



УДК 547.963

РОЛЬ УГЛЕВОДНЫХ ГРУПП В ИММУНОГЛОБУЛИНАХ М.

II. ИЗОТЕРМЫ ГИДРАТАЦИИ ИММУНОГЛОБУЛИНА М*

*Хургин Ю. И., Шерман Ф. Б., Тусупкалиев У.,
Лапук В. А., Шмакова Ф. В., Климова В. А.,
Каверзнева Е. Д.*

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Гидратация IgM в твердом состоянии изучена динамическим методом с использованием реактива Фишера. С помощью уравнения БЭТ рассчитаны величины эффективного монослоя воды на поверхности IgM, образующиеся в ходе процессов сорбции и десорбции воды. Проведено сопоставление величин эффективного монослоя для нейтрального препарата IgM с данными аминокислотного и углеводного анализов и показано, что практически все полярные боковые группы аминокислотных остатков и полярные группы углеводных остатков находятся на поверхности глобулы. Сравнение величин эффективного монослоя из изотерм сорбции и десорбции приводит к выводу, что значительная часть поверхностных полярных групп молекулы IgM образует ионные пары или прочные водородные связи. В кислом образце белка (хлоргидрат IgM), 25—30% полярных групп не гидратируется, т. е. становятся экранированными. Предполагается, что при переносе из нейтральной среды в кислую изменяется пространственная структура молекулы IgM.

Изучение взаимодействия глобулярных белков с известной пространственной структурой с парами воды показало, что имеется корреляция между параметрами изотерм гидратации и строением поверхности глобулы [1]. Наличие такой корреляции, в принципе, позволяет использовать изотермы гидратации для изучения строения поверхности белков с неустановленной пространственной структурой. В настоящей работе это сделано на примере IgM.

Обычно для измерения гидратации белков используют статические, преимущественно весовые, методы. Недавно был нами предложен более быстрый динамический метод с использованием реактива Фишера [2], который и был применен для изучения гидратации IgM. Выделение, очистка и основные химические свойства изученного препарата IgM описаны нами ранее [3].

IgM имеет сложную (четвертичную) пространственную структуру и, кроме того, является гликопротеином, содержащим до 12% углеводов. Количественная интерпретация изотерм гидратации гликопротеинов ранее не проводилась и поэтому вклад углеводных фрагментов в суммарную гидратацию до сих пор не установлен. Как известно, ход изотерм сорбции и десорбции паров воды глобулярными белками не совпадает

* Сокращения: IgM и IgG — иммуноглобулины M и G соответственно; уравнение БЭТ — уравнение Брунауэра — Эммета — Теллера.

(гистерезис); в режиме десорбции белки удерживают больше молекул воды, чем в режиме сорбции (при той же самой относительной упругости водяных паров — p/p_s). Явление гистерезиса при адсорбции паров воды наблюдалось для всех изученных до настоящего времени глобулярных белков. Физическая природа гистерезиса не имеет в настоящее время единого, строгого объяснения. Ранее относительно более прочное связывание

воды в процессе дегидратации препарата белка объяснялось нами [1] кооперативным характером разрушения гидратной оболочки, а также чувствительностью пространственной структуры белков к степени заполнения их поверхности молекулами воды.

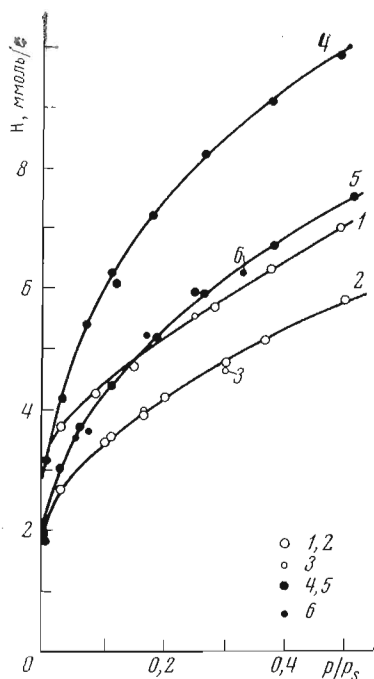


Рис. 1.

