

Конструювання і дослідження модельної ДНК-вакцини

Я. О. Похолоenko, Т. Г. Титок, О. М. Сухорада, Т. А. Рубан

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

*Розробка ДНК-вакцин є одним з найперспективніших напрямків у сучасній вакцинології. Проте, незважаючи на швидкі темпи розвитку цього напрямку в прикладному аспекті, недостатньо вивченим залишається широке коло питань щодо базових механізмів індукції імунної відповіді при застосуванні зазначеного методу імунізації. З огляду на це створено модельну ДНК-вакцину, де як ген модельного антигену використано ген β -галактозидази *E. coli*. У результаті експериментів показано, що створена модельна рекомбінантна плазмідна рBG-TR102 здатна індукувати продукцію специфічних до β -галактозидази *E. coli* антитіл у мишей залежно від місця її введення, тобто може бути використана як модельна ДНК-вакцина у подальших дослідженнях.*

Ключові слова: ДНК-вакцина, модельний антиген, імунізація, гуморальна імунна відповідь.

Вступ. Вакцинація є одним з найдієвіших засобів профілактики інфекційних захворювань. Її ефективність підтверджено багаторічним світовим досвідом. Безперечним успіхом цього напрямку профілактичної медицини є викорінення віспи до 1980 року шляхом проведення масових імунізацій. Проте загрозливе поширення таких небезпечних інфекцій, як сухоти, дифтерія та ін., а також виявлення упродовж останніх десятиріч СНІДу та деяких нових інфекційних захворювань поставили перед сучасною медициною нагальну проблему створення нових безпечних та ефективних вакцинних препаратів.

На сьогодні у вакцинології розробляється перспективний напрямок — створення ДНК-вакцин, що базується на принципово новому підході — в організм безпосередньо вводиться не антиген, а плазмідна ДНК, яка його кодує. ДНК-вакцини можуть стати ефективною, безпечною та відносно дешевою альтернативою традиційним вакцинам.

З моменту опублікування роботи [1], у якій було продемонстровано, що ін'єкція плазмідної

ДНК у фізіологічному розчині в квадрицепс миші призводить до поглинання її клітинами та експресії в них репортерного гена, кодованого плазмідною, а також роботи [2], де показано, що ДНК-вакцинація спричиняє генерацію повноцінної імунної відповіді та зумовлює високий рівень захисту мишей від прямого зараження грипом, кількість досліджень у цій галузі лавиноподібно зростає. Сучасна тематична література містить доволі робіт, які підтверджують можливість ефективного застосування ДНК-вакцин для профілактики різноманітних інфекційних захворювань людини і тварин [3, 4]. Проте найціннішою перевагою ДНК-вакцин перед традиційними є можливість їхнього застосування не лише для профілактики, а й для лікування таких захворювань, як хронічний гепатит В [5], СНІД [6], сухоти [7], ревматоїдний артрит [8] і навіть онкологічні захворювання [9, 10]. У вищезазначених дослідженнях в умовах експерименту показано високу протективну або лікувальну ефективність та відсутність побічних ефектів при застосуванні ДНК-вакцин.

Однак, незважаючи на швидкі темпи розвитку даного напрямку в прикладному аспекті, недостатньо вивченим залишається широке коло питань

щодо базових механізмів індукції імунної відповіді при застосуванні згаданого методу імунізації. Саме для їхнього вирішення необхідно створити модель, у якій функції антигену буде виконувати білок з добре вивченими імуногенними властивостями. Цим вимогам цілковито відповідає β -галактозидаза *E. coli*, ген якої і використано в даній роботі.

Отже, метою цієї роботи було створення модельної ДНК-вакцини з геном, що кодує модельний антиген — β -галактозидазу *E. coli*, та проведення дослідження можливості індукції гуморальної імунної відповіді у мишей при імунізації створеною рекомбінантною конструкцією.

