



УДК 577.112.853.044

РОЛЬ УГЛЕВОДНЫХ ГРУПП В ИММУНОГЛОБУЛИНАХ М  
VII\*. ВЛИЯНИЕ КИСЛОТНОЙ ОБРАБОТКИ IgM НА ПОСЛЕДУЮЩЕЕ  
ДЕЙСТВИЕ НА НЕГО ГЛИКОЗИДАЗ И ЭНДОГЕННЫХ ПРОТЕИНАЗ

Чухрова А. И., Киверзнева Е. Д.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва

При выдерживании иммуноглобулина М (IgM<sub>сер</sub>) в кислой среде (рН 3; 30 мин, 20° С) происходит необратимое изменение состояния молекулы. Кислотообработанный IgM<sub>сер</sub> становится практически недоступным действию гликозидаз; в то же время повышается его доступность протеолизу сопутствующими протеиназами. Предполагается, что оба указанных эффекта — результат необратимой конформационной перестройки молекулы IgM в кислой среде.

Известно, что все пять олигосахаридных групп тяжелой цепи иммуноглобулина М (IgM) доступны действию гликозидаз [2]. Имеются также указания на то, что чувствительность молекулы IgM к действию ферментов изменяется при понижении рН среды: снижается степень расщепления гликозидазами [3, 4] и повышается чувствительность к трипсину [5]. Ранее нами было высказано предположение о том, что в кислой среде происходит выход Fab-фрагментов молекулы IgM из плоскости ее центрального диска, что вызывает экранирование углеводных групп [6]. Интересно, что сходная конформационная перестройка имеет место при фиксации иммуноглобулина М на бактериальной клетке [7].

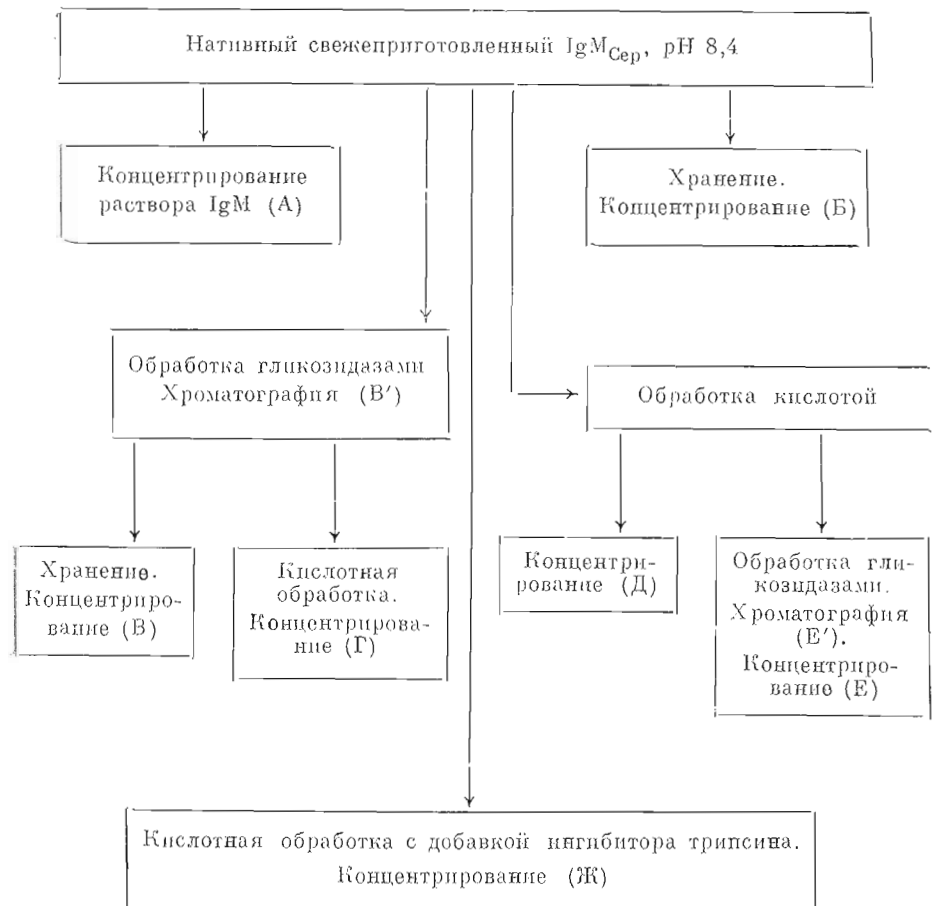
В настоящей работе с целью более полного выяснения характера изменений, вызываемых в молекуле IgM кислотной обработкой, проведено сравнительное изучение действия гликозидаз и протеиназ на нативный и кислотообработанный IgM (схема). Кислотную обработку осуществляли выдерживанием раствора IgM<sub>сер</sub> при рН 3 в течение 30 мин при 20° С.

