

4439 / 2-79



ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

5/11-79

Г-522

P14 - 12477

И.А.Гладких, И.Новотны, Ю.М.Останевич,
Ф.Франек, Л.Чер

ИЗМЕРЕНИЯ РАССТОЯНИЯ
МЕЖДУ ЦЕНТРАМИ СВЯЗЫВАНИЯ
В МОЛЕКУЛЕ АНТИТЕЛА

Подход, использующий малоугловое рассеяние
рентгеновых лучей и нейтронов.

1979

P14 - 12477

И.А.Гладких, И.Новотны*, Ю.М.Останевич,
Ф.Франек*, Л.Чер

ИЗМЕРЕНИЯ РАССТОЯНИЯ
МЕЖДУ ЦЕНТРАМИ СВЯЗЫВАНИЯ
В МОЛЕКУЛЕ АНТИТЕЛА

Подход, использующий малоугловое рассеяние
рентгеновых лучей и нейтронов.

Направлено в "FEBS Letters"

* Институт молекулярной генетики Академии наук ЧССР,
Прага.



Измерения расстояния между центрами связывания в молекуле антитела./Подход, использующий малоугловое рассеяние рентгеновых лучей и нейтронов/

Приведены результаты исследований малоуглового рассеяния рентгеновых лучей в растворах ранних и поздних антидинитрофенил-антител и их комплексов с моновалентными декстрановыми антигенами, предпринятые с целью дальнейшего уточнения расстояния между центрами связывания в молекуле антитела. Полученные данные существенно дополняют более ранние результаты рассеяния нейтронов, и в комбинации с ними дают следующие значения расстояний декстран-декстран: $36,1 \pm 1,2$ нм для раннего антитела и $29,7 \pm 1,9$ нм - для позднего.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1979

Determination of the Distances between Antibody Binding Sites./An Approach Using X-Ray and Neutron Small Angle Scattering/

Results of X-ray small angle scattering investigation on solutions of early and late anti-Dnp-antibodies and their complexes with mono-Dnp-dextran antigens carried out in order of a more precise determination of the distances between antibody binding sites are reported. Obtained data give an essential information in addition to that from neutron scattering. Together they bring forward the following values for dextran to dextran distances: 36.1 ± 1.2 nm (early antibody) and 29.7 ± 1.9 nm (late antibody).

The investigation has been performed at the Laboratory of Neutron Physics, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1979

1. ВВЕДЕНИЕ

В предыдущей работе /1/ мы сообщали о нейтронных малоугловых экспериментах, предпринятых для измерения расстояния между центрами связывания в молекуле антитела. Комплексы IgG анти-Dnp-антител свиньи с моно-Dnp-декстраном /м.в. 40000/ в H_2O и 41% D_2O растворах были исследованы с помощью малоуглового рассеяния нейтронов. Расстояние декстран-декстран было вычислено из измеренных значений радиусов инерции в H_2O для указанного комплекса и отдельно взятых антител и декстрана. Второй тип эксперимента в 41% растворе D_2O /при этом составе плотности рассеяния растворителя и антитела совпадают/ выявил наличие интерференционного максимума, связанного с рассеянием нейтронов на двух молекулах декстрана, находящихся на фиксированном расстоянии. Положение интерференционного максимума также позволяет определить расстояние декстран-декстран. Хотя оба значения были определены со сравнительно большой статистической погрешностью, из них следовало, что раннее, т.е. преципитирующее анти-Dnp-антитело свиньи имеет протяженную форму с расстоянием антиген-антиген $35,8 \pm 1,3$ нм. Для позднего /не преципитирующего/ антитела интерференционный эксперимент выполнить пока не удалось, поэтому расстояние декстран-декстран / $27,3 \pm 3,7$ нм/ было определено только по набору значений радиусов инерции R_g .

В данной работе мы сообщаем о радиусах инерции антител и /антитело-декстран₂/ комплексов, измеренных методом малоуглового рассеяния рентгеновых лучей. Применение этого метода интересно по двум причинам: во-первых, могут быть получены независимые значения R_g антител и их комплексов /и, следовательно, расстояния антиген-антиген/; во-вторых, возникает возможность проверить совместимость всех данных, анализируя зависимость квадрата радиуса инерции от относительной рассеивающей способности антител и декстрана. Используя оба этих подхода, мы определили расстояние декстран-декстран в комплексе /раннее антитело-декстран₂/ . Полученное значение $36,1$ нм хорошо согласуется с нашим прежним результатом / $35,8$ нм/. Для комплекса /позднее антитело-

