



УДК 577.154.02

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОЛЮБИЛИЗИРОВАННЫХ ФОРМ
СИАЛИЛТРАНСФЕРАЗ ИЗ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС И ПЛАЗМАЦИТОМЫ
МЫШЕЙ МОРС-104Е

Анфимова М. Л., Габриэлян Н. Д., Хорлин А. Я.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва

Сравнительное изучение мембраносвязанных и солубилизованных сиалилтрансфераз из селезенки крыс и плазматомы мышей МОРС-104Е показало, что максимальной удельной активностью по отношению к высокомолекулярным акцепторам асиалоиммуноглобулину М и асиалофетуину обладают сиалилтрансферазы из плазматомы МОРС-104Е. Методом изоэлектрофокусирования в градиенте сахарозы впервые обнаружено присутствие в селезенке и плазматоме не менее восьми множественных форм фермента в широком интервале градиента рН. В малигнизированных клетках плазматомы по сравнению с селезенкой не обнаружено упрощения спектра форм.

Солубилизация мембраносвязанных сиалилтрансфераз, десалированных нейраминидазой (*Cl. perfringens*), приводит к упрощению спектра форм в области рН 3,0–4,5 и к специфической активации отдельных форм фермента. Формы сиалилтрансфераз с pI 5,2–5,4 из селезенки и с pI 8,4–8,6 из плазматомы МОРС-104Е обладают высокой удельной активностью по отношению к асиалоиммуноглобулину М и перспективны для салирования поверхности лимфоцитов.

В настоящее время широко исследуется участие сиаловых кислот в процессах адгезии, рецепции и маскировки антигенной специфичности клеток [1]. Роль сиаловых кислот в реализации функций клеток иммунной системы практически не изучена. Появились только первые работы, свидетельствующие об участии сиаловых кислот в поддержании оптимальной конформации растворимых иммуноглобулинов (Ig) при взаимодействии их с первым компонентом системы комплемента [1]. Недавно было показано также, что сиаловые кислоты входят в состав олигосахаридных цепей мембраносвязанных IgM, IgG, IgD, экспонированных на поверхности В-лимфоцитов [2–4]. В познании функций сиаловых кислот на поверхности лимфоцитов важную роль призваны сыграть методы избирательной модификации поверхности клеток, среди которых наиболее перспективны энзиматические методы направленного удаления и введения сиаловых кислот. Десалирование целых клеток является сейчас широко используемым методом воздействия на поверхность клеток. Ресалирование пока применялось мало, так как этот метод требует подбора высокоспецифических сиалилтрансфераз [5].

В задачу нашей работы входило изучение влияния салирования на функции Ig В-лимфоцитов. В связи с этим на первом этапе работы мы подбирали оптимальные условия ферментативного салирования IgM, основного поверхностного рецептора В-клеток, с помощью специфических сиалилтрансфераз (IgM предварительно десалировали). Для этого было

Таблица 1

Удельная активность мембраносвязанных и солюбилизованных сиалилтрансфераз по отношению к асиалофетину (1) и асиало-IgM (2) *

Источник фермента	Суммарная мембранная фракция		Солюбилизованная суммарная мембранная фракция	
	1	2	1	2
Печень крыс	0,24	0,16	0,83	0,31
Селезенка крыс	0,30	0,18	1,58	1,47
Плазмацитома МОРС-104Е	1,20	0,60	4,20	1,12

* Соотношение тритон — белок равно 1; удельную активность выражали в нМоль N-ацетилнейраминовой кислоты на 1 мг белка за 90 мин.

Таблица 2

Зависимость ферментативной активности солюбилизованных сиалилтрансфераз от соотношения тритон — белок

Источник фермента	Соотношение тритон — белок	Уд. акт., имп/мин·мг ⁻¹ белка по отношению к асиалоглико-протеинам	
		фетину	IgM
Селезенка	0,3	550	300
	1,0	1720	1300
	1,5	1040	730
МОРС-104Е	0,5	1000	300
	1,0	5000	2500
	1,75	3850	1270

необходимо исследовать свойства $\alpha 2 \rightarrow 6$ -сиалилтрансферазы (КФ 2.4.99.1), так как в состав IgM входят сиаловые кислоты, присоединенные $\alpha 2 \rightarrow 6$ -связью к остатку β -галактозы концевой последовательности N-гликозидной цепи [6].

