

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ  
БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 578.088

ВЛИЯНИЕ МЕЖДОМЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ  
НА АМИЛОИДОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ИНТАКТНЫХ  
БЕЛКОВ БЕНС-ДЖОНСА

© 2011 г. В. М. Тищенко\*

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

Поступила в редакцию 31.12.2010 г.

Принята к печати 30.03.2011 г.

Изолированные константные домены двух белков Бенс-Джонса VAD и BIR способны к образованию амилоидных фибрилл, но лишь первый из них сохраняет указанную способность в составе интактного белка. Исследования конформации и стабильности этих белков методами сканирующей микрокалориметрии, кругового дихроизма, флуоресценции и аналитического центрифугирования при физиологических условиях (10 мМ фосфатный буфер, pH 7.0, 100 мМ NaCl) показали, что стабильность пары изолированных константных доменов ( $C_L-C_L$ ) VAD и BIR понижена по сравнению с обычными (неамилоидогенными) белками Бенс-Джонса. Однако в составе интактного белка BIR стабильность блока его константных доменов резко возрастает, что коррелирует с утратой белком способности образовывать амилоидные фибриллы.

**Ключевые слова:** белки Бенс-Джонса, амилоидные фибриллы, константные домены, стабильность, междоменные взаимодействия  $C_L-C_L$ .

THE INFLUENCE OF INTERDOMAIN INTERACTION ON THE AMYLOIDOGENIC PROPERTIES BENCE-JONES PROTEINS, by V. M. Tischenko\* (Institute of Biological Instrumentation, Russian Academy of Science, Moscow Region, Pushchino, 142290 Russia; \*e-mail: tischen@vega.protres.ru). Isolated constant domains from two Bence-Jones proteins VAD and BIR able to form amyloid fibrils, whereas only the first of them to keep specific ability of the intact protein. Studies of conformation and stability of these proteins by scanning microcalorimetry, circular dichroism, fluorescence and analytical centrifugation at physiological conditions (10 mM phosphate buffer, pH 7.0, 100 mM NaCl) showed that the stability of isolated pair of constant domains ( $C_L-C_L$ ) VAD and BIR is reduced by compared with standard (nonamyloidogenic) Bence-Jones protein. However, in the intact protein BIR stability of his constant domains increases sharply, which correlated with the loss of the protein ability to form amyloid fibrils.

**Keywords:** Bence-Jones proteins, amyloid fibrils, constant domain, stability,  $C_L-C_L$  inter-domain interaction.

Многие белки при различных условиях обладают способностью к формированию регулярных агрегатов, имеющих структуру кросс- $\beta$ -фибрилл, причем данный процесс может протекать как *in vivo*, так и *in vitro*. Как правило, этот феномен связан с понижением стабильности нативной структуры целого белка, либо с понижением стабильности отдельных доменов (мультидоменные белки). Образование регулярных кросс- $\beta$ -фибрилл (амилоидных отложений) в тканях живого

организма – общий молекулярный механизм развития целого ряда наследственных и приобретенных заболеваний человека. При этом белок-предшественник оказывает лишь слабое влияние на общую структуру фибриллы [1, 2]. Возможен и второй тип отложений, резко отличающийся от первого по своей морфологии и представляющий собой гранулярные (аморфные) агрегаты [3, 4].

Белки Бенс-Джонса могут формировать агрегаты обоих типов, и образование одного из типов

Принятые сокращения: S-S-связь – дисульфидная связь; IgG – иммуноглобулины, принадлежащие классу G;  $C_L$  – константные домены легкой цепи IgG;  $V_L$  – переменные домены легкой цепи IgG;  $F_V$ -фрагмент – фрагмент, образованный парой переменных доменов  $V_L-V_L$ ;  $F_B$ -фрагмент – фрагмент, образованный парой константных доменов  $C_L-C_L$ ; флуоресцентная метка FITC – флуоресцеин изотиоционат; FITC- $C_L$ , FITC- $V_L$  – константный и переменный домены, меченные флуоресцентной меткой; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

\* Эл. почта: tischen@vega.protres.ru

отложений определяет тяжесть заболевания. Эти белки возникают в организме человека при множественной миеломе. Болезнь сопровождается неограниченный синтез моноклональных иммуноглобулинов и появление в крови больных большого количества свободных легких цепей иммуноглобулинов. Часть из них после формирования дисульфидной связи между константными доменами двух легких цепей и образует белок Бенс-Джонса — димер легких цепей. Определенная доля этих белков фильтруется почками в мочу и покидает организм. Другая часть теряет свою термодинамическую стабильность и формирует в почках нерастворимые агрегаты.

В настоящее время достаточно широко представлены работы по изучению структурных и термодинамических свойства переменных доменов, которые образуют амилоидные фибриллы [5–8]. Считают, что стабильность нативной структуры этих амилоидогенных доменов (свободная энергия стабилизации  $\Delta G$ ) понижена по сравнению со стабильностью обычных (неамилоидогенных) доменов. Следует подчеркнуть, что речь в указанных примерах идет о внутренней стабильности изолированных переменных доменов.

Хотя известно, что образование амилоидных структур может быть связано также и с константным доменом [9–11], никаких систематических исследований по изучению их стабильности не проводили. Недавно нами показано, что стабильность константного домена в амилоидогенном белке VAD также понижена, что приводит к способности целого белка и его константной части ( $F_c$ -фрагмента) образовывать фибриллы. Этот эффект связан с необычной упаковкой блока константных доменов ( $C_L-C_L$ ) [12], что, вероятно, вызвано точечной мутацией Ser177Asn [9]. Это может привести к резкому уменьшению междоменного взаимодействия, дестабилизации и распаду кооперативного блока [12], образованного в норме парой константных доменов [13, 14].

