



УДК 547.963.1 : 576.8.097.07

РОЛЬ УГЛЕВОДНЫХ ГРУПП В ИММУНОГЛОБУЛИНАХ М

I. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОГЛОБУЛИНА М ЧЕЛОВЕКА, ИМЕЮЩЕГО УГЛЕВОДНЫЕ ГРУППЫ НА L-ЦЕПЯХ

*Ланук В. А., Шмакова Ф. В., Каверзнева Е. Д.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Описано выделение и дан физико-химический анализ IgM_{E_L} (κ -тип), характеризующегося наличием углеводных групп в L-цепях.

Среди гликопротеинов за последние годы все возрастающее внимание привлекают иммуноглобулины, в частности иммуноглобулины М (IgM). Число работ, посвященных выяснению строения и биологических функций IgM , непрерывно растет. Установлена общая архитектоника молекулы IgM , включающей комплекс из пяти субъединиц, которые в свою очередь состоят из двух одинаковых половин, образованных «тяжелой» (H) и «легкой» (L) полипептидными цепями [1]. Для отдельных IgM установлены аминокислотные последовательности H-цепей [2, 3] и L-цепей [3]. Решается вопрос о наличии «связующего» пептида (J-цепь), по-видимому, скрепляющего весь этот комплекс [4, 5]. Имеется уже ряд данных о третичной структуре этих макромолекул [6, 7]. В то же время IgM содержат до 13% углеводов, которые, как правило, расположены в H-цепях [3], гораздо реже — в L-цепях [8]. Функции этих углеводных группировок с достаточной определенностью до сих пор не выяснены.

С целью исследования этих функций мы прежде всего поставили задачу выделения и характеристики достаточно чистого и гомогенного IgM , пригодного для дальнейшего детального изучения. В настоящем сообщении даны метод выделения и характеристика IgM_{E_L} от больного макроглобулинемией (болезнь Вальденштрёма).

Для получения IgM_{E_L} была использована в основном общепринятая методика [9]. Исключением составила стадия промежуточного выделения лиофильно сухой фракции глобулинов (СФГ), что было вызвано ненадежностью длительного хранения замороженной плазмы. Растворимость свежеполученных препаратов СФГ достигала 97%, выходы IgM_{E_L} и IgG при гель-фильтрации СФГ (рис. 1, пики II и III соответственно) составили соответственно 45—49 и 7—8% от взятого количества СФГ. Правда, при длительном хранении растворимость СФГ за счет образования ассоциатов (рис. 1, пик I) сильно уменьшается, что снижает эффективность гель-фильтрации. Это затруднение было преодолено быстрой обработкой 1 г СФГ за 100 мл буфера pH 8,4 (см. «Экспериментальную часть»). При этом ассоциаты практически не растворяются, а полученный разбавленный

раствор концентрируют примерно до 10 мл с помощью подходящего ультрафильтра (например, фирмы «Sartorius», ФРГ). При гель-фильтрации такого образца выходы $IgM_{EЛ}$ также достигают 50% от нанесенного на колонку количества СФГ.

Полученные по этой методике препараты $IgM_{EЛ}$ оказались гомогенными по данным электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноэлектрофореза. L-цепи $IgM_{EЛ}$ относятся к κ -типу.

Ультрацентрифугирование $IgM_{EЛ}$ показало наличие симметричного основного пика с $s_{20} = 17,4, S$ и малого пика с $s_{20} = 24,6 S$ (рис. 2). Второй пик содержится в количестве $\sim 10\%$ и, по всей вероятности, соответствует ассоциату, встречающемуся практически во всех препаратах IgM [10].

Результаты аминокислотного анализа представлены в табл. 1. Справедливость данных этой таблицы подтверждается некоторыми перекрестными определениями и вспомогательными расчетами. Так, суммарный выход аминокислот в расчете на навеску составил по данным аминокислотного анализа 87,3%, а соответствующая расчетная величина, полученная вычитанием содержания углеводов (табл. 2) — 88,2%. Содержание тирозина, найденное спектрофотометрически [11] и по данным аминокислотного анализа, составило соответственно 4,15 и 4,25%. Триптофана найдено колориметрическим методом [12] — 3,38, спектрофотометрически [11] — 2,96%. Наконец, на основании данных аминокислотного анализа был проведен расчет молекулярного веса полученного $IgM_{EЛ}$ по формуле:

$$M_a = \sum_{1-x} (n_1 M_1 + n_2 M_2 + \dots + n_x M_x) - \left[\left(\sum_{1-x} n_1 + n_2 + \dots + n_x \right) - 1 \right] \times M_{H_2O},$$

где M_a — молекулярный вес аминокислотной части $IgM_{EЛ}$; n_1, n_2, \dots, n_x — число молей соответствующей аминокислоты на моль белка ($M \cdot 10^5$ — средний для IgM); M_1, M_2, \dots, M_x — молекулярные веса аминокислот.