В качестве дегликозилирующего препарата использовали смесь гликозидаз из моллюсков *Limnaea stagnalis*. Этот ферментный препарат содержит набор гликозидаз различной специфичности и характеризуется высокой дегликозилирующей активностью, что было изучено нами ранее [8]. Отсутствие протеолитической активности в нем было специально проверено по гемоглобину при рН 6,0 и по казеину при рН 8,2 по методу Ансона [9].

Из таблицы видно, что если свежеприготовленный IgM при обработке препаратом гликозидаз теряет ~50% нейтральных сахаров, то кислотообработанный становится почти недоступным действию этих ферментов. Эти результаты полностью согласуются с установленным нами [10] для кислотообработанного препарата IgM<sub>сер</sub> снижением величины эффективного монослоя воды, который соответствует числу первичных центров гидратации на поверхности его молекулы. Общее количество полярных групп, принадлежащих в IgM<sub>сер</sub> углеводным остаткам, составляет 1,85 м·экв/г белка. После перехода в кислую среду величина эффективного монослоя воды на поверхности молекулы снижается с 6,13 до 4,48 м·экв/г, т. е. на величину, близкую количеству углеводных полярных групп в исходном препарате. Таким образом, оба эти результата — недоступность кислотообработанного препарата действию гликозидаз и снижение в нем степени гидратации — говорят об экранировании углеводов при кислотной обработке IgM.

\* Сообщение VII см. [1].

Схема получения различных препаратов IgM (препараты А — Ж)



Известно, что в препаратах иммуноглобулинов даже после их повторной очистки присутствуют эндогенные протеиназы [11, 12], что приводит к частичному протеолизу белка при его длительном хранении в нейтральной среде. В данной работе часть препаратов специально выдерживали 1,5 мес в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 8,4) под толуолом при 8–10° С (схема) и сравнивали поведение различным образом обработанных препаратов IgM<sub>Сер</sub> при гель-фильтрации на сефарозе 6В (рис. 1).

Из рис. 1 следует, что если свежеприготовленный препарат IgM<sub>Сер</sub> (А) элюируется в виде одного четкого пика, соответствующего интактному белку, то в аналогичном препарате после длительного хранения об-

Содержание нейтральных углеводов в препаратах IgM<sub>Сер</sub> после различных обработок

Препарат IgM <sub>Сер</sub> *	Тип обработки	Содержание нейтральных углеводов, %	Отщепление нейтральных углеводов по отношению к контролю, %
Свежеприготовленный (контроль)	—	5,34±0,06	—
В'	Гликозидазы	2,60	51,3
В	Гликозидазы, хранение, концентрирование	2,60	51,3
Е'	Кислотная обработка гликозидазы	5,02±0,07	6,0

\* См. схему.

