



УДК 577.154.26.02

**ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ И СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ
МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ α -L-ФУКОЗИДАЗЫ ЧЕЛОВЕКА
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ
ФУКОЗОСОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОСАХАРИДОВ***Вах Н. Л., Бейер Е. М., Видершайн Г. Я.**Институт биологической и медицинской химии Академии наук СССР, Москва**Бовин Н. В., Зурабян С. Э.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва*

Известно, что α -L-фукозидаза (КФ 3.2.1.51) существует в виде множественных форм, обнаруживаемых с помощью гель-фильтрации [1-3], изоэлектрофокусирования [4, 5], электрофореза [6] и аффинной хроматографии [7, 8]. Биологический смысл существования множественных форм фермента оставался до недавнего времени невыясненным, и не исключено, что их наличие могло быть результатом ограниченного протеолиза при выделении фермента [9]. Однако обнаружение в организме человека и животных фукозосодержащих соединений с различным типом связи фукозильного остатка позволяет предполагать участие множественных форм фермента в деградации этих соединений. Можно думать, что при этом разные формы фермента обладают определенной специфичностью к особенностям структуры расщепляемых субстратов.

В настоящей работе при использовании фукозосодержащих олигосахаридов различного строения получены данные о свойствах и главным образом о субстратной специфичности множественных форм α -L-фукозидазы человека. Кроме этого выяснилось влияние ограниченного протеолиза α -L-фукозидазы на образование ее множественных форм. Предварительные данные по исследованию некоторых из указанных вопросов изложены в опубликованном ранее сообщении [10].

С помощью метода изоэлектрофокусирования из сульфат-аммонийной фракции гомогената почек человека было выделено пять форм α -L-фукозидазы с изоэлектрическими точками 5,54; 5,61; 5,83; 6,07; 6,35. Выборочное рефокусирование некоторых форм (рис. 1) свидетельствовало об их индивидуальности и о том, что, по-видимому, множественные формы представляют собой ферменты с постоянными значениями изоэлектрической точки.

Исследование термостабильности выделенных множественных форм фермента показало, что при температуре примерно до 60° С они сохраняют в среднем 80% активности, при 70° С происходит резкое снижение ферментативной активности — в среднем на 70% (рис. 2). Однако, если при 70° С

Сокращения: NeuGc—N-гликолилейраминовая кислота, GalNAc-ol—N-ацетилгалактозаминитол.

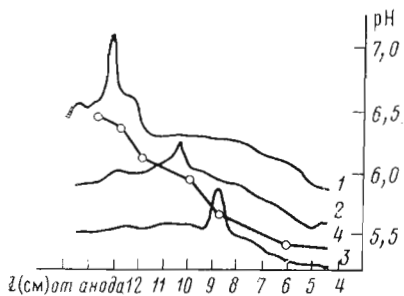


Рис. 1

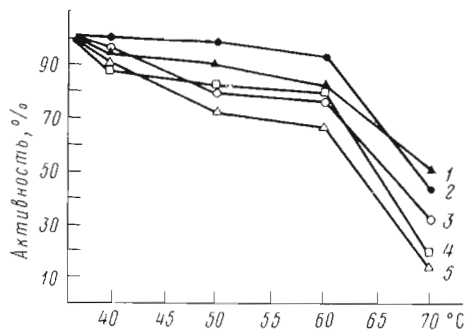


Рис. 2

Рис. 1. Рефокусирование форм α -L-фукозидазы человека с pI 6,35 (1), 5,83 (2) и 5,61 (3); 4 – градиент pH

Рис. 2. Термостабильность множественных форм α -L-фукозидазы человека с pI 5,61 (1), 5,54 (2), 6,07 (3), 5,83 (4) и 6,35 (5)

остаточная активность формы с pI 6,35 составляет 15%, форма с pI 5,61 сохраняет 60% активности. Из данных опытов по термостабильности можно заключить, что «кислые» формы α -L-фукозидазы являются более стабильными по сравнению с «нейтральными».

Изучение влияния pH на активность как множественных форм, так и исходного препарата (рис. 3) показало, что для последнего наблюдается четко выраженный оптимум при pH 4,6 и плечо, предположительно отвечающее второму оптимуму при pH 5,4, что согласуется с известными данными [11]. Множественные формы можно разделить на две группы по более выраженному оптимуму pH . К первой группе относятся формы с pI 6,35 и 5,54 с основным оптимумом при pH 5,0. Для форм с pI 5,61; 5,83 и 6,07 оптимум смещен в более кислую область и находится при pH 4,1.

