

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ И НЕМТЕХИМИИ

На правах рукописи

РАДАВСКИЙ Юрий Леонидович

АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА КАПСИДНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСОВ  
РАСТЕНИЙ И БЕЛКОВЫХ АНТИГЕНОВ *Bordetella pertussis*

02.00.10 - Биоорганическая химия, химия природных  
и физиологически активных веществ

А в т о р е ф е р а т  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Киев - 1994

AB 29.554

Диссертацией является рукопись

Работа выполнена в Институте биоорганической химии и нефтехимии АН Украины

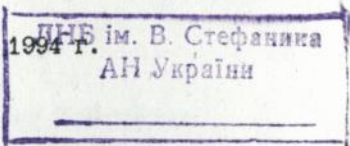
Официальные оппоненты:  
академик УААН, доктор биологических наук,  
профессор БОЯКО А.Л.  
доктор медицинских наук,  
профессор БЕРЕЖНАЯ Н.М.  
доктор биологических наук,  
профессор КИВИРЕВ В.К.

Ведущее учреждение: Институт биохимии им. А.В.Палладина  
АН Украины

Защита диссертации состоится "22" августа 1994 г.  
на заседании специализированного ученого совета Д.016.65.01  
в Институте биоорганической химии и нефтехимии АН Украины  
( 253094, г.Киев-94, ул. Мурманская, 1).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института  
биоорганической химии и нефтехимии АН Украины (253094,  
г.Киев-94, ул. Мурманская, 1).

Автореферат разослан "22" августа 1994 г.



Ученый секретарь  
специализированного совета

*Д.М. Федоряк*

Д.М. ФЕДОΡЯК

Зам. 63

Формат 60x84/16

Обл.-вид. арк, 2.00

Підписано до друку II.03.1994 р.

Тираж 100

Поліграфічна дільниця ІТФ ім.М.М.Воголюбова АН України

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00801673 (P)

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Последние годы ознаменовались значительными успехами в изучении антигенных свойств белков, в частности вирусных и бактериальных. Установлено, что антитела и рецепторы иммунокомпетентных клеток узнают не всю молекулу белка, а определенный ее участок — антигенную детерминанту или эпитоп. Локализация антигенных детерминант и их синтетическое моделирование позволяют лучше понять молекулярные основы антигенности. Совместное применение химически простых синтетических антигенов и инбредных линий мышей, создающих генетически однозначную ситуацию, дает неопровержимое доказательство детерминантной специфичности генетического контроля иммунного ответа.

В настоящее время ведутся многочисленные исследования вирусов высших растений и их компонентов. Интерес к ним вызван, с одной стороны, значительным влиянием на экономику сельского хозяйства, а с другой — разнообразием структурно-функциональной организации их белков и геномных нуклеиновых кислот. Знание антигенной структуры капсидных белков X-, Y- и M-вирусов картофеля даст информацию об их топографии в капсиде, что важно для установления молекулярной организации их вирионов, изучения белок-белкового и белок-нуклеинового взаимодействия и понимания таких процессов, как самосборка вирусов и освобождение РНК от белка. Известно, что потери урожая картофеля на 40–80% связаны с использованием в сельском хозяйстве зараженного вирусами посадочного материала. Поэтому знание антигенной структуры изучаемых вирусов даст возможность усовершенствовать существующие методы их диагностики.

С изучением антигенности белков тесно связана проблема создания искусственных или синтетических вакцин. Такие вакцины содержат не целые вирусы, бактерии или их антигены, а искусственно синтезируемые в больших количествах (методами органической химии или геной инженерии) антигенные детерминанты, включающие только иммунологически значимую часть антигена, вызывающую выработку иммунитета. Основным преимуществом таких вакцин является то, что можно проводить иммунизацию минимальными количествами материала и значительно уменьшит нежелательные побочные эффекты. Они не будут

представлять опасность ни для самого вакцинируемого человека, ни для окружающих.

В настоящее время в Украине и за рубежом для вакцинации детей применяют, в основном, АКДС вакцину, состоящую из дифтерийного и столбнячного анатоксинов и инактивированного коклюшного микроба. Однако эта вакцина дает ряд локальных и системных побочных реакций. Это побочное действие связано, в большинстве случаев, с цельноклеточным компонентом вакцины - коклюшным микробом. Естественно, возникает проблема разработки и создания менее реактогенной вакцины. Она может быть решена путем выделения из микроба протективных белковых антигенов и создания на их основе вакцины, которая вызвала бы устойчивый иммунитет. Одними из основных протективных антигенов *Bordetella pertussis* являются коклюшный токсин и филаментозный гемагглютинин. Выделение и изучение антигенных свойств этих белков позволяет вплотную подойти к созданию бесклеточных и синтетических вакцин против коклюша.

Во многих странах мира ведутся интенсивные научные исследования по созданию химических (синтетических) вакцин. Одним из подходов в создании таких вакцин является химический синтез пептидов, содержащих аминокислотные последовательности протективных антигенных детерминант, определяющих выработку специфических антител. Для получения сильного иммунного ответа на пептиды, последние конъюгируют с высокомолекулярными носителями с помощью различных поперечносшивающих бифункциональных реагентов. Синтез и применение новых бифункциональных реагентов является весьма актуальной задачей при создании синтетических антигенов и вакцин.

Настоящая работа выполнялась в рамках тем Института биоорганической химии и нефтехимии АН Украины № госрегистрации 01.86.0007421 и № госрегистрации 01.89.00027489 по Постановлению Президиума АН Украины от 27.12.86г. и Бюро ВХХТ АН Украины от 26.12.89г.

Цель и задачи исследования. Исходя из вышеизложенного - цель настоящей работы заключалась в изучении антигенной структуры капсидных белков Х-, У-, и М-вирусов картофеля (RVX, RVY, RVM), в изучении иммуногенных и антигенных свойств коклюшного токсина (КТ) и филаментозного гемагглютинина (ФГА) из *B. pertussis* и ряда синтетических пептидов, которые соответствуют аминокислотной

последовательности отдельных функционально важных участков этих белков. Целью работы являлось также изучение возможности использования новых бифункциональных реагентов в иммунологических исследованиях.

Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

-локализовать антигенные детерминанты с помощью поли- и моноклональных антител, находящиеся на поверхности капсидных белков РVХ, РVУ и РVМ;

-изучить химическое строение участков капсидных белков, включающих эпитопы;

-провести сравнение первичных и высших структур капсидных белков изучаемых вирусов;

-выделить в гомогенном виде коклюшный токсин и филаментозный гемагглютинин *B. pertussis*;

-получить иммуноконъюгаты на основе ряда синтетических пептидов коклюшного токсина и филаментозного гемагглютинина и изучить их иммуногенные и антигенные свойства;

-изучить возможность применения 2-нитро-4-сульфопениловых эфиров кислот для получения иммуноконъюгатов.

Научная новизна работы. Впервые, с применением поли- и моноклональных антител к РVХ и модификацией остатков лизина показано, что в N-концевом участке капсидного белка РVХ содержится одна или две перекрывающиеся антигенные детерминанты в которые входит остаток лизина в позиции 19 полипептидной цепи белка. Этот участок является иммунодоминантной областью и экспонирован на поверхности вириона. Синтезировано три пептида входящие в эту область и получены конъюгаты. Один из пептидов (нанопептид) взаимодействует с двумя МКА к РVХ, что подтверждает экспонированность этого участка на поверхности РVХ.

С помощью компьютерных расчетных методов доказана принадлежность РАМV к потексгруппе.

Исследованы два МКА, полученные к штамму Н РVУ, которые реагируют с целым вирусом, нативным и денатурированным капсидным белком. Выявлено, что МКА У306 реагирует с тремя штаммами РVУ и восьмью другими вирусами потигруппы. С помощью этого МКА локализован группоспецифический эпитоп потивирусом, идентифицированных на Дальнем Востоке. МКА У20 взаимодействует только с интактными капсидными белками штаммов РVУ, но не

реагирует с другими потивирусами и продуктами деградации белков по N- и (или) C-концевым участкам. Отсюда следует, что МКА У20 узнает вирусспецифический эпитоп в капсидном белке.

Проведено расщепление капсидного белка РvМ трипсином и фракционирование смеси пептидов ВЭЖХ в обращенной фазе. Методом флюороиммуноанализа временного разрешения установлено, что один из пептидов взаимодействует с МКА М6D5, полученным к целому вирусу. Установлена аминокислотная последовательность этого пептида: E A R R L R T A A D F E G K. Данный пептид расположен в N-концевой области капсидного белка РvМ в позиции 21-34 и этот участок экспонирован на поверхности вириона и представляет собой иммунодоминантную область.

Впервые выделены две формы коклюшного токсина из одного производственного штамма *B. pertussis*. Эти формы отличаются друг от друга разной электрофоретической подвижностью субъединицы S1 при проведении электрофореза в ПААГ с ДСН. При восстановлении внутрипочечной -S-S- связи электрофоретическая подвижность субъединицы S1 одной из форм практически не меняется, однако электрофоретическая подвижность субъединицы S1 второй формы значительно уменьшается и почти сравнивается с подвижностью субъединицы S1 первой формы.

Найдено, что конъюгат полученный на основе синтетического N-концевого пептида DDPRATVYRYDSRPPED субъединицы S1 и сывороточного альбумина лошади активно реагирует с ПКА к коклюшному токсину. Это свидетельствует о том, что иммунодоминантной областью в N-концевом участке является сайт, входящий в последовательность 1-17 субъединицы S1.

Проведен сравнительный анализ антигенности субъединиц с использованием ПКА к целому токсину методом иммуоэлектроблоттинга.

Найдены закономерности, которые приводят к протеолизу нативной молекулы филаментозного гемагглютинина в зависимости от культивирования, сроков хранения препаратов, добавления ингибиторов протеаз и условий выделения белка.

Локализована антигенная детерминанта в районе аминокислотных остатков 1094-1102 полипептидной цепи ФГА, принимающая участие в адгезии бактериальных клеток на макрофагах. Для этого определения использован нативный ФГА, синтетический нонапептид TYGRGDPHQ и его конъюгаты с BSA и CA1.

Эпитопспецифические антитела исследованы с помощью иммуноаффинной хроматографии и иммуноферментным анализом.

Показана возможность получения конъюгатов гаптен-белок, пептид-белок, белок-белок с использованием 2-нитро-4-сульфопениловых эфиров моно- и дикарбоновых кислот.

Практическое значение работы. Разработаны способы выделения пептидов, представляющих поверхностные эпитопы РVХ, РVУ, РVМ и являющиеся иммунодоминантными областями. Эти пептиды и полученные их синтетические аналоги позволят усовершенствовать диагностические тест-системы идентификации этих вирусов в растениях.

Получены поликлональные антитела к РVХ, РVУ и РVМ, которые являются важным инструментом для иммунодиагностики вирусов в посадочном материале. Иммунологические методы, которые апробированы в данной диссертации могут быть внедрены в семеноводческих хозяйствах Украины.

Получены два вида мишинных моноклональных антител к коклюшному токсину *B. pertussis*. Определено, что каждая из гибридом продуцирует МКА, обладающие сродством к нативному коклюшному токсину с величиной константы связывания  $\sim 1.0 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ . С помощью этих МКА можно надежно определять токсин в биологических образцах, начиная с концентрации 0,5 мкг/мл. Выделенные поликлональные антитела к КТ и ФГА могут найти применение при создании иммунодиагностических тест-систем.

На основе пяти синтетических пептидов из каталитической субъединицы КТ и белков-носителей синтезированы иммуноконъюгаты, которые могут быть использованы при разработке синтетических пептидных вакцин против коклюша.

Получен высокопродуктивный токсигенный серовариант штамма *B. pertussis*. Выход высокоочищенного токсина с 1 л освобожденной от клеток среды культивирования этого штамма составляет  $2.1 \pm 0.28$  мг. Этот штамм защищен авторским свидетельством (АС СССР №1761795) и может применяться при получении коклюшного токсина.

Результаты этой работы отражены в производственном регламенте - "Инструкция по изготовлению и контролю коклюшного токсина, сухого". На базе ИБОНХ АН Украины и НИЛВС им. И.И. Мечникова РАМН внедрен в производство препарат коклюшного токсина, который реализуется в Украине и за ее пределами.

Локализация В-эпитопа в участке ФГА, отвечающего за связывание с CR-3 интегрином макрофагов, свидетельствует о возможности использования синтетического пептида, входящего в эту область, в качестве компонента синтетической вакцины против коклюша.

Предложен способ получения иммуноконъюгатов с помощью 2-нитро-4-сульфопениловых эфиров кислот, который может найти применение в технологии производства синтетических вакцин.

