



Анализ доменной специфичности протективного химерного антитела ch14D5a против гликопротеина E вируса клещевого энцефалита

И.К. Байков¹✉, Л.А. Емельянова^{1,2}, Л.М. Соколова¹, Е.М. Карелина^{1,2}, А.Л. Матвеев^{1,2}, И.В. Бабкин^{1,2}, Я.А. Хлусевич^{1,2}, В.Ф. Подгорный¹, Н.В. Тикунова^{1,2}✉

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

В настоящее время на основе протективного химерного антитела ch14D5a разрабатывается препарат для профилактики и терапии вируса клещевого энцефалита. Вместе с тем эпитоп, узнаваемый этим антителом на поверхности гликопротеина E, не локализован. Для терапевтического использования антитела ch14D5a крайне желательно знать механизм действия этого антитела, в том числе узнаваемый им эпитоп. Целью данной работы было выявить домен гликопротеина E, с которым связывается протективное антитело ch14D5a. Для этого с использованием бактериальной системы экспрессии было получено четыре рекомбинантных варианта гликопротеина E: 1) белок rE, содержащий домены D1, D2 и D3 гликопротеина E; 2) белок rED1+2, содержащий домены D1 и D2; 3) белок rED3_301, представляющий собой домен D3; 4) белок rED3_294, включающий домен D3 и шарнирный участок, соединяющий домены D1 и D3. Белки rED3_294 и rED3_301 были получены в растворимой мономерной форме, что подтверждено гель-фильтр-рациональной хроматографией. Белки rE и rED1+2 экстрагированы из телец включения. Методами вестерн-блот анализа и поверхностного плазмонного резонанса установлено, что протективное химерное антитело ch14D5a и его Fab-фрагмент связываются с доменом D3 и не связываются с доменами D1 и D2 гликопротеина E вируса клещевого энцефалита. Поскольку антитела, узнающие эпитопы на поверхности домена D3, не склонны вызывать антителозависимое усиление инфекции по сравнению с антителами, направленными на домены D1 и D2, полученные данные подтверждают перспективность использования антитела ch14D5a при создании терапевтического препарата против вируса клещевого энцефалита.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; гликопротеин E; домен D3; антитело; рекомбинантный белок; поверхностный плазмонный резонанс; картирование эпитопа.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Байков И.К., Емельянова Л.А., Соколова Л.М., Карелина Е.М., Матвеев А.Л., Бабкин И.В., Хлусевич Я.А., Подгорный В.Ф., Тикунова Н.В. Анализ доменной специфичности протективного химерного антитела ch14D5a против гликопротеина E вируса клещевого энцефалита. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):459-467. DOI 10.18699/VJ18.383

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Baykov I.K., Emelyanova L.A., Sokolova L.M., Karelina E.M., Matveev A.L., Babkin I.V., Khlusevich Ya.A., Podgorny V.F., Tikunova N.V. Analysis of domain specificity of the protective chimeric antibody ch14D5a against glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):459-467. DOI 10.18699/VJ18.383 (in Russian)

Received 31.08.2017

Accepted for publication 10.05.2018

© AUTHORS, 2018

Analysis of domain specificity of the protective chimeric antibody ch14D5a against glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus

I.K. Baykov¹✉, L.A. Emelyanova^{1,2}, L.M. Sokolova¹, E.M. Karelina^{1,2}, A.L. Matveev^{1,2}, I.V. Babkin^{1,2}, Ya.A. Khlusevich^{1,2}, V.F. Podgorny¹, N.V. Tikunova^{1,2}✉

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

A drug for the prevention and therapy of tick-borne encephalitis virus is being developed on the basis of the protective chimeric antibody ch14D5a. At the same time, the epitope recognized by this antibody on the surface of glycoprotein E has not been localized yet. The aim of this work was to identify the domain of glycoprotein E, to which the protective antibody ch14D5a binds. As a result, four recombinant variants of glycoprotein E were generated using the bacterial expression system: (1) the rE protein containing the domains D1, D2, and D3 of glycoprotein E; (2) the rED1+2 protein containing domains D1 and D2; (3) the rED3_301 protein, which is domain D3 of glycoprotein E, and (4) the rED3_294 protein comprising domain D3 and a hinge region connecting domains D1 and D3. The rED3_294 and rED3_301 proteins were obtained in soluble monomeric form. The rE and rED1+2 proteins were extracted from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. Using Western blot analysis and surface plasmon resonance analysis, it was demonstrated that the protective chimeric antibody ch14D5a and its Fab fragment bound specifically to domain D3 of glycoprotein E. Since the antibodies recognizing epitopes on the surface of domain D3 do not tend to cause antibody-dependent enhancement of the infection as compared to antibodies directed to domains D1 and D2, the data obtained confirm the promise of using the antibody ch14D5a in the development of a therapeutic preparation against the tick-borne encephalitis virus.

Key words: tick-borne encephalitis virus; glycoprotein E; domain D3; antibody; recombinant protein; surface plasmon resonance; epitope mapping.

Флавивирусы – семейство РНК-содержащих вирусов, включающих множество возбудителей опасных заболеваний человека. Актуальность получения рекомбинантных аналогов поверхностных белков различных флавивирусов определяется необходимостью разработки вакцин нового поколения (Chen, 2015; Rey et al., 2018), создания высокочувствительных тест-систем (Holbrook et al., 2004; Zidane et al., 2013), а также проведения структурных исследований (Rey et al., 1995; Wu et al., 2003; Volk et al., 2009). Рекомбинантные флавивиральные белки используются при изучении эпитопов, узнаваемых потенциально терапевтическими высоконейтрализующими и протективными антителами (Nybakken et al., 2005; Robinson et al., 2015; Barba-Spaeth et al., 2016; Zhao et al., 2016; Wang et al., 2017).

Антигенная структура флавивирального гликопротеина Е непосредственным образом связана с пространственной структурой этого белка и его ориентацией на поверхности вириона. Гликопротеин Е расположен на поверхности зрелого вириона флавивирусов в количестве 180 молекул, организованных в виде 90 гомодимеров. Он состоит из доменов D1, D2 и D3 (рис. 1, а), а также двух трансмембранных доменов. D1 – центральный домен, объединяющий домены D2 и D3. Домен D2 отвечает за димеризацию гликопротеина Е, а также содержит гидрофобную петлю слияния, которая участвует в выходе вирусного капсида из эндосомы в цитоплазму клетки. Домен D3 взаимодействует с различными клеточными рецепторами и участвует в проникновении вируса в заражаемую клетку (Pierson, Kielian, 2013).

