



УДК 547.962.4.02:577.02:546.8.097.3

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДОСТУПНОСТИ ОСТАТКОВ ТИРОЗИНА
ИММУНОГЛОБУЛИНА М В РЕАКЦИИ НИТРОВАНИЯ
ТЕТРАНИТРОМЕТАНОМ***Шмакова Ф. В., Хурган Ю. И., Каверзнева Е. Д.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Методом спектрофотометрии изучена кинетика нитрования остатков тирозина в молекуле иммуноглобулина М ($IgM_{Сер}$) тетранитрометаном при разных температурах. Показано наличие трех типов остатков тирозина: полностью недоступных, с боковыми группами во внутренней части доменов, частично доступных, локализованных в междоменном пространстве, и полностью доступных, экспонированных в среду.

Распределение остатков тирозина между внутренней частью доменов и их поверхностью, по данным кинетики нитрования $IgM_{Сер}$ соответствует данным о первичной и пространственной структуре иммуноглобулинов и их доменов. Показано, что в молекуле $IgM_{Сер}$ на одну тяжелую и одну легкую цепь приходится один полностью экспонированный остаток тирозина. Структурные изменения молекулы $IgM_{Сер}$ при 37 и 56° С сопровождаются увеличением числа полностью доступных остатков тирозина до двух и трех соответственно. Нитрование первых трех остатков тирозина при 23° С не вызывает заметных изменений антигенных свойств молекул $IgM_{Сер}$. К небольшому снижению антигенности по реакции преципитации и торможения пассивной геммагглютинации с анти- IgM -антисывороткой приводит только модификация $IgM_{Сер}$ при высокой концентрации тетранитрометана или при повышенной температуре (56° С).

Лабильность структуры иммуноглобулинов — важная особенность белков данного класса, необходимая им для выполнения биологических функций. Так, известно, что специфическое взаимодействие иммуноглобулинов G (IgG) с двухвалентными гаптенами осуществляется за счет изменения угла между Fab-областями [1]. При взаимодействии с гаптенами молекулы специфических антител IgG -класса уменьшают свой объем на ~7% [2]. При образовании иммунного комплекса бактериальных клеток с иммуноглобулином М (IgM) структура последнего становится не плоской, как в нативном состоянии, а «столообразной»: Fab-области выходят из плоскости молекулы и образуют значительный угол с центральным диском (Fc_3)₂, состоящим из пяти Fc-областей [3].

Изменения структуры иммуноглобулинов наблюдаются также и при неспецифических воздействиях среды. Например, методами дифференциальной пертурбационной спектрофотометрии [4] и микрокалориметрии [5] были зарегистрированы изменения структуры IgG при 37° С. Молекулы IgM претерпевают, кроме того, структурный переход при 56° С; при этом увеличивается устойчивость Fc-области к действию трипсина, в то время как протеолиз при 37° С полностью разрушает Fc-фрагмент [6].

Предварительное выдерживание иммуноглобулинов в кислой среде (рН < 5) также приводит к структурным изменениям. Трипсин, химотрипсин и пепсин начинают гидролизовать IgG , так же как и пепсин, т. е. с образованием Fab-фрагментов и с разрушением Fc-фрагмента [7]. Даже очень краткое пребывание IgM в кислой среде приводит к необратимому уменьшению максимального размера молекулы [8] и ее поверхности [9].

Для изучения изменений структуры иммуноглобулинов, которые осуществляются за счет междоменной гибкости, наряду с другими методами может быть использована химическая модификация отдельных аминокислотных остатков, сравнительно редко встречающихся в данном белке. С этой точки зрения представляют интерес остатки тирозина, которые могут играть определенную роль в стабилизации структуры иммуноглобули-

Таблица 1

Результаты нитрования остатков тирозина в IgM_{сер} тетранитрометаном [IgM_{сер}] 3,2·10⁻⁶ М, pH 8,2; 30° С

| [C(NO ₂) ₄], мМ | Время, ч | Количество Туг(NO ₂), моль/моль %, μ-димера |
|---|----------|---|
| 0,61 | 24 | ~3 |
| 3,05 | 24 | ~8 |
| 6,1 | 2(2) | 7-8 (~12) * |
| 15,2 | 5 | ~9 |

* В скобках — данные для опыта при 56° С.

