



УДК 577.112.017:543.422.25

## ЭПИТОП КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ВИСКУМИНА, ПОЯВЛЯЮЩИЙСЯ ПРИ ЕЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ЛИПИДНЫМ БИСЛОЕМ

© 2003 г. В. С. Пашков\*#, И. И. Агапов\*\*, Т. А. Балашова\*, Н. С. Егорова\*, А. Ю. Суровой\*, И. Б. Певзнер\*\*, А. Г. Тоневицкий\*\*

\*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/110;

\*\*Государственный научный центр РФ ГОСНИИгенетика, Москва

Поступила в редакцию 27.05.2002 г. Принята к печати 03.10.2002 г.

Ранее было показано, что каталитическая субъединица растительного токсина вискумина вызывает агрегацию малых мономеллярных липосом и что этот процесс ингибируется в присутствии моноклонального антитела mab\_TA7, продуцированного к денатурированной форме каталитической субъединицы вискумина (Agarov I. I. et al. FEBS Lett. 1999. V. 464. P. 63–66). Методом спектроскопии <sup>1</sup>H-ЯМР исследовано взаимодействие синтетических фрагментов каталитической субъединицы вискумина (F<sup>101</sup>-T<sup>105</sup> и A<sup>96</sup>-T<sup>105</sup>) с моноклональным антителом mab\_TA7. Результаты этих исследований показали, что лишь фрагмент A<sup>96</sup>-T<sup>105</sup> способен связываться с mab\_TA7. Анализ ядерного эффекта Оверхаузера, возникшего в комплексе антиген-антитело и зарегистрированного на сигналах свободного пептида, обменивающегося между свободным и связанным с антителом состояниями, позволил установить антигенную детерминанту mab\_TA7 (H<sup>99</sup>-T<sup>105</sup>), а также определить конформацию и ориентацию антигенной детерминанты в комплексе с антителом.

*Ключевые слова:* вискумин; моноклональное антитело; эпитопный анализ; ЯМР.

### ВВЕДЕНИЕ

Вискумин – белковый токсин, содержащийся в листьях омелы белой (*Viscum album*), принадлежит к группе инактивирующих рибосомы белков типа II [1]. Он состоит из двух связанных дисульфидной связью субъединиц, каждая из которых выполняет четко выраженную биологическую функцию. Каталитическая субъединица (MLA, 27 кДа) взаимодействует с цитоплазматической мишенью токсина, представленной консервативной GAGA-петлей (4323–4326) 28S РНК 60S рибосом эукариот, отщепляя от петли остаток A4324 и прекращая синтез белка на рибосоме. Связывающая субъединица (MLB, 34 кДа) обеспечивает взаимодействие токсина с рецепторами клеточной поверхности, содержащими концевую галактозу.

После связывания с рецепторами вискумин перемещается внутри клетки в составе эндосомных везикул, попадает в аппарат Гольджи, а затем в эндоплазматический ретикулум. По-видимому, окислительно-восстановительный комплекс эндоплаз-

матического ретикулума, представленный глутатионом и дисульфидизомеразой, способствует восстановлению дисульфидной связи между субъединицами вискумина, что приводит к диссоциации токсина на отдельные субъединицы [2]. Как MLA попадает в цитозоль, остается пока неясным.

Способность MLA вызывать агрегацию липосом [3] указывает на то, что эта субъединица взаимодействует с мембранами. Антитела, специфично связывающиеся с нативной MLA, а также антитело mab\_TA7, взаимодействующее лишь с денатурированной MLA, ингибируют агрегацию липосом, вызываемую MLA [3]. Методами ИФА было показано, что антигенным эпитопом mab\_TA7 является фрагмент F<sup>101</sup>-T<sup>105</sup>. Этот эпитоп, появляющийся на поверхности MLA при денатурации субъединицы или при взаимодействии MLA с мембраной липосом, возникает, по-видимому, и при внутриклеточной транслокации MLA к своей биологической мишени. Основой для такого предположения служит устойчивость гибридомы, продуцирующей mab\_TA7, к цитотоксическому действию вискумина [3].

Взаимодействие антиген-антитело характеризуется высокой стереоспецифичностью. По этой причине небольшой конформационно-лабильный синтетический пептид, содержащий антигенный эпитоп, при взаимодействии с антите-

Сокращения: MLA – каталитическая субъединица вискумина *Viscum album*; mab\_TA7 – моноклональное антитело, продуцированное к денатурированной MLA; ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера; ИФА – иммуноферментный анализ.

# Автор для переписки (тел.: (095) 335-27-33; факс: (095) 335-71-03; эл. почта: pav@nmr.ru).

лом должен принимать ту конформацию, которая вызвала продуцирование антитела.

Исследование методом спектроскопии ЯМР ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО), возникающего в комплексе лиганд–макромолекула и регистрируемого на сигналах свободного лиганда, в настоящее время широко используется для изучения конформации и ориентации лигандов в их комплексах с макромолекулами [4, 5]. Для эффективного применения этого метода необходимо, чтобы лиганд сравнительно быстро обменивался между связанным с макромолекулой и свободным состояниями, т.е. связывание лиганда с макромолекулой в исследуемой системе должно быть относительно слабым ( $K_d > 1$  мкМ, [4, 5]). Этот метод был применен нами ранее [6, 7] при исследовании эпитопов бактериородопсина, где в качестве антигенов использовались синтетические фрагменты бактериородопсина, содержащие антигенные детерминанты.

В настоящей работе синтезированы три фрагмента MLA:  $A^{96}-L^{100}-NH_2$  (Fr1),  $F^{101}-T^{105}-NH_2$  (Fr2),  $A^{96}-T^{105}-NH_2$  (Fr1\_2), а также их биотинилированные по *N*-концу производные с тем, чтобы с их помощью установить конкретные группы антигена, обеспечивающие связывание с антителом, и определить конформацию эпитопа в комплексе антиген–антитело. Сопоставление этих данных с рентгеноструктурной моделью MLA [8] позволяет получить представление о характере конформационных перестроек, испытываемых MLA при взаимодействии с мембраной.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установление конформации и ориентации антигенной детерминанты в комплексе с mab\_TA7 было начато с исследования спектров  $^1H$ -ЯМР смесей mab\_TA7 и пептида  $F^{101}-T^{105}$  (Fr2), поскольку, согласно опубликованным данным [3], эпитопом mab\_TA7 является именно этот фрагмент (данные получены при исследовании методами ИФА взаимодействия mab\_TA7 с серией перекрывающихся по аминокислотной последовательности октапептидных фрагментов MLA, пришитых *C*-концом к полиэтиленовым иглам иммунологического планшета).

