Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Intézet, Budapest

AZ IgG POLYPEPTID LÁNCAINAK KAPCSOLÓDÁSÁT MEGHATÁROZÓ TÉNYEZŐK TANULMÁNYOZÁSA IZOLÁLT LÁNCOK REKOMBINÁCIÓJA ÚTJÁN

GERGELY JÁNOS az orvostudományok doktora, MEDGYESI GYÖRGY a biológiai tudományok kandidátusa, CSÉCSI-NAGY MÁRIA és PUSKÁS ÉVA

Közlésre érkezett: 1972. XI. 17.

Az immunoglobulinok (Ig) négy-polypeptid láncos egységekből álló fehérjék, amelyek jellegzetessége, hogy a molekulák C-terminális része (az L-láncok fele, a H-láncok 2/3-a) konstans, N-terminális része pedig variábilis összetételű. A könnyű- és nehéz láncok variábilis részének aminosav sorrendje alapján igen jelentős homológia volt kimutatható az egyes láncok között, aminek alapján a kappa 3, a lambda láncok 5 és a H-láncok 4 alcsoportja volt elkülöníthető. E homológia mellett a variábilis molekula-szakaszok további jellegzetessége a H- és L-láncokban egyaránt kimutatható 3—3 ún. hypervariábilis régió, amely mai ismereteink szerint az ellenanyag-specificitás, azaz az antigén-determinánssal való kapcsolódás molekuláris bázisa (Bennett 1968, Kabat 1971, Kehoe és Capra 1968, Langer és mtsai 1968, Milstein és Milstein 1969, Milstein és Pink 1970, Press és Hogg 1970, Terry és Ohms 1970, Wang és mtsai 1970, Wang és Pink 1971).

Az ellenanyagképzés egyik alapvető kérdése: milyen tényezők határozzák meg a variábilis és konstans molekula-részek kapcsolódását. Véletlenszerűség, vagy nem-véletlenszerűség jellemzi azt a folyamatot, amelynek eredményeképpen a specifikus ellenanyag tulajdonsággal rendelkező Ig molekulák kialakulnak? Milyen tényezők játszanak szerepet abban, hogy a rendkívül heterogén láncok közül éppen azok kapcsolódnak Ig molekulákká, amelyek az antigén-determinánsnak megfelelő hypervariábilis régiókat tartalmazzák, és térszerkezetileg az antigénnel való specifikus reakcióra a legalkalmasabbak?

A H- és L-láncok in vitro rekombinációjának vizsgálata lehetőséget nyújt annak tanulmányozására, hogy melyek a láncok funkcionális szempontból legkedvezőbb kapcsolódását meghatározó tényezők.

Viszonylag régóta ismert, hogy az IgG molekulák izolált, alkilezett polypeptid láncai a láncok között helyreálló nem-kovalens erők révén könnyen egyesülnek olyan négyláncos egységekké, amelyek a natív IgG molekulákhoz hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek. A natív molekulákhoz való hasonlóság vizsgálható:

a) immunológiai módszerekkel (helyreáll-e az ellenanyag aktivitás?),

b) immunokémiai módszerekkel (van-e különbség a natív, és rekombinálódott molekulák antigén-tulajdonságai között?),

c) fizikokémiai módszerekkel (azonos vagy eltérő a rekombinátum és a natív fehérje ORD-a, cirkuláris dikroizmusa stb.).

(Björk és Tanford 1971, Dorrington és mtsai 1967, Edelman és mtsai 1967, Fougereau és Edelman 1964, Fougereau és mtsai 1964, Franek és Nezlin 1963, Gally és Edelman 1964, Grey és Mannik 1965, Gordon és Cohen 1966, Mannik 1967, Metzger és Mannik 1964, Olins és Edelman 1964, Roholt és mtsai 1967).

Ugyancsak jól ismert az a jelenség, hogy az ellenanyag molekulákból származó láncok, ill. azonos ellenanyag tulajdonságú, de különböző molekulákból származó láncok preferenciálisan kapcsolódnak egymással. Azonos ellenanyag tulajdonságú IgG molekulák láncai könnyebben „felismerik" egymást és rekombinálódnak, mint heterológ, eltérő ellenanyag tulajdonsággal rendelkező polypeptid láncok (Grey és Mannik 1965, Mannik 1967, Roholt és mtsai 1967). Ez a preferencialitás egyrészt arra utal, hogy a láncok kapcsolódását nem a véletlenszerűség jellemzi. Másrészt pedig arra enged következtetni, hogy az ellenanyag tulajdonságot elsősorban meghatározó variábilis molekularészek a nem-véletlenszerű kapcsolódást jelentős mértékben befolyásolják.

