

УДК 577.112.083

ОСОБЕННОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ И ПРОТЕКТИВНОСТИ ИЗОФОРМ LcrV *Yersinia pestis*

© 2019 г. П. Х. Копылов¹, *, Т. Э. Светоч¹, С. А. Иванов¹, Т. И. Комбарова¹,
О. Н. Перовская¹, Г. М. Титарева¹, А. П. Анисимов¹

¹Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Оболensk, 142279 Россия

*e-mail: pkopylov@obolensk.org

Поступила в редакцию 19.07.2018 г.

После доработки 16.11.2018 г.

Принята к публикации 22.04.2019 г.

В результате хроматографической очистки получены электрофоретически гомогенные высокоочищенные препараты различных изоформ иммунодоминантного антигена V (белка LcrV) *Yersinia pestis*. Отмечено существенное сходство хроматографических профилей изоформ антигена LcrV различных штаммов с остатками триптофана (W113) и глутаминовой кислоты (E113) в положении 113, которые отличались от профиля изоформы, содержавшей в этом положении остаток глицина LcrV(G113). Последняя характеризовалась наибольшей антигенной и протективной активностью по сравнению с другими изоформами белка. Эта изоформа практически полностью защищала иммунизированную группу животных и обладала наибольшей способностью индуцировать продукцию антител, титры которых достигали значения 1 : 250000.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, чумная вакцина, V антиген, LcrV, хроматографическая очистка, протективность

DOI: 10.1134/S0555109919040081

Антиген V (белок LcrV¹, low calcium response vigilence), который является одним из основных факторов патогенности *Yersinia pestis*, а также защитным компонентом чумных вакцин, представлен несколькими изоформами. Из них изучена классическая изоформа штаммов подвида *pestis*, обладающих универсальной вирулентностью для широкого круга теплокровных животных. У ряда филогенетических групп условно патогенных для человека штаммов подвида *microti* продуцируются антигены, которые отличаются от классической изоформы белка одним или несколькими аминокислотными остатками. Значительные защитные свойства антигена V (LcrV) обусловили его включение в виде индивидуального или слитого белка в состав практически всех экспериментальных чумных субъединичных (химических и молекулярных) вакцин [1–5]. В ранних работах свойства этого белка изучали с использованием очищенных препаратов LcrV, полученных из таких источников, как супернатант культуральной жидкости после роста чумного микроба или цитоплазмы лизированных клеток йерсиний [6, 7]. Протеолитическая деградация затрудняет выделение белка из клеток самих йерсиний [8]. Протеолиза удалось избежать при клонировании LcrV

в протеазодефицитных штаммах кишечной палочки *Escherichia coli* BL 21, однако его очистка была многоступенчатой, и выход целевого белка составлял не более 0.5% [9]. Для получения очищенных антигенов в одну стадию были разработаны методы очистки, основанные на его избирательном сродстве к хроматографическому сорбенту, что потребовало обязательного введения аффинной метки в полипептидную цепь. Так, на основе кишечной палочки были сконструированы продуценты LcrV, синтезирующие гибридный белок, содержащий полигистидиновый якорь или глутатион S-трансферазу, которые позволяли выделять химерный белок с помощью аффинной хроматографии из культуральной жидкости клеток *E. coli* в один этап [10–12]. Аффинные метки, обладающие высоким сродством к сорбенту, способствовали избирательному извлечению целевого продукта из сложной смеси белков. Выход LcrV определялся количеством вновь синтезированного антигена, содержание которого в исходном материале часто превышало 30%. Так, из 10 г влажного осадка клеток получали десятки миллиграммов очищенного гибридного белка, при этом потери при хроматографии имели второстепенное значение. Однако рекомбинантные белки использовались после отщепления аффинных групп. Это

требовало применения дополнительных стадий очистки от продуктов протеолиза. Разработка способов получения LcrV включало наработку клетками *E. coli* белка, не содержащего аффинных групп [10, 11], и последующее применение простых методов выделения, обеспечивающих необходимую чистоту и количество антигена [13–15].

Цель работы – оптимизировать метод препаративного выделения известных изоформ LcrV (K18, K72, E103, W113, S273 и S324–G325–K326), (N18, R72, E103, W113, S273 и R324), (N18, R72, G103, W113, S273 и R324), (N18, R72, E103, E113, S273 и S324–G325–K326) и (N18, R72, E103, G113, S273 и S324–G325–K326) и определить их защитную активность по отношению к штамму дикого типа основного подвида [16–18].

МЕТОДИКА

Реактивы. Использовали реактивы для электрофореза, гель гидроокиси алюминия для иммунизации животных, желатину кожи арктических рыб (“Sigma-Aldrich”, США), белки-маркеры для электрофореза и питательную среду Луриа–Бертани (LB, “Thermo Fisher Scientific”, США), соли, HCl, H₂SO₄, органические компоненты буферных растворов (“Fluka”, Германия) и “Рехим” (Россия), хроматографические сорбенты Toyopearl HW-40F, Toyopearl DEAE-650M и фенил-сефароза “Tosoh Bioscience”, Германия и “GE Healthcare Biosciences”, США). Использовали также конъюгат антимышиных антител овцы с пероксидазой хрена (“GE Healthcare Biosciences”, США).

Штаммы микроорганизмов. Используемые в работе штаммы микроорганизмов получены в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия).

Культивирование микроорганизмов. Глубинное культивирование продуцентов изоформ LcrV проводили на платформе с амплитудой 55 мм и частотой оборотов 180 мин⁻¹, что обеспечивало массообмен в области 200 ч⁻¹. В качалочные колбы емкостью 0.75 л вносили 0.1–0.2 л питательной среды. Культивирование проводили также в лабораторном ферментере (“New Brunswick Scientific Co.”, США) с рабочим объемом 2 л при 37°C, скорости подачи воздуха 2 л/мин, частоте вращения мешалки 600–800 об/мин и массообмене до 300 ч⁻¹. Культуры *E. coli* выращивали в жидкой аэрируемой среде LB, содержащей соответствующие антибиотики: ампициллин (100 мг/л), хлорамфеникол (20 мг/л), тетрациклин (40 мг/л) и канамицин (40 мг/л) для роста клеток с рекомбинантными плазмидами.

