

УДК 577.1:612.017.1:616-097

# Структура Fab-фрагментов антител к фуллерену C<sub>60</sub>: структурные детерминанты связывания фуллерена

Е. М. Осипов<sup>1</sup>, О. Д. Гендриксон<sup>1</sup>, Т. В. Тихонова<sup>1</sup>, А. В. Жердев<sup>1</sup>, О. Н. Солопова<sup>2</sup>,  
П. Г. Свешников<sup>2</sup>, Б. Б. Дзантиев<sup>1</sup>, В. О. Попов<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, 119071, Москва, Ленинский просп., 33

<sup>2</sup>Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Россия, 113149, Москва, Симферопольский бул., 8

\*E-mail: vpopov@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 11.10.2018

Принята к печати 12.02.2019

**РЕФЕРАТ** Структура Fab-фрагментов антител к фуллерену C<sub>60</sub> (FabC<sub>60</sub>) решена методом рентгеноструктурного анализа. Виртуальный докинг C<sub>60</sub> в антигенсвязывающем кармане FabC<sub>60</sub> показал, что связывание C<sub>60</sub> с FabC<sub>60</sub> обеспечивается энтальпийными и энтропийными факторами: π-π-стэкинг-взаимодействиями с ароматическими остатками антигенсвязывающего кармана и снижением площади доступной растворителю гидрофобной поверхности C<sub>60</sub>. Фрагмент подвижной петли CDR H3, локализованный на поверхности FabC<sub>60</sub>, затрудняет доступ C<sub>60</sub> в антигенсвязывающий центр, что может объяснять пониженную аффинность антител к C<sub>60</sub>. Структура FabC<sub>60</sub> депонирована в Protein Data Bank с pdbid 6H3N.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** антитела, молекулярное моделирование, рентгеноструктурный анализ, фуллерен.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** а.о. – аминокислотный остаток; ИФА – иммуноферментный анализ; СИТ – соевый ингибитор трипсина; ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; ФБ – 50 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7.4, содержащий 100 мМ NaCl; ФБТ – ФБ, содержащий 0.05% Тритона X-100; CDR – гипервариабельные участки; FabC<sub>60</sub> – Fab-фрагмент антител к фуллерену C<sub>60</sub>; K<sub>d</sub> – константа диссоциации; r.m.s.d. – среднеквадратичное отклонение; SolC<sub>60</sub> – фуллеренаминокaproновая кислота.

## ВВЕДЕНИЕ

Проблема иммунного распознавания – один из ключевых вопросов современной биохимии, важный как для понимания биологических процессов, так и для создания новых лекарственных препаратов и конструирования вакцин. За последние годы получено большое количество теоретических и экспериментальных данных, способствующих пониманию структурно-функциональных закономерностей иммунного взаимодействия [1–5]. Одним из эффективных средств изучения комплекса антитело–антиген является рентгеноструктурный анализ, успешно применяемый для изучения взаимодействия антител с различными высокомолекулярными антигенами (белками, полисахаридами и др.) и низкомолекулярными водорастворимыми гаптенами [6–9].

На сегодняшний день круг потенциальных мишеней иммунного распознавания существенно расширился, в том числе благодаря частицам со структурно выродженной поверхностью. К таким частицам относятся техногенные наночастицы, объемы производства

и применения которых в различных областях науки и технологий интенсивно растут [10]. Возможность варьировать физико-химические параметры наночастиц открывает широкие горизонты для синтеза наночастиц с заданными свойствами, которые могут использоваться в таких областях биомедицины, как направленная доставка лекарственных средств, диагностика заболеваний и имиджинг органов и тканей [11–13]. Использование этих нестандартных объектов в медицине и биотехнологии делает важным изучение особенностей иммунного ответа на техногенные наночастицы, попадающие в организм.

К антигенам, взаимодействие с которыми не укладывается в рамки стандартных закономерностей иммунной реакции, относятся фуллерены – наночастицы, состоящие исключительно из атомов углерода и обладающие уникальной геометрией и свойствами [14]. Ряд исследований показывает возможность получения специфических антител к фуллеренам и предоставляет данные о комплексах антитело–фуллерен [15–18].

Изучению структуры сайта иммунного связывания фуллерена со специфическими антителами посвящена лишь одна работа [15]. Методами рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования показано, что специфический сайт связывания молекул фуллерена представляет собой сферическую полость размером 7 Å, образованную кластером гидрофобных аминокислот. Однако в смоделированной структуре комплекса фуллерена с Fab-фрагментом антитела [15] во взаимодействие с фуллереном вовлечены гидрофобные остатки за пределами CDR.

Задача настоящего исследования состояла в изучении структуры Fab-фрагмента антител против фуллерена C<sub>60</sub> методом рентгеноструктурного анализа и в моделировании строения комплекса антитело-фуллерен. С этой целью использованы Fab-фрагменты полученных ранее моноклональных антител к фуллерену C<sub>60</sub> (FabC<sub>60</sub>) [18].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы

Растворимое производное C<sub>60</sub> – фуллеренаминокaproновая кислота (C<sub>60</sub>(H)<sub>3</sub>(NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COONa)<sub>3</sub> × 10 H<sub>2</sub>O, SolC<sub>60</sub>) с чистотой 98% – приобретено у «Интелфарм» (Россия). Меченные пероксидазой хрена козы антитела против λ-цепей IgG мыши приобретены у Bethyl Laboratories Inc. (США), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и Тритон X-100 – у Sigma-Aldrich (США). Остальные реагенты имели аналитическую степень чистоты. Для иммуноферментного анализа (ИФА) использованы микропланшеты Costar 9018 фирмы Corning (США).

