

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

5936/2-80

8/12-80
P14-80-478

Л.Чер,¹ Ф.Франек,² И.А.Гладких,¹ А.Б.Кунченко,
Ю.М.Останевич

ОБЩИЙ ВИД
АНТИДИНИТРОФЕНИЛ-АНТИТЕЛ СВИНЬИ
И КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ,
ИНДУЦИРОВАННЫЕ ГАПТЕНОМ
Исследования малоуглового рассеяния

Направлено в "European Journal of Biochemistry"

¹ ЦИФИ ВАН, Будапешт.

² Институт молекулярной генетики ЧСАН, Прага.

Чер Л. и др.

P14-80-478

Общий вид антидинитрофенил-антител свиньи и конформационные изменения, индуцированные гаптеном. Исследования малоуглового рассеяния

С помощью малоуглового рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей исследованы антидинитрофенил-антитела свиньи. Экспериментальные кривые рассеяния показывают, что формы двух типов антител, преципитирующих и неprecипитирующих, подобны друг другу, однако последнее более компактно. Установлено, что при связывании гаптена происходят конформационные изменения антител, которые можно описать в виде сжатия молекулы с сохранением подобия формы. На основе всех имеющихся к настоящему времени данных построена модель антитела, имеющая полость в F_c -части и либо полностью распростертые, либо слегка наклоненные к F_c -части F_{ab} участки. Модель согласуется как с данными по рассеянию на свободных антителах, так и с более ранними определениями расстояния между центрами связывания и рентгеноструктурными данными о строении F_c фрагмента в кристаллической форме.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ. Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1980

Csér L. et al.

General Shape and Hapten-Induced
Conformational Changes of Pig Anti-Dinitrophenyl

P14-80-478

ВВЕДЕНИЕ

Хотя существует подробная информация о трехмерной структуре доменов иммуноглобулина, полученная при помощи рентгеновского анализа кристаллизованных фрагментов иммуноглобулина^{/1/}, все еще имеется большая неопределенность в вопросе о размерах, форме и динамическом поведении целой молекулы иммуноглобулина в растворе. В частности, исследователи еще далеки от полного понимания характера конформационных изменений молекул антитела после связывания специфических лигандов, антигенов или гапте-нов^{/2,3/}.

Большое количество существующих экспериментальных данных противоречиво. Некоторые методы не обнаруживают каких-либо изменений, вызываемых связыванием антигена или гаптена. К их числу относятся исследование кругового дихроизма^{/4/}, молекулярных движений комплекса антитело Gd(III)^{/5/}, исследование доступности шарнира антитела для протеолиза и редукции^{/6/}. В других исследованиях наблюдались достоверные, хотя и малые, изменения параметров молекулы, указывающие на то, что антитело, связанное с лигандом, обладает изменившейся конформацией. Эти заключения были сделаны методами исследования водород-дейтериевого обмена^{/7/}, циркулярной поляризации флуоресценции^{/8/}, релаксации скачка температуры^{/9/}, деполяризации флуоресценции^{/10/}, электронным спиновым резонансом в образцах со спиновыми метками^{/11,12/}.

Малоугловое рассеяние рентгеновых лучей, использованное Пильц с сотр.^{/13,14/} для изучения свободных и лигандных антител кролика, специфичных к поли-/D-аланил/ группе и к р-азофенил- β -лактозидной группе, показало, что связывание гаптена сопровождалось уменьшением радиуса инерции. В наших предшествующих исследованиях малоуглового рассеяния нейтронов на двух типах антител свиньи^{/15/}, специфичных к динитрофенил-группе, наблюдался подобный эффект: радиусы инерции комплексов антитело - гаптен оказались достоверно меньшими, чем для свободных антител. В другом исследовании Пильц с сотр.^{/16/} показали, что радиусы инерции фрагментов антител F'_{ab} и $(F'_{ab})_2$ не изменяются при связывании гаптена. Авторы пришли к выводу, что эффект сжатия должен быть связан с присутствием F_c части в интактной молекуле.

При больших значениях переданного импульса $\hbar k^*$ рентгеновские ^{/13,14,17,18/} и нейтронные ^{/19/} малоугловые исследования дают похожие кривые рассеяния - т.н. построения поперечного сечения ^{/18/} /т.е. зависимость $\ln(I(k) \cdot k)$ от k^2 /. Эти построения содержат два прямолинейных участка с разными наклонами. Пильц с сотр. ^{/13,14/} заключили, что такой вид кривых можно объяснить, предполагая, что молекулы иммуноглобулина имеют Т-образную форму.

В этой работе мы описываем результаты исследования антидинитрофенильных антител свиньи с помощью малоуглового рассеяния нейтронов и рентгеновых лучей. Исследуемая область была расширена в сторону более высоких значений k , и нам удалось выявить конформационные изменения, вызванные гаптенем. Путем подбора моделей, дающих расчетные кривые рассеяния, согласующиеся с экспериментальными, была построена вероятная модель молекулы антитела свиньи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антитела

Антидинитрофенил-антитела были выделены из сыворотки крови свиней, иммунизированных против динитрофенилированного иммуноглобулина быка ^{/20,21/}.

Преципитирующие антитела, называемые также ранними антителами ^{/15/}, выделялись из сыворотки, отобранной на ранней фазе иммунной реакции ^{/22,23/}, неprecипитирующие или поздние антитела - соответственно на поздней фазе. Оба типа антител являлись иммуноглобулинами класса G($M_{\text{вес}} = 150000$). Приемы препарирования не отличались от описанных в работе ^{/15/}. Константа ассоциации с $D_{\text{np}} - L$ -лизинном была $6,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ для преципитирующих и $1,8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ - для неprecипитирующих антител.

Фрагменты антител

F_{ab} и F_{c} фрагменты неспецифического свиного иммуноглобулина G приготавливались путем расщепления трипсином и разделялись гель-хроматографией и ионно-обменной хроматографией ^{/24/}. Их чистота проверялась методом иммуноэлектрофореза с использованием подходящим способом абсорбированной антисыворотки кролика.

