

# МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

---

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ  
УДК 6-6-008.93--055.5/7-07

## ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ $\alpha$ -ФУКОЗИДАЗЫ, СЕКРЕТИРУЕМОЙ КЛЕТКАМИ-МИШЕНЯМИ ПРИ НЕКОТОРЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЭНЗИМОПАТИЯХ

Т.С.ИВЛЕВА, Е.М.БЕЙЕР, Н.А.УШАКОВА, В.А.МАЛАХОВА\*, Е.А.КАРПОВА,  
И.В.ЦВЕТКОВА

Институт биомедицинской химии РАМН, 119832 Москва, Погодинская, 10  
\*Медико-генетический научный Центр РАМН, 1155478 Москва, Москворечье, 1

Исследован спектр внутриклеточной и секретируемой форм  $\alpha$ -L-фукозидазы в культуре нормальных фибробластов и клеток от пациентов с наследственными энзимопатиями, болезнью Фабри (гликолипидоз), болезнями Гурлер и Санфилиппо D (мукополисахаридозы). Показано, что профиль множественных форм  $\alpha$ -L-фукозидазы, секретируемой патологическими фибробластами, изменен в сравнении с нормой, т.к. экспрессируются более основные изоформы фермента. Подобные изменения наблюдались и при моделировании болезни накопления путем нагрузки нормальных фибробластов сахарозой. Эти данные позволяют предположить, что внутриклеточное накопление продуктов, гидролиз которых нарушен в результате наследственной энзимопатии, влияет на посттрансляционный процессинг  $\alpha$ -L-фукозидазы, фермента, первично не затронутого генетическим дефектом. Экспрессия в клетках-мишенях более основных изоформ обусловлена, вероятно, изменением процесса сialiрования секретируемой  $\alpha$ -L-фукозидазы.

**Ключевые слова:** лизосомные болезни накопления, кислые гликозидазы,  $\alpha$ -L-фукозидаза, сахароза, кожные фибробласты

**Введение.** В настоящее время описано более 40 наследственных лизосомных болезней накопления. Большинство из них развивается при недостаточности той или иной лизосомной гидролазы, приводя к накоплению в лизосомах клеток нерасщепляющихся углеводсодержащих биополимеров. Ранее было показано, что такая аккумуляция негидролизуемых соединений эндо- и экзогенной природы, вызывая гипертрофию всей вакуолярной системы клетки (комплекс Гольджи и лизосомный компартмент), приводит к избирательной внутриклеточной активации кислых гликозидаз, не связанных с первичным дефектом [1, 2], и изменению таких свойств секретируемых форм этих ферментов, как термостабильность и рН-зависимость [2, 3, 4]. Природа этих изменений неизвестна. В частности, неясно, идентичны ли ферменты, синтезирующиеся в нормальных клетках и в патологически измененных клетках при болезни накопления. Известно, что внутриклеточные и секретируемые гликозидазы отличаются по структуре углеводной части, которая играет важную роль в функционировании ферментов, их направленном транспорте в лизосомы и секреции [5]. Чтобы оценить различия между внутриклеточными и секретируемыми формами гликозидаз, возникающими в ответ на накопление в клетках негидролизуемых соединений, в качестве объекта исследования была выбрана  $\alpha$ -L-фукозидаза ( $\alpha$ -L-фукозид фукогидролаза, КФ 3.2.1.51), ответственная за гидролиз фукосодержащих гликопротеидов, гликолипидов и про-

теогликанов. Это типичная лизосомная гидролаза является, как и другие гликозидазы, гликопротеидом. Фермент существует в виде множественных молекулярных форм, отличающихся между собой преимущественно количеством остатков сиаловых кислот [6]. В данной работе было проведено сравнительное исследование множественных форм внутриклеточной и секретируемой  $\alpha$ -L-фукозидазы фибробластов кожи человека в норме и при таких лизосомных болезнях накопления как болезнь Фабри (недостаточность  $\alpha$ -D-галактозидазы, КФ 3.2.1.22), относящейся к группе гликолипидозов, и болезни Гурлер (недостаточность  $\alpha$ -L-идуронидазы, КФ 3.2.1.76) и Санфилиппо D (недостаточность N-ацетилглюкозаминид-6-сульфатазы, КФ 3.2.1.14), относящихся к группе мукополисахаридозов. Полученные результаты свидетельствуют о наличии как общих, так и специфических, зависимых от клеточного штамма изменений в спектре множественных форм  $\alpha$ -L-фукозидазы, секретируемой клетками с гипертрофированным лизосомным компартментом.

