



УДК 576.8.097.3:577.112.825

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ КООПЕРАТИВНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИХ КРИОПРЕЦИПИТАЦИЮ МОНОКЛОНАЛЬНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА М ЧЕЛОВЕКА

Косарев И. В., Суровцев В. И., Завьялов В. П.

*Всесоюзный научно-исследовательский институт
прикладной микробиологии, г. Оболенск Московской обл.*

Исследована химическая модификация карбоксильных групп моноклонального криоглобулина М человека. Модификация хромофорным карбодимидом сопровождается полной потерей криопреципитирующих свойств IgM. Рассчитанное методом Цоу число существенных для биологической активности карбоксильных групп, приходящихся на одну макромолекулу, оказалось равным 2. Исследована зависимость криопреципитации от ионной силы, рассчитано число ионов, приходящихся на один центр связывания и выделяемых при образовании межмолекулярных ионных пар. Предложен механизм криопреципитации, обусловленный межмолекулярными кооперативными электростатическими взаимодействиями.

Как известно, криоглобулины преципитируют или образуют гель при температурах ниже 37°C . При $4-5^{\circ}\text{C}$ растворимость их может быть в 1000 и более раз ниже растворимости иммуноглобулинов, не проявляющих преципитирующих свойств.

Криопреципитация — явление обратимое. Нагревание до 37°C повышает растворимость криоглобулинов так, что она становится сравнимой с растворимостью обычных иммуноглобулинов. Криоглобулины встречаются в сыворотке крови и других биологических жидкостях. Впервые они были обнаружены в 1933 г. в сыворотке крови больного миеломатозом, а в дальнейшем — при ревматоидном артрите и других аутоиммунных заболеваниях, хронических инфекциях, алкогольном циррозе, некоторых опухолях [1]. При высоких концентрациях этих аномальных белков в крови наблюдаются классические симптомы криоглобулинемии: синдром Рейно с гангреной охлажденных частей тела, синдром гипервязкости крови, при котором возможна слепота, а также поражение почек и центральной нервной системы.

По классификации Селигмана [2] криоглобулины разделены на три группы:

- 1) моноклональные иммуноглобулины;
- 2) смешанные иммуноглобулины, состоящие из одного моноклонального и одного поликлонального иммуноглобулина;
- 3) смешанные иммуноглобулины, ни один из которых не является моноклональным.

Несмотря на то что на молекулярном уровне явление криопреципитации начали исследовать еще в 1947 г. [3], природа его до сих пор остается невыясненной.

Цель данной работы — изучение роли межмолекулярных электростатических взаимодействий, обуславливающих криопреципитацию моноклонального иммуноглобулина М человека.

При модификации криоглобулина по глутаминовым и аспарагиновым аминокислотным остаткам водорастворимым карбодимидом оказалось, что с увеличением числа модифицированных остатков степень криопреципитации (отношение количества IgM, образующего гель, к общему количеству IgM) уменьшается вплоть до полного исчезновения (рис. 1). Использование хромофорного водорастворимого карбодимида [4] позволило спектрофотометрически определять число замещенных остатков.

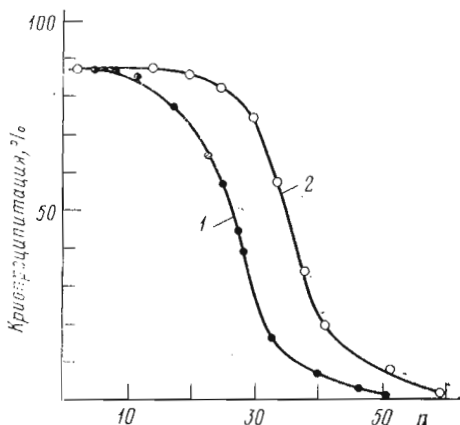


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость степени криопреципитации крио-IgM от числа модифицированных карбоксильных групп (n) N - n -фелилазофенил- N' (γ -диметиламинопропил)карбодимидом после обработки 0,5 М гидроксиламином (1) и без нее (2)

