



УДК 547.963

## РОЛЬ УГЛЕВОДНЫХ ГРУПП В ИММУНОГЛОБУЛИНАХ М

IV. ВЛИЯНИЕ ОТЩЕПЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ НА ГИДРОЛИЗ  
ИММУНОГЛОБУЛИНА М ТРИПСИНОМ*Шмакова Ф. В., Вижа Г. В., Ланук В. А.,  
Каверзнева Е. Д.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва*

Изучен гидролиз трипсином при 38° иммуноглобулина М (IgM) человека после частичного отщепления углеводов. Показано, что отщепление 12—21% нейтральных сахаров вызывает ускорение гидролиза по сравнению с гидролизом исходного IgM, что может быть связано с частичным снятием стерических препятствий для действия трипсина. Дальнейшее отщепление сахаров (свыше 29%), наоборот, замедляет гидролиз вследствие возможного изменения пространственной структуры молекулы IgM при значительном отщеплении от нее углеводных групп. Углеводные группы, вероятно, играют важную роль в поддержании нативной пространственной структуры полипептидных цепей молекулы IgM. Предварительное выдерживание IgM при pH 3 приводит к необратимому изменению пространственной структуры и в результате к значительному ускорению гидролиза трипсином как исходного IgM, так и препаратов с отщепленными углеводными группами.

В предыдущих работах нами было показано, что отщепление углеводных групп от молекулы иммуноглобулина М (IgM) вызывает нарушение его способности к самосборке в пентамер из субъединиц [1]. Причиной такого нарушения могли быть изменения пространственной структуры молекулы; можно было также предполагать непосредственное участие углеводных групп в образовании водородных связей между субъединицами для правильной ориентации их в нужном для пентамеризации порядке.

Были также получены указания на конформационные изменения молекулы IgM под влиянием кислой среды. При исследовании гидратации сухого препарата IgM оказалось, что предварительная кислотная обработка вызывает уменьшение степени его гидратации. В количественном отношении это уменьшение коррелировало с числом полярных групп, входящих в состав углеводов IgM. Отсюда можно было заключить, что под влиянием кислой среды происходит экранирование этих групп [2]. В хорошем соответствии с таким предположением находится факт значительного ускорения отщепления углеводов от IgM под действием гликозидаз при повышении pH среды от 5,5 до 6,3, хотя оптимум pH этих ферментов лежит в пределах 5—5,5. Очевидно, что в слабокислой среде доступ ферментов к углеводным группам IgM затрудняется [3].

Перечисленные факты указывают на большую лабильность пространственной структуры молекулы IgM и на вероятное участие углеводных групп в ее поддержании.

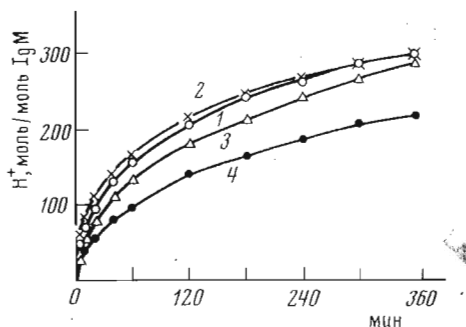


Рис. 1

Рис. 1. Влияние предварительной обработки IgM на скорость его гидролиза трипсином. 1 — нативный IgM; 2 — IgM, инкубированный 27 сут при pH 6,3 и 39°; 3 — IgM, инкубированный в условиях 2, но в присутствии пара-хлормеркурибензойной и  $\epsilon$ -аминокапроновой кислот и очищенный на сефарозе 4B; 4 — IgM, инкубированный в условиях 2 и очищенный на сефарозе 4B

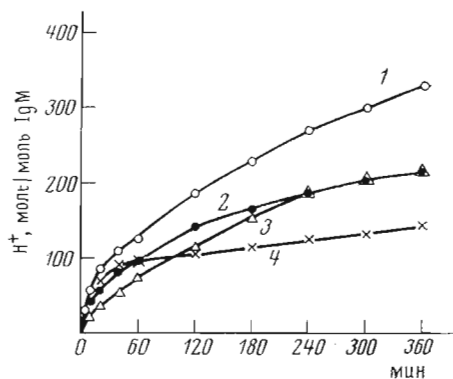


Рис. 2

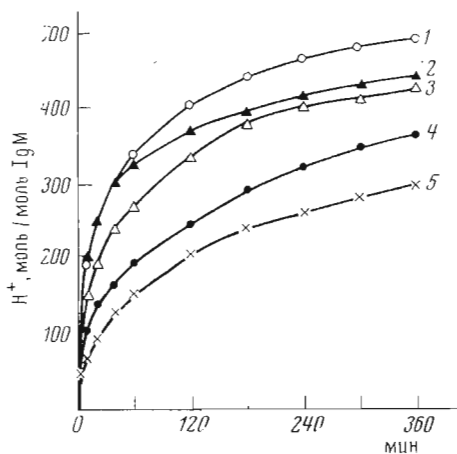
Рис. 2. Скорость гидролиза IgM трипсином при разной степени отщепления углеводов. 1 — 18—21% отщепления нейтральных сахаров; 2 — контроль: IgM, инкубированный 27 сут при pH 6,3 и 39° и очищенный на сефарозе 4B; 3 — 29% отщепления нейтральных сахаров; 4 — 41% отщепления нейтральных сахаров

