



УДК 577.112.853.088.5:543.544

СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ НОРМАЛЬНОГО И МИЕЛОМНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G С ПОМОЩЬЮ ВЭЖХ

Арбатский И. П., Мартынова М. Д., Алешкин В. А.*,
Деревицкая В. А.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва;

* Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. Г. Н. Габричевского

С помощью ВЭЖХ проведен сравнительный анализ углеводных цепей миеломного IgG (подкласса 4) и IgG из сыворотки здоровых людей. Установлено, что миеломный IgG4 содержит углеводные цепи такого же типа (диантенные и бисектные), что и «нормальный» IgG, однако в ином соотношении: увеличивается относительное количество бисектных цепей и недостроенных, с меньшим числом концевых остатков галактозы. Из полученного по стандартной методике образца нормального IgG выделены два пептидифицированных ранее минорных олигосахиарида и методами частичного гидролиза и деградации по Смиту получены данные об их строении.

Известно, что иммуноглобулин G (IgG) содержит углеводный фрагмент, который находится в C₂-домене тяжелой цепи IgG [1]. Строение его сильно варьирует, причем число различных олигосахаридных структур достигает нескольких десятков [2]. После десалирирования, снижающего гетерогенность углеводных цепей, обычно обнаруживают 16 различных олигосахаридных фрагментов — диантенных и бисектных цепей, различающихся числом концевых остатков галактозы и фукозы [1, 3]. Для их анализа предложено использовать аффинную хроматографию [4] и ВЭЖХ [5, 6], однако разделение некоторых групп олигосахаридов не вполне удовлетворительно.

По соотношению различных углеводных цепей миеломные IgG (mIgG) отличаются от IgG из сыворотки крови здоровых людей [6]: в большинстве случаев наблюдается заметное увеличение содержания недостроенных цепей, не содержащих одного или обоих концевых остатков галактозы.

Ранее нами предложен новый подход к структурному анализу десалирированных углеводных цепей N-гликопротеинов, основанный на идентификации олигосахаридов с помощью последовательной ВЭЖХ на двух колонках [7, 8]. В числе объектов исследования был и IgG, полученный из нормальной сыворотки человека (nIgG). Среди олигосахаридов, выделенных из десалирированного nIgG [8], идентифицированы все типы цепей, о которых говорилось выше, причем соотношение их было близким к описанному в литературе [5]. Представляло интерес, используя применявшуюся нами хроматографическую систему [7, 8], сравнить набор и соотношение углеводных цепей различного типа в nIgG и IgG больного, страдающего миеломной болезнью, и сопоставить результаты с данными Такахаши и сотр. [6], полученными при анализе нескольких mIgG «одноколочной» ВЭЖХ.

В качестве миеломного IgG использован IgG подкласса 4 (mIgG4), выделенный из сыворотки крови больного моноклональной гаммапатией. Два образца mIgG4 были выделены из двух порций сыворотки, взятых с интервалом в 1 нед, и очищены с помощью гидрофобной хроматографии. После десалирирования образцы mIgG4 обрабатывали LiBH₄ в водном трет-бутиловом спирте [8, 9], смесь восстановленных олигосахаридов очищали хроматографией на биогеле P-6 и фракционировали на колонке Ultrasphere-C8. Оба образца mIgG4 дали совершенно идентичную карти-

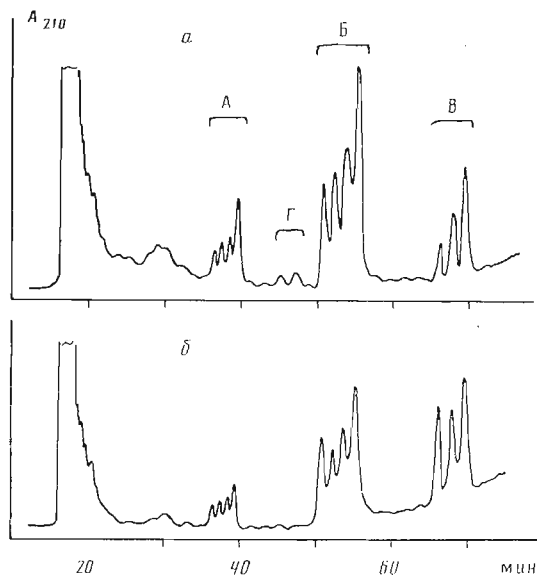


Рис. 1. ВЭЖХ на колонке Ultrasphere-C8 олигосахаридов из нормального IgG (а) и миеломного IgG4 (б). Отмечены олигосахариды 1, 3, 5 (А), 2, 4, 6, 7, 9, 11 (Б), 8, 10, 12 (В), 13, 14 (Г) (см. рис. 2)

