



УДК 612.017 : 616-097+577.412.853.083

**ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛИКОПРОТЕИНА ИЗ РЕТРОПЛАЦЕНТАРНОЙ
КРОВИ, ИМЕЮЩЕГО РЯД ОБЩИХ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ
С ТРОФОБЛАСТСПЕЦИФИЧЕСКИМ β_1 -ГЛИКОПРОТЕИНОМ**

*Павленко А. Ф., Мороз С. В., Глазунов В. П.,
Безнаев А. Н., Оводов Ю. С.*

*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ
Академии наук СССР, Владивосток*

Показано, что выделенный из ретроплацентарной крови гликопротеин (ТСГ-ФС) имеет ряд общих антигенных детерминант с трофобластспецифическим β_1 -гликопротеином (ТСГ). Антигенная активность ТСГ-ФС составляет 3,4% антигенной активности ТСГ. Подобно ТСГ гликопротеин ТСГ-ФС содержит четыре внутримолекулярные дисульфидные связи и относится к белкам с преобладающим содержанием β -структуры. Данные КД-спектроскопии свидетельствуют о высокой стабильности вторичной структуры ТСГ-ФС. Показана иммунохимическая идентичность ТСГ-ФС с восстановленным и карбоксиметилированным производным ТСГ. Полученные данные позволяют предположить, что ТСГ-ФС — фрагмент молекулы ТСГ.

Трофобластспецифический β_1 -гликопротеин (ТСГ) — один из наиболее важных белков зоны беременности [1, 2]. ТСГ привлек особое внимание после обнаружения его в сыворотках больных с трофобластическими опухолями [3], а также в связи с возможностью с его помощью следить за патологией беременности [4]. Однако значительная гетерогенность ТСГ не только затрудняет его исследование, но и ограничивает использование в клинике [2].

Нами была изучена вторичная и третичная структуры ТСГ и некоторых его производных спектральными методами [5, 6]. Ранее мы сообщали [7] об обнаружении и выделении из ретроплацентарной крови гликопротеина, проявляющего частичную иммунохимическую идентичность с ТСГ. Он имеет молекулярную массу 25 кДа и обозначен нами как ТСГ-ФС*. Одновременно [7] сделано предположение, что ТСГ-ФС является фрагментом молекулы ТСГ, так как он полностью иммунохимически идентичен фрагменту, полученному из ТСГ в результате мягкого кислотного гидролиза (ТСГ-ФК) [7].

Настоящая работа посвящена иммунохимическому и физико-химическому изучению ТСГ-ФС. Основные физико-химические характеристики ТСГ-ФС приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 2, ТСГ-ФС содержит меньшее количество триптофана, тирозина, аргинина и лейцина по сравнению с ТСГ. В отличие от ТСГ он почти не содержит N-ацетилшейраминной кислоты и фукозы.

Антигенная активность ТСГ-ФС, определенная иммуноферментным методом как описано нами ранее [6], составляет $3,4 \pm 0,3\%$ от исходной активности нативной молекулы ТСГ. В работе [6] нами было показано, что антигенная активность ТСГ в значительной степени зависит от вторичной и третичной структуры молекулы. Поэтому представляло интерес изучить элементы вторичной и третичной структур ТСГ-ФС в сравнении с таковыми для ТСГ [5, 6]. С этой целью нами были изучены спектры КД ТСГ-ФС. В ароматической области спектра КД водного раствора ТСГ-ФС наблюдается широкая отрицательная полоса с субмаксимумами при 295, 287 и 270 нм и положительная — при 255 нм (рис. 1б); все полосы малой

* ТСГ-ФС — сопутствующий фрагмент ТСГ.

