



УДК 577.27:577.322.5:543.422.25

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ
СВОЙСТВ Fc-ФРАГМЕНТОВ ПОДКЛАССОВ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ¹H-ЯМР****Христоворев В. С., Кутышенко В. П.*, Абрамов В. М.,
Завьялов В. П.***Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной микробиологии,
Оболенск Московской обл.;*** Институт биологической физики Академии наук СССР, Пущино Московской обл.*

Методом ¹H-ЯМР (270 и 400 МГц) исследованы конформационные свойства Fc- и pFc'-фрагментов млекопитающих иммуноглобулинов G человека первого и третьего подклассов. В соответствии с данными этого метода глобулярные структуры (домены) Fc-фрагментов IgG1 и IgG3 в растворе характеризуются высокой сегментальной подвижностью и между ними нет существенных различий в пространственной организации.

Сравнительный анализ спектров, полученных при различных температурах в интервале 30–70° С, показал, что Fc-фрагмент IgG3 имеет более термостабильную конформацию по сравнению с Fc IgG1. Отмечено увеличение внутримолекулярной подвижности Fc-фрагмента при смещении pH в кислую область.

Проведено частичное отщепление сигналов в спектрах ЯМР Fc-фрагментов иммуноглобулинов G1 и G3, определены значения рK_a для гистидинов pFc'-фрагмента IgG1.

Имуноглобулины G человека (IgG) подразделяют на четыре подкласса — IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, которые отличаются друг от друга по своим эффекторным функциям, таким, как фиксация и активация системы комплемента, взаимодействие с В- и Т-лимфоцитами, макрофагами, нейтрофилами, моноцитами и др. [1]. Центры, ответственные за большинство эффекторных функций, локализованы в Fc-субъединице иммуноглобулинов [1, 2], которую можно получить в виде Fc-фрагмента (M_r ~ 50 000) с помощью контролируемого ферментативного гидролиза.

Fc-фрагмент молекулы иммуноглобулина — это димер, образованный двумя C-концевыми половинами тяжелой цепи и состоящий из четырех глобулярных доменов (C_H2, C_H3)₂. Кристаллическая структура Fc-фрагмента IgG1, полученного из пула сыворотки крови человека, была изучена методом рентгеноструктурного анализа (РСА) с разрешением 0,4 [3], 0,35 [4] и 0,29 нм [5]. Эти исследования позволили установить пространственную структуру молекулы и расположение олигосахаридной цепочки, ковалентно присоединенной к C_H2-домену.

Следует отметить, что для иммуноглобулинов РСА позволяет рассматривать лишь статическую структуру молекулы в одной определенной конформации, в то время как необходимость изучения динамики Ig вполне очевидна [6, 7].

Для исследования структуры и динамики биологических макромолекул в растворе широко используют спектроскопию ЯМР, с помощью которой можно получить обширную информацию о конформационных характеристиках белков при физиологических условиях [8–10].

Ранее мы уже сообщали об исследовании конформационно-функциональных свойств молекул IgG человека (IgG1, IgG3) и их протеолитических фрагментов F(ab')₂, Fab, Fc и pFc' методом ¹H-ЯМР [11–13]. В данной работе изучены конформационные свойства Fc- и pFc'-фрагментов молекул IgG1 и IgG3 методом ¹H-ЯМР с целью выяснения структурной основы различной эффекторной активности сравниваемых подклассов.

Анализ спектров ¹H-ЯМР. На рис. 1а представлена ароматическая область ¹H-ЯМР-спектра Fc-фрагмента молекулы IgG1. В области

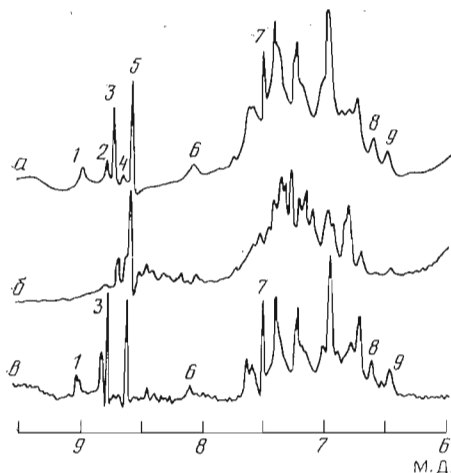


Рис. 1. Ароматическая область ^1H -ЯМР-спектра (400 МГц): а — Fc IgG1 Bad (pH 4,00; 24° C), б — то же при pH 4,81 в присутствии 6 М мочевины, в — Fc IgG3 (pH 3,85; 32° C). $^2\text{H}_2\text{O}/0,2 \text{ M NaCl}$. 1–6 — сигналы от протонов C2-H гистидинов: 1 — His⁴³⁵, 3 — His⁴³³, 6 — His⁴²⁹; 2, 4, 5 — гистидины, находящиеся в C_H2-доменах; 7 — сигнал от протонов C4-H His⁴³³; 8 и 9 — сигналы от протонов ароматических колец тирозинов

7,8–9,0 м. д. наблюдаются шесть отдельных сигналов (1–6). Исходя из данных о химических сдвигах сигналов протонов индивидуальных аминокислот в спектре ^1H -ЯМР, эти сигналы должны быть обусловлены протонами C2-H гистидинов, которые присутствуют в Fc-области IgG1. Известно [14], что IgG1 человека имеют шесть пар гистидинов в Fc-области: His^{268, 285, 310} в C_H2-доме и His^{429, 433, 435} в C_H3-доме. Сравнение аминокислотной последовательности Fc-фрагментов четырех подклассов IgG человека показывает, что гомология между ними находится на уровне 95% [15]. Каждому подклассу присущ характерный набор Gm-аллотипических маркеров. Различия в аминокислотной последовательности, связанные с определенными Gm-маркерами, выражаются в заменах единичных аминокислотных остатков в C_H1-доменах IgG [1].

