

УДК 602.66:612.017.12

Исследование структурных и иммунологических свойств химерных белков, содержащих участки MPER ВИЧ-1

А. П. Рудометов¹, Н. Б. Рудометова¹, Д. Н. Щербаков^{1,4}, А. А. Ломзов^{2,3}, О. Н. Каплина¹, Н. С. Щербакова¹, А. А. Ильичев¹, А. Ю. Бакулина^{1,3}, Л. И. Карпенко¹

¹ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, Кольцово Новосибирской обл.

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

³Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

⁴Алтайский государственный университет, 656049, Барнаул, просп. Ленина, 61

E-mail: andrei692@mail.ru

Поступила в редакцию 28.05.2019

Принята к печати 07.08.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-56-65

РЕФЕРАТ Разработка безопасной и эффективной вакцины против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) могла бы способствовать прекращению пандемии ВИЧ/СПИДа, представляющей серьезную проблему здравоохранения во всем мире. Значительная часть исследований в области вакцинопрофилактики ВИЧ-1 направлена на разработку иммуногенов и стратегий иммунизации, способных вызывать формирование антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении широкого спектра изолятов ВИЧ-1 (bNAbs). Цель данной работы заключалась в создании иммуногенов, способных направить иммунный ответ на мембрано-проксимальную наружную область (MPER) ВИЧ-1, один из районов связывания bNAbs. Сконструированы два иммуногена, представляющие фрагменты MPER в составе двух белков-носителей: белка YkuJ *Bacillus subtilis* и искусственного полипептида ТВ1. С помощью метода кругового дихроизма показано, что вторичная структура иммуногенов согласуется с их теоретическими моделями. Антигенная структура белков MPER-ТВ1 и YkuJ-MPER охарактеризована с помощью bNAbs, узнающих MPER ВИЧ-1 (2F5, 4E10 и 10E8). Иммуногенность полученных рекомбинантных белков показана на кроликах. Установлено, что полученные сыворотки кросс-реактивны в отношении иммуногенов, содержащих MPER. Конструкции, созданные и охарактеризованные в данной работе, могут быть использованы для фокусирования гуморального иммунного ответа на MPER, который считается одним из регионов уязвимости ВИЧ-1.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ВИЧ-1, рекомбинантные иммуногены, эпитопы нейтрализующих антител, bNAbs, MPER.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека первого типа; bNAbs – нейтрализующие антитела широкого спектра действия (broadly neutralizing antibodies); BSA – бычий сывороточный альбумин; MPER – мембрано-проксимальная наружная область (membrane-proximal external region); МКА – моноклональное антитело; PBS – фосфатно-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Для прекращения пандемии ВИЧ/СПИДа необходимо иметь безопасную и эффективную вакцину против ВИЧ-1 [1, 2]. Надежду на появление такой вакцины дало открытие антител, способных нейтрализовать широкий спектр изолятов ВИЧ-1 (broadly neutralizing antibodies, bNAbs) [3, 4]. Установлено, что пассивное введение отдельных bNAbs или их

комбинаций может обеспечить полную защиту животных моделей от ВИЧ-инфекции [5, 6]. Несмотря на появление bNAbs в организме при естественном течении ВИЧ-инфекции, вызвать формирование таких антител при вакцинации оказалось нетривиальной задачей, решить которую пока не удалось [7]. В настоящее время можно выделить ряд направлений, в рамках которых ведутся разработки имму-

ногенов, направленных на индукцию bNAbs [4, 8, 9]. Одно из таких направлений – включение в состав белков-носителей (скаффолдов) консервативных областей ВИЧ-1 (регионов уязвимости), с которыми взаимодействуют нейтрализующие антитела широкого спектра действия [10, 11].

Одним из регионов уязвимости ВИЧ-1 является мембрано-проксимальная наружная область (MPER) gp41, необходимая для слияния вирусной мембраны с клеточной [12]. Известен ряд bNAbs к этой области, таких, как 2F5, 4E10, Z13, Z13e1, m66.6, CH12, 10E8 и DH511.2 [13, 14].

Ранее был предпринят ряд попыток, направленных на разработку иммуногенов, способных вызвать наработку bNAbs, нацеленных на MPER [15], но лишь некоторые из них обеспечили индукцию нейтрализующих антител, при этом с низкой эффективностью и ограниченной шириной нейтрализации [16, 17]. Причины этого могут быть самыми разными, среди них аутореактивность анти-MPER-антител [18], изменение конформации района MPER в процессе проникновения вируса в клетку [14], участие липидной мембраны в формировании комплекса с анти-MPER-антителами [19]. Более того, высокая гидрофобность MPER [20] и стерические ограничения, накладываемые фрагментом gp120 [21], делают его слабо иммуногенным.

В данной работе мы провели исследование, направленное на разработку и характеристику рекомбинантных иммуногенов YkuJ-MPER и MPER-TBI, предназначенных для фокусирования иммунного ответа на регион уязвимости ВИЧ-1 – MPER.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Моноклональные антитела, штаммы бактерий, ферменты

МКА 4E10 (№ 10091), 10E8 (№ 12294), 2F5 (№ 1475) получены в рамках программы предоставления реактивов NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (США). Штамм *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS (Invitrogen) предоставлен отделом «Коллекции микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия). Эндонуклеазы рестрикции XbaI, FauNDI, Sfr274I, EcoRI, Zsp2I, KpnI и T4 ДНК-лигаза приобретены в компании «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия).

Получение гена химерного белка YkuJ-MPER

Для выбора белка-носителя YkuJ проведен поиск в классификаторе белковых структур SCOP. Для оценки вероятности аутоиммунных реакций проведен анализ гомологии аминокислотной последовательности YkuJ и белков человека с использо-

ванием базы данных UniProt и программы BLAST. При проектировании химерного белка YkuJ-MPER N- и C-концы выбранного белка-носителя были заменены на фрагменты последовательности MPER региона ВИЧ-1.

Ген химерного белка YkuJ-MPER синтезирован компанией «Евроген» (Москва, Россия), а затем клонирован в составе плазмидного вектора pET21a (Novagen) по сайтам рестрикции FauNDI и Sfr274I.

