



УДК 577.152.321'136:577.336

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ  
ЛИЗОСОМНЫХ ГЛИКОЛИПИДГИДРОЛАЗ ЧЕЛОВЕКА  
С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ФЛУОРОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ

*Видершайн Г. Я., Козлова И. К., Ильина Г. С.,  
Михайлова М. А.*

*Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва*

Синтезирован ряд  $\beta$ -галакто- и  $\beta$ -глюкозидов на основе *o*-ациламино-4-метилумбеллиферона, различающихся длиной жирнокислотных остатков. Показано, что 6- и 8-гексадекааноиламино-4-метилумбеллиферил- $\beta$ -*D*-галактопиранозиды (6-НМGal и 8-НМGal) являются субстратами для галактоцереброзидазы человека. Аналоги 6-НМGal с более короткими ацильными остатками — октаноильным (ОМGal) и бутаноильным (ВМGal) — расщеплялись другим типом  $\beta$ -галактозидазы —  $G_{M1}$ -ганглиозид- $\beta$ -галактозидазой. Установлено, что переход от хромогенного синтетического  $\beta$ -глюкозида, 2-гексадекааноиламино-4-нитрофенил- $\beta$ -*D*-глюкопиранозид (НМGlc), к его флуорогенному аналогу (НМGlc) в значительной степени снижает скорость расщепления последнего под действием глюкоцереброзидазы человека и животных. ОМGlc также не имеет преимуществ перед НМGlc, хотя скорость его расщепления выше по сравнению с НМGlc.

Гликолипидгидролазы (КФ 3.2.1) относятся к лизосомным ферментам и осуществляют в норме последовательное расщепление углеводного компонента гликолипидов [1, 2]. Наследственная недостаточность одного из этих ферментов приводит к развитию гликолипидозов, являющихся наиболее многочисленной группой лизосомных болезней накопления человека [2–5].

Изучение субстратной специфичности гликолипидгидролаз по отношению к различным природным и синтетическим субстратам позволяет не только выяснять особенности каталитического действия этих ферментов, но и надежно проводить биохимическую диагностику наследственных гликолипидозов.

Целью настоящей работы было изучение субстратной специфичности трех гликолипидгидролаз: галактоцереброзидазы ( $\beta$ -*D*-галактозил-*N*-ацилсфингозингалактогидролаза, КФ 3.2.1.46),  $G_{M1}$ -ганглиозид- $\beta$ -галактозидазы (КФ 3.2.1.23) и глюкоцереброзидазы ( $\beta$ -*D*-глюкозил-*N*-ацилсфингозинглюкогидролаза, КФ 3.2.1.45). Недостаточность этих ферментов приводит к развитию гликолипидозов — соответственно болезни Краббе,  $G_{M1}$ -ганглиозидозу и болезни Гоше [2–7].

Природными субстратами для галактоцереброзидазы являются прежде всего галактоцереброзид, а также ряд галактолипидов: моногалактозилглицерол, галактосфингозин и лактозилцерамид [6]. Атакуемый ферментом галактозный остаток в перечисленных субстратах либо непосредственно соединяется с липидным компонентом, либо удален от него не более чем на одно моносахаридное звено (лактозилцерамид). Галактоцереброзидаза не отщепляет концевую галактозу от гликолипидов с более длинной углеводной цепью, а также от гликопротеидов и протеогликанов

Сокращения: ВМ, ОМ, НМ — бутаноиламино-, октаноиламино-, 6-гексадекааноиламино-4-метилумбеллифероны; MGal, VMGal, OMGal, HMGal, HNGal — 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -*D*-галактопиранозид, бутаноиламино-, октаноиламино-, гексадекааноиламино-4-метилумбеллиферил- и 2-гексадекааноиламино-4-нитрофенил- $\beta$ -*D*-галактопиранозиды; MGlc, OMGlc, HMGlc, HNGlc — 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -*D*-глюкопиранозид, октаноил-, гексадекааноиламино-4-метилумбеллиферил- и 2-гексадекааноиламино-4-нитрофенил- $\beta$ -*D*-глюкопиранозиды; TX-Na — таурохолат натрия; X-Na — холат натрия; DMSO — диметилсульфоксид.

[2, 3, 6, 8]. Эти соединения являются субстратами для  $G_{M1}$ -ганглиозид- $\beta$ -галактозидазы, недостаточность которой, как отмечалось выше, приводит к развитию  $G_{M1}$ -ганглиозидоза [2, 3, 9]. Как следует из недавних работ ряда авторов,  $G_{M1}$ -ганглиозид- $\beta$ -галактозидаза человека при определенных условиях способна отщеплять галактозу от галактоцереброзида и в гораздо меньшей степени — от галактозилсфингозина [10—12].

Основным природным субстратом для глюкоцереброзидазы является глюкоцереброзид, который в норме в небольших количествах содержится в селезенке и печени человека, а также образуется при ферментативном расщеплении ганглиозидов и других гликофинголипидов [4, 7]. Кроме глюкоцереброзида фермент способен расщеплять глюкозилсфингозин и стероид- $\beta$ -глюкозиды [13].

Введение радиоактивных меток в углеводную или липидную часть природных субстратов позволяет использовать их в различных методах определения активности обоих ферментов [4, 14]. В последние годы получили распространение и флуоресцентно меченные аналоги природных субстратов, которые дают возможность с высокой чувствительностью и специфичностью определять активность галакто- и глюкоцереброзидаз [15—17]. Однако выделение и модификация природных субстратов представляют собой, как известно, довольно сложный процесс, что ограничивает их применение для изучения гликолипидгидролаз в норме и при наследственной недостаточности. Использование же коммерческих MGal и MGlc имеет следующие ограничения. Определение активности галактоцереброзидазы с помощью MGal в различных тканях человека практически невозможно, так как этот субстрат гидролизует  $G_{M1}$ - $\beta$ -галактозидазой, активность которой в тканях пачного превышает активность галактоцереброзидазы [3, 8].

Глюкоцереброзидаза гидролизует MGlc, как и «нейтральная» форма фермента, активность которой не изменяется при болезни Гоше. Существует ряд приемов, позволяющих снижать активность нейтральной глюкозидазы. Однако даже в этих условиях применение MGlc не позволяет уверенно выявлять гетерозиготных носителей болезни Гоше и дает сравнительно высокие значения остаточной активности глюкоцереброзидазы у гомозиготных носителей заболевания [18].

Описанные в литературе хромогенные синтетические субстраты липидной природы — HNGal [19] и HNGlc [20] — не давали возможности чувствительного и специфического определения активности соответствующих ферментов [21, 22].