Доменная структура гликопротеина Е стабилизирована шестью дисульфидными связями, консервативными для всех флавивирусов. Известно, что эпитопы, узнаваемые вируснейтрализующими и протективными антителами, расположены во всех трех доменах гликопротеина (Dowd, Pierson, 2011). Эпитопы мышинных моноклональных антител, обладающих наиболее выраженными вируснейтрализующими и протективными свойствами, находятся преимущественно в области домена D3 (Roehrig, 2003; Oliphant et al., 2005; Sánchez et al., 2005; Dai et al., 2016), поэтому антитела, направленные к этому домену, представляют наибольший интерес с точки зрения профилактики и терапии флавивиральных инфекций. Известно также, что высоконейтрализующие и протективные антитела, направленные к петле слияния, вызывают антителозависимое усиление инфекции (Haslwanter et al., 2017). В связи с этим при разработке терапевтических препаратов против флавивирусов для потенциально терапевтического антитела должно быть подтверждено отсутствие связывания с петлей слияния гликопротеина Е.

Ранее на основе вируснейтрализующих моноклональных мышинных антител (Tsekhanovskaya et al., 1993) нами было сконструировано высокоаффинное химерное антитело ch14D5a, обладавшее способностью эффективно защищать модельных животных от сотен летальных доз вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) (Baykov et al., 2014; Тикунова и др., 2015). Доклинические испытания этого антитела показали его высокую эффективность, а также отсутствие токсических свойств (Тикунова и др., 2015). Однако для терапевтического использования препарата на

основе антитела ch14D5a необходимо детальное исследование механизма действия этого антитела, в том числе локализация эпитопа, с которым связывается антитело на поверхности гликопротеина Е.

Цель данной работы – выявить домен гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита, с которым связывается протективное химерное антитело ch14D5a. Для этого были получены рекомбинантные белки, представляющие собой фрагменты гликопротеина Е, и исследовано взаимодействие антитела ch14D5a с этими белками методами поверхностного плазмонного резонанса и вестерн-блот анализа.

Материалы и методы

Материалы. Химерное антитело ch14D5a было наработано и очищено согласно методике, опубликованной ранее (Baykov et al., 2014). Fab-фрагмент антитела получен с использованием набора Pierce™ Fab Micro Preparation Kit (Thermo Scientific) согласно инструкции производителя. Комплементарная ДНК гена *E* вируса клещевого энцефалита, штамм Софьин, была предоставлена С.Е. Ткачёвым, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск).

Создание генетических конструкций для получения фрагментов гликопротеина Е. Фрагменты ДНК, кодирующие рекомбинантные белки rED3_294, rED3_301, rED1+2 и rE, были получены методом ПЦР по матрице кДНК гена *E* вируса клещевого энцефалита, штамм Sofjin-Ru (GenBank: AEP20480.1), с использованием праймеров: rED3_301_NcoI_dir: 5'-GCGCCATGGCCGCGGGTGGCTCGGGTCTTACATACACAATGTGCG-3'; rED3_294_NcoI_dir: 5'-GCGCCATGGCCGCGGGTGGCTCGCTAGAAAACTTAAGATGAAAGGTC-3'; rED3_his_NotI_rev: 5'-TTAGCGGCCGCTTAGTGATGTGATGATGACTCCCTTTTGGAAACCATTTG-3'; rED1_SfiI_dir: 5'-ATAGGCCAGCCGGCCATGGCCTCACGGTGCACACATCTGG-3'; rED2_his_NotI_rev: 5'-TTAGCGGCCGCTTAGTGATGGTGTGATGATGATGTTTCATCTTAAGTTTTCTAGCCC-3'. Фрагмент, кодирующий белок rED3_294, получен с использованием праймеров rED3_294_NcoI_dir и rED3_his_NotI_rev. Фрагмент, кодирующий белок rED3_301, – с использованием праймеров rED3_301_NcoI_dir и rED3_his_NotI_rev. С помощью праймеров rED1_SfiI_dir и rED2_his_NotI_rev получали фрагмент, кодирующий белок rED1+2, а с помощью праймеров rED1_SfiI_dir и rED3_his_NotI_rev – фрагмент, кодирующий белок rE.

Гены рекомбинантных белков кодировали глицин-сериновую последовательность на N-конце для повышения растворимости, а также C-концевую гексагистидиновую последовательность для очистки белков на Ni-NTA сорбенте. ДНК-фрагменты, кодирующие белки rED3_294 и rED3_301, были встроены в плазмидную ДНК рHEN2 по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции *NcoI* и *NotI*. Фрагменты, кодирующие белки rED1+2 и rE, были встроены в ту же плазмиду по сайтам *SfiI* и *NotI*. Правильность конструкций рHEN2-rED3_294, рHEN2-rED3_301, рHEN2-rED1+2 и рHEN2-rE подтверждали секвенированием. Описанные конструкции депонированы в базу GenBank и имеют следующие номера: MH319019, MH383220, MH383221 и MH383222.

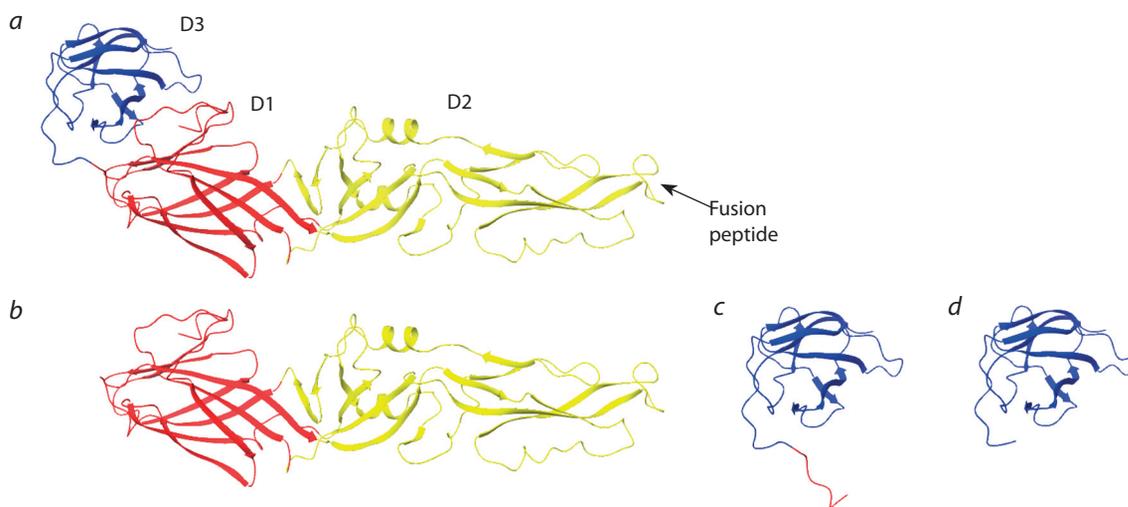


Fig. 1. Fragments of the 3D structure of glycoprotein E ectodomain: (a) protein rE, containing domains D1, D2, and D3; (b) protein rED1+2, containing domains D1 and D2; (c) protein rED3_294; (d) protein rED3+301.

