

Т а б л и ц а 1.2

Константы ассоциации $K_{асс}$ при спаривании три- и тетра-нуклеотидов с антикодонами тРНК в водном растворе 1,0 М NaCl, 10 мМ MgCl₂ и 10 мМ фосфата при pH 7 и 0 °С [12—14]

Формил-Мет-тРНК AA [<u>УАЦ</u>] УЦ	$K_{асс}$, моль ⁻¹	Тир-тРНК AA* [<u>АУ*Г</u>] УЦ	$K_{асс}$, моль ⁻¹
<u>АУГ</u>	1200 ± 200	<u>УАЦ</u>	700
<u>АУГА</u>	13 500	<u>УАЦА</u>	90 000
<u>АУГУ</u>	1 400	<u>УАУ</u>	700
<u>АУГЦ</u>	900	<u>УАУА</u>	37 000
<u>АУГГ</u>	1 000	Фен-тРНК	
<u>ГУГ</u>	1 200	Ау [<u>ААГ*</u>] УЦ*	
<u>ГУГА</u>	9 800	<u>УУЦ</u>	900
<u>ГУГУ</u>	1 000	<u>УУЦА</u>	10 000
		<u>УУУ</u>	300
		<u>УУУА</u>	1 000

А* — N(6)-диметил-А, У* — псевдо-У, Г* — 2-О-метил-Г, Ц* — 2-О-метил-Ц. Дважды подчеркнуты регулярные кодоны, один раз — кодоны, соответствующие «вилянию» ([1], стр. 593). Рамкой выделены антикодоны.

«структурам узнавания», но и барьеры, эти минимумы разделяющие. Узнавание непосредственно связано с ускорением соответствующего процесса, т. е. со снижением активационного барьера в результате слабых взаимодействий. Количественная теория этих процессов еще далеко не построена.

В следующем параграфе мы рассмотрим сравнительно хорошо изученные структурные соответствия во взаимодействиях антител с антигенами.

§ 1.3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИГЕН — АНТИТЕЛО

Иммунологическая защита организма позвоночного животного от чужеродных белков и других биополимеров, именуемых в этом случае *антигенами*, в конечном счете сводится к взаимодействию специфических белков — *антител* — с антигенами. Им-мунный ответ, т. е. появление антител в организме, есть результат узнавания антигенов определенными популяциями клеток. Этот процесс развивается на организменном уровне, в нем участвуют различные клеточные узнающие системы, являющиеся обучающимися в том смысле, что они приобретают память об

однажды введенном антигене и отвечают на его вторичное введение усиленной выработкой антител. Эти важные процессы, имеющие непосредственное отношение к общей проблеме клеточной дифференциации, рассмотрены в § 9.11. Здесь мы остановимся на структуре антител и антигенов и их взаимодействиях, определяющих молекулярное узнавание.

Антитела (АТ) представляют собой белки, относящиеся к группе иммуноглобулинов. У человека имеется пять основных классов иммуноглобулинов, обозначаемых IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, в свою очередь разделяемых на подклассы [15]. Важнейшими являются IgG. Их молекулярный вес равен примерно 150 000, константа седиментации 7S. IgM имеют молекулярный вес $(9-10) \cdot 10^5$, константу седиментации около 19S. IgM, по видимому, представляют собой пентамеры IgG.

С помощью ряда химических и физико-химических методов установлена схема строения макромолекулы IgG [16, 17]. На рис. 1.1 показана схема строения IgG кролика по Портеру [15, 18]. Молекула состоит из двух тяжелых цепей, обозначаемых γ ,

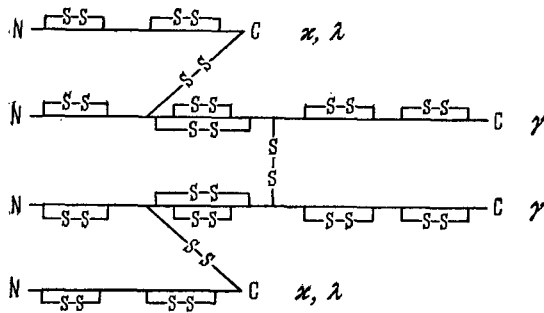


Рис. 1.1. Схема строения антитела IgG по Портеру.

