



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.27 : 577.322 : 543.422.25

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G И ИХ ФРАГМЕНТОВ МЕТОДОМ ^1H -ЯМР*Христофоров В. С., Кутышенко В. П.*, Завьялов В. П.**Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной микробиологии,
Оболенск Московской обл.;***Институт биологической физики Академии наук СССР,
Пушино Московской обл.*

Представлен обзор результатов исследований структурно-функциональных свойств иммуноглобулинов G и их протеолитических фрагментов с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии. Обсуждается взаимосвязь между структурными и динамическими характеристиками иммуноглобулинов G и их функциональными свойствами.

Содержание

Введение

1. Структура иммуноглобулинов G.
2. Исследование конформационных свойств белков Бенс-Джонса и Fab-фрагментов.
3. Конформационные и динамические свойства Fc- и rFc'-фрагментов иммуноглобулинов G.
4. Конформация «шарнирного» участка иммуноглобулинов G по данным ^1H -ЯМР.

Заключение.

Введение

Антитела — это белки, синтезируемые и секретируемые В-лимфоцитами в результате взаимодействия микроорганизма с несвойственными ему в период препатального развития веществами — антигенами. Антигены могут поступать как извне, так и возникать при изменении собственных макромолекул и клеток вследствие мутационных, метаболических и других повреждений. Антитела относятся к особому классу гликопротеинов, называемых иммуноглобулинами, которые играют центральную роль в процессе иммунного ответа. Иммуноглобулины являются мультидоменными и полифункциональными белками. Их функции заключаются в специфическом связывании антигенов в антигенсвязывающих центрах и индукции молекулярных и клеточных реакций, направленных на уничтожение антигена: активация системы комплемента, вызывающей лизис клеточных антигенов; стимуляция специализированных иммунокомпетентных клеток, приводящая к фагоцитозу антигенов; выделение фармакологически активных веществ — активаторов процессов воспаления так называемыми тучными клетками и т. д. [1–3].

Вопрос взаимосвязи структуры и функции иммуноглобулинов привлекает интерес многих исследователей, использующих широкий арсенал физико-химических методов [4–6]. К настоящему времени методом рентгеноструктурного анализа (РСА) установлена структура иммуноглобулинов, позволяющая детально проследить упаковку полипептидных цепей в домены и пространственное расположение доменов [7–13]. В результате получена структурная основа для понимания специфичности и гибкости молекул антител. Тем не менее остается необходимость дальнейшего изучения особенностей структуры и молекулярной динамики иммуноглобулинов в растворе. Сегодня уже не вызывает сомнений, что для выяснения

механизмов функционирования белков недостаточно знать их статическую структуру, определяемую методом РСА, а необходимо учитывать многообразие движений атомов, т. е. динамику белковой структуры [14–16]. В частности, для иммуноглобулинов это имеет особое значение [3, 6, 17–19]. Так, для реализации иммуноглобулинами класса G (IgG) их биологических функций, таких, как преципитация и агглютинация антигенов, фиксация и активация факторов системы комплемента, существенное значение имеет гибкость связей между отдельными частями макромолекулы и возможность изменения ее конформации при взаимодействии с лигандами и реценторами. Однако объем информации о структурных основах эффекторных функций иммуноглобулинов очень ограничен [1, 2, 6].

Имуноглобулины G человека подразделяют на четыре подкласса (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), которые различаются по своим биологическим свойствам (эффекторным функциям) [1, 2, 20, 21]. Они представляют удобный объект исследований благодаря возможности сопоставления биологических свойств и первичной структуры с конформационными и динамическими характеристиками.

Одним из наиболее информативных методов исследования пространственной структуры белков в растворе стала спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Метод ЯМР способен дать уникальную информацию о пространственной организации и динамических особенностях структуры биополимеров при физиологических условиях [22–25]. Принципиально важный аспект ЯМР-исследований состоит в получении сведений о динамике пространственной структуры молекул на атомном уровне — конформационных перестройках, аллостерических переходах, подвижности отдельных группировок и фрагментов, процессах денатурации и ренатурации и т. п. Применение двумерной ЯМР-спектроскопии еще более увеличивает возможности и информативность метода в структурных исследованиях биологических макромолекул [24, 26–28].

ЯМР-спектроскопия на изотопах с магнитно-активными ядрами ^1H , ^{31}P , ^{19}F , ^{15}N была применена для исследования взаимодействия различных гаптоенов с мышечными миеломными белками класса A и их фрагментами, а также для установления структуры активного центра данных иммуноглобулинов [29–40]. Новые возможности в этом направлении представлены в работах Мак-Коннела и сотр. [41–43], в которых структура активного центра мышечных моноклональных антител к спин-меченому производному динитробензола изучалась с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии. В этих работах исследовались Fab-фрагменты моноклональных антител, продуцируемых гибридомой, культивированной на средах, содержащих дейтерированные и селективно-дейтерированные аминокислоты. Авторы полагают, что используя ^1H -ЯМР-исследования рекомбинантных и нормальных Fab-фрагментов, можно установить структуру активного центра, если известна полная аминокислотная последовательность моноклонального антитела.

Исследованию конформационных и динамических свойств иммуноглобулинов G человека и их фрагментов методом ЯМР посвящено небольшое число работ [44–51]. В настоящем обзоре обобщены и проанализированы результаты работ по изучению белков Бенс-Джонса, подклассов иммуноглобулинов G методом ^1H -ЯМР, в частности рассмотрены основные направления исследований, проведено сравнение данных, полученных с помощью ^1H -ЯМР и РСА, а также показано значение этих работ для молекулярной иммунологии. Особое внимание уделено вопросам структурной организации эффекторных участков IgG.

1. Структура иммуноглобулинов G

Имуноглобулины G представляют собой Y- или T-образные молекулы, состоящие из двух пар идентичных полипептидных цепей: легких (L) и тяжелых (H) с молекулярной массой 22–25 и 50–60 кДа соответственно. С помощью межцепочечных дисульфидных связей и нековалентных

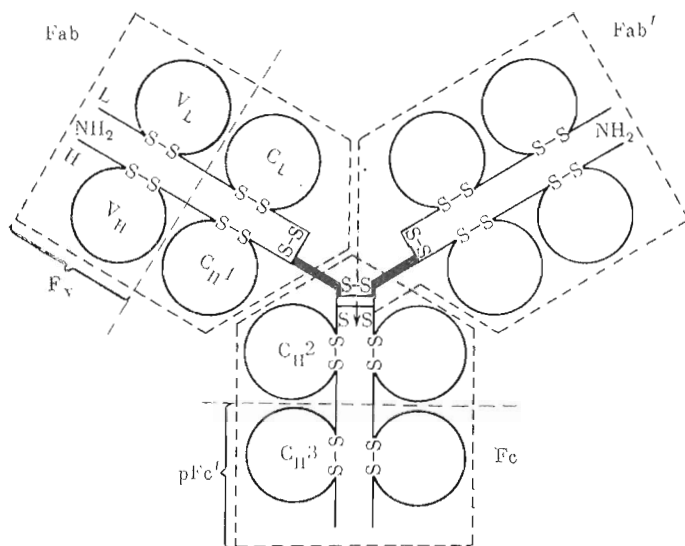


Рис. 1. Схематическое изображение молекулы IgG1 человека. L-Цепи разделены на две гомологичные области: V_L (варибельная) и C_L (константная). Утолщенные линии H-цепей соответствуют «шарпирному» участку. Показаны четыре гомологичные области H-цепей (V_H , C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}), внутри- и межцепочечные дисульфидные связи, N-концевые участки обеих цепей и основные фрагменты (Fab, Fab', Fc, pFc' и F_V) [7]

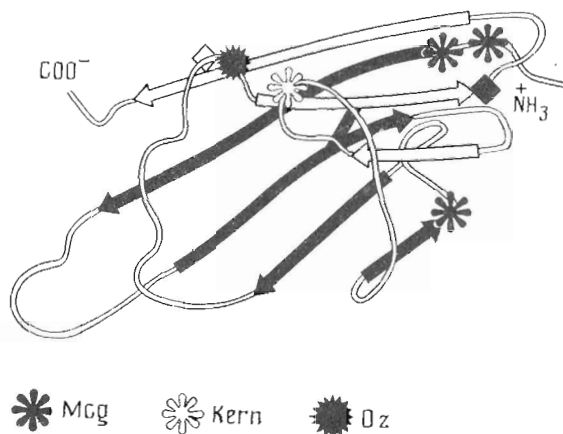


Рис. 2. Укладка полипептидной цепи C_L -домена белка Бенс-Джонса Mcg (λ) на основании данных РСА [59]. Четыре черных и три светлых линейных сегмента образуют два слоя антипараллельной β -структуры. Оба слоя соединены внутрицепочечной дисульфидной связью (зачерненный прямоугольник). Узкая светлая лента обозначает участки цепи, соединяющие линейные сегменты и образующие изгибы и другие структуры. Светлым и черным ромбами показано расположение His^{189} и His^{198} соответственно. Указано расположение изотипических маркеров: Mcg, Kern, Oz [51].

взаимодействий четыре цепи объединяются в единую пространственную структуру [52], состоящую из глобулярных доменов с молекулярной массой ~ 12 кДа. L-Цепочка состоит из двух доменов: N-концевого (варибельного) — V_L и C-концевого (константного) — C_L , содержащих по 110–115 аминокислотных остатков каждый. H-Цепь образована четырьмя доменами: V_H , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} (рис. 1).