Лизис микробных клеток. Микробные клетки отделяли центрифугированием при 7000 г в течение 10 мин при 4°C, осадок диспергировали в десятикратном (вес/объем) избытке 20 мМ трис-

HCl буфера, pH 7.5. Для лизиса ультразвуком применяли дезинтегратор (“Bandelin”, Германия) с мощностью, ограниченной до 40% от максимальной. Дискретную обработку суспензии вели на льду импульсами ультразвука в течение 10 с с паузами 15 с до величины затраченной энергии 36–38 кДж, затем центрифугировали клеточный лизат при 15000 g в течение 25 мин и надосадочную жидкость фильтровали через мембрану с порами 0.45 мкм.

Выделение и очистка антигенов V. Фильтрат пропускали через колонку XK50/40, наполненную 600 мл Toyopearl HW-40F, предварительно уравновешенный 20 мМ трис-HCl буфером, pH 8.0, содержащим 1 мМ ЭДТА, (TE, буфер А). Фракции, элюирующиеся после свободного объема колонки, содержали изоформы LcrV. Эти фракции наносили на колонку XK50/20, наполненную 200 мл Toyopearl DEAE-650M. Не связавшиеся белки удаляли, промывая колонку буфером А, и элюировали фракции, содержащие LcrV, ступенчатым градиентом хлористого натрия в том же буфере. Фракции с наибольшим содержанием целевого белка смешивали с эквивалентными объемами 1 М сернокислого аммония и инкубировали в течение 18 ч при 10°C, после чего центрифугировали при 20°C. Фильтрат наносили на колонку XK26/20, наполненную 80 мл фенил-сефарозы, предварительно уравновешенной буфером А, содержащим 0.5 М сернокислый аммоний. Элюировали белки при комнатной температуре. Сначала балластные белки удаляли тем же буфером, а затем фракции LcrV элюировали нисходящим ступенчатым градиентом сернокислого аммония.

Определение антигенов V в хроматографических фракциях. В полученных хроматографических фракциях определяли концентрацию общего белка по методу Лоури, а белки в них анализировали электрофоретически в 12.5%-ном полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na по методу Лэммли с последующим окрашиванием гелей Ку-масси G 250. Цифровые изображения гелей (8-бит по серой шкале, разрешение 300 dpi) получали в проходящем свете на устройстве для гель-документации (“Vilber-Lourmat”, Франция). Электрофоретические дорожки анализируемых образцов обрабатывали с использованием программных инструментов “GelAnalyzer-2010” (США), определяя площади пиков, соответствующие окрашенным белковым компонентам LcrV, примесям и белкам известной концентрации (БСА). Для построения профилей элюции использовали нормированные количества белка в различных элюатах при анионообменной или гидрофобной хроматографии по отношению к его содержанию в соответствующих исходных фракциях, нанесенных на сорбенты. В расчетах учитывали объемы фракций и результаты определения белка по методу Лоури.

Лабораторные животные. Использовали мышей линии BALB/ 8–10 нед возраста и среднего веса (19 ± 2) г из вивария ГНЦ ПМБ. Работы с животными проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации и Директивой европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [19]. Содержание и манипуляции с животными выполняли в виварии, соответствующем требованиям GAC (Good Animal Care) и протоколом комитета по биоэтике (разрешение № ВП-2016/1) ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии.

Препараты изоформ LcrV и иммунизация мышцей. Мышей делили на группы по 5 особей случайным образом и иммунизировали различными монопрепаратами LcrV подкожно в объеме 0.2 мл в нулевое время и через 30 сут. Монопрепараты для иммунизации получали сорбцией индивидуальных белковых антигенов LcrV на геле гидроксида алюминия. Компоненты подбирали таким образом, чтобы в одной иммунизирующей дозе суспензии объемом 0.2 мл гидроксида алюминия содержала 10 мкг сорбированного белка. Контрольной группе животных вводили только гель гидроксида алюминия. Термостабильные составляющие препаратов, включающие гидроокись алюминия, деионизованную воду и фосфатно-солевой буфер, pH 7.2, предварительно стерилизовали автоклавированием, растворы LcrV фильтровали через стерильные мембраны с пораи 0.22 мкм, а затем в асептических условиях готовили препараты различных LcrV. Кровь иммунизированных и контрольных мышцей в объеме 40–50 мкл забирали из ретроорбитального синуса на 62 сут.

Защитная активность изоформ LcrV. Группы иммунизированных мышцей заражали на 64 сут подкожным введением в верхнюю треть левого бедра 0.2 мл 2-суточной бактериальной культуры вирулентного штамма *Y. pestis* 231 (от 10^4 до 10^7 КОЕ, выросших при высеве на плотную питательную среду, на одно животное), разведенной в 10 раз 0.9%-ным раствором NaCl. За зараженными животными наблюдали в течение 21 сут с ежедневной фиксацией погибших. Павших животных вскрывали для проведения микробиологического подтверждения причин гибели. Вычисление величин LD_{50} и доверительного интервала (для вероятности 95%) проводили по методу Кэрбер в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [20]. Для сравнения кривых выживания зараженных иммунизированных мышцей использовали логарифмический ранговый критерий Мантела-Кокса, различия признавались достоверными при величине $P < 0.05$ [21]. Напряженность иммунитета выражали отношением LD_{50} для животных, иммунизированных изоформами LcrV к LD_{50} для интактных живот-

ных. Статистический анализ результатов проводили программой “Prism”, версия 7.0.

