

О.В. Масалова¹, Е.И. Леснова¹, А.В. Иванов², А.В. Пичугин³, К.Ю. Пермякова¹, О.А. Смирнова²,
В.Л. Туницкая², Т.И. Уланова⁴, А.Н. Бурков⁴, С.Н. Кочетков², Р.И. Атауллаханов³, А.А. Кушч¹

Сравнительный анализ иммунного ответа на ДНК-конструкции, кодирующие неструктурные белки вируса гепатита С

¹ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России, Москва; ²ФГБУ науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; ³ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва;
⁴НПО "Диагностические системы", Нижний Новгород

Перспективный подход к конструированию противовирусных вакцин состоит в активации клеточного звена иммунитета с помощью ДНК-вакцин. Цель работы – изучение эффективности генетической иммунизации мышей ДНК-конструкцией рсNS3-NS5B, одновременно кодирующей 5 неструктурных белков вируса гепатита С (ВГС) – NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B – в сравнении с плазмидами, содержащими гены индивидуальных неструктурных белков NS3, NS4, NS5A и NS5B ВГС. Мышей линии DBA иммунизировали ДНК-конструкциями трехкратно. Гуморальный иммунный ответ оценивали в иммуноферментном анализе (ИФА), клеточный – по количественному анализу уровня пролиферации Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии и в реакции бласттрансформации лимфоцитов, по синтезу и секреции цитокинов ИФН-γ и ИЛ-2 методами ELISpot и ИФА. Установлено, что по большинству изученных параметров иммунный ответ на плазмиду рсNS3-NS5B был выше, чем на плазмиды, кодирующие отдельные белки. Так, достигнут функционально активный Т-клеточный ответ одновременно на антигены, представляющие эпитопы белков NS3, NS4, NS5A и NS5B ВГС разных генотипов. Показан высокий уровень пролиферации CD4⁺-Т-клеток, секреция ИЛ-2 и ИФН-γ, индукция антител изотипа IgG2a к белкам NS3 и NS5B. Полученные результаты свидетельствуют о возможности создания эффективной вакцины против гепатита С на основе ДНК-конструкции рсNS3-NS5B.

Ключевые слова: вирус гепатита С (ВГС), неструктурные белки, ДНК-иммунизация, иммунный ответ

Comparative Analysis of the Immune Response to DNA Constructions Encoding Hepatitis C Virus Nonstructural Proteins

O. V. Masalova¹, E. I. Lesnova¹, A. V. Ivanov², A. V. Pichugin³, K. Yu. Permyakova¹, O. A. Smirnova²,
V. L. Tunitskaya², T. I. Ulanova⁴, A. N. Burkov⁴, S. N. Kochetkov², R. I. Ataulakhanov³, A. A. Kushch¹

¹ Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia;

² Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; ³ Institute of Immunology, Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia; ⁴ RPC Diagnostic Systems, Nizhny Novgorod, Russia

A promising approach to construction of antiviral vaccines consists in activation of cellular immunity with the DNA vaccines. The goal of this work was to evaluate the efficacy of genetic immunization of mice with DNA рсNS3-NS5B encoding five hepatitis C virus (HCV) nonstructural proteins: NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B in comparison with plasmids containing genes of same individual nonstructural proteins. The DNA constructions were injected intramuscularly in DBA mice three times. The humoral immune response was assessed with ELISA; cellular immune response – in blast transformation reaction, by quantitation of CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation using flow cytometry, by intracellular synthesis and secretion of IFN-γ and IL-2 in ELISpot and ELISA. It was found that the functionally active T cell response was achieved to antigens presenting NS3, NS4, NS5A, and NS5B epitopes of different HCV genotypes in response to рсNS3-NS5B plasmid and was stronger than that to plasmids carrying individual genes. A high proliferation rate of CD4⁺ T cells, secretion of IL-2 and IFN-γ, induction of anti-NS3 and anti-NS5B IgG2a were demonstrated. These findings indicate that DNA construction рсNS3-NS5B is one of promising candidates for anti-HCV vaccine developing.

Key words: hepatitis C virus (HCV), nonstructural proteins, DNA immunization, immune response

Вакцина против вируса гепатита С (ВГС) до настоящего времени не создана. Сложность разработки вакцины заключается в гетерогенности ВГС, его высокой мутабельности и интерференции вирусных белков с иммунным ответом хозяина. Исследование больных с разрешившимся гепатитом С и хронизацией инфекции показало, что основным благоприятным фактором является ранний, сильный и мультиспецифический клеточный ответ на белки ВГС [21]. Большинство исследователей признают важность цитотоксических CD8⁺-Т-клеток (ЦТЛ) в контроле

виремии при остром гепатите С. Установлена зависимость этого эффекта от функционально активных Т-хелперных (Th) CD4⁺-клеток, с потерей которых связывают рецидивы виремии [22]. Показано, что ДНК-вакцинация, когда в организм вводятся бактериальные плазмиды со встроенными генами вирусных белков, экспрессирующимися *in vivo*, способна стимулировать ответ Th1-типа с образованием антивирусных ЦТЛ. Особого внимания в качестве компонентов вакцин заслуживают неструктурные белки ВГС, образующие репликативный комплекс, так как

Контактная информация:

Масалова Ольга Владимировна, д-р биол. наук; e-mail: ol.mas@mail.ru

они содержат консервативные иммунодоминантные эпитопы, ассоциированные с выздоровлением [24]. Исследования показали, что в репликации ВГС участвует связанный с мембраной эндоплазматического ретикулума (ЭР) мультисубъединичный комплекс, состоящий из одной молекулы минус-РНК, 2–10 молекул плюс-РНК и нескольких сотен молекул каждого из неструктурных белков вируса, которые функционально и структурно взаимосвязаны [18]. Перестройку мембран ЭР с образованием "мембранных сетей", на которых формируется репликативный комплекс, индуцирует NS4B. Белок NS3 является сериновой протеиназой и хеликазой/АТФ-азой, NS4A-кофактором сериновой протеиназы, NS5B – РНК-зависимой РНК-полимеразой. NS5A представляет собой регулятор многих клеточных процессов и репродукции вируса [16]. К настоящему времени на модели лабораторных животных исследована иммуногенность более 40 разнообразных ДНК-конструкций, кодирующих отдельные белки ВГС [12, 19, 23]. Однако показано, что при использовании генов индивидуальных неструктурных белков их экспрессия наблюдается не в везикулах "мембранных сетей", а в цитозоле (кроме NS4B) [16, 18]. А priori нельзя исключить, что не только локализация в разных компартментах клетки, но и конформация тех же белков в составе репликативного комплекса различаются. Можно предположить, что включение в состав вакцины комплекса всех или большинства неструктурных белков ВГС повысит эффективность иммунного ответа за счет адекватной внутриклеточной экспрессии и процессинга белков с образованием нативной пространственной структуры и более полного представления антигенных эпитопов иммунокомпетентным клеткам.

