

Lietuvos
Respublikos
valstybinis
patentų biuras

(11) **LT 6905 B**

(51) Int. Cl. (2022.01):

C07K 16/44
C12P 21/00
G01N 33/532

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2020 539**
(22) Paraiškos padavimo data: **2020-07-24**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2022-01-25**
(45) Patento paskelbimo data: **2022-04-25**

(73) Patento savininkas:

Vilniaus universitetas, Universiteto g. 3, 01513 Vilnius, LT

(72) Išradėjas:

Saulius KLIMAŠAUSKAS, LT
Rasa RAKAUSKAITĖ, LT
Giedrė URBANAVIČIŪTĖ, LT
Rita LASICKIENĖ, LT
Martynas SIMANAVIČIUS, LT
Aurelija ŽVIRBLIENĖ, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Jurga PETNIŪNAITĖ, 51, AAA Law, A. Goštauto g. 40B, Verslo centras „Dvyniai“, LT-03163 Vilnius, LT

LT 6905 B

(54) Pavadinimas:

Antikūnai fotoaktyvių baltymų manipuliavimui

(57) Referatas:

Išradimas apibūdina didelio afiniškumo monokloninį antikūną 12B6, kuris specifiskai sąveikauja su fotolabilia DMNB grupe. Šis antikūnas tinka DMNB grupėms, esančioms baltymų (ir potencialiai kitų biomolekulių) sudėtyje, atpažinti. Antikūno ir unikalios DMNB grupės sąveika leidžia imunoprecipitacijos būdu manipuluoti fotolabiliais grupėmis žymėtais baltymais.

IŠRADIMO SRITIS

Išradimas yra susijęs su imunologinėmis technologijomis. Jo esmė - didelio afiniškumo monokloninio antikūno (MAK), kuris atrankiai sąveikauja su šviesai jautria 4,5-dimetoksi-2-nitrobenzilo (DMNB) grupe, sukūrimas ir jo taikymas manipuluoti fotoaktyviais baltymais.

TECHNIKOS LYGIS

Rekombinantinių baltymų su pageidaujamomis katalizinėmis savybėmis inžinerija ir sintezė ląstelėje yra plačiai plėtojama baltymų struktūros ir funkcijos tyrimams bei praktiniam taikymui medicinoje ir biopramonėje. Konkrečiai, kryptinga baltymų modifikacija suteikia unikalią galimybę preciziškai kontroliuoti jų savybes bei išplėsti funkcijas. Optinė baltymų funkcijos kontrolė sukuria išskirtinę galimybę valdyti biologinius procesus laike ir erdvėje, ko negalima išgauti kitais sąlyginės kontrolės būdais. Tai dažnai pasiekama naudojant fotolabilias (FL) apsaugines grupes, kurių pašalinimas veikiant šviesai yra švelni ir neinvazinė procedūra. Ji yra visiškai ortogonalinė kitiems cheminiams biologinės sistemos procesams. Ši technologija buvo sėkmingai pritaikyta kontroliuoti mažų molekulių, peptidų, oligonukleotidų bei baltymų fotocheminį aktyvumą (Spicer CD ir Davis BG. Nat Commun. 2014; Sep 5;5:4740. doi: 10.1038/ncomms5740).

Yra sukurta keletas sistemų, leidžiančių į baltymų sudėtį įvesti šviesai jautrią grupę apsaugotą liziną, tiroziną, seriną, cisteiną ir selenocisteiną (Riggsbee CW ir Deiters A. Trends Biotechnol. 2010;Sep;28(9):468-75; Dumas A et al. Chemical Science. 2015;6(1):50-69). Aukštas tiolio, esančio cisteino liekanoje, nukleofiliškumas jau ilgai taikomas diegiant įvairias chemines funkcijas. Cisteinas (Cys) yra palyginti mažai paplitusi aminorūgštis, o tirpikliui prieinami laisvi cisteinai laukinio tipo baltymuose taip pat sutinkami gana retai. Selenocisteinas (Sec) – 21-oji aminorūgštis – yra dar retesnė ir pasižymi dar stipresniu funkcionalumu. Į baltymus įjungtas Sec jiems suteikia ypatingų cheminių savybių (lyginant su Cys - aukštą nukleofiliškumą, žemą pKa, žemą oksidacijos-redukcijos potencialą); Sec įjungtas tikslinėje baltymo pozicijoje leidžia išplėsti natūraliai evoliucionavusį katalizinį fermentų pajėgumą arba sukuria vietas selektyviai baltymų konjugacijai, žymėjimui, dimerizacijai, taip pat keičia baltymo susisukimą. Sec yra gyvybiškai svarbus visų trijų domenų organizmuose, kurie išvystė sudėtingus biosintezės ir transliacijos mechanizmus, reikalingus šiai retai

aminorūgščiai įjungti į baltymus. Nepaisant šių akivaizdžių privalumų, yra aprašyta nedaug pavyzdžių, iliustruojančių naujovišką ir su biologine sistema derančią fotocheminę transformaciją. Taigi, naujas metodas, leidžiantis į baltymus selektyviai įvesti fotoaktyvias chemines grupes ir vėliau jas eksploatuoti praktiniais tikslais, yra reikšmingas indėlis biotechnologijai.

Yra sukurti metodai, kurie įgalina biosintezės būdu gauti baltymus su genetiškai parinktose pozicijose įvestais šviesai jautria grupe apsaugotais Cys (Nguyen DP et al. J. Am. Chem. Soc. 2014;136:2240-3; Uprety R et al. ChemBioChem 2014;15:1793-9) ar Sec (Rakauskaitė R et al. Chem Commun (Camb) 2015;51(39):8245-8). DMNB grupė apsaugo labai reaktyvų Sec (arba tirpalui eksponuotą Cys) nuo nepageidaujamų šalutinių reakcijų baltymą produkujančių ląstelių viduje bei visų baltymo manipuliacijų metu ir gali būti nesunkiai pašalinta apšvitinus 370 nm šviesa. Deja, kiekvieno naujo FL grupe apsaugoto baltymo gryninimui arba jo valdymui *in vitro* ar ląstelių viduje, reikalingas individualus naujai sukurtas protokolas, kadangi kol kas nėra afiniškumo ligandų, kurie specifiskai sąveikautų su gana nedidele chemine grupe.

Šis išradimas neturi aukščiau išvardintų trūkumų susijusių su baltymų gryninimu ir apima papildomus privalumus.