Ранее нами было показано, что одним из богатых источников именно этого типа сиалилтрансфераз является печень крыс [7]. Однако сравнение величин удельной активности мембраносвязанных и солюбилизованных сиалилтрансфераз из печени и селезенки крыс, а также из плазмацитомы мышей МОРС-104Е * показал, что наиболее активными по отношению к асиало-IgM были солюбилизованные препараты фермента из селезенки крыс и плазмацитомы мышей МОРС-104Е (табл. 1), поэтому в дальнейшем мы использовали эти два источника. Так как ресиалирование Ig необходимо проводить с помощью высокоочищенных специфических сиалилтрансфераз, прежде всего были отработаны условия их солюбилизации и изучены их основные энзиматические свойства.

Солюбилизация сиалилтрансфераз. При выборе условий солюбилизации сиалилтрансфераз мы старались получить активные и специфичные по отношению к IgM препараты ферментов. При этом в полученных препаратах могло содержаться несколько сиалилтрансфераз, различающихся по акцепторной специфичности.

Для солюбилизации использовали неионный детергент тритон X-100. Первые же опыты показали, что солюбилизованные препараты сиалилтрансфераз обладают большей активностью, чем мембраносвязанные (табл. 1).

* Плазмацитома мышей МОРС-104Е — перевиваемая солидная опухоль, состоящая из плазматических клеток, продуцирующих IgM, была любезно предоставлена нам Б. Б. Фуксом (Институт морфологии человека АМН СССР).

Максимальную активность солиобилизованного препарата получали, когда соотношение концентрации тритона в экстрагирующем растворе к концентрации белка в мембранной фракции было равно 1 (табл. 2). Получив активные солиобилизованные препараты сиалилтрансфераз из обоих источников, исследовали зависимость реакции сиалирования от pH и температуры с двумя акцепторами: асиалофетуином и асиало-IgM. Кроме того, тестировали включение [¹⁴C]N-ацетилнейраминной кислоты в эндогенные гликопротеины, имеющиеся в ферментном препарате, т. е. определяли так называемую эндогенную активность. Результаты показывают (рис. 1), что солиобилизат суммарной мембранной фракции селезенки имеет два pH-оптимума сиалилтрансферазной активности в присутствии асиалофетуина: 7,5 и 8,5. По отношению к асиало-IgM активность имеет только один pH-оптимум — 8,0. Солиобилизованные препараты сиалилтрансферазы из плазматомы имеют разные pH-оптимумы сиалилтрансферазной активности по отношению к асиалофетуину и асиало-IgM: соответственно 7,5 и 8,0. Зависимости от температуры носили сложный характер и не совпадали для разных акцепторов (рис. 2). Полученные данные позволили предположить, что в детергентных экстрактах суммарных мембранных фракций обоих исследуемых источников имеется несколько активных сиалилтрансфераз, различающихся по способности сиалировать асиало-IgM и асиалофетуин.

Изоэлектрическое фокусирование солиобилизованных сиалилтрансфераз из селезенки и плазматомы МОРС-104Е. Для разделения предполагаемых различных сиалилтрансфераз из солиобилизованных препаратов селезенки крыс и плазматомы мышей МОРС-104Е мы использовали метод изоэлектрофокусирования в градиенте плотности сахарозы в интервале pH 3,5—10,0. Этот метод разделения белков ранее успешно применяли к растворимым гликозидазам и гликозилтрансферазам [8, 9]. Кроме того, этот метод был впервые нами применен к разделению солиобилизованных сиалилтрансфераз печени крыс [10]. Изоэлектрофокусирование проводили в течение 42 ч при 500—600 В. Собранные фракции характеризовали по трем параметрам: поглощению при 280 нм, pH и сиалилтрансферазной активности.

В наших условиях изоэлектрофокусирования основная часть белков сосредотачивалась в кислой области (pH 3—6), в нейтральной части градиента обнаруживали от 1 до 3 максимумов поглощения при 280 нм в зависимости от объекта, в щелочной области (pH 8—9,5) находилось не более двух четких максимумов поглощения, характерных для белка. Распределение белков воспроизводилось от опыта к опыту и не зависело ни от концентрации детергента, ни от количества наносимого белка. Для детергентного экстракта суммарной фракции мембран селезенки распределение белков после изоэлектрофокусирования было детально изучено двумя методами: по поглощению при 280 нм и по методу Лоури после предварительного удаления амфолинов длительным диализом. Оба метода дали хорошо совпадающую картину распределения белковых фракций.

