

Получение рекомбинантного слитого белка OprF-aTox *Pseudomonas aeruginosa*, обладающего защитными свойствами

А. В. Солдатенкова, Н. А. Михайлова, Е. М. Зими́на, Е. И. Леонова, А. А. Калошин

Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

Поступила 03.03.2016. Принята к публикации 22.04.2016.

Получен рекомбинантный слитый белок OprF-aTox, который содержал последовательности белка F наружной мембраны (OprF) и дефектной формы экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa*. Этот рекомбинантный белок был синтезирован в клетках *Escherichia coli* и очищен с помощью никель-сефарозы. Показано, что слитый рекомбинантный белок OprF-aTox при иммунизации обладал защитными свойствами от инфекции, вызываемой вирулентной токсигенной культурой *Pseudomonas aeruginosa* штамма PA-103.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*; белок F наружной мембраны; экзотоксин A; анатоксин; слитый рекомбинантный белок OprF-aTox; иммунизация.

Библиографическое описание: Солдатенкова АВ, Михайлова НА, Зими́на ЕМ, Леонова ЕИ, Калошин АА. Получение рекомбинантного слитого белка OPRF-ATOX *Pseudomonas aeruginosa*, обладающего защитными свойствами. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (2): 96–100.

Среди внутрибольничных гнойно-септических инфекций синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) стабильно занимает второе-третье место. Распространение данная инфекция получила из-за высокой неприхотливости микроорганизма к условиям внешней среды, а так же чрезвычайно высокой резистентности к большинству применяемых в клиниках антибиотиков и химиотерапевтических средств [1–3]. Кроме того, этот патоген является причиной серьезных патологий у больных муковисцидозом, генетическим заболеванием, сопровождающимся увеличением и сгущением секрета, что рано или поздно приводит к колонизации легких *P. aeruginosa*, с образованием биопленки [3, 4].

Нами рассматривается создание вакцинного антисинегнойного препарата на основе рекомбинантных белков, полученных в клетках *Escherichia coli*. Ранее был получен продуцент высокоиммуногенного порообразующего белка F наружной мембраны (OprF), который является консервативным для всех иммунотипов синегнойной палочки. Показано, что рекомбинантный белок OprF в результате иммунизации способствовал повышению выживаемости мышей, экспериментально зараженных нетоксигенным штаммом *P. aeruginosa* PA-170015 [5]. Так же, был получен и исследован рекомбинантный анатоксин (нетоксичный вариант экзотоксина A без 106 C-концевых аминокислотных остатков) [6]. Экзотоксин A, ингибирующий синтез белков в эукариотических клетках, является одним из основных факторов поражения *P. aeruginosa*, играя важную роль в разрушении тканей организма хозяина [7].

Целью настоящих исследований явилось слияние генов, кодирующих OprF и анатоксин, с получением рекомбинантного белка, способного вызывать иммунные реакции против мажорного поверхностного белка и экзотоксина A *P. aeruginosa*. Для достижения данной цели были поставлены и выполнены следующие задачи: встраивание генов, кодирующих OprF и анатоксин, в один плазмидный вектор для экспрессии в клетках *E. coli*; получение рекомбинантного белка; изучение специфичности и защитных свойств рекомбинантного белка.

Материалы и методы

С целью создания конструкций для экспрессии генов слитых белков использована плаزمид (pET28-atox), предназначенная для синтеза рекомбинантного анатоксина [6]. В эту конструкцию встраивали последовательность гена *oprF* в двух вариантах, который амплифицировали с помощью ПЦР. В качестве матрицы использовали конструкцию для синтеза рекомбинантного белка OprF (pQE30-oprF) [5]. При амплификации первого варианта, праймеры имели на 5'-концах дополнительный сайт рестрикции *XhoI* (5'-GAT CTC GAG TAT GAA ACT GAA GAA CAC CTT AG и 5'-CAT CTC GAG CTT GGC TTC AGC TTC TAC), а при втором – использовали праймеры с сайтами рестрикции *HindIII* (5'-GAT AAG CTT ATG AAA CTG AAG AAC ACC TTA G и 5'-CAT AAG CTT TTA CTT GGC TTC AGC TTC TAC). Первый амплификат встраивали в плазмиду pET28-aTox по сайту *XhoI*, второй – по сайту рестрикции *HindIII*. Продукты лигирования использовали для трансформации клеток *E. coli* штамма BL21 (DE3). Клоны отбирали с помощью рестриктивного анализа и секвенирования. Секвенирование осуществляли при помощи прибора ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer («Applied Biosystems»).