TRUMPAS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Siekiant išplėsti bendras šios technologijos taikymo ir funkcionalumo galimybes, mes sukūrėme antikūnus, specifiskus baltymų sudėtyje esančiai fotoapsauginei DMNB grupei. Šis naujas įrankis gerokai palengvina apsaugotų baltymų tyrimus ląstelės viduje (atliekant imunoblotingą) ir apsauginei fotogrupei specifiską afininį gryninimą (atliekant imunoprecipitaciją). Mes pirmą kartą sukūrėme afininio gryninimo sistemą, kurios pagalba DMNB grupe žymėtas baltymas buvo išgrynintas iš sudėtingų molekulinų mišinių, formuojant imunoprecipitacijos kompleksą. Šis baltymų gryninimo būdas gali būti toliau plėtojamas panaudojant kontroliuojamą imunoprecipitacijos komplekso švitinimą, kurio metu baltymas būtų atpalaiduojamas nepaliekant fotožymės pėdsakų. Panašios sistemos būtų labai pageidautinos rekombinantinių selenobaltymų gryninimui, kai negalima naudoti kai kurių cheminių reagentų ar sąlygų (imidazolo, didelės druskos koncentracijos, tio-grupes turinčių reduktorių ir kt.). Tokia strategija taip pat išplėstų funkcionalizuotų biomolekulių įvairovę ir prieinamumą diegiant miniatiūrizuotas šviesa kontroliuojamas

sistemas, tokias kaip mikroskysčių prietaisus, mikrogardeles ir nanodaleles, kadangi leistų selektyviai sukaupti žymėtą tikslinį baltymą kietų dalelių paviršiuje ir norimu momentu šviesos pagalba atpalaiduoti tikslinį baltymą į tirpalą. Šis išradimas, apjungiantis molekulinę biologiją, biokonjugavimo chemiją, fotofiziką ir imunologiją prisidėtų prie tokių mokslo šakų, kaip baltymų mokslai, sintetinė biologija ir nanomedicina, technologinio progreso.

Nors yra sukurta nemažai metodų, leidžiančių biomolekules pažymėti šviesai jautriomis grupėmis, tačiau kol kas nėra technologijų, kuriose selektyvi šių grupių sąveika su kitomis molekulėmis būtų pritaikyta tikslinių baltymų detekcijai ar praturtinimui. Sprendžiant šią problemą mes sukūrėme aukšto afiniškumo monokloninį antikūną, kuris atrankiai sąveikauja su fotolabilia chemine grupe ir jį pritaikėme baltymų, turinčių tokias fotolabilias grupes, manipuliavimui šviesos pagalba.

TRUMPAS PAVEIKSLŲ APRAŠYMAS

1 pav. Fotolabilia grupe pažymėtų baltymų identifikavimas imunoblotingo metodu, naudojant monokloninį antikūną.

2 pav. Fotolabilia grupe pažymėtų baltymų detekcijos ribos imunoblotingo metode, naudojant monokloninį antikūną.

3 pav. Fotolabilia grupe pažymėtų baltymų detekcija imunoblotingo metodu sudėtinguose molekuliniuose mišiniuose (ląstelių lizatuose), naudojant monokloninį antikūną.

4 pav. Unikaliuose vietose fotolabilia grupe pažymėtų SUMOstar ir EGFP baltymų imunoprecipitacija (selektyvų sukaupimą kietų dalelių paviršiuje), naudojant monokloninį antikūną.

5 pav. Unikalia fotolabilia grupe pažymėto SUMOstar baltymo imunoprecipitacija (selektyvus sukaupimas kietų dalelių paviršiuje) iš kompleksinio biomolekulių mišinio, naudojant monokloninį antikūną.

6 pav. Fotocheminis fotolabilia grupe pažymėto baltymo atpalaidavimas į tirpalą iš imunoprecipitacijos komplekso (kietų dalelių paviršiaus).

7 pav. Fotochemiškai iš imunoprecipitacijos komplekso atpalaiduotų baltymų identifikavimas.

DETALUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Antigeno paruošimas

Mažos cheminės molekulės - haptentai - paprastai nesukelia stipraus imuninio atsako. Kuriant prieš juos monokloninius antikūnus, gyvūnų imunizacijai yra naudojami neimunogeniško hapteno ir imunogeniško baltymo-nešiklio konjugatai (Chappey ON et al. Pharm Res. 1992; Nov;9(11):1375-9; Howard GC ir Bethell DR. CRC Press, 2000).

Monokloniniams antikūnams, specifikiems DMNB junginiui, sukurti pirmiausia buvo paruoštas imunizacijos antigenas – hapteno (DMNB) ir baltymo-nešiklio (KLH) konjugatas. Tam tikslui buvo naudojamas DMNB bromidas, kuris pasižymi reaktyvumu su sulfhidrilais (-SH), ir cheminės reakcijos metu DMNB grupės buvo prijungtos prie KLH baltymo paviršiuje esančių laisvų cisteino liekanų. Cisteinas yra palyginti reta aminorūgštis baltymuose, todėl siekiant padidinti baltymo nešiklio reaktyvumą su DMNB bromidu, alternatyviai buvo paruoštas KLH su papildomomis -SH liekanomis. Šiam tikslui naudojome pirminių aminių sulfhidrilinimo reagentą SATA (S-acetiltioacetato N-sukcinimido esteris), kuris reaguoja su baltymo lizino šoninėmis grandinėmis. Po reakcijos su hidroksilaminu gautą deacilintą KLH-AT nešiklį analogiškai konjugavome su DMNB.

KLH-AT-DMNB antigenas tolesniame darbe buvo naudojamas pelių imunizacijai, o BSA-DMNB bei BSA-AT-DMNB konjugatai - antikūnų specifiškumui įvertinti.

Tokia strategija buvo panaudota, kad pavyktų sukurti tik DMNB grupei specifiskus antikūnus, kurie nereaguotų su baltymu-nešikliu. Antikūnų kūrimas prieš cheminius junginius (haptenus) yra sudėtingas uždavinys, nes patys cheminiai junginiai yra neimunogeniški – jie negali aktyvinti T limfocitų, kurie būtini B limfocitų aktyvacijai, kad šie pradėtų gaminti aukšto afiniškumo IgG izotipo antikūnus. Kadangi tik baltyminiai antigenai gali aktyvinti T limfocitus, haptenas turi būti prijungtas prie baltymo-nešiklio molekulės. Labai svarbu pasirinkti tinkamą baltymą-nešiklį ir tinkamą hapteno prijungimo metodą, kad haptenas būtų efektyviai eksponuotas paviršiuje ir prieinamas B limfocitams. Tas ypač svarbu mažiems haptenums (<200 Da), kadangi antikūno ir hapteno molekulinis kontaktas, lemiantis sąveikos selektyvumą ir stiprumą, yra minimalus. Efektyviausias hapteno eksponavimo būdas yra sunkiai prognozuojamas ir kiekvienu atveju parenkamas empirinių eksperimentų pagalba. Todėl buvo išbandyti skirtingi DMNB grupės prijungimo būdai – per baltymo SH grupę

ir per SATA reagentą. Tam, kad būtų galima atrinkti tik DMNB grupei specifiskus antikūnus, buvo naudojami skirtingi baltymai-nešikliai – KLH (imunizacijai) ir BSA (imuninio atsako tikrinimui ir hibridomų atrankai). Tuo būdu pavyko gauti aukšto afiniškumo antikūnus, nerodančius jokių kryžminių reakcijų nei su prijungimo reagentu, nei su baltymu-nešikliu.