Иммуноферментный анализ. В лунки микропланшетов (“Greiner Bio-One”, Австрия) вносили по 100 мкл (600 нг) растворов изоформ LcrV в 0.1 М карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9.6, и сорбировали антигены в течение ночи при 4°C. Вероятное проявление неспецифического связывания подавляли 3–4%-ным раствором желатины кожи арктических рыб, не образующей геля при температуре около 0°C. Раствор готовили в 10 мМ фосфатно-солевом буфере, pH 7.2, содержащим 150 мМ NaCl и 0.05% твин-20 (ФСБТ), и использовали этот буфер на этапах промывания микропланшетов, а также для разведения иммунных сывороток и конъюгата. Серийные разведения мышечных сывороток с шагом 2.5 готовили в специальных полипропиленовых титр-пробирках (“SSI”, США) емкостью 1.2 мл. Антитела, специфически связавшиеся с изоформами LcrV, выявляли конъюгатом антимишечных антител овцы с пероксидазой хрена в разведении 1 : 6000. Непосредственно перед использованием готовили 50 мМ цитрат-фосфатный буфер, pH 5.0, содержащий 0.04%-ный раствор хромогена ортофенилендиамина и 0.012%-ный раствор пероксида водорода. Развитие окраски останавливали добавлением в лунки по 100 мкл 1 М серной кислоты. Проводку и фотометрию микропланшет при 450 нм осуществляли роботизированной системой “Evolis Twin Plus” (“Bio-Rad”, США). Продолжительность инкубации микропланшет на этапах сенсibilизации антигенами и с иммунными сыворотками составляла 16 ч при 4°C, блокировку проводили в течение 3 ч, обработку конъюгатом – 1.5 ч при 37°C. Титром антител считали величину наибольшего разведения иммунной сыворотки, которой соответствовала оптическая плотность раствора (ОП), превосходящая контрольное значение на 0.1 единицы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для экспрессии изоформ LcrV использовали штаммы микроорганизмов, приведенные в табл. 1. Изоформы LcrV, секретируемые клетками каждого из приведенных штаммов очищали не менее трех раз, начиная с этапа культивирования микроорганизмов, что позволило представить статистически обработанные результаты хроматографии, включающие 34 эксперимента. Хроматографию проводили по одинаковой схеме, состоявшей из трех этапов. На подготовительном этапе, который включал лизис микробных клеток и удаление неразстворимых компонентов, были получены бесклеточные фракции растворимых белков, содержащие вновь синтезированные клетками-продукентами изоформы LcrV, которые можно было подвергнуть колоночной хроматографии. При

Таблица 1. Характеристика использованных в работе штаммов микроорганизмов

Штамм	Характеристика
<i>Escherichia coli</i> из коллекции ГКПМ “Оболенск”	
BL21(DE3)/pETV EV	Продуцент LcrV (K18, K72, E103, W113, S273 и S324–G325–K326)
BL21(DE3)/pETV A1728	Продуцент LcrV (N18, R72, E103, W113, S273 и R324)
BL21(DE3)/pETV C582	Продуцент LcrV (N18, R72, G103, W113, S273 и R324)
BL21(DE3)/pETV I2359	Продуцент LcrV (N18, R72, E103, E113, S273 и S324–G325–K326)
BL21(DE3)/pETV I3455	Продуцент LcrV (N18, R72, E103, G113, S273 и S324–G325–K326)
<i>Y. pestis</i> 231	pFra ⁺ pCad ⁺ pPst ⁺ , вирулентный

лизисе клеточных суспензий ультразвуком выби- рали такой режим обработки, при котором темпе- ратура лизатов не превышала 12–15°C. При этом ве- личина затраченной энергии составляла 36–38 кДж для объема клеточной суспензии около 115 ± 10 мл, приготовленного из 12–13 г влажной биомассы. Условия клеточного лизиса для каждого штамма предварительно контролировали под микроско- пом и электрофорезом в ПААГ с Na-ДСС. Все суспензии микробных клеток готовили с таким избытком, чтобы после лизиса, удаления осадков центрифугированием и фильтрации надосадоч- ного материала объем фильтрата для нанесения на колонку с Toyopearl HW-40F составлял при- мерно 100 мл (табл. 2). Выбор Toyopearl HW-40 для гель-проникающей хроматографии был обу- словлен, в первую очередь, высокой скоростью потока элюента и низкой кратностью разбавле- ния надосадочной жидкости после лизиса, а так- же величиной предела исключения сорбента для глобулярных белков (10 кДа). Это позволяло в те- чение 1 ч получать фракцию, которую можно бы- ло подвергнуть анионообменной хроматографии. Картина гель-проникающей хроматографии ока- залась одинаковой для всех штаммов. В ней при- сутствовал основной пик, содержащий антиген V, который элюировался сразу после свободного объема колонки (200 мл). Присутствие изоформ LcrV предварительно подтверждали ДДС-ПААГ.

Установлено, что в исходных лизатах микроб- ных клеток содержание изоформ LcrV в среднем составляло 33%. После гель-проникающей хро- матографии бесклеточных фильтратов эта вели- чина увеличивалась и достигала 36%, что, по- видимому, было обусловлено частичным удалением части нецелевых белков, молекулярная масса ко- торых была ниже предела исключения сорбента (табл. 2). Высокая воспроизводимость результа- тов гель-проникающей хроматографии фильтрат- ов различных штаммов обеспечила возможность использования второго этапа их очистки анионо- обменной хроматографией, в том числе тандем- ного характера. При этом объем наносимых на сорбенты фракций, содержащих целевые белки,

находился в интервале от 1.15 до 1.25 от объема ис- ходного фильтрата. Анионообменный сорбент промывали буфером А, а белки элюировали ступ- пенчатым градиентом хлористого натрия в том же буфере, начиная с 40 мМ NaCl, с последующим удвоением его концентрации на каждой следую- щей ступени.

В препаративных масштабах использовали па- раметры этого ступенчатого градиента для выделе- ния изоформ LcrV из клеток различных штаммов. Во фракции, которые элюировались 40 и 80 мМ NaCl, сразу добавляли при перемешивании экви- валентный объем 1.0 М сернокислого аммония в буфере А и инкубировали в течение ночи при 6°C. Фракцию с максимальным содержанием целево- го белка определяли по результатам ДДС-ПААГ. На этом этапе выход изоформ LcrV (W113) и LcrV (E113) во фракциях, содержащих 40 мМ NaCl, со- ставлял в среднем 51%, в то время как наибольшее относительное содержание изоформы LcrV (G113) во фракции элюата, содержащих 80 мМ NaCl, до- стигало только 8% (табл. 2). При хранении фрак- ций на холоду даже в течение 3–4 сут не отмечали значительного уменьшения доли изоформ LcrV. Вместе с тем наблюдали осаждение некоторой ча- сти балластных белков. Результаты анионооб- менной хроматографии представлены на рис. 1а, 1в и 1г, гидрофобной хроматографии – на рис. 1б, 1г и 1е. Результаты показали существенное совпа- дение профилей элюции, а также распределения антигенов V во фракциях, полученных при ис- пользовании этих видов хроматографии. Это вид- но, в частности для белков, содержащих остаток триптофана (W113) или глютаминовой кислоты (E113) в положении 113 аминокислотной последо- вательности LcrV (рис. 1а и 1в, рис. 1б и 1г). Практически отсутствовали достоверные различия в содержании общего белка и антигенов V в полу- ченных фракциях, а наибольшее количество це- левого белка (превосходящее 60%) было обнару- жено во фракциях, которые элюировались 40 мМ хлористым натрием. Эти фракции использовали для гидрофобной хроматографии LcrV (W113) и LcrV (E113). В отличие от белков, содержащих

