

Janusz KLIMEK, Jolanta WRÓŃSKA,  
Sławomir WAWRZYCKI

### Produkty redukcji białka toksoidu tężcowego

Продукты редукции протеина столбнячных токсоидов

The Products of the Reduction of the Tetanus Toxoid Protein

Biochemiczna natura białek jest ściśle związana ze strukturą tych substancji. W przypadku toksoidu tężcowego czynione są próby ustalenia biologicznych własności tego antygeny przy wykorzystaniu różnych fizykochemicznych środków. Temu celowi służyć mogą niektóre ustalenia: składu aminokwasowego (6, 8), powierzchniowych grup funkcyjnych (7) oraz masy cząsteczkowej (9, 10). Prezentowana praca jest kontynuacją powyższych badań i dotyczy poznania produktów wyodrębnionych z białka toksoidu tężcowego po jego redukcji. Zachętą do podjęcia tego tematu były doniesienia o istnieniu podjednostek, z których zbudowane jest białko toksyny tężcowej (14). Założono, że po uwzględnieniu tego i po porównaniu z rezultatami otrzymanymi w przedstawionej pracy dla białka toksoidu tężcowego, będzie można przynajmniej w części odpowiedzieć na pytania, w jakim stopniu oraz, jakie fragmenty molekuly toksyny ulegają modernizacji pod wpływem czynnika odzjadliwiającego, prowadzącego do wytworzenia toksoidu tężcowego.

#### MATERIAŁY I METODY

Białka: cytochrom C — BDH, hemoglobina — BDH i albumina ludzka — BDH, dekstran błękitny — BDH, zestaw wzorców aminokwasowych — National Biochemical Corporation Cleveland Ohio, Sephadex G-100 i G-200 — Pharmacia Uppsala, Tris — BDH, 2-merkaptotanol — Loba, kwas jodooctowy — Koch-Light, bibuła do chromatografii — Whatman 3, woreczki celofanowe do dializy — Zakład Chemii Fizjologicznej AM w Lublinie. Dalsze odczynniki były produkcji polskiej i cha-

rakteryzowały się następującym stopniem czystości: chlorek sodu cz.d.a., kwas solny stężony cz.d.a., kwas octowy (lod.) cz.d.a., etanol 95% cz.d.a., n-butanol cz.d.a., wodorotlenek sodu cz.d.a., ninhydryna cz.d.a. i aceton cz.d.a.

Przygotowywano następujące roztwory: 0,2 M bufor Tris *pH* 8; 97 g Tris rozpuszczano w 1000 ml wody (podwójnie przekroplonej), dodawano 2 N kwas solny do *pH* 8 i wodą dopełniano do 4000 ml. Buforowane roztwory: 0,15 M i 0,45 M NaCl, 0,2 M 2-merkaptotoetanolu i 0,6 M kwasu jodooctowego — sporządzano odważki: NaCl, 2-merkaptotoetanolu i kwasu jodooctowego oraz rozpuszczano je w 0,2 M buforze Tris do objętości 100 ml. Układy chromatograficzne: n-butanol, kwas octowy (lod.), woda — 4 : 1 : 1 V/V — A, pirydyna, woda — 65 : 35 V/V — B, pirydyna, kwas octowy (lod.), woda — 50 : 35 : 15 V/V — C. Żele przed wprowadzeniem na kolumnę poddawano pęcznieniu w soli fizjologicznej — Sephadex G-200 i w buforze Tris-Sephadex G-100.

Do otrzymywania preparatu białka toksoidu tężcowego wykorzystano zagęszczony formolowy przesącz hodowli *Cl. tetani* — Warszawska Wytwórnia Surowic i Szczepionek oraz oczyszczano według Komorowskiej i wsp. (11). Produkty redukcji białka toksoidu tężcowego otrzymywano za pośrednictwem 2-merkaptotoetanolu (17). Rozdziału dokonywano przy pomocy sączenia molekularnego na kolumnie 2,5×40 cm wypełnionej Sephadexem G-100, wycieki zbierano przy pomocy automatycznego kolektora, produkcji Rzemieślniczej Spółdzielni „Mechanik” — Poznań i kontrolowano przy pomocy spektrofotometru VSU-2P.

