



УДК 577.112.853.083 : 616-097

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ  
НА МОЛЕКУЛЕ ТРОФОБЛАСТСПЕЦИФИЧЕСКОГО  
 $\beta_1$ -ГЛИКОПРОТЕИНА***Павленко А. Ф., Мороз С. В., Глазунов В. П., Вакорина Т. И.  
Одиноков С. Е., Оводов Ю. С.**Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ  
Академии наук СССР, Владивосток*

Для выяснения природы и локализации антигенных детерминант трофобласт-специфического  $\beta_1$ -гликопротеина (ТСГ) проведена химическая модификация его углеводной и белковой частей. Показано, что различные методы дегликозилирования ТСГ приводят к соединениям, трудно растворимым даже в присутствии сильных детергентов. Модификация углеводных цепей, связанная с образованием боратных комплексов, не изменяет, по данным спектров КД, конформации белковой части ТСГ и вызывает небольшое увеличение его антигенной активности. Модификация более чем одного остатка триптофана N-бромсукцинимидом, а также трех остатков тирозина тетранитрометаном изменяет пространственную структуру белковой части ТСГ, что приводит к значительной потере ее антигенной активности. Сделан вывод, что антигенные детерминанты ТСГ локализованы в белковом коре молекулы и являются топографическими. Но крайней мере один остаток триптофана входит в антигенные детерминанты.

Трофобластспецифический  $\beta_1$ -гликопротеин (ТСГ) является сialogликопротеином с молекулярной массой  $\sim 75$  кДа и содержит 30% углеводов [1]. ТСГ представляет значительный интерес в качестве антигена, позволяющего следить за патологией беременности, а также служит маркером некоторых злокачественных новообразований [2]. Однако значительная гетерогенность большинства препаратов ТСГ, недостаточная изученность его структуры и особенно взаимосвязи структуры с антигенной активностью существенно ограничивает клиническое использование ТСГ и понимание его биологической роли [3].

Ранее нами было показано, что антигенная активность ТСГ в значительной степени зависит от состояния пространственной структуры белковой части молекулы, в свою очередь зависящего от pH и температуры раствора [4]. Очевидно, что изменение пространственной структуры белковой части ТСГ может приводить к изменению конформации углеводных цепей ТСГ и, следовательно, к нарушению общей архитектоники молекулы. Поэтому на основании ранее полученных данных [4] нельзя однозначно оценить роль углеводной и белковой частей этого антигена в формировании антигенных детерминант молекулы ТСГ. Между тем выяснение этого вопроса представляет определенный интерес. Данная работа продолжает исследования по выяснению роли белковой и углеводной частей молекулы ТСГ в формировании ее антигенных детерминант.

Сольволитическое дегликозилирование ТСГ под действием безводного фтористого водорода [4], так же как и проведенное нами периодатное окисление этого антигена с удалением половины углеводов (эксперимент не описан), приводило к получению соединений, с трудом растворимых только в присутствии сильных детергентов. Аналогичные результаты были получены в работе [5], где при дегликозилировании ТСГ смесью экзогликозидаз получен препарат ТСГ с содержанием углеводов  $\sim 7\%$ . Таким образом, удаление углеводов даже в мягких условиях не позволяет проследить за изменением пространственной структуры полученного белкового фрагмента молекулы ТСГ, определить его антигенную активность и, следовательно, оценить роль углеводной части в формировании антигенных

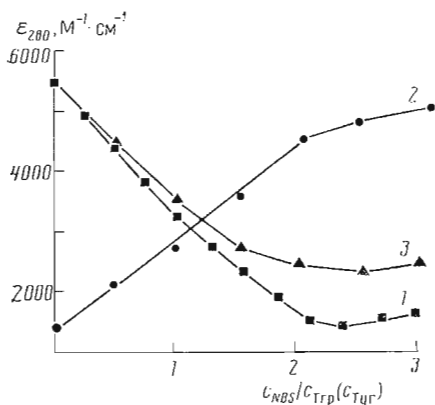


Рис. 1. Зависимость поглощения при 280 нм от концентрации в УФ-спектрах растворов в 0,01 М ацетатном буфере, рН 5,0, этиловых эфиров N-ацетилпроизводных: триптофана (1), тирозина (2), смеси триптофана и тирозина (1 : 4) (3)

детерминант ТСГ. Однако из экспериментов по дегликозилированию очевидно, что углеводная часть ТСГ снижает гидрофобность и, вероятно, формирует нативную конформацию молекулы ТСГ.