Синтез рекомбинантных белков индуцировали с помощью изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (ИПТГ), а очистку осуществляли методом аффинной хроматографии с использованием никель-сефарозы («Amersham») в 8 М буферном растворе мочевины, в соответствии с предварительными исследованиями [5]. Препараты рекомбинантных белков переводили в нативное состояние в результате диализа против физиологического раствора. Определенные концентрации белков проводили в спектрофотометре Genesys 6 («Thermoscientific») при длине волны 280 нм. Белковые продукты анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле по методу Лэммли. В иммуноблоттинге использовали сыворотки крови кроликов, иммунизированных рекомбинантным белком OprF и рекомбинантным анатоксином.

Для иммунизации рекомбинантные белки сорбировали на гидроксиде алюминия из расчета 1 мг Al(OH)₃ на

1 мг белка. Сорбцию проводили в течение 12 часов при температуре 4°C. Препараты вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл мышам, массой 16–18 г (филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА).

При индукции экспериментальной инфекции животных заражали внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл живой вирулентной культурой *P. aeruginosa* штамма PA-103, после чего в течение семи суток проводили учет погибших и выживших животных. ЛД₅₀, вычисляли по формуле Кербера в модификации Ашмарина-Воробьева:

$$ЛД_{50} = 10^{(lgA - lg2 \cdot (B_1/C_1 + B_2/C_2 + B_3/C_3 + B_4/C_4 + B_5/C_5 - 0,5))};$$

где *A* — максимальная инфекционная доза в опыте, *B* — количество животных, павших в группе, *C* — первоначальное количество животных в группе.

Высококислородный штамм PA-103 был любезно предоставлен для музея лаборатории протективных антигенов НИИВС имени И. И. Мечникова доктором Liu (США) [8].

Все работы с животными проводили в соответствии с положениями «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Результаты и обсуждение

Ранее нами получена плазмидная конструкция для синтеза в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3) дефектной формы экзотоксина A *P. aeruginosa*. У рекомбинантного белка отсутствовали 106 С-концевых аминокислотных остатков, что привело к нарушению домена, отвечающего за цитотоксическую функцию [6]. Этот делеционный вариант гена *toxA*, кодирующий рекомбинантный анатоксин, в конструкции pET28-atox был расположен между сайтами рестрикции *Hind*III и *Xho*I (рис. 1А). Встраивание последовательности гена *oprF* осуществляли в двух вариантах.

В первом случае, ген *oprF* встраивали со стороны 3'-конца гена анатоксина, т.е. по сайту рестрикции *Xho*I. В результате получена конструкция pET28-atox-oprF, предназначенная для синтеза рекомбинантного слитого белка аТох-ОprF (рис. 1Б). Прямой праймер для амплификации данного варианта после сайта рестрикции содержал дополнительный нуклеотид (Т), который был необходим для восстановления открытой рамки считывания слитого гена.

Во втором случае, встраивание осуществлялось со стороны 5'-конца гена анатоксина, т.е. по сайту рестрикции *Hind*III, в результате чего была получена конструкция pET28-oprF-atox, предназначенная для синтеза реком-

бинантного слитого белка OprF-aTox (рис. 1В). В последовательности обратного праймера для ПЦР этого варианта гена *oprF* отсутствовал терминаторный кодон (ТАА).

После проведения экспрессии отобранных конструкций выявлено, что синтез слитого рекомбинантного белка в существенных количествах происходил только с использованием конструкции pET28-oprF-atox. Размер рекомби-