Для проверки этих предположений был необходим метод, достаточно прямо детектирующий малые конформационные изменения в молекуле IgM. Одним из таких методов является исследование скорости гидролиза IgM трипсином. С этой целью нами был изучен гидролиз IgM трипсином после частичного отщепления от него углеводных групп. Так как мы имели указания на конформационные изменения IgM в кислой среде, все опыты были проведены как с препаратами IgM, выдержанными в нейтральной или слабощелочной среде (pH 8), так и с препаратами, подвергнутыми кислотной обработке (диализ против 0,001 M HCl).

Гидролиз трипсином проводили при 38° и pH 8. За скоростью гидролиза следили с помощью потенциометрического титрования раствором NaOH образующихся при гидролизе ионов  $H^+$ . Результаты представлены в виде графиков зависимости количества выделившихся ионов  $H^+$  от времени (в молях на 1 моль IgM).

Так как ферментативное отщепление углеводов от IgM требовало длительного (не менее 8 сут) выдерживания растворов IgM с гликозидазами при pH 6,3 и 39° и последующей очистки препаратов, необходимы были контрольные опыты с IgM в тех же условиях, но без введения гликозидаз. При этом было обнаружено, что в препаратах даже высокоочищенного IgM, вероятно, содержатся следы эндогенных протеаз, которые в длительных опытах могут вызывать гидролиз небольшого числа пептидных связей. Такие протеазы были ранее описаны другими авторами [4, 5]. Было обнаружено, что заметное влияние на последующий гидролиз трипсином оказывает очистка контрольных препаратов на сефарозе 4B, которую обычно проводили во всех опытах с гликозидазами. Без очистки контрольный препарат гидролизывался трипсином примерно так же, как и исходный белок (рис. 1, 1, 2), в то время как после очистки гидролиз происходил медленнее (рис. 1, 4). Такое явление удастся объяснить образованием некоторого количества пептидов за счет гидролиза IgM собственными протеазами; пептиды после очистки отделяются и уже не подвергаются действию трипсина. Не исключено также, что вследствие удаления пептидов могли произойти локальные конформационные изменения в оставшейся части молекулы IgM, в результате которых часть ранее доступных для трипсина связей оказалась закрытой.

Рис. 3. Скорость гидролиза IgM трипсином после предварительной кислотной обработки. 1 — нативный IgM; 2 — IgM после отщепления 12% нейтральных сахаров; 3 — IgM после отщепления 21% нейтральных сахаров; 4 — IgM, инкубированный 27 сут при pH 6,3 и 39° и очищенный диализом против 0,001 н. HCl; 5 — нативный IgM без кислотной обработки



Предположение о присутствии в препарате IgM следов протеаз было подтверждено проведением соответствующих контрольных опытов, в которых выдерживание IgM при 39° проводилось в присутствии ингибиторов предполагаемых протеаз —  $\epsilon$ -аминокапроновой и пара-хлормеркурибензойной кислот. После очистки на сефарозе 4В скорость гидролиза трипсином такого препарата лишь незначительно отличалась от скорости гидролиза нативного IgM (рис. 1, 3).

Учитывая эти факты, мы при изучении влияния отщепления углеводов на скорость триптического гидролиза IgM проводили сравнение не со скоростью гидролиза исходного IgM, а со скоростью гидролиза контрольного образца, выдержанного в соответствующих условиях, но в отсутствие гликозидаз и очищенного гель-фильтрацией.

Полученные результаты (рис. 2) показывают, что при сравнительно небольшом отщеплении углеводных групп (~20% от имеющихся нейтральных сахаров) скорость гидролиза IgM трипсином увеличивается. Глубина гидролиза IgM за 6 ч была в этом случае на 50% выше, чем в контрольном опыте (рис. 2, 1). Из работы по гидратации IgM [2] следует, что, по-видимому, все углеводные группы находятся на поверхности и доступны растворителю. Как было показано недавно рентгеноструктурными исследованиями иммуноглобулина G, имеющаяся в нем углеводная группа занимает фиксированное положение на поверхности домена  $C_{H2}$  [6]. Поэтому вполне вероятно, что при отщеплении небольшого количества углеводных остатков вскрываются некоторые новые, чувствительные к трипсину пептидные связи. Однако дальнейшее отщепление углеводов приводит к снижению скорости триптического гидролиза: при 29% отщепления наблюдается некоторая задержка распада и только к 6 ч реакция доходит до уровня распада в контрольном опыте за то же время. При 41% отщепления нейтральных сахаров наступает резкое изменение хода триптического гидролиза: после короткого интенсивного расщепления гидролиз резко замедляется и к 6 ч глубина его достигает лишь 68% от глубины гидролиза в контрольном опыте (рис. 2, 4).

