

СОЗДАНИЕ ГИБРИДНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВ VP6 И VP8 РОТАВИРУСА ЧЕЛОВЕКА ГРУППЫ А

И.В. Духовлинов, Е.Г. Богомолова, Е.А. Федорова, А.С. Симбирцев

ФГУП Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Ротавирусная инфекция является одной из наиболее распространенных причин детских энтеритов. Инфицирование этим вирусом зачастую приводит к выраженной дегидратации организма ребенка. Обезвоживание организма сопровождается многими инфекционными заболеваниями и является самой распространенной причиной смертности. На сегодняшний день самым эффективным способом профилактики ротавирусной инфекции считается своевременная вакцинация. Однако вакцинация проводится с применением живых аттенуированных вакцин, что может приводить к развитию различных осложнений. Создание кандидатной вакцины в этой работе осуществлялось на основе рекомбинантных гибридных белков, являющихся активными агентами при развитии протективного иммунитета против ротавируса. В ходе исследования созданы гибридные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8, подобран оптимальный протокол индукции генов, кодирующих данные белки. Белки VP6VP8 и FliCVP6VP8 наработаны и очищены с использованием металлоаффинной хроматографии.

Ключевые слова: ротавирусный гастроэнтерит, вакцина, рекомбинантные гибридные белки.

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ротавирусы являются одной из ведущих причин возникновения тяжелой диареи, приводящей к дегидратации организма у детей младшего возраста; большинство детей инфицируется до достижения 5 лет. Ротавирусы человека являются причиной порядка 450 000 смертей младенцев и маленьких детей ежегодно, особенно в развивающихся странах [9]. В России заболеваемость ротавирусной инфекцией постоянно растет, что объясняется как увеличением числа случаев инфицирования, так и совершенствованием способов диагностики данного заболевания.

Ротавирус открыт сравнительно недавно, лишь начале 70-х гг. прошлого века [2, 5]. Ротавирусы включают в семейство *Reoviridae*, род *Rotavirus*. Ротавирион представляет собой безоболочечный, сложноорганизованный трехслойный капсид,

который окружает геном, представленный 11 сегментами двуцепочечной РНК [10].

Род *Rotavirus* подразделяется на серологические группы А–Е. Все эти группы инфицируют животных, но лишь А–С — человека. Ротавирусы повреждают энтероциты, расположенные на микроворсинках тонкого кишечника, что приводит к снижению абсорбции и диарее. Широкий спектр клинических проявлений колеблется от преходящей легкой диареи до тяжелой диареи и рвоты, вызывающих дегидратацию, нарушение электролитного баланса, шок и при отсутствии лечения — смерть.

Иммунитет к ротавирусной инфекции в большинстве случаев возникает в раннем детстве после перенесенного заболевания. Иммунитет нестойкий, поэтому у взрослых с низким уровнем антител заболевание может повториться. Невосприимчивость у переболевших обусловлена не только гуморальными, но и секреторными антителами.

Авторы:

Духовлинов И.В., к.б.н., начальник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Богомолова Е.Г., младший научный сотрудник ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Федорова Е.А., научный сотрудник ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Симбирцев А.С., д.м.н., профессор, директор ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Адрес для переписки:

Симбирцев Андрей Семенович
197110, Россия, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7.
Тел.: (812) 235-12-25.
E-mail: simbirtsev@hpb-spb.com

поступила в редакцию 21.04.2014
отправлена на доработку 24.04.2014
принята к печати 30.06.2014

© Духовлинов И.В. и соавт., 2014

Существующие в настоящее время вакцины для профилактики ротавирусной инфекции основаны на живых аттенуированных штаммах ротавируса человеческого и/или животного происхождения, которые размножаются в кишечнике человека.

Использование вакцин на основе рекомбинантных белков позволяет избежать рисков, связанных с введением вируса в организм, пусть и аттенуированного. Целью работы было создание двух белков — VP6VP8 и FliCVP6VP8. FliCVP6VP8 включает фрагмент белка VP6, фрагмент белка VP8 ротавируса А, фрагмент белка VP6 имеет общие и гомологичные участки с фрагментом белка VP6 ротавируса С, а также компоненты флагеллина *Salmonella* FliC в качестве адъюванта; компоненты соединены гибкими мостиками. Белок VP6VP8 содержит все перечисленные элементы, за исключением компонентов флагеллина. Представленные фрагменты являются консервативными частями белков VP6, VP8, к которым в процессе естественной инфекции образуются специфические антитела, перекрестно реагирующие с гомологичными эпитопами среди различных штаммов ротавирусов А, В и С. Использование эпитопов нескольких белков позволяет увеличить эффективность вакцины, а использование гибких мостиков между эпитопами позволяет сохранить правильную пространственную укладку белка и, соответственно, обеспечивает полноценное функционирование каждого эпитопа. Результаты исследований показывают, что рекомбинантные белки, вводимые с флагеллином, имеют повышенные иммуногенные и антигенные характеристики. Ответы на них регистрируются в более короткие сроки и вызывают более сильный клеточный и гуморальный иммунный ответ [1].

