



УДК 579.22

РОЛЬ УГЛЕВОДНОГО КОМПОНЕНТА В ФОРМИРОВАНИИ
ИММУНОХИМИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ
РАКОВОЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА **Павленко А. Ф., Курика А. В., Белогорцев Н. И.,
Набиуллин А. А., Оводов Ю. С.**Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ
Академии наук СССР, Владивосток*

Раковоэмбриональный антиген (РЭА), выделенный из метастазов аденокарциномы толстой кишки, подвергали дегликозилированию жидким HF. Белковый компонент РЭА использовали для получения моноспецифической антисыворотки к белковому компоненту. Проведено сравнительное изучение РЭА, его белкового компонента и неспецифического перекрестно реагирующего антигена с моноспецифическими к ним антисыворотками. Изучены КД-спектры РЭА и его белкового компонента. Сделано предположение о топографическом характере ряда иммунодетерминантных участков РЭА и о необходимости определенной конформации молекулы для их формирования. Углеводный компонент играет при этом роль стабилизатора конформации.

Ранее [1, 2] было показано, что РЭА, выделенный из метастазов аденокарциномы толстой кишки, представляет собой сиалогликопротеин ($M \sim 200$ кДа) с содержанием углеводов до 60%. В настоящее время РЭА достаточно хорошо изучен, однако до сих пор не решен вопрос о локализации опухолевоспецифических детерминант на молекуле РЭА.

Настоящая статья посвящена изучению локализации опухолевоспецифических детерминант РЭА и роли углеводного компонента в их формировании.

РЭА получали экстракцией буферным раствором метастазов аденокарциномы толстой кишки в печень. Сырой препарат очищали последовательной хроматографией на сефарозе 4В, сефадексе G-200, DEAE-целлюлозе DE-52 и конканавалин-А-сефарозе. В результате получили гомогенный, по данным электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия в градиенте пористости полиакриламидного геля и ультрацентрифугирования, препарат с $M \sim 200$ кДа.

Как видно из таблицы, в составе полученного образца отсутствует метионин. В качестве единственной N-концевой аминокислоты обнаружен лизин, что служит дополнительным подтверждением гомогенности препарата. Из углеводов обнаружены N-ацетилнейраминовая кислота, L-фукоза, D-галактоза, D-манноза, N-ацетил-D-глюкозамин. Таким образом, РЭА представляет собой сиалогликопротеин.

Для определения характера гликозидных связей между моносахаридными остатками полученный образец подвергали исчерпывающему метилированию по методу Хакомори. В гидролизате полностью метилированного РЭА с помощью хромато-масс-спектрометрии идентифицированы 2,3,4,6-тетра-O-метил-L-фукоза, 2,3,4,6-тетра-, 2,3,4- и 2,4,6-три-O-метил-D-галактоза, 3,4,6-три-, 2,4-, 3,4- и 3,6-ди-O-метил-D-манноза, 3,4,6-три-, 3,6-ди- и 6-моно-O-метил-D-глюкозамин. Отсюда следует, что в углеводной цепи РЭА остатки D-галактозы и L-фукозы занимают концевое положение. Кроме того, остатки D-галактозы включены в углеводную цепь 1,3- и 1,6-связями, а D-маннозы и D-глюкозамина — 1,2-гликозидными связями. В точках разветвления углеводной цепи гликопротеина находятся

* РЭА и БК РЭА — раковоэмбриональный антиген и его белковый компонент; NSCA-1 — неспецифический перекрестно реагирующий антиген.

Аминокислотный и моносахаридный состав РЭА и его белкового компонента *

Аминокислоты и моносахариды	РЭА	БК РЭА	Аминокислоты и моносахариды	РЭА	БК РЭА
Asp	13,05	13,57	Leu	8,66	8,24
Thr	7,89	8,62	Tyr	4,69	3,93
Ser	9,53	10,99	Phe	2,42	2,58
Glu	11,52	10,06	Lys	3,59	3,68
Pro	8,52	8,04	His	1,75	1,82
Gly	5,88	6,22	Arg	3,43	3,54
Ala	5,76	6,37	NeuAc	3,13	0,00
Cys	1,67	1,71	L-Fuc	8,00	0,00
Val	6,92	6,43	D-Man	7,20	1,62
Met	0,00	0,00	D-Gal	12,60	0,00
Ile	4,72	4,21	D-GlcNAc	16,00	1,90

* Содержание аминокислот и моносахаридов приведено в мольных и весовых процентах, соответственно; содержание триптофана, определенное спектрофотометрически [3], для РЭА равно 11 ост./моль, для БК РЭА — 8 ост./моль.

