

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *Yersinia pseudotuberculosis* С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ, ОХАРАКТЕРИЗОВАННЫЕ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2022 г. А.А. Бывалов*, **, #, В.С. Белозёров*, **, Б.А. Ананченко*, И.В. Коньшев*, **

*Вятский государственный университет, Московская ул., 36, Киров, 610000, Россия

**Институт физиологии Коми научного центра УрО РАН, Первомайская ул., 50, Сыктывкар, 167982, Россия

#E-mail: byvalov@nextmail.ru

Поступила в редакцию 15.04.2022 г.

После доработки 13.07.2022 г.

Принята к публикации 15.07.2022 г.

Методом атомно-силовой микроскопии проведена оценка силы связи зонда, функционализированного липополисахаридом *Yersinia pseudotuberculosis*, с моноклональными антителами, иммобилизованными на слюде, а также вклада в это взаимодействие неспецифических факторов. Показано отсутствие выраженных взаимодействий между «чистым» зондом и «чистой» или обработанной тем или иным способом слюдой. Модификация «чистой» слюды (3-аминопропил)триэтоксисиланом вызывала повышение силы взаимодействия с кантилевером, покрытым липополисахаридом. Обработка аминированной слюды глутаровым альдегидом приводила к еще большему возрастанию силы неспецифического связывания. Последующая иммобилизация моноклональных антител на слюде, предварительно обработанной (3-аминопропил)триэтоксисиланом и затем глутаровым альдегидом, вызывала резкое ослабление взаимодействия, существенно менее выраженное при использовании антител, комплементарных липополисахариду, по сравнению с гетерологичными антителами. Сила специфической связи с антителами антигенов, характеризующихся склонностью к агрегации, таких как липополисахариды, по степени выраженности может уступать неспецифическому компоненту взаимодействия, включающему «деагрегацию», «развертывание» агломератов биомолекул, иммобилизованных на поверхность зонда и слюды.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, сила связи, липополисахарид, моноклональные антитела.

DOI: 10.31857/S0006302922050023, EDN: LIYGNE

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) — один из наиболее информативных биофизических методов, широко используемый в различных областях биологии. Сфера применения АСМ включает, в частности, исследование силовых характеристик взаимодействия биообъектов на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях [1–5]. Измеряемая сила таких взаимодействий составляет, как правило, от единиц-десятков пиконьютонов до десятков-сотен наноньютонов [6]. Среди используемых модельных систем есть такие, на которых можно с достаточно высокой вероятностью оценивать единичные межмолекулярные

взаимодействия. Для большинства же систем измеряются сложные, многокомпонентные взаимодействия, определяемые совокупностью отдельных, далеко не всегда идентифицируемых, межмолекулярных связей [6, 7]. При проведении подобных исследований, направленных на определение силы специфической связи между двумя целевыми биомолекулами, одной из серьезных и трудноразрешимых проблем является выявление чисто «специфического» сигнала, свидетельствующего о разрыве определяемой связи, на фоне неспецифических сигналов фотодетектора. Понятия «специфическая» и «неспецифическая» связь достаточно относительны и иногда они трактуются по-разному. Под специфическим взаимодействием обычно понимается лишь такое взаимодействие, которое является предметом данного исследования. Специфическое связыва-

Сокращения: АСМ — атомно-силовая микроскопия, ЛПС — липополисахарид, МКАт — моноклональные антитела, АРТЕС — (3-аминопропил)триэтоксисилан, ГА — глутаровый альдегид, ФБР — фосфатный буферный раствор.

ние для одного эксперимента может являться неспецифическим для другого, имеющего иную цель. Так, при оценке силы связи в системе «антиген—антитело» для некоторых бактериальных белков (например, иммуноглобулинсвязывающих белков ряда бактерий, в том числе *Yersinia pseudotuberculosis* [8]) взаимодействие с Fc-участком антител рассматривается как специфическое, а все остальные — как неспецифические. Однако в подавляющем большинстве исследований иммунохимических взаимодействий проводится оценка силы специфического взаимодействия антигенной детерминанты с Fab-фрагментом комплементарных антител. В настоящей работе именно так трактуется специфическое взаимодействие, а под неспецифическим понимаются иные сопутствующие (дополнительные) силы связи.

Взаимодействия между биологическими молекулами и различными субстратами намного сложнее, чем между небиологическими молекулами или поверхностями. Эта сложность обусловлена рядом факторов: одновременным участием множества различных молекул и различных нековалентных сил — ван-дер-ваальсовых, электростатических, сольватационных (гидратационных, гидрофобных), стерических, энтропийных и «специфических», а также гибкостью биологических макромолекул и текучестью мембран, если одним из участников взаимодействия является бактериальная клетка [9—11].

В силу различного толкования терминов «специфическое» и «неспецифическое» связывание, недостаточной изученности механизмов взаимодействия «нефункционализированный зонд — нефункционализированная подложка», влияния на это взаимодействие иммобилизованных биомолекул и др. доказательных общепринятых критериев идентификации специфических сигналов на силовых кривых до настоящего времени не представлено. Одни авторы принимают за неспецифическое связывание такое, которое на хронограмме сигнала отведения проявляется неизменностью угла его наклона до момента пересечения кривой базисной линии непосредственно после такового безотносительно к картине последующего сигнала [12, 13]. Многие авторы при оценке силовых характеристик взаимодействий ориентируются на силу последнего отрыва, который и отражает специфическое взаимодействие [14, 15]. В ряде экспериментов при наличии на хронограмме сигнала отведения нескольких скачков первый из них часто считают свидетельством разрыва неспецифической связи [16]. На гистограммах распределения сил отрыва за неспецифическое взаимодействие принимают, как правило, низкоамплитудные отрывы [17]. Существуют и иные подходы к разграничению специфической и неспецифической составляющих оцениваемой

связи, трактовка результатов подобных исследований во многом зависит от типа взаимодействующих биообъектов и условий проведения экспериментов.

В работах, направленных на количественное определение сил связи между биообъектами, в целях минимизации неспецифических взаимодействий существенным обстоятельством признается выбор способа иммобилизации на твердой фазе (зонд или подложка) целевых молекул. Так, прямой контакт между минеральным субстратом и биомолекулами приводит к изменению их пространственной ориентации и снижению подвижности, что вызывает ослабление специфического взаимодействия [5]. В этой связи для определения силы специфического взаимодействия предпочтительным признается использование гибких и длинных линкеров, например, полиэтиленгликоля, что позволяет более точно отделять исследуемое специфическое взаимодействие от неспецифической адгезии. Линкер обеспечивает присоединенной молекуле свободу вращения и тем самым делает сайты связывания более доступными. Кроме того, он обеспечивает прочное, ковалентное присоединение биомолекул к зонду с относительно низкой плотностью, что позволяет регистрировать единичные межмолекулярные взаимодействия, увеличивает расстояние между поверхностью и молекулой, что нивелирует возможные воздействия (например, электростатической природы) подложки или кантилевера на изучаемый процесс [5, 18, 19].