Az IgG H- és L-láncainak kapcsolódásában szerepet játszó tényezők tanulmányozására magunk is a láncok in vitro rekombinálódásának vizsgálatát választottuk. Módszereinket illetően azonban több tekintetben is eltértünk az általában alkalmazott methodikáktól. Az IgG polypeptid láncainak rekombinációjával foglalkozó munkák általában alkilezett, szabad SH-csoportokkal nem rendelkező láncok kapcsolódását vizsgálták, ami természetesen nem teszi lehetővé a láncok közötti diszulfid hidak szerepének a megismerését. Vizsgálatainkban nemcsak alkilezett láncokat rekombináltunk, hanem szabad SH csoportokkal rendelkező *nem-alkilezett* H- és L-láncokat is. Így lehetőségünk nyílott a láncok között kialakuló diszulfid hidak jelentőségének tanulmányozására is.

A molekulák rekonstrukciójának ellenőrzésére és jellemzésére az immunokémiai és fizikokémiai módszerek mellett új lehetőségként bevezettük a rekombinált fehérje papain-emészthetőségének a vizsgálatát. Korábbi vizsgálataink alapján beszámoltunk arról, hogy az IgG molekulák papain-emészthetősége különböző, és hogy ez a tulajdonságuk elsősorban a H-lánc szerkezetével függ össze. Ezzel kapcsolatos az IgG molekulák alosztály tulajdonsága és azok papain susceptibilitása közötti korreláció, nevezetesen az IgG1, és IgG3 alosztályba tartozó fehérjék papain sensitivitása, és az IgG2, valamint az IgG4 alosztályba tartozók papain rezisztenciája (Gergely és mtsai 1967, Gergely és Medgyesi 1967, Gergely és mtsai 1967b, Gergely és mtsai 1969a, Gergely és mtsai 1970). Az ismert alosztály tulajdonságú IgG myeloma fehér-

jékből nyert molekulák papain susceptibilitásának vizsgálata érzékeny módszernek bizonyult a molekula rekonstitúciójának ellenőrzésére.

Az alább ismertetésre kerülő vizsgálatainkkal elsősorban a következő kérdésekre kívántunk választ kapni:

1. Milyen befolyással vannak a láncok közötti diszulfid hidak a láncok kapcsolódására, az IgG molekulák papain rezisztenciáját eredményező szerkezeti sajátságok kialakítására.

2. Befolyásolja-e az L-láncok variábilis része a láncok kapcsolódását?

3. Van-e preferenciális kapcsolódás azonos alosztályba tartozó IgG molekulákból származó H- és L-láncok között?

Vizsgálataink eredményeiből a láncok kapcsolódásának véletlen-, vagy nem-véletlenszerűségére vonatkozó következtetéseket is reméltünk levonni. Vizsgálataink egyes részletei már más helyen közlésre kerültek (Gergely és mtsai, 1969b, P. Csécsi-Nagy és mtsai 1971).

Vizsgálati anyag és módszerek

IgG myeloma fehérjék. Az IgG myeloma fehérjéket myelomás betegek savójából DEAE-Sephadex batch technikával (Baumstark és mtsai 1964), vagy DEAE-Sephadex oszlopkromatográfiával (Sela és mtsai 1963) nyertük. A vizsgálatokban alkalmazott fehérjék fontosabb adatait az I. táblázat tartalmazza.

H- és L-láncok preparálása

a) *Alkilezett H- és L-láncok.* Az IgG myeloma fehérjéket 0,2 M 2-Merkaptoetanollal redukáltuk majd 100% feleslegben levő jódacetamiddal alkilezték. A polypeptid láncokat 1 M ecetsavval egyensúlyba hozott Sephadex G-100 oszlopon választottuk szét.

b) *Nem-alkilezett H- és L-láncok.* Nem alkilezett láncok preparálására kétféle eljárást alkalmaztunk. Az egyik módszer szerint az IgG myeloma fehérjéket 0,2 M 2-merkaptoetanollal redukáltuk, és a polypeptid láncokat 1 M ecetsavval egyensúlyba hozott Sephadex G-100 oszlopon választottuk szét. Mind a gélszűrés, mind pedig az izolált láncok tárolása N_2-atmoszférában történt.

A másik eljárás során az IgG myeloma fehérjéket 0,01 M dithiothreitollal redukáltuk. A H- és L-láncok elválasztása 0,01 M dithiothreitolt tartalmazó 1 M ecetsavval egyensúlyba hozott Sephadex G-100 oszlopon történt.

H- és L-láncok rekombinációja. Az izolált H- és L-láncokat equimoláris mennyiségben kevertük, és 24 órán át 4 °C-on 0,15 M pH 7,0 foszfát pufferrel szemben dializáltuk, majd töményítés után azonos pufferrel egyensúlyba

hozott Sephadex G-150 oszlopon gélszűrést végezve izoláltuk a rekombinálódott láncokat.

A vizsgálatok másik részében az equimoláris arányban kevert láncokat 4 mM nátriumacetát pufferrel szemben dializáltuk (pH 5,4), majd töményítés után a dialízist 0,02 M Tris—HCl (pH 8,0) pufferrel szemben folytattuk. Az újraegyesült láncok elválasztása az utóbbi pufferrel egyensúlyba hozott Sephadex G-150 oszlopon történt. A Sephadex oszlopon történő frakcionálás általában 3 frakciót eredményezett. Az első frakció oldódó aggregátumokat, a natív IgG-nek megfelelő eluciós térfogattal eluálódó második frakció az újrakapcsolódott H- és L-láncokat, míg a harmadik frakció az esetleg jelenlevő szabad L-láncokat tartalmazta.