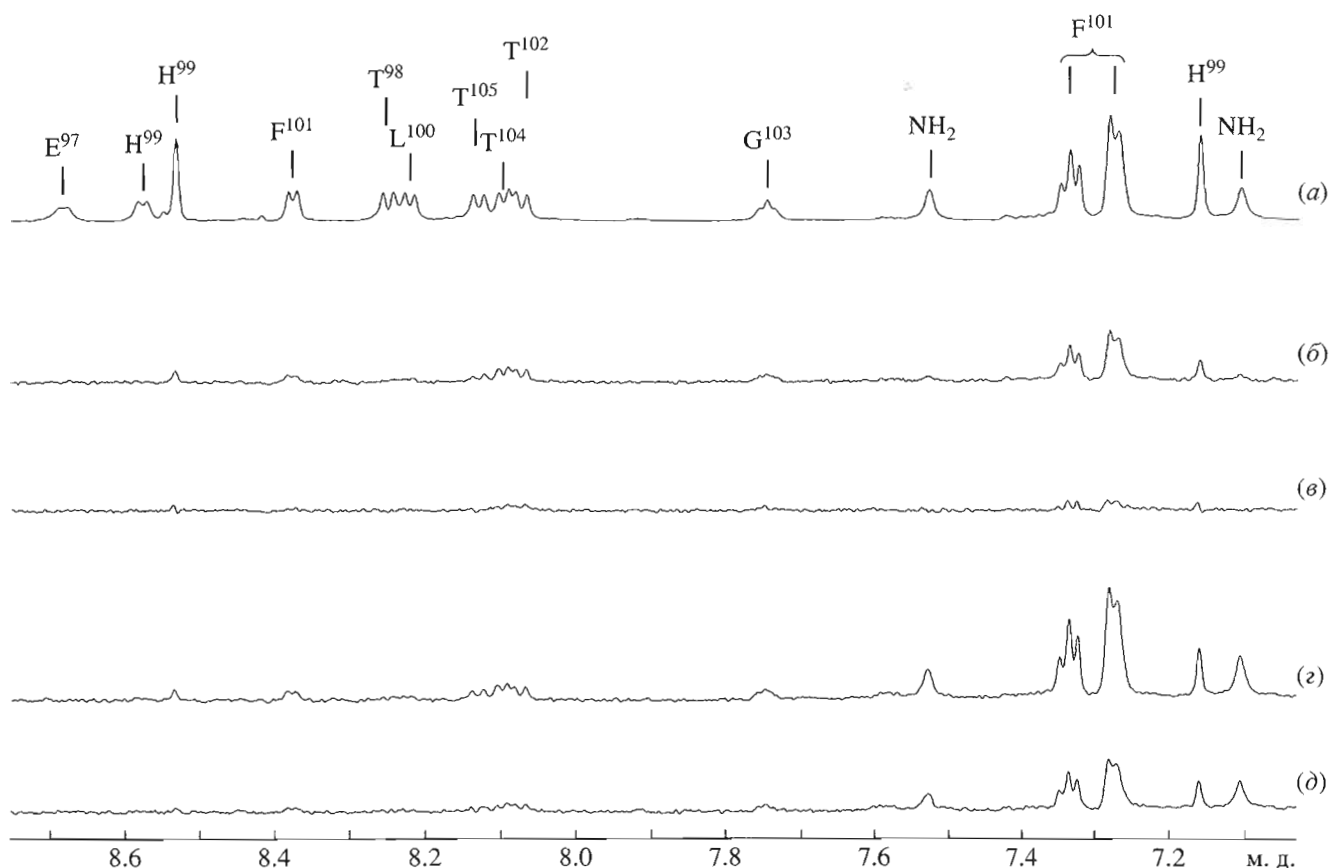
Исследование спектров  $^1H$ -ЯМР, выполненное нами, показало, что присутствие mab\_TA7 не оказывает влияния на ширину сигналов Fr2. При облучении дополнительным радиочастотным полем сигналов от протонов mab\_TA7 интенсивность сигналов свободного Fr2 не менялась. Оба этих факта, указывающих на отсутствие связывания Fr2 с mab\_TA7, привели к необходимости синтеза других фрагментов MLA и их биотинилированных производных с тем, чтобы методами  $^1H$ -ЯМР и ИФА установить эпитоп, вызвавший продуцирование mab\_TA7.

Методом ИФА нам не удалось обнаружить связывания mab\_TA7 с биотинилированными по *N*-концу пептидами Fr1, Fr2 и Fr1\_2. В отличие от ИФА, метод спектроскопии  $^1H$ -ЯМР, в котором применяли немодифицированные биотином пептиды, выявил наличие связывания пептида Fr1\_2 с антителом. При добавлении Fr1\_2 к раствору mab\_TA7 в буфере PBS (pH 7.3, 30°C), уширенные сигналы пептида становились заметны на фоне сигналов от протонов антитела и комплекса антитело–пептид при соотношениях концентраций [пептид]/[антитело]  $> 2 : 1$ , что, несомненно, свидетельствует о связывании пептида Fr1\_2 с mab\_TA7. Наличие связывания пептида с антителом подтвердили также существенные изменения интенсивности сигналов протонов Fr1\_2 при облучении протонов mab\_TA7 дополнительным радиочастотным полем.

При установлении конформации пептидов и белков в растворе методом спектроскопии  $^1H$ -ЯМР важную роль играют сигналы от протонов NH пептидных групп. Эти группы обычно детектируют в слабокислой и кислой средах (pH  $\leq 6$ ). При более высоких величинах pH происходит резкое увеличение скорости обмена атомов водорода NH-групп с растворителем, приводящее к уширению и исчезновению сигналов от протонов NH из спектров  $^1H$ -ЯМР пептидов. Для того чтобы получить возможность регистрации сигналов от протонов NH в спектрах  $^1H$ -ЯМР смеси пептид–антитело, pH раствора был понижен от значения 7.3 до 5.1. При этом характер взаимодействия пептида Fr1\_2 с mab\_TA7 остался прежним. Об этом свидетельствует идентичность изменения интенсивностей сигналов свободного пептида при облучении дополнительным радиочастотным полем протонов антитела при pH 7.3 и 5.1. Все последующие исследования взаимодействия Fr1\_2 и mab\_TA7 проводились при pH 5.1 и мольном отношении пептид/антитело, 8 : 1.