Физико-химические характеристики ТСГ-ФС и ТСГ

Характеристика	ТСГ-ФС	ТСГ
Молекулярная масса, кДа	25±1,6	75±3
Электрофоретическая подвижность (агар, рН 8,6)	Как у α_2 -глобулинов	Как у β_1 -глобулинов
ρI	3,70	4,08
Белок, % по весу	70,7	68,6
Углеводы, % по весу	25,0	30,3
ϵ_{278} , М ⁻¹ ·см ⁻¹	13 110±130	47 780±480

Таблица 2

Аминокислотный и моносахаридный состав ТСГ-ФС и ТСГ *

Аминокислоты	ТСГ-ФС	ТСГ	Аминокислоты и моносахариды	ТСГ-ФС	ТСГ
Asx	10	35	Leu	10	35
Thr	17	34	Tyr	4	16
Ser	14	40	Phe	3	8
Glx	13	36	Lys	6	16
Pro	13	34	His	2	6
Gly	16	47	Arg	3	14
Ala	16	34	Trp	1	5
¹ / ₂ Cys	8	8	NeuAc	1	8
Val	10	27	L-Fuc	следы	6
Met	0	0	D-Man	5	22
Ile	6	14	D-Gal	10	37
			D-GlcNAc	13	40

* Содержание аминокислот и моносахаридов приведено в остатках на молекулу гликопротеина; содержание триптофана определено спектрофотометрически [8]; содержание цистеина определяли в виде карбоксиметилцистеина.

эллиптичности. Они относятся, по-видимому, к переходам остатков триптофана в молекуле. Не исключено, что в положительную полосу при 255 нм может вносить вклад поглощение остатков цистеина. Относительно низкая эллиптичность указанных полос в сравнении с эллиптичностью полос ароматической области в спектрах КД нативного ТСГ (рис. 1) [6] позволяет предположить, что остатки триптофана и тирозина находятся на поверхности молекулы ТСГ-ФС. Данные по доступности для молекул воды остатков триптофана и тирозина ТСГ-ФС, полученные из УФ-спектров тепловой пертурбации, свидетельствуют, что все остатки тирозина (4) и триптофана (1) в ТСГ-ФС экспонированы на поверхности молекулы. В нативной молекуле ТСГ содержится 5 остатков триптофана и 16 остатков тирозина, из которых на поверхности экспонировано 35 и 46% соответственно [6]. Количество остатков триптофана и тирозина определяли по методу второй производной УФ-спектра [8] в 6М гуанидингидрохлориде.

Нагревание раствора ТСГ-ФС до 70°С не приводит в отличие от ТСГ [6] к заметным изменениям эллиптичности полос в ароматической области спектра КД (рис. 1б). Следующая отсюда высокая термостабильность третичной структуры белковой части ТСГ-ФС позволяет предположить, что в отрицательную полосу при 287 нм вносят значительный вклад дисульфидные связи. Аналогичную широкую отрицательную полосу, обусловленную дисульфидными связями, мы наблюдали в спектрах КД ТСГ, денатурированного нагреванием и изменением рН [6] (см. рис. 1б).

В пептидной области спектра КД водного раствора ТСГ-ФС (рис. 1а) наблюдаются две интенсивные полосы: отрицательная (208 нм с плечом около 220 нм) и положительная (190 нм, характерная для белков, содержащих α -спираль). Расчет спектра по ранее описанному методу [9] на содержание элементов вторичной структуры показывает, что молекула

