



УДК 612.124.017.1 : 577.322.5 : 543.42.27

ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ СУБКОМПОНЕНТА C1q  
КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА ПРИ СПОНТАННОЙ ИНАКТИВАЦИИ  
В РАЗБАВЛЕННЫХ РАСТВОРАХ*Козлов Л. В., Зимченко А. А., Сизой М. П.,  
Бретова А. Ф., Тихоненко А. С.\***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва;  
\* Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Разбавление сыворотки крови или растворов, содержащих высокоочищенный субкомпонент C1q комплемента человека, приводит к падению во времени активности C1q. Электронно-микроскопическое исследование высокоочищенного субкомпонента C1q обнаружило наличие части молекул с измененной ультраструктурой и диссоциацию субъединиц C1q. Поскольку препараты для электронной микроскопии готовятся из разбавленных растворов, изменения ультраструктуры и инактивация C1q — связанные явления. Высказано предположение о функциональном значении лабильности структуры C1q.

Важным этапом активации системы комплемента по классическому пути являются узнавание активаторов и инициация активации первого фермента — C1r. За осуществление этого этапа отвечает субкомпонент C1q, который вместе с проферментами C1r и C1s входит в состав мультимерного комплекса C1. В настоящее время белок C1q (*M* 459 300, шесть субъединиц) основательно изучен [1]. Известна полная аминокислотная последовательность его А- и В-цепей и коллагеновой части С-цепи [2, 3]. Электронно-микроскопические исследования [4–8] позволили охарактеризовать ультраструктуру C1q, размеры отдельных элементов молекулы [4, 5], характер взаимодействия C1q с димерами IgG [6] и Ca<sup>2+</sup>-зависимым тетрамером C1r<sub>2</sub>C1s<sub>2</sub> [7, 8]. Молекула C1q, состоящая из шести трехцепочечных субъединиц, имеет ультраструктуру, называемую «букетом тюльпанов». «Головки» тюльпанов — глобулярные части, ответственные за связывание с иммуноглобулинами или другими активаторами — осуществляют узнавание активатора. Головки связаны с центральной частью молекулы, именуемой «центральной связкой», коллагеновыми фибриллами — «ручками». Центральная связка объединяет шесть коллагеновых стеблей. Тетрамер C1r<sub>2</sub>C1s<sub>2</sub> расположен, по данным электронной микроскопии [7, 8], высоко на букете тюльпанов в виде кольца так, что глобулы C1r и C1s находятся вблизи головок между ручками. Стебли каждой субъединицы имеют гибкий участок между ручкой и частью, принадлежащей центральной связке. Гибкость этого участка обусловлена нарушениями регулярной коллагеновой структуры в трех цепях — А, В и С [2, 3].

Сегментальная гибкость молекулы C1q была оценена по данным электронно-микроскопического измерения углов, образуемых ручками и осью молекулы, проходящей через центральную связку [8–10]. В свободной молекуле C1q этот угол составляет в среднем 49,75±11,72°, а в C1q в комплексе C1 — 49,85±6,45° [9, 10]. Если в первом случае измеряемые углы лежат в пределах 20–80°, то во втором — в пределах 40–60°, т. е. C1q в комплексе C1 представляет собой значительно более жесткую молекулу. Следует, однако, оговорить, что измерения проводились на C1, в котором тетрамер C1r<sub>2</sub>C1s<sub>2</sub> был ковалентно сшит с C1q, и комплекс был гемолитически неактивен [8].

Как было показано ранее (в частности, в нашей работе [11]), для активации C1 достаточно двухточечного связывания C1q с активатором, при этом активация C1r происходит вследствие конформационных изменений

молекулы С1q [11, 12]. Таким образом, способность к конформационным изменениям молекулы С1q может являться основным функционально важным свойством этого субкомпонента. Действительно, нет альтернатив в объяснении передачи сигнала о связывании С1q с активатором на молекулу активируемого зимогена С1г путем конформационных изменений С1q. Однако структурная лабильность молекулы белка тесно связана с пониженной устойчивостью к денатурирующим воздействиям (что было, в частности, показано в исследованиях иммобилизованных ферментов [13]). Следовательно, функционально обусловленная конформационная лабильность молекулы С1q позволяет ожидать ее структурную неустойчивость и способность к спонтанной инактивации. Действительно, при работе с препаратами высокоочищенного субкомпонента С1q мы обратили внимание на неустойчивость данных по определению активности препарата. В связи с этим была проведена систематическая проверка активности С1q в сыворотке крови и в очищенных препаратах при различных условиях определения.

