



УДК 577.112.853 [083.3+088]+616.097

© 1992 г. А. Ф. Павленко, И. В. Чикаловец,

А. В. Курика, Н. И. Белогорцева, Ю. С. Овдов

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ И ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ФОРМЫ
РАКОВО-ЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА (РЭА),
НЕ СВЯЗЫВАЮЩЕЙСЯ С КОНКАНАВАЛИНОМ А**

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток

Из фракции, получаемой при выделении РЭА из экстрактов метастазов в печень аденокарциномы толстой кишки человека, не связывающейся с конканавалином А (Кон А), выделен антиген (РЭА^{НК}). Показано, что он является молекулярной формой РЭА и иммунохимически полностью идентичен РЭА. РЭА^{НК} существенно отличается от РЭА по моносакхаридному и аминокислотному составу, строению углеводного компонента: наряду с N-, возможно, содержит и O-гликозидные углеводные цепи. Пространственное строение этих антигенов также различно. Отличия РЭА^{НК} в строении и свойствах от РЭА позволяют считать его новой молекулярной формой РЭА.

В настоящее время РЭА изучен достаточно основательно [1], хотя до сих пор существуют нерешенные вопросы в определении как его строения, так и опухолевой специфичности. Как известно, препараты РЭА, выделенные даже из одной и той же опухоли, взятой от разных индивидуумов, обнаруживают значительную внутри- и межмолекулярную гетерогенность, которая обусловлена в основном его углеводным компонентом [2]. Так как установлены существенные различия в углеводсодержащих антигенах нормальных и опухолевых клеток [3, 4], представляет значительный интерес изучение всех молекулярных вариантов РЭА, и в первую очередь тех, где наиболее заметны различия в углеводном компоненте.

Практически все многочисленные исследования РЭА были выполнены с молекулярной формой РЭА, связывающейся с Кон А. Интерес к этой форме антигена был обусловлен тем, что большую часть активности РЭА проявляет материал фракций, связывающихся с Кон А. Кон-А-несвязывающаяся форма РЭА, составляющая около 15% общего количества РЭА в экстракте опухоли, ранее не исследовалась [2, 5, 6]. Так как для гликопротеинов способность связываться с Кон А обусловлена исключительно строением их углеводных цепей [7], то для молекулярных форм РЭА, связывающихся и не связывающихся с этим лектином, наиболее значительными должны быть различия в строении их углеводных цепей.

Настоящая работа посвящена выделению и исследованию молекулярной формы РЭА, не связывающейся с Кон А и обозначенной нами РЭА^{НК}. Изучение именно этой молекулярной формы РЭА представляет интерес и в связи с тем, что недавно было показано наличие различающихся по строению молекул РЭА в нормальных, эмбриональных и злокачественных тканях [8].

Сокращения: Кон А — конканавалин А; РЭА — раково-эмбриональный антиген, связывающийся с Кон А; РЭА^{НК} — раково-эмбриональный антиген, не связывающийся с Кон А; ИФА — иммуноферментный анализ.

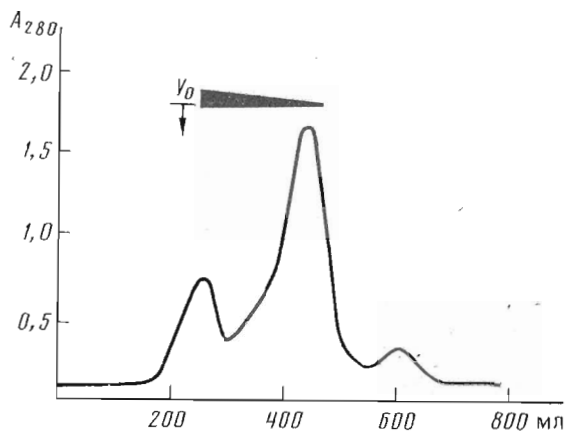


Рис. 1. Гель-фильтрация на колонке (3,0×96 см) Ultrogel AcA-34 Кон-А-несвязывающейся фракции РЭА. V_0 — свободный объем колонки. Здесь и далее на рисунках зачерненным треугольником отмечены отбираемые фракции, проявляющие РЭА-активность