Цель работы – изучение эффективности генетической иммунизации мышей ДНК-конструкцией, одновременно кодирующей 5 неструктурных белков ВГС – NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B – в сравнении с ДНК-вакцинами, содержащими гены индивидуальных неструктурных белков ВГС.

Материалы и методы

ДНК-конструкции. Для экспрессии в эукариотических клетках на основе вектора pcDNA3.1(+) ("Invitrogen", США) создана плаزمид, кодирующая фрагмент полипротеина NS3-NS5B. В качестве источника NS3-NS5B-кодирующей ДНК использовали плазмиду pFK I389 PI-luc-ubi-neo/NS3-3'/ET, любезно предоставленную проф. R. Bartenschlager (Германия). Данная плаزمид кодирует субгеномный геном ВГС генотипа 1b (изолят Con1, Acc N AJ238799). Клонирование осуществляли в две стадии. На первом этапе при помощи специфических олигонуклеотидов амплифицировали область генома ВГС, соответствующую участку от начала белка NS3 до середины белка NS5A (сайт *EcoRI*), и клонировали ДНК-продукт в вектор pcDNA3.1(+) по сайтам *HindIII* и *EcoRI*. В структуру олигонуклеотида NS3-Fog была введена последовательность Kozak, кодирующая остаток метионина и обеспечивающая эффективную инициацию трансляции. Второй фрагмент генома ВГС, кодирующий оставшуюся часть белка NS5A и белок NS5B, амплифицировали при помощи другой пары олигонуклеотидов и клонировали в плазмиду, полученную в предыдущей стадии, по сайтам *EcoRI* и *XbaI*. Нуклеотидная последовательность полученной плазмиды pcNS3-NS5B была подтверждена флюоресцентным секвенированием.

ДНК-конструкции, кодирующие одиночные неструктурные белки ВГС, в частности полноразмерные неструктурные белки NS3 (pcNS3), NS4A и NS4B (pcNS4), NS5A (pcNS5A) и NS5B (pcNS5B), описаны ранее [2, 3, 5, 14]. Для препаративного выделения и очистки плазмид из культуры бактерий *E. coli* (штамм *XL-1 blue*) использовали щелочной метод [1], для аналитического – набор "Qiagen Inc." (США).

Трансфекция. Для изучения способности плазмиды pcNS3-NS5B экспрессировать гены ВГС в клетках млекопитающих использовали линию клеток гепатокарциномы человека *Huh7*. Культивирование клеток и их трансфекцию с использованием липосомного агента Lipofectamine 2000 ("Invitrogen", США) проводили

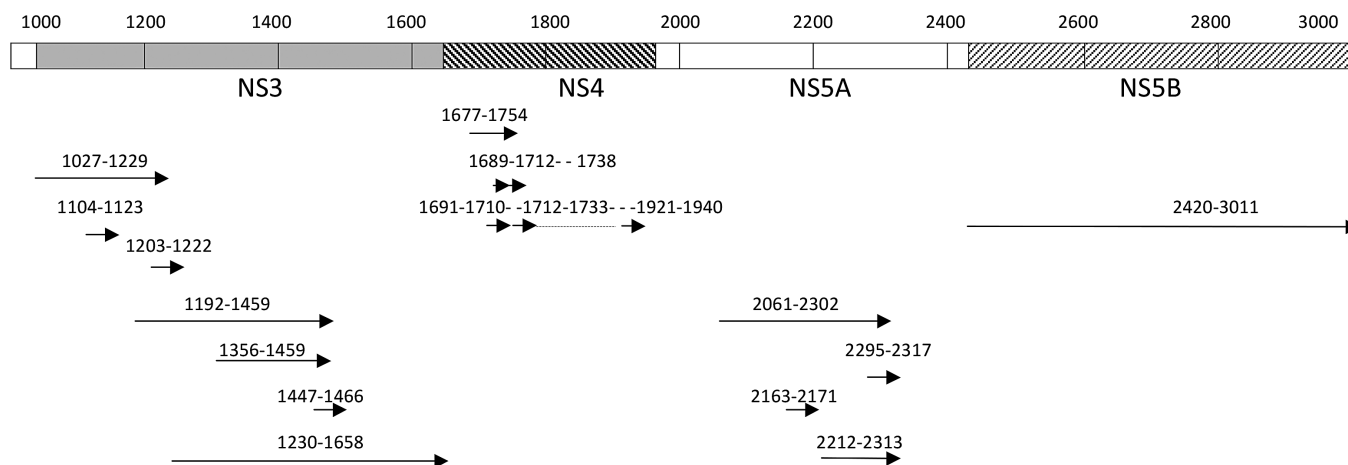


Рис. 1. Схематичное изображение исследованных рекомбинантных белков и пептидов, имитирующих последовательности неструктурных белков ВГС.

Горизонтальная шкала показывает положение аминокислотных остатков (а. о.), соответствующих белкам NS3, NS4, NS5A и NS5B в полипротеине ВГС (1027–3011 а. о.). Стрелками показано положение рекомбинантных белков и пептидов, использованных в данной работе.

в соответствии с указаниями, приведенными в работе [2]. Анализ трансфицированных клонов выполняли с помощью непрямого иммунопероксидазного окрашивания [2] с использованием 8 оригинальных МКА к белкам NS3, NS4A, NS4B и NS5A, полученных и охарактеризованных ранее [7], коммерческих МКА к белку NS5B (sc-58146, "Santa Cruz Biotechnology", США), поликлональной сыворотки, полученной при иммунизации кролика рекомбинантным белком NS5B. Результаты иммуноцитохимического окрашивания оценивали с помощью светового микроскопа Opton (Германия).