Papain susceptibilitás vizsgálata. A reasszociált molekulák papain susceptibilitását korábban leírt módszerünkkel vizsgáltuk (Gergely és mtsai 1967a).

Azonos és különböző alosztályba tartozó IgG myeloma fehérjék H- és L-láncainak kapcsolódása. Annak tisztázása érdekében, hogy van-e preferenciális kapcsolódás azonos alosztályba tartozó IgG myeloma fehérjék könnyű, és nehéz láncai között, izolált nem-alkilezett H-láncokat kétféle L-láncot tartalmazó keverékkel inkubáltunk. A keverékben levő egyik L-lánc ugyanolyan alosztályba tartozó myeloma fehérjékből származott, mint a H-lánc, a másik láncot viszont más alosztályba tartozó IgG myeloma fehérjékből nyertük. A kétféle L-lánc azonos mennyiségben volt jelen a rendszerben. A reasszociált láncokban a kétféle L-lánc arányát az alábbi módszerek valamelyikével állapítottuk meg:

I. Az egyik L-láncot jelöltük ^{131}J-dal, és a rekombinátumban a kétféle L-lánc arányát a rekombinált láncokat tartalmazó frakció fehérjetartalma alapján határoztuk meg.

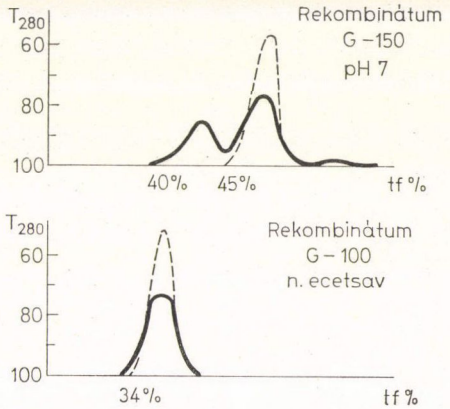
II. Az egyik L-láncot ^{131}J-dal, a másikat pedig ^{125}J-dal jelöltük. A láncok rekombinálása után Sephadex G-150 oszlopon izoláltuk a rekombinált fehérjét. A kétféle lánc arányát az egyes frakciók aktivitásának vizsgálatával állapítottuk meg.

III. Az egyik L-láncot ^{131}J-dal, a másikat ^{125}J-dal jelöltük. A láncokat rekombinálás után savanyú (pH 3,5) urea-polyacrylamid gélben elektroforézist végeztünk, majd a különböző jelzésű láncok arányát az egyes zónákban meghatároztuk.

Eredmények

1. *A láncok közötti diszulfid hidak helyreállásának vizsgálata.* Annak tisztázása érdekében, hogy nem-alkilezett láncok rekombinálása alkalmával kialakulnak-e a láncok közötti diszulfid hidak, autológ H- és L-láncokból álló rekombinált fehérjét izoláltunk, és azt 1 M ecetsavval egyensúlyba hozott

Sephadex G-100 oszlopon át szűrtük. A rekombinátum a natív IgG-vel azonos térfogatban eluálódott, jeléül annak, hogy a nem-alkilezett láncok rekombinációja alkalmával nemcsak nem-kovalens kötések, hanem diszulfid hidak is kialakulnak a láncok között (1. ábra).



1. ábra. „Sza" myeloma fehérje nem-alkilezett H- és L-láncainak autolog rekombinátuma. *A:* a rekombinált anyag frakcionálása Sephadex G-150 oszlopon. *B:* a rekombinált fehérje gélszűrése 1 M ecetsavval egyensúlyba hozott Sephadex G-100 oszlopon
———: LKB Uvicord II-vel regisztrált fehérje tartalom, ... ^{131}J izotóppal jelzett natív IgG

2. *Reasszociált autolog H- és L-láncok papain susceptibilitása.* Reasszociált alkilezett, illetve reasszociált nem-alkilezett autolog H- és L-láncok izolálása után megvizsgáltuk a rekombinált fehérje papain-susceptibilitását. Az eredményeket a II. táblázat tartalmazza.

I. táblázat

A vizsgálatokhoz alkalmazott IgG myeloma fehérjék

Fehérje	Alosztály	L-lánc típus	Papain susceptibilitás	Gm típus
Kof	IgG1	κ	PS	a+
Sza	IgG1	κ	PS	f+
Ml	IgG1	κ	PS	f+
Su	IgG1	κ	PS	f+
KGy	IgG1	κ	PS	f+
Cr	IgG1	λ	PS	f+
Wih	IgG2	κ	PR	n−
Ré	IgG2	κ	PR	n−
Bi	IgG2	κ	PR	
Pe	IgG3	κ	PS	b+
Pre	IgG4	κ	PR	

PS = papain sensitiv.
PR = papain resistens.

