



УДК 577.152.311*7.083.3:577.112.016

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОГО АНТИИДИОТИПИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА К АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЕ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2002 г. Е. С. Александрова^{*#}, Ф. Коралевски^{2*}, М. И. Титов^{*}, А. В. Демин^{3*},
А. В. Козырь^{*}, А. В. Колесников^{*}, А. Трамонтано^{4*}, С. Паул^{4*}, Д. Тома^{2*},
А. Г. Габибов^{*}, Н. В. Гнучев^{3*}, А. Фрибуле^{2*}

^{*} Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Свечинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

^{2*} Технологический университет Компьена, Франция;

^{3*} Институт биологии гена РАН, Москва;

^{4*} Университет Техаса, Хьюстон, США

Поступила в редакцию 13.11.2000 г. Принята к печати 13.08.2001 г.

Проведено структурно-функциональное исследование каталитического моноклонального антитела 9A8 (МА 9A8), являющегося антиидиотипом к антителу АЕ-2, полученному на активный центр ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека. Методом поверхностного плазмонного резонанса показано специфическое связывание МА 9A8 с МА АЕ-2 ($K 2.26 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$). Продемонстрирована функциональная активность МА 9A8. В отличие от ацетилхолинэстеразы, оно специфически реагирует с фосфонатными необратимыми ингибиторами эстераз. Методом MALDI-масс-спектрометрии проанализированы результаты пептидного картирования МА 9A8. Показано, что остаток Ser99 тяжелой цепи входит в состав активного центра каталитического антитела. Проведено компьютерное моделирование активного центра МА 9A8. На основании анализа модели высказано предположение о существовании каталитической диады, сформированной остатками Ser99 и His35. Сравнение трехмерных структур МА 9A8 каталитического антитела МА 17E8, также обладающего эстеразной активностью, но полученного на стабильный аналог переходного состояния реакции, показало практически полное совпадение строения их предполагаемых активных центров.

Ключевые слова: антиидиотипические антитела; абзимы ацетилхолинэстеразы; фосфонаты; поверхностный плазмонный резонанс.

ВВЕДЕНИЕ

Уникальная способность иммунной системы вырабатывать антитела, являющиеся “молекулярными отпечатками” природных или синтетических антигенов, была успешно использована в последние годы для создания антител с заданными каталитическими свойствами. Большинство таких новых биокатализаторов (абзимов) получено на синтетические антигены, являющиеся стабильными аналогами переходных состояний реакций [1–3].

В 1974 г. Нильс Ерни [4] предложил теорию идиотипических сетей, согласно которой иммунная система может представлять собой сеть взаимодействий идиотип–антиидиотип (рис. 1). В рамках этой концепции для каждого антитела Ab1 (идиотипа), направленного против антигена и носителя идиотопа (i1), существует свое антитело

Ab2 (антиидиотип), комплементарно направленное против идиотипических детерминант Ab1 и само несущее идиотоп (i2). Эта схема многократно повторяется.

Таким образом, связывающий центр антиидиотипического антитела (Ab2) может нести в себе “внутренний образ” исходного антигена [5]. Эта гипотеза привела к идее получения каталитических антител путем отражения активных центров ферментов. В этом случае антитело, полученное на активный центр фермента играет роль антигена на втором этапе иммунизации, в ходе которой индуцируется получение антиидиотипического антитела со свойствами, отражающими первый антиген – фермент.

Ранее структурная и функциональная мимикрия активных центров ферментов аутоантителами была предложена как одна из гипотез, объясняющих появление абзимов при аутоиммунных патологиях [6, 7].

[#] Автор для переписки (факс: (095) 310-70-07; эл. почта: lenik@ibch.ru).

Это предположение вскоре было подтверждено успешным получением, согласно схеме (рис. 1), антиидиотипических антител к холинэстеразе [8] и бета-лактамазе [9].

Ранее иммунизацией мыши моноклональным антителом АЕ-2 (МА АЕ-2), полученным на активный центр ацетилхолинэстеразы человеческих эритроцитов (НЕ АСhЕ), проявляющим высокую специфичность к ее активному центру и ингибирующим ее ферментативную активность, было получено антиидиотипическое антитело (IgM) 9А8, проявляющее сходную с НЕ АСhЕ активность и также ингибирующееся идиотипом МА АЕ-2 [8].

