



УДК 547.963.1

РОЛЬ УГЛЕВОДНЫХ ГРУПП В ИММУНОГЛОБУЛИНАХ М

V. СТЕРИЧЕСКАЯ ДОСТУПНОСТЬ ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ГРУППИРОВОК
В МАКРОИММУНОГЛОБУЛИНАХ*Каверзнева Е. Д., Чухрова А. И., Вижа Г. В.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Для выяснения различий в стерической доступности углеводных групп на поверхности молекулы IgM изучен ход ферментативного отщепления их от Fc- и Fab-фрагментов во время ферментативной обработки нативного IgM гликозидазами. Установлено, что отщепление происходит от олигосахаридных цепей на обоих фрагментах, по значительнее легче от Fab, что говорит о большей стерической обнаженности их на последнем. При глубоком отщеплении (30—40%) происходит, очевидно, разрушение не только боковых цепей, но и «кора» олигосахаридных остатков. Обсуждается параллелизм этого явления с фактом нарушения конформации молекулы IgM при глубоком отщеплении углеводов, установленным ранее.

Молекулы макроиммуноглобулинов (IgM) несут на своих тяжелых цепях по 5 олигосахаридных остатков разного состава и строения. Из данных по изучению гидратации препаратов IgM следует [1], что эти группировки в нативных молекулах должны располагаться на поверхности молекулы. Недавно поверхностное положение углеводной группы на C_H-2-домене в молекуле IgG было установлено рентгеноструктурным анализом [2].

Удаление углеводных остатков лишает молекулу IgM способности к самосборке из субъединиц [3] и приводит к конформационным изменениям, что следует из более трудной расщепляемости IgM трипсином после ферментативного отщепления части углеводных остатков [4]. Однако остается открытым вопрос: какие из пяти олигосахаридных остатков атакуются на поверхности молекулы в первую очередь и с какой скоростью происходит отщепление углеводных остатков от каждой из них? На какой-то стадии это отщепление приводит к значительному изменению конформации молекулы со всеми вытекающими из такого изменения последствиями.

Ферментативное отщепление углеводных остатков от гликопептидов было изучено Корнфельдом и сотр. [5—7] при установлении строения олигосахаридных цепей в иммуноглобулинах. Соответствующим набором гликозидаз, как показали эти работы, удается отщепить все моносахаридные остатки, кроме остатка ацетилглюкозамина, связанного с пептидной цепью. Третичная и четвертичная структуры IgM должны влиять на стерическую доступность моносахаридов в молекуле IgM. Поэтому, чтобы подойти к решению поставленного вопроса, нами было исследовано точное содержание углеводов раздельно в Fab- и Fc-фрагментах после действия набора гликозидаз на нативный IgM при разной степени отщепления углеводов (рис. 1).

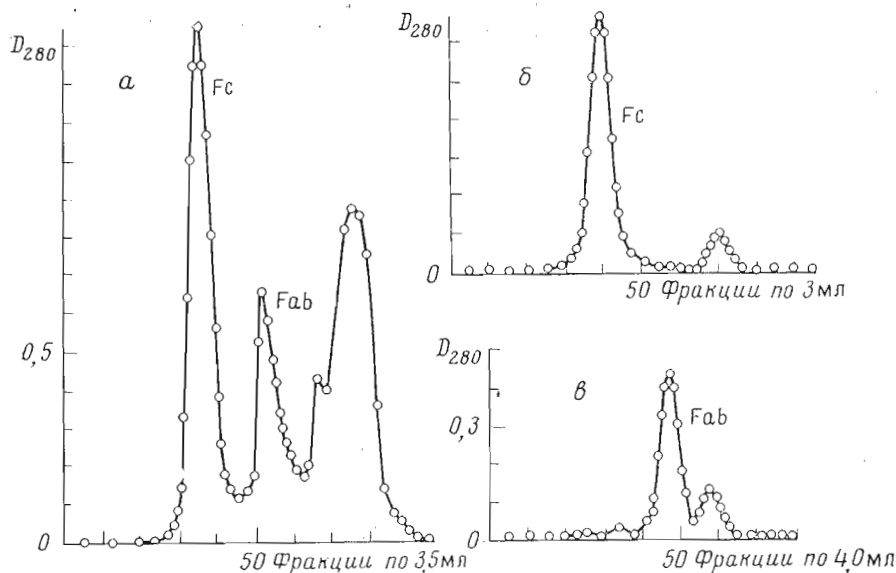


Рис. 1. Выделение Fc- и Fab-фрагментов после триптического расщепления IgM. а — хроматография на колонке с сефарозой 6В; б — рехроматография фрагмента Fc; в — рехроматография фрагмента Fab