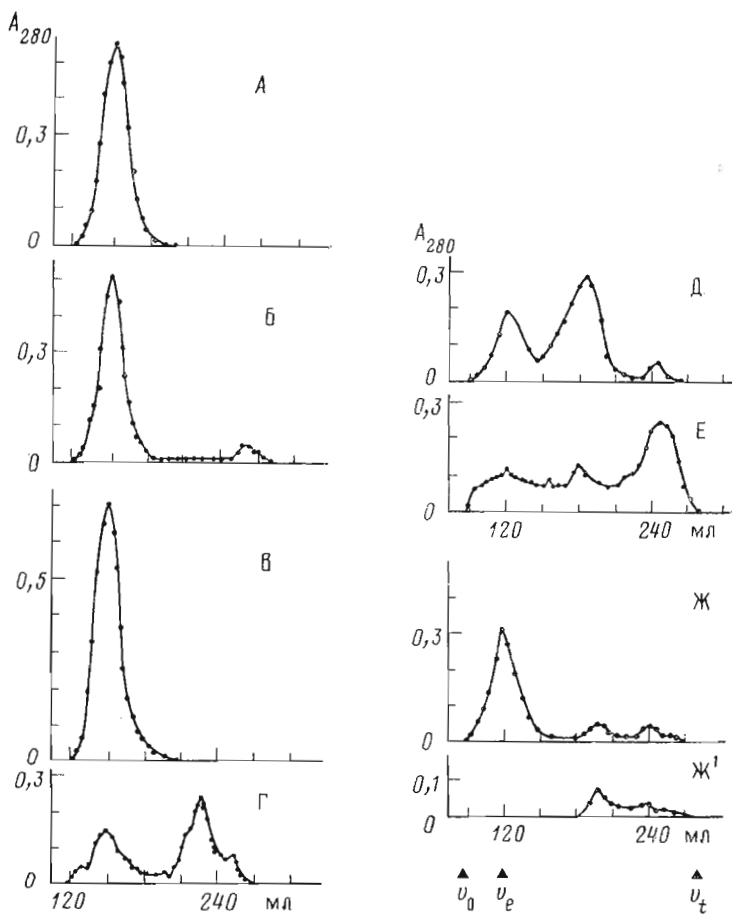
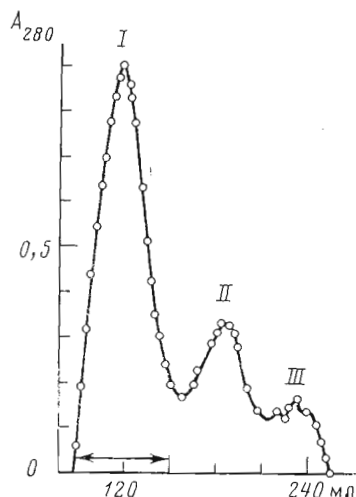


Рис. 1. Хроматография на колошке (2×90 см) с сефарозой 6В в 0,05 М трис-НСI-буфере, рН 8,4, нативного свежеприготовленного IgM<sub>сер</sub> (А), а также его препаратов после различной обработки (см. схему): Б, В, Г, Д, Е, Ж, Ж' — ингибитор трипсина

наруживается немного низкомолекулярных продуктов распада (Б). Препарат, обработанный гликозидазами и хранившийся в аналогичных условиях (В), не содержит примесей продуктов разложения, что согласуется с полученными ранее данными о протеолитической устойчивости значительно дегликозилированного IgM<sub>сер</sub> [5].

Выдерживание IgM<sub>сер</sub> в кислой среде, как и было установлено ранее [5], повышает чувствительность к действию протеиназ: кислотообработанный препарат подвергается протеолизу уже в мягких условиях концентрирования раствора (препарат Д). Дегликозилированный после кислотной обработки IgM<sub>сер</sub> (препарат Е) по своей чувствительности к эндогенным протеиназам сходен с препаратом Д. При обратной последовательности обработок (сперва дегликозилирование, а затем кислотная обработка — препарат Г), несмотря на доказанное блокирование протеиназолабильных связей при отщеплении углеводов, кислотная обработка такого препарата и последующее концентрирование его приводят к значительному протеолитическому распаду. Таким образом, кислотообработанные препараты (Г, Д, Е) при хроматографии независимо от проведения дополнительных обработок всегда дают сложный хроматографический профиль, свидетельствующий о фрагментации молекулы. Такому расщеплению способствует одновременное действие двух факторов: конформационная перестройка молекулы IgM в кислой среде и длительное концентрирование препарата (16–20 ч в вакууме при 20° С). Следует еще раз подчеркнуть, что аналогичное концентрирование нативного IgM<sub>сер</sub> не приводит к появлению низкомолекулярных продуктов (препарат В). С дру-

