

Введение

Наша иммунная система защищает нас от различных инфекций. Одной из важных частей этой системы являются антитела, которые в организме синтезируются В-лимфоцитами. Классические антитела используются в лабораторной практике и медицине, но имеют некоторые недостатки, например, наличие иммунного ответа и трудности с воспроизводством антител биотехнологическими методами. Как мы можем их избежать?

Альтернативой классическим антителам служат **нанотела** - белки, соответствующие переменным доменам антител, состоящих только из тяжелых цепей (HCAb). Такие антитела были найдены в сыворотке крови животных из семейства Верблюдовые и класса Хрящевые рыбы.

Зачем мы исследуем свойства нанотел?

Наиболее очевидным преимуществом нанотел является их **небольшая**, по сравнению с классическими антителами, **молекулярная масса** ~15 кДа. При этом они распознают антигены с **большой аффинностью**. Нанотела не претерпевают посттрансляционных модификаций, что позволяет нам производить нанотела в бактериальных клетках.

Другие преимущества нанотел вытекают из их структуры.

Переменные домены HCAb легче собираются в клетке и остаются растворимыми из-за гидрофильной поверхности. В данном случае не происходит ошибочного связывания доменов Fab-фрагмента, что характерно для классических антител. Также они могут распознавать **больше эпитопов** из-за гибкой петли CDR3, которая может достигать полостей целевых антигенов, недоступных классическим антителам.

Эта технология является перспективной в биомедицине: она может помочь в лечении паразитарных или аутоиммунных заболеваний путем таргетной доставки лекарств, а также может использоваться в качестве лабораторного инструмента для таких методов как Western-blot и ИФА (иммуноферментный анализ).

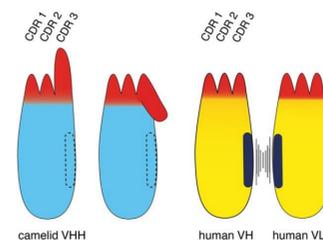
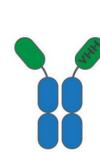
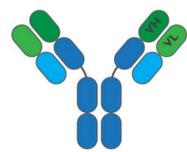


Рис. 1. Сравнение стандартных антител и антител, состоящих только из тяжелых цепей.

Показано нанотело – переменный домен HCAb. Нанотела не имеют домена Fc, который связывается с клеточными рецепторами и белками системы комплемента, тем самым не вызывают иммунного ответа [1].

Рис. 2. Сравнение переменных доменов классических антител и антител, состоящих только из тяжелых цепей.

Цель 1: Как изменения в структуре нанотел влияют на их функции?

Используя метод иммунопреципитации для исследования силы связывания мутантных нанотел с антигенами, мы сравнили свойства мутантов со свойствами нанотела дикого типа LaG19. LaG19 - это нанотело, которое взаимодействует с зеленым флуоресцентным белком GFP. Молекулярная масса LaG19 = 15,528 кДа и коэффициент диссоциации = 24,6 нМ [3].

Мутантные нанотела, которые были использованы в работе, были получены путем сайт-направленного мутагенеза. Одиночные замены аминокислот были произведены в CDR1, CDR2 и CDR3 доменах. Мутантные нанотела были любезно предоставлены Наталией Кетарен.

Известно, что аффинность LaG19 (дикий тип) самая низкая, по сравнению с мутантными нанотелами. Наиболее высокой аффинностью обладает нанотело M3.



Нам известны оптимальные условия для связывания трёх комплексов: Tcb2, Arp2 и Ent2 [3]. Основываясь на этих данных, мы попытались воспроизвести эксперимент.

Для экспрессии комплексов белков Tcb2, Arp2 и Ent2, ассоциированных с GFP, мы использовали дрожжи. При проведении иммунопреципитации мы использовали нанотела, ковалентно связанные с магнитными частицами.

Isolating Tcb2 complex

Extraction buffer: 40 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 250 mM trisodium citrate, 5 mM CHAPS

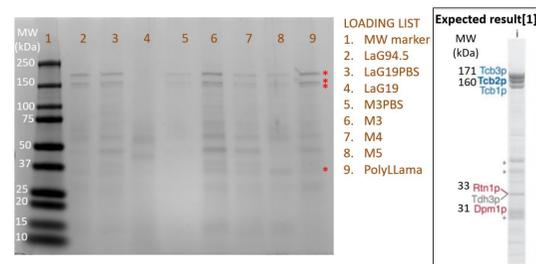


Рис. 4. Результат выделения Tcb2 комплекса с помощью различных нанотел (денатурирующий электрофорез)

