

УДК 577.2

НОВЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ КЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ОПРЕДЕЛЕННЫМ БЕЛКОМ

© 2008 г. А. С. Вятчанин, С. В. Тиллиб

Представлено академиком Г.П. Георгиевым 22.04.2008 г.

Поступило 23.04.2008 г.

Основным инструментом при биохимических и микроскопических исследованиях белков и других компонентов клетки являются антитела. Получение специфических антител, способных эффективно узнавать определенный антиген *in vivo*, является, как правило, сложной задачей вследствие трудности биохимического выделения конкретных клеточных компонентов и недостатка знаний, например, о посттрансляционном процессинге исследуемого белка, вхождении в состав комплексов и доступности его доменов для детекции антителами. В данной работе описывается новый многообещающий комбинированный подход, позволяющий эффективно генерировать высокоаффинные мини-антитела к эндогенным клеточным антигенам на примере получения мини-антител к компонентам хроматина, ассоциированным с регуляторным белком TRITHORAX (TRX) в ядрах клеток *Drosophila melanogaster*.

Описываемый подход базируется на относительно недавнем открытии бельгийских ученых существования у представителей семейства Верблюдовых функциональных и обладающих достаточно широким спектром узнавания неканонических антител, состоящих из димера только одной укороченной тяжелой цепи иммуноглобулина (без легких цепей), специфичность узнавания которых определяется лишь одним вариабельным доменом [1]. Предлагаемый нами подход включает: а) иммунизацию верблюда смесью эндогенных антигенов (хроматином), б) генерирование библиотеки вариабельных доменов “однодоменных” антител (мини-антител) и использование этой библиотеки для отбора мини-антител, узнающих определенные белки и их комплексы.

Наработку ядерного материала (хроматина) для иммунизации верблюда проводили из 30 г эмбрионов дрозофилы (для 5 инъекций), а для финального анализа мини-антител – из культуры дрозофилиных клеток S2 согласно ранее описан-

ным протоколам [2, 3] получения хроматина для иммунопреципитации (X-ChIP). Фиксацию *in vivo* белковых и белок–ДНК-комплексов проводили, инкубируя ядра в буферном растворе, содержащем 1%-ным формальдегид (эмбрионы – в течение 40 мин, а клетки – в течение 15 мин). Набухшие в низкосолеваемом буфере ядра лизировали и параллельно дробили хроматин ультразвуком. Полученный ядерный лизат центрифугировали для удаления нерастворимого материала и отбирали супернатант. Супернатант, содержащий растворимые сшитые хроматиновые комплексы, а также другие растворимые ядерные белки, хранили в аликвотах при -70°C .

Иммунизация верблюда (3-летней самки *Camelus bactrianus*) включала 5 инъекций. Первую инъекцию проводили хроматином, смешанным с полным адьювантом Фройнда в соотношении 1:1. Затем хроматин смешивали с неполным адьювантом Фройнда (1:1) и проводили последовательно еще 4 инъекции, соответственно, через 1 мес. и затем трижды через 2 недели. Финальное взятие крови осуществляли через 5 дней после последней инъекции. В-лимфоциты из периферической крови иммунизированного верблюда использовали как источник индуцированных и наивных мРНК для клонирования (генерирования библиотеки) всего репертуара соответствующих вариабельных доменов особых иммуноглобулинов верблюда, состоящих из димера только одной тяжелой цепи. Процедуру генерирования библиотеки мини-антител в поверхностном белке бактериофага M13 и последующей селекции (методом “фагового дисплея”) мини-антител, узнающих заданный антиген, проводили в основном так, как описано ранее [4–6]. Принципиально новым при селекции фаговых частиц было использование модификации метода, показанной на схеме (рис. 1). Это вариант “сэндвич”-иммунной селекции. Вначале на иммобилизованные специфические антитела к известному изучаемому белку (в данном случае аффинно-очищенные анти-TRX кроличьи антитела N1 и N6, полученные нами ранее [3, 7]) из материала хроматина вылавливаются специфические комплексы (TRX-содержащие). Затем