Рис. 2. Очистка  $IgM_{сер}$  после обработки гликозидазами гель-фильтрацией на колонке с сефарозой 6В в 0,05 М трис-буфере. I —  $IgM$  (препарат В'), II и III — гликозидазы и возможные продукты расщепления



гой стороны, препарат Ж, прошедший кислотную обработку в присутствии осевого ингибитора трипсина, также не дает продуктов распада.

Таким образом, кислая среда вызывает одновременно два различных эффекта: экранирование олигосахаридных группировок  $IgM_{сер}$  и экспонирование трипсиночувствительных связей в молекуле. Это координированное изменение состояния различных участков структуры белка в результате действия одного и того же фактора свидетельствует в пользу необратимого (по отношению к изменению рН) конформационного изменения молекулы  $IgM_{сер}$ . Следует отметить, что в отличие от поливалентной молекулы  $IgM$  изменения бивалентного  $IgG$  под влиянием кислоты и температуры в известных пределах обратимы [13].

### Экспериментальная часть

В работе был использован препарат человеческого иммуноглобулина М ( $IgM_{сер}$ ) (болезнь Вальденштрема), выделенный по ранее описанной методике [14], но без промежуточной лиофильной сушки глобулиновой фракции. Препарат был гомогенен при ультрацентрифугировании и по данным иммуноэлектрофореза с антисывороткой против цельной сыворотки человека. Для работы использовали свежеприготовленный препарат в 0,05 М трис-НСI-буфере, рН 8,4 (стандартный буфер). В отдельных опытах использовали препараты, хранившиеся в этом буфере в течение 1,5 мес при 8° С.

Препарат гликозидаз был получен из моллюсков *Limnaea stagnalis* по описанному ранее способу [15]. Протеолитическая активность в ферментном препарате отсутствовала.

**Кислотная обработка.** Препараты  $IgM_{сер}$  переводили из раствора в стандартном буфере в 0,001 л. НСI путем ультрафильтрации в ячейке Amicon (объем 100 мл, мембрана РМ-30), выдерживали 30 мин при достигнутом рН ~3,0, затем тем же способом заменяли НСI на исходный буфер рН 8,4. В ходе обработки концентрация белка не превышала 1 мг/мл. Ее определяли спектрофотометрически по удельному коэффициенту поглощения для  $IgM$  ( $E_{280}^{1\%} = 12$ ).

При приготовлении препарата Ж в исходный раствор  $IgM$  добавляли соевый ингибитор трипсина (Reanal, Венгрия) из расчета 0,21 мг/мг  $IgM_{сер}$ .

**Концентрирование препаратов  $IgM$**  в 0,05 М трис-НСI-буфере, рН 8,4, осуществляли в вакуум-эксикаторе в течение 16–20 ч при 20° С до концентрации белка 10 мг/мл.

**Обработка гликозидазами.** Препараты  $IgM_{сер}$  переводили в 0,1 н. натрий-ацетатный буфер, рН 6,0, при помощи ультрафильтрации через ячейку Amicon и устанавливали концентрацию белка в 2 мг/мл. К раствору

белка добавляли нужное количество препарата гликозидаз (активность его в опытах составляла в единицах активности на 100 мг IgM:  $\alpha$ -D-маннозидазная — 16,6,  $\beta$ -D-N-ацетилглюкозаминидазная — 23,3,  $\beta$ -D-галактозидазная — 3,33, нейраминидазная и фукозидазная активности — ~5) и выдерживали 10–14 сут при 37° С под толуолом. Затем препарат IgM переводили обратно в стандартный буфер, центрифугировали 15 мин со скоростью  $7,5 \cdot 10^3$  об/мин и подвергали хроматографированию для отделения ферментов (рис. 2).