### Получение Fab-фрагментов моноклональных антител мыши

Использовали Fab-фрагменты (FabC<sub>60</sub>) клона В1 моноклональных антител мыши (Ful В1, IgG2a lambda), полученных нами ранее [18]. Антитела В1 очищали из асцитной жидкости одностадийной аффинной хроматографией на G-сефарозе и диализовали в течение ночи против 200 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7.4, содержавшего 2 мМ EDTA и 10 мМ цистеин. Для получения Fab-фрагментов антител В1 кристаллический папаин (Sigma, США) растворяли в том же буфере, смешивали с антителами в пропорции 1 : 100 и инкубировали смесь в течение 4 ч при 37°C и легком покачивании. Реакцию останавливали добавлением йодоуксусной кислоты до конечной концентрации 10 мМ. Для удаления Fc-фрагментов реакцию смесь наносили на колонку с белок-А-сефарозой, проскок собирали и диализовали против натрий-фосфатного буфера. Концентрацию FabC<sub>60</sub> опреде-

ляли спектрофотометрически при 280 нм, используя коэффициент E<sub>280</sub> (1 мг/мл) = 1.4. Чистоту образцов контролировали методом электрофореза по Лэммли в 12% полиакриламидном геле без добавления β-меркаптоэтанола.

### Характеристика Fab-фрагментов моноклональных антител мыши

**Непрямой ИФА.** Конъюгат C<sub>60</sub>-тиреоглобулин (5 мкг/мл) в 50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7.4, содержавшем 100 мМ NaCl (ФБ), добавляли в лунки микропланшета и инкубировали в течение 16 ч при 4°C. Микропланшет отмывали 4 раза ФБ, содержавшим 0.05% Тритона X-100 (ФБТ). Затем в лунки микропланшета добавляли серию разведений антитела В1 и его Fab-фрагмента и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После четырехкратной отмывки ФБТ в лунки добавляли меченные пероксидазой хрена козы антитела против λ-цепей IgG мыши в разведении 1:10 000 и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Микропланшет отмывали 4 раза ФБТ и измеряли пероксидазную активность иммунных комплексов. Для этого в лунки вносили субстратную смесь, содержащую 0.42 мМ ТМБ и 1.8 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 0.1 М цитратном буфере, рН 4.0, и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Ферментативную реакцию останавливали, добавляя в лунки 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптическую плотность продукта окисления измеряли при 450 нм, используя микропланшетный фотометр Zenyth 3100 (Anthos Labtec Instruments, Австрия).

**Конкурентный ИФА SolC<sub>60</sub>.** Конъюгат C<sub>60</sub> – соевый ингибитор трипсина (C<sub>60</sub>-СИТ) (1 мкг/мл) в ФБ добавляли в лунки микропланшета и инкубировали в течение 16 ч при 4°C. Микропланшет промывали 4 раза ФБТ и вносили в лунки растворы SolC<sub>60</sub> (от 5 мкг/мл до 0.1 нг/мл) и FabC<sub>60</sub> (5 мкг/мл), инкубировали в течение 90 мин при 37°C. После четырехкратной отмывки ФБТ в лунки микропланшета добавляли меченные пероксидазой хрена козы антитела против λ-цепей IgG мыши в разведении 1:10 000 и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После отмывки микропланшета измеряли пероксидазную активность полученных комплексов как описано выше.

Зависимость оптической плотности от концентрации антигена аппроксимировали с помощью программы Origin 7.5 (OriginLab, США), используя четырехпараметрическую сигмоидную функцию:

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p},$$

где A<sub>1</sub> – максимальная величина оптической плотности, A<sub>2</sub> – минимальная величина оптической плотно-

сти,  $p$  – наклон калибровочной кривой,  $x_0$  – концентрация антигена, приводящая к 50% ингибированию связывания антителом.

### Кристаллизация

Для кристаллизации использовали два препарата белка: раствор FabC<sub>60</sub> (7 мг/мл) в 50 мМ буфере HEPES, pH 7.0, и раствор комплекса FabC<sub>60</sub> с SolC<sub>60</sub>, полученный смешиванием 100 мкл раствора FabC<sub>60</sub> (0.16 мМ или 7 мг/мл) с 20 мкл 1 мМ водного раствора SolC<sub>60</sub>.

Поиск условий кристаллизации проводили методом диффузии пара в варианте с висячей каплей при 298 К. В качестве противорастворов использовали наборы кристаллизационных растворов Index HR2-134 и Crystal Screen HR2-110/112 фирмы Hampton Research (США). Капли состояли из равных объемов (1 мкл) раствора белка и противораствора. Кристаллы FabC<sub>60</sub>, пригодные для рентгеноструктурного анализа, получены с использованием противораствора, содержавшего 25% полиэтиленгликоль 3350, 0.2 М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 М бис-Трис, pH 6.5. Образование кристаллов наблюдалось на третий день, в течение недели кристаллы вырастали до размеров 200×200×50 мкм.

