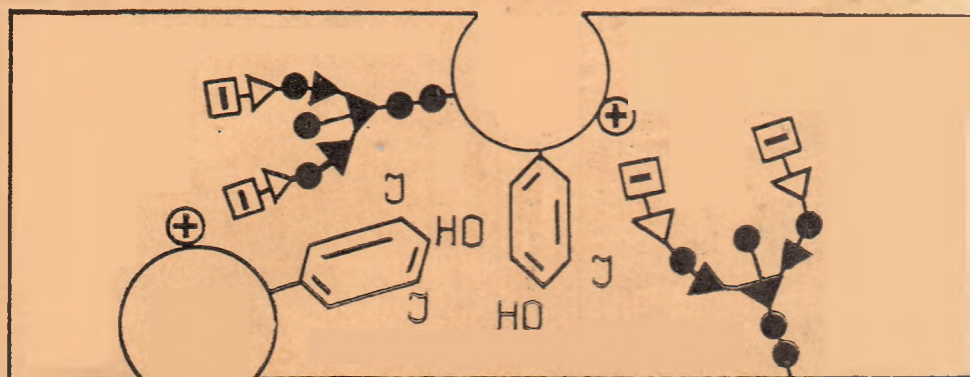


Т. А. Бабаев
Г. В. Вуха
Н. Т. Алимбабаева



ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГЛИКОПРОТЕИНОВ

АКАДЕМИЯ НАУК УЗБЕКСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ

Т. А. БАБАЕВ, Г. В. ВИХА,
Н. Т. АЛИМБАБАЕВА

ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГЛИКОПРОТЕИНОВ

ТАШКЕНТ
ИЗДАТЕЛЬСТВО «ФАН» УЗБЕКСКОЙ ССР.
1988

Бабаев Т. А., Виха Г. В., Алимбабаева Н. Т. **Химическая природа биологического действия гликопротеинов.** Ташкент, Фан УзССР, 1988, 150 с.

В монографии дана структурная характеристика гликопротеинов, отмечены общие черты этих биополимеров. Описана роль структурных элементов гликопротеинов в поддержании их функциональной активности, сборке и секретиции через мембраны клеток, в продолжительности их жизни в циркуляторной системе, клеточных контактах (антигены групп крови, лиганд-рецепторные взаимодействия, взаимодействие антиген—антитело—комплемент), протеолитическом процессинге гликопротеинов с образованием биологически активных соединений, участвующих в регуляции жизнедеятельности организма на разных уровнях.

Для биохимиков, биооргаников, биологов.

Ил. 16. Табл. 3. Библ. 219.

ответственный редактор: *докт. хим. наук Е. Д. Каверзнева*

рецензенты: *докт. биол. наук А. А. Абидов,*
канд. биол. наук Г. Хожиахмедов.

**Тулкун Арифович Бабаев,
Галина Васильевна Виха,
Наима Тўйчиевна Алимбабаева**

ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГЛИКОПРОТЕИНОВ

*Утверждено к печати Ученым советом
Института биохимии АН УзССР,
Отделением биологических наук АН УзССР*

Редактор *Т. А. Шур*
Технический редактор *О. А. Бакалова*
Художник *А. И. Сазонов*
Корректор *В. Д. Соловьева*

ИБ № 4404

Сдано в набор 14.12.87 г.. Подписано к печати 25.02.88 г. Р00114. Формат 60×90¹/₁₆.
Бумага типографская № 1. Гарнитура литературная. Печать высокая. Усл. печ.
л. 9,25. Уч.-изд. л. 9,6. Тираж 1000. Заказ 5. Цена 2 р.

Издательство «Фан» УзССР: 700047, Ташкент, ул. Гоголя, 70.
Типография издательства «Фан»: Ташкент, проспект М. Горького, 79.

ВВЕДЕНИЕ

Пространственная структура многих биологических молекул — один из наиболее важных факторов, определяющих их функциональную активность в организме. Исследование структурной и функциональной организации гликопротеинов, выявление группировок, обеспечивающих процессы узнавания, комплексообразования и активации клеточных рецепторов имеет ключевое значение для изучения механизмов их действия и понимания принципов функционирования клеточных регуляторных систем. Эта проблема имеет и практическое значение, поскольку выяснение основных закономерностей строения и действия молекул природных биорегуляторов является необходимой предпосылкой целенаправленной модификации их структур с целью создания новых лекарственных препаратов, ингибиторов и средств диагностики для медицины и ветеринарии.

Углеводы — источник энергии и структурирующий материал. В последнее время усилился интерес к роли углеводов как специфического узнающего маркера в биологических процессах.

Все опухолевые клетки характеризуются изменениями в углеводном составе и структуре по сравнению с нормой. Изменения в структуре кора N-аспарагинсвязанных углеводных цепей обычно не влияют на антигенные свойства гликопротеинов, однако изменения в периферической части N- или O-гликанов могут внести вклад в антигенную структуру опухолевых клеток. Измененная структура углеводов клеточной поверхности может вызывать изменения в процессе узнавания клетки клеткой и изменение клеточной адгезии. Углеводы могут модулировать антигенность мембранных белков, функцию рецепторов. Такие изменения антигенного статуса клеточной поверхности необходимы для консервирования трансформированных фенотипов (опухолевых клеток). Генетический механизм, контролирующий транскрипцию гликозилтрансферазы и регулирующий организацию гликозилтрансферазы, несомненно, будет в недалеком будущем областью, на которой сфокусируется внимание при изучении углеводных антигенов, ассоциированных с опухолью.

В настоящее время имеется достаточное количество фактов, свидетельствующих, что углеводные группы гликопротеинов име-

ют важное значение в осуществлении их биологической роли: это и стабилизация конформации белка, и специфичность групп крови, и контроль за временем жизни в циркуляторной системе, за поглощением гликопротеинов клетками.

В сывороточных гликопротеинах углеводные группы, в частности, модифицируют физико-химические свойства белков изменением их гидрофобности, заряда, массы, размера.

Перспективны прикладные аспекты исследования структуры и функций гликопротеинов. Это диагностика генетических нарушений углеводного метаболизма, разработка методов пришивки углеводов к ферментам для их стабилизации, для продления времени их жизни в кровотоке и доставки их прямо к месту действия, пришивка лекарств к сахароспецифическим белкам-лектинам с целью транспортировки, создание антисывороток к лектинам клеточной поверхности бактерий с целью предупреждения инфекционных болезней, создание препаратов целевого назначения и пролонгированного действия.

Углеводы — прекрасный объект для образования некоторых специфических структур. Если из 3 аминокислот можно составить 6 различных пептидов, то из 3 сахарных остатков — в 10 раз больше. Однако несмотря на астрономическое число структур, которое можно образовать из моносахаридов, по-видимому, в природе существуют определенные ограничения, которые сильно снижают число структур, действительно образуемых живыми организмами.

В связи с огромным биологическим значением гликопротеинов в данной работе мы стремились подытожить исследования, посвященные изучению структуры и функции этого класса биополимеров, выяснению их взаимосвязи на отдельных конкретных примерах и попытались определить задачи ближайшей перспективы.

Глава I. ГЛИКОПРОТЕИНЫ. СОСТАВ, СТРУКТУРА И ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ СТРОЕНИЯ

Согласно современным представлениям, гликопротеины — структуры, состоящие из ковалентно связанных полипептидного и углеводного компонентов. Этот класс смешанных биополимеров широко распространен в природе. Гликопротеины находятся на клеточной поверхности, циркулируют в кровяном русле в качестве транспортных белков, ими являются гормоны, ферменты, иммуноглобулины, токсины, лектины и структурные белки. Особенно богата гликопротеинами сыворотка, где из 60 идентифицированных белков только 2 (альбумин и преальбумин) не содержат сахаров. Другой богатый источник гликопротеинов — куриный белок, где все белки гликозилированы (за исключением лизоцима).

Размеры молекул гликопротеинов и соотношение белкового и углеводного компонентов варьируют в широких пределах. Углеводная часть может составлять от 1—3% (овальбумин, коллаген) до 80—90% (группоспецифические вещества крови) всей молекулы гликопротеина.

В олигосахаридных цепях гликопротеинов встречается набор лишь из 11 моносахаридов (всего в природе обнаружено около 200 различных моносахаридов). В основном это гексозы, их производные N-ацетилгексозамины и сиаловые кислоты. Сиаловая кислота — типичный компонент гликопротеинов, в ее молекуле содержится 9 углеродных атомов и различные функциональные группы, придающие этому соединению свойства дезоксиаминосахаров. «Сиаловые кислоты» — групповое название всех N-ацетилнейраминовых, O-ацетилнейраминовых и гликолилнейраминовых кислот. Один из наиболее часто встречающихся представителей сиаловых кислот в гликопротеинах — N-ацетилнейраминовая кислота. Она вместе с фукозой обычно занимает терминальное положение в олигосахаридных цепях гликопротеинов. Благодаря наличию карбоксильной группы сиаловая кислота обладает довольно сильными кислотными свойствами ($pK_a=2,6$) и обуславливает отрицательный заряд молекулы гликопротеина.

Все сахара имеют D-конфигурацию, однако дезоксигексоза (L-фукоза) и 2 пентозы (L-арабиноза и L-ксилоза) также являются составными частями углеводных групп гликопротеинов.

В олигосахаридных цепях моносахариды связаны ковалентными связями, которые образуются при реакции гидроксильной группы при С-1 с любой гидроксильной группой (кроме С-1) второго моносахарида, что сопровождается выделением воды. Конфигурация при С-1 может варьировать, в результате образуются α - или β -гликозидные связи.

Размеры углеводных цепей гликопротеинов колеблются от дисахаридного звена до очень сложных структур, содержащих 18 или более моносахаридов. Углеводные цепи характеризуются разветвленной структурой, подобно дереву с относительно жестким стволом и несколькими ответвлениями, обладающими высокой конформационной подвижностью.

Общая черта гликопротеинов — наличие углевод-белковой связи. Олигосахариды присоединяются лишь к немногим боковым цепям аминокислотных остатков белков. Чаще всего в образовании связи участвует С-1 N-ацетилглюкозамина и амидная группа аспарагина. К остатку N-ацетилглюкозамина присоединяются другие моносахариды. Углеводные цепи, присоединенные таким путем к полипептиду, называются N-гликанами.

Олигосахаридные группировки, прикрепленные к белку N-гликозидной связью, содержат, как правило, внутренний кор, состоящий из разветвленного пентосахиарида (Man)₃ (GlcNAc)₂. Периферические остатки маннозы в нем всегда замещены либо дополнительными остатками маннозы в форме коротких или длинных олигосахаридов, либо дисахаридными единицами Gal 1 ^{β} -4 GlcNAc, к которым часто прикрепляется N-ацетилнейраминовая кислота. Эти два типа N-гликанов называются маннозобогатыми и N-ацетилгалактозаминными.

Встречаются структурные варианты периферических цепей более сложного типа, например последовательность в гликопротеине мембран тимоцитов телят: Gal 1 ^{β} -3 Gal 1 ^{β} -4 GlcNAc.

В гликопротеине вируса гриппа к N-гликану прикреплена сульфатная группа. В лизосомальных ферментах (N-ацетил- β -D-гексозаминидаза и β -глюкуронидаза) маннозный остаток в положении 6 фосфорилирован.

Другой тип связи — O-гликозидная. Для нее характерно присутствие дисахиарида Gal 1 ^{β} -3 GalNAc, связанного с серином или треонином. В незамещенной форме этот дисахарид найден в некоторых иммуноглобулинах и антифризовых гликопротеинах антарктических рыб. Обычно он представлен в замещенной форме, например в фетуине, гликофореине, муцине подчелюстной железы, в групповых веществах крови.

В растениях олигосахаридные группировки, как правило, присоединяются к оксигенину или оксипролину. Распространена связь, когда L-арабиноза прикреплена гликозидной связью к оксипролину. В некоторых растительных гликопротеинах к оксигенину может присоединяться также D-галактоза. К оксигенину,

который входит в состав коллагенов позвоночных и беспозвоночных, D-галактоза прикрепляется β -гликозидной связью. К полипептидному остову коллагена присоединяется дисахарид Gal 1 α -2 Glc.

Дрожжи и плесени синтезируют гликопротеины с О-гликозидной связью, в которых углеводные цепи связаны через маннозу с

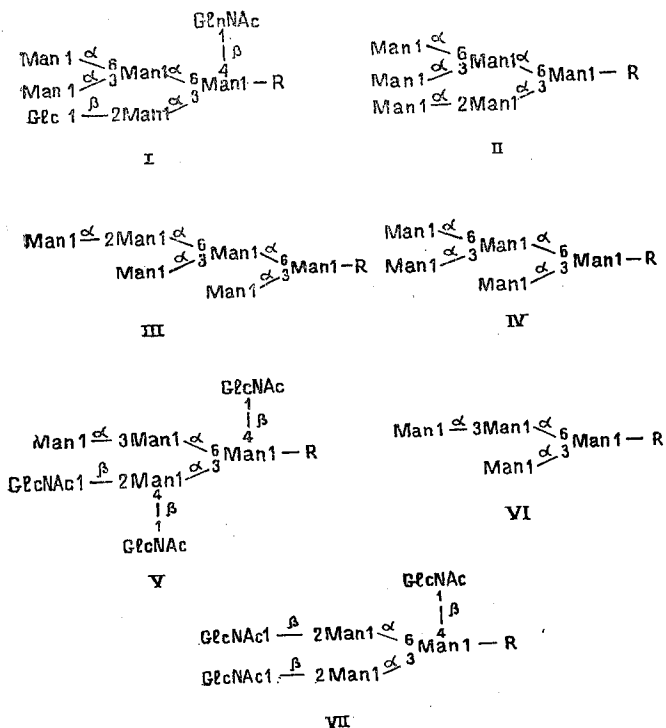
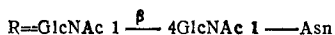


Рис. 1. Структура олигосахаридных цепей овальбумина (по Narasimhan et al., 1980).



остатками серина и треонина. Такие же связи найдены в минорных компонентах гликопротеинов млекопитающих.

Синтез олигосахаридных цепей гликопротеинов осуществляется без шаблона гликозилтрансферазами. Этот тип синтеза без участия гена менее точен, чем белковый. Следствием является микрогетерогенность олигосахаридных цепей гликопротеинов. Гликопротеины с одинаковой полипептидной последовательностью могут иметь олигосахаридные группировки разной структуры. Например, единственная олигосахаридная группировка овальбумина является смесью 7 разных структур, прикрепленных к одному и тому же месту полипептидного скелета (рис. 1).

Тиреоглобулины. В состав тиреоглобулина человека входят 3 типа олигосахаридных цепей, включающих следующие сахара: галактозу, маннозу, N-ацетилглюкозамин, сиаловую кислоту и фукозу. Кроме этих сахаров, тиреоглобулин человека содержит незначительное количество N-ацетилгалактозамина (Arima et al., 1972). По данным Ravitch et al. (1968), на 1 молекулу тиреогло-

Таблица 1

Углеводный состав тиреоглобулина, %

Источ- ник ТГ	NeuNAc	GlcNAc	Man	Gal	Fuc	Сумма	Автор
Свинья	2,7	4,0	—	—	—	—	Gottschalk, Ada, 1956
	1,2	2,74	2,64	1,34	0,48	8,40	Spiro, Spiro, 1963
	1,13	3,11	2,38	1,18	0,43	8,23	Spiro, Spiro, 1965
	1,35	—	—	—	—	—	Tarutani et al., 1977
Овца	—	1,9	—	—	—	—	Ingbar et al., 1959
	1,4	1,8	4,5*	—	—	—	Murthy et al., 1964
	1,48	2,63	2,71	1,26	0,40	8,48	Spiro, Spiro, 1963
	1,39	2,98	2,44	1,13	0,36	8,30	Spiro, Spiro, 1965
Теленок	1,21	2,5	2,6	1,32	0,33	7,96	Arima et al., 1972
	1,2	—	—	—	—	—	Wollman, Warren, 1961
	1,5	—	—	—	—	—	Robbins, 1963
	1,36	2,60	2,32	1,34	0,41	8,03	Spiro, Spiro, 1963
Человек	1,29	2,95	2,09	1,2	0,37	7,90	Spiro, Spiro, 1965
	1,15	2,85	2,47	1,43	0,53	8,43	Алимбабаева, 1985
	1,08	3,40	3,48	1,34	0,52	9,82	Spiro, Spiro, 1963
	1,01	3,86	3,13	1,21	0,46	9,67	Spiro, Spiro, 1965
	1,03	—	5,3*	—	—	—	Tarutani et al., 1977
	1,07	—	—	—	—	—	Salabe et al., 1976
	0,52	4,11	4,90*	—	0,67	10,20	Dunn, Ray, 1978
	1,13	3,27	3,55	1,44	0,54	9,93	Arima et al., 1972
	0,61	—	—	—	—	—	Hove-Vandenbrouche, Couvreur, 1978
	0,98	4,50	2,22	1,42	0,57	9,69	Алимбабаева, 1985

* Сумма гексоз.

булина человека приходится 3—4 остатка N-ацетилгалактозамина. Позже (Arima et al., 1972) было показано, что в тиреоглобулине содержится 13 остатков галактозамина, т. е. 10% всех гексозаминов. Сиаловые кислоты в тиреоглобулине человека и животных встречаются в виде N-ацетилпроизводных. В тиреоглобулине животного происхождения N-ацетилгалактозамин и гексуроновые кислоты не обнаружены (Pierce et al., 1965, Ito et al., 1977).

Данные разных авторов, полученные при определении отдельных углеводных компонентов тиреоглобулина некоторых животных и человека, представлены в табл. 1. Как видно из данных таблицы, в тиреоглобулине животных 3 видов содержание маннозы, галактозы и фукозы приблизительно одинаково. Содержание

N-ацетилглюкозамина колеблется от 1,8 (у овцы) до 3,11% (у свиньи). В тиреоглобулине свиньи, овцы и теленка количество сialовых кислот варьирует от 1,0 до 1,5%. По данным Spiro, Spiro (1963, 1965), тиреоглобулины свиньи и овцы по составу

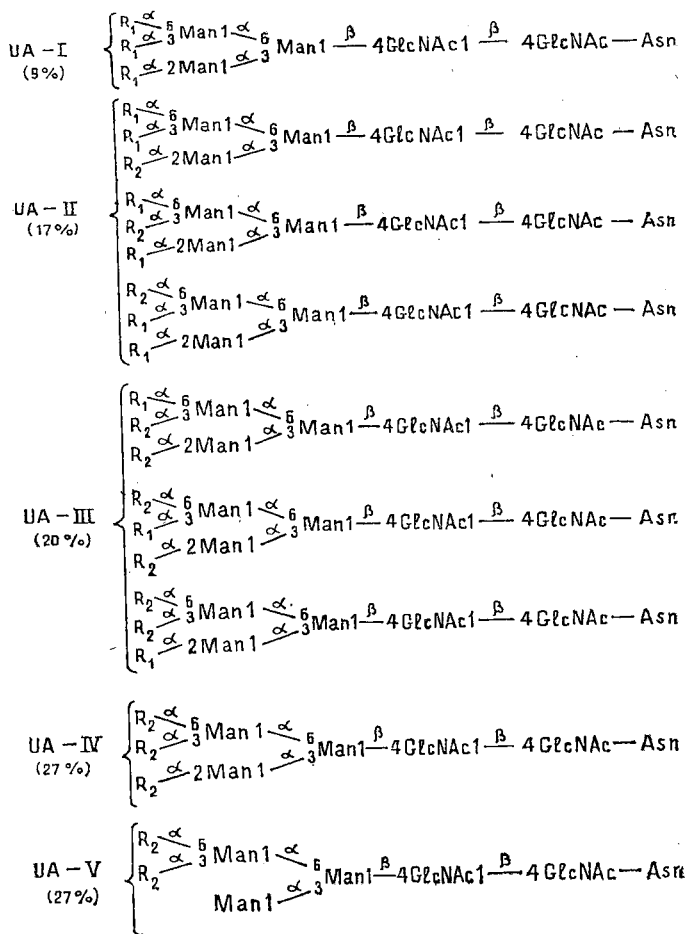


Рис. 2. Структура олигосахаридной единицы типа А (по Tsuji et al., 1981)

$R_1 = \text{Man1} \xrightarrow{\alpha} 2 \text{Man1}$; $R_3 = \text{Man1}$

сахаров идентичны тиреоглобулину теленка; их сумма составляет примерно 8,3% всего белка. Тиреоглобулин человека отличается от тиреоглобулина других видов тем, что в нем присутствуют в большем количестве остатки нейтральных сахаров и N-ацетилглюкозамина. Содержание же сialовых кислот в тиреоглобулине человека несколько снижено и колеблется от 0,5 до 1,2%.

В составе тиреоглобулина человека существуют 3 типа олигосахаридных единиц — А, В и С, различающихся качественным и количественным содержанием углеводов. Олигосахаридные группировки типа А и В присоединены к белковой части тиреоглобулина через N-гликозидную связь, то есть в этой связи участвуют NH-группы глюкозамина и β -карбоксильная группа аспарагиновой кислоты (Fucuda, Egami, 1971; Arima, Spiro, 1972; Ito et al., 1977; Tsuji et al., 1981; Yamamoto et al., 1981). Олигосахарид типа С является галактозаминбогатым и связан с белковой частью молекулы посредством О-гликозидной связи с аминокислотными остатками треонина или серина (Spiro et al., 1979; Arima et al., 1972).

Олигосахаридную единицу А можно отнести в группу «простых» углеводных цепей (Montreuil, 1975) с N-гликозидным типом связи. Она состоит только из N-ацетилглюкозамина и маннозы. В молекуле тиреоглобулина насчитывается 9 олигосахаридных цепей типа А с мол. массой 1050 (Spiro, 1965; Tsuji et al., 1981). Каждая углеводная единица содержит по 2 остатка N-ацетилглюкозамина, связанных между собой и маннозой $1^{\beta}4$ связью. Число остатков маннозы, присоединенных к N-ацетилглюкозамину, варьирует от 5 до 11. Несмотря на одинаковое строение единицы, состоящей из 2 видов сахаров, в ней наблюдается микрогетерогенность.

При хроматографии олигосахарида типа А из тиреоглобулина свиньи на дауэксе 50 W (1×2) получено 5 фракций, обозначенных UA-I, -II, -III, -IV, -V (Tsuji et al., 1981). Их структура схематически изображена на рис. 2. В олигосахаридных единицах типа А к «коровой» части цепи присоединены 2 типа радикалов, состоящих из 1 или 2 молекул маннозы. В зависимости от места присоединения радикалов и их соотношения в составе цепи олигосахаридные фракции единицы А встречаются в одном из 5 вариантов, причем большую их часть составляют UA-IV и -V. Структура фракций UA-IV и -V наиболее проста, остальные фракции имеют дополнительные маннозные остатки, присоединенные $1^{\alpha}2$ связями к концевым остаткам маннозы в «коровой» структуре. Предполагают, что этот маннозабогатый тип олигосахаридных единиц является предшественником сложного типа углеводной единицы В (Fucuda et al., 1976; Ito et al., 1977; Turmo et al., 1977; Tsuji et al., 1981; Yamamoto et al., 1981).

Олигосахаридная цепь типа В представляет собой «сложный» тип углеводных цепей, состоящих из сиаловых кислот, фукозы, галактозы, маннозы и N-ацетилглюкозамина. Молекулярная масса ее составляет 3200. Олигосахаридов типа В в молекуле ТГ 14. Показано, что цепь В содержит комплекс 3- и 2-членных олигосахаридов с различным характером разветвления (Yamamoto et al., 1981). «Коровая» структура этой единицы почти идентична с «коровой» частью олигосахарида типа А. Разветвления любого характера начинаются присоединением к терминальной «коровой»

маннозе N-ацетилглюкозамина 1^β—2 и (или) 1^β—4 связью (рис.3). Далее к N-ацетилглюкозамину присоединяются галактоза и

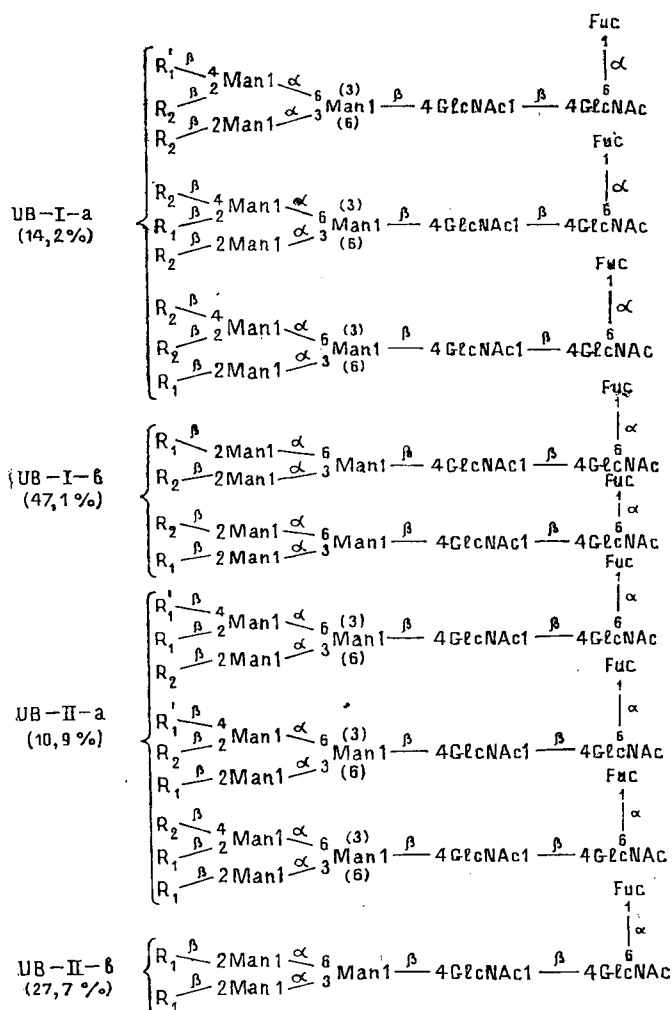
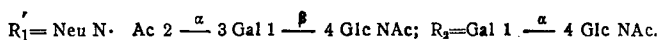
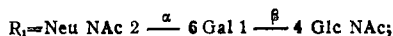


Рис. 3. Структура олигосахаридной единицы типа В (по Yamamoto et al., 1981)



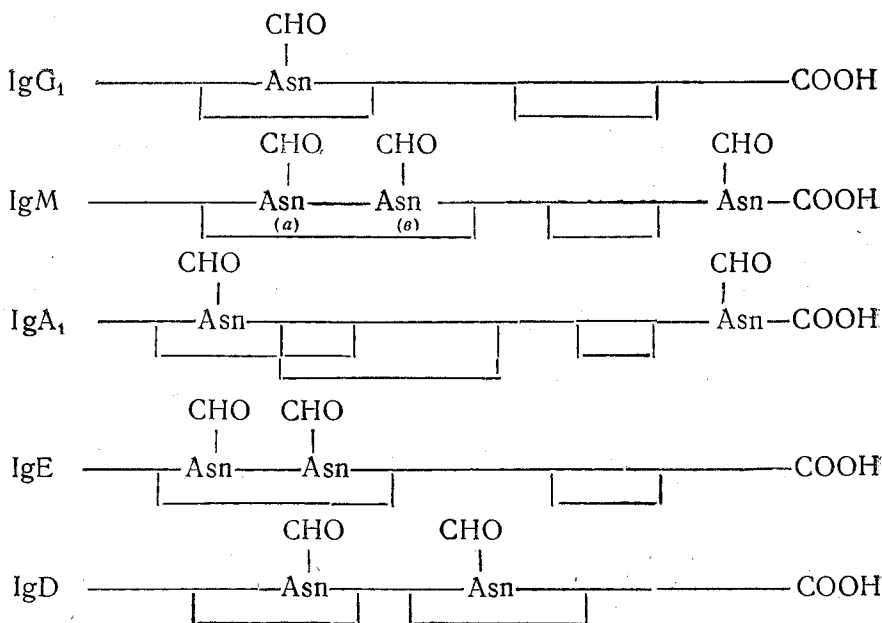
N-ацетилнейраминовая кислота 1^β—4 и 2^α—6 связями соответственно. На рис. 3 представлена структура четырех возможных вариан-

тов олигосахаридов, образующих, цепь В в ТГ свиньи (Yamamoto et al., 1981).

Олигосахаридная единица типа С найдена только в ТГ человека и изучена недостаточно. Эта единица состоит главным образом из N-ацетилгалактозамина и, возможно, сиаловой кислоты (Arima et al., 1972). Галактозамин является одним из редких углеводных компонентов, найденных в составе ТГ. Имеется сообщение о наличии галактозамина в составе ТГ свиньи в количестве 5 молей на 1 моль белка (Burkhardt et al., 1978).

Иммуноглобулины. Все иммуноглобулины, в том числе все 5 классов иммуноглобулинов человека, содержат углеводы. Молекулы этих гликопротеинов содержат гликаны, расположенные в константной области (Fc) тяжелых цепей. Заслуживает внимания, что между участками Fc областей, к которым прикреплены углеводные компоненты, обнаружена значительная степень гомологии.

Приводим схематическое изображение Fc области тяжелой цепи иммуноглобулинов (Asn — остатки аспарагина, CHO-олигосахаридные группировки, а и б — участки гликозилирования IgM (по Хьюз, 1985)).



Факт локализации гомологичных углеводных цепей в сходных участках Fc областей у всех иммуноглобулинов позволяет предположить, что необходимая последовательность аминокислот вокруг остатков аспарагина варьирует очень незначительно и, по-видимому, имеет большое структурное и функциональное

значение как точка прикрепления функционально важных гликанов.

Получены данные о строении 2 типов углеводных цепей иммуноглобулина М (IgM) человека и одной цепи иммуноглобулина

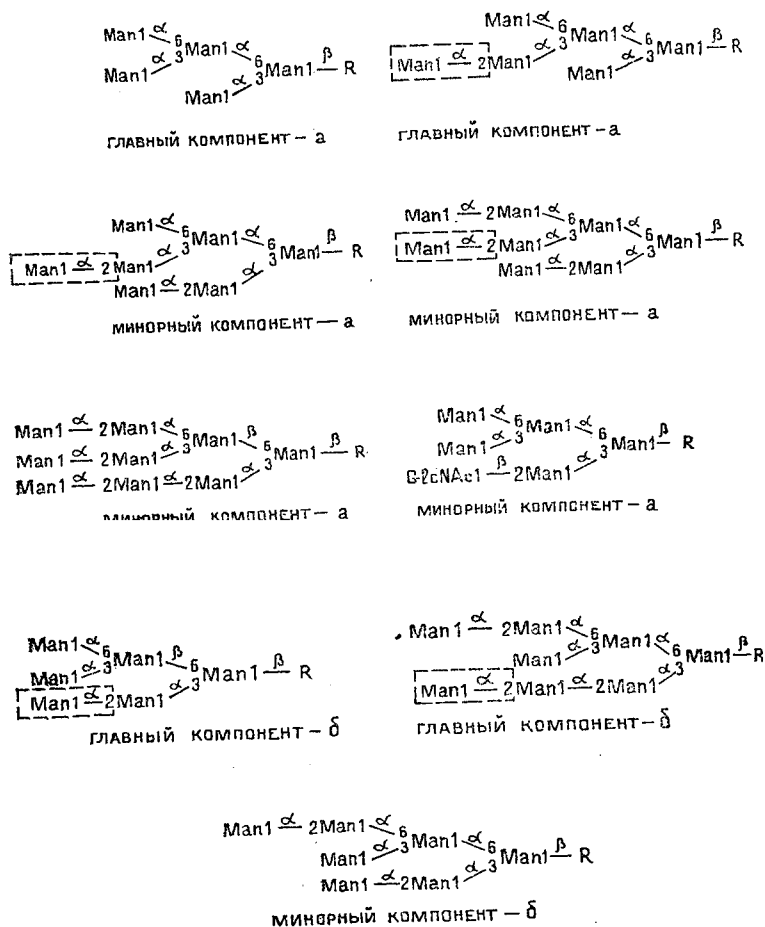


Рис. 4. Строение N-гликанов IgM человека.

а и б — участки гликозилирования Fc области тяжелой цепи.
В штриховой рамке — переменные участки.

G(IgG) человека, выделенных из сыворотки двух больных миеломой. Эти белки следует рассматривать как продукты секреции клеточных клонов, кодируемые в каждом случае определенными генами. Тем не менее, и в этих случаях установлена значительная гетерогенность в строении олигосахаридных цепей.

В молекуле моноклонального IgM при каждом остатке аспарагина имеются углеводные цепи двух основных типов: цепи,

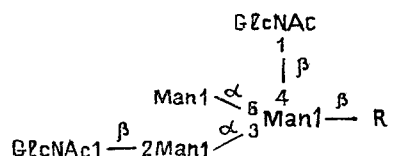
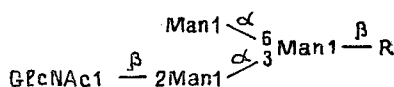
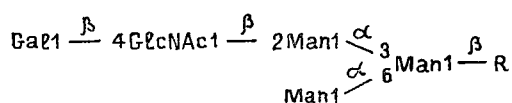
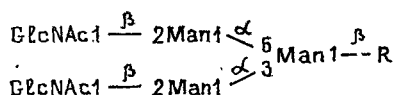
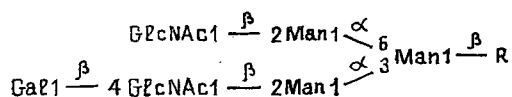
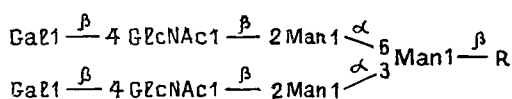
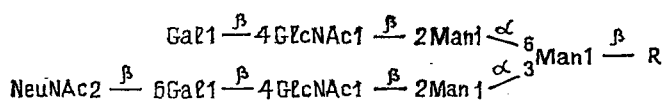


Рис. 5. Структура гликопептидов, выделенных из IgG сыворотки больного множественной миеломой (по Narasimhan et al., 1980).

содержащие только маннозу и N-ацетилглюкозамин, и цепи, содержащие, кроме того, N-ацетилнейраминую кислоту, галактозу, фукозу.

Все последовательности строятся путем добавления остатка маннозы к трисахариду коровой области



причем вначале происходит присоединение одного остатка маннозы к С-3 маннозы, а затем трех остатков маннозы по С-6 центрального маннозильного остатка.

Такая последовательность $(\text{Man})_5\text{R}$ идентична гликопептиду овальбумина. Кроме того, в иммуноглобулине М обнаружены и более сложные структуры с высоким содержанием α -маннозильных остатков. Это два изомера — $(\text{Man})_6\text{R}$ и $(\text{Man})_9\text{R}$.

Важно отметить наличие асимметрии гликозилирования в участках а и б тяжелых цепей IgM. Пять этих остатков маннозы расположены идентично, а еще один — $\text{Man } 1 \xrightarrow{\alpha} 2$ — присоединен к разным участкам углеводных цепей а и б. Сходная асимметрия встречается в цепях, содержащих 7 и 8 остатков маннозы. Они различаются также по расположению одного остатка α -маннозы (рис. 4).

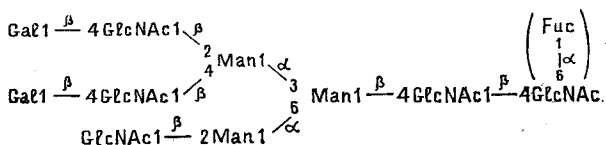
Сейчас еще не вполне ясны причины таких тонких различий в строении гликанов, имеющих сходную общую структуру и прикрепляющихся к остаткам аспарагинов, расположенных рядом в одной полипептидной цепи.

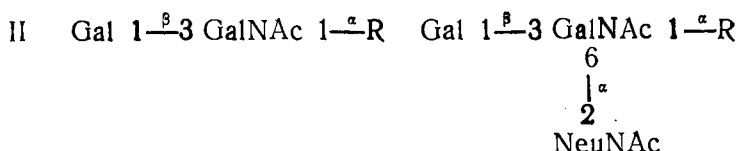
Минорные компоненты участка а, содержащие концевой N-глюкозамин, обнаружены в иммуноглобулинах и других гликопротеинах.

Единственная олигосахаридная группировка с N-гликозидной связью в IgG, полученная из сыворотки больного множественной миеломой, представлена 7 структурами, схематически изображенными на рис. 5. Представленные гликопептиды входят в состав IgG, секретируемых конкретной обследованной миеломой. Каждая миелома отличается от другой, причем все они образуют различные наборы гликанов.

В IgM больного макроглобулинемией Вальденштрема в коре N-гликана у аспарагина 563 отсутствует ацетилхитобиозный блок (Jouanneau, Bourillon, 1979). Структура коры следующая: $(\text{Man})_6\text{GlcNAc} - \text{Asn}$.

Особенностью N-гликанов является наличие остатка фукозы, присоединенного к хитобиозу коровой области связью $1 \xrightarrow{\alpha} 6$ (к первому остатку в цепи). Главные углеводные цепи комплексного типа (всего таких цепей 4) гемагглютиниона вируса гриппа А (Ленинград 385/80 НЗ№2) имеют следующее строение:





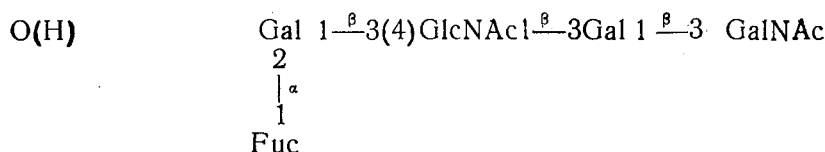
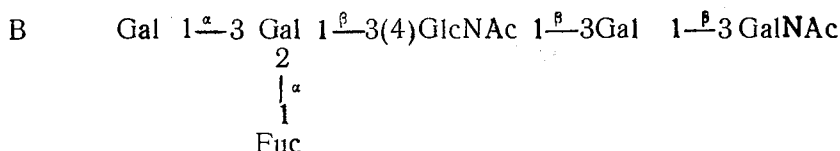
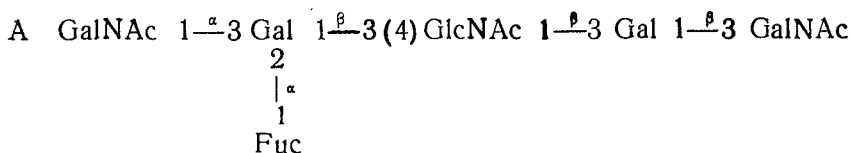
В гликопротеине толстой кишки крыс, подчелюстных желез свиней, в бронхиальном гликопротеине человека, больного хроническим бронхитом, обнаружены О-гликаны с новым типом связи (Lamblin et al., 1980): GlcNAc $1^{\beta}\text{---}3$ GalNAc.

Первый из этих остатков служит точкой удлинения цепи, в результате цепь превращается в сложную последовательность. Самая длинная цепь оканчивается участком, характерным для А-детерминанты группового вещества крови.

Другой хорошо изученной группой гликопротеинов, содержащих О-гликозидную связь, являются групповые вещества крови А, В, О человека. Обозначения группы крови относятся к антигенным различиям между эритроцитами разных индивидуумов, выявляемым специфическими антителами.

В начале 20-х годов К. Ландштайнер описал основные группы крови системы А, В, О(Н). Это открытие вызвало большой интерес, так как появился источник естественно встречающихся антител, причины образования которых остаются неизвестными и по сегодняшний день. Свойства антигенов групп крови зависят от строения углеводов, которое, в свою очередь, определяется генетическим контролем за их сборкой. Гликопротеины разных тканей обладают антигенными детерминантами, сходными с детерминантами для антигенов эритроцитов.

Антигенные детерминанты А, В и О(Н) групп крови человека приведены ниже.



Углевод на эритроцитах О-генотипа называется Н-антигеном. В качестве обязательного компонента он имеет остаток фукозы.

присоединенный к С-2 галактозы. Этот остаток связан с С-3 или С-4 соседнего N-ацетилглюкозамина. Иногда остатка фукозы может и не быть, что обуславливает отсутствие антигена А, В и Н на поверхности эритроцитов или в составе секретируемых гликопротеинов. Индивидуумы с этим редким отклонением впервые обнаружены в Индии, и соответствующий фенотип назван «Бомбей».

В результате присоединения остатков N-ацетилглюкозамина или галактозы 1-^о 3 связью Н детерминанта может быть превращена соответственно либо в А, либо в В детерминанту. Детерминанты А, В и Н находятся на концах О-гликанов секретируемых гликопротеинов. Что же представляет собой последовательность коровой области О-гликанов секретируемых гликопротеинов? Установлено большое их разнообразие. Например, в секретах подчелюстных желез свиньи антигенная детерминанта присоединена непосредственно к остатку N-ацетилгалактозамина, который связан с полипептидом. Значительно более длинная последовательность, к которой присоединена антигенная детерминанта, имеется в гликопротеинах толстого кишечника свиньи.

Известны гликопротеины — рецепторы мембран гепатоцитов, участвующие в узнавании десилированных гликопротеинов. Эти гликопротеины гомологичны в смысле общей организации молекул. В составе их молекул содержится коллагеноподобный домен, состоящий из 53—59 аминокислотных остатков. Аналогичный коллагеноподобный домен содержится и в структуре другого гликопротеина — Clq, участвующего в процессе узнавания активированного антигеном Fc участка иммуноглобулинов первым компонентом комплемента. Этот домен участвует в активации первого компонента комплемента.

Clq содержит 67 дисахаридных звеньев гликозил-галактозы и 24 моносахаридных звена галактозы, связанных с оксилизином коллагеноподобного домена; 82,6% оксилизинов этого домена гликозилированы. Высокий процент гликозилированных остатков оксилизинов и высокое значение отношения дисахаридных звеньев к моносахаридным звеньям в Clq отличают его от коллагенов кожи и хряща. Существует аналогия между степенью гликозилирования оксилизиновых остатков в коллагеноподобной области Clq и коллагеноподобных частей гликопротеинов гломерулярных мембран, внутренней оболочки сосудов аорты, А- и В-цепей гликопротеинов оболочки передних капсул хрусталика глаза быка (Shinkai, Yonemasu, 1979).

Мембранные гликопротеины. Гликопротеины — важные составляющие клеточных мембран. Мембранные гликопротеины являются амфифильными молекулами, т. е. наряду с гидрофильным полипептидом содержат гидрофобную полипептидную последовательность, с помощью которой встраиваются в липидный слой мембран. Поэтому мембранные гликопротеины могут экстрагироваться из мембран только растворителями, разрушающими гидро-

фобные связи. Олигосахаридные цепи часто сосредоточены на одном конце молекулы. Некоторые гликопротеины проходят через липидный бислой, как бы прошивая мембрану, и таким образом оказываются выставленными с внешней и внутренней сторон мембраны. Внутренние сегменты такого гликопротеина близко соприкасаются с некоторыми белками цитоплазматического пространства. Таким путем трансмембранные гликопротеины участвуют в транспорте растворимых веществ и воды, а также в передаче сигнала в ответ на внешние стимулы, такие как гормоны, антигены и др.

Асимметрия распределения компонентов в мембранах установлена для гликофоринов, которые составляют 5% массы мембран эритроцитов человека. На каждой клетке сосредоточено около 50000 молекул гликопротеинов.

Основной гликофорин А представляет собой полипептид, состоящий из 131 аминокислотного остатка с 16 олигосахаридными единицами, прикрепленными к полипептиду. Аминокислотная последовательность внеклеточного домена гликофорина А содержит большой процент заряженных аминокислот, 15 О-гликанов и 1 N-гликан.

О-гликозидные цепи гликофорина представляют собой ди-, три- и тетрасахариды, связанные с серином или треонином, и имеют коровую структуру — $\text{Gal1} \xrightarrow{\beta} \text{3GalNAc}$, которая, как правило, сиалирована в положении 6 GalNAc остатка или в положении 3 галактозного остатка. О-гликаны несут большую часть отрицательного заряда эритроцитов. N-гликаны имеют маннохитобиозный кор, к которому присоединены 2^α—6 сиалированные антены и N-ацетилглюкозамин, связанный с β-маннозным остатком.

Все углеводы найдены в первых 50 остатках N-терминального полипептидного конца, особенно плотно они распределены в крайней части N-конца, где каждый остаток в положении 2—5 и 10—15 несет по О-гликану. Другие гликофорины присутствуют в мембранах эритроцитов в небольшом количестве.

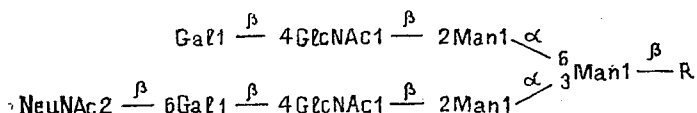
Видоспецифические и органоспецифические различия гликопротеинов. В гликопротеинах человека не обнаружено N-гликанов сложного типа с $\text{Gal1} \xrightarrow{\beta} \text{3GlcNAc}$ и $\text{Gal1} \xrightarrow{\beta} \text{3Gal1} \xrightarrow{\beta} \text{4GlcNAc}$ в периферической части. Такие цепи найдены в гликопротеинах быка и крысы.

Фибронектин быка содержит 4 разных N-гликана, в то время как фибронектин плазмы человека — только 2 типа биантенных сложных N-гликанов (рис. 6). Аналогичные структурные различия найдены между углеводными цепями фактора коагуляции крови быка и человека. Углеводные цепи α₁-кислого гликопротеина обнаруживают большие структурные различия. У крыс ни на одном из N-ацетилглюкозаминов не содержится α-фукозы, в то время как некоторые из них содержат 1 или 2 остатка α-фукозы в периферических углеводных цепях.

Некоторые углеводные цепи α_1 -кислого гликопротеина крыс содержат в периферических цепях группировку $\text{Gal } 1 \xrightarrow{\beta} 3 \text{GlcNAc}$.

Приблизительно 80% углеводных цепей α_1 -кислого гликопротеина крыс относятся к биантенному типу, 90% углеводных цепей α_1 -кислого гликопротеина человека — к три- и тетраантенному типу.

C1q субкомпонент первого компонента комплемента — сложная молекула, состоящая из 18 полипептидов. C1q имеет иден-



I

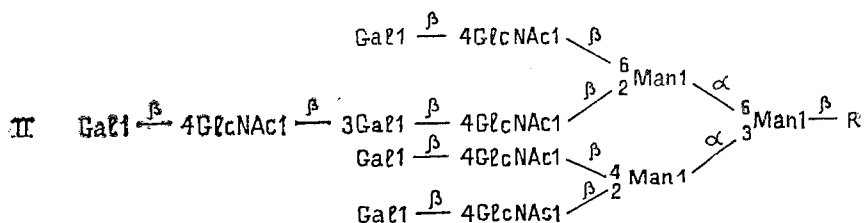
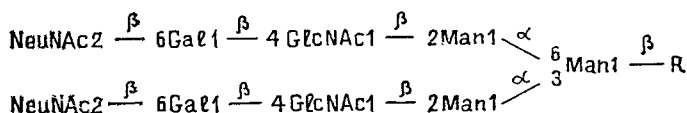


Рис. 6. Олигосахаридные группировки фибронектина человека (I) и быка (II).

тичный аминокислотный состав и трехмерную структуру в виде букета тюльпанов. Каждая глобулярная область содержит единственный N-гликан, который в молекулах C1q различается по структуре периферической части (рис. 7).

Кроме видоспецифических различий гликопротеинов, существуют и органоспецифические различия в структуре гликанов. γ -Глутамилтранспептидаза, связанная с эпителиальными клеточными мембранами различных органов, катализирует первую стадию катаболизма глутатиона. Она состоит из большой и малой субъединиц и встроена в плазматические мембраны клеток N-терминальным концом большой субъединицы. На рис. 8 представлены основные олигосахаридные цепи γ -глутамилтранспептидазы, выделенной из почек и печени разных животных. Характерная их особенность — Bisect N-ацетилглюкозамин, который найден в ферменте из почек всех видов животных (крысы, коровы, мыши) и

не найден в углеводных цепях фермента, выделенного из печени этих видов.

Таким образом, гликопротеины вездесущи, ими являются рецепторы поверхности клеток, они циркулируют в кровяном русле в качестве транспортных белков; ими являются иммуноглобулины, гормоны, многие ферменты, токсины, лектины и структурные белки. Углеводная часть гликопротеинов составляет от 1—3 (нап-

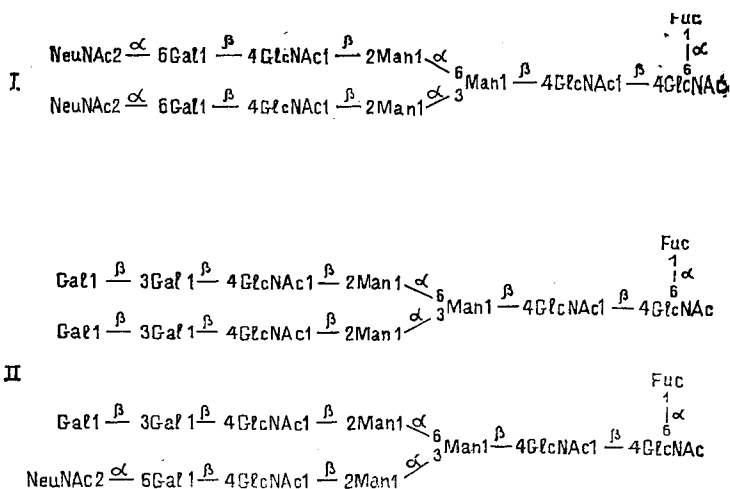


Рис. 7. Олигосахаридные цепи субкомпонента C1q первого компонента комплемента человека (I) и быка (II).

