

УДК 577.112.012.7:616-097

© Коллектив авторов

## АНАЛИЗ МОДЕЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ АНТИТЕЛ ПРОТИВ 2,4-ДИХЛОРОФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

*О.В.Колясников, В.Г.Григоренко, А.М.Егоров*

МГУ им. М.В.Ломоносова, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, 119899, Москва, Ленинские горы;  
тел.: (095)-939-34-07; факс: (095)-939-27-42; эл.почта: olkol@enz.chem.msu.ru,

По данным об аминокислотной последовательности методом гомологии построены пространственные структуры для трех антител, специфичных к пестициду 2,4-дихлорофеноксиуксусной кислоте (2,4-D). Во всех случаях была получена сходная структура сайта связывания. Наиболее важным остатком во взаимодействии с 2,4-D является тирозин, служащий "стенкой" сайта связывания и предположительно образующий  $\pi$ -стекинг взаимодействие с ароматическим ядром лиганда. Другие стенки полости образованы гидрофобными остатками. На входе в полость в 2-х из 3-х структур находятся остатки глутаминовой кислоты. На базе результатов докинга 2,4-D и его аналогов качественно объяснены данные по кросс-реактивности. По результатам моделирования предлагается замена глутаминовой кислоты H50 на входе в сайт связывания на серин или лизин для устранения электростатического отталкивания с лигандом и предположительно улучшения его связывания. Соответствующие мутации были проверены виртуальным мутагенезом на модельной структуре.

**Ключевые слова:** антитела, моделирование, структура, 2,4-D, 2,4-дихлорофеноксиуксусная кислота.

**ВВЕДЕНИЕ.** Одной из ключевых проблем современной биологии является проблема молекулярного распознавания, в частности, при взаимодействии антиген-антитело, отличающемся высокой селективностью и специфичностью. Для понимания фундаментальных основ этого взаимодействия в каждом конкретном случае необходим анализ на уровне структуры комплекса антиген-антитело. Современные методы экспериментального определения структур белков (рентгеноструктурный анализ, ЯМР, и т.д.) дороги и требуют значительных затрат времени. Характерной чертой современной структурной биологии является постоянно растущий разрыв между числом известных первичных последовательностей белков и числом расшифрованных пространственных структур. Так, сейчас известны сотни тысяч генов различных белков, в то время как число расшифрованных белковых структур измеряется тысячами (17197 на июль 2002 в PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/>, [1])), причем число оригинальных структур существенно меньше. Заполнить этот разрыв возможно с помощью методов молекулярного моделирования, в первую очередь, моделирования по гомологии. Поэтому, в последние годы всё большее внимание уделяется компьютерному моделированию белковых молекул и исследованию механизмов их функционирования [2]. Сочетание анализа модельных структур с сайт-направленным мутагенезом создает необходимую основу для рационального изменения специфичности антител.

### АНАЛИЗ МОДЕЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ АНТИТЕЛ

Целью данной работы было моделирование структуры антител против широко распространенного пестицида 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-D), биодegradация которого приводит к образованию диоксинов [3]. В ходе работы был проведен анализ имеющихся пространственных структур антител, на основании которого были построены молекулярные модели трех антител против 2,4-D и изучена корреляция между результатами молекулярного докинга 2,4-D и его аналогов с экспериментальными данными по кросс-реактивности антител. Предлагается подход к изменению специфичности антитела с использованием сайт-направленного мутагенеза.

**МЕТОДИКА.** *Моделирование структуры антител и лигандов.* Ранее были получены гибридные линии E2/B5, E2/G2, E4/C2 и C2/G3/D6. На их основе были наработаны моноклональные антитела против 2,4-D [4]. Гены данных антител были секвенированы [5] и их последовательность приведена на рис.1. Модели для переменных доменов антител линий E2/B5, E4/C2 и C2/G3/D6 были построены методом гомологии с использованием пакета InsightII.95 (BioSym Inc., San-Diego, CA, USA) на рабочей станции SGI Indy R4400. Сравнение последовательностей осуществляли с помощью программы FASTA 3.0 [7]. Отнесение структур гипервариабельных петель к каноническим классам [8] производилось автоматически с помощью программы Martin и Thornton ([9], <http://www.bioinf.org.uk/abs/>).

Моделирование структуры проводили в модуле Homology пакета InsightII.95. Было выделено два участка структуры. Первый из них включал всю легкую цепь и остатки 1-92, 103-113 тяжелой, что соответствует структурно консервативному b-каркасу антител и 5 из 6 гипервариабельным петлям (кроме CDR H3). Вторым включал остатки 93-102 тяжелой цепи, соответствующие CDR H3, из которых остатки 93-95 и 100-102 соответствовали ближней или "torso" области CDR H3. Каждый участок моделировался на основе своей матричной структуры (табл.1).

*Таблица 1.* Набор канонических классов для гипервариабельных петель целевых антител и выбранные матричные структуры. TNB - "torso-non-bulged", TB - "torso-bulged".

