

8. Машковский М. Д. Лекарственные средства.— М.: Медицина, 1985.— Ч. 1.— 624 с.
9. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Примак Р. Г. и др. Изменение структурного состояния фракционированного хроматина печени при активации перекисного окисления липидов // Биополимеры и клетка.— 1991.— 7, № 3.— С. 89—94.
10. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б. и др. Функциональная активность фракционированного хроматина печени крыс при однократном введении тетрахлорметана // Вопр. мед. химии.— 1989.— 35, № 4.— С. 119—124.
11. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Примак Р. Г. и др. Конформационные характеристики и характер упаковки эндогенных липидов фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина // Укр. биохим. журн.— 1991.— 63, № 2.— С. 83—89.
12. Ашмарин М. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование эксперимента.— Л.: Изд-во ЛГУ, 1975.— 78 с.
13. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б. и др. Перекисное окисление липидов фракций хроматина печени крыс // Докл. АН УССР, сер. Б.— 1989.— № 2.— С. 70—72.
14. Лебедев О. И., Журнов В. В., Зуева Н. А. и др. Структурные эффекты в саркомере кардиомиоцитов при добавлении модуляторов полифосфорнолигандной системы // Физiol. журн.— 1990.— 76, № 10.— С. 1210—1297.
15. Свердлова О. В. Электронные спектры в органической химии.— М.: Химия, 1985.— 248 с.
16. Bellami W. T., Dalton W. S., Kailly J. M. et al. Verapamil reversal of doxorubicin resistance in multi-drug-resistant human myeloma cells and association with drug accumulation and DNA damage // Cancer. Res.— 1988.— 48, N 22.— P. 6303—6308.
17. Weber J., Scheid W., Traut H. Enhancement of bleomycin-induced DNA damage by exposing isolated DNA to high concentrations of the calcium antagonist verapamil // Arzneim. Forsch. Drug Res.— 1989.— 39, N 12.— P. 1550—1554.

УкрНИИ фармакологии и токсикологии МЗ Украины, Киев

Получено 12.01.93

УДК 577.27

**Е. Г. Пхакадзе, Э. М. Кавун, В. А. Чечот,
А. В. Маринец, Ю. Л. Радавский, С. В. Комиссаренко**

АНАЛИЗ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ RGD-СОДЕРЖАЩЕГО УЧАСТКА ФИЛАМЕНТОЗНОГО ГЕМАГГЛЮТИНИНА BORDETELLA PERTUSSIS, ОТВЕЧАЮЩЕГО ЗА СВЯЗЫВАНИЕ С CR3-ИНТЕГРИНОМ МАКРОФАГОВ

*Локализована антигенная детерминанта в районе 1094—1102 полипептидной цепи филаментозного гемагглютинаина (ФГА) *B. pertussis*, участвующего в адгезии бактериальных клеток на макрофагах. Для определения использованы нативный ФГА синтетический пептид YGGRGDPHQ, его конъюгаты с БСА (полученный глутаральдегидным методом) и с ЧСА (полученный с помощью N-оксисукцинимидил-2-(3-пиридилдитиопронионата) — SPDP). Эпитопспецифические АТ исследовали с помощью иммуноаффинной хроматографии и иммуноферментного анализа. Наличие антигенной детерминанты в RGD-содержащем районе 1094—1102 ФГА указывает на возможность использования пептида, соответствующего данному эпитопу, в качестве компонента синтетической вакцины против коклюша.*

Введение. Для профилактики коклюша в настоящее время применяют два вида вакцин: цельноклеточные (на основе убитых бактериальных клеток *B. pertussis*) и ацеллюлярные субъединичные вакцины [1]. Недостатком их является остаточная АДФ-рибозилтрансферазная активность коклюшного токсина [2], что вызывает множество нежелательных побочных эффектов при вакцинировании детей.