В табл. 1 и 2 приведены результаты определения нейтральных углеводов и аминокислот как в исходных, не подвергнутых действию гликозидаз, препаратах IgM и его фрагментах (Fc и Fab), так и во фрагментах и IgM после обработки набором гликозидаз по достижении различной глубины отщепления углеводных остатков.

Кроме суммарного определения нейтральных сахаров было проведено определение отдельных остаточных моносахаридов в Fc- и Fab-фрагментах, выделенных после глубокого воздействия гликозидаз на IgM (табл. 3).

Полученные данные показывают, что отщепление углеводных остатков происходит от обеих частей молекулы. Таким образом, углеводные цепи IgM доступны для действия ферментов, однако далеко не одинаково. Как следует из хода кривых, представленных на рис. 2, общее количество моносахаридов, отщепляющихся от Fc-фрагментов, больше отщепляющегося от Fab-фрагментов. Но так как в состав Fc-фрагмента входят 4 олигосахаридные цепи, при расчете на одну углеводную цепь оказывается, что степень гидролиза углеводной составляющей Fab-фрагмента существенно больше. Отсюда следует, что углеводная цепь в Fab-фрагменте значительно доступнее для атаки ферментами, чем в Fc-фрагменте.

С другой стороны, на степень отщепления отдельных углеводных остатков должна влиять структура олигосахаридных группировок в IgM. Как было установлено Корифельдом и сотр. [5], углеводная группировка в C_{H-1} -домене (Asp¹⁷⁰), входящая в Fab-фрагмент, и две группировки в Fc-фрагменте (одна между доменами C_{H-2} и C_{H-3} (Asp³³²) и другая на домене C_{H-3} (Asp³⁹⁵)) имеют смешанный набор моносахаридов (рис. 3а), а две последних группировки [на домене C_{H-3} (Asp⁴⁰²) и на C-конце H-цепи (Asp⁵⁶³)] состоят только из ацетилглюкозамина и маннозы в колеблющихся отношениях и обозначаются как «маннозобогащенные» (рис. 3б). Общая схема расположения углеводов в субъединице IgM дана на рис. 3.

Хотя полученных данных еще недостаточно, чтобы детально установить ход распада каждой отдельной олигосахаридной цепи, уже теперь можно сделать ряд полезных заключений. Так, например, бросается в глаза быстрое нарастание отщепившихся аминокислот в Fab-фрагментах по мере углубления гидролиза, достигающее 55% их содержания (рис. 4).

Таблица 1

Углеводный состав макроглобулина (IgM_{Ел}) и его фрагментов

| Соединение | Нейтральные сахара | | Аминосакхара | |
|---------------|--------------------|-----------------|--------------|-----------------|
| | % | остаток на моль | % | остаток на моль |
| Нативный IgM | 5,95 | 340-350 | 3,9 | 162 |
| Fc/2-фрагмент | 12,0 | 23-25 | 5,6 | 8,5-9,0 |
| Fab-фрагмент | 4,0 | 14,1 | 1,44 | 3,8 |

Таблица 2

Содержание углеводов в IgM и его фрагментах после действия гликозидаз

| Соединение | Нейтральные сахара, % | | | Аминосакхара, % | |
|--------------------------------|-----------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | в IgM | в Fc-фрагменте | в Fab-фрагменте | в Fc-фрагменте | в Fab-фрагменте |
| Нативный IgM до гидролиза | 5,95 | 12,0 | 4,0 | 5,6 | 1,44 |
| Отщепление от IgM углеводов, % | | | | | |
| 4,6 | 5,68 | 11,2 | 3,83 | 5,6 | 1,25 |
| 28 | 4,23 | 8,63 | 3,28 | 4,2 | 0,85 |
| 39 | 3,63 | 6,55 | 3,00 | 2,68 | 0,63 |