Анализ аминокислотной последовательности показал, что N-концевые домены легкой и тяжелой цепи (V_L , V_H) имеют различную первичную структуру для разных иммуноглобулинов. Поэтому эти домены получили название варибельных [53, 54]. Варибельны только определенные участки N-концевых доменов, названные гиперварибельными. В легкой

цепи таких участков три, в тяжелой — четыре. Гипервариабельные участки непосредственно формируют антигенсвязывающий центр.

Структура остальных доменов постоянна, за исключением небольших отличий, обусловленных существованием аллельных генов (аллотипические вариации) [55], в связи с этим они названы константными. Структура H-цепи человеческих иммуноглобулинов G определяет их принадлежность к одному из четырех подклассов, различающихся в C-области последовательностью аминокислот (изотипические вариации). Кроме того, среди L-цепей молекул иммуноглобулинов G человека серологически различаются два типа, обозначаемых κ и λ , для каждого из которых характерна уникальная последовательность аминокислот в C-концевой области цепи.

Особенности строения различных участков молекулы иммуноглобулина, равно как и иммуноглобулинов разных классов (подклассов), находят отражение в их антигенных свойствах. В иммуноглобулинах G человека имеются четыре варианта λ -цепей, различающихся определенными антигенными детерминантами [2, 3, 56]. В константных доменах λ -цепей различия были найдены в пяти позициях: 113 (Ala/Asn), 115 (Ser/Thr), 153 (Ser/Gly), 164 (Thr/Lys) и 190 (Arg/Lys) (нумерация аминокислотных остатков приводится согласно работе [57]). Специфичность антигенных маркеров — детерминант Mcg, Kern, Oz* определяется заменами в следующих положениях аминокислотной последовательности λ -цепей: Mcg(+) — Asn¹¹³, Thr¹¹⁵, Lys¹⁶⁴; Kern(+) — Gly¹⁵³; Oz(+) — Lys¹⁹⁰. Указанные варианты известны как изотипические маркеры, которые существуют совместно с Mcg(—), Kern(—), Oz(—) λ -цепей у всех нормальных индивидуумов [2, 3, 58]. Рентгеноструктурные исследования показали, что упомянутые аминокислотные остатки расположены на поверхности молекул и доступны для растворителя [3, 7, 8] (рис. 2).

Как показал Портер [52], молекулы IgG можно расщепить папаином на три больших фрагмента с $M_r \sim 50\,000$, разделяемых с помощью ионообменной хроматографии. Два из этих фрагментов идентичны друг другу и сохраняют способность связывать по одной молекуле антигена. Они обозначаются как Fab (Fragment antigen-binding — антигенсвязывающий фрагмент). Третий фрагмент благодаря своему свойству легко кристаллизоваться из дистиллированной воды или нейтральных буферных растворов низкой ионной силы получил название Fc (Fragment crystalline — фрагмент кристаллический). Fab-фрагмент образован легкой цепью и аминокислотной половиной тяжелой цепи (рис. 1). Константные домены C-концевых половин двух тяжелых цепей молекулы иммуноглобулина G, взаимодействуя, образуют Fc-субъединицу, которая участвует в эффекторных функциях, таких, как активация системы комплемента, взаимодействие с Fc-рецепторами различных клеток и т. п. [1—3, 6, 20, 21, 60, 61]. В нативной молекуле иммуноглобулина G обе Fab-области связаны с Fc-фрагментом сравнительно короткими отрезками H-цепей, доступными для действия протеолитических ферментов; эти отрезки называются шарнирными (hinge) участками. Имеются экспериментальные данные, которые свидетельствуют о гибкости «шарпирной» области [6, 17, 19, 45, 48, 49, 51, 62, 63].

Ограниченный протеолиз IgG человека пепсином при pH 4,5 приводит к образованию двух фрагментов: F(ab')₂ с молекулярной массой 105 000 и pFc' с молекулярной массой 25 000 [2, 3, 7]. В этом случае C_H2-домены разрушаются на способные к диализу пептиды. Фрагмент типа F(ab')₂ (рис. 1) представляет собой димер фрагментов, идентичных по строению Fab, объединенных дисульфидными связями в районе «шарпирной» области. F(ab')₂-фрагмент вследствие своей двухвалентности действует как полное антитело и обладает способностью преципитировать или агглютинировать специфические антигены. При восстановлении и последующем алкилировании дисульфидных связей, соединяющих H-цепи, из F(ab')₂-фрагмента легко получить Fab'-фрагменты. Фрагмент pFc' образован двумя C-концевыми отрезками тяжелых цепей, каждый из которых равен

* Маркировка детерминант включает в себя первые буквы имен больных мышью, у которых впервые обнаружены данные антигены.

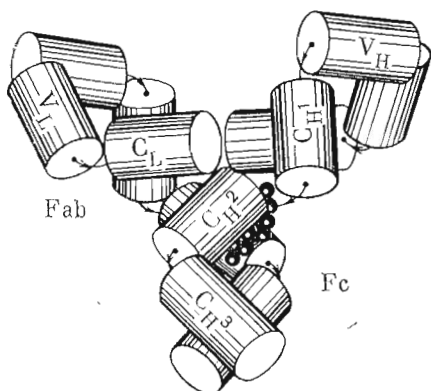


Рис. 3. Взаимное пространственное расположение доменов (цилиндры) L- и H-цепей IgG. Черными шариками обозначен углеводный компонент, присоединенный к C_{H2}-доменам H-цепей. Линии со стрелкой, соединяющие цилиндры, обозначают участки «switch» и «hinge» [51] (см. текст)

примерно четвертой части ее длины (C_{H3}-димер). Разработаны методы выделения C_{H2}-домена [2].

В результате протеолитического расщепления Fab-фрагментов некоторых моноклональных иммуноглобулинов удается получить F_v-фрагмент (тандем V_L- и V_H-доменов) (рис. 1).

Наиболее информативные данные в области изучения пространственной структуры иммуноглобулинов и их субъединиц получены в течение последних 15 лет с помощью рентгеноструктурного анализа [6, 7–13]. Впервые методом РСА с высоким разрешением исследован белок Бенс-Джонса Mcg λ-типа [64–66]. Это объясняется тем, что белки Бенс-Джонса можно просто и в больших количествах выделить из мочи mielomных больных. Они представляют собой гомогенные легкие цепи иммуноглобулинов, образующие в большинстве случаев димеры (рис. 1). Затем были получены данные для димеров V_H-частей белков Бенс-Джонса (Rei, Au, Roy) [67–70] и для Fab-фрагментов иммуноглобулинов: Fab McPC603 [71, 72], Fab New [73–75], Fab Kol [76, 77], Fab J539 [78, 79]. В результате показаны общие закономерности пространственной организации всех иммуноглобулинов. Несколько необычную пространственную структуру по сравнению с другими фрагментами иммуноглобулинов имеют белки Бенс-Джонса λ-типа: Rhe, являющийся V_L-димером [80, 81], и Los, имеющий особенности в структуре антигенсвязывающего центра [82].

Результаты РСА молекул иммуноглобулинов и их фрагментов показали, что между доменами в пределах одной цепи существуют продольные, а между доменами прилегающих цепей — поперечные (латеральные) взаимодействия. Поперечные взаимодействия сопровождаются формированием модулей: V_L–V_H, C_L–C_{H1}, C_{H3}–C_{H3}. Исключение составляет пара C_{H2}-доменов, у которых имеется олигосахаридная цепочка, препятствующая контакту между ними (рис. 3). Между доменами находятся короткие, но достаточно гибкие отрезки полипептидных цепей (switch), допускающие различное взаиморасположение доменов в молекуле иммуноглобулина.

Во всех доменах пептидная цепь свернута с образованием двух слоев β-структуры, один из которых состоит из четырех линейных антипараллельных отрезков цепи, второй — из трех. Оба слоя связаны друг с другом межцепочечным дисульфидным мостиком. Пространство между β-слоями заполнено боковыми цепями гидрофобных аминокислотных остатков, в результате чего ядро домена становится недоступным для растворителя. Внешние поверхности доменов, имеющие несколько изогнутую форму, участвуют в междоменных контактах (рис. 2). В отличие от C-доменов V-домены имеют, как правило, добавочный участок цепи, образующий петли различной формы и величины.

Методом РСА удалось проанализировать пространственные структуры некоторых целых иммуноглобулинов G: Kol [77], Dob [83, 84], Zie [85], Mcg [86]. В случае IgG1 (λ) Kol удивителен тот факт, что не удалось выделить электронную плотность, соответствующую Fc-субъединице,

структура которой, по-видимому, обладает значительной подвижностью даже в кристалле. Подобная ситуация наблюдалась при исследовании иммуноглобулина Zie-IgG2 (κ) [85, 87]. При анализе структуры IgG1 (κ) Dob найдены положения и ориентация всех доменов. Показано, что вся молекула имеет C_2 -ось симметрии и что структуры Fab- и Fc-фрагментов в изолированном состоянии и интактном IgG идентичны.

До недавнего времени для РСА использовались комплексы фрагментов иммуноглобулинов с гаптенами, в которых лигандами служили низкомолекулярные соединения (γ -оксипроизводное витамина K_1 , фосфорилхоллин), а в качестве источника моноклональных иммуноглобулинов — клетки множественной миеломы человека и мышинной плазмоцитомы [7, 8, 10, 12]. В настоящее время в нескольких лабораториях ведутся кристаллографические исследования структур моноклональных антител с известной специфичностью, полученных с помощью гибридомной технологии [88—90]. В частности, в лаборатории Поляка с разрешением 0,6 нм изучен комплекс Fab-фрагмента моноклонального иммуноглобулина, полученного против лизоцима, с лизоцимом из куриного яйца [91]. Можно полагать, что такие структурные исследования естественных комплексов антиген — антитело приведут к более полному пониманию функций иммуноглобулинов.

