



УДК 577.112.083.3

© 1992 г. Т. В. Швеи, В. М. Махнырь, Э. П. Козловская

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ НА ИММУНОХИМИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОТОКСИНА Rm-III ИЗ АКТИНИИ *RADIANTUS MACRODACTYLUS*

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток

Химическая модификация нейротоксина Rm-III из актинии *Radianthus macrodactylus* использована для изучения организации его антигенных детерминант. Иммунохимические эксперименты проводили методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с использованием поликлональных антител к Rm-III. Модификации подвергали N-концевую аминокислотную группу Gly¹, остатки Lys⁴, Arg¹³, Trp³⁰, один из остатков в последовательности Lys⁴⁶-Lys⁴⁷-Lys⁴⁸, по одному разному остатку в последовательности Asp⁶-Asp⁷-Glu⁸ двух образцов токсина, а также две дисульфидные связи. Только модификация дисульфидных связей приводила к значительному изменению сродства токсина к антителам. В результате модификации Trp³⁰ концентрация токсина, необходимая для достижения 50% ингибирования тест-системы, уменьшилась в 2 раза. Модификация любого другого аминокислотного остатка вызывала увеличение этой концентрации, но не более чем в 2,2 раза. Сделано предположение, что в последовательности Rm-III отсутствуют отдельные остатки, принципиально важные для антигенной активности токсина. Определяющее значение для формирования антигенных детерминант имеет конформация молекулы Rm-III.

Морская актиния *Radianthus macrodactylus* продуцирует серию гомологичных нейротоксинов, селективно взаимодействующих с натриевыми каналами возбудимых мембран [1]. Это полипептиды с молекулярной массой около 5 кДа и тремя дисульфидными связями [2]. Наиболее токсичным для млекопитающих и преобладающим количественно является токсин III (Rm-III), для которого известна аминокислотная последовательность [3] и достаточно подробно изучены структурно-функциональные взаимосвязи [4–7].

Химическая модификация нередко используется для установления организации антигенных детерминант биополимеров [8, 9]. Цель настоящей работы — изучение влияния модификации отдельных аминокислотных остатков на антигенные свойства нейротоксина Rm-III. Модификации подвергали заряженные аминокислотные остатки, расположенные на всем протяжении полипептидной цепи, а также единственный остаток триптофана и дисульфидные связи. Очистка производных и локализация модифицированных остатков описаны ранее [4–7]. Полипептидная цепь Rm-III содержит триплет кислых остатков Asp⁶-Asp⁷-Glu⁸, а также триплет остатков лизина Lys⁴⁶-Lys⁴⁷-Lys⁴⁸, расположенный на C-конце молекулы. В случае модификации какого-либо из этих остатков локализация проводилась с точностью до соответствующего триплета [5, 7]. По данным КД, модификация боковых цепей аминокислот проходила без изменения вторичной структуры токсина [4–7].

Методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с использованием поликлональных антител к Rm-III [10] показано (рисунок), что значительное уменьшение сродства токсина к антителам наблюдалось только в случае модификации дисульфидных связей. Соответст-

Шифр производного	Модификация, 1 остаток/моль белка	Реагент	Лит-ра	$I_{50}^M \cdot 10^{-9}$, М	I_{50}^M/I_{50}^M
1	Gly ¹	[³ H]CH ₃ CHO	[7]	2,8	2,0
2	Lys ⁴	То же	»	2,8	2,0
3	-Lys ⁴⁶ -Lys ⁴⁷ -Lys ⁴⁸ -	»	»	2,4	1,7
4	-Asp ⁶ -Asp ⁷ -Glu ⁸ -	[³ H]Метилловый эфир глицина, EDC ***	[5]	2,0	1,4
5	То же	То же	»	1,8	1,3
6	Arg ¹³	1,2-Дихлоргександион	[6]	3,0	2,2
7	Trp ³⁰	2-Гидрокси-5-нитробензил-бромид	[4]	0,7	0,5
8	Дисульфидные связи **	2-Меркаптоэтанол/иод-ацетамид	»	—	—

* I_{50} — концентрация ингибитора, при которой достигалось 50% ингибирование тест-системы (конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ); верхний индекс «м» и «и» соответствует модифицированному и нативному токсину.