В настоящей работе при изучении двух белков Бенс-Джонса получены данные, подтверждающие важную и неоднозначную роль различных типов междоменных взаимодействий. В этих взаимодействиях участвуют как домены, принадлежащие к одной, так и к различным цепям белка Бенс-Джонса: так называемые *цис*- и *транс*-взаимодействия соответственно [15].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Выделение, типирование и модификация исследуемых белков и их фрагментов.** Все изучаемые белки Бенс-Джонса получены по стандартной методике из суточной мочи больных множественной миеломой (0.7 л) [4]. После фракционирования

в растворе сульфата аммония (70%) белки разделены посредством ионообменной хроматографии на носителе DEAE-Sephacel (10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 8.1, линейный градиент NaCl 0–300 mM). Фракцию легких цепей иммуноглобулина дополнительно очищали на сорбентах Blue-Sepharose 4B и Protein A-Sepharose 4B. Заключительный этап выделения белков — гель-фильтрация на Sephacryl S100 HR. Исходные растворы легких цепей представляют собой гетерогенную систему: в результате ассоциации и тиол-дисульфидного обмена в растворе существует равновесие между мономерами, димерами и тетрамерами легких цепей [16, 17]. После очистки по указанной методике получены гомогенные препараты двух типов. Об их природе свидетельствуют данные по электрофорезу в денатурирующих условиях (1%-ный додецилсульфат натрия) как в присутствии восстанавливающих дисульфидные связи реагентов, так и в их отсутствие. Один из препаратов без восстанавливающих реагентов имеет молекулярную массу 50 кДа, которая падает вдвое при добавлении  $\beta$ -меркаптоэтанола. Второй препарат не меняет молекулярную массу в 25 кДа в зависимости от присутствия при электрофорезе восстанавливающих реагентов. Первый препарат — типичный белок Бенс-Джонса: две идентичные легкие цепи, состоящие из одного константного и одного переменного домена, которые соединены посредством одной дисульфидной связи между двумя константными доменами. Они представляют, по существу, упрощенные аналоги Fab-фрагментов иммуноглобулинов — основные объекты исследований. Второй препарат — мономер легкой цепи, полученный либо по описанной выше методике, либо путем восстановления и последующего алкилирования дисульфидных связей и предназначенный для определения амилоидогенного потенциала  $C_L$ -домена BIR (см. ниже).

Ограниченный протеолиз, который приводит к расщеплению пептидной связи между константным и переменным доменом, и последующее разделение константных ( $F_c$ -фрагмент) и переменных ( $F_v$ -фрагмент) частей белка осуществлены по методике, описанной в работе [13]. Гомогенность фрагментов контролировали электрофорезом при нативных условиях (pH 7.5), стандартным SDS-электрофорезом в полиакриламидном геле [18], а также двухмерным иммуноэлектрофорезом по методике [19], основанной на применении коммерческих поли- и моноспецифических антисывороток. Изотип легкой цепи определяли с помощью иммуноэлектрофореза в агарозном геле (1%) с полиспецифической антисывороткой к белкам плазмы крови человека (“ICN”) и моноспецифическими антисыворотками к изотипам легких цепей иммуноглобулина человека (“Sigma”). Так как оба белка VAD и BIR реагировали с антителами против  $\kappa$ -легких це-

пей, то они представляют собой белки Бенс-Джонса, образованные двумя  $\kappa$ -цепями. К белкам  $\kappa$ -типа относятся и ряд других белков Бенс-Джонса SEM, KIR и GRY,  $F_b$ -фрагменты которых не образуют амилоидных фибрилл.

Поскольку способность фрагментов белка VIR образовывать амилоидные фибриллы связана (см. ниже) с его константными доменами, то, как и в случае ранее исследованного белка VAD [12], проведен его трипсиновый гидролиз, и среди продуктов с помощью ВЭЖХ найден трипсиновый фрагмент, отличающийся от такового у стандартного (неамилоидогенного) константного домена [20].

Частичное и тотальное восстановление и алкилирование дисульфидных связей, затрагивающее только связи между цепями либо все указанные связи, проведено по ранее использованной методике [12, 21].

Белки Бенс-Джонса, селективно модифицированные меткой (флуоресцеин изотиоционат, FITC) либо по константной, либо по варибельной части интактных белков, получены по методике, которая ранее изложена автором в работах [22, 23].

**Контроль за образованием амилоидных фибрилл интактными белками Бенс-Джонса и их фрагментами.** Способность к образованию амилоидных фибрилл в исходном растворе целого белка VIR (его константной или варибельной части), а также контроль за этими процессами, проводили на основе общего подхода, изложенного ранее [4, 24, 25].

Указанные образцы (концентрация 1.5 мг/мл) в буферном растворе пропускали через фильтр 0.22 мкм ("Millipore") и инкубировали при 37°C в течение 14 сут. Не реже каждые 24 ч (6 ч на первом этапе) отбирали пробы объемом 50–100 мкл, в которых с помощью двух методов связывания красителей контролировали процесс самоассоциации белков.

Связывание тиофлавина Т регистрировали после смешивания 40 мкл раствора белка либо его фрагмента и 2 мл раствора 100 мМ фосфатного буфера, pH 7.5, 100 NaCl, содержащего 18 мкМ тиофлавина Т. Интенсивность флуоресценции раствора измеряли на флуориметре MPF-4B (Япония) при 520 нм, длина волны возбуждения – 450 нм.

Связывание конго красного контролировали после смешивания и инкубации в течение 1 ч двух растворов (100 мкл белкового раствора и 200 мкл раствора 100 мМ фосфатного буфера, pH 7.5, 100 мМ NaCl, содержащего 20 мкМ конго красного). Дифференциальный спектр в диапазоне 400–700 нм регистрировали на спектрофотометре Hitachi 2000M (Япония).

**Оптические измерения.** Изменения конформационных состояний интактных белков Бенс-

Джонса и их фрагментов проводили с использованием двух оптических методов. Регистрацию спектров кругового дихроизма осуществляли на дихрографе J-600 (Jasco, Япония) с применением термостатируемой ячейки с оптическим путем 1 мм.

Измерения флуоресценции выполнены на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 PC (Япония) также с использованием термостатируемой ячейки [22, 23, 26].

**Калориметрические измерения и анализ термодинамических данных.** Все эксперименты проводили на микрокалориметрах ДАСМ-4А с золотой капиллярной ячейкой объемом 1 мл и ДАСМ-4 с платиновой капиллярной спиралевидной ячейкой объемом 0.43 мл. Концентрацию белков в растворе изменяли в интервале 1–10 мг/мл. Измерения проводили со скоростями 0.25–2 град/мин. Методика анализа калориметрических данных описана в работе Привалова и Потехина [27].

