

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ

На правах рукопису

ГАВРИШ Олег Геннадійович

ВИВЧЕННЯ АНТИГЕННОЇ БУДОВИ КАШЛЮЧНОГО  
ТОКСИНУ З *BORDETELLA PERTUSSIS*

02.00.10 — біоорганічна хімія, хімія природних та  
фізіологічно активних речовин

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ — 1993

Робота виконана в лабораторії структури та функції білка Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії АН України.

Науковий керівник —

кандидат біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
Радавський Ю. Л.

Офіційні опоненти —

доктор біологічних наук,  
професор Кібірев В. К.  
доктор медичних наук,  
професор Колесніков М. М.

Провідна установа —

Київський науково-дослідний інститут епідеміології та інфекційних захворювань ім. Л. В. Громашевського.

Захист відбудеться «24» вересня 1993 року о 10.<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.65.01 в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії АН України (253660, м. Київ, вул. Мурманська, 1).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії АН України.

Автореферат розісланий «13» липеня 1993 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Федоряк ФЕДОРЯК Д. М.

ЛННБ України ім. В. Стефаника



00737481 (U)

Підписано до друку 25.05.93. 1,5 друк. л. Зам. 448

Друкарня КІВПС

ЛННБ ім. В. Стефаника  
АН України

Зараз в Україні та за кордоном для вакцинації дітей застосовують, головним чином, АКДП вакцину, яка складається з дифтерійного і правцевого анатоксинів та обробленого формальдегідом кашльочного мікроба. Однак, ця вакцина має ряд негативних властивостей, які призводять до виникнення таких явищ, як алергізація, сенсиділізація організму, ураження центральної нервової системи та таке інше. Ці побічні ефекти пов'язані з цільноклітинним компонентом АКДП вакцини – кашльочним мікробом. Внаслідок цього конче актуальною є проблема розробки вакцини, яка не викликала б негативних побічних явищ. Вона вирішується шляхом створення субодиночних вакцин на основі протективних білкових антигенів *B. pertussis* 1, у перспективі, пептидних та генноінженерних вакцин.

Об'єктом наших досліджень був кашльочний токсин – НАД-залежна АДФ-рібозилтрансфераза, який є головним фактором патогенності та найбільш важливим протективним білковим антигеном *B. pertussis*. Кашльочний токсин (КТ) – найбільш складний з відомих на сьогодні бактеріальних токсинів білкової природи. Він містить шість субодиниць п'яти різних типів, молекулярнов масов від 9,3 до 28,7 кДа. Субодиниця S1 (активаторна субодиниця, А-протомер) є власне ферментом. Субодиниці S2, S3, дві S4 та S5 утворюють В-олігомер, який відповідає за зв'язування токсина з мембраною клітини і забезпечує перетин мембрани субодиницею S1.

Актуальність проблеми. Вивчення антигенних властивостей білків – одна з ключових проблем сучасної молекулярної імунології. Зараз відомо, що імуногенні та антигенні властивості білків визначаються їхніми антигенними детермінантами або епітопами. Це порівняно невеликі за розмірами ділянки на поверхні білка, які можуть розпізнаватися антитілами або певними клонами специфічних клітин імунної системи, що виробляють потім антитіла проти даного епітопу. З вивченням антигенності білків тісно пов'язана проблема розробки та створення молекулярних та синтетичних вакцин. Такі вакцини складаються не з цілих вірусів, бактерій і таке інше, а з штучно синтезованих (методами органічної хімії або генної інженерії) молекул, які несуть на собі антигенні детермінанти і здатні викликати утворення специфічних нейтралізуючих антитіл до ікзавивчих агентів. Головною перевагою синтетичних

вакцини є можливість введення мінімальної кількості чужерідного матеріалу, що дає змогу гранично знизити алергізацію організму та суттєво зменшити кількість побічних ефектів.

Мета дослідження. Метою роботи було вивчення імунологічних та антигенних властивостей кашльчого токсину та декількох синтетичних пептидів каталітичної субодиниці S1-KT.

Задачі дослідження. Для досягнення мети роботи необхідно було вирішити такі завдання:

- розробити спосіб одержання з середовища культивування *B. pertussis* високоочищеного кашльчого токсину;

- провести теоретичний розрахунок потенційних антигенних детермінант всіх субодиниць KT;

- одержати синтетичні пептиди, що відповідають найбільш важливим імуногенним ділянкам та одержати на їхній основі імунокон'югати;

- одержати полі- та моноклональні антитіла до інтактного KT та імунокон'югатів на основі синтетичних пептидів і вивчити їхні властивості.

Новизна роботи.

- вперше виділені дві форми кашльчого токсину з одного виробничого штаму *B. pertussis*;

- проведений порівняльний аналіз антигенності субодиниць KT з використанням поліклональних антитіл проти цілого токсину за допомогою методу електроімунооблотінгу;

- за допомогою синтетичних пептидів досліджена імуногенність N-кінцевої ділянки S1-KT.

Наукова та практична значимість результатів.

Одержані МКА до інтактного KT, які спрявлені проти складної конформаційної детермінанти білка;

Проведений теоретичний розрахунок потенційних антигенних детермінант всіх субодиниць KT;

На основі п'яти синтетичних пептидів з каталітичної субодиниці S1 та білків-носіїв одержані імунокон'югати, які можуть бути використані при розробці синтетичних пептидних вакцин проти кашляка.

Одержані полі- та моноклональні антитіла до KT, які можуть бути використані при створенні імунодіагностичних тест-систем.

Одержаний високопродуктивний токсигенний сероваріант штаму *B. pertussis*. Вихід високоочищеного токсину з 1 л звільненого від клітин середовища культивування цього штаму складає  $2,1 \pm 0,26$  мг. Цей штам захищений авторським свідоцтвом [ АС СРСР, N 1761795 ] та може застосовуватися для одержання кашльчого токсину - головного компонента безклітинних кашльчих вакцин.

#### Реалізація результатів.

Розроблений виробничий регламент - "Інструкція по виготовленню та контролю кашльчого токсина, сухого". На базі ІБОНХ АН України та НДІВС ім. І.І. Мечнікова РАМН впроваджені у виробництво препарат КТ, який реалізується в Україні та за її межами.