В спектре  $^1H$ -ЯМР приготовленного таким образом образца на фоне широких сигналов от протонов антитела и комплекса пептид–антитело хорошо видны более узкие сигналы от протонов свободного пептида, положение которых идентично положению сигналов в спектре водного раствора пептида Fr1\_2 при pH 5.1 и температуре 30°C. Анализ спектров TOCSY и NOESY смеси Fr1\_2/mab\_TA7 подтвердил правомочность использования отнесения сигналов, полученного для водного раствора Fr1\_2, к спектрам  $^1H$ -ЯМР смеси пептида Fr1\_2 и mab\_TA7 (мольное отношение 8 : 1).

Для выявления групп атомов Fr1\_2, обеспечивающих связывание пептида с mab\_TA7, были проведены эксперименты по детектированию перенесенного ЯЭО, возникающего на сигналах свободного пептида при облучении сигналов от протонов антитела дополнительным радиочастот-



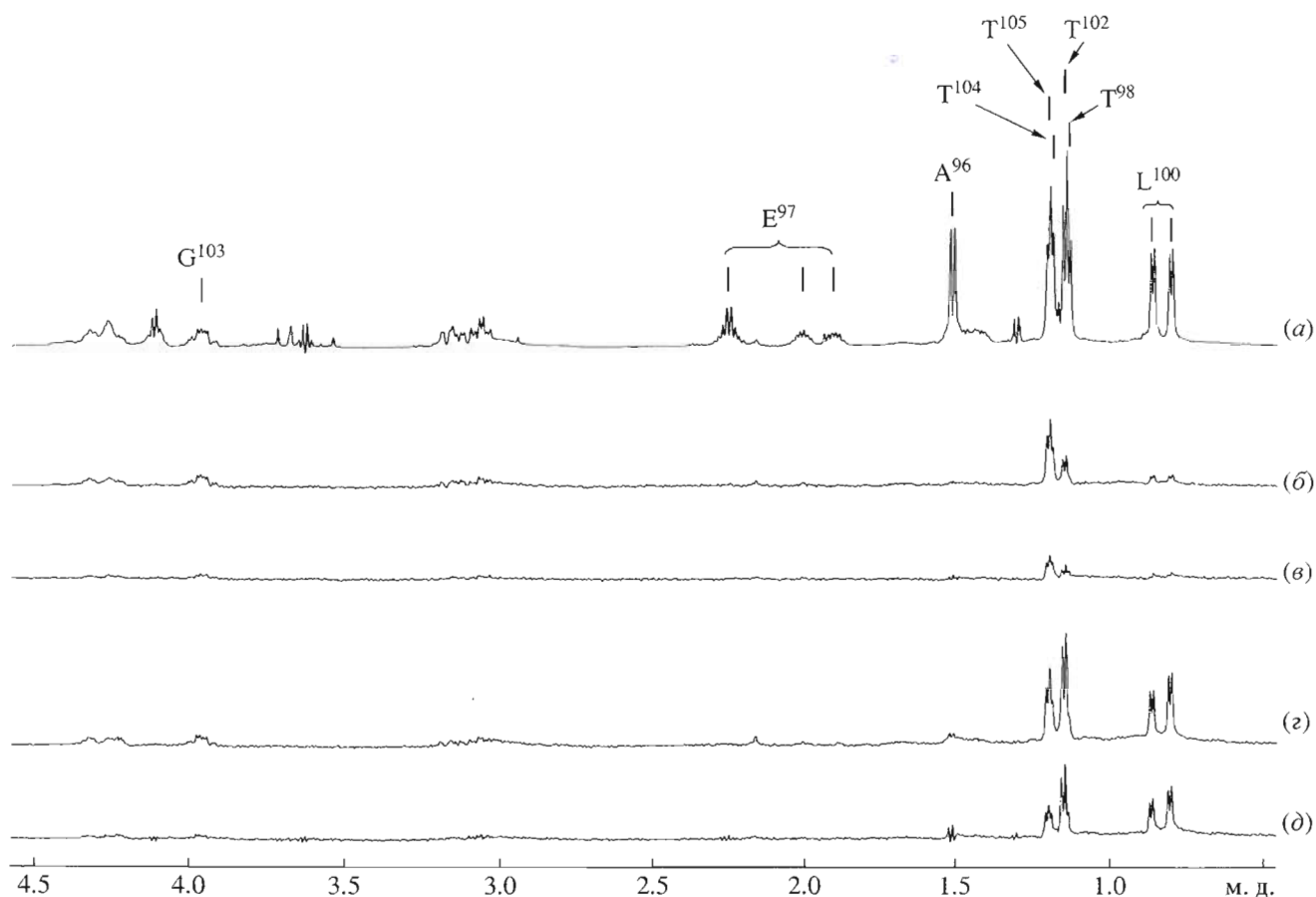
**Рис. 1.** Область сигналов ароматических и амидных протонов спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР смеси mAb\_TA7/Fr1\_2 (а) и увеличенные в четыре раза спектры ЯЭО (б–д), полученные при приложении дополнительного радиочастотного поля при 6.7 (з, д) или 0.5 м.д. (б, в); продолжительность включения дополнительного радиочастотного поля 0.2 (в, д) или 0.6 с (б, з); концентрации mAb\_TA7 и Fr1\_2 составляют 0.17 и 1.3 мМ (соответственно), pH 5.1, 30°C; вертикальные линии показывают положение в спектрах сигналов индивидуальных аминокислотных остатков.

