

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ "СТЕФАН АНГЕЛОВ"

АНДРЕЙ ИВАНОВ ЧОРБАНОВ

ИНЖЕНЕРНИ И ГЕННО-ИНЖЕНЕРНИ ХИМЕРНИ МОЛЕКУЛИ КАТО
АНТИГЕНИ

проект за
А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователната и
научна степен "Доктор"

София, 2002 г.

**СПЕЦИАЛИЗИРАН НАУЧЕН СЪВЕТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ
И ИМУНОЛОГИЯ ПРИ ВАК**

АНДРЕЙ ИВАНОВ ЧОРБАНОВ

**ИНЖЕНЕРНИ И ГЕННО-ИНЖЕНЕРНИ ХИМЕРНИ МОЛЕКУЛИ КАТО
АНТИГЕНИ**

01.06.23 Имунология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**на дисертационен труд за присъждане на образователната и
научна степен "Доктор"**

**Научни ръководители: ст.н.с. I ст. д-р Чавдар Василев,
дмн
проф. Петер Я. А. Капел**

София, 2002 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Националния семинар "Патогенни микроорганизми и инфекциозна имунология" към Институт по микробиология "Стефан Ангелов"-БАН. Дисертантът работи в секция "Имунология" към Института по микробиология "Стефан Ангелов"

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АПК	- Антиген представящи клетки
ГКТС	- Главен комплекс на тъканна
СЪВМЕСТИМОСТ	
Тн	- Т-хелперна клетка
IL-2	- Интерлевкин 2
Тс	- Т-цитотоксична клетка
IL-1	- Интерлевкин 1
TNF	- Тумор-некротизиращ фактор
IL-6	- Интерлевкин 6
IL-4	- Интерлевкин 4
ADCC	- Антитяло-зависима кл. цитотоксичност
NK	- Естествени убийци
ФДК	- Фоликулярни дендритни клетки
kDa	- Килодалтон
GPI	- Гликозил фосфатидил-инозитол
ITAM	- Имунорецепторен тирозин-базиран активационен мотив
ITIM	- Имунорецепторен тирозин-базиран инхибиторен мотив
PTK	- Протеин тирозин-киназа
PLC	- Фосфолипаза C
PKC	- Протеин киназа C
mPHK	- Матрична рибонуклеинова киселина
SCR	- Къси консенсусни повтори
CR	- Рецептор за комплемент
LHR	- Дълги хомоложни повтори
TM	- Трансмембранни домени
CT	- Цитоплазмена опашка
PE	- Фикоеритрин
FITC	- Флуороисцеин изотиоцианат
RU	- Съответстващи единици
CFA	- Пълен адювант на Freund
Ova	- Овалбумин
IP	- Пептид от грипен вирус

УВОД

При субединичните ваксини се избягват рисковете свързани с използването на живи, атенюирани бактериални и вирусни щамове. Нещо повече – епитоп-специфичните ваксини носят само протективните В и/или Т-клетъчни епитопи, избягвайки онези, които могат да имат нежелани биологични ефекти. Тези ваксини са, за съжаление, слабо имуногенни.

Разрешенията за приложение при хора адюванти нямат достатъчен имуностимулиращ ефект и затова се търсят алтернативни пътища за насочване и "доставяне" на епитопите към съответните АПК, което да доведе до бързо и мощно активиране на Т-клетките. Една такава алтернатива предлага насочването на епитопи към рецептори върху АПК, които са свързани с улавянето на антигените по време на естественото протичане на инфекцията. Явно е, че имуноглобулините могат да насочват свързаните с тях антигени както чрез своите Fc-домени, така и чрез Fab-участъците си. Вторият тип насочване се отличава със своята специфичност, докато Fc-фрагментът би могъл да се свърже с различни видове FcγR върху различни типове клетки. Именно в случая, когато за насочване на антигена се използват специфични антитела, Fc-фрагментът им може да не бъде включван в химерната молекула. Това предполага получаването на Fab-фрагмента по-която и да е стандартна рекомбинантна технология.

Използването на инженерни и генно-инженерни химерни молекули за насочване на антигени към Fcγ-рецепторите и рецепторите за комплемента дава възможност за модулиране на имунния отговор в желана от изследователя посока. За нашите цели бяха конструирани химерна молекула между антитяло 7G6, специфично срещу миши рецептори за комплемента 1 и 2 и антигена овалбумин, както и група химерни молекули, експресирани в прокариотни и еукариотни системи. И в двата случая се използват антитела (или техни фрагменти), които, насочени към своите естествени лиганди, "транспортират" антигени или техни епитопи към интересующите ни клетки. В първия случай беше получена химера по химически път между антитялото 7G6 в естествения му вид и цяла молекула овалбумин на ниво протеини. Във втория случай химерният протеин беше получен по генно-инженерен път чрез рекомбиниране на вирусна кДНК и ДНК-фрагменти, кодиращи леката и тежка верига на Fv фрагмента на две антитела. Първото от тях е вече споменатото 7G6, а второто е антитялото 22 специфично към FcγRI.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ: Да се провери хипотезата, че химерни молекули антиген-лиганд за повърхностни клетъчни рецептори са силно имуногенни.

ЗАДАЧИ:

1. Конструирание на химически конюгирана химерна молекула антицяло-овалбумин. Изолиране и пречистване на конюгата.
2. Експерименти върху клетъчни култури *in vitro* за модулиране на имунния отговор с химерните молекули антицяло-овалбумин чрез въздействие върху CR1/2 и FcγRIIb.
3. Опити за модулиране на имунния отговор *in vivo* с новосинтезираните химерни молекули антицяло-овалбумин.
4. Конструирание на генно-инженерни химерни ДНК молекули, кодиращи лека и тежка верига на Fv-фрагменти от антитела, специфичен срещу CR1/2 и FcγRI, както и епитопи на хемаглутинин на грипен вирус. Амплифициране в прокариотни култури, изолиране и пречистване на ДНК молекулите.
5. Експресия на химерните молекули Fv-вирусен пептид в прокариотни и еукариотни системи. Изолиране на рекомбинантния протеин. Идентификация на компонентите на новосинтезираната химерна белтъчна молекула.
6. Експерименти върху клетъчни системи *in vitro* за модулиране на имунния отговор и представяне на антигена чрез насочване на химерната белтъчна молекула към CR1/2 и FcγRI.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Животни: За имунизационните експерименти бяха използвани Balb/c мишки. За някои експерименти бяха използвани и женски CR1/2-дефицитни мишки (Molina и сътр. 1996). Като контроли (див тип) бяха използвани мишки със смесен генетичен фон C56B1/6 x 129Sv.

Клетъчни линии, антитела: Клетки от миша В-клетъчна лимфомна линия A20, нейният FcγR-негативен вариант IIA1.6, Т-хелперна овалбумин-специфична хибридома 3D0-54.8, Т-клетъчни хибридоми IP12-7 и H1-9-7-10, конструирани от клетките на слезка на Balb/c мишки, имунизирани с пептиди HA317-341 и HA317-329 респективно – бяха любезно предоставени от Jozsef Prechl (L. Eotvos University, God, Унгария). За измерване на продукцията на IL-2 беше използвана клетъчна линия CTLL-2 (ATCC TIB 214); CTLL-L16, мишата В-лимфома 2PK3, клетъчната линия COS беше използвана за трансфекция с химерните ДНК-молекули IP(1-3)-7G6scFv и IP(1-3)-22scFv, човешка лимфомна клетъчна линия U937 беше използвана като FcγRI

положителна линия; плъща хибридома 7G6, секретиреща антитела специфични към миши CR1 и CR2; миша хибридома 22 секретиреща антитела, специфични към човешки FcγRI. Като изотипна контрола бяха използвани пречистени плъщи моноклонални IgG2b антитела SHL45.6, специфични към човешки CD3.

Анти-миши IgM и анти-миши IgG антитела, конюгиран с алкална фосфатаза и пероксидаза бяха закупени от Sigma (USA).

Грипен вирус A/PR/8/34

Бактериални щамове: компетентни клетки от E.coli 10F' и E.coli XL-1 blue

Химерна молекула IgG-овалбумин беше получена чрез използване на N-сукцинимидил S-ацетилтиоацетат като химически бифункционална свързваща молекула. IgG (моноклоналното антитяло 7G6) и малеимид-активиран овалбумин бяха използвани за конструиране на химерната молекула. По аналогичен начин беше приготвена химерна молекула между SHL45.6 и овалбумин като изотипна контрола.

FPLC: За пречистване на химерните молекули беше използвана колона HiLoad Superdex 200 HR (Pharmacia LKB Biotech Uppsala, Sweden).

Проточна цитометрия: беше извършена с проточен цитометър FACS Calibur.

Представяне на антигена in vitro;

Придставяне на антигена in vivo;

ELISA за определяне на серумни анти-овалбуминови антитела;

PAGE и Western блот;

Генетични методи

RT-PCR;

PCR;

ДНК електрофореза;

Рестрикционни методи;

Лигазни реакции;

Методи за клониране, амплифициране и изолиране на генетичен материал;

ДНК-рекомбинантни техники;

Експресия на конструираните ДНК химерни молекули

1. Експресия в прокариотна система: химерните ДНК-молекули IP1-7G6scFv, IP1-7G6scFv и IP3-7G6scFv бяха експресирани в клетки BL23 (DE3) като включени тела.

2. Експресия в еукариотна система: клетъчната линия COS беше използвана за трансфекция с химерните ДНК-молекули IP(1-3)-7G6scFv и IP(1-3)-22scFv.

РЕЗУЛТАТИ

1. Модулиране на имунния отговор чрез насочване на моделен антиген към рецепторите за компоненти на комплемента 1 и 2 и Fcγ-рецепторите използвайки химически-свързана химера антиген-антитяло

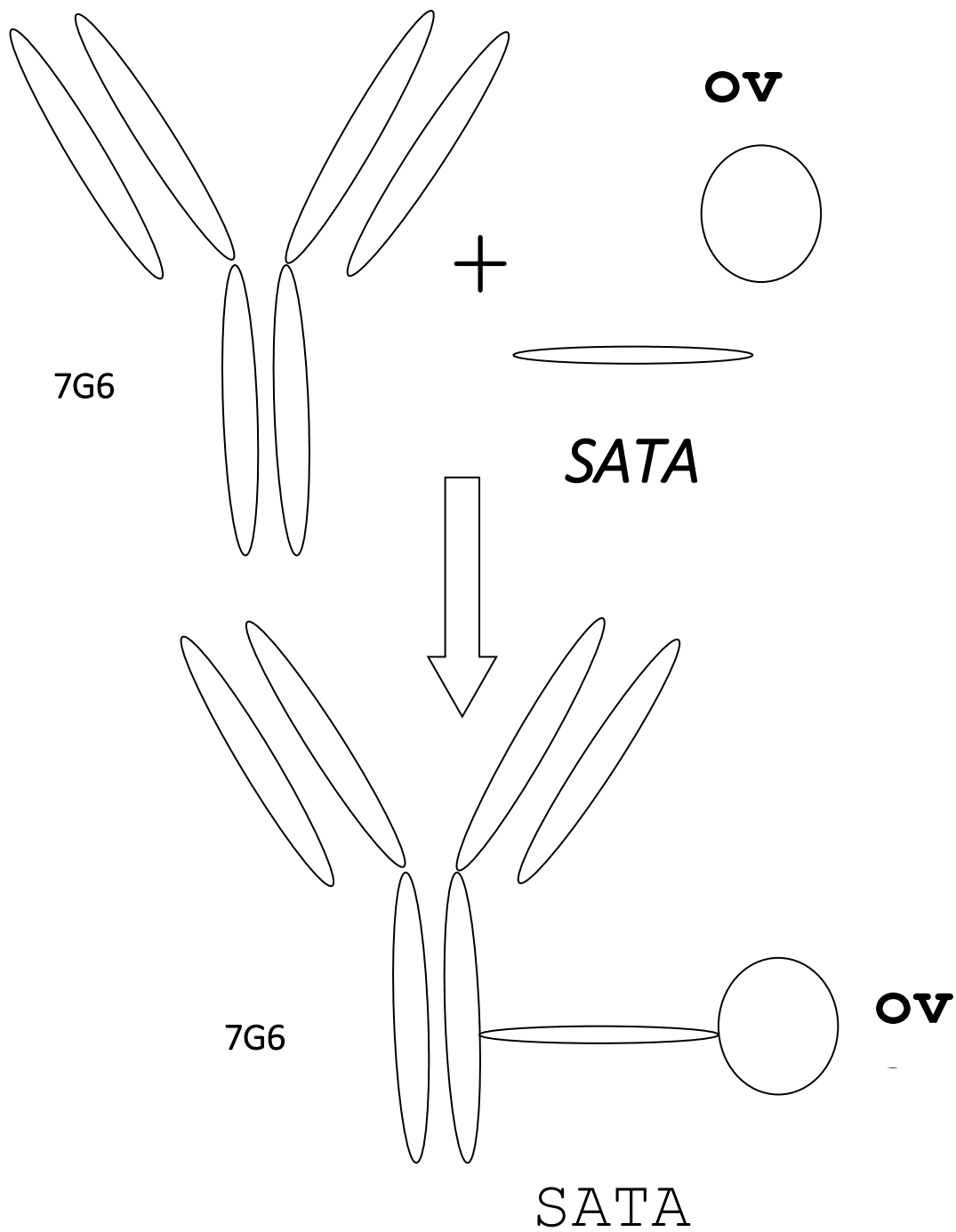
Химерата антицяло-овалбумин беше получена използвайки N-сукцинимидил S-ацетилтиоацетат (SATA) като химически бифункционален агент, осигуряващ ковалентна връзка между двата реагента (Фиг. 1). Експериментално беше определено оптималното моларно съотношение IgG:овалбумин - 1:1.5. След края на реакцията целият работен обем беше пречистен на FPLC с цел да бъдат отстранени нереагиралите (респ. несвързани) протеинови молекули (Фигура 2b).

