



УДК 547.963.1

РОЛЬ УГЛЕВОДНЫХ ГРУПП В ИММУНОГЛОБУЛИНАХ М

VI *. ЗНАЧЕНИЕ ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ЦЕПЕЙ В IgM
ДЛЯ ЕГО СТАБИЛЬНОСТИ В РАСТВОРЕ*Каверзнева Е. Д., Виха Г. В., Рыбакова Л. М.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Для выяснения участия углеводных цепей в составе IgM в стабилизации молекулы в растворе проведено постепенное ферментативное отщепление части углеводных остатков от IgM с изучением изменения некоторых свойств, в том числе образования ассоциатов. Установлено, что потеря углеводных групп нарушает устойчивость IgM в растворе, приводит к образованию ассоциатов обезуглевоженных IgM и к последующему выпадению их в осадок. Образование ассоциатов в значительной мере усиливается снижением pH растворов с 8 до 5 и при продолжительном хранении препаратов при низких температурах. Обсуждена последовательность превращений молекулы IgM по мере отщепления углеводных групп. Сделан вывод, что олигосахаридные цепи в молекуле IgM способствуют устойчивости молекулы в растворе за счет повышения ее гидрофильности; тем не менее главная роль их состоит в закреплении и стабилизации оптимальной конформации IgM, необходимой для правильного функционирования его в организме.

В циркулирующей плазме крови крупные молекулы макроиммуноглобулинов (IgM) в норме удерживаются в растворе за счет взаимодействия химических группировок на их поверхности с компонентами окружающей среды. Немалое участие в этом явлении должны принимать гидрофильные олигосахаридные цепи молекул IgM, которых содержится 10 на каждую из пяти субъединиц. Для подтверждения этого участия необходимо было определить, как изменяется стабильность IgM в растворе после отщепления части углеводных цепей.

В настоящей статье приведен ряд фактов, указывающих на большое значение углеводных групп для поддержания молекул IgM в растворе в неассоциированном состоянии.

Для решения поставленной задачи было проведено постепенное ферментативное отщепление углеводных остатков от IgM (содержание нейтральных сахаров ~6,0%) и изучено изменение некоторых свойств обезуглевоженных IgM (IgM'), в том числе их способность к образованию ассоциатов.

Ферментативное отщепление углеводных остатков от IgM в растворе проводили параллельно с контрольными опытами, в которых белок удерживали нужное время в тех же условиях, но без введения гликозидаз. Таким образом можно было отличить влияние отщепления углеводных групп от влияния других факторов. В растворе IgM после инкубации с фер-

* Сообщение 5 см. [1].

