

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ  
БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 578.088

НЕОБЫЧНЫЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПАКТНОЙ  
ФОРМЫ ФРАГМЕНТОВ pFh (“ШАРНИРНОЙ” ОБЛАСТИ) IgG3 Kuc и Sur

© 2011 г. В. М. Тищенко\*

Институт биологического приборостроения Российской академии наук, Пушchino, Московская обл., 142290

Поступила в редакцию 06.09.2010 г.

Принята к печати 05.04.2011 г.

Фрагменты pFh “шарнирной” области IgG3 Kuc и Sur человека способны свернуться в компактную форму, что приводит к образованию белков с вторичной (супервторичной) структурой, представленной преимущественно двойной поли-L-пролиновой спиралью. Показано, что тепловая денатурация компактной формы pFh-фрагмента “шарнирной” области IgG3 Kuc и Sur происходит в два этапа. На первом этапе по модели “все или ничего” происходит распад компактной структуры белков с сохранением вторичной структуры. На втором – плавится сама двойная поли-L-пролиновая спираль, состоящая из четырех отдельных кооперативных блоков, которые образованы участками с высоким содержанием остатков пролина. Полипролиновая конформация вторичной структуры и большое число дисульфидных связей между цепями обуславливают высокую удельную энтальпию ее денатурации и высокую термостабильность соответственно.

**Ключевые слова:** pFh-фрагмент, двойная поли-L-пролиновая спираль, кооперативные блоки, третичная структура.

THE UNUSUAL THERMODYNAMIC PROPERTIES OF COMPACT FORMS pFh FRAGMENTS (HINGE REGION) IgG3 Kuc AND Sur, by V. M. Tischenko\* (Institute of Biological Instrumentation, Russian Academy of Science, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia; \*e-mail: tischen@vega.protres.ru). pFh fragments from the hinge region of human IgG3 Kuc and Sur can fold into compact form, resulting the formation of proteins with secondary (super-secondary) structure, which is represented almost exclusively double poly-L-proline helix. It was demonstrated by several methods that the thermal denaturation of compact form pFh fragment (hinge region) IgG3 Kuc and Sur occurs in two stages. The “two-state” model described the disintegration of the compact structure with preservation of the secondary structure (double poly-L-proline helix). In the second stage melts itself helix consisting of four cooperative units, which are formed by the sections with a high content of proline residues. Poliproline conformation of secondary structure and large number of disulfide bonds is responsible for high specific enthalpy of denaturation and high thermal stability.

**Keywords:** pFh fragment, double poly-L-proline helix, cooperative units, tertiary structure.

Иммуноглобулины третьего подкласса человека (IgG3) обладают уникальной структурой, обусловленной необычно большими размерами шарнирной области (или шарнирного участка, hinge) [1]. Предполагают, что эта структура у IgG3 возникла в результате квадрупликации экзона, кодирующего шарнирную область IgG1 [2]. Длительное время считали, что в интактной молекуле этого белка шарнирный участок может иметь форму вытянутого стержня [3]. Однако затем показали, что у некоторых миеломных IgG3 указанная область способна иметь не только стержнеобразную, но и компактную форму [4]. Выделенная с помощью ограниченного протеолиза компактная форма pFh-фрагмента (этот фрагмент представ-

ляет собой основную часть “шарнирной” области, так называемый core hinge) в нейтральной области pH также может обладать, судя по некоторым гидродинамическим данным [5], как компактностью, так и некоторыми другими свойствами, которые типичны для небольших глобулярных белков. Известно, что для указанного класса белков характерна очень высокая степень кооперативности в процессах сворачивания–разворачивания [6], в том числе при тепловой денатурации, что наиболее корректно показано методом сканирующей микрокалориметрии [7]. Вполне естественно исследовать с помощью этого же метода и pFh-фрагмент с тем, чтобы выяснить вопрос о его принадлежности к классу небольших глобулярных белков [6, 7]. Ранее мы показали, что в составе интактной молекулы IgG3 Kuc

\* Эл. почта: tischen@vega.protres.ru

“шарнирная” область способна, вдобавок к имеющимся 12 каноническим доменам, свернуться в тринадцатый домен [8]. Также мы предложили возможную структуру этого неканонического домена. Однако в составе интактной молекулы IgG3 Кис третичная структура указанного экстра-домена стабилизирована дополнительными взаимодействиями как с Fab-субъединицами, так и с Fc-субъединицей [4]. Принципиально то обстоятельство, что на фоне очень больших тепловых эффектов, связанных с разрушением двенадцати обычных доменов IgG [4, 8, 9], невозможно достаточно точно определить термодинамические параметры, которые характеризуют состояние тринадцатого домена. Поэтому в настоящей работе в первую очередь поставлена задача исследовать термодинамические характеристики изолированного домена (pFh-фрагмента), в частности определение его принадлежности к классу компактных глобулярных белков с помощью различных методов, прежде всего, метода сканирующей микрокалориметрии.

