



УДК 577.112(088.5+083.3):616.097

© 1992 г.

**А. Ф. Павленко**, А. А. Булгаков, С. В. Мороз, Ю. С. Оводов**ИЗУЧЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ И АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ НЕГЛИКОЗИЛИРОВАННОЙ ФОРМЫ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ПРЕАЛЬБУМИНА-1 (ЭПА-1НГ)***Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток*

Методами КД и производной УФ-спектроскопии изучена зависимость пространственной структуры негликозилированной формы нативного эмбрионального преальбумина-1 (ЭПА-1НГ) от температуры и pH. Сделан вывод о том, что молекула ЭПА-1НГ преимущественно состоит из  $\beta$ -структур. В интервале 40–50°С обнаружен конформационный переход в молекуле. Дальнейшее нагревание до 70°С приводит к разрушению исходной конформации, которая восстанавливается при охлаждении раствора до 20°С. Результаты спектральных исследований пространственной структуры ЭПА-1НГ сопоставлены с данными об антигенной активности нативного, температурно- и pH-денатурированного, а также карбоксиметилированного ЭПА-1НГ. Предполагается, что часть антигенных детерминант ЭПА-1НГ является топографической.

Эмбриональный преальбумин-1 (ЭПА-1) [1] наряду с раковоэмбриональным антигеном (РЭА) [2] и альфа-фетопротеином (АФП) [3] — один из маркеров злокачественных опухолей человека. Однако по сравнению с другими онкофетальными антигенами человека [4] ЭПА-1 значительно менее изучен, хотя и является важнейшим молекулярным маркером саркоматозных опухолей [5, 6].

ЭПА-1 впервые выделен из сыворотки крови зародышей человека [1]. Было показано, что в молекуле ЭПА-1 присутствуют два типа антигенных детерминант: общие для эмбриональных тканей и различных опухолей и специфические — в основном для опухолей соединительно-тканного происхождения [7, 8]. Было также установлено [9, 10], что ЭПА-1 представляет собой сульфатированный гликопротеин с содержанием углеводов 21% и сульфата 2%.

Ранее мы сообщили о выделении и характеристике негликозилированной формы эмбрионального преальбумина-1 (ЭПА-1НГ) [11]. Была также показана полная иммунохимическая идентичность ЭПА-1 и ЭПА-1НГ.

Настоящая работа посвящена изучению вторичной и третичной структур ЭПА-1НГ методами кругового дихроизма (КД) и производной УФ-спектроскопии. Кроме того, проведено сопоставление результатов спектральных исследований пространственной организации ЭПА-1НГ с данными о его антигенной активности.

ЭПА-1НГ представляет собой белок с молекулярной массой 7 кДа (определено SDS-электрофорезом) и молярным коэффициентом поглощения  $\epsilon_{270} = 8300 \pm 150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Определение числа остатков ароматических аминокислот в молекуле ЭПА-1НГ, проведенное нами по методу второй производной УФ-спектра [12] в растворе 6 М гуанидингидрохлорида, дает 5 остатков триптофана и 2 остатка тирозина.

В спектре КД нативного ЭПА-1НГ в близком ультрафиолете (350–240 нм), в области поглощения ароматических хромофоров, наблюдают-