Фракцията, съдържаща двата компонента е с молекулна маса 200-573 kDa. Широките молекулни граници се дължат на факта, че в хода на химичната реакция се получават димери и тримери както по отношение на имуноглобулиновата молекула, така и по отношение на овалбумина. Беше невъзможно да бъдат разделени тези полимерни форми от мономерната конюгирана молекула, така че в следващите експерименти беше включена цялата фракция. Изолираната и пречистена на FPLC при препаративни условия фракция беше вторично анализирана при аналитични условия за доказване отсъствието на нереагирали изходни протеини.

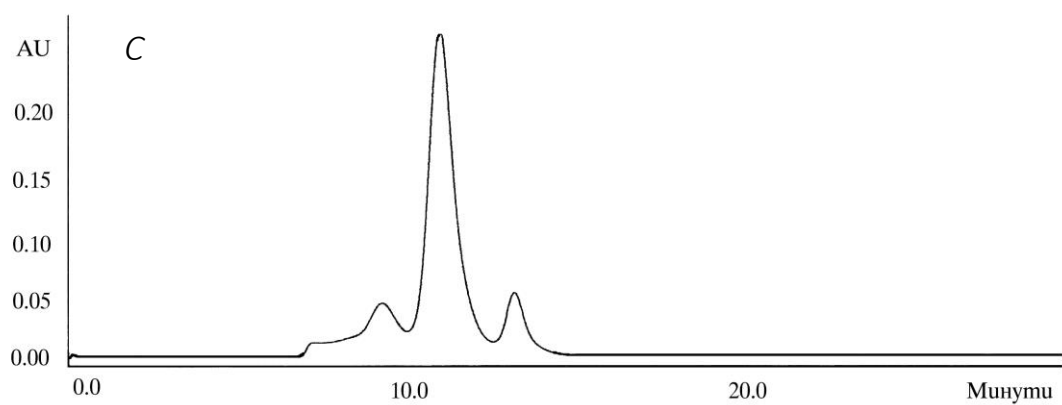
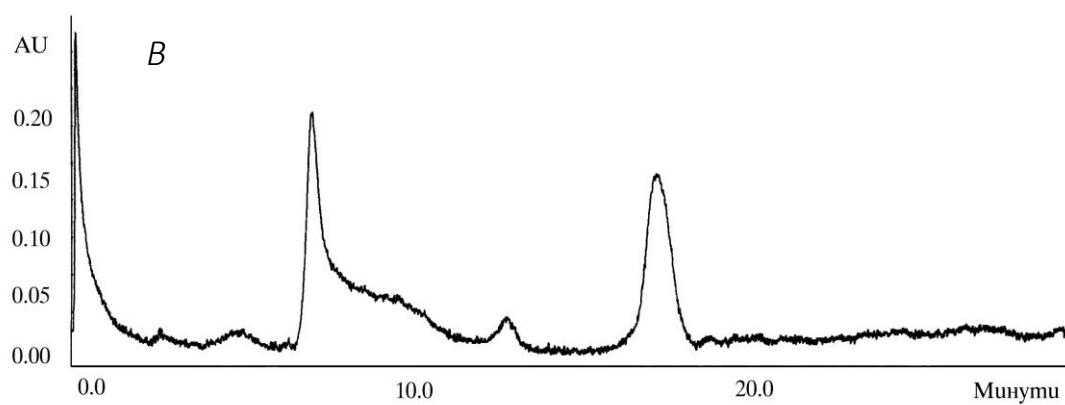
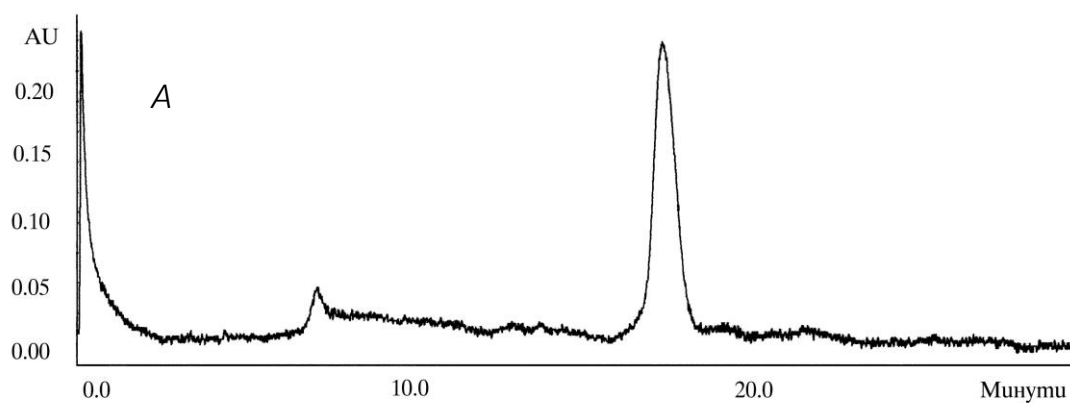
Свързване на химерната молекула 7G6-овалбумин към CR1/2 *in vitro*

Способността на химерата 7G6-овалбумин да се свързва с CR1/2 беше установена чрез проточна цитометрия използвайки CR1/2-експресиращата миша В-лимфомна клетъчна линия IIA1.6. След инкубирането на тези клетки с 7G6-овалбумин и след това с FITC- конюгирано мише анти-плъше антитяло беше наблюдаван отчетлив флуоресцентен сигнал (Фиг. 3b), със същата интензивност, каквато се получава при инкубиране и с неконюгирано антитяло 7G6 (Фиг. 3a). Клетъчно свързаният 7G6-овалбумин можеше да бъде установен чрез използването на поликлонално заешко анти-овалбуминово антитяло (Фиг. 3d), което не разпознава клетъчно-свързания неконюгиран 7G6 (Фиг. 3c). Тези резултати показват, че конюгатът 7G6-овалбумин запазва своята способност да се свързва с рецепторите за

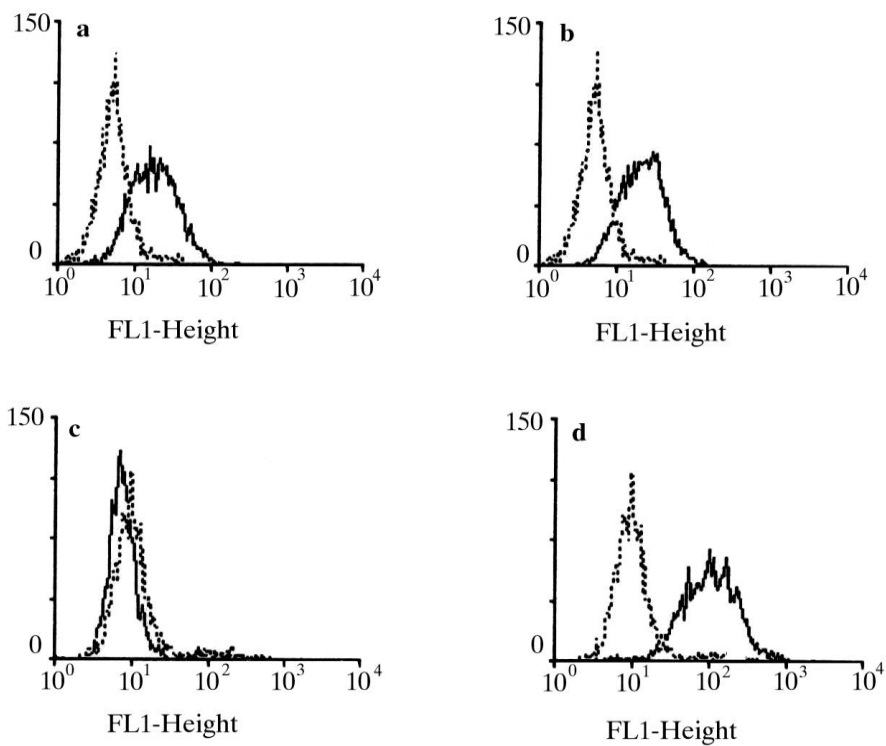
комплемент и потвърждават присъствието на овалбумина в конюгата.



Фигура 1. Моделна ковалентно свързване на антитяло 7G6 и овалбумин посредством бифункционална линкерна молекула SATA



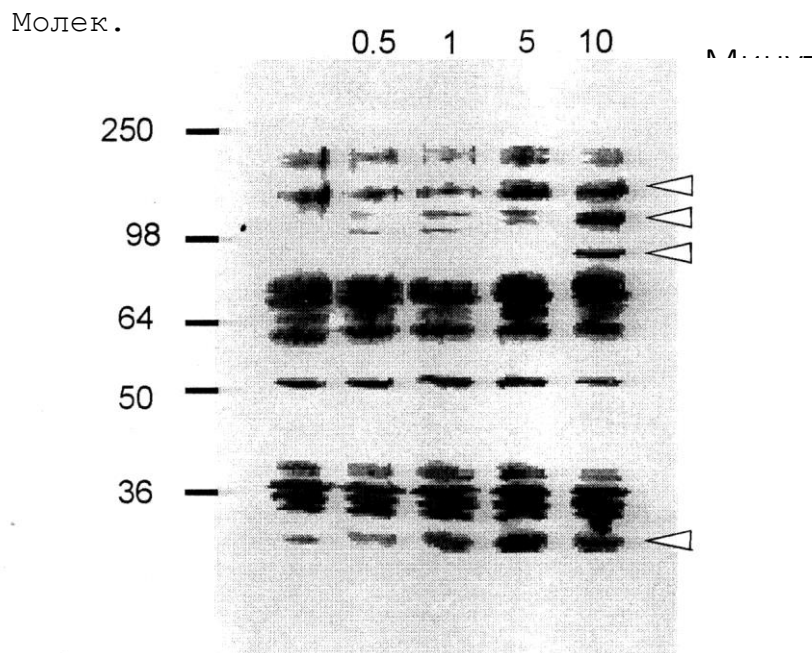
фигура 2. Разделяне чрез FPLC на конюгиралите молекули 7G6-овалбумин от нереагиралите мономерни; А: Свободна молекула SATA; В: Реакционната смес след края на конюгацията; С: Антитяло 7G6



Фигура 3. Химерата 7G6-овалбумин се свързва към CR1/2 *in vitro*. Суспензия от клетки IIA1.6 бяха инкубирани първо с неконюгирано антитяло 7G6 (a и c) или с химерната молекула 7G6-овалбумин (b и d), последвано от второ инкубиране с FITC-маркирани миши анти-плъщи антитела (a и в) или със заешки анти-овалбуминови IgG комбинирани с FITC-маркирани кози анти-заешки антитела (c и d). Непрекъснатите линии представят сигнала от клетките, инкубирани както с първия, така и с втория реагент. Прекъснатите линии представят сигнала от контролните клетки инкубирани само с вторите антитела.