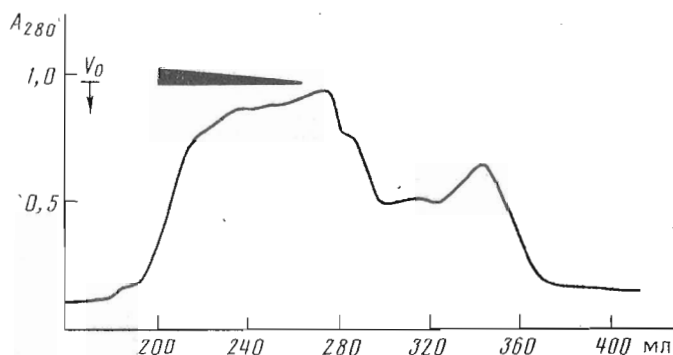


Рис. 2. Гель-фильтрация на колонке (2,6×85 см) Sephacryl S-300 фракции с РЭА-активностью, полученной хроматографией на Ultrogel AcA-34 (рис. 1.)

Для получения гомогенного препарата РЭА^{НК} фракцию, проявляющую РЭА-активность и не связывающуюся с Кон-А-сефарозой, отделяемую по методике, описанной нами ранее [9], хроматографировали последовательно на колонках, заполненных Ultrogel AcA-34 (рис. 1), Sephacryl S-300 (рис. 2) и Mono Q (рис. 3). Как видно из рисунков, во всех случаях отбирались для следующей операции фракции с РЭА-активностью. При использовании на конечном этапе высокоэффективной жидкостной хроматографии, как видно из рис. 3, РЭА-активность проявляется в ряде пиков. Вещество, выходящее в первом пике (РЭА^{НК}), было гомогенно, по данным SDS-электрофореза в градиенте пористости ПААГ, в отличие от других, выходящих в остальных пиках. Это соединение, по данным иммунодиффузии в агаре (рис. 4) и иммуноэлектрофореза, полностью идентично обычному препарату РЭА и, кроме того, имеет ту же N-концевую аминокислоту (*L*-лизин), что и РЭА. Это соединение также иммунохимически однородно — гипериммунные антисыворотки, полученные против РЭА^{НК}, выявляют в первом пике (рис. 3) только одну полосу преципитации.

При аналитическом изоэлектрофокусировании фракция I (рис. 3) наблюдается единственная полоса в диапазоне pH 3,75–4,15, что также

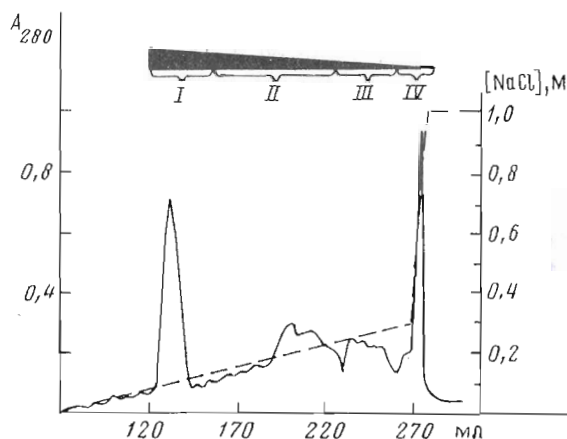


Рис. 3. Ионообменная хроматография на колонке (1,0x10 см) Моно Q (Pharmacia FPLC System) фракции с РЭА-активностью, полученной хроматографией на Sephacryl S-300 (рис. 2). Штриховая линия — градиент концентрации NaCl; I—IV — объединяемые фракции