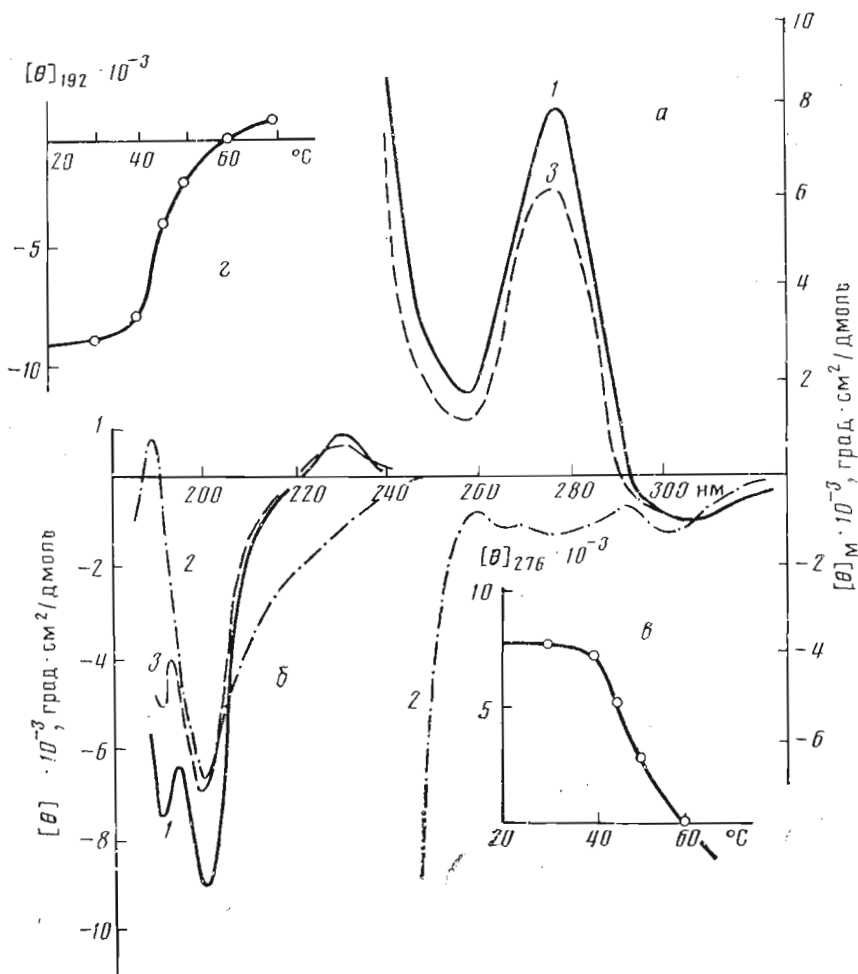


Рис. 1. Спектры КД ЭПА-1НГ в 0,01 М  $\text{K}_2\text{PO}_4$ , pH 7,2, при 20 (1), 70 (2) и 20°С через 1 ч после 70°С (3): а—с 1,0 мг/мл,  $l$  1 см; б—с 0,28 мг/мл,  $l$  1 мм;  $[\theta]_m$  приведена в расчете на моль белка (а) и на один остаток (б); в и г — изменение от температуры эллиптичности полосы 276 и 192 нм

ся одна широкая положительная полоса с максимумом при 278 нм и плечом в области 282–284 нм и две отрицательные полосы при 292 и 305 нм, относящиеся к переходам остатков тирозина и триптофана (рис. 1а).

В далеком ультрафиолете (240–185 нм), в области поглощения пептидных связей, наблюдаются две отрицательные полосы при 202- и 192 нм (рис. 1б) и слабая положительная полоса с максимумом при 230 нм, обусловленная, вероятно, вкладом ароматических аминокислот. Наличие интенсивной отрицательной полосы в области 200–210 нм характерно для белков с преимущественным содержанием  $\beta$ -структур. Расчет элементов вторичной структуры (нативного ЭПА-1НГ) по методу Провинчера [13] показывает высокое содержание  $\beta$ -структур (табл. 1). Для учета влияния ароматических аминокислот на спектр КД в пептидной области мы провели расчет относительного вклада элементов вторичной структуры по методу Болотинской [14] (табл. 2).