Поскольку метод определения активности С1q высокочувствителен [11, 14], для удобства, чтобы не работать с очень малыми объемами растворов, содержащих С1q, препараты предварительно разбавляют. Как показали проведенные опыты (рис. 1), разбавление сыворотки до 10 раз изотоническим вероналовым буфером не приводит к падению активности С1q даже после 30 мин хранения разбавленных растворов при 4° С. Но при разбавлении в 100 раз через 30 мин активность начинает падать. Разбавление же в 1000 раз вызывает существенное снижение активности С1q (рис. 1). Так, если сыворотку крови разбавить в 1000 раз, то через полчаса при 37° С активность С1q упадет в 2 раза по сравнению с исходной (рис. 2).

Хрупкость молекулы С1q, особенно в разбавленных растворах, отмечалась в одной из первых работ по его электронно-микроскопическому исследованию [4], в которой для сохранения структуры С1q в раствор вводили не взаимодействующий с С1q белок — глутаминсинтетазу. Следует отметить, что в сыворотке крови даже в разбавленных растворах содержатся значительные концентрации других белков. Поэтому для высокоочищенных препаратов С1q можно было ожидать еще большую неустойчивость в разбавленных растворах. Действительно, С1q в концентрации 14 мкг/мл, что соответствует концентрации в сыворотке, разбавленной в 5 раз, теряет активность при 4° С со скоростью, примерно в 5 раз превосходящей скорость инактивации С1q в сыворотке, разбавленной в 1000 раз, в тех же условиях инкубации (рис. 3, 1). Введение белка — сывороточного альбумина человека в концентрации 1 мг/мл — приводит к некоторому снижению скорости инактивации С1q (рис. 3, 2). В еще большей степени стабилизируется С1q в растворах, содержащих желатину (рис. 3, 3), которая, вероятно, подобно коллагену [15] может взаимодействовать с С1q. Следует также отметить, что С1q в концентрации 1—2 мг/мл в 5 мМ трибуфере, рН 7,4, содержащем 10 мМ EDTA и 0,5 М NaCl, хранится при 4° С в течение месяца без потери активности [11].

Можно было предполагать, что падение активности С1q до 50% в первые 5 мин инкубации при 4° С разбавленных растворов высокоочищенного субкомпонента (рис. 3, 1) обусловлено серьезными структурными изменениями молекулы. С целью наблюдения за такими изменениями структуры были проведены электронно-микроскопические исследования. Для электронной микроскопии препараты высокоочищенного субкомпонента С1q разбавляли до концентраций 20—40 мкг/мл. При таких концентрациях активность С1q в первые 10 мин падает вдвое. В связи с этим белок разбавляли непосредственно перед нанесением на пленку и через 1—3 мин препараты осушали. На рис. 4, 1—3 показаны электронные микрофотографии интактной молекулы С1q. Общий вид молекулы, ее размеры и размеры отдельных элементов соответствуют описанным в литературе [4, 5, 16]: высота всей молекулы С1q (вид сбоку) составляет 35 нм, размеры центральной связки — 6×12 нм, диаметр головок — 8 нм, длина ручек 12 нм, ширина — 1,5 нм. На некоторых микрофотографиях (рис. 4, 1в, 2б, 4а) раз-