CDR	Канонические классы для петель модельных структур		
	E2/B5, E4/C2	C2/G3/D6	
CDR L1	2/11A		
CDR L2	1/7A		
CDR L3	1/9A		
CDR H1	1/10A		
CDR H2	2/10A		
1-я матричная структура	2RCS [18]		1JHL [19]
CDR H3	TB	TNB	TB
2-я матричная структура	1CGS [20]	1AXT [21]	2FBJ [22]

Дисульфидные связи между консервативными остатками цистеина H22 и H92, а также L23 и L88 замкнуты вручную в модуле Builder пакета InsightII.95.

Полученные структуры были оптимизированы методами молекулярной механики, как описано ниже. Полную структуру каждого антитела подвергали предварительной регуляризации путем минимизации энергии (500 шагов) в вакууме. Затем, молекула белка была окружена приблизительно 5000 молекулами воды и полную систему в режиме PBS (periodically bound system) оптимизировали минимизацией энергии (500 шагов), молекулярной динамикой (5000 фс) при постоянной температуре (T = 300 K) и завершающей минимизацией энергии (500 шагов).

В построенную таким образом модель вносили мутации путем замещения боковой цепи глутаминовой кислоты H50 на целевую боковую цепь. Затем структуру оптимизировали вышеизложенным способом.

Все процедуры производили в силовом поле cvff (consistent valence forcefield, [10]).

Модели лигандов сконструированы в модуле Builder пакета InsightII.95 и оптимизированы с помощью программы MORAC.

**Докинг.** Для докинга лигандов был применен алгоритм докинга Монте-Карло, реализованный в модуле Docking пакета InsightII.95. Он состоял в случайном изменении положения (3 переменных), ориентации (3 переменных) и конформации (до 4 переменных) лиганда с последующей минимизацией энергии (300 шагов) системы лиганд/рецептор в вакууме.

Энергию взаимодействия лиганда с антителом рассчитывали как разность между суммой энергий свободных антитела и лиганда и энергией комплекса лиганд/антитело в вакууме.

Структуры с наибольшей расчетной энергией взаимодействия между антителом и лигандом были дополнительно оптимизированы методами молекулярной механики, как описано выше для структуры антитела.

**Определение констант диссоциации меченого лиганда и свободного лиганда.**

В качестве меченого лиганда были использовали конъюгаты 2,4-D и 2-метил-4-хлорфеноксиуксусной кислоты (МСРА) с флуоресцеином, предоставленные С.А.Ереминым. На стадии определения константы диссоциации комплекса антитела с меченым антигеном использовали раствор моноклональных антител E2/B5 в концентрациях от 285 нМ до 34 пМ и раствор конъюгата с концентрацией 5 нМ. Концентрации определяли спектрофотометрически по поглощению на длинах волн 280 нм (антитело) и 500 нм (конъюгат). Смешивали по 500 мкл каждого раствора. Затем проводили измерение поляризации флуоресценции на поляризационном флуориметре TDX ("Abbott Laboratories", США). Определение константы диссоциации проводили по формуле

$$K_d(Tr) = 2 \cdot [Ab]_{измер} - 0.5 \cdot [Tr]_i,$$

где  $[Ab]_{измер}$  определяли при 50% связывании, а  $[Tr]_i$  - концентрация конъюгата.

На стадии определения константы диссоциации лигандов смешивалось 10 мкл пестицида в разведениях от 450 мкМ до 45 нМ, 495 мкл моноклональных антител линии E2/G2 в разведении 8,5 нМ (что соответствует концентрации при 50% связывании в предыдущем эксперименте) и 495 мкл конъюгата в разведении 5 нМ. Затем проводилось измерение поляризации флуоресценции. Определение константы диссоциации проводили по формуле

$$K_d(Ag) = \frac{0.3 \cdot K_d(Tr) \cdot ([Ag]_i - 2 \cdot [Ab]_{измер} + 0.3 \cdot K_d(Tr) + 0.25 [Tr]_i)}{2 \cdot [Ab]_{измер} - 0.3 \cdot K_d(Tr) - 0.25 [Tr]_i},$$

где  $[Ag]_i$  - концентрация антигена при 50% связывании, а  $K_d(Tr)$  - константа диссоциации меченого лиганда.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Анализ аминокислотных последовательностей. Последовательности антител против 2,4-D (рис.1) можно разделить на три группы: последовательности E2/B5 и E2/G2 оказались идентичными, E4/C2 - весьма близкой к ним (идентичность составила 85%), а C2/G3/D6 - относительно далекой (идентичность - 65% в сравнении с E2/B5 и 63% - с E4/C2). Это может быть объяснено тем фактом, что антитела E2/B5, E2/G2 и E4/C2 были получены при использовании в качестве гаптена 2,4-D, в то время как антитело C2/G3/D6 было выработано против 2-метил-4-хлорфеноксиуксусной кислоты (МСРА) (хотя и связывает 2,4-D лучше, чем МСРА). Таким образом, мы рассматриваем три различных последовательности антител - E2/B5, E4/C2 и C2/G3/D6.

Антитела принадлежат к в значительной степени консервативным по своей структуре белкам, и при моделировании по гомологии всегда возможно подобрать матричную структуру со степенью гомологии не менее чем 70%. Для многих белков этого достаточно для моделирования с аккуратностью достигающей уровня рентгеноструктурного анализа или ЯМР [11].

