

УДК 578.245

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛИКОПРОТЕИНА CD2V ВИРУСА АЧС, СЛИТОГО С Fc-ФРАГМЕНТОМ СВИНОГО IG G ИЗОТИПА 1

*Е.И. Каторкина, аспирант,
89056124100, elena.fadeeva.1990@inbox.ru*

*К.А. Мима, кандидат биологических наук,
89157730702, tita89@yandex.ru*

*С.А. Каторкин, кандидат биологических наук,
89607370847, katorkin2012@mail.ru*

*С.Ж. Цыбанов, доктор биологических наук, профессор,
89036471919, cybanov@mail.ru*

*А.С. Малоголовкин, кандидат биологических наук,
89055442285, talogolovkin@inbox.ru*

**ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и
микробиологии»**

Ключевые слова: вирус АЧС, гликопротеин CD2v, Fc-фрагмент, свиной иммуноглобулин G 1 изотипа, пролиферация, индукция интерферона гамма.

Работа посвящена функциональной характеристике гликопротеина CD2v вируса АЧС, слитого с Fc-фрагментом свиного иммуноглобулина G 1-го изотипа. Слияние белка CD2v вируса АЧС с константным регионом IgG 1-го изотипа позволило получить активные рекомбинантные химерные гликопротеины CD2v-Fc и Fc-CD2v, которые являются нетоксичными для свиней РВМС, обладают Fc-опосредованной активностью и индуцируют синтез интерферона гамма.

Введению. Африканская чума свиней (АЧС)- контагиозная болезнь домашних свиней, в том числе декоративных и диких кабанов.

Вирус АЧС - единственный представитель семейства *Asfarviridae* и уникальный ДНК - арбовирус, передающийся членистоногими, мягкими клещами рода *Ornithodoros*.

Геном вируса АЧС представлен двуцепочечной линейной молекулой ДНК, содержащей 170-190 тыс. п.н. в зависимости от штамма. В геноме вируса закодировано более 100 белков. Некоторые белки вируса АЧС влияют на разные сигнальные пути проявления гуморального и клеточного иммунитета и обеспечивают уклонение от защитных систем организма. Этим объясняется отсутствие эффективного иммунного ответа хозяина на инфицирование вирусом АЧС [1].

Из всех известных белков вируса АЧС гликопротеин CD2v (EP402R), расположенный на поверхности вирусной частицы, наиболее вариабелен и обуславливает гемадсорбирующие свойства вируса. Белок CD2v, не полиморфный поверхностный гликопротеин, присутствующий на поверхности Т-лимфоцитов и естественных клеток-киллеров, играет важную роль в усилении активации Т-клеток и природных клеток-киллеров. Структурное и функциональное сходство CD2v вируса с клеточным белком CD2m, вовлеченным в клеточную адгезию и опосредованную Т-клетками иммунную реакцию, позволяет предположить возможную роль этого белка в тканевом тропизме и/или уклонении от иммунной системы свиней [2].

Один из современных подходов в создании эффективных вакцин, приводящих к индукции клеточного иммунитета, был реализован при получении химерного белка, состоящего из Fc-домена агонистических моноклональных антител CD40 (mAb) с ингибиторным Fc γ -рецептором Fc γ RIIB [3]. Технология Fc-слияния была успешно применена для борьбы со многими инфекционными болезнями вирусной и бактериальной этиологии [4].

Таким образом, основываясь на результаты полученных данных применения технологии Fc-слияния вирусных антигенов для создания кандидатов вакцин, выглядит перспективным для антигенов вируса АЧС, в частности, вирусного антигена CD2v.

Материалы и методы исследований. В работе использовали сыворотки крови от домашних свиней, зараженных вирусом АЧС 8 серотипа и сыворотки крови от клинически здоровых домашних свиней; антивидовой конъюгат к IgG1 свиньи - goat-anti-swine IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, США).

Выделение лимфоцитов из крови доноров проводили центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина (A. Boyum, 1974).

Анализ пролиферации свиных клеток PBMC выполняли в соответствии с инструкцией к набору «XTT Cell Proliferation Kit II» (Panreac кат. № A8088.1000).

Тест на индукцию интерферона- γ мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) проводили с помощью набора «Porcine IFN-gamma ELISpot, Kit» (R&D Systems, кат. №. EL985) согласно инструкции производителя.

Результаты исследований и их обсуждение. Нами были получены две рекомбинатные химерные молекулы CD2v-Fc и Fc-CD2v, которые состояли из 2 частей:

- CD2v- гемадсорбирующий гликопротеин вируса АЧС
- Fc IgG- кристаллообразующий домен свиного иммуноглобулина G 1 изотипа.

