

Institutul de chimie fiziologică al Universității Ruhr din Bochum, R.F.G.
(director: prof. dr. H. Faillard) și Laboratorul de biochimie clinică al I.M.F.
(cond.: conf. dr. E. Módy, doctor în medicină) din Tirgu-Mureș

IZOLAREA ȘI CARACTERIZAREA MUCINEI SUBMAXILARE DE CAL. LEGĂTURILE GLUCIDO-PEPTIDICE POSIBILE

III. Proprietăți imunologice *

dr. E. Módy, dr. H. Huser, dr. H. Faillard

Mucinele submaxilare izolate pînă în prezent prezintă proprietăți de grup sanguin (bou (1), porc (2, 3), oaie (4)). Această activitate se datorește unor glucide localizate la capătul terminal nereducător al catenelor glucidice (5, 6). Acidul N-glicolil-neuraminic maschează uneori această activitate (7). Antigenicitatea mucinelor submaxilare pare să fie determinată aproape exclusiv de partea proteinică (4).

În lucrarea de față GSC (8) a fost studiată cu ajutorul imunodifuziunii (9), imunoelectroforezei (10) și testului de inhibare a hemaglutinării (11). Acidul neuraminic a fost scindat enzimatic (12), respectiv cu ajutorul unei hidrolize acide slabe (0,1 N acid sulfuric, la 80° C, timp de o oră (13)).

Material și metodă

1. Antiserul de iepure contra GSC a fost obținut după metoda lui Grabar (10) și păstrat sub formă liofilizată.
2. Imunodifuziunea s-a efectuat după metoda lui Ouchterlony (9) în

* Lucrarea a fost efectuată cu sprijinul Fundației Humboldt din R. F. a Germaniei.

gel de agaroză (Behringwerke, Marburg/Lahn, R.F.G.), soluție tampon 1% medinal/veronal pH = 8,2. Soluțiile de antigen conținând 1 mg GSC pe ml au fost diluate cu soluția tampon 1:8, respectiv 1:16 înainte de aplicare.

3. Dezacetilarea GSC: 50 mg GSC s-au dizolvat în 50 ml de tampon fosfați 0,05 M, pH = 7,5, și s-au amestecat cu un volum egal de hidroxilamină—HCl 0,4 M, incubându-se la 37°C, timp de o oră, pentru scindarea grupărilor acetilice (14). Amestecul a fost dializat și liofilizat. GSC dezacetilată conține încă 11,3% acid neuraminic (13).

4. Scindarea acidului neuraminic cu neuraminidază (12): GSC nativă, respectiv dezacetilată, a fost incubată cu neuraminidază (12) într-un aparat Warburg la 37°C. După 8 și 24 de ore de incubare s-a adăugat neuraminidază proaspătă. La sfârșitul incubăției (72 ore) soluția a fost aplicată pe o coloană de Sephadex G-200 (88 × 3,5 cm) pentru îndepărtarea neuraminidazei, utilizând tampon fosfați (0,05 M, pH = 7,0, conținând KCl 0,1 M și 0,02% azid de Na pentru conservare). Cantitatea de GSC din eluate a fost determinată prin citirea extincțiilor la 280 nm, precum și prin dozarea hexozelor totale cu metoda lui Dubois și colab. (15). Frațiunile conținând GSC au fost colectate, dializate la rece față de apă deionizată și liofilizate.

5. Scindarea acidului neuraminic printr-o hidroliză acidă slabă: 100 mg de GSC au fost dizolvate în 100 ml acid sulfuric 0,1 N și incubate la 80°C timp de o oră. Soluția a fost dializată față de apă deionizată la rece și liofilizată. GSC desialinizată conține acid neuraminic mai puțin decât 1% după metoda lui Aminoff (13).

6. Imunoelectroforeza (10): s-a utilizat același tampon ca și în cazul imunodifuziunii. Pe fiecare lamă de microscop s-au aplicat câte 3 ml de agaroză 1%. Electroforeza s-a efectuat într-o cuvă Shandon. Toate soluțiile de derivați de GSC au fost de 0,1%, serul de cal fiind aplicat nediluat. Electroforeza a fost efectuată la 140 V și 3 mA pe lamă, timp de două ore și jumătate. După terminarea electroforezei, în jgheabul central s-au pipetat 30—40 μ l de antiser. Lamele au fost ținute în cameră umedă timp de 48 ore. Eluția proteinelor neprecipitate s-a efectuat cu o soluție de NaCl 0,9%. După uscarea lamele au fost colorate cu amidoschwarz — 10 B (10).