Monokloninio antikūno prieš fotolabilią DMNB grupę sukūrimas

Hibridomų ląstelių linija, sekretuojanti monokloninį antikūną prieš DMNB, buvo sukurta pagal anksčiau aprašytą metodiką (Howard GC ir Bethell DR. CRC Press, 2000; Köhler G ir Milstein C. Nature. 1975;Aug7;256(5517):495-7). BALB/c pelių patelės (6-8 savaičių amžiaus) buvo imunizuotos 50 µg antigeno su pilnu Freund adjuvantu pirmai imunizacijai, nepilnu Freund adjuvantu antrai imunizacijai ir PBS trečiai imunizacijai. Poodinės injekcijos buvo atliktos 3 kartus kas 28 dienas. Gautos hibridomos kultivuotos selektyvioje HAT terpėje, atrinkti DMNB-specifiškus antikūnus sekretuojantys hibridinių ląstelių klonai, jie klonuojant stabilizuoti ir padauginti. Po stabilizavimo buvo atrinktas hibridomų klonas 12B6, šio klonu ląstelės buvo užšaldytos kriokonservavimo terpėje ir saugomos skystame azote.

Hibridomos 12B6 sekretuojamas anti-DMNB monokloninis antikūnas (MAk) buvo charakterizuotas naudojant komercinį izotipavimo rinkinį. Nustatyta, kad ši hibridoma gamina IgG klasės antikūnus.

Hibridoma buvo deponuota Vokietijoje, Leipzigo instituto depozitoriume DSMZ 2020 m. liepos 8d., jai suteiktas numeris DMNB12B6=DSM ACC3363.

Monokloninio antikūno 12B6 specifiškumo analizė

Anti-DMNB MAk 12B6 buvo charakterizuotas taikant klasikinius imunofermentinės analizės bei imunoblotingo metodus (Howard GC ir Bethell DR. CRC Press, 2000). Anti-DMNB antikūno specifiškumas DMNB grupei buvo nustatytas imunofermentinės analizės metodu, naudojant imunizacijos antigeną KLH-AT-DMNB bei su imunizacija nesusijusius konjugatus BSA-DMNB ir BSA-AT-DMNB.

[vertinus DMNB specifiško MAk afiniškumą netiesioginės imunofermentinės analizės būdu, nustatyta, kad MAk 12B6 tariamoji disociacijos konstantos vertė yra $1,40 \times 10^{-10}$ M.

Antikūnas 12B6 ne tik gerai sąveikavo su daugybinėmis grupėmis žymėtais

KLH bei BSA baltymais, bet ir vienintelę DMNB grupę turinčiais EGFP Y39DMNB-C – buvo gauti aiškūs imunoblotingo signalai. Antikūnas visiškai nesąveikavo su tais pačiais nežymėtais baltymais, ar baltymais, kuriuose DMNB grupė buvo pašalinta šviesos pagalba.

Antikūnas 12B6 buvo išgrynintas afininės chromatografijos būdu, naudojant sefarozę su prijungtu baltymu A.

IŠRADIMO ĮGYVENDINIMO PAVYZDŽIAI

1 pavyzdys. Fotolabilia grupę apsaugotų baltymų detekcija imunoblotingo metodu

Anti-DMNB 12B6 antikūnas leidžia specifiskai nustatyti baltymų sudėtyje esančias DMNB grupes, kai tiriami baltymai yra denatūruoti SDS tirpalu PAA gelio elektroforezės sąlygomis. Šiems tyrimams buvo naudojami įvairūs komerciniai (KLH, BSA, lizocimas), modeliniai (EGFP, SUMOstar) ir unikalūs laboratorijoje sintetinami (DNR metiltransferazės: M.HpaII, M.HhaIΔHT, M2.Eco31I) baltymai. Analizei paruošti dvejopi baltymai: 1) pažymėti cheminiu būdu daugybinėmis DMNB grupėmis bei 2) biosinteniai baltymai, turintys vienintelę DMNB grupę. Daugybinės DMNB grupės buvo įvestos į 2 komercinius bei 14 laboratorijoje susintetintų ir Ni-IMAC metodu išgrynintų baltymų, atliekant žymėjimo cheminę reakciją su DMNB bromidu. Vienintelė DMNB grupė į 13 baltymų buvo įversta biosintetiškai, naudojant genetiškai koduojamų nestandartinių aminorūgščių įterpimo technologiją (Rakauskaitė R et al. Chem Commun (Camb). 2015;51(39):8245-8). Jie buvo išgryninti afininės Ni-IMAC chromatografijos metodu. Visų baltymų masės bei juose esančių DMNB grupių skaičius buvo patvirtinti HPLC-ESI/MS analizės būdu.

Imunoblotingo metodas buvo pritaikytas detektuoti baltymus, pažymėtus tiek daugybinėmis, tiek vienintele DMNB grupe. Visų tirtų baltymų atveju 12B6 antikūnas sąveikavo su DMNB ir leido specifiskai identifikuoti pažymėtus baltymus.

1 pav. parodoma, kad unikalios fotolabilios grupės, prijungtos tiek prie S, tiek prie Se atomų (atitinkamai EGFP Y39DMNB-C ir EGFP Y39DMNB-U baltymuose), yra labai specifiskai atpažįstama imunoblotingo metodu, naudojant anti-DMNB antikūną 12B6: paveikus DMNB-baltymą 365 nm šviesa, DMNB grupė yra pašalinama, o imunoblotingo signalas yra prarandamas. EGFP Y39DMNB-C ir EGFP Y39DMNB-U baltymų sintezė, ląstelių lizato tirpios frakcijos ruošimas, baltymų gryninimas,

charakterizavimas bei fotocheminė DMNB grupės nuskėlimo reakcija buvo atlikta pagal anksčiau aprašytą metodiką (Rakauskaitė R et al. Chem Commun (Camb). 2015;51(39):8245-8). Eksperimente buvo naudojamas išgrynintų EGFP Y39DMNB-C (2, 3 takeliai) ir EGFP Y39DMNB-U (7, 8 takeliai) baltymų preparatai, bei kompleksinis molekulinis mišinys – mielių ląstelių, sintetinančių EGFP Y39DMNB-C, ekstrakto tirpi frakcija (4, 5 takeliai). Baltymų mėginiai buvo išfrakcionuoti dviejuose identiškuose SDS-PAA geliuose, kurių vienas (A) buvo nudažytas Coomassie mėliu, o kitas (B) analizuotas imunoblotingo metodu, naudojant anti-DMNB 12B6 antikūną.