Аутентичность составных частей химерных белков CD2v-Fc и Fc-CD2v была подтверждена с помощью иммуноблота с использованием антивидового конъюгата с гипериммунной сывороткой против вируса АЧС (8 серотипа).

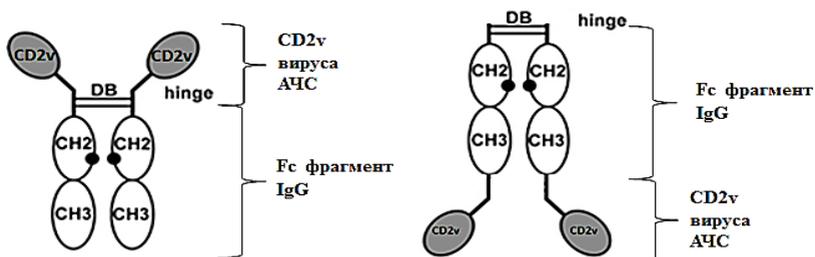


Рисунок 1. Схематическое представление вариантов химерного гликопротеина CD2v, слитого с Fc-фрагментом свиного иммуноглобулина G.

Анализ пролиферации клеток РВМС

Нами был проведен анализ способности рекомбинантных белков влиять на пролиферацию клеток РВМС (моноклеарные клетки периферической крови). Данный анализ пролиферации клеток широко используется в клеточных тестах для изучения факторов роста, цитокинов, а также применяется при скрининге цитотоксических агентов и активации лимфоцитов.

Тест на пролиферацию клеток проводили с помощью набора «ХТТ Cell Proliferation Kit II» (Panreas кат. № А8088.1000). Субстрат ХТТ (2, 3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолиум-5-карбоканилид) был использован вместо МТТ так, как давал большую чувствительность и имел более высокий динамический диапазон.

В качестве объектов исследования использовали свиные моноклеарные клетки периферической крови (РВМС), полученные от здоровых свиней белой породы в возрасте 6 месяцев. Полученные данные обрабатывали с использованием программного пакета GraphPad Prism 6.0.

Нами были получены данные о пролиферации и жизнеспособности клеток РВМС в течение 48 часов стимуляции рекомбинантными белками CD2v-Fc и Fc-CD2v. Коэффициент детерминации в эксперименте был не ниже 90%, что подтверждает достоверность полученных данных. Для препарата CD2v-Fc минимальное значение оптической плотности составило - 1,142, максимальное - 2,033. Для препарата Fc-CD2v минимальное значение оптической плотности составило - 1,213, максимальное - 1,971. Полуэквивалентная эффективная концентрация (EC50) для препарата CD2v-Fc составила 4,06 нМ, а для Fc-CD2v - 1,129 нМ.

Проведенный эксперимент показал, что при инкубации выделенной фракции РВМС от здоровых свиней с препаратами CD2v-Fc и Fc-CD2v в течение 48 часов происходит пролиферация Т-лимфоцитов.

По результатам проведенного анализа можно утверждать, что полученные рекомбинантные препараты вируса АЧС CD2v-Fc и Fc-CD2v не являются токсичными и обладают пролиферирующими свойствами по отношению к мононуклеарным клеткам периферической крови.

Связывание с рекомбинантными *FcγRI* и *FcRn* рецепторами свиньи

Связывание химерных молекул CD2v-Fc и Fc-CD2v со свиным *FcγRI* и *FcRn*- рецепторами проводили методом ИФА.

Так, EC50 связывания с *FcγR1* для препарата CD2v-Fc составила 15,9 нг/мл, для Fc-CD2v- 15,2 нг/мл. Если оценивать данное взаимодействие в молярном количестве, то EC50 для CD2v-Fc равно 106,7 нМоль, а Fc-CD2v- 101,3 нМоль.

EC50 связывания с *FcRn* для препарата CD2v-Fc составила 11,5 нг/мл, для Fc-CD2v - 12,1 нг/мл. Если оценивать данное взаимодействие в молярном количестве, то EC50 для CD2v-Fc равно 81 нМоль, а Fc-CD2v -84 нМоль.

Результаты связывания в формате ИФА позволяют сделать вывод, что химерные молекулы CD2v-Fc и Fc-CD2v связываются с клеточными рецепторами *FcγR1* и *FcγRn*. Значения EC50 для каждой химерной молекулы имеет константу связывания в наномолярном диапазоне, что говорит об высокоаффинном взаимодействии.