* $k = \frac{2\pi}{\lambda} \theta$; θ - угол рассеяния, λ - длина волны.

Комплексы антитело - гаптен

Во всех опытах использовался гаптен 8- $D_{\text{np}} - 5,8$ -аза-4-оксо-октановая кислота. Он синтезировался, как было описано ранее ^{/15/}. Антитело-/гаптен/₂-комплексы приготавливались путем растворения взвешенных количеств гаптена в растворе антител. Гаптен добавлялся в приблизительно стехиометрическом количестве - 2,2 моля гаптена на моль антител. В соответствии со значением константы ассоциации ожидается, что более 90% мест связывания окажутся занятыми гаптенем.

Приготовление образцов для малоуглового рассеяния

Для рассеяния нейтронов готовился 2% /вес./ раствор антител в буферном растворе 100 мМ фосфата натрия. Для достижения максимального контраста при наименьшем некогерентном фоне буферный раствор готовился из окиси дейтерия, в котором устанавливался наблюдаемый pH = 6,36. Для рассеяния рентгеновых лучей готовился 2% /вес./ раствор антител в 100 мМ буфере фосфата натрия при pH = 6,4.

Растворы антител уравнивались с соответствующим буфером путем диализа. Возможные агрегаты удалялись из растворов путем центрифугирования в течение 20 мин при 6000 г. Отсутствие агрегатов и димеров проверялось седиментационным анализом, в ультрацентрифуге модели Spinco E.

Техника малоуглового рассеяния

Эксперименты по малоугловому рассеянию нейтронов проводились на время-пролетной малоугловой установке Лаборатории нейтронной физики Объединенного института ядерных исследований ^{/25/}. Рассеяние рентгеновских лучей выполнялось нами с помощью малоугловой камеры Кратки в Институте белка Академии наук СССР. Угловое распределение рассеянных рентгеновых лучей исправлялось на коллимационные искажения по методу, описанному в ^{/26/}.

Радиусы инерции поперечных сечений и погрешности их определения из нейтронных данных находились методом наименьших квадратов. Экспериментальные точки прямолинейной части кривой рассеяния аппроксимировались линейной функцией k^2 . Подобная обработка, однако, лишена смысла в случае рентгеновских данных, поскольку между экспериментальными точками существует сильная корреляция, возникающая при исправлении на коллимационные искажения.

Модельные расчеты и конструирование модели

Из-за случайной ориентации растворенных молекул невозможно восстановить трехмерную форму молекулы, пользуясь только малоугловыми данными. Однако, исходя из известной формы, всегда возможно вычисление распределения рассеянного излучения и сравнение его с наблюдаемым экспериментально. Поэтому, если доступна некоторая исходная информация о форме молекулы /например, из стереохимических данных или рентгеновской кристаллографии/, метод проб и ошибок позволяет конструировать осмысленные молекулярные модели. Процедура при этом состоит из генерации ряда возможных моделей, вычисления соответствующих распределений рассеянного излучения и отбора тех моделей, которые дают лучшее согласие экспериментальных и расчетных распределений.

Ранее Пильц с соотр.^{/17/} показала, что экспериментальное распределение рассеянной интенсивности в Гинье-области и в двух прямолинейных участках построения поперечного сечения содержит достаточно информации для сравнения с моделями антител и их фрагментов. В нашей работе мы использовали метод твердых шаров^{/27/}, оказавшийся вполне пригодным для построения распределений рассеяния от антител и конструирования молекулярных моделей. Этот метод использует обобщение формулы Дебая:

$$I(\kappa) = \sum_i \sum_k f_i f_k \frac{\sin \kappa r_{ik}}{\kappa r_{ik}}, \quad /1/$$

где f_i и f_k - амплитуды рассеяния атомов или ядер, расположенных в точках i и k соответственно, r_{ik} - расстояние между этими точками.

В соответствии с методом^{/27/}, тело молекулы с хорошим приближением может быть построено из ряда однородных идентичных шаров. Тогда ф-ла /1/ может быть преобразована к виду

$$i(\kappa) = \frac{I(\kappa)}{I(0)} = g(\kappa) \cdot (n+2) \cdot \sum_{j=1}^m A_j \frac{\sin \kappa r_j}{\kappa r_j} \cdot \frac{1}{n^2}, \quad /2/$$

где $g(\kappa) = \frac{9}{2} \pi [J_{3/2}(\kappa R)]^2 / (\kappa R)^3$ - рассеянная интенсивность от шара с радиусом R , n - число шаров, заполняющих тело, A_j - число повторений расстояния r_j , m - число различных расстояний, J - функция Бесселя.

Для простоты и сокращения времени счета шары должны быть расположены некоторым простым образом, например, их центры могут образовать примитивную кубическую решетку. Диаметр шаров должен быть меньше разрешающей способности малоуглового эксперимента, т.е. 1-2 нм. Такую компьютерную модель легко визуализировать, используя реальные шарики, скрепляемые вместе. Мо-

дели, иллюстрирующие данную статью, делались из стальных шариков диаметром 5 мм, скрепленных пицеином.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Антидинитрофенил-антитела и их комплексы с гаптенем

Распределения рассеянной интенсивности в виде построения поперечного сечения /рис.1 и 2/ характеризуются двумя прямолинейными участками, подобными тем, которые наблюдали Пильц с соотр.^{/13/}. Из наклона прямолинейного участка определялся радиус инерции поперечного сечения R_q в соответствии с формулой^{/13/}:

$$R_q^2 = -2 \frac{\partial \ln(I(\kappa) \cdot \kappa)}{\partial \kappa^2}. \quad /3/$$

Следуя обозначениям, принятым в^{/13/}, мы для внутренней, более крутой части кривой, употребляем обозначение R_{q1} , для внешней - соответственно R_{q2} . Сводка результатов в табл.1 показывает, что R_{q1} для преципитирующего антитела больше, чем для неприципитирующего. Обратная ситуация имеет место для R_{q2} .