1, 6 takeliai. Baltymų molekulinės masės standartas.

2 takelis. Išgrynintas EGFP Y39DMNB-C.

3 takelis. Išgrynintas EGFP Y39DMNB-C, veiktas UV.

4 takelis. Ląstelių, sintetinančių EGFP Y39DMNB-C, ekstrakto tirpi frakcija.

5 takelis. Ląstelių, sintetinančių EGFP Y39DMNB-C, ekstrakto tirpi frakcija, veikta UV.

7 takelis. Išgrynintas EGFP Y39DMNB-U.

8 takelis. Išgrynintas EGFP Y39DMNB-U, veiktas UV.

2 pavyzdys. Fotolabilia grupė apsaugotų baltymų detekcijos efektyvumas, naudojant imunoblotingo metodą

Imunoblotingo metodu buvo įvertinta DMNB-baltymų detekcijos riba. Tam tikslui atlikome išgrynintų modelinių DMNB-baltymų detekciją, naudojant serijinius baltymo skiedimus (2 pav.). Šiuose eksperimentuose buvo nustatyti mažiausi detektuojami baltymo kiekiai: 16 ng BSA-(DMNB)₁₋₄, 31 ng EGFP-(DMNB)₁ ir 63 ng SUMOstar-(DMNB)₁.

1 takelis. 1 µg baltymo.

2 takelis. 0,5 µg baltymo.

3 takelis. 0,25 µg baltymo.

4 takelis. 0,125 µg baltymo.

5 takelis. 0,063 µg baltymo.

6 takelis. 0,031 µg baltymo.

7 takelis. 0,016 µg baltymo.

M – Baltymų molekulinės masės standartas.

3 pavyzdys. Fotolabilia grupė apsaugotų baltymų detekcija ląstelių lizatuose imunoblotingo metodu

Monokloninis anti-DMNB antikūnas 12B6 leidžia identifikuoti įvairius vienintele DMNB grupę žymėtus baltymus sudėtinguose molekuliniuose mišiniuose (ląstelių lizatuose) (3 pav.). Šiems eksperimentams naudotų keturių modelių baltymų biosintezė vyko mielių *S. cerevisiae* ląstelėse: su SUMO sulietų M.HhaI, M.HpaII ir M2.Eco31I baltymų raiška buvo indukuojama CuSO₄; EGFP baltymo raiška vyko nuo konstitucinio *ADH1* promotoriaus (nt - indukcijos sąlygos netaikomos). Fotocheminė DMNB grupė į rekombinantinius baltymus buvo įvesta genetiškai koduojamų nestandartinių aminorūgščių metodu (Rakauskaitė R et al. Chem Commun (Camb), 2015;51(39): 8245-8) nurodytose pozicijoje, ląstelėms į augimo terpę tiekiant DMNB-C (5, 9, 13, 15 takeliai). Atitinkamų kontrolinių rekombinantinių baltymų tose pačiose pozicijose buvo įvesta leucino (L) arba izoleucino (I) mutacija (3, 7, 11, 14 takeliai). Rekombinantinius baltymus sintetinančių ląstelių biomasės buvo surinktos, iš jų paruošti lizatai išfrakcionuoti SDS-PAA gelyje (viršutinis paveikslas: SDS-PAA gelis nudažytas Coomassie mėliu, rekombinantiniai baltymai pažymėti žvaigždute), o lizatuose esantys DMNB-baltymai identifikuoti analogiškame SDS-PAA gelyje imunoblotingo metodu naudojant 12B6 antikūną (apatinis paveikslas). Imunoblotingo metodu buvo specifiškai nustatyti tik DMNB grupę turintys baltymai. Kiti ląstelių lizato komponentai su 12B6 MAk nereagavo.

1, 16 takeliai - baltymų dydžio standartas.

2 takelis. SUMOstar-M.HhaI C81L/I baltymo raiška neindukuota.

3 takelis. SUMOstar-M.HhaI C81L/I baltymo raiška indukuota.

4 takelis. SUMOstar-M.HhaI C81DMNB-C baltymo raiška neindukuota.

5 takelis. SUMOstar-M.HhaI C81DMNB-C baltymo raiška indukuota.

6 takelis. SUMOstar-M.HpaII C103L/I baltymo raiška neindukuota.

7 takelis. SUMOstar-M.HpaII C103L/I baltymo raiška indukuota.

8 takelis. SUMOstar-M.HpaII C103DMNB-C baltymo raiška neindukuota.

9 takelis. SUMOstar-M.Hpall C103DMNB-C baltymo raiška indukuota.

10 takelis. SUMOstar-M2.Eco31I C232L/I baltymo raiška neindukuota.

11 takelis. SUMOstar-M2.Eco31I C232L/I baltymo raiška indukuota.

12 takelis. SUMOstar-M2.Eco31I C232DMNB-C baltymo raiška neindukuota.

13 takelis. SUMOstar-M2.Eco31I C232DMNB-C baltymo raiška indukuota.

14 takelis. EGFP Y39L/I baltymo raiška.

15 takelis. EGFP Y39DMNB-C baltymo raiška.

4 pavyzdys. Baltymų, pažymėtų fotolabilia grupe, išskyrimas imunoprecipitacijos būdu

DMNB grupe žymėtų baltymų imunoprecipitacijos eksperimentas rodo, kad monokloninis anti-DMNB antikūnas 12B6 yra tinkamas natyvios formos baltymų atpažinimui. Nors DMNB fotocheminė grupė yra mažas haptenas, jos sąveika su MAK užtikrina stabilų imunoprecipitacijos (IP) kompleksą (4 pav.).

IP kompleksų formavimui buvo naudotos magnetinės (MagnaBind protein A beads, Thermofisher) dalelės su prijungtu baltymu A, kuris specifiškai sąveikauja su IgG klasės imunoglobulinais. Magnetinės dalelės su prijungtu baltymu A buvo pirmiausia inkubuotos su 12B6 MAK, ir toliau naudotos inkubacijai su DMNB-baltymais. IP kompleksai buvo formuojami naudojant išgrynintus ir PBS buferyje ištirpintus SUMOstar ir EGFP baltymus, kurių paviršiuje esančiose unikaliose pozicijose (SUMOstar: L11, E89, M93, I106; EGFP: Y39, D117, E132, N150, N212) įjungta nekanoninė aminorūgštis S-DMNB-cisteinas. Po inkubavimo su baltymais magnetinės dalelės buvo nuplautos PBS. Ant dalelių esantys baltymai buvo atpalaiduoti į tirpalą 10 min. 95°C inkubuojant daleles denatūruojančiame SDS-PAGE mėginio buferyje, išfrakcionuoti SDS-PAA gelyje bei analizuoti imunoblotingo metodu naudojant anti-DMNB antikūną 12B6. Pažymėtina, kad šalia DMNB-baltymų, dėl sąveikos su antriniais antikūnais yra vizualizuojamos ir nuo IP komplekso atpalaiduotos 12B6 antikūno grandinės: sunkioji (SG) bei lengvoji (LG). Trys iš keturių analizuotų SUMOstar-DMNB ir trys iš penkių EGFP-DMNB baltymų variantų pasižymėjo geru arba labai geru IP efektyvumu (3, 5, 6, 10, 11 ir 13 takeliai). Šie eksperimentai rodo, kad IP gali vykti DMNB žymeis esant įvairiose baltymo vietose.