Апробация работы. Результаты исследований, изложенные в диссертации, докладывались и представлялись на V-VII Всесоюзных симпозиумах по химии белков и пептидов (Баку, 1980; Рига, 1983; Таллинн, 1987), I Всесоюзной конференции "Молекулярная структура бактериальных токсинов и генетический контроль их биосинтеза" (Москва, 1985), V-VI Украинских биохимических съездах (Ивано-Франковск, 1987; Киев, 1992), II Всесоюзной конференции "Бактериальные токсины" (Юрмала, Латвия, 1989), VII съезде Украинского микробиологического общества (Черновцы, 1989), I Всесоюзном иммунологическом съезде (Сочи, 1989), II-III Международных симпозиумах "Плюс-цепочечные РНК-вирусы" (Вена, Австрия, 1989; Клируотер, США, 1992), Международном симпозиуме "Основные достижения в вирусологии растений" (Еберсвальде, ГДР, 1989), VII СССР-ФРГ симпозиуме "Химия пептидов и белков" (Дилижан, Армения, 1989), Всесоюзном симпозиуме "Химия белков" (Тбилиси, 1990), VIII Международном конгрессе по вирусологии (Берлин, ФРГ, 1990), VI Всероссийском съезде микробиологов, эпидемиологов и паразитологов (Нижний Новгород, 1991), XII Украинском республиканском съезде микробиологов, эпидемиологов и паразитологов (Харьков, 1991), Международном симпозиуме "Вирусология, иммунология и общество" (Киев, 1991), II Россия-Израиль симпозиуме "Пептиды и белки" (Москва, 1992), IX Международном конгрессе по вирусологии (Глазго, Шотландия, 1993)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 48 работ, включая 2 авторских свидетельства СССР.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из Введения, обзора литературы, экспериментальной части (материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение в 5 главах), заключения, выводов, списка цитированной литературы, приложения.

Работа изложена на 275 страницах машинописного текста.

включает 53 рисунка, 16 таблиц. Список цитированной литературы включает 355 источников.

Отдельные фрагменты работы выполнены при участии Д.П.Грамы (Институт микробиологии и вирусологии АН Украины) - наработка вирусов; Л.Ярвекюльг (Институт химической и биологической физики АН Эстонии) - помощь при проведении радиоиммунанализа и флюороиммунанализа временного разрешения; Э.М.Кавуна (Институт биохимии АН Украины) - получение МКА к КТ и иммуноанализ синтетических пептидов ФГА; Л.А.Баратовой (МГУ), А.В.Шишкова (Институт химической физики, Москва), А.В.Ефимова (Институт белка, Пушкино) - мечение тритием капсидного белка РVХ и расчет его третичной структуры.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись: средневирулентный штамм РVХ, русский штамм РVМ, три штамма РVУ, коклюшный токсин и филаментозный гемагглютинин из штаммов №475 и №305 *B. pertussis*.

Моноклональные антитела к изучаемым вирусам были получены из Института химической и биологической физики АН Эстонии. МКА к коклюшному токсину нарабатывались в отделе молекулярной иммунологии Института биохимии им. А.В.Палладина АН Украины.

Пептиды из S1 субъединицы КТ, пептид из ФГА и пептид из капсидного белка РVУ были синтезированы в Институте биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова АН России Е.Макаровым и В.Абакумовым. Пептид последовательности 11-17 субъединицы S1 КТ и пептид IPDGDFF из капсидного белка РVХ были синтезированы в Институте биоорганической химии АН Украины А.Дыбенко и А.Гершковичем. Сорбент фенол-сефароза был получен А.Терентьевым в Институте молекулярной биологии и генетики АН Украины.

Эксперименты на животных проводились в соответствии с рекомендациями ВОЗ.

При выполнении диссертации использовали следующие (основные) методы исследования:

- анализ белков и пептидов электрофорезом в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (Laemmli, 1970; Swank и Munkers, 1971);
- иммуноэлектроблоттинг (Towbin et al. 1979);
- различные модификации твердофазного иммуноферментного анализа в полистироловых планшетах;

- радиоиммунологический анализ, в котором реакцию антиген-анти-тело определяли количественно при помощи связывания белка А меченого изотопом  $^{125}\text{I}$ ;
- флуороиммуноанализ временного разрешения с применением антител конъюгированных хелатом европия (Sinijarv et al. 1988);
- расщепление белков бромцианом (Steers, 1965), трипсином (Descalzi-Cancedda, 1984), протеиназой V8 из *St. aureus* (Aitken, 1984);
- определение аминокислотной последовательности белков и пептидов в "ручном" и автоматическом вариантах;
- фракционирование белков и пептидов гель-фильтрацией, ионообменной хроматографией, высокоэффективной жидкостной хроматографией в обращенной фазе;
- модификация остатков лизина цитраконовым ангидридом (Hospattakkar, 1984);
- иммуносафтинную хроматографию с применением BrCN-агарозы;
- получение конъюгатов пептид-белок с помощью различных бифункциональных реагентов;
- расчет профилей гидрофильности (Hopp, 1985), акрофильности (Hopp и Woods, 1981), гидрпатии (Kyte и Doolittle, 1982) белков
- расчет вторичной структуры белков (Chou и Fasman, 1974; Lim, 1974);
- компьютерный анализ структурно-функциональных особенностей исследуемых белков по их аминокислотным последовательностям (программы PC Gene и Genebee).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 1. ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КАПСИДНОГО БЕЛКА RVX

Для определения гомогенности капсидного белка RVX, выделенного соевым методом (LiCl) проводили электрофорез в ПААГ с ДСН и N-концевой анализ.

Анализ капсидного белка RVX показал наличие одной полосы, соответствующей белку с М.м. 27 кДа. Молекулярная масса белка, рассчитанная по первичной структуре его гена, составляет 25 кДа (Морозов и др., 1983). Известно, что белок RVX при проведении электрофореза в денатурирующих условиях ведет себя аномально. Такое поведение белка связано с большим содержанием остатков се-

рина и треонина в N-концевом участке, что приводит к меньшему связыванию с ДСН и определению завышенного значения М.м. белка.

N-концевой анализ, проведенный дансилхлоридным методом, показал отсутствие свободной  $\alpha$ -аминогруппы в исследуемом белке.

Таким образом с помощью электрофореза и N-концевого анализа было показано, что выделенный белок является гомогенным и пригоден для структурно-функциональных исследований.

С целью локализации антигенных детерминант в капсидном белке РVХ его расщепляли бромцианом.

Аминокислотная последовательность капсидного белка РVХ представлена на рисунке 1. Как видно из рисунка, белок РVХ содержит всего семь остатков метионина и, таким образом, в результате расщепления его бромцианом можно получить ограниченное число крупных фрагментов, что крайне важно для локализации в них антигенных детерминант. Кроме того бромциан обладает высокой селективностью и расщепляет только пептидную связь Met-X, поэтому первоначально для гидролиза белка был выбран именно этот реагент. После расщепления бромцианом в смеси полученных фрагментов дансилхлоридным методом были идентифицированы следующие N-концевые аминокислотные остатки:

Leu, Ile, Ala, Asp, Lys и Pro,

что соответствовало последовательностям Met-X первичной структуры гена капсидного белка РVХ (рис. 1).

Смесь бромциановых фрагментов фракционировали на сефадексе с-50 в 20% уксусной кислоте (рис.2). В результате гель-фильтрации были получены четыре фракции пептидной природы, в которых дансилхлоридным методом были определены следующие N-концевые аминокислотные остатки:

I фракция - Asp, Leu, Ile;

II фракция - Ala, Leu, Ile;

III фракция - Pro; . IV фракция - Lys.

"Непрямой" иммуноферментный анализ показал, что только фракция I дает специфическую реакцию с ПКА и МКА, и, следовательно, содержит антигенные детерминанты нативного белка. Так как наша цель - изучение антигенной структуры белка оболочки РVХ, в дальнейшем мы исследовали именно эту фракцию. Для дальнейшей очистки фракцию I хроматографировали на ионообменнике

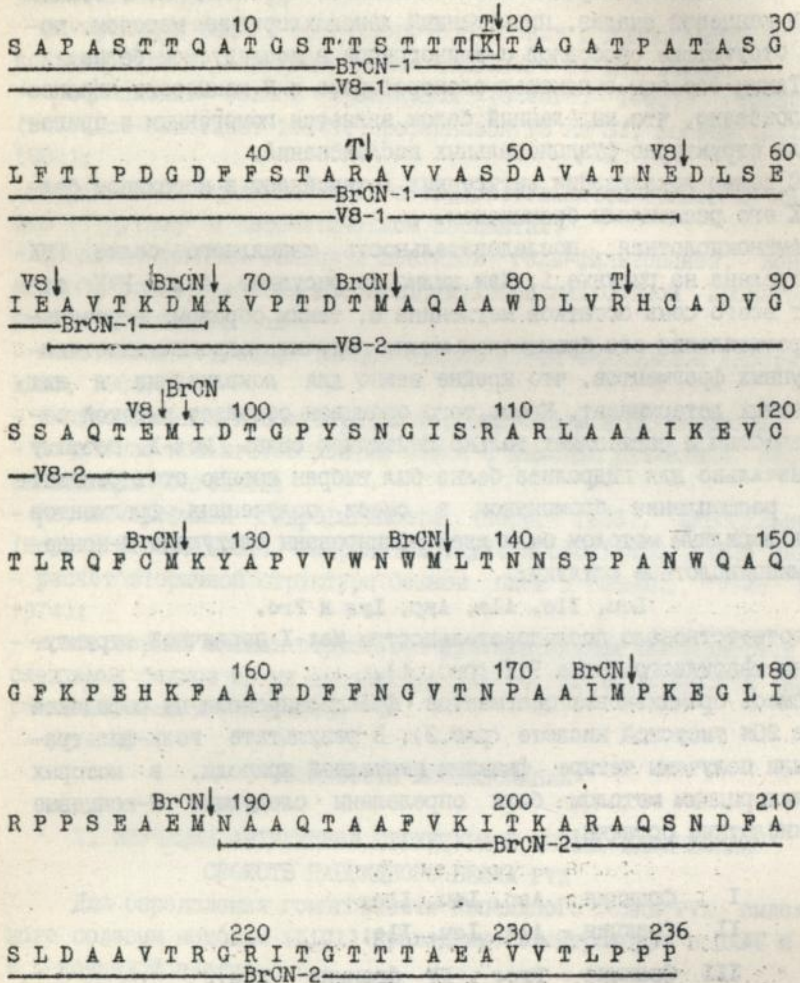


Рис. 1 Аминокислотная последовательность капсидного белка ХБК ( Морозов и др., 1983 )

Стрелками показаны атакуемые бромцианом, трипсином (Т) и протеазой из *St. aureus* (V8) пептидные связи. Прямыми линиями отмечены выделенные пептиды. В рамке остаток лизина, входящий в антигенную детерминанту.

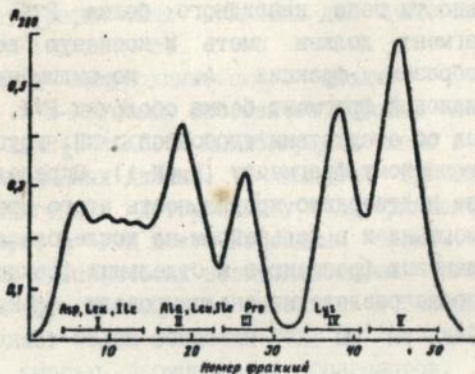


Рис. 2 Фракционирование фрагментов бромиданового расщепления капсидного белка РVХ на сефадексе G-50 в 20%  $\text{CH}_3\text{COOH}$

Колонка 2,8x45 см, скорость элюции 30 мл/ч, объем фракции - 3 мл

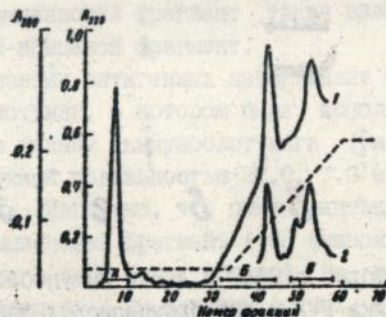


Рис. 3 Хроматография фракции I (рис. 2) на колонке с DEAE-Тоуоргар1-650

Колонка 1,6x12 см. Линейный градиент (---) 0,01-0,5 моль  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , рН 9,0. Объем фракции 3 мл. 1 - оптическая плотность при 220 нм, 2 - оптическая плотность при 280 нм

DEAE-Toyorearl-650 (рис. 3.). В результате хроматографического разделения были получены две фракции содержащие пептидный материал в гомогенном состоянии. Во фракции А в качестве N-концевой была идентифицирована аспарагиновая кислота, а во фракции Б не обнаружено свободной  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-группы. Исходя из данных о нуклеотидной последовательности гена капсидного белка РvX, С-концевой бромциановый фрагмент должен иметь N-концевую аспарагиновую кислоту. Таким образом, фракция А, по-видимому, содержит С-концевой бромциановый фрагмент белка оболочки РvX, а фракция Б, с учетом данных об отсутствии свободной  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-группы в белке, соответствует N-концевому фрагменту (BrCN-1). Определение аминокислотного состава подтвердило правильность этого предположения. Фракция В - негомогенна и в дальнейшем не исследовалась.

Смесь бромциановых фрагментов и отдельных фракций и пептидов, полученных после разделения анализировали электрофорезом в ПААГ с ДСН (рис. 4).