Тирозин фосфорилиране

Следващият въпрос, който ни интересуваше, беше дали свързаната химерна молекула предизвиква интрацелуларен отговор в мишите В-клетки. Електрофоретичният мотив на активираните клетки

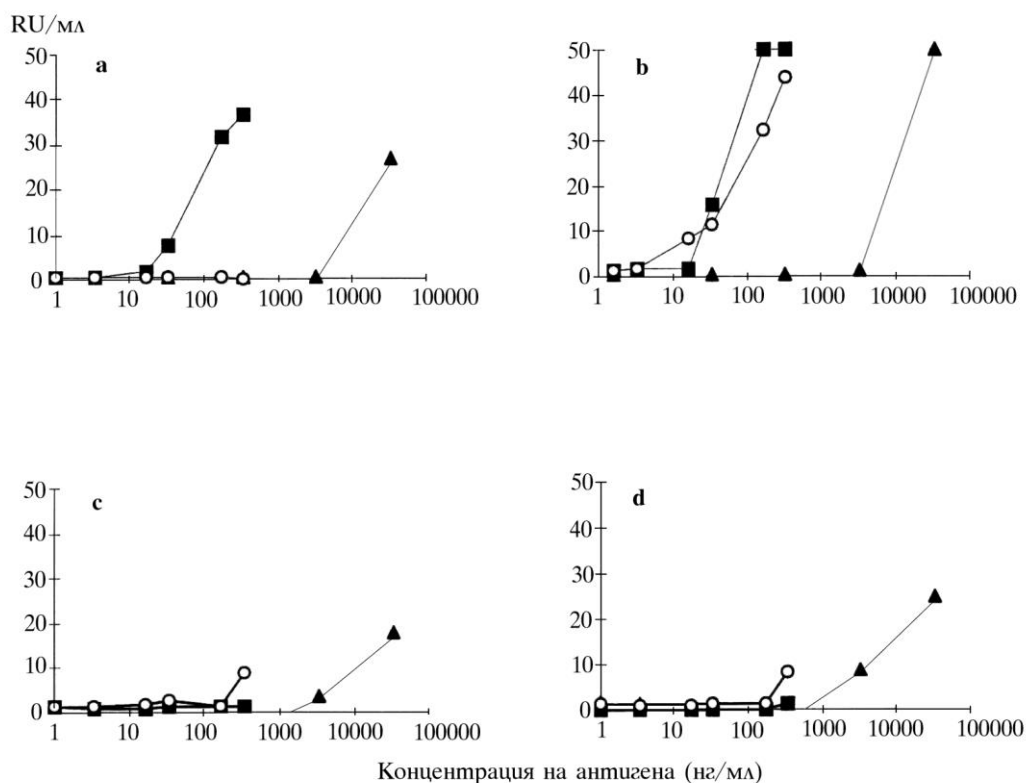


фигура 4. Анализ на тирозин-фосфорилирането, индуцирано в клетки IIA1.6 след третиране с химерата 7G6-овалбумин. Клетките IIA1.6 бяха инкубирани с 7G6-овалбумин за 20 мин./4°C, промити и инкубирани на 37°C за различни периоди от време (0.5, 1, 5 и 10 мин.). Като негативен контрол същите клетки бяха третирани само с хранителна среда (най-лявата линия), като по-този начин се представя базовото фосфорилиране. Клетките бяха лизирани, протеините разделени на 10% SDS-PAGE и анализирани с блот върху мембрана PVDF с анти-фосфотирозин моноклонално антитяло.

получен при свързването на рецептора за комплемента с 7G6-конюгирия овалбумин при клетъчна линия IIA1.6 беше изследван чрез установяване на протеин-фосфорилирането на тирозиновите остатъци. Установено беше силно фосфорилиране на две протеинови ивици от 110 kDa и 74 kDa след 10-минутно инкубиране при 37°C на клетките, третирани с 7G6-овалбумин. Това показва индукция на интрацелуларен сигнал (Фиг. 4). Този фосфорилационен мотив не беше установен при инкубиране на клетките с химера от случайно избрано антитяло, конюгирано с овалбумин, което доказва, че свързването на 7G6-конюгирия овалбумин към рецептора за комплемента е отговорно за фосфорилирането на споменатите протеини. Контролни експерименти с пречистени антитела 7G6 показаха подобен мотив на фосфорилиране на 110 kDa и 74 kDa протеинови ивици, което доказва че конюгирането на 7G6 с овалбумин в общи линии не променя сигнала от прицелните рецептори.

Представяне на антигена *in vitro*

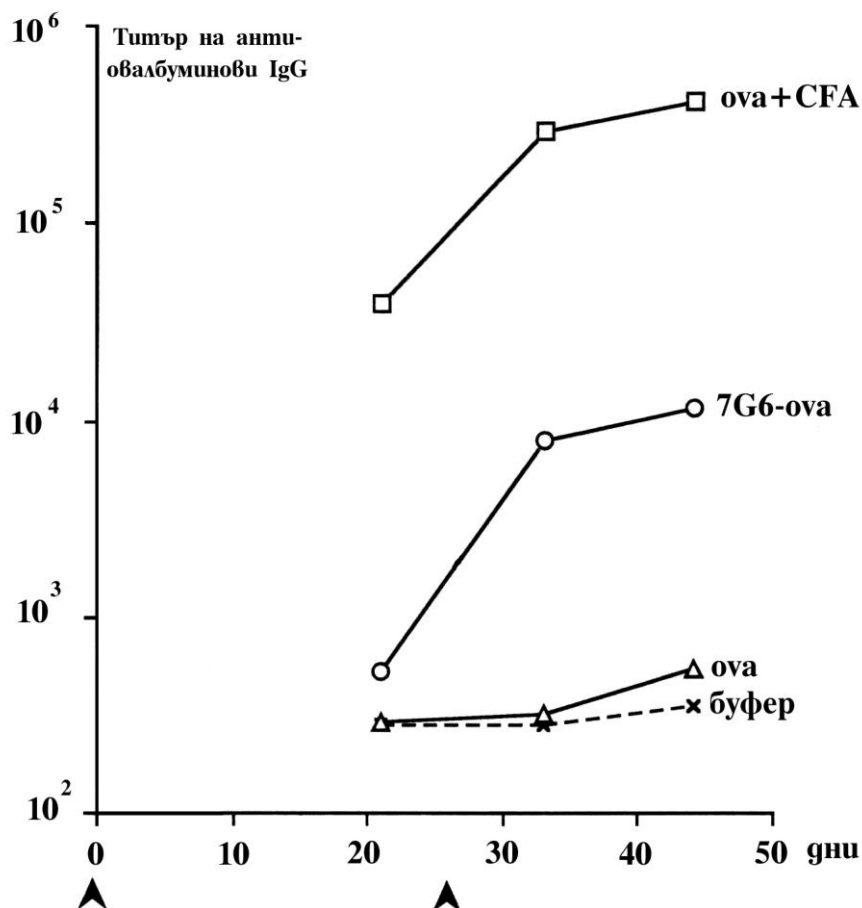
Способността на рецептора за комплемента да модулира ефективността на антигенното представяне от В-лимфоцити



Фигура 5. Представяне на антигена от В-лимфоцити посредством CR1/2 на овалбумин-специфична Т-хелперна клетъчна линия и синтез на IL-2 (RU/мл). Нетрансфектирани или трансфектирани клетки IIA1.6 бяха инкубирани с овалбумин-специфични Т-хелперни клетки за 24 часа/37°C в присъствието на различни концентрации от 7G6-овалбумин (квадрати), химерни молекули с контролно антитяло от същия изотип SHL45.6-овалбумин (кръгове) или свободен овалбумин (триъгълници). Антигенното представяне се следеше при нетрансфектирани клетки IIA1.6 (a), клетки IIA1.6 трансфектирани с човешки FcγRIIa/γ-γ (b), клетки A20 (c) и клетки IIA1.6 трансфектирани с миши FcγRIIb1 (d). Синтезираният от Т-хелперите в културалната среда IL-2 беше измерван чрез CTLL пролиферативен метод, като резултат от ефективно антигенно представяне. Резултатът е представен като условни единици (RU/мл).

in vitro беше проучено чрез използването на 7G6-конюгиран овалбумин, IIA1.6 клетки и овалбумин-специфичен Т-клетъчен клон. Ефективността на клетките IIA1.6 при антигенно представяне на овалбумин-специфичните Т-клетки беше наблюдавана при инкубирането им с химерната молекула 7G6-овалбумин (Фиг. 5а). Свободният овалбумин предизвиква видимо антигенно представяне чрез IIA1.6 клетките само при използване на високи концентрации (повече от 15.0 мкг/мл) (Фиг. 5а). Овалбуминен конюгат с изотипно контролно антитяло SHL45.6 не можа да бъде представено чрез IIA1.6 клетките (Фиг. 5а), което показва, че наблюдаваният ефект на 7G6-овалбумина зависи от взаимодействието с CR1/2. Като положителна контрола бяха използвани клетки IIA1.6 трансектирани с човешки FcγRI. Тези клетки бяха инкубирани с SHL45.6-овалбумин, в резултат на което се получи ефективно антигенно представяне. Това доказва (Фиг. 5в) способността на тази химера да взаимодейства с FcγRI, което води до ефективно представяне на епитопи на овалбумина. Представянето на антигена, предизвикано от 7G6-овалбумин беше напълно блокирано от добавянето на свободно антитяло 7G6, но не и чрез добавянето на CR1-специфично моноклонално мише антитяло 8C12, което предполага участието поне на CR2. Чрез тези резултати се демонстрира, че овалбуминът може да бъде ефективно представен чрез В-клетки, когато бъде конюгиран с 7G6, както и че този процес ангажира поне CR2, експресиран от тези клетки.

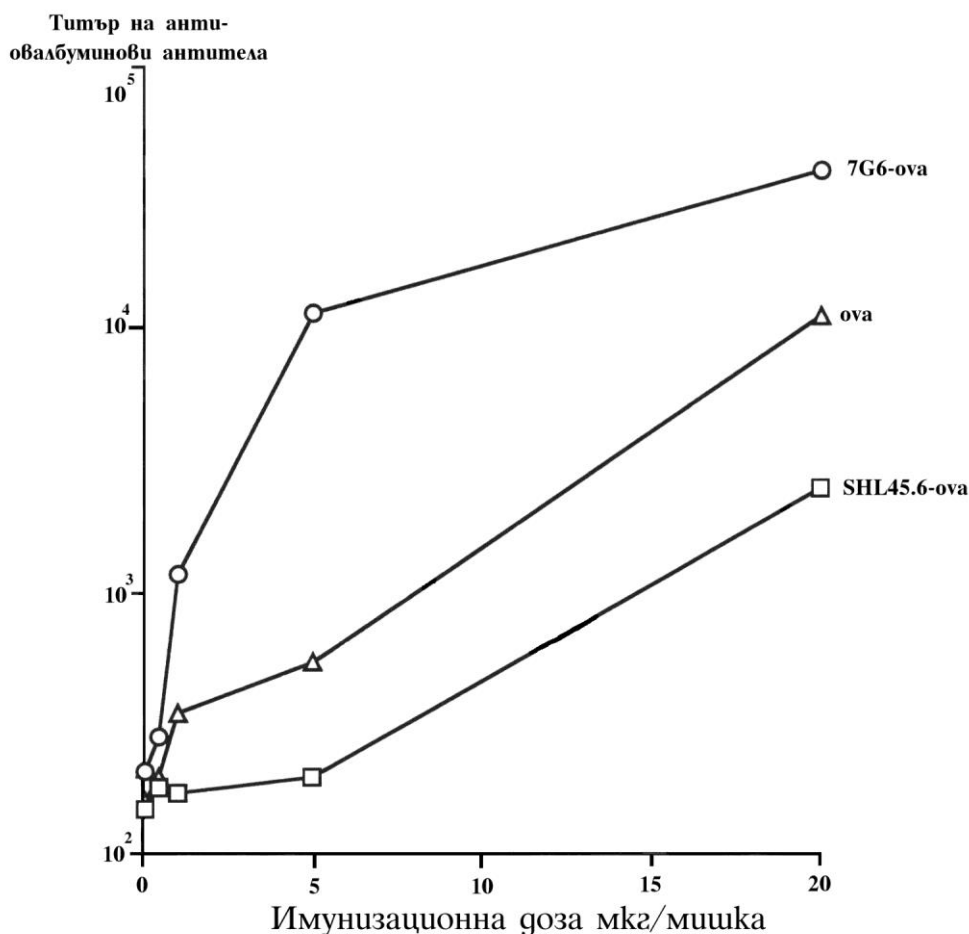
По-късно беше изследвано взаимодействието на химерната молекула 7G6-овалбумин с FcγRIIb експресиран от В-клетки и влиянието на това взаимодействие върху представянето на антигена. Беше използвана мишата клетъчна линия IIA1.6, трансектирана с FcγRIIb. Представянето на антигена посредством IIA1.6 при инкубиране с 7G6-овалбумин беше напълно подтиснато при трансектираните с FcγRIIb клетки (Фиг. 5d). Този резултат беше потвърден чрез невъзможността на естествено-експресираща FcγRIIb В-клетъчна линия A20 да осъществи антигенно представяне след инкубиране с 7G6-овалбумин (Фиг. 5с). Тези резултати показват, че взаимодействието на комплекса антиген-антитяло с FcγRIIb на В-клетките инхибира CR-зависимото представяне на антигена от тези клетки.



Фигура 6. Първичен и вторичен анти-овалбуминов отговор, индуциран чрез имунизация с 7G6-овалбумин. Мишките бяха инжектирани i.p. двукратно (през 26 дни) с 5 мкг 7G6-овалбумин (кръгове), свободен овалбумин (триъгълници), свободен овалбумин в пълен адювант на Freund (CFA) (квадрати) или с буфер (кръстове). Резултатите са представени като титър на анти-овалбуминови антитела в серума на третата седмица след първата имунизация и първата и третата седмица след втората имунизация измерени чрез ELISA. Показана е средната стойност от 5 мишки.

