

В МИРЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

Панкова Екатерина Олеговна,

*студент кафедры вирусологии,
МГУ им. М.В. Ломоносова,*

г. Москва

Руководитель Стародубова Е.С., *к.б.н., с.н.с.,*

*ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
г. Москва*

ИЗМЕНЕНИЕ ВРЕМЕНИ ПОЛУЖИЗНИ ГЛИКОПРОТЕИНА ВИРУСА БЕШЕНСТВА ЗА СЧЕТ ДОБАВЛЕНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ БЕЛКОВ NS1 И СТЛА4

Аннотация. Несмотря на долгую историю, заболевание бешенством остается непобежденным. Это зоонозное вирусное заболевание ежегодно вызывает гибель десятков тысяч людей. На сегодняшний день в мире для вакцинации против бешенства используются культуральные антирабические вакцины (КАВ) на основе вирусного штамма, наработанного в культуре клеток или курином эмбрионе и инактивированного различными методами. Данные вакцины имеют ряд недостатков, к которым следует отнести развитие побочных реакций и стоимость, обусловленную необходимостью холодной цепи при транспортировке. Кроме того, такие условия транспортировки делают современные вакцины практически недоступными для стран Азии и Африки, которые в большей степени подвержены данному заболеванию. Поэтому на данный момент ведется активная разработка новых поколений вакцин, в том числе ДНК-вакцин. В данной работе проведено исследование времени полужизни прототипной ДНК-вакциной конструкции на основе консенсусной аминокислотной последовательности гликопротеина вируса бешенства с добавленными последовательностями белков NS1 и СТЛА4, встроенной в коммерческий вектор pVax1. В качестве референсной конструкции использовали вектор pVax1, несущий последовательность гликопротеина вакцинного штамма вируса бешенства Внуково-32. Исследование проводили на клеточной линии человека HeLa, трансфецированной созданной конструкцией. Остановку трансляции производили циклогексамидом. Уровень накопления гликопротеина в клетках оценивали с помощью метода вестерн блот. По результатам данной работы было показано, что добавление последовательностей белков NS1 и СТЛА4 к консенсусной аминокислотной последовательности приводит к увеличению его времени полужизни в клетках человека по сравнению с референсной конструкцией с $4,5 \pm 1$ час до 10 ± 2 часа. Результаты данного исследования предполагают возможное дальнейшее использование ДНК-конструкции на основе консенсусной аминокислотной последовательности гликопротеина ви-

В МИРЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

руса бешенства с добавленными последовательностями белков NS1 и CTLA4 в качестве компонента поливалентных ДНК-вакцин.

Ключевые слова: бешенство, гликопротеин, ДНК-вакцины, антирабические вакцины.

Вирус бешенства (*Rabies virus*, *Lyssavirus*, *Rhabdoviridae*) известен человеку более 4000 лет. Несмотря на это, заболевание бешенством до сих пор остается широко распространенным и вызывает летальный исход как среди животных, так и среди людей. Основная проблема заключается в диагностике заболевания. Диагностика заболевания крайне затруднена. Ранняя диагностика опирается практически только на историю укуса [6], но точное подтверждение диагноза возможно только после проведения посмертной биопсии тканей мозга, извлеченных из черепа [12, с.3]. Основными переносчиками заболевания являются дикие лисы, еноты, скунсы, мангусты и собаки [7, с.173]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), заболевание бешенством регистрируется на территории более чем 150 стран мира, ежегодно унося жизни более 55 тысяч человек [12, с.2]. Бешенство является заболеванием центральной нервной системы и развивается как острый прогрессирующий энцефалит с летальным исходом [6]. С помощью мышей, нокаутных по различным компонентам иммунной системы было показано, что основным компонентом защиты организма от вируса бешенства является образование антител [2, с.3718-3719]. В большинстве случаев заражения человека данным вирусом антитела в крови не выявляются до развития острого неврологического периода [3, с.197], [8, с.502]. Особый интерес представляет случай пациента, который выжил после заражения вирусом. У него был обнаружен высокий титр антител как в крови, так и в спинномозговой жидкости [10, с.2510]. Так как после проявления симптомов бешенство практически всегда смертельно, пост-экспозиционная профилактика обязательна после каждого случая заражения [4, с.370]. Кроме того, для профилактики заболевания используют пре-экспозиционную вакцинацию. В обязательном порядке ей подвержены лица, которые ввиду своей работы или проживания постоянно подвержены риску заражения [4, с.370].