и двух легких, обозначаемых в зависимости от типа АТ κ или λ . Их молекулярные веса равны соответственно $53\,500 \pm 4000$ и $23\,800 \pm 1000$ (кролик), а числа аминокислотных остатков 446 и 214 (последнее число относится к миеломному белку человека IgG, первичная структура которого была полностью расшифрована [19]).

Белковые цепи в молекуле IgG связаны дисульфидными мостиками, показанными на рис. 1.1.

Структура молекулы IgG была установлена, в частности, в результате ее расщепления на отдельные полипептидные цепи под действием различных химических агентов и протеолитической фрагментации. Схема фрагментации IgG папаином, установленная Эдельманом, показана на рис. 1.2 [15].

АТ к самым различным антигенам (АГ) характеризуются принципиальным единством строения — схема, приведенная на рис. 1.1, универсальна. Исследование первичной структуры полипептидных цепей IgG показало закономерное расположение внутрицепочных S—S-связей, изображенных на рис. 1.1. Примерно на каждые 100 остатков приходится один дисульфидный

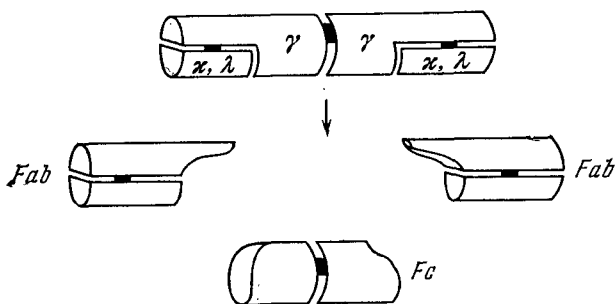


Рис. 1.2. Схема фрагментации IgG папаином по Эдельману.

мостик, формирующий петлю, содержащую примерно 60 остатков. Такой участок с петлей, согласно предположению Эдельмана, представляет собой компактную глобулу, названную *доменом* [19]. Схема доменной структуры IgG приведена на рис. 1.3.

АТ к различным АГ характеризуются различиями первичной структуры. Эти различия локализованы в совершенно определенной области макромолекулы IgG — в вариабельной, или V-области. Вариабельная область занимает примерно половину Fab фрагментов папаинового протеолиза (см. рис. 1.2), т. е. в нее входит около половины легкой цепи и половины прилежащего участка тяжелой цепи у их N-концов. Соответствующие домены на рис. 1.3 отмечены буквой V. Первые структуры остальных областей тяжелых и легких цепей постоянны в пределах данной группы IgG. У человека длина V-областей κ-цепей варьирует от 107 до 112 остатков, длина постоянной C-области равна 107 остаткам [15].

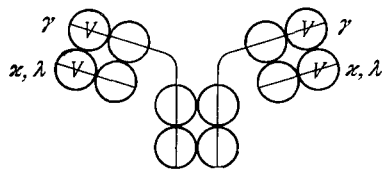
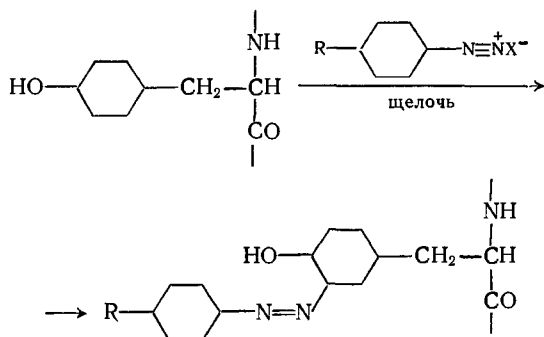


Рис. 1.3. Схема доменной структуры IgG по Эдельману.