Рис. 2. Нормированные спектры КД нативного крио-IgM (1) и IgM, модифицированного по карбоксильным группам и лишённого криопреципитирующих свойств (2)

Рис. 3. Ингибирование криопреципитации крио-IgM растворами KCl (1, 2) и NaCl (3). Концентрация белка: 1 - 2,75; 2, 3 - 0,256 мг/мл

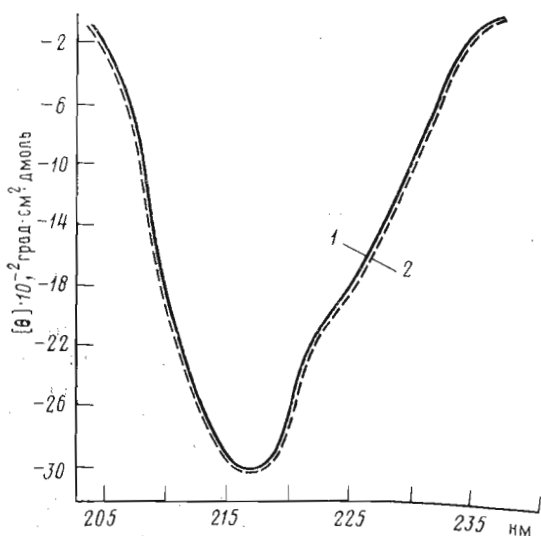


Рис. 2

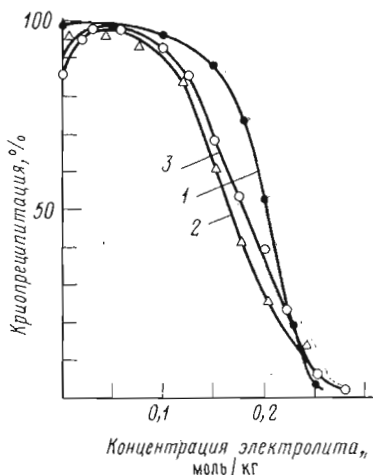


Рис. 3

Модифицированные остатки тирозина (рис. 1) деацелировали действием гидроксиламина [5].

Спектры КД нативного белка и белка, полностью лишённого преципитирующих свойств, показали, что изменения эллиптичности полос в области 205–250 нм при этом не происходит (рис. 2). Таким образом, конформация нативного и модифицированного белков практически совпадают. Полученные результаты позволяют сделать вывод о существенной роли межмолекулярных электростатических взаимодействий в механизме криопреципитации. Зависимость степени преципитации от ионной силы (рис. 3) также свидетельствует в пользу этого вывода.

Поскольку для криопреципитации существенны электростатические силы, к ней можно применить теорию ион-ионного взаимодействия макромолекул [6]. Ранее эта теория была, например, использована для исследования связывания C1q-первого субкомпонента фактора системы комплемента с агрегатами IgG [7] и гепарина с антитромбином [8]. Основное уравнение, описывающее эффект ионов на макромолекулярное равновесие, имеет вид:

$$\lg K_{\text{дис}} = \Delta n_{\text{ион}} \cdot \lg a_{\pm} - \lg K^{\circ}, \quad (1)$$

где $K_{\text{дис}}$ — константа диссоциации комплекса, образующегося при электростатическом макромолекулярном связывании; K° — константа диссоциации.