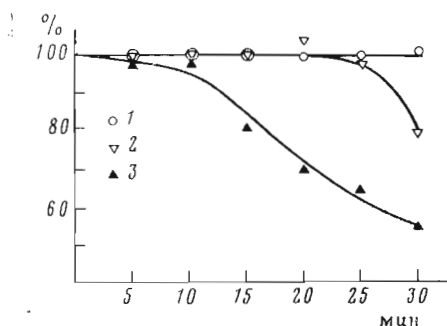


Рис. 1

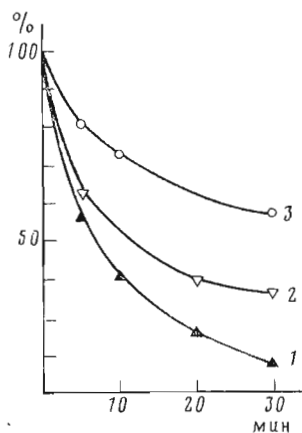


Рис. 3

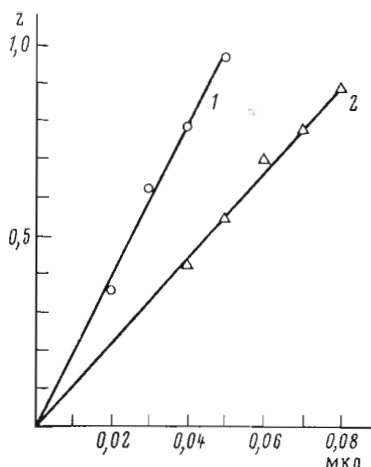


Рис. 2

Рис. 1. Изменение активности C1q в сыворотке крови, разбавленной в 10 (1), 100 (2) и 1000 раз (3) VBS<sup>2+</sup>, при 4° С

Рис. 2. Титрование C1q в сыворотке крови, разбавленной в 1000 раз VBS<sup>2+</sup>, сразу после разбавления (1) и через 30 мин (2) инкубации при 37° С, z — доля гемолитически активных молекул C1q [14]

Рис. 3. Падение активности высокоочищенного C1q (14 мкг/мл) в буферах VBS<sup>2+</sup> (1), VBS<sup>2+</sup>/HSA (2) и GVBS<sup>2+</sup> (3) при 4° С. Состав буферов см. в «Экспер. части»

личима небольшая глобулярная часть у основания центральной связки, соответствующая неколлагеновым участкам N-концевой части цепей. Кроме того, центральная связка, состоящая из шести коллагеновых тройных спиралей, обнаруживает некоторую спиралевидную перевитость (см. рис. 4, 1*б*, 2*б*, 3*б*). Ранее такую перевитость и глобулярную часть у основания центральной связки не наблюдали.

Наряду с интактными молекулами на фотографии видны отдельные этапы деструкции молекулы C1q в результате разбавления раствора (рис. 4, 4—6). Наблюдаются начальные этапы диссоциации центральной связки (рис. 4, 4, а также 2*а*, *б*) и распад на димерные структуры (рис. 4, 6), а также отрыв отдельных субъединиц (рис. 4, 5*г*, *д*). Иногда наблюдаются «обломки» молекулы C1q с оторванными отдельными субъединицами (рис. 3, 5*а*—*в*). В целом рисунок 4 воссоздает поэтапную картину изменений ультраструктуры и деградации молекулы C1q в разбавленных растворах, что приводит, как мы видели выше, к потере гемолитической активности.

Следует отметить, что, к сожалению, нельзя провести строго количественной корреляции между уровнем потери активности C1q и числом измененных молекул, наблюдаемых при электронно-микроскопическом исследовании, поскольку из чисто технических условий электронной микроскопии нет возможности в точности воспроизвести условия инкубации раствора C1q в пробирке при получении препаратов для электронной микроскопии. Подсчет числа измененных и внешне интактных молекул C1q, наблюдаемых в поле электронного микроскопа, дает примерно равное их количество, что качественно согласуется с потерей половины гемолитической активности C1q при инкубации в разбавленном растворе за первые 5 мин (см. рис. 3, 1).