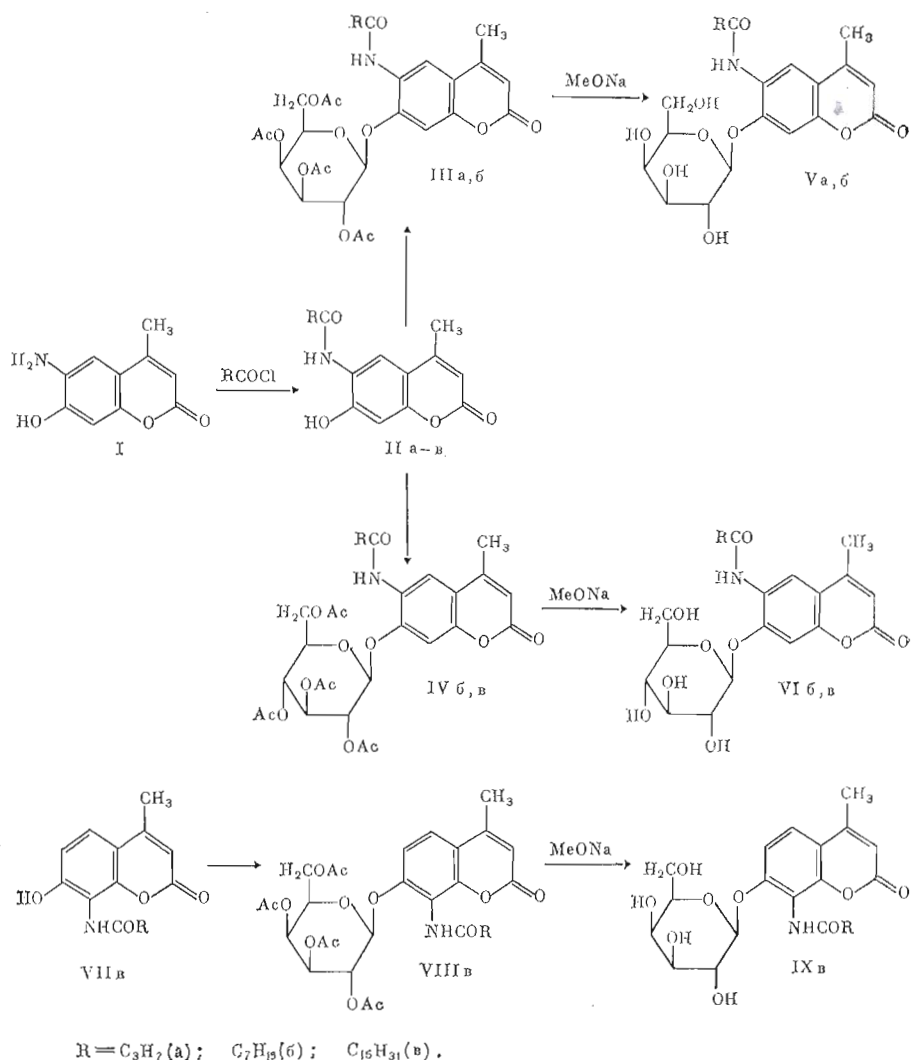
В настоящей работе ставилась задача синтезировать флуорогенные субстраты для галакто- и глюкоцереброзидаз на основе *o*-ациламинопроизводных 4-метилумбеллиферона и выяснить значение длины и положения ациламидного остатка в субстрате на каталитическое действие исследованных ферментов. Предварительное сообщение о синтезе 6-НMGal и его расщеплении галактоцереброзидазой человека опубликовано нами ранее [23].

*Гликозиды o-ациламино-4-метилумбеллиферона.* Для синтеза аналогов 6-НMGal (Vb) с короткими кислотными остатками были получены соответствующие агликоны — 6-бутаоиламино- (BM, IIa) и 6-октаоиламино-4-метилумбеллиферон (OM, IIб) ацилированием 6-амино-4-метилумбеллиферона (I) [24] хлорангидридом масляной или каприловой кислоты в пиридине [25].

Необходимые для исследования 1,2-*транс*-гликозиды — BMGal (Va), OMGal (Vб), HMGlc (VIв) и OMGlc (VIб) (схема) — получены гликозилированием соответствующих агликонов по методу Кенигса — Кнорра в условиях, описанных ранее для синтеза 6- и 8-НMGal (Vв и VIIв) [26].

Строение впервые полученных 6-ациламинопроизводных 4-метилумбеллиферона и гликозидов на их основе подтверждено данными элементного анализа и  $^1H$ -ЯМР-спектроскопии. Конфигурацию 1,2-*транс*-гликозидной связи подтверждает присутствие в спектрах  $^1H$ -ЯМР гликозидов дублета при 4,8—4,9 м. д. ( $J_{1,2}$  8,0—8,3 Гц).

В табл. 1 приведены данные УФ-спектров и спектров флуоресценции



синтезированных гликозидов, а также агликонов при pH 7,0 (нейтральная форма) и 10,5 (анионная форма).

Характер флуоресценции агликонов VM и OM (IIa и б) аналогичен описанному ранее для 6-НМ (IIв) [25]. Флуоресценция усиливается при подщелачивании растворов и достигает максимума при pH 10,5, т. е. при переходе из неионизированного состояния в анионную форму. При этом наблюдается сдвиг максимумов возбуждения и испускания флуоресценции в длинноволновую область. Добавление щелочи в количестве большем, чем эквимольное, приводит к исчезновению флуоресценции, связанному, по-видимому, с расщеплением пирронового цикла, который замыкается вновь при подкислении раствора [25].

Квантовые выходы флуоресценции β-гликозидов практически равны квантовым выходам исходных агликонов при pH 7,0 и составляют 0,27—0,35. Для 8-замещенных (8-НМ, VIIв и 8-НМGal, VIIIв) квантовый выход существенно ниже:  $(2,0-4,6) \cdot 10^{-3}$  [26].

Определение ферментативной активности с помощью синтезированных субстратов такого типа не требует разделения продуктов реакции и исходных субстратов и этим выгодно отличается от методов с использованием флуоресцентно меченных или радиоактивных соединений, включающих разделение компонентов реакционной смеси.

*Специфичность галактоцереброзидазы и  $G_{M1}$ -β-галактозидазы.* Как показали наши опыты, все синтезированные галактозиды расщепляются

Константы *o*-ациламинопроизводных 4-метилумбеллиферона (IIa–в), (VIIв) и гликозидов (Va–в), (VIб, в) и (VIIIв)

Соединение	Т. пл., °С *	$R_f$ (система)	Спектр УФ, $\lambda_{\max}$ , нм (ε) при		Спектр флуоресценции **, нм			
					рН 7,0		рН 10,5	
			рН 7,0	рН 10,5	$\lambda_{\text{возб}}$	$\lambda_{\text{исп}}$	$\lambda_{\text{возб}}$	$\lambda_{\text{исп}}$
IIa	235–236	0,4 (А)	341 (11900)	385 (23900)	342	420	380	456
IIб	182–184	0,55 (А)	340 (14700)	385 (31800)	342	420	380	456
IIв <sup>3*</sup>	191–194	0,65 (А)	340 (14700)	385 (30000)	342	415	382	450
VIIв <sup>3*</sup>	135–136	0,90 (А)	320 (8000)	369 (19800)	330	430	370	480
Va	252–254	0,17 (Б)	338 (11800)		338	420		
Vб	228–229	0,36 (Б)	338 (12100)		338	420		
Vв <sup>4*</sup>	205–206	0,24 (В)	320 (11200)		312	413		
VIб	223–225	0,39 (Б)	338 (12200)		338	420		
VIV	202–204	0,53 (Б)	338 (11200)		336	420		
VIIIв <sup>4*</sup>	186–187	0,30 (Г)	319 (13300)		320	430		

\* Перекристаллизованы из спирта.