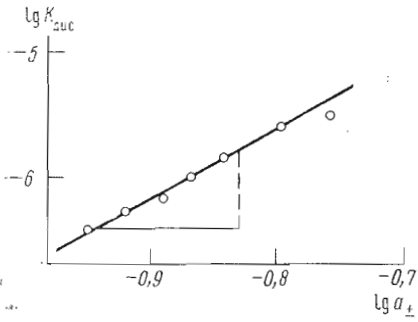


Рис. 4

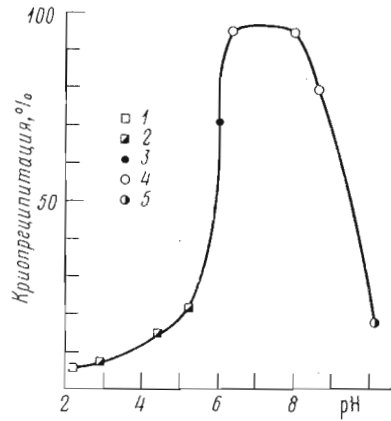


Рис. 5

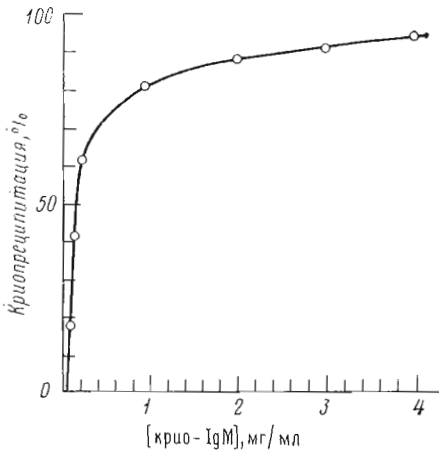


Рис. 6

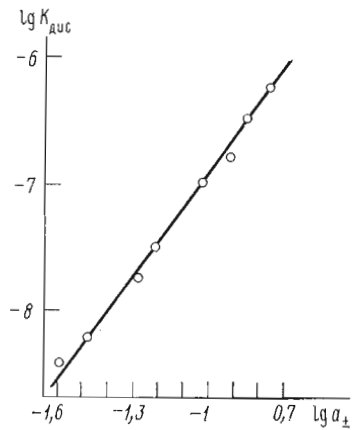


Рис. 7

Рис. 4. Определение числа ионов, приходящихся на 1 центр связывания и выделяемых при образовании межмолекулярных ионных пар. Концентрация белка 2,75 мг/мл, pH 7,4

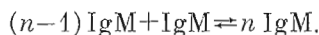
Рис. 5. Влияние pH на криопреципитацию крио-IgM. Концентрация белка 2 мг/мл. Состав буферов: 1 — 0,05 M глицин-HCl, 0,1 M NaCl; 2 — 0,05 M Na_2HPO_4 -лимонная кислота, 0,1 M NaCl; 3 — 0,05 M фосфат, 0,1 M NaCl; 4 — 0,05 M трис-HCl, 0,1 M NaCl; 5 — 0,05 M глицин-NaOH, 0,1 M NaCl

Рис. 6. Зависимость степени криопреципитации крио-IgM от его концентрации. Белок растворяли в 0,05 M фосфатном буфере (pH 7,4) с 0,15 M NaCl

Рис. 7. Определение числа ионов, приходящихся на 1 центр связывания. Концентрация белка 0,256 мг/мл при pH 7,4 или 2,75 мг/мл при pH 5,9

при единичной активности (a_{\pm}); $\Delta n_{\text{ион}}$ — число ионов, приходящихся на один центр связывания и выделяемых при образовании межмолекулярных ионных пар; a_{\pm} — средняя активность электролита, в котором происходит ион-ионное макромолекулярное взаимодействие, для одно-одновалентных электролитов (типа NaCl) равна произведению моляльной концентрации электролита на средний коэффициент активности при данной температуре (γ_{\pm}) [9]. Величина γ_{\pm} является табличной [10].

