



УДК 578.088

ВЛИЯНИЕ ОСТАТКА Pro290 В ИММУНОГЛОБУЛИНЕ G1 НА СТРУКТУРНЫЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЕГО C_H2-ДОМЕНА

© 1998 г. В. М. Тищенко*

Институт иммунологии, 142380, Московская область, Чеховский район, пос. Любучаны

Поступило в редакцию 17.12.97 г. Принято к печати 12.02.98 г.

Триптический гидролиз только одного из 11 исследованных Fc-фрагментов миеломных иммуноглобулинов человека первого подкласса (IgG1) осуществляется с высоким выходом интактных C_H2-доменов (до 40% против стандартных 2-3%). Показано, что первичная структура C_H2-доменов этого белка имеет лишь одно отличие – остаток лизина-290 замещен на пролин. Эта замена приводит к снижению способности Fc-фрагмента IgG1 Sem взаимодействовать с белками системы комплемента.

Ключевые слова: иммуноглобулины; C_H2-домены, протеолиз ограниченный, система комплемента.

Ранее было показано, что после инкубации IgG кролика при pH 2.8 в течение 60 мин и последующего повышения pH до 7.0 белок находится в состоянии, при котором с помощью плазмина можно провести селективный гидролиз пептидной связи в участке полипептидной цепи между C_H2- и C_H3-доменами [1]. В результате этого из интактной молекулы IgG образуются F_{ab}-фрагмент и Fc-фрагмент (димер C_H3-доменов), и данный результат является стандартным для IgG кролика. В литературе описан лишь один случай, когда подобная процедура с IgG1 человека привела к селективному гидролизу пептидной связи между C_H2- и C_H3-доменами с высоким выходом C_H2-доменов [2]. Отмеченная для иммуноглобулинов G1 человека неизбирательность гидролиза связана с низкой резистентностью их C_H2-доменов к действию протеиназ [3], что обусловлено небольшой энергией стабилизации его нативной структуры [4].

Известно, что ограниченный протеолиз приводит к образованию C_H2-доменов из Fc-фрагмента IgG1, если последний предварительно подвергается обработке кислотой. При подобной процедуре Fc-фрагмент переходит в метастабильное состояние, которое характеризуется резким ослаблением взаимодействий между C_H2- и C_H3-доменами, а также увеличением их взаимной подвижности [5, 6].

С целью получения обоих доменов с помощью ограниченного протеолиза трипсином нами было исследовано 11 миеломных IgG1 человека. Лишь

в случае Fc-фрагмента, полученного из миеломного IgG1 Sem, удалось с помощью подобного подхода выделить C_H2-домены с высоким выходом (порядка 40% от расчетного, тогда как для других белков выход не превышал 2-3%). Интересно выяснить особенности структуры отдельных IgG1 человека (в данном случае IgG1 Sem), которые позволяют получить с помощью ограниченного протеолиза интактные C_H2-домены с высоким выходом.

К числу таких причин могут относиться либо особенности в аминокислотных последовательностях Fc-фрагментов, либо различия в структуре их углеводных компонентов. Как известно, в C_H2-доменах имеется уникальный сайт специфического гликозилирования – Asp297 [7].

Характерной особенностью углеводных компонентов является их четко выраженная гетерогенность [8]. Поскольку между белковой матрицей и углеводным фрагментом имеются многочисленные контакты [9] и наблюдается модулирующее влияние последнего на ряд биологических свойств IgG и Fc-фрагмента [10-12], нельзя исключить, что различия в структуре углевода приводят к различной резистентности C_H2-доменов к действию протеиназ. Однако нами ранее было показано, что C_H2-домены разных миеломных иммуноглобулинов человека, принадлежащих к одному подклассу и имеющих различающиеся в силу гетерогенности углеводные компоненты, как правило, не различаются по стабильности [13-15]. Объяснение заключается в том, что основная масса контактов между белковой матрицей и углеводным компонентом обеспечивается консервативной частью последнего [9].

* 142292, г. Пушкино Московской обл., Институт белка РАН; тел.: 924-04-93, e-mail: tischen@sun.ipr.serpukhov.su.