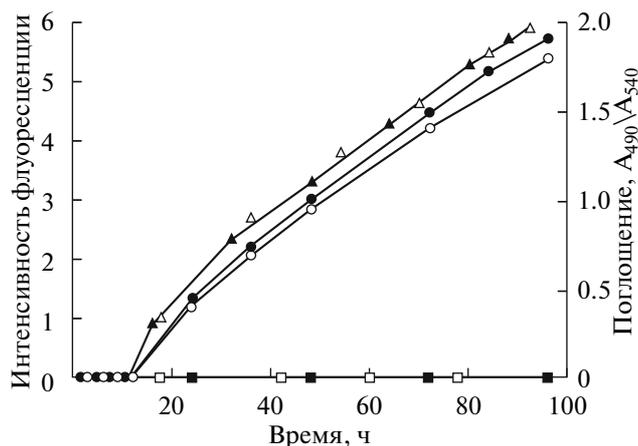
**Определение молекулярной массы и коэффициента седиментации.** Аналитическое ультрацентрифугирование для определения молекулярных масс белков и их фрагментов и скорости седиментации проводили на центрифуге Beckman Spinco модель E (США). В случае высокоскоростного и низкоскоростного равновесного центрифугирования использовали методы Ифантиса [28] и Ван-Холда–Болдуина [29]. Распределение концентрации в ячейке регистрировали либо с помощью интерференционной системы Релея при концентрации белка 0.3 мг/мл, либо с помощью абсорбционной двулучевой ультрафиолетовой системы на длинах волн 280 и 230 нм при концентрациях белка 1 и 0.1 мг/мл соответственно.

Эксперименты по седиментации проводили с использованием как шлирен-оптики, так и ультрафиолетового поглощения при концентрациях 2.0–10 и 0.1–1.0 мг/мл соответственно. Применяли 10 мМ фосфатный буфер, pH 7.0, 100 мМ NaCl.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Определение способности целого белка VIR и его фрагментов к образованию амилоидных фибрилл*

Интактный белок Бенс-Джонса VIR не проявляет никаких видимых тенденций к связыванию стандартных красителей (конго красного и тиофлавина Т), а мономеры легких цепей этого белка (25 кДа), неассоциированные в димерную форму, и константные домены  $C_L$  белка VIR проявляют эту способность (рис. 1). Стоит иметь в виду, что константные домены  $C_L$  белка VIR (как в составе  $F_b$ -фрагмента, когда они соединены дисульфидной связью, так и в случае, когда связь между ними восстановлена) неотличимы, как минимум, по целому ряду иммунологических, структурных, термодинамических характеристик (см. табл. 1 и 2, рис. 2) от аналогичного  $F_b$ -фрагмента амилоидо-



**Рис. 1.** Кинетика связывание конго красного (темные символы) и тиофлавина Т (светлые символы) с интактным белком BIR (квадраты), его  $F_b$ -фрагментом (кружки) и мономером его легких цепей (треугольники).

генного белка VAD. Этот фрагмент не только сам способен образовывать амилоидные фибриллы, но и индуцирует такую возможность у интактного белка VAD [12]. Это значит, что и константные домены BIR должны обладать амилоидогенным потенциалом, что поднимает вопрос о причинах его утраты у интактного белка.

Действительно, представленные на рис. 1 данные по кинетике связывания  $F_b$ -фрагмента и легкой цепи BIR с конго красным и тиофлавином Т свидетельствуют о амилоидогенных свойствах

константных доменов BIR, способных (по данным электронной микроскопии), как и ранее исследованный белок GRY, образовывать неветвящиеся фибриллы диаметром около 50 и длиной до 1000 Å [4]. Способность образовывать фибриллы проявляется у  $F_b$ -фрагмента BIR, когда константные и переменные домены практически не взаимодействуют между собой и ведут себя как независимые подсистемы, например, в случае мономеров легких цепей [13, 14, 30]. Однако интактный белок BIR не связывает ни один из этих зондов в сколько-нибудь заметных количествах, что, вероятно, обусловлено многочисленными *цис*- и *транс*-взаимодействиями между отдельными доменами, что часто можно встретить как у Fab-фрагментов, так и многих белков Бенс-Джонса [13, 14, 30–32].

#### **Определение условий, при которых амилоидогенные объекты находятся в мономерной форме**

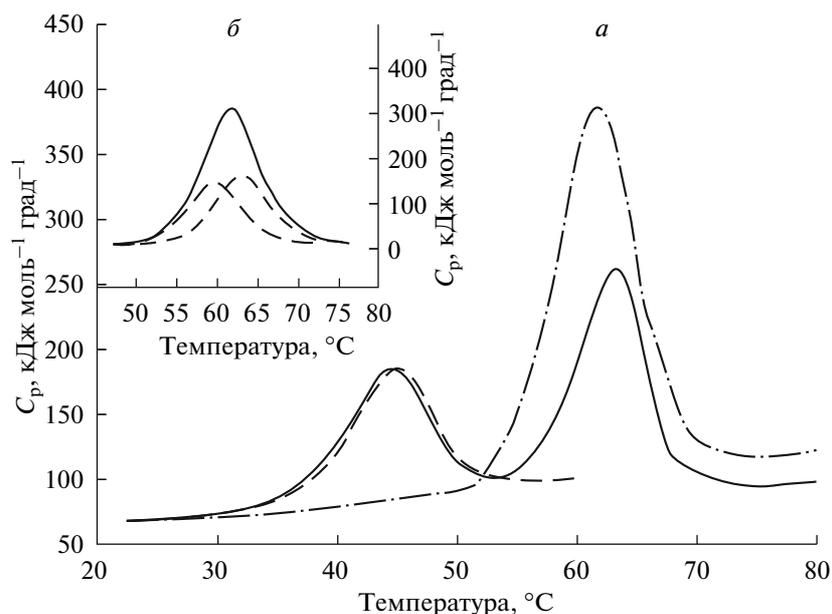
Ясно, что причиной утраты амилоидогенного потенциала  $C_L$ -доменов BIR могут быть только новые взаимодействия, которые проявляются в интактном белке и оказывают влияние на конформацию и термодинамическую стабильность указанных доменов. Природа такого стабилизирующего воздействия может быть самой различной.