Рекомбинантные белки (r) и пептиды (p) ВГС использовали как антигены для стимуляции Т-клеточных реакций *in vitro*, а также как сорбенты в иммуноферментном анализе (ИФА) для оценки продукции антител (рис. 1). Пептиды генотипа 1b из аминокислотной последовательности (а.о.) белков NS3 (позиции 1104–1123, 1203–1222, 1363–1454, 1447–1466 а. о.), NS4 (1689–1712, 1689–1738, 1693–1707, 1921–1940 а. о.) и NS5A (2163–2171, 2295–2317 а. о.) получены из Института биохимической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Используются рекомбинантные белки ВГС: core (1–90 а. о.), NS3 (протеазный домен 1027–1229 а. о., хеликазный домен 1230–1658 а. о., генотип 1b, иммунодоминантные регионы 1192–1459 и 1356–1459 а. о., генотипы 1a и 1b соответственно), NS4 (1677–1754 а. о. и мозаичный белок NS4 mosaic, содержащий участки 1691–1710, 1712–1733, 1921–1940 а. о. из генотипов 1, 2, 3 и 5), NS5A (2061–2302 и 2212–2313 а. о., генотипы 1b и 2a соответственно), NS5B (2420–3011 а. о., генотип 1b). Получение и аффинная очистка белков описаны ранее [5, 8, 13].

Иммунизация мышей. Для иммунизации использовали самок мышей линии DBA/2J (H-2^d) в возрасте 6–8 нед, полученных из Центрального питомника лабораторных животных "Крюково" РАМН. Каждая группа состояла из 8–10 животных. Мышам контрольной группы (группа 1) вводили физиологический раствор трехкратно с 3-недельным интервалом в четырехглавую мышцу бедра задних лап. Очищенные плазмиды pcNS3-NS5B (группа 2), pcNS3 (группа 3), pcNS4 (группа 4), pcNS5A (группа 5) и pcNS5B (группа 6) вводили в те же сроки в дозе 100 мкг/мышь совместно с адьювантом – плазмидой, кодирующей гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор мышей (pcGM-CSF), 100 мкг/мышь. Иммунный ответ оценивали через 9 дней после второй и третьей иммунизаций.

Оценка иммунного ответа. Гуморальный ответ. Активность взаимодействия антител к белкам ВГС в сыворотках крови мышей с антигенами ВГС определяли методом непрямого ИФА. 96-луночные планшеты сенсibilizировали рекомбинантными белками и пептидами в фосфатно-солевом буфере в концентрации 1 и 5 мкг/мл соответственно. В качестве вторичных антител использовали антитела к иммуноглобулинам мыши изотипов IgG1 и IgG2a, конъюгированные с пероксидазой хрена ("Jackson ImmunoResearch Laboratories", США), в качестве субстрата пероксидазы – тетраметилбензидин ("Sigma", США); оптическую плотность измеряли при 450 нм. За титр сывороток в ИФА принимали предельное разведение сыворотки крови, при котором значение оптической плотности

при A_{450} в 2 раза превышало значение для контрольного образца (сыворотка крови неиммунизированных мышей).

Т-клеточный ответ in vitro оценивали в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ), методом проточной цитометрии по количественному учету пролиферации лимфоцитов разных популяций, по секреции цитокинов ИФН- γ и ИЛ-2, а также методом ELISpot. Клетки селезенки от мышей каждой экспериментальной группы объединяли и выделяли фракцию мононуклеарных клеток, как описано в работе [2]. Для стимуляции спленоцитов *in vitro* использовали рекомбинантные белки в конечных концентрациях 0,2 и 1 мкг/мл и пептиды – 2 и 10 мкг/мл (каждая концентрация взята в двух повторах, данные усредняли). Положительным контролем служили культуры спленоцитов, активированные конканавалином А (conA; 5 мкг/мл). В качестве отрицательных контролей использовали: нестимулированные клеточные культуры из селезенки мышей; культуры, стимулированные неспецифическим антигеном – рекомбинантным белком core ВГС; клеточные культуры из селезенки мышей контрольной группы.

РБТЛ выполняли, как описано ранее [2]. Индекс стимуляции пролиферации (ИСП) рассчитывали как отношение среднего количества лимфобластов в ответ на специфические антигены к среднему количеству лимфобластов в лунках с культуральной средой и контрольным антигеном (core ВГС).

Пролиферацию CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток *in vitro* оценивали методом проточной цитометрии по "разведению" внутриклеточного красителя Cell Trace Violet (CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit; "Invitrogen", США) согласно протоколу фирмы-производителя. Клетки инкубировали в концентрации 3 млн в 1 мл в течение 4 сут в присутствии стимуляторов, окрашивали антителами к поверхностным маркерам anti-CD4 PerCP-Cy 5.5 ("BD Biosciences", США) и anti-CD8a Alexa Fluor 700 ("BioLegend", США); процент поделившихся Т-клеток подсчитывали по снижению флуоресценции красителя Cell Trace Violet с помощью проточного цитометра FACS Aria II и программы FACS Diva 6 ("BD Biosciences", США). Результаты выражали как ИСП.

Измерение концентрации цитокинов в культуральных жидкостях, полученных через 2,5 сут после стимуляции лимфоцитов, проводили методом ИФА с помощью наборов для определения ИФН- γ и ИЛ-2 ("Mabtech", Швеция) в соответствии с рекомендациями фирмы. Концентрацию цитокинов определяли по калибровочным кривым стандартных образцов. Предел чувствительности для ИФН- γ составлял 3 пг/мл, для ИЛ-2 – 5 пг/мл.

Определение ИФН- γ - и ИЛ-2-секретирующих клеток методом ELISpot. Количество клеток, секретирующих цитокины, определяли с помощью тест-системы "Dual-Color ELISpot Mouse IFN- γ /IL-2 Kit" ("R&D systems", США). Изолированные спленоциты (~5 · 10⁵ клеток в лунке) инкубировали с иммобилизованными на 96-луночных планшетах антителами к ИФН- γ и ИЛ-2 мыши в присутствии стимуляторов в течение 2,5 сут при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Окрашивание клеток проводили в соответствии с инструкцией. Окрашенные пятна (spots) детектировали визуально с помощью стереоскопического микроскопа

МБС-10 ("ЛОМЗ", Россия). Результаты выражали в количестве пятен на 10⁶ клеток.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента; различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Визуализация белков ВГС в трансфицированных клетках. С помощью МКА подтверждена экспрессия белков NS3, NS4A, NS4B и NS5A в клетках *Huh7* (рис. 2, см. 2-ю полосу обложки). Локализация окраски была цитоплазматической, различались количество окрашенных клеток (от 10 до 80%) и интенсивность окраски при использовании разных МКА. Наиболее активно выявлялись белок NS3 с помощью МКА 5G2, 4H8 и 5B2, белок NS4B – МКА 6B11 и белок NS5A – МКА 1C5. Белок NS5B коммерческими МКА выявить не удалось. Применение поликлональной анти-NS5B-сыворотки кролика было более эффективным, окрашивалось перинуклеарное пространство клеток. Окраска белков ВГС в контрольных образцах (трансфицированные клетки, обработанные МКА к белку core ВГС, и интактные клетки, окрашенные МКА к неструктурным белкам ВГС) отсутствовала. Таким образом, иммуноцитохимическим методом показано, что плазида pcNS3-NS5B функциональна и способна экспрессировать все изученные белки ВГС в клетках млекопитающих.

