Взаимодействие антител с положительно-заряженными малыми антигенами

Выполнили:

ученицы специализированного учебно – Научного центра им. А. Н. Колмогорова

Беляева Юлия Дмитриевна и Смирнова Александра Григорьевна

Научный руководитель:

аспирант Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова

Аржаник Владимир Константинович

СУНЦ МГУ

2015/2016

Содержание

Список сокращений 2
Введение 3
Литературный обзор 5
Глава 1 Антитела 5
1.1 Общие сведения об антителах 5
1.2 Классификация антител 5
1.3 Строение антител 7
1.3.1 Общие сведения 7
1.3.2 Гипервариабельные участки 7
1.3.3 Источники разнообразия антигенраспознающих структур 9
Глава 2 Межмолекулярные взаимодействия между антителом и антигеном 10
2.1 Гидрофобный эффект 10
2.2 Ван-дер-Ваальсовы силы 10
2.3 Водородные связи 11
2.4 Координационные связи 12
2.5 π-стэкинг 12
2.6 π-катионные взаимодействия 13
2.7 Электростатические (ионные) взаимодействия 14
Глава 3 Заряженные группы антигенов 15
Глава 4 Результаты и обсуждение 17
4.1 Исключения 18
Выводы 23
Список используемой литературы 24

Список используемых сокращений

PDB – Protein Data Bank;

SAbDab – Structural Antibody Database;

Å – расстояние в Ангстремах (0.1 нм)

Ig – иммуноглобулины;

АОК – Антителобразующая клетка;

АО – Аминокислотный остаток;

Fab-фрагмент - fragment antigen binding (фрагмент связывания антигена);

Fc-фрагмент - crystallizable fragment (кристаллизующийся фрагмент);

CDR – complementary determining regions (гипервариабельные участки);

NCGs – negatively charged groups (отрицательно заряженные группы);

H-цепь – тяжелая цепь;

L-цепь – легкая цепь;

C_L - константная область L-цепи;

V_H – вариабельная область H-цепи;

V_L – вариабельная область L-цепи.

Введение

Антитела - семейство гликопротеинов, отвечающих за распознавание антигенов в организмах позвоночных. Общая схема устройства для антител делает их привлекательным объектом для моделирования по гомологии. Однако требуются критерии качества смоделированной структуры. В качестве таких критериев могут выступать как паттерны взаимодействия между молекулами или их отдельными группами, так и выявленные зависимости третичной структуры от первичной.

Многие малые антигены несут положительно-заряженные в нейтральном pH группы, и, поскольку недавно был выявлен мотив связывания антител с отрицательно заряженными антигенами [8], то можно предположить, что взаимодействия положительно–заряженных лигандов с антителами также имеют определенные закономерности. Из такой гипотезы вытекает цель данной работы - Взаимодействие положительно–заряженных лигандов с антителами также должны иметь определенные закономерности.

Задачи данной работы можно сформулировать так:

- Выбрать группы антигенов, необходимых для изучения (малые, положительно–заряженные);
- Описать взаимодействие с аминокислотами антитела, систематизировать полученные данные;
- Выявить закономерности связывания антигенов данного типа с антителами:
  - Корреляция с аминокислотной последовательностью,
  - Закономерности в геометрических параметрах связывания.

Задачи достигнуты с использованием данных методов: поиск в базах данных пространственных структур молекул, необходимых для изучения, их визуализация и корреляционный анализ.

Для работы были использованы данные базы данных 3D–визуализированных структур белков и нуклеиновых кислот: Protein Data Bank (PDB) [1]. Информация, полученная методами рентгеновской кристаллографии или ЯМР-спектроскопии (стереоскопия ядерного магнитного резонанса), вносится в базу данных биологами и биохимиками со всего мира, доступна через интернет.

Работа по изучению механизмов взаимодействия между антителом и малыми положительно – заряженными антигенами проводилась в программе PyMOL (PyMOL - свободная система молекулярной визуализации) [2]. Программа позволяет создавать высококачествен-

ные трёхмерные изображения биологических макромолекул, таких как белки, нуклеиновые кислоты.

Поиск и отбор лигандов, необходимых для исследования и соответствующих его требованиям, проводился на основе данных Structural Antibody Database (SAbDab - база данных о структуре антител; здесь собраны и представлены данные из PDB). Из базы данных отбирались антигены следующих категорий: углеводы (carbohydrate), гаптены (hapten).

Антитела, выделенные из организмов верблюжьих (например, Лама), по своей структуре отличны от антител человека и некоторых других млекопитающих, которые мы рассматриваем при изучении. Они меньше по размерам и состоят только из H-цепей, поэтому мы исключили их из рассмотрения.

Проводилось исследование механизмов взаимодействия малых положительно-заряженных антигенов с антителами. Мы искали заряженные группы в составе лиганда, описывали их местоположение и характер взаимодействия. Мы считали, что электростатическое взаимодействие существует, если расстояние между группами не превышает 4.0 Å (см. раздел 2.7).

Литературный обзор

Глава 1. Антитела

Тема нашей работы: «Взаимодействие антител с малыми положительно – заряженными антигенами». Рассмотрим первоначально основные теоретические сведения, которые будут полезными в ходе данной исследовательской работы, а именно некоторые особенности строения антител, их основные свойства, факторы, обеспечивающие вариабельность, классификацию.

1.1. Общие сведения об антителах

Антитела, называемые также иммуноглобулинами, - это группа гликопротеинов, составляющих один из главных белковых компонентов крови (по весу примерно 20% суммарного белка плазмы) и обладающих способностью проникать в тканевые жидкости организма и связываться там с чужеродными антигенами, вызвавшими их синтез. Связывание с антителами инактивирует вирусы и бактериальные токсины, но, кроме связывания антигена, антитела осуществляют одну или несколько эффекторных функций. Структурные участки молекулы иммуноглобулина, ответственные за эффекторную активность (за активацию комплимента или связывание, например, с фагоцитирующими клетками), пространственно удалены от антигенсвязывающих центров и находятся главным образом в Fc – области.

Синтез антител осуществляют В-клетки (В-лимфоциты), но для этого необходим контакт с антигеном и вызванное им созревание В-лимфоцитов в антителообразующие клетки (АОК). Антитела представляют собой растворимую форму антигенсвязывающих В-клеточных рецепторов. Благодаря своей идентичности исходным рецепторным молекулам они взаимодействуют с тем антигеном, который первоначально активировал В-клетки. [3, т. 3 с. 215-228]

1.2. Классификация антител

Основная структурная единица в молекуле антитела образована из двух идентичных легких (L-цепи, каждая примерно из 220 аминокислот) и двух идентичных тяжелых (Н-цепи, каждая примерно из 440 аминокислот) цепей. Все четыре цепи соединены между собой нековалентными и ковалентными (дисульфидными) связями. Молекула состоит из двух одинаковых половинок, имеющих идентичные антигенсвязывающие участки (рис.1.2-1).

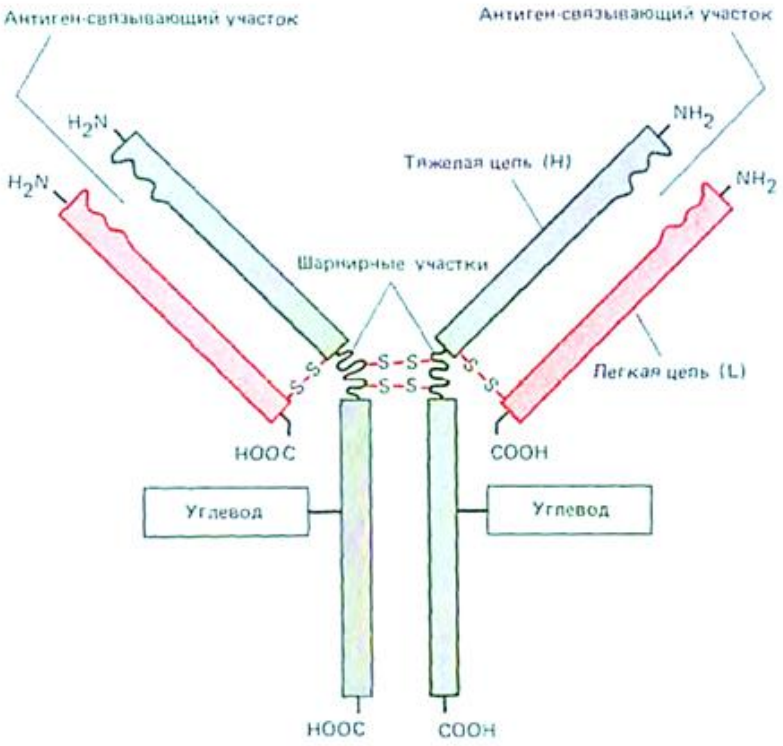


*Рисунок **Ошибка! Текст указанного стиля в документе***

Принадлежность молекулы иммуноглобулина к тому или иному классу зависит от типа тяжелых цепей. Так, у высших позвоночных существуют пять классов антител - IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, каждый со своим типом H-цепей α, δ, ε, γ и μ, соответственно. Кратко рассмотрим функции и особенности строения каждого класса.