Ингибирующее действие АЕ-2 на ацетилхолинэстеразу и ее антиидиотип МА 9А8 является строгим подтверждением концепции идиотипических сетей Н. Эрни и основным фактом для демонстрации функциональных свойств исследуемого антитела. Представлялось интересным количественно охарактеризовать специфичность этого взаимодействия. Для его изучения использовали метод поверхностного плазмонного резонанса, позволяющий проводить прямое детектирование взаимодействующих биомолекул [10]. В основе метода лежит явление поверхностного плазмонного резонанса, который возникает на поверхности металла при условии полного внутреннего отражения и характеризуется специфическим для каждого плазмона углом отражения и, следовательно, специфическим показателем преломления. Взаимодействия между молекулами на поверхности металла приводят к изменению характеристик поверхностного плазмона, что выражается в изменении резонансного угла и, следовательно, показателя преломления в поверхностном слое. По величине изменения показателя преломления судят о силе взаимодействия биомолекул. Исследование проводили на приборе VIACORE (Pharmacia, Швеция), в котором применяют сенсорные чипы, представляющие собой золотую поверхность, покрытую декстрановой матрицей. В данном эксперименте применяли сенсорные чипы с ковалентно иммобилизованным на матрице стрептавидином, что позволило использовать аффинное взаимодействие биотин-стрептавидин для прочного связывания биотинилированного лиганда (антивидовых антител к константным фрагментам мышиных IgG) с поверхностью чипа.

Концентрацию вводимого во взаимодействие с МА АЕ-2 антиидиотипического МА 9А8 варьировали в широких пределах (3×10^{-5} – 3×10^{-8} М), покрывая все теоретически возможные значения констант связывания для взаимодействия антиген-антитело (рис. 2).

Метод поверхностного плазмонного резонанса демонстрирует достаточно быстрое установление равновесия идиотип-антиидиотип. Гиперболический характер зависимости свидетельствует

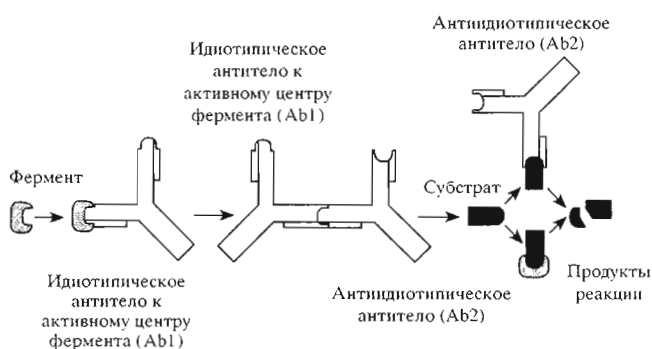


Рис. 1. Схема теории идиотипических сетей Н. Эрни [4].

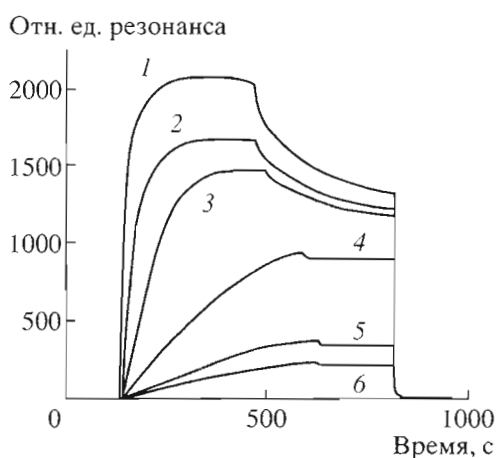


Рис. 2. Анализ взаимодействия между МА АЕ-2 (идиотип) и МА 9А8 (антиидиотип) методом поверхностного плазмонного резонанса. Концентрации вводимого во взаимодействие с иммобилизованным МА АЕ-2 антиидиотипа МА 9А8 варьировали в диапазоне от 3×10^{-5} М (1) до 3×10^{-8} М (6).

об образованию комплекса. Константу связывания определяли из экспериментальных данных нелинейной аппроксимацией по методу Гаусса-Ньютона. Величина константы связывания K 2.26×10^9 М⁻¹ свидетельствует о том, что данное взаимодействие является сильным и соответствует характеристикам взаимодействия антиген-антитело. Таким образом, связывание антител АЕ-2-9А8 действительно отвечает условию специфического взаимодействия идиотип-антиидиотип.

Специфической особенностью эстераз является их необратимое ингибирование фосфорорганическими ядами, фосфонатами, обусловленное ковалентным связыванием этих соединений с ферментом через остаток серина активного центра [11]. Поскольку, согласно теории Эрни, МА 9А8 должно нести “внутренний образ” исходного антигена – ацетилхолинэстеразы, интересно было провести сравнительное исследование взаимодействия МА 9А8 и ацетилхолинэстеразы с фосфонатными ингибиторами. Для этой цели были синтезированы

