

С.Е. Ткачев, В.А. Матвеева

## ИССЛЕДОВАНИЕ ИНДУКЦИИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ БЕЛКОВ E И NS1 ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ПРИ ИММУНИЗАЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫМИ НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск)

Одним из подходов к разработке новых средств профилактики инфекций, вызываемых вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ), может стать иммунизация рекомбинантными нуклеиновыми кислотами. В данной работе проводились исследования индукции гуморального иммунитета при иммунизации мышей рекомбинантными ДНК и РНК, содержащими фрагменты генома ВКЭ. После 4 иммунизации специфические антитела против белков E и NS1 ВКЭ были обнаружены в сыворотках крови мышей, иммунизированных препаратами рекомбинантных РНК, содержащих 5'-концевую нетранслируемую область, гены C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B и 5'-фрагмент гена NS3 ВКЭ или плазмидной ДНК, содержащей гены E и NS1. Более того, было показано, что две недели спустя после пятой иммунизации, титры специфических антител увеличились. Иммунизация рекомбинантными ДНК приводила к появлению более высоких титров антител по сравнению с вводимыми рекомбинантными РНК.

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, генная иммунизация

## INDUCTION OF HUMORAL IMMUNITY AGAINST E AND NS1 TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS PROTEINS AFTER RECOMBINANT NUCLEIC ACIDS IMMUNIZATION

S.E. Tkachev, V.A. Matveeva

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

One of the approaches to development of new prophylaxis methods against infections caused by tick-borne encephalitis virus (TBEV) could be the immunization with recombinant nucleic acids. In this work the investigations of humoral immunity induction after mice immunization with recombinant DNA and RNA contained TBEV genome fragments were carried out. After fourth immunization the specific antibodies against E and NS1 TBEV proteins were detected in sera of mice immunized with recombinant RNA contained 5'-end non-translated region, C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B TBEV genes and 5'-fragment of NS3 protein, or with plasmid DNA contained E and NS1 TBEV genes. Moreover, after fifth immunization the specific antibodies titers were shown to increase. Immunization with recombinant DNA resulted in higher titers of specific antibodies in comparison with recombinant RNA injection.

**Key words:** tick-borne encephalitis virus, genes immunization

### ВВЕДЕНИЕ

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) вызывает поражения центральной нервной системы человека. Одним из подходов к разработке средств профилактики данного заболевания могут стать кандидатные вакцины на основе рекомбинантных нуклеиновых кислот, содержащих фрагменты генома патогена [9].

Как было показано ранее в наших работах, ДНК-вакцины, содержащие гены E, E-NS1 и prM-E ВКЭ, обеспечивают существенный защитный эффект при заражении мышей летальными дозами вируса [1, 4]. Тем не менее, несмотря на достоинства ДНК-вакцин, потенциальная возможность их геномных перестроек [6] и интеграции в геном хозяйских клеток [18, 21] требует тщательного изучения вопроса их безопасности. Одним из способов решения данной проблемы может стать использование генных вакцин на основе РНК, принцип действия которых подобен ДНК-вакцинам, но для индукции иммунитета не требуется проникновения молекулы рекомбинантной РНК в ядро клетки. Потенциал вакцин на основе РНК проверялся

их способностью индуцировать защитный иммунный ответ и защиту от хронической инфекции на нескольких моделях, описанных в литературе [13, 14, 17].

В данной работе проводились исследования индукции гуморального иммунитета при иммунизации мышей рекомбинантными ДНК и РНК, содержащими фрагменты генома ВКЭ.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### Клонирование фрагментов кДНК ВКЭ

Рекомбинантная плазмида pSVK3-ENS1 была получена путем переклонирования фрагмента ДНК, содержащего гены E и NS1 ВКЭ штамма Софьин, в эукариотический экспрессирующий вектор pSVK3 («Amersham», UK) [1]. ДНК-копия геномной РНК ВКЭ, содержащая 5'-концевую нетранслируемую область, гены C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B и 5'-фрагмент гена NS3, была клонирована в плазмидном векторе pBR322 под контролем SP6-промотора, узнаваемого ДНК-зависимой РНК-полимеразой бактериофага T7 [19].

