



УДК 577.112.083 : 57.083.3

© 1992 г.

*Е. В. Ганеева, С. П. Марцев*

## ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ ФЕРРИТИНА 1. ВЫДЕЛЕНИЕ СУБЪЕДИНИЦ ФЕРРИТИНА И ИХ ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

*Институт биоорганической химии АН Беларуси, Минск*

Предложен способ получения гомогенных субъединиц ферритина в мономерной форме, основанный на диссоциации ферритина тиогликолевой кислотой в присутствии фосфат-ионов с последующей гель-хроматографией. Дана иммунохимическая характеристика ферритина и его структурных аналогов (апоферритина, карбоксиметилированного ферритина, Н- и L-субъединиц ферритина). Показано, что иммунореактивность ферритина изменяется в зависимости от степени денатурации. Выделение Н- и L-субъединиц в мономерной форме приводит к демаскированию антигенных участков, недоступных для антител в нативном ферритине. Предполагается, что эти «скрытые» антигенные детерминанты локализованы в районах межсубъединичных контактов и внутрикапсулярной поверхности ферритина и определяют различия в иммунохимических свойствах его Н- и L-субъединиц.

Ферритин — один из основных компонентов сложной системы метаболизма железа в организме человека и животных. Основная функция ферритина заключается в хранении железа в стабильной, растворимой и нетоксичной форме до момента возникновения дополнительной потребности в нем в организме [1]. Ферритин присутствует практически во всех тканях, но наибольшее содержание этого белка наблюдается в селезенке, печени, костном мозге [2].

Ферритин обладает тканевой специфичностью и существует в форме изоферритинов — белков, различающихся электрофоретической подвижностью и изоэлектрическими точками [3, 4]. Этот факт можно объяснить тем, что ферритин — гетерополимерный белок с четвертичной структурой, формирующейся из двух типов субъединиц различной молекулярной массы (Н — 21 и L — 19 кДа) и заряда; соотношение Н- и L-субъединиц в ферритине характерно для каждой ткани [5–8].

24 субъединицы ферритина соединяются в сферическую глобулу, окружающую железосодержащее ядро, в состав которого может входить до 4500 атомов железа [9–13]. При использовании различных денатурирующих веществ (мочевины [3, 14], тиогликолевой кислоты [2, 5, 15], дитиотреита [16] и некоторых других [17]) в кислой среде может происходить диссоциация ферритина на субъединицы. Однако при значениях рН, близких к нейтральным, субъединицы реассоциируют в апоферритиновую глобулу [4, 9, 12]. Кроме того, молекулы апоферритина могут образовывать суперполимеры — димеры и тетрамеры [4, 9, 12, 18]. Гомогенные субъединицы, полученные при помощи электрохроматографии [14] и ВЭЖХ [2, 5, 15], в нейтральной среде также реассоциируют с образованием гомополимеров.

Биологическая функция ферритина связана с особенностями формирования и динамики его сложной четвертичной структуры. Одним из широко используемых способов изучения динамики структуры белков является иммунохимический подход, основанный на анализе с помощью

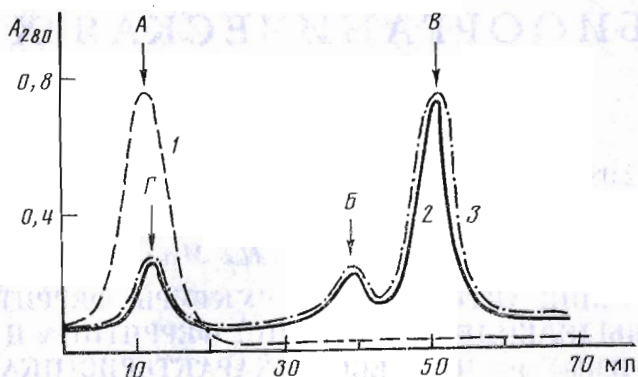


Рис. 1. Гель-хроматография ферритина, обработанного тиогликолевой кислотой в течение 30 мин при рН 4,5 (1), рН 3,5 (2) и в течение 4 ч при рН 3,5 (3), на биогеле Р-30 (1×50 см) в 5% уксусной кислоте. А — апоферритин. Б и В — Н- и L-субъединицы ферритина, Г — агрегаты примесь недиссоциированного ферритина