Гуморальный иммунный ответ. В сыворотках мышей после второй иммунизации специфические антитела не обнаружены. Титры антител с различными антигенами ВГС в ИФА после третьей иммунизации представлены в табл.1. Установлено, что ДНК-вакцины индуцировали антитела исключительно изотипа IgG2a. При сравнении титров антител в группах 2 (pcNS3-NS5B) и 3 (pcNS3) показано, что антитела, взаимодействующие с рекомбинантным белком NS3 1356–1459 а. о. и протяженным пептидом сходного состава NS3 1363–1454 а. о. в титрах 1:800–1:1000,

образовались только в группе 2. Взаимодействие с тремя 20-членными пептидами было незначительным (ИФА-титры 1:20). В группе 3 реактивность антител с исследованными антигенами NS3 была слабой – титры не превышали 1:100. При сравнении групп 2 (pcNS3-NS5B) и 4 (pcNS4) по взаимодействию сывороточных антител с антигенами из состава белка NS4 обнаружена обратная ситуация: более активно реагирующие антитела индуцировало введение мышам pcNS4 по сравнению с pcNS3-NS5B. В группах 2 (pcNS3-NS5B) и 5 (pcNS5A) антитела к белку NS5A индуцировались в одинаково невысоких титрах (1:100), тогда как продукция антител к белку NS5B была высокой (титры в ИФА 1:1000 – 1:3000) в группах 2 (pcNS3-NS5B) и 6 (pcNS5B).

Клеточный иммунный ответ. Результаты РБТЛ показали, что после двух иммунизаций мышам плазмидами, содержащими гены неструктурных белков ВГС, все испытанные антигены ВГС (кроме NS5B) стимулировали *in vitro* образование лимфобластов в группе 2 (pcNS3-NS5B), тогда как в остальных группах – только единичные антигены (табл. 2). Протеазный домен NS3 вызывал активную пролиферацию лимфоцитов в группах 2 и 3, отмечено формирование лимфобластов также в контрольной группе. После третьей иммунизации в группе 2 выявлен пролиферативный ответ на все использованные антигены; количество лимфобластов увеличилось в группах 2 и 3 в ответ на протеазный домен NS3, в группах 2 и 5 – на NS5A 2061–2302 а. о. и, напротив, уменьшилось в группах 2 и 4 в ответ на NS4 1677–1756 а. о. (результаты не представлены).

Методом проточной цитометрии установлено, что клетки селезенки мышей, дважды иммунизированных плазмидами, отвечают пролиферацией на стимуляцию *in vitro* различными антигенами ВГС (см. табл. 2). В частности, пролиферация CD4⁺-Т-клеток мышей группы 2 (pcNS3-NS5B) индуцировалась в ответ на стимуляцию антигенами NS3, NS4, NS5A и NS5B. При этом наиболее активный ответ CD4⁺-Т-клеток вызывали NS3-хеликазный фрагмент 1230–1658 а. о.,

Таблица 1

Индукция антител изотипа IgG2a к белкам ВГС у мышей, иммунизированных ДНК-конструкциями, содержащими неструктурные белки ВГС

Белок ВГС	Антиген для сорбции в ИФА, последовательность а. о., генотип 1b	Группа 1 – контроль	Группа 2 – pcNS3- NS5B	Группа 3 – pcNS3	Группа 4 – pcNS4	Группа 5 – pcNS5A	Группа 6 – pcNS5B
NS3	rNS3_1356–1459	0	1000	100	0	0	0
	pNS3_1363–1454	0	800	0	0	0	0
	pNS3_1104–1123	0	20	50	0	0	0
	pNS3_1203–1222	0	20	0	0	0	0
	pNS3_1447–1466	0	20	0	0	0	0
NS4	rNS4_1677–1756	0	100	0	2500	0	0
	pNS4_1689–1738	0	40	0	100	0	0
	pNS4_1689–1712	0	40	0	20	0	0
	pNS4_1921–1940	0	20	0	20	0	0
NS5A	rNS5A_2212–2313	0	100	0	0	100	0
	pNS5A_2295–2317	0	100	0	0	100	0
NS5B	rNS5B_2420–3011	0	1000	0	0	0	3000

Примечание. Представлены титры антител к соответствующим антигенам в ИФА; r – рекомбинантные белки, p – пептиды; 0 – титр < 1:20.

Проллиферация лимфоцитов мышей, дважды иммунизированных ДНК-конструкциями, индуцированная антигенами *in vitro*

