

УДК 571.27

Встраивание сигнала направления в лизосомы инвариантной цепи изменяет деградацию обратной транскриптазы ВИЧ-1, повышая ее иммуногенность

Е. С. Стародубова^{1*}, М. Г. Исагулянц², Ю. В. Кузьменко¹, О. А. Кротова^{1,2}, В. Л. Карпов¹¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32²НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Министерства здравоохранения РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

*E-mail: estarodubova@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.07.2013

РЕФЕРАТ Внутриклеточный процессинг антигена, кодируемого ДНК-вакциной, является одним из ключевых этапов формирования иммунного ответа. ДНК-иммунизация антигенами, искусственно направленными в эндосомно-лизосомный компартмент и на презентацию в составе МНС класса II, приводит к индукции сильного иммунного ответа. В представленной работе с целью повышения иммуногенности ДНК-конструкции на основе обратной транскриптазы ВИЧ-1 создан химерный ген, который кодирует рекомбинантный белок с N-концевым коротким фрагментом инвариантной цепи молекулы МНС класса II человека, содержащим сигнал направления в лизосомы. Наличие этого сигнала привело к изменению локализации обратной транскриптазы и ускорению ее деградации в клетке. Деградация химерного белка происходила преимущественно за счет лизосомных протеаз. ДНК-иммунизация мышей линии BALB/c плазмидой, кодирующей химерный белок, привела к повышению иммунного ответа, что выразилось в более эффективной антигенспецифичной продукции Th1-цитокинов, IFN- γ и IL-2, спленоцитами иммунизированных животных. При этом большая часть спленоцитов продуцировала оба цитокина, т.е. была полифункциональной. Полученные данные показывают эффективность перенаправления антигена в лизосомы для улучшения ответа на ДНК-вакцинные антигены, обладающие исходно низкой иммуногенностью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ВИЧ-1, ДНК-вакцина, инвариантная цепь, обратная транскриптаза, процессинг антигена.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; МНС – главный комплекс гистосовместимости; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; Ii – инвариантная цепь молекул МНС класса II; IFN- γ – интерферон γ ; IL-2 – интерлейкин-2; RT – обратная транскриптаза.

ВВЕДЕНИЕ

ДНК-вакцинные антигены синтезируются в цитоплазме клетки, процессируются преимущественно протеасомой и презентуются на поверхности клетки в составе комплекса с молекулами МНС класса I, которые узнаются цитотоксическими CD8⁺ Т-лимфоцитами [1]. В то же время в опытах на мышах показано, что для индукции эффективного иммунного ответа при ДНК-вакцинации необходима опосредованная молекулами МНС класса II активация CD4⁺ Т-клеток [2, 3]. В связи с этим для повышения эффективности ДНК-вакцин разрабатываются подходы по усилению CD4⁺ Т-клеточной составляющей

индуцируемого иммунного ответа [4, 5]. Один из таких подходов основан на повышении эффективности презентации кодируемых ДНК-вакциной антигенов в составе МНС класса II. Антигенные пептиды, представляемые молекулами МНС класса II, образуются в ходе протеолитического расщепления субстратов в лизосоме [6]. Усилить презентацию антигена в составе МНС класса II можно искусственно изменив деградацию ДНК-вакцинного антигена за счет введения сигнала лизосомной локализации [7].

Известно, что молекулы МНС класса II транспортируются в лизосомы в комплексе с инвариантной цепью (Ii), которая содержит на N-конце

сигнал направления в лизосомный компартмент [6]. Сигнальная последовательность расположена в N-концевой части белка (аминокислотные остатки 1–30), при этом ключевыми аминокислотами являются Leu7 и Ile8, а также Pro15, Met16 и Leu17 [8–10]. Установлено, что встраивание этого сигнала в другие белки способствует их направлению в лизосомы [11–15]. В данной работе для изменения процессинга обратной транскриптазы (RT) ВИЧ-1 с целью повышения ее иммуногенности в составе ДНК-вакцины использовали сигнал инвариантной цепи МНС класса II человека [16, 17]. Добавление сигнала инвариантной цепи привело к изменению локализации RT в клетке с цитоплазматической на преимущественно лизосомную и увеличению скорости ее деградации лизосомными протеазами. Изменение локализации и деградации RT с сигналом инвариантной цепи привело к повышению иммуногенности RT или химерной RT в экспериментах по ДНК-иммунизации мышей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клонирование ДНК-конструкций

Плазмида рКСМV2RT, кодирующая обратную транскриптазу ВИЧ-1 подтипа В (HXB2), получена при клонировании гена *RT* в вектор рКСМV [18] по сайтам SalI и EcoRI. Ген *RT* получали с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы плазмиду рСМVRT [19]. Амплификацию проводили с Pfu-полимеразой (Fermentas, Литва) и праймерами RT-SalI-BsiWI-F (5'-tcaggctgactgaacgtacgatgccctattg-3') и RT-BamHI-EcoRI-R (5'-agtagaattcatgtggatccctagagcactttctgattccagc-3').

