

· УДК 612.53+612.014.3+577.155.3

Н. П. МЕСРОПЯН, А. Я. КУЛЬБЕРГ

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ
КОНФОРМАЦИИ ХОЛОДОВЫХ АНТИТЕЛ

Проведено сравнительное изучение аминокислотного состава и пространственной конформации холодových антител и нормального γ Q-глобулина. Показано, что молекула холодových гемагглютининов претерпевает существенно большие изменения третичной структуры при повышении температуры, нежели нормальный γ Q-глобулин. Молекула холодových антител характеризуется конформационной термолабильностью, причем признаки изменения конформации выявляются при той же температуре, при которой молекула антитела утрачивает способность взаимодействовать с антигеном.

Феномен холодовой гемагглютинации представляет собой один из случаев реакции антиген—антитело, оптимум которой лежит при низкой температуре (около 4°C), тогда как при 37°C специфический комплекс распадается. Такая своеобразная зависимость активности от температуры присуща холодovým антителам, которые представляют единственный тип антител, сродство которых к антигену изменяется столь существенно при повышении температуры. Холодовые гемагглютинины были обнаружены при различных патологических состояниях: лейкомии, циррозе печени, вирусной пневмонии, инфекционном мононуклеозе и т. д. [3, 5, 7, 8, 10]. Поэтому изучение холодových гемагглютининов представляет интерес как для клиницистов, так и для исследователей, пытавшихся найти объяснение столь своеобразной зависимости их реакции с антигеном от температуры. Можно предположить, что холодové гемагглютинины, сохраняя некоторые присущие соответствующим классам иммуноглобулинов свойства, обладают определенным своеобразием строения, обуславливающим существенно большее изменение их конформации при повышении температуры.

В настоящей работе предпринята попытка выявить особенности пространственной конформации холодových антител. Для сравнительной оценки использовали нормальный γ Q-глобулин, выделенный из сыворотки интактных животных [1].

Материалы и методы

Исследовались холодové гемагглютинины кролика, направленные к антигенным детерминантам эритроцитов барана, а также нормальный γ Q-глобулин, выделенный из сыворотки интактных кроликов. Для сравнительной оценки состава холодových гемагглютининов и нор-

мального γ Q-глобулина исследуемые пробы подвергали кислотному гидролизу в течение 24 часов при 105°C, после чего определяли их аминокислотный состав с помощью аминокислотного анализатора. Окислительное бромирование холодовых гемагглютининов и нормального γ Q-глобулина N-бромсукцинимидом проводили при 18°C и 37°C по методу, описанному Рамачандраном [9] с целью исследования степени доступности триптофильных остатков. Об окислении остатков триптофана судили по падению оптической плотности при 280 нм. Степень окисления выражали отношением оптических плотностей неокисленного препарата к окисленному (Кд). Измерение собственной флуоресценции холодовых гемагглютининов и нормального γ Q-глобулина проводили в диапазоне температур от 17°C до 70°C, используя спектрофлуорометр с монохроматическим возбуждением. Температурное тушение флуоресценции выражали в % от величины интенсивности флуоресценции при 17°C, которую принимали за 100%. Восстановление холодовых гемагглютининов и нормального γ Q-глобулина осуществляли с помощью 0,2 М меркаптоэтанола при pH 7,5—7,9 в течение 1,5—2 часов при 18°C и 36°C. О числе восстановленных дисульфидных связей судили по алкилированию SH групп C¹⁴ моноиодацетатом при pH 7,5.

Результаты и обсуждение

По данным аминокислотного анализа, состав холодовых гемагглютининов, принадлежащих к классу γ Q-глобулинов, в значительной степени совпадает с таковым для нормального γ Q-глобулина. Можно отметить лишь, что в холодовых гемагглютинах несколько в большем количестве содержатся полярные аминокислоты (аспарагиновая, серин, треонин) за счет уменьшения содержания таких неполярных аминокислот, как валин, аланин, лейцин.

Отсутствие существенных отличий состава холодовых гемагглютининов не исключает того, что сравниваемые белки могут отличаться по первичной структуре своих полипептидных цепей. Это может повлечь за собой различия в пространственной укладке полипептидных цепей и стабилизации третичной структуры за счет нековалентных связей. Исходя из этого предположения и принимая во внимание феномен обратимой инактивации холодовых гемагглютининов при 37°C, можно предположить, что молекула холодовых гемагглютининов претерпевает существенно большие изменения третичной структуры при повышении температуры, нежели нормальный γ Q-глобулин. О степени этих изменений можно судить по демаскированию отдельных аминокислотных остатков, используя метод химической модификации белка.

Поэтому в первой серии экспериментов осуществляли окислительное бромирование триптофана в холодовых гемагглютинах γ Q класса и нормального γ Q-глобулина кролика N-бромсукцинимидом при 18°C и 37°C. Зависимость процесса окисления триптофана от концентрации реагента представлена на рис. 1.