В случае криоглобулина гель находится в динамическом равновесии с жидкой фазой:



Поскольку $(n-1) \text{IgM}$ и $n \text{IgM}$ представляют собой конденсированную фазу (гель), $K_{\text{дис}} = [\text{IgM}]_{\text{св}}$, где $[\text{IgM}]_{\text{св}}$ — концентрация белка в суперна-

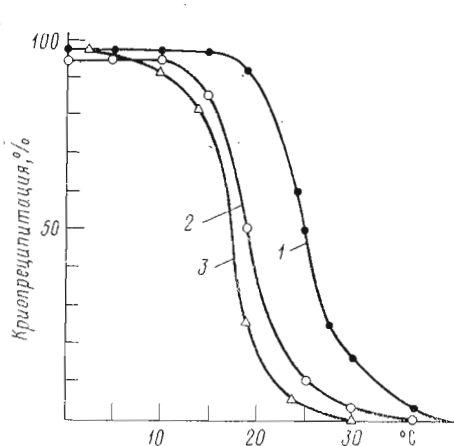


Рис. 8

Рис. 8. Влияние температуры на криопреципитацию крио-IgM. Крио-IgM в 0,05 M фосфатном буфере, pH 7,4 (1, 2) и в 0,05 M фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,15 M NaCl (3). Концентрация крио-IgM: 1, 3 — 13,4; 2 — 1,55 мг/мл

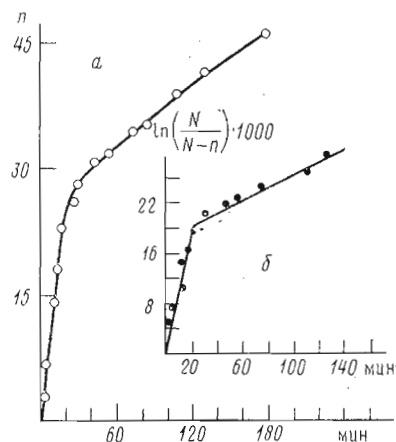


Рис. 9

Рис. 9. Кинетические кривые модификации крио-IgM и N-n-фенилазофенил-N' (γ-диметиламинопропил)карбодиимидом в прямых координатах (а), в координатах уравнения реакции псевдопервого порядка (б). N — общее число карбоксильных групп белка (N=1440 [12]), n — число модифицированных карбоксильных групп

танте после центрифугирования геля. Согласно уравнению (1), если отложить $\lg K_{\text{дис}}$ как функцию $\lg a_{\pm}$, $\Delta n_{\text{ион}}$ будет соответствовать тангенсу угла наклона прямой. Из рис. 4 следует, что $\Delta n_{\text{ион}}$ равно 5,5, т. е. на один центр связывания крио-IgM при pH 7,4 и концентрации белка 2,75 мг/мл приходится 5,5 межмолекулярных электростатических связей. Анализ pH-зависимости степени криопреципитации крио-IgM (рис. 5) и зависимости последней от концентрации крио-IgM (рис. 6) показывает, что при низкой степени криопреципитации ~50% (pH 5,9, концентрация белка 2,7 мг/мл или pH 7,4, концентрация белка 0,256 мг/мл) на один центр связывания приходится 2,7 связей (рис. 7).

Возможны два механизма образования этих связей. Первый предполагает, что они независимы друг от друга и могут располагаться либо рядом, либо по всей поверхности макромолекулы IgM (независимый механизм). Согласно второму механизму, связи располагаются рядом и константа равновесия при образовании каждой последующей связи больше предыдущей (кооперативный механизм). Независимый механизм исключается по следующим причинам. Во-первых, известно, что на поверхности макромолекул в водном окружении величина ион-ионного взаимодействия очень мала из-за высокой диэлектрической проницаемости воды и, следовательно, небольшое число обычных электростатических связей не может противостоять тепловому движению макромолекул и отталкиванию, вызываемому их одинаковым зарядом. Во-вторых, из данных рис. 1 видно, что зависимость степени криопреципитации от числа модифицированных карбодиимидом карбоксильных групп белка является S-образной. Такой же характер имеет зависимость степени криопреципитации от ионной силы (рис. 3) и от температуры (рис. 8). Все эти данные указывают на кооперативность электростатического взаимодействия при криопреципитации.

Для определения числа существенных для биологической активности карбоксильных групп, приходящихся на одну макромолекулу белка, использовали метод Цоу [11].

