

УДК 571.27

# Регуляция процессинга иммуногена: сигнальные последовательности и их использование для создания нового поколения ДНК-вакцин

Е.С. Стародубова<sup>1\*</sup>, М.Г. Исагулянц<sup>2,3,\*</sup>, В.Л. Карпов<sup>1</sup><sup>1</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16<sup>3</sup> Institute of Microbiology, Cell and Tumor Biology, Karolinska Institutet, 17177, Stockholm, Sweden

\* E-mail: estarodubova@yandex.ru, maria.isaguliantz@smi.se

**РЕФЕРАТ** Среди новых направлений в создании профилактических и терапевтических вакцин против различных патогенов весьма перспективным считается использование ДНК-вакцин. Активно разрабатывается целый ряд ДНК-вакцинных препаратов, часть из которых уже проходят клинические испытания. Тем не менее иммуногенность ДНК-вакцин, особенно для человека, еще недостаточно высока. Для повышения их эффективности используются различные подходы. Одним из таких подходов является модификация иммуногена, изменяющая путь их процессинга и презентации, что в свою очередь изменяет иммунный ответ на иммуноген. Такая модификация основана на конструировании эукариотических экспрессионных векторов, кодирующих химерные белки, состоящие из антигена и специализированных сигнальных последовательностей. В обзоре рассмотрены различные сигналы, направляющие несущий их белок в определенные компартменты клетки, а также примеры их использования для создания ДНК-иммуногенов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ДНК-вакцины, МНС-I, МНС-II, презентация антигена.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** эндоплазматический ретикулум (ER), убиквитин (Ub), вирус гепатита С человека (HCV), орнитиндекарбоксилаза (ODC), обратная транскриптаза HIV-1 (RT), Ca<sup>2+</sup>-связывающий белок калретикулин (CRT), вирус папилломы человека-16 (HPV-16), лизосомаассоциированный белок 1 (LAMP-1), нуклеокапсидный белок коронавируса SARS (sarsN), вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), главный комплекс гистосовместимости класса I (МНС-I), главный комплекс гистосовместимости класса II (МНС-II).

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активно развиваются вакцины, создаваемые генно-инженерными методами. Среди них весьма перспективными считаются ДНК-вакцины. В самом простом варианте ДНК-вакцина представляет собой плазмиду, содержащую ген белка патогена и элементы, необходимые для транскрипции этого гена в клетках млекопитающих. При иммунизации ДНК попадает в клетки организма, транскрибируется и происходит синтез закодированного антигена, который, в свою очередь, инициирует иммунный ответ (рис. 1). В отличие от белковых вакцин ДНК-вакцины на основе генов вирусов и раковых антигенов имеют то преимущество, что специфический иммуноген синтезируется непосредственно в организме хозяина и правильно процессируется, что в итоге индуцирует иммунный ответ желаемой специфичности. Также эта технология является перспективной за счет дешевизны и простоты производства и транспортировки препаратов, по сравнению с традиционными вакцинами. Кроме того, ДНК-иммуноген относи-

тельно просто может быть изменен методами генной инженерии, что дает возможность создания антигена с новыми свойствами, сконструированными *in silico*. При использовании ДНК-вакцин могут возникать опасения относительно возможности встраивания вносимого генетического материала в геном хозяина (инсерционного мутагенеза). Однако вероятность такого события чрезвычайно низка. Она составляет от 1–7 событий на 150 000 ядер, что на три порядка меньше, чем частота естественных спонтанных мутаций в организме [1].

ДНК-вакцины применяются для индукции протективного иммунного ответа против различных инфекций как на мелких животных, например грызунах, так и на животных более крупных видов [2–4]. Проводятся серии испытаний профилактических и терапевтических ДНК-вакцин против патогенов человека, таких как HIV-1 и HCV [5–7]. Однако иммуногенность генетических вакцин требует улучшения, в особенности для применения на людях [8–10]. Для увеличения эффективности ДНК-вакцин ис-

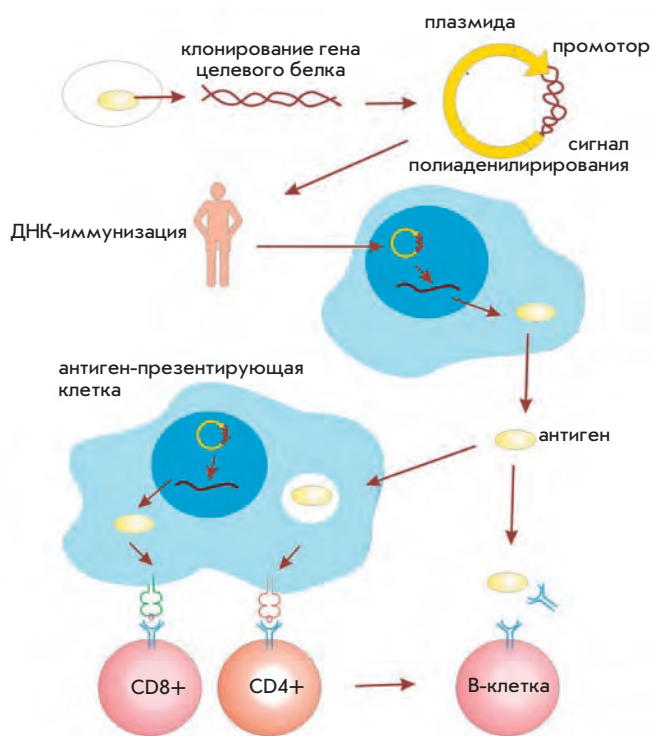


Рис. 1. ДНК-иммунизация

пользуют различные подходы [11–13]. Они включают в себя разработку новых методов доставки ДНК-вакцин (особо популярной в последнее время стала электропорация), добавление в состав препаратов цитокинов и химокинов [14], оптимизируют основу векторной молекулы: подбирают эффективные промоторы генов и регуляторные элементы плазмиды [15], регулируют CpG состав молекулы [14]. Сам ДНК-антиген также подвергается модификации, в частности осуществляют оптимизацию последовательностей генов целевых белков для улучшения их экспрессии [16]. Одним из перспективных подходов модификации иммуногена является изменение природного пути его процессинга и презентации [17]. Такое перенаправление может быть достигнуто за счет добавления специализированных сигнальных последовательностей белков. В данном обзоре рассматриваются сигналы направления белков в различные клеточные компартменты и их применение для конструирования ДНК-вакцин.