Температурные исследования спектров ЭПА-1НГ (рис. 1) показы-

Таблица 1

Расчет содержания элементов  
вторичной структуры ЭПА-1НГ (%)  
по методу Провинчера

t, °C/pH	α-Спираль	β-Структура	β-Изгиб	Неупорядоченная форма
20/7,2	0	81	19	0
40/7,2	0	80	18	1
45/7,2	0	66	33	1
50/7,2	0	62	31	7
70/7,2	0	50	24	26
20/7,2*	0	81	19	00
20/13	0	66	16	17
20/11,2	0	58	24	18
20/10,3	0	58	23	19
20/9,4	0	78	12	10
20/6,1	0	78	19	3
20/3,8	0	73	19	8
20/2,1	0	69	21	10
20/1,1	0	63	21	15
20/7,2**	0	46	27	27

\* Через 1 ч после прогрева до 70° С.  
\*\* Для ЭПА-1НГ-КМ.

Таблица 2

Расчет содержания элементов  
вторичной структуры ЭПА-1НГ (%)  
по методу Болотиной

t, °C/pH	α-Спираль	β-Структура	β-Изгиб	Неупорядоченная структура
20/7,2	6	46	28	20
40/7,2	6	46	29	19
45/7,2	10	39	21	30
50/7,2	11	37	20	32
70/7,2	13	41	14	32
20/7,2*	8	43	24	24
20/13	11	21	29	39
20/11,2	13	38	20	29
20/10,3	12	44	21	23
20/9,4	10	46	21	23
20/6,1	6	45	29	20
20/3,8	9	45	26	20
20/2,1	9	44	25	22
20/1,1	9	43	24	24
20/7,2**	14	47	20	19

\* Через 1 ч после прогрева до 70° С.  
\*\* Для ЭПА-1НГ-КМ.

вают, что эллиптичность всех полос в ароматической области плавно уменьшается с повышением температуры раствора (рис. 1а, в). В интервале 40–50° С наблюдается конформационный переход, затрагивающий третичную структуру молекулы ЭПА-1НГ. При 60° С происходит полное нарушение нативной структуры ЭПА-1НГ. В спектре КД ЭПА-1НГ при 70° С наблюдается широкая отрицательная полоса при 280 нм малой эллиптичности, которая, по-видимому, относится к дисульфидным связям в молекуле белка. Охлаждение раствора ЭПА-1НГ до 20° С приводит к частичному восстановлению эллиптичности полос при 240, 276, 292 и 305 нм. Через 1 ч после охлаждения указанные полосы восстанавливаются до 80% исходной эллиптичности.

Как следует из спектров КД ЭПА-1НГ в пептидной области (рис. 1б, г), увеличение температуры раствора ЭПА-1НГ до 70° С приводит также к конформационной перестройке вторичной структуры белка. Спустя 1 ч после прогрева полоса при 202 нм восстанавливается на 70%, а полоса при 192 нм — на 60% от исходной величины эллиптичности.

Следует отметить, что 50-кратное разведение раствора ЭПА-1НГ, а также использование дистиллированной воды вместо фосфатного буфера не вызвали изменения характера кривой спектра КД. Это свидетельствует о том, что наблюдаемые изменения в спектрах КД в зависимости от температуры раствора связаны с внутримолекулярными конформационными изменениями в молекуле ЭПА-1НГ.

Расчет по методу Провинчера содержания элементов вторичной структуры ЭПА-1НГ при различной температуре (табл. 1) показывает, что до конформационного перехода (в интервале 20–40° С) не происходит заметного перераспределения содержания отдельных элементов вторичной структуры. Конформационный переход (температура раствора выше 40° С) вызывает уменьшение содержания β-структуры и β-изгибов и увеличение доли неупорядоченной структуры. Расчет для предварительно инкубированного при 70° С раствора ЭПА-1НГ свидетельствует, что содержание элементов вторичной структуры белка через 1 ч после охлаж-

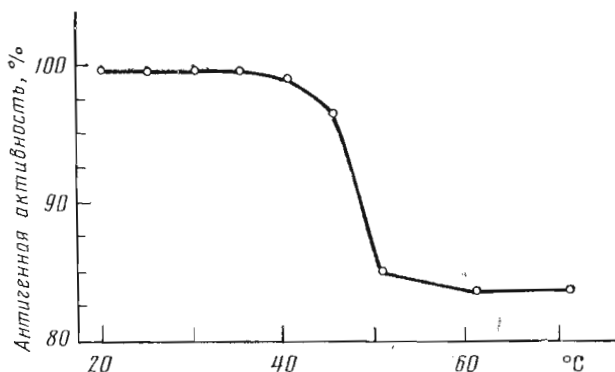


Рис. 2. Зависимость антигенной активности ЭПА-1НГ от температуры предварительной инкубации раствора