Из сказанного следует, что именно V-области ответственны за взаимодействие АТ — АГ, поскольку специфичность АТ определяется особенностями первичной структуры. Активный центр АТ, в котором локализовано взаимодействие АТ — АГ, должен

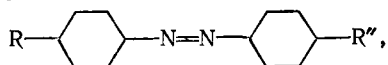
содержать V-область и действительно, как показано прямыми опытами, он расположен в *Fab* фрагментах [20]. Симметричная структура IgG, т. е. наличие двух тождественных *Fab*-фрагментов, указывает на то, что IgG имеет два активных центра, т. е. «валентность» АТ равна двум (см. стр. 23).

Антигенами являются биополимеры, прежде всего белки и полисахариды. В 1919 г. Ландштейнер открыл прекрасный способ получения искусственных синтетических АГ [21]. Метод основан на соединении диазотированных ароматических аминосоединений с тирозилом белка в слабощелочном растворе. Схема реакции Ландштейнера следующая:



Таким способом можно ввести в белок в принципе любой радикал R. R-фенилазобелок можно использовать в качестве АГ и стимулировать выработку соответствующих АТ.

Сопоставление иммунологических свойств радикалов R, присоединенных к белкам, и самих белков показало, что фактором, определяющим антигенную специфичность, является радикал R, а белок играет второстепенную роль. Это было доказано перекрестными реакциями. АТ, полученное в результате воздействия антигена R—Б (Б—белок), реагирует с другим антигеном R—Б' (Б'—другой белок), но не реагирует с антигеном R'—Б (R'—радикал, отличный от R). Антиген R—Б дает с соответствующим АТ труднорастворимый осадок. Если добавлять к системе R-антиген — R-антитело малые молекулы, содержащие ту же детерминантную группу R, например,

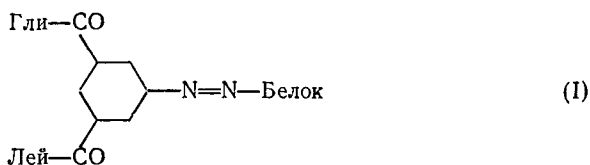


то реакция тормозится, а при дальнейшем повышении концентрации низкомолекулярного соединения прекращается вовсе. Такого рода малые молекулы не создают антител в организме подопытного животного и, следовательно, не являются антигенами. Однако они взаимодействуют с ранее возникшими антите-

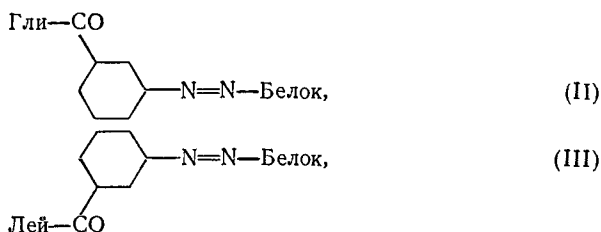
лами, образуя растворимые соединения. Это — так называемое *гаптенное действие*, а указанные малые молекулы называются *гаптенами*. Гаптены конкурируют с АГ, взаимодействуя с теми же активными областями АТ. Взаимодействие подобно обычной химической реакции и подчиняется закону действия масс. АГ содержит детерминантную группу и высокомолекулярный носитель, а гаптен — только детерминантную группу. Исследование иммунохимической реакции показывает, что природные АГ содержат ряд детерминантных групп и в этом смысле поливалентны.

В дальнейшем было показано, что АТ не только поливалентны в смысле наличия нескольких тождественных групп, узнающих АГ, но могут быть и полифункциональными. Установлено, что некоторые АТ взаимодействуют с несколькими АГ, структурно сильно различающимися. Это имеет существенное биологическое значение [117].

Спрашивается, какие свойства детерминантных групп определяют их взаимодействие с антителами? Выясняется, что существенно пространственное строение детерминантной группы. Искусственный АГ типа



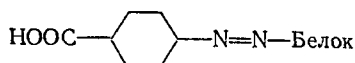
вызывает образование двух типов антител к антигенам (II) и (III)



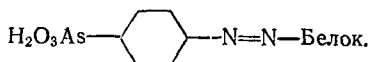
но не к антигену (I), как целому. Это показывает, что размеры детерминантных групп и адекватных им реактивных участков антител относительно невелики [22].