Согласно кинетике модификации карбоксильных групп крио-IgM карбодиимидом (рис. 9), карбоксильные группы белка можно разделить на быстро и медленно модифицируемые [11]. В этом случае доля остаточной активности (α), число существенных остатков (i) и число модифици-

руемых групп (m) связаны уравнением

$$\alpha^{1/i} = \frac{P + S - m}{P}, \quad (2)$$

где S — число быстро модифицируемых остатков, несущественных для активности, P — число медленно модифицируемых остатков, среди которых i остатков важно для активности. Значение i , как показал Цоу, выражается небольшим целым числом. Построив зависимость $\alpha^{1/i}$ от m для разных значений i в случае линейной зависимости, можно найти число важных для активности карбоксильных групп.

Дисперсия адекватности экспериментальных точек теоретической кривой была просчитана на ЭВМ СМ-3 и для i от 1 до 5 составила соответственно 0,0062; 0,0055; 0,0076; 0,0104; 0,0133. Из этих данных следует, что для криопреципитации существенны только две карбоксильные группы из всех, входящих в состав макромолекулы IgM.

Значения S и P при i , равном 2, составляют 9,1 и 43,5. Поскольку при электростатическом связывании любой положительно заряженный аминокислотный остаток одной макромолекулы белка взаимодействует с карбоксильной группой другой, наличие двух существенных карбоксильных групп свидетельствует о том, что область связывания имеет очень малые размеры. Это согласуется с данными, полученными из уравнения (1). Кроме того, из обработки результатов химической модификации по методу Цоу можно прийти к выводу, что на макромолекулу приходится два центра связывания с другими молекулами IgM.

Действительно, две существенные карбоксильные группы могут входить либо в один и тот же центр связывания («отрицательный»), либо в состав разных центров одной и той же молекулы. Поскольку для криопреципитации необходимо не менее двух центров связывания, а все молекулы идентичны, то первый случай означает, что в этой же макромолекуле имеется «положительный» центр без существенных карбоксильных групп. Так как макромолекула IgM состоит из пяти одинаковых «лучей», оба центра связывания («положительный» и «отрицательный») должны быть в каждом из них. Наличие двух существенных групп, входящих в состав разных центров одной и той же молекулы, предполагает вследствие ее симметрии, что все эти центры, по-видимому, в отличие от первого случая одинаковы. Биологическая важность лишь двух карбоксиллов в обоих случаях может означать, что группы, входящие в состав других центров этой же макромолекулы, не могут быть существенными для криопреципитации из-за стерических затруднений.

Итак, при криопреципитации на макромолекулу IgM приходится два центра связывания с другими идентичными молекулами. Поскольку из уравнения (1) следует, что одному центру связывания при нейтральных значениях pH и концентрации белка порядка 2 мг/мл соответствует 5,5 связей, то на одну макромолекулу при этих же условиях приходится 11 межмолекулярных электростатических связей.

Данные о существенной роли электростатических межмолекулярных кооперативных взаимодействий при криопреципитации позволяют построить модель гелеобразования. При низкой концентрации крио-IgM (порядка нескольких мкг/мл) гель не образуется ни при каких значениях pH, температуры, ионной силы. Известно, например, что в сыворотке здоровых людей присутствуют криоглобулины в концентрации 30 мкг/мл [13]. В этом случае димерный комплекс с 5–6 связями, образуемый при взаимодействии двух макромолекул, даже при низкой температуре разрушится прежде, чем с димером свяжутся другие макромолекулы.