Эти факты можно понять, допустив, что при отщеплении большого числа углеводов происходят конформационные изменения в молекуле IgM, затрудняющие действие трипсина. Отсюда можно заключить, что углеводные группы, лежащие на поверхности молекулы IgM, стабилизируют ее нативную конформацию, а их удаление вызывает перестройки этой конформации.

В следующей серии опытов раствор IgM перед гидролизом трипсином был диализован против 0,001 н. HCl до pH 3 и затем снова доведен до pH 8. Кривые гидролиза (рис. 3) свидетельствуют, что выдерживание при pH 3 приводило во всех случаях к увеличению скорости гидролиза IgM трип-

**Расщепление трипсином за 6 ч разных препаратов IgM  
после частичного удаления углеводов**

№ опытов	Препарат	Выделилось ионов Н <sup>+</sup> , моль/моль IgM (38° и рН 8)	% расщепления
1	Контроль: IgM, инкубирован 27 сут при рН 6,3 и 39°, очищен на сефарозе 4В	215	100 (условно)
2	IgM, отщепление 18–21% нейтральных сахаров	330	154
3	IgM, отщепление 29% нейтральных сахаров	215	100
4	IgM, отщепление 41% нейтральных сахаров	140	65
5	Нативный IgM без инкубации и очистки После кислотной обработки	295	137
6	Контроль	360	168
7	IgM, отщепление 12% нейтральных сахаров	440	204
8	IgM, отщепление 21% нейтральных сахаров	425	198
9	Нативный IgM (без инкубации и очистки)	495	232

сином по сравнению со скоростью гидролиза нативного IgM без кислотной обработки. Особенно заметно такое увеличение в течение 1-го ч, что указывает на появление под действием кислоты дополнительного числа легко доступных для трипсина связей. Эффект этот сохраняется независимо от того, был ли гидролиз трипсином проведен через 10–15 мин или через 4 сут после доведения рН раствора от 3 до 8. Полученный результат говорит о практически необратимом изменении пространственной структуры молекулы IgM под влиянием кислой среды.

Изучение кривых на рис. 3 показывает, что в контрольном опыте с IgM, инкубированным в условиях отщепления углеводов, но без добавления гликозидаз и очищенным диализом против 0,001 н. HCl, наблюдается по сравнению с нативным IgM заметное снижение скорости гидролиза (кривые 1 и 4); очевидно, и в этом случае сказывается действие собственных протеаз. На этом фоне остается заметным повышение скорости гидролиза после удаления небольшого числа углеводных остатков (12%) (кривая 2). Однако при дальнейшем их отщеплении (21%) скорость гидролиза уменьшается. Полученные данные суммированы в таблице.

Таким образом, после кислотной обработки во всех случаях увеличивается число легко доступных для трипсина пептидных связей и скорость гидролиза возрастает (рис. 3 и таблица). Что же касается влияния отщепления углеводов, то небольшое их отщепление (до 29%) сказывается одинаково как на нейтральных, так и на обработанных кислотой препаратах: оно приводит к увеличению скорости гидролиза. При большем отщеплении углеводов (20% и более) протеолиз для нейтральных препаратов сильно задерживается, и, очевидно, то же самое справедливо для препаратов после кислотной обработки. По крайней мере такая тенденция к снижению скорости гидролиза с увеличением отщепления углеводов намечается при сравнении опытов с 12 и 21% отщепления (таблица, опыты 7 и 8).

Полученные результаты приводят к выводу об изменении конформации молекулы IgM при отщеплении от нее более 29% углеводов и, следовательно, о роли углеводных групп в поддержании нативной структуры полипептидных цепей в молекуле IgM.

### Экспериментальная часть

IgM выделяли из сыворотки крови больного макроглобулинемией по методу, описанному ранее [7]; трипсин — из поджелудочной железы крупного рогатого скота [8].