При выборе условий осуществления экспериментов такого рода и анализе получаемых результатов следует учитывать влияние ряда факторов на формирование неспецифической составляющей оцениваемых взаимодействий. Выраженность неспецифического связывания в значительной мере зависит от химического состава и физико-химических особенностей, в частности, ионной силы раствора, в котором проводится эксперимент [20—22]. При оценке результатов подобных исследований следует учитывать, что увеличение времени контакта функционализированного зонда с субстратом (*dwel time*), а также скорости нагружения (*loading rate*) приводит к усилению неспецифического взаимодействия [23]. В целях идентификации специфического сигнала, его обособления от неспецифической компоненты в состав реакционной среды включают компонент, комплементарный одной из целевых биомолекул, который препятствует специфическому связыванию. Его удаление (отмывание) из среды восстанавливает специфическое взаимодействие [24]. Для снижения вклада в оцениваемое взаимодействие неспецифической составляющей предлагается использование в реакционной среде детергентов (например, Твин 20), веществ с низкой реакционной способностью,

применяемых, в частности, в составе блокирующих буферов в иммунохимических реакциях, таких как бычий сывороточный альбумин [25]. Однако в полной мере избавиться от неспецифической составляющей регистрируемых сигналов взаимодействия практически невозможно. В этой связи важным представляется понимание структуры интегрального сигнала для каждого отдельного эксперимента, осуществляемого при тех или иных заранее заданных условиях.

В настоящей работе мы попытались оценить значимость неспецифической составляющей во взаимодействии липополисахарида (ЛПС) *Y. pseudotuberculosis* с моноклональными антителами, комплементарными и гетерологичными.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биомолекулы, иммобилизуемые на поверхность кантилевера и слюды. Для функционализации поверхности кантилевера использовался ЛПС, выделенный из культуры клеток *Y. pseudotuberculosis* 1b методом водно-фенольной экстракции по Вестфалу [26]. Клетки штамма-продуцента выращивали в жидкой питательной среде на основе гидролизата казеина при температуре 10°C, которая способствует образованию полноразмерных О-боковых цепей на молекуле ЛПС.

Поверхность слюды была покрыта моноклональными антителами (МКАт) двух типов: МКАт2, являющимися комплементарными эпиглобулином на О-боковых цепях ЛПС [27], и МКАт7, комплементарными белковому эпиглобулину внешней мембраны *Y. pseudotuberculosis* [28]. Перед использованием в процессе функционализации препараты ЛПС и антител центрифугировали при 13000 g в течение 15 мин и перед добавлением в реакционную смесь фильтровали через насадку Millipore с диаметром пор 0.22 мкм (Merck, Германия).

Аминирование поверхностей кантилевера и слюды. При изучении силового взаимодействия использовали кантилеверы PNP-DB (NanoWorld, Швейцария). Кантилеверы данного типа имеют зонд, заточенный методом термоокисления, за счет чего на его поверхности формируется тонкий слой оксида кремния [29]. В качестве подложки использовали слюду. Слюда относится к группе природных алюмосиликатов со слоистой структурой. При скальвании слюды формируется молекулярно-гладкая грань, содержащая на своей поверхности силанольные группы (Si-OH). Наличие на поверхности термоокисленного зонда и слюды силанольных групп позволяет проводить модификацию их поверхности с использованием органических силанов [30].

Перед проведением модификации для удаления загрязнений с поверхности зондов их подвер-

гали облучению ультрафиолетом в течение 15 мин, а слюду скальвали непосредственно перед модификацией. Модификацию аминными группами поверхностей кантилевера и свежесколоченой слюды в течение полутора часов проводили в эксикаторе в атмосфере аргона, рядом с субстратами помещали две емкости, содержащие 30 мкл (3-аминопропил)триэтоксисилана (APTES) (Sigma-Aldrich, США) и 10 мкл триэтиламина («Reachem», Россия). После инкубации слюду и зонд помещали в сушижаровой шкаф при температуре 60°C на 1 ч для десорбции несвязанных ковалентно с минеральными поверхностями молекул APTES.

Функционализация кантилевера. Функционализацию поверхности кантилевера препаратом ЛПС проводили с использованием Acetal-PEG-NHS [31]. Аминированный зонд помещали на 2 ч в 0.5 мл раствора хлороформа, содержащего 1 мг полиэтиленгликоля, любезно предоставленного доктором Н. Gruber (Institute for Biophysics, Johannes Kepler University of Linz, Linz, Austria), и 30 мкл триэтиламина. После окончания реакции зонд промывали трижды по 5 мин в хлороформе. Для перевода ацетальной группы полиэтиленгликоля в альдегидную зонд помещали в профильтрованный через насадку Millipore (размер пор — 0.22 мкм) 1%-й раствор лимонной кислоты в деионизированной воде на 10 мин. После активации ацетальной группы осуществляли промывку зонда в деионизированной воде трижды по 5 мин и помещали его на 1 ч в раствор, содержащий 100 мкл ЛПС (50–100 мкг/мл) и 20 мМ NaCNBH₃ (Sigma-Aldrich, США). Непосредственно перед этой операцией раствор ЛПС центрифугировали (13000 g, 15 мин), надосадочную жидкость фильтровали через насадку Millipore (размер пор — 0.22 мкм). Несвязавшиеся альдегидные группы блокировали добавлением в реакционную смесь 5 мкл 1 М моноэтаноламина («Reachem», Россия) с последующей инкубацией в течение 10 мин. Процесс функционализации завершали трехкратным отмыванием зонда деионизированной водой трижды по 5 мин и его сушкой с использованием фильтровальной бумаги.

Функционализация слюды. После окончания аминирования пластинки слюды помещали в 8%-й раствор глутарового альдегида (ГА) на 30 мин. Данного времени достаточно для связывания глутарового альдегида со свободными аминными группами на минеральной поверхности. Далее пластинки отмывали фосфатным буферным раствором (ФБР) трижды по 5 мин в объеме 3 мл, перенесли в ФБР, содержащий антитела в концентрации 50–100 мкг/мл, и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После функционализации пластинки тщательно отмывали ФБР. По окончании каждой из стадий функционализации

часть пластинок слюды отбирали и хранили в ФБР, оставшиеся подвергали последующим процедурам функционализации. Таким образом, кроме чистой (ничем не обработанной) слюды в работе использовали четыре типа пластин, обозначенных далее как «АРТЕS» (обработанные только АРТЕС), «ГА» (обработанные последовательно АРТЕС и ГА), «МКАт2» (обработанные последовательно АРТЕС, ГА и МКАт2), «МКАт7» (обработанные последовательно АРТЕС, ГА и МКАт7).

Иммуноферментный анализ. Подтверждение факта сенсibilизации слюды моноклональными антителами проводили с использованием твердофазного иммуноферментного анализа. Для этого в лунки 96-луночного планшета помещали предварительно аминированные и обработанные препаратами антител стеклянными пластинками площадью $\sim 20 \text{ мм}^2$. Методика функционализации стекла была идентична той, которую использовали при функционализации слюды. Процедура твердофазного иммуноферментного анализа стандартна и описана ранее [32]. Результаты реакции оценивали по показателю $ОП_{492}$.

Атомно-силовая микроскопия. Изучение поверхности образцов слюды проводили полуконтактным методом на воздухе в режиме регистрации сигнала «высота» с использованием зондов NSG30 с радиусом закругления иглы 10 нм (TipsNano, Эстония). Сканирование проводили на микроскопе «NtegraPrima» («NT-MDT», Россия) при частоте развертки 1 Гц, изображения получены с разрешением 512×512 пикселей. Анализ полученных изображений и расчет показателей шероховатости проводили с помощью программного обеспечения Nova_Px v.3.4.0. Эффективность процедуры модификации и функционализации поверхности слюды оценивали по показателям шероховатости: R_a (среднеарифметическая шероховатость) и R_z (шероховатость поверхности по выбранным пяти максимальным высотам и впадинам) [33].