IgG3, обладающие G3m(b)- или G3m(g)-аллотипами, имеют пять пар гистидинов в Fc-фрагменте [16, 17]. У них His⁴³⁵, играющий важную роль во взаимодействии Fc-области IgG с белком А *Staphylococcus aureus* [18], заменен на аргинин. В работах [19, 20] показано, что IgG3, имеющие G3m(b)- или G3m(g)-аллотипы, не связываются с белком А. В то же время IgG3 с G3m(st)-аллотипическими маркерами, в которых присутствует His⁴³⁵ [21], взаимодействуют с белком А так же, как и в случае IgG1, IgG2, IgG4.

На рис. 1в в области 7,8–9,0 м. д. наблюдаются шесть сигналов в спектре ^1H -ЯМР Fc-фрагмента IgG3. Данный Fc-фрагмент получен из IgG3 Lap, который связывается с белком А и обладает, по-видимому, G3m(st)-аллотипическим маркером.

В результате расщепления молекулы IgG пепсином можно получить pFc'-фрагмент, представляющий собой C_H3-димер с $M_r \sim 25\,000$ [1]. pFc'-фрагменты IgG1 и IgG3, обладающих G3m(st)-аллотипическим маркером, содержат шесть гистидиновых остатков [14, 21]. В спектрах ^1H -ЯМР pFc'-фрагментов IgG1 Van (рис. 2б) и IgG3 Pla* (рис. 2а) наблюдаются три сигнала в области 7,5–8,5 м. д. В работе [22], в которой было проведено ^1H -ЯМР исследование мнеломного IgG3 Her, обладающего G3m(g)-аллотипом, авторы наблюдали в спектрах ^1H -ЯМР (область 7,8–9,0 м. д.) пять сигналов от C2-H-протонов гистидинов для Fc-фрагмента и два сигнала для pFc'. Таким образом, данные работы [22] и результаты наших исследований позволяют использовать метод ЯМР для идентификации IgG3, содержащих шесть пар гистидинов в Fc-фрагменте и обладающих G3m(st)-аллотипом. Кроме того, наличие только трех сигналов в спектрах ^1H -ЯМР pFc'-фрагментов IgG1, IgG3 [G3m(st)] и двух для IgG3 [G3m(g)] [22] в области 7,5–8,5 м. д. свидетельствует о том, что химические сдвиги сигналов, соответствующих C2-H-протонам гистидинов в каждом C_H3-доме одинаковы. По-видимому, pFc'-фрагмен-

* Исследуемый pFc'-фрагмент получен из IgG3 Pla, который связывается с белком А *St. aureus*.

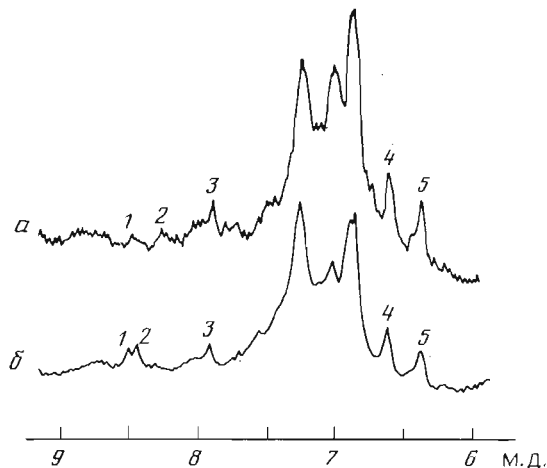


Рис. 2. Ароматическая область ^1H -ЯМР-спектра (270 МГц): *a* – рFc' IgG3 Plа (рН 6,34); *б* – рFc' IgG1 Van (рН 6,07), 5 мМ фосфатный буфер/ $^2\text{H}_2\text{O}$, содержащий 0,15 М NaCl, 36° С. 1–3 – сигналы от протонов C2-H гистидинов: 1 – His⁴³⁵, 2 – His⁴³³, 3 – His⁴²⁹, 4 и 5 – сигналы от протонов ароматических колец тирозинов