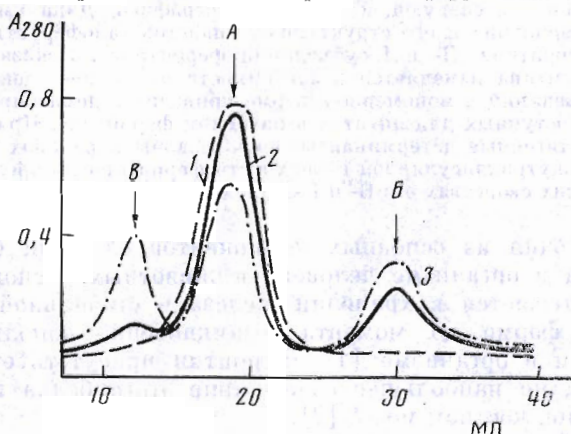


Рис. 2. Гель-хроматография апоферритина, полученного реассоциацией после обработки ферритина тиогликолевой кислотой в течение 30 мин при рН 4,5 (1) и рН 3,5 (2) и при рН 3,5 в течение 4 ч (3), на TSK-геле HW-55 (1×50 см) в 0,1 М трис-НСl-буфере, рН 7,4. А — апоферритин, Б — субъединицы ферритина, В — агрегаты

антител изменений антигенной структуры белковой молекулы, формируемой совокупностью ее антигенных детерминант.

Для изучения механизмов формирования четвертичной структуры ферритина, его антигенного строения и функциональной роли субъединиц необходимо получить мономерные субъединицы ферритина, не дающие гомополимеров в неденатурирующих условиях. До настоящего времени эта задача не была решена. В данной работе предложен метод получения индивидуальных субъединиц ферритина в мономерной форме, определены их иммунохимические характеристики и проведен сравнительный анализ иммунохимических свойств нативного ферритина и его структурных аналогов.

При обработке ферритина смесью, содержащей 0,5% тиогликолевой кислоты и 1,5% уксусной кислоты, рН 4,5, при 20° С происходит «вытекание» ионов железа, которые связываются с тиогликолевой кислотой, и образуется апоферритин, лишенный железа. При этом продуктов диссоциации на субъединицы практически не наблюдается (рис. 1, 1). По



мере закисления среды до рН 3,5 и повышения концентрации кислот (до 2% тиогликолевой и до 6% уксусной) степень диссоциации ферритина на субъединицы значительно увеличивается (рис. 1, 2, 3). После реассоциации субъединиц в апоферритин в процессе постепенного перевода смеси к нейтральным значениям рН методом длительного диализа сохраняется некоторое количество низкомолекулярных продуктов диссоциации, а также увеличивается количество высокомолекулярных агрегированных форм (рис. 2, 1, 2). Выход апоферритина, полученного в таких условиях, составил 90%. При увеличении длительности процесса диссоциации от 30 мин до 4 ч выход реассоциации апоферритина заметно снижается, а количество суперполимеров и низкомолекулярных продуктов резко возрастает (рис. 2, 3).

Для получения субъединиц ферритина в мономерной форме и предотвращения реассоциации диссоциацию в смеси 2% тиогликолевой и 6% уксусной кислот проводили в присутствии избытка фосфат-ионов. Фосфат-ионы, по-видимому, связываются с участками полипептидной цепи, расположенными в районах межсубъединичных контактов, и, таким образом, препятствуют взаимодействию субъединиц между собой [12, 13].

Разделение субъединиц проводили при помощи гель-хроматографии на биогеле Р-30 в 5% уксусной кислоте (см. рис. 1, 2). При этом были получены три фракции (Г, Б, В). Фракция Г, элюирующаяся со свободным объемом колонки, представляет собой агрегаты с примесью недиссоциированного ферритина. С помощью аналитической гель-хроматографии на биогеле Р-30 в 0,1 М трис-НСl-буфере, рН 7,4 (рис. 3) и электрофореза в ПААГ показано, что фракции Б и В содержат гомогенные Н- и L-субъединицы соответственно.