### Сбор дифракционных данных и решение структуры

Набор дифракционных данных с кристалла FabC<sub>60</sub> собирали на пучке K4.4e (станция «Белок» Курчатовского источника синхротронного излучения, Москва, Россия) на длине волны 0.98 Å при 100 К в токе азота. Перед сбором данных кристаллы вымачивали в противорастворе, дополнительно содержащем 20% глицерина, и замораживали в жидком

азоте. Набор дифракционных данных обрабатывали программой XDS [19]. Кристаллографические расчеты проводили с использованием комплекта программ CCP4 [20]. Структуру FabC<sub>60</sub> решали методом молекулярного замещения программой BALBES [21]. В качестве модели для молекулярного замещения использовали структуру антител из Protein Data Bank (код pdbid 1MFB) [22]. Уточнение структуры проводили с использованием программы REFMAC5 [23]. Визуальную коррекцию модели проводили вручную с использованием COOT [24]. Иллюстрации подготавливали с использованием программного пакета PyMOL [25]. Структуру депонировали в Protein Data Bank (PDB, код pdbid 6H3H).

### Докинг малых молекул

Докинг и подготовку структур рецептора и лиганда выполняли с использованием программы Autodock Vina [26]. Файл с координатами C<sub>60</sub> скачивали из ChemSpider (www.chemspider.com). Рецептор определяли как трехмерную сеть со стороной, равной 22.5 Å, и с центром в точке (13.95; -9.51; 38.74). Каждое измерение сети содержало 60 точек.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Характеристика Fab-фрагментов моноклональных антител мыши

FabC<sub>60</sub>, использованные в настоящей работе, получены расщеплением полноразмерных анти-C<sub>60</sub>-антител В1 папаином и очищены до гомогенного состояния, что подтверждено данными электрофореза в 12% полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях (рис. 1А).

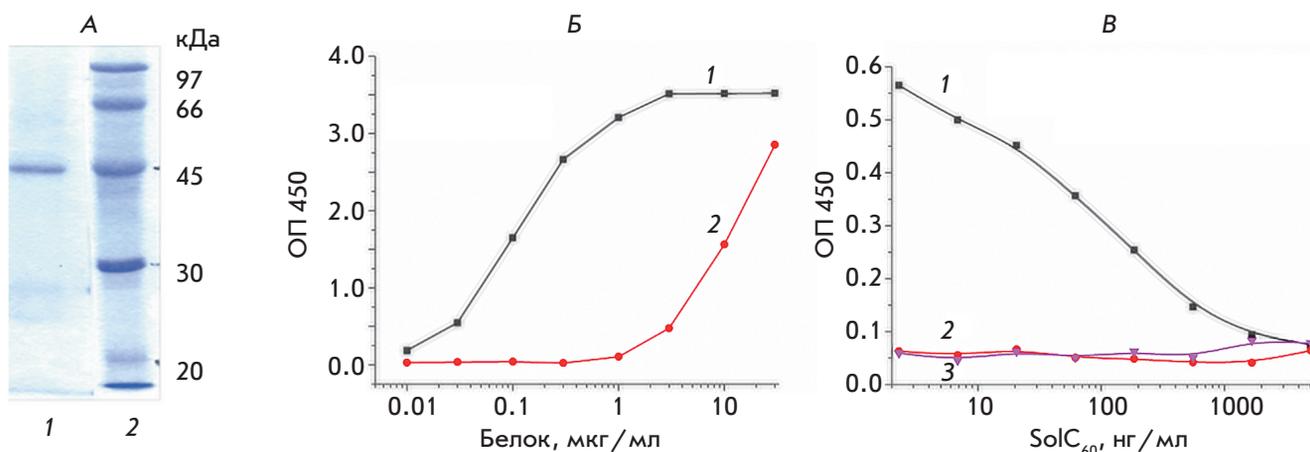


Рис. 1. Характеристика FabC<sub>60</sub>. А – определение гомогенности FabC<sub>60</sub> (1) с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях. Полоса 2 – маркеры молекулярных масс. Б – кривые титрования моноклонального антитела В1 (1) и FabC<sub>60</sub> (2) в непрямом ИФА. В – конкурентный ИФА SolC<sub>60</sub>: иммобилизован конъюгат C<sub>60</sub>-СИТ, в растворе – FabC<sub>60</sub> (1); иммобилизован конъюгат C<sub>60</sub>-СИТ, в растворе – Fab-фрагмент моноклональных антител к X-вирусу картофеля (2); иммобилизован конъюгат атразин-СИТ, в растворе – FabC<sub>60</sub> (3)

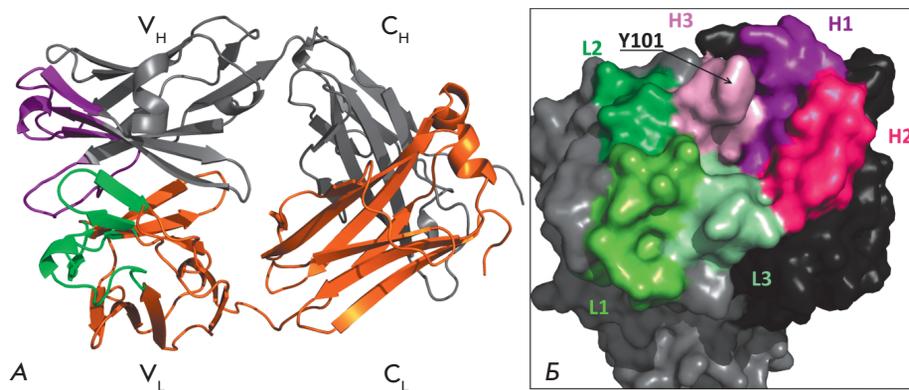


Рис. 2. А – структура FabC<sub>60</sub>. Н-цепь и ее CDR окрашены серым и фиолетовым, L-цепь и ее CDR окрашены оранжевым и зеленым цветом соответственно. Б – поверхность антигенсвязывающего кармана в FabC<sub>60</sub>. Поверхность Н- и L-цепей показана черным и серым цветом, поверхность CDR Н- и L-цепей – оттенками фиолетового и зеленого цветов соответственно

Иммунохимическая реакционная способность FabC<sub>60</sub> изучена методом непрямого ИФА (рис. 1Б). По данным ИФА реакционная способность полученных FabC<sub>60</sub> примерно в 80 раз ниже по сравнению с полноразмерными антителами.