Матеріали і методи. У дослідях використано: штам *E. coli* DH10B (F⁺mcgA Δ (mgr-hsdRMS-mcgBC) ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galK γ^- rpsL pupG) («Life Technologies», США), плазмиди *pTR-UF* (С. Золотухін, U. F. Gene Therapy Center Vector Core Lab., США), *pMA766*, *pPolylynk-Kozak*; ендонуклеази рестрикції, T4-ДНК-лігаза фірми «MBI Fermentas» (Литва). ДНК гідролізували згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Переклонування фрагментів ДНК здійснювали відповідно до методик, описаних в [11]. Клітини *E. coli* трансформували плазмідною ДНК з використанням CaCl₂ [11]. У процесі роботи плазмідну ДНК та її рестрикти розділяли гель-електрофорезом в 0,8—1 %-му агарозному гелі. З агарозного гелю ДНК виділяли за стандартною методикою [11]. Плазмідну ДНК для імунізації отримували з клітин *E. coli* (штам DH10B) методом лужного лізису з подальшою депротейнізацією фенолом і хлороформом, як в описано [11].

Трансфекція клітин лінії HEp-2 (епідермоїдна карцинома гортані людини). Культуру HEp-2 отримано з Російської колекції клітинних культур (Санкт-Петербург). Клітини цієї лінії є епітеліоподібними за морфологією. Каріотип її — 2n = 46 з можливими варіаціями в межах 68—77 хромосом [12]. Клітини лінії HEp-2 вирощували на поживному середовищі такого складу: 90 % середовища DMEM («Sigma», США), 10 % ембріональної телячої сироватки («Геном», Україна), 100 од/мл пеніциліну та 100 мг/мл стрептоміцину («Київмедпрепарат», Україна). Для пересіву клітини знімали з поверхні скла чи пластику 0,25 %-м розчином трипсину і 0,02 %-м розчином версену (Інститут поліомієліту і вірусних енцефалітів РАН) у співвідношенні 1:1 та розсівали у співвідношенні 1:3—

1:10. Клітини культивували при температурі 37 °С в атмосфері, яка містила 5 % CO₂.

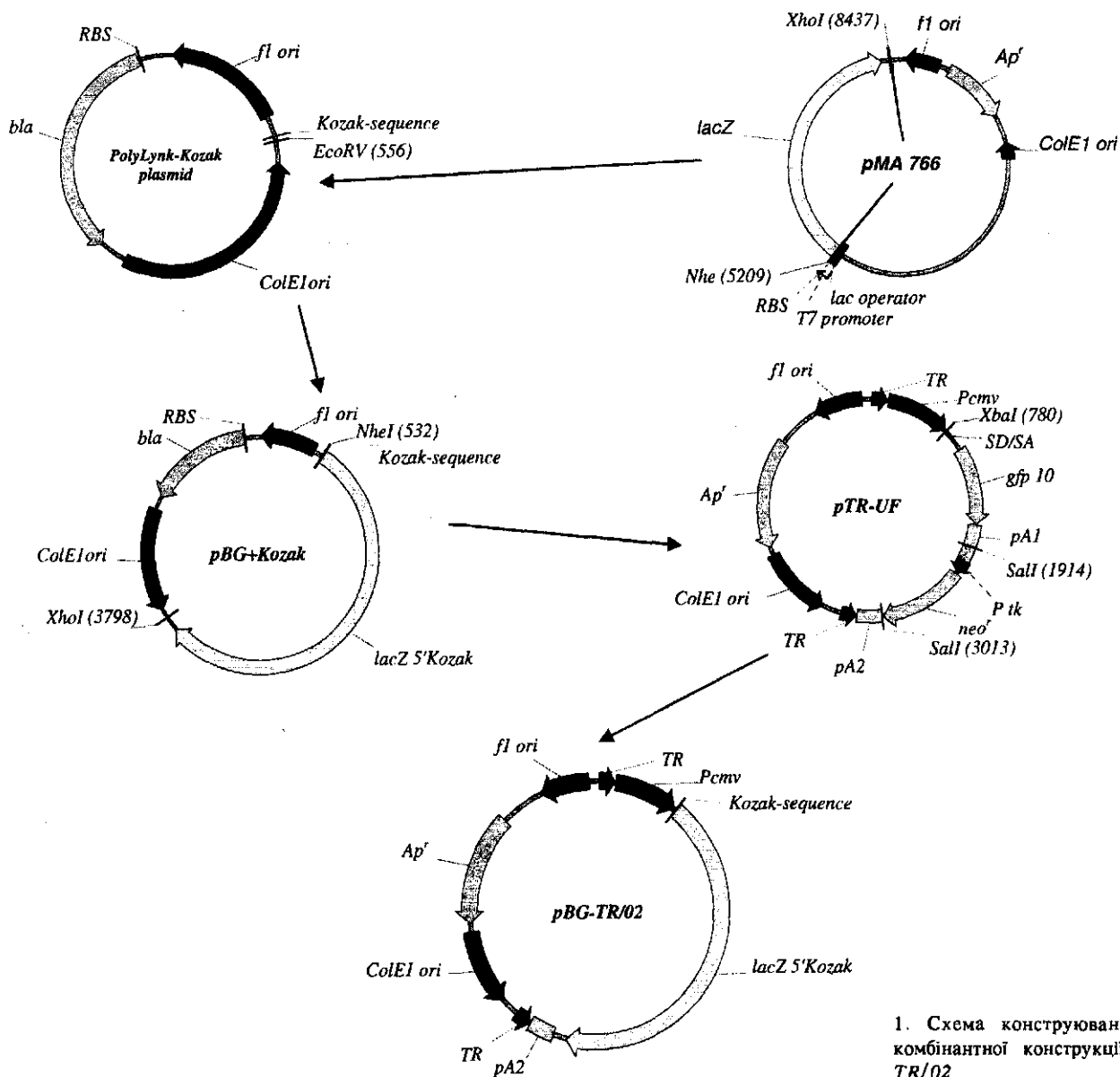
Трансфекцію здійснювали кальцій-фосфатним методом за [11]. Концентрація трансформуючої ДНК становила 10 мкг/мл на 10⁶ клітин. Клітини фіксували 30 %-м розчином ацетону на третю добу після трансфекції. Наявність рекомбінантної β -галактозидази *E. coli* в клітинах визначали за допомогою імунопероксидазного тесту в культурі клітин.