Полученные таким образом субъединицы остаются в мономерной форме и не подвергаются ассоциации при дальнейшей обработке в любых условиях.

Иммунохимические свойства ферритина и его структурных аналогов определяли несколькими способами.

1. Иммуноферментным анализом с использованием фиксированных концентраций поликлональных антител и антигена. При этом величина сигнала связанных с антигеном пероксидазных конъюгатов антител характеризует величину иммунореактивности белка, т. е. степень сохранения им антигенной структуры.

2. По способности ингибировать связывание [ $^{125}$ I]ферритина с поликлональными антителами к ферритину в конкурентном тесте, одновременно характеризующем специфичность и аффинность взаимодействия антиген — антитело.

3. По величине констант связывания аналогов ферритина с поликлональными антителами к ферритину. Результаты этих исследований представлены в таблице и на рис. 4, 5.

Иммунохимические свойства апоферритина, как видно из полученных результатов, незначительно изменяются в зависимости от способа его получения: от практически полной иммунохимической идентичности нативному ферритину у апоферритина, полученного удалением железа без диссоциации на субъединицы, до повышения иммунореактивности на 10% у апоферритина, полученного путем диссоциации-реассоциации. Константа связывания такого апоферритина с антителами имеет величину  $7 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ , что несколько выше, чем у ферритина ( $1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ). Результаты конкурентного анализа также показали высокую иммунохимическую активность апоферритина 2, который ингибирует связывание антител с [ $^{125}$ I]ферритином при концентрации  $10^{-9} \text{ M}$  (450 нг/мл) на 90% (ферритин в такой концентрации ингибирует связывание на 75%). Наблюдаемое увеличение иммунохимической активности апоферритина

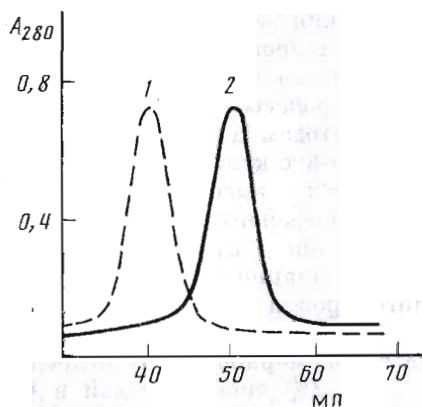


Рис. 3

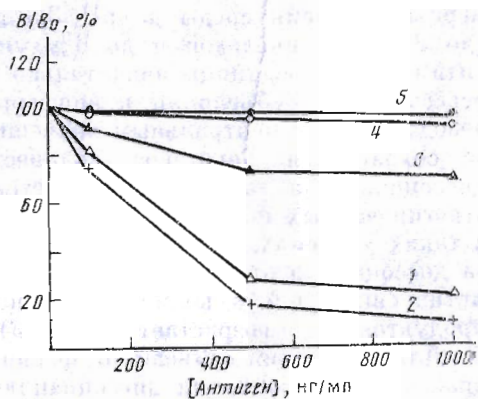


Рис. 4

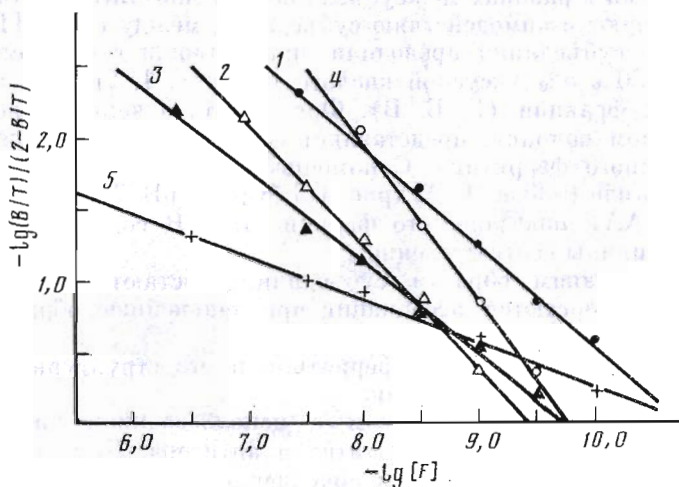


Рис. 5

Рис. 3. Гель-хроматография фракций Б (1) и В (2) рис. 1 на биогеле Р-30 (1×50 см) в 0,1 М трис-НСl-буфере, рН 7,4 (соответственно Н- и L-субъединицы)