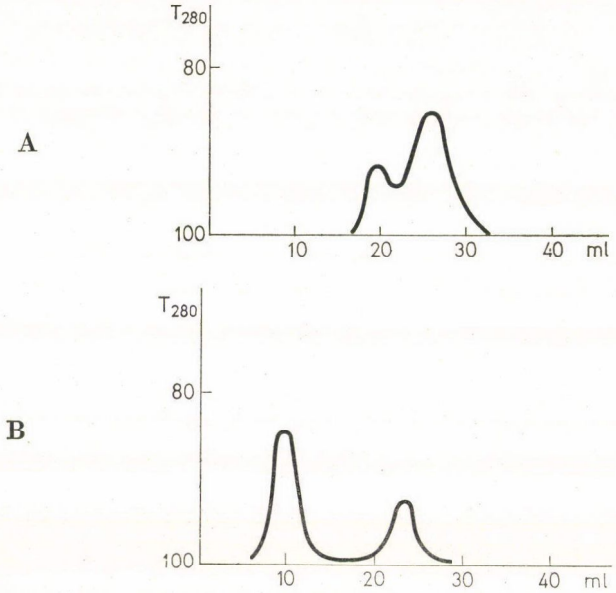
Papain sensitiv myeloma fehérjékből nyert H- és L-láncok rekombinálása csaknem kizárólag papain sensitiv molekulákat eredményezett, függetlenül attól, hogy a kapcsolódó láncok alkilezettek, vagy nem-alkilezettek voltak. Papain resistens IgG2, vagy IgG4 myeloma fehérjékből nyert *alkilezett* láncok rekombinálásakor képződő molekulák többsége papain sensitiv volt, míg ugyanezen fehérjékből izolált *nem-alkilezett* láncok rekombinációja túlnyomórészt papain resistens molekulákat eredményezett (II. táblázat, 2. ábra).

II. táblázat

Reasszociált autolog H- és L-láncok papain susceptibilitása

A láncok eredete	Alkilezett láncok	Nem-alkilezett láncok	Reasszociált láncok	
			PR	PS
PR	9			9
PS		3		3
PR	6			6*
PR		2	2**	

PS = papain senstitiv.
PR = papain resistens.
A számok az elvégzett rekombinációs kísérletek számát mutatják.
* A rekombinálódott molekulák többsége PS volt. PR rekombinálódott molekulákat csupán nyomokban találtunk 5 esetben.
** A molekulák túlnyomó többsége PR volt.



2. ábra. „Pre" IgG 4 alosztályba tartozó (papain resistens) myeloma fehérje rekombinált autolog láncainak vizsgálata. Az ábra a reasszociált láncok papainos hydrolysise után végzett gélszűrés (Sephadex G-100) eredményét mutatja. *A:* Reasszociált alkilezett láncok. Oszlop méret: 1,2×40 cm. *B:* Reasszociált nem-alkilezett láncok. Oszlop méret: 1,2×18 cm. Az első frakcióval az emésztetlen fehérje, a másodikkal az Fab és Fc fragmentumok eluálódtak.

3. *Reasszociált heterolog H- és L-láncok papain susceptibilitása.* A vizsgálatok eredményét a III. táblázatban foglaltuk össze, és a 3., 4. ábrákon demonstráljuk.

Alkilezett láncok esetében a képződött rekombinált fehérje molekulák túlnyomó többsége papain sensitiv volt, tekintet nélkül arra, hogy papain sensitiv, vagy papain resistens myeloma fehérjékből származtak-e.

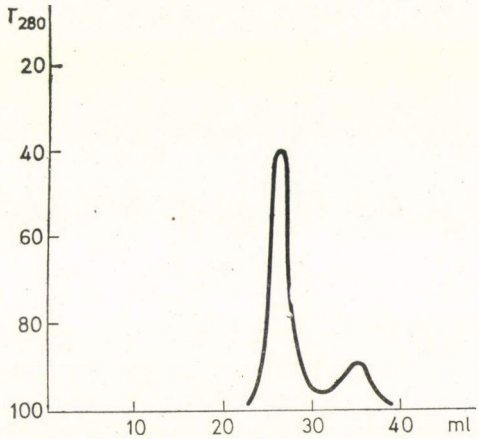
Nem-alkilezett láncok esetében, ha a H-lánc papain resistens az L-lánc pedig papain sensitiv IgG myeloma fehérjékből származott, a rekombinálódott molekulák túlnyomó többsége papain resistens volt. Papain resistens

III. táblázat

Reasszociált heterolog H- és L-láncok papain susceptibilitása

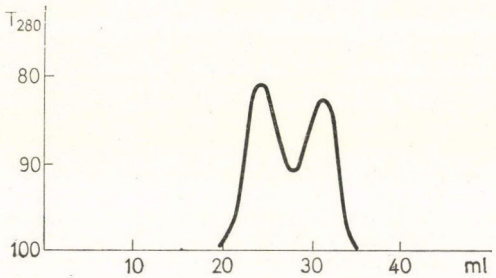
A láncok eredete		Alkilezett láncok	Nem-alkilezett láncok	Reasszociált láncok	
H	L			PR	PS
PR	PS	12			12*
PS	PR	10			10
PR	PS		4	4	
PS	PR		4	4**	4**
PS	PS		4		4

PS = papain sensitiv.
PR = papain resistens.
A számok az elvégzett rekombinációs kísérletek számát mutatják.
* Három esetben találtunk nyomokban emésztetlen (PR) molekulákat.
** A PS és PR molekulák aránya kb. 50 : 50% volt.



