



Молекулярные механизмы дифференцировки

УДК 576.8—097.3

АНОМАЛЬНОСТЬ ПОВЕДЕНИЯ В МОНОСЛОЯХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ М ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ *

Н. А. Матвеева, В. А. Алешкин,
Л. В. Часовникова, Д. В. Стефани, В. В. Лаврентьев

Введение. В настоящее время большинство исследователей рассматривает иммуноглобулины (Ig), вырабатываемые при злокачественных поражениях системы В-лимфоцитов, как нормальный продукт патологического клона клеток. Однако в работах [1, 2], посвященных патогенезу, клинике и диагностике моноклональных иммуноглобулинопатий, нередко подчеркивается необычность некоторых физико-химических свойств парапротеинов.

В последние годы показано, что при лимфопролиферативных заболеваниях наблюдаются различные нарушения хромосом, причем число и характер хромосомных аномалий коррелирует с тяжестью заболевания [3]. Наиболее часто встречаются нарушения, связанные с транслокациями, в результате которых ген *c-myc* переносится в непосредственную близость или даже внедряется в область хромосом, кодирующую цепи иммуноглобулинов [4]. С другой стороны, известно, что при лимфопролиферативных заболеваниях нередко синтезируются явно дефективные иммуноглобулины, и степень нарушения структуры может быть различной. Особенно ярко это проявляется при болезни тяжелых цепей.

Парапротеины, не обладающие явными дефектами структуры, могут тем не менее обладать свойствами, отличающими их от нормальных белков. У некоторых парапротеинов, например, наблюдается повышенная склонность к образованию агрегатов, обусловленная не высокой концентрацией в крови, а особенностями структуры [5]. Приблизительно в 30 % случаев обнаруживается аномальное гликозилирование миеломных IgG: помимо углеводов в F_c -фрагментах они обладают дополнительным углеводом в F_{ab} -фрагментах [6—9]. Наблюдаются не только количественные, но и качественные отличия углеводных составов нормальных и миеломных IgG [9]. Между тем установлено, что углевод в F_c -фрагменте, во-первых, определяет взаимную ориентацию $C_{\gamma 2}$ -доменов и, во-вторых, возможно, как следствие первого препятствует протеолизу [10]. Среди иммуноглобулинов миеломного происхождения встречаются крио- и пироглобулины.

Все перечисленные выше особенности Ig, синтезируемых при лимфопролиферативных заболеваниях, позволяют подвергнуть сомнению гипотезу о полной тождественности парапротеинов иммуноглобулинам нормальной сыворотки. Идею о патологичности миеломных белков высказывали авторы [11], показавшие, что миеломный IgG отличается от IgG донора более полярным окружением тирозиновых и триптофановых остатков молекулы.

* Представлена членом редколлегии В. И. Ивановым.

Ранее нами было показано [12, 15, 18], что иммуноглобулины класса G различного видового происхождения, выделенные из нормальной сыворотки, а также антидансильные и антидинитрофенильные антитела свиньи отличаются от миеломных IgG человека и мыши по двум признакам. Во-первых, молекулам миеломных IgG свойственна вертикальная ориентация в монослоях на границе вода — воздух, в то время как молекулам нормальных IgG — горизонтальная. Во-вторых, IgG миеломного происхождения быстрее денатурируют на границе фаз. Целью данной работы было проверить, существуют ли между нормальными и патологическими IgM различия, аналогичные таковым между нормальными и миеломными IgG.

Материалы и методы. Иммуноглобулины M из нормальных сывороток человека, морской свинки и мыши выделяли комбинацией методов гидрофобной хроматографии на протамина-сефарозе с последующей гель-фильтрацией на Тоуреаг1 HW55 (fine). Протамина-сефарозный сорбент готовили согласно [16]. В качестве основы использовали CNBr-сефарозу НПО «Биолар» (Олайн). Иммуноглобулины M из сывороток больных макроглобулинемией Вальденстрема выделяли методом двух последовательных гель-фильтраций на сефадексе G-200 («Pharmacia», Швеция). Все препараты были иммунохимически чистыми.