дения раствора до 20° С восстанавливается полностью. Расчет содержания элементов вторичной структуры с вычетом вклада ароматических хромофоров в пептидную часть спектра ЭПА-1НГ (табл. 2) показывает, что конформационный переход приводит также к увеличению содержания  $\alpha$ -спирали. Охлаждение предварительно инкубированного при 70° С раствора ЭПА-1НГ до 20° С вызывает почти полное восстановление вторичной структуры молекулы ЭПА-1НГ. Таким образом, конформационный переход в молекуле ЭПА-1НГ в результате повышения температуры обратим. На это указывают данные по антигенной активности ЭПА-1НГ с учетом происходящих изменений во вторичной и третичной структурах молекулы белка.

Определение антигенной активности проводилось иммуноферментным анализом (ИФА) по степени связывания ЭПА-1НГ со специфическими антителами. График зависимости антигенной активности от температуры предварительной инкубации раствора приведен на рис. 2.

Сопоставление полученных данных ИФА со спектральными показывает, что до конформационного перехода антигенная активность не изменяется. После конформационного перехода антигенная активность ЭПА-1НГ уменьшается на 17% по отношению к исходной. Антигенная активность полностью восстанавливается через 2 ч после охлаждения раствора ЭПА-1НГ, прогретого до 70° С. Низкое падение антигенной активности ЭПА-1НГ при конформационном переходе может быть обусловлено двумя причинами: либо антигенные детерминанты молекулы ЭПА-1НГ не имеют топографической природы, либо их структура вследствие длительности проведения ИФА восстанавливается вместе с соответствующим восстановлением пространственной структуры белка.

Следует отметить, что сравнение прогретого образца ЭПА-1НГ с нативным антигеном с помощью иммунодиффузии показало их полную иммунохимическую идентичность, а электрофорез в градиенте пористости полиакриламидного геля в присутствии SDS не обнаружил деградации молекулы ЭПА-1НГ. Таким образом, снижение антигенной активности ЭПА-1НГ связано с изменением пространственной структуры его молекулы.

Наряду с изучением зависимости пространственной структуры ЭПА-1НГ от температуры проведено исследование ее зависимости от pH раствора (рис. 3). Оно показало, что с понижением pH от 7,2 до 4,0 в ароматической области спектра КД ЭПА-1НГ не наблюдается заметных изменений. При значениях pH ниже 4,0 происходит плавное уменьшение эллиптичности положительной полосы при 278 нм. Спектр КД ЭПА-