Masę cząsteczkową badanych substratów wyznaczano wobec wzorcowych białek, uwzględniając przy ostatecznej ocenie: objętość elucji i rachunek wyrównawczy (12). Skład aminokwasowy białkowych produktów redukcji określano w następujący sposób. Próbkę badanych substancji poddawano zasadowej (2) lub kwaśnej hydrolizie (3). Mieszaninę aminokwasów nanoszono obok wzorców na bibułę Whatman 3 (37×46 cm) i rozwijano techniką wstępującą w komorach szklanych 20×22×49 cm. Nie rozdzielone powyższym sposobem aminokwasy rechromatografowano, wykorzystując ten sam gatunek bibuły 28×28 cm oraz szklany eksykator o średnicy 32 cm (4).

## BADANIA WŁASNE

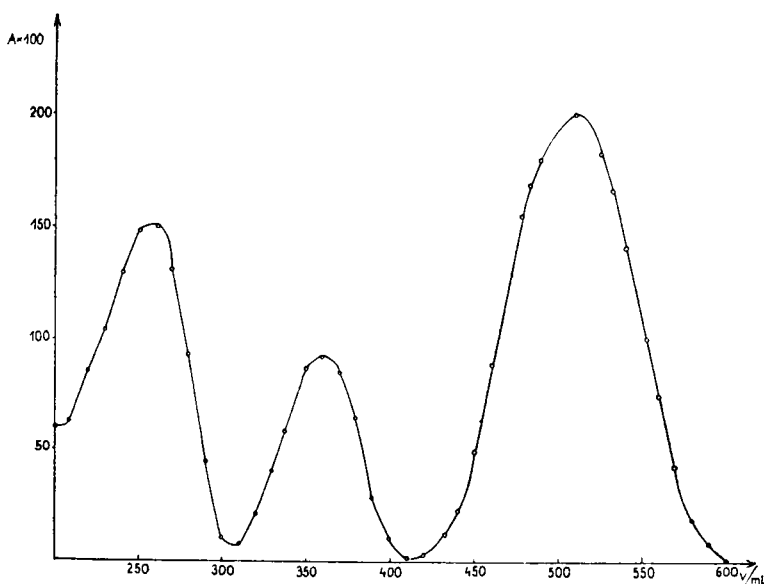
### Redukcja białka toksoidu tężcowego

25 mg białka toksoidu tężcowego rozpuszczano w 2,5 ml 0,2 M buforu Tris. Następnie dodawano 1,25 ml 0,2 M 2-merkaptotoetanolu w powyższym buforze. Mieszaninę doprowadzono do 30°C i pozostawiano na 60 min. Reakcję przerywano wstawiając probówkę z zawartością do łaźni lodowej na 15 min. Po oziębieniu dodawano 1,25 ml 0,6 M kwasu jodooctowego w buforze Tris i przy pomocy 1 M NaOH doprowadzano mieszaninę do *pH* 8, a następnie oziębiano do 4°C i pozostawiano na 60 min. Składniki niskocząsteczkowe usuwano za pomocą dializy wobec 0,15 M NaCl w buforze Tris, a następnie powtarzano tę operację, stosując 0,45 M NaCl w tym samym buforze. Po wykonaniu dializy, która w obu przypadkach prowadzona była przez 12 godz., przenoszono zawartość woreczka do szklanych

próbówek, w których doprowadzano ciecz do objętości 1 ml w 30°C pod próżnią.