Таблица 2

Влияние температуры на быструю фазу реакции нитрования остатков тирозина в IgM_{сер} [IgM_{сер}] 3,2 мкМ, [C(NO₂)₄] 0,61 мМ

| Температура, °С | Количество быстро реагирующих Туг, моль/моль %, μ-димера | k ₁ ·10 ⁴ , с ⁻¹ |
|-----------------|--|---|
| 23 | 0,98 | 2,20 |
| 30 | 1,1 | 2,76 |
| 37 | 2,2 | 3,50 |
| 56 | 3,1 | 11,0 |

нов и входит в состав антигенных детерминант. В настоящей работе изучена реакция нитрования остатков тирозина в молекуле IgM тетранитрометаном.

Молекулы иммуноглобулинов М содержат 10 тяжелых (μ) цепей и 10 легких (в нашем случае κ) цепей, организованных в пять μ₂ κ₂-субъединиц, каждая из которых построена из двух легких и двух тяжелых цепей. Реакцию нитрования проводили при pH 8,2 и концентрации IgM_{сер} в растворе 3,2·10⁻⁶ М в интервале температур 23–56° С, захватывающем оба термических перехода для молекул иммуноглобулинов. Концентрацию тетранитрометана варьировали в пределах 0,61 мМ (с₀) — 15,2 мМ (25 с₀). Величина с₀ примерно соответствует общему содержанию остатков тирозина в использованных растворах IgM. Исследованный в настоящей работе белок IgM_{сер} содержит, по данным аминокислотного анализа, 190 остатков тирозина или 19 остатков на одну μ- и одну κ-цепь (κ, μ-димер).

Обычно в IgM значительное количество остатков тирозина содержится в гипервариабельных участках вариабельных доменов. В константных доменах и негипервариабельных участках вариабельных доменов иммуноглобулинов М человека [10, 11], собаки [12] и мыши [13] с известной первичной структурой содержится 20–24 остаток тирозина. В связи с этим в нашем случае мы можем предположить, что в гипервариабельных участках исследованного белка IgM_{сер} остатки тирозина отсутствуют.

Анализ, проведенный на основе гомологичности первичной и пространственной структуры различных доменов, входящих в состав иммуноглобулинов разных классов (IgG, IgA и IgM), показывает, что боковые группы по крайней мере 8–10 остатков тирозина в молекулах различных IgM [10–13] локализованы во внутренней части доменов и не имеют контакта с внешней средой. Подробнее этот вопрос будет рассмотрен ниже.

В широком интервале концентраций тетранитрометана (с₀–25с₀) при 30° С за сравнительно большое время (5–24 ч) в IgM_{сер} удается пронитровать не более 8–9 остатков тирозина на κ, μ-димер (табл. 1). При 56° С и концентрации реагента, равной 6,1 мМ, максимальная степень нитрования увеличивается до 12 остатков на κ, μ-димер: реакция сравнительно быстро достигает насыщения и после 120 мин дальнейшего нитрования не наблюдается (рис. 1). Поэтому можно сделать вывод, что только часть остатков тирозина даже в самых жестких условиях, принятых в данной работе, доступна действию тетранитрометана. Недоступными для нитрования в молекуле IgM_{сер} оказались 7 остатков, что удовлетворительно соответствует количеству остатков тирозина, расположенных внутри доменов, по оценкам, основанным на использовании данных о гомологичности первичной и пространственной структур доменов разных иммуноглобулинов. Недоступность почти одной трети остатков тирозина свидетельствует также об относительной устойчивости пространственной структуры отдельных доменов при термических структурных переходах макромолекулы.