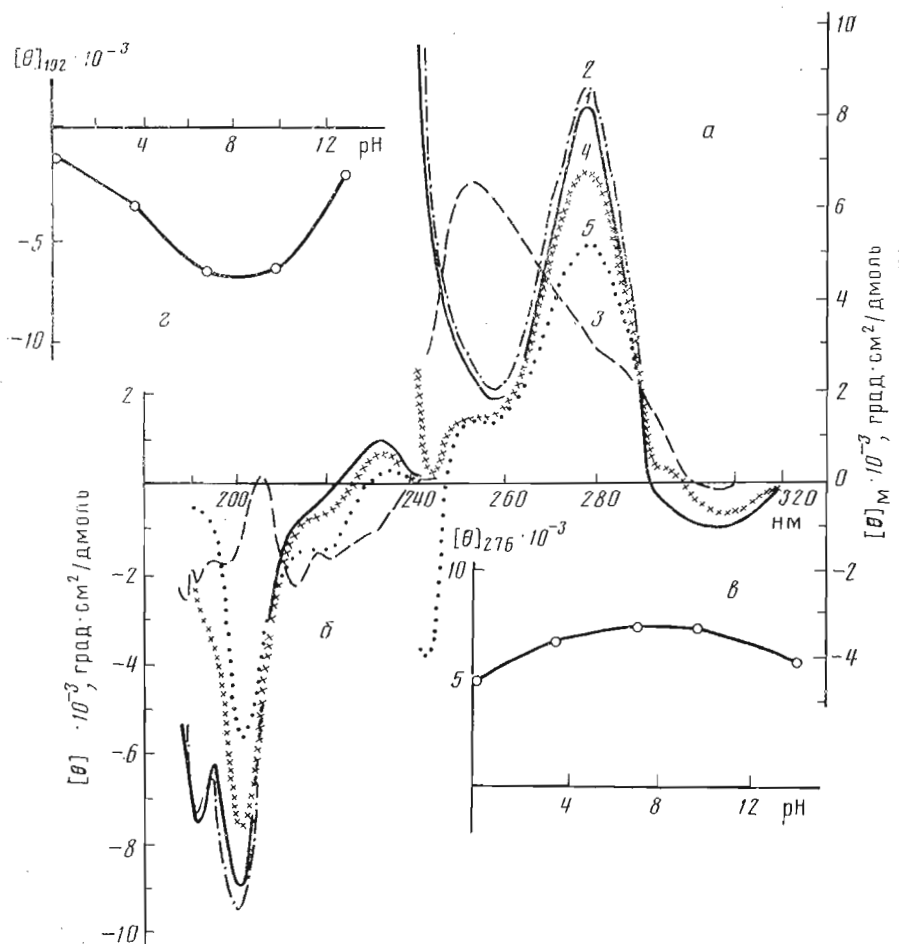


Рис. 3. Спектры КД ЭПА-1НГ в 0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  при 20° С и рН 7,2 (1), 10,3 (2), 13,0 (3), 3,8 (4), 2,1 (5): а-с 1,03 мг/мл,  $l$  - 1 см; б-с 0,25 мг/мл,  $l$  - 1 мм; в и г - изменение от рН раствора эллиптичности полосы 276 и 192 нм

1НГ при рН 2,1 подобен спектру КД ЭПА-1НГ при 45° С. Полного разрушения нативной третичной структуры молекулы ЭПА-1НГ не происходит даже при значении рН меньше 2,0. Титрование раствора ЭПА-1НГ до рН 11,2 вызывает очень незначительное изменение спектра КД в ароматической области. Дальнейшее увеличение значения рН до 13,0, при котором происходит полная ионизация остатков тирозина, вызывает исчезновение наблюдаемых полос и появление интенсивной широкой положительной полосы при 252 нм.

Изучение спектров КД ЭПА-1НГ в пептидной области (рис. 3б, г) в зависимости от рН растворов показывает, что изменение рН в диапазоне 4,0-11,0 не вызывает заметного нарушения хода кривой спектра КД. При рН ниже 4,0 происходят изменения, подобные наблюдаемым для ароматической области, т. е. плавное уменьшение эллиптичности полос 202-230 нм и исчезновение полосы при 192 нм. Увеличение значения рН до 13,0 вызывает нарушение вторичной структуры белка. Спектры КД ЭПА-1НГ, полученные в интервале рН 4,0-1,0 и при 10° С, похожи.