7. Testele de hemaglutinare au fost efectuate după metodele lui Kabat și Mayer (11). Suspensiile de eritrocite „Sangocell A₁Rh +“, „B, Rh +“ și „O Rh +“, precum și imunoserurile de testare (anti-A, anti-B și fitohe-maglutinină anti-H) au fost obținute de la firma Behringwerke, Marburg/Lahn, R.F.G.

a) Testul pentru determinarea unității hemaglutinante: O unitate hemaglutinantă (UHA) este considerată de Kabat și Mayer (11) fiind cantitatea de anticorpi, care aglutinează eritrocitele din 0,2 ml suspensie eritrocitară de 4%, la 37°C. S-au utilizat eprubetele de 7 × 50 mm. Astfel, volumele indicate de Kabat și Mayer (11) au putut fi reduse la 0,05 ml (2—5 UHA). Citirea aglutinării s-a efectuat la microscop.

b) Diferenții derivați ai GSC au fost dizolvați în NaCl 0,9% în concentrație de 0,1% și au fost supuși testelor calitative și cantitative de inhibare a hemaglutinării.

Cite 0,15 ml din soluțiile 0,1% de GSC respectiv de diferiți derivați ai GSC s-au incubat la 37°C, timp de 30 minute cu 0,05 ml din imunoserurile anti-A, anti-B și anti-H, diluate în prealabil 1:4 cu NaCl 0,9%. Apoi

E. MODY ȘI COLAB.: IZOLAREA ȘI CARACTERIZAREA MUCINEI
SUBMAXILARE DE CAL...

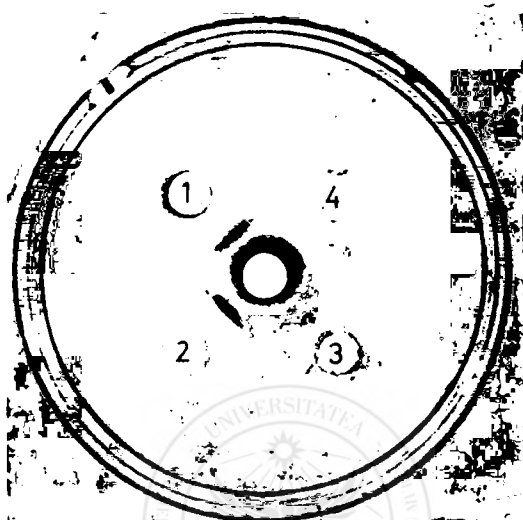


Fig. nr. 1: Imunodifuziunea GSC purificată pe
DEAE-Sephadex (1 și 2) și hidroxilapatită (3 și 4),
diluții 1:8 respectiv 1:16

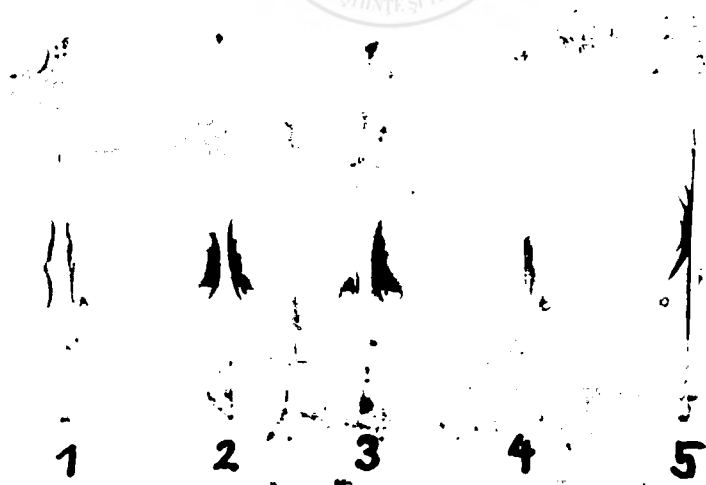


Fig. nr. 2: Imunoelectroforeza diferiților derivați ai GSC (explicație în text)

s-a adăugat la fiecare eprubetă 0,05 ml din suspensia 4^o de eritrocite corespunzătoare, tuburile fiind incubate din nou la 37°C timp de o oră. S-au efectuat următoarele teste de control:

1. 0,2 ml NaCl 0,9^o + 0,05 ml suspensie 4% de eritrocite,
2. 0,15 ml NaCl 0,9% + 0,05 ml antiser corespunzător diluat 1:4 + 0,05 ml suspensie 4^o de eritrocite corespunzătoare,
3. 0,15 ml GSC 0,1^o + 0,05 ml NaCl 0,9^o + 0,05 ml suspensie 4^o de eritrocite corespunzătoare.

c) *Testul cantitativ de inhibare a hemaglutinării*: s-au efectuat diluții succesive din soluțiile 0,1% ale derivaților de GSC cu NaCl 0,9^o pînă la 1:16.384. Control pozitiv: 0,05 ml NaCl 0,9% + 0,05 ml antiser corespunzător (diluat 1:4). Cei 0,05 ml din suspensiile 4^o de eritrocite corespunzătoare au fost adăugați după o incubatie de 37°C, timp de 30 de minute. Amestecurile au fost incubate din nou la 37°C timp de o oră. Control negativ: 0,1 ml NaCl 0,9^o + 0,05 ml suspensie 4% de eritrocite corespunzătoare.

Rezultate

1. Imunodifuziunea:

Așa cum arată figura nr. 1, GSC purificată pe DEAE-Sephadex prezintă două linii de precipitare, pe cînd cea purificată pe hidroxilapatită prezintă numai una.

Pentru a afla dacă grupările acetil maschează într-o oarecare măsură antigenicitatea substanței, GSC a fost dezacetilată în mediu alcalin cu hidroxilamină (14). Schauer și Faillard (16) au pus în evidență în cazul GSC efectul grupărilor 4—0-acetil asupra eliberării acidului neuraminic de către neuraminidază. Din acest motiv GSC a fost încălzită în mediu alcalin cu hidroxilamină și pe urmă tratată cu neuraminidază. GSC dezacetilată și tratată cu neuraminidază conține încă 3,8^o ± 0,2% acid neuraminic (13).

GSC a fost tratată și direct cu neuraminidază, conținînd în urma acestui tratament încă 3,6 ± 0,2^o acid neuraminic (13). Am constatat că nici dezacetilarea urmată de desialinizare, nici desialinizarea singură nu au nici un efect asupra desfășurării reacției antigen-anticorp.

2. Imunoelectroforeza:

Figura nr. 2 reprezintă imunoelectroforegramele ale GSC purificate cu hidroxilapatită, cu DEAE-Sephadex precum și ale unor derivați ai acestora:

Pe partea dreaptă a fiecărei lame s-a aplicat GSC purificată cu hidroxilapatită. Pe partea stîngă a plăcilor se găsesc în ordine de la stînga spre dreapta: 1 = GSC purificată pe DEAE-Sephadex, prezentînd 2 linii de precipitare; 2 = GSC desialinizată enzimatic; 3 = GSC dezacetilată și desialinizată enzimatic; 4 = GSC desialinizată cu ajutorul unei hidrolize acide slabe; 5 = ser de cal nediluat.

S-a vede că GSC desialinizată enzimatic prezintă 2 linii de precipitare, din care una mai slabă. GSC dezacetilată și desialinizată enzimatic prezintă numai o singură linie de precipitare. Acest derivat pare să nu migreze în agaroză. Tratarea GSC cu acid sulfuric 0,1 N timp de o oră la

80° C distruge total antigenitatea acesteia. Serul de cal prezintă 6—7 linii de precipitare.

3. Testele de inhibare a hemaglutinării:

Cu ajutorul acestor teste se pot obține unele informații indirecte referitoare la structura catenelor glucidice. Activitățile de grup sanguin sînt bazate pe prezența unor glucide caracteristice la capătul terminal nereducător al lanțurilor laterale (5, 6). Pentru grupul A este esențială prezența terminală a N-acetil-galactozaminei; D-galactoza terminală determină activitatea de grup B; iar poziția terminală a L-fucozei este caracteristică activității de grup O.

a) Determinarea unității hemaglutinante (UHA):

Imunoserurile specifice antigrup sanguin au manifestat acțiune hemaglutinantă pînă la diluția de 1:64.