Анализ кинетических кривых нитрования IgM_{сер} тетранитрометаном при разных его концентрациях показывает разную доступность остатков тирозина для модифицирующего реагента. При самой низкой из исполь-

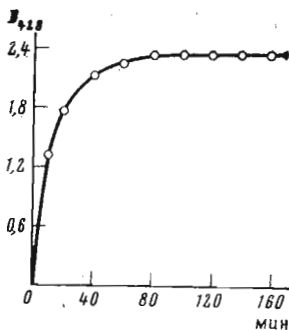


Рис. 1

Рис. 1. Кинетика нитрования $IgM_{сер}$ тетранитрометаном, определение предельной степени нитрования $IgM_{сер}$. $[C(NO_2)_4]$ 6,1 мМ, рН 8,2; 56° С

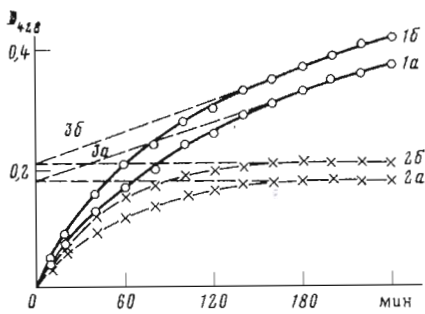


Рис. 2

Рис. 2. Кинетика начальной стадии нитрования $IgM_{сер}$ (I) при 23° С (а) и 30° С (б) и кривые для быстрой (2) и медленной (3) фаз реакции. $[C(NO_2)_4]$ 0,61 мМ

зованных концентраций реагента (0,61 мМ) нитрование нативного $IgM_{сер}$ при 23 и 30° С проходит сравнительно медленно. За 120 мин (время достижения предельной степени нитрования при 56° С и концентрации тетранитрометана, равной 6,1 мМ) в реакцию вступает только один остаток тирозина на α , μ -димер (рис. 2, табл. 2). Характер кинетических кривых на рис. 2 для обеих температур одинаков и указывает на протекание двух параллельных реакций — быстрой и медленной. Экстраполяцией линейного участка конечной части кинетической кривой ко времени начала реакции был выделен вклад в суммарную кинетическую кривую каждой из двух реакций. На рис. 2 показано графическое построение кинетических кривых для быстрой реакции и начального участка медленной реакции. Аналогичным образом были преобразованы кинетические кривые нитрования $IgM_{сер}$ при 37 и 56° С, поскольку они также имеют рассмотренный выше характер.

Полулогарифмическая анаморфоза кинетических кривых быстрой реакции при всех температурах оказалась линейной, что свидетельствует о псевдопервом порядке этой реакции. Пропорциональность начальной скорости реакции нитрования $IgM_{сер}$ при 30° С концентрации реагента (рис. 3) также указывает на псевдопервый порядок реакции. Экспоненциальный характер кинетических кривых позволяет оценить два параметра: константу скорости первого порядка (k_1 , s^{-1}) и количество остатков тирозина, вступающих во взаимодействие с тетранитрометаном в быстрой реакции нитрования (табл. 2). Зависимость значений k_1 от температуры в координатах Аррениуса является практически линейной (рис. 4), эффективная энергия активации $E_a = 9,8$ ккал/моль. Это говорит об одинаковом характере кинетических закономерностей реакций всех быстронитрующихся остатков тирозина при каждой температуре в интервале 23—56° С. Одинаковая скорость нитрования различных быстронитрующихся остатков тирозина может объясняться их полным экспонированием в среду.

Выше было показано (табл. 2), что при 23 и 30° С, т. е. до первого структурного перехода (при 37° С), в быстрой реакции участвует только один из 12 доступных остатков тирозина. При 37° С, вероятно вследствие изменения пространственной структуры $IgM_{сер}$, в быстрой реакции участвуют уже два остатка, а при 56° С быстро нитруются три из 12 доступных остатков тирозина (табл. 2). Таким образом, структурные переходы молекулы $IgM_{сер}$ при 37 и 56° С сопровождаются увеличением числа полностью экспонированных остатков тирозина, но в то же время основная их масса ограничено доступна в реакции нитрования.

Следовательно, остатки тирозина в молекуле $IgM_{сер}$ можно разделить на три группы: полностью доступные остатки, частично экранированные и полностью недоступные. Чтобы отнести отдельные остатки к той или иной группе, следует локализовать их в пространственной структуре молекулы IgM . Точная структура молекул IgM в настоящее время не уста-

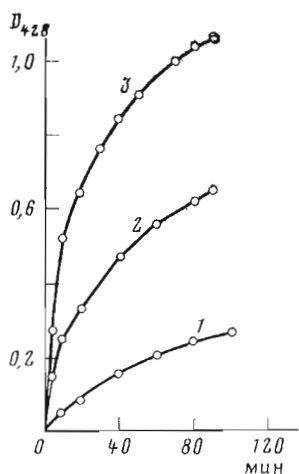


Рис. 3

Рис. 3. Кинетика нитрования остатков тирозина IgM_{сер} (30° С, pH 8,2) при концентрации C(NO₂)₄: 0,61 (1), 3,05 (2), 6,1 мМ (3)