Силовая спектроскопия. Оценку силовых характеристик межмолекулярного взаимодействия проводили с использованием атомно-силового микроскопа «Ntegra Prima» с измерительным вкладышем AU-208 и зондов PNP-DB (NanoWorld, Швейцария), имеющих радиус закругления около 10 нм и жесткость консоли 0.06 нН/нм. Все измерения проводили в жидкой среде (ФБР) при значении скорости нагружения (loading rate), равной 37 нН/с (скорость подведения и отведения образца была равна 0.5 мкм/с), время контакта зонда и образца – 1 с, частота дискретизации – 500 Гц.

Процедура проведения силовой спектроскопии изложена в работе [32]. Обработку силовых

кривых проводили в программе Nova_Px 3.4.0. Выбраковку графиков, имеющих отклонения, а также обработку прошедших выбраковку графиков и расчет силовых характеристик проводили в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения, разработанного авторами. За отрыв программа принимала скачок сигнала фотодетектора, превышающий средний фоновый шум не менее чем в четыре раза. Значения оцениваемых параметров представлены в виде средних ($X_{\text{mean}} \pm I_{99}$).

Общее число силовых кривых, описывающих взаимодействие чистого (ничем не обработанного) кантилевера с чистой слюдой – 1325; слюдой, покрытой МКАт2 – 1325; слюдой, покрытой МКАт7 – 1325; слюдой, покрытой АРТЕС – 325; слюдой, покрытой глутаровым альдегидом – 325; взаимодействие ЛПС-кантилевера с чистой слюдой – 1575; взаимодействие со слюдой, покрытой МКАт2 – 1575; слюдой, покрытой МКАт7 – 1575; слюдой, покрытой АРТЕС – 325; слюдой, покрытой глутаровым альдегидом – 325. Для программной выбраковки не подлежащих дальнейшему анализу графиков были предложены четыре критерия: 1) горизонтальность базисной линии на последних 100 точках, по которым определяются положение базисной линии и амплитуда шума; 2) отсутствие изменений сигнала в положительную область относительно базисной линии после последнего отрыва (линейность всей базисной линии); 3) линейность силовой кривой отведения по первым 40 точкам (плотный контакт между зондом и подложкой), которые используются для последующего пересчета показаний фотодетектора в значения силы; 4) отсутствие резких, превышающих шум, изменений сигнала в положительную область на силовой кривой от момента отведения кантилевера до пересечения с базисной линией (момент контакта). Силовые кривые, не соответствующие представленным выше критериям, в определении силовых характеристик не были использованы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы оценивали методом АСМ силовые характеристики взаимодействия между зондом, функционализированным препаратом ЛПС и слюдой, покрытой комплементарными к О-антигену липополисахарида антителами МКАт2. Для оценки влияния на названное специфическое взаимодействие иных факторов измеряли силу связи между этим зондом и «чистой», интактной слюдой, слюдой, аминированной с помощью АРТЕС, а также слюдой, обработанной АРТЕС с последующей инкубацией в растворе ГА, – две названные операции последовательно предшествуют обработке слюды антителами. Кроме того, дополнительным референс-

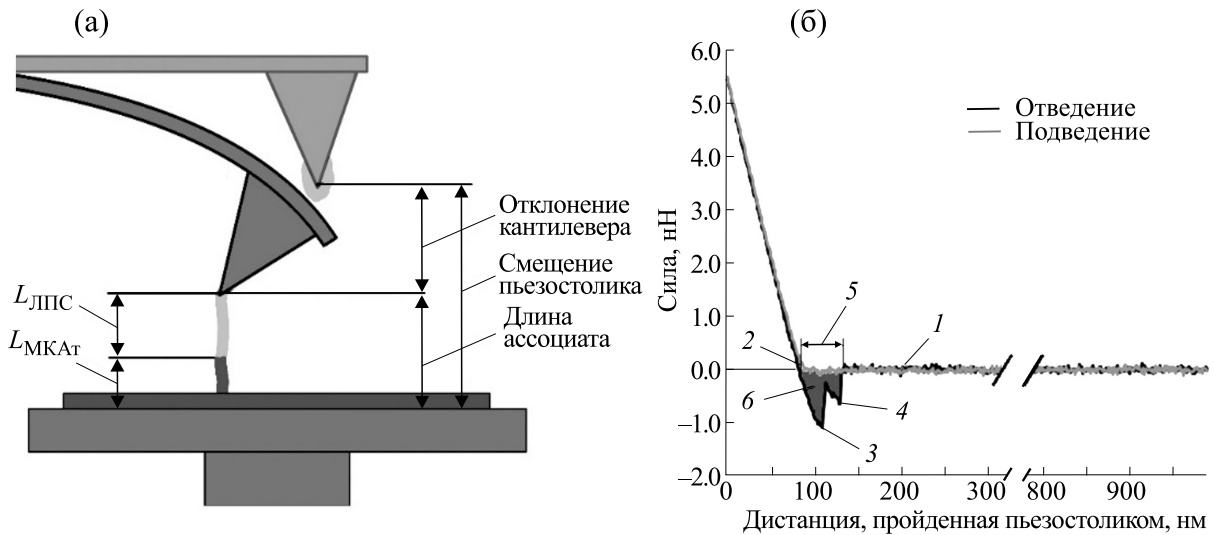


Рис. 1. (а) – Принципиальная схема измерения силовых характеристик взаимодействия методом АСМ. (б) – Пример силовой кривой взаимодействия «МКАт2 – ЛПС» где 1 – базисная линия, 2 – момент контакта зонда с субстратом, 3 – максимальная адгезия, 4 – момент разрыва последней связи, 5 – дистанция последнего отрыва, 6 – работа сил адгезии (площадь).

препаратом служила слюда, функционализированная по той же схеме, но с заменой антител МКАт2 на моноклональные антитела МКАт7, не взаимодействующие с ЛПС. Все пять вариантов слюды были использованы и для соответствующих измерений с «интактным», ничем не обработанным зондом этой же серии. Схематическое изображение процедуры экспериментов представлено на рис. 1а.

В предварительных экспериментах методом атомно-силовой микроскопии оценивали структуру поверхности слюды вышеуказанных пяти типов. Приведенные в табл. 1 результаты свидетельствуют о том, что каждая последующая операция обработки слюды, особенно иммобилизация антител, приводила к повышению ее шероховатости по показателям R_a и R_z . Иллюстрирует вышесказанное рис. 2, на котором представлены АСМ-изображения поверхности использованных в работе субстратов. Поверхность слюды, функ-

ционализированной антителами МКАт2 и МКАт7, характеризуется достаточно равномерным и плотным распределением отдельных агрегатов, имеющих приблизительно одинаковые размеры (рис. 2г,д). Аналогичная картина поверхности функционализированной слюды наблюдалась и при ином методе ковалентной иммобилизации антител [32]. Эффективность сенсibilизации поверхности слюды антителами была подтверждена методом твердофазного иммуноферментного анализа: средние значения $ОП_{492}$ для субстрата, обработанного МКАт2 и МКАт7, составили соответственно 1.981 и 1.551; в контроле (слюда, обработанная АРТЕS) это значение составило 0.291.

