

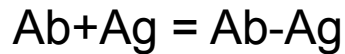
## ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛ С ВИРУСОМ ШАРКИ СЛИВЫ МЕТОДОМ АТОМНО- СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

И.В. Сафенкова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН*



# Взаимодействие антиген-антитело



$$K_d = [\text{Ab}] * [\text{Ag}] / [\text{Ab-Ag}]$$

$$d[\text{Ab-Ag}] / dt = k_{\text{on}} * [\text{Ab}] * [\text{Ag}]$$

$$k_{\text{on}} * [\text{Ab}] * [\text{Ag}] = k_{\text{off}} * [\text{Ab-Ag}]$$

$$d[\text{Ab-Ag}] / dt = k_{\text{off}} * [\text{Ab-Ag}]$$

$$K_d = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$$

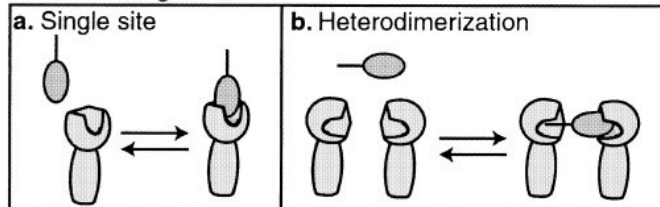
$$E = -RT \ln(K_d)$$

Ab - антитело      Ag - антиген

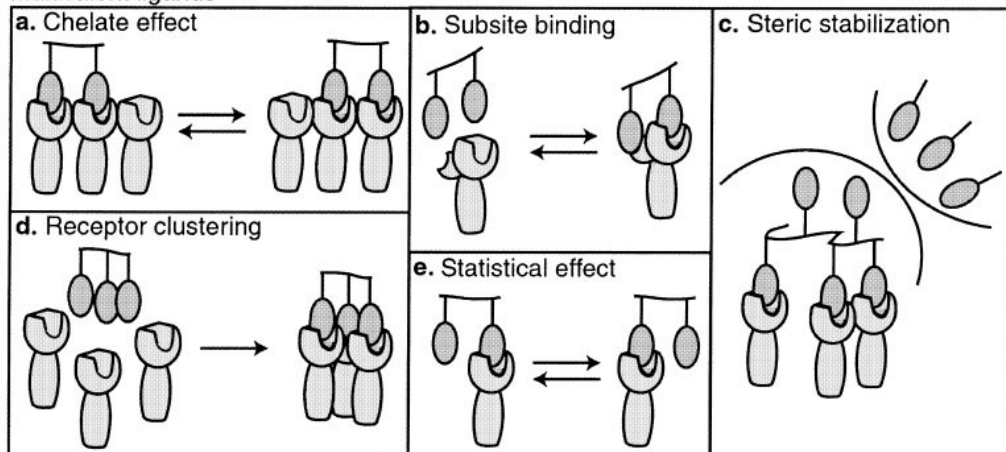
- равновесный диализ
- смещение полосы в нативном фореze
- физическое отделение (хроматография, центрифугирование) (Hardie and Van Regenmortal, 1975)
- РИА (Rodbard, 1971, 1974)
- твердофазный ИФА (Azimzadeh et al., 1992; Frankel and Gerhard, 1979)
- ELISA равновесная (Friguet et al., 1985; Friguet et al., 1989)
- изотермальная калориметрия
- SPR
- AFM

# Поливалентные взаимодействия

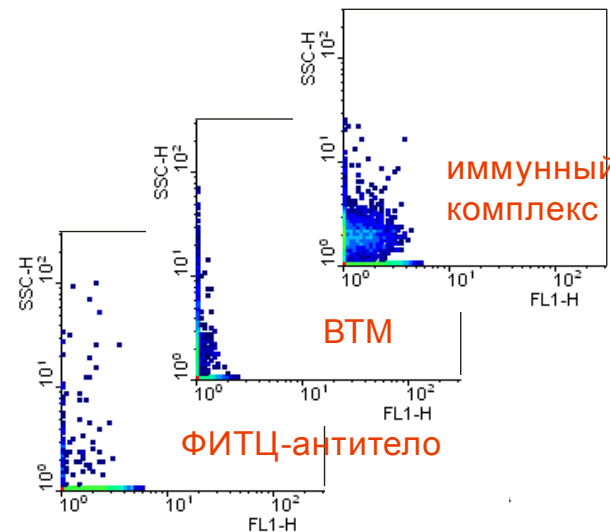
## Monovalent ligands



## Multivalent ligands



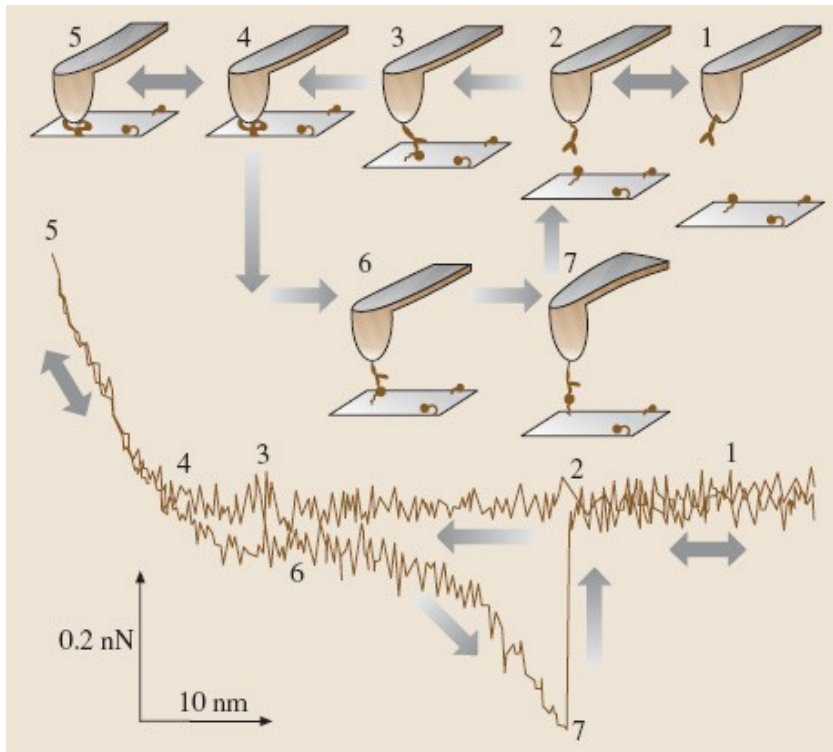
Gestwicki J.E. et al. J.AM.CHEM.SOC. 2002. 124, pp. 14922-14933