Для разработки полностью безопасных вакцин активно ведутся работы по двум основным направлениям, а именно: создание рекомбинантных аналогов S1-субъединицы коклюшного токсина [3, 4] и выявление пептидов, которые можно использовать при создании синтетических вакцин [5, 6]. Наиболее перспективными для дальнейшего поиска

© Е. Г. Пхакадзе, Э. М. Кавун, В. А. Чечот, А. В. Маринец, Ю. Л. Радавский,
С. В. Комиссаренко, 1993

пептидов — компонентов синтетических вакцин являются три антигена *B. pertussis*: коклюшный токсин, филаментозный гемагглютинин и пертактин [7]. ФГА — адгезивный фактор, участвующий в прикреплении *B. pertussis* к мембранам макрофагов и клеток эпителия трахеи [8]. При этом он распознает на цитоплазматических мембранах макрофагов два класса молекул: CR3-интегрин и галактозосодержащие гликолипиды [9].

Найдено, что ФГА взаимодействует с CR3-интегрином через участок, содержащий характерный Arg-Gly-Asp-сайт, который находится в районе остатков 1097—1099 молекулы ФГА [9].

Задача настоящей работы состояла в анализе антигенных свойств RGD-содержащего фрагмента ФГА для выяснения его перспективности в качестве компонента синтетической вакцины против коклюша.

Материалы и методы. Пептид с БСА конъюгировали с помощью глутарового альдегида. БСА и пептид TVGRGDPHQ (молярное соотношение носителя к пептиду 1/20) последовательно растворяли в 0,5 мл физраствора, содержащего 0,02 М Na, К-фосфатный буфер, pH 7,5 (ФРБ), и добавляли по каплям 0,1 мл 2,5 %-го раствора глутарового альдегида. Реакцию проводили при перемешивании в течение 30 мин. Оставшиеся активные группы блокировали в течение 30 мин добавлением в реакционную смесь 0,06 мл 1 М раствора глицина, затем диализовали против 0,03 %-го раствора аммиака с последующей лиофилизацией.

Ацилирование ЧСА. При ацилировании ЧСА придерживались подходов, описанных в [10]. 50 мг ЧСА («Reanal», Венгрия) растворяли в 1,5 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера, содержащего 0,1 М NaCl, pH 7,5 (ФБ). К раствору белка по каплям добавляли 40 мМ раствор SPDP в 96 %-м этиловом спирте так, чтобы молярное соотношение ЧСА: SPDP равнялось 1 : 50. Время реакции 2 ч при 20 °С. Ацилированный ЧСА (ЧСА-PDP) диализовали против 0,03 %-го раствора аммиака в дистиллированной воде с последующей лиофилизацией. Для определения степени ацилирования 200 мкг ЧСА-PDP растворяли в 2 мл ФБ и добавляли 34 мкл 100 мМ дитиотреитола. Об освобождении 2-тиопиридона судили по увеличению экстинкции при 343 нм. Степень ацилирования составила около 30 остатков SPDP на молекулу ЧСА.

Получение конъюгата пептида из филаментозного гемагглютинина с ЧСА. Пептид TVGRGDPHQ из ФГА *B. pertussis* (пФГА) получен от Вектор-Биопродукт LTD. 2 мг пФГА растворяли в 0,1 М Na-ацетатном буфере, pH 4,5. SPDP вносили в пятикратном молярном избытке по отношению к пФГА. Реакцию проводили при 20 °С в течение 2 ч. Ацилированный пептид отделяли от продуктов реакции на колонке с сефадексом G-10 ($d=1$ см; $h=55$ см). Для генерирования дополнительных SH-групп 6 мг ЧСА-PDP растворяли в 1 мл ФБ, содержащего 50 мМ дитиотреитол. Реакцию проводили в течение 30 мин при 20 °С, после чего ЧСА отделяли от продуктов реакции на колонке с сефадексом G-25 Fine ($d=1$ см; $h=30$ см), уравновешенным ФБ. Собирали первый пик и немедленно смешивали с ацилированным пептидом. Конъюгирование проводили при 20 °С в течение 24 ч. От низкомолекулярных продуктов избавлялись диализом против 0,03 %-го раствора аммиака.

Для получения аффинного сорбента пФГА был иммобилизован на BrCN-агарозе, как описано в [11]. 1,5 мл BrCN-агарозы инкубировали с 1,5 мг пептида. По данным спектрофотометрического анализа, с агарозой связалось 1,2 мг пептида.