The images were constructed with Pymol software on the base of the 1SVB structure retrieved from Protein Data Bank.

Получение рекомбинантных белков. Бактерии *Escherichia coli* HB2151, трансформированные соответствующей плазмидной ДНК, растили в среде LB с добавлением ампициллина и 0.1 % глюкозы при скорости перемешивания 180 об./мин и температуре 37 °С. При достижении оптической плотности OD600 = 0.7–0.9 синтез белка индуцировали добавлением ИПТГ до конечной концентрации 0.5 мМ, а рост культуры продолжали при скорости перемешивания 180 об./мин и 30 °С. Через 4 ч биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием 10 мин при 6000 g, осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 20 % сахарозы, 1 мМ ЭДТА и 10 мМ трис-НСl, рН 7.5, взятом в количестве 1/10 исходного объема жидкой культуры. После инкубации 5 мин при комнатной температуре и 5 мин при 0 °С клетки осаждали 2 мин при 10000 g и температуре 6 °С. После удаления супернатанта клеточный осадок ресуспендировали в 5 мМ растворе MgSO₄, взятом в количестве 1/10 исходного объема жидкой культуры, и инкубировали 5 мин при 0 °С. Образовавшиеся сферопласты осаждали 2 мин при 10000 g и температуре 6 °С, а супернатант, содержащий периплазматические белки, фильтровали через полиэфирсульфоновый фильтр с размером пор 0.22 мкм и замораживали. Осадок сферопластов также замораживали.

При получении гED3_294 либо гED3_301 фракцию периплазматических белков наносили на хроматографическую колонку, упакованную 4 мл Ni-NTA агарозы (Novagen) со скоростью потока 0.5 мл/мин. Для промывки колонки и элюции использовали фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБР) с добавлением NaCl до 300 мМ, содержащий различные концентрации имидазола. После нанесения периплазматической фракции хроматографическую колонку промывали 5 объемами буфера, не содержащего имидазола. Неспецифически связавшиеся белки элюировали буфером с 25 мМ имидазола, после чего целевой белок элюировали буфером с 300 мМ имидазола. С помощью фильтров Amicon ultra-4 с порогом отсека 3 кДа осуществляли диафильтрацию буфера и

концентрирование белка до 2–4 мг/мл. Белок фильтровали через фильтр с размером пор 0.22 мкм и хранили при 4 °С в фосфатно-солевом буферном растворе, рН 7.4, с добавлением 0.02 % азиды натрия.

При получении белков гE и гED1+2 использовали осадок сферопластов, оставшийся после выделения периплазматических белков. Осадок подвергали обработке ультразвуком в течение 3 мин, после чего суспензию центрифугировали 15 мин при 12000 g. Супернатант, содержащий цитоплазматические белки, замораживали. Осадок, представляющий собой клеточный дебрис, растворяли в ФСБР, содержащем 8 М мочевины, при комнатной температуре в течение 30 мин, затем центрифугировали 15 мин при 12000 g. Целевой белок выделяли из супернатанта аффинной хроматографией аналогично тому, как это делали для белков гED3_294 и гED3_301, с тем лишь исключением, что все растворы содержали 8 М мочевины. Белки хранили в ФСБР, содержащем 8 М мочевины, при –20 °С.

Вестерн-блот анализ рекомбинантных белков. Клеточные лизаты и фракции периплазматических белков фракционировали электрофорезом в 15 % денатурирующем полиакриламидном геле, после чего белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) электропереносом в буфере, содержащем 25 мМ трис, 192 мМ глицина, 0.1 % додецилсульфат натрия и 20 % этанол, и окрашивали красителем «пунцовый S». Последующие стадии осуществляли в термостатируемом шейкере при 37 °С. Мембрану блокировали 5 % суспензией обезжиренного сухого молока в течение 45 мин. После трехкратного промывания мембраны ФСБР, содержащим 0.05 % твин-20 (ФСБР-твин), к мембране добавляли раствор антитела 6x-His Tag Monoclonal Antibody (4A12E4) (Invitrogen), разведенного в том же буфере в соотношении 1:10000. После 45-минутной инкубации и трехкратного промывания мембраны ФСБР-твин к мембране добавляли раствор вторичного антитела, конъюгированного с щелочной фосфатазой, Anti-Mouse IgG (Fc specific)–Alkaline

Phosphatase antibody produced in goat, A1418 (Sigma). После 45-минутной инкубации и трехкратного промывания мембраны ФСБР-твин мембрану промывали AP-буфером (100 мМ трис-HCl, pH 9.5, 100 мМ NaCl и 10 мМ MgCl₂) и производили окрашивание мембраны раствором хромогенов BCIP-T (пара-толуидиновая соль 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата) (Fermentas) и NBT (nitro blue tetrazolium chloride) (Fermentas) в том же буфере до появления окраски. Окрашенную мембрану промывали дистиллятом и сканировали.

В случае вестерн-блот анализа с использованием антитела ch14D5a процедуру осуществляли аналогично, при этом антитело ch14D5a применяли в конечной концентрации 1 мкг/мл, а в качестве вторичного антитела использовали Anti-Human IgG (whole molecule)–Alkaline Phosphatase antibody produced in goat, A1543 (Sigma).

Исследование взаимодействия антитела ch14D5a и его Fab-фрагмента с рекомбинантными фрагментами гликопротеина E на оптическом биосенсоре ProteOn XPR36. Эксперименты проводили в ФРСБ с добавлением 0.005 % твин-20 и 0.1 мМ этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА). Поверхность НТГ-чипа активировали пропуская 1 мМ водного раствора Ni(NO₃)₂ в течение 120 с. Рекомбинантные белки нековалентно иммобилизовали на поверхности НТГ-чипа в концентрации 3 мкг/мл до достижения уровня сигнала 50–70 ед. отклика. Последовательные трехкратные разведения Fab-фрагмента антитела ch14D5a в концентрации 260, 87, 29, 9.6 и 3.2 нМ анализировали на связывание с рекомбинантными белками. В качестве референсного был взят сигнал, зарегистрированный для буфера, не содержащего Fab-фрагмента, а также сигнал, полученный при пропуске разведений Fab-фрагмента в той части чипа, где не было иммобилизовано белков. Скорректированный таким образом сигнал использовали для вычисления кинетических и равновесных констант методом глобального выравнивания на основе простой модели односайтового связывания с помощью программного обеспечения ProteOn Manager 3.1.0. В случае антитела ch14D5a анализировали трехкратные разведения антитела в концентрации 81, 27, 9, 3 и 1 нМ.