Получение гена полипептида MPER-TBI

Иммуноген MPER-TBI получен путем замены C- и N-концевых участков полипептида TBI_tag [22] на районы, соответствующие районам MPER в составе YkuJ-MPER. Образующие дуплексы олигонуклеотиды, кодирующие последовательности ELLELDK WASLANWFIITNLLWLK и IALLLD AWASLWNWFDITNWLWYI и содержащие липкие концы, аналогичные тем, которые образуются при обработке плазмидного вектора эндонуклеазами рестрикции EcoRI и Zsp2I или KpnI и Sfr274I соответственно, синтезированы компанией «Евроген» (Москва, Россия). Олигонуклеотидные дуплексы клонировали по уникальным сайтам в составе рекомбинантной плазмиды pET-TBI_tag, кодирующей полипептид TBI_tag. Первый олигонуклеотидный дуплекс клонировали по сайтам EcoRI и Zsp2I, при этом был заменен участок env (255–266), входящий в состав TBI_tag. Второй олигонуклеотидный дуплекс клонировали по сайтам KpnI и Sfr274I, при этом были заменены участки gag (351–361), gag (211–305) и gag (99–109) полипептида TBI_tag. Таким образом получена рекомбинантная плазида pET-MPER-TBI. Структуры целевых плазмид pET-YkuJ-MPER и pET-MPER-TBI подтверждены секвенированием в ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск, Россия).

Построение моделей взаимодействия YkuJ-MPER с Fab-фрагментами антител 10E8, 2F5 и 4E10

Для построения моделей использовали программы Modeller и PyMOL. С помощью программы PyMOL совмещали структуры YkuJ из PDB (2FFG) и структуры фрагментов MPER из комплексов MPER с Fab-фрагментами антител 2F5 (2PR4), 4E10 (2FX8) или 10E8 (4G6F). Результат такого совмещения использовали как шаблон при моделировании по гомологии в программе Modeller. Затем для проверки возможности соединения YkuJ-MPER с моноклональными антителами на полученные модели с помощью программы PyMOL накладывали соответствующие структуры комплексов MPER с Fab-фрагментами антител.

Наработка и очистка рекомбинантных белков YkuJ-MPER и MPER-TBI

Бактериальные штаммы-продуценты белков YkuJ-MPER и MPER-TBI получали путем трансформации химически компетентных клеток *E. coli* BL21 плазмидами pET-YkuJ-MPER и pET-MPER-TBI и культивировали их как описано ранее [22]. Рекомбинантные белки очищали с помощью металл-хелатной хроматографии на колонке с Ni-NTA (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Рефолдинг очищенных белков проводили с помощью диализа против четырех смен PBS с понижающейся концентрацией мочевины (6, 4, 2, 1 М), последний этап диализа проводили против физиологического раствора. Степень очистки целевого белка оценивали с помощью электрофореза в 15% ПААГ с последующей фиксацией и окрашиванием Кумасси G250. Количественный анализ содержания белков проводили путем спектрофотометрического измерения концентрации при 280 нм (NanoDrop-2000, Thermo Fisher Scientific).

Предсказание вторичной структуры MPER-TBI

Для предсказания вторичной структуры иммуногена MPER-TBI использовали алгоритм PSSfinder на сервере GeneSilico Metaserver [23].

Круговой дихроизм

Спектры кругового дихроизма (КД) белков YkuJ-MPER и MPER-TBI зарегистрированы при 25 °С в физиологическом растворе с использованием термостатируемой 1-мм кюветы на спектрополяриметре J-600 (JASCO, Япония). Все спектры были записаны в диапазоне 195–260 нм с шагом 1 нм и усреднены после трех измерений. Концентрации образцов в физиологическом растворе были приведены к одинаковой оптической плотности на длине волны 214 нм.

Для определения доли α -спиралей, β -листов, поворотов и неупорядоченной формы минимизировали разницу между теоретическими и экспериментальными кривыми. Теоретические кривые представляли в виде линейной комбинации базовых спектров различных компонент вторичных структур, взятых из программы CCA+ [24].

Дот-блот-анализ

Дот-блот-анализ проводили с использованием системы SNAP i.d. (Millipore, США) как описано ранее [22]. На нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, Австрия) наносили по 2 мкл двукратных последовательных разведений белков YkuJ-MPER и MPER-TBI (стартовая концентрация 0.2 мг/мл). В качестве первичных использовали МКА 4E10, 10E8 и 2F5 (разбавленные 1 : 10000 в PBS, 1% BSA). В качестве вторичных использовали антитела кролика против IgG

человека (Sigma, США), конъюгированные со щелочной фосфатазой (разбавленные 1 : 5000 в PBS, 1% BSA). Иммуновый комплекс визуализировали, добавляя NBT/BCIP-субстратный раствор (Sigma, США).

Получение и анализ сывороток животных, иммунизированных белками YkuJ-MPER и MPER-TBI

В экспериментах использовали 4-месячных кроликов-самок (вес 1.6–2 кг) породной принадлежности шиншилла. Животных содержали в отдельных клетках (виварий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) в условиях содержания на стандартном рационе со свободным доступом к пище и воде. Эксперименты были одобрены на заседании Биоэтической комиссии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 3 от 25.04.2018 г.) и выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

Животные были случайным образом разделены на две группы (три кролика в каждой группе). Препараты белков вводили четырехкратно на 1-й, 14-й, 28-й и 42-й дни. При первой иммунизации кроликам подкожно вводили по 500 мкг YkuJ-MPER либо MPER-TBI с полным адъювантом Фрейнда. При второй – по 500 мкг образца в комплексе с неполным адъювантом Фрейнда, при последующих иммунизациях – по 800 мкг образца без адъюванта. Перед каждой иммунизацией и через 2 недели после последней иммунизации проводили забор образцов крови, из которых получали сыворотки.

Иммуноферментный анализ

Специфическую активность сывороток кроликов, иммунизированных белками YkuJ-MPER и MPER-TBI, оценивали с помощью ИФА как описано ранее [22]. Белки YkuJ-MPER и MPER-TBI (5 мкг/мл) сорбировали в лунках 96-луночного планшета (Greiner bio one, Германия). Образцы сывороток вносили в пятикратном последовательном разведении. Затем добавляли антитела козы против IgG кролика (разбавленные в PBS 1 : 10000), конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), планшет промывали и вносили раствор субстрата ТМВ (Amresco, США). Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм на ИФА-ридере (Model 680 Micro plate reader, Bio-Rad, США). Все эксперименты проводили в трех повторах. При определении титра сывороток максимальным разведением считали разведение, значение оптической плотности (ОП) которого превышало в 2 раза ОП отрицательного контроля (при том же разведении). Графики построены с помощью программы GraphPad Prism 6.0.

