



УДК 577.112.853 [083.3+088]

ЭМБРИОНАЛЬНЫЙ ПРЕАЛЬБУМИН-1 ЧЕЛОВЕКА. ХИМИЧЕСКАЯ И ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

*Павленко А. Ф., Булгаков А. А., Белогорцева Н. И.,
Оводов Ю. С.*

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

Дана общая химическая и иммунохимическая характеристика эмбрионального преальбумина-1 (ЭПА-1), выделенного из абортной крови. Показано, что ЭПА-1 присутствует в виде гликозилированной и негликозилированной форм, которые иммунохимически идентичны. В углеводную часть гликозилированной формы входят остатки фукозы (3,0%), маннозы (3,2%), галактозы (7,8%), N-ацетилглюкозамина (5,4%), N-ацетилгалактозамина (1,2%) и N-ацетилпептаминовой кислоты. Методом метилирования определены типы связей между моносахаридами.

Как известно [1], неопластическая трансформация клеток приводит к появлению на их поверхности молекул, отсутствующих в нормальных клетках или не характерных для них. Из различных групп молекул, появляющихся на поверхности раковых клеток, онкофетальные антигены (ОФА) представляют собой наиболее универсальные маркеры злокачественных опухолей [2]. ОФА нашли широкое применение в практической онкологии для мониторинга рака, дифференциальной диагностики опухолей, выявления метастазов, наблюдения за эффективностью лечения онкологических больных. Исследование строения ОФА дает возможность полнее понять молекулярные механизмы малигнизации и существенно улучшить иммунодиагностику и иммунотерапию рака. Одним из важных представителей ОФА является эмбриональный преальбумин-1 (ЭПА-1).

ЭПА-1 впервые выделен из сыворотки крови плода человека [3]. Было показано, что в молекуле ЭПА-1 присутствуют два типа антигенных детерминант: общие для эмбриональных тканей и различных опухолей и специфичные, в основном для опухолей соединительно-тканного происхождения [4, 5]. Было также показано [6, 7], что он представляет собой сульфатированный гликопротеин с содержанием углеводов 21% и сульфата 2%.

Данная работа посвящена исследованию ЭПА-1, выделенного из абортной крови при сроке беременности 14–18 недель.

Нами из двух разных осадков абортной крови, полученных при ее фракционировании по методу [8], были выделены две формы ЭПА-1 в гомогенном состоянии: гликозилированная (ЭПА-1-Г) и негликозилированная (ЭПА-1-НГ). В табл. 1 приведены основные физико-химические свойства обоих препаратов ЭПА-1.

ЭПА-1-Г так же, как и ЭПА-1 из сыворотки плода человека, является сульфатированным сialogликопротеином и обладает заметной гетерогенностью (рис. 1, табл. 1). В отличие от этих двух препаратов ЭПА в негликозилированной форме (ЭПА-1-НГ) такая гетерогенность отсутствует (рис. 1).

К обоим препаратам были получены моноспецифические поликлональные антисыворотки по схеме, описанной ранее [3]. Иммунохимическое сравнение ЭПА-1-Г и ЭПА-1-НГ со стандартной тест-системой на ЭПА-1 (рис. 2 и 3) свидетельствует о полной иммунохимической идентичности полученных антигенов и антисывороток к ним стандартному ЭПА-1 и антисыворотке к ЭПА-1. Обнаружение негликозилированной формы ЭПА-1, вероятно, позволит улучшить иммунодиагностическую ценность теста на

