

ЧАСТЬ II

РАСПОЗНАВАНИЕ АНТИГЕНА

- 4 Распознавание антигена В-клеточными и Т-клеточными рецепторами
- 5 Формирование рецепторов лимфоцитов для антигенов
- 6 Презентирование антигена Т-лимфоцитам

Распознавание антигена В-клеточными и Т-клеточными рецепторами

4

Врожденный иммунный ответ является первой линией защиты организма от инфекции, но он действует только при борьбе с патогенами, несущими на своей поверхности определенные молекулярные структуры или индуцирующими интерфероны и другие неспецифические защитные механизмы. Для того чтобы эффективно бороться с возбудителями широкого спектра, с которыми может встретиться организм, эволюция лимфоцитов адаптивного иммунитета была направлена на обеспечение распознавания большого количества антигенов бактерий, вирусов и других патогенных микроорганизмов. Антигеном является любая молекула или ее часть, распознаваемая высокоспецифичными белками лимфоцитов. Такими белками у В-лимфоцитов являются продуцируемые этими клетками **иммуноглобулины** (immunoglobulin, **Ig**), с широким диапазоном специфичностей к антигенам. Каждый В-лимфоцит продуцирует иммуноглобулины одной специфичности (см. подраздел 1.12). Мембраносвязанная форма иммуноглобулинов на поверхности В-лимфоцитов является рецептором для антигенов, который называют **В-клеточным рецептором** (B-cell receptor, **BCR**). Секретируемая форма иммуноглобулинов той же антигенной специфичности представляет собой **антитело**, продуцируемое В-лимфоцитами в терминальной стадии дифференцировки — плазмобластами и плазматическими клетками. Секреция антител, связывающихся с патогенами и их токсичными продуктами в межклеточном пространстве (см. рис. 1.23), является главной эффекторной функцией В-лимфоцитов в адаптивном иммунитете.

В ЭТОЙ ГЛАВЕ

Структура типичной молекулы антитела

Взаимодействие молекулы антитела со специфичным антигеном

Распознавание антигена Т-лимфоцитами

Антитела являются первыми детально изученными белками, участвующими в специфичном распознавании иммунной системой. Молекула антитела выполняет две самостоятельные функции: (1) специфически связывается с патогеном или продуктами его жизнедеятельности, что вызывает иммунный ответ; (2) вовлекает другие клетки и молекулы в процесс уничтожения патогена, с которым связалась. Например, связывание антителами может нейтрализовать вирусы и пометить патогены для последующего их разрушения фагоцитами и компонентами системы комплемента (см. главы 2, 3).

Функцию распознавания и эффекторную функцию выполняют 2 структурно разделенные части молекулы антитела: одна часть специфически связывает антиген, а другая часть включает механизмы элиминации антигена. Антигенсвязывающий центр у разных молекул антител сильно различается и известен как **вариабельная область (V-область)**. Вариабельность молекул антител позволяет каждой из них связываться со своим специфичным антигеном. Общий репертуар антител любого организма достаточно велик, что гарантирует распознавание практически любой антигенной структуры. Часть молекулы антитела, которая участвует в реализации его эффекторной функции, не вариабельна, ее называют **константной областью (С-областью)**.

Эта область представлена пятью разными формами, называемыми **изотипами**, каждый из которых специализирован для активации разных эффекторных механизмов. Мембраносвязанный **В-клеточный рецептор** не имеет подобных эффекторных механизмов, поскольку С-область встроена в мембрану В-лимфоцита. Функция В-клеточного рецептора заключается в распознавании и связывании антигена посредством V-области, расположенной на поверхности клетки, таким образом иницируя передачу сигнала, активирующего В-лимфоцит, что приводит к клональной активации и продукции антител. Для обеспечения этой функции В-клеточный рецептор связан с определенными внутриклеточными сигнальными белками (см. главу 7). Антитела стали важной группой лекарственных средств благодаря их высокоспецифичной активности, мы вернемся к обсуждению их терапевтического применения в главе 16.

Антигенраспознающие молекулы Т-лимфоцитов представляют собой мембраносвязанные белки, которые ассоциированы с внутриклеточным сигнальным комплексом и функционируют только для передачи активационного сигнала Т-лимфоцитам. Эти мембраносвязанные белки называют **Т-клеточными рецепторами** (T-cell receptors, **TCR**). Они родственны иммуноглобулинам как по белковой структуре (имеют V- и С-области), так и по генетическому механизму, обеспечивающему их высокую вариабельность (см. главу 5). Т-клеточный рецептор существенно отличается от В-клеточного рецептора: не распознает и не связывает непосредственно нативный антиген, а распознает короткие пептидные фрагменты белковых антигенов, которые презентуются Т-клеточному рецептору в составе поверхностных трансмембранных гликопротеинов, известных как **главный комплекс гистосовместимости** (major histocompatibility complex, **МНС**).

Наиболее яркой структурной особенностью МНС является углубление на поверхности внеклеточной части молекулы, с которым могут связываться пептиды. МНС **высокополиморфны**: каждый тип МНС внутри популяции имеет множество вариантов.

МНС кодируются несколькими разными версиями генов, называемыми **аллелями**. По этой причине большинство людей являются гетерозиготными по МНС, т.е. клетки человека экспрессируют два разных аллеля для каждого типа МНС, тем самым увеличивая разнообразие пептидов патогенного происхождения и аутоантигенов организма. Т-клеточный рецептор распознает участки как пептидного антигена, так и МНС, с которым связан. Такое свойство Т-клеточного рецептора обеспечивает дополнительную возможность для распознавания антигена Т-лимфоцитами, известную как **МНС-рестрикция**, поскольку любой Т-клеточный рецептор специфичен для конкретного пептида, связанного с конкретным МНС собственного организма.

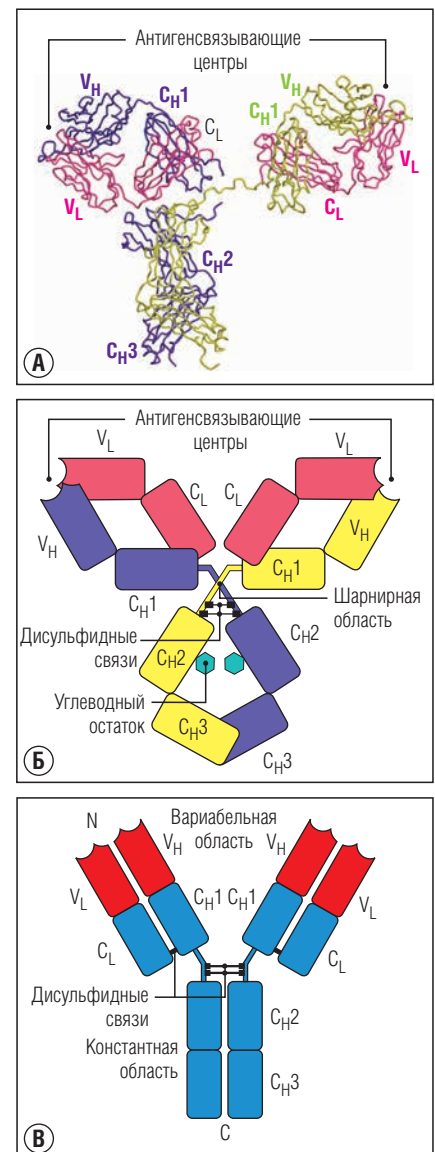
В этой главе мы сфокусируемся на структуре и антигенсвязывающих свойствах иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов. Хотя В-лимфоциты и Т-лимфоциты распознают чужеродные молекулы по-разному, рецепторы, которые они используют для этой цели, очень схожи по своей структуре. Мы увидим, как эта структура может вмещать в себя огромное разнообразие антигенных специфичностей и как она позволяет иммуноглобулинам и Т-клеточным рецепторам выполнять свои функции в качестве антигенраспознающих молекул при адаптивном иммунном ответе. Мы вернемся к обсуждению влияния полиморфизма МНС на распознавание антигена Т-лимфоцитами и дифференцировку Т-лимфоцитов в **главах 6, 8** соответственно.