остатки *D*-маннозы и *D*-глюкозамина, причем углеводная цепь отличается высокой степенью разветвленности. Все эти данные находятся в хорошем соответствии с результатами, ранее полученными для других образцов РЭА. Таким образом, РЭА из метастазов аденокарциномы толстой кишки в печень по своим химическим свойствам близок к РЭА из других источников.

До настоящего времени остается нерешенным вопрос о локализации опухолевоспецифических детерминант на молекуле РЭА, что крайне важно для понимания механизма канцерогенеза и для повышения диагностической ценности РЭА. Чтобы подойти к определению характера детерминант и их места в молекуле РЭА, нами проводилась фрагментация молекулы гликопротеина с последующим анализом образующихся фрагментов иммунохимическими методами. С этой целью было использовано сольволитическое дегликозилирование РЭА с помощью безводного фтористого водорода [4]. Этот метод применяется для удаления углеводного компонента из белков, причем было показано, что после обработки HF белок сохраняет свои основные физико-химические, биологические и иммунологические свойства [5, 6]. Такая обработка РЭА приводит к отщеплению значительной части моносахаридных остатков: в гидролизате дегликозилированного РЭА обнаружены лишь манноза и глюкозамин, содержание которых снижается до 1,6 и 1,9% соответственно (таблица). Это говорит о том, что остатки маннозы и глюкозамина находятся в узле углевод-белковой связи гликопротеина. Дегликозилированный РЭА очищали от низкомолекулярных продуктов сольволиза с помощью длительного диализа, в результате чего с выходом 60% был получен гомогенный препарат дегликозилированного РЭА. Его гомогенность была подтверждена электрофорезом в градиенте пористости полиакриламидного геля. Основную часть полученного образца составляет белковый компонент РЭА, о чем свидетельствуют данные аминокислотного анализа (таблица) и определение лизина в качестве единственной *N*-концевой аминокислоты белкового компонента РЭА. Попытка получить специфическую антисыворотку к полученному образцу белкового компонента потребовала увеличения времени иммунизации и 10-кратной дозы антигена по сравнению с исходным РЭА. Эти данные указывают на значительную потерю иммуногенности при дегликозилировании нативного РЭА.

Сравнительное иммунохимическое изучение РЭА, его белкового компонента и НСА-1 (неспецифического перекрестно реагирующего антигена) [7] выявило (рис. 1а), что дегликозилированный РЭА сохраняет иммунохимическое сходство с нативным РЭА. Однако, как видно из рис. 1а, антисыворотка к белковому компоненту РЭА не взаимодействует с нативным антигеном. Иммунохимическое сопоставление белкового компонента РЭА и неспецифического перекрестно реагирующего

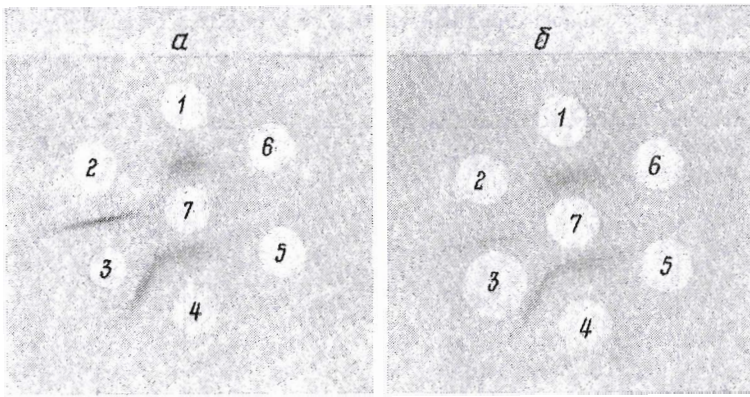


Рис. 1. Сопоставление тест-систем: БК РЭА – анти-БК РЭА с РЭА – анти-РЭА (а) и NCA-1 – анти-NCA-1 (б). а: 1, 4 – БК РЭА, 7 – антисыворотка против БК РЭА, 2 – РЭА, 3 – антисыворотка против РЭА, 5, 6 – физиологический раствор; б: 1, 4–7 – то же, что в а, 2 – NCA-1, 3 – антисыворотка против NCA-1

антигена, имеющего ряд общих иммунохимических детерминант с РЭА, показало, что антисыворотка к белковому компоненту не взаимодействует с NCA-1 (рис. 1б). Это может свидетельствовать о потере ряда важных иммунодетерминант в процессе дегликозилирования РЭА. В этой связи представляет значительный интерес выяснение конформационных различий между молекулами нативного и дегликозилированного антигена, а также определение онкологической специфичности детерминант.