Более подробные сведения о структуре и функциях иммуноглобулинов приведены в ряде обзоров и монографий [2—4, 6, 7, 11, 12, 56, 61, 83, 92—95].

2. Исследование конформационных свойств белков Бенс-Джонса и Fab-фрагментов

Большое сходство третичной и четвертичной структуры Fab-фрагментов иммуноглобулинов и некоторых белков Бенс-Джонса, а также их высокое сродство к динитрофенильным гаптенам позволяют использовать эти белки в качестве модели для изучения структуры и функции антител [7, 65, 96].

В работах Араты и соавт. [44, 97] для идентификации изотипических маркеров M κ g, K κ n и O κ z в белках Бенс-Джонса (см. раздел 1) и исследования их конформации в растворе с успехом был применен метод ^1H -ЯМР. Отметим, что серологический метод не всегда дает однозначный результат при определении антигенных детерминант иммуноглобулинов [98].

Одним из важных моментов ЯМР-исследования конформации белка является выделение сигналов в спектрах ЯМР и их отнесение к определенным протонам и группам протонов в молекуле. Анализ первичной структуры легких цепей иммуноглобулинов G человека [99] показывает, что в основном они имеют два гистидина в положениях 189 и 198, принадлежащих C_L -домену. На рис. 4 представлена ароматическая область ^1H -ЯМР-спектра белка Бенс-Джонса Rib κ -типа [51]. В низкочастотной части спектра (7,2—8,5 м.д.) можно выделить сигналы 1—4, которые принадлежат протонам гистидиновых остатков [100].

В работе [44] на основании изучения рН-зависимости химических сдвигов сигналов 1 и 2, скоростей протон-дейтериевого обмена, ширины линии в спектрах ^1H -ЯМР белков Бенс-Джонса было проведено отнесение указанных сигналов к протонам C2-H His 189 и His 198 соответственно (рис. 4). Сделано заключение, что эти два гистидина имеют различное пространственное окружение, а именно: His 189 доступен действию растворителя, в то время как His 198 недоступен для растворителя. Это согласуется с данными РСА. Согласно кристаллографическим данным для белка Бенс-Джонса M κ g λ -типа [66], His 189 находится в петле, соединяющей два антипараллельных слоя β -структуры, и экспонирован в растворитель, тогда как His 198 ориентирован внутрь молекулы (рис. 2). Сигналы 3 и 4 в спектре ^1H -ЯМР белка Бенс-Джонса (рис. 4) на основании данных работы [44] можно отнести к протонам C4-H His 198 и His 189 соответственно.

В результате исследования рН-зависимости химических сдвигов сигналов His 189 и His 198 , анализа их спектральных характеристик в 15 белках

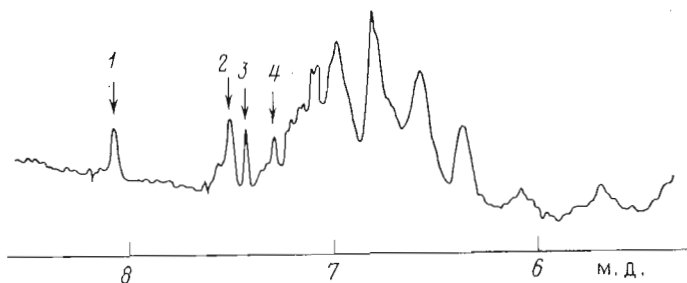


Рис. 4. Ароматическая область ^1H -ЯМР-спектра (270 МГц) белка Бенс-Джонса Rib(κ) [51]. Разрешение в спектре улучшено по методу [101]. Отмечены сигналы от протонов C2-H и C4-H His 189 (1, 4) и His 198 (2, 3). 5 мМ фосфатный буфер, содержащий 0,15 М NaCl; pH 7,50; 36° С

Бенс-Джонса λ -типа и 3 κ -типа было показано, что λ - и κ -типы белков Бенс-Джонса в основном сходны по пространственной организации константных доменов в растворе, но C_L -домен белков κ -типа имеет более компактную структуру [44]. Как известно, у всех индивидуумов присутствуют оба типа легких цепей, однако их соотношение изменяется в зависимости от вида животного, класса и подкласса иммуноглобулинов [3, 56]. На основании различия в химических сдвигах сигналов His 189 при pH 7,0–8,0 для κ - и λ -типов легких цепей было предложено определять количественно отношение κ/λ для нормального иммуноглобулина G человека по отношению интенсивностей соответствующих сигналов в спектре ^1H -ЯМР.

Логическим продолжением работы [44] явилось исследование [97], в котором представлены данные по изучению pH-зависимости сигналов от протонов His 189 и His 198 14 белков Бенс-Джонса λ -типа и 8 C_L -доменов, полученных из этих белков с помощью ограниченного протеолиза папаином. Измерения проводились при 29° С в интервале pH 2,5–9,5. Изотипические маркеры белков были известны или определялись в данной работе. Данные ^1H -ЯМР сравнивались с результатами РСА Fab-фрагмента миеломного иммуноглобулина человека IgG1 (λ) New [73] и белка Бенс-Джонса Mcg [66]. Было показано, что величина химического сдвига сигнала протона C2-H His 198 при pH 4–5 в спектре ^1H -ЯМР белков Бенс-Джонса может быть использована для идентификации Mcg-изотипа. Было также установлено, что химические сдвиги сигналов протонов C4-H His 189 и His 198 могут служить индикаторами для обнаружения аминокислотных замен в положениях 153 и 190 L-цепи, которые являются соответственно изотипическими маркерами Kern и Oz. Установлено, что сигналы протонов C2-H His 189 и His 198 для шести белков Бенс-Джонса имеют сходную с сигналами соответствующих C_L -доменов pH-зависимость химических сдвигов. Это свидетельствует о том, что C_L -домены сохраняют свою основную пространственную структуру, свойственную им в составе интактных λ -цепей. Аналогичные данные были получены при использовании других физико-химических методов [4].

Из сравнения данных ЯМР и РСА авторы работ [44, 97] делают вывод о сходстве пространственной организации константного домена λ -цепи в кристалле и растворе. Предполагается, что Kern-маркер и по крайней мере один из Mcg-маркеров пространственно расположены вблизи от His 189 и His 198 соответственно (рис. 2).

Методами ^1H -ЯМР и КД было также установлено [102], что восстановление внутречной дисульфидной связи в C_L -домене (см. рис. 2) не приводит к изменению конформации белка, в то время как последующее алкилирование сульфгидрильных групп ведет к разворачиванию полипептидной цепи. Обнаружено, что конформационная стабильность C_L -домена во много раз больше, чем белка с восстановленной и алкилированной S—S-группой.

В работе [45] показано, что при pH < 6 в спектрах ^1H -ЯМР миеломных иммуноглобулинов IgG1 (κ) и их протеолитических фрагментов Fab и

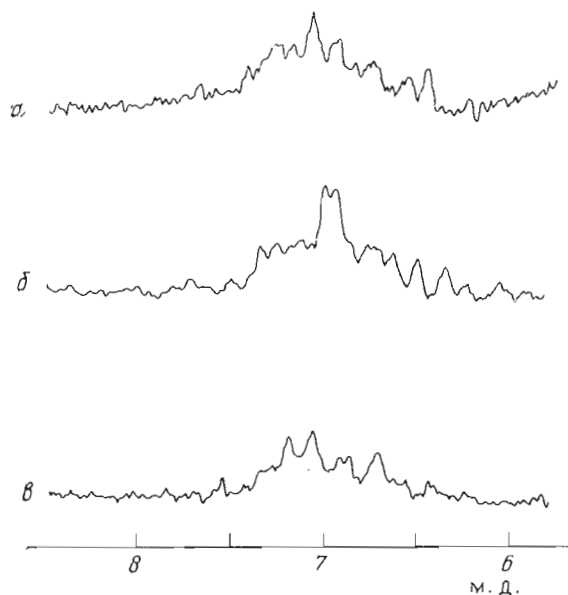


Рис. 5. Ароматическая область ^1H -ЯМР-спектра (270 МГц) Fab-фрагментов иммуноглобулинов G: Fab IgG1 (λ) Van (pH 7,47) (a), Fab IgG2 (λ) Ком (pH 8,28) (б) и Fab IgG3 (λ) Pla (pH 8,67) (в) [51]. Разрешение улучшено по методу [101]; 5 мМ фосфатный буфер, содержащий 0,15 М NaCl, 36° С

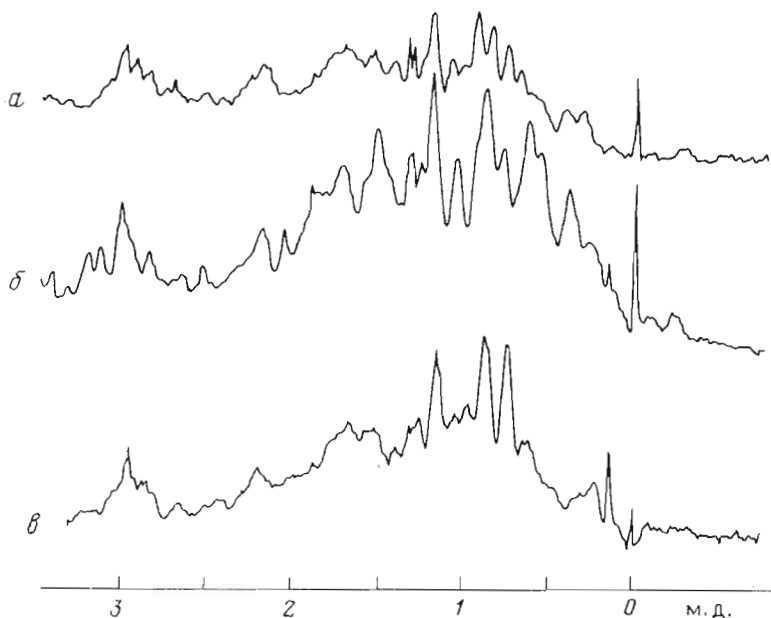


Рис. 6. Алифатическая область ^1H -ЯМР-спектра (270 МГц) Fab-фрагментов иммуноглобулинов G. Экспериментальные параметры и обозначения спектров идентичны приведенным в подписи к рис. 5