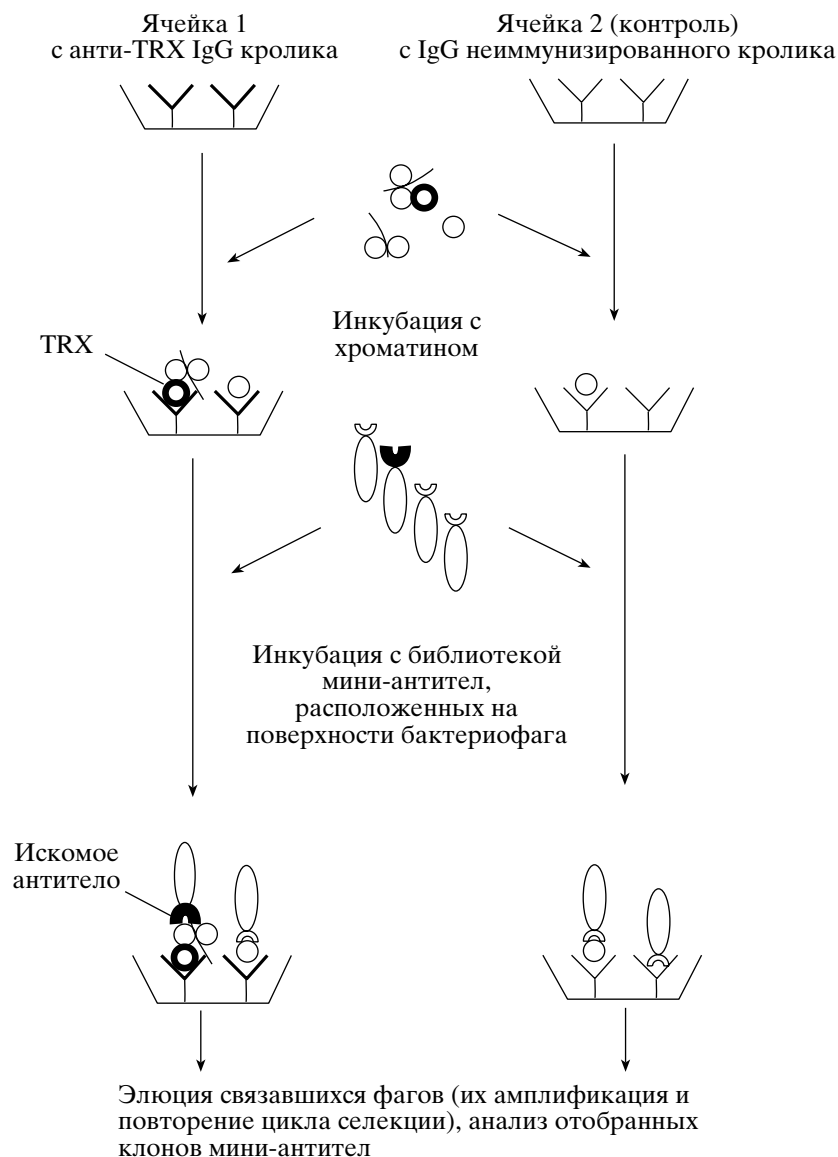


Рис. 1. Схема селекции бактериофагов, содержащих на поверхности мини-антитела, специфически связывающихся с компонентами хроматиновых комплексов, ассоциированных с белком TRX. Жирным кружком и жирной скобкой обозначены соответственно TRX-узнающие домены кроличьих антител, белок TRX и искомое мини-антитело, специфически связывающееся с компонентами TRX-содержащего комплекса. Овалом со светлой и жирной скобками обозначены фаговые частицы с расположенными на их поверхности мини-антителами. Компоненты хроматина обозначены кружками (белки) и линиями (ДНК).

отбираются фаговые частицы, содержащие экспрессированные на поверхности частиц мини-антитела (а также внутри частиц кодирующие их плазмидные клоны ДНК), которые связываются с другими (TRX-ассоциированными) компонентами этих комплексов.

Основные стадии процедуры, представленной на рис. 1, включали: а) иммобилизацию в ячейке 1 иммунологической плашки кроличьих анти-TRX-антител (1 мкг) или – в ячейке 2 – эквивалентное количество антител из сыворотки неиммунизированного кролика (контроль), с последующей от-

мывкой и блокировкой лунок; б) инкубацию IgG-содержащих ячеек с хроматином (100 мкл выделено из 10^7 S2-клеток) и блокировкой лунок; в) инкубацию с генерированной библиотекой мини-антител, расположенных на поверхности бактериофага M13 с последующей тщательной отмывкой; г) элюцию связавшихся фагов триэтиламинном. Для блокировки лунок поочередно использовали растворенные в стандартном солевом растворе (PBS) 1%-ный бычий сывороточный альбумин и 1%-ный раствор нежирного молока (фирмы “Bio-Rad”). Для отмывки использовали PBS, содержащий 0.05%-ный Tween 20.