Методы

Синтез и клонирование генов, кодирующих гибридные рекомбинантные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8. Синтез последовательностей генов *vp6vp8* и *flicvp6vp8* осуществляли методом ПЦР с использованием перекрывающихся олигонуклеотидов [8]. В общей сложности для синтеза гибридного гена *flicvp6vp8* длиной 1389 п.н. использовали 51 праймер, для синтеза гена *vp6vp8* длиной 537 п.н. — 20 праймеров. Полученные гены клонировали в векторе pGEM-T Easy, с последующим клонированием в экспрессионной плазмиде pET28a(+) по рестрикционным сайтам NdeI и XhoI.

Для амплификации векторов pET28a(+)-*vp6vp8* и pET28a(+)-*flicvp6vp8* трансформировали ими клетки *E. coli* штамма DH10B/R (Gibco BRL, США) с генотипом F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM 15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)769 galUgalKλ-rpsLnupG методом электропорации.

С помощью скрининга клеток *E. coli* на наличие плазмид на селективной среде, содержащей LB-агар, 100 мкг/мл канамицина, отбирали колонии клеток *E. coli* — штаммы *E. coli* для амплификации плазмидной ДНК, содержащей гибридный ген. Очищенную плазмидную ДНК проверяли с помощью рестрикционного анализа и секвенирования. В ходе работы были отобраны клоны, содержащие фрагменты ДНК требуемого размера в составе плазмиды, из которых такие плазмиды были выделены для создания штаммов *E. coli* для дальнейшей экспрессии целевого гена.

Создание штаммов-продуцентов, кодирующих гибридные рекомбинантные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8. Для экспрессии генов, кодирующих гибридные белки, использовали клетки *E. coli* штамма BL21 Star (DE3) (Invitrogen, США), с генотипом F-ompThsdSB (rB-mB-) galdcm rne131 (DE3), содержащие в геноме λDe3 лизоген и мутацию rne131. Мутированный ген *rne* (*rne131*) кодирует усеченную форму РНКазы E, что уменьшает внутриклеточное разрушение мРНК, приводя к увеличению ее ферментативной стабильности. Ion- и ompT-мутации по генам протеаз позволяют получать непротеолизированные рекомбинантные белки в больших количествах. Трансформацию компетентных клеток плазмидами pET28a(+)-*vp6vp8* и pET28a(+)-*flicvp6vp8* осуществляли методом электропорации.

Индукция экспрессии гибридных генов vp6vp8 и flicvp6vp8. Осуществляли подбор оптимального прокола индукции экспрессии генов, кодирующих гибридные рекомбинантные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8. Для этого осуществляли индукцию экспрессии гибридных генов двумя способами — с помощью изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) в трех концентрациях и 0,2% лактозы (по Штудиеру) [11].

Индукцию экспрессии гибридных генов ИПТГ осуществляли следующим образом. Инкубировали клетки при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин в течение ночи в LB среде (1% триптон, 1% дрожжевой экстракт и 1% натрий хлористый), содержащей канамицин в концентрации 25 мкг/мл. Разводили культуру свежей LB средой в 50 раз и выращивали в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин +37°C до достижения культурой клеток оптической плотности 0,6–0,8 оптических единиц при длине волны 600 нм. После этого осуществляли индукцию экспрессии рекомбинантных генов с помощью добавления ИПТГ к культуре до конечной концентрации 0,1, 0,5 или 1 мМ. Оставляли на 10 часов для определения оптимального уровня экспрессии белка, после чего клетки концентрировали с помощью центрифугирования.

Индукцию экспрессии гибридных генов 0,2% лактозой (по Штудиеру) осуществляли следующим образом. В среду RYP-5052, содержащую 1% пептон (Gibco, США), 0,5% дрожжевой экстракт (Gibco, США), 50 мМ Na_2HPO_4 , 50 мМ K_2HPO_4 , 25 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 мМ MgSO_4 , 0,5% глицерол, 0,05% глюкозу и 0,2% лактозу, содержащую канамицин в концентрации 25 мкг/мл, инокулировали единичную колонию штамма-продуцента. После ферментации при 37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин в течение 20 часов до отсутствия существенного изменения ОП600 за 1 час. Далее отбирали аликвоту клеток на анализ.

