

Вятчанин Антон Сергеевич

Генерирование мини-антител
для исследования компонентов клеточного ядра.

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2008

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биологии гена РАН,
группе «Эпигенетические механизмы регуляции активности генов»

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Тиллиб Сергей Владимирович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Купраш Дмитрий Владимирович
кандидат биологических наук
Розенкранц Андрей Александрович

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт
биоорганической химии им. М.М.Шемякина и
Ю.А.Овчинникова РАН

Защита состоится 19 ноября 2008 г. в 13 часов на заседании диссертационного
совета Д 002.037.01 при Институте биологии гена РАН по адресу:
119334, Москва, ул.Вавилова, д.34/5

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения академии наук Институте
молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу:
119991, Москва, ул.Вавилова, д.32

Автореферат разослан 19 октября 2008 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета канд. фарм. наук

Л.С.Грабовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Антитела – важнейший инструмент для исследования макромолекул, прежде всего белков. Все большее значение приобретают антитела в связи с их терапевтическим и диагностическим использованием. В настоящее время существует несколько технологий получения новых антител.

Получение поликлональных антител из сыворотки иммунизированных животных наиболее простой и доступный метод. Более сложным и, вместе с тем, позволяющим получить более надежные антитела методом (однажды полученные и охарактеризованные гибридомы представляют собой неограниченный источник моноклональных антител) является гибридная технология. Действительно, за последние десятилетия с помощью гибридной технологии было получено большое число противораковых антител, однако применение их для лечебных целей наталкивается на серьезные ограничения, связанные с тем, что чужеродные (мышьиные) антитела вызывают у человека гуморальный иммунный ответ, элиминирующий экзогенные протеины (а в некоторых случаях приводящей к неблагоприятной анафилактической реакции). Для преодоления этих ограничений необходимо создавать новые рекомбинантные неприродные иммуноглобулины с заменой участков молекулы, не отвечающих за распознавание опухолевой клетки, на соответствующие фрагменты человеческого происхождения (гуманизированные антитела), либо удалять домены, не вовлеченные в связывание антигена (мини-антитела).

В последнее время все больше применяются рекомбинантные технологии, основанные на работе с библиотеками последовательностей антител человека. Для построения таких библиотек в экспрессионном векторе соединяют случайным перебором в одной рамке считывания переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, разъединенные линкерной последовательностью. Работа с очень громоздкими библиотеками таких одноцепочечных антител (scFv) весьма трудоемка и имеет ряд узких мест. Результатом такой работы редко бывает высокоаффинное антитело. Само по себе создание репрезентативной библиотеки - трудновыполнимая работа, требующая клонирования всевозможных комбинаций всех последовательностей переменных доменов легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов. Определенные сложности связаны со стабильностью полученных генетических конструкций, низким уровнем экспрессии продукта и его растворимостью.

Существенный технологический прорыв в этой области связан с обнаружением у представителей сем. Верблюдовые (Camelidae) неканонических антител, лишенных легких цепей и представляющих собой димер укороченных тяжелых цепей. Иммунный ответ с участием этих антител можно вызвать с помощью классической иммунизации.

Использование репертуара этих неканонических антител для создания библиотек последовательностей переменных доменов (только тяжелой цепи) имеет целый ряд преимуществ. Однодоменная структура узнающего переменного домена обуславливает малый размер антиген-связывающего фрагмента (мини-антитела) и его высокую стабильность и растворимость. Благодаря особенностям своего строения, мини-антитела могут использоваться для выявления скрытых для классических иммуноглобулинов эпитопов. Экспрессия с одного гена упрощает генно-инженерные манипуляции и позволяет эффективно и экономично нарабатывать мини-антитело в больших количествах (в *E. coli* или дрожжах). Как следствие, существенно упрощаются работы с библиотеками последовательностей переменных доменов. Низкая иммуногенность (являющаяся следствием высокой гомологии последовательностей мини-антител с переменным доменом тяжелых цепей IgG3 человека) и простота гуманизации открывает широкие возможности для использования мини-антител для создания лекарственных препаратов нового типа.

Возможности этой новой технологии мы исследовали и применили в данной работе с целью генерирования новых антител к эндогенным (нативным) эпитопам внутриклеточных белков.

Цели и задачи исследования. Основной традиционной тематикой в нашей группе являлось исследование ядерных (хромосомных) белков. Антитела являются основным инструментом в подобных исследованиях. С целью найти оптимальную процедуру получения новых антител, узнающих эндогенные ядерные или иные антигены, мы решили освоить и адаптировать для наших условий одну из совсем новых и весьма перспективных технологий генерирования антиген-узнающих молекул. Собственно, данная работа является первой в данном направлении для нашей группы и, насколько нам известно, уникальной для нашей страны.

Целью данной работы было исследование возможностей новой технологии генерирования антиген-узнающих молекул, основанной на использовании особых антител, свойственных среди млекопитающих только представителям сем. Верблюдовые. В данной работе были поставлены следующие задачи:

1) Освоение и дальнейшая разработка новой перспективной технологии генерирования особых «верблюжьих» мини-антител, исследование возможности использования на её начальном этапе для иммунизации двугорбого верблюда (вместо традиционно используемых одногорбого верблюда или ламы).

2) Проведение полного цикла работ, включающих иммунизацию верблюда (индукцию образования заданных антител), создание библиотеки последовательностей

антиген-узнающих переменных доменов особых антител иммунизированного животного и процедуры отбора из этой библиотеки (методом фагового дисплея) новых мини-антител.

- 3) Оптимизация данной технологии и ее адаптация для наших целей.
- 4) Исследование возможностей применения новых мини-антител.

Научная новизна и практическая ценность работы. Данная работа посвящена освоению (насколько нам известно, впервые в России), разработке и исследованию возможностей новой перспективной технологии генерирования антиген-узнающих молекул, основанной на факте существования неканонических двуцепочечных антител у представителей сем. Верблюдовые. На начальном этапе, в ходе совместной работы с бельгийскими коллегами, которые являются первооткрывателями этого направления, нам удалось освоить базовую технологию и затем адаптировать ее для наших условий. После чего мы уже независимо продолжили развивать данный многообещающий подход, направленный на получение новых антител.

В отличие от предыдущих работ, где использовали ламу или одногорбого верблюда, мы решили работать с более адаптированным к условиям нашей климатической полосы двугорбым верблюдом (*Camelus bactrianus*), которого оказалось возможным содержать недалеко от Москвы на научно-экспериментальной базе «Черноголовка» ИПЭЭ имени А.Н. Северцова РАН. В процессе адаптации методики нами был получен ряд новых мини-антител, специфически узнающих различные клеточные белки (ламин, цитокератин, тропомиозин и др.). Мини-антитело, узнающее ламин, было получено нами первым. Поэтому именно на примере этого мини-антитела мы анализировали свойства и потенциал подобных антиген-узнающих молекул. Полученное мини-антитело использовалось при окрашивании соответствующего белка как и *in vitro*, так *in vivo*.

В ходе дальнейших исследований мы разработали ряд модификаций, повышающих эффективность отбора мини-антител в формате фагового дисплея. Одна из них носит универсальный характер и заключается в частичной делеции гена gIII фага помощника, использование которого при соответствующих изменениях в процедуре приводит к значительному уменьшению фона и повышению эффективности процедуры селекции. Другим направлением была попытка получить мини-антитела, адаптированные для процедуры иммунопреципитации хроматина (X-CHIP). Для этого мы использовали сшитый формальдегидом ядерный экстракт для иммунизации и «сэндвич»-иммунное связывание при селекции мини-антител из генерированной библиотеки. Разработанный нами подход к получению новых мини-антител имеет достаточно универсальный характер и с соответствующими изменениями может быть использован для исследования различных пока

еще неизвестных клеточных компонентов/комплексов, содержащих известный белок. Данная работа является одной из первых, где была показана принципиальная возможность использования сложного антигенного материала естественного происхождения для создания универсальных («тематических») библиотек переменных доменов, для последующей селекции мини-антител к конкретным составляющим.

Помимо очевидной новизны, представленное исследование имеет значительную практическую ценность. Разрабатываемая нами технология имеет очень широкий спектр приложений, как в научных исследованиях, так и в технологии, диагностике и медицине. Так, в нашей группе с использованием данной технологии уже получен набор мини-антител к ряду раковых маркеров (MUC-1, CA125 и CA199, PSA, Alpha-FP, CEA и другим), которые могут иметь важное значение как для исследований, так и для диагностики и лечения соответствующих заболеваний. Антитела, узнающие ламин и цитокератин, соединенные с флуоресцентным белком, были успешно использованы для слежения за соответствующими антигенами в живой клетке. Получен ряд новых мини-антител, узнающих определенные домены ядерных белков (таких как TRX), которые можно использовать для изучения поведения соответствующих белков и их комплексов в живой клетке. Ряд отобранных мини-антител может быть использован при изучении структуры ядра.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. (Новосибирск, 2008), а также на международной школе-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Пушино, 2008)

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 4 печатные работы. Из них статей – 2, тезисов устных и стендовых сообщений на конференциях – 2.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на ___ страницах, содержит ___ рисунков и ___ таблицы, состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов исследования, Обсуждения, Выводов, Списка литературы, включающего ___ источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Использование нового модельного животного для создания библиотеки последовательностей переменных доменов неканонических антител.