Таблица 3

Отщепление отдельных моносахаридов (%) от фрагментов IgM после глубокого гидролиза IgM гликозидазами (39% отщепления)

| Фрагменты | Манноза | Галактоза | Фукоза | N-Ацетил-глюкозамин |
|-----------|---------|-----------|--------|---------------------|
| Fc | 40-45 | 75 | 0 | 56,6 |
| Fab | 20 | 78 | 0 | 55,5 |

Такое отщепление глюкозамина возможно только после предварительного удаления остатка галактозы, закрывающей доступ к аминсахарам. Найденное отщепление до 78% присутствующей галактозы вполне согласуется с этим фактом.

Напротив, аминсахара в Fc-фрагменте начинают отщепляться не сразу, поскольку глюкозамин становится доступным только после отщепления значительного количества маннозы. О том, что такое отщепление действительно происходит, свидетельствует тот факт, что от Fc-фрагмента отщепляется в конечном итоге 40-45% маннозы (табл. 3), кроме того, скорость отщепления нейтральных моносахаридов от Fc-фрагмента постепенно возрастает, превышая в определенный момент таковую от фрагмента Fab.

Следует отметить, что манноза отщепляется также и от Fab-фрагмента (до 20%). Это очень важно в том отношении, что доказывает возможность глубокого разрушения ферментами олигосахаридных цепей Fab в составе IgM, при котором затрагиваются не только боковые ветви цепи, но и ее кор. Аналогичный вывод можно сделать относительно Fc-фрагментов: высокий процент отщепившихся при глубоком гидролизе ацетилглюкозаминных остатков должен происходить за счет разрушения не только смешанных олигосахаридных группировок в этом фрагменте, но и, вероятно, маннозобогатых.

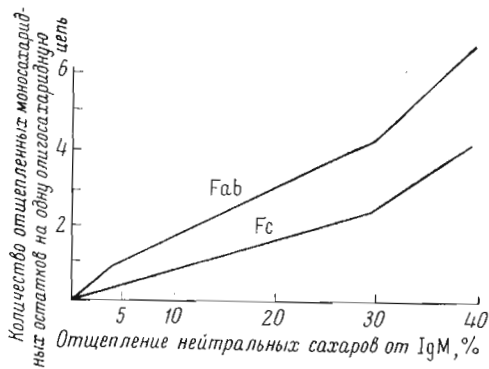


Рис. 2. Количество отщепившихся углеводных остатков на одну олигосахаридную цепь в Fc- и Fab-фрагментах при различной степени гидролиза IgM

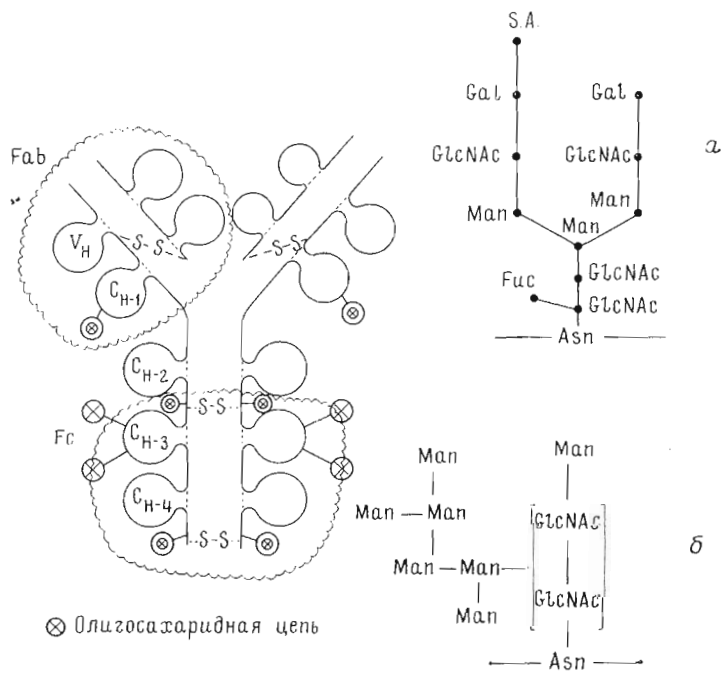


Рис. 3. Схема строения субъединицы IgM по Корняфельду. а — олигосахаридная группа смешанного типа, б — олигосахаридная группа из ацетилглюкозамина и маннозы (маннозобогатая)