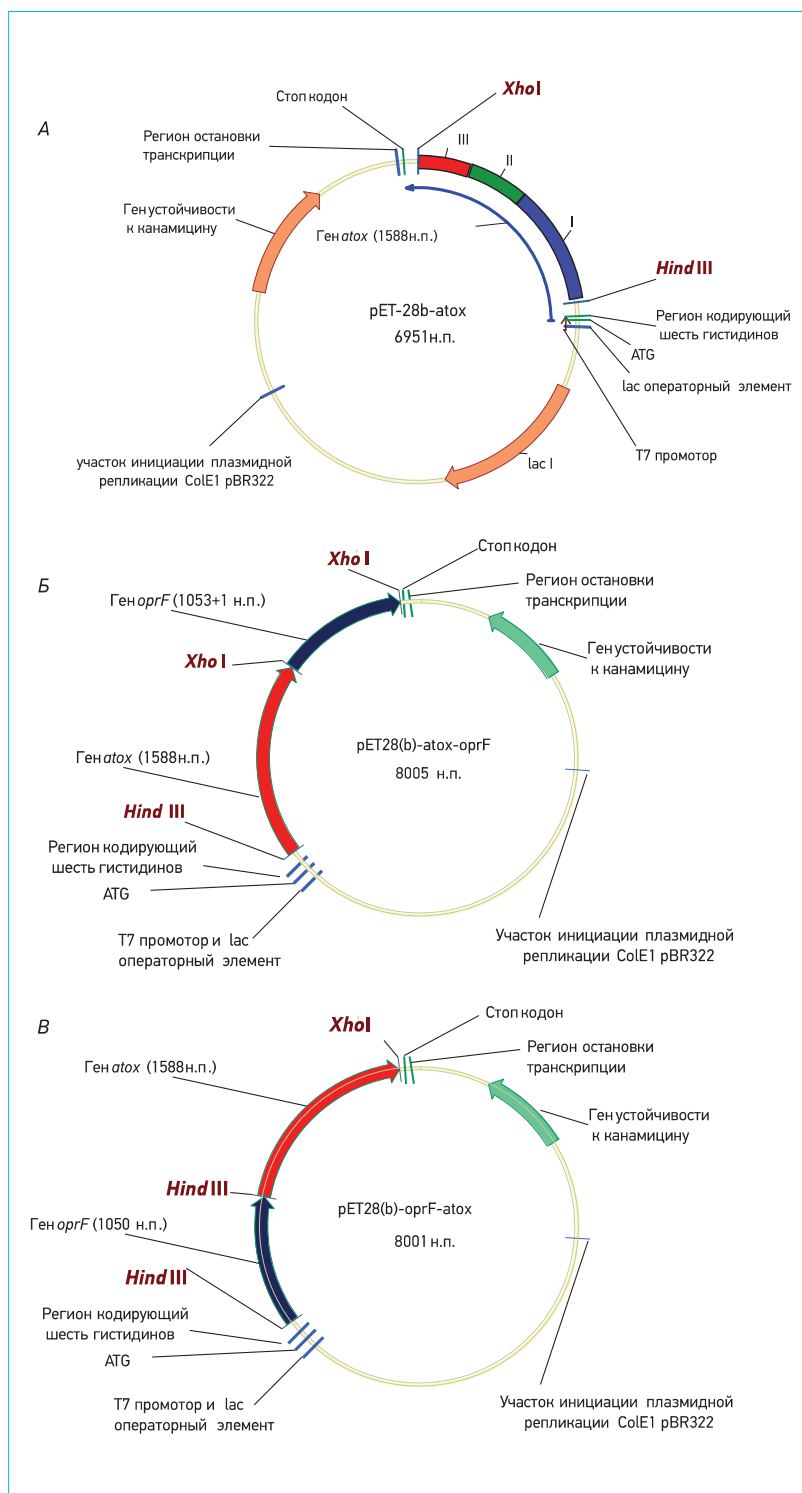


Рис. 1. Схема создания генно-инженерных конструкций для синтеза рекомбинантных слитых (гибридных) белков аТох-ОprF и OprF-aTox. А — pET28-atox; Б — pET28-atox-oprF; В — pET28-oprF-atox.