Апробація роботи. Матеріали дисертаційної роботи були викладені та обговорені на I та II Всесоюзних конференціях по бактеріальним токсинам ( Москва, 1985 р., Ермала 1989 р. ); VII Всесоюзному симпозиумі по хімії білків та пептидів ( Таллінн, 1987 р. ); I Всесоюзному з'їзді імунологів ( Сочі, 1988 р. ); VII з'їзді Українського мікробіологічного товариства ( Чернівці, 1989 р. ); Республіканській конференції "Застосування ІФА у медицині", ( Харків, 1989 р. ); VI Міжнародному з'їзді по прискореним методам і автоматизації у мікробіології та імунології ( Хельсінкі, 1990 р. ); VI Всеросійському з'їзді мікробіологів, епідеміологів та паразитологів ( Нижній Новгород, 1991 р. ); XII Українському з'їзді мікробіологів, епідеміологів та паразитологів ( Харків, 1991 р. ); науковій конференції, присвяченій 85-й річниці Томського НДІ вакцин та сироваток ( Томськ, 1991 р. ); на конференції молодих вчених Московського НДІ епідеміології та мікробіології ім. Радрічевського ( Москва, 1991 р. ).

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 150 сторінках машинописного тексту та складається із вступу, двох розділів огляду літератури, опису методів дослідження та дванадцяти підрозділів власних досліджень. Список використаних літературних джерел містить найменувань. У дисертації таблиці, 21 малюнок та 4 додатки.

Публікації. По темі дисертації опубліковано 17 робіт.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В роботі використовували синє агарозу фірми "КЕМОТЕХ БІО", Естонія, сефарозу 4В та сефадекс G-25 фірми "Pharmacia", Швеція, фетуїн з телячої ембріональної сироватки фірм "Serwa", ФРН та "Bio-Rad", США, набір реактивів для електрофорезу фірми "Reanal", Угорщина, мишачі антитіла проти імуноглобулінів кролика, що були мічені пероксидазов хрому та сироватка діагностична кашлючна аглунинурча, суха, підприємства з виробництва бакпрепаратів НДІЕМ ім. М.Ф. Гамалеї, Росія, кіньський сироватковий альбумін (КСА) підприємства по виробництву бактерійних препаратів, м. Томськ, Росія, клітини мієломи Х63-Ag8.6.5.3 - фірми "Flow laboratories", США, кон'югати кролячих антимишачих антитіл з пероксидазов хрому та афінноочищені антитіла специфічні до IgG миші "Вектор Біопродукт ІЛД", м. Кольцово, Росія, тест-система для визначення ізоіотипів важких та легких ланцюгів антитіл фірми "Calbiochem Immunochemicals", США.

Сорбент фенол-сефароза (ФенС) був синтезований в ІМБГ АН України. Пептиди, що відповідають ділянкам 1 - 17, 4 - 17, 7 - 17 та 189 - 187 каталітичної субодиниці КТ були синтезовані твердофазовим методом в ІВХ АН Росії (м. Москва). У лабораторії синтезу пептидів ІВОНХ методами класичного пептидного синтезу був одержаний пептид, що відповідає ділянці 11 - 17 N-кінцевої області субодиниці S1 КТ.

Виділення та очистка КТ. У культуральну рідину, попередньо звільнену від клітин, вносили синє агарозу з розрахунку 10 - 15 мл на 1 л рідини. рН культуральної рідини перед внесенням сорбента знижували до значення 8,0. Суспензію синьої агарози із культуральною рідиною витримували при температурі 4 - 10 °С протягом 48 годнів, постійно перемішуючи. Після цього перемішувачня припиняли і коли сорбент повністю осідав на дно, надосадову рідину видаляли. Сорбент збирали і поміщали в адаптерну колуку, що мала діаметр 3,2 см. Колонку промивали двома об'ємами розчину ФБР (С = 0,25 моль/л, рН 8,0) та двома об'ємами трісвої (С = 0,05 моль/л, рН 7,4) (ТСВ), після чого елювали ділою буферним розчином ТСВ (С = 0,05 моль/л, рН 7,4), із зміс-

том  $MgCl_2$  у концентрації 0,75 моль/л. Промивку колонки та елюцію білкових фракцій проводили при швидкості потоку 150 мл/год. Потім білкові фракції, що були елюйовані ТСБ буфером з  $MgCl_2$  у 0,75 моль/л, об'єднували, розводили у два рази дистильованою водою і наносили на колонку з фетуїн-сефарозов (ФетС). Ця колонка (діаметр 2 см) містила сорбент з розрахунку 20 - 25 мл на 10 л початкового об'єму культуральної рідини і була зрівноважена ТСБ. Після нанесення білкового матеріалу, що містив КТ, колонку промивали 1,1 - 1,2 об'ємами таких буферних розчинів: ТСБ, потім ТСБ з 1 моль/л NaCl. Після цього КТ елювали ТБС із  $MgCl_2$  у концентрації 4 моль/л. Нанесення матеріалу на колоку з ФетС промивання та елюцію білка проводили при швидкості потоку 80 мл/год. Елюцію білкових фракцій контролювали, вимірюючи оптичне поглинання на спектрофотометрі при довжині хвилі 280 нм.

Розчин КТ, що був отриманий після елюції з ФетС звільняли від хлориду магнію, діалізуючи проти ФБР (С = 0,01 моль/л, рН 7,0), із NaCl у концентрації 0,05 моль/л. Кількість білку після діалізу визначали за методом [O. Lowry, 1951]. Після чого розчин КТ ліофілізували та зберігали при температурі 4 - 10 °С.

Електрофорез у ПААГ у присутності ДСН проводили за методом U. Laemmli, 1970. У роботі використовували мікрометод подвійної радіальної імунодифузії за O. Ouchterlony, 1962.

Виділення двох форм КТ з одного виробничого штаму Bordetella pertussis. Дві різні форми КТ одержували від одного з варіантів виробничого штаму 475. Звичайну форму КТ, що була позначена нами як ш-КТ, виділяли із середовища культивування *B. pertussis*, як описано вище.

Після цього білки, що не сорбувалися на ФетС висаджували  $(NH_4)_2SO_4$ , доводячи його концентрацію у розчині до 0,7 г/л. Білок екстрагували з осаду буферним розчином, який містив тріс-НСІ у концентрації 0,05 моль/л та NaCl у концентрації 1 моль/л, рН 7,4. Екстракт наносили на колонку, діаметром 2 см, яка була заповнена феніл-сефарозов (ФенС). Для одержання другої форми кашличного токсину, що була позначена нами як п-КТ, на 10 л надосадової рідини середовища культивування *B. pertussis* використовували близько 20 мл ФенС. Нанесення розчину з екстрагованими з осаду білками, промивання колонки та елюцію білку проводили при швидкості потоку 80 мл/год. Колонку промивали тим же буфер-

ним розчином, яким екстрагували білок з осаду, і елювали форму п-КТ розчином, який містив тріс у концентрації 0,05 моль/л та NaCl у концентрації 0,1 моль/л, рН 10,0. Елюат, що містив п-КТ, діалізували та визначали концентрацію білку, як описано вище.