Рис. 3. Схема эксперимента по выделению белковых комплексов из клеточных экстрактов методом иммунопреципитации

Isolating Arp2 complex

Extraction buffer: 40 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 250 mM trisodium citrate, 10 mM CHAPS

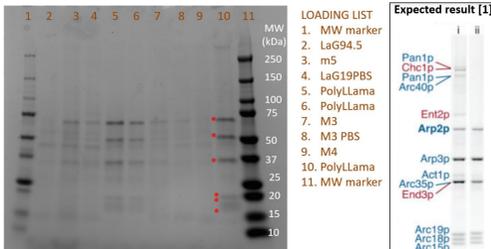


Рис. 5. Результат выделения Arp2 комплекса с помощью различных нанотел (денатурирующий электрофорез)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выделение комплекса Tcb2:

- Нанотела LaG19, M3, M4 & M5 способны выделять комплекс из клеточного экстракта (Рис. 4).
- Для M3 характерно неспецифическое связывание антигена.

Выделение комплекса Arp2:

- LaG19, M3 & M5 способны выделять комплекс из клеточного экстракта (Рис. 5).
- Для M3 характерно неспецифическое связывание антигена.

ОБСУЖДЕНИЕ

- Необходимо повторить эксперименты по иммунопреципитации для повышения валидности результатов.
- Несмотря на то, что моноклональные нанотела распознают только один эпитоп, они способны выделять комплексы так же хорошо, как и поликлональные нанотела.

Цель 2: Какова структура идеального нанотела?

Кристаллизация – популярный метод визуализации структуры белков в атомном разрешении. В основе метода кристаллизации лежит свойство биомолекул образовывать кристаллы, способные рассеивать рентгеновские лучи. Закон Брэгга, описывающий зависимость между углами и фазами падающих и отраженных волн и расстояниями между атомами в кристаллической решетке, позволяет воссоздать трехмерную кристаллическую структуру по картине дифракции кристаллами рентгеновских лучей.

Проблема заключается в том, чтобы вырастить кристалл для таких экспериментов. Процесс кристаллизации белка, то есть упорядочивания белковых молекул, весьма продолжительный. Важным аспектом является подбор оптимальных для кристаллизации условий.

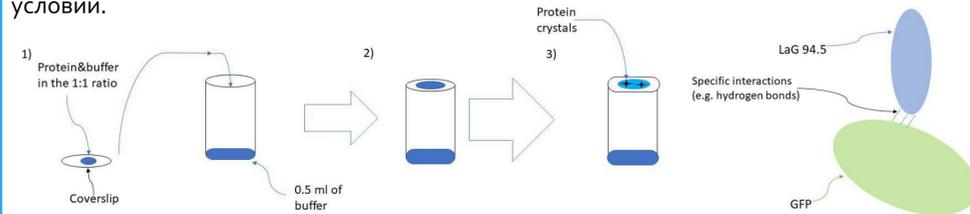


Рис. 6. Схема метода "висячей капли"

Рис. 7. Схема взаимодействия GFP с нанотелом LaG94.5

Нашей целью было подобрать оптимальные условия, в которых нанотело LaG94.5 может образовывать кристаллы в присутствии своего антигена (зеленого флуоресцентного белка, GFP) и без него. Мы выбрали данное нанотело, так как оно обладает наибольшей аффинностью к GFP по сравнению с другими нанотелами и стабильно при различных физико-химических условиях. В нашем эксперименте мы использовали метод «висячей капли» (Рис. 6) и набор преципитантов Molecular Dimensions 3D Structure Screen „MD 1-13”.



Рис. 8. Результаты кристаллизации LaG94.5 и комплекса LaG94.5+GFP в различных условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ & ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексы LaG94.5+GFP преимущественно образовывали неаморфные осадки, которые в большинстве случаев и приводят к кристаллообразованию. Это можно объяснить следующими стабилизирующими растущий кристалл факторами: взаимодействием антиген-нанотело, а также естественной димеризацией GFP в высоких концентрациях.

Список источников:

1. Hakhverdyan et al. Rapid, Optimized Interatomic Screening. *Nat. Methods.* (2015). 12(6):553-560
2. Hong Sh et al. In Vivo Model for Testing Effect of Hypoxia on Tumor Metastasis. *J Vis Exp.* (2016). Dec 9(118)

3. Peter Bannas, Julia Hambach and Friedrich Koch-Nolte. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Front Immunol.* (2017). 8(1603)
4. Hampton Research. Hanging drop vapor diffusion crystallization. *Crystal growth.* 101. p.1
5. Alexander McPherson. Introduction to protein crystallization. *ScienceDirect.* (2004). Vol. 34(3): 254-265