

Всероссийская конференция «Биомедицинская химия: наука и практика»

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ, ОБЪЕДИНЯЮЩИЕ МЕЖДОМЕННЫЙ РЕГИОН ПНЕВМОКОККОВОГО ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА "А" И АДАПТИВНЫЙ ПОЛИПЕПТИД W-ТИПА БАКТЕРИЙ РОДА *THERMOTOGA*, В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ КОМПОНЕНТНОЙ БАЗЫ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ДИАГНОСТИКУМОВ И ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ СУБЪЕДИНИЧНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

О.К. Парфенова^{1*}, Н.Г. Сидоров^{1,2}, Е.Ю. Касан¹, Р.В. Куркин¹, Д.В. Гришин¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121, Москва, Погодинская ул., 10; *e-mail: molbiol_ibm@inbox.ru

²Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Малый Казенный пер., 5а.

Проблемы, связанные с разработкой противопневмококковых вакцин, требуют дополнения традиционных решений альтернативными системами, способными оптимизировать данную процедуру. Рекombинантные субъединичные вакцины имеют неоспоримые преимущества перед инактивированными и живыми аттенуированными вакцинами, поскольку они эффективно и с высокой специфичностью индуцируют клеточно-опосредованные и гуморальные иммунологические реакции. Однако субъединичные вакцины зачастую требуют особых адъювантов для усиления иммунного ответа или специальных партнёров слияния для улучшения растворимости, экспрессии и оптимизации очистки белка интереса. В рамках данной работы в качестве модельного белка был выбран структурно консервативный участок наиболее иммуногенной области вакцино-ценного поверхностного антигена PspA *Streptococcus pneumoniae*, а в качестве перспективного белка-слияния использован адаптивный полипептид CheW из гипертермофильного микроорганизма *Thermotoga petrophila*. Спланированы *in silico* и сконструированы *in vitro* соответствующие экспрессионные плазмидные векторы. Получены эффективные штаммы-продуценты *E. coli* и подобраны соответствующие условия для гетерологической наработки химерных белков. Фьюжн партнёр из *T. petrophila* положительно влиял на такие свойства результирующих конструкторов, как термостабильность, растворимость и гомогенность. В процессе работы были определены оптимальные диапазоны pH и температуры созданных белков, а также отработаны принципы малостадийной очистки. Таким образом, в исследовании получены и охарактеризованы новые белки, не встречавшиеся ранее в природе в подобной биоконфигурации. При этом результаты свидетельствуют о том, что биотехнологически ценные характеристики у слитого белка были более выраженными в том случае, когда адаптивный белок CheW объединялся с N-концом антигена PspA.

Ключевые слова: химерные белки; поверхностный антиген пневмококков; термостабильный белок; вакцинно-ценный белок; *Escherichia coli*; гетерологическая экспрессия

DOI: 10.18097/BMCRM00237

ВВЕДЕНИЕ

Мезофильный микроорганизм *Streptococcus pneumoniae* поражает верхние дыхательные пути и является основной причиной таких опасных заболеваний, как менингит, бактериемия, острый отит, синусит и пневмония [1]. Пневмококковые инфекции по-прежнему ежегодно уносят миллионы жизней, особенно в развивающихся странах [2]. Современные антипневмококковые вакцины основаны на капсульных полисахаридах. Между тем, возрастающая устойчивость клинических изолятов *S. pneumoniae* к антибиотикам определяет актуальность разработки новых и повышения эффективности уже существующих стрептококковых вакцин. Вакцины, состоящие из полисахаридов пневмококка, эффективны в основном только в отношении конкретных серотипов; при этом само производство является сложным и дорогостоящим процессом, что ограничивает их широкое

использование [3]. В связи с этим усилия современной иммунологической науки сосредоточены на характеристике белковых антигенов *S. pneumoniae*, которые могли бы обеспечить более широкую защиту на уровне носоглоточного носительства и бактериемии [4–6].

Одним из таких перспективных полипептидов является поверхностный антиген пневмококка А (PsaA) массой 37 кДа, представляющий собой основной фактор вирулентности данной бактерии, который генетически консервативен среди большинства серотипов *S. pneumoniae* [7, 8].

Ряд исследований показал, что активная и пассивная иммунизация полноразмерным PspA способны обеспечить защиту лабораторных животных от летального исхода при заражении пневмококком [9–11]. Усечённые фрагменты PspA были способны обеспечить защиту, но только в присутствии полного адъюванта Фрейнда (CFA).



В отсутствие CFA фрагменты были менее иммуногенными, чем нативный PspA [12]. Помимо этого, следует отметить, что современные вакцины на основе этого антигена индуцируют антитела с низкой перекрёстной реактивностью, что приводит к ограниченному охвату серотипов патогена [13].

Выделение нативного полноразмерного PspA из экстрактов клеточных стенок пневмококков сильно затруднено тем фактом, что он интенсивно агрегирует. Использование стандартных сорбентов в данном случае малоэффективно, поэтому для подобных целей используют специфические дорогостоящие сорбенты, основанные на модифицированной холином сефарозе, что значительно удорожает конечный продукт [14].

