



УДК 547.963.1 : 576.8.097.07

РОЛЬ УГЛЕВОДНЫХ ГРУПП В ИММУНОГЛОБУЛИНАХ М

III. ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ОТЩЕПЛЕНИЕ УГЛЕВОДНЫХ ГРУПП
ОТ ИММУНОГЛОБУЛИНА М*Каверзнева Е. Д., Вижа Г. В., Ланук В. А.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Проведено ферментативное отщепление части углеводных групп от иммуноглобулина М (IgM_{Б.л}) (болезнь Вальденштрема) при помощи смеси гликозидаз из эпидидимиса хряка. Показано, что действие гликозидаз при pH 5 затруднено и может быть значительно повышено путем смещения pH до 6,3—6,4.

Назначение углеводных групп в биологических функциях больших пентамерных молекул иммуноглобулинов М до сих пор не установлено. В поисках путей для выяснения этого вопроса в настоящей работе проведено ферментативное отщепление части углеводных групп от препарата IgM_{Б.л} (болезнь Вальденштрема), описанного в предыдущем сообщении [1] и отличающегося наличием углеводных групп не только в тяжелых, но и в легких цепях.

Известно, что для отщепления углеводных остатков от олигосахаридных группировок на поверхности макромолекул IgM необходим целый набор гликозидаз. Предполагается, что по мере отщепления концевых остатков, которыми в данном случае являются нейраминная кислота, N-ацетилглюкозамин и галактоза [2], открывается доступ к более глубоко находящимся следующим звеньям углеводной цепи, в том числе к маннозе. Поэтому Миллер, исследовавший этот вопрос [3], проводил отщепление при помощи последовательно, или одновременно, вводимых в раствор IgM гликозидаз, соответствующих определенной стадии расщепления. Гидролиз проводили при 37° и pH 5,0—5,1, что близко к оптимуму действия этих гликозидаз. Максимальное количество отщепленных углеводных остатков составило в этих опытах 50% за 50 сут действия ферментов.

При проведении ферментализа в сходных условиях смесью гликозидаз эпидидимиса хряка или с добавками отдельных очищенных ферментов (табл. 1) мы также не смогли добиться более интенсивного гидролиза. Только при введении очень большого количества ферментов (см. табл. 1, опыт 5) за 21 сут при pH 5,0 и 39° было достигнуто отщепление примерно половины всех углеводных остатков. Очевидно, доступность углеводных остатков действию гликозидаз в этих условиях очень невелика.

Миллер в своей работе для получения более глубокого отщепления углеводных цепей использовал гидролиз отдельных гликопептидов, выделенных из IgM после протеолитического гидролиза [3].

Ферментативное отщепление углеводов от IgM_{Ел} в разных условиях

Номер опыта	рН	Время, сут	t, °С	Состав ферментного препарата, ед-акт/г IgM _{Ел}				Отщепление нейтральных моносахаридов, %
				β-N-Ас-D-глюкозаминидаза	β-D-галактозидаза	α-D-маннозидаза	α-L-фукозидаза	
1	5,3	15	37	700	0,7	2	2	14
2	5,1	15	37	700	0,7	2	2	15
3	4,5	18	37	700	0,7	2	2	16,3
4	5,0	14	39	3 900	4	16	19	20
5	5,0	21	39	26 000	56	116	118	51,5
6	6,35	3	39	18 000	9	26	43	21
7	6,35	6	39	18 000	9	26	43	30
8	6,38	8	39	18 000	9	26	43	26
9	6,38	8	39	18 000	9	26	43	42
10	6,38	8	39	18 000	9	26	43	28

Таблица 2

Снижение содержания углеводов в IgM_{Ел} при его ферментативном гидролизе, данные в процентах
Условия см. табл. 1, опыт 5

Углеводы	IgM _{Ел}		
	нативный	после гидролиза в течение	
		15 сут	21 сут
Нейтральные моносахариды			
содержание	6,0	4,8	2,92
отщепление	—	20	51,5
Аминосахара			
содержание	4,0	2,56	1,24
отщепление	—	36	63
Нейраминовая кислота			
содержание	0,95	0,37	0,3
отщепление	—	57	65