Для характеристики силы взаимодействия ЛПС-МКАт определяли несколько показателей, измеряемых при отведении пьезостолика от кантилевера (рис. 1а,б): количество отрывов (1); среднюю силу (амплитуду) всех отрывов (2); силу

Таблица 1. Шероховатость образцов слюды

№	Слюда	Шероховатость	
		R_a , нм	R_z , нм
1	Чистая	0.019 ± 0.002	0.089 ± 0.011
2	АРТЕS	0.031 ± 0.004	0.136 ± 0.029
3	ГА	0.041 ± 0.010	0.191 ± 0.038
4	МКАт2	0.330 ± 0.055	1.277 ± 0.332
5	МКАт7	0.277 ± 0.048	1.133 ± 0.260

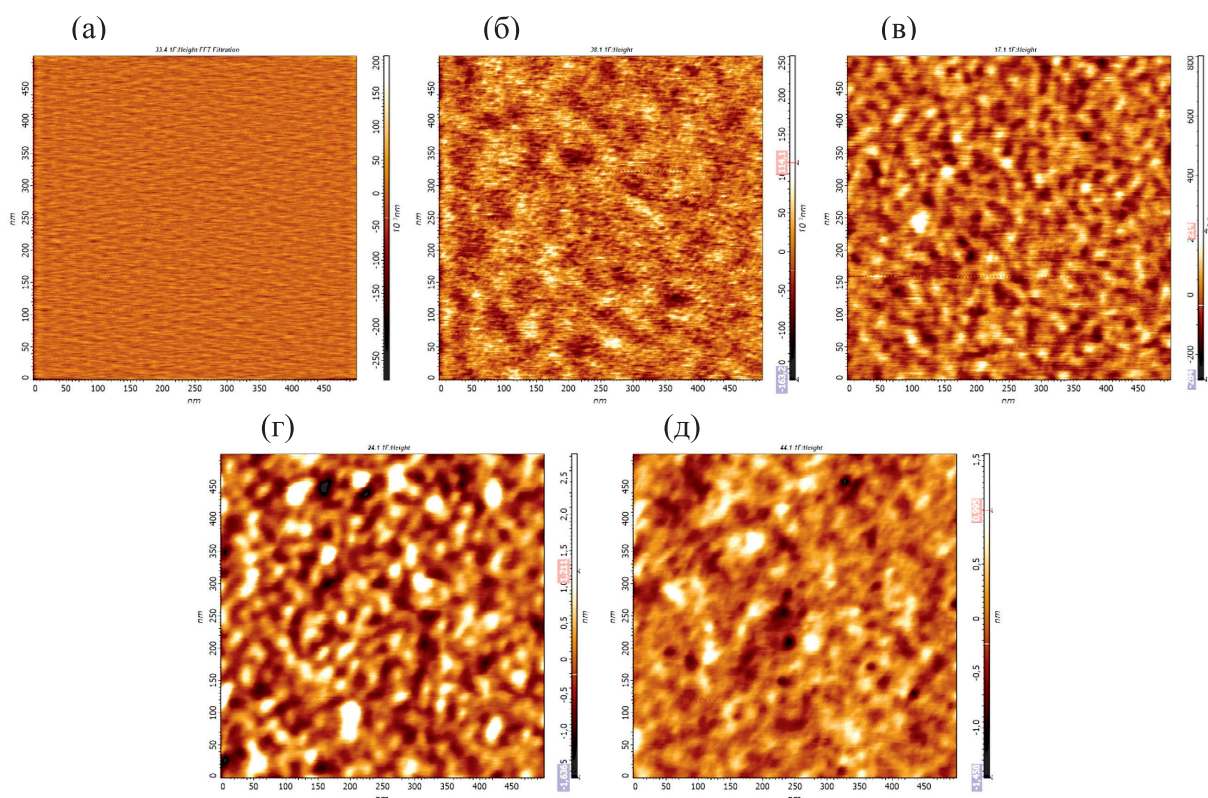


Рис. 2. АСМ-изображения поверхности свежесколотой слюды (а), слюды, обработанной АРТЕS (б), обработанной последовательно АРТЕS и ГА (в), обработанной последовательно АРТЕS, ГА, МКАт2 (г) или МКАт7 (д) при размерах области сканирования $0,5 \times 0,5$ мкм.

(амплитуду) последнего отрыва (3); дистанцию, на которой произошел последний отрыв (4); работу, затрачиваемую на разрыв всех связей и соответствующую площади между кривой отведения и базисной линией (5); максимальную адгезию, определяемую как наибольшее расстояние от точки на кривой отведения до базисной линии (6); длину ассоциата (агломерата) ЛПС-МКАт, под которой в данном эксперименте понимается расстояние от поверхности слюды до острия кантилевера в момент разрыва последней связи, определяемое как сумма длины ассоциата ЛПС ($L_{\text{ЛПС}}$) и длины ассоциата антители ($L_{\text{МКАт}}$) (7).

Обобщенные результаты оценки силовых характеристик взаимодействий представлены в табл. 2 в виде средних значений указанных выше показателей для всех десяти пар объектов.

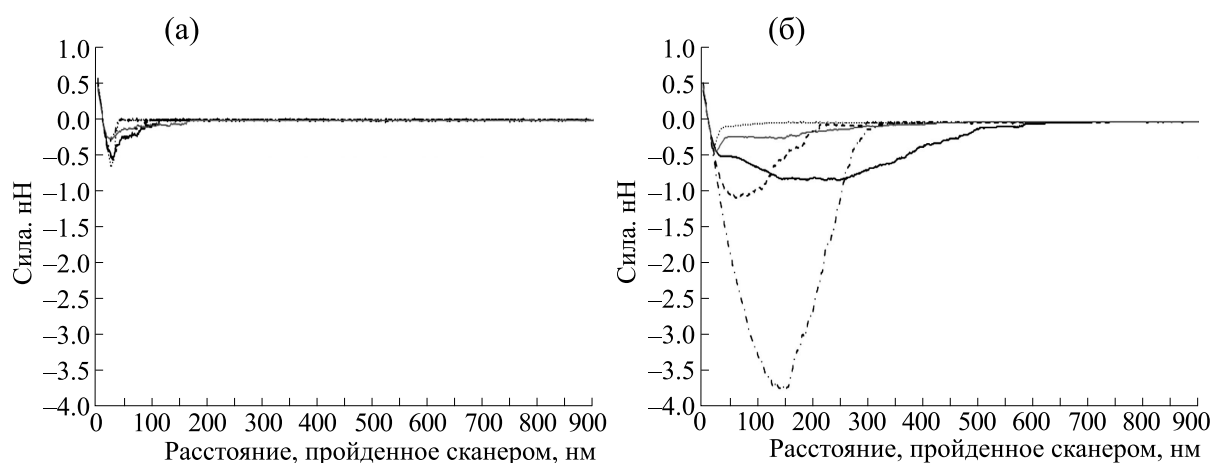
На рис. 3 и 4 представлены также усредненные хронограммы сигнала фотодетектора (в координатах «сила — дистанция, пройденная сканером») для всех пяти типов слюды при отведении интактного и функционализированного ЛПС кантилеверов. При усреднении хронограмм за нулевую точку принимали точку пересечения кривой отведения с базисной линией.

Анализ индивидуальных и усредненных кривых подведения для всех десяти пар сравниваемых объектов показал отсутствие значимых свидетельств их притяжения или отталкивания до момента касания при использованных условиях эксперимента (данные не представлены). Взаимодействия регистрировали только после соприкосновения и односекундного контакта зонда и субстрата.