### Rozdział produktów białka toksoidu tężcowego

1 ml roztworu zawierającego produkty redukcji białka toksoidu tężcowego nanoszono na szczyt kolumny wypełnionej Sephadexem G-100. Do eluowania używano 0,2 M bufor Tris. Wycieki wypływające ze średnią szybkością 0,56 ml/min zbierano w próbkach umieszczonych w kolektorze i fotometrowano przy 280 nm. Otrzymane wyniki przedstawiono graficznie na ryc. 1, uwzględniając na osi odciętych objętość wycieku w ml — V/ml, a na osi rzędnych absorbancje —  $A \times 100$ .



Ryc. 1. Produkty redukcji białka toksoidu tężcowego rozdzielone na kolumnie wypełnionej Sephadexem G-100

The products of the reduction of the tetanus toxoid protein separated on the column filled with the Sephadex G-100

### Masy cząsteczkowe produktów redukcji białka toksoidu tężcowego

10 mg wzorcowych białek: cytochromu C, hemoglobiny i albuminy ludzkiej łączono w jedną całość i rozpuszczano w 1 ml buforu Tris. Otrzymany roztwór nanoszono na szczyt kolumny. Objętość elucji poszczególnych standardów określano przy zachowaniu warunków stosowanych przy rozdziale produktów redukcji białka toksoidu tężcowego. Przyjmując ma-

sy cząsteczkowe: cytochromu C — 11600, hemoglobiny — 67000, albuminy ludzkiej — 69000 daltonów (5), a odpowiednie objętości elucji: 600, 80, 50 ml oraz uwzględniając, że logarytm masy cząsteczkowej  $x$  jest funkcją objętości elucji  $y$ , wyznaczono wspomnianą zależność przy pomocy rachunku wyrównawczego — wzór 1.

$$y = 3358,270 - 680,712 \cdot x \quad (1)$$

Masę cząsteczkową produktów redukcji białka toksoidu tężcowego obliczano przy pomocy przedstawionego równania. Postępowanie polegało na wstawieniu do powyższego wyrażenia kolejnych objętości elucji otrzymanych przy rozdziale produktów redukcji: 1, 2, 3 (ryc. 1) i wyznaczeniu  $\log M - x$  oraz masy cząsteczkowej —  $M$ . Ostatecznie uwzględniając wszystkie otrzymane wyniki opracowano ich zestawienie (tab. 1).

Tab. 1. Zestawienie produktów redukcji białka toksoidu tężcowego: 1, 2, 3 —  $P$ , z objętością elucji w ml —  $y$ , masą cząsteczkową w daltonach —  $M$  i  $\log M - x$   
The comparison of the products of the reduction of the tetanus toxoid protein: 1, 2, 3 —  $P$  with the volume eluation in ml —  $y$ , molecular weight in daltons —  $M$  and  $\log M - x$

$P$	$y$	$x$	$M$
1	255	4,559	36 210
2	350	4,419	26 260
3	515	4,177	15 030

#### Skład aminokwasowy produktów redukcji białka toksoidu tężcowego

Rozdzielone produkty redukcji białka toksoidu tężcowego wprowadzono do oddzielnych parowniczek, w których pod promiennikami usuwano składniki lotne. Pozostałość przenoszono do szklanych ampułek przygotowanych w takiej ilości, aby można było równolegle prowadzić hydrolizę kwaśną i alkaliczną w obecności: 1 ml 6 M HCl lub 1 ml 5 M NaOH. Po zatopieniu ampułek pod próżnią, zawartość ogrzewano w 105°C przez 24 godz. Otrzymaną mieszaninę wolnych aminokwasów umieszczano w parowniczkach, usuwając kwas solny sposobem podanym wyżej. Następnie wprowadzano bezwodny etanol. Część nierozpuszczalną odrzucano. Po usunięciu etanolu z roztworu otrzymywano suchą masę, zawierającą wolne aminokwasy. Rozpuszczano ją w trzech kroplach wody i nanoszono obok standardów na bibułę Whatman 3. Rozwijano dwukrotnie w układzie — A w każdym przypadku 48 godz. Za pomocą 0,2% acetonowego roztworu ninhydryny uwidaczniano położenie aminokwasów na chromatogramie. W przypadku: asparaginy, seryny, glicyny oraz kwasu gluta-