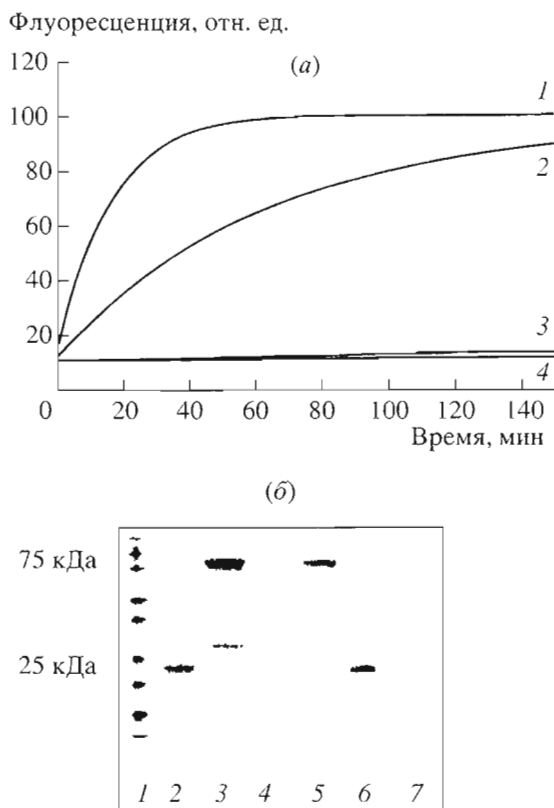
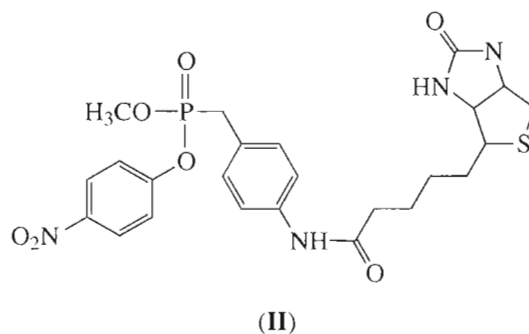
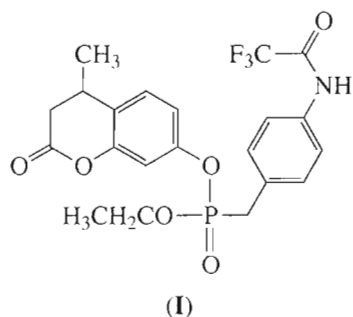


Рис. 3. Анализ взаимодействия моноклонального антидиотипического антитела 9А8 со специфическими фосфонатными ингибиторами эстераз: (а) кинетика взаимодействия соединения (I) с ферментами бутирилхолинэстеразой (1) и ацетилхолинэстеразой (3) и моноклональными IgM 9А8 (2) и 2Н11 (4); (б) вестерн-блот-анализ взаимодействия МА 9А8 (3, 5), трипсина (2, 6) и МА 2Н11 (4, 7) с биотинилированными ингибиторами: биотинил-АЕBSF (2, 3, 4) и соединением (II) (5, 6, 7). 1 – маркер молекулярных масс.

два подобных соединения, представляющих собой производные диизопропилфторфосфата, необратимого ингибитора эстераз и протеиназ: кумаринил-этил[4-(*N*-трифторацетил)аминобензил]фосфонат (I) и метил-4-нитрофенил[4-(*N*-биотинил)аминобензил]фосфонат (II). Оба соединения имели группы, облегчающие детекцию взаимодействия: соединение (I) кумаринильную флуоресцентную уходящую группу, а соединение (II) биотинильную.



Методом флуоресцентной спектроскопии было проведено сравнительное исследование взаимодействия соединения (I) с ацетилхолинэстеразой и МА 9А8 – антидиотипическим антителом к ферменту. В качестве контроля был использован иммуноглобулин класса М МА 2Н11 [12], не проявляющий эстеразной и протеиназной активностей, и бутирилхолинэстераза. Как следует из рис. 3а, фосфонат (I) явился эффективным модификатором бутирилхолинэстеразы, однако он практически не действовал на ацетилхолинэстеразу. В то же время был замечен явный рост квантового выхода флуоресценции в ходе химической модификации абзима соединением (I), связанный с высвобождением кумаринильной группы. Рассчитанные кинетические константы скорости взаимодействия бутирилхолинэстеразы и абзима МА 9А8 с соединением (I) составили 0.062 и 0.0154 мин⁻¹ соответственно. МА 2Н11, выбранный в качестве отрицательного контроля, не взаимодействовал с соединением (I). Объяснением инертности ацетилхолинэстеразы может служить тот факт, что ее активный центр находится на дне узкой щели и недоступен для объемного модификатора (I) [13, 14]. Расположение активного центра бутирилхолинэстеразы позволяет доступ таких объемных молекул.

Для контроля за модификацией МА 9А8 соединением (II), несущим детектируемый остаток биотина, применяли вестерн-блот-анализ (рис. 3б). В качестве модифицирующего агента использовали также 4-(2-биотиниламиноэтил)бензилсульфонил-фторид (биотинил-АЕBSF), биотинилированный аналог необратимого ингибитора сериновых гидролаз [15], выбранный в качестве положительного контроля. Контрольными белками служили трипсин (положительный) и МА 2Н11 (отрицательный). Из рис. 3б следует, что трипсин модифицировался как биотинил-АЕBSF, так и соединением (II) (дорожки 2, б), в то время как МА 2Н11 не реагировало с ними (дорожки 4, 7). Появление при модификации МА 9А8 полосы с массой около 70 кДа, соответствующей его тяжелой цепи (рис. 4б, дорожки 3, 5), свидетельствовало о взаимодействии абзима с обоими биотинилированными фосфонатами. Эффективность низкой концентрации модифицирующего агента (II) (100 пМ),