Анализ сывороток на наличие антител, специфических к белкам ВИЧ-1

Анализ проводили с использованием тест-системы New Lav Blot I (Bio-Rad, Франция) в соответствии с протоколом производителя. В качестве конъюгата для сывороток кроликов использовали антитела козы против IgG кролика (разбавленные 1 : 5000 в PBS), конъюгированные со щелочной фосфатазой (Sigma, США). Иммуные комплексы визуализировали, добавляя NBT/BCIP-субстратный раствор (Sigma, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проектирование белков-носителей области MPER ВИЧ-1

Для презентации MPER иммунной системе решено использовать два белковых носителя с разной пространственной организацией. При этом носители должны обеспечивать конформационную подвижность области MPER, а также быть нетоксичными, растворимыми, иметь небольшой размер и не вызывать аутоиммунных реакций.

С помощью поиска в классификаторе белковых структур SCOP мы выбрали белок-носитель YkuJ *Bacillus subtilis* (рис. 1А). Ядро данного белка состоит из антипараллельных β-тяжей, образующих жесткий каркас молекулы. Концевые участки являются спиральными, что соответствует конформации эпитопов МКА 4Е10 и 10Е8. Можно предполагать, что белок YkuJ безопасен, поскольку *B. subtilis* не патогенна для животных и человека. Чтобы по возможности исключить аутоиммунные реакции на YkuJ, с помощью программы BLAST проведен поиск его гомологов в базе данных белков человека. В результате анализа не обнаружено значимых совпадений аминокислотной последовательности этого белка с белками человека, поэтому индукция аутоиммунных реакций маловероятна.

При проектировании химерного белка YkuJ-MPER N- и C-концы белка-носителя были заменены на фрагменты консенсусной последовательности MPER региона ВИЧ-1 подтипа В, нумерация соответствует штамму HXB2: ⁶⁵⁹ELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIK₆₈₃. При этом перекрывающиеся со встраиваемой последовательностью остатки YkuJ, важные для поддержания пространственной структуры белка-носителя, были оставлены без изменений. Ядро белка-носителя также не подвергали изменениям, чтобы максимально сохранить исходную структуру YkuJ. В конструкции YkuJ-MPER присутствуют все аминокислотные остатки MPER, критичные для связывания bNAbs 10Е8, 4Е10 и 2F5. Для возможности очистки рекомбинантного белка с помощью

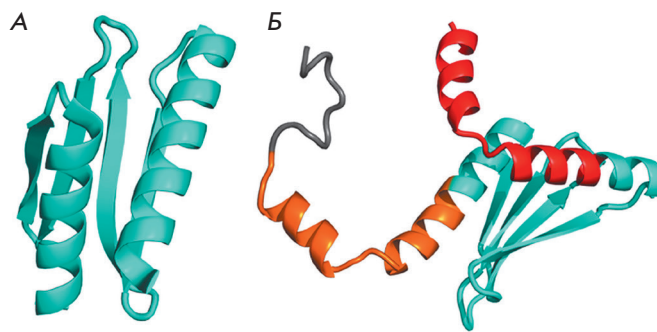


Рис. 1. А – структура белка YkuJ, идентификатор PDB 2FFG; Б – модель химерного белка YkuJ-MPER. Для наглядности каркас исходного белка выделен бирюзовым, встроенные в N-конец участки MPER – красным, в С-конец – коричневым, гистидиновая метка обозначена серым цветом

металл-хелатной хроматографии к С-концу добавлено шесть остатков гистидина. Итоговая конструкция YkuJ-MPER имеет размер 119 аминокислотных остатков и молекулярную массу 14,2 кДа (рис. 1Б). Аминокислотная последовательность YkuJ-MPER (фрагменты, принадлежащие MPER, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты): **MELLELDKWASLANWFIITNLLWLIK**TAEAAANEPMQRYFEVNGEKICSVKYFEKNQTFELTVFQKGEKPNTYFPDNIDMVSIEIALLLLD**AWASLWNWFDITNWLWYI**NNNNNN.

Методами молекулярного моделирования установлено, что участки MPER, находясь на концах химерного белка YkuJ-MPER, могут принимать конформации, характерные для эпитопов известных моноклональных антител к данному региону: 2F5 и Z13 (конформация без регулярной вторичной структуры), 4Е10 и 10Е8 (α-спиральная конформация), при этом два антитела могут связаться одновременно с двумя районами молекулы (рис. 2). Также моделирование пространственной структуры химерного белка показало, что фрагмент, содержащий 6 а.о. гистидина, не препятствует связыванию антител с YkuJ-MPER (рис. 2).

При проектировании гена, кодирующего YkuJ-MPER, в состав нуклеотидной последовательности заложены уникальные сайты рестрикции (FauNDI, Bpu14I, Bsa29I, Sfr274I), фланкирующие участки MPER, с целью использования данного белка как платформы для получения иммуногенов, содержащих другие антигенные детерминанты ВИЧ-1 или других инфекционных агентов. Синтезированный ген YkuJ-MPER клонирован в составе плазмидного вектора pET21a.

В качестве второго носителя использовали оптимизированный вариант полипептида ТВ1 – ТВ1_tag [22]. ТВ1 в составе кандидатной вакцины

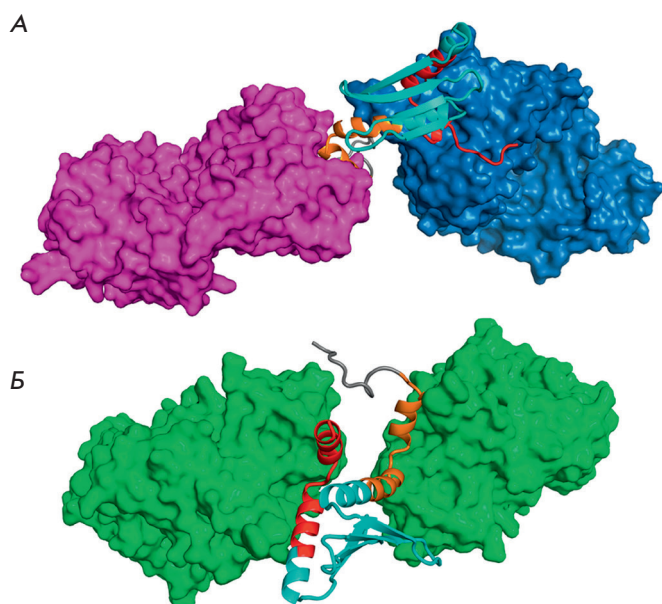


Рис. 2. Модель взаимодействия YkuJ-MPER с Fab-фрагментами МКА 2F5 и 4E10 (А) и с 10E8 (Б). А – фиолетовым цветом обозначен Fab-фрагмент антитела 2F5; синим – Fab-фрагмент антитела 4E10. Б – зеленым цветом обозначены Fab-фрагменты антитела 10E8. Модели построены с помощью программы PyMOL