Антигенсвязывающую способность FabC<sub>60</sub> изучали с помощью конкурентного ИФА. В данном формате анализа конъюгат C<sub>60</sub>-белок, иммобилизованный на твердой фазе, и водорастворимое производное фуллерена, SolC<sub>60</sub>, конкурентно взаимодействовали с Fab-фрагментами антител. Специфичность взаимодействия подтверждали в экспериментах, где в качестве контроля использовали Fab-фрагменты моноклональных антител к другому антигену (Х-вирусу картофеля), а также иммобилизованный на твердой фазе конъюгат белка с другим гаптеном (пестицидом атразином) (рис. 1В). Как видно из полученных данных, FabC<sub>60</sub> не взаимодействует с адсорбированным конъюгатом атразин-СИТ (кривая 3 на рис. 1В). Кроме того, иммобилизованный конъюгат C<sub>60</sub>-СИТ не связывается с неспецифическими антителами (кривая 2 на рис. 1В). Кривая 1 на рис. 1В свидетельствует о наличии эффекта конкуренции между свободным SolC<sub>60</sub> и иммобилизованным конъюгатом C<sub>60</sub>-СИТ за антигенсвязывающие участки FabC<sub>60</sub>. Таким образом, полученные результаты подтверждают специфическую природу иммунного взаимодействия Fab-фрагментов антител В1 и производного фуллерена C<sub>60</sub>.

### Структура FabC<sub>60</sub>

Кристаллизация комплекса FabC<sub>60</sub> с SolC<sub>60</sub> привела к образованию кристаллов свободной формы FabC<sub>60</sub>. Структуры FabC<sub>60</sub>, полученные без SolC<sub>60</sub> и в ее присутствии, были одинаковыми, и в дальнейшем мы рассматриваем только структуру, полученную при кристаллизации свободной формы FabC<sub>60</sub>.

Структура FabC<sub>60</sub> была решена методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 1.9 Å. Статистика собранных дифракционных данных

представлена в таблице. В независимой части элементарной ячейки располагаются две молекулы FabC<sub>60</sub>, которые совмещаются по координатам 2717 эквивалентных атомов со среднеквадратичным отклонением 1.0 Å. Эти же молекулы совмещаются по координатам атомов варибельного домена со среднеквадратичным отклонением 0.4 Å. Две молекулы независимой части элементарной ячейки отличаются конформацией С-концов и межмолекулярными контактами (см. ниже).

FabC<sub>60</sub> имеет характерную для Fab-фрагментов двухдоменную структуру, состоящую из тяжелой (H) и легкой (L) λ-цепей, и линейные размеры 45×50×100 Å (рис. 2А). Варибельный домен тяжелой цепи (V<sub>H</sub>) включает остатки 1–119, а варибельный домен легкой цепи (V<sub>L</sub>) – остатки 1–108. Константный домен тяжелой цепи (C<sub>H</sub>) включает остатки 123–222, константный домен легкой цепи (C<sub>L</sub>) – остатки 115–215. В электронной плотности уточнены все аминокислотные остатки легких цепей. Остатки 135–139, расположенные в петле между доменами V<sub>H</sub> и C<sub>H</sub>, разупорядочены и не локализованы на картах электронной плотности.

Гиперварибельные участки (CDR) определены следующим образом: **L1** (Arg23–Asn36), **L2** (Gly51–Ala57), **L3** (Ala91–Val99), **H1** (Gly26–His35), **H2** (Tyr50–Glu59) и **H3** (Gly99–Trp109) [27, 28] (рис. 2Б). Аминокислотные остатки этих участков формируют антигенсвязывающий карман с размерами 9×7 Å и глубиной 5 Å (диаметр сферы C<sub>60</sub> = 7 Å). Из-за наличия у фуллерена сопряженной системы π-π-связей мы ожидали, что CDR будет содержать остатки, склонные к π-π-стэкинг-взаимодействиям. Действительно, поверхность антигенсвязывающего кармана частично образована расположенными в CDR гидрофобными ароматическими остатками Tyr50 (H2), Tyr101 (H3), Tyr34 (L1), Trp93 (L3) и Trp98 (L3). Боковая группа Tyr101 из петли Asp100–Tyr101 в CDR H3 плохо видна на картах электронной плотности; В-факторы у атомов боковой группы

Статистика сбора данных и уточнения структуры

Обработка данных	
Пространственная группа симметрии	P2 <sub>1</sub>
Параметры элементарной ячейки a; b; c, Å; β, град	40.18; 137.58; 83.15 β = 91.9°
Разрешение	28.83–1.91 (2.02–1.91)
I / σ	17.5 (3.2)
Полнота набора, %	99.5 (97.3)
Общее число отражений	349716 (52972)
Уникальные отражения	69665 (10963)
Избыточность набора	5.0 (4.8)
R <sub>meas</sub> , %*	8.4 (2.3)
CC <sub>1/2</sub>	99.9 (83.0)
В-фактор Вильсона	29.7
Уточнение структуры	
R <sub>cryst</sub> , %	19.3 (27.9)
R <sub>free</sub> , %	23.5 (34.3)
Отклонение величин от идеальных значений:	
Длина связей, Å	0.02
Углы между связями, град	1.9
Двугранные углы, град	7.2
Число атомов	
Белок	6535
Вода	456
Величина среднего температурного фактора, Å <sup>2</sup>	
Белок	30.1
Вода	32.5
Статистика графика Рамачандрана	
Разрешенная область, %	97.4
Запрещенная область, %	0.2

\*Для R<sub>meas</sub> величина в скобках дана для слоя с наивысшим разрешением.