Імуноцитохімічне визначення β -галактозидази *E. coli*. Експресію рекомбінантної β -галактозидази *E. coli* в культурі клітин, трансфікованих плазмідними конструкціями, визначали на третю добу після трансфекції за методикою, описаною в [13], з використанням поліклональної антисироватки, одержаної гіперімунізацією мишей лінії BALB/c β -галактозидазою *E. coli*.

Імунізація. Для імунізації використовували самиць мишей лінії BALB/c (розведення ІМБіГ НАН України) у віці 2—2,5 місяця. Тварин утримували на стандартному раціоні.

Різним групам тварин тричі вводили внутрішньом'язово в квадрицепс чи біцепс з інтервалом у два тижні різні дози плазмідної ДНК, розчиненої в 150 мкл фізіологічного розчину. Через 10 діб після останньої імунізації у тварин брали кров для одержання сироватки ретроорбітальною пункцією. До кожної групи входило по сім тварин, дослід повторювали двічі.

ELISA. Титр IgG у досліджуваних сироватках оцінювали за допомогою методу ELISA. Антиген у кінцевій концентрації 6 мкг/мл в об'ємі 100 мкл сорбували на полістиролових планшетах («Titer-tek», Велика Британія) протягом 18 год. Після цього надлишок антигену відмивали буфером PBS, pH 7,4, що містить 0,05 % твін-20. Сироватки та антимишачий кон'югат з пероксидазою хрому («Sigma») додавали у PBS, pH 7,4, який містив 0,05 % твіну-20 та 0,5 % желатини. Інкубували сироватки з антигеном протягом 60 хв при температурі 37 °С. Тричі відмивали та вносили антимишачий кон'югат з пероксидазою хрому («Sigma») у розведенні 1:4000. Інкубацію здійснювали протягом 90 хв при 37 °С, після чого відмивали ще п'ять разів і додавали розчин ТМВ («Sigma») з перекисом водню та інкубували упродовж 20 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 1N розчину сірчаної кислоти та вимірювали OD₄₉₂. Результати оцінювали з використанням критерію Ст'юдента [14].