Наличие реактивных групп (активных центров) в АТ непосредственно доказывается красивыми опытами Прессмана и Штернбергера [23]. Кролик иммунизировался искусственным АГ, содержащими в качестве детерминантных групп остаток

n-азобензойной



и *n*-азофениларсиновой кислот



Полученные АТ подвергались йодированию, чем полностью подавлялась их иммунологическая активность. Однако, если йодирование проводилось в присутствии гаптененов, то активность сохранялась. Отсюда следует, что введение йода в активную область АТ уничтожает ее активность, а гаптен защищает эту область от йода. Сказанное изображено схематически на

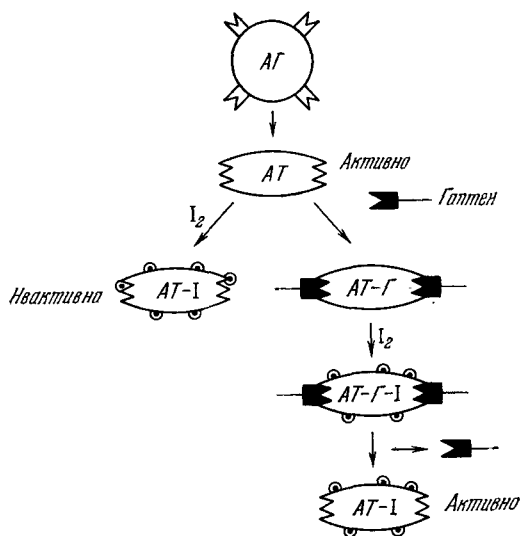
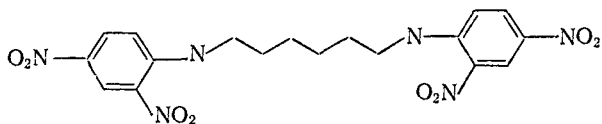


Рис. 1.4. Схема йодирования антител.

рис. 1.4. По-видимому, между активной областью, с одной стороны, и гаптененом или детерминантной группой АГ — с другой, имеется структурное соответствие. Гаптенен конкурирует с детерминантной группой за место в активной области антигена. Сродство АТ к гаптену, структурно сходному с детерминантной группой, определяется либо методом равновесного диализа, либо по торможению реакции преципитации антигена антителом при различных концентрациях гаптенена.

Структура комплекса АТ с соответствующим двухвалентным (бифункциональным) динитрофенильным гаптенем (ДНФ)



была изучена методом электронной микроскопии [24]. На рис. 1.5, а показана электронная микрофотография комплекса

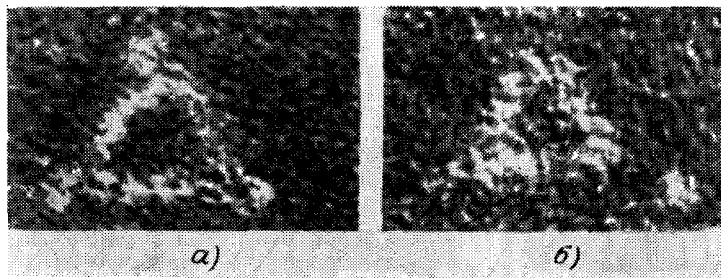
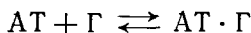


Рис. 1.5. Электронные микрофотографии комплекса АГ с АТ (а) и комплекса АГ с АТ, обработанным пепсином (б).

АГ с АТ, а на рис. 1.6 — схема, основанная на ее интерпретации [17]. Двухвалентные АТ, взаимодействуя с двухвалентными же ДНФ, образуют циклы. Молекулы ДНФ не видны на микрофотографии, выступы у вершин треугольника, по видимому, являются фрагментами *Fc*.

Предварительная обработка АТ пепсином приводит к отщеплению *Fc*, но остаются фрагменты *Fab*, по-прежнему дающие циклические комплексы с ДНФ, но уже без выступов (рис. 1.5, б).