Одной из причин такого поведения белка Бенс-Джонса BIR может быть изменение состояния его константных доменов в результате стабилизирующего воздействия, которое могут оказать на них переменные домены. Вторая причина

**Таблица 1.** Гидродинамические параметры амилоидогенных (VAD, BIR и GRY) и неамилоидогенного белков Бенс-Джонса (SEM) и их  $F_b$ -фрагментов в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7.0, 100 мМ NaCl при 20°C

Белок (фрагмент)	$M_w$ , кДа	$M_z$ , кДа	$S_{20}^0$ , S
Белок Бенс-Джонса BIR	50.6 ± 1.5 (50.9 ± 1.5)	51.1 ± 2.5 (51.3 ± 2.5)	3.35 ± 0.05
Белок Бенс-Джонса VAD	50.8 ± 1.5 (54.7 ± 1.5)	50.9 ± 2.5 (57.8 ± 2.5)	3.03 ± 0.05
Белок Бенс-Джонса GRY	50.5 ± 1.5 (55.2 ± 1.5)	51.0 ± 2.5 (58.4 ± 2.5)	3.33 ± 0.05
Белок Бенс-Джонса KIR	51.1 ± 1.5 (51.4 ± 1.5)	51.3 ± 2.5 (51.6 ± 2.5)	3.35 ± 0.05
Белок Бенс-Джонса SEM	51.4 ± 1.5 (51.7 ± 1.5)	51.6 ± 2.5 (51.8 ± 2.5)	3.37 ± 0.05
$F_b$ -фрагмент BIR	25.2 ± 0.7 (27.8 ± 0.7)	25.3 ± 1.5 (29.7 ± 1.5)	1.97 ± 0.05
$F_b$ -фрагмент VAD	25.4 ± 0.7 (27.6 ± 0.7)	25.8 ± 1.5 (29.5 ± 1.5)	1.96 ± 0.05
$F_b$ -фрагмент GRY	25.3 ± 0.7 (25.8 ± 0.7)	25.9 ± 1.5 (26.3 ± 1.5)	2.25 ± 0.05
$F_b$ -фрагмент SEM	25.0 ± 0.7 (25.6 ± 0.7)	25.8 ± 1.5 (26.1 ± 1.5)	2.28 ± 0.05
$F_v$ -фрагмент GRY	25.7 ± 0.7 (28.4 ± 0.7)	26.3 ± 1.5 (29.1 ± 1.5)	2.35 ± 0.05
$F_v$ -фрагмент SEM	25.5 ± 0.7 (25.8 ± 0.7)	25.7 ± 0.7 (25.9 ± 1.5)	2.35 ± 0.05
$C_L$ -домен BIR	12.1 ± 0.4 (14.1 ± 0.4)	12.5 ± 0.7 (15.1 ± 0.7)	1.45 ± 0.05

Примечание. В скобках приведены значения молекулярных масс, полученных в экспериментах после предварительной инкубации в течение 24 ч белковых растворов с концентрацией 0.4 мг/мл. Молекулярные массы и константы седиментации в случае  $F_v$ -фрагментов определяли после химической сшивки димеров  $V_L-V_L$  [22]. Гидродинамические параметры двух других неамилоидогенных белков Бенс-Джонса (SIM и KUS) и их фрагментов не представлены, поскольку они практически совпадают с данными для белка SEM.



**Рис. 2.** *a* – Температурная зависимость молярной парциальной теплоемкости intactных белков Бенс-Джонса VAD (сплошная линия) и BIR (штрих-пунктирная линия) и  $F_b$ -фрагмента BIR (пунктирная линия). Эксперименты проведены в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7.0. Величины теплоемкости фрагмента и intactных белков приведены к одной величине. *б* – Разложение кривой избыточного теплопоглощения белка BIR.

утраты амилоидогенных свойств также может быть связана с переменными доменами, однако природа этого воздействия совершенно иная. Известно, что некоторые белки Бенс-Джонса имеют четко выраженную тенденцию к образованию агрегатов в результате межмолекулярных взаимо-

действий, причем в этих взаимодействиях участвуют переменные домены (но это взаимодействия, не имеющие никакого отношения к образованию амилоидных структур). Олигомеры, возникающие в результате таких контактов между переменными доменами соседних молекул

**Таблица 2.** Термодинамические параметры плавления белков Бенс-Джонса и их фрагментов

Белок (фрагмент)	$T_d$ , °C	$\Delta H_{\text{кал}}$ , кДж/моль	$\Delta H_{\text{эфф}}$ , кДж/моль	$\Delta G$ , кДж/моль
Белок Бенс-Джонса VAD	46.1 <sup>1</sup> ; 63.0 <sup>2</sup> ; 45.3 <sup>3</sup> ; 63.1 <sup>4</sup>	297 <sup>1</sup> ; 647 <sup>2</sup>	207 <sup>1</sup> ; 642 <sup>2</sup> ; 208 <sup>3</sup> ; 652 <sup>4</sup>	
Белок Бенс-Джонса BIR	59.8 <sup>1</sup> ; 63.3 <sup>2</sup> ; 59.2 <sup>3</sup> ; 63.6 <sup>4</sup>	585 <sup>1</sup> ; 670 <sup>2</sup>	571 <sup>1</sup> ; 642 <sup>2</sup> ; 604 <sup>3</sup> ; 646 <sup>4</sup>	
Белок Бенс-Джонса KIR	59.1 <sup>1</sup> ; 62.9 <sup>2</sup> ; 61.9 <sup>3</sup> ; 64.1 <sup>4</sup>	595 <sup>1</sup> ; 683 <sup>2</sup>	571 <sup>1</sup> ; 672 <sup>2</sup> ; 585 <sup>3</sup> ; 670 <sup>4</sup>	
Белок Бенс-Джонса SEM	59.0 <sup>1</sup> ; 63.1 <sup>2</sup> ; 58.7 <sup>3</sup> ; 62.8 <sup>4</sup>	589 <sup>1</sup> ; 677 <sup>2</sup>	569 <sup>1</sup> ; 682 <sup>2</sup> ; 588 <sup>3</sup> ; 679 <sup>4</sup>	
$F_b$ -фрагмент VAD	45.6 <sup>1</sup> ; 45.1 <sup>3</sup>	315 <sup>1</sup>	209 <sup>1</sup> ; 218 <sup>3</sup>	7.8
$F_v$ -фрагмент VAD	63.2 <sup>1</sup> ; 63.0 <sup>3</sup>	659 <sup>2</sup>	665 <sup>2</sup> ; 656 <sup>4</sup>	
$F_b$ -фрагмент BIR	45.1 <sup>1</sup> ; 45.6 <sup>3</sup>	317 <sup>1</sup>	210 <sup>1</sup> ; 319 <sup>3</sup>	8.1
$F_v$ -фрагмент BIR	61.2 <sup>1</sup> ; 61.9 <sup>3</sup>	643 <sup>2</sup>	672 <sup>2</sup> ; 666 <sup>4</sup>	
$F_b$ -фрагмент KIR	61.3 <sup>1</sup> ; 62.0 <sup>3</sup>	590 <sup>1</sup>	583 <sup>1</sup> ; 579 <sup>3</sup>	31.8
$F_v$ -фрагмент KIR	62.2 <sup>1</sup> ; 64.5 <sup>3</sup>	673 <sup>2</sup>	674 <sup>2</sup> ; 669 <sup>4</sup>	

Примечание. Температуру перехода определяли для  $F_v$ -фрагментов, у которых пара константных доменов соединена с помощью химической сшивки [22].