Гель-фильтрационная хроматография. Хроматографический профиль образцов белков gED3_294 и gED3_301 был проанализирован на колонке Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) с помощью хроматографа АКТА pure (GE Healthcare). Профильтрованный образец белка вносили в количестве 100 мкл и фракционировали со скоростью потока 0.5 мл/мин. Оптическую плотность на выходе из колонки анализировали на длинах волн 214 и 280 нм. В качестве референсных белков были использованы РНКазы А (13.7 кДа), лизоцим куриных яиц (14.3 кДа) и одноцепочечное антитело 14D5 (27 кДа). Эксперименты проводили в буфере ФСБР.

Обработка дебриса детергентом. Клеточный дебрис, оставшийся в результате центрифугирования бактерий, предварительно обработанный ультразвуком, ресуспендировали в буфере (50 мМ трис-HCl, pH 7.5, 1 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl), содержащем 0.5 %, 1 % или 1.5 % детергента тритон ×100. Образцы инкубировали в течение ночи при 4 °С. Центрифугировали 10 мин при 12000 g,

анализировали осадок и супернатант денатурирующим электрофорезом в полиакриламидном геле.

Результаты

Получение рекомбинантных фрагментов гликопротеина E ВКЭ

Рекомбинантные фрагменты гликопротеина E были разработаны в результате экспрессии в бактериях *E. coli* HB2151. Для этого были сконструированы плазмидные ДНК на основе ДНК pHEN2, содержащей сигнальную последовательность гена пектат-лиазы В (pelB). Эта последовательность направляет синтез белка в периплазматическое пространство *E. coli*, которое обладает более высоким окислительным потенциалом, а также содержит белки клеточной системы Dsb, способствующие образованию дисульфидных связей, необходимых для стабилизации пространственной структуры белка (Berkmen, 2012), что способствует образованию правильной конформации белковой молекулы и накоплению белка в растворимой форме. Всего было сконструировано четыре рекомбинантных фрагмента гликопротеина E: 1) белок gE, содержащий домены D1, D2 и D3, аминокислотные остатки (а.к.о.) 1–397 гликопротеина E ВКЭ; 2) белок gED1+2, содержащий домены D1 и D2 (а.к.о. 1–302 гликопротеина E); 3) белок gED3_301, представляющий собой домен D3 (а.к.о. 301–397 гликопротеина E); 4) белок gED3_294 (а.к.о. 294–397 гликопротеина E), включающий домен D3 и шарнирный участок, соединяющий домены D1 и D3. Все рекомбинантные белки содержали гексагистидиновую последовательность на С-конце и не содержали С-концевой трансмембранный участок (а.к.о. 398–496). На рис. 1 представлены соответствующие фрагменты пространственной структуры эктодомена гликопротеина E (Rey et al., 1995, PDB_id: 1SVB).

В результате индукции бактерий, трансформированных соответствующими плазмидными ДНК, были получены клеточные лизаты, содержащие необходимые белки. Белки фракционировали гель-электрофорезом в восстановительных условиях (рис. 2, а) и выявляли антителом против гексагистидиновой последовательности в вестерн-блот анализе для соотнесения полос на геле целевым белкам (см. рис. 2, б). Белки gED3_294 и gED3_301 находились в растворимом виде в периплазматическом пространстве клеток (см. рис. 2, а, дорожки 1 и 2). Белок gE присутствовал в небольшом количестве в цитоплазме клеток в растворимом виде и выявлялся вестерн-блот анализом антителом против гексагистидиновой последовательности (см. рис. 2, б, дорожка б). Вместе с тем большая часть белков gE и gED1+2 была расположена в клеточном дебрисе, оставшемся после выделения периплазмы и цитоплазмы (см. рис. 2, а, дорожки 3 и 4). Кроме того, зарегистрированы в небольшом количестве дополнительные формы белков gED3_294 и gE, незначительно отличающиеся по электрофоретической подвижности. Присутствие этих форм может быть вызвано неполным отщеплением лидерного пептида от целевого белка.

Была проверена гипотеза о том, что белки gED1+2 и gE находятся преимущественно в нерастворимом виде из-за того, что они связаны с фрагментами бактериаль-

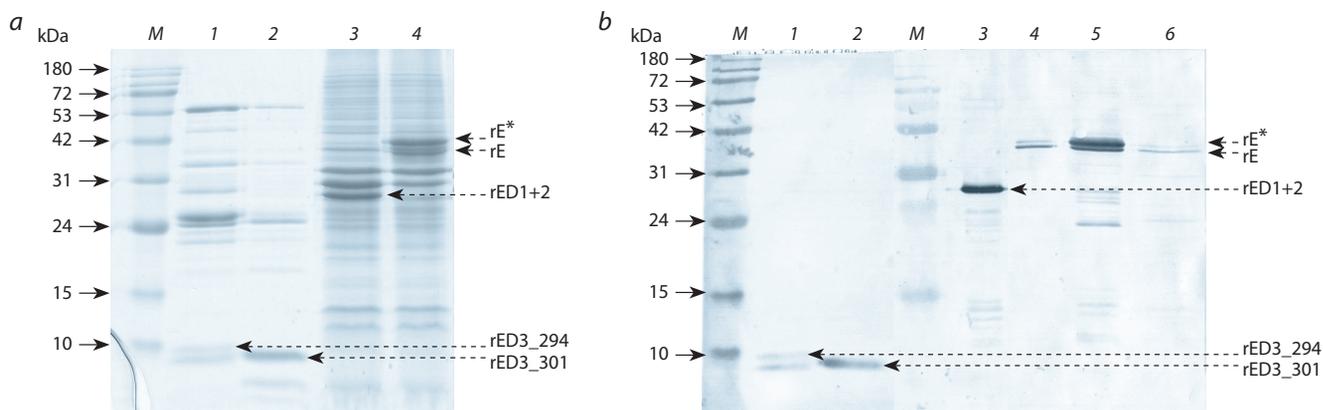


Fig. 2. Analysis of cell fractions containing recombinant proteins rED3_294, rED3_301, rED1+2, and rE: (a) electrophoresis in 15% denaturing polyacrylamide gel, (b) Western blotting with antibody against the hexahistidine fragment.

1, 2, Periplasmic fraction of bacteria transformed with plasmids pHEN2-rED3_294 and pHEN2-rED3_301, respectively; (3) cell debris of bacteria transformed with pHEN2-rED1+2; 4, 5, cell debris of bacteria transformed with pHEN2-rE; 6, cytoplasmic fraction of bacteria transformed with pHEN2-rE; M, protein molecular weight ladder. All samples were prepared with the presence of dithiothreitol.

