УДК 577.322.4

Количественный анализ образования комплексов IgM с иммобилизованным лигандом с помощью атомно-силовой микроскопии

Н.В. Малюченко^{1*}, И.И. Агапов¹, А.Г. Тоневицкий¹, М.М Мойсенович¹, М.Н. Савватеев², Е.А. Гудим¹, В.А. Быков², М.П. Кирпичников¹

¹Биологический факультет Московского государственного университета , 119992, Москва, Воробьевы горы д.1, кор. 12, факс: (095)939-5738 <u>mal_nat@mail.ru</u> ²НТ-МДТ, НИИ физических проблем, 124482, Москва, Зеленоград, кор. 317 А, РО 158, факс

(095)5356410, <u>spm@ntmdt.ru</u> ; <u>http://www.ntmdt.ru</u>

РЕЗЮМЕ

Благодаря своей доменной структуре и размерам (950 кДа) IgM являются удобным маркером для проведения исследований с помощью атомно-силовой микроскопии. В данной работе мы наблюдали специфическое взаимодействие IgM человека с иммобилизованными на подложке поликлональными антителами. Данные IgM человека ответственны за ряд побочных эффектов, возникающих при ксенотрансплантации органов млекопитающих человеку. На основе ACM был проведен количественный анализ образующихся комплексов с IgM, данные которого хорошо согласовывались с результатами иммуноферментного анализа. В работе показано, что метод детекции иммунных комплексов на основе ACM позволяет определять наличие специфических антител/антигенов в сыворотке.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, полуконтактный метод, IgM, антитела.

Принятые сокращения: ACM – атомно-силовая микроскопия; БСА - бычий сывороточный альбумин, ФКС - фетальная коровья сыворотка, поли-АЧ – антивидовые кроличьи антитела к человеку.

*Адресат для корреспонденции и запросов оттисков

введение

В основе многих существующих клинико-диагностических систем лежит принцип детекции специфического взаимодействия антиген-антитело. С помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) можно детектировать такое взаимодействие либо непосредственной визуализацией образующихся комплексов при сканировании образцов, либо измерением сил, возникающих между антигеном и антителом [1-3]. Огромное преимущество метода АСМ перед иммунохимическими методами – это скорость и чувствительность анализа. АСМ позволяет за минуты получить изображение поверхности образца с разрешением порядка нескольких нанометров [4-5]. Непосредственная визуализация может быть осложнена недостаточной разрешающей способностью прибора, наличием "шумов" в виде неровностей образующегося на подложке слоя, неспецифических взаимодействий и рядом других причин. Поэтому остается актуальной проблема поиска надежных маркеров, которые позволят однозначно интерпретировать получаемые изображения. Для АСМ такими маркерами могут быть частицы, размеры, которых находятся в пределах хорошей разрешающей способности АСМ микроскопа и, главное, имеющие отчетливую структуру. В данной работе мы использовали иммуноглобулины изотипа IgM. IgM представляют собой сложные гликопротеиновые молекулы (950 кДа) с четко выраженной доменной структурой: пяти У-образных молекул, соединенных между собой связывающим пептидом; С-концевые участки Y-единиц направлены к центру, а Fab-фрагменты располагаются на внешней стороне пентамера [6]. Использование IgM в данной работе позволило нам провести с помощью АСМ количественную оценку образующихся комплексов, а также детектировать наличие специфических антител в составе сыворотки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы и белки

Специфические иммуноглобулины человека против углеводного эпитопа Galα1,3αGal, были выделены аффинной хроматографией на Galα1,3αGal-сефарозе. Моноклональные антитела TA5, направленные к каталитической субъединице вискумина,

были получены ранее [7]. Кроличьи антивидовые поликлональные антитела против иммуноглобулинов человека, а также конюьгат данных антител с пероксидазой были приобретены в фирме ИМТЕК (Россия). Рицин и вискумин получали по описанным ранее методикам [8] и [9] соответственно.

Приготовление образцов для АСМ

Слюду модифицировали APTES (3-aminopropyl-triethoxysilane, FLUKA) согласно методу, опубликованному [10]. Подробное описание процедуры ковалентной пришивки первого лиганда и внесения вторых антител описано в [11].