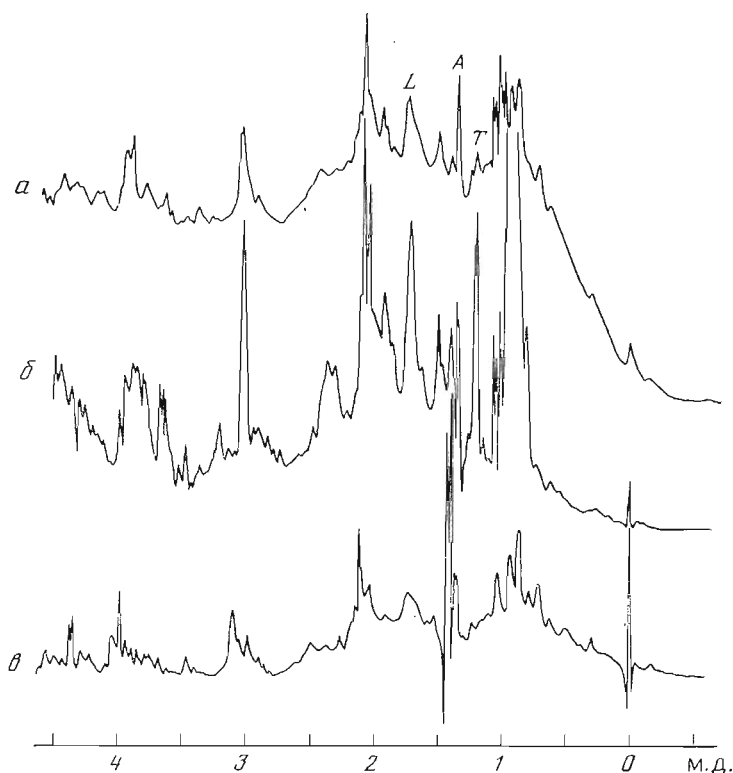


Рис. 3. Алифатическая область ^1H -ЯМР-спектра (400 МГц) Fc-фрагментов. Экспериментальные параметры и обозначения спектров идентичны указанным в подписи к рис. 1. Проведено отнесение к группам некоторых аминокислотных остатков, входящих в состав «шарнирной» области IgG1, где T – C^γH₃ Thr²²⁵, A – C^βH₃ Ala²³¹, L – C^βH₂, C^γH Leu²³⁴

ты молекул IgG1, IgG3 обладают в растворе C_2 -осью симметрии. Аналогичные результаты были получены Двеком и сотр. для Fc- и рFc'-фрагментов IgG кролика [23].

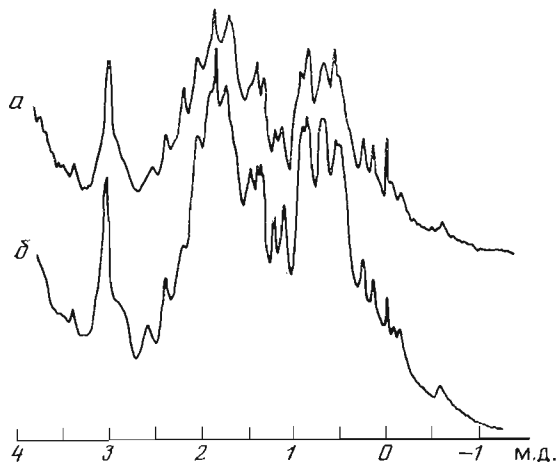


Рис. 4. Алифатическая область ^1H -ЯМР-спектра (270 МГц) рFc'-фрагментов. Экспериментальные параметры и обозначения спектров идентичны приведенным в подписи к рис. 2

В спектрах ^1H -ЯМР Fc- (рис. 3а, 3в) и рFc'-фрагментов (рис. 4, IgG1 и IgG3 содержится большое число сигналов в необычно высоком поле — область от 0,8 до $-0,5$ м. д. Такие сигналы, как правило, относятся к метильным протонам аполярных алифатических остатков валинов, лейцинов и изолейцинов, которые находятся в непосредственной близости от плоскости колец ароматических остатков [8]. Кольцевой ток сдвигает сигналы протонов этих групп в высокое поле. Наличие сигналов, сдвинутых кольцевым током, является характерной особенностью ЯМР-спектров глобулярных белков, имеющих в отличие от фибриллярных белков компактное гидрофобное ядро [8]. Таким образом, спектры ^1H -ЯМР Fc- и рFc'-фрагментов IgG1 и IgG3 свидетельствует о глобулярной структуре данных белков в растворе.

Отнесение сигналов ароматических протонов. Область ^1H -ЯМР-спектра в низком поле (6,0–7,8 м. д.) рFc'-фрагментов (рис. 2) соответствует протонам боковых цепей ароматических остатков белка (рFc' IgG1 — 4 триптофанов, 8 фенилаланинов, 10 тирозинов; рFc' IgG3 — 4 триптофанов, 10 фенилаланинов, 8 тирозинов). Как видно из спектров, сигналы ароматических протонов уширены. Условно сигналы 4 и 5 можно отнести к *мета*- и *орто*-кольцевым протонам тирозинов. При изменении рН и температуры раствора белка (рFc' IgG1) сигналы 4 и 5 (рис. 2б) расщеплялись на дублет с константой спин-спинового взаимодействия ~ 8 Гц, что согласуется с данными работы [23].