Рис. 1. Изотермы сорбции (1—3) и десорбции (4—6) паров воды нейтральным (1 и 4) и кислым (2, 5) препаратами IgM (3 и 6 — кислый препарат, полученный растворением нейтрального препарата в 0,001 н. HCl)

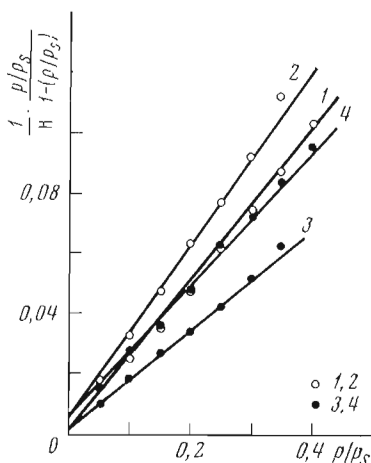


Рис. 2.

Рис. 2. Изотермы сорбции (1, 2) и десорбции (3, 4) паров воды нейтральным (1, 3) и кислым (2, 4) препаратами IgM (в координатах уравнения БЭТ)

Начальный участок изотерм сорбции воды глобулярными белками удовлетворительно описывается уравнением полимолекулярной адсорбции БЭТ [4]:

$$\frac{1}{H} \frac{p/p_s}{1 - (p/p_s)} = \frac{1}{h \cdot C} + \frac{C - 1}{h \cdot C} (p/p_s),$$

где H — количество воды, удерживаемое белком при данном p/p_s , h — величина эффективного монослоя [4] и C — параметр, связанный с избыточной энергией адсорбции (в пределах эффективного монослоя) по сравнению с теплотой конденсации газовой фазы. Ранее нами было показано, что начальный участок изотерм десорбции ($p/p_s < 0,5$) также удовлетворительно описывается уравнением БЭТ [1]. Следовательно, спрямление изотерм сорбции и десорбции (рис. 1) в координатах уравнения БЭТ (рис. 2) позволяет получить два значения эффективного монослоя воды на поверхности белковой глобулы — \bar{h} и \bar{h} (стрелки показывают направление процесса — увеличение или уменьшение гидратации). Образование эффективного монослоя воды представляет собой в случае глобулярных белков

процесс локальной гидратации независимых центров связывания воды, так как даже при максимальной гидратации, которая в 5—6 раз превышает значения \bar{h} или \bar{h} , удерживаемой белком воды, недостаточно для образования сплошного монослоя на его поверхности [1].

Ранее [1] нами было показано, что для белков с известной пространственной структурой имеется следующая корреляция между величинами \bar{h} и \bar{h} и числом поверхностных полярных боковых групп аминокислотных остатков: величина \bar{h} соответствует полному числу поверхностных полярных групп (включая N- и C-концевые группы), величина \bar{h} ниже, причем $\delta h = \bar{h} - \bar{h}$ соответствует суммарному числу ω -амидных групп аспарагина и глутамина и групп, образующих ионные пары или прочные водородные связи на поверхности глобулы. Поверхностные пептидные группы при данном способе интерпретации изотерм гидратации не учитываются. Важно отметить, что величины \bar{h} и \bar{h} , полученные статическими и динамическим методом, практически совпадают [2].

Таким способом изотермы гидратации позволяют независимо от других методов изучения структуры глобулярных белков оценить распределение полярных аминокислотных остатков между внутренней частью глобулы и ее поверхностью. Для того чтобы изотермы гидратации использовать для изучения поверхности белков с неизвестной пространственной структурой, необходимо провести сопоставление величин \bar{h} и \bar{h} с данными аминокислотного анализа, т. е. с общим числом полярных групп (n_{Σ}' , мэkv/г) и содержанием ω -амидных групп (n_{Ω}' , мэkv/г). Для гипотетического белка, который не имеет экранированных полярных групп и не имеет на поверхности ионных пар или прочных водородных связей $\bar{h} = n_{\Sigma}'$ и $\delta h = n_{\Omega}'$. Если же $\bar{h} < n_{\Sigma}'$, то часть полярных групп экранирована ($n_{\Sigma}' - \bar{h}$) и недоступна для взаимодействия с парами воды; при $\delta h < n_{\Omega}'$ часть амидных групп также может находиться во внутренней части глобулы; если $\delta h > n_{\Omega}'$, то на поверхности глобулы возможно образование ионных пар или прочных водородных связей.