Взаимодействие BTM с ФИТЦ-меченными антителами на проточном цитофлуориметре

Характеристика единичных межмолекулярных взаимодействий бивалентного антитела с поливалентным вирусным антигеном

# Принцип измерения взаимодействия методом АСМ



$$k_{on} = t_{0.5}^{-1} N_A V_{eff}$$

$V_{eff}$  – эффективный объем  
иммобилизованного на зонд  
лиганда

Закон Гука  $F = -k \cdot d$

$k$  – коэффициент  
жесткости кантилевера

$$\tau(0) = 1/k_{off} \quad r = df/dt$$

$$\tau(0) = \tau_{osc} \exp(Eb/k_B T)$$

$$\tau(f) = \tau_{osc} \exp((Eb - fx)/k_B T)$$

$$f(r) = k_B T/x \ln((rx)/k_B T k_{off})$$

$$k_{off} = r_{F=0} x/k_B T$$

$\tau_{osc}$  – величина обратная  
частоте колебаний

$Eb$  – энергетический барьер  
диссоциации

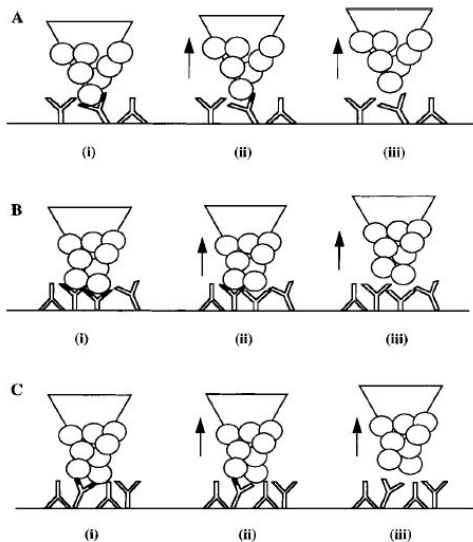
$x$  – расстояние от  
энергетического барьера до  
энергетического минимума



# Изучение белок-белковых взаимодействий методом ACM

| Ligand-receptor          | Fu (pN) |
|--------------------------|---------|
| Avidin-biotin            | 160 20  |
| Avidin-iminobiotin       | 85 10   |
| Streptavidin-biotin      | 257 25  |
| Avidin-desthiobiotin     | 94 10   |
| Streptavidin-iminobiotin | 135 15  |

1994: Moy V.T. et al. Science 266, pp. 257-259

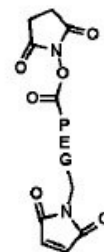


1997: Allen S. et al. Biochemistry. 36, pp. 7457-63

amino-functionalized  
cantilever



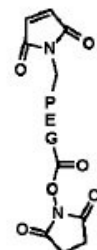
NHS-PEG-maleimide



GCN4(7P14P) peptide

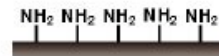


anti-GCN4 scFv  
with C-terminal Cys



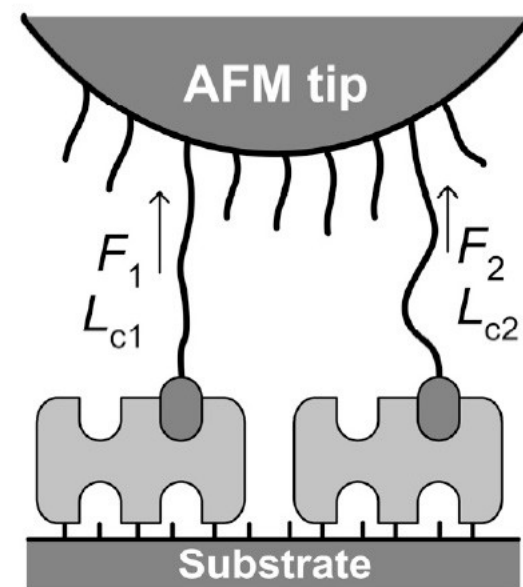
maleimide-PEG-NHS

amino-functionalized  
glass slide



Агтнген/антнтело -  
60-244 пН

(Dammer, Hegner et al. 1996), (Hinterdorfer, Baumgartner et al. 1996); (Stuart et al., 1995).



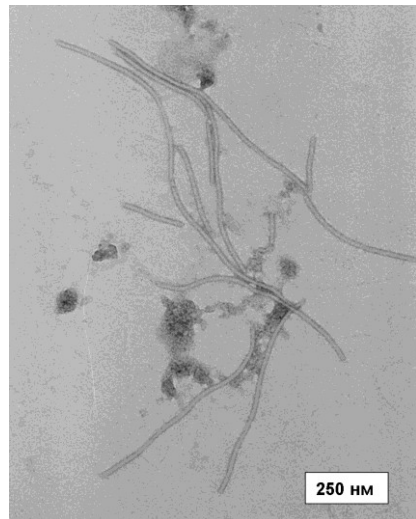
2007: Morfill J. et al. Biophysical Journal 93(10), pp. 3583-90

2008: Guo S. et al. Biophysical Journal 95(8), pp. 3964-76



# Участники взаимодействия

Антиген: вирус шарки сливы (ВШС)



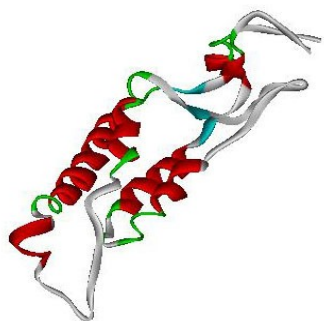
Структура вирусной частицы:

- длина 760 нм,
- диаметр 15-20 нм
- $M_r$  (субъединицы) = 36,4 kDa (330 а.о.)