ным полем. Результаты этих экспериментов приведены на рис. 1 и 2, где сверху показан спектр сравнения, а ниже четыре спектра ЯЭО, интенсивность сигналов в которых пропорциональна степени сближенности соответствующей группы пептида с протонами поверхности антитела в комплексе пептид–антитело. Сопоставление спектров ЯЭО (см. рис. 1б–1д) показывает, что в результате приложения радиочастотного поля при 6.7 м.д. (см. рис. 1з, 1д) интенсивность сигналов от ароматических протонов остатков F<sup>101</sup>, H<sup>99</sup> и С-концевых амидных протонов значительно больше, чем при приложении радиочастотного поля при 0.5 м.д. (см. рис. 1б, 1в). Интенсивность сигналов от метильных протонов остатков L<sup>100</sup>, T<sup>102</sup>, T<sup>104</sup> и T<sup>105</sup> в спектрах ЯЭО также зависит от положения, к которому прикладывается дополнительное радиочастотное поле (см. рис. 2б–2д).

Возможны два варианта объяснения зависимости интенсивности сигналов, наблюдаемых в спектрах ЯЭО, от места приложения дополнительного радиочастотного поля. Первый вариант предполагает, что в комплексе пептид–антитело разные

группы протонов могут входить в состав разных кластеров. Например, метильные группы пептида в этом комплексе могут оказаться в окружении метильных групп антитела, тогда как ароматические и амидные протоны пептида – в окружении ароматических и/или амидных групп антитела. В этом случае интенсивность сигналов в разностных спектрах ЯЭО будет зависеть не только от степени сближенности той или иной группы антигена с поверхностью антитела, но и от того, к какому кластеру приложено дополнительное радиочастотное поле. Так, максимальные величины перенесенного ЯЭО для метильных протонов пептида будут наблюдаться при облучении дополнительным радиочастотным полем метильных протонов антитела (0.5 м.д.), а максимальные величины перенесенного ЯЭО для ароматических и амидных протонов пептида – при приложении дополнительного радиочастотного поля к ароматическим и амидным протонам антитела (6.7 м.д.).

Второй вариант объяснения правомерен в случае медленного (в шкале химических сдвигов) обмена пептида между свободным и связанным с ан-



**Рис. 2.** Область сигналов алифатических протонов спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР смеси *tab\_TA7/Fr1\_2* (а) и увеличенные в четыре раза спектры ЯЭО (б–д), полученные при приложении дополнительного радиочастотного поля при 6.7 (б, в) или 0.5 м.д. (г, д); продолжительность включения дополнительного радиочастотного поля 0.2 (в, д) или 0.6 с (б, г). Условия снятия спектра и обозначения приведены в подписи к рис. 1.

тителом состояниями. В этих условиях в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР будут наблюдаться два набора сигналов от протонов пептида: 1) сравнительно узкие сигналы от протонов свободного пептида, хорошо заметные на фоне широких сигналов от протонов антитела; 2) сильно уширенные сигналы от протонов связанного с антителом пептида, перекрытые с широкими сигналами от протонов антитела. В этом случае не исключено, что дополнительное радиочастотное поле, приложенное при 0.5 м.д., может затрагивать какие-то сигналы от метильных протонов пептида, связанного с антителом, а радиочастотное поле, приложенное при 6.7 м.д., возможно, затронет сигналы от ароматических и/или амидных протонов пептида, находящегося в составе комплекса.

Имеющиеся в нашем распоряжении данные не позволяют сделать вывод, какой из этих двух вариантов реализуется в действительности, поскольку не известно ни пространственное строение комплекса пептид–антитело, ни химические сдвиги протонов пептида в комплексе пептид–антитело. Для вычисления величин перенесенного ЯЭО,

наблюдающегося на сигналах протонов пептида, расположенных в области 7.1–8.7 м.д., использовались спектры ЯЭО, полученные при приложении дополнительного радиочастотного поля при 0.5 м.д., а для сигналов пептида, расположенных в области 0.8–4.0 м.д., – разностные спектры ЯЭО, полученные с использованием дополнительного радиочастотного поля, приложенного при 6.7 м.д. Такой подход позволяет избежать больших ошибок в оценке степени сближенности протонов пептида с поверхностью антитела, поскольку он гарантирует, что протоны, сближенность которых с поверхностью антитела оценивается, не будут затронуты дополнительным радиочастотным полем.

Величины перенесенного ЯЭО почти линейно возрастают с увеличением продолжительности приложения дополнительного радиочастотного поля ( $\tau_{ir}$ , см. табл. 1), что указывает на отсутствие эффектов спиновой диффузии [9] и позволяет использовать величины перенесенного ЯЭО, измеренные при относительно больших значениях  $\tau_{ir}$  (0.6 с), для оценки степени сближенности групп ан-

тигена с антителом в комплексе F1\_2-mab\_TA7. Максимальные величины перенесенного ЯЭО, наблюдающиеся для протонов остатков G<sup>103</sup>, F<sup>101</sup>, T<sup>104</sup>, T<sup>102</sup>, T<sup>105</sup>, а также протонов H<sup>δ2</sup> остатка H<sup>99</sup> свидетельствуют, что соответствующие группы находятся в контакте с поверхностью антитела. Для протонов остатков A<sup>96</sup>, E<sup>97</sup> и T<sup>98</sup> величины перенесенного ЯЭО составляли менее 2–3% даже при τ<sub>ir</sub> = 0.6 с, что свидетельствует об удаленности этих остатков от поверхности антитела в комплексе пептид–антитело. Таким образом в комплексе пептид–антитело в антигенсвязывающую полость антитела попадает участок полипептидной цепи антигена F<sup>101</sup>–T<sup>105</sup>, тогда как участок полипептидной цепи антигена A<sup>96</sup>–T<sup>98</sup> не участвует в связывании с антителом, оставаясь экспонированным в растворителе. Величины перенесенного ЯЭО, наблюдающиеся для сигналов метильных протонов остатка L<sup>100</sup> и сигналов протонов боковой цепи H<sup>99</sup>, имеют промежуточное значение между максимальными (характерны для фрагмента F<sup>101</sup>–T<sup>105</sup>) и минимальными (характерны для фрагмента A<sup>96</sup>–T<sup>98</sup>), что свидетельствует о нахождении остатков H<sup>99</sup> и L<sup>100</sup> на границе контакта поверхностей антигена и антитела.