**Методика.** Исследовали штаммы постнатальных нормальных фибробластов кожи человека и клеток от пациентов с болезнью Фабри и мукополисахаридозами (МПС) типа I (синдром Гурлер) и типа III (синдром Санфилиппо), которые были получены из Центра медицинской генетики РАМН. МПС типа III был отнесен нами к форме D, так как формы B, A и C болезни были исключены на основании нормальной активности N-ацетил- $\alpha$ -D-глюкозаминидазы, гепарансульфамидазы и ацетил-LK-CoA:глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы в фибробластах больного. Активности двух последних ферментов определяли с помощью новых разработанных нами флуориметрических методов [7, 8]. Клетки выращивали в сосудах Карреля (диаметр 10 см) на среде Игла с добавлением L-глутамин (0,03 %), канамицина (50 ед/мл), 5% бычьей сыворотки и 5% пуповинной сыворотки человека до стадии сформированного монослоя. Опыты на культурах патологических клеток проводились на раннем (2-3 сут.) и позднем (10-14 сут.) монослое, т.е. при минимальном и максимальном накоплении нерасщепляющихся соединений. Для моделирования лизосомной болезни накопления *in vitro* в культуральную среду добавляли сахарозу (0,04 М), в этих условиях монослойные культуры нормальных фибробластов выдерживали 6 сут. [2]. Для исследования спектра форм секретируемого фермента культуральную среду в контрольных и опытных флаконах заменяли на бессывороточную среду Игла с 0,5 % БСА. Через 24 час. среду сливали, центрифугировали при 5 тыс.об/мин в течение 5 мин., затем сгущали при 4 С на ячейке фирмы Amicon (PM-10) до 0,5 - 1мл, в ряде случаев дополнительно использовали фикол. Перед определением активности секретируемого фермента в пробы добавляли БСА (конечная концентрация 1 мг/мл). Клетки снимали с помощью 0,2 % раствора трипсина (СПОФА, ЧСФР), определяли их количество в суспензии с помощью в камеры Горяева, затем осаждали при 4°C (5 тыс.об/мин, 15 мин). Осадок отмывали несколько раз 0,05 М фосфатно-цитратным буфером и замораживали при -20°C, перед определением активности фермента проводили 5 циклов замораживания-оттаивания.

Активность ферментов определяли по количеству свободного 4-метилумбеллиферона, выделяющегося при расщеплении соответствующих гликозидов. Инкубационная проба (конечный объем 0,1мл) содержала 5 мкл ферментного препарата, 45 мкл 0,1 Н ацетатного буфера рН 5,0 и 50 мкл 1 мМ субстрата, приготовленного на 0,1 Н ацетатном буфере рН 5,0. После инкубации при 37°C реакцию останавливали добавлением 2мл 0,4 М глицин-NaOH буфера рН 10,5. О количестве свободного 4-метилумбеллиферона судили по измерению флуоресценции на флуоримет-

ре Shimadzu RF- 5000. За единицу активности принимали количество фермента, расщепляющего 1 нмоль субстрата за 1 час в стандартных условиях (0,1 Н ацет. буфер, рН 5.0, 37° С). Удельную активность выражали количеством единиц, отнесенных к 1 мг белка или к 10<sup>6</sup> клеток.

Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) в тонком слое ПААГ проводили на приборе Multiphog-II с охлаждающим блоком (ЛКВ, Швеция) при +10°С в течение 3 час. Использовали готовые пластинки ПААГ (ЛКВ, Швеция) с градиентом рН 4-6.5 толщиной 1.0 мм, а также готовили пластины ПААГ толщиной 0.5 мм, с градиентом рН 4.0-6.0, согласно инструкции фирмы ЛКВ-Pharmacia. В качестве электродных растворов при использовании ПААГ-пластин с градиентом рН 4-6.5 применяли 0.1 М глутаминовую кислоту в 0.5 М фосфорной кислоте (анодный раствор), 0.1 М β-аланин (катодный раствор); для ПААГ-пластин с градиентом рН 4.0-6.0 использовали 1 М NaOH (катодный раствор) и 0.5 М фосфорную кислоту и 0.1 М глутаминовую кислоту (анодный раствор). На пластинку ПААГ наносили по 50 мкл клеточных гомогенатов, содержащих 100-200 мкг белка или 30-40 мкл культуральной среды (300-700 мкг белка) на расстоянии 3.5-5 см от анода. Для идентификации разделенных при ИЭФ форм фермента слой геля разрезали вдоль градиента на участки размером 0.25x1 см, которые помещали в 0.1 мл 0.1 Н ацетатного буфера, рН 5.0. Полученные образцы инкубировали с 0.1 мл (1.25 mM) 4-МУФ-α-L-фукопиранозида, приготовленного на том же буфере, в течение 18-24 час. Фиксацию проб и измерение флуоресценции проводили как было описано выше.

Определение градиента рН по окончании ИЭФ осуществляли непосредственно в геле, измеряя значения рН через каждый сантиметр при помощи поверхностного стеклянного электрода фирмы Pharmacia. В ряде случаев значение рН измеряли в растворе на потенциометре фирмы Orion после -2-час. экстрагирования полосок геля размером 0,25x1см в 0.2 мл дист. воды.

Ультрафильтрацию ферментных препаратов проводили, руководствуясь рекомендациями фирмы Amicon (США). Для ультрафильтрации использовали ячейки объемом 200 мл и 10 мл (диафлю-мембраны типа РМ-10, РМ-30, Amicon, USA). Давление азота 2-3 атм.

**Результаты и обсуждение.** Лизосомный аппарат клеток является весьма динамичной системой, участвующей в поддержании внутриклеточного гомеостаза. Значительный интерес представляет изучение качественных изменений в состоянии лизосомной системы в условиях, экстремальных для жизнедеятельности клеток. Ранее было сделано предположение о том, что накопление в клетке соединений, гидролиз которых нарушен в результате наследственного дефекта какой-либо гликозидазы, влияет на функционирование других гликозидаз, не связанных с первичным ферментным дефектом [2-4]. Мы получили новые подтверждения этого предположения, выполнив ИЭФ внутриклеточной и секретируемой α-L-фукозидазы постнатальных нормальных и патологически измененных фибробластов от пациентов с болезнями Фабри, Гурлер и Санфилиппо. Выбор указанных лизосомных заболеваний объясняется тем, что при данных патологиях фибробласты кожи больных, часто используемые для диагностики, являются и клетками-мишенями. В условиях *in vitro* эти клетки начинают интенсивно накапливать нерасщепляющиеся соединения после завершения процесса пролиферации, т.е. на стадии формирования монослоя; уровень внутрилизосомного накопления, как и степень гипертрофии всего вакуолярного компартмента, определяется длительностью существо-

вания клеточной культуры в стационарной фазе роста, которая для патологических фибробластов не превышает обычно 10-14 сут.

Для постнатальных фибробластов (рис. 1 А) в норме и при сахарозной нагрузке, моделирующей болезнь накопления, ИЭФ  $\alpha$ -L-фукозидазы показало близкое сходство спектров внутриклеточных изоформ, как по профилю, так и по соотношению компонентов. В то же время, фермент, секретированный клетками в условиях сахарозной нагрузки, характеризовался значительной выраженностью более щелочных форм (рис.1 Б). Эти результаты подтверждают те, что мы получили на других штаммах нормальных фибробластов кожи (3,4), межштаммовые различия проявляются в индивидуальности спектра множественных форм  $\alpha$ -L-фукозидазы.