ной мембраны при помощи гидрофобной петли слияния (а.к.о. 98–111 гликопротеина E), расположенной в домене D2. Однако после обработки клеточного дебриса буфером, содержащим 0.5%, 1% или 1.5% тритона $\times 100$, белки rED1+2 и rE по-прежнему находились в осадке и не переходили в супернатант.

Белки rED3_294 и rED3_301 были выделены из периплазматической фракции Ni-NTA хроматографией. Методом гель-фильтрационной хроматографии в отсутствие детергентов было показано, что белки rED3_294 и rED3_301 соответствовали по времени удержания на колонке белкам с молекулярной массой около 12 кДа, следовательно, эти белки находились в растворе в виде мономеров и не образовывали агрегатов.

Анализ связывания рекомбинантных белков rED3_294, rED3_301, rED1+2 и rE с антителом ch14D5a

Полученные белки в виде клеточных лизатов и периплазматических фракций были исследованы вестерн-блот анализом на специфическое связывание с антителом ch14D5a. В результате обнаружено, что антитело связывается с белками rED3_294, rED3_301 и rE, но не связывается с белком rED1+2 (рис. 3). Это свидетельствует о том, что эпитоп, узнаваемый антителом ch14D5a, расположен на домене D3 гликопротеина E ВКЭ, причем шарнирный участок, соединяющий домены D1 и D3, не принимает участия во взаимодействии с антителом ch14D5a.

Сродство антитела ch14D5a и Fab-фрагмента этого антитела к белкам rED3_294 и rED3_301 было измерено с помощью оптического биосенсора ProteOn XPR 36 (BioRad), использующего явление поверхностного плазмонного резонанса (рис. 4). Белки rED3_294 и rED3_301 иммобилизовали на поверхность чипа и анализировали их связывание с антителом ch14D5a и его Fab-фрагментом. В случае взаимодействия с Fab-фрагментом измеряли аффинность, которая для белков rED3_294 и rED3_301 составила 53 ± 3 и 48 ± 3 нМ соответственно (см. рис. 4, а, б). В случае антитела ch14D5a измеряли значение кажущейся (эффективной) константы диссоциации, называемой так-

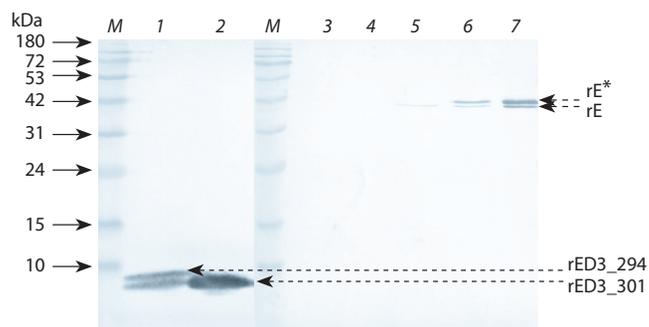


Fig. 3. Western blotting of recombinant proteins with antibody ch14D5a. 1, rED3_294; 2, rED3_301; 3, 4, rED1+2; 5–7, rE; M, protein molecular weight ladder. Proteins were resolved in reducing 15% polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane.

же avidностью, которая характеризует взаимодействие полноразмерного антитела, имеющего два антигенсвязывающих домена, с поверхностью, покрытой множеством молекул антигена. Полученное значение кажущейся (эффективной) константы диссоциации составило для обоих вариантов домена D3 около 1.5 ± 0.2 нМ (см. рис. 4, в).

Чтобы оценить вклад доменов D1 и D2 в связывание антитела ch14D5a с гликопротеином E, мы исследовали взаимодействие Fab-фрагмента этого антитела с белком rE, содержащим все три домена. Полученное значение константы диссоциации находилось на уровне сродства Fab-фрагмента к белкам rED3_294 и rED3_301 и составило 45 ± 3 нМ (см. рис. 4, з), что свидетельствует об отсутствии значимого вклада доменов D1 и D2 в связывание антитела с гликопротеином E.

Стабильность белка

Хранение белков rED3_294 и rED3_301 в течение года при 4 °C в концентрации 2–4 мг/мл в фосфатно-солевом буфере с добавлением азида натрия не приводило ни к выпадению осадка, ни к изменению активности белка.

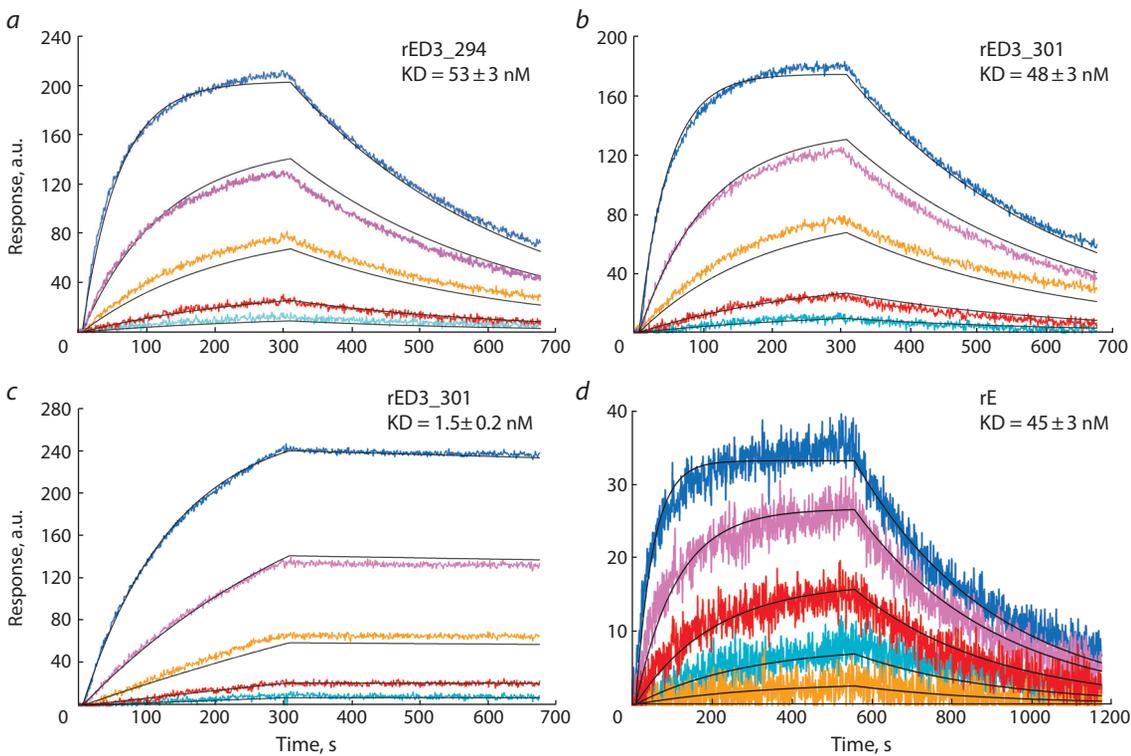


Fig. 4. (a, b, d) Binding of the Fab fragment of antibody ch14D5a to proteins (a) rED3_294, (b) rED3_301, and (d) rE. (c) Binding of antibody ch14D5a to protein rED3_301. KD – dissociation constant.