Исходя из формы кривой pI -зависимости исходного препарата, можно было бы предположить, что плечо при pH 5,4 – результат существования определенной формы с оптимумом в этой области. Однако этого не наблюдается, а графики pH -зависимости множественных форм выявляют гетерогенность последних. Не исключено, что особенности кривых отражают pH -зависимое равновесие между агрегированными и диссоциированными формами фермента, что наблюдалось также другими авторами [12].

Каталитические свойства α -L-фукозидазы исследовали, используя в качестве субстрата *n*-нитрофенил- α -L-фукопиранозид. Полученные данные (табл. 1) свидетельствуют о сходстве кинетических параметров реакции, катализируемой отдельными множественными формами фермента.

Использование ряда синтетических и природных фукозосодержащих олигосахаридов (I)–(X) в качестве субстратов показало как определенные сходства, так и различия в субстратной специфичности множественных

Таблица 1

Кинетические параметры реакции расщепления *n*-нитрофенил- α -L-фукопиранозид, катализируемой множественными формами α -L-фукозидазы человека

Формы фермента с pI	K_m , мМ	V , (мкмоль/мин)/мг белка	Формы фермента с pI	K_m , мМ	V , (мкмоль/мин)/мг белка
6,35	0,271	23	5,61	0,209	35
6,07	0,372	30	5,54	0,271	23
5,83	0,583	30			

форм α -L-фукозидазы. Общей особенностью исследованных форм являлось отсутствие узкой избирательности по отношению к тому или иному типу гликозидной связи ($\alpha 1 \rightarrow 2$, $\alpha 1 \rightarrow 3$ и $\alpha 1 \rightarrow 4$) фукозильного остатка в различных по структуре олигосахаридах. Исключение составляла лишь форма фермента с *pI* 5,61, которая не гидролизовала $\alpha(1-4)$ -связи фукозильного остатка в субстратах (II)–(IV) (табл. 2).

Природа соседнего с фукозильным остатком моносахаридного звена, по-видимому, имеет существенное значение для действия всех форм α -L-фукозидазы. Этот вывод подтверждается при сравнительном изучении расщепления субстратов (I), (II), содержащих один и тот же тип связи и различающихся природой соседнего с фукозой моносахаридного звена. Как следует из данных табл. 2, наличие в субстрате (I) N-гликолилпираниновой кислоты затрудняет расщепление этого дисахарида, несмотря на его сравнительно высокую концентрацию. В то же время субстрат (II), представляющий собой 2-ацетамидо-2-дезоксид-4-O-(α -L-фукопиранозил)-D-глюкозу, достаточно полно расщеплялся формами фермента с *pI* 6,35; 6,07; 5,83 и 5,54, не гидролизующими субстрат (I).

Введение заместителя в соседний с фукозильным остатком моносахарид приводит к уменьшению степени гидролиза субстрата под действием исследованных форм фермента. Это показано при использовании субстрата (III), сходного по строению с олигосахаридной цепью группового вещества крови с Le^a-специфичностью и отличающегося от субстрата (II) только присоединенной к N-ацетилглюкозамину в третьем положении галактозой. Как видно из табл. 2, расщепление этого субстрата значительно хуже, чем субстрата (II) каждой из множественных форм, за исключением формы с *pI* 5,61, которая, как указывалось выше, не расщепляет $\alpha(1-4)$ -связь.

Влияние дальнейшей модификации олигосахаридной цепи на степень гидролиза ферментами было исследовано при использовании лакто-N-фукопентаозы II (IV), отличающейся от субстрата (III) наличием лактозильного остатка. При изучении действия множественных форм α -L-фукозидазы на этот субстрат показано, что процент гидролиза в значительной степени возрастает. Исключением по-прежнему является форма с *pI* 5,61, не расщепляющая этот субстрат.

Изменение степени гидролиза в зависимости от наличия в молекулах субстратов одного или двух фукозильных остатков изучалось при сравни-

Таблица 2

Расщепление (%) фукозосодержащих олигосахаридов различными множественными формами α -L-фукозидазы человека

Субстрат	[S], мМ *	Множественная форма с <i>pI</i>				
		6,35	6,07	5,83	5,61	5,54
(I)	8	0	0	0	0	0
(II)	0,08	33,3	25,0	41,7	0	8,3
(III)	4	0	0	<1	0	<1
(IV)	1,5	9,5	13,6	1	0	1
(V)	5	2,0	1	<1	1,6	<1
(VI)	3	12,9	11,0	3,8	6,1	1,4
(VII)	3	<1	3,4	<1	<1	<1
(VIII)	8	2,2	16,9	1,1	1,9	<1
(IX)	10	1,6	9,7	<1	<1	<1
(X)	1,5	4,5	23,3	1,8	8,1	<1

* Различные концентрации субстратов обусловлены необходимостью достоверного определения в пробе не менее 0,5 мкг фукозы.