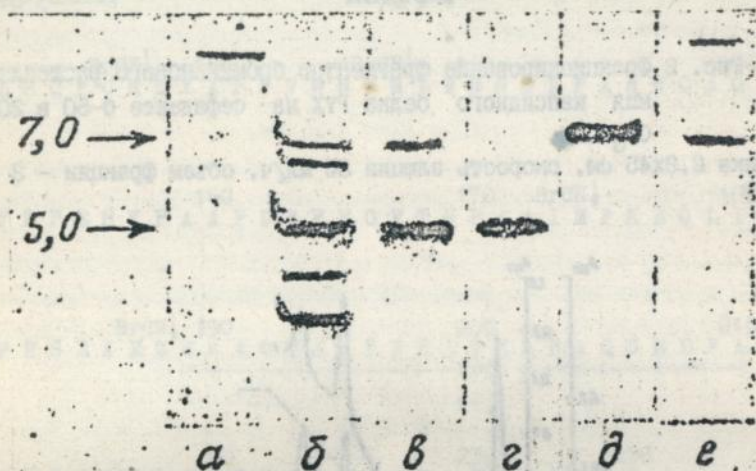


Рис. 4. Электрофорез в ПААГ с ДСН и иммуноблоттинг капсидного белка РvX и его бромциановых фрагментов  
а - капсидный белок РvX; б - смесь бромциановых фрагментов;  
в - фракция В ( рис. 2 ); г - фракция А ( рис. 3 );  
д - фракция Б ( рис. 3 ); е - иммуноблоттинг смеси бромциановых фрагментов и капсидного белка РvX.

Как видно из рисунка фракция I содержит, в основном, два крупных фрагмента М.м. около 7 и 5 кДа, соответственно. Это также свидетельствует о том, что указанная фракция содержит N- и C-концевые крупные фрагменты. Данные, представленные на рисунке 4 (г и д), свидетельствуют также о том, что в результате ионообменной хроматографии были получены два гомогенных бромциановых пептида (BrCN-1 и BrCN-2).

Результаты иммунохимического анализа RVX, его белка оболочки, N- и C-концевых фрагментов методом "непрямого" ИФА с ПКА и с МКА 21XB4, 21XD2 и 23XA5 представлены в таблице 1. Как видно из приведенных данных, N-концевой бромциановый фрагмент содержит антигенную детерминанту (детерминанты). Все три МКА взаимодействуют с RVX и его капсидным белком. Более того, МКА 21XD2 и 23XA5 специфически взаимодействуют также с N-концевым бромциановым фрагментом и со смесью N- и C-концевых фрагментов. МКА 21XB4 узнает белок оболочки RVX, но не дает специфической реакции со смесью бромциановых фрагментов. Возможно, что антигенная детерминанта узнаваемая МКА 21XB4 локализована на расщепленном участке капсидного белка.

Результаты "непрямого" радиоиммуноанализа подтверждают тот факт, что N-концевой бромциановый фрагмент капсидного белка RVX узнается МКА 21XD2 (Табл. 2). Таким образом, можно утверждать, что один или два эпитопа, узнаваемые этими МКА, локализованы в N-концевом участке капсидного белка RVX. Необходимо отметить, C-концевой бромциановый фрагмент также взаимодействует с ПКА, но слабее чем N-концевой фрагмент.

Для локализации антигенных детерминант мы применяли также иммуноэлектроблоттинг, в котором были использованы только МКА 21XD2. Согласно данным иммуноблоттинга (рис. 4,б) три полосы с электрофоретической подвижностью 27,0, 7,0 и 6,5 кДа дали реакцию с антителами. Известно, что помимо интактного белка только N-концевой бромциановый фрагмент (68 аминокислотных остатков) может находиться в этой зоне. Второй по величине, C-концевой бромциановый фрагмент (48 аминокислотных остатков) обладает большей подвижностью (рис. 4.5,г). При иммуноблоттинге гомогенного N-концевого бромцианового фрагмента с МКА наблюдается специфическое окрашивание (рис. 4,е). Однако, в ряде случаев при проведении электрофореза BrCN-1 давал две или три полосы. Наличие

Таблица 1

Сравнение антигенной активности РvX, капсидного белка РvX, N- и С-концевых бромциановых фрагментов капсидного белка методом ИФА

Антитело	А н т и г е н				
	РvX	Белок оболочки	Смесь N- и С-концевых фрагментов	N-концевой фрагмент	С-концевой фрагмент
21XB4	0,63	0,38	+	+	+
21XD2	0,54	0,46	0,35	0,42	0,19
23XA5	0,75	0,45	0,36	0,42	0,21
ПКА	0,97	0,79	0,69	0,75	0,41

Результаты представлены в единицах поглощения при длине волны 414 нм. +Взаимодействие МКА 21XB4 с N- и С-концевыми фрагментами белка оболочки РvX не являлось специфическим (наблюдалась лишь высокая фоновая реакция, 0,2 ед. оптической плотности, при разных концентрациях антигена), поэтому цифровые значения этих данных в таблице не приведены.

Таблица 2

Сравнение антигенной активности РvX, капсидного белка РvX, N- и С-концевых бромциановых фрагментов капсидного белка методом радиоиммуноанализа

Антитело	А н т и г е н				
	РvX	Белок оболочки	Смесь N- и С-концевых фрагментов	N-концевой фрагмент	С-концевой фрагмент
21XD2	3199	699	433	647	252
23XA5	3356	1106	304	863	139
ПКА	4820	1897	454	1254	392

Реакцию взаимодействия антиген - антитело определяли количественно при помощи <sup>125</sup>I белка А. В лунки плат вносили по 3,75 нКири (8000 имп/мин) меченого иодом белка А. Результаты радиоиммуноанализа представлены в имп/мин с вычитанием фонового значения (550 имп/мин), полученного при взаимодействии исследуемых АТ к РvX с серологически не родственными вирусом - ВТМ.

двух или более полос связано с обработкой материала перед нанесением на гель, а также с условиями проведения электрофореза. Так, при использовании концентрирующего геля было отмечено более одной полосы. Необычное поведение N-концевого фрагмента при электрофорезе можно объяснить аномальным связыванием с ДСН за счет присутствия в этом участке большого числа остатков сорина и треонина, что отмечалось выше. Не исключено, что аномальная подвижность белка и фрагмента BrCN-1 связана с различной степенью гликозилирования.

Данные, полученные "непрямым" ИФА и иммуноблоттингом с применением ПКА и МКА, свидетельствуют о наличии в N-концевом участке белка оболочки PVX по крайней мере одного эпитопа. Этот участок содержит большое число гидрофильных аминокислотных остатков. Известно, что антигенные детерминанты белков очень часто содержат именно гидрофильные остатки [ Lerner, 1981 ].

N-концевой бромциановый фрагмент ( BrCN-1 ) содержит два остатка лизина в позициях 19 и 66 и остаток аргинина в позиции 44 ( рис. 1 ). С целью получения пептидов, возможно включающих антигенные детерминанты, фрагмент расщепляли трипсином. Однако, при анализе смеси триптических пептидов дот- блоттингом и ИФА ( Табл. 3 ) с помощью МКА не было отмечено положительной реакции. Это свидетельствовало о том, что остатки лизина или аргинина входят в антигенную детерминанту или детерминанты, для которых специфичны используемые антитела. Для доказательства важности участия остатков лизина во фрагменте BrCN-1 при взаимодействии с МКА проводили его модификацию цитраконовым ангидридом. Известно, что цитраконовый ангидрид модифицирует  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-группы лизина и остаток приобретает отрицательный заряд. Цитраконалированный пептид не давал специфической реакции с МКА ( Табл. 3 ), однако, при снятии цитраконовой защиты была отмечена положительная реакция. Полученные результаты свидетельствовали о том, что в антигенную детерминанту или детерминанты, взаимодействующие с обоими МКА входит остаток лизина.

Так как фрагмент BrCN-1 содержит два остатка лизина, необходимо было установить, какой из этих остатков специфичен для МКА 21XD2, а какой для 23XA6, или оба МКА специфичны для одного и того же остатка лизина. С этой целью капсидный белок PVX расщепляли протеазой V8 из *St. aureus*. В результате расщепления протеазой V8 можно было ожидать получения двух крупных фраг-

Таблица 3

Сравнение антигенной активности белка оболочки РУХ и его фрагментов методом "непрямого" ИФА

АНТИГЕН							
АНТИ-	Белок	Триптичес-	Фрагмент	Модифи-	Пептид	Пептид	ВТМ
тело	болоч-	кий гидро-	BrCN-1	цирован-	v8-1	v8-2	
МКА	ки	лизат		ный			
		BrCN-1		BrCN-1			
21XD2	0,47	0,04	0,43	0,05	0,52	0,04	0,02
23XA5	0,46	0,04	0,44	0,06	0,50	0,03	0,03

Результаты представлены в единицах поглощения при длине волны 414 нм. В качестве контроля использовался белок оболочки ВТМ.

ментов, включающих остатки 1-56 и 64-96 (рис. 1). Первый из этих фрагментов содержит остаток лизина в позиции 19, а второй - в позиции 66 последовательности белка оболочки РУХ.

Продукт расщепления белка протеазой v8, фракционировали ВЭЖХ в обращенной фазе (рис 5) и полученные фракции анализировали "непрямым" методом ИФА. Из всех пептидных фракций, представленных на рисунке, только материал фракции 15 взаимодействовал с обоими МКА.

N-концевым анализом не было обнаружено свободной  $\alpha$ -амино-группы в материале данной фракции. Анализируя вышеизложенное, а также данные по аминокислотному составу полученного фрагмента, можно утверждать, что фракция 15 представляет собой гомогенный N-концевой пептид (v8 - 1) белка оболочки РУХ, включающий 56 аминокислотных остатков. Результаты иммуноанализа этого пептида представлены в таблице 3. Пептид v8-2 не взаимодействует ни с одним из используемых МКА (табл. 3), следовательно, не входит в состав соответствующих детерминант.

Таким образом, МКА 21XD2 и 23XA5 взаимодействуют с участком полипептидной цепи капсидного белка РУХ, включающим остаток лизина в позиции 19. Можно предположить, что:

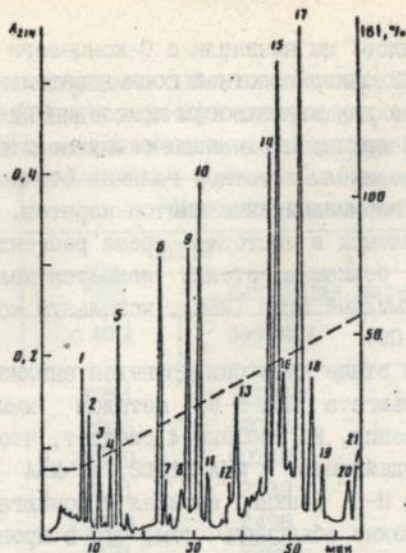
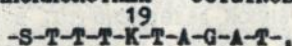


Рис. 5 Разделение пептидов, полученных в результате гидролиза капсидного белка РvX протеазой v8 из *St. aureus* с помощью ВЭЖХ в обращенной фазе

Состав подвижной фазы: А - 3% изопропиловый спирт, 0,1% ТФУ, 0,1% N-этилморфолин; В - 60% изопропиловый спирт, 0,1% ТФУ, 0,1% N-этилморфолин. ( --- ) - изменение концентрации буфера В.

- а) этим МКА соответствует одна общая детерминанта;
- б) имеются две перекрывающиеся антигенные детерминанты, в которые входит один и тот же остаток лизина.

По-видимому, для взаимодействия с МКА помимо положительного заряда на остатке лизина существенно также наличие большого числа гидроксиминнокислотных остатков в последовательности



которые могут образовывать водородные связи в активном центре антител.

С целью подтверждения результатов, полученных при иммуноанализе природных фрагментов капсидного белка РvX были синтезированы три пептида, включающие остаток лизина в позиции 19:

Т К Т А С (П-5)

Т Т Т К Т А С (П-7)

Т Т Т Т Т К Т А С (П-9)

Синтез пептидов мы начинали с С-концевого цистеина вместо глицина позиции 22 аминокислотной последовательности капсидного белка РУХ (рис. 1) для возможности присоединения синтезированных пептидов через SH-группу цистеина к белку носителю с учетом того, что боковые радикалы остатков глицина обычно вносят незначительный вклад во взаимодействие эпитоп-паратоп. Одним из наиболее широко применяемых в настоящее время реагентов для присоединения пептидов к белкам-носителям является малеинимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир (МБС), используя который мы получили конъюгат БСА--П9.

На следующем этапе нами был проведен анализ пептидов П-5, П-7, П-9 и конъюгата БСА-П-9 методом иммунофлюороанализа временного разрешения. Из таблицы 4 следует, что пептиды П-5, П-7 и П-9 не взаимодействуют с МКА 21XD2, а МКА 23XA5 реагирует только с пептидом П-9. Реакция антител с конъюгатом БСА--П-9 отсутствует. Это можно объяснить тем, что в процессе конъюгации конформация пептида претерпела изменения по сравнению с конформацией интактного пептида. Не исключено также, что во время конъюгации была экранирована  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-группа лизина, который, как ранее было показано, играет важную роль во взаимодействии с антителами. Результаты иммуноанализа свидетельствовали о том, что для взаимодействия МКА 23XA5 с синтезированными пептидами значительную роль играет длина пептида. Пептид П-9 имеет на два N-концевых остатка (Thr-Ser) больше, чем пептид П-7, оксигруппы которых, возможно, участвуют в образовании дополнительных водородных связей с паратопом МКА 23XA5.