IgG составляют основной класс иммуноглобулинов плазмы крови (70-75%), производящихся при вторичном иммунном ответе. Их Fc-область не только активирует системы комплемента, но и связывается со специфическими рецепторами макрофагов и нейтрофилов, благодаря чему эти фагоцитирующие клетки могут связывать, поглощать и разрушать внедрившиеся микроорганизмы, покрытые IgG-антителами, выработавшимися в ответ на инфекцию. Различные типы лейкоцитов, несущие Fc-рецепторы, могут убивать также и покрытые IgG чужеродные эукариотические клетки, не фагоцитируя их (антител-зависимая клеточная цитотоксичностъ).

Молекула IgG может рассматриваться как типичное по строению антитело, так как представляет собой гликопротеин, имеющий в составе четыре цепи: две H, две L. Каждая из них, в свою очередь, характеризуется наличием нескольких доменов:

- H-цепь: один V и три C домена. CH2 домены несколько удалены друг от друга: между ними находятся углеводные компоненты.
- L-цепь: один V и один C – домены. C_L, по обыкновению, располагается параллельно C_{H1} – домену.

IgM - это класс антител, выделяющихся при первичном иммунном ответе. Является пентамером основной четырехцепочечной единицы.

IgA - основной класс антител в секретах (молоке, слюне, слезах, секретах дыхательных путей и кишечного тракта). В сыворотке человека он представлен четырехцепочечными мономерами, а в сыворотке большинства других млекопитающих – димерами.

Класс **IgD** составляет менее 1% всех иммуноглобулинов плазмы, однако он в больших количествах присутствует на мембране многих В-клеток. Его биологическая роль еще не до конца изучена.

Концентрация класса **IgE** в сыворотке очень мала, молекула содержит пять доменов Н - цепи. [4, с. 98-100]

1.3. Строение антител

1.3.1. Общие сведения

Тяжелые и легкие цепи в составе антитела содержат константную и вариабельную области. Именно на N-концевых, вариабельных частях цепей каждая L- и Н-цепь содержатся области, которые формируют антигенсвязывающий участок - паратоп. Константная (CL) область L-цепи равна по длине вариабельной (VL) и составляет примерно 110 аминокислот. В Н-цепях N-концевая вариабельная (VH) область также состоит приблизительно из 110 аминокислот, а константная, в зависимости от класса антител, насчитывает от 330 до 440 аминокислот.

Однако только часть вариабельной области непосредственно участвует в связывании антигена. Различия между вариабельными областями и в L-, и в Н-цепях в основном ограничены тремя небольшими гипервариабельными областями в каждой цепи. Остальные части, называемые структурными областями, относительно постоянны. Итак, антигенсвязывающий участок образуют всего лишь 5-10 аминокислот каждой гипервариабельной области. [3, т. 3 с. 228-243]

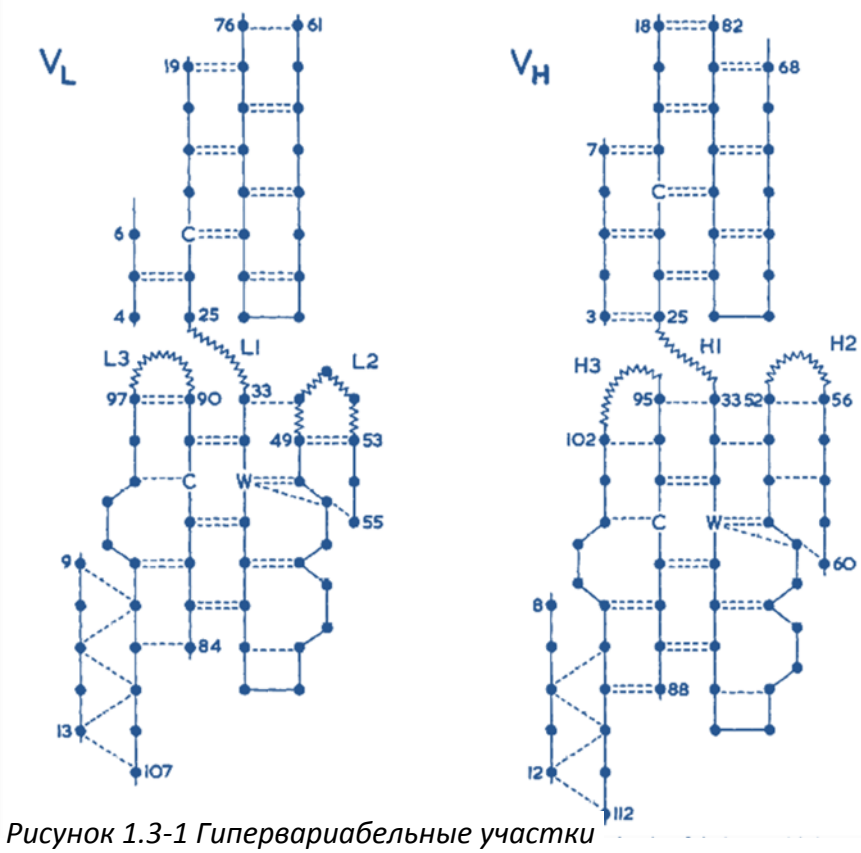


Рисунок 1.3-1 Гипервариабельные участки

1.3.2. Гипервариабельные участки (CDR)

Каждый из вариабельных доменов имеет свой набор из трех гипервариабельных областей, уложенных в три гипервариабельные петли. Гипервариабельные петли L- и H- вариабельных доменов собраны в группу и образуют антиген-связывающий участок. Вариабельная область молекулы антитела состоит из весьма консервативной жесткой структуры, к одному из концов которой прикреплены гипервариабельные петли (L1, L2, L3, H1, H2, H3).

Каждая С-область цепей Ig кодируется лишь одним генным сегментом, в отличие от V-областей. V-область каждой L-цепи кодируется последовательностью ДНК, собираемой из двух генных сегментов - длинного V-сегмента и короткого соединительного J-сегмента. V-область каждой H-цепи кодируется последовательностью ДНК, собираемой из трех генных сегментов: V-сегмента, J-сегмента и D-сегмента, что играет важную роль в разнообразии антител. [3 т. 3 с. 228-243], [4, с. 129-147]

Ключевую роль в распознавании антигена играют третичная и первичная структура CDR. Пространственная структура основной цепи CDR, исключая H3, определяется набором «канонических структур». [5], [6], [7]

Таблица 1 Гипервариабельные участки (по материалам [5], [7]***)***

Гипервариабельные участки	Остатки	Кодирующие сегменты генов
L1	26-32	V
L2	50-52	V
L3	91-96	V, J
H1	26-32	V
H2	52-56	V
H3	96-101	V, J, D

Чтобы предсказать взаимодействие антител с антигенами, при невозможности кристаллографической структуры, используются такие способы, как компьютерное моделирование по гомологии. Для устранения ошибок, связанных с использованием гомологичных структур, необходимо уметь точно предсказывать схему взаимодействия, не используя при этом структурной информации, отталкиваясь лишь от аминокислотной последовательности антитела. Это ста-

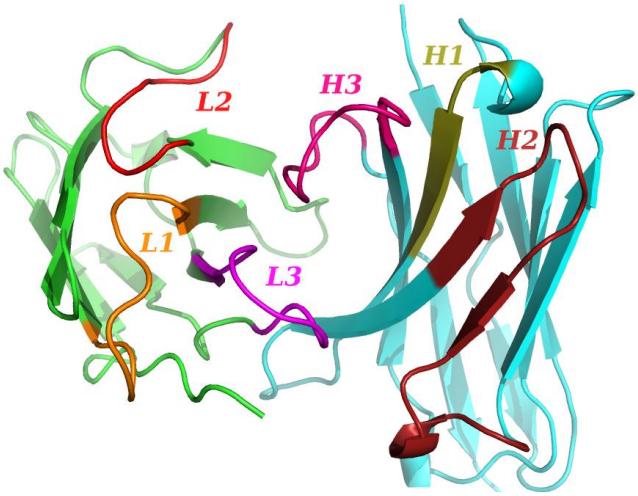


Рисунок 1.3–2 Гипервариабельные участки

новится возможным при знании определенных консервативных мотивов связывания, таких как, например, недавно найденный в CDR H2 мотив, состоящий из четырех остатков (аргинин в H52, треонин в H59, глютаминовая к-та в позиции H61, тирозин в H33), взаимодействующих только с NCGs (т. е. negatively charged groups - отрицательно заряженные группы). [8]

1.3.3. Источники разнообразия антигенраспознающих структур

Половина аминокислотной последовательности любой легкой и четверть тяжелой цепи Ig всегда вариабельна, а остальная часть константна. Вариабельные и константные области кодируются отдельными генами. Существует множество генов для вариабельных (V) и весьма ограниченное число генов для константных (C) участков.