\*\* Спектры не скорректированы.  $\lambda_{\text{возб}}$  и  $\lambda_{\text{исп}}$  — длины волн максимумов возбуждения и испускания флуоресценции.\*<sup>3</sup> Данные из работы [25].\*<sup>4</sup> Данные из работы [26].

ферментными препаратами из различных органов и тканей человека. Расщепление субстратов было прямо пропорционально времени инкубации и количеству белка в пробах (рис. 1а, б).

Исследуя специфичность галактоцереброзидазы и  $G_{M1}$ - $\beta$ -галактозидазы, мы исходили из того, что известные типы гликолипидозов являются моногенными заболеваниями и развиваются при наследственной недостаточности только одного из ферментов или его активатора [2, 3]. Поэтому получение данных о ферментной недостаточности при использовании того или иного из исследуемых субстратов в препаратах с идентифицированной патологией позволяет достаточно надежно судить об особенностях субстратной специфичности гликолипидгидролаз без их предварительного выделения в очищенном состоянии.

Результаты по расщеплению синтезированных галактозидов ферментными препаратами из органов и клеток здоровых людей и пациентов с различными типами гликолипидозов представлены в табл. 2. 6-НМGal расщеплялся препаратами от здоровых людей и примерно в такой же степени препаратами от больных с  $G_{M1}$ -ганглиозидозом, при котором, как уже отмечалось выше, имеется недостаточность  $G_{M1}$ - $\beta$ -галактозидазы. Напротив, расщепление субстратов с более короткими алкильными цепями — OМGal и ВМGal, так же как и МGal, резко снижалось при  $G_{M1}$ -ганглиозидозе. При болезни Краббе (недостаточность галактоцереброзидазы) в фибробластах, лейкоцитах и органах больных в значительной степени снижалась  $\beta$ -галактозидазная активность по 6-НМGal, а расщепление OМGal и ВМGal было в пределах нормы.

Полученные данные показывают, что 6-НМGal является субстратом для галактоцереброзидазы, а его аналоги — OМGal и ВМGal — субстраты для  $G_{M1}$ - $\beta$ -галактозидазы.

Таким образом, длина жирнокислотного остатка в субстрате имеет существенное значение для действия различных типов  $\beta$ -галактозидаз. При наличии в остатке кислоты 16 углеродных атомов (НМGal) галактоза отщепляется галактоцереброзидазой.  $G_{M1}$ - $\beta$ -галактозидаза на этот субстрат не действует. При укорочении длины жирнокислотного остатка в 2 и 4 раза (OМGal и ВМGal) реакция катализируется  $G_{M1}$ -галактозидазой. Выше уже подчеркивалось, что активность галактоцереброзидазы человека гораздо ниже, чем  $G_{M1}$ -галактозидазы (см. табл. 2). Поэтому пока мы не можем с уверенностью утверждать, что субстраты с более короткими алкильными цепями не могут расщепляться первым фермен-

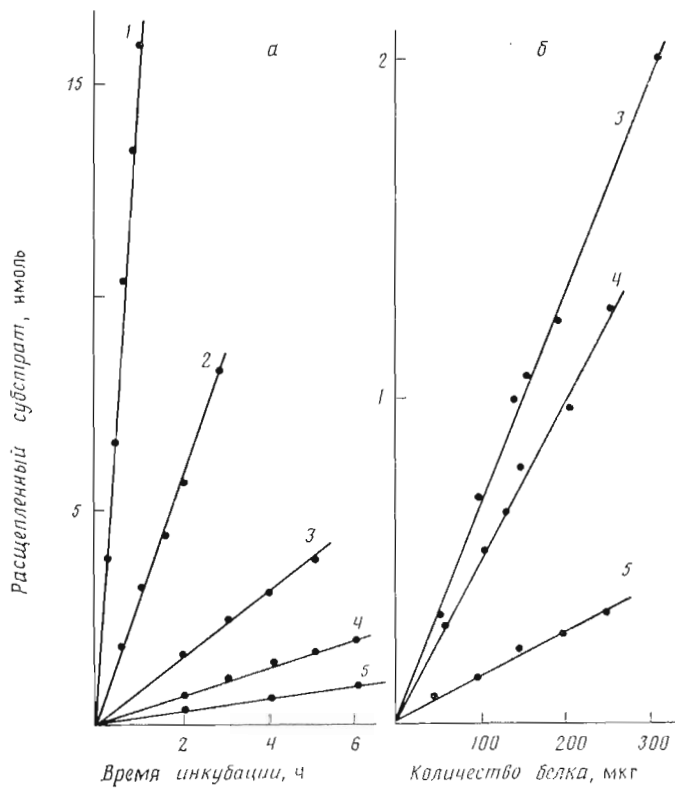


Рис. 1. Зависимость ферментативного расщепления различных по структуре субстратов от времени инкубации (а) и количества белка в пробе (б): 1 — BMGal, 2 — OMGal, 3 — 8-HMGal, 4 — 6-HMGal, 5 — HMGal. Ферментные препараты: 1—4 — лейкоциты человека; 5 — плацента человека

том. Для решения этого вопроса необходимо использование гомогенных препаратов галактоцереброзидазы. В литературе имеются данные о том, что гомогенные препараты галактоцереброзидазы из печени и частично очищенные из мозга человека, содержащие мономерную (125 кДа) и гексамерную (750 кДа) формы фермента, кроме галактоцереброзида гидролизуют и MGal [8]. В этой же работе показано снижение галакто-

Таблица 2

Активность  $\beta$ -галактоцереброзидазы и  $G_{M1}$ -галактозидазы в норме, при  $G_{M1}$ -ганглиозидозе и болезни Краббе (нмоль/ч на 1 мг белка) В скобках — пределы колебаний активности в исследованных образцах от разных индивидов

Субстрат	Норма				$G_{M1}$ -ганглиозидоз		Болезнь Краббе		
	фибробласты	лейкоциты	печень	мозг	фибробласты	лейкоциты	фибробласты	печень	мозг
HMGal	2,5 (1,0-3,5) n=10	1,0 (0,6-2,0) n=10	0,85	0,52	2,6 n=1	0,9 (0,6-1,2) n=4	0,06 (0,0-0,14) n=3		0
OMGal	26 (22-29) n=3	12 (7,5-17) n=17	20	3,3	7,3 n=1	3,3 (3,0-3,7) n=2	25 (19-33) n=3	12	3,3
BMGal	200 (120-370) n=3	107 (86-180) n=12	100	15	16,5 n=1	7,2 (7,2-7,3) n=2	220 (162-281) n=3	94	17
MGal	235 (150-400) n=10	180 (120-480) n=10	349	88	6,7 n=1	4,2 (2,3-5,4) n=4	330 (220-440) n=3	300	65

церебробридазной активности по двум субстратам в частично очищенном препарате из мозга при болезни Краббе. Эти данные говорят о том, что галактоцеребробридаза, во всяком случае по отношению к определенным синтетическим субстратам, может являться гетерокаталитическим ферментом, способным расщеплять различные по структуре  $\beta$ -галактозиды. Примером таких ферментов являются и различные типы фуккозидаз человека, исследованные нами ранее [27, 28].