Группа животных	Плазмиды, использованные для иммунизации <i>in vivo</i>	Проллиферация лимфоцитов	Антигены, использованные для реактивации Т-клеток <i>in vitro</i>								
			NS3			NS4		NS5			
			NS3 1192–1459 а. о. (1a)	NS3-протеаза 1027–1229 а. о. (1b)	NS3-хеликаза 1230–1658 а. о. (1b)	NS4 1677–1756 а. о. (1b)	NS4 mosaic (1, 2, 3, 5)	NS5A 2061–2302 а. о. (1b)	NS5A 2212– 2313 а. о. (2a)	NS5B 2420–3011 а. о. (1b)	
1	Контроль (физиологический раствор)	Бласты	0,7 *	8,6	0,4	1,5	0,4	0,7	0,4	0,5	
CD4 ⁺		1,3	6,1	0,6	8,2	4,3	0,8	1,9	4,5		
CD8 ⁺		4,3	6,6	8,2	6,3	7,3	0,8	4,8	6,6		
2	pcNS3- NS5B	Бласты	2,4	80,2	1,8	4,8	3,0	2,1	2,0	0,8	
CD4 ⁺		2,8	10,5	6,8	22,4	5,7	1,7	6,5	11,0		
CD8 ⁺		0,9	3,8	3,3	32,1	6,4	1,7	8,4	4,4		
3	pcNS3	Бласты	1,4	51,4	1,4	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	
CD4 ⁺		3,3	4,0	1,6	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и		
CD8 ⁺		5,8	0,8	1,3	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и		
4	pcNS4	Бласты	н/и	н/и	н/и	3,0	0,7	н/и	н/и	н/и	
CD4 ⁺		н/и	н/и	н/и	15,7	4,6	н/и	н/и	н/и		
CD8 ⁺		н/и	н/и	н/и	45,9	2,1	н/и	н/и	н/и		
5	pcNS5A	Бласты	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	1,0	1,8	н/и	
CD4 ⁺		н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	1,8	1,9	н/и		
CD8 ⁺		н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	2,0	1,0	н/и		
6	pcNS5B	Бласты	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	2,5	
CD4 ⁺		н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	6,5		
CD8 ⁺		н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	10,1		

Примечание. Представлены значения ИСП; выделены значения ИСП, статистически значимо ($p < 0,05$) отличающиеся от значений в контрольной группе; н/и – не исследовали. Проллиферацию лимфоцитов, индуцированную антигенами *in vitro*, оценивали по количеству лимфоцитов в БТЛ (бласты) и проценту CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток методом проточной цитометрии.

NS4 1677–1756 а. о. и NS5A 2212–2313 а. о. Клетки селезенки мышей в группах 3, 4 и 5, иммунизированных плазмидами pcNS3, pcNS4 или pcNS5A соответственно, реагировали пролиферацией CD4⁺-Т-клеток в ответ на стимуляцию антигеном, ген которого был использован для иммунизации, но с меньшей интенсивностью по сравнению с ответом на те же антигены в группе 2 (см. табл. 2). В группе 6 (pcNS5B) пролиферация CD4⁺-Т-клеток в ответ на стимуляцию белком NS5B не выявлена.

Спленциты мышей группы 2, иммунизированных плазмидой pcNS3-NS5B, реагировали пролиферацией CD8⁺-Т-клеток при реактивации *in vitro* антигенами NS4 1677–1756 а. о. и двумя антигенами из области белка NS5A (см. табл. 2). CD8⁺-Т-клетки мышей, иммунизированных плазмидой pcNS3, не показали достоверную пролиферативную реакцию на стимуляцию антигенами NS3. Иммунизация мышей плазмидами pcNS4, pcNS5A и pcNS5B вызывала накопление в селезенке CD8⁺-Т-клеток, пролиферирующих в ответ на стимуляцию *in vitro* соответственно антигенами NS4, NS5A и NS5B. Наиболее интенсивная пролиферация CD8⁺-Т-клеток была зарегистрирована после иммунизации плазмидой pcNS4 и стимуляции *in vitro* антигеном NS4 1677–1756 а. о.

Изучение уровня цитокинов, вырабатываемых спленцитами дважды иммунизированных мышей в ответ на стимуляцию антигенами ВГС *in vitro*, показало, что секрецию ИЛ-2 вызывали только 4 из 8 использованных антигенов: протеазный домен NS3 в группах 2 и

3 (15–20 пг/мл), NS3 1192–1459 а. о. – в группе 2 (7 пг/мл), NS5A 2061–2302 а. о. в группах 2 и 5 (9 пг/мл) и NS5B 2420–3011 а. о. в группе 6 (11 пг/мл). Секретция ИФН- γ не обнаружена.

После третьей иммунизации мышей секреция ИЛ-2 получена в ответ на 9 из 10 использованных антигенов, из них на 7 (3 из состава NS5A, 2 – из NS3, 1 – из NS4, 1 – из NS5B, концентрация 9–20 пг/мл) – только у мышей группы 2 (pcNS3-NS5B) (рис. 3, а). Эквивалентные количества ИЛ-2 (30–40 пг/мл) секретировались в группах 2 и 3 (pcNS3) при стимуляции протеазным доменом NS3. На пептид из последовательности белка NS4A 1693–1707 а. о. ИЛ-2 вырабатывался только у мышей группы 4 (pcNS4).

Девять из 10 стимуляторов вызывали секрецию ИФН- γ (рис. 3, б). В ответ на 2 антигена из состава NS3, на 1 – из NS5A и на 1 – из NS5B этот цитокин вырабатывался в сходных количествах (до 5 пг/мл) спленцитами мышей, иммунизированных плазмидами pcNS3-NS5B и pcNS3, pcNS5A и pcNS5B соответственно. Незначительные количества ИФН- γ (около 3 пг/мл) вырабатывались при стимуляции клеток антигенами NS4, причем только в группе 4, вакцинированной pcNS4. Наибольшая концентрация ИФН- γ (более 30 пг/мл) отмечена в группе 2 при стимуляции спленцитов протеазным доменом NS3.

При анализе результатов ELISpot установлено (рис. 4), что все антигены стимулировали нако-