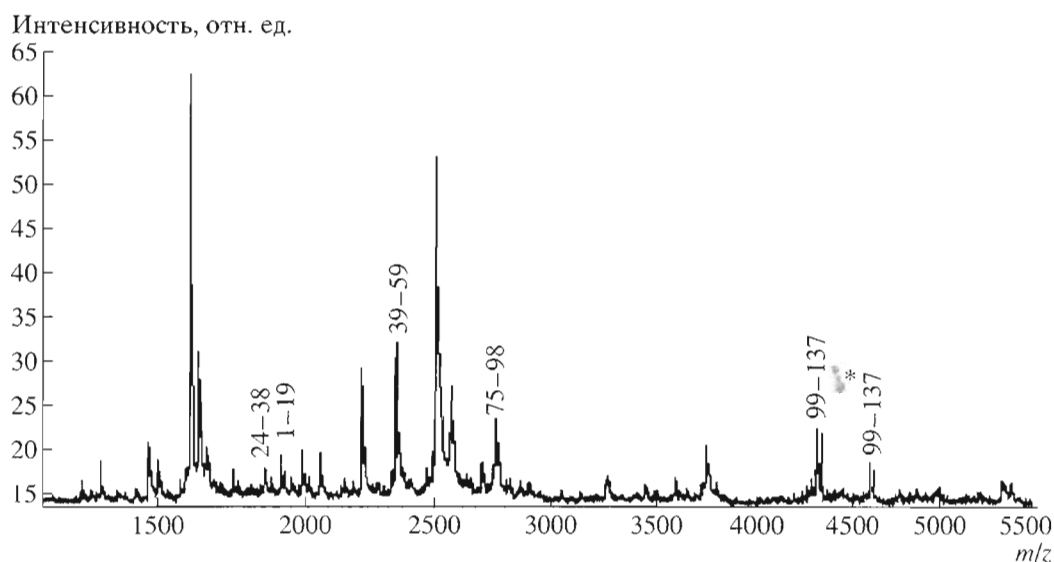


Рис. 4. MALDI-масс-спектр триптического гидролизата антиидиотипического антитела 9A8, модифицированного соединением (I). Отмечены пики, соответствующие пептидам – фрагментам гиперварибельного участка тяжелой цепи. Звездочкой отмечен пик, соответствующий пептиду, модифицированному соединением (II).

соответствующая концентрация биотинилированных фосфонатов при специфической модификации эстераз и протеиназ [16], подтверждает высокоспецифичность взаимодействия абзима с биотинилированным соединением (II).

Реакционная способность антиидиотипического абзима демонстрирует, что потенциальные реакционноспособные группы его активного центра, в отличие от активного центра ацетилхолинэстеразы (см. выше), достаточно доступны для модифицирующего действия фосфоната. Таким образом, отражение трехмерной структуры активного центра ацетилхолинэстеразы в гиперварибельных участках абзима неполно. Несмотря на свое функциональное многообразие, антитела представляют собой очень консервативные структуры, весь широчайший спектр свойств которых вызван различиями в варибельных областях, небольших по сравнению с общим размером молекул антител. По-видимому, в гиперварибельных участках молекул абзимов могут быть отражены лишь главные особенности строения исходных антигенов, способные в ряде случаев обеспечить каталитические функции.

Как уже отмечалось выше, соединения, использованные нами как потенциальные необратимые ингибиторы эстераз во флуориметрических исследованиях, являлись производными диизопропилфторфосфата и, вероятнее всего, вступали во взаимодействие с остатком серина активного цен-

тра. Представлялось возможным идентифицировать эту ключевую аминокислоту методом масс-спектрометрического пептидного картирования фермент-ингибиторных комплексов [17].

Для решения поставленной задачи был проведен компьютерный анализ потенциальных сайтов расщепления абзима MA 9A8 протеиназами с помощью программы GPMAW (General Peptide Mass Analysis for Windows) на основе аминокислотной последовательности антиидиотипического антитела 9A8, установленной нами ранее [18]. Анализ молекулярных масс теоретически рассчитанных пептидов выявил предпочтительность использования трипсина.

Сравнение данных MALDI-масс-спектрометрии для триптических гидролизатов MA 9A8 и этого же антитела, предварительно подвергнутого модификации соединением (I), продемонстрировало появление дополнительного молекулярного иона в случае модифицированного абзима (рис. 4). Его молекулярная масса (M 4625 Да) увеличена за счет модификации по сравнению с триптическим фрагментом 99–137 (M 4331 Да). Таким образом, наиболее вероятно, что каталитически активный остаток Ser MA 9A8 входит в состав пептида 99–137 с массой M 4331 Да, который включает в себя последовательно третий гиперварибельный участок (99–105), четвертый каркасный регион (106–116) и начало последовательности константного участка тяжелой цепи (117–137) [18].