Для узнавания иммунной системой антиген должен быть процессирован и представлен на поверхности клетки мо-

лекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Различают два наиболее значимых класса этих молекул: МНС класса I (МНС-I) и МНС класса II (МНС-II). Для связывания с молекулами каждого класса антиген проходит подготовку в специализированных компартментах клетки (табл. 1). Так, эндогенные белки направляются на деградацию на протеасоме и представляются в комплексе с МНС-I на поверхности клетки для распознавания рецепторами цитотоксических CD8+ Т-клеток (CTL), которые осуществляют цитотоксический иммунный ответ [18]. Экзогенный белок расщепляется лизосомными протеазами, включается в состав МНС-II молекул и распознается рецепторами хелперных CD4+ Т-клеток, которые способствуют как клеточному, так и гуморальному ответам [19]. Таким образом, путь процессинга антигена определяет тип иммунного ответа на него.

### ПРЕЗЕНТАЦИЯ ДНК-КОДИРУЕМОГО АНТИГЕНА ПО ПУТИ МНС-I

Как уже было сказано, процессинг антигена по пути МНС-I приводит к развитию CTL-ответа. Этот процесс проходит в несколько этапов (рис. 2). Белок, синтезированный в клетке, расщепляется протеасомой на короткие пептиды, которые переносятся белками-транспортерами, ассоциированными с процессингом антигенов (ТАР), в эндоплазматический ретикулум (ER), где они связываются с МНС-I [18]. Затем комплекс пептид-МНС-I транспортируется на поверхность клетки для распознавания рецепторами цитотоксических CD8+ Т-клеток (CTL), которые осуществляют клеточный ответ. Поэтому усиление направления белков в протеасому или ER должно способствовать их большей доступности для представления по МНС-I пути и, следовательно, усилению клеточного ответа.

### ПРОТЕАСОМ-ОПОСРЕДОВАННЫЙ МЕХАНИЗМ

Для деградации на протеасоме белок должен нести специальную метку – цепь молекул убиквитина (Ub), который представляет собой небольшой полипептид, состоящий из 76 аминокислотных остатков. В эукариотической клетке существует специализированный комплекс ферментов, осуществляющих узнавание белковых субстратов и ковалентное присоединение к ним полиубиквитина, – убиквитин-конъюгирующая система [20]. Распознаваемые этой системой сигналы направления на деградацию в протеасому разнообразны. Такими деградационными сигналами могут служить аминокислотные последовательности, определенный характер фосфорилирования белка, а также изменения пространственной укладки его молекулы. Идентифицировано несколько деградационных сигналов с характерной аминокислотной последователь-

Таблица 1. Пути процессинга антигенов и формы иммунного ответа

Локализация антигена	Основной инструмент процессинга	Антиген-презентирующий комплекс	Узнающие клетки иммунной системы	Стимулируемый иммунный ответ
Внутри клетки	Протеасома	МНС-I	CD8+	Цитотоксический
Вне клетки	Лизосома	МНС-II	CD4+	Клеточный, гуморальный

