УДК 571.27

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЯДЕРНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В, СОДЕРЖАЩЕГО ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ ДОМЕН БЕЛКА М2 ВИРУСА ГРИППА В РАЙОНЕ ПОВЕРХНОСТНОЙ ИММУНОДОМИНАНТНОЙ ПЕТЛИ

Блохина Е.А., Куприянов В.В.

ФГБУН «Центр «Биоинженерия» Российской академии наук», Москва, e-mail: Blohina-lena87@mail.ru

Перспективным кандидатом для создания рекомбинантной противогриппозной вакцины, которая была бы эффективна против широкого спектра штаммов вируса гриппа, является трансмембранный М2 белок, последовательность внешнего домена (М2е) которого высоко консервативна у различных штаммов. Основной проблемой при использовании М2е является его слабая иммуногенность, что требует присоединения М2е к носителю, способному усилить его антигенные свойства. В качестве такого носителя широко используется ядерный антиген вируса гепатита В (HBc), способный к самосборке в симметричные вирусоподобные частицы. Мы получили искусственные гены и рекомбинантные векторы экспрессии, позволяющие получать в клетках бактерий *Escherichia coli* гибридные белки, содержащие одну или две копии М2е пептида вируса гриппа птиц A/Chicken/Kurgan/05/2005 в иммунодоминантной петле HBc антигена. Введение глицин-богатых линкерных последовательностей в точки «стыка» последовательностей М2е и HBc антигена обеспечило необходимую гибкость химерной последовательности и фолдинг гибридного белка, позволившие получить его в растворимой форме. Полученные гибридные М2е-HBc белки могут стать основой для создания новой рекомбинантной противогриппозной вакцины.

Ключевые слова: грипп, белок М2, HBc антиген, вирусоподобная частица, вакцина

PRODUCTION OF RECOMBINANT CORE ANTIGEN OF HEPATITIS B VIRUS CARRYING THE EXTRACELLULAR DOMAIN OF INFLUENZA VIRUS M2 PROTEIN WITHIN SURFACE IMMUNODOMINANT LOOP

Blokhina E.A., Kuprianov V.V.

Centre «Bioengineering» of the Russian academy of sciences, Moscow, e-mail: Blohina-lena87@mail.ru

Transmembrane protein M2, which extracellular domain (M2e) is highly conserved in various influenza strains, is a promising candidate for development of recombinant vaccine efficient against a wide range of influenza virus strains. The main problem in development of M2e-based vaccines is low immunogenicity of M2e that requires its linkage to a carrier capable to enhance antigenic properties of M2e. Nuclear antigen of hepatitis B virus (HBc), capable to self-assembly into symmetrical virus-like particles, is widely used as such carrier. We constructed artificial genes and recombinant expression vectors allowing producing in *Escherichia coli* the hybrid proteins containing one or two copies of M2e peptide of avian influenza virus A/Chicken/Kurgan/05/2005 within immunodominant loop of HBc. Insertion of glycine-rich linkers at the junctions between M2e and HBc sequences ensured appropriate flexibility of chimeric polypeptide and folding of hybrid protein that allowed its production in a soluble form. The hybrid M2e-HBc proteins may be used for development of recombinant vaccine against influenza.

Keywords: influenza, M2 protein, HBc antigen, virus-like particle, vaccine

Проблема получения эффективной противогриппозной вакцины остается актуальной. Существующие субъединичные и расщепленные вакцины в качестве основных иммуногенных агентов используют поверхностные белки вируса гриппа, нейраминидазу и гемагглютинин. Однако высокая изменчивость этих белков, сопровождающаяся изменением антигенной специфичности, не позволяет обеспечить защиту от всех штаммов вируса гриппа, что требует постоянного мониторинга циркулирующих вирусов и корректировки набора штаммов, входящих в вакцину [9]. Необходимость ежегодного создания новой вакцины сопряжена с большими организационными и экономическими затратами.