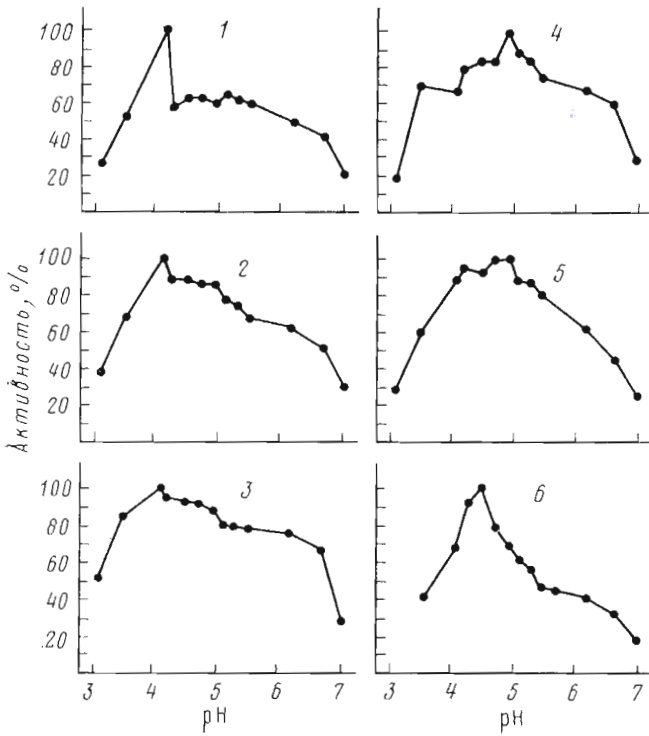
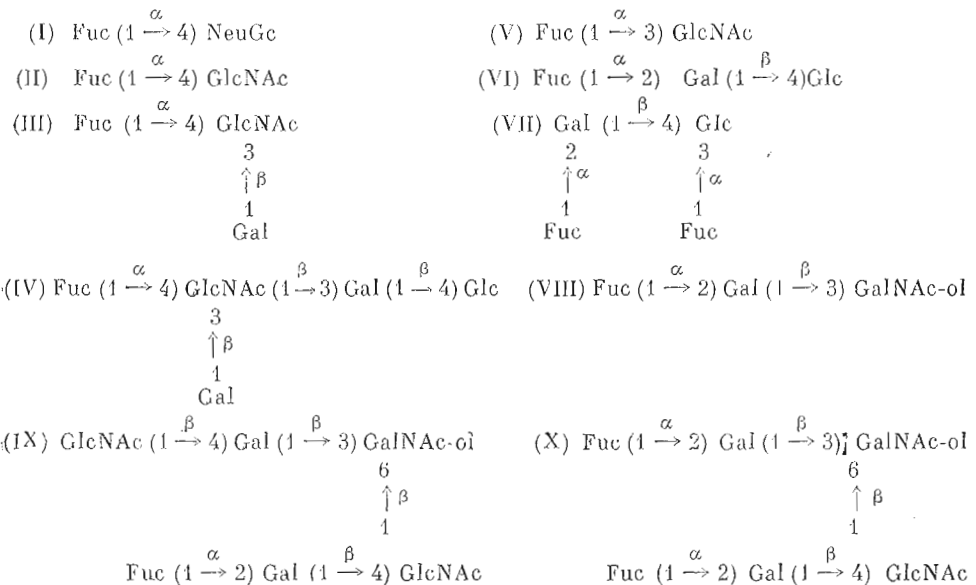


Рис. 3. Зависимость от рН активности множественных форм α -L-фукозидазы с pI 5,61 (1), 5,83 (2), 6,07 (3), 6,35 (4), 5,54 (5) и исходного препарата фермента (6)

тельном исследовании расщепления субстратов (VI, VII). Указанные субстраты различаются лишь наличием дополнительного фукозильного остатка с $\alpha(1-3)$ -связью в субстрате (VII). Как было показано, подобная модификация приводит к резкому снижению его расщепления. При этом



остаются неясным, является ли обнаруживаемая фукоза результатом отщепления обоих фукозильных остатков либо одного из них. В случае расщепления $\alpha(1-3)$ -связи продуктами гидролиза должны являться фукоза и соответствующий трисахарид. В случае же отщепления обоих фукозильных остатков продуктами гидролиза являлись бы лактоза, фукоза, а при наличии β -галактозидазы, значительная активность которой обнаруживается в препаратах множественных форм α -L-фукозидазы, — также галактоза и глюкоза. Как было показано, продуктами гидролиза лактодифуко-тетраозы под действием всех множественных форм фермента являются галактоза, фукоза и дисахарид $Fuc\alpha(1-3)Glc$. Эти данные свидетельствуют о том, что деградация происходит по пути отщепления фукозильного остатка с $\alpha(1-2)$ -связью.