Индукция образования специфических высокоаффинных антител *in vivo* в процессе иммунизации, последующее клонирование (генерирование фагмидной библиотеки) всего репертуара последовательностей переменных доменов неканонических антител, свойственных представителям сем. Верблюдовые (НСAbs – Heavy Chain-only Antibodies, или антитела, состоящие только из двух тяжелых цепей) из В-лимфоцитов периферической крови иммунизированного верблюда, и, наконец, эффективная селекция искомым мини-антител методом фагового дисплея потенциально открывает большие возможности для получения новых антиген-узнающих белков, которые являются основным инструментом в изучении белков и их комплексов. Мы решили наладить данную технологию у нас.

Первое, чего требует создание библиотеки верблюжьих антител это животное, иммунную систему которого можно эксплуатировать. Традиционно для этих целей используют ламу (*Lama glama*, *Lama pacos*) или одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*). Однако в наших климатических условиях двугорбые верблюды, или бактрианы (*Camelus bactrianus*), обладают рядом преимуществ. Бактрианы лучше переносят холод, дольше живут и более доступны у нас. Достаточно большое поголовье бактрианов есть в заповеднике под Москвой, также двугорбый верблюд (бактриан) используется в сельском хозяйстве в Астраханской области и в Казахстане. Поэтому было решено исследовать особенности иммунной системы двугорбого верблюда в плане применимости для адаптации в наших условиях выбранной технологии генерирования мини-антител.

В нашей работе мы использовали для иммунизации молодую (одно-, а затем и двух-летнюю) самку двугорбого верблюда, которая содержалась в Московской области на научно-экспериментальной базе «Черноголовка» ИПЭЭ имени А.Н. Северцова РАН. Когда мы начинали эту работу, в литературе имелось лишь краткое словесное упоминание о наличии неканонических (состоящих только из димера тяжелых цепей) антител у бактриана, как и у остальных Верблюдовых, но не было никаких опубликованных экспериментальных доказательств. Для того чтобы подтвердить наличие НСAbs и лучше охарактеризовать их, мы анализировали как тотальный белок сыворотки, так и выделенные из нее гамма-глобулины (IgG). Для фракционирования подклассов IgG мы использовали колонки с белокА- и белокG-сефарозой (pA-S и pG-S), в соответствии с методикой, предложенной ранее (Congrath, Lauwereys et al. 2001). Принадлежность полученных нами фракций сыворотки крови бактриана к гамма-глобулинам подтверждается ИФА, с использованием в качестве

вторичных антивидовых антител к IgG верблюда. Фракции анализировали при помощи электрофореза в ПААГ в соответствии со стандартной методикой Лэммли.

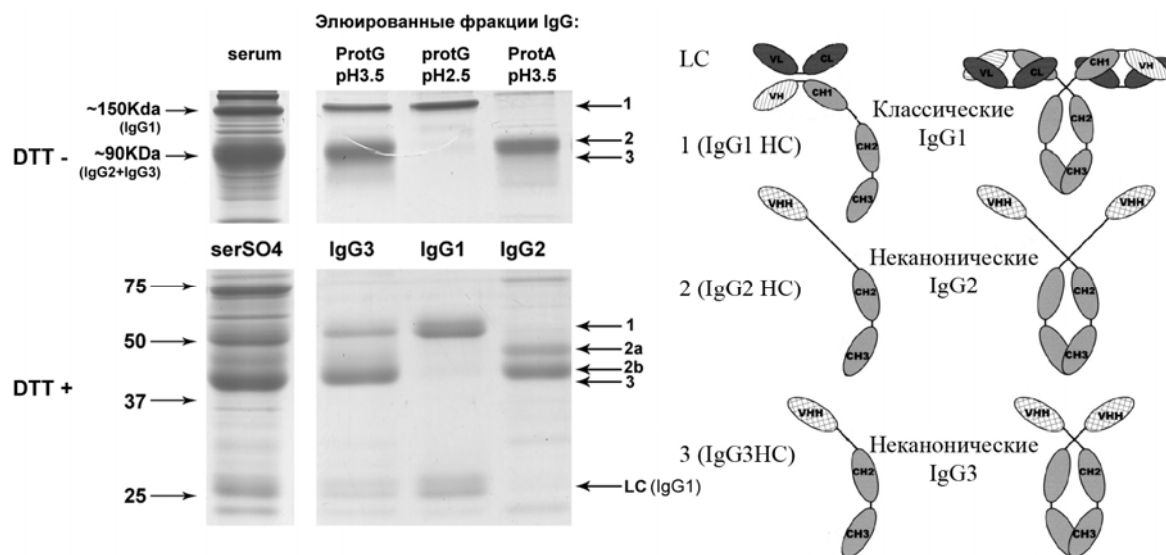


Рис. 1. Фракционирование гамма-глобулинов сыворотки крови бактриана.

В нижней и верхней частях рисунка представлены результаты ПААГ электрофореза в восстанавливающих (DTT) и не восстанавливающих условиях соответственно. Первая полоса (Serum) соответствует суммарной белковой составляющей сыворотки после переосаждения сульфатом аммония. Последующие три - фракциям элюции: IgG3 – pG-S при pH 3.5; IgG1 – pG-S при pH 2.5; IgG2 – pA-S при pH 3.5. Нумерация справа соответствует ожидаемым молекулярным массам гамма-глобулинов или их фрагментов, описанным для дромедара: 1 – IgG1, 2a –IgG2a, 2b –IgG2b, 3 – IgG3, LC – легкой цепи.

На рис. 1 видно, что в сыворотке бактриана выявляются несколько различных подклассов IgG. Неканонические антитела, лишённые лёгкой цепи, HCAbs, обнаруживаются в исследуемой сыворотке бактриана во фракциях IgG3 и IgG2 и по массе соответствуют IgG3, IgG2a и IgG2b подклассам дромедара (Conrath, Lauwereys et al. 2001). Одна из особенностей двуцепочечных антител заключается в полном отсутствии CH1-домена тяжелой цепи и в удлинении (в одном из подклассов) шарнирного участка. Как следствие, молекулярная масса HCAbs ниже таковой для тяжелых цепей классических IgG иммуноглобулинов. Мы видим это на электрофореграмме: при первой кислой элюции (pH3.5) с pG-S колонки вместе с IgG3 частично элюируются и IgG1 иммуноглобулины. Полоса соответствующая молекулярной массе ~40 кДа, основная в первой фракции, соответствует тяжелой цепи IgG3 иммуноглобулина, который лишен легких цепей. Полосы на уровне ~25кДа и ~50кДа маркерного белка (на рис. 1 – «LC» и «1» соответственно) соответствуют легкой и тяжелой цепям IgG1. Соотношение интенсивностей полос сохраняется на следующей дорожке геля, соответствующей фракции IgG1. Последняя дорожка геля фракции IgG2 содержит две полосы, соответствующие подклассам IgG2a и

IgG2b (2a и 2b на рис. 1). При электрофоретическом разделении в невозстанавливающих условиях тех же фракций (верхняя часть рис. 1) картина распределения гамма-глобулинов повторилась, а относительные подвижности при электрофорезе, соответствуют ожиданиям. Канонические антитела содержатся в IgG1 фракции и частично в IgG3 (похожие условия элюции), а более легкие неканонические с меньшей молекулярной массой IgG3, IgG2a и IgG2b содержатся в оставшихся двух фракциях. Полученные данные показывают наличие неканонических двуцепочечных антител у бактриана (порядка 60% всех IgG антител). Следовательно, бактриан может быть использован для создания библиотек последовательностей переменных фрагментов неканонических антител (VНН или мини-антител). В последующем, в нашей группе была проведена работа по секвенированию последовательностей кДНК, соответствующих различным подклассам гамма-глобулинов бактриана, что подтвердило сделанные нами выводы.

Перед тем, как перейти непосредственно к созданию библиотеки последовательностей VНН, мы должны были охарактеризовать участие НСАbs в иммунном ответе. Антиген-связывающий домен НСАbs структурно заметно отличается от подобного домена классических гамма-глобулинов, поэтому спектр узнавания НСАbs может существенно отличаться. Для выяснения степени участия НСАbs иммунизация одним антигеном может оказаться не показательной, поэтому нами было принято решение об иммунизации сложной белковой смесью естественного происхождения. В качестве антигенной смеси нами был выбран экстракт ядер эмбрионов *Drosophila melanogaster*. Идея наших экспериментов заключается в том, чтобы генерировать специфические библиотеки мини-антител, которые могли бы быть использованы как основа для селекции новых антител к эндогенным белкам и к более сложным клеточным компонентам. Из личного сообщения западных коллег нам было известно о принципиальной возможности эффективной иммунизации верблюда тотальным белковым экстрактом из дрожжей. Поэтому в данной работе мы решили проводить иммунизацию суб-протеомной ядерной фракцией в надежде индуцировать иммунный ответ сразу к нескольким наиболее представленным/иммуногенным ядерным компонентам. Для того, чтобы получить антитела к нерастворимым компонентам т.н. ядерного матрикса (нерастворимые белки ламины и т.п.), выделение ядерного экстракта мы проводили в буфере с 8М мочевиной, с последующим диализом экстракта против PBS. Полученная смесь, содержала как растворимые, так и нерастворимые компоненты. Такая экстракция, с одной стороны, позволяет экстрагировать белки матрикса, но, с другой стороны, нарушает нативную конформацию белков и поэтому последующая селекция индуцированных антител проводится, в первую очередь, к линейным эпитопам белков.

Для оценки эффективности иммунизации сложной смесью мы использовали Вестерн-блот детекцию, где разделенный в ПААГ и перенесенный на PVDF-мембрану тотальный ядерный экстракт эмбрионов *D. melanogaster* проявлялся различными фракциями гамма-глобулинов из сыворотки иммунизированного животного.