Как видно из рис. 3а, все неспецифические взаимодействия материала интактного (чистого) зонда с разнокачественными вариантами слюды, включая обработанные антителями двух специфичностей, являются мало выраженными относительно функционализированного зонда. Из числа пяти типов слюды, по-видимому, несколько большее взаимодействие с интактным кантилевером отмечено для слюды «АРТЕS» (рис. 3а и 4). Эти данные качественно подтверждают результаты авторов работы [11], зарегистрировавших притяжение аминированного с помощью APDES зонда (нитрид кремния) к поверхности стекла; не обработанный APDES зонд указанного свойства не проявлял. Авторы объясняют данный эффект адгезии действием электростатических (положительно заряженные аминогруппы и от-

Таблица 2. Влияние метода обработки слюды на силовые характеристики ее взаимодействия с кантилеверами «чистым» и функционализированным ЛПС *Y. pseudotuberculosis*

Кантилевер	Слюда	Показатели, $X_{\text{mean}} \pm I_{99}$							
		Сила последнего отрыва, нН	Работа сил адгезии, Дж $\times 10^{-15}$	Средняя сила всех отрывов, нН	Максимальная адгезия, нН	Длина ассоциата, нм	Дистанция последнего отрыва, нм	Количество отрывов	Количество отведений с отрывами, %
Чистый	Чистая	1.078 \pm 0.132	0.12 \pm 0.02	1.078 \pm 0.132	1.148 \pm 0.106	0.7 \pm 0.4	18.6 \pm 2.2	1.00 \pm 0.00	65.5
	ARTES	1.051 \pm 0.260	0.20 \pm 0.08	1.042 \pm 0.208	1.097 \pm 0.248	13.2 \pm 9.8	30.7 \pm 10.7	1.30 \pm 0.21	100.0
	ГА	0.926 \pm 0.506	0.16 \pm 0.19	1.063 \pm 0.447	0.963 \pm 0.501	7.5 \pm 6.2	22.9 \pm 12.3	1.42 \pm 0.67	80.0
	МКАт2	0.686 \pm 0.184	0.16 \pm 0.09	0.778 \pm 0.168	0.852 \pm 0.207	20.3 \pm 6.8	31.7 \pm 7.9	1.46 \pm 0.30	51.3
	МКАт7	0.585 \pm 0.187	0.11 \pm 0.05	0.602 \pm 0.150	0.655 \pm 0.174	18.6 \pm 5.2	28.3 \pm 6.7	1.28 \pm 0.21	43.3
Функционализированный ЛПС	Чистая	0.538 \pm 0.035	0.10 \pm 0.02	0.547 \pm 0.034	0.627 \pm 0.033	12.2 \pm 3.9	21.1 \pm 4.0	1.10 \pm 0.03	73.5
	ARTES	1.876 \pm 0.302	1.28 \pm 0.32	2.117 \pm 0.232	2.365 \pm 0.322	103.7 \pm 34.5	134.9 \pm 33.5	1.82 \pm 0.20	93.6
	ГА	5.461 \pm 0.375	6.05 \pm 0.61	5.199 \pm 0.220	6.032 \pm 0.379	77.0 \pm 5.2	167.8 \pm 8.9	2.76 \pm 0.19	99.3
	МКАт2	2.267 \pm 0.211	2.66 \pm 0.45	2.650 \pm 0.161	2.383 \pm 0.215	85.3 \pm 6.6	123.0 \pm 9.6	1.96 \pm 0.12	78.0
	МКАт7	1.169 \pm 0.134	0.59 \pm 0.16	1.447 \pm 0.124	1.251 \pm 0.129	33.4 \pm 4.0	52.8 \pm 5.6	1.53 \pm 0.08	72.5

**Рис. 3.** Усредненные хронограммы сигнала отведения слюды от чистого кантилевера (а) и кантилевера, покрытого ЛПС (б). Хронограммы взаимодействия кантилеверов выполнены в виде точек (чистая слюда), пунктирной линии (слюда «ARTES»), штрих-пунктирной линии (слюда «ГА»), сплошной черной линии (слюда «МКАт2») и сплошной серой линии (слюда «МКАт7»).

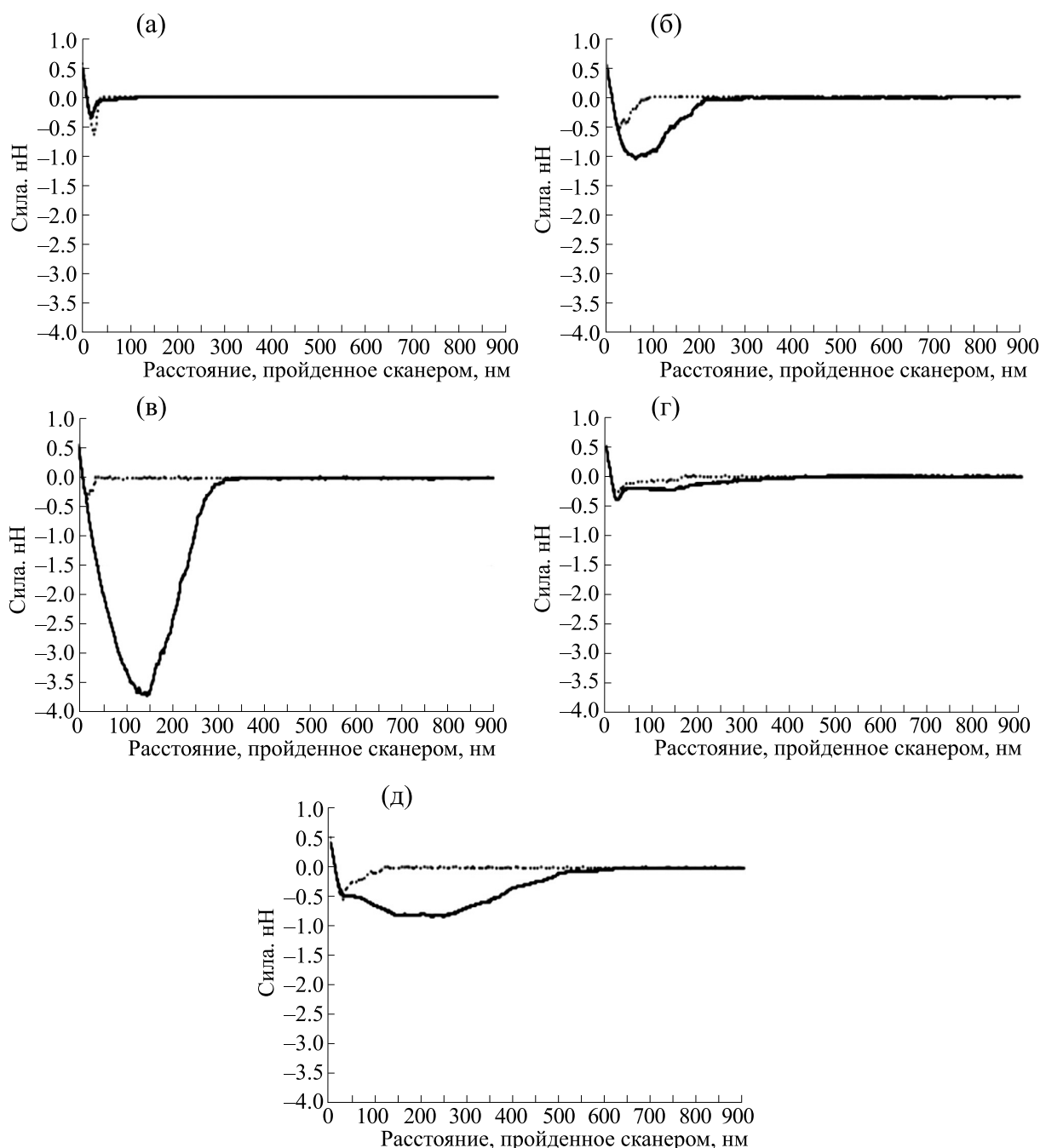


Рис. 4. Усредненные хронограммы сигнала отведения чистой слюды (а) и слюды, обработанной препаратами АРТЕS (б), глутарового альдегида (в), МКАт7 (г) и МКАт2 (д) от чистого кантилевера (точки) и кантилевера, функционализированного ЛПС (сплошная линия).