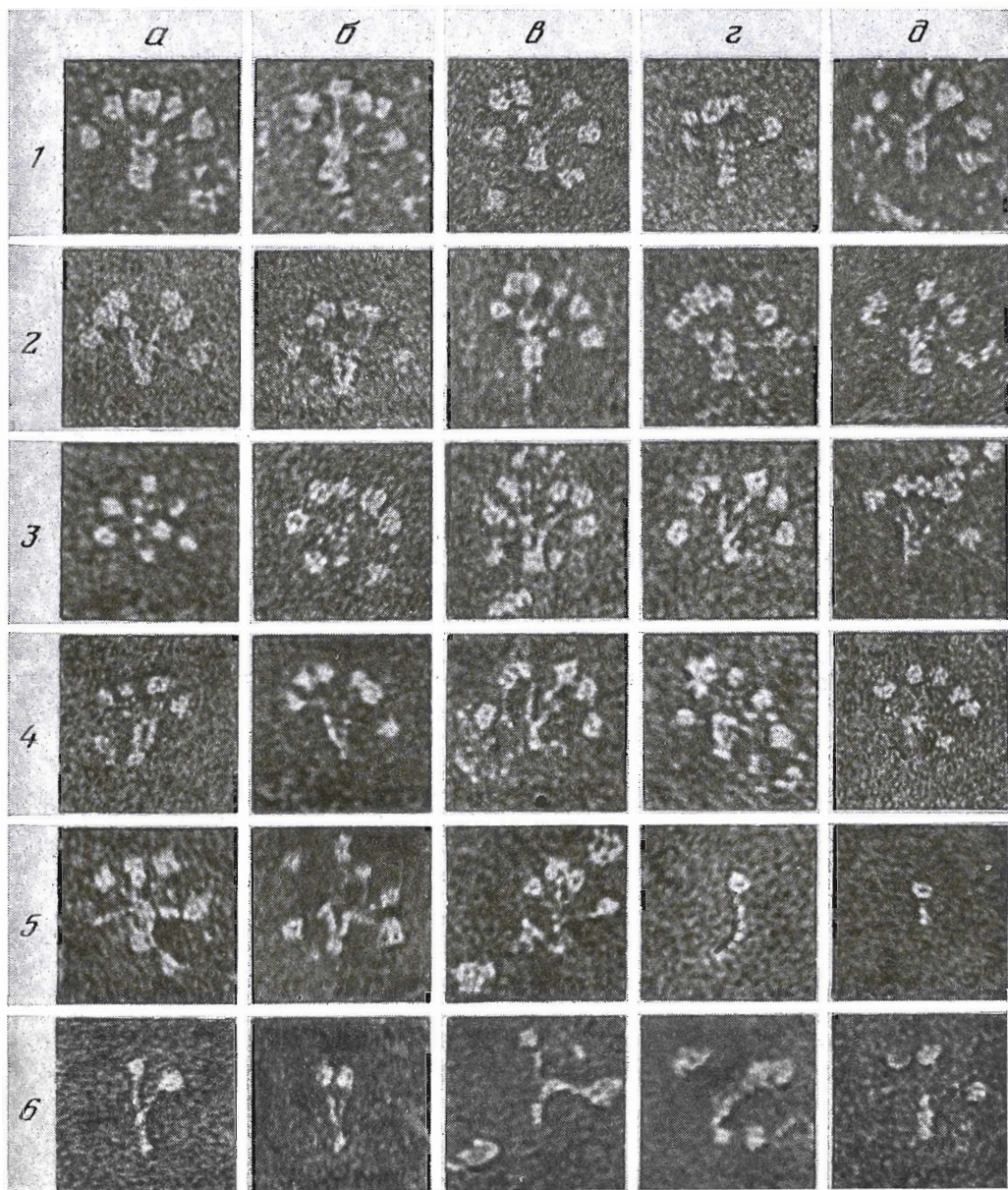


Рис. 4. Электронные микрофотографии препарата С1q. Негативное контрастирование, увеличение в 500 000 раз

Логичнее всего предположить, что потеря активности белка при его разбавлении происходит за счет диссоциации субъединиц. Активность не может теряться ни в результате действия протеиназ, так как в высокоочищенных препаратах их не было, а если бы и были, то протеолиз снижается при уменьшении концентраций фермента и субстрата, ни за счет тонких конформационных изменений, которые по существу, как правило, бывают обратимыми и не отражаются на активности из-за сдвига равновесия в сторону активной формы при определении активности. В связи с этим мы и предполагаем, что диссоциация субъединиц с последующими деструктивными изменениями и является причиной потери гемолитической активности молекул С1q в разбавленных растворах. Предшествующие диссоциации изменения ультраструктуры, наблюдаемые в электронном микроскопе, как мы полагаем, отражают динамику этого процесса.