Дополнительный интерес к структуре и термодинамическим свойствам этих объектов вызван тем, что они, по-видимому, имеют нестандартную для глобулярных белков структурную организацию. Вторичная структура белков представлена почти полностью двойной поли-L-пролиновой спиралью, тогда как ранее для типичных глобулярных белков найдены лишь участки обычной поли-L-пролиновой спирали (наряду с  $\alpha$ -спиралями и  $\beta$ -тяжами) [10, 11]. Такая вторичная (супервторичная) структура образована идентичными протяженными участками Val215–Pro276 двух тяжелых цепей IgG3. Каждая из двух цепей имеет, в основном, конформацию поли-L-пролиновой спирали, а вместе, соединенные большим числом дисульфидных связей, они образуют двойную поли-L-пролиновую спираль [12–14]. Рентгеноструктурный анализ показал, что это образование имеет жесткую стержнеобразную форму [15]. Можно предположить, что компактная форма pFh-фрагмента состоит из нескольких жестких блоков, которые сохраняют конформацию двойной поли-L-пролиновой спирали, но разделены небольшими гибкими участками [5, 13].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Получение препаратов и их химическая модификация.** Как IgG3 Кис человека, неоднократно изучавшийся ранее [4, 5, 13, 16], так и новый IgG3 Sur человека получены по стандартной методике [16]. Белки отнесены к третьему подклассу, поскольку реагируют с антисывороткой к иммуноглобулинам этого подкласса, не взаимодействуют с белком *A Staphylococcus aureus* и имеют молекулярную массу 170 кДа.

pFh-фрагмент (т.е. пепсиновый фрагмент), а также субфрагменты Lys218–Cys252, Lys253–Pro276 и Lys218–Cys267, первые два из которых представляют собой приблизительно 1/2, а третий – 3/4 от всего pFh-фрагмента, получены путем пепсинового и папаинового протеолиза соответственно как это описано ранее [14, 17].

Частичное восстановление и последующее алкилирование дисульфидных связей проведено в 10 mM фосфатном буфере, pH 7.0, 10 mM DTT с помощью 24 mM йодацетамида [18]. Модификацию белка с восстановленной дисульфидной связью флуоресцеин-5-малеимидом проводили в 20 mM фосфатном буфере, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA при комнатной температуре при избытке белка над меткой с тем, чтобы предотвратить появление фракции белка с двумя и более флуоресцентными метками на одну молекулу [19, 20]. Селективную модификацию другой флуоресцентной меткой (флуоресцеин изотиоционат, FITC) интактных белков проводили по методике, по которой в молекуле pFh-фрагмента присутствует не более одной метки [20, 21].

**Определение молекулярной массы.** Молекулярную массу белков определяли на скоростной аналитической ультрацентрифуге “Beckman” модель E и на ультрацентрифуге “MOM”. При высокоскоростном равновесном центрифугировании использовали метод Ифантиса [22]. Распределение концентрации препаратов в ячейке регистрировали либо с помощью интерференционной системы Релея (концентрация белка – 0.3 мг/мл), либо с помощью абсорбционной двулучевой ультрафиолетовой системы на длинах волн 278 и 230 нм (концентрации белка 1 и 0.1 мг/мл). Средневесовую молекулярную массу  $M_w$  рассчитывали по формуле

$$M_w = 2RT / (1 - \nu \rho_{\text{рас}}) \omega^2 \times d \ln c / dr^2, \quad (1)$$

где  $c$  – концентрация белка,  $r$  – расстояние до точки вращения,  $\omega$  – угловая скорость в рад/с,  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $T$  – абсолютная температура,  $\nu$  – удельный парциальный объем,  $\rho_{\text{рас}}$  – плотность растворителя.

Молекулярную массу белков определяли и с помощью второго метода – низкоскоростного равновесного ультрацентрифугирования (метод Ван-Холда–Болдуина [23]). Расчет  $z$ -средней молекулярной массы  $M_z$  проводили по формуле

$$M_z = 2RT / \omega^2 (1 - \nu \rho) d(1/r \, dc/dr) / dc. \quad (2)$$

**Определение коэффициента седиментации.** Седиментацию белков изучали на ультрацентрифуге “Beckman” модель E при скоростях вращения ротора 41050–50150 об/мин. Использовали двулучевую ультрафиолетовую систему на длинах волн 230 и 278 нм. Концентрация белка составляла

0.05–0.3 мг/мл. Значения  $s_{20}^0$  определяли путем экстраполяции к нулевым значениям концентрации.

**Определение характеристической вязкости препаратов.** Вязкость растворов измеряли при различных температурах на вискозиметре Оствальда со временем истечения воды около 100 с при 20°C. Характеристическую вязкость  $[\eta]$  определяли экстраполяцией к нулевой концентрации значений вязкости белковых растворов. В экспериментах концентрацию белка изменяли в пределах 2–12 мг/мл в случае его компактной формы и 1–8 мг/мл для стержнеобразной формы. Каждую точку усредняли по результатам не менее шести измерений (десяти в случае компактной формы).

**Определение эллиптичности методом кругового дихроизма.** Спектры кругового дихроизма для субъединицы  $\text{Cafl}_{13-149}$  измерены на спектрополяриметре J-600 (Jasco) в термостатированных ячейках с длиной оптического пути 1.0 мм. Концентрацию белка изменяли от 0.2 до 1.0 мг/мл в ходе равновесных экспериментов. Молярную эллиптичность определяли по формуле

$$[\theta] = (\Theta M_{\text{ам}})/cl,$$

где  $\Theta$  – экспериментально измеренная эллиптичность в град,  $M_{\text{ам}}$  – средняя масса аминокислотного остатка,  $l$  – длина оптического пути.

**Исследование методом флуоресценции.** Эксперименты по измерению флуоресценции белка проводили на спектрофлуориметре MPF-44A (“Perkin Elmer”). Интенсивность флуоресценции раствора для меченых рFh-фрагментов измеряли в интервале 460–600 нм, длина волны возбуждения – 450 нм. Щели для эмиссии и экстинкции составляли соответственно 3 и 5 мм. При высоких температурах все спектральные измерения проводили при давлении в ячейках не менее 3 атм и обдувке азотом.

