Детекция иммунных комплексов с помощью атомно-силовой микроскопии

Н.В. Малюченко^{1*}, И.И. Агапов¹, А.Г. Тоневицкий¹, М.М Мойсенович¹, М.Н.

Савватеев², Е.А. Тоневицкий², 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>

²*НТ-МДТ, НИИ физических проблем, 124482, Москва, Зеленоград, кор. 317 А, РО 158, факс* (095)5356410, электронная почта: <u>spm@ntmdt.ru</u>; <u>http://www.ntmdt.ru</u>

РЕЗЮМЕ

В настоящей работе методом атомно-силовой микроскопии детектировали образование комплексов иммуноглобулинов с ковалетно присоединенными к подложке лигандами. Использовали две системы; в первой, на слюду иммобилизовали белки массой 60 кДа, имеющие только один участок связывания с антителами. В другой системе изучали связывание IgG человека с иммобилизованными на подложку поликлональными антителами. В обеих системах при внесении специфичных антител обнаруживали появление комплексов с антигеном, в контроле образование комплексов не наблюдали. Разработанный способ детекции иммунных комплексов с помощью прямой визуализации методом атомно-силовой микроскопии предполагается использовать для создания современных диагностических систем.

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

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

^{*}Адресат для корреспонденции и запросов оттисков

введение

Детекция специфического взаимодействия антиген-антитело служит основой создания различных диагностических систем. Несмотря на существующее огромное разнообразие методов детекции патогенов или антител к ним, остается актуальной проблема быстрой и высокочувствительной диагностики. К основным параметрам, характеризующим эффективность диагностических систем можно отнести следующие: 1) скорость анализа; 2) чувствительность; 3) селективность; 4) возможность одновременного анализа нескольких патологий; 5) стоимость метода.

Использование атомно-силовой микроскопии (АСМ) открывает огромные возможности в данной области, поскольку метод позволяет за относительно небольшое время – минуты - получить изображение поверхности образца с разрешением порядка [1-2]. нескольких нанометров Кроме того, АСМ чувствительна к силам межмолекулярного взаимодействия, находящихся в диапазоне пиконьютонов [3-4]. Такие возможности АСМ позволяют развивать высокоэффективные методы детекции комплексов антиген-антитело. К преимуществам АСМ также относится прямая визуализация объектов в реальном времени и отсутствие необходимости вводить метки в образец или фиксировать его.

В данной работе мы анализировали в двух различных системах образование комплексов IgG с лигандом, ковалетно иммобилизованным на подложке. Были отработаны способы отсечения фоновых значений и визуализации сформировавшихся комплексов на подложке. И в той и другой системе, мы обнаруживали образование специфичных комплексов; в контрольных образцах неспецифическое связывание не наблюдали. Данный способ визуализации комплексов антиген-антитело методом атомно-силовой микроскопии планируется использовать для разработки современных диагностических систем.

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 [5]. Кроличьи антивидовые поликлональные антитела против иммуноглобулинов человека, а также коньюгат данных антител с пероксидазой были приобретены в фирме ИМТЕК (Россия). Рицин и вискумин получали по описанным ранее методикам [6] и [7] соответственно.

Приготовление образцов для АСМ

Образцы свежеочищенной слюды помещали в эксикатор в присутствии APTES (3aminopropyl-triethoxysilane, FLUKA,) и DIPEA (N,N-Disopropylethylamine ACROS) и инкубировали в атмосфере аргона в течение 2 часов при комнатной температуре [8]. Затем проводили оценку качества слоя APTES полуконтактным методом ACM на воздухе. При необходимости проводили выравнивание слоя APTES, нагревая образцы при 120°C в течение часа. Образцы выдерживали в 1% глутаровом альдегиде в течение 15 минут, отмывали и затем вносили раствор первого белка в фосфатно-солевом буфере (Φ CE) на 15 минут. Концентрация первых белков составляла 6,7 x 10⁻⁴M: для антител 150 кДа - 100мкг/мл, для рицина и вискумина - 40 мкг/мл. Затем следовала отмывка раствором 0,5M Триса, необходимая для ингибирования активных групп, образующихся при взаимодействии APTES с глутаровым альдегидом. Оставшиеся места связывания, незаполненные первым белком блокировали 0,1% раствором БСА/ФСБ. После 45 минутной инкубации с БСА и отмывки ФСБ с 0,05% Tween и 50мМ лактозы (Φ CE-TЛ) вносили исследуемые образцы второго белка в концентрации 5x 10⁻⁶M: для IgG -1 мкг/мл и инкубировали в течение часа. После удаления несвязавшихся белков ФСБ-ТЛ, образцы отмывали водой, обдували сжатым воздухом и анализировали с помощью ACM полуконтактным методом на воздухе.