Таблица 2. Очистка изоформ рекомбинантных антигенов LcrV из клеток штаммов *E. coli* BL21(DE3)

Этап выделения	Плаزمид	Объем фракции, мл	Концентрация общего белка, мг/мл	Количество общего белка, мг	Количество LcrV, мг	Выход, %
Исходный клеточный лизат	pETV EV	116 ± 10	9.5 ± 0.7	1055 ± 46	380 ± 35	100
	pETV A1728	115 ± 4	12.2 ± 0.6	1380 ± 40	450 ± 29	100
	pETV C582	112 ± 4	10.5 ± 0.4	1170 ± 27	300 ± 15	100
	pETV I2359	112 ± 9	13.1 ± 0.9	1440 ± 50	455 ± 34	100
	pETV I3455	112 ± 8	13.4 ± 0.4	1450 ± 33	575 ± 28	100
Toyopearl HW-40F	pETV EV	200 ± 51	4.2 ± 0.9	850 ± 113	254 ± 82	67
	pETV A1728	165 ± 32	5.0 ± 0.4	820 ± 45	322 ± 48	71
	pETV C582	185 ± 28	4.4 ± 0.6	810 ± 19	240 ± 25	80
	pETV I2359	150 ± 35	5.3 ± 0.8	790 ± 96	306 ± 34	67
	pETV I3455	160 ± 26	5.8 ± 0.8	960 ± 87	417 ± 59	72
Toyopearl DEAE-650M	pETV EV	382 ± 33	0.69 ± 0.09	265 ± 34	203 ± 14	53
	pETV A1728	352 ± 42	0.76 ± 0.08	265 ± 26	190 ± 19	42
	pETV C582	397 ± 28	0.69 ± 0.08	276 ± 31	189 ± 18	63
	pETV I2359	405 ± 53	0.72 ± 0.10	290 ± 35	208 ± 56	45
	pETV I3455	162 ± 29	0.43 ± 0.04	70 ± 13	45 ± 6	8
Фенил-сефароза	pETV EV	104 ± 12	0.41 ± 0.06	43 ± 4	41 ± 6	10
	pETV A1728	95 ± 15	0.62 ± 0.05	59 ± 7	57 ± 6	13
	pETV C582	88 ± 14	0.57 ± 0.06	50 ± 7	48 ± 7	16
	pETV I2359	98 ± 18	0.53 ± 0.08	52 ± 10	51 ± 8	11
	pETV I3455	73 ± 8	0.09 ± 0.03	6.5 ± 1.5	6.2 ± 1.4	1.1

остаток триптофана (W113) или глутаминовой кислоты (E113), профиль элюции LcrV (G113), содержащего в этом положении остаток глицина, существенно отличался (рис. 1d и 1e). При анионообменной хроматографии наибольшее количество белка LcrV (G113) было обнаружено во фракции, которая элюировалась буфером с самой высокой ионной силой (500 мМ NaCl) и которая была значительно контаминирована нецелевыми белками *E. coli*. Поэтому, для следующего этапа очистки этой изоформы LcrV использовали фракцию, элюировавшуюся 80 мМ NaCl. При этом принимали во внимание то, что в этой фракции присутствовало наивысшее относительное содержание LcrV (G113).

Таким образом, все высокоочищенные белки были получены после завершающей гидрофобной хроматографии на фенил-сефарозе по трехэтапной схеме (рис. 2). При гидрофобной хроматографии нисходящим линейным градиентом сернокислого аммония удалось элюировать основную часть антигена V низкими концентрациями соли, в основном менее 100 мМ. Наиболее высокой степени отделения примесей от чистого

целевого белка достигали в том случае, когда на каждой ступени градиента концентрацию сернокислого аммония уменьшали на один порядок, начиная со значения 100 мМ (рис. 1). В области его низких концентраций проявлялось такое преимущество ступенчатого градиента, как отсутствие ограничения по объему элюента, при этом достигались не только исчерпывающая промывка сорбента, но и снижение количества примесей. В этих условиях высокочистые белки LcrV (W113) и LcrV (E113) элюировали 10 мМ сернокислым аммонием, а для LcrV (G113) концентрация соли в элюенте должна быть в 10 раз меньше. Замещенные в положении 113 изоформы LcrV различными остатками вели себя при гидрофобной хроматографии не одинаково. Так, по мере снижения концентрации сернокислого аммония от 100 до 1.0 мМ относительное содержание изоформы LcrV (W113) во фракциях уменьшалось, а изоформы LcrV (E113) оставались примерно на одном уровне, в то время как количество изоформы LcrV (G113) в этих же условиях достоверно возрастало и достигало наибольшей величины во фракции

