



УДК 616-097:577.112.4

РОЛЬ ОСТАТКОВ ТРИПТОФАНА В АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ
РАКОВО-ЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА*Глазунов В. П., Вакорина Т. И., Одинокоев С. Е.,
Курика А. В., Павленко А. Ф.**Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ
Академии наук СССР, Владивосток*

Для выяснения локализации антигенных детерминант раково-эмбрионального антигена (РЭА) проведена химическая модификация остатков триптофана N-бром-сукцинимидом в ацетатном буфере (нативная конформация) и с добавлением гуанидингидрохлорида (развернутое состояние). Из анализа спектров КД следует, что модификация поверхностных остатков триптофана не изменяет пространственной структуры белковой части РЭА и не сказывается на его антигенной активности. Модификация внутренних остатков триптофана изменяет пространственную структуру белковой части РЭА и приводит к значительной потере его антигенной активности. Показано, что антигенная активность РЭА зависит от пространственной структуры его белковой части.

Ранее было показано, что необратимые конформационные изменения в белковой части молекулы раково-эмбрионального антигена (РЭА) под действием температуры приводят к частичной (~20%) потере его антигенной активности [1]. Химическая модификация доступных остатков тирозина, триптофана, гистидина и аргинина не изменяет, по данным радиоиммунного анализа, антигенной активности РЭА [2]. Только модификация внутренних остатков тирозина и триптофана с использованием гуанидингидрохлорида приводила к значительному уменьшению активности [2]. Высказывалось предположение, что это может быть следствием изменения конформации белковой части РЭА.

Настоящая работа является продолжением исследования роли белковой части РЭА в формировании антигенных детерминант. Прослежены изменения пространственной структуры белковой части и антигенной активности РЭА при модификации как внешних, так и внутренних остатков триптофана.

Недавно в работах [3–5] установлена аминокислотная последовательность белковой части РЭА — гликопротеина с высоким содержанием углеводов (до 60%). Молекулярная масса белковой части равна 72 870 Да, а молярный расчетный коэффициент поглощения (ϵ) составляет $94\,200 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, что на 10% ниже измеренной нами в УФ-спектре ($103\,900 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) образца РЭА, выделенного из того же источника [6]. Так как для большинства белков с известной аминокислотной последовательностью расчетная величина молярного коэффициента поглощения, как правило, на 10% ниже экспериментальной, то измеренное нами значение $\epsilon = 103\,900 \text{ л} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$ следует считать истинным значением молярного поглощения РЭА. Исходя из этого значения можно определить процентное содержание белковой части в молекуле РЭА, которое составляет $42 \pm 2\%$ при молекулярной массе всей молекулы 173 520 Да. Отметим, что определение молекулярной массы РЭА методом SDS-электрофореза дает завышенное значение: 230 000 Да. Метод второй производной УФ-спектра РЭА в растворе 6 М гуанидингидрохлорида дает 27 остатков тирозина и 10 остатков триптофана, что совпадает с их содержанием по данным аминокислотной последовательности. В молекуле РЭА, согласно дифференциальным УФ-спектрам тепловой пертурбации (данные не приведены), из 10 остатков триптофана 3–5 доступны молекулам воды при pH растворе 7,4–4,0. Исходя из этого, мы проследили роль поверхностных и внут-

Рис. 1. Пептидная область спектров КД растворов РЭА в 0,01 М KH_2PO_4 , pH 7,4 (1) и его производных с модифицированными в 6 М гуанидингидрохлориде 0 (2), 3 (3) и 6 (4) остатками Тгр. Кривая 2 идентична спектру КД РЭА в 0,01 М NaOAc (pH 4,0) с модифицированными в этом же буфере 6 остатками Тгр. $[\theta]$ — эллиптичность в расчете на средний аминокислотный остаток (см. «Экспер. часть»)

Рис. 2. Ароматическая область спектров КД РЭА (1) и его производных, модифицированных в 0,01 М NaOAc (pH 4,0) по 6 остаткам Тгр (2) и в 6 М гуанидингидрохлориде по 0 (1), 3 (3) и 6 (4) остаткам Тгр. 1, 2 — растворы в 0,01 М NaOAc (pH 4,0); 3, 4 — растворы в 0,01 М KH_2PO_4 (pH 7,4). $[\theta]_m$ — молярная эллиптичность