Структура типичной молекулы антитела

Антитела представляют собой секретируемую форму В-клеточного рецептора. Поскольку антитела растворимы и секретируются в кровь в больших количествах, их легко получать и легко изучать. По этой причине большая часть информации о В-клеточном рецепторе была получена при изучении антител.

Форма молекулы антител напоминает букву **Y** (**рис. 4.1**). В этом разделе главы объясняется, как формируется эта структура и каким образом она позволяет молекулам антител выполнять двойные функции, связываясь как с разнообразными антигенами, так и эффекторными молекулами и клетками, разрушающими антиген. Каждую из этих функций выполняют разные части молекулы. Концы двух «плеч» Y-подобной структуры — V-области —

Рис. 4.1 Структура молекулы антитела. (А) Ленточная диаграмма каркаса полипептидных цепей IgG (рентгеноструктурный анализ). Две тяжелые цепи обозначены желто-зеленым и фиолетовым цветами, две легкие цепи — красным цветом. Три глобулярных участка формой напоминают букву Y. Два антигенсвязывающих центра являются концами «плеч», связанных со «стволом» Y-подобной структуры с помощью гибкого шарнира. Показаны переменный домен легкой цепи (V_L), константный домен легкой цепи (C_L) и переменный домен тяжелой цепи (V_H). V_H и V_L вместе образуют антигенсвязывающий центр. (Б) Та же структура с обозначением каждого домена в виде отдельного прямоугольника. Шарнир, который связывает первый константный домен (C_H1) каждой тяжелой цепи со вторым константным доменом тяжелой цепи (C_H2), изображен в виде фиолетовой и желтой линий соответственно. Антигенсвязывающие центры показаны вогнутыми областями на V_L и V_H . (В) Упрощенное изображение: переменные области обозначены красным цветом, константные области — синим. С — карбоксиконец; C_H3 — третий константный домен тяжелой цепи; N — аминоконец (предоставлено R.L. Stanfield и I.A. Wilson).



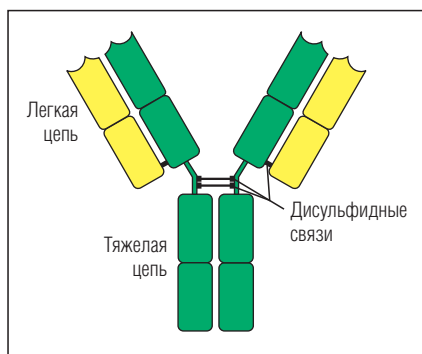


Рис. 4.2 Молекула иммуноглобулина. Каждая молекула иммуноглобулина состоит из двух тяжелых цепей (зеленый цвет) с шарнирной областью и двух легких цепей (желтый цвет), соединенных дисульфидными связями следующим образом: каждая тяжелая цепь соединена с легкой цепью и две тяжелых цепи соединены между собой.

различаются по своему строению между различными молекулами антител и участвуют в связывании с антигеном. Различия, присущие V-области, объясняют специфичность связывания антигена. «Ствол» Y-подобной структуры — С-область — имеет низкую вариабельность и взаимодействует с эффекторными молекулами и клетками, разрушающими антиген.

Все антитела имеют сходное строение — соединенные попарно тяжелые и легкие полипептидные цепи. Все белки такого типа называют **иммуноглобулинами**. Существует 5 **классов**, или **изотипов**, иммуноглобулинов, различающихся тем, что содержат С-области с разной структурой и свойствами: **иммуноглобулин М (IgM)**, **иммуноглобулин D (IgD)**, **иммуноглобулин G (IgG)**, **иммуноглобулин A (IgA)** и **иммуноглобулин E (IgE)**.

В качестве примера для описания общих структурных особенностей иммуноглобулинов возьмем молекулу IgG.

4.1 IgG состоит из четырех полипептидных цепей

IgG — крупные молекулы (молекулярная масса ≈ 150 кДа), которые имеют различные полипептидные цепи. Одну цепь (молекулярная масса ≈ 50 кДа) называют **тяжелой цепью** (heavy chain), или **Н-цепью**, другую (молекулярная масса ≈ 25 кДа) — **легкой цепью** (light chain), или **Л-цепью** (рис. 4.2). Каждая молекула IgG состоит из двух тяжелых и двух легких цепей. Две тяжелые цепи связаны между собой дисульфидными связями, а каждая тяжелая цепь связана с легкой цепью одной дисульфидной связью. В любой молекуле иммуноглобулина две тяжелые и две легкие цепи идентичны между собой и образуют в молекуле антитела два одинаковых антигенсвязывающих центра. Это позволяет антителу одновременно связывать на своей поверхности два одинаковых антигена, таким образом увеличивая общую силу связывания с антигеном, что называют **авидностью**. Силу связывания между антигенсвязывающей поверхностью и антигеном называют **аффинностью**.

В антителах выявляют два типа легких цепей — **лямбда-цепь** (λ -цепь) и **каппа-цепь** (κ -цепь). Конкретный иммуноглобулин содержит либо κ -цепи, либо λ -цепи, и никогда по одной каждого вида¹. Функциональных различий между антителами с легкими κ -цепями или λ -цепями обнаружено не было, в антителах любого из 5 классов может быть любой тип легкой цепи. Соотношение количества иммуноглобулинов, содержащих разные типы легких цепей, варьирует от вида к виду. У мыши соотношение κ -цепей и λ -цепей равно 20 : 1, у человека — 2 : 1, а у крупного рогатого скота — 1 : 20. Причина такой вариабельности неизвестна. Смещение этого соотношения иногда можно использовать для обнаружения аномальной пролиферации клона В-лимфоцитов, поскольку все потомки конкретного В-лимфоцита будут экспрессировать идентичную легкую цепь. Например, аномально высокий уровень легких λ -цепей у человека может указывать на наличие В-клеточной опухоли.

Класс и, следовательно, эффекторная функция антитела определяются структурой его тяжелой цепи. Существует 5 основных **классов**, или **изотипов, тяжелых цепей**. Некоторые классы имеют подклассы, которые определяют функциональную активность мо-

¹ Одновременно κ -цепи и λ -цепи. — Прим. науч. ред. пер.

лекулы антитела. Тяжелые цепи IgM, IgD, IgG, IgA и IgE обозначают строчными греческими буквами μ , δ , γ , α и ϵ соответственно. Например, константную область IgM с тяжелой μ -цепью обозначают как C_{μ} .

IgG является наиболее распространенным иммуноглобулином в сыворотке крови у человека и имеет несколько подклассов: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Различия функциональных особенностей разных классов и подклассов антител обусловлены карбоксиконцом тяжелой цепи, не связанным с легкой цепью. Общие структурные особенности всех изотипов иммуноглобулинов сходны, особенно в отношении связывания антигена. Мы вернемся к обсуждению структурных и функциональных свойств изотипов в [главе 5](#).