<sup>1,2</sup> и <sup>3,4</sup> – Значения для первого и второго переходов, полученные с помощью калориметрии и флуоресценции соответственно.

Бенс-Джонса, характеризуют довольно высокие константы ассоциации [16, 17, 33], и они могут эффективно препятствовать проявлению амилоидогенного потенциала константных доменов.

Поскольку нас интересует корреляция между амилоидогенными свойствами белка и тем уровнем стабильности доменов, который они имеют в изолированной молекуле, то вполне естественно предложить следующий подход. Необходимо убедиться в том, что как белок VIR, так и его  $F_b$ -фрагмент исходно существуют в растворе в форме мономеров. Только в этом случае полученные экспериментальные данные будут описывать стабильность доменов в составе изолированных молекул, а не их вовлеченность в межмолекулярные взаимодействия.

Впрочем, такая постановка вопроса не вполне корректна, поскольку амилоидогенные белки по своей природе должны обладать способностью к интенсивным межмолекулярным взаимодействиям. Корректнее переформулировать проблему следующим образом. Известно, что процесс образования амилоидных фибрилл из всех известных белков-предшественников протекает достаточно медленно, о чем, в частности, непосредственно свидетельствуют и данные по кинетике формирования фибрилл с участием  $F_b$ -фрагмента VIR (рис. 1). Однако эти данные свидетельствуют только о процессе образовании уже достаточно крупных агрегатов, но не предоставляют никаких данных о скорости формирования небольших олигомеров, которые состоят из нескольких молекул.

Такие данные на качественном уровне мы получили ранее в работе [4], где появление и накопление фракции небольших олигомеров (тримеров-тетрамеров) показано для белка Бенс-Джонса GRU с помощью метода химических шшивков. Установлено, что этот процесс также протекает медленно. Это позволяет экспериментально определить тот временной интервал, в течение которого при конкретных условиях (рН буфера, температура) основная масса амилоидогенного белка будет в состоянии мономера. Только в течение этого временного отрезка можно изучать свойства белка, которые характеризуют внутримолекулярное состояние доменов и междоменные взаимодействия.

С этой целью проведена серия экспериментов по определению молекулярных масс свежеприготовленного белка Бенс-Джонса VIR, его  $F_b$ -фрагмента, а также аналогичные контрольные эксперименты с объектами, способными и неспособными образовывать амилоидные фибриллы. В качестве представителей первой группы исследованы целые белки Бенс-Джонса SEM, KIR и  $F_b$ -фрагменты этих белков, а в качестве представителей второй группы — целый белок Бенс-Джонса GRU [4]

и его  $F_v$ -фрагмент, отвечающий за амилоидогенный потенциал всего белка GRU. Результаты этих экспериментов представлены в табл. 1. В ней приведены и ранее полученные характеристики амилоидогенного белка Бенс-Джонса VAD и  $F_b$ -фрагмента этого белка, ответственного за образование фибрилл [12].

Видно, что для всех свежеприготовленных белковых препаратов средневесовые значения молекулярной массы  $M_w$  совпадают с z-средними значениями молекулярной массы  $M_z$ , определенными по данным высокоскоростного и низкоскоростного методов соответственно. Величина  $M_z$  массы белка намного более чувствительна к присутствию в растворе олигомеров с большой массой. Именно равенство величин  $M_w$  и  $M_z$  свидетельствует о том, что все препараты находятся в растворе в основном в виде мономеров, и содержание примесей-олигомеров не превышает 3% [34]. Следовательно, можно считать, что все представленные ниже термодинамические параметры, полученные на свежеприготовленных препаратах, характеризуют исключительно их внутримолекулярное состояние.

#### *Исследование гидродинамических параметров амилоидогенных и неамилоидогенных белков Бенс-Джонса и их фрагментов*

Определение по результатам ультрацентрифугирования тех временных рамок, при которых препараты находятся в форме мономеров (не более суток), позволило спланировать и затем провести ряд экспериментов по исследованию белков различными физическими методами, чтобы охарактеризовать состояние всей молекулы белка, либо ее отдельных доменов.

Коэффициент седиментации, полученный методом центрифугирования, свидетельствует о компактности различных белков и их фрагментов. В табл. 1 представлены соответствующие значения для обычных (неамилоидогенных) и амилоидогенных образцов. Видно, что как все интактные белки, так и те их фрагменты, которые не формируют амилоидных фибрилл, систематически имеют более высокие коэффициенты седиментации по сравнению с аналогичными образцами, образующими амилоидные фибриллы. Поскольку легкие цепи всех белков имеют одинаковые гидродинамические характеристики, то полученные данные можно интерпретировать как образование более компактных структур обычными белками Бенс-Джонса и их  $F_b$ -фрагментами. Однако эти структуры могут возникать лишь за счет более интенсивных междоменных взаимодействий в белке, либо в его фрагментах. При этом в случае интактных белков они включают контакты между доменами, возникающие по-

средством *цис*- и *транс*-взаимодействий [15]. В случае же изолированных  $F_b$ -фрагментов существуют лишь *транс*-взаимодействия. Следовательно, между парами константных доменов, образующих  $F_b$ -фрагмент в белках VAD и VIR посредством *транс*-взаимодействий, существует меньшее число контактов.

Действительно, по данным рентгеноструктурного анализа, контактные поверхности между парой константных доменов изменяются у различных белков Бенс-Джонса в весьма широких пределах [35–37], что может очень сильно сказаться на энергии междоменных взаимодействий.

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что только у изолированного  $F_b$ -фрагмента VIR удается обнаружить необычные признаки в упаковке константных доменов, а в составе интактного белка они не проявляются (табл. 1).

#### **Термодинамическое исследование амилоидогенных и неамилоидогенных белков Бенс-Джонса и их фрагментов**

Информация о тех условиях, при которых препараты существуют в форме мономеров, позволила провести также и термодинамические исследования белков и их фрагментов, склонных к образованию амилоидных фибрилл. Необходимые измерения выполнены с использованием метода сканирующей калориметрии и данных по флуоресценции белков, у которых либо переменные, либо константные домены селективно помечены флуоресцентной меткой [12, 22]. Такой комбинированный подход позволил получить не только важную информацию о параметрах, характеризующих состояние всей молекулы, но и более ценную информацию о состоянии различных доменов в составе интактной молекулы белка Бенс-Джонса.