На рис. 5 представлены кривые (1–3) рН-зависимостей химических сдвигов сигналов 1–3 (рис. 2б) протонов C2-H импидазольных колец гистидинов рFc'-фрагмента IgG1. Согласование полученных экспериментальных результатов для кривых 1 и 2 рН-зависимостей (рис. 5) с теоретическим уравнением (см. «Экспериментальную часть») дает значения pK_a 7,15 ($h=0,94$) для кривой 1 и pK_a 6,75 ($h=0,86$) для кривой 2. Химический сдвиг сигнала 3 не изменяется в области рН 4,5–9,0. Следовательно, гистидины, соответствующие этому сигналу, не доступны растворителю при рН $> 4,5$. Аналогичные результаты были получены в работах [22, 23]. Полученные значения pK_a и коэффициентов Хилла для кривых 1 и 2 свидетельствуют о пространственной близости и взаимодействии двух одновременно титрующихся ионогенных групп [24, 25]. Используя данные работы [26], можно определить расстояние между одновременно титрующимися группами, которое в нашем случае равно 0,7 нм и находится в хорошем согласии с данными РСА ($\sim 0,85$ нм).

Согласно данным РСА Fc-фрагмента человека [5], His⁴²⁹ расположен в β -структурном участке полипептидной цепи и ориентирован внутрь

молекулы, а его имидазольное кольцо связано водородной связью с карбонильными кислородами Tyr³⁷³ и Asp³⁷⁶. Напротив, His⁴³³ локализован в петле, соединяющей два участка β-структуры, и экспонирован в растворитель. His⁴³⁵ расположен в области контакта C_{II}2- и C_{II}3-доменов, а его имидазольное кольцо связано водородной связью с карбонильным кислородом Leu²⁵¹ в C_{II}2-доме. Общая доступная площадь атомов боковой цепи каждого гистидина Fc-фрагмента была рассчитана в работе [22] на основании данных РСА [5]. Эти результаты (в Å²) следующие: 70 (His²⁶⁵), 110 (His²⁸⁵), 40 (His³¹⁰), 0 (His⁴²⁹), 140 (His⁴³³), 50 (His⁴³⁵).

Таким образом, на основании данных РСА и результатов по исследованию pH-зависимости химических сдвигов сигналов (рис. 5) сигнал 3 в спектре ¹H-ЯМР рFc'-фрагмента IgG1 (рис. 2б) можно отнести к His⁴²⁹, а сигналы 1, 2 — к His⁴³³ и/или His⁴³⁵. Используя данные ЯМР [22], можно сделать отнесение сигналов 1–3 в спектрах рFc'-фрагментов IgG1 и IgG3 (рис. 2) к C2-Н-протонам соответствующих гистидинов: 1 — His⁴³⁵, 2 — His⁴³³, 3 — His⁴²⁹.

Как видно из данных РСА (см. выше), из 6 гистидинов, содержащихся в C_{II}2- и C_{II}3-доменах, His⁴³³ наиболее экспонирован в растворитель. В спектрах ЯМР Fc-фрагментов (рис. 1) His⁴³³ является единственным, который имеет узкий сигнал от протона C4-Н в области значений pH от 4 до 9. Сигналы от протонов C4-Н других гистидинов не могут быть выявлены вследствие уширения и их перекрывания с другими сигналами. На основании данных работы [22] и собственных результатов можно провести отнесение сигналов в ароматической области спектра Fc-фрагмента IgG1 (рис. 1а). Протоны C2-Н: 1 — His⁴³⁵, 3 — His⁴³³, 6 — His⁴²⁹; 7 — протоны C4-Н His⁴³³, 8 и 9 — протоны ароматических колец тирозинов, находящихся в основном в рFc'-фрагменте. Для Fc-фрагмента IgG3 (рис. 1в) отнесение сигналов в спектре аналогично.

Сигналы 1 и 6 в спектрах ¹H-ЯМР Fc-фрагментов IgG1, IgG3 можно использовать в качестве «зондов-информаторов» при исследовании их конформационных и динамических характеристик.

Конформационные и динамические характеристики Fc-фрагментов. В последнее время с помощью физико-химических методов весьма интенсивно изучается внутримолекулярная подвижность белков, играющая важную роль в обеспечении их функциональных свойств [27, 28], в особенности у таких сложных полифункциональных молекул, как иммуноглобулины [6, 7]. Ширина сигналов в спектре ЯМР для белков с одинаковой молекулярной массой и аналогичной природы может служить качественной мерой сегментальной подвижности в них, если отсутствует агрегация. На основании сравнения спектров ¹H-ЯМР можно сделать вывод, что рFc'- и Fc-фрагменты молекул IgG1 и IgG3 имеют одинаковую степень сегментальной подвижности. В то же время по сравнению с Fab-фрагментами (M_r ~ 50 000) Fc-субъединицы обладают большей внутримолекулярной подвижностью. Аналогичные выводы получены ранее для IgG кролика методом ¹H-ЯМР (270 МГц) [23] и для IgG человека методом спиновой метки [29].

Уникальным свойством иммуноглобулинов является высокая степень гибкости молекулы в области, соединяющей Fab- и Fc-субъединицы, — «шарнирная» (hinge) область [7]. В ее структуре, кодируемой отдельным экзоном [30], запрограммированы конформационные и функциональные особенности Fc-субъединиц подклассов человека и животных [31].