Мы для повышения действенности применили другой прием. Исследования гидратации сухих препаратов IgM, проведенные в нашей лаборатории [4], показали, что препарат IgM_{Ел}, высушенный в виде хлоргидрата, удерживает меньше воды на своей поверхности, чем препарат, высушенный из раствора с рН выше его изоэлектрической точки (ИЭТ для IgM_{Ел} = 5,5). Это явление могло вызываться локальными конформационными изменениями молекулы, при которых в кислой среде часть полярных группировок становится недоступной для гидратации. Можно было предположить, что такие изменения могут влиять на положение углеводных групп в молекуле IgM и что в среде с рН выше изоэлектрической точки белка доступность их действию гидролаз увеличится.

Опытная проверка полностью подтвердила эти предположения. Как видно из рис. 1, отщепление углеводных групп при рН 6,3 происходит значительно интенсивнее, чем при рН 5, хотя такие условия не соответствуют оптимуму действия гликозидаз. Если при рН 5,1 отщепление нейтральных углеводов от IgM_{Ел} составляло за 14—18 сут 14—16%, то при рН 6,3 оно составило уже за 8 сут 30—40% (табл. 1).

В низкомолекулярных продуктах гидролиза в первую очередь появляются нейраминовая кислота, галактоза и фукоза. При глубоком распаде по

Рис. 1. Отщепление углеводов от $IgM_{EЛ}$ в разных условиях (номера столбиков соответствуют номерам опытов в табл. 1)

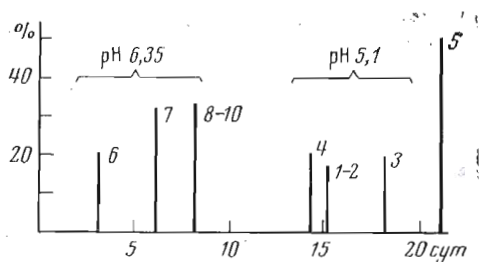


Рис. 1

Рис. 2. Гель-фильтрация $IgM_{EЛ}$ после обработки гликозидазами: I — ассоциаты, II — $IgM_{EЛ}$, III — ферменты; 1 — инкубация 8 сут при pH 6,38, $[IgM_{EЛ}]$ 0,8 мг/мл; 2 — 15 сут при pH 5,1, $[IgM_{EЛ}]$ 3 мг/мл; 3 — 33 сут при pH 4,55, $[IgM_{EЛ}]$ 0,72 мг/мл

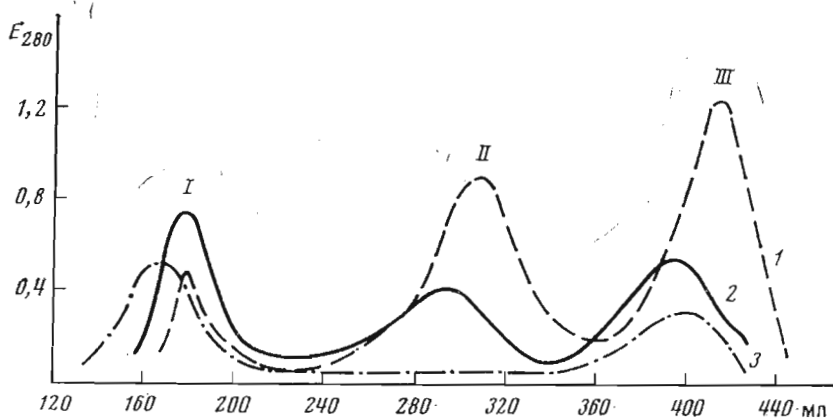


Рис. 2

данным анализа $IgM_{EЛ}$, обработанного гликозидазами ($IgM'_{EЛ}$), можно установить отщепление глюкозамина и маннозы (табл. 2).

