УДК 616-097.1/3-076 + 612.118.221.2

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ АНТИГЕН-АНТИТЕЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНФОКАЛЬНОЙ ЛАЗЕРНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ

¹Колотьева Н.А., ¹Гильмиярова Ф.Н., ²Тимченко П.Е., ²Тимченко Е.В., ³Рыскина Е.А.¹ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Самара, e-mail: bio-sam@yandex.ru;²Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева
(Самарский университет), Самара;³ФГБОУ ВПО Российский университет дружбы России, Москва

В литературе отсутствуют данные об использовании конфокальной лазерной сканирующей микроскопии для исследования взаимодействия группоспецифических антигенов с антителами. Цель исследования – визуализация и количественная оценка влияния этанола на специфические белок-лигандные взаимодействия с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Объектом исследования являлась молекулярная модель АВ0 системы. Этанол по-разному влияет на межмолекулярные взаимодействия: антиген А с терминальным N-ацетилгалактозамином показывает большую устойчивость к действию малых молекул, чем антиген В с терминальным моносахаридом D-галактозой, что подтверждает ранее проведенные эксперименты. Таким образом, использование лазерной сканирующей конфокальной микроскопии позволило визуализировать белок-белковые комплексы и дало возможность количественно оценить характер и действие биологически активного метаболита на гликопротеины А и В.

Ключевые слова: белок-белковое взаимодействие, конфокальная микроскопия, группа крови АВ0 системы, этанол

VISUALIZATION OF ANTIGEN-ANTIBODY INTERACTION USING CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY

¹Kolotyeva N.A., ¹Gilmiyarova F.N., ²Timchenko P.E., ²Timchenko E.V., ³Ryskina E.A.¹Samara State Medical University, Samara, e-mail: bio-sam@yandex.ru;²Samara University, Samara;³Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

There are no published data on the use of confocal laser scanning microscopy to study the interaction of group specific antigens with antibodies. The purpose of the study – the visualization and quantification of the effect of ethanol on the specific protein-ligand interaction using laser scanning confocal microscopy. The object of the study was molecular model AB0 system. Ethanol has a different effect on the intermolecular interactions: antigen A with a terminal N-acetylgalactosamine indicates greater resistance to the action of small molecules than the antigen in a terminal monosaccharide D-galactose, which confirms the earlier experiments. Thus, the use of laser scanning confocal microscopy allowed the visualization of protein-protein complexes, and has made it possible to quantify the nature and effect of the active metabolite on glycoproteins A and B.

Keywords: protein-protein interaction, confocal microscopy, blood group AB0 system, ethanol

С появлением вычислительных методов молекулярного моделирования, позволяющих построить математические модели биологического взаимодействия, возникла необходимость в создании дополняющих, экспериментальных технологий. В то же время, развитие прецизионных методов оптической диагностики и уникальные свойства лазеров, стали основой для появления нового научно-технологического направления, получившего название биологический имаджинг. Фундаментальной задачей биоимаджинга, является, получение изображений живых биологических объектов на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях. Характерной особенностью этих методов, является то, что они не нарушают относительное постоянство состава и свой-

ства внутренней среды, а также процессы взаимодействия между молекулами, как на уровне целого организма, так и на субклеточном уровне [1-5].

На сегодняшний день наиболее перспективными технологиями, позволяющими наблюдать процессы на уровне молекул, являются оптические методы, среди которых особое место занимает конфокальная микроскопия. В литературе отсутствуют данные об использовании конфокальной лазерной сканирующей микроскопии для исследования взаимодействия группоспецифических антигенов с антителами. Метод визуализации антиген-антительного взаимодействия, с использованием конфокальной микроскопии, имеет большой потенциал, чтобы стать в будущем стандартной техно-

логией в научных исследованиях. Разработка данного способа оптического биоимиджинга даст возможность получить новую информацию, применимую как в фундаментальных науках о жизни, так и для развития современных лигандных технологий.

Все изложенное выше определило цель и задачи дальнейшего исследования, а именно, визуализацию специфических белок-лигандных взаимодействий с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии с использованием молекулярных зондов (естественного метаболита этанола) с последующей количественной оценкой влияния.