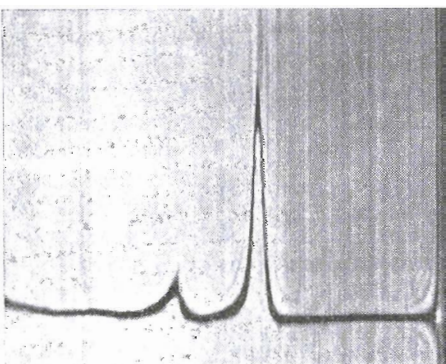


Рис. 2. Ультрацентрифугирование $IgM_{EЛ}$

Найденная по этой формуле величина M_a равна 809 726, что в пересчете на молекулярный вес с учетом содержания углеводов (табл. 2) составляет 920 000 с отклонением от взятой по данным работы [1] средней величины всего на 2,2%.

Некоторые затруднения вызвало установление весового соотношения гексов в $IgM_{EЛ}$. Для этой цели был выбран метод количественной БХ с использованием трифенилтетразолий-хлорида — одного из самых чувствительных из имеющихся для этой цели реагентов [13]. Эта методика достаточно подробно описана в ряде публикаций [13—15]. Однако на практике оказалось, что все предложенные варианты приводят к образованию сильного фона при окрашивании хроматограммы, что резко сни-

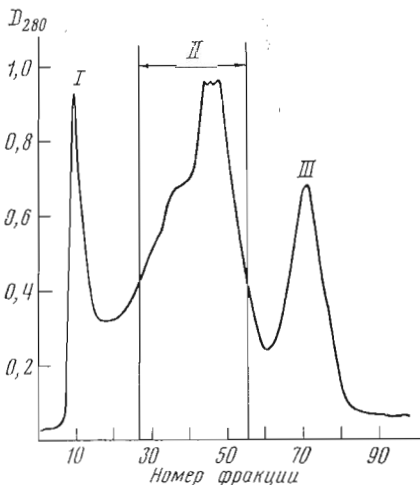


Рис. 1. Гель-фильтрация γ -глобулиновой фракции плазмы крови (СФГ) на сефарозе 4В, объем фракции — 8,5 мл

Аминокислотный состав IgM_{ЕЛ}

Аминокислота	Весовые %, считая сумму аминокислот за 100 %	Моль/моль белка	Аминокислота	Весовые %, считая сумму аминокислот за 100%	Моль/моль белка
Lys	5,69	368	1/2 Cys *	2,57	202
His	1,69	103	Val	7,43	602
Arg	5,83	317	Met	1,47	94
Asx	7,77	553	Ile	3,14	232
Thr *	9,74	781	Leu	8,30	600
Ser *	8,70	783	Tyr	4,15	218 ***
Glx	11,40	734	Phe	4,53	260
Pro	6,01	495	Trp	3,38 **	130 ***
Gly	3,83	482	Амидный N	—	50
Ala	4,37	464			

* С учетом разрушения при гидролизе.

** Определено колориметрически [12].

*** Определено спектрофотометрически [11].

Таблица 2

Содержание углеводов (%) в IgM_{ЕЛ} (M 920 000, s₂₀ 17,4 S, ИЭТ5,5)

Углеводы	IgM _{ЕЛ}	H-цепь	L-цепь
Общее содержание	11,82	—	—
гексозы	5,95	8,07	2,00
GlcNAc	4,95	7,80	0,72
сиаловые кислоты	0,92	—	—
Man — Gal — Fuc	3 : 1 : 1	—	—

жает точность определения. Поэтому был проведен тщательный подбор условий проявления. Разработанная методика (см. «Экспериментальную часть») позволила получать хроматограммы почти без фона. В результате было установлено, что в IgM_{ЕЛ} соотношение манноза — галактоза — фукоза равно 3 : 1 : 1.