Исследование субстратов (VIII) — (X) показало, что все они в той или иной степени расщепляются каждой множественной формой α -L-фукозидазы. К сожалению, разнообразие структур этих субстратов по многим параметрам (тип связей, длина олигосахаридной цепи и т.п.) не позволило вывести какие-либо закономерности в расщеплении этих соединений. Однако полученные данные подтверждают выводы прежних экспериментов, в которых было показано, что фукозидаза животных отщепляет L-фукозу от фрагментов групповых веществ крови и не действует на нативные молекулы этих биополимеров [1, 2].

Определенные различия в гидролитической активности форм α -L-фукозидазы были выявлены при элементарном кинетическом анализе с использованием субстратов (V) и (VI). Из табл. 2 видно, что по степени гидролиза субстрата (V) можно выделить две группы ферментов: формы с rI 6,35 и 5,61 и формы с rI 5,54; 5,83 и 6,07. Выбрав формы с rI 6,35 и 5,54 как представителей каждой группы, мы исследовали зависимость гидролиза субстрата от времени. Результаты эксперимента (рис. 4) свидетельствуют о значительных различиях в скорости гидролиза α -L-фукозил-1 \rightarrow 3-N-ацетилглюкозамина каждой из этих форм.

При исследовании действия множественных форм на субстрат (VI) (2'-фукозиллактоза) использовали аналогичный подход. При этом было показано (табл. 2), что множественные формы α -L-фукозидазы можно также разделить на две группы ферментов. Одна из них включала формы с rI 6,35 и 6,07, а другая — формы с rI 5,83; 5,61 и 5,54. Изучение зависимости скорости гидролиза от времени также показало наличие существенных различий в скорости гидролиза субстрата (VI) разными формами α -L-фукозидазы (рис. 5).

Таким образом, изучение субстратной специфичности множественных форм α -L-фукозидазы выявило индивидуальные особенности субстратной специфичности как при расщеплении тех или иных субстратов одной из множественных форм, так и при действии множественных форм на один и тот же субстрат. Примером, иллюстрирующим первое положение, является форма с rI 5,61, практически не гидролизующая субстраты, в которых фукозильный остаток присоединен $\alpha(1-4)$ -связью. Этот же факт доказывает, по-видимому, и то, что множественные формы α -L-фукозидазы могут быть настроены на определенный тип гликозидной связи. О важности не только типа связи, но и природы соседнего с фукозой моносахаридного звена для гидролиза субстрата говорят данные исследования субстратов (I, II).

Большие различия, показанные при кинетическом анализе гидролиза субстратов (V, VI), могут свидетельствовать о целесообразности существования множественных форм α -L-фукозидазы, которые участвуют в деградации самых разнообразных по структуре фукозосодержащих соединений.

Предположение о возможной роли протеолиза в образовании множественных форм фермента побудило нас провести серию экспериментов на ткани плаценты с использованием ингибиторов различных типов протеи-

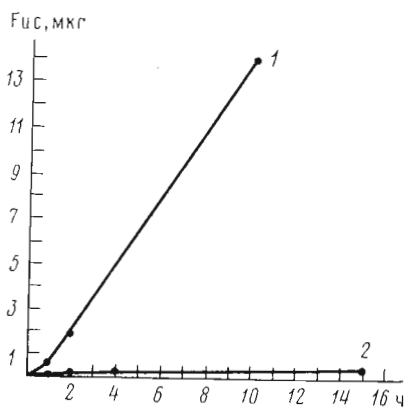


Рис. 4

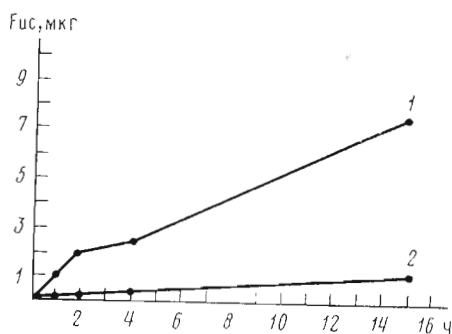


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость гидролиза субстрата (V) от времени формами α -L-фукозидазы с рI 6,35 (1) и 5,54 (2)

Рис. 5. Зависимость гидролиза субстрата (VI) от времени формами α -L-фукозидазы с рI 6,35 (1) и 5,54 (2)

наз. Выбор плаценты в качестве источника фермента обусловлен возможностью быстрой заморозки материала плаценты, что сводит к минимуму влияние протеиназ в процессе выделения, при показанной ранее [13] идентичности изоферментного спектра α -L-фукозидазы плаценты и паренхиматозных органов — в частности, почек человека.