Взаимодействие АТ с гаптенем (Γ), как уже сказано, подобно взаимодействию с соответствующими АГ. Константа равновесия реакции



выражается как

$$K = \frac{[\text{АТ} \cdot \Gamma]}{[\text{АТ}] [\Gamma]} = \exp \frac{T \Delta S - \Delta H}{RT}, \quad (1.1)$$

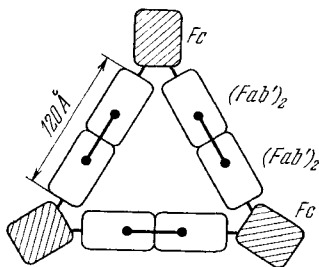


Рис. 1.6. Комплекс антиген — антитело.

Схема, основанная на электронных микрофотографиях; «гантель» — молекула ДНФ.

Для определения K пользуются гаптенами, окрашенными или мечеными радиоактивными атомами. Величину K можно найти и по торможению реакции АТ с АГ (преципитации). По температурной зависимости K определяют значения ΔH , примерно равные нескольким ккал/моль; значения ΔS , как правило, положительны. Последнее можно объяснить освобождением гидратирующих молекул воды при образовании комплексов.

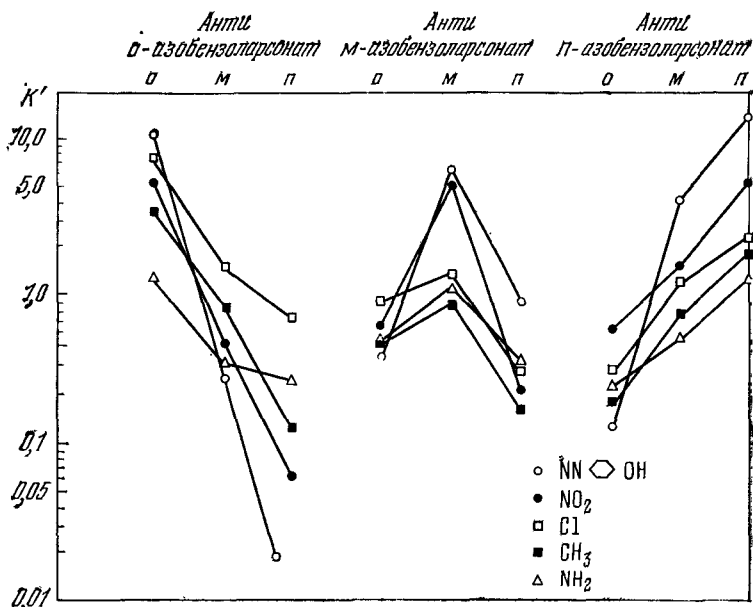


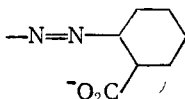
Рис. 1.7. Влияние положения заместителя на значение K' для гаптена (по Прессману).

Детальные исследования зависимости констант связывания от структуры Г или соответствующей детерминантной группы АГ были проведены Полингом, Прессманом и их сотрудниками [25—27]. В частности, были получены АТ к ионам орто-, мета-, пара-азобензоларсоната. Антитела к каждой из этих групп действуют так, как если бы они вступали в структурное соответствие с ван-дер-ваальсовой поверхностью детерминантной группы. Взаимодействие таких АТ с другими замещенными азобензольной группы определяется исходным АГ. На рис. 1.7 приведены результаты, полученные для таких трех систем — даны значения относительной константы связывания K' , равной отношению константы связывания замещенного бензоларсоната к константе связывания незамещенного бензоларсоната в этих системах [27].

Антитело к *орто*-азобензоларсонату связывает *орто*-замещенные, слабее *мета*-замещенные и хуже всего *пара*-замещенные.

В табл. 1.3 приведены результаты исследования ряда *пара*-систем [27]. Были получены АТ к различным гаптенным группам. Звездочка указывает гомологичную заряженную группу, числа — относительные константы связывания гомологичного гаптена с антителом (для производных бензола принято значение этой константы, равное 1,0).