На данный момент рекомендованными и широко применяемыми являются культуральные антирабические вакцины. Они получают на культурах клеток или куриных эмбрионах. Процесс производства многостадийный, различные этапы производства могут варьировать в зависимости от производителя [9, с.578], [11, с.21]. На территории Российской Федерации иммунизацию против бешенства рекомендовано проводить курсом концентрированной очищенной инактивированной культуральной антирабической вакцины (КОКАВ), либо комбинированным

В МИРЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

курсом вакцин и антирабического иммуноглобулина. Данная вакцина основана на вирусном штамме Внуково-32, выращиваемом на культуре клеток ВНК-21, и инактивируемого ультрафиолетом. Однако, иногда применение данных препаратов связано с развитием побочных реакций аллергического, нервнопаралитического и энцефалитного характера [9, с.579]. Кроме того, одним из недостатков данного типа вакцин является необходимость холодной цепи транспортировки. Что увеличивает их стоимость и делает их практически недоступными для развивающихся стран. На сегодняшний день одной из перспективных ветвей развития новых вакцинных препаратов являются ДНК-вакцины. В простейшем случае они представляют собой вектор, в который встроены гены протективного антигена [5, с.549]. Для вируса бешенства единственным белком, который связан с образованием антител является гликопротеин (*G-prot*). Именно он и используется в качестве основы для ДНК-вакцин. ДНК-вакцины имеют ряд преимуществ, среди которых действие в присутствии материнских антител, высокая устойчивость, массовая продукция и экономическая выгода [1, с.342]. Кроме того, к несомненным преимуществам следует отнести вызываемый ими длительный клеточный и гуморальный иммунный ответ [4, с.373]. В клинических испытаниях было показано, что ДНК-вакцины не обеспечивают полноценной защиты от вирусной инфекции. Для увеличения протективных свойств используются различные подходы, затрагивающие условия вакцинации состав вакцинного препарата, адьюванты и модификации самого целевого вирусного агента.

Таким образом, в настоящий момент вопрос создания новых вакцин против вируса бешенства, в частности нового поколения, остается актуальным. Созданию модифицированного целевого вирусного агента для ДНК-вакцины против вируса бешенства и посвящена данная работа.

В данной работе нами была использована ДНК-вакцинная конструкция на основе вектора pVax1, несущая консенсусную аминокислотную последовательность гликопротеина вируса бешенства, модифицированную сигналом секреции и сигналом узнавания антиген презентующими клетками. (pVax-NS1-G-cons-CTLA4). Для данной конструкции было определено время полужизни *in vivo* в клеточной линии человека в сравнении с ДНК-вакциной конструкцией на основе того же вектора, несущего немодифицированный гликопротеин вакцинного штамма вируса Внуково-32 (pVax-G-Vn-32). Данный параметр является одним из необходимых оценочных этапов при создании ДНК-вакцины.

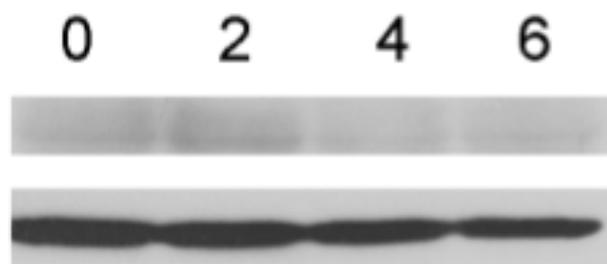
В данной работе был использован модифицированный гликопротеин вируса бешенства. К консенсусной аминокислотной последова-

В МИРЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

тельности гликопротеина вируса бешенства, полученной в нашей лаборатории ранее, были добавлены сигналы секреции и сигнал узнавания антиген презентирующими клетками. В качестве сигнала секреции использовалась сигнальная последовательность белка NS1 вируса клещевого энцефалита. Данная последовательность была добавлена на N-конец гликопротеина. На C-конец была добавлен внеклеточный домен белка CTLA-4, ассоциированного с цитотоксическими лимфоцитами антигена 4. Данный домен способен активировать антиген презентирующие клетки связываясь с их Т-клеточным рецептором. Модифицированный гликопротеин был встроен в вектор pVax1, рекомендованный для создания ДНК-вакцин.