Иммуноаффинную хроматографию специфичных к RGD-содержащему пептиду антител проводили следующим образом. Иммуноглобулиновую фракцию из иммунной сыворотки в ряде случаев осаждали сульфатом аммония. Специфичные к пептиду антитела выделяли либо из фракции иммуноглобулинов, либо непосредственно из иммунной кроличьей сыворотки. В последнем случае 0,35 мл иммунной сыворотки разводили в 10 раз ФРБ и затем трижды пропускали через

аффинный сорбент объемом 1,5 мл. Колонку тщательно промывали ФРБ, после чего связавшиеся антитела элюировали 4 М KSCN и диализовали против ФРБ.

Сорбционный иммуоферментный анализ. Планшеты Flow Laboratories (Великобритания) или «Экран» (Москва) сенсибилизировали в течение 2 ч при комнатной температуре соответствующими антигенами в концентрации 2 мкг/мл в ФРБ. После их сорбции в ряде случаев планшет блокировали 1 %-м БСА в ФРБ в течение 1 ч при 37 °С. После каждого этапа сорбции планшет трижды промывали водой. Антисыворотки или аффинноочищенные антитела разводили в ФРБ с 0,05 % твин-20 (ТФБ) и инкубировали в планшетах при 4 °С. Антитела выявляли с помощью конъюгата АТ овцы, специфичных к IgG кролика, с пероксидазой (Вектор-Биопродукт LTD) в разведении 1:4000 в ТФБ. В качестве субстрата использовали раствор ортофенилендиамина в 0,05 М Na, К-фосфатном буфере, pH 6,0 с 0,013 %-м раствором перекиси водорода.

Антисыворотку к ФГА получали, используя 2 схемы иммунизации кроликов. Перед иммунизацией у животных брали кровь для получения нормальной сыворотки. В одном случае кроликов иммунизировали по 100 мкг ФГА в 50 мМ трис-HCl буфере, pH 8,0, содержащем 1 М NaCl (кролики №№ 2—4, таблица). Первую иммунизацию проводили внутримышечно с ПАФ, последующие — внутривенно. Через 21 день после первой иммунизации животных иммунизировали вторично, еще через месяц — третий раз и спустя 7,5 месяца — четвертый. Кровь брали на 7-й день после каждой иммунизации. После 4-й иммунизации антисыворотку получали на 7-й и 14-й дни.

По другой схеме кроликов иммунизировали шесть раз по 20 мкг ФГА с интервалом в один месяц без использования адъювантов (кролик № 1). Первую иммунизацию проводили внутримышечно, последующие — внутривенно. Кровь брали на 7-й день, начиная со второй реиммунизации.

Результаты и обсуждение. Образование специфичных к ФГА антител анализировали с помощью сорбционного ИФА. В качестве антигенов использовали нативный ФГА, пептид TVGRGDPHQ, а также его конъюгаты с БСА (БСА—пФГА) и ЧСА (ЧСА—пФГА). Титры антител к нативному ФГА в антисыворотках отличались и зависели от схемы иммунизации и количества инъекций. Распознавание пептида, сорбированного на планшете, было менее эффективным, хотя в целом коррелировало с общим уровнем антител к ФГА (см. таблицу). 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 гистосовместности. Наиболее эффективно пептид в составе конъюгата с БСА распознавался антителами из ан-

Сравнение титров антител к нативному ФГА и к его RGD-содержащему пептиду в тесте ELISA

№ Кролика	№ Сыворотки	Количество инъекций	День получения антисыворотки*	Десятичный логарифм титра антител к	
				ФГА	пФГА**
1	1	5	7	5,56	4,60
2	2	3	7	4,61	0
3	3	4	7	3,67	0
3	4	4	14	4,13	0
4	5	2	7	5,56	4,13
4	6	3	7	5,56	4,13
4	7	4	7	4,61	4,13
4	8	4	14	5,08	4,60

* После очередной иммунизации; ** титр антител к пептиду в антисыворотках определяли по их взаимодействию с конъюгатом БСА—пФГА.