На основе рКСМV2RT был создан вектор рКСМV2RT-Ii, кодирующий обратную транскриптазу с первыми 30 аминокислотными остатками инвариантной цепи МНС класса II человека на N-конце. Нуклеотидную последовательность, кодирующую фрагмент гена инвариантной цепи (NM_001025159.1), получали с использованием синтетических олигонуклеотидов («Синтол», Россия). На первом этапе проводили отжиг олигонуклеотидов IC₁₋₄₅, соответствующего нуклеотидам 1–45 гена инвариантной цепи (5'-atggatgaccagcgcgaccttatctccaacaatgagcaactgccc-3'); 5'-фосфорилированного IC₄₆₋₉₀ – нуклеотиды 46–90 (5'-atgtggggccggcgcctggggcccccggagagcaagtgcagccgc-3'), и IC-mid – нуклеотиды 37–71 комплементарной цепи гена (5'-ggcgcggcccgagcattgggagcagttgctcattgttg-3') с последующим лигированием одноцепочечного разрыва между IC₁₋₄₅ и IC₄₆₋₉₀. На втором этапе полученный двухцепочечный фрагмент использовали в качестве матрицы для ПЦР. Реакцию проводили с Pfu-полимеразой и прай-

мерами IC-F (5'-atccgtcgacatggatgaccagcgcgacc-3') и IC-R (5'-tgccgctacggcggctgacttgctctc-3'), содержащими сайты рестрикции SalI и BsiWI соответственно. Полученный ПЦР-фрагмент клонировали в вектор рКСМV2RT на 5'-конец гена *RT* по сайтам рестрикции SalI и BsiWI. При этом фрагменты Ii и RT образовали одну рамку считывания. Структуру клонированного фрагмента подтверждали секвенированием района вставки.

Плазмиды, предназначенные для иммунизации животных, выделяли с помощью наборов Plasmid EndoFree (QIAGEN, Германия) в соответствии с рекомендациями фирмы.

Культивирование и трансфекция культуры клеток

Клетки аденокарциномы шейки матки линии HeLa культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота и смеси 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Трансфекцию проводили, используя реагент Lipofectamine LTX (Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями фирмы.

Определение накопления белка в клетках

Содержание обратной транскриптазы в трансфицированных клетках определяли методом иммуноблоттинга. Через 48 ч после трансфекции клетки лизировали в буфере RIPA (10 мМ Трис-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 1% дезоксихолат натрия, 1% Тритон X-100, 0.1% SDS, 1 мМ EDTA). Образцы клеточных лизатов с равным содержанием белка разделяли в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США). Для блокирования неспецифического связывания мембраны инкубировали в течение ночи при 4°C в буфере PBS-T (80 мМ Na₂HPO₄, 20 мМ NaH₂PO₄, 100 мМ NaCl, 0.1% Твин-20) с добавлением 5% обезжиренного молока. Затем мембраны последовательно инкубировали с поликлональными антителами кролика к RT [20] в разведении 1 : 5000 и специфичными к IgG кролика иммуноглобулинами козы, конъюгированными с пероксидазой хрена (Jackson, США), в разведении 1 : 5000. Иммуные комплексы на мембране выявляли с помощью реактивов ECLTM plus (Amersham Pharmacia Biotech., США) и регистрировали сигнал на рентгеновскую пленку (Fuji Film, Япония). Пленку сканировали, изображение обрабатывали в программе ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Затем блоты повторно окрашивали моноклональными антителами мыши к β-актину (Sigma, США) в разведении 1 : 5000 и специфичными к IgG мыши иммуноглобулинами козы, конъюгированными с пероксидазой хрена (Jackson, США), в разведении 1 : 5000.

Время полужизни белка в клетке

Анализ проводили на основе методики [21], которую ранее уже использовали для обратной транскриптазы [22]. Через 2 сут после трансфекции к клеткам добавляли циклогексимид (Sigma, США) в концентрации 100 мкг/мл и инкубировали в течение 0, 2 и 4 ч. Затем клетки лизировали, и образцы с равным содержанием белка разделяли в 10% ПААГ. Содержание обратной транскриптазы оценивали иммуноблотингом.

Значение времени полужизни белка рассчитывали по стандартной формуле полураспада вещества

$$N = N_0 \times 2^{t/T},$$

где N_0 – начальное количество белка, N – количество белка в момент времени t , T – время полужизни белка.

Ингибирование протеасомного и лизосомного протеолиза в культуре клеток

В качестве ингибиторов протеасом использовали MG132 и эпоксомидин (Calbiochem, США) в концентрации 5 и 0.1 мкМ соответственно. Активность протеаз лизосом подавляли с помощью хлорохина (Sigma, США) в концентрации 100 мкМ. Ингибиторы добавляли в клеточную среду через 1 сут после трансфекции. Клетки инкубировали с ингибиторами в течение 18 ч, лизировали и оценивали содержание специфических белков иммуноблотингом.

Иммуноокрашивание клеток

Клетки HeLa растили и трансфицировали на покровных стеклах (20 × 20 мм) в шестилуночных планшетах. На вторые сутки после трансфекции клетки фиксировали смесью ацетон–метанол (1 : 1) в течение 1 ч при –20°C. Фиксированные клетки инкубировали в буфере PBS в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего последовательно инкубировали с растворами поликлональных антител кролика к обратной транскриптазе [20], взятых в разведении 1 : 100, специфичных к IgG кролика иммуноглобулинов свиньи, конъюгированных с TRITC (Dako, Дания), в разведении 1 : 50, и моноклональных антител к белку 1, ассоциированному с лизосомами (LAMP1, CD107a) человека, конъюгированных с FITC, в разведении 1 : 50 (BD Pharmingen, США). Антитела разводили в буфере PBS, содержащем 0.5% Твин-20 и 2% бычий сывороточный альбумин (BSA). После каждой инкубации клетки трехкратно промывали буфером PBS. В заключении ядра клеток окрашивали 150 мМ раствором DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндолил; Invitrogen, США) в течение 1 мин. Слайды заключали в среду

Vectashield (Vector Laboratories, США) и анализировали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Leica TCS5 (Leica, Германия).

