



УДК 577.112.384.853.083.3 + 616.006.097

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ
В РАКОВО-ЭМБРИОНАЛЬНОМ АНТИГЕНЕ,
РОЛЬ УГЛЕВОДНОГО КОМПОНЕНТА***Павленко А. Ф., Курика А. В., Чикаловец П. В.,
Коржиков И. А., Глазунов В. П., Оводов Ю. С.**Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ
Академии наук СССР, Владивосток*

Показано, что в большинство топографических антигенных детерминант раково-эмбрионального антигена (РЭА), представляющего собой гликопротеин, входят моносахаридные остатки углеводных цепей РЭА. При периодатном окислении с последующим восстановлением РЭА получено его производное (РЭА-ПОВ), сохраняющее лишь 3% антигенной активности РЭА. Установлено, что вторичная и третичная структура РЭА-ПОВ приближается к пространственной структуре РЭА, подвергнутого нагреванию до 80° С. Найдено, что образование моносахаридными остатками РЭА боратных комплексов снижает антигенную активность молекулы до 5% от исходной, не изменяя пространственной структуры ее белкового кодра.

Иммунологические методы являются многообещающими для обнаружения, лечения и, возможно, предотвращения раковых заболеваний [1]. Для того чтобы эти возможности были успешно реализованы, необходимо не только изучить антигены, ассоциированные со злокачественными новообразованиями, но и понять химическую природу их антигенных детерминант.

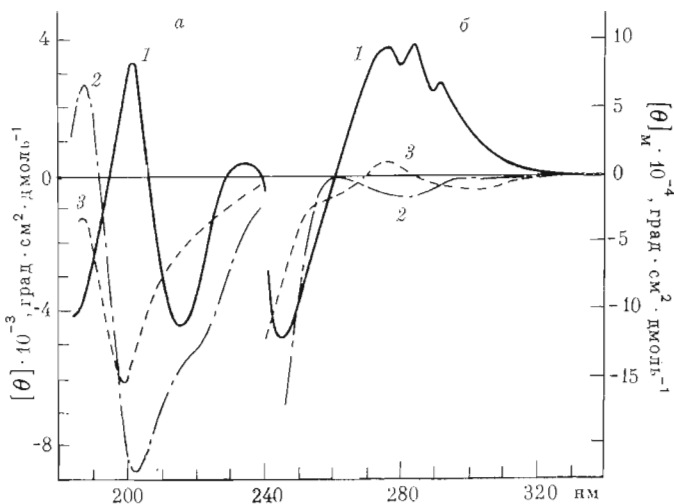
Однако даже для раково-эмбрионального антигена (РЭА) по вопросу о локализации антигенных детерминант существуют прямо противоположные точки зрения [2, 3].

Ранее [4, 5] нами было показано, что часть антигенных детерминант, содержащихся в РЭА, имеет топографическую природу; при этом углеводный компонент играет роль стабилизатора конформации РЭА.

Данная работа посвящена дальнейшему выяснению роли углеводного компонента в формировании антигенных детерминант РЭА.

Хорошо известно, что дегликозилирование РЭА под действием HF приводит к белковому компоненту РЭА (БК РЭА), практически не обладающему антигенной активностью [2, 5, 6]. Нами также показано, что при этом происходит значительная перестройка вторичной и третичной структуры БК РЭА [5]. В то же время при удалении углеводов из РЭА посредством его периодатного окисления исследователи обнаруживают либо потерю 70% исходной активности РЭА [7], либо практически полное сохранение антигенной активности [8]. Необходимо указать, что авторы последней работы [8] особо отмечали, что полученные ими результаты являются частным случаем для имеющейся в их распоряжении козьей антисыворотки против РЭА и не могут быть перенесены на другие антисыворотки. Они же отметили, что после окисления периодатом в образце РЭА не обнаруживался триптофан. Кроме того, эти авторы работали с препаратом РЭА, содержащим метионин, что свидетельствует о наличии посторонних белков, так как чистые образцы РЭА не содержат метионина [2]. Возможно, наличие примесей и обуславливало сохранение антигенной активности после периодатного окисления. Тем не менее данные работы [8] широко используются для подтверждения того факта, что антигенные детерминанты РЭА локализованы в его белковой части [2].