Рекомбинантные варианты PspA не стабильно продуцируются в стандартных экспрессионных системах и по-прежнему требуют использования дорогостоящей многостадийной очистки препарата от эндотоксинов и белков продуцента, включающей обработку катионными детергентами, анионообменную хроматографию, криопреципитацию, катионообменную и мультимодальную хроматографию [13].

Различные направления генной и белковой инженерии предоставляют возможность реализации новых индивидуальных стратегий в соответствии с требованиями конкретного технологического процесса. Одним из таких направлений является технология химеризации белков, иначе называемая fusion-технологией, при которой разные системы слияния (протеазы, иммуноглобулины, углеводсвязывающие модули, стрессовые белки и т.д.) используются для решения различных технологических целей и задач: для повышения иммуногенности полипептида, улучшения гетерологической экспрессии и растворимости рекомбинантного белка, оптимизации его очистки от клеточного дебриса и т.п. [15–17].

Таким образом, задачей данного исследования стала разработка на базе технологии слитных генно-инженерных конструкций необходимой компонентной базы для оптимизации антипневмококковых субъединичных вакцин на примере модельного объекта, в качестве которого выступил инвариантный для различных биоваров междоменный участок (BP) PspA, захватывающий часть наиболее иммуногенного таксон-специфического региона (CDR) и часть пролин-богатого домена (PRD).

В качестве потенциальной системы слияния, которая может быть использована для получения белка интереса в растворимом виде и оптимизации его тонкой очистки, был предложен адаптивный полипептид W-типа (CheW) из термостабильных бактерий рода *Thermotoga* [18].

Подобный выбор был продиктован тем, что некоторые белки, ответственные за хемотаксис, помимо транспортных функций могут участвовать в фолдинге белков и их защите от стресса. Другими словами, данные белки способны проявлять шапероноподобные свойства [19], тем самым влияя на биосинтез белка, что актуализирует изучаемую проблему.

Полученные в ходе работы результаты расширяют представления о функционировании подобных систем и могут стать толчком к разработке новых специализированных инструментов для производства иммунологически ценных белков в клетках *E. coli*.

МЕТОДИКА

Анализ данных

Последовательности, аннотированные в международной базе данных GenBank, были проанализированы с использованием базового инструмента по поиску и локальному выравниванию (“BLAST”, США) [20]. Для множественного и попарного выравнивания биоинформатических последовательностей, а также для последующей визуализации сайтов с различной гомологией были использованы программы DNASIS v 2.5 (“Hitachi Software Engineering Co., Ltd.”, Япония) и Clustal W [21]. Моделирование генно-инженерных конструкций и картирование рекомбинантных плазмид проводили с использованием программы Clone Manager 4.0 (“Scientific & Educational Software”, США).

Бактериальные штаммы

В работе использовали штамм *Escherichia coli* BL21(DE3) *pLysS E. coli str. B F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+JK-12(λS) pLysS[T7p20 orip15A](CmR)* и штамм *XL1-Blue [recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZdeltaM15 Tn10(TetR)]* (“Stratagene”, США).

ДНК и трансформация клеток

В работе были использованы плазмидный вектор pET21a (“Novagen”, США) и синтетические олигонуклеотиды, синтезированные твердофазным амидофосфитным методом в “Евроген” (Россия). Компетентные клетки *E. coli* трансформировали, как описано в [22].

Выделение и элюция ДНК

Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток осуществляли стандартным методом щелочного лизиса с использованием додецилсульфата натрия (ДСН) [23]. Элюцию фрагментов ДНК из агарозного геля проводили с помощью набора “Cleanup S-Cap” (“Евроген”) в соответствии с рекомендациями производителя.

Конструирование рекомбинантной ДНК

При конструировании за основу брали аннотированные в GenBank нативные биоинформатические последовательности пневмококкового антигена PspA (GenBank: AAC62252.1) и термостабильного адаптивного полипептида W-типа (CheW) из бактерий *T. petrophila* (GenBank: ABQ46258.1). Генно-инженерные конструкции собирали из синтетических

олигонуклеотидов, как описано в [24]. При этом использовался мастер-микс Gibson Assembly Cloning Kit (ISO буфер; Phusion ДНК-полимераза; Taq ДНК лигаза; T5-экзонуклеаза) (“NEB”, США). Правильность сборки кодирующих генов подтверждали рестрикционным картированием и ДНК-секвенированием. Секвенирование молекул ДНК с использованием меченных терминаторов и разделение продуктов секвенирования проведено на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730xl (“Applied Biosystems”, США) в компании “Евроген”. Анализ сложных хроматограмм секвенирования осуществляли в программе Chromas 2.6.6 (“Technelysium Pty Ltd.”, Australia).

Полимеразная цепная реакция

ПЦР проводили на приборе Терцик (“ДНК-технология”, Россия). Реакционная смесь (25 мкл) содержала: 2.5 мкл 1X Phusion буфера (“NEB”), dNTP в конечной концентрации 400 мкМ, 5×10^{-7} М каждого праймера, 1 мкл Phusion ДНК полимеразы (“NEB”) до 5 Единиц активности фермента на объём пробы и необходимое количество ДНК матрицы.