С помощью метода кругового дихроизма (КД) нами была изучена вторичная структура нативного и дегликозилированного РЭА (рис. 2). Нативный РЭА имеет отрицательную полосу в спектре с максимумом ~ 215 нм, что указывает на предпочтительную β -структуру белкового компонента нативного антигена [8]. В спектре белкового компонента РЭА эта полоса исчезает, что, вероятно, обусловлено переходом β -структурированной конформации в неупорядоченную форму при дегликозилировании РЭА. Полученные результаты позволяют предположить, что некоторые иммунодетерминантные участки РЭА – топографические и для их формирования требуется не только заданная аминокислотная последовательность, но и определенная конформация молекулы.

Вывод подтверждается данными электронной микроскопии, согласно которым молекула РЭА представляет собой частицу неправильной формы (9×40 нм). Такая частица [9] отвечает одиночной цепи молекулы РЭА с многочисленными дисульфидными связями. Поскольку она короче, чем следует ожидать для линейного гликопротеина с той же молекулярной массой, можно считать, что молекула РЭА нелинейна и ее иммунохимические детерминанты формируются с вовлечением фрагментов из различных участков полипептидной цепи. Углеводный компонент играет при этом роль стабилизатора конформации: дегликозилирование РЭА приводит к дестабилизации конформации, что обуславливает исчезновение ряда топографических пептидных иммунодетерминант и падение иммуногенности препарата.

Экспериментальная часть

Метастазы аденокарциномы толстой кишки в печень больного, умершего от рака, полученные после аутопсии, хранили при -20°C . Аминокислотный анализ проводили после гидролиза образца 6 н. HCl в течение 24, 48 и 72 ч при 105°C на аминокислотном анализаторе LC 2000 (Biotronic, ФРГ). Сialовые кислоты определяли по методу [10], гексозамины – по методу [11]. Качественное и количественное определение моносахаридов проводили методом ГЖХ, для этого РЭА и его белковый компонент

гидролизovali 12 ч 2 н. трифторуксусной кислотой при 105° С, моносахариды превращали в ацетаты полиолов и анализировали на хроматографе «Цвет-110» с использованием стеклянных спиральных колонок (90×0,6 см) ECNSS-M на Gas-Chrom Q (100–120 меш) при температуре 180–200° С (2°/мин).

Масс-спектры снимали на хромато-масс-спектрометре LKB 9000 (LKB, Швеция). Электрофорез в градиенте пористости полиакриламидного геля проводили как описано в работе [12]. N-Концевую аминокислоту определяли по методу [13]. Спектры КД снимали на дихрографе Mark-III (Jobin Iyon, Франция) в области длин волн 190–240 нм при концентрации вещества 1 мг/мл в кювете толщиной 0,01 см.

Антисыворотки против РЭА, белкового компонента РЭА и NCA-1 получали по схеме, описанной нами ранее [14]. Определение содержания РЭА в экстрактах и иммунохимический анализ проводили как описано Н. И. Храмовой и Г. И. Абелевым [15].

Экстракция и выделение РЭА. Опухолевую ткань (1 г) размораживали и гомогенизировали 2 мин при 14 000 об/мин с 3 мл буфера. Гомогенат перемешивали 1 ч и центрифугировали 20 мин при 5500 об/мин. К супернатанту добавляли по каплям 70% хлорную кислоту до pH 4,0–5,0 и сразу нейтрализовали 2 М NaOH, осадок отделяли центрифугированием при 5500 об/мин в течение 10 мин. Супернатант диализовали против дистиллированной воды (2×24 ч), центрифугировали и концентрировали ультрафильтрацией, а затем лиофилизовали. Гомогенный препарат РЭА выделяли из экстракта опухолевой ткани как описано нами ранее [16].

Метилирование РЭА. РЭА (5 мг) метилировали по методу Хакомори [17]. Полностью метилированный РЭА (5 мг) очищали от продуктов реакции на колонке с силикагелем (5×0,5 см), сначала колонку промывали хлороформом (10 мл), затем полностью метилированный РЭА элюировали 10 мл метанола. Раствор упаривали и проводили метанолиз продукта 2 н. HCl в абс. метаноле при 105° С в течение 12 ч. Продукт реакции ацетилировали и исследовали ГЖХ-масс-спектрометрией.