Виділення окремих субодиниць КТ. Розділення субодиниць КТ проводили в пластині ПААГ з ДОН 3 мм завтовшки, що мав лінійний градієнт пористості 10 - 20%. По закінченні електрофорезу білкові смуги в гелі проявляли попередньо охолодженим розчином хлориду калію (  $C = 0,25$  моль/л ). Ділянки гелю, що містили субодиниці КТ, вирізали та діставали білок шляхом електроелектролізу.

Розділення субодиниць S1 ( А-протомера ) та В-олігомера КТ. 2 мг КТ у 5 мл ФБР (  $C = 0,01$  моль/л, рН 7,0 ), який містив NaCl у концентрації 0,05 моль/л сечовину у концентрації 2,1 моль/л та АТФ у концентрації 100 мкмоль/л витримували на протязі 15 хвилин з 2 мл фетуїн-сефарози. Потім рідину відділяли від сорбента, на центрифугі. Розчин, який містив субодиниць S1 КТ, діалізували проти ФБР (  $C = 0,01$  моль/л, рН 7,0 ), із вмістом NaCl у концентрації 0,05 моль/л після чого ліофільно висушували. В-олігомер елювали з фетуїн-сефарози з такий же спосіб, як і власне КТ.

Передбачення антигенних ділянок та структурно-функціональних особливостей КТ за допомогою розрахункових методів. Розрахунки профілів акрофільності та гідрофільності субодиниць КТ проводили за методами, що були запропоновані у роботах Т. Норр та К. Woods [ 1981, 1984 ]. Комп'ютерний аналіз структурно-функціональних особливостей субодиниць КТ, що впливає із їхньої амінокислотної послідовності, виконували використовувачи пакет програм PC Gene.

Імунізацій кроликів та мишей здійснювали за загальноприйняттою схемою, імуноглобуліни виділяли за методикю, що описана Р. Аверкиной, 1967 . Імуноферментний аналіз проводили у непрямому варіанті [ А. Волер і др., 1977 ]. Електроімуноблотінг субодиниць КТ проводили за методикю Н. Towbin *et al.*, 1979.

Одержання та характеристика кон'югатів КТ-пептидів із білками-носіями. Пептиди 1-17, 4-17, 7-17 та 189 - 187 кон'югували із кінським сироватковим альбуміном ( КСА ) за допомогою гетеробіфункціонального перехреснозшивачого реагента *m*-малеїмідобензолі-*N*-сукцинімідного ефіру ( МБС ). Кон'югат синтетичного пеп-

таду 11 - 17 із ВСА одержували за допомогою глютарового альдегіду.

Для визначення амінокислотного складу кон'югати гідролізували у запаяних під вакуумом ампулах у розчині 5,7 N HCl при 110-112 ° C протягом 24 годин. Амінокислотний склад білків та кон'югатів визначали на автоматичному аналізаторі амінокислот ААА-339 ( ЧСФР ). Епітопну густина для кожного кон'югату розраховували на підставі співвідношення вмісту будь-якої амінокислоти, яка є в складі пептиду, у кон'югати та її вмісту у складі білка-носія.

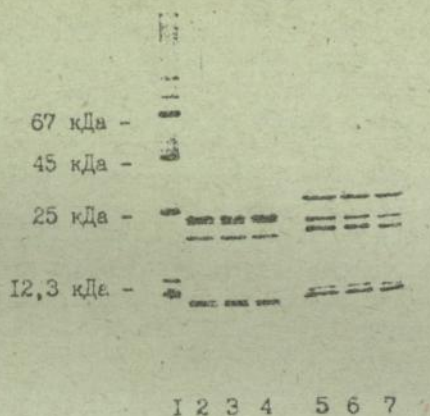
### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Одержання та очистка КТ. Виділення кашльочного токсина з надосадової рідини середовища культивування *B. pertussis* проводили, використовуючи двостадійний метод очистки, що базується на застосуванні афінної хроматографії [ R. Sekura et al., 1983 ]. Застосовуючи цей метод одержання здається досягти ступеня очистки КТ у 800 - 800 разів.

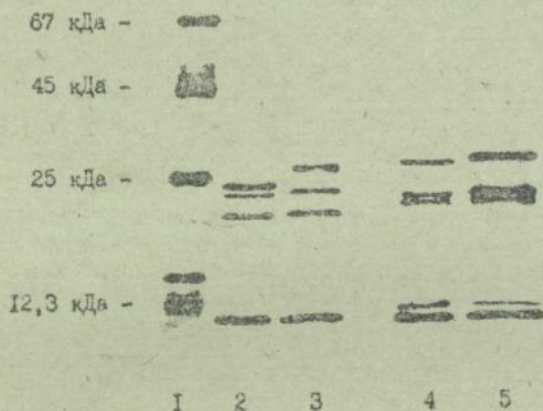
Одержаний білок ідентифікували як кашльочний токсин та оцінювали якість його очистки, аналізуючи за допомогою електрофорезу у ПААГ-ДСН ( Мал. 1 ). На фотографії електрофорезного геля можна спостерігати п'ять білкових смуг у діапазоні від 9 до 28 кДа, які відповідають субодиницям S1 - S5 КТ. Електрофоретична рухливість субодиниць S1, S3 та S5 зменшується, якщо зразок КТ перед нанесенням на гель була відновлена 2-меркаптоетанолом ( Мал. 1 - 5, 6, 7 ), що свідчить про наявність у цих субодиницях внутрішньо-оплянцтованих дисульфідних зв'язків.

Ферментативна та біологічні активності одержуваного КТ досліджувалася у НДІБС ім. І.І. Мечнікова АМН Росії, Інституті біоорганічної хімії ім. М.М. Шемякіна АН Росії та Інституті хімічної та біологічної фізики АН Естонії.

Цитостатична дія КТ на культуру клітки лейкоцитів китайського хом'ячка виявлялася у дозах від 0,3 до 78 мг/мл, лейкоцитостимулюючий та гістамінсенсибілізуючий вплив при внутрішньочеревному введенні білим мишам виказували дози 0,3 - 0,7 мкг, а АДФ-рібозилтрансферазна активність варіювала у межах 55 - 120



Мал. 1. Електрофорез у ПААГ-ДСН зразків очищеного КТ.  
1 - маркерні білки; 2 - 4 - зразки КТ без відновлення;  
5 - 7 - зразки КТ відновлені 2-меркаптоетанолом. Кількість білку у кожній пробі - 20 мкг.



Мал. 2. Електрофорез у ПААГ-ДСН двох форм КТ.  
1 - маркерні білки; 2 - m-КТ без відновлення; 3 - p-КТ без відновлення; 4 - m-КТ, відновлена 2-меркаптоетанолом; 5 - p-КТ, відновлена 2-меркаптоетанолом.