КомбиВИЧвак прошел первую фазу клинических испытаний и продемонстрировал иммуногенность и безопасность [25]. TBI_tag отличается от TBI тем, что для эффективной экспрессии в *E. coli* проведена оптимизация состава кодонов его нуклеотидной последовательности, а также замена фрагмента, кодирующего 20 аминокислотных остатков белка ResA *Proteus mirabilis*, на последовательность, кодирующую фрагмент (7 аминокислот) белка-активатора транскрипции InfB *E. coli*. В данной работе концевые фрагменты TBI_tag были заменены на участки MPER ВИЧ-1, аналогичные включенным в YkuJ-MPER. Спроектированный полипептид назван MPER-TBI (156 аминокислотных остатков, 17.8 кДа).

Блок-схемы белков TBI_tag и MPER-TBI изображены на рис. 3.

Ген, кодирующий полипептид MPER-TBI, клонирован в составе плазмидного вектора рЕТ21а в рамке считывания с последовательностью, кодирующей 6 остатков гистидина.

Получение и анализ свойств рекомбинантных белков YkuJ-MPER и MPER-TBI

Белки YkuJ-MPER и MPER-TBI наработаны и очищены с помощью металл-хелатной хроматографии. Степень очистки белков оценивали с помощью электрофореза в 15% ПААГ (рис. 4). Дополнительную очистку белков и их рефолдинг проводили с помощью диализа против буферов со снижающейся концентрацией мочевины. В финальных препаратах степень очистки белков была не менее 90%.

Предсказание вторичной структуры MPER-TBI

Вторичная структура белка MPER-TBI, предсказанная с помощью программы PSSfinder, и его аминокислотная последовательность представлены на рис. 5. Согласно предсказанию, структура MPER-TBI является преимущественно α-спиральной с содержанием α-спиралей 56%.

Круговой дихроизм YkuJ-MPER и MPER-TBI

Экспериментальное определение элементов вторичной структуры антигенов YkuJ-MPER и MPER-TBI проводили с помощью спектроскопии кругового дихроизма. Доля элементов вторичной структуры иммуногенов, согласно результатам измерения спектров КД в физиологическом растворе, приведена в таблице.

Согласно модели (рис. 1Б), YkuJ-MPER с концевыми районами, соответствующими эпитопам 10E8, имеет следующее соотношение элементов вторичной структуры: 45% α-спиралей, 24% β-тяжей. Результаты, полученные методом кругового дихроизма, согласуются с этой моделью по содержанию β-тяжей, тогда как экспериментально определенная доля α-спиралей оказалась меньше.

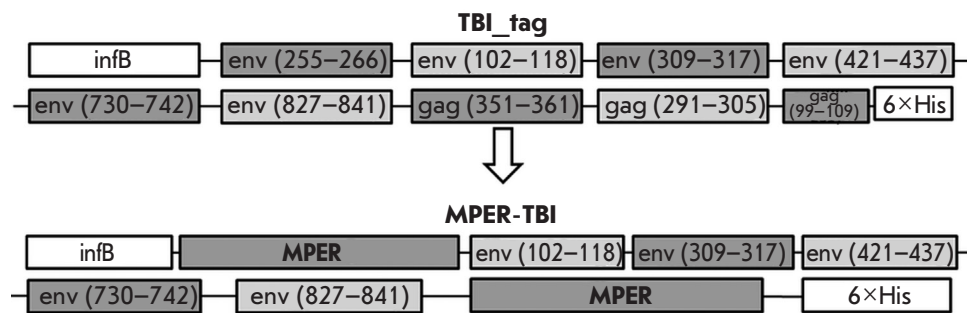


Рис. 3. Схематическое изображение структуры иммуногенов TBI_tag и MPER-TBI. Темным фоном выделены В-клеточные эпитопы, светлым фоном – Тh-эпитопы. InfB – фрагмент белка-активатора транскрипции *E. coli* InfB; 6×His – шесть аминокислотных остатков гистидина; MPER – участки мембрано-проксимальной наружной области ВИЧ-1

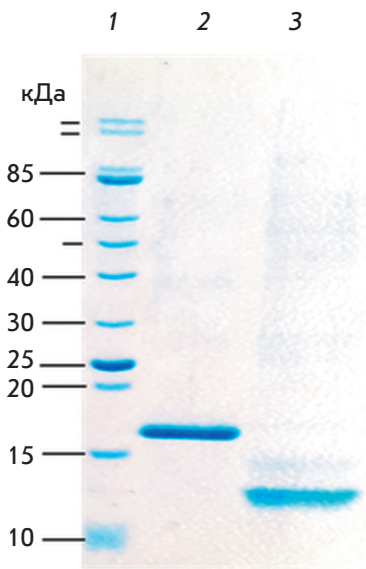


Рис. 4. Электрофореграмма белков MPER-TBI (2) и YkuJ-MPER (3), 1 – маркер молекулярной массы

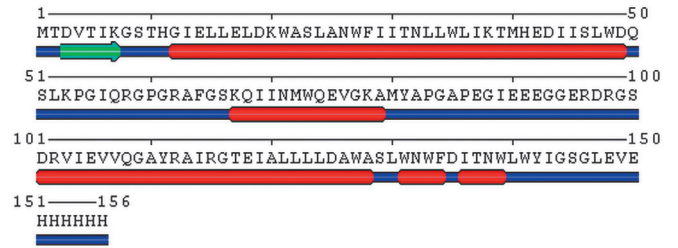


Рис. 5. Аминокислотная последовательность и вторичная структура белка MPER-TBI. Синим обозначены неупорядоченные области, красным – α -спирали, зеленым обозначены β -тяжи. Метод предсказания – PSSfinder

Предсказанная модель вторичной структуры MPER-TBI (рис. 5), согласно которой доля α -спиралей равна 56%, незначительно отличается от результатов КД, так как по полученным данным MPER-TBI содержит 68% α -спиралей и не содержит β -тяжей.