Легкие цепи иммуноглобулинов кодируются генными сегментами V и J; в копировании тяжелых цепей дополнительное разнообразие вносят ещё и сегменты D. Общее количество возможных вариантов антигенсвязывающих центров рассчитывается как произведение чисел различных легких и тяжелых цепей. Рекомбинации ограниченного числа генных сегментов V, D и J создают бесконечное число доменов разной специфичности. Разнообразие такого масштаба дают пять возможных источников (см. рис. 1.3-3):

1) многочисленность гаметных генов V – областей;

2) соматический мутагенез;

3) соматическая рекомбинация;

4) генная конверсия;

5) вставки добавочных нуклеотидов. [4, с. 129-147]

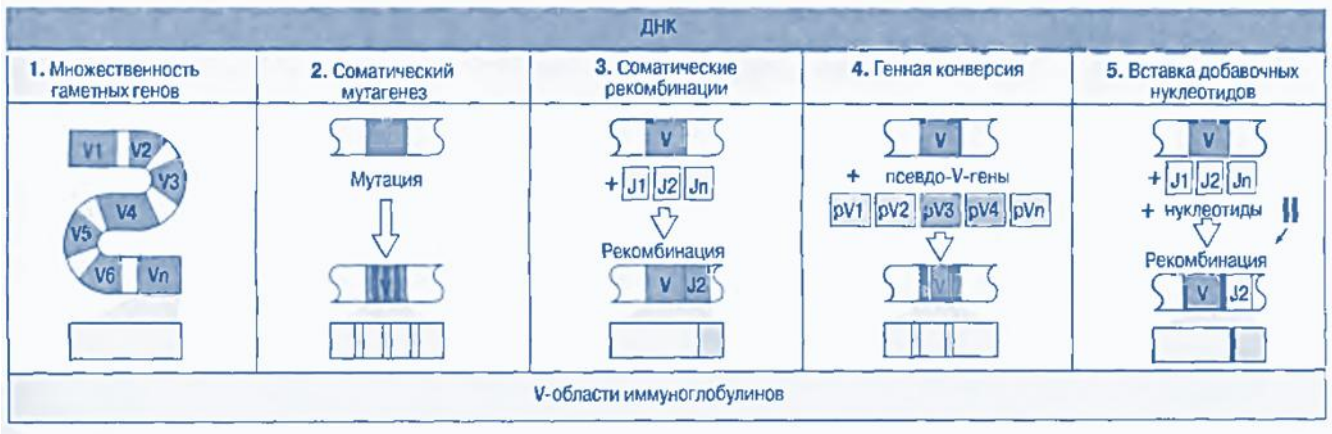


Рисунок 1.3-3 Источники разнообразия антител [4, с. 131]

Глава 2. Межмолекулярные взаимодействия между антителом и антигеном

При контакте антитела с антигеном связывание происходит благодаря комплиментарности конформаций паратопа антитела и эпитопа антигена и наличию межмолекулярных взаимодействий, возникающих между сближающимися атомами без образования при этом ковалентных связей. Такое притяжение появляется на больших расстояниях, когда не наблюдается перекрывания электронных облаков, имеет квантовую основу и связано с согласованным колебанием электронов в атомах.

Выделяют следующие типы межмолекулярных взаимодействий: гидрофобные, водородные связи, Ван-дер-Ваальсовы силы, ионные взаимодействия и др. Эти силы возрастают при уменьшении расстояния между молекулами антигена и антитела, особенно если в среде отсутствуют молекулы воды. [3, т. 3 с. 236-237]

2.1. Гидрофобный эффект

Гидрофобность (буквально «боязнь воды») возникает из-за способности воды образовывать водородные связи и отсутствия такой способности у гидрофобных молекул. При внедрении в воду чего-либо гидрофобного сильно падает энтропия, что ведет к росту свободной энергии и, собственно, вытеснению молекул из воды.

Гидрофобные связи возникают между неполярными гидрофобными группами, полностью устраняя их контакт с водой. Они обеспечивают до 50% сродства между антителом и антигеном.

Эффект обладает небольшой энергией: 2 — 25 кДж/моль. Основной вклад во взаимодействие вносит энтропийная составляющая свободной энергии. [4, с. 149-152]

2.2. Ван-дер-Ваальсовы силы

Ван-дер-Ваальсовы силы действуют на небольших расстояниях, возникают в результате взаимодействия внешних электронных оболочек молекул (см. рис. 2.1-1). В них включают силы взаимодействия трех типов: постоянный диполь-постоянный диполь (диполь-дипольное притяжение), постоянный диполь-индуцированный диполь (индукционное притяжение) и мгновенный диполь-индуцированный диполь (дисперсионное притяжение, или лондоновские силы).

По сравнению с ковалентной связью очень слабы, характеризуются энергией 10-20 кДж/моль. Их энергия обратно пропорциональна расстоянию между центрами молекул в

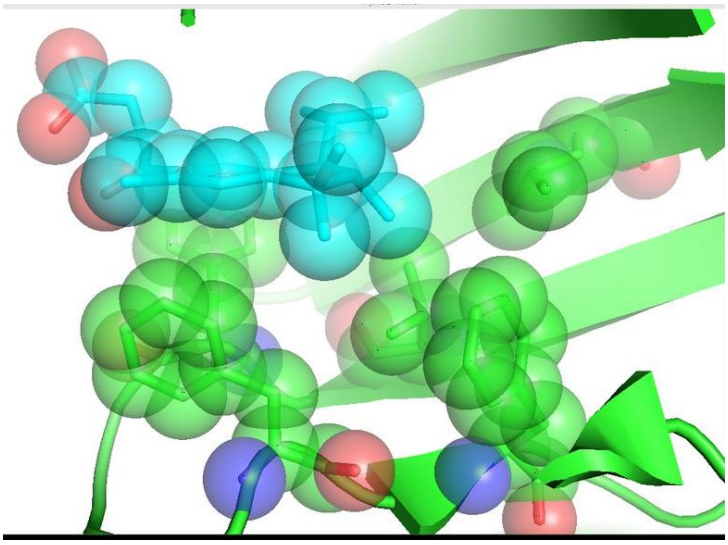


Рисунок 2.1-1 Антигенсвязывающий участок в структуре 1C12

шестой степени. Минимальная энергия обеспечивается при расстояниях между центрами молекул 4-5 Å. [9, с. 33-41], [10, с. 96-100]

2.3. Водородные связи

Водородные связи наблюдаются, когда водород химически связан с одним электроотрицательным атомом, приближаясь при этом к другому электроотрицательному атом. Примерами таких взаимодействий могут служить следующие варианты: O-H:::O, N-H:::O и N-H:::N (см. рис. 2.1-2). Отметим, что C-H группа не образует водородных связей из-за того, что углерод не достаточно электроотрицателен. Кроме того, в отличие от Ван-дер-Ваальсова взаимодействия, водородная связь чувствительна к направлению донорной группы: валентная связь донора прямо смотрит на акцептор. [9, с. 42-53]

Водородная связь на порядок слабее ковалентной связи, но по своей прочности превосходит Ван-дер-Ваальсово взаимодействие. Её энергия составляет от 8 до 40 кДж/моль, зависит от электроотрицательного атома, с которым водородной связью связан водород. Например,8-21 кДж/моль с азотом, 13-29 с кислородом и т.п. Длина водородной связи пропорциональна ее энергии (в молекулах воды составляет примерно 2 Å). [10, с. 106-107]