Контроль экспрессии осуществляли с помощью диск-электрофореза аликвот клеток после индукции. Электрофорез клеточных лизатов проводили в 12,5%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в неоднородной (ступенчатой) буферной системе (диск-электрофорез) с использованием на стадии концентрирования образца механизма изотахофореза по Леммли [7].

Очистка гибридных рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8. Очистку гибридных рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 проводили с использованием метода иммобилизованной металлоаффинной хроматографии с использованием сорбента Ni-НТУ сефарозы [6]. Связывание с данным сорбентом происходит за счет 6 остатков гистидина, имеющих на N-конце полученного рекомбинантного белка.

Индукцированные клетки-продуценты лизировали с помощью 5 циклов соникации по 30 с с перерывом в 2 мин на льду. Затем проводили разрушение телец включения путем инкубации с лизирующим буфером в течение часа, содержащим 500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 6 М гуанидин гидрохлорид, 500 мМ хлористый натрий.

Колонка, содержащая Ni-НТУ сефарозу, предварительно уравнивалась буфером для нанесения (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 10 мМ имидазол). Разрушенные тельца включения наносили на колонку. Далее промывали колонку двумя объемами буфера для нанесения. После этого промывали колонку тремя объемами буфера для промывки (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 30 мМ имидазол). Элюировали белок с помощью 5 мл буфера для элюции (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 200 мМ имидазол). Собирали фракции по 1 мл, концентрацию белка в них определяли по методу Бредфорд. Далее материал анализировали с помощью диск-электрофореза по Леммли.

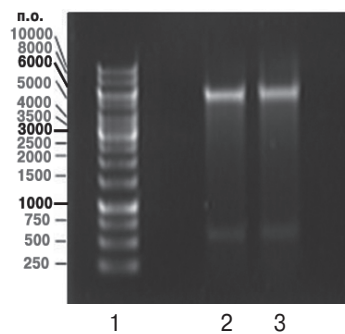


Рисунок 1. Электрофореграмма результатов рестрикции плазмиды pET-28a(+)-vp6vp8 рестриктазами XhoI и NdeI (0,8% агароза)

1 — маркер 1 kb (Fermentas), п.о.; 2, 3 — плазида pET-28a(+)-vp6vp8 после рестрикции.

Результаты

Смоделированы два гибридных белка — VP6VP8 и FliCVP6VP8, содержащих участки вирусных белков VP6 и VP8 в первом случае и дополнительно участки флагеллина FliC — во втором. Анализ аминокислотных последовательностей данных белков (приведены в заявке на изобретение RU2013122473, дата приоритета 15.05.2013) с помощью программы ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) показал, что гибридные белки стабильны и имеют молекулярную массу 19,4 kDa (VP6VP8) и 48,8 kDa (FliCVP6VP8).

Созданы два штамма-продуцента, на основе клеток *E. coli*, трансформированных векторами

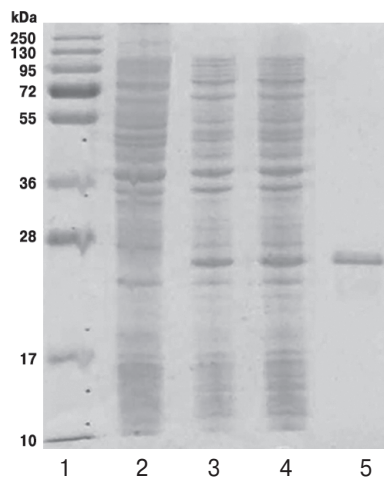


Рисунок 2. Электрофореграмма результатов сравнения индукции экспрессии гена vp6vp8 в штамме-продуценте E. coli BL21(DE3) pET28a(+)-vp6vp8 0,5 мМ ИПТГ и 0,2% лактозой, и очистки белка VP6VP8, 12,5% ПААГ с додецилсульфатом натрия

1 — маркер PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas); 2 — лизат клеток до индукции; 3 — лизат клеток после индукции ИПТГ; 4 — лизат клеток после индукции лактозой; 5 — препарат очищенного белка VP6VP8.

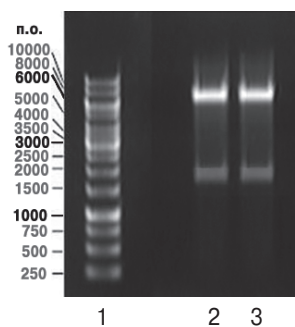


Рисунок 3. Электрофореграмма результатов рестрикции плазмиды pET28a(+)-*flicvr6vr8* рестриктазами *XhoI* и *NdeI*, 0,8% агароза

1 — маркер 1 kb (Fermentas), п.о.; 2, 3 — плазмиды pET28a(+)-*flicvr6vr8* после рестрикции.

pET28a(+)-*vr6vr8* и pET28a(+)-*flicvr6vr8*. С использованием секвенирования и рестрикционного анализа (рис. 1) показано, что векторы несут гены гибридных рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8.

