

ПРЕИМУЩЕСТВА ДВУХ- ИЛИ ПОЛИВАЛЕНТНОГО СВЯЗЫВАНИЯ РЕЦЕПТОРА С ЛИГАНДОМ ПЕРЕД ОДНОВАЛЕНТНЫМ

С. А. БОБРОВНИК, М. А. ДЕМЧЕНКО, С. В. КОМИСАРЕНКО

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: s-bobrov@bk.ru*

Рассмотрены особенности моновалентного и двухвалентного взаимодействия рецепторов (или антител) с поливалентным лигандом (или антигеном). Показано, что жесткое соединение сайтов связывания рецептора приводит к значительному возрастанию аффинности связывания с соответствующим лигандом, но только в случае, если его эпитопы полностью комплементарны обоим сайтам связывания рецептора. В противном случае никакого выигрыша от двухвалентного связывания не происходит. Если сайты связывания рецептора соединены гибким линкером, то независимо от расположения эпитопов лиганда происходит успешное связывание рецептора и лиганда. Именно этот подход использует Природа в большинстве случаев при конструировании поливалентных рецепторов, которые обычно соединяются между собой гибким линкером.

Ключевые слова: взаимодействие антиген-антитело, аффинность, avidность.

В основе специфического взаимодействия биологических макромолекул лежит сродство между этими молекулами, определяемое комплементарностью их структур, а иногда и противоположным знаком зарядов [1]. Силу или эффективность взаимодействия между двумя молекулами можно охарактеризовать при помощи константы равновесия, равной отношению между концентрацией комплекса и произведением концентраций обеих молекул, оставшихся несвязанными друг с другом. Соответственно, зная константу равновесия, легко рассчитать часть молекул, находящихся в комплексе или в свободном состоянии.

Намного сложнее проводить изучение двух- и поливалентного взаимодействия. Однако именно такие взаимодействия между макромолекулами являются наиболее частыми и/или намного более эффективными. Из-за этого двухвалентное взаимодействие является чрезвычайно важным для многих биологических процессов и широко распространено в Природе. Так, двухвалентное взаимодействие имеет место в процессах, связанных с репликацией ДНК [2], а также при считывании информации с ДНК [3, 4], при внутриклеточной сигнализации [5], апоптозе [6] и многих других процессах.

Одним из наиболее изученных является реакция связывания моно- или двухвалентных антител и поливалентного антигена [7]. Еще в

первых работах, посвященных этому вопросу, было отмечено, что поливалентное связывание антител является значительно более эффективным, чем одновалентное связывание [8, 9]. На примере реакции взаимодействия антиген-антитело мы рассмотрим в настоящей статье, какие имеются преимущества у двух- или поливалентного связывания рецепторов с поливалентными лигандами по сравнению с моновалентным взаимодействием.

Результаты и обсуждение

Рассмотрим вначале, как изменяются термодинамические характеристики реакции связывания для случаев моно- и двухвалентного взаимодействия взаимно комплементарных молекул. Пусть некий моновалентный рецептор R связывается с одним из сайтов связывания поливалентного лиганда L (рис. 1, а). Тогда для данной системы процесс изменения свободной энергии в ходе реакции связывания можно изобразить с помощью схемы, представленной на рис. 2, а. По оси ординат здесь откладывается так называемая «координата реакции», а по оси абсцисс — значение энергии.

В начальный момент времени, когда молекулы R и L не связаны, имеется некий начальный энергетический уровень A данной системы, а после образования комплекса — уровень B (рис. 2, а). Обычно энергия активации для процесса связывания лиганда с

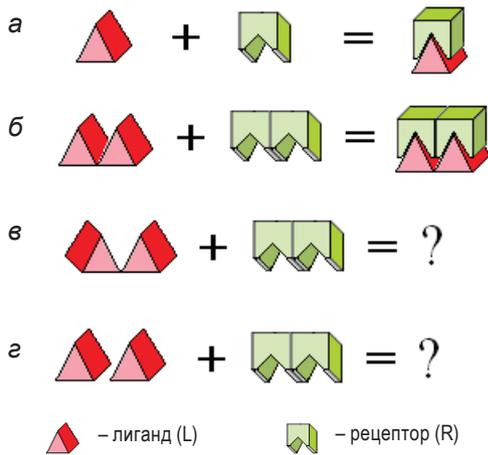


Рис. 1. Схема моновалентного (а) и бивалентного (б) взаимодействия рецепторов с соответствующим лигандом. При жестком объединении двух рецепторов их двухвалентное связывание с лигандами, расположенными «некомплементарно» связывающим центрам рецептора ((в) или (г)), невозможно из-за стерического несоответствия

рецептором, ΔE_1 , заметно ниже, чем энергия активации процесса диссоциации связавшихся молекул, ΔE_2 , т. е. $\Delta E_1 < \Delta E_2$.