Таким образом, иммунохимический анализ синтетического пептида П-9 подтвердил данные об участии остатка лизина в позиции 19 аминокислотной последовательности капсидного белка РУХ в формировании антигенной детерминанты, взаимодействующей с МКА, а также показал, что данный N-концевой участок экспонирован на поверхности вириона.

### 1.1. Третьевая планиграфия РУХ и моделирование трехмерной структуры капсидного белка РУХ.

Этот раздел работы выполнен совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной биологии и биорганической химии им.А.Н.Белозерского МГУ, Института химической физики и Института белка АН России и посвящен определению топографии капсидного белка РУХ в

Таблица 4

Антигенная активность (имп/сек) пептидов П-5, П-7, П-9 и конъюгата БСА--П-9 в методе иммунофлуороанализа временного разрешения с моноклональными антителами к РУХ

Антиген	Моноклональные антитела			
	23ХА5		21ХЛ2	
	Инкубация антигена			
	с МКА	без МКА	с МКА	без МКА
П-5	2351	2144	1979	1849
П-7	2095	2093	1909	1734
П-9	35589	10740	5082	4675
БСА--П-9	2161	2239	3075	2836
Белок РУХ	20099	2498	22566	2236
Буфер	2131	2390	2276	1898

вирусной частице с помощью термически активированных атомов трития. На основании этих результатов, данных по топографии капсидного белка РУХ с помощью МКА, теоретических расчетов вторичной и третичной структуры белка мы предлагаем модель структурной организации субъединицы капсидного белка в вирионе РУХ.

Капсидный белок РУХ может частично расщепляться протеазами сока растений и трипсином в N-концевой области и, иногда в С-концевой области, что показано на ряде вирусных препаратах. Экспериментально установлено, что интактная форма капсидного белка (Бм форма, медленнее движется при электрофорезе) расщепляется до продукта, который быстрее движется при электрофорезе (Бб форма). Форма Бб характеризуется отсутствием 19 - 25 аминокислотных остатков в N-концевой области. Аминокислотный анализ, N-концевое секвенирование и сравнение триптических пептидов ВЭЖХ в обращенной фазе Бм и Бб форм показало, что Бб форма капсидного белка РУХ короче на 19 и 21 остаток по сравнению Бм формой.

Ранее (Шишков с соавт. 1976) было показано, что при бомбардировке в вакууме горячими атомами трития пептидов и белков, происходит замещение водорода в С--Н-связях на тритий с образованием меченой материнской молекулы, причем вероятность реакции зависит как от химической природы остатка, так и от его

расположения в пространственной структуре. Малая величина пробега реакционноспособных атомов трития в конденсированной фазе ( $2 \cdot 10^{-8}$  А) обуславливает локализацию радиоактивной метки преимущественно в тонких поверхностных слоях мишени, что позволяет на основании данных о распределении трития получать сведения о пространственной структуре белков, а также о топографии белковых и нуклеопротеидных комплексов.

Бомбардировка двух типов вирусных частиц РVХ (содержащих Бм и Бб формы капсидного белка) термически активированными атомами трития и определения профиля доступности аминокислотных остатков в капсидном белке для тритиевой метки позволило нам сравнить топографию поверхности этих двух препаратов.

Для анализа внутримолекулярного распределения тритиевой метки в капсидном белке РVХ мы использовали фрагментацию меченого тритием белка трипсином с последующим аминокислотным анализом гомогенных пептидов и одновременным измерением радиоактивности каждого типа аминокислотного остатка. Для анализа капсидного белка РVХ гидролиз трипсином с последующим разделением пептидов ВЭЖХ, по-видимому, является оптимальным подходом. Мы думаем, что фрагментация белка на 18 пептидов (рис. 6) явилась успешной для сравнения основных различий в доступности тритиевой метки для двух типов частиц РVХ. Из рисунка 6 очевидно, что профили доступности для тритиевой метки частиц РVХ, содержащих Бм и Бб формы белков значительно отличаются. Пептиды Т1, Т2, Т3 и Т4 содержат 85% всей тритиевой метки интактного белка - Бм форма (рис 6. А). Интересно, что за исключением первых 19 или 21 аминокислотных остатков (Т1) доступность аминокислотных остатков С-концевой области формы Бб для тритиевой метки значительно увеличивается (рис. 6, В). Пептиды от Т9 до Т18 содержат около 13.6% общего количества тритиевой метки Бб формы капсидного белка и около 44.7% в случае Бм формы капсидного белка. С-концевой пептид Т18 Бб формы капсидного белка содержит 13.5% общей радиоактивности Бб белка, тогда как идентичный пептид Т18 в интактной Бм форме капсидного белка содержит только 1.6% тритиевой метки. Таким образом, данные по бомбардировке тритием интактных вирусных частиц показали, что С-концевой участок капсидного белка РVХ скрыт в вирусной частице. Однако удаление первых 19 или 21 аминокислотных остатков N-концевой области капсидного белка (форма Бб) приводит к конформационным изменениям капсидного белка и

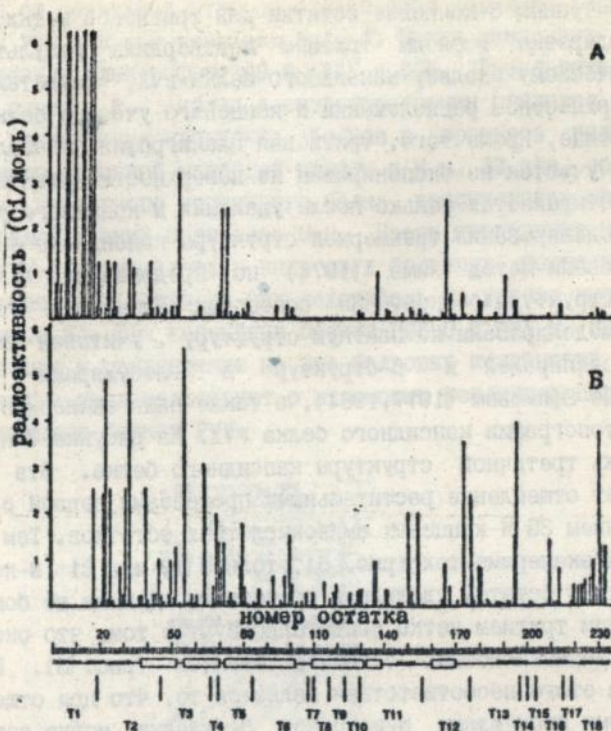


Рис. 6. Третьевая планиграфия RVX, содержащего две формы капсидного белка

A - Bm форма белка, B - Bb форма белка; T-1 - T18 триптические пептиды, (—) область α-спиралей, (~~~~) область β-структуры



Рис. 7. Схематическое изображение укладки полипептидной цепи капсидного белка RVX

α-спирали представлены цилиндрами, β-складки представлены стрелами; N и C - N- и C-концевые участки полипептидной цепи. Прономерованы некоторые позиции аминокислотных остатков

делает доступным С-концевые остатки для тритиевой метки. Данные по бомбардировке горячим тритием подтвердили результаты по иммунохимическому анализу капсидного белка PVX, свидетельствующие о поверхностном расположении N-концевого участка белка в вирусной частице. Кроме того, тритиевая планиграфия показала, что С-концевой участок не экспонирован на поверхности интактных частиц PVX и открывается только после удаления N-концевого участка.

Для моделирования трехмерной структуры капсидного белка PVX мы использовали метод Лима (1974) по предсказанию элементов вторичной структуры белков. На основании элементов вторичной структуры моделировали компактную структуру, учитывая принципы упаковки  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -структур в глобулярных белках, предложенные Ефимовым (1977, 1984), а также наши экспериментальные данные по топографии капсидного белка PVX. На рисунке 7 представлена модель третичной структуры капсидного белка. Эта модель предполагает отщепление растительными протеазами первой  $\beta$ -складки с удалением 35 N-концевых аминокислотных остатков. Тем не менее в наших экспериментах (рис. 6), только 19 или 21 N-концевой аминокислотный остаток удалялись протеазами. Данные по бомбардировке горячим тритием четко свидетельствуют о том, что около 35 N-концевых аминокислотных остатков метятся (рис. 6). Простым объяснением этого несоответствия является то, что при отщеплении растительными протеазами N-концевой  $\beta$ -складки могут возникать стерические препятствия, тогда как очень маленькие атомы трития способны проникать и метить этот участок. Предсказанная молекулярная модель капсидного белка в PVX (рис. 7) соответствует экспериментальным данным, полученным иммунохимическим анализом и тритиевой планиграфией.

## 2. ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ КАПСИДНЫХ БЕЛКОВ ШТАММОВ PVY И КАПСИДНОГО БЕЛКА PVM

Основным представителем вирусов потигруппы является PVY. В 1986 году была установлена первичная структура капсидного белка одного из штаммов PVY, включающая 267 аминокислотных остатков (Shukla *et al.*, 1986).

Наши исследования были проведены на трех штаммах PVY: PVY-0 (обычный - отличается суровыми симптомами на картофеле), PVY-H (некротический - вызывает суровый некроз жилок табака) и PVY-C

( отличается от остальных штаммов отсутствием передачи характерным вектором *RVU - Myzus persicae* Sulz ). Белки указанных штаммов анализировали электрофорезом в ПААГ с ДСН. Результаты представлены на рисунке 8. Анализ электрофореграммы свидетельствует о частичном расщеплении капсидных белков в процессе выделения вирусов. Помимо основной мажорной полосы с М.м. 32 кДа, соответствующей М.м. интактного капсидного белка, присутствует несколько полос с более низким значением М.м. Часть препаратов капсидного белка *RVU-C* проявлялась в виде двух белковых полос в эквимолярном соотношении, одна из них находилась на уровне интактного белка (рис.8,3). Для капсидных белков *RVU-O* и *RVU-H* была отмечена тенденция к расщеплению на два белковых компонента (рис. 1-2). Эти данные свидетельствуют о штаммовых различиях первичных структур капсидных белков *RVU*.



Рис. 8. Электрофорез в ПААГ с ДСН капсидных белков трех штаммов *RVU*:

1 - *RVU-O*, 2 - *RVU-H*, 3 - *RVU-C*, 4 - белки маркеры: фосфорилаза (94 кДа), БСА (67 кДа), овальбумин (43 кДа, карбангидраза (30 кДа), ингибитор трипсина (20 кДа

С целью сравнения антигенных свойств штаммов *RVU-O*, *RVU-H* и *RVU-C* был проведен иммуноблоттинг с ПКА и МКА. Для анализа использовали три ПКА, полученные к каждому из исследуемых штаммов. Все белковые полосы *RVU-O* и *RVU-C* в равной степени реагировали со всеми антителами (рис.9.). Как видно из рис.9-б,д,з интактный капсидный белок *RVU-H* в иммуноблоттинге реагировал с ПКА, полученными к каждому из трех штаммов, тогда как белковая полоса с М.м. приблизительно 30 кДа не давала реакции ни с одним из ПКА, в том числе полученным к *RVU-H* (рис. 9-д). Это, по-види-

тому, указывает на отсутствие в данном белковом компоненте иммунодоминантных областей. Отметим, что высокоактивная иммунодоминантная область во всех белках исследуемых штаммов выявлялась при иммуноблоттинге в зоне полипептидов М.м. 12-14 кДа и имела высокую степень антигенного родства с антителами. Мы предполагаем, что это полипептиды, представляющие N- и C-концевые фрагменты капсидных белков со штаммоспецифичными эпитопами. Эти данные соответствуют результатам, полученным для других потивирусов (Shukla et al., 1988).

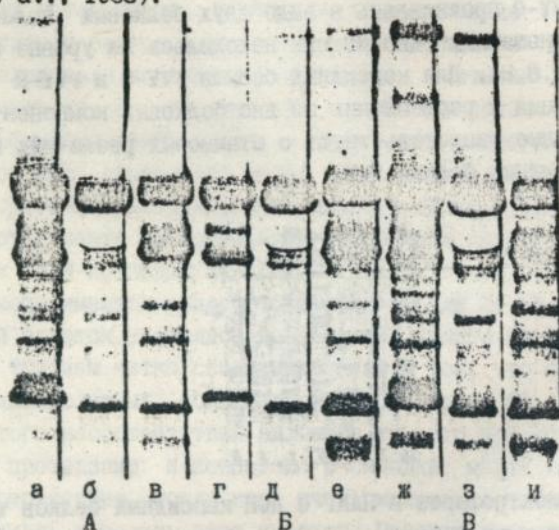


Рис. 9 Иммуноблоттинг капсидных белков штаммов РVУ с поликлональными антителами: А - ПКА к РVУ-О; Б - ПКА к РVУ-Н; В - ПКА к РVУ-С; а,г,ж - белок РVУ-О; б,д,з - белок РVУ-Н; в,е,и - белок РVУ-С

Результаты с использованием в иммуноблоттинге МКА У306 и У4в1 подтвердили данные с ПКА, но в этом эксперименте не было отмечено реакций с полипептидами небольшой М.м. Это говорит о направленности применяемых МКА на общие эпитопы коровой, более устойчивой части капсидных белков штаммов РVУ.

