



УДК 547.963.1.04

РОЛЬ УГЛЕВОДНЫХ ГРУПП В ИММУНОГЛОБУЛИНАХ М
VII*. РОЛЬ МАННОЗОБОГАТЫХ ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ГРУППИРОВОК
В ФОРМИРОВАНИИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ М

Гавверзнева Е. Д., Шмакова Ф. В.

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Изучена роль маннозобогатых олигосахаридных цепей в формировании пространственной структуры IgM человека. Показано, что обе маннозобогатые группировки на Н-цепи IgM доступны действию ферментов в нативном белке. Ферментативное отщепление периферических маннозных остатков не вызывает крупных изменений конформации молекулы и не препятствует самосборке пентамерной молекулы из свободных Н- и L-цепей. В то же время отщепление 6-7 периферических маннозных остатков, по-видимому, изменяет структуру Fc-фрагмента, поскольку при этом усиливается начальная ассоциация молекул. Это следует из увеличения светорассеяния раствора частично дегликозилированного IgM в УФ-области. Получено подтверждение тому, что конформационные изменения, вызываемые отщеплением углеводов от IgM, имеют другой характер, чем изменения под влиянием температуры и pH среды.

Высокомолекулярные молекулы иммуноглобулинов М (IgM), обладающие сложной четвертичной структурой, находятся на грани между чисто химическими соединениями и гистологическими образованиями. Электронно-микроскопические исследования и определения размеров при малоугловом рентгеновском рассеянии доказали пентамерную, плоскую, звездообразную структуру молекул сывороточного иммуноглобулина М [2].

Обращает на себя внимание наличие на поверхности белковой молекулы олигосахаридных цепей. Назначение их окончательно еще не выяснено. Как показал рентгеноструктурный анализ, единственная олигосахаридная группировка на Н-цепи молекулы IgG находится на обращенных друг к другу поверхностях двух C₂-доменов, как бы раздвигая их и не давая им плотно соприкасаться [3]. Отсюда появилась вполне обоснованная гипотеза о структурирующей роли этой олигосахаридной цепи [4]. Но если на молекуле IgG две такие цепи (по одной на каждую Н-цепь), то на пентамерной молекуле IgM по 5 олигосахаридных цепей на каждую Н-цепь, а в целом на молекулу — 50 таких группировок. Логично было поставить вопрос о причинах такого повышенного содержания углеводных групп в IgM.

Некоторые данные о роли углеводных составляющих мы получили, исследуя физико-химические свойства IgM после частичного отщепления углеводов с одной стороны и изучая способность к самосборке IgM из частично дегликозилированных Н- и L-цепей. Оказалось, что отщепление углеводов значительно снижает устойчивость IgM в растворе, увеличива-

* Сообщение 6 см. [1].

Ферментативное отщепление маннозы и галактозы от IgM_{Серд}

Условия ферментативного дегликозилирования			Содержание нейтральных сахаров, %	Потери Man		Потери Gal	
Фермент	Время, сут	t, °C		А	Б	А	Б
α-Маннозидаза	4	20	5,6	10,9	2,3	—	—
»	11	20	4,5	25,7	5,4		
»	3	37	4,6	22,0	4,6		
»	7	37	4,1	33,5	6,9		
α-Маннозидаза + + β-галактозидаза	3	37	5,0	17,0	3,5	32,0	2,6
То же	7	37	2,5	30,2	6,3	57,0	4,6

Примечание. А — процент к содержанию Man (или Gal) в нативном IgM_{Серд}; Б — число отщепившихся остатков на одну N-цепь.

ет его склонность к ассоциации [1] и нарушает способность молекулы IgM к самосборке из H- и L-цепей [5, 6]. Самосборка доходит в лучшем случае до мономерных IgM или их «половинок», но пентамерные молекулы не образуются. Эти результаты указывают на структурирующую роль по крайней мере некоторых из углеводных цепей IgM.