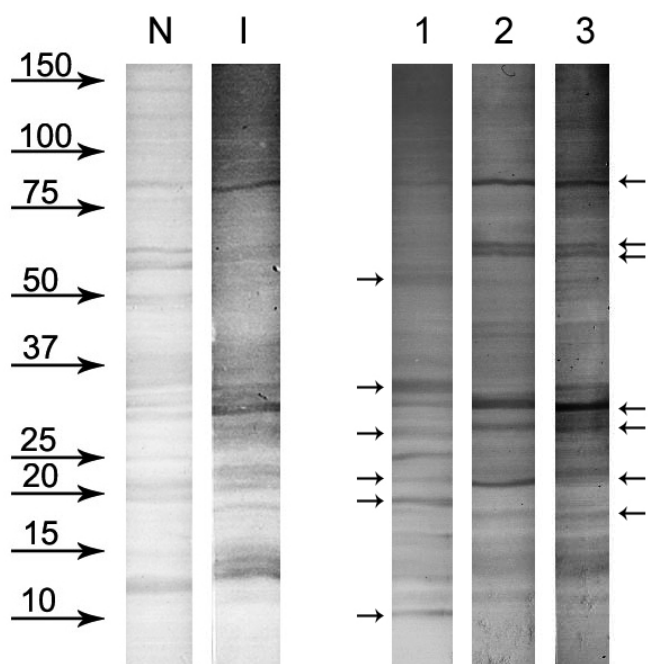


Рис. 2. Проверка иммунного ответа Вестерн-блот детекцией.

Белки ядерного экстракта эмбрионов *Drosophila melanogaster* разделены по стандартной методике Лэммли на градиентном ПААГ, после чего перенесены на PVDF мембрану. Полосы мембраны, подвергавшиеся обработке разными первичными антителами, имеют следующие обозначения: NE – тотальный белок, окрашенный Ронсеау, N – наивная сыворотка, I – иммунная сыворотка, 1 – IgG1 фракция иммунной сыворотки, 2 – IgG2 фракция иммунной сыворотки, 3 – IgG1 фракция иммунной сыворотки. В качестве вторичных антител использовались кроличьи антитела против иммуноглобулинов двугорбого верблюда (полученные в нашей группе). Стрелками указаны мажорные антигены, к которым были индуцированы антитела.

Данные, представленные на рис. 2, показывают, что спектр узнавания ядерных белков антителами иммунной сыворотки отличается от того, что получается в случае преиммунной сыворотки. Изменение специфичности антител указывает на возникновение иммунного ответа. Анализ фракций гамма-глобулинов, показывает, что антитела к белкам ядерного экстракта *D. melanogaster* присутствуют в каждом подклассе. Сравнение спектров узнавания канонических (IgG1) и неканонических (IgG2/IgG3) антител указывает на различия специфичности в отношении отдельных антигенов, что, по всей видимости, является следствием структурных различий гамма-глобулинов этих двух типов. Такой анализ позволяет увидеть зоны, в которых локализуются белки, вызвавшие наиболее сильный иммунный ответ. Соответственно, белки из этих зон могут использоваться в качестве антигенов в процедуре селекции.

Работа по созданию первой библиотеки мини-антител проводилась в сотрудничестве с первооткрывателями и основными разработчиками данной технологии – лабораторией профессора Муилдерманса (S. Muyltermans) из Свободного университета Брюсселя (Бельгия). Используя выделенную из В-лимфоцитов периферической крови иммунизированного верблюда поли(А)-РНК, специфически обогащенную в результате иммунизации новыми индуцированными антиген-узнающими последовательностями

антител, синтезировали комплементарную ДНК, которую затем использовали в качестве матрицы для амплификации (ПЦР) последовательностей переменных доменов антител. Для этого были проанализированы и выбраны пары праймеров к консервативным последовательностям IgG. Преимущество работы с неканоническими антителами заключается в том, что VHH представлены одним подклассом и, следовательно, одна пара праймеров достаточна для того, чтобы покрыть весь репертуар генов антител. Кроме того, упрощаются многие процедуры клонирования, так как клонируемая последовательность соответствует той самой единственной полипептидной цепи (образующейся *in vivo*), которая достаточна для формирования функционального мини-антитела (в отличие от scFv, в случае которых возникает необходимость дополнительного объединения, обычно с помощью случайного перебора, переменных участков VH и VL, и при этом лишь очень малая часть получаемых комбинированных последовательностей ведет к образованию функциональных антител).

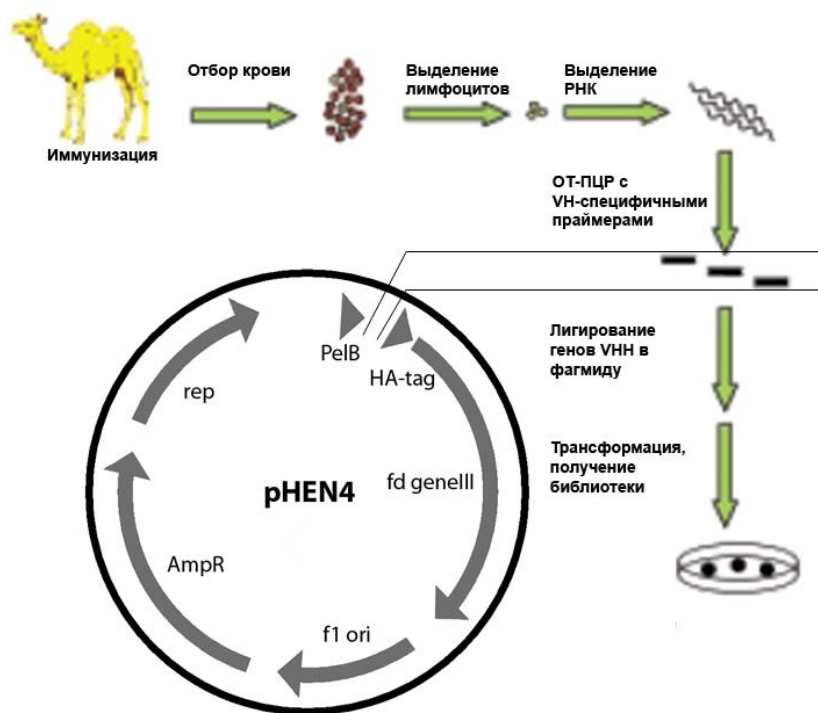


Рис. 3. Схема создания библиотеки последовательностей мини-антител.

Для клонирования синтезированных последовательностей ДНК, в качестве фагмидного вектора была использована плазмида pHEN4 (Arbabi Ghahroudi, Desmyter et al. 1997), рис.3, любезно предоставленная проф. Муйлдермансом. Последовательность переменного домена на 5'-конце была фланкирована последовательностью «pelB», кодирующей сигнал периплазматической локализации, а на 3'-конце содержала последовательность «HA-tag» (гемагглютинин-таг), кодирующую аминокислотную

последовательность, используемую для детекции нарабатываемого белка с помощью соответствующих коммерческих антител. Такую снабженную дополнительными последовательностями последовательность (ген) варибельного домена клонировали в N-концевую часть (между сигнальной последовательностью и началом первого N1 домена) гена, кодирующего поверхностный белок рIII бактериофага фага M13 с сохранением рамки считывания. Расположение вставки в N-концевой части рIII позволяет избежать побочных эффектов при сборке фаговой частицы (за которую ответственен C-концевой домен белка рIII) и стерических взаимодействий экспонируемого домена с соседними рIII (N-конец наиболее удален от фаговой частицы).

В нашем случае, получаемая библиотека содержит последовательности специфически индуцированных антител, узнающих ряд различных клеточных (ядерных) компонентов *D. melanogaster*. Такая библиотека может использоваться для селекции мини-антител как против известных антигенов (конкретных белков), так и против мажорных и особо иммуногенных неизвестных антигенов с целью получить инструмент их изучения. В отличие от тех случаев, когда для иммунизации животного используется рекомбинантный полипептид, в нашем случае иммунизация проводилась эндогенными белками, прошедшими все стадии посттрансляционных модификаций. Генерируемые при использовании новой технологии мини-антитела имеют существенно меньший размер, чем обычные IgG. Это обуславливает более высокую проникающую способность мини-антител, что может оказаться важным преимуществом при иммунном окрашивании препаратов фиксированных клеток или в экспериментах по иммунопреципитации. Так, ранее уже было показано, что мини-антитела способны узнавать скрытые для обычных IgG эпитопы, например, активные центры ряда ферментов. Несмотря на сравнительно небольшой размер мини-антитела имеют достаточно широкий спектр узнавания различных антигенов, в том числе антигенов небольшого размера и гаптен (Spinelli, Frenken et al. 2000).

Исследование свойств новой библиотеки последовательностей мини-антител, полученной иммунизацией бактриана экстрактом ядер *D. melanogaster*.

Полученная в фагмиде библиотека последовательностей антител может служить источником для получения широкого спектра мини-антител. Для селекции методом фагового дисплея фагмидные библиотеки последовательностей мини-антител трансформацией переводили в формат частиц нитчатого бактериофага M13, содержащих эти фагмиды и при этом экспрессирующих мини-антитело в составе своего поверхностного белка. Фаговые частицы нарабатывали путем последовательной трансформации бактерий (*E. coli*) сначала фагмидами, а затем фагом-помощником.

Сначала мы руководствовались стандартной процедурой селекции методом фагового дисплея, той, что используется нашими бельгийскими коллегами. В последствии (см. ниже) мы ввели ряд модификаций, которые могут существенно повысить эффективность селекции. В качестве антигена мы использовали как тотальный ядерный экстракт *D. melanogaster*, так и электроэлюированные из отдельных зон ПААГ группы белков. Во втором случае особое внимание уделялось белкам из зон геля, соответствующих антигенам, вызвавшим наиболее выраженный иммунный ответ (см. рис. 2).