Ограниченный протеолиз трипсином потивирусов отщепляет N- и C-концевые участки и оставляет трипсиноустойчивую (коровую) часть капсидного белка с группоспецифичными эпитопами (Shukla et al., 1988). С целью локализации поверхностных эпитопов в РVУ-Н

вирус подвергали ограниченному протеолизу трипсином.

После проведения протеолиза коровие вирусные частицы удаляли ультрацентрифугированием при 142000 g, а супернатант анализировали ВЭЖХ в обращенной фазе (рис.10.). Полученные фракции лиофилизировали и детектировали методом флуороанализа временного разрешения с использованием МКА УЗС6 и У20, полученным к РГУ-Н.

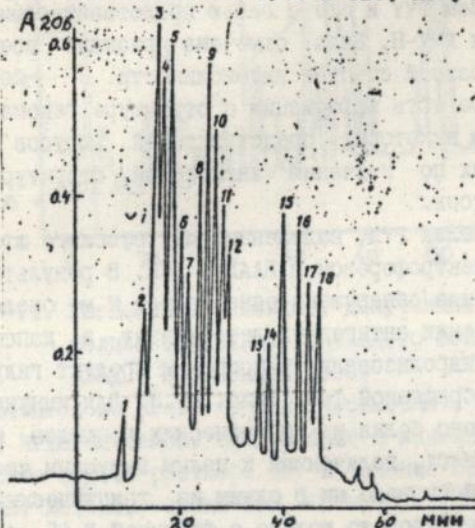


Рис. 10. Разделение пептидов, полученных в результате ограниченного протеолиза трипсином РГУ-Н с помощью ВЭЖХ в обращенной фазе.

Колонка С18 (218 ТР, 5 мкм, 4,6х260 мм, Zorbax ODS), соединенная с Du PONT 8900 HPLC-системой. Элюирование в линейном градиенте 0-75% ацетонитрила в 0,1%-ном растворе ТФУ в течение 30 мин. при скорости 1 мл/мин. Детектирование при длине волны 220 нм.

МКА У20 реагировало только с интактными капсидными белками штаммов РГУ, но не взаимодействовало с другими потивирусами, а также с деградированными капсидными белками у которых отсутствовали N- и (или) С-концевые участки. Мы заключили, что МКА У20 узнает вирусспецифический эпитоп в капсидном белке РГУ.

Из 18 триптических пептидов полученных при проведении ВЭЖХ (рис.10.), только пептид № 17 давал сильную реакцию с МКА УЗС6. Была определена аминокислотная последовательность этого пептида:

Y A F D F Y E V T S R

Эта последовательность соответствует позиции 198-208 полипептидной цепи исследуемого капсидного белка. Гомологичная последовательность имеется еще в 17 капсидных белках вирусов потигруппы. Таким образом эта последовательность является группоспецифичным эпитопом, экспонированным на поверхности вирионов потивирусов. Эти результаты нашли подтверждение при постановке иммуоблоттинга с тремя штаммами RVU и еще с семью представителями вирусов потигруппы с ПКА к RVU-Н. Была отмечена реакция всех капсидных белков, хотя и разной степени интенсивности.

В литературе есть информация о структуре генома и сравнении капсидных белков некоторых представителей вирусов карлагруппы, однако нет данных по изучению антигенной структуры капсидных белков этих вирусов.

Капсидный белок RVU, выделенный из русского штамма вируса анализировали электрофорезом в ПААГ с ДСН. В результате электрофореза на геле была обнаружена одна полоса М.м. около 36 кДа.

Для локализации антигенных детерминант в капсидном белке RVU, последний гидролизовали трипсином и продукт гидролиза подвергали ВЭЖХ в обращенной фазе (рис. 11.). Для иммунохимического анализа капсидного белка и триптических пептидов использовали два МКА: М6D5 и М4С1, полученных к целым вирусным частицам. МКА М4С1 не взаимодействовало ни с одним из триптических пептидов. МКА М6D5 взаимодействовало только с фракцией № 15 (рис.11.) при применении флуороиммуноанализа временного разрешения (табл. 5.).

Определение аминокислотной последовательности этой фракции показало, что она представляет собой тетрадекапептид:

**Е А R P L P T A A D F E S K (Т-15)**

Эта последовательность занимает позицию 21-34 полипептидной цепи капсидного белка RVU.

Таким образом иммунохимический анализ пептида Т-15 показал, что N-концевой участок капсидного белка RVU экспонирован на поверхности вириона и представляет собой иммунодоминантную область. Выше мы показали, что N-концевая область капсидного белка RVU также экспонирована на поверхности вируса. В литературе отмечалось значительное подобие в геномной организации и аминокислотной последовательности капсидных белков различных вирусов карла и потексгрупп. Результаты по иммунохимическому анализу капсидного белка RVU, представленные нами, подтверждают общность молекулярной организации вирусов потекс- и карлагрупп.

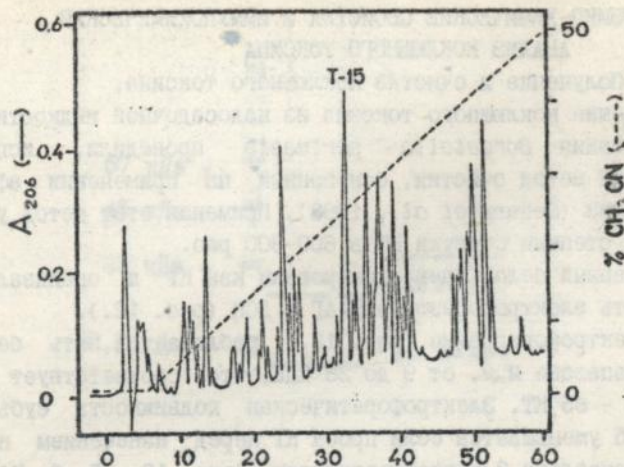


Рис. 11. Разделение пептидов, полученных в результате гидролиза трипсином капсидного белка РУМ с помощью ВЭЖХ в обращенной фазе.

Колонка LiChrosorb RP-18 (5 мкм, 4,6x250мм), соединенная с Pharmacia-LKB HPLC-системой. Элюирование в линейном градиенте 2-50% ацетонитрила в 0,1% растворе ТФУ в течение 60 мин при скорости 1,0 мл/мин. Детектирование при 206 нм.

Таблица 5

Антигенная активность РУМ, капсидного белка РУМ и его триптического пептида Т-15 в методе флуороиммуноанализа временного разрешения с применением МКА. Значения даны в ИМП/сек.

Антиген	Моноклональные антитела			
	М6D5		М4С1	
	МКА+	МКА-	МКА+	МКА-
РУМ	109908	2453	27944	2508
капсидный белок РУМ	77910	5686	21495	2087
пептид Т-15	31687	2126	5308	1897
РАМУ	1819	1800	1544	1418

МКА+ антигены инкубировали с МКА, МКА- антигены инкубировали без МКА, РАМУ - вирус аукуба мозаики картофеля

### 3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОКЛЮШНОГО ТОКСИНА

#### 3.1. Получение и очистка коклюшного токсина.

Выделение коклюшного токсина из надосадочной жидкости среды культивирования *Bordetella pertussis* проводили, используя двустадийный метод очистки, основанный на применении аффинной хроматографии (Sekura et al., 1933). Применяя этот метод удается достигнуть степени очистки КТ в 600-800 раз.

Полученный белок идентифицировали как КТ и оценивали его гомогенность электрофорезом в ПААГ с ДСН (рис. 12.).

На электрофореграмме (рис. 12.) наблюдается пять белковых полос в диапазоне М.м. от 9 до 28 кДа, что соответствует субъединицам S1 - S5 КТ. Электрофоретическая подвижность субъединиц S1, S3 и S5 уменьшается если проба КТ перед нанесением на гель была восстановлена 2-меркаптоэтанолом (рис. 12 - 5, 6, 7), что свидетельствует о наличии в этих субъединицах внутрицепочечных дисульфидных связей.

Ферментативная и биологическая активность полученного нами КТ изучалась в НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова АН России и Институте химической и биологической физики АН Эстонии.

Цитопатогенное действие КТ на культуру клеток яичника китайского хомячка определялась в дозах от 63 до 78 мг/мл; лейкоцитозстимулирующее и гистаминсенсibiliзирующее действие при внутрибрюшинном введении белым мышам соответствовала дозам 0,3 - 0,7 мкг; АДФ-рибозилтрансферазная активность варьировала в пределах 55-120 фемтомоль мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup>. Полученные результаты свидетельствовали о том, что по своим свойствам полученный нами КТ не уступает аналогичным образцам токсина, которые выпускаются ведущими фирмами мира (например, "Sigma", США).

Совместно с НИИВС им. И.И. Мечникова было проведено изучение уровня продукции коклюшных антигенов (в первую очередь КТ и ФГА) разными штаммами и вариантами штаммов *B. pertussis*. В результате этих исследований был получен более эффективный серовариант производственного штамма - продуцент КТ.

На основе примененного нами метода выделения КТ совместно с НИИВС им. И.И. Мечникова был разработан производственный регламент и налажен выпуск коклюшного токсина, как коммерческого пре-

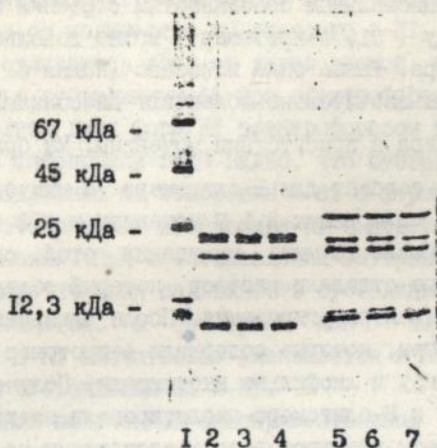


Рис. 12 Электрофорез в ПААГ с ДСН образцов очищенного КТ. 1 - маркерные белки; 2 - 4 - образцы КТ без восстановления; 5 - 7 восстановленные образцы КТ. Количество белка в каждой пробе - 20 мкг.



Рис. 13 Электрофорез в ПААГ с ДСН А-протомера и В-олигомера КТ. 1 - образец КТ; 2 - А-протомер (субъединица S1), 3 - В-олигомер.

парата для научных исследований.

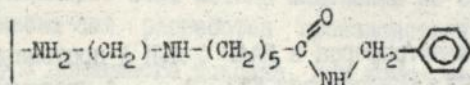
Благодаря функциональным особенностям строения КТ его активаторную субъединицу ( S1, А-протомер ) можно довольно легко отделить от В-олигомера. Ранее было показано (Burns et al., 1987), что нуклеотидфосфаты значительно облегчают диссоциацию субъединицы S1 от В-олигомера в присутствии мочевины. Мы брали фетуинсефарозу (ФетС) как сорбент для В-олигомера и инкубировали ее в буферном растворе , содержащем 2,1 М мочевины и АТФ в концентрации 100 мкмоль/л. После 15 мин. инкубации этой суспензии при комнатной температуре отделяли раствор, который содержал А-протомер от ФетС путем центрифугирования. После элюирования В-олигомера с ФетС растворы, которые содержали А-протомер и В-олигомер подвергали диализу и лиофильно высушивали. Полученные образцы субъединицы S1 и В-олигомера анализировали электрофорезом в ПААГ с ДСН. Результаты электрофореза представлены на рисунке 13. На рисунке видно, что с помощью предложенного метода удается в значительной степени разделить А-протомер и В-олигомер

Выделение отдельных функциональных частей КТ имеет значение при проведении биохимических, иммунохимических исследований с помощью КТ и структурно-функционального изучения самого КТ. Кроме того, разделение КТ на отдельные субъединицы или функционально различные части имеет важное значение при разработке субъединичных вакцин с использованием КТ.

### 3.2. Выделение двух форм коклюшного токсина из одного производственного штамма *B. pertussis*.

Из надосадочного раствора среды культивирования производственного штамма 475 *B. pertussis*, который был получен в НИИВС им. И.И.Мечникова, нами были получены две формы токсина.

После выделения формы КТ по методу описанному выше, раствор который содержал белки не сорбированные на фетуинсефарозе, высаживали сульфатом аммония. Форму - выделенную обычной процедурой мы обозначили  $\sigma$ -КТ. Белки, высаженные сульфатом аммония, несколько раз экстрагировали из осадка буферным раствором и начили на колонку, которая была наполнена сорбентом - аналогом фенилсефарозы:



В результате эликирования с этого сорбента мы получили вторую форму, обозначенную м-КТ. Количество м-КТ составляло приблизительно половину от количества полученного б-КТ.

Формы КТ отличаются друг от друга разной электрофоретической подвижностью субъединицы S1 при электрофорезе в ПААГ с ДСН. Результаты анализа двух форм КТ электрофорезом представлены на рисунке 14. На фотографии геля видно, что субъединица S1 м-формы КТ двигается медленнее по отношению к S1 б-формы КТ, причем наиболее заметна эта разница в образцах КТ с невозстановленными дисульфидными связями. При восстановлении внутрипечечной -S-S-связи электрофоретическая подвижность субъединицы S1 м-КТ практически не изменяется, в то время как электрофоретическая подвижность S1 б-КТ значительно уменьшается и почти сравнивается с подвижностью субъединицы S1 м-КТ.