В ходе выделения H- и L-цепей неожиданно выяснилось, что в L-цепях, так же как и в H-цепях, содержится антрон-положительный материал. Спектр поглощения реакционной смеси — антронный реактив плюс L-цепь (рис. 3) — оказался характерным для гексоз и позволил сделать вывод, что в L-цепях IgM_{ЕЛ} имеются гексозы в количестве 2%. Следует отметить, что этот спектр сохраняется только в первые часы после проведения реакции с антронным реактивом. Уже примерно через 18 ч он полностью теряет свою характерность (рис. 3). В L-цепях, как и следовало ожидать, был найден и N-ацетилглюкозамин (табл. 2).

Точные данные о содержании N-ацетилглюкозамина были получены лишь путем определения при разном времени гидролиза, так как имелись указания на его разрушение в ходе гидролиза таких крупных гликопротеинов, как иммуноглобулины [16]. Действительно, наши результаты показали, что в процессе гидролиза для IgM_{ЕЛ} и H-цепей существует соответственно свой предел разрушения N-ацетилглюкозамина, который в H-цепях достигается примерно в 6 раз быстрее, чем в IgM_{ЕЛ} (рис. 4). Обра-

Рис. 3. Спектры поглощения продуктов реакции с аутоновым реактивом: 1 — L-цепи IgM_{EЛ} (спектр снят немедленно после реакции), 2 — L-цепи IgM_{EЛ} (спектр снят примерно через 18 ч после реакции), 3 — манноза, 50 мкг/мл

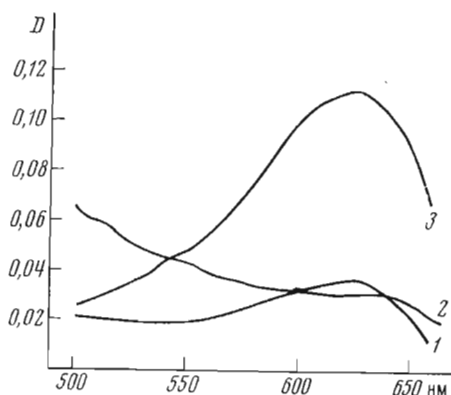


Рис. 3.

Рис. 4. Определение содержания N-ацетилглюкозамина (Y, %): А — в IgM_{EЛ}, Б — в Н-цепях IgM_{EЛ}

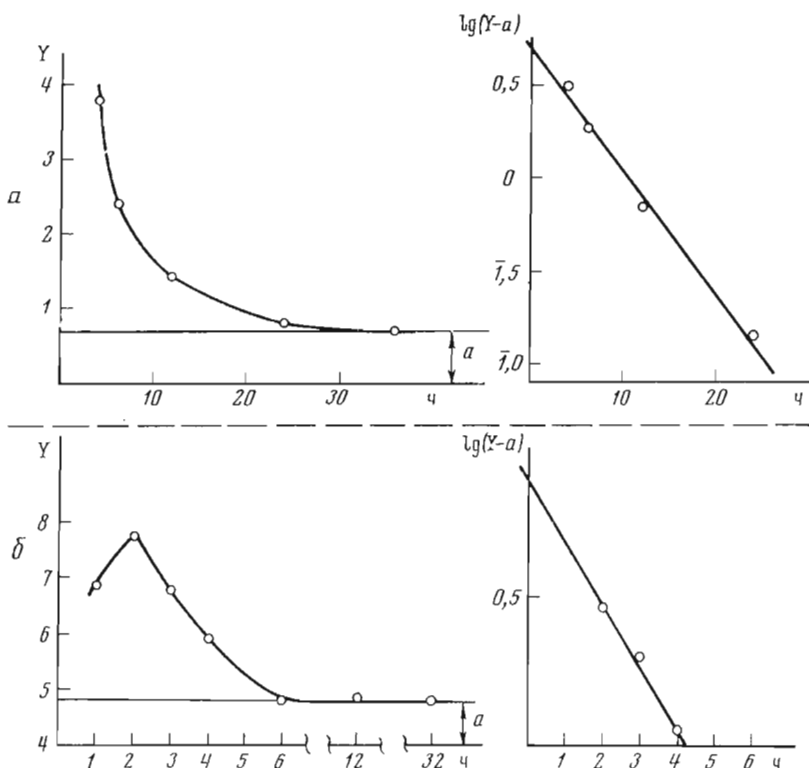


Рис. 4.