В большинстве случаев антитела с соответствующим антигеном не отталкиваются или отталкиваются очень слабо из-за электростатических зарядов и поэтому энергия активации подобной реакции (ΔE_1), также является незначительной, а скорость реакции связывания мало зависит от температуры раствора. Это связано с тем, что при температуре раствора выше нуля большинство молекул благодаря броуновскому движению имеют энергию выше, чем ΔE_1 . Зато после связывания антигена с антителом для разрыва образовавшейся связи необходима значительно большая энергия активации (ΔE_2 , рис. 2, а). Очевидно, что данная реакция резко сдвинута в сторону образования обратимого комплекса между антителом и антигеном. При физиологических значениях температуры (около 37 °С) только незначительная часть молекул (связавшихся антител и антигенов) может получить энергию активации равную ΔE_2 , которая достаточна для диссоциации образовавшегося комплекса. Следовательно, диссоциация комплекса при этих условиях является маловероятной.

Если попытаться индуцировать диссоциацию комплекса антиген-антитело с помощью постепенного увеличения температуры рас-

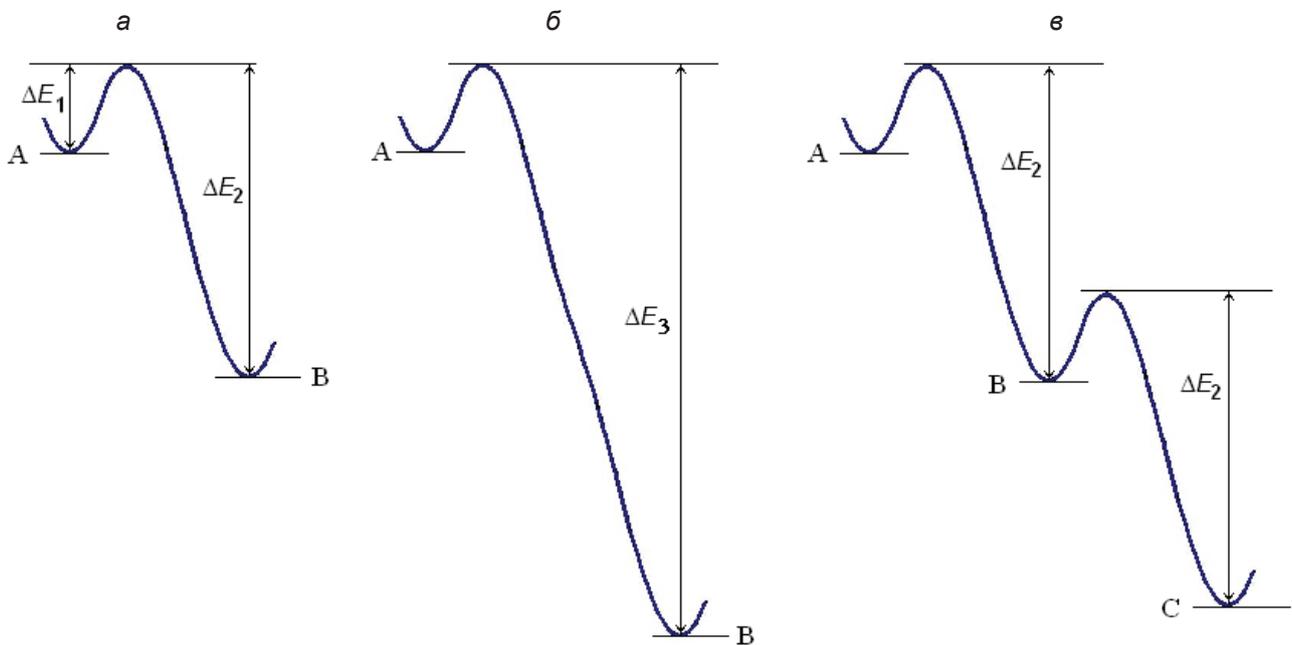


Рис. 2. Схематическое изображение изменения величины энергии активации для связывания или диссоциации рецептора и соответствующего лиганда: а – моновалентное связывание или диссоциация рецептора и лиганда (рис. 1, а); б – двухвалентное связывание или диссоциация лиганда с рецептором, у которого два связывающих центра жестко соединены друг с другом (рис. 1, б); в – двухвалентное связывание или диссоциация лиганда с рецептором, у которого два связывающих центра соединены друг с другом гибким линкером (рис. 3)

твора так, чтобы энергия заметной части молекул комплекса превысила значение ΔE_2 , то скорее наступит денатурация большей части связавшихся молекул антител, чем произойдет заметный сдвиг реакции в сторону распада образовавшегося комплекса. Поэтому для индукции диссоциации комплекса антиген-антитело обычно используют не высокие температуры, а резкие сдвиги pH раствора или же высокие концентрации солей, образующих в растворе так называемые хаотропные ионы, например, 2,5–3,0 М раствор KSCN. В подобных случаях связь антиген-антитело ослабляется, значение ΔE_2 значительно уменьшается и при комнатной температуре или даже около 0 °С появляется достаточно много комплексов антиген-антитело, способных диссоциировать.