1. Схема конструювання рекомбінантної конструкції *pBG-TR/02*

Результати і обговорення. Плазмиду *pBG-TR/02* конструювали за наступною схемою. Спочатку одержували проміжну конструкцію *pBG + Kozak* (рис. 1) за рахунок переклювання *NheI-XhoI* фрагмента *pMA766*, який містить повнорозмірний ген β -галактозидази *E. coli*, у вектор *pPolyLynk-Kozak* за його унікальним сайтом *EcoRV*. Таким чином створено проміжну конструкцію *pBG-Kozak*. Для отримання *pBG-TR/02* вектор *pTR-UF* гідролізували рестриктазами *XbaI* та *Sall*. Паралельно проміжну конструкцію *pBG + Kozak* гідролізували рестриктазами *NheI* і *XhoI* та фрагмент, що містить ген β -галактозидази *E. coli* з послідовністю *Kozak*, використовували для лігування з

отриманим фрагментом вектора *pTR-UF*. Таким способом створено конструкцію *pBG-TR/02* (рис. 1). Вона містить ген β -галактозидази *E. coli*, що регулюється сильним тканинонеспецифічним промотором/ехансером цитомегаловірусу людини [15, 16], і розташований між інвертованими термінальними повторами аденоасоційованого вірусу людини, за наявності яких у ДНК-вакцині, згідно з літературними даними [17, 18], спостерігається значне посилення гуморальної і клітинної імунної відповіді на ДНК-вакцинацію. *pBG-TR/02* буде використано як модельну ДНК-вакцину у подальшій роботі. Проте перед імунізацією тварин нам здалося доцільним перевірити наявність експресії



Рис. 2 Транзиторна експресія плазмиди *pBG-TR/02* у клітинах лінії HEp-2 (імуноцитохімічне визначення β -галактозидази *E. coli* в культурі клітин епідермоїдної карциноми гортані людини) ($\times 280$)

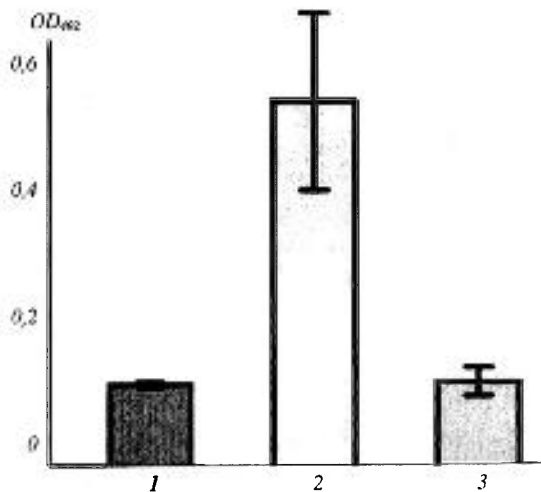


Рис. 3. Результати імуноферментного аналізу сироваток крові мишей після третьої імунізації: 1 — контрольні тварини, яким вводили *pTR-UFneo*; 2, 3 — тварини, імунізовані плазмідною *pBG-TR/02*, яку вводили в біцепс і квадрицепс відповідно. Дані наведені при робочому розведенні сироваток 1:800

цільового антигену в культурі еукаріотних клітин, щоб оцінити функціональність створеної конструкції. Для цього ми використали імуноцитохімічний аналіз як один з найточніших і найчутливіших методів. Щоб запобігти отриманню псевдопозитивного результату внаслідок неспецифічного зв'язування імуноглобулінів нормальної мишачої сиро-

ватки, спочатку виконали окремий дослід, у якому на клітинах лінії HEp-2, трансфікованих плазмідною конструкцією *pBG-TR/02* і *pTR-UF*, а також на інтактних клітинах цієї ж лінії застосовано дану методику з використанням нормальної мишачої сироватки, отриманої від неімунізованих мишей лінії BALB/c у робочому розведенні 1:100, як перших антитіл. У жодному з варіантів не помічено специфічного забарвлення. На базі цих спостережень зроблено висновок про те, що нормальна сироватка мишей даного стоку не дає псевдопозитивних результатів через неспецифічне зв'язування. Після одержання цих результатів виконали ще один дослід. Отримані дані (рис. 2) свідчать про те, що з введеної у клітини плазмідної конструкції *pBG-TR/02* експресується β -галактозидаза *E. coli*.