## АНАЛИЗ МОДЕЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ АНТИТЕЛ

```

1      11     21     31     41     51
>E2B5_VH QVQLQQSGPE LVKPGTSVKM SCKAS[REDACTED] WVKQR TGQGLEWIG[REDACTED] YPGRGSIYYN
>E2G2_VH QVQLQQSGPE LVKPGTSVKM SCKAS[REDACTED] WVKQR TGQGLEWIG[REDACTED] YPGRGSIYYN
>E4C2_VH QVQLQQSGPE LVKPGDSVKM SCKAS[REDACTED] WVKQR SQQGLEWIG[REDACTED] YPGRGSIYYN
>C2G3D6_VH QVQLQQSGAE LVKPGA AVKL SCKAS[REDACTED] WVRQR PGQGLEWIG[REDACTED] INPRNGETNN

      CDR H1      CDR H2
61     71     81     91     99
EKFRDKATLT VDKSSTTVYM QLSSLTSEDSAVY FC[REDACTED] WGQG TTVTSS
EKFRDKATLT VDKSSTTVYM QLSSLTSEDSAVY FC[REDACTED] WGQG TTVTSS
ENFRGKATLT ADISSNIAHM QLSSLTSDSAVY IC[REDACTED] WGQG TTVTSS
EKFKSKATLT VDTSSSTAYM QLSSLTSEDSAVY HC[REDACTED] WGQG TTVTSS

      CDR H3
1      11     21     31     41     51
>E2B5_VL DIELTQSPSS LSASLGERVS LTC[REDACTED] WFQQES DGTIKRLIY[REDACTED] GVPK
>E2G2_VL DIELTQSPSS LSASLGERVS LTC[REDACTED] WFQQES DGTIKRLIY[REDACTED] GVPK
>E4C2_VL DIELTQSPSS LSASLGERVS LTC[REDACTED] WLQQEP DGTIKRLIY[REDACTED] GVPK
>C2G3D6_VL DIVMTQAQKI MSTSVGDRVS VTC[REDACTED] WYQQKP GQSPKPLIY[REDACTED] GVPD

      CDR L1      CDR L2
61     71     81     91     101
RFSGRSRSGD YSLTISSLES EDFVDYYC[REDACTED] FGG GTKLEIKR
RFSGRSRSGD YSLTISSLES EDFVDYYC[REDACTED] FGG GTKLEIKR
RFSGRSRSGD YSLTISSLES EDFVDYYC[REDACTED] FGG GTKLEIKR
RFTGSGSGTD FTLTINNVS EDLAEYFC[REDACTED] FGG GTKLEIKR

      CDR L3

```

Рисунок 1.

Последовательности антител против 2,4-D [6]. Нумерация антител приведена в соответствии с [7].

Структуру переменных доменов антитела можно грубо охарактеризовать, как сочетание протяженного консервативного каркаса из  $\beta$ -слоев и шести относительно небольших гипервариабельных петель (или CDR - complementary determining regions). Способность антител связывать молекулы любых антигенов с высокой аффинностью происходит из высокой вариабельности данных поверхностных петель. Это свойство создает дополнительные трудности в моделировании, которые в большей части случаев удается разрешить с помощью подразделения структур CDR на канонические классы [8,9]. Данное утверждение выполняется, по крайней мере, для 5 из 6 CDR (кроме CDR H3). Последовательность CDR H3 формируется рекомбинацией трех исходных сегментов генов - VH, D и JH. Благодаря этому, CDR H3 имеет максимальное разнообразие в последовательностях антител. Исходя из последних данных, в большинстве случаев возможно предсказать, по меньшей мере, структуру части CDR H3, ближней к каркасу, так называемой "torso"-области [12,13], к которой относятся остатки 93-95 и 101-102 тяжелой цепи антител. Именно, на основе первичной структуры, согласно существующей теории, возможно отнести укладку "torso" к "torso- $\beta$ -bulged" (или "kinked") конформации или "torso-non- $\beta$ -bulged" (или "extended") конформации. Данные конформации отличаются наличием или отсутствием в "torso"-области характерного изгиба полипептидной цепи (" $\beta$ -bulge" [12], "kink"[13]).

Ключевыми аминокислотными остатками для отнесения "torso"-области к той или иной конформации являются остатки в позициях H94 и H101. Теория предсказывает конформацию "torso" области CDR H3 исходя из наличия или отсутствия аргинина или лизина в позиции H94 и аспарагиновой кислоты в позиции H101. Именно, если в позиции H94 находится аргинин либо лизин, теория предсказывает "torso-bulged" конформацию CDR H3, в случае отсутствия Arg/Lys H94 и присутствия Asp H101 наблюдается "torso-non-bulged" конформация [12]. Пока что в литературе не рассмотрен случай с отсутствием и Arg/Lys H94, и Asp H101. В гене, кодирующем тяжелую цепь антител, позиция 94 происходит из сегмента VH, а позиция 101 - из сегмента JH. В табл. 2 приведен набор данных генов для человека и для мыши. Исходя из приведенных данных, менее 2% антител не содержат Arg/Lys H94 and Asp H101. На сегодняшний день известно 14 структур антител данного типа (табл.3); 7 из них имеют "torso-bulged" конформацию, остальные 7 - "torso-non-bulged".