1 takelis. Chemiškai DMNB grupėmis pažymėtas BSA-(DMNB)₁₋₄

(imunoblotingo kontrolė).

2, 8 takeliai - baltymų dydžio standartas.

3 takelis. SUMOstar L11DMNB-C IP kompleksas.

4 takelis. SUMOstar E89DMNB-C IP kompleksas.

5 takelis. SUMOstar M93DMNB-C IP kompleksas.

6 takelis. SUMOstar I106DMNB-C IP kompleksas.

7 takelis. SUMOstar (laukinis tipas) IP kompleksas.

9 takelis. EGFP Y39DMNB-C IP kompleksas.

10 takelis. EGFP D117DMNB-C IP kompleksas.

11 takelis. EGFP E132DMNB-C IP kompleksas.

12 takelis. EGFP N150DMNB-C IP kompleksas.

13 takelis. EGFP N212DMNB-C IP kompleksas.

5 pavyzdys. Baltymų gryninimas imunoprecipitacijos būdu iš kompleksinių molekulinų mišinių

Imunoprecipitacijos metu 12B6 MAk specifiskai sąveikauja tik su baltymuose esančiomis DMNB grupėmis ir nesudaro nespecifinių sąveikų su kitais ląstelių lizato baltymais. Geriausiai IP kompleksą formuojantis SUMOstar I106DMNB-C baltymas (4 pav.) buvo efektyviai išgrynintas ir iš mielių ląstelių lizato (5 pav.).

Fotocheminė DMNB grupė į rekombinantinį baltymą SUMOstar I106DMNB-C buvo įvesta genetiškai koduojamų nestandartinių aminorūgščių metodu (Rakauskaitė R et al. Chem Commun (Camb). 2015;51(39):8245-8), ląstelėms į augimo terpę tiekiant DMNB-C. Rekombinantinio baltymo raiška buvo patvirtinta SDS-PAGE analize, išfrakcionavus CuSO₄ indukuotų (2 takelis) ir neindukuotų (3 takelis) ląstelių lizatus. IP eksperimentui buvo paruoštas indukuotų mielių ląstelių lizatas, kuris toliau buvo inkubuojamas su magnetinėmis dalelėmis, prie kurių prijungtas baltymas A, o prie jo - 12B6 MAk. Magnetinės dalelės buvo surinktos, o ant jų esantis tikslinis baltymas SUMOstar I106DMNB-C bei 12B6 MAk vizualizuoti imunoblotingo metodu (5 takelis) kaip aprašyta 4 pavyzdyje.

1, 4 takeliai - baltymų dydžio standartas.

2 takelis. SUMOstar I106DMNB-C raiška indukuota (SDS-PAA gelis, nudažytas Coomassie mėliu).

3 takelis. SUMOstar I106DMNB-C raiška neindukuota (SDS-PAA gelis, nudažytas Coomassie mėliu).

5 takelis. SUMOstar I106DMNB-C IP kompleksas (IB analizė, naudojant 12B6 MAk).

6 pavyzdys. Fotocheminis baltymo atpalaidavimas nuo imunoprecipitacijos komplekso

Fotocheminės reakcijos metu IP kompleksus veikiant UV šviesa, apsauginė DMNB grupė nuskyta nuo kompleksuose esančių DMNB-baltymų ir į tirpalą yra išlaisvinami baltymai be cheminės žymės pėdsakų. Eksperimentui buvo pasirinkti EGFP baltymai, nes jų fotocheminį atpalaidavimą iš IP komplekso galima netiesiogiai stebėti kaip tirpalo fluorescencijos padidėjimą po UV poveikio (6 pav.). Fotocheminei reakcijai buvo paruoštas IP kompleksas, susidedantis iš silicio dalelių, prie kurių prijungtas baltymas A (Silica Particles, Protein A coated, 1 μm; Kisker), 12B6 antikūno ir chemiškai pažymėto EGFP D117DMNB-C antigeno (1, 2 stulpeliai). Analogiškas kontrolinis IP kompleksas buvo paruoštas naudojant nežymėtą EGFP D117C baltymą (3, 4 stulpeliai). Eksperimentui buvo imama po du kiekvieno komplekso pavyzdžius (65 μl 0,3% IP dalelių suspensijos PBS buferyje): vieni pavyzdžiai (1, 3 stulpeliai) buvo laikyti tamsoje, 4 °C, o kiti pavyzdžiai (2, 4 stulpeliai) – švitinti 365 nm, 10 min., 4 °C. Visų pavyzdžių dalelės buvo atskirtos, o likę tirpalai naudoti EGFP fluorescencijai įvertinti. Paveikus EGFP D117DMNB-C IP kompleksą šviesa, tirpalo fluorescencija padidėjo 9,3 karto, lyginant su nešvitinto komplekso (1 ir 2 stulpeliai), kai tuo tarpu kontrolinio EGFP D117C IP komplekso atveju abiejose sąlygose stebėta tik nežymi foninė fluorescencija (3 ir 4 stulpeliai).

1 stulpelis. EGFP D117DMNB-C IP kompleksas, neveiktas UV.

2 stulpelis. EGFP D117DMNB-C IP kompleksas, veiktas UV.

3 stulpelis. EGFP D117C IP kompleksas, neveiktas UV.

4 stulpelis. EGFP D117C IP kompleksas, veiktas UV.