Исследования АСМ

Измерения макромолекул производили на зондовом микроскопе Solver P47H (NT-MDT, Mocква). Для получения высокого разрешения использовали приставку AA110 (NT-MDT) и зондовые датчики серии NSG11S (NT-MDT), типичный радиус кривизны острия которых был менее 10 нм. Перед сканированием образцы обдували сжатым воздухом. Величина начальной и рабочей амплитуд колебаний зонда была подобрана экспериментально ранее [9]. Сканирование проводили с частотой 1,8 Гц.

Для определения фоновых значений оценивали среднюю высоту изображений (Rmean) образцов с иммобилизованным первым белком до внесения лигандов с помощью приложения "Statistics" в программе управления микроскопом SMENA8.45 (NT-MDT).

$$R mean = \frac{l}{N_x N_y} \sum_{i=1}^{N_x} \sum_{j=1}^{N_y} Z_{ij}$$

Для обсчета мы выбирали полный размер скана (512x512 точек). Затем определяли границы значений фоновых высот (p<0,05) и проводили линию отсечения фона по верхней границе доверительного интервала. При анализе опытных и контрольных образцов (после внесения лиганда) частицы, имеющие высоту выше верхней границы фоновых значений, рассматривали как значимые объекты. Проводили оценку геометрических параметров таких частиц с помощью программы «Grain analysis», разработанной фирмой NT-MDT для статистической обработки изображения поверхности. Оценивали длину, высоту и эффективный размер молекулы в объеме XYZ ($^3\sqrt{V}$) после отсечения верхней границы области высот фона. Сопоставляли данные параметры с размерами этих же частиц, нанесенных на чистую слюду.

где Nx Ny – количество точек по оси Хи У

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящая работа направлена на отработку метода анализа образующихся специфичных комплексов в условиях, когда одна из составляющих комплекса иммобилизована на твердой подложке. Для решения данной задачи был применен «полуконтактный» («прерывисто-контактный») метод атомно-силовой микроскопии [10]. В предыдущих работах нами были подобраны такие условия сканирования, которые позволили отчетливо визуализировать структурные детали белковых молекул с латеральным разрешением 7-8 нм [9,11].

Для стабильной иммобилизации белка на подложке мы использовали метод ковалентной пришивки [8]. Было показано, что белки остаются на подложке и после жесткой обработки образцов 1% SDS (данные не приводятся). При этом ковалетно присоединенные белки остаются активны в отношении взаимодействия с антителами, как было продемонстрировано с помощью иммуноферментного анализа на слюде.

В исследованиях использовали две системы. В одной системе, в качестве первого слоя наносили антиген небольшой молекулярной массы- 60 кДа, имеющий только один участок связывания для вносимых моноклональных антител. Антигенами служили растительные токсины – вискумин и рицин. Это два гомологичных белка, принадлежащих семейству рибосом-инактивирующих белков II типа [12]. Для изучения специфичного взаимодействия использовали моноклональные антитела к вискумину – TA5 (изотип IgG1), которые не взаимодействовали с рицином [5]. В другой системе в качестве первой компоненты вносили поликлональные антитела к человеческим иммуноглобулинам (поли-АЧ), а второй - иммуноглобулины человека IgG. Данная система предполагала более сложное взаимодействие между белками, поскольку поли-АЧ обладают различными аффинностями и специфичностями к лиганду. Кроме того, в этой системе могли образовываться комплексы с

5

присоединенными двумя молекулами IgG за счет двуцентрового связывания с лигандом.

После ковалентной пришивки первого белка следовала процедура внесения бычьего сывороточного альбумина, которая способствовала ингибированию свободных мест связывания и частичному выравниванию слоя. На рисунке 1 продемонстрированы изображения сканированных площадей, размером 500х500 нм².



Рисунок 1. АСМ-топография (500 x 500 нм²⁾ взаимодействия моноклональных антител TA5 с вискумином и рицином. Слева (A,B) - АСМ-топография иммобилизованного на слюде лиганда с 0,1%БСА, справа (Б,Г) – те же образцы после внесения TA5. Стрелками отмечены некоторые иммунные комплексы. Концентрации вискумина и рицина на слюде 6,7 x 10⁻⁴M, а вносимых TA5 - 5x10⁻⁶ М. Подробный протокол приготовления образцов см. "Материалы и методы".

При внесении TA5 антител к рицину топография распределения частиц практически не меняется по сравнению с исходным образцом (1В и Г). При добавлении TA5 к вискумину мы визуализировали частицы, высота которых превышала фон (1Б). Более подробное описание процедуры отсечения фоновых значений см. в "Материалах и методах". Данные частицы рассматривали детально на площади размером 110 х110 нм² (рис 2А). Высота частицы от уровня фона составляет 2 нм, эффективный размер 5-6 нм и длина 18-22 нм (рис 2Б).