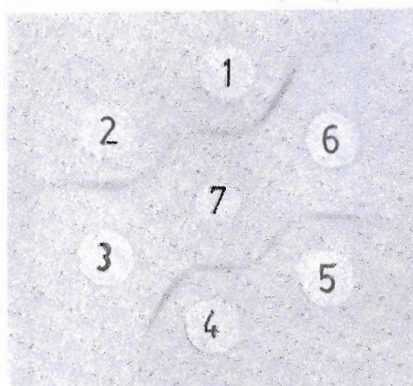


Рис. 4. Сопоставление иммунодиффузией в агаре тест-систем на РЭА и РЭА^{НК}: 1,4 — РЭА; 2,5 — РЭА^{НК}; 3,6 — анти-РЭА^{НК}; 7 — анти-РЭА

свидетельствует о высокой степени гомогенности полученного антигена.

Аналогичное исследование фракций II—IV (рис. 3) свидетельствует об их значительной гетерогенности, причем не все примеси проявляют РЭА-активность.

Изучение полученного гомогенного РЭА^{НК} показало (табл. 1), что это гликопротеин с еще более высоким содержанием углеводов, чем РЭА, связывающийся с Кон А. Как видно из табл. 2, РЭА^{НК} значительно отличается от РЭА по моносахаридному составу: содержание фукозы в нем намного выше, а маннозы значительно ниже, чем в РЭА. Это, а также наличие N-ацетилгалактозамина в РЭА^{НК} говорит о возможном присутствии в этом антигене O-гликозильных углеводных цепей.

Анализ продуктов метилирования (табл. 3) указывает на то, что состав метиловых эфиров, полученных при метилировании РЭА^{НК}, не отвечает обычному построению углеводных цепей РЭА [11]. Основное отличие состоит в том, что РЭА^{НК} содержит удлинённые фукозильрованные

Таблица 1

Физико-химические свойства РЭАНК

Характеристики	Значения
M^* , кДа	180 ± 10
E_{λ} в агаре (рН 8,6)	Равно E_{λ} β -глобулинов
ϵ_{278} , $M^{-1} \text{ см}^{-1}$	37 830
pI	3,75–4,15
Содержание, %	
белка **	34,1
углеводов ***	62,8

* По данным SDS-электрофореза.

** Определено по методу Лоури.

*** Определено методом количественного ГЛХ.

Таблица 2

Аминокислотный и моносахаридный состав * РЭАНК и РЭА

Аминокислоты	РЭАНК	РЭА	Аминокислоты, моносахариды	РЭАНК	РЭА
Asx	9,72	13,05	Tyr	6,52	8,31
Thr	10,0	7,89	Phe	1,78	2,42
Ser	9,92	9,53	Lys	2,87	3,59
Glx	5,49	11,52	His	1,52	1,75
Pro	5,63	8,52	Arg	2,3	3,43
Gly	8,74	5,88	Trp **	0,31	0,62
Ala	5,32	5,76	L-Fuc	17,85	8,0
Cys	н. о.	1,76	D-Man	3,01	7,20
Val	4,41	6,92	D-Gal	16,10	12,60
Met	н. о.	0	D-GlcNAc	23,30	16,00
Ile	2,83	4,72	D-GalNAc	3,10	0
Leu	6,52	8,31	NeuAc	н. о.	3,13

* Содержание аминокислот и моносахаридов выражено в мольных и весовых процентах соответственно.

** Определяли посредством второй производной УФ-спектроскопии [10]; н. о. — не определялось.

Таблица 3

Соотношение производных метилированных сахаров РЭАНК *

Метиловые эфиры моносахаридов	Соотношение, моль/моль 2,4 Me ₂ Man	Метиловые эфиры моносахаридов	Соотношение, моль/моль 2,4 Me ₂ Man
2,3,4-Me ₃ Fuc	6,0	2,3,6-Me ₃ Man	1,4
2,3,4,6-Me ₄ Gal	1,5	2,4-Me ₂ Man	1,0
2,4,6-Me ₃ Gal	1,5	3,6-Me ₂ GlcNAc	1,2
3,4,6-Me ₃ Gal	1,8	6-Me ₁ GlcNAc	2,8
4,6-Me ₂ Gal	0,7	3-Me ₁ GlcNAc	Следы

