

УДК 577.29

АФФИННЫЕ ЯКОРЯ: СРАВНЕНИЕ ПОПУЛЯРНЫХ ТЕГОВ В СОВРЕМЕННОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

© 2024 г. П. А. Крюкова¹, О. И. Киселева¹, И. Ю. Курбатов¹, Е. В. Поверенная^{1, *}¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

*e-mail: inst@ibmc.msk.ru

Поступила в редакцию 14.05.2024 г.

После доработки 14.05.2024 г.

Принята к публикации 14.05.2024 г.

В функционировании живых систем ключевую роль играют межмолекулярные контакты, осуществляемые в том числе через белок-белковые взаимодействия. Одним из основных методов их изучения является аффинная очистка, сопряженная с масс-спектрометрией (AP-MS). Этот подход невозможен без совершенствования эпитопных меток, представляющих собой короткие генетические модификации белков, за которые впоследствии удается “выловить” целевые молекулы. Обзор направлен на сравнение самых популярных эпитопных меток, а также на обсуждение традиционных и инновационных исследований, в которых они применяются. Основная задача данной работы — оценить, насколько близко научное сообщество к созданию “оптимальной” метки, удовлетворяющей потребностям большинства исследователей, применяющих теги для решения широкого спектра молекулярно-биологических задач.

Ключевые слова: аффинная очистка, теги, эпитопы, белок-белковые взаимодействия

DOI: 10.31857/S0042132424040037, EDN: PPQOLU

ВВЕДЕНИЕ

Расшифровка биологических процессов основана на определении межмолекулярных контактов, которые осуществляются в том числе посредством белок-белковых взаимодействий. Базовым способом получения интерактомных данных являются методы на основе аффинной очистки, сопряженной с масс-спектрометрией AP-MS (affinity purification with mass spectrometry) (Dunham et al., 2012). Развитие данного подхода невозможно без усовершенствования меток — основных элементов в дизайне AP-MS-экспериментов. Метка представляет собой генетическую модификацию белка: это “пришитая” преимущественно (хотя и не обязательно) к его N- либо C-концу последовательность, кодирующая полипептид с необходимыми свойствами. Благодаря метке возможна идентификация белка, для которого недоступны специфические антитела. Главной характеристикой метки является ее высокая аффинность к лиганду — на этом и основана очистка целевого белка. Другое важное качество метки — ее компактность, которая позволяет максимально сохранить нативные свойства целевого белка. Широко используются метки и для выделения и очистки целевого белка с помощью методов иммунопреципита-

ции (Muñoz, Castellano, 2018), включая и тандемную аффинную очистку TAP (tandem affinity purification) (Low, Lee, 2023).

На данный момент разработано более 50 тегов (не считая флуоресцентных меток, обсуждение которых выходит за рамки данного обзора) (Kimple et al., 2013). Чтобы сориентировать исследователя во всем их многообразии, регулярно выходят исследования, рапортующие о создании новых белковых тегов (Terpe, 2003; Kimple et al., 2013; Mahmoudi Gomari et al., 2020). При этом в лабораторной практике спектр используемых тегов зачастую сужен до десятка наиболее проверенных временем меток. Интуитивно выбор останавливается на теге, свойства которого известны и предсказуемы, в противном случае процесс подбора тега напоминает гибрид искусства и проверки на удачливость.

Цель данного обзора — сравнение самых популярных аффинных меток и обсуждение традиционных и необычных исследований с их применением. Работа призвана отразить тренды разработки и оценить, насколько профессиональное сообщество близко к созданию “оптимального” тега, который бы удовлетворил потребности большинства биологов, использующих молекулярные якоря в своих исследовани-

ях. Лаконичные паспорта тегов, упорядоченные в соответствии с результатами литературного поиска и учитывающие предпочтения специалистов, рутинно использующих теги, формируют дорожную карту, которая позволит извлечь максимальную пользу для омикс-исследований.

КЛАССИФИКАЦИЯ ТЕГОВ

Среди меток выделяют эпитопы, которые представлены коротким пептидом, и крупные аффинные теги, которые являются частью белка (доменом) или непосредственно самим белком (Mishra, 2020). Несмотря на то что все теги по определению обладают высоким сродством к конкретным лигандам, крупные метки принято называть аффинными тегам (что, по сути, избыточно). Более точное название — белковый или доменный тег — для описания крупных меток (размер которых может достигать 20–120 кДа) используется реже.

Крупные белковые аффинные теги используются преимущественно для очистки целевого белка (Kimple et al., 2013). К крупным тегам относятся СВР (кальмодулин-связывающий белок), МБД (мальтозо-связывающий домен) и GST (глутатион-S-трансфераза). Все они обладают специальными сайтами связывания для низкомолекулярных лигандов, иммобилизованных на смолах.

Интересное свойство аффинных тегов состоит в том, что они могут увеличивать растворимость таргетного белка за счет привлечения шаперонов (в случае МВР и NusA), либо сами проявлять шаперон-подобную активность и защищать от электростатического отталкивания (Costa et al., 2014). Это свойство тегов особенно полезно, если в экспрессионной системе в связи со спецификой работы ферментов необходимый белок оказывается нерастворим. Например, в *E. coli* достаточного уровня экспрессии растворимой формы удается достичь лишь для 25–50% случаев (Pacheco et al., 2012).

Белковые теги не должны мешать правильному фолдингу итогового fusion-белка. Для сохранения функциональности целевой молекулы теги зачастую удаляют после очистки, однако это не гарантирует сохранения интактной структуры и, как следствие, функциональности и растворимости. Кроме того, массивные белковые теги создают значительную метаболическую нагрузку на экспрессионные системы, тем самым отдаляя их от нативных.

Популярность набирают компактные теги-эпитопы (His-, Мус-, FLAG-теги и пр.) с молекулярной массой около 1 кДа: они чаще

применяются в иммунохимических методах (вестерн-блот, иммунопреципитация и др.), а их лигандами являются антитела (Brizzard, Chubet, 2001). Из-за небольшой длины кодирующей последовательности эпитопы меньше влияют на структуру белка и его свойства, и в этом их большое преимущество. Пептидные метки более универсальны и меньше влияют на структуру и функции целевых белков. Кроме того, короткие теги в общем случае повышают растворимость тегируемых белков независимо от состояния сворачивания.