рицательно заряженная поверхность стекла) и гидрофобных взаимодействий. Последние определяются заменой силанольных групп на поверхности зонда на аминокруппы [11]. Можно отметить, что усредненная кривая для интактной слюды и слюды «ГА» выходит на базисную линию через ~40 нм после начала отведения пьезостолика; для слюды, модифицированной АРТЕS, а так-

же обработанной МКАт2 и МКАт7, выход кривых на базисную линию происходит значительно позднее, через 100 и более нм (рис. 3а).

Иная картина наблюдается при использовании кантилевера, функционализированного ЛПС (рис. 3б и 4). Если наличие/отсутствие молекул ЛПС на поверхности зонда мало отражается на его адгезивности к интактной слюде

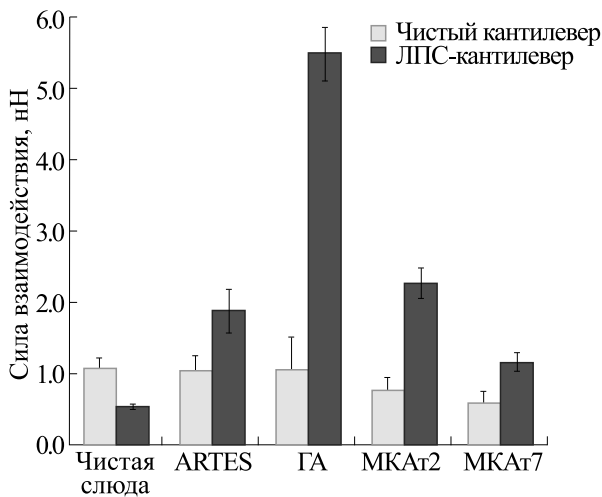


Рис. 5. Средняя сила разрыва последней связи. Доверительные интервалы указаны для $p = 0.01$.

(рис. 4а), то в остальных четырех случаях функционализированный ЛПС кантилевер вызывает существенно более выраженное взаимодействие с субстратами по сравнению с интактным кантилевером. Последнее объясняется в том числе тем, что выделенные из бактериальной массы препараты ЛПС склонны к агрегации во времени и, в зависимости от его концентрации и состава раствора, могут находиться в виде высокомолекулярных структур (ассоциатов, агломератов) различных формы и размера [34]. При взаимодействии функционализированного ЛПС кантилевера и аминированной слюды регистрируются выраженные неспецифические силовые взаимодействия. Эти данные согласуются с результатами работы [35], в которой при помощи установки для изучения поверхностных сил авторы показали, что сила взаимодействия в системе «ЛПС – аминированная ARTES слюда» значительно превышает взаимодействие в системе «ЛПС – немодифицированная слюда». Вероятно, между аминогруппами модифицированной слюды и молекулами ЛПС происходит образование большого числа связей, имеющих кислотно-основную природу, обусловленную присутствием на молекулах ЛПС свободных фосфатных, карбоксильных и гидроксильных групп.

Силы взаимодействий между функционализированным ЛПС зондом и аминированной слюдой резко возрастают после последующей ее обработки глутаровым альдегидом. Природа взаимодействий в системе «ЛПС – слюда «ГА»» не совсем ясна. Так, считается, что карбогидраты слабо взаимодействуют с альдегидами. Вместе с тем, альдегиды могут в порядке убывания силы взаимодействия реагировать с ϵ -, α -, вторичными аминогруппами и гидроксильными функциональными

группами [36]. Полисахаридная часть ЛПС содержит большое число гидроксильных групп, при этом даже в случае образования слабых водородных связей в системе «альдегидная группа – гидроксильная группа» интегральная сила взаимодействия множества отдельных частных связей может достигать больших величин. Общеизвестно также, что альдегидные группы легко вступают в реакцию с аминогруппами с образованием ковалентной связи. Можно предположить, что значительная сила связи обусловлена в том числе взаимодействием между свободными аминогруппами молекулы ЛПС и альдегидными группами подложки, поскольку известно, что содержание общего белка в препаратах ЛПС, выделенных даже жесткими методами, может достигать 1.5–2.5%. Использованный нами в работе препарат ЛПС включал в качестве прочно связанной примеси 1.3% белка.

Заключительная стадия функционализации моноклональными антителами слюды, предварительно обработанной последовательно ARTES и затем ГА, при использовании ЛПС-кантилевера приводила к резкому падению силы взаимодействия, выраженному в на много большей степени для слюды «МКАт7» по сравнению с «МКАт2» (табл. 2, рис. 3б). Последнее обстоятельство указывает на то, что «пришитые» антитела, как МКАт2, так и МКАт7, экранируют на поверхности слюды реакционно-активные группы ГА, способные взаимодействовать с молекулами ЛПС. Вместе с тем существенная разница в адгезивности функционализированного ЛПС кантилевера к слюде, покрытой комплементарными этому антигену и гетерологичными антителами, свидетельствует о весомом вкладе в регистрируемое взаимодействие «МКАт2-ЛПС» специфической составляющей.

Наиболее часто используемыми и показательными силовыми характеристиками изучаемых взаимодействий в разнообразных системах «лиганд – рецептор» являются сила последнего разрыва связей и площадь между кривой отведения и базисной линией (работа сил адгезии). Последний отрыв в такого рода исследованиях, как предполагается [14], отражает разрыв специфической связи непосредственно между молекулами, иммобилизованными на поверхность зонда и субстрата. Площадь между кривыми подведения и отведения соответствует работе, которую необходимо приложить для разрыва всех связей, как специфических, так и неспецифических [37].