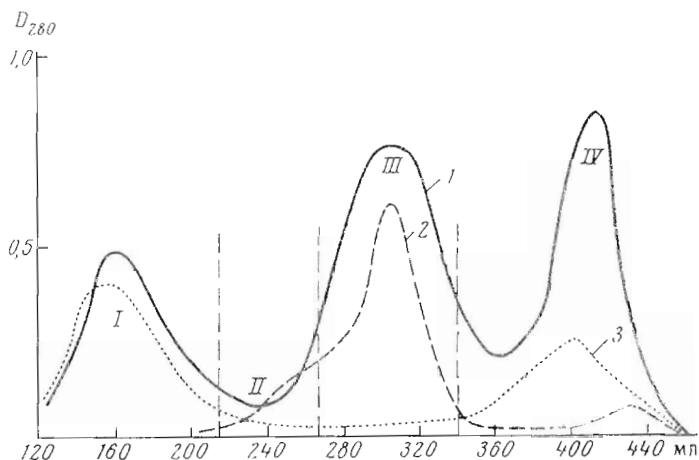


Рис. 1

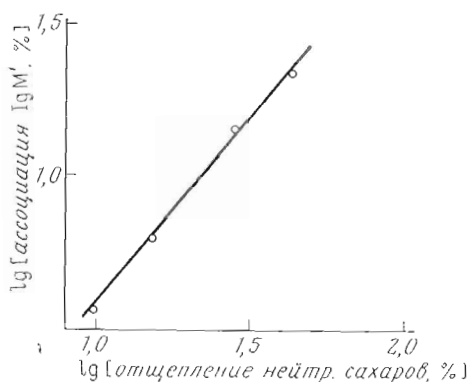


Рис. 2

Рис. 1. Разделение гель-хроматографией на сефарозе 4В продуктов инкубации IgM с гликозидазами. 1 — опыт с отщеплением 27% нейтральных сахаров; 2 — контрольный опыт без гликозидаз к опыту 1; 3 — опыт с отщеплением 50% нейтральных сахаров. Пик I — ассоциаты, III — IgM', IV — ферменты и другие примеси, II — промежуточная зона

Рис. 2. Корреляция между процентом отщепления углеводов и процентом ассоциации в IgM

ментами методами гель-фильтрации всегда можно было обнаружить высокомолекулярную фракцию ассоциатов (рис. 1), которая отсутствовала в контрольных опытах. Количество образовавшихся ассоциатов являлось указанием глубины изменений в состоянии обезуглевоженного IgM. На рис. 1 представлены хроматограммы выделения IgM' гель-фильтрацией после обработки гликозидазами. Обычно при этом с колонки с сефарозой 4В сначала сходит фракция образовавшихся высокомолекулярных ассоциатов, а затем, после некоторой промежуточной зоны, фракция обезуглевоженного IgM. Позднее выходят добавленные в раствор гликозидазы и другие примеси. Некоторые количественные данные по образованию ассоциатов IgM' после действия ферментов представлены в табл. 1. Как следует из ее рассмотрения, во всех случаях за время инкубации с ферментами отщепление углеводных остатков сопровождалось образованием ассоциатов; в то же время в контрольных опытах без добавки гликозидаз ассоциации за время опыта практически не наблюдалось. Из данных этой таблицы можно также видеть влияние pH среды и продолжительности опытов. Так, например, отщепление нейтральных сахаров при pH 5,1 и длительной инкубации (опыт 3) составило всего 22%, но ассоциатов образовалось больше, чем при pH 6,3 в условиях более глубокого отщепления (опыты 1 и 2).

Для того чтобы проследить за образованием ассоциатов во времени, был проведен опыт ферментализации гликозидазами в течение 25 сут с периодическим анализом продуктов реакции. Оказалось (табл. 2), что количество ассоциатов растет во времени по мере отщепления углеводов. В данных

Образование ассоциатов IgM' при ферментативном отщеплении углеводных остатков от IgM по данным разделения на сефарозе 4В

Опыт	Условия гидролиза ферментами			Отщепление нейтр. сахаров, % от содержания их в IgM	Ассоциаты, % от количества IgM
	pH	температура, °C	время, сут		
1	6,3	39	6	29,7	17,7
2	6,3	39	8	26,0	12,4
3	5,1	37	24	22	60
4	5,1	37	33	50	100

Примечание. При разделении контрольных смесей, в которых растворы IgM выдерживались в тех же условиях, что и в опыте, но без введения гликозидаз, фракции ассоциатов не найдено.

Таблица 2

Ход образования ассоциатов во времени при отщеплении сахаров

Время инкубации, сут	Содержание белка во фракциях (см. рис. 1), мг			Углеводы в IgM'		Ассоциаты IgM', %
	пик I, ассоциаты	зона II	пик III, IgM'	содержание, %	количество отщепленных, % к содержанию в IgM	
5	4,8	6,02	31,5	5,48	10	3,6
11	3,25	5	33,3	5,20	15	6,5
18	7,05	3,94	37,6	4,42	28	14,1
25	10,3	2,8	35,0	3,46	43	20,6

Примечание. На каждый опыт взято по 50 мг IgM в 50 мл ацетатного буфера (pH 6,3) при 39°.