Было обнаружено, что ингибиторы бактериальной природы лейпептин и пепстатин, тормозящие активности тиоловых и кислых протеиназ соответственно, в 1 мМ концентрации [14] не оказывают влияния на спектр множественных форм α -L-фукозидазы. Аналогичные результаты были получены при использовании фенилметилсульфонилфторида — ингибитора сериновых протеиназ (рис. 6). Некоторые различия в соотношении наблюдаемых компонентов объясняются техникой сканирования, не позволяющей учесть диффузию белка в тонком слое сефадекса.

При действии высокоактивной лизосомной протеиназы катепсина D на ферментный препарат α -L-фукозидазы также получены аналогичные данные. Все изложенное выше позволяет считать, что, по-видимому, множественные формы не являются следствием ограниченного протеолиза при выделении фермента. Кроме того, опыты с катепсином D свидетельствуют об устойчивости фермента к одной из наиболее активных тканевых протеиназ, что может объясняться гликопротеидной природой α -L-фукозидазы человека [15].

Экспериментальная часть

В работе использовали сефадексы G-25 и G-200 (Pharmacia, Швеция), сывороточный альбумин человека (Reanal, Венгрия), амфолины (ЛКВ, Швеция), *n*-нитрофенил- α -L-фукопиранозид и *N*-ацетил-*D*-глюкозамин (Serva, ФРГ), 4-метилумбеллиферил- α -L-фукопиранозид (Koch-Light, Англия), *L*-фукозу (BDH Lab. Chemicals, Англия), *D*-глюкозу и *D*-галактозу («Союзреактив»); ингибиторы протеиназ — лейпептин и пепстатин (Вауп, Япония), фенилметилсульфонилфторид (Serva, ФРГ). Препарат катепсина D был предоставлен О. В. Казаковой и О. Н. Лубковой (Институт биологической и медицинской химии АМН СССР).

Дисахарид (I) — 4-О-(α -L-фукопиранозил)-*N*-гликолилнейраминаовая кислота — получен от д-ра К. Хотта (Токийский университет, Япония). Дисахарид (II) получали как описано ранее [16]; трисахарид (III) син-

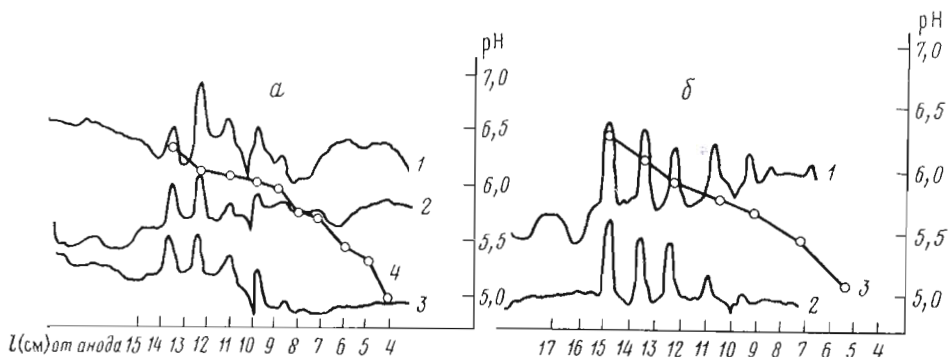


Рис. 6. Изоэлектрофокусирование множественных форм α -L-фукозидазы в присутствии ингибиторов протеиназ: а) лейпептин (1), пепстатин (2), контроль (3), градиент рН (4); б) фенолметилсульфонилфторид (1), контроль (2), градиент рН (3). Конечная концентрация ингибиторов в пробе 1 мМ

тезировали по методу [17, 18]. Субстраты (IV, VI, VII) получены от д-ра А. Гауз (Институт им. Макса Планка, Гейдельберг, ФРГ).