Таблица 2. Набор исходных генов, кодирующих "torso"-область CDR H3.

Тип исходного гена	Общее число генов	Число генов, не кодирующих R/K H94 или D H101	Ссылка
VH, человек	51	5	[14]
JH, человек	6	1	[15]
VH, мышь	44	2	[16]
JH, мышь	4	1	[17]

Таблица 3. Последовательности всех антител с известной пространственной структурой и отсутствием Arg/Lys в позиции H94 (выделена курсивом) и Asp в позиции H101 (выделена подчеркиванием) по данным на июль 2002 г.

Длина	PDB код	Последовательность CDR H3	Наличие лиганда	Конформация "torso"- области.
9	1EMT	CATS-----SAYWG		TNB
10	1KTR	CE <u>sq</u> -----SGAYWG	L	TB
10	2RCS	CAS <u>y</u> -----YGIYWG		TB
10	1AJ7	CAS <u>y</u> -----YGIYWG	L	TB
11	1SM3	CTG <u>vg</u> -----QFAYWG	L	TB
11	1F3D	CAM <u>dy</u> -----DGVYWG	L	TNB
12	1AXT	CKI <u>yfy</u> -----SFSYWG		TNB
12	1JHK	CATW <u>gg</u> -----NSAYWG		TNB
12	1JGL	CATW <u>gg</u> -----NSAYWG	L	TNB
13	1F8T	CAS <u>y</u> DD-----YTWFTYWG		TNB
13	1F90	CAS <u>y</u> DD-----YTWFTYWG	L	TNB
14	1DLF	CTGI <u>yy</u> -----HYPWFAYWG		TB
14	2DLF	CTGI <u>yy</u> -----HYPWFAYWG		TB
14	43C9	CVS <u>gy</u> -----GGDRFSYWG		TNB
14	43CA	CVS <u>gy</u> -----GGDRFSYWG	L	TNB
14	1F11	CAM <u>dy</u> G-----STYGFAYWG		TB
15	12E8	CNAG <u>hdy</u> -----DRGRFPYWG		TB
15	1C12	CVTSL <u>tw</u> -----LLRRKRSYWG	L	TNB
22	1GC1	CAGVYEGE <u>adegey</u> DNNGFLKHWG	L	TB
22	1G9M	CAGVYEGE <u>adegey</u> RNNGFLKHWG	L	TB
22	1G9N	CAGVYEGE <u>adegey</u> RNNGFLKHWG	L	TB

TB - "torso-bulged" conformation, TNB - "torso-non-bulged"

Длина CDR H3 в последовательностях E2/B5 и E4/C2 составляет 10 аминокислотных остатков, в случае C2/G3/D6 - 12. Таким образом, мы можем предполагать, что основной вклад в конформацию CDR H3 вносит "torso"-область, так как дальняя часть CDR H3 относительно коротка и ее конформация зависит от "torso".

В случае C2/G3/D6 в позициях H94 и H101 присутствуют Arg и Asp соответственно. Следовательно, CDR H3 в C2/G3/D6 имеет "torso-bulged" конформацию. В случае же E2/B5 и E4/C2 мы имеем Thr/Ala H94 и Ala H101. Как описано выше, мы не можем однозначно предсказать конформацию CDR H3 для подобной последовательности. Поэтому для данных антител модельные структуры были построены в обоих вариантах конформации "torso"-области CDR H3.

Таким образом, каждую структуру моделировали на основе двух матричных. Первая - для каркаса антитела и пяти из шести CDR - выбиралась с требованием совпадения длины и канонических классов для данных петель, а также максимальной близости по первичной последовательности. Вторая - с требованием совпадения длины и, как обсуждалось выше, конформации "torso". Используемые нами матричные структуры приведены в табл. 1.

Моделирование пространственной структуры антител. В результате моделирования укладки мы получили пять структур переменных фрагментов

### АНАЛИЗ МОДЕЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ АНТИТЕЛ

антител - по две для E2/B5 и E4/C2 и одна для C2/G3/D6. Как обсуждалось выше, укладка полипептидной цепи для них полностью заимствована из матричных структур. Основная задача состояла в оптимизации укладки боковых цепей в полученных структурах. Для этого каждая структура была подвергнута минимизации энергии в вакууме и циклу из минимизации энергии и молекулярной динамики в водном окружении.

Все результирующие структуры, как и ожидалось, полностью сохранили свою укладку и различия наблюдались лишь в положении боковых цепей. Проверка распределения торсионных углов полипептидной цепи показала, что для большинства остатков (68-70%) торсионные углы попадают в зону "разрешенных областей", остатки вне этих областей относятся к зоне поверхностных петель, образуя повороты цепи.

В трех из пяти структур на поверхности гипервариабельных петель наблюдалась четкая полость, по размерам соответствующая величине гаптена. По своей архитектуре полость гомологична для всех трех вариантов. Мы полагаем, что данная полость и является сайтом связывания лиганда. Остатки, образующие полость, перечислены в табл. 4.