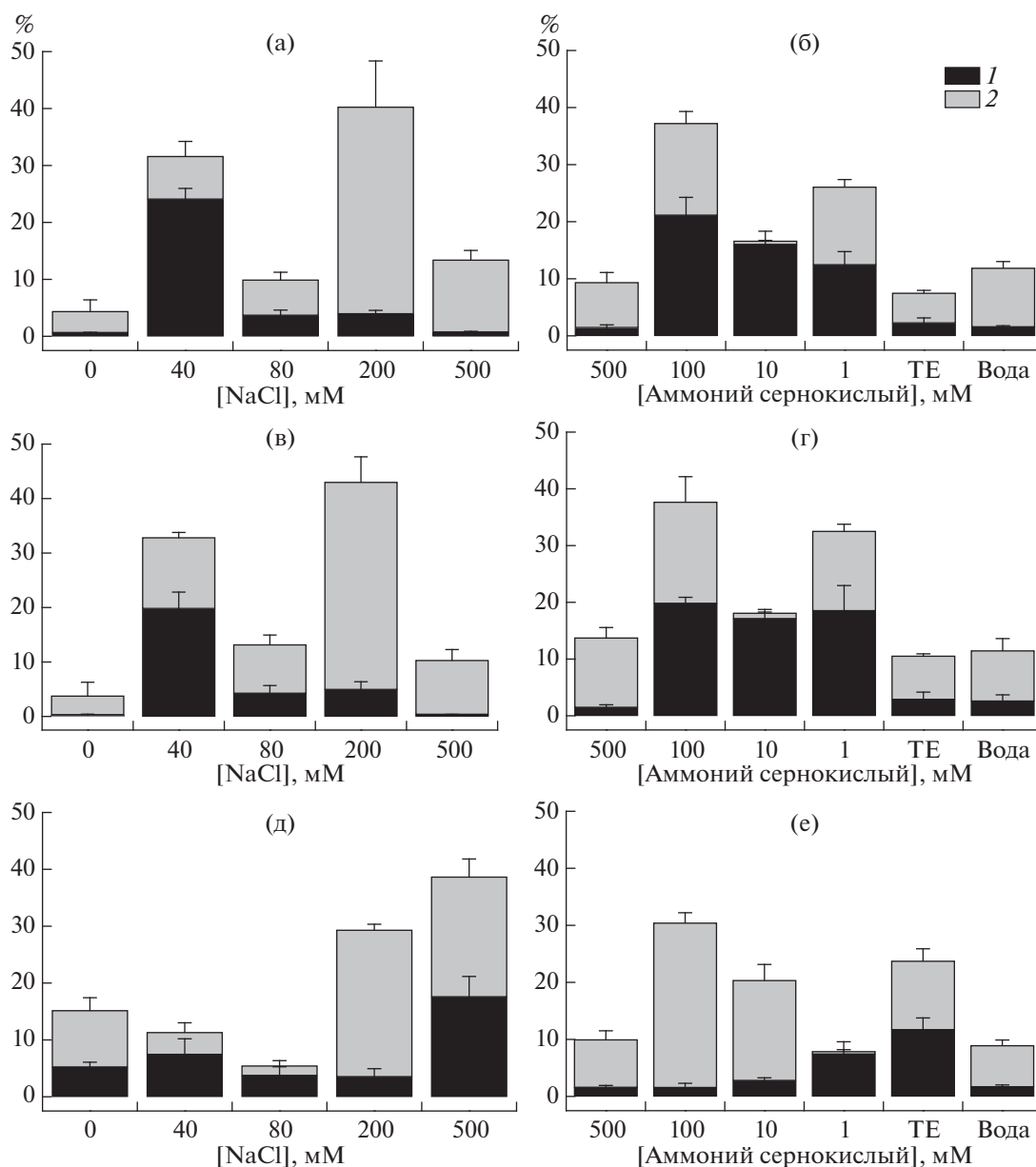


Рис. 1. Процентное содержание изоформ LcrV (1) и примесных белков (2) во фракциях при их анионообменной (а, в, г) и гидрофобной (б, г, е) хроматографии: W113 (а, б), E113 (в, г), G113 (д, е).

“TE”, в которой отсутствовал сернокислый аммоний (рис. 1б, 1г и 1е).

При гидрофобной хроматографии профили элюции белков LcrV (W113) и LcrV (E113) были подобны. Основное количество этих изоформ находилось во фракциях, в которых концентрация сернокислого аммония убывала от 100 до 1.0 мМ, в то время как для LcrV (G113) этот интервал лежал в области 0.1 мМ – TE. Практически совпали профили анионообменной хроматографии LcrV (W113) и LcrV (E113), а основную часть этих изоформ обнаружили во фракциях, элюировавшихся 40 мМ NaCl, причем содержание этих белков более чем в 3 раза превышало их содержание в

смежных фракциях. Ранее было отмечено, что замена остатка триптофана на остаток глутаминовой кислоты увеличивала потенциал перестройки гидрофобных связей вокруг E113 и, соответственно локальной структуры изоформы белка LcrV (E113). Однако поведение этой изоформы при анионообменной хроматографии свидетельствовало о том, что, в целом, возможная перестройка мало влияла на поверхностный заряд, несмотря на введение отрицательно заряженного аминокислотного остатка [15]. Этому соответствовало нахождение главных фракций изоформ LcrV (W113) и LcrV (E113) в одной области концентрации NaCl, равной 40 мМ, что, по-видимому, могло отра-

жать сходство их поверхностных зарядов, определяющее условия связывания с анионообменником. Напротив, появление глицина в изоформе LcrV (G113) усиливало связывание целевого белка с анионообменником, поэтому половина его количества находилась во фракции, элюировавшейся 500 мМ NaCl. Остальная часть этой изоформы была монотонно распределена по хроматографическому профилю в интервале концентраций соли от 40 до 200 мМ. Отсутствие пика LcrV (G113) при элюции 40 мМ NaCl указывало на отличие его поверхностного заряда после перестройки структуры белка, у которого вместо остатка триптофана в положении 113 первичной последовательности оказался глицин. Таким образом, замена остатка триптофана (или глутаминовой кислоты) на глицин, не приносящий дополнительный заряд в молекулу белка, приводила к выраженным изменениям профиля элюции.