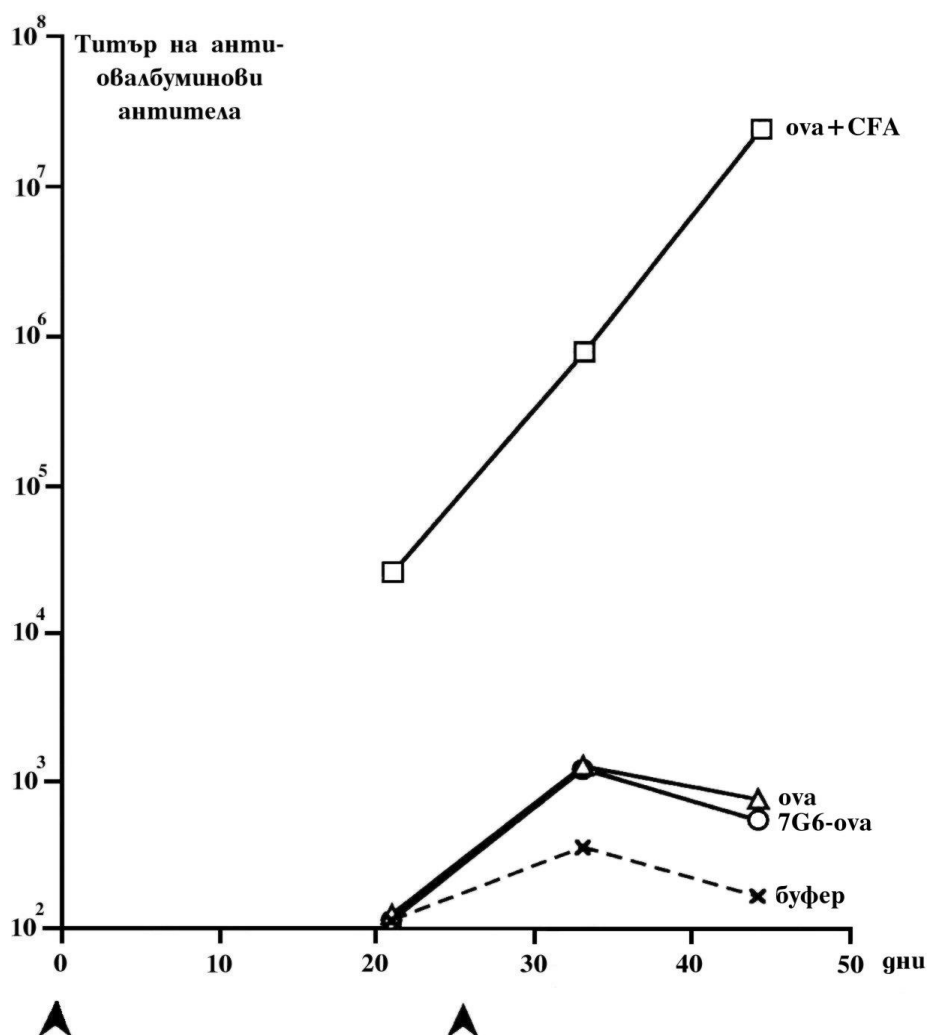
Имунизация с конюгата 7G6-овалбумин

Като следващ етап беше изследван ефекта от насочването на овалбумина към CR1/2 и FcγR по време на отговора *in vivo*. Когато бяха имунизирани нормални Balb/c мишки с конюгата 7G6-овалбумин, то отговорът с анти-овалбуминови антитела беше видимо повишен спрямо отговора получен след имунизация със свободен овалбумин (Фиг. 6).



Фигура 7. Влияние на имунизационната доза върху вторичния анти-овалбуинов отговор след двукратна имунизация с химерната молекула антитяло-овалбумин. Мишките бяха инжектирани i.p. двукратно (в интервал от 26 дни) с различни дози от 7G6-ova (кръгове), несвързан овалбумин (триъгълници) или SHL45.6-ova (квадрати). Резултатите са представени като титър на анти-овалбуинови имуноглобулини в серума на третата седмица след втората имунизация; взета е средна стойност от 5 мишки.

Същото се наблюдава и при вторичния имунен отговор (Фиг. 6). Този потенциращ ефект беше най-силен при доза от 1.0 мкг или по-висок за мишка (Фиг.7). Когато мишките бяха имунизирани с овалбумин в пълен адювант на Freund като положителна контрола, както първичният, така и вторичният анти-овалбуминов отговор бяха силни (Фиг. 6).



Фигура 8. Анти-овалбуминов отговор при CR2-KO мишки предизвикан с 7G6-ova. Мишките бяха инжектирани i.p. (с 26 дневен интервал) с 5 мкг 7G6-ova (кръгове), несвързан овалбумин (триъгълници), несвързан овалбумин в пълен адювант на Freund (квадрати) или с буфериран физиологичен разтвор (кръстове). Резултатите са представени като титър на анти-овалбуминови имуноглобулини в серума на третата седмица след първата имунизация и на първата и третата седмица след втората имунизация. Представеният резултат е средна стойност от 5 мишки. Стрелките показват дните на имунизация.

Имунизацията с химерната молекула 7G6-овалбумин не предизвика антитель-отговор при CR1/2-дефицитни мишки (Фиг. 8), докато ефектът при имунизация на дивия тип мишка като контроли предизвика силен анти-овалбуминен отговор. При CR1/2-дефицитни мишки се получи силен имунен отговор при имунизация с овалбумин в пълен адювант на Freund (положителна контрола) (Фиг. 8).

Отговорът на животните, имунизирани с химерата SHL45.6-овалбумин (като изотипна контрола) беше значително по-нисък, отколкото след имунизацията със

свободен овалбумин (Фиг. 7). Вероятната причина е взаимодействието на химерата с инхибиращия FcγRIIb на В-клетките. Този резултат беше подкрепен от експериментите *in vitro*, които показаха, че трансфектираните с FcγRIIb клетки IIA1.6 не представят ефективно епитопи от овалбумина на овалбумин-специфични Т-клетки след инкубиране с 7G6-овалбумин (Фиг. 5d). Обобщено погледнато, двата резултата показват, че свързването на овалбумина към анти-комплемент рецепторното антитяло 7G6 силно повишава хуморалния имунен отговор към овалбумина и това повишаване е зависимо от CR1/2. От друга страна взаимодействието на същия комплекс антиген-антитяло с FcγRIIb може да подтисне хуморалния отговор.

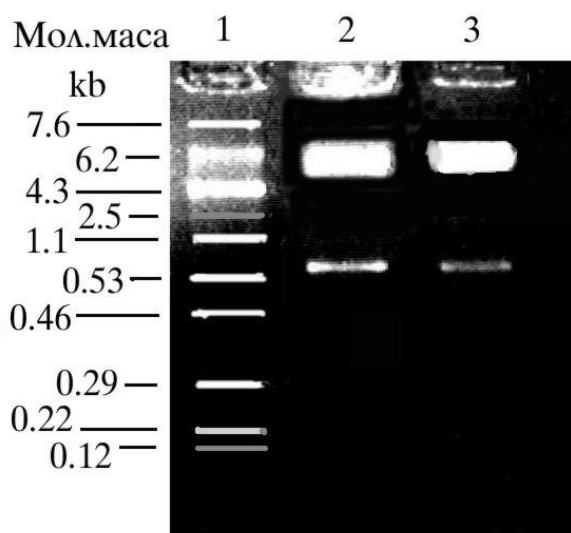
2. Модулиране на имунния отговор чрез генно-инженерни химерни молекули

2.1. Генетична част

Получаване на едноверижни Fv-фрагменти специфични срещу рецептори за комплемента I и II и FcγRI.

Изолирано беше цялото количество РНК от хибридома 7G6, продуцираща антитела специфични срещу миши рецептори за комплемента I и II. За получаване на кДНК от вариабълните участъци на леката и тежката верига на имуноглобулиновата молекула бяха използвани специфични праймери и RT-PCR. Получената кДНК беше използвана като матрица за PCR за получаването на V_L и V_H. Чрез праймерите в новосинтезираната ДНК молекула се въвежда секвенция, кодираща гъвкава връзка от серин и глицин (G₄S)₃, както и рестрикционни позиции, даващи възможност за клониране и амплифициране. V_L и V_H бяха свързани помежду си, като V_L беше поставена откъм 5' края на молекулата, а между двете вериги беше монтирана линкерната секвенция. По аналогичен начин беше конструиран ДНК фрагмент, кодиращ едноверижна Fv молекула, специфичен към FcγRI. Всички получени ДНК молекули бяха анализирани на 2% агарозна електрофореза в присъствието на етидиев бромид (Фиг. 9).

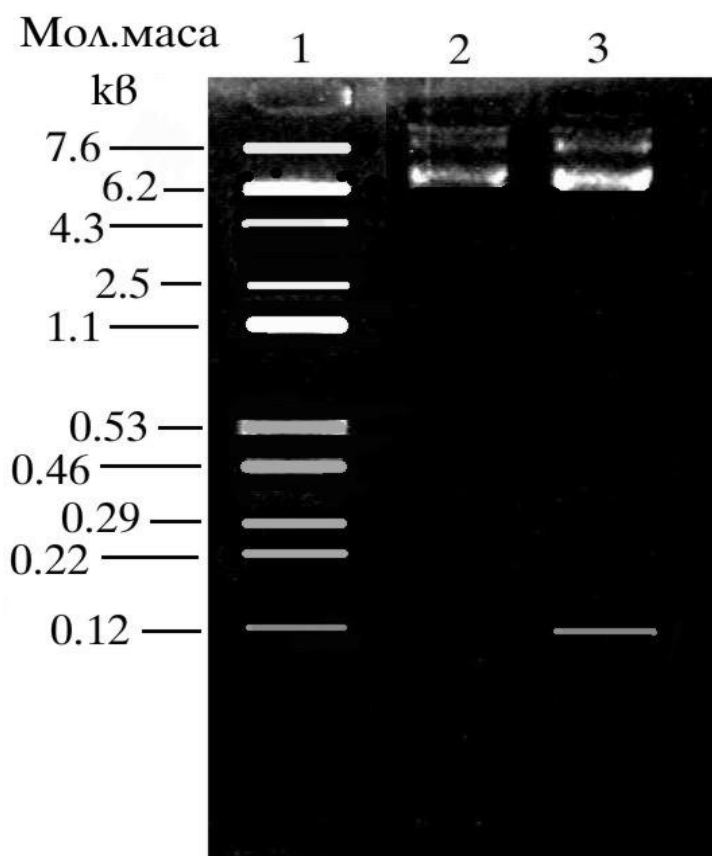
Двете химерни ДНК молекули бяха клонирани и амплифицирани в клониращ вектор pNep.



Фигура 9. Рестрикционен анализ на плаزمиди, съдържащи химерни ДНК фрагменти, кодиращи едноверижна Fv молекула с рестриктази NotI/NcoI. Линия 2 - фрагмент (750 bp), кодиращ scFv специфичен към CR1/2; линия 3 - фрагмент (750 bp), кодиращ scFv специфичен към FcγRI; линия 1 – молекулни маркери. Електрофорезата беше проведена в 2% агарозен гел в присъствието на етидиев бромид. Във всяка ямка бяха нанесени по 10.0 мкл проба, съдържаща 2.0 мкл от анализираната ДНК и 8.0 мкл натоварващ буфер. Резултатът беше наблюдаван на УВ-илюминатор.

2.1.2. Клониране на пептид, съставна част от вирусен структурен протеин.

От грипен вирус A/PR/8/34 беше изолирано цялото количество РНК. Чрез специфичен праймер и RT-PCR беше амплифициран прицелен участък от вирусния хемаглутинин HA 317- 341. Този участък кодира В и Т-клетъчни епитопи, отговорни за индуциране на имунния отговор. Получената кДНК беше амплифицирана чрез дълги специфични sense и antisense праймери посредством PCR-техника. След анализирането на получената dsДНК, PCR-реакцията беше повторена в петкратен обем. Чрез праймерите в полученият пептид бяха въведени RcaI рестрикционна позиция и (глицин)₃-серин-(глицин)₃ линкерен район за свързване. Крайният продукт беше анализиран в 3% агарозен гел в присъствието на етидиев бромид (Фигура 10). Полученият вирусен пептид беше лигиран в клониращ вектор.



Фигура 10. Рестрикционен анализ на плазмид, съдържащ ДНК фрагмент, кодиращ вирусен пептид от хемаглютинин на грипен вирус A/PR/8/34 с рестриктази BamHI/NotI. Линия 2 - фрагмент (100 bp), кодиращ вирусния пептид; линия 3 – вектор несъдържащ клонираната молекула; линия 1 – молекулни маркери. Електрофорезата беше проведена в 3% агарозен гел в присъствието на етидиев бромид. Във всяка ямка бяха нанесени по 10.0 мкл проба, съдържаща 2.0 мкл от анализираната ДНК и 8.0 мкл натоварващ буфер. Резултатът беше наблюдаван на УВ-илюминатор.

2.1.3. Амплификация на клонираните продукти в компетентни бактериални клетки.