Обсуждение

Домен D3 гликопротеина E флавивирусов по пространственной структуре относится к семейству иммуноглобулиновых доменов. Это достаточно стабильный домен, дополнительно стабилизированный одной консервативной дисульфидной связью. Рекombинантные белки, представляющие собой домены D3 некоторых флавивирусов, таких как вирус желтой лихорадки, вирус Денге, вирус западного Нила и вирус Лангат, были получены в бактериальных системах экспрессии как в виде телец включения с последующим рефолдингом белка (Volk et al., 2009; Elahi et al., 2014; Kulkarni et al., 2016), так и в растворимом виде в формате белков слияния (White et al., 2003; Volk et al., 2006; Maillard et al., 2008). В случае периплазматической экспрессии домены D3 вируса японского энцефалита и вируса лихорадки Денге были получены в нативной конформации без рефолдинга и отщепления белка-носителя (Wu et al., 2003; Lisova et al., 2007; Yang et al., 2012).

Для вируса клещевого энцефалита известны всего две работы по конструированию рекомбинантного домена D3. В одной из них белок D3 образовывался в растворимом виде, однако аминокислотная последовательность этого белка соответствовала штамму Найдорф европейского подтипа ВКЭ (Jarmer et al., 2014) и отличалась от последовательности штамма Софьин дальневосточного подтипа, использованной в нашем исследовании. В другой работе рекомбинантные домены D3 были получены для штаммов европейского, сибирского и дальневосточного подтипов ВКЭ, однако белки образовывали тельца включения (Ershova et al., 2016), что, как правило, вызвано нарушенным фолдингом белка (Fink, 1998; Carrió, Villaverde, 2005).

В нашем случае требовалось получить растворимый мономерный белок, пространственная структура которого была бы максимально приближена к структуре домена D3 природного гликопротеина E ВКЭ, поэтому была выбрана система бактериальной экспрессии с транслокацией белка в периплазматическое пространство клеток за счет лидерного пептида пектат-лиазы В (pelB). В результате оба варианта домена D3, rED3_294 и rED3_301, были получены без применения хаотропных агентов и рефолдинга, а растворимость и мономерность сконструированных белков были подтверждены гель-фильтрацией.

Для получения белка гЕ, представляющего собой эктодомен гликопротеина E ВКЭ, мы также использовали лидерный сигнал pelB, направляющий синтез в периплазму, и относительно слабый lac промотор. Это делалось с целью снижения эффективности транскрипции и уменьшения вероятности образования телец включения. Тем не менее белок гЕ присутствовал в растворимой форме лишь в небольшом количестве, в то время как основная часть белка присутствовала в клеточном дебрисе предположительно в виде телец включения. Вместе с тем полученный белок однозначно выявлялся исследуемым антителом ch14D5a в вестерн-блот анализе, что совместно с другими наблюдениями позволило нам локализовать эпитоп этого антитела с точностью до домена.

Созданные нами белки были использованы для выявления домена гликопротеина E вируса клещевого энцефалита, узнаваемого антителом ch14D5a, на основе которого разрабатывается терапевтический препарат. Оба варианта rED3_294 и rED3_301, отличающиеся N-концевой частью, показали сходное сродство к антителу ch14D5a и

Fab-фрагменту этого антитела, из чего мы заключили, что область с 294 по 300 а.к.о. гликопротеина E, которая отсутствует в белке gED3_301, не вносит существенного вклада в связывание антитела ch14D5a с гликопротеином E ВКЭ и не входит в состав эпитопа, узнаваемого этим антителом.

Поскольку известные вируснейтрализующие антитела к гликопротеину E флавивирусов, эпитоп которых расположен на нескольких доменах одновременно (de Alwis et al., 2012; Sun et al., 2017), было необходимо проверить, связывается ли антитело ch14D5a с доменами D1 или D2. Вестерн-блот анализ с использованием белка gED1+2 не выявил связывания антитела с этим белком. Белок gE, отличающийся от белка gED1+2 только наличием домена D3, однозначно выявлялся антителом ch14D5a. Кроме того, сродство Fab-фрагмента антитела ch14D5a к домену D3, измеренное с помощью биосенсора ProteOn, оказалось очень близко по величине к сродству этого же Fab-фрагмента к белку gE, содержащему все три домена (D1, D2 и D3) гликопротеина E ВКЭ. То есть присутствие доменов D1/D2 не усиливало взаимодействия антитела с антигеном. На основании этих данных можно заключить, что эпитоп, узнаваемый антителом ch14D5a, полностью находится в составе домена D3 и не перекрывается с доменами D1 и D2.

Ранее при исследовании мышинных и человеческих антител, образующихся в результате иммунного ответа на флавивирусные инфекции, было установлено, что антитела, направленные на домен D3, обладают рядом преимуществ по сравнению с антителами, направленными на другие участки гликопротеина E (Roehrig, 2003; Oliphant et al., 2005; Sánchez et al., 2005; Dai et al., 2016). С одной стороны, эти антитела, как правило, обладают высокой вируснейтрализующей и протективной активностью, что может быть вызвано их способностью блокировать взаимодействие домена D3 с клеточными рецепторами. С другой стороны, антитела против домена D3 не склонны вызывать антителозависимое усиление инфекции, тогда как антитела к доменам D1 и D2, в частности антитела к петле слияния, могут усиливать инфекционность флавивирусов *in vivo* и приводить к усилению инфекции у людей (Dowd, Pierson, 2011; Halstead, 2014; Haslwanter et al., 2017; Katzelnick et al., 2017). Вместе с тем при иммунизации людей большинство образующихся антител направлено на домены D1 и D2 (Oliphant et al., 2007; Crill et al., 2009; Wahala et al., 2009; Vratskikh et al., 2013; Jarmer et al., 2014). С этой точки зрения, расположение эпитопа, узнаваемого антителом ch14D5a, в области домена D3 гликопротеина E подчеркивает потенциальные преимущества подхода/препарата, который может быть создан на основе этого антитела, по сравнению с препаратами сывороточных антител человека против вируса клещевого энцефалита, которые преимущественно содержат антитела к доменам D1 и D2.