Альтернативой традиционным вакцинам, использующим ослабленные вирусы или их компоненты, являются рекомбинантные вакцины, основанные на отдельных вирусных белках, которые могут быть получены в стандартных организмах-продуцентах, например в бактериях или дрожжах. Такой подход позволяет, с одной стороны, подготовить вакцину очень быстро, и/или, с другой стороны, создавать вакцины, способные защищать от большого числа вирусных штаммов в случае использования консервативных белков вируса [2].

Одним из перспективных кандидатов при создании «универсальной» противогриппозной вакцины является трансмембранный М2 белок вируса гриппа, последовательность внешнего домена (М2е) которого из 23 аминокислотных остатков высоко консервативна у большинства штаммов вируса гриппа человека и отличается лишь по нескольким аминокислотам у штаммов вирусов гриппа, выделенных от

животных [4]. Основной проблемой при использовании M2e является его слабая иммуногенность, что требует присоединения M2e к носителю, способному усилить его антигенные свойства. С разной степенью успеха в качестве носителей M2e пептида были использованы вирусоподобные частицы на основе папилломавируса человека, бактериофага Qβ, вируса мозаики папайи и вируса мозаики коровьего гороха [4]. Наиболее широко и успешно в качестве высокоиммуногенного носителя эпитопов используется ядерный антиген вируса гепатита B (HBc), способный к самосборке в симметричные вирусоподобные частицы [6]. Включение чужеродных последовательностей в состав HBc с помощью генетического «сшивания» (т.е. создания гена, кодирующего химерный белок) может происходить в трех позициях. Это N- и C-концы, а также область иммунодоминантной петли, расположенная между 75 и 85 аминокислотными остатками HBc.

Примером успешного применения HBc антигена в качестве носителя M2e является получение гибридных белков с вставкой M2e в N-концевую область HBc антигена. Такие белки, экспрессированные в бактериях *Escherichia coli*, собирались в вирусоподобные частицы, которые обладали высокой иммуногенностью и обеспечивали защиту мышей против летального заражения вирусом гриппа [1; 3; 5]. Наиболее выгодным для обеспечения иммуногенности целевого пептида является его включение в область иммунодоминантной петли, позволяющее не только придать ему максимальную иммуногенность, но и снизить иммунный ответ против белка-носителя. Однако включение в район иммунодоминантной петли HBc антигена чужеродных последовательностей часто нарушает фолдинг химерного белка [6], поэтому такая задача не является тривиальной. Ранее были описаны рекомбинантные HBc белки, содержащие в районе иммунодоминантной петли вставку только одной копии M2e пептида вируса гриппа человека. Однако известно, что увеличение числа копий M2e пептида на N-конце HBc значительно усиливает иммунный ответ.

Цель исследования: получить гибридные HBc белки, содержащие вставку одной или двух копий M2e пептида высокопатогенного вируса гриппа птиц A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в районе иммунодоминантной петли.

Материалы и методы исследования

Для получения генетических конструкций и проведения ПЦР использовали следующие синтетические олигонуклеотиды: M2ek-ssF (GATCCAGCCTGCTGACCGAAGTGGAAAC CCCGACCCGTAACGAATGGGAAA GCCGTAGCAGCGATAGCAGCGATGGGCC), M2ek-ssR (CATCGCTGCTATCGCTGCTACGG CTTTCCCATTCGTTACGGGTCGGGGTTTCC ACT TCGGTCAGCAGGCTG), F M2e (BamHI, Ecl136II) (ATGGATCCATCATCGAGCTCAGCCTG CTGA), R M2e (ApaI, EcoRV) (ACTACTGG GCCCCATCATGATATCCTAGCTGCTCTA), F1Gly19 (BamHI, Ecl136II) (GATC CGGCAC CAGTGGCAGTAGCGGTAGTGGCAGTGGT GGCAGCGGCAGTGGTGGCGGTGGCGAG), R1Gly19 (BamHI, Ecl136II) (CTCGCCACCGC CACCA CTGCCGCTGCCACCACTGCCACTACCGCTACTGC CACTGGTGCCG), F2Gly19 (ApaI, EcoRV) (ATCGGC ACCAGTGGCAGTAGCGGTAGTGGCAGTGGTGGC AGCGGCAG TGGTGGCGGTGGCGGGCC), R2Gly19 (ApaI, EcoRV) (CGCCACCGCCACCACTGCCGCT GCCACCACTGCCACTACCGCTACTGC CACTGGTGCCGAT).