Рис. 5 и 6 иллюстрируют наличие специфической и неспецифической составляющих взаимодействий при использовании кантилеверов двух типов, функционализированного ЛПС и интактного, для двух наиболее демонстративных критериев силы разрываемых связей – силе последнего

отрыва (рис. 5) и работе сил адгезии (рис. 6). Применительно к intactному кантилеверу по указанным показателям значимость процедуры той или иной обработки слюды существенно ниже по сравнению с ЛПС-кантилевером. Обращает на себя внимание аналогичный характер результатов сравнительной оценки амплитуды последнего отрыва и работы, затрачиваемой на разрыв всех связей. В частности, более высокие значения обоих показателей для слюды, покрытой МКАт2, по сравнению с МКАт7, при использовании функционализированного ЛПС кантилевера подтверждают наличие специфического компонента связи (рис. 5 и 6). Об этом можно судить при сравнении названных систем не только по двум вышеуказанным показателям, но и таким, как дистанция последнего отрыва, длина ассоциата, среднее количество отрывов, доля отведений, имеющих хотя бы один отрыв (табл. 2). По-видимому, относительно более высокие значения использованных показателей для пары «МКАт2 – ЛПС» объясняются наличием в препарате ЛПС, иммобилизованном на зонде, достаточно крупных ассоциатов (агломератов) субъединиц антигена, отрыв которых от субстрата требует преодоления не только сил специфического связывания, но и опосредуемых ими неспецифических сил дезагрегации ассоциата, очевидно, превышающих таковые для пары «МКАт7 – ЛПС», в которой нет специфического взаимодействия «антиген – антитело». Вместе с тем достаточно высокие абсолютные значения показателей взаимодействия в паре «МКАт7 – ЛПС» могут свидетельствовать о том, что степень выраженности суммарной неспецифической составляющей во взаимодействии «МКАт2 – ЛПС» по крайней мере сопоставима с таковой у его специфического компонента, если не выше. Так, по литературным данным сила единичной связи между молекулами антигена и антитела в подобных системах зависит, в частности, от скорости отведения и, как правило, не превышает 250–280 пН [38]. В наших экспериментах средняя сила последнего отрыва в паре «МКАт2 – ЛПС» превысила 2.2 нН (табл. 2), что свидетельствует о разрыве сильного неспецифического взаимодействия, которое может превышать специфическое взаимодействие, и, кроме того, одновременном разрыве множественной специфической связи «антиген – антитело», поскольку область контакта острия кантилевера и субстрата значительно превышает размеры одной белковой молекулы [39, 40].

Следует подчеркнуть, что последний (и часто единственный) отрыв в оцениваемой связи «МКАт2 – ЛПС» содержит неспецифическую составляющую. На это указывают относительно большие значения показателя «сила последнего отрыва» и, косвенно, показателей «дистанция последнего отрыва», «длина ассоциата», «среднее

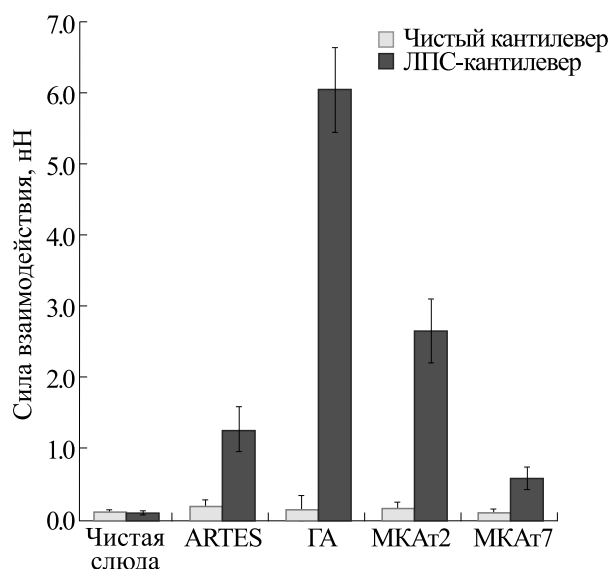


Рис. 6. Площадь между кривыми подведения и отведения (работа сил адгезии). Доверительные интервалы указаны для $p = 0.01$.

количество отрывов» для субстратов без МКАт2, в первую очередь, для пары «МКАт7 – ЛПС» (рис. 3, табл. 2). В этой связи можно ли утверждать, что каждый последний отрыв в системе «МКАт2 – ЛПС» содержит специфическую компоненту, то есть отражает ли он в том числе и разрыв связи между Fab-фрагментом МКАт2 и О-антигеном липополисахарида? По-видимому, нельзя, поскольку, как можно судить по представленным в табл. 2 результатам, силы неспецифического связывания достаточно велики и могут целиком опосредовать последний отрыв. Даже если отрыв (в том числе и последний) включает специфическую в указанном выше смысле составляющую, прикладываемая сила разрывает не только такую связь, но и сопутствующую неспецифическую, определяемую в том числе и дезагрегацией биомолекул. Поэтому при количественной оценке взаимодействия «антиген – антитело» ориентироваться на абсолютные значения силы последнего отрыва не следует, во всяком случае, как и в наших экспериментах, для биомолекул, имеющих склонность к агрегации. Точность таких измерений относительна и в силу других причин – шероховатости соприкасающихся поверхностей, адсорбции на них примесных компонентов, способа ковалентного связывания биомолекул к твердой фазе, определяющего доступность реакционноспособных сайтов для иммуноспецифического взаимодействия, и др. [11, 41]. Кроме того, существуют разные подходы к идентификации отрыва как отрыва, выбраковке отдельных хронограмм, иные различия в проце-

дуре измерений, статистической обработке и трактовке полученных результатов.

Литературные данные, а также вышеприведенные результаты экспериментов свидетельствуют о том, что применительно к изучению методом АСМ силы связи между двумя биообъектами неспецифические связи можно квалифицировать следующим образом.

1. Взаимодействие минеральных материалов зонда и подложки (субстрата) между собой.

2. Взаимодействие каждого из них с биообъектом (биомолекулами), иммобилизованным на другом.

3. К числу неспецифических взаимодействий следует отнести, очевидно, также и события, которые вызывают изменения сигнала, отражающие дезагрегацию биомолекул; исследуемые биомолекулы могут иметь различные химический состав, физико-химические свойства, пространственную организацию или представлять собой агломераты, как, например, препараты бактериальных липополисахаридов [32, 42]. Дезагрегация такого агломерата может иметь место и в отсутствие специфической связи, но наличие последней требует повышения суммарной работы, затрачиваемой на разрыв всех связей.

4. Вполне вероятно также, что существенный вклад в силу формируемой связи вносит и компонента, определяемая неспецифическим, единичным или множественным, взаимодействием соприкасающихся участков биомолекул, не имеющих прямого отношения к определяемой связи «антигенная детерминанта – Fab-фрагмент антител». Указанная компонента, очевидно, также может влиять на количество работы, требуемой для дезагрегации агломератов макромолекул.

ВЫВОДЫ

Совокупность представленных экспериментальных данных свидетельствует о том, что неспецифические связи, регистрируемые в проведенных экспериментах, включают взаимодействия не только между минеральными носителями, но и, в гораздо большей степени, взаимодействия, определяемые иммобилизованными на них биомолекулами. По-видимому, последние регистрируются в результате дезагрегации агломератов ЛПС (и в меньшей степени – агломератов антител) при отведении сенсibilизированного ЛПС кантилевера от субстрата, покрытого антителами; указанная неспецифическая составляющая взаимодействия ЛПС кантилевера с субстратом, обработанным комплексными антителами МКАт2, оказалась существенно выше по сравнению с гетерологичными антителами МКАт7. При этом следует подчеркнуть резкое снижение неспецифического связывания ЛПС-кантилевера