Параметры амплификации:

Предварительная денатурация: 98°C, 30 с;

Шаг 1 (денатурация): 98°C, 10 с;

Шаг 2 (отжиг): 59–65°C, 30 с;

Шаг 3 (элонгация): 72°C, variable;

Шаги с 1 по 3 необходимо повторить 30 раз с целью амплификации достаточного количества ДНК-мишени для последующей визуализации на геле.

Финальная элонгация: 72°C, 5 мин;

Хранение: 10°C.

Режим амплификации устанавливали точный.

Культивирование штамма-продуцента

Культуру *E. coli* BL21(DE3) pLysS, продуцирующую рекомбинантный белок, выращивали на среде LB в присутствии ампициллина. Трансформанты пересевали в разведении 1:50–1:100 на свежую среду LB и дальнейшее выращивание проводили при 37°C и интенсивном перемешивании при 250 об/мин на шейкере-инкубаторе ES-20 (“Biosan”, Латвия). Индуктор изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозид (ИПТГ) добавляли до финальной концентрации 0.5 мМ после достижения суспензией клеток значений оптической плотности $OD_{600} = 0.7–0.9$ ед. Предварительно отбирали необходимые контрольные пробы. Далее клетки культивировали на шейкере-инкубаторе ещё 16–18 ч при 27°C.

Термоллизис

Осадки индуцированных клеток *E. coli* суспендировали в буфере “Т” (20 мМ Tris-HCl, 50 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0.1% Triton X-100, pH (5.7–8.5)) из расчёта 10% от объёма культуры. Суспензию клеток обрабатывали ультразвуком на приборе Scientz JY96-IIN (“Drawell”, Китай)

в жёстком режиме (22 кГц, 2–3 раза по 50 с с интервалом в 20 с) на льду. Пробы прогревали при 75–99°C в течение 40–45 мин, после чего клеточный дебрис и денатурировавшие белки удаляли центрифугированием. Молекулярную массу, чистоту рекомбинантных белков в супернатанте и растворимость определяли электрофорезом в 12%-ном ДСН-ПААГ. Маркером для сравнительной идентификации молекулярного веса белков служил Low Range Protein Ladder (LRPL) (“Thermo Fisher Scientific”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биоинформатическое планирование

Запланированный химерный белок должен объединять иммуногенный В-регион поверхностного антигена из *S. pneumoniae* (PspA) (GenBank: AAC62252.1) и адаптивный полипептид CheW анаэробных гипертермофильных бактерий *T. petrophila* (GenBank: ABQ46258.1) в N- и C-концевых вариациях относительно термостабильного белка. Для пространственного разделения разнофункциональных доменов между ними был запланирован инертный глицин-сериновый линкер, который не накладывает ограничений на конформацию или взаимодействия связанных между собой белковых партнёров [25].

Если белок CheW характеризовался весьма высокой инвариантностью первичной аминокислотной последовательности, то в случае PspA требовался программный расчёт консенсусного сиквенса. Созданию синтетических генов также предшествовала необходимость учёта современных принципов оптимизации триплетов для обеспечения их эффективной экспрессии в клетках *E. coli*. В рамках этого осуществляли оптимизацию кодонового состава генов, кодирующих нативный CheW и консенсусный PspA. В результате разработанные *in silico* оптимизированные варианты гибридных генов стали основой для дальнейшей практической работы (рис. 1).

Конструирование экспрессионных векторов и молекулярное клонирование

Для сборки спланированных конструкций использовали метод Гибсона, основанный на ДНК рекомбинации, позволяющей поэтапно собрать несколько перекрывающихся фрагментов ДНК в единую молекулу. В работе плазмидный вектор pET-21a (“Novagen”, США) предварительно линеаризовали, а затем использовали для рекомбинации с заранее подготовленными синтетическими олигонуклеотидами. Для этого к полученной эквимольной смеси добавляли 10 мкл 2-кратного мастер-микса (см. раздел Методика). Реакционную смесь инкубировали при 50°C. На следующем этапе проводили трансформацию компетентных клеток *E. coli* 10 мкл полученной лигазной смеси. Правильность сборки генно-инженерных конструкций на разных этапах