Для установления конформации пептида F1\_2 в комплексе с антителом были проведены съемка и анализ спектров NOESY смеси F1\_2/mab\_TA7. Характерной чертой этих спектров является наличие кросс-пиков между протонами C<sup>α</sup>H *i*-го и NH (*i* + 1)-го по аминокислотной последовательности остатков, тогда как кросс-пики между протонами NH *i*-го и *i* ± 1-го остатков, исключая остатка T<sup>102</sup> и G<sup>103</sup>, в спектре NOESY отсутствовали. Поскольку кросс-пики первого типа характерны для вытянутых участков полипептидной цепи, а кросс-пики второго типа для изгибов и спиральных участков, полученные нами данные свидетельствуют о том, что полипептидная цепь эпитопа (остатки L<sup>100</sup>–T<sup>105</sup>) имеет вытянутую конформацию с изгибом в районе остатков T<sup>102</sup> и G<sup>103</sup>.

Расчет конформации F1\_2 в комплексе с mab\_TA7 выполнен на основе объемов кросс-пиков, измеренных в спектре NOESY смеси F1\_2/mab\_TA7, в котором время смешивания продольных компонентов намагниченности (τ<sub>mix</sub>) составляло 0.1 с. Появление кросс-пиков в этом спектре обусловлено ЯЭО, возникшим в комплексе F1\_2-mab\_TA7 и переносимым на сигналы свободного пептида в результате обмена пептида между связанным в комплекс с антителом и свободным состояниями. Вклад ЯЭО свободного пептида в интенсивность этих кросс-пиков пренебрежимо мал, так как в спектре NOESY свободного пептида F1\_2, полученного в аналогичных условиях, кросс-пики едва заметны на уровне шума.

Вычисления проводили с помощью программы DYANA [10], используя экспериментально ус-

**Таблица 1.** Величины перенесенного ЯЭО, наблюдавшегося на сигналах от протонов свободного пептида F1\_2 в смеси [F1\_2]/[mab\_TA7], 8 : 1 (pH 5.1, 30°C) при приложении дополнительного радиочастотного поля к сигналам от протонов антитела в течение τ<sub>ir</sub> 0.2, 0.4 и 0.6 с (ошибка измерения величин перенесенного ЯЭО составляла ±1%)

Сигнал от протонов	Величина перенесенного ЯЭО, % при τ <sub>ir</sub> (с)		
	0.2	0.4	0.6
H <sup>α2</sup> G <sup>103</sup>	5.7	10.0	14.9
H <sup>α1</sup> G <sup>103</sup>	6.4	9.7	14.5
H <sup>ε1, ε2</sup> F <sup>101*</sup>	3.4	7.0	13.1
(H <sup>γ2</sup> ) <sub>3</sub> T <sup>104</sup> QG	4.1	8.6	12.5
H <sup>δ1, δ2, ζ</sup> F <sup>101*</sup>	2.4	6.9	12.3
HN T <sup>102</sup>	6.0	8.4	11.7
HN T <sup>104</sup>	3.9	9.2	11.4
HN G <sup>103</sup>	5.4	7.4	9.3
(H <sup>γ2</sup> ) <sub>3</sub> T <sup>105</sup>	3.6	5.8	8.8
H <sup>δ2</sup> H <sup>99</sup>	2.2	3.2	6.6
NH <sup>1</sup> T <sup>105</sup> -NH <sub>2</sub>	0.6	2.3	6.2
HN T <sup>105</sup>	2.9	4.9	6.1
(H <sup>γ2</sup> ) <sub>3</sub> T <sup>102</sup>	1.7	3.4	4.8
HN F <sup>101</sup>	3.2	4.3	4.7
NH <sup>2</sup> T <sup>105</sup> -NH <sub>2</sub>	–	2.1	4.4
H <sup>ε1</sup> H <sup>99</sup>	1.8	2.2	3.4
(H <sup>δ1</sup> ) <sub>3</sub> L <sup>100</sup>	1.5	1.8	3.0
(H <sup>δ2</sup> ) <sub>3</sub> L <sup>100</sup>	1.1	1.5	2.9

\* Сигналы от ароматических протонов F<sup>101</sup> в спектре <sup>1</sup>H-ЯМР представлены двумя мультиплетами H<sup>ε1, ε2</sup> и H<sup>δ1, δ2, ζ</sup>, имеющими химические сдвиги 7.35 и 7.31 м.д. соответственно.

тановленные ограничения на допустимые межпротонные расстояния, вычисленные из объемов кросс-пиков, измеренных в спектре NOESY (см. “Эксперимент. часть”). Из ста сгенерированных случайным образом конформеров F1\_2 и оптимизированных программой DYANA были отобраны пять конформеров, наилучшим образом удовлетворявших экспериментально установленным ограничениям на межпротонные расстояния. Анализ среднеквадратичного отклонения координат тяжелых атомов основной цепи этих конформеров показал, что эти отклонения на участке L<sup>100</sup>–T<sup>104</sup> минимальны, их величины составляют 0.5–1 Å. По мере удаления от этого участка величины отклонений координат атомов в конформерах начинают резко возрастать. Увеличение среднеквадратичного отклонения координат атомов остатка T<sup>105</sup>, по-видимому, обусловлено меньшим количеством экспериментально определенных ограничений на положения атомов этого остатка, являющегося в пептиде F1\_2 C-концевым. Увеличение среднеквадратичного отклонения атомов на участке H<sup>99</sup>–A<sup>96</sup> свидетельствует о том, что в комплексе F1\_2-mab\_TA7 остаток H<sup>99</sup> находится на

**Таблица 2.** Сопоставление рентгеноструктурных данных о доступности для растворителя (радиус 1.4 Å) индивидуальных атомов водорода фрагмента Н<sup>99</sup>-Т<sup>105</sup> каталитической субъединицы вискумина (MLA) с данными ЯМР о степени сближенности групп Fr1\_2 с поверхностью mab\_TA7 в комплексе пептид-антитело