фемтомоль  $\times$  хв<sup>-1</sup>  $\times$  мг<sup>-1</sup> [ В. Шмелева и др., 1989 ]. Отримані дані свідчать, що за своїми властивостями одержуваний нами КТ не поступається аналогічним зразкам токсина, що розповсюджувься провідними фірмами світу ( наприклад, "Sigma" ).

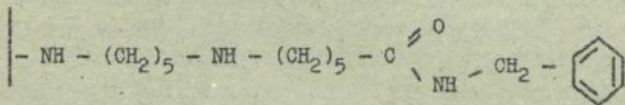
Спільно з НДІВС ім. І.І.Мечнікова було проведено визчення рівня продукування кашльочних антигенів ( у першу чергу – кашльочного токсина і філаментозного гемаглютиніна ) різними штамами та варіантами штамів *B. pertussis*. В результаті цих досліджень був одержаний більш ефективний штам – продуцент КТ.

На основі нашого методу виділення КТ спільно із НДІВС ім. І.І. Мечнікова був розроблений виробничий регламент і налагоджений випуск кашльочного токсина, як препарата для біохімічних досліджень .

Одержані зразки КТ перевіряли за допомогою мікрометоду подвійної радіальної імунодифузії. Для визначення чистоти препаратів КТ використовували сироватку діагностичну кашльочну аглютинувчу, що вироблялася, як антисироватка проти цілого мікробу *B. pertussis*. Всі перевірені зразки КТ давали у методі імунодифузії єдину смугу преципітації.

Виділення двох форм КТ з одного виробничого штаму *Bordetella pertussis*. З налосадової рідини середовища культивування виробничого штаму 475 *B. pertussis*, що була напрацьована у НДІВС ім. І.І. Мечнікова, нами були одержані дві форми КТ.

Спочатку виділяли КТ за методом, що був описаний вище. Розчин, який містив білки, що не сорбувалися на фетуйн-сефарозі, висаджали сульфатом амонію. Форму, що була виділена за звичайних процедур, ми позначили ш-КТ. Далі осад кілька разів екстрагували буферним розчином і екстракт наносили на колонку, що була заповнена сорбентом – аналогом феніл-сефарози:



В результаті елюції з цього сорбента ми одержували другу форму, яка була позначена нами п-КТ. Кількість п-КТ становила приблизно половину від кількості одержаного перед тим ш-КТ.

Форми КТ відрізняються одна від одної різною електрофоретичною рухливістю субодиниці S1 при електрофорезі у ПААГ-ДСН. Результати аналізу двох форм КТ за допомогою електрофорезу наведені на Мал. 2. На фотографії гелю видно, що S1 п-форми КТ рухається більш повільно у порівнянні з S1 ш-форми КТ, причому найбільш помітна ця різниця на зразках КТ з невідновленими дисульфідними зв'язками. При відновленні внутришьольанцюгового - S - S - зв'язку електрофоретична рухливість S1 п-КТ практично не змінюється, проте електрофоретична рухливість S1 ш-КТ суттєво знижується і майже вирівнюється з рухливістю S1 п-КТ.

На підставі одержаних експериментальних результатів та комп'ютерного аналізу структурно-функціональних особливостей S1 КТ, ми припустили, що дві різні форми КТ відповідають двом відрізняючимся первинним послідовностям, що відомі з літератури для S1 [ A. Nicosia et al., 1986, C. Locht & J. Keith, 1986 ]. Слід зауважити, що за обома сіквенсами у складі S1 є лише два залишки цистеїну, тобто дисульфідний зв'язок може утворюватися лише між ними. Імовірно, форма ш-КТ, відповідає первинній послідовності [ A. Nicosia et al., 1986 ] ( S11 ), оскільки токсин для своїх досліджень автори одержували шляхом очистки на фетуїн-сефарозі, а взаємне розташування субодиниць при електрофорезі таке ж саме, як у форми ш-КТ. Форма п-КТ, за нашим припущенням, відповідає сіквенсу [ C. Locht & J. Keith, 1986 ] ( S1A ). Це припущення з урахуванням результатів комп'ютерного аналізу вторинної будови за методом Garnier, 1978, первинних послідовностей, що відомі для S1 КТ, дозволяє пояснити різницю в електрофоретичній рухливості першої субодиниці двох форм КТ. В субодиниці S1 ш-КТ має змогу утворюватися внутришьольанцюговий дисульфідний зв'язок, що підтверджується результатами електрофореза у ПААГ-ДСН зразків ш-КТ без відновлення та відновлених 2-меркаптоетанолом. У субодиниці S1 п-КТ внутришьольанцюговий дисульфідний зв'язок, імовірно, не утворюється, оскільки її електрофоретична рухливість без відновлення майже співпадає з електрофоретичною рухливістю S1 ш-КТ після відновлення, а також не змінюється при відновленні 2-меркаптоетанолом. Однією з причин може бути  $\beta$ -поворот

поліпептидного ланцюгу поблизу Cys 200 ( 201 ), який передікається комп'ютерною програмою для сіквенсу S1A, але не для сіквенсу S11. Якщо поворот поліпептидного ланцюгу у цієї ділянці дійсно відбувається, - S - S - зв'язок у п-КТ може не утворюватися внаслідок стеричних перешкод. Не виключено, що розбіжності між двома формами КТ не вичерпуються розбіжностями у структурі активаторної субодиниці, а торкаються також і В-олігомера, оскільки форми токсина по різному взаємодіють з фетуїн-сефарозою. Нам вдалося розділювати на колонії з FetC суміш двох форм КТ. Хоча, можливо просторова будова S1 з незамкненим дисульфідним зв'язком перешкоджає взаємодії В-олігомера із FetC.

Дві форми кашльничного токсина були проаналізовані нами за допомогою методу електроімуноблотінгу ( EIB ) з поліклональними антитілами. Якщо ш-форму КТ брали у відновленому стані, поліклональні АТ реагували з обома формами токсина однаково.

Одержання окремих субодиниць КТ. Для одержання окремих субодиниць кашльничий токсин розділяли методом препаративного електрофорезу у більш товстому ( 3 мм ) ПААГ-ДСН. Після завершення електрофореза білкові смуги проявляли розчином охолодженого KCl і вирізали з гелю. Шматочки гелю, які містили субодиниці КТ переносили у скляні трубки пристрою "Reanal" для вертикального електрофорезу і проводили електроосмолю. Після цього розчини, які містили елюовані субодиниці, діалізували та ліофілічно висушували. Одержані зразки субодиниць аналізували за допомогою аналітичного варіанту електрофорезу у ПААГ-ДСН. Результати аналізу засвідчили, що перша субодиниця була отримана практично у чистому вигляді, друга та третя субодиниці містять суттєві домішки одна одної, четверта має незначний домішок п'ятої субодиниці, а п'ята отримана у суміші з четвертою субодиницею.