пример, в овальбумине, коллагене) до 80—90% (в группоспецифических белках крови) всей молекулы.

Углеводная часть гликопротеинов построена однотипно: имеются N-гликаны со строго определенной структурой кора и O-гликаны.

Bayard et al. (1982) высказали предположение об единообразии построения олигосахаридных цепей в пределах индивидуальных молекулярных вариаций. Такое единообразие характерно для всех сывороточных гликопротеинов. Этот вопрос важен для понимания процессов гликозилирования гликопротеинов и их секреции из клетки.

Характерная черта гликопротеинов — гетерогенность их периферических олигосахаридных цепей. Вряд ли только в этом причина того, что биосинтез олигосахаридов идет без определенного шаблона, а с помощью специфических гликозилтрансфераз. Все функции, которые выполняют гликаны гликопротеинов, основаны на участии именно периферических олигосахаридных цепей. Гликопротеины выполняют множество функций с разной степенью специфичности. Если углеводы участвуют в формировании структур, предназначенных для осуществления биологических функций,

то одновременно должны присутствовать структуры с разной степенью специфичности. Специфичность взаимодействия белок—белок, лиганд—белок определяется комплементарностью и пространственным сближением доноров и акцепторов водородных связей и солевых мостиков. Если из существующего набора структур какая-либо структура окажется подходящей в том смысле, что сродство к структурам другого участника взаимодействия превышает

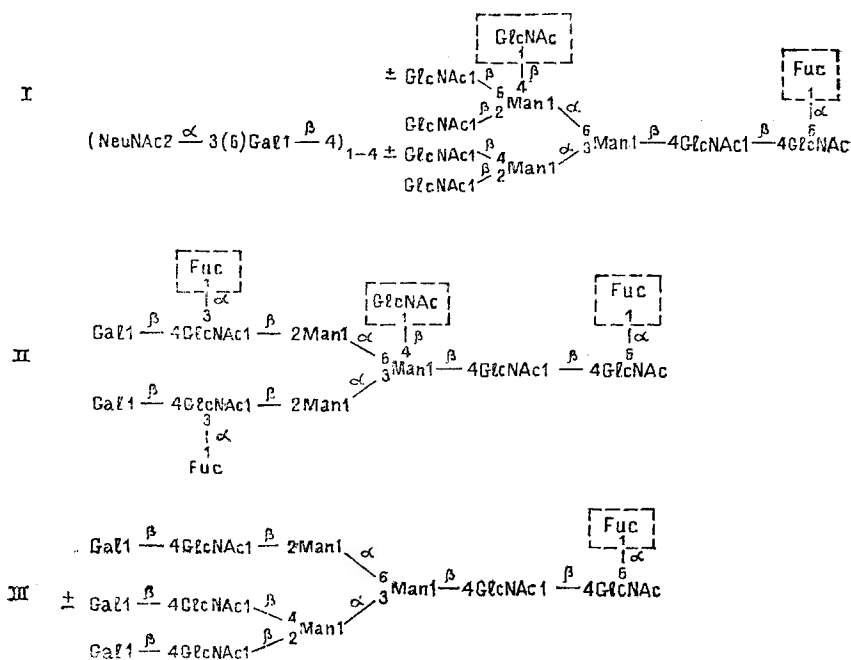


Рис. 8. Олигосахаридные цепи γ -глутамилтранспептидазы.

I—почки крыс и коров, *II*—почки мышей, *III*—печень крыс.

сит определенный уровень, то инициируется биологически значимая реакция.

Олигосахаридные цепи гликопротеинов отличаются по видовой и органной специфичности. По-видимому, это связано с различиями в специфичности белков-лектинов, клеточных рецепторов, гормонов разных органов и различных видов животных.

Fc рецепторы разных типов клеток отличаются по сродству связывания с Fc участками иммуноглобулинов, по чувствительности к протеинолизу и, вероятно, отличаются по целому ряду еще не изученных свойств. Гликопротеины отвечают за многие свойства мембран клеток. Они действуют как сенсоры для антигенов, гормонов, токсинов и интерферона. Содержание и специфичность этих компонентов различаются в зависимости от вида животного и органа.

Глава II. ПУТИ ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ УГЛЕВОДНЫХ КОМПОНЕНТОВ ГЛИКОПРОТЕИНОВ

При исследовании функции и структуры гликановой части гликопротеинов используют следующие подходы: деструкция, или элиминирование гликановой части гликопротеинов с помощью периодата, перфтората, специфических гликозидаз; ингибирование синтеза олигосахаридных цепей; выделение мутантных клеток, продуцентов гликановых структур с дефектами; использование ингибиторов процессинга с целью модификации гликановых структур; искусственное присоединение олигосахаридных цепей к белкам.

Типы углевод-белковых связей различаются по стабильности при кислотной и щелочной обработке. N-гликозидная связь относительно устойчива к мягкому кислотному гидролизу, однако гидролизует в жестких условиях. O-гликозидные связи заметно различаются по чувствительности к щелочи.

Связь галактозил-гидроксизил высоко стабильна, и этот фрагмент может быть изолирован количественно из щелочных гидролизатов таких гликопротеинов, как коллагены. O-гликозидная связь, образованная серином и треонином, расщепляется щелочью по реакции β -элиминирования в присутствии натрийборгидрида с последующим кислым гидролизом. В этих условиях O-гликозиды серина и треонина превращаются соответственно в аланин и лейцин. Сахара, первоначально включенные в эту связь, превращаются в соответствующие сахароспирты, например, N-ацетилглюкозамин — в галактозаминитол, ксилоза — в ксилитол. Количественный анализ потерь серина и треонина, увеличение количества аланина и лейцина и образовавшихся сахароспиртов дает информацию не только о природе углевод-пептидной связи, но и о приблизительном числе O-гликозидно-связанных остатков в гликопротеине.

Положение связи в сахарном остатке можно установить с помощью метилирования свободных гидроксильных групп с последующим кислым гидролизом. При этом расщепляется углевод-пептидная связь, а метильные группы не затрагиваются.

Последовательность сахаров в олигосахаридах и их аномерная конфигурация устанавливается с помощью специфических экзогликозидаз, обладающих строгой стереохимической специ-

Эндогликозидазы (Kobata, 1979)

Фермент	Источник	Тип гидролизуемой связи
Тип А		
Эндо- β -N-ацетилглюкозаминидаза D	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptomyces plicatus</i> <i>Streptomyces griseus</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \beta \\ \text{Man1} \text{---} 4 \text{GlcNAc1} \text{---} 4 \text{GlcNAc} \text{---} \text{Asn} \\ \\ 3 \\ \\ \alpha \\ \\ \text{man} \end{array}$
Эндо- β -N-ацетилглюкозаминидаза H		$\begin{array}{c} \downarrow \\ \beta \\ \text{Man1} \text{---} 4 \text{man1} \text{---} 6 \text{man1} \text{---} \beta 4 \text{GlcNAc} \text{---} 4 \text{GlcNAc} \text{---} \text{Asn} \\ \\ \alpha \end{array}$
Эндо- β -N-ацетилглюкозаминидаза C1	<i>Clostridium perfringens</i> Инжир; почки, печень, селезенка млекопитающих; яйцеводы кур	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \beta \\ \text{man1} \text{---} 4 \text{GlcNAc1} \text{---} 4 \text{GlcNAc} \text{---} \text{Asn} \\ \\ 3 \\ \\ \text{man} \end{array}$
Эндо- β -N-ацетилглюкозаминидаза CII		$\begin{array}{c} \downarrow \\ \beta \\ \text{Man1} \text{---} 4 \text{man1} \text{---} 6 \text{man1} \text{---} \beta 4 \text{GlcNAc1} \text{---} 4 \text{GlcNAc} \text{---} \text{Asn} \\ \\ \alpha \\ \\ \alpha \\ \\ \text{man1} \text{---} 4 \end{array}$
Тип В		
Эндо- β -N-ацетилгалактозаминидаза	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Escherichia freundii</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \beta \\ \text{Gal1} \text{---} 3 \text{GalNAc} \text{---} \text{Ser(Threo)} \end{array}$

Продолжение таблицы 2

Фермент	Источник	Тип гидролизуемой связи
Эндо- β -N-ацетилглюкоза-минидаза	Эмульсин миндаля	$\text{man}1 \xrightarrow{\beta} 4\text{GlcNAc}1 \xrightarrow{\beta} 4\text{GlcNAc} \xrightarrow{\downarrow} \text{Asn}$
Эндо- β -галактозидаза	<p>Flavobacter keratolyticus Escherichia freundii</p> <p>Streptococcus pneumoniae</p>	$\text{R}_1 \text{---} \text{GlcNAc}1 \xrightarrow{\beta} 3\text{Gal}1 \xrightarrow{\downarrow \beta} 4\text{GlcNAc} \text{---} \text{R}_2$ $\text{Gal}(\text{GalNAc})1 \xrightarrow{\alpha} 3\text{Gal}1 \xrightarrow{\downarrow \beta} 4\text{GlcNAc} \text{---} \text{R}_1$ <div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 20px;"> <div style="text-align: center;"> α \downarrow Fuc </div> <div style="text-align: center;"> α \downarrow Fuc </div> <div style="text-align: center;"> α \downarrow (Fuc) </div> </div>

Примечание. R₁—атом водорода или остаток сахара или церида, R₂—атом водорода.

фичностью нейраминидазы, β -D-галактозидазы, N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы, α -D-маннозидазы, α -L-фукозидазы. Они последовательно отщепляют с невозстанавливающегося конца соответствующие сахара от гликопротеинов и гликопептидов.

Открыты эндо- β -N-ацетилглюкозаминидазы, расщепляющие связи между двумя ацетилглюкозаминовыми остатками в коровой области N-гликановых цепей гликопротеинов. Известно несколько типов эндо- β -N-глюкозаминидаз (табл. 2). Эти ферменты способны реагировать с интактными гликопротеинами, и даже с теми из них, которые расположены на поверхности неповрежденных клеток.

Эндо- β -N-ацетилглюкозаминидазы типа А расщепляют гликозидную связь между двумя остатками N-ацетилглюкозамина, непосредственно присоединенными к аспарагиновому остатку полипептида. Ферменты D и CI (но не H или CII) гидролизуют эту связь, даже если хитобиоза замещена фукозой, как это наблюдается в иммуноглобулине G. Ферменты D и CI гидролизуют хитобиозную связь только в том случае, если α 1—3 манноза не замещена. Для эндо- β -N-глюкозаминидазы H требуется более сложная цепь из остатков α -маннозы, присоединенной по C-6 β -маннозы коровой области. Этот фермент неактивен, если к коровой области присоединена фукоза. Имеются 2 принципиальных различия между ферментами H и CII. Фермент CII требует наличия разветвленной структуры, когда как C-3, так и C-6 остатки β -маннозы замещены остатками α -маннозы. Фермент не действует на цепи, содержащие 4-O-замещенный остаток маннозы, который присоединен 1^a—3 связью к коровой области, так как для проявления его активности гидроксильная группа в положении 4 должна быть незамещенной.

Эндо- β -N-глюкозаминидаза эмульсина миндаля действует на интактные гликопротеины и гликопептиды, расщепляя связь N-ацетилглюкозамин—аспарагин.

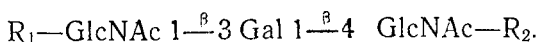
Из *Flavobacterium meningosepticum* выделены 2 фермента: эндо- β -N-ацетилглюкозаминидаза F (эндо F) и пептид:N-гликозидаза F. Эндо F, подобно эндо H, гидролизует многие, но не все высокоманнозные и гибридные олигосахаридные цепи, а также биантенные олигосахаридные цепи. Она расщепляет ди-N-ацетилхитобиозную связь.

Пептид:N-гликозидаза — гидрофобный белок, действует на углевод-белковую связь. Многие белки в их нативной форме чувствительны к этому ферменту (Elder, Alexander, 1982; Hirani et al., 1987).

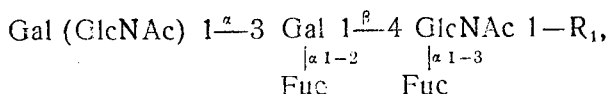
Эндо- β -N-ацетилгалактозаминидаза стрептококка обладает высокой специфичностью в отношении дисахарида Gal1 ^{β} —3GalNAc, прикрепленного к серину или треонину полипептидной цепи, и расщепляет связь между серином (треонином) и N-ацетилгалактозамином. Однако если этот дисахарид замещен, то фермент не действует на O-гликозидную связь. Сходный фермент выделен из

культуральной жидкости *Clostridium perfringens*. В результате катализируемой им реакции образуется свободный дисахарид Gal 1^β3 GalNAc.

Выделена эндо-β-галактозидаза, специфичная в отношении протяженных углеводных цепей. Фермент из *E. freundii* и *flavobacter keratolyticus* гидролизует связь 1^β4, образованную галактозой и N-ацетилглюкозамином



Фермент из *Streptococcus pneumoniae* гидролизует ту же связь в цепях типа



где R_1 — атом водорода или остатка сахара или церамида;

R_2 — атом водорода или остатка сахара.

Фермент из *E. freundii* гидролизует внутренние связи в углеводных цепях гликопротеинов, если галактоза соединена 1^β4 связью с N-ацетилглюкозамином, или в гликопептидах, если галактоза соединена той же связью с глюкозой, присоединенной к церамидному звену. Расщепление таких внутренних связей происходит даже в случае очень длинных олигосахаридных цепей. При замещении С-6 галактозного остатка, входящего в состав важного трисахаридного звена, чувствительность фермента к этой связи исчезает. Однако присоединение сульфата к N-ацетилглюкозамину не влияет на активность фермента. Сходной специфичностью обладает фермент из *Flavobacter keratolyticus*. Оба фермента получены в гомогенном состоянии, их молекулярная масса 35000.

Эндо-β-галактозидаза стрептококка гидролизует разветвленные олигосахариды, которые представляют собой антигенные детерминанты веществ крови группы А (с концевым остатком N-ацетилгалактозамином) или В (с концевым остатком галактозой). Фермент гидролизует связь Gal 1^β4 GlcNAc, но не гидролизует связь Gal 1^α3 GlcNAc.

Обе эти связи присутствуют в разных цепях, замещенных фукозой, галактозой или N-ацетилглюкозамином. В результате получают цепи с активностью антигенов групп крови А и В. Фермент из стрептококков способен различать эти антигенные структуры; его специфичность даже выше, чем у соответствующих антител.

Информация об аномерных связях, последовательности моносахаридов и положении их связей может быть получена при использовании метода ПМР-спектроскопии гликопептидов. Такой анализ основан на сравнении спектров ПМР исследуемого материала со спектрами гликопептидов с установленной структурой.

В последнее время предложен метод Fast atom bombardment mass-spectrometry (масс-спектрометрия с бомбардировкой быстрыми атомами) для одновременной локализации центров прикрепления углеводов и определения степени гликозилирования. Он включает сравнение производных гликопептидов, полученных перед и после обработки пептид: N-гликозидазой F. После обработки эндогликопептидов этим ферментом исчезает сигнал аспарагин-N-ацетилглюкозамина и появляется новый сигнал от аспарагина. Различие в массах этого сигнала определяет вид сахара. Степень гликозилирования устанавливается по относительной высоте пиков (Carr, Roberts, 1985).

Модифицировать олигосахаридные группировки можно, применяя специфические ингибиторы, действующие на разных стадиях процесса гликозилирования. Это позволяет получать белки без олигосахаридных группировок или с измененными олигосахаридными группировками. Широко используется ингибитор гликозилирования белка — туникамицин. Это структурный аналог УДФ-2-дезоксиглюкозы (молекула туникамицина содержит 1 урацил, 1 N-ацетилглюкозамин и 1 глюкозамин, ацилированный ненасыщенной жирной кислотой с C₂₀). Он блокирует начальную стадию гликозилирования долихолового интермедиата в сборке коровой части гликана, связанного с белком N-гликозидной связью. Другие ингибиторы гликозилирования: свейнсонин (алкалоид из австралийского дерева — *Swainsona caucensis*) — ингибитор маннозидазы II аппарата Гольджи; 1-диоксийримицин (1-deoxybujugimycin) ингибитор гликозидазы I и II и бромкондуритол — ингибитор гликозидазы II эндоплазматического ретикула. Они специфически модифицируют структуру N-связанного гликана.

Данные, полученные при удалении олигосахаридных группировок от гликопротеинов, которые *in vivo* уже синтезированы и приобрели для функционирования нужную конформацию, отличаются от данных, полученных при ингибировании гликозилирования белка, который синтезирован, но еще не приобрел необходимую для функционирования конформацию. Отсутствие олигосахаридных группировок, по-видимому, должно сказаться на процессе свертывания белка и, вероятно, его конформация не всегда будет соответствовать физиологически активной, поскольку могут быть нарушены пространственное сближение и ориентация доноров и акцепторов водородных связей. Даже различие в несколько углеводных единиц в олигосахаридных цепях может иметь огромное значение (патология).

Введение в гликопротеин олигосахаридных цепей, являющихся гидрофильными, а иногда и заряженными группировками, которые легко вступают во всякого рода взаимодействия, может коренным образом изменить его структуру. При физиологических условиях глюкоза реагирует неэнзиматическим путем с некоторыми белками, образуя стабильные аддукты. Около 10% альбу-

мина в норме модифицировано неэнзиматическим гликозилированием по ϵ -аминогруппе лизина 525. Такое неферментативное гликозилирование вызывает конформационные изменения, что установлено измерением флуоресценции триптофана у гликозилированного *in vivo* и *in vitro* сывороточного альбумина человека.

У гликозилированного альбумина выход флуоресценции триптофана 214 снижен на 30% по сравнению с негликозилированной формой альбумина человека. Максимальная длина волны эмиссии флуоресценции триптофана сдвинута в коротковолновую область.

Изучены лигандсвязывающие свойства альбумина. Показано, что сродство к гемину не изменяется, однако сродство к билирубину у гликозилированного альбумина снижено на 50%, сродство к длинноцепочечным жирным кислотам у гликозилированного альбумина *in vivo* и *in vitro* было в 20 раз ниже, чем у негликозилированной формы.

Введение олигосахаридных группировок в полипептидную цепь изменяет ее структурную организацию, о чем свидетельствует экранировка или даже удаление от поверхности хромофора. Изменение в структуре отражается на функциональных свойствах гликопротеина (Shaklai et al., 1984).

Таким образом, в настоящее время разработаны надежные методы анализа структуры гликопротеинов, в основном сывороточных, содержание которых достаточно для их выделения в гоомогенном состоянии. Число расшифрованных структур олигосахаридов увеличивается с каждым днем и зависит лишь от трудности выделения индивидуальных гликопротеинов. Это касается в основном мембранных гликопротеинов — белков-лектинов, рецепторов. Трудности заключаются в их малом содержании, тенденции агрегировать, связываться неспецифически с нерастворимым материалом за счет гидрофобного взаимодействия и терять специфические функциональные свойства.

Существуют 3 подхода в получении дегликозилированного белка: 1) использование ингибиторов гликозилирования, действующих на разные стадии гликозилирования; 2) использование ферментов с разными специфическими свойствами, расщепляющих олигосахаридные цепи в мягких условиях; 3) использование мутантов клеточных линий, в которых нарушены разные стадии процесса гликозилирования. Каждый из этих методов не универсален и применим только в определенных рамках для изучения определенных функций.

Применение туникамицина, ингибитора начальной стадии гликозилирования — присоединения кора олигосахаридной цепи, позволяет исследовать только процессы гликозилирования, транспорта, секреции в клетке. Дело в том, что белки, полученные в условиях ингибирования гликозилирования, имеют измененную структуру, в результате чего они приобретают новые свойства.

Поскольку эти процессы настроены на неизменный белок, то при контакте с конформационно или структурно измененным белком они нарушаются. В результате структурных изменений белок приобретает новые свойства: тенденцию агрегировать (поскольку отсутствуют гидрофильные углеводные группы, способные удерживать его в растворе) и подвергаться деградации протеазами. Важное значение имеет контроль за этими процессами.

При секреции гликопротеина в присутствии туникамицина по выходу радиоактивной метки наблюдается отсутствие метки вне клетки, белок не секретируется. Однако вывода относительно влияния олигосахаридных групп на процесс секреции сделать нельзя. Можно выдвинуть лишь 2 гипотезы: 1) на мембране клетки есть механизм, узнающий гликозилированный белок; структурно измененный белок он не узнает, и при этом механизм секреции не запускается; 2) секреция изменена в результате приобретения дегликозилированным белком новых свойств (агрегация, деградация протеиназами, повышение склонности к гидрофобным взаимодействиям), которые не позволяют ему пройти через мембрану.

Для изучения физико-химических свойств с успехом могут быть использованы гликопротеины, полученные в присутствии туникамицина. Изменения в свойствах можно увязать с конформационными изменениями, регистрируемыми физико-механическими методами, с помощью дифференциальных спектров, спектров кругового дихроизма, рентгеноструктурным анализом, ЯМР, ЭПР и т. д. Точная локализация структурных изменений при дегликозилировании дает возможность обосновать изменения физико-химических свойств.

Следует с особой осторожностью и тщательностью относиться к анализу физическими методами. В настоящее время существует широкий арсенал физических методов, но не всегда информация, полученная с их помощью, адекватна. Можно привести следующий пример. Fc фрагмент IgG — первый гликопротеин, для которого установлена пространственная структура доменов. Найдены олигосахаридные цепи, прикрепленные к аспарагину 297 у C_H2 домена. Этот домен включается в связывание иммунного комплекса с первым компонентом комплемента, именно его узнающим центром C1q. Результаты рентгеноструктурного изучения структуры Fc фрагмента и целого IgG показали, что углеводные группировки лежат над гидрофобной поверхностью Fc участка IgG, прикрывая его. В полной структуре IgG олигосахаридные группировки погружены внутрь молекулы.

Исследуя структуру IgG в растворе с помощью спин-метки, введенной в олигосахарид, Willan et al. (1977) показали, что олигосахаридные группировки достаточно подвижны в нативном Fc фрагменте. Позже Rosen et al. (1979) при анализе спектра ¹³C-ЯМР в области 70—110 пМ пришли к выводу, что в Fc фрагменте IgG человека отсутствует независимое движение углевод-

ных цепей относительно белка. Возможно, спин-метка была связана с терминальным углеводным остатком и, следовательно, не могла представлять подвижность всей олигосахаридной цепи. Можно предположить, что она была связана неспецифически или неполностью отделена диализом.

Применение ингибиторов гликозилирования для выяснения функций узнавания, которые в некоторых случаях выполняют углеводы, не дает интерпретируемых данных. Изменение функций не означает участие углеводов в узнавании, поскольку это изменение может произойти за счет структурных изменений при дегликозилировании, при этом узнающие структуры удаляются с поверхности или становятся замаскированными.

Функции узнавания в лиганд-рецепторном взаимодействии можно исследовать мягким удалением углеводов с помощью специфических эндогликозидаз и экзогликозидаз, хотя последние не так удобны для этих целей вследствие их медленного действия. При этом можно проследить динамику изменения функции, если олигосахаридные группы удалять постепенно, чтобы ухудшение или улучшение узнавания происходило медленно.

В случае использования мутантов, в которых нарушены процессы гликозилирования, а также исследования патологического материала надежность выводов зависит от всестороннего исследования продуктов мутации или патологического материала. Вероятнее всего, что кроме процессов гликозилирования в мутантах и в условиях патологии нарушены и другие процессы. Все это необходимо строго доказывать.

Исследование функций углеводов широко распространенного класса белков-гликопротеинов только начинается. Сделаны лишь первые шаги, которые показали, что этому вопросу следует уделять должное внимание, так как решение его имеет непосредственный выход в практику лечения многих заболеваний, создания высокоэффективных специфических средств защиты организма от внешних воздействий. Открытие и разработка методов выделения эндо- β -галактозидаз, действующих на связь $\text{Gal } 1 \xrightarrow{\beta} 4 \text{GlcNAc}$, присутствующую в групповых веществах крови, открывает перспективы получения «универсальной крови» без групповой специфичности.

Идея создания крови, лишенной группоспецифических свойств, пока не нашла практического решения, поскольку разрушение группоспецифических свойств приводит к появлению новой иммунологической специфичности эритроцитов. Химическая же модификация эритроцитов не лишает их групповой специфичности, но сказывается на их кислород-транспортной функции. По этой же причине не решена проблема переливания человеку крови животных, лишенной иммунологической несовместимости.

Глава III.
РОЛЬ СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ
ГЛИКОПРОТЕИНОВ В ОРГАНИЗАЦИИ
ИХ МОЛЕКУЛЫ
БИОСИНТЕЗ, СБОРКА И СЕКРЕЦИЯ

Биосинтез гликопротеинов подробно изложен в обзоре Г. Я. Вилершайна (1976). Полипептидные цепи гликопротеинов синтезируются по тому же механизму, что и негликозилированные белки. Гликозилирование начинается сразу после образования пептидной цепи на рибосомах, связанных с клеточными мембранами, на внутренних поверхностях которых локализованы гликозилтрансферазы.

Биосинтез углеводных цепей осуществляется серией гликозилтрансфераз, специфических как к донорам гликозидных остатков, так и к их акцепторам. Гликозилтрансферазы действуют последовательно, продукт действия одного фермента служит субстратом для следующего. Генетический контроль олигосахаридной последовательности гликопротеинов достигается без прямого участия ДНК или РНК. Последовательность сахаров контролируется прямо свойствами гликозилтрансфераз, являющихся первичным продуктом генов.

Инициация гликозилирования происходит в цистернах шероховатого эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи. Активность гликозилтрансфераз, участвующих в образовании углеводпептидной связи и внутренних углеводных связей, наиболее высока в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме, а активность трансфераз, строящих периферические и концевые участки цепи, увеличивается соответственно в гладком эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, т. е. существует своего рода внутриклеточный конвейер гликозилирования.

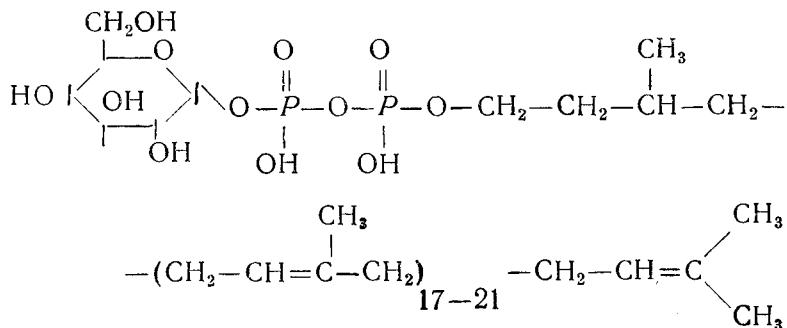
Донорами гликозильных остатков до недавнего времени считались лишь нуклеозидфосфатсахара. Это хорошо растворимые в воде гидрофильные соединения. В качестве азотистых оснований они могут содержать аденин, гуанин, цитозин, тимин и урацил. В тканях животных каждому сахару соответствует определенный нуклеозиддифосфат, точнее, гетероциклическое основание. Так, при ферментативном образовании нуклеозиддифосфатпроизводного L-фукозы всегда образуется ГДФ-фукоза, глюкозы — УДФ-глюкоза. У растений и бактерий глюкоза может быть связана с УДФ, ГДФ, АДФ и ТДФ.

Нуклеозиддифосфатсахара не случайно являются лучшими донорами углеводных остатков. Они обладают наиболее высокой свободной энергией гидролиза гликозидной связи по сравнению с другими потенциальными донорами гликозидных остатков.

Большое значение, по-видимому, имеют и структурные особенности нуклеозиддифосфатсахаров, например, внутримолекулярные взаимодействия между моносахаридным остатком и гетероциклическим ядром за счет образования водородных связей. Эти соединения рассматриваются как активированные формы сахаров, от которых под действием высокоспецифических гликозилтрансфераз происходит перенос и включение углеводных остатков в строящиеся молекулы углеводсодержащих соединений.

Недавно открыт второй класс доноров углеводных остатков, так называемые липидные переносчики. Первые работы в этой области были сделаны в 1970 г. на препаратах бактерий. Вскоре липидные переносчики были обнаружены в организмах высших животных и растений. В отличие от хорошо растворимых в воде гидрофильных нуклеозиддифосфатсахаров, липидные переносчики, так называемые полипренолфосфатсахара, гидрофобны. Липофильная часть молекул этих соединений представляет собой неопределенный полиизопренол, к которому через 1—2 остатка фосфорной кислоты присоединен углеводный остаток. В организме животных наиболее распространенным полиизопренолом является долихол. Термином «долихол» называют все пренолы, у которых изопреновый остаток, несущий гидроксильную группу, насыщен (в отличие от полипренола бактерий — ундекапренола, у которого концевое звено цепи ненасыщено).

Углеводная цепь долихола состоит из 90—100 атомов углерода. Это одна из самых длинных алифатических молекул. Цепь ундекапренола состоит из 50—60 углеродных атомов. Спиртовый гидроксил долихола может быть замещен 1 или 2 остатками фосфорной кислоты с образованием соответствующего долихолмонофосфата или долихолдифосфата, в котором через фосфатный или пирфосфатный мостик присоединяются сахарные остатки.



Долихолпирфосфатглюкоза

Образующиеся долихолмоно- и долихолдифосфатсахара — основные известные в настоящее время липидные переносчики при биосинтезе углеводсодержащих соединений в клетках животных.

Полипиренолдифосфатсахара (долихолпирозфосфатсахара) выступают как акцепторы углеводных остатков, донорами которых являются нуклеозиддифосфатсахара или долихолмонофосфатсахара. После построения олигосахаридной цепи, связанной с долихолдифосфатом, целый олигосахаридный блок может присоединяться к белку или другому акцептору углеводной компоненты. Гликозилирование долихолдифосфатсахаров может, по-видимому, осуществляться не только через последовательное присоединение моносахаридных остатков от нуклеозиддифосфатсахаров и долихолмонофосфатсахаров, но и через присоединение нескольких моносахаридных звеньев от долихолдифосфатолигосахаридов. В этом состоит отличие липидных переносчиков от нуклеозиддифосфатсахаров, которые являются донорами только одного моносахарида.

В механизме биосинтеза углеводсодержащих соединений главными являются гликозилтрансферазы, специфичные к донорам углеводных остатков и их акцепторам. Именно гликозилтрансферазы обуславливают построение разнообразных углеводсодержащих соединений.

Гликозилирование инициируется под действием специфических гликозилтрансфераз, которые узнают определенную аминокислотную последовательность пептидной цепи. Кроме того, гликозилтрансферазы специфичны не только к первичной структуре белка, но и к вторичной и третичной. То, что часть аминокислотных остатков, удовлетворяющих формальным условиям гликозилтрансфераз к аминокислотной последовательности, остаются негликозилированными, может свидетельствовать о существовании стерических условий для действия трансфераз. Например, овальбумин имеет одну углеводную цепь, присоединенную к аспарагину на участке пептида с триплетом аспарагин — лейцин — треонин. В то же время имеющийся в овальбумине триплет аспарагин — лейцин — серин остается негликозилированным. Естественно, что инициация гликозилирования может не происходить и в тех случаях, когда акцепторная молекула удовлетворяет всем требованиям специфичности гликозилтрансфераз, но сами гликозилтрансферазы в данной ткани отсутствуют.

Очевидным считается факт, что предшественник N-гликанов, связанный с липидом олигосахарид, образуется у животных, растений и дрожжей. Он состоит из 2 остатков N-ацетилглюкозамина, 9 остатков маннозы, 2 или 3 остатков глюкозы. Обнаружение глюкозы в этом липидоолигосахариде было неожиданным, так как глюкоза не найдена в составе N-гликанов гликопротеинов.

Построение углеводного кора из повторяющихся звеньев маннозы и N-ацетилглюкозамина с гликозиламидным узлом связи осуществляется при помощи липидного переносчика. Дальнейшее

построение на коре уникальной последовательности сахаров и терминация биосинтеза происходят, по-видимому, при помощи нуклеозиддифосфатсахаров и специфических трансфераз, которые полномочны ставить своего рода «точки» на концах цепи, после чего элонгация цепи прекращается. Терминирующая гликозилтрансфераза может менять сахара, как это наблюдается в углеводных цепях групповых веществ крови. В других случаях удлинение цепи заканчивается после присоединения терминальных сахаров — N-ацетилнейраминовой кислоты или фукозы. Трансферазы, переносящие терминальные сахара, специфичны не только к сахару, который они непосредственно гликозилируют, но и к более удаленным углеводным остаткам в цепи.

Данные по механизму гликозилирования получены при изучении ингибирования туникамицином гликозилирования куриного овальбумина. Туникамицин, добавленный к мембранам яйцеводов кур, ингибировал синтез N-ацетилглюкозаминилипида со свойствами N-ацетилглюкозаминилипирофосфорилполиизопренола. Не обнаружено ингибирования других стадий процесса, т. е. ингибировался синтез липидного переносчика.

При использовании мембранных препаратов из яйцеводов кур, преинкубированных с туникамицином, установлено, что маннозилфосфорилдолихол — единственный синтезируемый сахаридлипид. Следовательно, туникамицин, введенный *in vivo*, устраняет эндогенные пулы N-ацетиллипидного предшественника олигосахаридлипида. Показано также, что туникамицин не ингибирует полипептидный синтез, а ингибирует только гликозилирование (Struck, Lennarz, 1977).

Олигосахаридные цепи коровой области, синтезированные на липидном переносчике, переносятся как структурные единицы к остатку аспарагина возникающей полипептидной цепи. Аспаргин гликозилируется, если находится в составе трипептидной акцепторной последовательности асп-Хаа-сер (трео). Для гликозилирования полипептида эта последовательность необходима, но недостаточна. Например, у овальбумина цыпленка имеются 2 потенциальных центра гликозилирования: у асп 293 и асп 312, однако *in vivo* белок гликозилируется только у асп 293.

Изучена экспрессия гена овальбумина цыпленка в гетерологичных клетках. За гликозилированием овальбумина, синтезированного клетками мышей линии L-353, следили по включению [³H]-маннозы и чувствительности к эндо-β-N-ацетилглюкозаминидазе. Анализ углеводных компонентов (гликопептида) высокоэффективной жидкостной хроматографией (HPLC) показал, что белок, синтезированный мышинной клеточной линией, гликозилируется у того же акцепторного центра, что и в овальбумине цыпленка — у асп 293. Как и в случае овальбумина цыпленка, овальбумин L-353 клеток мышей содержал большое количество гибридных олигосахаридов: найдено 50% [³H]-маннозы.

Однако в гликозилировании овальбумина цыпленка и в L-

клетках мышей обнаружены различия. В отличие от гибридных цепей овальбумина цыпленка, гибридные олигосахариды овальбумина, синтезированного L-клетками, были полностью сиалированы и не содержали разветвления у N-ацетилглюкозамина. У овальбумина сиалированы только 1,3% олигосахаридных цепей. Наряду с маннозобогатыми и гибридными олигосахаридами овальбумин, синтезированный L-клетками мышей, содержал олигосахариды сложного типа. Олигосахариды этого типа у овальбумина цыпленка не обнаружены. Таким образом, в олигосахаридном процессинге важен также тип гликозилирующих клеток (Sheares, Robbins, 1986).

Гликозилированные по кору белки, образованные в дрожжевом эндоплазматическом ретикулуме, переносятся в аппарат Гольджи, где олигосахарид удлиняется добавлением внешнецепочечных углеводов. Процесс транспорта блокируется в мутанте *Sacharomyces cerevisiae* (sec 18), чувствительном к температуре секретиции. Этот мутант аккумулирует гликозилированную по кору инвертазу в эндоплазматическом ретикулуме. Для выяснения механизма транспортных процессов Haselbeck, Schekman (1986) использовали перенос в аппарат Гольджи *in vitro* инвертазы, гликозилированной по кору и аккумулированной в клетках мутанта *Sacharomyces cerevisiae* (sec 18). Для этого мембраны от клеток *Sacharomyces cerevisiae* (sec 18) SU C2, которые дефектны по внешнецепочечной (1^a—3) маннозилтрансферазе, смешивали с мембранами клеток *Sacharomyces cerevisiae* штаммов, содержащих трансферазу, но не дефицитных по инвертазе (MN № 1, ΔSUC2).

Перенос инвертазы обнаружен по появлению внешнецепочечной (1^a—3)-связанной маннозы, которое зависит от донора и реципиента мембран. Показано, что реакция переноса чувствительна к температуре, детергентам, требует присутствия АТФ, ГДФ-маннозы, Mg^{2+} и Mn^{2+} . Продукт — инвертаза — остается связанным с седиментирующими мембранами. Обработка донора, но не акцептора, N-метилmaleимидом или трипсином инактивирует процесс переноса инвертазы. Авторы считают, что эндоплазматический ретикулум или его везикулы переносят инвертазу к химически отличающимся компонентам, где происходит ее модификация присоединением маннозы.

Лимфоциты синтезируют негликозилированные формы предшественников мембранного и секреторного иммуноглобулинов (молекулярная масса соответственно 62000 и 60000 Д), каждый из которых имеет отщепляемый впоследствии пептид — лидер. В секретируемых клетках предшественники иммуноглобулинов подвергаются серии стадий посттрансляционной модификации, после чего превращаются в гликозилированные формы с мол. массой соответственно 73000 и 70000 Д. В клетках, синтезирующих обе формы IgM, скорость оборота секреторной формы значительно выше. Время оборота мембранного IgM составляет около 20 ч,

период полураспада секреторного IgM — менее 1 ч в нормальных плазматических клетках и 2—4 ч в плазматических клетках опухоли. Секреторный и мембранный IgM отличаются и тяжелыми цепями. Мембранный IgM имеет сегмент последовательности в 20 гидрофобных аминокислот на COOH-терминальном конце. Эта гидрофобная область ответственна за встраивание в липидный слой мембраны и отсутствует у секреторного IgM.

Последовательность посттрансляционных модификаций предшественников иммуноглобулинов изложена в обзоре Abbas (1984). Тяжелые и легкие цепи ковалентно связываются межцепочечными дисульфидными мостиками в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме. Коровый олигосахарид прикрепляется сразу после завершения синтеза и выхода из рибосом к растущим полипептидным цепям в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме (или к укомплектованным полипептидным цепям в везикулах аппарата Гольджи).

Результаты исследования *in vitro* посттрансляционной ковалентной модификации тяжелых и легких цепей иммуноглобулина G показали, что тяжелые цепи, продуцируемые клетками МРС-II, количественно гликозилируются коровым олигосахаридом, когда длина достигает 38000, сразу же после того, как аспарагиниловый акцепторный центр проходит через мембрану в цистерну шероховатого эндоплазматического ретикула.

Возможность гликозилирования Н цепей после их выхода из рибосом исследовалась ингибированием переноса корового олигосахарида к появляющимся Н цепям в присутствии высоких концентраций глюкозамина. Установлено, что негликозилированные, уже укомплектованные γ_{2B} , γ_1 , α и μ Н цепи, синтезированные в присутствии ингибитора, не гликозилируются, хотя имеются клетки, способные гликозировать вновь синтезированные Н цепи.

Вероятно, уже сформированные тяжелые цепи не могут гликозилироваться, ибо происходит внутримолекулярное скручивание и свертывание полипептидных цепей (при образовании вторичной и третичной структур), а также межмолекулярная сборка субъединиц (при образовании четвертичной структуры). Подтверждением является то, что коровый олигосахарид присоединяется *in vitro* только к денатурированному овальбумину и рибонуклеазе, но не к нативным формам этих белков. В только что возникших цепях с еще несформированной третичной и вторичной структурами аспарагиниловый акцепторный центр может быть доступен для гликозилирования. Гликозилирование происходит перед свертыванием полипептидных цепей (Bergman, Kuell, 1977, 1979). Эксперименты с клетками МОРС 46В показали, что укомплектованная L цепь может быть гликозилирована, если она в мономерной форме, а не собрана в димер.

Добавление терминальных сахаров и полимеризация секреторного IgA в димер и IgM в пентамер происходит быстро перед секрецией. Секреция является процессом, обратным пиноцитозу.

Олигосахаридные группировки могут играть важную роль при сборке функционально активных молекул гликопротеинов из их субъединиц. По мнению некоторых авторов (Parkhouse, Askonas, 1969; Della Corte, Parkhouse, 1973), ступенчатое присоединение углеводов к полипептидным цепям вряд ли может контролировать процесс полимеризации субъединиц в макромолекулы. Однако получены доказательства того, что углеводные группы играют важную роль в сборке пентамерной молекулы иммуноглобулина М и поддержании структуры.

Е. Д. Каверзнева и др. (1975), Kleine et al. (1975) исследовали участие олигосахаридных группировок в процессе диссоциации и реассоциации иммуноглобулина нативного и модифицированного дегликозилированием обработкой гликозидазами. Не обнаружено различий в процессе диссоциации нативного и модифицированного дегликозилированием иммуноглобулина М в 10 мМ дитиотрейтоле, рН 8,8, 22°C. Однако диссоциированный немодифицированный иммуноглобулин М после удаления дитиотрейтола полностью полимеризовался в иммуноглобулин М, соответствующий по положению на электрограммах исходному иммуноглобулину.

В случае модифицированного иммуноглобулина М сборка диссоциированного материала идет медленно до НL и IgM, олигомер образуется в незначительном количестве.

По-видимому, водородные связи, солевые мостики, образованные N-ацетилнейраминовой кислотой, и другие нековалентные связи, возникающие между соседними олигосахаридными группами или N-ацетилнейраминовой кислотой, а также заряженными аминокислотными остатками, принимают участие в свертывании мономеров IgM в структуры, способные полимеризоваться в биологически активный пентамер. Далее, по-видимому, в стабилизации этой структуры участвуют дисульфидные мостики.

Участие олигосахаридных группировок в стабилизации структуры пентамерной молекулы IgM подтверждается сравнением содержания углеводов в молекулах IgM и IgG. В то время как IgG в большинстве случаев содержит только 1 углеводную группу, в молекуле IgM содержится 5 олигосахаридных группировок на каждой Н цепи, 4 из которых расположены возле межсубъединичного мостика в Fc области и только 1 — в константной части Fab. Более высокое содержание углеводов в иммуноглобулине М может быть одной из причин способности IgM скорее, чем IgG, образовывать ковалентносвязанные полимеры.

Большинство внутриклеточных иммуноглобулинов в нормальных плазматических клетках локализовано в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме. Накопительских и секреторных гранул в таких клетках нет, и среднее время продвижения от шероховатого эндоплазматического ретикулума к цистерне аппарата Гольджи и секреция занимают 20 мин. Кинетика этих процессов в основном идентична для всех классов иммуноглобулинов.

Иммуноглобулины специфически отбираются для секреции среди белков, синтезированных клетками, продуцирующими антитела. Присутствие сигнального пептида-лидера — один из факторов, обеспечивающих направление возникающих иммуноглобулиновых цепей в эндоплазматический ретикулум и отбирающих их для секреции.

Коровые сахара — манноза и N-ацетилглюкозамин — прикрепляются к аспарагиновым остаткам растущей полипептидной цепи в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме из пула предварительно синтезированных долихололигосахаридных переносчиков, присутствующих в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме. Терминальные сахара — фукоза и сиаловые кислоты, иногда и галактоза, добавляются к предварительно собранным иммуноглобулиновым цепям перед их секрецией в месте между аппаратом Гольджи и плазматическими мембранами.

Роль гликозилирования в транспорте и секреции иммуноглобулинов пока считается спорной. Туникамицин, ингибирующий присоединение корового N-ацетилглюкозамина к возникающей полипептидной цепи, блокирует секрецию иммуноглобулинов в нормальных плазматических клетках, а также в миеломных клетках. Однако он не снижает экспрессию мембранного иммуноглобулина IgM. Ультраструктурные исследования показали накопление иммуноглобулинов в цистерне шероховатого эндоплазматического ретикулума при обработке миеломных клеток туникамицином.

Между μ -цепями секретируемой и мембранной форм иммуноглобулина M человека и мыши существуют структурные различия. Доказано, что эти IgM синтезируются разными рибонуклеазами.

Методом стимулирования липополисахаридом клеток BCL₁₁ мышинной лейкемии изучена экспрессия мембранного и секретируемого IgM одной и той же клеточной популяции на разных стадиях дифференциации. Эти неопластические клетки экспрессируют на своей поверхности 8S IgM. Одновременно эффект гликозилирования на секрецию IgM и IgG изучен в гибридной клеточной линии BCL₁, которая секретирует оба типа иммуноглобулинов. Показано, что в присутствии туникамицина синтезируется нормальное количество негликозилированных μ -цепей IgM, и эти негликозилированные IgM не секретируются и не экспрессируются на клеточной поверхности (Yuan, 1982).

По-видимому, несмотря на различия в путях биосинтеза мембранных и секретируемых μ -цепей, экспрессия и секреция IgM может иметь общие черты: оба процесса зависят от стадии гликозилирования этих белков. Углеводы могут влиять на эти процессы, активно помогая миграции цепей через цистерну эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи к поверхности клетки. Гликозилирование также может влиять на формирование третичной структуры IgM и тем самым косвенно участвовать в про-

цессах секреции и экспрессии. По-видимому, негликозилированный IgM не узнается структурами клетки, отвечающими за экспрессию и секрецию.

В экспериментах с биосинтезом в присутствии радиоактивной метки показано, что в секретирующих В-лимфоцитах и миеломных клетках туникамицин не влияет на синтез предшественников иммуноглобулинов, но блокирует поздние стадии процесса. 2-дезоксид-D-глюкоза ингибирует транспорт иммуноглобулинов из полисом к шероховатому эндоплазматическому ретикулуму и затем в везикулы гладкого эндоплазматического ретикулума, но не блокирует секрецию синтезированных молекул и иммуноглобулинов из гладкого эндоплазматического ретикулума, поскольку туникамицин снижает пул олигосахаридных интермедиатов, предназначенных для связывания с полипептидом. Следовательно, гликозилирование иммуноглобулинов и других гликопротеинов важно для транспорта их от полисом в гладкий эндоплазматический ретикулум, но добавление терминальных сахаров не критично для секреторных процессов.

Идентифицированы варианты миеломных клеток, у которых отсутствует способность секретировать иммуноглобулины и обнаружено аномальное гликозилирование. Однако неясно, вызывают ли дефекты в гликозилировании неспособность к секреции, или оба эти процесса являются результатом измененной первичной последовательности аминокислот или нарушения процесса регуляции. Эти вопросы требуют выяснения.

В противоположность экспериментам, подтверждающим, что гликозилирование существенно для корректного внутриклеточного транспорта и секреции иммуноглобулинов, имеются работы, из которых можно сделать противоположный вывод.

Большая часть легких цепей мышинных иммуноглобулинов не гликозилирована, но активно секретируется. В некоторых случаях неспособность легких цепей секретироваться клетками миеломы приписывается структурным мутациям, которые не влияют на образование и отщепление пептида-лидера, но блокируют сборку и секрецию.

Перенос полипептида через мембрану шероховатого эндоплазматического ретикулума, иницируемый пептидом-лидером, необходим, но недостаточен для секреции. Анализ спонтанных или продуцируемых мутагеном вариантов миелом показал, что структурные изменения в тяжелых и легких иммуноглобулинах в одних случаях приводят к потере способности секретировать, в других случаях аномальные белки секретируются с нормальной скоростью. Сравнительное изучение таких мутантных белков позволит идентифицировать специфическую сигнальную последовательность аминокислот, которая является критической для внутриклеточного транспорта, сборки и секреции.

Таким образом, очевидно, что гликозилирование иммуноглобулинов и других гликопротеинов — важный этап в процессах

секреции, но не во всех случаях является существенной стадией.

Ранние события в транспорте иммуноглобулинов (биосинтез на полисомах, связанных с мембранами, сборка и гликозилирование в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме, транспорт в везикулы аппарата Гольджи) охарактеризованы лучше, чем последующее передвижение иммуноглобулиновых цепей, потому что клетки, синтезирующие антитела, не накапливают и не хранят иммуноглобулины перед секрецией.

Исследование секреции иммуноглобулинов показало, что происходит постоянное передвижение небольших иммуноглобулинсодержащих везикул от аппарата Гольджи к плазматическим мембранам и различные вещества могут ингибировать секрецию. Блокирование разных стадий движения, например, снижение уровня внутриклеточного Ca^{2+} ионофором, ухудшает миграцию везикул, содержащих иммуноглобулины, из комплекса Гольджи, где они агрегируют. Моненсин и нигерин, карбоксильные ионофоры, ускоряющие обмен Na^+ и K^+ , вызывают слияние везикул, содержащих иммуноглобулины, друг с другом. Эти агрегированные везикулы не могут двигаться к плазматическим мембранам. Ингибиторы энергетического обмена блокируют транспорт иммуноглобулинов перед включением в аппарат Гольджи.

Для некоторых гликопротеинов гликозилирование не требуется для их секреции из клетки и доставки специфическим клеточным органеллам.

Фибриноген — гликопротеин, содержащий 4 разветвленных олигосахаридных цепи с N-гликозидными связями у аспарагина 364 на β -цепи, у аспарагина 52 — на γ -цепи. Показано, что несмотря на ингибирование гликозилирования фибриногена, он секретруется клетками гепатомы мышей.