ботка полученных данных в координатах, указанных на рис. 4, позволила определить содержание N-ацетилглюкозамина при «нулевом» времени гидролиза. Соответствующие результаты представлены в табл. 2.

Экспериментальная часть

IgM_{EЛ} получали, видоизменив описанную в работе [9] методику. 250—500 мл плазмы крови фильтровали через плотный складчатый фильтр на холоду, к фильтрату добавляли 2 объема дистиллированной воды и осаждали 1,08 объема насыщенного сульфата аммония. После отстаивания при 5° и центрифугирования осадок растворяли в воде и повторяли осаждение сульфатом аммония. Полученный препарат растворяли в минимальном ко-

личестве воды и после 3 сут диализа против дистиллированной воды центрифугировали; надосадочную жидкость лиофилизовали, получали СФГ, выход $\sim 2,8$ г на 100 мл плазмы.

Для выделения $IgM_{E.L}$ из смеси глобулинов 400 мг полученного препарата растворяли в 8—10 мл 0,01М трис-НСl буфера (рН 8,4), содержащего 0,3М NaCl, осадок отделяли центрифугированием, надосадочную жидкость хроматографировали на колонке с сефарозой 4В (3×100 см), уравновешенной тем же буфером при скорости элюирования 25 мл/ч. $IgM_{E.L}$ (рис. 1, пик II) обессоливали на колонке с сефадексом G-25 и лиофилизовали.

Выделение Н- и L-цепей $IgM_{E.L}$ проводили на сефадексе G-100 в 1М пропионовой кислоте после восстановления $IgM_{E.L}$ 0,01 М дитиотреитом при рН 8,4 (0,01 М трис-НСl буфер) и алкилирования 50%-ным молярным избытком иодоацетамида (по отношению к дитиотреиту).

Аминокислотный анализ проводили на автоматическом аминокислотном анализаторе ААА-881 («Mikrotechna», ЧССР) после кислотного гидролиза (6 н. HCl, 105°) в течение 24, 48 и 72 ч с последующей экстраполяцией полученных результатов к «нулевому» времени гидролиза и введением соответствующих поправок в данные для серина, треонина и цистина. Триптофан был определен колориметрически с $FeCl_3$ [12] и (вместе с тирозином) спектрофотометрически [11].

Определение гексоз проводили комбинацией методов с использованием антронового реактива [17, 18].

Соотношение гексоз устанавливали при помощи количественной БХ с использованием 2,3,5-трифенилтетразолийхлорида (ТТХ) в качестве реагента для колориметрического определения. 10 мг $IgM_{E.L}$ гидролизовали в 10 мл 2н. HCl 4 ч при 100°, отфильтровывали, фильтрат нейтрализовали дауэксом 1×16 (HCO_3^-), к объединенным фильтрату и промывным водам добавляли триэтиламин до рН 7, раствор пропускнули через колонку с зеокарбом 225 (Н⁺-форма, $1,2 \times 3$ см) и элюат упаривали досуха. Сухой остаток растворяли в 0,1 мл воды и хроматографировали на бумаге ватман-2 в системе бутанол — пиридин — вода (10 : 3 : 3) [13], нанося по 10 мкл в точку. Сухую хроматограмму погружали в 0,5%-ный раствор ТТХ в перегнанном метаноле, высушивали 5 мин в темноте при комнатной температуре, затем погружали в свежеприготовленный 0,5н. раствор КОН в перегнанном метаноле, высушивали 5 мин в темноте и выдерживали 1 сут при 37° в темноте в атмосфере паров воды. Розовые пятна, соответствующие маннозе, галактозе и фукозе, вырезали, соблюдая равенство площадей (25×20 мм), и вещество элюировали 3 мл смеси метанол — уксусная кислота (8 : 1) в течение 10 мин, встряхивая 2—3 раза [14, 15]; фотометрировали при 483 нм [14] против контроля, полученного элюированием фона с такой же площади хроматограммы.

Анализ аминокислот в $IgM_{E.L}$ и Н-цепях проводили после гидролиза 3н. HCl при 110° в течение 1—36 ч [16] на колонке ($0,8 \times 62$ см анализатора ААА-881), уравновешенной стандартным буфером рН 5,28 [19]. Полученные данные экстраполировали в полулогарифмических координатах к «нулевому» времени гидролиза (рис. 4). L-цепи гидролизовали в тех же условиях 4 ч и вводили поправку на разрушение глюкозамина, рассчитанную для 4-часового гидролиза Н-цепей.