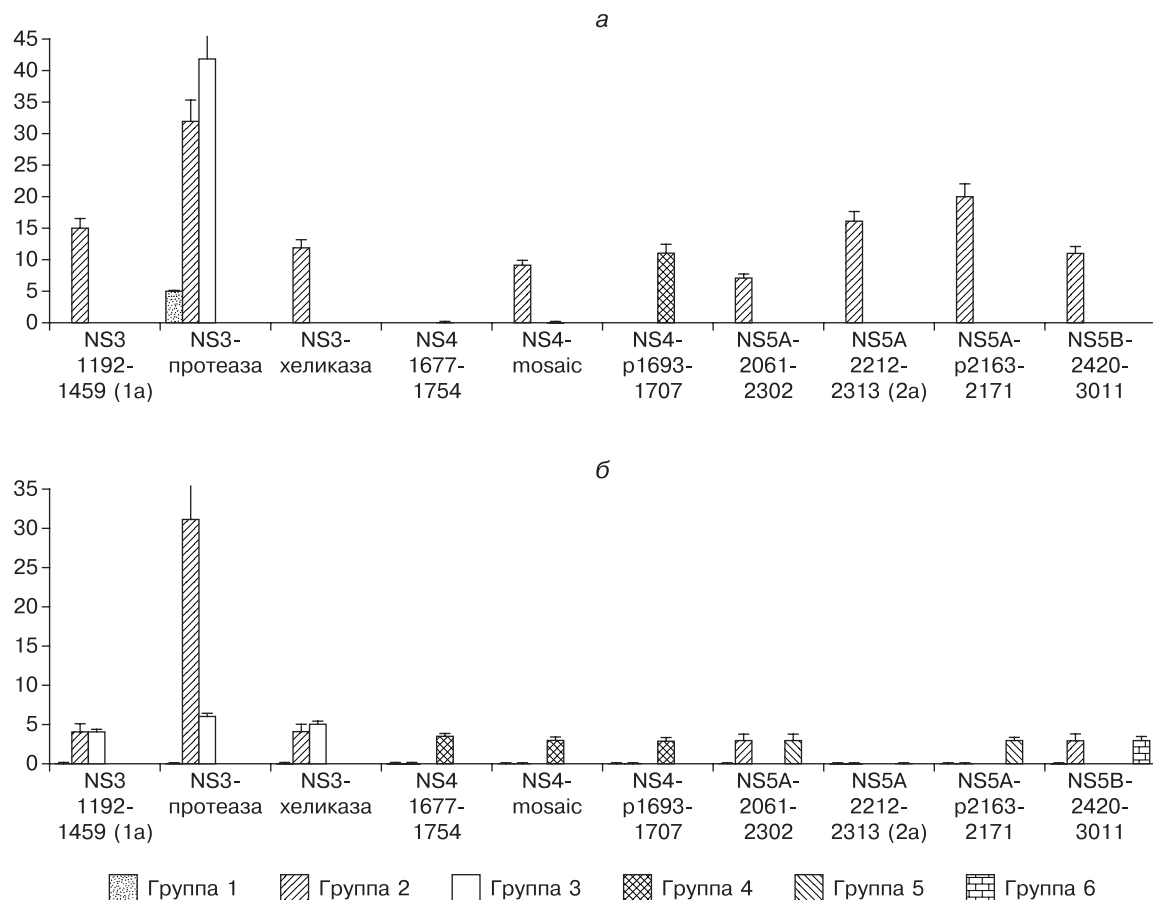


Рис. 3. Секретия цитокинов ИЛ-2 (а) и ИФН-γ (б) спленцитами мышей, иммунизированных ДНК-конструкциями. По оси абсцисс – антигены ВГС для стимуляции клеток *in vitro*; по оси ординат – концентрация цитокинов в культуральной среде, пг/мл.

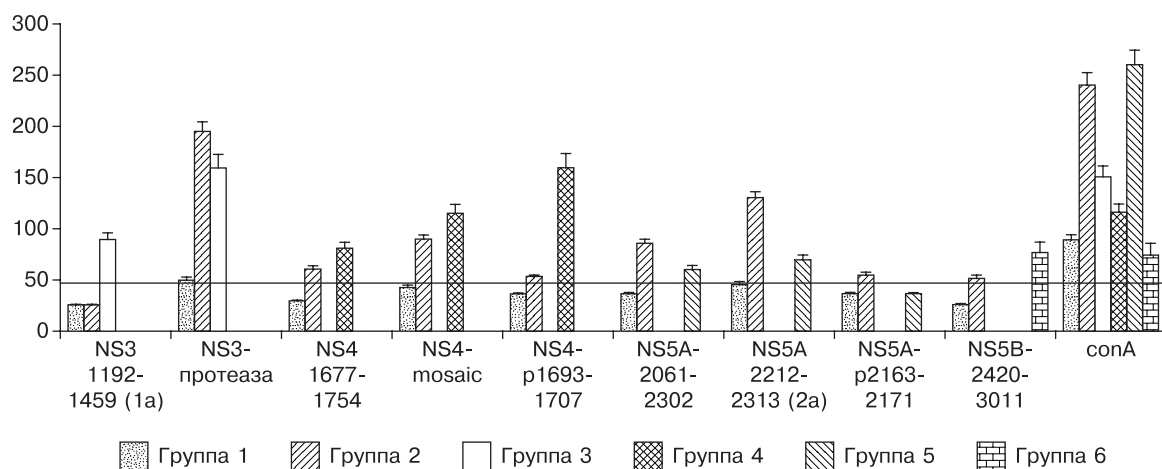


Рис. 4. Формирование ИФН-γ-секретирующих клеток в культуре спленцитов мышей, иммунизированных ДНК-конструкциями. По оси абсцисс – антигены для стимуляции клеток *in vitro*; по оси ординат – количество «спотов» на 10^6 клеток. Горизонтальная линия показывает фоновый уровень реакции ELISpot.

пление ИФН-γ-секретирующих лимфоцитов у иммунизированных мышей, за исключением рекомбинантного белка NS3 1192–1459 а. о. в группе 2 и пептида NS5A 2163–2171 а. о. в группе 4. Количество клеток значительно различалось. Наблюдалось более интенсивное образование ИФН-γ-секретирующих клеток в группе 2 по сравнению с группой 5 в ответ на все использованные антигены NS5A, а также по сравне-

нию с группой 3 в ответ на протеазный домен NS3 ($p < 0,05$). Напротив, число ИФН-γ-секретирующих лимфоцитов в группе 2 было меньше при стимуляции клеток антигенами NS4 (группа 4) и NS5B (группа 6). Наиболее активная стимуляция, сравнимая с действием conA, получена в ответ на следующие антигены: протеазный домен NS3, пептид NS4 1693–1707 а. о., NS4 mosaic и NS5A 2212–2313 а. о. Что касается

ИЛ-2-секретирующих клеток, то они были выявлены только в 3 случаях: в группах 2 и 3 в ответ на протеазный домен NS3 (5 и 25 клеток соответственно) и в группе 4 в ответ на рекомбинантный белок NS4 1677–1754 а. о. (5 клеток).

