



Структура и функция биополимеров

УДК 576.8.097:547.963.1

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ СПИН-МЕТКИ В ОСТАТОК N-АЦЕТИЛНЕЙРАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ ОЛИГОСАХАРИДНОЙ ГРУППИРОВКИ Fab-ОБЛАСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНА M *

В. П. Тимофеев, В. А. Лапук, А. П. Чухрова, А. Е. Арутюнян,
Т. М. Киселева

Введение. Метод спин-метки является весьма информативным при исследовании динамической структуры биологических макромолекул [1]. В последнее время с помощью этого метода были выявлены важные особенности динамики молекулы иммуноглобулина M (IgM) — одного из основных участников иммунного ответа организма человека и животных [2, 3]. При этом использовалась, главным образом, спин-метка по углеводам IgM — 2,2,6,6-тетраметил-4-аминопиперидин-1-оксил (СМ1). Однако интерпретация данных в этом случае осложнялась трудностью контроля процесса введения спин-метки в IgM и ее последующей локализации в макромолекуле. В данной работе показана возможность введения СМ1 только в одну из пяти олигосахаридных группировок (ОГ) IgM (в расчете на μ -цепь), расположенную в Fab-области. При этом спин-метка локализуется только в остатке N-ацетилнейраминовой кислоты (AcNeu) этой ОГ. Полученные таким образом спин-меченные по Fab-области препараты IgM могут оказаться весьма полезными при исследовании динамики структуры IgM, в частности в процессе связывания антигена.

Материалы и методы. Моноклональный IgM_{Рощ} (болезнь Вальденштрёма) выделяли по описанному ранее методу [7], но без стадии лиофилизации. Гомогенность препарата доказана иммуноэлектрофорезом с использованием овечьей поливалентной антисыворотки против плазмы крови человека.

Спин-метка СМ1 фирмы «Aldrich Chemical Co.» (США).

Введение СМ1 в ОГ IgM в условиях неконтролируемого окисления NaIO₄ проводили по описанному методу [2].

Введение СМ1 в ОГ IgM по остаткам AcNeu [4]. К 1 мл раствора IgM (8,27 мг/мл, или $9 \cdot 10^{-6}$ M; концентрация AcNeu — $3,6 \cdot 10^{-4}$ M) в 0,006 M фосфатном буфере, pH 7,0, содержащем 0,15 M NaCl (буфер А), охлажденного до 0÷4 °С, добавляют 10 мкл раствора NaIO₄ в воде (15,6 мг/мл), т. е. до концентрации $7,1 \cdot 10^{-4}$ M, выдерживают 15 мин при 0÷4 °С, добавляют 136 мкл этиленгликоля, т. е. до концентрации $1,9 \cdot 10^{-3}$ M, выдерживают 10 мин при 4 °С, добавляют 0,62 мг ($3,65 \cdot 10^{-6}$ моля) СМ1 (сухая навеска или раствор в минимальном объеме этанола) и 0,23 мг ($3,65 \times 10^{-6}$ моля) NaCNBH₃, т. е. до концентрации $3,14 \cdot 10^{-3}$ M, выдерживают 16—20 ч при 4 °С и диализуют в трубках «Visking» 5 сут против буфера А (6×0,4 л). Таким образом, молярное соотношение AcNeu : NaIO₄ : СМ1 : этиленгликоль : NaCNBH₃ округленно составляет 1 : 2 : 9 : 5 : 9.

* Представлена членом редколлегии В. И. Ивановым.

Получение десалированного препарата IgM. Раствор IgM в 0,01 М трис-HCl буфере, pH 8,3—8,4, содержащем 0,15 М NaCl (буфер Б), с концентрацией 1,5 мг/мл центрифугируют 15 мин при 7500 об/мин, белок переводят в 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 6,0, содержащий 0,002 М CaCl₂, 0,15 М NaCl, с помощью ячейки «Amicon» с мембраной PM-10, добавляют нейраминидазу холерного вибриона (фирма «Serva», ФРГ) из расчета 0,1 ед. активности на 1 мг IgM, инкубируют 3,5 сут при 37 °С под толуолом, переводят в буфер Б с помощью ячейки «Amicon» с мембраной PM-30, центрифугируют 15 мин при 7500 об/мин, надосадочную жидкость