Deci 0,05 ml de antiser nediluat a conținut cca 16 UHA ($64:4 = 16$) deoarece, față de metoda originală s-au utilizat volume de 4 ori mai reduse. Din acest motiv, în cursul examinărilor antiserurile au fost diluate 1:4 cu NaCl 0,9%.

b) Testul calitativ de inhibare a hemaglutinării:

Am putut constata că GSC și toți derivații acesteia pe care i-am examinat într-o concentrație de 0,1% prin fixarea aglutinelor, sînt capabili să inhibe în aceeași măsură hemaglutinarea de tip A, B și H.

c) Testele cantitative de inhibare a hemaglutinării:

Pentru a determina capacitatea reală de fixare a diferiților derivați ai GSC s-a recurs la efectuarea testelor cantitative de inhibare a hemaglutinării. S-a constatat că GSC purificată cu DEAE—Sephadex, hidroxilapatită, GSC desialinizată enzimatic și dezacetilată plus desialinizată prezintă o capacitate însemnată de a inhiba aglutinarea eritrocitelor de tip A, pînă la diluția 1 : 2.048. Această capacitate de inhibare este cu mult mai scăzută față de grupele B și H (pînă la diluția de 1 : 16). O hidroliză acidă slabă, precum și tratamentul cu hidroxilamină, reduce capacitatea de inhibare a hemaglutinării față de tipul A.

Discutarea rezultatelor

În cursul imunodifuziunii, GSC purificată cu DEAE-Sephadex prezintă 2 linii de precipitare, pe cînd cea purificată cu hidroxilapatită numai una. Se poate deci afirma, că derivatul din urmă conține numai cantități neglijabile de impurități proteinice. Nici dezacetilarea, nici desialinizarea enzimatică nu influențează reacția antigen-anticorp. *Gottschalk* și colab. (4) au îndepărtat enzimatic acidul neuraminic și N-acetil-galactozamina din mucina submaxilară de oaie. Acest derivat parțial desialinizat mai prezintă o activitate antigenică, fapt care arată că antigenicitatea mucinelor este legată mai mult de structura proteinică și nu de cea glucidică. Rezultatele noastre sînt în concordanță cu această observație.

GSC purificată cu hidroxilapatită prezintă 3 linii de precipitare aproape identice la imunoelectroforeză. Această glucoproteină migrează foarte neomogen în agaroză, ocupînd o zonă foarte largă în gel. GSC tratată cu neuraminidază prezintă 2 linii de precipitare, derivatul dezacetilat și desialinizat numai una. Este deci clar, că în urma acestui tratament au fost îndepărtate sarcini puternic electronegative. GSC desialinizată nu

migrează atât de mult și apar linii de precipitare mai puține. Modificări similare în migrarea electroforetică a unor glucoproteine desialinizate au mai fost observate și de alții (17, 18).

O hidroliză acidă slabă distruge total antigenicitatea GSC.

Serul de cal nediluat prezintă 6—7 linii de precipitare. Cele 7 tipuri de imunoglobuline de cal (19, 20) apar foarte similare cu aceste linii.

GSC și derivații ei, ca și celelalte mucine, posedă activități de grup sanguin. Activitatea de grup A este cea mai accentuată. Îndepărtarea acidului neuraminic nu are nici un efect asupra acestei activități. Este bine cunoscut faptul că acidul neuraminic nu joacă nici un rol în determinarea activității de grup sanguin ABO (2) și Lewis. O hidroliză acidă slabă distruge determinanții antigenici în așa măsură încît activitatea de grup sanguin A a GSC devine mult redusă.

Tratamentul cu hidroxilamină a GSC reduce la fel activitatea de grup sanguin A. Se știe că hidroxilamina în mediu alcalin scindează grupările acil ale hexozaminelor (21) dar într-o măsură cu mult mai mică decît grupările O-acetilice. Activitatea de grup sanguin A trebuie să scadă deci în urma acțiunii hidroxilaminei, așa cum s-a și observat. Tratamentul ulterior cu neuraminidază poate demasca cîteva fragmente terminale de N-acetil-galactozamină (7), prin care se poate explica creșterea din nou a activității de grup sanguin A. *Aminoff și Morrow* (7) descriu un fenomen similar.