Дисахарид (V) — 2-ацетидамо-2-дезоксиг-3-О-(α -L-фукопиранозил)-D-глюкоза — получен дифенилциклопропениловым методом [19, 16], исходя из 2-О-бензил-3,4-ди-О-(*n*-нитробензоил)- α -L-фукопиранозилбромид [20] и бензил-2-ацетидамо-4,6-ди-О-ацетил-2-дезоксиг- α -D-глюкопиранозид [16]. Продукт гликозилирования, выделенный хроматографией на силикагеле в системе бензол — эфир (7 : 3) с выходом 60%, дезацетилировали в метаноле с триэтиламином. После стандартной обработки и кристаллизации из спирта получили бензил-2-ацетидамо-2-дезоксиг-3-О-(2-О-бензил- α -L-фукопиранозил)-D-глюкопиранозид, $C_{28}H_{37}NO_{10}$, т. пл. 225–226° С, $[\alpha]_D^{20} +33^\circ$ (с 0,5; метанол). Каталитическое гидрирование последнего над Pd/C в 80% метаноле дает аморфный дисахарид (V), $[\alpha]_D^{20} -82^\circ$ (с 0,6; вода), гомогенный по ТСХ на силуфол в ряде систем. ТМС-производное полиола, полученного при восстановлении дисахарид (V) $NaBH_4$, обнаруживается в условиях анализа методом ГЖХ [16] в виде одного пика. Анализ полиола методом метилирования с последующей хромато-масс-спектрометрией [21] показал наличие лишь (1–3)-связи в дисахариде (V).

Субстраты (VIII) — (X) были любезно предоставлены нам Н. П. Арбатским (Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР).

Частично очищенный ферментный препарат α -L-фукозидазы получали из гомогената почек человека (материал аутопсии) по методике [22].

В работе использовали водный гомогенат плаценты человека, приготовленный в соотношении 1 : 2. Ткань плаценты, полученная при медицинском прерывании нормальной беременности, была предоставлена д-ром В. А. Бахаревым (Всесоюзный научно-исследовательский центр по охране здоровья матери и ребенка МЗ СССР).

Концентрирование растворов белка перед изоэлектрофокусированием осуществляли методом ультрафильтрации на мембранах типа PM-30 и XM-100 (Amicon, США) или с использованием фикола (Pharmacia, Швеция). Концентрацию белка определяли по методу Лоури [23].

Изоэлектрофокусирование ферментных препаратов проводили в аппарате с охлаждающим блоком (Desaga, ФРГ) при 4° С на стеклянных пластинках с тонким слоем сефадекса G-200 согласно рекомендации фирмы [24]. При использовании метода в аналитических целях на пластину 20×20 см с помощью автоматических пипеток наносили образцы ферментных препаратов, содержащие 50–200 мкг белка в 10–30 мкл. Изоэлектрофокусирование проводили 16 ч при 300 В, затем напряжение увеличивали до 600 В в течение 1,5 ч.

При препаративном изоэлектрофокусировании на пластину 20×40 см на расстоянии 10 см от апода наносили полосой размером 1×16 см до 2 мл обессоленного на сефадексе G-25 ферментного препарата из почек человека, содержащего до 500 мг белка с уд. акт. ≈ 200 усл. ед./мг. Изоэлектрофокусирование проводили при 500 В в течение первых 20 ч, затем напряжение увеличивали до 800 В, после чего через каждые 2 ч увеличивали на 100 В до 1000 В. Разделение α -L-фукозидазы на формы контролировали по флуоресцирующим зонам, накладывая бумажные реплики (10 мм, 37° С), смоченные 1 мМ раствором 4-метилумбеллиферил- α -L-фукопиранозидом, на два края пластины. Зоны геля, содержащие определенную форму фермента, собирали с пластины и помещали в 0,05 н. ацетатный буфер, рН 5,0. Элюирование α -L-фукозидазы с геля проводили этим же буфером, используя стеклянные фильтры.

Определение градиента рН осуществляли непосредственно в слое геля при помощи комбинированного стеклянного электрода LOT 406-6298-K7 (Ingold, Швейцария).

Активность α -L-фукозидазы определяли по количеству свободного *n*-нитрофенола, образующегося при расщеплении *n*-нитрофенил- α -L-фукопиранозидом по методике [25]. За единицу активности принято количество фермента, приводящее в условиях опыта (37° С) к увеличению поглощения при 400 нм на 0,01 за 1 мин. Константы Михаэлиса определяли, используя в качестве субстрата *n*-нитрофенил- α -L-фукопиранозид. Расчеты проводили по уравнению линейной регрессии в координатах Эди-Хофсти [26].