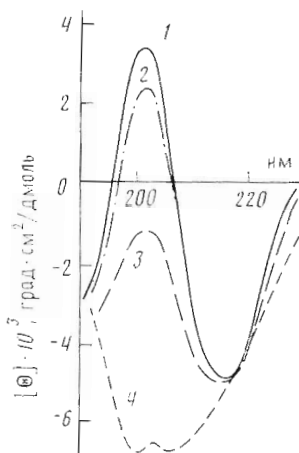


Рис. 1

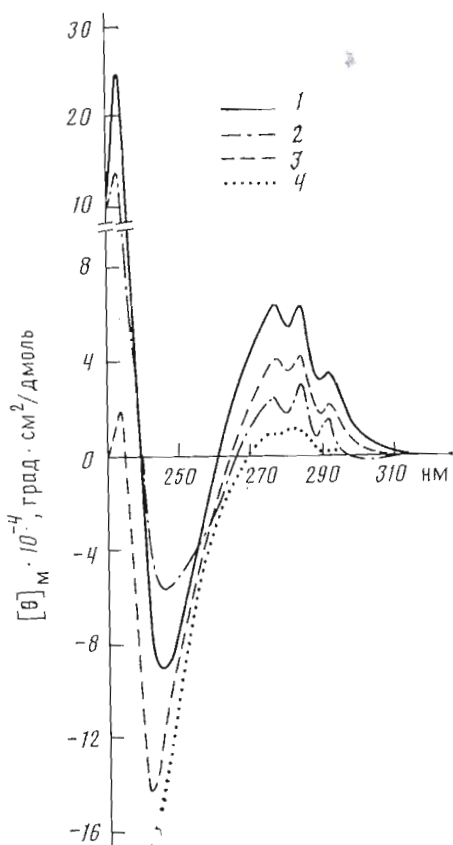


Рис. 2

ренных остатков триптофана в формировании антигенных детерминант РЭА, модифицируя их в ацетатном буфере, pH 4,0, и в растворе 6 М гуанидингидрохлорида. При модификации контроль за изменением пространственной структуры белковой части РЭА осуществляли по спектрам КД, а антигенную активность определяли иммуноферментным сэндвич-методом.

Модификация остатков триптофана N-бромсукцинимидом в 0,01 М NaOAc , pH 4,0

Согласно методике [7], модификацию остатков триптофана N-бромсукцинимидом осуществляют при pH 4,0. По спектрам КД не наблюдается изменения нативной конформации РЭА в области значений pH 7,4–3,0. Инкубация РЭА в растворе NaOAc , pH 4,6, в течение нескольких часов не изменяет его антигенной активности.

Модификация трех остатков триптофана в этих условиях, по данным спектров КД и иммуноферментного анализа, не изменяет как пространственную структуру белковой части РЭА, так и его антигенную активность (рис. 1–4). Модификация пяти остатков триптофана затрагивает лишь третичную структуру антигена, на что указывает уменьшение эллиптичности полос в ароматической области спектра КД (спектры не приведены, см. рис. 3). Вероятно, четвертый и пятый остатки триптофана частично погружены во внутренние области молекулы. Из анализа пептидной области спектра КД следует, что вторичная структура белковой части РЭА при такой модификации не изменяется. Антигенная активность РЭА уменьшается на 10–15% (рис. 4).

Нарушение вторичной структуры белковой части РЭА наблюдается только при модификации шести и более остатков триптофана. В пептид-

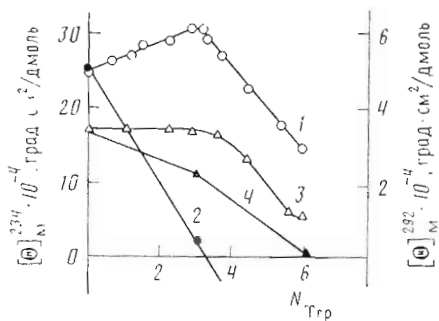


Рис. 3

Рис. 3. Зависимости молярных эллиптичностей полос 234 (1, 2) и 292 нм (3, 4) в спектрах КД растворов РЭА от числа остатков триптофана, модифицированных в 0,01 М NaOAc, pH 4,0 (1, 3) и в 6 М гуанидингидрохлориде (2, 4). Растворы в 0,01 М NaOAc, pH 4,0 (1, 3) и в 0,01 М KH_2PO_4 , pH 7,4 (2, 4)

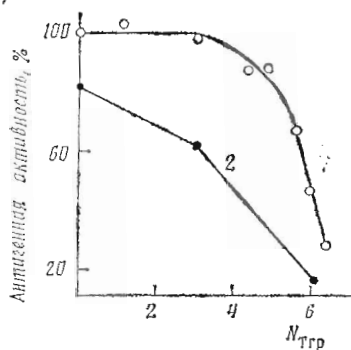


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость антигенной активности РЭА от числа модифицированных остатков триптофана; модификация в 0,01 М NaOAc, pH 4,0 (1) и в 6 М гуанидингидрохлориде (2)

ной области спектра КД при модификации шести остатков триптофана наблюдается небольшое уменьшение эллиптичности только положительной полосы 202 нм (рис. 1), тогда как в ароматической области (см. рис. 2, 3) наблюдаются большие изменения эллиптичности всех полос (более 50%). Как видно из рис. 4, модификация шести остатков триптофана приводит к потере 60% * антигенной активности. Таким образом, модификация внутренних остатков триптофана приводит как к изменению пространственной структуры, так и к уменьшению антигенной активности. Эти выводы подтверждаются результатами модификации остатков триптофана в водном растворе 6 М гуанидингидрохлорида.