$\text{F}(\text{ab}')_2$ удается выделить и идентифицировать сигнал от протона C2-H His¹⁸⁹, принадлежащего C_L-домену. Указанный сигнал проявляет сходную pH-зависимость химического сдвига для интактных иммуноглобулинов IgG1 (λ) и их Fab- и $\text{F}(\text{ab}')_2$ -фрагментов, а также для белков Бенс-Джонса λ -типа [44], что свидетельствует о сходном пространственном микроокружении остатка His¹⁸⁹ в исследованных белках. Этот результат согласуется с рентгеноструктурными исследованиями, которые показывают, что имеется близкое сходство в конформации постоянных доменов легкой цепи в белке Бенс-Джонса и Fab-фрагменте [7, 8, 66].

Сравнительное исследование динамических и конформационных свойств Fab-фрагментов миеломных иммуноглобулинов G человека разных подклассов было проведено с использованием метода спинного эха [48] и ^1H -ЯМР (270 МГц) [51]. В работе [48] были выполнены измерения времен спин-спиновой релаксации T_2 протонов Fab-фрагментов IgG1, IgG2, IgG3 в диапазоне 10–40°С. Как известно, величина T_2 и эквивалентная ей естественная ширина линии в ЯМР-спектре молекулы являются параметрами, связанными с частотными характеристиками молекулярных движений [22, 23]. Из результатов работы [48] следует, что гибкость Fab-фрагментов проявляется в отдельных температурных интервалах. Изолированные Fab-фрагменты менее стабильны и имеют более высокий уровень внутренней подвижности, чем в целой молекуле иммуноглобулина.

На рис. 5 и 6 приведены спектры ^1H -ЯМР Fab-фрагментов миеломных IgG1 (κ) Van, IgG2 (λ) Kom и IgG3 (κ) Pla, полученные в работе [51]. Сравнительный анализ их спектральных ЯМР-параметров показывает, что Fab-фрагменты указанных белков различаются по своей конформации в растворе. Это, по-видимому, может быть обусловлено различиями в аминокислотной последовательности переменных доменов (V_L , V_H) Fab-субъединиц. Заметим, что, согласно данным работы [48], гибкость Fab-фрагментов одинакова в тех условиях, при которых проводился эксперимент.

Дальнейшее выяснение вопроса о гибкости Fab-фрагментов и интактных молекул иммуноглобулинов требует дополнительных исследований. По моему мнению, в этом отношении может оказаться перспективным вариант метода ^1H -ЯМР, при котором изучается скорость распространения спиновой диффузии в белках. В работах Асаки [103] показано, что скорость распространения спиновой диффузии в белке зависит от подвижности его отдельных участков. Это позволяет выделить гибкие и жесткие участки в макромолекуле посредством анализа спектров ^1H -ЯМР, а также оценить их уровень подвижности.

3. Конформационные и динамические свойства Fc- и pFc'-фрагментов иммуноглобулинов G

Экспериментально показано, что центры, ответственные за большинство эффекторных функций, локализованы в Fc-субъединице [1–3, 6, 20, 21, 60]. Информация, имеющаяся в настоящее время о структуре эффекторных центров, ограничена и нередко противоречива [2, 6].

Пространственная структура Fc-фрагмента IgG1, полученного из сыворотки крови человека, была изучена методом РСА с разрешением 0,4 [104], 0,35 [105] и 0,29 нм [106]. Эти исследования показали, что C_{H2} - и C_{H3} -домены состоят из двух слоев антипараллельной β -структуры, которые окружают внутреннее гидрофобное ядро, т. е. имеют типичную для всех доменов иммуноглобулинов пространственную укладку полипептидной цепи. Димер C_{H3} -доменов имеет очень схожую конформацию с C_{H1} — C_L -комплексом Fab-фрагментов. Между C_{H2} -доменами прямой контакт отсутствует, так как между ними расположены олигосахаридные цепи, каждая из которых ковалентно связана с остатками Asn^{297} и состоит из девяти гексозных остатков. Площадь контакта между C_{H2} - и C_{H3} -доменами примерно втрое меньше, чем площадь C_{H3} — C_{H3} -контакта.

Для выяснения структурных основ различной эффекторной активности подклассов иммуноглобулинов G в работах [47, 50] методом ^1H -ЯМР были изучены конформационные и динамические свойства Fc- и pFc'-фрагментов миеломных IgG1 и IgG3 человека.

В литературе до 1980 г. для подклассов иммуноглобулинов G человека отмечали различную специфичность их взаимодействия с белком A из *Staphylococcus aureus*. Иммуноглобулины IgG1, IgG2, IgG4 связывали белок A, а для IgG3 указанное взаимодействие не обнаружили [1, 20, 21]. Как оказалось, это не совсем так (см. ниже), хотя некоторые авторы до сих пор при характеристике биологических свойств подклассов IgG приводят прежние данные [2, 3, 95].

и для Fc-фрагментов, поскольку аналогичные результаты были получены Двеком и соавт. [110] при исследовании ^1H -ЯМР Fc- и pFc'-фрагментов иммуноглобулинов G кролика. В ^1H -ЯМР-спектрах Fc- и pFc'-фрагментов IgG1, IgG3 было проведено отнесение протонов C2-H остатков His⁴²⁹, His⁴³³, His⁴³⁵ и определены их значения pK_a для pFc'-фрагмента IgG1 Van [50]. Отнесение сигналов протонов C2-H остатков His²⁶⁸, His²⁸⁵ и His³¹⁰ не проведено. Сравнительный анализ спектральных характеристик ЯМР для Fc- и pFc'-фрагментов IgG1, IgG3, идентичность кривых pH-зависимостей химических сдвигов сигналов протонов C2-H пяти гистидиновых остатков (кроме His⁴³⁵) для Fc-фрагментов IgG1, IgG3[G3m(st)], IgG3[G3m(g)] [47] свидетельствуют о том, что между Fc-субъединицами иммуноглобулинов G1 и G3 нет существенных различий в пространственной организации. Полученные с помощью ^1H -ЯМР результаты позволяют также говорить о сходстве пространственной структуры Fc-фрагмента IgG1 в кристаллическом состоянии [106] и в растворе. Для Fc-фрагмента IgG3 данных РСА не имеется.

Однако следует обратить внимание на некоторые особенности конформационных и динамических свойств Fc-фрагментов иммуноглобулинов человека IgG1 и IgG3. Fc-Фрагменты молекул IgG1 и IgG3, согласно данным ^1H -ЯМР [50], обладают одинаковой сегментной подвижностью. Это справедливо и для pFc'-фрагментов. В то же время по сравнению с Fab-фрагментами Fc-субъединицы имеют большую внутримолекулярную подвижность. Аналогичные выводы получены ранее методом ^1H -ЯМР для иммуноглобулинов G кролика [110] и с помощью метода поляризации флуоресценции [111] и спиновой метки [112] для иммуноглобулинов G человека.

Анализ ^1H -ЯМР-спектров (270 МГц) фрагментов, имеющих одинаковую молекулярную массу 25 кДа (pFc' IgG1 Van, IgG3 Pla [50], pFc' IgG кролика [110], V_L -димера [110] и F_V [113]), полученных из миеломного белка МОРС 315), свидетельствует о том, что указанные pFc'-фрагменты обладают большей сегментной подвижностью по сравнению с $(V_L)_2$ и F_V . Наличие сегментной гибкости в pFc'-фрагменте иммуноглобулина IgG1 человека показано также методом спиновой метки [114]. При смещении pH в кислую область внутримолекулярная подвижность Fc-фрагмента IgG1 возрастает, что ранее отмечалось и для Fc-фрагмента в составе интактной молекулы по данным ^1H -ЯМР [45, 49]. По всей видимости, гибкая структура Fc-фрагментов в противоположность более жесткой структуре Fab-фрагментов необходима для выполнения иммуноглобулинами разнообразных эффекторных функций.

Анализ ^1H -ЯМР-спектров, полученных при различных температурах в интервале 30–70° С, показал, что Fc-фрагмент IgG3 Pla характеризуется большей термостабильностью по сравнению с Fc-фрагментом IgG1 Vad [50]. Это согласуется с результатами, полученными методом температурно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии [115]. Указанное различие в термостабильности может быть связано с заменами в аминокислотной последовательности Fc-фрагмента IgG3 по отношению к аналогичному фрагменту IgG1 (таких замен 8 [99]), локализованных в основном на поверхностях C_H2- и C_H3-доменов [106]. Подтверждением такого объяснения могут служить результаты работы [116], в которой методами КД и сканирующей микрокалориметрии обнаружены различия в термостабильности N-концевого домена репрессора факта λ для 15 мутантов с единичной аминокислотной заменой.

