



УДК 577.112.6.012.6:543.422.25

© 1993 Т. А. Балашова, В. С. Пашков,
Д. Е. Нольде, Л. В. Оноприенко, И. И. Михалева,
Л. В. Самохвалова, Г. В. Малахова, А. С. Арсеньев

КОНФОРМАЦИЯ ФРАГМЕНТА 66—72 ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 В КОМПЛЕКСЕ С МОНОКЛОНАЛЬНЫМ АНТИТЕЛОМ К ИНТЕРЛЕЙКИНУ-2

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва

Проанализированы спектры $^1\text{H-NMR}$ синтетического фрагмента $\text{As-Leu}^{66}\text{-Glu-Glu-Val-Leu-Asp-Leu}^{72}\text{-OCH}_3$ интерлейкина-2 человека в отсутствие и в присутствии моноклонального антитела. Согласно полученным данным, в водном растворе пептид имеет развернутую неупорядоченную конформацию. Расчеты, основанные на результатах измерения величин кросс-пиков ЯЭО в спектрах NOESY смеси пептид — антитело, позволили определить пространственное строение связанного с антителом пептида (близко к α_R -спирали), а также выявить наличие гидрофобного и гидрофильного кластеров на противоположных сторонах поверхности связанного с антителом пептида. Гидрофобный кластер контактирует с поверхностью антитела, а гидрофильный экспонирован в растворитель. В присутствии антитела происходит гидролиз С-концевой метоксильной группы пептида, что, несколько понижая аффинность пептида к антителу, не влияет на конформацию пептида в комплексе с антителом.

Исследование межмолекулярных взаимодействий, возникающих при формировании комплексов антиген — антитело, имеет фундаментальное значение для установления принципов, лежащих в основе химической комплементарности и специфичности реакций, протекающих в живых организмах. Основываясь главным образом на результатах рентгеноструктурного анализа комплексов Fab-фрагментов антител с гаптенами [1] и лизоцимом [2], установили, что специфичность и высокая аффинность взаимодействия антиген — антитело обусловлены стерическим соответствием участков связывания и образованием в области контакта многочисленных взаимодействий (водородные связи, гидрофобные и электростатические взаимодействия). Природа этих взаимодействий пока еще недостаточно широко исследована для проведения обобщений, позволяющих на основании первичной структуры антитела предсказать его антигенную специфичность [3]. Для выяснения механизма связывания антигена с антителом существенное значение имеет выявление взаимодействий, приводящих к связыванию антигена с антителом, а также установление конформации молекулы антигена в комплексе антиген — антитело.

Недавно [4] методом спектроскопии $^1\text{H-NMR}$ мы исследовали взаимодействие между моноклональным антителом ЛНКБ-2 (или его Fab-фрагментом) и 10 синтетическими пептидами, соответствующими участку 59—78 полипептидной цепи интерлейкина-2. Результаты этого исследования показали, что взаимодействие пептид — антитело имеет гидрофобный характер — в связывании с антителом (Fab-фрагментом) участвуют метильные группы остатков $\text{Leu}^{66, 70, 72}$, Val^{69} и Ala^{73} интерлейкина-2; минимальным фрагментом молекулы интерлейкина-2,

Химические сдвиги (δ , м. д.) и КССВ ($^3J_{\text{NH}-\text{C}^\alpha\text{H}}$, Гц) протонов пептида (I) в смеси пептид — антитело ($\approx 30:1$) в H_2O , pH 5,57, 30° С*

Остаток	δ , м. д.					$^3J_{\text{NH}-\text{C}^\alpha\text{H}}$, Гц
	NH	C $^\alpha$ H	C $^\beta$ H	C $^\gamma$ H	Другие	
COCH ₃					CH ₃ 2,02	
Leu ⁶⁶	8,22	4,30	1,61	1,66	C $^\delta$ H ₃ 0,90; 0,95	6,3
Glu ⁶⁷	8,49 (8,47)	4,25 (4,27)	1,93; 2,04	2,26		6,1
Glu ⁶⁸	8,34 (8,33)	4,28	1,93; 2,02	2,20 2,24		6,6
Val ⁶⁹	8,12 (8,16)	4,07 (4,09)	2,07 (2,06)	0,93 0,96		7,3
Leu ⁷⁰	8,26 (8,30)	4,35 (4,39)	1,63; 1,68	1,62	C $^\delta$ H ₃ 0,88; 0,95	6,8
Asn ⁷¹	8,38 (8,36)	4,75	2,71; 2,81 (2,70) (2,82)		N $^\delta$ H ₂ 6,86; 7,57	7,7
Leu ⁷²	8,22 (7,78)	4,42 (4,18)	1,67 (1,59)	1,61	C $^\delta$ H ₃ 0,87; 0,94	7,3
OCH ₃					CH ₃ 3,78	

* В скобках приведены химические сдвиги протонов пептида (II), не совпадающие с химическими сдвигами эквивалентных по структуре протонов пептида (I).

сохраняющим способность связываться с антителом, является фрагмент -Leu⁷⁰-Asn⁷¹-Leu⁷²-.

В настоящей работе определена конформация синтетического пептида Ac-Leu⁶⁶-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu⁷²-OCH₃ (I) в комплексе с моноклональным антителом ЛНKB-2.