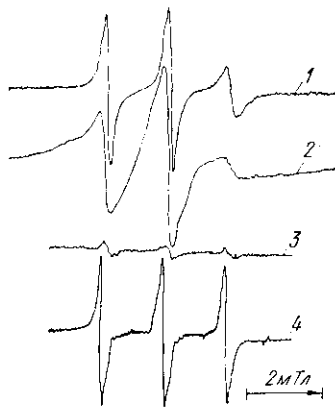


Рис. 1. Спектры ЭПР нативного и десалированного IgM, меченного спин-меткой СМІ: 1 — препарат, полученный в условиях контролируемого окисления ОГ по AcNeu с помощью NaIO₄ (IgM_{снл}-СМІ); 2 — препарат, полученный в условиях неконтролируемого окисления ОГ с помощью NaIO₄ (IgM-СМІ) [2]; 3 — десалированный препарат IgM, спин-меченный в условиях получения спектра 1; 4 — свободная спин-метка СМІ (5·10⁻⁶ М). Все растворы — в буфере А (см. «Материалы и методы»). Концентрации препаратов белков — в пределах 1,5—3,0 мг/мл. Спектры 3 и 4 записаны при одинаковых параметрах, но при усилении в 3 раза большем, чем спектр 1. Все спектры записаны при 20 °С

Fig. 1. ESR spectra of the native and asialo-IgM labelled with the spin label СМІ: 1 — the preparation obtained upon controlled NaIO₄-oxidation of AcNeu in oligosaccharide groups (OG-s) of the IgM (IgM_{снл}-СМІ); 2 — the preparation obtained upon noncontrolled NaIO₄-oxidation of OG-s (IgM-СМІ) [2]; 3 — asialo-IgM spin-labelled as in 1; 4 — free spin label СМІ (5·10⁻⁶ М). All solutions are in buffer A (see «Materials and methods»). Protein concentrations are in the range of 1.5-3.0 mg/ml. The spectra 3 and 4 are recorded under the same recording parameters but at 3-fold receiver gain as compared with 1. All spectra are recorded at 20 °С

концентрируют до 0,35 мг/мл с помощью ячейки «Amicon» с мембраной PM-10, отделяют нейраминидазу гель-фильтрацией на колонке с сефарозой 6В (2×90 см) в буфере Б и полученный препарат десалированного IgM концентрируют до 4—6 мг/мл с помощью ячейки «Amicon» с мембраной PM-10. Во всех случаях концентрирования IgM методом ультрафильтрации в фильтрате практически не обнаруживали низкомолекулярных продуктов распада белка.

Определение AcNeu в препаратах IgM. Навеску лиофильно высушенного обессоленного препарата IgM гидролизуют 1 ч при 80 °С в 0,1 н. H₂SO₄ (из расчета 2—3 мл кислоты на 1 мг белка) и затем проводят определение по методу [8].

Спектры ЭПР записывали на приборе «Varian E-104-A» (США) при амплитуде модуляции ВЧ-поля 0,2 мТл и уровне СВЧ 5 мВт. Для определения расстояния между крайними широкими пиками спектры записывали на развертке поля 0,25 мТл/см при амплитуде модуляции ВЧ-поля 0,4 мТл. Расчет и построение температурно-вязкостной зависимости проводили по описанному ранее методу [1, 9]. Интерпретация спектров ЭПР, обозначения, терминология и анализ описаны ранее [1, 2, 10—12].

Результаты и обсуждение. Для введения СМІ в ОГ биологических макромолекул необходимо предварительное окисление этих ОГ с помощью NaIO₄. Этот процесс плохо поддается контролю и во всяком случае требует дополнительных трудоемких исследований. Недавно была предложена методика окисления с помощью NaIO₄ ОГ гликопротеиновых и гликолипидных рецепторов лимфоцитов, позволяющая избирательно окислять только остатки AcNeu [4]. Мы модифицировали указанную методику и применили этот вариант для введения СМІ в моноклональный IgM (болезнь Вальденштрема). В результате был получен спин-меченный препарат IgM_{снл}-СМІ, спектр ЭПР которого (рис. 1, спектр 1) отличался существенно большей расторможенностью спин-метки, чем в случае спин-меченного препарата IgM-СМІ (рис. 1, спектр 2), в котором СМІ вводили в условиях неконтролируемого окисления ОГ периодатом Na [2]. Это видно уже при 20 °С по полному отсутствию крайнего широкого пика (КШП) в левой части спектра

IgM_{спал}-СМІ, тогда как в спектре IgM-СМІ этот КШП хорошо заметен. Более наглядно расторможенность ЭПР-спектра IgM_{спал}-СМІ проявляется при 1 °С и переменной вязкости среды (рис. 2).