Для окончательной идентификации положения каталитически активного остатка серина

триптический гидролизат MA 9A8, модифицированный соединением (II), был подвергнут аффин-

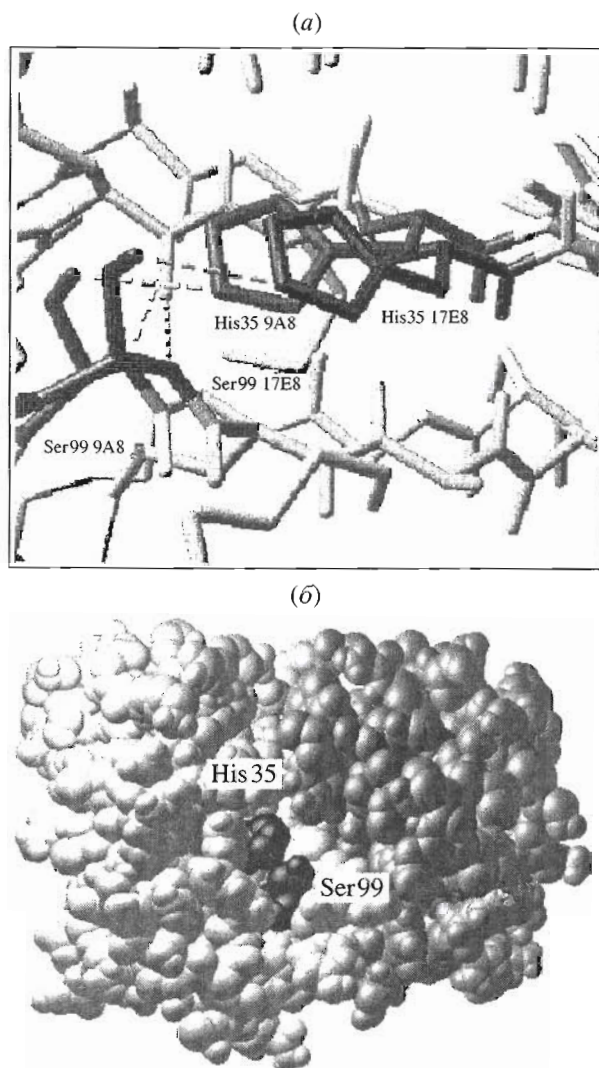


Рис. 5. Трехмерная компьютерная модель активного центра антиидиотипического антитела 9А8. (а) Сравнительное взаиморасположение предполагаемых каталитических диад Ser99 и His35 активных центров эстеролитических антител 9А8 (светлое изображение) и 17Е8 (темное изображение). Пунктирной линией обозначены водородные связи; (б) пространственное расположение аминокислотных остатков каталитической диады Ser99 и His35 в молекуле антитела 9А8. Светло-серое изображение – тяжелая цепь, темно-серое – легкая цепь. Каталитическая диада выделена черным цветом.

ной хроматографии на сорбенте, содержащем моноавидин (Soft Release Avidine Resin, Promega). Модифицированный пептид был выделен благодаря содержанию в нем биотинильного остатка. Масс-спектр элюата показал наличие в исследуемой пробе единственного пептида с массой, соответствующей модифицированному пептиду 99–137 (*M* 4667 Да).

Третий гипервариабельный участок исследуемого антитела 9А8 содержит единственный оста-

ток серина (Ser99) [18]. Другие остатки серина в рассматриваемом пептиде 99–137 входят в состав константных регионов, достаточно консервативных по своему строению и не определяющих функциональных свойств антитела. Таким образом, масс-спектрометрический анализ однозначно свидетельствует о том, что именно остаток Ser99 тяжелой цепи – часть активного центра абзима.

Трехмерная компьютерная модель МА 9А8 была построена нами при помощи программы Swiss Model [19]. Из рис. 5а видно, что остаток His35 первого гипервариабельного участка тяжелой цепи расположен достаточно близко к остатку Ser99 для образования водородной связи с его гидроксилом. Из литературных данных известно, что остаток His35 тяжелой цепи является ключевым в некоторых эстеролитических абзимах, полученных на аналог переходного состояния реакции, и участвует как в общеосновном, так и в ковалентном катализе [20–23]. Рис. 5б показывает, что активный центр абзима расположен на поверхности Fab-фрагмента, в неглубоком кармане, сформированном тяжелой цепью.

Основываясь на предложенной модели можно сказать, что исследуемое антитело обладает каталитической диадой, образованной остатками Ser99 и His35. Каталитическая диада распространена для многих ферментов и некоторых каталитических антител, в том числе и для эстеролитического антитела 17Е8, полученного на аналог переходного состояния реакции эстеролиза [23]. При сравнении вариабельных фрагментов последовательностей МА 9А8 [18] и МА 17Е8 [23] можно проследить некоторые общие элементы их структур. Как и в случае МА 17Е8, каталитическая диада МА 9А8 сформирована остатками Ser99 и His35 тяжелой цепи. Начало последовательности третьего гипервариабельного участка обоих антител также совпадает (Ser-Tyr-Tyr-Gly). В каталитический механизм МА 17Е8 включен еще один аминокислотный остаток – Tyr101 [23]. Последовательность МА 9А8 также содержит остаток Tyr101, который, вероятно, может принимать участие и в механизме катализа антителом 9А8.