**Трансформация компетентных клеток *E. coli* плазмидными ДНК**

Плазмидную ДНК pBR322-5' выделяли из трансформированных ранее бактериальных клеток *E. coli* штамма XL2Blue методом щелочной денатурации [2] и использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3)pLysS, содержащих клонированный ген T7 РНК-полимеразы в соответствии с [8]. После селекции в присутствии соответствующих антибиотиков, бактериальные клоны выращивали в селективной питательной среде с 0,5 мМ изопротилтиогаалактозида в течение ночи.

**Выделение РНК с использованием гуанидинтиоцианата**

Суммарные РНК выделяли из трансформированных бактериальных клеток *E. coli* BL21(DE3)pLysS с использованием гуанидинтиоцианата. Клетки центрифугировали, ресуспендировали в 4М растворе гуанидинтиоцианата в снежной бане и оставляли на 10 мин. Добавляли равный объем смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25 : 24 : 1) и встряхивали в течение 1 минуты. Для образования плотной интерфазы пробирки замораживали в жидком азоте, затем после размораживания центрифугировали. Водную фазу отбирали, добавляли 1/10 объема 5М раствора ацетата натрия, затем равный объем изопропанола и центрифугировали. Полученный осадок дважды промывали 75 % этанолом, затем ацетоном, высушивали и растворяли в физиологическом растворе.

**Внутримышечная иммунизация мышей**

Рекомбинантную плазмиду pSVK3-ENS1 или плазмидный вектор pSVK3, очищенные в градиенте плотности хлорида цезия в соответствии с [2], а также РНК, выделенные из бактериальных клеток *E. coli* BL21(DE3)pLysS, трансформированных рекомбинантной плазмидой pBR322-5' или РНК из контрольных бактериальных клеток, вводили внутримышечно в квадрицепс правой задней лапы самок мышей линии ICR массой 10 – 12 г по 100 мкг в 50 – 100 мкл физиологического раствора при помощи инъекционной иглы и шприца.

**Иммуноферментный анализ вирус-специфических антител**

Определение суммарных специфических антител к белкам Е и NS1 ВКЭ и классов вирус-специфических антител в полученных образцах крови мышей проводили методом иммуноферментного анализа с использованием в качестве антигенов очищенных гликопротеинов Е и NS1, сорбированных на нитроцеллюлозу. Суммарные антитела, специфичные к белкам Е и NS1, выявляли антителами кролика, направленными к иммуноглобулинам мыши и ковалентно присоединенными к щелочной фосфатазе. Иммуноглобулины класса G, специфичные к белкам Е и NS1, определяли с использованием белка А, конъюгированного с пероксидазой хрена. Антитела класса М, специфичные к белкам Е и NS1, выявляли антителами кролика, направленными к иммуноглобулинам класса М мыши и ковалентно присоединенными к пероксидазе хрена [3, 5].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

По литературным данным, при ДНК- или РНК-иммунизации наблюдается образование специфических антител против белков, кодируемых рекомбинантными нуклеиновыми кислотами [10, 15, 16]. Для исследования иммуногенных свойств рекомбинантных ДНК и РНК, содержащих гены ВКЭ, самок мышей линии ICR иммунизировали внутримышечно 5 раз рекомбинантной плазмидой pSVK3-ENS1 или плазмидным вектором pSVK3, а также препаратами РНК, выделенными из бактериальных клеток *E. coli* BL21(DE3)pLysS, трансформированных рекомбинантной плазмидой pBR322-5', или РНК из контрольных бактериальных клеток по следующей схеме: вторую иммунизацию проводили через 2 недели после первой, третью и четвертую с недельным интервалом, пятую иммунизацию проводили через 2 недели после четвертой. Известно, что тип иммунитета, активирующегося в ответ на введение ДНК-вакцин, зависит от способа их доставки в организм. Наиболее простым и распространенным способом является внутримышечная инъекция растворенной ДНК, в результате которой происходит стимуляция цитотоксических Т-лимфоцитов и секреция антител IgG2A [12]. Обычно дозы вводимых внутримышечно ДНК-вакцин в мышечной ткани в разных экспериментах варьировали от 50 до 300 мкг [7, 11, 20]. В наших экспериментах по ДНК-иммунизации мышей против ВКЭ мы использовали дозы 100 мкг плазмидной ДНК на мышь [1, 4], поэтому с целью сравнения эффективности РНК-иммунизации по сравнению с ДНК-иммунизацией, были выбраны те же самые дозы вводимых препаратов.