Сиаловые кислоты определяли по методу Уоррена [20].

Константу седиментации s_{20} определяли на ультрацентрифуге «Beckman» модель E (США) при 56 100 об/мин, 20° и концентрации белка ~ 5 мг/мл в 0,15 М NaCl и рассчитывали обычным способом [21].

Иммунохимическую проверку $IgM_{E.L}$ осуществляли методом иммуноэлектрофореза с использованием кроличьей антисыворотки против сыворотки человека (Из Института судебной медицины) и моноспецифической кроличьей антисыворотки против IgM человека (из Московского

научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии — МНИИЭМ). Определение типа IgM_{E_L} проводили методом иммуноэлектрофореза с использованием моноспецифических антисывороток против κ - и λ -цепей человека (МНИИЭМ).

Авторы выражают глубокую благодарность Е. В. Чернохвостовой и Г. П. Герман (МНИИЭМ) за предоставление антисывороток и определение типа L-цепей IgM_{E_L} , и В. Я. Черняку (Межфакультетская лаборатория биоорганической химии МГУ им. М. В. Ломоносова) за проведение ультрацентрифугирования IgM_{E_L} .

ЛИТЕРАТУРА

1. Metzger H. (1970) *Adv. Immunology*, **12**, 57—116.
2. Putnam F. W., Florent G., Paul C., Shinoda T., Shimizu A. (1973) *Science*, **182**, 287—291.
3. Laure C. J., Watanabe S., Hilschmann N. (1973) *Hoppe — Seyler's Z. physiol. Chem.*, **354**, 1503—1504; Watanabe S., Barnikov H., Horn J., Bertram J., Hilschmann N. (1973) *Hoppe — Seyler's Z. physiol. Chem.*, **354**, 1505—1509.
4. Mestecky J., Zikan J., Butler W. T. (1974) *Science*, **171**, 1163—1165.
5. Della Corte E., Parkhouse R. M. E. (1973) *Biochem. J.* **136**, 597—606.
6. Miller J. N. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **236**, 655—658.
7. Feinstein A., Munn E. A. (1969) *Nature*, **224**, 1307—1309.
8. Кайгородова Л. Н., Каверзнева Е. Д. (1967) *Молекулярн. биология*, **1**, 224—230.
9. Egorov A. M., Chernyak V. Ya., Dunaevsky Ya. E., Gavrilova E. M., Moiseev V. L. (1974) *Immunochemistry*, **8**, 1157—1163.
10. Mihaesco C., Mihaesco E., Metzger H. (1973) *FEBS Lett.*, **37**, 303—306.
11. Edelhoch H. (1967) *Biochemistry*, **6**, 1948—1954.
12. Opienska-Blauth J., Charezinski M., Berbec H. (1963) *Anal. Biochem.*, **6**, 69—76.
13. Mes J., Kamm L. (1968) *J. Chromatogr.*, **38**, 120—125.
14. Szabados L., Vass G., Mester L. (1968) *Compt. rend. (Paris)*, D266, 291—292.
15. Fischer F. G., Dörfel H. (1954) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **297**, 164—178.
16. Fanger M. W., Smyth D. G. (1970) *Anal. Biochem.*, **34**, 494—499.
17. Südhof H., Kellner H., Shulte N. (1955) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **300**, 68—81.
18. Hörmann H., Gollwitzer R. (1966) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **346**, 21—41.
19. Walborg E. F., Cobb B. F., Adams-Mayne M., Ward D. N. (1963) *Anal. Biochem.*, **6**, 367—373.
20. Warren L. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**, 1971—1975.
21. Шпикитер В. О. (1964). Современные методы в биохимии (под ред. В. Н. Ореховича), т. 1, стр. 12—18, «Медицина», М.

Поступила в редакцию
6.I.1975.

ROLE OF CARBOHYDRATE GROUPS IN IMMUNOGLOBULINS M. I. ISOLATION AND PROPERTIES OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN M WITH CARBOHYDRATE GROUPS BOUND TO L-CHAINS

LAPUK V. A., SHMAKOVA F. V., KAVERZNEVA E. D.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The isolation and physico-chemical properties of human immunoglobulin M of the κ -type (IgM_{E_L}) possessing carbohydrate groups linked to the L-chains are described.