В работах [32, 33], в которых исследовались конформационные свойства «шарнирного» участка IgG1 методом ¹H-ЯМР, было сделано отнесе-

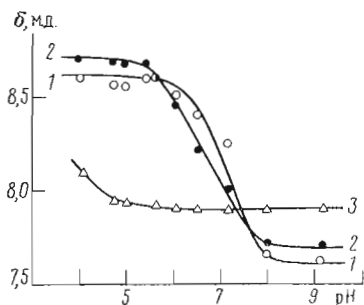


Рис. 5. pH-Зависимость химических сдвигов протонов C2-Н гистидинов рFc'-фрагмента IgG1 Van (5 мМ фосфатный буфер/²H₂O, содержащий 0,15 М NaCl, 36° С). Кривые соответствуют His⁴³⁵ (1), His⁴³³ (2), His⁴²⁹ (3)

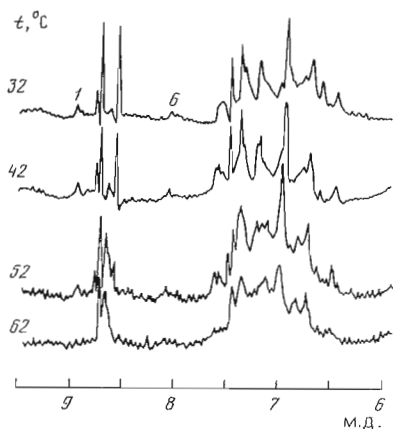


Рис. 6

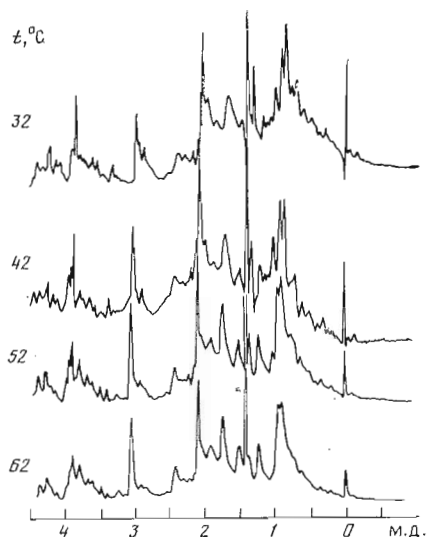


Рис. 7

Рис. 6. Ароматическая область ^1H -ЯМР-спектра (400 МГц) Fc-фрагмента IgG1 Vad ($^2\text{H}_2\text{O}/0.2 \text{ M NaCl}$, pH 3,87) при изменении температуры. В области 62–72° С происходит денатурация белка. 1, 6 – сигналы протонов C2-H His⁴³⁵ и His⁴²⁹ соответственно

Рис. 7. Алифатическая область ^1H -ЯМР-спектра (400 МГц) Fc-фрагмента IgG1 Vad при изменении температуры. Экспериментальные параметры идентичны приведенным в подлинки к рис. 6

ние сигналов в спектре Fc-фрагмента к некоторым аминокислотным остаткам, входящим в состав шарнирного участка. Известно, что в Fc-фрагменте IgG1, получаемого с помощью папаина, имеется часть «шарнирного» участка с аминокислотной последовательностью: Thr²²⁵-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro²³⁰-Ala-Pro-Glu-Leu²³⁴. (Нумерация аминокислотных остатков «шарнирной» области обычно приводится по иммуноглобулину Eu [14].) В алифатической области спектра Fc-фрагмента IgG1 (рис. 3а) нами также отмечены сигналы, принадлежащие группам некоторых аминокислотных остатков, входящих в состав «шарнирной» области. Узкие сигналы в ^1H -ЯМР-спектре свидетельствуют о высокой подвижности этих остатков.

Для получения информации о конформационных и динамических свойствах Fc-фрагментов IgG1, IgG3 при изменении внешних условий проведено изучение влияния таких факторов, как кислотность (pH), состав среды (мочевина) и температура.

При смещении pH в кислую область внутримолекулярная подвижность Fc-фрагмента IgG1 возрастает, что ранее отмечалось и для Fc-области в составе интактной молекулы IgG1 [32, 34]. В спектрах ЯМР Fc-фрагментов IgG1, IgG3 в области 3,5–4,0 м. д. (рис. 3а, 3б) можно выделить сигналы, принадлежащие необменивающимся кольцевым протонам углеводных остатков [23]. При 2,1 м. д. наблюдается узкий сигнал, который можно отнести к CH_3 -протонам N-ацетильных групп олигосахарида. Наличие в спектре узкого сигнала, соответствующего этим метильным группам, говорит об их быстром вращении, даже если некоторые углеводные остатки жестко связаны с белком [5].

Согласно данным РСА [5], олигосахарид ковалентно присоединен к остатку Asp²⁹⁷ и закрывает часть C-контактной поверхности C_{H2}-домена, экранируя находящиеся на этой поверхности гидрофобные остатки.