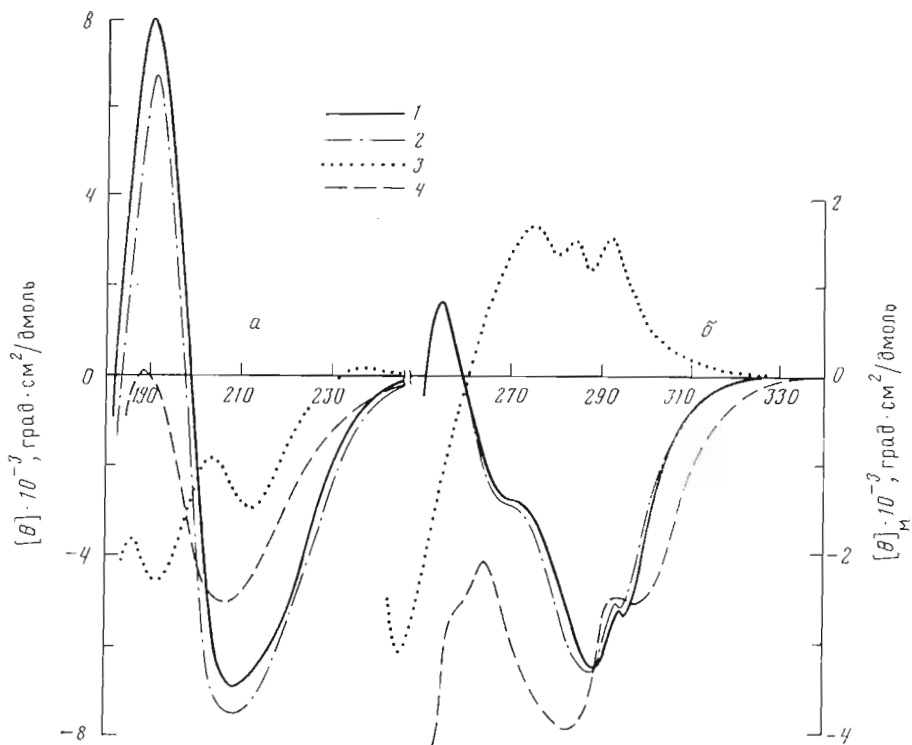


Рис. 1. Спектры КД ТСГ-ФС в H_2O при 20 (1) и 70° С (2) и ТСГ в H_2O при 20 (3) и 70° С (4): а – пептидная область, $l=0,01$ см, б – ароматическая область, $l=1$ см. Для спектра 3 (б) шкала ординат уменьшена в 10 раз

ТСГ-ФС содержит 16% α -спирали, 55% β -структуры и 29% β -изгибов. Таким образом, ТСГ-ФС, как и ТСГ, относится к белкам с преобладающим содержанием β -структуры. Нагревание раствора ТСГ-ФС до 70° С приводит к очень слабым изменениям эллиптичности полос в спектре КД в отличие от нативного ТСГ (рис. 1а), что свидетельствует о высокой стабильности вторичной структуры молекулы ТСГ-ФС. Высокая стабильность пространственной структуры белкового компонента ТСГ-ФС может быть обусловлена наличием дисульфидных связей.

Для подтверждения этого предположения провели титрование растворов ТСГ и ТСГ-ФС реактивом Эллмана с целью определения количества свободных сульфгидрильных групп. Свободные сульфгидрильные группы отсутствуют в обоих гликопротеинах. Восстановление дитиотреитом и последующее карбоксиметилирование показало, что в ТСГ и ТСГ-ФС содержится по 8 остатков карбоксиметилцистеина. Эти данные свидетельствуют о наличии четырех внутримолекулярных дисульфидных связей в молекулах ТСГ и ТСГ-ФС. Таким образом, высокая стабильность пространственной структуры ТСГ-ФС обусловлена четырьмя дисульфидными связями, которые, однако, в случае в 3 раза более крупной молекулы ТСГ не могут обеспечить такой же стабильности.

Определение антигенной активности иммуноферментным методом в восстановленном и карбоксиметилированном ТСГ (ТСГ-КМ) показало, что ТСГ-КМ сохраняет 3,0% активности молекулы ТСГ.

Проведенное иммунохимическое сравнение методом двойной иммунодиффузии в агаре свидетельствует, что при полной иммунохимической идентичности ТСГ-ФС и ТСГ-КМ они лишь частично идентичны ТСГ (рис. 2).

По данным электрофореза в градиенте пористости полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия, при восстановлении и карбоксиметилировании не происходит деградации молекулы ТСГ (рис. 3). Подвижность ТСГ-КМ меньше, чем у ТСГ, а кажущаяся молекулярная масса равна 82 кДа.

Рис. 2. Иммунохимическое сравнение ТСГ (2), ТСГ-ФС (3), ТСГ-КМ (4). 1 — антисыворотка против ТСГ

Рис. 3. Электрофорез ТСГ-КМ (2) и ТСГ (3) в градиенте пористости полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия; 1 — стандартные белки