Дот-блот-анализ белков

Для анализа антигенных свойств эпитопов bNAbs 4E10, 10E8 и 2F5, входящих в MPER в составе белков YkuJ-MPER и MPER-TBI, проведен дот-блот-анализ с использованием МКА 10E8, 4E10 и 2F5 (рис. 6). В качестве контроля использовали белок TBI_tag, не содержащий эпитопы данных антител. Подтверждено, что МКА 10E8, 4E10 и 2F5 взаимодействуют с YkuJ-MPER и MPER-TBI и не взаимодействуют с контролем.

Анализ иммуногенности белков

Анализ иммуногенности проводили на кроликах. Две группы животных иммунизировали очищенными

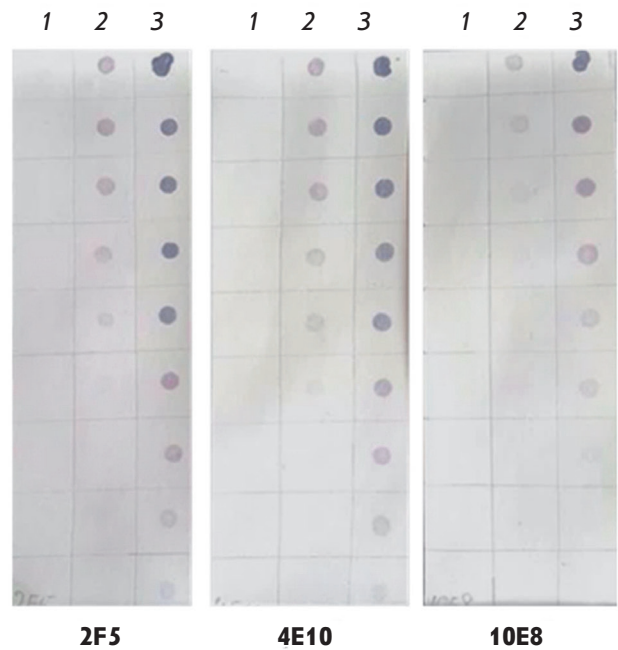


Рис. 6. Дот-блот-анализ: 1 – TBI_tag (контроль); 2 – MPER-TBI; 3 – YkuJ-MPER; 2F5, 4E10 и 10E8 – МКА. Сверху вниз нанесены двукратные разведения соответствующих белков

Элементы вторичной структуры белков YkuJ-MPER и MPER-TBI

Структура	Образец			
	YkuJ-MPER		MPER-TBI	
	Теоретический расчет, %	КД в физиологическом растворе, %	Теоретический расчет, %	КД в физиологическом растворе, %
α -спирали	45	26	56	68
β -тяжи	24	26	3	0
Поворот_I	-	5	-	5
Поворот_II	-	0	-	0
Неупорядоченные структуры	31	43	41	27

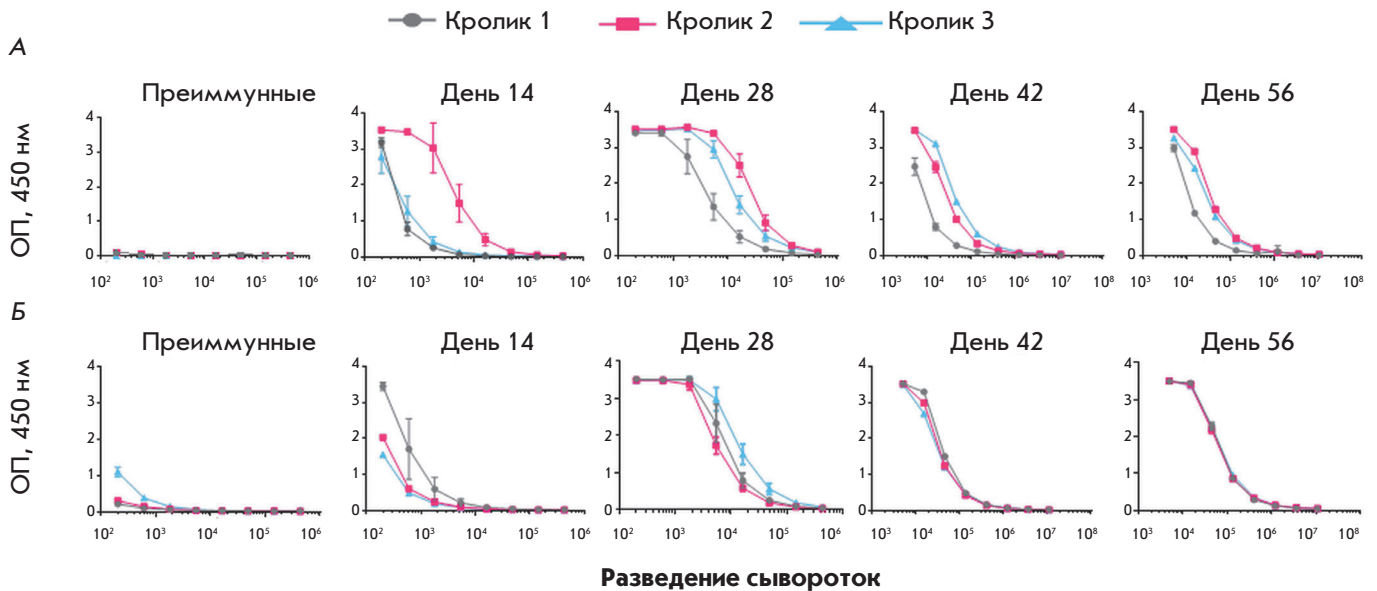


Рис. 7. Результаты ИФА сывороток кроликов, иммунизированных MPER-Tb1 или YkuJ-MPER. А – группа кроликов, иммунизированных MPER-Tb1: в качестве антигена сорбирован белок MPER-Tb1. Б – группа кроликов, иммунизированных YkuJ-MPER: в качестве антигена сорбирован белок YkuJ-MPER. По оси Y отложено значение ОП, 450 нм, по оси X – разведения сывороток. Данные на графиках представлены как среднее значение и стандартное отклонение

ми препаратами белков YkuJ-MPER или MPER-Tb1 (см. «Экспериментальную часть»). Специфическую активность сывороток исследовали в ИФА, сопоставляя с контролем – сыворотками, полученными от кроликов до иммунизации. Показано, что в сыворотках крови обеих групп иммунизированных животных содержатся антитела, специфичные к исследуемым иммуногенам. После четвертой иммунизации титры антител в сыворотках кроликов, иммунизированных MPER-Tb1, составляли 1 : 1 000 000, а в сыворотках кроликов, иммунизированных YkuJ-MPER, – 1 : 3 000 000 (рис. 7). В обеих группах титры возрастали от первой до третьей иммунизации. Сигнал преиммунных сывороток в ИФА был на уровне фона.