Аминокислотный остаток	Рентгеноструктурный анализ		<sup>1</sup> Н-ЯМР	
	атом водорода	относительная доступность*, %	протоны	относительная доступность**, %
His <sup>99</sup>	HN	0.0	HN	<15
	H <sup>δ2</sup>	0.0	H <sup>δ2</sup>	44.3
	H <sup>ε1</sup>	72.0	H <sup>ε1</sup>	22.6
Leu <sup>100</sup>	HN	0.0	HN	<15
	H <sup>δ11</sup>	0.0	(H <sup>δ1</sup> ) <sub>3</sub>	19.3
	H <sup>δ12</sup>	13.4		
	H <sup>δ13</sup>	7.5		
	H <sup>δ21</sup>	0.0	(H <sup>δ2</sup> ) <sub>3</sub>	20.4
H <sup>δ22</sup>	0.0			
H <sup>δ23</sup>	5.4			
Phe <sup>101</sup>	HN	66.7	HN	31.6
	H <sup>δ1</sup>	0.0	H <sup>δ1, δ2, ζ***</sup>	82.6
	H <sup>δ2</sup>	71.9		
	H <sup>ζ</sup>	0.0		
	H <sup>ε1</sup>	0.0	H <sup>ε1, ε2***</sup>	88.0
H <sup>ε2</sup>	2.2			
Thr <sup>102</sup>	HN	83.3	HN	78.6
	H <sup>γ21</sup>	100.0	(H <sup>γ2</sup> ) <sub>3</sub>	32.1
	H <sup>γ22</sup>	85.5		
	H <sup>γ23</sup>	97.4		
Gly <sup>103</sup>	HN	83.3	HN	62.7
	H <sup>α1</sup>	51.2	H <sup>α1</sup>	97.5
	H <sup>α2</sup>	100.0	H <sup>α2</sup>	100.0
Thr <sup>104</sup>	HN	100.0	HN	76.8
	H <sup>γ21</sup>	2.5	(H <sup>γ2</sup> ) <sub>3</sub>	83.6
	H <sup>γ22</sup>	1.1		
	H <sup>γ23</sup>	66.7		
Thr <sup>105</sup>	HN	0.0	HN	33.1
	H <sup>γ22</sup>	34.0		
	H <sup>γ23</sup>	100.0		

\* Доступность атомов водорода для растворителя в изолированном аминокислотном остатке принята за 100%.

\*\* Данные вычислены из отношений величин перенесенного ЯЭО, наблюдавшегося на сигналах свободного пептида в смеси A<sup>96</sup>-T<sup>105</sup>-NH<sub>2</sub>/mab\_TA7 (τ<sub>ir</sub> 0.6 с); степень сближенности H<sup>α2</sup>G<sup>103</sup> с поверхностью антитела принята за 100%.

\*\*\* Сигналы от ароматических протонов F<sup>101</sup> в спектре <sup>1</sup>Н-ЯМР представлены двумя мультиплетами H<sup>ε1, ε2</sup> и H<sup>δ1, δ2, ζ</sup>, имеющими химические сдвиги 7.35 и 7.31 м.д. соответственно.

границе контакта с поверхностью антитела, тогда как остатки T<sup>98</sup>-A<sup>96</sup> не контактируют с поверхностью антитела, сохраняя высокую конформационную подвижность как в свободном пептиде, так и в комплексе антиген-антитело.

Таким образом, результаты исследования методом спектроскопии ЯМР взаимодействия синтетических фрагментов MLA с mab\_TA7 показывают, что эпитоп mab\_TA7 образован аминокислотными остатками фрагмента Н<sup>99</sup>-Т<sup>105</sup>. В связывании с антителом важная роль принадлежит аминокислотным остаткам Н<sup>99</sup> и L<sup>100</sup>: отсутствие этих остатков в пептиде Fr2 (F<sup>101</sup>-T<sup>105</sup>) приводит к его неспособности связываться с mab\_TA7. Учитывая, что большинство аминокислотных остатков пептида Fr1 не входят в состав антигенного эпитопа, исследование методом <sup>1</sup>Н-ЯМР взаимодействия этого пептида с mab\_TA7 не имело смысла и в данной работе не было проведено.

Сопоставление полученных нами результатов с рентгеноструктурной моделью молекулы вискумина [8] позволяет объяснить, почему mab\_TA7 не взаимодействует с нативной MLA. Так, ароматическое кольцо F<sup>101</sup>, метильные группы остатков T<sup>104</sup> и L<sup>100</sup>, C<sup>δ2</sup>H Н<sup>99</sup> и другие группы (см. табл. 2) антигенного фрагмента, контактирующие с поверхностью mab\_TA7 в комплексе и, очевидно, обеспечивающие связывание антигена, в нативной MLA экранированы белковой глобулой. В нативной MLA фрагмент L<sup>100</sup>-T<sup>104</sup> образует изогнутую петлю, соединяющую α-спираль с ветвью β-структуры. В составе комплекса с mab\_TA7 полипептидная цепь имеет более развернутую конформацию, изогнутость полипептидной цепи сохраняется лишь в районе остатков T<sup>102</sup>-G<sup>103</sup> (см. рис. 3).

Устойчивость гибридомы TA7 к цитотоксическому действию вискумина обусловлена способностью продуцируемого ею моноклонального антитела mab\_TA7 связываться с каталитической субъединицей вискумина (MLA). Известно [3], что mab\_TA7 не связывается с нативной MLA и что эпитоп, взаимодействующий с mab\_TA7, появляется на поверхности MLA при взаимодействии субъединицы с липидным бислоем. Данные настоящей работы позволяют получить представление о характере конформационных перестроек, испытываемых MLA при взаимодействии с липидным бислоем. Согласно этим данным, на поверхности MLA появляются дополнительные гидрофобные группы (ароматическое кольцо остатков Н<sup>99</sup> и F<sup>101</sup>, метильные группы остатков L<sup>100</sup> и T<sup>104</sup>), а полипептидная цепь в районе остатков Н<sup>99</sup>-Т<sup>105</sup> приобретает более вытянутую конформацию.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: L-аминокислоты, N-гидроксисбензотриазол (Novobiochem, Германия); N,N'-диизопропилкарбодимид, трифторуксусную кислоту, пиперидин, 1,2-этандитиол (Fluka, Германия); <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (Изотоп, Россия); <sup>2</sup>HCl, KO<sup>2</sup>H (Stochler Isotope, США).