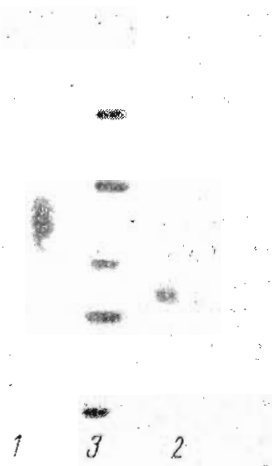


Рис. 1

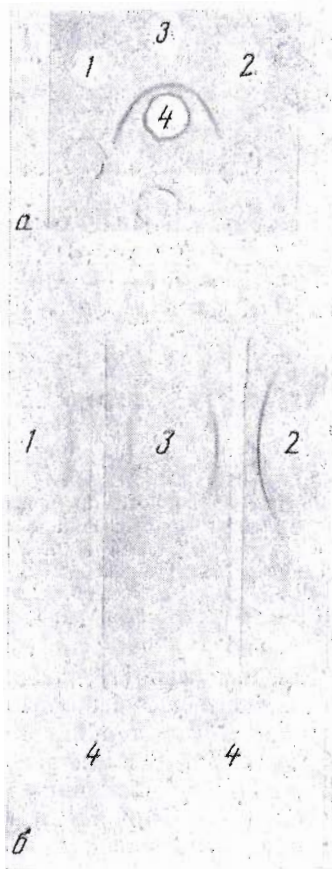


Рис. 2

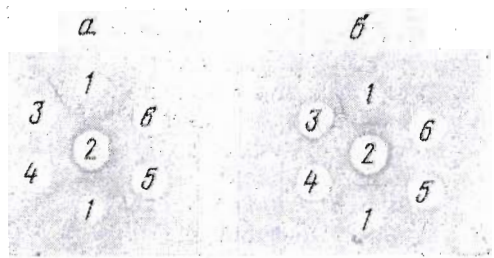


Рис. 3

Рис. 1. Градиентный ПААГ-электрофорез в присутствии SDS [14] ЭПА-1-Г (1), ЭПА-1-НГ (2), стандарты (M 17,2; 14,6; 8,4; 6,38; 2,5 кДа)

Рис. 2. Иммунодиффузионное (а) и иммуноэлектрофоретическое (б) сравнение антигенов: 1 – ЭПА-1-Г, 2 – ЭПА-1-НГ, 3 – стандартный ЭПА-1, 4 – стандартная антисыворотка к ЭПА-1

Рис. 3. Иммунодиффузионное сравнение антисывороток: 1 – стандартный ЭПА-1; 2 – стандартная антисыворотка к ЭПА-1; 3–6 – разведение антисыворотки к ЭПА-1-Г (а) и к ЭПА-1-НГ (б)

ЭПА-1, так как сейчас ЭПА-1 обнаруживается и у части больных с неопухолевыми заболеваниями [9]. В то же время было показано, что один из ранее полученных препаратов ЭПА-1 был иммунохимически неоднороден [4], наряду с ЭПА-1 он содержал и другую форму ЭПА-1 со специфической антигенной детерминантой [4]. Выделение ЭПА-1-НГ, вероятно, объясняет эти результаты. Так как обе полученные нами формы ЭПА-1 иммунохимически идентичны в стандартной тест-системе на ЭПА-1, можно предположить, что антитела направлены против их белкового компонента, а в случае, описанном в работе [4], авторы, по-видимому, имели дело с антителами, направленными против углеводного компонента ЭПА-1. По аминокислотному составу ЭПА-1-Г и ЭПА-1-НГ близки.

Сейчас хорошо установлено, что имеются существенные различия в углеводных антигенах нормальных и неопластических клеток [10, 11]. В этой связи представляется важным получение антител, специфичных к углеводному компоненту ЭПА-1, что, вероятно, позволит получить антисыворотки на ЭПА-1 с более узкой специфичностью для злокачественных опухолей. Определенный интерес в этой связи представляет изучение строения углеводного компонента ЭПА-1-Г.

Для определения характера гликозидных связей между моносахаридными остатками ЭПА-1-Г подвергали исчерпывающему метилированию по

Таблица 1

Физико-химические характеристики ЭПА-1

Характеристика	ЭПА-1-Г	ЭПА-1-НГ	ЭПА-1 по данным работы [6]
Содержание, % *			
белка	78,5	98,1	76,9
углеводов	20,6	0	21,0
из них Fuc	3,0	—	2,1
Man	3,2	—	13,2
Gal	7,8	—	1,8
Glc	0	—	1,8
GlcNAc	5,4	—	2,1
GalNAc	1,2	—	Следы
NeuAc	1,0	—	0
сульфата	2,0	0	2,0
M_n^{2*}	11 ± 3	$6,5 \pm 0,5$	$32 \pm 0,5^{3*}$
E^{4*}	1,15	1,2	1,17

* Везде весовые проценты.

2* По данным SDS-электрофореза в градиенте пористости ПААГ.