На основании полученных экспериментальных результатов и компьютерного анализа структурно-функциональных особенностей субъединицы S1 КТ, мы предположили, что две различные формы КТ соответствуют двум аминокислотным последовательностям, которые известны по литературным данным для субъединицы S1 (Nicosia et al., 1986; Locht и Keith, 1986). Следует отметить, что в обоих последовательностях в составе S1 есть только два остатка цистеина, то есть дисульфидная связь может образоваться только между ними. Вероятно, форма б-КТ соответствует последовательности,

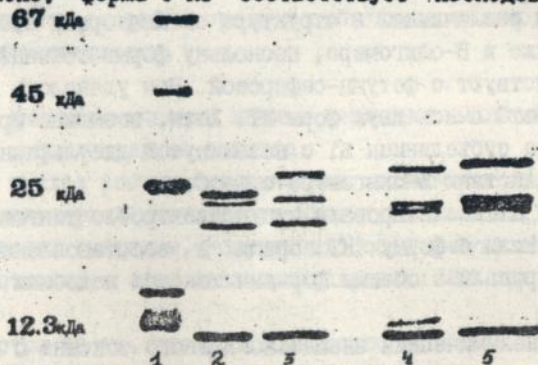


Рис. 14 Электрофорез в ПААГ с ДСН двух форм КТ.

1 - маркерные белки; 2 - б-КТ без восстановления; 3 - м-КТ без восстановления; 4 - б-КТ, восстановленная 2-меркаптоэтанолом; 5 - м-КТ, восстановленная форма.

представленной в работе (Nicosia et al., 1986), поскольку токсин для своих исследований авторы получали путем очистки на фетуин-сефарозе, а взаимное расположение субъединиц при электрофорезе такое же как у формы б-КТ. Форма м-КТ, по нашим предположениям, соответствует сиквенсу представленному в работе (Locht и Keith, 1986). Это предположение, с учетом результатов компьютерного анализа свойств аминокислотных последовательностей субъединицы S1, позволяет объяснить разницу в электрофоретической подвижности ее в двух формах КТ. В субъединице S1 б-КТ может образовываться внутрицепочечная дисульфидная связь, что подтверждается результатами электрофореза в ПААГ с ДСН образцов б-КТ без восстановления и восстановленных 2-меркаптоэтанолом. В субъединице S1 м-КТ внутрицепочечная дисульфидная связь, по-видимому, по той или иной причине не образуется, так как ее электрофоретическая подвижность без восстановления почти совпадает с электрофоретической подвижностью субъединицы S1 б-КТ после восстановления, а также не меняется при восстановлении 2-меркаптоэтанолом. Одной из причин этого может быть  $\beta$ -поворот полипептидной цепи вблизи Cys 200 (201), который предсказывается компьютерной программой для сиквенса S1a, но не для сиквенса S1б. Если поворот полипептидной цепи в этом участке действительно происходит, -S-S- связь в м-КТ может не образовываться вследствие стерических препятствий. Не исключено, что различия между двумя формами КТ не ограничиваются различиями в структуре активаторной субъединицы, а касаются также и В-олигомера, поскольку формы токсина по-разному взаимодействуют с фетуин-сефарозой. Нам удавалось разделять на колонке с ФетС смесь двух форм КТ. Хотя, возможно пространственное строение субъединицы S1 с незамкнутой дисульфидной связью мешает взаимодействию В-олигомера с ФетС.

Две формы КТ анализировали иммуноэлектроблоттингом с применением ПКА. Если б-форму КТ брали в восстановленном виде, антитела реагировали с обоими формами токсина подобным образом.

### 3.3. Иммунохимический анализ коклюшного токсина с помощью поликлональных антител

Способность субъединиц КТ взаимодействовать с ПКА исследовали с помощью иммуноэлектроблоттинга. С антителами реагировали главным образом первые три субъединицы КТ: S1, S2 и S3.

Результаты реакции с антителами невосстановленного КТ показывают, что наиболее интенсивно с АТ реагирует субъединица S2, несколько слабее субъединица S3 и в незначительной степени субъединица S1. При восстановлении внутрицелочечных дисульфидных связей токсина картина меняется: способность субъединиц S2 и S3 распознаваться АТ значительно уменьшается, в то время как субъединицы S1 наоборот значительно увеличивается.

Важным результатом этих экспериментов является то, что наибольшей иммуногенностью характеризуются функционально наиболее важные субъединицы - S1, S2, и S3. Этот факт безусловно необходимо учитывать при разработке субъединичных вакцин против коклюша. Субъединица S1 функционально активна только после восстановления дисульфидной связи и проявляет ферментативную активность если -S-S- замкнута. Кроме того известно, что наиболее антигенные сайты субъединицы S1 расположены рядом или даже перекрываются с сайтами, которые отвечают за ферментативную активность этой субъединицы. С этой точки зрения становится понятным значительное повышение способности активаторной субъединицы КТ взаимодействовать с ПКА при восстановлении дисульфидной связи. Субъединицы S2 и S3 наоборот выполняют свои функции - связываются с углеводами мембран - в интактном состоянии, то есть с невосстановленными дисульфидными связями. Бполне вероятно, что их нативная конформация отвечает максимальной иммуногенности и наоборот, при восстановлении -S-S- связей и нарушении конформации способность второй и третьей субъединиц взаимодействовать с антителами уменьшается.

#### 3.4. Иммунохимический анализ коклюшного токсина с помощью моноклональных антител.

Этот раздел работы был выполнен совместно с сотрудниками отдела молекулярной иммунологии Института биохимии АН Украины.

Из многих гибридом, полученных после иммунизации мышей коклюшным анатоксином стабильно продуцировали МКА два клона: I-5с и II-5с.

Несмотря на то, что КТ свойственно значительное сродство к иммуноглобулинам, МКА другой специфичности, а также Ig сыворотки крови неиммунизированных мышей с КТ взаимодействуют в незначительной степени. МКА I-5с и II-5с в "непрямом" варианте ИФА не давали перекрестных реакций с контрольными белковыми антигенами:

сывороточным альбумином человека (САЛ), цитохромом С и ФГА из *B. pertussis*. Высокая специфичность полученных антител подтверждается также данными конкурентного ИФА: КТ эффективно тормозил связывание антител с сорбированным антигеном, тогда как БСА не влиял на взаимодействие МКА с КТ.

Для определения эпитопной специфичности аффинноочищенные МКА были биотинилированы по аминогруппам с помощью N-оксисулфинимидного эфира биотина. Как показали результаты ИФА, биотинилирование не задело активных центров антител и они сохранили свою активность. Было продемонстрировано, что биотинилированные антитела успешно взаимодействуют с токсином только в том случае, когда они принадлежат разным клонам. Оба контроля дали отрицательный результат. Таким образом применение МКА I-5с и II-5с клонов позволяет создать систему детекции коклюшного токсина.

Чувствительность анализа обеспечивается сродством антител к антигену. Аффинность антител была определена по результатам титрования МКА на КТ в непрямом варианте ИФА. По расчетам она составила для I-5с  $K_{об} = 1,2 \times 10^8$  моль<sup>-1</sup>, а для II-5с  $K_{об} = 1,1 \times 10^8$  моль<sup>-1</sup>.

Для нахождения чувствительности определения КТ применяли сэндвич-анализ ИФА, в котором верхние и нижние МКА принадлежали к разным клонам. Растворка антигена показала, что КТ может надежно определяться, начиная с концентрации 50 нг/мл.

Таким образом, моноклональные антитела I-5с и II-5с, которым свойственна специфичность к различным эпитопам коклюшного токсина, могут применяться для его определения в биологических образцах или для получения токсина с помощью аффинной хроматографии.

### 3.5. Получение и иммуноанализ конъюгатов синтетические пептиды - носитель

Три синтетических пептида (участки 1-17, 4-17 и 7-17 S1 КТ)

V Y R Y D S R P P E C ( п7-17 )

P A T V Y R Y D S R P P E C ( п4-17 )

D D P P A T V Y R Y D S R P P E C ( п1-17 ) .

1

17

были конъюгированы с сывороточным альбумином лошади. Синтез пептидов начинали с C-концевого Суз. Конъюгацию осуществляли с помощью МВС. Четвертый пептид (участок 11-17 S1 КТ):

D S R P P E D ( п11-17 ),  
11 17

и пятый пептид (участок 169-187 S1 КТ):

Q Q T R A N P N P Y T S R R S V A S (п169-187 )  
169 187

конъюгировали с БСА глутаровым альдегидом.

Для всех конъюгатов был сделан аминокислотный анализ и, основываясь на его результатах, рассчитана эпитопная плотность каждого конъюгата. Эпитопная плотность составляла для всех конъюгатов в среднем от 15 до 30 молекул пептида на одну молекулу белка носителя.

Конъюгатом п11-17 - БСА иммунизировали кроликов и получали ПКА. Методом твердофазного ИФА было определено, что минимальная концентрация антител, которые реагируют с конъюгатом пептид-БСА, составляет 20 мкг/мл. При рабочей концентрации антител 100 мкг/мл чувствительность метода составляла 8 нг конъюгата пептид-БСА.

ИФА и дот-блоттингом было показано, что АТ против этого конъюгата совсем не реагируют с БСА и очень слабо реагируют с нативным коклюшным токсином. Поскольку ПКА полученные к КТ не взаимодействовали также с конъюгатом п11-17 - БСА ни в ИФА ни в дот-блоттинге, можно заключить, что участок 11 - 17 субъединицы S1 КТ не является антигенной детерминантой.

Анализ конъюгатов синтетические пептиды - САЛ ( соответственно, п1-17 - САЛ, п4-17 - САЛ и п7-17 САЛ ) проводили с помощью ИФА в "непрямом" варианте. ПКА к КТ достаточно активно реагировали с конъюгатом п1-17 - САЛ, наоборот реакция ПКА с конъюгатом п4-17 - САЛ и особенно п7-17 - САЛ значительно слабее. Этими результатами было подтверждено, что иммунодоминантной областью в N-концевом участке субъединицы S1 является сайт 1 - 17, в то время как более короткие участки не стимулируют выработку антител. Не исключено, что для выработки антител важными являются четыре N-концевых аминокислотных остатка. Конъюгат п169-187 - БСА также взаимодействует с ПКА, полученными к КТ.

Участки КТ, которые были определены как антигенные в этих экспериментах, могут быть использованы в дальнейших исследованиях при разработке синтетических вакцин против коклюша.

#### 4. ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ФИЛАМЕНТОЗНОГО ГЕМАГГЛЮТИНИНА ИЗ *B. pertussis*.

Вторым наиболее перспективным компонентом для создания бесклеточных и синтетических вакцин против коклюша является филаментозный гемагглютинин (ФГА).

Для выделения ФГА применяли сорбент - бензиламид-ди-ε-аминокапроил сефарозу. Структурно и функционально этот сорбент подобен известной фенил-сефарозе, однако имеет более длинную углеводную цепочку за счет чего бензольное кольцо стерически более доступно для взаимодействия с большими по размеру молекулами ФГА. Достаточно прочное взаимодействие белка с этим сорбентом позволило нам получить чистые препараты ФГА. С сорбентом связывалось от 60 до 90% ФГА. Максимальное количество белка, полученное этим способом составляло 2 мг белка на литр супернатанта культуральной среды. Формула сорбента представлена в разделе 3.2.

Препараты ФГА, полученные указанным выше способом из разных штаммов *B. pertussis*, содержали несколько компонентов, которые мигрировали при электрофорезе в ПААГ с ДСН как гетерогенная фракция полипептидов с М.м. от 60 до 220 кДа. Степень деградации интактного ФГА М.м. 220 кДа практически не зависела от времени культивирования, однако в значительной степени зависела от условий культивирования и способов выделения белка.

Были подобраны условия, при которых получали интактный ФГА. В трехсуточной культуре штамма 305, который был культивирован на полусинтетической среде, ФГА накапливался в меньших количествах по сравнению со штаммом 475. Препараты ФГА, которые были выделены с 3-х или 5-ти суточных культур этого штамма, показали, при электрофорезе в ПААГ как и препараты, которые были получены из штамма 475 (п/с) - одну основную полосу М.м. 220 кДа. При культивировании штамма 305 в течение 5-ти суток на синтетической среде очищенные препараты ФГА были идентичны препаратам штамма 475 (с/с), но выход по белку был в 2-3 раза ниже.

При хранении очищенных препаратов ФГА, которые были получены из штаммов 305 и 475, в течение трех месяцев в 0.01 М натрий-фосфатном буфере pH 7.4, который содержал 0.14 М NaCl при температуре 4°C наблюдалась типичная картина гидролиза белка. Это подтверждалось увеличением на электрофореграммах белковых полос, что соответствовали фрагментам с М.м. 60, 75, 98 и 125 кДа. Хра-

нение ФГА при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$  или добавление в раствор PMSF в концентрации 1 мМ предотвращало протеолиз.

Известно, что последовательность Arg-Gly-Asp участвует в адгезии целого ряда белков с рецепторами цитоплазматических мембран. ФГА - адгезивный фактор, участвующий в прикреплении *V. pertussis* к мембранам макрофагов и клеток эпителия трахеи. При этом он распознает на цитоплазматических мембранах макрофагов два класса молекул: CR3-интегрин и галактозосодержащие гликолипиды. Найдено, что ФГА взаимодействует с CR3-интегрином через участок, содержащий характерный Arg-Gly-Asp-сайт, который находится в районе остатков 1097-1099 молекулы ФГА (Reiman et al. 1990). Мы анализировали антигенные свойства RGD-содержащего фрагмента ФГА с целью выяснения его перспективности в качестве компонента синтетической вакцины против коклюша.