4. Конформация «шарнирного» участка иммуноглобулинов G по данным ^1H -ЯМР

Уникальным свойством молекулы иммуноглобулинов G является высокая степень ее гибкости в «шарнирной» области [6, 17, 19, 63, 95]. Наличие «шарнирной» области обеспечивает несколько степеней свободы фрагментов молекулы иммуноглобулина G: изменение угла между Fab-фрагментами, вращение Fab-фрагментов, движение Fc-области относи-

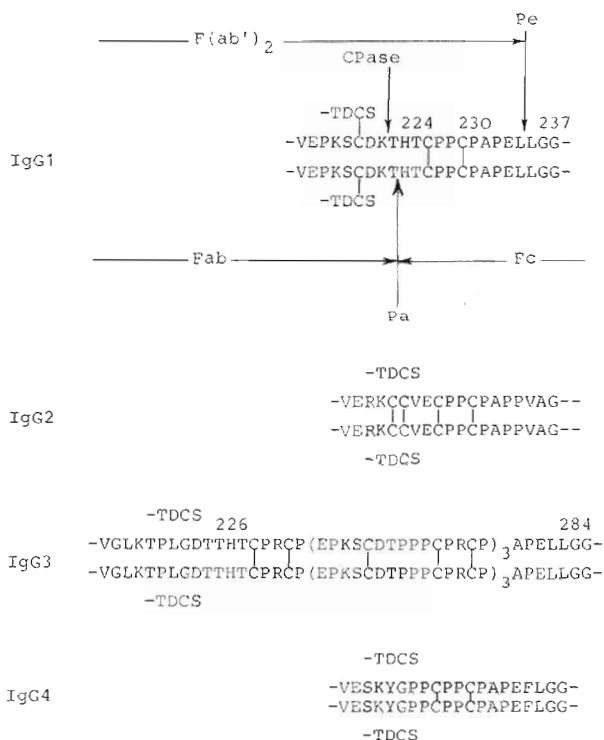


Рис. 7. Аминокислотная последовательность «шарнирной» области подклассов иммуноглобулинов G человека [51]. Аминокислотные остатки обозначены с помощью однобуквенного кода. Нумерация дана по работе [109]. Вертикальными стрелками показаны места расщепления тяжелой цепи IgG1 папаином (Pa), пепсином (Pe) и карбоксипептидазой А (CPase). Последовательность из четырех аминокислот соответствует С-концевому тетрапептиду легкой цепи

тельно Fab-субъединиц. Гибкость молекулы позволяет антителам легко «адаптироваться» к различному пространственному расположению антигенных детерминант.

Сопоставление первичных структур тяжелых цепей различных подклассов иммуноглобулинов G человека показывает, что в «шарнирной» области сосредоточены основные различия между ними. Если гомология аминокислотной последовательности константных доменов тяжелых цепей достигает 90–95%, то для «шарнирного» участка она составляет 60–70%. Длина «шарнирной» области варьирует от 14 до 64 аминокислотных остатков в зависимости от принадлежности к подклассу иммуноглобулинов и содержит от 2 до 11 дисульфидных связей [6, 19, 93, 99]. Центральная часть «шарнирной» области иммуноглобулина G состоит из двух параллельных связанных S–S-мостиком поли-L-пролиновых спиралей с аминокислотной последовательностью Cys-Pro-Pro-Cys [10] (рис. 7). Имеются данные, что «шарнирная» область не только придает иммуноглобулину G определенную степень гибкости, но и в значительной мере влияет на другие функциональные свойства молекулы [19, 117–120]. В ее структуре, кодируемой отдельным экзоном [121], запрограммированы, по-видимому, конформационные и функциональные особенности подклассов иммуноглобулинов G человека.

В работе [51] методом ¹H-ЯМР исследовалась конформация «шарнирного» участка миеломных иммуноглобулинов человека первого и третьего подклассов. Как известно [6, 99, 122], «шарнирный» участок IgG1 состоит из 17 аминокислотных остатков, а IgG3 имеет «шарнирную» область из 64 аминокислот (рис. 7). В IgG3 «шарнирный» участок состоит из трех повторяющихся фрагментов длиной по 15 аминокислотных остатков каждый, N-концевого сегмента из 12 остатков Leu²²¹ — Pro²³², гомологичного этим фрагментам, и С-терминала Ala²⁷⁸ — Cys²⁸⁴, полностью совпадающего с соответствующей последовательностью IgG1. Нумерация аминокислот-

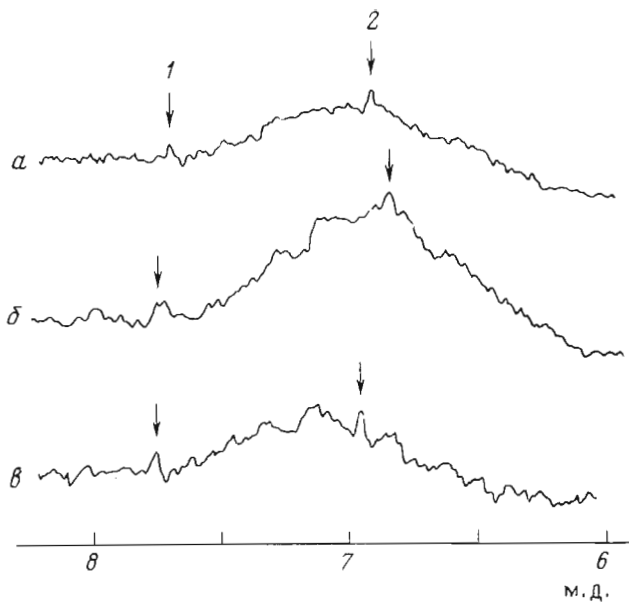


Рис. 8. Ароматическая область ^1H -ЯМР-спектра (270 МГц) иммуноглобулинов G: IgG1 (\times) Van (pH 7,70) (а), IgG3 (\times) Lap (pH 7,60) (б) и $\text{F}(\text{ab}')_2$ -фрагмента IgG3 Lap (pH 7,85) (в) [51]. 5 мМ фосфатный буфер, содержащий 0,15 М NaCl, 36°C . Разрешение в спектрах улучшено по методу [101]. Стрелками отмечено положение сигналов остатков His (см. текст)

ных остатков «шарнирной» области обычно приводится по IgG1 (\times) Eu [109]. Конформационные свойства «шарнирного» участка IgG1 человека изучали, используя сигналы от протонов His²²⁴ N-цепи в качестве «зондов-информаторов» в составе ^1H -ЯМР-спектра, а у IgG3 — от протонов His²²⁶, который присутствует только в N-концевом фрагменте «шарнирной» области (рис. 7).

На рис. 8 представлена ароматическая область ^1H -ЯМР-спектра IgG1 (\times) Van, IgG3 (\times) Pla и $\text{F}(\text{ab}')_2$ IgG3 Pla. На фоне широкой огибающей спектра видны два узких сигнала 1 и 2, которые можно отнести, используя данные работы [45], к протонам C2-H и C4-H соответственно остатков His²²⁴ (рис. 8а) и His²²⁶ (рис. 8б, в). Одинаковые химические сдвиги и ширины сигналов свидетельствуют об аналогичном пространственном окружении указанных остатков гистидина, а также о том, что в интактных IgG1 и IgG3 большая часть «шарнирного» участка полностью экспонирована в растворитель. При утрате иммуноглобулином G Fc-фрагмента конформация «шарнирного» участка в $\text{F}(\text{ab}')_2$ -субъединицах остается без изменений.

Отнесение сигналов в спектре ^1H -ЯМР IgG1 (\times) Ogo к протонам His²²⁴ было сделано в работе [45] при использовании различных протеолитических фрагментов: $\text{F}(\text{ab}')_2$, Fab и Fab, полученного с помощью карбоксипептидазы А (рис. 7). Указанные сигналы можно использовать в исследованиях конформационных и динамических характеристик IgG1 при воздействии внешних факторов, а также взаимодействия с различными лигандами.

Одна из важнейших эффекторных функций иммуноглобулинов — активация системы комплемента по классическому пути, где необходимым условием является прочное связывание с C1q-субкомпонентом первого компонента системы комплемента. Подклассы иммуноглобулинов G человека различаются по способности связывать C1q и активировать систему комплемента [1, 2, 6]. Эти различия нельзя объяснить только особенностями локальной структуры C1q-связывающего центра, расположенного в C_H2-доменах [3, 6, 11], так как гомология в этой части молекулы между подклассами иммуноглобулинов G достигает 92–95% [6, 99]. Кроме того,

показано, что Fc-фрагменты разных подклассов иммуноглобулинов G человека имеют близкие значения константы связывания с C1q [11, 20, 24]. Точное расположение участка связывания для C1q не установлено [6]. Отсутствие «шарнирной» области у иммуноглобулинов G влияет на их функциональные свойства [118]. Например, белки IgG1 (κ) Dob, IgG1 (κ) Lec [118] и IgG1 (λ) Mcg [86], у которых имеется делеция в тяжелой цепи, соответствующая «шарнирной» области (остатки 216–230), не обладают комплементсвязывающей способностью и некоторыми другими эффекторными функциями, присущими нормальным иммуноглобулинам.

В ряде работ было отмечено, что при восстановлении и алкилировании дисульфидных связей между H-цепями у молекул иммуноглобулинов G человека и кролика увеличивается гибкость белка. Относительно влияния такой химической модификации S–S-связей «шарнирной» области иммуноглобулинов G на взаимодействие с C1q имеются противоречивые данные. По одним данным восстановление и алкилирование дисульфидных связей между H-цепями приводит к снижению или потере комплементсвязывающей способности иммуноглобулинов G, по другим — это не влияет на связывание [6]. Здесь мы рассмотрим и обсудим значение «шарнирной» области, ее дисульфидных связей в функционировании молекулы иммуноглобулина G на основании данных ^1H -ЯМР-спектроскопии [49, 123].