**Синтез пептидов** Ala<sup>96</sup>-Glu-Thr-His-Leu<sup>100</sup>-NH<sub>2</sub> (Fr1), Phe<sup>101</sup>-Thr-Gly-Thr-Thr<sup>105</sup>-NH<sub>2</sub> (Fr2) и Ala<sup>96</sup>-Glu-

Thr-His-Leu-Phe-Thr-Gly-Thr-Thr<sup>105</sup>-NH<sub>2</sub> (Fr1\_2) проводили твердофазным методом в ручном варианте на 100 мг полимера 4-(2',4'-диметоксифенил-*Fmoc*-аминометил)феноксиполистирола (0.51 ммоль NH<sub>2</sub>/г полимера, Novobiochem, Германия). На каждом шаге пептидной конденсации карбоксильную группу *Fmoc*-аминокислот активировали превращением в гидроксibenзотриазоловый эфир с помощью *N*-гидроксibenзотриазола (HOBT) и *N,N*-диизопропилкарбодимид (DIC). *Fmoc*-аминокислоты, HOBT и DIC вводили в реакцию в 10-кратных мольных избытках по отношению к аминогруппам полимера. За ходом реакции следили по изменению окраски бромфенолового синего, который добавляли в реактор в виде раствора в DMSO. Перед последующей конденсацией смолу обрабатывали 20% раствором пиперидина в *N,N*-диметилформамиде. Биотинилирование пептидов проводили по той же схеме в течение 3 ч.

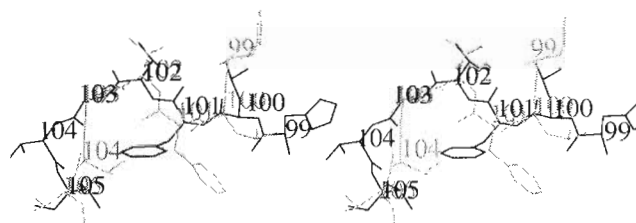
Пептиды отщепляли от полимерного носителя смесью трифторуксусная кислота/H<sub>2</sub>O/1,2-этандитиол (95.0 : 2.5 : 2.5, объемные %). Пептиды выделяли с помощью офВЭЖХ на колонке Nucleosil C18 250 × 8 (Machery-Nagel, Германия) при градиентном элюировании в системе ацетонитрил (растворитель В) и 0.1% трифторуксусная кислота в H<sub>2</sub>O (растворитель А). Пептиды анализировали методом офВЭЖХ на колонке Luna C18 250 × 3 (Phenomenex, США) и методом <sup>1</sup>H-ЯМР. Чистота пептидов и их биотинилированных производных после хроматографического разделения составляла 98–99%.

**Получение таб\_TA7 и иммуноферментный анализ взаимодействия таб\_TA7 с биотинилированными пептидами** выполнены как описано ранее [3].

**Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР** (500 и 600 МГц) зарегистрированы на спектрометрах DRX 500 (Bruker, Германия) и UNITY 600 (Varian, США) в ампулах, имеющих внешний диаметр 5 мм. Подавление сигнала воды в спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР осуществлялось с помощью цикла импульсов WATERGATE [11]. Для изменения pH исследуемых образцов использовались 0.1 и 1.0 М растворы HCl и KOH. Значения химических сдвигов протонов измерены относительно сигнала <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O, химический сдвиг которого при 30°C составляет 4.75 м.д. DSS (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонат натрия).

Отнесение сигналов пептидов в спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР выполняли в ходе анализа спектров TOCSY (время фиксации компонентов намагниченности 0.08 с) и ROESY (время смешивания компонентов намагниченности 0.4 с) растворов пептидов (1–3 мМ) в смеси <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O/<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, 9 : 1, pH 3.5–5.5, 30°C, используя стандартные процедуры [12] и данные о химических сдвигах сигналов аминокислотных остатков в модельных пептидах [13].

Для исследования методом <sup>1</sup>H-ЯМР взаимодействия пептидов с таб\_TA7 использовали препараты антитела, содержащие 0.2 мМ таб\_TA7,



**Рис. 3.** Стереизображение конформаций фрагмента полипептидной цепи H<sup>99</sup>-T<sup>105</sup> MLA, установленных методом рентгеноструктурного анализа (серый цвет) и методом <sup>1</sup>H-ЯМР в комплексе Fr1\_2-таб\_TA7 (черный цвет); суперпозиция моделей проведена по атомам основной цепи остатков F<sup>101</sup>-G<sup>103</sup>.

100 мМ NaCl, 5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 М NaN<sub>3</sub>, к которым была добавлена тяжелая вода до соотношения [<sup>1</sup>H<sub>2</sub>O]/[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O], 9 : 1.

Регистрация перенесенного ЯЭО, возникшего на сигналах свободных пептидов в результате насыщения сигналов от протонов антитела дополнительным радиочастотным полем, выполнена с использованием импульсной последовательности [9]:

$$[t_3 - \tau_{ir}(F1, F2) - t_2 - 90^\circ - (t_3 - 180^\circ - t_3)_m - \text{WG} - \text{AQ}]_n, \quad (1)$$

где  $t_3 = 4$  с – релаксационная пауза;  $\tau_{ir}(F1, F2) = 0.1\text{--}1.5$  с – продолжительность включения радиочастотного поля ( $\gamma_{H_2} = 60$  Гц), прикладываемого к сигналам от протонов антитела (F2) или свободному от сигналов краю спектральной области (F1);  $t_2 = 2$  мкс; 90 и 180° – неселективные радиочастотные импульсы высокой мощности;  $t_3 = 0.48$  мкс;  $m = 12$  – число повторений цикла ( $t_3 - 180^\circ - t_3$ ), предназначенного для устранения из спектров быстро релаксирующих широких сигналов; WG – цикл импульсов WATERGATE [11], подавляющий сигнал протонов воды; AQ = 0.512 с – время регистрации спада сигнала свободной индукции;  $n = 256$  – число повторений импульсной последовательности для увеличения соотношения сигнал/шум в двух результирующих спектрах (F1 и F2), вычитание которых дает разностный спектр ЯЭО. Величины перенесенного ЯЭО вычислены из соотношения  $(I_{\text{TRNOE}}/I_{\text{REF}}) \times 100$ , где  $I_{\text{TRNOE}}$  и  $I_{\text{REF}}$  – интенсивности аналогичных сигналов в разностном спектре ЯЭО и в спектре сравнения (F1) соответственно. При вычислении величин перенесенного ЯЭО для сигналов пептида, расположенных в области 7–9 м.д., применялись разностные спектры ЯЭО, полученные с использованием дополнительного радиочастотного поля, приложенного при 0.5 м.д., а для сигналов пептида, расположенных в области 0.8–4.0 м.д., – разностные спектры ЯЭО, полученные с использованием дополнительного радиочастотного поля, приложенного при 6.7 м.д.