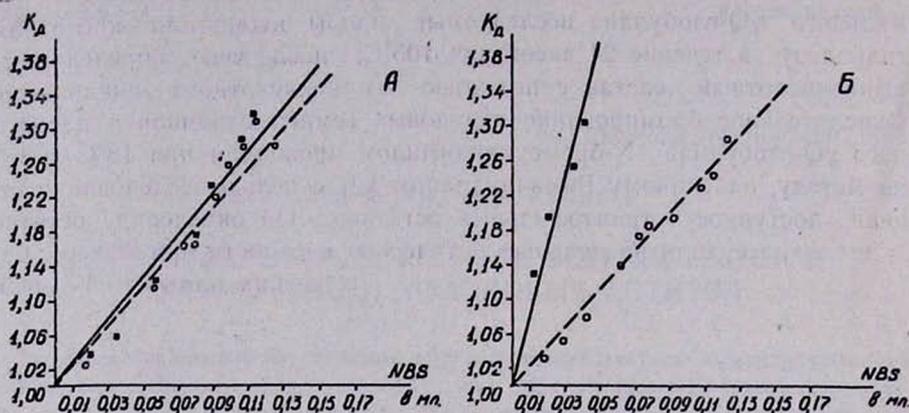


Рис. 1. Кинетика окисления триптофана холодowych гемагглютининов и нормального γ Q-глобулина N-бромсукцинимидом при 18°C (А) и 37°C (Б).

■/■ — холодowych гемагглютинины, % — нормальной γ Q-глобулин.

При 18°C не наблюдается отличий в эффективности окисления триптофана в холодowych гемагглютинах и нормальном γ Q-глобулине кролика. При 37°C эффективность окисления остатков триптофана в холодowych гемагглютинах существенно возрастает по сравнению с таковой для нормального γ Q-глобулина.

В следующих эксперименте показано, что при повышении температуры от 17°C до 70°C наблюдаются достоверные отличия в изменении флуоресценции холодowych гемагглютининов и нормального γ Q-глобулина кролика. Поскольку собственная флуоресценция γ Q-глобулина определяется преимущественно остатками триптофана [2], то это свидетельствует о том, что сравниваемые белки отличаются по конформации структур (табл.).

Таблица
Демаскирование триптофана и дисульфидных связей в молекуле холодowych гемагглютининов и нормального γ Q-глобулина при 37°C

Препарат	Изменение интенсивности флуоресценции %		Число дисульфидных связей, восстановленных 0.2 М 2-меркаптоэтанолом	
	17°C	37°C	17°C	37°C
Нормальный γ Q-глобулин	100	66	6	6
Холодowych гемагглютинины γ Q класса	100	72	6	8

Как было показано рядом авторов [4, 6], эффективность разрушения дисульфидного каркаса молекулы γ Q-глобулина зависит в значительной степени от разрушения третичной структуры полипептидных цепей в присутствии денатурирующих агентов. Поэтому представлялось целесообразным оценить степень доступности дисульфидных свя-

зей холодовых гемагглютининов для действия восстановителя при повышении температуры, используя в качестве контрольного препарата нормальный γ Q-глобулин.

Как видно из таблицы, в присутствии 0,2 М 2-меркаптоэтанола при 18°C в холодовых гемагглютинаинах и нормальном γ Q-глобулине происходит разрушение равного числа дисульфидных связей. Напротив, при 37°C в молекуле холодовых гемагглютининов происходит разрыв двух дополнительных дисульфидных связей.

Таким образом, в пределах исследованной модели получило известное подтверждение высказанное предположение, что молекула холодовых гемагглютининов γ Q класса характеризуется конформационной термолабильностью, причем признаки изменения конформации выявляются при той же температуре, при которой молекула утрачивает способность взаимодействовать с антигеном.

Институт экспериментальной биологии

АН Арм. ССР

Поступила 28/1 1976 г.

Ե. Պ. ՄԵՍՐՈՊՅԱՆ, Ա. ՅՄ. ԿՈՆԻՍԵՐԿ

ՍԱՌՑԱՅԻՆ ՀԱԿԱՄԱՐՄԻՆՆԵՐԻ ՏԱՐԱԾԱԿԱՆ ԿՈՆՖՈՐՄԱՑԻԱՅԻ
ՈՐՈՇ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հետազոտված է γ Q-գլոբուլինների և սառցային հակամարմինների ամի-
նոթթվածնային կազմի և տարածական կոնֆորմացիայի համեմատական
հետազոտությունը: Ցույց է տրված, որ սառցային հակամարմինների մոլե-
կուլը ջերմաստիճանի բարձրացումից կրում է հրորոդային կառուցվածքի
ավելի մեծ փոփոխություններ, քան նորմալ γ Q-գլոբուլինը:

Ուսումնասիրությունները վկայում են այն մասին, որ սառցային հակա-
մարմինները բնութագրվում են կոնֆորմացիոն թերմոլաբիլությամբ, ըստ
որում կոնֆորմացիայի փոփոխության նշանները ի հայտ են գալիս այն ջեր-
մաստիճանի պայմաններում, որում հակամարմինների մոլեկուլը կորցնում է
անտիգենի հետ փոխազդեցության հատկությունները:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Месропян Н. П., Кульберг А. Я. Бюлл. exper. биол. и медицины, 1970, 1, 64.
2. Шанин С. С. В сб.: Материалы II Всесоюзного биохимического съезда. Ташкент, 1969, стр. 48.
3. Alexander Al., Thompson L. D. J.A.M.A., 85, 1707, 1905.
4. Cecil K., Wake K. G. Biochem. J., 82, 401, 1962.
5. Christenson W. N., Davie J. V., Crouches B. E. E. Brit. J. Haemat., 3, 262, 1957.
6. Franek F., Nesltn R. S., Skwaril F. Folia Microb., 8, 197, 1963.
7. Gordon I. K. J. Immunol., 71, 44, 220, 1953.
8. March W. L. Nature, 188, 755, 1960.
9. Ramachandran L. K. J. Sci. Ind. Res., 21, 111, 1962.
10. Weber K. Vox. Sang, 1, 37, 1956.