3* По данным гель-фильтрации.

4* Подвижность в агаре (рН 8,0) относительно сывороточного человеческого альбумина [16].

Таблица 2

Соотношение метилированных производных моносахаридов гидролизата ЭПА-1-Г *

Моносахарид	Номер пика	ЭПА-1-Г	Моносахарид	Номер пика	ЭПА-1-Г
2,3,4,6Me ₄ Gal	2	1,4	2,4Me ₂ Gal	9	0,5
2,3,4Me ₃ Fuc	1	1,8	3,6Me ₂ Man	7	0,6
2,4,6Me ₃ Gal	3	2,65	2,4Me ₂ Man	8	1,0
2,3,4Me ₃ Gal	6	1,7	3,4Me ₂ Man	10	0,1
3,4,6Me ₃ Man	4	1,2	3,6Me ₂ GlcN(Me)Ac	11	1,6
2,3,6Me ₃ Man	5	0,8	6MeGlcN(Me)Ac	12	0,2

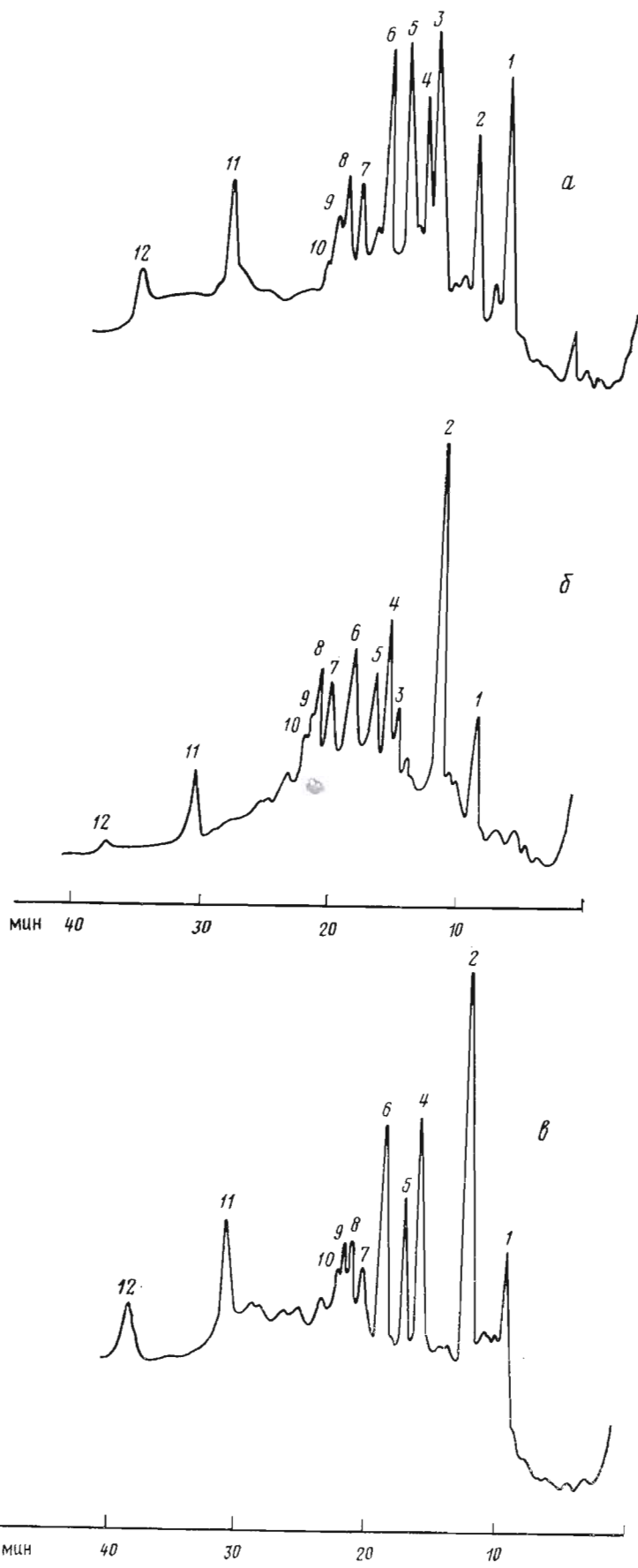
* Рассчитано относительно 2,4-ди-О-метилманнозы.