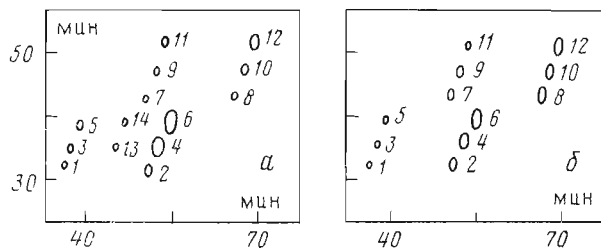


Рис. 2. Олигосахаридные карты нормального IgG (а) и миеломного IgG4 (б). По оси абсцисс и ординат — время элюции олигосахаридов на колонках Ultrasphere-C8 и Ultrasil-NH₂ соответственно. Изомерные олигосахариды, различающиеся положением остатка галактозы, имеют очень близкие хроматографические характеристики, поэтому на картах они изображены в виде одного пятна (олигосахариды 3, 4, 9 и 10)

ну распределения олигосахаридов (рис. 1б), что соответствует представлению о постоянстве особенностей гликозилирования IgG, продуцируемого одним клоном клеток [1]. Однако сравнение профилей элюции олигосахаридов из nIgG (рис. 1а), охарактеризованного ранее [8], и mIgG4 показывает некоторые различия в соотношении отдельных компонентов.

В целом картина элюции олигосахаридов на колонке Ultrasphere-C8 очень близка приведенной в работах [5, 6], несмотря на то что авторы анализировали флуоресцентные аминопиридиновые производные олигосахаридов и использовали другую хроматографическую систему. В обоих случаях олигосахариды группы А (рис. 1) соответствуют нефукозилированным диантенным цепям (с различным числом остатков галактозы), олигосахариды группы В — фукозилированным бисектным цепям, а смесь олигосахаридов группы Б содержит, как установлено ранее [5, 8], фукозилированные диантенные и нефукозилированные бисектные цепи. В этой смеси олигосахаридов (группы Б) трудно идентифицировать каждую из 8 возможных структур, однако применяемая нами последующая хроматография частично разделенных компонентов на колонке Ultrasil-NH₂ позволяет надежно различить диантенные и бисектные цепи.

В результате последовательного фракционирования на двух колонках каждый выделенный олигосахарид имеет два хроматографических пара-

метра — времена элюции на колонках Ultrasphere-C8 и Ultrasil-NH₂. В соответствии с этими параметрами весь набор олигосахаридов может быть нанесен на «олигосахаридную карту», где координатами являются времена элюции на двух колонках, а размер пятна отражает относительное содержание данного олигосахаридов (рис. 2). Отнесение олигосахаридов на карте к определенным структурам (таблица) проведено ранее [8].

Сравнение олигосахаридных карт выявляет заметные различия в соотношении олигосахаридов различного типа в составе nIgG и mIgG4. Во-первых, в mIgG4 увеличивается относительное количество недостроенных цепей, в содержащих или содержащих только один остаток галактозы. Это согласуется с данными, полученными для других миеломных IgG [6], хотя в нашем случае это выражено слабее. Во-вторых значительно увеличивается доля бисектных цепей, особенно фукозилированных. Это не характерно ни для одного из исследованных ранее mIgG, напротив, как правило, количество их уменьшается. Нужно подчеркнуть, что каждый из изучавшихся mIgG [6] имел свою характерную особенность в соотношении олигосахаридов. Очевидно, не составляет исключения и исследуемый нами mIgG4: от других миеломных IgG он отличается не менее, чем от nIgG.

При фракционировании углеводных фрагментов из nIgG [8] нами были обнаружены два неидентифицированных ранее минорных олигосахаридов: ОС-13 и ОС-14 (рис. 2а). По моносахаридному составу они соответствовали фукозилированным диаптенным цепям, содержащим один и два остатка галактозы соответственно, но отличались от ОС-4 и ОС-6 (рис. 2а, таблица) по хроматографическим свойствам. В дальнейшем эти олигосахариды были выделены препаративно в количестве (30–50 нмоль), достаточном для изучения их строения химическими методами.