Este deci foarte probabil că, catenele laterale glucidice ale GSC prezintă ramificații ca și în cazul mucinei submaxilare de porc (2, 3). Această afirmație este sprijinită și de observația, că fucoza și acidul neuraminic au fost găsite totdeauna la capătul terminal nereducător al lanțurilor (5, 6). Din cercetările noastre referitoare la studiul capacității hemaglutino-inhibitoare a GSC, reiese că majoritatea lanțurilor glucidice trebuie să aibă N-acetil-galactozamină la capătul lor nereducător.

Glucoproteina alfa-1 acidă (23) conține la fel o cantitate însemnată de acid neuraminic, care se scindează greu cu neuraminidaza. În cazul GSC s-a reușit scindarea numai a 70% din cantitatea totală de acid neuraminic legat covalent, într-o perioadă de 72 de ore, cu ajutorul neuraminidazei.

Concluzii

GSC și diferiții săi derivați au fost studiați cu ajutorul imunodifuziunii, imunoelectroforezei și testelor calitative și cantitative de inhibare a hemaglutinării. În cursul imunodifuziunii GSC purificată pe hidroxilapatită prezintă o singură linie de precipitare. Antigenicitatea substanței pare să fie determinată de partea proteinică, dezacetilarea și desialinizarea neavînd nici un efect asupra ei. În cursul imunoelectroforezei GSC purificată prezintă 3 linii de precipitare identice, care dispar în urma desialinării respectiv dezacetilării, rămînînd numai una, ceea ce pledează pentru caracterul polidispers al moleculelor de GSC. GSC are o capacitate marcată de inhibare a hemaglutinării de tip A. Este deci foarte probabil că lanțurile glucidice conțin N-acetil-galactoză la capetele lor terminale nereducătoare.

Sosit la redacție: 27 iunie 1972.

Bibliografie

1. Horowitz M. I., Hashimoto Y., Pigman W.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 83, 209;
2. Carlson D. M.: *J. Biol. Chem.* (1968), 243, 616;
3. Payza A., Rizvi S., Pigman W.: *Arch. Biochem. Biophys.* (1969), 129, 68;
4. Gottschalk A., Schauer H., Uhlenbruck G.: *Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chem.* (1971), 352, 17;
5. Morgan W. T. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1970), 169, 118;
6. Eatkins W. M.: *Science* (1966), 152, 172;
7. Aminoff F., Morrow M. P.: *FEBS Letters* (1970), 8, 353;
8. Huser H., Mody E., Faillard H.: *Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chem.* (1973), 354, 749;
9. Ouchterlony O.: *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* (1948), 25, 186;
10. Grabar P., Burtin P.: *Immunoelktrophoretische Analyse*. Vol. I, Elsevier Publ. Co., 1964;
11. Kabat E. A., Mayer M. M.: *Experimental Immunochemistry*, 2nd Ed. Ch. C. Thomas Publ., Springfield, Illinois, 1964, 127;
12. Mohr E., Schramm G.: *Z. Naturforsch* (1960), 15 B, 568;
13. Aminoff D.: *Biochem. J.* (1961), 81, 384;
14. Hestrin S.: *J. Biol. Chem.* (1949), 180, 249;
15. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith D.: *Anal. Chem.* (1956), 28, 350;
16. Schauer R., Faillard H.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* (1968), 349, 961;
17. Saini P. S., Done J.: *FEBS Letters* (1970), 7, 86;
18. Baker E., Shaw D. C., Morgan E. H.: *Biochemistry* (1968), 7, 1371;
19. Rohey J. H.: *J. exp. Med.* (1967), 125, 249;
20. Helms C. H., Allern Z. P.: *J. Immunol.* (1970), 105, 1253;
21. Herman-Boussier G., Harbon S., Clauser H.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1963), 45, 1267;
22. Harbon S., Herman-Boussier G., Clauser H.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1963), 45, 1279;
23. Labat J., Schmid K.: *Experientia* (1969), 25, 701.