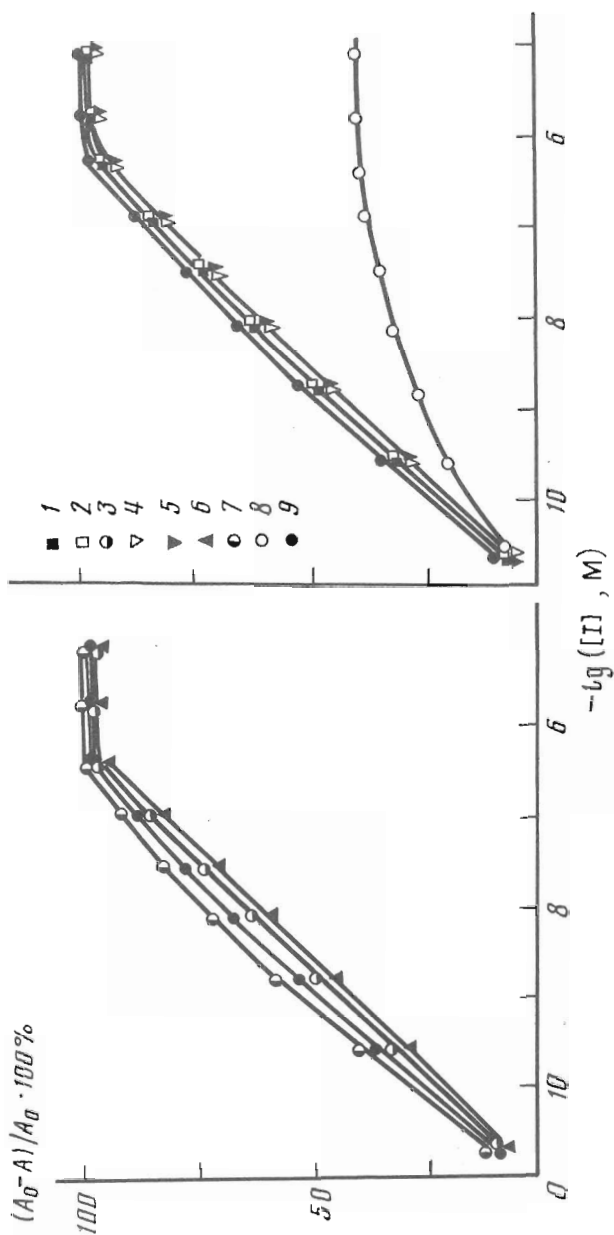
** Модифицированы две из трех дисульфидных связей белка.

*** 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид.

вующая кривая ингибирования расположена значительно ниже кривых ингибирования производных по боковым цепям аминокислот, причем максимальная величина ингибирования тест-системы производным с модифицированными дисульфидными связями не превышает 40%. Для остальных производных, использованных в эксперименте, максимальные величины ингибирования тест-системы близки к 100%. В таблице приведены концентрации модифицированных производных, при которых наблюдалось 50% ингибирование взаимодействия токсина с антителами. Интересно, что модификация остатка Trp³⁰ приводила к понижению этой концентрации, тогда как в случае остальных модифицированных остатков наблюдалось ее повышение. Следует, однако, подчеркнуть, что изменения величины I_{50} в результате модификаций невелики и не превышают 2,2 раза.

Таким образом, несмотря на использование достаточно большого количества производных токсина, нам не удалось выявить в его последовательности хотя бы один остаток, модификация которого приводила бы к значительному изменению антигенной активности. Это позволяет предположить, что каждый в отдельности аминокислотный остаток токсина не имеет решающего значения для его антигенности. По-видимому, антигенные свойства токсина складываются из множества эффектов отдельных аминокислотных остатков, интеграция которых осуществляется на уровне третичной структуры. На принципиальное значение конформации молекулы Rm-III для формирования антигенных детерминант указывает значительное уменьшение антигенной активности токсина в результате модификации двух дисульфидных связей. Ранее было показано [4], что дисульфидные связи важны для сохранения нативной конформации Rm-III, которая изменяется при их модификации. Некоторое увеличение антигенной активности в результате модификации остатка Trp³⁰, вероятно, связано с появлением новых эпитопов или с увеличением доступности уже имеющихся, что может быть обусловлено влиянием модификации на третичную структуру. Факт появления новых антигенных детерминант в результате даже незначительного изменения пространственной структуры молекул белков отмечался ранее [11, 12].