В силу большей универсальности дальнейшее повествование будет сфокусировано преимущественно на особенностях тегов-эпитопов, их зоне применения, а также сильных сторонах и ограничениях, которые только предстоит преодолеть.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАИБОЛЕЕ ПОПУЛЯРНЫХ ТЕГОВ

Мы сопоставили описанные в литературе теги-эпитопы по востребованности (Kimple et al., 2013) и построили гистограмму, отображающую количество публикаций по данным PubMed, для часто упоминаемых меток (рис. 1). Хит-лист тегов включает в себя S-tag, Мус-tag, НА-tag, Strep-tags и FLAG-tag. Чемпионом по встречаемости является His-tag и его производные. Среди эпитопов-аутсайдеров можно выделить две категории: часть пептидных тегов разработана достаточно давно (как правило, в 1990-е гг.), но применялась лишь в единичных экспериментах, а, значит, не выдержала проверку временем (в частности, AU1 (Goldstein et al., 1992) и AU5 (Crespo et al., 1997)), другие разработаны не так давно, отчего могли попросту не успеть набрать достаточной популярности (например, RA-tag (Lee et al., 2020) или M-tag (Zhang et al., 2023)).

HIS-ТЕГ

Пожалуй, наиболее часто используемым является His-тег (или 6xHis) (Lilius et al., 1991): по данным PubMed на 6.05.2024, опубликовано более 2.5 тысяч работ с применением His-тега. Своей популярностью метка обязана способности гистидина координировать ионы металлов. Используемая для очистки целевого белка металлообменная хроматография значительно дешевле, чем подложки с антителами. Хотя антитела к His-тегу также коммерчески доступны и расширяют сферу его применения. Наибольшей аффинностью традиционно обладают ионы никеля, однако возможны варианты взаимодействия с другими металлами (Co²⁺, Cu²⁺,

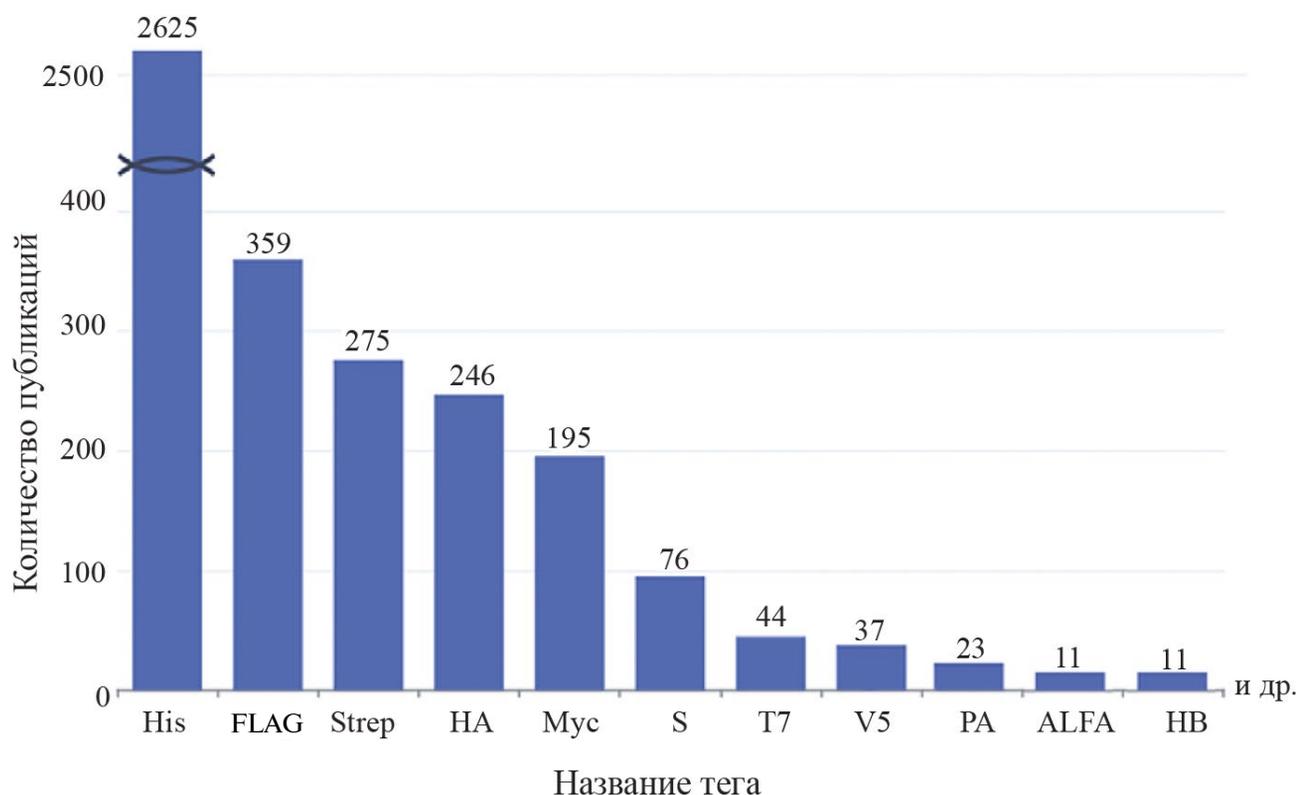


Рис. 1. Гистограмма распределения публикаций с упоминанием тегов-эпитопов по встречаемости в репозитории PubMed.

Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+}). Переход к альтернативному металлу может улучшить очистку целевого белка, и это один из вариантов оптимизации протокола наряду с изменением положения тега на С- либо N-конце белка (Liu et al., 2003; Krupka et al., 2016). Интересно, что размещение His-тега в С-конце последовательности защищает белок от убиквитинирования, чего не наблюдается при тегировании в N-конце (Park et al., 2015). В случае некоторых белков His-тег может негативно влиять на его растворимость (Woestenenk et al., 2004).

У животных и растений остатков гистидина в белках существенно больше, чем у бактерий, особенно в белках, хелатирующих металлы. Для того, чтобы избежать неспецифического связывания с другими белками, увеличивается число остатков гистидина в метке (в среднем используется от 6 до 10 а.к.о.). Однако такой подход следует применять с осторожностью, поскольку это может повлиять на активность белка, как было показано в эксперименте на цитохроме P450 (Aslantas, Surmeli, 2019), или на его конформацию, например, из-за образования белковых агрегатов (Ayoub et al., 2023).

Чтобы решить проблему влияния большого числа остатков гистидина на характеристики белка и увеличить специфичность связывания, можно использовать комбинацию из нескольких тегов, например Strep- и His-тега (Tsukamoto et al., 2024). Комбинирование пары тегов получило название тандемной аффинной очистки TAP. Этот подход часто применяется совместно с масс-спектрометрией — TAP-MS. Последовательная очистка на двух аффинных сорбентах выполняет роль дополнительного фильтра и позволяет добиться требуемой степени чистоты.

Другим недостатком метки является довольно низкая специфичность вестерн-блота (Pao et al., 2022).

Альтернативный вариант для снижения воздействия тега на конформацию белка использован в недавней работе (Ino et al., 2023), в рамках которой авторы модифицировали канонический His-тег, добавив к трем остаткам гистидина четыре другие аминокислоты (HiP4-тег). Тандемная методика очистки предполагала последовательное использование металлообменной хроматографии и иммунопреципитации со специально синтезированными к новому тегу анти-

телями. С новым тегом удалось открыть новые мишени взаимодействия целевого белка — это позволяет заявить о высокой специфичности метки.