Радиусы инерции комплексов антитело-гаптен меньше, чем для свободных антител. Поскольку статистическая точность нейтронных измерений очень хорошая, наблюдаемые различия являются достоверными.

Между распределениями рассеянной интенсивности рентгеновских лучей и нейтронов нет существенной разницы в общих чертах /рис.2/. Радиусы инерции поперечных сечений из нейтронных и рентгеновских экспериментов имеют очень близкие значения /табл.1/. Радиусы инерции, измеренные нейтронами, оказываются несколько больше, а радиусы инерции поперечных сечений - несколько меньше, чем соответствующие рентгеновские значения. Различие отношений R_{q1} и R_{q2} для преципитирующих и неприципитирующих антител не было обнаружено в рентгеновских экспериментах. Как уже отмечалось, процедура деконволюции, применяемая к результатам рентгеновских измерений, затрудняет детальное сравнение с нейтронными данными.

F_{ab} и F_c фрагменты

Радиусы инерции фрагментов иммуноглобулина свиньи, приводимые в табл.1, лишь незначительно отличаются от значений, полученных ранее другими исследователями для фрагментов иммуногло-

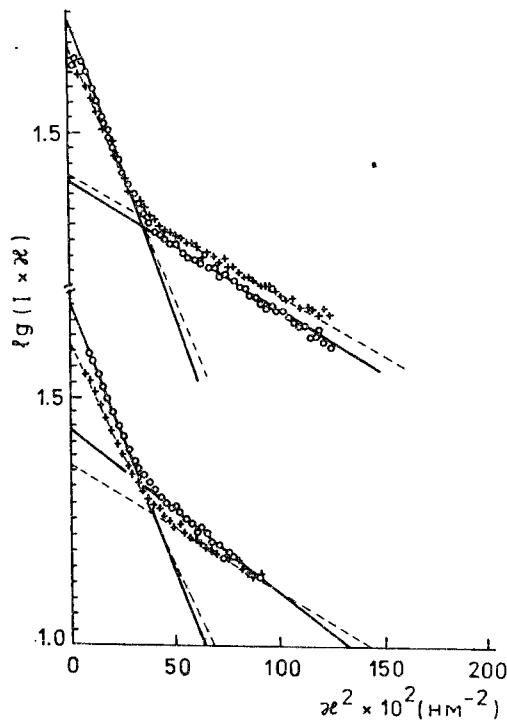


Рис.1. Построения поперечного сечения для антидинитрофенил-антител свиньи и их комплексов, полученные рассеянием нейтронов на малые углы. Ординаты экспериментальных точек получены из измеренной интенсивности рассеянного излучения /в произвольных единицах/. Кружочки (O) - свободные антитела, крестики /+/- комплекс антитело-/гаптен/. Прямые линии, аппроксимирующие крутой и пологий участки кривой, получены методом наименьших квадратов. Прямые, относящиеся к комплексу, представлены прерывистой линией. Верхняя часть рисунка - precipитирующее антитело, нижняя - неprecипитирующее.

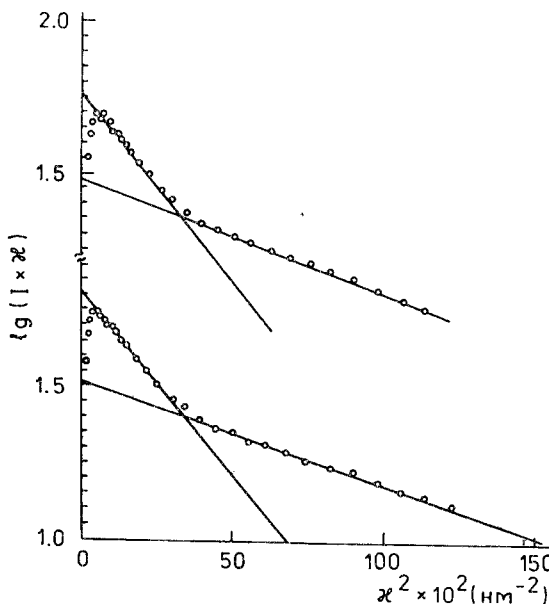


Рис.2. Построения поперечного сечения для антител, полученные рассеянием рентгеновских лучей на малые углы. Ординаты экспериментальных точек получены из измеренной интенсивности рассеянного излучения /в произвольных единицах/. Прямые линии получены методом наименьших квадратов с использованием произвольных постоянных весов для экспериментальных точек. Верхняя часть рисунка - precipитирующее антитело, нижняя - неprecипитирующее.

Таблица 1

Радиусы инерции R_g и радиусы инерции поперечного сечения свободных и лигандных антидинитрофенил-антител свиньи, полученные малоугловым рассеянием

Образец	R_g , нм	R_{q1} , нм	R_{q2} , нм
А/ Рассеяние нейтронов:			
Преципитирующее антитело	6,74±0,08	2,313±0,018	1,140±0,021
Комплекс precipитирующее антитело-/гаптен/	6,42±0,09	2,181±0,014	1,042±0,014
Неprecипитирующее антитело	6,16±0,07	2,232±0,016	1,263±0,016
Комплекс неprecипитирующее антитело-/гаптен/	5,69±0,08	2,014±0,012	1,130±0,027
Б/ Рассеяние рентгеновских лучей:			
Преципитирующее антитело	6,57	2,33	1,29
Неprecипитирующее антитело	6,02	2,40	1,26

булина человека /17,19/. Построения поперечного сечения для обоих фрагментов /рис.3/ - прямые линии в широком диапазоне q^2 . Однако радиусы инерции поперечных сечений R_q в наших опытах /табл.2/ получились заметно меньшими, чем в нейтронных и рентгеновских экспериментах /17,19/.