Gilman et. al. (1984) исследовали синтез и секрецию фибриногена в культуре нормальных гепатоцитов кролика в присутствии туникамицина. За синтезом следили по включению ^3H -аминокислот, за секрецией — по включению ^3H -маннозы. Доказано, что туникамицин не ингибировал синтез фибриногена, однако общий синтез белка ингибировался на 30—40% (определено по включению метки в преципитаты при добавлении трихлоруксусной кислоты). Туникамицин не ингибировал и секрецию фибриногена. Негликозилированный фибриноген был так же функционален, как и гликозилированный.

Однако в некоторых случаях дегликозилирование изменяет эти процессы. Например, обработка туникамицином предотвращает секрецию инвертазы и кислой фосфатазы в дрожжах, и негликозилированные белки аккумулируются в неспецифических внутриклеточных органеллах мембран. Обработка туникамицином клеток гепатомы человека в культуре ингибирует секрецию α_2 -макроглобулина, α_1 -протеазного ингибитора и церулоплазмينا. Обнаруженное различие в секреции гликозилированных и неглико-

зилированных гликопротеинов может быть связано с агрегацией, изменением растворимости или стабильности этих гликопротеинов. Не исключено специфическое влияние углеводов на секрецию гликопротеинов из клетки. Дополнительные доказательства включения гликановой части гликопротеинов в процесс их секреции получены при изучении гликозилирования в присутствии ингибиторов.

Обработка клеток гепатомы человека в культуре свейнсонном (ингибитор маннозидазы II аппарата Гольджи) уменьшает лаговую фазу секреции синтезированных гликопротеинов — трансферрина, церулоплазмينا и α_1 -антитрипсина на 10—15 мин.

1-диоксийиримицин (ингибитор глюкозидазы I и II эндоплазматического ретикулума) ингибирует перенос трансферрина, церулоплазмينا, α_2 -макроглобулина и α_1 -антитрипсина из шероховатого эндоплазматического ретикулума, так что они накапливаются в нем. Однако этот ингибитор не влияет на внутриклеточный транспорт альбумина и белка G вируса везикулярного стоматита. Следовательно, этот ингибитор не вызывает общего ингибирования транспорта гликопротеинов из шероховатого эндоплазматического ретикулума.

1-диоксийиримицин ингибирует также секрецию α_1 -антитрипсина и антихимотрипсина клеток гепатомы человека и внутриклеточный транспорт в лизосомы синтезированного катепсина D и N-ацетил- β -D-гексозаминидазы.

Неясно, как N-связанные гликаны влияют на внутриклеточный транспорт гликопротеинов. Модификация в структуре гликановой части, вызванная свейнсонном и 1-диоксийиримицином, вероятно, не изменяет конформацию вновь синтезированного гликопротеина, как это можно допустить для туникамина. Существует мнение, что рецепторы мембран на ламенальной поверхности аппарата Гольджи регулируют селективный внутриклеточный транспорт гликопротеинов. Поскольку модифицированные гликановые структуры гликопротеинов влияют на внутриклеточный транспорт секреторных и лизосомальных гликопротеинов, то, возможно, олигосахариды являются частью рецепторной системы узнавания.

Приводим данные по влиянию ингибирования гликозилирования на секрецию и транспорт гликопротеинов (Olden et al., 1982).

Гликозилированный гликопротеин	Ингибитор гликозилирования	Результат
Белки поверхности клеток Balb/c3T3 (иодированные)	Дефект в синтезе N-ацетилглюкозамина	Отсутствие или снижение метки в бедке
Белки поверхности клеток ВНК (иодированные)	2-дезэксиглюкоза	Снижение метки в белковых полосах
IgG МОРС	2-дезэксиглюкоза	80% ингибирование переноса в эндоплазматический ретикулум; 15% ингибирование секреции

<i>IgG</i> тяжелые цепи MPC-II миелома	Мутация гликозилирования	Нет изменений в кинетике секреции
K легкие цепи K-46 плазмцитомы 46B	2-дезоксиглюкоза	60% ингибирование секреции, такое же ингибирование общего белкового синтеза, 2-кратное увеличение внутриклеточного пула
<i>IgA</i> MPC 315	Туникамицин	85% ингибирование секреции, увеличение содержания <i>IgA</i> в эндоплазматическом ретикулуле
<i>IgE</i> IR 162	Туникамицин	Полное ингибирование секреции
Инвертаза и кислая фосфатаза дрожжей	Туникамицин	Ингибирование секреции; не обнаружено внутриклеточной аккумуляции
Прокollaген фибробластов эмбрионов цыплят	Туникамицин	Нет ингибирования секреции; ингибирование протеолитического процесса
Фибронектин фибробластов сухожилий цыплят и клеток TST	Туникамицин	Ингибирование секреции в свободную от сыворотки среду
Фибронектин эмбрионов цыплят фибробластов	Туникамицин	Нет ингибирования секреции; усиление протеолиза
Трансферрин печени крыс	Туникамицин	Нет ингибирования секреции
T25 гликопротеин плазмцитомы	Генетические дефекты гликозилирования	Снижение содержания на поверхности; усиление протеинолиза
Апопротеин В печени цыплят	Туникамицин	Нет ингибирования секреции
Предшественник АКГГ-эндорфина	Туникамицин	Нет влияния на секрецию
Мембранные гликопротеины клеток ВНК	Туникамицин	Не ингибирует экспорт и слушивание
Ацетилхолиновый рецептор мышечных клеток	Туникамицин	Не ингибирует экспорт; усиление протеинолиза

Вирусные гликопротеины E ₂ , E ₃	2-дезоксиглюкоза и N-ацетилглюкозамин	Усиление протеолитического процессинга
Вирусные гликопептиды HA ₁ и HA ₂	2-дезоксиглюкоза и N-ацетилглюкозамин	Усиление протеолитического процессинга
Гликопротеин G вируса VS	Генетическое блокирование гликозилирования	Усиление внутриклеточного процессинга
Овальбумин печени цыплят	Туникамицин	Не ингибирует секрецию
Фактор, стимулирующий образование колоний	Туникамицин	Не ингибирует секрецию и биологическую активность
Карбоксипептидаза дрожжей	Туникамицин	Не ингибирует секрецию
Интерферон лейкоцитов	Туникамицин	Не ингибирует секрецию и биологическую активность
HLA антиген лимфобластов	Туникамицин	Не ингибирует секрецию
Родопсин мембран со- сочков сетчатки	Туникамицин	Не ингибирует встраивание в мембраны
Инвертаза и кислая фосфатаза дрожжей	Туникамицин	Ингибирует секрецию
Мембранные белки вируса SF	Туникамицин	Ингибирование встраивания в мембраны

Итак, имеются лишь общие представления относительно биосинтеза и секреторных процессов гликопротеинов. Узнаванием специфическими гликозилтрансферазами определяется аминокислотная последовательность полипептидной цепи, подлежащая гликозилированию. Гликозилтрансферазы специфичны не только к определенной последовательности аминокислот, но и ко вторичной и третичной структурам этих последовательностей, т. е. существуют определенные стерические условия действия трансфераз.

Очевиден факт, что олигосахаридные предшественники N-гликанов связаны с липидом и образуются у животных, растений и дрожжей. Олигосахаридный предшественник N-гликанов состоит из 2 остатков N-ацетилглюкозамина, 3 остатков маннозы и 2—3 остатков глюкозы. Построение кора с гликозиламидным узлом связи осуществляется с помощью этого липидного переносчика. Дальнейшее удлинение цепи осуществляется гликозилтрансферазами. Синтез олигосахаридного предшественника N-гликанов ингибируется туникамицином. В построении олигосахаридных цепей важен тип гликозилирующих клеток.

Гликозилирование начинается сразу после того, как полипептидная цепь сходит с рибосомы, пока она еще не успела свернуться при образовании вторичной, третичной и четвертичной струк-

тур, пока еще доступны для гликозилирования аспарагиловые центры гликозилирования.

Имеются примеры влияния гликозилирования на сборку, транспорт к мембранам и секрецию гликопротеинов, однако есть примеры и противоположного свойства. Вопрос участия олигосахаридных цепей гликопротеинов в этих процессах окончательно не решен. Неизвестны и механизмы, посредством которых гликопротеины отбираются для секреции. Определенную роль играет пептид-лидер. И секреторный, и мембранный IgM имеют в составе пептид-лидер, однако процессы их движения на последних стадиях различаются. Возможно, в отношении механизма секреции гликопротеины разделяются на группы. Гликопротеины, относящиеся к одной группе, вероятно, должны иметь общие гомологичные (в смысле организации) участки молекулы, ответственные за эти процессы. Поэтому для выяснения механизма секреции прежде всего необходимо выделение этих гомологичных участков гликопротеинов, а также мембранных компонентов, с которыми они вступают в контакт, и установление закономерностей их взаимодействия.

Нельзя исключить возможность того, что между мембранным и секреторным иммуноглобулинами существуют небольшие структурные различия, но выявить их чрезвычайно сложно. Способность мембранных иммуноглобулинов взаимодействовать с мембраной представляет собой интригующую особенность этих белков, о которой пока мало что известно. Исследование ее может оказаться важным для понимания механизма антигенной стимуляции.

Расшифровка механизмов секреции и гликозилирования имеет значение для практических целей. Полученные генной инженерией штаммы бактерий, предназначенные для биосинтеза тех или иных биологически активных компонентов, часто неспособны к гликозилированию. Это затрудняет терапевтическое использование полученных таким путем биологически активных компонентов, поскольку они либо быстро деградируются действием протеиназ, либо выводятся из циркуляции механизмом клиренса. Поэтому, чтобы их можно было эффективно использовать для терапевтических целей, необходимо их гликозилирование.

ФОРМИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ

Посттрансляционная модификация белка прикреплением олигосахаридных группировок значительно изменяет размер и структуру полипептидных цепей; могут изменяться и физико-химические свойства белка: третичная структура, растворимость, вязкость, заряд. Накоплено достаточно примеров, когда дегликозилированные формы гликопротеинов получали в присутствии ингибиторов гликозилирования и (или) с использованием специфических гликозидаз.

Молекулы иммуноглобулинов, обладающие сложной пространственной структурой, способны изменять конформацию. Такая подвижность структуры иммуноглобулинов, по-видимому, обеспечивается многими элементами, в том числе и олигосахаридными группировками, и связана с выполнением многообразных биологических функций. Молекула иммуноглобулина М (IgM) имеет форму пятиконечной звезды с поперечником в 320 \AA . Развоенные концы — «лучи», образованные Fab-фрагментами, и пентамерный (Fc)₅-остов образуют центральный диск этой звезды. Основными элементами структуры являются домены, построенные из участков полипептидной цепи. Области доменов четко ограничены на картах распределения электронной плотности. Эти домены свертываются независимо друг от друга. Каждый домен состоит из 100—150 остатков, диаметр их приблизительно 25 \AA . Из таких доменов состоят тяжелые и легкие цепи, связанные дисульфидными мостиками в мономерные IgM субъединицы. Из 5 таких мономерных субъединиц образуется пентамерная молекула IgM с мол. массой 900000.

В целом структура субъединицы IgM аналогична структуре иммуноглобулина G (IgG), но значительно усложнена за счет наличия одного лишнего домена в тяжелой цепи и присутствия четырех лишних олигосахаридных группировок. В отличие от молекулы IgG, на каждую тяжелую цепь в IgM приходится не 1, а 5 олигосахаридных группировок. Пентамеризация субъединиц значительно повышает количество возможных структурных изменений молекулы. В иммуноглобулинах поверхность в 100 \AA^2 может принимать порядка 1000 конформаций, проявляющих различные связывающие свойства. Специфичность поверхности определяется ее формой, характером доноров и акцепторов водородных связей, а также зарядом.

Функция иммуноглобулинов осуществляется путем взаимодействия между их молекулами и реагирующими с ними лигандами. В момент связывания антигена в области между переменными участками Fab происходят некоторые смещения в расположении этих участков. Одновременно происходят некоторые смещения в расположении участков поверхности, ответственных за взаимодействия с системой комплемента (именно с узнающим центром первого компонента — C1q), так как известно, что связывание C1q происходит только после присоединения антигена (Huber, 1980) или после некоторых других внешних воздействий на IgG и IgM. Таким образом, подвижность структуры иммуноглобулинов является их функциональной особенностью.

Каковы характерные черты этой структуры, лежащие в основе функции иммуноглобулинов? Этой проблеме посвящены обзорные работы (Каверзнева, 1984; Burton, 1985).

Конформационные изменения IgM после удаления части олигосахаридных группировок специфическими экзогликозидами с

помощью физико-химических методов показаны на примере моноклонального IgM, полученного из крови людей с болезнью Вальденштрема. Частично дегликозилированные молекулы могут служить моделями природных молекул IgM с недостроенными углеводными цепями.

Показательно изменение склонности к ассоциации молекулы IgM. В данном случае имеется в виду первичная ассоциация в растворе, улавливаемая по усилению светорассеяния при 280—350 нм. Воздействие температуры 37°C без каких-либо нарушений в первичной структуре приводит к резкому повышению склонности к ассоциации. Если же одновременно отщепляются олигосахаридные группировки, склонность к ассоциации оказывается меньше и даже при глубоком отщеплении не достигает уровня, вызванного температурным воздействием.

Таким образом, под воздействием температуры резко повышается склонность иммуноглобулина М к ассоциации. Эта склонность менее выражена, если одновременно происходит отщепление углеводных групп. По-видимому, механизмы конформационных перестроек при температурных воздействиях и отщеплении олигосахаридных группировок различаются.

Аналогичное явление отмечено нами при исследовании связывания IgM с белком *A Staphylococcus aureus* штамм А-676 и Cowan-1 иммуноферментным методом при использовании конъюгатов белка А с β-галактозидазой *Bacillus subtilis* (Г. В. Виха, И. В. Виха, 1987).

Количество связанного с IgM конъюгата белка А после температурной обработки IgM снижалось на 25%. При обработке IgM гликозидазами отщепляются олигосахаридные группировки, что приводит к конформационным изменениям. Такой частично дегликозилированный IgM связывал на 13% меньше конъюгата белка А по сравнению с исходным IgM, т. е. снижение было меньше, чем у IgM, подвергшегося температурной обработке.

Приводим данные по связыванию конъюгатов белка А *Staphylococcus aureus* и β-галактозидазы *Bacillus subtilis* с иммуноглобулином М.

<i>Иммуноглобулин М</i>	Связывание, %
<i>IgM</i> _{Андр.} без обработки сразу после выделения	100
<i>IgM</i> _{Андр.} инкубированный при 18°C, рН 6,4 в течение 10 суток в присутствии ингибитора протеиназ	75,3±4,4 (n=17)
<i>IgM</i> _{Андр.} инкубированный при 18°C, рН 6,4 в течение 10 суток в присутствии гликозидаз и ингибитора протеиназ. Отщеплено 84,5% маннозы, 31% N-ацетилглюкозамина, вся N-ацетилнейраминная кислота	87,1±3,3 (n=21)

Примечание. n—число опытов.

Таким образом, как и в наблюдаемой нами ассоциации, конформационные перестройки, возникающие при отщеплении оли-

госахаридных группировок, имеют направленность, противоположную той, которая вызвана термообработкой.

Специфичность во взаимодействиях белок—белок определяется комплементарностью контактирующих поверхностей, пространственным сближением и ориентацией доноров и акцепторов водородных связей и солевых мостиков. Солевым мостикам приписывается большое пассивное влияние: если заряды в белке некомпенсированы, энергия связывания ослабляется настолько сильно, что белок теряет способность к ассоциации.

Как известно, IgM содержит 0,9% N-ацетилнейраминовой кислоты, что составляет 47 остатков на 1 молекулу. N-ацетилнейраминовая кислота занимает терминальное положение в олигосахаридных цепях IgM. При физиологических значениях pH N-ацетилнейраминовая кислота ионизирована и может вступать в электростатические взаимодействия, например, с образованием солевого мостика по типу $-\text{COO}^-\cdots\text{H}_3\text{N}^+$, либо с образованием водородных связей с карбонильным атомом по типу $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$ или $-\text{OH}\cdots\text{O}=\text{C}$. При удалении концевых остатков N-ацетилнейраминовой кислоты один из участников такого типа взаимодействия (солевых мостиков или водородных связей) уходит, другой участник такого рода связей может вступить во взаимодействие снова, если найдется пара, но может остаться и некомпенсированным.

После отщепления части олигосахаридных группировок от IgM дифференциальный и сольвентпертурбационный спектры указывают на уменьшение доступности хромофоров триптофана и тирозина. Трипсинолиз после отщепления 50% нейтральных углеводов заторможен. На 50% уменьшилась доступность остатков триптофана при реакции с реактивом Кошланда. По реакции с тетранитрометаном доступность остатков тирозина при малом отщеплении сахаров практически не изменялась, а при 50% отщеплении углеводов несколько увеличивалась. Это подтверждается данными Н. Т. Алимбабаевой (1985) по иодированию дегликозилированного тиреоглобулина.

При удалении олигосахаридных группировок главной причиной конформационных изменений является нарушение структуростабилизирующей функции этих олигосахаридных группировок.

Удаление части углеводов может приводить к сближению между собой доменов, их слипанию и уплотнению в целом. Отмечена высокая конформационная лабильность в Fc-области иммуноглобулинов в противоположность большой жесткости Fab фрагментов. Такая же разница в свойствах этих фрагментов наблюдается при изучении дифференциальных спектров IgM в разных условиях (Каверзнева и др., 1984). Именно в Fc-области сосредоточены олигосахаридные группировки, олигосахарид C₂ в шарнире при аспарагине-332, олигосахаридные группировки C₃ и C₄ в домене C_μ 3 на асн 395 и асн 402 (Putman et al., 1973). Склонность к нарушению плоскостной конфигурации в (Fc)₅-области особенно резко проявляется на свободных фрагментах, т. е. после

отщепления от молекулы Fab фрагментов. Очевидно, они удерживают $(Fc)_5$ -фрагмент в напряженном плоском состоянии. Возможно, это вызвано электростатическим отталкиванием между Fab фрагментами, которые мешают взаимному сближению субъединиц и выходу их из плоскости центрального диска в нативном состоянии молекулы. После отщепления Fab фрагментов в свободном $(Fc)_5$ -фрагменте происходит взаимное перемещение доменов $C_{\mu} 3$ и $C_{\mu} 4$, причем микроокружение хромофоров тирозина и триптофана сильно меняется, что проявляется в степени их доступности реактиву Кошланда, тетранитрометану и трипсину. Форма такого свободного $(Fc)_5$ -фрагмента значительно приближается к глобулярной.

В IgG, где имеется всего 2 олигосахаридных группировки на двух соседних доменах $C_{\mu} 2$ молекулы, о роли углеводов можно судить на основании рентгеноструктурного анализа этой молекулы. Анализ показал, что углеводные группировки расположены на противоположных сторонах доменов и как бы распирают их, не давая им плотно соприкоснуться (Huber, 1980).

В IgM, где имеется по 5 группировок углеводов на каждую H цепь, их роль трудно выяснить аналогичным путем. Сами группировки отличаются по составу: 3 из них относятся к смешанному типу, а 2 в глубине $(Fc)_5$ -области состоят только из глюкозамина и маннозы, поэтому называются маннозобогатыми; основная функция их, по-видимому, состоит в поддержании нужной пространственной структуры молекулы IgM. Это следует из того факта, что после отщепления части олигосахаридных группировок теряется способность к самосборке целой пентамерной молекулы из свободных H- и L-цепей, в то время как для нативного IgM такая способность хорошо доказана (Каверзнева и др., 1975; Kleine et al., 1975). В отсутствие углеводов необходимая для самосборки конформация не устанавливается. Эта функция связана, вероятно, с тремя олигосахаридными группировками смешанного типа, находящимися в доменах $C_{\mu} 1$ и $C_{\mu} 3$ и между $C_{\mu} 2$ и $C_{\mu} 3$ доменами. Маннозобогатые группировки в этой функции не участвуют, так как самосборка IgM происходит и после их отщепления (Каверзнева и др., 1981). Эти группировки необходимы для придания IgM устойчивости в растворе за счет их гидрофильности (Каверзнева и др., 1978).

Можно предположить, что отщепление части углеводных остатков в $C_{\mu} 2$ и $C_{\mu} 3$ доменах может вызывать смещение доменов таким образом, что шарнирные области как бы втянутся в центральный диск, молекула уплотнится и Fab фрагменты станут менее подвижными. При этом трипсинолабильные связи в шарнирной области могут экранироваться. Гибкость в области шарниров должна снижаться, что затормозит загибание «лапок». Следствием сближения доменов $C_{\mu} 2$ и $C_{\mu} 3$ при отщеплении углеводов может явиться погружение хромофоров в толщу молекулы,

что подтверждается анализом кривых дифференциальных спектров.

Другим примером участия олигосахаридных группировок в осуществлении функции гликопротеинов является биосинтез гормонов — трийодтиронина (T_3) и тетрайодтиронина (тироксин — T_4) в составе молекулы тиреоглобулина, который является одним из типичных гликопротеинов.

Тиреоглобулин — основной иодпротеин, вырабатываемый в щитовидной железе. Способны иодироваться многие белки, но только в молекуле тиреоглобулина происходит эффективная конденсация моно- и диiodтирозиновых остатков с образованием гормонально активных иодтиронинов, сохраняющихся ковалентносвязанными в составе тиреоглобулина и поступающих в циркуляцию по мере физиологической потребности организма. Это свидетельствует, что молекуле тиреоглобулина присуща специфическая для биосинтеза гормонов первичная структура, а также вторичная, третичная и четвертичная структуры.

Тиреоглобулин (мол. масса 660000) — компактный белок: в нем найдено около 100 дисульфидных связей между 200 цистеиновыми остатками. Богатая иодом структура молекулы тиреоглобулина имеет еще более компактную структуру по сравнению с нормально иодированным тиреоглобулином. Молекула тиреоглобулина состоит из 2 субъединиц с мол. массой 330000. Каждая из субъединиц состоит из 2 полипептидных цепей, связанных дисульфидными связями. Для тиреоглобулина характерно наличие значительного количества иода (от 0,04 до 1,2%), который связан с тирозином. Содержание иодированных аминокислот может быть увеличено иодированием *in vitro*. При иодировании *in vitro* интактного тиреоглобулина число остатков моноиодтирозина увеличивается до определенного уровня иода в белке, но дальнейшее искусственное иодирование не приводит к увеличению иодтирозина выше этого предела. Эффективное иодирование белка *in vitro* при добавлении атомарного иода происходит только при более низких уровнях иода и иодаминокислот в белке; связывание иода с белком имеет свой предел (Саатов, 1974). По-видимому, в тиреоглобулине присутствуют остатки тирозилов, микроокружение которых препятствует иодированию. Это значит, что структурная организация молекулы тиреоглобулина обеспечивает конденсацию лишь определенной группы иодтирозиловых остатков в тироксин и трийодтиронин.

Образование тирокина внутри молекулы тиреоглобулина предполагает конденсацию двух иодтирозиновых остатков полипептидных цепей тиреоглобулина, однако до сих пор не выяснено, происходят ли оба бензольных кольца тирокина от одной полипептидной цепи белка или же в реакции конденсации участвуют иодтирозиловые остатки двух разных полипептидных цепей. Биосинтез тиреоидных гормонов путем иодирования тиреоглобулина происходит в полностью гликозилированной молекуле тиреоглобулина.

Присоединение углеводных компонентов к неиодированной молекуле тиреоглобулина необходимо для транспортировки этого белка к фолликулам, где он иодируется (Mopaso et al., 1975; 1981; Björkman, Ekholm, 1982). Этот иодгликопротеин содержит 8—10% углеводов в виде трех типов олигосахаридных цепей — А, В и С. Содержание отдельных углеводных компонентов и их структура (структура А и В олигосахаридных цепей) подробно приведены в главе I.

Полное или частичное удаление N-ацетилнейраминовой кислоты от тиреоглобулина приводит к изменениям его физико-химических свойств. Удаление N-ацетилнейраминовой кислоты на 90% от тиреоглобулина крупного рогатого скота и полное удаление ее от тиреоглобулина человека не изменяли коэффициента седиментации, однако электрофорез показал снижение суммарного отрицательного заряда молекулы тиреоглобулина (Salabe et al., 1974).

Десиалирование тиреоглобулина человека и свиньи приводит к заметному понижению их растворимости в солевых растворах (Tarutani et al., 1977). Десиалирование тиреоглобулина повышает способность асиалотиреоглобулина к агрегации. Аналогичные изменения наблюдались в препаратах тиреоглобулина, выделенных из диффузного токсического зоба (после десиалирования) (Tarutani et al., 1977).

Растворимость тиреоглобулинов и содержание в них углеводов у разных видов животных неодинаковы (Robbins et al., 1959). По данным Tarutani et al. (1971), при электрофорезе подвижность нативного тиреоглобулина приблизительно на 10% выше, чем асиалированного, который разделяется при изоэлектрическом фокусировании на 2 компонента с изоэлектрическими точками 4,55 и 4,66, тогда как изоточка нативного белка 4,49. По данным Mopaso et al. (1974), тиреоглобулин с содержанием сиаловой кислоты 0,15% и иода 0,02%, выделенный из опухоли щитовидной железы экспериментальных крыс, обнаруживал более низкую электрофоретическую подвижность.

При дегликозилировании повышается способность тиреоглобулина к агрегации. По-видимому, отщепление углеводных компонентов вызывает конформационные изменения в структуре молекулы тиреоглобулина, при этом на поверхность могут выходить гидрофобные участки, взаимодействие между которыми вызывает первичную ассоциацию. Она инициирует новые конформационные изменения, в итоге ассоциат теряет способность удерживаться в растворе и выпадает в осадок. По данным Kondo, Kamiya (1976), Tarutani et al. (1977), тиреоглобулин человека с 82% отщеплением сиаловых кислот менее растворим, чем тиреоглобулин с 72% отщеплением, в свою очередь 72% менее растворим, чем интактный тиреоглобулин.

Имеются данные о влиянии гликозилирования тиреоглобулина на процесс образования тиреоидных гормонов. Mopaso et al.

(1974) наблюдали ослабление биосинтеза тиреоидных гормонов в тиреоглобулине экспериментальной опухоли щитовидной железы крыс, содержащем 0,02% иода и 0,15% сиаловой кислоты. Такой опухолевый тиреоглобулин содержал незначительное количество трийодтиронина и не содержал тироксина. Авторы полагают, что внутриклеточное присоединение сиаловых кислот к тиреоглобулину необходимо для его последующего иодирования. Сиаловые кислоты необходимы также для миграции синтезированного тиреоглобулина из аппарата Гольджи к месту иодирования его в клетке (Monaco et al., 1974, 1976, 1981; Seagar et al., 1980; Dominici et al., 1981).

Ингибирование процесса гликозилирования туникамицином подавляет иодирование и секрецию тиреоглобулина. Определено, что содержание сиаловых кислот в тиреоглобулине часто коррелирует с содержанием иода в норме и при патологии (Monaco et al., 1974). В препаратах тиреоглобулина, полученных из щитовидных желез людей с различными формами тиреоидной патологии, снижено содержание сиаловых кислот и иода (Hove-Vandembrouche, Couvreur, 1978). Содержание сиаловых кислот существенно снижено в тиреоглобулине из фолликулярных карцином, холодных узлов и токсической аденомы. Во всех этих случаях снижено и содержание иода, что, по мнению авторов, объясняется влиянием сиаловых кислот на процесс иодирования этого белка.

Основная функция тиреоглобулина — связывание иода и биосинтез гормонов трийодтиронина и тироксина из доступного количества иода. Моно- и диодтирозин образуются на уровне 12 S субъединиц тиреоглобулина, но иодтиронины синтезируются только при объединении полностью гликозилированных субъединиц тиреоглобулина, т. е. условия для конденсации иодтирозилов создаются на уровне четвертичной структуры. Решающим условием синтеза гормонов является пространственное сближение двух иодтирозилов в молекуле тиреоглобулина. Пространственное сближение иодтирозилов, находящихся на разных концах полипептидной цепи или в разных полипептидных цепях молекулы тиреоглобулина, задается всеми четырьмя уровнями структурной организации тиреоглобулина. В этом процессе участвуют все типы связей: дисульфидные мостики, водородные связи, солевые мостики, Ван-дер-Ваальсовы силы взаимодействия, гидрофобные связи и др.

Участие олигосахаридных группировок в формировании необходимой для синтеза структуры молекулы тиреоглобулина, в которой достигается пространственное сближение двух иодтирозилов, исследовано на модели (Бабаев и др., 1978). Иодированию *in vitro* подвергали образцы тиреоглобулина с разным содержанием углеводов, первичная структура которых в отношении аминокислотного состава оставалась неизменной. Иодирование *in vitro* тиреоглобулина, у которого удалено 35% N-ацетилнейраминовой кислоты, приводит к интенсивному образованию иодти-

розинов, в основном за счет образования моно- и диодтирозинов (МИТ и ДИТ соответственно). При этом тироксин не образуется.

При иодировании *in vitro* тиреоглобулина, у которого удалено 14% N-ацетилнейраминовой кислоты, по 28% маннозы и галактозы и 36% N-ацетилглюкозамина, наблюдается несколько иная картина: сумма вновь образующихся иодтирозинов увеличивается не только за счет МИТ и ДИТ, но и за счет образования тироксина, причем интенсивность образования тироксина такая же, как при иодировании интактного белка.

В случае более глубокого дегликозилирования тиреоглобулина, а именно — при отщеплении 35% N-ацетилнейраминовой кислоты, по 71% маннозы и галактозы и 60% N-ацетилглюкозамина, наблюдается значительное увеличение иодтирозинов за счет образования моно- и диодтирозина. Содержание тироксина при этом не изменяется.

Таким образом, при иодировании дегликозилированного тиреоглобулина конденсация иодтирозилов в тироксин подавляется, способность белка связывать атомы иода сохраняется, что в итоге приводит к увеличению содержания МИТ и ДИТ. По-видимому, при дегликозилировании тиреоглобулина число доступных для атаки иодом остатков тирозина возрастает. В то же время синтез иодтиронинов из имеющихся МИТ и ДИТ при отщеплении от тиреоглобулина 35% N-ацетилнейраминовой кислоты существенно подавляется. Видимо, нарушаются условия сближения иодтирозилов, благоприятные для их конденсации. Вклад в формирование структуры, благоприятной для конденсации иодтирозилов в тироксин, вносит только N-ацетилнейраминовая кислота, так как отщепление других углеводов не отражается на синтезе тироксина.

N-ацетилнейраминовая кислота в олигосахаридных цепях гликопротеинов занимает терминальное положение. Как правило, при физиологических значениях pH она ионизирована и может вступать в электростатические взаимодействия либо с образованием солевых мостиков по типу $\text{—COO—...H}_3\text{N}$, либо с образованием водородных связей с карбонильным атомом по типу NH...C= или —O—H...O= . Вступая в электростатические взаимодействия, N-ацетилнейраминовая кислота может участвовать в сближении иодтирозинов разных участков полипептидной цепи или разных полипептидных цепей и создавать стерические условия, благоприятные для конденсации иодтирозилов. Таким образом, N-ацетилнейраминовая кислота участвует в формировании структуры тиреоглобулина для осуществления его основной гормонообразующей функции.

В природе существует несколько уровней регуляции одного и того же процесса. Возможно, одним из уровней регуляции процесса иодирования является создание олигосахаридными группировками стерических препятствий для включения иода

в тирозилы. Это необходимо, чтобы иодирование проходило до определенной степени и в определенных локусах молекулы иод-протеина, для создания конформаций тиреоглобулина, оптимальных для нормального гормоногенеза. Схематическое изображение формирования места конденсации иодтирозинов в составе молекулы тиреоглобулина приведено на рис. 9.

В результате дегликозилирования изменяются физико-химические свойства целого ряда гликопротеинов. Углеводы состав-

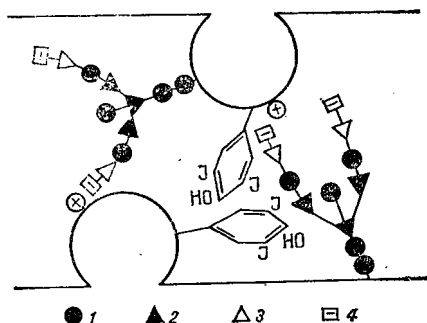


Рис. 9. Схематическое изображение формирования места конденсации иодтирозинов в составе молекулы тиреоглобулина.

1—GlcNAc, 2—Man, 3—Gal, 4—NeuNAc.

ляют 50% молекулярной массы внеклеточной дрожжевой инвертазы. Фермент состоит из 2 идентичных субъединиц с мол. массой 60000, к каждой субъединице прикреплено 9 олигосахаридных цепей, состоящих из ди-N-ацетилхитобиозного кора и 26—54 остатков маннозы. Дрожжевая инвертаза, полученная в условиях ингибирования туникамицином, сохраняет каталитические свойства, но становится более чувствительной к денатурации при нагревании и кислом pH, замораживанию и оттаиванию (Schwartz et al., 1982). Показано также, что после удаления от дрожжевой инвертазы 90% углеводов эндо-β-ацетилглюкозами-нидазой Н она становится менее устойчивой к многократному замораживанию и оттаиванию, кислому pH. При инаktivации гуанидилхлоридом у нативной инвертазы сохраняется 76% исходной активности. У ренатурированной дегликозилированной инвертазы различия в эллиптичности замечены при 232 и 293 нм (Chu et al., 1978).

Некоторые исследователи сообщают, что нет четких различий в эллиптичности между гликозилированной и негликозилированной формами рибонуклеазы, инвертазы и карбоксипептидазы (Puett, 1973). Значительное снижение флуоресценции триптофана при 324 нм обнаружено у ренатурированной дегликозилированной инвертазы по сравнению с ренатурированной исходной. Это свидетельствует, что ренатурированная дегликозилированная инвертаза не восстанавливает свою структуру так легко, как нативная (Chu et al., 1978).

Таким образом, вероятно роль углеводов в стабилизации ассоциированных субъединиц белка. Олигосахаридные группировки корректируют скручивание и раскручивание фермента *in vitro*. *In vivo* углеводная часть в некоторых случаях прямо накручивает возникающую полипептидную цепь на полисому в наиболее стабильной трехмерной конфигурации.

Обработка овечьего фоллитропина гипофиза безводным HF при 0°C приводит к удалению 80% углеводов; при этом полипептидная цепь не изменяется. Фукоза, N-ацетилнейраминная кислота, N-ацетилгалактозамин отщепляются полностью, в то время как гексозы и N-ацетилглюкозамин отщепляются соответственно на 86 и 56%. Такая обработка не изменяет четвертичную структуру гормона, однако после дегликозилирования объем элюции на сефадексе G-100 увеличивается (видимо, из-за снижения мол. массы), теряется способность связываться с конканавалин А-сефарозой, изменяется электрофоретическая подвижность и изоточка. УФ-спектры после дегликозилирования фоллитропина не изменяются, но слегка снижается флуоресценция триптофана. После дегликозилирования не изменяется способность связываться с рецепторами гормона (Manjunath et al., 1982).

Кристаллографический анализ иммуноглобулина G человека показал, что олигосахаридные группировки в Fc-фрагменте маскируют гидрофобные домены, поэтому могут влиять на его растворимость.

Негликозилированные иммуноглобулины А и Е аккумулируются в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме плазматических клеток мыши. По-видимому, дегликозилирование изменяет их физико-химические свойства, вызывая агрегацию и ухудшая их прохождение через внеклеточные мембранные оргanelлы (Schwartz, 1982).

Вирус везикулярного стоматита (San Juan) содержит единственный гликопротеин оболочки, который имеет 2 сложные олигосахаридные цепи, связанные с аспарагином. Синтез этого гликопротеина происходит на полисомах, связанных с мембранами. Используя систему *in vitro*, Rothman, Lodish (1977) показали, что встраивание гликопротеина в мембрану везикул и гликозилирование происходят во время синтеза полипептидов. Инициация гликозилирования включает перенос маннозобогатого высокомолекулярного олигосахарида с липида-носителя к растущему полипептиду. Для осуществления сборки вириона этот гликопротеин должен быть локализован на внешней поверхности плазматической мембраны инфицированных клеток. Эти же авторы установили, что туникамицин является сильным ингибитором сборки вируса везикулярного стоматита (San Juan), негликозилированный гликопротеин, синтезированный в присутствии туникамицина, не может нормально мигрировать к поверхности клетки.

Негликозилированный гликопротеин, в противоположность гликозилированному, не солюбилизируется тритоном X-100. Следовательно, гликозилирование влияет на свертывание растущей полипептидной цепи и конечную конформацию гликопротеина. Показано также, что негликозилированный гликопротеин чувствителен к температуре. Выход вируса везикулярного стоматита (Orsay), содержащего негликозилированный гликопротеин, в ус-

ловиях сборки при 30° был в 2—5 раз больше, чем при 37°C. При 37—38°C туникамицин ингибировал сборку вируса везикулярного стоматита (San Juan) на 97—99%, а сборку вируса Orsay — на 85—95%. В обоих случаях негликозилированный гликопротеин не обнаруживался на внешней мембране плазматических клеток. При 30°C в присутствии туникамицина сборка вируса везикулярного стоматита San Juan ингибировалась на 90—95%, а Orsay — только на 30—55%. При 30°C негликозилированный гликопротеин вируса Orsay обнаруживался на мембране плазматических клеток непрямой иммунофлуоресценцией (Gibson et al., 1979).

Мутант вируса везикулярного стоматита ts 45 (Orsay) с чувствительными к температуре повреждениями в гликопротеине обнаруживал более высокую чувствительность к туникамицину, чем его родственные формы. Негликозилированный гликопротеин в этом случае не обнаруживался на мембранах плазматических клеток.

Выявлены различия в физико-химических свойствах гликопротеина вируса везикулярного стоматита (Orsay) в зависимости от температуры, при которой он синтезируется, седиментации в градиенте сахарозы, экстракции тритоном X-100, гуанидинхлоридом, агрегации при диализе. В связи с этим Gibson et al. (1979) делают следующие выводы: негликозилированный гликопротеин чувствителен к температуре и подвергается агрегации при ее повышении. Гликопротеины с разной первичной структурой по-разному гликозилируются. Гликозилирование влияет на свертывание белка и его конечную нативную конформацию. Гликозилирование гликопротеина влияет на сборку вириона. Блокирование туникамицином сборки вириона связано с внутриклеточной агрегацией негликозилированного гликопротеина.

Олигосахаридным группам муцина подчелюстных желез приписывают участие в агрегационных свойствах молекул. Олигосахаридные цепи муцина овечьих подчелюстных желез имеют простую структуру — это дисахарид, состоящий из N-ацетилнейраминовой кислоты, соединенной 2^а-6 связями с N-ацетилгалактозаминном. Дисахарид прикреплен к полипептидному скелету О-гликозидной связью с треонином или серином. Таких олигосахаридных цепей 200 на мономер в 650 аминокислотных остатков. Мономер с мол. массой 154000 самоассоциируется, давая тетрамеры с мол. массой 557000—640000. При высоких концентрациях муцина образуются большие агрегаты.

Структура муцина подчелюстных желез овец изучена электронмикроскопически. В разбавленном растворе (5—30 мл в 0,8 М NaCl или ацетате аммония) при высокой ионной силе обнаружены нитевидные молекулы, из которых 90% имеют длину 100—230 нм и диаметр 1,0—1,4 нм. При высоких концентрациях муцин образует олигомеры в виде связок.

Удаление N-ацетилнейраминовой кислоты от муцина несколь-

ко изменяет картину: кроме нитевидных структур, как это наблюдалось у полностью гликозилированного муцина, происходит образование менее протяженных нитевидных структур. Удаление еще и N-ацетилгалактозамина приводит к значительным изменениям в структуре муцина, образуются как протяженные, так и глобулярные структуры. Нативный муцин имеет фрикционное отношение 3,09 (сильно асимметричный тропомиозин имеет фрикционное отношение 3,22). Дегликозилированный муцин имел фрикционное отношение 1,11, сравнимое с глобулярным овальбумином (1,01). Таким образом, в муцине углеводная группа нужна для поддержания нитевидной конформации и придания ему агрегационных свойств (Rose et al., 1984).

Еще одно важное свойство гликопротеинов — их антифризовая активность. Так, кровь антарктических рыб не замерзает из-за присутствия гликопротеинов с мол. массой 10000, 17000 и 21000. Структурно повторяющейся единицей этих гликопротеинов является трипептид с двумя остатками аланина и одним остатком треонина. К треонину присоединяется дисахарид, состоящий из N-ацетилглюкозамина и галактозы, которая является концевым сахаром. Оказалось, что важнейшим фактором, обуславливающим антифризовую активность этих гликопротеинов, является углеводный компонент. Окисление гидроксильных групп у C6 галактозы полностью снимает противозамораживающую активность этих гликопротеинов. Считают, что гидрофильные углеводные цепи гликопротеинов-антифризов препятствуют образованию центров кристаллизации при переходе молекулы воды в кристаллическое состояние. Гликопротеины-антифризы обнаружены не только в сыворотке крови, но и в мышцах антарктических рыб. Вероятно, их роль состоит в защите клеток от замораживания (Osuga, Feeney, 1978; Morris et al., 1978).

Качественный вклад углеводной компоненты в молекулу гликопротеина может быть самым неожиданным и не определяется количеством. Церулоплазмин содержит 2% N-ацетилнейраминовой кислоты. При ее отщеплении конформация молекулы этого белка не меняется, но меняется форма кристаллов (Зайцев и др., 1975).

Представлены доказательства структурных изменений в иммуноглобулине G человека после дегликозилирования (Dodon et al., 1981). При отщеплении сиаловых кислот от IgG при 37°C в течение 16 ч иммобилизованной нейраминидазой *Clostridium perfringens* количество первичных аминогрупп уменьшалось почти в 5 раз. Свободные N-группы исчезают почти полностью, содержание карбоксильных групп уменьшается почти в 2 раза. Обработка десиалированного IgG 4M мочевиной приводит к увеличению числа доступных первичных аминогрупп с 6,1 до 14,1 моль/моль, в то время как в опытах с нативным IgG не отмечено значительного увеличения первичных аминогрупп (25,2 моль/моль после обработки 4M мочевиной по сравнению с 30,6 моль/моль в контроле).

Чувствительность к обработке 4М мочевиной свидетельствует, что в десиализованном IgG есть водородные связи, образованные аминокруппами. Показателем структурных изменений в IgG при десиализации является изменение его растворимости при 4°C. После удаления 40% N-ацетилнейраминовой кислоты при 4°C растворимость была равна 100%, полное удаление этого сахара приводило к осаждению 70% IgG из раствора. Изменение структуры IgG при десиализации не связано с действием протеаз. При десиализации изменяется вторичная структура, в образовании которой принимают участие водородные связи, при этом затрагиваются как Fab, так и Fc области IgG.

Гетерогенность кислых гликопротеиновых гормонов, таких как человеческий хорионный гонадотропин, фоллитропин, связана с наличием терминальной N-ацетилнейраминовой кислоты. Однако была непонятна причина гетерогенности основных гликопротеиновых гормонов — лютропина и тиреотропина. В работе Nattori et al. (1985) выявлена причина гетерогенности лютропина гипофиза крыс. Лютропин выделен из гипофиза крыс гельфильтрацией на ультрагеле АсА-44 в виде 7 компонентов с разными изоточками: A¹ (pI 8,0), A (pI 8,5), B (pI 8,8), C (pI 9,1), D (pI 9,3), E (pI 9,6), F (pI 10,0). После десиалирования нейраминидазой все компоненты имели изоточки компонента F. Это свидетельствует, что разница значения pI компонентов лютептина была обусловлена включением N-ацетилнейраминовой кислоты. Компоненты с более низкой изоточкой имели *in vitro* более низкую биологическую активность, чем компоненты с высокой изоточкой. Десиалированные компоненты могут активировать аденилатциклазу и стероидогенез более активно, чем соответствующие интактные компоненты. По-видимому, высокоосновной лютептин является основной молекулой, которая превращается сиализацией в другие менее основные. Таким образом, N-ацетилнейраминовая кислота в молекуле лютептина ответственна за его гетерогенность и биологическую потенцию.

Dill et al. (1986) показали участие олигосахаридных группировок в формировании структуры функционально активного мембранного белка эритроцитов — гликофорина А. М-, N-антигенные свойства эритроцитов определяются 6 первыми остатками аминокислот N-терминального конца гликофорина А. Именно в этом участке находится углеводная группа, прикрепленная к одному из аминокислотных остатков. В экспериментах с использованием метки ¹³C на терминальном конце гликофорина А^М и гликофорина А^N установлено, что гликозилирование у второго и третьего остатков N-терминального конца гликофорина пертурбирует структуру этого белка, в то же время замещение у четвертого и пятого аминокислотных остатков не оказывало такого влияния.

После удаления N-ацетилнейраминовой кислоты у иммуноглобулина G, полученного из сыворотки здоровых доноров, изменяется антигенный статус молекулы (Dodon et al., 1981). Из сыворот-

ки больных ревматоидным артритом выделена фракция, реагирующая с латексными частицами, к которым через углеводные группы пришит десиалированный IgG. Эта фракция включала IgM с содержанием N-ацетилнейраминовой кислоты 0,75 мкг/мг белка (в норме 1,9 мкг/мг белка) и IgM с содержанием N-ацетилнейраминовой кислоты 2,9 мкг/мг белка (в норме 13 мкг/мг белка). Следовательно, сыворотка больных ревматоидным артритом содержит IgM и IgG со сниженным содержанием N-ацетилнейраминовой кислоты. Подтверждения этому получены другими авторами, которые сообщили, что существуют изменения в общем содержании N-ацетилнейраминовой кислоты в сыворотке пациентов с ревматоидным артритом (Silver et al., 1979). С другой стороны, денатурационные изменения, вызванные тепловой обработкой, не приводили к связыванию IgG с сывороткой этих больных.

Таким образом, десиалирование может отражаться на иммуногенности молекулы IgG. Представленные данные описывают модель для модификации структуры IgG человека и кролика. Полученный таким образом IgM является аутоиммуногенным.

Какие факторы ответственны за изменение содержания N-ацетилнейраминовой кислоты в IgG? Во-первых, это могут быть дефекты в сиалилтрансферазе, во-вторых,— увеличение нейраминидазной активности лимфоцитов, ответственных за синтез IgG.

Исследовано влияние десиалирования на иммунологические свойства тиреоглобулина. Антисыворотка кролика к тиреоглобулину крупного рогатого скота одинаково реагировала как с нативным, так и десиалированным тиреоглобулином, однако полоса преципитации с десиалированным тиреоглобулином была шире. Сделано предположение, что удаление N-ацетилнейраминовой кислоты открывает новые группы, которые могут функционировать как антигенные детерминанты (Salabe et al., 1974). Эти же авторы изучали связывание тиреоглобулина с 20 антисыворотками от больных хроническим тиреоидитом. Установлено, что при хронических тиреоидитах специфические антитела к антигенным детерминантам, существующим в тиреоглобулине в норме, маскируются сиаловыми кислотами. По-видимому, десиалирование тиреоглобулина в щитовидной железе у больных с различными формами хронических тиреоидитов может вызывать аутоиммунные процессы.

При исследовании сывороток больных с аутоантителами к тиреоглобулину также показано, что существуют аутоантитела со специфичностью к детерминантам тиреоглобулина, скрытым в интактном тиреоглобулине сиаловыми кислотами. Salabe et al. (1974) полагают, что сиаловые кислоты играют маскирующую роль, прикрывая некоторые детерминанты тиреоглобулина и тем самым предупреждая их действие как аутоантигенов. Monasco, Andreoli (1976) методом иммунодиффузии исследовали влияние последовательного удаления сиаловых кислот и галактозы на иммунологические свойства тиреоглобулина человека и крысы. Не-

которые различия обнаружены между асиалотиреоглобулином и агалактотиреоглобулином. Авторы полагают, что галактоза также участвует в формировании антигенных детерминант тиреоглобулина.

В настоящее время вопрос о возможности синтеза тиреоглобулина с измененной структурой при тиреоидной патологии нельзя считать однозначно решенным. Данные относительно аминокислотного и углеводного состава тиреоглобулина фрагментарны и противоречивы. В одних работах отмечены значительные вариации физико-химических свойств тиреоглобулинов при патологии щитовидной железы (Easty et al., 1958; De Crombrughe et al., 1967; Massi, Crivelli, 1979), в других (Rapaport et al., 1972; Massi, Crivelli, 1979) доказывается отсутствие различий в тиреоглобулине из нормальной и патологически измененной щитовидных желез. Менее противоречивы данные относительно содержания иода и иодаминокислот в тиреоглобулине. При некоторых формах патологии щитовидной железы отмечено резкое уменьшение, а порой и полное отсутствие в тиреоглобулине тироксина, повышение отношения МИТ/ДИТ и иодтирозины/иодтиронины.

В немногочисленных работах, посвященных углеводному составу ТГ при различных формах зоба (Salabe et al., 1976; Tarutani et al., 1977; Dunn, Ray, 1978; Hove-Vandenbrouche, Couvreur, 1978), отмечено значительное снижение содержания N-ацетилнейраминовой кислоты в тиреоглобулине из изолированных узлов и при токсической аденоме (табл. 3). В этих же образцах тиреоглобулина определено низкое содержание иода. Авторы делают вывод, что снижение содержания сиаловых кислот отрицательно сказывается на степени иодирования молекулы тиреоглобулина (Hove-Vandenbrouche, Couvreur, 1978). Наоборот, при диффузном зобе содержание сиаловых кислот значительно повышено по сравнению с нормой. Тиреоглобулин при этой форме патологии характеризуется повышенной растворимостью, увеличенной электрофоретической подвижностью, иными, чем у интактного тиреоглобулина, параметрами поведения при ионообменной хроматографии (Tarutani, Shulman, 1971a, b; Tarutani et al., 1977; Алимбаева, 1985).