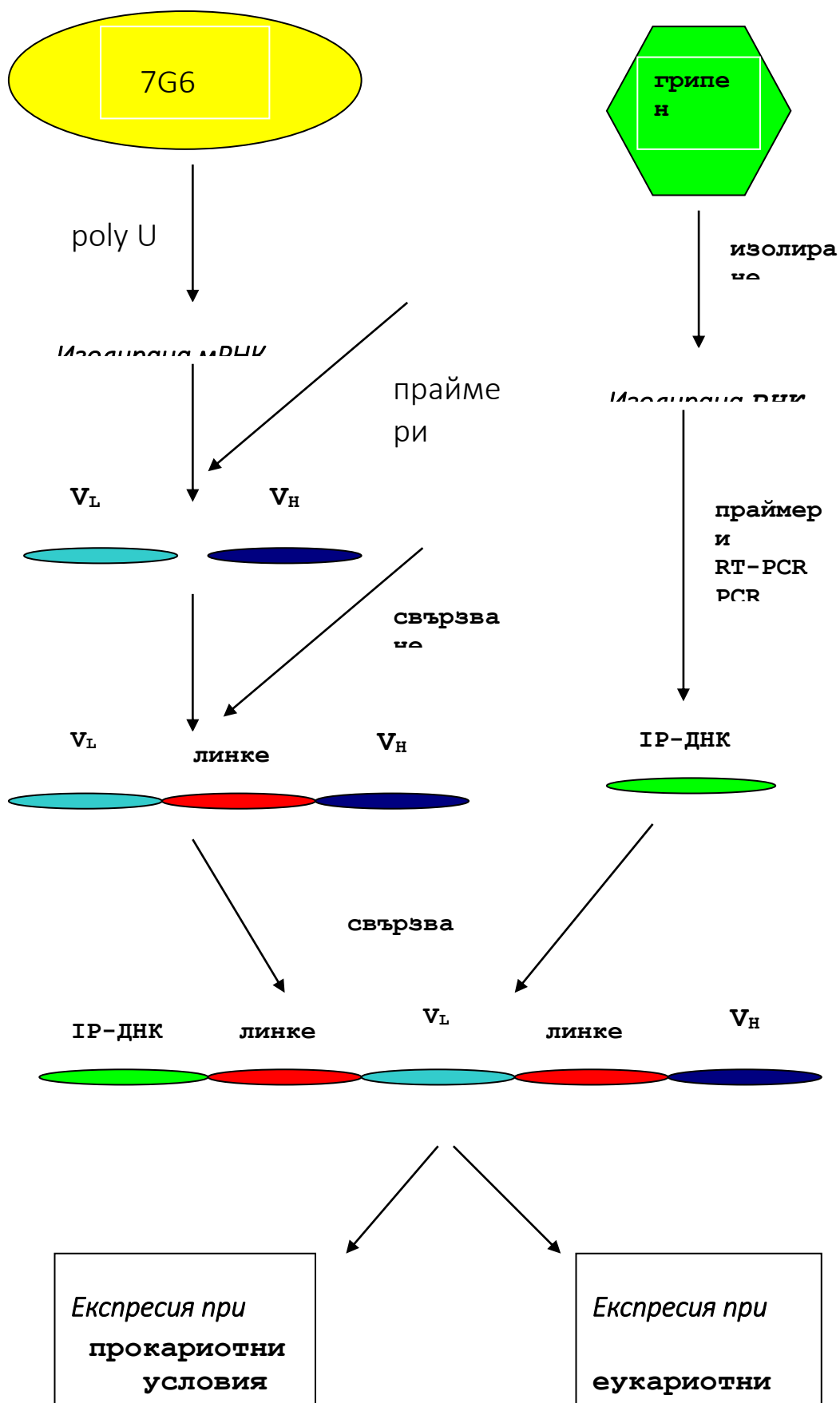
От бактериалните щамове *E. coli* 10f' и *E. coli* XL-1 blue бяха получени компетентни клетки, подходящи за амплификация на чужд генетичен материал. Химерните молекули pHen-sc7G6 и pHen-sc22 бяха амплифицирани чрез трансформация на компетентни клетки от щам *E. coli* 10F'. Вирусният пептид беше амплифициран чрез трансформация на компетентни клетки от щам *E. coli* XL-1 blue с pGem-IP. Компетентните клетки бяха култивирани в прогресивно увеличаващи се обеми от хранителна среда. На всеки

междинен етап част от плазмидната ДНК, съдържаща клонираните фрагменти беше изолирана по "boiling" метод или фенол-хлороформен метод и подложена

на рестрикционен анализ с цел доказване идентичността на интересуващите ни фрагменти.

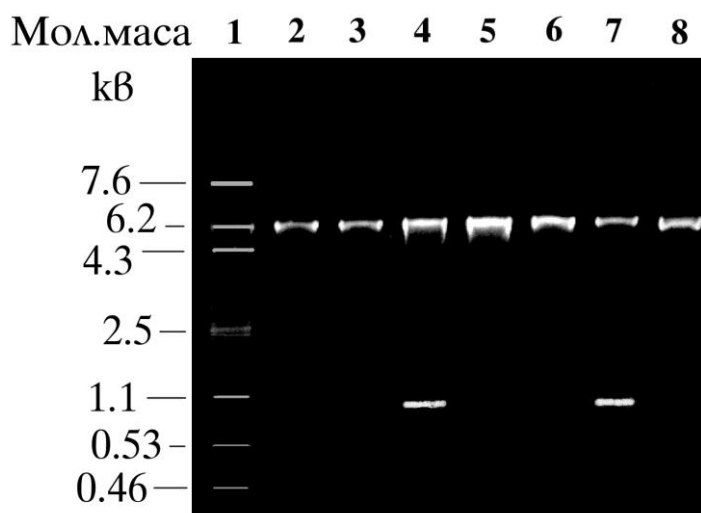
2.1.4. Вмъкване на химерните ДНК фрагменти в експресионен вектор pNut.

Интересуващите ни генетични фрагменти бяха изолирани от амплифициращите вектори чрез рестрикция при препаративни условия. Фрагментите бяха изолирани на 2% LMP агарозна електрофореза. След отварянето на вектора pNut с аналогични рестриктази, фрагментите бяха монтирани във вектора в последователността, показана на Фигура 11. Бяха получени два основни типа химерни ДНК молекули – кодиращи едноверижно Fv-7G6 и кодиращи едноверижно Fv-22 антитяло, всяка от които беше свързана с едно, две или три копия от ДНК, кодираща вирусния пептид. След лигарирането на химерната ДНК молекула във вектора, той беше амплифициран чрез трансформация на щам *E. coli* 10F'. Векторът пренася в трансформираната бактериална клетка ампицилинова резистентност, която е използвана като селективен маркер за успешно трансформираните клетки. След култивиране на бактериалната култура, плазмидната ДНК, носеща химерната молекула беше изолирана и пречистена по "Boiling"-метода или по фенол-хлороформният метод.



Фигура 11. Конструирание на химерна ДНК-молекула, кодираща scFv антители, специфично към CR1/2 или FcγRI, както и вирусен пептид от грипния хемаглутинин.

Изолираната ДНК беше окончателно пречистена чрез колона Qiaex (Qiagen, GB) и тествана с рестрикционни ензими BamHI/Ecl XI за наличието на инсерт (Фигура 12).

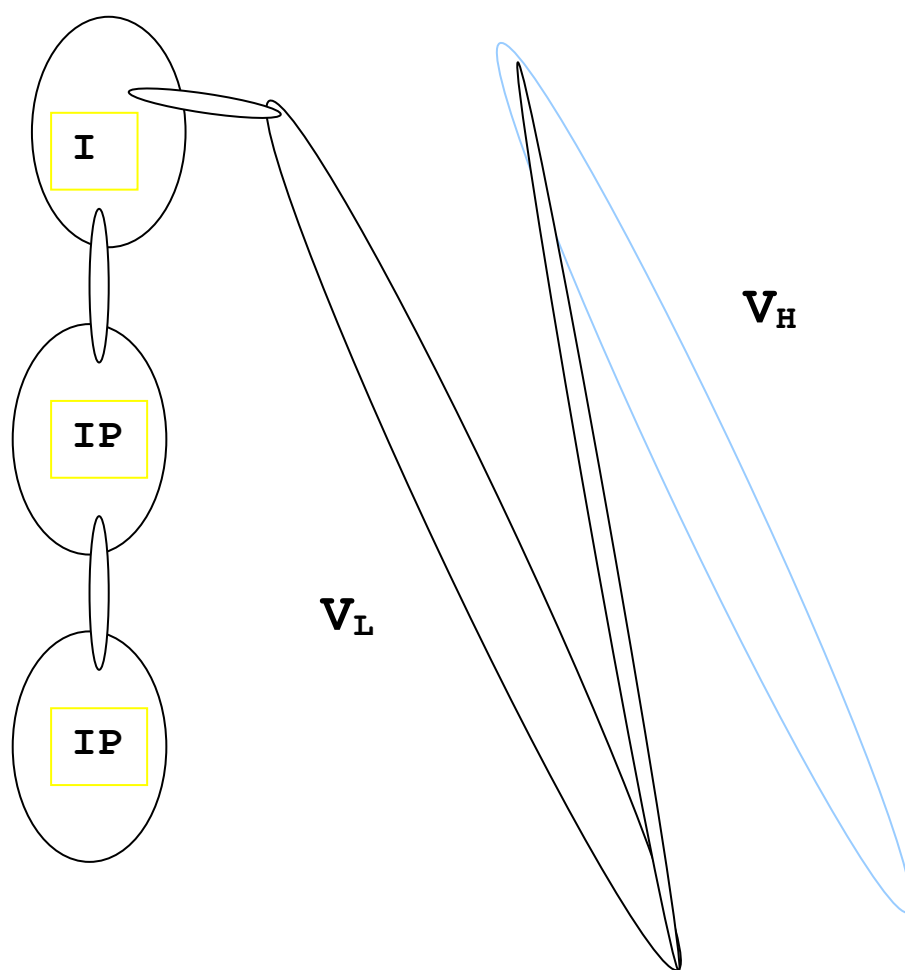


Фигура 12. Рестрикционен анализ на плазмиди, съдържащи scFv-IP1 с рестриктази BamHI/EclXI. Позитивните клонове 4 и 7 съдържат съответно sc7G6-IP1 и sc22-IP1. Електрофорезата беше проведена в 1.2% агарозен гел в присъствието на етидиев бромид. Във всяка ямка бяха нанесени по 10.0 мкл проба, съдържаща 2.0 мкл от анализираната ДНК и 8.0 мкл натоварващ буфер. Резултатът беше наблюдаван с УВ-илюминатор.

2.2. Експресия на конструираните ДНК химерни молекули

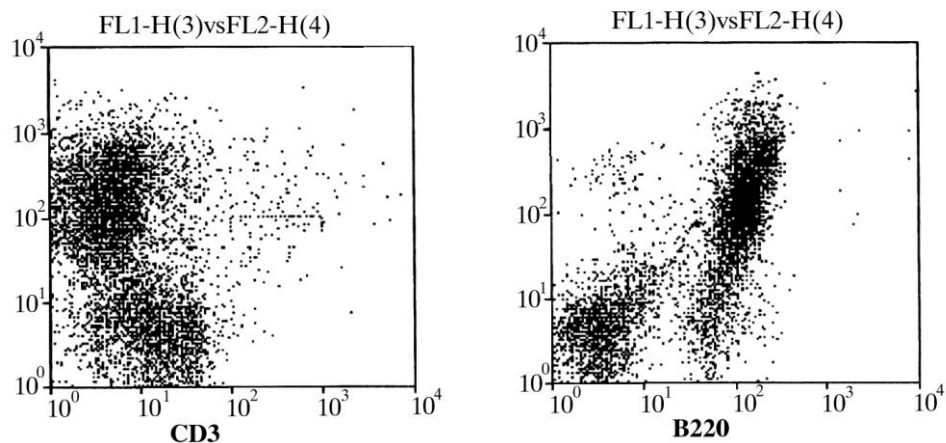
2.2.1. Експресия в прокариотна система

Рекомбинантната ДНК-молекула sc7G6-IP(1-3), съдържаща В и Т-клетъчни епитопи на грипния хемаглутинин, както и V-области на леката и тежка верига на антитяло 7G6, беше

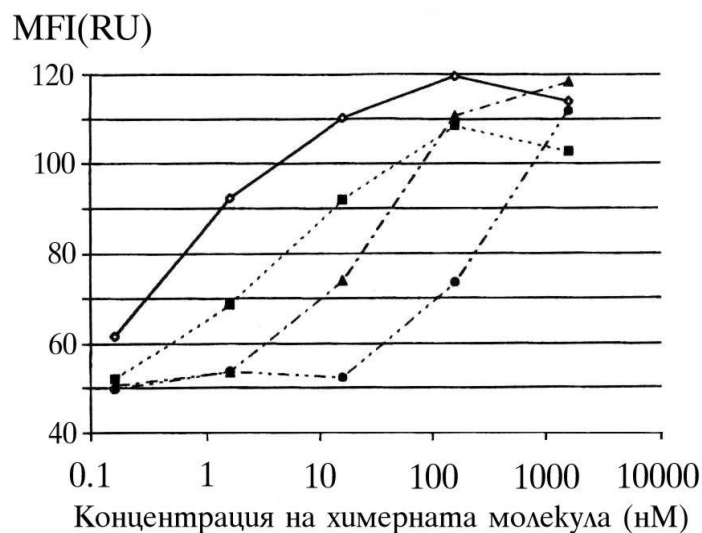


Фигура 13. Моделен вид на експресираната химерна молекула sc7G6-IP(1-3)