Исследования АСМ

Измерения макромолекул производили на зондовом микроскопе Solver P47H (NT-MDT, Москва). Перед сканированием образцы обдували сжатым воздухом. Условия сканирования были подобраны экспериментально [12]. Статическую обработку изображений проводили методом, описанным ранее [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы изучали взаимодействие мышиных и человеческих IgG с лигандами, ковалентно присоединенными к подложке [11]. После отсечения фоновых значений, мы визуализировали комплексы между специфическими антителами и соответствующими антигенами, при этом в контрольных образцах неспецифическое взаимодействие не наблюдали. Критерием наличия комплексов являлось появление частиц, высота которых достоверно превышала фоновые значения. Эти частицы соответствовали второй компоненте комплекса – вносимым сверху антителам. Такой подход оказался достаточно трудоемок и требовал аккуратного проведения процедуры вычитания фоновых значений. Поскольку в данной работе помимо визуализации образующихся комплексов мы ставили ряд дополнительных задач, таких как использовать количественную оценку, а также детектировать наличие специфических антител в сыворотке, было решено использовать более четкий маркер для интерпретации изображений. Во всех экспериментах мы применяли иммуноглобулины IgM человека. IgM были направлены к специфиченому αGal

-эпитопу, который в большом количестве экспрессируется на поверхности клеток млекопитающих, но отсутствует в норме у человека. Данные антитела ответственны за ряд побочных эффектов, возникающих при ксенотрансплантации органов млекопитающих человеку.

После ковалентной пришивки первого белка (поликлональных антител против иммуноглобулинов человека) следовала процедура внесения бычьего сывороточного альбумина, которая способствовала ингибированию свободных мест связывания и выравниванию слоя. На рисунке 1 продемонстрированы изображения сканированных площадей, размером 500х500 нм² в опытных (1 А-Г) и контрольных образцах (1Д,Е).



Рисунок 1. АСМ-топография (500 х 500 нм²⁾ взаимодействия иммуноглобулинов человека IgM с иммобилизованными лигандами: (В) – с поликлональными антителами, (Е) – с контрольными антителами TA5. (А, Б) – топография иммобилизованных поли-АЧ до и после вычитания фона

(В, Г) - топография образца с IgM человека до и после вычитания фона

(Д, Е) – проверка специфичного взаимодействия IgM человека с контрольными антителами.

Концентрации поли-АЧ и ТА5 на слюде 6,7 х 10⁻⁴M, а IgM - 5х10⁻⁶ М. Подробный протокол приготовления образцов см. "Материалы и методы".

При добавлении к поли-АЧ человеческих иммуноглобулинов IgM визуализируются объекты характерного строения, напоминающие IgM-подобные пентамерные структуры (рис 1 В,Г). В качестве контроля на специфичность связывания мы использовали моноклональные антитела TA5, которые были инертны в отношении к человеческим иммуноглобулинам. IgM-подобные объекты не визуализировали при

внесении IgM к антителам TA5, при этом топография распределения частиц существенно не менялась (рис. 1Д, Е).

Один из важных критериев диагностических систем – возможность применения количественной оценки. Используя IgM, мы проверяли зависимость количества образующихся комплексов от концентрации вносимых антител. На рисунке 2 видно, что при внесении 0,04 мкг/мл IgM топография распределения частиц практически не меняется по сравнению с исходным образцом (рис. 2 А,Б).



Рисунок 2. Зависимость количества образующихся комплексов от концентрации IgM.

А- Е: АСМ изображения сканов 500х500 нм² при разных концентрациях IgM.

Ж: количественная зависимость числа частиц, превышающих уровень фона от концентрации IgM, обсчет

проводился на 3000х3000нм².

3- результаты ИФА (см "Материалы и методы")

Объекты, соответствующие комплексам с IgM, визуализируются, начиная с концентрации 0,2 мкг/мл. Количество таких объектов растет вплоть до 25 мкг/мл (рис. 2В-Е) Эти данные полностью соответствуют данным иммуноферментного анализа (Рис 2 3). При концентрации 25 мкг/мл (рис 2Е) в результате сближения образующихся комплексов происходит их частичное слияние в крупные образования, при этом идентификация отдельных комплексов затруднена. На рисунке 2Е видно, что потенциальные места связывания на поли-АЧ остаются, и поэтому в ИФА мы не наблюдаем насыщения в точке 25 мкг/мл. Увеличение образующихся комплексов пропорционально количеству вносимых IgM, что является одним из подтверждений, что выступающие частицы действительно соответствуют комплексам поли-АЧ с IgM. Таким образом, с помощью АСМ можно не только детектировать наличие специфического взаимодействия антиген-антитело, но применять количественную оценку.