Для характеристики обратимого одновалентного взаимодействия лиганда и рецептора обычно используют константу равновесия (или константу аффинности) K , которая равна отношению концентрации комплекса к произведению концентраций несвязанных реагентов:

$$K = \frac{c}{(l-c)(r-c)} \quad (1)$$

где r – концентрация рецептора; l – концентрация лиганда; c – концентрация комплекса. Отсюда следует, что $r-c$ – это концентрация свободного рецептора, а $l-c$ – это концентрация свободного лиганда.

Зная величину константы аффинности, можно рассчитать, какова концентрация лиганд-рецепторного комплекса, образовавшегося после достижения равновесия, если известны исходные концентрации лиганда и рецептора. С другой стороны, можно решить также обратную задачу, т.е. определить величину константы аффинности, если известна концентрация образовавшегося комплекса и концентрации свободных реагентов. Очевидно, что чем выше аффинность взаимодействия, тем больше концентрация образующегося комплекса, и наоборот.

А теперь представим себе, что происходит связь не одного, а двух жестко связанных рецепторов с двумя соответствующими детерминантами лиганда (рис. 1, б). В этом случае энергия связывания в два раза выше (рис. 2, б), а константа равновесия такой реакции K_2 будет численно равна произведению констант аффинности моновалентного взаимодействия [10, 11], т.е. для данного случая получим, что

$$|K_2| \text{ М}^{-1} = |K \times K| \text{ М}^{-1} = |K^2| \text{ М}^{-1}. \quad (2)$$

Это значит, что эффективность взаимодействия для подобного случая возрастет многократно, а именно, в K раз. Учитывая, что значение константы равновесия для моновалентного связывания рецептора с лигандом может достигать 10^8 – 10^{10} М^{-1} , подобное «двойное» взаимодействие могло бы повысить эффективность взаимодействия в 10^8 – 10^{10} раз.

Если жестко связать два различных рецептора, специфичных к одному или двум разным лигандам, имеющим к ним различные аффинности (K_a и K_b соответственно), то тогда константа равновесия для связывания объединенного рецептора с обоими лигандами будет также численно равна произведению обоих констант, т.е. $|K_2| \text{ М}^{-1} = |K_a \times K_b| \text{ М}^{-1}$. Совершенно ясно, что и в этом случае происходит огромное увеличение эффективности аффинности лиганд-рецепторного взаимодействия. Однако, всегда ли подобное взаимодействие и, как результат, огромное повышение аффинности может быть целесообразным для большинства биологических процессов? Чтобы получить ответ на данный вопрос, рассмотрим процесс взаимодействия двухвалентного рецептора с поливалентным лигандом на следующем примере.