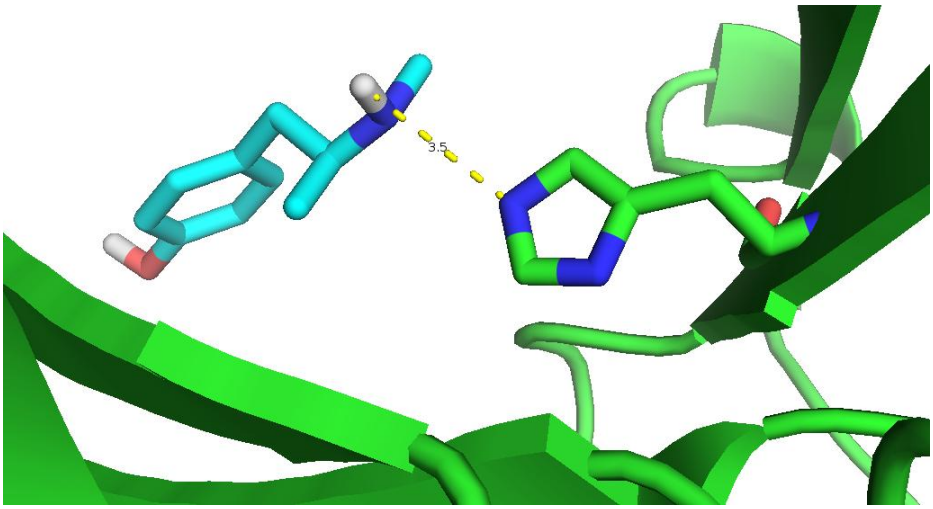


Рисунок 2.1-2 Антигенсвязывающий участок в структуре 4LAS

2.4. Координационные связи

Координационные связи образуются N-, O-, S-атомами белка с двух- или трехвалентными ионами металлов (Fe, Zn, Ca, Mg и др.). Эта связь очень похожа на обычную химическую связь, только электроны поставляются не обоими связывающимися атомами, а лишь одним из них. Пример такой связи между антигеном и антителом можно найти в структуре 1IND, где в гистидин антигенсвязывающего центра связан с ионом индия In3+ (см. рисунок 2.1-3). [9, с. 85-86]

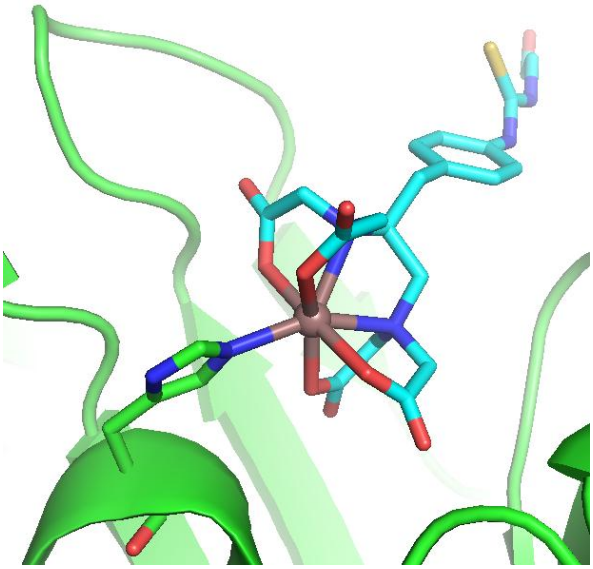


Рисунок 2.1-3 Антигенсвязывающий участок в структуре 1IND

2.6. π-стекинг

π-стэкингом называют нековалентное взаимодействие между органическими соединениями, содержащими ароматические компоненты, в результате которого происходит пересечение π-орбиталей, обеспечивающее выигрыш в энтропии сформировавшегося комплекса в водной среде. Для π-стэкинга характерно параллельное расположение двух ароматических систем на расстоянии 3,5-4 Å друг от друга.

Образование π-стэкинга в комплексах антиген-антитело зависит от размера ароматической системы относительно всей молекулы антигена. Так π-стэкинг эффективно образуется если площадь поверхности, формируемая ароматикой, составляет более трети от общей поверхности лиганда.

Со стороны антитела взаимодействующие аминокислоты часто наблюдаются в позициях H33, H95, L32 и L93. Также следует отметить, что участвующими в π-стэкинге ароматическими остатками в большинстве случаев являются триптофан и тирозин. [11]

Пример π-стэкинга между антигеном и антителом можно наблюдать в структуре 1UB5 (см. рис. 2.1-4).

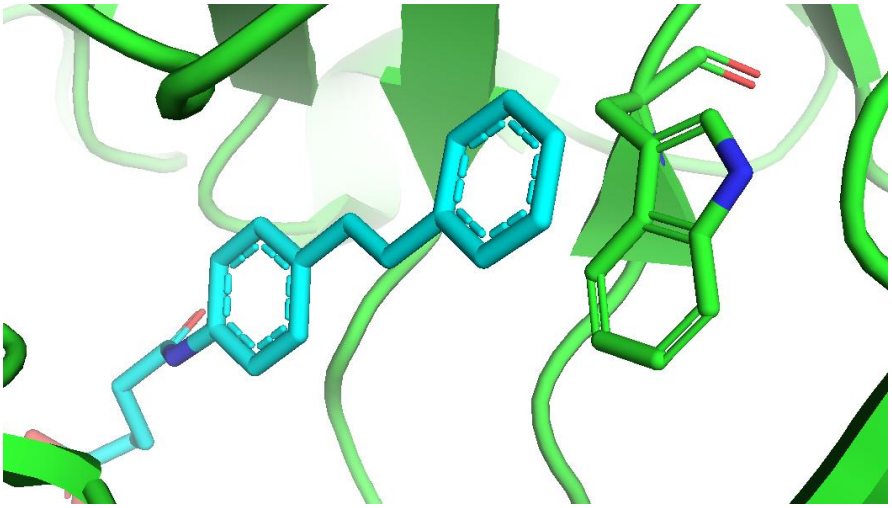


Рисунок 2.1-4 Антигенсвязывающий участок в структуре 1UB5

2.6. π-катионные взаимодействия

Примером сильнейших нековалентных связей являются π-катионные взаимодействия, возникающие между системой, богатой π-электронной плотностью и имеющей частично отрицательный заряд, и катионами (напр., Li+, Na+, N+).

Энергия взаимодействия пар π-катион составляет от 20 до 30 кДж/моль и соотносится с электростатическим потенциалом π-плотности аренов, но электростатическое притяжение не является единственной причиной таких взаимодействий. На силу связей влияет природа катиона и π-системы, а так же геометрия их взаимодействия в пространстве (при перпендикулярном относительном расположении связь сильнее). π-катионную связь можно встретить между антигеном и антителом: она присутствует в структуре 4JN2 между вторичным амином N13 и ароматическим кольцом Tyr L38 (см. рис. 2.1-5). [12]

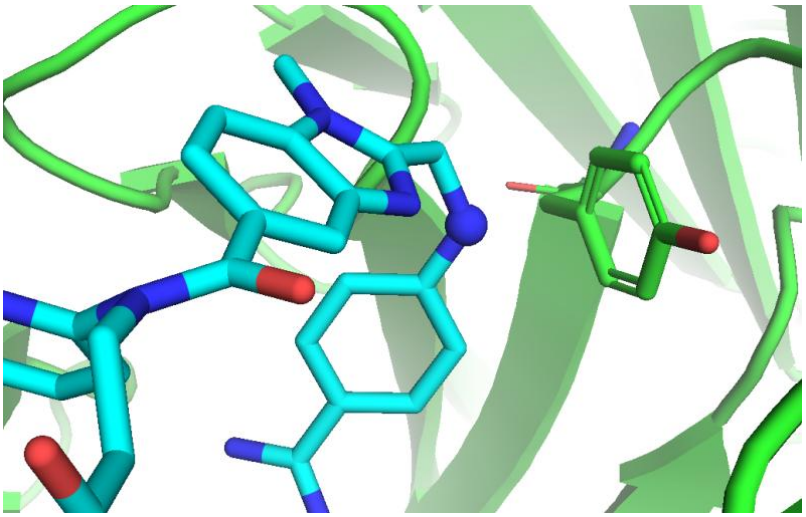


Рисунок 2.1-5 Антигенсвязывающий участок в структуре 1JN2

2.7. Электростатические (ионные) взаимодействия

Принимающие участие в связывании антиген-антитело электростатические взаимодействия возникают между двумя противоположно заряженными ионизированными атомными группами в виде солевых мостиков. По сути, солевой мостик образуют не просто электростатические взаимодействия, но и водородные связи. Солевые мостики являются достаточно сильными взаимодействиями, обладают энергией около 15-20 кДж/моль. Расстояние между остатками, участвующими в построении солевых мостиков, имеет большое значение: оно не должно превышать 4-4,5 Å. [13]

В образовании солевых мостиков со стороны антитела могут участвовать:

- карбоксильная группа (RCOO-) аспарагиновой и глютаминовой кислот, способная взаимодействовать с положительно-заряженными группами в составе антигена, например, с различными аминами или гуанидиновой группой;
- аминогруппа лизина (RNH3+) и гуанидиновая группа аргинина (RNHC(NH2)2+), которые способны связываться с отрицательно-заряженными группами на антигене, например, карбоксильной, фосфатной или сульфатной группами;
- гистидин, тирозин или серин, которые могут иметь заряд лишь при определенных внешних условиях, что следует из значений их pK_a.