Для определения вклада углеводных цепей ТСГ в антигенную активность его молекулы мы использовали способность углеводов образовывать с борной кислотой и ее солями отрицательно заряженные комплексы [6]. Таким способом для некоторых гликопротеинов была доказана ответственность углеводов за проявление активности [7, 8]. Недавно нами также было показано, что образование боратных комплексов с углеводной частью раковоэмбрионального антигена (РЭА) приводило почти к полной потере его антигенной активности [9] без изменения пространственной структуры его белковой части (данные КД). Разрушение боратных комплексов вызывало полное восстановление антигенной активности РЭА.

Антигенная активность ТСГ после обработки боратным буфером при рН 7,6, как показано иммуноферментным методом, увеличивается на 10% по сравнению с активностью в фосфатном буфере при том же значении рН. Спектр КД ТСГ в боратном буфере не изменяется во времени и совпадает с таковым в фосфатном буфере, что указывает на отсутствие изменений в конформации белковой части ТСГ при модификации углеводных цепей. Следовательно, по-видимому, углеводные цепи молекулы ТСГ не несут антигенных детерминант этого антигена и не входят в их структуру. Наблюдаемое увеличение антигенной активности, вероятно, вызвано изменением конформации углеводных цепей, которое приводит к большей доступности белковой части ТСГ для антител.

Хорошо известно, что для иммуногенности белковых антигенов наиболее важны ароматические аминокислоты, особенно остатки триптофана и тирозина [10]. По этой причине в первую очередь мы провели модификацию остатков именно этих аминокислот.

Для модификации остатков триптофана использовали известную методику окисления N-бромсукцинимидом (NBS) в ацетатном буфере, рН 5,0 [11]. Контроль за степенью модификации осуществляли по убыли поглощения при 280 нм в УФ-спектре раствора ТСГ. Однако при наличии в

Антигенная активность и число модифицированных остатков триптофана (N\*) в ТСГ при добавках NBS

[NBS] · 10 <sup>5</sup> , М	[ТСГ] · 10 <sup>5</sup> , М	[NBS]/[ТСГ]	N *	Активность, %
3,828	1,857	2,06	0,18	95
7,613	1,839	4,14	0,83	91
11,362	1,821	6,24	1,73	74
15,074	1,803	8,36	2,80	62
18,751	1,786	10,50	3,50	33
22,394	1,769	12,66	3,60	26