Пусть имеется поливалентный лиганд, на котором имеется n сайтов связывания, которые распознаются и связываются с данным рецептором. Если два сайта распознавания рецептора будут связаны жестко, тогда они смогут соединиться только с теми двумя сайтами лиганда, которые расположены строго комплементарно к сайтам связывания рецептора (рис. 1, б), т.е. если взаимодействующие структуры являются зеркальным отражением друг друга. Если же сайты связывания лиганда расположены под иным углом, чем жестко связанные рецепторы или находятся на ином расстоянии (рис. 1, в и г), то взаимодействие рецепторов с лигандом может не произойти вообще, или, в лучшем случае, произойдет только одновалентное взаимодействие. Таким образом, во многих ситуациях, которые могут встретиться в природе, подобная жесткая связь между двумя рецепторами не даст никакого выигрыша, а во многих случаях даже приведет к отрицательному результату, т.е. взаимодействие рецептора и лиганда может не состояться из-за стерической некомплементарности (рис. 1, в и г).

Здесь необходимо также отметить следующее. Когда мы рассматриваем связывание с двумя лигандами двух жестко объединенных между собой рецепторов, то фактически мы

имеем дело со взаимодействием одного составного рецептора с соответствующим составным лигандом (рис. 1, б). Очевидно, что все закономерности взаимодействия в этом случае будут являться точно такими же, как и для моновалентного (рис. 1, а) взаимодействия рецептора и лиганда. Таким образом, в данном случае мы имеем фактически моновалентное взаимодействие, которое происходит по принципу «все или ничего». При этом свободная энергия такого взаимодействия равна сумме энергий взаимодействий каждого из компонентов рецептора. Следовательно, рассматривать подобное взаимодействие как двухвалентное просто нет смысла, точно так же, как нет смысла в подобных случаях говорить и об avidности взаимодействия, т.к. это взаимодействие является фактически моновалентным.

Совсем иная картина наблюдается в том случае, если два рецептора (одинаковы они или различны, не имеет значения) связаны между собой гибким линкером. Благодаря гибкому линкеру каждый из сайтов рецептора имеет определенную автономность и может связаться с лигандом относительно независимо от того, связался ли с лигандом второй сайт рецептора или нет (рис. 3). Точно также каждый из сайтов рецептора имеет возможность автономно диссоциировать, разорвав связь с лигандом, независимо от того, связан с лигандом или нет второй рецептор. Возникает вопрос, как в таком случае изменяется эффективность лиганд-рецепторного взаимодействия, а также, почему в природе имеет место именно гибкая связь между сайтами рецептора и как гибкий линкер между ними влияет на эффективность взаимодействия рецептора с лигандом? Иными словами, как avidность связывания зависит от

аффинности моновалентного связывания, от длины и степени гибкости линкера?

Прежде чем пытаться ответить на сформулированные выше вопросы, попытаемся вначале выяснить, почему связь двух и более рецепторов гибким линкером для биологических объектов более предпочтительна, чем жесткая связь между теми же рецепторами. Для этой цели рассмотрим взаимодействие с лигандами, жестко связанными с какой-либо поверхностью (антигены капсида вирусов, клеточной стенкой бактерий, антигены, связанные с поверхностью микроплат и др.), двух рецепторов, которые или связаны между собой жестко, или же с помощью гибкого линкера. В первом случае рецептор может связываться обоими сайтами связывания с лигандами только тогда, когда расстояние между лигандами и их стерическое расположение полностью совпадает со взаимным расположением сайтов связывания рецептора (рис. 1, б). В противном случае рецептор будет по-прежнему взаимодействовать только с одним из эпитопов лиганда, или не сможет связываться с ними вообще. Следовательно, жесткое объединение обоих сайтов связывания рецептора в подавляющем большинстве случаев будет не только бесполезным, но и наоборот, иногда может стать даже невыгодным по сравнению с одновалентным связыванием.