Анализ спектров DQF-COSY и HONANA MLEV-17 пептида позволил идентифицировать сигналы от протонов спиновых систем индивидуальных аминокислотных остатков. Синглетные сигналы от протонов ацетильной (2,05 м. д.) и метоксильной (3,78 м. д.) групп, а также амидной группы боковой цепи остатка Asn (7,57 и 6,86 м. д.) обладают характерными для этих групп химическими сдвигами, и их идентификация в спектрах не вызвала затруднений. Отнесение сигналов от протонов индивидуальных аминокислотных остатков к положению в первичной структуре молекулы белка или пептида обычно основывается на результатах анализа связей $d_{\alpha\text{N}}[i, i+1]$, $d_{\beta\text{N}}[i, i+1]$, $d_{\text{NN}}[i, i+1]$, отвечающих наличию кросс-пиков ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) между протоном NH ($i+1$)-го остатка и соответственно протонами C $^\alpha$ H, C $^\beta$ H, α -NH i -го в первичной структуре остатка [5, 6]. В спектрах NOESY водных растворов пептида кросс-пики ЯЭО не проявлялись даже при величинах $\tau_m = 600$ мс, что типично для водных растворов пептидов подобного размера [7]. Поэтому соотнесение спиновых систем протонов аминокислотных остатков с аминокислотной последовательностью пептида выполнено при анализе спектров ROESY [8, 9] с $\tau_m = 300$ и 400 мс. Полное отнесение сигналов в спектрах ^1H -ЯМР пептида приведено в табл. 1.

Представление о вторичной структуре пептида в растворе можно получить из оценки интенсивностей кросс-пиков ЯЭО между протонами основной цепи и констант спин-спинового взаимодействия (КССВ) протонов NH-C $^\alpha$ H [10, 11]. В ROESY-спектрах пептида наблюдаются интенсивные кросс-пики между протоном C $^\alpha$ H i -го остатка и протоном NH $i+1$ -го остатка (см. рис. 1а). Этот факт,

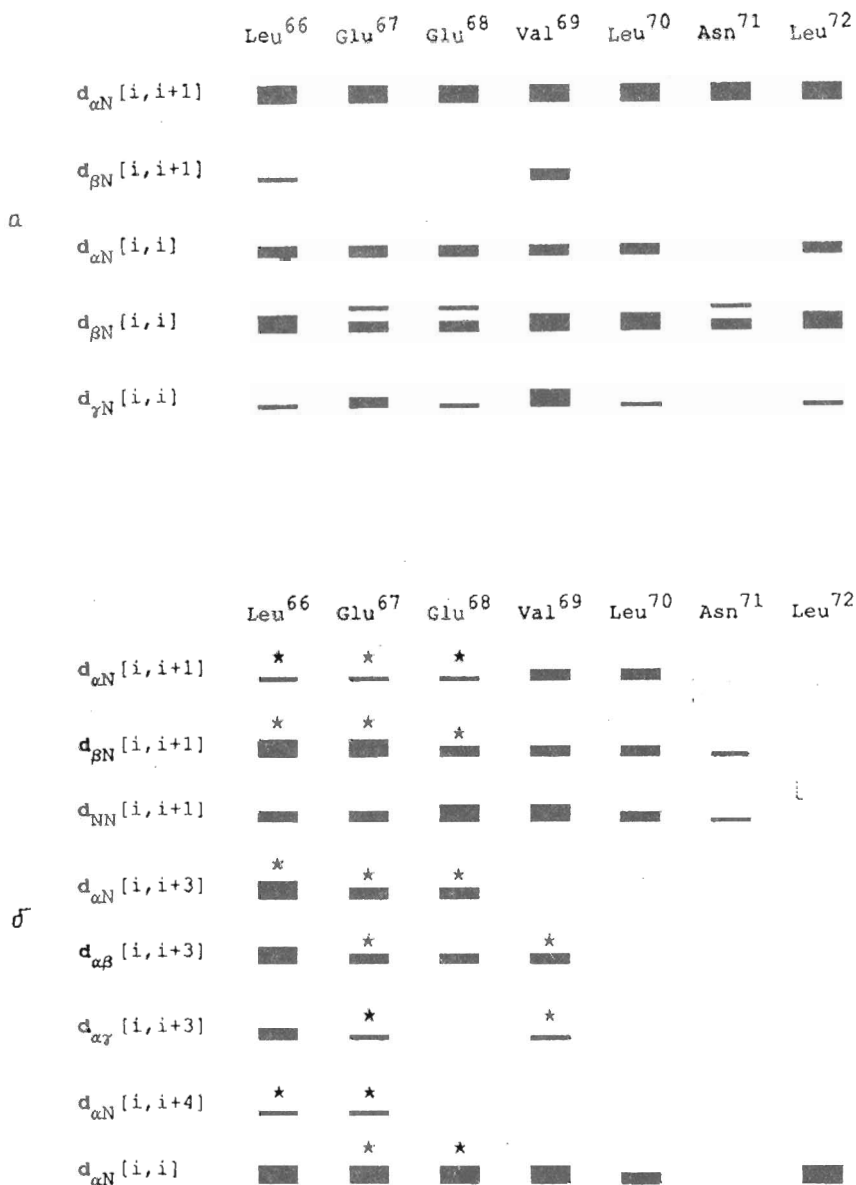


Рис. 1. d -Связи, наблюдавшиеся в спектре ROESY ($\tau_m = 400$ мс) свободного пептида (а) и в спектре NOESY ($\tau_m = 300$ мс) смеси пептид — антитело ($\approx 30 : 1$) (б). Толщина линии, отвечающей d -связи, характеризует величину (большая, средняя и малая) соответствующего кросс-пика ЯЭО. Номера аминокислотных остатков соответствуют аминокислотной последовательности интерлейкина-2. Звездочкой помечены d -связи, кросс-пики которых были неоднозначно идентифицированы на начальных этапах анализа конформации пептида. Несколько $d_{\beta N}[i, i]$ -связей, наблюдавшихся в спектре ROESY, показаны двумя линиями, характеризующими величины по отдельности измеренных в спектре кросс-пиков между протонами NH и C ^{β} H, NH и C ^{β'} H

а также значения КССВ протонов NH-C ^{α} H, лежащие в диапазоне 6,1—7,7 Гц (см. табл. 1), свидетельствуют о том, что в водных растворах пептид имеет развернутую неупорядоченную конформацию.