Прежде всего было установлено, что олигосахариды ОС-13 и ОС-14 являются изомерами обычных диаптенных цепей (ОС-4 и ОС-6) по положению остатка фукозы. Так, с помощью ВЭЖХ на колонке Ultrasphere-C8 было показано, что при отщеплении остатка фукозы мягким кислотным гидролизом олигосахариды ОС-4 и ОС-6 превращались в нефукозилированные ОС-3 и ОС-5 соответственно (рис. 2а), тогда как при аналогичной обработке олигосахаридов ОС-13 и ОС-14 появлялись лишь фрагменты, элюируемые на 33–34-й мин.

Возможными вариантами структуры, изомерной диаптенной цепи, являются олигосахариды, в которых обе антенны (лактозаминные звенья) присоединены к одному из остатков α -маннозы. Как правило, остаток Man α 1-3 замещен лактозаминными звеньями по С-2 и С-4, а остаток Man α 1-6 — по С-2 и С-6 [10], и, следовательно, эти два варианта легко можно различить по результатам деградации по Смитту: в первом случае продуктом реакции должен быть гексасахарид GlcNAc₂Man₂GlcNAc₂ × GlcNAc-ol(1), а во втором — трисахарид Man₁GlcNAc₁GlcNAc-ol. Олигосахарид ОС-14 был подвергнут деградации по Смитту, и полученный продукт выделен хроматографией на колонке TSK-HW-40, при этом образующийся фрагмент элюировался в районе выхода гексасахаридов. Анализ моносахаридного состава показал, что выделенный фрагмент не содержит фукозы и галактозы, а соотношение GlcN : Man (3,4:2) соответствует гексасахариду (1). На основании этого мы предлагаем для ОС-14 структуру, представленную в таблице; ОС-13 отличается от ОС-14, очевидно, лишь отсутствием одного из остатков галактозы. Однако, поскольку такого типа углеводные цепи необычны для гликопротеинов, это заключение, а также то, что они принадлежат именно IgG, требует дополнительного подтверждения. В смеси олигосахаридов из mIgG4 такие минорные структуры не обнаружены.

Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что разработанный нами метод «олигосахаридных карт» [7, 8] весьма эффективен при анализе структуры и гетерогенности углеводных цепей N-гликопротеинов, и в частности IgG. По сравнению с одноклоночным методом анализа [5, 6] используемый нами подход, состоящий в последовательной хроматографии на двух колонках, обладает более широкими возможностями

Структура олигосахаридов, идентифицированных в нормальном и миеломном IgG

Номер на карте (рис. 2)	R	Структура
1 2	R ¹	GlcNAcβ1-2Manα1
	R ²	Manβ1-4R
3 4	R ¹	GlcNAcβ1-2Manα1
	R ²	4GlcNAcβ1-2Manα1 Galβ1
5 6	R ¹	GlcNAcβ1-2Manα1
	R ²	4GlcNAcβ1-2Manα1 [Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1
7 8	R ¹	Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1
	R ²	GlcNAcβ1 GlcNAcβ1-2Manα1
9 10	R ¹	GlcNAcβ1-2Manα1
	R ²	4GlcNAcβ1-2Manα1 Galβ1
11 12	R ¹	Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1
	R ²	GlcNAcβ1 GlcNAcβ1-2Manα1
13	R ²	Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1 Manα1
		4GlcNAcβ1 Galβ1 4GlcNAcβ1 Manα1
14	R ²	Galβ1-4GlcNAcβ1 Manα1
		Galβ1-4GlcNAcβ1 Manα1

R¹ = GlcNAcβ1-(GlcNAc-ol); R² = GlcNAcβ1-(GlcNAc-ol).



ми и позволяет надежнее идентифицировать олигосахариды. Полученные данные о структуре углеводных цепей mIgG4 позволяют сделать следующие заключения: 1) несмотря на то что mIgG4 синтезируется одним клоном клеток, для него, так же как и для nIgG, характерна гетерогенность углеводной цепи в одном сайте гликозилирования; 2) mIgG4 содержит те же типы углеводных цепей (дипатенные и бисектные), что и nIgG, но

в шном соотношении; 3) изученный нами mIgG4 по характеру гликозилирования заметно отличается от других миеломных IgG.

Дальнейшее изучение различных вариантов IgG представляет несомненный интерес, поскольку структура углеводных цепей IgG может отражать некоторые особенности или аномалии иммунной системы организма.