FLAG-ТЕГ

Искусственно сконструированная синтетическая последовательность FLAG-тега DYKDDDDK обладает наибольшей гидрофильностью среди всех эпитопов (Zhao et al., 2013). Благодаря этому, FLAG-тег минимально влияет на активность таргетного белка. Также считается, что FLAG-тег обладает наибольшей специфичностью (Gao et al., 2023). Еще одно полезное свойство — наличие на его N-конце сайта узнавания энтерокиназы (Einhauer, Jungbauer, 2001), что позволяет довольно просто убрать тег после очистки белка. Следует учитывать, что активность энтерокиназы зависит от аминокислотной последовательности после сайта узнавания, поэтому она может работать не со всеми белками (Zhao et al., 2013).

К недостаткам метки относится то, что в некоторых организмах, как показано на насекомых (Schmidt et al., 2012), ее последовательность может подвергаться посттранскрипционным модификациям, вследствие чего ухудшается качество узнавания тега антителами. Также FLAG-тег может давать не самые высокие показатели выхода очищенного белка (Kimple et al., 2013).

Аналогично His-тегу, популярная модификация в виде тройного FLAG-тега (3×FLAG) одновременно обеспечивает лучшую детекцию и очистку белка (Hernan et al., 2000), но может повлиять на его экспрессию. Именно эта модификация использовалась для изучения локализации серотониновых рецепторов (Thompson et al., 2023).

FLAG-тег довольно часто используется для разработки оригинальных методик, например технологии SKI-TRIP (single copy knockin translating ribosome immunoprecipitation) (Wester et al., 2023), с помощью которой изучают тканезависимую разницу в трансляции белка. Флуоресцентный иммуносенсор Quenchbody используется для изучения экспрессии белков с меткой FLAG в реальном времени (Gao et al., 2023).

В 2024 г. к FLAG-тегу получены антитела из растений (Kong et al., 2024). Как утверждают авторы, их технология позволяет достигнуть большего выхода антител. Физиология растений не предполагает синтез иммуноглобулинов, но с помощью генной инженерии ученые получили возможность синтезировать так называемые plantibodies (Oluwayelu, Adebisi, 2016).

На примере FLAG-тега показано, что специфичность очистки белка может варьировать в зависимости не только от выбора тега и условий элюции, но и от варианта антитела (Marchetti et al., 2023), что, впрочем, характерно и для других меток.

STREP-ТЕГИ

Стрептавидин-связывающая метка (Strep-tag) — это небольшой пептид, который был впервые использован в качестве аффинной метки в начале 1990-х гг. (Schmidt, Skerra, 1993) и усовершенствование которого ведется до сих пор. В основе технологии лежит высокая аффинность стрептавида к биотину (витамину H), которая превышает показатели взаимодействия антиген—антитело. В качестве сорбента используется стрептавидин или его модификации, которые можно регенерировать и использовать многократно. Элюирование проводится в мягких условиях с использованием конкурентного связывания биотина (Kosobokova et al., 2016). Небольшие по размеру и практически инертные Strep-теги оказывают малое влияние на функцию белка, а физиологически близкая к нативным условиям элюция позволяет использовать метки для различных типов белков. Эти метки используются как для выделения и очистки белка, так и в интерактомных исследованиях (Li et al., 2021).

Из-за ограничений в выборе локализации тега (доступен только C-конец), а также из-за сниженной аффинности был предложен тег Strep II (Schmidt, Skerra, 2007), который одинаково хорошо работает как на C-, так и на N-концах рекомбинантного белка. Кроме того, усовершенствован стрептавидин — Strep-Tactin, что позволило повысить эффективность связывания с сорбентом и снизить потери целевого продукта. Однако в таких условиях эффективность биотина недостаточна.

Примечательные результаты получены при использовании дестиобиотина для элюирования желаемого продукта. Полученная система долгое время широко использовалась для очистки рекомбинантных белков из бактерий, дрожжей, клеток млекопитающих, растений и насекомых, инфицированных бакуловирусом (Tegre, 2003). Однако низкая концентрация одного из компонентов (Strep-tag или Strep-Tactin) затрудняла использование этой системы в случае низкой экспрессии рекомбинантного белка и/или при использовании больших объемов буферных растворов.

Для преодоления этих ограничений разработана оптимизированная система Twin-Strep-

tag II. Метка представляет собой два Strep-тега, связанных коротким линкером. Как и в предыдущем варианте, матрицей служит Strep-Tactin. Система обеспечивает эффективную очистку нужного белка даже в случае большой рекомбинантной конструкции или при использовании объемных образцов с низкой концентрацией белка (Schmidt et al., 2013).

НА-ТЕГ

Часто используемый НА-тег представляет собой компактный участок молекулы поверхностного гемагглютинаина вируса гриппа (YRDVDPYA, 98–106 а.к.о.), что минимизирует риски искажения свойств фьюжн-белков. НА-тег считается высокоиммунореактивным тегом, рутинно применяемым для изолирования, очистки, детекции и мониторинга белков (Schembri et al., 2007; Moon et al., 2012). У тега репутация сбалансированного по параметрам специфичности и выхода связывания. К удобству использования НА-тега добавляется тот факт, что его последовательность содержит в себе сайт узнавания каспазы (Schembri et al., 2007). В качестве недостатка следует отметить, что НА-тег, как и другие эпитопные метки, может давать невысокий выход связывания белка (Kimple et al., 2013).

Считается, что увеличение плотности тега, т. е. увеличение количества повторов последовательности тега в метке, несмотря на их большой размер, помогает в выделении белков, экспрессирующихся в клетке на низком уровне. Это показано на примере НА- и Мус-тегов. Генетические конструкции, включающие десять повторов каждого из них, получили забавное, но очень точное название — спагетти-монстр (Hortua Triana et al., 2018).

МУС-ТЕГ

Мус-тег — это участок кодирующей последовательности протоонкогена и фактора транскрипции с-Мус (MacMillan et al., 2011), состоящего из 10 аминокислот (EQKLISEEDL). Мус-тег очень популярен прежде всего из-за своей компактности, которая позволяет минимизировать влияние на функции тегируемого белка и физиологию всей клеточной системы.

На С-конце последовательности этот тег может увеличивать экспрессию белка и защищать белки от убиквитинирования (Mikalsen et al., 2005). Увеличенная экспрессия таргетного белка естественным образом облегчает его детекцию, но имеет и свои негативные последствия. Оверэкспрессированный белок взаимодействует с не-

характерными для него партнерами (например, белками теплового шока), что может обернуться неверными выводами о функциях целевого белка в клетке. Мус-тег стоит с осторожностью применять для изучения секретируемых белков. Примечательно, что расположение метки сразу за сигнальным пептидом препятствует правильному прохождению белком секреторного пути (Zhao et al., 2013).