В присутствии антитела сигналы протонов пептида существенно уширяются.

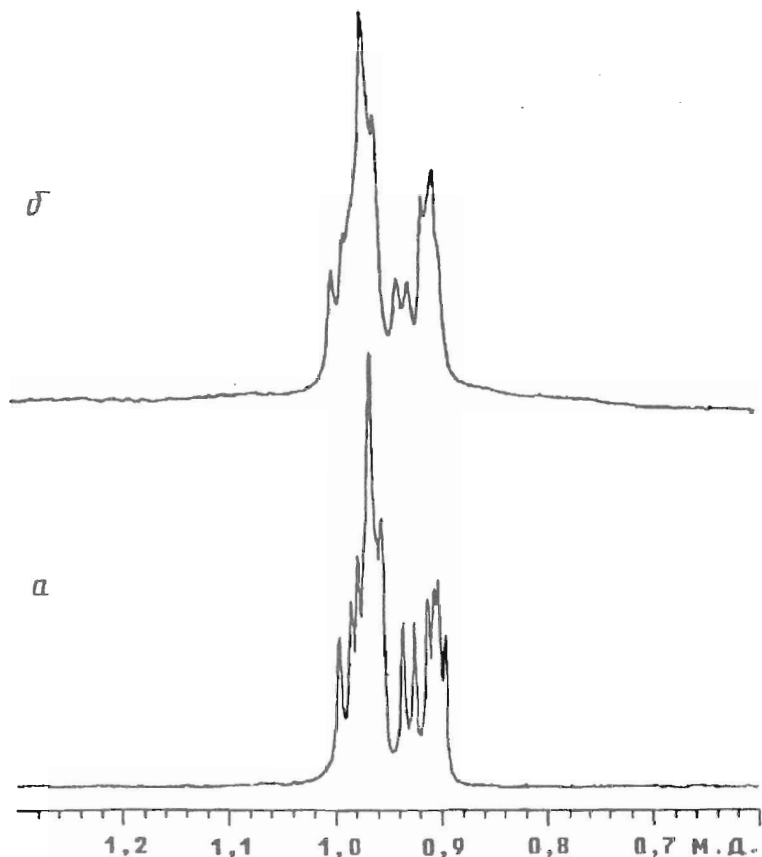


Рис. 2. Сигналы от метильных протонов в спектре ^1H -ЯМР пептида (I) в отсутствие (а) и в присутствии (б) антитела при соотношении молярных концентраций пептид — антитело ($\approx 30 : 1$)

По мере возрастания концентрации пептида уширение уменьшается, но остается заметным даже при молярном соотношении пептид — антитело $\approx 30 : 1$ (см. рис. 2). Это свидетельствует о быстром в шкале времени ЯМР обмене молекул пептида между свободным и связанным с антителом состояниями [12, 13]. Быстрый обмен пептида между свободным и связанным с антителом состояниями приводит к тому, что сигналы от протонов пептида в свободном и связанном в комплекс состояниях сливаются, образуя один набор сигналов пептида. Параметры образовавшихся таким образом сигналов пептида (ширина сигнала, химический сдвиг, константы спин-спинового взаимодействия и т. д.) по мере увеличения фракции свободного пептида приближаются к параметрам сигналов пептида в отсутствие антитела. Эффект быстрого обмена пептида между свободным и связанным состояниями был использован в данной работе для облегчения идентификации кросс-пиков ЯЭО между протонами пептида в спектрах NOESY смеси пептид — антитело. В этих спектрах, полученных в условиях существенного преобладания фракции пептида в свободном состоянии, на фоне широких кросс-пиков ЯЭО протонов антитела достаточно легко идентифицировать узкие кросс-пики ЯЭО пептида. В отличие от свободного пептида в смеси пептида с антителом в спектрах NOESY наблюдаются кросс-пики ЯЭО отрицательной интенсивности. Возникновение этих кросс-пиков обусловлено высокой скоростью кросс-релаксации между пространственно сближенными протонами комплекса пептид —