Во-первых, наличие селективно меченных образцов белков позволяет полноценнее использовать данные по флуоресценции и получать непосредственно термодинамические параметры (температура денатурации, эффективная энтальпия), которые описывают состояние отдельных частей (кооперативных блоков) белка Бенс-Джонса. Во-вторых, привлечение этих данных также способствует более четкой интерпретации калориметрических кривых плавления интактных белков, определяя в них порядок плавления константных и переменных частей в исследуемых молекулах белков Бенс-Джонса.

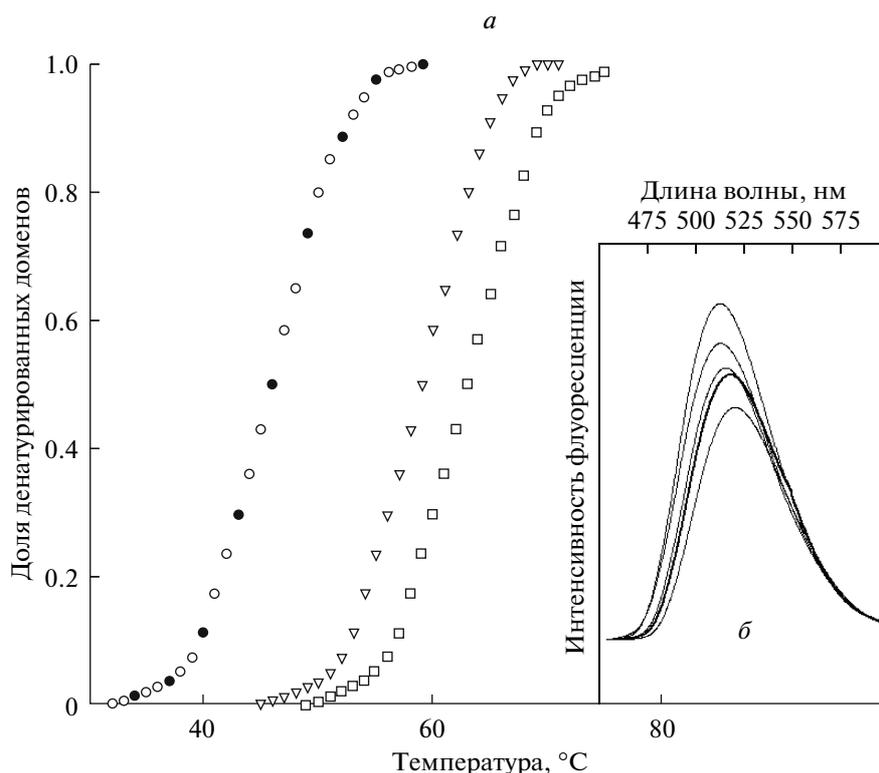
На рис. 2а приведены температурные зависимости молярной парциальной теплоемкости для двух белков Бенс-Джонса VAD и VIR, а также  $F_b$ -фрагментов этих белков, полученных на основе их калориметрических кривых плавления. Отчетливо видны качественные различия между кривыми денатурации двух интактных белков. Плавление

белка Бенс-Джонса VIR описано одним пиком теплопоглощения, и эта картина типична для тепловой денатурации основной массы белков Бенс-Джонса и Fab-фрагментов иммуноглобулинов [13, 14]. Наличие лишь одного пика теплопоглощения, конечно, не свидетельствует о том, что денатурационный переход всей молекулы из нативного состояния происходит в одну стадию по механизму “все или ничего”. Условие для подобного заключения — равенство калориметрической энтальпии  $\Delta H_{\text{кал}}$ , определенной из площади под пиком на кривой теплопоглощения, и эффективной энтальпии  $\Delta H_{\text{эфф}}$ , рассчитанной по полуширине перехода, как минимум [38]. При тепловой денатурации белка VIR для единственного пика теплопоглощения обнаружено почти двукратное превышение калориметрической энтальпии над эффективной ( $\Delta H_{\text{кал}} = 1250 \text{ кДж моль}^{-1}$ ,  $\Delta H_{\text{эфф}} = 668 \text{ кДж моль}^{-1}$ ). Более того, анализ кривой избыточного теплопоглощения показал, что при тепловой денатурации белка Бенс-Джонса VIR происходит последовательное плавление двух кооперативных блоков (рис. 2б).

Ранее мы неоднократно показывали, что и в иммуноглобулинах, и белках Бенс-Джонса отдельные домены указанных белков, как правило, сгруппированы в отдельные кооперативные блоки [13, 14, 22, 30]. Эти блоки образуются в результате интенсивных *транс*-взаимодействий, однако на их стабильность могут влиять и менее интенсивные *цис*-взаимодействия. В исследованных ранее белках Бенс-Джонса (как и в Fab-фрагментах) указанные кооперативные блоки образуются из пары константных доменов  $C_L-C_L$  и пары переменных доменов  $V_L-V_L$  [13, 14]. Вполне логично предположить, что в случае белка VIR также имеет место стандартная ситуация.

При этом, однако, остается нерешенным вопрос о порядке плавления указанных блоков в составе целой молекулы VIR. Он успешно решается с привлечением данных по флуоресценции селективно меченого белка VIR, как показано ранее на примере иммуноглобулинов и белков Бенс-Джонса [12, 14, 22, 23, 26]. На рис. 2б представлены данные по изменению доли денатурированного состояния блоков доменов, меченных флуоресцентной меткой. Видно, что температура плавления блоков константных и переменных доменов в составе белка VIR равна, по данным флуоресценции, 59.2 и 63.6°C, соответственно. Это практически совпадает с калориметрическими данными, которые получены при разложении кривой избыточного теплопоглощения этого белка (табл. 2, рис. 2б).

Таким образом, можно констатировать полное согласие между данными, полученными с помощью калориметрии и флуоресценции. Необходимо отметить, что эти совпадения возникают не



**Рис. 3.** *a* — Температурные зависимости доли денатурированного состояния изолированных константных доменов белка VAD (темные кружки) и белка BIR (светлые кружки), константных (светлые треугольники) и переменных доменов (светлые квадраты) в составе белка BIR при pH 7.0, 10 мМ фосфатный буфер, 100 мМ NaCl. *б* — Изменение флуоресценции при плавлении константных доменов в составе интактного белка BIR. Представлены спектры при температурах 49, 53, 56, 58 и 63°C.