декстран₂ / расстояние декстран-декстран /29,1 нм/ также определено с большой степенью достоверности. Полученные результаты подтверждают наш более ранний тезис о существенном различии геометрических характеристик ранних и поздних антител.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анти-Дпр-антитела свиньи и моно-Дпр-декстран /мол. в. 40000/ были из той же партии, что и в работе^{1/}. Растворы антител /1,30 и 2,77 вес.% ранних антител, 1,25% и 2,48% поздних/, так же как и растворы антител с добавлением моно-Дпр-декстрана /молярное отношение декстран-антитело 2,2:1/, готовились в 0,1 М фосфатном буфере при pH 6,4. Эксперименты по рассеянию выполнялись на малоугловой камере Кратки в Лаборатории физики белка Института белка АН СССР /Пушино/. Так как для комплексов /антитело-декстран₂/ область Гинье очень коротка, для них коллимация пучка сужалась вдвое по сравнению с коллимацией для свободных антител. Каждое измерение выполнялось дважды, измеренные зависимости исправлялись на коллимационные эффекты^{2/}.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 и 2 приведены кривые рассеяния в Гинье-координатах для ранних и поздних антител при двух концентрациях. Зависимость наблюдаемых радиусов инерции от концентрации показана на рис. 3а. В полном согласии с результатами рассеяния нейтронов^{3/} значение R_g для раннего антитела оказалось больше, чем для позднего /см. табл. 1/. Абсолютные значения R_g из нейтронных и рентгеновых экспериментов слегка различаются.

Радиусы инерции комплексов ранних и поздних антител с антигеном также были измерены для двух концентраций и экстраполированы к нулевой концентрации /рис. 3б/. При интерпретации этих данных и отыскании расстояний декстран-декстран следует иметь в виду, что комплексы антитело-антиген являются гетерогенными частицами, т.е. плотность амплитуды рассеяния в случае нейтронов и электронная плотность для антитела и декстрана различны. Совместное использование рентгеновых и нейтронных данных для исследования неоднородных частиц впервые было предложено и успешно использовано для изучения 50-S субъединиц рибосомы E.Coli^{5/}. Этот же подход мы можем применить и для комплексов /антитело-антиген/.

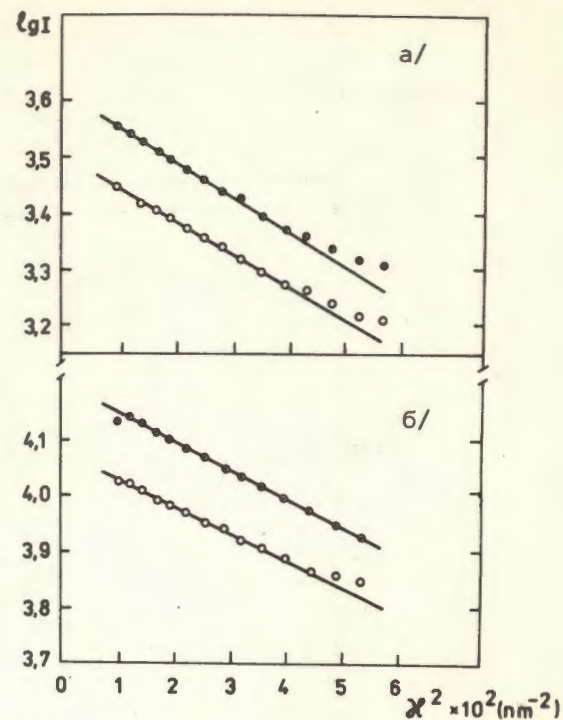


Рис. 1. Гинье-построение для результатов, усредненных по двум измерениям: а/ раннее анти-Дпр-антитело при концентрациях 1,30 вес.% (●) и при 2,77 вес.% (○); б/ - позднее анти-Дпр-антитело при 1,25 вес.% (●) и 2,48 вес.% (○)

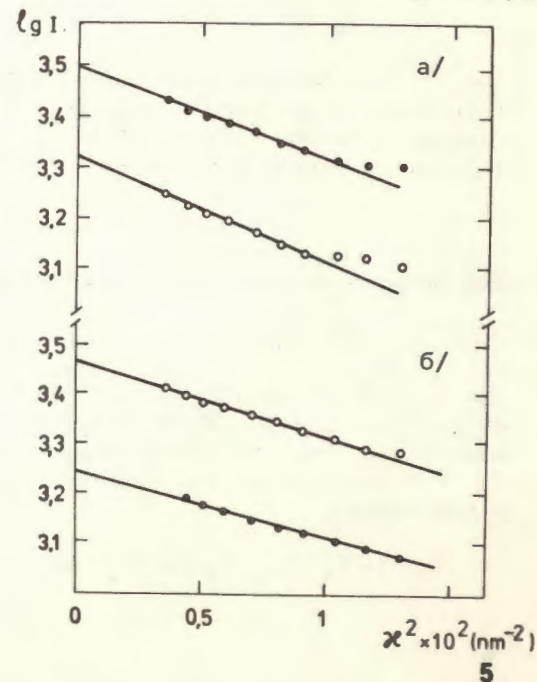


Рис. 2. То же, что на рис. 1: а/ комплекс /раннее антитело-декстран₂/ при концентрациях антител 1,30 вес.% (○) и 2,77 вес.% (●); б/ комплекс /позднее антитело-декстран₂/ при концентрациях антител 1,25 вес.% (○) и 2,48 вес.% (●).