В заключение нельзя не отметить, что рассмотренные каталитические антитела 9А8 и 17Е8, созданные для моделирования одной и той же функции (гидролиз эфиров) и использующие относительно близкие механизмы катализа (идентичные каталитические диады), получены по принципиально разным схемам. МА 17Е8 получено на аналог переходного состояния реакции эстеролиза, в то время как МА 9А8, ставшее практической реализацией теории идиотипических сетей, направлено на воспроизведение активного центра самой эстеразы, а не переходного состояния реакции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали трис(гидроксиметил)аминометан (Sigma), акриламид, *N,N*-метиленисакриламид (Bio-Rad), Твин-20 (Bio-Rad), бычий сывороточный альбумин (Sigma), трипсин (Sigma), дитиотреит (Sigma), йодацетамид (Sigma), соли и другие химические реактивы фирм Sigma, BioRad, Merck; нитроцеллюлозные мембраны (Amersham, Англия), антивидовые антитела (Sigma). Остальные реактивы отечественного производства марки "ос.ч".

Соединения (I) и (II) синтезированы А. Трамонтано [24].

Биотинил-АЕBSF получали инкубацией в течение 24 ч *N*-гидроксисукцинимидного эфира *N*-биотиниламинокпроновой кислоты (Sigma) и 4-(2-аминоэтил)-бензилсульфонилфторида (Sigma) в соотношении 1 : 1.1 в диметилсульфоксиде при комнатной температуре. Полноту протекания реакции оценивали ТСХ в системе метанол-хлороформ, 2 : 8.

Моноклональные антитела МА 9А8 и МА АЕ-2 нарабатывали в мышцах линии BALB/c, которым предварительно (за 7 сут) вводили пристан (0.5 мл/мышь). Клетки гибридом 9А8 и АЕ-2, продуцирующих соответствующие антитела, вводили внутрибрюшинно, из расчета 3 млн. клеток/мышь. Асцитную жидкость собирали через 7–10 сут.

Моноклональное антитело 2Н11 любезно предоставлено М.И. Шахпароновым (ИБХ РАН) [12].

МА 9А8 очищали хроматографически (ВЭЖХ). Асцитную жидкость фракционировали на колонке (HR 10/30) с сефакрилом Super-fine S-200 (Pharmacia), уравновешенной 0.1 М фосфатным буфером, рН 7.4. Скорость элюции 0.5 мл/мин. Интересующий нас белок (молекулярная масса IgM составляет около 900000 Да) элюировался в первом пике.

Дальнейшую очистку антител проводили на ионообменной колонке (HR 5/10) с керамическим гидроксипатитом (Bio-Rad). Пробу наносили в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 6.8, со скоростью 1 мл/мин. Элюцию осуществляли в линейном градиенте концентрации фосфата калия от 10 до 400 мМ и рН от 6.8 до 8.0 в течение 40 мин с последующей 10-минутной элюцией 400 мМ фосфатом калия, рН 8.0.

Очистку МА АЕ-2 осуществляли на белок А-сефарозе (Bio-Rad), следуя рекомендациям фирмы-производителя.

Взаимодействие МА АЕ-2–МА 9А8 исследовали на приборе VIACORE (Pharmacia). Использовали сенсорные чипы с ковалентно иммобилизованными на поверхности декстрановой матрицы стрептавидином SA (Pharmacia). Каждый рабочий цикл проводили в 0.1 М фосфатном буфере, рН 7.4, при постоянной скорости потока, равной

5 мкл/мин. На поверхность чипа наносили 30 мкл (разведение 1 : 30) биотинилированных кроличьих IgG антител, специфичных к константным фрагментам мышинных IgG (Sigma), затем на подготовленную поверхность чипа иммобилизовывали избыток идиотипического антитела АЕ-2 в объеме 30 мкл, конечное количество белка на поверхности чипа 1.8×10^{-10} М. Антиидиотипическое антитело 9А8 наносили в диапазоне концентраций (3×10^{-5} – 3×10^{-8} М) в объеме 30 мкл. После каждого акта нанесения абзима поверхность регенерировали промыванием 10 мл 0.1 М глицин-НCl, рН 2.4. Линеаризацию кривой насыщения и расчет констант связывания проводили методом нелинейного регрессионного анализа.

Взаимодействие МА 9А8 с кумаринилэтил[4-(*N*-трифторацетил)аминобензил]фосфонатом (I) исследовали с помощью спектрофлуориметра Aminco SPF 1200. Концентрация соединения (I) 10^{-6} М, концентрации белков (МА 9А8, ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразы, МА 2Н11) 5.5×10^{-8} М. Все эксперименты проводили в 0.1 М фосфатном буфере, рН 7.8. Длина волны возбуждения 365, длина волны испускания 450 нм, ширина щелей 20 нм, длина оптического пути 1 см. В раствор белка вносили соединение (I) и за ходом реакции следили по изменению интенсивности флуоресценции, обусловленному отщеплением остатка кумарина в ходе реакции. Показания снимали каждые 5 мин в течение 2 ч.