Обсуждение

Основной предпосылкой для проведения данной работы явилось предположение о большей эффективности ДНК-иммунизации конструкцией, кодирующей неструктурные белки NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B в одной открытой рамке считывания. Эта плазида содержит полный набор генов белков ВГС, необходимых для образования репликативного комплекса на мембранах ЭР. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток гепатокарциномы человека, трансфицированных плазмидой рсNS3-NS5B, подтвердило экспрессию белков ВГС. Обнаружены значительные различия в количестве клеток, окрашенных антителами разной эпитопной специфичности. Это может объясняться различной экспонированностью антигенных детерминант на поверхности белков. При трансфекции клеток плазмидой рсNS3-NS5B белок NS3 обнаружен только в цитоплазме, тогда как при трансфекции плазмидой рсNS3 – в цитоплазме и ядре [3]. Подобную локализацию белка NS3 в зависимости от коэкспрессии с NS4A отмечали и ранее [16, 18]. МКА, наиболее эффективно выявляющие белки ВГС в трансфицированных плазмидой рсNS3-NS5B клетках (NS3-5B2, NS4-6B11, NS5A-1C5), активно реагировали с белками ВГС также в клетках печени больных гепатитом С [4]. Полученные результаты показали, что синтезируемые в комплексе белки имеют адекватный фолдинг, способствующий экспрессии иммуногенных детерминант, в том числе конформационно-зависимых.

Гены NS3-NS5B ВГС в составе различных рекомбинантных бактериальных и вирусных экспрессионных векторов ранее успешно апробировались для индукции клеточного ответа [9, 10, 17]. Однако сравнение иммунного ответа на эти конструкции и на конструкции, кодирующие отдельные белки, не проводилось. Кроме того, гуморальный ответ не исследовали. В настоящей работе В- и Т-клеточный иммунный ответ мышей на ДНК-вакцины оценивали по комплексу параметров. Показано, что вводимые гены индуцировали антитела изотипа IgG2a, но не IgG1. Этот результат указывает на активацию Th1 звена иммунного ответа, который важен для элиминации вируса. В группе 2 антитела в титрах 1:100 – 1:1000 вырабатывались на все белки ВГС, гены которых кодирует плазида рсNS3-NS5B. При этом протяженная плазида индуцировала антитела к белку NS3 в большем количестве, к NS4 – в меньшем, к NS5A и NS5B – в том же количестве, что и соответствующие "короткие" плазмиды. Полученные данные согласуются с наблюдением, свидетельствующим о том, что включение гена NS4A в состав ДНК-вакцин значительно повышает экспрессию и иммуногенность NS3 [19]. Примечательно, что при естественном инфекционном процессе индукцию антител к NS3 связывают с благоприятным прогнозом, тогда как к NS4 – с тяжелым течением гепатита С [6].

Клеточный ответ характеризовали по пролиферации лимфоцитов и их функциональной активности – секреции и внутриклеточному содержанию цитокинов. Результаты РБТЛ свидетельствуют о специфическом

ответе на антигены ВГС во всех группах иммунизированных мышей, при этом интенсивность ответа на белки NS3, NS4 и NS5A после второй иммунизации была выше в группе 2, чем в группах 3, 4 и 5 соответственно. ИСП в целом совпадали с ранее полученными данными при исследовании ДНК-вакцин NS3 и NS5A [2, 3, 15]. Количественный анализ пролиферации лимфоцитов с помощью проточной цитометрии позволил уточнить популяционный состав клеток, делящихся при стимуляции антигенами ВГС. Оказалось, что в группе 2 (рсNS3-NS5B) уровень пролиферации CD4⁺-Т-клеток был статистически значимо выше, чем в группах 3 (рсNS3), 4 (рсNS4), 5 (рсNS5A) и 6 (рсNS5B). Этот результат очень важен, так как показано, что пролиферация функционально активных CD4⁺-Т-клеток является определяющим фактором в выздоровлении после острого гепатита С [21]. Проллиферацию CD8⁺-Т-клеток, активируемых CD4⁺-Th1-клетками, наиболее значимо стимулировали антигены из области белков NS4 и NS5A в группах 2, 4 и 5.

Активированные Т-клетки CD4⁺ и CD8⁺ способны синтезировать провоспалительные цитокины, такие, как ИФН- γ , ИЛ-2, ФНО α и др., необходимые для элиминации вируса. Секреция цитокинов достоверно увеличивалась после третьей иммунизации мышей плазмидами. Примечательно, что ИЛ-2 секретиروали преимущественно лимфоциты мышей группы 2. ИЛ-2 играет ключевую роль в индукции эффекторных и регуляторных Т-клеток. Показано, что экзогенный ИЛ-2, добавленный в культуру лимфоцитов больных хроническим гепатитом С, восстанавливает способность CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток к пролиферации и синтезу ИФН- γ [11]. Потеря способности Т-клетками секретировать ИЛ-2 может вести к нарушению ИФН- γ -секреторной и пролиферативной функций *in vivo* [20]. Секреция ИФН- γ в концентрации 3–5 пг/мл обнаружена при стимуляции спленоцитов разными антигенами ВГС, однако значительно большее количество цитокина (> 30 пг/мл) вырабатывалось в ответ на протеазный домен NS3 только в группе 2. Результаты ELISpot и ИФА по синтезу и секреции ИФН- γ достаточно хорошо совпадали и дополняли друг друга, тогда как ИЛ-2-секретирующие клетки выявлены в небольшом количестве (≤ 25) всего в трех группах (2, 3 и 4). Возможно, это связано с разной динамикой синтеза этих цитокинов или с недостаточной чувствительностью ELISpot для определения ИЛ-2. Для большинства антигенов интенсивность пролиферации Т-клеток и выработка цитокинов коррелировали. Эти антигены представлены разными регионами ВГС: протеазным доменом NS3 1027–1229 а. о., с которым в ряде случаев связывают клиренс гепатита С [22, 24], рекомбинантным белком, имитирующим иммунодоминантный участок белка NS5A 2061–2302 а. о. Однако прямая зависимость между пролиферацией и продукцией цитокинов не выявлена. Например, синтез и секреция цитокинов лимфоцитами мышей в ответ на антиген NS4 1677–1756 а. о. были слабыми, несмотря на активную пролиферативную реакцию Т-клеток. Возможно, это связано с недостаточным количеством функционально активных лимфоцитов, праймированных данным регионом ВГС. Немаловажно, что часть антигенов NS3, NS4 и NS5A, содержащих последовательности не-1b-генотипов, стимулировали клеточный ответ преимущественно в группе

2. При сравнении эффективности плазмид необходимо учитывать, что мыши группы 2 в итоге получили меньшее количество ДНК каждого гена по сравнению с группами 3–6, так как всем мышам вводили одинаковое количество плазмид – по 100 мкг.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что по большинству изученных параметров иммунный ответ на плазмиду, содержащую комбинацию генов 5 неструктурных белков ВГС, был выше, чем на плазмиды, кодирующие отдельные белки. Так, показан высокий уровень пролиферации CD4⁺-Т-клеток в ответ на антигены NS3, NS4, NS5A и NS5B, а также секреция ИЛ-2 и ИФН- γ , индукция антител изотипа IgG2a к белкам NS3 и NS5B. Достигнутый функционально активный Т-клеточный ответ одновременно на множество эпитопов, в том числе на антигены разных генотипов, позволяет характеризовать ДНК-конструкцию рсNS3-NS5B как перспективную основу для создания вакцины.