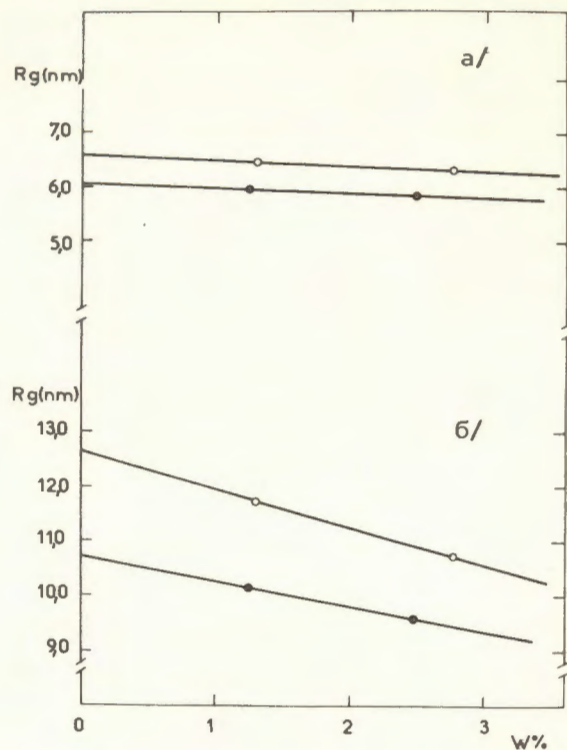


Рис. 3. Зависимость наблюдаемых радиусов инерции от концентрации: а/ ранние (O) и поздние (●) антигена; б/ комплексы /раннее анти- Dnp -антигено/-/моно- Dnp -декстран₂ / (O), и /позднее анти- Dnp -антигено/-/моно- Dnp -декстран₂ (●).

Для радиуса инерции комплекса R_c имеет место соотношение

$$R_c^2 = f_A \cdot R_A^2 + f_D R_D^2 + f_A f_D a^2, \quad /1/$$

где R_A и R_D - радиусы инерции антигена и фиктивной гантели из декстрана; $D/2 = R_D$ - расстояние декстран-декстран; a - расстояние между центрами тяжести антигена и гантели; f_A и f_D - относительные рассеивающие способности антигена и декстрана:

$$f_D = 1 - f_A = \Delta\rho_D \cdot V_D (\Delta\rho_A V_A + \Delta\rho_D V_D)^{-1}; \quad /2/$$

Таблица 1

Радиусы инерции при различных относительных рассеивающих способностях

Объект	R_g /нм/	f_D	Ссылка	Примечания
Раннее анти- Dnp - антигено	$6,74 \pm 0,08$	0	/3/	1
-"-	$6,57 \pm 0,05$	0	данная работа	2
Позднее анти- Dnp антигено	$6,16 \pm 0,07$	0	/3/	1
-"-	$6,02 \pm 0,05$	0	данная работа	2
Раннее анти- Dnp антигено с гаптенем	$6,42 \pm 0,09$	0	/3/	1
Позднее анти- Dnp -антигено с гаптенем	$5,69 \pm 0,08$	0	/3/	1
Комплекс /раннее анти- Dnp -антигено/-/моно- Dnp декстран ₂ /	$11,5 \pm 0,6$	0,30	/1/	1
-"-	$12,6 \pm 0,4$	0,41	данная работа	2
-"-	$17,9 \pm 1,3$	1,00	/1/	3
Комплекс /позднее анти- Dnp -антигено/-/моно- Dnp -декстран ₂ /	$8,87 \pm 1$	0,30	/1/	1
-"-	$10,7 \pm 0,35$	0,41	данная работа	2

Примечания: 1/ Рассеяние нейтронов в H₂O растворах /1/ и D₂O растворах /3/. 2/ Рассеяние рентгеновых лучей; R_g экстраполировано к нулевой концентрации; H₂O-растворы; оценка погрешности R_g не статистическая; в качестве погрешности приводится половина расхождения значений R_g в двух независимых измерениях. 3/ Нейтронный интерференционный опыт в 41% D₂O растворе. Приведено значение R_g , равное половине расстояния между центрами декстрановых антигенов.