При гидрофобной хроматографии по мере уменьшения концентрации сернокислого аммония увеличивалось количество только изоформы LcrV (G113). Различные гидрофобные свойства изоформ LcrV обусловили характер их профилей элюции при гидрофобной хроматографии. Совпадающие “гидрофобные” профили элюции LcrV (W113) и (E113) свидетельствовали в пользу того, что замена остатка триптофана на остаток глутаминовой кислоты не вызывала существенных изменений гидрофобной поверхности этих изоформ LcrV. В то же время появление в этом положении аминокислотной последовательности белка остатка глицина привело к переменам, которые проявились при гидрофобной хроматографии в идентичных условиях. Практически совпадающие профили элюции LcrV (W113) и LcrV (E113) с фенил-сефарозы показали, что большая часть этих целевых белков освобождалась с сорбента при концентрации сернокислого аммония от 100 до 1 мМ. Изоформа LcrV (G113) накапливалась во фракциях со следовыми концентрациями (менее 1.0 мМ) соли, что указывало на определенное усиление ее гидрофобности по сравнению с другими изоформами. Можно предположить, что это было следствием проявления различий гидрофобных областей изоформ LcrV, которые лежали в основе взаимодействия (удержания) молекул белка с гидрофобной матрицей при хроматографии и которые, в свою очередь, являлись следствием предполагаемой структурной перестройки. Введение остатка глицина, заменившего остаток триптофана или глутаминовой кислоты в положении 113 первичной аминокислотной последовательности, значительно снижало выход очищенной изоформы белка LcrV (G113) при использовании трехэтапной схемы колоночной хроматографии (табл. 2). Если выход изоформ LcrV (W113) и LcrV (E113) составил в среднем 12.5%, то для LcrV (G113) только 1.1%, при этом

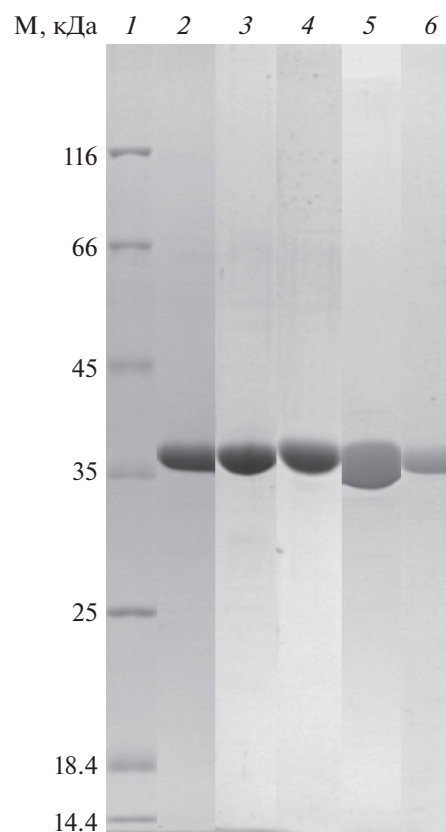


Рис. 2. ДДС-ПААГ электрофорез очищенных изоформ LcrV(W113)/pETV A1728 (2), LcrV(W113)/pETV C582 (3), LcrV(W113)/pETV EV (4), LcrV(E113)/pETV I2359 (5) и LcrV(G113)/pETV I3455LcrV (6), продуцируемых штаммами *E. coli*; 1 – белки-маркеры молекулярных масс (“Bio-Rad”, США).

содержание целевых белков во всех полученных препаратах находилось в пределах 95–97% (рис. 2).

В предыдущей работе [22] было показано, что основные полиморфные типы аминокислотных последовательностей содержали “горячие точки” замен аминокислотных остатков, которые, как было обнаружено при моделировании трехмерной структуры белка LcrV, локализовались в составе “альфа” домена N-концевого участка (аминокислотные остатки 1–146). В настоящей работе были использованы представители пяти основных изоформ LcrV, у которых присутствовали замены в этой области, а в некоторых из них – замены остатков серина на остатки аргинина в положении 324, и представляли собой несколько укороченные последовательности, утратившие C-концевые аминокислотные остатки G325–K326 (табл. 1). Принимая во внимание высокую степень подобия представленных хроматографических свойств изоформ LcrV (W113) и LcrV (E113), можно заключить, что замены различных аминокислотных остатков в положениях 18, 72, 103 и 324 и удаление остатков G325–K326 не оказывали влияния на характер их хроматографии. Существенное изменение хрома-

Таблица 3. Защитная активность изоформ рекомбинантного LcrV из клеток штаммов *E. coli* BL21(DE3)

Изоформы антигена LcrV/штамм <i>E. coli</i> BL21(DE3)	LD ₅₀ <i>Y. pestis</i> 231 для мышей, иммунизированных LcrV, КОЕ/мышь, среднее (интервал)	Напряженность (индекс) иммунитета
LcrV(W113)/pETV EV	7 (1–20)	2.3
LcrV(W113)/pETV A1728	5 (1–19)	1.6
LcrV(W113)/pETV C582	15 (4–59)	5.0
LcrV(E113)/pETV I2359	15 (4–59)	5.0
LcrV(G113)/pETV I3455	1.7 × 10 ⁶ (1.0 × 10 ⁶ –3.2 × 10 ⁶)	5.7 × 10 ⁵
Контроль, Al(OH) ₃	3 (1–12)	1.0

тографических свойств изоформ антигена V было обнаружено после введения остатка глицина в положение 113 первичной аминокислотной последовательности LcrV.

Известно, что классическая изоформа LcrV (W113), используемая в качестве компонента прототипа субъединичной вакцины, вызывала развитие гуморального иммунитета к экспериментальной чумной инфекции, включающего выработку специфических антител [23]. Титры специфических IgG сывороток крови мышей, иммунизированных разными изоформами LcrV, найденные по результатам иммуноферментного анализа, показали, что самое высокое значение 1 : 250 000 вызывала изоформа белка LcrV (G113). В то же время титры изоформ LcrV (W113) и LcrV (E113) находились в интервале 1 : 16 000–1 : 25 000. Таким образом, эти изоформы обладали существенно меньшей способностью индуцировать продукцию антител. Структурные перестройки антигена, вызванные появлением глицина в положении 113 и обнаруженные при хроматографии изоформ LcrV, оказались значительными для развития существенного ответа и коррелировали с показателями защитных свойств изоформ (табл. 3). Подкожное введение и бустерная иммунизация препаратом V(G113)/I3455 обеспечивали полную защиту животных от заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 в дозах от 1 до 10⁷ КОЕ. По сравнению с ним препараты LcrV (W113)/EV, LcrV (W113)/A1728, LcrV (W113)/C582 и LcrV (E113)/I2359 обладали значительно меньшей защищающей активностью. Показатели LD₅₀ и напряженности иммунитета против вирулентного штамма *Y. pestis* 231 у мышей, иммунизированных последующими препаратами, не превосходили соответствующие значения контрольной группы в отличие от тех, которые были вычислены для препарата LcrV (G113)/I3455 (табл. 3). Однако, анализ динамики гибели мышей в группах, им-