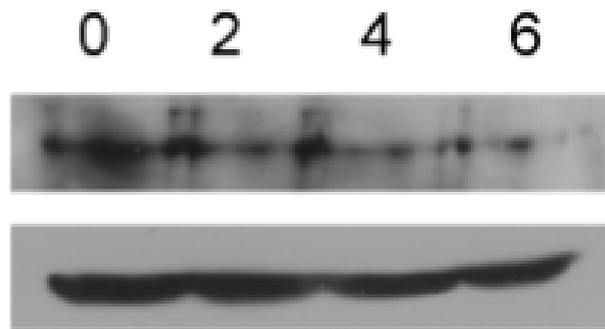
Все этапы исследования проводили на клеточной линии HeLa человека. Трансфекцию клеток проводили с помощью липосомного реагента Lipofectamine LTX (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями производителя.

Для определения времени полужизни вирусного антигена клетки трансфецировали, спустя двое суток к клеткам добавляли ингибитор трансляции – циклогексамид, в концентрации 100 мкг/мл. Через 0, 2, 4 и 6 часов аликвоты клеток собирали и лизировали. Содержание гликопротеина в лизатах клеток оценивали методом вестерн блот. Для этого белки лизатов разделяли электрофоретически в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях, после чего белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью электропереноса. Полученную мембрану окрашивали последовательно с антителами к гликопротеину и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Связывание антител детектировали с помощью набора люминесцентных субстратов. Регистрацию проводили на рентгеновскую пленку.



(A)

В МИРЕ ИССЛЕДОВАНИЙ



(Б)

Рис. 1. Деградация гликопротеина вируса бешенства: pVax-G-Vn-32 (А), pVax-NS1-G-cons-CTLA4 (Б) в клетках HeLa после остановки трансляции циклогексамидом 100 мкг/мл. на дорожках 1, 2, 3 и 4 соответственно представлены лизаты клеток после 0, 2, 4 и 6 часов после добавления циклогексамида соответственно. В качестве внутреннего контроля использовали вторичное окрашивание антителами к актину (нижнее поле).

Полученные рентгеновские пленки сканировали и анализировали с помощью программы ImageJ. Значение времени полужизни белка рассчитывали по стандартной формуле времени полураспада вещества:

$$T_{1/2} = -0.693 * t / \ln N / N_0, \text{ где}$$

$T_{1/2}$ - время полураспада вещества,

N_0 – количество вещества в начальный момент времени,

N – количество вещества через промежуток времени t .

Для обеих конструкций время жизни было определено не менее чем в трех независимых повторах и составило $4,5 \pm 1$ час для pVax-G-Vn-32 и 10 ± 2 часа для pVax-NS1-G-cons-CTLA4.

Таким образом в данной работе было оценено время полужизни модельной ДНК-вакциной конструкции на основе коммерческого вектора pVax1, содержащего консенсусную аминокислотную последовательность гликопротеина вируса бешенства, содержащую на С-конце сигнал связывания с антиген презентирующими клетками – внеклеточный домен белка CTLA4 и на N-конце- сигнальную последовательность белка NS1 вируса клещевого энцефалита для секреции. Для сравнения влияния вносимых изменений использовалась конструкция на основе того же вектора, несущая последовательность гликопротеина вируса бешенства вакцинного штамма Внуково-32, используемого на территории РФ для создания культуральных антирабических вакцин. По результатам нашего исследования время полужизни модельной конструкции в клеточной линии человека HeLa составило 10 ± 2 часа, а референсной конструкции- $4,5 \pm 1$ час. Как несложно заметить, внесенные модификации продлевают время полужизни, а соответственно и полураспада белка в клетках, что говорит о функциональной активно-

В МИРЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

сти введенных модификаций. Как мы предполагаем, данные модификации позволят увеличить иммуногенность конструкции, что позволит использовать ее в качестве компонента поливалентных ДНК-вакцин.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 14.604.21.0109 от 7 августа 2014 г., RFMEFI60414X0109).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Dhama, K., Mahendran, M., Gupta, P.K., Rai, A. DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives/ K. Dhama, M. Mahendran, P.K. Gupta, A. Rai // *Vet Res Commun.* - 2008.- Т. 32, № 5(Jun). - С. 341-356.
2. Hooper, D.C., Morimoto, K., Bette, M., Weihe, E., Koprowski, H., Dietzschold, B. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system/ D.C. Hooper, K. Morimoto, M. Bette, E. Weihe, H. Koprowski, B. Dietzschold // *J Virol.* - 1998. - Т. 72, № 5(May). - С. 3711-3719.
3. Kasempimolporn, S., Hemachudha, T., Khawplod, P., Manatsathit, S. Human immune response to rabies nucleocapsid and glycoprotein antigens/ S. Kasempimolporn, T. Hemachudha, P. Khawplod, S. Manatsathit // *Clin Exp Immunol.* - 1991. - Т. 84, № 2(May). - С. 195-199.
4. Kaur, M., Garg, R., Singh, S., Bhatnagar, R. Rabies vaccines: where do we stand, where are we heading?/ M. Kaur, R. Garg, S. Singh, R. Bhatnagar // *Expert Rev Vaccines.* - 2015. - Т. 14, № 3(Mar.). - С. 369-381.
5. Robinson, H.L. DNA vaccines: basic mechanism and immune responses (Review)/ H. L. Robinson // *Int J Mol Med.* - 1999. - Т. 4, № 5(Nov.). - С. 549-555.
6. Rupprecht, C.E. Rhabdoviruses: Rabies Virus / C. E. Rupprecht // *Medical Microbiology* / под ред. Baron S. - Galveston (TX), 1996.
7. Rupprecht, C.E., Hanlon, C.A., Slate, D. Oral vaccination of wildlife against rabies: opportunities and challenges in prevention and control/ C. E. Rupprecht, C. A. Hanlon, D. Slate // *Dev Biol (Basel).* - 2004. - Т. 119. - С. 173-184.
8. Solomon, T., Marston, D., Mallewa, M., Felton, T., Shaw, S., McElhinney, L.M., Das, K., Mansfield, K., Wainwright, J., Kwong, G.N., Fooks, A.R. Paralytic rabies after a two week holiday in India/ T. Solomon, D. Marston, D. Mallewa, T. Felton, S. Shaw, L.M. McElhinney, K. Das, K. Mansfield, J. Wainwright, G.N. Kwong, A.R. Fooks // *BMJ.* - 2005. - Т. 331, № 7515(Sep. 3). - С. 501-503.
9. Starodubova, E.S., Preobrazhenskaia, O.V., Kuzmenko, Y.V., Latanova, A.A., Yarygina, E.I., Karpov, V.L. Rabies vaccines: Current status and prospects for development/ E.S. Starodubova, O.V. Preobrazhenskaia, Y.V. Kuzmenko, A.A. Latanova, E.I. Yarygina, V.L. Karpov // *Mol Biol (Mosk).* - 2015. - Т. 49, № 4(Jul-Aug). - С. 577-584.
10. Willoughby, R.E. Jr., Tieves, K.S., Hoffman, G.M., Ghanayem, N.S., Amlie-Lefond, C.M., Schwabe, M.J., Chusid, M.J., Rupprecht, C.E. Survival after treatment of rabies with induction of coma/ R.E. Willoughby Jr., K.S. Tieves, G.M. Hoffman, N.S. Ghanayem, C.M. Amlie-Lefond, M.J. Schwabe, M.J. Chusid, C.E. Rupprecht // *N Engl J Med.* - 2005. - Т. 352, № 24(Jun 16.). - С. 2508-2514.
11. Yang, D.K., Kim, H.H., Lee, K.W., Song, J.Y. The present and future of rabies vaccine in animals/ D.K. Yang, H.H. Kim, K.W. Lee, J.Y. Song. // *Clin Exp Vaccine Res.* - 2013. - Т. 2, № 1(Jan.). - С. 19-25.

В МИРЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

12. Yousaf, M. Z., Qasim, M., Zia, S., Khan, M., Ashfaq, U.A., Khan, S. Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment/ M.Z. Yousaf, M. Qasim, S. Zia, M. Khan, U.A. Ashfaq, S. Khan // Virol J. - 2012. - Т. 9. - С. 50.