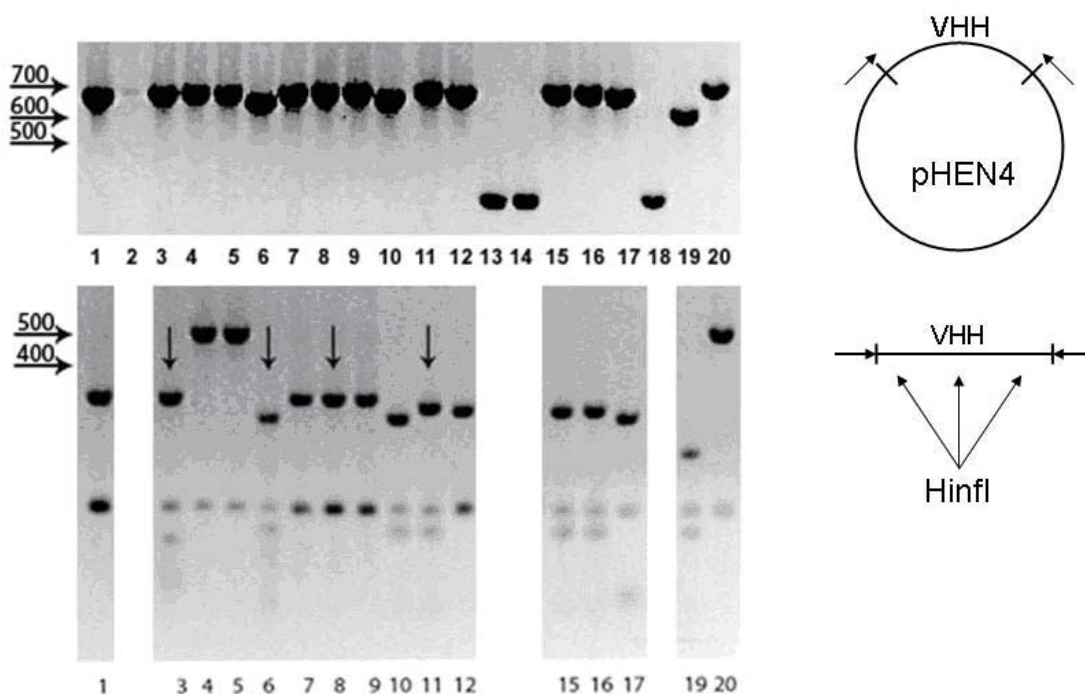


Рис. 4. Анализ отдельных клонов после третьего раунда селекции. В верхней части рисунка показано разделение продуктов ПЦР-амплификации клонированных последовательностей мини-антител в 1 % агарозном геле, в нижней части – разделение в 2% геле соответствующих продуктов после рестрикции *HinfI*.

После третьего раунда селекции индивидуальные клоны подвергались ступенчатому анализу, в ходе которого постепенно отбирались наиболее сильные связывающие домены. Для каждого из анализируемых клонов мы проводили ПЦР-амплификацию последовательности мини-антитела, получаемые фрагменты ДНК анализировали при помощи электрофореза в агарозном геле. Далее, клоны, которые имели ожидаемый размер ПЦР-продукта, подвергались обработке *HinfI*- рестриктазой (рис.4). На основании сходства или различия паттернов рестрикции мы группировали клоны. Из каждой группы схожих последовательностей мини-антител были отобраны по 1-2 представителя для дальнейшего анализа.

Средний ожидаемый размер вставки, соответствующей VHH участку, обнаруживаемой при электрофоретическом разделении продуктов ПЦР-амплификации

используемыми праймерами должен приходиться приблизительно на 650 пар оснований. Вставки заметно большего или меньшего размера, скорее всего, означают артефактные продукты или соответствуют вариабельным доменам обычных гамма-глобулинов.

Сравнивая паттерны рестрикции амплифицированных «правильных» вставок мы выбирали для дальнейшего анализа клоны с непохожими паттернами.

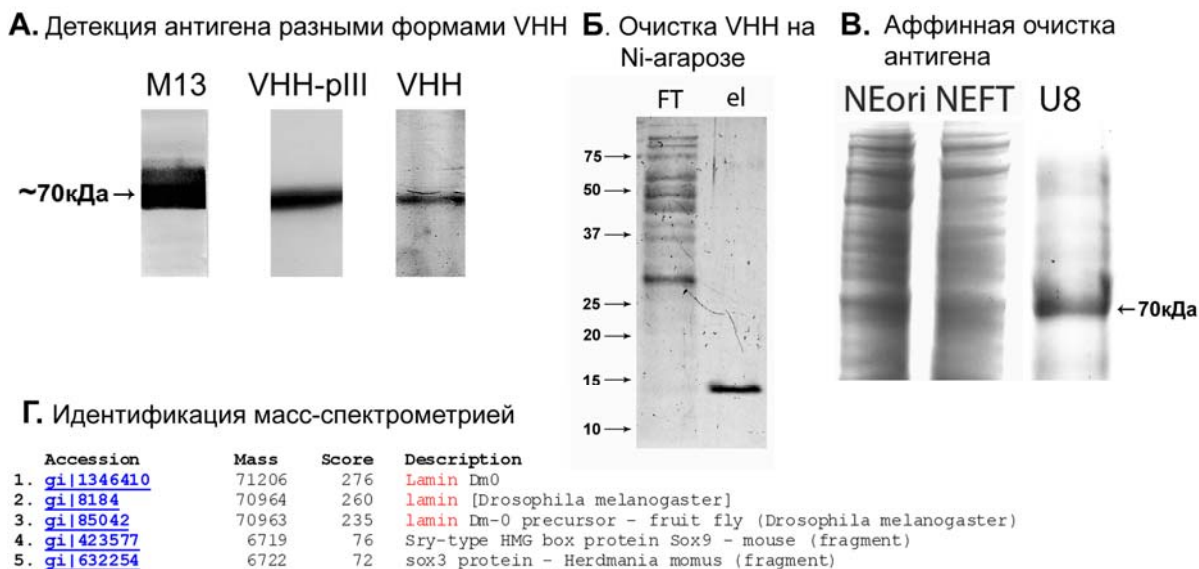


Рис. 5. Этапы идентификации отдельного клона

А. Разделенный в ПААГ экстракт ядер *D. melanogaster* переносили на PVDF-мембрану, где детектировали соответственно (слева направо): а) М13-фаговыми частицами, содержащими мини-антитело в составе поверхностного белка рIII, б) гибридным белком мини-антитело-рIII, экспрессированным в *E. coli* (VNH-рIII), в) мини-антителом, экспрессированным в *E. coli* (VNH). **Б.** Привдены несвязавшаяся (слева) и элюированная (справа) фракции периплазматического экстракта, соответственно, полученные при очистке на Ni-агарозе мини-антитела, содержащего His6-таг на С-конце. **В.** Фракции белков, полученные при иммуноаффинной очистке антигена с помощью иммобилизованного на колонке мини-антитела, узнающего ламин. NEori – исходный ядерный экстракт, NEFT – несвязавшаяся фракция, U8 – элюированная 8М мочевиной фракция, соответствующая связавшемуся антигену (ламину). **Г.** Полоса, соответствующая по массе детектируемому на Вестрне антигену, вырезалась для масс-спектрометрической идентификации.

На следующем этапе мы проводили Вестерн-блот-анализ белковых продуктов, кодируемых отобранными последовательностями мини-антител (рис.5А). Сильная амплификация сигнала, полученного при использовании фаговых частиц, обусловлена использованием вторичных антител к рVIII – мажорному поверхностному белку капсида. В случае экспрессированных как гибридного белка (мини-антитела с рIII), так и одного мини-антитела, оба белка содержали на С-конце НА-таг, который и использовали для детекции мест связывания этих антиген-узнающих белков (вторичные антитела- анти-НА-таг моноклональные мышинные антитела, и третичные – конъюгированные с пероксидазой козы антитела, узнающие IgG мыши). Такая сложная детекция приводила к более слабому, но отчетливому сигналу. На следующем этапе последовательность изучаемого мини-антитела

переклонировали в иные плазмидные вектора, которые, как правило, позволяли добавлять к С-концу экспрессируемого в периплазме бактерии мини-антитела последовательность (His)₆-тага, что позволяет эффективно очищать продуцируемое мини-антитело на Ni-агарозной колонке (рис. 5Б).

Полученное мини-антитело по всей видимости обладает аффинностью в отношении наиболее иммуногенного и представленного в ядерном экстракте антигена. Имея подобный связывающий домен, мы имеем универсальный инструмент для Вестерн-детекции антигена и, может быть, для работы с ним *in vivo*. Для того чтобы выяснить, к какому белку получено мини-антитело, мы выделили антиген из суммарной белковой фракции ядра *D. melanogaster* при помощи аффинной колонки с иммобилизованным на Ni-агарозе рекомбинантным мини-антителом, снабженным (His)₆-tag (рис.5В). Элюцию проводили буфером с 8М мочевиной (комплекс антиген/мини-антитело разрушается, но вариабельный домен при этом остается на колонке). Элюированную фракцию мы анализировали электрофоретически, после чего обогащающийся белок, соответствующий по молекулярной массе детектируемому при Вестерн-анализе антигену, мы вырезали для масс-спектрометрической идентификации, которая проводилась совместно с масс-спектрометрической группой ГУ НИИ БМХ РАМН (рис. 5Г).