Материалы и методы исследования

Визуализация белок-белкового взаимодействия осуществлялась при помощи экспериментального стенда, который был реализован на базе конфокального оптического микроскопа и лазерного комбайна фирмы ANDOR (скорость сканирования до 25 слоёв в секунду). На рис. 1 приведена блок-схема установки. Стенд обеспечивал два режима микросъемки: режим конфокальной микроскопии в видимом свете и режим лазерной флуоресценции. В первом случае в качестве источника излучения использовался широкополосный источник (галогеновая лампа), а во втором – лазерные излучатели мощностью 100 мВт на длинах волн 488 нм и 561 нм.

Рис. 1. Установка флуоресцентной конфокальной микроскопии: 1 – источник видимого света (галогеновая лампа), 2 – коллиматор, 3 – объект, 4 – объектив, 5 – поворотное зеркало, 6 – конфокальный сканирующий блок, 7 – блок фильтров, 8 – камера, 9 – компьютер, 10 – лазерный блок

В режиме конфокальной микроскопии свет от галогеновой лампы 1 (видимый диапазон) через блок фильтров поступает на систему фокусировки 2, которая фокусирует излучение на объекте 3. Прошедшее

через объект (рассеянное вперед) излучение собирается объективом (20х или 40х) 4 и через систему зеркал и призм 5 вводится в сканирующий конфокальный блок 6. Сканирующий конфокальный блок построен по принципу Нипкова [6]: вращающиеся диски с микродиафрагмами, реализующими конфокальный метод. Перемещение фокальной плоскости (выделение анализируемого слоя ткани) осуществляется за счет управляемого с компьютера пьезоэлектрического z-микросканера, с установленным на нем объектом исследования. Спектральная фильтрация излучения осуществляется в блоке 7, реализованном в виде системы сменных фильтров, установленных на вращающейся турели. Спектральная фильтрация позволяет повысить контрастность регистрируемого изображения. После блока 7 излучение вводится в камеру 8 (1024*1024, время экспозиции 40 мс-10 мин). Для снижения темновых токов (в среднем на 3 порядка) матрица камеры захлаживается до температуры – 75 °С.

В режиме флуоресценции галогеновая лампа выключена. Вместо неё используется либо 4х модульный блок лазеров 10 (в настоящей работе использовались каналы излучения с длинами волн 488 нм и 561 нм), либо ртутная лампа. В обоих случаях используется волоконный ввод 11, а мощность каждого источника независимо управляется с компьютера (с шагом 0,1 %). Фокусировка и согласование падающего излучения осуществляется в блоке 6 при помощи вращающегося диска с микролинзами, синхронизованного с диском Нипкова.

Следует отметить, что при использовании флуоресцентной конфокальной микроскопии для контроля клеток возникает принципиальная задача обработки, распознавания и анализа слабых оптических сигналов на фоне достаточно больших шумов, вызванных тем обстоятельством, что биологическая среда является многократно рассеивающей средой. Дополнительно осуществлялась обработка шумовых пикселей полученных микроснимков. Для уменьшения шума и увеличения контрастности микроснимков использовался пороговый фильтр с порогом порядка 5 % от максимальной интенсивности кадра и замены его на нулевой сигнал. Обработка отдельных шумовых пикселей осуществлялась в программной среде MathCad.

Объектом исследования являлась молекулярная модель АВ0 системы с последующим изучением влияния малой молекулы этанола на антиген-антительное взаимодействие. После подсчета количества эритроцитов на гематологическом анализаторе цельная кровь разводилась раствором FAX flow до примерного содержания 1×10^6 эритроцитов. Состав солевого раствора FAX flow: KH_2PO_4 – 0,02 %, Na_2HPO_4 – 0,21 %, NaCl – 0,8 %, KCl – 0,01 %, Na_2EDTA – 0,03 %, H_2O – 98,9 %. Перед постановкой реакции геммагглютинации 100 мкл эритроцитов инкубировали с 20 мкл этанола в конечной концентрации 0,03 мМ в течение 5 минут. После инкубации с биологически активными веществами проводили реакцию антиген-антитело со специфичными моноклональными конъюгированными антителами Blood group A antigen (Z2A), Blood group B antigen (89-F), меченными флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) фирмы Santa Cruz biotechnology, Inc. (США) в полистироловой пробирке в течение 20 минут в темном месте. Полученный комплекс антиген-антитело тщательно перемешивали на вортексе, к данной смеси добавляли 2 мл раство-

ра FAX flow и проводили регистрацию изображений в модельной среде. Для анализа использовали конъюгированные маркером антитела и разведенные эритроциты, раздельно инкубированные с раствором этанола в разведении 1:5. В качестве контроля использовали разведенные эритроциты без добавления биологически активных веществ.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе проведенного исследования нами получены электронные микрофотографии в режиме основного рассеивания, отражающие связывание моноклональных антител, меченных ФИТЦ, с антигенами А и В эритроцитов А(II) и В(III) группы крови. При взаимодействии антигенов А с антителами образуются сплош-

ные, большие конгломераты эритроцитов, состоящие в основном, из нескольких десятков эритроцитов. Значительно реже встречаются соединения из 10 и менее эритроцитов (рис. 2, А).