Рисунок 2. АСМ-топография (110 x 110 нм²) антител ТА5 в составе комплекса и на чистой слюде. А антитела ТА5 добавлены к ковалентно пришитому вискумину; Б - вычитание фоновых значений рисунка А (см. объяснения в тексте); В - топография ТА5 антител, нанесенных на чистую слюду. Концентрации вискумина на слюде 6,7 х 10⁻⁴М, ТА5 - 5х10⁻⁶

Ранее с помощью АСМ были определены размеры и структура антител ТА5, нанесенных на чистую слюду: длина составляла 19 нм, эффективный размер 5 нм, высота около 2 нм. (рис. 2В) [9]. Таким образом, частицы, которые мы наблюдаем при внесении к вискумину, были сопоставимы по размерам антителам ТА5, нанесенным на чистую слюду. Наличие частиц, соответствующих второй компоненте комплекса, говорит об образовании комплексов между вискумином и антителами ТА5. При добавлении антител ТА5 к контрольному белку –рицину - мы не визуализировали образование комплексов (1В,Г).

Далее мы анализировали образование комплекса IgG с иммобилизованным лигандом, который был представлен поликлональными антителами. Несмотря на то, что было взято такое же количество белка для ковалентной пришивки, что и в первой системе (6,7 х 10⁻⁴M), поли-АЧ образуют более высокий и сложный матрикс (рис 3A).



Рисунок 3. АСМ-топография (500 х 500 нм²⁾ взаимодействия иммуноглобулинов человека с

иммобилизованными лигандами: (B) - с поликлональными антителами, (E) - с контрольными антителами TA5.

- (А, Б) топография иммобилизованных поли-АЧ до и после вычитания фона
- (В, Г) топография образца с IgG человека до и после вычитания фона
- (Д, Е) проверка специфичного взаимодействия IgG человека с контрольными антителами.

Концентрация белка, иммобилизованного на слюде 6,7 х 10^{-4} M, а вносимых IgG - 5х 10^{-6} M

При сопоставлении высот образующегося монослоя при ковалентной посадке было обнаружено, что отклонение от среднего значения фона в первой системе составляло около 0,7 нм, а во второй достигало 2,5 нм. При внесении в данную систему человеческих IgG мы визуализировали частицы, высота которых превышает уровень фона (рис 3В, Г). Видно, что частицы разделяются на более крупные и мелкие. При более детальном рассмотрении было выявлено, что высота "крупных" объектов 4-5 нм и длина 50 нм. Размеры данных частиц примерно в два раза превышают размер изолированных IgG, измеренный на чистой слюде [9]. Скорее всего, это ассоциаты молекул IgG, которые могут образовываться на поли-АЧ вследствие двухвалентного связывания с первыми антителами. Другая популяция частиц, имеющих меньшие размеры (длина порядка 20 нм и высота 2 нм), видимо, относятся к одиночным молекулам IgG (рис 3 В,Г). Специфичность взаимодействия проверяли на контрольных образцах, когда в качестве первого слоя наносили моноклональные антитела TA5, инертные к человеческим иммуноглобулинам. При добавлении человеческих иммуноглобулинов IgG к TA5 высота слоя и топография распределения частиц существенно не менялась (рис 3Д,Е).

Данная работа демонстрирует возможность использования ACM для анализа образования комплексов между антигеном и антителом. О преимуществах ACM скорости и чувствительности, уже говорилось выше. Хотелось бы отметить, что в настоящий момент активно развиваются методы адресного позиционирования большого числа различных молекул на микроподложках для создания диагностических чипов. Сочетание ACM и использование таких чипов возможно послужит созданию такого метода диагностики, который в считанные минуты позволит проанализировать большое количество информации.

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:

- 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.
- Giocondi M.C., Milhiet P.E., Lesniewska E., Le Grimellec C. // Med. Sci. (Paris). 2003 V.
 19. P. 92-99.
- 4. Allison D.P., Hinterdorfer P., Han W. // Curr. Opin. Biotechnol. 2002. V. 13. P. 47-51.
- 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.
- 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.
- 10. Paulo S.A., Garcia R.// Biophys. J. 2000. V. 78. P. 1599-1605.
- Savvateev M.N., Kozlovskaya N.V., Moisenovich M.M., Tonevitsky A.G., Agapov I.I., Maluchenko N.V., Bykov V.A., Kirpichnikov M.P. // AIP Conference proceedings. 2003. V. 696. P. 137-140.
- 12. Barbieri L., Battelli M.G., Stirpe F.// Biochim. Biophys. Acta. 1993. V. 1154. P. 237-282.