3. ábra. Nem-alkilezett H- és L-láncokból rekombinált fehérje papain susceptibilitásának vizsgálata. A rekombinált fehérje a papain resistens IgG 2 alosztályba tartozó „Wih" myeloma fehérje H-láncait, és papainsensitiv IgG 1 alosztályba tartozó „Sza" myeloma fehérje L-láncait tartalmazza. Az izolált rekombinátum papainos emésztése után végzett gélszűrés (Sephadex G-100; oszlopméret: 1,2 × 55 cm). Az első frakcióval az emésztetlen fehérje, a másodikkal az Fab és Fc fragmentumok eluálódtak

myeloma fehérjékből származó L-láncok és papain sensitiv eredetű H-láncok rekombinációjakor képződő molekulák mintegy fele papain sensitiv, fele pedig papain resistens volt. Gyakorlatilag valamennyi rekombinálódott molekula emésztődött papainnal cystein nélkül, ha a H- és L-láncok egyaránt papain sensitiv IgG myeloma fehérjékből származtak.



4. ábra. Heterolog nem-alkilezett H- és L-láncokból rekombinált fehérje papain susceptibilitásának vizsgálata. A rekombinált fehérje a papain sensitiv IgG 1 alosztályba tartozó „Sza" myeloma fehérje H-láncait és a papain resistens IgG 2 alosztályba tartozó „Wih" myeloma fehérje L-láncait tartalmazza. Az izolált rekombinátum papainos emésztése után végzett gélszűrés (Sephadex G-100; oszlop méret: 1,2 × 56 cm). Az első frakcióval az emésztetlen fehérje, a másodikkal az Fab és Fc fragmentumok eluálódtak

Tekintettel arra, hogy a *nem-alkilezett* autolog, vagy heterolog gamma-2, vagy gamma-4 láncokat tartalmazó rekombinált molekulák többsége papain resistensnek bizonyult, az eredmények egyrészt alátámasztják azon korábbi észlelésünket, miszerint az IgG molekulák papain resistens jellegének kialakításában a H-láncnak fontos szerepe van. Másrészt pedig a kísérletek a láncok közötti diszulfid hidak jelentőségére hívják fel a figyelmet, hiszen a papain resistencia csak *nem-alkilezett* láncok rekombinációjakor alakult ki.

Figyelemre méltó, hogy a rekombinálódott molekulák mintegy fele papain resistens volt akkor is, ha a könnyű láncok származtak papain resistens myeloma fehérjékből. Ez az észlelés arra hívja fel a figyelmet, hogy az L-láncoknak is lehet esetleg szerepe a papain resistenciát kölcsönző struktúra kialakításában.

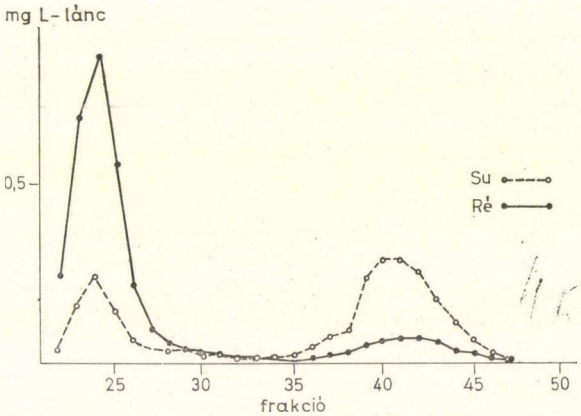
4. *Ugyanazon alosztályba tartozó myeloma fehérjékből származó H- és L-láncok preferenciális kapcsolódása.* 9 vizsgálat eredményét a IV. táblázatban foglaltuk össze, és egy tipikus kísérletet az 5. ábrán demonstráltunk. Azokban az esetekben, amelyekben az IgG2 myeloma fehérjékből preparált gamma-2 láncot IgG1 és IgG2 myeloma fehérjékből nyert L-láncokkal kevertünk, a rekombinálódott molekulák túlnyomó többségében a gamma-2 lánc IgG2 eredetű könnyű lánccal kapcsolódott. Ha gamma-1 láncokat hasonló L-lánc keverékkel inkubáltunk, a rekombinálódott molekulák többsége IgG1 eredetű L-láncot tartalmazott. A ^{131}J-dal, és ^{125}J-dal jelzett L-láncok aránya közel 50 : 50 volt, amikor a gamma-1, vagy gamma-2 láncokat két különböző IgG1

IV. táblázat

Azonos és különböző alosztályba tartozó IgG myeloma fehérjék polypeptid láncainak rekombinációja