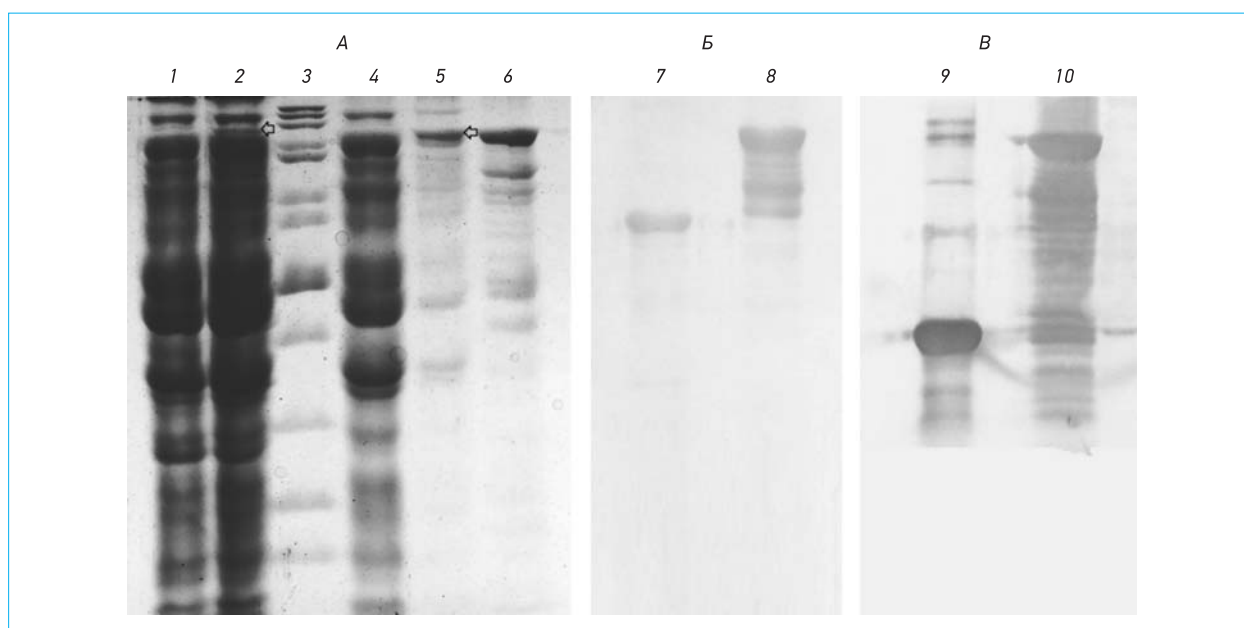


Рис. 2. Анализ белковых продуктов, полученных в результате экспрессии конструкций pET28-atox-oprF и pET28-oprF-atox в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3). А — полиакриламидный гель, окрашенный Кумасси R-250; Б — нитроцеллюлозная мембрана после иммуноблоттинга с сывороткой к рекомбинантному анатоксину; В — нитроцеллюлозная мембрана после иммуноблоттинга с сывороткой к рекомбинантному OprF. 1 — белки, полученные в результате выращивания клеток трансформированных pET28-atox-oprF без экспрессии (без добавления ИПТГ); 2 — продукты, полученные при выращивании клеток трансформированных pET28-atox-oprF с экспрессией; 3 — весовой белковый маркер Fermentas-SM0661 (размеры фрагментов: 200, 150, 120, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 и 15 кДа); 4 — белки штамма-продуцента OprF-аТох, полученные при выращивании без экспрессии; 5 — белки штамма-продуцента OprF-аТох при выращивании с экспрессией; 6, 8 и 10 — очищенный рекомбинантный белок OprF-аТох; 7 — очищенный рекомбинантный белок аТох; 9 — очищенный рекомбинантный белок OprF. Стрелками отмечены рекомбинантные продукты.

нантного продукта составлял около 100 кДа (рис. 2А), что совпадало с расчетной (105 кДа). Очищенный рекомбинантный белок OprF-аТох в иммуноблоттинге специфично реагировал с сыворотками, иммунными как к рекомбинантному OprF, так и к анатоксину (рис. 2Б).

На следующем этапе рекомбинантный слитый белок OprF-аТох оценили по способности защищать мышей от экспериментальной инфекции токсигенным штаммом *P. aeruginosa*. Ранее при исследовании протективных свойств рекомбинантного белка OprF использовали куль-

Таблица 1. Защитные свойства рекомбинантных белков от экспериментальной инфекции *P. aeruginosa*

Вводимые препараты в дозе	Доза заражения (млн. м.к.)	Количество мышей павших/выживших	ЛД ₅₀ (млн. м.к.)	ИЭ*
Контроль (интактные мыши)	100	9/1	30,9	—
	50	7/3		
	25	4/6		
	12,5	2/8		
	6,25	0/10		
OprF, 25 мкг	200	8/2	66,1	2,1
	100	6/4		
	50	4/6		
	25	2/8		
	12,5	1/9		
аТох, 50 мкг	200	9/1	61,7	2,0
	100	7/3		
	50	3/7		
	25	2/8		
	12,5	1/9		
OprF-аТох, 25 мкг	200	10/0	43,7	1,4
	100	7/3		
	50	5/5		
	25	3/7		
	12,5	2/8		
OprF-аТох, 50 мкг	200	8/2	107,2	3,5
	100	3/7		
	50	2/8		
	25	1/9		
	12,5	0/10		
OprF-аТох, 100 мкг	200	8/2	93,3	3,0
	100	4/6		
	50	2/8		
	25	1/9		
	12,5	1/9		

* ИЭ — индекс эффективности.