тисывороток № 1 и № 8 (см. таблицу), т. е. теми, которые лучше всего распознавали и нативный АГ. Антитела контрольной сыворотки неиммунизированного кролика не распознавали вышеперечисленные антигены.

Известно, что сорбция молекул пептида на твердой поверхности в ряде случаев затрудняет их распознавание антителами. Это связано с воздействием поверхности полистирола на конформацию полипептидной цепи [12]. Для облегчения взаимодействия пептида с антителами

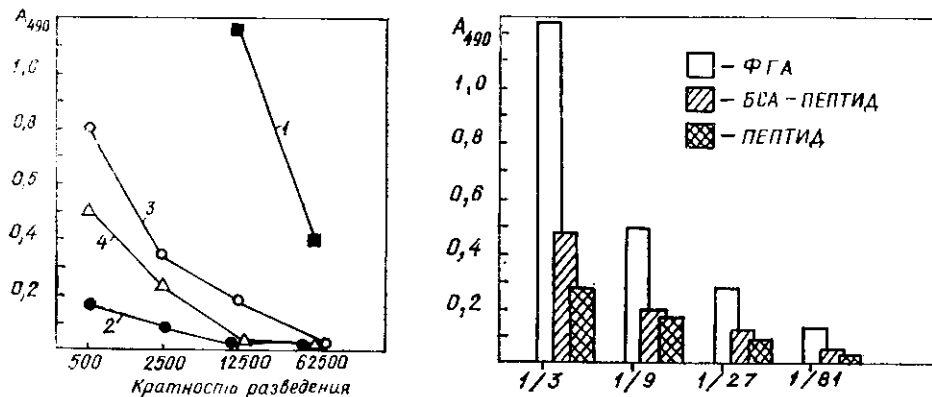
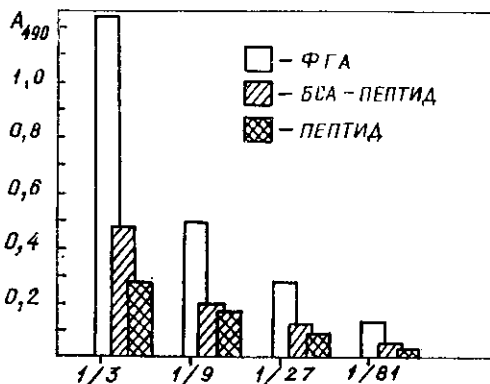


Рис. 1. Взаимодействие антител из иммунной сыворотки кроликов с нативным ФГА (1), RGD-содержащим пептидом из ФГА (2), его конъюгатами с БСА (3) и ЧСА (4)

Рис. 2. Сравнение эффективности распознавания нативного ФГА, пептида TVGRGDPHQ в свободной форме и в составе конъюганта с БСА эпитопспецифическими антителами, выделенными на аффинном сорбенте агароза — пФГА. По оси абсцисс указано разведение элюата после снятия антител с аффинного сорбента. Приведены усредненные данные трех измерений



нами были получены два его конъюгата с белковыми носителями. В первом случае пептид конъюгировали с БСА, используя глутаральдегидный метод, во втором — для конъюгирования пептида с ЧСА применяли гетеробифункциональный реагент N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиопропионат) — SPDP. С каждым из этих конъюгатов антитела из иммунной сыворотки взаимодействовали эффективнее, нежели с пептидом, сенсibiliзированным на планшете (рис. 1). В то же время антитела из нормальной сыворотки с данными антигенами практически не взаимодействовали. Таким образом, в иммунных сыворотках кроликов присутствовали антитела, распознающие RGD-содержащий участок ФГА. Более низкий уровень сигнала, полученный при взаимодействии АТ с пептидом и его конъюгатами, чем с нативным ФГА, связан с небольшой удельной площадью данного эпитопа по отношению ко всей молекуле. Известно, что практически вся поверхность белковых АГ является потенциально иммуногенной [13], а поскольку молекулярная масса ФГА составляет 220 000, доля эпитопспецифических АТ не должна превышать нескольких процентов от всех АТ, направленных к нативному ФГА.