Взаимодействие МА 9А8, МА 2Н11 и трипсина с биотинилированными соединениями метил-4-нитрофенил[4-(*N*-биотинил)аминобензил]фосфонатом (II) и 4-(2-биотиниламиноэтил)бензилсульфонилфторидом (биотинил-АЕBSF) осуществляли при комнатной температуре в течение 1 ч в 0.1 М фосфатном буфере, рН 7.4. Количества исследуемых белков 5.5 пмоль, ингибиторов 100 пмоль.

Для реакции антитела МА 9А8 с соединением (II) с целью последующего выделения модифицированного пептида использовали 3.3 мг антитела (3.66 мкмоль) и 20-кратный избыток модификатора – 73.2 мкмоль. Реакцию проводили в условиях, указанных выше.

Вестерн-блот-анализ осуществляли по стандартному протоколу [25]. Мембрану с перенесенными на нее белками инкубировали с нейтравидин-пероксидазой (Pierce) в разведении 1 : 2000 в течение 1 ч и окрашивали 4-хлор-1-нафтолом.

Трипсинолиз антител. К антителам (1 мг/мл) в буфере, содержащем 0.1 М бикарбонат аммония, добавляли свежеприготовленный раствор дитиотреита (0.1 М) до конечной концентрации 5 мМ и инкубировали в течение 20 мин при 50°C. К охлажденной до комнатной температуры реакционной смеси прибавляли свежеприготовленный раствор йодацетамида (0.2 М) до конечной концент-

рации 25 мМ и оставляли в темноте на 30 мин. К подготовленному к гидролизу белку добавляли раствор трипсина в воде до весового соотношения фермент-субстрат 1 : 20 и инкубировали при 37°C 4 ч. Реакцию останавливали добавлением 5% трифторуксусной кислоты до pH ниже pH 4.

Пептид МА 9А8 99-137, модифицированный соединением (II) выделяли ВЭЖХ на колонке HR 5/5 (Pharmacia) с иммобилизованным мономерным авидином (Soft Release Avidine Resin, Promega) (K_d 10^{-7} М) в фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7.4. Для блокирования сайтов необратимого связывания смолу промывали двумя объемами колонки 5 мМ раствором биотина на скорости 0.1 мл/мин и оставляли на 15 мин для связывания биотина. Сорбент регенерировали пропусканием восьми объемов колонки 10% уксусной кислоты со скоростью 0.5 мл/мин. Далее смолу промывали PBS до достижения pH 6.8 и останавливали поток на 1 ч для рефолдинга авидина.

Триптический гидролизат модифицированного антитела наносили на подготовленный сорбент в PBS со скоростью 0.1 мл/мин. Элюцию осуществляли 5 мМ раствором биотина в PBS со скоростью 0.5 мл/мин. По окончании элюции биотином смолу промывали двумя объемами колонки 10% уксусной кислотой для окончательной очистки сорбента.

Приготовление образцов для MALDI-масс-спектрометрического анализа. Приготовление пробы осуществляли методом высушенной капли. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидробензойную кислоту (25 мг/мл в 30% ацетонитриле). На мишень наносили последовательно, капля на каплю, 0.2 мкл 2% трифторуксусной кислоты, 0.2 мкл (около 10 пмоль) раствора образца и 0.2 мкл раствора матрицы и оставляли при комнатной температуре до полного высыхания.

MALDI-масс-спектрометрический анализ осуществляли на времяпролетном (TOF) масс-спектрометре VISION 2000 (ThermoBioAnalysis, США). В качестве способа ионизации использовалась матрично-стимулированная лазерная десорбция (MALDI). Регистрировались положительно заряженные ионы в режиме отражения.