Модели фрагментов антител

Вспомогательная информация для построения моделей фрагментов антител вначале была взята из данных по рентгеновской кристаллографии, которые дают форму и размеры F_{ab} и F_c фрагментов в кристаллической форме /1/. Кроме того, в силу подобия кривых малоуглового рассеяния для различных иммуноглобулинов, ожидается, что форма и размеры фрагментов антител разного происхождения также будут примерно одинаковыми. Однако необходимо иметь в виду, что в процессе фрагментации десятки аминокислот могут быть утеряны, например, в области шарниров, а также могут произойти изменения конформации фрагментов. Кроме того, не очевидно, что конформация фрагментов в кристаллическом состоянии совпадает с их конформацией в растворе /28/.

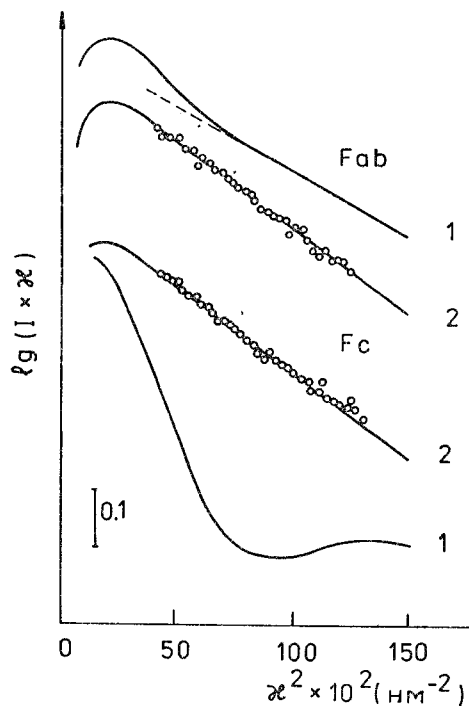


Рис.3. Построения поперечного сечения для F_{ab} и F_c фрагментов иммуноглобулина G свиньи, полученные малоугловым рассеянием нейтронов. Кружочки (O) – экспериментальные точки. Сплошные кривые соответствуют моделям F_{ab} и F_c фрагментов, показанным на рис.4.

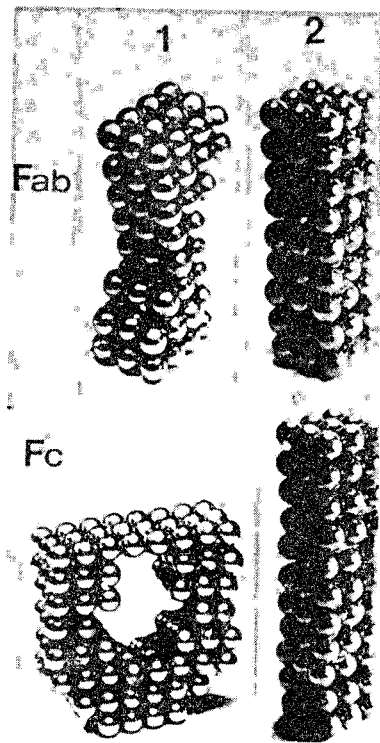


Рис.4. Модели F_{ab} и F_c фрагментов иммуноглобулина G. F_{ab} 1 и F_c 1 соответствуют формам, известным из рентгеновской кристаллографии^{1,29}. F_{ab} 2 и F_c 2 – стержнеобразные модели.

Из наших малоугловых экспериментов удалось извлечь 4 количественные характеристики, пригодные для отыскания формы F_{ab} и F_c фрагментов. Ими являются значения радиуса инерции, радиуса поперечного сечения и граничные значения для интервалов κ^2 , внутри которых соответствующие линейные приближения применимы.

Используя вышеописанный метод, мы построили модель, аппроксимирующую F_{ab} фрагмент в кристаллическом состоянии, которая состоит из 78 шаров диаметром 1 нм /рис.4/. Эта модель дает заниженное значение радиуса инерции по сравнению с экспериментальным. Кроме того, построение поперечного сечения также за-

Таблица 2

Экспериментальные и модельные радиусы инерции (R_g) и радиусы инерции поперечных сечений (R_q) фрагментов антител свиньи

Образец	Эксперимент а/		Расчет по модели б/	
	R_g , нм	R_q , нм	R_g , нм	R_q , нм
фрагмент F_{ab}	$2,97 \pm 0,07$	$1,14 \pm 0,01$	2,92	1,18
фрагмент F_c	$3,44 \pm 0,08$	$1,19 \pm 0,02$	3,31	1,18

а/ Получено из малоуглового рассеяния нейтронов.

б/ Соответствуют моделям F_{ab} №2 и F_c №2 на рис.4.

Таблица 3

Радиусы инерции поперечных сечений / R_{q1} и R_{q2} / моделей молекулы антитела

Номер модели а/	R_{q1} , нм	R_{q2} , нм
1	2,31	1,37
2	2,32	1,19
3	2,08	1,17
4	2,82	1,00
5	2,32	1,17
6	2,12	1,16

а/ Модели 1-3 показаны на рис.6, модели 4-6 на рис.7.

метно отличается от найденного в эксперименте. Как видно из рис.3, модельная кривая при малых κ^2 имеет явно выраженный подъем над линейной частью. Экспериментальная кривая в этой же области не обнаруживает отклонений от прямолинейности, как в наших опытах, так и в более ранних исследованиях других фрагментов^{19,21}. Если расхождение экспериментального и модельного радиусов инерции легко устранить путем соответствующего изменения всех размеров модели, то упомянутое отличие формы кривых таким образом устранить не удастся.

Более удлиненная стержнеобразная модель, состоящая из 81 шара /рис.4/, намного лучше согласуется с экспериментальными данными, в том числе и в области малых k^2 /рис.3/.

Построение поперечного сечения для кристаллографической модели F_c фрагмента неожиданно сильно отличается от экспериментального /рис.3/. Модель из 168 шаров /рис.4/ дает радиус инерции, довольно близкий к экспериментальному, однако радиус инерции поперечного сечения имеет значение, существенно превышающее экспериментальное. Кроме того, модельная кривая имеет намного более узкую область с прямолинейным участком.