Структура В-клеточного рецептора идентична структуре соответствующего ему антитела, за исключением небольшой части на карбоксиконце С-области тяжелой цепи. В В-клеточном рецепторе карбоксиконец представлен гидрофобной аминокислотной последовательностью, которая закрепляет молекулу в мембране, а в антителе — гидрофильной последовательностью, которая обеспечивает секрецию антитела.

4.2 Тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов состоят из константных и переменных областей

В настоящее время определены аминокислотные последовательности многих тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов и выявлены две важные особенности молекул антител. Во-первых, цепь состоит из серии сходных, но не идентичных последовательностей, каждая из которых содержит 110 аминокислот и соответствует дискретной, компактно свернутой области белка, называемой **иммуноглобулиновым доменом**, или **Ig-доменом**. Легкая цепь состоит из двух Ig-доменов, тогда как тяжелая цепь — из четырех Ig-доменов (см. [рис. 4.1В](#)). Это говорит о том, что цепи молекулы иммуноглобулина эволюционировали путем повторной дубликации наследуемых генных сегментов, соответствующих отдельному Ig-домену.

Вторая важная особенность заключается в том, что аминоконцы аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей существенно различаются у разных антител. Такая переменность цепей иммуноглобулинов одного изотипа ограничена 110 аминокислотами первой аминокислотной последовательности, которые соответствуют первому Ig-домену, тогда как остальные Ig-домены константны. Аминоконцы **переменных Ig-доменов** (variable Ig domains), или **V-доменов**, тяжелой и легкой цепи (V_H -домен и V_L -домен соответственно) вместе составляют V-область антитела и определяют его антигенсвязывающую специфичность, тогда как **константные Ig-домены** (constant Ig domains), или **C-домены**, тяжелых и легких цепей (C_H -домен и C_L -домен соответственно) составляют С-область (см. [рис. 4.1](#)). С-домены тяжелой цепи нумеруются последовательно от аминоконца к карбоксиконцу, например C_{H1} , C_{H2} и т.д.

4.3 Домены молекулы иммуноглобулина имеют сходную структуру

Тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов состоят из Ig-доменов, имеющих сходную структуру. Каждый V-домен и C-домен имеет

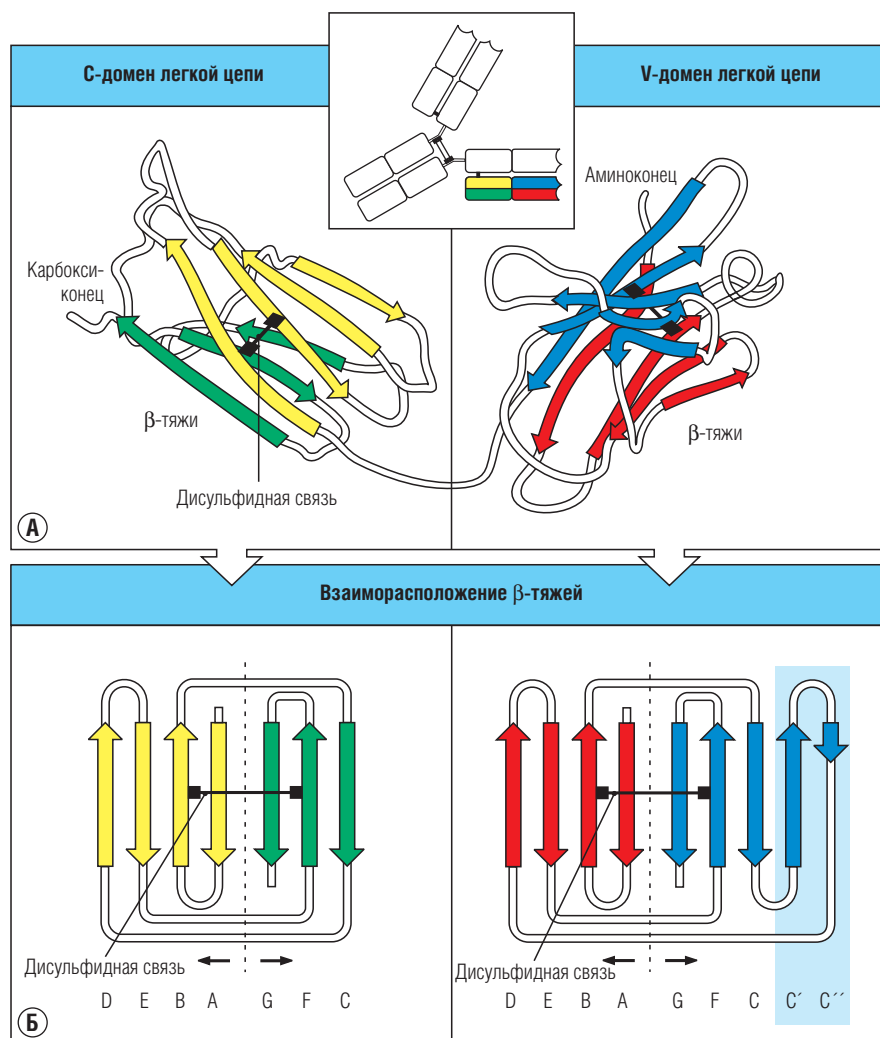
2 β -слоя (β sheet), или β -листа. β -слой состоит из нескольких β -тяжей (β strand), также называемых β -цепями (рис. 4.3), и является участком, в котором несколько последовательных полипептидов соединены пептидными связями и расположены в плоской конформации, образуя полипептидный каркас. β -тяжи иногда изображают в виде «лент» со стрелкой, указывающей направление полипептидного каркаса (см. рис. 4.3). β -тяжи могут «упаковываться» параллельно друг другу, стабилизируясь в поперечном направлении двумя или тремя водородными связями между соседними тяжами.

Ig-домен состоит из двух β -слоев, которые укладываются друг на друга и формируют структуру, называемую β -сэндвичем, в которой остатки цистеина β -слоя ковалентно связаны между собой дисульфидными мостиками.

Такую структуру молекулы иммуноглобулина называют **складчатой структурой иммуноглобулина**, или **иммуноглобулиновой укладкой цепи**.

Сходства и различия между V-доменом и C-доменом см. рис. 4.3. Здесь Ig-домены раскрыты, чтобы было видно, как их полипептидные β -тяжи сворачиваются, создавая β -слой, и как каждый полипептидный тяж формирует гибкие петли между β -тяжа-

Рис. 4.3 Структура константного и переменного доменов легкой цепи иммуноглобулина. (А) Схематично изображены свернутые участки константного домена (С-домен) и переменного домена (V-домен) легкой цепи иммуноглобулина. Каждый домен представляет собой бочкообразную структуру, в которой β -тяжи (желтого и зеленого цветов у С-домена, красного и синего цветов у V-домена) идут в противоположных направлениях, складываясь вместе и формируя два β -слоя, соединенных друг с другом дисульфидной связью. Способ сворачивания полипептидной цепи дает представление о конечной структуре. (Б) β -тяжи обозначены соответственно порядку в аминокислотной последовательности. Порядок в каждом β -слое является характеристикой Ig-домена. β -тяжи C' и C'' расположены в V-домене. Для структурных блоков доменов суперсемейства иммуноглобулинов характерно следующее расположение тяжей: 4 тяжа + 3 тяжа (С-домен) или 4 тяжа + 5 тяжей (V-домен). Такое расположение тяжей типично для некоторых других белков, а также антител и Т-клеточных рецепторов.