Для более надежного подтверждения образования антител к участку 1094—1102 ФГА нами был синтезирован аффинный сорбент с иммобилизованным на BrCN-агарозе RGD-содержащим пептидом. В дальнейшем 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 нативному белку в тесте ELISA был не менее 1 : 364 000, а к пептиду достигал 1 : 40 500 (антисыворотки №№ 1, 8, см. таблицу). Полученные антитела анализировали против ФРБ, а их специфичность по отношению к пептиду, его конъюгату с БСА, к нативному ФГА и к контрольному антигену (БСА) была проанализирована методом ELISA. Несмотря на то, что антитела были аффинно очищены на сорбенте с иммобилизован-

ним пептидом, они распознавали нативный ФГА значительно эффективнее, нежели свободный пептид, перекрывающий его RGD-содержащий участок или его конъюгат с белковым носителем (рис. 2). Это, по-видимому, является результатом конформационных различий RGD-содержащей последовательности в составе нативного белка, в составе конъюгата пептида с носителем и в свободной форме. Подобные отличия участков полипептидных антигенов, находящихся в форме пептидов, были показаны ранее и для других антигенов [14].

Известно, что последовательность Arg-Gly-Asp участвует в адгезии целого ряда белков с антигенами цитоплазматической мембраны. Среди них фибриноген, фактор Ван Виллебранда (von Willebrand factor), RGD-содержащие пептиды которых распознаются мембранными белками тромбоцитов [15]. Фибриноген, кроме того, конкурирует с ФГА за связывание с CR3-интегрином [9]. Участок фибронектина, содержащий данную последовательность, распознается мембранным рецептором к витронектину [16]. Полагают, что пертактин из *B. pertussis* также распознается CR3-интегрином макрофагов [17]. Взаимодействие RGD-содержащих участков с рецепторами мембран связано с их аминокислотным окружением. Так, у пертактина в районе 665—667 имеется еще один участок с последовательностью Arg-Gly-Asp, который не взаимодействует с мембранами макрофагов [17]. Это, по-видимому, связано с недостаточной степенью его экспонирования в растворитель и/или измененной конформацией, которая недоступна для распознавания интегрином.

Таким образом, эффективное распознавание эпитопспецифическими антителами нативного 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 коклюша при условии, что антитела, направленные к пептиду, будут распознавать при этом и нативный антиген.

Резюме. Виявлено антигенну детермінанту, що розпізнається антитілами, в районі 1094—1102 філаментозного гемаглютинину *B. pertussis*. В дослідженнях використовували нативний ФГА, синтетичний пептид TVGRGDPHQ, його кон'югати з альбумінами із сироватки крові бика та людини. Перший кон'югат був одержаний за допомогою глутаральдегідного методу, другий — з використанням N-сукцинімідіду (3-піридилдітіопропіонату) — SPDP. Епітопспецифічні антитіла вивчали за допомогою імуноафінної хроматографії та імуоферментного аналізу. Локалізація антигенної детермінанти в даному локусі ФГА вказує на можливість використання відповідного пептиду як складової частини синтетичної вакцини проти кашлюку.

Summary. The antigen determinant distinguished by the antibodies was found in the region 1094—1102 of filamentous hemagglutinin from *B. pertussis*. The native FHA, nonapeptide TVGRGDPHQ, its conjugates with albumins from bovine and human sera were used in the experiments. The first conjugate was obtained with the glutaraldehyde, the another one with the use of SPDP. The immunoaffinity chromatography and ELISA were used for the determination of the epitope-specific antibodies. Localization of the antigen determinant in this site of FHA makes it possible to apply the peptide as a component of the synthetic vaccine against whooping-cough.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Robinson A., Ashworth L. A. E. Acellular and defined-component vaccines against pertussis // Pathogenesis and immunity in pertussis / Eds. A. C. Wardlaw, R. Parrott.— New York: John Wiley and Sons, 1988.— P. 399—417.
2. Ui M., Nogimori K., Tamura M. Islet-activating protein, pertussis toxin: subunit structure and mechanism for its multiple biological actions // Pertussis toxin / Eds. R. D. Sekura et al.— New York: Acad. press, 1985.— P. 19—43.
3. Burns D. L., Manclark C. R. Role of cysteine 41 of the A subunit of pertussis toxin // J. Biol. Chem.— 1989.— 264, N 1.— P. 564—568.