При использовании в качестве субстратов галактоцеребробридазы набора галактоцеребробридов, содержащих остатки различных насыщенных и ненасыщенных жирных кислот (пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, лигноцериновой и нервоновой), наиболее высокая активность фермента наблюдалась с N-нервоноилгалактозилсфингозином (C24:1-церебробрид) [29].

Для решения вопроса о том, насколько существенны для галактоцеребробридазы различия в структуре между ее природным субстратом, галактоцеребробридом, и синтетическим, HMGal, мы провели эксперименты, в которых использовали смеси обоих субстратов в разных молярных соотношениях. Разведение 6-HMGal в стандартной инкубационной пробе различными количествами галактоцеребробрида не приводила к ингибированию ферментативной реакции с флуорогенным субстратом. Расщепление 6-HMGal было пропорциональным его содержанию в пробе в диапазоне 5—50% в смесях с галактоцеребробридом. Эти данные позволяют полагать, что галактоцеребробридаза не различает молекулы использованных субстратов, расщепляя их с одинаковой скоростью. Ранее в аналогичных экспериментах с флуоресцентно меченным аналогом галактоцеребробрида нами были получены сходные результаты [16].

По-видимому, в активном центре галактоцеребробридазы имеются по крайней мере два участка, один из которых связывает гидрофильный галактозный остаток субстрата, а другой — гидрофобный липидный компонент. Последний может быть представлен либо сфингозиновым и жирнокислотным остатками церамидной части галактоцеребробрида, либо сфингозиновым остатком галактосфингозина, либо, наконец, одной из жирных кислот, как это имеет место в 6-HMGal и HNGal. Наши результаты по разведению 6-HMGal галактоцеребробридом, а также сходство некоторых обсуждаемых ниже кинетических параметров при действии фермента на природный и флуорогенный субстраты подтверждают предположение о наличии в галактоцеребробридазе одного центра, связывающего те или иные гидрофобные части молекул субстратов.

Специфическое расщепление галактоцеребробридазой 6-HMGal позволяет определять активность этого фермента в норме и выявлять его недостаточность при болезни Краббе в присутствии высокоактивной  $G_{M1}$ - $\beta$ -галактозидазы. Сравнительное исследование ферментативного расщепления 6-HMGal и 8-HMGal показало, что последний субстрат гидролизует примерно в 2—2,5 раза быстрее (см. рис. 1). Величины  $K_m$  у обоих субстратов были довольно сходными и составляли 0,05 мМ (лейкоциты, фибробласты). Близкая по значению величина  $K_m$  характерна и для природного субстрата — галактоцеребробрида [15]. Величина  $V_{max}$  для 6-HMGal составила в препаратах лейкоцитов 1,37—2,8 нмоль/мг белка/ч при концентрации TX-Na в пробе 0,25 и 1,5% соответственно (рис. 2). Величина  $V_{max}$  для 8-HMGal была равна 4,8 нмоль/мг белка/ч (1,5% TX-Na в пробе).

Результаты показывают, что не только длина ацильного остатка, но и его положение в молекуле имеют существенное значение для действия фермента. К сожалению, гораздо меньший квантовый выход 8-HMGal по сравнению с 6-HMGal ограничивает применение первого субстрата при определении активности галактоцеребробридазы. Скорость ферментативной реакции при использовании в качестве субстрата 6- и 8-HMGal была максимальной при pH 4,5 в присутствии 0,25% TX-Na в инкубационной пробе (фибробласты) и при pH 5,0 в присутствии 1,5% TX-Na (лейкоциты) (рис. 3).

Активирующее действие TX-Na на расщепление 8- и 6-HMGal фер-

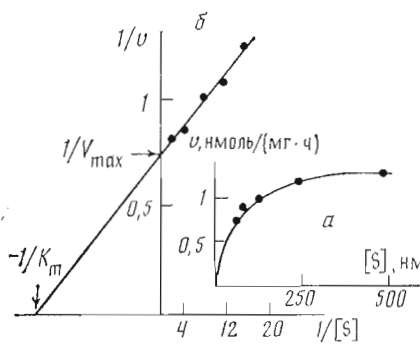


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость ферментативного расщепления 6-НМGal от концентрации субстрата (а) и определение кинетических констант графическим методом Лайнуивера — Берка (б)

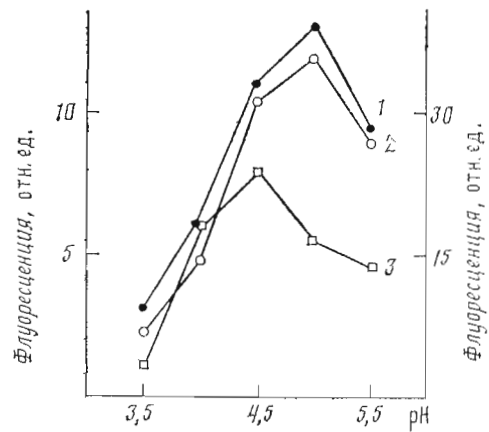


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость скорости ферментативного расщепления субстратов от pH и процентного содержания ТХ-На в пробе. 1 — 8-НМGal, лейкоциты, 1,5% ТХ-На; 2 — 6-НМGal, лейкоциты, 1,5% ТХ-На; 3 — 6-НМGal, фибробласты, 0,25% ТХ-На. Справа по оси ординат — шкала для кривой 1, слева — для кривых 2 и 3

ментными препаратами из лейкоцитов человека наблюдалось при увеличении концентрации ТХ-На от 0,25 до 1,5%, что приводило к повышению скорости расщепления указанных субстратов соответственно в 1,5- и 2,5 раза. Повышение концентрации ТХ-На до 1,5%, как оказалось, не только повышает удельную активность галактоцереброзидазы в норме, но и нивелирует различия между активностью фермента в норме и при болезни Краббе. Остаточная активность фермента при болезни Краббе существенно возрастает в присутствии 1,5% ТХ-На. Причины такой активации остаются пока не совсем понятными, и для их выяснения необходимы дальнейшие эксперименты. Из литературы известно о сильном активирующем действии ТХ-На на галактоцереброзидазу из мозга крысы [30] и лейкоцитов человека [31]. Удаление ТХ-На из инкубационной смеси приводило практически к полному угнетению реакции расщепления галактоцереброзида. Предполагается, что ТХ-На способствует образованию оптимальных по размеру мицелл субстрата, эффективно взаимодействующих с ферментом [30]. Известно, что добавление олеиновой кислоты к препаратам галактоцереброзидазы снижает потребность в ТХ-На и увеличивает активность фермента [29]. Сейчас уже не вызывает сомнений, что для эффективного расщепления таких амфипатических субстратов, как гликолипиды, необходима особая организация фермент-субстратного комплекса, которая *in vivo* обеспечивается существованием в лизосомах набора каталитически неактивных белковых активаторов, являющихся своего рода детергентами [32]. Обнаружен такой активатор и для галактоцереброзидазы [33]. Поэтому не исключено, что болезнь Краббе, как и некоторые другие типы гликолипидозов, может развиваться при недостаточности не только галактоцереброзидазы, но и каких-то факторов, необходимых для активности фермента. Высокие концентрации детергентов в этом случае могут нивелировать разницу в величинах активностей в норме и при патологии и затруднять идентификацию болезни.