Исследование методом ^1H -ЯМР Fc-фрагмента иммуноглобулина G кролика с восстановленной и алкилированной дисульфидной связью в положении Cys²²⁶ не выявило заметных различий в конформации по сравнению с интактной Fc-субъединицей [110]. В работе [49] было показано, что восстановление и алкилирование S–S-связей между H-цепями в положении Cys²²⁶ и Cys²²⁹ в IgG1 (κ) Ike-N и Fc-фрагментов также не приводит к изменениям в конформации белков по сравнению с интактными. Данные по pH-зависимостям химических сдвигов сигналов His²²⁴ IgG1 (κ) Ogo, F(ab')₂- и Fab'-фрагментов [45] свидетельствуют о том, что указанные S–S-связи не играют главной роли в поддержании конформации «шарнирной» области в интактной молекуле IgG1, так же как и в F(ab')₂-субъединицах.

Таким образом, из вышеприведенных данных следует, что восстановление и алкилирование дисульфидных связей, содержащихся в пределах «шарнирной» области, не приводит к существенным изменениям ее конформации, а также конформации IgG1 и Fc-фрагментов. Отметим, однако, что в этом случае комплементфиксирующая способность иммуноглобулина человека IgG1 значительно снижается, как показано нами в работе [124].

Возникает вопрос: какими причинами обусловлено это понижение? Данные по исследованию с помощью ^1H -ЯМР конформационных и динамических свойств «шарнирного» участка как в изолированном виде, так и в составе интактного иммуноглобулина IgG1 освещают этот вопрос. В работе [49] были использованы два типа миеломных белков: IgG1 (κ) Ike-N, обладающего интактным «шарнирным» участком, и IgG1 (κ) Dob, у которого имеется делеция в «шарнирной» области (см. выше). Для выделения и отнесения сигналов протонов в спектрах ^1H -ЯМР иммуноглобулинов к определенным аминокислотным остаткам «шарнирной» области было проведено изучение протеолитических фрагментов Fab, F(ab')₂, Fab', Fc иммуноглобулина IgG1 Ike-N, которые содержат разные по длине фрагменты «шарнирного» участка (рис. 7). В результате сравнения полученных спектров ^1H -ЯМР было сделано отнесение сигналов в них (спектральная область 0,5–4,5 м.д.) к химическим группам следующих аминокислотных остатков «шарнирного» участка IgG1 Ike-N: Lys²²², Thr²²³, His²²⁴, Thr²²⁵, Ala²³¹, Glu²³³, Leu²³⁴. В ^1H -ЯМР-спектре Fc-фрагмента IgG1 (κ) нами также выделены сигналы протонов некоторых из указанных остатков, свидетельствующие о высокой подвижности соответствующих им химических групп [50].

Эксперименты по наблюдению спиновой диффузии в иммуноглобулинах Ike-N и Dob показали, что белок IgG1 Dob обладает меньшей сегмент-

ной гибкостью по сравнению с IgG1 Ike-N [49]. В спектре $^1\text{H-NMR}$ IgG1 Ike-N были выделены сигналы от протонов C2-H остатков His¹⁸⁹ L-цепей, His²²⁴ «шарнирной» области и гистидиновых остатков шести Fc-фрагментов (см. разделы 2, 3). Проведено отнесение сигналов His¹²⁹, His¹³³ и His¹³⁵. В спектре $^1\text{H-NMR}$ IgG1 Dob также выделены сигналы C2-H остатков гистидина Fc-фрагмента, которые имели значительно большую ширину линии. Сравнение pH-зависимостей химических сдвигов сигналов остатков гистидина Fc-фрагментов IgG1 Ike-N и IgG1 Dob с соответствующими кривыми Fc-фрагмента IgG1 Yot [47] указывает на сходство их строения. Таким образом, делеция в «шарнирной» области мало влияет на пространственную организацию Fc-субъединицы, в частности на пространственную структуру области контакта C_H2- и C_H3-доменов. Последнее подтверждается сообщением [125] о связывании IgG1 Dob с белком *A. St. aureus*.

Необходимо отметить, что, согласно литературным данным, IgG3 человека обладает большей комплементфиксирующей способностью (IgG3 > IgG1 > IgG2) [1, 6, 11] по сравнению с другими подклассами иммуноглобулинов G. Fc-Фрагменты IgG1 и IgG3 (см. раздел 3 обзора) имеют сходную пространственную организацию и обладают одинаковой гибкостью. Таким образом, комплементсвязывающая способность иммуноглобулинов G не зависит от пространственного строения Fc-фрагментов.

Другие результаты работы [49] свидетельствуют: 1) сегменты «шарнирного» участка Lys²²² — Thr²²⁵ и Pro²³⁰ — Leu²³⁴, которые флапкируют дисульфидносвязанную часть Cys-Pro-Pro-Cys, обладают высокой степенью гибкости; 2) сегмент Pro²³⁰ — Leu²³⁴ имеет вытянутую конформацию и меньшую гибкость, чем сегмент Lys²²² — Thr²²⁵; 3) наличие сегмента Lys²²² — Thr²²⁵ имеет существенное значение для придания гибкости IgG1; 4) оба сегмента становятся сравнимыми по степени гибкости, если дисульфидные связи между тяжелыми цепями в части «шарнирного» участка Cys-Pro-Pro-Cys восстановлены и алкилированы.

Конформационные и динамические свойства фрагмента «шарнирной» области IgG1 (Thr²²³-His-Thr-Cys²²⁶-Pro-Pro-Cys²²⁹-Pro-Ala-Pro-Glu-Leu²³⁴)₂ (I), полученного с помощью расщепления трипсином F(ab')₂-субъединицы IgG1 (x) Ike-N, были исследованы методом $^1\text{H-NMR}$ в работе [123]. В результате показано, что сегменты «шарнирного» участка IgG1 обладают различным уровнем гибкости и различаются по конформации. Сравнение данных этой работы и ранее полученных результатов работ [45, 49] позволило авторам заключить следующее. При отщеплении Fab-субъединицы происходит значительное изменение в конформации сегмента, предшествующего Cys-Pro-Pro-Cys области «шарнирного» участка IgG1. Присутствие или отсутствие Fc-субъединицы мало влияет на конформацию этой части «шарнирного» участка. Спиральная структура центральной части «шарнирного» участка IgG1, установленная с помощью РСА [77], сохраняется в растворе и вносит основной вклад в придание гибкости молекуле иммуноглобулина. Сегмент Pro²³⁰ — Leu²³⁴ имеет линейную конформацию, и наличие дисульфидносвязанной части Cys-Pro-Pro-Cys существенно для поддержания его стабильности. Анализ вицинальных констант спин-спинового взаимодействия для α - и β -протонов Cys²²⁶ и Cys²²⁹ фрагмента (I) при различных значениях pH и температуры показал, что Cys²²⁹ обладает значительной степенью свободы для внутреннего движения вокруг HN—C α - и C β —S-связей в отличие от Cys²²⁶. Видимо, это движение и определяет размывание электронной плотности, соответствующей сегменту Pro²³⁰ — Leu²³⁴, в дифракционной картине при кристаллографических исследованиях.

Вышеприведенные данные позволяют предположить, что основную роль в процессе фиксации комплемента играет взаимное расположение Fab- и Fc-субъединиц на уровне четвертичной структуры, определяемое «шарнирной» областью. Наличие сложной структуры «шарнирной» области, показанное методом $^1\text{H-NMR}$, по-видимому, необходимо для регуляции конформационных состояний иммуноглобулина G при взаимном перемещении Fab- и Fc-субъединиц, в результате которых создаются необходимые условия для связывания C1q и последующей активации системы комп-

лемента. «Шарнирный» участок и его S—S-связи контролируют степень гибкости молекулы иммуноглобулина, тем самым позволяя ей осуществлять различные функции. Восстановление и алкилирование S—S-связей «шарнирной» области ведет к увеличению ее гибкости и уменьшению числа конформационных состояний иммуноглобулина, при которых происходит связывание с C1q. Длина «шарнирной» области, ее гибкость и дисульфидные связи играют, очевидно, важную роль в осуществлении иммуноглобулинами G и других эффекторных функций, в частности во взаимодействии с Fc-рецепторами различного типа клеток [6, 117, 126, 127].

Несомненно, что новая информация на молекулярном уровне в этом аспекте может быть получена при изучении конформационных и структурных характеристик изолированной «шарнирной» области IgG3 с помощью как одномерной, так и двумерной ¹H-ЯМР-спектроскопии.

Заключение

Подводя итоги вышесказанного, можем заключить, что методом ¹H-ЯМР получены сведения о структурных и динамических свойствах иммуноглобулинов G и их протеолитических фрагментов в растворе, которые углубляют наше понимание молекулярных механизмов функционирования иммунной системы. Показана перспективность использования ЯМР-спектроскопии для изучения таких сложных полифункциональных белков, как иммуноглобулины, и заложен базис для дальнейших исследований в этом направлении. Мы убеждены, что нарастающие темпы прогресса ЯМР-спектроскопии приведут к ее более широкому применению в области молекулярной иммунологии.