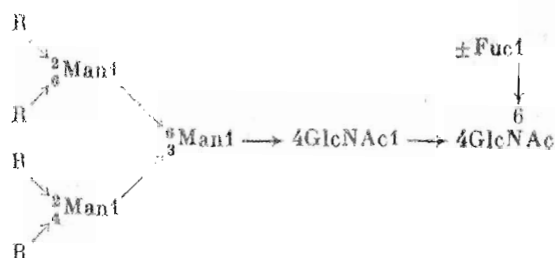
* Метиловые эфиры GalNAc присутствовали в следовых количествах.

Таблица 4

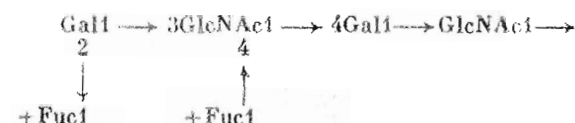
Вторичная структура белкового компонента РЭА^{НК} и РЭА (%)

Соединение	α -Спираль	β -Структура	β -Изгиб	Неупорядоченная структура
РЭА ^{НК}	—	65	31	4
РЭА [9]	—	69	15	16

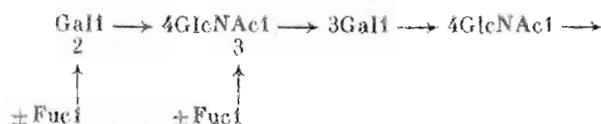
N-гликозильные цепи, строение которых может быть представлено в следующем виде:



где R



или



Число R может быть от 1 до 4.

В пользу такого построения углеводных цепей свидетельствует необычно высокое содержание 6-моно-O-метилглюкозамина, 2,4,6-три-O-метилгалактозы, а также сполна метилированной фукозы. Остатки галактозы, не замещенные фукозой, могут быть связаны с нейраминовой кислотой.

Различия в содержании некоторых аминокислот (табл. 2) пока неясны.

Согласно полученным данным, РЭА^{НК} по аминокислотному и моносахаридному составу, строению углеводного компонента значительно отличается от РЭА.

В этой связи представляется интересным выяснить пространственную организацию РЭА^{НК}, так как ранее нами была изучена конформация РЭА и установлена зависимость антигенной активности от ее состояния [9, 11]. Пространственное строение молекулы РЭА^{НК} мы изучали методом КД-спектроскопии. Как видно из рис. 5, КД-спектр РЭА^{НК}, а следовательно, и его конформация отличается от КД-спектра РЭА и пространственной структуры РЭА. Если последний имеет КД-спектр, характерный для β -структурированных белков [9], то КД-спектр РЭА^{НК} заметно отличается, и на основе вторичной структуры этот антиген нельзя отнести к какому-либо типу белков [12]. Формальное применение метода Проппингера [13] к анализу спектра КД для определения содержания элементов вторичной структуры белковой части РЭА^{НК} дает преобладающее содержание β -структур и β -изгибов (табл. 4).

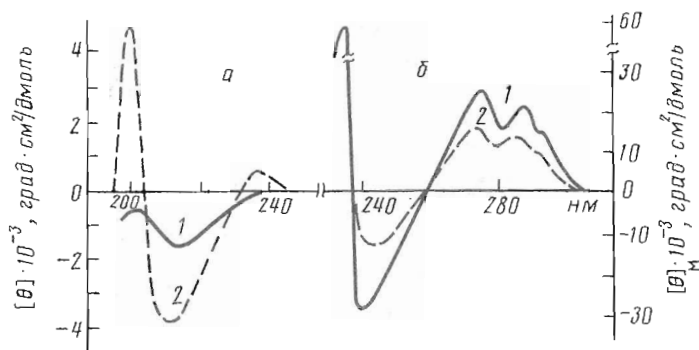


Рис. 5. КД-спектры в 0,01 М NaH_2PO_4 , pH 7,4, при 24° С, РЭА^{НК} (1) и РЭА (2); $[\text{РЭА}^{\text{НК}}] = 1,26$ (а) и 0,89 мг/мл (б); $[\text{РЭА}] = 1,40$ (а) и 0,44 мг/мл (б), $l = 1$ см (а) и 1 мм (б)