Анализ аминокислотного состава пептида Thr256–Arg292 из IgG1 Sem и пяти других иммуноглобулинов

Аминокислотный остаток	IgG1 Sem		IgG1 Kom	IgG1 Б
	А	Б		
Lys	2	1.8	3	2.9
Pro	4	3.5	3	3.1
Asn + Asp	5	5.3	5	5.1
Glu + Gln	4	4.3	4	4.1
Met(O ₂)	0	<0.1	0	<0.1
Cys(SO ₃ H)	1	0.8	1	0.9
Ala	1	1.1	1	1.0
Arg	1	1.2	1	1.1
Val	9	9.5	9	9.2
Gly	1	1.3	1	1.1
Ile	0	<0.1	0	<0.1
Leu	0	<0.1	0	<0.1
Thr	3	2.8	3	3.1
Ser	1	0.8	1	0.9
His	2	1.7	2	1.9
Trp	1	0.7	1	0.8
Tyr	1	1.3	1	1.1
Phe	1	1.4	1	1.1

Примечания. А – определено по аминокислотной последовательности пептидов из IgG1 Sem и IgG1 Kom на секвенаторе Beckman 890 С, Б – на аминокислотном анализаторе Durrum D-500. Результаты анализа нормированы на 37 остатков. Представлены средние результаты трех измерений для Fc Sem и средние результаты для Fc-фрагментов пяти других анализируемых IgG1 человека.

У всех исследованных в данной работе IgG1 стабильность C_H2-доменов совпадала при pH 7.0. Значит, можно предположить, что по меньшей мере консервативная часть углеводного компонента у IgG1 Sem является стандартной. Поэтому мы провели сравнительный анализ аминокислотной последовательности и аминокислотного состава C_H2-домена IgG1 Sem и пяти других миеломных IgG1. С этой целью из всех образцов при 4°C [16] были получены C_H2-домены, каждый из которых образован фрагментом полипептидной цепи Thr223–Lys338. Затем после предварительной обработки цитраконовым ангидридом [17] они расщеплялись трипсином и продукты гидролиза разделялись хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой. Показано, что исходный фрагмент Thr223–Lys338 и пептид Thr256–Arg292 из IgG1 Sem имели больший отрицательный заряд при нейтральных pH, чем соответствующие фрагменты из других IgG1. Это вызвано заменой одного из остатков лизина на пролин, что предполагает-

ся на основании следующих экспериментальных данных:

1) согласно анализу аминокислотного состава фрагментов по методике [18], во фрагменте Thr256–Arg292 из IgG1 Sem имеется лишь два остатка лизина (в остальных образцах три), но, вероятно, больше, чем в остальных образцах, остатков пролина (таблица);

2) анализ С-концевой последовательности этого пептида, выполненный с помощью карбокси-пептидазы С по методике [19], показал в сравнении с литературными данными [2, 9], что в числе трех С-концевых аминокислотных остатков пептида из IgG1 Sem имеются аргинин и пролин, но отсутствует лизин;

3) наконец, определение аминокислотной последовательности на секвенаторе по методике [20] свидетельствует о том, что структуры пептидов Thr256–Arg292 из IgG1 Sem и IgG1 Kom идентичны, за исключением позиции 290, в которой остаток лизина замещен у IgG1 Sem на остаток пролина, в результате чего в его фрагменте возникает тандем из двух пролиновых остатков (ср. [2, 9]).

Как известно, наличие пролиновых остатков делает третичную структуру белка более жесткой, что, видимо, и предопределяет более высокую резистентность C_H2-домена IgG1 Sem по отношению к действию трипсина и ряда других протеолитических ферментов. Наиболее примечательно то обстоятельство, что такое увеличение жесткости структуры домена приводит к падению способности Fc-фрагмента IgG1 Sem участвовать во взаимодействиях с белками, которые активируют систему комплемента по классическому пути [21]. Концентрация Fc-фрагментов, приводящая к 50% ингибированию активности фактора системы комплемента C1 человека и кролика, определенная нами по методике [21], равна для IgG1 Sem 4.5 и 8.9 мкМ, а для IgG1 Kom – 2.0 и 3.2 мкМ соответственно.