туру *P. aeruginosa* штамма, который характеризуется отсутствием синтеза экзотоксина А. В то же время, для оценки рекомбинантного анатоксина использовали рекомбинантный функциональный экзотоксин А. Для исследования препарата, состоящего из мембранного и экзотоксинового компонентов, был взят штамм с основными факторами патогенности.

Исследование проводилось в сравнении с отдельным введением рекомбинантных OprF и анатоксина. OprF вводили в дозе 25 мкг, а анатоксин в дозе 50 мкг на мышь при однократном введении. Данные дозы были подобраны для двукратной иммунизации в предыдущих исследованиях. Слитый белок OprF-aTox вводили в дозах: 25, 50 и 100 мкг (при однократном введении). Контрольная группа включала мышей той же партии, которым вводили физиологический раствор. Животных иммунизировали двукратно, с двухнедельным интервалом. Экспериментальное заражение осуществляли через две недели после курса иммунизаций. Мышам контрольной группы вводили 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 млн. микробных клеток (млн. м.к.) культуры *P. aeruginosa*. ЛД₅₀ для этой группы животных составила 30,9 млн. м.к. При инфицировании мышей, иммунизированных рекомбинантными белками, использовали следующие дозы: 12,5; 25; 50; 100 и 200 млн. м.к. культуры *P. aeruginosa*. Показано, что рекомбинантные OprF и анатоксин способны защищать иммунизированных мышей от *P. aeruginosa* штамма PA-103 с индексами эффективности (отношение ЛД₅₀ для иммунизированных мышей к ЛД₅₀ в контрольной группе) 2,1 и 2,0. ЛД₅₀ для этих групп были 66,1 и 61,7 млн. м.к., соответственно для OprF и анатоксина. В случае слитого белка OprF-aTox установлены следующие значения ЛД₅₀: 43,6 млн. м.к. — для иммунизирующей дозы 25 мкг; 107,2 млн. м.к. — для дозы 50 мкг

и 93,3 млн. м.к. ? для дозы 100 мкг. Индекс эффективности оптимальной дозы (50 мкг) составил 3,5 (табл. 1).

Полученные данные позволяют рассматривать рекомбинантный слитый белок OprF-aTox в качестве кандидата компонента вакцины, предназначенной для профилактики синегнойной инфекции.

Литература

1. Руднов ВА. Антибиотикотерапия госпитальных инфекций вызванных *P. aeruginosa*. Русский медицинский журнал 2005; **13**(7): 485–90.
2. Илюкевич ГВ. Синегнойная инфекция: в новый век со старой проблемой. Медицинские новости 2004; (12): 3–8.
3. Лазарева АВ, Чеботарь ИВ, Крыжановская ОА, Чеботарь ВИ, Маянский НА. *Pseudomonas aeruginosa* патогенность, патогенез и патология. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2015; **17**(3): 170–86.
4. Бобровнический ВИ. Современные подходы к диагностике и лечению синегнойной инфекции у больных муковисцидозом. Медицинский журнал 2012; **1**(36): 4–9.
5. Калошин АА, Гатыпова ЕВ, Михайлова НА. Получение рекомбинантных форм белка F наружной мембраны (OprF) *Pseudomonas aeruginosa* и исследование их иммуногенных свойств. Биотехнология 2011; (2): 74–84.
6. Калошин АА, Исаков МА, Михайлова НА, Вертнев ЮВ. Получение рекомбинантной атотоксической формы экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2012; **154**(9): 330–5.
7. Вертнев ЮВ, Бродвинова НС, Мороз АФ. Экзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa* и его роль в патогенезе синегнойной инфекции. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 1981; (2): 13–9.
8. Станиславский ЕС, Жванецкая МИ, Машилова ГМ, Гладус МА. Бесклеточная Псевдомонас-вакцина. Сообщение I. Ферментативные свойства и вирулентность штаммов *P. aeruginosa*, протективная активность их водорастворимых антигенов. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 1980; (8): 66–71.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова». Российская Федерация, 105064, Москва, Малый Казенный переулок, 5А.

Солдатенкова Алена Владимировна. Научный сотрудник лаборатории протективных антигенов.

Михайлова Наталья Александровна. Заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией протективных антигенов, д-р мед. наук, профессор.