Из данных аминокислотного анализа исследуемого в настоящей работе препарата IgM_{БЛ} [3] следует, что этот белок содержит 4,353 мэkv/г полярных групп, из которых 0,95 мэkv/г составляет вклад ω -амидных групп (табл. 1). Величины \bar{h} и \bar{h} для нейтрального препарата IgM (табл. 2) составляют соответственно 6,13 и 4,23 мэkv/г, т. е. величины эффективного монослоя существенно превышают максимально возможное число поверхностных полярных групп. В связи с этим необходимо рассмотреть участие в гидратации дополнительных центров связывания воды. В случае IgM такими дополнительными центрами являются углеводные группы. Всего в углеводных компонентах IgM содержится 0,588 мэkv/г углеводных остатков, из которых N-ацетилглюкозамин составляет 0,223 мэkv/г (табл. 1). В то же время величины \bar{h} и \bar{h} (табл. 2) превышают значения n_{Σ}' и n_{Ω}' на соответственно 1,78 и 0,95 мэkv/г. Однако все углеводные группы молекулы IgM содержат 1,85 мэkv/г полярных (ОН, NHCOCH₃ и COOH), групп, из которых 0,253 мэkv/г составляют амидные группы (табл. 1). Таким образом, наблюдается удовлетворительное соответствие между полным числом полярных групп ($n_{\Sigma} = 6,20$ мэkv/г) и величиной \bar{h} , полученной с помощью уравнения БЭТ из изотерм гидратации нейтрального препарата IgM. Очевидно, при расчете числа потенциальных центров гидратации гликопротеина в качестве первичных центров гидратации следует считать все полярные группы углеводных остатков, а не общее число углеводных остатков, как это делается в случае аминокислот.

Практически полное совпадение величин \bar{h} и n_{Σ} для нейтрального препарата IgM показывает, что в этом случае все полярные группы белковой молекулы находятся на ее поверхности и доступны для взаимодей-

Полярные группы молекулы IgM по данным работы [3]

Полярные группы	мэв/г	Полярные группы	мэв/г
Аминокислотные остатки		Олигосахаридные фрагменты *	
Arg, His, Lys	0,851	—ОН	1,573
Asp, Glu, Asn, Gln	1,388	—NHCOCH ₃	0,253
Ser, Thr, Tyr, Trp	2,068	—COOH	0,030
N- и C-концевые группы	0,046	Всего	1,846
Всего (n'_{Σ})	4,353	Всего амидных групп (n_{Ω})	0,950

* Вычислено на основании данных [3] о составе олигосахаридных фрагментов; нейтральные моносахариды (Man, Gal, Fuc) — 0,335; GlcNAc — 0,223; AcNeu — 0,030 мэв/г.

Таблица 2

Величины эффективного моно слоя \bar{h} и \bar{h} (в мэв H₂O/г белка), полученные для нейтральных и кислых препаратов белков из изотерм сорбции и десорбции паров воды

Препарат белка	Нейтральный		Кислый	
	\bar{h}	\bar{h}	\bar{h}	\bar{h}
IgM	4,23	6,13	3,47	4,48
IgG	4,11	7,08	3,94	6,06
Химотрипсиноген А	2,94	4,05	2,64	3,75

ствия с парами воды. Для нейтрального препарата IgM эффект гистерезиса (δh) составляет 1,90 мэв/г (табл. 2), что существенно выше общего числа ω -амидных групп ($n_{\Omega} = 1,20$ мэв/г): В рамках используемого нами способа интерпретации изотерм гидратации такое несоответствие указывает на возможность образования ионных пар и прочных водородных связей на поверхности молекулы IgM (не менее 0,70 мэв/г). Имеющиеся данные не позволяют рассматривать распределение этих групп между ионными парами или прочными водородными связями, так как максимальное количество групп, участвующих в образовании ионных пар, не может быть выше 0,88 мэв/г (всего в молекуле IgM имеется 1,29 мэв/г ионогенных групп, из которых 0,44 мэв/г катионных и 0,85 мэв/г анионных).

В табл. 2 приведены данные о величинах \bar{h} и \bar{h} для кислого препарата IgM, полученного в форме хлоргидрата, которые отличаются заметным образом от соответствующих величин для нейтрального препарата. Из рис. 1 и 2 видно, что способ получения белка (лиофилизация раствора нейтрального препарата в 0,001 н. HCl или длительный диализ нейтрального раствора IgM против 0,001 н. HCl) не оказывает влияния на способность белка к взаимодействию с парами воды.