Для АТ к *орто*-азобензоату







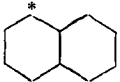
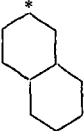
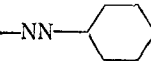
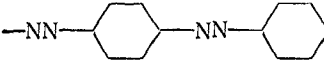
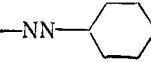
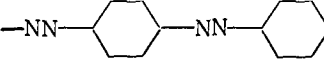
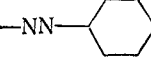
относительные константы связывания *пара*-гаптенных $R-C_6H_4-CO_2^-$ равны для ряда $R = H, F, Cl, Br, I$ соответственно 1,00, 0,6, 0,5, 0,4, 0,5.

Эти данные показывают, что для образования связи АТ—АГ или АТ—Г необходимо достаточно точное соответствие активного участка АТ с поверхностью гаптенной группы. Чрезвычайно существенно относительное расположение компонентов гаптенной группы. Для АТ к *пара*- $NN-C_6H_4-AsO_3H^-$ относительные константы связывания $OAsO_3H^-$, $H_3CAsO_3H^-$, $H_5C_6AsO_3H^-$ и $H_5C_6CH_2AsO_3H^-$ соответственно равны 0, 0, 1, 0. Удаление бензольного кольца (необходимого для связывания) от арсоната на одну метильную группу CH_2 уничтожает связывание [27].

Связывание сильно зависит от природы заряженной группы. Так, те же АТ к *пара*- $NN-C_6H_4-AsO_3H^-$ одинаково сильно связывают $C_6H_5AsO_3H^-$ и $C_6H_5PO_3H^-$, но не связывают $C_6H_5SO_3^-$, $C_6H_5CO_2^-$ и $C_6H_5SbO_5H_4^-$. Существенное значение имеет радиус иона.

Описанные результаты и другие данные, им подобные, свидетельствуют о комплементарности, о структурном соответствии активного участка АТ и детерминантной (гаптенной) группы АГ. Очевидно, что размеры активного участка АТ должны быть соизмеримы с размером гаптена. Методом торможения реакции АТ с АГ были исследованы взаимодействия АТ к поли-L-аланину с олигопептидами аланина. Оптимальным гаптенем, сильнее всего тормозящим реакцию, оказался пентапептид. На этом основании размеры активного участка были оценены в $25 \times 11 \times 2 \text{ \AA}^3$ [28]. Считается, что вообще в активных участках фигурируют 10—20 аминокислотных остатков, т. е. около 1% всех остатков молекулы АТ. Следует отметить, что число остатков в активном центре фермента того же порядка, но мономерные

Связывание в различных пара-системах

Система	•	Галтены					
							
	$N(CH_3)_2$	1,0	1,45	0,86	1,05	2,0	
	AsO_3H^-	1,0	2,7	1,1	1,1	2,9	3,9
	AsO_3H^-	1,0	1,9	0,78	0,21	0,52	6,0
	COO^-	1,0	1,8	0,21	0,03	0,03	1,98
	COO^-	1,0	3,0	0,66	0,08	0,18	10

молекулы ферментов, как правило, значительно меньше молекул антител.

При денатурации антител их способность к специфическому связыванию АГ или Г исчезает. Однако удается в некоторых случаях осуществить и ренатурацию антител с восстановлением их активности. Присутствие гаптена способствует ренатурации.

Значения свободных энергий связывания, стерическое структурное соответствие активного центра АТ и гаптенной группы, оценки размеров активных центров показывают, что взаимодействие АТ с гаптенем весьма сходно по характеру с взаимодействием фермента с субстратом, приводящим к образованию михаэлисова комплекса ([1], гл. 6). Естественно возникает вопрос о конформационных свойствах антител, о конформационных превращениях в акте взаимодействия.