Анализ профиля гидрофильности Rm-III [10] выявил в его последовательности три области с высокими значениями гидрофильности, которые, как принято считать [13], могут быть потенциальными антигенными



Изгибирование связывания Rm-III с антителами нативным Rm-III (9) и его модифицированными производными (1)-(8) (номер кривой соответствует шифру производного, см. таблицу). По оси ординат откладывались средние значения величин, вычисленные по результатам двух опытов (см. «Экспер. часть»)

детерминантами. Среди остатков, подвергавшихся модификации в настоящем исследовании, остатки 1, 4, 6—8 и 46—48 входят в области высоких значений гидрофильности, тогда как остаток 13 интегрирован в гидрофобный регион молекулы Rm-III [10]. Из данных, приведенных в таблице, следует, что эффект модификации не зависит существенным образом от принадлежности модифицируемого остатка к гидрофильному или гидрофобному региону молекулы Rm-III. Аналогичные наблюдения описаны. Так, для токсина АТХ-II из актинии *Anemonia sulcata* было показано [8], что его антигенные детерминанты включают как остаток Asp⁷, находящийся в области высоких значений гидрофильности, так и Gly⁴⁷, входящий в гидрофобный регион, тогда как остатки Lys³⁵-Lys³⁶, образующие второй участок высоких значений гидрофильности, в эпитопы не входят. Ряд авторов [14, 15] высказывали предположение, что антигенные детерминанты белков расположены в вариабельных, экспонированных наружу участках полипептидной цепи, тогда как центры, ответственные за токсичность, находятся в консервативных, иммунологически пассивных частях молекул. С этой точки зрения анализировать наши данные по Rm-III достаточно сложно, поскольку Rm-III — короткий полипептид, а степень гомологии среди нейротоксинов из *R. macrodactylus* очень высока. Тем не менее в первом приближении такая закономерность прослеживается. Остатки, подвергавшиеся модификации, консервативны для токсинов из *R. macrodactylus* и, как оказалось, по отдельности не играют значительной роли в антигенной активности.

Авторы благодарят А. В. Курику за рекомендации и критические замечания, высказанные в ходе обсуждения рукописи статьи.

Экспериментальная часть

В работе использовали бычий сывороточный альбумин (Technicon, Бельгия), Твин-20 (Fergak, Германия), диагностические антитела против иммуноглобулинов кролика, меченные пероксидазой из хрена (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи). Остальные реактивы имели квалификацию ос. ч. и х. ч.

Токсин Rm-III был выделен по методу [5], его гомогенность доказана данными ВЭЖХ, аминокислотного и N-концевого анализа. Модификация Rm-III и локализация модифицированных остатков описаны в работах [4—7].

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [16]. Аминокислотный анализ проводили на анализаторе Biotronic LC 6000 после гидролиза токсина в 6 н. HCl в течение 24 ч при 108°С.

Иммунизацию кроликов, получение поликлональных антител к Rm-III и иммуноферментный анализ проводили как описано ранее [10].

Реакция ингибирования. В предварительных экспериментах [10] были подобраны оптимальные для спектрофотометрирования концентрации Rm-III и антител к нему (1 мкг/мл). В ячейки планшетов для микротитрования (Dynatech, Швейцария) вносили по 0,2 мл раствора Rm-III (1 мкг/мл) в буфере А (0,01 М NaHCO₃). Планшеты инкубировали 18 ч при 4°С. Параллельно в тех же условиях в пробирках инкубировали по 0,5 мл раствора антител к Rm-III (1 мкг/мл) в буфере Б (0,01 М NaH₂PO₄, 0,15 М NaCl, 0,1% Твин-20, рН 7,4), содержащего производные токсина в различных концентрациях (в каждой последующей пробирке концентрация производного была в 2 раза ниже, чем в предыдущей). Планшеты с иммобилизованным токсином промывали буфером Б и водой, обрабатывали 1 ч 0,3% раствором бычьего сывороточного альбумина в буфере Б при 37°С и вновь промывали буфером Б и водой. В лунки планшетов вносили по 0,2 мл раствора из пробирок, инкубировали 1,5 ч при 37°С, тща-