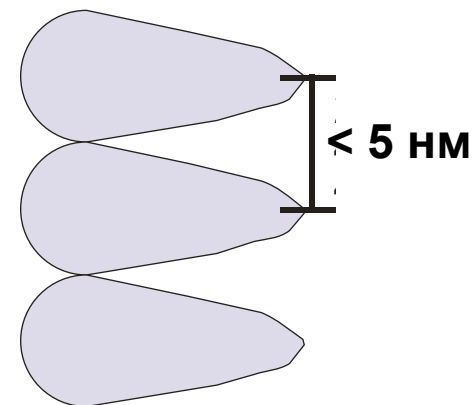
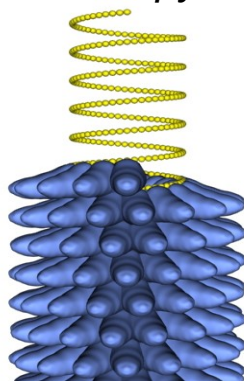


Субъединица вируса

Модель  
нуклеопротеинового  
комплекса вируса



> 2000

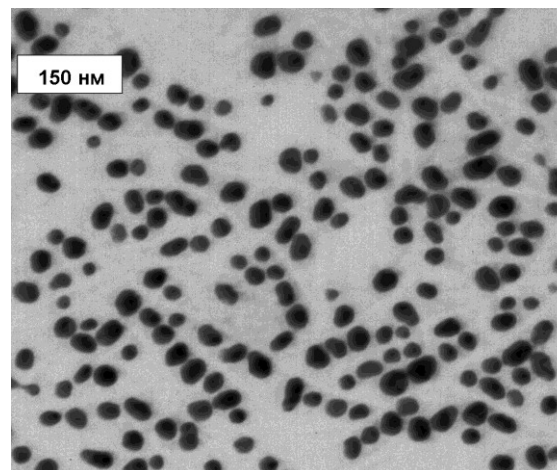


# Участники взаимодействия

моноклональные антитела (специфичные и неспецифичные),  
поливалентные конъюгаты антител с наночастицами коллоидного  
золота

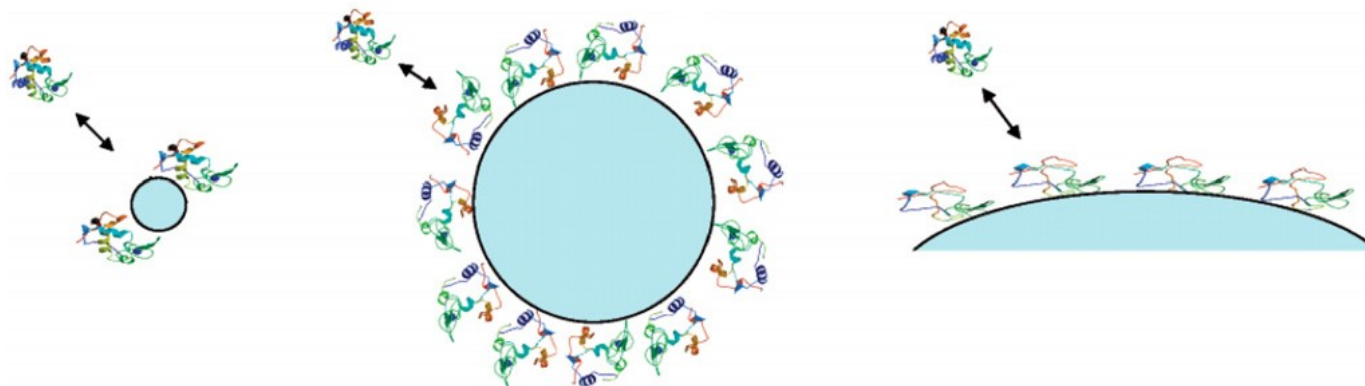


Антитела



Наночастицы коллоидного золота

Конъюгаты антител с наночастицами коллоидного золота





# Схема эксперимента

**Иммобилизация антител на кантилевер**

(специфичные к вирусу, неспецифичные к вирусу)



**Иммобилизация антигена на подложку** (вирус, БСА)

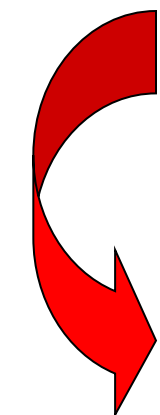
**Детекция вируса на воздухе**

(полуконтактный режим, кантилевер немодифицированный антителами)

**Детекция вируса в жидкости**

(полуконтактный режим, кантилевер немодифицированный антителами)

**Проверка способности вируса взаимодействовать с препаратом антител**  
(взаимодействие с конъюгатом антител и коллоидным золотом)



**Измерение взаимодействия в контактном режиме**  
(выбор мест взаимодействия по изображению, полученному в полуконтактном режиме)



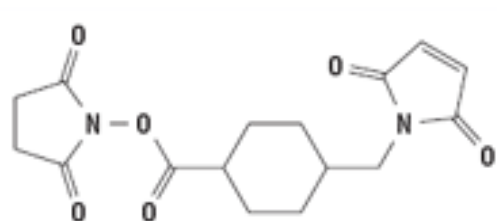
**Детекция специфического взаимодействия**  
(специфичные антитела/вирус)



