

ОСОБЕННОСТИ АНТИГЕН-АНТИТЕЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ У РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА (ВПЧ) ПРИ ЯДЕРНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ

Р.К. Саляев¹, Н.И. Рекославская^{1,2}, А.С. Столбиков¹

¹ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

²ФГБУН Иркутский научный центр СО РАН, Иркутск

В настоящее время наблюдается широкое распространение различных папилломатозов: от сравнительно безвредных "бородавок на ножке", имеющих почти у каждого человека, до высокоонкогенных ВПЧ, вызывающих раковые опухоли. Выявлено около 200 типов ВПЧ, почти 40 из которых являются высокоонкогенными. Низкоонкогенные ВПЧ могут также вызывать весьма неприятные заболевания типа аногенитальных папилломатозов (скопления остроконечных кондилом) с достаточно серьезными последствиями.

При разработке четырёхкомпонентной пероральной вакцины против цервикального рака, создаваемой на базе растительных экспрессионных систем, мы обнаружили необычные антиген-антительные взаимодействия, заключающиеся в том, что антитела к высокоонкогенному типу вируса ВПЧ 16 способны взаимодействовать не только со "своими" антигенами ВПЧ16 L1, но и с некоторыми другими антигенами ВПЧ, вызывающими цервикальный рак. Оказалось, что антитела к ВПЧ16 L1 способны активно реагировать ещё и с антигенами ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1, также принадлежащими к семейству высокоонкогенных ВПЧ. Этот факт позволил предположить о более широком (не строго специфичном) перекрестном антиген - антительном взаимодействии между четырьмя типами высокоонкогенных ВПЧ.

Более глубокое изучение перекрестного взаимодействия специально поставленными экспериментами с использованием иммуноферментного анализа, а также методами вестерн-блот-гибридизации подтвердили наличие обнаруженного ранее перекрестного антиген-антительного взаимодействия между ВПЧ16, ВПЧ18, ВПЧ31 и ВПЧ45 типами онкогенных вирусов папилломы человека.

Имуноферментный анализ проводили (рис. 1), определяя содержание антигенных белков всех четырёх типов вирусов в экстрактах лиофилизированных плодов томата, предварительно генетически трансформированных методом *in fructo* суспензиями *A.tumefaciens* с генетическими конструкциями pVINHPV16 L1, pVINHPV18 L1, pVINHPV31 L1 и pVINHPV45 L1.

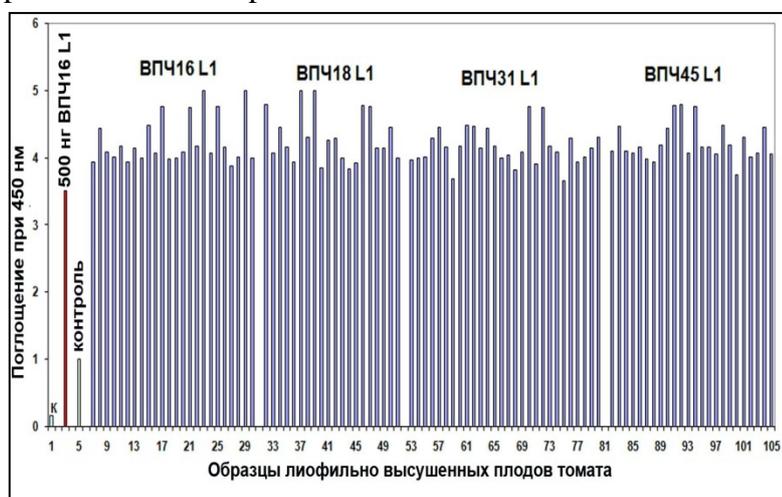


Рис. 1. ИФА содержания антигенных белков ВПЧ:

16 L1, 18 L1, 31 L1 и 45 L1 в экстрактах лиофильно высушенных плодов трансгенного томата. К – отрицательный контроль, 500 нгHPV16 L1 – положительный контроль стандарта, контроль – нетрансформированные плоды, 6–105 – экстракты образцы индивидуальных плодов трансгенного томата. Первичные антитела –

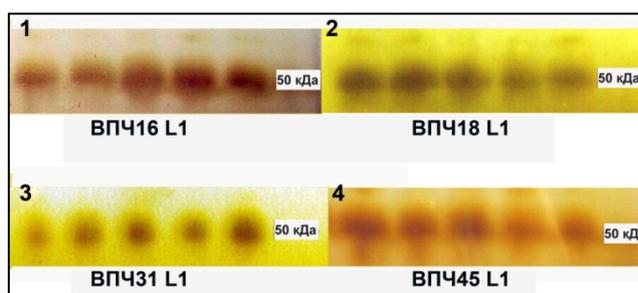
сыворотка крови мышей, вакцинированных ВПЧ16 L1. Вторичные антитела – конъюгат с пероксидазой, субстрат – ТМВ.