Модификация остатков триптофана N-бромсукцинимидом в растворе 6 М гуанидингидрохлорида

По данным дифференциальных спектров тепловой пертурбации в растворе 6 М гуанидингидрохлорида все остатки триптофана в молекуле РЭА становятся доступными растворителю (данные не приведены). Удаление гуанидингидрохлорида исчерпывающим диализом против 0,01 М KH_2PO_4 (pH 7,4) приводит к восстановлению пространственной структуры белковой части молекулы РЭА. Степень восстановления пространственной структуры белковой части молекулы, по данным спектров КД, высока: в ароматической области наблюдается полная воспроизводимость спектра (рис. 2), а в пептидной частично не восстанавливается только эллиптичность положительной полосы 202 нм (рис. 1). Обработка РЭА водным раствором 6 М гуанидингидрохлорида с последующим диализом приводит к потере лишь 20% антигенной активности. Учитывая высокую степень восстановления пространственной структуры белковой части, мы наряду с модификацией остатков триптофана нативного РЭА осуществили также их модификацию в водном растворе 6 М гуанидингидрохлорида (pH 4,0), где равновероятно могут быть модифицированы любые из 10 остатков триптофана.

Модификация трех остатков триптофана в развернутой молекуле отличается от модификации в нативных условиях. После диализа модифицированного РЭА появляются изменения как в ароматической, так и в пептидной области спектра КД (рис. 1, 2), что свидетельствует об изменении пространственной структуры белковой части РЭА. Вероятно, один или бо-

* Приведенные изменения антигенной активности в зависимости от числа модифицированных остатков триптофана целиком обусловлены изменением пространственной структуры молекулы, так как из данных SDS-электрофореза модифицированных образцов следует, что полипептидная цепь молекулы остается интактной.

лее из трех модифицированных остатков триптофана являются внутренними. Такие изменения в пространственной структуре белковой части антигена приводят к потере 40% антигенной активности относительно нативного образца (рис. 4). При модификации шести остатков триптофана изменения в ароматической и пептидной области спектра КД свидетельствуют о полном нарушении нативной пространственной структуры белковой части РЭА. Антигенная активность уменьшается при этом на 83%.

Полученные результаты показывают, что поверхностные остатки триптофана не входят в антигенные детерминанты РЭА. Внутренние остатки триптофана играют важную роль в формировании нативной пространственной структуры белковой части РЭА. Наблюдается прямая зависимость антигенной активности РЭА от изменения пространственной структуры белковой части. Так как антигенная активность более чувствительна к изменениям в третичной структуре РЭА, то, вероятно, большая часть антигенных детерминант является топографической. Только ~15–20% антигенной активности сохраняется при существенных изменениях пространственной структуры белковой части РЭА.

Экспериментальная часть

Определение антигенной активности иммуноферментным сэндвич-методом проводили как описано в работе [1]. За 100% антигенной активности принята активность РЭА в растворе фосфатного буфера, pH 7,4.

При определении коэффициента молярного поглощения РЭА концентрацию белковой части определяли по содержанию азота, согласно модифицированной методике Кнелдала [8], с учетом азота в пептидной кислоте и N-ацетилглюкозамине, содержание которых в углеводной части РЭА взято из работы [9].

Модификация остатков триптофана. Модификацию остатков триптофана N-бромсукцинимидом проводили согласно методике, описанной в работе [7], в 0,01 М NaOAc, pH 4,0. Число модифицированных остатков определяли по убыли поглощения в УФ-спектре при 280 нм [7]. 1,2 мг РЭА растворяли в 1,5 мл 0,01 М NaOAc, pH 4,0, и добавляли порциями по 10 мкл свежеприготовленного ($9,3 \cdot 10^{-4}$ М) водного раствора N-бромсукцинимиды. Спустя 2–3 мин после каждого добавления измеряли поглощение при 280 нм, затем регистрировали спектры КД и отбирали аликвоту (10 мкл) для определения антигенной активности. В последнюю добавляли избыток (по отношению к бромсукцинимиду) этилового эфира N-ацетилтриптофана для исключения побочных окислений в процессе определения антигенной активности.