Совсем иная ситуация наблюдается в том случае, когда два или более сайтов связывания рецептора (или два паратопа антитела) соединены между собою не жестко, а с помощью гибкого линкера (рис. 3). Благодаря гибкости линкера, присоединение каждого из сайтов связывания рецептора к соответствующим эпитопам лиганда может происходить независимо от ориентации этих эпитопов. Единственным

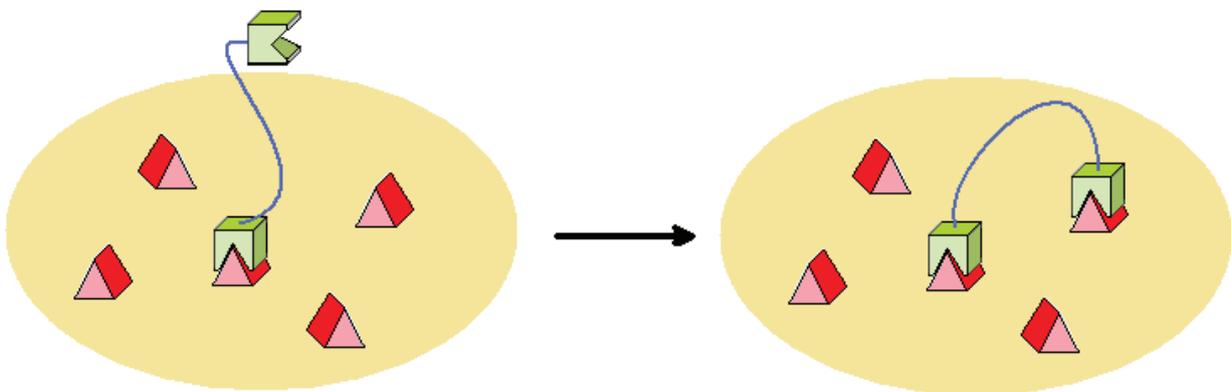


Рис. 3. Схема взаимодействия двухвалентного рецептора, у которого сайты связывания объединены гибким линкером с поливалентным лигандом

ограничением в этом случае является длина и гибкость линкера между сайтами связывания, и если расстояние между эпитопами лиганда находятся в пределах достижения этих сайтов рецептора, то их двухвалентное связывание может происходить весьма успешно, независимо от их ориентации (рис. 3).

Рассмотрим теперь, как изменяется энергия активации для прямой и обратной реакции между двухвалентным рецептором и поливалентным лигандом. Для упрощения ситуации предположим, что линкер связывающий оба паратопа антитела обладает абсолютной гибкостью. Это значит, что после связывания с лигандом одного из паратопов антитела, второй может свободно двигаться в пространстве, ограниченном длиной линкера. Помимо этого, благодаря предполагаемой абсолютной гибкости линкера, для его сгибания не нужна дополнительная энергия. По этой причине для диссоциации образовавшегося комплекса сайта связывания рецептора и лиганда нужна точно такая же энергия активации ΔE_2 , как и для диссоциации моновалентного рецептора (рис. 2, в).

Итак, после связывания одного из сайтов рецептора с лигандом система переходит из состояния А в состояние В. Это моновалентное связывание одного из сайтов рецептора (рис. 3) энергетически ничем не отличается от моновалентной реакции рецептора (рис. 2, в), график которой представлен на рис. 2, а. Поскольку связывание является обратимым, то не только связывание, но и диссоциация комплекса произойдет с такой же вероятностью, как и при связывании моновалентного рецептора, а энергия активации для такой диссоциации будет также равной ΔE_2 . Однако существенным отличием в данном случае является тот факт, что на небольшом расстоянии, которое не превышает длины гибкого линкера, находится второй сайт связывания рецептора, который также может связаться с лигандом.

Благодаря небольшой длине линкера создается огромная «локальная концентрация» или «эффективная концентрация» второго сайта рецептора и эпитопов лиганда, поскольку они находятся в небольшом объеме пространства. Эта «эффективная концентрация» реагентов обычно в тысячи или даже миллионы раз может превышать истинную концентрацию указанных реагентов в данном растворе. Соответственно, во столько же раз повышается и вероятность связывания второго сайта рецептора с одним из близлежащих эпитопов лиганда (рис. 3). По этой причине ве-

роятность связывания второго сайта рецептора с лигандом намного превышает вероятность диссоциации первого сайта рецептора с лигандом. В результате этого образуется устойчивая двухвалентная связь лиганда и рецептора, и система переходит с высокой вероятностью из состояния В в состояние С (рис. 2, в).