ми, когда поворачивается, чтобы изменить направление. Основное различие между V-доменом и C-доменом состоит в том, что V-домен крупнее и содержит дополнительные β -тяжи — C' и C". В V-домene гибкие петли между некоторыми β -тяжами способствуют созданию антигенсвязывающего центра молекулы иммуноглобулина.

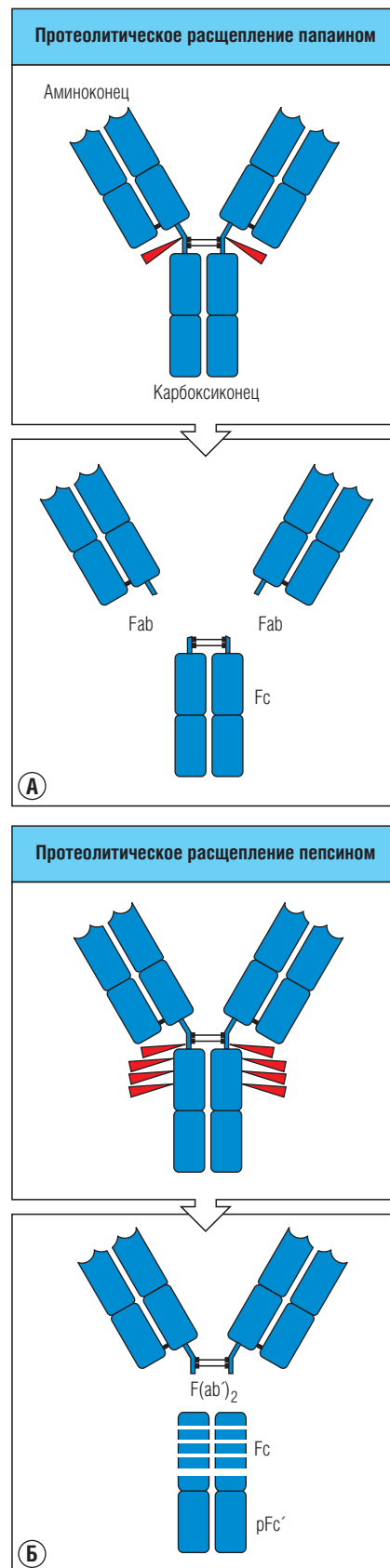
Многие из аминокислот, являющиеся общими для V-домена и C-домена, присутствуют в ядре складчатой структуры иммуноглобулина и имеют важное значение для его стабильности. Было установлено, что другие белки, имеющие последовательности, сходные с таковыми иммуноглобулина, содержат домены со сходной структурой, называемые **иммуноглобулиноподобными доменами** (immunoglobulin-like domains), или **Ig-подобными доменами**. Эти домены присутствуют во многих белках иммунной системы, например в KIR, экспрессируемых НК-клетками (см. главу 3). Ig-подобные домены также часто участвуют в распознавании и адгезии клеток. Вместе с иммуноглобулинами и T-клеточными рецепторами эти белки составляют большое **суперсемейство иммуноглобулинов**.

4.4 Молекулу антитела можно легко расщепить на функционально различные фрагменты

Полностью сформированная молекула антитела состоит из трех равных глобулярных частей с двумя «плечами», присоединенных к «стволу» гибким участком полипептидной цепи, называемым **шарнирной областью** (см. рис. 4.1Б). Каждое «плечо» этой Y-подобной структуры образовано легкой цепью, связанной с аминоконцом тяжелой цепи. V_H-домен сопряжен с V_L-доменом, а C_{H1}-домен — с C_L-доменом. Два антигенсвязывающих центра образованы парными V_H-доменами и V_L-доменами на концах двух «плеч» Y-подобной структуры (см. рис. 4.1Б). «Ствол» Y-подобной структуры образован спаренными карбоксиконцами двух тяжелых цепей. C_{H3}-домены соединяются друг с другом, а C_{H2}-домены — нет. Боковые углеводные цепочки, присоединенные к C_{H2}-доменам, располагаются между двумя тяжелыми цепями.

Протеолитические ферменты (протеазы) были важным инструментом на ранних этапах исследований структуры антител, поэтому следует рассмотреть терминологию, которая сформировалась в результате применения протеаз. Ограниченная по времени обработка ферментом **папаином** расщепляет молекулы антител на три фрагмента (рис. 4.4). Папаин разрезает молекулу антитела по аминоконцевой части дисульфидных связей, соединяющих две тяжелые цепи, и высвобождает два «плеча» в виде двух идентичных фрагментов, обладающих антигенсвязывающей активностью и называемых **антигенсвязывающими фрагментами** (fragment antigen binding, **Fab**). «Ствол» Y-подобной структуры не имеет антиген-

Рис. 4.4 Молекула иммуноглобулина может быть расщеплена путем частичного переваривания протеазами. (А) Папаин расщепляет молекулу иммуноглобулина на три части: два Fab и один Fc. Fab содержит V-области и связывает антиген. Fc подвержен кристаллизации и содержит C-области. (Б) Пепсин расщепляет иммуноглобулин с образованием одного F(ab')₂ и множества малых частей Fc, самый большой из которых называют pFc'. F(ab')₂ содержит больше аминокислот, чем Fab, включая цистеин, который формирует дисульфидные связи.



связывающей активности, его называют **кристаллизуемым фрагментом** (fragment crystallizable, **Fc**), поскольку он легко кристаллизуется. Fc соответствует сопряженным C_H2-домену и C_H3-домену, с антигеном не взаимодействует, а взаимодействует с эффекторными молекулами и клетками. Fc у разных изотипов иммуноглобулинов различный.

Другая протеаза, **пепсин**, расщепляет молекулу антитела по карбоксиконцевой части дисульфидных связей (см. **рис. 4.4**). Так образуется **F(ab')₂**, с которым остаются связанными два «плеча» молекулы антитела. Оставшуюся часть тяжелой цепи пепсин расщепляет на несколько мелких фрагментов. F(ab')₂ обладает такими же антигенсвязывающими характеристиками, как и оригинальное антитело, но не может взаимодействовать с какими-либо эффекторными молекулами, например C1q или Fc-рецептором. Пепсин можно использовать в экспериментах, когда нужно отделить антигенсвязывающие функции антител от других эффекторных функций.

Методами генной инженерии можно сконструировать множество молекул, родственных молекуле антител, используемых в терапевтических целях для лечения различных заболеваний. Мы вернемся к этой теме в **главе 16**, где обсудим различные возможности терапевтического применения антител, разработанных за последние 20 лет.

4.5 Шарнирная область молекулы иммуноглобулина обеспечивает гибкость при связывании с несколькими антигенами

Шарнирная область молекулы IgG допускает некоторую степень независимого движения (гибкость) двух ее «плеч». Например, в молекуле антитела (см. **рис. 4.1А**) не только два шарнира изогнуты по-разному, но и угол между V-доменом и C-доменом в каждом из двух «плеч» неодинаков. Соединение между V-доменом и C-доменом называют **«молекулярным шаровидным соединением»** (ball-and-socket joint). Эту гибкость можно выявить, изучая антитела, которые связываются с малыми антигенами, известными как **гаптены**. К ним относят молекулы различных типов, которые обычно сравнимы по размеру боковой группы тирозина. Хотя гаптены специфически распознаются антителом, они могут стимулировать образование антигаптенных антител, только связавшись с белком (см. **приложение I**, раздел A1). Две идентичные молекулы гаптена, соединенные между собой короткой гибкой областью, могут связывать две или более молекулы антигаптенных антител, образуя димеры, тримеры, тетрамеры и т.д., что можно наблюдать с помощью электронного микроскопа (**рис. 4.5**). Структуры, образованные этими комплексами, доказывают наличие гибкости в шарнирной области. Некоторая гибкость также выявляется в месте соединения V-домена и C-домена, что позволяет V-домену изгибаться и вращаться относительно C-домена. Гибкость как в шарнирном соединении, так и в соединении V-домена с C-доменом позволяет двум «плечам» молекулы антитела связываться с участками, расположенными на некотором расстоянии друг от друга, например повторяющимися участками на полисахаридах клеточных стенок бактерий. Гибкость в шарнирной области позволяет антителам также взаимодействовать с антигенсвязывающими белками, которые участвуют в иммунных эффекторных механизмах.