Для перевірки можливості індукції гуморальної імунної відповіді при вакцинації створеною модельною ДНК-вакциною тварин імунізували за схемою, описаною в розділі «Матеріали і методи». Мишам контрольної групи вводили вихідний вектор *pTR-UFneo*, а дослідним тваринам — створену рекомбінантну конструкцію *pBG-TR/02*. Оскільки в літературі існують повідомлення стосовно того, що ступінь індукції імунної відповіді при імунізації ДНК-вакцинами залежить не лише від способу, а й від місця введення [19], ми обрали для ін'єкцій квадрицепс і біцепс. Наявність антитіл, специфічних до β -галактозидази *E. coli*, визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу через 10 діб після останньої імунізації. Результати проведеного аналізу наведено на рис. 3.

Як наглядно продемонстровано на цьому рисунку, антитіла, специфічні до β -галактозидази *E. coli*, присутні лише у варіанті з введенням модельної ДНК-вакцини в біцепс. В усіх інших випадках індукції гуморальної імунної відповіді не відбувалося. На сьогоднішній день ми не маємо досить даних, щоб пояснити механізм цього феномену. Проте в такому разі правомірно зробити деякі припущення. По-перше, це можна пояснити як низьким відсотком трансфікованих клітин, так і наявністю меншої кількості дренувальних лімфовузлів у зоні квадрицепса. По-друге, необхідно взяти до уваги різницю у розмірах м'язів, у які вводили плазмідну ДНК. Можливо, що підвищення гідростатичного тиску, яке спричиняється введенням вищезгаданого об'єму, також відіграє певну роль в ефективнішій трансфекції міоцитів.

Таким чином, проведені нами дослідження по-

казали, що створена модельна рекомбінантна плазміда pBG-TR/02 здатна індукувати продукцію специфічних до β -галактозидази *E. coli* антитіл у мишей залежно від місця введення і, отже, може бути використана як модельна ДНК-вакцина у подальших дослідженнях.

I. O. Pokhonenko, T. G. Titok, O. M. Sukhorada, T. A. Ruban

Development of model DNA-vaccine

Summary

The development of DNA-vaccines is one of the most perspective directions in modern vaccinology. However, despite rapid progress in their application, a broad range of questions concerning the basic mechanisms of induction of immune response to DNA-vaccination remains unanswered. A model DNA-vaccine, containing the gene of *Escherichia coli* β -galactosidase as the gene of model antigen, has been developed. The data obtained suggest that the created recombinant plasmid pBG-TR/02 is able to induce the humoral immune response to *E. coli* β -galactosidase in mice depending on the place of administration and, therefore, it can be used as the model DNA-vaccine for future research.

Key words: DNA-vaccine, model antigen, immunization, humoral immune response.

Я. А. Похолоенко, Т. Г. Титок, Е. М. Сухорада, Т. А. Рубан

Конструирование и исследование модельной ДНК-вакцины

Резюме

Разработка ДНК-вакцин представляет собой одно из наиболее перспективных направлений в современной вакцинологии. Однако, несмотря на быстрые темпы развития этого направления в прикладном аспекте, остается недостаточно изученным широкий круг вопросов, касающихся базовых механизмов индукции иммунного ответа при использовании упомянутого метода иммунизации. В представленной работе создана модельная ДНК-вакцина, где в качестве гена модельного антигена использован ген β -галактозидазы *Escherichia coli*. В результате экспериментов показано, что сконструированная модельная рекомбинантная плазмида pBG-TR/02 способна индуцировать продукцию специфических к β -галактозидазе *E. coli* антител у мышей в зависимости от места ее введения и может быть использована как модельная ДНК-вакцина в дальнейших исследованиях.