Очень простая модель в виде прямого стержня с тем же сечением, как и для F_{ab} фрагмента, но немного длиннее, дает вполне удовлетворительные результаты /рис.4 и табл.3/. Таким образом, сопоставление данных о фрагментах в растворе и в кристаллической форме приводит нас к заключению о неидентичности формы F_{ab} и, в особенности, F_c фрагментов в этих двух состояниях.

Модели молекулы антитела свиньи

Последнее заключение означает, что имеющиеся сведения о форме фрагментов нельзя с уверенностью использовать в качестве дополнительной информации при построении модели интактной молекулы антитела. Поэтому основополагающими сведениями о форме молекулы антитела являлись известная псевдосимметрия второго порядка молекулы и расстояние между местами связывания, расположенными на концах F_{ab} "рук" /30,31/.

В процессе поиска модели форма F_c части менялась в широкой области, начиная от стержнеобразной, найденной в растворе, и кончая формой "мики-мауса" из рентгеновской кристаллографии /29/. F_{ab} части считались стержнеобразными, варьировались только их длина, поперечное сечение и угол между ними. Несмотря на такие ограничения, пришлось рассмотреть более чем 300 моделей, прежде чем было достигнуто удовлетворительное согласие модельных кривых с экспериментальными данными. Когда на модельных кривых появились прямолинейные участки, была исследована зависимость модельных радиусов инерции поперечных сечений от параметров модели /толщины F_{ab} и F_c частей, см. рис.6 и табл.3/. Радиус R_{q2} , в основном, зависит от толщины F_{ab} частей. При уменьшении толщины наклон дальней части модельной кривой уменьшается /сравни кривые на рис.5 с моделью рис.6/. Наклон внутренней части (R_{q1}) аналогично зависит от толщины F_c части.

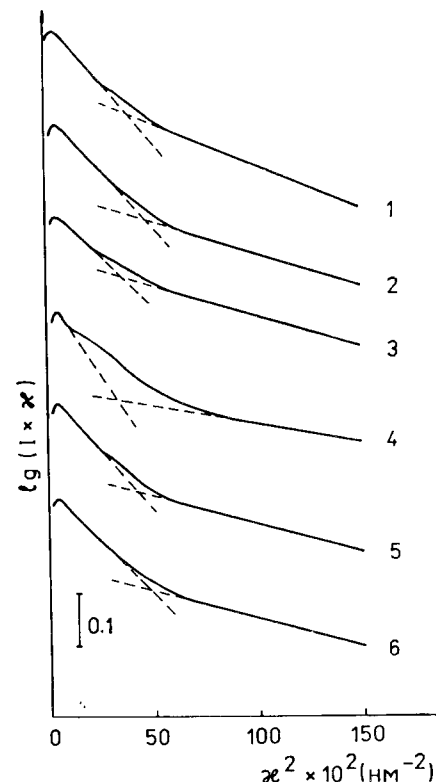


Рис.5. Вычисленные построения поперечного сечения моделей антитела. Нумерация кривых соответствует нумерации моделей на рис.6 и 7.

Следующий шаг состоял в вариации взаимного расположения частей молекулы при постоянной их толщине, соответствующей лучшему приближению к наблюдаемым радиусам инерции поперечных сечений /т.е. модель №2/. На этом этапе изучались только компланарные модели, поскольку имеющиеся к настоящему времени сведения об антителах не содержат указаний на иное расположение их частей. Если молекула обладает достаточной гибкостью и под действием столкновений с молекулами растворителя деформируется в неплоскую, мы принимаем, что плоская конформация в среднем сохраняется и является наиболее вероятной.

Три наиболее важные модели приведены на рис.7. Первая из них /№4/ соответствует Y-модели, согласующейся с фотографиями, получаемыми электронной микроскопией /32/. Следующая /№5/ - модификация T-модели, предложенной Пильц с сотр. /17/. Соответствующие им модельные кривые, однако, обнаруживают выраженный подъем между двумя прямолинейными участками. Этот подъем особенно велик для Y-модели и уменьшается при переходе к T-модели. Если продолжать опускание F_{ab} частей /№6/, этот подъем почти полностью исчезает.

Модель, дающая наилучшее согласие с экспериментальными данными /рис.7, №6/, была построена из 386 шаров радиусом 0,48 нм. Высота модели - 7,71 нм, толщина F_c части - 3,86 нм, F_{ab} - частей - 2,89 нм. Расстояние между концами F_{ab} частей было 27 нм, что хорошо согласуется с экспериментально найденным расстоянием между центрами связывания /30,31/. Радиус инерции модели, равный 6,80 нм, и радиусы инерции поперечных сечений также хорошо согласуются с экспериментальными /см. табл.1 и 3/.

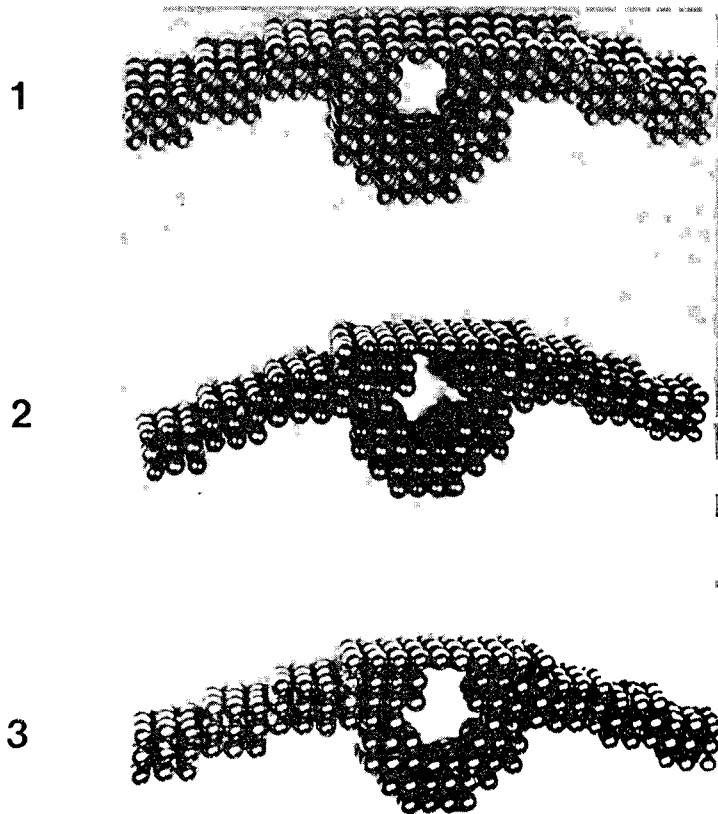


Рис.6. Модели молекулы антитела свиньи с различной толщиной F_{ab} и F_c частей. Нумерация моделей соответствует нумерации кривых на рис.5. Модель 1 - F_{ab} и F_c толстые, модель 2 - F_{ab} тоньше, чем F_c ; модель 3 - F_{ab} и F_c тонкие.