Таблица 4 Остатки, образующие сайты связывания в модельных антителах.

CDR	E2/B5	E4/C2	C2/G3/D6
CDR H1	<i>Val</i> <u>H33</u> <i>Ser</i> <u>H35</u>	<i>Phe</i> <u>H32</u> <del><i>Leu</i> <u>H33</u></del> <i>Ser</i> <u>H35</u>	
CDR H2	<i>Glu</i> <u>H50</u>	<i>Glu</i> <u>H50</u>	█
CDR H3	<i>Tyr</i> <u>H95</u>	<i>Tyr</i> <u>H95</u> <i>Glu</i> <u>H97</u>	<i>Thr</i> <u>H98</u> <i>Tyr</i> <u>H99</u> <i>Tyr</i> <u>H100</u> <i>Phe</i> <u>H100A</u>
CDR L1		<i>His</i> <u>L34</u>	<i>Asn</i> <u>L32</u> <i>Ala</i> <u>L34</u>
CDR L2		<i>Arg</i> <u>L46</u> <i>Tyr</i> <u>L49</u>	█ <i>Tyr</i> <u>L53</u>
CDR L3	█ <i>Ala</i> <u>L92</u> <i>Phe</i> <u>L94</u> <i>Tyr</i> <u>L96</u>	<i>Tyr</i> <u>L91</u>	█

Данная полость была отмечена в варианте с "torso-non-bulged" конформацией CDR H3 для антител E2/B5 и E4/C2, а также и для структуры антитела C2/G3/D6. Это позволяет выдвинуть предположение о том, что для антител E2/B5 и E4/C2 характерна "torso-non-bulged" конформация CDR H3.

На рис. 2 приведен вид полости для антитела E2/B5. Она имеет диаметр около 5 Å и глубину до 9Å. Полость находится на стыке между гипервариабельными петлями H3 и L3, подобно большинству известных структур антител. Полость имеет гидрофильное дно с предполагаемыми прочно связанными молекулами воды и полярный остаток на входе в полость.

Ранее, по данным анализа 45 структур комплексов антиген/антитело [23], был выделен ряд позиций в структуре гипервариабельных петель антител, аминокислотным остаткам в которых принадлежит основной вклад в связывании антигена. Большая часть остатков сайта связывания в построенных нами моделях (табл.4) относится к этим позициям, что согласуется с данным анализом.

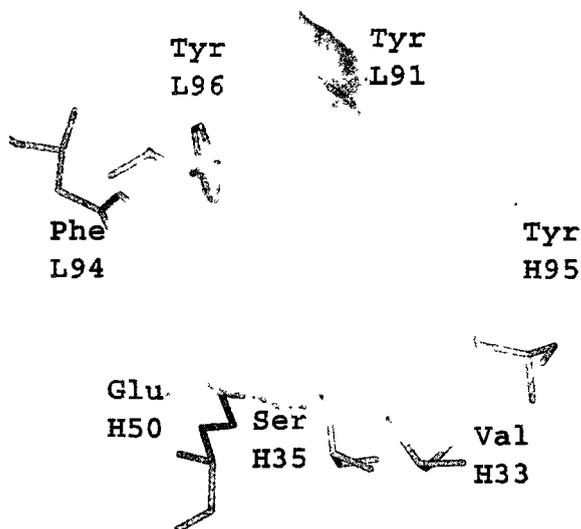


Рисунок 2.  
Поверхность полости связывания антитела E2/B5.

*Докинг.* Анализ пространственной структуры комплекса антиген/антитело. Алгоритм докинга состоял в случайном ограниченном изменении начальных положения, ориентации и конформации лиганда с последующей минимизацией энергии в вакууме.

Начальные ориентации для 2,4-D и его аналогов были выбраны на основе геометрии сайта связывания в модельной структуре антител с учетом расположения связи с несущим белком в исходном иммуногене. Две ориентации были проверены. Их общие свойства: а) параллельность между ароматическим кольцом лиганда и тирозином H95 (L91 в случае C2/G3/D6); б) направление карбоксильной группы лиганда от сайта связывания. Ориентации различались в направлении 2-го атома хлора по отношению к CDR H2.

Для каждой построенной модели антитела был проведен докинг 2,4-D и его аналогов, во всех случаях результаты оказались сходными (рис.3-5). Для сравнения, кросс-реактивность антитела E2/B5 анализировали методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА). Результаты и аналогичные данные, полученные в работе [4] методом иммуноферментного анализа (ИФА), приведены в табл. 5.

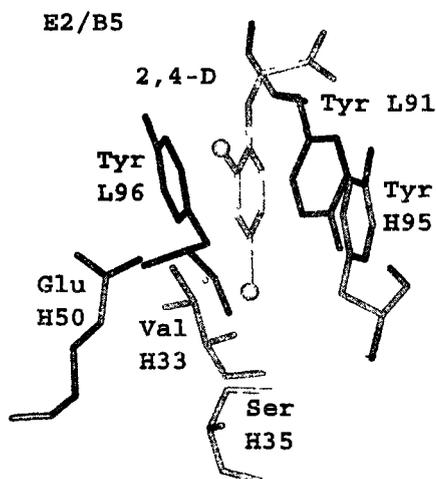


Рисунок 3.  
Структура модели комплекса 2,4-D с антителом E2/B5.