Tyr101 (54 Å<sup>2</sup>) выше, чем у атомов Tyr101 основной цепи (28 Å<sup>2</sup>). Это различие в величине В-факторов свидетельствует о подвижности боковой группы Tyr101 и может быть связано с локализацией Tyr101 на поверхности белка. Подвижный Tyr101 может выполнять функцию «крышки» кармана, затрудняя вход C<sub>60</sub> в антигенсвязывающий карман и снижая тем самым аффинность взаимодействия антитело–антиген (рис. 2Б).

На поверхности антигенсвязывающего сайта обнаружены остатки Thr33 и His35 из CDR H1, способные образовывать водородные связи, которые могут быть вовлечены в связывание фуллерена [15]. Однако в полученной нами структуре свободной формы FabC<sub>60</sub> остатки Thr33 и His35 двух молекул FabC<sub>60</sub> независимой части элементарной ячейки образуют водородные связи с С-концевыми остатками Н- и L-цепей симметрично упакованных молекул FabC<sub>60</sub> (рис. 3А,Б). В первой молекуле FabC<sub>60</sub> антигенсвязывающий карман занят С-концевым пептидом Ala219–Ser222 Н-цепи симметричной молекулы. Карбоксильная группа Ser222 симметрично-связанной молекулы FabC<sub>60</sub> образует две водородные связи с Thr33 и His35. Во второй молекуле FabC<sub>60</sub> антигенсвязывающий карман занят С-концевым пептидом Asp213–Ser215 L-цепи другой симметрично-связанной молекулы FabC<sub>60</sub>. В этом случае водородные связи С-концевого остатка Ser215 с остатками Thr33 и His35 опосредованы молекулами воды. Вероятнее всего, связывание в антигенсвязывающем сайте FabC<sub>60</sub> одного из С-концов другой молекулы не имеет отношения к биологической роли и является арте-

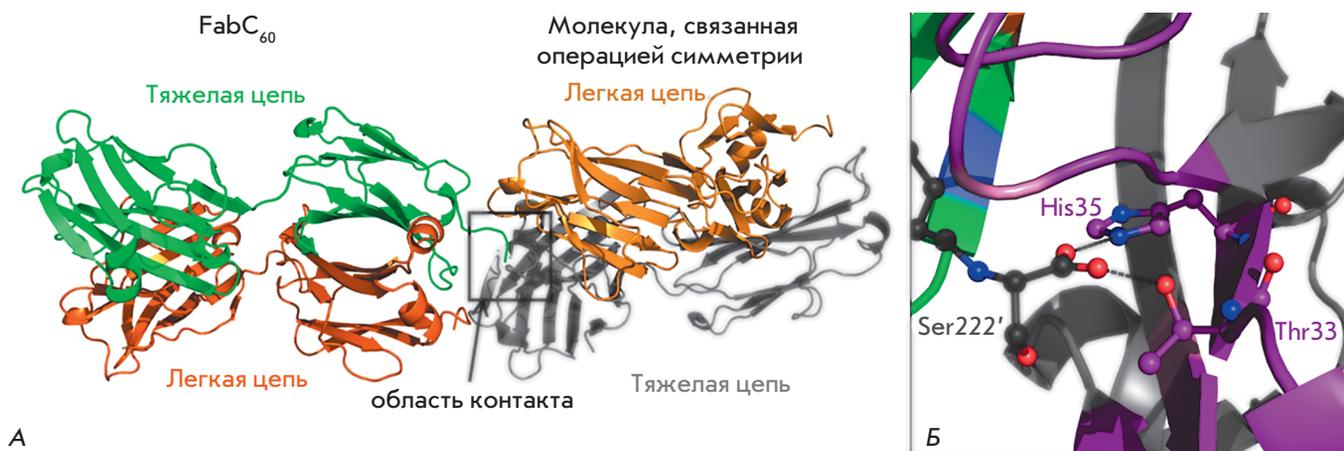


Рис. 3. А – упаковка FabC<sub>60</sub> в кристалле с пространственной группой P2<sub>1</sub>. С-Конец тяжелой цепи FabC<sub>60</sub> (зеленый) занимает антигенсвязывающий сайт соседней FabC<sub>60</sub>. Б – увеличенная область контакта (ориентация и окрашивание отличаются от рис. 3А). Связывание С-концевого Ser222' тяжелой цепи соседней молекулы в антигенсвязывающем кармане FabC<sub>60</sub>. Тяжелая и легкая цепи гипервариабельных участков окрашены фиолетовым и зеленым цветом соответственно. Водородные связи С-концевой карбоксильной группы Ser222' (атомы углерода черного цвета) показаны пунктиром черного цвета