**Калориметрические исследования.** Измерения проводили на микрокалориметре ДАСМ-4М. Парциальную теплоемкость белка  $C_P$ , эффективную и калориметрическую энтальпию плавления  $\Delta H$  рассчитывали, как это описано в работах [6, 7]. Чтобы стабилизировать рН, использовали следующие буферные системы: при рН 3.5 – 10 мМ глициновый буфер, при рН 7.5 – 10 мМ фосфатный буфер.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно ранее полученным нами данным есть основания считать рFh-фрагмент, полученный из IgG3 Kuc, мономером в широком диапазоне рН (минимум от 3.5 до 8.0) [5, 14]. Это вновь подтверждено и уточнено более прямыми экспериментами, аналогичные данные получены для рFh-фрагмента IgG3 Sur. Результаты высокоскоростного и низкоскоростного ультрацентрифугирования позволяют утверждать, что оба белка су-

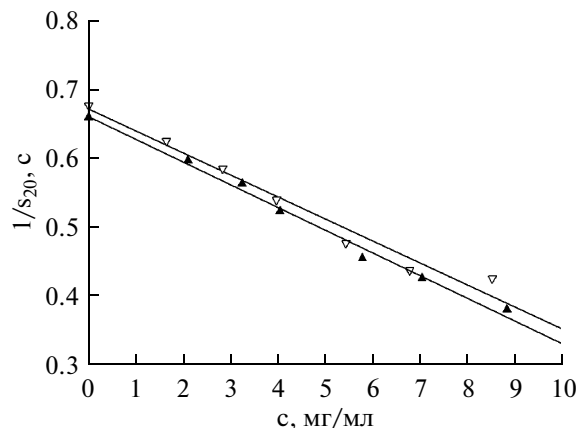
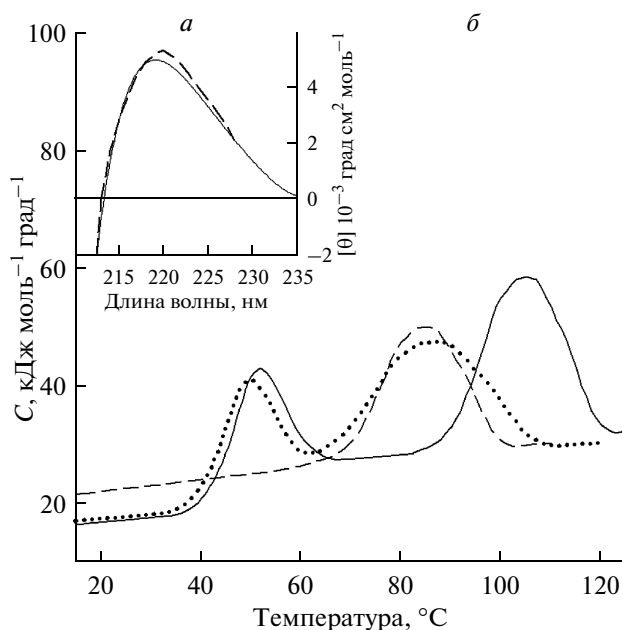


Рис. 1. Определение коэффициентов седиментации рFh-фрагментов IgG3 Kuc (▲) и IgG3 Sur (△) в 10 мМ фосфатном буфере, 100 мМ NaCl, рН 7.5.

ществуют в растворе в форме мономеров. Действительно, значения молекулярных масс для белков Kuc и Sur составляют  $M_w = 17.0 \pm 0.5$  кДа,  $M_z = 17.4 \pm 0.8$  кДа и  $M_w = 16.8 \pm 0.5$  кДа,  $M_z = 16.9 \pm 0.8$  кДа соответственно [5, 14]. Поскольку величины средневесовой и  $z$ -масс сильно различаются по чувствительности к наличию агрегатов, то их совпадение – наиболее убедительное доказательство “мономерности” обоих рFh-фрагментов [24].

Найденная величина характеристической вязкости  $\eta$  для рFh-фрагмента IgG3 Sur составляет при рН 7.5  $4.3 \text{ см}^3 \text{ г}^{-1}$ , что совпадает с аналогичной величиной для рFh-фрагмента IgG3 Kuc [5]. Эта величина близка к той, которую имеют компактные белки с близкими значениями молекулярной массы [25, 26]. Более того, величины коэффициентов седиментации  $s_{20}^0$  для рFh-фрагментов, полученных из двух миеломных белков Kuc и Sur, также характерны для компактных глобулярных белков аналогичной массы (1.45 S и 1.5 S соответственно, рис. 1).

Таким образом, гидродинамические данные указывают на то, что исследуемые рFh-фрагменты весьма схожи по компактности с обычными небольшими глобулярными белками. Исходя из этого факта, а также из формы самого спектра кругового дихроизма (рис. 2а) можно сделать вывод о том, что вторичная структура компактной формы рFh-фрагментов Kuc и Sur, в основном, состоит из двойных поли-L-пролиновых спиралей. Ранее теоретический анализ известных белковых структур показал, что небольшие сегменты обычных поли-L-пролиновых спиралей достаточно широко распространены в глобулярных белках [10, 11]. Также показано, что эта структура легко трансформируется в другие типы структур, в частности, в реверсивные повороты [10, 11]. Двойные спирали обладают меньшей способно-



**Рис. 2.** *a* – Спектр кругового дихроизма рFh-фрагмента до (20°C, пунктирная линия) и после (65°C, сплошная линия) плавления компактной структуры при pH 7.5. *б* – Температурная зависимость парциальной молярной теплоемкости компактной формы интактного рFh-фрагмента при pH 7.5 (1); компактной формы при pH 7.5 рFh-фрагмента с частично восстановленными дисульфидными связями (2); стержнеобразной формы [5] рFh-фрагмента при pH 3.5 (3). Данные представлены для рFh-фрагмента IgG3 Kuc, аналогичные данные получены и для рFh IgG3 Sur.