Согласно литературным данным, углеводные группировки в молекуле IgM играют определенную роль в некоторых эффекторных функциях этих белков (например, секреция IgM из клетки [7], выведение комплекса антиген — антитело из циркуляции) [8]. Следует остановиться еще на одной специфической особенности строения IgM: из пяти углеводных группировок на N-цепи три относятся к сложным, т. е. состоят из остатков N-ацетилглюкозамина, галактозы, маннозы, фукозы и сиаловой кислоты (они локализованы на доменах C_{H-1}, C_{H-2} и между C_{H-2} и C_{H-3}), а две последних (на C_{H-3} и C-конце N-цепи) — к маннозобогатым, состоящим только из N-ацетилглюкозамина и маннозы. В работе [8] авторы, используя ферментативное отщепление небольшого количества маннозы от свободного и связанного в комплексе с антигеном IgM, нашли, что маннозобогатые цепи играют определенную роль в реакциях с конканавалином А и в выведении комплекса антиген — антитело из организма. Вызванная связыванием антигена перестройка конформации молекулы IgM сопровождается изменением ориентации маннозобогатых цепей относительно поверхности глобулы белка, что служит сигналом для присоединения образующегося комплекса к печеночной клетке. Если данное авторами толкование ряда довольно сложных взаимодействий правильно, то в этом факте можно видеть одну из эффекторных функций олигосахаридных группировок в IgM.

Возникает вопрос: единственная ли это функция маннозобогатых цепей? Ранее нами было установлено, что отщепление 30–40% углеводов от IgM приводит к глубоким нарушениям пространственной структуры [5]. Однако, является ли это результатом деградации маннозобогатых олигосахаридных группировок, оставалось неизвестным.

Для решения этого вопроса мы поставили перед собой три задачи: 1) выяснить доступность маннозобогатых олигосахаридных цепей действию ферментов; 2) рассмотреть конформационные изменения молекулы IgM после отщепления маннозных остатков; 3) проверить возможность самосборки IgM после отщепления части маннозных остатков.

Содержание нейтральных сахаров в исходном IgM_{Серд}, определенное фенол-сернокислотным методом, составляло 5,7%. Согласно анализам на углеводном анализаторе, на одну N-цепь в IgM_{Серд} приходилось: Man 21, Gal 8 и Fuc 3 остатка.

Образование ассоциатов иммуноглобулином М после обработки гликозидазами *

Эксперимент	α -Маннозидаза, 20° С		α -Маннозидаза, 37° С		α -Маннозидаза + β -галактозидаза	
	Время, сут.	Образование ассоциатов	Время, сут	Образование ассоциатов	Время, сут	Образование ассоциатов, % **
Контроль	4 и 11	Нет	7	Есть	7	6
Опыт	4 и 11	Следы	3 и 7	»	3 и 7	16-20

* Ассоциаты отделяли гель-фильтрацией на сефарозе 4В; контроль — в отсутствие фермента.

** Дано количество ассоциатов в процентах по отношению к контролю.

Таблица 3

Сравнительные данные по отщеплению углеводов и изменению светорассеяния при действии гликозидаз *

Условия ферментативного дегликозилирования		Отщепление, %		Поправка на светорассеяние при 280 нм, %
Фермент	Время, сут	Man	Gal	
α -Маннозидаза, 20° С	4	10,9	—	Нет
	11	25,7	—	25
Контроль α -Маннозидаза, 37° С	11	—	—	Нет
	3	22,0	—	42
Контроль α -Маннозидаза + β -галактозидаза, 37° С	7	33,5	—	44,5
	7	—	—	50
Контроль α -Маннозидаза + β -галактозидаза, 37° С	3	17,0	32,0	25,5-30
	7	30,2	57,0	41,8-42
Контроль	7	—	—	50

* Измерения светорассеяния проведены непосредственно после выделения на сефарозе 4В, так как при стоянии даже в холодильнике светорассеяние постепенно росло. Определение поправки на светорассеяние описано в «Экспериментальной части».