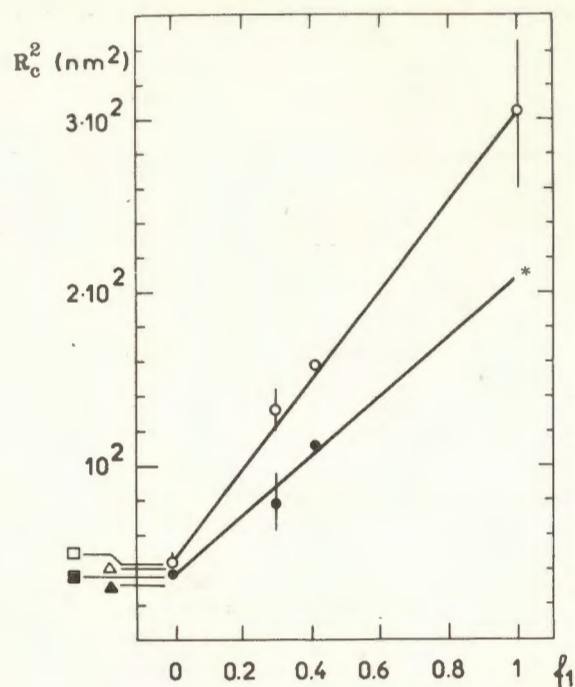


Рис. 4. Зависимость квадрата радиуса инерции комплексов /антитело-декстран₂/, R_c^2 , от относительной рассеивающей способности декстрана f_D ; (O) - комплекс /раннее анти- Dnp - антитело/-/моно- Dnp -декстран/₂; (●) - комплекс /позднее Dnp -антитело/-/моно- Dnp -декстран/₂. При $f_D=0$ использованы следующие обозначения: (O) - раннее анти- Dnp -антитело, из рассеяния нейтронов в D_2O . (Δ) - комплекс /раннее анти- Dnp -антитело/-/ Dnp -гаптен/₂, из рассеяния нейтронов D_2O . (□) - раннее анти- Dnp -антитело, из рассеяния рентгеновых лучей в H_2O . (●) - позднее анти- Dnp -антитело, из рассеяния нейтронов в D_2O . (▲) - комплекс /позднее анти- Dnp -антитело/-/ Dnp -гаптен/₂, из рассеяния нейтронов в D_2O . (■) - позднее анти- Dnp -антитело, из рассеяния рентгеновых лучей. * - экстраполированное значение R_c^2 для комплекса /позднее анти- Dnp -антитело/-/моно- Dnp -декстран/₂.

V_A , V_D и $\Delta\rho_A$, $\Delta\rho_D$ - объемы и избыточные рассеивающие плотности /по сравнению с растворителем/ для антитела и декстрана соответственно. Из выражения /1/ следует, что R_c^2 линейно зависит от f_D , если пренебречь членом $f_A f_D a^2$.

$$R_c^2 = f_D(R_D^2 - R_A^2) + R_A^2. \quad /3/$$

Пренебрежение последним членом в /1/ вполне допустимо, если учесть, что для существующих Т^{8/} или Y^{7/} моделей формы антитела оценка a оказывается не более 3 нм. Соответственно, пренебрегаемый член не более $2,5 \text{ нм}^2$, что не превышает погрешностей экспериментальных данных для R_c^2 . Относительные рассеивающие способности f_A и f_D легко вычислить /см. табл. 1/, поскольку химический состав и объемы компонентов были определены ранее /3,4/. На рис. 4 представлены зависимости R_c^2 от f_D . Высокий уровень значимости линейной гипотезы - 0,9998 для комплекса /раннее антитело-антиген₂/ и 0,9778 позднее антитело-антиген₂/ - служит веским подтверждением взаимного согласия всех наших результатов. Из них следуют следующие расстояния декстран-декстран: $36,1 \pm 1,2$ нм для раннего антитела, что хорошо согласуется с $35,8 \pm 1,3$ нм, полученным ранее; $29,7 \pm 1,9$ нм для позднего антитела /прежнее значение $27,3 \pm 3,7$ нм/.

Авторы выражают благодарность И.Н.Сердюку за ценные консультации и предоставление возможности выполнить эксперимент по рассеянию рентгеновых лучей, а также А.К.Гренадеру, Г.С.Полубесову и Ю.Шпунгину за помощь при проведении измерений. Авторы благодарят акад. И.М.Франка за постоянный интерес к этой работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cser L. et al. FEBS Lett., 1978, 93, p.312.
2. Щедрин Б.М. и др. Кристаллография, 1966, 11, с.159.
3. Cser L. et al. FEBS Lett., 1977, 80, p.329.
4. Cser L. et al. FEBS Lett., 1976, 68, p.283.
5. Serdyouk I.N. et al. FEBS Lett., 1975, 59, p.1333.
6. Pilz I. et al. Biochemistry, 1973, 12, p.4998.
7. Colman P.M. et al. J.Mol.Biol., 1976, 100, p.257.

Рукопись поступила в издательский отдел
22 мая 1979 года.