стью к трансформации, хотя для них отмечена возможность существования дополнительной конформации в виде спирали  $3_{10}$  [27]. Наличие последней не подтверждается имеющимися данными по КД (рис. 2*a*). Что касается реверсивных  $\beta$ -изгибов, то их присутствие более вероятно посколькучастьки, обогащенные остатками пролина и цистеина, разделены короткими сегментами, включающими остатки статистически достоверно присутствующие в  $\beta$ -изгибах [5, 28]. Такую точку зрения подтверждают прямые данные по использованию антител, направленных против эпитопа в  $V_H$ -домене миеломного IgG Ser, который представляет типичный  $\beta$ -изгиб [29]. Указанные антитела взаимодействуют с компактной, но не стержнеобразной формой рFh Kuc и Sur.

На рис. 2*б* приведена температурная зависимость молярной парциальной теплоемкости рFh-фрагмента Kuc, полученная из калориметрической кривой плавления этого белка в нейтральной области pH (практически идентичная кривая измерена и для плавления рFh-фрагмента IgG3 Sur). Если рассматривать лишь один низкотемпературный переход, то на первый взгляд плавление рFh-фрагмента происходит по достаточно стандартной схеме. Действительно, поскольку соглас-

но данным по молекулярным массам рFh мы имеем дело исключительно с внутримолекулярным конформационным переходом, то логично предположить, что первый пик теплопоглощения соответствует плавлению компактной структуры самого белка, а не олигомеров, которые могли образоваться в результате межмолекулярных взаимодействий. Об этом же свидетельствует отсутствие зависимости формы калориметрической кривой и всех термодинамических параметров от концентрации белка в интервале концентраций 1.5–7.0 мг/мл. Предположение о том, что первый пик на кривой теплопоглощения относится исключительно к плавлению компактной структуры рFh-фрагментов, полностью подтверждается и при совместном анализе данных, полученных с помощью микрокалориметрии и гидродинамики.

На рис. 3*б* представлены данные о степени завершенности первого перехода, рассчитанные по изменению доли энтальпии от ее полного значения, а также гидродинамические данные (характеристическая вязкость) и флуоресценция. Видна полная симбатность при изменении трех независимых параметров, характеризующих плавление компактной структуры белка. Следует указать, что форма кривых плавления не зависит от скорости прогрева в интервале 0.25–2 град/мин. Первый пик полностью воспроизводится после спонтанного охлаждения при повторном прогреве, если только белок не выдерживают при температуре 65°C и выше в течение двух ч. Таким образом, согласно всем имеющимся данным распад компактной структуры рFh-фрагментов – равновесный процесс, а это позволяет по кривым плавления, полученным различными методами, рассчитать термодинамические параметры этого перехода.

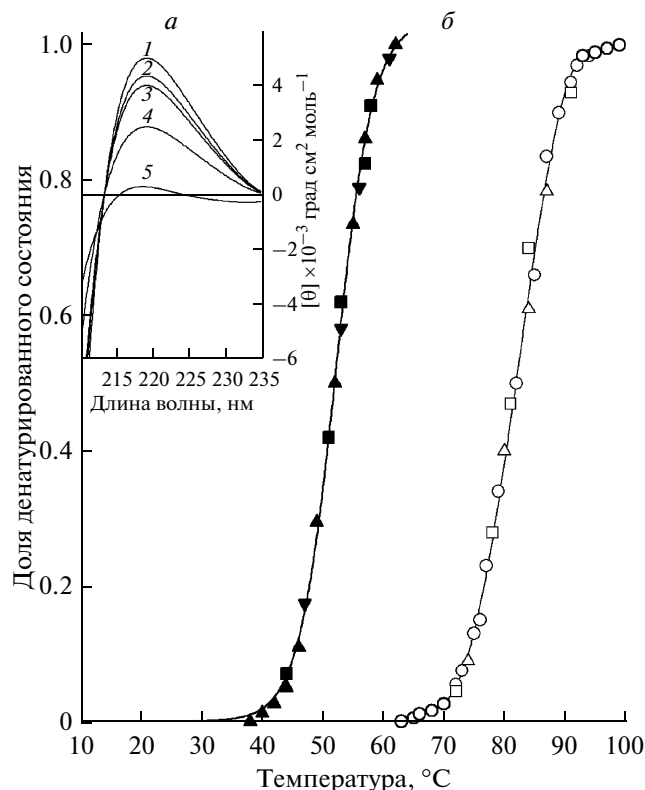
Отметим, что упомянутая инкубация при 65°C не приводит к полной необратимости низкотемпературного перехода. Однако после инкубации для воспроизведения первого пика теплопоглощения необходим уже не спонтанный процесс охлаждения образца, а медленное контролируемое охлаждение (отжиг), которое занимает не менее 6 часов. Поэтому логично предположить, что резкое снижение скорости ренатурации связано с изомеризацией пролиновых остатков при инкубации, поскольку процесс образования компактной структуры существенно ускорен в присутствии периплазматической пептидил-пролил цис-транс изомеразы *E. coli* [30]. Если рFh-фрагмент после инкубации при 65°C охладить до 37°C, а затем добавить изомеразу (соотношение фермент/субстрат – 1 : 50), то компактная форма белка возникает при обычном неконтролируемом охлаждении и первый пик теплопоглощения полностью воспроизводится. В результате инкубации при 65°C рFh-фрагмент переходит в метастабильное долгоживущее состояние [21, 31] со стержнеобразной формой [5, 14].