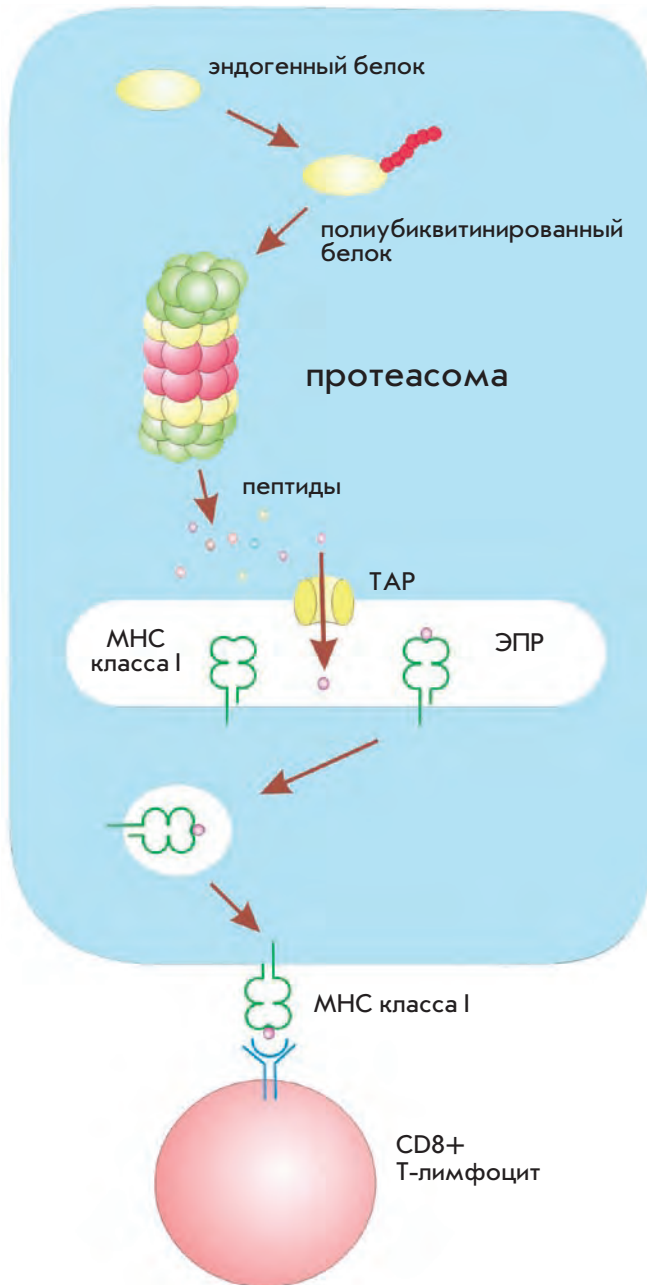


Рис. 2. Процессинг антигена при презентации в комплексе с MHC-I

ностью. Первым выявленным сигналом, который регулирует накопление белка в клетке, является N-дегрон [21]. Он представлен N-концевой аминокислотой белка, которая является субстратом действия специализированных клеточных ферментов. Также установлены сигналы деградации: PEST-последовательность [22] и Destruction Box [23], которые характерны для короткоживущих клеточных белков (табл. 2).

### УБИКВИТИН-ЗАВИСИМЫЙ МЕХАНИЗМ

Серьезное внимание исследователей было сфокусировано на направлении антигена на деградацию на протеасоме по убиквитин-зависимому механизму, которое позволило

изменить процессинг и презентацию антигена в составе MHC-I и усилить CTL-ответ [25–28]. Такое направление осуществляли путем клонирования Ub-кодирующей последовательности на 5'-конец целевого гена в сочетании с введением после Ub дестабилизирующего N-концевого остатка, что делало антиген еще более подходящим субстратом для протеасомы. В данной конструкции Ub посттрансляционно отщепляется клеточной C-концевой убиквитин-гидролазой и открывается доступ к N-дегрону. С использованием этого подхода был модифицирован ген белка nef HIV-1 (Ub-Arg-Nef), что привело к его более высокой иммуногенности в экспериментах на мышах [29]. Слияние с убиквитином было использовано при иммунизации экспрессионными библиотеками генов HIV-1. Во все открытые рамки считывания HIV-1, закодированные на 32 плаزمидях, была добавлена кодирующая последовательность убиквитина. После однократной иммунизации генной пушкой такая библиотека стимулировала сильный T-клеточный ответ против всех 32 антигенов. Ответ детектировали по CTL-активности, IFN- $\gamma$ /CD8+ T-клеточной активации и связыванию тетрамеров HLA [30]. Добавление убиквитина на N-конец синтетического белка, состоящего из CTL-эпитопов HIV, также привело к усилению иммуногенности конструкта на клеточном уровне [31].

Сигналом протеасомной деградации может служить также неправильная укладка белка. Этот вариант был применен к белкам вируса гриппа. Были сконструированы нестабильные варианты белков M1 и NS1, в которых трехмерная структура белков была разрушена введением коротких последовательностей в альфа-спиральные участки. Иммунизация генами «деструктурированных» белков приводила к значительно более сильному CTL-ответу, чем иммунизация исходными генами [32].

Однако на некоторых вирусных белках слияние с протеасом-направляющими сигналами не привело к ускорению их деградации [27, 33]. Белок HIV-1 Gag, модифицированный убиквитином и дестабилизирующим остатком аргинина (Ub-Arg-Gag), лишь незначительно изменил скорость деградации. Для значительной дестабилизации белка потребовалось введение дополнительной последовательности, содержащей экспонированный остаток лизина  $e^k$  (Ub-R- $e^k$ -Gag). Химера Ub-R- $e^k$ -Gag активно направлялась в протеасому, что повысило презентацию антигенных пептидов в комплексе с MHC-I на поверхности клеток, однако это не привело к значительному усилению анти-Gag CTL-ответа при иммунизации мышей [34]. Аналогичный результат был получен для нескольких химер белка нуклеокапсида вируса гепатита человека (HCV), которые содержали как ковалентно связанный убиквитин, так и отщепляемый Ub в сочетании с N-стабилизирующим или N-дестабилизирующим аминокислотным остатком [35]. В ряде других случаев, особенно на вирусных моделях, усиление протеасомной деградации также не привело к повышению протективного иммунитета [34].

### УБИКВИТИН-НЕЗАВИСИМЫЙ МЕХАНИЗМ

Интересно отметить, что для деградации некоторых белков не требуется убиквитинирование [36]. Первым найденным белком такого типа была орнитиндекарбоксилаза (ODC) [37]. Ее деградация зависит от АТФ и белка-антизима.

С-конец антизима осуществляет связывание с N-концевой частью орнитиндекарбоксилазы, при этом ODC направляется в протеасому, а сам антизим высвобождается. Помимо сайта связывания антизима, находящегося на N-конце ODC, в С-концевой части находится PEST-сигнал [38]. В экспериментах на делеционных мутантах ODC было установлено, что минимальным необходимым сигналом для быстрой деградации ODC на протеасоме являются 37 концевых аминокислот [39]. Показано, что этот участок отвечает за связывание ODC с протеасомой. Убиквитин-конъюгирующая система является многоступенчатым, сложно регулируемым механизмом. Использование сигналов деградации белков, направляемых в протеасому по убиквитин-независимому механизму, позволяет избежать влияния на эффективность направления в протеасому большого числа факторов. Слияние обратной транскриптазы HIV-1 с двумя короткими сигналами, содержащимися на С-конце ODC и представляющими собой минимальный протеасом-направляющий мотив, приводит к ускорению деградации и улучшению иммунного ответа у мышей по сравнению с исходным немодифицированным геном [40]. Эта модификация успешно сработала для низкоиммуногенной [41] лекарственно-устойчивой обратной транскриптазы HIV-1 и позволила индуцировать как клеточный, так и антительный иммунный ответ [42].