Характерно, что в обследованных препаратах не найдено отщепления фукозы ни от Fab-, ни от Fc-фрагментов, даже при общем значительном отщеплении (37—40%) нейтральных сахаров от нативного IgM. Эти факты согласуются с данными других авторов [8, 9], отметивших трудность отщепления фукозы, и, по-видимому, объясняются стерическими препятствиями, затрудняющими атаку этого моносахарида фукозидазой.

Таким образом, проведенные опыты позволяют предварительно заключить, что ферментативное отщепление углеводных остатков происходит в нативной молекуле IgM как от Fab-, так и от Fc-фрагментов, но значительно легче от первых из них. Кроме потери углеводных остатков, образующих разветвления группировки, происходит и разрушение ее основания как в Fc-, так и в Fab-фрагментах.

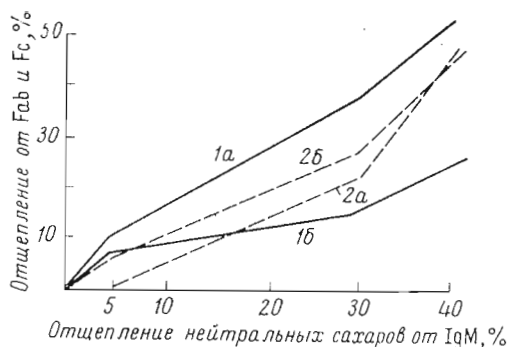


Рис. 4. Отщепление нейтральных и аминсахаров от Fc- и Fab-фрагментов в процессе обработки IgM гликозидазами (в % от исходного содержания во фрагментах). 1a — аминсахара в Fab; 1б — нейтральные сахара в Fab; 2a — аминсахара в Fc; 2б — нейтральные сахара в Fc-фрагментах

Известно, что при небольшом отщеплении углеводов от IgM действие на него трипсина несколько облегчается, а при отщеплении значительного количества их (~30—40%), наоборот, заметно задерживается [4]. Последнее может быть объяснено изменением конформации молекулы IgM при потере углеводных групп. На основании полученных нами данных, можно высказать предположение, что отщепление углеводных остатков от «ветвей» олигосахаридов не вызывает значительных изменений в конформации молекулы IgM; эти изменения наступают тогда, когда начинают разрушаться структурные основания олигосахаридных группировок.

Авторы выражают глубокую благодарность Л. М. Лихошерстову за проведение анализов на углеводном анализаторе.

Экспериментальная часть

В работе был использован препарат иммуноглобулина М человека (болезнь Вальденштрема), выделенный по описанному ранее способу [10].

Отщепление углеводных групп от IgM проведено под толуолом при 37° в 0,1 М Na-ацетатном буфере (рН 6,2—6,4) в течение 8—20 сут в присутствии набора гликозидаз: нейраминидазы (Koch-Light, Англия), β-D-галактозидазы печени, α-D-маннозидазы, α-L-фукозидазы и N-Ас-β-D-глюкозаминидазы эпидидимиса хряка. Выделение модифицированных IgM из гидролизата проводилось по ранее описанному методу гель-фильтрацией через сефарозу 4В [11].

Для получения Fab- и Fc-фрагментов IgM проводили триптический гидролиз нативного и обезуглевоженных IgM (0,1—0,2% растворы) при 56° в течение 2 ч в 0,05 М Трис-НСI-буфере, рН 8,15, в присутствии 0,015 М CaCl₂. Отношение фермент — субстрат составляло 1 : 25.

Гидролиз прекращали добавлением соевого ингибитора трипсина и быстрым охлаждением инкубационной смеси. Выделение фрагментов из трипсинового гидролизата проводили на колонке с сефарозой 6В (2 × 90 см) с последующей рехроматографией сначала на той же колонке (рис. 1); а затем на колонке с биогелем Р-30 (1,5 × 75 см) для отделения следов сорбированных углеводов и других примесей.