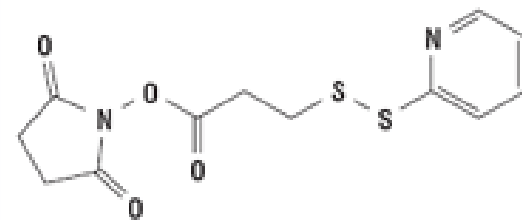
**Статистическая обработка**



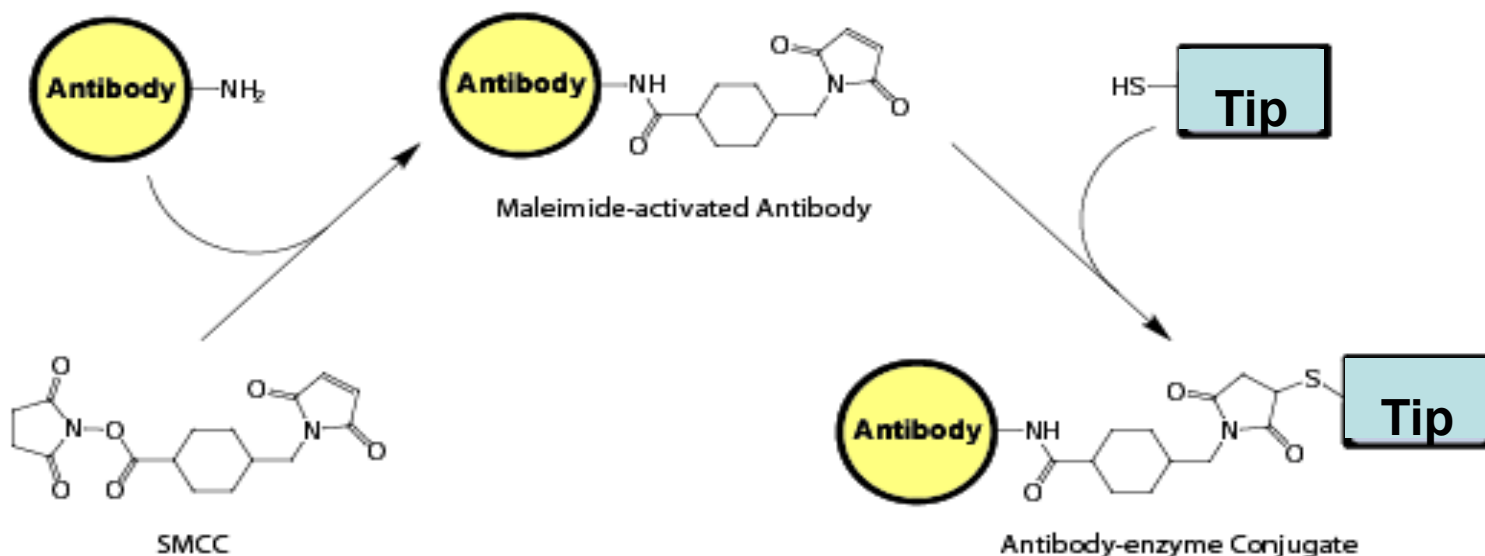
# Иммуобилизация антител на поверхность кантилевера



**SMCC**  
 M.W. 334.32  
 Spacer Arm 8.3 Å

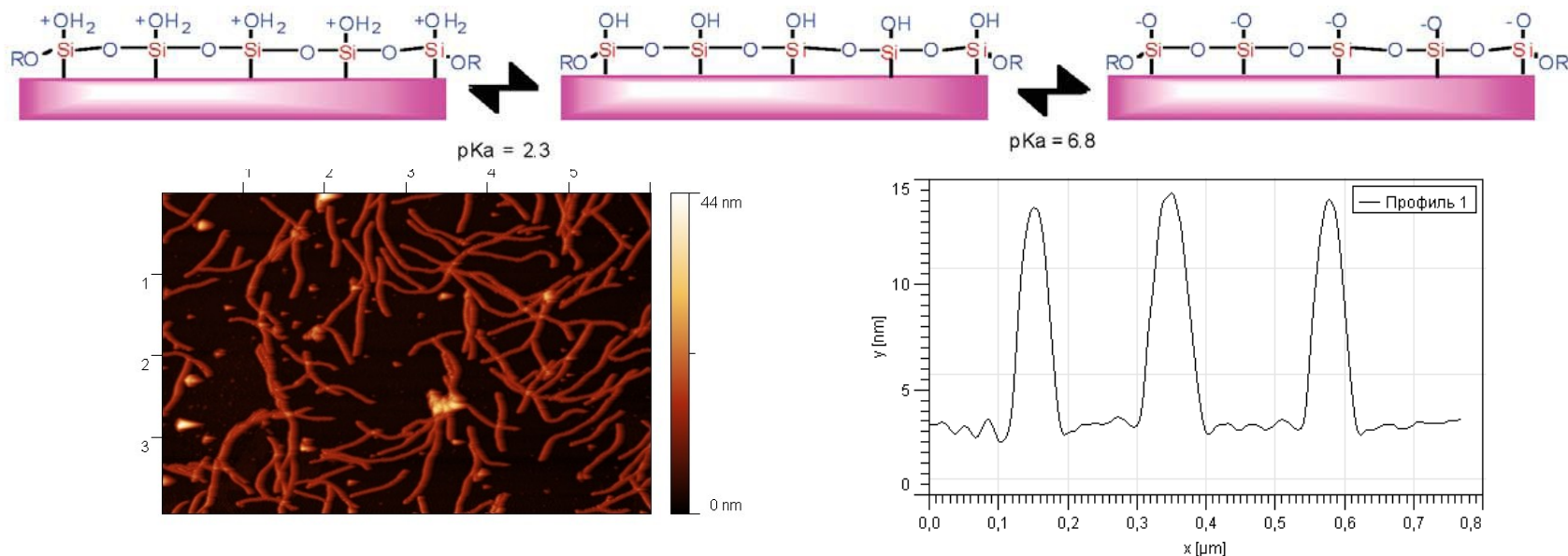


**SPDP**  
 M.W. 312.37  
 Spacer Arm 6.8 Å

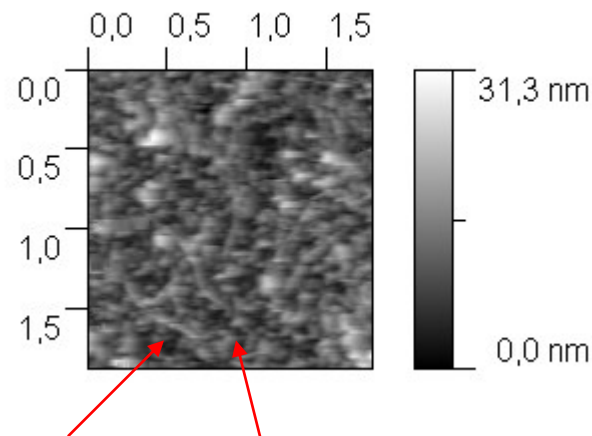
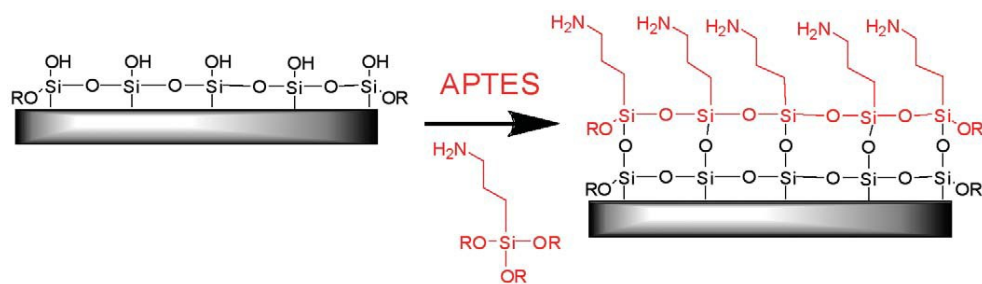