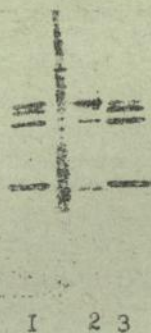
Розділення активаторної субодиниці та В-олігомера КТ. Завдяки функціональним особливостям будови КТ його активаторну субодиницю ( S1, А-протомер ) можна порівняно легко відділити від В-олігомера. Відомо, що КТ стабільний у розчинах сечовини з концентрацією вище 2 моль/л [ М. Tamura et al., 1982 ]. В роботі D. Vignas et al., 1987 було показано, що нуклеотидфосфати значно полегшують дисоціацію S1 від В-олігомеру у присутності сечовини. Причому найбільший ефект мала АТФ. В цитованій роботі для

сорбції вивільненого від активаторної субодиниці В-олігомера автори використовували CM-Sepharose.

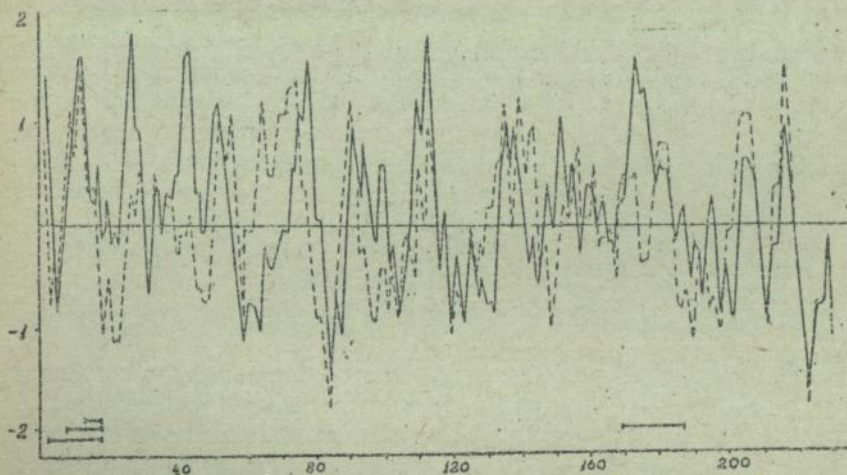
Ми брали фетуїн-сефарозу як сорбент для В-олігомера і інкубували її у буферному розчині разом з КТ. На-фосфатний буферний розчин ( C = 0,01 моль/л, pH 7,0 ) містив 2,1 М сечовини та АТФ у концентрації 100 мкмоль/л. Після 15 хвилин інкубації цієї суспензії при кімнатній температурі ми відділяли розчин, який містить А-протомер від FetC шляхом центрифугування. Після елюції В-олігомера з FetC розчини, що містили А-протомер та В-олігомер подавали діалізу та ліофільно висушували. Одержані зразки S1 субодиниці та В-олігомеру аналізували за допомогою електрофорезу у ПААГ-ДСН. Результати електрофорезу наведені на Мал. 3. На фотографії електрофорезного геля видно, що за допомогою запропонованого методу вдається розділити А-протомер та В-олігомер.

Передбачення антигенних детермінант та структурно-функціональних особливостей будови S1 КТ за допомогою розрахункових методів. За методами К. Норр та Т. Вудс були виконані розрахунки профілів акрофільності та гідрофільності всіх субодиниць КТ. На підставі передбачення найбільш імовірних антигенних ділянок нами для подальшої роботи з використанням синтетичних пептидів була обраєна найбільш важлива та імуногенна субодиниця КТ - S1 та, зокрема її N-кінцева ділянка ( див. Мал. 4 ).

Як ми вже згадували, між амінокислотними послідовностями S1 КТ, що були визначені двома групами дослідників існують розбіжності у C-кінцевій ділянці. Ці розбіжності полягають у тому, що на відтинку між 193 і 198 амінокислотними залишками п'ять з них відрізняються, а залишок Gly у положенні 199' за сіквенсом S1A відсутній взагалі. Таким чином, послідовність S1A на один амінокислотний залишок коротша. Як відомо, ( наприклад, [ Т. Katada & М. Ui, 1982 ] ) здібність перегинати плазматичку мембрану є функціонально необхіднов рисов активаторної субодиниці КТ. Тим більше, що саме C-кінцева ділянка S1, виходячи з даних літератури відповідає за її транслокацію у середину клітинки. Тому, природньо, нас цікавили результати порівняння передбачення можливості молекул за сіквенсами S1i та S1A взаємодіяти з клітинними мембранами. При обрахунку первинних структур S1i та S1A за методом Р. Klein et al., 1985, програма "SOAP" ідентифікувала поліпептид, що відповідає сіквенсу S1i, як інтегральний білок і ви-



Мал. 3. Електрофорез у ПААГ-ДСН А-протомера та В-олігомера КТ. 1 - зразок КТ, 2 - А-протомер ( субодиниця S1 ), 3 - В-олігомер.



Мал. 4. Гексапептидні профілі акрофільності та гідрофільності субодиниці S1 КТ. — — — профіль акрофільності, - - - - профіль гідрофільності, — — — ділянки, що були обрані для синтезу пептидів.

значила послідовність закрученого у мембрану сегмента у межах 186 - 203 амінокислотних залишків. Цей сегмент включає ділянку, яка відрізняється від аналогічної у сіквенсі S1A. Поліпептид, що описується послідовність S1A був ідентифікований програмою як периферичний, проте не інтегральний білок. При розрахунках для двох амінокислотних послідовностей S1 за методом J. Rao & P. Argov, 1986 програмов "RAOARGOS" було передбачено для сіквенсу S11 утворення трансмембранної петлі в межах 184 - 203 амінокислотних залишків тоді як для сіквенсу S1A така можливість не була.

Визначення оптимальної концентрації антитіла для вивчення антигенності КТ методами ІФА та імуноблотінгу. Для антигенного аналізу субодиниць КТ застосовували антитіла (АТ) у вигляді IgG, що були виділені з кролячої антисироватки проти КТ та антисироватку (АС) до токсину, яка була одержана у НДІВС ім. І.І. Мечнікова (м. Москва). Кролячу антисироватку до КТ у НДІВС одержували, вводячи тваринам кашльочний токсин у суміші із бластолізином [Г. Кириллова и др., 1989]: перший раз - детоксикований КТ, а надалі - нативний білок.

