонирования во внешнюю среду.

Одной из причин отсутствия образования антител на антигены первого и третьего вариабельных доменов MOMP серотипа E является экранирование их расположенными рядом третьей и седьмой внеклеточными петлями.

Образование антител только против двух вариабельных доменов MOMP у серотипа E может быть одним из факторов, способствующих адаптации хламидий данного серотипа к иммунному ответу хозяина и широкому распространению.

Список литературы

- Литовченко О.А. Генотипирование *Chlamydia trachomatis*, выявленных в образцах, полученных у больных с урогенитальной патологией в Северо-восточном регионе Украины // Annals of Mechnikov Institute. – 2011. – №4. – С. 314–315. [www.imiamn.org.ua/journal.htm/Litovchenko O.A. Genotipirovaniye Chlamydia trachomatis, vyjavlennykh v obraztsakh, poluchennykh u bol'nykh s urogenital'noy patologiyey v Severo-vostochnom regione Ukrainy](http://www.imiamn.org.ua/journal.htm/Litovchenko%20O.A.%20Genotipirovaniye%20Chlamydia%20trachomatis,%20vyjavlennykh%20v%20obraztsakh,%20poluchennykh%20u%20bol'nykh%20s%20urogenital'noy%20patologiyey%20v%20Severo-vostochnom%20regione%20Ukrainy) // Annals of Mechnikov Institute. – 2011. – №4. – С. 314–315.
- Hopp T.P., Woods K.R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1981. – Vol.78. – P.3824.
- Maupetit J., Derreumaux P., Tuffery P. A fast and accurate method for large-scale de novo peptide structure prediction // J. Comput. Chem. – 2010. – Vol.31. – P. 726–738.
- Nunes A., Borrego M.J., Nunes B. et al. Evolutionary dynamics of *ompA*, the gene encoding the *Chlamydia trachomatis* key antigen // J. Bacteriol. – 2009. – Vol.191, №23. – P. 7182–7192.
- Wang Y., Berg E.A., Feng X. et al. Identification of surface-exposed components of MOMP of *Chlamydia trachomatis* serovar F // Prot. Sci. – 2006. – Vol.15. – P. 122–134.

Представлено: С.І.Похил / Presented by: S.I.Pokhil

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 14.11.2012