Проведенные нами исследования роли углеводных компонентов тиреоглобулина крупного рогатого скота в процессе гормонообразования *in vitro* показали, что они необходимы для поддержания оптимальной конформации тиреоглобулина для нормального течения процесса конденсации иодтирозинов в иодтиронины. Показан наибольший вклад в этот процесс N-ацетилнейраминовой кислоты. Установлена также роль этого сахара в высвобождении гормонов из их резервной формы. В связи с этим интересно было выяснить участие углеводных компонентов тиреоглобулина из патологических щитовидных желез в процессе протеинолиза этого белка с освобождением гормонов. Исследовали иодирование и

Содержание углеводов (%) в тиреоглобулине человека в норме и при тиреоидной патологии

Источник тиреоглобулина	Иод	NeuNac	GlcNac	Man	Gal	Fus	Автор
Нормальная щитовидная железа	—	1,1	3,86	3,13	1,21	0,46	Spiro, Spiro, 1965
Нормальная щитовидная железа	0,20	1,07					} Salabe et al., 1976
Микрофолликулярная аденома	0,12	0,5					
Коллоидный зоб	0,64	1,1					
Нормальная щитовидная железа	0,46	1,03		5,3*			} Tarutani et al., 1977
Диффузный зоб	0,64	1,56		5,3*			
Нормальная щитовидная железа	0,48	0,52	4,11	4,9*		0,67	} Dunn, Ray, 1978
Узловой зоб	0,26	1,16	5,04	4,9*		0,64	
Нормальная щитовидная железа	0,34	0,64					} Hove-Vaubenbrouche, Couvreur, 1978
Папиллярная карцинома	0,14	0,50					
Фолликулярная карцинома	0,04	0,16					
Аденома токсическая	0,14	0,26					
Узловой зоб	0,22	0,62					
Горячий узел	0,20	0,29					
Холодный узел	0,15	0,54					
Нормальная щитовидная железа	0,46	0,98	4,50	2,22	1,42	0,57	} Н. Т. Алимбаева, 1935
Диффузный токсический зоб	0,23	1,15	4,11	2,16	1,41	0,51	
Узловой эутиреоидный зоб	0,20	0,83	3,45	2,63	1,95	0,64	

*—сумма гексоз.

протеинолиз тиреоглобулина человека в норме и при диффузном токсическом, а также узловом эутиреоидном зобе.

Исследуемые образцы тиреоглобулина анализировали на содержание иода и углеводов. Результаты, полученные по определению иода и углеводных компонентов, приведены в табл. 3.

При той или иной форме патологии образцы препаратов тиреоглобулина различаются не только содержанием иода, но и содержанием углеводных компонентов. Тиреоглобулин из нормальной щитовидной железы человека содержит в среднем 0,46% иода. Суммарное количество углеводов составляет 9,69%. Это количество по компонентам распределяется следующим образом: N-ацетилнейраминовая кислота (NeuNAc) — 0,98%, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) — 4,5%, манноза (Man) — 2,22%, галактоза (Gal) — 1,42%, фукоза (Fuc) — 0,57%.

При узловом эутиреоидном зобе в тиреоглобулине количество нейтральных сахаров, т. е. маннозы, галактозы и фукозы, несколько увеличено по сравнению с нормой и составляет в среднем соответственно 2,63; 1,95 и 0,64%. Снижение содержания сиаловых кислот до 0,83% и N-ацетилглюкозамина — до 3,45% сопровождается уменьшением количества иода до 0,20%.

В тиреоглобулине из диффузного токсического зоба наблюдается иная картина. Почти при одинаковом количестве нейтральных сахаров содержание N-ацетилглюкозамина несколько снижено и составляет 4,11% против 4,50% в норме. Содержание сиаловых кислот повышено до 1,15%. Кажется парадоксальным, что при данной форме болезни щитовидной железы относительно низко содержание иода. Это, по-видимому, связано с тем, что больные тиреотоксикозом в предоперационном периоде принимают антитиреоидные препараты. К сожалению, тактика хирургического лечения тиреотоксического зоба не дает возможности исследовать больных без предоперационной подготовки. Учитывая это, с большой долей вероятности можно полагать, что у больных диффузным токсическим зобом уровень иода должен быть достаточно высоким. Как видно из табл. 3, между содержанием иода и сиаловых кислот наблюдается прямая связь. С увеличением содержания сиаловых кислот возрастает и содержание иода (диффузный токсический зоб), снижение же содержания сиаловых кислот сопровождается уменьшением иода.

Увеличение содержания сиаловых кислот в тиреоглобулине из диффузного зоба установлено Tarutani et al. (1977), Dunn, Ray (1978). Эти же авторы определили низкое содержание иода в тиреоглобулине, которое связывают с лечением больных антитиреоидными препаратами до хирургического вмешательства.

Значительное уменьшение содержания сиаловых кислот в тиреоглобулине отмечают Hove-Vandenbrouche, Couvreur (1978) в изолированных холодных узлах и токсической аденоме. Авторы считают, что в таких патологических ситуациях дефект сиаловых кислот может мешать иодированию молекулы тиреоглобулина.

При патологии щитовидной железы синтез тиреоидных гормонов претерпевает некоторые изменения. Как правило, тиреоглобулины, выделенные из зоба, содержат низкие количества общего йода и гормонов (T_4 и T_3), иногда гормоны отсутствуют (De Crombrughe et al., 1967; Covelli et al., 1971; Lamas et al., 1972). Иодаминокислотный состав и гормонообразование при иодировании *in vivo* и *in vitro* тиреоглобулина при патологии щитовидной железы приведены в литературе (Саатов, 1974; Kusakabe, 1972; Niepomniszeze et al., 1973).

Наши исследования по иодированию *in vitro* показывают, что в тиреоглобулине из узлового эутиреоидного зоба интенсивность формирования новых молекул моно- и дииодтирозина не отличается от нормы, тогда как тироксина образуется в 2 раза меньше. По данным, Т. С. Саатова (1974), в некоторых образцах тиреоглобулина при этой форме патологии образование тироксина вообще не происходит. В тиреоглобулине из узлового эутиреоидного зоба нами установлено пониженное содержание N-ацетилпептираминовой кислоты и N-ацетилглюкозамина по сравнению с нормой.

Наиболее интенсивное гормонообразование происходит при иодировании тиреоглобулина из диффузного токсического зоба: прирост числа остатков тироксина составляет 2,1 против 0,8 в узловом эутиреоидном зобе.

Несмотря на одинаковый уровень иодирования во всех изучаемых образцах тиреоглобулина, йод распределяется по-разному. Моноидтирозиновые остатки образуются до определенного уровня. Относительно интенсивно формируются молекулы дииодтирозина. Образование же тироксина происходит иначе. Так, при узловом эутиреоидном зобе, несмотря на почти шестикратное увеличение концентрации дииодтирозина, синтезируется всего 0,8 остатка тироксина. Эти данные указывают на коррелятивную связь между содержанием углеводных компонентов и гормонообразованием при иодировании *in vitro* тиреоглобулина в норме и при иодировании при патологии щитовидной железы.

При иодировании *in vitro* тиреоглобулина из зоба отмечено, что этот процесс нарушен из-за аномальной структуры белка (Niepomniszeze et al., 1973). Иодирование тиреоглобулина из зоба с очень низким содержанием дииодтирозина и тироксина не приводит к образованию новых иодаминокислот (Kusakabe, 1972). Авторы делают вывод, что в данном случае торможение синтеза иодаминокислот связано с изменением структуры тиреоглобулина.

Мы отметили, что образцы тиреоглобулина с частично отщепленной углеводной группой очень неустойчивы и склонны к выпадению в осадок. Значительное количество образовавшихся ассоциатов тиреоглобулина при ферментативном отщеплении углеводных остатков по сравнению с контролем свидетельствует, что дегликозилирование тиреоглобулина снижает его растворимость и повышает склонность к ассоциации.

Наши данные об уменьшении растворимости молекулы тиреоглобулина при частичном дегликозилировании подтверждают предположение многих авторов о влиянии углеводных компонентов гликопротеинов на их растворимость (Kondo, Kamiya, 1976; Tarutani et al., 1977; Каверзнева и др., 1978).

Кроме изменения растворимости тиреоглобулина, в наших исследованиях менялась и электрофоретическая подвижность десалированного тиреоглобулина. При электрофорезе в 7% полиакриламидном геле десалированный на 35% тиреоглобулин показывает более низкую электрофоретическую подвижность, чем интактный тиреоглобулин. Это свидетельствует об уменьшении суммарного отрицательного заряда молекулы модифицированного тиреоглобулина.

Заметное снижение формирования тироксина в тиреоглобулине из узлового эутиреоидного зоба связывают с наличием каких-то дефектов в структурной организации белка (Саатов, 1974). Установлено, что при узловом зобе уменьшается растворимость иодпротейна (Саатов, 1974; Michel et al., 1964). Изменение растворимости, в частности, снижение ее при зобе, наблюдали и другие исследователи. Однако некоторые авторы (Furth et al., 1970; Tarutani, Schulman, 1977) указывают на увеличение растворимости тиреоглобулина из диффузного зоба с высоким содержанием иода и сиаловых кислот.

Существует мнение, что степень иодирования и содержание иодаминокислот не влияют на растворимость тиреоглобулина. Это свойство, по мнению многих авторов, зависит от степени салирования белка. Некоторые исследователи (Hove-Vandenbrouche, Souvreur, 1978) связывают низкое содержание иода и иодаминокислот в тиреоглобулинах из щитовидных желез при различных формах патологии с низким содержанием сиаловых кислот в этих белках. Очевидно, при этом дефект сиаловых кислот может отрицательно влиять на иодирование.

Мы отщепляли от тиреоглобулина углеводные компоненты в различных количествах и соотношениях, а затем изучали образование в нем гормонов *in vitro*. При иодировании дегликозилированного тиреоглобулина иодаминокислотный состав белка претерпевает существенные изменения. Иодирование *in vitro* тиреоглобулина, от которого отщеплено 35% N-ацетилнейраминовой кислоты, приводит к интенсивному образованию иодтирозинов: сумма иодтирозинов увеличивается на 10 остатков, причем, это увеличение происходит в основном за счет вновь образующихся моно- и диiodтирозинов. Образование тироксина при этом не наблюдается. При иодировании *in vitro* модифицированного белка, у которого удалено 14% N-ацетилнейраминовой кислоты, по 28% маннозы и галактозы, 36% N-ацетилглюкозамина, сумма вновь образующихся иодтирозинов заметно увеличивается не только за счет МИТ и ДИТ, но и за счет тироксина, причем интенсивность образования T_4 такая же, как при иодировании *in vitro* интакт-

ного белка (Саатов, 1974; Edelhoeh, 1962; De Crombrughe et al., 1967; Lissitzky, 1977).

В случае более глубокого дегликозилирования тиреоглобулина, а именно — при отщеплении 35% сиаловых кислот, по 71% маннозы и галактозы, 60% глюкозамина наблюдается интенсивное увеличение иодтирозинов, главным образом за счет существенного образования МИТ и ДИТ. При этом содержание тироксина достоверно не отличается от контроля.

Таким образом, основываясь на приведенных выше данных, можно сделать заключение, что при иодировании дегликозилированного белка формирование тироксина подавляется при сохранении способности белка связывать атомы иода, что в конечном итоге приводит к увеличению содержания МИТ и ДИТ. Заслуживает внимания то, что с увеличением степени дегликозилирования тиреоглобулина его иодирование *in vitro* приводит к образованию все больших остатков иодированных тирозинов. Если иметь в виду, что в нативной молекуле белка существуют группы тирозиновых остатков, способных иодироваться до моно- и диодтирозинов (Бабаев, 1979), то можно допустить, что при дегликозилировании тиреоглобулина число доступных для атаки иодом остатков тирозина возрастает. В то же время при отщеплении от белка 35% сиаловых кислот существенно подавляется синтез иодтирозинов из имеющихся в белке МИТ и ДИТ.

В наших экспериментах по искусственному иодированию образцов тиреоглобулина из узлового эутиреоидного зоба наблюдалась картина, аналогичная той, которую можно видеть при иодировании тиреоглобулина, модифицированного дегликозилированием. В обоих случаях, несмотря на образование значительного количества иодтирозиновых остатков, синтез тироксина заторможен. Это позволяет предположить, что степень гликозилирования, особенно сиалирования, вносит определенный вклад в поддержание той нативной пространственной структуры, в которой протекает нормальный гормоногенез. Поскольку изменение содержания в тиреоглобулине N-ацетилнейраминовой кислоты отрицательно заряженного углевода приводит к изменению в некоторой степени его основной функции, то, очевидно, это влияет и на следующую стадию гормоногенеза — на высвобождение образующихся гормонов путем расщепления иодпротеина.

Мы изучали протеинолиз проназой человеческого тиреоглобулина из нормально функционирующей щитовидной железы, диффузного токсического и узлового эутиреоидного зоба. Анализ пептидных фракций проназного гидролизата тиреоглобулина в норме и при патологии щитовидной железы показывает, что наибольшей резистентностью к протеинолизу обладает тиреоглобулин из щитовидных желез при диффузном токсическом зобе, в котором найдено повышенное содержание сиаловых кислот по сравнению с нормой. Одинаковой резистентностью обладает тиреоглобулин в норме и при узловом зобе, хотя в последнем случае в тиреогло-

булине снижено содержание сиаловых кислот. Вероятно, на протеолиз белка, кроме содержания углеводных компонентов, влияет и степень иодирования тиреоглобулина (Santisteben, Lamas, 1981).

Получены прямые доказательства, что сайт-специфическое гликозилирование влияет на расщепление гемагглютинаина вируса гриппа и его вирулентность. Прямым структурным анализом выделенных белков идентифицировали центр гликозилирования на HA_1 субъединице из вирулентных и невирулентных штаммов вируса гриппа. Установлено, что единственное различие между HA_1 вирулентных и невирулентных штаммов состоит в гликозилировании. На HA_1 субъединице вирулентных штаммов отсутствует связанный с асп II олигосахарид (Deshpande et al., 1987).

Присутствие обратимо нерастворимого на холоду иммуноглобулина связано с разными формами патологии. Такая агрегация иммуноглобулинов обусловлена электростатическим взаимодействием его молекул.

В последнее время получены доказательства участия олигосахаридных цепей в этом феномене. Middangh, Litman (1987) показали, что в крио-IgG гликозилирована первая гипервариабельная область тяжелой цепи. Дегликозилированный Fab фрагмент IgG оказался не способным ингибировать криопреципитацию IgG. Это является прямым доказательством присутствия дополнительного сиалильного остатка в тяжелой цепи первой гипервариабельной области, ответственной за криосвойства этого белка.

Некоторые мутанты гибридомных и миеломных клеточных линий продуцируют IgM либо с дефектами в связывании гаптена, либо в активации комплемента. В этих IgM обнаружены следующие структурные изменения: укорочение или удлинение полипептида в μ тяжелой цепи, а также ненормальное гликозилирование (Shulman et al., 1982).

Таким образом, биологически активная структура формируется многими участками и функциональными группами гликопротеина. Среди них не последнее место занимают олигосахаридные группировки. Олигосахаридные цепи гликопротеинов могут создавать стерические препятствия, временно маскируя структуры, участие которых в определенных функциях гликопротеина необходимо на каком-то этапе, олигосахаридные цепи могут также стабилизировать нужные в данный момент конформации, а также маскировать или открывать хромофоры, когда они нужны для участия в гидрофобных взаимодействиях молекул гликопротеинов и, наконец, путем завязывания связей заряженными углеводными остатками сближать или, наоборот, удалять определенные участки молекул.

В вопросе о роли олигосахаридных группировок гликопротеинов ведущей точкой зрения является защита ими полипептидного скелета от действия протеиназ. Beeley (1976, 1977) проанализировал вторичные структуры 31 гликопротеина, применив метод предсказания конформации полипептидной цепи по ее аминокислотной последовательности. Оказалось, что 30 гликозилированных аспарагиновых остатков находятся в структурах, образующих β -складчатые конформации и петли, 22 гликозилированных остатка аспарагина находятся в тетрапептидах, предпочтительно образующих β -складчатые конформации. Высказана гипотеза, что олигосахаридные группировки предназначены для маскировки такого типа структур от протеинолиза.

Внешняя мембрана вируса гриппа содержит 2 гликопротеина: гемагглютинин и нейраминидазу. Гемагглютинин — типичный мембранный интегральный белок, имеющий характерную трехдоменную структуру: большой гидрофильный углеводсодержащий домен на внешней поверхности мембраны, маленький (24—28 аминокислот) незаряженный гидрофобный пептид в мембране и небольшой гидрофильный домен (10—55 аминокислот) на внутренней стороне мембраны. Тример гемагглютинина — удлинненный цилиндр длиной 135 Å, радиус которого варьирует от 15 до 40 Å. Структура разделена на 2 области: 1) длинная нитевидная, содержащая остатки HA_2 и HA_1 ; 2) глобулярная, содержащая аминотерминальные остатки HA_1 и HA_2 . Олигосахаридные цепи локализованы на поверхности тримера: вдоль его длины, более половины — возле мембраны, остальная часть — на глобулярном конце. В гемагглютинине имеется 7 центров гликозилирования: две олигосахаридные цепи простые, состоящие из маннозы и N-ацетилглюкозамина, остальные — сложного типа, содержащие, кроме маннозы и N-ацетилглюкозамина, фукозу и галактозу. Терминальная сиаловая кислота отсутствует, видимо, это связано с активностью вирусной нейраминидазы. На картах электронной плоскости видно, что углеводы покрывают 17—20% доступной поверхности (Wilson et al., 1981). Потенциальные центры, гидролизуемые трипсином и химотрипсином, покрыты олигосахаридными цепями. Это позволило авторам предположить, что олигосахаридные группы гемагглютинина могут стабилизировать его молекулу, обеспечивая защиту против протеолитических ферментов.

Экспериментальное подтверждение гипотезы о включении олигосахаридных группировок в регуляцию протеолитической деградации гликопротеинов получено с использованием ингибиторов белкового гликозилирования.

Изучено влияние гликозилирования белка на деградацию его после эндоцитоза в клетках печени крыс. В экспериментах использован ингибитор лизосомальной α -маннозидазы и α -маннозидазы аппарата Гольджи — свейнсонин. Поскольку в лизосомах отсут-

ствуют эндогликозидазы и удаление сахарных остатков происходит при действии серии экзогликозидаз, свейнсонин должен останавливать процесс дегликозилирования углеводной цепи на маннозе. Показано, что дегликозилирование эндоцитозированных гликопротеинов является стадией, ограничивающей скорость деградации гликопротеинов в клетке. При концентрации ингибитора 6×10^{-7} М деградация ^{125}I -асиалофетуина ингибировалась на 5%. В присутствии этого ингибитора происходило накопление гликопротеина в клетке. При концентрации ингибитора 10^{-6} М отмечено ингибирование деградации асиалогонадотропина хориона человека на 50%, а при концентрации ингибитора 10^{-5} М ингибирование было полное. Ингибитор не влиял на деградацию негликозилированных белков (Winkler, Segal, 1984).

Фибронектин — высокомолекулярный гликопротеин — найден в растворимой форме в плазме, в цереброспинальной и семенной жидкостях. Фибронектин связывает коллаген, гликоаминогликаны, ганглиозиды, фибриноген и фибрин, отдельные бактерии, ДНК и актин. Разнообразие молекулярных взаимодействий, в которых участвует фибронектин, отражает множественность биологических активностей его. Эти активности включают способность влиять на клеточную адгезию, способствовать заживлению ран, восстанавливать нормальную морфологию у трансформированных клеток *in vitro* и усиливать морфологогенетические перемещения в течение эмбриогенеза. Наконец, фибронектин взаимодействует с разными компонентами иммунной системы, участвуя в защите организма.

Изучена деградация различными протеиназами (проназа, термолизин, трипсин и химотрипсин) гликозилированного фибронектина и фибронектина, синтезированного в присутствии туникамицина. Отсутствие углеводов в фибронектине не отражалось на картине протеинолиза фибронектина, идентифицированной электрофорезом в полиакриламидном геле в натрийдодецилсульфате. Однако негликозилированные фрагменты фибронектина, соответствующие углеводобогатым коллагенсвязывающим доменам, полностью расщеплялись протеиназами за 60 мин при 30°C . Эти фрагменты в гликозилированном фибронектине были резистентны. Гепаринсвязывающие домены фибронектина, в которых отсутствовали углеводы в норме, были одинаково чувствительны к протеиназам в гликозилированном фибронектине. Авторы сделали вывод, что углеводы играют важную роль в стабилизации специфических доменов фибронектина, повышающих резистентность против протеолитической деградации, однако не изменяют общую протеолитическую специфичность. Возникает вопрос, почему углеводы защищают коллагенсвязывающий домен и не защищают гепаринсвязывающий домен? Вероятно, решение этого вопроса имеет непосредственное значение для выяснения назначения углеводов в этом белке. В этой же работе проведено сравнение действия разных протеиназ на расщепление фибронектина, измерено

количество ^{14}C -лейцина в фрагментах белка, растворимых в трихлоруксусной кислоте. Все протеиназы расщепляли негликозилированный фибронектин в 1,5—2 раза быстрее, чем гликозилированный. Проназа и термолизин были в 2—4 раза эффективнее, чем трипсин и химотрипсин в расщеплении фибронектина до ТХУК-растворимых фрагментов. Скорость расщепления фибронектина бифазна: быстрая в течение первых 10 мин, затем замедленная. Это свидетельствует, что первоначально расщепляются более чувствительные к протеиназам области в гликозилированном и негликозилированном фибронектине (Bernard et al., 1982).

С учетом этой гипотезы увеличенная резистентность к протеинолизу плацентарного фибронектина человека относительно его плазменной формы может быть объяснена двукратным увеличением количества углеводов. Плазменный фибронектин содержит 5% углеводов в виде частично сialiрированных биантенных структур с небольшим количеством больших олигосахаридов, содержащих полилактозаминные структуры, часть из них — в желатин-связывающей области. N-гликаны плазменного фибронектина разветвленные. В плацентарном фибронектине углеводов 9%, в олигосахаридных цепях повышено содержание галактозы и N-ацетилглюкозамина. Однако авторы не рассматривают идентичность первичной и вторичной структур этих белков, которые формируются в процессе биосинтеза и гликозилирования белка (Zhu et al., 1984).

Ацетилхолиновый рецептор клеток скелетных мышц — интегральный мембранный гликопротеин, объект исследования фармакологов и биохимиков. Он может служить хорошей моделью для изучения функции углеводного компонента гликопротеинов в регуляции некоторых свойств плазматических мембран. Изучена роль углеводного компонента в регуляции и деградации ацетилхолинового рецептора в культуре мышечных клеток. Установлено, что в присутствии туникамицина синтез ацетилхолинового рецептора и введение его в плазматические мембраны не блокируется. Однако замечено, что при этом сильно увеличивается протеолитическая деградация, приводящая к заметному снижению аккумуляции ацетилхолинового рецептора. Протеиназный ингибитор люпептин снимает этот эффект. Следовательно, гликозилирование стабилизирует этот рецептор к действию протеиназ (Prives, Olden, 1980).

Olden et al. (1982a) показали, что в фибронектине, выделенном из вторичных культур фибробластов куриных эмбрионов, олигосахаридные цепи не нужны для его синтеза и секреции. Они защищают фибронектин от деградации протеиназами.

Ферментативное удаление углеводных групп у ДНКазы, рибонуклеазы В, инвертазы дрожжей, карбоксипептидазы Y, нуклеазы I бобов маша, пенициллиновой нуклеазы P_1 и мукопротеина бычьих подчелюстных желез повышало их чувствительность к протеинолизу (Olden et al., 1982b).

Показано также, что расщепление муцина подчелюстных желез лизосомальными экстрактами не происходит, пока большая часть олигосахаридов не удалена (Aronson, De Duve, 1968). Удаление терминального сахарного остатка усиливает аутолитическое расщепление белковых компонентов лизосомальных гидролаз (Goldstone, Koenig, 1974).

Исследовано влияние размера и места расположения олигосахаридных цепей при расщеплении полипептидных цепей специфическими протеиназами. Для этого использованы рибонуклеаза А, которая не содержит олигосахаридных группировок, и рибонуклеаза В, в которой содержится единственная олигосахаридная группировка высокоманнозного типа. Чувствительность асп 34 к трипсину и химотрипсину негликозилированной рибонуклеазы А сравнивали с тремя гликозилированными образцами рибонуклеазы В, которые различались длиной олигосахаридных цепей. Полностью гликозилированная рибонуклеаза В была в 6—10 раз более резистентна к трипсину, чем негликозилированная. Рибонуклеаза В с короткими олигосахаридными цепями деградировалась ферментами со скоростями, пропорциональными числу маннозных остатков. Протективный эффект был обратно пропорционален расстоянию между центром прикрепления углеводов и центром расщепления трипсином или химотрипсином. Следовательно, размер олигосахаридных цепей и их близость к центру первичного расщепления, ограничивающего скорость общей деградации, важны для защиты гликопротеинов от протеолитической деградации. Однако авторы не обсуждают вопрос об идентичности третичных структур рибонуклеаз (Plummer, Hirs, 1964; Olden et al., 1985).

Влияние гликозилирования на протеинолиз гликопротеинов показано ниже.

<i>Объект</i>	<i>Условия дегликозилирования</i>	<i>Результат</i>
125 ¹ -асиалофетуин	Свейнсонин	Ингибирование на 50 %
125 ¹ -асиалогонадотропин	"	"
Фибронектин сывороточный	Туникамицин	100 % деградация за 60 мин при 30°C
14С-фибронектин (2% углеводов)	"	Деградация в 1,5—2 раза
Фибронектин плаценты (9% углеводов)	"	Более резистентен, чем сывороточный
Фибронектин из фибробластов куриных эмбрионов	"	Гликозилирование защищает от протеиназ
Ацетилхолиновый рецептор скелетных мышц	"	Гликозилирование защищает от протеиназ
Лизосомальные гидролазы	Аутолиз в присутствии свейнсонина	Углеводы защищают от протеиназ
Рибонуклеазы А негликозилир.		Не резистентна

В гликозилир.		Резистентна
С гликозилир.		Резистентна
Прокollaген, HL A-A и	Туникамицин	Гликозилирование не
В-антигены		влияет на протеинолиз
Иммуноглобулин М	Экзогликозидазы	Резистентен
Тиреоглобулин	Экзогликозидазы	Резистентен
Инвертаза	Эндогликозидазы и экзо-гликозидазы	

Многие гликопротеины являются продуктами расщепления их высокомолекулярных предшественников. Образование биологически активных продуктов — результат специфического протеолитического расщепления первичных продуктов биосинтеза. Экранируя места протеолитического расщепления предшественников, гликаны могут влиять на специфичность расщепления в процессе превращения полипротеинового предшественника в активную полипептидную форму.

Полипептидные гормоны и гликопротеины оболочки вирусов являются удобной моделью для исследования роли углеводов в контролируемом протеинолизе. Так, гликопротеины оболочки вируса Semliki forest (E_1 , E_2 и E_3) получены в эквимольных количествах из гликопротеина-предшественника с мол. массой 130000.

Основной гликопротеин оболочки вируса гриппа — гемагглютинин — в результате протеолитического процессинга дает 2 гликопротеина с меньшей мол. массой (HA_1 и HA_2).

Внутриклеточный протеолитический процессинг негликозилированной формы гликопротеина оболочки вируса Semliki forest и вируса Sindbis происходит, как и процессинг их гликозилированных форм; продукты процессинга стабильны. Однако негликозилированная форма гемагглютинина HA_0 вируса гриппа и продукты его расщепления HA_{01} и HA_{02} нестабильны и расщепляются с образованием необычных пептидов. HA_0 может быть обнаружен только в присутствии протеиназных ингибиторов.

Другим примером включения гликанов гликопротеинов в контролируемый протеинолиз является биосинтез общего предшественника аденокортикотропина, β -липопротеина, β -эндорфина, α -меланоцитстимулирующего гормона.

Белок-предшественник, синтезирующийся в нейроинтермедиатных долях африканской лягушки (*Xenopus laevis*) в присутствии туникамина, неспецифически деградируется и дает биологически неактивные пептиды.

Как следует из этих примеров, специфичность протеолитического расщепления может изменяться, если белок-предшественник не содержит олигосахаридных группировок. Однако есть противоположные примеры. Изучение протеинолиза *in vitro* негликозилированной формы проколлагена и антигенов HLA-A и В показало, что отсутствие углеводов не отражается на результатах протеинолиза (Schwarz, Datema, 1982).

Тиреоидные гормоны, которые сохраняются в виде резервных форм в молекуле тиреоглобулина, по мере потребности организ-

ма поступают в ток крови после энзиматического расщепления молекулы гликоидпротеина.

Мы изучали устойчивость к протеинолизу модифицированного ферментативным дегликозилированием тиреоглобулина (Виха и др., 1983). С этой целью нативный и модифицированные отщеплением 35% N-ацетилнейраминовой кислоты иодпротеины инкубировали с проназой *Streptomyces griseus* в течение 24 ч при 37°C. Проназные гидролизаты как интактного, так и дегликозилированного образцов тиреоглобулина при разделении на сефадексе G-25 дают 5 пептидных фракций. Радиоиммунным и радиоавтохроматографическим методами установлено, что во фракциях 4 и 5 содержится максимальное количество радиоактивного йода и тиреоидных гормонов. По-видимому, тиреоидные гормоны образуются в тех частях молекулы тиреоглобулина, которые наиболее чувствительны к протеинолизу. Это согласуется с данными, полученными на интактном тиреоглобулине (Dunn et al., 1983; Lejeune et al., 1983; Turmo et al., 1983).

Сопоставление фракций проназного гидролизата нативного и модифицированного тиреоглобулинов показало, что в результате удаления части углеводных остатков повышается устойчивость тиреоглобулина к действию протеолитических ферментов и существенно уменьшается выход пептидных фракций, содержащих основное количество тиреоидных гормонов. Ступенчатое удаление отдельных углеводов показало, что от N-ацетилнейраминовой кислоты зависит резистентность тиреоглобулина к действию протеиназ. Предполагается, что уменьшение суммарного отрицательного заряда при десалировании вызывает конформационные перестройки, приводящие к увеличению резистентности к протеинолизу. Как было отмечено в гл. III, такие же изменения наблюдались в дегликозилированных образцах тиреоглобулина. Чем больше отщеплялось силовых кислот, тем больше ассоциатов образовывалось при хранении белка. Этот процесс особенно ускоряется, когда гидролиз тиреоглобулина проназой проводится при температуре 37°C. Образование ассоциатов, в свою очередь, может приводить к снижению деградации молекулы белка протеолитическими ферментами.

Высказанное предположение проверено контрольными исследованиями. Интактный и частично дегликозилированный тиреоглобулин инкубировали в тех же условиях, в которых проводили протеинолиз, но без добавления проназы. Инкубированную смесь разделяли на колонке с сефарозой 6В. Проинкубированный без фермента тиреоглобулин разделяется на фракции ассоциатов и тиреоглобулина. При одинаковом количестве образцов тиреоглобулина, взятых для инкубации, выход фракций, различается. В частично дегликозилированном тиреоглобулине (отщеплено 35% N-ацетилнейраминовой кислоты) фракция ассоциатов составляет большее количество, чем в интактном тиреоглобулине, что указывает на изменение стабильности молекулы гликопротеина.

на при его дегликозилировании. Очевидно, наряду с гидролизом дегликозилированного тиреоглобулина проназой происходит ассоциация дегликозилированных молекул.

По-видимому, десилирование вызывает конформационные изменения в структуре молекулы тиреоглобулина. При этом на поверхность могут выходить гидрофобные участки, взаимодействие между которыми вызывает первичную ассоциацию. Ассоциации инициируют новые конформационные изменения, в итоге ассоциат теряет способность удерживаться в растворе и выпадает в осадок.

В описанном примере представлен факт участия олигосахаридных группировок в создании оптимальных конформаций тиреоглобулина для его протеинолиза с образованием биологически активных продуктов — гормонов тироксина и трийодтиронина. В отличие от обсуждавшихся примеров, здесь наблюдается увеличение резистентности тиреоглобулина при его десилировании. При этом функция олигосахаридных группировок — не маскировать центры протеинолиза, а наоборот, создавать конформации, при которых обеспечивается выход гормонов из резервной формы.

Изучено влияние ферментативного дегликозилирования на гидролиз трипсином иммуноглобулина М (Шмакова и др., 1977). Гидролиз трипсином проводили при 38°C, pH 8,0. За скоростью гидролиза следили с помощью потенциометрического титрования раствором NaOH образующихся при гидролизе ионов H⁺. Результаты представляли в виде количества выделившихся ионов H⁺ (в молях на 1 моль IgM) и процента расщепления пептидных связей. При этом учитывалось участие в этом гидролизе сопутствующих IgM протеиназ. Данные показали, что при сравнительно небольшом отщеплении углеводных групп (примерно 20% от имеющихся нейтральных сахаров) скорость гидролиза трипсином увеличивается. Глубина гидролиза IgM за 6 ч была в этом случае на 50% выше, чем в контроле.

Вполне вероятно, что при отщеплении небольшого количества углеводных групп вскрываются некоторые новые, чувствительные к трипсину пептидные связи. Однако дальнейшее отщепление углеводов приводит к снижению скорости триптического гидролиза: при 29% отщеплении нейтральных углеводов наблюдается некоторая задержка распада, и только к 6 ч реакция доходит до уровня распада в контрольном опыте за то же время. При 41% отщеплении нейтральных сахаров наступает резкое изменение хода триптического гидролиза: после короткого интенсивного расщепления гидролиз резко замедляется, и к 6 ч глубина его достигает лишь 68% от контроля.

Эти факты можно понять, допустив, что при отщеплении большого количества олигосахаридных цепей происходят конформационные изменения в молекуле IgM, затрудняющие действие трипсина. Можно заключить, что углеводные группы, лежащие на поверхности молекулы IgM, стабилизируют ее нативную конфор-

мацию: а их удаление вызывает перестройки этой конформации. Таким образом, очевиден факт участия олигосахаридных группировок в поддержании нативной структуры полипептидных цепей в молекуле иммуноглобулина М.

Изучали устойчивость дрожжевой инвертазы к протеинолизу (Виха и др., 1981). Получены образцы инвертазы с 53% отщеплением маннозы после действия α -маннозидазы. При действии хитиназы *Streptomyces griseus* также отщеплялось 50% маннозы, т. е. в этих образцах расщеплялись разные олигосахаридные цепи: α -маннозидаза расщепляла полиманнозильные цепи, расположенные на поверхности молекулы, а хитиназа расщепляла связь между хитобиозными звеньями, при этом в этих цепях отщеплялась и манноза. Образцы модифицированной таким путем инвертазы подвергали гидролизу проназой *Streptomyces griseus* 24 ч при 37°C.

Определение инвертазной активности в проназных гидролизатах нативной инвертазы и ее модифицированных по углеводному компоненту форм показало, что при обработке проназой нативная инвертаза инактивируется почти полностью. Наименьшая степень инактивации обнаружена после гидролиза инвертазы, модифицированной обработкой α -маннозидазой (инактивация на 13%). После обработки хитиназой инвертаза более чувствительна к действию проназы, чем инвертаза, модифицированная α -маннозидазой (инактивация на 27,7%). Необычно высокую устойчивость инвертазы к протеинолизу после отщепления α -маннозидазой 50% маннозы можно объяснить изменениями в конформации инвертазы. Возможно, при отщеплении концевых маннозильных остатков происходят конформационные изменения, приводящие к тому, что часть связей, доступных для гидролиза проназой в нативной инвертазе, экранируется оставшимися углеводными группами или уходит с поверхности молекулы. При отщеплении половины углеводных цепей инвертазы под действием хитиназы экранированные связи, доступные для гидролиза проназой, частично открываются.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют об участии олигосахаридных группировок в защите гликопротеинов от протеинолиза. Следует с большой осторожностью относиться к интерпретации результатов, полученных при ингибировании туникамицином, который влияет на первую стадию гликозилирования — присоединение гликозидного кора. Как обсуждалось выше, гликозилирование приводит к изменениям во вторичной и третичной структурах. На уровне присоединения кора происходит свертывание нативной цепи гликопротеина. Если полипептидная цепь не гликозилирована, то ее свертывание идет иным путем.

Реакция протеинолиза имеет сложный характер: сначала протекает быстро, затем замедляется, видимо, на первой стадии идет замедление либо из-за торможения продуктами гидролиза, либо в результате того, что идет догидролиз менее доступных экранированных связей. В этом также состоит сложность интерпре-

тации полученных результатов. Большинство гликопротеинов с макромолекулярной структурой, а также мембранные гликопротеины легко агрегируют при повышении температуры, а также при удалении олигосахаридных цепей, придающих их структурам гидрофильный характер. Этот факт не может не сказаться на результатах протеинолиза.

С другой стороны, если олигосахаридные группировки действительно придают резистентность к протеинолизу, маскируя чувствительные для протеаз связи, то почему многие гликопротеины *in vitro* не защищены от их действия? Например, церулоплазмин — одноцепочечный голубой белок из α_2 -глобулиновой фракции сыворотки, обладающий оксидазной активностью, содержащий 8% углеводов в виде сиалированных N-гликанов, интенсивно деградируется эндогенными протеиназами (Kingston et al., 1977). Факт деградации эндогенными протеиназами гликопротеинов в процессе их выделения и хранения отмечался неоднократно для иммуноглобулина М, γ -глобулина, тиреоглобулина (Виха и др., 1982; Алимбабаева и др., 1986).

И наконец, что касается сывороточных гликопротеинов, то в кровяном русле протеазы существуют со своими ингибиторами, которые и регулируют их действие. При разного рода денатурационных повреждениях гликопротеинов нейраминидаза десилирует поврежденный гликопротеин, который узнается лектином гепатоцитов и выводится из кровяного русла.

Таким образом, установлен факт участия олигосахаридных цепей в формировании структуры гликопротеинов, позволяющей им функционировать в сложных условиях окружающей среды и определять разнообразные функции в организме. Это единственная функция олигосахаридных цепей, которая убедительно доказана в настоящее время.

Олигосахаридные группировки удерживают гликопротеины в растворе, во-первых, в силу своего гидрофильного характера и, во-вторых, вследствие маскирования гидрофобных группировок, оказавшихся на поверхности молекулы. Маскируя гидрофобные группы, углеводы предотвращают образование агрегатов.

Дегликозилирование нарушает устойчивость молекул IgM и тиреоглобулина в растворе, приводит к образованию ассоциатов и выпадению их в осадок. По-видимому, образование ассоциатов проходит в несколько стадий: отщепление олигосахаридных цепей постепенно доходит до такого уровня (30—50%), при котором вначале происходят незначительные изменения структуры и нарушается устойчивость молекулы в растворе. При этом на поверхность молекулы, вероятно, выходят гидрофобные участки, взаимодействие между которыми вызывает первичную ассоциацию, инициирующую новые конформационные изменения. В конечном счете ассоциат теряет растворимость и выпадает в осадок.

Олигосахаридные группировки участвуют в формировании структур активного центра, предназначенного для выполнения

определенных биологических функций. Как правило, на конце цепочки олигосахаридов стоит N-ацетилнейраминная кислота, несущая отрицательный заряд. За счет этого заряда она может образовывать солевые мостики или участвовать в образовании водородных связей. Энергия этих взаимодействий невелика. При определенных условиях такие связи могут разрываться и завязываться в новые связи с другими заряженными группами; полипептидные цепи могут складываться таким образом, что гидрофобные и ионные группировки, участвующие во всякого рода межмолекулярных взаимодействиях, оказываются экспонированными на поверхности или, наоборот, спрятанными внутрь глобулы.

Так, олигосахаридные группы с терминальной N-ацетилнейраминной кислотой принимают участие в сближении иодтирозилов разных участков полипептидных цепей или разных полипептидных цепей, обеспечивая условия, благоприятные для конденсации иодтирозилов, т. е. они участвуют в формировании структуры тиреоглобулина для осуществления его основной гормонообразующей функции. При иодировании тиреоглобулина олигосахаридные группировки создают стерические препятствия для включения иода в тирозилы. Это необходимо для того, чтобы иодирование проходило до определенной степени и в определенных локусах молекулы тиреоглобулина, чтобы создать его конформации, оптимальные для нормального гормоногенеза.

Для многих гликопротеинов показано изменение физико-химических свойств: агрегации, растворимости, чувствительности к денатурации, замораживанию и оттаиванию, инактивации денатурирующими агентами.

В некоторых случаях N-ацетилнейраминная кислота маскирует антигенные детерминанты, которые при десилировании гликопротеина размаскировываются, следствием чего являются аутоиммунные заболевания. Размаскирование антигенных детерминант, скрытых в норме, может происходить под действием вирусной, бактериальной нейраминидазы или при повышении уровня собственных нейраминидаз организма.

Нельзя сказать однозначно, защищают ли олигосахаридные цепи полипептидный скелет гликопротеина от протеинолиза. Задачу проверки гипотезы Beeley ставили многие ученые на различных объектах — сывороточных и мембранных гликопротеинах. Данные разноречивы: в некоторых случаях олигосахариды не защищают от протеинолиза, в других — олигосахариды не влияют на этот процесс, в-третьих, наоборот, после дегликозилирования появляется резистентность к протеинолизу. Скорее всего, этот вопрос решается на уровне функционального предназначения данного гликопротеина. Возможно, для мембранных гликопротеинов гипотеза Beeley и справедлива, поскольку мембранные гликопротеины содержатся в незначительных количествах в функциональных доменах мембран и определенная их ориентировка

(за счет липидного компонента) на клеточной мембране способствует проявлению максимальной активности, чем компенсируется их низкое содержание. За счет связи гликопротеинов с мембраной их структура недостаточно лабильна и динамична, поэтому им нужны маскирующие компоненты, которыми являются олигосахаридные цепи (Beeley, 1976, 1977).

По-другому обстоит дело с сывороточными гликопротеинами. Например, структура IgM очень динамична. Она состоит из 5 субъединиц, 70 доменов. Субъединичная и доменная структуры повышают количество возможных структурных изменений молекулы. В иммуноглобулинах поверхность в 100 \AA может принимать порядка 1000 конформаций, проявляющих различные связывающие свойства. Олигосахариды покрывают 10—15% поверхности иммуноглобулина, и вряд ли это может быть решающим фактором в обеспечении защиты молекулы IgM от действия протеиназ. После удаления 50% углеводов с поверхности молекулы IgM она становится резистентной к действию трипсина. Как показали дифференциальные и сольвентпертурбационные спектры, при этом уменьшается доступность остатков триптофана и тирозина. Вероятно, назначение удаленной в данном случае части олигосахаридных цепей состоит в вытягивании на поверхность гидрофобных триптофана и тирозина для участия в какого-то рода взаимодействиях, т. е. в создании структуры, способной выполнять определенные биологические функции.

Вероятнее всего, олигосахаридные цепи предназначены не для защиты гликопротеинов от протеинолиза, и констатируемые в настоящее время примеры защиты являются побочным явлением. По-видимому, основная роль олигосахаридных единиц в составе гликопротеинов заключается в том, что они, обладая многочисленными композиционными возможностями, участвуют в создании определенной конформации биополимера, обеспечивающей реализацию его биологической функции.

Глава IV.

**ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ УЗНАВАНИЯ
В БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ И КЛЕТОЧНЫХ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ**

На поверхности клеток мультиклеточных организмов находится сложный механизм, который узнает определенные растворимые компоненты в жидкостях организма — гормоны, ферменты, транспортные белки, компоненты межклеточного матрикса (коллагены и протеогликаны), компоненты плазматических мембран других клеток. Узнавание инициируется специфическим связыванием молекул, расположенных на наружной мембране клеток, с рецепторами мембран плазматических клеток. В результате специфического связывания инициируются изменения в физиологическом и метаболическом статусе клетки. Имея такой механизм, клетка может выступать как член клеточного сообщества.

В процессе развития оплодотворенных клеток поделившиеся клетки движутся, меняют расположение относительно друг друга и дифференцируются в формы разных органов и тканей. В этих процессах узнавание клетка—клетка, клетка — субстрат является основным механизмом развития. Факт, что углеводы могут служить специфическим сигналом для узнавания компонентов клеточной поверхности, основан на информации, полученной при изучении антигенов клеточной стенки бактерий и веществ групп крови. В этих антигенах небольшие структурные изменения в олигосахаридных цепях могут дать другие антигены, которые уже не узнаются специфическими антителами.

Моносахариды, как и аминокислоты и нуклеотиды, могут образовывать полимерные цепи с большим разнообразием специфических структур. Однако вариации структур, которые могут быть образованы ограниченным числом мономерных единиц, намного больше у олигосахаридных цепей, чем у пептидов и нуклеотидов. Это объясняется тем, что моносахарид имеет от 3 до 4 центров возможного замещения следующим моносахаридом, в противоположность аминокислотам и нуклеотидам, которые имеют только по одному центру для образования связи со следующей мономерной единицей. Кроме того, моносахарид, вступая в связь с другим моносахаридом, может образовывать 2 аномерные структуры — α или β , что также вносит свой вклад в структурную множественность олигосахаридных цепей.

Ashwell, Morell (1977) открыли, что обработанные нейрами-нидазой гликопротеины плазмы, введенные кроликам, быстро выходят из циркуляторной системы. Это явилось первым доказательством того, что олигосахаридные цепи гликопротеинов действуют как сигнал для узнавания поверхностью клетки. Дальнейшие исследования Ashwell, Morell позволили выделить из плазматических мембран паренхимальных клеток рецепторы, которые специфически связывались с β -галактозилными остатками олигосахаридных цепей гликопротеинов. Впоследствии были найдены другие рецепторы, специфически связывающиеся с определенными углеводными структурами на поверхности клеток.

РЕГУЛЯЦИЯ КАТАБОЛИЗМА ГЛИКОПРОТЕИНОВ

Несмотря на развитие исследований внутриклеточной деградациии белка, регуляция катаболизма гликопротеинов изучена недостаточно. Активируемые эффекторами механизмы, которые контролируют катаболизм гликопротеинов, важны, так как они удаляют из циркуляции старые и поврежденные иммуноглобулины, чужеродные антигены и другие гликопротеины и вносят свой вклад в состояние иммунитета. Молекулярные механизмы, посредством которых гликопротеины удаляются из циркуляции, называются клиренсом, или катаболическим процессом.

После синтеза иммуноглобулинов иммунными клетками каждый класс иммуноглобулинов приобретает собственную характеристическую скорость исчезновения из циркуляции. Хотя общая скорость катаболизма противоположна размерам животного, для всех подклассов IgG время существования его в циркуляторной системе намного больше, чем альбумина, что делает его одним из долгоживущих белков. Скорость катаболизма IgM в 2—3 раза выше, а скорость синтеза его составляет 1/5 от скорости синтеза IgG. IgG и IgA имеют одинаковую скорость синтеза, а разница в их концентрации в сыворотке составляет 4—5 раз, что обусловлено быстрым катаболизмом IgA. Скорость катаболизма подклассов мышиных IgG зависит от их относительной концентрации в сыворотке, период полураспада крысиного IgE не зависит от уровня его и других иммуноглобулинов в сыворотке. Подобное явление наблюдается для IgA и IgM. Уровень IgD в сыворотке человека составляет 1/500 уровня всех иммуноглобулинов, он синтезируется со скоростью 1/100 скорости IgG и расщепляется в 6—8 раз быстрее. Это делает его одним из самых короткоживущих иммуноглобулинов.

К настоящему времени известны 2 механизма удаления иммуноглобулинов из плазмы: межклеточный транспорт и поглощение макрофагов Fc рецепторами. Других процессов, специфических для клиренса иммуноглобулинов, не описано.

Первый механизм удаления иммуноглобулинов из плазмы включает относительно широкий класс неспецифических процес-

сов, подобных фильтрации, таких, которые функционируют в гломерулярной капиллярной сети почек. Продукты протеолитического расщепления агрегированных IgG и интактных IgG и IgA, но не IgM, находят в моче или почках.

Второй механизм включает рецепторное связывание макрофагами, клетками кишечного эпителия и тучными клетками. Fc рецепторы макрофагов в норме насыщены при концентрации IgG $8 \cdot 10^{-5}$ М (12 мг/мл). До тех пор, пока IgG свободно не диссоциирует *in vivo*, число свободных рецепторов должно быть экстремально мало. Рецепторы макрофагов, клетки эпителия кишечника и тучные клетки связывают иммуноглобулиновые структуры, которые в норме скрыты, но становятся размаскированными химической, энзиматической или физической травмой. Скорость катаболизма L цепей, Fab и F(ab)₂ фрагментов в 50—100 раз больше, чем нативных иммуноглобулинов. Однако катаболизм Fc части подобен катаболизму интактного IgG. Fc структурная область, которая узнается механизмом клиренса, по-видимому, включает пептидную и углеводную части, то есть углевод тоже может играть роль в фазе распада IgG.

E. W. Voss, V. H. Voss (1977) показали, что IgG низкого родства метаболизируются медленнее, чем антитела высокого родства. Для антител высокого и низкого родства обнаружены различия в углеводном составе (Mitchell et al., 1976).