експресирана в прокариотна система. Експресията беше извършена в клетки BL23(DE3) като включени тела. Химерните протеинови молекули бяха изолирани, пречистени и концентрирани чрез утаяване, денатуриране, и обратно ренатуриране чрез афинитетна хроматография. Смисълът от насочването на моделния антиген към рецепторите за комплемент CR1/2 е да се изследва участието на тези рецептори при представянето на антигена, без да се заангажират други рецептори. Това е възможно поради факта, че в химерната протеинова молекула липсва Fc доменът на антитялото (Фиг. 13), което участва и в други взаимодействия. Затова от първостепенно значение беше да се установи, че химерната молекула разпознава само прицелните рецептори. За установяване на тази специфичност, обработвахме клетки от слезка с химерната молекула

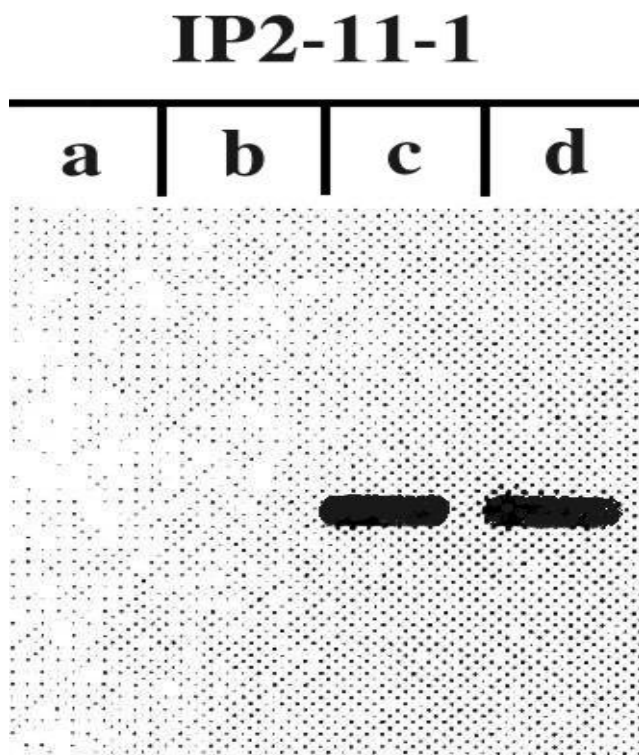


фигура 14. Химерната молекула IP₁7G6scFv се свързва само към В-клетките. Клетки от слезка бяха инкубирани с химерната молекула IP₁7G6scFv (10 мкг/мл), после с биотинилирано козе анти-плъше IgG1-антитяло и Экстравидин-РЕ. При последния инкубационен етап бяха добавени също анти-CD3-FITC (a) или анти-B220-FITC (b).



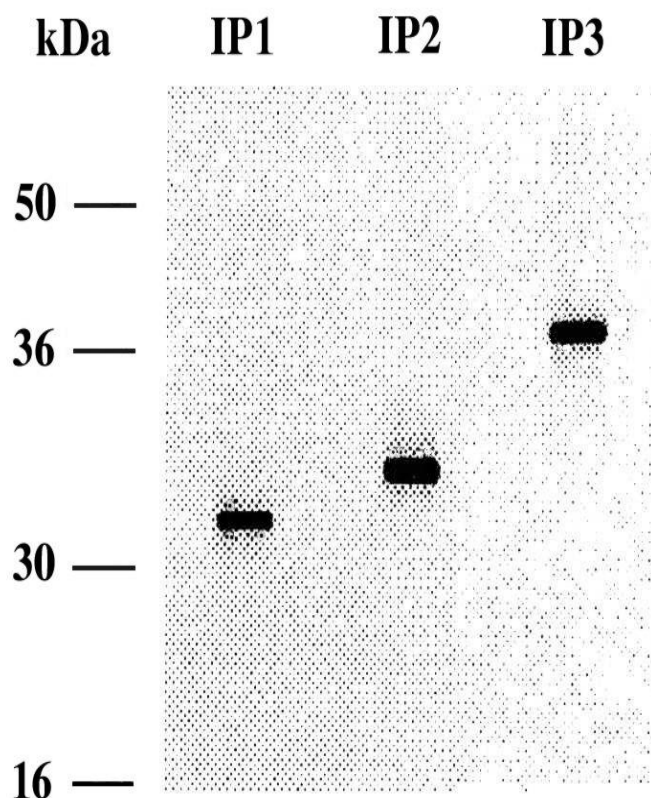
фигура 15. Влияние на броя на включените в химерата грипни пептиди върху свързването и с CR1/CR2 експресирани клетки. 2×10^5 клетки IIA1.6 бяха инкубирани с десетократни разреждания на химерната молекула, съдържаща различен брой пептиди: само 7G6 (плътна линия), IP1-7G6 с един пептид (запълнени квадрати), IP2-7G6 с два пептида (триъгълници) и IP3-7G6 с три пептида (кръгове). Свързването беше наблюдавано чрез флуоресцентно белязани антитела и средната интензивност на флуоресценцията (MFI) бе изразена като функция от концентрацията на химерната молекула.

и едновременно с моноклонални антитела срещу В и Т-клетъчни маркери. Както се вижда на Фигура 14, химерната протеинова молекула се свързва само към В-клетките, които по правило експресират CR1 и CR2. От своя страна инкубирането на клетките с интактното антитяло 7G6 инхибира свързването на химерната молекула.



фигура 16а. Включеният в химерата грипепептид запазва своя В-клетъчен епитоп. Експресираният в бактерии IP1-7G6 беше получен чрез лизиране на клетките с ултразвук и разреден 1:10 000 (a), 1:1 000 (b), 1:100 (c) и 1:10 в PBS. Пробите бяха денатурирани и анализирани с 12% SDS-PAGE, прехвърлени на нитроцелулозна мембрана и визуализирани чрез анти-IP антитялото IP2-11-1 посредством ECL-техника.

Тъй като биологичната активност на химерната молекула е зависима най-вече от нейния афинитет към рецептора, нашата цел беше да изследваме ефекта на броя на включените в нея пептиди върху афинитета на свързването на същия. Както е показано на Фигура 15 свързващата способност намалява с увеличаването на броя на включените в химерата копия от вирусните пептиди. За следващите експерименти беше избрана химерната протеинова молекула, съдържаща едно копие от вирусния пептид (IP).

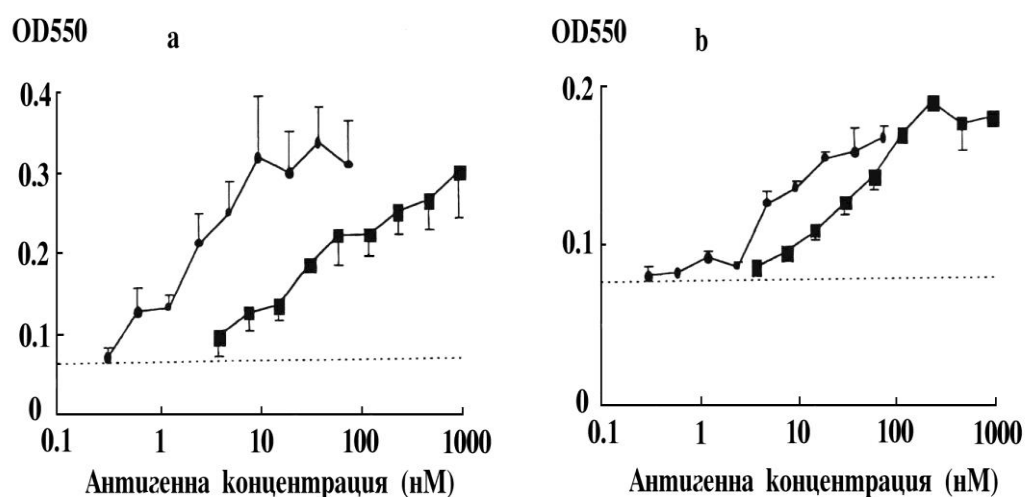


Фигура 16в. При включването в химерите на 1, 2 или 3 епитопа от грипен хемаглутинин те запазват своите В-клетъчни епитопи. По 1 мкг от пречистените химерни протеинови молекули съдържащи едно (IP1-7G6), две (IP2-7G6) и три (IP3-7G6) копия от IP-пептида бяха подложени на SDS-PAGE, блотинг и визуализация с моноклоналното антитяло IP2-11-1.

Разпознаването на грипният пептид HA317-341 от моноклоналното антитяло IP2-11-1 е конформационно-зависимо. За да можем да променяме конформационната структура на пептида го разположихме в N-терминалния участък на scFv, като го свързахме с гъвкава линкерна секвенция. Експресираният в прокариотна система химерен протеин беше анализиран с цел доказване присъствието и пространствения достъп до вирусния пептид. Моноклоналното антитяло IP2-11-1, специфично срещу В-клетъчния епитоп на грипния хемаглутинин разпознава химерната молекула при Western blot (Фиг. 16а и 16в) и ELISA, което показва, че вирусният пептид, включен в структурата на scFv запазва своя В-клетъчен епитоп. При включването в химерните молекули на 1, 2 или 3 копия от епитопа свързването от моноклоналното антитяло

IP2-11-1 не се променяше, което показва, че броя на копията не ограничава достъпа до В-клетъчния епитоп.

Пептидният участък от вирусния HA 317-329 представлява ограничен по I-E^d Т-клетъчен епитоп. Тъй като епитопът няма N-краен защитен регион и има 16 допълнителни автентични аминокиселинни остатъка в С-края, ние очаквахме вътреклетъчното обработване и свързването с молекули на ГКС от II клас да не бъдат повлияни от разположението на пептида в химерната молекула. Както се вижда на Фигура 17, вирусният пептид в състава на scFv запазва своя Т-клетъчен епитоп. Инкубацията на химерната молекула с АПК води до активирането на пептид-специфични Т-клетки. Ефективността на антигенното представяне беше повишена с насочването на IP-пептидите към CR1/2.



Фигура 17. Пептидът от грипен вирус, включен в химерата IP1-7G6 запазва Т-клетъчния си епитоп. 1×10^4 клетки 2РК3 бяха инкубирани с различни концентрации от антигена и с 2×10^4 IP-специфични Т-клетки: IP12-7 (а) или H1-9-7-10 (b). Концентрацията на IL-2 беше доказана в 24-часови културални супернатанти чрез измерването на пролиферацията на IL-2-зависима линия STLL-2 използвайки МТТ-техника. Кръговете представят ефекта на IP1-7G6scFv, а квадратите - на свободния IP пептид. Продукцията на IL-2 предизвикана от двата антигена е подчертано различна и при двете Т-клетъчни линии.

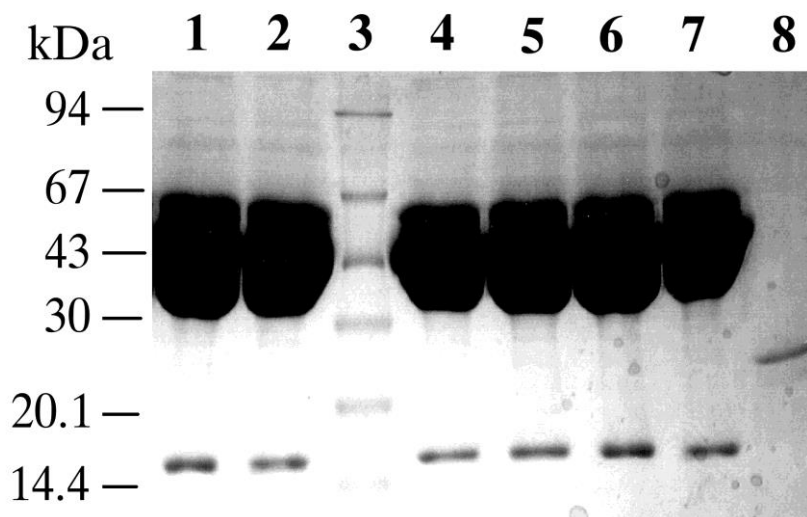
2.2.2. Експресия в еукариотна система

Експресията на генно-инженерните химерни молекули в еукариотна система би могла да осигури някои предимства спрямо тази в прокариотната бактериална система:

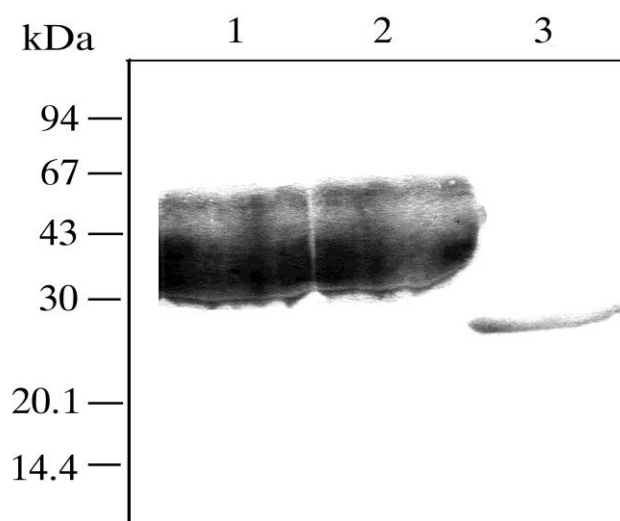
1. Еукариотната система в лицето на клетъчна линия COS притежава естествени механизми за експресия и секреция на химерната ДНК-молекула, която по своята същност е съставена от сегменти с еукариотен произход. Това би означавало, че новосинтезираната протеинова молекула ще бъде експресирана при естествени еукариотни условия, избягвайки риска от грешно разчитане на ДНК-рамката, което е възможно поради малките разлики в генетичните кодове при прокариотите и еукариотите.
2. Притежавайки специфични органели за вътрешно-клетъчен транспорт и секреция през цитоплазмената мембрана, еукариотната експресионна система запазва нативната структура на синтезирания протеин, като го отделя в хранителната среда без никакви конформационни промени. Това е предпоставка за по-високата биологична активност на химерните молекули.
3. При експресия в еукариотна система се избягват процесите на обработка на протеиновите молекули с цел тяхното изолиране и пречистване от бактериалните клетки. Това в ной-голяма степен запазва нативната структура на протеиновата молекула.