В конечном итоге, как результат селекции фаг-дисплейной библиотеки антиген-связывающих доменов НСАbs мы получили плазмиду со вставкой, кодирующей мини-антитело, которое обладает высокой аффинностью в отношении структурного ядерного белка ламина. То, что в результате проведенной процедуры мы получили клонированную нуклеотидную последовательность мини-антитела, открывает возможность для ее последующего использования в создании всевозможных генно-инженерных конструкций. Полученная в ходе адаптации метода библиотека вариабельных доменов двуцепочечных IgG антител бактриана, безусловно, представляет интерес с точки зрения исследования возможности получения связывающих доменов к широкому спектру антигенов, представленных в белковой смеси, использованной при иммунизации. Для дромедара и лам существует успешный опыт по получению мини-антител как из библиотек, полученных иммунизацией смесью очищенных антигенов, так и из наивных библиотек (Lauwereys M. *et al.*, 1998). Полученная нами библиотека не является «наивной» и не является «иммунной» в обычном понимании этих терминов. Ядерный экстракт, использованный для иммунизации одногорбого верблюда, содержит огромное число различных белков, представленных в различном количестве и обладающих разной иммуногенностью. Подтвердив наличие иммунного ответа, интересно было выяснить, можно ли из этой же библиотеки отобрать мини-антитела к другим клеточным компонентам. Данные, полученные при оценке

эффективности иммунизации (см. рис. 2), указывают на то, что профиль представленности антител, связывающих различные белковые компоненты клеточного ядра дрозофилы изменился. Эти изменения затронули все подклассы иммуноглобулинов группы G, в том числе и IgG2, IgG3.

Для того чтобы получить представление о том, каков потенциал полученной библиотеки с точки зрения генерирования новых мини-антител, мы провели селекцию фагов с использованием уже полученного из этой библиотеки мини-антитела (анти-ламин) для блокировки соответствующего эпитопа в смеси антигенов. В качестве альтернативы данному подходу, возможно, достаточно было бы провести анализ клонов, полученных после второго раунда селекции, но выбранный нами подход, во-первых, избавляет от необходимости трудоемкого анализа большого количества клонов и, во-вторых, позволяет последовательно отобрать различные клоны VHH, сообразно их иммуногенности (аффинности/представленности в смеси).

Для получения новых мини-антител («второго эшелона») мы проводили селекцию фагов на различных белковых фракциях, получаемых из исходного тотального ядерного экстракта, и в каждом случае мини-антитело к ламину использовалось для блокировки соответствующего мажорного антигена. Такая селекция клонов «второго эшелона» привела к получению нескольких новых мини-антител, из которых специфичность трех была выяснена через очистку и идентификацию связываемого ими антигена, как и в описанном выше случае антител к ламину. Это оказались мини-антитела к к цитокератину, тропомиозину и к малоизученному ядерному белку (данные не приводятся).

Мы показали, что полученная нами библиотека потенциально может использоваться для получения целого ряда антител к различным компонентам клеточного ядра. Однако дальнейших скринингов с использованием в качестве блокирующих агентов вариабельных доменов антител к тропомиозину и цитокератину мы не проводили.

Исследование нового подхода к генерированию мини-антител с использованием библиотек, полученных в результате иммунизации верблюда сшитым *in vivo* и затем дробленным ультразвуком хроматином.

Метод иммунопреципитации хроматина (X-ChIP), в котором обычно используются формальдегидная сшивка белок-ДНК комплексов *in vivo*, последующая обработка клеток ультразвуком, а полученный фрагментированный растворимый хроматиновый материал используется для специфической иммунопреципитации исследуемых комплексов с помощью имеющихся антител, применяется в широком спектре исследований (в том числе и в нашей группе) для анализа связывания регуляторных белков с определенными участками ДНК

хроматина. Наличие сшивки подразумевает, что комплексы белок-ДНК фиксируются в приближенной к нативной конформации, что позволяет их исследовать в минимально «потревоженном» состоянии. Однако это преимущество может обратиться в недостаток в тех случаях, когда эпитоп белка-мишени оказывается закрытым для взаимодействия с имеющимися узнающими именно этот эпитоп антителами. Использование поликлональных антител в данном случае часто более предпочтительно, но сопряжено с появлением высокого неспецифического фона. В этой связи очень привлекательной показалась возможность создания библиотеки последовательностей мини-антител, переменных доменов двуцепочечных антител, основанной на репертуаре переменных доменов двуцепочечных антител верблюда, иммунизированного материалом хроматина в том виде, в котором он используется в методе X-CHIP. Полученные из подобной библиотеки антитела потенциально будут обладать способностью к узнаванию белков в составе комплексов *in vivo*, что сделает их удобными для применения не только в X-CHIP, но и в *in vivo* детекции, выделении и очистке белков-мишеней в составе комплексов. В качестве материала для иммунизации мы использовали материал сшитого *in vivo* и затем дробленого ультразвуком хроматина, выделенного из ядер клеток дехорионизированных эмбрионов *D. melanogaster*.

Для скрининга полученной библиотеки мы использовали различные фракции ядерного экстракта, в том числе аффинно-очищенную, для получения которой использовали имевшиеся в нашем распоряжении охарактеризованные антитела кролика к аминокотерминальному домену ядерного белка триторакса. Такой подход потенциально дает возможность для получения антител не только к самому целевому белку в составе *in vivo* комплексов, но и к его партнерам, что может оказаться важнее для его характеристики. В ходе различных селекций с использованием специально подготовленных фракций экстракта ядер *D. melanogaster*, нами был получен набор клонов мини-антител, характеристика каждого из которых требует большой специальной работы.

«Сэндвич-иммунная» селекция мини-антител.

Полученная библиотека к «нативным» ядерным белкам/комплексам была также использована для разработки нового подхода для селекции мини-антител, узнающих компоненты комплекса, ассоциированные с изучаемым белком. Мы назвали этот подход «сэндвич»-иммунной селекцией (рис. 6).

Показан вариант «сэндвич»-иммунной селекции, при котором вначале на иммобилизованные специфические антитела к известному изучаемому белку (в данном случае аффинно-очищенные анти-TRX кроличьи антитела N1 и N6, полученные нами ранее) из материала хроматина вылавливаются (за счет связывания с TRX) специфические

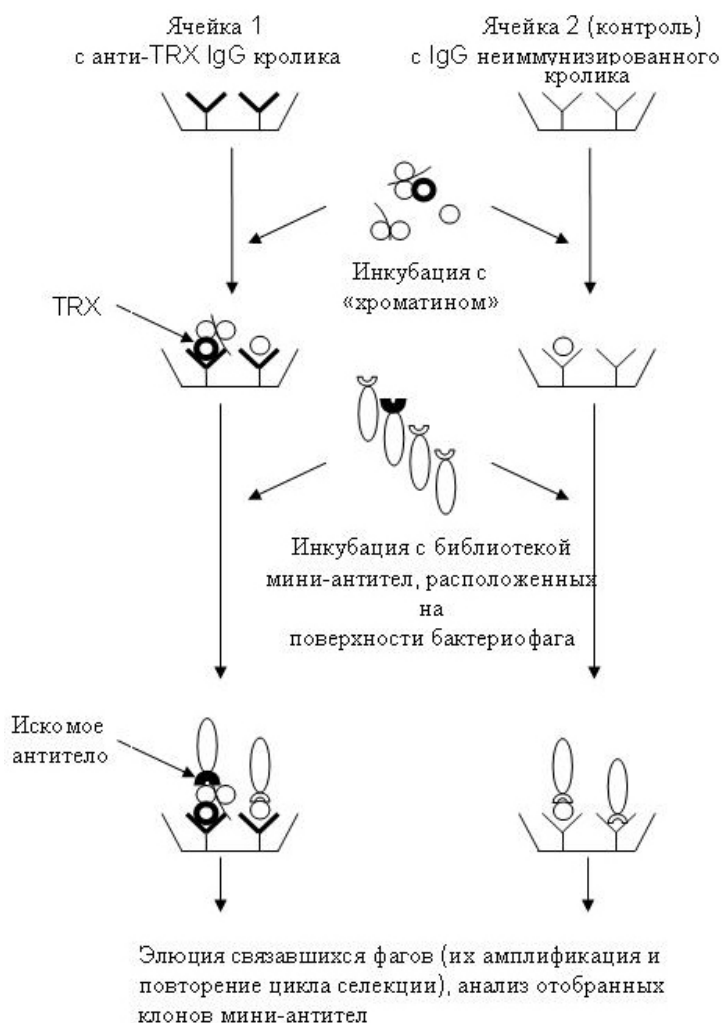


Рис. 6. Схема «сэндвич-иммунной» селекции.

Бактериофаги, несущие на своей поверхности мини-антитела, специфически связываются с компонентами хроматиновых комплексов, ассоциированных с белком TRX, который зафиксирован на поверхности полистирола специфичными антителами кролика. Жирными линиями выделены соответственно TRX-узнающие домены кроличьих антител, сам белок TRX, и искомое антитело.

Очищенные мини-антитела использовали для иммуноферментного анализа (ИФА), схема и результаты которого представлены на рис. 7.

Нам удалось отобрать 5 различных мини-антител (соответствующих группам 1-5 на рис.7.В,Г), которые узнают ядерные компоненты, по-видимому, способные к ассоциации с белком TRX. Эти мини-антитела связывают TRX-содержащие компоненты хроматина и дают при иммунофлуоресцентном окрашивании слюнных желез личинок дрозофилы несколько различающиеся ядерные окрашивания (не приведены), как волокнистые, так и точечные, в различной степени перекрывающиеся с окрашиванием TRX с помощью кроличьих антител. Мы ранее показали, что TRX имеет заметное сродство к структурным

комплексы (TRX-содержащие), а затем отбираются фаговые частицы, содержащие на своей поверхности мини-антитела, которые связываются с другими (TRX-ассоциированными) компонентами этих комплексов.