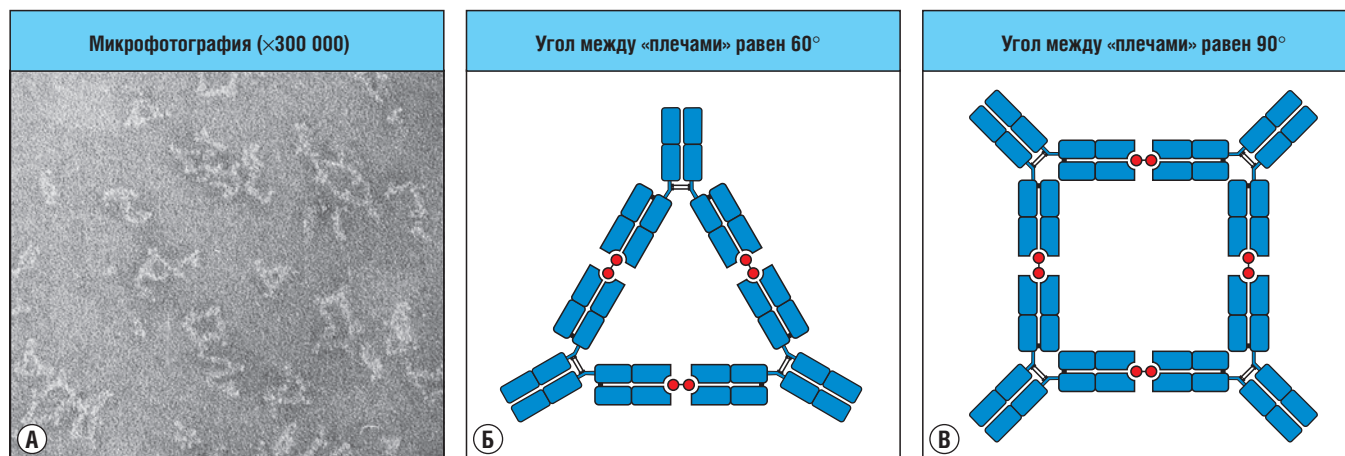


Рис. 4.5 «Плечи» антитела соединены гибким шарниром. Антигены, содержащие две молекулы гаптена (красные кружки), перекрестно связанные с двумя антигенсвязывающими центрами, формируют комплексы «антиген–антитело». На электронной микрофотографии (А) видны линейные, треугольные и квадратные структуры с короткими шипиками (F_c антитела). Ограниченное переваривание пепсином удаляет эти шипики (не показано), а F(ab')₂ остаются связанными с антигеном. Угол между «плечами» молекул антител различается. В треугольных структурах он равен 60° (Б), в квадратных структурах — 90° (В). Это доказывает гибкость соединения между «плечами» (предоставлено N.M. Green).

Заключение

Молекула антитела состоит из четырех полипептидных цепей: двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей. Эти цепи образуют Y-подобную структуру. Каждая из четырех цепей имеет на своем аминоконце V-область, участвующую в связывании антигена, и C-область, которая взаимодействует с эффекторными молекулами и клетками. Легкие цепи связаны с тяжелыми цепями множеством нековалентных связей и дисульфидными связями. V-домены тяжелых и легких цепей сопряжены между собой в каждом «плече» Y-подобной структуры и образуют на концах этих «плеч» два идентичных антигенсвязывающих центра. Их наличие позволяет молекулам антител перекрестно связывать антигены и взаимодействовать с ними более стабильно и с более высокой авидностью. «Ствол» Y-подобной структуры иммуноглобулина, называемый F_c, образован доменами на карбоксиконце тяжелых цепей. Именно эти домены определяют изотип антитела. Место присоединения «плеч» Y-подобной структуры к ее «стволу» называют шарнирной областью. F_c и шарнирная область у антител разных изотипов отличаются. Различные изотипы имеют разные свойства и различаются по взаимодействию с эффекторными молекулами и типами клеток. Тем не менее общая структура доменов одинакова у всех изотипов.

Взаимодействие молекулы антитела со специфичным антигеном

В этом разделе мы рассмотрим антигенсвязывающие центры молекулы иммуноглобулина, обсудим различные способы, с помо-

щью которых антигены могут связываться с антителом, и как изменение в аминокислотных последовательностях V-доменов антитела определяет специфичность к антигену.

4.6 Локализованные гипервариабельные участки образуют антигенсвязывающие центры

V-области у разных молекул антител отличаются. Однако вариабельные участки аминокислотной последовательности не распределяются равномерно по всей V-области, а концентрируются в определенных сегментах, что видно на **графике вариабельности (рис. 4.6)**, на котором сравниваются аминокислотные последовательности различных V-областей антитела. В V_H -доменах и в V_L -доменах могут быть идентифицированы три сегмента с выраженной вариабельностью, которые называют **гипервариабельными участками (hypervariable regions, HV)** — **HV1, HV2, HV3**. В тяжелых цепях они располагаются на остатках аминокислот 30–36, 49–65 и 95–103 соответственно, тогда как в легких цепях расположены на остатках аминокислот 28–35, 49–59 и 92–103 соответственно. Часть домена с самой высокой вариабельностью локализуется в HV3. Участки между гипервариабельными участками, которые включают оставшуюся часть V-домена, обладают наименьшей вариабельностью. Эти участки называют **каркасными участками (framework regions, FR)**. В каждом V-домене есть 4 таких участка — **FR1, FR2, FR3 и FR4**.

Каркасные участки формируют β -слои, которые обеспечивают структурную основу Ig-домена. Гипервариабельные участки соответствуют трем петлям и расположены в свернутом домене вблизи друг от друга на внешнем крае β -сэндвича (**рис. 4.7**).

Области наибольшей вариабельности не только сосредоточены на определенных участках аминокислотной последовательности V-доменов, но также локализованы в определенной области на поверхности молекулы. Когда V_H -домен и V_L -домен иммуноглобулина соединяются в молекуле антитела, по три петли с гипервариабельными участками из каждого домена объединяются. В резуль-

Рис. 4.6 В V-домене существуют локализованные гипервариабельные участки. Эти участки вносят вклад в связывание антигена молекулой антитела. График вариабельности представляет собой результат сравнения аминокислотных последовательностей нескольких десятков V-доменов тяжелых и легких цепей. Степень вариабельности — это отношение количества различных аминокислот во всех последовательностях к частоте большинства типичных аминокислот. Три гипервариабельных участка (HV1, HV2, HV3) ограничены менее вариабельными каркасными участками (FR1, FR2, FR3, FR4).