Экспериментальная часть

В работе использовали IgG подкласса 4, выделенный из сыворотки больного (Зла) путем фракционирования в присутствии каприловой кислоты [11] и последующей гидрофобной хроматографии на Butyl-ToyoPearl в градиенте молярности $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,2→0,2 М). Фракции, соответствующие IgG4, отбирали с помощью преципитации по Оухтерлони с моноспецифической антисывороткой к подклассам IgG (Nordic, Дания). Подкласс IgG определен методом иммуноэлектрофореза с использованием указанной выше антисыворотки. Из двух порций сыворотки, взятых с интервалом в 1 нед, получены два образца mIgG4 (по ~20 мг). Десалирование mIgG4 осуществляли с помощью мягкого кислотного гидролиза: 1,3% HCOOH (рН 2,1), 80° С, 1,5 ч. Образец nIgG из суммарной сыворотки здоровых людей получен по методу [12].

Отщепление углеводных цепей IgG и выделение смеси олигосахаридов проводили аналогично [13]. Восстановленные олигосахариды фракционировали с помощью ВЭЖХ на хроматографе Bio-Rad (США) с использованием колонок (10×250 мм, 10 мкм) Ultrasphere-C8 и Ultrasil-NH₂; УФ-детекцию осуществляли при 210 нм. Условия элюции на Ultrasphere-C8: 0–15 мин, вода (0,5 мл/мин); 16–35 мин, вода (1 мл/мин); 36–55 мин, вода→2,5% метанол (2 мл/мин); 56–85 мин, водный метанол 2,5→25% (2 мл/мин); на Ultrasil-NH₂: 75% водный метанол (1 мл/мин).

Моносахаридный состав олигосахаридов определяли с помощью углеводного анализатора Biotronik LC-2000 (ФРГ). Избирательное отщепление фукозы (0,05 н. CF₃COOH, 100° С, 2 ч) и деградацию по Смитсу проводили как описано ранее [14].

ЛИТЕРАТУРА

1. Burton D. R. // Mol. Immunol. 1985. V. 22. № 3. P. 161–206.
2. Parekh R. B., Dwek R. A., Sulton B. J., Fernandes D. L., Leung A., Stanworth D., Rademacher T. W., Mizuochi T., Taniguchi T., Matsuta K., Takeichi F., Nagono Y., Miyamoto T., Kobata A. // Nature. 1985. V. 316. № 6027. P. 452–547.
3. Mizuochi T., Taniguchi T., Shimizu A., Kobata A. // J. Immunol. 1982. V. 129. № 5. P. 2016–2020.
4. Harada H., Kamei M., Tokumoto Y., Yui S., Koyama F., Kochibe N., Endo T., Kobata A. // Anal. Biochem. 1987. V. 164. № 2. P. 374–381.
5. Tomiya N., Kurono M., Ishihara H., Tejima S., Endo S., Arata Y., Takahashi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 163. № 2. P. 489–499.
6. Takahashi N., Ishii I., Ishihara H., Mori M., Tejima S., Jefferis R., Endo S., Arata Y. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 4. P. 1137–1144.
7. Арбатский Н. П., Желтова А. О., Секченко С. Н., Юргов Д. В., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 11. С. 1542–1549.
8. Арбатский Н. П., Маргунова М. Д., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 237. № 4. С. 995–999.
9. Лихошерстов Л. М., Новаикова О. С., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 274. № 1. С. 222–225.
10. Vliegthart J. F. G., Dorland L., van Halbeek H. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. V. 41. Eds Tipson R. S., Horton D. N. Y.-L.: Acad. Press, 1983. P. 209–374.
11. Steinbuch M., Audran R. // C. r. Acad. sci. 1972. V. 274. № 20. P. 2805–2808.
12. Webb A. J. // Vox Sang. 1972. V. 23. № 4. P. 279–290.
13. Арбатский Н. П., Желтова А. О., Лихошерстов Л. М., Секченко С. П., Юргов Д. В., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 837–844.
14. Арбатский Н. П., Желтова А. О., Юргов Д. В., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 8. С. 1111–1117.

Поступила в редакцию
21.VII.1988

STRUCTURAL ANALYSIS OF CARBOHYDRATE CHAINS OF NORMAL
AND MYELOMA IMMUNOGLOBULINS G BY HPLC

ARBATSKY N. P., MARTYNOVA M. D., ALYOSHKIN V. A.*, DEREVITSKAYA V. A.

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR:

** G. N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology,
Ministry of Public Health of the Russian SFSR, Moscow*

A comparative analysis of carbohydrate chains from human normal IgG and myeloma IgG (subclass 4) was carried out using HPLC. It is shown that both IgGs contain the same carbohydrate chains (biantennary and bisected) but the relative amount of bisected and incomplete chains (with fewer terminal galactose residues) is higher in myeloma IgG4. Two earlier unknown minor oligosaccharides were isolated from normal IgG and structurally studied by means of the partial hydrolysis and the Smith degradation.