Анализ перекрестной иммуногенности белков

Для проверки способности сывороток связываться с «чужим» антигеном проведен перекрестный ИФА (анализировали способность сывороток животных, иммунизированных MPER-Tb1, взаимодействовать с белком YkuJ-MPER, а сывороток животных, иммунизированных YkuJ-MPER, – с MPER-Tb1) (рис. 8 и 9 соответственно). Показано, что сыворотки животных перекрестно взаимодействуют с соответствующими антигенами. При этом при иммунизации MPER-Tb1 значения титров антител сывороток крови всех животных данной группы на антиген YkuJ-MPER были равны 1 : 400 000 (рис. 8). Титры анти-

тел сывороток крови животных, иммунизированных YkuJ-MPER, когда в качестве антигена сорбирован MPER-Tb1, равны 1 : 1 000 000 (рис. 9).

Анализ специфичности сывороток иммунизированных животных

С помощью тест-системы New Lav Blot I исследовано наличие в сыворотках антител, специфичных к белкам ВИЧ-1. Установлено, что сыворотки, полученные от кроликов, иммунизированных как MPER-Tb1, так и YkuJ-MPER, содержат антитела к белкам gp160 и gp41 (рис. 10). Сыворотки группы животных, иммунизированных MPER-Tb1, дополнительно распознают gp120.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мембрано-проксимальная наружная область ВИЧ-1 считается одной из наиболее перспективных мишеней для разработки иммуногенов, индуцирующих bNAbs [14]. Тем не менее, до сих пор не удалось создать иммуноген, способный обеспечить надежное формирование bNAbs, специфичных к этой мишени [18, 19]. Для повышения эффективности презентации эпитопов MPER иммунной системе их можно включать в состав молекул-носителей, полученных при помощи рационального дизайна. Стратегия прайм-буст иммунизации с использованием таких конструкций может позволить повысить иммунный ответ на встроенные эпитопы [26–28].

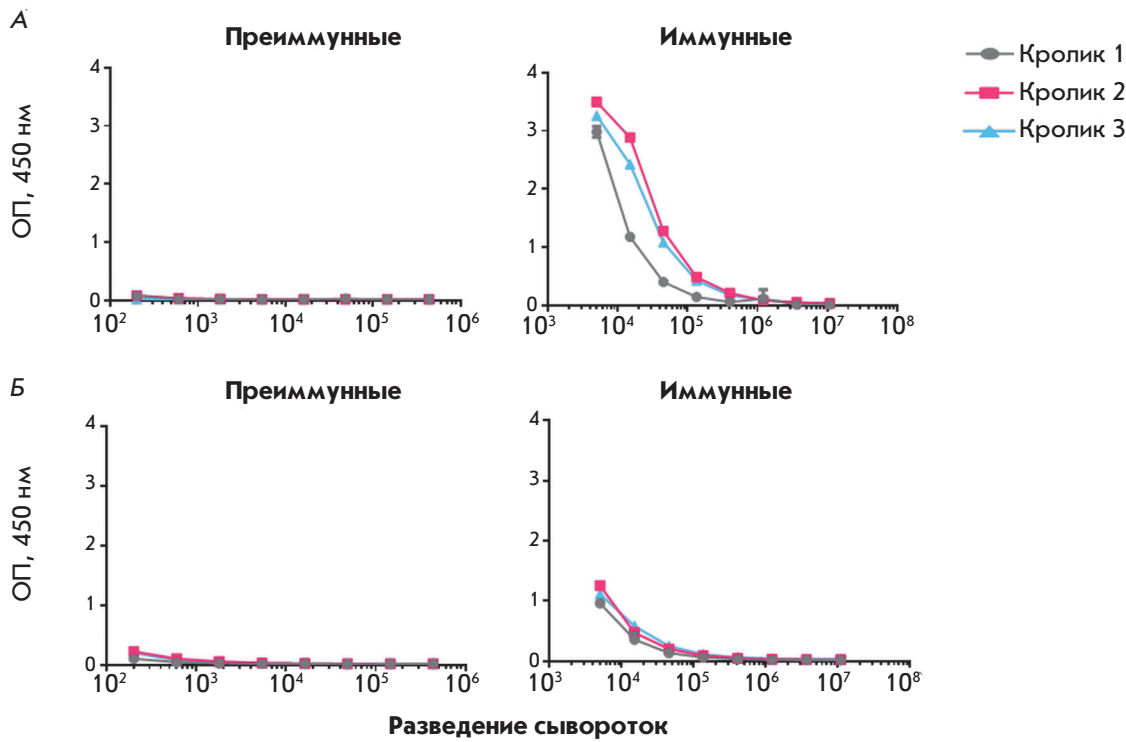


Рис. 8. Результаты ИФА сывороток группы кроликов, иммунизированных MPER-TBI. А – в качестве антигена сорбирован белок MPER-TBI; Б – в качестве антигена сорбирован белок YkuJ-MPER. Преиммунные – сыворотки intactных животных, иммунные – сыворотки животных после 4-й иммунизации