ДНК-иммунизация мышей

Для иммунизации использовали самок мышей линии BALB/c (8 недель; Charles River Laboratories, Sandhofer, Германия). Группы из трех–четырёх мышей иммунизировали плазмидами, кодирующими RT-Ii или RT, или пустым вектором. Каждая мышь получала по две инъекции плазмидной ДНК (10 мкг в 20 мкл PBS). Плазмиды вводили инсулиновыми шприцами внутривожно: слева и справа от позвоночника, у основания хвоста. Затем сразу же проводили электропорацию участков введения плазмид на приборе DermaVax (Celectis, Франция) как описано ранее [23]. Через 6 дней после первой инъекции вводили 50 мкг той же плазмиды в PBS внутримышечно (tibialis anterior). На 28 день у мышей забирали кровь из хвостовой вены, после чего их усыпляли и извлекали селезенки. Эксперимент проводили в двух независимых повторах с соблюдением этических норм работы с животными.

FluoroSpot

Селезенки иммунизированных мышей гомогенизировали по отдельности и выделяли спленоциты [24]. Клетки инкубировали в среде культивирования с антигенами: белком RT (12.5 мкг/мл) [25, 26] или пептидами RT (ITTESIVIWGKTPKF (аминокислотные остатки 375–389) и KEKVYLAWVPAKNGIG (аминокислотные остатки 528–543), 10 мг/мл). В положительном контроле спленоциты стимулировали конканавалином А (ConA) – 5 мкг/мл, в отрицательном контроле клетки находились в среде культивирования. После инкубации в течение 20 ч со специфическими и контрольными антигенами оценивали секрецию цитокинов IFN-γ и IL-2 спленоцитами мышей. Оценку проводили методом FluoroSpot с использованием набора флуороспот-планшетов и реактивов Dual IFN-γ/IL-2 FluoroSpot (Mabtech, Швеция) по протоколу фирмы. Число клеток, секретирующих цитокины, подсчитывали на флуориметре AID ELISpot (Autoimmun Diagnostika GmbH, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Накопление и локализация в клетке обратной транскриптазы со встроенным фрагментом инвариантной цепи МНС класса II

С целью изменения пути процессинга обратной транскриптазы ВИЧ-1 подтипа В методами генной инженерии был создан химерный ген, кодирующий рекомбинантный белок, на N-конце которого нахо-

дился фрагмент инвариантной цепи МНС класса II человека с сигналом транспорта в лизосомы через эндоплазматический ретикулум (ЭПР). Для этого была получена плазмида рКСМV2RT-Ii, которая содержит ген RT с 5'-концевым фрагментом, кодирующим 30 N-концевых аминокислотных остатков инвариантной

цепи МНС класса II человека. Трансфекция клеток HeLa этой плазмидой приводила к появлению в лизатах белка с молекулярной массой 68–70 кДа (рис. 1, дорожка 3), что соответствует ожидаемой массе химерного белка.

Ранее было показано, что в клетках, трансфицированных плазмидой с геном обратной транскриптазы, синтезируемый белок равномерно распределяется в цитоплазме [27]. С помощью иммуноокрашивания установлено, что в клетках HeLa, трансфицированных плазмидой, кодирующей химерный белок RT-Ii, внутриклеточное распределение этого белка изменилось с равномерного на гранулярное (рис. 2). Известно, что подобная локализация свойственна инвариантной цепи, которая направляется в эндосомно-лизосомный компартмент [28]. В трансфицированных клетках, окрашенных одновременно антителами к RT и к белку, ассоциированному с лизосомами (LAMP1, CD107a), который является маркером лизосомно-эндосомного компартмента, наблюдали практически полное совпадение сигналов. Полученная картина иммуноокрашивания свидетельствует о том, что обратная транскриптаза с сигналом инвариантной цепи направляется в лизосомы клетки.

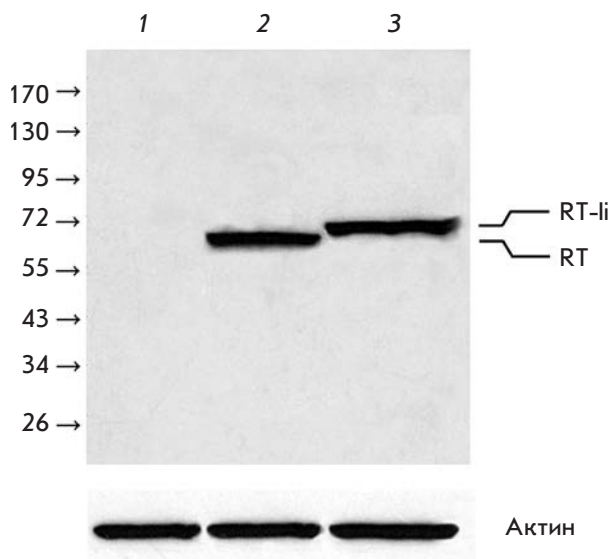


Рис. 1. Накопление белков RT и RT-Ii в клетках HeLa. Иммуноблоттинг лизатов нетрансфицированных клеток (1); клеток, трансфицированных плазмидами рКСМV2RT (2) и рКСМV2RT-Ii (3). Специфическое окрашивание проводили поликлональными антителами к обратной транскриптазе (верхняя панель). Для контроля равномерности нанесения образцов на гель мембраны повторно инкубировали с антителами к актину (нижняя панель). Слева указано положение белковых маркеров молекулярных масс (кДа)