Монослой IgM получали, осторожно насаивая раствор белка из микропипетки на поверхность раствора NaCl в ванне Ленгмюра. Развиваемое при сжатии монослоя поверхностное давление π измеряли по модифицированному методу Вильгельми [17] с точностью $\pm 0,15$ мН/м. Молекулярную массу IgM принимали равной 900000. По кривым поверхностное давление — площадь на молекулу в монослое ($\pi - A$) определяли площадь A_0 , занимаемую одной белковой молекулой в плотноупакованном монослое [12]. Измерения проводили при температуре 20 ± 1 °C.

Результаты и обсуждение. Поведение в монослоях IgM здоровых доноров и больных макроглобулинемией Вальденстрема сравнивали по тем же параметрам, что и IgG [12]. Были изучены шесть препаратов IgM больных макроглобулинемией, среди которых был один криоглобулин, и нормальные IgM различного видового происхождения (человека, мыши и морской свинки). Для всех указанных белков были опре-

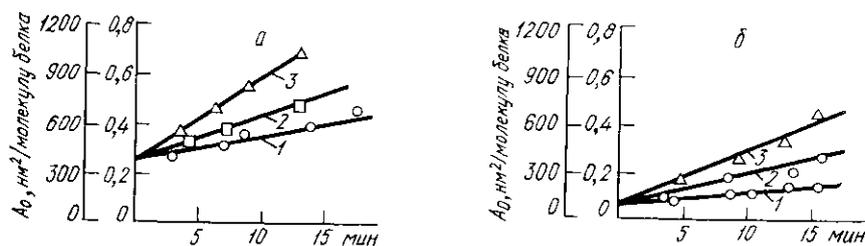


Рис. 1. Зависимость предельной площади A_0 от времени формирования монослоя при различных концентрациях NaCl в подлежащем растворе: а — для нормального IgM человека (1—0,5; 2—0,75; 3—1,0 М); б — для IgM, выделенного из сыворотки больного И (1—0,3; 2—0,5; 3—1,0 М)

Fig. 1. Characteristic area A_0 versus time of monolayer formation for monolayers of normal human IgM at different NaCl concentrations in the aqueous phase: а — for human normal IgM (1—0.5; 2—0.75; 3—1.0 M); б — for IgM isolated from the patient serum (1—0.3; 2—0.5; 3—1.0 M)

делены площади A_0 , занимаемые в монослое одной белковой молекулой через различные промежутки времени t с момента образования монослоя. Эти данные для нормального IgM человека и для одного из парпротеинов приведены на рис. 1, а, б. Для нормальных IgM мыши и морской свинки получены результаты, аналогичные представленным на рис. 1, а, а для всех патологических IgM, включая криоглобулин, зависимости A_0 от t принципиально не отличались друг от друга.

Представленные графики характеризуют кинетику поверхностной денатурации белковых молекул, заключающуюся в том, что молекулы

постепенно утрачивают свою третичную структуру и распластаются на поверхности таким образом, что все полипептидные цепи располагаются в плоскости границы раздела.

Из рис. 1 видно, что на начальном этапе процесса поверхностной денатурации зависимость A_0 от t имеет линейный характер. Угол наклона прямой к оси абсцисс характеризует скорость поверхностной денатурации, а отрезок, отсекаемый на оси ординат, соответствует площади, занимаемой нативной молекулой IgM в монослое при $t=0$ (A'_0). Увеличение концентрации NaCl в подлежащем растворе приводит к возрастанию скорости денатурации молекул, но, как и следовало ожидать, не влияет на значение A'_0 .

Как упоминалось, нормальные IgG отличаются от миеломных очень высокой устойчивостью к поверхностной денатурации. Стабильность нативной структуры патологических IgM, однако, оказалась близкой к устойчивости нормальных белков этого же класса. Сле-

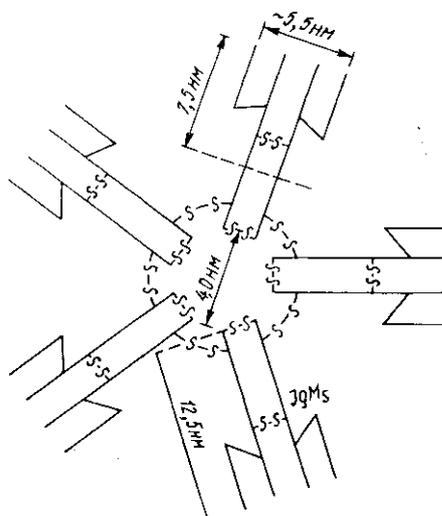


Рис. 2. Схема строения молекулы IgM по данным работы [19]

Fig. 2. Scheme of the IgM molecule structure [19]

довательно, данный признак не может рассматриваться в качестве критерия при определении патологичности IgM.