Теперь, находясь в состоянии С, любой из сайтов связывания рецептора может диссоциировать с одинаковой вероятностью, если он приобретет необходимую энергию активации, равную ΔE_2 . Однако, даже после диссоциации этот сайт рецептора не сможет удалиться от эпитопов лиганда на значительное расстояние, поскольку он будет удерживаться гибким линкером. Следовательно, вероятность того, что этот сайт рецептора опять свяжется с одним из эпитопов лиганда, намного выше, чем вероятность того, что с лиганда диссоциирует и второй сайт связывания рецептора. Таким образом, благодаря двухвалентности рецептора и тому, что оба сайта связывания соединены гибким линкером, рецептор приобретает способность намного эффективнее связываться с двухвалентным или поливалентным лигандом, чем моновалентный рецептор. Соответственно, еще более возрастает avidность связывания в том случае, если рецептор является трех-, пяти- или более валентным.

Точно такая же ситуация происходит и в случае связывания двухвалентных антител с поливалентным антигеном (рис. 4). Благодаря тому, что Fab-участки антител связаны гибкой полипептидной цепью, они могут связываться с любыми эпитопами антигена, которые находятся в области достижения Fab-участка, причем независимо от ориентации эпитопов. Вследствие этого реакцию взаимодействия антител с антигеном можно характеризовать не только аффинностью (как для моновалентного связывания), но и avidностью (как для двухвалентного связывания, если это антитела IgG или же десятивалентного, если это антитела IgM). Многочисленные исследования показали, что в случае двухвалентных IgG антител эффективность их связывания с поливалентным антигеном возрастает в 100–1000 (а иногда и более) раз по сравнению с моновалентным связыванием Fab-фрагмента того же антитела и антигена [7]. Это значит, что константа аффинности, вычисленная с помощью уравнения (1) в 100–1000 раз больше, чем константа аффинности моновалентного связывания Fab-фрагмента тех же антител и того же антигена.

Несмотря на то, что подвижность Fab-фрагментов позволяет им достаточно успешно

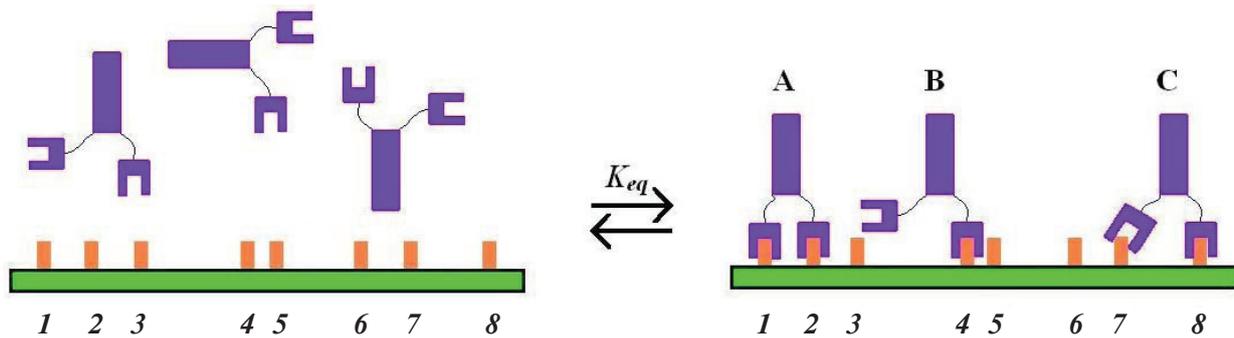


Рис. 4. Схема связывания двухвалентных антител (А, В, С) с эпитопами (№ 1–8) поливалентного антигена

связываться с поливалентными антигенами, видимо, бывают случаи, когда двухвалентное антитело связывается с антигеном только одним из Fab-фрагментов (частичное связывание и потому не полностью эффективное). Чтобы понять это, рассмотрим рис. 4, на котором представлена схема связывания двухвалентного IgG антитела с эпитопами антигена (№ 1–8). Как видно из рисунка, антитело А «полноценно» соединилось обоими сайтами связывания с эпитопами антигена № 1 и № 2. В отличие от антитела А, антитело В связалось моновалентно только с эпитопом № 4, т.к. его второй Fab-фрагмент не может связаться с эпитопом № 3 из-за его удаленности, а с эпитопом № 5 второй Fab-фрагмент не может связаться из-за стерических препятствий.