Рис. 4. Ингибирование связывания  $[^{125}\text{I}]$ ферритина с поликлональными антителами к ферриту нативным ферритином (1), апоферритином 2 (2), субъединицами ферритина L (3) и H (4), карбоксиметилированным ферритином (5). В — концентрация  $[^{125}\text{I}]$ ферритина, связанного с антителами в присутствии конкурирующего аналога ферритина;  $B_0$  — концентрация  $[^{125}\text{I}]$ ферритина, связанного с антителами в отсутствие конкурирующего аналога ферритина

Рис. 5. Графики расчета по методу Сипса констант диссоциации нативного ферритина (1), апоферритина 2 (2) субъединиц ферритина L (3) и H (4), карбоксиметилированного ферритина (5).  $B/T$  — отношение концентраций связанных и внесенных в пробу  $[^{125}\text{I}]$ антител;  $F, M$  — концентрация свободных  $[^{125}\text{I}]$ антител

по сравнению с ферритином, вероятно, вызвано некоторыми конформационными изменениями молекулы белка в процессе диссоциации-реассоциации и повышением ее конформационной лабильности (молекулярной мобильности), что способствует вовлечению во взаимодействие с антителами участков, недоступных (либо малодоступных) в нативной молекуле [19–21].

С целью выяснения степени конформационной зависимости антигенной структуры ферритина мы провели восстановление дисульфидных



Иммунохимические свойства структурных аналогов ферритина \*

Антиген	$K_a, M^{-1}$	Иммунореактивность, %	$V_i, \%$
Ферритин	$1 \cdot 10^{10}$	100	75
Апоферритин 1	$9 \cdot 10^9$	100	75
Апоферритин 2	$7 \cdot 10^{10}$	110	90
L-субъединицы	$4 \cdot 10^8$	70	30
H-субъединицы	$8 \cdot 10^{11}$	90	6
КМ-ферритин	$\sim 10^4$	30	3

\* Апоферритин 1 — апоферритин, полученный удалением железа из ферритина без диссоциации его на субъединицы. Апоферритин 2 — апоферритин, полученный реассоциацией диссоциированного ферритина. КМ-ферритин — карбоксиметилированный ферритин.  $V_i$  — величина ингибирования ( $V/V_0$ ) связывания [ $^{125}I$ ]ферритина с поликлональными антителами к ферритину при концентрации конкурирующего антигена 450 нг/мл (см. «Экспериментальную часть»).  $K_a$  — константа связывания поликлональными антителами ферритина и его аналогов. Иммунореактивность определялась в иммуноферментном тесте (см. «Экспериментальную часть»).

связей в белке с последующим карбоксиметилированием образующихся сульфгидрильных групп. Исследование иммунохимических свойств модифицированного таким образом ферритина показало, что иммунореактивности КМ-ферритина составляет всего 30% от исходной иммунореактивности нативной молекулы. Карбоксиметилированный ферритин не ингибирует связывание антител с [ $^{125}I$ ]ферритином в конкурентном тесте и имеет очень низкую константу связывания с антителами — порядка  $10^4 M^{-1}$  (рис. 4, 5, таблица). Таким образом, нарушение пространственной структуры ферритина приводит к потере значительной части его антигенных детерминант. Эти данные свидетельствуют о том, что большинство антигенных детерминант на молекуле ферритина конформационно зависимы и разрушаются при нарушении структуры белка.

Выделение индивидуальных субъединиц ферритина в мономерной форме и изучение их иммунохимических свойств позволило установить существенные различия антигенных структур нативного ферритина и его субъединиц, а также различия субъединиц между собой. Как видно из рис. 4, гомогенные L-субъединицы в концентрации 450 нг/мл вызывают лишь 30%-ное уменьшение связывания [ $^{125}I$ ]ферритина с антителами, тогда как ферритин в этих условиях ингибирует связывание на 75%. H-субъединицы в той же концентрации практически неспособны конкурировать с [ $^{125}I$ ]ферритином за связывание с антителами. В то же время H-субъединицы имеют более высокую константу связывания ( $8 \cdot 10^{11} M^{-1}$ ) по сравнению с L-субъединицами ( $4 \cdot 10^8 M^{-1}$ ), а также по сравнению с нативным ферритином ( $1 \cdot 10^{10} M^{-1}$ ) (таблица, рис. 5).