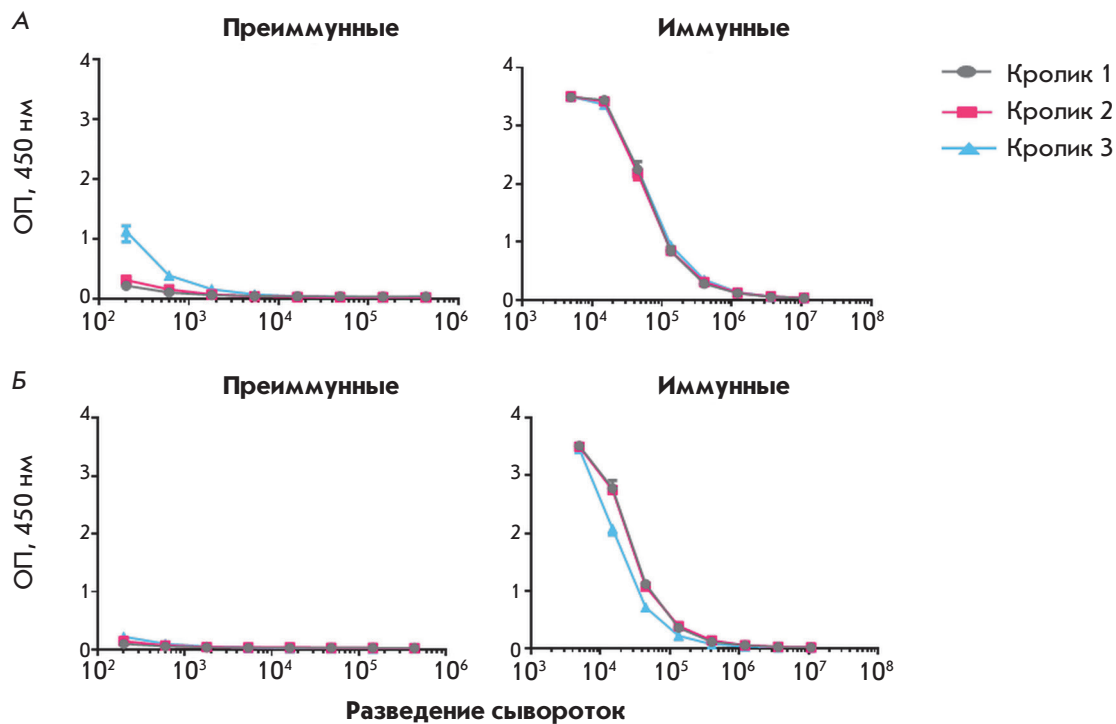


Рис. 9. Результаты ИФА сывороток группы кроликов, иммунизированных YkuJ-MPER. А – в качестве антигена сорбирован белок YkuJ-MPER; Б – в качестве антигена сорбирован белок MPER-TBI. Преиммунные – сыворотки intactных животных, иммунные – сыворотки животных после 4-й иммунизации

В данной работе сконструированы два иммуногена на основе белковых носителей с разной пространственной организацией. Их использование в стратегии прайм-буст иммунизации может позволить избежать нежелательного иммунного ответа на сам носитель. В качестве носителей мы выбрали: глобу-

лярный белок *B. subtilis* YkuJ с известной третичной структурой и охарактеризованный нами ранее искусственный полипептид TBI_tag.

Экспериментальное определение вторичных структур иммуногенов в физиологическом растворе методом КД позволило получить результаты,

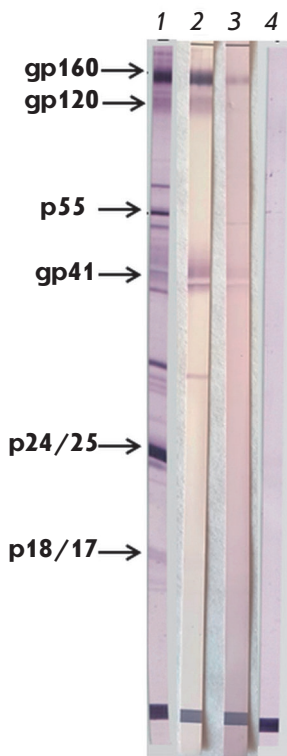


Рис. 10. Анализ сывороток крови животных, иммунизированных белками MPER-TbI и YkuJ-MPER, с использованием коммерческой тест-системы New Lav Blot I. 1 – положительный контроль из набора New Lav Blot I; 2 – сыворотки кроликов, иммунизированных MPER-TbI; 3 – сыворотки кроликов, иммунизированных YkuJ-MPER; 4 – преиммунные сыворотки кроликов

согласующиеся с теоретически предсказанными структурами. Структура MPER-TbI оказалась преимущественно α -спиральной, что согласуется с предсказанной методом PSSfinder вторичной структурой. Количество β -тяжелых элементов в YkuJ-MPER согласуется с построенной моделью пространственной структуры, а доля α -спиралей меньше по сравнению с моделью, в которой оба встроенных участка MPER имеют α -спиральную конформацию, соответствующую эпитопу антитела 10E8. Это говорит в пользу того, что центральный β -лист YkuJ-MPER остается стабильным, а встроенные эпитопы являются гибкими, как и предполагалось.

Оба иммуногена оказались хорошо растворимыми в физиологических условиях. Одна из известных проблем MPER как иммуногена – его гидрофобность [20], и, как и ожидалось, наши конструкции позволили ее преодолеть.

Результаты дот-блот-анализа показали, что YkuJ-MPER и MPER-TbI могут специфически взаимодействовать с МКА 4E10 и 10E8, которые связываются с MPER в α -спиральной конформации, а также с антителом 2F5, которое связывается с MPER в конформации без регулярной вторичной структуры [14]. Полученный результат косвенно указывает на конформационную подвижность встроенного участка MPER. Нами не была проведена экспериментальная проверка того, сколько молекул антител может

связаться с одной белковой молекулой YkuJ-MPER, но модели показывают, что существует принципиальная возможность связывания сразу двух антител. Также предполагается, что MPER-TbI может связывать одновременно два антитела, так как его структура достаточно подвижна, и это предположение тоже нуждается в экспериментальной проверке.

Иммунизация лабораторных животных очищенными препаратами белков показала, что в организме кроликов формируются специфические антитела, титры которых возрастают уже после первой иммунизации. Более того, установлено, что антитела, возникающие в результате иммунизации YkuJ-MPER, взаимодействуют с MPER-TbI, и наоборот. Поскольку, за исключением гистидиновой метки (6 а.о. His), у YkuJ-MPER и MPER-TbI нет общих фрагментов, кроме MPER-области, можно предположить, что эти конструкции вызывают индукцию анти-MPER-антител.