### ER-ОПОСРЕДОВАННЫЙ МЕХАНИЗМ

При процессинге по МНС-I-пути антиген проходит ER. Поэтому повышение сродства антигена к ER может улучшить иммуногенные свойства антигена. В ER широко представлен  $Ca^{2+}$ -связывающий белок калретикулин (CRT) [43], который ассоциирован с компонентами, осуществляющими представление антигена по МНС-I-пути [44, 45]. Присоединение калретикулина к кодируемому антигену было использовано для усиления Т-клеточного иммунного ответа на опухолевые клетки. Была создана ДНК-вакцина, кодирующая химеру CRT с белком E7 вируса папилломы человека-16 (HPV-16) E7. У мышей, иммунизированных этим препаратом, наблюдалось значительное увеличение популяции E7-специфических CD8+ Т-клеток и их литическая активность в отношении E7-экспрессирующих опухолей [46, 47]. Слияние CRT с другим белком HPV-16 – E6 также привело к усилению E6-специфического CD8+ Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных мышей [48].

Изменение локализации белка E7 HPV-16, связанное с повышением его ассоциации с ER, было достигнуто и другим путем при его слиянии с внеклеточным доменом лиганда Fms-подобной тирозинкиназы 3 (FL) [49]. Данный ДНК-иммуноген, введенный подкожно с помощью генной пушки, значительно повышал частоту активации E7-специфических CD8+ Т-клеток по сравнению с вакциной, несущей немодифицированный вариант гена E7. В ходе *in vitro* исследований было выявлено, что клетки линии 293, трансфицированные FL-E7 ДНК, представляют E7 антиген в составе МНС-I более эффективно, чем при трансфекции ДНК исходным геном E7. Химера FL-E7 активировала в основном CD8+ Т-клетки, и противоопухолевый эффект был полностью независимым от CD4+ Т-клеток [49].

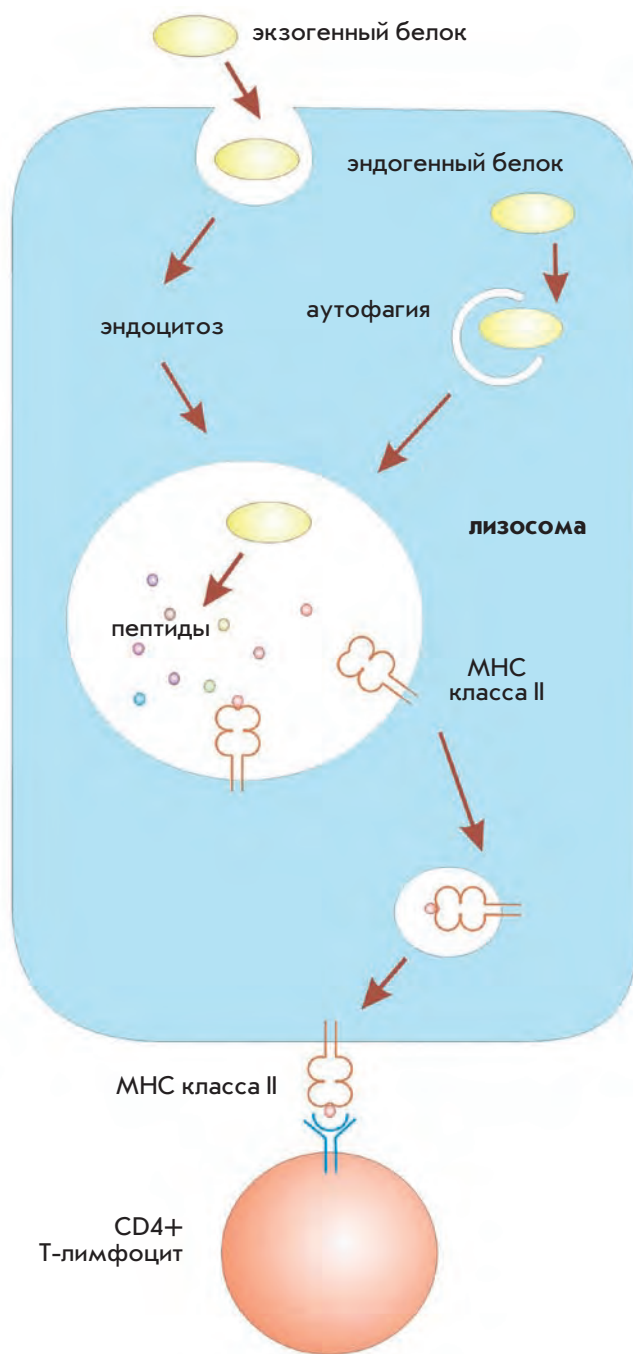


Рис. 3. Процессинг антигена при презентации в комплексе с МНС-II

Успешный опыт по усилению иммунного ответа к оболочечному белку E2 HCV был получен при удвоении сигнала локализации в ER, что привело к облегчению освобождения E2 из эндоплазматического ретикулума [50].