Выбор детергентов, как было показано, — весьма важный фактор, влияющий на активность галактоцереброзидазы и  $G_{M1}$ - $\beta$ -D-галактозидазы [40]. Оказалось, что недостаточность первого фермента в фибробластах при болезни Краббе выявляется с помощью галактоцереброзида только в присутствии ТХ-На. В этих же условиях галактоцереброзидазная активность в фибробластах больных  $G_{M1}$ -ганглиозидозом остается в

пределах нормы. Использование же X-Na с тем же субстратом не позволяет обнаружить недостаточность галактоцереброзидазной активности при болезни Краббе и выявляет ее резкое снижение при G<sub>M1</sub>-ганглиозидозе. Если в качестве субстрата использовать галактозилсфингозин (психозин), то ферментативная недостаточность при болезни Краббе выявляется в присутствии как TX-Na, так и X-Na. Предполагается, что оба фермента способны в определенных условиях расщеплять галактоцереброзид. Галактосфингозин расщепляется только галактоцереброзидазой, а G<sub>M1</sub>-β-галактозидаза обладает к этому субстрату очень низким сродством.

Приведенные результаты представляют, с нашей точки зрения, большой интерес в плане подбора структуры синтетических субстратов, пригодных для специфического расщепления определенной гликолипидгидролазой. По аналогии с галактозилсфингозином, являющимся, вероятно, наиболее адекватным субстратом для биохимической диагностики болезни Краббе вне зависимости от природы детергентов, можно полагать, что по своей структуре HMGal представляет собой достаточно специфический субстрат для галактоцереброзидазы. Поэтому была бы интересна проверка такого предположения путем расщепления этого субстрата высокоочищенными препаратами G<sub>M1</sub>-β-галактозидазы в условиях ее активирования X-Na, т. е. в оптимальных условиях для проявления активности указанного фермента.

В заключение хотелось бы подчеркнуть, что применение 6-HMGal в качестве субстрата галактоцереброзидазы позволяет существенно повысить чувствительность метода определения активности фермента по сравнению с хромогенным субстратом, на что уже обращалось внимание ранее [23]. По-видимому, пока преждевременно обсуждать вопрос относительно широкого применения флуорогенного субстрата при исследовании активности галактоцереброзидазы в норме и при болезни Краббе. Для решения этого необходимы дополнительные данные о корреляции между величинами активности фермента в норме и при наследственной патологии при сравнительном использовании синтетического и природного субстратов в условиях, оптимальных для определения галактоцереброзидазной активности. Первые обнадеживающие результаты в этом направлении были получены при исследовании остаточной активности галактоцереброзидазы в фибробластах двух пациентов с болезнью Краббе, биохимический диагноз которых был первоначально поставлен нами с помощью 6-HMGal, а затем подтвержден доктором О. Ван Дигелен с меченым галактоцереброзидом в отделе клеточной биологии и генетики Роттердамского университета (Нидерланды) [34].

*Специфичность глюкоцереброзидазы.* Зависимости ферментативного гидролиза HMGlc от количества белка в пробе и периода инкубации показаны на рис. 1. В табл. 3 представлены данные по β-глюкозидазной активности различных тканей человека и животных при использовании четырех различных синтетических субстратов. Из тканей человека наиболее высокой активностью по MGlc и HMGlc обладает плацента (вор-

Таблица 3

Активность β-глюкозидазы в различных тканях человека и животных по отношению к разным субстратам (нмоль/ч на мг белка)

Источник фермента	MGlc(—)	MGlc(+)	OMGlc	HMGlc	HNGlc
Плацента человека (ворсины хориона)	79,5	226	4,3	0,5	92,3
Эмбриональные фибробласты человека	46,2	87	—	0	74,88
Печень человека	28,5	11,5	0,36	0,02	2,6
Селезенка человека	3,5	3,8	0,07	0,01	4,0
Печень кролика	973	371	10,1	2,1	35,6
Селезенка морской свинки	—	—	—	1,75	31,8

Примечание. (+), (—) — определение активности соответственно в присутствии или в отсутствие детергентов (см. «Экспериментальную часть»).



систый хорион), в которой активность многих лизосомных гликозидаз, как показано [35], проявляется на ранних стадиях эмбрионального развития. При этом активность по НМГlc была примерно в 200 раз ниже, чем при использовании хромогенного аналога — ННГlc. Расщепление ОМГlc с ферментными препаратами из плаценты человека хотя и было заметным по сравнению с другими источниками, по в то же время в значительной степени уступало расщеплению МГlc и ННГlc.

Мы попытались увеличить скорость расщепления НМГlc, вводя в субстратную смесь различные количества DMSO, который, по данным [36], повышает растворимость хромогенного субстрата (ННГlc) и, таким образом, приводит к повышению глюкоцереброзидазной активности. Однако добавление в инкубационную пробу 2,5–7,5% DMSO не приводило в наших экспериментах ни к повышению растворимости НМГlc, ни к увеличению скорости его гидролиза различными ферментными препаратами из тканей человека и животных. Повышение концентрации ТХ-Na в субстратной смеси от 0,5 до 2,5% увеличивало скорость гидролиза НМГlc на 60–70%. При этом не было выявлено существенных различий во влиянии на  $\beta$ -глюкозидазную активность препаратов чистого и неочищенного ТХ-Na. Увеличение концентрации Тритона X-100 в инкубационной пробе от 2 до 4 мМ не повышало скорость ферментативного гидролиза НМГlc препаратами из плаценты человека.

Проведенные эксперименты показали, что скорость ферментативного расщепления НМГlc намного ниже скорости расщепления его хромогенного аналога ННГlc в самых различных ферментных препаратах из тканей человека и животных. Другой субстрат, ОМГlc, с укороченным жирнокислотным остатком расщепляется хотя и с большей скоростью, чем НМГlc, но, как уже отмечалось, степень его гидролиза ниже по сравнению с ННГlc и МГlc.

Попытка использовать НМГlc при биохимической диагностике болезни Гоше не увенчалась успехом. В то время как  $\beta$ -глюкозидазная активность в селезенке, удаленной у пациента с болезнью Гоше, при использовании ННГlc в качестве субстрата составила 2,6 нмоль/мг/ч (23% от нормы — 11,5 нмоль/мг/ч), с НМГlc не было получено различий между нормой и патологией, и в обоих случаях активность не превышала 0,05 нмоль/мг/ч.