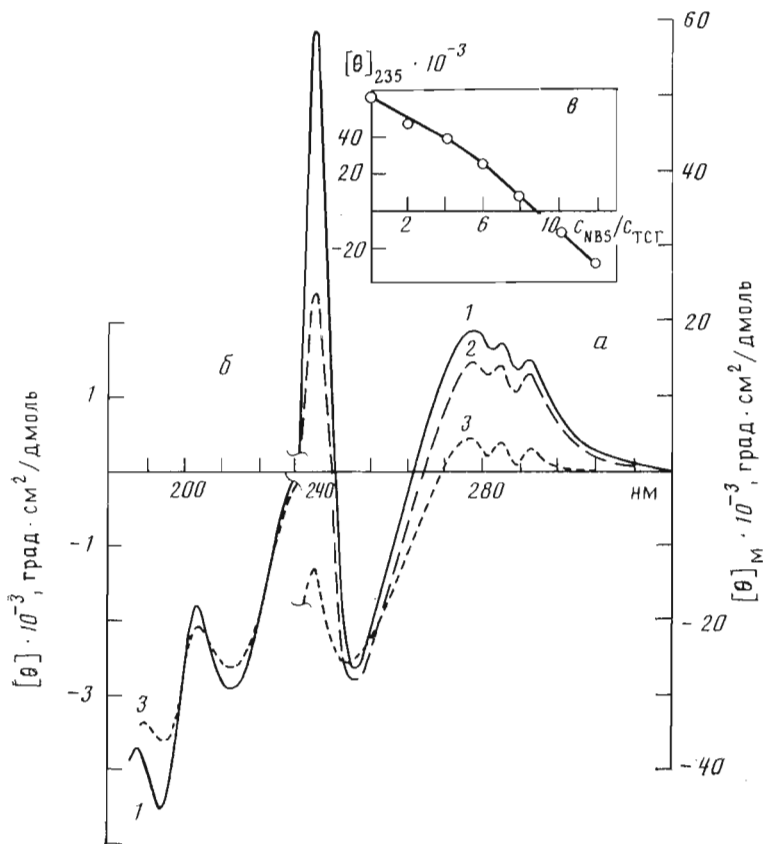


Рис. 2. Спектры КД ТСГ в 0,01 М ацетатном буфере, рН 5,0, с добавками NBS:  $c_{\text{NBS}}/c_{\text{ТСГ}}=0$  (1), 6:1 (2); 10:1 (3). а —  $c_{\text{ТСГ}}=1$  мг/мл,  $l=1$  см, б —  $c_{\text{ТСГ}}=0,4$  мг/мл,  $l=0,1$  см. в — зависимость эллиптичности полосы 235 нм от  $c_{\text{NBS}}/c_{\text{ТСГ}}$

молекуле белка остатков тирозина надо учитывать их вклад в изменение спектральных характеристик белка при обработке его NBS.

Для учета вклада тирозина при определении модифицированных остатков триптофана нами были проведены эксперименты на модельных образцах этиловых эфиров N-ацетилтриптофана, N-ацетилтирозила и их смеси (1:4) (рис. 1). Выбранное соотношение тирозин — триптофан в смеси соответствует количеству этих остатков, экспонированных на поверхность молекулы ТСГ [4]. На основании полученных данных (рис. 1) при расчете числа модифицированных остатков триптофана в растворе ТСГ ( $N^*$ ) мы вводили поправку  $N^*=N/0,8$ , где  $N$  — число модифицированных остатков триптофана, рассчитанных по убыли величины поглощения  $\Delta A_{280}$  (см. «Экспериментальная часть»). Результаты расчета числа модифицированных остатков триптофана и антигенная активность полученных модифицированных молекул ТСГ приведены в таблице.

В спектре КД ТСГ из всех наблюдаемых полос в области 330–230 нм наиболее чувствительна к добавкам NBS интенсивная положительная полоса при 235 нм. Ее эллиптичность уменьшается с увеличением концентрации NBS (рис. 2). Для кривой зависимости эллиптичности этой полосы от концентрации NBS характерно наличие двух линейных участков (см. рис. 2в). Такой же характер имеет и зависимость антигенной активности ТСГ от концентрации NBS (рис. 3). Конец первого линейного участка на рис. 2в соответствует модификации одного остатка триптофана, при этом антигенная активность ТСГ уменьшается на 10%. В пептидной области спектра КД (230–185 нм) не наблюдается каких-либо изменений для первого участка концентраций NBS. Следовательно, модификация од-

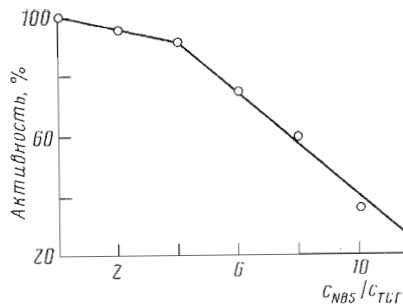


Рис. 3. Зависимость антигенной активности ТСГ от  $c_{NBS}/c_{TSG}$

ного поверхностного остатка триптофана не вызывает изменения в пространственной структуре молекулы ТСГ. Для второго участка концентраций NBS, когда модифицируются второй и последующие остатки триптофана, становятся заметными изменения как в ароматической, так и в пептидной областях спектра КД. В ароматической области спектра КД наблюдается не только уменьшение эллиптичности положительной полосы при 235 нм, но и заметное уменьшение эллиптичности других положительных полос при 276, 284 и 292 нм (рис. 2). Изменения в пептидной области спектра КД, свидетельствующие об изменении вторичной структуры белковой части молекулы ТСГ, сопровождаются значительным снижением антигенной активности. Эти результаты показывают, что по крайней мере один поверхностный остаток триптофана входит в антигенные детерминанты ТСГ. Значительное уменьшение антигенной активности ТСГ при модификации последующих остатков триптофана сопровождается изменением пространственной структуры белковой части антигена. Это обстоятельство не позволяет однозначно выявить роль остальных остатков триптофана в формировании антигенных детерминант молекулы ТСГ, однако дополнительно подтверждает тот факт, что большинство его антигенных детерминант являются топографическими.