методу Хакомори, Количественное соотношение полученных метиловых эфиров (рис. 4а) приведено в табл. 2. Так, образование производных 3,4,6-три-О-метил- и 2,4-ди-О-метилманнозы, а также 3,6-ди-О-метил-2-дезоксид-2-N-метилацетамидоглюкозы указывает на присутствие маннотриозидо-ди-N-ацетилхитобиозного кора. Соотношение 2,4-ди-О-метил- и 3,6-ди-О-метилманнозы указывает на преимущественное содержание триантенных углеводных цепей. Появление 6-О-монометил-2-дезоксид-2-N-метилацетамидоглюкозы, очевидно, связано с замещением остатка N-ацетилглюкозамина в ЭПА-1-Г остатком галактозы по С-4 и остатком фукозы по С-3.

Несмотря на то что метиловых эфиров N-ацетилгалактозамина в заметных количествах обнаружить не удалось, наличие этого моносахарида может свидетельствовать о присутствии углеводных цепей, соединенных О-гликозидными связями.

Для выяснения места привязки нейраминной кислоты было проведено десалирование ЭПА-1 нейраминидазой из *Vibrio cholerae* с последующим метилированием. Как видно из анализа полученных метиловых эфиров (рис. 5), резко уменьшается содержание 2,5,6-три-О-метилгалактозы, что свидетельствует о присоединении остатков нейраминной кислоты в основном по С-3 остатков галактозы.

Место локализации сульфатных групп определяли метилированием предварительно десульфатированного ЭПА-1. В продуктах гидролиза полностью отсутствует 2,4,6Me₃Gal (рис. 5в), что можно объяснить наличием сульфатной группы при С-3 остатков галактозы и десалированием в процессе сольволитического десульфатирования.



Таким образом, полученные данные свидетельствуют об одновременном присутствии гликозилированной и негликозилированной формы ЭПА-1, что является необычным для ОФА. Предварительные данные о строении углеводного компонента ЭПА-1-Г указывают на его своеобразие в сравнении с остальными ОФА.

Экспериментальная часть

ЭПА-1-Г и ЭПА-1-НГ в индивидуальном виде получали аналогично ЭПА-1 [3]. Метилирование проводили по методу Хакомори [12]. Газожидкостную хроматографию ацетатов частично метилированных полиолов осуществляли на хроматографе Pye Unicam 104 (Англия) на стеклянных колонках, заполненных 3% QF-1 на Gas-Chrom Q (100–200 меш), при 130–210°С ($\Delta 3^\circ/\text{мин}$). Метилированные производные моносахаридов идентифицировали методом хроматомасс-спектрометрии на приборе LKB 9000S (Швеция). Аминокислотный анализ проводили после гидролиза образца 6 н. HCl в течение 24 и 48 ч при 105°С на аминокислотном анализаторе LC 2000 (Biotronic, ФРГ), содержание триптофана определено спектрофотометрически [13]. Качественное и количественное определение моносахаридов осуществляли методом ГЖХ, как описано нами ранее [14]. Антисыворотки против ЭПА-1-Г и ЭПА-1-НГ получали по схеме, описанной ранее [15]. Иммуохимический анализ проводили согласно [16]. Содержание сульфата в образцах было определено методом Догсона [17]. Сольволитическое десульфатирование проводили в диметилсульфоксиде в соответствии с [18].

Десульфирование ЭПА-1-Г. 5,5 мг ЭПА-1 растворяли в 3 мл 0,1 М цитрат-фосфатного буфера (рН 5,5), содержащего 5 мМ Ca^{2+} , и добавляли 100 ед. акт. нейраминидазы из *Vibrio cholerae* (Calbiochem, США). Раствор перемешивали 2 ч при 20°С и 20 ч при 4°С. Добавляли EDTA и рН раствора доводили до 7,2. Десульфированный ЭПА-1-Г отделяли от нейраминидазы понообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе.