На рисунке 2.1-6 в качестве примера изображен солевой мостик, обеспечивающий связь антиген-антитело в структуре 1Q9V.[13], [14]

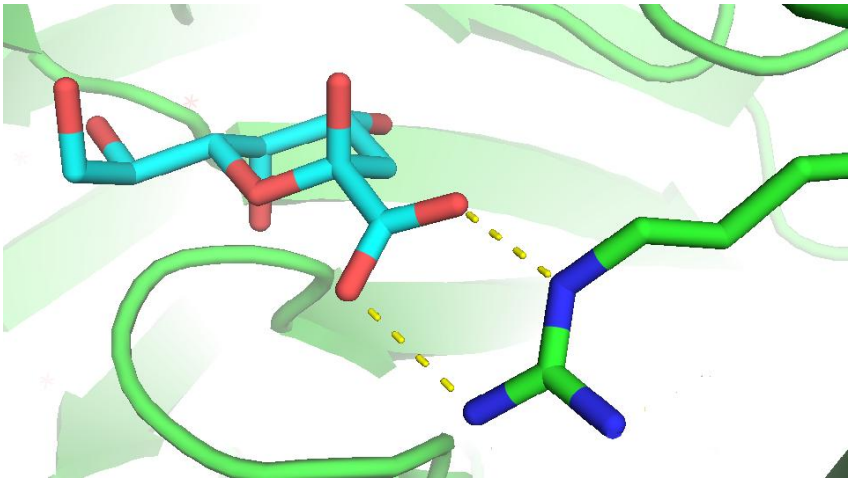


Рисунок 2.1-6 Антигенсвязывающий участок в структуре 1Q9V

Глава 3. Заряженные группы антигенов

В целом молекулы, как правило, заряда не имеют, но в водном растворе они могут распадаться на заряженные части. Так кислоты выступают донорами протонов, распадаясь по реакции:

$HA \rightleftharpoons H+ + A-$

при этом молекула A- будет заряжена отрицательно.

Основания же напротив, выступают акцепторами протонов, и приобретают положительный заряд – BH^+:

$B + H_2O \rightleftharpoons BH^+ + OH^-$

Количественной мерой степени диссоциации кислот и оснований являются соответственно pK_a и pK_b. K_a – константа диссоциации кислот (acids), K_b – константа диссоциации оснований (bases), а оператор p обозначает взятие отрицательного логарифма данных констант:

$Ka = \frac{[H+][A-]}{[HA]}$ $pK_a = -\lg K_a$

$Kb = \frac{[BH+][OH-]}{[B]}$ $pK_b = -\lg K_b$

Ясно, что при этом раствор остается в целом нейтральным, так как процесс диссоциации равновесный, но локально, например, расхождение на достаточное расстояние диссоциировавших H^+ и отрицательно заряженной группы, позволит устроить отрицательный заряд на антигене или антителе.

Для самых слабых кислот pK_a составляет от 2 до 14 (т. е. K_a измеряется от 10^{-2} до 10^{-14}), а для самых слабых оснований pK_b находится в промежутке от 2 до 13 (K_b от 10^{-2} до 10^{-13}). Чем меньше значения pK_a и pK_b, тем сильнее кислота или основание [15, с. 30-31]. Вообще говоря, даже слабые основания или кислоты могут при определенных условиях окружающей среды иметь заряд. Так, при высоком pH (больше 10), что означает недостаток протонов в растворе по сравнению с водой, по принципу Ле Шателье диссоциация пойдет успешнее.

Наш же главный критерий оценки заряженности продиктован физиологическими условиями водной среды, в которой, собственно, находятся антитела и которая имеет значение pH в пределах 7,2-7,4. Таким образом, отрицательно заряженными мы будем считать обладателей pKa с меньшими значениями.

Таблица 2 содержит значения pK_a некоторых групп и позволяет понять, какие из них и почему мы их считаем отрицательно заряженными. Так, фосфатная, сульфатная и карбоксильная группа, которая встречается в частности в аспарагиновой и глутаминовой кислотах, имеют pK_a меньше семи. Гидроксильная группа спиртов под наш критерий не подходит.

В боковых цепях таких аминокислот, как серин и тирозин, содержащиеся гидроксигруппы будут иметь pK_a, близкий по значению к pK_a спиртов и фенола соответственно.

Таблица 2 Значения pKa, соответствующие некоторым группам

Группы	**Значение pK_a**
карбоксильная группа $-COO^-$	3,8
фосфатная группа $-H_2PO_4^-$	2,1
сульфатная группа $-HSO_4^-$	-2,8
гидроксигруппа спиртов $-OH^-$	16-18
гидроксигруппа фенола $-OH^-$	10

Аналогичные рассуждения можно провести и для положительно заряженных групп, основным источником которых будут являться самые разнообразные амины: первичные, вторичные, третичные, связанные с ароматическим кольцом (как у анилина) или входящие в его состав. Именно значения их pK_b представлены в таблице 3.

Таблица 3 Значения pKb, соответствующие различным аминам

Амины	**Значение pK_b**
первичные	3,2-3,4
вторичные	2,7-3,2
третичные	3,1-4,2
связанные с ароматическим кольцом (например, анилин)	9,4

При анализе структур в антигенах часто присутствовала карбоксамидная группа, поэтому на ее свойствах необходимо остановиться дополнительно. Итак, карбоксамиды - амиды карбоновых кислот, имеющие формулу $R\text{-}CO\text{-}N(R_1R_2)$, где R_1 и R_2 — водород или углеводородные радикалы. Примером может служить пептидная связь - связь -CO-NH-, образующаяся при формировании первичной структуры белка путём соединении аминокислот после отщепления от них молекулы воды. [15, с. 36-37]

Электронное строение этой группы таково, что помимо занятости всех валентностей, имеет место значительное сопряжение неподеленной пары электронов азота и π-электронной системы двойной связи C=O. Из-за этого связь углерод-азот имеет частично двойной характер, что сильно снижает основные свойства азота. Поэтому карбоксамидная группа (-CO-NH-) не заряжена.

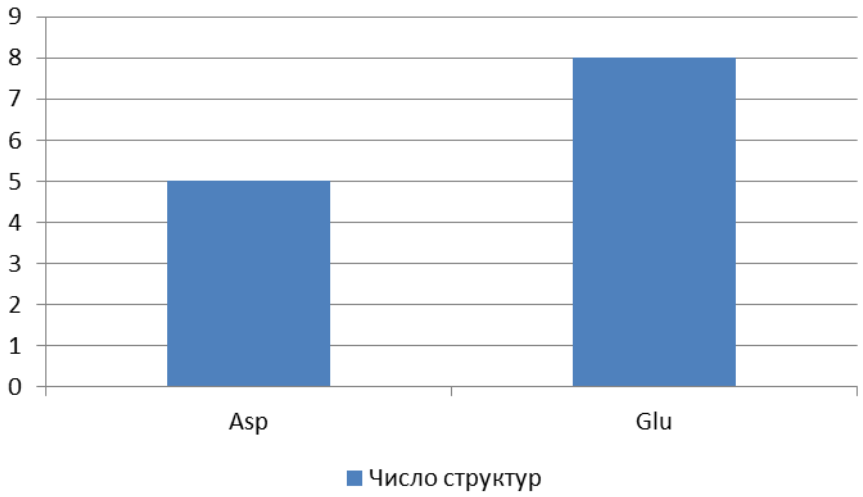
Глава 4. Результаты и обсуждение

Как было сказано ранее, для исследования были использованы малые лиганды, такие как углеводы и гаптены. Они являются достаточно удобным объектом для изучения, так как на их основе можно выявить закономерности связывания антител с положительно заряженными группами малых антигенов (молекулы имеют небольшой размер, часто – небольшое число заряженных групп, как следствие, достаточно удобно наблюдать способы специфического связывания и выявлять закономерности).

В ходе работы было просмотрено 1326 антител в комплексе с антигенами, вследствие чего для более подробного анализа был отобрано 56 комплексов с положительно-заряженными лигандами.

На основе анализа взаимодействия антитела с малыми положительно заряженными лигандами было выяснено, что в большинстве случаев связывание антигенов с антителами происходит через отрицательно – заряженные аминокислоты (аспарагиновую и глутаминовую кислоты). В большинстве случаев это – глутаминовая кислота.