Калориметрическая энтальпия плавления третичной структуры рFh фрагментов Kuc и Sur составляет  $\Delta H_{\text{кал}} = 325 \text{ кДж} \times \text{моль}^{-1}$  и  $\Delta H_{\text{кал}} = 337 \text{ кДж} \times \text{моль}^{-1}$  соответственно. Эти величины хорошо соответствуют эффективным значениям энтальпии, определенным как из непосредственно самих калориметрических кривых, так и из кривых плавления, полученных с помощью флуоресценции и гидродинамики (табл. 1). Поскольку все величины эффективной энтальпии рассчитаны для модели одностадийного перехода между двумя состояниями и для мономолекулярной реакции, то можно сделать однозначный вывод о том, что плавление рFh-фрагментов Kuc и Sur происходит по принципу “все или ничего”, как это имеет место в случае небольших компактных глобулярных белков [6, 7]. Таким образом, эти фрагменты по ряду очень важных свойств (компактность структуры, ее высококооперативное плавление) можно отнести к упомянутой группе белков. Вместе с тем, по некоторым своим свойствам они отличаются от обычных глобулярных белков.

Денатурации обычных глобулярных белков сопутствует, как правило, разрушение не только их третичной структуры, но и значительной части вторичной структуры и переход в состояние, близкое к состоянию клубка [32], при котором взаимодействия между отдельными элементами полипептидной цепи невелики [33, 34].

При распаде компактной структуры рFh фрагментов Kuc и Sur в ходе их тепловой денатурации наблюдаем принципиально иную картину. На рис. 2а видно, что спектр кругового дихроизма компактной формы рFh фрагмента имеет вид, характерный для поли-L-пролиновой спирали [13, 14]. При прогреве до температуры 65°C, т.е. до температуры, при которой плавление третичной структуры белка по всем имеющимся данным завершено, спектр кругового дихроизма меняется незначительно. Согласно этим данным вторичная структура при распаде третичной структуры претерпела минимальные изменения и продолжает сохранять конформацию двойной поли-L-пролиновой спирали (поскольку все межцепочечные дисульфидные связи также сохраняются).

Кроме того, как уже имеющиеся данные для рFh Kuc, включая электронномикроскопические и гидродинамические [4, 5, 14, 35], так и представленные в табл. 1 новые данные для этого белка и для рFh Sur, свидетельствуют, что после прогрева до 65°C, а также при pH 3.5 они имеют форму стержня (равно как и в долгоживущем метастабильном состоянии при 20°C). Поэтому вполне логично предположить, что второй пик теплопоглощения, наблюдаемый в высокотемпературной области, обусловлен плавлением ис-



**Рис. 3.** а – Изменение спектров кругового дихроизма в температурном интервале 60–99°C (кривые 1–5 соответствуют температурам 62, 77, 79, 85, 99°C) при плавлении вторичной структуры в 10 мМ глициновом буфере, pH 3.5. б – Изменение доли денатурированного состояния компактной (темные символы) и вторичной (светлые символы) структур по данным калориметрии (▲ и △), вязкости (▼), флуоресценции (■ и □), кругового дихроизма (○). Все измерения проводили в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7.5 (при получении данных о компактной структуре) и в 10 мМ глициновом буфере, pH 3.5 (при получении данных о вторичной структуре).

ключительно вторичной (супервторичной) структуры этого необычного белка.

Калориметрические данные (рис. 2б) свидетельствуют, что плавление рFh фрагментов Kuc и Sur происходит в два этапа, причем и при втором переходе речь идет о внутримолекулярном процессе. Впрочем, в свете уже представленных выше данных неудивительно, что процесс тепловой денатурации рFh фрагментов оказался более сложным, чем это наблюдается у небольшого глобулярного белка. Поэтому вполне логично предположить, что второй пик теплопоглощения, наблюдаемый в высокотемпературной области, обусловлен плавлением исключительно вторичной (супервторичной) структуры этого необычного белка.

Из-за технических проблем невозможно изучить высокотемпературный переход при нейтральных значениях pH, используя метод кругового дихроизма, который наиболее адекватен для

**Таблица 1.** Гидродинамические параметры, характеризующие рFh-фрагменты IgG3 Kuc и Sur до и после низкотемпературного перехода при pH 7.5, а также термодинамические параметры, характеризующие сам низкотемпературный переход

Образец	Характеристическая вязкость, $[\eta]$ , $\text{см}^3 \text{г}^{-1}$	Коэффициент седиментации, $s_{20}^0$ , S	Калориметрическая энтальпия, $\Delta H_{\text{кал}}$ , $\text{кДж} \times \text{моль}^{-1}$	Эффективная энтальпия, $\Delta H_{\text{эфф}}$ , $\text{кДж} \times \text{моль}^{-1}$
рFh IgG3 Kuc	4.3 <sup>1</sup> ; 9.8 <sup>2</sup> ; 13.8 <sup>3</sup> ; 14.1 <sup>4</sup>	1.5 <sup>1</sup> ; 0.55 <sup>3</sup> ; 0.5 <sup>4</sup>	325	334 <sup>5</sup> ; 342 <sup>6</sup> ; 324 <sup>7</sup> ; 331 <sup>8</sup>
рFh IgG3 Sur	4.4 <sup>1</sup> ; 9.8 <sup>2</sup> ; 13.9 <sup>3</sup> ; 14.0 <sup>4</sup>	1.45 <sup>1</sup> ; 0.5 <sup>3</sup> ; 0.5 <sup>4</sup>	337	331 <sup>5</sup> ; 325 <sup>6</sup> ; 340 <sup>7</sup> ; 337 <sup>8</sup>

<sup>1, 2, 3, 4</sup> – Определены для нативного белка при 20 и 65°C (после низкотемпературного перехода), при 20°C после “необратимого” низкотемпературного перехода и при pH 3.5, когда рFh фрагмент IgG3 Kuc имеет стержнеобразную форму [10] соответственно.