Анализ сиалилтрансферазной активности показал присутствие в обоих исследованных нами источниках множественных форм сиалилтрансфераз, различающихся по величине *pI* (рис. 3). Профиль сиалилтрансферазной активности по отношению к обоим акцепторам был сложным и имел не менее 8—10 максимумов. В кислой области градиента (pH 3,5—6,0) сосредотачивались максимумы с низкой удельной активностью включения [¹⁴C]AcNeu в асиалогликопротеины, а в области градиента pH 6,0—9,5 сосредотачивались наиболее четкие и хорошо воспроизводимые максимумы активности с высокой удельной активностью включения меченой N-ацетилнейраминной кислоты в асиалогликопротеины. Распределение форм в этой области спектра хорошо совпадало для обоих исследованных нами источников.

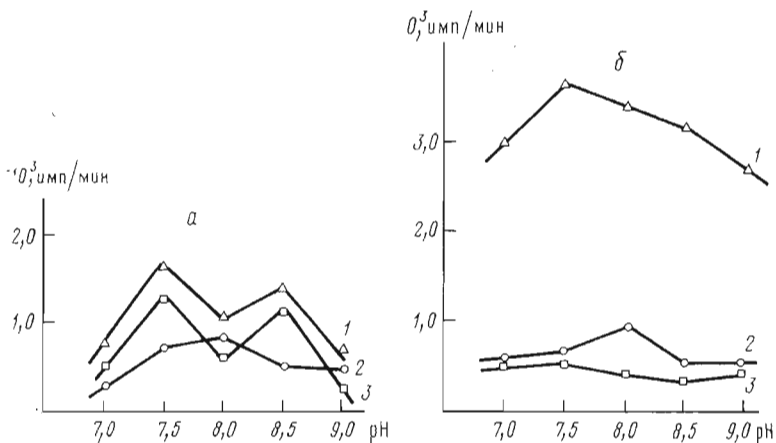


Рис. 1

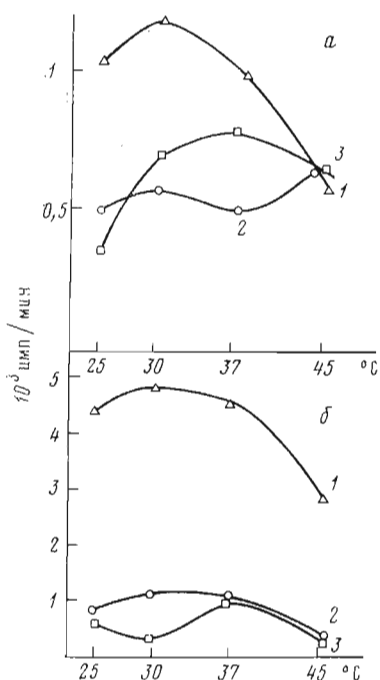


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость от рН сиалилтрансферазной активности солюбилизованных препаратов мембран: селезенки крыс (а) и плазмацитомы МОРС-104Е (б) по отношению к асиалофетуину (1), асиало-IgM (2); 3 — эндогенная активность

Рис. 2. Зависимость от температуры сиалилтрансферазной активности солюбилизованных препаратов мембран: селезенки крыс (а) и плазмацитомы МОРС-104Е (б) по отношению к асиалофетуину (1), асиало-IgM (2); 3 — эндогенная активность

Использование двух разных акцепторов (асиалофетуина и асиало-IgM) для определения сиалилтрансферазной активности фракций после изоэлектрофокусирования позволяет анализировать разницу в акцепторной специфичности множественных форм данного фермента. Различия в специфичности можно было ожидать, так как структура олигосахаридных цепей фетуина такова, что в их сиалировании могут участвовать по крайней мере 3 разных типа сиалилтрансфераз, различающихся по структурной направленности и акцепторной специфичности [5], а сиалирование IgM может осуществлять лишь один тип сиалилтрансфераз, как уже говорилось выше. Как видно из рис. 3, внутри одного источника, а именно селезенки, различия в составе форм, тестируемых по двум акцепторам, незначительны. Можно выделить лишь один самостоятельный максимум для асиалофетуина с рН 6,6—6,8 и один для асиало-IgM с рН 5,0—5,2.