Авторы глубоко признательны В. В. Калашникову (ВНИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Москва) за любезно предоставленную аналитическую тест-систему на ЭПА-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Косяков П. Н., Косякова Н. П. Антигены опухолей человека. М.: Медицина, 1985. 172 с.
2. Горобилова В. В., Боева М. Н. Иммунобиология опухолевого роста. М.: Медицина, 1983. 240 с.
3. Tatarinov Yu. S., Kalashnikov V. V. // Nature. 1977. V. 265. № 5595. P. 638–639.
4. Калашников В. В., Васильев М. Ю., Татаринов Ю. С. // Вопр. мед. химии. 1980. № 3. С. 424–425.
5. Васильев М. Ю., Сергеева Н. С., Авдеев Г. П. // Эксперим. онкология. 1985. Т. 7. № 1. С. 33–36.
6. Оводов Ю. С., Калашников В. В., Курика А. В., Павленко А. Ф., Татаринов Ю. С. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 6. С. 813–815.
7. Tatarinov Yu. S., Kalashnikov V. V., Kraevsky N. A., Kurika A. V., Pavlenko A. F., Ovodov Yu. S., Voloshuk S. G. // Scand. J. Immunol. 1978. V. 8. Suppl. 8. P. 621–625.
8. Руководство по вакцинальному и сывороточному делу/Ред. П. Н. Бургасов. М.: Медицина, 1978. С. 320–339.
9. Gallon M. E., Reid W. A., McHardie G. A., Hardman R., Smith G. D., Horne C. H. W., Kalashnikov V. V., Tatarinov Yu. S. // J. Clin. Pathol. 1981. V. 34. P. 764–768.
10. Feizi T. // Nature. 1985. V. 314. № 6006. P. 53–57.
11. Yamada K. M., Ponyssegur J. // Biochimie. 1979. V. 60. № 11–12. P. 1221–1234.
12. Nakomori S. // J. Biochem. (Tokyo). 1985. V. 55. № 2. P. 205–208.
13. Ichikawa T., Terada H. // Chem. Pharm. Bull. 1981. V. 29. № 2. P. 438–444.

Рис. 4. Газожидкостная хроматография ацетатов полиолов метилированных моносахаридов, полученных из ЭПА-1-Г (а), ЭПА-1-Г после обработки нейраминидазой (б), ЭПА-1-Г после сольволитического десульфатирования (в): 1 – 2,3,4Me₃Fuc; 2 – 2,3,4,6Me₂Gal; 3 – 2,4,6Me₃Gal; 4 – 3,4,6Me₃Man; 5 – 2,3,6Me₃Man; 6 – 2,3,4Me₃Gal; 7 – 3,6Me₂Man; 8 – 2,4Me₂Man; 9 – 2,4Me₂Gal; 10 – 3,4Me₂Man; 11 – 3,6Me₂GlcN(Me)Ac; 12 – 6MeGlcN(Me)Ac

14. Павленко А. Ф., Курика А. В., Белогорцева Н. И., Набиулин А. А., Оводов Ю. С. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 646-650.
15. Павленко А. Ф., Курика А. В., Мороз С. В., Оводов Ю. С., Маслова М. Г., Володарский В. Л. // Вопр. онкологии. 1982. Т. 28. № 4. С. 14-16.
16. Храмова Н. И., Абелев Г. И. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1961. Т. 52. № 12. С. 107-111.
17. Dogson K. S., Price R. G. // Biochem. J. 1962. V. 84. № 1. P. 106-108.
18. Usov A. I., Adamyants K. P., Miroshnikova L. I., Shaposhnikova A. A., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1971. V. 18. № 2. P. 336-338.

Поступила в редакцию

2.IX.1988

После доработки

2.XI.1988

HUMAN EMBRYONIC PREALBUMIN-1. CHEMICAL AND IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION

PAVLENKO A. F., BULGAKOV A. A., BELOGORTSEVA N. I., OVODOV Yu. S.

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

General chemical and immunochemical characterization of human embryonic prealbumin-1 (EPA-1) isolated from abortive blood is presented. EPA-1 was found to exist as glycosylated and non-glycosylated forms, which are immunochemically identical. Sugar moiety of the glycosylated form contains residues of fucose (3,0%), mannose (3,2%), galactose (7,8%), N-acetylglucosamine (5,4%), N-acetylgalactosamine (1,2%) and N-acetylneuraminic acid. Using methylation studies, types of bonds between the sugar residues were elucidated.