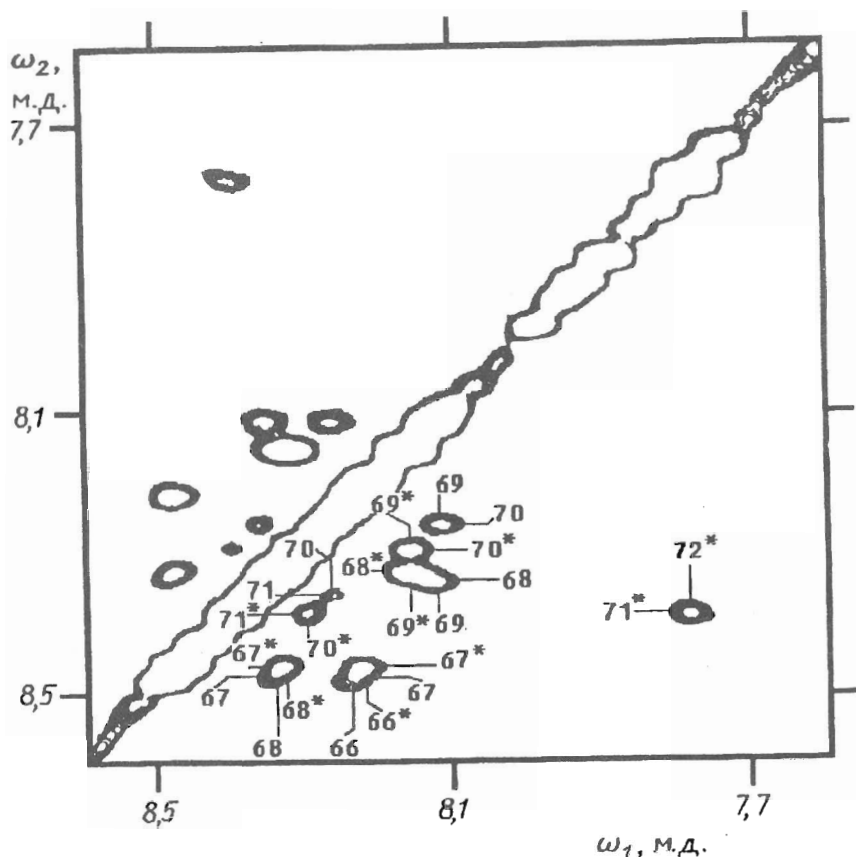


Рис. 3. Область NH/NH ($\omega_1, \omega_2 = 7,5-8,6$ м. д.) спектра NOESY ($\tau_m = 300$ мс) смеси пептид — антитело ($\approx 30:1$), pH 5,57, 30° С. Номера остатков соответствуют аминокислотной последовательности интерлейкина-2. Кросс-пики ЯЭО пептида (II) помечены звездочкой

антитело, что типично для макромолекул [14]. В спектрах NOESY смеси пептид — антитело следует ожидать появления кросс-пигов, обусловленных кросс-релаксацией между: 1) протонами антитела; 2) протонами антитела и протонами связанного с антителом пептида; 3) между протонами пептида, находящегося в комплексе с антителом. Кросс-релаксация между протонами свободного пептида не вносит вклад в интенсивность кросс-пигов в спектре NOESY, что отмечалось выше при обсуждении спектров NOESY пептида в отсутствие антитела.

Идентификация кросс-пигов ЯЭО, отвечающих протонам пептида, в спектрах NOESY смеси пептид — антитело была начата с наиболее разрешенной и, следовательно, наиболее легко интерпретируемой области спектра, в которой расположены кросс-пики ЯЭО от протонов NH. В этой области были обнаружены две группы подобных по ширине кросс-пигов ЯЭО (см. рис. 3). Кросс-пики второй группы, едва заметные в свежеприготовленной смеси пептид — антитело, по мере стояния образца становились более интенсивными, тогда как кросс-пики первой группы уменьшались. Для установления природы изменений, которые пептид претерпевает в присутствии антитела, на 6-й день после приготовления смеси пептид — антитело был снят спектр HONANA MLEV-17. Анализ этого спектра позволил идентифицировать кросс-пики от протонов, связанных спин-спиновым взаимодействием, и определить их химические сдвиги (см. табл. 1).

Интервалы допустимых значений торсионных углов φ , ψ и χ^1 , установленные при анализе локальной структуры гептапептида на основе результатов измерения величин кросс-пиков ЯЭО в спектре NOESY ($\tau_m = 100$ мс) смеси пептид — антитело ($\approx 30 : 1$)

Остаток	φ	ψ	χ^1
Leu ⁶⁶		$-90 \div -10$	$-90 \div -30$
Glu ⁶⁷	$170 \div -30$	$-90 \div -160$	
Glu ⁶⁸	$170 \div -30$	$-90 \div -160$	
Val ⁶⁹	$-170 \div -30$	$-90 \div 90$	$30 \div -150$
Leu ⁷⁰	$-110 \div -30$	$-90 \div -10$	$-90 \div -30$
Asn ⁷¹	$160 \div 80$	$-90 \div -160$	
Leu ⁷²	$-170 \div 50$		$150 \div -30$

Химические сдвиги возрастающих со временем сигналов хорошо согласовались с химическими сдвигами протонов пептида Ac-Leu⁶⁶-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu⁷²-ОН (II) [4], у которого С-концевой остаток содержит незащищенную α -COOH-группу. Следовательно, присутствие антитела приводит к медленному гидролизу сложноефирной связи —COOCH₃ пептида. Сопоставление интенсивностей сигналов в спектрах ¹H-ЯМР смеси пептид — антитело ($\approx 30 : 1$) позволило оценить скорость гидролиза пептида — для протекания гидролиза наполовину требуется около 8 сут. Идентификация кросс-пиков ЯЭО в спектрах NOESY смеси пептид — антитело, начатая с области кросс-пиков ЯЭО между протонами NH-групп, была продолжена в ходе анализа других областей спектров NOESY, полученных при $\tau_m = 100, 200$ и 300 мс.

В спектре NOESY ($\tau_m = 100$ мс) смеси пептид — антитело были обнаружены кросс-пики ЯЭО между протонами пептидов (I) и (II), входящими в состав одного и того же или соседних в аминокислотной последовательности пептида остатков. В спектре NOESY с $\tau_m = 300$ мс, помимо кросс-пиков ЯЭО, присутствующих при $\tau_m = 100$ мс, были достаточно хорошо видны также кросс-пики ЯЭО между протонами удаленных в первичной структуре пептида остатков. Хотя близость значений химических сдвигов ряда неэквивалентных по первичной структуре протонов не позволила на этом этапе провести однозначное отнесение части кросс-пиков ЯЭО, тем не менее результаты анализа спектров NOESY привели к двум заслуживающим внимания выводам. Во-первых, между спектром ROESY пептида (антитело отсутствует) и спектром NOESY смеси пептид — антитело наблюдаются существенные различия в наличии или относительных интенсивностях кросс-пиков ЯЭО (см. рис. 1), что указывает на различие конформаций пептида в свободном состоянии и в комплексе с антителом. Во-вторых, поскольку в спектрах NOESY смеси пептид — антитело для пептидов (I) и (II) наблюдается один и тот же набор кросс-пиков ЯЭО с одинаковыми относительными интенсивностями, в комплексе с антителом оба пептида имеют аналогичную конформацию.