условиях меняются сразу два параметра, от которых может зависеть образование ассоциатов: количество отщепившихся углеводных остатков и продолжительность опыта. Однако при изображении на графике (рис. 2) зависимость ассоциации от количества отщепившихся углеводных групп представляет собой прямую, что дает основание считать главным фактором ассоциации именно потерю углеводных остатков, на которую может накладываться влияние продолжительности опыта при повышенной температуре (37—39°).

Присутствие ассоциатов в растворах IgM после ферментативного гидролиза было также изучено спектроскопически по увеличению светорассеяния, вносимому ими в УФ-спектры IgM. Из сравнения результатов определения содержания белка по поглощению растворов при 280 нм и с помощью микробиуретовой реакции можно было вывести вклад, вносимый в D_{280} светорассеянием на ассоциатах. Этим методом была изучена стабильность растворов IgM и определено влияние на нее отщепления углеводных групп, а также таких факторов, как продолжительность опыта, pH и концентрации белка в растворе. Наконец, некоторые указания на конформационные изменения IgM после отщепления углеводных остатков были получены из характера УФ-спектров после внесения в них поправки на светорассеяние.

В табл. 3 дана количественная оценка содержания ассоциатов в различных препаратах IgM: нативных обезуглевоженных и в выделенных препаратах ассоциатов на основании сопоставления определения белка по D_{280} и по микробиуретовому методу. В свежеполученных после выделения на сефарозе 4В препаратах IgM нативных, а также IgM' ассоциатов практически нет. При хранении растворов (pH 8,0; 4—5°) ассоциаты постепенно образуются: очень медленно, в течение нескольких месяцев, в раство-

Оценка примеси ассоциатов IgM' на основании вклада в поглощение при 280 нм за счет светорассеяния *

Препарат	Количество белка, мг/мл		Поправка на ассоциацию, %
	по D_{280}	по микробиурету	
Нативный IgM, свежевыделенный раствор	0,62	0,61	Нет
Нативный IgM, полученный растворением сухого препарата в трис-буфере (pH 8,0)	1,95	1,45	25
IgM', свежий, выделенный с колонки:	0		
препарат 1 **	0,425	0,450	Нет
препарат 2	0,94	1,00	»
препарат 3	0,93	1,04	»
IgM' в растворе 1 М гуанидинхлорида	0,974	1,04	»
IgM' через 5 сут после выделения гель-фильтрацией	0,54	0,46	15
Отдельные препараты ассоциатов IgM':			
ассоциат 1 **	0,415	0,170	60
ассоциат 2	0,395	0,16	60
ассоциат 3	0,504	0,16	68
ассоциат 4	0,570	0,17	70
Ассоциат IgM' в 1 М гуанидинхлориде	0,96	0,88	8

* Для расчета количества IgM по D_{280} принят показатель поглощения $E_{2\%}^{1\text{cm}} = 12,0$. Поправка на ассоциацию выведена как процент избыточного содержания белка, определенного по D_{280} относительно количества его по микробиуретовому методу.

** Приведены анализы растворов IgM' и ассоциатов из различных опытов.

Таблица 4

Содержание нейтральных сахаров в IgM' и в их ассоциатах после разделения гель-хроматографией на колонке с сефарозой 4В

№ опыта	Условия опытов			Содержание нейтральных сахаров, %		Отщепление нейтральных сахаров, %	
	pH	температура, °C	время, сут	в ассоциатах в растворе	в IgM' в растворе	в ассоциатах	в IgM'
1	6,3	39	6	3,8	4,7	37	21,7
2	6,3	39	8	4,2	4,6 *	30	23,4
3	6,3	39	8	3,2	3,5	46,6	41,7
4	5,0	37	24	3,8	4,35	37	27
5	5,1	37	33	3,0 **	—	50	—
6	6,3	39	7	1,89 ***		68,5	—

* Разница в глубине отщепления в оп. 2 и 3 зависит от разного количества добавленных ферментов.