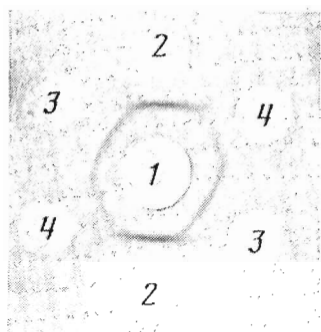


Рис. 2

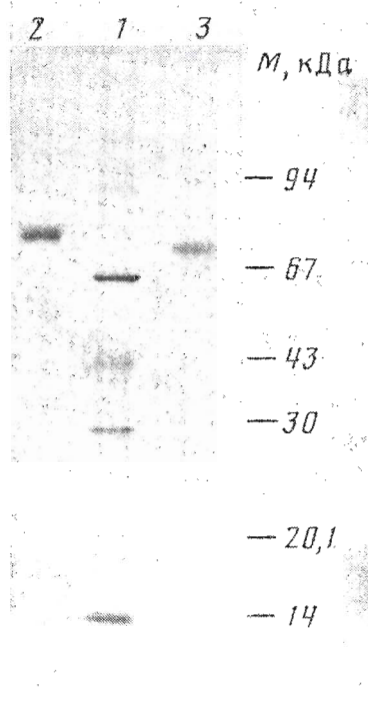


Рис. 3

Как уже указывалось выше, нами при мягком кислотном гидролизе ТСГ был выделен фрагмент (ТСГ-ФК) с молекулярной массой 37 ± 3 кДа, который иммунохимически идентичен ТСГ-ФС [7]. Это обстоятельство, а также полученные нами данные по исследованию пространственной структуры ТСГ подтверждают ранее высказанное нами предположение [7], что ТСГ-ФС — фрагмент молекулы ТСГ.

Обнаружение ТСГ-ФС в ретроплацентарной крови и доказательство того, что он является фрагментом молекулы ТСГ, позволяют по-новому объяснить гетерогенность ТСГ, причины которой интенсивно исследуются в последние годы [2]. Гетерогенность ТСГ, вероятно, вызвана наличием лабильной связи между двумя частями молекулы, которые несут различные антигенные детерминанты, а один из этих фрагментов имеет большую склонность к агрегации и ассоциации с молекулой ТСГ. Так, наряду с ТСГ-ФК при мягком кислотном гидролизе ТСГ получается еще один фрагмент, не имеющий общих антигенных детерминант с ТСГ-ФК и ТСГ-ФС и проявляющий частичную иммунохимическую идентичность с ТСГ. Этот фрагмент отличается большей склонностью к агрегации, давая компоненты с молекулярной массой >160 кДа [7].

Значительный интерес в свете полученных данных представляет выяснение опухолевой специфичности антигенных детерминант обоих фрагментов ТСГ. Возможно, один из них будет иметь большую клиническую ценность, чем целая молекула ТСГ.

Экспериментальная часть

ТСГ и ТСГ-ФС получали по методике [7]. Иммунохимический анализ проводили как описано в работе [10]. Электрофорез в градиенте пористости полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия осуществляли согласно [11]. Аминокислотный и углеводный составы определяли так, как описано нами ранее [7].

Спектры УФ регистрировали на спектрофотометре Cary-219 (США). Дифференциальные УФ-спектры тепловой пертурбации (ТПДС) растворов ТСГ-ФС регистрировали в термостатируемых кварцевых кюветах толщиной 1 см с притертыми тефлоновыми пробками в интервале $5-25^\circ\text{C}$. Кюветы термостатировали с точностью $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Для расчета количества пертурбируемых водой остатков триптофана и тирозина в молекуле ТСГ-ФС полученные ТПДС корректировали на изменение концентрации рас-

творения белка из-за разности температур в кюветах измерения и сравнения. В качестве стандартов использовали растворы этиловых эфиров N-ацетилтриптофана и N-ацетилтриптозина (Serva) в 6 М гуанидингидрохлориде.

Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре Jasco J-500A (Япония) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см для ароматической области (350–240 нм) и 0,1 мм для пептидной области (240–185 нм). Прибор калибровали по полосам аммониевой соли 10-сульфоната *d*-камфоры (Kakayama Chemical, Япония). Отношение эллиптичностей ее полос при 192 и 290 нм составляло 2,05. В пептидной области эллиптичность полос считали только на белковую часть молекулы, как эллиптичность среднего аминокислотного остатка с молекулярным весом 110:

$$[\theta] = \theta S \cdot 110 / c l \cdot 0,7 \cdot 10 \text{ в град. см}^2 / \text{дмоль},$$

где S – чувствительность прибора, c – весовая концентрация ТСГ-ФС (мг/мл). В ароматической области эллиптичность полос считали как молярную эллиптичность на молекулярный вес всей молекулы 25 кДа:

$$[\theta]_M = \theta S / c_M l \cdot 10,$$

где c_M – молярная концентрация ТСГ-ФС.