Новым качеством этой модели является то, что F_{ab} "руки" опущены, приближены к F_c части. Далее эту модель мы будем называть моделью "рубашки".

Хотя детальное согласие экспериментальных данных с модельной кривой не было столь полным, как в случае Т-модели для антител кролика /17/, модель "рубашки" для антител свиньи может рассматриваться как хорошее приближение. Y-модель должна быть исключена, поскольку она при всех вариантах приводит к подъему на кривых поперечного сечения, который не наблюдается в экспериментах.

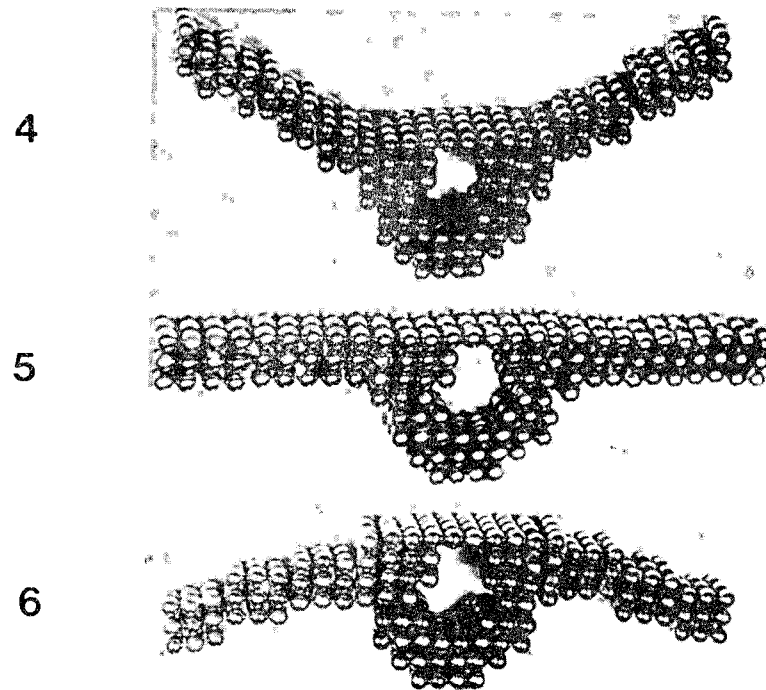


Рис.7. Модели молекул антитела свиньи с разными углами между F_{ab} участками. Нумерация моделей соответствует нумерации кривых на рис.5. №4 - Y-модель, №5 Т-модель, №6 - модель "рубашка".

ДИСКУССИЯ

Различия между преципитирующими и неprecипитирующими антителами

Общий характер построения поперечного сечения очень близок как для обоих рассматриваемых антител, так и для иммуноглобулинов G другого происхождения, поэтому можно ожидать сходства и для основных геометрических аспектов формы молекулы и взаимного расположения F_{ab} и F_c частей. Хотя различия в молекулярной геометрии преципитирующих и неprecипитирующих антител несущественны, малые различия параметров R_g , R_{q1} и R_{q2} наблюдаемы.

Поскольку молекулярный вес обоих типов антител примерно совпадает /150000/, меньший радиус инерции неprecипитирующего

антитела указывает на более компактную упаковку его массы, чем для преципитирующего. Это соображение согласуется с недавним наблюдением меньшего расстояния между центрами связывания в случае непреципитирующего антитела^{/30,31/}. Хотя и нет прямой связи между компактностью и жесткостью молекулы, наблюдение меньшей гибкости для непреципитирующего антитела свиньи^{/33,34/} служит указанием в пользу мнения о более компактной упаковке непреципитирующего антитела.

Радиусы инерции поперечного сечения R_{q_2} , соответствующие сечению F_{ab} частей молекулы^{/17/}, показывают, что F_{ab} части у непреципитирующего антитела на 10% толще, чем у преципитирующего. Для различий радиусов R_{q_1} столь определенного заключения сделать нельзя, поскольку на основной вклад в R_{q_1} , идущий от F_c части /рис.5/, F_{ab} части оказывают заметное влияние. Таким образом, при общем подобии формы, F_{ab} "руки" позднего антитела короче и толще. Картина, полученная с помощью малоуглового рассеяния нейтронов, является вполне приемлемой с точки зрения имевшихся ранее сведений. Полная длина F_{ab} фрагмента зависит от углов между образующими его составными частями, переменными и постоянными доменами. Из рентгеновской кристаллографии различных F_{ab} фрагментов^{/1/} известно, что они подвержены изменениям.

Эффект связывания гаптена

Наблюдавшееся нами уменьшение радиусов инерции антител свиньи при связывании лигандов^{/15/} согласуется с более ранними сообщениями Пильц с сотр.^{/13,14/}, относящимися к антителам кролика. Однако эти авторы не обнаружили заметных изменений радиусов инерции поперечных сечений. Наши дальнейшие исследования антител свиньи ясно показывают, что как R_{q_1} , так и R_{q_2} меняются при образовании комплекса антитело-/гаптен/₂.