Для выяснения вопроса о способности НМГlc и ОМГlc расщепляться «кислой» или «нейтральной» формами  $\beta$ -глюкозидазы мы провели разделение этих ферментов из препарата печени по методу [18] с использованием гель-фильтрации на сефадексе G-200. Элюиционный профиль  $\beta$ -глюкозидазной активности, определенный с помощью различных субстратов, представлен на рис. 4. Согласно [18], компонент с большей молекулярной массой ( $V_{эл}=34$  мл) является глюкоцереброзидазой («кислая» форма фермента), а с меньшей ( $V_{эл}=53,5$  мл) — «нейтральной» формой фермента. Это подтверждается и нашими данными о различном влиянии ТХ-Na на активность обеих глюкозидаз. ТХ-Na активирует «кислую» форму фермента и почти не влияет на «нейтральную» форму. НМГlc и ОМГlc, так же как и ННГlc, расщепляются «кислой» формой фермента, в то время как «нейтральная»  $\beta$ -глюкозидаза эти субстраты в условиях эксперимента практически не гидролизует.

Как выяснилось в ходе дальнейших опытов, селективное расщепление ННГlc, НМГlc и ОМГlc во фракциях, содержащих только глюкоцереброзидазу, могло определяться не столько различной специфичностью «кислой» и «нейтральной» форм фермента, сколько их различной термостабильностью. Оказалось, что за период инкубации от 15 до 48 ч, необходимый для выявления активности с использованием перечисленных выше субстратов, «нейтральная» форма фермента практически полностью инактивируется. При этом активность «кислой» формы  $\beta$ -глюкозидазы сохраняется примерно на 70%.

Результаты исследования термостабильности обеих форм фермента показали, что прогревание при 45°С в течение 15–20 мин снижает активность «нейтральной» формы фермента почти на 70%. В этих же условиях «кислая» форма фермента сохраняет 80% исходной активности. Кон-

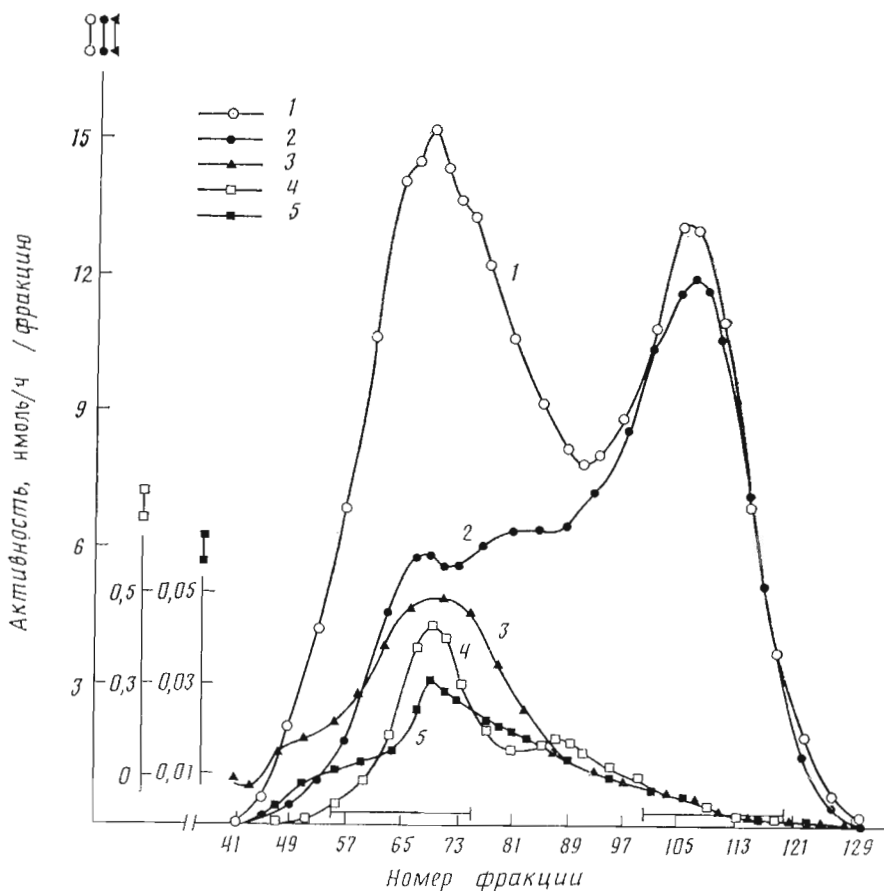


Рис. 4. Элюционный профиль  $\beta$ -глюкозидазной активности при гель-фильтрации ферментного препарата из печени человека на колонке с сефадексом G-200 и использовании различных по структуре  $\beta$ -глюкозидов в качестве субстратов. 1 — MGlc(+); 2 — MGlc(-); 3 — HNGlc; 4 — OMGlc; 5 — HMGlC; (+) и (-) — определение активности  $\beta$ -глюкозидазы соответственно в присутствии и в отсутствие TX-Na. Показаны границы объединенных фракций. Колонка 1,6×33,5 см; элюция 0,01 М фосфатным буфером, pH 5,8, содержащим 0,1 М NaCl и 0,5% Тритона X-100, 7 мл/ч. Объем каждой фракции 0,5 мл

центрирование фракций, соответствующих «кислой» и «нейтральной» формам фермента, позволило сократить срок инкубации до 1,5–3 ч и обнаружить расщепление HMGlC и OMGlc преимущественно «кислой» формой фермента, соответствующей глюкоцереброзидазе.

Приведенные результаты показывают, что переход от хромогенного синтетического  $\beta$ -глюкозида липидной природы (HNGlc) к его флуорогенному аналогу (HMGlC) в значительной степени снижает скорость расщепления последнего под действием глюкоцереброзидазы человека и животных. Использование в качестве субстрата OMGlc с укороченным вдвое по сравнению с HMGlC липидным «хвостом» также не имеет преимуществ перед хромогенным субстратом. Причины такой низкой скорости расщепления использованных флуорогенных соединений при самых различных условиях экспериментов остаются пока неизвестными. Можно предполагать, что агликоновый центр связывания, постулируемый в глюкоцереброзидазе [37, 13], весьма чувствителен к различиям в структурах хромогенного и флуорогенного субстратов. В литературе известны примеры других сфинголипидгидролаз, в частности сфингомиелиназы, которая расщепляет субстраты на основе 4-метилумбеллиферона с гораздо меньшей скоростью, чем его *n*-нитрофенильные аналоги [38].

Таким образом, конструирование синтетических субстратов для гликолипидгидролаз представляет собой довольно сложную задачу, решение

которой позволяет получить новые данные об особенностях специфичности этой важнейшей группы лизосомных ферментов и в ряде случаев разработать на этой основе чувствительные методы определения их активности. В настоящей работе, как было показано, специфическим и высокочувствительным субстратом для  $\beta$ -галактоцереброзидазы оказался 6-НМGal, который дает возможность определять активность фермента в норме и проводить биохимическую диагностику болезни Краббе.