Тест на индукцию интерферона- γ мононуклеарными клетками периферической крови

Способность рекомбинантных молекул CD2v-Fc и Fc-CD2v индуцировать CTL ответ был исследован с помощью набора «Porcine IFN-gamma ELISpot, Kit» (R&D Systems, кат. №. EL985) путем определения числа лимфоцитов, продуцирующих интерферон - гамма. Химерные

белки CD2v-Fc и Fc-CD2v были использованы в качестве специфических антигенов.

По результатам анализа способности рекомбинантных молекул CD2v-Fc и Fc-CD2v вызывать индукцию интерферона- γ мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) можно отметить, что обе молекулы вызывают CTL ответ. Кроме того, показано, что количество лимфоцитов, продуцирующих интерферон - гамма прямо зависит от количества вносимого рекомбинантного антигена- CD2v-Fc или Fc-CD2v, и имеет дозозависимый эффект (рис. 2).

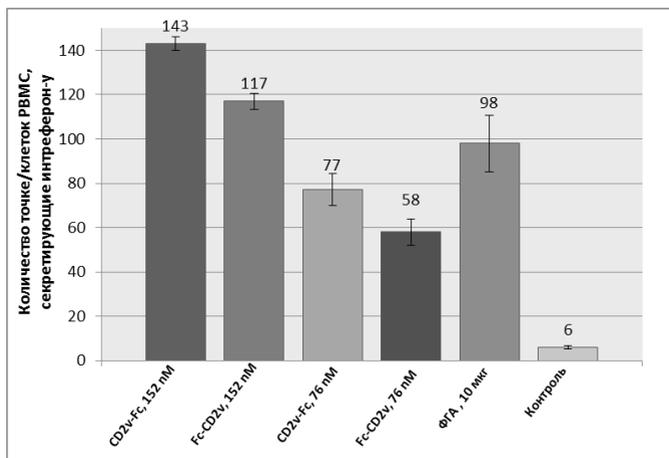


Рисунок 2. Результаты анализа выброса интерферона-гамма клетками PBMC ($1,5 \cdot 10^4$ /лунку), стимулированные молекулами CD2v-Fc и Fc-CD2v

Заключение. Анализ пролиферации клеток PBMC показал, что при инкубации выделенной фракции клеток от здоровых свиней с препаратами CD2v-Fc и Fc-CD2v в течение 48 часов происходит пролиферация Т-лимфоцитов. Данный факт говорит о том, что полученные химерные молекулы не являются токсичными.

Анализ связывания в формате ИФА показал, что молекулы CD2v-Fc и Fc-CD2v связываются с рекомбинантными клеточными рецепторами Fc γ R1 и FcRn с наномолярным аффинитетом.

Рекомбинантные молекулы CD2v-Fc и Fc-CD2v показали, что способны вызывать индукцию интерферона- γ мононуклеарными клетками РВМС и вызывать CTL (Cytotoxic T lymphocytes, цитоксический Т клеточный) ответ. Кроме того, достоверно показано, что количество лимфоцитов, продуцирующих интерферон- γ напрямую коррелирует от количества вносимого рекомбинантного антигена - CD2v-Fc или Fc-CD2v, и имеет дозозависимый эффект.

Библиографический список:

1. Vercammen E., Staal J., Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. Clin. Microbiol. Rev. 21 (1)2008: 13–25. doi:10.1128/CMR.00022-07.
2. Rowlands R.J. [и др.]. The CD2v protein enhances African swine fever virus replication in the tick vector, *Ornithodoros erraticus* // Virology. 2009. № 2 (393). С. 319–328.
3. Li F., Ravetch J.V. Inhibitory Fc γ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. Science. 2011 Aug 19;333(6045):1030-4. doi: 10.1126/science.1206954.
4. Levin D. [и др.]. Fc fusion as a platform technology: potential for modulating immunogenicity // Trends in Biotechnology. 2015. № 1 (33). С. 27–34.

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF ASFV CD2V GLYCOPROTEIN FUSED WITH THE PORCIN IGG1 FC-FRAGMENT

E. I. Katorkina, K. A. Mima, S.A. Katorkin, S. Zh. Tsybanov, A. S. Malogolovkin

Key words: ASF virus, CD2v glycoprotein, Fc fragment, pork immunoglobulin G 1 isotype, proliferation, interferon gamma induction.

The work is devoted to the functional characteristics of ASF virus CD2v glycoprotein fused to Fc fragment of porcine immunoglobulin G 1 isotype. Fusion of ASF virus CD2v protein with IgG constant region of 1st isotype made it possible to obtain active recombinant chimeric glycoproteins CD2v-Fc and Fc-CD2v, which are non-toxic for porcine PBMCs, has Fc-mediated activity and induce gamma interferon synthesis.