Различия результатов конкурентного анализа с данными, полученными при определении констант связывания, позволяют предположить, что H- и L-субъединицы связываются в конкурентном тесте с различными субпопуляциями иммуноглобулинов и наборы антигенных детерминант субъединиц ферритина отличны от набора детерминант нативного ферритина. Иммунохимические различия ферритина и его субъединиц подтверждаются также результатами, полученными при определении иммунореактивности с использованием иммобилизованных на полистироле антигенов: иммунореактивность H-субъединиц составляет 90%, L-субъединиц — 70% от исходной иммунореактивности нативного ферритина (таблица). Таким образом, величина иммунореактивности H-субъединиц, адсорбированных на полистироле, в 1,3 раза выше иммунореактивности L-субъединиц в тех же условиях.



Наблюдаемое соотношение иммунохимических свойств Н- и L-субъединиц, по-видимому, является результатом действия в условиях экспериментов двух разнонаправленных факторов: с одной стороны, большего сродства Н-субъединиц к «своим» специфическим антителам, а с другой — меньшего удельного содержания таких антител в популяции поликлональных иммуноглобулинов. Последнее следует предполагать на основании того, что иммунизация животных проводилась ферритином, выделенным из селезенки человека, в котором содержание Н-субъединиц составляет всего 15%. Это существенно затрудняет конкуренцию Н-субъединиц с [ $^{125}$ I] ферритином за связывание с поликлональными антителами к нативному ферритину.

Некоторое уменьшение различий нативного ферритина и его субъединиц как антигенов в тесте на иммунореактивность с использованием адсорбированных на полистироле белков по сравнению с результатами конкурентного анализа, а также определения констант связывания (таблица, рис. 4, 5) может быть объяснено конформационными изменениями белковых антигенов при адсорбции на полистироле [22—24]. По-видимому, адсорбированные белки (ферритин и его субъединицы) приобретают конформации, напоминающие конформации денатурированных молекул, вследствие чего различия в их иммунохимических свойствах уменьшаются.

Установление иммунохимических различий ферритина и его субъединиц свидетельствует о том, что при диссоциации ферритина на субъединицы открываются ранее недоступные для антител антигенные детерминанты в районах межсубъединичных контактов и в участках, формирующих внутрикапсулярную поверхность ферритина. Таким образом, субъединицы ферритина содержат группы антигенных детерминант, отличные от антигенных детерминант нативного ферритина и включающиеся во взаимодействие с поликлональными антителами после выделения субъединиц в мономерной форме.

Сохранение способности мономерных Н- и L-субъединиц ферритина связывать антитела к нативному ферритину при установленных различиях антигенных структур субъединиц и ферритина можно объяснить тем, что в препаратах (популяциях) поликлональных антител к белковым антигенам всегда присутствует фракция (субпопуляция) антител, направленная к антигенным детерминантам, которые отсутствуют в нативных белках и появляются при денатурирующей процедуре иммунизации, а также в результате протеолиза антигенов ферментами антигенпредставляющих клеток *in vivo* [22, 23, 25]. Таким образом, препараты поликлональной антисыворотки к ферритину содержат субпопуляции антител, направленных против антигенных детерминант, «скрытых» в нативном ферритине в результате формирования его сложной четвертичной структуры (в том числе против антигенных детерминант субъединиц). При выделении ферритинспецифичных антител с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованном ферритине происходит частичная дезинтеграция пространственной структуры ферритина с экспонированием «скрытых» антигенных детерминант. В результате субпопуляции антител, направленные против «скрытых» антигенных детерминант, попадают в препарат ферритинспецифичных антител, обеспечивая эффект высокоаффинного и специфического взаимодействия с субъединицами ферритина.