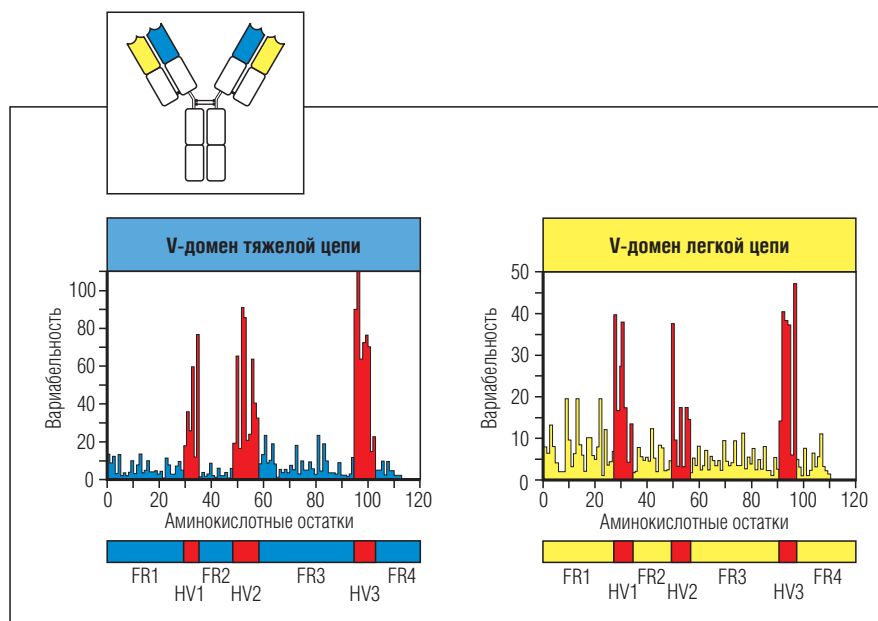


Рис. 4.7 Гипервариабельные участки лежат в отдельных петлях β-слоя. (А) Гипервариабельные участки (HV1, HV2, HV3) нанесены на структурную карту кодирующего участка V-домена. (Б) Гипервариабельные участки представлены в составе петель (красный цвет), соединяющих конкретные β-тяжи. (В) В структуре V-домена эти петли (красный цвет) вместе формируют антигенсвязывающий центр. (Г) В молекуле антитела тяжелая и легкая цепи приводят к сближению петель с гипервариабельным участком каждой цепи, и на каждом «плече» молекулы образуется единая гипервариабельная поверхность — антигенсвязывающий центр. Гипервариабельные участки обычно называют регионами, определяющими комплементарность (CDR). С — карбоксиконец; FR1, FR2, FR3, FR4 — каркасные участки; N — аминоконец.

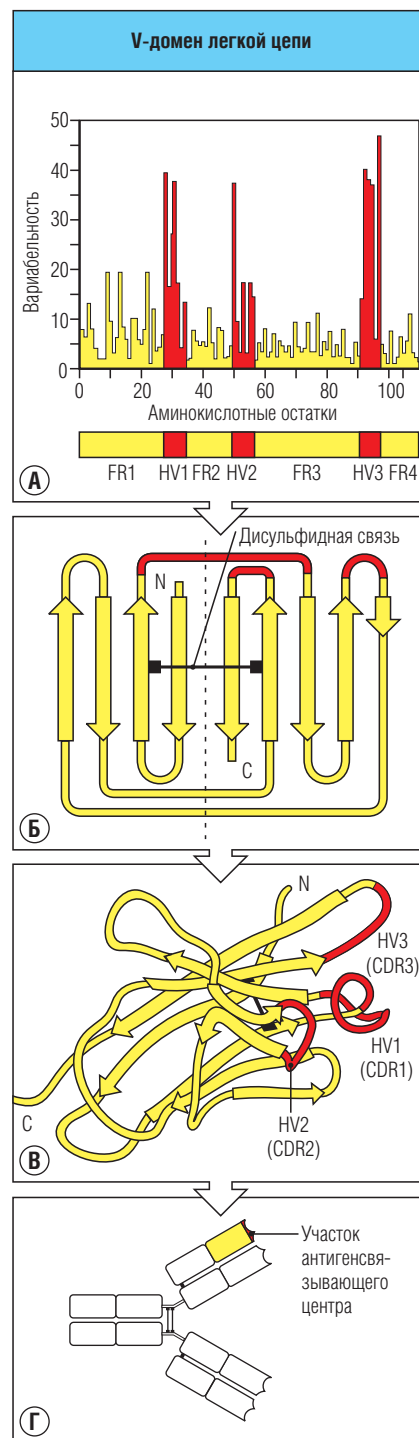
тате на конце каждого «плеча» молекулы формируется единый гипервариабельный участок, который называют **антигенсвязывающим центром**, или **связывающим участком антитела**. Он определяет специфичность антитела к антигену.

Петли с гипервариабельными участками чаще называют **регионами, определяющими комплементарность** (complementarity-determining regions, **CDR**), поскольку сформированная ими поверхность комплементарна поверхности антигена, с которым связывается. У каждой тяжелой и легкой цепей есть три CDR — CDR1, CDR2 и CDR3. В большинстве случаев CDR V_H-домена и V_L-домена входят в состав антигенсвязывающего центра, таким образом, конечная антигенная специфичность зависит от комбинации тяжелой и легкой цепей (см. рис. 4.6). С помощью рентгеноструктурного анализа установлено, что существуют Fab, у которых антиген взаимодействует только с тяжелой цепью. В качестве примера можно привести взаимодействие Fab с вирусом гриппа, происходящее за счет связывания в основном CDR3 V_H-домена и в минимальной степени — за счет контакта с другими CDR.

Таким образом, один из способов продукции иммунной системой антител различной специфичности, заключающийся в создании различных комбинаций V-доменов тяжелой цепи и легкой цепи, называют **комбинаторным разнообразием**. В главе 5 подробнее рассмотрим комбинаторное разнообразие, когда будем изучать, как гены, кодирующие V-домены тяжелой и легкой цепей, собираются из более мелких сегментов ДНК во время дифференцировки В-лимфоцитов в костном мозге.

4.7 Антитела связывают антигены посредством контактов в CDR, комплементарных антигену по размеру и форме

На ранних этапах исследований связывания антигена с антителами единственными доступными источниками большого количества однотипных молекул антител были опухоли из антитело-секретирующих клеток. Антигенная специфичность этих антител была неизвестна, и, чтобы ее определить, нужно было провести скрининг множества соединений. Как правило, веществами, связывавшимися с этими антителами, были гаптены (см. подраздел 4.5), например фосфохолин или витамин К₁. Структурный анализ комплексов антител с их гаптеновыми лигандами позволил получить первое прямое доказательство того, что гипервариабельные участки образуют антигенсвязывающий центр, и продемонстрировал структурную основу специфичности гаптена. Впоследствии, в



связи с открытием методов получения моноклональных антител (см. приложение I, раздел А7), стало возможным создание большого количества чистых антител, специфичных к конкретному антигену. Это позволило получить более общую картину того, как антитела взаимодействуют с антигенами, подтверждая и расширяя представление о этих взаимодействиях, полученных в результате изучения гаптенов.