С целью выяснения влияния углеводов на конформацию белкового компонента РЭА и его антигенную активность мы осуществили периодат-



Спектр КД в 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,2, РЭА при 20 (1) и 80° С (2) и РЭА-ПОВ при 20° С (3). Спектр КД в 0,25 М боратном буфере, рН 7,6 (1). Условия: а — с = 0,44 мг/мл, $l = 1$ мм; б — с = 1,40 мг/мл, $l = 1$ см

ное окисление РЭА с последующим восстановлением боргидридом натрия, соблюдая все условия проведения периодатного окисления РЭА, которые использовались ранее [7, 8]. В результате было получено соответствующее производное РЭА с окисленной периодатом и восстановленной боргидридом натрия углеводной частью (РЭА-ПОВ). Оно содержит около 50% углеводных остатков (от исходного РЭА), не подвергшихся периодатному окислению, а также полиолы. Несмотря на то что полученный нами РЭА-ПОВ также не содержит триптофана, согласно определению по методу [9], он сохраняет однородность, о чем свидетельствуют данные SDS-электрофореза в градиенте пористости полиакриламидного геля. Вероятно, модификация триптофана не сопровождается разрывом пептидных связей. С помощью метода кругового дихроизма (КД) нами была изучена вторичная и третичная структура РЭА-ПОВ. КД-спектр РЭА-ПОВ свидетельствует о значительной перестройке его пространственной структуры по сравнению с исходным РЭА (рисунок). В ароматической области (рисунок а) отсутствуют полосы, характерные для нативного антигена. Спектр КД РЭА-ПОВ показывает, что изменяется и вторичная структура антигена: вместо отрицательной полосы при 266 нм (рисунок б) и положительной при 202 нм для нативного антигена в КД-спектре РЭА-ПОВ наблюдается лишь одна отрицательная полоса при 200 нм. Как видно из рисунка, КД-спектр РЭА-ПОВ близок к КД-спектру денатурированного при 80° С РЭА (рисунок а, кривая 2). Ранее нами было показано [5], что прогретый до 80° С РЭА сохраняет 75% активности нативного гликопротеина.

Полученный РЭА-ПОВ ингибирует преципитацию тест-системы РЭА — анти-РЭА, однако он не взаимодействует с тест-системой БК-РЭА — анти-БК-РЭА [4] при проведении двойной иммунодиффузии в агаре. Антигенная активность РЭА-ПОВ, определенная иммуноферментным методом как описано нами ранее [5], составляет 3% от исходной антигенной активности нативной молекулы РЭА (для БК-РЭА она составляет 1%). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о важной роли углеводной части РЭА в формировании антигенных детерминант РЭА.

Хорошо известно [10], что углеводы и их производные образуют отрицательно заряженные комплексы с борной кислотой и ее солями. Это свойство мы использовали для выяснения роли углеводов в формировании антигенных детерминант РЭА, углеводный компонент которого составляет около половины его молекулы [11]. При обработке РЭА 0,25 М боратным буфером, рН 7,6, в течение 12 ч он сохраняет лишь 5% исходной антигенной активности. Образовавшиеся боратные комплексы легко разрушаются диализом, и после проведения диализа раствора РЭА в бо-

ратном буфере против фосфатного наблюдается полное восстановление антигенной активности РЭА.

Активность белковых антигенов, в частности IgG кролика, одинакова в боратном и фосфатном буферах, как показали данные иммуноферментного анализа. Эти результаты свидетельствуют о том, что снижение антигенной активности РЭА в боратном буфере по сравнению с фосфатным с тем же рН обусловлено образованием комплексов ионов бората с гидроксильными группами моносахаридных остатков, входящих в состав РЭА. КД не выявляет изменений во вторичной и третичной структуре белкового компонента молекулы РЭА в боратном буфере. Как видно из рисунка (кривая 1), спектры КД РЭА в ароматической и пептидной областях в боратном и фосфатном буферах полностью идентичны.

Таким образом, эти и ранее полученные нами данные [4, 5] позволяют предположить, что моносахаридные остатки РЭА входят в большинство топографических антигенных детерминант РЭА.

Экспериментальная часть

РЭА получали как описано ранее [11]. Электрофорез, определение аминокислотного и углеводного состава, съемку и обработку КД-спектров, измерение антигенной активности для РЭА-ПОВ и РЭА в фосфатном буфере проводили как описано нами в работах [4, 5].

Периодатное окисление РЭА. Раствор РЭА (23 мг) в 0,2 М натрий-ацетатном буфере (рН 3,8; 20 мл), содержащий 5 мМ NaIO_4 , выдерживали 40 ч в темноте при 20° С, после чего добавляли 5 мкл этиленгликоля. К раствору, полученному в результате диализа против 15 л дистиллированной воды в течение 7 ч, прибавляли 20 мл 0,1 М бикарбонатного буферного раствора (рН 8,9), 30 мг боргидрида натрия и через 16 ч по каплям ледяную уксусную кислоту до рН 5,0. Полученный раствор диализовали против дистиллированной воды при 40° С и лиофилизовали. Получили 16 мг РЭА-ПОВ.