При всех обозначенных особенностях, Мус-тег считается подходящей меткой для большого набора иммунохимических методов (Zhao et al., 2013).

S-ТЕГ

S-тегирование подразумевает специфическое связывание 15-аминокислотного (KETAAAKFEREHMDS) S-тега (или S15) с S-белком, происходящим из рибонуклеазы А (Kim, Raines, 1993). Тег состоит из четырех положительно заряженных, трех отрицательно заряженных, трех незаряженных полярных и пяти неполярных аминокислот. Такой аминокислотный состав обеспечивает высокую растворимость пептида, его суммарный заряд близок к нейтральному уровню pH (Yadav et al., 2016).

S-тег применяется для одностадийной очистки (при использовании S-белка в качестве иммобилизованного лиганда) и колориметрической детекции меченых белков (Hackbarth et al., 2004). Недостаток S-системы — жесткие условия элюирования меченых белков (pH 2) (Zhao et al., 2013).

КОМБИНИРОВАННЫЕ ТЕГИ

Комбинированные теги используются для двухстадийной ТАР. Благодаря двум последовательным стадиям элюции достигается достаточная степень очистки белка. Изначально ТАР разработана для очистки рекомбинантных белков, разрушаемых в процессе выделения протеолитическими системами бактериальной клетки. В частности, к ним относится IGF-II — гормон белковой природы, влияющий на рост и дифференцировку клеток во многих тканях (главным образом, внутриутробно) (Hammarberg et al., 1989; Rozkov, Enfors, 2004). Для предотвращения деградации целевого белка по терминальным положениям предложена следующая стратегия: по одной различной аффинной метке пришивалось к N- и С-концам последовательности, и продуктом ТАР был целый белок. Впоследствии использование двух аффинных меток открыло возможность быстрой очистки

белковых комплексов в мягких условиях (Rigaut et al., 1999).

Сейчас существуют и используются комбинации из аффинных меток (Gully et al., 2003), аффинной и пептидной, двух пептидных. Каждая получаемая система обладает собственными особенностями, включая плюсы обоих тегов (Li, 2010). К примеру, для FLAG-Strep II-тег все этапы очистки могут быть проведены в одном буфере (Gloeckner et al., 2007), что позволяет выделять различные виды белков в бактериях (Fodor et al., 2004) и клетках млекопитающих (Gloeckner et al., 2009). Использование FLAG-His-тега позволяет сочетать детекцию белковых комплексов с помощью чувствительных антител к FLAG и сравнительно простую и недорогую очистку iMAC (DiCiommo et al., 2004). Низкий выход белка в случае высокоспецифичного FLAG-тега также может быть компенсирован в случае объединения с Мус- (Donaubauer et al., 2016; Mehrasa et al., 2023) или HA-тегами (Shestakova et al., 2017; Tagami, 2018). В частности, именно FLAG-HA использован в крупнейшем интерактомном проекте BioPlex для выявления белковых взаимодействий более чем для 14 тыс. белков (Huttlin et al., 2015, 2021).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КЛЮЧЕВЫХ ЭПИТОПОВ

По определению, эпитопные теги — короткие последовательности, однако добавление даже десятка аминокислотных остатков может повлиять на характеристики тегируемого белка (Bucher et al., 2002; Zhao et al., 2020): стабильность, растворимость, склонность к полимеризации и способность сохранить нативную конформацию.

Например, His-тег на N-конце белка в некоторых случаях может уменьшать его термическую стабильность (Booth et al., 2018) либо приводить к димеризации (Wu, Filutowicz, 1999). В эксперименте на дрожжевых белках метки Мус и GFP не влияли на свойства, в то время как 3×HA-тег уменьшал активность целевого продукта (Saiz-Baggetto et al., 2017).

Последовательность тега влияет на растворимость белка. Так, для плохо растворимых белков предпочтение отдается меткам, состоящим из гидрофильных аминокислот (Jo, 2022).

Важным критерием является также и положение метки в тегируемой последовательности. Традиционно в целях минимизации воздействия на конформацию белка теги пришиваются либо на N-, либо на C-конец целевого продукта, хотя иногда ведется поиск оптимального места для

тега внутри последовательности (Bonanno et al., 2023). При терминальном положении метки возможно использование линкера, несущего сайт узнавания протеазы (среди популярных — TEV, тромбин). С помощью протеазы после очистки возможно отрезать уже ненужную последовательность тега, что может быть важно для нивелирования эффектов, оказываемых меткой на характеристики исследуемого белка. Однако использование протеаз увеличивает как стоимость, так и сложность эксперимента (Agnau et al., 2006). К тому же ферменты могут узнавать и расщеплять последовательности и внутри целевого белка (Jenny et al., 2003).

Условия элюции — также немаловажный фактор, поскольку принципиально сохранить структуру и функцию белка, выделить только целевой белок и в достаточном количестве. Предпочтение отдается легко удаляемым тегам (De Almeida et al., 2018), для которых применяется одностадийная очистка (Kinrade et al., 2020). Кроме того, идеальный тег должен иметь одинаково высокую эффективность очистки разными подходами — иммунопреципитацией, вестерн-блотом и пр.

При выборе подходящей метки для каждого эксперимента необходимо учитывать и другие факторы: тип белка, характер системы экспрессии и последующее применение целевого белка (Tehseen et al., 2019).

На рис. 2 приведены ключевые суммирующие свойства для наиболее популярных меток: His-, Мус-, FLAG-, HA-, S- и Strep-тегов.

СЕГОДНЯ И ЗАВТРА ЭПИТОПНЫХ МЕТОК

История применения эпитопных меток начинается с 1984 г., когда была предложена (Munro, Pelham, 1984) генетическая конструкция, в которой участок кодирующей последовательности субстанции Р (нейропептида, опосредующего взаимодействия между нейронами и иммунными клетками) пришит к таргетному белку теплового шока hsp70 из *Drosophila*. В дальнейшем конструкция узнавалась с помощью специфического моноклонального антитела. Параллельно другая группа исследователей занималась получением антител к одному из первых известных протоонкогенов — с-Мус — для изучения его свойств. В 1985 г. получен (Evan et al., 1985) эффективный пептид для мечения белков, хотя исследователи и не ставили себе такую цель изначально. Одними из первых также созданы теги из остатков повторяющихся аминокислот. В 1984 г. впервые описан Arg-тег (Smith et al., 1984), состоящий из пяти или шести остатков аргинина, который не нашел широкого при-