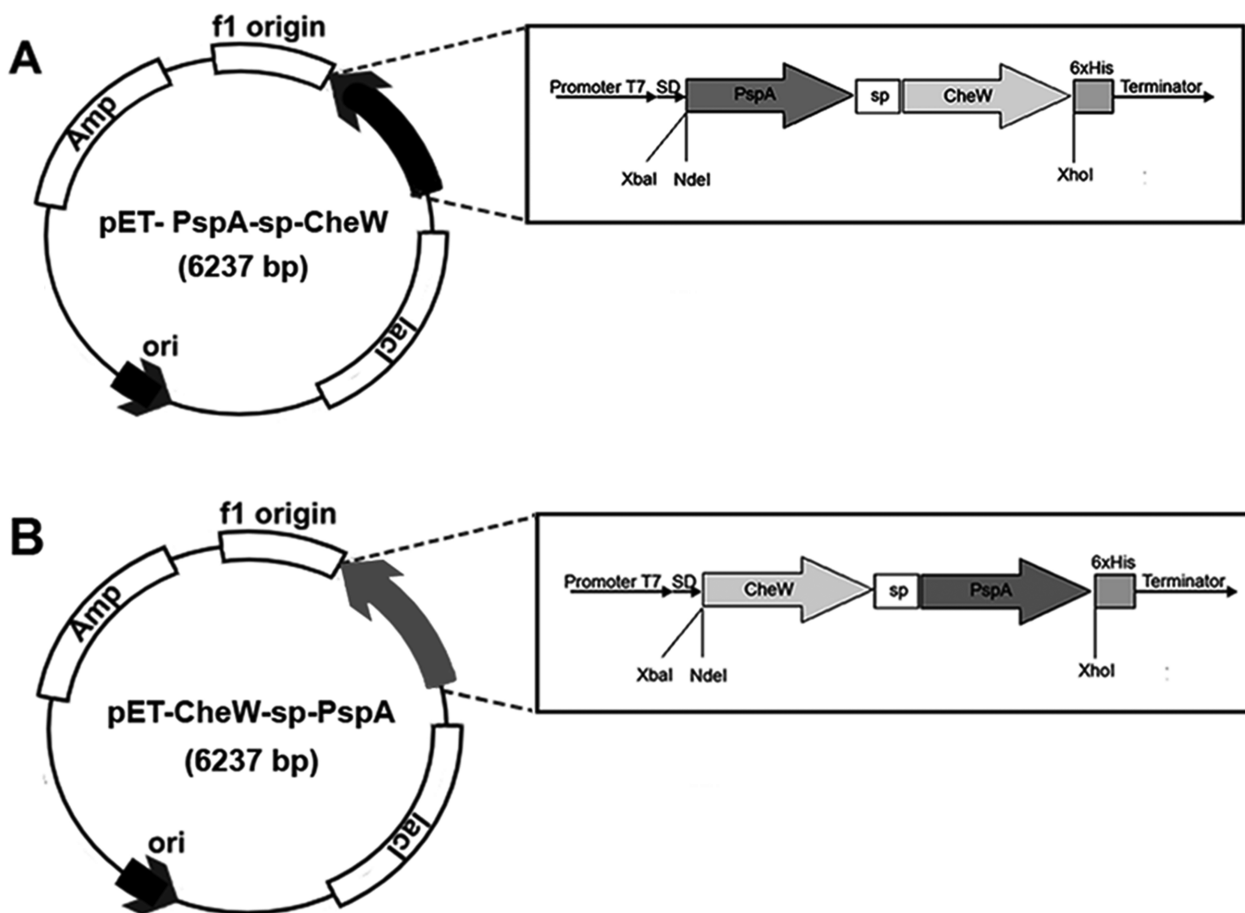


Рисунок 1. Схема строения генно-инженерных кассет **А)** PspA-sp-CheW и **В)** CheW-sp-PspA. Promoter T7 – сильный промотор бактериофага T7; SD – сайт связывания рибосом или последовательность Шайна-Дальгарно; PspA – нуклеотидная последовательность, кодирующая междоменный регион поверхностного антигена *S. pneumoniae*; CheW – нуклеотидная последовательность, кодирующая термостабильный адапторный полипептид W-типа из бактерий рода *Thermotoga*; sp – нуклеотидная последовательность, кодирующая разделительный глицин-сериновый линкер; 6×His – нуклеотидная последовательность, кодирующая шесть остатков аминокислоты гистидин; XbaI, NdeI и XhoI – сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции; Terminator – терминатор транскрипции.

подтверждали рестрикционным картированием, ПЦР с соответствующими праймерами (Cw-F: catatgaaaaccctggcgatgcgctgaaaga; Cw-R: acctagctcattcagggtcgctctaactcttct; Pas-F: atgaaagaaggcctggaacaggcgatta; Pas-R: gscagtttcacgccttcttcacggta) и секвенированием. Таким образом, были созданы рекомбинантные плазмиды pET-PspA-sp-CheW и pET-CheW-sp-PspA, в которых гены интереса находятся под контролем высокоэффективных регуляторных элементов бактериофага T7 (рис. 1).

Изучение экспрессии PspA-sp-CheW и CheW-sp-PspA

Компетентные клетки лабораторного штамма *E. coli* BL21(DE3) pLysS трансформировали экспрессионными плазмидами, созданными на предыдущем этапе, а также плазмидой pET-TrpCheW, кодирующей исходный термостабильный белок CheW в качестве одного из контролей.

Анализ результатов экспрессии гибридных генов в клетках *E. coli* при помощи электрофореза в 12% ДСН-ПААГ продемонстрировал появление

белковой полосы ожидаемого молекулярного веса 34 кДа в лизатах индуцированных клеток, содержащих плазмиду pET-CheW-sp-PspA (рис. 2А). В случае же белка PspA-sp-CheW наблюдается лишь слабо выраженная полоса на уровне, соответствующем примерно 70 кДа, что может свидетельствовать о формировании артефактной димерной формы (рис. 2В).