Если в кислой среде молекула белка не претерпевает существенных конформационных изменений, то можно ожидать уменьшения гистерезиса из-за разрыва ионных пар при нейтрализации кислотных групп при сохранении общего числа полярных групп. Можно было ожидать также и других изменений адсорбционной способности белков в кислой среде, например за счет образования хлоргидратов катионных групп. Для оценки возможного вклада этих эффектов нами были измерены изотермы

гидратации химотрипсиногена в форме нейтрального препарата [2] и в форме хлоргидрата (табл. 2), поскольку в этом белке содержание ионных пар незначительно. Оказалось, что величины \bar{h} и \bar{h} для обоих препаратов оказались весьма близкими по величине и поэтому неспецифическими эффектами кислой среды можно было пренебречь. Однако, в отличие от химотрипсиногена, изотермы гидратации нейтрального и кислого препаратов IgM сильно различаются. Кислые препараты IgM характеризуются существенно более низкой способностью к взаимодействию с парами воды по сравнению с нейтральными препаратами. Величина \bar{h} в кислом препарате уменьшилась на 0,76 мэкв/г по сравнению с нейтральным (табл. 2). Еще больше изменилось в кислом препарате общее число центров гидратации (\bar{h}); оно снизилось по сравнению с нейтральным препаратом на 1,65 мэкв/г (27,5%). Величина гистерезиса в кислом препарате меньше, чем в нейтральном, и составляет $\delta h = 1,02$ мэкв/г. Поэтому

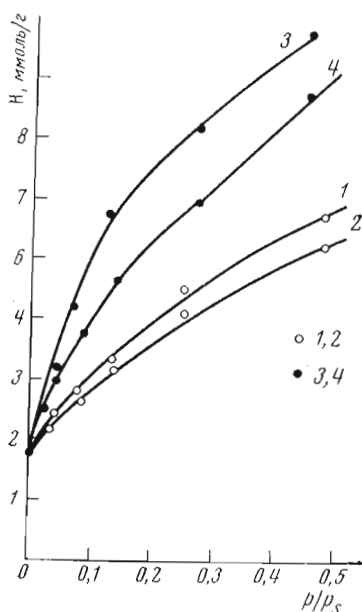


Рис. 3. Изотермы сорбции (1, 2) и десорбции (3, 4) паров воды нейтральным (1, 3) и кислым (2, 4) препаратами IgG

можно предполагать, что в IgM имеется хотя бы небольшое количество ионных пар, которое должно компенсироваться экранировкой соответствующего количества ω -амидных групп. Таким образом, при получении кислых препаратов IgM наблюдается существенное перераспределение полярных групп между поверхностью глобулы и ее внутренней частью и происходит экранирование значительной части полярных групп. При этом часть центров, сильно связывающих воду, а также часть центров, удерживающих воду относительно менее прочно, становятся недоступными для паров воды. Однако первые перераспределились значительно сильнее (на 0,90 мэкв/г). Одной из причин экранирования полярных групп могла быть агрегация белка при получении кислого препарата. Однако агрегация препарата при pH 3,0 менее вероятна, чем в случае нейтрального, «изоэлектрического» препарата, полученного диализом против дистиллированной воды. Поэтому предположение о конформационном изменении молекулы IgM при переходе из нейтральной в кислую среду более предпочтительно, причем характер этой перестройки должен быть таким, чтобы изменялась доступность для паров воды значительного числа полярных групп углеводных компонентов. О возможном экранировании части углеводных групп молекулы IgM в кислой среде свидетельствуют следующие факты. Углеводные цепи IgM крайне слабо подвергаются действию различных карбогидраз [5] при pH 5,4, которое соответствует pH-оптимуму для этих ферментов. Однако было показано (см. следующее сообщение), что при pH 6,35, т. е. выше изоэлектрической точки IgM, наблюдается значительное увеличение скорости гидролиза олигосахаридных цепей IgM под действием карбогидраз. Ускорение ферментативного гидролиза олигосахаридных цепей в неоптимальных условиях может быть связано с частичным их деэкранированием при pH выше изоэлектрической точки.

В настоящей работе нами были также получены изотермы гидратации кислого и нейтрального препаратов другого представителя класса иммуноглобулинов — IgG (рис. 3). Было показано, что в кислом препарате IgG происходит перераспределение полярных групп между внутренней

частью глобулы и ее поверхностью (табл. 2), аналогичное перераспределению в кислых препаратах IgM. Однако в IgG при структурной перестройке затрагивается меньшее число полярных групп, чем в IgM. Не исключено, что это количественное различие адсорбционных характеристик кислых и нейтральных препаратов IgG и IgM может быть связано со значительно более низким содержанием углеводов в IgG.