4. Barbieri J. T., Moloney B. K., Mende-Mueller L. M. Expression and secretion of the S-1 subunit and C180 peptide of pertussis toxin in *Escherichia coli* // J. Bacteriol.— 1989.— 171, N 8.— P. 4362—4369.
5. Askelof P., Rodmalm K., Abens J. et al. Use of synthetic peptides to map antigenic sites of *Bordetella pertussis* toxin subunit S1 // J. Infect. Diseases.— 1988.— 157, N 4.— P. 738—742.
6. Askelof P., Rodmalm K., Wraggell G. et al. Effective immunogenicity of two synthetic peptides selected from the amino acid sequence of *Bordetella pertussis* toxin subunit S1 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1990.— 87, N 4.— P. 1347—1351.
7. Mortimer E. A., Kimura M., Cherry J. D. Protective efficacy of the Takeda acellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids following household exposure of Japanese children // AIDC.— 1990.— 144.— P. 899—904.
8. Kimura A., Mountzouros K., Reiman D. et al. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model // Infect. and Immunol.— 1990.— 58, N 1.— P. 7—16.
9. Reiman D., Tuomanen E., Falkow S. et al. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 ($\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis* // Cell.— 1990.— 61, N 7.— P. 1375—1382.
10. Carlsson J., Drezin H., Axen R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate a new heterobifunctional reagent // Biochem. J.— 1978.— 173, N 3.— P. 723—737.
11. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот.— М. Наука, 1985.— 536 с.
12. Muller S., Briandt J. P., Plane S. et al. Immunochemical reactivity of synthetic peptides // Protides Biol. Fluids Proc. 34-th Colloq. (Oxford, sept. 1986).— Oxford, 1986.— P. 87—90.
13. Geysen H. M., Jainer J. A., Rodda S. J. et al. Chemistry of antibody binding to a protein // Science.— 1987.— 235, N 4793.— P. 1184—1190.
14. Carbone F. R., Paterson G. Monoclonal antibodies to horse cytochrome c expressing four distinct idiotypes distribute among two sites on the native protein // J. Immunol.— 1985.— 135, N 4.— P. 2609—2616.
15. Plow E. F., Pierschbacher M. D., Ruoslahti E. et al. The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— 82, N 23.— P. 8057—8061.
16. Putela R., Pierschbacher M. D., Ruoslahti E. A 125/115 kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence from fibronectin // Ibid.— N 17.— P. 5766—5770.
17. Leininger E., Roberts M., Kenimer J. D. et al. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells // Ibid.— 1991.— 88, N 2.— P. 345—349.

Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН Украины, Киев
Ин-т биоорг. химии и нефтехимии АН Украины, Киев

Получено 12.01.93

УДК 577.112.5

**Л. И. Пальчиковская, Т. Л. Левитина,
М. Т. Бобровская, М. Н. Овандер, М. С. Кацман, Э. А. Козлов**

**УСКОРЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ВЫСОКОГОМОЛОГИЧНЫХ БЕЛКОВ.
ПОЛНАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ПОЛИЭДРИНА ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА (ВЯП)
КАПУСТНОЙ СОВКИ, MAMESTRA BRASSICAE**

*Разработан ускоренный метод («препаративного картирования») определения аминокислотной последовательности высокогомологичных белков. Этим методом выяснена первичная структура полиэдрина ВЯП *M. brassicae*, включающего 246 остатков аминокислот.*

Введение. В течение ряда лет наша лаборатория занимается выяснением первичной структуры белков тел включений (ТВ) бакуловирусов — ВЯП и вирусов гранулеза (ВГ). Соответственно белки ТВ ВЯП называются полиэдринами, а ТВ ВГ — гранулинами. К моменту публика-

© Л. И. Пальчиковская, Т. Л. Левитина, М. Т. Бобровская, М. Н. Овандер,
М. С. Кацман, Э. А. Козлов, 1993