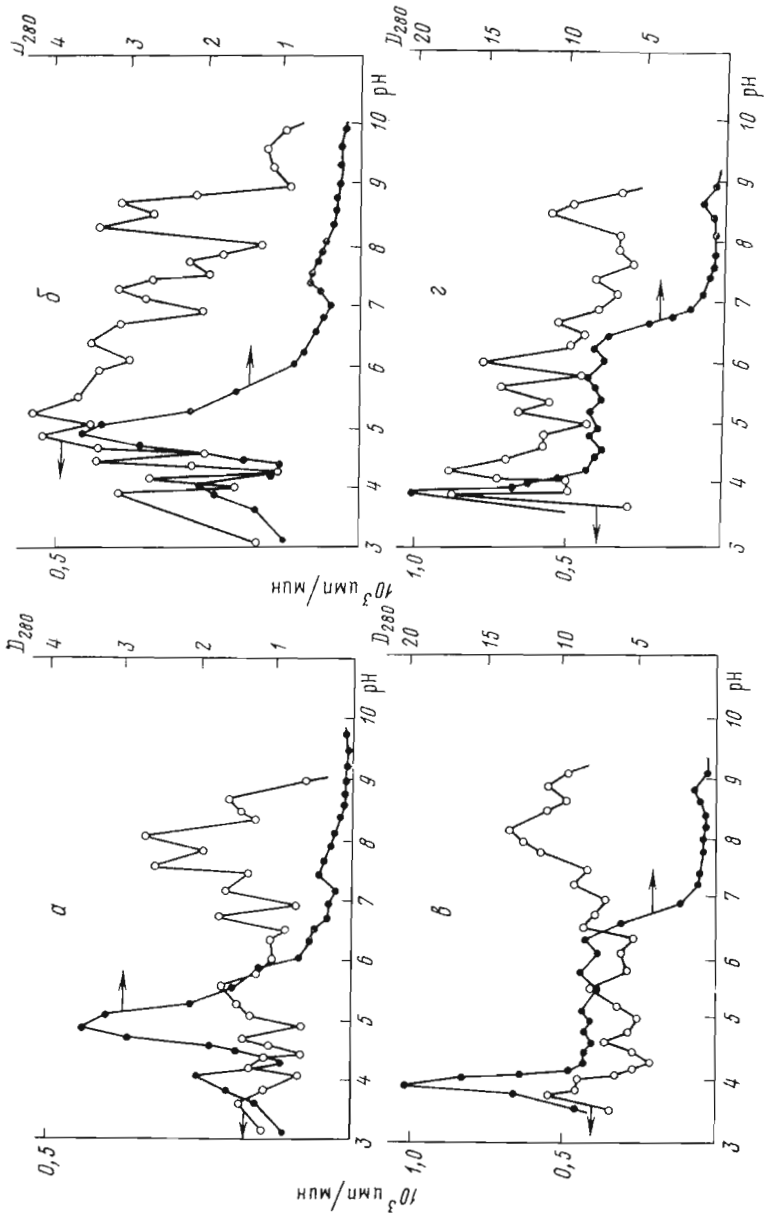


Рис. 3. Изоэлектрическое фокусирование солилизированных форм сialiлтрансфераз селезенки крыс (а, б) и плазмацитомы МОРС-104Е (в, г). Сialiлтрансферазную активность определяли по асиалофетину (а, в) и асиало-IgM (б, г)

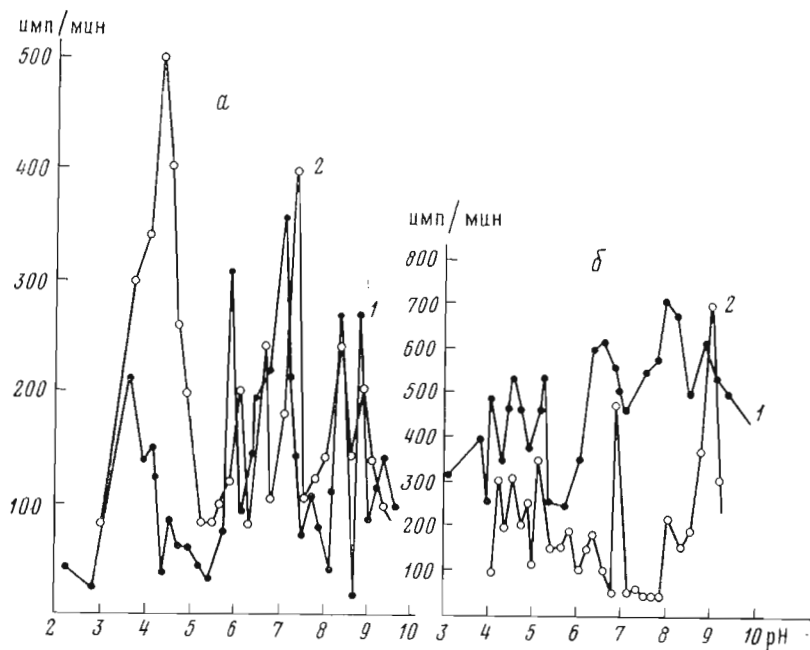


Рис. 4. Изоэлектрическое фокусирование солибиллизатов селезенки (а) и плазмацитомы МОРС-104Е (б). Эндогенная активность до (1) и после (2) обработки нейраминидазой