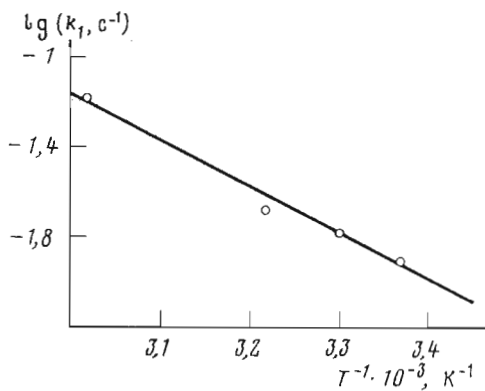


Рис. 4

Рис. 4. Температурная зависимость константы скорости быстрой реакции нитрования IgM_{сер}. [C(NO₂)₄] 0,61 мМ, pH 8,2

повлена, и такая локализация может быть проведена лишь на основе не-
прямых подходов.

Пространственная структура всех доменов, входящих в состав иммуноглобулинов, имеет одинаковый характер упаковки пептидных цепей. Он характеризуется наличием двух почти параллельных, изогнутых β-слоев X и Y, содержащих четыре и три вытянутых отрезка цепи fx_1-fx_4 и fy_1-fy_3 соответственно (рис. 5). Каждый из отрезков соединен с двумя соседними по цепи соответствующим «изгибом» (петли b_1-b_6).

Первичная структура иммуноглобулинов, за исключением гипервариабельных участков, отличается достаточно большой консервативностью. Наблюдается высокая гомологичность первичной структуры всех доменов; наибольшая степень консервативности характерна для вытянутых отрезков fx и fy , особенно для остатков аминокислот, боковые группы которых ориентированы внутрь домена, т. е. располагаются между параллельными слоями X и Y. Наличие гомологий в родственных структурных элементах позволяет достаточно надежно локализовать положение отдельных аминокислотных остатков в пространственной структуре доменов.

Анализ положения остатков тирозина можно провести на примере белка IgM_{гал} [10, 11], первичная структура которого хорошо изучена. IgM_{сер} и IgM_{гал} имеют одинаковую молекулярную массу и углеводный состав и близкий аминокислотный состав. Некоторые различия в содержании отдельных аминокислот, присутствующих в небольших количествах, могут быть отнесены к вариациям аминокислотного состава в гипервариабельных участках тяжелых и легких цепей, в частности это касается и остатков тирозина.

В табл. 3 приведена локализация остатков тирозина в IgM_{гал} [10, 11]. Отмечены 8 экранированных остатков, ориентированных внутрь доменов [14] и поэтому недоступных для молекул из среды.

При оценке доступности остальных остатков тирозина следует учесть, что вариабельные домены контактируют между собой со стороны аминокислотных остатков, расположенных в fy -отрезках цепи, а константные домены — со стороны отрезков fx [14]. Остатки, боковые группы которых ориентированы в междоменное пространство, являются, вероятно, ограниченно доступными. Таких остатков в β-складчатых слоях X и Y восемь, не считая остатков тирозина в гипервариабельных участках. В нелинейных отрезках b_1-b_6 разных доменов и в дополнительном C-концевом пептиде домена C_{н4} [14] содержится 6 остатков тирозина, два остатка, Tyr-554 и Tyr-568, входящие в C-концевой пептид, являются, вероятно, недоступными, поскольку должны находиться в областях тесных контактов между

