

Моноклональные Антитела к Транскрипционным Факторам

Предварительная Характеристика для Использования в Аффинном Связывании

Д. Маракулина, М. Минкевич, А. Прадас, К. Суханова, Д. Стрелкова, Д. ЛаКава

Введение

Возможности клеток в основном регулируются через сети белок-белковых взаимодействий (ББВ). Изучение таких сетей позволяет полно понимать клеточную биологию на молекулярном уровне. Более того, между изменениями в ББВ и различными заболеваниями очень часто можно проследить связь. В нашей работе мы решили предпринять подготовительную попытку очистить белковые комплексы связанные с транскрипционными факторами, используя метод аффинного связывания.

Мы выбрали для изучения транскрипционные факторы, потому что они напрямую влияют на экспрессию генов и для многих транскрипционных факторов сеть ББВ описана очень скудно. Понимание того, какие белки взаимодействуют с транскрипционными факторами, позволит получить полную картину ББВ, которые контролируют экспрессию генов, информация о которых может привести к прорыву в нашем понимании биологии транскрипционных факторов и в биомедицине

Пример: Белок p53, чьим транскрипционным фактором является белок Trp53, это опухолевый супрессор. Такие белки часто контролируют переход клетки к делению, препятствуют слишком быстрому или неконтролируемому размножению и росту клеток, также контролируют репарацию ДНК. Опухолевые супрессоры могут посылать клетке сигналы, которые активируют апоптоз, когда репарация ДНК не может восстановить повреждения.

В нашей работе мы использовали антитела к транскрипционным факторам Trp53, STAT3 и SMAD7, что бы при помощи аффинного связывания выделить комплексы этих транскрипционных факторов с другими белками клетки.

Методы



1. Разрушение клеток

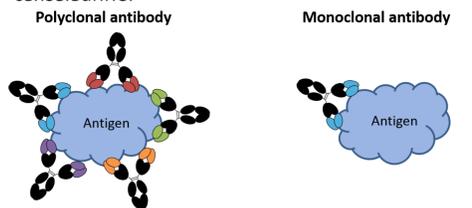
В наших экспериментах мы использовали планетарную шаровую мельницу чтобы получить клеточный порошок. Клетки разрушаются в твердом состоянии при температуре жидкого азота. Принцип работы мельницы заключается в том, что металлические шары в сосуде совершают накладывающиеся вращательные движения (планетарные). Создающиеся силы взаимодействия еретируют клетки в мельчайшую пудру с частицами размером около одного микрометра.

most stabilizing strongly hydrated anions	most destabilizing weakly hydrated anions
$\text{citrate}^{3-} > \text{sulfate}^{2-} > \text{phosphate}^{2-} > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^-$	
$\text{N(CH}_3)_4^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Al}^{3+}$	
weakly hydrated cations	strongly hydrated cations

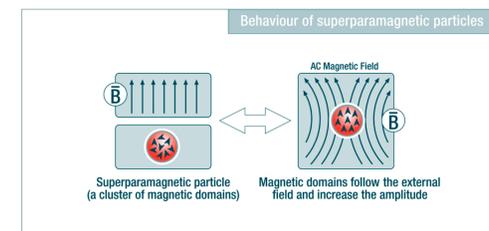
Диаграмма описана справа → комплекса и комплекс распадается.

2. Антитела

Антитело это Y-образный белок, используемый иммунной системой для идентификации и нейтрализации патогенов с помощью связывания с целью на незнакомой молекулу с высоким сродством. Благодаря этим свойствам антитела используются в качестве реагентов для идентификации и/или выделения белков или белкового комплексов. Антитела состоят из 4 цепей (2 тяжелые, 2 легкие) и включают переменные домены на N-терминале белка (паратопе), которые позволяют контактировать антигенами (эпитопом). Эта особенность нашла применение в различных биохимических анализах, включая Вестерн-блот и аффинное связывание.



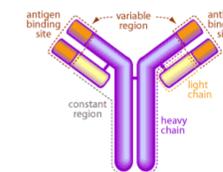
3. Суперпарамагнитные бусины



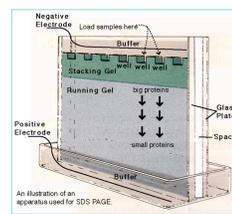
Мы использовали суперпарамагнитные бусины (Dynabeads M-270 Ероху) как нерастворимую основу для закрепления наших антител. Многие свойства этого типа бусин делают их отличным выбором для использования в наших экспериментах: 1. Маленький размер (2.8 мкм в диаметре) сферических бусин позволяет размещать антитела с высокой плотностью на поверхности. Это же свойство ответственно за быстрое выделение бусин из суспензии под влиянием магнитного поля. 2. На поверхности бусин находятся эпоксидные (глицидил эфирные) группы, с которыми почти не происходит неспецифическое связывание, что позволяет не использовать дополнительные блокирующие агенты. Эпоксидные группы в основном реагируют с цистеиновыми и аминокислотными группами в белках.

3. Буферы для Выделения

Используемый при выделении из клеток комплексов белков раствор должен обладать способностью отделять исследуемый комплекс от остальных частей клетки и поддерживать в нативном состоянии связи между белками комплекса. В зависимости от характеристик используемого раствора стабильность белкового комплекса может различаться. Такие факторы как температура, pH раствора, присутствие детергента и использования соль напрямую влияют на стабильность комплекса. Способность солей заставлять белок выпадать в осадок и наоборот растворяться отражена в ряде Гофмейстера (СЛЕВА). Стабилизирующие ионы усиливают гидрофобные взаимодействия внутри белка в то время как дестабилизирующие связываются с полярными группами белка уменьшая полярные взаимодействия между белками



В природе существует вариант антитела, состоящего только из тяжелой цепи антитела. Вариателный регион такого антитела, который распознает антиген, может быть вырезан, размножен с помощью бактерий и использован как маленький и более устойчивый реагент вместо обычного антитела и называется наноантителом.