На основании полученных в работе результатов можно заключить, что антигенные детерминанты, ответственные за взаимодействие нативного ферритина с антителами, в основном конформационно зависимы и разрушаются при нарушении структуры белка. При образовании апоферритина путем диссоциации-реассоциации происходит реконструкция



этих антигенных детерминант. Кроме того, за счет некоторого повышения конформационной лабильности молекулы апоферритина открываются антигенные участки, недоступные (либо малодоступные) в нативной молекуле.

Наборы антигенных детерминант Н- и L-субъединиц ферритина отличаются друг от друга, а также от набора антигенных детерминант нативного ферритина. Часть антигенных детерминант, ответственных за иммунохимические свойства субъединиц ферритина, локализована в районах межсубъединичных контактов и маскируется взаимодействием субъединиц при образовании молекул ферритина и апоферритина.

Авторы выражают благодарность Г. И. Лепешевой и В. А. Прейгерзону (Институт биоорганической химии АН БССР, Минск) за предоставление препаратов антител, конъюгированных с пероксидазой, и ферритина, меченного изотопом  $^{125}\text{I}$ .

### Экспериментальная часть

В работе использованы биогель Р-30 (Bio-Rad, США), TSK-Gel Тоурораг1 HW-55 (Тоуо Soda, Япония), хлоргидрат гуанидина (Merck, ФРГ), сефароза 4В, активированная бромцианом (Pharmacia, Швеция), динатриевая соль EDTA (Merck, ФРГ), тетраметилбензидин, бычий сывороточный альбумин (Sigma, США), нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 0,4 мкм (Schleicher und Schüll, ФРГ), платы из полистирола (Nunc, Дания), микрокристаллическая целлюлоза (Chemapol, ЧСФР). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч. или х. ч.

Ферритин выделяли из селезенки человека согласно работе [26].

*Апоферритин получали* тремя способами. К раствору 2 мг ферритина в 0,5 мл 0,05 М трис-НСl-буфера, рН 7,4, добавляли: *в первом способе* — 5 мкл тиогликолевой кислоты до конечной концентрации 0,5%, 15 мкл уксусной кислоты до конечной концентрации 1,5% (рН 4,5), инкубировали 30 мин при 20°С; *во втором способе* — 20 мкл тиогликолевой кислоты до конечной концентрации 2%, 60 мкл уксусной кислоты до конечной концентрации 6%, рН 3,5, инкубировали 30 мин при 20°С или, согласно *третьему способу*, в тех же условиях инкубировали 4 ч. Из инкубационной смеси отбирали по 10 мкг белка для аналитической гель-хроматографии на биогеле Р-30 (1×50 см) в 5% уксусной кислоте. Оставшуюся смесь диализовали против 0,05 М трис-НСl-буфера, рН 7,4, в течение 4 ч и хроматографировали на колонке с TSK-гелем HW-55 (1×50 см), уравновешенным тем же буфером. Скорость элюирования 6 мл/ч.

*Получение субъединиц ферритина.* Ферритин (2 мг) в 1 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера, рН 7,4, обрабатывали тиогликолевой кислотой по способу 2. Выпавший при этом осадок, содержащий смесь субъединиц ферритина, собирали центрифугированием, растворяли в 1 мл 5% уксусной кислоты в присутствии 0,1 М фосфата натрия при 37°С и подвергали хроматографическому разделению на колонке с биогелем Р-30 (1×50 см), уравновешенным 5% уксусной кислотой. Скорость элюирования 6 мл/ч. Полученные фракции лиофилизировали.

Электрофорез в ПААГ проводили по методу [27].

*Карбоксиметилирование ферритина* осуществляли иодацетамидом согласно методике [28].

*Получение поликлональных антител к ферритину.* Антисыворотку к ферритину получали в результате иммунизации кроликов препаратами ферритина. Ферритинспецифичные антитела из антисыворотки выделяли с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованном на активированной бромцианом сефарозе ферритине, используя элюцию антител



глицин-HCl-буфером, рН 2,3. Конъюгат антител с пероксидазой получали по методике [29]. Мечение антител и ферритина радиоактивным изотопом иода  $^{125}\text{I}$  проводили согласно работе [30].