мунизированных препаратами изоформ LcrV, показал особенности защитного действия разноразмерных антигенов. Гибель животных контрольной группы, иммунизированных гелем гидроокиси алюминия, наступала в зависимости от дозы заражающего агента в интервале от 3 до 6 сут. Препарат, содержащий LcrV (G113)/I3455 практически полностью защищал соответствующую группу животных, а эффект от других изоформ распределялся в области между контролем и последней группой и имел выраженную зависимость от доз *Y. pestis* 231 введенных подкожно (рис. 3). Использование логарифмического рангового теста Мантела-Кокса для анализа защитных свойств препаратов показало, что кривые смертности всех групп иммунизированных мышей достоверно отличались от контрольной группы, которая получала только гидроокись алюминия. Показатель *P* характеризовался довольно монотонными значениями, которые свидетельствовали о достоверных отличиях от контроля для всех групп, и находился в интервале 0.0035–0.0050 (детальные данные не приводятся). Однако анализ данных о времени гибели мышей в группе иммунизированных LcrV (G113)/I3455, проведенный этим же методом, продемонстрировал подобие защитного действия классической формы LcrV(W113)/pETV EV и LcrV (G113)/I3455 при заражении дозами от 10 до 10⁴ микробных клеток по сравнению с другими группами (табл. 4). Логично было отнести к совпадению пограничное значение показателя *P* (0.0494*) при заражении групп мышей 10² и 10³ КОЕ. Интересно, что при наименьшей заражающей дозе показатель *P* для группы мышей иммунизированных LcrV(E113)/pETV I2359 превосходил величину 0.05, что свидетельствовало о защитном, хотя и незначительном действии этой изоформы LcrV. Изоформы LcrV(W113)/pETV A1728 и LcrV(W113)/pETV C582, несущие соответствующие замены аминокислотных остатков в

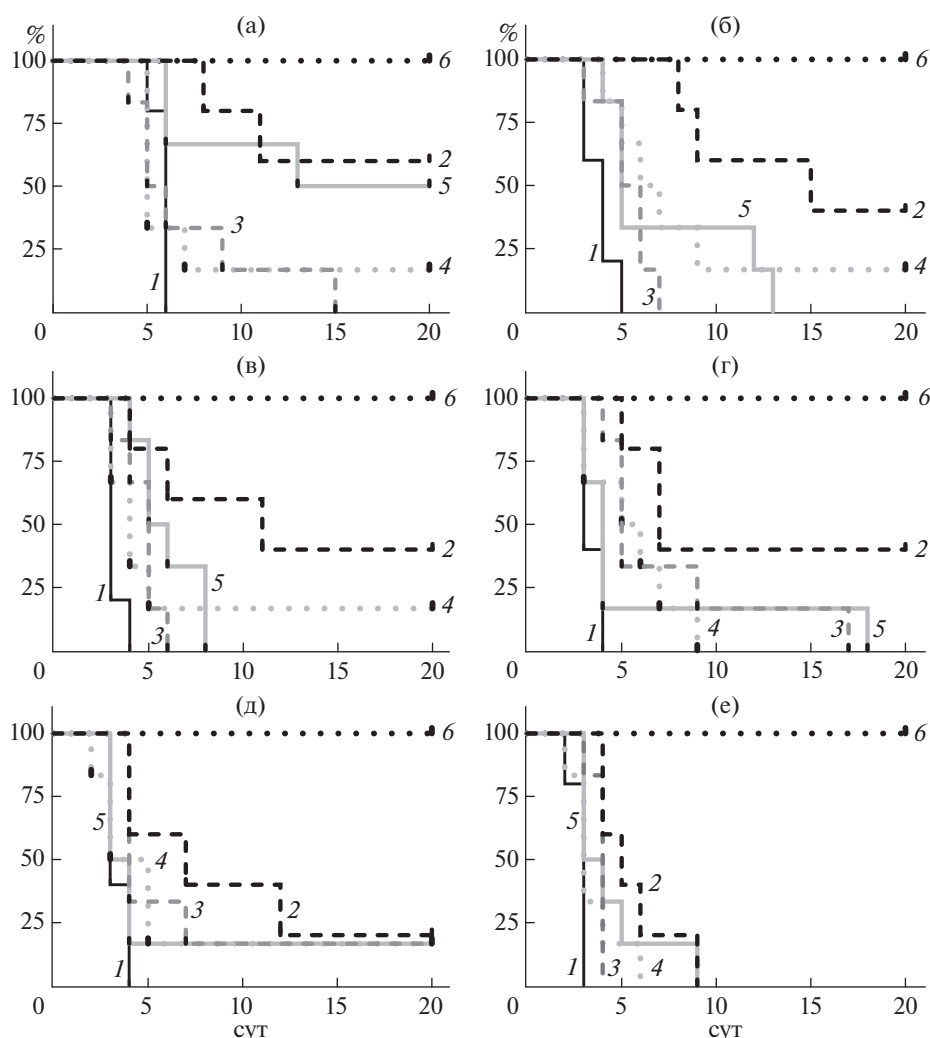


Рис. 3. Выживание мышей, иммунизированных очищенными белками изоформ LcrV(W113)/pETV A1728 (2), LcrV(W113)/pETV C582 (3), LcrV(W113)/pETV EV (4), LcrV(E113)/pETV I2359 (5) и LcrV(G113)/pETV I3455LcrV (6) из штаммов *E. coli* после заражения дозами 10 (а), 10^2 (б), 10^3 (в), 10^4 (г), 10^5 (д) и 10^6 (е) КОЕ; $Al(OH)_3$ (1 – контроль).

положении 113 полипептидной цепи показали самые низкие защитные свойства по сравнению с LcrV (G113)/I3455 (табл. 4).