Таким образом, РЭА^{НК} значительно отличается от РЭА, хотя, как уже отмечалось, они иммунохимически полностью идентичны (рис. 4).

Антигенная активность РЭА^{НК}, определенная иммуноферментным анализом (ИФА) в системе на РЭА, составляет 39% от активности РЭА. Из результатов иммунодиффузии и ИФА следует, что в РЭА^{НК} отсутствуют свои эпитопы и присутствуют все эпитопы РЭА, но в меньшем количестве.

Посредством конкурентного ИФА было проведено ингибирование связывания РЭА^{НК} с антителами против него различными углеводами: хитобioseй, хитотриозой, хитотетраозой, углеводными цепями, выделенными из α -кислого гликопротеина, и суммой углеводных цепей А+Н-антигенов групповых веществ крови. Даже при значительном избытке углеводов ни в одном случае ингибирования не наблюдалось.

Эти результаты свидетельствуют о том, что так же, как и в РЭА, иммунодоминантные группы не являются простыми концевыми олигосахаридами, а могут состоять из более комплексных антигенных конформационных структур.

Таким образом, несмотря на наличие иммунохимически общих антигенных детерминант между РЭА^{НК} и РЭА, столь значительные различия в их строении и свойствах позволяют считать РЭА^{НК} новой молекулярной формой РЭА.

Это, в свою очередь, предполагает значительный самостоятельный интерес определения опухолевой специфичности и клинической ценности аналитической тест-системы РЭА^{НК} для диагностики и мониторинга рака.

Экспериментальная часть

Имунохимический анализ и SDS-электрофорез в градиенте пористости ПААГ проводили как описано в работе [9]. Спектры КД снимали и обрабатывали как описано ранее [8,14]. Аминнокислотный и моносахаридный состав определяли согласно работе [9].

Поликлональные кроличьи антитела использовали во всех иммунохимических анализах. Антигенная активность определялась иммуноферментным «сэндвич»-анализом [9, 10].

Для выделения РЭА^{НК} использовали фракцию белка, который не связывался с Кон-А-сефарозой и оставался в растворе при выделении РЭА по описанному способу [9].

Метилирование РЭА^{НК} проводили по методу Хакомори [15]. Продукты метилирования обрабатывали и анализировали, как описано нами ранее [16].

Гель-фильтрация на *Ultrogel AcA-34* и *Sephacryl S-300*. Фракцию белка, обладающего РЭА-активностью и не связывающегося с Кон-А-сепфарозой (430 мг), растворяли в 15 мл 0,01 М трис-НСl-буфера с 0,15 М NaCl и 0,02% NaN_3 , pH 7,5 (буфера А) и наносили на колонку (3,0×96 см) *Ultrogel AcA-34* (LKB, Швеция), уравновешенную этим же буферным раствором. После завершения хроматографии фракции с РЭА-активностью объединяли (рис. 1), диализовали против дистиллированной воды и лиофилизировали. Полученные 250 мг вещества растворяли в 15 мл буферного раствора А, наносили на колонку (2,6×85 см) с *Sephacryl S-300* (Pharmacia, Швеция) и промывали колонку этим же буферным раствором. Фракции с РЭА-активностью объединяли (рис. 2), диализовали против дистиллированной воды и лиофилизировали.

Высокоэффективную хроматографию проводили на хроматографе FPLC (Pharmacia, Швеция) с колонкой Mono Q (1,0×10 см), уравновешенной стартовым буфером (0,01 М трис-НСl-буфер с 5 мМ EDTA, pH 7,7).