Белки, способные узнавать специфические олигосахариды, изолированы из различных органов позвоночных (Ashwell, Hartford, 1982). Эти белки делятся на несколько групп. Одна группа состоит из интегральных мембранных белков, которые включены во внутриклеточный транспорт гликопротеинов к специфическим органеллам клетки, в основном лизосомам. К ним относятся рецепторы гепатоцитов млекопитающих для десалирированных гликопротеинов, рецептор гепатоцитов птиц для гликопротеинов с удаленной галактозой и широко распространенный маннозофосфатный рецептор. Вторая группа — небольшие водорастворимые галактозосвязывающие белки, которые экстрагируются из различных тканей животных. Это сывороточный амилоидный белок, который специфически связывает галактозо-содержащие полимеры. В настоящее время уже известны первичные структуры некоторых из этих белков.

Пять связанных с мембранами гликопротеинов рецепторов, включая два родственных рецептора для десалирированных гликопротеинов, выделенных из печени крыс, и два рецептора, найденные в печени человека, а также рецептор птиц для гликопротеинов с удаленной галактозой, гомологичны в смысле общей организации, они содержат COOH-терминальный домен в 130—150 аминокислот. Этот домен содержит центр связывания углеводов. Каждый из этих белков встроен в мембрану клетки полипептидом, состоящим в основном из гидрофобных аминокислот. Каждый из этих рецепторов имеет NH₂-терминальный сигнальный

пептид (который впоследствии удаляется), за ним следует короткий сегмент (18—20 аминокислот), богатый цистеином, затем коллагеноподобный домен (53—59 аминокислотных остатков) (Drickamer et al., 1986).

Маннозосвязывающий белок выделен из печени кролика и крыс. Первоначально предполагали, что он включен в поглощение маннозосодержащих гликопротеинов макрофагами. Однако нахождение его исключительно в паренхимальных клетках печени исключает эту функцию. Маннозосвязывающий белок выделен также из сыворотки кролика, крыс, людей. Белки, связывающие маннозу из сыворотки и печени, идентичны по связывающей способности, рН, зависимости от Ca^{2+} , антигенности и поведению при ЭФ в ПААГ в додецилсульфате натрия.

В процессе узнавания участвует белок Clq , который является узнающим центром первого компонента комплемента. COOH -терминальные домены Clq и белка, связывающего маннозу, включены в узнавание — связывание маннотерминального олигосахарида в случае белка, связывающего маннозу, и Fc части иммуноглобулина — в случае Clq . Хотя ни один из консервированных участков в изучаемом лектине не присутствует в Clq , тем не менее интригующим является факт, что фиксация комплемента зависит от гликозилирования Fc домена IgG (Nose, Wigzell, 1983).

Аналогия в смысле общей организации белка, связывающего маннозу, апопротеина легочного сурфактанта и Clq наводит на мысль об идентичности их биологических функций. Возможно, белок, связывающий маннозу, и апопротеин легочного сурфактанта участвуют в примитивном иммунном ответе. Это аналогично предполагаемой функции для C -реактивного белка, который узнает капсулярные полисахариды отдельных бактерий. Манноза может быть неспецифическим маркером на бактериальной поверхности, который дает сигнал для индуцирования эффекторных функций, аналогичных тем, которые индуцируются, но более специфично, Clq . Белок легочного сурфактанта может выполнять подобную протективную защиту на поверхности легких.

Получены данные о роли самой олигосахаридной структуры в процессе узнавания. Выделен лектин из гепатоцитов печени человека и изучена его специфичность для ряда гликопротеинов и гликопептидов. Ниже представлены значения K_1 для о-гликанов в реакции связывания лектина печени человека с гликопротеинами и гликопептидами разного строения.

Гликопротеин	Галактоза	Глюкоза	K_1
Асиалоорозомуконид	20	0	$1,7 \cdot 10^{-9} \text{M}$
Антифризовый гликопротеин	24	24	$2,0 \cdot 10^{-8} \text{M}$
Гликопептиды	4		$3,9 \cdot 10^{-5} \text{M}$
	2		$5,4 \cdot 10^{-5} \text{M}$

	1		$9,8 \cdot 10^{-5} \text{M}$
Лактоза	1	1	$2,2 \cdot 10^{-4} \text{M}$
α -Метилгалактозид	1		$2,7 \cdot 10^{-4} \text{M}$

Удаление галактозы от (1^{β} -3) GalNAc приводит к 10—27-кратному снижению K_1 . Сродство лектина больше к N-ацетилглюкозамину, чем к галактозе. Снижение K_1 обнаружено для гликопептидов с 4 Gal 1^{β} -3 GalNAc или N-ацетилглюкозамином по сравнению с двумя такими единицами. Предполагают, что этот эффект обусловлен одновременным связыванием у 2 центров, а не статистическим влиянием увеличения числа остатков. Связывающие центры находятся, по-видимому, на расстоянии 25—30 Å друг от друга. Из гепатоцитов печени кролика выделен в гомогенном виде и охарактеризован мембранный белок как водорастворимый гликопротеин с содержанием углеводов 10%. Связывание с этим белком требует концевой галактозы на биополимере и Ca^{2+} . Он является потенциальным митогеном для десиалированных лимфоцитов.

В печени птиц выделен другой лектин со специфичностью к N-ацетилглюкозамину. Лектин иммобилизован на сефарозе 4B, и связывающий центр его изучен конкурентным ингибированием с использованием [^3H] меченых веществ группы крови, полисахаридов, моносахаридов, гликозидов (Sarkar et al., 1979). Сформулированы основные черты углеводсвязывающего центра. Связывающий центр имеет относительно небольшие размеры. Он включает терминальный сахарный остаток, содержащий аксиальный гидроксил на C-4, и простирается на часть предшествующего углеводного остатка. Среди моно- и олигосахаридов лучшим ингибитором был метил- α -D-GalNAc, который был в 4 раза эффективнее метил- β -D-GalNAc. Метил- β -D-Gal более эффективен, чем соответствующий α -изомер. Среди дисахаридов α -Gal 1^{β} -3 D-GlcNAc более эффективен, чем D-Gal 1^{β} -4D-GlcNAc.

Замещение аминасахара на восстанавливаемом конце α -D-Gal или глюкозой приводило к снижению связывающей способности.

Среди моносахаридов GalNAc, Gal, α -D-Gal, D-Fuc имели почти одинаковую ингибиторную силу. Лактоза ингибировала, как моносахариды.

Лактозаминогликаны широко распределены как антигены клеточной поверхности, они подвергаются структурным изменениям во время процессов развития, и галактозосвязывающие белки могут участвовать в клеточных взаимодействиях как комплементарные молекулы.

Ohara, Yamagata (1986) выделили 2 специфических к галактозе лектина — I и II из новорожденных мышей хроматографией на лактамилсефарозе 4B. Молекулярная масса их субъединиц составляет соответственно 15 000 и 16 000 Дальтон, изоэлектрические точки — 5,3 и 6,8. Они агглютинировали эритроциты кро-

лика, обработанные трипсином. Наиболее эффективными ингибиторами этого взаимодействия были N-ацетиллактозамин и десиалированные гликопептиды с N-ацетилглюкозаминном на невосстанавливаемом конце. Галактозосвязывающий белок I найден в печени и эпидермисе новорожденных мышей. Предполагают, что он способен узнавать лактозаминогликаны на поверхности клеток мышинных эмбрионов и тем самым участвовать в регуляции процесса развития.

Проведены исследования связывания лектина гепатоцитов кролика с большой группой гликопротеинов и с веществами групп крови. Установлено, что если от некоторых сывороточных гликопротеинов (церулоплазмин, гаптоглобин, фетуин, орозомукоид) отщепить ферментативно N-ацетилнейраминовую кислоту, то время полураспада этих гликопротеинов сократится от нескольких десятков часов до нескольких минут. Все они при этом уходят из кровотока в печень. Вначале они связываются с мембраной паренхиматозных клеток печени, затем, в результате пиноцитоза, попадают внутрь клеток, атакуются гликозидазами и протеазами лизосом и перевариваются. Таким образом, N-ацетилнейраминовая кислота определяет время жизни циркулирующих в кровотоке гликопротеинов. Для того, чтобы происходило связывание асиалогликопротеинов концевым сахаром, в углеводной цепи гликопротеина должна находиться галактоза, к которой обычно присоединена N-ацетилнейраминовая кислота. В случае, если удаляется и галактоза, связывания гликопротеина с мембранами клеток печени не происходит. В мембранах паренхиматозных клеток печени за связывание асиалогликопротеинов ответственен гликопротеин, содержащий N-ацетилнейраминовою кислоту.

Как и в случае других сывороточных гликопротеинов, сиаловая кислота определяет время пребывания тиреоглобулина в циркуляторной системе (Tatumi et al., 1979; Ikekubo et al., 1980). При исследовании клиренса ^{125}I -тиреоглобулина после введения крысам метки *in vivo* и *in vitro* установили, что период полураспада асиалотиреоглобулина равен соответственно 6 и 12 мин.

Ikekubo et al. (1980) изучали клиренс тиреоглобулина экспериментальной опухоли щитовидной железы крыс, в которой нарушен процесс включения сиаловой кислоты в тиреоглобулин. Период полураспада в этих экспериментах определяли измерением радиоиммунным методом в плазме концентраций тиреоглобулина из экспериментальной опухоли крыс, интактного тиреоглобулина щитовидной железы крыс, десиалированного тиреоглобулина и тиреоглобулина с окисленной галактозой и удаленной сиаловой кислотой после введения их крысам в кровоток. Тиреоглобулин опухоли и асиалотиреоглобулин почти полностью исчезали из кровотока соответственно через 12 и 15 мин, тогда как тиреоглобулин с окисленной галактозой и интактный тиреоглобулин уходили из кровотока соответственно через 1,5 и 4,4 ч. Таким образом, время жизни тиреоглобулина в кровотоке определяется

наличием N-ацетилнейраминовой кислоты, и для выведения его из кровотока необходимо не только его десалирование, но и наличие за N-ацетилнейраминовой кислотой следующего остатка галактозы.

Многие протеолитические реакции, происходящие в крови, требуют контроля. Один из путей регуляции протеолитической активности в крови — специфические протеиназные ингибиторы. Они контролируют протеолитические каскады, ответственные за иммунологические реакции, за коагуляцию и за другие противовоспалительные стимулы. Среди анти-протеаз α_1 -протеиназный ингибитор играет важную роль в защите тканей против протеолитической атаки, осуществляемой лейкоцитарной эластазой. Дефицит α_1 -протеиназного ингибитора является причиной эмфиземы легких и, в некоторых случаях, цирроза печени. Имеется сообщение, что развитие эмфиземы может быть остановлено внутривенным введением α_1 -протеиназного ингибитора из сыворотки человека.

Синтезируется α_1 -протеиназный ингибитор *E. coli* и дрожжами с применением технологии, использующей рекомбинантную ДНК. В аспекте терапевтического использования основной вопрос, которому придается важное значение — это период полураспада негликозилированной формы полученного рекомбинантным путем α_1 -протеиназного ингибитора по сравнению с гликозилированной формой, поскольку полученный рекомбинантным путем ингибитор является негликозилированным. Weber et al. (1985) показали, что период полураспада негликозилированного α_1 -протеиназного ингибитора, синтезированного в культурах гепатоцитов крыс в присутствии туникамицина, в 6 раз меньше, чем у его гликозилированной формы. Следовательно, для терапевтического использования требуется предварительное гликозилирование α_1 -протеиназного ингибитора (Weber et al., 1985).

Ингибитор C1-эстеразы комплементного каскада — α_2 -гликопротеин 4S, который прочно связывает C1r, C1s, плазмин, каликреин и активированный фактор Хагемана и тем самым блокирует их ферментативную активность. Это одноцепочечный гликопротеин с мол. массой 105000, содержит 34% углеводов, из них 12% гексоз и 17% сиаловых кислот. Для осуществления функциональной активности не требуются N-ацетилнейраминовая кислота и галактоза, так как их удаление не отражается на способности ингибировать C1. При этом не происходит изменений его антигенной структуры. Однако введение кроликам очищенного меченого ^{125}I асиалогликопротеина — ингибитора приводит к быстрому выведению его из кровотока и накоплению в печени. Удаление галактозы увеличивает время нахождения ингибитора в циркуляторной системе, и распределение его по органам становится близким к норме (Minta, 1981).

Показано также, что гонадотропный и фолликулостимулирующий гормоны после удаления N-ацетилнейраминовой кислоты

быстро выходят из кровотока. N-ацетилнейраминовая кислота определяет время жизни эритроцитов в кровотоке. Отщепление N-ацетилнейраминовой кислоты с поверхности эритроцитов приводит к выведению их из кровотока.

Winkelhake, Nicolson (1976) показали, что N-ацетилнейраминовая кислота определяет время жизни иммуноглобулина G в плазме и его отложение в тканях.

В лимфоцитах синтезируются 2 формы IgM: одна из них встраивается в плазматические мембраны, другая секретируется в растворимую форму. Эти формы IgM содержат подобные, но не идентичные тяжелые цепи, которые отличаются по COOH-терминальным структурам. Экспрессия двух форм IgM зависит от стадии дифференциации В-клеток. В несекретирующих В-клетках экспрессия IgM находится под посттрансляционным контролем. В несекретирующих клетках образуются обе формы тяжелых цепей: μ_m — мембранная и μ_s — секретируемая. Оба белка подвергаются гликозилированию. μ_m тяжелые цепи проходят все стадии до включения в мембраны, μ_s тяжелые цепи не собираются в пентамер, не секретируются и должны деградироваться.

Линия Dandi клеточной лимфомы человека является фенотипом несекретирующих В-клеток. Эта линия клеток синтезирует обе формы — мембранную и секретируемую — тяжелых цепей IgM, но экспрессирует только функциональный мембранный IgM. Секретируемый тип тяжелых цепей быстро деградируется в этих клетках с периодом полураспада 1,3 ч. Часть тяжелых цепей мембранного типа также быстро катаболизируется, но большинство экспрессируется в стабильной форме с периодом полураспада 13 ч (Dulis et al., 1982).

Ингибирование гликозилирования тяжелых цепей туникамицином оказывает различное влияние на скорость катаболизма μ_m и μ_s цепей. Этот ингибитор не влияет на скорость катаболизма μ_m цепей, но деградация μ_s цепей, синтезированных в присутствии туникамицина, происходит намного быстрее. Негликозилированные μ_s цепи по сравнению с гликозилированными ковалентно не связываются с легкими цепями. Дегликозилирование влияет на образование стабильного μ_m белка, возможно, изменением конформации μ_m цепей и ингибированием взаимодействия с легкими цепями. Авторы считают, что цепи специфически защищаются от протеолиза посттрансляционными событиями: ковалентной сборкой с легкими цепями в 8S мономер, терминальным гликозилированием и встраиванием в плазматические мембраны. Таким образом, гликозилирование и другие ковалентные модификации могут играть важную регуляторную роль в катаболизме μ цепей.

Периодатное окисление влияет на клиренс очищенных лизосомальных ферментов из печени крыс. Не подвергавшиеся периодатному окислению лизосомальные β -D-глюкуронидаза, N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза, α -L-фукозидаза и α -D-маннозидаза быстро выводились из циркуляции, однако после периодатного окисления

они задерживались в циркуляции. Очищенные лизосомальные ферменты конкурировали за клиренс с другими очищенными лизосомальными ферментами. Следовательно, один и тот же рецептор ответственен за связывание нескольких ферментов. Этот рецептор отличался от рецептора фибробластов, ответственного за поглощение лизосомальных ферментов, так как β -D-глюкуронидаза печени крыс и N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза препуциальных желез крыс быстро выводились из циркуляции *in vivo*, но не эффективно захватывались фибробластами.

Рибонуклеаза В (но не А), С и Д быстро поглощались печенью. Все 4 формы рибонуклеазы отличались только по степени гликозилирования. Форма А негликозилирована, форма В содержит высокоманнозный тип олигосахаридов, С и Д содержат сложного типа олигосахариды, различающиеся по степени сialiрования. Период полураспада этих форм соответственно 577, 15, 862 и 941 мин. Обработка α -D-маннозидазой приводит к продлению времени нахождения рибонуклеазы В в циркуляции от 15 до 733 мин.

Система поглощения десialiрированных гликопротеинов может функционировать для выведения из циркуляции иммунных комплексов. Комплексы IgG крыс с ВСА—ВСА антигеном выводятся из циркуляции с периодом полураспада 4 мин и локализуются в паренхиматозных клетках печени. Десialiрированный фетуин и галактоза ингибируют это поглощение иммунных комплексов паренхиматозными клетками. Предполагают, что при связывании антигена молекула IgG подвергается конформационным изменениям, результатом которых является экспонирование на поверхность терминальных галактозных остатков олигосахаридных цепей, что способствует узнаванию иммунных комплексов системой поглощения десialiрированных гликопротеинов.

Система поглощения иммунных комплексов находится на ретикулоэндотелиальных клетках. ВСА—IgM комплексы быстро выводятся из циркуляции неиммунных крыс, и выведение их ингибируется овальбумином и маннаном, но не ингибируется десialiрированным фетуином. Обработка α -D-маннозидазой иммунных комплексов отменяла ускоренное их выведение из циркуляции. Вероятно, связывание с антигеном индуцировало к экспонированию высокоманнозного типа олигосахаридов. Это подтверждено связыванием с конканавалином А.

Nose, Wigzell (1983) показали, что комплексы антиген—анти-тело с нормально гликозилированным моноклональным IgG2b выводились быстро из циркуляции мышей, но комплексы с дегликозилированным IgG2b оставались в циркуляции намного дольше.

Обсуждается роль N-ацетилнейраминовой кислоты в выживании и деградаци эритроцитов. Поверхность эритроцита покрыта толстым слоем углеводов. Углеводный слой выступает над мембраной эритроцита на 150—500 Å. Концентрация моносахаридов в этом слое составляет 20—30 мМ, 50% этого количества сос-

тавляют лактозамины (Viitala, Järnefelt, 1985). Если слой углеводного покрытия тоньше, то концентрация моносахаридов в нем больше. Концентрация моносахаридов в гидратной оболочке эритроцитов более чем в 10 раз превышает концентрацию внутри домена агрегата протеогликана хряща. Это углеводное покрытие эритроцита выполняет определенную функцию.

В кровяном русле эритроциты подвергаются значительным механическим нагрузкам. Углеводное покрытие эритроцита, как в протеогликане хряща, способно выдерживать значительное давление и защищать эритроцит от повреждений при прохождении через стенки капилляров. Углеводы гидрофильны и окружены значительным слоем воды, которая составляет гидратную оболочку эритроцита. В кровяном русле они не подвержены адгезии, поскольку адгезивные процессы включают либо специфические, либо гидрофобные взаимодействия между клеткой и субстратом или двумя клетками.

Почему эритроцит после десиалирования выводится из кровотока? При десиалировании разрушается гидратная «шуба» эритроцита и удаляется концевая N-ацетилнейраминовая кислота, несущая заряд. При этом нарушается структурный статус компонентов мембран эритроцитов, экспонируются на поверхность скрытые до того структуры, которые могут вступать во всякого рода неспецифические гидрофобные взаимодействия, посредством которых эритроцит может быть выведен из кровотока. Таким образом, углеводы эритроцитов играют защитную маскирующую роль, их повреждение приводит к драматическим событиям.

Итак, в настоящее время очевиден факт участия олигосахаридных цепей гликопротеинов в биологическом узнавании, регулирующем катаболизм гликопротеинов. Это, пожалуй, вторая уже доказанная функция углеводов гликопротеинов. Идентифицированы сахара, отвечающие за клиренс гликопротеинов. Из гепатоцитов печени выделены белки-лектины, связывающие моносахариды, и показано, что они действительно связывают соответствующие углеводные структуры. Однако отсутствуют доказательства, что именно эти белки связывают десиалированные гликопротеины, введенные в кровоток. Установлен лишь факт поглощения их печенью.

Тем не менее, маскирующее действие N-ацетилнейраминовой кислоты, ее регуляторная роль как терминального заряженного углевода очевидна. Однако нет определенной ясности в том, осуществляет ли N-ацетилнейраминовая кислота свою функцию прямо, либо сиамирование — десиалирование белка приводит к конформационным изменениям во всей молекуле, которые, в свою очередь, влияют на рецепторные взаимодействия. Неизвестен и механизм регуляторных процессов, в которых участвует N-ацетилнейраминовая кислота.

Уже сейчас можно воздействовать на процесс деградации гликопротеинов, используя ингибиторы нейраминидаз, например, 2-диокси-2,3-дигидро-N-ацетилнейраминовую кислоту. Этот инги-

битор воздействует на первую стадию деградации гликопротеинов.

Один из основных вопросов, которые предстоит решить в ближайшее время — это выделение и изучение механизма действия белков-лектинов, связывающих углеводные структуры. Установление их специфичности и механизма действия позволит создать мощное терапевтическое средство для лечения метаболических нарушений организма и аутоиммунных болезней. С помощью этих лектинов можно ликвидировать отложения иммунных комплексов. Для каждого из аутоиммунных заболеваний можно будет подобрать определенный эффективно действующий лектин.

Ценную информацию о свойствах и функциях этих белков можно получить при установлении топографии распределения и ориентации белков-лектинов в функциональных доменах мембран.

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИЗМЕНЕНИЙ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК

В нормальном клеточном сообществе рост и дифференциация клеток регулируются соответствующими регуляторами. Опухолевые клетки ускользают от этой регуляции, многие из них приобретают свойство метастазировать. Детальная характеристика поверхности опухолевых клеток представлена в обзоре Nakamori (1984).

Две химически близкие группы углеводов обнаруживают значительные изменения в трансформированных и опухолевых клетках: а) углеводы, связанные с церамидами (гликосфинголипидами, или гликолипидами), встроенными в липидные бислои; б) углеводы, которые связаны с гликопротеинами поверхности клетки (включая интегральные мембранные белки, или гликопротеины, и периферические мембранные белки, такие как фибронектин).

Основные изменения в олигосахаридных цепях гликопротеинов опухолевых клеток могут быть разделены на 3 категории:

а) присутствие гликопептидов в N-гликозидных цепях с большой молекулярной массой по сравнению с соответствующими фракциями, полученными от нетрансформированных клеток. Фракции гликопептидов от опухолевых клеток имеют крупные антенные структуры из-за увеличения разветвления у маннозного кода, то есть разветвление у $\text{Gal } 1\text{--}4 \text{GlcNAc } 1\text{--}4 \text{Man}$ и появление bisecting $\text{GlcNAc } 1\text{--}4 \text{Man}$ структур;

б) увеличение O-гликозилированных структур муцинового типа, в частности появление густогликозилированной области белка с сиалил ди- и тетрасахаридами;

в) присутствие в периферической области боковых цепей либо у N- либо у O-гликозидных структур. Здесь обнаружены либо недостроенные олигосахаридные цепи, либо новые, несвойственные фрагменты олигосахаридных цепей.

Химическая основа изменений в олигосахаридных цепях гликопротеинов при опухолевых клетках. Подавление синтеза глико-

зилтрансфераз показано в различных клетках, трансформированных опухолевыми вирусами и химическими канцерогенами. Есть несколько примеров, показывающих ферментный состав клеток, в которых обнаружен неосинтез.

Показано увеличение активности ферментов, ответственных за G_{6p} синтез в 3Т3 клетках мыши, трансформированных штаммом Kirsten вируса мышиной саркомы, синтез фукозилированных олигосахаридных цепей в преопухолевой печени крыс, получающих в пищу химические канцерогены, и в гепатоме крыс.

Присутствие сильно разветвленной мультиантенной коровой структуры в N-гликанах гликопротеинов трансформированных клеток приписывается появлению N-ацетилглюкозаминилтрансферазы с необычной специфичностью, которая синтезирует структуру $GlcNAc 1 \rightarrow 4 Man$.

Специфические ферментативные дефекты или специфическое усиление ферментативной активности, ответственное за изменение в углеводном составе поверхности опухолевых клеток, обсуждаются в ряде работ (Накамоти, 1984).

В некоторых трансформированных клетках прослеживаются явно химические изменения, но ферменты, ответственные за такие изменения в углеводной структуре, не обнаружены. Более того, возможно, что структура олигосахаридных цепей контролируется не только количеством и специфичностью гликозилтрансфераз (регуляция на уровне транскрипции), но регулируется также сборкой и организацией мультигликозилтрансферазных комплексов в мембранах (на уровне организации мембран), которая может контролироваться посттрансляционной модификацией гликозилтрансфераз посредством гликозилирования и фосфорилирования.

Биологическое значение изменений углеводов поверхности клеток. Изменения углеводного состава могут происходить серий каскадных механизмов, запущенных онкогенной активацией. Изменения в гликолипидах и коровых структурах гликопротеинов были обнаружены на клеточных линиях, трансформированных чувствительными к температурам мутантами опухолевых вирусов, и клетках, трансформированных опухолевой ДНКазой человека.

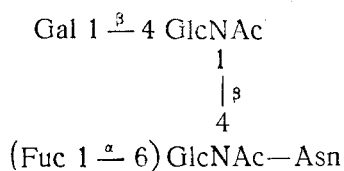
Многие из изменений в углеводной структуре отражают замороженную программу дифференциации, т. е. те же или близкородственные структуры и организации, выраженные на гликопротеинах клеточной поверхности на определенных стадиях развития и дифференциации. Необычные олигосахаридные структуры на поверхности клеток могут быть инструментом в функциональных клеточных контактах и клеточных взаимоотношениях, что обеспечивает инвазивные и инфильтрационные свойства опухолевых клеток. Изменения в олигосахаридных структурах поверхности клеток могут влиять на функции таких мембранных белков, как рецепторы факторов роста и мембранные ферменты. Изменения в олигосахаридных структурах могут влиять на конформации

мембранных белков, скорость их метаболизма и антигенность белков.

Примеры изменений олигосахаридных структур в гликопротеинах трансформированных клеток. Один из наиболее широко известных феноменов, коррелирующих с опухолевым ростом,— появление или увеличение фукозосодержащих гликопептидов с высокой молекулярной массой. Проведено сравнительное изучение фибробластов мыши и их вирусных трансформантов. Фибробласты мышей линии 3Т3 и их вирусные трансформанты (SV-3Т3) мечены радиоактивным глюкозамином. Исследованы также в сравнении образцы меченых гликопептидов, полученных после исчерпывающего проназного гидролиза гликопротеинов поверхности нормальных клеток. Установлено, что трансформированные SV-3Т3 клетки богаче большими гликопептидами, чем нормальные клетки. Проведено аналогичное сравнение клеток хомяка линии ВНК₂₁/С₁₃ и клеток, трансформированных ДНК вируса саркомы Rous и ДНК опухолевых вирусов, вируса полиомы и SV40. Проведен анализ мышинных клеток линии 3Т3 и фибробластов эмбрионов цыплят, трансформированных вирусом саркомы SV40. Во всех случаях число больших гликопептидов из гликопротеинов трансформированных клеток было увеличено (Накатогі, 1984).

Заметные различия наблюдались, когда использовалась радиоактивно меченная фукоза. Этот феномен был обнаружен не только в трансформированных вирусом клетках, но и в клетках, трансформированных химическим путем или спонтанно. Это явление наблюдалось на клетках гепатомы крыс, лейкемических клетках человека, лимфоидных клетках человека и нейробластомных клетках.

Обнаружено, что различия между гликопептидами трансформированных и нормальных клеток исчезают, если перед гельхроматографией гликопептидов их подвергнуть обработке нейрамидазой. Так возникла гипотеза о том, что ключевая стадия индуцированных структурных изменений в поверхностных олигосахаридных структурах при трансформации клеток — это сиалирование. Для проверки гипотезы в ряде лабораторий проведено сравнение сиалилтрансферазной активности в нормальных и трансформированных клетках. Оказалось, что в одних случаях уровень сиалилтрансферазы выше, а в других — ниже. Дальнейшие исследования показали, что олигосахаридные цепи гликопротеинов поверхности трансформированных клеток представляют собой сложные олигосахаридные цепи, содержащие во внешних цепях от 2 до 6 структурных единиц состава



Это свидетельствует, что стадия N-ацетилглюкозаминирования является ключом к структурным изменениям олигосахаридных цепей в гликопротеинах трансформированных клеток.

Изменения олигосахаридных структур гликопротеинов поверхности клеток наблюдаются при развитии клеток. Показано также, что большинство гликопротеинов, которые связываются с агглютинином земляного ореха, изменяются во время созревания лимфоцитов мышей и человека.

Исследования показали, что эмбриональные клетки карциномы содержат гликопептиды в составе гликопротеинов необычно высокой мол. массы. Эти исследования представляют особый интерес, так как клетки эмбриональной карциномы участвуют во многих биологических функциях с мультипотенциальными клетками нормальных эмбрионов на ранней стадии развития и большие гликопептидные фрагменты исчезают во время дифференциации клеток эмбриональной карциномы *in vitro*.

Изучены изменения олигосахаридных структур на поверхности эритроцитов при их дифференциации. Основные интегральные гликопротеины на поверхности эритроцитов — гликофорин А и белок полосы 3. Изучали поверхностные гликопротеины эритроцитов человека и клеток К-562 (лейкемические клетки человека, находящиеся в проэритробластной стадии). Найдено, что клетки К-562 содержат гликофорин А, но не содержат белок полосы 3. Кроме того, гликопротеин GP-105, который не обнаружен в эритроцитах человека, найден в клетках К-562. Результаты исследования олигосахаридных структур из плазматических мембран клеток К-562 и эритроцитов взрослых людей показали, что нейтральные олигосахариды из клеток К-562 являются высокоманнозным типом, в то время как на эритроцитах взрослых людей они представлены структурами сложного типа. Ни одна из олигосахаридных цепей клеток К-562 не содержала *bisect* N-ацетилглюкозамин, в то же время такие цепи были в большинстве кислых гликопептидов эритроцитов.

Антигенность и иммуногенность углеводных антигенов на клеточной поверхности определяются не только первичной структурой углеводного антигена, но и организацией олигосахаридных структур на поверхности мембраны. Даже если первичные структуры углеводных цепей не изменены, они могут быть иммуногенны и узнаются как антигенные, если организованы на клеточной поверхности особым способом. Доминантными факторами, влияющими на экспрессию антигенов, являются плотность и скрытость олигосахаридных цепей на клеточной поверхности в добавление к уникальной углеводной структуре.

Необычная структура и организация углеводов на клеточной поверхности, необычное узнавание клетки клеткой изменяют клеточную адгезию. Углеводы также могут регулировать антигенность мембранных белков, модулировать функции рецепторов и мембранных белков, поэтому проблемой недалекого будущего

должно стать познание генетического механизма, контролирующего транскрипцию гликозилтрансфераз и регуляцию их организации. Тесно связана с этим направлением другая проблема: как мембраны различных типов клеток преобращают свой характерный набор белков-гликопротеинов, с одной стороны служащих визитной карточкой данной мембраны (и клетки), с другой стороны — определяющих ее функциональные свойства.

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ УЗНАВАНИЯ В ИММУННЫХ ПРОЦЕССАХ

Полностью дифференцированные плазматические клетки считают прототипом клеток, функция которых — синтезирование и секретирование большого количества иммуноглобулинов. Каждая из этих клеток секретирует около 2000 молекул иммуноглобули-

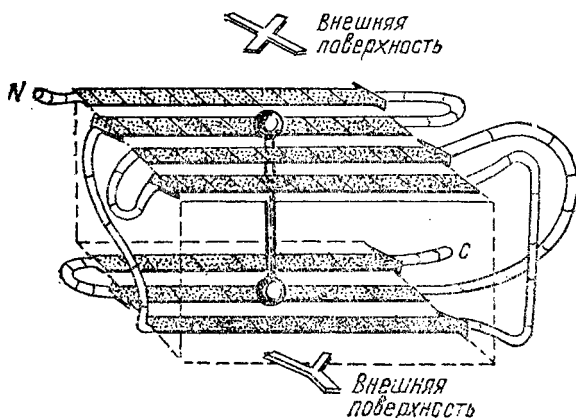


Рис. 10. Схематическое изображение структуры домена.

нов в 1 мин. 5—40% общего синтезированного белка и 75—90% белка, секретированного этими клетками, состоит из молекул антител. Иммунная система выполняет ограниченное число физиологических функций в ответ на почти бесконечное разнообразие внешних и внутренних стимулов. Это стало понятно лишь после установления структуры антител. Структура иммуноглобулинов обсуждается в литературе (Тернер и др., 1983), поэтому мы ограничимся лишь краткими сведениями по этому вопросу.

Иммуноглобулины построены из легких и тяжелых цепей, объединенных попарно. Легкие цепи имеют 2 домена, а тяжелые цепи в соответствии с тем классом, к которому они относятся, — 3, 4 или 5 доменов. Каждый домен состоит из 110—120 аминокислот, причем все домены обладают сходной структурой, которая сформирована двумя антипараллельными плоскостями β -типа

(рис. 10). Такая структура подобна ящику с двумя поверхностями (X — из 4 тяжёлых, Y — из 3), которые удерживаются гидрофобными связями изнутри и стабилизируются дисульфидным мостиком между поверхностями. Все домены в участках цепи, образующих складчатую поверхность, характеризуются выраженным единообразием, однако степень гомологичности резко уменьшается в участках, расположенных между изгибами β -структуры. N-концевые домены тяжёлых и лёгких цепей получили название вари-

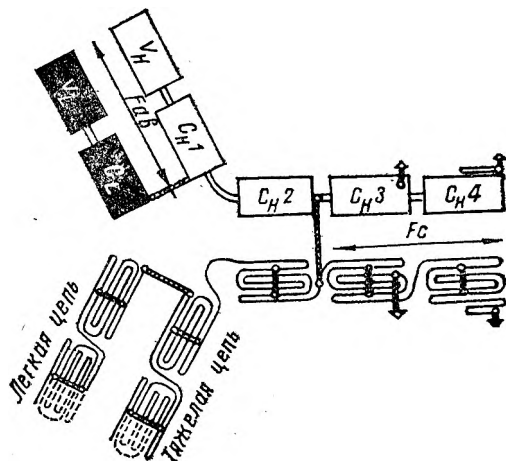


Рис. 11. Схематическое изображение одной из субъединиц IgM. Пунктиром в нижней половине показаны фрагменты V-доменов, характеризующиеся вариабельностью (Тернер, 1983).

бельных (V) участков. Они отличаются от константных (C) доменов наличием нескольких дополнительных аминокислот, локализованных в центральном участке.

Домены могут ассоциироваться в пары за счет нековалентных связей: ассоциация V-доменов происходит между Y-поверхностями, а C-доменов — между X-поверхностями. Тяжёлые и лёгкие цепи удерживаются вместе к тому же дисульфидными мостиками, соединяющими 2 цепи (рис. 11, 12, 13). В тех участках, которые определяют взаимодействие между соседними доменами, имеются боковые олигосахаридные цепи. Выделяют 5 классов сывороточных иммуноглобулинов — IgM, IgD, IgG, IgE, IgA. Они различаются по структуре тяжёлых цепей, которые соответственно обозначают греческими буквами: μ , δ , γ , α , ϵ . Внутри каждого класса могут существовать отдельные подклассы (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄ человека с тяжёлыми цепями γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4). Каждый из подклассов может содержать как κ , так и λ лёг-

кие цепи, причем содержание κ -цепей является характеристикой каждого подкласса. Каждому подклассу соответствует отдельный ген. Все гены, кодирующие образование С-участков тяжелых цепей, расположены единым комплексом; ассоциированные с ними гены V-участка сконцентрированы на одном конце комплекса. Обнаружены несколько типов генов, контролирующих V-участки тяжелых цепей: V_{H1} и V_{H11} . Гены, контролирующие синтез легких цепей, полностью разделены: гены V_λ и C_λ локализованы в одной группе сцепления, а гены V_κ и C_κ — в другой.

Два класса иммуноглобулинов — IgM и IgA — характеризуются наличием дополнительных 19 С-концевых аминокислот в пос-

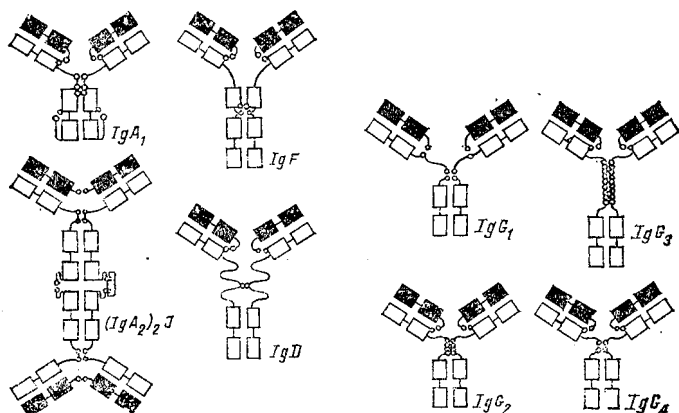


Рис. 12. Схематическое изображение доменов, стержневого участка и дисульфидных мостиков, соединяющих цепи между собой.

леднем C_H -домене. В присутствии пептида, вырабатываемого плазматическими клетками (так называемая I-цепь), они способны полимеризоваться: IgM и IgE содержат по 5 доменов. Остальные классы иммуноглобулинов человека имеют по 4 домена, из которых 2 концевых домена (V_H и C_H1) отделены от $COOH$ -концевых доменов последовательностью аминокислот. Эта последовательность называется шарнирным участком. Во всех классах иммуноглобулинов домены V_H и C_H1 ассоциируются попарно с соответствующими доменами легкой цепи (V_L и C_L), образуя участок Fab (фрагмент с активностью антител). Два $COOH$ -концевых домена тяжелой цепи получили название F_c участок.

Функции иммуноглобулинов. Иммуноглобулины обладают двумя основными типами функций: связывание антигена, которое осуществляется V-доменами, и многочисленные эффекторные функции контроля, выполняемые остальной частью молекулы. Полагают, что вся молекула иммуноглобулина сформировалась в процессе эволюции из одного исходного домена, затем домены

специализировались в различных направлениях и приобрели индивидуальные функции. Тем не менее, функция любого иммуноглобулина не определяется суммой функции отдельных его доменов. В этом отношении важную роль играет стержневой участок, который контролирует взаимодействие между Fab и Fc-участками молекулы.

Связывание антигена происходит в месте соединения доменов V_H и V_L . Конформация этого участка образована петлями NH_2 -

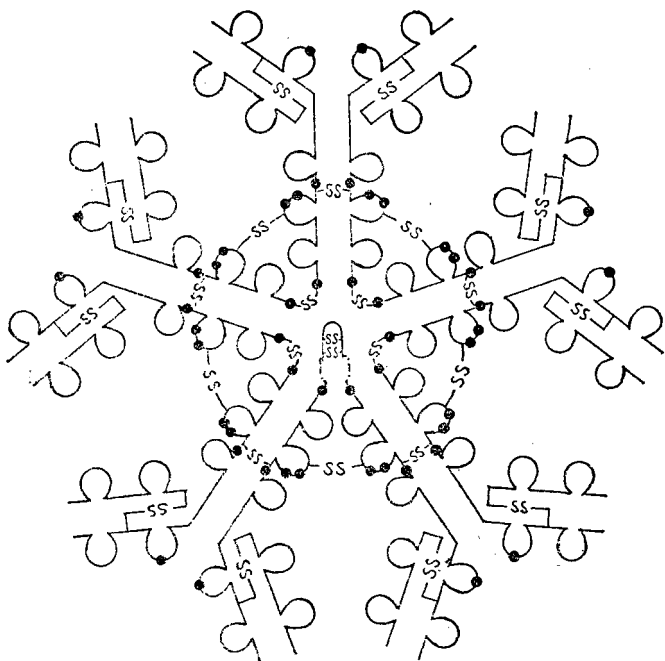


Рис. 13. Схема строения IgM человека. Показаны гомологичные области, углеводные цепи (·) (Тернер и др., 1983).

концевых участков доменов. Остальная часть V-домена обладает относительно постоянной структурой, но петли, окружающие место присоединения антигена, характеризуются гипервариабельностью.

Тот факт, что очень сходные молекулы иммуноглобулинов обладают как антитела таким широким спектром специфичностей, объясняется различиями в аминокислотных последовательностях переменных сегментов антигенсвязывающего центра (Fab). Аминокислотная последовательность белка определяет его трехмерную структуру. По отношению к молекулам антител это означает, что функциональное разнообразие аминокислотных последовательностей необходимо, чтобы обеспечить антитела набором различных антигенсвязывающих активных центров.

Показано, что в каждой V-области аминокислоты, обнаружи-

вающие наибольшую вариабельность, группируются в 3 или 4 коротких участка, обозначаемых как «гипервариабельные». Они играют определенную роль в контроле специфичности антител.

Гуморальный механизм иммунной защиты устраняет антигены разнообразными способами, их реализация зависит от появления активных центров на Fc участке молекулы антитела или от агрегации иммуноглобулина, вызванной связыванием антигена. Активные центры реализуют свое действие либо прямо, либо косвенно через систему комплемента и специализированные клетки, ответственные за процессы воспаления и удаления антигена.

Активированный Fc участок иммуноглобулина может связываться с рецепторами: тромбоцитов, вызывая освобождение нуклеотидов и аминов; нейтрофилов, в результате чего запускается фагоцитоз и высвобождаются цитолитические ферменты; эозинофилов, которые приобретают в результате связывания цитотоксические свойства; базофилов и тучных клеток, которые в результате дегранулируют; мононуклеарных фагоцитов, вызывая фагоцитоз или контактный лизис; К (киллеры)-клеток, вызывая антителозависимый клеточно опосредованный цитоллиз.

Активированный участок Fc иммуноглобулина может активировать комплемент, в результате чего реализуются: иммунное прилипание (нейтрофилы связываются с мембранами клеток, несущими активированный комплемент, происходит экзоцитоз гранул и фагоцитоз); хемотаксис — миграция лейкоцитов по направлению к компонентам комплемента, перешедшим в жидкую фазу; активность анафилотоксина — активированный комплемент, перешедший в жидкую фазу, вызывает дегрануляцию тучных клеток. Однако до сих пор остается открытым вопрос, какие группы и каким образом передают сигнал с Fab к Fc участку молекулы иммуноглобулина. Предполагают, что «шарнирный участок» обеспечивает передачу структурных изменений с Fab участков на Fc участки молекулы иммуноглобулина.

Структура шарнирного участка значительно варьирует в различных классах и подклассах иммуноглобулинов. Этот участок содержит один или больше остатков полуцистина, который принимает участие в межцепочечных дисульфидных связях. Шарнирный участок относительно богат пролином. Считается, что в молекулах IgG₃ и IgD шарнирный участок имеет значительную протяженность (до 15 полуцистиновых остатков в IgG₃). Особенности строения шарнирного участка в IgG₂ и IgG₄ обуславливают относительно малую подвижность Fab участков этих молекул, в результате чего эти участки остаются в таком положении, когда загораживают активный центр, связывающий Clq в C_H2 домене даже после присоединения антигена. Целая молекула IgG₄ не связывает Clq, а Fc участок IgG связывает Clq, что свидетельствует о наличии активного центра, замаскированного другими участками молекулы.

Активация системы комплемента. Комплемент — важная часть адаптивного иммунного ответа. Механизм, посредством которого реализуется взаимодействие его молекул с Fc участком антитела, называется классическим. Однако комплемент может взаимодействовать с антигенами и непосредственно (главным образом с бактериальными полисахаридами) путем активации всех своих биологических эффекторных механизмов по так называемому альтернативному пути.

Система комплемента представляет собой совокупность белков, которые последовательно взаимодействуют друг с другом, продуцируя молекулы с биологическим действием. Каждый из компонентов обладает важными свойствами.

Последовательная активация компонентов часто заканчивается расщеплением каждого последующего компонента предшествующим. Расщепление может способствовать появлению участков, связывающих другие белки комплемента, приводя к комплексации компонентов. Активированные компоненты могут обладать активными связывающими центрами для рецепторов мембран клеток, что обеспечивает переход этих компонентов из жидкой фазы на мембрану клеток. По существу, система комплемента представляет собой протеолитический каскад, в результате которого группы белковых молекул локализуются на мембранах клеток и выделяются низкомолекулярные продукты расщепления, обладающие биологической активностью.

Классический путь активации комплемента начинается со связывания C1 макромолекулы, состоящей из C1q, C1s и C1r, связанных воедино ионами кальция с двумя критически расположенными в пространстве активированными Fc участками. Для двух произвольно расположенных молекул IgG вероятность оказаться на таком критическом расстоянии мала (для активации одной молекулы C1 необходимо наличие $0,5 \times 10^6$ молекул на поверхности эритроцита). Молекула IgG — неэффективный активатор комплемента. В то же время Fc участки пентамерной молекулы IgM уже расположены в пространстве критически, одна молекула IgM может активировать одну молекулу C1.

После связывания с узнающим центром первого компонента комплемента C1q происходит активация C1. Затем обнажается активный участок, способный расщеплять C4 и C2 на 2 фрагмента. Комплекс C42 освобождается из C1 и связывается с клеточной мембраной, C1 освобождается для последующего расщепления C4 и C2, усиливая таким образом эффект. C4, в свою очередь, расщепляет C3 на 2 фрагмента: C3a, обладающий анафилактической и хемотоксической активностью, и C3b, к которому лейкоциты имеют иммунно-адгезивные рецепторы. C3b связан с клетками и несет ответственность за протеолитическое расщепление C5. C5a обладает аналогичным эффекторным действием на C3a, а C5b остается связанным с клеткой. C6 связывается с C5b, а компоненты C6 и C7 соединяются без расщепления, образуя литический комплекс, вызывающий очаговые ультраструктур-

ные повреждения мембраны клеток. Возникающий свободный жидкофазный комплекс C567 продуцирует хемотоксин.

C3 ответственен за возникновение нескольких эффекторных молекул комплемента. Именно на уровне компонента C3 может включаться альтернативный путь активации комплемента, а также образуется круг положительной обратной связи, в функционировании которой может участвовать компонент C423b.

Альтернативный путь активации. Молекулярный уровень альтернативного пути активации комплемента сложен и не до конца ясен. Альтернативный путь активирует терминальные компоненты классического пути, начиная с C3 до C9. Его можно активировать разнообразными веществами, в том числе бактериальными липополисахаридами. Альтернативный путь активации комплемента осуществляет немедленный механизм защиты от внедрения микроорганизмов, когда не требуется включение медленного процесса формирования антител, и, следовательно, представляет собой исключительно важный механизм защиты.

Альтернативный механизм активации комплемента — это последовательно замыкающаяся цепь обратной связи. C3b образует с фактором D в присутствии ионов магния и фактором В комплекс C3bB, который может быть стабилизирован добавлением пропердина (P). И C3bB и C3bBP способны активировать нативный C3 к образованию C3b, который, в свою очередь, соединяется с фактором В в присутствии ионов магния. C3bBP является C5 конвертазой. Цикл контролируется удалением C3b с помощью C3b ингибитора как путем прямого воздействия, так и после диссоциации комплексов C3bB и C3bBP под воздействием белка ингибитора. Таким образом, любой фактор, приводящий к образованию C3b, активирует цикл обратной связи.

Домены Fab и Fc участков IgG. C_γ1 домен каждого участка IgG сближен с C_L доменом и соединен с V_γ доменом пептидом. C_γ1 Fab человека имеет 2 доступных растворителю гидрофобных участка, один из которых расположен на наружной стороне домена, а другой — в пакете, образованном C_γ1 и V_γ доменами. Сравнительное исследование показало, что некоторые остатки первой гидрофобной области консервативны. Наличие консервативной области позволяет предположить, что C_γ1 домен участвует в выполнении определенных функций. C_L домен соединяется с доменом пептидом. Он имеет 2 доступных для растворителя гидрофобных участка, в которых не установлено наличие консервированных аминокислотных остатков. Нет данных относительно участия C_L домена в прямом связывании каких-либо функциональных молекул. Dorrington, Painter (1974) выдвинули гипотезу, что C_γ1 и C_L домены могут функционировать как спейсеры между антигенсвязывающей областью и Fc эффекторно функциональными областями IgG.

У некоторых иммуноглобулинов в Fab участке обнаружены олигосахаридные цепи (Spiegelberg et al., 1970). В 30% случаев

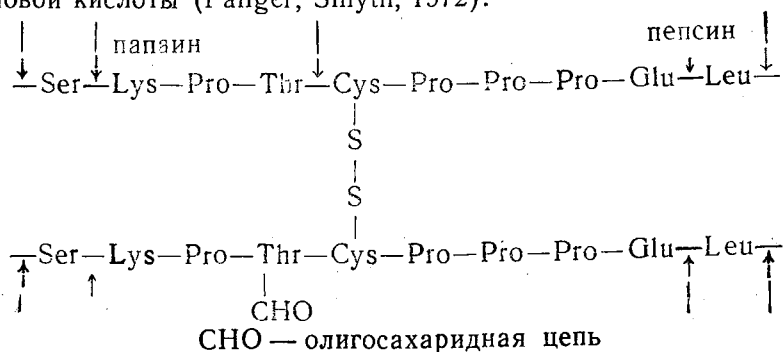
наблюдается гликозилирование Fab участка IgG миеломы. Пул человеческого IgG содержит более двух ($2,8 \pm 0,4$) олигосахаридных цепей на молекулу. Места гликозилирования полипептидных цепей Fab области неизвестны.

Образование комплексов IgG — анти IgG — важная в медицинском плане иммунная реакция. Обычно она происходит между F(ab)₂ фрагментом IgG и Fc фрагментом IgG антигена. Химические группы, участвующие в этой реакции, не установлены. Однако имеются доказательства, что в этом взаимодействии участвуют олигосахариды (сиаловые кислоты) легких цепей (Humes et al., 1979). У пациентов с ревматоидным артритом и болезнью Ходкинса из иммунных комплексов, седиментирующих при 7S—19S, выделен IgG, из которого получены F(ab)₂ фрагменты.