**Определение иммунореактивности методом твердофазного иммуоферментного анализа.** Для проведения иммуоферментного анализа использовали платы из полистирола (Nunc, Дания). По 100 мкл раствора антигена в концентрации 500 нг/мл вносили в лунки плат в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,4 (буфер А) и инкубировали 16 ч при 20° С. Раствор антигена концентрировали в вакууме и промывали лунки дистиллированной водой, затем вносили в лунки по 0,2 мл 1% раствора бычьего сывороточного альбумина в буфере А для блокировки сорбирующей поверхности и инкубировали 2 ч при 20° С. После отмывки плат в лунки вносили по 100 мкл (12 нг) раствора антител к ферритину, конъюгированных с пероксидазой. Платы инкубировали 3 ч при 20° С, промывали и вносили в лунки по 100 мкл субстратной смеси, содержащей  $4 \cdot 10^{-4}$  М тетраметилбензидин и  $10^{-3}$  М перборат натрия в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, рН 5,8. Оптическое поглощение окрашенного продукта реакции измеряли через 30 мин при длине волны 655 нм на приборе Spacol 21 (ГДР). Величина оптического поглощения характеризует иммунореактивность исследуемого антигена. За 100% принята иммунореактивность нативного ферритина.

**Конкурентный анализ.** В пробирки, содержащие по 100 мкл 10% суспензии иммуносорбента (антител к ферритину, иммобилизованных на окисленной периодатом микрокристаллической целлюлозе по методу [31]), вносили по 100 мкл раствора исследуемого антигена в концентрациях от 10 до 1000 нг/мл и по 100 мкл (10 нг) ферритина, меченного изотопом  $^{125}\text{I}$ . Инкубировали 3 ч при 20° С, центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин, осадок промывали дистиллированной водой и измеряли активность осадка на гамма-счетчике Riagamma (LKB, Швеция).

**Определение констант связывания.** *Способ 1.* Для определения констант связывания использовали нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,4 мкм. Кусочки нитроцеллюлозной мембраны помещали в пробирки. Антигены в концентрации 4 нг/мл вносили в пробирки в 100 мкл буфера А, содержащего 1% бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали 16 ч при 20° С. Растворы антигенов упаривали в токе воздуха и промывали нитроцеллюлозу дистиллированной водой. Затем вносили в пробирки антитела к ферритину, меченные изотопом  $^{125}\text{I}$ , в количествах от 10 до 1000 нг в объеме 100 мкл и инкубировали 3 ч при 20° С. Активность отмойтой нитроцеллюлозы измеряли на гамма-счетчике. Константу диссоциации рассчитывали по модифицированному методу Сипса [32]. *Способ 2.* В пробирки, содержащие по 100 мкл антигена в концентрации 4 нг/мл, вносили антитела к ферритину, меченные изотопом  $^{125}\text{I}$ , в количествах от 10 до 1000 нг в объеме 100 мкл и инкубировали 3 ч при 20° С. Затем добавляли по 100 мкл 10% суспензии иммуносорбента (антител к ферритину, иммобилизованных на окисленной периодатом микрокристаллической целлюлозе) для осаждения антител, связавшихся с ферритином, и инкубировали 1,5 ч. Центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин, осадок промывали дистиллированной водой и измеряли его активность на гамма-счетчике.

Результаты определения констант обоими способами совпадали.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cragg S. J., Coeval A. M., Burch A. // J. Hematol. 1983. V. 55. № 1. P. 83-92.
2. Collawn J. F., Donato H., Urshur J. K., Fish W. W. // Comp. Biochem. and Physiol. 1985. V. 81B. № 4. P. 901-904.
3. Watanabe N., Drysdale J. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 743. № 1. P. 98-105.