Авторы выражают благодарность А. И. Денесюку за ряд полезных замечаний, высказанных в адрес данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кихоу Дж. // Иммуноглобулины/Ред. Литмен Г., Гуд Р. М.: Мир, 1981. С. 235–265.
2. Тернер М. // Структура и функции антител/Ред. Глини Л., Стьюард М. М.: Мир, 1983. С. 8–75.
3. Кульберг А. Я. Молекулярная иммунология. М.: Высш. школа, 1985. С. 54–107.
4. Кайваряйнен А. И., Незлик Р. С. // Иммуногенез и клеточная дифференцировка/Ред. Гурвич А. И. М.: Наука, 1978. С. 10–40.
5. Zavalov V. P. // Haematologia. 1981. V. 14. № 1. P. 73–78.
6. Burton D. R. // Mol. Immunol. 1985. V. 22. № 3. P. 161–206.
7. Поляк Р. // Иммуноглобулины/Ред. Литмен Г., Гуд Р. М.: Мир, 1981. С. 9–57.
8. Amzel L. M., Poljak R. // Ann. Rev. Biochem. 1979. V. 48. P. 961–967.
9. Huber R. // Klin. Wochenschr. 1980. V. 58. № 22. S. 1217–1241.
10. Marguart M., Deisenhofer J. // Immunol. Today. 1982. V. 3. № 6. P. 160–166.
11. Файнштейн А., Бул Д. // Структура и функции антител/Ред. Глини Л., Стьюард М. М.: Мир, 1983. С. 148–199.
12. Davies D. R., Metzger H. // Ann. Rev. Immunol. 1983. V. 1. P. 87–117.
13. Deisenhofer J., Huber R. // Progress in Immunology. V. 5/Eds Yamamura Y., Tada T. Tokyo e. a.: Acad. Press, 1984. P. 47–59.
14. Karplus M., McCammon J. Q. // Ann. Rev. Biochem. 1983. V. 52. P. 263–300.
15. Ringo D., Petsko G. A. // Prog. Biophys. and Mol. Biol. 1985. V. 45. № 3. P. 197–235.
16. Karplus M., McCammon J. Q. // Sci. Amer. 1986. V. 254. № 4. P. 32–39.
17. Кару Р. // Иммуноглобулины/Ред. Литмен Г., Гуд Р. М.: Мир, 1981. С. 58–120.
18. Дудич Е. И. Изучение динамических и структурных свойств иммуноглобулинов методом поляризации флуоресценции. Автореф. дис. канд. физ.-мат. наук/МГУ, биол. фак. М.: Изд-во МГУ, 1985. 21 с.
19. Feinstein A., Richardson N., Taussig M. J. // Immunol. Today. 1986. V. 7. № 6. P. 169–174.
20. Calvanico N. J., Tomasi T. B. // Immunochemistry of Proteins. V. 3/Ed. Atassi M. Z. N. Y.—L.: Plenum Press, 1979. P. 1–85.
21. Painter R. H. // Immunotherapy — a guide to immunoglobulin prophylaxis and therapy/Ed. Nydegger U. E. L.: Acad. Press, 1981. P. 27–35.
22. Wüthrich K. NMR in biological research: peptides and proteins. Amsterdam: North Holland Publ. Co., 1976.
23. Jardetzky O., Roberts G. C. K. NMR in molecular biology. N. Y.: Acad. Press, 1981.
24. Быстров В. Ф. // Биоорг. химия. 1984. Т. 10. № 8. С. 997–1043.
25. Campbell I. D., Dobson C. M., Williams R. J. P. // Biochem. J. 1985. V. 231. № 1. P. 1–10.
26. Nagayama K. // Adv. Biophys. 1981. V. 14. № 1. P. 139–204.

27. *Bax A.* Two-dimensional nuclear magnetic resonance in liquids. Dordrecht: D. Reidel Publ. Co., 1982.
28. *Кондаков В. Н.* // Итоги науки и техники. Сер. биоорганич. химия. Т. 12/Ред. Быстров В. Ф. М.: ВНИИГН. 1986. С. 1-124.
29. *Dwek R. A.* // Contemporary topics in molecular immunology. V. 6/Eds Ihman F. P., Reisfeld R. A. N. Y.: Plenum Press, 1977. P. 1-52.
30. *Dower S. K., Dwek R. A.* // Biological applications of magnetic resonance/Ed. Shulman R. G. N. Y.: Acad. Press, 1979. P. 271-303.
31. *Dwek R. A., Wain-Hobson S., Dower S., Gellins P., Sutton B., Perkins S. J., Givol D.* // Nature. 1977. V. 266. № 5597. P. 31-37.
32. *Morris A. T., Givol D., Dwek R. A.* // Immunochemistry. 1978. V. 15. № 8. P. 519-522.
33. *Dower S. K., Gellins P., Jackson R., Dwek R. A.* // Biochem. J. 1978. V. 169. № 1. P. 179-188.
34. *Jackson W. R. C., Leatherbarrow R. J., Gavich M., Givol D., Dwek R. A.* // Biochemistry. 1981. V. 20. № 8. P. 2339-2345.
35. *Gellins P., Boyd J., Glaudemans C. P. J., Potter M., Dwek R. A.* // Biochemistry. 1981. V. 20. № 20. P. 7463-7469.
36. *Gellins P., Dwek R. A.* // FEBS Lett. 1981. V. 124. № 2. P. 248-252.
37. *Gellins P., Porter M., Rydikoff S., Dwek R. A.* // FEBS Lett. 1977. V. 84. № 1. P. 87-91.
38. *Kooistra D. A., Richards J. H.* // Biochemistry. 1978. V. 17. № 2. P. 345-351.
39. *Kooistra D. A., Richards J. H., Smallcombe S. H.* // Org. Magn. Res. 1980. V. 13. № 1. P. 1-8.
40. *Gellins P., Dwek R. A., Stenhouse I.* // FEBS Lett. 1980. V. 117. № 1. P. 23-27.
41. *Anglister J., Frey T., McConnell H. M.* // Biochemistry. 1984. V. 23. № 6. P. 1138-1142.
42. *Frey T., Anglister J., McConnell H. M.* // Biochemistry. 1984. V. 23. № 26. P. 6470-6473.
43. *Anglister J., Frey T., McConnell H. M.* // Nature. 1985. V. 315. № 6014. P. 65-67.
44. *Arata Y., Shimizu A.* // Biochemistry. 1979. V. 18. № 12. P. 2513-2520.
45. *Arata Y., Honzawa M., Shimizu A.* // Biochemistry. 1980. V. 19. № 22. P. 5130-5135.
46. *Rosen P., Pecht I., Cohen J.* // Mol. Immunol. 1979. V. 16. № 6. P. 435-436.
47. *Shimizu A., Honzawa M., Ito S., Miyazaki T., Matsumoto H., Michaelsen T. E., Arata Y.* // Mol. Immunol. 1983. V. 20. № 2. P. 141-148.
48. *Иванчиков А. П., Абрамов В. М., Волков В. Я., Завьялов В. П.* // Молекулярн. биология. 1983. Т. 17. № 4. С. 734-740.
49. *Endo S., Arata Y.* // Biochemistry. 1985. V. 24. № 6. P. 1561-1568.
50. *Христофоров В. С., Кутышенко В. П., Абрамов В. М., Завьялов В. П.* // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 41. С. 1469-1477.
51. *Христофоров В. С., Кутышенко В. П., Завьялов В. П.* Исследование структурно-функциональных свойств иммуноглобулинов и их фрагментов методом ЯМР: Препринт. Пущино: ОНТИ ИЦБИ АН СССР, 1986.
52. *Porter R. R.* // Science. 1973. V. 180. № 4087. P. 713-720.
53. *Wu T. T., Kabat E. A.* // J. Exp. Med. 1970. V. 132. № 2. P. 211-250.
54. *Kabat E. A.* // Adv. Protein Chem. 1978. V. 32. P. 1-75.
55. *Hiltschmann N.* // Naturwissenschaften. 1969. V. 56. № 4. S. 195-205.
56. *Петров Р. В.* // Иммунология. М.: Медицина. 1982. С. 17-65.
57. *Ritnat F. W.* // Science. 1969. V. 163. № 3868. P. 633-644.
58. *Solomon A.* // Immunogenetics. 1977. V. 5. P. 525-533.
59. *Capra J. D., Edmundson A. B.* // Sci. Amer. 1977. V. 236. № 1. P. 50-59.
60. *Hahn C. S.* // Clin. Physiol. Biochem. 1983. V. 1. № 2-5. P. 117-144.
61. *Завьялов В. П.* // Молекулярная биология. Вып. 37./Киев: Наук. думка, 1984. С. 70-78.
62. *Burton D. R., Forsen S., Karlstrom G., Dwek R. A.* // Prog. NMR Spectrosc. 1979. V. 13. P. 1-46.
63. *Клявзярйнен А. П.* Динамическое поведение белков в водной среде и их функции. Л.: Наука, 1980. С. 131-136.
64. *Schiffer M., Girling R. L., Ely K. R., Edmundson A. B.* // Biochemistry. 1973. V. 12. № 23. P. 4620-4631.
65. *Edmundson A. B., Ely K. R., Girling R. L., Abola E. E., Schiffer M., Westholm F. A., Fausch M. D., Deutsch H. F.* // Biochemistry. 1974. V. 13. № 18. P. 3816-3827.
66. *Edmundson A. B., Ely K. R., Abola E. E., Schiffer M., Panagiotopoulos N.* // Biochemistry. 1975. V. 14. № 18. P. 3953-3961.
67. *Epp O., Colman P. M., Fehllhammer H., Bode W., Schiffer M., Huber R., Palm W.* // Eur. J. Biochem. 1974. V. 45. № 2. P. 513-524.
68. *Epp O., Lottman E. E., Schiffer M., Huber R., Palm W.* // Biochemistry. 1975. V. 14. № 22. P. 4943-4952.
69. *Fehllhammer H., Schiffer M., Epp O., Colman P. M., Lottman E. E., Schwager P., Steigemann W., Schramm H.* // J. Biophys. Struct. Mech. 1975. V. 1. № 2. P. 136-146.
70. *Colman P. M., Schramm H. J., Guss J. M.* // J. Mol. Biol. 1977. V. 116. № 1. P. 73-79.
71. *Segal D. M., Padlan E. A., Cohen G. H., Rudikoff S., Potter M., Davies D. R.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1974. V. 71. № 11. P. 4298-4302.
72. *Satow Y., Cohen G. H., Padlan E. A., Davies D. R.* // J. Mol. Biol. 1986. V. 190. № 4. P. 593-604.
73. *Poljak R. J., Amzel L. M., Avey H. P., Chen B. L., Phizackerley R. P., Saul F.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. № 12. P. 3305-3310.