Наличие кросс-пиков ЯЭО между протонами α -NH-групп соседних в первичной структуре аминокислотных остатков свидетельствуют о том, что в комплексе с антителом пептид (I) и его гидролизованый аналог (II) имеют спиральную конформацию. В спектрах NOESY смеси пептид — антитело были обнаружены кросс-пики ЯЭО (см. рис. 1б), интенсивности которых характерны [10, 11] для конформации правой α -спирали: $C^{\alpha}H(i) - NH(i+3)$, $C^{\alpha}H(i) - NH(i+4)$, $C^{\alpha}H(i) - C^{\beta}H(i+3)$, $C^{\beta}H(i) - NH(i+1)$ и $C^{\alpha}H(i) - NH(i+1)$, где i — номер аминокислотного остатка в первичной структуре пептида. Хотя на данном этапе анализа многие из этих кросс-пиков ЯЭО еще не были однозначно отнесены к

Усредненные значения торсионных углов $\varphi, \psi, \chi^1, \chi^2$ для 10 конформаций пептида (см. рис. 4), полученных при помощи программы DIANA и обладавших минимальной величиной штрафной функции

Остаток	φ	ψ	χ^1	χ^2
Leu ⁶⁶		$-37,0 \pm 0,1$	$-26,5 \pm 0,0$	$-18,9 \pm 0,0$
Glu ⁶⁷	$-36,2 \pm 0,2$	$-56,1 \pm 0,8$	$-163,2 \pm 0,3$	$-135,3 \pm 3,1$
Glu ⁶⁸	$-58,4 \pm 1,2$	$-38,5 \pm 0,9$	$-115,1 \pm 1,2$	$132,6 \pm 40,3$
Val ⁶⁹	$-61,3 \pm 1,1$	$-59,4 \pm 5,7$	$126,0 \pm 0,6$	
Leu ⁷⁰	$-72,9 \pm 6,4$	$-7,2 \pm 0,1$	$-45,4 \pm 0,5$	$-173,0 \pm 1,0$
Asn ⁷¹	$-86,7 \pm 1,5$	$-48,4 \pm 1,7$	$144,8 \pm 1,8$	$20,2 \pm 1,5$
Leu ⁷²	$51,7 \pm 5,3$		$-131,2 \pm 15,9$	$-17,5 \pm 89,1$

конкретным парам протонов, полученные результаты дают веское основание полагать, что в комплексе с антителом вторичная структура пептида близка к правой α -спирали.

Незначительные концентрации комплексов пептид — антитело по сравнению с концентрацией свободных пептидов приводят к тому, что константы спин-спинового взаимодействия, установленные из расщепления сигналов от протонов пептидов в спектре ¹H-ЯМР смеси пептид — антитело, практически не отличаются от констант спин-спинового взаимодействия протонов пептидов в отсутствие антитела. Таким образом, единственным реальным источником информации о конформации пептида в комплексе с антителом остаются кросс-пики ЯЭО между протонами пептидов в спектрах NOESY смеси пептид — антитело. При достаточно коротких временах τ_m кросс-пики ЯЭО в спектрах NOESY пептидов или белков проявляются между протонами, находящимися на расстоянии менее 5 Å друг от друга [15, 16], а объем кросс-пика ЯЭО обратно пропорционален шестой степени расстояния между протонами. Это, в принципе, позволяет использовать объемы кросс-пиков ЯЭО для более точной оценки расстояний между протонами, находящимися на расстоянии менее 5 Å [12, 13, 17].

Перекрытие кросс-пиков ЯЭО в спектрах NOESY смеси пептид — антитело не позволяет установить с достаточной точностью объемы многих индивидуальных кросс-пиков, используя стандартное программное обеспечение ЯМР-спектрометра UNITY 600. По этой причине в данной работе в качестве меры величины кросс-пиков использовались не объемы, а площади их сечений плоскостями, проведенными через вершину кросс-пика параллельно оси ω_2 . Эффективность и адекватность такого измерения величины кросс-пиков ЯЭО продемонстрированы в работе [18].

В спектрах NOESY смеси пептид — антитело были измерены величины как кросс-пиков ЯЭО, образованных в результате слияния кросс-пиков, отвечающих эквивалентным по структуре протонам пептида или его гидролизованного аналога (химические сдвиги этих протонов в пептидах близки), так и индивидуальных кросс-пиков ЯЭО между протонами пептида и его аналога (в случае существенных различий химических сдвигов у эквивалентных по структуре протонов этих пептидов). Учитывая уже отмеченное выше сходство конформаций пептида и его аналога в комплексе с антителом, мы провели суммирование площадей кросс-пиков ЯЭО, отвечающих различающимся по химическим сдвигам, но эквивалентным по первичной структуре протонам пептидов. Это суммирование существенно упростило последующие расчеты, поскольку отпала необходимость учитывать сосуществование двух пептидов в смеси пептид — антитело: вместо двух наборов кросс-пиков ЯЭО в расчеты вводился один суммарный набор