Ранее мы показали, что при получении IgM-СМІ количество связанных остатков СМІ в расчете на μ -цепь не превышает 2. При этом

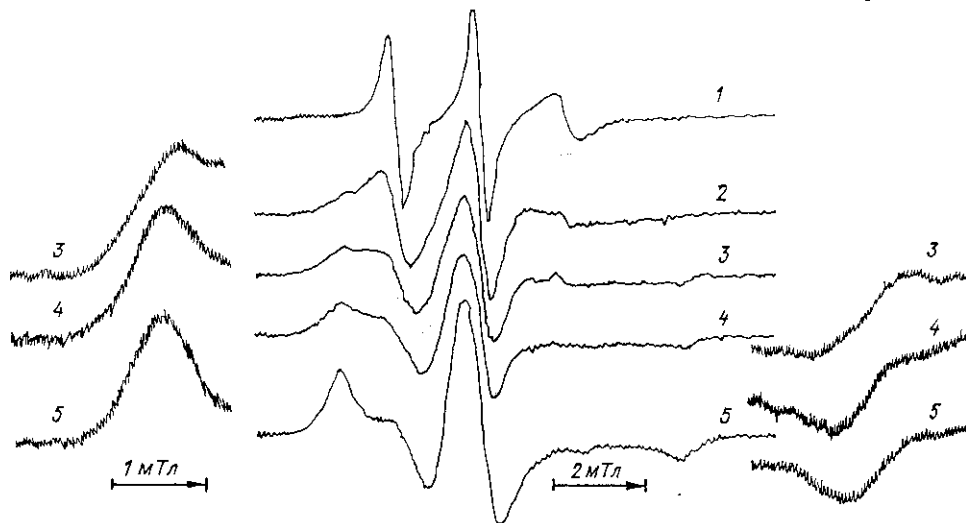
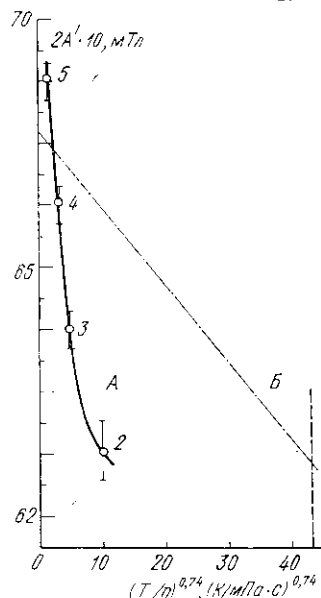


Рис. 2. Влияние вязкости среды на спектры ЭПР IgM_{спал}-СМІ (рис. 1, спектр 1): 1—0, 2—41, 3—50, 4—55, 5—60,6 % сахарозы. Спектры записаны при 1 °С в буфере А (см. «Материалы и методы»). Концентрация белка \approx 1,5 мг/мл

Fig. 2. Influence of the solution viscosity on the ESR spectrum of the IgM_{spal}-CMI (Fig. 1, spectrum 1): 1—0, 2—41, 3—50, 4—55, 5—60.6 % sucrose. Spectra are recorded at 1 °С in buffer A (see «Materials and Methods»). Protein concentration is \approx 1.5 mg/ml

Рис. 3. Зависимость расстояния между крайними широкими пиками в ЭПР-спектре IgM, меченного СМІ в различных условиях окисления NaIO₄, от вязкости среды при постоянной температуре (1 °С): А — для IgM_{спал}-СМІ (см. рис. 2); Б — для IgM-СМІ [2]. Цифры на кривой А соответствуют нумерации спектров на рис. 2; вертикальная пунктирная линия отвечает вязкости раствора при температуре 1 °С в отсутствие сахарозы

Fig. 3. The dependence of a distance between the outer wide peaks of the ESR spectra of the IgM spin-labelled under various NaIO₄-oxidation conditions on solution viscosity at the constant temperature (1 °С): А — for IgM_{spal}-CMI (see Fig. 2); Б — for IgM-CMI [2]. The digits at the curve А are the same as for ESR spectra in Fig. 2; the vertical dotted line refers to sucrose-free solution at the temperature 1 °С



в ЭПР-спектре IgM-СМІ наблюдалась суперпозиция двух форм: заторможенной и расторможенной [2]. Дальнейшее исследование показало, что вторая — расторможенная — форма спектра ЭПР обусловлена вхождением одного из двух остатков СМІ в ОГ Fab-области [3]. Такой вывод был сделан на том основании, что спектр ЭПР спин-меченного фрагмента Fab-СМІ имел именно такую расторможенную форму: КШП хорошо разрешались в этом спектре лишь при 1 °С и концентрации сахарозы 47 %. Аналогичное явление мы наблюдаем и в случае ЭПР-спектра IgM_{спал}-СМІ, в котором КШП появлялись лишь при 1 °С и кон-

центрации сахарозы 41 % (рис. 2, спектр 2; рис. 3). Такое совпадение характеристик ЭПР-спектров Fab-СМ1 и IgM_{сиал}-СМ1 позволяет сделать вывод, что в предлагаемых нами условиях удается избирательно ввести СМ1 в ОГ Fab-области IgM.