Компьютерную модель МА 9А8 получали при помощи программы Swiss Model Program, использующей гомологичные антитела известной структуры для ввода координат.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы "Научные школы" (грант NOO-15-97844).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jenks W.P.* Catalysis in Chemistry and Enzymology. New York: McGraw-Hill Book Company Inc., 1969.
2. *Tramontano A., Janda K.D., Lerner R.A.* // *Science*. 1986. V. 234. P. 1566-1570.
3. *Pollack S.J., Jacobs J.W., Schultz P.G.* // *Science*. 1986. V. 234. P. 1570-1573.
4. *Jerne N.K.* // *Ann. Immun.* 1974. V. 125C. P. 373-378.
5. *Pan Y., Yuhasz S.C., Amzel L.M.* // *FASEB J.* 1995. V. 9. P. 43-56.
6. *Bronshtein I.B., Shuster A.M., Gololobov G.V., Gromova I.I., Kvashuk O.A., Belostotskaya K.M., Alekberova Z.S., Prokaeva T.B., Gabibov A.G.* // *FEBS Lett.* 1992. V. 314. P. 259-263.
7. *Shuster A.M., Gololobov G.V., Kvashuk O.A., Bogomolova A.E., Smirnov I.V., Gabibov A.G.* // *Science*. 1992. V. 256. P. 665-667.
8. *Izadyar L., Friboulet A., Remy M.H., Roseto A., Thomas D.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 8876-8880.
9. *Avalle B., Thomas D., Friboulet A.* // *FASEB J.* 1998. V. 12. P. 1055-1060.
10. *Brigham-Burke M., Edwards J.R., O'Shannessy D.J.* // *Anal. Biochem.* 1992. V. 205. P. 125-131.
11. *Quinn D.M.* // *Chem. Rev.* 1987. V. 87. P. 955-979.
12. *Корнеев Т.В., Пестов Н.Б., Егоров М.В., Иванова М.В., Костина М.Б., Шахпаронов М.И.* // *Био-орган. химия*. 1997. Т. 23. С. 800-804.
13. *Soreq H., Gnatt A., Loewenstein Y., Neville L.F.* // *Trends Biochem. Sci.* 1992. V. 17. P. 353-358.
14. *Radic Z., Pickering N.A., Vellom D.C., Camp S., Taylor P.* // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 12074-12084.
15. *Baker B.R., Cory M.J.* // *J. Med. Chem.* 1971. V. 14. P. 119-125.
16. *Glynn P., Read D.J., Guo R., Wylie S., Johnson M.K.* // *Biochem. J.* 1994. V. 301(2). P. 551-556.
17. *Kussmann M., Lassing U., Sturmer C.A.O., Przybylski M., Roepstorff P.* // *J. Mass Spectrom.* 1997. V. 32. P. 483-493.
18. *Kolesnikov A.V., Kozyr A.V., Alexandrova E.S., Koralewski F., Avalle B., Demin A.V., Titov M.I., Tramontano A., Paul S., Thomas D., Gabibov A.G.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 13526-13531.
19. *Guex N., Peitsch M.C.* // *Electrophoresis*. 1997. V. 18. P. 2714-2723.
20. *Patten P.A., Gray N.S., Yang P.L., Marks C.B., Wedemayer G.J., Boniface J.J., Stevens R.C., Schultz P.G.* // *Science*. 1996. V. 271. P. 1086-1091.
21. *Gigant B., Charbonnier J.-B., Eshhar Z., Green B.S., Knossow M.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 7857-7861.
22. *Charbonnier J.-B., Golinelli-Pimpaneau B., Gigant B., Tawfik D.S., Chap R., Schindler D.G., Kim S.H., Green B.S., Eshhar Z., Knossow M.* // *Science*. 1997. V. 275. P. 1140-1142.
23. *Zhou W., Guo J., Huang W., Fletterick R.J., Scanlan T.S.* // *Science*. 1994. V. 265. P. 1059-1064.
24. *Tramontano A., Ivanov B., Gololobov G.V., Paul S.* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2000. V. 83. P. 233-243.
25. *Harlow E., Lane D.* *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1988. P. 726.

A Structure–Function Study of a Catalytic Antiidiotypic Antibody to the Human Erythrocyte Acetyl Cholinesterase

E. S. Aleksandrova*#, F. Koralevski**, M. I. Titov*, A. V. Demin***, A. V. Kozyr*, A. V. Kolesnikov*, A. Tramontano****, S. Paul****, D. Thomas**, A. G. Gabibov*, N. V. Gnuchev***, and A. Friboulet**

#Fax: +7 (095) 310-7007; e-mail: lenik@ibch.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

**Technological University of Compiègne, France

*** Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 34/5, Moscow, 117984 Russia

****University of Texas, Houston, USA

The catalytic monoclonal antibody 9A8 (MA 9A8), antiidiotypic to the antibody AE-2 (MA AE2) produced to the active site of acetyl cholinesterase from human erythrocytes, was subjected to a structure–function study. The specific binding of MA 9A8 to MA AE2 ($K 2.26 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) was shown by the method of surface plasmon resonance, and the functional activity of MA 9A8 was demonstrated. Unlike acetyl cholinesterase, this antibody specifically reacted with the irreversible phosphonate inhibitors of esterases. A peptide map of MA 9A8 was analyzed by MALDI mass spectrometry. The Ser99 residue of its heavy chain was shown to be within the active site of the catalytic antibody. A computer modeling of the MA 9A8 active site suggested the existence of a catalytic dyad formed by Ser99 and His35. A comparison of the tertiary structures of the MA 9A8 and the 17E8 monoclonal antibody, which also exhibited an esterase activity and was produced to the stable analogue of the reaction transition state, indicated a practically complete coincidence of the structures of their presumed active sites. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: abzymes of acetyl cholinesterase, antiidiotypic antibodies, phosphonates, surface plasmon resonance