Встраивание фрагмента инвариантной цепи в RT изменяет ее деградацию

Направление обратной транскриптазы в лизосомы приводит к изменению скорости деградации белка и набора протеаз, осуществляющих ее протеолиз. Ранее мы показали, что время полужизни обратной транскриптазы составляет 18 ч [29, 30]. Анализ скорости деградации химерного белка RT-Ii в трансфицированных клетках после остановки трансляции показал, что время полужизни этого белка сократилось

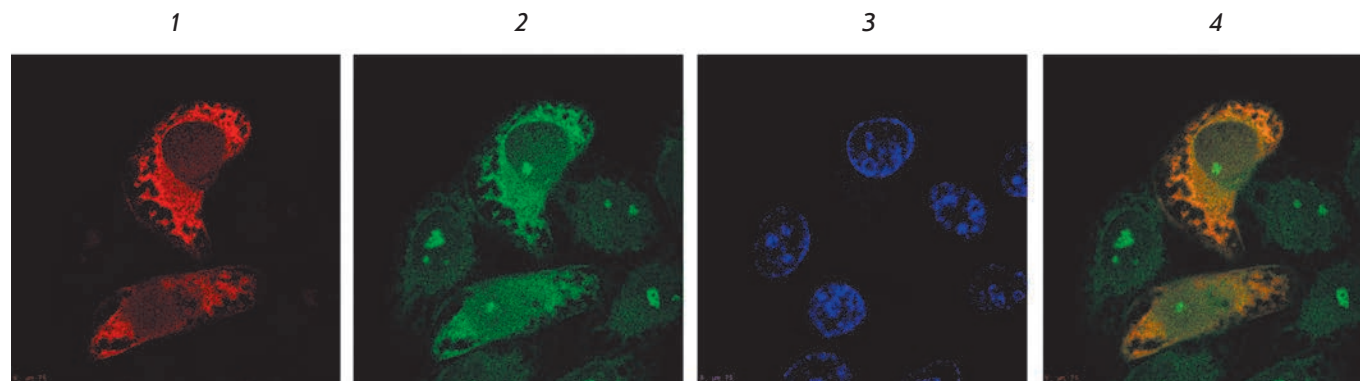


Рис. 2. Внутриклеточная локализация химерного белка RT-Ii. Клетки HeLa трансфицировали плазмидой рКСМV2RT-Ii, фиксировали и окрашивали поликлональными антителами к RT с вторичными TRITC-конъюгированными антителами (1), моноклональными антителами к CD107a человека, конъюгированными с FITC (2) и DAPI (3). Наложение сигналов антител к RT и CD107a (4)

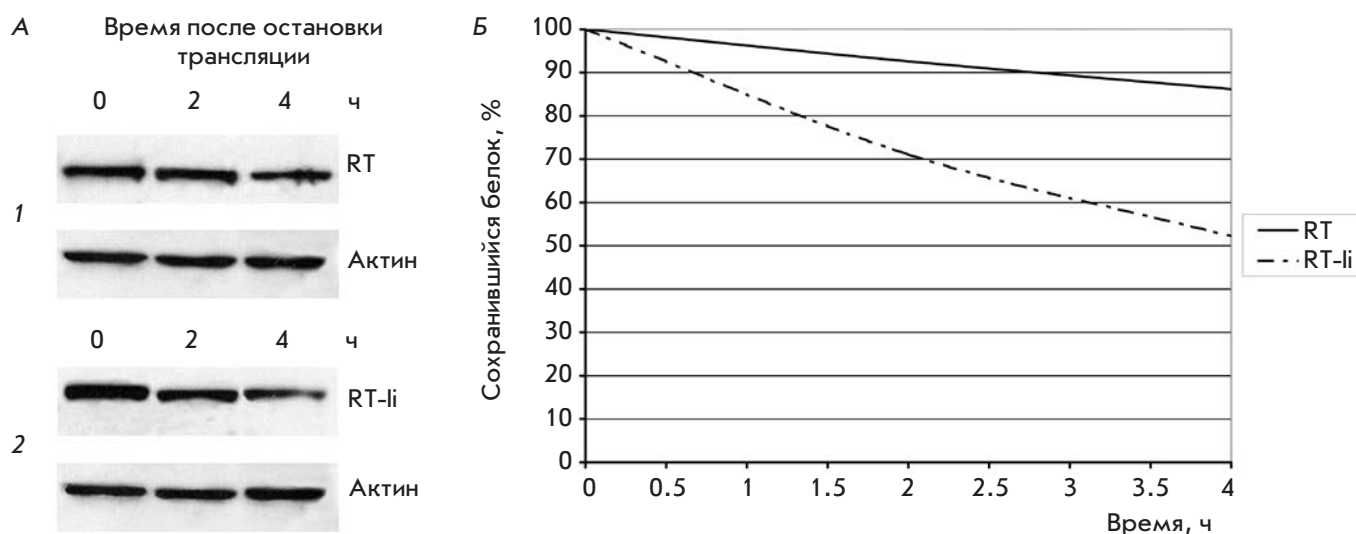


Рис. 3. Динамика деградации RT и RT-Ii в клетках. А – иммуноблотинг клеток HeLa, трансфицированных плазмидами pKCMV2RT (1) и pKCMV2RT-Ii (2) после добавления циклогексимида (100 мкг/мл). Блоты окрашивали поликлональными антителами к обратной транскриптазе. Для контроля равномерности нанесения образцов на гель мембраны окрашивали антителами к актину. Б – диаграмма, показывающая скорость распада белков

до 4.5 ч (рис. 3). Таким образом, добавление фрагмента Ii к обратной транскриптазе привело к уменьшению времени полужизни белка в 4 раза.