Все манипуляции с ДНК – клонирование последовательностей в плазмидные вектора, ПЦР-амплификация, рестрикция, лигирование, секвенирование, и т.п. – проводили согласно общепринятым методикам [8].

В качестве основы для создания рекомбинантных векторов экспрессии использовали вектор pQE60 (Qiagen). Для получения штаммов *E. coli*-продуцентов рекомбинантных белков соответствующие векторы вводили в клетки *E. coli* штамма DLT1270 с помощью трансформации. Бактерии выращивали в LB бульоне или чашках с LB агаром при 37°C с добавлением в случае необходимости в качестве селективного маркера ампициллина (100 мкг/мл). Для экспрессии рекомбинантных белков в клетках *E. coli* ночную культуру штамма-продуцента засевали в LB бульон в разведении (1:100) и выращивали при 37°C на качалке до достижения оптической плотности раствора OD_{600} = 0,5–0,6. Затем для индукции синтеза рекомбинантных белков в культуру вносили изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1мМ и продолжали культивировать при 28°C в течение 16 часов. Определение уровня экспрессии белков проводили с помощью SDS-PAGE суммарных белковых препаратов, выделенных из бактериальных культур.

Для определения растворимости целевого белка после индукции клетки штамма-продуцента осаждали с помощью центрифугирования (3000 g, 30 мин). Осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 0,1 M NaCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА из расчета 1 мл буфера на 50 мл культуральной жидкости. Клеточную суспензию обрабатывали лизоцимом (1 мг/мл) в течение 30 мин при 4°C. Затем проводили центрифугирование в течение 10 мин при 13000 об/мин, отбирали супернатант и анализировали его состав с помощью SDS-PAGE.

Результаты исследования и их обсуждение

Ранее в нашей лаборатории был получен искусственный ген модифицированного HBc антигена со встроенными в район иммунодоминантной петли сайтами рестрикции BamHI и ApaI, клонированный в экспрессионном векторе pQE60. Этот вектор, pQE60HBc, использовали в качестве

основы для получения и клонирования химерных генов.

На первом этапе была получена искусственная последовательность ДНК, кодирующая M2e пептид вируса гриппа птиц A/Chicken/Kurgan/05/2005 (M2ek). Для предотвращения хаотичного образования дисульфидных связей и, как следствие, агрегации белков, цистеины в позициях 11 и 13 последовательности M2e пептида были заменены серинами. Двухцепочечный фрагмент ДНК, кодирующий M2ek и фланкированный сайтами рестрикции BamHI и ApaI, был получен в результате отжига олигонуклеотидов M2ek-ssF и M2ek-ssR. Этот фрагмент клонировали по сайтам BamHI и ApaI в pQE60HBc, в результате чего был создан вектор pQE60 HBc/M2ek(C-S), позволяющий экспрессировать рекомбинантный белок HBc/M2e, включающий последовательность HBc со встроенной в область иммунодоминантной петли по сайтам BamHI и ApaI последовательностью M2ek пептида (рис. 1). Однако синтезируемый в клетках *E. coli* рекомбинантный белок оказался нерастворим, что не позволяло получить вирусоподобные HBc частицы – носители M2e.

Мы предположили, что возможной причиной этого является нарушение фолдинга гибридного белка вследствие включения M2e. В ряде работ показано, что для обеспечения гибкости структуры и, как следствие, правильного фолдинга белка можно использовать глицин-богатые линкерные последовательности [7]. Поэтому следующим этапом работы стало встраивание в точки стыков последовательностей HBc и M2ek дополнительных «гибких» линкеров длиной 19 аминокислотных остатков (GTSGSSGSGSGGSGSGGGG).

Для решения этой задачи на первом этапе в HBc/M2e были введены дополнительные сайты рестрикции Ecl136II и EcoRV. Фрагмент M2ek получали с помощью ПЦР с праймерами F M2e (BamHI, Ecl136II) и R M2e (ApaI, EcoRV), 5'-участки которых дополнительно содержали эти сайты. Полученный ПЦР фрагмент был клонирован в pQE60HBc по сайтам BamHI и ApaI.

