

Сравнение подходов к выделению иммунопептидома МНС I: мягкая кислотная элюция и иммуноаффинная хроматография

Научный руководитель – Горбачев Алексей Юрьевич

Борзенко Наталия Ильинична

Аспирант

НИИ физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства,
Москва, Россия

E-mail: nataliaborzenko01@gmail.com

Иммунопептидный подход позволяет идентифицировать пептидные эпитопы, презентуемые молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС класса I и II) на поверхности клеток. Иммунопептидомика особенно эффективна для определения внутриклеточных бактериальных антигенов, представленных в комплексе с МНС I на поверхности инфицированных клеток.

Иммунопептиды могут быть выделены различными методами, среди которых эталонным является иммунопреципитация (IP) со специфическими антителами, а более доступным, но менее специфичным – мягкая кислотная элюция (MAE). Методы MAE и IP выявляют как частично перекрывающиеся, так и различающиеся пептидные репертуары, что обосновывает целесообразность их комплексного применения.

Целью работы является сравнение иммунопептидных профилей клеточной линии кератиноцитов HaCaT, полученных с использованием метода иммунопреципитации с антителами W6/32 и метода мягкой кислотной элюции.

Материалы и методы. Иммунопептиды, презентуемые на поверхности клеток HaCaT, выделяли методами MAE и IP. Метод MAE основан на мягкой обработке интактных клеток слабокислым буфером в присутствии ингибиторов протеаз. Для проведения IP моноклональные антитела W6/32 (гибридома НВ-95) предварительно выделяли из секретомы гибридомных клеток с использованием колонки с сефарозой и протеином А, после чего иммобилизовали на иммуноаффинных колонках с последующим ковалентным связыванием с протеином А. Полученные пептиды анализировали с использованием системы нано ВЭЖХ Ultimate 3000 RSLC, соединенной с масс-спектрометром Q Exactive HF Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). Обработку масс-спектрометрических данных проводили с использованием инструмента quantms для сравнения числа и длины идентифицированных пептидов, а также оценки их сродства к молекулам МНС класса I с применением алгоритма netMHC.

Результаты. Методом IP было идентифицировано примерно в четыре раза больше целевых пептидов по сравнению с методом MAE. При этом для обоих подходов был получен характерный для МНС I диапазон длин пептидов (8-12 аминокислот). Доля перекрывающихся пептидов, идентифицированных методами IP и MAE, составила 14,5 %. Анализ сродства пептидов к молекулам МНС I показал значительно более высокие значения при применении иммунопреципитации по сравнению с MAE (67 % против 11 % соответственно), что отражает более высокую специфичность иммуноаффинного метода.

Выводы. Метод иммунопреципитации превосходит мягкую кислотную элюцию по числу идентифицированных пептидов и сродству к молекулам МНС I. Однако, применение обоих подходов приводит к выявлению значительного числа уникальных пептидов, что подчеркивает целесообразность использования метода MAE для более полного охвата иммунопептидного профиля.