Для установления конформации пептида F1\_2 в комплексе с таб\_TA7 снят спектр NOESY смеси

[F1\_2]/[mab\_TA7], 8 : 1 при pH 5.1 и 30°C, с временем смешивания продольных компонентов намагниченности  $\tau_{\text{mix}} = 0.1$  с. Для измерения объемов кросс-пиков между пептидными протонами, наблюдавшихся в этом спектре, использована программа XEASY [14].

Расчеты конформации пептида в комплексе пептид–антитело выполнены с помощью программы DYANA [10] с использованием экспериментально установленных ограничений на допустимые межпротонные расстояния. Верхние ограничения на эти расстояния вычислены с помощью стандартных процедур программы DYANA из объемов кросс-пиков, измеренных в спектре NOESY смеси F1\_2/mab\_TA7, нижние ограничения на межпротонные расстояния ( $>3.6$  Å) введены для протонов, кросс-пики которых в спектре NOESY отсутствовали.

При определении доступности атомов водорода фрагмента H<sup>99</sup>–T<sup>105</sup> MLA для растворителя (радиус 1.4 Å) использовалась программа MOLMOL [15]. Эта же программа использовалась для идентификации элементов вторичной структуры фрагмента H<sup>99</sup>–T<sup>105</sup>, находящегося в составе рентгеноструктурной модели MLA или в составе комплекса F1\_2–mab\_TA7, а также для построения рис. 3, приведенного в данной работе.

Авторы выражают благодарность проф. А.С. Арсеньеву (ИБХ РАН, Москва) за полезные замечания, сделанные при подготовке работы к публикации.

Настоящая работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 01-04-49025 и 00-04-55024) и Министерства науки и технологий РФ (проект № 96-03-08).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barbieri L., Battelli M.G., Stirpe F. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. V. 1154. P. 237–282.
2. Agapov I.I., Tonevitsky A.G., Moysenovich M.M., Maluchenko N.V., Weyhenmeyer R., Kirpichnikov M.P. // FEBS Lett. 1999. V. 452. P. 211–214.
3. Agapov I.I., Tonevitsky A.G., Maluchenko N.V., Moysenovich M.M., Balah I.S., Weyhenmeyer R., Kirpichnikov M.P. // FEBS Lett. 1999. V. 464. P. 63–66.
4. Ni F. // Progress in NMR Spectroscopy/Eds J.W. Emsley, J. Feeney, L.H. Sutcliffe. Oxford; New York; Toronto; Sydney; Frankfurt: Pergamon Press, 1994. V. 26. P. 517–606.
5. Roberts G.C.K. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1999. V. 10. P. 42–47.
6. Пашков В.С., Мареева Т.Ю., Балашова Т.А., Вычалковский А.А., Самохвалова Л.В., Байдакова Л.К., Родионов И.Л., Несмеянов В.А. // Биоорг. химия. 2002. Т. 28. С. 109–117.
7. Pashkov V.S., Balashova T.A., Zhemaeva L.V., Sikilinda N.N., Kutuzov M.A., Abdulaev N.G., Arseniev A.S. // FEBS Lett. 1996. V. 381. P. 119–122.
8. Sweeney E.C., Tonevitsky A.G., Palmer R.A., Niwa H., Pfueller U., Eck J., Lentzen H., Agapov I.I., Kirpichnikov M.P. // FEBS Lett. 1998. V. 431. P. 367–370.
9. Балашова Т.А., Пашков В.С., Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Мареева Т.Ю., Петрова Е.Э., Несмеянов В.А., Иванов В.Т. // Биоорг. химия. 1991. Т. 17. С. 1470–1486.
10. Gunter P., Mumenthaler C., Wuthrich K. // J. Mol. Biol. 1997. V. 273. P. 283–289.
11. Piotto M., Saudek V., Sklenar V. // J. Biomol. NMR. 1992. V. 2. P. 661–665.
12. Clore G.M., Gronenborn A.M. // Prog. NMR Spectroscopy. 1991. V. 23. P. 43–92.
13. Bundi A., Wuthrich K. // Biopolymers. 1979. V. 18. P. 285–297.
14. Bartels C., Xia T.-H., Billeter M., Guntert P., Wuthrich K. // J. Biomol. NMR. 1995. V. 6. P. 1–10.
15. Koradi R., Billeter M., Wuthrich K. // J. Mol. Graphics. 1996. V. 14. P. 51–55.

## An Epitope of the Viscumin Catalytic Subunit Exposed on Its Interaction with Lipid Bilayer

V. S. Pashkov<sup>\*,#</sup>, I. I. Agapov<sup>\*\*,\*</sup>, T. A. Balashova<sup>\*</sup>, N. S. Egorova<sup>\*</sup>,  
A. Yu. Surovoy<sup>\*</sup>, I. B. Pevzner<sup>\*\*,\*</sup>, and A. G. Tonevitsky<sup>\*\*,\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (095) 335-2733; fax: +7 (095) 335-71-03; e-mail: pav@nmr.ru

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

<sup>\*\*</sup>Federal State Unitary Enterprise GosNIIgenetika, Pervyi Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 113545 Russia

It was previously shown that the catalytic subunit of the plant toxin viscumin induces aggregation of small unilamellar liposomes and this process is inhibited by the mab\_TA7 monoclonal antibody produced to the denatured catalytic subunit of viscumin (Agapov, I.I. *et al.*, *FEBS Lett.*, 1999, vol. 464, pp. 63–66). The interaction of the synthetic F<sup>101</sup>–T<sup>105</sup> and A<sup>96</sup>–T<sup>105</sup> fragments of the viscumin catalytic subunit with the mab\_TA7 monoclonal antibody was studied by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. The results of this study demonstrated that only the A<sup>96</sup>–T<sup>105</sup> fragment is capable of binding to mab\_TA7. A nuclear Overhauser effect observed in the antigen–antibody complex and registered on the resonances of the free peptide and exchanging between the free state and the antibody-bound state was analyzed; the mab\_TA7 antigen determinant (H<sup>99</sup>–T<sup>105</sup>) was identified; and its conformation and orientation within the complex with the antibody were determined. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* epitope analysis, monoclonal antibody, NMR, viscumin