100 мг вещества, полученного на предыдущей стадии, растворяли в 10 мл стартового буферного раствора, наносили на колонку и элюировали 50 мл этого же буфера. Связавшийся антиген элюировали линейным градиентом концентрации NaCl 0→0,3 М (общий объем 200 мл), а затем 1,0 М NaCl. РЭА-содержащие фракции объединяли по числу выходящих пиков, как указано на рис. 3, диализовали против дистиллированной воды и лиофилизировали. Выход фракции I (РЭА^{НК}) 18,5 мг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Matsuoka Y. // Human Tumor Markers / Eds Ting S. W., Chen J. S., Schwartz M. K. Excerpta Med., 1989. P. 185–198.
2. Rogers G. T. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 695. № 3–4. P. 227–249.
3. Yamada N. M., Ponyssegur J. // Biochimie. 1979. V. 60. № 11–12. P. 1221–1234.
4. Feizi T. // Nature. 1985. V. 314. № 6006. P. 53–57.
5. Slayter H. S., Coligan J. E. // Cancer Res. 1976. V. 36. № 5. P. 1696–1704.
6. Kosaki G., Yamamoto T. // Tumor Res. 1973. V. 8. P. 184–188.
7. Bayard B., Kerckaert J.-P. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. V. 95. № 2. P. 777–784.
8. Yeung M. M. U., Hammarstrom M.-L., Hammarstrom S. // Oncodevelop. Proteins Clin. Appl., Abstracts of XVIII Meeting Intern. Soc. Oncodevelop. Biol. Med. M., 1990. P. 90.
9. Pavlenko A. F., Chikalovets I. V., Kurika A. V., Glazunov V. P., Mikhalyuk L. V., Ovodov Yu. S. // Tumor Biol. 1990. V. 11. № 6. P. 306–318.
10. Engvall E. // Methods Enzymol. Immunochem. Technol. 1980. V. 70. Part A. P. 419–439.
11. Yamashida K., Tatani K., Kuroki M., Matsuoka T., Ueda I., Kobata A. // Cancer Res. 1987. V. 47. № 3. P. 3451–3459.
12. Manavalan P., Johnson W. C. // Nature. 1983. V. 305. № 5937. P. 831–832.
13. Provencher S. W., Glokner J. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 1. P. 33–37.
14. Глазунов В. П., Вакорина Т. И., Одинокова С. Е., Курика А. В., Павленко А. Ф. // Биорган. химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1166–1170.
15. Nakomori S. // J. Biochem. 1964. V. 55. № 2. P. 205–208.
16. Pavlenko A. F., Moroz S. V., Glazunov V. P., Vakorina T. I., Belogortseva N. I., Odnokov S. E., Ovodov Yu. S. // Tumor Biol. 1988. V. 9. № 5. P. 249–262.

Поступила в редакцию

18.VI.1991

После доработки

17.I.1992

A. F. PAVLENKO, I. V. CHIKALOVETS, A. V. KURIKA, N. I. BELOGORTSEVA,
Yu. S. OVODOV

**PHYSICO-CHEMICAL AND IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION
OF MOLECULAR FORM OF CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN (CEA)
NON-BINDING CONCANAVALIN A (Con A)**

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division,
Russian Academy of Sciences, Vladivostok*

A molecular form of CEA non-binding Con A (CEA^{nc}) was isolated from colon adenocarcinoma metastases in liver as a fraction of CEA having no affinity to Con-A-Sepharose. CEA^{nc} was shown to be immunochemically identical to CEA, but to differ substantially with regard to the amino acid and sugar composition, and structure of the sugar moiety, possibly containing not only N-, but also O-glycosyl carbohydrate chains. The antigens studied were also found to possess different spatial structures. The differences between CEA and CEA^{nc} suggest CEA^{nc} to be a new molecular form of CEA.