### ПРЕЗЕНТАЦИЯ ДНК-КОДИРУЕМОГО АНТИГЕНА ПО ПУТИ МНС-II

Основным источником пептидов для связывания с МНС-II являются экзогенные белки, которые с помощью эндо-

Таблица 2. Сигналы деградации на протеасоме со специфическими аминокислотными последовательностями

Название сигнала	Аминокислотная последовательность
N-дегрон	N-концевая кислота (узнающий фермент): Дестабилизирующие – F, L, W, Y, I, R, K, H, A, S, T, G (E3 -лигаза); N,Q (N-концевая аминогидролаза); D,E,C (Arg-т-РНК-трансфераза) Стабилизирующие – M, S, G, V (нет распознающих ферментов)
PEST-последовательность	Последовательность, обогащенная пролином (P), глутаминовой кислотой (E), серином (S) и треонином (T)
Destruction box	R-A/T-A-L-G-X-I/V-G/T-N

цитоза и далее направляются в лизосомы (рис. 3). Однако обнаружено, что пептиды некоторых внутриклеточных белков также могут быть представлены МНС-II посредством аутофагии [51]. При этом белки попадают в лизосомы при шаперон-опосредованном переносе из цитоплазмы белком-транспортёром, при окружении части цитоплазмы мембраной лизосом, а также при формировании двумембранных аутофогосом в цитоплазме [51–55][49–53]. В лизосомах антиген расщепляется кислыми протеазами, и образованные пептиды включаются в состав МНС-II-молекул. На поверхности клеток эти комплексы распознаются рецепторами CD4+ Т-клеток [56]. В результате происходит активация CD4+ Т-клеток, которые стимулируют как клеточный иммунитет (Th1-тип CD4+ Т-клеток), так и гуморальный иммунитет (Th2-тип).

Традиционно терапевтические стратегии вакцинации растворимыми белковыми антигенами нацелены на мобилизацию CD4+ Т-клеток. Сравнительно низкий ответ CD4+ Т-клеток является одним из недостатков ДНК-вакцин. Текущие клинические испытания также показали, что нынешнее поколение ДНК-вакцин не способно индуцировать выработку высоких титров антител [57]. Поэтому направление антигенов по пути презентации МНС-II с целью повышения способности активировать CD4+ Т-клетки представляется особо выигрышным. Такое направление может задаваться искусственно путем добавления к ДНК-антигену сигналов лизосомной локализации.

Иммуноген, кодируемый ДНК, может быть специфически перенаправлен в лизосомы клетки с помощью сигналов белкового сортинга. Внутриклеточные сигналы сортинга содержатся в цитоплазматических концевых фрагментах трансмембранных и лизосомаассоциированных белков [24, 58, 59]. Большинство из них представляет собой короткие аминокислотные последовательности, которые можно подразделить на тирозин- и дилейцинсодержащие [24, 60]. Тирозинсодержащие сигналы представляют собой консенсусный мотив: NPXY или YXXØ (где X – любая аминокислота, а Ø – аминокислота с объемной гидрофобной боковой цепью). Консенсусная последовательность дилейциновых сигналов: (DE)XXXL(LI) или DXHLL. Эти сигналы распознаются адапторным белком AP или родственными комплексами и затем направляются в транс-Гольджи, плазматическую мембрану или эндосомы. Существуют и другие мотивы, напри-

мер кластер кислых аминокислот и последовательность NPFSD [58]. Ряд клеточных белков направляется в лизосомы за счет наличия фосфорилированного остатка маннозы, находящегося на консенсусной последовательности NX(ST) [61–63]. Предполагается также наличие сигналов направления цитоплазматических белков в лизосому по аутофагосомному механизму [64].

### ЛИЗОСОМ-ОПОСРЕДОВАННЫЙ МЕХАНИЗМ

Показано, что тирозин- и дилейцинсодержащие сигналы способны эффективно направлять в лизосому гетерологичные белки [19, 65, 66]. Наиболее активно применялось направление на презентацию по МНС-II-пути с помощью сигналов сортинга белков LAMP-1 [67], Ii [65] и AP3-связывающего мотива LIMP II [66].

### СИГНАЛ LAMP-1

Сигнал сортинга лизосомаассоциированного белка 1 (LAMP-1) направляет антиген по пути процессинга МНС-II и усиливает его презентацию CD4+ Т-клеткам, что показано в опытах *in vitro*. Эксперименты по иммунизации мышей продемонстрировали, что химеры с геном LAMP-1 стимулируют повышение лимфопролиферативной активности, титров антител и СТЛ-активности по сравнению с ДНК-вакцинами на основе немодифицированных вариантов генов.

Усиление Th2-типа иммунного ответа CD4+ Т-клеток при слиянии с белком LAMP-1 было продемонстрировано для ДНК-иммуногенов на основе генов белков HIV-1 gp160- и p55gag [68, 69]. LAMP/gag DNA-вакцина стимулировала длительный В-, CD4+ и CD8+ Т-клеточные ответы, тогда как иммунный ответ на введение ДНК немодифицированного гена Gag быстро спадал [70]. Другой пример успешного перенаправления цитоплазматического белка – нуклеокапсидный белок коронавируса SARS (sarsN). Был проанализирован спектр иммунного ответа у мышей в ответ на введение ДНК, кодирующей химеру sarsN с LAMP-1. Иммунизация LAMP-sarsN геном индуцировала сбалансированный IFN-γ и IL-4-ответ, а также сильную активацию СТЛ-ответа [66]. Слияние LAMP-1 с обратной транскриптазой HIV-1 привело к улучшению иммуногенности прототипной ДНК-вакцины против лекарственно-устойчивого вируса. Была преодолена толерантность иммунной системы к консервативному ретровирусному

антигену и достигнут сильный иммунный ответ смешанного Th1/Th2-типа против обратной транскриптазы как дикого, так и лекарственно-устойчивого типов [71].