Модификацию остатков триптофана в растворе 6 М гуанидингидрохлорида (pH 4,0) проводили аналогичным образом [7]. После регистрации УФ-спектра на каждой стадии модификации в раствор РЭА добавляли избыток водного раствора этилового эфира N-ацетилтриптофана для избежания побочных окислений, и этот раствор ставили на диализ против 0,01 М KH_2PO_4 (pH 7,4) в течение 3 сут при 4° С. После исчерпывающего диализа регистрировали спектр КД и отбирали аликвоту для определения антигенной активности. Концентрацию модифицированного образца РЭА после диализа определяли по УФ-спектру, принимая за эталон поглощение модифицированного образца известной концентрации в исходном растворе 6 М гуанидингидрохлорида до диализа.

Гуанидингидрохлорид марки ч. перекристаллизовывали дважды из абсолютного этанола.

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометрах Cary 219 (Varian, США) с приставкой для получения второй производной и Specord M40 (Karl Zeiss, ГДР). Дифференциальные УФ-спектры тепловой пертурбация регистрировали в термостабируемых кварцевых кюветках с притертыми тефлоновыми пробками в интервале 5–25° С. Расчет числа пертурбируемых остатков триптофана в молекуле РЭА производили по спектру, скорректированному на изменение объема раствора от температуры. В качестве стандартов для расчета использовали растворы этиловых эфиров N-ацетилтирозина и N-ацетилтриптофана (Serva, США) в 6 М гуанидингидрохлориде.

Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре JASCO J-500A с процессором ДР 501-N (Япония) в кварцевых кюветках с толщиной слоя 1 см для ароматической области и 1 мм для пептидной области. Прибор калибровали по 0,06% водному раствору аммониевой соли d-камфоры-10-сульфоната (Katauma Chemical, Япония) и по 0,15% водному раствору D-пентониллактона (Serva, США). Отношение эллиптичностей полос при 192 и 290 нм составляло 1,05. В пептидной области эллиптичность полос приводили в расчете на средний аминокислотный остаток с молекулярной массой 110, содержание белка 42%: $[\theta] = \theta_{\text{набл.}} \cdot S \cdot 110 / c \cdot l \cdot 0,42 \cdot 10$, в град·см²/дмоль, где S — чувствительность прибора; c — концентрация РЭА в мг/мл. В ароматической области эллиптичность полос считали как молярную: $[\theta]_{\text{м}} = \theta_{\text{набл.}} \cdot S / c_{\text{м}} \cdot l \cdot 10$, где $c_{\text{м}}$ — молярная концентрация РЭА, определенная по молярному коэффициенту поглощения с учетом светорассеяния по логарифмической зависимости.

ЛИТЕРАТУРА

1. *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.
2. *Thomas P., Edwards R. G., Westwood J. H.* // Biochem. Soc. Trans. 1976. V. 4. № 3. P. 513–515.
3. *Oikawa Sh., Nakazato H., Kosaki G.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1987. V. 142. № 2. P. 511–518.
4. *Zimmermann W., Ortlieb B., Friedrich R., von Kleist S.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 9. P. 2960–2964.
5. *Beauchemin N., Benchined S., Conroyer D., Fuks A., Stanners C. P.* // Mol. Cell. Biol. 1987. V. 7. № 9. P. 3221–3230.
6. *Соколов А. В., Курика А. В., Ткачева Г. А., Пивень Н. В., Павленко А. Ф.* // Мед. радиология. 1983. Т. 28. № 8. С. 61–68.
7. *Spandle T. K., Witkop B.* // Meth. Enzymol. 1967. V. 11. P. 498–506.
8. *Jaenicke L.* // Anal. Biochemistry. 1974. V. 61. № 2. P. 623–627.
9. *Chandrasekaran E. V., Davilia N., Nixon D. U., Goldfarb M., Mendicino J.* // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 11. P. 7213–7222.

Поступила в редакцию
16.II.1988

PARTICIPATION OF TRYPTOPHAN RESIDUES IN ANTIGENIC ACTIVITY OF CARCINO-EMBRYONIC ANTIGEN

GLAZUNOV V. P., VAKORINA T. I., ODINOKOV S. E., KURIKA A. V.,
PAVLENKO A. F.

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

Antigenic determinants of carcino-embryonic antigen (CEA) were spatially located using N-bromosuccinimide modification of tryptophan residues both in native (acetate buffer solution) and unfolded (guanidinium chloride solution) molecule of the antigen. Modification of exposed tryptophan residues failed to alter CEA antigenic activity and conformation of its protein portion as shown by CD spectroscopy. On the contrary, modification of buried tryptophan residues induced conformational changes of CEA protein portion connected with a considerable loss of its antigenic activity. It was shown that CEA antigenic activity depends on spatial structure of its protein moiety.