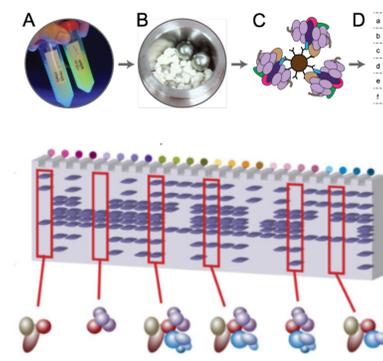
4. SDS-PAGE

Натриевый додецил сульфат-полиакриламидный гель для электрофореза. Используется для разделения белков в зависимости от их молекулярной массы. SDS-детергент прочно (почти равномерно, пропорционально белковой массе) связывается с белками, сообщая им чистый отрицательный заряд. Этот заряд придает всем белкам способность двигаться к аноду в электрическом поле внутри геля.

Обнаружить белки можно несколькими способами, включая обычное окрашивание, например, с помощью Coomassie Brilliant Blue (CBB) - смотри выше. По сравнению с другими белковыми красителями (silver stain) CBB имеет низкую чувствительность в диапазоне десятков нанограмм. В нашей работе мы использовали вариант CBB известный как blue silver, который обладает большей чувствительностью, чем обычный CBB. Вестерн-блот - это аналитическая техника, используемая в молекулярной биологии для обнаружения определенных белков в образце. После электрофореза белки под воздействием электрического тока переносятся на мембрану, после чего исследуются антителами на наличие конкретных целей. Для обнаружения белков мы использовали хемилюминесценцию.



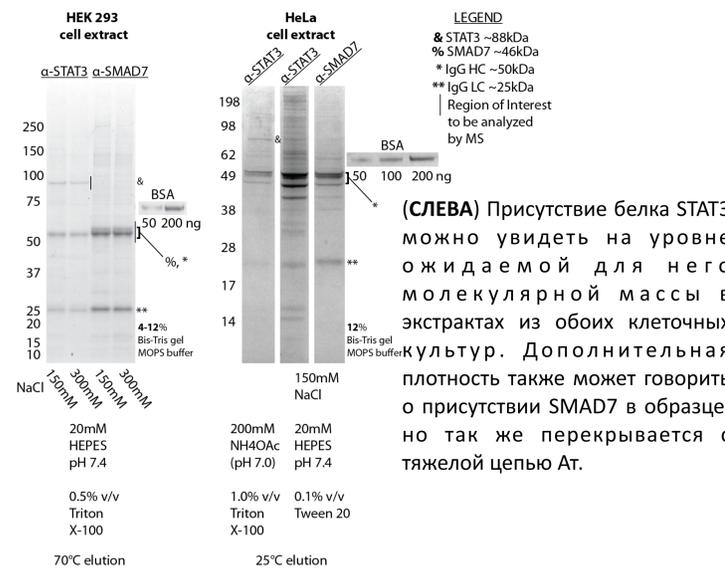
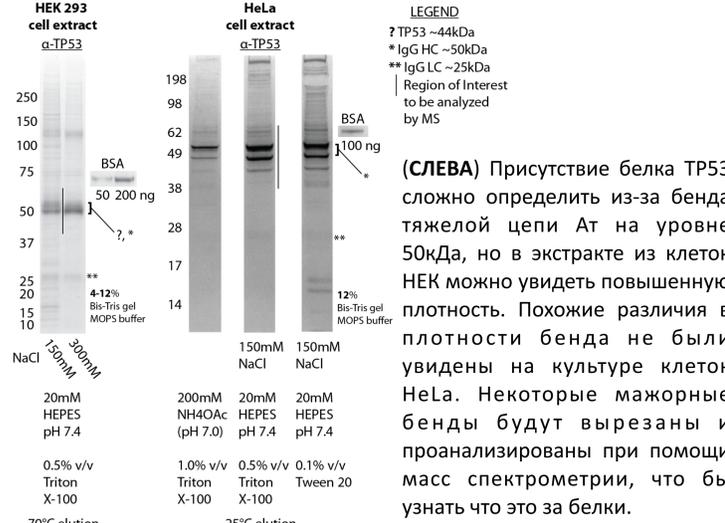
5. Обнаружение белков



Краситель Ронсеау может использоваться в Вестерн-блоте чтобы увидеть основные белки или подтвердить, что перенос на мембрану прошел успешно. Окрашивание обратимо и легко смывается водой.

Клетки перемалывают при криогенных температурах, чтобы получить порошок. Клеточный порошок экстрагируют разными вариантами буферов, чтобы сохранить нативный белковый комплекс во время аффинного связывания. Разные условия дадут разные различимые результаты, белки в которых можно определить и визуализировать большим количеством разных способов.

Предварительные результаты



Выводы

Не смотря на то, что мы не увидели стехиометрических взаимодействий в экспериментах с разными условиями экстракции, мы увидели дополнительные бенды. Эти бенды могут быть физиологическими кофакторами изучаемых транскрипционных факторов. После подтверждения наличия транскрипционных факторов в наших образцах с помощью массспектрометрии (МС), можно будет провести МС и с другими бедными тоже. Так же наши результаты могут подтвердить, что в клеточных культурах HEK и HeLa транскрипционные факторы экспрессируются ра разным уровне.