Денситометрический анализ электрофореграмм показал, что уровень экспрессии белка CheW-sp-PspA составил не менее 27% от общего белка клетки, в то время как экспрессия PspA-sp-CheW не превышала 6%. Выход PspA-sp-CheW и CheW-sp-PspA из 16–18 часовых культур клеток *E. coli* составил около 40 мг и 230 мг с одного литра культуральной среды соответственно.

Необходимо также отметить, что рост клеток с плазмидой pET-PspA-sp-CheW до и после индукции существенно отличался от такового для клеток, трансформированных плазмидой pET-CheW-sp-PspA, что наглядно демонстрирует график, отражающий динамику накопления биомассы продуцентов (рис. 3).

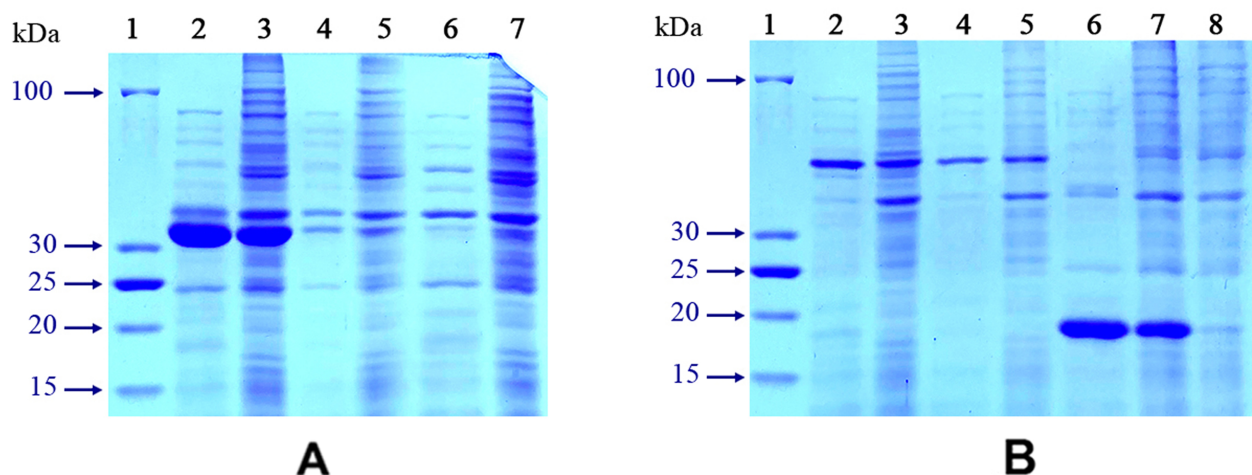


Рисунок 2. Контроль экспрессии генно-инженерных кассет PspA-sp-CheW и CheW-sp-PspA в 12%-ом ДСН-ПААГ, в присутствии бета-меркаптоэтанола и красителя Coomassie Brilliant Blue R-250. (объем наносимых на один трек проб без термолиза составил 9 мкл, с термолизом – 16 мкл). **А)** 1 – Маркер молекулярной массы LRPL; 2 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pET-CheW-sp-PspA] (индукция+прогрев 75°C); 3 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pET-CheW-sp-PspA] (индукция, без прогрева); 4 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pET-CheW-sp-PspA] (до индукции+прогрев 75°C); 5 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pET-CheW-sp-PspA] (до индукции, без прогрева); 6 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS (индукция+прогрев 75°C); 7 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS (индукция, без прогрева). **В)** 1 – Маркер молекулярной массы LRPL; 2 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pET-PspA-sp-CheW] (индукция+прогрев 75°C); 3 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pET-PspA-sp-CheW] (индукция, без прогрева); 4 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pET-PspA-sp-CheW] (до индукции+прогрев 75°C); 5 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pET-PspA-sp-CheW] (до индукции, без прогрева); 6 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pET-TpeCheW] (индукция+прогрев 75°C); 7 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pET-TpeCheW] (индукция, без прогрева); 8 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pET-TpeCheW] (до индукции, без прогрева).