A vizsgálat száma	H-lánc	L*-lánc	A különböző eredetű L-láncok aránya a reasszociált molekulákban (%-ban kifejezve)	Az ellenőrzésre alkalmazott módszer
1.	gamma-2	$\varkappa(2)$	70	I.
		$\varkappa(1)$	30	
2.	gamma-2	$\varkappa(2)$	89	I.
		$\varkappa(1)$	11	
3.	gamma-2	$\varkappa(2)$	78	II.
		$\varkappa(1)$	22	
4.	gamma-2	$\varkappa(2)$	85	III.
		$\varkappa(1)$	15	
5.	gamma-2	$\varkappa(2)$	96	III.
		$\varkappa(1)$	4	
6.	gamma-1	$\varkappa(1)$	79	III.
		$\varkappa(2)$	21	
7.	gamma-1	$\varkappa(1)$	74	III.
		$\varkappa(2)$	26	
8.	gamma-1	$\varkappa(1)$	45	II.
		$\varkappa(1)$	55	
9.	gamma-1	$\varkappa(1)$	50	III.
		$\lambda(1)$	50	

* A zárójelben levő számok annak a myeloma fehérjének az alosztályát mutatják, amelyből az L-láncot nyertük.



5. ábra. ^{131}J-dal és ^{125}J-dal jelzett L-láncok aránya a „Wih $H^{Ré}_{Su}$ L" rekombinált fehérjében (l. III. táblázat 3. kísérlet)

myeloma fehérjékből nyert könnyű lánccal reagáltattuk. Egy kísérlet kivételével valamennyiben kappa típusú könnyű láncot alkalmaztunk. Egyedül a 9. sz. kísérletünkben származott az egyik L-lánc kappa típusú, a másik pedig lambda típusú IgG1 fehérjékből. Ennek a kísérletnek az eredményéből arra lehet következtetni, hogy a könnyű lánc-típus nem befolyásolja a láncok kapcsolódásának az arányát.

Megbeszélés

Meghatározott szerkezetű H- és L-láncok preferenciális kapcsolódása kizárja annak lehetőségét, hogy az antigénnel való reakcióra alkalmatlan szerkezetű immunoglobulin molekulák képződjenek. Ezért lett az ellenanyagképzés mechanizmusának tanulmányozásában az egyik leglényegesebb kérdés: véletlenszerűség, vagy nem-véletlenszerűség jellemzi-e a H- és L-láncok kapcsolódását. A polypeptid láncok in vitro kapcsolódásának tanulmányozása lehetőséget nyújt annak tisztázására, hogy milyen strukturális tényezők játszhatnak szerepet az antigénnel való kapcsolódás szempontjából legkedvezőbb szerkezetű molekulák kialakulásában. Így választ lehet kapni arra is: milyen szerkezeti tényezők eredményezik a láncok preferenciális kapcsolódását.

Az IgG molekula H- és L-láncainak kapcsolódásával a vizsgálatok egész sora foglalkozik, és ezek eredménye azt bizonyítja, hogy alkilezett polypeptid láncok nem kovalens kötések útján könnyen kapcsolódnak össze a natív IgG molekuláknak megfelelő négy-láncos egységekké. Vitatható azonban, hogy ilyen feltételek mellett létrejön-e a molekulák restitutio ad integruma (Björk és Tanford 1971, Dorrington és mtsai 1967, Edelman és mtsai 1967, Fougereau és Edelman 1964, Fraňek és Nezlin 1963, Gally és Edelman 1964, Grey és Mannik 1965, Gergely és mtsai 1969b, Gordon és Cohen 1966, Mannik 1967, Metzger és Mannik 1964, Olins és Edelman 1964).

Jelen vizsgálatainkban — eltérően a rekombinációs kísérletekben általában alkalmazott gyakorlattól — nemcsak alkilezett, hanem nem-alkilezett, tehát szabad SH csoportokkal rendelkező láncok, autolog, és heterolog rekombinációjakor képződő molekulákat vizsgáltunk. A láncokat homogén papain sensitiv és papain resistens IgG myeloma fehérjékből nyertük, a rekombinált láncokat gélszűréssel izoláltuk, és megvizsgáltuk a rekombinálódott molekulák papainsusceptibilitását. Ez a módszer igen alkalmasnak bizonyult annak tisztázására: helyreáll-e a rekombináció után a natív molekulák papain resistenciáját eredményező konformáció.

Eredményeink azt igazolták, hogy a láncok *csak nem-kovalens* kötések útján történő kapcsolódása nem elegendő az IgG2 és IgG4 alosztályokra jellemző papain resistencia helyreállására. A molekuláknak ez a tulajdonsága csak nem-alkilezett láncok rekombinációjakor alakul ki ismét, és ez a láncok közötti diszulfid hidak fontosságát mutatja a papain resistens tulajdonságú IgG alosztályok szerkezetének kialakulásában.