И, наконец, антитело С полноценно связалось одним из Fab-фрагментов с эпитопом № 8, а вот второй Fab-фрагмент антитела связался с эпитопом № 7 не полностью, благодаря чему аффинность такой связи должна быть заметно снижена. Таким образом, несмотря на значительно большую эффективность связывания двухвалентных антител с поливалентным антигеном, видимо, даже в подобных случаях часть антител может быть связана моновалентно или же только частично двухвалентной связью. Наличие таких моновалентно или не полностью двухвалентно связанных антител привносит дополнительные сложности для теоретических оценок или же для экспериментального измерения величины avidности антител.

ПЕРЕВАГА ДВО- АБО ПОЛІВАЛЕНТНОГО ЗВ'ЯЗУВАННЯ РЕЦЕПТОРА З ЛІГАНДОМ ПЕРЕД ОДНОВАЛЕНТНИМ

С. П. Бобровник, М. О. Демченко,
С. В. Комісаренко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ;
e-mail: s-bobrov@bk.ru

Розглянуто особливості моновалентної і двовалентної взаємодії рецепторів (або антитіл) із полівалентним лігандом (або антигеном). Показано, що жорстке з'єднання сайтів зв'язування рецепторів призводить до значного збільшення афінності зв'язування з відповідним лігандом, але тільки у випадку, коли його епітопи повністю комплементарні обома сайтам зв'язування рецептора. У протилежному випадку ніякої вигоди від двовалентного зв'язування рецептора не відбувається. Якщо сайти зв'язування рецептора об'єднані гнучким лінкером, то незалежно від розташування епітопів ліганду відбувається успішне зв'язування рецептора і ліганду. Саме цей підхід використовує Природа в більшості випадків під час конструювання полівалентних рецепторів, які зазвичай зв'язуються між собою гнучким лінкером.

Ключові слова: взаємодія антиген-антитіло, афінність, avidність.

**ADVANTAGES OF TWO- OR
POLYVALENT BINDING OF A
RECEPTOR TO THE CORRESPONDING
LIGAND IN COMPARISON TO
UNIVALENT BINDING**

*S. A. Bobrovnik, M. O. Demchenko,
S. V. Komisarenko*

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: s-bobrov@bk.ru

S u m m a r y

The features of monovalent and bivalent binding of receptors (or antibodies) with a polyvalent ligand (or with an antigen) are considered. It is shown that the rigid connection of the binding sites of the receptor brings to high increase of binding affinity for the corresponding ligand, but only in case if its epitopes are fully complementary to both sites of the receptor binding. If not, then there is no advantage of the binding of bivalent receptor before univalent binding. If the binding sites of the receptor are connected by a flexible linker, then regardless of location of epitopes of the corresponding ligand there is the successful fastening of receptor and ligand. Exactly the connection by a flexible linker is used by Nature in most cases at constructing of polyvalent receptors.

Key words: antibody-antigen interaction, affinity, avidity.

1. *Stites W. E.* // Chem. – Rev. – 1997. – **97**. – P. 1233–1250.
2. *Berdis A., Soumillion P., Benkovich S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1996. – **93**. – P. 12822–12827.
3. *Klemm J. D., Pabo C. O.* // Genes Dev. – 1996. – **10**. – P. 27–36.
4. *Schleif R.* // Bioassays. – 2003. – **25**. – P. 274–282.
5. *Sano T., Ohyama K., Yamano Y. et al.* // J. Biol. Chem. – 1997. – **272**. – P. 23631–23636.
6. *Shi Y.* // Cell Death Differ. – 2002. – **9**. – P. 93–95.
7. *Стьюард М.* Аффинность реакции антиген-антитело и ее биологическое значение / В кн. «Структура и функции антител». – Под ред. Глинна Л., Стьюарда М. – М.: «Мир», 1983. – С. 113–147.
8. *Hornick C. L., Karuch F.* // Immunochemistry. – 1972. – **9**. – P. 325–340.
9. *Karuch F.* // Contemp. Top. Mol. Immunol. – 1976. – **5**. – P. 217228.
10. *Tobita T., Oda M., Azuma T.* // Molec. Immunol. – 2004. – **40**. – P. 803–811.
11. *Bobrovnik S. A.* // J. Molec. Recognition. – 2007. – **20**. – P. 253–262.

Получено 21.03.2011