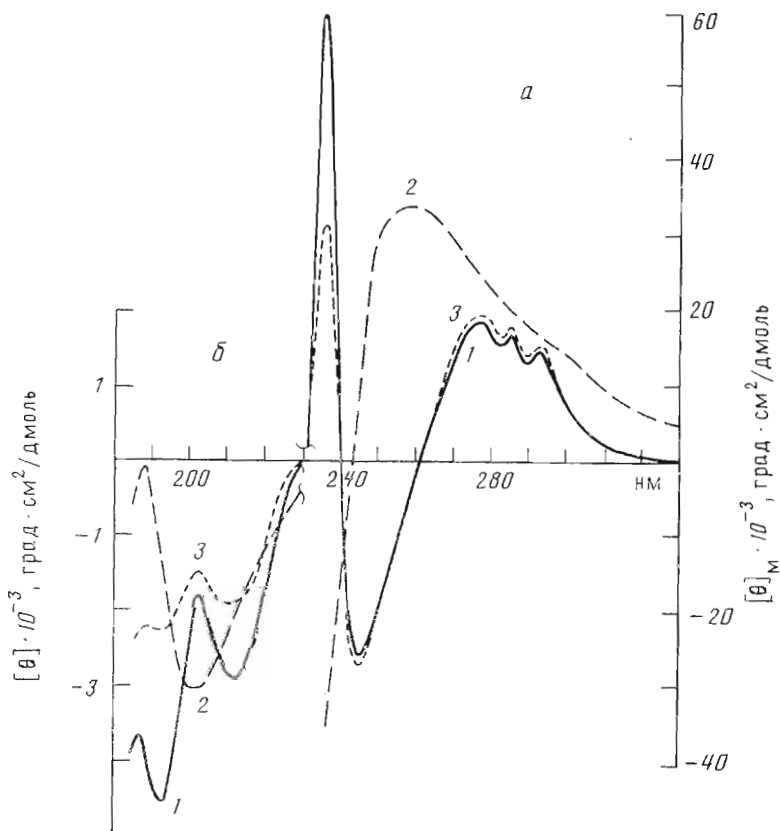


Рис. 4. Спектры КД в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,0: ТСГ (1), ТСГ-НМ (2), ТСГ-NO<sub>2</sub> (3). а -  $c=1$  мг/мл,  $l=1$  см; б -  $c=0,4$  мг/мл,  $l=0,1$  см

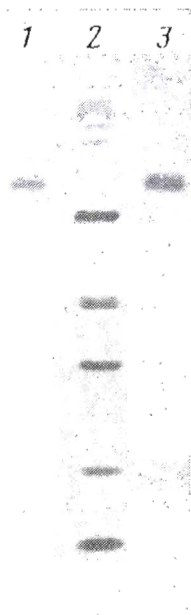


Рис. 5. SDS-электрофорез в градиенте пористости полиакриламидного геля ТСГ, модифицированного NBS (1) и ТСГ-NO<sub>2</sub> (3); 2 — стандарты молекулярных масс, кДа (сверху вниз): фосфоорилаза В — 94; бычий сывороточный альбумин — 67; овальбумин — 43; карбоангидраза — 30; ингибитор трипсина — 20,4; α-лактальбумин — 14

Модификацию остатков тирозина проводили тетранитрометаном при рН 7,5 [12]. Количество модифицированных остатков тирозина рассчитывали спектрофотометрически по поглощению при 428 нм, рН 9,0, принимая для нитрометана  $\epsilon_{428} = 42\,000\text{ M}^{-1}\text{ см}^{-1}$  [12]. При модификации трех остатков тирозина антигенная активность модифицированного образца (ТСГ-NO<sub>2</sub>) уменьшалась на 30%. Как показывает спектр КД ТСГ-NO<sub>2</sub> (рис. 4), его пространственная структура относительно нативного ТСГ изменена. Эти данные не позволяют сделать вывод, входят ли модифицированные остатки тирозина в антигенные детерминанты ТСГ, так как изменение антигенной активности может быть вызвано происходящим изменением в пространственной структуре молекулы. Следует также отметить, что наблюдаемое изменение пространственной структуры белковой части ТСГ под действием тетранитрометана, вероятно, может быть обусловлено модификацией других, отличных от тирозина, аминокислот [12].