# Иммобилизация вируса на поверхность слюды

## I. Физическая адсорбция на поверхности слюды

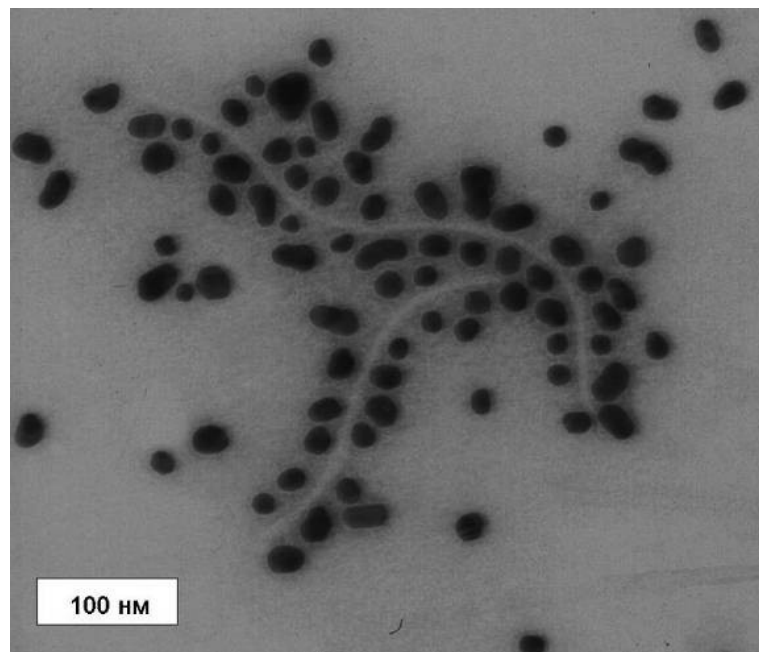
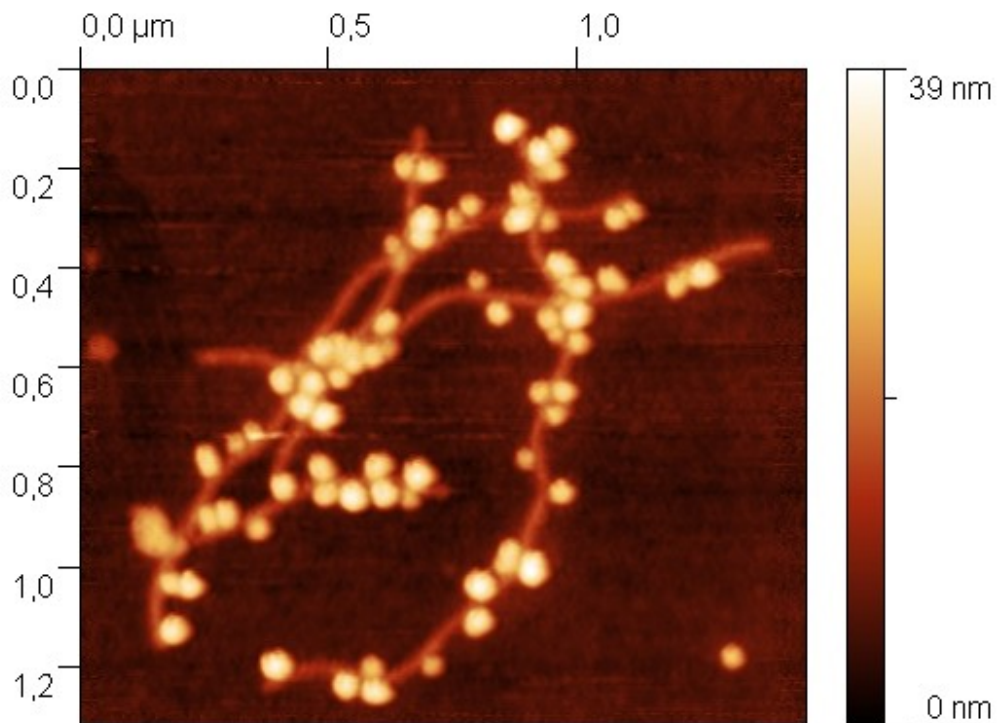