Оптимальну концентрацію АТ в методі ІФА визначали за максимальної різниці у забарвленні відповідних лунок контрольного та дослідного рядів у планшетях. Для АТ, якими ми користувалися оптимальна робоча концентрація становила 20 мкг імуноглобулінів в 1 мл розчину. На підставі результатів титрування АТ та КТ була побудована калібровочна крива для кількісного визначення токсина.

Оптимальну концентрацію АТ та оптимальне розведення АС для використання у методі імуноблотінга визначали за допомогою дотблотінгу. На смужки нітроцелюлозних мембран наносили фіксовану кількість токсина у межах від 0,25 мкг до 0,01 мкг та тестували за допомогою антитіла. В умовах наших дослідів оптимальна концентрація АТ становила 50 мкг імуноглобулінів в 1 мл відповідного розчину, а оптимальне розведення АС дорівнювало 1 : 5 000.

Вивчення взаємодії поліклональних антитіла із субодиницями КТ методом ЕІБ. Взаємодію субодиниць КТ вивчали за допомогою методу електроімуноблотінга з використанням АТ та АС. Електрофорез проводили у градієнтному ПААГ з ДСН на приборі АВГЕ-1 у двох пластинках одночасно. На кожному пластинку гелю наносили по 12 ерез-

ків КТ: шість зразків - без відновлення та шість зразків, що перед нанесенням на гель були відновлені 2-меркаптоетанолом. В кожній серії з шести зразків три містили по 15 мкг КТ, четвертий зразок - 1,5 мкг КТ, п'ятий - 0,15 мкг КТ, шостий - 0,015 мкг КТ. Після проведення електрофорезу і переносу розділених субодиниць на НЦ, смужки з двома зразками, що містили по 15 мкг КТ, відтинали. Одну з них забарвлювали аміно чорним, другу використовували для імунологічного контролю. Листки нітроцелюлози із чотирма зразками розділених під час електрофорезу субодиниць КТ після підсушування блокували у розчині БСА і проводили імуоферментний аналіз. АТ для імуоблотінгу брали у концентрації 50 мкг/мл, АС - у розведенні 1 : 5 000. Для імунологічного контролю другий зразок з кожної серії інкубували або з АТ, що були вицілені із сироватки крові кроликів за 7 днів до початку імунізації, або з інтактною кролячою сироваткою у відповідних розведеннях.

Було встановлено, що із антитілами реагують переважно перші три субодиниці КТ: S1, S2 та S3. Результати реакції з АТ невідновлених зразків КТ вказують, що найбільш інтенсивно з антитілами реагує S2, дещо слабше S3 і в незначній мірі субодиниця S1. При відновленні внутримшольованцгових дисульфідних зв'язків токсину за допомогою 2-меркаптоетанолу картина змінюється: взаємодія S2 та S3 із подіклональними антитілами після відновлення суттєво придушується, тоді як інтенсивність взаємодії S1 навпаки різко зростає. При обробці таких же блотів АС у невідновлених зразках найбільш сильно реагують з антитілами S2 та S3 і дещо слабше - S1. Крім того, на НЦ з'являється смужка, що відповідає відновленій S1, яка можливо присутня у невідновлених зразках в дуже незначній кількості і тому при забарвленні ПААГ після електрофорезу не виявляється. При відновленні КТ характер взаємодії субодиниць змінюється подібно до того, що і в разі з АТ: інтенсивність розпізнавання S1 антитілами значно підсилюється, а S2 та S3 суттєво зменшуються.

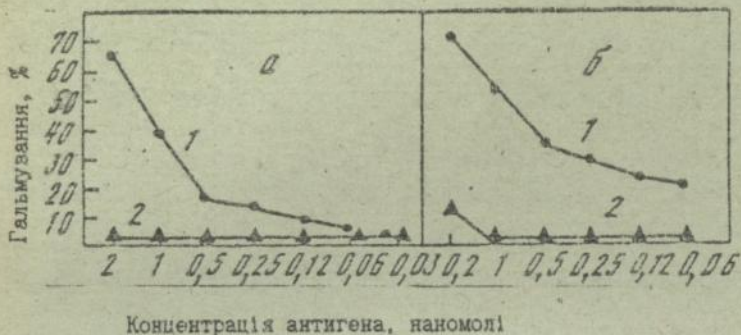
Імунохімічний аналіз КТ за допомогою моноклональних антитіл (МКА). Цей розділ роботи був виконаний спільно із відділом молекулярної імунології ІВХ АН України. З багатьох гібридом одержаних після імунізації мишею анатоксином КТ стабільно продукували МКА тільки два клони: I-5с та II-5с.

Було показано, що МКА ішої специфічності, а також імуноглобуліни з сироватки крові неімунізованих мишей з кашльччим токсином взаємодіяли незначною мірою, а МКА I-5с та II-5с у непрямому варіанті ІФА не мали перехресних реакцій з контрольними білковими антигенами: сироватковим альбуміном людини, цитохромом с, та з ФГА із *B. pertussis*. Висока специфічність антитіл була підтверджена також даними конкурентного імуноферментного аналізу: КТ ефективно перешкоджає зв'язуванню антитіл із сорбованим антигеном, тоді як БСА не впливає на взаємодію моноклональних антитіл з КТ ( Мал. 5 ).

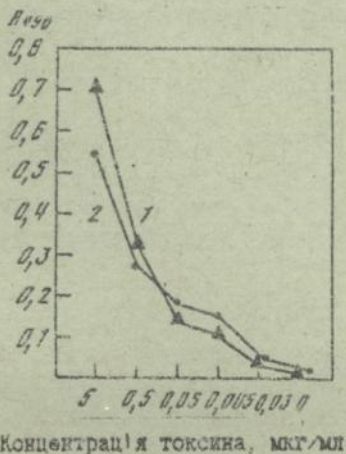
Для визначення епітопної специфічності афінноочищені МКА були біотинилізовані по аміногрупам з використанням N-оксисукцинімідного ефіру біотина. Після цього імунологічні планшети сенсibiliзували кожним з клонів МКА та додавали у лунки розчин КТ. У третьому шарі наносилися біотинилізовані АТ ішого клона. Їхню взаємодію із зв'язаним кашльччим токсином аналізували за допомогою кон'югату пероксидази із стрептавідіном. Як негативний контроль в одному випадку не вносили антиген, а у другому — після зв'язування токсина у лунки додавали розчин біотинилізованих антитіл того ж самого клона, який використовували для сенсibiliзації планшету. Біотинилізовані антитіла успішно взаємодіяли із токсином лише у тому разі, коли вони належали до різних клонів. Обидва контролі дали негативний результат. Отже МКА клонів I-5с та II-5с розпізнають різні епітопи на поверхні КТ, що дозволяє створити систему детекції кашльччого токсину.