Для IgG было показано [18], что значение A'_0 соответствует размерам этих молекул по данным рентгеноструктурного анализа. Так как молекула IgG не обладает сферической симметрией, по значению A'_0 удалось установить ориентацию молекул на границе раздела вода — воздух, оказавшейся горизонтальной для нормальных и вертикальной для миеломных IgG.

Ориентация патологических и нормальных IgM в монослоях на границе водные растворы NaCl — воздух

Abnormal and normal IgM molecules orientation in monolayers at aqueous NaCl solution — air interface

IgM	A'_0 , $\text{nm}^2/\text{молекулу белка}$	Ориентация
При патологии у больных		
И	90	Вертикальная
Г	90	»
Н	105	»
Ж	97	»
П (криоглобулин)	105	»
А	75	»
В норме		
Человек	345	Горизонтальная
Мышь	360	»
Морская свинка	360	»

У всех изученных патологических IgM величины предельной площади A'_0 близки к значению $90 \text{ nm}^2/\text{молекулу}$, которое примерно в четыре раза меньше соответствующих площадей для нормальных IgM ($350\text{—}360 \text{ nm}^2/\text{молекулу}$). Величины предельной площади A'_0 для всех изученных IgM представлены в таблице.

Для интерпретации полученных различий в площади на молекулу нормальных и патологических IgM использовали схему строения и размеры молекулы по данным [19], воспроизведенным на рис. 2. Естественно предположить, что различия между IgM здоровых доноров и больных макроглобулинемией аналогичны таковым между нормальными и миеломными IgG, т. е. что нормальные IgM ориентированы в монослоях горизонтально, а патологические — вертикально.

При горизонтальной ориентации молекул IgM в монослое площадь на молекулу не может быть меньше суммы площадей наибольших сечений субъединиц (IgM_s) плюс площадь, заключенная между С-концевыми доменами субъединиц. Эта площадь составляет приблизительно 330 нм². Вертикально ориентированная молекула IgM должна занимать в монослое площадь, близкую к сумме площадей поперечных сечений десяти F_{ab}-фрагментов, т. е. ~80 нм². Из сопоставления рассчитанных площадей с экспериментальными значениями A'₀ очевидно, что площади, занимаемые нормальными IgM в монослое, независимо от видового происхождения соответствуют горизонтальной ориентации молекул в монослое. Отклонения от соответствующей рассчитанной площади составляют менее 10 %. IgM больных макроглобулинемией ориентированы в монослоях вертикально. Для патологических IgM отклонения экспериментальных значений площадей от рассчитанного несколько больше (порядка 30 %), что вполне закономерно, так как чем меньший отрезок отсекает прямая на оси ординат, тем больше относительная погрешность в определении величины отсекаемого отрезка. Таким образом, факт отличия патологических IgM от нормальных по ориентации в монослоях можно считать установленным достоверно.

Мы считали, что при вертикальной ориентации патологических молекул происходит поворот мономерных субъединиц вокруг дисульфидных связей. Предполагаемая конфигурация молекулы IgM отличается от «столообразной», принимаемой молекулой в результате взаимодействия с антигеном и которой должна соответствовать площадь в монослое не менее 150 нм².

Следовательно, между нормальными и патологическими IgM существуют различия, аналогичные ранее установленным между нормальными и миеломными IgG. Таким образом, метод мономолекулярных слоев позволяет достоверно отличить белок, связанный с патологиями типа множественного миеломатоза и макроглобулинемии Вальденстрема, от нормальных иммуноглобулинов, выделенных из крови здоровых доноров.

Авторы выражают благодарность А. К. Куреку за иммунохимический анализ чистоты препаратов.

ANORMALITIES IN MONOLAYER BEHAVIOUR OF IMMUNOGLOBULINS M OF MALIGNANT ORIGIN

N. A. Matveeva, V. A. Alyoshkin, L. V. Chasovnikova, D. V. Stefani, V. V. Lavrentyev

N. I. Pirogov Second Order of Lenin Medical Institute, Moscow

*G. N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology,
Ministry of Public Health, RSFSR, Moscow*

Summary

Six preparations of immunoglobulin M (IgM) from patients with Waldenström macroglobulinemia and normal IgM of different species (man, guinea pig and mouse) have been studied by the monomolecular layer method. Molecules of normal IgM, like molecules of normal IgG, are oriented horizontally at the aqueous NaCl solution — air interface, but abnormal IgM molecules always have vertical orientation. Unlike IgG, there were no essential differences in the surface denaturation rate for normal and abnormal IgM.