Расположение остатков тирозина в легких и тяжелых цепях IgM_{Gal}
[10, 11] по элементам структуры доменов [14]

| Номер остатка Тур в цепи IgM _{Gal} | Домен | Элемент структуры домена |
|--|-------------------|---------------------------|
| 36 | V _κ | <i>fy1</i> |
| 49 | » | Дополнительная петля E |
| 86 * | » | <i>fy2</i> |
| 87 | » | <i>fy2</i> |
| 94 | » | Гипервариабельный участок |
| 140 | C _κ | <i>b2</i> |
| 173 * | » | <i>fx4</i> |
| 186 | » | <i>b5</i> |
| 192 * | » | <i>fy2</i> |
| 60 | V _μ | Гипервариабельный участок |
| 80 | » | <i>fx4</i> |
| 94 * | » | <i>fy2</i> |
| 95 | » | Гипервариабельный участок |
| 105 * | » | <i>fy3</i> |
| 159 * | C _{μ1} | <i>fy1</i> |
| 180 | » | <i>fx4</i> |
| 291 | C _{μ2} | <i>fx4</i> |
| 366 | C _{μ3} | <i>b2</i> |
| 446 | C _{μ4} | <i>fx1</i> |
| 492 * | » | <i>fx3</i> |
| 507 | » | <i>fx4</i> |
| 526 * | » | <i>fy2</i> |
| 554 | С-концевой пептид | |
| 568 | То же | |

* Отмечены остатки тирозина в недоступной части доменов; на рис. 5 эти остатки, так же как и остатки тирозина в гипервариабельных участках IgM_{Gal} не показаны.

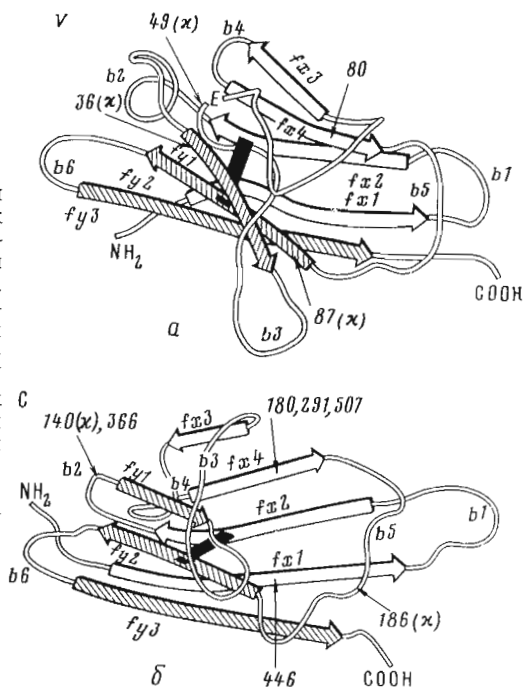
субъединицами. Кроме того, остаток Тур-554 находится в соседстве с остатком Asp-555, несущим объемистый олигосахаридный фрагмент, затрудняющий доступ к этому участку цепи. С-концевой остаток Тур-568 связан по цепи с остатком Cys-567, входящим в состав дисульфидной связи, соединяющей два домена C_{μ4} из соседних субъединиц, что также может затруднять нитрование.

Сравнивая результаты нитрования с результатами проделанного анализа доступности остатков тирозина в молекулах IgM (табл. 3), можно предположить, что при низкой концентрации тетранитрометана и температуре ниже 37° С нитруется один из трех остатков тирозина: Тур-49 (петля E V_κ-домена), Тур-140 (петля *b2* C_κ-домена) или Тур-366 (петля *b2* C_μ-домена). Один из этих остатков доступен для тетранитрометана в нативном IgM, два других доступных при 56° С остатка находятся, вероятно, в продольных междоменных контактах. Увеличение их доступности при повышении температуры, вероятно, обусловлено изменением взаимной ориентации доменов при термических структурных переходах.

При 37 и 56° С, а также при более высоких концентрациях, тетранитрометана нитруются остальные доступные остатки (см. рис. 5), доступность которых для молекул из среды затруднена в силу междоменных контактов, контактов между субъединицами или соседства объемных олигосахаридных групп (остатки Тур-36, -87 и -186 в легкой цепи и Тур-80, -180, -291, -446, -507, -554 и -568 в тяжелой цепи).