74. Poljak R. J., Amzel L. M., Chen B. L., Phizackerley R. P., Saul F. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1974. V. 71. № 9. P. 3440-3444.
75. Saul F. A., Amzel L. M., Poljak R. J. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 2. P. 585-597.
76. Matsushima M., Marquart M., Jones T. A., Colman P. M., Bartels K., Huber R., Palm W. // J. Mol. Biol. 1978. V. 121. № 4. P. 441-459.
77. Marquart M., Deisenhofer J., Huber R. // J. Mol. Biol. 1980. V. 141. № 4. P. 369-391.
78. Navia M. A., Segal D. M., Padlan E. A., Davies D. R., Rao N., Rudikoff S., Potter M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 8. P. 4071-4074.
79. Suh S. W., Bhat T. N., Navia M. A., Cohen G. H., Rao D. N., Rudikoff S., Davies D. R. // Proteins. 1986. V. 1. № 1. P. 74-80.
80. Wang B. C., Yoo C. S., Sax M. // J. Mol. Biol. 1979. V. 129. № 4. P. 657-674.
81. Furey W., Wang B. C., Yoo C. S., Sax M. // J. Mol. Biol. 1983. V. 167. № 3. P. 661-692.
82. Chang C. H., Short M. T., Westholm F. Q., Stevens F. J., Wang B. C., Furey W., Schiffer M. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 18. P. 4890-4897.
83. Silverston E. W., Navia M. A., Davies D. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 11. P. 5140-5144.
84. Sarma R., Laudin A. G. // J. Appl. Cryst. 1982. V. 15. № 5. P. 476-481.
85. Ely K. R., Colman P. M., Abola E. E., Hess A. C., Peabody D. S., Parr D. M., Connell G. E., Lasehinger C. A., Edmundson A. B. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 5. P. 820-823.
86. Rajan S. S., Ely K. R., Abola E. E., Wood M. K., Colman P. M., Athay R. J., Edmundson A. B. // Mol. Immunol. 1983. V. 20. № 7. P. 787-799.
87. Edmundson A. B., Ely K. R., Abola E. E., Colman P. M. // Biomolecular structure, conformation, function and evolution. V. 1/Ed. Srinivasan R. Oxford - New York: Pergamon Press. 1980. P. 153-164.
88. Silverton E. W., Padlan E. A., Davies D. R., Smith-Gill S., Potter M. // J. Mol. Biol. 1984. V. 180. № 3. P. 761-765.
89. Gibson A. L., Herron J. N., Ballard D. W., Voss E. W., He X. M., Patrick V. A., Edmundson A. B. // Mol. Immunol. 1985. V. 22. № 4. P. 499-502.
90. Colman P. M., Tulloch P. A., Gough K. H., Varghese J. N., Laver W. G., Webster R. G. // Immune Recogn. Protein Antigens. Cold Spring Harbor, 1985. P. 77-81.
91. Amit A. G., Miriuzza R. A., Phillips S. E. V., Poljak R. J. // Nature. 1985. V. 313. № 5998. P. 156-159.
92. Незлин П. С. Строение и биосинтез антител. М.: Наука, 1972. С. 49-185.
93. Meitzger H. // Contemporary topics in molecular immunology. V. 7/Eds Inman F. P., Reitsfeld R. A. N. Y.: Plenum Press. 1978. P. 119-153.
94. Seiler F. R. // Gelben Hefte. 1982. B. 22. № 1. S. 1-13.
95. Егоров А. М., Диков М. М. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1982. Т. 27. № 4. С. 381-388.
96. Marx J. L. // Science. 1975. V. 189. № 4208. P. 1075-1076.
97. Shimizu A., Honzawa M., Yamamura Y., Arata Y. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 22. P. 2784-2790.
98. Tsuzukida Y., Wang C., Putnam F. W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 3. P. 1104-1108.
99. Kabat E. A., Wu T. T., Bilofsky H., Reid-Miller M., Perry H. Sequences of proteins of immunological interest. Washington: National Institute of Health, 1983. P. 14-196.
100. Campbell I. D., Dobson C. M., Williams R. J. P. // Proc. Roy. Soc. Lond. 1975. V. A345. № 1. P. 23-40.
101. Campbell I. D., Dobson C. M., Williams R. J. P., Xavier A. V. // J. Magn. Res. 1973. V. 11. № 2. P. 172-181.
102. Ashikari Y., Arata Y., Hamaguchi K. // J. Biochem. 1985. V. 97. № 2. P. 517-528.
103. Akasaka K. // J. Magn. Res. 1983. V. 51. № 1. P. 14-25.
104. Deisenhofer J., Colman R. M., Huber R., Haupt H., Schwick G. // Hopper-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1976. B. 357. № 3. S. 435-445.
105. Deisenhofer J., Colman R. M., Epp O., Huber R. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1976. B. 357. № 10. S. 1421-1434.
106. Deisenhofer J. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 9. P. 2361-2370.
107. Ito S., Miyazaki T., Matsumoto H. // Proc. Japan Acad. 1980. V. 56B. № 4. P. 226-229.
108. Van Loghem E., Frangione B., Recht B., Franklin E. C. // Scand. J. Immunol. 1982. V. 15. № 3. P. 275-278.
109. Edelman G. M., Cunningham B. A., Gall W. E., Gottlieb P. D., Rutishauser U., Waxdal M. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1969. V. 63. № 1. P. 78-85.
110. Boyd J., Easterbrook-Smith S. B., Zavodsky P., Mountford-Wright C., Dwek R. A. // Mol. Immunol. 1979. V. 16. № 11. P. 851-858.
111. Nezlin R. S., Zagjansky Y. A., Tumerman L. A. // J. Mol. Biol. 1970. V. 50. № 2. P. 569-572.
112. Тимофеев В. П., Дудич И. В., Сыкулев Ю. К., Незлин Р. С. // FEBS Lett. 1978. V. 89. № 2. P. 191-192.
113. Cavish M., Ben Nerion Y., Zukut R., Givol D., Dwek R. A., Jackson W. R. C. // Mol. Immunol. 1979. V. 16. № 11. P. 957-963.
114. Незлин Р. С., Арутюнян А. Е., Тимофеев В. П. // Биофизика. 1985. Т. 30. № 1. С. 161-162.

115. Abramov V. M., Arkhangel'skaia Z. A., Zav'yalov V. P. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 742. № 2. P. 295-302.
116. Hecht M. H., Sturtevant J. M., Sauer R. T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 18. P. 5685-5689.
117. Денесюк Л. П., Тищенко В. М., Абрамов В. М., Завьялов В. П. // Молекулярн. биология. 1983. Т. 17. № 6. С. 1262-1271.
118. Dorrington K. J., Klein M. H. // Mol. Immunol. 1982. V. 19. № 10. P. 1215-1221.
119. Dorrington K. J., Klein M. H. // Progress in Immunology. V. 5/Eds Yamamura Y., Tada T. Tokyo et al.: Acad. Press, 1984. P. 37-46.
120. Завьялов В. П. // Химия и биология иммунорегуляторов/Ред. Чипенс Г. И. Рига: Зинатне, 1985. С. 294-315.
121. Sakano H., Rogers J. H., Hoppi K., Brack C., Trannecker A., Maki R., Wall R., Tonegawa S. // Nature. 1979. V. 277. № 5698. P. 627-633.
122. Michaelson T. E., Frangione B., Franklin E. S. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 3. P. 883-889.
123. Ito W., Arata Y. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 23. P. 6467-6474.
124. Христофоров В. С., Персанов В. М., Сухожудренко А. Г., Абрамов В. М., Завьялов В. П. // Биофизика. 1987. Т. 32. № 1. С. 32-36.
125. Klein M., Haefliger-Cavallion N., Isenman D. E., Rivat C., Navia M. A., Davies D. R., Dorrington K. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 1. P. 524-528.
126. Burton D. R. // Immunol. Today. 1986. V. 7. № 6. P. 165-167.
127. Woof J. M., Partridge L. J., Jeffcris R., Burton D. R. // Mol. Immunol. 1986. V. 23. № 3. P. 319-330.

Поступила в редакцию
14.III.1986
После доработки
20.IV.1987

¹H-NMR-INVESTIGATION OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF IMMUNOGLOBULINS G AND THEIR FRAGMENTS

KHRISTOFOROV V. S., KUTYSHENKO V. P*, 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, Moscow Region*

Data on NMR-spectroscopy studies of the structure-function interrelation in immunoglobulins G and their proteolytic fragments are reviewed. Relationship between structural and dynamic characteristics of immunoglobulins G and their functional properties is discussed.