7 pavyzdys. Baltymų, fotochemiškai atpalaiduotų iš imunoprecipitacijos komplekso, identifikavimas

Paveikus IP kompleksus UV šviesa, į tirpalą atpalaiduoti DMNB žymę praradę EGFP D117C ir SUMOstar I106C baltymai buvo identifikuoti frakcionavimo SDS-PAA gelyje bei masių spektrometrijos (HPLC/ESI-MS) metodais (7 pav.). Imunoprecipitacijos kompleksai buvo suformuoti naudojant silicio daleles, konjuguotas su baltymu A (Silica Particles, Protein A coated, 1 µm; Kisker) ir inkubuotas su 12B6 antikūnu. Šios dalelės toliau buvo inkubuojamos su išgryninto EGFP D117C-(DMNB)₁₋₃ baltymo tirpalu (7 pav. 1 takelis viršuje) arba mielių, ekspresuojančių SUMOstar I106C-DMNB baltymą, ląstelių lizatu (7 pav. 1 takelis apačioje). Kontrolinių mėginių (3, 4 takeliai) ir 365 nm šviesa paveiktų mėginių (5, 6 takeliai) tirpalas ir dalelės buvo atskirti, išfrakcionuoti SDS-PAA gelyje ir nudažyti Coomassie mėliu. Analizės metu buvo stebimas dėl UV apšvitos „tirpalo“ mėginyje atsiradęs analizuojamų baltymų signalas (5 takelis), tuo tarpu „dalelių“ mėginyje (6 takelis) šis signalas susilpnėjo. Kontrolinės fotocheminės reakcijos buvo atliktos naudojant tik grynų EGFP D117C-(DMNB)₁₋₃ (7 pav. 8, 9 takeliai viršuje) ir SUMOstar I106C-(DMNB)₁₋₂ (7 pav. 8, 9 takeliai apačioje) baltymų tirpalus ir rodo, kad UV apšvita analizuojamiems baltymams žymaus poveikio neturėjo. Nagrinėjamų baltymų juostelės pažymėtos žvaigždute. SG, sunkioji grandinė. LG, lengvoji grandinė. M, baltymų dydžio standartas.

Fotocheminės reakcijos metu praradęs DMNB žymę ir į tirpalą atpalaiduoti EGFP D117C bei SUMOstar I106C baltymai (7 pav. 5 takelis) buvo tiesioginiai identifikuoti masių spektrometrijos metodu (HPLC/ESI-MS) (7 pav.). Apskaičiuotos baltymų masės nurodytos skliaustuose.

1, 7 takeliai - baltymų dydžio standartas.

2 takelis. IP suspensija.

3 takelis. Neveiktos UV IP suspensijos tirpalas.

4 takelis. Neveiktos UV IP suspensijos dalelės

5 takelis. Veiktos UV IP suspensijos tirpalas.

6 takelis. Veiktos UV IP suspensijos dalelės.

8 takelis. DMNB-baltymas, neveiktas UV.

9 takelis. DMNB-baltymas, veiktas UV.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Monokloninis antikūnas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad specifiskai sąveikauja su fotolabilia chemine DMNB grupe.

2. Monokloninis antikūnas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s aukštu afiniškumu.

3. Monokloninis antikūnas pagal 1-2 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad tariamoji disociacijos konstantos vertė yra $1,40 \times 10^{-10}$ M.

4. Monokloninis antikūnas pagal 1-3 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis specifiskai jungiasi prie baltymų sudėtyje esančios DMNB grupės.

5. Monokloninis antikūnas pagal 1-4 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad DMNB-baltymų žemiausia detekcijos riba yra >16 ng.

6. Monokloninis antikūnas pagal 1-5 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad identifikuoja įvairius vienintele DMNB grupe žymėtus baltymus sudėtinguose molekuliniuose mišiniuose, tokiuose kaip ląstelių lizatai.

7. Monokloninis antikūnas pagal 1-6 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad užtikrina stabilų imunoprecipitacijos (IP) kompleksą, DMNB žymeis esant įvairiose baltymo vietose.

8. Monokloninis antikūnas pagal 1-7 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį produkuoja 12B6 hibridomos deponuotos DSMZ numeriu: DSM ACC3363.

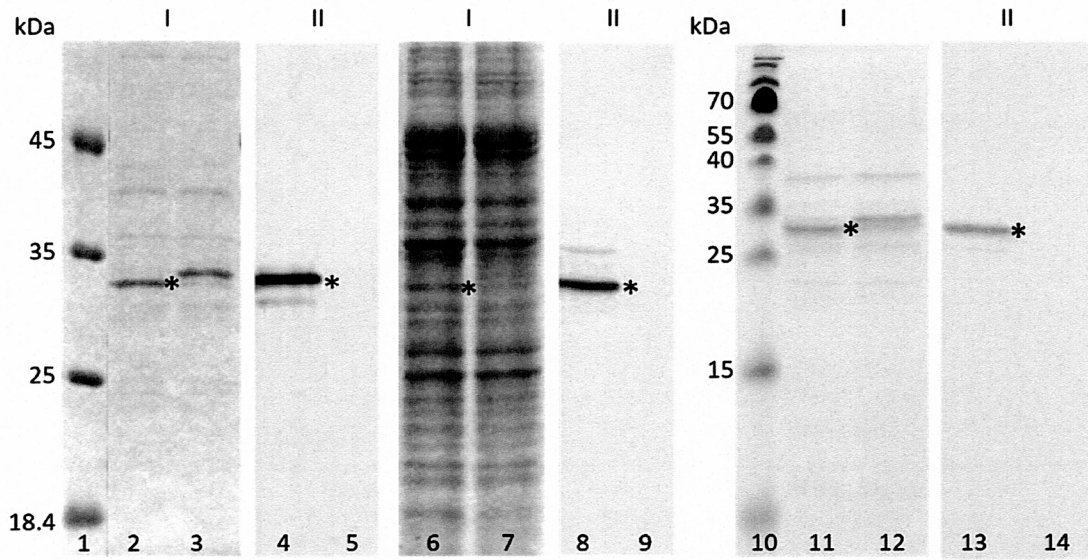
9. Monokloninio antikūno pagal 1-8 punktus panaudojimas pažymėtų baltymų identifikavimui.

10. Monokloninio antikūno pagal 1-8 punktus panaudojimas baltymų, turinčių fotolabiles grupes, sukaupimui kietų dalelių paviršiuje ir atpalaidavimui į tirpalą šviesos pagalba.

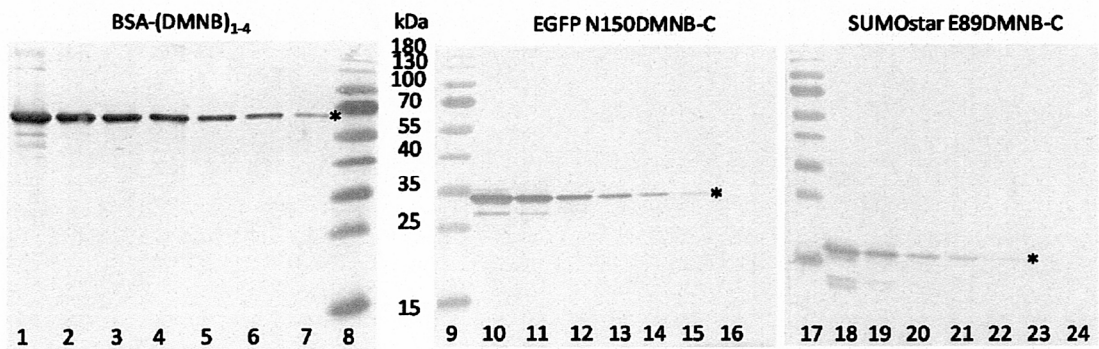
11. Monokloninio antikūno pagal 1-8 punktus panaudojimas baltymų gryninimo būde, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad monokloninis antikūnas specifiskai sąveikauja tik su baltymuose esančiomis DMNB grupėmis ir nesudaro nespecifinių sąveikų su kitais ląstelių lizato baltymais.