Гидролиз субстратов проводили, инкубируя определенное количество ферментного препарата 1 сут в объеме 50 мкл с 40 мкл субстрата при 37° С. Реакцию останавливали, осаждая белок спиртом (конечная концентрация спирта 70%). Гидролизат обессоливали, упаривали досуха, затем растворяли в минимальном объеме спирта и наносили на пластинки с сплюфолом (Kavalier, СССР). Разделение сахаров проводили в системе хлороформ — метанол — конц. NH₄OH — уксусная кислота (50 : 30 : 2 : 1), обнаруживая сахара с помощью анилинфталата по методике [27]. Степень гидролиза рассчитывали по отношению площади пиков к площади пика, содержащего 10 мкг фукозы после сканирования пластинок на денситометре «Хромоскан-200» (Joice-Loebl, Англия).

Зависимость активности α -L-фукозидазы от рН (рис. 3) определяли, добавляя 50 мкл ферментного препарата к 150 мкл 0,1–0,2 М цитратно-фосфатного буфера со значением рН от 3,0 до 7,5. После добавления *n*-нитрофенил- α -L-фукопиранозидом до конечной концентрации 1 мМ пробы инкубировали при 37° С в течение 10–15 мин. Реакцию останавливали добавлением 250 мкл 0,4 М буферного раствора глицин — NaOH (рН 10,4) и в смеси определяли *n*-нитрофенол.

Термостабильность α -L-фукозидазы определяли, прогревая ферментный препарат в течение 10 мин при 40, 50, 60 и 70° С. После прогревания пробы охлаждали на льду и определяли активность по *n*-нитрофенил- α -L-фукопиранозиду, как описано выше. За 100% принята активность пробы, хранившейся при 0° С.

Влияние ограниченного протеолиза на ферментный препарат α -L-фукозидазы изучали, добавляя тот или иной ингибитор при гомогенизировании образцов или инкубируя гомогенат в течение 1 ч с препаратом катепсина D. Затем гомогенат подвергали изоэлектрофокусированию и сравнивали полученный изоферментный спектр со спектром контрольного образца (рис. 6).