Изучение образования комплексов десиалированного IgG и его F(ab)₂ фрагментов показало, что десиалированный IgG и его F(ab)₂ фрагменты не образуют комплексов с нормальным IgG, в то время как сialiрованные IgG и F(ab)₂ образуют такие комплексы. В опытах по рекомбинации IgG из H и L цепей установлено, что L цепи ответственны за образование комплексов.

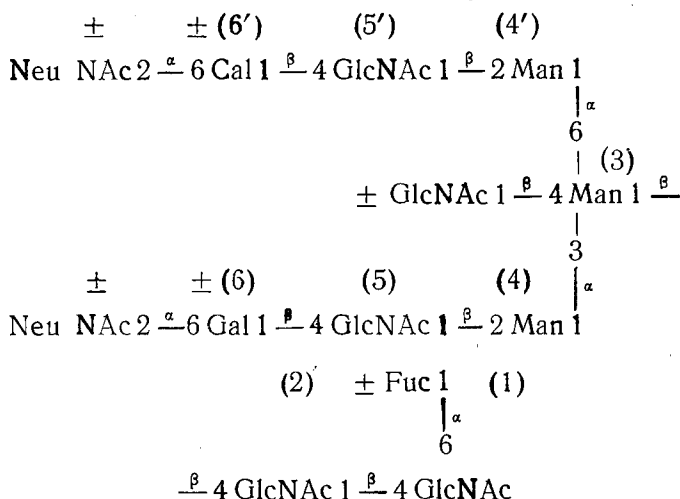
Шарнирный участок различается у изоформ IgG. В соответствии с представлениями некоторых авторов (Burton, 1985; Dorington, Klein, 1982), шарнирная область играет ключевую роль в формировании функциональных центров за счет создания стерических затруднений. Для детального выяснения этого вопроса наиболее важную информацию можно получить при изучении функциональных свойств изоформ, которые, имея различия в составе шарнирного участка, отличаются по своим эффекторным функциям, таким как фиксация и активация системы комплемента, взаимодействие с Т- и В-лимфоцитами, макрофагами, нейтрофилами, моноцитами.

Показано, что в 40% случаев γ -цепи IgG содержат углеводы, соединенные ковалентно с треонином 226 шарнирной области. Углеводы прикреплены только к одной γ -цепи IgG молекулы. Состав углеводов: один N-ацетилгалактозамин, образующий связь с треонином 226, одна галактоза, один или два остатка N-ацетилнейраминовой кислоты (Fanger, Smyth, 1972).



Центры, ответственные за большинство эффекторных функций, локализованы в Fc части IgG. Fc фрагмент — димер, образованный двумя COOH-концевыми половинами тяжелой цепи, состоит из 4 глобулярных доменов C_H2, C_H3. Кристаллическая структура Fc фрагмента IgG 1, полученного из пула сыворотки крови человека, изучена методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 0,4; 0,35 и 0,29 нм. Эти исследования позволили установить пространственную структуру молекулы и расположение олигосахаридных цепей, ковалентно присоединенных к аспарагину 297 C_γ2 домена. Рентгеноструктурный анализ позволяет рассматривать лишь статическую структуру молекулы в одной конформации.

Во всех IgG структурах имеются 2 олигосахаридные единицы, присоединенные к асп 297 каждого C_γ2 домена Fc участка.



Анализ моноклональных и миеломных антител показал, что каждый клон имеет гетерогенное распределение олигосахаридов (Mizuochi et al., 1982).

Две олигосахаридные цепи, одинаковые по коровой структуре, GlcNAc (1), GlcNAc (2), Man (3), Man (4) и Man (4'), принимающие конформацию, допускающую их близкое расположение относительно друг друга, осуществляют контакт C_γ2 доменов. Олигосахаридные цепи у аспарагина 297 закрывают часть контактной поверхности C_γ2 домена, экранируя гидрофобные участки.

Изучена динамическая структура IgG кролика и человека методом ¹H-ЯМР в растворе (Христофоров и др., 1986; Rosen et al., 1979), а также IgG и IgM человека методом спин-метки (Тимофеев и др., 1978). Установлено, что Fc IgG1 и IgG3 имеют одинаковую сегментальную подвижность, у них нет существенных различий в пространственной организации. Сравнительный анализ спектров при температурах 30—70° показал, что Fc-фрагмент

IgG3 имеет более термостабильную конформацию, чем Fc IgG1. При смещении pH в кислую область отмечена увеличенная внутримолекулярная подвижность Fc. Методом нейтронного спинного эха исследовано динамическое поведение молекулы анти D—IgG свиньи. Показано существование внутреннего движения исследуемой молекулы, что связано со случайным блуждающим движением вокруг связывающего с Fc частью шарнирного участка пептидной цепи (Alpert et al., 1982).

Fc C γ 2 домен имеет 4 экспонированных на поверхности гидрофобных участка: один в промежуточной с C γ 3 доменом поверхности (образует центр, связывающий белок A), один по направлению к NH₂ концу домена и еще два небольших участка. Существуют доказательства включения C γ 2 домена в формирование функциональных центров связывания с C1q и Fc клеточными рецепторами. Возможно, клиренс IgG также медиатируется C γ 2 доменом. Функция углеводов в C γ 2 домене у аспарагина 297 состоит в поддержании необычного расположения двух C γ 2 доменов, чтобы они служили критической связывающей единицей. Однако выводы об участии углеводов основаны на изучении структурных изменений в дегликозилированном IgG, а не на прямом рецепторном связывании с углеводами.

Домены C γ 3 расположены близко друг к другу. На них имеется по 4 экспонированных гидрофобных участка, один на внутренней стороне доменов, который не доступен для связывания с белком, один на наружной стороне доменов и два в эквивалентных положениях, близких к области C γ 2—C γ 3. В C γ 3 нет консервативных группировок, которые могли бы составить функциональный центр. С определенностью установлено лишь то, что белок A *Staphylococcus aureus* взаимодействует с C γ 3 доменом и, кроме того, взаимодействует ряд анти Fc моноклональных антител.

Одна из функций C γ 3 доменов — стабилизировать уникальное расположение C γ 2 доменов. Удаление C γ 3 доменов способствует экспонированию гидрофобных участков в C γ 2 доменах, разрушает их и тем самым дестабилизирует. Исследование структурных изменений в C γ 2 доменах после удаления C γ 3 доменов, несомненно, может дать информацию относительно участия C γ 3 доменов в функциях IgG и объяснить зависимость C γ 2 конформации от C γ 3 доменов.

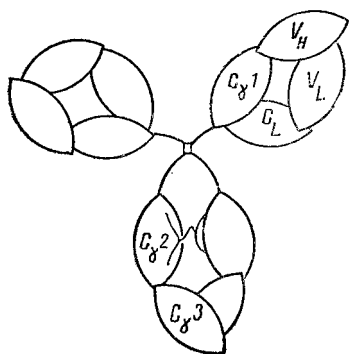


Рис. 14. Схематическое изображение доменной структуры IgG 1 человека. Fab участок молекулы связан с Fc областью шарнирным участком. C γ 2 домены, в отличие от других доменов, расположены близко друг к другу и имеют две разветвленные олигосахаридные цепи (Burton, 1985).

Однако имеются данные, что после удаления $C\gamma 3$ доменов от IgG (Fab кролика) функция связывания $C1q$ сохраняется. По мнению Burton (1985), связывание $C1q$ менее чувствительно к конформационным пертурбациям IgG по сравнению с Fc-рецепторным связыванием.

Другая важная функция доменов $C\gamma 3$, вероятно, сборка молекулы IgG. Две тяжелые цепи, как известно, контактируют друг с другом в трех местах: в области шарнира, в углеводных цепях $C\gamma 2$ (по крайней мере, показано для Fc кролика) и в области $C\gamma 3$ доменов (рис. 14).

Предполагают, что за исключением протяженной области шарнира в IgG3, наиболее обширные взаимодействия, которые образуются между $C\gamma 3$ доменами, являются движущей силой в димеризации тяжелых цепей IgG.

Молекулы, взаимодействующие с иммуноглобулинами. $C1q$ — катионный гликопротеин с мол. массой 410000—460000, циркулирующий в плазме, как субъединица $C1$ — первого компонента комплемента. $C1$ — кальцийзависимый макромолекулярный комплекс общей формулы $C1q C1r_2 C1s_2$. Функция $C1q$ внутри комплекса — узнавать и связывать полимерные структуры активированных молекул, таких как иммунные комплексы, бактерии, вирусы, и инициация классического комплементного пути устранения антигена.

В последние годы обнаружена другая функция $C1q$ — способность служить лигандом для рецепторов поверхности различных соматических клеток. Специфические рецепторы для $C1q$ найдены на лимфоцитах, нулевых клетках, моноцитах, полиморфноядерных лимфоцитах, фибробластах, некоторых линиях опухолевых клеток (Raji, Wil₂WT и U 937), на тромбоцитах.

По существующим представлениям (Porter, Reid, 1979; Reid, 1983), $C1q$ состоит из 18 полипептидов и представляет собой как бы «букет тюльпанов», в котором центральная связка — 6 стеблей, имеющих коллагеноподобную структуру, на концах стеблей 6 глобулярных головок, содержащих по одной олигосахаридной цепи, связанных N-гликозидной связью с аспарагином. Олигосахаридные цепи могут отличаться по концевым остаткам. На каждой глобулярной головке $C1q$ имеется по 2 гидрофобных центра (Alcolea, Anton, 1986) (рис. 15).

$C1r$ и $C1s$ расположены вблизи головок. Стебли каждой субъединицы имеют гибкий участок между ручкой и частью, принадлежащей центральной связке. Эта структура сохраняется начиная с таких филогенетически отдаленных видов, как лягушка.

$C1q$ из разных источников в основном перекрестно взаимодействуют с IgG разных видов животных. $C1q$ человека и крысы связываются с агрегатами IgG крысы и человека с одинаковым сродством. $C1q$ человека взаимодействует с IgG мыши, кролика, кошки, $C1q$ цыплят — с IgG человека, $C1q$ морской свинки — с IgG лягушки, $C1q$ лягушки — с IgG кролика.

Связывание C1q с IgG детально обсуждается в обзоре Burton (1985). Константа связывания C1q человека с нормальным IgG человека (пулом) в мономерном состоянии попадет в область $1-5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Приблизительно такое же значение найдено для связывания изолированных головок C1q с агрегатами IgG. Следовательно, единица взаимодействия между C1q головкой и Fc

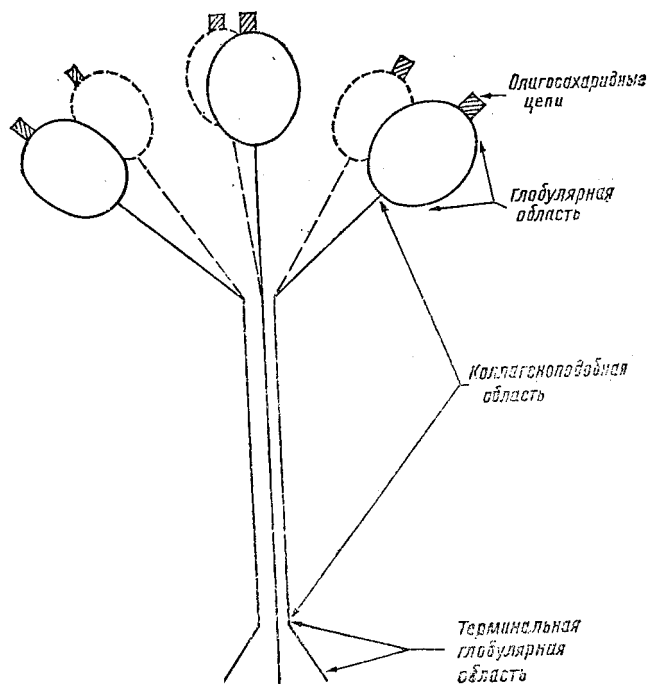


Рис. 15. Схематическая модель C1q (Mizuochi et al., 1978).

связывающим центром соответствует ΔG 5—6 ккал. Ультрацентрифугированием определены константы сродства подклассов мономерного IgG человека с C1q человека: IgG3 ($K=2,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$), IgG1 ($1,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$), IgG2 ($0,64 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$), IgG4 ($0,44 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$). Одна головка C1q связывается с 2 центрами на двух IgG.

При физиологических условиях только IgG1 в его мономерной форме может занимать связывающие центры C1q. Как было установлено, только 30% связывающих центров C1q занято мономерным IgG1 при физиологических условиях.

Константа связывания C1q в агрегированном состоянии с IgG увеличивается. Приводим данные Burton (1985).

<i>IgG</i>	<i>Clq</i>	Константа связывания (M^{-1})
<i>IgG</i> (чел.) мономер	<i>Clq</i> (чел.)	$1-5 \cdot 10^4$
<i>IgG</i> (крол.) агрегаты сшитые	<i>Clq</i> (чел.)	
димер		10^6
тример		10^7
тетрамер		$3 \cdot 10^9$
<i>IgG</i> (чел.) перекр. сшит. глут. альд.	<i>Clq</i> (чел.)	$0,6 \cdot 10^8$
<i>IgG</i> (чел.) агрегир. нагреванием	<i>Clq</i> (чел.)	$0,5 \cdot 10^8$
<i>IgG</i> комплекс <i>IgG</i> анти <i>IgG</i> (чел.)	<i>Clq</i> (чел.)	$0,3 \cdot 10^8$
<i>IgG</i> (крол.) в иммунном комплексе	<i>Clq</i> (чел.)	$0,2 \cdot 10^8$

Установлено, что связывание обратимо и чувствительно к ионной силе. При физиологических условиях резкое увеличение константы связывания означает, что *IgG* в комплексе даже при наномолярном уровне концентрации будет значительно связывать *Clq* (*Cl*). Показано, что *Clq* мультивалентен, он предпочтительнее связывается с областями наивысшей концентрации антител, т. е. с клеточной поверхностью. Причины увеличения сродства к *Clq* агрегированного *IgG* по сравнению с мономерным являются предметом дискуссий. Одни исследователи предполагают, что агрегация антигеном вызывает конформационные изменения в *IgG*, которые увеличивают сродство к *Clq* за счет образования комплементарных *Clq* центров; по мнению других, нет необходимости в таких конформационных изменениях, а мультивалентная природа *Clq* предполагает увеличение сродства при связывании с агрегатами *IgG*. Следует отметить, что сродство увеличивается при агрегации независимо от ее стимула: антигеном, нагреванием, химической сшивкой бифункциональным реагентом. *Clq* глобулярные головки связываются с таким же сродством, как интактный *Clq* связывается с мономерным *IqG*. Эти данные говорят против требования конформационных изменений при связывании с антигеном.

Локализация *Clq* связывающего центра на *IgG*. Включение *Fc* области *IgG* в связывание *Clq* показано ингибированием *Fc* фрагментами *Clq*—*IgG* взаимодействия. Константа связывания для *Fc*—*Clq* взаимодействия равна 10^4 — $10^5 M^{-1}$, что сравнимо с константой связывания для *Clq*—*IgG* взаимодействия. *Fc* фрагмент *IgG*4 человека (*Fc*4) связывает *Clq* с константой сродства $10^5 M^{-1}$, как *Fc IgG*1. В тех же условиях *IgG*4 при концентрации $10^5 M^{-1}$ не фиксирует *Clq*. *Fc* из *IgG*4, агрегированный на латексе, фиксирует комплекс с одинаковым сродством, как и *Fc* из *IgG*1. Эти данные свидетельствуют о существовании *Clq* связывающего центра на *Fc*4, но он, по крайней мере частично, скрыт стерическими препятствиями на *IgG*4, возможно, *Fab* участками.

Связывание *Clq* происходит на *Cy*2 домене, так как *Cy*2 домен связывает *Clq* со сродством, сравнимым с *Fc* фрагментом. Пептид лиз 274-гли 281, в котором треонин находится в положе-

нии 277, ингибирует связывание C1q с IgG. Однако рентгеноструктурный анализ показывает, что тре 277 не выходит на поверхность глобулы. Высказано предположение, что тре 277 может выходить на поверхность после взаимодействия IgG с антигеном. Однако нет доказательств существования такого рода конформационных изменений.

Показано, что взаимодействие C1q с IgG может ингибироваться различными молекулами благодаря присутствию на них заряженных групп (Burton, 1985): динитрофенилфосфат (при концентрации 10^{-3} М), полилизин (K_{50} 10^{-4} М), диаминобутан.

Предполагают, что три C1q связывающих центра располагаются на C γ 2 домене; первый включает остатки области лиз 290-гли 295 в IgG1 человека, второй — остатки гис 285-арг 292 в IgG1 человека, третий — остатки по крайней мере 2 антипараллельных β -тяжей C γ 2 домена. Эти области содержат заряженные остатки.

Кроме того, показано, что примерно 12 ионов переходят в раствор, когда C1q связывается с иммунным агрегатом (Burton, 1985). Вывод, что взаимодействие C1q с IgG на 50% носит электростатический характер и на 50% — неэлектростатический, содержится в работе Hughes-Jones et al. (1978). Присутствие заряженных групп на глобулярных головках C1q обсуждается в обзоре Reid (1983). Наличие двух гидрофобных центров на каждой из глобулярных головок C1q показано Alcolea, Anton (1986).

Анализ аминокислотных последовательностей в областях аминокислотных остатков 290—295, 282—292 подклассов IgG человека, мыши, морской свинки и кролика показал, что C1q связывающий центр IgG обладает либо видовой специфичностью, либо способен узнавать разнообразные структуры, т. е. обладает широкой специфичностью. В этих областях есть положительно заряженные и гидрофобные остатки.

Другой вариант связывания C1q с IgG — через олигосахаридные группировки, связанные с асп 297 на C γ 2 домене.

Существование гетерогенных олигосахаридных цепей в IgG может увеличивать функциональное разнообразие IgG молекул благодаря тому, что олигосахаридные цепи могут действовать как специфические лиганды для узнавания рецепторами.

Williams et al. (1973) определили, что при обработке гликозидазами от IgG кролика удаляется 60% углеводов. При этом у 3 из 4 препаратов дегликозилированного IgG не изменялись фиксация комплемента, опсонининовая и агглютинирующая активность. Один препарат полностью терял способность фиксировать комплемент и опсонининовую активность.

В опытах Koide et al. (1977) с обработкой гликозидазами удалено 84% углеводов от IgG кролика к бараньим эритроцитам, при этом не изменялась гемагглютинирующая активность, но значительно изменялись розеткообразование и фиксация комплемента.

Winkelhake et al. (1980) эндогликозидазой из яйцеводов кур

от IgG удалили все олигосахаридные группировки сложного типа с N-гликозидной связью. При этом наблюдалось полное отсутствие способности связывать C1q у модифицированного таким образом IgG. В этом опыте был использован фермент β -аспартил-N-ацетил-глюкозаминиламидогидролаза, описанная Tarantino, Maley (1969). Авторы показали, что этот фермент расщепляет связь асп-N-ацетилглюкозамин при условии, если у асп свободны аминокислотные карбоксильные группы. Поэтому непонятно, как мог этот фермент действовать на связь асп-N-ацетилглюкозамин в белке.

Leatherbarrow et al. (1985) исследовали дегликозилированный моноклональный анти-ДНФ-IgG2a, продуцируемый в присутствии туникаммина гибридомой K3 у мышей (BAL B/c x CBA) F₁. Константа связывания C1q увеличивалась приблизительно в 3 раза; небольшое различие наблюдалось при связывании C1 (30% по сравнению с 42% для нативного), отмечено снижение скорости активации C1q.

Факт активации C1q дегликозилированным IgG2a подтверждает, что олигосахариды играют не главную роль в связывании и активации комплемента.

Burton et al. (1980) установили, что моносахариды почти не изменяют взаимодействие IgG—C1q.

Bragado et al. (1982) провели химическую модификацию карбоксильных групп в Fc IgG человека и исследовали способность ингибировать фиксацию комплемента. Определено, что при модификации 13 остатков 6 из них находятся в C γ 2 домене, при этом происходит полная инактивация функции связывания комплемента. Однако модификация глутаминов 269 и глутамина 318 не изменяет функцию фиксации комплемента. Видимо, эти остатки не включаются в активацию комплемента. Потеря способности активировать комплемент связана с модификацией асп 249, глутамина 258, глутамина 293 и глутамина 333. По мнению авторов, за снижение способности активировать комплемент ответственно скорее аккумулятивное образование сетки отрицательных зарядов, а не модификация единственной группы.

Проведено изучение роли дисульфидных мостиков в связывании и активации комплемента (Burton, 1985). Мягкое восстановление IgG не отражается на взаимодействии C1q с моноклональным IgG. Восстановленный и алкилированный IgG человека незначительно связывал C1q. Мягкое восстановление IgG кролика устраняло его способность фиксировать комплемент при нахождении в иммунных агрегатах.

Таким образом, взаимодействие C1q и IgG обнаруживает межвидовую перекрестную реактивность с константой для C1q—мономер IgG взаимодействия порядка 10^4 M^{-1} . Агрегация IgG приводит к увеличению константы связывания до 10^8 M^{-1} . Это можно объяснить мультивалентной природой C1q, а не требованием индуцирования антигеном конформационных изменений. Во взаимодействии C1q—IgG важную роль играют заряженные группы.

В некоторых подклассах IgG домен, на котором происходит взаимодействие IgG с C1q—Cγ2, экранируется Fab участками. Восстановление дисульфидных мостиков внутри тяжелых цепей мономерного IgG кролика не влияет на связывание C1q. Точная локализация C1q связывающего центра пока неизвестна, предположительно это 2 области с относительно высокой плотностью заряженных групп. Одна из этих областей высококонсервативна, другая — нет. Точная локализация C1q связывающего центра требует кристаллографического изучения комплексов глобулярных головок C1q с Fc фрагментами с одновременным химическим модифицированием в сочетании с составлением пептидных карт.

Дегликозилирование IgG снимает его способность участвовать во взаимодействии с C1q. Однако из разрозненных экспериментов, проведенных разными авторами на разных объектах, нельзя сделать определенных выводов относительно участия углеводных групп. Необходимо систематическое изучение на IgG из одного источника, корректное удаление олигосахаридных группировок с одновременной регистрацией изменений в структуре IgG. Если углевод и участвует в связывании комплемента, то еще предстоит выяснить, каким образом это происходит: либо по типу реакции узнавания углеводов—лектиновые структуры, либо олигосахаридные группировки создают активный центр для связывания C1q посредством соответствующей ориентации определенных группировок, участвующих в этом взаимодействии. Udaка et al. (1986) предположили, что существует кооперация между парой доменов Cγ2 в образовании C1q связывающего центра. При этом глобулярная головка C1q связывается с парой Cγ2 доменов. Восстановление дисульфидных мостиков или удаление олигосахаридных групп у асп 297 в Cγ2 доменах нарушает четвертичную структуру C1q связывающего центра, образованного кооперацией пары доменов Cγ2.

Локализация центров связывания C1q на IgM. Молекулярная архитектура IgM и его Fc фрагмента мало изучены. Электронномикроскопические исследования (Feinstein et al., 1971) показали, что (Fc)₅ представляет собой диск диаметром приблизительно 100 Å. Восстановление и алкилирование приводит к диссоциации декамерной молекулы в Fc субъединицы, которые, в свою очередь, построены из 2 связанных дисульфидной связью полипептидных цепей, названных Cμ3 и Cμ4 доменами. (Fc)₅ состоит из 20 доменов, соединенных пептидными и поперечными дисульфидными связями.

В связывании комплемента IgM играет, вероятно, более важную роль, чем IgG, но о локализации этой функции в IgM известно очень мало. Это объясняется тем, что IgM имеет намного более сложную структуру и, кроме того, методы выделения Fc фрагментов IgM разработаны намного позже.

Исследование C1q фиксации IgM и отдельными его фрагментами и специфическими доменами показало, что Cμ4 домен со-

держит C1q фиксирующий центр, C μ 3 домен фиксирует комплемент очень слабо. Два C μ 4 фрагмента фиксируют комплемент много лучше, чем C μ 3, что свидетельствует о важности четвертичной структуры в связывании с комплементом (Bubb, Conradie, 1976, 1978). Приводим данные по C1q фиксации IgM и его фрагментами.

<i>Белок</i>	<i>Молекулы C1q, фиксированные $\cdot 10^6$ нмоль белка</i>
IgM	8721
Fc μ_5 (Fc μ) $_5$	1875
Fc μ	18,2
C μ 4	18,9
C μ 4 восст. и алкил-лир.	26,7
C μ 3	1,4
pFc*	0,9

* Фрагмент приготовлен гидролизом пепсином (Turner et al., 1970).

Из миеломного IgM было приготовлено 2 образца (Fc μ) $_5$ фрагментов. Обработкой IgM трипсином при 60° получен фрагмент, содержащий C μ 3 и C μ 4 домены, а также часть C μ 2 домена. Последующая обработка этого фрагмента растворимым или иммобилизованным папаином приводила к удалению фрагмента C μ 2 домена. (Fc μ) $_5$, полученный гидролизом трипсином, не фиксировал комплемент, в то время как после обработки его папаином он стал фиксировать комплемент в несколько раз лучше, чем исходный IgM. Ниже показана фиксация C1q IgM человека и его некомплексованными фрагментами (Feinstein et al., 1983).

<i>Исследуемый материал</i>	<i>Моль $\cdot 10^{11}$ (50% C1q фиксации)</i>	<i>Функциональная константа сродства* (K) M$^{-1}$</i>
IgM человека	45	$0,03 \times 10^8$
(Fc μ) $_5$ (трипсин)	50 (не фикс.)	$0,03 \times 10^8$
(Fc μ) $_5$ (папаин)	1	$1,5 \times 10^8$
Контроль		
IgG (агрегир. нагр.)	3	$0,5 \times 10^8$

*Эти значения рассчитаны при условии, что каждая молекула способна связывать C1q.

Обработка иммобилизованным папаином приводила к образованию олигомеров (Fc μ) $_5$. Присутствие значительных количеств олигомеров увеличивало способность фиксировать комплемент. Оба препарата (Fc μ) $_5$ связывали C1q с таким же сродством, как и исходный IgM. При анализе с использованием ^{125}I -C1q показано, что ни (Fc μ) $_5$, полученный гидролизом трипсином, ни (Fc μ) $_5$, по-

лученный гидролизом папаином, не активировали C1q лучше, чем исходный IgM.

Приводим функциональные константы сродства для связывания $^{125}\text{I-C1q}$ с IgM человека и его фрагментами (некомплексованными) (Feinstein et al., 1983).

Исследуемый материал	Кол-во белка, мг	K (M^{-1})
IgM человека	2,5	$6,0 \times 10^5$
	2,5	$5,0 \times 10^5$
(Fcm) ₅ (трипс.)	1,0	$3,0 \times 10^5$
	0,5	$3,0 \times 10^5$
(Fcm) ₅ (папаин)	1,0	$3,5 \times 10^5$
	0,5	$3,0 \times 10^5$

IgG имеет C1q связывающий центр на Cγ2 домене Fc участка и C1q связывается с ним с $K 5 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$. Это значение увеличивается в 1000 раз, когда C1q связывается двумя головками с двумя молекулами IgG. $K_{\text{сродства}}$, полученная для мономерного IgM в растворе, в 10 раз выше, чем для мономера IgG. Следовательно, на IgM один связывающий C1q центр предшествует и C1q связывается с ним прочнее, чем с IgG.

При связывании с антигеном значение $K_{\text{сродства}}$ возрастает в 100 раз, свидетельствуя о том, что другие связывающие C1q центры становятся доступными на молекуле IgM. Увеличение способности фиксировать C1q олигомеров (Fcm)₅ объясняется либо ассоциацией слабых связывающих центров, либо конформационными изменениями, при которых раскрываются другие связывающие центры.

Исследование C1q фиксации и литической активности холодových агглютининов человека (анти-1 IgM человека) и его (Fab)₂ и IgM_s показало, что в фиксации C1q IgM_s так же активен, как и пентамерный IgM, но в литической активности IgM намного менее эффективен. Авторы полагают, что на IgM_s отсутствует центр для связывания C1r—C1s.

Влияние антигена на связывание комплемента. Мышиная плазмоцитома МОРС 104Е секретирует IgM, который преципитирует декстраны, фиксирует комплемент, проявляет гаптенную специфичность и агглютинирует покрытые декстраном эритроциты. IgM плазмоцитомы специфичен к $(1 \rightarrow 3)\text{-D-}$ глюкозной единице (нигерозе и ее производным, слабое сродство имеет к D-глюкобиозе). Антигенсвязывающий центр специфичен к незаряженным гидрофильным лигандам.

IgM МОРС 104Е образует с декстраном комплексы в отношении 4:1 по массе, и эти комплексы эффективно связывают C1q и активируют C1. IgM, связанный с декстраном в отношении 0,005:1, связывает C1q менее эффективно. На 10 скомплексованных молекул IgM связывается 1 молекула, но константа связывания $3 \cdot 10^7 \text{M}^{-1}$. Такое же значение найдено для комплекса IgM—

декстран 4:1. Комплекс IgM—декстран с соотношением 0,05:1 не активирует комплемент.

Приводим данные по фиксации ^{125}I —C1q к комплексам IgM мыши/декстран (Feinstein et al., 1983).

<i>Исследуемый материал</i>	<i>Функциональная константа сродства $K(M^{-1})$</i>	<i>Центры* IgM связывания</i>
IgG мыши (не компл.)	$0,05 \times 10^7$	—
4 IgM/I декстран	$1,6 \times 10^7$	1:1
1 IgM/I декстран	$1,25 \times 10^7$	0,5:1
0,5 IgM/I декстран	$3,0 \times 10^7$	0,1:1

*Это значение представляет связывающие центры на IgM для C1q, опделенные анализом Скетчарда.

Структура этих комплексов изучалась с помощью электронной микроскопии. Установлено, что комплексы с соотношением 4:1 IgM—декстран содержат молекулы IgM, связанные с единственной частицей декстрана. Комплексы, образованные при низких весовых отношениях IgM—декстран, содержат в основном молекулы IgM, включенные в перекрестно связанные частицы декстрана.

Значение функциональной константы сродства к C1q для свободного IgM в растворе составляет $5 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$. Связывание C1q с IgM в комплексе с декстраном увеличивается в 30—60 раз.

В экспериментах с комплексами IgM—декстран в отношении 4:1, где имела место активация, IgM был в 100-кратном молярном избытке над C1q, следовательно, вероятность нахождения двух молекул C1q на одной молекуле IgM очень низка. Наиболее вероятно, что для активации достаточно одной молекулы C1q.

Отсутствие активации комплемента комплексами IgM—декстран 0,05:1, вероятно, объясняется тем, что нужен дополнительный на IgM центр связывания C1r—C1s, который в данном случае недоступен из-за перекрестных связей декстрана с IgM.

Исследовано связывание комплексов декстран IgM и декстран — (Fab)₂ фрагментов. IgM₂ в растворе не связывал C1q в большей степени, чем интактный IgM. Однако в экспериментах с ^{125}I —C1q C1q связывался с комплексом IgM—декстран, но не активировался. Эти данные согласуются с экспериментами по связыванию IgM—анти I, который фиксировал C1q, но не активировал его. Следовательно, на IgM должен быть центр, связывающий C1r—C1s.

Исследована роль дисульфидных мостиков в связывании C1q—IgM человека и мыши. Нековалентно связанный пентамер IgM, полученный в диссоциирующих условиях, образует комплексы с декстраном, подобно тем, которые образуют нативный мышинный IgM. Их свойства в отношении C1q связывания и C1 активации не изменяются относительно нативного IgM. Те же ре-

зультаты получены с пентамерным холодовым агглютинином IgM в отношении C1 фиксации. Нековалентно связанный IgM связывал эритроциты кролика так же эффективно, как нативный IgM. Однако при восстановлении межцепочечных мостиков в IgG человека и кролика происходила потеря способности фиксировать комплемент.

Siegal, Cathou (1980) показали, что антидансильные IgM антитела морской свинки эффективно активируют комплемент только в комбинации с большим высокополимеризованным антигеном, таким как дансилфиол. Другие небольшие дансильные производные неэффективны, даже если они образуют комплексы антиген—антитело. Этот вывод был подтвержден в работах Fewtrell et al. (1979) и Kurush et al. (1979).

При обработке свиного IgM пепсином при pH 4,6 и 37°C в течение 18 ч происходит постепенное удаление Fab «рук» и C_μ2 доменов; других изменений в структуре не обнаружено. Основными продуктами после такой обработки являются молекулы IgM с разным числом Fab «рук» и C_μ2 доменов. По мере снижения среднего числа «рук» на моль IgM постепенно снижается его способность агглютинировать клетки *Salmonella oranienburg* (mt-H). Фиксация комплемента комплексами такого модифицированного IgM быстро снижается и становится незначительной, когда среднее число «рук» достигает 4. Молекулы с 3 и 4 «руками» могут агглютинировать клетки *Salmonella oranienburg*, но комплексы таких молекул IgM не фиксируют комплемент. Комплексы IgM с 5 «руками» ведут себя аналогично молекулам IgM с 4 «руками». Комплексы IgM с 6 «руками» эффективны в фиксации комплемента. Таким образом, только мультивалентное связывание приводит к формированию C1q связывающих центров (Beale, Fazakerley, 1980).

Электронномикроскопические исследования показали, что молекула IgM может иметь структуру в виде скобки, когда ее Fab «руки» выходят из плоскости центрального диска и загибаются при связывании Fab с клетками *Salmonella oranienburg* (mt-H). Возможно, эта структура является критической для связывания комплемента. Для образования ее требуется, чтобы большинство Fab «рук» вышли из плоскости центрального диска. Все это может прямо привести к экспонированию центра связывания комплемента или инициировать конформационные изменения в (Fc)₂ части, что приводит к активации центра связывания комплемента.

Вероятно, структура «скобки» не может быть образована молекулой только с 4 «руками», или такая структура может быть образована, однако при 4 загнутых «руках» комплементсвязывающие центры не могут быть полностью экспонированы или не происходит соответствующих конформационных изменений для активации центров связывания. Электронномикроскопические исследования таких молекул IgM, у которых удалена часть Fab «рук», позволят выяснить эти вопросы.

Свойства фиксировать комплемент исследованы на гибридных IgM, специфичных к отрицательно заряженному мультивалентному арсенатному гаптену (арсенат — бычий сывороточный альбумин, арсенат — фико́л, арсенат — гемоцианин улитки). Заряженный антиген был выбран для того, чтобы обеспечить прочное связывание (K ассоциации антигена равна $3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Предполагалось, что прочное связывание должно вызвать конформационные изменения, необходимые для формирования C1q связывающего центра. Однако все исследованные гибридные антиарсенат-IgM обнаруживали минимальное связывание комплемента. IgM перекрестно реагировал с неродственными заряженными антигенами, такими как сукцинат и цитрат. Отсутствие структурного подобия среди этих лигандов показало, что их связывание с антиарсенат-IgM носит зарядный характер. Однако сильное электростатическое взаимодействие антигена с IgM не отражалось на фиксации комплемента. Был сделан вывод, что основной определяющий фактор в экспрессии эффекторной функции IgM — способность антигена подгоняться в соответствии с активным центром антитела и индуцировать конформационные изменения, результатом которых является формирование центра фиксации комплемента (Crossland, Koshland, 1983).

Итак, C1q фиксирующий центр определяется прежде всего первичной структурой домена $\text{C}_\mu 4$, далее он может быть модулирован изменениями в структурах высших порядков. Такие изменения могут быть индуцированы аллостерически или специальным перемещением функциональных группировок активного центра при связывании антигена с Fab участками молекулы IgM или возможным изменением в нативной конформации, вызванными денатурирующими агентами. Bubb, Conradie (1976) показали, что повышение температуры при выделении $(\text{Fc})_5$ индуцирует статические изменения в Fc части IgM, которые влияют на доступность C1q фиксирующего центра: полученный в присутствии 5M мочевины и затем инкубированный при разных температурах $(\text{Fc})_5$ фрагмент обнаруживал наибольшую фиксирующую активность при прогревании при 60°C .

Именно в Fc области IgM сосредоточена основная часть олигосахаридных группировок: олигосахарид $\text{C}_\mu 2$ в шарнире при асн 332, олигосахаридные группировки C_3 и C_4 в домене $\text{C}_\mu 3$ на асн 395 и асн 402 (Putnam et al., 1973). Сами олигосахаридные группировки отличаются по составу: 2 из них относятся к смешанному типу, а 2 последних состоят только из маннозы и глюкозамина, названы маннозобогатыми. Основная функция их состоит в поддержании нужной пространственной конфигурации молекулы IgM (Каверзнева и др., 1975). Маннозобогатые группировки нужны для придания гидрофильности IgM и удерживания его в растворе (Каверзнева и др., 1978).

Анализ дифференциальных спектров показал, что при отщеплении части олигосахаридных группировок хромофоры уходят с

поверхности молекулы, что может происходить при сближении доменов. Участие олигосахаридных группировок в связывании C1q и активации комплемента IgG показано рядом авторов (см. выше). Вполне вероятно, что изменения, происходящие при удалении углеводных групп, могут нарушить конформацию C1 связывающего центра IgM. Нами получены данные, свидетельствующие, что удаление олигосахаридных группировок от двух IgM, выделенных из сыворотки больных макроглобулинемией, снижает способность IgM фиксировать C1, а также связываться с C1q, имобилизованным на сефарозе 4В.

Константа связывания для C1q с мономером IgG порядка 10^4M^{-1} . При агрегации IgG происходит увеличение константы связывания до 10^8M^{-1} . Это объясняется мультивалентной природой этого взаимодействия и не связано с индуцированными антигеном конформационными изменениями в комплемент связывающем центре. В C1q—IgG взаимодействии существенную роль играют заряженные группы. Связывание C1q происходит на домене C γ 2. В некоторых классах IgG Fab участки молекулы пространственно затрудняют связывание C1q. Восстановление дисульфидных связей между тяжелыми цепями не отражается на связывании C1q. C1q связывающий центр находится в области большой плотности заряженных групп, одна из этих областей высоко консервативна.

Точная идентификация центра связывания C1q возможна при кристаллографическом изучении связывания глобулярных областей C1q с Fc областями IgG при одновременном пептидном картировании.

Относительно связывания C1q с IgM можно сделать следующие выводы. Центр связывания C1q лежит на C μ 3—C μ 4 доменах, хотя нет доказательств, что он не лежит на C μ 2 домене. На IgM предшествует один C1q связывающий центр, другие связывающие C1q центры формируются при связывании с антигеном. Простая стерическая модель не подходит для объяснения связывания C1q, поскольку нет доказательств, что удаление (Fab) $_2$ выявляет дополнительные связывающие центры и (Fc) $_5$ подвергается дальнейшим конформационным изменениям.

Предполагается, что связывание более чем одной IgM $_s$ субъединицы требуется, чтобы произошли конформационные изменения при образовании структуры, подобной скобке, которая видна под электронным микроскопом. Активная конформационно измененная форма, по-видимому, включает перераспределение активных группировок (Fc) $_5$ диска.

IgM $_s$, связанный с антигеном, имеет связывающий центр для C1q, но константа связывания значительно ниже, чем интактного IgM.

Тетрамер C1r—C1s нуждается в дополнительном центре связывания на IgM для активации. Этот центр недоступен, когда одна молекула IgM связана с 20 молекулами декстрана.

Участие олигосахаридных группировок в связывании IgM и

IgG с Clq не доказано, однако можно предположить, что они могут участвовать в узнавании Clq или формировать структуру комплемент—связывающего центра.

РЕЦЕПТОРЫ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК

Координация развития мультиклеточных систем или тканей происходит через обмен информацией между соседними клетками (клеточные контакты) и между клеточной поверхностью и окружающей жидкой фазой (гуморальные контакты). Жидкофазный контакт в основном включает узнавание и поглощение информационных молекул рецепторами и секрецию клеточных компонентов. Иммуноглобулины являются наиболее хорошо изученными представителями большого древнего семейства белков, включенных в процесс узнавания либо активно, как проводник (среда), со специфичностью узнавания (антиген—связывающие антитела), либо пассивно, как поверхностные структуры, которые являются узнаваемыми (антигены гистосовместимости). Кроме иммуноглобулинов, к этому семейству относятся β -макроглобулины, Thy-1 антигены, главный и минорный антигены гистосовместимости и рецепторы поверхности клеток.

Некоторые клетки обладают способностью связывать IgG или IgM, IgE, IgA либо в виде мономера, либо в виде агрегата. Связывание ингибируется Fc фрагментом. Поверхностные структуры клеток, которые связывают иммуноглобулины, названы Fc рецепторами. Этот термин введен Dorrington, Klein (1982), однако он не означает, что рецепторы разных типов клеток структурно родственны или один и тот же центр иммуноглобулина узнает разные типы клеток. Действительно, рецепторы разных типов клеток различаются в отношении IgG связывания по средству, антигенности и чувствительности к протеазам.

В результате связывания антигена на Fc участке IgG появляются активные центры, реализующие свое действие либо прямо, либо через систему комплемента или ряд клеток, участвующих в иммунном ответе. Сначала были обнаружены Fc рецепторы для IgG иммунофлуоресценцией с иммунными комплексами или агрегированными IgG, или образованием розеток с эритроцитами, покрытыми антителами. Позже были открыты Fc рецепторы IgM на Т-лимфоцитах в норме и при лейкемии, а также на В-лимфоцитах в норме.

С тех пор, как было показано, что Т-клеточные популяции, несущие рецепторы для Fc части IgM или IgG, оказывают противоположное влияние на дифференциацию В-клеток, индуцированных митогеном, в основном изучались рецепторы Т-лимфоцитов.

Разработаны условия количественного определения связывания IgG Fc рецепторами на макрофагах и лимфоцитах опухолевых клеток с помощью радиоактивной метки (Arend, Mannik, 1973;

Unkeless, Eisen, 1975; Segal, Hurwitz, 1977). Простой количественный метод определения Fc рецепторов из различных линий клеток разработан с применением агрегированных IgG, меченых флуоресцеином. Метод позволяет обнаружить $5 \cdot 10^{10}$ М связанных агрегированных IgG (Schreiber et al., 1978). Количественная оценка сродства и количества Fc рецепторов к IgG и количество их на клетку определены на лейкоцитах периферической крови, миндалинах, тимусе и селезенке человека с помощью тримеров, меченных ^{125}I —IgG. Высокая плотность рецепторов определена на полиморфноядерных лимфоцитах. Во всех клетках Fc рецепторы имели одинаковое сродство для тримера IgG ($K_{\text{асс}} 5 \cdot 10^7 \text{M}^{-1}$). Основная разница была в числе Fc рецепторов на клетках (Alexander et al., 1979).

Идентифицированы Fc специфические к IgA связывающие центры на мышиных лимфоидных клетках. Связывание этими рецепторами обнаружено как и на Т-, так и на В-клеточных популяциях. Показано, что рецепторы IgG отличаются от рецепторов IgA. Полагают, что найденные на лимфоидных клетках рецепторы Fc играют важную роль в регуляции класс-специфического биосинтеза иммуноглобулинов (Strober et al., 1978).

Рецептор для Fc IgM на Т-лимфоцитах имеет сродство как к мономерному, так и к пентамерному IgM. Обычно эти рецепторы не обнаруживаются на только что выделенных свежих клетках, а выявляются на клетках, которые культивировались в течение ночи в среде, свободной от IgM. Исследовали экспрессию IgM и IgG рецепторов, локализованных на поверхности разных Т-клеток (популяции Т_М-несущих рецепторов IgM и популяции Т_Г-несущих рецепторов IgG). Fc рецептор к IgM чувствителен к проназе и трипсину. Рецепторы легко удалялись с поверхности клеток после обработки проназой. Повторное появление их на клеточной поверхности прослежено *in vitro*. Fc рецепторы обнаруживались на клетках через 2 ч, ресинтез полностью заканчивался через 6 ч. Fc рецепторы IgG обнаруживались через 4—6 ч, ресинтез их заканчивался через 12 ч.

При культивировании клеток в присутствии ингибитора белкового синтеза — циклогексимида Fc рецепторы IgM полностью исчезали в течение 6 ч. Fc рецепторы IgG еще обнаруживались в это время. Таким образом, ингибирование белкового синтеза влияло на рецепторы, имеющие большую скорость катаболизма. Большая скорость обмена Fc рецепторов IgM, по-видимому, имеет физиологическое значение. Согласно одной из гипотез, Fc рецептор играет синергическую роль с антиген-специфическим рецептором на Т_М-клетках после связывания антигена с IgM на В-клетках. Так как Fc рецепторы IgM на покоящихся Т-клетках обычно блокированы сывороточным IgM, их быстрый оборот может обеспечивать продолжительно свободные рецепторы для связывания цитофильного IgM разных специфичностей (Mingari et al., 1978). В смысле содержания Fc рецепторов популяция Т-клеток гетеро-

гена, т. е. часть Т-клеток содержит Fc рецепторы для IgM и IgG, часть не содержит. Т-клетки человека, содержащие на поверхности Fc рецепторы IgG (T-) или Fc рецепторы IgM (T-), после взаимодействия с иммунными комплексами IgG действуют как супрессорные клетки. Если Т-клетки не взаимодействуют с иммунными комплексами, они не становятся супрессивными для стадии терминальной дифференциации В-клеток.

В отсутствие антигена Fc рецепторы IgG располагаются на В-лимфоцитах случайным образом. Появление антигена в системе оказывает поразительный эффект. Расположенные на поверхности В-лимфоцитов Fc рецепторы вместе с агрегированным IgG или иммунным комплексом собираются на одной стороне В-клеток, образуя колпачки, которые при 37°C сливаются вместе с рецептором. Большая часть Т-клеток имеет либо Fc рецепторы IgM, либо Fc рецепторы IgG. Некоторые Т_H-клетки утрачивают свои рецепторы при 37° спонтанно. Большая часть Т-клеток утрачивает свои Fc рецепторы IgG после взаимодействия с иммунным комплексом. Некоторые Т_H-клетки приобретают Fc рецепторы IgM в культуре после взаимодействия с иммунным комплексом. В определенных условиях может происходить экспрессия как Fc рецепторов IgG, так и Fc рецепторов IgM. Взаимодействие Fc рецепторов IgG с иммунным комплексом может изменить общую экспрессию Fc рецепторов (Pichler et al., 1978).

Fc рецепторы к комплексам IgG с соответствующим антигеном (IgG разных видов животных, овальбумин, БСА, полисахарид пневмококков, β -макроглобулин) выделены из лизатов меченных ¹²⁵I лимфоцитов кроликов. Показано ЭФ в ПААГе в присутствии натрийдодецилсульфата, что Fc рецептор — молекула с массой 110000 (в невосстанавливающих условиях) и в восстанавливающих условиях — 120000. Fc рецепторы чувствительны к протеинолизу. Фрагменты протеинолиза с мол. массой 75000, 45000 и 20000 сохраняют свои свойства, аналогично Fc-рецепторам на лимфоцитах мышей. Высокий титр рецепторов найден на мембранах лимфоцитов инфицированных кроликов. Авторы предполагают, что они играют определенную роль в регуляции иммунного ответа (Sire et al., 1980).

Мономерный IgG миеломы МОРС21 мыши ингибирует образование розеток между мышинными лимфатическими клетками и мышинными эритроцитами, сенсibilизированными Fc, с константой связывания $3 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$. Используя мутантные белки, продуцируемые МОРС21, в которых отсутствует весь C γ 2 домен, Ramasamy et al. (1975) показали, что C γ 3 домен важен для связывания с рецепторами лимфоцитов. Возможно, C γ 3 домен включается прямо во взаимодействие с лимфоцитом, либо нарушается нативная, необходимая для связывания с лимфоцитами конформация C γ 2 домена при удалении домена.

Исследовано связывание гетерологичных IgG с мышинными Т-лимфоцитами. Мономер IgG кролика ингибирует розеткооб-

разование между мышинными Т-клетками и эритроцитами, сенсibilизированными IgG кролика с константой связывания 10^7M^{-1} . $K_{\text{асс}}$ для IgG человека с периферическими Т-лимфоцитами человека составляет 10^6M^{-1} . Показано также существование Fc-рецепторов на этих клетках с $K_{\text{асс}}$ 10^7M^{-1} , которые могут быть индуцированы контролируемой гипотонической обработкой Т-клеток человека (Saal et al., 1982).

Fc рецепторы моноцитов человека. В экспериментах по прямому связыванию и ингибированию связывания показано, что мономер IgG человека связывается с моноцитами периферической крови человека с $K_{\text{асс}}$ $5 \cdot 10^8 \text{M}^{-1}$ (37°C). Это соответствует приблизительно 20000—30000 рецепторным молекулам на 1 клетку. IgG3 имеет к моноцитам сродство, аналогичное IgG1; сродство IgG4 — приблизительно в 5—10 раз меньше, IgG2 — в 100 раз меньше; возможно, связывание обусловлено присутствием небольших количеств примесей других подклассов IgG.

В экспериментах по конкурентному ингибированию показано, что разные подклассы IgG связываются с одной и той же рецепторной молекулой моноцита. Связывание IgG с Fc рецепторами моноцита не увеличивается при агрегации IgG. Агрегированный нагреванием IgG связывается даже со слегка меньшим сродством, чем мономерный IgG. Перекрестное связывание молекул IgG слегка увеличивает сродство к Fc рецепторам моноцитов. При физиологических условиях в сыворотке мономерный IgG находится в концентрации 10^{-4}M , Fc рецепторы моноцитов в этих условиях насыщены мономерным IgG.

На моноцитах имеется 2 вида Fc рецепторов: один из них связывается с мономерным IgG, другой — с агрегированным IgG.