Слияние с LAMP-1 способствовало также повышению иммуногенности белка оболочки флави вируса. В кандидатной вакцине против вируса Дэнге типа 2 на основе генов премембранного белка (prM) и белка оболочки (E) трансмембранные и цитоплазматический домены белка E были заменены аналогичными доменами белка LAMP-1 [72]. Для полученного химерного белка было показано специфическое гранулярное цитоплазматическое окрашивание, свидетельствующее о ко-локализации химеры с эндогенными белками LAMP-1, МНС-II, и H2-M, чего не наблюдали в случае немодифицированного антигена. Мыши, иммунизированные модифицированным конструктором Dengi PrM/E, отвечали значительно более высоким уровнем продукции нейтрализующих антител по сравнению с мышами, иммунизированными немодифицированным вариантом. Аналогично, для вируса Западного Нила последовательность гена премембранного и оболочечного белков (preM-E) была слита с трансмембранным и цитоплазматическим доменами LAMP [73]. В мышах, иммунизированных ДНК-конструктором, экспрессирующим химеру WN preM-E/LAMP, наблюдалась значительная выработка антител с длительной нейтрализующей активностью в отличие от иммунизации плазмидами с исходным вариантом антигена, приводящей к образованию короткоживущих антител в низком титре. Эти результаты могут стать основой для создания эффективной ДНК-вакцины против флавириусов.

Введение гена белка E7 HPV-16, слитого с LAMP, также позволило усилить Th2-тип иммунного ответа [74]. Введение секреторного варианта ДНК-химеры E7-LAMP-1 в форме рекомбинантного вируса привело к выработке сильного противоопухолевого иммунитета, способного как предотвращать развитие опухолей, так и уменьшать уже имеющиеся [75].

Есть и несколько примеров неудачного применения данной модификации к цитоплазматическим белкам, например белку нуклеокапсида HCV и белку p53 [76]. Была создана плаزمид, экспрессирующая химеру белка нуклеокапсида HCV с сигнальной и С-концевой последовательностью LAMP-1. При иммунизации мышей не было зарегистрировано ни антительного ответа, ни пролиферации клеток, лишь очень слабая СТЛ-активность [35]. Таким образом, направление в лизосому не путем слияния иммуногена с LAMP не является гарантированно эффективным методом усиления иммунного ответа Th2-типа.

### СИГНАЛ ИНВАРИАНТНОЙ ЦЕПИ

Сами молекулы МНС класса II также нуждаются в транспортировке в лизосомный компартмент. За данный процесс ответственна инвариантная цепь молекул МНС класса II (Ii) [77]. Два сигнала сортировки содержатся в цитоплазматическом домене Ii [65, 77, 78].

Показано, что эндогенно синтезированные белки, обычно исключенные из представления по пути МНС-II, могут быть эффективно представлены молекулами МНС-II при слиянии с Ii [79]. Присоединение Ii к рекомбинантным антигенам может усилить, расширить и продлить протективный иммунный ответ на ДНК-вакцинные антигены, что проде-

монстрировано на животных моделях. Как было установлено в опытах *in vitro* и *in vivo*, иммуногены на основе аденовируса, экспрессирующие химеру Ii с гликопротеином вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), имеют повышенную способность стимулировать CD4+ и CD8+ Т-клетки. Кроме того, мыши, однократно вакцинированные данной плазмидой, оказываются защищенными от инфекции летальной дозой вируса хориоменингита [80]. Этот подход также эффективен при ДНК-иммунизации крупных животных. Так, был создан ДНК-конструкт на основе последовательности основного поверхностного белка 1a *Anaplasma marginale*, который был слит с мотивом бычьего Ii, направляющим его в лизосомы [81]. Однократное введение данной плазмиды эффективно стимулировало иммунный ответ, выраженный в активной пролиферации IFN- $\gamma$ + / CD4+ Т-клеток и продукции специфических иммуноглобулинов класса G. Однократное введение данной конструкции индуцировало образование иммунологической памяти, которая обеспечила ускоренный ответ при повторной встрече с антигеном [81].

### НАПРАВЛЕНИЕ В АУТОФАГОСОМЫ

На сегодняшний день точные механизмы аутофагии не установлены, ведется их активное изучение. Показано, что слияние с аутофагосом-ассоциированным белком Atg8/LC3 матриксного белка 1 вируса гриппа приводит к значительному усилению презентации в составе МНС-II и узнаванию CD4+ Т-клетками [82]. Это подтверждает, что аутофагия постоянно и эффективно доставляет цитоплазматические белки для представления МНС-II, что в свою очередь может быть использовано для улучшения стимуляции Т-хелперного ответа.

### НАПРАВЛЕНИЕ НА СЕКРЕЦИЮ

Эффективным методом индукции Т-хелперного иммунного ответа может быть нацеливание на выведение иммуногена во внеклеточную среду. Слияние белков HIV-1 Gag и Env с секреторным хемокином MCP3 направляет вирусные белки на секрецию и приводит к эффективной выработке антител у иммунизированных макаков. При заражении патогенным вирусом SIVmac251 у вакцинированных животных наблюдалось достоверно более низкое содержание вируса, чем у невакцинированных [83].