Полученные в результате этой процедуры клоны мини-антител исследовали на предмет их разнообразия и требуемой специфичности.

Последовательности клонов мини-антител, получаемые исходно в составе плазмиды pHEN4, группировали согласно схожести картин их электрофоретически разделенных рестриктивных фрагментов (обычно использовали рестриктазу HinfI). 1-2 представителя каждой группы использовали для переклонирования в другой плазмидный вектор (pHEN6), позволяющий присоединение к 3'-концу мини-антитела (His)₆-тага.

компонентам ядра, так называемому «ядерному матриксу» и «S/MAR». Биохимическое фракционирование TRX-ассоциированных комплексов весьма проблематично.

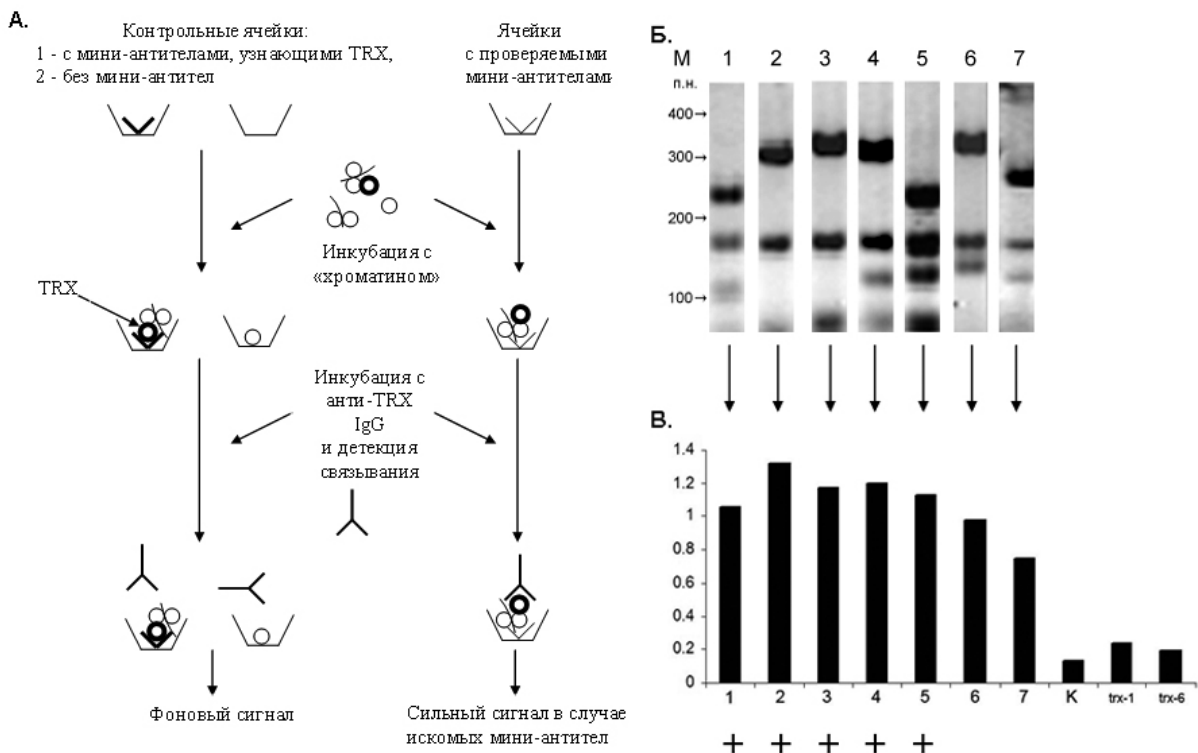


Рис. 7. Анализ отобранных клонов мини-антител.

А. Схема «сэндвич»-ИФА- анализа мини-антител, продуцируемых отдельными группами клонов. В ячейках иммунологической плашки иммобилизовали равные количества проверяемых мини-антител. Для сравнения использовали блокированную лунку без антител (К), а также лунки с полученными нами ранее мини-антителами, узнающими TRX (trx1 и trx6). Блокированные лунки инкубировали с хроматином, после чего проводили детекцию белка TRX с помощью кроличьих анти-TRX антител. **Б.** HinfI-фингерпринтный анализ амплифицированных последовательностей обогащенных клонов мини-антител. 1-5 дорожки соответствуют 5 различным группам клонов, специфически отобранных в процедуре, показанной на рис.7, в ячейке с иммобилизованными анти-TRX антителами. Дорожка 6 соответствует, мини-антителу, которое обогащалось как в случае специфических антител, так и в случае неспецифических антител. Наконец, дорожка 7 соответствует мажорному мини-антителу, которое обогащалось только в случае неспецифических антител. **В.** Результат обсчета «сэндвич»-ИФА, схема которого показана на рис. 7.Б 7 первых столбцов соответствуют мини-антителам - представителям групп с 1 по 7, анализируемых на рис. 7.В. Остальные 3 контрольные ячейки были описаны выше. Плюсы соответствуют мини-антителам, которые при иммунофлуоресцентном анализе ядер слюнных желёз личинок дрозофилы дали ядерное окрашивание, перекрывающееся (в разной степени) с окрашиванием TRX.

Мы надеемся, что использованный в данной работе подход позволит нам определить с помощью генерированных мини-антител компоненты хроматина или ядерного скелета, с которыми TRX взаимодействует *in vivo*. Предложенный подход может иметь и более широкое (универсальное) значение в плане применения для исследования других клеточных белков и структур. На основе получаемых мини-антител также могут быть созданы зонды для слежения за антигеном в живой клетке.

Модификация фага-помощника, оптимизация метода фагового дисплея.

Наиболее распространенной вариацией фагового дисплея варибельных доменов антител на нитчатом бактериофаге М13 является методика, основанная на клонировании исследуемых последовательностей в аминотерминальную часть последовательности минорного капсидного белка рIII. Поверхностный белок рIII состоит из двух аминотерминальных доменов (N1, N2), с которыми связана инфекционная активность фага, и одного карбокситерминального (СТ), участвующего в сборке вириона. Показано, что присоединение антиген-узнающего домена к N-концу белка рIII не нарушает его функциональной активности. Однако, этот традиционный подход обладает определенными проблемами. Среди них: довольно высокий фон, связанный с неспецифической сорбцией фаговых частиц, низкая в сравнении с диким типом эффективность включения в капсид гибридного белка, недостаточная эффективность процедуры сохранения и амплификации специфических клонов. Нами были предприняты усилия по преодолению упомянутых недостатков путем создания и использования модифицированной версии фага-помощника. Это новая версия делеции N-конца геномной последовательности белка рIII фага М13 (М13КО7), нарушающая способность фага заражать клетки бактерий, но не мешающая формированию фаговой частицы (рис.8). Для получения делеции были использованы сайты *MspA*I (1634 п.н.) и *Bam*HI (2221 п.н.) в последовательности фага М13КО7. В полученном мутантном фаге-помощнике hrΔMBpIII делетированы практически весь N1-домен и почти весь N2-домен за исключением 19 С-концевых аминокислот, за которыми следуют глицин-богатый район и СТ-домен.

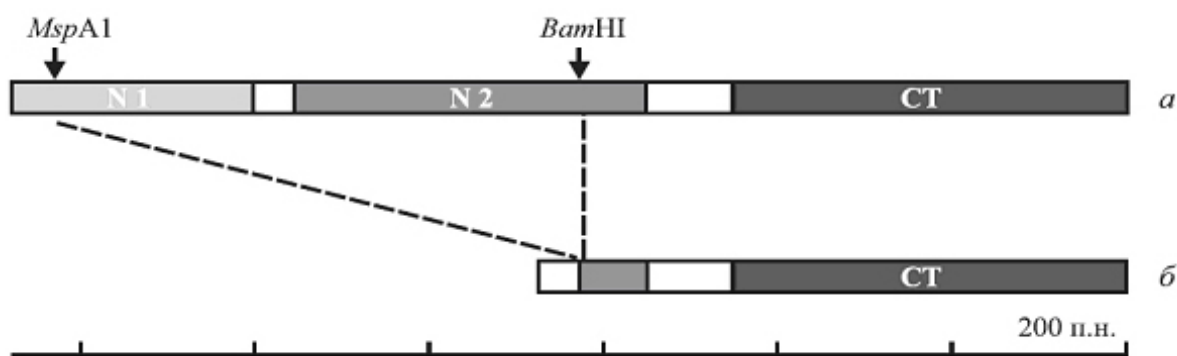


Рис. 8. Схематическое представление делеции последовательности белка рIII.

А – последовательность рIII в геноме бактериофага М13 дикого типа, Б – полученная в данной работе делеция рIII фага hrΔMBpIII. N1, N2, СТ – последовательности соответствующих доменов рIII, линией обозначены глицин-богатые линкерные последовательности.

Полученный мутантный фаг-помощник, hrΔMBpIII, может быть наработан и выделен в препаративных количествах с помощью стандартной процедуры примерно с той же или лишь немного меньшей эффективностью по сравнению с исходным фагом-помощником.