Относительно домена IgG, ответственного за взаимодействие с моноцитами, данные противоречивы. В основном они базируются на ингибировании Fc, pFc' или доменами C γ 3 связывания IgG с Fc рецепторами моноцитов. Ratcliffe, Stanworth (1982) показали, что пептид, соответствующий остаткам 407—416 из C γ 3 домена (Tyr—Ser—Lys—Leu—Thr—Val—Asp—Lys—Ser—Arg), в IgG1 человека ингибирует связывание IgG к моноциту в области микромолярных концентраций. Исследователи не обнаружили ингибирования этим пептидом связывания IgG с моноцитами. Из анализа кристаллической структуры IgG видно, что последовательность 407—416 экспонирована на поверхности молекулы IgG, и эти остатки идентичны во всех четырех подклассах IgG.

Относительно включения C γ 2 домена в связывание IgG с Fc-рецепторами моноцитов имеются только косвенные доказательства. Во-первых, эффективное связывание IgG1 и IgG3 человека и низкое сродство IgG2 и IgG4 к Fc рецепторам моноцитов указывают на участие C γ 2 домена в этом взаимодействии. Во-вторых, модификация C γ 2 домена в этом взаимодействии приводит к заметному снижению сродства к Fc рецепторам моноцитов. Дегликозилированный IgG2a, продуцируемый в присутствии туника-

мицина гибридомой K3 у мышей (BaLB/c×CBA)F₁, обнаруживает 50-кратное снижение сродства к Fc рецепторам моноцитов. Таким образом, отсутствие углеводов у асп 297 в Cγ2 доменах приводит к резким изменениям в сродстве к рецепторам моноцитов. Однако углеводы сами по себе не ингибируют взаимодействие IgG—Fc рецепторов моноцитов, следовательно, они не прямо включены в это взаимодействие, а вероятно, путем создания определенных структур.

Анализируя данные по связыванию IgG—C1q (Udaka et al., 1986), можно предположить, что происходит кооперация Cγ2 доменов IgG, при этом формируется C1q связывающий центр. Восстановление дисульфидных связей и удаление олигосахаридных группировок приводит к нарушению четвертичной структуры C1q связывающего центра и изменению взаимного расположения группировок, участвующих в связывании с C1q. Возможно, Fc рецепторный центр моноцита на IgG также формируется кооперацией Cγ2 доменов и олигосахаридные группировки создают необходимые конформации этого участка взаимодействия IgG с Fc-рецепторами моноцита.

Мышиный IgG2, как и IgG1 человека, имеет сродство к Fc-рецепторам моноцитов человека.

Изучено ингибирование взаимодействия IgG и моноцитов синтетическими пептидами, соответствующими остаткам 295—301 в Cγ2 домене (Gln—Tyr—Asn—Ser—Thr—Tyr—Arg) и 289—292 (Thr—Lys—Pro—Arg). Показано, что они слабо ингибируют взаимодействие IgG с Fc рецепторами моноцитов. Однако пептид, соответствующий остаткам 289—301, не ингибирует это взаимодействие (Ratcliffe, Stanworth, 1982).

Таким образом, моноциты человека связывают мономерный IgG1 и IgG2 человека с $K_{асс} 5 \cdot 10^8 M^{-1}$. Однако нет доказательств, что в этом взаимодействии участвует Cγ3 домен, есть только косвенные доказательства участия Cγ2 домена.

Fc рецепторы макрофагов. Связывание IgG с гомологичными и гетерологичными макрофагами и клеточными линиями макрофагов (в основном мышей) представлено в обзоре Unkellet et al. (1981). Среди Fc рецепторов макрофагов мышей существует несколько подклассов специфических мышиных макрофагов: один из них состоит из чувствительных к трипсину Fc рецепторов, связывающих мономерный и агрегированный IgG2 с высоким сродством (FcRI), второй — из резистентных к трипсину Fc рецепторов, связывающих IgG2b и IgG1 (FcRII), третий — из резистентных к трипсину Fc-рецепторов, связывающих агрегированный IgG3. Связывание мономерного IgG2a к FcRI характеризуется константой связывания $2 \cdot 10^7 M^{-1}$. Это связывание на порядок слабее связывания IgG1 и IgG3 человека к моноцитам человека. Мономерные IgG2b и IgG1 слабо связываются с мышиными макрофагами (константа связывания порядка $5 \cdot 10^5 M^{-1}$), мономерный IgG2a связывается с мышиными макрофагами с таким же срод-

ством и с тем же центром связывания (преимущественно FcRII). IgG1 связывается с FcRII со сродством $5 \cdot 10^6 - 10^7 \text{M}^{-1}$. Данные относительно специфичности выделенных рецепторных препаратов к подклассам IgG противоречивы. Одно из наиболее интересных сообщений состоит в том, что выделенный IgG2b Fc рецептор макрофага, который не связывает IgG2a, обладает активностью фосфолипазы A_2 . В препарате выделенного Fc-рецептора IgG2a, который не связывает IgG2b, такая активность не обнаружена.

Отмечена перекрестная реактивность Fc рецепторов макрофагов мышей. Мономерный IgG1 человека конкурирует с мышиными IgG2a и IgG2b за Fc рецепторы макрофагов мышей. Эта конкуренция с IgG2a менее эффективна. Тример IgG кролика конкурирует с мономерными IgG1 и IgG2a и IgG2b с K_{50} 1 мкМ и связывается с чувствительным и резистентным к трипсину рецепторами макрофагов мышей.

Относительно связывания фрагментов IgG показано, что сродство к Fc рецептору Fc фрагмента IgG2a по сравнению со сродством IgG2a пятикратно снижено. Мономерные IgG1 и IgG2b ингибируют связывание меченых мономерных белков более эффективно, чем соответствующие их Fc фрагменты. Nose, Wigzell (1983) показали, что дегликозилированный IgG2 не связывается с мышиными макрофагами. Это согласуется с данными Leatherbarrow et al. (1985), которые показали, что дегликозилированный IgG2b не связывается с моноцитами.

Fc рецепторы иммуноглобулинов найдены на макрофагах морской свинки. Изучены связывающие свойства, стабилизация и чувствительность к энзиматической обработке Fc рецепторов на макрофагах морской свинки. Число молекул антител в комплексах, связанных с макрофагом, определенное методом Скетчарда в условиях насыщения макрофагов иммунными комплексами, составляет $6,5 \cdot 10^5$ на 1 клетку (Yagawa et al., 1979).

На макрофагах морской свинки обнаружено существование 2 типов рецепторов: один из них связывает только IgG2, другой — IgG1 и IgG2. Мономерный IgG1 имеет константу связывания с Fc рецептором макрофага при 20°C $6 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$, мономерный IgG2 связывается с Fc рецептором макрофага к IgG1 с меньшим сродством, чем сам IgG1. Агрегация IgG2 и IgG1 приводит к увеличению сродства к рецептору макрофага до значения $10^8 - 10^9 \text{M}^{-1}$. Относительно домена, участвующего во взаимодействии с макрофагом, данные противоречивы. Мягкое восстановление и алкилирование Fc фрагмента IgG2 приводит к 10-кратному снижению сродства.

Ингибированием связывания ^{125}I -меченых растворимых иммунных комплексов к макрофагам морской свинки определена рецепторная активность в 20000 г супернатантной фракции, полученной разрушением макрофагов ультразвуком. Обработка супернатантной фракции 20000 г или интактных клеток детергентом Nonidet P-40 солюбилизировала Fc рецепторы. В присутствии детергента

эти рецепторы существуют как молекулы с радиусом Стокса большим, чем у IgG, они агрегируют после удаления детергента. При обработке фосфолипазой С ультразвуковых лизатов макрофагов показано, что рецепторная активность фрагментов клеток, преципитирующих при 100000 g, исчезает. Однако это не связано с их снятием с фрагментов клеток. В экспериментах с использованием меченых макрофагов показано, что после обработки фосфолипазой С, когда разрушается Fc-рецепторная активность, инактивированные фосфолипазой С клеточные фрагменты после обработки детергентом Nonidet P-40 обнаруживают связывание растворимых Fc рецепторов с нерастворимыми иммунными комплексами. Авторы делают вывод, что структура Fc рецепторного центра макрофага формируется с участием фосфолипида (Yagawa et al., 1979).

Результаты исследований связывания гетерологичных IgG к макрофагам морской свинки показали, что Facb кролика ингибирует взаимодействие эритроцитов, сенсibilизированных IgG кролика, с макрофагами легких морской свинки так же эффективно, как и IgG кролика (K_{50} 0,5 мкМ); pFc' кролика неэффективен при концентрации 30 мкМ (Ovary et al., 1976).

Исследована специфичность подклассов IgG в отношении связывания с Fc рецепторами альвеолярных макрофагов крыс (Boltz-Nitulescu et al., 1981). Определено, что резистентный к трипсину Fc рецептор связывает IgG2a крыс, но не связывает другие подклассы IgG крыс. Константа сродства для IgG2a крыс составляет 10^6M^{-1} . Гетерологичные IgG (IgG1, 3 и 4 человека, IgG1 и IgG2a мыши, IgG кролика) связываются с Fc рецепторами для IgG1/2b крыс, но не связываются с Fc рецепторами для IgG2a. Не обнаружено связывания IgG2c крыс с Fc рецепторами макрофагов. Этот же подкласс не активирует комплемент.

На мышинных, перитонеальных макрофагах найдены Fc-рецепторы двух видов: один из них взаимодействует с цитофильным мономерным IgG человека, другой узнает агрегированный нагреванием IgG человека, а также скомплексованный антигеном IgG.

IgG связывающие центры этих клеток играют важную биологическую роль в осуществлении разных функций, таких как иммунный фагоцитоз и пиноцитоз, экзоцитоз лизосомальных ферментов и монокинов и катаболизм IgG молекул.

Fc рецепторы перитонеальных макрофагов мышей, связывающие цитофильные молекулы, медленно движутся по поверхности клеточной мембраны и образуют области неправильной формы, а не колпачки, в то время как опсонинотипный тип Fc рецепторов быстро движется, образуя колпачки (Sulica et al., 1979). Мономерный IgG, связанный с Fc рецептором перитонеального макрофага, более стабилен ($T_{1/2}$ 285 мин), чем агрегированные нагреванием или взаимодействием с антигеном IgG, которые исчезают с мембраны макрофагов очень быстро ($T_{1/2}$ 12 и 13 мин соответственно). Исчезновение всех трех IgG с мембраны макрофага зависит от

температуры. Эндоцитоз и внутриклеточная деградация проходят медленнее в случае мономерного IgG.

$K_{асс}$ при 22°C для связывания мономерного IgG кролика с перитонеальными макрофагами кролика составляет $6 \cdot 10^5 M^{-1}$. Это значение близко к $K_{асс}$ связывания IgG2b и IgG1 мыши с мышинными макрофагами и к $K_{асс}$ IgG2 морской свинки с макрофагами морской свинки, однако это связывание на 3 порядка ниже, чем связывание IgG1 и IgG3 человека с моноцитами человека и связывание IgG кролика с моноцитами человека (Woof et al., 1984). Нет доказательств включения C γ 2 и C γ 3 доменов IgG в связывание с IgG макрофагов кролика. Восстановление и алкилирование IgG не влияет на связывание с макрофагами.

Fc рецепторы полиморфноядерных лейкоцитов человека. По данным ингибирования, $K_{асс}$ мономерного IgG человека с полиморфноядерными лейкоцитами человека равно $10^6 M^{-1}$. $K_{асс}$ при 4°C для ковалентно связанного димера IgG1 с Fc рецепторами полиморфноядерных лейкоцитов равняется $5 \cdot 10^6 M^{-1}$, а для олигомерного IgG1 — $18 \cdot 10^6 M^{-1}$, т. е. связывание такое же, как IgG1 с моноцитами человека ($3-9 \cdot 10^8 M^{-1}$ для мономера и $30 \cdot 10^8$ для димера и олигомера). Таким образом, связывание IgG1 с Fc-рецепторами полиморфноядерных лейкоцитов на три порядка ниже, чем с рецепторами моноцита. Как и в случае моноцитов, связывание IgG1 и IgG2 с Fc-рецепторами полиморфноядерных лейкоцитов более прочно, чем с IgG2 и IgG4.

Ряд работ посвящен различиям между Fc рецепторами полиморфноядерных лейкоцитов и моноцитов. Выделены 2 вида моноклональных антител к Fc рецепторам полиморфноядерных лейкоцитов. Эти антитела не взаимодействовали с Fc рецепторами моноцитов и клеточных линий HL/-60 или V937 (Pleit et al., 1982). Бараньи эритроциты, сенсibilизированные Fасb кролика, образуют розетки с моноцитами человека, но не образуют розеток с полиморфноядерными лейкоцитами. Фрагмент В белка A Staphylococcus aureus не ингибирует взаимодействие бараньих эритроцитов, сенсibilизированных IgG кролика, с моноцитами человека, но ингибирует взаимодействие бараньих эритроцитов, сенсibilизированных IgG кролика, с полиморфноядерными лейкоцитами человека.

Высказана гипотеза, что центр связывания IgG с рецепторами полиморфноядерных лейкоцитов близок или даже перекрывается с центром связывания белка A Staphylococcus aureus, в то время как центр связывания IgG с рецепторами моноцитов удален от места связывания белка A Staphylococcus aureus.

Ни pFc' фрагмент IgG человека, ни C γ 2 домен в концентрации 10 мкМ, Fасb кролика в концентрации 1 мкМ не ингибируют взаимодействие IgG человека с полиморфноядерными лейкоцитами. Cosio et al. (1982) показали существование двух популяций Fc рецепторов на полиморфноядерных лейкоцитах, отличающихся по чувствительности к обработке проназой. Относительно участия

C γ 2 и C γ 3 доменов IgG в связывании с Fc рецепторами полиморфноядерных лейкоцитов данных мало.

Foster et al. (1978) исследовали структурные требования Fc, необходимые для взаимодействия с фагоцитирующими клетками. Изучена способность разных фрагментов IgG1 миеломы человека ингибировать образование розеток между эритроцитами человека, сенсibilизированными анти-D-IgG и полиморфноядерными лейкоцитами. Хотя IgG и Fc обнаруживали зависимое от дозы ингибирование образования розеток при эквимолекулярных концентрациях, фрагменты, соответствующие C γ 2 и C γ 3, полученным трипсинолизом, не ингибировали образование розеток. Фрагменты, полученные расщеплением пепсином Fc, pFc', которые представляли полный домен C γ 3, не ингибировали образование розеток. Восстановление и алкилирование IgG или Fc значительно снижало цитофильную активность. По-видимому, центр связывания с гранулоцитами на IgG1 человека зависит от целостности четвертичной структуры Fc.

Fc рецепторы тромбоцитов человека. $K_{асс}$ для мономера IgG человека, измеренная в экспериментах по ингибированию димером IgG1 взаимодействия IgG мономера с Fc рецепторами тромбоцитов, равна $4 \cdot 10^6 M^{-1}$; $K_{асс}$ димера IgG1 человека с Fc рецепторами тромбоцитов равна $2 \cdot 10^7 M^{-1}$, а для соответствующего олигомера — $9 \cdot 10^7 M^{-1}$. Число рецепторных центров составляет 400—2000 на тромбоцит. Константа связывания в ряду мономеров миеломного IgG уменьшается в следующем порядке $IgG3 \approx IgG1 > IgG2 > IgG4$.

Fc рецепторы адипоцитов. Получены данные, что IgG оказывает стимулирующее действие на липогенезис адипоцитов. Этот эффект медиатирован через Fc часть молекулы IgG. Эти данные указывают на присутствие Fc рецепторов IgG на адипоцитах (Knokher, Dandona, 1983). IgM оказывает на липогенезис влияние, аналогичное влиянию IgG (Kahn et al., 1977).

Присутствие IgG во всех жидких фазах организма наталкивает на мысль, что он может оказывать тонизирующее стимуляторное влияние на липогенезис. Этим путем IgG может модулировать влияние других гормонов, которые воздействуют на функции адипоцитов: инсулин, глюкагон, катехоламины и тиреоидстимулирующий гормон. Действительно, относительно тиреоидстимулирующего гормона существуют данные, показывающие, что IgG в норме оказывает сильное влияние на связывание тиреоидстимулирующего гормона к тиреоидным фолликулам и мембранам адипоцитов (Woods et al., 1982; Gill et al., 1980). Эти данные служат примером существования разных уровней регуляции одного и того же процесса в организме. Они открывают большую область исследования возможной роли нормального IgG в эндокринно-метаболической регуляции.

Fc рецепторы IgE на тучных клетках и базофилах. IgE — класс антител, важный в иммунном ответе к аллергенам и пара-

зитах. Тучные клетки и базофилы имеют на своей поверхности высокоспецифические для IgE рецепторы. После синтеза плазматическими клетками IgE связаны через свою Fc область с тучными клетками и базофилами. Последующее связывание антигена с Fab областью рецептора обуславливает способность клеток реализовать гистамин и другие медиаторы немедленной гиперчувствительности, вероятно, перекрестным связыванием соответствующих рецепторов.

В связи с тем, что изучение Fc рецепторов IgE на нормальных тучных клетках и базофилах затруднено небольшим числом этих клеток и трудностью выделения их в чистом виде, используют базофильные лейкоэмические клеточные линии крыс (RBL-1). RBL-1 клетки связывают $3 \cdot 10^5$ — $1,5 \cdot 10^6$ IgE молекул на клетку со сродством, близким к нормальным тучным клеткам крыс. Исследование кинетики связывания меченого ^{125}I —IgE крыс с RBL-1 клетками показало, что эта реакция обратимая бимолекулярная с $K_{\text{асс}} 6 \cdot 10^9 \text{M}^{-1}$.

Рецептор может быть солюбилизован с мембраны RBL-1 клеток неионным детергентом без потери рецепторной активности. Солюбилизованный материал содержит единственное меченое вещество, которое преципитирует с IgE и анти-IgE в иммунный комплекс. Рецептор очищен в 5000 раз. Показано, что он является гликопротеином (Kulczycki, Parker, 1979) с мол. массой 45000—50000 D (по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия). Kulczycki, Parker (1979) для изучения связывания Fc рецептора IgE использовали IgE-сефарозу CL4B. Оценка активности основывалась на различии в рецепторной миграции на IgE-сефарозе CL6B в присутствии и отсутствии растворимого IgE. Взаимодействие IgE — рецептор ингибировалось IgE крыс, но не ингибировалось IgE человека, IgG крыс. Высокоочищенный рецептор быстро инактивировался при 37°C, но был стабилен до месяца при 4°C.

На сефарозе 4B Fc рецептор IgE выходил двумя пиками с мол. массами 40000 и 170000. Оба пика связывались с IgE-сефарозой CL4B. После преникубации рецептора с растворимыми IgE появлялся новый пик с мол. массой 460000 D. По-видимому, очищенный рецептор существует в мономерной и мультимерных формах, все эти формы способны связывать IgE.

Pescoud et al. (1981) исследовали рецепторы тучных клеток крыс, базофилов лейкоэмических крыс и базофилов человека и показали, что Fc рецепторы IgE являются мембранными компонентами с мол. массой 45000—60000 (по данным электрофореза в полиакриламидном геле в додецилсульфате натрия). Fc рецепторы IgE являются гликопротеинами со специфичностью к лентил-лектину (Kulczycki et al., 1976; Helm et al., 1979).

Исследована роль олигосахаридных цепей Fc рецепторов базофилов крыс при лейкемии и тучных клеток крыс. Мембранные олигосахариды метили обработкой галактооксидазой с последую-

шим восстановлением ^3H -натрийборгидридом, затем рецепторы удаляли с мембраны обработкой детергентом. Анализ полученных фракций электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия показал присутствие галактозы во всех связывающих IgE компонентах базофилов. Предварительная обработка нейраминидазой заметно увеличивала включение ^3H в Fc рецепторы IgE. Предварительное насыщение клеток IgE не влияло на включение метки ^3H в олигосахариды, что говорит о

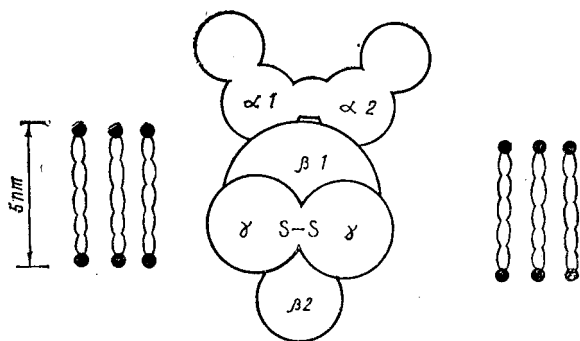


Рис. 16. Схематическая модель рецептора на тучных клетках, обладающего высоким сродством к IgE (Metzger et al., 1984).

расположении олигосахаридных цепей вне Fc рецепторного центра IgE.

Удаление терминальной сиаловой кислоты нейраминидазой *Vibrio Cholerae* увеличивало сродство рецептора IgE, но заметно не влияло на число рецепторных центров. При культивировании клеток в присутствии туникамицина обнаружено заметное ингибирование включения ^3H -гликозамина в рецептор. Лейкемические базофильные клетки крыс, растущие в среде в присутствии туникамицина, экспрессировали преимущественно рецепторы на поверхности клеток, что установлено изучением связывания лиганда и включения метки.

Таким образом, по-видимому, олигосахариды локализованы на рецепторе вне связывающего IgE центра. Возможно, они играют роль в транспорте рецептора к плазматической мембране или его последующей ориентации на мембране.

Механизм действия рецептора IgE изучен в реконструированной системе липосом. Metzger et al., (1984) предложена модель Fc рецептора IgE (рис. 16). Он имеет более сложную структуру, чем рецептор IgE, и состоит из 4 полипептидных цепей: α-, β- и 2γ-цепей. Цепи β- и γ экспонированы на внутренней поверхности мембраны, обращенной к цитоплазме.

Агрегация Fc рецептора IgE тучных клеток и близких к ним

неопластических клеток приводит к эндоцитозу внутриклеточных гранул, что сопровождается увеличением поглощения [$^{45}\text{Ca}^{2+}$], увеличением метилирования фосфолипидов, повышением уровня циклического АМФ и фосфокиназной активности. Кроме того, отмечено изменение в мембранном потенциале, что, видимо, является следствием открытия специфических ионных каналов (Sagi-Eisenberg, Pecht, 1983; Kanner, Metzger, 1983). Деполяризация прямо коррелирует с числом агрегированных рецепторов, присутствующих на клетках. Деполяризация индуцирует образование ионных каналов. Через эти каналы могут проходить ионы натрия, но этот процесс блокируется, когда Ca^{2+} присутствует в миллимолярных концентрациях.

Таким образом, на клетках человека и животных существуют Fc рецепторы иммуноглобулинов. Моноциты имеют высокое сродство к IgG1: $K_{\text{асс}} (37^\circ\text{C}) 5 \cdot 10^8 \text{M}^{-1}$, лимфоциты (Т- и В-) по сравнению с нейтрофилами и тромбоцитами связывают IgG1 значительно слабее — $K_{\text{асс}} 10^6 \text{M}^{-1}$.

Иммуноглобулин		Клетки	$K_{\text{асс}} (\text{M}^{-1})$
IgG человека	мономер	Моноциты человека	$3-9 \cdot 10^8$
	димер и олигомер		
IgG1 мыши, мономер		Макрофаги мыши	$3 \cdot 10^5$
IgG человека		Лимфоциты Т	10^6
IgG1 человека	димер	Полиморфоядерные лейкоциты человека	$5 \cdot 10^6$
	олигомер		$18 \cdot 10^6$
IgG1 мономер	димер	Тромбоциты	$2 \cdot 10^7$
	олигомер		$9 \cdot 10^7$
IgG мономер	димер	Нейтрофилы	$4 \cdot 10^7$
	олигомер		$2 \cdot 10^7$
			$40 \cdot 10^7$

Моноциты связывают агрегированный нагреванием или химическим ковалентным связыванием IgG1 несколько большим сродством по сравнению с мономерным IgG1. Нейтрофилы связывают агрегированный химическим ковалентным связыванием IgG1 со сродством в 20 раз большим, чем мономер IgG1. Аналогично лимфоциты связывают агрегированный IgG со значительно большим сродством, чем мономерный, и тромбоциты связывают агрегированный IgG со сродством в 5 раз большим мономерного.

Моноклональные антитела к Fc рецепторам — полезный инструмент исследования клеточных рецепторов. Fleit et al. (1982) показали, что моноклональные антитела 3G8 (Fab фрагмент) к Fc рецепторам нейтрофилов реагируют с популяцией Т-лимфоцитов, имеющих Fc рецепторы, но только 20% клеток В, содержащих Fc рецепторы, реагируют с этими антителами. Эти моноклональные антитела не реагируют с моноцитами. 15% моноцитов, куль-

тивированных в течение 7 дней, и 60% легочных макрофагов экспрессируют 3G8 антиген. Эти данные свидетельствуют о гетерогенности рецепторов В-клеток и различии между Т- и В-клетками, а также моноцитами и макрофагами.

Fc-рецепторы Т- и В-клеток чувствительны к проназе, в то же время на моноцитах и нейтрофилах они более резистентны. На моноцитах и нейтрофилах найдена популяция рецепторов, чувствительная к проназе. На моноцитах обнаружены разные рецепторы к мономерному и агрегированному IgG.

Однако есть и общие черты клеточных рецепторов. Все клетки обладают одинаковым сродством в отношении подклассов: $\text{IgG1}, \text{IgG3} > \text{IgG2}, \text{IgG4}$.

Мягкое восстановление и алкилирование приводят в основном к относительно небольшим изменениям (до 10-кратного снижения) в связывании мономерного IgG с разными типами клеток. Интересные данные выявлены при исследовании гомологичной и гетерологичной систем. Мономер IgG кролика связывается с Fc рецептором макрофага кролика с $K_{\text{асс}} 5 \cdot 10^8 \text{M}^{-1}$. Это значение сравнимо с $K_{\text{асс}}$ для IgG1 человека. Аналогично мономер IgG2a мыши связывается с мышинными макрофагами с $K_{\text{асс}} 2 \cdot 10^7 \text{M}^{-1}$, но с Fc рецепторами моноцитов человека связывается с $K_{\text{асс}} 5 \cdot 10^7 \text{M}^{-1}$. Следовательно, относительно слабое связывание в гомологичной системе является функцией не структуры IgG, а структуры клеточных рецепторов. Данные относительно участия $\text{C}\gamma 2$ и $\text{C}\gamma 3$ доменов IgG во взаимодействии с Fc рецепторами разных клеток противоречивы. Они базируются в основном на ингибировании образцами IgG, в которых исключен либо домен $\text{C}\gamma 2$, либо домен $\text{C}\gamma 3$, а также Fc фрагментами IgG также с исключенным $\text{C}\gamma 2$ или $\text{C}\gamma 3$ доменами.

Есть работы по связыванию дегликозилированного IgG с Fc рецепторами. Однако ни в одной из работ не установлена степень структурных изменений, которые происходят при дегликозилировании у асп 297 в $\text{C}\gamma 2$ домене. Неясно, как соотносится структура моноклональных IgG, продуцируемых в присутствии туникамина или без него, со структурой сывороточных IgG. В этом, нам кажется, заключается суть имеющихся противоречий.

Из имеющихся на настоящий день данных можно выдвинуть лишь гипотезы относительно участия $\text{C}\gamma 2$ и $\text{C}\gamma 3$ доменов.

1. Fc рецепторный центр IgG формируется с участием как $\text{C}\gamma 2$, так и $\text{C}\gamma 3$ доменов.

2. Олигосахариды у асп 297 участвуют в формировании рецепторного центра, создавая комплементарные рецепторам участки и экспонируя функционально активные необходимые для этого взаимодействия группировки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные выше данные свидетельствуют о том, что гликопротеины представляют собой весьма важный класс биополимеров, выполняющих разнообразные функции. Так, гликопротеины поверхности клеток играют важную роль в пиноцитозе, дифференциации клеток, генезисе опухолей, межклеточной регуляции и узнавании, адгезии, являются рецепторами гормонов, вирусов и медиаторами иммунологической специфичности. Секретируемые гликопротеины включают гормоны, иммуноглобулины, сывороточные факторы переноса. Широкое распространение гликопротеинов в тканях животных и консервированная структура углеводной части подтверждают их важность в неопределенных, но универсальных биологических процессах.

Основываясь на имеющемся в настоящее время экспериментальном материале, можно сформулировать некоторые выводы относительно функций олигосахаридных цепей гликопротеинов и наметить пути дальнейших исследований, направленных на решение практических задач.

Олигосахаридные группировки гликопротеинов выполняют 2 основные функции: структурирующую, или структуроподдерживающую, и функцию узнавания и связанную с ней функцию регуляции.

Согласно концепции Schauer (1982), несмотря на гетерогенный спектр биологического действия, нейраминовой кислоте, являющейся терминальным сахаром в олигосахаридных цепях гликопротеинов, можно приписать 4 основные функции: 1) снабжение гликопротеинов и гликоконъюгатов клеточных мембран отрицательным зарядом; 2) влияние на макромолекулярную структуру гликопротеинов; 3) перенос информации; 4) защита гликопротеинов, гликоконъюгатов и клеток от узнавания и последующей дегградации.

На наш взгляд, первые две функции относятся к формированию структуры гликопротеинов, в котором участвуют углеводы. Третья и четвертая функции относятся к процессам узнавания и связанным с ним процессам регуляции.

Основная, еще не решенная проблема состоит в том, чтобы объяснить удивительную избирательность механизма секреции.

Плазматические клетки относятся к типичным секреторным клеткам с хорошо развитым эндоплазматическим ретикулумом. Характерно, что такие клетки секретируют только иммуноглобулины и, тем не менее, иммуноглобулины составляют лишь 20—40% общего белка, образуемого плазматическими клетками. Возникает необходимость каким-то образом отделить иммуноглобулины, предназначенные для секреции, от тех белков, которые синтезируются для внутриклеточного использования.

Этот вопрос первоначально был решен для других секреторных клеток, таких, как клетки поджелудочной железы. Был установлен механизм общей клеточной секреции и выяснена функциональная роль эндоплазматического ретикулума. Как правило, секретируемые молекулы транслируются на полирибосомах, ассоциированных с эндоплазматическим ретикулумом. Еще в процессе синтеза полипептидные цепи вытесняются в цистерны эндоплазматического ретикулума (векторное выделение), откуда они попадают в окружающую среду через аппарат Гольджи. После получения таких данных на других клетках относительно легко было подтвердить, что аналогичные события происходят и при секреции иммуноглобулинов.

В серии тщательно проведенных экспериментов окончательно доказано, что синтез иммуноглобулинов происходит на полирибосомах, ассоциированных с эндоплазматическим ретикулумом. Продемонстрировано также векторное выделение пептидов иммуноглобулина в цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулума. Данные, полученные при фракционировании клеток, в совокупности с анализом углеводов, а также результаты электронномикроскопической радиоавтографии меченного по галактозе иммуноглобулина показали, что иммуноглобулин переходит из шероховатого эндоплазматического ретикулума в зону аппарата Гольджи. Предполагается, что иммуноглобулин связан с мембраной в течение всей своей внутриклеточной жизни.

При определении времени, необходимого для перехода иммуноглобулина от места синтеза во внутриклеточную среду, выяснилось, что они зависят от использованной миеломы. В среднем период полураспада составляет 90—150 мин. Однако одни молекулы находятся в клетке только 30 мин, другие остаются там в течение 2 ч и более. По-видимому, это обусловлено наличием большого смешанного пула иммуноглобулинов в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме. Поэтому трудно проследить путь иммуноглобулина от шероховатого эндоплазматического ретикулума к аппарату Гольджи, хотя эксперимент такого типа был осуществлен. По некоторым данным, молекула иммуноглобулина около двух третей своей внутриклеточной жизни находится внутри шероховатого эндоплазматического ретикулума, а остальное время — в аппарате Гольджи.

Во время прохождения молекулы иммуноглобулина через мембранные элементы клетки на определенных внутриклеточных уча-

стках к ней присоединяются углеводные остатки. Пока окончательно не доказано, что присоединение углевода необходимо для секреции иммуноглобулинов, но существование секретируемых легких цепей, лишенных углеводов, безусловно, служит аргументом против обязательного участия углеводов в секреции.

Опыты по включению в иммуноглобулины моносахаридов с радиоактивной меткой проводили на нормальных лимфоидных клетках кролика, миеломных клетках мыши и митогенстимулированных В-лимфоцитах. Скорость появления радиоактивного иммуноглобулина внутри и снаружи клетки (в присутствии или в отсутствие ингибитора белкового синтеза) показывает, что N-ацетилглюкозамин и манноза присоединяются к полипептидной цепи как сразу же после ее синтеза, так и позднее. Присоединение галактозы происходит позже, при прохождении молекулы через аппарат Гольджи. Сиаловая кислота и фукоза присоединяются непосредственно перед секрецией. В IgM галактоза соединяется с полипептидной цепью перед самым началом секреции.

Таким образом, получена информация относительно секреторных процессов и биосинтеза гликопротеинов. Необычен структурный состав антител, т. е. присутствие отдельно синтезированных, но впоследствии ковалентно связанных тяжелых и легких цепей, каждая из которых состоит из функционально и биохимически обособленных глобулярных областей (доменов) в 100—150 аминокислотных остатков протяженностью приблизительно 25 Å. С точки зрения количества свободной энергии такое ограничение величины домена является неожиданным, так как одна крупная глобула характеризуется значительно меньшим отношением площади поверхности к объему по сравнению с несколькими мелкими глобулами. В большой глобуле должно образовываться большое гидрофобное ядро и многочисленные внутренние водородные связи; то и другое энергетически выгодно. Возможно, ограничение величины домена необходимо для простоты процесса свертывания глобулы. Вероятно также, что создание крупных белковых молекул из субъединиц, состоящих из обособленных доменов, которые синтезируются и свертываются самостоятельно, необходимо для создания сложного полифункционального механизма.

В результате ассоциации контактные поверхности субъединиц оказываются скрытыми. Это может быть представлено как перенос поверхности из воды во внутреннюю часть белка. Параллельно происходит снижение энтропии системы, поскольку ассоциированные мономеры (олигомеры) характеризуются более высокой упорядоченностью, чем свободные. Основной движущей силой ассоциации служит энтропия.

$$\text{Свободная энергия } \Delta G_{\text{а.с.}}^{\text{рссч.}} = \Delta G_{\text{переноса}} - T\Delta S_{\text{а.соц.}}$$

Для неполярных поверхностей величины ΔG переноса пропорциональны площади поверхности, доступной воде. Для полярных она меньше, однако остается величиной того же порядка. Таким

образом, во всех случаях $\Delta G_{\text{переноса}}$ примерно пропорциональна общей скрытой поверхности. Во многих олигомерах абсолютная свободная энергия ассоциации менее значима, чем ее изменения при конформационных перестройках, вызванных присоединением лиганда или взаимодействием с другими молекулами. Удаление от воды контактных поверхностей дает наибольший выход свободной энергии, кроме того, важный вклад вносит энтропийный фактор. Абсолютная величина такого вклада зависит от комплементарности контактирующих поверхностей. Площадь контактной поверхности уменьшается, если имеется возможность доступа к ней воды. Прикрепление в определенных местах полипептидной цепи олигосахаридных группировок, которые придают молекуле гидрофильные свойства, т. е. доступность молекулам воды, возможно, является своеобразным регулятором размера контактирующих поверхностей. Когда это необходимо, размер контактирующих поверхностей увеличивается, в других случаях — уменьшается. Эти взаимодействия отличаются по специфичности связывания.

Существование доменной структуры гликопротеинов означает, что необходимы определенные механизмы сборки полипептидных цепей, мономеров и олигомеров. Существующие на сегодняшний день морфологические и биохимические методы позволяют изучить последовательность событий биосинтеза, сборки и секреции в деталях. Наиболее интригующим является вопрос, как и на какой стадии процессы биосинтеза иммуноглобулинов и других функционально активных гликопротеинов подвержены внешним регуляторным стимулам. Решение этого вопроса позволит сделать определенные практические выводы.

Продуцирование двух разных форм антител — мембранного и секреторного — теми же самыми клетками является неразгаданным феноменом. Биосинтетический и внутриклеточный путь этих антител приводит к экспрессии белков, которые в основном идентичны, но отличаются сегментом у СООН-терминального конца.

Присутствие одинаково построенных олигосахаридных цепей, прикрепленных в строго определенных местах полипептидных цепей, которые прикрепляются сразу же после того, как полипептидные цепи сходят с рибосомы, наталкивает на мысль, что с этого времени они должны выполнять определенную функцию — участвовать в процессах транспорта и секреции гликопротеинов внутри клетки. Выяснение роли олигосахаридных группировок в этих процессах даст возможность регулировать эти процессы.

Найденные в настоящее время в большом числе гомогенные, клонированные опухолевые линии, продуцирующие антитела, и варианты таких линий со специфическими изменениями в биосинтезе антител или их секреции могут быть использованы в качестве моделей для оценки биосинтеза и секреции антител в деталях.

В последнее десятилетие установлено, что экспрессия иммуноглобулинов нормальными и неопластическими В-лимфоцитами

может быть специфически и селективно изменена различными внешними агентами, такими как антигены, поликлональные активаторы и регуляторы, Т-лимфоциты. Это явление можно использовать для изучения механизма регуляции белкового синтеза и секреции в эукариотической клетке. Исследования в этом направлении могут дать ответ на вопрос, каким путем лиганд-рецепторные взаимодействия на клеточной поверхности приводят к изменениям в экспрессии генов и функционировании клеток.

Представлены доказательства, показывающие важность узнавания углеводных структур в иммунной системе. Углеводные структуры узнаются антителами. Функции системы комплемента лимфокинов и монокинов, белков-лектинов, ферментов клеточной поверхности и катаболизм гликопротеинов опосредованы углеводами. Углеводные структуры изменяются в течение дифференциации клеток иммунной системы.

Некоторые взаимодействия в иммунной системе могут зависеть от узнавания углеводных структур. Однако это показано на уровне феномена, а доказательства специфичности узнавания структур сложных олигосахаридов в некоторых иммунных взаимодействиях отсутствуют. Неизвестны и структурные основания для большинства этих узнаваний. Очень мало известно о природе белков клеточной поверхности, связывающих углеводы. В дальнейшем усилия ученых должны быть направлены на расшифровку углеводных структур и их функций в иммунной системе.

Точное понимание клеточной регуляции в опухолевых клетках может привести к более рациональной и специфической терапии опухолей. При использовании углеводсвязывающих антител и специфических лектинов диагностика может быть поднята на качественно новую ступень. Эти же реагенты могут оказаться полезными в терапии раковых заболеваний.

Констатированы изменения в углеводном составе гликопротеинов и гликолипидов поверхности опухолевых клеток. Однако структурные основания структурных различий углеводов и контроль изменений в процессе гликозилирования гликоконъюгатов поверхности опухолевых клеток неизвестны. Необходимо систематическое интенсивное изучение поверхностных структур, ферментов и процессов регуляции гликозилирования в нормальных, инфицированных вирусом и опухолевых клетках. Это позволит расшифровать систему защиты против измененного «своего» и наметить пути противоопухолевой терапии.

Комплементная система, аналогично каскаду, состоит из серии последовательно включающихся в реакцию ферментов, активируемых комплексами антиген—антитело и микроорганизмами. Активация системы комплемента приводит к лизису клеток и стимуляции некоторых других иммунных реакций. Получены доказательства, что система комплемента может активироваться в отсутствие специфических антител сложными углеводными структурами. Существует 2 пути активации системы комплемента: первый —

классический, когда требуется участие 9 компонентов системы комплемента (C1—C9); второй — альтернативный, требующий участия C3 и C5—C9 и действующий в отсутствие специфических антител. Альтернативный путь активируется бактериальными и вирусными структурами. Активация классического пути в отсутствие специфического антигена возможна прямым взаимодействием гликоконъюгата с C1q компонентом системы комплемента. C3b — продукт расщепления C3 прикрепляется к мишеням во время фиксации комплемента в классическом и альтернативном путях активации. При изучении кинетики получены доказательства образования эфирной связи между активированными карбоксильными группами на C3b и гидроксильными группами гликоконъюгата на мишени.

Сиаловые кислоты на поверхности клеток мишеней, по-видимому, регулируют реакции активации системы комплемента. Активаторы системы комплемента — эритроциты кролика, которые дефицитны по сиаловым кислотам, допускают неограниченное образование C3 конвертазы и активируют систему комплемента по альтернативному пути. Бараньи эритроциты, имеющие высокий уровень сиаловых кислот, не активируют альтернативный путь системы комплемента. Удаление сиаловых кислот с поверхности нейраминидазой или периодатным окислением превращает их в активаторы альтернативного пути.

Сиаловые кислоты в капсулярном полисахариде *Streptococcus* группы В типа III влияют на активацию системы комплемента по альтернативному пути. Нативный полисахарид, содержащий сиаловые кислоты, не активирует альтернативный путь, но удаление сиаловых кислот нейраминидазой или восстановление карбоксильных групп остатков сиаловых кислот в гидроксиметильные группы приводит к активации системы комплемента по альтернативному пути.

Наконец, имеются доказательства, что олигосахариды сложного типа на IgG молекулах могут участвовать в активации системы комплемента. Моноклональный IgG2b, полученный обработкой клеток гибридомы туникамицином, связывал антиген, но был неспособен фиксировать комплемент так же эффективно, как нативный гликозилированный IgG2b.

В иммунологических процессах терминальный углевод олигосахаридных цепей гликопротеинов играет важную регуляторную роль. Терминальная сиаловая кислота обычно выполняет либо маскирующую, либо рецепторную функцию. Однако неясно, осуществляет ли сиаловая кислота функцию прямо, либо сиалирование и десиалирование белка приводит к конформационным изменениям во всей молекуле, которые, в свою очередь, влияют на взаимодействие рецептор — лиганд.

До сих пор не выяснен важный вопрос, может ли сама сиаловая кислота действовать как антиген, либо она является активной как специфическая детерминанта макромолекулы. Этот вопрос

возник в аспекте изучения антигенов М- и N-групп крови. Эти М- и N-детерминанты локализованы на очень высоко сialiризованном гликофореине А мембран эритроцитов. В N-терминальном октапептиде 2 тетрасахарида и 1 трисахарид связаны О-гликозидной связью с серином и треонином в положениях 2, 3 и 4. Углеводный состав антигенов М и N одинаков, но различаются их пептидные последовательности в положениях 1 и 5, которые заняты серином и глицином в М-антигене, и лейцином и глутаминовой кислотой в N-антигене.

Частичное десialiрирование эритроцитов М- и N-фенотипов приводит к размаскированию антигена, повышению антигенности, при дальнейшем десialiрировании антигенные свойства фенотипов М и N пропадают. Естественно, концевой остаток сialiровой кислоты не может проявлять антигенные свойства. Видимо, при этом изменяется структура антигенного участка, в результате чего антигенные группы становятся замаскированными.

Маскирующее действие остатков сialiловых кислот важно в процессах биологического регулирования. Это действие может быть прямым и косвенным. При прямом маскировании антигенные углеводные остатки гликопротеинов покрываются терминальной сialiровой кислотой. При косвенном маскировании остатки сialiловой кислоты соседних гликоконъюгатов в пределах плазматических мембран покрывают данный антиген, который сам по себе обязательно имеет олигосахаридные цепи. В обоих случаях сialiловая кислота — эффективный маскирующий агент, так как она окружена гидратной оболочкой, поскольку несет отрицательный заряд. Существует обратная зависимость между способностью полисахарида или гликопротеина связывать воду и их антигенностью. Антигенная активность нейтральных и богатых фукозой гликопротеинов выше.

Типичные примеры случайного антигенного маскирования отрицательно заряженными гликопротеинами найдены в опухолевых клетках, гликопротеинах эмбрионов, сперматозоидов и гликопротеинах семенной плазмы. Термин «иммунологически привилегированный» приписывается определенным частям организма: передняя камера и хрусталик глаза, тестикулы, мозг, тиреоиды и соединительные ткани. Все они характеризуются высоким содержанием сialiлогликоконъюгатов. Аутоиммунные болезни наиболее часто проявляются, возможно, при размаскировании антигенных структур при действии бактериальной или вирусной нейраминидазы.

Нейраминидаза *Clostridium perfringens* специфически стимулирует участников иммунного ответа. Это ее действие показано на иммунном ответе к бараньим эритроцитам, к антигенам, которые не содержат периферической терминальной N-ацетилнейраминовой кислоты (бактериальные вакцины, рабелла вирус), и растворимым антигенам БСА. Оптимальная доза 0,5—50 ед. на 1 животное (мышь). Нейраминидаза, инактивированная нагреванием, не оказывает такого эффекта. N-ацетилнейраминовая кислота инги-

бирует адьювантный эффект нейраминидазы. Препарат нейраминидазы не содержал пирогенов, поэтому можно полагать, что это действие оказывал сам фермент. Дозы нейраминидазы, вводимые животным, не позволяют считать, что нейраминидаза осуществляет локальную реакцию воспаления, которая помогает иммунному ответу.

Фагоцитоз с участием макрофагов стимулируется *in vivo* и *in vitro* нейраминидазой. Обработка нейраминидазой популяции киллерных клеток селезенки усиливает освобождение C_r^{51} из клеток мастцитомы.

Показано, что нейраминидаза может изменять количество и качество соответствующих антигенов на опухолевых клетках. Нейраминидаза *Vibrio cholerae* успешно использована на различных моделях опухолей у животных. Она индуцировала иммунный ответ к индуцированным и инплантированным растущим опухолям. Однако есть и противоположные данные. Для увеличения эффективности и надежности влияния нейраминидазы необходима информация относительно того, как нейраминидаза изменяет иммуногенность опухолевых антигенов.

Адгезия клеток играет очень важную роль в формировании тканей и органов и в процессе эмбриогенеза. При эмбриональном развитии происходит дифференцировка клеток и их сортировка в организованные скопления сходных клеток и окончательное формирование специализированных органов. Эти процессы зависят от специфического межклеточного узнавания и избирательной адгезии клеток. Известно, что нарушение нормального процесса гликозилирования часто останавливает развитие, поэтому гликопротеинам приписывается важная роль во многих взаимодействиях клеток, обуславливающих нормальное развитие.

В настоящее время обнаружены белки, связывающие углеводы (галактозу, N-ацетилглюкозамин, маннозу, фукозу). Установлена их локализация на поверхности клеток и сделаны шаги в установлении границ их специфичности. В некоторых случаях эти белки появляются именно в то время, когда в ходе развития происходят изменения. Изменения в углеводном составе гликопротеинов и гликолипидов поверхности опухолевых клеток, видимо, должны сказываться на недостаточности адгезии между этими клетками, которая первично ответственна за начальные стадии метастазирования. Есть данные, что дефектные адгезии частично вызваны сниженной способностью связывания кальция, которая обеспечивает образование «мостиков» между нормальными клетками. Однако, как нам кажется, любые обобщения относительно раковых клеток далеки от истины просто потому, что описано приблизительно 300 различных типов рака — от медленно растущих, неметастазирующих, до быстро растущих, выраженно метастазирующих опухолей. Солидные опухоли являются гетерогенными клеточными общностями, содержащими не только раковые, но и нормальные клетки в разных пропорциях.

В последнее время в опухолях обнаружены эндогенные лектины (Gabries et al., 1986). Исследование структуры и специфичности этих лектинов, их отношения к лектинам нормальных тканей, взаимодействие с опухолевыми и нормальными тканями может помочь пониманию процессов метастазирования. Создание диагностикума на основе эндогенных лектинов опухолей поможет своевременному распознаванию опухолевых заболеваний. Диагностикум должен быть основан на биохимическом различии между опухолями различного гистогенеза и различиях опухолей того же самого класса.

Функция лектинов состоит в участии процесса адгезии клеток. Если специфичность эндогенных лектинов в опухолевых и нормальных клетках различна, то изменяется и специфичность адгезивных процессов, нарушается контроль роста, клетки метастазируют. Рациональная терапия, основанная на лектинах, может помочь вводу лекарств в метастатические клетки. Однако не следует забывать, что наши представления о взаимодействии белков с углеводами еще далеки от решения, что следует хотя бы из отсутствия понятий о функционировании групповых веществ крови, строение которых хорошо изучено.

Прямым следствием уже имеющихся данных о функциях олигосахаридов в организме является разработка методов диагностики генетических нарушений углеводного обмена. Разрабатываются также методы гликозилирования ферментов с целью пролонгирования времени их нахождения в циркуляции; начаты разработки методов прикрепления разного рода лекарственных средств к сахароспецифическим белкам, а сыворотки к углеводным структурам бактерий уже используются для предупреждения и лечения инфекционных болезней.

Это лишь небольшая часть тех практических задач, которые можно решить, используя имеющийся арсенал знаний о функциях углеводов.

Когда работа над книгой была закончена, вышел в свет обзор West (1986), где были представлены общепринятые идеи о значении гликозилирования. Мы сочли нужным привести основные выводы этого обзора.

Почти повсеместное гликозилирование внеклеточных и мембранных белков отражает неспецифические функции их поддержки и защиты.

Однако такая углеводная группировка, когда она слегка изменяется и становится различной для определенного рецептора, может приобретать отдельную функцию. Это узнавание определенными рецепторами позволяет углеводным группировкам содействовать специфическим функциям.

Углеводы используются клеткой для выполнения вторичных функций (специфических и неспецифических), в том числе для специализированной компартментализации, скорости транспорта, межклеточной ассоциации, контроля конформации и общей защиты.