По сравнению с антигеном А, антиген В образует меньше комплексов с антителом, как по количеству, так и по величине. На микроснимках эритроцитов, несущих антиген В, преобладают одиночные эритроциты, число которых кажется немного большим, чем у лиц А(II) группы крови (рис. 2, Б). Данный факт можно интерпретировать тем, что у лиц с В(III) группой крови большее количество эритроцитов в цельной крови по сравнению с генеральной совокупностью [7].

А

Б

Рис. 2. А – Электронная микрофотография взаимодействия эритроцитов А(II) группы крови с моноклональными антителами в режиме основного рассеивания; Б – Электронная микрофотография взаимодействия эритроцитов В(III) группы крови с моноклональными антителами в режиме основного рассеивания

А

Б

Рис. 3. Микрофотографии образования комплексов антиген-антитело эритроциты А(II) группы крови в режиме флуоресценции: А – эритроциты А(II) группы крови (контрольный образец); Б – эритроциты А(II) группы крови после инкубации с этанолом

А

Б

Рис. 4. Микрофотографии образования комплексов антиген-антитело эритроциты В(III) группы крови в режиме флуоресценции: А – эритроциты В(III) группы крови (контрольный образец); Б – эритроциты В(III) группы крови после инкубации с этанолом

А

Б

В

Г

Рис. 5. Диаграммы пространственного распределения интенсивности флуоресценции в комплексах антиген – антитело: А – контрольные эритроциты А(II) группы крови; Б – эритроциты А(II) группы крови после инкубации с этанолом; В – контрольные эритроциты В(III) группы крови; Г – эритроциты В(III) группы крови после инкубации с этанолом

Рис. 6. Диаграммы размаха интенсивности флуоресценции антигенов А и В до (контроль) и после (опыт) действия этанола

Образование большого числа комплексов эритроцитов А(II) группы крови с моноклональными антителами, принадлежащие к иммуноглобулинам класса М, может быть объяснено высокой авидностью антител, которая характеризует общую стабильность комплекса антиген-антитело, а также особенностями пространственной структуры антигена А. Как известно, авидность описывает силу кооперативных аффинных взаимодействий антиген-антитело, по-видимому, антиген А обладает большим сродством к моноклональным антителам, чем антиген В.

Данные конфокальной микроскопии в режиме флуоресценции показывают, что после инкубации с этанолом, количество и размер антиген-антительных комплексов, образованных антигеном А, незначительно увеличилось (рис. 3). Наблюдается объективное увеличение числа агглютинатов, образованных антигеном В В(III) группы крови (рис. 4).

Полученные результаты пространственного распределения интенсивности флуоресценции эритроцитов А(II) и В(III) группы крови, выявили однонаправленное действие этанола на интенсивность флуо-

ресценции комплексов антиген – антитело (рис. 5).

Диаграммы интенсивности флуоресценции комплексов антиген-антитело системы АВ0, демонстрируют небольшие изменения пиков флуоресценции для антигена А второй группы крови и значительное увеличение пиков флуоресценции для антигена В третьей группы крови, по сравнению с контрольными образцами.

Для того чтобы выявить молекулярные особенности белок-белковых взаимодействий АВ0 системы мы оценили диаграммы размаха интенсивности флуоресценции антигенов А и В до (контроль) и после (опыт) действия этанола. После инкубации с этанолом количество антиген-антительных комплексов антигена А увеличилось незначительно, а антигена В на 15 % и составило соответственно $137,2 \pm 18,3$ и $182,3 \pm 18,8$ (рис. 6). Значения интенсивности флуоресценции в контрольных образцах антигена А было равно $130,8 \pm 13,8$, антигена В $155,1 \pm 15,6$. Полученные микрофотографии и диаграммы пространственного распределения интенсивности флуоресценции в комплексах антиген – антитело, а также количественная оценка интенсивности флуоресценции, позволяет сделать вывод, что

этанол влияет на межмолекулярные взаимодействия антигенов с антителами. Серия ранее проведенных экспериментов отчетливо показала влияние лактата и других метаболитов, таких как пируват, на белок-лигандные взаимодействия антигена с антителом АВ0-системы, что является результатом суммарных модификаций, вызванных этими метаболитами [8-10].