С повышением концентрации криоглобулина вероятность присоединения еще одной макромолекулы и стабильность комплекса растут. При этом 11 связей, приходящихся на молекулу, достаточно для образования геля. После формирования геля свободные молекулы IgM могут связаться только одним центром. Молекулы в фазе раствора находятся в динамическом равновесии с гелем, и именно они дают супернатант после центрифугирования. Поскольку степень кооперативности мала, процесс гелеобра-

зования происходит не резко (в интервале 1–2° С), а может растягиваться на 10–15° С. Гель должен представлять собой сеть, состоящую из плоских слоев, так как число центров связывания равно 2. Более двух центров на молекулу не образуется, вероятно, по стерическим причинам, хотя молекула IgM симметрична и имеет большее число потенциальных центров. Методом малоуглового рентгеновского рассеяния было показано, что при ассоциации молекулы IgM не складываются стопкой, а образуют плоскую сеть [14].

Предложенный кооперативный механизм криопреципитации не противоречит полученным ранее экспериментальным данным. Так, Литман и соавт. [15–17] показали, что криоглобулины по многим параметрам, включая аминокислотный состав, не отличаются от нормальных иммуноглобулинов. Так как центр связывания у криоглобулинов, как это следует из уравнения (1) и из данных химической модификации, представляет собой очень небольшую область, достаточно единичной аминокислотной замены, чтобы создать кооперативно взаимодействующий центр.

Литературные данные указывают на то, что центры, ответственные за связывание, по всей видимости, находятся в переменных доменах [18]. Так, было показано, что Fab- и Fc-фрагменты криоглобулинов классов А и G не сохраняют криопреципитирующих свойств в отличие от F(ab')₂-фрагментов [19, 20]. Эти экспериментальные данные можно объяснить тем, что в Fc-области центров связывания нет, Fab-фрагменты не преципитируют, так как имеют только один центр связывания, тогда как F(ab')₂-фрагменты сохраняют два связывающих центра и способность к преципитации. В пользу того, что для криопреципитации необходимо не менее двух центров, расположенных в Fab-субъединицах, свидетельствует также тот факт, что легкие цепи, выделенные из криоиммуноглобулинов G, не преципитируют, но их димеры сохраняют способность к преципитации [21].

Термодинамические данные согласуются с тем, что макромолекулы в криопреципитате удерживаются небольшим количеством межмолекулярных связей [21]. Образование геля идет с большим уменьшением энтропии ($\Delta S \approx -260$ э. е.) и выделением тепла ($\Delta H \approx -74,5$ ккал/моль). Если считать, что при образовании одной межмолекулярной связи выделяется 6–7 ккал/моль, то что соответствует 10–12 связям на молекулу, вернее, на димер легких цепей, с которым проводилась работа.

На основании полученных в настоящей работе данных можно сделать вывод, что криоглобулины — это иммуноглобулины, связывающиеся при температурах ниже 37° С за счет межмолекулярных кооперативных электростатических взаимодействий.

Поскольку S-образный характер кривых зависимости степени криопреципитации от числа замещенных заряженных остатков установлен пока только для одного образца крио-IgM, при анализе частоты криопреципитации моноклональных и смешанных иммуноглобулинов по предложенному механизму приходится учитывать косвенные данные. Для многих моноклональных криоглобулинов установлена S-образная зависимость степени криопреципитации от температуры [21] или ионной силы [15]. Для смешанных криоглобулинов зависимость степени криопреципитации от ионной силы также имеет S-образный характер [22].

Если считать, что эти данные указывают на кооперативность процесса, то для большинства описанных криоглобулинов подходит предложенный механизм криопреципитации. Этот вопрос требует дальнейших исследований в связи с тем, что в литературе описаны случаи образования геля иммуноглобулинами при уменьшении температуры за счет поливалентного связывания по типу антиген-антитело [23, 24]. Причиной подобного явления, по мнению авторов этих работ, могут быть конформационные изменения при 20–35° С, в результате которых Fab-субъединица иммуноглобулина класса G начинает взаимодействовать с гомо- и гетерологичными Fc-областями иммуноглобулинов. Однако такие иммуноглобулины, по-видимому, необходимо относить не к криоглобулинам, а к холодным аутоантителам.