Вклад в процессинг химерного белка RT-Ii протеасомной и лизосомной деградации оценили с применением специфических ингибиторов. Для установления участия протеасомы в деградации химерного белка RT-Ii использовали ингибиторы MG132 и эпоксомидин, а в качестве ингибитора лизосомного протеолиза – хлорохин. Трансфицированные клетки HeLa инкубировали с ингибиторами в течение 18 ч и иммуноблотингом оценивали накопление белка, которое сравнивали с содержанием белка в необработанных ингибиторами клетках (рис. 4). Добавление ингибитора лизосомного протеолиза – хлорохина – не влияло на накопление RT, тогда как под его воздействием количество RT-Ii в клетке увеличивалось в 6 и более раз (рис. 4). RT-Ii, в отличие от RT, оказалась нечувствительной к воздействию ингибиторов протеасомы (рис. 4).

Встраивание сигнала направления в лизосомы повышает иммуногенность RT

Мыши линии BALB/c были праймированы внутрикожной инъекцией плазмиды, кодирующей RT-Ii, с последующей электропорацией, а спустя 5 дней бустированы той же плазмидой, введенной внутримышечно. Контрольных мышей иммунизировали плазмидой, кодирующей немодифицированную RT, или пустым вектором. Иммунный ответ оценивали

по способности спленоцитов мышей вырабатывать IFN- γ и IL-2 после *in vitro*-стимуляции полноразмерным белком RT или пептидами, представляющими ее иммунодоминантные эпитопы (аминокислотные остатки 375–389 и 528–543 [31, 32]). Методом FluoroSpot определяли количество клеток, секретирующих IFN- γ , IL-2 или оба цитокина, в ответ на стимуляцию (рис. 5). Специфическая продукция IFN- γ и IL-2 в ответ на стимуляцию белком и пептидами обнаружена только в группе мышей, иммунизированных плазмидой, кодирующей химерный белок RT-Ii. Большая часть популяции клеток, синтезирующих IFN- γ , также продуцировала и IL-2, т.е. была полифункциональной. В группе мышей, получавших ген RT, а также в контрольной группе, получавшей пустой вектор, специфической секреции цитокинов не наблюдалось (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для формирования эффективного иммунного ответа необходимо участие CD4⁺ Т-клеток. Активация CD4⁺ Т-клеток, стимулирующих как клеточный (Th1-тип CD4⁺ Т-клеток), так и гуморальный иммунитет (Th2-тип), происходит в результате распознавания рецепторами CD4⁺ Т-клеток комплексов антигенных пептидов с молекулами МНС класса II на поверхности антигенпрезентирующих клеток [33]. Основным источником пептидов для связывания с молекулами МНС класса II служат экзогенные белки, которые попадают в клетку путем эндоцитоза,