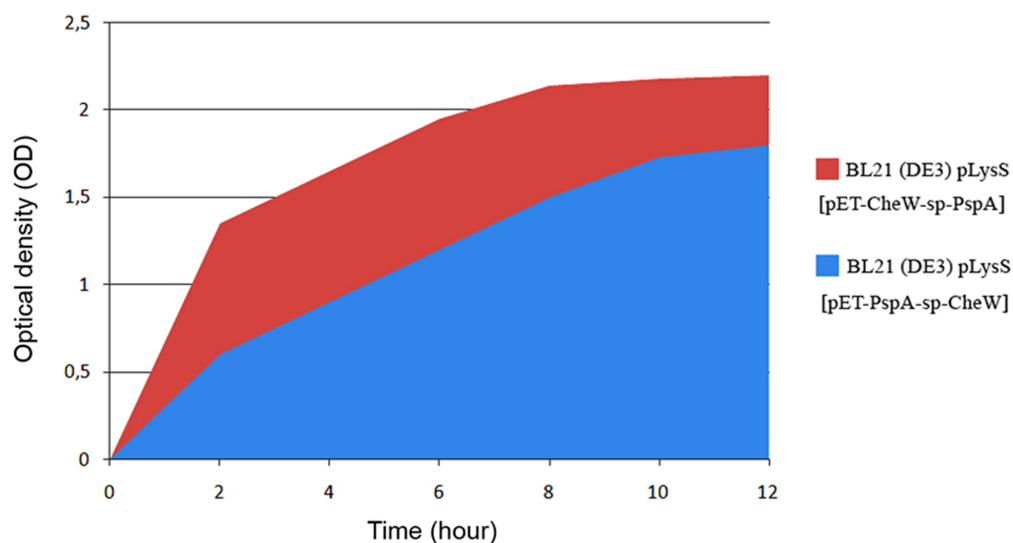


Рисунок 3. Сравнение динамики роста клеток *E. coli* BL21(DE3) pLysS продуцентов химерных белков PspA-sp-CheW и CheW-sp-PspA.

Сотнеся эти данные с итоговым уровнем экспрессии PspA-sp-CheW, можно сделать вывод, что данный белок плохо переносится клетками *E. coli*, обладая, по всей видимости, определённой токсичностью для данного микроорганизма.

Определение оптимального диапазона pH и температуры

Важнейшим показателем для сконструированных белков является их термостабильность, поэтому основной фазой данного этапа исследования

стал сбор супернатанта, который должен был включать наиболее термоустойчивые и растворимые белковые фракции. При этом только химерный белок CheW-sp-PspA обладал высоким уровнем термостабильности и локализовался в основном в растворимой фракции клеточного лизата (рис. 2, 4). Попутно было определено влияние pH на термостойкость при различных температурах. Картина электрофореза CheW-sp-PspA была идентичной для всех диапазонов pH от 5.7 до 8.5 (показаны при pH 7.5). pH не оказывал

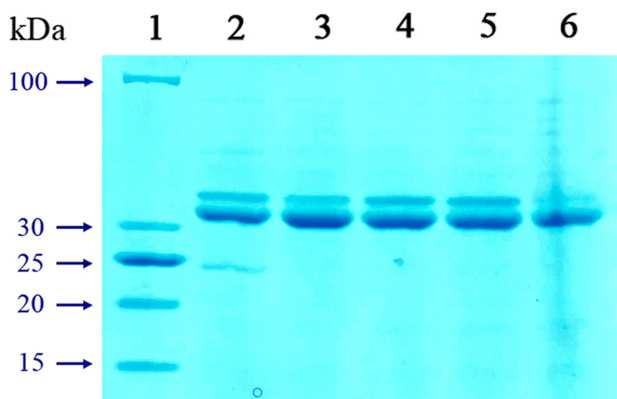


Рисунок 4. Анализ растворимой фракции очищенного рекомбинантного белка CheW-sp-PspA при разных температурах и pH 7.5 в 12%-ом ДСН-ПАААГ. 1 – Маркер молекулярной массы LRPL; 2 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pET-CheW-sp-PspA] (индукция+прогрев 75°C); 3 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pET-CheW-sp-PspA] (индукция+прогрев 80°C); 4 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pET-CheW-sp-PspA] (индукция+прогрев 85°C); 5 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pET-CheW-sp-PspA] (индукция+прогрев 90°C); 6 – *E. coli* BL21(DE3) pLysS [pET-CheW-sp-PspA] (индукция+прогрев 99°C).

существенного влияния на термостабильность, что даёт возможность в дальнейшем использовать этот белок с различными буферными системами и физиологическими значениями pH.

Простое выделение и очистка белка

Для очистки белков осадки индуцированных клеток *E. coli* суспендировали в специальном буфере для термолиза из расчёта 10% от объёма культуры. Клеточную суспензию обрабатывали ультразвуком в интенсивном режиме на льду (см. раздел Методика). Образцы нагревали при температуре $\geq 80^\circ\text{C}$ в течение 40 мин, после чего клеточный дебрис удаляли центрифугированием. К оставшемуся супернатанту добавляли кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до насыщения 80% и оставляли смесь на 20 ч при 4°C для концентрирования рекомбинантных белков. Раствор осветляли центрифугированием при 6800 g не менее 5 мин, осадок либо лиофилизировали, либо растворяли в буфере (20 mM Трис-НСl; pH 7.5; 10 mM ЭДТА; 10% глицерина) и хранили при температуре -20°C до дальнейшего использования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спланированы и сконструированы индуцибельные синтетические генно-инженерные конструкции, позволяющие получать в гетерологических системах химерные белки, объединяющие в различной пространственной ориентации копию адаптивного полипептида CheW *T. petrophila* и копию иммуногенного В-региона поверхностного антигена из *S. pneumoniae*. Введение линкеров в зоны объединения CheW и PspA призвано обеспечить необходимую гибкость итоговой рекомбинантной конструкции и правильный фолдинг гибридного белка, позволяющие получить его в растворимой форме.