Для обнаружения некоторой закономерности изменения параметров кривых рассеяния мы рассмотрели отношения соответствующих радиусов до и после связывания, т.е.

$$p_i = \frac{R_i \text{ /свободное антитело/}}{R_i \text{ /комплекс/}}, \quad /4/$$

где $i = g, q_1, q_2$. Значения p_i , приведенные в табл.4, показывают, что все они близки к общему среднему \bar{p} . Другими словами, все три радиуса, характеризующие свободное антитело, трансформируются в соответствующие радиусы комплексов антитело-

Таблица 4

Отношения радиусов инерции и радиусов инерции поперечного сечения при присоединении гаптена

Отношение	Преципитирующее антитело	Непреципитирующее антитело
ρ_g	1,05±0,02	1,08±0,02
ρ_{q_1}	1,06±0,01	1,11±0,01
ρ_{q_2}	1,10±0,02	1,12±0,03
$\bar{\rho} \text{ а/}$	1,065±0,008	1,105±0,009
$\bar{\rho} \text{ б/}$	1,083±0,006	

а/ Отношение, усредненное по ρ_g , ρ_{q_1} и ρ_{q_2} .

б/ Среднее отношение по преципитирующему и непреципитирующему антителам.

/гаптен/₂ путем деления на \bar{p} . Более того, если абсциссу k всей кривой рассеяния от свободного антитела умножить на \bar{p} , последняя в пределах экспериментальных ошибок преобразуется в кривую рассеяния от комплекса.

Такое подобие кривых рассеяния позволяет высказать предположение, что при связывании гаптена вся молекула антитела сжимается, оставаясь себе подобной, а взаимное расположение F_{ab} и F_c частей при этом существенно не изменяется. Однако этой точки зрения следует придерживаться с некоторой осторожностью, так как не существует взаимно однозначного соответствия между распределением рассеянной интенсивности и формой рассеивающего тела, т.е. множество различных форм могут дать одну и ту же кривую рассеяния.

Сокращение молекулы антитела без существенного изменения формы возможно лишь в том случае, если свободная молекула антитела упакована не максимально плотно, и в сокращении участвуют все части молекулы. Первое условие, очевидно, выполнено, поскольку междоменные каналы и зазоры обнаружены даже в кристаллической форме фрагментов иммуноглобулина.

Поскольку молекула антитела обладает заметной сегментной гибкостью, величина междоменных просветов, очевидно, флуктуирует. Сжатие молекулы антитела при связывании гаптена можно

также интерпретировать как сдвиг среднего значения этих про-светов в сторону уменьшения.

Как мы уже отмечали, уменьшение радиуса инерции поперечного сечения не было наблюде-но для антител кролика /13,14/. В связи с этим остается открытым вопрос, насколько общим является описанное выше сокращение целой молекулы.

Форма молекул антител и их фрагментов

При определении формы таких больших многодоменных молекул, какими являются молекулы антител, весьма соблазнительным пред-ставляется предварительное изучение формы отдельных составных частей молекулы, т.е. формы протеолитических фрагментов F_{ab} и F_c . Однако этот подход оказался безуспешным, так как фрагмен-ты в растворе приобретают стержнеобразную форму. Это наблюде-ние согласуется с более ранними исследованиями фрагментов иммуноглобулина человека /Пильц с сотр. /35/. Модель, по-строенная из трех стержней, дает кривую рассеяния, очень силь-но отличающуюся от экспериментальной.

Поэтому дополнительная информация для моделирования всей молекулы была взята из других источников. Так, форму F_c фрагмента в кристаллическом состоянии удалось включить в мо-дель, хорошо согласующуюся с экспериментом. Рыхлость C_{H2} до-мена, найденная при исследовании кристаллической формы F_c фрагмента /29/, также согласуется с характером построений попе-речного сечения для реальных антител в растворе.

Модель, предложенная в данной работе, визуализирует основ-ные очертания антитела, но не выявляет мелких различий между преципитирующими и неprecипитирующими антителами. Значения радиуса инерции /6,80 нм/ и расстояния между концами F_{ab} частей /27 нм/ модели №6 близки к экспериментальным значениям для преципитирующего антитела /80/. Лучшее совпадение модельных и экспериментальных значений достижимо путем уточнения толщины отдельных частей молекулы. Однако такое уточнение требует ис-пользования шаров по крайней мере вдвое меньшего диаметра. Поскольку время счета пропорционально 6-й степени обратной величины диаметра шара, выбор диаметра приходится делать с не-которой осмотрительностью.

Обе модели, Т-модель Пильц с сотр. /17/ и наша модель "ру-башки" описывают жесткие модели. Разумеется, такое описание несовершенно, так как молекулы иммуноглобулина обладают сег-ментной гибкостью. Экспериментально наблюдаемое распределение интенсивности является суперпозицией интенсивностей, рассея-ных молекулами, находящимися в разных конформационных состоя-ниях. Не исключено, что две модели /№5 и №6/, согласующиеся

с экспериментальными данными, как раз и представляют собой разные конформации, реализующиеся в растворе одновременно.