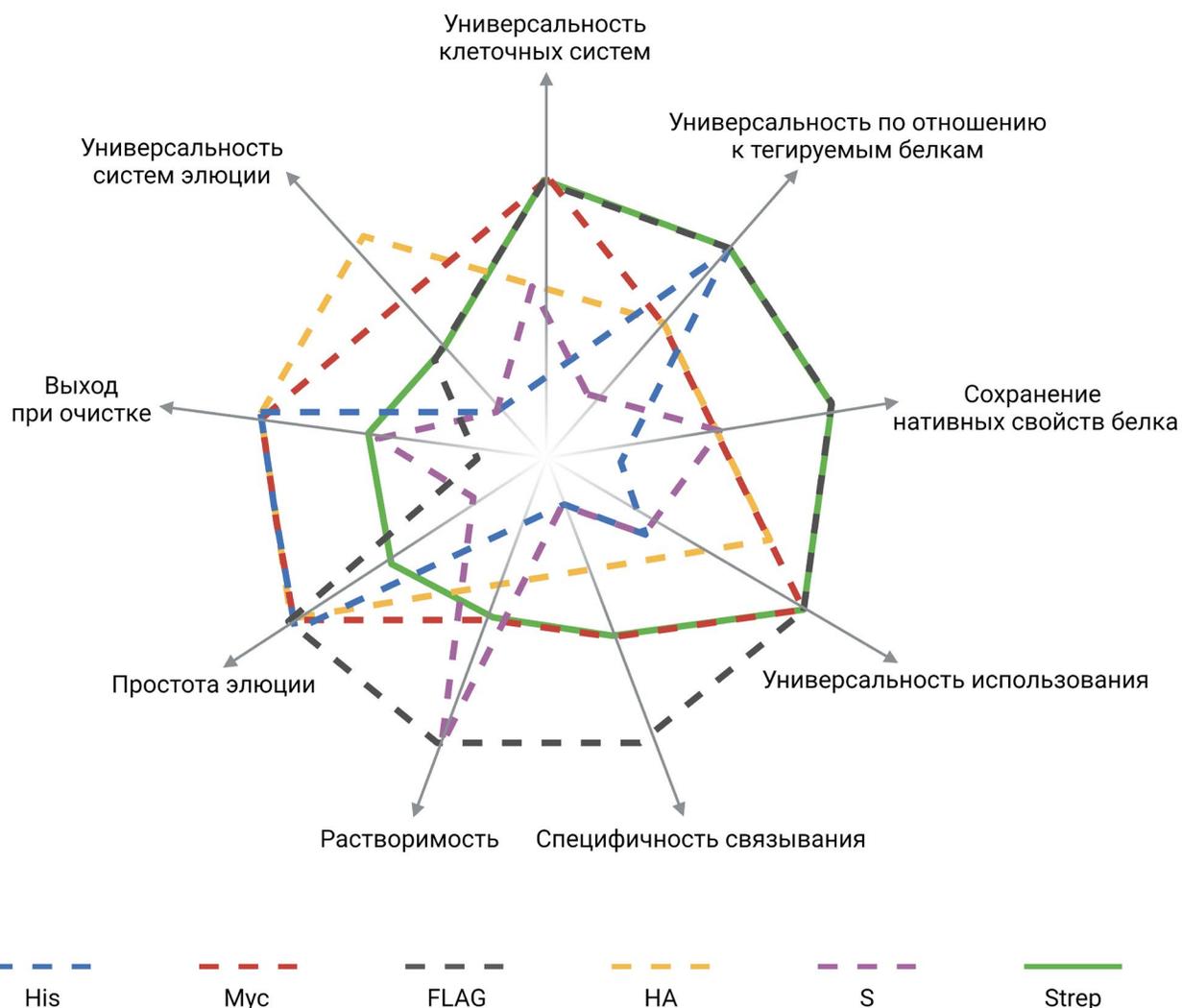


Рис. 2. Диаграмма-радар, характеризующая сильные и слабые стороны наиболее популярных эпитопов. Центр окружности соответствует наименьшим значениям, периферия — наибольшим.

менения. Противоположной ситуация оказалась для разработанного в 1988 г. и ставшего одним из самых популярных полигистидинового тега (His-тег). В это же время были предложены и другие популярные системы для детекции белков, например FLAG-тег (Hopp et al., 1988), HA-тег (Field et al., 1988) и Strep-тег (Schmidt, Skerra, 1993).

Множество доступных к приобретению меток является лучшей иллюстрацией тезиса о том, что идеального тега, подходящего к любому белку, пока не существует. Ограничения в универсальности использования того или иного тега могут быть следствием жестких условий элюции (например, для Myc-тега), результатом искажения функций получившегося fusion-белка по сравнению с целевым (как в случае His-тега) и многих других особенностей (Kimple et al.,

2013). Кажется очевидным, что для более чем 20 тыс. отличающихся по своим физико-химическим свойствам белков невозможно подобрать универсальный тег, не влияющий на нативные характеристики белка, его стабильность и проч. Однако для того, чтобы облегчить исследовательскую жизнь, не прекращается работа в направлении получения идеальной метки.

Теги последнего поколения, к примеру PepTag (Fagbadebo, Rothbauer, 2022) или ALFA-тег (Götzke et al., 2019), вместо обычных антител, связываются с наноантителами. Наноантитела, обладая однодоменной структурой, малым размером, высокой стабильностью и растворимостью, совершили революцию в сфере тегирования и выделения белков. Они используются для визуализации живых клеток, поскольку наноантитела можно связать с флуорофором (Pedreñez

et al., 2021). Флуоресцентно меченые наноантитела экспрессируются в качестве так называемых chromobodies (Traenkle et al., 2020). Объемная флуоресцентная метка переносится на не связанный непосредственно с белком агент, тем самым не препятствуя параметрам его экспрессии и стабильности.

Схожую цель создания идеальной метки преследовала разработанная в 2012 г. система SpyCatcher-SpyTag. Идея реализует прочное взаимодействие между эпитопом и лигандом за счет формирования пептидной связи. Помимо меченых белков, данная система используется для стабилизации белковых комплексов и даже при разработке вакцин (Hatlem et al., 2019). С использованием ортогональной для SpyCatcher-SpyTag системы SnoopCatcher-SnoopTag можно исследовать белковые ассоциации из нескольких компонентов.

Дизайн новых тегов также нацелен на преодоление влияния метки на функциональность белка. В качестве решения предлагается составлять тег таким образом, чтобы его структура не изменяла структуру и свойства белка. Такой функционально нейтральной меткой является ALFA-tag (Götzke et al., 2019), что и отражено в названии тега, который представляет собой альфа-петлю. По заявлениям разработчиков ALFA-метки, она не влияет на сворачивание белка и другие его характеристики. Похожими свойствами обладает RA-tag, который образует β -поворот в связывающем кармане NZ-1. Эта уникальная конформация позволяет пептиду RA встраиваться в петли, образующие поворот в складчатом домене белка. Такое решение применяется в различных областях, включая очистку белка, вестерн-блоттинг и проточную цитометрию (Brown, Takagi, 2018).