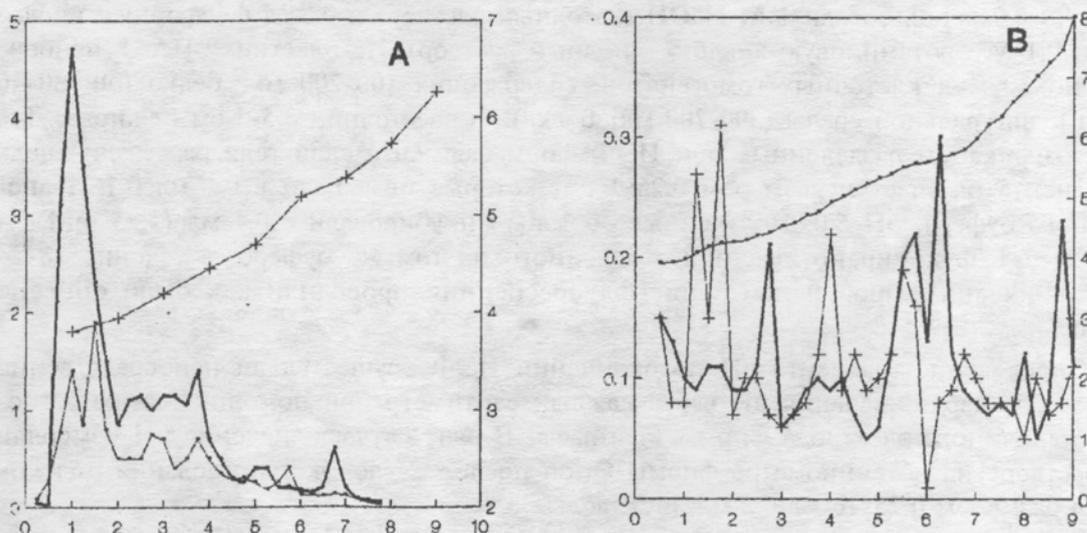


Рис. 1 - ИЭФ внутриклеточной (А, Y1) и секретированной (Б, Y1) нормальными фибробластами  $\alpha$ -L-фукозидазы, до (-) и после сахарозной нагрузки (---); градиент pH (-+-, Y2).

По оси абсцисс - расстояние от анода (см), по оси ординат: Y1 - флуоресценция (относительные единицы), Y2 - значения pH

Для фибробластов Фабри на разных сроках культивирования ИЭФ внутриклеточной и секретированной фукозидазы показало следующее. Как видно на рис. 2, профиль спектра изоформ внутриклеточного фермента существенно не изменялся, однако наблюдались значительные изменения в спектре изоформ секретированной  $\alpha$ -L-фукозидазы. Эти изменения касались, в основном, соотношения кислых и щелочных изоформ фермента. Так, для раннего монослоя (при минимальном уровне внутрилизосомного накопления нерасщепляющихся гликолипидов) была характерна большая выраженность кислых форм секретированной  $\alpha$ -L-фукозидазы (рис. 2А); на следующей стадии наблюдалась противоположная картина, было характерно преобладание более щелочных изоформ фермента (рис. 2Б). На рис. 3 представлен комбинированный профиль фукозидазы с кислыми и более основными изоформами из культуральной среды раннего и позднего монослоя.

Сходные изменения спектра множественных форм секретированной  $\alpha$ -L-фукозидазы были найдены для фибробластов больных с мукополисахаридозами. На рис. 4, где приведены данные по клеткам пациента с болезнью Санфилиппо,