Определение нейтральных сахаров проводили с фенол-серной кислотой по известному методу [12]. В качестве стандарта использовали маннозу (0,2 мг/мл). Оптическую плотность растворов измеряли на спектроколориметре «Spesol» при 490 нм (ширина кювет 10 мм). Качественный состав и соотношение гексоз определяли на автоматическом углеводном анализаторе (71100, СССР) в боратном буфере, рН 8,5. Гидролиз сухих образцов проводили 6 ч при концентрации белка 0,1% в 2 н. трифторуксусной

кислоте при 100° в запаянной ампуле. Гидролизаты сразу упаривали досуха в вакуум-эксикаторе; перед анализом еще несколько раз упаривали с водой для удаления кислоты [13].

Определение глюкозамина проводили после гидролиза навески сухих образцов при концентрации белка 0,1% в 3 н. HCl при 110° в течение 4–8 ч (для IgM — 4 ч, для Fc-фрагмента — 6 ч и для Fab — 8 ч). Оптимальная продолжительность гидролиза, дававшая максимальный выход глюкозамина, была в каждом случае определена в специальных опытах. Гидролизаты упаривали досуха в вакуум-эксикаторе, остаток дважды упаривался с водой. Анализ проводили на аминокислотном анализаторе (AAA-881, ЧССР) с колонкой 0,8 × 27 см в цитратном буфере, pH 5,28; по количеству определенного глюкозамина рассчитано процентное содержание ацетилглюкозамина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хургин Ю. И., Шмакова Ф. В., Тусункалиев У., Шерман Ф. Б., Климова В. А., Каверзнева Е. Д. (1975) *Биоорганическая химия*, **1**, 1140–1146.
2. Huber R. (1976) *Trends in Biochem. Sci.*, **1**, 174–178.
3. Kleine R., Shmakova F. V., Lapuk V. A., Vicha G. V., Kaverzneva E. D. (1975) *Immunochemistry*, **12**, 825–831.
4. Шмакова Ф. В., Виха Г. В., Лапук В. А., Каверзнева Е. Д. (1977) *Биоорганическая химия*, **3**, 1205–1209.
5. Baenziger J., Kornfeld S., Kochwa S. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 1889–1896, 1897–1903.
6. Hickman S., Kornfeld R., Osterland C. K., Kornfeld S. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 2156–2163.
7. Baenziger J., Kornfeld S. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 7260–7269.
8. Miller Fr. (1972) *Immunochemistry*, **9**, 217–228.
9. Andersen B. R. (1969) *Immunochemistry*, **6**, 739–749.
10. Лапук В. А., Шмакова Ф. В., Каверзнева Е. Д. (1975) *Биоорганическая химия*, **1**, 1134–1139.
11. Виха Г. В., Лапук В. А., Каверзнева Е. Д. (1975) *Биоорганическая химия*, **1**, 1379–1382.
12. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956) *Anal. Chem.*, **28**, 350–356.
13. Lee Y. C., Johnson G. S., White B., Scocca J. (1971) *Anal. Biochem.*, **43**, 640–643.

Поступила в редакцию
8. VI. 1977.

THE ROLE OF CARBOHYDRATE GROUPS IN IMMUNOGLOBULINS M. V. STERIC ACCESSIBILITY OF OLIGOSACCHARIDE GROUPINGS IN MACROIMMUNOGLOBULINS

KAVERZNEVA E. D., CHUKHROVA A. I., VIKHA G. V.

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

With the purpose to probe the differences in steric accessibility of carbohydrate groups situated on the surface of IgM molecule, their enzymatic splitting off from the Fc and Fab fragments was monitored in the course of native IgM digestion with the glycosidases. The cleavage was shown to occur in both Fc and Fab fragments, being more effective for the latter and thus indicating more exposed position of the carbohydrate chains in Fab fragments. Extensive enzymatic digestion was supposed to affect not only the side-chains but also to destruct the oligosaccharide core. A parallelism is discussed between this destruction and the conformational change in IgM molecule observed earlier after considerable loss (~ 30–40%) of carbohydrates.