Диаграмма 1 Аминокислоты антитела, связывающие положительно заряженные группы малых лигандов



Данные по количеству избыточных и неизбыточных структур, входящих в состав каждой группы, приведены на Диаграммах 2 и 3. Избыточные структуры – все проанализированные антитела, они могут иметь одинаковую аминокислотную последовательность, то есть быть идентичными по своей структуре. Неизбыточные структуры – выборка антител, имеющих различную аминокислотную последовательность. Анализ такой выборки позволяет обнаружить общие свойства между различными антителами.

Диаграмма 2 Количество структур

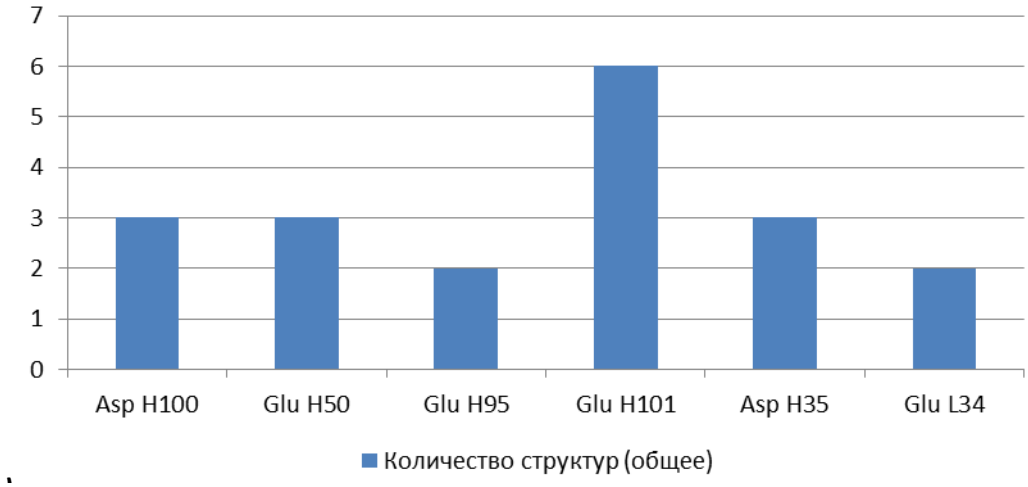
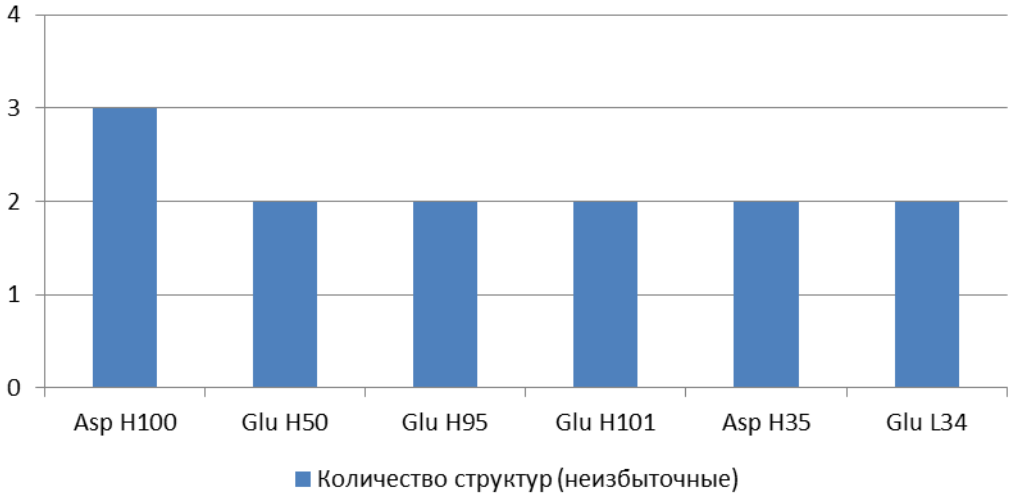


Диаграмма 3 Количество структур (неизбыточные)



Из диаграммы для не избыточной выборки видно, что связывание положительно-заряженных групп лиганда происходит через аминокислоты, которые находятся в различных позициях. Таким образом, отсутствует общая для всех антител позиция, отвечающая за взаимодействие с положительно заряженной группой на антигене.

Позиции, связывающие заряженные группы антигена, расположены как на гипервариабельных, так и на каркасных участках. Можно предположить, что аминокислоты в позициях на каркасе антитела в силу консервативности могли бы образовывать мотив, но сейчас недостаточно данных, чтобы надежно это установить.

4.1. Исключения

В составе малого лиганда, взаимодействующего с антителом 1YNL, присутствует сульфатная группа. Она связывается с погруженным вглубь связывающего кармана антитела остатком His L34, который, в свою очередь, связан с Arg L50 и имеет положительный заряд (см.

рис. 4-1). Здесь наблюдается тенденция связывания отрицательно заряженной группы антигена положительно заряженными аминокислотами антитела. Таким образом, помимо положительно-заряженной группы в данном антигене присутствует отрицательно заряженная сульфатная группа, которая и участвует в формировании ионного мостика.

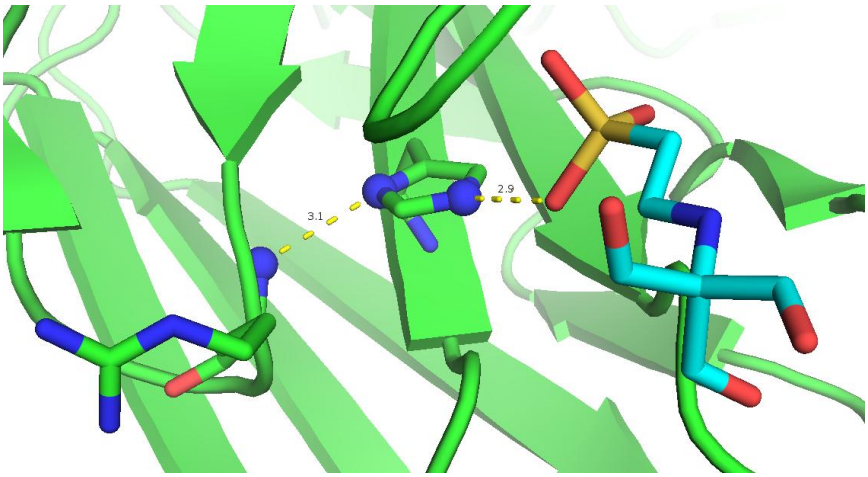


Рисунок 4-1 Антигенсвязывающий участок в структуре 1YNL

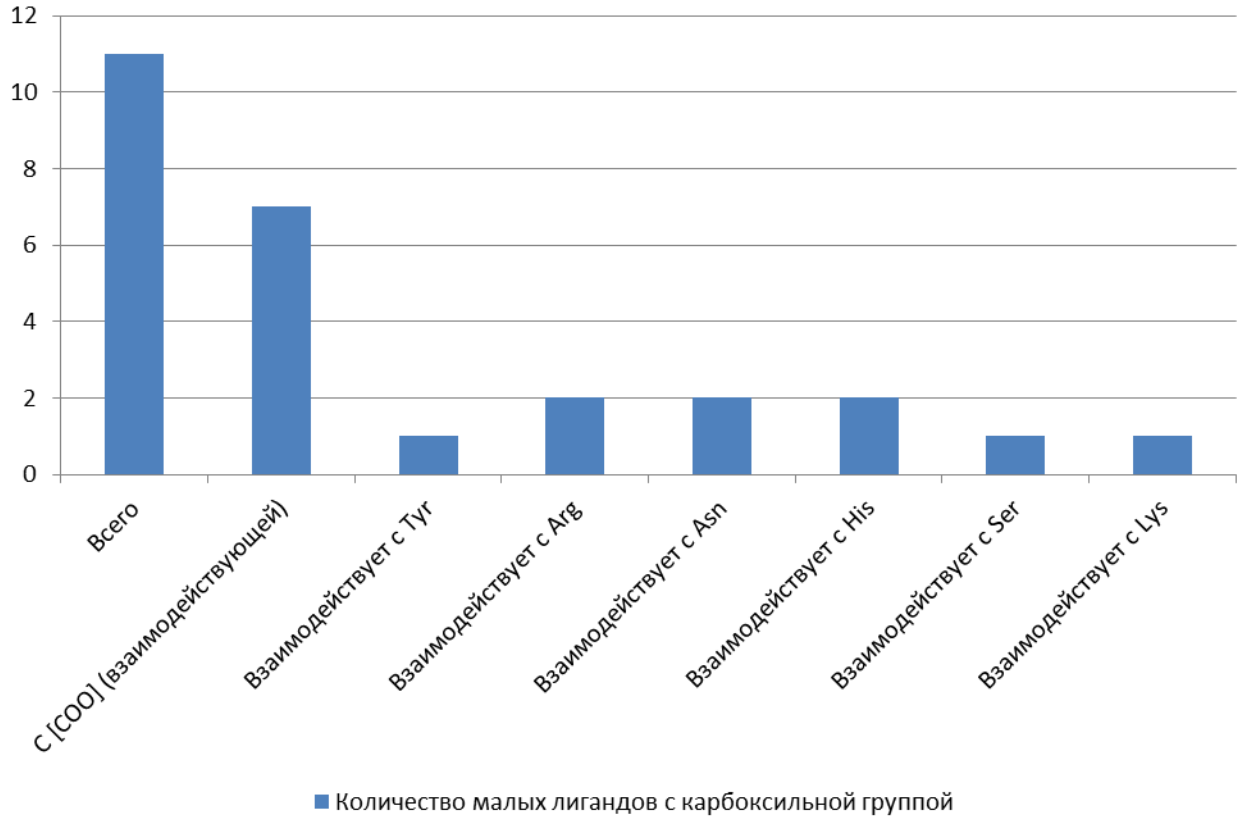
Далее возникает вопрос: есть ли в исследуемых нами малых лигандах отрицательно-заряженные группы и как они влияют на координацию и связывание положительно заряженной группы лиганда антителом.