АНАЛИЗ МОДЕЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ АНТИТЕЛ

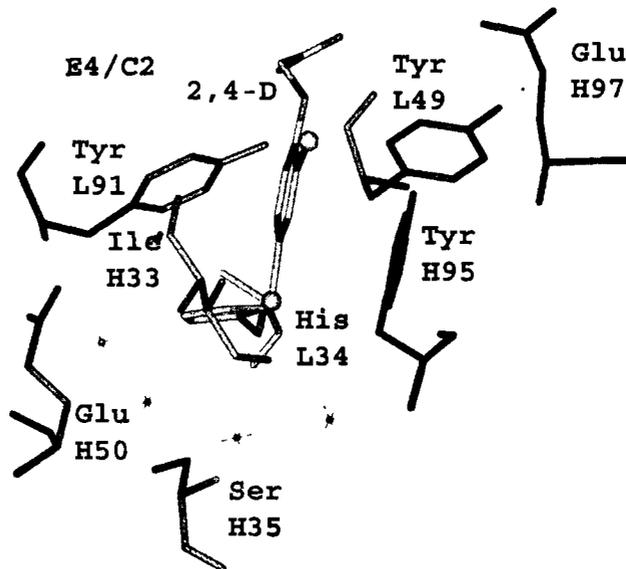


Рисунок 4.  
Структура модели комплекса 2,4-D с антителом E4/C2.

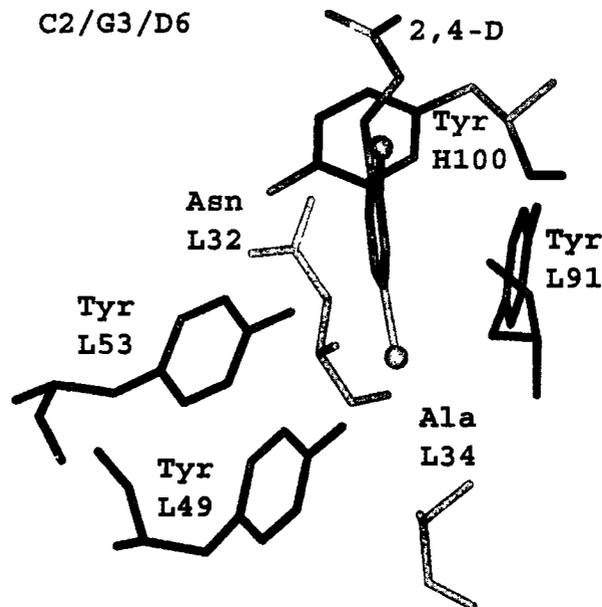


Рисунок 5.  
Структура модели комплекса 2,4-D с антителом C2/G3/D6.

Все комплексы имеют небольшой энергетический минимум в зоне сайта связывания лиганда, причем расчетная энергия взаимодействия отрицательна, в основном, за счет электростатического отталкивания между карбоксильной группой лиганда и Glu H50. Величина расчетной энергии завышена ориентировочно на два порядка, так как, при проведении расчетов в вакууме не учитывалась диэлектрическая постоянная воды. Также, не оценивался энтропийный вклад в свободную энергию связывания.

Во всех моделях комплексов, как и предполагалось, ароматическое ядро лиганда расположено параллельно плоскости тирозина (Tyr H95 в E2/B5 и E4/C2; Tyr L91 в C2/G3/D6) на расстоянии 4 Å от него, что дает основания предполагать

Таблица 5. Данные по кросс-реактивности антитела E2/B5.

Пестицид	Кросс-реактивность по данным ПФИА.	Кросс-реактивность по данным ИФА [4].	Расчетная энергия взаимодействия по данным докинга (ккал/моль)
<p>2,4-D</p>	100,0%	100,0%	-522
<p>МСПА</p>	11,3%	29,4%	-528
<p>2,4,5-T</p>	5,1%	2,0%	-533
<p>2,4-DP</p>	2,1%	0,3%	-528

наличие  $\pi$ -стекинга взаимодействия. Более того, благодаря гибкости метиленового мостика в тирозине, данное взаимодействие стабильно при симуляции молекулярной динамики. Ароматические остатки противоположной стенки экранируют гидрофобное ядро лиганда от воды. Размер полости точно соответствует размерам молекулы 2,4-D. Например, молекула 2,4,5-T входит в полость не полностью и в значительной мере остается экспонированной в окружающую среду. Это объясняет плохое связывание молекулы 2,4,5-T и ему подобных объемных аналогов 2,4-D (табл.5).