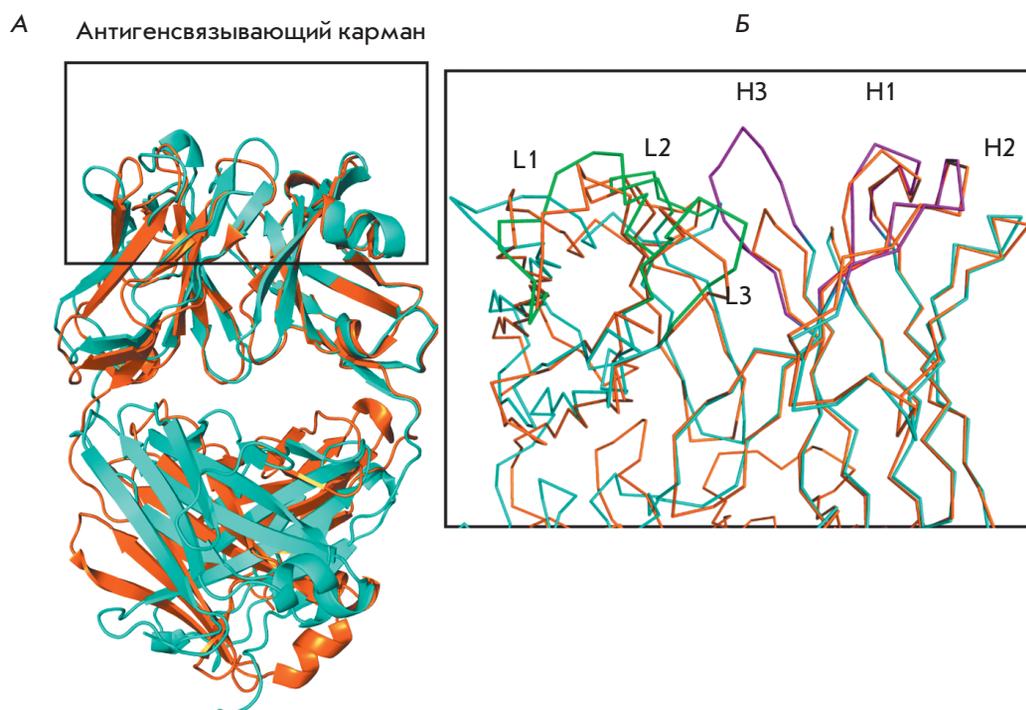


Рис. 4. А – структуры FabC<sub>60</sub> (показана голубым) и анти-C<sub>60</sub> Fab (показана оранжевым цветом) [15], совмещенные по V<sub>H</sub>-доменам. Антигенсвязывающий карман выделен рамкой. Б – увеличенные области связывания C<sub>60</sub> в FabC<sub>60</sub> (голубой) и анти-C<sub>60</sub> Fab (оранжевый), совмещенные по V<sub>H</sub>-доменам. Гиперварибельные участки тяжелых и легких цепей FabC<sub>60</sub> окрашены фиолетовым и зеленым

фактом кристаллической упаковки. Однако мы предполагаем, что подобная кристаллическая упаковка, стабилизированная дополнительными водородными связями, препятствует связыванию антигена и является одной из причин, не позволивших нам закристаллизовать комплекс FabC<sub>60</sub> и SolC<sub>60</sub>.

Степень гомологии первичной структуры FabC<sub>60</sub> и ранее описанных антител к фуллерену (анти-C<sub>60</sub> Fab, pdbid 1emt) [15] довольно высока и составляет 76 и 40% по H- и L-цепям соответственно. FabC<sub>60</sub> содержит легкую λ-цепь, в то время как анти-C<sub>60</sub> Fab – легкую κ-цепь. Структуры этих антител отличаются взаимным расположением V- и C-доменов, поэтому сравнительный анализ этих двух структур затруднен. При совмещении структур по координатам V<sub>H</sub> домена r.m.s.d. составляет 0.4 Å (рис. 4А). Антигенсвязывающие карманы этих антител отличаются по составу и строению, максимальные отличия наблюдаются в укладке L-цепи и петли CDR H3 (рис. 4Б). Петля H3 анти-C<sub>60</sub> Fab [15] на семь остатков короче петли H3 FabC<sub>60</sub> (11 остатков).

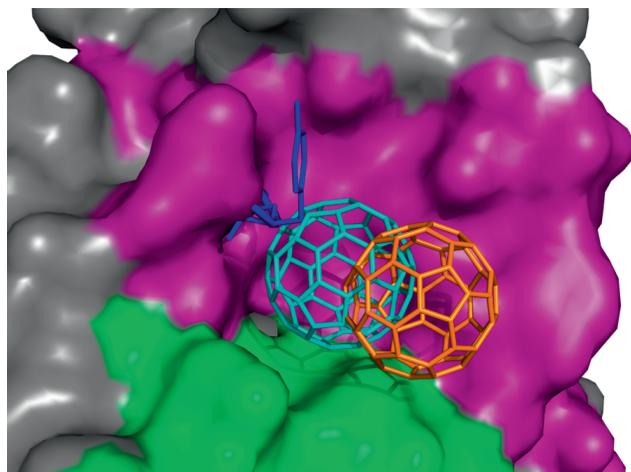
#### Докинг C<sub>60</sub> в FabC<sub>60</sub> и анализ связывания C<sub>60</sub> с FabC<sub>60</sub>

Поскольку нам не удалось получить структуру комплекса C<sub>60</sub> с FabC<sub>60</sub>, мы выполнили докинг C<sub>60</sub> в антигенсвязывающем кармане FabC<sub>60</sub>, чтобы определить структурные особенности связывания фуллерена с антителами [26]. Известно, что связывание антигена сопровождается конформационными изменениями в гиперварибельных участках [29, 30].