minowego, treoniny oraz izoleucyny i leucyny dokonywano dodatkowej identyfikacji. W związku z tym po wstępnym ustaleniu miejsca występowania wymienionych aminokwasów wycinano je wraz z nośnikiem bibułowym, który wykorzystywano jako „knot” w chromatografii krążkowej. Dla dwu pierwszych zespołów aminokwasów stosowano układ B, w trzecim — układ C. Po wywołaniu dokonywano odczytów. Ostatecznie ustalono skład aminokwasowy produktów redukcji białka toksoidu tężcowego (tab. 2) na podstawie chromatografii wykonanej techniką wstępującą oraz krążkową (rechromatografia), zarówno w odniesieniu do kwaśnych, jak i zasadowych hydrolizatów.

#### DYSKUSJA I WNIOSKI

Białko toksyny tężcowej ma masę cząsteczkową w granicach 160 000 daltonów i może być rozbite na dwa fragmenty o masie 53 000 i 107 000 daltonów (14). Przyjmując, że toksoid tężcowy tworzy się z toksyny po uprzednim wprowadzeniu formaldehydu. Wysuwane są różne hipotezy co do trybu działania tego czynnika. Jedne z nich sugerują, że w procesie tym zachodzą zmiany w niektórych centrach aktywności (1, 16), inne dotyczą zmian konformacyjnych (13, 15). Na tle tych rozbieżności uzasadnione stało się podjęcie próby wyjaśnienia tej kwestii na nieco odmiennym płaszczyźnie niż dotychczas. Spróbowano zanalizować, jakie różnice mogą występować między wspomnianymi antygenami w świetle porównania produktów ich redukcji. Wcześniejsze badania wykazały, że toksoid tężcowy ma masę cząsteczkową 74 000 (9, 10), a więc przeszło dwukrotnie niższą niż toksyna. Można postulować, że w procesie detoksyfikacji toksyny dochodzi do oderwania niektórych strukturalnych elementów. Pragnąc to potwierdzić, wykonano redukcję białka toksoidu tężcowego, z której wynikło, że tworzą się przy tym trzy produkty określone roboczo: 1, 2 i 3 o masie cząsteczkowej: 15 030, 26 260 i 36 210 daltonów. Daje to w zestawieniu z toksyną dodatkowy fragment. W ten sposób można założyć, że proces detoksyfikacji winien łączyć się z dodatkowym tworzeniem tego fragmentu. Powstaje pytanie, jak to przedstawia się w aspekcie porównawczym obu antygenów. Z przyjęcia, iż mniejszy fragment toksyny ma masę cząsteczkową 53 000 daltonów, wynika, że w tym procesie dochodzi do rozłożenia go na wykrywalne w toksoidzie produkty, określone jako: 1 i 3, bowiem ich łączna masa odpowiada masie tego fragmentu toksyny. Natomiast produkt 2 tworzy się z większego fragmentu, którego znaczna część zostaje odrzucona w procesie detoksyfikacji.

Badania składu aminokwasowego produktów redukcji toksoidu tężcowego wykazały istnienie pewnych różnic (tab. 2). Natomiast występo-

wanie w każdym z nich reszt cysteinowych mogłoby dowodzić, że są one połączone mostkami dwusiarczkowymi. Wcześniejsze badania dotyczące ogólnej zawartości aminokwasów w toksoidzie pozwalają przyjąć zgodność tych rezultatów, ponieważ ogólny skład aminokwasowy w obu przypadkach jest ten sam (6, 8).