только для температур переходов блоков константных и переменных доменов, но также и для энтальпий их плавления. По изменению флуоресценции селективно меченых белков (рис. 3*б*) рассчитаны величины только эффективных энтальпий, а из калориметрических кривых прямо определены и рассчитаны калориметрические энтальпии и эффективные энтальпии (табл. 2).

Сопоставляя данные для BIR и ряда других белков (как способных образовать амилоидные фибриллы, так и неспособных), можно сделать определенные выводы. Стабильность и энтальпия плавления константных доменов в составе интактного белка BIR практически ничем не отличаются от аналогичных параметров обычных неамилоидогенных белков Бенс-Джонса KIR и SEM (табл. 2). Однако они резко отличаются по стабильности и энтальпии плавления от константных доменов белка VAD, образующего амилоидные фибриллы. Это непосредственно следует из калориметрических данных по его плавлению, представленных в данной работе (рис. 2*а*), а также параметров, ранее полученных с помощью метода флуоресцентных меток [12].

При плавлении изолированных  $F_v$ - и  $F_b$ -фрагментов белка BIR обнаружены примечательные изменения. Если параметры, характеризующие тепловую денатурацию  $F_v$ -фрагментов, претерпели лишь малые изменения по сравнению с плавлением переменных доменов в составе интактной молекулы (табл. 2), то в поведении константных доменов наблюдается весьма заметная трансформация. Во-первых, по калориметрической кривой плавления  $F_b$ -фрагментов видно, что термостабильность изолированных константных доменов сильно изменилась. При их тепловой денатурации падает температура плавления с 59.8 до 45.1°C, также заметно падение интенсивности соответствующего пика (рис. 2*а*), т.е. калориметрической энтальпии. Во-вторых, что важнее, характер взаимодействия между константными доменами в изолированном  $F_b$ -фрагменте приобрел качественно иную форму, судя по калориметрическим данным.

Выше показано, что в составе целой молекулы белка BIR два его константных домена сформировали единый кооперативный блок, о чем свидетельствует равенство эффективной и калориметрической энтальпий их плавления (табл. 2). Однако

пик теплопоглощения на кривой плавления изолированного  $F_b$ -фрагмента уже нельзя охарактеризовать равенством указанных энтальпий, поскольку калориметрическая почти в два раза превышает эффективную (табл. 2, рис. 2а). Это однозначно свидетельствует о том, что единый кооперативный блок, который существовал в интактном белке Бенс-Джонса, распадается в  $F_b$ -фрагменте из-за ослабления междоменных взаимодействий между парой  $C_L$ -доменов.

На калориметрической кривой плавления целого белка VAD видно уже два пика теплопоглощения, что и следовало ожидать на основании термодинамических данных, ранее полученных при изучении этого белка оптическими методами, в частности, с использованием флуоресцентных меток [12]. При этом положение низкотемпературного пика на температурной шкале очень близко к положению пика, соответствующего плавлению  $F_b$ -фрагменте белка BIR (рис. 2а). Термодинамические параметры, которые характеризуют плавление  $F_b$ -фрагментов VAD и BIR, из-за идентичности структурных характеристик их константных доменов полностью совпадают в пределах экспериментальных погрешностей (рис. 2а, табл. 2).

Таким образом, сравнивая белки Бенс-Джонса и их фрагменты, которые обладают амилоидогенным потенциалом, с обычными (неамилоидогенными) белками, можно сделать вывод, что стабильность определенных доменов у первых понижена. Это  $C_L$ -домены у белков VAD и BIR. Этим они отличаются от основной массы изученных амилоидогенных белков, у которых понижена стабильность  $V_L$ -доменов, что способствует формированию амилоидных фибрилл. При этом гидродинамические данные подтверждают, что у белка VAD и у  $F_b$ -фрагментов VAD и BIR проявление амилоидогенного потенциала коррелирует с необычной упаковкой константных доменов и, согласно термодинамическим данным, домены слабо взаимодействуют между собой.

На основании экспериментальных данных обнаружена корреляция между наличием амилоидогенного потенциала и снижением термостабильности соответствующих доменов или кооперативных блоков. Наиболее важна корреляция этого свойства белков с резким снижением уровня свободной энергии  $\Delta G$  стабилизации нативной структуры, что отражает распад кооперативного блока, образующегося в норме у обычных белков Бенс-Джонса и их  $F_b$ -фрагментов. На рис. 4 представлена зависимость энтальпии плавления соответствующих кооперативных единиц (отдельных константных доменов или их блоков) от температуры денатурации для белков VAD и BIR, что позволяет рассчитать значение  $\Delta G$  [27, 38]. Видно, что величина свободной энергии для ами-

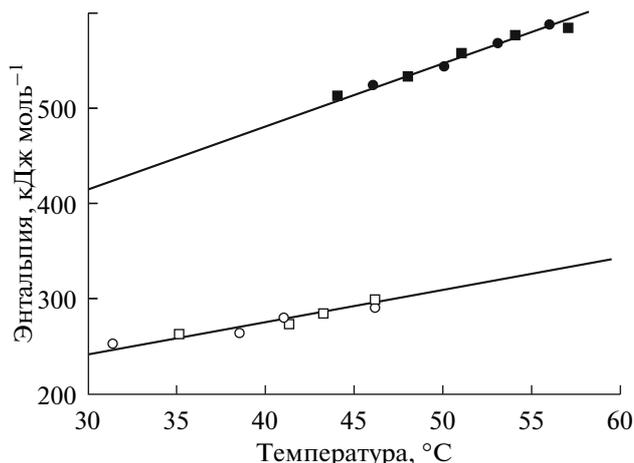


Рис. 4. Температурная зависимость энтальпии плавления константных доменов белка BIR (светлые символы) и белка VAD (темные символы). Данные по калориметрии и флуоресценции представлены кружками и квадратами. Интервалы pH составляли 2.5–3.8 (10 мМ глициновый буфер) и 5.8–8.0 (10 мМ фосфатный буфер).

лоидогенных объектов намного ниже, чем для обычных белков.