Изучали экспрессию гибридных генов *vr6vr8* и *flicvr6vr8* при индукции 0,1, 0,5 и 1 мМ ИПТГ, а также 0,2% лактозой по Штудиеру. Наблюдали экспрессию гибридного гена *vr6vr8* при всех вариантах индукции, гена *flicvr6vr8* — при индукции 1 мМ ИПТГ и 0,2% лактозой. Подбран оптимальный прокол индукции экспрессии генов, кодирующих гибридные рекомбинантные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8 — метод

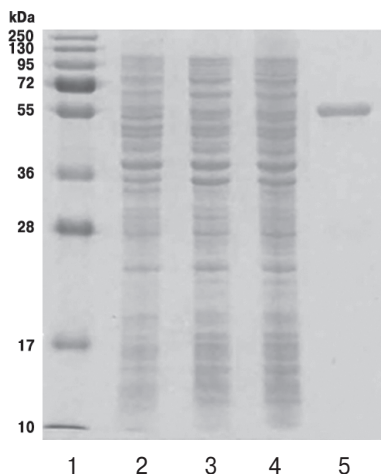


Рисунок 4. Электрофореграмма результатов сравнения индукции экспрессии гена *flicvr6vr8* в штамме — продуценте *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+)*flicvr6vr8* 1 мМ ИПТГ и 0,2% лактозой, и очистки белка FliCVP6VP8, 12,5% ПААГ с додецилсульфатом натрия

1 — маркер PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas); 2 — лизат клеток до индукции; 3 — лизат клеток после индукции ИПТГ; 4 — лизат клеток после индукции лактозой; 5 — препарат очищенного белка FliCVP6VP8.

автоиндукции, благодаря тому, что является оптимальным по выходу белка и затратам на его осуществление (рис. 2, рис. 4).

Получены высокоочищенные гибридные рекомбинантные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8 с использованием металлоаффинной хроматографии с Ni-НТУ сефарозой (рис. 2, рис. 4).

Обсуждение

Профилактика ротавирусной инфекцией является важной задачей для современной медицинской науки. Ротавирусная инфекция обладает высокой вирулентностью и является причиной тяжелого обезвоживания организма у новорожденных и маленьких детей, что в ряде случаев может привести к смерти. Лечение ротавирусной инфекции зачастую сводится к минимизации последствий дегидратации организма, развитие которой в раннем возрасте может быть критическим. В настоящее время в мире для профилактики ротавирусного гастроэнтерита используют две живые вакцины — Rotarix (GSK, Бельгия) и RotaTeq (Merck, США). Rotarix основана на живом аттенуированном штамме ротавируса человека (RV1). В основе вакцины RotaTeq лежит реассортант ротавирусов человека и быка (RV5) [4]. В России лицензирована лишь вакцина RotaTeq. Постлицензионные исследования вакцинации младенцев из группы риска в Европе показали хорошие результаты, однако регистрируются случаи возникновения различных осложнений после введения данных препаратов [3].

Использование вакцин на основе рекомбинантных белков позволяет избежать рисков, связанных с введением вируса в организм, пусть и аттенуированного. Также выбранные участки белков не несут функций природных белков ротавирусов и, соответственно, не вызывают побочных эффектов, характерных для вакцин, полученных с использованием ротавирусов. Вакцинные препараты, получаемые с помощью технологии рекомбинантной ДНК, обладают большей фармацевтической чистотой (не содержат аллергенов в виде яичных белков), чем вирионы, выращенные в куриных эмбрионах, и не содержат консервантов (формальдегид, мертиолят). Технология получения рекомбинантных белков с использованием клеток бактерий позволяет в течение 2–3 дней в ферментерах небольшого объема, занимающих меньшую площадь получить аналогичное или большее количество вакцинных доз по сравнению с культивированием живого вируса.

Целью исследования являлось создание вакцины, которая, наряду с высокой эффективностью, обладала бы относительной безопасностью применения. Для реализации поставленной цели был разработан и создан активный агент кандидатной вакцины против ротавируса А — гибридные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8.