Как мы уже отмечали, лабильность молекулы С1q может быть связана

с ее функциональной активностью. Ранее, исследуя конформационное поведение молекулы фермента (на примерах химотрипсина и пепсина), мы показали, что наиболее лабильной частью фермента является зона его активного центра [17] и повышенная конформационная подвижность возникает при переходе от зимогенной формы фермента в его активную форму [18, 19], т. е. лабильное состояние молекулы фермента является неизбежным следствием его функциональной активности. В настоящее время трудно сказать, какие именно конформационные изменения молекулы C1q приводят к аутоактивации C1r в комплексе C1. Можно лишь высказать предположение, что изменение угла раскрытия «букета тюльпанов», связанное с взаимодействием головок с кластерами молекул иммобилизованного иммуноглобулина, и является сигналом для такой активации. Это предположение основано на повышенной сегментальной гибкости именно ручек, несущих глобулярные головки молекулы C1q. Более серьезные изменения ультраструктуры, затрагивающие центральную связку, приводят к потере активности C1q.

### Экспериментальная часть

*Изотонический вероналовый буфер с  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  ( $VBS^{2+}$ )* готовили как описано в работе [20].  $VBS^{2+}/HSA$  содержал 1 мг сывороточного альбумина человека на 1 мл  $VBS^{2+}$ .  $GVBS^{2+}$  содержал 1 мг желатинины на 1 мл  $VBS^{2+}$ .

*Реагент R1q и препарат высокоочищенного C1q* получали согласно [11].

*Сенсибилизированные эритроциты (EA)* в концентрации  $1,5 \cdot 10^8$  клеток/мл в  $VBS^{2+}/HSA$  получали как описано в работе [11].

*Определение устойчивости C1q в сыворотке крови после разбавления.* Сыворотку крови человека без разбавления, а также разбавленную  $VBS^{2+}$  в 10, 100 и 1000 раз инкубировали при  $4^\circ C$  в течение 30 мин. Для определения гемолитической активности C1q в нулевой момент времени, а также через 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин отбирали пробы по 0,1, 1, 10 и 100 мкл соответственно для неразбавленной сыворотки и для разбавлений в 10, 100 и 1000 раз. Отобранные пробы добавляли в смесь, содержащую 200 мкл EA, 30 мкл R1q и  $VBS^{2+}$  до общего объема 500 мкл, инкубировали 60 мин при  $37^\circ C$ , периодически встряхивая. Реакцию останавливали добавлением 2,5 мл 0,15 M NaCl, центрифугировали 5 мин при 1500g при  $4^\circ C$  и определяли  $A_{412}$  супернатанта. Долю гемолитически активных молекул C1q ( $z$ ) определяли согласно [14].

*Определение устойчивости разбавленных растворов высокоочищенного C1q.* 14 мкг/мл высокоочищенного компонента C1q (что соответствует разбавлению сыворотки в 5 раз) в  $VBS^{2+}$ ,  $VBS^{2+}/HSA$  или  $GVBS^{2+}$  инкубировали при  $4^\circ C$ , отбирая пробы по 0,1 мкл через 5, 10, 20 и 30 мин. Пробы вносили в гемолитическую систему для определения активности C1q, как описано выше.