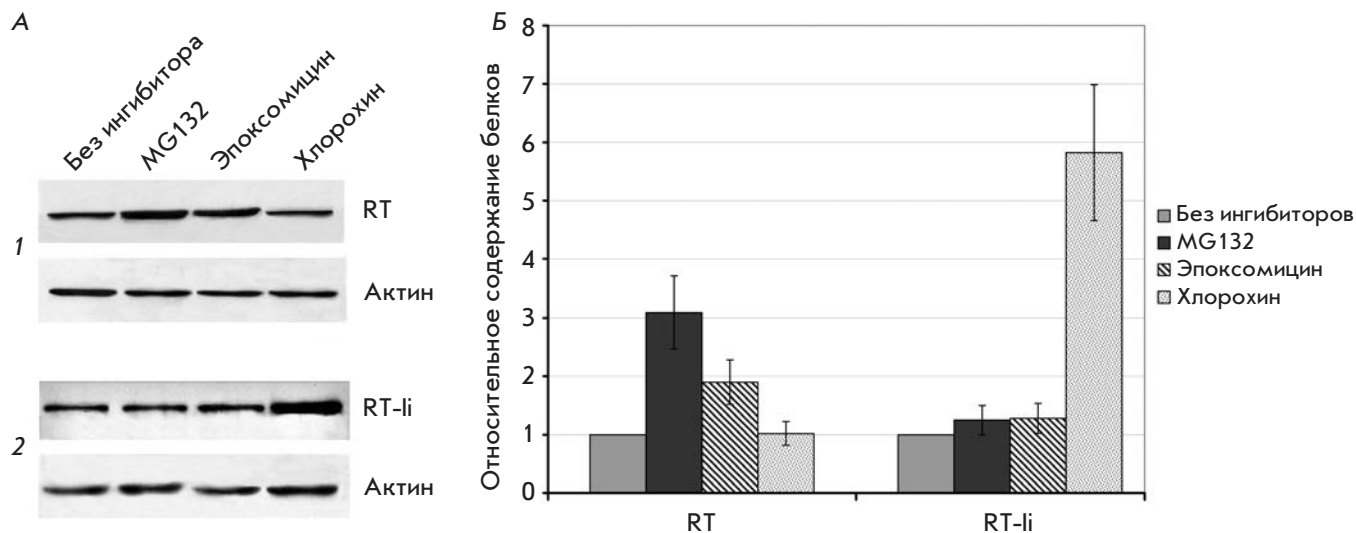


Рис. 4. Накопление RT и RT-li в присутствии ингибиторов протеасомного и лизосомного протеолиза. А – иммуноблотинг клеток HeLa, трансфицированных плазмидами рKCMV2RT (1) и рKCMV2RT-li (2), без добавления ингибиторов или после инкубации в течение 18 ч с MG132 (5 мкМ), эпоксомидином (0.1 мкМ), хлорохином (100 мкМ). Блоты окрашивали поликлональными антителами к RT. Для контроля равномерности нанесения образцов на гель мембраны окрашивали антителами к актину. Б – диаграмма содержания белков в образцах, обработанных ингибиторами, относительно содержания белка в образце без ингибитора

а затем направляются в лизосомы [34]. Однако в некоторых случаях в комплексе с молекулами МНС класса II могут быть представлены и пептиды из состава белков, синтезируемых внутри клетки. Эти белки ассоциированы с лизосомами, где и происходит их процессинг [35, 36]. В связи с этим было предложено встроить в антиген природный сигнал лизосомной локализации и тем самым направить его в лизосому для процессинга и презентации в комплексе с молекулами МНС класса II [7].

Ранее для искусственного направления антигенов на презентацию в МНС класса II использовали сигналы белков LAMP1 [37] и AP3-связывающего мотива LIMP-II [38]. Испытание иммуногенности таких химерных ДНК-вакцин на лабораторных животных показало, что они способны индуцировать более сильный иммунный ответ, чем исходные варианты антигенов [24, 39, 40]. Наблюдалась как стимуляция образования В-лимфоцитами защитных антител, так и увеличение активности цитотоксических лимфоцитов. В большинстве случаев иммунный ответ на химерную конструкцию был более продолжительным, чем на немодифицированный антиген [7].

Путем присоединения инвариантной цепи к рекомбинантным антигенам удалось добиться усиления иммуногенности и увеличения у иммунизированных животных длительности протективного иммунного ответа на ДНК-вакцинные препараты.

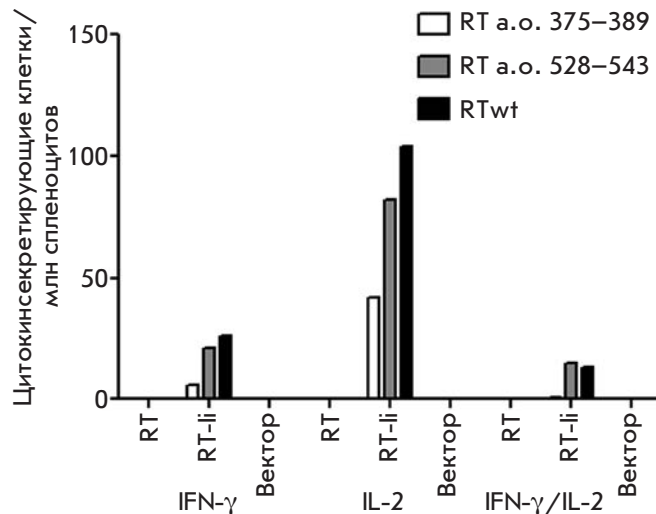


Рис. 5. Иммунный ответ животных, иммунизированных плазмидами, кодирующими RT и RT-li. Мышей иммунизировали плазмидами рKCMV2RT, рKCMV2RT-li или пустым вектором, выделяли спленоциты, стимулировали их обратной транскриптазой (RTwt) или пептидами RT (RT 375–389 или RT 528–543), затем методом FluoroSpot определяли число спленоцитов, секретирующих IFN-γ и IL-2 (число точкоформирующих клеток на миллион спленоцитов)

ДНК-конструкции, кодирующие белок, состоящий из гликопротеида вируса лимфоцитарного хориоменингита и Ii, обладали повышенной способностью к активации CD4+ и CD8+ Т-клеток [12]. Однократное вакцинирование мышей химерным геном защищало животных от заражения летальной дозой вируса [12]. Эффективность этого подхода наблюдали и при ДНК-иммунизации крупных животных. Так, была создана ДНК-вакцина, кодирующая гибридный основной поверхностный белок *Anaplasma marginale* с фрагментом инвариантной цепи крупного рогатого скота [13]. Однократное введение такой ДНК-вакцины телятам стимулировало выработку иммуноглобулинов класса G к анаплазме и приводило к активной пролиферации CD4+ Т-клеток, сопровождающейся антигенспецифичной секрецией IFN- γ . Такая ДНК-иммунизация была достаточной для образования иммунологической памяти, обеспечивающей ускоренный ответ при повторной встрече с антигеном [13].