4. Ono K., Jitsukawa T., Ishihara H., Fukuda A. // J. Biochem. 1986. V. 99. № 1. P. 269-279.
5. Collawn J. F., Gowan L. K., Crow H., Schwabe C., Fish W. W. // Arch. Biochem. and Biophys. 1987. V. 259. № 1. P. 105-113.
6. Crichton R. R., Marshall J. C. // Biochemistry. 1982. V. 3. № 1. P. 78-125.
7. Arosio P., Adelman T., Drysdale J. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 12. P. 4451-4458.
8. Arosio P. // FEBS Lett. 1979. V. 104. № 1. P. 51-54.
9. Chiancone E., Stefanini S. // Ferritins and Isoferritins as Biochemical Markers/Ed. Albertini A. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ., 1984. P. 23-31.
10. Stuhmann H. B., Haas J., Koch M. J., Crichton R. R. // J. Mol. Biol. 1976. V. 100. № 3. P. 399-413.
11. Trejffry A., Harrison P. M. // Biochem. J. 1979. V. 181. № 3. P. 709-716.
12. Stefanini S., Vecchini P., Chiancone E. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 7. P. 1831-1837.
13. Crichton R. R. // The Biological Chemistry of Iron/Eds Dunford H. B. et al. Dordrecht: Reidel D. Publishing Company, 1982. P. 45-61.
14. Otsuka S., Maruyama H., Listowsky J. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 18. P. 5226.
15. Collawn J. F., Lau P. Y., Morgan S. L., Fox A., Fish W. W. // Arch. Biochem. and Biophys. 1984. V. 233. № 1. P. 260-266.
16. Martin G., Rainer J. // Biol. Chem. Hoppe-Seylers. 1987. V. 368. № 4. P. 387-396.
17. Linder M. C., Kakavandi H. R., Miller P., Wirth P. L., Nagel G. M. // Arch. Biochem. and Biophys. 1989. V. 269. № 2. P. 485-496.
18. Gerl M., Jaenicke R. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 11. P. 4089-4097.
19. Berzofsky J. A. // Science. 1985. V. 229. № 4717. P. 932-939.
20. Tainer J. A., Getzoff E. D., Paterson Y., Olson A. J., Lerner R. A. // Ann. Rev. Immunol. 1985. V. 3. P. 501-535.
21. Fiesher T. M., Tainer J. A., Geysen H. M., Houghten R. A., Lerner R. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 23. P. 8568-8572.
22. Jemmerson R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 24. P. 9180-9184.
23. Friguet B., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E. // Mol. Immunol. 1984. V. 21. № 7. P. 633-677.
24. Cazaubon S., Couraud P. O., Hoebeke J., Nahmias C., Emorine L., Grass-Masse H., Strosberg A. D. // J. Immunol. Meth. 1988. V. 114. № 1-2. P. 13-20.
25. Refetoff S., Murata Y., Vassart G., Chandramoule U., Marshall J. S. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1984. V. 59. № 2. P. 269-277.
26. Crichton R. R., Millar J. A., Cumming L. S., Bryse S. F. A. // Biochem. J. 1973. V. 131. № 1. P. 51-59.
27. Остерман А. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. С. 37-65.
28. Crestfield A. M., Moore S., Stein V. H. // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. № 2. P. 622.
29. Nakane P. K., Kawaoi A. // J. Histochem. and Cytochem. 1974. V. 22. № 1. P. 1084-1091.
30. Fraker P. J., Spec J. C. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1978. V. 80. № 4.
31. Лезтцинд Е. В., Гурвич А. Е. // Бюлл. экспер. биол. и мед. 1981. Т. XCII. № 7. С. 68-70.
32. Stanley C., Lew A. M., Steward M. W. // J. Immunol. Meth. 1983. V. 64. № 1-2.

Поступила в редакцию 12.II.1991  
После доработки 19.IV.1991

E. V. GAPEYEVA, S. P. MARTSEV

## STUDY OF THE FERRITIN ANTIGENIC STRUCTURE. 1. ISOLATION AND IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF FERRITIN SUBUNITS

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of Byelorussia, Minsk*

A method for the isolation of monomers of ferritin subunits has been developed. The procedure comprises dissociation of ferritin by treatment with thioglycolic acid in the presence of phosphate ions and subsequent gel-permeation chromatography. Ferritin and a number of its structural analogues (apoferritin, carboxymethylated ferritin, H- and L-subunits of ferritin) have been immunochemically characterized. The immunoreactivity of ferritin is shown to vary along with the degree of denaturation. Isolation of monomers of H- and L-subunits results in appearance of new antigenic sites. These «hidden» antigenic determinants are presumed to be localized in the regions of inter-subunit contacts and intracapsular surface of the ferritin molecule and are responsible for the differences in immunochemical properties of its H- and L-subunits.