Наличие пролинового тандема в области 290-го аминокислотного остатка у других иммуноглобулинов также коррелирует либо с уменьшением их способности активировать систему комплемента (у IgG кролика [22]), либо с полным отсутствием такой способности (у IgA1 и IgA2 [3]).

Автор выражает благодарность П. Нэшу (Бирмингемский университет, Медицинская школа, Великобритания) за помощь в проведении аминокислотного анализа и определении первичной последовательности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Connel G.E., Porter R.R. // *Biochem. J.* 1971. V. 124. P. 53P.
2. Ellerson J.R., Yasmeen D., Painter R.H., Dorrington K.J. // *J. Immunol.* 1976. V. 116. P. 510–517.
3. Calvanico N.J., Tomasi T.B. // *Immunochemistry of Protein*. V. 3 / Ed. M.Z. Atassi. New York; London: Plenum Press, 1977. P. 5–84.
4. Tishchenko V.M., Zav'yalov V.P., Medgyesi G.A., Potekhin S.A., Privalov P.L. // *Eur. J. Biochem.* 1982. V. 126. P. 517–522.
5. Tishchenko V., Lund J., Goodall M., Jeffeis R. // *The First International Conference on the Applications of Biocalorimetry*. Oxford, UK, 1996. P. R-04.
6. Tishchenko V. // *Glycoconjugate J.* 1996. V. 13. P. 881–882.
7. Beale D., Feinstein A. // *Quart. Rev. Biophys.* 1976. V. 9. P. 135–180.
8. Jefferis R., Lund J., Mizutani H., Nakagawa H., Kawazoe Y., Arata Y., Takahashi N. // *Biochem. J.* 1990. V. 268. P. 529–537.
9. Padlan E.A. // *Mol. Immunol.* 1994. V.31. P. 169–217.
10. Duncan A.R., Winter G. // *Nature*. 1988. V. 332. P. 738–740.
11. Walker M.R., Lund J., Thompson K.M., Jefferis R. // *Biochem. J.* 1989. V. 259. P. 347–353.
12. Malhotra R., Wormald M.R., Rudd P.M., Fischer P.B., Dwek R.A., Sim R.B. // *Nature Med.* 1995. V. 1. P. 237–243.
13. Денесюк А.И., Тищенко В.М., Абрамов В.М., Завьялов В.П. // *Молекуляр. биология*. 1983. V. 17. P. 1262–1271.
14. Ryazantsev S., Tishchenko V., Vasiliev V., Zavyalov V., Abramov V. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 190. P. 393–399.
15. Zav'yalov V.P., Tishchenko V.M. // *Scand. J. Immunol.* 1991. V. 133. P. 755–762.
16. Тищенко В.М., Суровцев В.П. // *Биохимия*. 1989. V. 54. P. 1607–1610.
17. Gibbons I., Perham R.N. // *Biochem. J.* 1970. V. 116. P. 843–849.
18. Michaelsen T.E., Natvig J.B. // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 2778–2785.
19. Zuber H. // *Methods Enzym.* 1976. V.45. P.561–568.
20. Hartley B.S. // *Biochem. J.* 1970. V. 119. P. 805–812.
21. Isenman D.E., Dorrington K.J., Painter R.H. // *J. Immunol.* 1975. V. 114. P. 1726–1729.
22. Dangl J.L., Wensel T.G., Morrison S.L., Stryer L., Herzenberg L.A., Oi V.T. // *EMBO J.* 1988. V. 7. P. 1989–1994.

Effect of Pro290 on Structural and Functional Properties of the C_{H2} Domain of Immunoglobulin G1

V. M. Tishchenko*

Institute of Immunology, pos. Lyubuchany, Chekhov region, Moscow oblast, 142380 Russia

Tryptic hydrolysis of only one of 11 studied Fc fragments of human myeloma immunoglobulins G1 (IgG1) provided an intact C_{H2} domain in a high yield (up to 40% as opposed to 2–3% for other IgG1s). The only structural difference of this domain was shown to be the substitution of Pro for Lys290. This decreased the capacity of the IgG1 Sem Fc fragment to interact with proteins of the complement system.

Key words: immunoglobulins, C_{H2} domains, limited proteolysis, complement system

* *Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia; phone: 924-0439; e-mail: tischen@sun.ipr.serpukhov.su.*