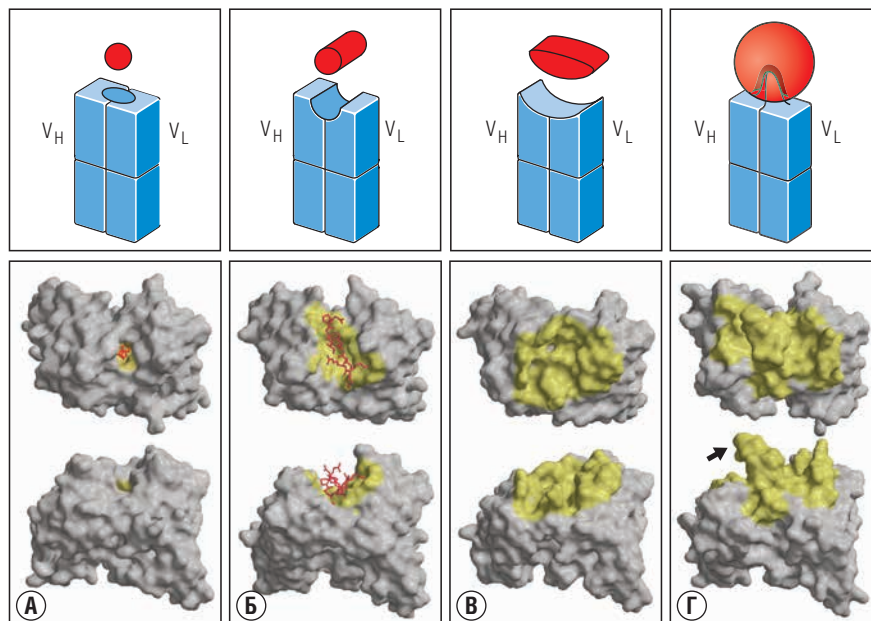
Поверхность молекулы антитела, образованная путем совмещения CDR тяжелых и легких цепей, является участком, с которым связывается антиген. Аминокислотные последовательности CDR в разных антителах различны, также различны формы и свойства поверхностей, образуемых этими CDR. Небольшой антиген, например гаптен или короткий пептид, обычно связывается в кармане, или выемке (щели), образуемой между V-доменами тяжелой и легкой цепей (рис. 4.8А, Б). Некоторые антигены, например белки, могут иметь тот же размер, что антитело, или больше. В этих случаях поверхность контакта между антигеном и антителом более обширна и включает все CDR (см. рис. 4.8В), а в некоторых случаях даже часть каркасных участков. Эта поверхность не должна быть вогнутой, но может быть плоской, волнистой или выпуклой. В некоторых случаях удлиненные CDR3 могут, подобно пальцам, вдаваться в углубления на поверхности антигена. Антитело, связывающееся с антигеном **вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) gp120**, направляет длинную петлю внутрь своей мишени (см. рис. 4.8Г).

Рис. 4.8 Антиген может связываться в кармане или желобке либо с протяженной поверхностью антигенсвязывающих центров антител.

Различные типы антигенсвязывающих центров Fab: карман (А); желобок (Б); протяженная поверхность (В); выпуклая поверхность (Г). (А) Вверху — изображение поверхности взаимодействия гаптена с CDR Fab. Внизу — гаптен ферроцен (красный цвет) связан в кармане (желтый цвет). (Б) В комплексе «антитело — пептид вируса иммунодефицита человека» пептид (красный цвет) связывается в желобке (желтый цвет), сформированном между V-доменами тяжелой цепи (V_H) и легкой цепи (V_L). (В) Показан комплекс лизоцима белка куриного яйца с антителом HyHel5. Поверхность антитела, которая будет контактировать с лизоцимом, окрашена в желтый цвет. В связывании принимают участие все шесть CDR антигенсвязывающих центров. (Г) Молекула антитела к антигену ВИЧ gp120 имеет продолговатый CDR3 (стрелка), который проникает в углубление на одной стороне антигена. Структура комплекса «антитело-gp120» была расшифрована. В этом случае с gp120 взаимодействовала только тяжелая цепь. На нижних изображениях молекула повернута примерно на 90° , чтобы показать антигенсвязывающие центры сбоку (представлено R.L. Stanfield и I.A. Wilson).

4.8 Антитела связываются с конформационными эпитопами на поверхности антигенов с помощью множества нековалентных связей

Биологическая функция антител заключается в связывании с патогенами и продуктами их жизнедеятельности для облегчения их элиминации из организма. Антитело обычно распознает только



небольшой участок на поверхности молекулы, такой как полисахарид или белок. Структуру, распознаваемую антителом, называют **антигенной детерминантой**, или **эпитопом**. Некоторые из наиболее важных патогенов имеют полисахаридные оболочки, а антитела, которые распознают эпитопы, образованные субъединицами сахаров этих молекул, имеют важное значение для обеспечения иммунной защиты от таких патогенов. Однако во многих случаях антигены, индуцирующие иммунный ответ, являются белками. Например, многие протективные антитела к вирусам распознают белки вирусных оболочек. Во всех подобных случаях эпитопы расположены на поверхности белка. Они, вероятно, состоят из аминокислот, находящихся в разных частях полипептидной цепи, которые были собраны вместе в процессе **фолдинга белка**². Эпитопы такого типа называют **конформационными**, или прерывистыми, **эпитопами**, поскольку они состоят из сегментов белка, разобщенных в аминокислотной последовательности антигена, но расположенных рядом в трехмерной структуре. Напротив, эпитоп, состоящий из одного сегмента полипептидной цепи, называют **линейным**, или непрерывным, **эпитопом**. Хотя большинство антител к целым свернутым белкам распознают конформационные эпитопы, некоторые из антител будут связываться с пептидными фрагментами белка. Иногда обнаруживается, что антитела к пептидным участкам белка или к синтетическим пептидам, соответствующим его последовательности, связываются с естественным целым свернутым белком. Такое свойство антител позволяет в некоторых случаях использовать в вакцинах, применяемых для увеличения количества антител к белкам патогена, синтетические пептиды.

Взаимодействие между антителом и соответствующим ему антигеном может быть нарушено высокими концентрациями солей, крайними значениями pH, детергентами, а иногда и конкуренцией самого эпитопа при его высокой концентрации.

Таким образом, связывание антитела с антигеном имеет природу обратимого нековалентного взаимодействия. Силы, обеспечивающие нековалентные взаимодействия, представлены в **табл. 4.1**. Между заряженными боковыми группами аминокислот в виде солевых мостиков возникают электростатические взаимодействия. Большинство взаимодействий антиген–антитело включает по крайней мере одно электростатическое взаимодействие. Взаимодействие в виде водородных связей происходит между электрическими диполями или может вовлекать близкодействующие ван-дер-ваальсовы силы. Высокие концентрации солей и крайние значения pH нарушают связь антиген–антитело, ослабляя электростатические взаимодействия и/или водородные связи. Этот эффект используют при очистке антигенов с помощью аффинных колонок с сорбированными на них антителами или при очистке антител с использованием антигенов (см. **приложение I**, раздел АЗ). Гидрофобное взаимодействие происходит, когда две гидрофобные поверхности соединяются, вытесняя воду. Сила, обеспечивающая гидрофобное взаимодействие, пропорциональна площади поверхности, освобожденной от воды. Некоторым антигенам для гидрофобного взаимодействия, вероятно, необходимо больше энергии. Иногда молекулы воды задерживаются на границе раздела между антигеном и антителом. Эти молекулы воды, особенно

² Сворачивания с формированием третичной структуры. — Прим. науч. ред. пер.