*Хроматография на сефарозе 6В.* На колонку (2×90 см) с сефарозой 6В, уравновешенной стандартным буфером, наносили 10–15 мл раствора белка в том же буфере. Содержание белка в случае очистки от гликозидаз 20–30 мг (получение препаратов F' и B' — см. рис. 3) и 10–18 мг в случае хроматографического анализа получаемых препаратов. Контроль фракций спектрофотометрический ( $\lambda$  280 нм).

*Содержание нейтральных сахаров* определяли с фенол-серной кислотой согласно работе [16].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Каверзнева Е. Д., Шмакова Ф. В. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 8, с. 1254–1260.
2. Каверзнева Е. Д., Чухрова А. И., Виха Г. В. Биорган. химия, 1978, т. 4, № 3, с. 369–374.
3. Каверзнева Е. Д., Виха Г. В., Ланук В. А. Биорган. химия, 1975, т. 1, № 9, с. 1379–1382.
4. Хургин Ю. И., Шмакова Ф. В., Каюшина Р. Л., Дельбо А. Т., Рольбин Ю. А., Дамашун Г., Дамашун Х., Плигц П. Биорган. химия, 1980, т. 6, № 2, с. 300–302.
5. Шмакова Ф. В., Виха Г. В., Ланук В. А., Каверзнева Е. Д. Биорган. химия, 1977, т. 3, № 9, с. 1205–1209.
6. Каверзнева Е. Д. Докл. АН СССР, 1981, т. 260, № 1, с. 228–230.
7. Feinstein A., Minn E. A. Nature, 1969, v. 224, № 5226, p. 1307–1309.
8. Чухрова А. И., Каверзнева Е. Д. Тез. IV Всес. биохим. съезда. Л., 1979, т. 1, с. 102.
9. Anson M. L. J. General Physiol., 1929, v. 22, p. 79–89.
10. Хургин Ю. И., Шерман Ф. В., Тусупкалиев У., Ланук В. А., Шмакова Ф. В., Климова В. А., Каверзнева Е. Д. Биорган. химия, 1975, т. 1, № 3, с. 1140–1146.
11. Robert V., Vockman R. S. Biochem. J., 1967, v. 102, p. 554–563.
12. Виха Г. В., Филатова Т. Н., Каверзнева Е. Д. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 10, с. 1415–1417.
13. Троицкий Г. В., Завьялов В. П., Абрамов В. М., Тэтин С. Ю. Лейкоцитология. Рига, 1976, вып. 5, с. 35.
14. Ланук В. А., Шмакова Ф. В., Каверзнева Е. Д. Биорган. химия, 1975, т. 1, № 8, с. 1134–1139.
15. Чухрова А. И., Каверзнева Е. Д., Тютрина Г. В. Биохимия, 1970, т. 35, с. 95.
16. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Analyt. Chem., 1956, v. 28, № 3, p. 350–356.

Поступила в редакцию

26.III.1982

После доработки

10.X.1983

#### A ROLE OF IMMUNOGLOBULIN M CARBOHYDRATES. VIII. INFLUENCE OF ACIDIC TREATMENT OF IgM ON THE ACTION OF GLYCOSIDASES AND ON PROTEOLYSIS BY ENDOGENOUS PROTEINASES

TCHUKHROVA A. I., KARERZNEVA E. D.

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

Exposure of IgM to acidic medium (pH~3, 30 min, at 20°) and subsequent returning to neutral conditions leads to irreversible changes in the state of the molecule. This results in the loss of IgM accessibility for the action of glycosidases and, at the same time, makes it more susceptible to the action of proteinases. Both effects are thought to be due to an irreversible conformational rearrangement of IgM in acidic medium.