Таким образом, совпадение профилей активности по этим двум акцепторам скорее всего говорит о том, что разные по величине рI сialiлтрансферазы являются множественными формами одного и того же по структурной направленности фермента — β -галактозид- α 2 \rightarrow 6-сialiлтрансферазы. Разные величины удельной активности у одних и тех же форм по отношению к разным акцепторам в данном случае могут свидетельствовать о тонких различиях в акцепторной специфичности, которая определяется не только структурой терминального дисахаридного звена, но и всей олигосахаридной последовательностью, а возможно, и структурой пептидной цепи. Сравнение профилей сialiлтрансферазной активности для двух разных источников с разными акцепторами показывает, что число форм и их распределение по градиенту рН в основном совпадает. Однако для плазмацитомы характерно меньшее число совпадающих максимумов активности по двум разным экзогенным акцепторам. Изучение профиля эндогенной активности показало присутствие в детергентных экстрактах обоих источников эндогенных гликопротеинов-акцепторов, причем, хотя максимумы эндогенной активности перекрывались с максимумами экзогенной активности (см. рис. 3, 4) по отношению к асиалофетуину, уровень включения [14 C]N-ацетилнейраминаовой кислоты в эндогенные акцепторы был иногда выше, что свидетельствует о большем сродстве некоторых форм к собственным эндогенным акцепторам (рис. 4).

Таким образом, исследование детергентных экстрактов суммарной мембранной фракции селезенки и плазмацитомы МОРС-104Е методом изоэлектрофокусирования в градиенте сахарозы показал наличие в этих источниках множественных форм сialiлтрансфераз, различающихся по своей акцепторной специфичности. Никакого упрощения спектра форм в малигнизированной ткани лимфоидного происхождения — плазмацитоме МОРС-104Е не обнаружено.

Влияние десалирования мембранных фракций на свойства множественных форм сialiлтрансфераз. Известно, что сialiлтрансферазы являют-