Принципиальным отличием этих фагов является то, что, в отличие от исходного фага-помощника, мутантный фаг hrΔMВpIII совсем не способен заражать бактериальные клетки. Эта важная особенность делает полученный мутантный фаг весьма перспективным в плане использования для блокировки неспецифических сайтов сорбции фага в процедуре селекции специфически связывающихся с антигеном частиц, несущих на поверхности антиген-узнающий домен (в процедуре «фагового дисплея»). Присутствие этого не способного к инфицированию мутантного фага даже в больших количествах в составе элюированных фагов не должно мешать последующему размножению именно специфически обогащаемых фаговых частиц, которые вместе с антиген-узнающим доменом содержат также полную последовательность белка рIII и способны инфицировать бактерии. Это подтвердили и наши модельные эксперименты (не приведены), в которых проводили стадию селекции параллельно как в традиционной процедуре, так и в модифицированной процедуре с добавлением hrΔMВpIII на стадии блокировки. Мутантный фаг-помощник явно способствовал уменьшению неспецифического фона и при этом сохранял весь спектр антиген-узнающих доменов у специфически связывающихся частиц. Таким образом, полученный мутантный фаг-помощник hrΔMВpIII может быть эффективным блокатором неспецифических сайтов связывания фага M13.

Если бактериальные клетки, зараженные фагом-помощником M13, не могут быть заражены другим фагом M13 (приобретают устойчивость к заражению), то клетки, содержащие кольцевую ДНК с геном мутантного фага (hrΔMВpIII), способны эффективно (сравнимо с клетками без фаговой ДНК) заражаться фагом. Мы установили, что эффективность такого заражения, например, фагами, элюированными в процессе процедуры фагового дисплея, существенно выше, чем традиционная процедура последовательного заражения TG1-клеток сперва элюированными фагами (содержащими плазмиду с геном резистентности к ампициллину), а затем фагом-помощником (содержащим в составе своей ДНК ген устойчивости к канамицину), судя по числу колоний, вырастающих на агаре с ампициллином. Мы также установили (методом подсчета вырастающих на агаре с ампициллином колоний), что TG1-клетки, содержащие геном мутантного фага hrΔMВpIII, могут быть эффективно трансформированы плазмидными ДНК, кодирующими антиген-узнающие мини-антитела. Эти трансформированные клетки могут быть использованы для наработки/амплификации фагов, содержащих отобранные антиген-связывающие домены в количествах, необходимых для проведения процедуры селекции. Эта процедура может быть стартовой для перевода фагмидной библиотеки клонов мини-антител в формат фагового дисплея (экспрессии в составе поверхностного белка рIII бактериофага).

Одним из основных недостатков систем фагида / фаг-помощник является высокий фон инфекционных фагов, которые не содержат на поверхности искомый белок (мини-антитело), но сохраняются и размножаются благодаря неспецифическому связыванию с антигеном. Использование описываемого здесь мутантного фага hrΔMВрIII, в геноме которого отсутствует (делетирована) информация о необходимом для инфекционности домене белка оболочки фага рIII, потенциально может исправить этот недостаток, как через блокировку сайтов неспецифической сорбции (см. выше), так и путем использования этого мутантного фага в качестве фага-помощника. «Спасение» библиотеки клонов мини-антител с помощью этого фага-помощника будет осуществляться только в тех случаях, когда продуцируемые фаги будут содержать кодируемый фагомидой целый рIII, соединенный с мини-антителом, так как фаги без мини-антитела будут нести только укороченные рIII и будут потеряны при следующем заражении клеток. Мы провели модельный эксперимент, в котором сравнили эффективность отбора позитивных клонов в случае использования фага hrΔMВрIII и традиционной процедуры с использованием интактного фага M13KO7 в качестве фага-помощника. Для сравнения в качестве стартового материала была использована ранее нами полученная фаговая библиотека, амплифицированная после второго раунда селекции против антигена TNF-alpha (Тиллиб и др., статья готовится в печать). Этими, уже в значительной мере специфически отобранными, фагами заражали: (1) клетки TG-1 с последующей их суперинфекцией фагом-помощником M13KO7 согласно традиционной процедуре, а также (2) клетки TG-1, пред-инфицированные геномом фага hrΔMВрIII. Амплифицированные фаги анализировали с помощью ИФА на предмет содержания специфических фагов, несущих на поверхности мини-антитела, способные связывать TNF-alpha. Интересно (рис. 9,а), что, если общее количество наработанных фаговых частиц было больше в случае традиционного метода амплификации с использованием фага-помощника с интактным геном рIII, то доля фаговых частиц, содержащих на поверхности желаемые мини-антитела, оказалась существенно выше (примерно 63% против 26%) в случае заражения элюированным фагом TG-1 клеток, прединфицированных геномом мутантного фага hrΔMВрIII.

Отдельные колонии анализировали (с помощью HinfI- рестрикции амплифицированной вставки) на предмет отнесения последовательности мини-антитела к одной из групп (рис. 9,б). Подсчитывали относительное число представителей каждой группы. Для представителей каждой группы проводили наработку мини-антитела (в периплазме WK6-клеток) и анализировали с помощью ИФА их специфическую активность по связыванию с иммобилизованным антигеном (TNF-alpha). Данные не приведены (Вятчанин Тиллиб, 2008). Следует отметить, что фоновые мини-антитела и мини-антитела с

низкой аффинностью эффективно удалялись в случае предложенной нами модифицированной процедуры, тогда как в случае обычной процедуры представители этих групп сохранялись в заметном количестве. Исходно слабо представленные клоны, соответствующие высокоаффинным мини-антителам, существенно обогащались именно в результате модифицированной процедуры и почти терялись в случае традиционного метода селекции. В случае мини-антител других групп также можно наблюдать вариации в их относительном обогащении (рис. 9,в).

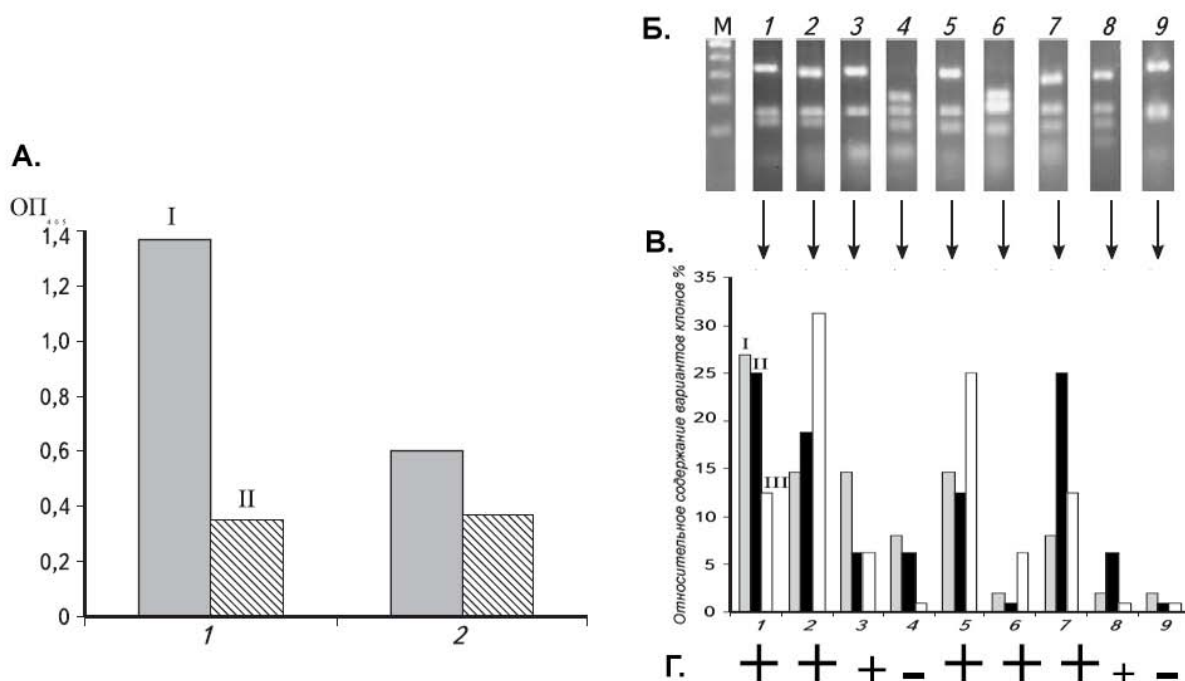


Рис. 9. А. Увеличение доли специфических фагов (данные ИФА) после одного раунда селекции 1 - традиционным способом, 2 – использованием TG-1 клеток, пред-инфицированных hrΔMVpIII. I – общее число фаговых частиц, II – количество частиц, связавшихся с антигеном. В правой части (Б-Г) приведены результаты одного раунда селекции, полученные с использованием нового фага помощника. Б. HinfI-фингерпринтный паттерн 9 основных групп клонов мини-антител. В. Изменение относительного процентного содержания каждого из клонов после раунда селекции. I – до селекции II – после традиционной селекции, III – после селекции с hrΔMVpIII. Г. Относительные данные ИФА по связыванию мини-антителами антигена (TNF-alpha).

В результате проведённых исследований можно заключить, что использование описанного в данной работе мутантного фага-помощника hrΔMVpIII как в качестве средства, блокирующего неспецифические сайты сорбции фага M13, так и в качестве собственно фага-помощника может заметно повысить эффективность процедуры селекции, в частности, может помочь отобрать специфические, но мало представленные в исходной библиотеке и поэтому часто теряющиеся при селекции мини-антитела. Конечно, нужно подтвердить этот вывод для различных антигенов, поэтому мы пока можем рекомендовать проводить процедуру селекции параллельно как традиционным многократно проверенным методом, так и предложенным модифицированным методом.

Использование мини-антител к ламину для *in vitro* и *in vivo* детекции антигена.