Как видно из рис. 3б, в 6 М мочевины в области 3,5–4,0 м. д. появляется большое количество индивидуальных сигналов, характерных для групп с высокой сегментальной подвижностью, что является следствием разворачивания Fc-фрагмента (сигнал 1 изменяет свое положение, см. рис. 1б) и высвобождения олигосахарида из пространства между C_{H2}-до-

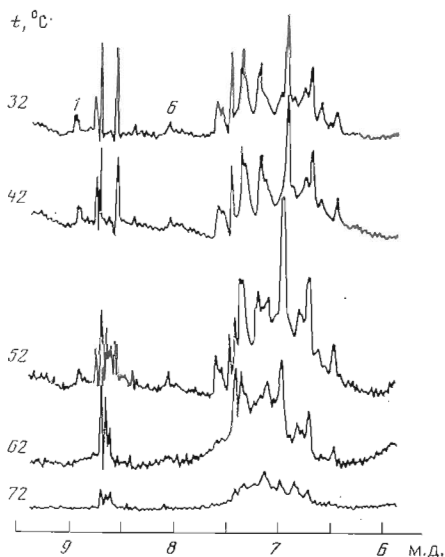


Рис. 8

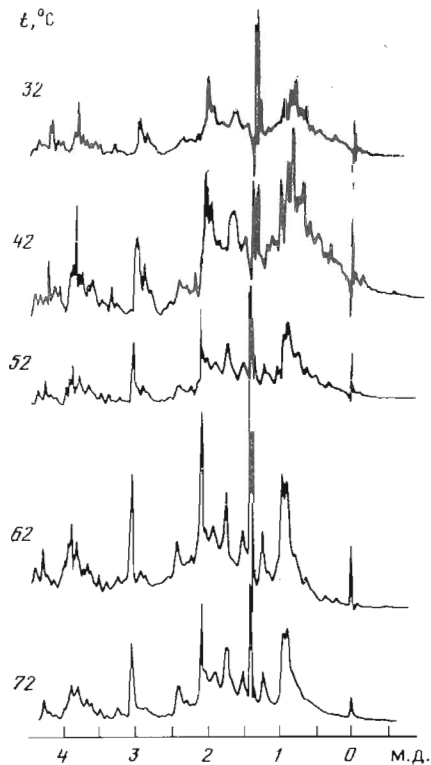


Рис. 9

Рис. 8. Ароматическая область ^1H -ЯМР-спектра (400 МГц) Fc-фрагмента IgG3 Lар ($^2\text{H}_2\text{O}/0,2 \text{ M NaCl}$, pH 3,85) при изменении температуры. 1, 6 — сигналы протонов C2-H His⁴³⁵ и His⁴²⁹ соответственно

Рис. 9. Алифатическая область ^1H -ЯМР-спектра (400 МГц) Fc-фрагмента IgG3 Lар при изменении температуры. Экспериментальные параметры идентичны приведенным в подписи к рис. 8

менами, хотя в целом структура гидрофобных ядер в доменах сохраняется, о чем свидетельствует положение сигнала 6 (рис. 1а, б) и наличие сигналов в области от 0,8 до $-0,5$ м. д. (рис. 3б).

Исследование температурной зависимости ^1H -ЯМР-спектров для rFc'-фрагмента IgG1 Van в интервале $10\text{--}50^\circ\text{C}$ показывает, что значительных конформационных изменений в этой области температур не происходит, так как спектры по своей форме практически не различались. Лишь начиная с 35°C у части сигналов как в ароматической, так и в алифатической областях спектра наблюдается сужение линий, которое может быть объяснено увеличением подвижности молекул. Анализ ^1H -ЯМР-спектров Fc-фрагмента молекул IgG1 Vad при изменении температуры раствора белка в интервале $30\text{--}70^\circ\text{C}$ свидетельствует (рис. 6, 7), что в области $42\text{--}62^\circ\text{C}$ наблюдаются два термoinдуцированных конформационных перехода, связанных как с нарушением междоменных контактов, так и с упорядоченностью пространственной структуры самих доменов [35]. Для Fc-фрагмента IgG3 Lар (рис. 8, 9) в области $42\text{--}62^\circ\text{C}$ наблюдаются также два термoinдуцированных конформационных перехода, что согласуется с данными сканирующей микрокалориметрии [36]. Однако следует отметить, что Fc-фрагмент IgG3 характеризуется большей термостабильностью по сравнению с Fc IgG1. Это согласуется с результатами, полученными методом температурно-пертурбационной дифференциальной спектроскопии [37].

Сравнение ^1H -ЯМР-спектров Fc- и rFc'-фрагментов молекул иммуноглобулинов G1 и G3 не выявляет заметных различий в их пространственной организации, а описанные выше различия в конформационных свой-

ствах исследованных белков обусловлены, по-видимому, немногочисленными заменами в аминокислотной последовательности. Полученные результаты позволяют говорить о сходстве пространственной организации Fc-фрагмента IgG1 в кристаллическом состоянии и в растворе.

Экспериментальная часть

Моноклональные IgG разных подклассов получали из сыворотки крови больных множественной миеломой. Для исследования использовались следующие иммуноглобулины: IgG1 Van, IgG2 Bad, IgG3 Gar, IgG3 Pla. IgG, используемые в работе, обладали легкими цепями κ -типа. Методики получения миеломных IgG различных подклассов и их протеолитических фрагментов приведены в работах [36, 37]. Подклассы IgG были идентифицированы при помощи моноспецифических антисывороток в тесте двойной иммунодиффузии в геле по методу Ухтерлони [38]. Идентификацию Fab- и Fc-фрагментов осуществляли методом иммуноэлектрофореза, используя антисыворотки к легким и тяжелым цепям [39].