Через неделю после четвертой и через две недели после пятой иммунизаций из глазной вены иммунизированных и контрольных животных собирали по 50 мкл сывороток крови. Затем собранные образцы внутри каждой из групп объединяли и проводили определение в них специфических антител к белкам Е и NS1 ВКЭ. Сыворотки интактных мышей и мышей, иммунизированных ДНК-вектором pSVK3 или суммарными РНК, выделенными из бактериальных клеток *E. coli* BL21(DE3)pLysS, использовали как отрицательные контроли.

В сыворотках крови мышей после четырехкратного внутримышечного введения препаратов рекомбинантных РНК или плазмидной ДНК pSVK3-ENS1 были обнаружены специфичные к белкам Е и NS1 ВКЭ суммарные иммуноглобулины (табл. 1). Более того, было показано, что две недели спустя после пятой иммунизации, титры специфических антител увеличились. Иммунизация рекомбинантными ДНК приводила к появлению более высоких титров антител по сравнению с вводимыми рекомбинантными РНК.

Следует отметить, что наиболее информативным являлось использование метода определения суммарных иммуноглобулинов к белкам Е и NS1 ВКЭ, позволяющего наиболее полно учитывать вклад всех классов специфических антител крови. Тем не менее, было показано наличие в исследуемых сыворотках крови и специфических

Таблица 1

Сравнение титров специфических антител к белкам E и NS1 ВКЭ в сыворотках крови иммунизированных мышей после 4-ой и 5-ой иммунизаций

Группа животных	Титры антител к белкам ВКЭ после 4 иммунизации		Титры антител к белкам ВКЭ после 5 иммунизации		Класс выявляемых антител
	к белку E	к белку NS1	к белку E	к белку NS1	
К-	–	–	–	–	ΣIg
pSVK3	–	–	–	–	ΣIg
PHK-	–	–	–	–	ΣIg
pSVK3-ENS1	1:90	1:30	1:270	1:30–1:90	ΣIg
5'	1:10	–	1:30–1:90	1:30	ΣIg

**Примечание:** К– – интактные мыши; pSVK3 – мыши, иммунизированные векторной ДНК; PHK– – мыши, иммунизированные суммарными РНК, выделенными из бактериальных клеток *E. coli* BL21(DE3)pLysS; pSVK3-ENS1 – мыши, иммунизированные рекомбинантной плазмидой pSVK3-ENS1; 5' – мыши, иммунизированные рекомбинантными РНК, выделенными из бактериальных клеток *E. coli* BL21(DE3)pLysS, трансформированных рекомбинантной плазмидой pBR322-5'; ΣIg – суммарные иммуноглобулины мыши.

антител класса IgM, чьи титры были сопоставимы с титрами суммарных иммуноглобулинов (данные не приведены). В то же время, в исследуемых сыворотках крови было показано отсутствие выявляемых количеств антител класса IgG, специфических к белкам E и NS1, что, по-видимому, объясняется тем, что данный метод определения антител класса IgG с использованием конъюгата белка A с пероксидазой хрена является наименее чувствительным по сравнению с другими использованными методами определения антител.

Слабый гуморальный иммунный ответ в результате генной иммунизации, возможно, обусловлен низким уровнем захвата рекомбинантных ДНК или РНК клетками мышечной ткани и, следовательно, малыми количествами вирусных антигенов.

Таким образом, нами показано, что при введении в организм мышей рекомбинантных ДНК и РНК, содержащих гены E и NS1 ВКЭ, наблюдается индукция гуморального иммунитета и образование специфических антител против кодируемых ими белков.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Генная иммунизация против вируса клещевого энцефалита / Е.Э. Митрофанова, В.Н. Бахвалова, Е.Ю. Добрикова и др. // Молекулярная биология. – 1997. – Т. 31. – С. 403 – 406.
2. Маниатис Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
3. Получение и свойства моноклональных антител к неструктурным белкам вируса клещевого энцефалита / В.А. Матвеева, Е.Ю. Добрикова, Н.А. Цехановская и др. // Вопросы вирусологии. – 1998. – № 3. – С. 134 – 137.
4. Сравнительный анализ защитного эффекта ДНК-вакцин с различными генами вируса клещевого энцефалита / С.Е. Ткачев, Е.Э. Митрофанова, Т.Г. Максимова и др. // Иммунология. – 2000. – № 3. – С. 26 – 29.