** Весь белок во фракции ассоциатов; мономерного IgM' не найдено.

*** Определение нейтральных сахаров проведено в осадке выпавших при стоянии ассоциатов. Ферментализ проведен при помощи иммобилизованных на носителе гликозидаз (данные будут опубликованы позднее).

рах нативных IgM и гораздо быстрее, за несколько дней, в достаточно глубоко обезуглевоженных препаратах. Снижение pH растворов с 6,3 до 5,0 при инкубации и повышение концентрации белка способствуют ассоциации. Этот вывод следует из приведенного выше примера (табл. 1, опыт 3), а также из следующего наблюдения. При концентрировании двух примерно одинаковых по степени отщепления углеводов растворов IgM' в вакууме, различавшихся по pH раствора, поправка на примесь ассоциатов возросла при pH 5,1 до 45%, а при pH 6,3 — только до 34%.

Внесение в раствор IgM' гуанидинхлорида до 1 М концентрации приводит к распаду ассоциатов; в выделенных препаратах ассоциатов введение

В раствор 1 М гуанидинхлорида значительно снижает их концентрацию (в разных опытах на 20—80%). В 3 М гуанидинхлориде ассоциаты полностью исчезают, но при этом происходит структурная модификация белка, что следует из резко измененного УФ-спектра растворов в области 250—280 нм.

Сравнение содержания нейтральных углеводов в препаратах IgM' и выделенных из тех же опытов ассоциатов показало, что в ассоциированных молекулах содержание остаточных углеводов всегда несколько ниже, чем в неассоциированных (табл. 4). Следовательно, в ассоциаты уходят прежде всего наиболее обедненные углеводами молекулы IgM. Как видно из таблицы, в опыте 5 (табл. 4) вообще весь IgM ушел в ассоциированную фракцию: он содержал 3% нейтральных сахаров при 6,0% для нативного белка, т. е. отщепление углеводов достигло в нем 50%. Более глубокого отщепления во фракциях, остающихся в растворе, нам, а также Миллеру [2] не удавалось достигнуть. Очевидно, при большем отщеплении углеводов растворимость настолько падает, что продукты реакции выпадают в осадок, который обычно образуется при проведении длительных опытов с глубоким отщеплением. Анализ такого осадка (табл. 4, оп. 6) показал отщепление 70% углеводных групп.

УФ-спектры модифицированных IgM' могут дать некоторое представление об изменениях, происходящих в молекулах IgM после отщепления углеводов. После введения поправки на светорассеяние спектры свежеполученных растворов IgM' мало отличались от спектра нативного белка (рис. 3). Незначительно снижается отношение D_{280}/D_{250} (в среднем с 2,3—2,0 до 1,7—1,9). Напротив, УФ-спектры ассоциатов сильно изменены: на них пропадает минимум при 250—255 нм и после введения поправки на опалесценцию лишь слабо проявляется максимум при 280 нм.

Из приведенных данных следует, что потеря углеводных цепей нарушает устойчивость молекул IgM в растворе, приводит к образованию ассоциатов и к дальнейшему выпадению их в осадок.

Можно ли наблюдаемые явления объяснить снижением гидрофильности IgM благодаря отщеплению углеводных групп? Вероятное поверхностное положение углеводных цепей в IgM вытекает из ряда наблюдений, в том числе из доступности их действию гликозидаз и из изотерм гидратации IgM [3]. Недавно рентгеноструктурным анализом [4] было показано, что в IgG его единственная углеводная цепь расположена на поверхности домена C_{H-2} . Поэтому отрицать значение гидрофильности углеводных групп для растворимости IgM нет оснований. Однако необходимо принять во внимание происходящие при отщеплении углеводных групп конформационные изменения, установленные нами ранее [5, 6] и предполагаемые на основании изложенных выше опытов.