12. Baltymų gryninimo būdas pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad DMNB grupę žymėtas baltymas išgryninamas iš sudėtingų molekulinų mišinių.

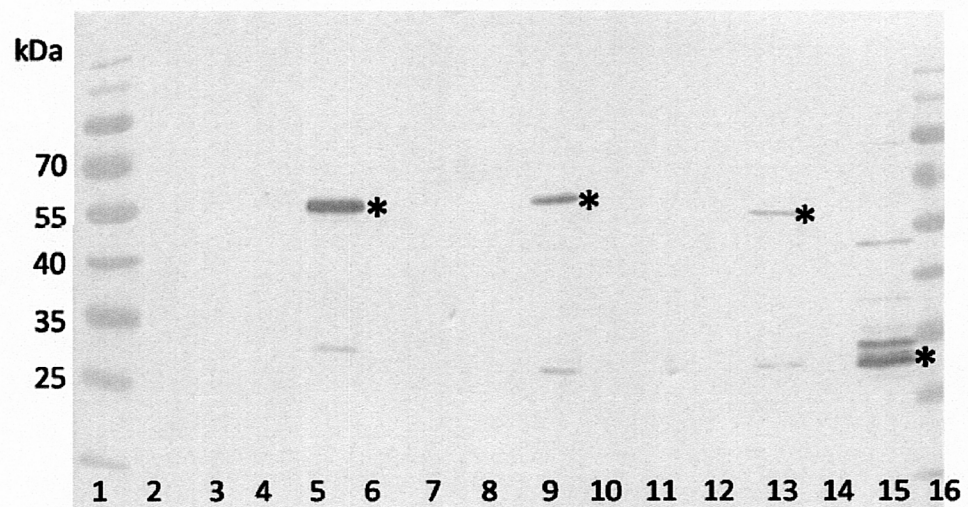
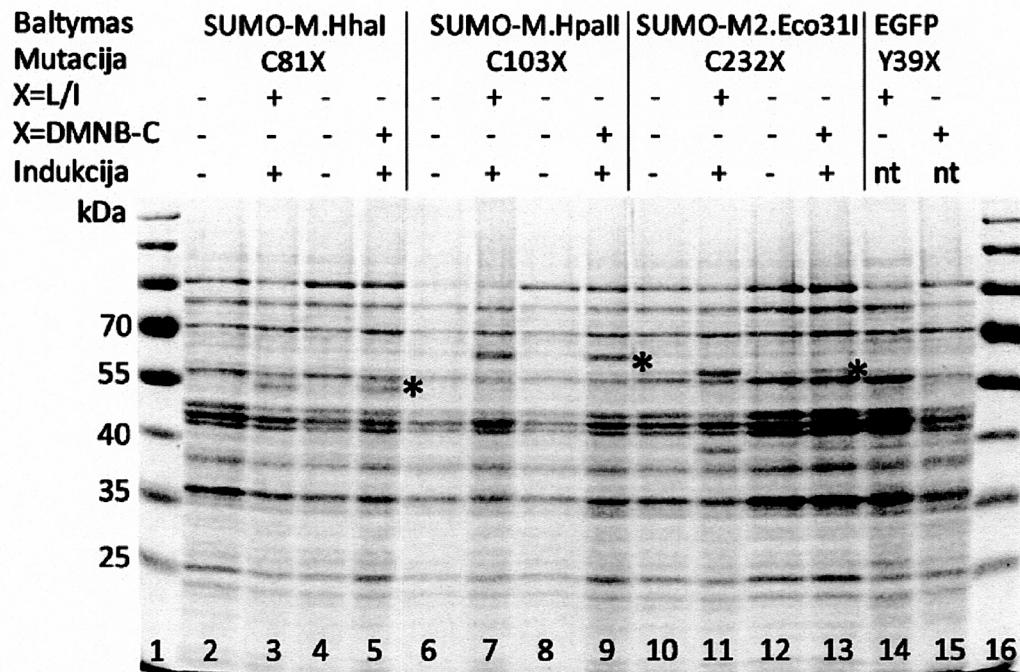
13. Baltymų gryninimo būdas, pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad fotocheminės reakcijos metu IP kompleksus veikiant UV šviesa, apsauginė DMNB grupė nuskyta nuo baltymų ir į tirpalą yra išlaisvinami baltymai be cheminės žymės pėdsakų.

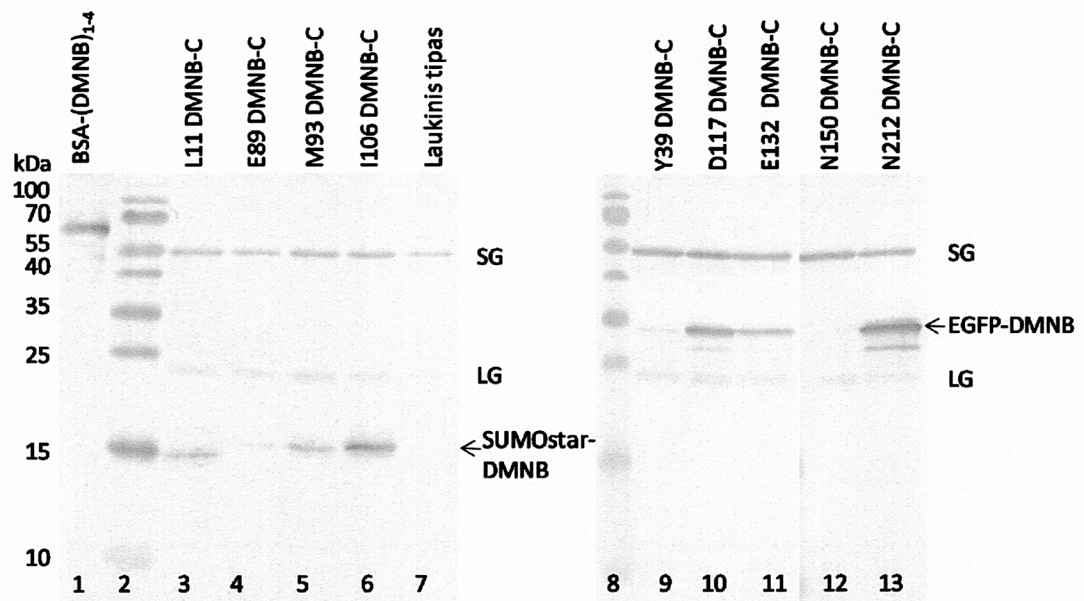


1 pav.