Гомогенность образцов и их молекулярную массу определяли методом электрофореза в 10% полиакриламидном геле в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия [40].

Взаимодействие Fc-фрагментов исследуемых препаратов с белком *A. St. aureus* определяли на колонке с Белок А-Сефарозой CL-4B, уравновешенной 0,1 М фосфатным буфером, pH 7,4.

Спектры ^1H -ЯМР получены на спектрометрах типа WH-270 и WM-400 Bruker (ФРГ) с рабочей частотой для протонов 270 и 400 МГц, соответственно в импульсном режиме с последующим фурье-преобразованием.

Для улучшения разрешения использовали метод конволюционной разностной спектроскопии [41] в случае получения спектров на WH-270, а для спектров, полученных на WM-400, сигнал спада свободной индукции обрабатывали по методике, предложенной в работе [42]. Длительность импульса составляла 9 мкс, время одного цикла 1,13 с, число накоплений от 1500 до 4000 для спектрометра WH-270 и 8 мкс, 0,68 с, 200–700 для WM-400. Химические сдвиги измерены относительно внутреннего эталона 2,2-диметил-2-силилацетил-сульфоната натрия. Спектры сняты в 5-мм ампулах с концентрацией белка 10–40 мг/мл в 0,2 М NaCl/2H₂O. Значения pH раствора устанавливались 0,3–0,5 М ^2HCl и NaO^2H_2 и соответствовали показанию pH-метра типа Orion Research 501 (США) без введения поправки на изотопное замещение.

Зависимость химических сдвигов сигналов протонов C2-H гистидинов от pH среды согласовывали на ЭВМ по методу наименьших квадратов с теоретическим уравнением [25]:

$$\delta_{\text{набл}} = \delta_{\text{H}^+} - \Delta\delta \frac{10^{h(\text{pH}-\text{p}K_a)}}{1 + 10^{h(\text{pH}-\text{p}K_a)}},$$

где $\delta_{\text{набл}}$ и δ_{H^+} — химические сдвиги сигнала, наблюдаемые при данном значении pH и при протонировании ионогенной группы соответственно; K_a — константа диссоциации ионогенной группы; $\Delta\delta$ — изменение химического сдвига сигнала при депротонировании ионогенной группы, h — коэффициент Хилла.

В работе использовалась модель Fc-фрагмента IgG1 человека, построенная в нашей лаборатории А. И. Денесюком на основании данных РСА [5].

Авторы выражают благодарность д-ру Й. Дейзенхоферу (Мартинсрид, ФРГ) за любезно предоставленные координаты атомов Fc-фрагмента, Е. Я. Волкову за возможность получения спектров ЯМР на спектрометре WH-270 и А. З. Гуревичу за помощь при расчетах кривых титрования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тернер М. В кн.: Структура и функция антител/Ред. Гэлин Л., Стьюард М. М.: Мир, 1983, с. 8–75.
2. Painter R. H. In: Immunohemotherapy/Ed. Nydegger U. E. L.: Acad. Press, 1981, p. 27–35.
3. Deisenhofer J., Colman P. M., Huber R., Haupt H., Schwick G. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1976, v. 357, № 3, p. 435–445.
4. Deisenhofer J., Colman P. M., Epp O., Huber R. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1976, v. 357, № 10, p. 1421–1434.
5. Deisenhofer J. Biochemistry, 1981, v. 20, № 9, p. 2361–2370.
6. Kary P. В кн.: Иммуноглобулины/Ред. Литмен Г., Гуд Р. М.: Мир, 1981, с. 58–120.