Сульфгидрильные группы определяли по методике [12].

Восстановление и карбоксиметилирование ТСГ-ФС и ТСГ. Раствор 0,08 мкмоль вещества в 1 мл 0,5 М трис-НСI-буфера, рН 8,1, содержащего 2 мМ EDTA и 6 М гуанидингидрохлорид, продували аргоном и инкубировали 15 мин при 37° С. Затем к раствору добавляли 8 мкмоль дитиотрепта (Reanal, Венгрия) и снова продували аргоном. После инкубирования при 37° С в течение 4 ч к раствору добавляли 16 мкмоль водного раствора свеженекристаллизованной моноиодуксеной кислоты, корректировали рН (8,0) 1 М раствором аммиака, смесь оставляли в темноте при 20° С на 20 мин и в темноте пропускали через колонку (1,2×23 см), заполненную сефадексом G-10 и уравновешенную 0,01 М аммоний-бикарбонатным буфером, рН 8,0. Белковые фракции собирали, диализовали против холодной дистиллированной воды и лиофилизировали. Получали восстановленный и карбоксиметилированный ТСГ-ФС и ТСГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Татаринова Ю. С. // Успехи соврем. биологии. 1983. Т. 95. № 1. С. 57–64.
2. Sørensen S. // Tumour Biology. 1984. V. 5. № 6. P. 275–302.
3. Tatarinov Yu. S. // Carcino-embryonic proteins. Vol. 1/Ed. Lehmann P. G. Amsterdam, 1979. P. 313–319.
4. Sørensen S. // Acta obstet. gynecol. scand. 1978. V. 57. № 1. P. 193–201.
5. Glazunov V. P., Moroz S. V., Vakorina T. I., Odinokov S. E., Pavlenko A. F., Ovodov Yu. S. // F. E. C. S. Third Intn. Confer. Chem. Biotechnol. Biologically Active Natural Product, Sofia, 1985. V. 4. P. 34–38.
6. Мороз С. В., Глазунов В. П., Вакорина Т. И., Одинокоев С. Е., Павленко А. Ф., Оводов Ю. С. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 519–527.
7. Pavlenko A. F., Moroz S. V., Kuznetsov Yu. N., Ovodov Yu. S. // Tumour Biology. 1985. V. 6. № 5. P. 491–501.
8. Ichikawa T., Terada H. // Chem. Pharm. Bull. 1981. V. 29. № 2. P. 438–444.
9. Provencher C. W., Glöcker J. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 1. P. 33–37.
10. Храмова Н. И., Абелев Г. И. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1961. Т. 52. № 12. С. 107–111.
11. Остерман Л. А. // Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1981. С. 56–76.
12. Glazer A. N., DeLange R. J., Sigman D. S. Chemical Modification of Proteins. N. Y.: Amer. Elsevier Publ., 1975. P. 113–114.

Поступила в редакцию
22.V.1986

После доработки
13.III.1987

IMMUNOCHEMICAL AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF A GLYCOPROTEIN FROM RETROPLACENTAL BLOOD POSSESSING COMMON ANTIGENIC DETERMINANTS WITH TROPHOBLAST-SPECIFIC β_1 -GLYCOPROTEIN

PAVLENKO A. F., MOROZ S. V., GLAZUNOV V. P.,
BEZNAEV A. N., OVODOV Yu. S.

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

A glycoprotein (TSG-fs) isolated from retroplacental blood is shown to have common antigenic determinants with trophoblast-specific β_1 -glycoprotein (TSG, SP-1). Antigenic activity of TSG-fs constitute 3.4% of TSG's activity. Like TSG, glycoprotein TSG-fs contains four intramolecular disulfide bonds and belongs to proteins with predominantly β -structure. CD-spectroscopy data give evidence of high stability of the secondary structure of TSG-fs. Immunochemical identity of TSG-fs with the reduced and carboxymethylated derivative of TSG has been demonstrated. The above data allow to suggest that TSG-fs is a fragment of the TSG molecule.