Экспериментальная часть

Выделение крио-IgM из сыворотки человека. Сыворотку крови больного макроглобулинемией Вальденстрёма охлаждали до 4°С и выдерживали 2 ч до образования преципитата, который при этой же температуре центрифугировали 30 мин при 17 000g. Осадок белка растворяли в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 0,15 М КСl, при 37°С, затем центрифугировали при этой же температуре. Супернатант выдерживали 2 ч при 4°С и вновь подвергали центрифугированию. Указанную выше процедуру очистки крио-IgM повторяли 10 раз. После этого осадок крио-IgM растворяли в 1 М КСl и пропускали через колонку (5,0×100 см) с ультрагелем АСА-34 при 4°С. Белок диализовали против 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,4, затем замораживали при -20°С и хранили в этих условиях.

Крио-IgM был гомогенен по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и β-меркаптоэтанола.

Модификация карбоксильных групп. 6 мг N-n-фенилазофенил-N' (γ-диметиламинопропил)карбодимида растворяли в 2 мл диметилформамида (100-кратный молярный избыток по отношению к белку) и приливали к 40 мл крио-IgM (3 мг/мл) в 0,1 М пиридин-НСl-буфере, рН 5,5. Реакцию проводили при 37°С в темноте, через определенные промежутки времени отбирали пробы по 2 мл и останавливали в них реакцию добавлением 0,5 мл 0,5 М ацетатного буфера, рН 5,5. Пробы диализовали против 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,0, а затем против 0,5 М гидроксиламина, рН 7,0, в 0,1 М фосфатном буфере для перевода тирозиновых остатков, взаимодействующих с карбодимидом, в исходную форму [5], вновь против фосфатного буфера и определяли степень криопреципитации. Число модифицированных групп определяли при 325 нм ($\epsilon=22\,000\text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$) [4].

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Сагу-219. Концентрацию белка определяли, используя значение $E_{1\text{ см}}^{1\%}=12,0$ при 280 нм. В случае модификации карбоксильных групп, когда концентрацию белка нельзя было определить спектрофотометрически, ее определяли по методу Лоури [25].

Спектры КД изучали с помощью дихрографа JASCO-50 в термостатируемых кюветах толщиной 1 или 5 мм при 37°С в 0,05 М фосфатном буфере, рН 5,9. Концентрация белка в образцах составляла 0,3–2 мг/мл.

Степень криопреципитации вычисляли по формуле

$$\text{степень криопреципитации} = \frac{C_{\text{общ}} - C_{\text{суп}}}{C_{\text{общ}}} \cdot 100\%, \quad (3)$$

где $C_{\text{общ}}$ — концентрация белка в пробе при 37°С, $C_{\text{суп}}$ — концентрация белка в супернатанте после охлаждения пробы до 0°С, выдерживания (30 мин) при этой температуре и последующего центрифугирования (30 мин) при 17 900g.

Влияние температуры на криопреципитацию исследовали на образцах крио-IgM с концентрацией 1,55 и 13,4 мг/мл в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,4, с или без 0,15 М NaCl. Препараты выдерживали в криостате при различной температуре, после чего центрифугировали при той же температуре и определяли белок в супернатанте.

Влияние низкомолекулярных солей на криопреципитацию. 1 М КСl и NaCl добавляли к образцам, содержащим по 3 мл крио-IgM с концентрацией 0,5 и 5 мг/мл в 0,005 М фосфатном буфере, рН 7,4, до различной конечной концентрации соли и определяли степень криопреципитации.

Авторы выражают благодарность Е. Н. Лысогогорской (МГУ) за предоставление N-n-фенилазофенил-N' (γ-диметиламинопропил)карбодимида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Литмен Г., Гуд Р. Иммуноглобулины. М.: Мир, 1981, с. 422–447.
2. Brouet J. C., Clauvel J.-P., Danon F., Klein M., Seligman M. Amer. J. Med., 1974, v. 57, № 6, p. 775–788.