Максимальные структурные перестройки наблюдаются в петле CDR H3, которая имеет наибольшую подвижность и наиболее трудна для моделирования среди всех петель антигенсвязывающего региона [31]. Для понимания возможного влияния петли CDR H3 на связывание антигена мы сравнили две модели комплекса C<sub>60</sub> с нативной формой FabC<sub>60</sub> (Комплекс I) и модифицированной формой FabC<sub>60</sub> с удаленными остатками Asp100 и Tyr101 из CDR H3 (Комплекс II) (рис. 5).

В комплексе I молекула C<sub>60</sub> связывается на поверхности антигенсвязывающего сайта и образует π-π-стэкинг с остатками: Tyr50 (CDR H2), Tyr101 (CDR H3) и Trp93 (CDR L3). При связывании фуллерена площадь его доступной растворителю поверхности снижается на 40%. Энергия связывания, рассчитанная с использованием программы Autodock Vina, составила -7 ккал×моль<sup>-1</sup>, что соответствует константе диссоциации (K<sub>d</sub>) комплекса, равной 7.4 × 10<sup>-6</sup> М. Экспериментально определенная K<sub>d</sub> комплекса C<sub>60</sub> и полноразмерных антител В1 к фуллерену составила 1.1 × 10<sup>-7</sup> М [18]. С учетом 80-кратного снижения аффинности взаимодействия C<sub>60</sub> с FabC<sub>60</sub>, K<sub>d</sub> комплекса C<sub>60</sub> и FabC<sub>60</sub> оценивается величиной 9 × 10<sup>-6</sup> М, что хорошо коррелирует с величиной, рассчитанной для модели комплекса C<sub>60</sub> с нативной формой FabC<sub>60</sub>, полученной докингом.

Удаление остатков Asp100 и Tyr101 приводит к тому, что в комплексе II молекула C<sub>60</sub> глубже входит в антигенсвязывающую полость и связывается на расстоянии около 4 Å от положения C<sub>60</sub> в комплек-



**Рис. 5.** Смоделированное с использованием программы Autodock Vina связывание  $C_{60}$  (показан стержневой моделью) в немодифицированном (оранжевый каркас  $C_{60}$ ) и модифицированном (голубой каркас  $C_{60}$ ) антигенсвязывающем кармане  $FabC_{60}$ . Остатки Asp100-Tyr101, удаленные в модифицированной структуре, показаны стержневой моделью синего цвета. Поверхность Н- и L-цепей модифицированного антигенсвязывающего кармана, использованная для генерации рецептора в Autogrid, окрашена фиолетовым и зеленым соответственно

се I (рис. 5). Энергия связывания, рассчитанная с использованием программы Autodock Vina, растет с  $-7$  до  $-12$  ккал $\times$ моль $^{-1}$ , что соответствует снижению величины  $K_d$  комплекса с  $7.4 \times 10^{-6}$  до  $1.6 \times 10^{-9}$  М. Рост аффинности в отсутствие Asp100 и Tyr101 объясняется образованием дополнительных (помимо ранее упомянутых)  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействий с His35 Н-цепи и Tyr34 L-цепи, а также снижением площади доступной растворителю гидрофобной поверхности  $C_{60}$  с 60 до 40% от исходной. Таким образом, остатки Asp100 и Tyr101 из CDR H3 могут играть ключевую роль в снижении аффинности взаимодействия фуллерена  $C_{60}$  с соответствующими антителами.

В уже упомянутой работе [15] также не удалось получить кристаллическую структуру комплекса Fab-фрагментов (pdbid 1emt) с  $C_{60}$ , и структура комплекса была смоделирована с использованием программы INSIGHT 2 по методике, отличной от ис-

пользованной в нашей работе: молекулу  $C_{60}$  вручную помещали в полость варибельного домена между Н- и L-цепями, после чего энергия системы минимизировалась [15]. В связывание  $C_{60}$  в полученной модели вовлечены остатки Tyr36, Gln89, Phe96 и Phe98 L-цепи и Asn35, Trp47 и Trp106 Н-цепи, связывание сопровождалось уменьшением на 90% площади доступной растворителю гидрофобной поверхности фуллерена [15].

Единственными экспериментально установленными структурами, по которым возможно проверить правильность выводов о движущих силах образования комплекса антитело-фуллерен, являются структуры комплекса  $C_{60}$  с синтетическим белком (pdbid 5hkn, 5hkr, 5et3) [32]. Фуллерен  $C_{60}$  в этих комплексах связан в гидрофобном кармане. При связывании доступная растворителю гидрофобная поверхность  $C_{60}$  уменьшается на  $\sim 90\%$  и образуется  $\pi$ - $\pi$ -стэкинг-взаимодействие с остатком Tyr9. Проведенный нами дополнительный анализ структур позволил обнаружить не упомянутое в работе [32] еще одно  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействие  $C_{60}$  с пептидной связью Leu19-Ala20.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты, полученные при моделировании строения комплексов  $C_{60}$  с  $FabC_{60}$ , согласуются с экспериментальными данными [32]. Основной вклад в энергию связывания фуллерена с белками вносят гидрофобные и  $\pi$ - $\pi$ -стэкинг-взаимодействия. Подвижный фрагмент петли в гиперварибельном участке H3 затрудняет доступ  $C_{60}$  к антигенсвязывающему сайту, что объясняет низкую аффинность изучаемых антител ( $K_d$  около  $10^{-7}$  М).