Для отщепления нейтральных сахаров от иммуноглобулина был использован препарат α -маннозидазы из люпина, содержащий примесь β -галактозидазы. Для избирательного отщепления остатков маннозы мы применяли тот же препарат после дополнительной очистки, не проявляющий β -галактозидазной активности. Таким образом, олигосахаридные группировки сложного типа, которые имеют концевые остатки галактозы и сиаловой кислоты, должны были остаться нетронутыми.

Рассмотрение данных по отщеплению маннозы (табл. 1) приводит к следующему выводу: отщепление маннозы наблюдается как при 20° С, так и при 37° С. В последнем случае оно проходит с большей скоростью, однако предельное количество отщепленных маннозных остатков (6-7 из 21-23, имеющих на II-цепи) приблизительно одинаково во всех трех опытах. Это количество, очевидно, отвечает содержанию манноз в периферических областях маннозобогатых цепей, доступных действию ферментов.

Для регистрации возможных конформационных изменений, возникающих в результате отщепления маннозных остатков, была изучена склонность дегликозилированных препаратов к ассоциации, а также изменение УФ-спектров растворов, обезуглевоженных IgM.

Результаты опытов при 37° С представляли собой отражение действия двух факторов: отщепления маннозы и температуры. Оказалось, что на начальные стадии ассоциации даже физиологическая температура (37° С) оказывает значительное влияние, ускоряя этот процесс, что согласуется с наблюдениями Завьялова [9]. Поэтому в чистом виде влия-

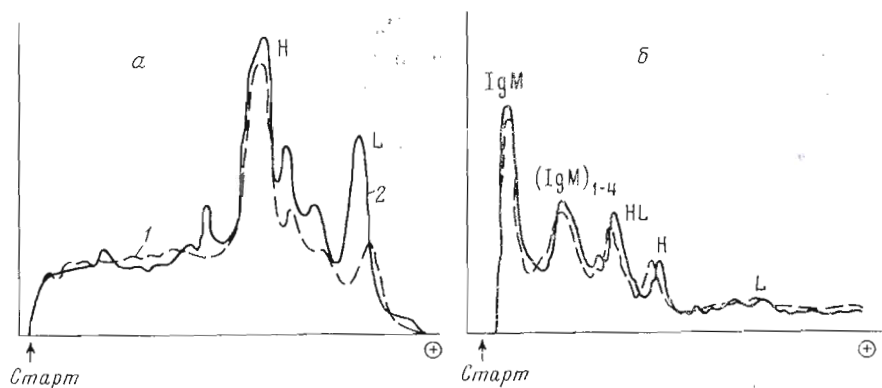


Рис. 1. Электрофорез IgM (условия см. в [6]) после диссоциации до свободных цепей (а) и после реассоциации (б): пунктир — опыт после обезуглеживания, сплошная линия — контрольный опыт с нативным IgM. HL — половинки субъединиц, H — тяжелые цепи, L — легкие цепи, $(\text{IgM})_{1-4}$ — частичные ассоциаты субъединиц

ние отщепления маннозы можно было увидеть только в опытах при 20°C . Полученные результаты представлены в табл. 2 и 3.

При рассмотрении результатов табл. 2 и 3 можно сделать следующие выводы. Во-первых, при 20°C даже при значительном отщеплении маннозы высокомолекулярных ассоциатов, отделяемых на сефарозе 4В, не образуется. Следовательно, отщепление периферических маннозных остатков от маннозобогатых цепей само по себе мало нарушает устойчивость молекулы IgM в растворе. В то же время при 37°C такие ассоциаты образуются в заметном количестве (16,6%). Как будет показано ниже, одновременное влияние температуры и дегликозилирования на процессы ассоциации IgM более сложно.

Из данных по светорассеянию, отражающему начальные стадии изменения состояния молекулы, предшествующие образованию ассоциатов, можно сделать вывод о конформационных изменениях, происходящих при отщеплении маннозы. Согласно табл. 3, значительная поправка на светорассеяние при 20°C появляется только при отщеплении всех периферических остатков маннозы. В этом случае, по-видимому, имеют место какие-то конформационные предденатурационные изменения в Fc-фрагментах. При 37°C отщепление остатков маннозы вызывает более глубокие конформационные изменения, поскольку в этом случае светорассеяние повышается до 42–44%.