<sup>5–8</sup> – Эффективная энтальпия по данным калориметрии, характеристической вязкости, флуоресценции FITC-рFh-фрагмента и рFh-фрагмента, меченного флуоресцентной меткой после восстановления одной из дисульфидных связей.

**Таблица 2.** Термодинамические параметры, характеризующие высокотемпературный переход рFh-фрагментов IgG3 Kuc и Sur с интактными дисульфидными связями при pH 3.5 в 10 мМ глициновом буфере и частично восстановленными дисульфидными связями при pH 7.5 в 10 мМ фосфатном буфере

Образец	Калориметрическая энтальпия, $\Delta H_{\text{кал}}$ , $\text{кДж} \times \text{моль}^{-1}$	Эффективная энтальпия, $\Delta H_{\text{эфф}}$ , $\text{кДж} \times \text{моль}^{-1}$
рFh-фрагмент IgG3 Kuc	1010	255 <sup>5</sup> ; 248 <sup>7</sup> ; 265 <sup>8</sup> ; 258 <sup>9</sup>
рFh-фрагмент IgG3 Sur	1070	265 <sup>5</sup> ; 240 <sup>7</sup> ; 257 <sup>8</sup> ; 263 <sup>9</sup>
рFh*-фрагмент IgG3 Kuc	1240	196 <sup>5</sup> ; 208 <sup>7</sup> ; 215 <sup>8</sup> ; 200 <sup>9</sup>
рFh*-фрагмент IgG3 Sur	1210	206 <sup>5</sup> ; 202 <sup>7</sup> ; 208 <sup>8</sup> ; 206 <sup>9</sup>

\* – Фрагмент с частично восстановленными дисульфидными связями.

<sup>9</sup> – Эффективная энтальпия по данным кругового дихроизма. Прочие индексы, как и в табл. 1.

описания изменений во вторичной структуре рFh фрагментов Kuc и Sur, впрочем, как ряд и других методов, поскольку переход происходит при температурах выше 100°C. Следовательно, необходимо понизить термостабильность белков. В принципе, можно использовать два подхода – изменить pH раствора или восстановить некоторые межцепочечные дисульфидные связи.

Ранее уже показано, что при переходе из нейтральной в кислую область pH в рFh фрагментах Kuc (а также в интактном IgG3 Kuc) происходит конформационный переход. В результате компактная структура этих белков переходит в стержнеобразную с сохранением вторичной структуры [4, 5, 14, 35]. Для рFh-фрагмента Sur также получены аналогичные гидродинамические данные, которые свидетельствуют о том, что и этот фрагмент в кислой области pH приобретает стержнеобразную форму (табл. 1). Кроме того, при pH 3.5 на кривых плавления рFh фрагментов Kuc и Sur отсутствуют низкотемпературные пики теплопоглощения, которые соответствуют плавлению их компактной структуры в нейтральной области pH (рис. 2б). Эти калориметрические данные также подтверждает вывод о распаде при переходе в кислую область pH компактной структуры исследуемых фрагментов.

Как и предполагали, термостабильность вторичной структуры рFh-фрагментов Sur и Kuc в

кислой области pH весьма существенно понижается и в результате удается полностью зафиксировать высокотемпературный конформационный переход как методом кругового дихроизма (рис. 3б), так и рядом других методов. Поскольку процесс тепловой денатурации вторичной структуры рFh фрагмента не зависит от скорости прогрева (в интервале скоростей 0.25–2 град/мин) и полностью обратим, т.е. является равновесным, то можно, используя данное обстоятельство, рассчитать все термодинамические параметры, характеризующие указанный высокотемпературный переход, отвечающий плавлению поли-L-пролиновой спирали.

На рис. 3б представлены результаты исследования высокотемпературного перехода при pH 3.5 как в данной работе, так и в более ранних исследованиях [5, 12]. Видно, что изменения доли денатурированного состояния, как и в случае первого перехода, происходят симбатно и, как следствие этого, эффективные энтальпии, определенные по данным калориметрии, флуоресценции и кругового дихроизма, близки (табл. 2).

Для второго пика (рис. 2б) характерно четырехкратное превышение калориметрической энтальпии над эффективной ( $\Delta H_{\text{кал}} = 1010\text{--}1070 \text{ кДж} \times \text{моль}^{-1}$ ,  $\Delta H_{\text{эфф}} = 255\text{--}265 \text{ кДж} \times \text{моль}^{-1}$ , табл. 2). Это указывает то, что сам рFh-фрагмент, вероятно, состоит из четырех кооперативных блоков. Такую

точку зрения подтверждают как анализ первичной структуры того участка полипептидной цепи, который соответствует рFh-фрагменту, так и возможность получить путем его ограниченного протеолиза субфрагменты, представляющие 1/4, 1/2 и 3/4 части всего “шарнирного” участка [14].

Анализ первичной структуры соответствующего фрагмента полипептидной цепи IgG3 показывает, что он состоит из четырех участков, в которых сконцентрированы остатки пролина и цистеина [1]. Они разделены короткими сегментами с более высокой конформационной подвижностью, поэтому доступны действию протеаз, способны образовывать реверсивные  $\beta$ -изгибы [29] и являются границами участков с высокой концентрацией пролина и цистеина.