Затем в полученный вектор pQE60 HBc/M2e + Ecl136II + EcoRV (рис. 1) последовательно встраивали два глициновых линкера по сайтам BamHI и Ecl136II и сайтам EcoRV и ApaI. Двухцепочечные фрагменты ДНК, кодирующие линкеры и имеющие необходимые «липкие» концы, были получены в результате отжига олигонуклеотидов F1Gly19 (BamHI, Ecl136II) с R1Gly19 (BamHI, Ecl136II) и F2Gly19 (ApaI, EcoRV) с R2Gly19 (ApaI, EcoRV). Полученные двуцепочечные фрагменты были последовательно встроены в вектор pQE60 HBc/M2e + Ecl136II + EcoRV по соответствующим сайтам. Таким образом, был получен вектор pQE60 HBc/M2ek (рис. 1), содержащий ген химерного белка HBc с встроенной в район иммунодоминантной петли одной копией последовательности M2ek пептида, фланкированной глициновыми линкерами. Отсутствие ошибок при генно-инженерных операциях было подтверждено результатами секвенирования.

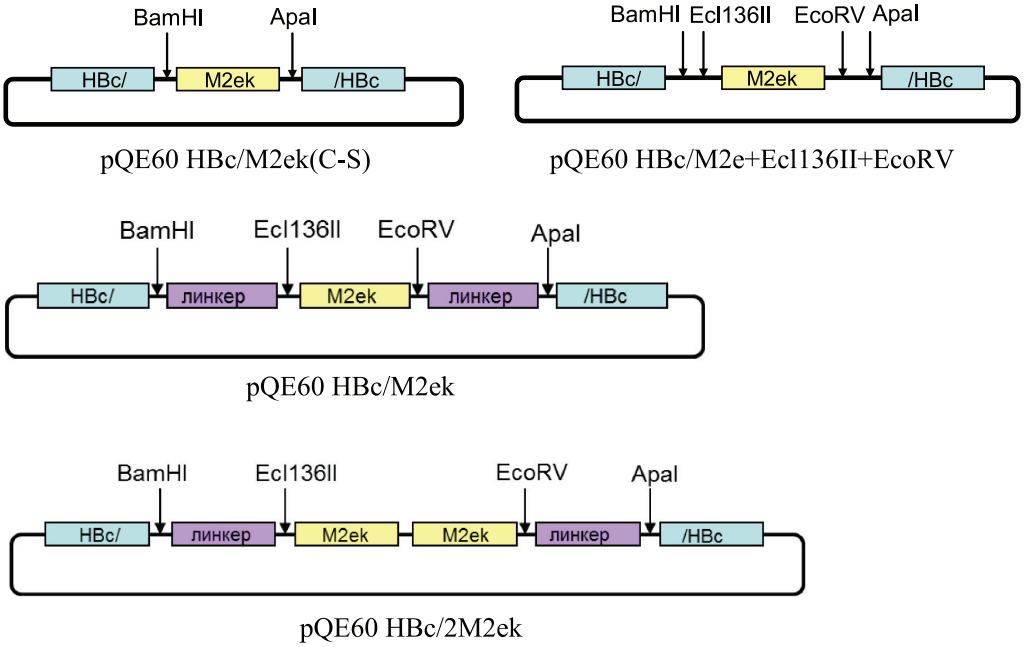
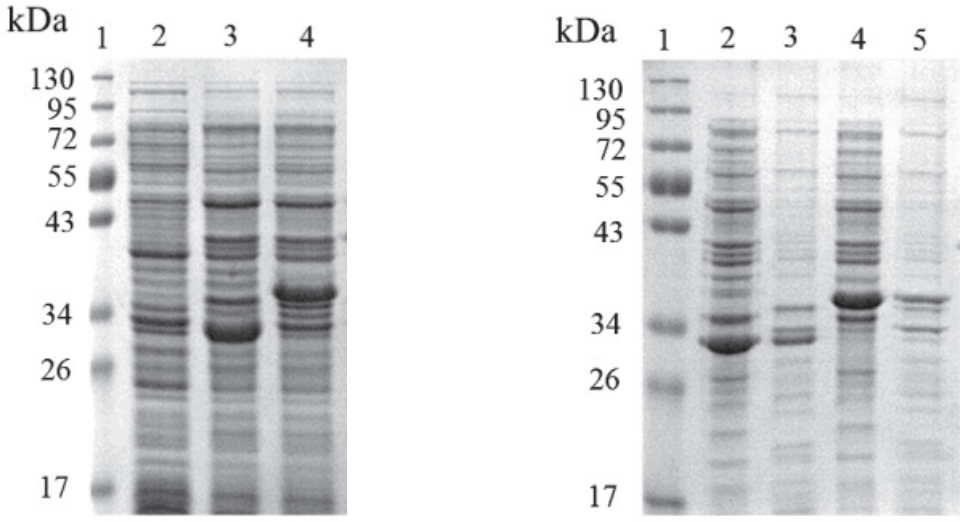