тельно отмывали буфером Б и водой, после чего вносили 0,2 мл раствора диагностических антител в буфере Б (разведение 1:1000) и инкубировали планшеты при 37°С в течение 1,5 ч. Затем планшеты промывали как указано выше, добавляли в лунки по 0,2 мл раствора: *о*-фенилендиамин (0,4 мг/мл), перекись водорода (0,006%) в цитратно-фосфатном буфере (24,4 мМ лимонная кислота, 51,2 мМ NaH_2PO_4 , pH 5,5). Планшеты оставляли при комнатной температуре на 20 мин, после чего реакцию останавливали добавлением 0,05 мл 1 М серной кислоты и определяли поглощение при 492 нм на спектрофотометре Multiscan plus (Финляндия). В качестве контроля использовали реакционную смесь, не содержащую токсина. Ингибирование связывания токсина с антителами рассчитывали по формуле

$$\frac{A_0 - A}{A_0} \cdot 100\%,$$

где A_0 и A — оптическое поглощение в отсутствие и в присутствии ингибитора. Для каждого производного токсина ставили два параллельных опыта по ингибированию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сорокина З. А., Чижмаков И. В., Еляков Г. Б., Козловская Э. П., Вожегова Е. И. // Физiol. журн. 1984. Т. 30. № 5. С. 571–579.
2. Зыкова Т. А., Козловская Э. П., Еляков Г. Б. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1489–1494.
3. Зыкова Т. А., Винокуров Л. М., Козловская Э. П., Еляков Г. Б. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 3. С. 302–310.
4. Махнырь В. М., Козловская Э. П. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 5. С. 643–648.
5. Mahnir V. M., Kozlovskaya E. P., Elyakov G. B. // Toxicon. 1990. V. 28. № 11. P. 1255–1263.
6. Mahnir V. M., Kozlovskaya E. P., Elyakov G. B. // Toxicon. 1989. V. 27. № 10. P. 1075–1084.
7. Mahnir V. M., Kozlovskaya E. P. // Toxicon. 1991. V. 29. № 7. P. 819–826.
8. Ayebe M. E., Bahraoui E. M., Granier G., Beress L., Rochat H. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 6755–6761.
9. Ayebe M. E., Darbon H., Bahraoui E. M., Vargas O., Rochat H. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 155. № 2. P. 289–294.
10. Швеуц Т. В., Козловская Э. П., Филитов А. Н. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. № 3. С. 374–382.
11. Friquet B., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E. // Molec. Immunol. 1984. V. 21. № 7. P. 673–677.
12. Benjamin D. C., Berzofsky J. A., East I. J., Gurd F. R. N., Hannum C., Leach S. J., Margoliash E., Michael J. G., Miller A., Prager E. M., Reichlin M., Sercarz E. E., Smith-Gill S., Todd P. E., Wilson A. C. // Ann. Rev. Immunol./Eds Paul W. E., Fathman C. G., Metzger H. Palo Alto, California: Annual Reviews Inc., 1984. V. 2. P. 67–101.
13. Hopp T. P., Woods K. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 6. P. 3824–3828.
14. Ayebe M. E., Bahraoui M. E., Granier C., Rochat H. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 6671–6678.
15. Granier C., Novotny J., Fontecilla-Camps J.-C., Fourquet P., Ayebe M. E., Bahraoui M. E. // Molec. Immunol. 1989. V. 26. № 6. P. 503–513.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.

Поступила в редакцию
4.II.1992

EFFECT OF CHEMICAL MODIFICATION ON IMMUNOCHEMICAL
ACTIVITY OF NEUROTOXIN Rm-III FROM THE SEA
ANEMONE *Radianthus macrodactylus*

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of
Sciences, Vladivostok*

A chemical modification was used for studying the organization of antigenic determinants of neurotoxin Rm-III from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. Immunochemical experiments were performed using competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with polyclonal antibodies to Rm-III. The modification affected N-terminal amino group of Gly¹, Lys⁴, Arg¹³, Trp³⁰ residues, a residue in the Lys⁴⁶-Lys⁴⁷-Lys⁴⁸ sequence, two different residues in the Asp⁶-Asp⁷-Glu⁸ sequence in two samples of the toxin, and two disulphide bonds. Only the modification of the disulphide bonds led to a considerable change in the toxin's affinity to antibodies. The modification of Trp³⁰ resulted in two-fold decrease of the toxin concentration necessary for 50% inhibition of the test-system, whereas upon modification of any other amino acid residue this concentration increased but not more than by 2.2 times. It is suggested that Rm-III sequence lacks individual residues which are of great importance for the toxin's antigenic activity, its conformation being of vital importance for the formation of the toxin's antigenic determinants.