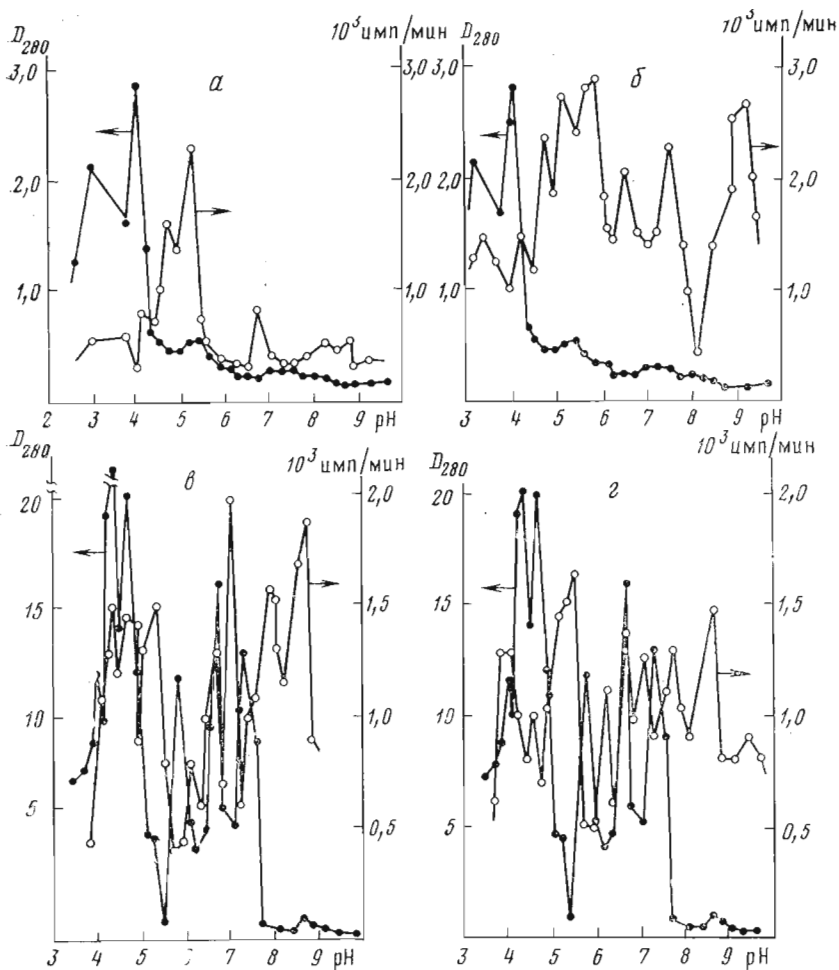


Рис. 5. Изоэлектрическое фокусирование солюбилизатов деспализированной мембранной фракции из селезенки крысы (а, б) и плазмацитомы МОРС-104Е (в, г). Сиалилтрансферазную активность определяли по асиалофетину (а, в) и асиало-IgM (б, г)

ся гликопротеинами, поэтому сложные спектры множественных форм сиалилтрансфераз могли объясняться микрогетерогенностью за счет разного содержания в них сialовых кислот. Кроме того, при выделении мог происходить частичный протеолиз присутствующими в гомогенате протеиназами. Для устранения этих причин гетерогенности состава множественных форм мы повторили выделение сиалилтрансфераз после обработки суммарной фракции нейраминидазой, в присутствии ингибитора протеиназ — фенилметилсульфонилфторида (см. «Экспериментальную часть»). Как видно из рис. 5, новые условия выделения существенно не изменили картину распределения белка и состава множественных форм сиалилтрансфераз. Однако обработка нейраминидазой значительно улучшила разделение белков детергентного экстракта и уменьшила число перекрывающихся пиков активности. Для множественных форм селезенки можно заметить некоторое упрощение варибельной части спектра. Существенно, что содержание сialовых кислот в мембранной фракции этого источника было несколько больше, чем в плазмацитоме МОРС-104Е, где упрощения этой области практически не наблюдалось.

Анализируя профили сиалилтрансферазной активности для двух акцепторов, можно заметить, что в детергентном экстракте обработанной

Изменение сиалилтрансферазной активности * солюбилизованных препаратов из селезенки крысы и плазмацитомы МОРС-104Е после обработки их нейраминидазой

Акцептор	Селезенка				Плазмацитома			
	pH	до обработки	pH	после обработки	pH	до обработки	pH	после обработки
Асиалофетуин	4,8	1100	4,8	15 220	4,7	170	4,6	18 100
	5,1	2000	5,2	19 520	5,5	300	5,5	16 000
	6,8	2160	6,8	14 420	6,6	1500	6,7	7400
	7,7	5000	7,8	5500	7,3	2800	7,3	11 500
	8,2	6300	8,2	8500	8,2	7200		
	8,7	4390	8,7	12 500	8,9		8,7	21 300
Асиало-IgM	4,8	1140	4,5	15 300	3,9	115	4,0	260
	5,2	1740	5,0	21 660	5,3	420	5,3	850
			5,6	23 550	6,1	900	6,1	500
	7,2	1770	7,3	30 000	6,8	2000	6,7	200
	8,7	3570	8,7	53 430	7,5	1630	7,8	3330
					8,5	5000	8,4	4300

* имц/мин·мг⁻¹ белка за 90 мин.

нейраминидазой мембранной фракции селезенки сохраняется характерный для асиалофетуина максимум активности с рI 6,8, а для асиало-IgM — максимум активности с рI 5,4—5,6.

Профили сиалилтрансферазной активности по отношению к разным акцепторам для плазмацитомы практически совпадают, за исключением небольшого смещения максимумов активности, тестируемой с асиало-IgM в нейтральной части спектра (рI 6,8—7,1).

Однако при сравнении состава форм сиалилтрансфераз для двух источников видно, что область градиента с рН от 6,0 до 9,0 значительно более гетерогенна для плазмацитомы.

Профили эндогенной сиалилтрансферазной активности до и после обработки нейраминидазой практически совпадали для обоих источников, причем деление эндогенных акцепторов тоже улучшалось (рис. 4).

Влияние обработки нейраминидазой на величины удельной активности сиалилтрансфераз. После обработки нейраминидазой изменялись также величины удельных активностей некоторых форм сиалилтрансфераз. Эффект активации зависел от природы используемого акцептора и от источника ферментов. Так, в селезенке крыс активируются все формы, тестируемые в присутствии асиало-IgM; при использовании асиалофетуина в качестве акцептора можно заметить активацию только кислых и нейтральных форм (табл. 3). Напротив, для плазмацитомы мы заметили активацию только в присутствии асиалофетуина. Активность форм фермента по отношению к асиало-IgM практически не увеличивается, а для формы в области рН 6,8—7,1 мы наблюдали ингибирование активности (табл. 3).