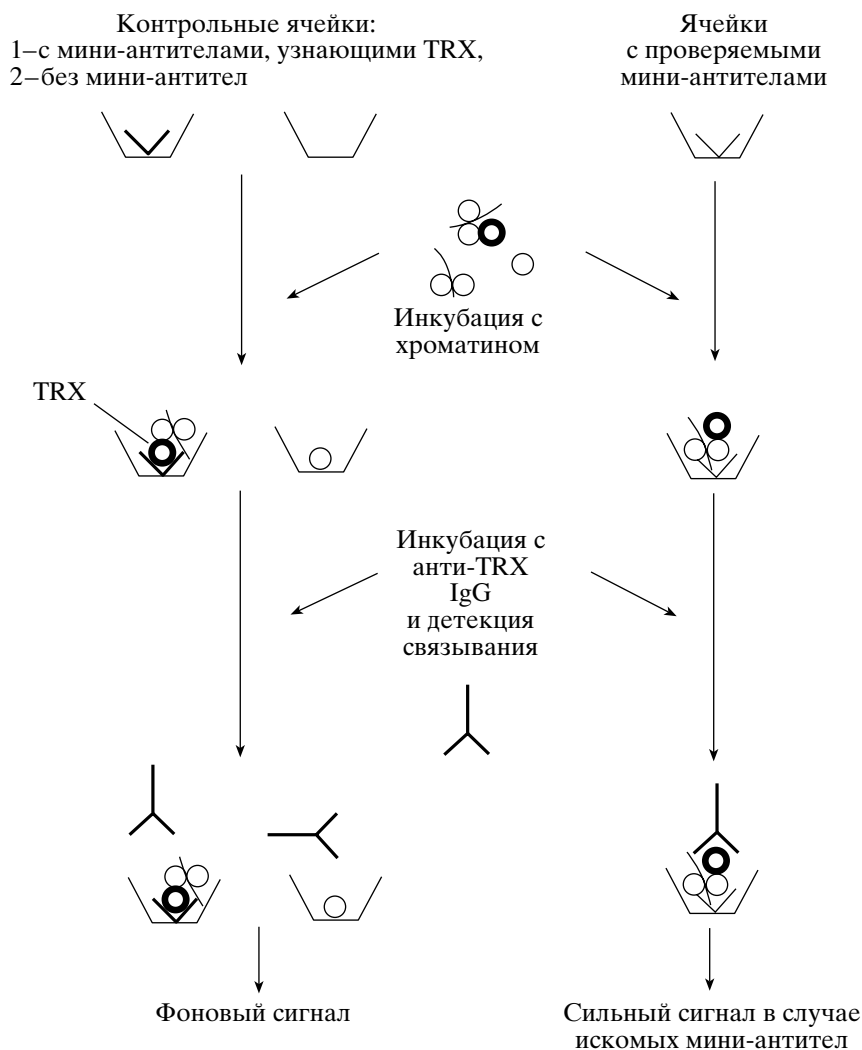


Рис. 2. Схема сэндвич-ИФА-анализа индуцированных и очищенных мини-антител.

Процедуру селекции повторяли 3 раза. 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 рНЕН4, группировали согласно схожести картин их электрофоретически разделенных рестриктных фрагментов (обычно использовали рестриктазу *HinfI*). Один-два представителя каждой группы использовали для переклонирования в другой плазмидный вектор (рНЕН6), позволяющий присоединение к 3'-концу мини-антитела (His)₆-тага. Из периплазматического экстракта выделяли (на колонке с Ni-NTA-агарозой) индуцированные (добавлением к растущим бактериям 1 мМ IPTG) мини-антитела для последующего иммуноферментного анализа (ИФА), схема и результаты которого представлены на рис. 2, рис. 3. Согласно представленной схеме (рис. 2) в ячейках иммунологической плашки иммобилизо-

вали равные количества (1 мкг) 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*). После промывки и блокировки лунок (1% БСА в PBS) проводили инкубацию с хроматином, снова отмывали и блокировали, после чего проводили детекцию белка TRX с помощью кроличьих анти-TRX-антител, затем — конъюгированных с пероксидазой вторичных антител к IgG кролика (Имтек) и, наконец, визуализацией с ABTS (“Sigma”) и количественным подсчетом поглощения при длине волны 405 нм. Были отображены и проанализированы представители 7 групп мини-антител (рис. 3). Мини-антитела, обозначенные номерами с 1 по 5 соответствуют 5 различным группам клонов, специфически отобраным в ячейке с иммобилизованными анти-TRX-антителами. Номер 6 соответствует мини-антителу, которое обогащалось как в случае специфиче-