1. Андреева Н. Е., Чернохвостова Е. В. Иммуноглобулинопатии.— М.: Медицина, 1985.—240 с.
2. Яворковский Л. Парапротейнемия и ее клиническое значение.— Рига: Звайгзне, 1981.—255 с.
3. Cytogenetic study in multiple myeloma / A. Ferti, A. Panani, G. Arapakis, S. Raptis // Cancer Genet. and Cytogenet.—1984.—12, N 3.— P. 247—253.
4. Klein G. The role of chromosomal translocations in oncogene transposition into functionally active gene regions: a mechanism in carcinogenesis // Hereditas.—1984.—100, N 2.— P. 169.
5. Aggregation of IgG *in vivo*. 2. Physicochemical properties of the isolated protein / S. Kochwa, E. Smith, M. Brownell, L. R. Wasserman // Biochemistry.—1966.—5, N 1.— P. 277—285.
6. Abel C. A., Spiegelberg H. L., Grey H. M. The carbohydrate content of fragments and polypeptide chains of human γ G-myeloma proteins of different heavy-chain subclasses // Ibid.—1968.—7, N 4.— P. 1271—1278.
7. The structure of glycopeptide of human γ G-myeloma proteins / R. Kornfeld, J. Keller, J. Baenziger, S. Kornfeld // J. Biol. Chem.—1971.—246, N 10.— P. 3259—3268.
8. A monoclonal immunoglobulin G1 in which some molecules possess glycosylated light chains. 1. Site of glycosylation / G. Savvidon, M. Klein, C. Horn et al. // Mol. Immunol.—1981.—18, N 9.— P. 793—805.
9. Structural and numerical variations of the carbohydrate moiety of immunoglobulin G / T. Mizuochi, T. Taniguchi, A. Shimisu, A. Kobata // J. Immunol.—1982.—129, N 5.— P. 2016—2020.
10. Burton D. R. Immunoglobulin G: functional sites // Mol. Immunol.—1985.—22, N 3.— P. 161—206.
11. Структурные особенности белка, характерного для G-миелом / Б. О. Проценко, В. П. Короткоручко, Л. М. Сенько, О. П. Демченко // Укр. биохим. журн.—1976.—48, № 1.— С. 78—81.
12. О различии ориентации и устойчивости к поверхностной денатурации в монослоях нормальных и миеломных иммуноглобулинов / Л. В. Часовникова, Н. А. Матвеева, Д. В. Стефани, В. В. Лаврентьев // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.—1983.— № 3.— С. 39—43.
13. Кульберг А. Я. Молекулярная иммунология.— М.: Высш. шк., 1985.—287 с.
14. Seia M., Mozes E. Dependence of chemical nature of antibodies on the net electrical charge of antigen // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1966.—55, N 2.— P. 445—452.
15. Часовникова Л. В., Матвеева Н. А., Лаврентьев В. В. Изучение ориентации, конформационной устойчивости и поверхностного потенциала иммуноглобулинов в мономолекулярных слоях // Биофизика.—1982.—27, № 1.— С. 17—19.
16. Hudson L., Hay F. C. Practical immunology.— Oxford etc.: Blackwell, 1988.—220 p.
17. Трапезников А. А. Температурная зависимость давления монослоев как новый метод исследования кристаллогидратов высших алифатических соединений // Журн. физ. химии.—1945.—19, № 4—5.— С. 228—238.
18. Одинаковый характер различий между нормальными и миеломными IgG мыши и человека методом монослоев / Л. В. Часовникова, В. В. Лаврентьев, В. А. Алешкин и др. // Бюл. эксперим. биологии и медицины.—1984.—98, № 7.— С. 63—65.
19. Dorrington K. J., Mihaesco C. Subunit structure of human γ M-globulins // Immunochimistry.—1970.—7, N 7.— P. 651—660.

Второй Моск. гос. мед. ин-т
им. Н. И. Пирогова МЗ РСФСР
НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. Г. Н. Габричевского МЗ РСФСР, Москва

Получено 03.06.87