Получение белкового компонента РЭА. К 42 мг тщательно высушенного РЭА (3 сут в вакууме над P₂O₅ при 56° С) добавляли 1,5 мл абс. анизола и 15 мл жидкого HF. Реакцию проводили в герметически закрытом тефлоновом сосуде при 23° С в течение 1 ч. HF удаляли в вакууме водоструйного насоса, присоединенного к сосуду с HF через трубку с CaO. После удаления HF к остатку добавляли 50% уксусную кислоту до обесцвечивания раствора. Полученный раствор диализовали против дистиллированной воды и лиофилизовали. Выход белкового компонента составил 19,9 мг.

Авторы выражают благодарность проф. Ю. С. Татаринovu и канд. мед. наук В. В. Калашникову за любезно предоставленную возможность сопоставления тест-систем на РЭА и NCA-1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gold P., Freedman S. O. J. Exp. Med., 1965, v. 121, № 3, p. 439–462.
2. Rogers G. T. Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 695, № 3–4, p. 227–249.
3. Ichikawa T., Terada H. Chem. Pharm. Bull., 1981, v. 29, № 2, p. 438–444.
4. Mort A. J., Lamport D. T. A. Anal. Biochem., 1977, v. 82, № 2, p. 289–309.
5. Glassman J. N. S., Todd C. W., Shively J. E. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1978, v. 85, № 1, p. 209–216.
6. Manjunath P., Sairam M. R. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 12, p. 7109–7115.
7. von Kleist S., Chavanel G., Burtin P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 9, p. 2492–2494.

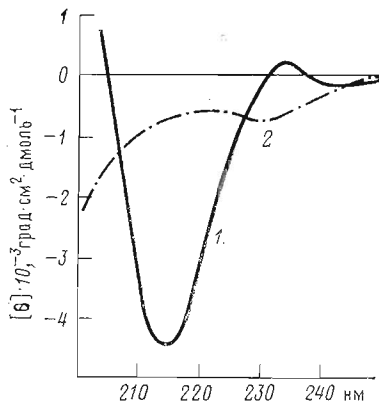


Рис. 2. Спектры КД растворов РЭА (1) и BК РЭА (2). Буфер – 0,05 М трис-HCl, содержащий 0,15 М NaCl, pH 7,5

8. *Seans D. W., Beychok S.* In: Physical principles and techniques of proteins chemistry. Part C/Ed. Leach S. N. Y.: Acad. Press, 1973, p. 446-593.
9. *Slayter H. S., Coligan J. E.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 11, p. 2323-2330.
10. *Warren L. J.* Biol. Chem., 1959, v. 234, № 8, p. 1971-1975.
11. *Elson L. A., Morgan W. T. Y.* Biochem. J., 1933, v. 27, № 11, p. 1824-1828.
12. *Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1981, с. 56-76.
13. *Ганкина Э. С., Королева Е. М., Бельский Б. Г.* Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 485-490.
14. *Павленко А. Ф., Курика А. В., Мороз С. В., Оводов Ю. С., Маслова М. Г., Володарский В. Л.* Вopr. онкологии, 1982, т. 28, № 4, с. 14-16.
15. *Храмкова Н. И., Абелев Г. И.* Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1961, т. 52, № 12, с. 107-111.
16. *Соколов А. В., Курика А. В., Ткачева Г. А., Пивень Н. В., Павленко А. Ф.* Мед. радиология, 1983, № 8, с. 61-65.
17. *Nakomori S. J.* Biochem., 1964, v. 55, № 2, p. 205-208.

Поступила в редакцию
22.VIII.1984

После доработки
18.X.1984

ROLE OF THE SUGAR MOIETY IN SHAPE-UP OF IMMUNOCHEMICAL DETERMINANTS OF CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN

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

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science Centre,
Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

Carcinoembryonic antigen (CEA) isolated from metastases of colon adenocarcinoma was subjected to deglycosylation with liquid hydrogen fluoride. The protein fraction obtained (PF CEA) was used for to prepare monospecific antiserum to PF CEA. Comparative studies of CEA, PF CEA, and non-specific cross-reacting antigen (NCA-1) have been carried out using monospecific antisera. Circular dichroism spectra of CEA and PF CEA have been studied. The data obtained suggest that some immunodominant regions of CEA are topographic, and their formation needs a specific conformation of the macromolecule, which is stabilized by the sugar moiety.