Несомненно, экстремально высокая термостабильность вторичной структуры рFh-фрагментов — следствие крайне высокой насыщенности двойной поли-L-пролиновой спирали межцепочечными дисульфидными связями (11 дисульфидных связей на 128 аминокислотных остатков двух цепей). Это достаточно очевидное предположение, которое следует из известного влияния различных межцепочечных [36] и, в частности, дисульфидных связей [37, 38], на стабильность коллагенов, в молекулах которых каждая из трех цепей имеет конформацию поли-L-пролиновой спирали. Термостабильность структуры таких молекул резко возрастает даже при наличии одной межцепочечной дисульфидной связи [39].

Это предположение полностью подтверждено экспериментальными данными по плавлению вторичной структуры рFh-фрагмента. Частичное восстановление дисульфидных связей у этого фрагмента (в среднем 3–4 связи на одну молекулу) и их последующее алкилирование приводит к существенной трансформации пика теплопоглощения на калориметрической кривой. Это, в первую очередь, выражается в том, что температура максимума пика, соответствующего плавлению поли-L-пролиновой спирали, весьма заметно сдвигается в область более низких температур (рис. 2б). Кроме того, обнаружено снижение интенсивности пика теплопоглощения, его уширение и, следовательно, уменьшение калориметрической и эффективной энтальпии плавления (рис. 2б, табл. 2). Такая трансформация обусловлена дестабилизацией отдельных кооперативных участков, образующих “шарнирный” участок, поскольку, во-первых, среднее число дисульфидных связей, приходящихся на один кооперативный блок, падает. Во-вторых, уширение пика обусловлено и тем обстоятельством, что восстановление дисульфидных связей — неселективный процесс, поэтому в каждом кооперативном блоке и место, и число восстановленных (сохранившихся) связей может изменяться весьма заметно, т.е. в результате

модификации возникают гетерогенные блоки, имеющие различную термостабильность.

Значения удельной энтальпии плавления, которые характеризуют разрушение двойной поли-L-пролиновой спирали, очень высоки и лежат в интервале 63.2–72.1 Дж г<sup>-1</sup>. Такие большие величины характерны не для плавления глобулярных белков [6, 7], а для белков, имеющих структуру поли-L-пролиновой спирали, из которых наиболее известными являются коллагены [38, 40].

Таким образом, два исследованных рFh-фрагмента обладают свойствами, которые делают их схожими с небольшими глобулярными белками, хотя у них необычная вторичная (супервторичная) структура. Фрагменты состоят почти исключительно из двойной поли-L-пролиновой спирали, тогда как обычные глобулярные белки включают лишь небольшие сегменты одиночной спирали. Наличие необычной вторичной структуры делает необычным и процесс тепловой денатурации этих белков.

В настоящий момент трудно понять целесообразность существования у некоторых миеломных иммуноглобулинов G человека, которые принадлежат к третьему подклассу, компактной формы “шарнирной” области. Однако следует подчеркнуть, что компактная форма указанного участка в молекулах IgG3 взаимодействует с C<sub>H</sub>2-доменами, в которых локализованы активные центры, отвечающие за эффекторные функции иммуноглобулинов.

Так, компактная и вытянутая формы IgG3 Кус отличаются по интенсивности взаимодействия с фактором системы комплемента C1 [41].

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (06-04-48915а, 11-04-00064а и 07-04-12199-офи).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Michaelsen T.E., Frangione B., Franklin E.C. 1977. Primary structure of the “hinge” region of human IgG3. *J. Biol. Chem.* **252**, 883–889.
2. Huck S., Fort P., Crawford D.H., Lefranc M.-P., Lefranc G. 1986. Sequence of human immunoglobulin gamma 3 heavy chain constant region: comparison with other human C gamma genes. *Nucl. Acid. Res.* **14**, 1779–1789.
3. Pumphrey R. 1986. Structure human IgG subclasses. *Immunol. Today.* **7**, 174–178.
4. Ryazantsev S., Tishchenko V., Vasiliev V., Zavyalov V., Abramov V. 1990. Structure of human myeloma IgG3 Кус. *Eur. J. Biochem.* **190**, 393–399.
5. Тищенко В.М. 2000. Три состояния рFh фрагмента миеломного IgG Кус человека с нативоподобным содержанием вторичной структуры. *Биохимия.* **65**, 1450–1454.
6. Privalov P.L. 1979. Stability of protein. *Adv. Prot. Chem.* **33**, 167–241.