Авторы выражают благодарность д-ру R. Bartsch (Германия) за предоставление плазмиды рFK I389 PI-luc-ubi-neo/NS3-3'/ET и Л. Н. Шингаровой (Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) – плазмиды рсGM-CSF. Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-01594).

ЛИТЕРАТУРА

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир; 1984.
2. Масалова О.В., Леснова Е.И., Грабовецкий В.В. и др. ДНК-иммунизация плазмидой, содержащей ген белка NS5A вируса гепатита С, индуцирует эффективный клеточный иммунный ответ. Молекулярная биология. 2010; 44 (2): 275–83.
3. Масалова О.В., Леснова Е.И., Шингарова Л.Н. и др. Комбинированное применение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей белка NS3 вируса гепатита С, гена гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и блокатора регуляторных Т-клеток индуцирует эффективный иммунный ответ против вируса гепатита С. Молекулярная биология. 2012; 46 (3): 525–34.
4. Масалова О.В., Речкина Е.А., Шкурко Т.В. и др. Белки вируса гепатита С в клетках печени при остром гепатите С: связь с повреждением печени и исходом заболевания. Вопросы вирусологии. 2005; 50 (4): 18–23.
5. Муковия А.В., Туницкая В.Л., Хандажинская А.Л. и др. Хеликаза/NTРаза вируса гепатита С. Эффективная система экспрессии и новые ингибиторы. Биохимия. 2008; 73: 822–32.
6. Попонин Д.М., Горовиц Э.С., Бондаренко А.Л. Зависимость титров IgG, специфичных к различным белкам вируса гепатита С, от особенностей течения хронической инфекции. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011; 6: 57–61.
7. Речкина Е.А., Денисова Г.Ф., Масалова О.В. и др. Картирование антигенных детерминант белков вируса гепатита С при помощи технологии фагового дисплея. Молекулярная биология. 2006; 40 (2): 357–68.
8. Уланова Т.И., Пузырев В.Ф., Бурков А.Н., Обрядина А.П. Влияние гетерогенности аминокислотной последовательности на иммунореактивность комплекса антигенных эпитопов, локализованного в пределах 1192-1456 аминокислот белка NS3 вируса гепатита С. Вопросы вирусологии. 2006; 51 (1): 28–30.
9. Barnes E., Folgori A., Capone S. et al. Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. Sci. Transl. Med. 2012; 4: 1–11.
10. Capone S., Zampaglione I., Vitelli A. et al. Modulation of the immune response induced by gene electrotransfer of a hepatitis C virus DNA vaccine in nonhuman primates. J. Immunol. 2006; 177 (10): 7462–71.
11. Folgori A., Spada E., Pezzanera M. et al. Early impairment of hepatitis C virus specific T cell proliferation during acute infection leads to failure of viral clearance. Gut. 2006; 55 (7): 1012–9.
12. Halliday J., Kleenerman P., Barnes E. Vaccination for hepatitis C virus: closing in on an evasive target. Expert Rev. Vaccines. 2011; 10 (5): 659–72.
13. Ivanov A.V., Korovina A.N., Tunitskaya V.L., Kostyuk D.A., Rechinsky V.O., Kukhanova M.K., Kochetkov S.N. Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus nonstructural NS5B and NS5A proteins. Protein Expr. Purif. 2006; 48: 14–23.
14. Ivanov A.V., Smirnova O.A., Ivanova O.N. et al. Hepatitis C virus proteins activate NRF2/ARE pathway by distinct ROS-dependent and independent mechanisms in HUH7 cells. PLoS ONE. 2011; 6 (9): e24957.
15. Masalova O.V., Lesnova E.I., Pichugin A.V. et al. The successful immune response against hepatitis C nonstructural protein 5A (NS5A) requires heterologous DNA/protein immunization. Vaccine. 2010; 28 (8): 1987–96.
16. Moradpour D., Penin F., Rice C.M. Replication of hepatitis C virus. Nat. Rev. Microbiol. 2007; 5: 453–63.
17. Pancholi P., Perkus M., Tricoche N. et al. DNA immunization with hepatitis C virus (HCV) polycistronic genes or immunization by HCV DNA priming-recombinant canarypox virus boosting induces immune responses and protection from recombinant HCV-vaccinia virus infection in HLA-A2.1-transgenic mice. J. Virol. 2003; 77: 382–90.
18. Quinkert D., Bartenschlager R., Lohmann V. Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. J. Virol. 2005; 79 (21): 13594–605.
19. Sallberg M., Frelin L., Weiland O. DNA vaccine therapy for chronic hepatitis C virus (HCV) infection: immune control of a moving target. Expert Opin. Biol. Ther. 2009; 9 (7): 805–15.
20. Semmo N., Day C.L., Ward S.M. et al. Preferential loss of IL-2-secreting CD4⁺ T helper cells in chronic HCV infection. Hepatology. 2005; 41 (5): 1019–28.
21. Smyk-Pearson S., Tester I.A., Klarquist J. et al. Spontaneous recovery in acute human hepatitis C virus infection: functional T-cell thresholds and relative importance of CD4 help. J. Virol. 2008; 82 (4): 1827–37.
22. Thimme R., Neumann-Haefelin C., Boettler T., Blum H. Adaptive immune responses to hepatitis C virus: from viral immunobiology to a vaccine. J. Biol. Chem. 2008; 283 (5): 457–67.
23. Torresi J., Johnson D., Wedemeyer H. Progress in the development of preventive and therapeutic vaccines for hepatitis C virus. J. Hepatol. 2011; 54 (6): 1273–85.
24. Yerly D., Heckerman D., Allen T. et al. Increased cytotoxic T-lymphocyte epitope variant cross-recognition and functional avidity are associated with hepatitis C virus clearance. J. Virol. 2008; 82 (6): 3147–53.

Поступила 07.09.12