Tab. 2. Skład aminokwasowy produktów redukcji białka toksoidu tężcowego: 1, 2, 3  
The aminoacids composition of the products of the reduction of the tetanus toxoid protein: 1, 2, 3

Lp.	Amino- kwas	1	2	3
1.	Cys	+	+	+
2.	Lys	+	+	—
3.	Asn	+	+	+
4.	His	—	—	+
5.	Arg	—	—	+
6.	Asp	+	—	+
7.	Gly	+	+	—
8.	Ser	+	+	—
9.	Glu	+	+	+
10.	Thr	+	+	—
11.	Ala	+	+	—
12.	Pro	+	+	+
13.	Tyr	—	—	—
14.	Trp	+	+	+
15.	Met	+	+	—
16.	Val	+	+	+
17.	Phe	+	+	+
18.	Ile	+	+	—
19.	Leu	+	+	—

+ Obecny.

— Nieobecny.

Podsumowując można założyć, że przedstawione badania uzupełniają dotychczasowe poglądy związane z procesem detoksyfikacji i wskazują, że łączy się one z rozbiciem mniejszego fragmentu toksyny tężcowej na produkt: 1 i 3 oraz większego — na produkt 2, z których następnie tworzy się molekula toksoidu tężcowego. O prawdziwości tego założenia świadczy fakt, że łączna masa cząsteczkowa produktów: 1, 2 i 3 daje masę cząsteczkową toksoidu równą w przybliżeniu 74 000 daltonów. Dodatkowym potwierdzeniem jest skład aminokwasowy białka toksoidu, który jest identyczny w odniesieniu do wszystkich łącznie wziętych produktów redukcji.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Blass J.: Ann. Inst. Pasteur (Paris). **101**, 687—702, 1961.
2. Blackburn S.: Amino Acid Determination Methods and Techniques. Marcel Dekker. New York 1968, 22—24.

3. Block R., Durrum E., Zweig G.: A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis. Academic Press. New York 1955, 80—87.
4. Borkowski T.: Acta Biochim. Pol. 3, 333—343, 1956.
5. Karlson P.: Zarys biochemii. PWN, Warszawa 1964, 66—68.
6. Klimek J.: Med. Dośw. Mikrobiol. 21, 49—55, 1969.
7. Klimek J.: Med. Dośw. Mikrobiol. 21, 57—60, 1969.
8. Klimek J., Wrońska J.: Med. Dośw. Mikrobiol. 24, 39—43, 1972.
9. Klimek J., Wrońska J.: Med. Dośw. Mikrobiol. 24, 293—297, 1972.
10. Klimek J., Wrońska J.: Med. Dośw. Mikrobiol. 27, 305—308, 1975.
11. Komorowska-Rycerz A., Brühl A., Krauze R.: Bull. Acad. Polon. 14, 81—84, 1965.
12. Küster F.: Logarytmiczne tablice analityczne. PWT, Warszawa 1952, 206—209.
13. Largier F.: J. Immun. 76, 393—398, 1956.
14. Matsuda M., Yoneda M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 1257—1262, 1974.
15. Pillemer L., Witter R., Grossberg D.: Science 103, 615—616, 1946.
16. Raynaud M., Blass J., Turpin A.: Compt. rend. 862—863, 1957.
17. Tomaszewski J.: Acta Biochim. Polon. 20, 45—54, 1973.

Otrzymano 7 III 1977.

#### РЕЗЮМЕ

Показано, что протеин столбнячных токсидов в присутствии восстановительных факторов распадается, образуя три продукта редукции. Определено молекулярные массы и аминокислотный состав. Сделано попытку выяснить процесс детоксификации столбнячного токсина, происходящего под влиянием муравьиного альдегида.

#### SUMMARY

It has been found that the tetanus toxoid proteins is decomposed in the presence of reducing factors and gives three products of the reduction. Molecular weight is described as well as the aminoacids composition. An attempt to explain the process of the detoxication of tetanus toxin taking place under the influence of formic aldehyde has been made.