Набор антител, полученных в ходе данных исследований, представляет интерес, прежде всего, в качестве реагентов для иммунного окрашивания. Было проведено сравнение полученных в нашей группе мини-антитела к ламину с коммерчески-доступными антителами. В качестве объекта были выбраны слюнные железы дрозофилы (крупные политенные ядра которых удобно наблюдать).

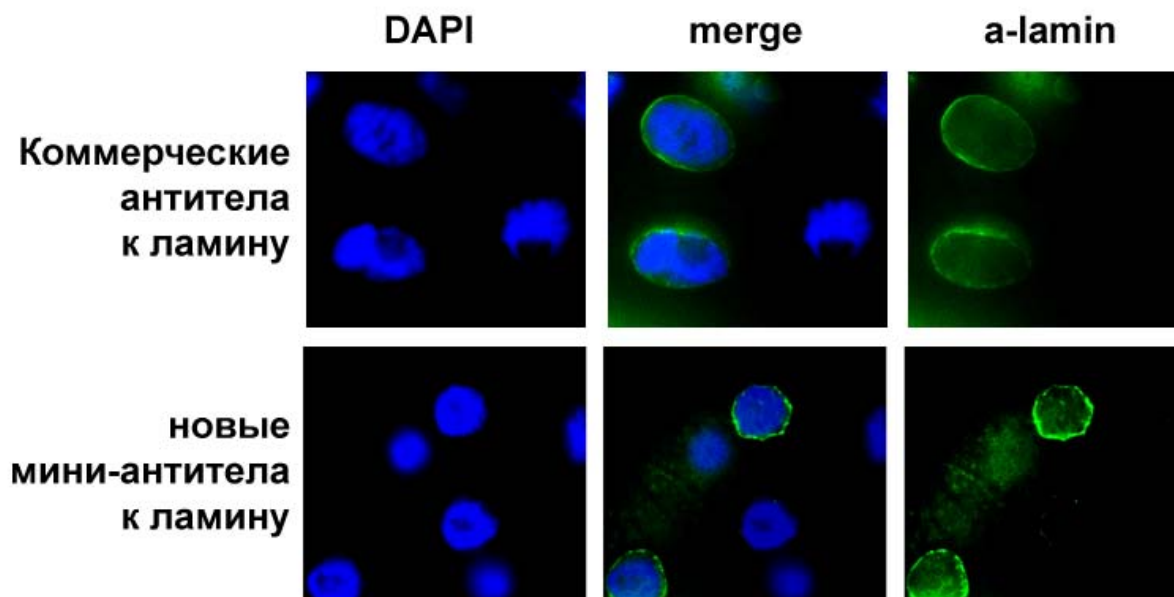


Рис. 9. Окрашивание ядер слюнных желез *D. melanogaster* антителами к ламину. На рисунке приведены паттерны окрашивания ламина ядра коммерчески-доступными антителами (верхняя часть) и новыми мини-антителами (нижняя часть), полученными в данной работе.

На рисунке 9 видно, что детекция ламина с помощью наших рекомбинантных мини-антител вполне сопоставима с детекцией коммерческими моноклональными антителами. При этом с экономической точки зрения мини-антитела остаются более выгодными. Кроме того, путем несложных генно-инженерных манипуляций возможно получить мини-антитела в ди- или мульти-мерном формате, что должно привести к увеличению их аффинности (авидности).

Мини-антитела к ламину были использованы в исследованиях свойств белка TRX, который, как показано ранее, ассоциирован с компонентами «ядерного скелета». Располагая мини-антителами к одному из структурных компонентов ядра, ламину, мы провели двойное иммунное окрашивание ядер клеток слюнных желез *D. melanogaster*, используя поликлональные кроличьи анти-TRX антитела и мини-антитела к ламину. Полученные результаты (рис. 10) указывают на отсутствие ассоциации TRX с ламинной, что было позже подтверждено и биохимическими экспериментами.

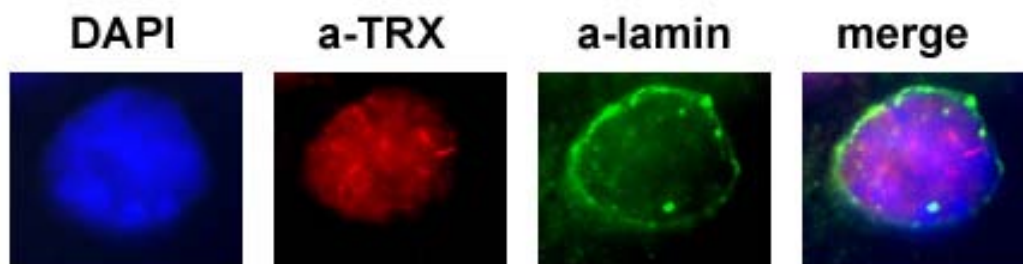


Рис. 10. Окрашивание ядер слюнных желез *D. melanogaster* антителами к тритораксу совместно с мини-антителами к ламину.

Используя проклонированные последовательности мини-антител, можно относительно легко создавать разные генно-инженерные конструкции, например, бифункциональные флуоресцентные зонды для слежения за антигеном в живой клетке. На основе коммерчески доступных векторов (фирмы Евроген), мы создали несколько вариантов конструкций с разным взаимным расположением последовательностей мини-антитела и флуоресцентного белка (RFP или GFP), разделенных линкерной последовательностью разной длины. Этими конструкциями были трансфицированы S2 клетки *D. melanogaster*. Оптимальным (согласно детектируемому окрашиванию ламина, рис. 11) вариантом оказалась конструкция с конфигурацией N-мини-антитело – короткий линкер – RFP/GFP-C.

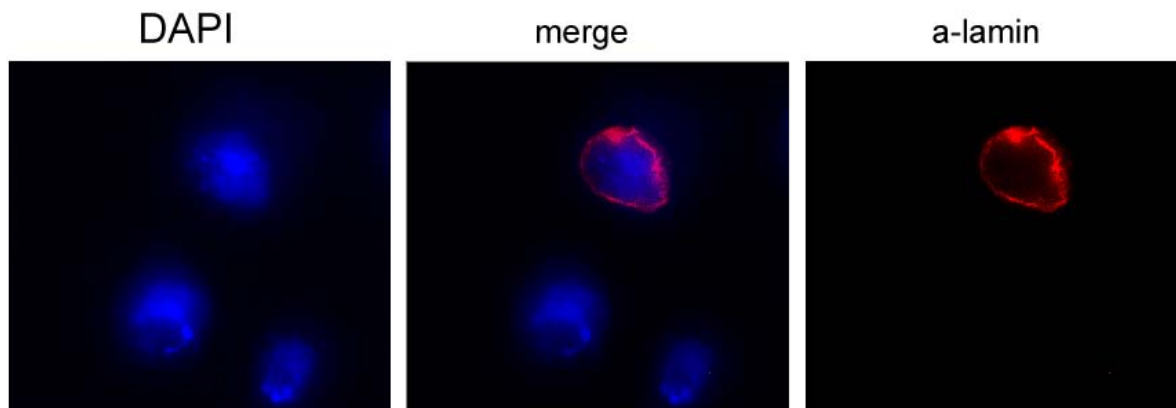


Рис. 10. Детекция антигена в живых S2 клетках, трансфицированных VHH-RFP конструкцией.

Одним из важных путей приложения описанной технологии является её использование для получения на основе генерируемых мини-антител и их производных новых эффективных препаратов для диагностики и лечения. Так, в настоящее время в нашей группе ведутся работы по получению мини-антител к разным антигенам, которые важны для диагностики и терапии раковых или иных заболеваний. Результаты этой работы весьма обнадеживающие.

ВЫВОДЫ

1. Показана принципиальная возможность использования в новой технологии генерирования мини-антител особенностей иммунной системы двугорбого верблюда.
2. Применен новый подход к созданию библиотек последовательностей мини-антител, основанный на иммунизации верблюда сложной белковой смесью. С его использованием получен ряд новых мини-антител к компонентам клеточного ядра.
3. В рамках метода фагового дисплея разработан новый способ селекции мини-антител к компонентам комплекса, содержащего известный белок.
4. На основе модифицированного фага помощника предложены пути оптимизации процедуры отбора мини-антител методом фагового дисплея.
5. Продемонстрирован потенциал использования получаемых мини-антител для детекции антигена, как *in vitro*, так и *in vivo*, на примере мини-антитела, специфично связывающегося с ядерным белком ламином.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Вятчанин А.С., Тиллиб С.В. Новый подход к исследованию клеточных компонентов, ассоциированных с определенным белком. *Доклады Академии Наук*, 2008, том 421, №6, стр. 826-829.
2. Вятчанин А.С., Тиллиб С.В. Модификации процедуры фагового дисплея для повышения эффективности селекции антиген-связывающих доменов особых одноцепочечных верблюжьих антител. *Биотехнология*, 2008, № 4, стр. 22-27.

Материалы конференций:

1. Тиллиб С.В., Рутовская М.В., Вятчанин А.С., Коробко И.В., Калиниченко С.В., Захарова Е.С., Кибардин А.В., Ларин С.С., Георгиев Г.П. «Нано-антитела» для диагностики и лечения. Доклад на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. 11-15 мая 2008 г. в г. Новосибирске. Тезисы, с. 311.
2. Вятчанин А.С., Тиллиб С.В. Модификации процедуры фагового дисплея для повышения эффективности селекции антиген-связывающих доменов особых одноцепочечных верблюжьих антител. Российская школа-конференция "Генетика микроорганизмов и биотехнология", 20 – 24 октября 2008 г. Москва – Пущино.