В нашей работе создана ДНК-конструкция, кодирующая обратную транскриптазу ВИЧ-1 подтипа В, на N-конце которой был встроен фрагмент инвариантной цепи МНС класса II человека, несущий сигнал лизосомной локализации. Химерный белок накапливался в везикулярных структурах клетки, таких, как ЭПР, аппарат Гольджи и эндосомно-лизосомный компартмент. Добавление фрагмента Ii к RT привело к существенному (в 4 раза) уменьшению времени полужизни химерного белка по сравнению с немодифицированной обратной транскриптазой. Ингибиторы протеасомы не влияли на накопление в клетках белка RT-Ii. В то же время при обработке клеток ингибитором лизосомного протеолиза содержание химерного белка в клетках многократно увеличивалось. Таким образом, встраивание в обратную транскриптазу фрагмента инвариантной цепи человека с сигналом лизосомной локализации привело к изменению пути ее деградации с протеасомного на лизосомный.

ДНК-иммунизация мышей плазмидой, несущей химерный ген, показала, что он способен вызывать антигенспецифичную продукцию IFN- γ и IL-2, в то время как исходный ген специфического иммунного ответа не вызывал. Таким образом, путем добав-

ления минимального фрагмента инвариантной цепи с сигналом направления в лизосому удалось преодолеть низкую иммуногенность гена обратной транскриптазы в составе плазмидной ДНК.

Следует отметить, что большая часть спленоцитов иммунизированных животных секретировала как IFN- γ , так и IL-2. Продукция IFN- γ считается важным показателем, свидетельствующим о формировании эффективной защиты от вирусной инфекции. IL-2 важен для экспансии Т-клеток памяти, которые составляют основу долговременного протективного иммунитета [41]. Большинство эпитоп-специфичных цитотоксических лимфоцитов продуцируют IFN- γ ; гораздо меньшая доля клеток, называемых «полифункциональными», способна к секреции нескольких цитокинов: IFN- γ , IL-2 и TNF- α [42]. Такие клетки необходимы как для эффективного контроля инфекционного процесса, так и для формирования протективного ответа при вакцинации [43, 44]. Используемый в настоящей работе способ конструирования ДНК-вакцин обеспечивает выработку полифункционального иммунного ответа, позволяя получить такой ответ, в том числе и на слабые иммуногены.

ВЫВОДЫ

Таким образом, за счет добавления последовательности, несущей сигнал направления в лизосомы инвариантной цепи человека, улучшена конструкция ДНК-вакцины на основе обратной транскриптазы ВИЧ-1. Введение сигнала направления в лизосомы привело к изменению локализации обратной транскриптазы и пути ее деградации. Эта модификация позволила преодолеть низкую иммуногенность обратной транскриптазы как ДНК-иммуногена, приведя к выработке у мышей выраженного антигенспецифичного иммунного ответа. Улучшенную конструкцию на основе обратной транскриптазы ВИЧ-1 можно включать в состав мультигенных ДНК-вакцинных препаратов с целью повышения их эффективности. ●

Работа поддержана РФФИ
(грант № 11-04-01569-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gurunathan S., Klinman D.M., Seder R.A. // Annu. Rev. Immunol. 2000. V. 18. P. 927–974.
- Chan K., Lee D.J., Schubert A., Tang C.M., Crain B., Schoenberger S.P., Corr M. // J. Immunol. 2001. V. 166. P. 3061–3066.
- Maecker H.T., Umetsu D.T., DeKruyff R.H., Levy S. // J. Immunol. 1998. V. 161. P. 6532–6536.
- Almeida R.R., Rosa D.S., Ribeiro S.P., Santana V.C., Kallas E.G., Sidney J., Sette A., Kalil J., Cunha-Neto E. // PLoS One. 2012. V. 7. P. e45267.
- Hutnick N.A., Myles D.J., Bian C.B., Muthumani K., Weiner D.B. // Curr. Opin. Virol. 2011. V. 1. P. 233–240.
- Neefjes J., Jongsma M.L., Paul P., Bakke O. // Nat. Rev. Immunol. 2011. V. 11. P. 823–836.
- Starodubova E.S., Isaguliantz M.G., Karpov V.L. // Acta Naturae. 2010. V. 2. № 1 (4), P. 53–60.
- Bremnes B., Madsen T., Gedde-Dahl M., Bakke O. // J. Cell Sci. 1994. V. 107. P. 2021–2032.
- Odorizzi C.G., Trowbridge I.S., Xue L., Hopkins C.R., Davis C.D., Collawn J.F. // J. Cell Biol. 1994. V. 126. P. 317–330.