Чутливість аналізу забезпечується спорідненістю антитіл, що використовуються, до визначасмого антигена. Афіяність МКА розраховували за тангенсом кута нахилу  $tg \alpha = K_{зв}$  лінійної ділянки в класичних координатах Скетчарда, знайденого за результатами титрування МКА на КТ у непрямому варіанті ІФА. Було визначено, що для I-5с  $K_{зв} = 1,2 \times 10^8$  моль<sup>-1</sup>, а для II-5с  $K_{зв} = 1,1 \times 10^8$  моль<sup>-1</sup>.

Для знаходження чутливості визначення КТ використовували сендвіч-аналіз ( див. Мал. 6 ), у якому верхні та нижні МКА належали до різних клонів. За результатами титрування антигена КТ може надійно визначатися, починаючи з концентрації 50 нг/мл.



Мал. 5. а - конкурентне гальмування зв'язування I-5c, б - конкурентне гальмування зв'язування II-5c на планшеті із сорбованим КТ. Як конкурентний антиген використовували КТ (1), як контрольний антиген - БСА (2).



Мал. 6. Визначення КТ проводили з використанням других біотинільованих антитіл I-5c (1) та II-5c (2). Планшет у кожному випадку сенситивізували МКА іншого клону.

Характеристика кон'югатів синтетичних пептидів із білками-носійми.

Кон'югатити п'яти синтетичних пептидів ( Мал. 7 ) були одержані, як описано у розділі "Матеріали та методи". Для всіх кон'югатів був зроблений амінокислотний аналіз та за його результатами розрахована епітопна густина для кожного кон'югату. Епітопна густина становила для всіх кон'югатів у середньому від 15 до 30 молекул пептиду на одну молекулу білку-носія.

Одержання та імунологічний аналіз антитіл до кон'югату пептид 11-17 - БСА.

Кон'югатом р11-17 - БСА імунізували кроликів та одержували поліклональні антитіла. Методом твердофазового ІФА було визначено, що мінімальна концентрація антитіл, які реагують із кон'югатом пептид-БСА, складала 20 мкг/мл. При робочій концентрації антитіл 100 мкг/мл чутливість методу складала 3 нг кон'югату пептид-БСА.

Шляхом імунологічного аналізу з використанням ІФА та ЕІВ було визначено, антитіла проти цього кон'югату зовсім не реагують з БСА і дуже слабо реагують із нативним кашлючним токсином. Оскільки поліклональні антитіла проти КТ не реагували також із кон'югатом р11 - 17 - БСА ні у методі ІФА, ні у методі дот-блотінгу, можна зробити висновок, що ділянка 11 - 17 S1 КТ не є антигенно детермінантою.

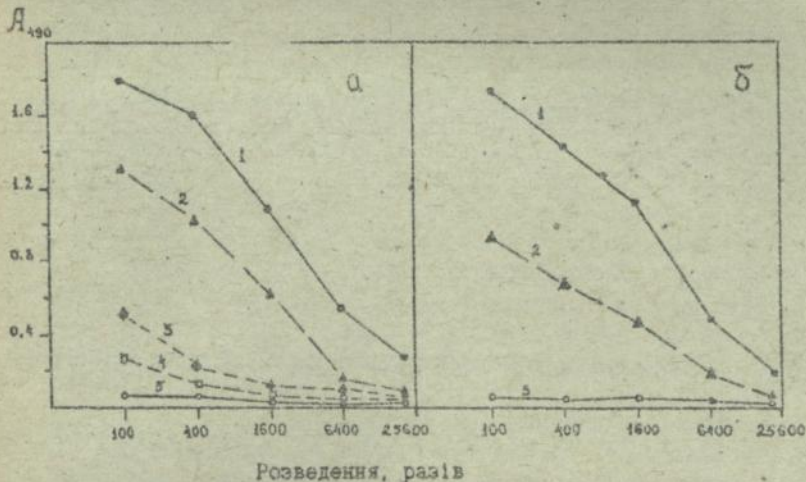
Дослідження взаємодії кон'югатів синтетичних пептидів-КСА із поліклональними антитілами до-КТ. Певний інтерес з точки зору точної локалізації антигенного сайту у N-кінцевій ділянці субодиниці S1 КТ становили експерименти із кон'югатами синтетичних пептидів, що відповідають ділянкам S1 1 - 17, 4 - 17, 7 - 17, із кісьським сироватковим альбуміном ( КСА ) ( відповідно, р1-17 - КСА, р4-17 - КСА та р7-17 - КСА ). Крім того, перевіряли взаємодію з антитілами кон'югата пептида 169 - 187 із КСА.

Аналіз кон'югатів синтетичних пептидів із КСА проводили за допомогою методу твердофазового ІФА у непрямому варіанті. Поліклональна АС до КТ досить активно реагувала із р1-17 - КСА, набагато менше антитіл із р4-17 - КСА та особливо р7-17 - КСА набавгато стабіла ( Мал. 8, а ). Це підтверджує, що імунодомінантною областю в N-кінцевій ділянці S1 є сайт 1 - 17 тоді як більш

```

DDPPATVYRYDSRPPED - C
1                               17
    PATVYRYDSRPPED - C
4                               17
        VYRYDSRPPED - C
7                               17
            DSRPPED
            11                17
QOTRANPNRYTSRRSVAS - C
169                               187
    
```

Мал. 7. Пептиди, що були синтезовані для вивчення антигенної будови субодиниці S1 кашльчого токсина.



Мал. 8. Зв'язування поліклонального антитілу із кон'югатами.  
 а - зв'язування АС із кон'югатами синтетичних пептидів N-кінцевої ділянки S1 КТ. 1 - як антиген використовували КТ, 2 - p1-17 - КСА, 3 - p4-17 - КСА, 4 - p7-17 - КСА, 5 - КСА.  
 б - 1 - КТ, 2 - p189-187 - КСА, 3 - КСА.

короткі ділянки не стимулюють направлення антитіл.

Кон'югат р189 - 187 ( Мал. 8, с ) також реагує із поліклональними антитілами до КТ, що узгоджується із результатами, які були одержані іншими дослідниками [ P. Askelef et al., 1988, 1990 ].

Ділянки КТ, що були визначені як антигенні у дослідях з синтетичними пептидами, можуть бути використані у подальших дослідженнях при розробці синтетичних вакцин проти кашляка.

## В И С Н О В К И

1. За допомогою двостадійної очистки з використанням афінної хроматографії із середовища культивування *Bordetella pertussis* виділений у високоочищеному стані кашльчий токсин.

2. Вперше виділені дві форми кашльчого токсину з виробничого штаму *Bordetella pertussis*.