7. Privalov P.L., Potekhin S.A. 1986. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Methods Enzymol.* **131**, 4–51.
8. Tischenko V.M., Zav'yalova G.A., Zav'yalov V.P. 2003. Folding of the human immunoglobulin G3 C<sub>1</sub> hinge into the thirteen globular domain. *Immunol. Lett.* **90**, 43–47.
9. Tischenko V.M., Zav'yalov V.P., Medgyesi G.A., Potekhin S.A., Privalov P.L. 1982. A thermodynamic study of cooperative structure in rabbit immunoglobulin G. *Eur. J. Biochem.* **126**, 517–521.
10. Adzhubei A.A., Eisenmenger F., Tumanyan V.G., Zinke M., Brodzinski S. 1987. Third type of secondary structure: noncooperative mobile conformation. Protein bank analysis. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **146**, 934–938.
11. Adzhubei A.A., Sternberg M.J.E. 1993. Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins. *J. Mol. Biol.* **229**, 472–493.
12. Marquart M., Deisenhofer J., Huber R., Palm W. 1980. Crystallographic refinement and atomic models of intact molecule Kol and its antigen-binding fragment at 3.0 Å and 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **141**, 369–391.
13. Johnson P.M., Michaelsen T.E., Skopes P.M. 1975. Conformation of the hinge region and various fragments of human IgG3. *Scand. J. Immunol.* **4**, 113.
14. Тищенко В.М. 2000. “Шарнирная” область IgG3 человека имеет стержнеобразную форму в кислой области рН. *Молекуляр. биология.* **34**, 110–115.
15. Renneboog-Squibin C. 1972. Conformational study of the human immunoglobulin G1 hinge peptide. *J. Mol. Biol.* **64**, 221–236.
16. Денесюк А.И., Тищенко В.М., Абрамов В.М., Завьялов В.П. 1983. Теоретическое и экспериментальное исследование конформации “шарнирных” участков в подклассах иммуноглобулинов G человека. *Молекуляр. биология.* **17**, 1262–1271.
17. Sjoberg B., Rosenqvist E., Michaelsen T., Pap S., Osterberg R. 1980. The solution shapes of IgG3 immunoglobulin and its F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> fragments. A small-angle X-ray scattering study. *Biochim. Biophys. Acta.* **625**, 10–17.
18. Michaelsen T.E., Ness L.M., Aase A. 1993. Human IgG3 is decreased and IgG1, IgG2 and IgG4 are unchanged in molecular size by mild reduction and reoxidation without any major change in effector functions. *Mol. Immunol.* **30**, 35–45.
19. Zheng Y., Shopes, Holowka D., Baird B. 1992. Dynamic conformations compared for IgE and IgG1 in solution and bound to receptors. *Biochemistry.* **31**, 7446–7456.
20. Tischenko V.M., Abramov V.M., Zav'yalov V.P. 1998. Investigation of the cooperative structure of Fc fragments from myeloma immunoglobulin G. *Biochemistry.* **37**, 5576–5581.
21. Tischenko V.M., Zav'yalov V.P. 2002. Long-term metastable conformation of human Fc gamma subunit. *Immunol. Lett.* **84**, 241–245.
22. Yphantis D.A. 1964. Equilibrium ultracentrifugation of dilute solutions. *Biochemistry.* **3**, 297–317.
23. van Holde K.E., Baldwin R.L. 1958. New approach for molecular weight determination. *J. Phys. Chem.* **62**, 734–743.
24. Боуэн Т. 1973. *Введение в ультрацентрифугирование.* М.: Мир.
25. Griko Yu.V., Privalov P.L., Venyaminov S.Yu., Kutysheiko V.P. 1988. Cold denaturation of myoglobin. *J. Mol. Biol.* **202**, 127–138.
26. Crumpton M.J., Polson A. 1965. A comparison of the conformation of sperm whale metmyoglobin with that of apomyoglobin. *J. Mol. Biol.* **11**, 722–729.
27. Пирцхалава М.К., Поройков В.В., Туманян В.Г. 1983. О двух возможных конформациях повторяющейся части шарнирного участка иммуноглобулина G3. *Биооргани. химия.* **9**, 1220–1230.
28. Crawford J.L., Lipscomb W.N., Schellman C.G. 1973. The reverse turn as a polypeptide conformation in globular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**, 538–542.
29. Tischenko V.M. 1999. 11-th international conference on small-angle scattering. N.Y., USA. Abstract book. P. 93.
30. Liu J., Walsh C.T. 1990. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase from *Escherichia coli*: a periplasmic homolog of cyclophilin that is not inhibited by cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 4028–4032.
31. Tischenko V.M. 2000. Metastable state of the Fc fragment. *J. Therm. Analit. Calorimetry.* **62**, 63–68.
32. Privalov P.L., Tiktopulo E.I., Venyaminov S.Yu., Griko Yu.V., Makhatadze G.I., Khechinashvili N.N. 1989. Heat capacity and conformation of proteins in the denatured state. *J. Mol. Biol.* **205**, 737–750.
33. Pfeil W., Privalov P.L. 1976. Thermodynamic investigations of proteins. III. Thermodynamic description of lysozyme. *Biophys. Chem.* **4**, 41–50.
34. Privalov P.L., Makhatadze G.I. 1990. Heat capacity of proteins. II. Partial molar heat capacity of the unfolded polypeptide chain of proteins: protein unfolding effects. *J. Mol. Biol.* **213**, 385–391.
35. Tischenko V.M. 1999. Biophysical meeting. Moscow, Russia. Abstract book. P.81.
36. Miles C.A., Avery N.C., Rodin V.V., Bailey A.J. 2005. The increase in denaturation temperature following cross-linking of collagen is caused by dehydration of the fibres. *J. Mol. Biol.* **346**, 551–556.
37. Brodsky-Doyle B., Leonard K.R., Reid K.B. 1976. Circular-dichroism and electron-microscopy studies of human subcomponent C1q before and after limited proteolysis by pepsin. *Biochem. J.* **159**, 279–286.
38. Tischenko V.M., Ichtchenko A.M., Andreyev C.V., Kajaeva A.V. 1993. Thermodynamic studies of the collagen-like region of human subcomponent C1q. A water-containing structural model. *J. Mol. Biol.* **234**, 654–660.
39. McBride O.W., Harrington W.F. 1967. Ascaris cuticle collagen: on the disulfide cross-linkages and the molecular properties of the subunits. *Biochemistry.* **6**, 1484–1498.
40. Privalov P.L., Tiktopulo E.I., Tischenko V.M. 1979. Stability and mobility of the collagen structure. *J. Mol. Biol.* **127**, 203–216.
41. Тищенко В.М. 2001. Состояние “шарнирной” области влияет на взаимодействие IgG3 человека с системой комплемента. *Биохимия.* **66**, 1671–1675.