со слюдой, предварительно обработанной АРТЕС и далее ГА, за счет последующего блокирования препаратами антител ее реакционно-активных групп, способных к взаимодействию с ЛПС. Учитывая вышеизложенное, количественное выявление из интегрального сигнала фотодетектора компонента, который бы соответствовал чисто специфической связи «молекула антигена – молекула антител», представляется сложной проблемой вследствие неотъемлемого и не всегда строго идентифицируемого влияния на разрывающую связь неспецифических факторов. Их природа, количество и степень выраженности определяются выбранными условиями проведения эксперимента. В подобного рода исследованиях целесообразным и продуктивным представляется использование нескольких, желательнее радикально различающихся и взаимодополняющих методических подходов, совокупные результаты применения которых должны давать более объективную, взвешенную оценку подобных взаимодействий.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-34-90013, а также гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых-кандидатов наук (№ МК-3383.2021.1.4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. Nandi and S.R.K. Ainaravaru, *Emerg. Top. Life Sci.* **5** (1), 103 (2021).
2. M.Y. Amarouch, J. El Hilaly, and D. Mazouzi, *Scanning* **2018**, 7801274 (2018).
3. S. Liu and Y. Wang, *Scanning* **32**(2), **61** (2010).
4. Z. Bednarikova, Z. Gazova, F. Valle, and E. Bystrenova, *J Microsc.* **280** (3), 241 (2020).
5. C. Lo Giudice, A.C. Dumitru, and D. Alsteens, *Anal Bioanal Chem* **411** (25), 6549 (2019).
6. L.S. Dorobantu and M.R. Gray, *Scanning* **32** (2), 74 (2010).
7. C. Formosa-Dague, M. Castelain, H. Martin-Yken, et al., *Microorganisms* **6** (2), 39 (2018).

8. E.V. Sidorin and T.F. Solov'eva. *Biochemistry (Mosc)*. **76** (3), 295 (2011).
9. J. Israelachvili, *Q Rev Biophys*. **38** (4), 331 (2005).
10. A. Elbourne, J. Chapman, A. Gelmi, et al., *J Colloid Interface Sci*. **546**, 192 (2019).
11. T.S. Tsapikouni and Y.F. Missirlis, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **75** (1), 252 (2010).
12. O.H. Willemsen, M.M. Snel, K.O. van der Werfs, et al., *Biophys. J.* **75**, 2220 (1998).
13. L. Chih-Kung, W. Yu-Ming, H. Long-Sun, and L. Shiming, *Micron* **38** (5), 446 (2007).
14. M. Utjesanovic, T.R. Matin, K.P. Sigdel, et al., *Sci Rep*. **9** (1), 451 (2019).
15. C.T. Lim, E.H. Zhou, A. Li, et al., *Mater. Sci. Eng.* **26** (8), 1278 (2006).
16. M. Targosz, P. Czuba, R. Biedron, et al., *ACTA PHYSICA POLONICA A* **109** (3), 421 (2005).
17. E. Brzozowska, A. Leśniewski, S. Sęk, et al., *Sci. Rep.* **8** (1), 10935 (2018).
18. И.В. Сафенкова, А.В. Жердев и Б.Б. Дзантиев, *Успехи биологической химии* **52**, 281 (2012).
19. A. Beaussart and S. El-Kirat-Chatel, *Cell Surf.* **5**, 100031 (2019).
20. Y. Wang, J. Wang, J. Sun, et al., *J Nanosci Nanotechnol* **19** (12), 7584 (2019).
21. S. Ramezani, H.X. Ta, B. Muhunthan, and N. Abu-Lail, *Biointerphases* **13** (4), 041005 (2018).
22. M.M. Elmahdy, A. Drechsler, C. Gutsche, et al., *Langmuir* **25** (22), 12894 (2009).
23. E. Celik and V.T. Moy, *J Mol Recognit.* **25** (1), 53 (2012).
24. J.R. King, C.M. Bowers, and E.J. Toone, *Langmuir* **31** (11), 3431 (2015).
25. J. Wakayama, H. Sekiguchi, S. Akanuma, et al., *Anal Biochem.* **380** (1), 51 (2008).
26. O. Westphal and K. Jann, *Methods in Carbohydrate Chemistry* **5**, 83 (1965).
27. A.A. Byvalov, L.G. Dudina, S.G. Litvinets, et al., *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **50** (2), 203 (2014).
28. A.A. Byvalov, L.G. Dudina, A.V. Chernyad'ev, et al., *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* **33** (2), 32 (2015).
29. H. He, J. Zhang, J. Yang, and F. Yang, *Microsyst. Technol.* **23**, 1799 (2017).
30. S. Kim, H.K. Christenson, and J.E. Curry, *Langmuir* **18**, 2125 (2002).
31. A. Ebner, L. Wildling, and H.J. Gruber, *Methods Mol. Biol.* **1886**, 117 (2019).
32. B. Ananchenko, V. Belozherov, A. Byvalov, et al., *Int. J. Biol. Macromol.* **156**, 841 (2020).
33. ISO 4287:2000, Geometrical product specification (GPS). Surface texture. Profile method. Terms, definitions and surface texture parameters, International Organization of Standardization.
34. N.C. Santos, A.C. Silva, M.A. Castanho, et al., *Chem-biochem.* **4** (1), 96 (2003).
35. Q. Lu, J. Wang, A. Faghihnejad, et al., *Soft Matter* **7** (19), 9366 (2011).
36. I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, and K.C. Waldron, *Biotechniques* **37** (5), 790 (2004).
37. R. Popeski-Dimovski, *Carbohydr Polym.* **123**, 146 (2015).
38. H. Gao, X.X. Zhang, and W.B. Chang, *Front Biosci.* **10**, 1539 (2005).
39. Y. Wang, J. Wang, S. Huang, et al., *Int J Biol Macromol.* **134**, 28 (2019).
40. C. Wang, J. Wang, and L. Deng, *Nanoscale Res Lett.* **6** (1), 579 (2011).
41. H.J. Butta, B. Cappella, and M. Kappl, *Surface Science Reports* **59**, 1 (2005).
42. W. Kaca, J. Gleńska-Olender, I. Konieczna, et al., *Methods Mol Biol.* **2021**, 273 (2019).

Specific and Non-Specific Interactions of *Yersinia pseudotuberculosis* Lipopolysaccharide with Monoclonal Antibodies Assessed by Atomic Force Microscopy

A.A. Byvalov*, **, V.S. Belozherov*, **, B.A. Ananchenko*, and I.V. Konyshov*, **

*Vyatka State University, Moskovskaya ul. 36, Kirov, 610000 Russia

**Institute of Physiology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Pervomaiskaya ul. 50, Syktyvkar, 167982 Russia

Atomic force microscopy (AFM) was employed to quantify the interaction force between a probe coated with *Yersinia pseudotuberculosis* lipopolysaccharide (LPS) (a LPS-functionalized probe) and monoclonal antibodies immobilized on mica; contribution of nonspecific factors to this interaction was evaluated. No evidence was observed for the presence of discernable interactions between the "pure" probe and "pure" mica or mica subjected to any treatments. Surface modification of "pure" mica with (3-aminopropyl)triethoxysilane led to an increase in the forces of interaction between an LPS-covered AFM cantilever tip and mica. Treatment of surface-aminated mica with glutaric aldehyde caused further increase in nonspecific binding force. Subsequent immobilization of monoclonal antibodies on mica pretreated with (3-aminopropyl)triethoxysilane and then with glutaric aldehyde induced a sharp decrease in the interaction, decrease was significantly less pronounced in the presence of specific anti-lipopolysaccharide antibodies than decrease in the presence of heterologous antibodies. The force of specific binding to antibodies of antigens that have a tendency to aggregate, such as lipopolysaccharides, can be lower than the force of nonspecific interaction, including "disaggregation", "unfolding" of agglomerates of biomolecules immobilized on the probe and mica surface.

Keywords: atomic force microscopy, binding force, lipopolysaccharide, monoclonal antibodies