Для разрешения вопроса мы проверили исследуемые малые лиганды на наличие групп, несущих отрицательный заряд: в составе 11 из них помимо положительно-заряженной присутствовала отрицательно-заряженная карбоксильная группа. Далее мы проверили, взаимодействует ли она с аминокислотными остатками антитела. В результате анализа структур было выяснено, что карбоксильные группы только 7 антигенов из 11 взаимодействуют с аминокислотами антитела, в комплексе с которыми они находятся; остальные 4 лиганда не формировали никаких связей с аминокислотными остатками антител.

Таблица 4 Аминокислотные остатки антител, взаимодействующие с карбоксильной группой лигандов

Структура	Карбоксильная группа	АО 1	АО 2
1Y0L	c17 o18 o19	Tyr A32	-
1YNK	c10 o1 o2	Arg H56	Asn H58
2CGR	c10 o1 o2	Arg H57	Asn H59
3FO1	c16 o17 o18	His A31	-
3FO2	c16 o17 o18	His L31	-
4JN2	c28 o31 o32	Ser B57	-
1ETZ	c10 o1 o2	Lys B58	-

Диаграмма 4 Количество малых лигандов с карбоксильной группой



Карбоксильные группы малых лигандов в комплексе с 1N7M, 1NGW, 3FCT, 4OCX не связываются с гипервариабельными участками антител (не входят в «карман» связывания, расположены далеко от аминокислотных остатков, на расстоянии более 4.0 Å), они не влияют на взаимодействие положительно заряженной группы малого антигена с аминокислотами антитела.

У других лигандов (в комплексе с 1ETZ, 1YNK, 2CGR, 1Y0L, 3FO1, 3FO2, 4JN2) карбоксильная группа взаимодействует с аминокислотными остатками Tyr, Arg, Asn, His, Ser, Lys. Карбоксильные группы, преимущественно, связываются с положительно–заряженными аминокислотами (гистидин, аргинин и лизин).

Карбоксильная группа малого антигена взаимодействует с достаточно удаленным (4.5 Å) остатком Lys H58 антитела 1ETZ. Эта группа не погружена в карман связывания иммуноглобулина. Есть альтернативная 1ETZ структура антитела, где расстояние до лизина больше и подобного взаимодействия не наблюдается (такое связывание не является надежным). Карбоксильная группа антигена не удалена от кармана связывания антитела.

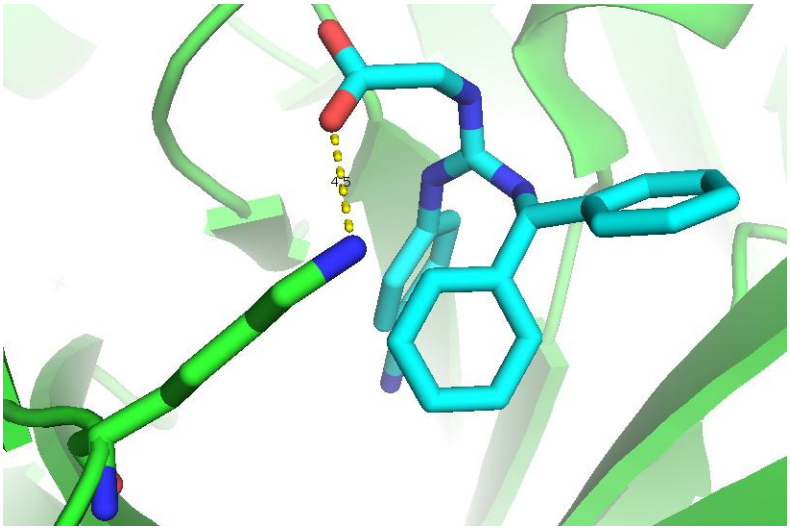


Рисунок 4-2 Антигенсвязывающий участок в структуре 1ETZ

Карбоксильная группа в структуре лигандов, взаимодействующих с антителами 1YNK и 2CGR находится между аргинином (o2 карбоксильной группы взаимодействует с NH2+) и аспарагином (o1 карбоксильной группы взаимодействует с NH2 полярной аминокислоты) антител на расстояниях 3.9 и 2.8 Å соответственно, что обеспечивает стабилизированное связывание. Карбоксильная группа данных антигенов не погружена в карман связывания молекулы антитела.

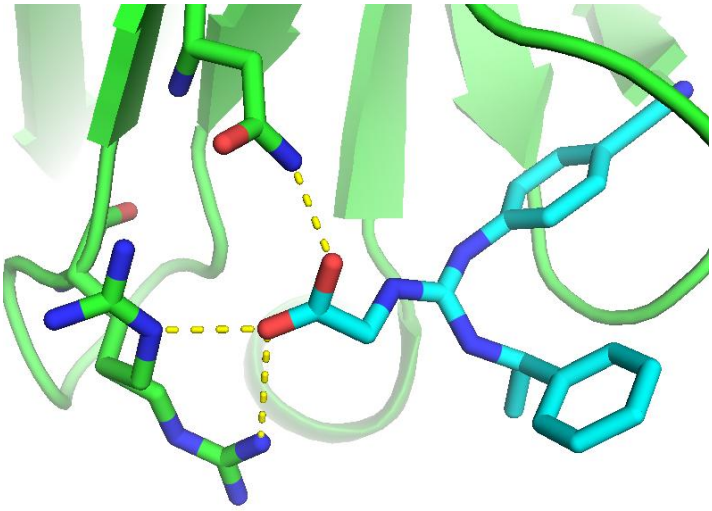


Рисунок 4-3 Антигенсвязывающий участок в структуре

Тирозин (Tyr F100D) в составе антитела 1Y0L взаимодействует с карбоксильной группой своего антигена (расстояние 4.1 Å). Карбоксильная группа данного малого антигена не погружена в карман связывания антитела 1Y0L; а вынесена из него на углеродном «хвосте».

Карбоксильная группа лигандов, находящихся в комплексе с антителами 3FO1 и 3FO2, вынесена за пределы кармана связывания антител на длинном углеродном «хвосте». Карбоксильная группа малых лигандов взаимодействует с His A31 антитела (на расстояниях 2.8 Å в 3FO1 и 3.2 Å в 3FO2) (см. рис. 4-5).

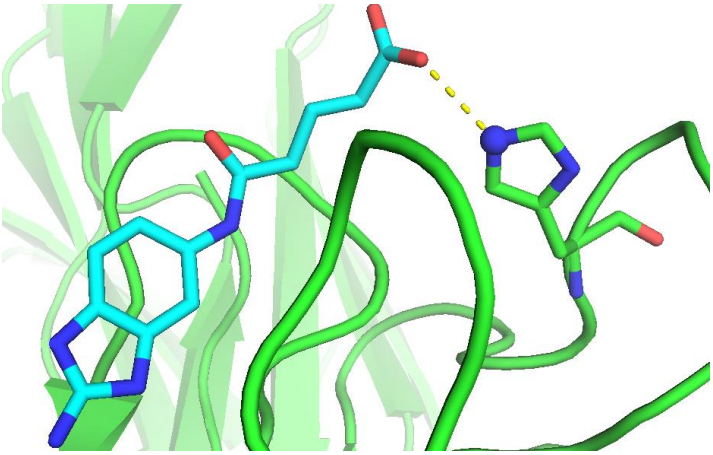


Рисунок 4-5 Антигенсвязывающий участок в структуре 3FO1

Серин, присутствующий в 4JN2, является незаряженной полярной аминокислотой (-R = -CH2OH). Аминокислотный остаток антитела находится на расстоянии 3.4 Å от карбоксильной группы лиганда, осуществляя похожий механизм координирования (как в примере с тирозином). Карбоксильная группа малого антигена вынесена за пределы кармана связывания антитела.