Рис. 1. Структуры рекомбинантных векторов экспрессии

Следующим этапом нашей работы было получение аналогичной конструкции с двумя копиями M2e пептида в иммунодоминантной петле HBc антигена (см. рис. 1).

Для этого вектор pQE60 HBc/M2ek обрабатывали Ecl136II и EcoRV (образуют тупые концы), получив, таким образом, фрагмент M2ek, который затем клонировали в тот же вектор по сайту EcoRV. При прямой ориентации вставки восстанавливался правый сайт EcoRV (см. рис. 1). Таким образом, были получены искусственный ген и вектор pQE60HBc/2M2ek, позволяющий экспрессировать рекомбинантный белок HBc/2M2ek с двумя копиями M2ek пептида в иммунодоминантной петле HBc антигена.

Для получения штаммов-продуцентов рекомбинантных белков HBc/M2ek и HBc/2M2ek соответствующие экспрессионные векторы на основе pQE60 вводили в клетки *E. coli* штамма DLT1270. Индукцию экспрессии рекомбинантных белков осуществляли путем инактивации LacI репрессора при добавлении ИПТГ и, тем самым, активации промотора в pQE60. Уровень синтеза целевых белков оценивали с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 2, а). Для обоих белков он составлял 10–15 % общего белка штамма-продуцента.



а б

Рис. 2. Экспрессия рекомбинантных белков HBc/M2ek и HBc/2M2ek в штаммах-продуцентах (а) и распределение гибридных белков между растворимой и нерастворимой фракциями клеточного лизата (б):
а – 1 – маркер молекулярного веса; 2 – белковый препарат из неиндуцированной культуры; 3 – белковый препарат из культуры DLT1270 pQE60 HBc/M2ek после индукции; 4 – белковый препарат из культуры DLT1270 pQE60 HBc/2M2ek после индукции;
б – 1 – маркер молекулярного веса; 2 – препарат растворимой фракции из культуры DLT1270 pQE60 HBc/M2ek; 3 – препарат нерастворимой фракции из культуры DLT1270 pQE60 HBc/M2ek; 4 – препарат растворимой фракции из культуры DLT1270 pQE60 HBc/2M2ek; 5 – препарат нерастворимой фракции из культуры DLT1270 pQE60 HBc/2M2ek

Поскольку предполагается, что модифицированный HBc будет формировать вирусоподобные частицы *in vivo*, а обработка ультразвуком может их разрушить, лизис клеток после индукции проводили путем обработки лизоцимом с последующим замораживанием-оттаиванием клеточной суспензии. Оба варианта рекомбинантных белков большей частью находились в растворимой фракции клеточного лизата (рис. 2, б).

Выводы

Созданы искусственные гены и рекомбинантные векторы экспрессии, позволяющие получать в клетках *E. coli* гибридные белки, содержащие одну или две копии M2ek пептида вируса гриппа птиц A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в иммунодоминантной петле HBc антигена. Введение глицин-богатых линкерных последовательностей в точки «стыка» последовательностей M2e

и HBc антигена обеспечило необходимую гибкость химерной последовательности и фолдинг гибридного белка, позволившие получить его в растворимой форме. Полученные гибридные белки, в случае образования ими вирусоподобных частиц, могут стать основой для создания новой рекомбинантной противогриппозной вакцины.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы, соглашение № 14.132.21.1769).