*Отщепление углеводов.* К раствору IgM в 0,1 М Na-ацетатном буфере, рН 6,4–6,3, содержащему 0,8 мг/мл белка, добавляли в несколько прие-

мов препарат  $\beta$ -D-галактозидазы из печени крупного рогатого скота (0,1 ед.  $\beta$ -D-галактозидазы/мг IgM) и препарат гликозидаз из эпидидимисов хряка [3] в соотношении 0,1 ед.  $\alpha$ -L-фукозидазы и  $\alpha$ -D-маннозидазы и 6—20 ед. N-Ас- $\beta$ -D-глюкозаминидазы на 1 мг IgM. Смесь инкубировали при 39° под толуолом в течение 8—27 сут. После окончания инкубации раствор диализовали против 0,01 М Трис-НСI-буфера, рН 8, и выделяли IgM гель-хроматографией на колонке (2,2 × 120 см) с сефарозой 4В. Углеводы определяли ранее описанным методом [7].

Для выяснения влияния длительной инкубации на IgM были поставлены контрольные опыты:

1) раствор IgM в 0,1 М Na-ацетатном буфере, рН 6,3, инкубировали 24—27 сут при 39° под толуолом, но без добавления гликозидаз;

2) IgM инкубировали в условиях опыта 1, затем диализовали против 0,01 М фосфатного буфера, рН 8, и пропускали через колонку с сефарозой 4В или же сразу после инкубации диализовали против 0,001 н. НСI;

3) для подавления действия следов протеаз в препаратах IgM раствор IgM инкубировали в условиях опыта 1, но в присутствии 7 моль пара-хлор-меркурибензойной кислоты и 25 моль  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты на 1 моль IgM и затем пропускали через сефарозу 4В при рН 8.

Перед гидролизом трипсином все растворы IgM освобождали от буфера пропусканием через колонку с сефадексом G-25 в воде и концентрировали ультрафильтрацией до содержания белка ~ 0,5%. В опытах с кислотной обработкой раствор IgM после десоляции и концентрирования диализовали против 0,001 н. НСI до рН 3,0.

Гидролиз трипсином проводили в водном растворе при концентрации IgM 0,4—0,6% и отношении фермент — субстрат 1 : 25, при рН 6,0 и 38°, в течение 6 ч в атмосфере азота и в присутствии 0,005 М CaCl<sub>2</sub>. Постоянное значение рН поддерживали титрованием 0,01 н. раствором NaOH. Из расхода NaOH для поддержания постоянного значения рН рассчитывали количество освободившихся ионов H<sup>+</sup> (в молях на 1 моль IgM) в зависимости от времени гидролиза. Молекулярный вес IgM принимали равным 900 000

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kleine R., Shmakova F. V., Lapuk V. A., Vikha G. V., Kaverzneva E. D. (1975) *Immunochemistry*, 12, 825—831.
2. Хургян Ю. И., Шерман Ф. Б., Тусупкалиев У., Лапук В. А., Шмакова Ф. В., Клямова В. А., Каверзнева Е. Д. (1975) *Биоорган. химия*, 1, 1140—1145.
3. Каверзнева Е. Д., Виха Г. В., Лапук В. А. (1975) *Биоорган. химия*, 1, 1379—1382.
4. Robert V., Bockman R. S. (1967) *Biochem. J.*, 102, 554—563.
5. Някитина В. Д., Холчев Н. В., Колесникова Л. И., Кораблева З. И. (1975) *Ж. эпидемиол. и иммунобиол.*, № 1, 44—48.
6. Huber R., Deisenhofer J., Colman P. M., Matsushima M., Palm W. (1976) *Nature*, 264, 415—420.
7. Лапук В. А., Шмакова Ф. В., Каверзнева Е. Д. (1975) *Биоорган. химия*, 1, 1134—1139.
8. Каверзнева Е. Д., Шмакова Ф. В. (1966) *Биохимия*, 31, 380—386.

Поступила в редакцию  
26.1.1977

ROLE OF CARBOHYDRATE GROUPS IN IMMUNOGLOBULINS M.  
IV. THE EFFECT OF CLEAVAGE OF CARBOHYDRATES ON THE TRYPTIC  
HYDROLYSIS OF IMMUNOGLOBULIN M

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

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

The trypsin digestion was studied of the human immunoglobulin M (IgM) wherein the oligosaccharide chains have been partially removed. Splitting off 12-21% of neutral sugars was shown to elicit an increase in the hydrolysis rate, the fact being attributed to partial release of steric hindrances towards trypsin action. Conversely, further sugar cleavage (above 29%) results in diminishing the hydrolysis rate which might have been the consequence of a possible change in the IgM spatial structure occurring after considerable loss of carbohydrates. The carbohydrate groups were invoked in the stabilization of native arrangement of the IgM polypeptide chains. The preincubation at pH 3 gives rise to irreversible changes in spatial structure, thereby increasing the rate of trypsin-catalyzed hydrolysis either of native IgM or its preparations with partially removed carbohydrate groups.

---