Экспериментально было продемонстрировано, что пептид CheW способен выступать в роли весьма эффективной системы слияния. При этом полученный С-концевой гомолог гибридного белка обладал рассчитанным молекулярным весом 34 кДа, высоким уровнем экспрессии (не менее 27% от общего белка) и необходимым уровнем термостабильности, обеспечивающим отсутствие денатурации белка в течение 40-минутной экспозиции в пределах от 75°C до 99°C . Полученный образец имел степень чистоты, превышающую 90%. Таким образом, созданный химерный белок CheW-sp-PspA обладает всеми необходимыми и достаточными свойствами, чтобы в дальнейшем стать основой для разработки новых кандидатных диагностикумов и профильных рекомбинантных вакцин.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

БЛАГОДАРНОСТИ

На некоторых этапах исследования было использовано оборудование Центра коллективного пользования ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (№ 075-15-2021-676).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499-5).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- O'Brien, K.L., Wolfson, L.J., Watt, J.P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O.S., Cherian T., Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team (2009) Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: Global estimates. *Lancet*, **374**(9693), 893–902. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61204-6
- Goulart, C., Darrieux, M., Rodriguez, D., Pimenta, F.C., Brandileone, M.C., de Andrade, A.L., Leite, L.C. (2011) Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. *Vaccine*, **29**(8), 1634–1642. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.12.074
- Dagan, R., Melamed, R., Zamir, O., Leroy, O. (1997) Safety and immunogenicity of tetravalent pneumococcal vaccines containing 6B, 14, 19F and 23F polysaccharides conjugated to either tetanus toxoid or diphtheria toxoid in young infants and their booster ability by native polysaccharide antigens. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **16**(11), 1053–1059. DOI: 10.1097/00006454-199711000-00010

4. Briles, D.E., Ades, E., Paton, J.C., Sampson, J.S., Carlone, G.M., Huebner, R.C., Virolainen, A., Swiatlo, E., Hollingshead, S. (2000) Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, **68**(2), 796–800. DOI: 10.1128/IAI.68.2.796-800.2000
5. Briles, D.E., Hollingshead, S., Brooks-Walter, A., Nabors, G.S., Ferguson, L., Schilling, M., Gravenstein, S., Braun, P., King, J., Swift, A. (2000) The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. *Vaccine*, **18**(16), 1707–1711. DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00511-3
6. Wizemann, T.M., Heinrichs, J.H., Adamou, J.E., Erwin, A.L., Kunsch, C., Choi, G.H., Barash, S.C., Rosen, C.A., Masure, H.R., Tuomanen, E., Gayle, A., Brewah, Y.A., Walsh, W., Barren, P., Lathigra, R., Hanson, M., Langermann, S., Johnson, S., Koenig, S. (2001) Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect. Immun.*, **69**(3), 1593–1598. DOI: 10.1128/IAI.69.3.1593-1598.2001
7. Converso, T.R., Goulart, C., Rodriguez, D., Darrieux, M., Leite, L.C.C. (2017) Rational selection of broadly cross-reactive family 2 PspA molecules for inclusion in chimeric pneumococcal vaccines. *Microb. Pathog.*, **109**, 233–238. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.06.004
8. Hollingshead, S.K., Baril, L., Ferro, S., King, J., Coan, P., Briles, D.E. (2006) The Pneumococcal Proteins Epi Study Group. Pneumococcal surface protein A (PspA) family distribution among clinical isolates from adults over 50 years of age collected in seven countries. *J. Med. Microbiol.*, **55**(2), 215–221. DOI: 10.1099/jmm.0.46268-0
9. Daniels, C.C., Coan, P., King, J., Hale, J., Benton, K.A., Briles, D.E., Hollingshead, S.K. (2010) The proline-rich region of pneumococcal surface proteins A and C contains surface-accessible epitopes common to all pneumococci and elicits antibody-mediated protection against sepsis. *Infect Immun.*, **78**(5), 2163–2172. DOI: 10.1128/IAI.01199-09
10. Kono, M., Hotomi, M., Hollingshead, S.K., Briles, D.E., Yamanaka, N. (2011) Maternal immunization with pneumococcal surface protein A protects against pneumococcal infections among derived offspring. *PLoS ONE*, **6**(10), e27102. DOI: 10.1371/journal.pone.0027102
11. Roche, H., Håkansson, A., Hollingshead, S.K., Briles, D.E. (2003) Regions of PspA/EF3296 best able to elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* in a murine infection model. *Infect Immun.*, **71**(3), 1033–1041. DOI: 10.1128/IAI.71.3.1033-1041.2003
12. Briles, D.E., King, J.D., Gray, M.A., McDaniel, L.S., Swiatlo, E., Benton, K.A. (1996) PspA, a protection-eliciting pneumococcal protein: Immunogenicity of isolated native PspA in mice. *Vaccine*, **14**(9), 858–867. DOI: 10.1016/0264-410X(96)82948-3
13. da Costa Rodrigues, T., Zorzete, P., Miyaji, E.N., Gonçalves, V.M. (2024) Novel method for production and purification of untagged pneumococcal surface protein A from clade 1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **108**(1), 281. DOI: 10.1007/s00253-024-13098-2
14. Briles, D.E., Hollingshead, S.K., Swiatlo, E., Brooks-Walter, A., Szalai, A., Virolainen, A., McDaniel, L.S., Benton, K.A., White, P., Prellner, K., Hermansson, A., Aerts, P.C., van Dijk, H., Crain, M.J. (1997) PspA and PspC: Their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb. Drug Resist.*, **3**(4), 401–408. DOI: 10.1089/mdr.1997.3.401
15. Yadav, D.K., Yadav, N., Yadav, S., Haque, S., Tuteja, N. (2016) An insight into fusion technology aiding efficient recombinant protein production for functional proteomics. *Arch. Biochem. Biophys.*, **612**, 57–77. DOI: 10.1016/j.abb.2016.10.012
16. Costa, S., Almeida, A., Castro, A., Domingues, L. (2014) Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: The novel Fh8 system. *Front. Microbiol.*, **5**, 63. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00063
17. Ki, M.R., Pack, S.P. (2020) Fusion tags to enhance heterologous protein expression. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, **104**(6), 2411–2425. DOI: 10.1007/s00253-020-10402-8
18. Grishin, D.V., Samoilenko, V.A., Gladilina, Y.A., Zhdanov, D.D., Pokrovskaya, M.V., Aleksandrova, S.S., Pokrovsky, V.S., Sokolov, N.N. (2019) Effect of heterologous expression of chemotaxis proteins from genus *Thermotoga* on the growth kinetics of *Escherichia coli* cells. *Bull. Exper. Biol. Med.*, **167**(3), 375–379. DOI: 10.1007/s10517-019-04530-z
19. Baker, M.D., Wolanin, P.M., Stock, J.B. (2006) Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays*, **28**(1), 9–22. DOI: 10.1002/bies.20343
20. Randić, M., Pisanski, T. (2015) Protein alignment: Exact versus approximate. An illustration. *J. Comput. Chem.*, **36**(14), 1069–1074. DOI: 10.1002/jcc.23892
21. Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**(21), 2947–2948. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm404
22. Drury, L. (1996) Transformation of bacteria by electroporation. *Methods Mol. Biol.*, **58**, 249–256. DOI: 10.1385/0-89603-402-X:249
23. Delaney, S., Murphy, R., Walsh, F. (2018) A comparison of methods for the extraction of plasmids capable of conferring antibiotic resistance in a human pathogen from complex broiler cecal samples. *Front. Microbiol.*, **9**, 1731. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01731
24. Gibson, D.G. (2011) Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. *Methods Enzymol.*, **498**, 349–361. DOI: 10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2
25. van Rosmalen, M., Krom, M., Merckx, M. (2017) Tuning the flexibility of glycine-serine linkers to allow rational design of multidomain proteins. *Biochemistry*, **56**(50), 6565–6574. DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00902