Для того чтобы удостовериться, что метка при этом, как можно было ожидать, действительно входит в остаток AcNeu, мы провели спин-мечение по этой же методике предварительно десилированного нейраминидазой препарата IgM, в котором было удалено 96—97 % AcNeu. Запись спектра ЭПР этого спин-меченного препарата на предельной чувствительности прибора выявила лишь присутствие следов свободной спин-метки (рис. 1, спектры 3, 4). Это означает, что в десилированный IgM спин-метка в наших условиях не входит.

Таким образом, полученные данные показывают, что предлагаемая нами методика позволяет избирательно вводить спин-метку СМ1 в ОГ Fab-области IgM, при этом СМ1 оказывается расположенной на остатках AcNeu. Такой результат можно объяснить тем, что из пяти ОГ в IgM в расчете на μ -цепь [5] именно ОГ в Fab-области является наиболее пространственно доступной и подвижной [3, 6].

SELECTIVE SPIN-LABELLING OF N-ACETYLNEURAMINIC ACID RESIDUE IN OLIGOSACCHARIDE OF IgM Fab-REGION

V. P. Timofeev, V. A. Lapuk, A. I. Tchukhrova, A. E. Arutjunjan, T. M. Kiseleva

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

Summary

A method is proposed for spin-labelling (2,2,6,6-tetramethyl-4-aminopiperidine-1-oxyl) of N-acetylneuraminic acid residue within oligosaccharide of Fab-region of immunoglobulin M.

1. Тимофеев В. П. Сегментальная подвижность поли(U) и метод спин-метки // Молекуляр. биология.— 1986.—20, № 3.— С. 697—711.
2. Тимофеев В. П., Ланук В. А. Исследование необратимого конформационного перехода в иммуноглобулине М методом спин-метки, введенной в углеводную и пептидную части его молекулы // Там же.— 1982.—16, № 2.— С. 403—410.
3. Some peculiarities of the dynamics of the immunoglobulin M structure / V. A. Lapuk, V. P. Timofeev, A. I. Tchukhrova et al. // J. Biomol. Struct. and Dynam.— 1984.—2, N 1.— P. 63—76.
4. Sharom F. J., Ross T. E. Spin labelling of sialic acid and galactose residues on lymphocyte plasma membrane: effects of lectins on oligosaccharide dynamics // Mol. Immunol.— 1985.—22, N 5.— P. 521—530.
5. Complete amino acids sequence of the Mu heavy chain of a human IgM immunoglobulin / F. W. Putnam, G. Florent, C. Paul et al. // Science.— 1973.—182, N 4109.— P. 287—291.
6. Каверзнева Е. Д., Чухрова А. И., Виха Г. В. Роль углеводных групп в иммуноглобулинах М. V. Стерическая доступность олигосахаридных группировок в макроиммуноглобулинах // Биоорг. химия.— 1978.—4, № 3.— С. 369—374.
7. Ланук В. А., Шамакова Ф. В., Каверзнева Е. Д. Роль углеводных групп в иммуноглобулинах М. I. Выделение и характеристика иммуноглобулина М человека, имеющего углеводные группы на L-цепях // Там же.— 1975.—1, № 8.— С. 1134—1139.
8. Warren L. Thiobarbituric acid assay of sialic acid // J. Biol. Chem.— 1959.—234, N 8.— P. 1971—1975.
9. Измерение времени вращательной корреляции макромолекул методом ЭПР в случае ковалентно связанной спин-метки / И. В. Дудич, В. П. Тимофеев, М. В. Волькенштейн, А. Ю. Мишарин // Молекуляр. биология.— 1977.—11, № 3.— С. 685—693.
10. Rotational correlation times of IgG and its fragments spin-labelled at carbohydrate or protein moieties. Spatially fixed position of the Fc carbohydrate / V. P. Timofeev, I. V. Dudich, Yu. K. Sykulev, R. S. Nezhlin // FEBS Lett.— 1978.—89, N 2.— P. 191—194.
11. Timofeev V. P., Dudich I. V., Volkenstein M. V. Comparative study of dynamic structure of pig and chicken aspartate aminotransferases by measuring the rotational correlation time // Biophys. Struct. and Mech.— 1980.—1, N 1.— P. 41—49.
12. Тимофеев В. П. Описание динамического поведения боковых групп глобулярных белков при помощи методов спин-метки, ЯМР и поляризации люминесценции // Молекуляр. биология.— 1983.—17, № 3.— С. 519—531.

Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва
Ин-т орг. химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва

Получено 10.02.87