Таким образом, немонотонное поведение изоформ LcrV, впервые обнаруженное при хроматографической очистке и обусловленное различия-

Таблица 4. Сравнительная оценка при помощи логарифмического рангового теста Мантла-Кокса*выживаемости зараженных мышей, иммунизированных различными изоформами LcrV, по сравнению с LcrV(G113)/pETV I3455

Заражающая доза вирулентного штамма <i>Y. pestis</i> 231, КОЕ	Изоформы LcrV			
	(W113)/pETV EV	(W113)/pETV A1728	(W113)/pETV C582	(E113)/pETV I2359
10	0.1343*	0.0013	0.0075	0.0786*
10^2	0.0494*	0.0014	0.0088	0.0012
10^3	0.0494*	0.0016	0.0086	0.0018
10^4	0.0511*	0.0012	0.0013	0.0014
10^5	0.0128	0.0075	0.0097	0.0089
10^6	0.0017	0.0023	0.0012	0.0011

* Кривые выживания совпадали, вычисленное значение p превышало величину 0.05.

ми первичных аминокислотных последовательностей белков природного классического белка штаммов подвидов *pestis* и *microti*, позволило обнаружить изоформу, проявляющую в качестве компонента субъединичных чумных вакцин очень высокую защищающую активность с высоким потенциалом [24].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00599).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Williamson E.D., Flick-Smith H.C., LeButt C., Rowland C.A., Jones S.M., Waters E.L., Gwyther R.J., Miller J., Packer P.J., Irving M. // *Infect. Immun.* 2005. V. 73. № 6. P. 3598–3608.
2. Cornelius C., Schneewind O., Anderson D., Quenee L. The Genus *Yersinia*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* / Eds. Perry R.D., Fetherston J.D. N. Y.: Springer, 2007. V. 603. P. 415–424.
3. Wang Z., Zhou L., Qi Z., Zhang Q., Dai R., Yang Y., Cui B., Wang H., Yang R., Wang X. // *Clin. Vaccine Immun.* 2010. V. 17. № 1. P. 199–201.
4. Pouliot K., Pan N., Wang S., Lu S., Lien E., Goguen J.D. // *Infect. Immun.* 2007. V. 75. № 7. P. 3571–3580.
5. Mattei P.J., Faudry E., Job V., Izore T., Attree I., Dessen A. // *FEBS J.* 2011. V. 278. № 3. P. 414–426.
6. Lawton W.D., Erdman R.L., Surgalla M.J. // *J. Immunol.* 1963. V. 91. № 2. P. 179–184.
7. Straley S.C., Brubaker R.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. № 2. P. 1224–1228.
8. Brubaker R.R., Sample A.K., Yu D.Z., Zahorchak R.J., Hu P.C., Fowler J.M. // *Microb. Pathog.* 1987. V. 2. № 1. P. 49–62.
9. Motin V.L., Nakajima R., Smirnov G.B., Brubaker R.R. // *Infect. Immun.* 1994. V. 62. № 10. P. 4192–35804201.
10. Leary S.E., Williamson E.D., Griffin K.F., Russell P., Eley S.M., Titball R.W. // *Infect. Immun.* 1995. V. 63. № 8. P. 2854–2858.
11. Motin V.L., Nedialkov Y.A., Brubaker R.R. // *Infect. Immun.* 1996. V. 64. № 10. P. 4313–4318.
12. Brubaker R.R. // *Infect. Immun.* 2003. V. 71. № 7. P. 3673–3681.
13. Li J., Li B., Li G., Ren J., Zhang J., Xu C., Yang X., Liu S., Fu L., Chen W. // *Protein Expr. Purif.* 2008. V. 57. № 2. P. 136–142.
14. Патент РФ. 2010. № 2439155 С1.
15. Патент Великобритании. 2003. № 2197988 С2.
16. Adair D.M., Worsham P.L., Hill K.K., Klevytska A.M., Jackson P.J., Friedlander A.M., Keim P. // *J. Clin. Microbiol.* 2000. V. 38. № 4. P. 1516–1519.
17. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2004. V. 17. № 2. P. 434–464.
18. Anisimov A.P., Dentovskaya S.V., Svetoch T.E., Panfertsev E.A. The Genus *Yersinia*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* / Eds. Perry R.D., Fetherston J.D. N. Y.: Springer, 2007. V. 603. P. 23–27.
19. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб.: Rus-LASA “НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными”, 2010. 48 с.
20. Ашмарин И.А., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Гос. изд-во. мед. лит., 1962. С. 85–104.
21. Machin D., Cheung Y., Palmar M. *Survival Analysis: A Practical Approach* London: John Wiley & Son, Ltd. 2nd edition, 2006. 278 p.
22. Anisimov A.P., Dentovskaya S.V., Panfertsev E.A., Svetoch T.E., Kopylov P. Kh., Segelke B.W., Zemla A., Telepnev M.V., Motin V.L. // *Infect. Genet. Evol.* 2010. V. 10. № 1. P. 137–145.
23. Williamson E.D., Eley S.M., Stagg A.J., Green M., Russell P., Titball R.W. // *Vaccine.* 1997. V. 15. № 10. P. 1079–1084.
24. Патент РФ. 2015. № 2671525.

Features of Chromatographic Purification and Protectivity of LcrV *Yersinia pestis* Isoforms

P. Kh. Kopylov^{a,*}, T. E. Svetoch^a, S. A. Ivanov^a, T. I. Kombarova^a, O. N. Perovskaya^a, G. M. Titareva^a, and A. P. Anisimov^a

^aState Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor, Obolensk, 142279 Russian
*e-mail: pkopylov@obolensk.org

Received July 19, 2018; revised November 16, 2018; accepted April 22, 2019

Electrophoretically homogeneous and highly purified preparations of various isoforms of *Yersinia pestis* immunodominant V antigen (LcrV) were isolated by chromatographic purification. Significant similarity of chromatographic profiles during the purification of the LcrV (W113) and LcrV (E113) isoforms (with tryptophan or glutamic acid at position 113) was noted in contrast to the glycine containing LcrV (G113) isoform, which significantly exceeded the first two isoforms in antigenic and protective activities. This isoform almost completely protected the group of animals immunized by it and had the greatest ability to induce the production of antibodies, the titers of which reached the value of 1 : 250000.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, plague vaccine, V antigen, LcrV, chromatographic purification, protectivity