Было показано, что папаиновые фрагменты IgG характеризуются большей компактностью, чем молекула в целом [29]. Это указывает на конформационное превращение. Различные протеазы разрывают тяжелую цепь в одном и том же участке. Можно думать, что этот участок неупорядочен и служит своего рода шарниром. Электронные микрофотографии комплексов АТ—Г, подобные приведенным на рис. 1.5, показывают, что углы между *Fab*-фрагментами могут изменяться. Все эти данные свидетельствуют об известной гибкости молекул IgG. Прямые доказательства конформационной лабильности молекул IgG и IgM были получены путем изучения поляризованной люминесценции (см. [1], § 5.8). Время вращательной релаксации τ комплексов IgG с 1-диметиламиноафталин-5-сульфониллом (ДНС, дансил) было оценено в 170—220 нс [30, 31]. Близкое значение τ дал расчет, основанный на моделировании IgG жестким эллипсоидом вращения. Однако в более точных исследованиях было получено $\tau = 60$ нс [32]. Это значение соответствует броуновскому движению не всей молекулы белка, но ее относительно малых участков, т. е. указывает на гибкость молекулы. Значения τ для отдельных *Fab*- и *Fc*-фрагментов равны соответственно 64 и 33 нс. При их свободной связи среднее τ должно составлять 56 нс, что хорошо согласуется с найденными для целой молекулы значениями. По-видимому, субъединицы IgG, сходные с папаиновыми фрагментами, обладают свободой вращения [33—35]. Взаимодействие гаптена с АТ приводит к заметному увеличению τ , что свидетельствует об изменении конформации АТ [36]. С другой стороны, методом кругового дихроизма установлено, что при образовании комплекса АТ—АГ изменяется и конформация АГ [37]. Результаты оптических измерений подтверждаются и исследованиями спектров ЭПР антител, содержащих парамагнитные метки ([38]; детальный обзор и дальнейшие подробности см. в [15, 39]).

Таким образом, конформационные перестройки действительно реализуются при взаимодействиях АТ—АГ. Есть основания думать, что они сводятся к изменению взаимных ориентаций доменов. В этом отношении также имеется сходство с фермент-субстратными комплексами. Принципиальное отличие взаимодействия АТ—АГ от взаимодействия фермент—субстрат состоит в том, что в первом случае практически отсутствуют электронные перестройки. Соответственно речь идет о чисто конформационных эффектах, но не об ЭКВ. В этом смысле первый случай значительно проще второго.

Узнавание антигена антителом определяется слабыми взаимодействиями, реализуемыми при структурном соответствии. Узнается сигнатура АГ—его детерминантная, гаптенная группа. Результатом узнавания является связывание АГ, но не химическое превращение (как в случае фермента).

В свое время Полинг выдвинул идею, согласно которой узнающая система антитела способна к обучению [40]. Полинг считал, что все молекулы АТ имеют одну и ту же первичную структуру. Специфические АТ образуются в результате конформационного свертывания полипептидных цепей, индуцируемого молекулами АГ, и достижения таким образом структурного соответствия. Однако в дальнейшем было показано, что первичные структуры различных АТ различаются. Подобно ферменту, иммуноглобулин — необучаемая узнающая система.

§ 14. РЕЦЕПЦИЯ ЗАПАХА

С другими яркими примерами узнавания мы встречаемся в первичных процессах, определяющих рецепцию запаха. Обонятельная рецепция имеет особое значение для ряда организмов, определяя важные черты их поведения. Сказанное относится, в частности, к насекомым. Насекомые пользуются «языком запахов» — выделяемые ими специальные вещества, именуемые *феромонами*, служат для сигнализации. Имеются феромоны, применяемые общественными насекомыми — муравьями — в качестве сигналов тревоги и указателей пути к запасам пищи [41]. Бабочки пользуются феромонами в качестве половых аттрактантов. Бабочки-самцы прилетают издалека, за много километров, руководствуясь запахом самки, что было показано еще Фабром [42]. Фабр помещал самку сатурнии в жестяную, деревянную или картонную коробку. Если коробки были достаточно герметичны, самцы не прилетали. Вместе с тем они прилетали к веточке, на которой ранее сидела самка, и даже на стул, на котором ранее лежала эта веточка. «Итак доказано, — пишет Фабр, — что нельзя допустить здесь способ уведомления, подобный беспроволочному телеграфу, потому что всякое препят-