Еще один вектор работы по усовершенствованию тегов направлен на уменьшение неспецифических взаимодействий при тегировании. В 2022 г. для достижения этой цели создан TD-пептид, состоящий из 9 аминокислот (Pao et al., 2022). Прочное связывание тега со специфическим антителом GD-26 обеспечивается как полярными, так и неполярными взаимодействиями. Полезная особенность этой метки заключается в том, что она не похожа ни на про-, ни на эукариотические белки, поскольку ее последовательность взята из архей. Таким образом снижается вероятность неспецифических кросс-взаимодействий.

Помимо движения в направлении универсализации эпитопов, улучшается эффективность меток и для решения конкретных задач. Например, hei-тег (high efficiency tag), созданный на основе Мус-тега, увеличивает эффективность CRISPR-редактирования (Thumberger et al., 2022).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эпитопы — это важный инструмент изучения белков, их функций, структур и партнеров по взаимодействиям. Несмотря на многочисленные обзоры (Wood, 2014; Kosobokova et al., 2016; Yadav et al., 2016; Mahmoudi Gomari et al., 2020), текущая практика свидетельствует, что научное сообщество еще находится в процессе создания идеального тега, который при малом размере имел бы высокую специфичность связывания, не менял бы свойств белков и был бы универсальным. От такой метки ожидают, что она будет удаляться с минимальными потерями целевого белка, без труда детектироваться иммуногистохимически, сохраняя близость к физиологическим условиям. Такой сферический тег в вакууме должен подходить для широкого спектра исследовательских задач — от наработки и очистки целевого белка вплоть до функциональной аннотации и поиска новых лекарств.

За сорокалетнюю историю эпитопов шесть из более 50 созданных тегов стали действительно востребованными (His, Мус, FLAG, HA, S и Strep). Эти метки имеют репутацию оптимальных для различных задач. Подходы с одновременным использованием нескольких меток зачастую нивелируют индивидуальные недостатки, хотя и повышают риски нарушения структуры и свойств белка.

Для взвешенного выбора подходящего тега в фокусе своих исследований мы собрали и проанализировали информацию о практическом использовании шести популярных тегов, упорядочив ее в формате радар-диаграммы. Такая наглядная иллюстрация видится нам дорожной картой, которая была бы полезна исследователям, решившим расширить горизонты своих молекулярно-биологических работ за счет тегов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Выполнение работ поддержано грантом Российского научного фонда № 21-74-10061.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- De Almeida J.M., Moure V.R., Müller-Santos M. et al. Tailoring recombinant lipases: keeping the His-tag favors esterification reactions, removing it favors hydrolysis reactions // *Sci. Rep.* 2018. V. 8 (1). P. 10000.
- Arnaud J., Lauritzen C., Petersen G.E., Pedersen J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins // *Protein Expr. Purif.* 2006. V. 48 (1). P. 1–13.
- Aslantas Y., Sürmeli N.B. Effects of N-terminal and C-terminal polyhistidine tag on the stability and function of the thermophilic P450 CYP119 // *Bioinorg. Chem. Appl.* 2019. V. 2019. P. 8080697.
- Ayoub N., Roth P., Ucurum Z. et al. Structural and biochemical insights into His-tag-induced higher-order oligomerization of membrane proteins by cryo-EM and size exclusion chromatography // *J. Struct. Biol.* 2023. V. 215 (1). P. 107924.
- Bonanno S.L., Sanfilippo P., Eamani A. et al. Constitutive and conditional epitope-tagging of endogenous G protein coupled receptors in *Drosophila* // *bioRxiv*. 2023.12.27.573472.
- Booth W.T., Schlachter C.R., Pote S. et al. Impact of an N-terminal polyhistidine tag on protein thermal stability // *ACS Omega*. 2018. V. 3 (1). P. 760–768.
- Brizzard B., Chubet R. Epitope tagging of recombinant proteins // *Curr. Protoc. Neurosci.* 2001. Ch. 5. Unit 5.8.
- Brown Z.P., Takagi J. The PA tag: a versatile peptide tagging system in the era of integrative structural biology // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018. V. 1105. P. 59–76.
- Bucher M.H., Evdokimov A.G., Waugh D.S. Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein // *Acta Crystallogr. D. Diol. Crystallogr.* 2002. V. 58 (3). P. 392–397.
- Costa S., Almeida A., Castro A. et al. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. P. 63.
- Crespo P., Schuebel K.E., Ostrom A.A. et al. Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product // *Nature*. 1997. V. 385. P. 169–172.
- DiCiommo D.P., Duckett A., Burcescu I. et al. Retinoblastoma protein purification and transduction of retina and retinoblastoma cells using improved alphavirus vectors // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004. V. 45 (9). P. 3320–3329.
- Donaubauer E.M., Law N.C., Hunzicker-Dunn M.E. Follicle-stimulating hormone (FSH)-dependent regulation of extracellular regulated kinase (ERK) phosphorylation by the mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase MKP3 // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291 (37). P. 19701–19712.
- Dunham W.H., Mullin M., Gingras A.-C. Affinity-purification coupled to mass spectrometry: basic principles and strategies // *Proteomics*. 2012. V. 12 (10). P. 1576–1590.
- Einhauer A., Jungbauer A. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2001. V. 49 (1–3). P. 455–465.
- Evan G.I., Lewis G.K., Ramsay G., Bishop J.M. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-Myc proto-oncogene product // *Mol. Cell. Biol.* 1985. V. 5 (12). P. 3610–3616.
- Fagbadebo F.O., Rothbauer U. Peptide-tag specific nanobodies for studying proteins in live cells // *Methods Mol. Biol.* 2022. V. 2446. P. 555–579.
- Field J., Nikawa J., Broek D. et al. Purification of a RAS-responsive adenyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method // *Mol. Cell. Biol.* 1988. V. 8 (5). P. 2159–2165.
- Fodor B.D., Kovács Á.T., Csáki R. et al. Modular broad-host-range expression vectors for single-protein and protein complex purification // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70 (2). P. 712–721.
- Gao Y., Zhao S., Zhang R. et al. Immunosensor for realtime monitoring of the expression of recombinant proteins during bioprocess // *Anal. Biochem.* 2023. V. 665. P. 115069.
- Gloeckner C.J., Boldt K., Schumacher A. et al. A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes // *Proteomics*. 2007. V. 7 (23). P. 4228–4234.
- Gloeckner C. J., Boldt K., Schumacher A. et al. Tandem affinity purification of protein complexes from mammalian cells by the Strep/FLAG (SF)-TAP tag // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 564. P. 359–372.
- Goldstein D.J., Toyama R., Dhar R., Schlegel R. The BPV-1 E5 oncoprotein expressed in schizosaccharomyces pombe exhibits normal biochemical properties and binds to the endogenous 16-kDa component of the vacuolar proton-ATPase // *Virology*. 1992. V. 190 (2). P. 889–893.
- Götzke H., Kilisch M., Martínez-Carranza M. et al. The ALFA-tag is a highly versatile tool for nanobody-based bioscience applications // *Nat. Commun.* 2019. V. 10 (1). P. 4403.
- Gully D., Moinier D., Loiseau L., Bouveret E. New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification // *FEBS Lett.* 2003. V. 548 (1–3). P. 90–96.
- Hackbarth J.S., Lee S.-H., Meng X.W. et al. S-peptide epitope tagging for protein purification, expression monitoring, and localization in mammalian cells // *Biotechniques*. 2004. V. 37 (5). P. 835–839.
- Hammarberg B., Nygren P. A., Holmgren E. et al. Dual affinity fusion approach and its use to express recombinant human insulin-like growth factor II // *PNAS USA*. 1989. V. 86 (12). P. 4367–4371.
- Hatlem D., Trunk T., Linke D., Leo J.C. Catching a SPY: using the SpyCatcher-SpyTag and related systems for labeling and localizing bacterial proteins // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20 (9). P. 2129.
- Hopp T.P., Prickett K.S., Price V.L. et al. A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification // *Nat. Biotechnol.* 1988. V. 6 (10). P. 1204–1210.