Определение антигенной активности в боратном буфере. Активность РЭА в боратном буфере определяли иммуноферментным «сэндвич»-методом на полистирольных планшетах (Dunatest, Швейцария) [5]. В лунки планшета вносили по 0,2 мл раствора (10 мкг/мл) IgG анти-РЭА* в 0,1 М бикарбонатном буфере (рН 9,5) и инкубировали 12 ч при 4° С. Планшет промывали водопроводной водой, а затем 0,01 М фосфатным буфером с 0,15 М NaCl (рН 7,5) с добавлением 0,05% твина 20 (повторяли 3 раза). Затем в лунки планшета вносили по 0,2 мл РЭА, растворенного в 0,25 М боратном (рН 7,6) или фосфатном буфере (рН 7,6) в концентрациях от 200 до 3,125 мкг/мл. Инкубировали 1 ч при 37° С. После этого планшет отмывали, как описано выше, и в лунки добавляли по 0,2 мл раствора конъюгата IgG анти-РЭА — пероксидаза, разведенного фосфатным буфером в соотношении 1 : 800, смесь инкубировали 1,5 ч при 37° С.

После отмывки добавляли по 0,2 мл субстрата (100 мл 0,8% раствора 5-аминосалициловой кислоты + 0,02 мл 30% H_2O_2 , рН 6,0), инкубировали 1 ч при 20° С. Поглощение измеряли при 449 нм на спектрофотометре (Multiskan, Финляндия). Антигенную активность РЭА в боратном буфере определяли из калибровочной кривой поглощения при 449 нм в зависимости от концентрации РЭА. За 100% активность принимали активность нативного РЭА при 20° С в фосфатном буфере.

Аналогично определяли и антигенную активность IgG кролика в боратном буфере. В этом случае проявление осуществляли конъюгатом анти-IgG — пероксидаза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Татаринев Ю. С. // Иммунология. 1982. № 3. С. 5—9.
2. Rogers G. T. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 695. № 3—4. P. 227—249.
3. Ткачева Г. А. // Мед. радиология. 1983. № 8. С. 69—74.

* IgG анти-РЭА — иммуноглобулин G из кроличьей антисыворотки против РЭА.

4. Павленко А. Ф., Курика А. В., Белогорцева Н. И., Набиуллин А. А., Оводов Ю. С. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 5. С. 646—650.
5. Одиноков С. Е., Набиуллин А. А., Глазунов В. П., Курика А. В., Павленко А. Ф., Оводов Ю. С., Геворкян Б. З. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1315—1322.
6. Shively I. E., Glassmann I. N. S., Engvall E., Todd C. U. // *Carcino-Embryonic Proteins*/Ed. Lehmann F.-G. New York — Oxford: Elsevier/North-Holland — Amsterdam, 1979. V. 1. P. 9—15.
7. Bessell M. E., Thomas P., Westwood I. H. // *Carbohydr. Res.* 1975. V. 45. P. 257—268.
8. Coligan J. E., Todd C. W. // *Biochemistry.* 1975. V. 14. № 4. P. 805—810.
9. Ichikawa T., Terada H. // *Chem. Pharm. Bull.* 1981. V. 29. № 2. P. 438—444.
10. Ferrier R. I. // *Adv. Carbohydr. Chem.* 1978. V. 35. P. 31—80.
11. Соколов А. В., Курика А. В., Ткачева Г. А., Пивень Н. В., Павленко А. Ф. // *Мед. радиология.* 1983. № 8. С. 61—65.

Поступила в редакцию

9.VII.1986

После доработки

24.XI.1986

LOCALIZATION OF ANTIGENIC DETERMINANT IN THE CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN: ROLE OF THE SUGAR MOIETY

PAVLENKO A. F., KURIKA A. V., CHIKALOVETS I. V.,
KORZHIKOV I. A., GLASUNOV V. P., OVODOV Yu. S.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science
Centre, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

The majority of topographic antigenic determinants of the carcinoembryonic antigen (CEA) representing a glycoprotein were shown to contain sugar residues of the CEA carbohydrate chains. Periodate oxidation of CEA followed by reduction afforded a corresponding CEA derivate (CEA-POR), which retained 3% antigenic activity of CEA. In secondary and tertiary structures CEA-POR was proved to be close to CEA pre heated to 80° C. Formation of borate complexes with sugar residues of CEA decreased the CEA antigenic activity to 5% while a but did not affect the spatial structure of its protein core.