### Экспериментальная часть

Спектры  $^1\text{H-NMR}$  снимали на спектрометре Bruker-WH-250 в  $\text{CD}_3\text{OD}$  и  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ , УФ-спектры — на приборе Spereord M-40 в этаноле, спектры флуоресценции — на спектрофлуориметре Hitachi MPF 4A в этаноле. ТСХ проводили на пластинках Silufol UV-254 в системах хлороформ — этилацетат, 2:1 (А), хлороформ — ацетон, 3:7 (Б), хлороформ — метанол, 1:1 (В), хлороформ — ацетон, 1:1 (Г). Синтез и константы соединений (I), (IIв) и (VIIв) приведены в работе [25], соединений (IIIв), (Vв) и (VIIIв) — в работе [26], НМGal синтезирован по методу [20]. Строение впервые полученных ациламинопроизводных 4-метилумбеллиферона (IIа, б), а также гликозидов (Va, в), (VIб, в) подтверждено данными элементного анализа.

*6-Октаноил- и 6-бутианоиламино-4-метилумбеллиферон (IIа, б)*. К суспензии 20 ммоль соединения (I) в 100 мл сухого пиридина при перемешивании добавляли 30 ммоль соответствующего хлорацетата кислоты и выдерживали 24 ч при 20° С. К смеси добавляли 150 мл ледяной воды, выпавший осадок отфильтровывали, промывали 3 раза водой, сушили в вакууме над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Выход ациламинопроизводных (IIа) и (IIб) 80–85%.

*$\beta$ -D-Галактопиранозиды (Va), (Vб) и  $\beta$ -D-глюкопиранозиды 6-ациламино-4-метилумбеллиферона (VIб), (VIв)*. К раствору 10 ммоль N-ациламинопроизводного (IIа) или (IIб) в 10 мл этанола добавляли при перемешивании эквивалентное количество 0,1 М спиртового раствора этилата натрия, упаривали досуха и сушили над КОН. Остаток суспендировали в 40 мл абс. тетрагидрофурана, добавляли раствор 10 ммоль ацетобромгалактозы или ацетобромглюкозы [39] в 15 мл свежеперегнанного над КОН DMSO, кипятили 20 ч, фильтровали, фильтрат, упаривали и к остатку добавляли 200 мл ледяной воды. Экстрагировали 5×20 мл эфира, экстракт сушили над  $\text{CaCl}_2$ , фильтровали через слой силикагеля (~2 см), упаривали. Выход тетраацетатов составлял 56–65%. Дезацетилирование тетраацетатов гликопиранозидов (IIIа, б) и (IVа, б) проводили в присутствии метилата натрия по методике [39]. Выход гликопиранозидов (Va, б) и (VIа, б) составлял 70–80%.

В качестве ферментных препаратов использовали гомогенаты из лейкоцитов и эмбриональных и постнатальных фибробластов кожи человека (штаммы № 814, 822, 1035), полученные из Института медицинской генетики АМН СССР и выращенные в нашей лаборатории И. Д. Беляевой и Т. С. Ивлевой. В качестве референсного штамма использовали фибробласты кожи человека с болезнью Краббе из Банка мутагичных клеток США, выращенные и хранящиеся в клеточном Банке Института медгенетики АМН СССР (штамм № 953). Ферментные препараты из различных органов здоровых людей и от пациентов с идентифицированной И. В. Цветковой болезнью Краббе [40] получали из материала аутопсии. В опытах использовали также лейкоциты от пациентов с  $\text{G}_\text{M1}$ -ганглиозидозом, которые были любезно предоставлены нам И. В. Цветковой (ИБМХ АМН СССР).

В работе использовали очищенный препарат галактоцереброзида из мозга крупного рогатого скота, полученный от Н. В. Проказовой (ВКНЦ АМН СССР), неочищенный (Союзреактив) и очищенный (Koch-Light) препараты ТХ-На и олеиновой кислоты. Общую лейкоцитарную фракцию получали согласно [41].

При получении гомогенатов клетки подвергали 3-кратному замораживанию и оттаиванию в минимальном количестве дистиллированной воды, затем суспензию гомогенизировали в течение 2–3 мин в стеклянном гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком. Полученный гомогенат после удаления обрывков клеток центрифугированием использовали в качестве ферментного препарата галактоцереброзидазы.

Белок в пробах определяли по методу Лоурри [42]. Величины  $K_m$  и  $V_{\text{max}}$  вычисляли графическим методом Лайнуивера — Берка [43].

При определении ферментативной активности галактоцереброзидазы инкубационная проба общим объемом 100 мкл содержала 50 мкл ферментного препарата (50–200 мкг белка) и 50 мкл субстратной смеси (50–70 ммоль соответствующих субстратов). Субстратную смесь готовили следующим образом: в стеклянном гомогенизаторе смешивали 4,2 мг субстрата в 2 мл смеси хлороформ — метанол (2:1), 10 мг ТХ-На и 0,06 мл 1% раствора олеиновой кислоты в гексане; смесь упаривали досуха в токе газообразного азота при 35–40° С, остаток суспендировали в 2 мл 0,2 М (по фосфату) фосфатно-цитратного буфера с pH 4,5 и гомогенизировали несколько минут с помощью тефлонового пестика при нагревании до 50° С.

Активность  $\beta$ -глюкозидазы определяли с помощью MGlc в двух вариантах: в присутствии 0,25% ТХ-На и 0,01% олеиновой кислоты — MGlc (+) и в их отсутствие — MGlc (—).

Содержание MGlc в инкубационной пробе (200 мкл) в обоих случаях составля-

ло 444 ямоль, рН среды (5,8) поддерживали с помощью 0,1 М (по фосфату) цитратно-фосфатного буфера.

При определении  $\beta$ -глюкозидазной активности с помощью OMGlc, HMGlc и HNGlc субстратные смеси готовили как указано выше для соответствующих галактозидов. Содержание субстратов в инкубационной пробе (200 мкл) составляло соответственно 62, 50 и 216 ямоль.

Определение  $\beta$ -галактозидазной активности с помощью MGal проводили согласно [41].

Реакцию останавливали, добавляя 1 мл смеси этанол — 0,4 М глициновый буфер, рН 10,5 (5:2).