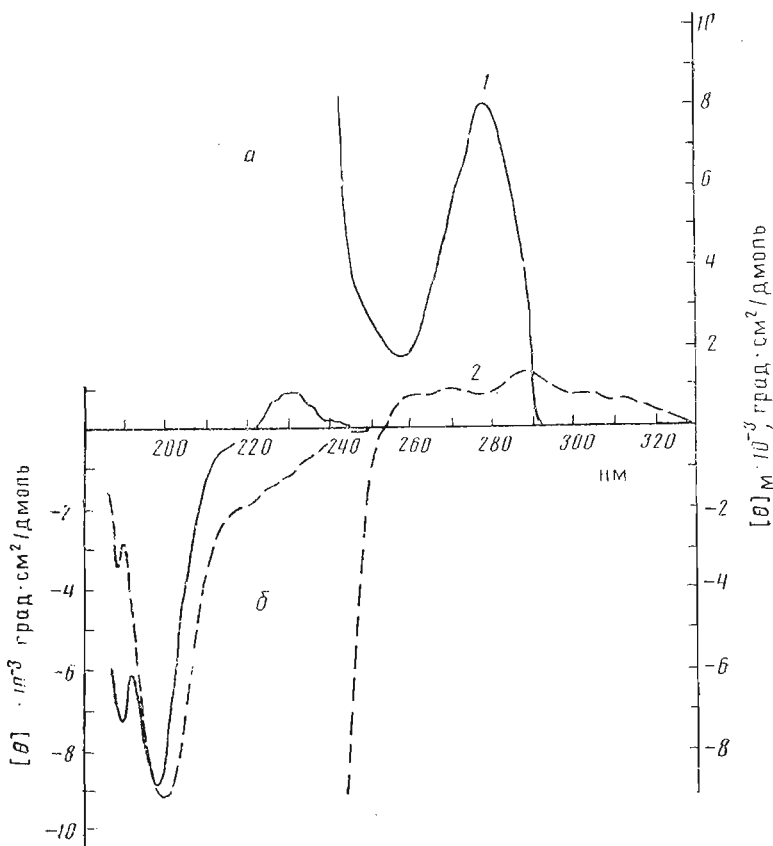


Рис. 4. Спектры КД растворов ЭПА-1НГ (1) и ЭПА-1НГ-КМ (2) в 0,01 М  $\text{KN}_2\text{PO}_4$ , рН 7,2 ( $20^\circ\text{C}$ ) при  $c$  1,01 мг/мл,  $l$  см (а) и  $c$  0,33 мг/мл,  $l$  1 мм (б)

Антигенная активность ЭПА-1НГ в диапазоне рН 2,5–12,0 практически не изменяется. Снижение рН до 2,0 вызывает потерю 13% антигенной активности. Возможно, это связано с попаданием в область рН, близкую к изоэлектрической точке белка.

Расчет элементов вторичной структуры ЭПА-1НГ по методу Провишера (табл. 1) показывает, что значительное отклонение рН от нейтрального приводит к увеличению доли неупорядоченной структуры за счет снижения содержания  $\beta$ -структуры. Расчет по методу Болотниной (табл. 2) показывает, что наряду с увеличением содержания неупорядоченной формы увеличивается также содержание  $\alpha$ -спирали в молекуле ЭПА-1НГ.

Таким образом, данные, полученные при рН-титровании ЭПА-1НГ, качественно подтверждают зависимость антигенной активности ЭПА-1НГ от его пространственной структуры.

Для выявления связи пространственной структуры и антигенной активности ЭПА-1НГ были исследованы спектры КД его карбоксиметилированного производного (ЭПА-1НГ-КМ).

Карбоксиметилирование ЭПА-1НГ приводит к исчезновению всех полос в спектре КД в ароматической области и появлению широкой положительной полосы при 290 нм малой эллиптичности (рис. 4а). В пептидной области спектра КД ЭПА-1НГ-КМ также наблюдаются изменения. Спектр КД ЭПА-1НГ-КМ в пептидной области (рис. 4б) подобен

спектру КД белка при 70° С. Однако карбоксиметилированный ЭПА-1НГ не проявляет антигенной активности. Это убедительно свидетельствует в пользу зависимости антигенной активности ЭПА-1НГ от пространственной структуры его молекулы.

### Экспериментальная часть

ЭПА-1НГ получали как описано ранее [11].

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Cary-219 (Varian, США) с приставкой для получения вторых производных. В качестве стандартов при расчете числа остатков триптофана и тирозина использовали растворы *N*-ацетатов этиловых эфиров тирозина и триптофана (Serva) в 6 М гуанидингидрохлориде.

Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре Jasco J-500А (Япония) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 мм для пептидной области спектра и 1 см для ароматической. Кювету при заданной температуре термостатировали 10–15 мин, после чего регистрировали спектр КД. Повторная запись спектра при этой же температуре показывала его полное совпадение с зарегистрированным первоначально. Точность термостатирования составляла  $\pm 0,5^\circ$  С. Для предотвращения испарения воды при нагревании до 70° С в кювету поверх исследуемого водного раствора наливали слой вазелинового масла. Контроль по УФ-спектрам показал, что при таком способе не наблюдалось испарения воды из кюветы. При расчетах эллиптичности учитывали изменения концентрации вследствие температурного изменения объема раствора. В пептидной области спектра КД (230–290 нм) эллиптичность  $[\theta]$  считали как эллиптичность среднего остатка, принимая молекулярную массу последнего равной 110 Да и содержание белка в ЭПА-1 100%, по формуле

$$[\theta] = [\theta]_{\text{набл}} S \cdot 110 / (10 \cdot C \cdot l) \quad (\text{град} \cdot \text{см}^2 / \text{дмоль}),$$

где  $S$  — чувствительность шкалы прибора,  $C$  — весовая концентрация в мг/мл,  $l$  — толщина кюветы (см). В ароматической области эллиптичность  $[\theta]$  считали как молярную для всего белка. Калибровку шкалы спектрополяриметра проводили по 0,06% водному раствору аммониевой соли 10-сульфоната-*d*-камфорной кислоты (Katayama Chemical, Япония). Отношение эллиптичности ее полос при 192 и 290 нм составляло 2,05.

Иммунодиффузию в агаре проводили как описано в работе [15], а электрофорез в градиенте пористости полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия — так, как описано в сообщении [16].

Антигенную активность измеряли иммуноферментным методом на полистирольных планшетах Dynatech (Испания). Фракцию IgG из кроличьей моноспецифической антисыворотки против ЭПА-1НГ (IgG анти-ЭПА-1НГ) получали как описано ранее [17], метили пероксидазой (Биохимреактив, г. Олайне) по методу [18]. В лунки планшета вносили по 0,2 мл раствора IgG-анти-ЭПА-1НГ (10 мкг/мл) в 0,1 М бикарбонатном буфере, pH 9,6, содержащем 0,15 М NaCl (буфер А), и инкубировали планшет 16 ч при 4° С. Планшет отмывали 6 раз 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,5, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05% твин-20. Для построения калибровочной кривой в лунки вносили по 0,2 мл растворов ЭПА-1НГ в отмывочном буфере А в разведениях 0–50 нг/мл. В остальные лунки вносили анализируемые пробы в концентрации 25 нг/мл. Планшет инкубировали 2 ч при 20° С, после чего отмывали как описано выше. Во все лунки планшета вносили по 0,2 мл раствора конъюгата в разведении 1:400 и планшет инкубировали 3 ч при 20° С. После отмывки в лунки вносили по 0,2 мл субстрата (0,15% вод-

ный раствор 5-аминосалициловой кислоты, рН 6,0, содержащий 0,0075%  $H_2O_2$ ). Планшет инкубировали 1 ч при 20° С и измеряли поглощение растворов в лунках при 450 нм на сканирующем спектрофотометре Multiskan (Финляндия). Антигенную активность анализируемых проб определяли из калибровочной зависимости поглощения при 450 нм от концентрации ЭПА-1НГ.