Поступила: 01. 07. 2024.

После доработки 11. 07. 2024.

Принята к публикации: 15. 07. 2024.

RECOMBINANT PROTEINS COMBINING THE INTER-DOMAIN REGION OF PNEUMOCOCCAL SURFACE ANTIGEN "A" AND ADAPTIVE W-TYPE POLYPEPTIDE OF *THERMOTOGA* BACTERIA AS A POTENTIAL COMPONENT BASE FOR THE DEVELOPMENT OF NEW DIAGNOSTICS AND GENETICALLY ENGINEERED SUBUNIT VACCINES AGAINST PNEUMOCOCCAL INFECTION

O.K. Parfenova^{1*}, *N.G. Sidorov*^{1,2}, *E.Y. Kasap*¹, *R.V. Kurkin*¹, *D.V. Grishin*¹

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: molbiol_ibm@inbox.ru
²I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera,
5A Malyi Kazennyi lane, Moscow, 105064 Russia

The problems related to the development of pneumococcal vaccines require combination of traditional solutions and alternative systems optimizing this procedure. Recombinant subunit vaccines have undeniable advantages over inactivated and live-attenuated vaccines: they induce cell-mediated and humoral immunologic responses effectively and with high specificity, but without the risks associated with authentic pathogen processing. However, subunit vaccines require specific adjuvants to enhance the immune response or special fusion partners to improve solubility, expression and optimize subsequent fine purification of the protein of interest. In the framework of this work, a structurally conserved region of the most immunogenic region of the vaccine-valuable surface antigen PspA of *Streptococcus pneumoniae* was chosen as a model protein, and the adaptive polypeptide CheW from the hyperthermophilic microorganism *Thermotoga petrophila* was used as a promising fusion protein. Appropriate expression plasmid vectors were designed *in silico* and constructed *in vitro*. Efficient *E. coli* producer strains were obtained and appropriate conditions for heterologous production of chimeric proteins were selected. The fusion partner from *T. petrophila* positively influenced the properties of the resulting constructs such as thermostability, solubility, and homogeneity. During this work, the optimal pH and temperature ranges of the created proteins were determined, and the principles of low-stage purification were elaborated. We obtained and characterized new proteins, which were not previously found in nature in a similar bioconfiguration. The results indicate that the biotechnologically valuable characteristics of the fusion protein were more expressed when the adaptive CheW protein was combined with the N-terminus of the PspA antigen.

Key words: fusion proteins; pneumococcal surface protein; thermostable protein; vaccine-valuable protein; *Escherichia coli*; heterologous expression

FUNDING

The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122022800499-5).

Received: 01.07.2024; revised: 11.07.2024; accepted: 15.07.2024.