5. Сравнительная оценка двух иммуноферментных тест-систем для выявления антител к вирусу клещевого энцефалита / Л.Э. Матвеев, А.С. Караванов, С.Г. Рубин и др. // Вопросы вирусологии. – 1989. – Т. 34, № 4. – С. 488 – 491.

6. Analysis of mutations occurring during replication of a SV40 shuttle vector in mammalian cells / G.R. Macgregor, M.R. James, C.F. Arlett, J.F. Burke // Mutat. Res. – 1987. – Vol. 183. – P. 273 – 278.

7. Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients / S. Calarota, G. Bratt, S. Nordlund et al. // Lancet. – 1998. – Vol. 351, N 9112. – P. 1320 – 1325.

8. Chung C.T. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution / C.T. Chung, S.L. Niemela, R.H. Miller // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – Vol. 86, N 7. – P. 2172 – 2175.

9. Cohen J. Naked DNA points way to vaccines / J. Cohen // Science. – 1993. – Vol. 259. – P. 1691 – 1692.

10. Davis H.L. DNA vaccines for viral diseases / H.L. Davis, M.J. McCluskie // Microbes and Infection. – 1999. – Vol. 1. – P. 7 – 21.

11. Donnelly J.J. DNA Vaccines. A New Era in Vaccinology / J.J. Donnelly, J.B. Ulmer, M.A. Liu. – The New York Academy of Sciences, New York, 1995. – P. 40 – 46.

12. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint / H. Tighe, M. Corr, M. Roman, E. Raz // Immunol. Today. – 1998. – Vol. 19. – № 2. – P. 89 – 97.

13. Intrahepatic genetic inoculation of hepatitis C virus RNA confers cross-protective immunity / A.J. Weiner, X. Paliard, M.J. Selby et al. // J. Virol. – 2001. – Vol. 75, N 15. – P. 7142 – 7148.

14. Naked RNA immunization with replicons derived from poliovirus and Semliki Forest virus genomes for the generation of a cytotoxic T cell response against the influenza A virus nucleoprotein / M. Vignuzzi, S. Gerbaud, S. Van der Werf, N. Escriou // J. of Gen. Virol. – 2001. – Vol. 82. – P. 1737 – 1747.

15. Recombinant Semliki Forest virus particles expressing louping ill virus antigens induce a better protective response than plasmid-based DNA vaccines or an inactivated whole particle vaccine / M.N. Fleeton, P. Liljestrom, B.J. Sheahan, G.J. Atkins // *J. Gen. Virol.* — 2000. — Vol. 81, Pt. 3. — P. 749–758.

16. Self-replicative RNA vaccines elicit protection against influenza A virus, respiratory syncytial virus, and a tickborne encephalitis virus / M.N. Fleeton, M. Chen, P. Berglund et al. // *J. Infect. Dis.* — 2001. — Vol. 189, N 9. — P. 1395–1398.

17. Sumiyoshi H. Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates / H. Sumiyoshi, C.H. Hoke, D.W. Trent // *J. Virol.* — 1992. — Vol. 66, N 9. — P. 5425–5431.

18. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice / N. Zhu, T. Liggitt,

Y. Liu, R. Debs // *Science.* — 1993. — Vol. 261. — P. 209–211.

19. T7 DNA-dependent RNA polymerase can transcribe RNA from tick-borne encephalitis virus (TBEV) cDNA with SP6 promoter / E.Yu. Dobrikova, A.G. Pletnev, V.N. Karamyshev, O.V. Morozova // *FEBS Letters.* — 1996. — Vol. 382, N 3. — P. 327–329.

20. Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of beta-chemokines / J.D. Boyer, A.D. Cohen, S. Vogt et al. // *J. Infect. Dis.* — 2000. — Vol. 181, N 2. — P. 476–483.

21. Xiong S. *In vivo* role of B lymphocytes in somatic transgene immunization / S. Xiong, M. Gerloni, M. Zanetti // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1997. — Vol. 94, N 12. — P. 6352–6357.