Заключение

Таким образом, использование лазерной сканирующей конфокальной микроскопии позволило визуализировать белок-белковые комплексы и дало возможность количественно оценить характер и действие биологически активного метаболита на антигены А и В группы крови АВ0. Этанол по-разному влияет на специфические белок-лигандные взаимодействия: антиген А с терминальным N-ацетилгалактозамином показывает большую устойчивость к действию малых молекул, чем антиген В с терминальным моносахаридом D-галактозой, что подтверждает ранее проведенные эксперименты. Оптический биоимиджинг позволяет глубже и более детально взглянуть на тонкий мир специфических взаимодействий. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования естественных интермедиатов, в частности, лактата, молекулярного зонда и перспективности использования гликопротеинов А и В, презентированных на мембране эритроцитов, в качестве молекулярной модели для изучения и визуализации межмолекулярных взаимодействий *in vitro*.

Список литературы

1. Копицын Д.С. Методы оптического биоимиджинга в исследованиях онкологических заболеваний / Д.С. Копицын, А.В. Бескоровайный, М.С. Котелев, А.А. Новиков, Е.В. Иванов, Е.В. Винокуров // Башкирский химический журнал. – 2013. – Т. 20. – № 4. – С. 64–71.
2. Artemova N. Formation of supramolecular structures of a native-like protein in the presence of amphiphilic peptides: Variations in aggregate morphology / N. Artemova, V. Stein-Margolina, E. Smirnova, B. Gurvits // FEBS Letters. – 2012. – V. 586. – N. 2. – P. 186–190.
3. Riezzo I. Confocal laser scanning microscope, Raman microscopy and Western blotting to evaluate inflammatory response after myocardial infarction / I. Riezzo, S. Cantatore, D. DeCarlo, C. Fiore // Curr Vasc Pharmacol – 2015. – 13(1). – P. 78–90.
4. Roberts M.S. Eur Non-invasive imaging of skin physiology and percutaneous penetration using fluorescence spectral and lifetime imaging with multiphoton and confocal microscopy / M.S. Roberts, Y. Dancik, T.W. Prow, C.A. Thorling // J Pharm Biopharm. – 2011. – 77(3). – P. 469–88.
5. Barizuddin S. Highly specific and rapid immuno-fluorescent visualization and detection of E. coli O104:H4 with protein-A coated magnetic beads based LST-MUG assay / S. Barizuddin, B. Balakrishnan, R.C. Stringer, M. Dweik // J Microbiol Methods. – 2015. – V. 115. – P. 27–33.
6. Sheppard C.J. The theory of the direct-view confocal microscope/ C.J. Sheppard, T. Wilson // J. Microsc., 1981. – 124. – p. 107–117.
7. Гильмиярова Ф.Н. Группы крови: биологическая вариабельность клеточного состава и метаболизма в норме и патологии / Ф.Н. Гильмиярова, В.М. Радомская, Н.И. Гергель, О.А. Гусякова, И.Ф. Сидорова // Москва. – 2007. – 490 с.
8. Gilmiyarova F. The predicted and experimentally confirmed role of the metabolic minor components in intermolecular interaction of the ABO system's antigens / BIT's 8th Annual International Congress of Antibodies, 2016, China.
9. Gilmiyarova F.N. The effect of Pyruvate on Antibody Interaction with Group-Specific Erythrocyte Antigens / F.N. Gilmiyarova, E.A. Shacnovich, V.M. Radomskaia, O.A. Gysiakova et.al. // Biomedical chemistry, 2014. – vol. 8. № 3. – P. 260–265.
10. Gilmiyarova F. Role of the Metabolic Minor Components in the Regulation of Intermolecular Interaction / Gilmiyarova F., Kolotyeva N., Radomskaia V., Gusiakova O., Gorbacheva I., Potekhina V. // Journal of Biosciences and Medicines, 2016. – 4. – p. 28–35.