## II. Химическая модификация поверхности слюды, ковалентная связь





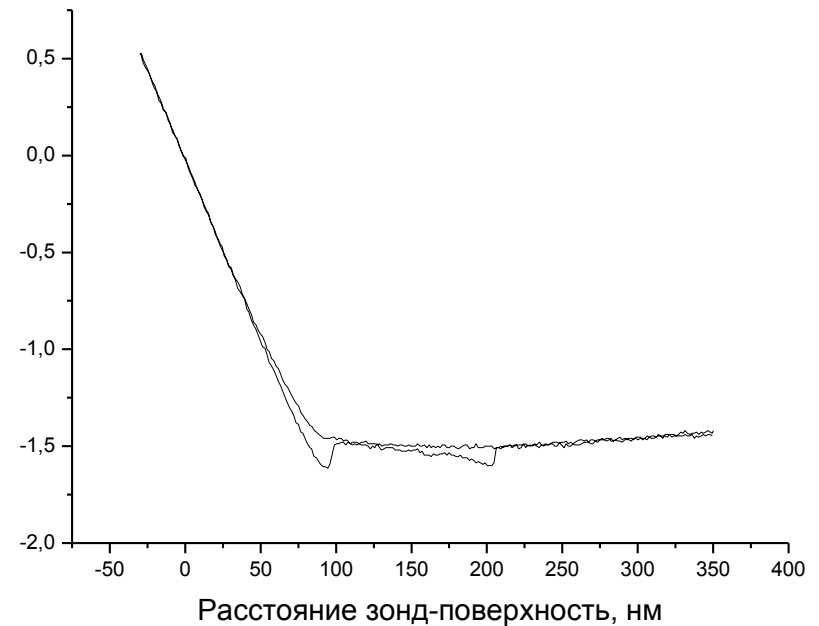
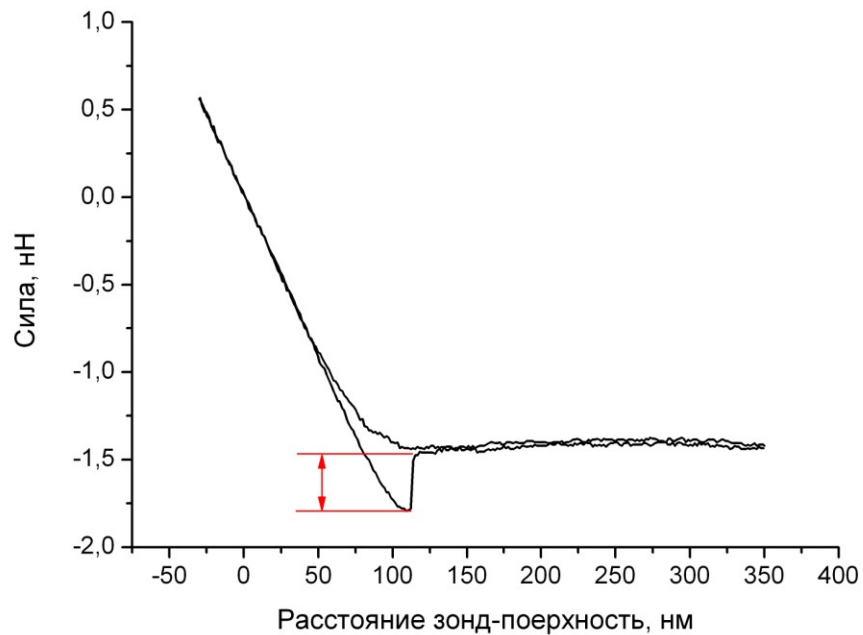
# Взаимодействие иммобилизованного вируса с конъюгатами наночастиц коллоидного золота и антителами



Изображение комплексов, образованных ВШС и конъюгатами моноклональных антител с коллоидным золотом



# Зависимости, полученные при специфических взаимодействиях

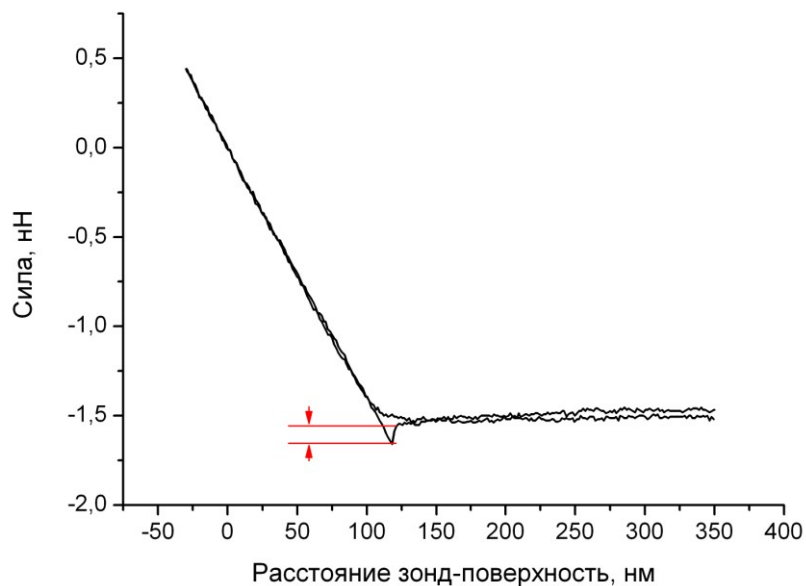


Высота вертикального участка пропорциональна  
величине силы взаимодействия антиген-антитело

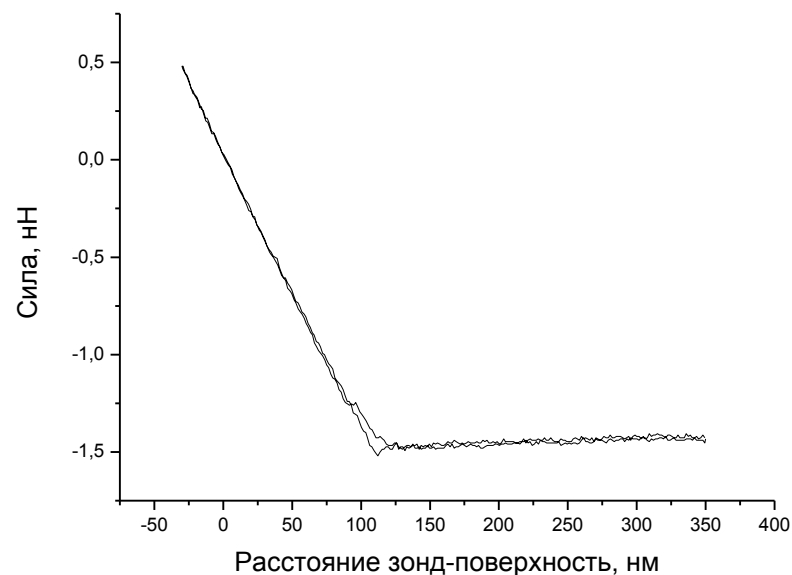


# Зависимости, полученные при неспецифических взаимодействиях

неспецифичные антитела/вирус



специфичные антитела/подложка



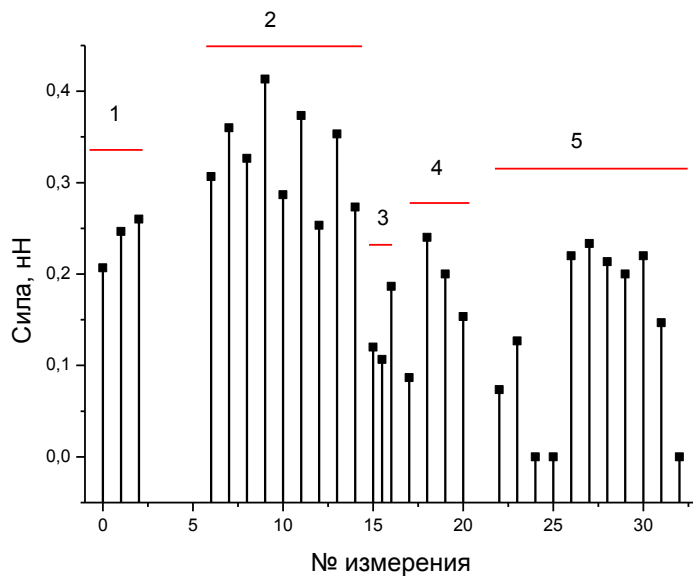
## Детекция неспецифического взаимодействия