Для получения высокоочищенных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 в больших количествах при малых затратах осуществлен ряд действий. Получены оптимизированные для высокой экспрессии в клетках *E. coli* гены, кодирующие гибридные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8. Созданы векторы pET-28avp6vp8 и pET28a(+)-flicvp6vp8. Созданы штаммы *E. coli* DH10B/RpET-28avp6vp8 и DH10B/RpET28a(+)-flicvp6vp8 для амплификации векторов, несущих гены *vp6vp8* и *flicvp6vp8*. Созданы высокопродуктивные штаммы *E. coli* BL21 (DE3) pET-28avp6vp8 и BL21 (DE3) pET28a(+)-flicvp6vp8 — продуценты рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8.

Подобран протокол индукции экспрессии генов, кодирующих гибридные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8, обеспечивающий высокий выход белка при наименьших затратах — индукция 0,2% лактозой по Штудиеру. Нарботаны и очищены с использованием металлоаффинной хроматографии рекомбинантные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8. В дальнейшем планируется оценить иммуногенные свойства созданных гибридных рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8, что позволит создать и внедрить безопасную вакцину против ротавируса, эффективно действующую при тяжелых формах заболевания.

Russian Journal of Infection and Immunity = *Infektsiya i immunitet*
2014, vol. 4, no. 3, pp. 229–234

ORIGINAL ARTICLES

DEVELOPMENT OF FUSION RECOMBINANT PROTEINS BASED ON VP6 AND VP8 OF HUMAN ROTAVIRUS A

Dukhovlinov I.V., Bogomolova E.G., Fedorova E.A., Simbirtsev A.S.

Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Rotaviruses are the most frequent cause of children enteritis. This infection often leads to severe dehydration of organism. Many infectious diseases are accompanied by fluid loss being the most common cause of death. Nowadays an early vaccination is considered to be the most effective way for prevention of rotavirus infection. However attenuated live vaccines are used for this purpose which can result in different complications. The candidate vaccine presented in this study was designed on the basis of recombinant fusion proteins — the crucial active agents for development of immune response against rotaviruses. As part of the study the following steps were taken: the design of fusion proteins VP6VP8 and FliCVP6VP8; protocol adjustment for induction of genes encoding these proteins expression, which yields in high level of the protein with minor expenditures; production and purification of recombinant proteins VP6VP8 and FliCVP6VP8 with metal affinity chromatography.

Key words: *rotavirus gastroenteritis, vaccine, recombinant fusion proteins.*

Authors:

Dukhovlinov I.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

Bogomolova E.G., Junior Researcher, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

Fedorova E.A., Researcher, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

Simbirtsev A.S. ✉, PhD, MD (Medicine), Director of the Research Institute of Highly Pure Biopreparations.

197110, Russian Federation, St. Petersburg, Pudozhskaya str., 7.

Phone: (812) 235-12-25. E-mail: simbirtsev@hpb-spb.com.

Received 21.04.2014

Revision received 24.04.2014

Accepted 30.06.2014

Список литературы/References

1. Balaram P., Kien P.K., Ismail A. Toll-like receptors and cytokines in immune responses to persistent mycobacterial and Salmonella infections. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2009, vol. 299, no. 3, pp. 177–185.
2. Bishop R.F., Davidson G.P., Holmes I.H., Ruck B.J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2, 1973, pp. 1281–1283.
3. Bruijning-Verhagen P., Mangen J.M.-J., Felderhof M., Hartwig G.N., van Houten M., Winkel L., de Waal J.W., Bonten J.M.M. Targeted rotavirus vaccination of high-risk infants; a low cost and highly cost-effective alternative to universal vaccination. *BMC Medicine*, 2013, vol. 11, p. 112.

4. Dennehy H.P. Rotavirus Vaccines: an overview. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2008, pp. 198–208.
5. Flewett T.H., Bryden A.S., Davies H.A. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, 1973, vol. 302, iss. 7844, p. 1497.
6. Invitrogen. Ni-NTA purification system. User manual. Catalog nos. K950-01, K951-01, K952-01, K953-01, K954-01, R901-01, R901-10, R901-15. Version C. 25-0496, 2006, 32 p.
7. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685.
8. Majumder K. Ligation-free gene synthesis by PCR: synthesis and mutagenesis at multiple loci of a chimeric gene encoding OmpA signal peptide and hirudin. *Gene*, 1992, vol. 110, no. 1, pp. 89–94.
9. Patton J.T. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discovery Med.*, 2012, vol. 13, no. 68, pp. 85–97.
10. Schnagl R.D., Holmes I.H. Characteristics of the genome of human infantile enteritis virus (Rotavirus). *J. Virol.*, 1976, vol. 19, no. 1, pp. 267–270.
11. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.*, 2005, vol. 41, no. 1, pp. 207–234.