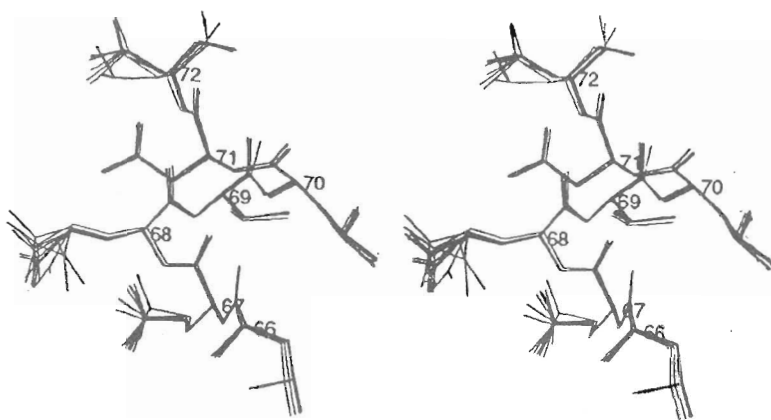


Рис. 4. Стереобразное изображение 10 совмещенных конформаций пептида в комплексе с антителом, вычисленных с помощью программы DIANA и имеющих минимальное значение штрафной функции. Конформации совмещены по атомам основной цепи остатков Leu⁸⁶—Leu⁷². Номерами обозначены C^α-атомы пептида. Номера остатков соответствуют аминокислотной последовательности интерлейкина-2

кросс-пиков ЯЭО, вместо вычислений двух весьма сходных конформаций (конформации пептидов (I) и (II)) вычислялась одна.

Расчет конформации пептида в комплексе пептид — антитело был начат с анализа локальной структуры пептида с помощью программы CONFONMR. Цель анализа — установление ограничений, накладываемых экспериментальными данными, на допустимые значения углов φ_i , ψ_i и ротамеры боковых цепей аминокислотных остатков (угол χ_i^1). В качестве экспериментальных данных в расчетах использованы величины кросс-пиков ЯЭО, измеренные в спектре NOESY ($\tau_m = 100$ мс), поскольку в этом спектре влияние спиновой диффузии на интенсивности кросс-пиков минимально (влияние этого фактора, нарастающее с ростом τ_m , увеличивает неточность вычисления межпротонных расстояний из величин кросс-пиков ЯЭО [17]). В результате анализа локальной структуры для всех возможных углов φ_i и ψ_i пептида были определены интервалы допустимых значений, а для 4 остатков получены ограничения на ротамеры боковой цепи (см. табл. 2).

Расчет конформации пептида проводился с помощью программы DIANA. В расчетах были использованы ограничения на интервалы допустимых значений углов φ_i , ψ_i и χ_i^1 , установленные при анализе локальной структуры (см. табл. 2), и результаты измерения величин кросс-пиков ЯЭО между протонами пептида в спектре NOESY ($\tau_m = 300$) смеси пептид — антитело (величины кросс-пиков ЯЭО между эквивалентными по первичной структуре парами протонов пептида и его аналога были суммированы, см. выше). В предварительных расчетах конформации учитывались лишь кросс-пики ЯЭО, чье отнесение к конкретным протонам пептида не вызывало сомнений. Из 50 конформаций пептида, полученных программой DIANA, отобрана конформация, имевшая минимальную величину штрафной функции. Эта конформация была использована для вычисления теоретических интенсивностей кросс-пиков ЯЭО между протонами пептида. Сопоставление величин теоретических и экспериментально измеренных кросс-пиков ЯЭО между протонами пептида позволило устранить неоднозначность отнесения ряда кросс-пиков ЯЭО в спектре NOESY. Это дало возможность увеличить количество экспериментальных данных, учитываемых на заключительных стадиях вычислений конформации пептида, и достаточно хорошо определить пространственное строение пептида в комплексе с антителом (см. табл. 3).

Для 10 конформаций пептида, обладавших минимальной величиной штрафной функции (см. рис. 4), среднеквадратичное отклонение координат тяжелых атомов составило $0,63 \pm 0,14$ Å; если учитывать только тяжелые атомы основной цепи, то среднеквадратичное отклонение составляет $0,22 \pm 0,13$ Å. Согласно результатам расчетов, в комплексе с антителом пептид имеет конформацию, близкую к правой α -спирали. В составе комплекса атомы основной цепи пептида, по-видимому, образуют три внутримолекулярные водородные связи. Для 10 конформаций, обладавших минимальной штрафной функцией, расстояния между атомами кислорода карбонильных групп и атомами водорода NH-групп аминокислотных остатков 1 и 5, 2 и 6, 3 и 7 составляли соответственно $1,82 \pm 0,01$, $1,98 \pm 0,03$, $1,62 \pm 0,06$ Å.

В расположении боковых цепей пептида (см. рис. 4) можно проследить характерную закономерность, приводящую к ярко выраженной амфифильности поверхности молекулы пептида: гидрофильные боковые цепи остатков Glu⁶⁷, Glu⁶⁸ и Asn⁷¹ располагаются вдоль одной из сторон поверхности пептида, тогда как гидрофобные боковые цепи остатков Leu⁶⁶, Val⁶⁹, Leu⁷⁰ и Leu⁷² расположены на противоположной стороне поверхности.

Таким образом, пептид в водном растворе имеет развернутую неупорядоченную конформацию. Добавление к раствору пептида антитела приводит к медленному гидролизу сложноэфирной связи CO—OCH₃ C-концевого аминокислотного остатка пептида, в результате чего концентрация пептида со временем падает, а концентрация его гидролизованного аналога возрастает. Сигналы протонов гидролизованного аналога пептида в меньшей степени уширены антителом по сравнению с сигналами пептида. Это, по всей видимости, связано с понижением аффинности пептида к антителу при появлении отрицательно заряженной C-концевой карбоксильной группы. Анализ интенсивностей кросс-пиков ЯЭО в спектрах NOESY показал, что в комплексе с антителом пептид и его аналог имеют одинаковую конформацию — правую α -спираль (см. рис. 4). Следует отметить, что использованное в данной работе антитело получено к рекомбинантному интерлейкину-2, у которого, согласно рентгеноструктурным данным [19], участок 66—78 имеет конформацию правой α -спирали.