Кроме того, анализируя величины удельных активностей сиалилтрансфераз до и после обработки нейраминидазой, можно выделить формы, наиболее активные и специфичные по отношению к асиало-IgM. Среди форм, присутствующих в суммарной мембранной фракции селезенки крыс, обработанной нейраминидазой, можно отметить форму фермента с рI 5,2—5,5, а среди ферментов суммарной мембранной фракции плазмацитомы, обработанной нейраминидазой, — форму с рI 8,5. Эти сиалилтрансферазы представляются нам наиболее перспективными для сиалирования поверхности лимфоцитов.

Таким образом, нейраминидазная обработка мембранных фракций перед экстрагированием сиалилтрансфераз детергентом приводила, во-первых, к улучшению деления форм фермента в обоих источниках и, как следствие

этого, к уменьшению разницы в спектре при использовании двух разных акцепторов; во-вторых, к активации некоторых форм фермента из селезенки крыс и плазмацитомы мышей МОРС-104Е.

Тот факт, что обработка нейраминидазой по-разному влияет на разные формы фермента, активируя одни и ингибируя другие, еще раз подтверждает то, что изоэлектрофокусирование делит множественные формы сиалилтрансфераз, различающиеся по свойствам.

Возможно, что обнаруженный нами эффект активации некоторых форм сиалилтрансфераз после обработки нейраминидазой отражает существующее взаимодействие комплементарных ферментов — сиалилтрансфераз и сиалидаз и дает подход к изучению механизмов регуляции сиалилтрансферазных систем.

Экспериментальная часть

Субстраты. В качестве акцепторов для сиалилтрансферазной реакции использовали фетуин (Sigma, США) и IgM, полученный из сыворотки больного макроглобулинемией стандартным способом после 2-кратного осаждения 10% полиэтиленгликолем (M 3000) с последующей хроматографией на сефарозе 4В и сефадексе G-200 [12]. Гомогенность IgM контролировали с помощью иммунодиффузии в агаре и электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [13]. Донор остатка сиаловой кислоты — СМР-АсNeu получали из АсNeu (Koch-Light, Англия) и СТР (Koch-Light, Англия) с помощью синтетазы СМР-АсNeu (КФ 2.7.7.43) из печени лягушки разработанным ранее способом [7]. Полученный образец разбавляли высокоочищенным препаратом СМР- ^{14}C АсNeu (удельная радиоактивность 258 мКи/ммоль, Amersham, Англия) до удельной радиоактивности 1,5—2,0 мКи/ммоль. Белок определяли методом Лоури [14], количество белка в растворе в присутствии детергента — модифицированным методом Лоури [15]. Десиалирование фетуина и IgM проводили по стандартному методу [16].

Определение сиалилтрансферазной активности. При определении экзогенной активности по отношению к асиалофетуину и асиало-IgM в пробу объемом 200—300 мкл вносили 0,1 мкмоль СМР- ^{14}C АсNeu (100 000—300 000 имп/мин), 40—90 мкл 0,5 М трис-НСl-буфера, рН 7,5, акцептор в количестве 10—20 нмоль акцепторных сайтов, определенных по отщеплению АсNeu при кислотном гидролизе, и 100—200 мкл препарата фермента, содержащего не более 1 мг белка. В состав инкубационной смеси для определения эндогенной активности входили те же компоненты, но без акцептора. Контрольные пробы содержали препарат фермента, инактивированный нагреванием при 100° С в течение 5 мин. Если в качестве препарата фермента использовали суммарную мембранную фракцию, то в инкубационную смесь добавляли тритон X-100 до концентрации 0,25%. После инкубации (90 мин, 30° С) в пробы вносили равный объем 1% раствора фосфорновольфрамовой кислоты в 0,5 н. НСl и оставляли на 30 мин при 4° С. Затем осадок переносили на фильтр GF/C (Whatman, Англия) и промывали 10-кратным объемом раствора фосфорновольфрамовой кислоты. Фильтры подсушивали при 70° С и определяли радиоактивность в толуольном сцинтилляторе на счетчике SL-40.