Восстановление и S-карбоксиметилирование ЭПА-1НГ проводили согласно [19] с небольшими модификациями. Для этого готовили 1 мл 1 мкМ раствора ЭПА-1НГ в 0,5 М трис-НСl-буфере, рН 8,0, содержащем 2 мМ EDTA и 6 М гуанидингидрохлорид. Раствор продували аргоном и инкубировали 15 мин при 37° С. Затем к раствору добавляли дитиотреит до концентрации 0,1 мМ и снова продували аргоном. После инкубирования при 37° С в течение 4 ч к раствору добавляли 0,2 мМ водный раствор свежеперекристаллизованной моноиодуксусной кислоты, доводили 1 М раствором аммиака рН раствора до 8,0 и смесь оставляли в темноте при 20° С на 20 мин. Гель-фильтрацию проводили на колонке с сефадексом G-10 в 0,01 М бикарбонат-аммонийном буфере, рН 8,0. Восстановленный и карбоксиметилированный ЭПА-1НГ (ЭПА-1НГ-КМ) диализовали против холодной дистиллированной воды и лиофилизовали.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tatarinov Yu. S., Kalashnikov V. V. // Nature. 1977. V. 265. № 5595. P. 638–639.
2. Павленко А. Ф., Курица А. В., Оводов Ю. С. // Успехи совр. биологии. 1987. Т. 106. № 6. С. 412–425.
3. Breborowicz J. // Tumor. Biol. 1988. V. 9. № 1. P. 3–14.
4. Steger G. // Lab. Akluell. 1989. № 7. P. 15–19.
5. Татаринев Ю. С. // Вопр. онкологии. 1989. Т. 25. № 3. С. 259–263.
6. Page M., Fortin C., Dalijard I. // Eur. J. Cancer. Clin. Oncol. 1985. V. 21. № 11. P. 1405.
7. Калашников В. В., Васильев М. Ю., Татаринев Ю. С. // Вопр. мед. химии. 1980. № 3. С. 421–425.
8. Васильев М. Ю., Сергеева Н. С., Агдеев Г. И. // Эксперим. онкология. 1985. Т. 7. № 1. С. 33–36.
9. Оводов Ю. С., Калашников В. В., Курица А. В., Павленко А. Ф., Татаринев Ю. С. // Биоорг. химия. 1978. Т. 4. № 6. С. 813–815.
10. Tatarinov Yu. S., Kalashnikov V. V., Kraevsky N. A., Kurika A. V., Pavlenko A. F., Ovodov Yu. S., Voloshnik S. G. // Scand. J. Immunol. 1978. V. 8. Suppl. P. 621–625.
11. Павленко А. Ф., Булгаков А. А., Белогорцева Н. И., Оводов Ю. С. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 6. С. 731–736.
12. Ichikawa T., Terada H. // Chem. Pharm. Bull. 1981. V. 29. № 2. P. 438–444.
13. Provencher C. W., Glockner J. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 1. P. 33–37.
14. Бологина И. А., Лугаускас В. Ю. // Молекулярн. биология. 1985. Т. 19. № 5. С. 1409–1421.
15. Храмова Н. И., Абелев Г. И. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1961. Т. 52. № 12. С. 107–111.
16. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
17. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. Методы и применение/ Ред. Аксельсен Н., Крейль И., Всеке Б. М.: Мир, 1977. С. 201–203.
18. Nakane P. K., Kavaoi A. // J. Histochem. 1974. V. 22. № 12. P. 1084–1090.
19. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. P. 622–627.

Поступила в редакцию  
21.V.1991



**STUDIES ON SPATIAL STRUCTURE AND ANTIGENIC ACTIVITY  
OF THE NON-GLYCOSYLATED FORM OF EMBRYONAL PREALBUMIN-1  
(EPA-1NG)**

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

The influence of temperature and pH on the spatial structure of EPA-1NG has been studied by means of circular dichroism and differential UV-spectroscopy, indicating the molecule to consist mainly of  $\beta$ -structures. A conformational transition in the molecule was observed within the range of 40–50°C. The further temperature elevation (up to 70°C) was accompanied to the complete distortion of the parent conformation, which is reversed after cooling down to 20°C. A correlation of the spectral data with the antigenic activity of genuine EPA-1NG and its carboxymethylated, heat-degraded and pH-denatured derivatives demonstrates that some antigenic determinants of EPA-1NG appear to be topographic.