- Hortua Triana M.A., Márquez-Nogueras K.M., Chang L. et al.* Tagging of weakly expressed toxoplasma gondii calcium-related genes with high-affinity tags // *J. Eukaryot. Microbiol.* 2018. V. 65 (5). P. 709–721.
- Hernan R., Heuermann K., Brizzard B.* Multiple epitope tagging of expressed proteins for enhanced detection // *Biotechniques.* 2000. V. 28 (4). P. 789–793.
- Huttlin E.L., Ting L., Bruckner R.J. et al.* The BioPlex network: a systematic exploration of the human interactome // *Cell.* 2015. V. 162 (2). P. 425–440.
- Huttlin E.L., Bruckner R.J., Navarrete-Perea J. et al.* Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome // *Cell.* 2021. V. 184 (11). P. 3022–3040.e28.
- Ino Y., Yamaoka Y., Tanaka K. et al.* Integrated tandem affinity protein purification using the polyhistidine plus extra 4 amino acids (HiP4) tag system // *Proteomics.* 2023. V. 23 (11). P. 2200334.
- Jenny R.J., Mann K.G., Lundblad R.L.* A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa // *Protein Expr. Purif.* 2003. V. 31 (1). P. 1–11.
- Jo B.H.* An intrinsically disordered peptide tag that confers an unusual solubility to aggregation-prone proteins // *Appl. Environ. Microbiol.* 2022. V. 88 (7). P. e0009722.
- Kim J.S., Raines R.T.* Ribonuclease S-peptide as a carrier in fusion proteins // *Protein Sci.* 1993. V. 2 (3). P. 348–356.
- Kimble M.E., Brill A.L., Pasker R.L.* Overview of affinity tags for protein purification // *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2013. V. 73. P. 9.9.1–9.9.23.
- Kinrade B., Davies P.L., Vance T.D.R.* Bacterial sugar-binding protein as a one-step affinity purification tag on dextran-containing resins // *Protein Expr. Purif.* 2020. V. 168. P. 105564.
- Kong Z., Xiong X., Wu C., Pan W.* High-level expression of anti FLAG tag antibody in plants // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2024. V. 40 (1). P. 269–279.
- Kosobokova E.N., Skrypnik K.A., Kosorukov V.S.* Overview of fusion tags for recombinant proteins // *Biochemistry (Mosc).* 2016. V. 81 (3). P. 187–200.
- Krupka M., Masek J., Barkocziova L. et al.* The position of His-tag in recombinant OspC and application of various adjuvants affects the intensity and quality of specific antibody response after immunization of experimental mice // *PLoS One.* 2016. V. 11 (2). P. e0148497.
- Lee T.H., Kim K.S., Kim J.H. et al.* Novel short peptide tag from a bacterial toxin for versatile applications // *J. Immunol. Methods.* 2020. V. 479. P. 112750.
- Li H., Huang L., Yu Y. et al.* Generation of recombinant influenza virus bearing strep tagged PB2 and effective identification of interactional host factors // *Vet. Microbiol.* 2021. V. 254. P. 108985.
- Li Y.* Commonly used tag combinations for tandem affinity purification // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2010. V. 55 (2). P. 73–83.
- Lilius G., Persson M., Bülow L., Mosbach K.* Metal affinity precipitation of proteins carrying genetically attached polyhistidine affinity tails // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 198 (2). P. 499–504.
- Liu H.-L., Ho Y., Hsu C.-M.* Molecular simulations to determine the chelating mechanisms of various metal ions to the His-tag motif: a preliminary study // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2003. V. 21 (1). P. 31–41.
- Low T.Y., Lee P.Y.* Tandem affinity purification (TAP) of interacting prey proteins with FLAG- and HA-tagged bait proteins // *Methods Mol. Biol.* 2023. V. 2690. P. 69–80.
- MacMillan M.A., Fisher D.I., Roberts K., Orme J.P.* Cellular assay optimization. Part I: The use of large-scale transiently transfected cryobanks and introduction of a c-Myc tag to design a standardized ELISA process // *J. Biomol. Screen.* 2011. V. 16 (9). P. 959–966.
- Mahmoudi Gomari M., Saraygord-Afshari N., Farsimadan M. et al.* Opportunities and challenges of the tag-assisted protein purification techniques: applications in the pharmaceutical industry // *Biotechnol. Adv.* 2020. V. 45. P. 107653.
- Marchetti A., Lima W.C., Hammel P., Cosson P.* A Quantitative comparison of antibodies against epitope tags for immunofluorescence detection // *FEBS Open Bio.* 2023. V. 13 (12). P. 2239–2245.
- Mehrasa R., Cristea I., Bredrup C. et al.* Functional characterization of all-trans retinoic acid-induced differentiation factor (ATRAID) // *FEBS Open Bio.* 2023. V. 13 (10). P. 1874–1886.
- Mikalsen T., Johannessen M., Moens U.* Sequence- and position-dependent tagging protects extracellular-regulated kinase 3 protein from 26S proteasome-mediated degradation // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005. V. 37 (12). P. 2513–2520.
- Mishra V.* Affinity tags for protein purification // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2020. V. 21 (8). P. 821–830.
- Moon J.-M., Kim G.-Y., Rhim H.* A new idea for simple and rapid monitoring of gene expression: requirement of nucleotide sequences encoding an N-terminal HA tag in the T7 promoter-driven expression in *E. coli* // *Biotechnol. Lett.* 2012. V. 34 (10). P. 1841–1846.
- Muñoz A., Castellano M.M.* Coimmunoprecipitation of interacting proteins in plants // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1794. P. 279–287.
- Munro S., Pelham H.R.* Use of peptide tagging to detect proteins expressed from cloned genes: deletion mapping functional domains of *Drosophila* hsp 70 // *EMBO J.* 1984. V. 3 (13). P. 3087–3093.
- Oluwayelu D.O., Adebisi A.I.* Plantibodies in human and animal health: a review // *Afr. Health Sci.* 2016. V. 16 (2). P. 640–645.
- Pacheco B., Crombet L., Loppnau P., Cossar D.* A screening strategy for heterologous protein expression in *Escherichia coli* with the highest return of investment // *Protein Expr. Purif.* 2012. V. 81 (1). P. 33–41.
- Pao P.-J., Hsu M.-F., Chiang M.-H. et al.* Structural basis of an epitope tagging system derived from *Haloarcula marismortui* bacteriorhodopsin I D94N and its monoclonal antibody GD-26 // *FEBS J.* 2022. V. 289 (3). P. 730–747.