Опыты по самосборке молекул IgM с отщепленными периферическими маннозными остатками показывают, что отсутствие этих манноз не сказывается существенно на способности к самосборке. Как видно из рис. 1, электрофореграммы для нативного IgM и для IgM, обработанного маннозидазой, после восстановительного расщепления до свободных цепей и реокисления («самосборки») идентичны. Следовательно, периферические маннозные остатки не играют существенной роли в создании конформации субъединиц, необходимой для самосборки в пентамеры при условии сохранения олигосахаридных цепей сложного типа. Только совместное отщепление маннозы и галактозы (ср. [5]) нарушает конформацию настолько, что самосборка становится невозможной. Таким образом, ответы на поставленные вопросы можно суммировать следующим образом: обе маннозобогатые группировки в IgM доступны действию α -маннозидазы, конформационные изменения происходят только при глубоком отщеплении маннозы, но не препятствуют самосборке молекулы в пентамер.

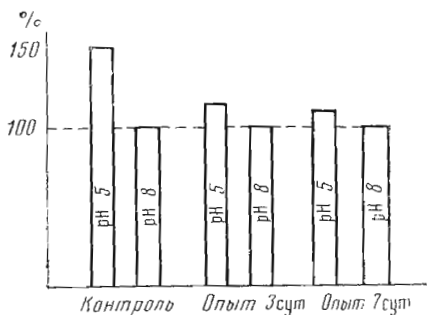


Рис. 2. Разница в поглощении при 280 нм для IgM в опытах при 37° С для растворов при pH 5 и 8

Только при глубоком отщеплении всех периферических манноз и части галактозы в длительных опытах светорассеяние опять увеличивается, не достигая, однако, уровня контрольного опыта. Складывается впечатление, что температурный фактор, вызывающий увеличение светорассеяния в контрольных опытах, встречается в опытах с отщеплением углеводов с противодействующим ему фактором отщепления углеводных остатков. Одновременное действие обоих факторов дает менее заметный эффект, чем действие одной температуры. Если допустить, что одной из движущих сил при первичной ассоциации является заряд молекулы [10], то следует ожидать, что ассоциация будет зависеть от pH среды. При отщеплении маннозных остатков количество зарядов на молекуле IgM не должно изменяться. Поэтому можно предположить, что интенсивность светорассеяния будет изменяться одинаково при переходе от нейтральной в кислую среду для контрольных опытных растворов IgM и после отщепления маннозных остатков. Нами было измерено поглощение при 280 нм для растворов в слабощелочной среде (pH 7,5–8,0, трис-буфер) и после подкисления до pH 5 (рис. 2). В контрольных опытах без фермента в кислой среде (7 сут, 37° С) поглощение возросло на 49%, что говорит о процессах ассоциации под влиянием как температуры, так и pH. В опытах с отщеплением маннозы α -маннозидазой (3 и 7 сут при 37° С) повышение поглощения составило всего 7–9%. Так как заряд IgM в этих опытах не изменялся, остается допустить, что в результате отщепления углеводов в молекуле IgM произошли какие-то конформационные изменения, увеличившие ее стабильность и уменьшившие ее чувствительность к изменениям pH среды.

Согласно нашим предыдущим исследованиям, конформационные изменения, вызванные в молекуле IgM действием pH среды, по своей направленности отличаются от изменений, вызываемых отщеплением углеводных остатков. Так, чувствительность IgM к трипсину увеличивается после выдержки в кислой среде и последующего возвращения в нейтральную среду. В то же время отщепление 12–21% нейтральных сахаров приводит к небольшому увеличению расщепляемости IgM трипсином, которое, однако, резко уменьшается, когда отщепление углеводов превышает 30% [11]. В обнаруженном в настоящей работе влиянии температуры и отщепления сахаров от IgM можно видеть дополнительное подтверждение различий в характере конформационных изменений, вызываемых повышенной температурой и кислой средой, с одной стороны, и удалением углеводных групп из IgM — с другой.