- неспецифичные антитела/вирус
- неспецифичные антитела/БСА
- неспецифичные антитела/подложка

- специфичные антитела/подложка
- специфичные антитела/БСА



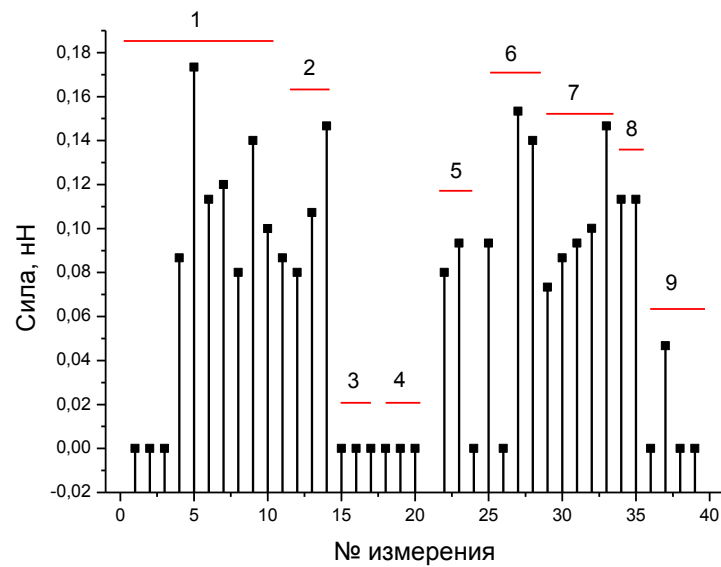
# Статистическая обработка результатов



Кантилевер со специфичными антителами, на слюде ВШС

| Mean, nN | Standard Deviation, nN | Min, nN | Max, nN |
|----------|------------------------|---------|---------|
| 0,229    | 0,090                  | 0,073   | 0,413   |

**229 90 nN**



Кантилевер с неспецифичными антителами, на слюде ВШС

| Mean, nN | Standard Deviation, nN | Min, nN | Max, nN |
|----------|------------------------|---------|---------|
| 0,107    | 0,030                  | 0,047   | 0,173   |

**107 30 nN**

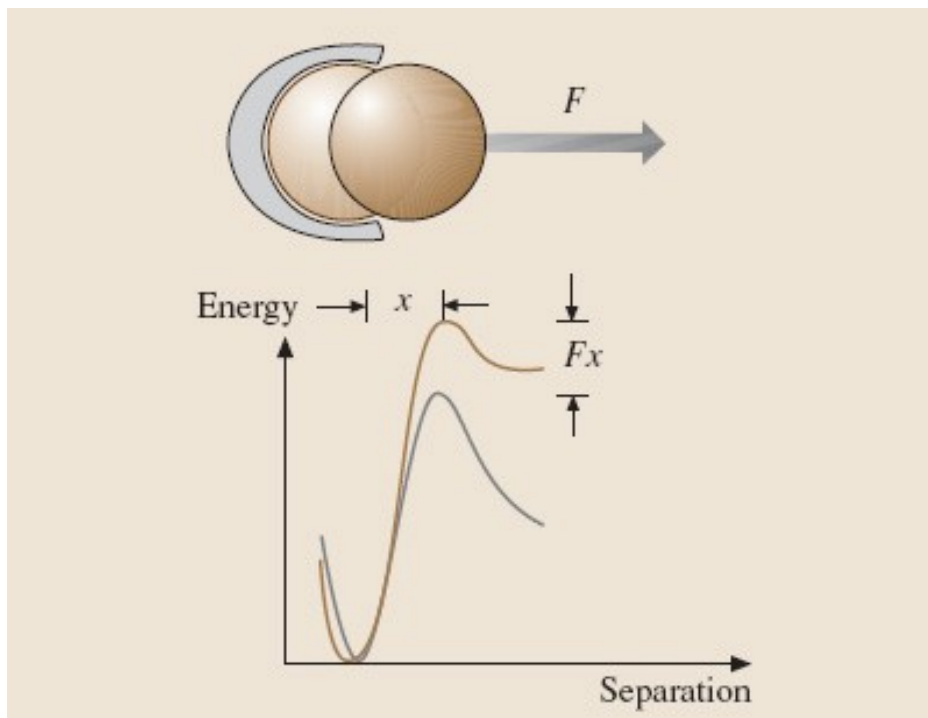


# Причины вариативности значений силы разрыва взаимодействий иммунного комплекса

1. Изменения в четвертичной структуре антитела/антигена
2. Различная ориентация антитела на зонде и антигена на поверхности
3. Множественные взаимодействия антиген-антитело