Выражаем благодарность Л. А. Локшиной за полезное обсуждение результатов по ограниченному протеолизу.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wiederschain G. Ya., Rosenfeld E. L.* Two forms of α -L-fucosidase from pig kidney and their action on natural oligosaccharides.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1971, v. 44, № 4, p. 1008–1014.
2. *Wiederschain G. Ya., Kolibaba L. G., Rosenfeld E. L.* Human α -L-fucosidase.— *Clin. chim. acta*, 1973, v. 46, № 3, p. 305–310.
3. *Видершайн Г. Я.* Множественность α -L-Фукозидаз из ферментного препарата почек свиньи.— *Докл. АН СССР*, 1974, т. 214, № 2, с. 462–464.
4. *Alhadeff J. A., Miller A. Z., Wenaas H., Vedvick J., O'Brien J. S.* Human liver α -L-fucosidase. Purification, characterisation and immunochemical studies.— *J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250, № 18, p. 7106–7113.
5. *Robinson D., Thorpe R.* Fluorescent assay of α -L-fucosidase.— *Clin. chim. acta*, 1974, v. 57, № 1, p. 29–35.
6. *Turner B. M., Beratis N. G., Turner V. G., Hirschhorn K.* Isoenzymes of human α -L-fucosidase detectable by starch gel electrophoresis.— *Clin. chim. acta*, 1974, v. 57, № 1, p. 29–35.
7. *Бейер Е. М., Кляцицкий Е. М., Видершайн Г. Я.* Гетерогенность α -L-Фукозидазы из почки человека при аффинной хроматографии.— *Биохимия*, 1979, т. 44, вып. 11, с. 1936–1943.
8. *Alam T., Balasubramanian A. S.* Affinity chromatography and separation of the molecular forms of monkey brain α -L-fucosidase on fucose-linked sepharose.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 566, № 2, p. 327–334.
9. *Локшина Л. А.* Реакции ограниченного протеолиза и их регуляторное значение.— *Успехи биол. химии*, 1977, т. 18, с. 162–184.
10. *Бах Н. Л., Бейер Е. М., Бовин Н. В., Зурабян С. Э., Видершайн Г. Я.* Специфичность и свойства множественных форм α -L-Фукозидазы человека.— *Докл. АН СССР*, т. 255, № 4, с. 996–999.
11. *Alhadeff J. A., O'Brien J. S.* Fucosidosis.— In: *Practical enzymology of the sphingolipidoses.* / A. R. Liss, ed. N. Y., 1977, p. 247–281.
12. *Turner B. M.* Purification and characterisation of α -L-fucosidase from human placenta. pH-dependent changes in molecular size.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 578, № 2, p. 325–336.
13. *Бейер Е. М., Видершайн Г. Я.* Индивидуальные различия изоферментного спектра α -L-Фукозидазы человека.— *Вопр. мед. химии*, 1980, т. 26, с. 538–539.
14. *Aoyagi T., Umezawa H.* In: *Proteases and biological control.* / E. Reich, D. Rifkin, eds. Gold Spring Harbor Conferens on Cell Proliferation, 1975, v. 2, p. 429–431.
15. *Alhadeff J. A., Freeze H.* Carbohydrate composition of purified human liver α -L-fucosidase.— *Moll. Cell. Biochem.*, 1977, v. 18, № 1, p. 33–37.
16. *Зурабян С. Э., Коломеер Г. Г., Хорлин А. Я.* Синтез 3-О-(β -D-галактопиранозил)-, 6-О-(α -L-фукопиранозил)- и 4-О-(α -L-фукопиранозил)-N-ацетил-D-глюкозамина дифенилциклопропениловым методом.— *Биоорг. химия*, 1978, т. 4, № 5, с. 654–663.
17. *Бовин Н. В., Зурабян С. Э., Хорлин А. Я.* Хлорацетильная и 2-тетрагидрофуранильная группы как временные защитные группы в синтезе олигосахаридов.— *Биоорг. химия*, 1980, т. 6, № 2, с. 242–249.
18. *Бовин Н. В., Зурабян С. Э., Хорлин А. Я.* Простой синтез детерминантного трисахарида группы крови Le^a.— *Биоорг. химия*, 1980, т. 6, № 5, с. 789–790.
19. *Khorlin A. Ya., Nesmeyanov V. A., Zurabyan S. E.* Glycosylation of sugar 2,3-diphenyl-2-cyclopropen-1-yl ethers. A new route to oligosaccharides.— *Carbohydr. Res.*, 1975, v. 43, № 1, p. 69–77.
20. *Dejter-Juszynski M., Flowers H.* Studies on the Koenigs-Knorr reaction. Part III. A stereoselective synthesis of 2-acetamido-2-deoxy-6- α -L-fucopyranosyl-D-glucose.— *Carbohydr. Res.*, 1972, v. 23, № 1, p. 41–45.
21. *Зурабян С. Э., Мирзаянова М. И., Розынов Б. В., Садовская В. Л., Хорлин А. Я.* Хромато-масс-спектрометрический анализ олигосахаридов, содержащих N-ацетилглюкозамин на восстанавливающем конце.— *Биоорг. химия*, 1978, т. 4, № 10, с. 1402–1409.
22. *Видершайн Г. Я., Розенфельд Е. Л.* Очистка и свойства фукозидазы из почки свиньи.— *Биохимия*, 1967, т. 32, вып. 1, с. 173–179.
23. *Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R.* Protein measurement with folin phenol reagent.— *J. Biol. Chem.*, 1954, v. 193, № 1, p. 265–275.
24. *Desaga TLE* – Double chamber Operation Instruction.
25. *Видершайн Г. Я., Колибаба Л. Г.* Методы определения свободных и связанных 6-дезоксигексоз.— *Вопр. мед. химии*, 1971, т. 17, вып. 4, с. 428–439.
26. *Гордон А., Форд Р.* Спутник химика. М.: Мир, 1976, с. 520–523.
27. *Хайс Е. М., Мацек К.* Хроматография на бумаге. М.: Мир, 1972.

Поступила в редакцию
24.XI.1980

A STUDY OF PROPERTIES AND SUBSTRATE SPECIFICITY OF HUMAN α -L-FUCOSIDASE MULTIPLE FORMS USING NATURAL AND SYNTHETIC FUCOSE-CONTAINING OLIGOSACCHARIDES

BACH N. L., BEYER E. M., WIEDERSCHAIN G. Ya., BOVIN N. V.,
ZURABYAN S. E.

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow; M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Five multiple forms of human α -L-fucosidase with pI ranging from 5,54 to 6,35 were shown to differ in the value of pH-optimum, thermostability, and substrate specificity. The latter property was analyzed using fucose-containing oligosaccharides as substrates. The hydrolytic activity of the enzyme forms was dependent on the nature of monosaccharide residue adjacent to fucose, the linkage type of fucose residue and some other substrate peculiarities. The data obtained with proteinase inhibitors indicated that the existence of α -L-fucosidase multiple forms is not due to the limited proteolysis.