Эти результаты свидетельствуют, что направление антигена в лизосомы усиливает его представление в составе комплексов с МНС-II и позволяет существенно улучшить иммуногенность ДНК-вакцин.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время остро стоит вопрос создания вакцин против различных заболеваний человека, таких как иммунодефицит, вызываемый HIV-1, гепатит С, рак и др. ДНК-вакцинные технологии предоставляют большие возможности по конструированию эффективных специфических вакцинных препаратов. В данном обзоре мы рассмотрели ряд сигнальных последовательностей, которые вносятся в иммуногены для их направления по выбранному пути процессинга и презентации, как правило, отличающемуся от природного. Направление антигена на презентацию по МНС-I-пути с помощью различных механизмов

позволяет улучшить цитотоксический Т-клеточный ответ, а по МНС-II-пути – активировать Т-хелперы, которые в свою очередь способны стимулировать как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В целом, использование сигнальных последовательностей как инструмента регуляции презентации иммуногена позволяет повысить иммуногенный потенциал существующих ДНК-вакцин и приближает к созданию эффективных профилактических

и терапевтических препаратов, применимых в клинической практике. ●

*Работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (ГК 02.740.11.5134), Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 08-04-01178-а) и Шведским советом по научным исследованиям (Swedish Research Council).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nichols W.W., Ledwith B.J., Manam S.V., et al. // *Ann N Y Acad Sci.* 1995. V. 772. P. 30–39.
- Powell K. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 799–801.
- Breathnach C.C., Clark H.J., Clark R.C., et al. // *Vaccine.* 2006. V. 24. P. 1180–1190.
- Bahloul C., Taieb D., Diouani M.F., et al. // *Vaccine.* 2006. V. 24. P. 1063–1072.
- Liu M.A., Wahren B. and Karlsson Hedestam G.B. // *Hum. Gene Ther.* 2006. V. 17. P. 1051–1061.
- Ulmer J.B., Wahren B. and Liu M.A. // *Trends Mol. Med.* 2006. V. 12. P. 216–222.
- Ahlen G., Soderholm J., Tjelle T., et al. // *J. Immunol.* 2007. V. 179. P. 4741–4753.
- Cui Z. // *Adv. Genet.* 2005. V. 54. P. 257–289.
- Laddy D.J. and Weiner D.B. // *Int. Rev. Immunol.* 2006. V. 25. P. 99–123.
- Duerr A., Wasserheit J.N. and Corey L. // *Clin. Infect. Dis.* 2006. V. 43. P. 500–511.
- Bachmair A. and Varshavsky A. // *Cell.* 1989. V. 56. P. 1019–1032.
- Donnelly J.J., Wahren B. and Liu M.A. // *J. Immunol.* 2005. V. 175. P. 633–639.
- Kutzel M.A. and Weiner D.B. // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. P. 776–788.
- Brough D.H. // *J. Pathol.* 2006. V. 208. P. 283–289.
- Jechlinger W. // *Expert Rev. Vaccines.* 2006. V. 5. P. 803–825.
- Egan M.A., Megati S., Roopchand V., et al. // *Vaccine.* 2006. V. 24. P. 4510–4523.
- Megati S., Garcia-Hand D., Cappello S., et al. // *Vaccine.* 2008. V. 26. P. 5083–5094.
- Leifert J.A., Rodriguez-Carreno M.P., Rodriguez F., et al. // *Immunol. Rev.* 2004. V. 199. P. 40–53.
- Yewdell J.W. // *Curr. Opin. Immunol.* 2007. V. 19. P. 79–86.
- van Bergen J., Ossendorp F., Jordens R., et al. // *Immunol. Rev.* 1999. V. 172. P. 87–96.
- Hershko A. and Ciechanover A. // *Annu. Rev. Biochem.* 1998. V. 67. P. 425–479.
- Bachmair A. and Varshavsky A. // *Cell.* 1989. V. 56. P. 1019–1032.
- Rogers S., Wells R. and Rechsteiner M. // *Science.* 1986. V. 234. P. 364–368.
- Yamano H., Gannon J. and Hunt T. // *Embo J.* 1996. V. 15. P. 5268–5279.
- Bonifacino J.S. and Traub L.M. // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. V. 72. P. 395–447.
- Restifo N.P., Bacik I., Irvine K.R., Yewdell J.W., McCabe B.J., Anderson R.W., Eisenlohr L.C., Rosenberg S.A., Bannink J.R. // *J. Immunol.* 1995. V. 154. P. 4412–4422.
- Townsend A., Bastin J., Gould K., Brownlee G., Andrew M., Coupar B., Boyle D., Chan S., Smith G. // *J. Exp. Med.* 1988. V. 168. P. 1211–1224.
- Wong S.B.J., Buck C.B., Shen X., Siliciano R.F. // *J. Immunology.* 2004. V. 173. P. 3073–3083.
- Wu Y., Kipps T.J. // *J. Immunol.* 1997. V. 159. P. 6037–6043.
- Tobery T. and Siliciano R.F. // *J. Immunol.* 1999. V. 162. P. 639–642.
- Singh R.A., Wu L. and Barry M.A. // *J. Immunol.* 2002. V. 168. P. 379–391.
- Bazhan S.I., Belavin P.A., Seregin S.V., et al. // *Vaccine.* 2004. V. 22. P. 1672–1682.
- Ilyinskii P.O., Meriin A.B., Gabai V.L., et al. // *Vaccine.* 2008. V. 26. P. 2177–2185.
- Altstein A.D., Gitelman A.K., Smirnov Y.A., Piskareva L.M., Zakharova L.G., Pashvykina G.V., Shmarov M.M., Zhirnov O.P., Varich N.P., Ilyinskii P.O., Shneider A.M. // *Arch. Virol.* 2006. V. 151. P. 921–931.