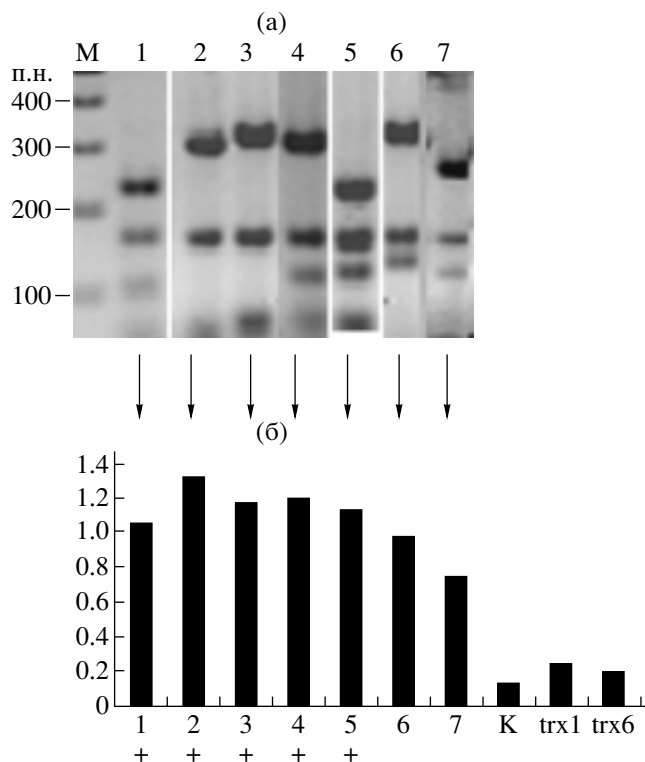


Рис. 3. Анализ отобранных клонов мини-антител: а – *HinfI*-фингерпринтный анализ амплифицированных последовательностей обогащенных клонов мини-антител. М – маркер, 1–7 соответствуют 7 различным группам клонов, специфически отобранным в процедуре, показанной на рис. 1. б – результат обсева сэндвич-ИФА, схема которого показана на рис. 2. 1–7 соответствуют 1–7 мини-антителам на а. К, *trx1*, *trx6* – контрольные ячейки. Плюсы соответствуют мини-антителам, дающим ядерное окрашивание, перекрывающееся с окрашиванием TRX.

ских антител, так и в случае неспецифических антител. Наконец, номер 7 соответствует мажорному мини-антителу, которое обогащалось только в случае неспецифических антител. В итоге, нам удалось отобрать 5 различных мини-антител (соответствующих группам 1–5 на рис. 3), 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 (как описано ранее [7]) 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 компонентам ядра, так называемому “ядерному матриксу” и “S/MAR” [7, 8]. Биохимическое фракционирование TRX-ассоциированных комплексов весьма проблематично. 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 могут быть созданы зонды для слежения за антигеном в живой клетке [6].

Авторы выражают благодарность проф. С. Муилдермансу (S. Muyltermans, Vrije Universiteit Brussel, Belgium) за консультации и предоставление плазмид рНЕН4 и рНЕН6, М.В. Рутоской и другим сотрудникам научно-экспериментальной базы “Черноголовка” ИПЭЭ имени А.Н. Северцова РАН за помощь в работе с верблюдом.

Данная работа была поддержана (С.В. Тиллибу) грантами Российского фонда фундаментальных исследований (05-04-08009-офи-а) и Программы фундаментальных исследований РАН “Молекулярная и клеточная биология” (проект № 10002-251/П-10/147–142/120503-051).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hamers–Casterman C., Atarhouch T., Muyltermans S. *et al.* // *Nature*. 1993. V. 363. P. 446–448.
2. Orlando V., Strutt H., Paro R. // *Methods*. 1997. V. 11. P. 205–214.
3. Ряховский А.А., Тиллиб С.В. // *Генетика*. 2007. Т. 43. № 9. С. 1181–1189.
4. Nguyen V.K., Desmyter A., Muyltermans S. // *Adv. Immunol.* 2001. V. 79. P. 261–296.
5. Saerens D., Kinne J., Bosmans E. *et al.* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 51965–51972.
6. Rothbauer U., Zolghadr K., Tillib S. *et al.* // *Nature Methods*. 2006. V. 3. P. 887–889.
7. Лебедева Л.А., Тиллиб С.В. // *Генетика*. 2003. Т. 39. № 2. С. 250–258.
8. Ряховский А.А., Тиллиб С.В. // *ДАН*. 2007. Т. 416. № 3. С. 416–419.