На основе количественных данных, полученных в экспериментах с использованием биосенсора ProteOn, взаимодействие между антителом ch14D5a и доменом D3 можно охарактеризовать как высокоаффинное. В случае антител принято разделять истинное сродство, проявляемое одним антигенсвязывающим центром, и эффективное сродство, определяемое совокупностью всех контактов антитела с антигеном. При взаимодействии противови-

русных антител с вирионом, покрытым множеством копий поверхностного белка, значение эффективной аффинности гораздо точнее характеризует прочность взаимодействия по сравнению с константой аффинности одновалентного взаимодействия (Wang, Yang, 2010). В случае антитела ch14D5a, несмотря на умеренную аффинность Fab-фрагмента этого антитела по отношению к домену D3, эффективная аффинность полноразмерного антитела находится на уровне 1.5 нМ, что в совокупности с благоприятным расположением эпитопа, узнаваемого на поверхности домена D3, обеспечивает высокую вируснейтрализующую и протективную активность этого антитела (Baykov et al., 2014).

Заключение

Получены рекомбинатные фрагменты гликопротеина E ВКЭ, штамм Софьин, и показано, что эпитоп, узнаваемый протективным антителом ch14D5a на поверхности гликопротеина E вируса клещевого энцефалита, расположен в области домена D3 и не перекрывается с доменами D1 и D2, содержащими эпитопы антител, обладающих повышенной способностью вызывать антителозависимое усиление инфекции. Полученные данные подтверждают перспективность использования антитела ch14D5a при создании терапевтического препарата против вируса клещевого энцефалита.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 17-74-10146.

Conflict of interest

The authors declare to have no conflict of interest.

References

- Barba-Spaeth G., Dejnirattisai W., Rouvinski A., Vaney M.C., Medits I., Sharma A., Simon-Lorière E., Sakuntabhai A., Cao-Lormeau V.M., Haouz A., England P., Stiasny K., Mongkolsapaya J., Heinz F.X., Screaton G.R., Rey F.A. Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*. 2016;536(7614):48-53. DOI 10.1038/nature18938.
- Baykov I.K., Matveev A.L., Stronin O.V., Ryzhikov A.B., Matveev L.E., Kasakin M.F., Richter V.A., Tikunova N.V. A protective chimeric antibody to tick-borne encephalitis virus. *Vaccine*. 2014; 32(29):3589-3594. DOI 10.1016/j.vaccine.2014.05.012.
- Berkmen M. Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 2012;82(1):240-251. DOI 10.1016/j.pep.2011.10.009.
- Carrió M.M., Villaverde A. Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. *J. Bacteriol.* 2005;187(10):3599-3601.
- Chen Q. Plant-made vaccines against West Nile virus are potent, safe, and economically feasible. *Biotechnol. J.* 2015;10(5):671-680. DOI 10.1002/biot.201400428.
- Crill W.D., Hughes H.R., Delorey M.J., Chang G.J. Humoral immune responses of dengue fever patients using epitope-specific serotype-2 virus-like particle antigens. *PLoS One*. 2009;4(4):e4991. DOI 10.1371/journal.pone.0004991.
- Dai L., Song J., Lu X., Deng Y.Q., Musyoki A.M., Cheng H., Zhang Y., Yuan Y., Song H., Haywood J., Xiao H., Yan J., Shi Y., Qin C.F., Qi J., Gao G.F. Structures of the Zika virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. *Cell Host Microbe*. 2016;19(5):696-704. DOI 10.1016/j.chom.2016.04.013.