- Wong S.B., Buck C.B., Shen X., et al. // *J. Immunol.* 2004. V. 173. P. 3073–3083.
- Vidalin O., Tanaka E., Spengler U., et al. // *DNA Cell. Biol.* 1999. V. 18. P. 611–621.
- Orlowski M. and Wilk S. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2003. V. 415. P. 1–5.
- Murakami Y., Matsufuji S., Kameji T., et al. // *Nature.* 1992. V. 360. P. 597–599.
- Hayashi S., Murakami Y. and Matsufuji S. // *Trends Biochem. Sci.* 1996. V. 21. P. 27–30.
- Murakami Y., Matsufuji S., Hayashi S., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 267. P. 1–6.
- Starodubova E.S., Boberg A., Litvina M., et al. // *Vaccine.* 2008. V. 26. P. 5170–5176.
- Isagulants M.G., Zuber B., Boberg A., et al. // *Vaccine.* 2004. V. 22. P. 1810–1819.
- Boberg A. and Isagulants M. // *Expert Rev. Vaccines.* 2008. V. 7. P. 131–145.
- Nash P.D., Opas M. and Michalak M. // *Mol. Cell. Biochem.* 1994. V. 135. P. 71–78.
- Spee P. and Neefjes J. // *Eur. J. Immunol.* 1997. V. 27. P. 2441–2449.
- Sadasivan B., Lehner P.J., Ortmann B., et al. // *Immunity.* 1996. V. 5. P. 103–114.
- Cheng W.F., Hung C.F., Chai C.Y., et al. // *J. Clin. Invest.* 2001. V. 108. P. 669–678.
- Cheng W.F., Hung C.F., Chen C.A., et al. // *Vaccine.* 2005. V. 23. P. 3864–3874.
- Peng S., Ji H., Trimble C., et al. // *J. Virol.* 2004. V. 78. P. 8468–8476.
- Hung C.F., Hsu K.F., Cheng W.F., et al. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 1080–1088.
- Sominskaya I., Alekseeva E., Skrastina D., et al. // *Mol. Immunol.* 2006. V. 43. P. 1941–1952.
- Klionsky D.J. and Emr S.D. // *Science.* 2000. V. 290. P. 1717–1721.
- Yorimitsu T. and Klionsky D.J. // *Cell. Death Differ.* 2005. V. 12 Suppl. 2. P. 1542–1552.
- Paludan C., Schmid D., Landthaler M., et al. // *Science.* 2005. V. 307. P. 593–596.
- Deretic V. // *Curr. Opin. Immunol.* 2006. V. 18. P. 375–382.
- Majeski A.E. and Dice J.F. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004. V. 36. P. 2435–2444.
- Prlic M., Williams M.A., Bevan M.J. // *Curr. Opin. Immunol.* 2007. V. 19. P. 315–319.
- Epstein J.E., Gorak E.J., Charoenvit Y., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2002. V. 13. P. 1551–1560.
- Bonifacino J.S. and Glick B.S. // *Cell.* 2004. V. 116. P. 153–166.
- Bonifacino J.S. and Dell'Angelica E.C. // *J. Cell. Biol.* 1999. V. 145. P. 923–926.
- Letourneur F. and Klausner R.D. // *Cell.* 1992. V. 69. P. 1143–1157.
- Helenius A. and Aebi M. // *Annu. Rev. Biochem.* 2004. V. 73. P. 1019–1049.
- Baranski T.J., Faust P.L. and Kornfeld S. // *Cell.* 1990. V. 63. P. 281–291.
- Steele R., Lee W.S. and Kornfeld S. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 33318–33323.
- Munz C. // *Cell. Microbiol.* 2006. V. 8. P. 891–898.
- Odorizzi C.G., Trowbridge I.S., Xue L., et al. // *J. Cell. Biol.* 1994. V. 126. P. 317–330.
- Gupta S.N., Kloster M.M., Rodionov D.G., et al. // *Eur. J. Cell. Biol.* 2006. V. 85. P. 457–467.
- Wu T.C., Guarnieri F.G., Staveley-O'Carroll K.F., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1995. V. 92. P. 11671–11675.
- Marques E.T., Jr., Chikhlikar P., de Arruda L.B., et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 37926–37936.
- Ruff A.L., Guarnieri F.G., Staveley-O'Carroll K., et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 8671–8678.
- de Arruda L.B., Chikhlikar P.R., August J.T., et al. // *Immunology.* 2004. V. 112. P. 126–133.
- Starodubova E., Boberg A., Ivanov A., et al. // *Vaccine.* 2010. V. 28. P. 1975–1986.
- Raviprakash K., Marques E., Ewing D., et al. // *Virology.* 2001. V. 290. P. 74–82.
- Anwar A., Chandrasekaran A., Ng M.L., et al. // *Virology.* 2005. V. 332. P. 66–77.
- Chen C.H., Wang T.L., Hung C.F., et al. // *Vaccine.* 2000. V. 18. P. 2015–2022.
- Ji H., Wang T.L., Chen C.H., et al. // *Hum. Gene Ther.* 1999. V. 10. P. 2727–2740.
- Deng H., Kowalczyk D., O I., et al. // *Cell. Immunol.* 2002. V. 215. P. 20–31.
- Bakke O. and Dobberstein B. // *Cell.* 1990. V. 63. P. 707–716.
- Lotteau V., Teyton L., Peleraux A., et al. // *Nature.* 1990. V. 348. P. 600–605.
- Sanderson S., Frauwirth K. and Shastri N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1995. V. 92. P. 7217–7221.
- Holst P.J., Sorensen M.R., Mandrup Jensen C.M., et al. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. P. 3339–3346.
- Mwangi W., Brown W.C., Splitter G.A., et al. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2007. V. 14. P. 304–311.
- Schmid D., Pypaert M. and Munz C. // *Immunity.* 2007. V. 26. P. 79–92.
- Rosati M., von Gegerfelt A., Roth P., et al. // *J. Virol.* 2005. V. 79. P. 8480–8492.