Список литературы

1. Разработка рекомбинантной вакцины против гриппа A(H1N1) 2009 на основе вирусоподобных наночастиц – носителей внеклеточного домена M2 белка / Р.Ю. Котляров, В.В. Куприянов, А.И. Мигунов, Л.А. Степанова, Л.М. Цыбалова, О.И. Киселев, Н.В. Равин, К.Г. Скрябин // Acta naturae – 2010 – Т. 2(5) – С. 75–80.

2. Киселев О.И. Прогресс в создании пандемических противогриппозных вакцин и технологии их производства // Биотехнология. – 2010. – № 2. – С. 8–24.

3. De Filette M., Min Jou W., Birkett A., Lyons K., Schultz B., Tonkyro A., Resch S., Fiers W. Universal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs. // Virology – 2005 – Vol. 337(1) – P. 149–161.

4. Fiers W., De Filette M., El Bakkouri K., Schepens B., Roose K., Schotsaert M., Birkett A., Saelens X. M2e-based universal influenza A vaccine. // Vaccine. – 2009 – Vol. 27(45) – P. 6280–6283.

5. Neirynck S., Deroo T., Saelens X., Vanlandschoot P., Jou W.M., Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. // Nat Med. – 1999 – Vol. 5(10) – P. 1157–1163.

6. Pumpens P., Grens E. HBV Core Particles as a Carrier for B Cell/T Cell Epitopes // Intervirology. – 2001. – Vol. 44(2–3) – P. 98–114.

7. Robinson C.R., Sauer R.T. Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1998 – Vol. 95(11) – P. 5929–34.

8. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Second edition // Cold Spring Harbor Laboratory Press New York USA. – 1989.

9. Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. // Microbiol Rev. – 1992 – Vol. 56(1) – P. 152–179.

References

1. Kotlyarov R.Yu., Kupriyanov V.V., Migunov A.I., Stepanova L.A., Cybalova L.M., Kiselev O.I., Ravin N.V., Skryabin K.G. Razrabotka rekombinantnoj vakciny protiv grippa A(H1N1) 2009 na osnove virusopodobnyx nanochastic nositelej vnekletochnogo domena M2 belka // Acta naturae 2010 T. 2(5) pp. 75–80.

2. Kiselev O.I. Progress v sozdanii pandemicheskix protivogrippoznyx vakcin i texnologii ix proizvodstva // Biotexnologiya 2010 no. 2 pp. 8–24.

3. De Filette M., Min Jou W., Birkett A., Lyons K., Schultz B., Tonkyro A., Resch S., Fiers W. Universal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs. // Virology 2005 Vol. 337(1) pp. 149–161.

4. Fiers W., De Filette M., El Bakkouri K., Schepens B., Roose K., Schotsaert M., Birkett A., Saelens X. M2e-based universal influenza A vaccine. // Vaccine 2009 Vol. 27(45) pp. 6280–6283.

5. Neirynck S., Deroo T., Saelens X., Vanlandschoot P., Jou W.M., Fiers W.A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. // Nat Med. 1999 Vol. 5(10) pp. 1157–1163.

6. Pumpens P., Grens E. HBV Core Particles as a Carrier for B Cell/T Cell Epitopes // Intervirology 2001 Vol. 44(2–3) pp. 98–114.

7. Robinson C.R., Sauer R.T. Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. // Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Vol. 95(11) pp. 5929–34.

8. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Second edition // Cold Spring Harbor Laboratory Press New York USA. 1989.

9. Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. // Microbiol Rev. 1992 Vol. 56(1) pp. 152–179.

Рецензенты:

Равин Н.В., д.б.н., зам. директора по научной работе, ФГБУН Центра «Биоинженерия» Российской академии наук, г. Москва;

Игнатов А.Н., д.б.н., зав. лабораторией, ФГБУН Центра «Биоинженерия» Российской академии наук, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 09.10.2013.