- de Alwis R., Smith S.A., Olivarez N.P., Messer W.B., Huynh J.P., Wahala W.M., White L.J., Diamond M.S., Baric R.S., Crowe J.E., Jr., de Silva A.M. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109(19):7439-7444. DOI 10.1073/pnas.1200566109.
- Dowd K.A., Pierson T.C. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view. *Virology*. 2011;411(2):306-315. DOI 10.1016/j.virol.2010.12.020.
- Elahi M., Islam M.M., Noguchi K., Yohda M., Toh H., Kuroda Y. Computational prediction and experimental characterization of a "size switch type repacking" during the evolution of dengue envelope protein domain III (ED3). *Biochim. Biophys. Acta*. 2014;1844(3):585-592. DOI 10.1016/j.bbapap.2013.12.013.
- Ershova A.S., Gra O.A., Lyaschuk A.M., Grunina T.M., Tkachuk A.P., Bartov M.S., Savina D.M., Sergienko O.V., Galushkina Z.M., Gudov V.P., Kozlovskaya L.I., Kholodilov I.S., Gmyl L.V., Karganova G.G., Lunin V.G., Karyagina A.S., Gintsburg A.L. Recombinant domains III of Tick-Borne Encephalitis Virus envelope protein in combination with dextran and CpGs induce immune response and partial protectiveness against TBE virus infection in mice. *BMC Infect. Dis.* 2016;16(1):544.
- Fink A.L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold. Des.* 1998;3(1):R9-23.
- Halstead S.B. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiol. Spectr.* 2014;2(6). DOI 10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014.
- Haslwanter D., Blaas D., Heinz F.X., Stiasny K. A novel mechanism of antibody-mediated enhancement of flavivirus infection. *PLoS Pathog.* 2017;13(9):e1006643. DOI 10.1371/journal.ppat.1006643.
- Holbrook M.R., Shope R.E., Barrett A.D. Use of recombinant E protein domain III-based enzyme-linked immunosorbent assays for differentiation of tick-borne encephalitis serocomplex flaviviruses from mosquito-borne flaviviruses. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(9):4101-4110.
- Jarmer J., Zlatkovic J., Tsouchnikas G., Vratskikh O., Strauß J., Aberle J.H., Chmelik V., Kundi M., Stiasny K., Heinz F.X. Variation of the specificity of the human antibody responses after tick-borne encephalitis virus infection and vaccination. *J. Virol.* 2014;88(23):13845-13857. DOI 10.1128/JVI.02086-14.
- Katzelnick L.C., Gresh L., Halloran M.E., Mercado J.C., Kuan G., Gordon A., Balmaseda A., Harris E. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*. 2017;358(6365):929-932. DOI 10.1126/science.aan6836.
- Kulkarni M.R., Numoto N., Ito N., Kuroda Y. Modeling and experimental assessment of a buried Leu-Ile mutation in dengue envelope domain III. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016;471(1):163-168. DOI 10.1016/j.bbrc.2016.01.159.
- Lisova O., Hardy F., Petit V., Bedouelle H. Mapping to completeness and transplantation of a group-specific, discontinuous, neutralizing epitope in the envelope protein of dengue virus. *J. Gen. Virol.* 2007;88(Pt.9):2387-2397.
- Maillard R.A., Jordan M., Beasley D.W., Barrett A.D., Lee J.C. Long range communication in the envelope protein domain III and its effect on the resistance of West Nile virus to antibody-mediated neutralization. *J. Biol. Chem.* 2008;283(1):613-622.
- Nybakken G.E., Oliphant T., Johnson S., Burke S., Diamond M.S., Fremont D.H. Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature*. 2005;437(7059):764-769.
- Oliphant T., Engle M., Nybakken G.E., Doane C., Johnson S., Huang L., Gorlatov S., Mehlhop E., Marri A., Chung K.M., Ebel G.D., Kramer L.D., Fremont D.H., Diamond M.S. Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat. Med.* 2005;11(5):522-530.
- Oliphant T., Nybakken G.E., Austin S.K., Xu Q., Bramson J., Loeb M., Throsby M., Fremont D.H., Pierson T.C., Diamond M.S. Induction of epitope-specific neutralizing antibodies against West Nile virus. *J. Virol.* 2007;81(21):11828-11839.
- Pierson T.C., Kielian M. Flaviviruses: braking the entering. *Curr. Opin. Virol.* 2013;3(1):3-12. DOI 10.1016/j.coviro.2012.12.001.
- Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C., Kunz C., Harrison S.C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*. 1995;375(6529):291-298.
- Rey F.A., Stiasny K., Vaney M.C., Dellarole M., Heinz F.X. The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. *EMBO Rep.* 2018;19(2):206-224. DOI 10.15252/embr.201745302.
- Robinson L.N., Tharakaraman K., Rowley K.J., Costa V.V., Chan K.R., Wong Y.H., Ong L.C., Tan H.C., Koch T., Cain D., Kirloskar R., Viswanathan K., Liew C.W., Tissire H., Ramakrishnan B., Myette J.R., Babcock G.J., Sasisekharan V., Alonso S., Chen J., Les-car J., Shriver Z., Ooi E.E., Sasisekharan R. Structure-guided design of an anti-dengue antibody directed to a non-immunodominant epitope. *Cell*. 2015;162(3):493-504. DOI 10.1016/j.cell.2015.06.057.
- Roehrig J.T. Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv. Virus Res.* 2003;59:141-175.
- Sánchez M.D., Pierson T.C., McAllister D., Hanna S.L., Puffer B.A., Valentine L.E., Murtadha M.M., Hoxie J.A., Doms R.W. Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology*. 2005;336(1):70-82.
- Sun H., Chen Q., Lai H. Development of antibody therapeutics against flaviviruses. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;19(1). pii: E54. DOI 10.3390/ijms19010054.
- Tikunova N.V., Matveev A.L., Baykov I.K., Khlusevich Y.A., Stronin O.V., Bondarenko D.A., Murashev A.N. Preclinical study of a preparation developed on the base of chimeric antibody against tick-borne encephalitis virus. *Trudy Instituta Poliomieliita i Virusnykh Entsefalitov im. M.P. Chumakova RAMN. Meditsinskaya Virologiya = Medical Virology (Moscow)*. 2015;29(2):111. (in Russian)
- Tsekhanovskaya N.A., Matveev L.E., Rubin S.G., Karavanov A.S., Pressman E.K. Epitope analysis of tick-borne encephalitis (TBE) complex viruses using monoclonal antibodies to envelope glycoprotein of TBE virus (persulcatus subtype). *Virus Res.* 1993;30(1):1-16.
- Volk D.E., Chavez L., Beasley D.W., Barrett A.D., Holbrook M.R., Gorenstein D.G. Structure of the envelope protein domain III of Omsk hemorrhagic fever virus. *Virology*. 2006;351(1):188-195.
- Volk D.E., May F.J., Gandham S.H., Anderson A., Von Lindern J.J., Beasley D.W., Barrett A.D., Gorenstein D.G. Structure of yellow fever virus envelope protein domain III. *Virology*. 2009;394(1):12-18. DOI 10.1016/j.virol.2009.09.001.
- Vratskikh O., Stiasny K., Zlatkovic J., Tsouchnikas G., Jarmer J., Kar-rer U., Roggendorf M., Roggendorf H., Allwinn R., Heinz F.X. Dissection of antibody specificities induced by yellow fever vaccination. *PLoS Pathog.* 2013;9(6):e1003458. DOI 10.1371/journal.ppat.1003458.
- Wahala W.M., Kraus A.A., Haymore L.B., Accavitti-Loper M.A., de Silva A.M. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology*. 2009;392(1):103-113. DOI 10.1016/j.virol.2009.06.037.
- Wang J., Bardelli M., Espinosa D.A., Pedotti M., Ng T.S., Bianchi S., Simonelli L., Lim E.X.Y., Foglierini M., Zatta F., Jaconi S., Beltranello M., Cameroni E., Fibriansah G., Shi J., Barca T., Pagani I., Rubio A., Broccoli V., Vicenzi E., Graham V., Pullan S., Dowall S., Hewson R., Jurt S., Zerbe O., Stettler K., Lanzavecchia A., Sallusto F., Cavalli A., Harris E., Lok S.M., Varani L., Corti D. A human B-specific antibody against Zika virus with high therapeutic potential. *Cell*. 2017;171(1):229-241.e15. DOI 10.1016/j.cell.2017.09.002.
- Wang P., Yang X. Neutralization efficiency is greatly enhanced by bivalent binding of an antibody to epitopes in the V4 region and the membrane-proximal external region within one trimer of human immunodeficiency virus type 1 glycoproteins. *J. Virol.* 2010;84(14):7114-7123. DOI 10.1128/JVI.00545-10.
- White M.A., Liu D., Holbrook M.R., Shope R.E., Barrett A.D., Fox R.O. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis

- of Langkat virus envelope protein domain III. *Acta Crystallogr.* 2003; D59:1049-1051. DOI 10.1107/S0907444903004475.
- Wu K.P., Wu C.W., Tsao Y.P., Kuo T.W., Lou Y.C., Lin C.W., Wu S.C., Cheng J.W. Structural basis of a flavivirus recognized by its neutralizing antibody: solution structure of the domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *J. Biol. Chem.* 2003;278(46):46007-46013.
- Yang J., Zhang J., Chen W., Hu Z., Zhu J., Fang X., Yuan W., Li M., Hu X., Tan Y., Hu F., Rao X. Eliciting cross-neutralizing antibodies in mice challenged with a dengue virus envelope domain III expressed in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 2012;58(4):369-380. DOI 10.1139/w11-137.
- Zhao H., Fernandez E., Dowd K.A., Speer S.D., Platt D.J., Gorman M.J., Govero J., Nelson C.A., Pierson T.C., Diamond M.S., Fremont D.H. Structural basis of Zika virus-specific antibody protection. *Cell.* 2016;166(4):1016-1027. DOI 10.1016/j.cell.2016.07.020.
- Zidane N., Dussart P., Bremand L., Bedouelle H. Cross-reactivities between human IgMs and the four serotypes of dengue virus as probed with artificial homodimers of domain-III from the envelope proteins. *BMC Infect. Dis.* 2013;13:302. DOI 10.1186/1471-2334-13-302.