3. Проведений теоретичний аналіз антигенних детермінант п'яти субодиниць кашльчого токсину.

4. Одержані поліклональні антитіла, які взаємодіють з усіма субодиницями КТ. Встановлено, що найбільш імуногенність характеризується субодиниці S1, S2 та S3.

5. Одержані два клони МКА до ітактного кашльчого токсину, які направлені проти конформаційних детермінант цього білка.

6. За допомогою синтетичних пептидів встановлено, що найбільш активно антитілами розпізнається ділянка 1 - 17 в N-кінцевій області S1 КТ.

7. На основі п'яти синтетичних пептидів, що відповідають окремим ділянкам S1, та білків-носіїв синтезовані імункон'югати і розрахована їхня епітопна густина.

8. Селекційним шляхом одержаний високопродуктивний токсико-генний сероваріант штаму *Bordetella pertussis*.

Основні результати дисертаційної роботи викладені у публікаціях:

1. Радавский Ю.Л., Гавриш О.Г. Экзотоксин *Bordetella pertussis*. // Тезисы докладов I Всесоюзной конференции "Молекулярная структура бактериальных токсинов и генетический контроль их биосинтеза", 1-2 октября 1985 г., Москва. - С. 90 - 91.
2. Фракционирование экзотоксина *Bordetella pertussis*. / Ю.Л. Радавский, О.Г. Гавриш, В.А. Чечот и др. // Тезисы докладов I Всесоюзной конференции "Молекулярная структура бактериальных токсинов и генетический контроль их биосинтеза", 1-2 октября 1985 г., Москва. - С. 91.
3. Радавский Ю.Л., Гавриш О.Г. Коклишный токсин *Bordetella pertussis*. // в сборнике научн. трудов под ред. Ю.В. Езепчука "Бактериальные токсины", Москва. - 1987. - С. 125 - 136.
4. Антигенный анализ коклюшного токсина. / О.Г. Гавриш, В.А. Чечот, И.П. Турова и др. // Тезисы докладов VII Всесоюзного симпозиума по химии белков и пептидов, 19 - 23 октября 1987 г., Таллин. - С. 40 - 41.
5. Антигенный анализ субъединиц коклюшного токсина. / О.Г. Гавриш, В.О. Чечот, О.А. Заикин та Ю.Л. Радавський // Доп. АН УРСР, Сер. Б. - 1989. - С. 61 - 64.
6. Изучение двух форм коклюшного токсина, выделенных из одного штамма *Bordetella pertussis*. / О.Г. Гавриш, В.А. Чечот, А.А. Заикин и др. // Тезисы. 2 Всесоюзная конференция "Бактериальные токсины", 27 - 30 ноября, 1989 г., Крмала. - С. 26.
7. Характеристика высокоочищенного токсина *Bordetella pertussis* в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. / в соавт. Е.И. Шмелева, Н.У. Мерцалова, Н.С. Захарова и др. // Тезисы. 2 Всесоюзная конференция "Бактериальные токсины", 27 - 30 ноября, 1989 г., Крмала, Латвия - С.152.
8. Иммунохимический анализ коклюшного токсина и его субъединиц. / О.Г. Гавриш, В.А. Чечот, А.А. Заикин и др. // Тезисы секц. и станд. сообщ., Первый Всесоюзный иммунологический съезд, 15 - 17 ноября 1989 г., Сочи. - том I. - С. 207.
9. Иммуноферментный анализ токсинообразующей активности штаммов *Bordetella pertussis* и остаточной активности бесклеточ-

ных коклюшных препаратов. / в соавт. Г.А. Кириллова, Е.И. Шмелева Н.У. Мерцалова и др. // Материалы республиканской конференции "Применение ИФА в медицине", Харьков. - 1989. - С. 84 - 85.

10. Изучение антигенной структуры коклюшного токсина. / О.Г. Гавриш, В.А. Чечот, А.А. Заикин и др. // Тезисы докладов VII съезда Украинского микробиологического общества, сентябрь 1989, Черновы. - Ч. 2. - С. 135.

11. Evaluation of the degree of detoxification of acellular pertussis vaccin by the method of the ELISA. / co-auth. with N.S. Zakharova, E.I. Shmeleva, T.N. Remova et al. // Sixth International Congress on Rapid Method and Automation in Microbiology and Immunology. Helsinki - Espoo, Finland, 7 - 10 June, 1990. - P. 316.

12. Разработка вакцин нового поколения: некоторые итоги и перспективы. / в соавт. Н.С. Захарова, Е.И. Шмелева, Ю.Л. Радавский и др. // Тезисы докладов VI Всероссийского съезда микробиологов, эпидемиологов и паразитологов. - Нижний Новгород. - М. - 1991. - Т. II. - С. 174 - 175.

13. Патофизиологическая и протективная активность коклюшных бактерий. / в соавт. Е.И. Шмелева, Н.У. Мерцалова, Е.Е. Сухинова и др. // Тезисы докладов XII Украинского республиканского съезда микробиологов, эпидемиологов и паразитологов. - Харьков. - 1991. - Ч. I - С. 179.

14. Экзотоксины и антитоксин *Bordetella pertussis*: технология получения, иммунобиологические характеристики, исследование в составе вакцин и диагностических препаратов. / в соавт. Е.И. Шмелева, Н.С. Захарова, Ю.Л. Радавский и др. // в сб. "Актуальные вопросы медицинской биотехнологии". - Материалы научной конференции, посвященной 85-летию Томского НИИ вакцин и сывороток. ИПО "Виррион". - Томск. - 1991. - С. 120 - 121.

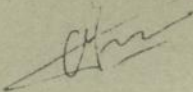
15. Г.А. Кириллова, О.Г. Гавриш. Высокочувствительная система иммуноферментного анализа для диагностики коклюша. // Материалы конференции молодых ученых Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Габричевского. - РМЖ. - 1991. - № 4-6, разд. III, № 1417.

16. Штамм бактерий *Bordetella pertussis* - продуцент коклюшного токсина. / в соавт. Е.И. Шмелева, Н.У. Мерцалова, Е.Е. Сухинова и др. // Авторское свидетельство СССР № 1761795 от 15 мая

1992 г.

17. Получение и анализ моноклональных антител к коклюшному токсину *Bordetella pertussis*. / Е.Г. Плякадзе, Э.М. Кавун, И.Н. Колесникова, О.Г. Гавриш, А.М. Буханевич, Б.Д. Ляшко, Ю.Л. Радавский, С.В. Комиссаренко // Биотехнология. - 1992. - № 6. - С. 33 - 36.

Пошукувач



О.Г. Гавриш



105801

AB 27.774