За трансфекция на клетъчна линия COS бяха избрани позитивни клонове плазмиди, съдържащи химерните ДНК-молекули sc7G6-IP1 и sc22-IP1. След трансфекцията на клетъчна линия COS с избраните конструирани плазмиди, бяха селектирани клетките, успешно приели външната ДНК-молекула. На 24 час в средата беше добавен 50 мкМ/литър метотраксат. Цитостатикът подтиква растежа на нетрансфектираните COS-клетки, докато трансфектираните, които са 5-10% от общия брой успяват да преживеят. Това става, защото приелите чуждата ДНК-молекула притежават DFER-ген, осигуряващ им резистентност към метотраксата. След селекцията и размножаването на селектираните клетки, културалните среди бяха тествани за наличие на синтезиран химерен протеин.

Поради изключително разнообразното съдържание на белтъци в средата и много ниското съдържание на продуцираната химерна протеинова молекула, беше невъзможно да се докаже нейното наличие в културалната среда чрез директно оцветяване на целия протеинов набор (Фигура 18), както и използването на същата среда в имунологични техники като проточна цитометрия.

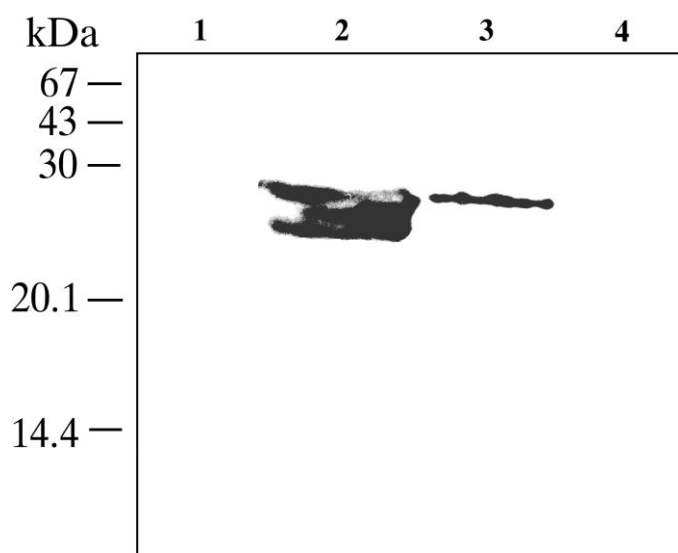


Фигура 18. SDS-PAGE на културални течности, след култивиране на трансфектирани COS клетки с sc7G6-IP1 и sc22-IP1. Линии 1 и 2 (sc7G6-IP1), 3 (молекулни маркери 14-94 кDa), 4-7 (sc22-IP1) и 8 (пречистен химерен протеин sc7G6-IP1, експресиран в бактериална система). В ямките бяха нанесени по 10 мкг белтък. Оцветяването беше извършено с разтвор на Coomassie Brilliant blue.



Фигура 19. SDS-PAGE-анализ на културалните течности от култивирането на трансфектирани COS-клетки след концентрация и пречистване на протеините в границите 10-50 кDa. Линия 1 (sc7G6-IP1), линия 2 (sc22-IP1) и линия 3 (концентриран и пречистен sc7G6-IP1, експресиран в бактериална експресионна система). В ямките бяха нанесени по 10 мкг белтък. Оцветяването беше извършено с разтвор на Coomassie Brilliant blue.

Огромният брой серумни белтъци, клетъчни метаболити и фрагменти от лизирани клетки след въздействието с метотраксат маскират присъствието на малките количества експресиран химерен протеин. Това наложи използването на допълнителни методи за пречистване и концентрация. След серия от ултрафилтрации с цел ограничаването на неинтересуващите ни протеини в предполагаемия молекулен диапазон (10-50 kDa) конвенционалните и неспецифични методи за анализ отново не дадоха възможност за наблюдение на новосинтезираният протеин (Фигура 19). Наблюдава се видимо ограничаване на протеиновия спектър, но количеството на новосинтезираният химерен протеин остава под прага на чувствителност на използвания метод.



фигура 20. Анализ с помощта на ECL-техника на концентрирани и пречистени химерни протеинови молекули, експресирани в еукариотни условия. Линия 1 (Fab фрагмент, получен химически от нативно антитяло 7G6), 2 (sc7G6-IP1, експресиран в еукариотна експресионна система), 3 (sc7G6-IP1, експресирано в прокариотна система) и 4 (хранителна среда след култивиране на нетрансфектирани COS-клетки).

Успешната трансфекция и получаването на химерна протеинова молекула получена в еукариотна експресионна система беше доказана чрез високо-специфичната и чувствителна ECL-техника. Както може да се види на Фигура 20 секретираният рекомбинантен протеин sc7G6-IP1 с еукариотен произход е абсолютно идентичен с този, получен при прокариотни условия. Аналогичен резултат се получи и с другия рекомбинантен протеин sc22-IP1. Детекцията беше извършена с антитела към вирусния компонент на химерната

молекула. Използването на химически получен фрагмент от анти тялото, несъдържащ вирусния компонент не даваше същия резултат, което потвърждава секретирането на химерната молекула.

ОБСЪЖДАНЕ

При субединичните ваксини се избягват рисковете свързани с използването на живи, атенюирани бактериални и вирусни щамове.

Получените резултати показват, че анти тяло-зависимото насочване на антигена към CR1/2, използвайки овалбуминен комплекс с анти-CR1/2 мише анти тяло (7G6) усилва хуморалния имунен отговор срещу този антиген. Взаимодействието на комплекса антиген-анти тяло с FcγRIIb може частично да подтисне отговора. Няколко групи от резултати са в основата на тези заключения.

1. Инкубирането FcγR-негативна В-лимфомна клетъчна линия IIA1.6 с химерната молекула 7G6-овалбумин доведе до ефективно представяне на епитопи на овалбумина на овалбумин-специфични Т-клетъчни линии *in vitro*. Този процес беше зависим от взаимодействието на комплекса с CR1/2, защото химерата SHL45.6-овалбумин като изотипна контрола нямаше този ефект.

2. Когато мишките бяха имунизирани с 7G6-овалбумин, хуморалният анти-овалбуминен отговор беше значително по-висок, отколкото след имунизация с неконюгиран овалбумин. Този усилен отговор се определяше от взаимодействието на комплекса 7G6-овалбумин с CR1/2, защото не беше наблюдаван в CR1/2-дефицитни мишки. Същите тези мишки реагираха с висок титър при имунизация с овалбумин в пълен адювант на Freund което доказва, че те са способни да образуват анти-овалбумин анти тела в зависимост от метода, използван за стимулиране на имунната система. 7G6-зависимото повишаване беше още по-ясно отчетливо при вторичния имунен отговор, подсказвайки намесата на клетки на имунната памет – В или Т-хелперни. Нашите резултати показват, че мишите CR1/2, експресирани от клетъчна линия IIA1.6, могат да предизвикат по-ефективно представяне на антигена на специфични Т-хелперни клонове, когато антигенът е насочен към рецептори за комплемента, без това да изисква овалбумин-специфични миши имуноглобулини. Този феномен корелира със способността на клетъчна линия IIA1.6 да генерира и предава вътрешноклетъчни сигнали, които представляват поредица от фосфорилирания на клетъчни протеини при контакт с 7G6-конюгиран овалбумин. Този резултат предполага, че и при липса на В-клетки без специфични имуноглобулинови рецептори мишите CR1/2 са способни да генерират интрацелуларен сигнал, който води

само до повишаване на представянето на антигена чрез молекули на ГКТС от II клас на Т-хелперните клетки. Този сигнал не е свързан с основните процеси при активирането на В-клетките. Биологичният смисъл на този ограничен стимулиращ ефект може да бъде отнесен към намаляването на прага от необходима помощ от антиген-специфичните Т-хелперни клетки в ранните етапи от хуморалния отговор.

Точният механизъм, чрез който 7G6-зависимото насочване на антигена към CR1/2 води до отчетливо усиление на хуморалния отговор все още остава неясен. Вероятните механизми могат да бъдат :

1. Свързването на комплекса 7G6-овалбумин към CR1/2 може да повиши локалната концентрация на антигена върху повърхността на антиген-специфичните В клетки, улеснявайки взаимодействието между антигена и неговият рецептор.

2. Свързването може да води до CR1/2-зависим активиращ вътреклетъчен сигнал и/или антигенно разпространяване чрез антиген-специфични или неспецифични В клетки, което да води до по-ефикасно антигенно представяне.

3. CR2, експресиран на повърхността на ФДК участват в задържането на комплекси антиген-комplement и да поддържат В-клетките на имунната памет активно състояние. Подобен механизъм може да е отговорен и за наблюдаваното биологично действие на химерната молекула.

От значение са и данните, че при имунизация на мишки с овалбумин конюгиран с SHL45.6 като изотипно контролно антигенно, анти-овалбуминния отговор беше понижен в сравнение с имунизацията с неконюгиран овалбумин. Вероятността тази инхибиция да е вследствие от взаимодействието между химерната молекула с инхибиращия FcγRIIb рецептор на В-клетките е подкрепена от наблюдението, че трансфектирането с FcγRIIb на клетъчна линия IIA1.6 я прави неспособна да представя епитопи на овалбумина при инкубиране с 7G6-овалбумин. Този резултат беше потвърден от неспособността на клетките A20, изходната клетъчна линия, чийто дериват е IIA1.6 и която естествено експресира FcγRIIb, да представя антиген след третиране с 7G6-овалбумин. Така се показва, че след имунизация с химерата 7G6-овалбумин, която позволява взаимодействие с CR1/2 и с FcγRIIb имунният отговор е в резултат на стимулиране през CR1/2 и супресиране през FcγRIIb.

В крайна сметка две групи данни показват, че взаимодействието с FcγR не е отговорно за повишаването на продукцията на антитела, предизвикано от 7G6-овалбумин *in vivo*.

1. Конюгирането на овалбумина към изотипното контролно антигенно SHL45.6 не доведе до усиление, а до потискане на анти-овалбуминния отговор.

2.Имунизацията на CR1/2 дефицитни мишки с химерата 7G6-овалбумин не доведе до усиление на отговора, което доказва, че наличието само на FcγR не води до стимулиране на антитялообразуването след използването и за имунизация.

Данните от представеното изследване дават възможност за проследяване механизма за индуциране на имунния отговор, резултат от взаимодействието на вродената и придобитата имунна система по време на вторичния контакт с антигена. Интензивността и продължителността на антитяловия отговор, предизвикан от комплемент и IgG-съдържащи имунни комплекси, могат да бъдат частично контролирани от баланса между стимулацията през CR1/2 и подтискането през FcγRIIb. Вероятно стимулирането на имунната реакция чрез CR1/2, която зависи от присъствието на активирани фактори на комплемента в антигенния комплекс има важна функция по време на ранните етапи на имунния отговор. На по-късните етапи отслабването на отговора е целесъобразно за предотвратяване на неконтролируемата антиген-индуцирана клетъчна пролиферация. Това изместване в равновесието по посока намаляване на отговора вероятно е зависимо от повишаването на концентрацията на специфични IgG, които са способни да взаимодействат с FcγRIIb и чиято продукция нараства в по-късните етапи на имунния отговор. Представените резултати сочат също възможността за нов подход за разработка на нови типове ваксини.