Таким образом, пептид, не имеющий в растворе упорядоченной конформации, при взаимодействии с антителом принимает конформацию соответствующего фрагмента молекулы интерлейкина-2, к которому продуцировалось антитело [4]. Модель пространственного строения пептида (см. рис. 4) и данные о боковых цепях пептида, контактирующих с антителом в комплексе пептид — антитело, позволяют определить поверхность, которой пептид связывается с антителом. Согласно работе [4], в контакт с поверхностью антитела попадают боковые цепи остатков Leu⁶⁶, ⁷⁰, ⁷², Val⁶⁹. Боковые цепи этих аминокислотных остатков располагаются на одной из сторон α -спирали, формируя гидрофобную область, участвующую в связывании с антителом. Гидрофильные боковые цепи остатков Glu⁶⁷, ⁶⁸ и Asn⁷¹, сгруппированные на противоположной стороне спиральной структуры в комплексе пептид — антитело, судя по всему, экранированы в растворитель.

Экспериментальная часть

В работе использовано моноклональное антитело IgG1 класса, полученное к рекомбинантному интерлейкину-2 человека. Получение и очистка антитела выполнены как в работе [4].

Пептид Ac-Leu¹-Glu²-Glu³-Val⁴-Leu⁵-Asn⁶-Leu⁷-OCH₃ (I), соответствующий участку 66—72 интерлейкина-2 человека, получен методами классического пептидного синтеза в растворе и очищен как в [4].

Спектры ¹H-ЯМР (600 МГц) были сняты на спектрометре Unity 600 (Varian, США) при 30° С в 5-мм ампулах. Объем образца составлял 0,7 мл. В качестве растворителя использовалась смесь обычной и тяжелой воды (¹H₂O : ²H₂O = 9 : 1).

Концентрация пептида в образцах, использованных для съемки спектров ^1H -ЯМР в отсутствие антитела, составляла 5,7 мМ. Концентрация антитела в образцах составляла приблизительно 0,2 мМ; концентрация пептида (в присутствии антитела) при съемке одномерных спектров ^1H -ЯМР варьировала в интервале 0,18—5,7 мМ, а при съемке двумерных спектров ^1H -ЯМР составляла 3,8 или 5,7 мМ (т. е. молярная концентрация пептида в смеси пептид — антитело приблизительно в 20 или 30 раз преобладала над концентрацией антитела).

При съемке спектров ^1H -ЯМР перед очередным повторением импульсной последовательности вводилась пауза длительностью 1 с. Для уменьшения динамического диапазона спектров сигнал растворителя (протоны H_2O) непрерывно облучался слабым радиочастотным полем, которое выключалось лишь на время регистрации сигнала свободной индукции. Все 2D-спектры ^1H -ЯМР снимали в фазоизбирательном режиме, используя стандартное программное обеспечение спектрометра Unity 600 (программа VNMR 3.2). При получении спектров HONANA MLEV-17 время смещения компонентов намагниченности составляло 60 или 80 мс. В отсутствие антитела спектры NOESY пептида получены с временем обмена компонент намагниченности $\tau_m = 300$ и 600 мс, спектры ROESY — с $\tau_m = 300, 400$ мс. Спектры NOESY смеси пептид — антитело сняты при $\tau_m = 100, 200, 300, 600$ мс.

Для измерения интегральных интенсивностей кросс-пиков в спектрах NOESY смеси пептид — антитело использовался модифицированный вариант программы FELIX (Hare Research, Inc, США). Перед преобразованием Фурье матрицы экспериментальных данных умножали на весовые функции (синус, сдвинутый по фазе на $70\text{--}90^\circ$) и дополняли нулями. Полученные таким образом спектры NOESY представляли собой матрицу данных, имеющую размеры 2048×2048 и разрешение 2,93 Гц на точку по обоим (ω_1 или ω_2) направлениям спектра. В качестве меры объема кросс-пика использовалась площадь сечения кросс-пика плоскостью, параллельной направлению ω_2 и проходящей через вершину кросс-пика. Для вычисления площадей сигналов в плоскости сечения сначала проводилась коррекция базовой линии, а затем сигналы аппроксимировали смесью лоренцевой и гауссовой линий, как в работе [18]. Качество аппроксимации оценивали при визуальном сравнении расчетного и экспериментального сигналов и при неудовлетворительном соответствии моделирование сигналов повторяли. Результаты вычислений показали, что этот метод позволяет с достаточно высокой точностью вычислять площадь сечения индивидуальных кросс-пиков даже при их частичном перекрытии.

Анализ локальной структуры пептида в комплексе пептид — антитело выполнен с помощью программы CONFORNMR [20—22]. Цель анализа — определение ограничений, накладываемых экспериментальными данными (интенсивности кросс-пиков ЯЭО) на допустимые интервалы углов φ_i, ψ_i и χ_i , где i — номер аминокислотного остатка в первичной структуре гептапептида.

Расчеты конформации пептида в комплексе пептид — антитело выполнены с помощью дистанционного алгоритма DIANA [23]. В качестве экспериментальных данных в расчеты вводили ограничения на допустимые значения двугранных углов $\varphi_i, \psi_i, \chi_i$ (результат анализа локальной структуры пептида) и межпротонные расстояния $d_{k,l}$, вычисленные из результатов измерения величин кросс-пиков в спектре NOESY ($\tau_m = 300$ мс):

$$d_{k,l} = \begin{cases} \alpha (S_c - S_0)^{-1/6}, & \text{если } S_c > S_0 \\ R, & \text{если } S_c < S_0 \end{cases}$$

где $d_{k,l}$ — расстояние между протонами k и l (Å); S_c — площадь сечения кросс-пика ЯЭО между протонами k и l ; $R = 5$ Å — верхний предел расстояния между протонами для малоинтенсивных кросс-пиков ЯЭО; α и S_0 — параметры калиб-

ровки, вычисленные при сопоставлении величин S_c у двух кросс-пиков ЯЭО с известными межпротонными расстояниями [18].