10. Pieters J., Bakke O., Dobberstein B. // *J. Cell Sci.* 1993. V. 106. Pt 3. P. 831–846.
11. Diebold S.S., Cotten M., Koch N., Zenke M. // *Gene Ther.* 2001. V. 8. P. 487–493.
12. Holst P.J., Sorensen M.R., Mandrup Jensen C.M., Orskov C., Thomsen A.R., Christensen J.P. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. P. 3339–3346.
13. Mwangi W., Brown W.C., Splitter G.A., Davies C.J., Howard C.J., Hope J.C., Aida Y., Zhuang Y., Hunter B.J., Palmer G.H. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2007. V. 14. P. 304–311.
14. Rowe H.M., Lopes L., Ikeda Y., Bailey R., Barde I., Zenke M., Chain B.M., Collins M.K. // *Mol. Ther.* 2006. V. 13. P. 310–319.
15. Sponaas A., Carstens C., Koch N. // *Gene Ther.* 1999. V. 6. P. 1826–1834.
16. Brave A., Hallengard D., Malm M., Blazevic V., Rollman E., Stanescu I., Krohn K. // *Vaccine.* 2009. V. 27. P. 184–186.
17. Sandstrom E., Nilsson C., Hejdeman B., Brave A., Bratt G., Robb M., Cox J., Vancott T., Marovich M., Stout R., et al. // *J. Infect. Dis.* 2008. V. 198. P. 1482–1490.
18. Isagulians M.G., Petrakova N.N., Zuber B., Pokrovskaya K., Gizatullin R., Kostyuk D.A., Kjerrstrom A., Winberg G., Kochetkov S.N., Hinkula J., et al. // *Intervirology.* 2000. V. 43. P. 288–293.
19. Isagulians M.G., Pokrovskaya K., Kashuba V.I., Pokholok D., Hinkula J., Wahren B., Kochetkov S.N. // *FEBS Lett.* 1999. V. 447. P. 232–236.
20. Isagulians M.G., Gudima S.O., Ivanova O.V., Levi M., Hinkula J., Garaev M.M., Kochetkov S.N., Wahren B. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2000. V. 16. P. 1269–1280.
21. Zhou P. // *Methods Mol. Biol.* 2004. V. 284. P. 67–77.
22. Стародубова Е.С., Исагулянц М.Г., Карпов В.И. // *Мол. биол.* 2006. Т. 40. P. 983–989.
23. Roos A.K., Eriksson F., Walters D.C., Pisa P., King A.D. // *Mol. Ther.* 2009. V. 17. P. 1637–1642.
24. Starodubova E., Boberg A., Ivanov A., Latyshev O., Petrakova N., Kuzmenko Y., Litvina M., Chernousov A., Kochetkov S., Karpov V., et al. // *Vaccine.* 2010. V. 28. P. 1975–1986.
25. Rechinskii V.O., Barbashov S.F., Degtiarev I.L., Vorob'ev S.M., Liakhov D.L., Kostyuk D.A., Starov A.I., Matsevich G.R., Kochetkov S.N. // *Mol. Biol. (Mosk.)* 1991. V. 25. P. 1248–1257.
26. Ivanov A.V., Korovina A.N., Tunitskaya V.L., Kostyuk D.A., Rechinsky V.O., Kukhanova M.K., Kochetkov S.N. // *Protein Expr. Purif.* 2006. V. 48. P. 14–23.
27. Starodubova E.S., Boberg A., Litvina M., Morozov A., Petrakova N.V., Timofeev A., Latyshev O., Tunitskaya V., Wahren B., Isagulians M.G., et al. // *Vaccine.* 2008. V. 28. P. 1975–1986.
28. Lamb C.A., Yewdell J.W., Bennink J.R., Cresswell P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 5998–6002.
29. Isagulians M.G., Belikov S.V., Starodubova E.S., Gizatullin R.Z., Rollman E., Zuber B., Zuber A.K., Grishchenko O.I., Rytting A.S., Kallander C.F., et al. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2004. V. 20. P. 191–201.
30. Starodubova E., Boberg A., Kashuba E.V., Wahren B., Karpov V., Isagulians M. // *Vaccine.* 2006. V. 24. P. 4541–4547.
31. Borg J.P., Ihlenfeldt H.G., Jung G., Haas G., Pierres M. // *Eur. J. Immunol.* 1994. V. 24. P. 1496–1502.
32. Restle T., Pawlita M., Sczakiel G., Muller B., Goody R.S. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 14654–14661.
33. Prlic M., Williams M.A., Bevan M.J. // *Curr. Opin. Immunol.* 2007. V. 19. P. 315–319.
34. Watts C. // *Annu. Rev. Immunol.* 1997. V. 15. P. 821–850.
35. Robinson J.H., Delvig A.A. // *Immunology.* 2002. V. 105. P. 252–262.
36. van Bergen J., Ossendorp F., Jordens R., Mommaas A.M., Drijfhout J.W., Koning F. // *Immunol. Rev.* 1999. V. 172. P. 87–96.
37. Wu T.C., Guarneri F.G., Staveley-O'Carroll K.F., Viscidi R.P., Levitsky H.I., Hedrick L., Cho K.R., August J.T., Pardoll D.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 11671–11675.
38. Gupta S.N., Kloster M.M., Rodionov D.G., Bakke O. // *Eur. J. Cell. Biol.* 2006. V. 85. P. 457–467.
39. Goldoni A.L., Maciel M., Jr., Rigato P.O., Piubelli O., de Brito C.A., Melo A., Marques E.T., August J.T., Duarte A.J., Sato M.N. // *Immunobiology.* 2011. V. 216. P. 505–512.
40. Valentin A., Chikhlikar P., Patel V., Rosati M., Maciel M., Chang K.H., Silvera P., Felber B.K., Pavlakakis G.N., August J.T., et al. // *Vaccine.* 2009. V. 27. P. 4840–4849.
41. Williams M.A., Tyznik A.J., Bevan M.J. // *Nature.* 2006. V. 441. P. 890–893.
42. Belz G.T., Xie W., Doherty P.C. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. P. 4627–4633.
43. Darrach P.A., Patel D.T., De Luca P.M., Lindsay R.W., Davey D.F., Flynn B.J., Hoff S.T., Andersen P., Reed S.G., Morris S.L., et al. // *Nat. Med.* 2007. V. 13. P. 843–850.
44. Forbes E.K., Sander C., Ronan E.O., McShane H., Hill A.V., Beverley P.C., Tchilian E.Z. // *J. Immunol.* 2008. V. 181. P. 4955–4964.