На основании сопоставления экспериментальных данных можно предположить следующую последовательность превращений при отделении углеводных цепей от IgM. Небольшое отщепление углеводных остатков (порядка 10—20%), входящих в состав разветвленных концов олигосахаридных цепей, проходит безболезненно для общей структуры молекулы. Кривая дисперсии оптического вращения, определенная для образца IgM' с 20%-ным отщеплением углеводов, не обнаружила существенных

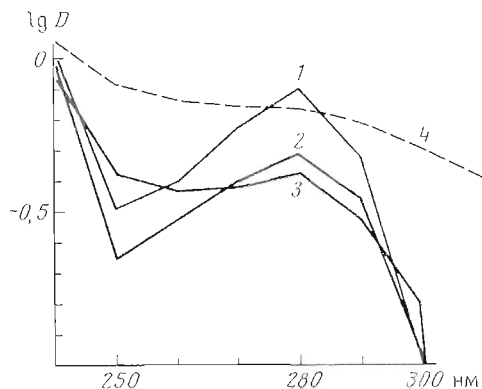


Рис. 3. УФ-спектры различных препаратов после введения в них поправки на светорассеяние: 1 — нативный IgM; 2 — частично обезуглевоженный IgM; 3 — ассоциаты IgM'; 4 — спектр ассоциатов IgM' до внесения поправки на светорассеяние

отличий по сравнению с нативным IgM в константе b^0 ; вычисленный по максимуму пика при 233 нм процент спиральности почти не изменился: найдено 13% против 11% для нативного IgM. В УФ-спектре образца IgM' с 13% отщепления углеводов произошли лишь незначительные изменения: отношение D_{280}/D_{250} немного снизилось (с 2,0 для нативного IgM до 1,7 для обезуглевоженного). Следовательно, при малом отщеплении углеводов нет указаний на какие-либо заметные изменения конформации в строении IgM'.

Можно отметить полную корреляцию этих результатов с нашими наблюдениями по гидролизу IgM трипсином [5]. Небольшое отщепление углеводов не отражается на действии трипсина на IgM и даже несколько облегчает его, по-видимому, за счет удаления углеводных остатков, экранировавших некоторые трипсино-лабильные связи.

После более глубокого отщепления углеводов (40—50%) наблюдаются явления иного порядка. В этих условиях начинают распадаться элементы основания олигосахаридных цепей, состоящего из маннозы и ацетилглюкозамина [1]. Изменяется характер действия на такие продукты трипсина: оно заметно тормозится, что можно объяснить конформационными изменениями, при которых часть трипсино-лабильных связей становится недоступной для трипсина. Как следует из настоящей работы, в растворах IgM при глубоком отщеплении углеводов образуется много ассоциатов. УФ-спектры в таких растворах после внесения поправки на светорассеяние должны принадлежать этим ассоциатам, структура которых нам неизвестна. Однако сопоставление найденных нами в опытах с трипсином гидролизом конформационных изменений в IgM' и характерных изменений УФ-спектров ассоциатов приводит к заключению, что найденные изменения в характере этих спектров отражают существенные конформационные перестройки после отщепления углеводных групп от IgM'.

По-видимому, образование ассоциатов проходит в несколько стадий: отщепление углеводных остатков доходит постепенно до такого уровня (30—50%), при котором вначале происходят незначительные пространственные изменения структуры и нарушается устойчивость молекулы в растворе. При этом на поверхность молекулы, вероятно, выходят гидрофобные участки, взаимодействие между которыми вызывает первичную ассоциацию. Последняя инициирует новые конформационные изменения, и в конечном счете ассоциат теряет растворимость и выпадает в осадок.

Таким образом, олигосахаридные цепи в молекуле IgM способствуют устойчивости молекулы в растворе за счет повышения ее гидрофильности. Однако главная роль их состоит в закреплении и стабилизации оптимальной структурной конформации IgM, необходимой для правильного функционирования его в организме.