Гидрофильные остатки, расположенные на дне полости, вместе с предполагаемыми молекулами воды образуют полярный карман для атома хлора в 4-м положении 2,4-D. В то же время, атом хлора во 2-м положении направлен в раствор на выходе из полости. В случае МСПА, данный атом замещен на метильную группу, которая оказывается помещенной в водную среду. Следует отметить, что для всех рассматриваемых антител МСПА связывается с ними хуже, чем с 2,4-D, но рассчитанная энергия взаимодействия между антигеном и антителом одинакова для МСПА и 2,4-D (табл.5, [4]). Это наводит на мысль о том, что ухудшение связывания МСПА вызвано именно взаимодействием гидрофобной метильной группы на поверхности комплекса антитело/антиген с водной средой, т.е. происходит за счет энтропийного фактора. В силу этого, (а также консервативности описанных сайтов связывания) маловероятно получение антитела, которое связывало бы МСПА лучше, чем 2,4-D, по крайней мере, на базе существующих антител (например, сайт-направленным мутагенезом). Подобное рассмотрение также применимо для связывания аналогов МСПА таких, как 2,4-дихлорпропионовая кислота (2,4-DP) (табл.5).

### АНАЛИЗ МОДЕЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ АНТИТЕЛ

Мы также наблюдаем, на первый взгляд, странное расположение отрицательно заряженного остатка глутаминовой кислоты на входе в полость (Glu H50 в E2/B5; Glu H50 и Glu H97 в E4/C2), что контрастирует с отрицательным зарядом 2,4-D при нейтральном pH, характерном для условий связывания. В силу этого, связывание 2,4-D с данным антителом невыгодно (табл.5), с точки зрения электростатики, и происходит лишь за счет выигрыша в энтропии.

Данное противоречие можно объяснить тем, что для иммунизации мышей на стадии получения моноклональных антител был использован конъюгат 2,4-D с тиреоглобулином [4], но не свободный 2,4-D. Следовательно, любой конъюгат 2,4-D связывается с антителом лучше, чем свободный 2,4-D. Мы показали это для антитела E2/B5 измерением константы диссоциации с помощью ПФИА (табл.6) и расчетом энергии связывания модельной структуры антитела E2/B5 со свободным 2,4-D и его этиламидом (табл.7). Этиламид в данном случае был использован как простейшая возможная форма замещенного 2,4-D с удалением отрицательного заряда.

Таблица 6. Константы диссоциации для меченого флуоресцеином (2,4-D-NHF) и свободного 2,4-D.

Антиген	Константа диссоциации
2,4D-NHF	$(7,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-9} \text{M}$
2,4D	$(1,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-7} \text{M}$

Таблица 7. Сравнение моделей мутантных вариантов с исходной моделью антитела.

Структура	Расчетная энергия взаимодействия антитело – лиганд (ккал/моль)	
	2,4-D	Этиламид 2,4-D
E2/B5	- 522	- 294
E2/B5 GluH50Ser	- 209	70
E2/B5 GluH50Lys	138	363

На качественном уровне явление предпочтительного связывания конъюгата в сравнении со свободным лигандом известно для многих низкомолекулярных гаптенных, но в данном случае мы можем объяснить его природу. Как результат, мы объясняем также улучшение чувствительности конкурентного анализа с использованием аналогов 2,4-D в используемых конъюгатах, как то показано для ПФИА [24] и вытеснительного иммуноанализа [25] на 2,4-D с теми же моноклональными антителами, что и в данном исследовании.

*Направление дальнейшего развития работы.* Из анализа архитектуры сайта связывания было намечено несколько точечных мутаций с целью повышения эффективности связывания 2,4-D. Как мы можем наблюдать для структуры C2/G3/D6 (рис.5), Asn L32 играет роль глутаминовой кислоты в остальных структурах. Таким образом, отрицательный заряд на входе в полость не принципиален для целостности организации активного центра. Соответственно, при замене заряда на входе в полость с отрицательного на нейтральный или положительный возможно ожидать улучшения связывания 2,4-D.

При выборе остатков для замены мы руководствовались следующими соображениями. Первое, остаток на поверхности белка, желательнее, должен быть гидрофильным. Это позволяет исключить из рассмотрения гидрофобные и ароматические остатки. Второе, замена по возможности не должна затрагивать конформацию полипептидной цепи. Это исключает глицин и пролин. Третье, остаток должен быть нейтральным или основным. Это исключает аспарагиновую кислоту. Таким образом, остаются для рассмотрения амиды - Gln, Asn, основные остатки - Lys, Arg, His. гидроксилсодержащие остатки - Ser, Thr, а также Ala.

Мы провели виртуальный мутагенез на модельной структуре E2/B5. В случае замен Glu H50 на Ser или Lys мы получили структуры с сохранением полости активного центра. Для данных структур действительно наблюдается улучшение связывания свободного 2,4-D, как и его этиламида (табл.7).

В то же время, замещение глутаминовой кислоты на другие остатки приводит к исчезновению полости сайта связывания, как правило, по причине заполнения полости боковой цепью замещаемого остатка H50.

Мы полагаем, что описанный подход может быть интересен, как одно из направлений рационального дизайна для изменения специфичности и селективности антител.