В результате нитрования возможны некоторые локальные изменения структуры IgM, которые могут отразиться на его биологических свойствах. Для исследованного нами IgM_{Сер} антиген неизвестен, но при рассмот-

Рис. 5. Предполагаемая локализация в константных (С) и переменных (V) доменах IgM доступных остатков тирозина (обозначены тонкими стрелками с цифрами, см. табл. 3). Укладка полипептидных цепей в доменах по данным [14]. $fx1-fx4$ и $fy1-fy3$ — линейные участки β -структуры, образующие слой X и слой Y соответственно. Контурные стрелки показывают ход полипептидной цепи от N- к C-концу. Оба слоя соединены внутримолекулярной S-S-связью (зачерченный четырехугольник). $b1-b6$ — петли, соединяющие линейные участки. E — дополнительная петля в V-домене



решив его самого как антигена можно предположить, что изменение ближайшего пространственного окружения модифицированных остатков тирозина приведет к ослаблению его взаимодействия со специфической анти-IgM-антисывороткой вследствие частичного разрушения или экранировки антигенных детерминант. В связи с этим нами было исследовано специфическое связывание нативного IgM_{сер} и нитро-IgM_{сер} с анти- κ и с анти- μ -антисыворотками в реакциях преципитации и торможения пассивной гемагглютинации.

Полученные результаты показывают (табл. 4), что нитрование трех остатков тирозина в IgM_{сер} при 23° С, из которых один нитруется быстро, так же как и одно прогревание раствора IgM_{сер} при 56° С, практически не влияет на его специфическое связывание с антителами против κ - и μ -цепей. В то же время быстрое нитрование трех остатков тирозина при 56° С приводит к небольшому снижению специфического связывания как с анти- κ , так и с анти- μ -антителами. Нитрование большим избытком тетранитрометана девяти остатков тирозина, в том числе дополнительных шести малодоступных, не приводит к дальнейшему уменьшению специфического связывания по сравнению с нитрованием трех остатков при 56° С.

Отсюда можно заключить, что небольшое изменение специфического связывания происходит, вероятно, вследствие незначительных локальных перестроек молекулы в результате нитрования двух ограниченно доступных остатков тирозина, которые становятся полностью доступными при 56° С. В то же время дальнейшее нитрование шести малодоступных при комнатной температуре остатков тирозина не оказывает влияния на состояние антигенных детерминант.

Экспериментальная часть

IgM_{сер} (тип К) выделяли из крови больного макроглобулинемией Вальденштрёма по методу, описанному ранее [15], но без промежуточной лиофильной сушки глобулиновой фракции.

Для нитрования брали $3,2 \cdot 10^{-6}$ М раствор IgM в 0,01 М трис-HCl-буфере, рН 8,2, с 0,3 М NaCl. Концентрации тетранитрометана в растворе варьировали от $6,1 \cdot 10^{-4}$ М (c_0), что соответствует концентрации остатков тирозина в $3,2 \cdot 10^{-6}$ М растворе IgM_{сер}, до 25 c_0 , температуру — от комнат-

Минимальные концентрации (мкг/мл) IgM и нитро-IgM в реакциях преципитации и торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА) с антисыворотками против κ - и μ -цепей

| Антиген | Условия нитрования | | | Содержание Тут (NO ₂), моль/моль κ , μ -димера | Реакция преципитации с анти-сывороткой | | РТПГА с анти-сывороткой | |
|------------------------------|---|-----------------|----------|---|--|---------------|-------------------------|---------------|
| | [C(NO ₂) ₂], мМ | температура, °С | время, ч | | анти- κ - | анти- μ - | анти- κ - | анти- μ - |
| Нативный IgM | | | | | 80 | 20 | 0,8 | 0,8 |
| IgM, прогретый 1 ч при 56° С | | | | | 190 | 47 | 0,8 | 0,8 |
| Нитро-IgM | 0,61 | 23 | 24 | 3 | 60 | 15 | 1,5 | 1,5 |
| » | 0,61 | 56 | 4 | 3 | 375 | 190 | 3,0 | 3,0 |
| » | 15,2 | 30 | 5 | 9 | 350 | 90 | 3,0 | 6,0 |

ной (23° С) до 56° С, время — от 2 до 24 ч. К раствору IgM в буфере, помещенному в кварцевую кювету и нагретому в термостате до соответствующей температуры, добавляли рассчитанное количество раствора тетранитрометана в спирте, перемешивали и следили за ходом реакции по увеличению поглощения при 428 нм с помощью спектрофотометра РДСХ-2 (СКБ ИОХ АН СССР). Реакцию прекращали пропусканьем реакционной смеси через колодку с сефадексом G-25 в 0,01 М трис-НСl-буфере, рН 8,2. В элюате определяли степень нитрования по поглощению при 428 нм (ϵ 4100 М⁻¹см⁻¹ для 3-нитротирозина). Полученные результаты хорошо совпадали с результатами определения степени нитрования с помощью аминокислотного анализатора.