В качестве кросс-пиков ЯЭО с известными межпротонными расстояниями использовали кросс-пик ЯЭО между HN Glu⁶⁷ и HN Glu⁶⁸ (2,8 Å), а также кросс-пик ЯЭО между протонами C^αH Glu⁶⁸ и C^βH Glu⁶⁸ (2,5 Å). Выбор этих кросс-пиков для вычисления калибровочных параметров основывался на результатах анализа локальной структуры пептида. На заключительной стадии расчета пространственной структуры гептапептида в комплексе с антителом учитывалось 114 межпротонных расстояний.

Авторы выражают благодарность акад. В. Т. Иванову (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН) за плодотворные обсуждения результатов работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alzari P. M., Lascombe M.-B., Brunori M., Giardina B., Falcioni G., Perutz M. F. // *J. Mol. Biol.* 1984. V. 178. № 3. P. 731—742.
2. Givol D. // *Mol. Immunol.* 1991. V. 28. № 12. P. 1379—1386.
3. Poljak R. J. // *Mol. Immunol.* 1991. V. 28. № 12. P. 1341—1345.
4. Балашова Т. А., Пауков В. С., Оноприенко Л. В., Михалева И. И., Мареева Т. Ю., Петрова Е. Э., Несмеянов В. А., Иванов В. Т. // *Биоорганич. химия.* 1991. Т. 17. № 11. С. 1470—1486.
5. Billeter M., Braun W., Wüthrich K. // *J. Mol. Biol.* 1982. V. 155. № 3. P. 321—346.
6. Wüthrich K. // *Biopolymers.* 1983. V. 22. № 1. P. 131—138.
7. Marion D. // *FEBS Lett.* 1985. V. 192. № 1. P. 99—103.
8. Bothner-Bu A. A., Stephens R. L., Lee J., Warren C. D., Jeanloz R. W. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1984. V. 106. № 3. P. 811—813.
9. Griesinger C., Ernst R. R. // *J. Magn. Reson.* 1987. V. 75. № 2. P. 261—271.
10. Wüthrich K., Billeter M., Braun W. // *J. Mol. Biol.* 1984. V. 180. № 3. P. 715—740.
11. Nettlesheim D. G., Edalji R. P., Mollison K. W., Greer J., Zuiderweg E. R. P. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. № 14. P. 5036—5040.
12. Clore G. M., Gronenborn A. M. // *J. Magn. Reson.* 1982. V. 48. № 3. P. 402—417.
13. Clore G. M., Gronenborn A. M. // *J. Magn. Reson.* 1983. V. 53. № 3. P. 423—442.
14. Wüthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids.* N. Y.: J. Wiley Int. Publ., 1986.
15. Anil Kumar, Wagner G., Ernst R. R., Wüthrich K. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1981. V. 103. № 13. P. 3654—3658.
16. Keepers J. W., James T. L. // *J. Magn. Reson.* 1984. V. 57. № 3. P. 404—426.
17. Clore G. M., Gronenborn A. M. // *J. Magn. Reson.* 1985. V. 61. № 1. P. 158—164.
18. Barsukov I. L., Nolde D. E., Lomize A. L., Arseniev A. S. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 206. P. 665—672.
19. Brandhuber B. J., Boone T., Kenney W. C., McKay D. B. // *Science.* 1987. V. 238. № 4834. P. 1707—1709.
20. Арсеньев А. С., Ломизе А. Л., Барсуков И. Л., Быстров В. Ф. // *Биол. мембраны.* 1988. Т. 3. № 11. С. 1077—1104.
21. Ломизе А. Л., Соболев А. Г., Арсеньев А. С. // *Биоорганич. химия.* 1990. Т. 16. № 12. С. 179—201.
22. Ломизе А. Л., Арсеньев А. С., Масленников И. В., Быстров В. Ф. // *Биоорганич. химия.* 1990. Т. 16. № 10. С. 1310—1324.
23. Güntert P., Braun W., Wüthrich K. // *J. Mol. Biol.* 1991. V. 217. P. 517—530.

Поступила в редакцию
13.VII.1992

T. A. BALASHOVA, V. S. PASHKOV, D. E. NOLDE, L. V. ONOPRIENKO,
I. I. MIKHALEVA, L. V. SAMOKHVALOVA, G. V. MALAKHOVA, A. S. ARSENIIEV

**CONFORMATION OF THE COMPLEX OF HUMAN INTERLEUKIN-2
FRAGMENT (66—72) WITH THE ANTI-INTERLEUKIN-2
MONOCLONAL ANTIBODY**

M: M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

$^1\text{H-NMR}$ spectra of the interleukin-2 synthetic fragment Ac-Leu⁶⁶-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu⁷²-OCH₃ in the presence or absence of the monoclonal antibody were analysed. The data obtained are consistent with an extended unordered conformation of the free peptide. Measurements of NOESY cross-peak intensities allowed us to determine the spatial structure of the peptide bound to the antibody. The peptide has an amphiphilic surface with hydrophobic and hydrophilic amino acid side chains clustered on the opposite sides of its α -helical-like structure. The hydrophobic and hydrophilic clusters are located on the opposite sides of the bound peptide's surface. The hydrophobic side chains contact the antibody surface, while the hydrophilic ones are oriented into the solvent (T. A. Balashova et al. (1991) *Bioorgan. Khim. (USSR)*, v. 17, p. 1470—1486). Hydrolysis of the methyl ester slowly occurs in the presence of the antibody. This process does not alter the conformation of the peptide bounded with the antibody, though decreases the peptide's affinity to the antibody.