Экспериментальная часть

Получение моноклонального IgM из сыворотки больного макроглобулинемией (болезнь Вальденштрёма) путем очистки гель-фильтрацией на сефарозе 4В описано в работе [7]. Отщепление углеводных групп набором гликозидаз проведено как описано [8]: раствор IgM с 0,5—0,8 мг/мл белка в ацетатном буфере с pH 5,1 или 6,3 выдерживали в термостате при 37 или 39° под слоем толуола в течение нужного срока, добавляя к нему периодически гликозидазы, вначале нейраминидазу, затем β -галактозидазу и смесь разных гликозидаз, в том числе β -N-ацетилглюкозаминидазу из эпидидимиса хряка. После окончания инкубации выделение частично обезуглевоженных IgM (IgM') и их ассоциатов проводили гель-фильтрацией на сефарозе 4В в 0,01 М трис-буфере, содержащем 0,3 М NaCl (pH 8,2). Выделенные фракции диализовали и концентрировали в вакуум-эксикаторах или ультрафильтрацией. Препараты хранили в растворе при низкой температуре.

Нейтральные углеводы определены по реакции с антроном [9] и с фенол-серной кислотой [10]. Содержание белка устанавливали по микроварианту биуретового метода [11] и по оптическому поглощению при 280 нм на спектрофотометре СФ-4. УФ-спектры сняты на регистрирующем спектрофотометре Spesord UV-VIS (ГДР). Поправку на светорассеяние вычисляли путем экстраполяции в коротковолновую область линейной зависимости $\lg D$ от λ в интервале λ от 320 до 370 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каверзнева Е. Д., Чухрова А. И., Виха Г. В. (1978) Биоорг. химия, 4, 369—374.
2. Miller Fr. (1972) *Immunochem.*, 9, 217—225.
3. Хургии Ю. И., Шерман Ф. Б., Тусупкалиев У., Лапук В. А., Шмакова Ф. В., Климова В. А., Каверзнева Е. Д. (1975) Биоорг. химия, 1, 1140—1146.
4. Huber R. (1976) *Trends in Biochem. Sci.*, 1, 174—178.
5. Шмакова Ф. В., Виха Г. В., Лапук В. А., Каверзнева Е. Д. (1977) Биоорг. химия, 3, 1205—1211.
6. Kleine R., Shmakova F. V., Lapuk V. A., Vikha G. V., Kaverzneva E. D. (1975) *Immunochem.*, 12, 825—831.
7. Лапук В. А., Шмакова Ф. В., Каверзнева Е. Д. (1975) Биоорг. химия, 1, 1134—1139.
8. Каверзнева Е. Д., Виха Г. В., Лапук В. А. (1975) Биоорг. химия, 1, 1379—1382.
9. Hormann H., Gollwitzer R. (1966) *Z. Physiol. Chem.*, 346, 21—23.
10. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P. A., Smith F. (1956) *Anal. Chem.*, 28, 350—358.
11. Robinson H. W., Hogden C. G. (1940) *J. Biol. Chem.*, 135, 707—725.

Поступила в редакцию
1.XI.1977

THE ROLE OF CARBOHYDRATE GROUPS IN IMMUNOGLOBULINS M. VI. IMPLICATION OF OLIGOSACCHARIDE CHAINS IN IgM STABILITY IN SOLUTION

KAVERZNEVA E. D., VIKHA G. V., RYBAKOVA L. M.

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

With the purpose of elucidating the role played by carbohydrate chains of IgM in stabilizing the molecules in solution, stepwise enzymatic cleavage of a part of carbohydrate residues was performed and the changes in some properties, such as aggregate formation, were monitored. The loss of carbohydrates was found to decrease the IgM stability in solution and lead to association of carbohydrate-deprived IgM molecules followed by their precipitation. The formation of associates is promoted by decrease in pH from 8.0 down to 5.0 or longer storage. Consecutive transformations of IgM molecules are discussed which run parallel with splitting off the carbohydrate groups. A conclusion was drawn that carbohydrate chains contribute to the IgM stability in solution making it more hydrophilic and conferring rigidity on optimal conformation which is essential for IgM functioning in organism.