Кроме ФГА в качестве антигенов для иммунизации кроликов использовали синтетический пептид TVGRGDPHQ (последовательность 1094 - 1102 ФГА), а также его конъюгаты с БСА (БСА-пФГА) и ЧСА (ЧСА-пФГА).

Распознавание пептида, сорбированного на планшете, было менее эффективным, хотя в целом коррелировало с общим уровнем антител к ФГА. В сыворотках с более низким титром антител к ФГА антитела к БСА-пФГА не обнаруживались, что может быть связано с генетической рестрикцией по главному комплексу гистосовместимости. Наиболее эффективно пептид в составе конъюгата с БСА распознавался антителами из антисывороток, которые лучше всего распознавали и целый ФГА. Антитела контрольной сыворотки неиммунизированных кроликов не распознавали вышеперечисленные антигены.

Известно, что сорбция молекул пептидов на твердой поверхности в ряде случаев затрудняет их распознавание антителами. Это связано с воздействием поверхности полистирола на конформацию полипептидной цепи. Для усиления взаимодействия пептида с антителами мы получили два конъюгата. В первом случае пептид конъюгировали с БСА, используя глутаровый альдегид, во втором для конъюгирования пептида с ЧСА использовали гетеробифункциональный реагент - N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдлитиопронионат). С каждым из этих конъюгатов антитела из иммунной сыворотки взаимодействовали эффективнее, нежели с пептидом, сенсibilизированным на планшете (рис. 15.). В то же время антитела из нормальной сыворотки с данными антигенами практически не взаимодействовали. Таким обра-

зом, в иммунных сыворотках кроликов присутствовали антитела, распознающие RGD-содержащий участок ФГА.

Для более надежного подтверждения образования антител к участку 1094 - 1102 полипептидной цепи ФГА нами был синтезирован аффинный сорбент с иммобилизованным на BrCN-агарозе RGD-содержащим пептидом. Его применяли для выделения эпитопспецифических кроличьих антител. При получении таких антител нами была использована суммарная антисыворотка двух кроликов, титр АТ в каждой из них к интактному белку в ИФА был не менее 1:364 000, а к пептиду достигал 1:40500. Специфичность антител по отношению к пептиду, его конъюгату с БСА, к нативному ФГА и к контрольному антигену (БСА) была проанализирована методом ИФА. Несмотря на то, что антитела были аффинно очищены на сорбенте с иммобилизованным пептидом, они распознавали нативный ФГА значительно эффективнее, нежели свободный пептид, перекрывающий его RGD-содержащий участок, или его конъюгат с белком-носителем (рис. 16.). Это, по-видимому, является результатом конформационных различий RGD-содержащей последовательности в составе интактного белка, в составе конъюгата пептид-белок и в свободной форме. Подобные отличия

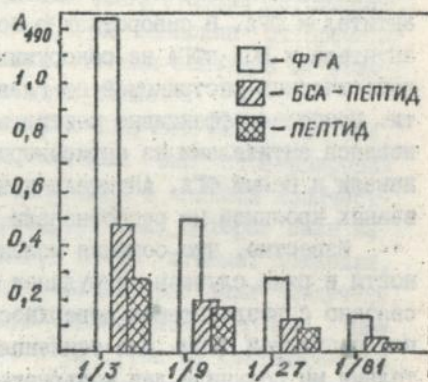
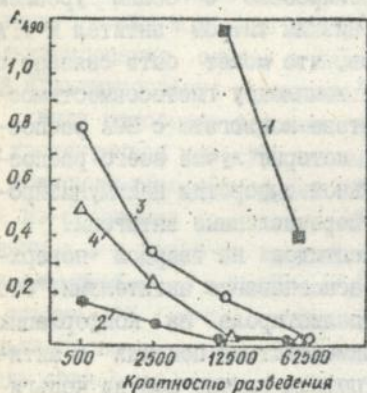


Рис. 15 Взаимодействие АТ с нативным ФГА (1), RGD-содержащим пептидом (2), его конъюгатами с БСА и ЧСА (3,4)

Рис. 16 Сравнение эффективности распознавания нативного ФГА пептида TVGRGDRHQ, конъюгата п-БСА антителами, выделенными на аффинном сорбенте агароза п-ФГА. По оси абсцисс - разведение раствора АТ снятых с сорбента.

между свободными пептидами и этими участками находящимися в целом белке, были показаны ранее и для других антигенов.

Таким образом, эффективное распознавание эпитопспецифическими антителами интактного антигена можно считать достаточным доказательством наличия антигенной детерминанты в районе 1094-1102 ФГА. Следовательно, локализация В-эпитопа в районе ФГА, отвечающего за связывание с CR3-интегрином макрофагов, свидетельствует о возможности использования пФГА в качестве компонента синтетической вакцины против кокليша при условии, что антитела, направленные к пептиду, будут распознавать при этом и нативный антиген.

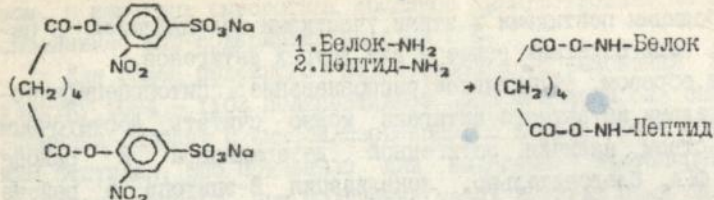
#### 5. ПРИМЕНЕНИЕ 2-НИТРО-4-СУЛЬФОФЕНИЛОВЫХ ЭФИРОВ КИСЛОТ ДЛЯ СИНТЕЗА ИММУНОКОНЬЮГАТОВ.

Для получения специфических антител на низкомолекулярные соединения (гаптены) и пептиды последние ковалентно присоединяют к иммуногенным носителям - белкам или синтетическим полипептидам. Для получения синтетических пептидных вакцин важным аспектом также является выбор бифункционального реагента и способа получения иммуногенного конъюгата. Поэтому выбор соответствующего реагента и способа конъюгации может быть использован для изменения иммунного ответа на пептид, что дает возможность получения антипептидной сыворотки с высоким титром к нативному белку. Бифункциональные реагенты также широко применяются для получения высокомолекулярных белковых конъюгатов, которые более иммуногенны чем мономерные белки.

В данном разделе работы исследована возможность применения водорастворимых 2-нитро-4-сульфофениловых (Nsp) эфиров кислот для получения конъюгатов пептид-белок и белок-белок. Получение конъюгатов на основе пептидов и белков, являющихся объектами наших исследований позволило решить ряд задач поставленных в диссертации.

Впервые (Nsp) эфиры были предложены для синтеза пептидов в водной среде Гершковичем и Серебряным и независимо Клауснером с соавт. в 1977 году. Мы получали конъюгаты белок-белок и пептид-белок с помощью нового бифункционального сшивающего реагента Nsp-эфира адипиновой кислоты.

Реакция идет по схеме:



Для испытания этого реагента мы производили сшивку капсидного белка РVХ ( М.м. 24,8 кДа ). Реакционную смесь разделяли на колонке с сефадексом G-200, предварительно калиброванной интактным капсидным белком РVХ, голубым декстраном (М.м. 2000 кДа ) и Dnp-глицином. Конъюгат выходил со свободным объемом. Следовательно, его М.м. не менее 600 кДа (предел эксклюзии у сефадекса G-200 для глобулярных белков). Белкового материала на месте выхода интактного белка не отмечалось. Гель-фильтрацию конъюгата проводили также в 0,1% водном аммиаке (рН 9,0) с добавкой 6 М мочевины или 4 М гуанидингидрохлорида, что позволяло исключить наличие агрегатов после модификации белка. Профиль элюции при этом не отличался от предыдущего

При изучении антигенной структуры капсидных белков РVХ и РVУ были синтезированы два пептида, которые, исходя из теоретического расчета и на основании экспериментальных данных, могли представлять потенциальные антигенные детерминанты, экспонированные на поверхности белка.

Один из пептидов ( П-1 ) последовательности I P D G D F P занимает позицию 34-40 в полипептидной цепи капсидного белка РVХ ( рис. 1 ). Второй пептид ( П-2 ) последовательности Y A F D F Y E V T S R представляет собой участок полипептидной цепи капсидного белка РVУ позиции 198-208.

Указанные пептиды конъюгировали с БСА с помощью Nsp-эфира адипиновой кислоты. Для сравнения проводили конъюгацию с применением глутарового альдегида. С целью установления оптимальных условий реакцию проводили в различные интервалы времени.

Соотношение пептид:белок в полученных конъюгатах определяли после сравнения аминокислотного состава модифицированного БСА с аминокислотным составом интактного белка. При проведении реакции в течение 10 мин., 1 час. и 24 час. с использованием в качестве сшивающего реагента Nsp-эфира адипиновой кислоты к белку-носителю присоединяется 14-15 молей пептида. В случае использования

глутарового альдегида пришивается 12 молей пептида на 1 моль БСА. Можно утверждать, что по эффективности N $\alpha$ -эфир адипиновой кислоты не уступает широко используемому в качестве сшивающего реагента глутаровому альдегиду. Преимущества этого реагента - хорошая растворимость в водных растворах и высокая реакционная способность. Кроме того, N $\alpha$ -эфир адипиновой кислоты селективно взаимодействует с  $\alpha$ - и  $\epsilon$ -аминогруппами в белках и пептидах.

Таким образом, N $\alpha$ -эфир адипиновой кислоты может быть использован в качестве сшивающего реагента для присоединения пептидов к белкам и получения конъюгатов белок-белок. Этот реагент может найти применение для получения синтетических пептидных вакцин.

## ВЫВОДЫ

1. Проведен гидролиз капсидного белка РVX бромцианом, трипсином и протеазой V3 из *St. aureus*. С помощью методов гель-фильтрации, ионного обмена и ВЭЖХ в обращенной фазе выделены пептиды, входящие в антигенные детерминанты капсидного белка РVX.

2. С помощью двух МКА и ПКА к РVX проведен иммуноанализ РVX, капсидного белка и пептидов, полученных в результате его фрагментации. Впервые установлено, что иммунодоминантная область локализована в N-концевом участке белка и этот участок расположен на поверхности вириона. В результате модификации N-концевого фрагмента установлено, что для взаимодействия с МКА важен остаток лизина в позиции 19 полипептидной цепи капсидного белка РVX. Эти результаты подтверждены иммуноанализом синтетических пептидов, входящих в антигенную детерминанту.

3. Основываясь на результатах иммунохимического анализа, тритиевой планиграфии и расчета вторичной структуры предложена трехмерная модель капсидного белка РVX.

4. В результате ограниченного протеолиза трипсином интактных вирионов РVУ, выделен пептид, который взаимодействует с одним из МКА, полученным к РVУ. Этот пептид является группоспецифическим эпитопом 17 вирусов потигруппы.

5. Впервые с помощью МКА локализована антигенная детерминанта в капсидном белке РVM. Она занимает позицию 21-34 полипептидной цепи белка. Установлена аминокислотная последовательность пептида входящего в эту детерминанту: E A R P L P T A A D F E G R.

Данный участок капсидного белка экспонирован на поверхности вирусной частицы.

6. С помощью аффинной хроматографии из среды культивирования *Bordetella pertussis* выделен в гомогенном виде коклюшный токсин. Впервые из производственного штамма *B. pertussis* выделены две формы токсина.

7. Установлено, что два МКА к интактному коклюшному токсину направлены к конформационным детерминантам белка.

8. Синтезированы иммуноконъюгаты на основе пяти синтетических пептидов, представляющих отдельные участки активаторной субъединицы (S1) коклюшного токсина. Показано, что наиболее активно антителами распознается участок 1-17 N-концевой области S1 КТ.

9. Селекционным путем получен высокопродуктивный токсигенный серовариант штамма *B. pertussis*.

10. Найдены закономерности, которые приводят к протеолизу интактной молекулы филаментозного геммагглютинаина из *B. pertussis*, зависящие от способов культивирования, сроков хранения препаратов, добавления ингибиторов протеаз и условий выделения.

11. Синтезирован пептид (T V G R G D P H Q), представляющий В-эпитоп ФГА и изучены его антигенные свойства. Этот пептид, содержащий Arg-Gly-Asp-сайт, представляет собой участок ФГА, отвечающий за связывание с CR3-интегрином макрофагов и может быть потенциальным компонентом синтетической вакцины против коклюша.