Сопоставляя же данные, полученные для двух исследованных белков Бенс-Джонса, следует сделать вывод, что взаимодействие константных доменов с переменными доменами способно модулировать взаимодействие внутри пары  $C_L$ - $C_L$ . В результате потенциально амилоидогенные константные домены белка BIR утрачивают эту способность в составе интактного белка.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Falk R.H., Comenzo R.L., Skinner M. 1997. The systemic amyloidoses. *N. Engl. J. Med.* **337**, 898–909.
2. Huff M.E., Balch W.E., Kelly J.W. 2003. Pathological and functional amyloid formation orchestrated by the secretory pathway. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 674–682.
3. Pozzi C., Locatelli F. 2002. Kidney and liver involvement in monoclonal light chain disorders. *Semin. Nephrol.* **22**, 319–330.
4. Близнюков О.П., Козьмин Л.Д., Высотская Л.Л., Голенков А.К., Тищенко В.М., Самойлович М.П., Климович В.П. 2005. Легкие цепи иммуноглобулинов человека образуют фибриллы амилоида и гранулярные агрегаты в растворе. *Биохимия.* **70**, 556–567.
5. Helms L.R., Wetzel R. 1995. Destabilizing loop swaps in the CDRs of an immunoglobulin VL domain. *Protein Sci.* **4**, 2073–2081.

6. Wall J., Schell M., Murphy C., Hrcic R., Stevens F.J., Solomon A. 1999. Thermodynamic instability of human lambda light chains: correlation with fibrillogenicity. *Biochemistry*. **38**, 14101–14108.
7. Raffin R., Diekman L.J., Szpunar M., et al. 1999. Physicochemical consequences of amino acid variations that contribute to fibril formation by immunoglobulin light chains. *Protein Sci.* **8**, 509–517.
8. Kim Y.-S., Wall J.S., Meyer J., et al. 2000. Thermodynamic modulation of light chain amyloid fibril formation. *J. Biol. Chem.* **275**, 1570–1574.
9. Solomon A., Weiss D.T., Murphy C.L., Hrcic R., Wall J.S., Schell M. 1998. Light chain-associated amyloid deposits comprised a novel kappa constant domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 9547–9551.
10. Odari S., Komori Y., Gejyo F. 1999. Structural analysis of the amyloidogenic kappa Bence Jones protein. *Amyloid*. **6**, 77–88.
11. Engvig J.P., Olsen K.E., Gislefoss R.E., Sletten K., Wahlstrom O., Westermarck P. 1998. Constant region of kappa III immunoglobulin light chain as major AL-amyloid protein. *Scand. J. Immunol.* **48**, 92–98.
12. Тищенко В.М., Христофоров В.С., Близнюков О.П. 2009. Термодинамические и гидродинамические исследования белков Бенс-Джонса. *Молекуляр. биология*. **43**, 148–156.
13. Zav'yalov V.P., Troitsky G.V., Khechinashvili N.N., Privalov P.L. 1977. Thermally induced conformational transitions of Bence-Jones protein IVA and its proteolytic fragments. *Biochim. Biophys. Acta*. **492**, 102–111.
14. Zav'yalov V.P., Tishchenko V.M. 1991. Mechanisms of generation of antibody diversity as a cause for natural selection homiothermal animals in the process of evolution. *Scand. J. Immunol.* **33**, 755–762.
15. Amzel L.M., Poljak R.J. 1979. Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 961–997.
16. Stevens F.J., Westholm F.A., Solomon A., Schiffer M. 1980. Self-association of human immunoglobulin kappa I light chains: role of the third hypervariable region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **77**, 1144–1148.
17. Stevens F.J., Schiffer M. 1981. Computer simulation of protein self-association during small-zone gel filtration. Estimation of equilibrium constant. *Biochem. J.* **195**, 213–219.
18. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–685.
19. Laurell C.B. 1965. Antigen-antibody crossed electrophoresis. *Analyt. Biochem.* **10**, 358–361.
20. Eulitz M., Chang L.Y., Zirkel C., Schell M., Weiss D.T., Solomon A. 1996. Distinctive serologic, chemical, and molecular properties of human lambda IV light chains. *J. Immunol.* **154**, 3256–3265.
21. Michaelsen T.E., Natvig J.B. 1974. Unusual molecular properties of human IgG3 proteins due to an extended hinge region. *J. Biol. Chem.* **249**, 2778–2785.
22. Tishchenko 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.
23. Tishchenko V.M., Zav'yalov V.P. 2002. Long-term metastable conformation of human Fcγ subunit. *Immunol. Lett.* **84**, 241–245.
24. Wall Y., Murphy C.L., Solomon A. 1999. *In vitro* immunoglobulin light chain fibrillogenesis. *Methods Enzymol.* **309**, 204–216.
25. Wetzel R. 1997. Domain stability in immunoglobulin light chain deposition disorders. *Adv. Prot. Chem.* **50**, 183–242.
26. Тищенко В.М. 2000. Исследование доменной структуры шаперона Caf1M *Yersinia pestis*. *Молекуляр. биология*. **34**, 116–122.
27. Privalov P.L., Potekhin, S.A. 1986. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Meth. Enzymol.* **131**, 4–51.
28. Yphantis D.A. 1964. Equilibrium ultracentrifugation of dilute solutions. *Biochemistry*. **3**, 297–317.
29. van Holde K.E., Baldwin R.L. 1958. New approach for molecular weight determination. *J. Phys. Chem.* **62**, 734–743.
30. Tishchenko 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.
31. Amzel L.M., Poljak R.J. 1979. Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 961–997.
32. Makino D.L., Henschen-Edman A.H., Larson S.B., McPherson A. 2007. Bence-Jones KWR protein structures determined by X-ray crystallography. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **63**, 780–792.
33. Maeda H., Steffen E., Engel J. 1978. Kinetics of dimerization of the Bence-Jones protein. *Biochem. J.* **9**, 57–64.
34. Боуэн Т. 1973. *Введение в ультрацентрифугирование*. М.: Мир.
35. Ely K.R., Herron J.N., Harker M., Edmundson A.B. 1989. Three-dimensional structure of a light chain dimer crystallized in water. Conformational flexibility of a molecule in two crystal forms. *J. Mol. Biol.* **210**, 601–615.
36. Carter P., Presta L., Gorman C.M., Ridgway J.B., Henner D., Wong W.L.T., Rowland A.M., Kotts C., Carver M.E., Shepard H.M. 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**, 4285–4294.
37. Roussel A., Spinelli S., Déret S., Navaza J., Aucouturier P., Cambillau C. 1999. The structure of an entire noncovalent immunoglobulin kappa light-chain dimer (Bence-Jones protein) reveals a weak and unusual constant domains association. *Eur. J. Biochem.* **260**, 192–199.
38. Privalov P.L. 1979. Stability of proteins. Small globular proteins. *Adv. Prot. Chem.* **33**, 167–241.
39. Privalov P.L. 1979. Stability of proteins. Proteins which do not represent a single cooperative system. *Adv. Prot. Chem.* **35**, 1–104.