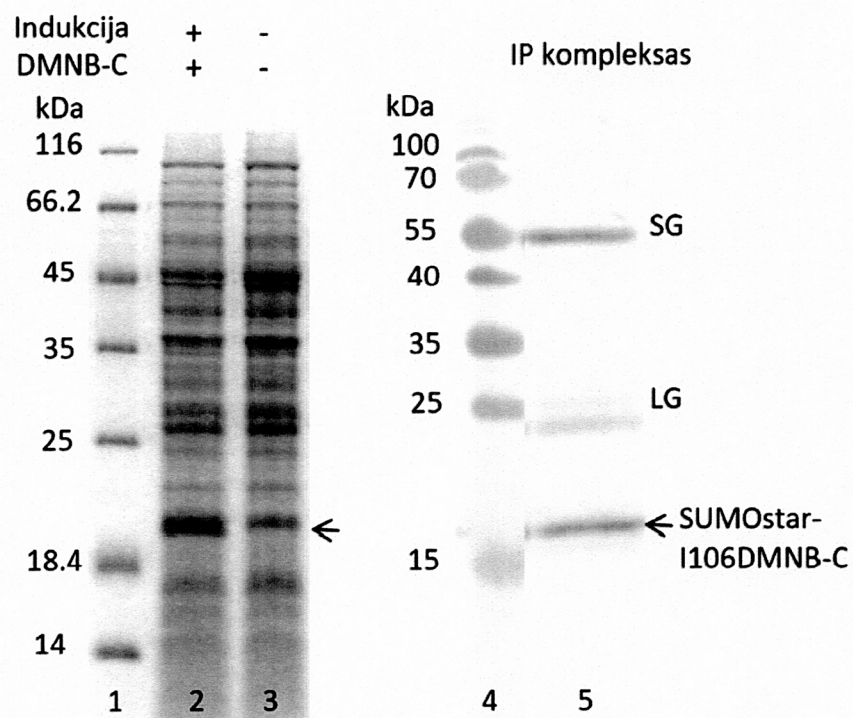


2 pav.

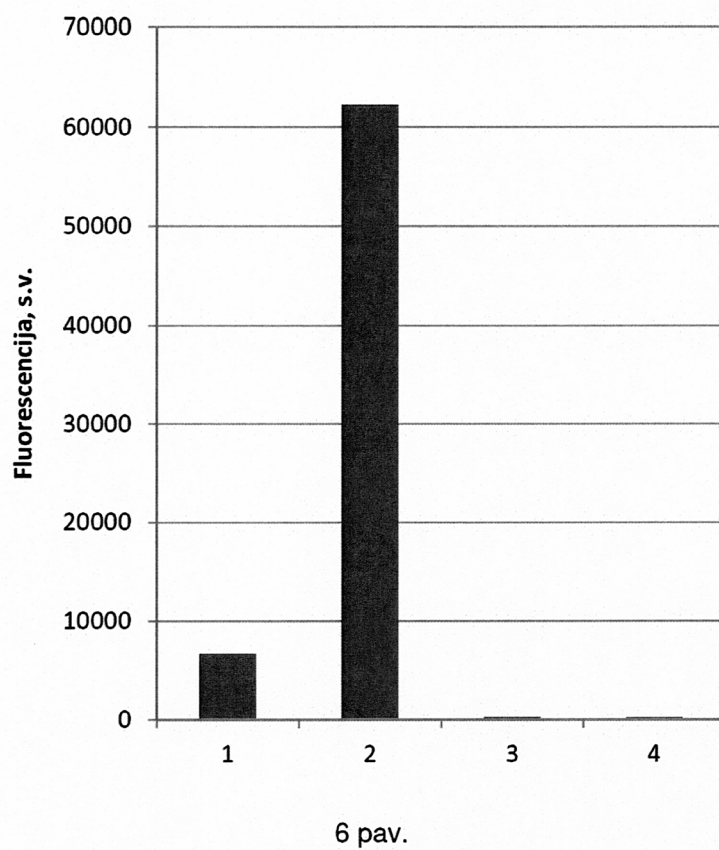


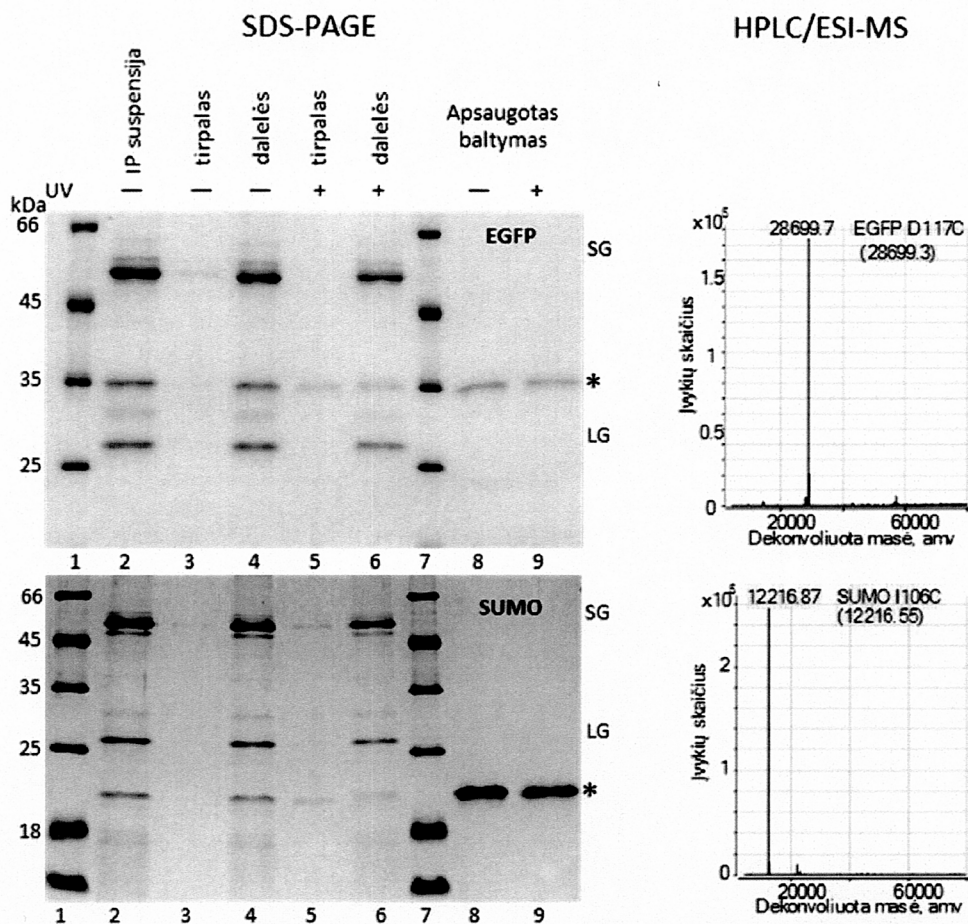


4 pav.



5 pav.





7 pav.