Работа поддержана грантами Европейской Комиссии (грант № ERB IC15-CT96-1002) и Российской Государственной Научно-Технологической Программы "Перспективные Методы Биотехнологии" (грант № 4-59)

## ЛИТЕРАТУРА

1. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235-242.
2. Sanchez R., Pieper U., Melo F., Eswar N., Marti-Renom M.A., Madhusudhan M.S., Mirkovic N., Sali A. (2000) *Nat.Struct.Biol.* 7 Suppl, 986-990.
3. Бродский Е.С., Ключев Н.А., Жильников В.Г. (1992) *Журнал Аналитической химии*. **47**, 1497-1503.
4. Franek M., Kolar V., Granatova M., Nevorankova Z. (1994) *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1369-1374.
5. Schmengler, K. (2000) PhD Thesis. Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
6. Kabat E.A., Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S., Foeller C. (1991) *Sequences of Immunological Interest* Bethesda, MD: NIH
7. Pearson W.R. (1990) *Methods Enzymol.*, **183**, 63-98.
8. Chothia C., Lesk A.M., Tramontano A., Levitt M., Smith-Gill S.J., Air G., Sheriff S., Padlan E.A., Davies D., Tulip W.R., Colman P.M., Spinelli S., Alzari P.M., Poljak R.J. (1989) *Nature*. **342**, 877-883.
9. Martin A.C., Thornton J.M. (1996) *J. Mol. Biol.*, **263**, 800-815.
10. Dauber-Osguthorpe P., Roberts V.A., Osguthorpe D.J., Wolff J., Genest M., Hagler A.T. (1988) *Proteins*, **4**, 31-47.
11. Sali A., Kuriyan J. (1999) *Trends Biochem. Sci.*, **24**, M20-M24
12. Morea V., Tramontano A., Rustici M., Chothia C., Lesk A.M. (1998) *J. Mol. Biol.*, **275**, 269-294.
13. Shirai H., Kidera A., Nakamura H. (1999) *FEBS Lett.*, **455**, 188-197.
14. Cook G.P., Tomlinson I.M. (1995) *Immunol. Today*, **16**, 237-242.
15. Tonegawa S. (1983) *Nature*. **302**, 575-581.
16. ABG: Germline gene directories of mouse of Juan Carlos Almagro Antibody Group, URL: [http://www.ibt.unam.mx/vir/V\\_mice.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html)
17. IMGT, the international ImMunoGeneTics database, URL: <http://imgt.cines.fr:8104/>
18. Wedemayer G.J., Wang L.H., Patten P.A., Schultz P.G., Stevens R.C. (1997) *J. Mol. Biol.*, **268**, 390-400.
19. Chitarra V., Alzari P.M., Bentley G.A., Bhat T.N., Eisele J.L., Houdusse A., Lescar J., Souchon H., Poljak R.J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 7711-7715.

**АНАЛИЗ МОДЕЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ АНТИТЕЛ**

20. Guddat L.W., Shan L., Anchin J.M., Linthicum D.S., Edmundson A.B. (1994) *J. Mol. Biol.*, **236**, 247-274.
21. Barbas C.F., Heine A., Zhong G., Hoffmann T., Gramatikova S., Bjornestedt R., List B., Anderson J., Stura E.A., Wilson I.A., Lerner R.A. (1997) *Science*, **278**, 2085-2092.
22. Suh S.W., Bhat T.N., Navia M.A., Cohen G.H., Rao D.N., Rudikoff S., Davies D.R. (1986) *Proteins*, **1**, 74-80.
23. MacCallum R.M., Martin A.C., Thornton J.M. (1996) *J. Mol. Biol.*, **262**, 732-745.
24. Krikunova V.S., Eremin S.A., Smith D.S., Landon J. (2002) *Int. J. Environ. Anal. Chem.* (submitted)
25. Gerdes M., Meusel M., Spener F. (1997) *Anal Biochem.*, **252**, 198-204.

Поступила 07.07.02

**ANALYSIS OF MODEL BINDING SITE OF ANTIBODIES AGAINST  
2,4-DICHLOROPHENOXY-ACETIC ACID**

**O.V.Koliasnikov, V.G.Grigorenko, A.M.Egorov**

Lomonosov Moscow State University, School of Chemistry, Department of Enzymology,  
Leninskie Gory, Moscow, 119899 Russia;

tel.: 007-(095)-939-34-07; fax: 007-(095)-939-27-42;  
E-mail: olkol@enz.chem.msu.ru

Models of three-dimensional structures of Fv domains of three antibodies specific to the pesticide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) have been derived from the sequence data by comparative modeling. The same binding site cavities were observed in all cases. The most important residue in antigen binding is tyrosine, which serves as a wall of cavity and putatively forms  $\pi$ -stacking interaction with aromatic moiety of the ligand. Another cavity wall is formed by hydrophobic residues. At the entrance of cavity a glutamate residue is located in 2 of 3 structures. Docking of 2,4-D and its analogs on the models was performed. On the basis of docking results an experimental cross-reactivity data were qualitatively explained. Using results of the modeling, mutation of glutamate to serine or lysine was suggested to eliminate electrostatic repulsion between antibody and ligand and to improve 2,4-D binding efficiency. Target mutations in the antibody binding site were checked on the model.

**Keywords:** antibodies, modeling, structure, 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.