7. *Burton D. R.* Mol. Immunol., 1985, v. 22, № 3, p. 161–206.
8. *Wüthrich K.* NMR in Biological Research: Peptides and Proteins. Amsterdam: North-Holland Pub. Com., 1976.
9. *Jardetsky O., Roberts G. C. K.* NMR in Molecular Biology. N. Y.: Acad. Press, 1981.
10. *Быстров В. Ф.* Биооргани. химия, 1984, т. 10, № 8, с. 997–1043.
11. *Христофоров В. С., Абрамов В. М., Волков В. Я., Завьялов В. П.* В сб.: Тез. докл. I Всес. биофиз. съезда. М.: 1982, т. 4, с. 5.
12. *Христофоров В. С., Абрамов В. М., Завьялов В. П.* В сб.: Тез. докл. V Всес. конференции по спектроскопии биополимеров. Харьков: 1984, с. 260.
13. *Христофоров В. С., Абрамов В. М., Завьялов В. П.* В сб.: Тез. докл. VI Всес. симпозиума «Химия белков и пептидов». Рига: 1983, с. 217.
14. *Edelman G. M., Cunningham B. A., Gall W. E., Gottlieb P. D., Rutishauser U., Waxdal M. J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, v. 69, № 1, p. 78–85.
15. *Connell G. E., Parr D. M., Hofmann T.* Can. J. Biochem., 1979, v. 57, № 6, p. 758–767.
16. *Wolfenstein-Todel C., Frangione B., Prelli F.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1976, v. 71, № 4, p. 907–914.
17. *Prahl J. W.* Biochem. J., 1967, v. 105, № 3, p. 1019–1028.
18. *Haake D. A., Franklin E. C., Frangione B.* J. Immunol., 1982, v. 129, № 1, p. 190–192.
19. *Ito S., Miyazaki T., Matsumoto H.* Proc. Japan Acad., 1980, v. 56B, № 4, p. 226–229.
20. *Van Loghem E., Frangione B., Recht B., Franklin E. C.* Scand. J. Immunol., 1982, v. 15, № 3, p. 275–278.
21. *Recht B., Frangione B., Franklin E. C., Van Loghem E. J.* Immunol., 1981, v. 127, № 3, p. 917–923.
22. *Shimizu A., Honzawa M., Ito S., Miyazaki T., Matsumoto H., Nakamura H., Michaelson T. E., Arata Y.* Mol. Immunol., 1983, v. 20, № 2, p. 141–148.
23. *Boyd J., Easterbrook-Smith S. B., Zawodszky P., Mountford-Wright C., Dwek R. A.* Mol. Immunol., 1979, v. 16, № 11, p. 851–858.
24. *Shrager R. I., Cohen J. S., Stephen R. H., Sachs D. H., Schechter A. N.* Biochemistry, 1972, v. 11, № 4, p. 541–547.
25. *Markley J. L.* Biochemistry, 1973, v. 12, № 12, p. 2245–2250.
26. *Tanford C., Rozby R.* Biochemistry, 1972, v. 11, № 11, p. 2192–2198.
27. *Gurd F. R. N., Rothgeb T. M.* Adv. Prot. Chem., 1979, v. 33, p. 73–156.
28. *Huber R., Bennett W. S.* Biopolymers, 1983, v. 22, № 1, p. 261–279.
29. *Timofeev V. P., Dudich I. V., Sykulev Yu. K., Nezlin R. S.* FEBS Lett., 1978, v. 89, № 2, p. 191–195.
30. *Sakano H., Rogers J. H., Hoppi K., Brack C., Trannecker A., Maki R., Tonegawa S.* Nature, 1979, v. 277, № 5698, p. 627–633.
31. *Завьялов В. П.* В сб.: Химия и биология иммунорегуляторов/Ред. Чппенс Г. И. Рига: Зинатне, 1985, с. 294–315.
32. *Endo S., Arata Y.* Biochemistry, 1985, v. 24, № 6, p. 1561–1568.
33. *Ito W., Arata Y.* Biochemistry, 1985, v. 24, № 23, p. 6467–6474.
34. *Arata Y., Honzawa M., Shimizu A.* Biochemistry, 1980, v. 19, № 22, p. 5130–5135.
35. *Христофоров В. С., Завьялов В. П.* В сб.: Тез. докл. симпозиума с участием стран СЭВ и СФРЮ «Физико-химические свойства биополимеров в растворе и клетках». Пушкино, 1985, с. 66–67.
36. *Денесюк А. И., Тищенко В. М., Абрамов В. М., Завьялов В. П.* Молекулярн. биология, 1983, т. 17, № 6, с. 1262–1271.
37. *Abramov V. M., Arkhangel'skaya Z. A., Zav'yalov V. P.* Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 742, № 2, p. 295–302.
38. *Вэл Э. В.* в кн.: Иммунологические методы/Ред. Фримель Х. М.: Мир, 1969, с. 31–37.
39. *Garbar P., Williams C. A.* Biochim. et biophys. acta, 1953, v. 10, № 1, p. 193–194.
40. *Laemmli U. K.* Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680–685.
41. *Campbell I. D., Bobson C. M., Williams R. J. P., Xavier A. V. J.* Magn. Res., 1973, v. 11, № 2, p. 172–181.
42. *Ferrige A. G., Lindom J. C. J.* Magn. Res., 1978, v. 31, № 2, p. 337–341.

Поступила в редакцию 16.XII.1985

После доработки 19.IV.1986

A COMPARATIVE ¹H-NMR STUDY ON CONFORMATIONAL PROPERTIES OF THE Fc-FRAGMENTS OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN G SUBCLASSES

KHRISTOFOROV V. S., KUTYSHENKO V. P., ABRAMOV V. M., ZAV'YALOV V. P.
All-Union Research Institute of Applied Microbiology, Obolensk, Moscow Region;
* Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino

Conformational properties of the Fc- and pFc'-fragments of human myeloma immunoglobulins G of the first and third subclasses were studied by ¹H-NMR method (270 and 400 MHz). It was found that the globular structures (domains) of the Fc-fragments of IgG1 and IgG3 in solution are characterized by high segmental mobility, and have no significant differences in their spatial arrangement. Comparative analysis of the spectra obtained at different temperatures (30–70°C) revealed that the Fc-fragment of IgG3 has a more heat-stable conformation than the Fc of IgG1. The intramolecular mobility of the Fc-fragment increased upon lowering the pH. The partial assignment of the signals in the NMR spectra of the Fc-fragments of immunoglobulins G1 and G3 was carried out, and the pK_a values for histidines of the pFc'-fragment of IgG1 were determined.