Различия в энергии, необходимой для достижения энергетического барьера



$$\tau(0) = \tau_{\text{osc}} \exp(\mathbf{Eb}/k_{\text{B}}T)$$

$$\tau(f) = \tau_{\text{osc}} \exp((\mathbf{Eb}-\mathbf{fx})/k_{\text{B}}T)$$

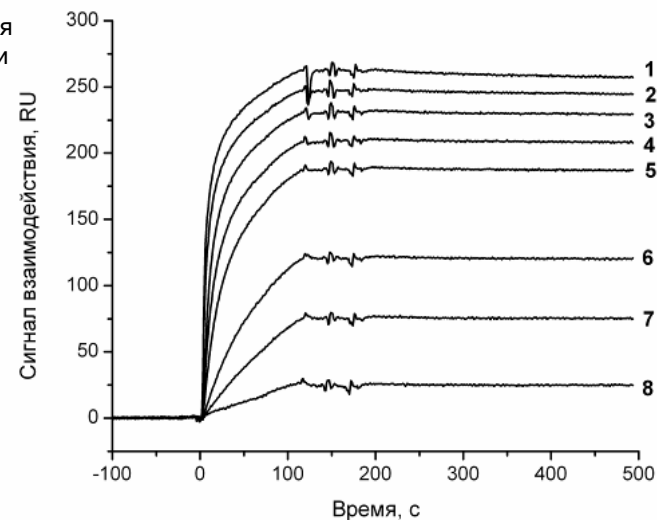
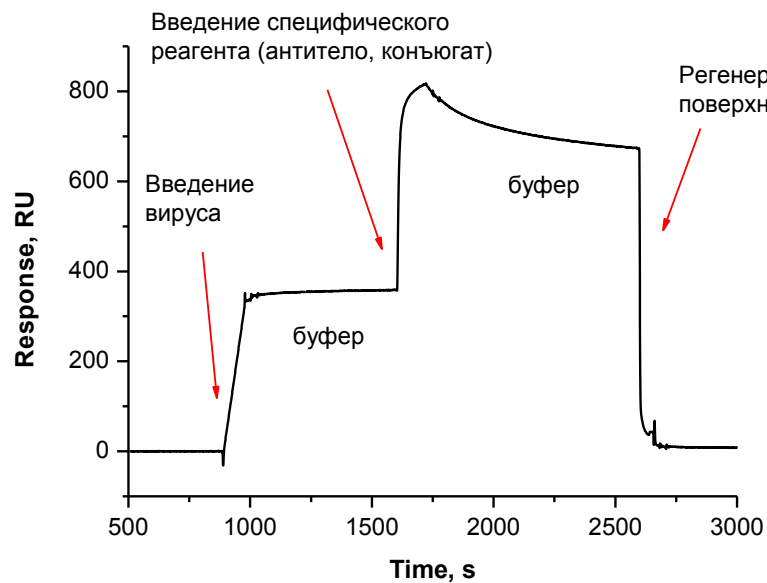
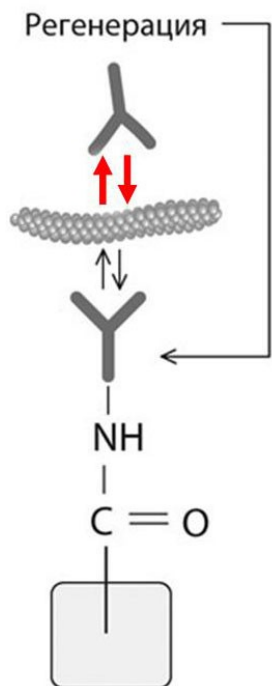
# Взаимодействие антитело/вирус в системе Biacore X



вирус



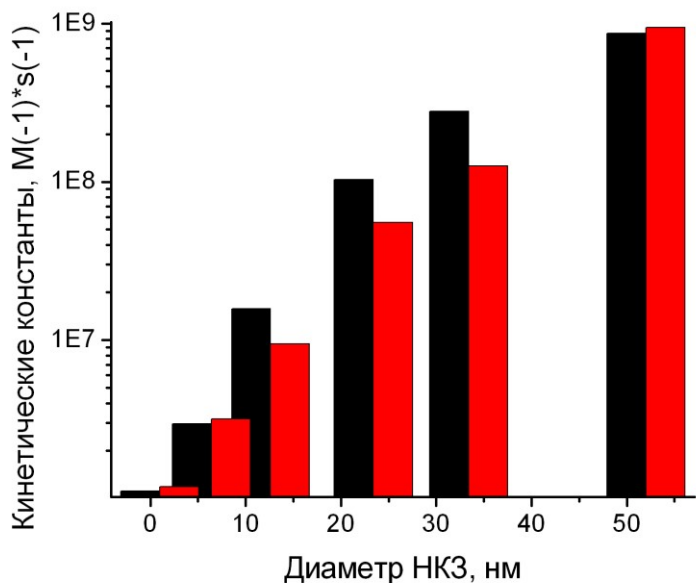
специфические  
антитела



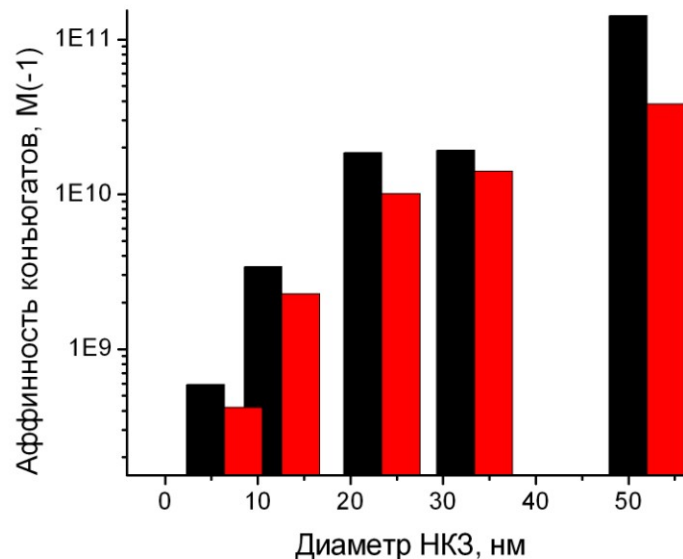
|                 | $K_a, M^{-1}$     | $K_d, M$             |
|-----------------|-------------------|----------------------|
| <i>Антитело</i> | $6,83 \cdot 10^7$ | $1,46 \cdot 10^{-8}$ |



Синтезированы конъюгаты моноклональных антител с наночастицами коллоидного золота с диаметрами в диапазоне от 5 до 60 нм



**А**



**Б**

Зависимость кинетических (А) и равновесных (Б) констант реакции взаимодействия ВШС и конъюгатов НКЗ с антителами (1D5B1 – красные столбцы, 2H2F6 – черные столбцы) от размера коллоидного носителя.

## Перспективы

**Предложенная методика для характеристики поливалентных взаимодействий с использованием метода АСМ может найти применение для оценки свойств конъюгатов антител, в частности – для сравнения конъюгатов разного состава.**

**Спасибо за внимание**