Ключевые слова: ДНК-вакцина, модельный антиген, иммунизация, гуморальный иммунный ответ.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Wolff J. A., Malone R. W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P. L. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo* // *Science*.—1990.—274, N 4949.—P. 1465—1468.
2. Ulmer J. B., Donnelly J. J., Parker S. E., Rhodes G. H., Felgner P. L., Dworki V. J., Gromkowski S. H., Deck R. R., DeWitt C. M., Friedman A. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein // *Science*.—1993.—259, N 5102.—P. 1745—1749.
3. Huygen K. Minireview: On the use of DNA vaccines for the prophylaxis of mycobacterial diseases // *Infection and Immunity*.—2003.—71, N 4.—P. 1613—1621.
4. Кордюм В. А., Похолоенко Я. О. ДНК-вакцины — расширение возможностей // *Вісн. фармакології та фармації*.—2004.—№ 10.—С. 2—9.
5. Mancini M., Hadchouel M., Davis H. L., Whalen R. G., Tiollais P., Michel M. L. DNA-mediated immunization in a transgenic mouse model of the hepatitis B surface antigen chronic carrier state // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1996.—93, N 22.—P. 12496—12501.
6. Calarota S. A., Leandersson A. C., Bratt G., Hinkula J., Klinman D. M., Weinhold K. J., Sandstrom E., Wahren B. Immune responses in asymptomatic HIV-1-infected patients after HIV-DNA immunization followed by highly active antiretroviral treatment // *J. Immunol.*—1999.—163, N 4.—P. 2330—2338.
7. Lowrie D. B., Tascon R. E., Bonato V. L., Lima V. M., Faccioli L. H., Stavropoulos E., Colston M. J., Hewinson R. G., Moelling K. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination // *Nature*.—1999.—400, N 6741.—P. 269—271.
8. Wildbaum G., Youssef S., Karin N. A targeted DNA vaccine augments the natural immune response to self TNF- α and suppresses ongoing adjuvant arthritis // *J. Immunol.*—2000.—165, N 10.—P. 5860—5866.
9. Quaglino E., Rolla S., Iezzi M., Spadaro M., Musiani P., De Giovanni C., Lollini P. L., Lanzardo S., Forni G., Sanges R., Crispi S., De Luca P., Calogero R., Cavallo F. Concordant morphologic and gene expression data show that a vaccine halts HER-2/neu preneoplastic lesions // *J. Clin. Invest.*—2004.—113, N 5.—P. 709—717.
10. Weber L. W., Bowne W. B., Wolchok J. D., Srinivasan R., Qin J., Moroi Y., Clynes R., Song P., Lewis J. J., Houghton A. N. Tumor immunity and autoimmunity induced by immunization with homologous DNA // *J. Clin. Invest.*—1998.—102, N 6.—P. 1258—1264.
11. Sambrook J., Fritsch E. E., Maniatis T. *Molecular cloning*.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.—625 p.
12. *Catalogue Russian cell culture collection (RCCC)*.—St. Petersburg; Omsk, 1999.—204 p.
13. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / Под ред. С. Херрингтона, Дж. МакГи.—М.: Мир, 1999.—558 с.
14. Фишер П. А. Статистические методы для исследователей.—М.: Госстатиздат, 1958.—268 с.
15. Boshart M., Weber F., Jahn G., Dorsch-Hasler K., Fleckenstein B., Schaffner W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus // *Cell*.—1985.—41, N 2.—P. 521—530.
16. Foecking M. K., Hofstetter H. Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors // *Gene*.—1986.—45, N 1.—P. 101—105.
17. Xin K. Q., Ooki T., Jounai N., Mizukami H., Hamajima K., Kojima Y., Ohba K., Toda Y., Hirai S., Klinman D.M., Ozawa K., Okuda K. A DNA vaccine containing inverted terminal repeats from adeno-associated virus increases immunity to HIV // *J. Genet. Med.*—2003.—5, N 5.—P. 438—445.
18. Chikhlikar P., Barros de Arruda L., Agrawal S., Byrne B., Guggino W., August J. T., Marques E. T. Inverted terminal repeat sequences of adeno-associated virus enhance the antibody and CD8+ responses to a HIV-1 p55Gag/LAMP DNA vaccine chimera // *Virology*.—2004.—323, N 2.—P. 220—232.
19. Yokoyama M., Hassett D. E., Zhang J., Whitton J. L. DNA immunization can stimulate florid local inflammation, and the antiviral immunity induced varies depending on injection site // *Vaccine*.—1997.—15, N 5.—P. 553—560.

УДК 577.21

Надійшла до редакції 27.05.04