ТАБЛИЦА 4.1 Силы, обеспечивающие нековалентные взаимодействия

Силы	Источник	Схема взаимодействия
Электростатические силы	Притяжение противоположных зарядов	$-\text{NH}_3^{\oplus} \quad \ominus \text{OOC}-$
Силы, обеспечивающие водородную связь	Водород, распределяемый между атомами с отрицательным зарядом (N, O)	$\begin{array}{c} > \text{N} - \text{H} \cdots \text{O} - \text{C} < \\ \delta^- \quad \delta^+ \quad \delta^- \end{array}$
Ван-дер-ваальсовы силы	Колебания в электронных облаках вокруг молекул противоположно поляризуют соседние атомы	
Силы, обеспечивающие гидрофобные взаимодействия	Гидрофобные группы пассивно взаимодействуют с водой и, как правило, собираются вместе, чтобы вытеснить молекулы воды. Во взаимодействии также участвуют ван-дер-ваальсовы силы	
Силы, обеспечивающие pi-катионные взаимодействия	Взаимодействие катиона и электронного облака близкой ароматической группы	

Примечание. Заряды электрических диполей показаны как δ^+ или δ^- . Электростатические взаимодействия обратно пропорциональны квадрату расстояния между зарядами, тогда как ван-дер-ваальсовы силы, которые более многочисленны при большинстве контактов антиген-антитело, обратно пропорциональны расстоянию в шестой степени и потому действуют только на очень коротких расстояниях. Ковалентные связи никогда не появляются между антигенами и естественно продуцируемыми антителами.

расположенные между полярными остатками аминокислот, также могут способствовать связыванию и, следовательно, специфичности антитела.

Вклад каждой из этих сил в общее взаимодействие зависит от конкретных антитела и антигена, вовлеченных в процесс. Заметная разница между взаимодействием антител с белковыми антигенами и большинством других природных белково-белковых взаимодействий состоит в том, что антитела зачастую содержат множество ароматических аминокислот в последовательностях антигенсвязывающих центров. Эти аминокислоты взаимодействуют с помощью главным образом ван-дер-ваальсовых сил, а также сил, обеспечивающих гидрофобные взаимодействия (иногда и pi-катионные взаимодействия) и водородную связь. Например, тирозин может участвовать как в образовании водородной связи, так и в гидрофобных взаимодействиях, поэтому часто встречается в составе антигенсвязывающих центров, обеспечивая их разнообразие. Как правило, силы, обеспечивающие гидрофобные взаимодействия, и ван-дер-ваальсовы силы действуют на очень коротких расстояниях и направлены на сближение двух поверхностей, комплементарных друг другу по форме, т.е. для надежного сцепления возвышения на одной поверхности должны совпадать со впа-

динами на другой. Напротив, электростатические взаимодействия между заряженными боковыми группами и водородные связи, соединяющие кислород и/или атомы азота, стабилизируют и усиливают более специфичные химические взаимодействия. Боковые группы ароматических аминокислот (включая азотсодержащие боковые группы, которые могут находиться в протонированном состоянии) могут нековалентно взаимодействовать с соседними катионами через систему π -катионов.

4.9 На взаимодействие антитела с интактными антигенами влияют пространственные ограничения

Пример взаимодействия антиген–антитело, включающего специфическую аминокислоту в антигене, можно увидеть в комплексе **лизоцима белка куриного яйца** (hen egg-white lysozyme, **HEL**) с Fab антитела D1.3 — **HEL–FabD1.3** (рис. 4.9). В этой структуре между антителом и остатком глутамина в молекуле лизоцима формируются сильные водородные связи. Остаток глутамина выступает между V_H -доменами и V_L -доменами. Лизоцим белков куропатки и индейки вместо глутамина имеет другую аминокислоту и не связывается с FabD1.3. В высокоаффинном комплексе лизоцима белка куриного яйца с антителом HyHEL5 (см. рис. 4.8B) два солевых мостика между двумя основными остатками аргинина на поверхности лизоцима взаимодействуют с двумя кислотными остатками глутамина — по одному на CDR1 и CDR2 V_H -домена. Лизоцимы, у которых отсутствует один из двух остатков аргинина, имеют аффинность к HyHEL5 в 1000 раз меньше. Суммарная комплементарность поверхности должна играть важную роль во взаимодействиях антиген–антитело, но в большинстве антител только несколько остатков аминокислот вносят основной вклад в энергию связывания и, следовательно, в конечную специфичность антитела. Многие антитела естественным образом связывают свои лиганды с высокой аффинностью даже в наномолярной концентрации, но генная инженерия путем сайт-направленного мутагенеза может адаптировать антитело так, чтобы оно связывалось с эпитопом еще сильнее.

Даже когда антитела обладают высокой аффинностью к антигенам в составе более крупной структуры, например целой частицы вируса, связыванию антител может препятствовать их собственное строение. Например, вирион возбудителя лихорадки Западного Нила имеет икосаэдрический скарфолд, на оболочке которого закреплены 90 гомодимеров гликопротеина E с тремя доменами (DI, DII и DIII) у каждого. DIII имеет 4 полипептидные петли, которые выступают наружу из частицы вируса. Антитело E16, нейтрализующее вирус лихорадки Западного Нила, распознает эти петли DIII (рис. 4.10). Теоретически у антитела E16 должно существовать 180 антигенсвязывающих центров для связывания с частицей вируса лихорадки Западного Нила. Однако исследования с помощью рентгенографического анализа и электронной микроскопии показали, что даже при избытке Fab антитела E16 с ними могут связываться только около 120 из 180 эпитопов DIII гликопротеина E (см. рис. 4.10). Это, вероятно, обусловлено пространственными ограничениями, причем присутствие одного Fab блокирует способность другого Fab связываться с некоторыми соседними участками гликопротеина E. По-видимому, пространственные ограничения станут более серьезными при связывании

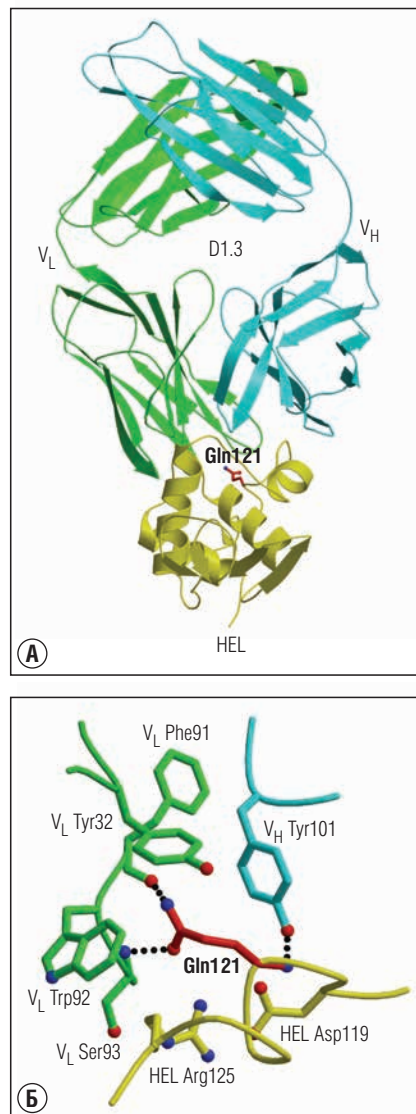


Рис. 4.9 Комплекс «HEL–FabD1.3». (А) Взаимодействие Fab антитела D1.3 с лизоцимом белка куриного яйца (HEL). (Б) Остаток глутамина (Gln121), выступающий из HEL (желтый цвет), протягивает свою боковую группу (красный цвет) между V_L -доменами (зеленый цвет) и V_H -доменом (бирюзовый цвет) антигенсвязывающего центра и образует водородную связь с гидроксильной группой аминокислот (красные точки). Эти водородные связи необходимы для связывания антигена с антителом (предоставлено R. Mariuzza и R.J. Poljak).