Авторы признательны И.Н.Сердюку /Институт белка АН СССР/ за ценные консультации и за предоставление возможности выполнить рентгеновские измерения. Мы благодарны академику И.М.Франку за постоянный интерес к этому исследованию, а также Д.Медешу /Институт гематологии, Будапешт/ за ценные дис-куссии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Davies D.R., Padlan E.A., Segal D.M. Ann.Rev.Biochem., 1975, 44, pp.639-667.
2. Metzger H. Adv.Immunol., 1974, 18, p.169-207.
3. Huber R. et al. Nature, 1976, 264, pp.415-420.
4. Cathou R.E., Kulczycki A. (Jr.), Haber E. Biochemistry, 1968, 7, pp.3958-3964.
5. Burton D.R. et al. FEBS Lett., 1979, 102, pp.249-252.
6. Wright J.K., Engel J., Jaton J.-C. Eur.J.Immunol., 1978, 8, pp.308-314.
7. Liberti P.A. et al. Biochemistry, 1972, 11, pp.3321-3326.
8. Schlessinger J. et al. Proc.Nat.Acad.Sci., U.S.A., 1975, 72, pp.2775-2779.
9. Lancet D., Pecht I. Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A., 1976, 73, pp.3549-3553.
10. Tumerman L.A., Nezlin R.S., Zagjansky Y.A. FEBS Lett., 1972, 19, pp.290-292.
11. Kaivarainen A.I., Nezlin R.S. Immunochemistry, 1976, 13, p.1001-1010.
12. Timofeev V.P. et al. FEBS Lett., 1979, 102, pp.103-106.
13. Pilz I. et al. Biochemistry, 1973, 12, pp.4998-5005.
14. Pilz I., Kratky O., Karush F. Eur.J.Biochem., 1974, 41, pp.91-96.
15. Cser L. et al. FEBS Lett., 1977, 80, pp.329-331.
16. Pilz I. et al. Biochemistry, 1975, 14, pp.1326-1333.
17. Pilz I. et al. Biochemistry, 1970, 9, pp.211-219.
18. Pilz I. Allgemeine und Prakt.Chem., 1970, 21, pp.21-29.
19. Cser L. et al. FEBS Lett., 1976, 68, pp.283-287.
20. Franek F., Simek L. Eur.J.Immunol., 1971, 1, pp.300-302.
21. Franek F., Doskokil J., Simek L. Immunochemistry, 1974, 11, pp.803-809.
22. Franek F. In: Antibody Structure and Molecular Immunology. FEBS Symposia, vol.36 (J.Gergely, G.A.Medgyesi, eds.), Akademiai Kiado, Budapest, pp.63-75.

23. Franek F., Olsovska Z., Simek L. Eur.J.Immunol., 1979, 9, pp.696-701.
24. Novotny J., Franek F. Abstracts 4th Eur.Immunology Meeting, Budapest, p.96.
25. Гладких И.А. и др. ОИЯИ, РЗ-11487, Дубна, 1978.
26. Щедрин Б.М., Фейгин Л.А. Кристаллография, 1966, 11, с.153-163.
27. Рольбин Ю.А. и др. Кристаллография, 1973, 18, с.701-705.
28. Kratky O., Pilz I. Quart.Rev.Biophys., 1978, 11, pp.39-70.
29. Deisenhofer J. et al. Hoppe-Seyler's. Z.Physiol.Chem., 1976, 357, pp.435-445.
30. Cser L. et al. FEBS Lett., 1978, 93, pp.312-316.
31. Cser L. et al. Immunology Lett., 1980, 1, pp.185-189.
32. Valentine R.C., Green N.M. J.Mol.Biol., 1967, 27, p.615-617.
33. Dudich E.I., Nezlin R.S., Franek F. FEBS Lett., 1978, 89, pp.89-92.
34. Sykulev Yu.K. et al. FEBS Lett., 1979, 101, pp.27-30.
35. Pilz I., Schwarz E., Palm W. Eur.J.Biochem., 1976, 71, pp.239-247.

Рукопись поступила в издательский отдел
7 июля 1980 года.

Нет ли пробелов в Вашей библиотеке?

Вы можете получить по почте перечисленные ниже книги, если они не были заказаны ранее.

Д1,2-8405	Труды IV Международного симпозиума по физике высоких энергий и элементарных частиц. Варна, 1974.	2 р. 05 к.
P1,2-8529	Труды Международной школы-семинара молодых ученых. Актуальные проблемы физики элементарных частиц. Сочи, 1974.	2 р. 60 к.
Д6-8846	XIV совещание по ядерной спектроскопии и теории ядра. Дубна, 1975.	1 р. 90 к.
Д13-9164	Международное совещание по методике проволочных камер. Дубна, 1975.	4 р. 20 к.
Д1,2-9224	IV Международный семинар по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1975.	3 р. 60 к.
Д-9920	Труды Международной конференции по избранным вопросам структуры ядра. Дубна, 1976.	3 р. 50 к.
Д9-10500	Труды II Симпозиума по коллективным методам ускорения. Дубна, 1976.	2 р. 50 к.
Д2-10533	Труды X Международной школы молодых ученых по физике высоких энергий. Баку, 1976.	3 р. 50 к.
Д13-11182	Труды IX Международного симпозиума по ядерной электронике. Варна, 1977.	5 р. 00 к.
Д17-11490	Труды Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1977.	6 р. 00 к.
Д6-11574	Сборник аннотаций XV совещания по ядерной спектроскопии и теории ядра. Дубна, 1978.	2 р. 50 к.
Д3-11787	Труды III Международной школы по нейтринной физике. Алушта, 1978.	3 р. 00 к.
Д13-11807	Труды III Международного совещания по пропорциональным и дрейфовым камерам. Дубна, 1978.	6 р. 00 к.
	Труды У1 Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна 1978. /2 тома/	7 р. 40 к.
Д1,2-12036	Труды V Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна 1978.	5 р. 00 к.
P18-12147	Труды III совещания по использованию ядерно-физических методов для решения научно-технических и народнохозяйственных задач.	2 р. 20 к.

Д1,2-12450	Труды XII Международной школы молодых ученых по физике высоких энергий. Приморско, НРБ, 1978.	3 р. 00 к.
P2-12462	Труды V Международного совещания по нелокальным теориям поля. Алушта, 1979.	2 р. 25 к.
Д-12831	Труды Международного симпозиума по фундаментальным проблемам теоретической и математической физики. Дубна, 1979.	4 р. 00 к.
Д-12965	Труды Международной школы молодых ученых по проблемам ускорителей заряженных частиц. Минск, 1979.	3 р. 00 к.
Д11-80-13	Труды рабочего совещания по системам и методам аналитических вычислений на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1979.	3 р. 50 к.
Д4-80-271	Труды Международной конференции по проблемам нескольких тел ядерной физике. Дубна, 1979.	3 р. 00 к.
Д4-80-385	Труды Международной школы по структуре ядра. Алушта, 1980.	5 р. 00 к.

Заказы на упомянутые книги могут быть направлены по адресу:

101000 Москва, Главпочтамт, п/я 79,

издательский отдел Объединенного института ядерных исследований