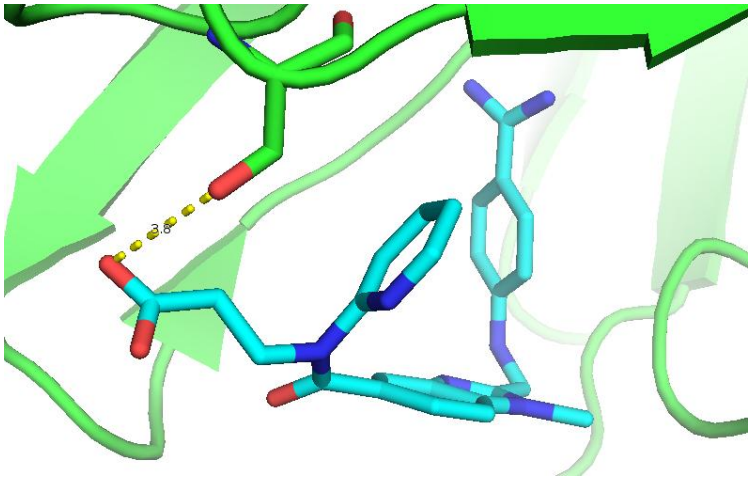


Рисунок 4-6 Антигенсвязывающий участок в структуре 4JN2

В 6 наблюдаемых структурах (1YNK, 2CGR, 1Y0L, 3FO1, 3FO2, 4JN2) карбоксильная группа малого антигена вынесена за пределы связывающего кармана антитела. Она удалена от участка взаимодействия положительно заряженной группы лиганда с аминокислотами гипервариабельного участка антитела и не оказывает влияния на это взаимодействие.

В седьмой структуре 1ETZ карбоксильная группа лиганда не удалена от кармана связывания антитела. Она взаимодействует с лизином антитела и, как мы убедились, это взаимодействие не является устойчивым. Вероятно, это связано с явлением двойного пистэкинга, наблюдаемого в данном случае. Кроме того, это явление встречается и в комплексе антитела 1BAF с его антигеном (см. рис. 4-7 и 4-8).

В структуре 1BAF ароматическое кольцо лиганда взаимодействует с индольными кольцами Trp H100, Trp L90 (1BAF) (см. рис. 4-8). Похожая картина наблюдается в комплексе антитела с антигеном (1ETZ) ароматическое кольцо лиганда также заключено между ароматическими кольцами Tyr B111 и Trp A93.(см. рис. 4-7)

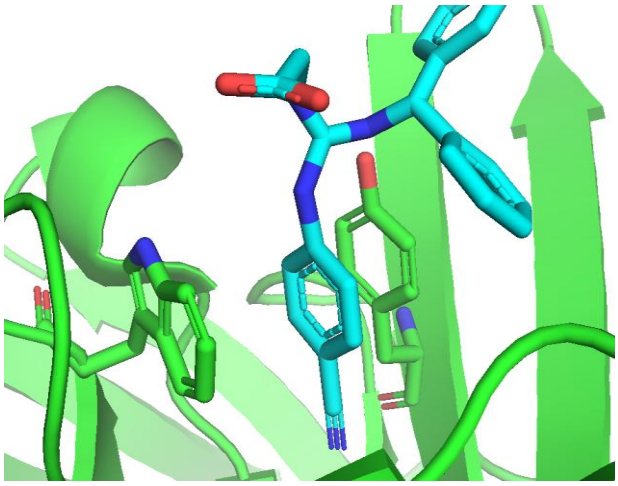


Рисунок 4-7 Двойной π -стэкинг в структуре 1ETZ

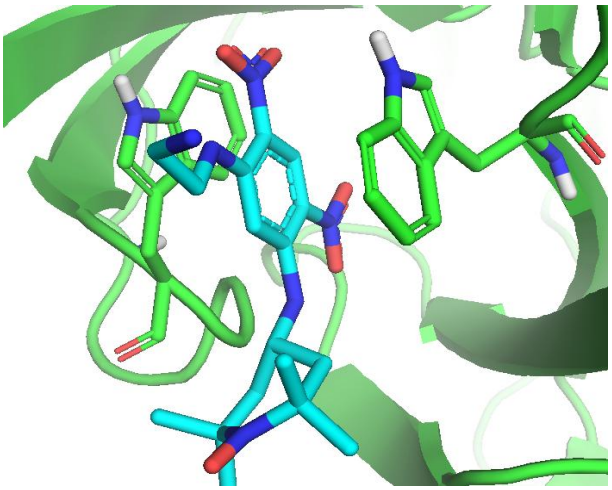


Рисунок 4-8 Двойной π -стэкинг в структуре 1BAF

Вероятно, координирование малого лиганда двойным пи-стэкингом является более выгодным, чем электростатические взаимодействия (взаимодействие заряженных аминокислот антител с заряженными группами малых лигандов). Происходит взаимодействие пи-электронных облаков, за счет чего координирование получается достаточно устойчивым. Именно поэтому взаимодействие карбоксильной группы лиганда с лизином антитела в структуре 1ETZ является случайным событием.

Выводы:

- Положительно заряженные группы малых лигандов в большинстве случаев взаимодействуют с антителом через отрицательно – заряженные аминокислоты (глутаминовая и аспарагиновая кислоты)
- Позиции, связывающие заряженные группы антигена, расположены как на гипервариабельных, так и на каркасных участках
- Двойной пи-стэкинг, по-видимому, является более выгодным способом связывания антигена с антителом, чем электростатическое взаимодействие положительно-заряженной группы антигена и отрицательно-заряженного остатка антитела
- При наличии в антигене с положительно-заряженной группой также отрицательно-заряженных групп, в формировании электростатического взаимодействия положительно-заряженная группа может не участвовать, если участвует отрицательно-заряженная

Список используемой литературы

[1] Berman H. M. et al. The protein data bank //Nucleic acids research. – 2000. – Т. 28. – №. 1. – С. 235-242.

[2] DeLano W. L. The PyMOL molecular graphics system. – 2002.

[3] Альбертс Б. и др. Молекулярная биология клетки. В 3 т //Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис, М. Рэфф–М.: Мир. – 1994.

[4] Ройт А. Иммунология./Ройт А., Бростофф Д., Мейл Д //перевод с англ.–М.: Мир. – 2000.

[5] Chothia C., Lesk A. M. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins //Journal of molecular biology. – 1987. – Т. 196. – №. 4. – С. 901-917.

[6] North B., Lehmann A., Dunbrack R. L. A new clustering of antibody CDR loop conformations //Journal of molecular biology. – 2011. – Т. 406. – №. 2. – С. 228-256.

[7] Martin A. C. R., Thornton J. M. Structural families in loops of homologous proteins: automatic classification, modelling and application to antibodies //Journal of molecular biology. – 1996. – Т. 263. – №. 5. – С. 800-815.

[8] Петров А., Курсовая работа «Анализ роли мотива ArgH52–GluH61 в связывании антигенов антителами», 2014

[9] Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. Физика белка. – М. : Ун-т Кн. дом, 2002.

[10] Ахметов Н. С. Общая и неорганическая химия: учебник для студентов химико-технологических специальностей вузов/НС Ахметов.

[11] Arzhanik V. et al. Interaction of antibodies with aromatic ligands: the role of π-stacking //Journal of bioinformatics and computational biology. – 2010. – Т. 8. – №. 03. – С. 471-483.

[12] Ma J. C., Dougherty D. A. The cation-π interaction //Chemical reviews. – 1997. – Т. 97. – №. 5. – С. 1303-1324.

[13] Kumar S., Nussinov R. Close-range electrostatic interactions in proteins //ChemBioChem. – 2002. – . 3. – №. 7. – С. 604-617.

[14] Tsumoto K. et al. Role of Salt Bridge Formation in Antigen-Antibody Interaction ENTROPIC CONTRIBUTION TO THE COMPLEX BETWEEN HEN EGG WHITE LYSOZYME AND ITS MONOC-LONAL ANTIBODY HyHEL10 //Journal of Biological Chemistry. – 1996. – Т. 271. – №. 51. – С. 32612-32616.

[15] Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. – М. : НИИ Биомед. химии РАМН, 1999.