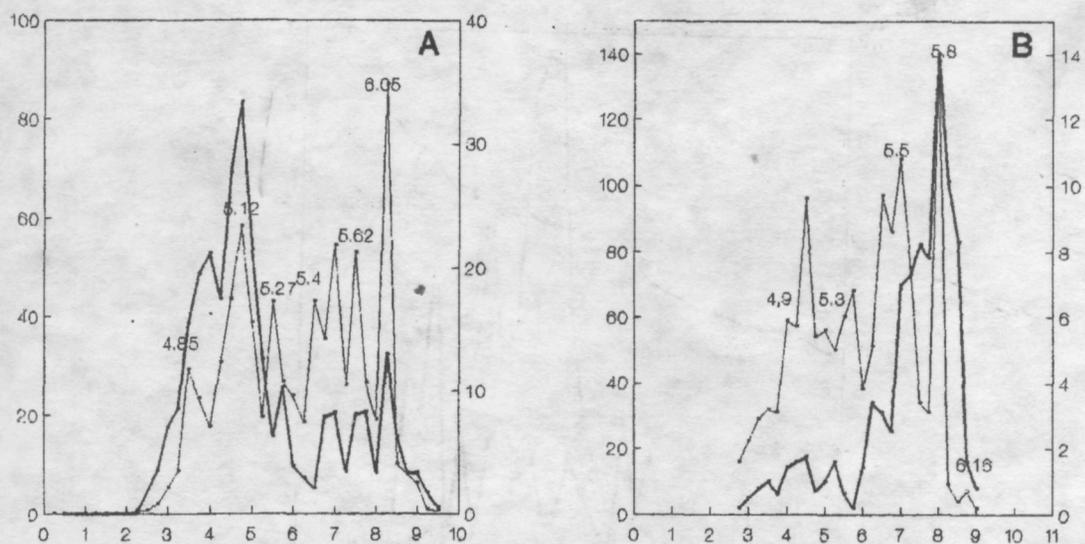


Рис. 2. - ИЭФ внутриклеточной (-, Y1) и секретированной (-, Y2)  $\alpha$ -L-фукозидазы фибробластов Фабри на ранней (А) и поздней (Б) стадии развития монослоя.

По оси абсцисс - расстояние от анода (см), по оси ординат (Y1, Y2) - флуоресценция (относительные единицы). Приведены значения изоточек.

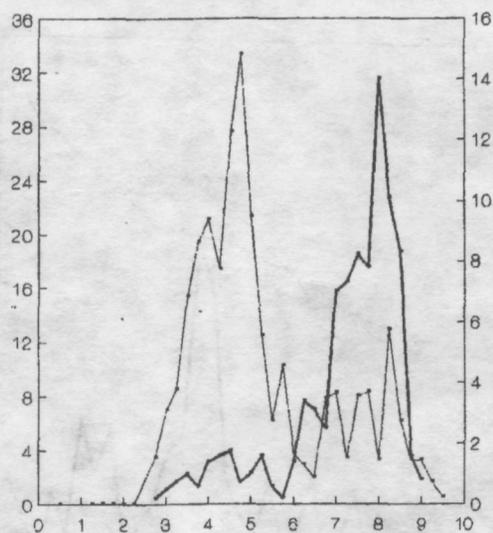


Рис. 3. - ИЭФ  $\alpha$ -L-фукозидазы, секретированной фибробласами Фабри на ранней (-, Y1) и поздней (-, Y2) стадии развития монослоя.

По оси абсцисс — расстояние от анода (см), по оси ординат (Y1, Y2) — флуоресценция (относительные единицы).

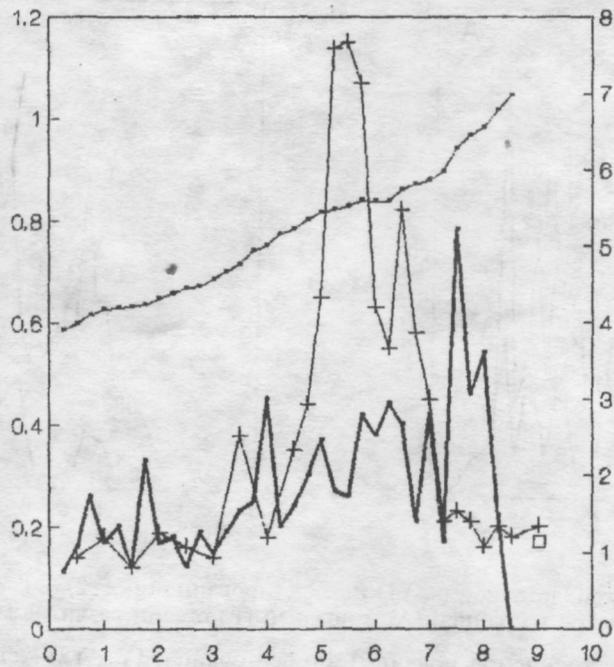


Рис.4.- ИЭФ  $\alpha$ -L-фукозидазы, секретированной фибробластами больного с MPS III на ранней (-+-) и поздней стадии развития монослоя (-); градиент pH (-·-).