В заключение следует отметить, что иммуноглобулины характеризуются существенно более высокой способностью к удерживанию молекул воды по сравнению с другими глобулярными белками, гидратация которых изучалась ранее. Обычно глобулярные белки имеют величины емкости эффективного моно слоя \bar{n} и \bar{h} соответственно в пределах $0,28 \div 0,32$ и $0,38 \div 0,43$ мэкв/г. Более высокие значения \bar{n} и \bar{h} обусловлены главным образом наличием в них углеводных групп, причем в IgM все углеводные группы являются, вероятно, поверхностными. Функции этих поверхностных полярных групп углеводных фрагментов не ограничиваются только увеличением гидрофильности поверхности молекулы белка; они, вероятно, могут также играть определенную структурирующую роль.

Экспериментальная часть

Получение, очистка и основные химические свойства препарата IgM (IgM_{Бл}) описаны ранее [3]. Для исследования гидратации было получено три препарата: раствор IgM (рН 8,4) был длительно диализован против дистиллированной воды (препарат а), нейтральный препарат IgM был растворен в воде и длительно диализован против 0,001 н. HCl (препарат б) и нейтральный препарат IgM был непосредственно растворен в 0,001 н. HCl (препарат в). Все препараты были получены лиофилизацией непосредственно перед снятием изотерм гидратации. Нейтральный и кислые препараты IgG были получены лиофилизацией после диализа против дистиллированной воды (а) и 0,001 н. HCl (б) растворов моноклонального миеломного IgG, очищенного предварительно ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе. Препараты химо трипсиногена А (фирма «Reanal», Венгрия) после освобождения от солей фильтрацией через сефадекс G-25 были получены лиофилизацией из водных растворов (рН 7,0 и 3,0). Методика получения изотерм гидратации динамическим методом с использованием реактива Фишера описана нами ранее [2]. Из-за ограниченного количества препаратов определение содержания воды производилось лишь в том интервале p/p_s , который был необходим для получения надежных значений \bar{n} и \bar{h} .

Авторы благодарны Р. С. Незлину (Институт молекулярной биологии АН СССР) за предоставление растворов очищенного иммуноглобулина G и И. А. Черкасову (Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР) за полезное обсуждение работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хургин Ю. И., Росляков В. Я., Клячко-Гурвич А. Л., Бруева Т. Р. (1972) Биохимия, 37, 485—492.
2. Климова В. А., Тусупкалиев У., Шерман Ф. Б., Хургин Ю. И., Клячко-Гурвич А. Л. (1973) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2110—2114.
3. Лапук В. А., Шмакова Ф. В., Каверзнева Е. Д. (1975) Биоорганическая химия, 1, 1134—1139.
4. Brunauer S., Emmet P. H., Teller E. (1938) J. Amer. Chem. Soc., 60, 309—319.
5. Miller F. (1972) J. Immunochimistry, 9, 217—228.

Поступила в редакцию
6.1.1975

THE ROLE OF CARBOHYDRATE GROUPS IN IMMUNOGLOBULINS M.
II. THE HYDRATION ISOTHERMS OF IMMUNOGLOBULIN M

KHURGIN Yu. I., SHERMAN F. B., TUSUPKALIYEV U.,
LAPUK V. A., SHMAKOVA F. V., KLIMOVA V. A.,
KAVERSNEVA E. D.

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

The adsorption of water from vapour phase by solid samples of immunoglobulin M (IgM) was studied by dynamic method utilizing Fisher reagent. The apparent monolayers formed in the course of desorption (\bar{h}) and sorption (\bar{h}) processes were calculated from hydration isotherms by means of BET equation. The data of amino acid and carbohydrate analyses and the \bar{h} and \bar{h} values for neutral IgM sample were compared and it was shown that nearly all polar amino acid side chains and polar groups of carbohydrates are hydrated and, consequently, exposed. On the basis of \bar{h} and \bar{h} values it was suggested that some polar groups form the surface ion pairs or stable hydrogen bonds. In the acid sample of IgM (the hydrochloride form), 25—30% of polar groups are not hydrated, i. e. are buried. The change of neutral for acidic media was assumed to be accompanied by the alterations in IgM spatial structure.