Флуоресценцию в пробах определяли с помощью отечественных флуориметров ЭФ-3МА, БИАИ-130 и на спектрофотометре Spereord M-40 (Carl Zeiss, ГДР) с приставкой для измерения флуоресценции. Количество расщепленных субстратов определяли по флуоресценции образующихся агликонов относительно их стандартов при рН 10,5;  $\lambda_{возб}$  флуоресценции агликонов 385 нм; измерение флуоресценции проводили с использованием светофильтра GVK 48 ( $\lambda > 455$  нм). В качестве контроля использовали пробы, не содержащие ферментных препаратов. Количественное измерение флуоресценции в пробах в условных единицах проводили с помощью стандартных растворов агликонов в изопропанол. Щелочного значения рН в стандарте достигали добавлением той же фиксирующей смеси, что и в опытные пробы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Brady R. O. // The Enzymes. 1983. V. 16. P. 409—426.
2. Видершайн Г. Я. // Усп. биол. химии. 1986. Т. 27. С. 117—135.
3. Видершайн Г. Я. Биохимические основы гликозидозов. М.: Медицина, 1980.
4. Kanfer J. // Handbook of Lipid Research. V. 3. Sphingolipid Biochemistry/Eds Kanfer J., Nakomori S. N. Y.: Plenum Press, 1983. P. 249—325.
5. Glew R. H., Basu A., Prence E. M., Remaley A. T. // Lab. Invest. 1985. V. 53. № 3. P. 250—269.
6. Suzuki K., Suzuki Y. // The metabolic basis of inherited disease/Eds Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrikson D. S., Goldstein J. L., Brown M. S. 5-th ed. N. Y.: Mc Graw-Hill, 1983. P. 857—880.
7. Brady R. O., Barranger J. A. // The metabolic basis of inherited disease/Eds Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrikson D. S., Goldstein J. L., Brown M. S. 5-th ed. N. Y.: Mc Graw-Hill, 1983. P. 842—856.
8. Ben-Joseph Y., Hungerford M., Nadler H. L. // Biochem. J. 1980. V. 189. № 1. P. 9—15.
9. O'Brien J. // The metabolic basis of inherited disease/Eds Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrikson D. S., Goldstein J. L., Brown M. S. 5-th ed. N. Y.: Mc Graw-Hill, 1983. P. 945—969.
10. Kobayashi T., Shinnoh N., Goto I., Korojwa Y. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 28. P. 14982—14987.
11. Kobayashi T., Shinnoh N., Kurojwa J. // Biochim. et biophys. acta. 1986. V. 879. № 2. P. 215—220.
12. Kobayashi T., Shinoda H., Goto I., Yamanaka T., Suzuki Y. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1987. V. 144. № 1. P. 41—46.
13. Gatt S., Dinur T., Osiecki K., Desnick R., Grabowski G. // Enzyme. 1985. V. 33. № 2. P. 109—119.
14. Svennerholm L., Hakansson G., Mansson J., Vanier M. // Clin. chim. acta. 1979. V. 92. № 1. P. 53—64.
15. Besley G. T., Gatt S. // Clin. chim. acta. 1981. V. 110. № 1. P. 19—26.
16. Семенов Е. П., Видершайн Г. Я. // Биохимия. 1984. № 9. С. 1556—1560.
17. Midorikawa M., Okada S., Yutaka T., Yabuuchi H., Naoi M., Kiuchi K., Yagi K. // Biochem. Int. 1985. V. 11. № 3. P. 327—332.
18. Венгер Д. А., Олсон Г. С. // Лизосомы и лизосомные болезни накопления. М.: Медицина, 1984. С. 179—194.
19. Gal A. E., Brady R. O., Pentchev P. G., Furbish F. S., Suzuki K., Tanaka H., Schneider E. L. // Clin. chim. acta. 1977. V. 77. № 1. P. 53—59.
20. Gal A. E., Pentchev P. G., Fash F. J. // Proc. Soc. Exptl Biol. and Med. 1976. V. 153. № 2. P. 363—366.
21. Besley G. T. N., Bain A. D. // Clin. chim. acta. 1978. V. 88. № 2. P. 229—236.
22. Svennerholm L., Vanier M. T., Hakansson G., Mansson J. E. // Clin. chim. acta. 1981. V. 112. № 3. P. 333—342.
23. Видершайн Г. Я., Козлова И. К., Ильина Г. С. // Биохимия. 1985. № 10. С. 1665—1668.
24. Козлова И. К. Способ получения 6-амино-4-метилумбеллиферона: А. с. 1106812 СССР // Б. И. 1984. № 29. С. 81.
25. Козлова И. К. // Химия гетероцикл. соединений. 1985. № 7. С. 906—909.
26. Козлова И. К. // Химия гетероцикл. соединений. 1987. № 5. С. 603—606.
27. Wiederschain G. Y., Beyer E. M., Klyashchitsky B. A. Shashkov A. S. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 659. № 2. P. 434—444.
28. Бейер Е. М., Видершайн Г. Я. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 291. № 4. С. 998—1001.
29. Mansson J. E., Svennerholm L. // Clin. chim. acta. 1982. V. 126. № 2. P. 127—133.
30. Bowen D. M., Radin N. S. // Biochim. et biophys. acta. 1968. V. 152. P. 599—610.
31. Poulos A., Beckman K. // Clin. chim. acta. 1980. V. 107. № 1. P. 27—35.

32. Sandhoff K. // Molecular basis of lysosomal storage disorders/Eds Barranger J., Brady R. O. Orlando, San-Diego, New York, London: Acad. Press, INC, 1984. P. 19-49.
33. Wenger D. A., Sattler M., Roth S. // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 712. № 3. P. 639-649.
34. Видершайн Г. Я., Цушше М., Зайдлиц Г. // Вопр. мед. химии. 1988. Т. 34. № 1. С. 87-89.
35. Wiederschain G. Ya., Rosenfeld E. L., Brusilovsky A. I., Kolibaba L. G. // Clin. chim. acta. 1971. V. 35. № 1. P. 99-107.
36. Barns R. J., Clague A. E. // Clin. chim. acta. 1982. V. 120. № 1. P. 57-63.
37. Grabowski G., Gatt S., Kruse J., Desnick R. // Arch. Biochem. and Biophys. 1984. V. 231. № 1. P. 144-157.
38. Fenson A. H., Benson P. F., Babarik A. W., Grant A. R., Jacobs L. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1977. V. 74. № 3. P. 877-883.
39. Методы химии углеводов/Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967. С. 169-198.
40. Цветкова Н. В., Золотухина Т. В., Розенфельд Е. Л. // Вопр. мед. химии. 1985. № 3. С. 128-135.
41. Кузьмичева Н. А., Видершайн Г. Я. // Вопр. мед. химии. 1984. № 5. С. 76-81.
42. Lowry C. P., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265-275.
43. Lineaweaver H., Burk D. // J. Amer. Chem. Soc. 1934. V. 56. P. 658-666.

Поступила в редакцию  
27.XI.1987

**THE STUDY OF SPECIFICITY  
OF HUMAN LYSOSOMAL GLYCOLIPIDHYDROLASES BY MEANS  
OF SYNTHETIC FLUOROGENIC SUBSTRATES**

WIEDERSCHAIN G. Ya., KOZLOVA I. K., ILYINA G. S., MICHALOVA M. A.

*Institute of Biological and Medical Chemistry,  
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

On the basis of *o*-acylamino-4-methylumbelliferon, a number of  $\beta$ -galactosides and  $\beta$ -glucosides have been synthesized. The fluorogenic compounds obtained differ by the length of acyl residues. 6- and 8-hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactopyranosides (6-HMGal and 8-HMGal) are shown to be substrates for human galactocerebroside- $\beta$ -D-galactosidase. 6-HMGal analogues with shorter acyl residues, octanoyl (OMGal) and butanoyl (BMGal), were cleaved by another type of  $\beta$ -galactosidase,  $G_{M1}$ -ganglioside- $\beta$ -galactosidase. It has been established that 6-hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (HMGlc) is cleaved by human and animal glucocerebroside much slower than its chromogenic analogue (HNGlc). OMGlc did not exceed HNGlc either, though it is cleaved by glucocerebroside faster than HMGlc.