Получение солюбилизированной формы сиалилтрансфераз. Для солюбилизирования использовали суммарную мембранную фракцию (СМФ), так как лимфоидные клетки имеют неразвитую систему внутренних мембран. СМФ получали центрифугированием безъядерного гомогената соответствующей ткани в буфере, содержащем 0,01 М трис-НСl (рН 7,1), 0,25 М сахарозу, 0,001 М ЕDТА, при 105 000 g в течение 1 ч. Солюбилизацию СМФ проводили в том же буфере, добавляя 10% раствор тритона X-100 с таким расчетом, чтобы соотношение тритон — белок было равно 1 (в отдельном опыте соотношение тритон — белок меняли от 0,3 до 1,75). Суспензию перемешивали 40 мин при 4° С, а затем центрифугировали 1 ч

при 120 000 g. Сулфернатант использовали для определения активности по отношению к экзогенным и эндогенным субстратам и для разделения методом изоэлектрофокусирования.

Изоэлектрофокусирование в градиенте плотности сахарозы. В аналитическом варианте разделения использовали колонку 8101 LKB (110 мл), на которую наносили от 30 до 20 мг белка экстракта. При изоэлектрофокусировании использовали 1% раствор амфолинов (LKB, Швеция) с интервалом pH 3,5—10 в градиенте плотности сахарозы 60—0%. Время фокусирования 40 ч при напряжении 600 В. Во фракциях определяли поглощение при 280 нм, pH и сиалилтрансферазную активность по отношению к эндо- и экзогенным субстратам.

Нами была определена концентрация тритона X-100 вдоль градиента после изоэлектрического фокусирования для исключения возможного неспецифического мицеллообразования. Оказалось, что низкая концентрация тритона во всех фракциях исключает эту возможность (максимальная концентрация 0,025%).

ЛИТЕРАТУРА

1. Winkelhake J. L. (1978) *Immunochemistry*, 15, 695—714.
2. Andersson J., Lafleur L., Melchers F. (1974) *Eur. J. Immunol.*, 4, 170—180.
3. Meschner M., Pollock R. (1979) *J. Immunol.*, 123, 1155—1161.
4. Gahnberg C., Häyry P., Andersson L. (1976) *J. Cell Biol.*, 68, 642—653.
5. Sadler E., Paulson J., Hill R. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 2112—2119.
6. Hickman S., Kornfeld R., Osterland K., Kornfeld S. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 2156—2163.
7. Лапина Е. Б., Дробинская Н. Д., Комалева Р. Л., Габриэлян Н. Д., Хорлин А. Я. (1975) *Биоорг. химия*, 1, 1169—1175.
8. Thorpe R., Robinson D. (1975) *FEBS Lett.*, 54, 89—92.
9. Gerber A., Kordruski I., Wyss S., Berger E. (1979) *Eur. J. Biochem.*, 93, 453—460.
10. Лапина Е. Б., Габриэлян Н. Д., Хорлин А. Я. (1979) *Биоорг. химия*, 5, 1720—1727.
11. Paulson J. C., Pricels J.-P., Glsco L., Hill R. L. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 5617—5625.
12. Putnam F. W., Kozuru M., Easley C. W. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 2435—2446.
13. Laemli U. K. (1970) *Nature*, 227, 680—687.
14. Lowry H. O., Rosenbrough N. I., Farr A. (1954) *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275.
15. Kusov Yu. Yu., Kalinchuk N. A. (1978) *Analyt. Biochem.*, 88, 256—262.
16. Patt L. H., Grimes W. J. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 4157—4165.

Поступила в редакцию
12.II.1980

A COMPARATIVE STUDY OF SOLUBILIZED FORMS OF SIALYLTRANSFERASES FROM RAT SPLEEN AND MOUSE PLASMACYTOMA MOPC-104E

ANFIMOVA M. L., GABRIELIAN N. D., KHORLIN A. Ya.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A comparison of membrane-bound and solubilized sialyltransferases from rat spleen and mouse plasmacytoma MOPS-104E revealed a higher activity of enzyme from the latter source towards high-molecular weight acceptors — asialo-immunoglobulin M and asialo-fetuin. By isoelectric focusing in a sucrose density gradient, the presence of at least 8 multiple enzyme forms within the pH range 3.5—10.0 was shown for the first time for sialyltransferases from both sources. No simplification of the spectrum was detected in malignant plasmacytoma cells in comparison with the spleen cells. Solubilization of membrane-bound sialyltransferases after desialylation with neuraminidase (*Cl. perfringens*) results in a simpler pattern of multiple forms at pH 3.0—4.5 and specific activation of some of them. The sialyltransferase forms of pI 5.2—5.4 and 8.4—8.6 from the spleen and plasmacytoma, respectively, manifest a high specific activity towards asialo-immunoglobulin M and seem promising for using in sialylation of the lymphocyte surface.