*Электронная микроскопия.* Высокоочищенные препараты C1q разбавляли до конечной концентрации 20–40 мкг/мл 0,3 M аммоний-ацетатным буфером, pH 6,8, перед нанесением на пленку. Пробы помещали на электронно-микроскопические сетки с формваровой пленкой, ионизированные непосредственно перед использованием. Через 1–3 мин капли слегка осушали фильтровальной бумагой и препараты контрастировали 1% раствором уранилформата, pH 4,1. Препараты исследовали в электронном микроскопе JEB 100 CX (Jeol, Япония) при увеличении на экране в 50 000 раз.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Reid K. B. M. Biochem. Soc. Trans., 1983, v. 11, № 1, p. 4–12.
2. Reid K. B. M. Biochem. J., 1979, v. 179, № 2, p. 367–371.
3. Reid K. B. M., Gagnon J., Frampton J. Biochem. J., 1982, v. 203, № 3, p. 559–569.
4. Shelton E., Yonemasu K., Stroud R. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 1, p. 65–68.
5. Knobel H. R., Villiger W., Isliker H. Eur. J. Immunol., 1975, v. 5, № 1, p. 78–82.

6. *Tschopp J., Villiger W., Lustig A., Jatou J.-C., Engel J.* Eur. J. Immunol., 1980, v. 10, № 7, p. 529-535.
7. *Strand C. J., Siegel R. C., Phillips M. L., Poon P. H., Schumaker V. N.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 2, p. 586-590.
8. *Schumaker V. N., Poon P. H.* Protein Conform. Immunol. Signal. Proc. EMBO Workshop, Portovenere, Oct. 1-4, 1981. New York, London: 1983, p. 97-114.
9. *Schumaker V. N., Poon P. H., Seegan G. W., Smith C. A.* J. Mol. Biol., 1981, v. 148, № 2, p. 191-197.
10. *Poon P. H., Schumaker V. N., Phillips M. L., Strang C. J.* J. Mol. Biol., 1983, № 3, p. 563-577.
11. *Козлов Л. В., Сизой М. Н., Зинченко А. А., Иванов А. Е., Зубов В. П.* Биоорганическая химия, 1984, т. 10, № 12, с. 1629-1638.
12. *Golan M. D., Burger R., Loos M. J.* Immunol., 1982, v. 129, № 2, p. 445-447.
13. *Козлов Л. В.* Биоорганическая химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1243-1254.
14. *Козлов Л. В., Зинченко А. А., Соляков Л. С., Сизой М. Н., Ищенко А. М., Мартюшин С. В., Андреев С. В.* Биоорганическая химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1047-1055.
15. *Menzel E.-J., Smolen J., Reid K.* Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 670, № 2, p. 265-273.
16. *Brodsky-Doyle B., Leonard K. R., Reid K. B. M.* Biochem. J., 1976, v. 159, № 2, p. 279-286.
17. *Суровцев В. И., Козлов Л. В., Антонов В. К.* Биохимия, 1972, т. 37, № 6, с. 1139-1143.
18. *Суровая А. Н., Слободянская Е. М., Козлов Л. В., Коган Г. А., Антонов В. К.* Молекулярная биология, 1972, т. 6, № 1, с. 106-112.
19. *Глогов Б. О., Козлов Л. В., Завада Л. Л.* Молекулярная биология, 1976, т. 10, № 1, с. 161-174.
20. *Козлов Л. В., Крылова Ю. И., Чих В. П., Молчанова Н. Н.* Биоорганическая химия, 1982, т. 8, № 5, с. 652-659.

Поступила в редакцию  
5.VI.1984  
После доработки  
11.VII.1984

## ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF THE HUMAN COMPLEMENT SUBCOMPONENT C1q ACCOMPANYING ITS SPONTANEOUS INACTIVATION IN DILUTE SOLUTIONS

KOZLOV L. V., ZINCHENKO A. A., SIZOJ M. N., KRETOVA A. F.\*,  
TIKHONENKO A. S.\*

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry and \*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Dilution of human serum or solutions of highly purified subcomponent C1q of human complement results in the drop of C1q activity. Electron microscopy of highly purified subcomponent C1q revealed that a certain part of molecules has a changed ultrastructure and C1q subunits are dissociated. As the preparations for electron microscopy have been obtained from dilute solutions, the changes in the ultrastructure and C1q inactivation should be interrelated phenomena. The conformational lability of the C1q structure is supposed to have a functional role.