Vizsgálataink egy további jelentős momentumra hívják fel a figyelmet. Korábbi eredményeinkkel egybehangzóan (Gergely és mtsai 1967a, Gergely és mtsai 1967b, Gergely és mtsai 1969a, Medgyesi és Gergely 1969) aláhúzzák ugyan a H-láncok elsőrendű fontosságát az IgG molekulák eltérő papain susceptibilitásának meghatározásában, de ugyanakkor azt is mutatják, hogy az L-láncok variábilis része is befolyással lehet erre. Mindazoknak a rekombi-

nálódott molekuláknak a többsége ugyanis, amelyek nem-alkilezett gamma-2, vagy gamma-4 nehéz láncokat tartalmaztak, papain resistens volt. A papain resistens molekulákból származó kappa-láncok gamma-1 nehéz lánccal rekombinálva viszont mintegy fele-fele arányban eredményeztek papain resistens és papin sensitiv molekulákat. Ez utóbbi észlelés a könnyű láncok variábilis részének a molekula konformációjára gyakorolt befolyása mellett szól.

Több más adat is arra utal, hogy a könnyű láncok variábilis része szerepet játszik a H-L lánc kapcsolódásban. Ha egy adott ellenanyag tulajdonságú molekulákból származó H-láncokat különböző eredetű L-láncokkal — köztük az autolog molekulákból származókkal is — kevernek, az azonos ellenanyagból származó láncok preferenciálisan kapcsolódnak egymással (Roholt és mtsai 1967). Ismeretes továbbá, hogy bizonyos ellenanyag tulajdonságú molekulákban meghatározott izotípusú polypeptid láncok találhatók. Más szóval: bizonyos variábilis szekvenciák csak meghatározott konstans szekvenciákkal kapcsolódnak. Így például: anti-dextrán és anti-leván ellenanyagok általában IgG2 alosztályba tartozó fehérjék (Yount és mtsai 1968); az anti-Rh aktivitás pedig IgG1 és IgG3 molekulák sajátsága (Natvig és Kunkel 1968); az anti-VIII faktor kizárólag IgG4 alosztályba tartozik (Shapiro és Carrol 1968). Ebben a tekintetben különösen jelentősek a hideg-agglutininek, amelyek kizárólag IgM osztályba tartoznak (Fudenberg és Kunkel 1957, Harboe és mtsai 1965), és csak kappa láncokat tartalmaznak. Legújabb — részben saját — vizsgálatok szerint pedig mind a könnyű, mind a nehéz láncok meghatározott alcsoportokba tartozónak bizonyultak (VH_I VH_{II} illetve VH_{III} Gergely és mtsai 1973, Capra és mtsai 1972).

Mindezek az adatok amellett szólnak, hogy az IgG molekulák variábilis és konstans régióinak a kapcsolódását a nem-véletlenszerűség jellemzi.

Jelen vizsgálatainkkal azt a kérdést is tisztázni kívántuk, hogy vajon ez a nem-véletlenszerűség alosztály szinten is érvényesül-e. Ezt a kérdést azon — már említett — megfigyelésünk alapján tettük tanulmány tárgyává, miszerint az L-láncok variábilis része is befolyásolhatja az egész molekula jellegzetes gombolyodását. Az azonos alosztályból származó láncok esetleges preferenciális kapcsolódása analog jelenség az azonos ellenanyag molekulák láncainak preferenciális kapcsolódásával.

Vizsgálataink azt bizonyítják, hogy a preferencialitás alosztály szinten is érvényesül, és azok a láncok amelyek azonos alosztályba tartozó molekulákból származnak, könnyebben kapcsolódnak egymással, mint a más alosztályból származókkal.

A natív immunoglobulin molekulák térbeli konformációja a kétféle polypeptid lánc kölcsönhatásának eredményeképpen alakul ki. Mivel a H- és L-láncok szétválasztásakor nem alkalmazunk teljes denaturációt, feltételezhető, hogy a könnyű lánc megőrzi a kiindulási fehérje nehéz láncával való kölcsönhatás eredményeként kialakult konformációs sajátságait. Ez magya-

rázhatja azon észlelésünket, hogy valamely nehéz lánc könnyebben köt olyan heterolog könnyű láncot, amely vele azonos alosztályba tartozó fehérjéből származik. Edelman és Gall (1969) hasonló jellegű „hiszterézist" feltételeznek az autolog láncok preferenciális kapcsolódásának magyarázatára.

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők különböző alosztályba tartozó IgG myeloma fehérjék alkilezett és nem-alkilezett H- és L-láncainak autológ, és heterológ rekombinációja után vizsgálták a reasszociált láncok papain susceptibilitását. Megállapították, hogy az IgG2 és IgG4 alosztályra jellemző papain resistencia helyreállásához nem elegendő a láncok nem-kovalens kötések útján történő kapcsolódása, ehhez a láncok közötti diszulfid hidak kialakulására is szükség van. A láncok heterolog rekombinációja kapcsán nyert eredményeik a nehéz láncok jelentőségét igazolták a molekula konformációjának kialakításában, és rávilágítanak az L-láncok variábilis része esetleges szerepére ebben a vonatkozásban. Tanulmányozták az azonos alosztályba tartozó IgG molekulákból nyert könnyű- és nehéz láncok preferenciális kapcsolódásának lehetőségét is, és kimutatták, hogy azok a heterolog láncok, amelyek azonos alosztályba tartozó IgG myeloma fehérjékből származnak, preferenciálisan kapcsolódnak egymással. Eredményeik alapján diszkutálják a „véletlenszerűség" és „nem-véletlenszerűség" jelentőségét a H- és L-láncok kapcsolódásában.