Экспериментальная часть

В работе использовался моноклональный IgM человека, полученный из сыворотки больного макроглобулинемией Вальденштрёма (IgM_{серд}) путем двукратного осаждения разбавленной вдвое сыворотки сульфатом

Заслуживает внимания следующий факт, вытекающий из сравнения поправки на светорассеяние при 37° С в контрольных опытах без введения ферментов и в опытах, где произошло ферментативное отщепление углеводов. Эти результаты хорошо воспроизводились (см. табл. 3).

В контрольном опыте при 37° С поправка на светорассеяние составляет 50%, но при одновременном отщеплении маннозы она заметно ниже (42%). При одновременном отщеплении маннозы и галактозы поправка еще ниже (25–30%).

аммония и гель-фильтрации на сефарозе 4В по [12]. Препарат α -маннозидазы из люпина (*Canavalia*) был получен и очищен от примеси β -галактозидазы по методике работы [13].

Для ферментативного отщепления маннозы и галактозы [14] растворы IgM_{серд} переводились из трис-буфера с рН 8,2 в 0,1 М ацетатный буфер, рН 6,2. Ферментный препарат с активностью 0,31 ед./мл в случае чистой α -маннозидазы и 0,61 ед./мл α -маннозидазой и 0,012 ед./мл β -галактозидазой активности в опытах с одновременным отщеплением обеих гексоз добавлялся из расчета 0,5–1,0 единиц маннозидазной активности на 10 мг IgM. Опыты были проведены при 20 и 37° С под толуолом с добавкой ингибиторов протеаз (ϵ -аминокапроновая кислота и *n*-хлормеркурибензоат) при периодическом взбалтывании, так как при рН 6,2 IgM_{серд}, обладавший крпосвойствами, был в осадке.

Продукты ферментативной реакции подвергали двукратной гель-фильтрации на сефарозе 4В и затем фракцию IgM пропускали через биогель Р-30 для удаления возможных углеводных примесей. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 нм и по Лоури, нейтральные сахара — по реакции с фенол-серной кислотой [15], а отдельные гексозы после мягкого гидролиза — на углеводном анализаторе (7-1100, СССР) в боратном буфере, рН 8,5.

Образовавшиеся в опытах ассоциаты IgM были отделены при разделении продуктов реакции на сефарозе 4В и определены количественно по Лоури и по поглощению при 280 нм.

В опытах по самосборке сперва проводили восстановление IgM дитиотреитом, а затем реокисление при длительном диализе, приводящем к удалению восстановителя [6]. За ходом самосборки следили путем электрофореза продуктов реакции в гелях и денситометрирования полученных окрашенных кумасси зон [6].