Специфическое связывание IgM и нитро-IgM с анти- κ - и анти- μ -антисыворотками определяли по методу Ухтерлони с последовательными двукратными разведениями антигена. Учитывали самую низкую концентрацию антигена (IgM или нитро-IgM), которая еще давала линию преципитации.

Авторы глубоко признательны проф. К. В. Чернохвостовой за любезно предоставленные антисыворотки и Ю. Л. Субботиной за проведение реакции торможения пассивной гемагглютинации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Valentine R. C., Green N. M. J. Mol. Biol., 1967, v. 27, № 2, p. 615–617.
2. Pilz I., Schwarz E., Durchschein W., Licht A., Sela M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 1, p. 117–121.
3. Feinstein A., Munn E. A. Nature, 1969, v. 224, № 5226, p. 1307–1309.
4. Troitsky G. V., Zav'yalov V. P., Kiryukhin I. F. Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 322, № 1, p. 53–61.
5. Zav'yalov V. P., Troitsky G. V., Khechinashvili N. N., Privalov P. L. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 492, № 1, p. 101–111.
6. Plaut A. G., Tomasi T. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, v. 65, № 2, p. 318–322.
7. Steward G. A., Stanwarth D. R. Immunochemistry, 1975, v. 12, № 8, p. 713–721.
8. Хургии Ю. И., Шмакова Ф. В., Каюшина Р. Л., Дембо А. Т., Рольбин Ю. А., Асадичиков В. Е., Дамашун Х., Дамашун Г., Платц П. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 2, с. 300–302.
9. Хургии Ю. И., Шерман Ф. Б., Тусуналиев У., Ланук В. А., Шмакова Ф. В., Климова В. А., Каверзнева Е. Д. Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 8, с. 1140–1145.
10. Laure C. J., Watanabe S., Hilschmann N. Hoppe-Scyler's Z. physiol. Chem., 1973, B354, № 10/11, S. 1503–1504.
11. Watanabe S., Barnikol H. V., Horn J., Hilschmann N. Hoppe-Scyler's Z. physiol. Chem., 1973, B354, № 10/11, S. 1505–1509.
12. Wasserman R. L., Capra J. D. Science, 1978, v. 200, № 4346, p. 1159–1161.
13. Kehry M., Sibley C., Fuhrman J., Schilling J., Hood L. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 6, p. 2932–2936.
14. Feinstein A., Beale D. In: Immunochemistry: an advanced textbook. New York – Brisbane – Toronto – Chichester: J. Wiley, 1977, p. 263–306.
15. Ланук В. А., Шмакова Ф. В., Каверзнева Е. Д. Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 8, с. 1134–1139.

Поступила в редакцию
22.X.1981

A STUDY ON ACCESSIBILITY OF TYROSINE RESIDUES IN IMMUNOGLOBULIN M TO TETRANITROMETHANE

SHMAKOVA F. V., KHURGIN Yu. I., KAVERZNEVA E. D.

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

The kinetics of tyrosine nitration in immunoglobulin M (IgM_{Ser}) with tetranitromethane at various temperatures have been studied by a spectrophotometric method. Three kinds of tyrosine residues have been observed: I) completely inaccessible, having their side chains inside the domains, II) partially accessible and arranged in the inter-domain space, and III) completely accessible and, hence, exposed to external medium. The distribution of tyrosine residues between the inner part of domain and its surface obtained from the kinetic data is in agreement with the primary and spatial structure of immunoglobulins and their domains. Only one completely exposed tyrosine residues per one heavy and one light chain was found in IgM_{Ser} . The structural changes in IgM_{Ser} at 37° and 56° C are accompanied by the increase in the number of completely accessible tyrosine residues up to two and three, respectively. Nitration of three tyrosine residues at 23° does not affect the antigenic properties of IgM_{Ser} . A small decrease in specific interaction with anti-IgM antibodies is observed after nitration either with high tetranitromethane concentrations or at 56° C.