С помощью тест-системы New Lav Blot I показано, что антитела, полученные при иммунизации животных как YkuJ-MPER, так и MPER-TbI, взаимодействуют с сорбированными белками ВИЧ, а именно с gp41 и gp160 (рис. 10). Кроме того, MPER-TbI индуцирует образование антител, распознающих белок gp120, благодаря тому, что в состав белка-носителя TbI_tag входят фрагменты gp120 ВИЧ-1 (env 102–118, env 309–317 и env 421–437).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе разработаны два иммуногена, способные обеспечить индукцию анти-MPER-антител: один из них создан на основе белка YkuJ, который ранее не использовали в качестве носителя вирусных эпитопов, второй – на базе хорошо изученного нами ранее иммуногена TbI. Показано, что химерные белки взаимодействуют с bNAbs, мишенями которых служит MPER ВИЧ-1. Результаты перекрестных проверок иммуногенных свойств YkuJ-MPER и MPER-TbI и иммуноблота с белками ВИЧ-1 свидетельствуют, что обе конструкции способны обеспечить формирование анти-MPER-антител у иммунизированных животных. Проведено предварительное исследование структурных особенностей разработанных иммуногенов. Результаты исследования и химерные белки (YkuJ-MPER и MPER-TbI) могут служить основой для разработки иммуногенов, фокусирующих гуморальный иммунный ответ на регионах уязвимости ВИЧ-1. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00314.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eisinger R.W., Fauci A.S. // *Emerg. Infect. Dis.* 2018. V. 24. № 3. P. 413–416.
2. Durova O.M., Vorobiev I.I., Smirnov I.V., Reshetnyak A.V., Telegin G.B., Shamborant O.G., Orlova N.A., Genkin D.D., Bacon A., Ponomarenko N.A., et al. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 47. № 1. P. 87–95.
3. Huang J., Kang B.H., Pancera M., Lee J. H., Tong T., Feng Y., Imamichi H., Georgiev I.S., Chuang G., Druz A., et al. // *Nature.* 2014. V. 515. № 7525. P. 138–142.
4. Sok D., Burton D.R. // *Nat. Immunol.* 2018. V. 19. № 11. P. 1179–1188.
5. Hessel A.J., Rakasz E.G., Tehrani D.M., Huber M., Weisgrau K.L., Landucci G., Forthal D.N., Koff W.C., Poignard P., Watkins D.I., et al. // *J. Virol.* 2010. V. 84. № 3. P. 1302–1313.
6. Pegu A., Hessel A.J., Mascola J.R., Haigwood N.L. // *Immunol. Rev.* 2017. V. 275. № 1. P. 296–312.
7. Subbaraman H., Schanz M., Trkola A. // *Retrovirology.* 2018. V. 15. № 1. P. 1–14.
8. Vzorov A.N., Uryvaev L.V. // *Mol. Biol.* 2017. V. 51. № 6. P. 819–829.
9. Saunders K.O., Verkoczy L.K., Jiang C., Zhang J., Parks R., Chen H., Housman M., Bouton-Verville H., Shen X., Trama A.M., et al. // *Cell. Rep.* 2017. V. 21. № 13. P. 3681–3690.
10. Haynes B.F., Moody M.A., Alam M., Bonsignori M., Verkoczy L., Ferrari G., Gao F., Tomaras G.D., Liao H., Kelsø G. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014. V. 134. № 1. P. 3–10.
11. Shcherbakov D.N., Bakulina A.Y., Karpenko L.I., Ilyichev A.A. // *Acta Naturae.* 2015. V. 7. № 4. P. 11–21.
12. Montero M., Houten N.E., Wang X., Scott J.K. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008. V. 72. № 1. P. 54–84.
13. Williams L.D., Ofek G., Schätzle S., McDaniel J.R., Lu X., Nicely N.I., Wu L., Lougheed C.S., Bradley T., Louder M.K., et al. // *Sci. Immunol.* 2017. V. 2. № 7. P. eaal2200.
14. Liu H., Su X., Si L., Lu L., Jiang S. // *Protein Cell.* 2018. V. 9. № 7. P. 1–20.
15. Venditto V.J., Wiczorek L., Molnar S., Teque F., Landucci G., Watson D.S., Forthal D., Polonis V.R., Levy J.A., Szoka F.C. // *J. Clin. Vaccine Immunol.* 2014. V. 21. № 8. P. 1086–1093.
16. Ye L., Wen Z., Dong K., Wang X., Bu Z., Zhang H., Compans R.W., Yang C. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 5. P. 1–12.
17. Correia B.E., Ban Y.E., Holmes M.A., Xu H., Ellingson K., Kraft Z., Carrico C., Boni E., Sather D.N., Zenobia C., et al. // *Structure.* 2010. V. 18. № 9. P. 1116–1126.
18. Kelsø G., Haynes B.F. // *Immunol. Rev.* 2017. V. 275. № 1. P. 79–88.
19. Irimia A., Serra A.M., Sarkar A., Jacak R., Kalyuzhnyi O., Sok D., Saye-Francisco K.L., Schiffner T., Tingle R., Kubitz M., et al. // *PLoS Pathog.* 2017. V. 13. № 2. P. 1–20.
20. Scholz C., Schaarschmidt P., Engel A.M., Andres H., Schmitt U., Faatz E., Balbach J., Schmid F.X. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 345. № 5. P. 1229–1241.
21. Kim M., Song L., Moon J., Sun Z.Y., Bershteyn A., Hanson M., Cain D., Goka S., Kelsø G., Wagner G., et al. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 44. P. 31888–31901.
22. Рудометов А.П., Андреева Н.Б., Чикаев А.Н., Щербак Н.С., Каплина О.Н., Карпенко Л.И. // *Сиб. научный мед. журн.* 2018. Т. 8. № 4. С. 37–43.
23. Kozłowski L.P., Bujnicki J.M. // *BMC Bioinformatics.* 2012. V. 13. № 1. P. 1–11.
24. Perczel A., Hollósi M., Tusnády G., Fasman G.D. // *Protein Eng.* 1991. V. 4. № 6. P. 669–679.
25. Karpenko L.I., Bazhan S.I., Bogryantseva M.P., Ryndyuk N.N., Ginko Z.I., Kuzubov V.I., Lebedev L.R., Kaplina O.N., Reguzova A.Y., Ryzhikov A.B., et al. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2016. V. 42. № 2. P. 170–182.
26. Rathore U., Kesavardhana S., Mallajosyula V.V., Varadarajan R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1844. № 11. P. 1891–1906.
27. Zolla-Pazner S., Kong X., Xunqing J., Cardozo T., Nádas A., Cohen S., Totrov M., Seaman M.S., Wang Sh., Lu Sh. // *J. Virol.* 2011. V. 85. № 19. P. 9887–9898.
28. Xu K., Acharya P., Kong R., Cheng C., Chuang G.Y., Liu K., Louder M.K., O'Dell S., Rawi R., Sastry M., et al. // *Nat. Med.* 2018. V. 4. № 6. P. 857–867.