При снятии УФ-спектров для нахождения добавочного поглощения за счет светорассеяния растворов белка строили кривые в пределах 280–350 нм в двойных логарифмических координатах. Продление кривой поглощения между 310 и 350 нм в сторону коротких волн отсекало на оси ординат при 280 нм зону поглощения, зависящую от светорассеяния. Величина этой зоны в процентах от общего поглощения принята за меру поправки, вызываемой первичной ассоциацией IgM в растворе.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Каверзнева Е. Д., Вижа Г. В., Рыбакова Л. А. Роль углеводных групп в иммуноглобулинах. VI. Значение олигосахаридных цепей в IgM для его стабильности в растворе.— Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 6, с. 767–773.
2. Richardson N. R., Feinstein A. Mouse intracellular immunoglobulin M. Structure and identification of free thiol groups.— Biochem. J., 1978, v. 175, p. 959–967.
3. Deisenhofer J., Colman P. M., Epp O., Huber R. Crystallographic structural studies of a human Fc fragment. 2. A complete model based on a Fourier map at 3,5 Å resolution.— Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1976, v. 357, p. 1421–1434.
4. Feinstein A. A spatial model of immunoglobulin M.— J. Physiol., 1974, v. 242, p. 32.
5. Каверзнева Е. Д., Клейне Р., Шмакова Ф. В., Вижа Г. В., Ланук В. А. Структурирующая роль углеводных групп иммуноглобулина М в процессе самосборки молекулы.— Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 2, с. 273–274.
6. Kleine R., Shmakova F. V., Lapuk V. A., Vikha G. V., Kaverzneva E. D. Different behaviour of immunoglobulin M poor in carbohydrate and native immunoglobulin M during dissociation and reassociation in vitro.— Immunochemistry, 1975, v. 12, p. 825–831.
7. Hickman S. C., Kornfeld St. Action of tunicamycin on secretion of IgM, IgA and IgG from murine plasmacytoma.— J. Immunolog., 1978, v. 121, p. 990–999.
8. Day J. F., Thornburg R. W., Thorpe S., Baynes J. W. Carbohydrate-mediated clearance of antibody-antigen compounds from the circulation. The role of high-mannose oligosaccharides in the hepatic uptake of IgM-antigen complexes.— J. Biol. Chem., 1980, v. 255, p. 2360–2365.

9. Завьялов В. П. Обратимые температурные переходы нативных IgG человека и яичного альбумина.— Молекулярн. биология, 1970, т. 4, № 4, с. 655—662.
10. Perutz M. F. Electrostatic effects in proteins.— Science, 1978, v. 201, p. 1187—1191.
11. Шмакова Ф. В., Виха Г. В., Ланук В. А., Каверзнева Е. Д. Роль углеводных групп в иммуноглобулинах М. IV. Влияние отщепления углеводов на гидролиз иммуноглобулина М трипсином.— Биооргани. химия, 1977, т. 3, № 9, с. 1205—1210.
12. Ланук В. А., Шмакова Ф. В., Каверзнева Е. Д. Роль углеводных групп в иммуноглобулинах М. I. Выделение и характеристика иммуноглобулина М человека, имеющего углеводные группы в L-цепях.— Биооргани. химия, 1975, т. 1, № 8, с. 1134—1139.
13. Li Y.-T. Presence of α -D-mannosidic linkage in glycoproteins. Liberation of D-mannose from various glycoproteins by α -mannosidase isolated from jack bean meal.— J. Biol. Chem., 1966, v. 241, p. 1010—1012.
14. Каверзнева Е. Д., Виха Г. В., Ланук В. А. Роль углеводных групп в иммуноглобулинах М. III. Ферментативное отщепление углеводных групп от иммуноглобулина М.— Биооргани. химия, 1975, т. 1, № 9, с. 1379—1382.
15. Dabois M., Gilles K., Hamillon J., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances.— Anal. Chem., 1956, v. 28, № 3, p. 350—358.

Поступила в редакцию
11.XII.1980
После доработки
23.II.1981

ROLE OF CARBOHYDRATES IN IMMUNOGLOBULIN M. VII. IMPLICATION OF MANNOSE-RICH OLIGOSACCHARIDE CHAINS IN ACQUISITION OF IMMUNOGLOBULIN SPATIAL STRUCTURE

KAVERZNEVA E. D., SHMAKOVA F. V.

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

Mannose-rich oligosaccharide chains implication in acquisition of the IgM spatial structure has been studied. In the native IgM both mannose-rich groups at the H-chain are accessible for enzymes. Enzymatic cleavage of the peripheral mannose residues neither provokes substantial conformational changes in the molecule, nor hinders the reassembly of the pentameric molecule from free H- and L-chains. Cleavage of 6-7 peripheral mannose residues appears to change the structure of Fc fragment. This conclusion follows from the enhanced initial association, as judged from the increased light-scattering of partly deglycosylated IgM in the UV-region. New data are obtained confirming a different nature of conformational changes brought about by a carbohydrate cleavage from IgM as contrasted to those induced by varying the temperature or pH of the medium.