По оси абсцисс - расстояние от анода (см), по оси ординат: Y1 - флуоресценция (относительные единицы), Y2 - значения pH

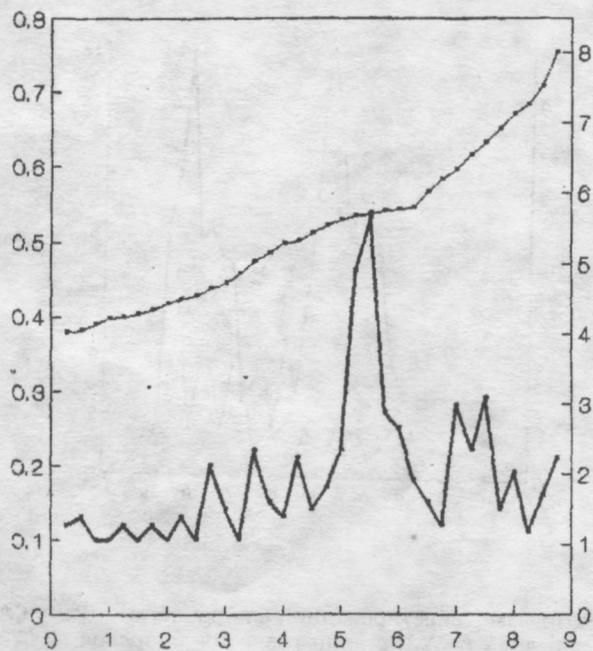


Рис.5.- ИЭФ  $\alpha$ -L-фукозидазы, секретированной фибробластами больного с синдромом Гурлер на поздней стадии развития монослоя (-); градиент pH (-·-).

По оси абсцисс - расстояние от анода (см), по оси ординат: Y1 - флуоресценция (относительные единицы), Y2 - значения pH

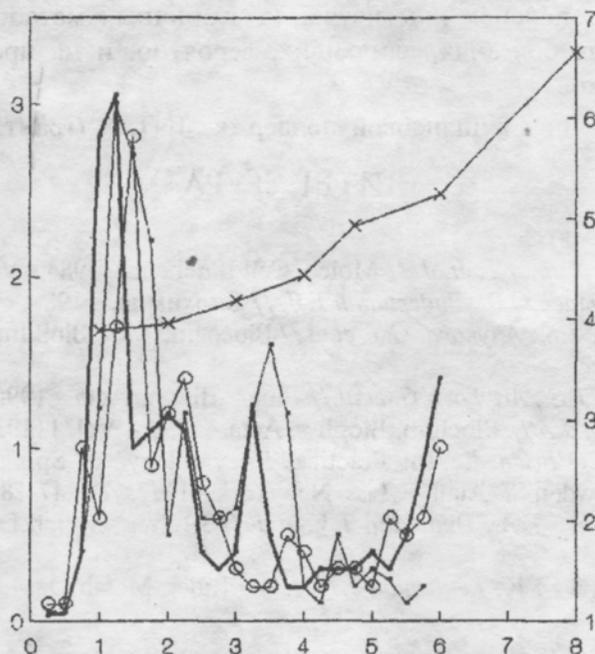


Рис.6. - ИЭФ внутриклеточной  $\alpha$ -L-фукозидазы нормальных фибробластов (-) и клеток от больных с синдромами Гурлер (-) и Санфилиппо (-o-); градиент pH (-+-).

По оси абсцисс - расстояние от анода (см), по оси ординат: Y1 - флуоресценция (относительные единицы), Y2 - значения pH

хорошо видно появление более нейтральных форм фермента, секретированного клетками на поздней стадии (и, соответственно, с максимальным уровнем накопления нерасщепляющихся соединений). Аналогичные данные получены на фибробластах от пациента с болезнью Гурлер (рис. 5). При этом профили изоферментного состава внутриклеточной фукозидазы при мукополисахаридозах обоих типов не изменялись (рис. 6). При данных лизосомных болезнях в тканях накапливаются такие гликозаминогликаны, как гепарансульфат и дерматансульфат.

Изменения профиля множественных форм  $\alpha$ -L-фукозидазы были сходны с таковыми в фибробластах больных с болезнью Фабри, при которой продуктами накопления являются преимущественно гексозилцерамиды.