При модификации ТСГ как NBS, так и тетранитрометаном не происходит деградации молекулы, что подтверждается SDS-электрофорезом в градиенте пористости полиакриламидного геля (рис. 5). Сопоставление модифицированных производных ТСГ двойной иммунодиффузией в агаре с тест-системой на ТСГ показывает их полную иммунохимическую идентичность нативному антигену.

С целью выяснения роли конформации белковой части молекулы ТСГ в определении ее антигенной активности мы провели разрыв всех четырех дисульфидных связей восстановлением с последующим карбоксиметилированием образующихся сульфгидрильных групп. Как показывают спектры КД карбоксиметилированного производного ТСГ (ТСГ-КМ) (рис. 4), разрыв дисульфидных связей приводит к нарушению нативной пространственной структуры белковой части молекулы. В результате теряется не только антигенная активность (сохраняется около 3% активности от нативной), но и часть антигенных детерминант [13]. Эти данные подтверждают вывод, что большинство антигенных детерминант на молекуле ТСГ являются топографическими.

На основании полученных в работе результатов можно заключить, что антигенные детерминанты ТСГ локализованы на белковой части молекулы и большинство из них являются топографическими. По крайней мере один остаток триптофана входит в антигенные детерминанты. Углеводная часть ТСГ снижает его гидрофобность и необходима для поддержания нативной конформации молекулы.

## Экспериментальная часть

Иммунохимический анализ, SDS-электрофорез и получение ТСГ проводили как описано в работе [1]. Антисыворотки против ТСГ получали по схеме, описанной ранее [14]. Иммуноглобулины G из кроличьей антисыворотки против ТСГ выделяли как описано ранее [15]. Антигенную активность определяли иммуноферментным методом [4]. Периодатное окисление ТСГ проводили как описано нами для Р5А [9].

**Модификация остатков триптофана.** Для обработки методики окисления N-бромсукцинимидом были использованы этиловые эфиры N-ацетилтриптофана и N-ацетилтирозина (Serva, ФРГ). 2,1 мг ( $2,8 \cdot 10^{-5}$  ммоль) ТСГ растворяли в 1,5 мл 0,01 M ацетатного буфера, pH 5,0, добавляли по 15 мкл  $3,85 \cdot 10^{-3}$  M водного раствора NBS и измеряли поглощение при 280 нм. Число модифицированных остатков триптофана ( $N^*$ ) считали по убыли величины поглощения  $\Delta A_{280}$  по формуле  $N^* = N/0,8$ , где  $N = A_{280}/3915 \cdot c_{\text{ТСГ}} \cdot l$  ( $3915 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  — убыль поглощения ( $\lambda_{280}$ ) этилового эфира N-ацетилтриптофана при его полной модификации).

**Модификация остатков тирозина.** 3 мг ТСГ растворяли в 1 мл 0,1 M фосфатного буфера, pH 7,5, содержащего 1 mM EDTA, и добавляли 20 мкл 0,15 M раствора тетрагидротетраметана (Serva, ФРГ) в 95% этаноле. Раствор инкубировали 1 ч при 20° C и добавляли 50 мкл 1 M раствора  $\beta$ -меркаптоэтанола в том же буфере. Раствор диализовали при 4° C против 1% бикарбоната аммония и лиофилизировали.

Разрыв дисульфидных связей и карбоксиметилированный образец ТСГ-КМ получили как описано в работе [13].

Для получения боратных комплексов с углеводными цепями ТСГ растворяли в боратном буфере 0,2 M  $\text{H}_3\text{BO}_3 + 0,05 \text{ M Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , pH 7,6, и инкубировали 2 сут при 4° C.

Спектры УФ регистрировали в 1-см кварцевых кюветах на спектрофотометре Cary-219 (США).

Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре Jasco J-500A с микропроцессором DP 501N (Япония) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см для области 330–230 нм и 1 мм для области 230–185 нм при 22° C. Прибор калибровали по полосам аммониевой соли *d*-камфоры-10-сульфоната (Katayama Chemical, Япония); отношение эллиптичностей полос при 192 и 290 нм составляло 2,05. В пептидной области эллиптичность полос считали только на белковую часть молекулы, как эллиптичность среднего аминокислотного остатка с молекулярной массой 110:  $[\theta] = \theta \cdot S \cdot 110 / c \cdot l \cdot 0,7 \cdot 10$  в град·см<sup>2</sup>/дмоль, где  $S$  — чувствительность прибора,  $c$  — весовая концентрация ТСГ в мг/мл. В ароматической области считали молярную эллиптичность в расчете на молекулярную массу всей молекулы, равную 75 000.  $[\theta]_M = \theta \cdot S / c_M \cdot l \cdot 10$ , где  $c_M$  — молярная концентрация ТСГ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Pavlenko A. F., Moroz S. V., Kuznetsov Yu. N., Ovodov Yu. S. // *Tumour Biology*. 1985. V. 6. № 5. P. 491–501.
2. Тарарунов Ю. С. // *Успехи соврем. биологии*. 1983. Т. 95. № 1. С. 57–64.
3. Sorensen S. // *Tumour Biology*. 1984. V. 5. № 5. P. 275–302.
4. Мороз С. В., Глазунов В. П., Ваюрина Т. И., Павленко А. Ф., Одиноков С. Е., Оводов Ю. С. // *Биоорган. химия*. 1987. Т. 13. № 4. С. 519–527.
5. Osborn J. C., Rosen S. W., Nilsson B., Colvert I., Bohn H. // *Biochemistry*. 1982. V. 21. № 22. P. 5523–5528.
6. Ferrier R. I. // *Adv. Carbohydr. Chem.* 1978. V. 35. P. 31–80.
7. Vandenheede J. R., Ahmed A. I., Feeney R. E. // *J. Biol. Chem.* 1972. V. 247. № 24. P. 7885–7889.
8. Tomimatsu Y., Scherer J. R., Yeh Y., Feeney R. E. // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. № 8. P. 2290–2298.
9. Павленко А. Ф., Курика А. В., Чикаловец И. В., Коржииков И. А., Глазунов В. П., Оводов Ю. С. // *Биоорган. химия*. 1987. Т. 13. № 6. С. 814–817.
10. Фримель Х., Брок И. *Основы иммунологии*. М.: Мир, 1986. С. 34–37.
11. Spandle T. F., Witkop B. // *Meth. Enzymol.* 1967. V. 41. P. 498–506.
12. Glazer A. N., Delange R. J., Sigman D. S. // *Chemical modification of proteins*. N. Y.: Amer. Elsevier Publ., 1975. P. 95–99.
13. Павленко А. Ф., Мороз С. В., Глазунов В. П., Безнаев А. Н., Оводов Ю. С. // *Биоорган. химия*. 1987. Т. 13. № 11. С. 1530–1534.
14. Павленко А. Ф., Курика А. В., Мороз С. В., Оводов Ю. С., Маслова М. Г., Володарский В. Л. // *Вопр. онкологии*. 1982. Т. 28. № 4. С. 14–16.
15. Рукводство по количественному иммуноэлектрофорезу. Методы и применение. / Ред. Аксельсен Н., Крелль И., Вееке Б. М.: Мир, 1977. С. 201–203.

Поступила в редакцию  
10.XI.1986

После доработки  
26.XII.1986

LOCALIZATION OF ANTIGENIC DETERMINANTS  
OF TROPHOBLAST-SPECIFIC  $\beta_1$ GLYCOPROTEIN

PAVLENKO A. F., MOROZ S. V., GLAZUNOV V. P., VACORINA T. I.,  
ODINOKOV S. E., OVODOV Yu. S.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry,  
Far-Eastern Scientific Centre, Academy of Sciences  
of the USSR, Vladivostok*

Spatial localization of antigenic determinants of trophoblast-specific  $\beta_1$ -glycoprotein (TSG) has been elucidated using chemical modifications of the sugar and protein moieties of the molecule. Various deglycosilation procedures of TSG afforded fragments slightly soluble even in the presence of powerful detergents. Treatment of TSG with boric acid and its salts, accompanied with a conformational change of the sugar moiety, failed to alter conformation of the protein portion as evidenced by CD spectral data. This modification was found to increase the antigenic activity of TSG only scarcely. Modification of tryptophane or tyrosine residues of TSG changed spatial structure of the protein portion to cause a considerable loss of the TSG antigenic activity. The data obtained led to the conclusion that antigenic determinants of TSG are localized at the protein portion of the molecule and are topographic. A tryptophane residue is an indispensable constituent of the antigenic determinants.