- Park W.-J., You S.-H., Choi H.-A. et al. Over-expression of recombinant proteins with N-terminal His-tag via subcellular uneven distribution in *Escherichia coli* // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). 2015. V. 47 (7). P. 488–495.
- Pedrañez A., Mosquera-Sulbarán J., Muñoz N. et al. Nanoantibodies: small molecules, big possibilities // BioTechnologia (Pozn). 2021. V. 102 (3). P. 321–336.
- Rigaut G., Shevchenko A., Rutz B. et al. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration // Nat. Biotechnol. 1999. V. 17. P. 1030–1032.
- Rozkov A., Enfors S.-O. Analysis and control of proteolysis of recombinant proteins in *Escherichia coli* // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2004. V. 89. P. 163–195.
- Saiz-Baggetto S., Méndez E., Quilis I. et al. Chimeric proteins tagged with specific 3×HA cassettes may present instability and functional problems // PLoS One. 2017. V. 12 (8). P. e0183067.
- Schembri L., Dalibart R., Tomasello F. et al. The HA tag is cleaved and loses immunoreactivity during apoptosis // Nat. Methods. 2007. V. 4 (2). P. 107–108.
- Schmidt T.G., Skerra A. The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment // Protein Eng. 1993. V. 6 (1). P. 109–122.
- Schmidt T.G.M., Skerra A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins // Nat. Protoc. 2007. V. 2 (6). P. 1528–1535.
- Schmidt P., Sparrow L., Attwood R. et al. Taking down the FLAG! How insect cell expression challenges an established tag-system // PLoS One. 2012. V. 7 (6). P. e37779.
- Schmidt T.G.M., Batz L., Bonet L. et al. Development of the Twin-Strep-tag® and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants // Protein Expr. Purif. 2013. V. 92 (1). P. 54–61.
- Shestakova E.A., Boutin M., Bourassa S. et al. Identification of proteins associated with transcription factors HOXA9 and E2A-PBX1 by tandem affinity purification // Mol. Biol. (Mosk). 2017. V. 51 (3). P. 490–501.
- Smith J.C., Derbyshire R.B., Cook E. et al. Chemical synthesis and cloning of a poly(arginine)-coding gene fragment designed to aid polypeptide purification // Gene. 1984. V. 32 (3). P. 321–327.
- Tagami H. Purification of histone variant-interacting chaperone complexes // Methods Mol. Biol. 2018. V. 1832. P. 51–60.
- Tehseen M., Raducanu V.-S., Rashid F. et al. Proliferating cell nuclear antigen-agarose column: a tag-free and tag-dependent tool for protein purification affinity chromatography // J. Chromatogr. A. 2019. V. 1602. P. 341–349.
- Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 60 (5). P. 523–533.
- Thompson J.M., Tragge W., Flood E.D. et al. Development of a 5-HT7 receptor antibody for the rat: the good, the bad, and the ugly // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2023. V. 396 (10). P. 2599–2611.
- Thumberger T., Tavhelidse-Suck T., Gutierrez-Triana J.A. et al. Boosting targeted genome editing using the hei-tag // eLife. 2022. V. 11. P. e70558.
- Traenkle B., Segan S., Fagbadebo F.O. et al. A novel epitope tagging system to visualize and monitor antigens in live cells with chromobodies // Sci. Rep. 2020. V. 10 (1). P. 14267.
- Tsukamoto A., Jae Man L., Oyama K. et al. Effective expression and characterization of the receptor binding domains in SARS-CoV-2 spike proteins from original strain and variants of concern using *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in silkworm // Protein Expr. Purif. 2024. V. 218. P. 106450.
- Wester L.E., Lanjuin A., Bruckisch E.H.W. et al. A Single-copy knockin translating ribosome immunoprecipitation toolkit for tissue-specific profiling of actively translated mRNAs in *C. elegans* // Cell Rep. Methods. 2023. V. 3 (3). P. 100433.
- Woostenen E.A., Hammarström M., van den Berg S. et al. His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors // J. Struct. Funct. Genomics. 2004. V. 5 (3). P. 217–229.
- Wood D.W. New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification // Curr. Opin. Struct. Biol. 2014. V. 26. P. 54–61.
- Wu J., Filutowicz M. Hexahistidine (His6)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale // Acta Biochim. Pol. 1999. V. 46 (3). P. 591–599.
- Yadav D.K., Yadav N., Yadav S. et al. An insight into fusion technology aiding efficient recombinant protein production for functional proteomics // Arch. Biochem. Biophys. 2016. V. 612. P. 57–77.
- Zhang Y., Zhao L., Wang Q. et al. A novel epitope tag from rabies virus has versatile *in vitro* applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2023. V. 107 (12). P. 3955–3966.
- Zhao F., Song Q., Wang B. et al. Purification and immobilization of α -amylase in one step by gram-positive enhancer matrix (GEM) particles from the soluble protein and the inclusion body // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104 (2). P. 643–652.
- Zhao X., Li G., Liang S. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification // J. Anal. Methods Chem. 2013. V. 2013. P. 581093.

Affinity Anchors: Overview of Popular Tags for Modern Molecular Biology

P. A. Kryukova^a, O. I. Kiseleva^a, I. Yu. Kurbatov^a, E. V. Poverennaya^{a,*}

^aOrekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

**e-mail: inst@ibmc.msk.ru*

In the functioning of living systems, intermolecular contacts, including protein-protein interactions, play a crucial role. One of the main methods for studying them is affinity purification coupled with mass spectrometry (AP-MS). This approach relies on the refinement of epitope tags, short genetic modifications of proteins, which subsequently enable the “capture” of target molecules. The review aims to compare the most popular epitope tags and discuss traditional and innovative studies in which they are used. The primary goal of this manuscript is to assess how close the scientific community is to creating a “perfect” tag that meets the needs of most researchers applying tags to address a wide range of molecular biology tasks.

Keywords: affinity purification, tags, epitope, protein-protein interaction