Рекомбинантните scFv са също алтернативен начин за получаване на интересувашите ни части от имуноглобулиновите молекули. Чрез генетично свързване на самостоятелните V области на леката и тежка вериги на Fv молекула, разпознаваща рецептори на АПК с различни пептидни епитопи, може да се създаде хибридна молекула, способна да достави тези епитопи до желаните клетки.

В представения труд беше избран модел, при който химерната молекула съдържа scFv, която разпознава CR1/CR2 и играе ролята на молекулярен адювант, приложен заедно с моделен пептиден антиген. Пептид-носещата химерна молекула запази свойството си да се свързва с CR1/CR2, но тази връзка отслабва с добавянето на всяко ново копие от моделния пептид. Поне три фактора имат вероятно отношение към това намаляване:

1. Конформационното нагъване на пептид-носещата химерна молекула е по-малко ефективно
2. Хидрофобните пептидни последователности могат да влияят на конформацията на scFv.
3. Добавените пептиди могат стерично да инхибират свързването на scFv към прицелния рецептор.

От теоретична гледна точка, доказването на свързването на химерната молекула с детекционни антитела

срещу имуноглобулиновата компонента би могло да бъде инхибирано от включените в състава и пептиди. Сравнителните експерименти с химерата и с нативното анти тяло 7G6 доказват, обаче, само намаляването на афинитета на конструираната молекула към прицелния клетъчен рецептор с увеличаването на броя на моделните пептиди в нея. Антигените, вмъкнати в строежа на химерната молекула, трябва да формират доменна структура, или да са достатъчно къси за да се избегнат такива нежелани взаимодействия.

При изследванията *in vitro* беше доказано ефективното свързване на антиген-съдържащата химера към CR1/CR2. При експериментите *in vivo*, при които В-клетките могат да разпознават химерните молекули посредством повърхностните им имуноглобулинови рецептори се наблюдава ко-свързване между В-клетъчните рецептори и CR1/CR2, което води до сигнали, подобни на активиращите сигнали от кооперацията с антиген-специфични Т-клетки. Антигенното представяне от АПК също може да бъде усилено чрез насочване на антигена към CR1/CR2 *in vivo*. Може да се очаква, че повишаването на валентността чрез използването на би- и тетравалентни scFv може допълнително да повиши ефективността на насочването.

Т-клетъчният епитоп в моделния антиген директно се свързва към I-E^d-молекулите по клетъчната повърхност на АПК, даже и ако е във формата на мултипептидна молекула. Ефикасността на пептидното представяне (спрямо свободния пептид) може да се подобри чрез повишаване на локалната пептидна концентрация върху клетъчната повърхност чрез свързване на химерата с CR1/CR2, което ще доведе и до повишената асоциация с ГКТС от II клас.

Представените резултати показват, че scFv-молекулата може да служи като насочващ механизъм за пептидни антигени *in vitro*. Малкият молекулен размер, молекулната хомогенност и единичната полипептидна верига придават на такава молекула качествата на много добра субединична ваксина. Тези резултати могат да служат като основа за конструиране на други подобни рекомбинантни ваксини.

Експресията на химерната ДНК-молекула при еукариотни условия би подобрило значително афинитета на синтезираната протеинова молекула към прицелните рецептори. Нормално е да се очаква, че експресията на ДНК-молекула, изградена от еукариотни сегменти при нативни еукариотни условия би възпроизвела в много по-добра степен естествената вторична структура на химерния протеин. Основен проблем при тези системи са ниските нива на експресия и сложните методи за изолиране и пречистване.

Главен недостатък в използваната COS-клетъчна трансфекционна система е много ниското съдържание на

продуцирания чужд протеин в културалната среда. Целта на проведените експерименти с тази система беше не толкова получаването на големи количества рекомбинантен протеин, който да бъде използван в имунологични експерименти, колкото проверка способността на вектора-носител да експресира в еукариотни условия интересуващата ни химерна молекула. Сложността на опитната постановка и относителните трудности при еукариотна експресия на химерна молекула *in vitro* поставиха редица нови експериментални въпроси, които липсваха при химично-конструирания химерна молекула и при експресията при прокариотни условия. На първо място това е изискването за много точно монтиране във вектора-носител, което е възможно само на едно-единствено място. Принципът на относителна интеграция на външната ДНК-молекула във вътрешно-клетъчния геном не ни дава основание да очакваме много мощна протеинова експресия, въпреки наличието на много ефективния промотор от SV 40. От друга страна, COS-клетъчната система няма способността за продължителна секреция на чуждеродните протеини, което допълнително ограничава очакваната експресия. Нейното преимущество се крие във факта, че тя успява в кратки срокове да произведе, макар и малки количества от интересувания ни протеин, а това напълно отговаря на поставените цели. Беше реализирана успешна трансфекция и синтез на генно-инженерния химерен протеин при еукариотни условия, чиито вирусен епитоп запазва способността си да се свързва със специфични антитела. Обект на бъдещи изследвания ще бъде възможността за експресия на химерната молекула в клетъчна линия ВНК, която дава възможност за по-продължителен синтез, респективно много по-големи количества от желания протеин. Това би дало възможност за експерименти *in vitro* и *in vivo* с химерен протеин, експресиран при естествени еукариотни условия.

ИЗВОДИ

1. Антитяло-зависимото насочване на антигена към CR1/2, използвайки овалбуминен комплекс с антимише-CR1/2 плъше антитяло (7G6) усилва хуморалния имунен отговор срещу този антиген.
- 1.1. Инкубирането на FcγR-негативна В-лимфомна миша клетъчна линия IIA1.6 с химерната молекула 7G6-овалбумин доведе до ефективно представяне на епитопи на овалбумина на овалбумин-специфични Т-клетъчни линии *in vitro*. Този процес беше зависим от взаимодействието на комплекса с CR1/2, защото химерата SHL45.6-овалбумин като изотипна контрола нямаше този ефект.
- 1.2. Когато мишките бяха имунизирани с 7G6-овалбумин, хуморалният анти-овалбуминен отговор беше значително по-висок, отколкото след имунизация с неконюгиран овалбумин.

Този усилен отговор се определяше от взаимодействието на комплекса 7G6-овалбумин с CR1/2, защото не беше наблюдаван при CR1/2-дефицитни мишки. 7G6-зависимото повишаване беше още по-ясно отчетливо при вторичния имунен отговор, подсказвайки участието на клетки на имунната памет – В или Т-хелперни.

1.3. Мишите CR1/2, експресирани от клетъчна линия IIA1.6, могат да предизвикат ефективно представяне на антигена на специфични Т-хелперни клонове, когато антигенът е насочен към рецептори за комплемента, без това да изисква овалбумин-специфични миши имуноглобулини. Този резултат предполага, че при липса на антиген-специфични имуноглобулини мишите CR1/2 са способни да генерират интрацелуларен сигнал, който води само до завишаване на представянето на антигена чрез ГКТС II клас на Т-хелперните клетки. Смисълът на този ограничен стимулиращ ефект може да бъде отнесен към намаляването на прага от необходима помощ от антиген-специфичните Т-хелперни клетки в ранните етапи от хуморалния отговор.

2. Взаимодействието на комплекса антиген-антитяло с FcγRIIb може частично да подтисне отговора. След имунизация с химерата 7G6-овалбумин, която позволява взаимодействие с CR1/2 и с FcγRIIb имунният отговор е в резултат на стимулиране през CR1/2 и супресирание през FcγRIIb. Интензивността и продължителността на антитяловия отговор, предизвикан от комплемент и IgG-съдържащи имунни комплекси, могат да бъдат частично контролирани от баланса между стимулацията през CR1/2 и подтискането през FcγRIIb. Вероятно стимулирането на имунната реакция чрез CR1/2, която зависи от присъствието на активирани фактори на комплемента в антигенния комплекс има важна функция по време на ранните етапи на отговора. На по-късните етапи намаляването на отговора вероятно е необходимо за предотвратяване на неконтролируема антиген-индуцирана клетъчна пролиферация. Това изместване в равновесието по посока намаляване на отговора може би е зависимо от повишаването на концентрацията на IgG, които са способни да взаимодействат с FcγRIIb и чиято продукция нараства в по-късните етапи на имунния отговор.

3. Чрез генетично свързване на самостоятелните лека и тежка верига на Fv молекула, разпознаваща рецептори на АПК с различни пептидни епитопи, може да се създаде хибридна молекула, която да бъде експресирана в прокариотна система и да е способна да достави тези епитопи до желаните клетки. Химерната молекула съдържа scFv, която разпознава CR1/CR2 и играе ролята на молекулярен адювант заедно с моделен пептиден антиген. Пептид-носещата химерна молекула запази свойството си да се свързва с CR1/CR2.

4. При изследванията *in vitro* беше доказано ефективното свързване на антигена към CR1/CR2. Антигенното представяне от АПК може също да бъде усилено чрез насочване на антигена към CR1/CR2 *in vivo*. Логично е да се очаква, че повишаването на валентността чрез използването на би и тетравалентни scFv би могло допълнително да повиши ефективността на насочването.

5. Химерните scFv-молекули, експресирани при прокариотни условия може да служат като насочващ механизъм за пептидни антигени към АПК. Малкият молекулен размер, молекулната хомогенност и единичната полипептидна верига придават на такава молекула качествата на много добра субединична ваксина. Тези резултати могат да служат като основа за конструиране на други подобни рекомбинантни ваксини.

6. Беше реализирана успешна трансфекция и синтез при еукариотни условия на генно-инженерния химерен протеин, чиито вирусен епитоп запазва способността си да се свързва със специфични антитела. Това дава възможност за експерименти *in vitro* и *in vivo* с химерен протеин, експесиран при естествени еукариотни условия, което допълнително ще повиши специфичността на взаимодействията и ефикасността на антигенното представяне.

Справка за приносите в дисертационния труд

Проведено е системно изследване върху механизма на модулиране на имунния отговор чрез група химерни инженерни и генно-инженерни молекули, получени за първи път.

1. За първи път е изследвано значението на мишите рецептори за компоненти на комплемента и Fc γ -рецепторите в процеса на имунния отговор посредством получена по химически път химерна молекула между нативно антитяло и моделен антиген (овалбумин).
2. За първи път е конструирана химерна ДНК молекула, съдържаща едноверижна лека и тежка верига на Fv-фрагмента на антитела, специфични срещу различни клетъчни рецептори и различен брой копия от моделни антигени (пептиди от грипен хемаглутинин).
3. Химерните ДНК-молекули са монтирани в експресионни вектори и са експресирани при прокариотни и еукариотни условия. Новосинтезираните протеинови молекули са използвани за насочване на антигените в процесите на антигенно представяне *in vitro*.
4. Представените резултати разкриват възможностите на създадените химерни молекули да играят ролята на мощни адюванти и да служат като модел за създаване на нови генерации ваксини.

Публикации във връзка с дисертацията

1. J. Prechl, A. Tchorbanov, A. Horvath, D.C. Baiu, W. Hazenbos, E. Rajnavolgyi, I. Kurucz, P. J. A. Capel, A. Erdei, Targeting of influenza epitopes to murine CR1/CR2 using single-chain antibodies. Immunopharmacology, 1999, 42, 159-165
2. D. C. Baiu, J. Prechl, A. Tchorbanov, H. D. Molina, A. Erdey, P. J.A. Capel, W. L.W. Hazenbos, Modulation of antibody responses by antibody-mediated antigen targeting to complement and Fc receptors. Journal of Immunology, 1999, 162:6, 3125 - 30

Участия с постери на конгреси и конференции

1. XVII-та ICW конференция, 11 - 16 Октомври, 1998, Родос, Гърция; "Targeting of influenza epitopes to murine CR1,2 using scFv antibodies", N225, J. Prechl, A. Horvath, I. Kurucz, D.C. Baiu, A. Tchorbanov, W. Hazenbos, E. Rajnavolgyi, A. Erdei, P. J. A. Capel
2. 3rd Balkan Congress of Immunology, 30 Октомври - 1 Ноември, 2001, Атина, Гърция, "Antigen targeting by fusion single-chain hybrid antibodies", №105, A. Tchorbanov, J. Prechl, D.C. Baiu, A. Horvath, W. Hazenbos, E. Rajnavolgyi, A. Erdei, P. J. A. Capel

ФИНАНСИРАНЕ

Работата по дисертационния труд беше извършена с финансовата подкрепа на проекти: на Европейския съюз "Коперник" СІРА СТ94-0152, Унгарския Национален научен фонд (ОТКА) №ТО 17158 и Унгарското Министерство на образованието (FKFP) 0102/1997

Изказвам своята благодарност на двамата си научни ръководители за безрезервната подкрепа и съветите при работата върху настоящия труд, на проф. П. Ненков за организирането на командировката ми в Холандия, на колектива на лаборатория "Експериментална имунология" – AZU, Утрехт, Холандия за техническата, материална и методична помощ и на моя приятел и колега Йозеф Прехл, помогнал за решаването на много експериментални проблеми.