12. Показана возможность применения нового бифункционального поперечносшивающего реагента - 2-нитро-4-сульфофенилового эфира адипиновой кислоты для получения иммуноконъюгатов.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Радавский Ю.Л., Гершкович А.А., Могирева Л.А., Манько Н.И., Серебряный С.Б. Применение водорастворимых 2-нитро-4-сульфофениловых эфиров в иммунохимических исследованиях // Тез. докл. V Всесоюз. симпоз. по химии и физике белков и пептидов.- Баку, 1980.-С.225.
2. Радавский Ю.Л., Могирева Л.А., Манько Н.И., Гершкович А.А. Применение водорастворимых 2-нитро-4-сульфофениловых эфиров кислот для синтеза их конъюгатов с белками // Биоорг. химия.- 1983.-Т.8.-№11.-С.1486-1489.
3. Гершкович А.А., Радавский Ю.Л., Серебряный С.Б. Водорастворимые ацилирующие реагенты для синтеза пептидов и модификации белковых молекул // Тез. докл. VI Всесоюз. симпоз. по химии белков и пептидов.-Рига.-1983.-С.229-230.
4. Радавский Ю.Л., Гавриш О.Р. Экзотоксин *Bordetella pertussis* // Тез. докл. I Всесоюз. конференции "Молекулярная структура бак-

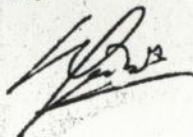
- риальных токсинов и генетический контроль их биосинтеза". - Москва. - 1985. - С. 90-91.
5. Радавский Ю.Л., Гавриш О.Г., Чечот В.А. и др. Фракционирование экзотоксина *Bordetella pertussis*. // Тез. докл. 1 Всесоюзной конференции "Молекулярная структура бактериальных токсинов и генетический контроль их биосинтеза". - Москва. - 1985. - С. 91.
  6. А.с. СССР №1369237 в соавт. Бовк М.В., Самарай Л.И., Серебряный С.Б. и др. / ДСП.
  7. Радавский Ю.Л., Витер С.С., Турова И.П. и др. Вивчення антигенної структури білка оболонки X- та M-вірусів картоплі // Тез. доп. V Укр. біохім. з'їзду. - Івано-Франківськ. - 1987. - ч. 1, С. 131-132.
  8. Турова И.П., Витер С.С., Радавский Ю.Л. Анализ бромциановых фрагментів білка оболонки X-вірусу картоплі (ХВК) // Тез. доп. V Укр. біохім. з'їзду. - Івано-Франківськ. - 1987. - ч. 2. - С. 211
  9. Радавский Ю.Л., Гавриш О.Г. Коклюшный токсин *Bordetella pertussis*. // в сб. научн. трудов "Бактериальные токсины", Москва. - 1987. - С. 125-136.
  10. Антигенный анализ коклюшного токсина. / в соавт. Гавриш О.Г., Чечот В.А., Турова И.П. и др. // Тез. докл. VII Всесоюз. симпози. по химии белков и пептидов. - Таллин. - 1987. - С. 40-41.
  11. Радавский Ю.Л., Витер С.С., Турова И.П. и др. Изучение антигенной структуры белка оболочки X-вируса картофеля // Тез. докл. VII Всесоюз. симпози. по химии белков и пептидов. - Таллин. - 1987. - С. 90-91.
  12. Радавский Ю.Л., Витер С.С., Саарма М.Ю. и др. Антигенная структура белка оболочки X-вируса картофеля. I. Иммунологический анализ бромциановых фрагментов // Биоорг. химия. - 1988. - Т. 14. - №1. - С. 20-26.
  13. Турова И.П., Витер С.С., Радавский Ю.Л. Сравнение вторичной структуры, гидрофильности и гидрофобности белков оболочек X-вируса картофеля и вируса аукуба мозаики картофеля // Докл. АН СССР. - 1988. - №9. - С. 80-83.
  14. Экспериментальная специфическая иммунотерапия острых отравлений динитрофенильными соединениями / в соавт. Лукьянчук В.Д., Луйк А.И., Войтенко Н.С. и др. // Вестн. Акад. Мед. наук СССР. - 1988. - №5. - С. 38-42.
  15. Радавский Ю.Л., Витер С.С., Турова И.П. и др. Антигенная структура белка оболочки X-вируса картофеля. II. Локализация антигенной(ных) детерминант в N-концевом участке белка // Биоорг. химия. - 1989. - Т. 15. - №6. - С. 615-619.
  16. Изучение антигенной структуры белков оболочек X-вируса картофеля и вируса аукуба мозаики картофеля / в соавт. с Туровой И.П. Витер С.С., Заикиным А.А. и др. // Тез. докл. VII Съезда Укр. микробиол. общества. - Черновцы. - 1989. - ч. 2. - С. 183-184.
  17. Антигенный анализ субъединиц коклюшного токсина. / в соавт. с Гавриш О.Г., Чечот В.А., Заikin О.А. и др. // Доп. АН УРСР, Сер. Б. - 1989. - С. 61-64.
  18. Изучение двух форм коклюшного токсина, выделенных из одного штамма *Bordetella pertussis*. / в соавт. с Гавриш О.Г., Чечот В.А., Заикин А.А. и др. // Тез. 2 Всесоюз. конференции "Бактериальные токсины". - Румала, Латвия. - 1989. - С. 26.
  19. Характеристика высокоочищенного токсина *Bordetella pertussis* в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. / в соавт. Мелева Е.И., Мерцалова Н.У., Захарова Н.С. и др. // Тез. 2 Всесоюз. конфер. "Бактериальные токсины". - Румала, Латвия. - 1989. - С. 152.
  20. Иммунохимический анализ коклюшного токсина и его субъединиц / в соавт. Гавриш О.Г., Чечот В.А., Заикин А.А. и др. // Тез.

I Всесоюз. иммунол. съезда.-Сочи.-1989.-Т.1.-С.207.

21. Изучение антигенной структуры коклюшного токсина. / в соавт. Гавриш О.Г., Чечот В.А., Зайкин А.А. и др. // Тез. докл. VII съезда Украинск. микробиол. общ.-Черновцы.-1989.-Ч.2.-С.135.
22. Бис(2-нитро-4-сульфобензильные) эфиры дикарбоновых кислот как водорастворимые бифункциональные реагенты для сшивки белков / в соавт. Гершкович А.А., Партешко А.В., Гончаренко В.С. // Биорган. химия.-1989.-Т.15.-№3.-С.1056-1059.
23. Радавский Ю.Л., Витер С.С., Саарма М.Ю. и др. Антигенная структура капсидных белков трех вирусов картофеля // Тез. Всесоюз. симпозиум. химия белков.-Тбилиси.-1990.-С.147.
24. Радавский Ю.Л., Зайцева Л.С., Партешко А.В. и др. Использование водорастворимого 2-нитро-4-сульфобензильного эфира адипиновой кислоты в иммунологических исследованиях белков // Тез. докл. Всесоюз. симпозиум. химия белков.-Тбилиси.-1990.-С.148.
25. Разработка вакцин нового поколения: некоторые итоги и перспективы / в соавт. Захарова Н.С., Шмелева Е.И., Мерцалова Н.У. и др. // Тез. докл. VI Всероссийского съезда микробиологов, эпидемиологов и паразитологов.- Нижний Новгород.-1991.-Т. II. - С.174-175.
26. Патологическая и протективная активность коклюшных бактерий. / в соавт. Е.И. Шмелева, Н.У. Мерцалова, Е.В. Сухинова Е. и др. // Тезисы докладов XII Украинского республиканского съезда микробиологов, эпидемиологов и паразитологов.-Харьков.-1991.- Ч. I.-С.179.
27. Экзотоксин и антитоксин *Bordetella pertussis*: технология получения, иммунологические характеристики, исследование в составе вакцин и диагностических препаратов. / в соавт. Шмелева Е.И., Захарова Н.С., Мерцалова Н.У. и др. // в сб. "Актуальные вопросы медицинской биотехнологии".-Материалы научной конференции посвященной 85-летию Томского НИИ вакцин и сывороток.-Томск -1991.-С.120-121.
28. Антигенная характеристика капсидных белков штаммов Y-вируса картофеля / в соавт. Гнутова Р.В., Сибирякова И.И., Ярвекльг Л.В. и др. // Биологические науки.-1991.-№11.-С.35-46.
29. А.с. СССР №1761795 Штамм бактерий *Bordetella pertussis* -производитель коклюшного токсина / в соавт. Шмелева Е.И., Мерцалова Н.У. Сухинова Е.Е. и др.
30. Імунохімічний аналіз білка оболонки М-вірусу картоплі / у співавт. Вітер С.С., Раудсепп Р.А., Гавриш О.Г. // Тез. доп. VI Укр. біохім. з'їзду.-Київ.-1992.-С.98.
31. Поліклональні антитіла кролів розпізнають сайт філаментозного гемаглютинину *B. pertussis*, що відповідає за взаємодію з OR-3 рецептором / у співавт. Пхакадзе О.Г., Кавун С.М., Чечот В.О. та ін. // Тез. доп. VI Укр. біохім. з'їзду.-Київ.-1992.-С.107.
32. Применение водорастворимого 2-нитро-4-сульфобензильного эфира адипиновой кислоты для получения конъюгатов пептид-белок / в соавт. Зайцева Л.С., Гершкович А.А., Абакумов В.Ю. // Укр. биохим. ж.-1992.-№3.-С.101-103.
33. Імунохімічний аналіз синтетичних пептидів, що входять до антигенної детермінанти білка оболонки X-вірусу картоплі / у співавт. Вітер С.С., Дибенко О.Г., Шилин В.В. та ін. // Укр. біохім. ж.-1992.-№1.-С.94-97.
34. Получение и анализ моноклональных антител к коклюшному токсину *Bordetella pertussis*. / в соавт. Пхакадзе Е.Г., Кавун Э.М., Комиссаренко С.В. и др. // Биотехнология.-1992.-№6.-С.33-36.
35. Аналіз антигенних свойств RGD-содержащего участка филаментозного гемагглютинаина *B. pertussis*, отвечающего за связывание с

- CR3-интегрином макрофагов./в соавт. Пхакадзе Е.Г., Кавун Э.М., Комиссаренко С.В. и др. // Биополимеры и клетка.-1993.-№4.-С. 39-44.
- 36.Радавский Ю.Л., Зайцева Л.С., Кухарь В.П. / Бифункциональные поперечносшивающие реагенты и методы получения конъюгатов пептид-носитель // Биополимеры и клетка.-1993.-№4.-С.3-21.
37. Antigenic characterization of potato virus X with monoclonal antibodies / co-auth. Sober J., Jarvekulg L. Toots I. et al. // J. gen. Virol.-1988.-Vol.-69.-№10.-P.1799-1807.
38. Radavsky Yu.L., Viter S.S., Turova I.P. et al. Antigenic structure of the coat proteins of potato virus X (PVX) and of potato aucuba mosaic virus (PAMV) // Abstr. 2-d Intern. Sympos on "Positive strand RNA viruses".-Vienna, Austria.-1989.-P.43
39. Radavsky Yu.L., Viter S.S., Turova I.P. et al. Immunochemical analysis of the coat proteins of potato virus X (PVX) and of potato aucuba mosaic virus (PAMV) // Abstr. 7-th USSR-FRG Sympos. on "Chemistry of peptides and proteins".-Dilizhan, USSR.-1989.-P.43.
40. Antigenic structure of potato viruses studied with monoclonal antibodies / co-auth. Jarvekulg L., Rabenstein F., Saarna M // Abstr. Sympos. on "Recent results in plant virology".-Eberswalde, Germany.-1989.-P.34-35.
41. Localization of the group-specific epitope of potyvirus with monoclonal antibodies / co-auth. Jarvekulg L., Saarna M., Zaitseva L. // Abstr. VIII-th Intern. Congress Virology.-Berlin, Germany.-1990.-P.84.
42. Radavsky Yu.L., Viter S.S., Turova I.P. et al. Immunochemical analysis, tritium planigraphy and structural features of the potato virus X and its coat protein // Intern. Sympos. "Virology, Immunology and Society".ROSTE/UNESCO.-Techn. Reports №6. 1991.-P.254-272.
43. Localization of epitope on potato virus M coat proteins / co-auth. Viter S.S., Raudsepp R.A., Gavrish C.G. // Докл. АН Украины.-1992.-№9.-С.162-164.
44. The RGD-containing peptide of filamentous haemagglutinin (FHA) is a potential component of the peptide vaccine against whooping cough / co-auth. Kavoon E.M., Pchakadze H.G., Komissarenko S.V. et al. // Abstr. II Russian-Israel Sympos. on "Peptides and proteins".-Moscow.-1992.-P.19.
45. The topography of the surface of potato virus X: tritium planigraphy and immunological analysis / co-auth. Baratova L.A., Grebenshchikov N.I., Shishkov A.V. et al. // J. Gen. Virol. 1992.-Vol.73.-Feb.-P.229-235.
46. Radavsky Yu.L., Viter S.S., Gavrish O.G. / Immunochemical analysis of the coat protein potato virus M // Abstr. 3-th Intern Sympos. on "Positive strand RNA viruses".-Florida, USA.-1992.-P.59.
47. The organization of potato virus X coat proteins in virus particles studied by tritium planigraphy and model building / co-auth. Baratova L.A., Grebenshchikov N.I., Dobrov E.N. et al. // Virology.-1992.-Vol.188.-№1.-P.175-180.
48. Immunochemical analysis and model building of the potato virus M and its coat proteins / co-auth. Viter S., Gavrish O., Baratova L. et al. // Abstr. IX-th Intern. Congress Virology.-Glasgow, Scotland.-1993.-P.263.

СОИСКАТЕЛЬ



461714

AB 29.554