Остатки Thr33 и His35 в антигенсвязывающем кармане, которые в растворе могут быть вовлечены в связывание фуллерена, в условиях кристаллизации образуют водородные связи с С-концевыми остатками симметрично расположенной молекулы  $FabC_{60}$ , стабилизируя кристаллическую упаковку свободной формы  $FabC_{60}$  и препятствуя кристаллизации комплекса  $C_{60}$  с  $FabC_{60}$  ●

*Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН № 32 «Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий».*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sundberg E.J., Mariuzza R.A. // Adv. Protein Chem. 2002. V. 61. P. 119–160.
- Sundberg E.J. // Methods Mol. Biol. 2009. V. 524. P. 23–36.
- Calvaresi M., Zerbetto F., Ciamician C.G., Bologna U., Selmi V.F. // ACS Nano. 2010. V. 4. № 4. P. 2283–2299.
- Dunbar J., Krawczyk K., Leem J., Baker T., Fuchs A., Georges G., Shi J., Deane C.M. // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. № D1. P. D1140–D1146.
- Abbott W.M., Damschroder M.M., Lowe D.C. // Immunology. 2014. V. 142. № 4. P. 526–535.
- Wilson I.A., Rini J.M., Fremont D.H., Fieser G.G., Stura E.A. // Methods Enzymol. 1991. V. 203. P. 153–176.
- Clementi N., Mancini N., Castelli M., Clementi M., Burioni R. // Drug Discov. Today. 2013. V. 18. № 9–10. P. 464–471.
- Narciso J.E.T., Uy I.D.C., Cabang A.B., Chavez J.F.C., Pablo J.L.B., Padilla-Concepcion G.P., Padlan E.A. // Nat. Biotechnol. 2011. V. 28. № 5. P. 435–447.

9. Malito E., Carfi A., Bottomley M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. № 12. P. 13106–13140.
10. Jeevanandam J., Barhoum A., Chan Y.S., Dufresne A., Danquah M.K. // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2018. V. 9. № 1. P. 1050–1074.
11. Boraschi D., Italiani P. // *Vaccines.* 2015. V. 3. № 4. P. 930–939.
12. Sun T., Zhang Y.S., Pang B., Hyun D.C., Yang M., Xia Y. // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2014. V. 53. № 46. P. 12320–12364.
13. Stylianopoulos T., Jain R.K. // *Nanomedicine Nanotechnology. Biol. Med.* 2015. V. 11. № 8. P. 1893–1907.
14. Castro E., Garcia A.H., Zavala G., Echegoyen L. // *J. Mater. Chem. B.* 2017. V. 5. № 32. P. 6523–6535.
15. Braden B.C., Goldbaum F.A., Chen B.X., Kirschner A.N., Wilson S.R., Erlanger B.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 22. P. 12193–12197.
16. Chen B.-X., Wilson S.R., Das M., Coughlin D.J., Erlanger B.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 18. P. 10809–10813.
17. Hendrickson O.D., Fedyunina N.S., Martianov A.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *J. Nanoparticle Res.* 2011. V. 13. № 9. P. 3713–3719.
18. Hendrickson O., Fedyunina N., Zherdev A., Solopova O., Sveshnikov P., Dzantiev B. // *Analyst.* 2012. V. 137. № 1. P. 98–105.
19. Kabsch W. // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 2010. V. 66. № 2. P. 125–132.
20. Winn M.D., Ballard C.C., Cowtan K.D., Dodson E.J., Emsley P., Evans P.R., Keegan R.M., Krissinel E.B., Leslie A.G.W., McCoy A., et al. // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 2011. V. 67. № Pt 4. P. 235–242.
21. Long F., Vagin A.A., Young P., Murshudov G.N. // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 2008. V. 64. № Pt 1. P. 125–132.
22. Cygler M., Wu S., Zdanov A., Bundle D.R., Rose D.R. // *Biochem. Soc. Trans.* 1993. V. 21. № 2. P. 437–441.
23. Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 1997. V. 53. № 3. P. 240–255.
24. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 2010. V. 66. № 4. P. 486–501.
25. The PyMOL Molecular Graphics System. Version 2.0 Schrödinger, LLC.
26. Trott O., Olson A.J. // *J. Comput. Chem.* 2009. V. 31. № 2. P. 455–461.
27. Kabat E.A., Te Wu T., Foeller C., Perry H.M., Gottesman K.S. *Sequences of Proteins of Immunological Interest.* Diane Publ. Comp. Bethesda, MD, USA, 1992.
28. Martin A.C. // *Proteins.* 1996. V. 25. № 1. P. 130–133.
29. Stanfield R.L., Wilson I.A. // *Trends Biotechnol.* 1994. V. 12. № 7. P. 275–279.
30. Weitzner B.D., Dunbrack R.L., Gray J.J., Gray J.J. // *Structure.* 2015. V. 23. № 2. P. 302–311.
31. Regep C., Georges G., Shi J., Popovic B., Deane C.M. // *Proteins.* 2017. V. 85. № 7. P. 1311–1318.
32. Kim K.H., Ko D.K., Kim Y.T., Kim N.H., Paul J., Zhang S.Q., Murray C.B., Acharya R., Degrado W.F., Kim Y.H., et al. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. A. 11429.