Следует отметить, что в контрольных опытах, в которых раствор $IgM_{EЛ}$ выдерживали в тех же условиях, но без введения ферментов, также наблюдалось отщепление нейраминовой кислоты; очевидно, оно происходит за счет длительного пребывания IgM в слабокислой среде при повышенной температуре (37—39°). Кроме того, за время длительной тепловой обработки происходит образование высокомолекулярных ассоциатов, снижающих выход $IgM'_{EЛ}$. Такие ассоциаты образуются как из нативного белка в контрольных опытах без фермента, так в еще большей мере при инкубации с гликозидазами. Количество образовавшихся ассоциатов может зависеть от ряда причин, в том числе от концентрации IgM , от pH раствора, от времени нагревания и, вероятно, от хода отщепления углеводных групп (рис. 2). Несомненно, что очередной задачей при детальном выяснении функций углеводов в IgM является установление, какие из олигосахаридных цепей наиболее доступны по своему положению на поверхности молекулы и в каком порядке происходит их отщепление ферментами.

Экспериментальная часть

Препараты смесей гликозидаз были получены из экстракта эпидидимиса хряка осаждением сульфатом аммония при 30—60%-ном насыщении. После диализа и лиофилизации такие препараты содержали набор гликозидаз со следующими величинами удельной активности (ед. акт/мг препарата): N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза — 6—8; N-ацетил- β -D-галактозаминидаза — 0,014; α -L-фукозидаза 0,04—0,06, α -D-маннозидаза — 0,02—0,04 и β -D-галактозидаза — 0,007—0,014. Препараты не обнаруживали протеоли-

тического действия при рН 7,0 и 7,6 при определении на казеине по Ансону [5]. В некоторых случаях использовали частично очищенные препараты индивидуальных гликозидаз с повышенной активностью.

В качестве субстратов для определения активности гликозидаз брали нитрофенилгликозиды соответствующих моносахаридов. Активность определяли при 37° в фосфат-цитратном буфере при рН, соответствующем оптимальному действию каждой гликозидазы. К 0,4 мл раствора соответствующего гликозида (3 мМ) добавляли 0,1 мл раствора фермента, выдерживали 5 мин при 37°, прерывали реакцию добавлением 2,5 мл боратного буфера (рН 9,8) и проводили спектрофотометрирование отщепленного нитрофенола при 400 нм. Содержание белка определяли по Лоури [6]. За единицу ферментной активности принято количество фермента, которое расщепляет 1 мкмоль субстрата при 37° за 1 мин.

Ферментативную обработку IgM_{ЕЛ} проводили в 0,1 М ацетатном буфере (рН 5,0—5,1 и 6,3—6,4) при 37 и 39°. К раствору с концентрацией IgM_{ЕЛ} от 0,5 до 7,0 мг/мл добавляли препарат гликозидаз в разных количествах (при длительных опытах в несколько приемов) и термостатировали под толуолом. После окончания инкубации растворы диализовали против 0,01 М трис-буфера (рН 8,4) и проводили выделение IgM_{ЕЛ} на колонке с сефарозой 4В в условиях выделения исходного препарата IgM_{ЕЛ} из смеси глобулинов [1].

Методы определения углеводов приведены в работе [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Лапук В. А., Шмакова Ф. В., Каверзнева Е. Д. (1975) *Биоорг. химия*, **1**, 1134—1139.
2. Baenziger J., Kornfeld J. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 7270—7284.
3. Miller F. (1972) *Immunochemistry*, **9**, 217—228.
4. Хургин Ю. И., Шерман Ф. Б., Тусупкалеву У., Лапук В. А., Шмакова Ф. В., Климова В. А., Каверзнева Е. Д. (1975) *Биоорг. химия*, **1**, 1140—1146.
5. Anson (1929) *J. general Physiol.*, **22**, 79—83.
6. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.

Поступила в редакцию
6.I.1975

ROLE OF CARBOHYDRATE GROUPS IN IMMUNOGLOBULINS M. III. ENZYMATIC CLEAVAGE OF CARBOHYDRATE GROUPS IN IMMUNOGLOBULIN M.

KAVERZNEVA E. D., VIKHA G. V., LAPUK V. A.

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

Some of the carbohydrate groups in immunoglobulin M (IgM_{ЕЛ}, Waldenström disease) were removed on treatment with a mixture of glycosidases from boar epididimis. The glycosidase activity is very low at рН 5 but can be markedly enhanced by rising рН to 6.3.