IRODALOM

Baumstark, J. S., Laffin, R. J. és *Bardawil, W. A.:* Arch. Biochem. Biophys. **108**, 514 (1964).
Bennett, C.: Biochemistry, **7**, 3340 (1968).
Björk, I. és *Tanford, C.:* Biochemistry **10**, 1289 (1971).
Capra, J. D., Kehoe, J. M., Williams, Jr. R. C., Feizi, T. és *Kunkel, H. G.:* Proc. Nat. Acad. Sci. USA **69**, 40 (1972).
Dorrington, K. J., Zarlengo, M. H. és *Tanford, C.:* Proc. Nat. Acad. Sci. USA **51**, 996 (1967).
Edelman, G. M., Olins, D. E., Gally, J. A. és *Zinder, N. D.:* Proc. Nat. Acad. Sci. USA **50**, 753 (1967).
Edelman, G. M. és *Gall, W. E.:* Ann. Rev. Biochem, **38**, 415 (1969).
Fougereau, M. és *Edelman, G. M.:* Miochemistry **3**, 1120 (1964).
Fougereau, M., Olins, D. K. és *Edelman, G. M.:* J. exp. Med. **120**, 349 (1964).
Franek, F. és *Nezlin, R. S.:* Biokhimiya **28**, 193 (1963).
Fudenberg, H. H. és *Kunkel, G. H.:* J. exp. Med. **106**, 689 (1957).
Gally, J. A. és *Edelman, G. M.:* J. exp. Med. **119**, 817 (1964).
Gergely, J., Stanworth, D. R., Jefferis, D., Normansell, D. R., Henney, C. S. és *Pardoe, G. I.:* Immunochemistry **4**, 101 (1967a).
Gergely, J., Medgyesi, G. A. és *Stanworth, D. R.:* Immunochemistry **4**, 369 (1967b).
Gergely, J., Fudenberg, H. H. és *van Loghem, Erna:* Immunochemistry **7**, 1 (1970).
Gergely, J., Pákh, Mária, Medgyesi, G. A. és *Puskás, Éva:* Immunochemistry **6**, 768 (1969a).
Gergely, J., Medgyesi, Gy., Pákh, Mária és *Puskás, Éva:* Orvostudomány **20**, 287 (1969b).
Gergely, J., Wang A. C., Fudenberg H. H. és *Vox Sang:* **24**, 432 (1973).
Grey, H. M. és *Mannik, M.:* J. exp. Med. **122**, 619 (1965).
Gordon, S. és *Cohen, S.:* Immunology **10**, 549 (1966).

Harboe, M., van Furth R., Schubo, E. H., Lind, K. és Evans, R. S.: Scand, J. Haematol. **2,** 259 (1965).
Hood, L. és *Talmage, D. W.:* Science **168,** 325 (1970).
Kabat, E. A. és *Wu, T. T.:* Ann. N. Y. Sci. **190,** 382 (1971).
Kehoe, J. M. és *Capra, J. D.:* Proc. Nat. Acad. Sci. USA **68,** 2019 (1971).
Langer, B., Steinmetz-Kayne, M. és *Hilschmann, N.:* Z. Physiol. Chem. **349,** 945 (1968).
Mannik, M.: Biochemistry **6,** 134 (1967).
Medgyesi, G. A. és *Gergely, J.:* Immunochemistry **6,** 473 (1969).
Metzger, H. és *Mannik, M.:* J. exp. Med. **120,** 765 (1964).
Milstein, C., Milstein, C. P. és *Feinstein, A.:* Nature **221,** 151 (1969).
Milstein, C. és *Pink, J. R. L.:* Proc. Biophys. Mol. Biol. **21,** 209 (1970).
Natvig, J. B. és *Kunkel, H. G.:* Series Haematol. I. **1,** 166 (1968).
Olins, D. E. és *Edelman, G. M.:* J. exp. Med. **119,** 789 (1964).
P. Csécsi-Nagy, Mária, Boross, L., Medgyesi, G. A. és *Gergely, J.:* Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **6,** 259 (1971).
Press, E. M. és *Hogg, N. M.:* Biochem, J. **117,** 650 (1970).
Roholt, O. A., Radzimski, G. és *Pressman, D.:* J. exp. Med. **125,** 191 (1967).
Sela, M., Givol, D. és *Mozes, E.:* Biochim. Biophys. Acta **68,** 649 (1963).
Shapiro, S. S. és *Carroll, K. S.:* Science **160,** 786 (1968).
Terry, W. D. és *Ohms, J.:* Proc. Nat. Acad. Sci. USA **66,** 558 (1970).
Wang, A. C., Fudenberg, H. H. és *Pink, J. R. L.:* Proc. Nat. Acad. Sci. USA **68,** 1143 (1971).
Yount, W. J., Dorner, M. M., Kunkel, H. G. és *Kabat, E. A.:* J. exp. Med. **127,** 623 (1968).