3. Lerner R., Watson C. J. Amer. J. Med. Sci., 1947, v. 214, № 2, p. 410-415.
4. Лысогорская Е. Н., Баландина Г. Н., Стенанов В. М. Биооргани. химия, 1977, т. 3, № 4, с. 537-545.
5. Carravay K. L., Koshland D. E. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 160, № 2, p. 272-274.
6. Record M. T., Anderson C. F., Jr., Lohman T. M. Q. Rev. Biophys., 1978, v. 11, № 2, p. 103-178.
7. Emanuel E. J., Brampton A. D., Burton D. R., Dwek R. A. Biochem. J., 1982, v. 205, № 2, p. 361-372.
8. Nordenman B., Björk I. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 672, № 1, p. 227-238.
9. Сорочеллетти В. В. Теоретическая электрохимия. Л.: Наука, 1963, с. 152-156.
10. Краткий справочник физико-химических величин / Ред. Равдель А. А., Пономарева А. М. Л.: Химия. 1983, с. 130-134.
11. Tsou Chen-Lu. Scientia sinica, 1962, v. XI, № 11, p. 1535-1558.
12. Middaugh C. R., Kehoe J. M., Prystowsky M. B., Gerber-Jenson B., Jenson J. C., Litman G. W. Immunochemistry, 1978, v. 15, № 2, p. 171-187.
13. Cream J. J. Clin. Exp. Immunol., 1972, v. 10, p. 117-126.
14. Wilhelm P., Pitz J., Bauer K. Eur. J. Biochem., 1978, v. 84, № 3, p. 457-460.
15. Middaugh C. R., Gerber-Jenson B., Hurvitz A., Paluszek A., Scheffel C., Litman G. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 7, p. 3440-3444.
16. Middaugh C. R., Thomas C. J., Prescott B., Aberlin M. E., Litman G. W. Biochemistry, 1977, v. 16, p. 2986-2994.
17. Middaugh C. R., Litman G. W. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, p. 8002-8006.
18. Parr D. M., Hofmann T. Mol. Immunol., 1980, v. 17, № 1, p. 1-7.
19. Saha A., Chowdhury P., Sambury S., Smart K., Rose B. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 10, p. 2730-2736.
20. Pruzanski W., Jancelewicz Z., Underdown B. Clin. Exp. Immunol., 1973, v. 15, № 2, p. 181-191.
21. Klein M., Kells D. I. C., Tinker D. O., Dorrington K. J. Biochemistry, 1977, v. 16, № 3, p. 552-560.
22. Konieczny L. Bulletin de l'Académie Polonaise des sciences. Série des sciences biologiques, 1979, v. XXVII, № 1, p. 1-6.
23. Saluk P. H., Clem N. Immunochemistry, 1975, v. 12, № 1, p. 29-37.
24. Saha A., Sambury S., Smart K., Heiner D. C., Sargent A. U., Rose B. J. Immunol., 1969, v. 102, № 3, p. 476-487.
25. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 1951, v. 193, № 1, p. 265-275.

Поступила в редакцию
5.XII.1984

STUDY OF THE ROLE OF INTERMOLECULAR ELECTROSTATIC COOPERATIVE INTERACTIONS STIPULATING CRYOPRECIPITATION OF MONOCLONAL HUMAN IMMUNOGLOBULIN M

KOSAREV I. V., SUROVTSEV V. I., ZAV'YALOV V. P.

*All-Union Research Institute of Applied Microbiology,
Obolensk, Moscow Region*

A chemical modification of carboxylic groups of monoclonal human cryoglobulin M has been studied. The modification by a chromophoric carbodiimide was accompanied by complete loss of IgM cryoprecipitating properties. The number of carboxylic groups important for biological activity was estimated by the Tsou method and found to be 2. The cryoprecipitation dependence on ionic strength has been investigated and the number of ions per binding site isolated upon formation of intermolecular ion couples has been estimated. Mechanism of cryoprecipitation stipulated by intermolecular cooperative electrostatic interactions is proposed.