Таким образом, полученные результаты подтверждают предположение, что накопление в клетках-мишенях негидролизуемых продуктов влияет на кислые гликозидазы, не связанные с первичным генетическим дефектом. На примере  $\alpha$ -L-фукозидазы показано, что при различных лизосомных болезнях, несмотря на индивидуальные отличия, изменения спектра множественных форм секретлируемого фермента имеют общую закономерность: появляются более нейтральные изоформы с уменьшенной термостабильностью и смещенным в более щелочную область оптимумом pH (2,3,4), а это, по данным литературы (6), характерно для менее сиалированных форм  $\alpha$ -L-фукозидазы. Поэтому полученные результаты свидетельствуют о том, что внутриклеточная аккумуляция негидролизуемых соединений, индуцируя синтез лизосомных ферментов *de novo*, влияет на посттрансляционный процессинг, в частности, на процесс сиалирования секретлируемых гликози-

даз и приводит к появлению менее сialiрированных изоформ ферментов. Эти результаты открывают перспективы изучения вторичных метаболических нарушений при лизосомных болезнях, влияющих, вероятно, и на проявление их фенотипических признаков.

Работа выполнена при финансовой поддержке INTAS (грант N 3625 ).

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Kato T., Okada S., Yutaka T. *et al.* // *Molec. Cell Biochem.*- 1984.- Vol. 60. - P. 83-98.
- 2 Ивлева Т.С., Ермолаев С.В., Видершайн Г.Я. // *Биохимия.*- 1988.- Т. 53.- С. 2010-2018.
- 3 Beyer, E.M., Ivleva, T.S., Artykova, G.T. *et al.*// *Biochem. Mol. Biol. Inter.*- 1993.- Vol. 30.- P. 367-375.
- 4 Beyer E.M., Ivleva T.S., Artykova G. *et al.*// *Bioch. Bioph. Acta.*- 1995.-Vol.1270.-P.7-11.
- 5 Piesecki S., Alhadef J.A.// *Biochim. Biophys. Acta.*- 1992.- Vol. 1119.- P. 194-200.
- 6 Alhadef J.A. and O'Brien J.S. In: *Practical Enzymology of Sphingolipidoses*, edited by Callahan J. and Lowden S. -Alan R.Liss. New York.- 1977.- P. 247-281.
- 7 Voznyi Ya.V., Karpova E.A., Dudukina T.V. *et al.*// *J.Inher. Metab.Dis.*- 1993.- Vol.16.- P. 465-472.
- 8 Karpova E.A., Voznyi Ya.V., Keulemans J.L.M. // *J.Inher. Metab.Dis.*- 1996.- Vol.19.- P. 278-285.

### CHANGE OF ISOFORMS' SPECTRA OF $\alpha$ -L-FUCOSIDASE SECRETED BY AFFECTED-CELLS IN SOME HEREDITARY LYSOSOMAL DISEASES

*T.S.Ivleva, E.M.Beyer, N.A.Ushakova, V.A.Malakhova\*, E.A.Karpova, I.V.Tsvetkova\**

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,  
Pogodinskaya St. 10, Moscow 119832, Russia

\* Research Centre for Medical Genetic, Moskvorech'e St. 1, Moscow 115478, Russia

In vitro it was studied the isoform spectra of the intracellular and secreted  $\alpha$ -L-fucosidase from skin fibroblasts of patients with Fabry disease (glycolipidosis), Hurler and Sanfilippo D diseases (mucopolysaccharodosis, types I and III) and in the normal state was studied. It was shown that the multiple form profile of secreted  $\alpha$ -L-fucosidase in patients fibroblasts was changed as compared to that in control: the pathological cells were characterized by expression of more basic isoforms of  $\alpha$ -L-fucosidase. The changes were similar to those in sucrose-loaded normal cells, modelling storage disease. The data obtained allow the suggestion that the intracellular accumulation of compounds whose hydrolysis was disturbed on a hereditary deficiency of enumerated glycosidases can influence the posttranslational processing of  $\alpha$ -L-fucosidase, the enzyme which is not primary affected in these disorders. These data allow the conclusion that the high phenotypic heterogeneity of lysosomal storage diseases is possibly due to the influence of so-called epigenetic factors involving the changes in properties of such glycosidases as are not associated with a primary hereditary defect.

**Key words:** Lysosomal storage, diseases, acid glycosidases,  $\alpha$ -L-fucosidase, sucrose, skin fibroblasts