Детекция специфических антител или антигенов в сыворотке больных лежит в основе методов диагностики различных заболеваний. Сыворотка представляет собой многокомпонентную систему, в которой содержание исследуемых объектов может быть чрезвычайно низко. Прежде чем использовать сыворотки пациентов, мы определяли возможность детекции специфических комплексов в системе с известным содержанием IgM в сыворотке. Для этого использовали сыворотку плода коровы, в которую вносили 0,5 мкг/мл IgM. Добавление сыворотки к поли-АЧ не приводило к появлению неспецифических комплексов между компонентами сыворотки и поли-АЧ (рис 3 А,Б).



Рисунок 3. Детекция человеческих IgM в сыворотке.
А- топография иммобилизованных поли-АЧ с БСА
Б – ФКС внесенная на поли-АЧ/БСА
В –IgM (0,5 мкг/мл), добавленные к поли-АЧ в ФСБ
Г- IgM (0,5 мкг/мл), добавленные к поли-АЧ в ФКС.

На рисунке представлена топография сыворотки, нанесенной на поли-АЧ. Видно, что заметных изменений (появление частиц, превышающих фоновые значения, увеличение общей высоты скана) по сравнению с исходным образцом не наблюдалось. При внесении 0,5 мкг/мл иммуноглобулинов IgM в составе сыворотки на иммобилизованные поли-АЧ мы наблюдали появление частиц, сопоставимые по размерами с IgM антителами (рис 3Г). В качестве контроля мы вносили те же 0,5 мкг/мл антител IgM в фосфатно-солевом буфере (рис 3В). При сопоставлении изображений рис 3В и рис 3Г наблюдается сходная картина и по количеству "севших" частиц и по характеру их распределения. При этом мы не наблюдали неспецифического связывания компонентов сыворотки. Таким образом, данная работа демонстрирует возможность определять с помощью атомно-силовой микроскопии наличие специфических антител в сыворотке и кроме того, использовать количественный подход при анализе.

Исследования частично финансировались в рамках двустороннего соглашения между Министерством науки и технологий РФ и Министерством образования и научных исследований Германии (проект RUS 01/237), а также грантом РФФИ № 03-04-49278

Список литературы:

- 1. Li L, Chen S, Oh S, Jiang S.// Anal. Chem. 2002. V.74. P.6017-6022
- Ouerghi O, Touhami A, Othmane A, Ouada HB, Martelet C, Fretigny C, Jaffrezic-Renault N. // Biomol. Eng. 2002. V. 19. P.183-188.
- 3. Paulo S.A., Garcia R.// Biophys. J. 2000. V. 78. P. 1599-1605.
- Cidade G.A., Costa L.T., Weissmuller G., da Silva Neto A.J, Roberty N.C., de Moraes M.B., Prazeres G.M., Hill C.E., Ribeiro S.J., de Souza G.G., Teixeira L., Moncores M, Bisch P.M // Artif. Organs. 2003. V. 27. P. 447-451.
- Fotiadis D., Liang Y., Filipek S., Saperstein D.A., Engel A., Palczewski K.// Nature. 2003 V. 421.
 P. 127-128.
- 6. Alzari P.M., Lascombe M.B., Polyak R. // Annu. Rev. Immunol. 1988. V.6. P.555-581.
- Tonevitsky A.G., Rakhmanova V.A., Agapov I.I., Shamshiev A.T., Usacheva E.A., Prokoph'ev S.A., Denisenko O.N., Alekseev Yu.O., Pfueller U. // Immunol. Lett. 1995. V. 44 P. 31-34.
- Tonevitsky A.G., Zhukova O.S., Mirimanova N.V., Omelyanenko V.G., Timofeeva N.V., Bergelson L.D. // FEBS Lett. 1990. V. 264. P. 249-252.
- Tonevitsky, A.G., Agapov, I.I., Temiakov, D.E., Moisenovich, M.M., Maluchenko, N.V., Solopova, O.S., Wurzner, G., Pfueller, U.// Arzneimittelforschung/Drug research. 1999. V. 49. P. 970-975.
- Lyubchenko Y. L., Gall A. A., Shlyakhtenko L. S., Harrington R. E., Jacobs B. L., Oden P. I., Lindsay S. M.//, J. Biomol. Struct. & Dyn. 1992. V. 10. P. 589-606.
- 11. Малюченко Н.В., Агапов Н.В., Тоневицкий А.Г., Мойсенович М.М, Савватеев М.Н., Тоневицкий Е.А., Быков В.А., Кирпичников М.П.// Биофизика. 2004. готовится к печати

Малюченко Н.В., Тоневицкий А.Г., Савватеев М.Н., Быков В.А., Мойсенович М.М., Агапов И.И.,

Козловская Н.В., Архипова В.С., Егорова С.Г., Кирпичников М.П. // Биофизика. 2003. V. 48. P. 830-836.