Зимина Екатерина Максимовна. Младший научный сотрудник лаборатории протективных антигенов.

Леонова Евгения Игоревна. Младший научный сотрудник лаборатории протективных антигенов.

Калошин Алексей Алексеевич. Ведущий научный сотрудник лаборатории протективных антигенов, канд. биол. наук.

Адрес для переписки: Калошин Алексей Алексеевич; alex-k-1973@yandex.ru

Obtaining the recombinant fusion protein OprF-aTox of *Pseudomonas aeruginosa* with protective properties

A. V. Soldatenkova, N. A. Mihailova, E. M. Zimina, E. I. Leonova, A. A. Kaloshin

Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia

Into the cells of *Escherichia coli* (strain BL21(DE3)) two forms of the fusion protein *Pseudomonas aeruginosa* containing the full length outer membrane protein F (OprF) and nontoxic form of Exotoxin A (without 106 C-terminal amino acid residues) have been synthesized. Two recombinant genes were inserted into plasmid pET28 in different order: *oprF-atox* and *atox-oprF*. Only *oprF-atox* variant allowed to obtain the recombinant protein sufficient for purification by affinity chromatography on Ni-Sephadex. The recombinant fusion protein OprF-aTox showed a high specificity in interaction with the preparations of polyclonal immune rabbit serum to the recombinant OprF, the recombinant nontoxic form of Exotoxin A and the bacterial cells of *P. aeruginosa*. The purified recombinant fusion protein OprF-aTox after two immunizations protected the mice against toxigenic strain of *P. aeruginosa* (PA-103) being injected intraperitoneally. The index of efficiency of protective properties of OprF-aTox in the optimal dose (50 µg protein per mouse) was 3.5. This was more efficient than in

cases when the recombinant OprF and the recombinant toxoid were injected separately. The indexes of efficiency of protective properties of OprF and the toxoid were 2.1 and 2.0.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; outer membrane protein F; exotoxin A; toxoid; recombinant fusion protein OprF-aTox; immunization.

For citation: Soldatenkova AV, Mihailova NA, Zimina EM, Leonova EI, Kaloshin AA. Obtaining the recombinant fusion protein OprF-aTox of *Pseudomonas aeruginosa* whith protective properties. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (2): 96–100.

References

1. Rudnov VA. Antibiotic treatment of hospital infections caused by *P. aeruginosa*. *Russkiy meditsinskiy zhurnal* 2005; **13**(7): 485–90 (in Russian).
2. Ilyukevich GV. *Pseudomonas* infection: the new century with an old problem. *Meditsinskie novosti* 2004; (12): 3–8.
3. Lazareva AV, Tchebotar IV, Kryzhanovskaya OA, Tchebotar VI, Mayanskiy NA. *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenicity, Pathogenesis and Diseases. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya* 2015; **17**(3): 170–86.
4. Bobrovnichy VI. Modern approaches to diagnosis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a patient with cystic fibrosis. *Meditsinskiy zhurnal* 2012; **1**(36): 4–9.
5. Kaloshin AA, Gatypova EV, Mikhailova NA. Obtaining recombinant forms of outer membrane protein F (OprF) of *Pseudomonas aeruginosa* and assessment of their immunogenic properties. *Biokhimiya* 2011; (2): 74–84.
6. Kaloshin AA, Isakov MA, Mikhailova NA, Vertiev YuV. Preparation of Recombinant Atoxic Form of Exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* 2012; **154**(9): 330–5.
7. Vertiev YuV, Brodinova NS, Moroz AF. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its role in the pathogenesis of pyocyanus infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 1981; (2): 13–9.
8. Stanislavskii ES, Zhvanetskaia MI, Mashilova GM, Gladus MA. Cell-free *pseudomonas* vaccine. I. Enzyme properties and virulence of strains of *P. aeruginosa*; protective activity of their water-soluble antigens. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 1980; (8): 66–72.

Authors

Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Maly Kazenny lane, 5A, Moscow, 105064, Russian Federation.

Soldatenkova AV. Researcher of Laboratory of protective antigens.

Mihaylova NA. Deputy Director General for the scientific work, head of Laboratory of protective antigens. Doctor of Medical Sciences, professor.

Zimina EM. Junior researcher of Laboratory of protective antigens.

Leonova EI. Junior researcher of Laboratory of protective antigens.

Kaloshin AA. Leading researcher of Laboratory of protective antigens. Candidate of Biological Sciences.