Взаимодействие клетки с окружением, которое в определенном смысле вторично для жизни клетки, тоже включает углеводы, связанные с белком.

Во многих случаях показано, что взаимодействие углеводов мультивалентно и состоит из многочисленных слабых взаимодействий, которые становятся сильными только в агрегатах.

Гликозилирование в течение эволюции способствовало развитию механизмов «экономии», благодаря структурным модификациям многих предсуществовавших белков с использованием тех же ферментов, т. е. не требовалась модификация генов. Изменения в структуре благодаря гликозилированию оказались полезными для регулирования дифференциации клеток.

Таким образом, выделяются две группы функций углеводов, а именно: обеспечивающие специфичность с определенной структурой углеводных цепей с одной стороны, и такие функции, которые акцентируют общую схожесть олигосахаридных структур (включая неспецифическую функцию стабилизации гликопротеинов в растворах), — с другой.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Алимбабаева Н. Т. Роль углеводных компонентов тиреоглобулина в его гормонообразующей функции. Автореф. дис. ...канд. биол. наук. Ташкент. 1985. 18 с.
- Алимбабаева Н. Т., Бабаев Т. А., Виха Г. В. Гормонообразование в частично дегликозилированном тиреоглобулине крупного рогатого скота//Тез. докл. Всес. симп. «Биохимия сельскохозяйственных животных и продовольственная программа». Ташкент: Б. и., 1986. С. 21.
- Алимбабаева Н. Т., Виха Г. В., Бабаев Т. А., Каверзнева Е. Д. Выделение свободного от эндогенной протеолитической активности тиреоглобулина щитовидной железы крупного рогатого скота//Прикл. биохим., микробиол., 1986, т. 12, вып. 3. С. 310—314.
- Арбатский Н. П., Желтова А. О., Юртов Д. Б., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. Строение главных углеводных цепей комплексного типа гемагглютинина вируса гриппа А-Ленинград, 385/80 (ИЗ № 2)//Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 8. С. 1111—1117.
- Артамонова С. И., Меклер Л. Б. Об углеводных компонентах тиреоглобулина, находящихся на поверхности его молекул//Бюл. эксп. биол. и мед., 1971, т. 72, № 8. С. 46—49.
- Бабаев Т. А. Йодпротеины и биосинтез тиреоидных гормонов. Автореф. дис. ...докт. биол. наук. М., 1979.
- Бабаев Т. А., Алимбабаева Н. Т., Виха Г. В. Роль углеводов тиреоглобулина при его иодировании *in vitro*//Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 12. С. 1631—1634.
- Видершайн Г. Я. Углеводсодержащие соединения, их биосинтез и роль в животной клетке//Молекулярная биология, 1976, т. 10, вып. 5. С. 957—980.
- Виха Г. В., Виха И. В. Применение иммуноферментного метода для установления изменений в конформации IgM//Иммунология, 1987, т. 2. С. 86—87.
- Виха Г. В., Каверзнева Е. Д., Алимбабаева Н. Т., Бабаев Т. А. Роль углеводов тиреоглобулина в его гормонообразующей функции. Протеинолиз дегликозилированного тиреоглобулина//Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 8. С. 1142—1144.
- Виха Г. В., Карпова О. В., Ковалева Н. С., Юркевич В. В. Устойчивость к протеинолизу частично дегликозилированной дрожжевой инвертазы//Биологические науки, 1981, № 12. С. 20—25.
- Виха Г. В., Филатова Т. Н., Каверзнева Е. Д. Ингибирование эндогенных протеиназ в препаратах моноклональных иммуноглобулинов М//Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 10. С. 1415—1417.
- Зайцев В. Н., Мошков К. А., Шавловский М. М., Нейфах С. А. Рентгенографическое изучение церулоплазмينا человека и его модифицированных форм//Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 10. С. 1521—1527.
- Каверзнева Е. Д. Различия в направленности конформационных изменений молекулы иммуноглобулинов М под влиянием окружающей среды и отщепления углеводов//ДАН СССР, 1981, т. 260, № 1. С. 228—230.

- Каверзнева Е. Д. Конформационная подвижность молекулы макроиммуноглобулинов и ее структурное обоснование//Изв. АН СССР, серия хим., 1984, № 1. С. 113—118.
- Каверзнева Е. Д., Виха Г. В., Рыбакова Л. Н. Роль углеводных групп в иммуноглобулинах М. VI. Значение олигосахаридных цепей в IgM для его стабильности в растворе//Биоорганическая химия, 1978, т. 4, № 6. С. 767—773.
- Каверзнева Е. Д., Кляйне Р., Шмакова Ф. В., Виха Г. В., Лапук В. А. Структурирующая роль углеводных групп иммуноглобулина М в процессе самосборки молекулы//Биоорганическая химия, 1975, т. 1, № 2. С. 273—274.
- Каверзнева Е. Д., Чухрова А. И. Стерическая доступность олигосахаридных группировок в макроиммуноглобулинах М//Биохимия, 1984, т. 49, № 2.
- Каверзнева Е. Д., Шмакова Ф. В. Роль углеводных групп в иммуноглобулинах М. VII. Роль маннозобогатых олигосахаридных группировок в формировании пространственной структуры иммуноглобулинов М//Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 8. С. 1254—1260.
- Саатов Т. Тиреоглобулин и другие йодированные белки щитовидной железы. Автореф. дис. ...докт. биол. наук. Ташкент, 1974.
- Тернер М., Ричардс Ф., Варга Дж., Розенштейн Р. и др. Структура и функции антител/Под ред. Л. Глинна и М. Стьюарда.— М.: Мир, 1983.
- Христофоров В. С., Кутышенко В. П., Абрамов В. М., Завьялов В. П. Сравнительное исследование конформационных свойств Fc фрагмента подклассов иммуноглобулинов G человека методом ¹H-ЯМР//Биоорганическая химия, 1986, т. 12, № 11. С. 1469—1477.
- Шмакова Ф. В., Виха Г. В., Лапук В. А., Каверзнева Е. Д. Роль углеводных групп в иммуноглобулинах М. IV. Влияние отщепления углеводов на гидролиз иммуноглобулина М трипсином//Биоорганическая химия, 1977, т. 3, № 9. С. 1205—1209.
- Хьюз Р. Гликопротеины. М.: Мир, 1985.
- Abbas A. K. Regulation of Immunoglobulin Synthesis and Secretion in B Lymphocytes//Cell. Biol. of Secret. Proc., 1984. P. 590—609.
- Alcolea J. M., Anton L. C. The Interaction of 1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate with Human C1q//Moll. Immunol. 1986, v. 23, № 1. P. 39—44.
- Alexander E. L., Titus J. A., Segal D. M. Human Leucocyte Fc (IgG) Receptors: Quantitation and Affinity with Radiolabeled Affinity Cross-Linked Rabbit IgG//J. Immunol., 1979, v. 123, № 1. P. 295—302.
- Alpert Y., Cser L., Faragc B., Franck F., Mezel F., Ostanevich Yu. M. Flexibility and Conformational Change of IgG Molecule//Közp. fuz. Kut. Inter., 1982, № 106. P. 14.
- Arend W. P., Mannik M. The Macrophage Receptors for IgG: Number and Affinity of Binding Sites//J. Immunol., 1973, v. 110. P. 1455.
- Arima T., Spiro M. L., Spiro R. G. Studies on the Carbohydrate Units of Thyroglobulin. Evolution of their Microheterogeneity in the Human and Calf Protein//J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 6. P. 1825—1835.
- Arima T., Spiro R. G. Studies on Carbohydrate Units of Thyroglobulin. Structure of the Mannose-N-Acetylglucosamine unit (Unit A) of the Human and Calf Proteins//J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 6. P. 1836—1848.
- Aronson N. N., De Duve Ch. Digestive Activity of Lysosomes//J. Biol. Chem., 1968, v. 243, № 17. P. 4564—4573.
- Ashwell G., Hartford I. Carbohydrate—Specific Receptors of the Liver//Annu. Rev. Biochem., 1982, v. 51. P. 531—554.
- Ashwell G., Morell A. Membrane Glycoproteins and Recognition Phenomena//Trends Biochem. Sci., 1977, v. 2. P. 76—78.
- Bayard B., Kerckaert Y. P., Laine A., Hayem A. Informity of Glycans within Molecular Variants of α_1 -Protease Inhibitor with Distinct Affinity for Concanavalin A//Eur. J. Biochem., 1982, v. 124. P. 371—376.
- Beale D., Fazakerley Y. K. The Action of Pepsin on Porcine immuno-

- globulin M and its Effect on Biological Activity//*Biochem. J.*, 1980, v. 191, P. 183.
- Beeley I. G. Location of the Carbohydrate Groups of Ovomuroid//*Biochem. J.*, 1976, v. 159, № 2. P. 335—345.
- Beeley I. G. Peptide Chain Conformation and the Glycosylation of Glycoproteins.—*Biochem. Biophys., Res. Commun.*, 1977, v. 76, № 4. P. 1051—1055.
- Bergman E., Allerhand A., Devries A. L. Natural Abundance Carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Antifreeze Glycoproteins//*J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255, № 10. P. 4407—4410.
- Bergman L. W., Kuell W. M. Addition of Glucosamine and Mannose to Nascent Immunoglobulin Heavy Chains//*Biochem.*, 1977, v. 16, № 20. P. 4490—4497.
- Bergman L. W., Kuell W. M. Co-Translational Modification of Nascent Immunoglobulin Heavy and Light Chains//*J. Supramol. Struct.*, 1979, v. 11, № 1. P. 9—24.
- Bernard B. A., Yamada K. M., Olden K. Carbohydrate Selectively Protect a Specific Domain of Fibronectin against Proteases//*J. Biol. Chem.*, 1982, v. 257, № 14. P. 8549—8554.
- Björkman U., Ekholm R. Effect of Tunicamycin on Thyroglobulin Secretion//*Eur. J. Biochem.*, 1982, v. 125, № 3. P. 585—591.
- Boyd Y., Easterbrook-Smith C. B., Zavodszky P., Mountford-Wright C., Dwek R. A. Mobility and Symmetry in the Fc and pFc' Fragments as Probed by ¹H NMR//*Mol. Immunol.*, 1979, v. 16, № 11. P. 851—858.
- Bragado R., Lopez de Castro J. A., Juarez C., Acbar J. P., Gareia Pardo A., Ortiz T., Vivanco-Martinez F. Chemical Modification of Carboxyl Groups in Human Fc γ Fragment-II. Location of Acidic Residues Involved in Complement Activation//*Mol. Immunol.*, 1982, v. 19. P. 579—588.
- Bubb M. O., Conredie T. D. The Importance of Quaternary Structure in the Expression of Cl—Binding. Site of IgM//*Immunol.*, 1976, v. 31. P. 893—901.
- Bubb M. O., Conradie T. D. Studies on the Structural and Biological Functions of the C μ 3 and C μ 4 Domains of IgM//*Immunol.*, 1978, v. 34. P. 449—458.
- Burkhardt A. E., Wilchek M., Rall Y. E. Analysis of Hog Thyroglobulin. Identification of Galactosamine and Absence of Lysinoalanine Product of Tyrosine Coupling//*Horm. Metab. Res.*, 1978, v. 10, № 2. P. 525—527.
- Burton D. R. Immunoglobulin G: Functional Sites//*Mol. Immunol.*, 1985, v. 22, № 3. P. 161—206.
- Burton D. R., Boy D. Y., Brampton A. D., Easterbrook-Smith S. B., Emanuel F. Y., Novotny Y., Rademacher T. W., van Schravendijk M. R., Sternberg M. J. E., Dwek R. A. The Clq Receptor Site on Immunoglobulin G//*Nature, Lond.*, 1980, v. 288. P. 338—344.
- Carr S. A., Roberts G. D. Carbohydrate Mapping by Mass-Spectrometry: a Novel Method for Identifying Attachment Sites of Asp-Linked Sugars in Glycoproteins//*Anal. Biochem.*, 1985, v. 157, № 2. P. 396—406.
- Chapman A., Kornfeld R. Structure of the High Mannose Oligosaccharides of a Human IgM Myeloma Protein. I. The Major Oligosaccharides of the Two High Mannose Glycopeptides//*J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 3. P. 816—828.
- Chu F. K., Trimble R. B., Maley F. Effect of Carbohydrate Depletion on the Properties of Yeast External Invertase//*J. Biol. Chem.*, 1978, v. 253, № 24. P. 8691—8693.
- Covelli J., Van Zyl A., Edelhoch H. Spectrophotometric Determination of Monoiodotyrosine, diiodotyrosine and thyroxine in Iodoproteins//*Anal. Biochem.*, 1981, v. 42, № 1. P. 82—90.
- De Crombrughe B., Edelhoch H., Beckers C., de Vischer M. Thyroglobulin from Human Goiters. Effect of Iodination Goiters on Sedi-

- mentation and Iodoaminoacid Synthesis//*J. Biol. Chem.*, 1967, v. 242. P. 5681—5685.
- Crossland K. D., Koshland M. E. Expression of Fc Effector Function in Homogenous Murine Anti-ARS IgM//Protein Conformation as an Immunological Signal, F. Celada, V. N. Schumacher, E. E. Sercarz (Eds.), Plenum Press, New York—London, 1983. P. 59—72.
- Della Corte E., Parkhouse R. M. E. Biosynthesis of Immunoglobulin A (IgA) and Immunoglobulin M (IgM). Requirement for L-Chain and a Disulphide-Exchanging Enzyme for Polymerization//*Biochem. J.*, 1973, v. 136, № 3. P. 597—606.
- Deshpande K. L., Fried U. A., Ando M., Webster R. G. Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence//*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, v. 84, No. 1. P. 36—40.
- Dill K., Carter R., Lacombe T. M., Pavia A. A. Possible Role of the Carbohydrate Residues on the Structure of the N-Terminus of Glycophorin A//*Carb. Res.*, 1986, v. 152. P. 217—228.
- Dodon M. D., Quash G. A. The Antigenicity of Asialylated IgG: its Relationship to Rheumatoid Factor//*Immunol.*, 1981, v. 42. P. 401—407.
- Dominici R., Carducci C., Carlini F., Andreoli M. Oligosaccharide Chains Formation into Thyroglobulin Effects of Tunicamycin//*Acta Endocrinol.*, 1981, v. 97, suppl., № 243. P. 329.
- Dorrington K. J., Painter R. H. Functional Domains of Immunoglobulin G//*Prog. Immun.*, 1974, v. 11—I. P. 75—84.
- Dorrington K. J., Klein M. H. Binding Sites for Fc γ Receptors on Immunoglobulin G and Factors Influencing on their Expression//*Mol. Immunol.*, 1982, v. 19. P. 1215—1221.
- Drickamer K., Dordal M. S., Reynolds L. Mannose-Binding Proteins Isolated from Rat Liver Contain Carbohydrate Recognition Domains Linked to Collagenous Tails//*J. Biol. Chem.*, 1986, v. 261, № 15. P. 6878—6885.
- Dulis B. H., Kloppel T. M., Grey H. M., Kubo R. T. Regulation of Catabolism of IgM Heavy Chains in a B Lymphoma Cell Lines//*J. Biol. Chem.*, 1982, v. 257, № 8. P. 4368—4374.
- Dunn I. T., Pay S. C. Variations in the Structure of Thyroglobulins from Normal and Goiterous Human Thyroids//*J. Clin. Endocrinol. and Metab.*, 1978, v. 47, № 4. P. 861—869.
- Easty G. C., Slater B. R., Stanley P. G. The Purity of Thyroglobulin from Normal and Carcinomatous Thyroid Tissues on One Patent by Fractional Salting out with Ammonium Sulphate//*Biochem. J.*, 1958, v. 68, № 2. P. 210—212.
- Elder J. H., Alexander S. Endo- β -N-Acetylglucosaminidase F: Endoglycosidase that Cleaves both High-Mannose and Complex Glycoproteins//*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, v. 79, № 15. P. 4540—4544.
- Fanger M. W., Smyth D. G. The Oligosaccharide Units of Rabbit Immunoglobulin G//*Biochem. J.*, 1972, v. 127. P. 757—765, 767—774.
- Feinstein A., Munn E. A., Richardson N. E. The Three-Dimensional of γ M and γ A Globulin Molecules//*Annals N. Y. Acad. Sci.*, 1971, v. 190. P. 104.
- Feinstein A., Richardson N. E., Gorick B. D., Hughes-Jones N. C. Immunoglobulin M Conformational Change is a Signal for Complement Activation//Protein Conformation as an Immunological Signal, F. Celada, V. N. Schumacher, E. E. Sercarz (Eds.), Plenum Press, N. Y.—London, 1983. P. 47—57.
- Fenouillet E., Fayet G., Hovsepian S., Bahraoui E. M., Ronin C. Immunochemical evidence for chains in thyroglobulin antigenicity//*J. Biol. Chem.*, 1986, v. 261, No. 32. P. 15153—15158.
- Fewtrell C., Geier M., Goetze A., Holowka D., Isenman D. E., Jones J. F., Metzger H. M., Navig M., Sieckmann D., Steverton E., Stein K. Mediation of Effector Functions by Antibodies//*Mol. Immunol.*, 1979, v. 16. P. 741.
- Fleiss H. B., Wright S. D., Unkeless J. C. Human Neutrophil Fc γ Re-

- ceptor Distribution and Structure//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, v. 79. P. 3275—3279.
- Foster D. E. B., Dorrington K. J., Painter R. H. Structure and Function of Immunoglobulin Domains. VII. Studies on the Structural Requirements of Human Immunoglobulin for Granulocyte Binding//*J. Immunol.*, 1978, v. 120, № 6. P. 1952—1956.
- Fucuda M., Egami F. Isolation and fractionation of glycopeptides from porcine thyroglobulin//*Biochem. J.*, 1971a, v. 123, № 3. P. 407—414.
- Fucuda M., Egami F. The structure of a glycopeptides purified from porcine thyroglobulin//*Biochem. J.*, 1971b, v. 123, № 3. P. 415—420.
- Fucuda E., Kondo T., Osawa T. Studies on the hydrolysis of glycoproteins. Core structures of oligosaccharides obtained from porcine thyroglobulin and pineapple stem Bromelain//*J. Biochem.*, 1976, v. 80, № 6. P. 1223—1232.
- Furth E. D., Agrawal R. B., Propp R. P. Secretion of Iodoalbumin and Iodoprealbumin by a Congenital Goiter Containing Thyroglobulin and the Iodoalbumins//*J. Clin. Endocrinol. and Metab.*, 1970, v. 31, № 1. P. 60—69.
- Gabries H. J., Engelhard P., Cramer F. Endogenic Tumor Lectins//*Anticancer Res.*, 1986, v. 6. P. 573—578.
- Gibson R., Schlesinger S., Kornfeld S. The Nonglycosylated Glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus is Temperature—Sensitive and Undergoes Elevated Temperatures//*J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 9, P. 3600—3607.
- Gill D. L., Marshall N. I., Eakins K. P. Effects of Immunoglobulins upon the Interaction of Thyrotropin with Receptors in Human Fat//*Endocrinol.*, 1980, v. 109. P. 1106.
- Gilman P. B., Keane P., Martinez J. The Role of the Carbohydrate Moiety in the Biologic Properties of Fibrinogen//*J. Biol. Chem.*, 1984, v. 259, № 5. P. 3248—3253.
- Goldstein I. J., Hayes C. E. The Lectins: Carbohydrate—Binding Proteins of Plants and Animals//*Adv. Carb. Chem.*, 1978, v. 35. P. 128—340.
- Goldstone A., Koenig H. Autolysis of Glycoproteins in Rat Kidney Lysosomes in vitro. Effects on the Isoelectric Focusing Behaviour of Glycoproteins, Arylsulphatase and p-Glucuronidase//*Biochem. J.*, 1974, v. 141, № 2. P. 527—535.
- Gottschalk A., Ada G. L. The Separation and Quantitative Determination of the Component Sugars of Mucoproteins//*Biochem. J.*, 1956, v. 62. P. 681.
- Hakomori S. I. Tumor-Associated Carbohydrate Antigens//*Ann. Rev. Immunol.*, 1984, v. 2. P. 103—126.
- Haselbeck A., Schekman R. Interorganelle Transfer and Glycosylation of Yeast Invertase in vitro//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1986, v. 83. P. 2017—2021.
- Hattori M., Ozawa K., Wakabayashi K. Sialic Acid Moiety is Responsible for the Charge Heterogeneity and Biological Potency of Rat Lutropin//*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, v. 127, № 2. P. 501—508.
- Helm R. M., Conrad D. H., Froese A. Lentil-Lectin Affinity Chromatography of Surface Glycoproteins and the Receptor for IgE from Rat Basophilic Leukemia Cells//*Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1979, v. 58. P. 90.
- Hirani S., Bernasconi R. J., Rosmussen J. R. The of N-glucanase to release asparagine linked oligosaccharides for structural analysis//*Anal. Biochem.*, 1987, v. 162, No. 2. P. 485—492.
- Hove-Vandembrouche M. F., Couvreur M. Teneur en Acide Sialique de Thyroglobulines Humaines Iodees a Differents Niveaux//*Ann. Endocrinol.*, 1978, v. 39, № 2. P. 137—138.
- Huber R., Deisenhofer J., Colman P. M., Matsushima M., Palm W. Crystallographic Structure Studies of an IgG Molecule and an Fc Fragment//*Nature*, 1976, v. 264, № 5584. P. 415—420.
- Huber R. Spatial Structure of Immunoglobulin Molecules//*Klin. Wochenschr.*, 1980, v. 58, № 22. P. 1217—1231.

- Hughes-Jones N. C., Gardner B. The Reaction between the Complement Subcomponent C1a, IgG complexes and Polyionic Molecules//*Immunol.*, 1978, v. 34. P. 459—463.
- Hymes A. J., Mullinax G. L., Mullinax F. Immunoglobulin Carbohydrate Requirement for Formation on of an IgG—IgG complex//*J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 9. P. 3148—3151.
- Ikekubo K., Pervos R., Sichneider A. B. Clearance of Normal and Tumor-Related Ig from the Circulation of Rats: Role of the Terminal Sialic Acid Residues//*Metabol.*, 1980, v. 29, № 7. P. 673—681.
- Ingbar S. H., Asconas B. A., Work T. S. Observations Concerning the Heterogeneity of Bovine Thyroglobulin//*Endocrinol.*, 1959, v. 64. P. 110.
- Iouanneau J., Bourrillon R. Characterization of a Glycopeptide from Pathological Human IgM with an Unusual Oligosaccharide Core//*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, v. 91, № 3. P. 1057—1061.
- Ito S., Muramatsu T., Kobata A. Release of Galactosyl Oligosaccharides by Endo- β -N-Acetylglucosaminidase D//*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, v. 63, № 4. P. 938—944.
- Kahn C. K., Baird K., Flier J. S., Jarret D. B. Effects of Autoantibodies to the Insulin Receptor on Isolated Adipocytes//*J. Clin. Invest.*, 1977, v. 60. P. 1094.
- Kanner B. J., Metzger H. Crosslinking of the Receptors for Immunoglobulin Depolarizes the Plasma Membrane of Rat Basophilic Leukemia Cells//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983, v. 80. P. 5744—5748.
- Khokher M. A., Dandona P. Insulin—Like Stimulatory Effect of Fc Fragments of Human Immunoglobulin G on Rat Adipocyte Lipogenesis: Indirect Evidence for Fc-Receptor on Adipocytes//*J. Clin. Endocrinol. and Metab.*, 1983, v. 56, № 2. P. 393—396.
- Kingston J. B., Kingston B. L., Putman F. W. Chemical Evidence that Proteolytic Cleavage Causes the Heterogeneity Present in Human Ceruloplasmin Preparations//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 12. P. 5377—5381.
- Kleine R., Shmakova F. V., Lapuk V. A., Vikha G. V., Kaverzneva E. D. Different Behavior of Immunoglobulin M poor in Carbohydrate and Native Immunoglobulin M during Dissociation and Reassociation in vitro//*Immunochem.*, 1975, v. 12. P. 825—831.
- Knop J., Sedlacek H. H., Seiler F. R. Stimulatory Effect of Vibrio Cholerae Neuraminidase on the Antibody Response to Various Antigen//*Immunol.*, 1978, v. 34. P. 181—187.
- Kobata A. Use of Endo-Exo-Glycosidases for Structural Studies of Glycoconjugates//*Anal. Biochem.*, 1979, v. 100, № 1. P. 1—4.
- Koide M., Neauport-Sautes C., Ellerson J. R., Fridman W. H. Binding Site of Human IgG Subclasses and their Domains for Fc-Receptor and Complement: Effects of Glycosidase Digestion//*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, v. 75. P. 838—844.
- Kondo Y., Kamiya Y. Purification and Some Properties of Microsome—Bound Thyroglobulin//*BBA*, 1976, v. 427, № 1. P. 268—284.
- Kozutsumi Y., Kawasaki T., Yamashina I. Kinetical Properties of the Serum Mannan-Binding Protein from Rabbit. A Comparison with those of the Liver Mannan-Binding Protein//*J. Biochem.*, (Tokyo), 1981, v. 90, № 6. P. 1799—1807.
- Kulczycki A., Parker Ch. V. The Cell Surface Receptor for Immunoglobulin E//*J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254. P. 3187—3193.
- Kulczycki A., McNearney T. A., Parker Ch. V. The Rat Basophilic Leukemia Cell Receptor for IgE. I. Characterization as a Glycoprotein//*J. Immunol.*, 1976, v. 117. P. 661.
- Kurush F., Clma M. M., Rodwell J. D. Interreaction of a Bivalent Ligand with IgM Antilactose Antibody//*Biochem.*, 1979, v. 18. P. 2226.
- Kusakabe T. A Goitrous Subject with Structural Abnormality of Thyroglobulin//*J. Clin. Endocrinol. and Metab.*, 1972, v. 35, № 6. P. 785—794.
- Lamas L., Dorris M. L., Taurog A. Evidence for a Catalytic Role for

- Thyroid Peroxidase in the Conversion of Iodotyrosine to Thyroxine//*Endocrinol.*, 1972, v. 90. P. 1417—1420.
- Lamblin G., Lhermitte M., Boersma A., Roussel Ph. Oligosaccharides of Human Bronchial Glycoproteins//*J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255, № 10. P. 4595—4598.
- Leatherbarrow R. J., Rademacher T. W., Dwek R. A., Woof J. M., Clark A., Burton D. K., Feinstein A. Effector Functions of a Monoclonal Aglycosylated Mouse IgG 2a: Binding and Activation of Complement C1 and Interreaction with Human Monocyte Fc Receptor//*Mol. Immunol.*, 1985, v. 22, № 4. P. 407—415.
- Lejeune P. Y., Marriq C., Rolland M., Lissitzky S. In vitro and in vivo Iodination of Human Thyroglobulin in Relation to Hormone Release//*FEBS Lett.*, 1983, v. 156, № 1. P. 77—82.
- Manjunath P., Sairam M. R., Sairam J. Studies of Pituitary Follicotropin. X. Biochemical, Receptor Binding and Immunological Properties of Deglycosylated Ovine Hormone//*Mol. and Cell Endocrinol.*, 1982, v. 28, № 2. P. 125—138.
- Massi G., Crivelli F. Characterization of Human Thyroglobulin by Polyacrilamide Slab Gel-Isoelectric Focusing in Hormonal Gland and in Some Pathological Conditions//*Recent Develop. Chromatog. and Electrophoresis. Proc. 9th Int. Symp., Rivadel Garda, 1978, Amsterdam, I. a., 1979. P. 211—219.*
- Metzger H., Rivnay B., Henkart M., Kanner B., Kinet J. P., Montfort R. P. Analysis of the Structure and Function of the Receptor for Immunoglobulin E//*Mol. Immunol.*, 1984, v. 21, № 12. P. 1167—1173.
- Michel R., Ralli I., Roche I., Tubiana M. Thyroidal Iodoproteins in Patients with Goitrous Hypothyroidism//*J. Clin. Endocrinol. and Metab.*, 1964, v. 24. P. 352—359.
- Middangh C. R., Litman G. W. Atypical glycosylation of an IgG monoclonal cryoimmunoglobulin//*J. Biol. Chem.*, 1987, v. 262, No. 8. P. 3671—3673.
- Mingary M. C., Moretta L., Moretta A., Ferrarini M., Preud'Homme J. L. Fc-Receptors for IgG and IgM Immunoglobulins on Human T-Lymphocytes: Mode of Re-Expression After Proteolysis//*J. Immunol.*, 1978, v. 121, № 2. P. 767—769.
- Minta J. O. The Role of Sialic Acid in the Functional Activity and the Hepatic Clearance of c-JNH//*J. Immunol.*, 1981, v. 126, № 1. P. 245—249.
- Mitchell J. E., Conrad H. E., Voss E. M. Radiochromatographic Carbohydrate Analysis of High and Low Affinity IgG Antibodies//*Immunochem.*, 1976, v. 13, № 8. P. 659.
- Mizuochi T., Taniguchi T., Shimizu A., Kobata A. Structure and Numerical Variations of the Carbohydrate Moiety of Immunoglobulin G1//*J. Immunol.*, 1982, v. 129. P. 2016—2020.
- Monaco F., Andreoli M. Role of Galactose in the Antigenic Properties of Thyroglobulin//*Acta Endocrinol.*, 1976, v. 83, № 1. P. 93—98.
- Monaco F., Dominici R., Carlini F., Carducci C., De Pirro R., Telli R., Roche I. Inhibition par la Tunicamycine de incorporation des Glucides dans la Thyroglobuline//*C. R. Soc. Biol.*, 1981, v. 175, № 4. P. 446—451.
- Monaco F., Grimaldi S., Andreoli M. Impaired Thyroid Hormones and Sialic Acid Biosynthesis into Thyroglobulin (Tg) in the Experimental Rat Thyroid Tumor//*Endocrinol. Exp.*, 1974, v. 8, № 3. P. 175—181.
- Monaco F., Grimaldi S., Dominici R., Robbins I. Defective Thyroglobulin Synthesis in an Experimental Rat Thyroid Tumor: Iodination and Thyroid Hormone Synthesis in Isolated Tumor Thyroglobulin//*Endocrinol.*, 1975, v. 97, № 2. P. 347—351.
- Montreuil Y. Recent Data on the Structure of the Carbohydrate Moiety of Glycoproteins. Metabolic and Biological Implications//*Pure Appl. Chem.*, 1975, v. 42. P. 431—477.
- Morris H. R., Thompson M. R., Osuga D. T., Achmed Ach. L.,

- Chan S. M. Antifreeze Glycoproteins from the Blood of an Antarctic Fish. The Structure of the Proline-Containing Glycopeptides//*J. Biol. Chem.*, 1978, v. 253, № 14. P. 5155—5162.
- Murthy P. V., Narasimha O., Raghupathy E., Abraham S., Chaikoff J. Isolation and Characterization of a Glycopeptide from Sheep Thyroglobulin//*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, v. 14. P. 514.
- Narasimhan S., Harpaz N., Longmore G., Carver J. P., Grey A. Control of Glycoprotein Synthesis. The Purification by Preparative High Voltage Paper Electrophoresis in Borate of Glycopeptides Containing High Mannose and Complex Oligosaccharide Chains Linked to Asparagine//*J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255, № 10. P. 4876—4884.
- Niepomniszeze H., Castells S., De Groot L. J., Refetoff S., Rim O. S., Rapoport B., Hati R. Peroxidase Defect in Congenital Goiter with Complete Organification Block//*J. Clin. Endocrinol.*, 1973, v. 36. P. 347—357.
- Nickerson J. M., Fuller G. M. In vitro Synthesis of Rat Fibrinogen: Identification of PreA α , PreA β , and PreA γ Polypeptides//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, v. 78, № 1. P. 303—307.
- Nose M., Wigzell H. Biological Significance of Carbohydrate Chains on Monoclonal Antibodies//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983, v. 80. P. 6632—6636.
- Ohara T., Yamagata T. Isolation and Characterization of Galactose—Binding Proteins from New-Born Mice//*BBA*, 1986, v. 884. P. 344—354.
- Olden K., Bernard B. A., Humphries M. J., Yeo T. K., Yeo K. T., White S. L., Newton S. A., Bauer H. S., Parent J. B. Function of Glycoprotein Glycans//*Trends Biochem. Sci.*, 1985, v. 10, № 2. P. 78—82.
- Olden K., Bernard B. A., White S. L., Parent J. B. Function of the Carbohydrate Moieties of Glycoproteins//*J. Cell. Biochem.*, 1982a, v. 18. P. 313—335.
- Olden K., Parent J. B., White S. L. Carbohydrate Moieties of Glycoproteins//*BBA*, 1982b, v. 650. P. 209—232.
- Osuga D. T., Feeney R. E. Antifreeze Glycoproteins from Arctic Fish//*J. Biol. Chem.*, 1978, v. 253, № 15. P. 5338—5343.
- Parkhouse R. M. E., Askonas B. A. Immunoglobulin M Biosynthesis. Intracellular Accumulation of 7s Subunits//*Biochem. J.*, 1969, v. 115, № 2. P. 163—169.
- Pees D. A. Polysaccharide Shapes. Chapman Hall, London, 1977.
- Pecoud A. R., Ruddy S., Conrad D. H. Functional and Partial Chemical Characterization of the Carbohydrate Moieties of the IgE Receptor on Rat Basophilic Leukemia Cells and Rat Mast Cells//*J. Immunol.*, 1981, v. 126, № 4. P. 1624—1629.
- Pichler W. J., Lum L., Rroder S. Fc-Receptors on Human T-Lymphocytes. I. Transition of T γ to T μ Cells//*J. Immunol.*, 1978, v. 121, № 4. P. 1540—1548.
- Plummer T. H., Hirs C. W. H. On the Structure of Bovine Pancreatic Ribonuclease B//*J. Biol. Chem.*, 1964, v. 239, № 8. P. 2530—2538.
- Porter R. K., Reid K. B. M. Activation of the Complement System by Antibody-Antigen Complexes: the Classical Pathway//*Adv. Protein Chem.*, 1979, v. 33. P. 1—71.
- Prives J. M., Olden K. Carbohydrate Requirement for Expression and Stability of Acetylcholine Receptor on the Surface of Embryonic Muscle Cells in Culture//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 9. P. 5263—5267.
- Puett D. Conformational Studies on a Glycosylated Bovine Pancreatic Ribonuclease//*J. Biol. Chem.*, 1973, v. 248, № 10. P. 3566—3572.
- Putnam F. W., Florent G., Paul C., Shinoda T., Shimizu A. Complete Amino Acid Sequence of the μ Heavy Chain of a Human IgM Immunoglobulin//*Sci.*, 1973, v. 182, № 4109. P. 287—291.
- Ramasamy R., Secher D. S., Adelugbo K. C $_H$ 3. Domain of IgG as Binding Site to Fc Receptor of Mouse Lymphocytes//*Nature, Lond.*, 1975, v. 253. P. 656.

- Rapoport B., Niepomniszere H., Bigazzi M., Hati R., De Groot L. Studies on the Pathogenesis of Poor Thyroglobulin Iodination in Non-Toxic Multinodular Goiter//*J. Clin. Endocrinol., and Metab.*, 1972, v. 34. P. 822—830.
- Ratcliffe A., Stanworth D. K. The Use of Synthetic Gamma Chain Peptides in the Localization of the Binding Site(s) of Human IgG1 for the Fc Receptors of Homologous Monocytes and Heterologous Mouse Macrophages//*Immun. Lett.*, 1982, v. 4. P. 215—221.
- Reid K. B. M. Proteins Involved in the Activation and Control of the Two Pathways of Human Complement//*Biochem. Soc. Trans.*, 1983, v. 11. P. 1—12.
- Robbins Y., Wolff Y., Rall Y. E. Iodoproteins in Normal and Abnormal Human Thyroid Tissue and in Normal Sheep Thyroid//*Endocrinol.*, 1959, v. 64, № 1. P. 37—52.
- Robbins Y. Thyroglobulin Fractionation on Diethylaminoethyl—Cellulose Columns//*J. Biol. Chem.*, 1963, v. 238. P. 182.
- Rose M. C., Voter W. A., Sage H., Brown C. F., Kaufman B. Effect of Deglycosylation on the Architecture of Ovine Submaxillary Mucin Glycoprotein//*J. Biol. Chem.*, 1984, v. 259, № 5. P. 3167.
- Rosen Ph., Pecht Y., Cohen J. S. Monitoring the Carbohydrate Component of the Fc Fragment of Human IgG by ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy//*Mol. Immunol.*, 1979, v. 16. P. 435—436.
- Rothman Y. E., Lodish H. F. Synchronized Transmembrane Insertion and Glycosylation of a Nascent Membrane Protein//*Nature*, 1977, v. 269, № 5630. P. 775—780.
- Saal J. G., Hadman M. R., Feucht H. E., Rautenstrauch H. Two Distinct Fc Receptors for IgG on Human Peripheral T-Lymphocytes//*Scand. J. Immunol.*, 1982, v. 16. P. 17—24.
- Sagi-Eisenberg R., Pecht I. Membrane Potential Changes during IgE-Mediated Histamine Release from Rat Basophilic Leukemia Cells//*J. Membrane Biol.*, 1983, v. 75. P. 97—104.
- Salabe H., Dominici R., Salali I. B. Immunological Properties of Tg Carbohydrates: Enhancement of Tg Immunoreaction by Removal of Sialic Acid//*Clin. and Exp. Immunol.*, 1976, v. 25, № 2. P. 234—243.
- Salabe J. B., Salabe H., Dominici R., Andreoli M. Role of Sialic Acid in the Antigenic Structure of Tg: Enhancement of Thyroglobulin Immunoreaction by Removal of Sialic Acid//*Endocrinol. Exp.*, 1974, v. 8, № 3. P. 182—186.
- Sarkar M., Liao I., Kabat E. A., Tanabe T., Ashwell G. The Binding Site of Rabbit Hepatic Lectin//*J. Biol. Chem.*, 1979, v. 259, № 9. P. 3170—3174.
- Santisteben P., Lamas L. The Effect of Varying Iodine Content on the Proteolytic Activity of Rat Thyroid Lysosomes//*Acta Endocrinol.*, 1981, v. 98, № 4. P. 556—563.
- Scharon N., Lis H. Glycoproteins: Research Booming on Long—Ignored Ubiquitous Compounds//*Mol. a. Cell. Biochem.*, 1982, v. 42. P. 167—187.
- Schauer R. Sialic Acids. Chemistry Metabolism and Function. Wien—New York, 1982.
- Schreiber A. B., Hoebeke I., Bergman Y., Haimovich I., Shosberg A. A Quantitative Fluorometric Assay for Detection and Characterization of Fc Receptors//*J. Immunol.*, 1978, v. 121, № 1. P. 19—23.
- Schwartz R. T., Datema R. The Lipid Pathway of Protein Glycosylation and its Inhibitors: The Biological Significance of Protein—Bound Carbohydrates//*Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem.*, 1982, v. 40. P. 287—379.
- Seagar M. I., Miquelis R. D., Simon C. Inhibitory Effects of Tunicamycin and 2-Deoxyglucose on Tg Synthesis//*Eur. J. Biochem.*, 1980, v. 113, № 1. P. 91—96.
- Segal D. M., Hurwitz E. Binding of Affinity Cross—Linked Oligomers of IgG to Cells Bearing Fc Receptors//*J. Immunol.*, 1977, v. 118. P. 1338.
- Shaklai N., Garlick K. L., Bunn H. T. Nonenzymatic Glycosylation of Human Serum Albumin Alters its Conformation and Function//*J. Biol. Chem.*, 1984, v. 259, № 6. P. 3812—3817.

- Sheares B. T., Robbins Ph. W. Glycosylation of Ovalbumin in a Heterologous Cell: Analysis of Oligosaccharide Chains of the Cloned Glycoprotein in Mouse L-Cells//Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1986, v. 83, № 7. P. 1993—1997.
- Shinkai H., Yonemasu K. Hydroxylysine—Linked Glycosides of Human Complement Subcomponent C1q and Various Collagens//Biochem. J., 1979, v. 177, № 3. P. 847—852.
- Shulman M. J., Heusser C., Filkin C., Konler G. Mutations affecting the structure and function of immunoglobulin M//Moll. Cell. Biol., 1982, v. 2, No 9. P. 1033—1043.
- Siegel R. C., Cathou R. E. Conformation of Immunoglobulin M. III. Structure Requirements of Antigen for Complement Fixation by Equine IgM//J. Immunol., 1980, v. 125. P. 1910—1980.
- Silver H. K. B., Karim K. A., Archibald E. L., Salinas F. A. Serum Sialic Acid and Sialyltransferase as Monitors of Tumor Burden in Malignant Melanoma Patients//Cancer Res., 1979, v. 39. P. 5036.
- Sire I., Kahn-Perles B., Colle A., Bourgois A. Biochemical Characterization of an Fc Receptor of Rabbit Lymphocytes//Eur. J. Immunol., 1980, v. 10. P. 116—121.
- Spiegelberg H. L., Abel C. A., Fishkin B. G., Grey H. H. Localization of the Carbohydrate within the variable Region of the Light and Heavy Chains of Human G Myeloma Protein//Biochem., 1970, v. 9, № 21. P. 4217—4223.
- Spiro R. G. The Carbohydrate Units of Thyroglobulin//J. Biol. Chem., 1965, v. 240, № 4. P. 1603—1610.
- Spiro R. G., Spiro M. Y. The Carbohydrate of Thyroglobulin//Fed. Proc., 1963, v. 22. P. 538.
- Spiro R. G., Spiro M. Y., Bhoyroo V. D. Processing of Carbohydrate Units of Glycoproteins. Characterization of a Thyroid Glucosidase//J. Biol. Chem., 1979, v. 254. P. 7659—7667.
- Strober W., Hague N. E., Lum L. G. IgA-Fc Receptors on Mouse Lymphoid Cells//J. Immunol., 1978, v. 121, № 6. P. 2440—2445.
- Struck D. K., Lennarz W. J. Evidence for the Participation of Saccharide Lipids in the Synthesis of the Oligosaccharide Chain of Ovalbumin//J. Biol. Chem., 1977, v. 252. P. 1007—1013.
- Sulica A., Gherman M., Medesan C., Sjöquist J., Ghetie V. IgG-Binding sites on Macrophage Cell Membrane. I. Identification of Two Distinct Fc Receptors on Mouse Peritoneal Macrophages//Eur. J. Immunol., 1979, v. 9, № 12. P. 979—984.
- Tarentino A. L., Maley F. The Purification and Properties of β -Aspartyl-N-Acetylglucosaminyl Amidohydrolase from Hen Oviduct//Arch. Biochem. Biophys., 1969, v. 130, p. 295—303.
- Tatumi K., Suzuki Y., Sinchara H. Clearance of Circulating Desialated Thyroglobulin in the Rat//Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 583, № 4. P. 509—511.
- Tarutani O., Kondo T., Shulman S. Properties of Carbohydrate—Stripped Thyroglobulin. III. Solubility Characteristics of Thyroglobulin//BBA, 1977, v. 492, № 2. P. 284—290.
- Tarutani O., Shulman S. Properties of Carbohydrate—Stripped Thyroglobulin. I. Preparation and Physicochemical Properties of Desialized Thyroglobulin//BBA, 1971a, v. 229, № 3. P. 642—648.
- Tarutani O., Shulman I. Properties of Carbohydrate—Stripped Thyroglobulin. II. Heterogeneity in Sialic Acid Content Thyroglobulin Subfraction//BBA, 1971b, v. 236, № 2. P. 384—390.
- Timofeev V. P., Dudich I. P., Sykules Y. K. Rotational Correlation Times of IgG and its Fragments Spin-Labeled at Carbohydrate of Protein Moieties//FEBS. Lett., 1978, v. 89, № 2. P. 191—195.
- Tsuji T., Yamamoto K., Irimura T., Osawa T. Structure of Carbohydrate Unit A of Porcine Thyroglobulin//Biochem. J., 1981, v. 195, № 3. P. 691—699.

- Turmo C., Santisteben P., Lamas L. Thyroxine-rich iodopeptide in rat thyroglobulin//*Ann. Endocrinol.*, 1983, v. 44, No 4. P. 24A.
- Turner M. W., Bennich H. H., Narvig V. B. Pepsin Digestion of Human G-Myeloma Proteins of Different Subclasses. I. The Characteristic Features of Pepsin Cleavage as a Function of Time//*Clin. Exp. Immunol.*, 1970, v. 7. P. 603.
- Udaka K., Okada M., Utsumi S. Cooperation Between the Pair of C γ 2 Domains in Clq Binding by Rabbit IgG//*Mol. Immunol.*, 1986, v. 23, № 10. P. 1103—1110.
- Unkeless I. C., Eisen H. N. Binding Monometric Immunoglobulins to Fc Receptors of Mouse Macrophages//*J. Exp. Med.*, 1975, v. 142. P. 1520.
- Unkeless I. C., Fleit H., Mellman I. S. Structural Aspects and Heterogeneity of Immunoglobulin Fc Receptors//*Adv. Immunol.*, 1981, v. 31. P. 247—270.
- Vandenhedl J. R., Ahmed A. I., Feeney R. E. Structure and Role of Carbohydrate in Freezing Point Depressing Glycoproteins from an Antarctic Fish//*J. Biol. Chem.*, 1972, v. 247. P. 7885—7889.
- Van Kuik I. A., Sijbesma R. P., Kamerling I. R., Vliegenterhart I. F., Wood E. I. Primary Structure of Low-Molecular Mass N-Linked Oligosaccharide from Hemocyanin of *Lynnea Staynalis*//*Eur. J. Biochem.*, 1986, v. 160, № 3. P. 621—625.
- Viitala I., Järnefelt J. The Red Cell Revisited//*Trends Biochem. Sci.*, 1985, v. 10, № 10. P. 392—395.
- Voss E. W., Voss V. H. Comparative Catabolic Rates of Anti-Hapten IgG Antibodies of Different Affinities//*Immunochem.*, 1977, v. 14, № 11/12. P. 741—748.
- Walborg E. F., Cobb B. F., Adams-Mayne M., Ward D. N. Semiautomatic Analysis of Glucosamin in Protein Hydrolyzates//*Ann. Biochem.*, 1963, v. 6. P. 367—373.
- Weber W., Steube K., Gross V., Thuy-Anh-Tran-Thi, Decker K., Gerok W., Heinrich P. C. Unglycosylated Rat α -Proteinase Inhibitor Has a Six-Fold Shorter Plasma Half-Life than the Nature Glycoprotein//*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, v. 126, № 1. P. 630—635.
- West C. Current ideas on the significance of Protein glycosilation//*Mol. a Cell Biochem.*, 1986, v. 72. P. 3—20.
- Willan K. J., Golding B., Givol D., Dwek R. A. Specific Spin Labeling of the Fc Region of Immunoglobulins//*FEBS Lett.*, 1977, v. 80, № 1. P. 133—136.
- Williams R. C., Osterland C. K., Margherita S., Tukuda S., Messher R. P. Studies of Biologic and Serologic Activity of Rabbit IgG Antibody Depleted of Carbohydrate Residues//*J. Immunol.*, 1973, v. 111. P. 1690—1698.
- Wilson L. A., Skehel J. J., Wiley D. C. Structure of the Haemagglutinin Membrane Glycoprotein of Influenz Virus at 3Å Resolution//*Nature*, 1981, v. 289. P. 366.
- Winkelhake J. L., Kunicki T. J., Eliombe B. M., Aster R. H. Effect of pu Treatments and Deglycosylation of Rabbit Immunoglobulin G on the Binding of Clq//*J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255. P. 2822—2828.
- Winkelhake J. L., Nicolson G. L. Aglycosylantibody. Effect of Exoglycosidase Treatments on Autochthonous Antibody Survival Time in the Circulation//*J. Biol. Chem.*, 1976, v. 251, № 4. P. 1074—1080.
- Winkler I. R., Segal H. L. Inhibition by Swainsonine of the Degradation of Endocytosed Glycoproteins in Isolated Rat Liver Parenchymal Cells//*J. Biol. Chem.*, 1984, v. 259, № 3. P. 1958—1962.
- Wollman S., Warren L. Effects of Thyrotropin and Thiouracil in the Sialic Acid Concentration in the Thyroid Gland//*Biochim. Biophys. Acta*, 1961, v. 47, № 2. P. 251—258.
- Woods R. J., Khokher M. A., Dandona P. Stimulatory Effect of Human IgM on Lipogenesis by Rat Adipocytes//*Clin. Sci.*, 1982, v. 62. 57 p. (Abst.).

- Yagawa K., Onoue K., Aida Y. Structural Studies of Fc Receptors. I. Binding Properties, Solubilization and Partial Characterization of Fc Receptors of Macrophages//J. Immunol., 1979, v. 122, № 1. P. 366—373.
- Yamamoto R., Tsuji T., Irimura T., Osawa T. The Structure of Carbohydrate Unit B of Thyroglobulin//Biochem. J., 1981, v. 195, № 3. P. 701—713.
- Yuan D. Role of Glycosylation in the Cell Surface Expression and Secretion of Immunoglobulin Molecules by BCL₁ Cells//Mol. Immunol., 1982, v. 19, № 9. P. 1149—1157.
- Zhu B. C. R., Fisher S. F., Pande H. Human Placental Fibronectin//J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 6. P. 3962—3970.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Глава I. Гликопротеины. Состав, структура и общие принципы строения	5
Глава II. Пути исследования роли углеводных компонентов гликопротеинов	23
Глава III. Роль структурных элементов гликопротеинов в организации их молекулы	32
Глава IV. Химические основы узнавания в белок-белковых и клеточных взаимодействиях	78
Заключение	127
Список использованной литературы	137