При анализах в качестве первичных антител использовали сыворотку крови мышей, перорально вакцинированных лиофилизированным вакцинным материалом плодов томата, трансгенных по ВПЧ16 L1. Вторичные антитела - конъюгат с пероксидазой хрена, субстрат – тетраметилбензидин (ТМВ). Результаты ИФА показали (рис. 1), что содержание антигенных белков ВПЧ16 L1, ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1 при использовании первичных антител к ВПЧ16 L1 было достаточно высоким, отличалось равномерностью и в пересчете на общий растворимый белок (ОРБ) составило 25–27 мкг/мг ОРБ.

Электрофоретические исследования подтвердили установленное иммуноферментным анализом активное взаимодействие антител к ВПЧ16 L1 с антигенами ВПЧ16 L1, ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1 (рис. 2). То есть двумя независимыми методами было подтверждено перекрестное взаимодействие антигенных белков L1 всех четырех типов онкогенных папилломавирусов с антителами против ВПЧ16 сыворотки крови мышей, предварительно перорально вакцинированных антигенным белком ВПЧ16 L1.

Рис. 2. ДСН электрофорез и вестерн-блот-гибридизация экстрактов плодов томата с ВПЧ четырех типов: 16 L1 (1), 18 L1 (2), 31 L1 (3) и 45 L1 (4).

Первичные антитела – сыворотка крови мышей, вакцинированных ВПЧ16 L1, вторичные антитела – конъюгат с пероксидазой, субстрат – ортофенилендиамин.



Поскольку обнаруженные результаты относились к перекрестному взаимодействию между антителами и антигенами четырех типов вируса, относящихся к одному семейству вирусов, вызывающих цервикальный рак, представляло интерес проверить, будет ли подобное взаимодействие наблюдаться между антителами и антигенами "неродственных" групп папилломавирусов, вызывающих другие заболевания. Для выяснения этого вопроса были взяты, как и ранее, антитела к вирусу ВПЧ16, вызывающего цервикальный рак, а антигены использовались от совершенно другого типа папилломавируса ВПЧ6, вызывающего аногенитальные папилломатозы (так называемые остроконечные кондиломы).

Был разработан дизайн генетической конструкции с целевым геном ВПЧ6 L1 (рис. 3), осуществлен её синтез, проведена генетическая трансформация плодов томата и получен вакцинный материал с антигенами ВПЧ6 L1. Антителами в этом случае служила сыворотка крови мышей к антигенам ВПЧ16 L1 (рис. 4).

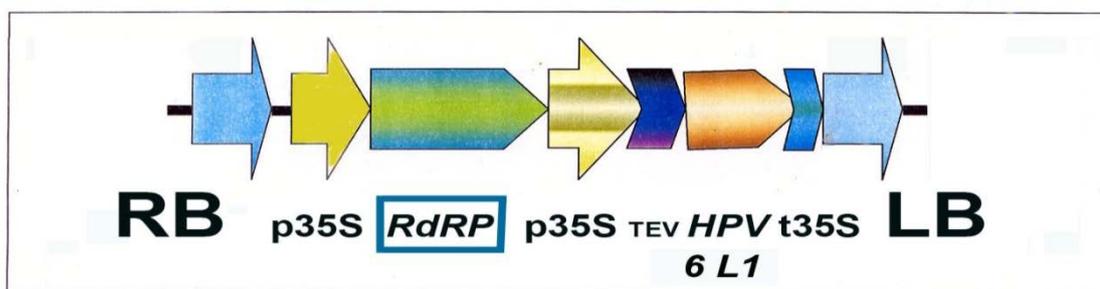


Рис. 3. Дизайн генетической конструкции ВПЧ6 L1.

RB и LB – левая и правая границы ТДНК *A.tumefaciens*, p35S – промотор гена РНКвируса CaMV (использованы некоплементарные последовательности для генов RdRP и ВПЧ6 L1), RdRP – ген, кодирующий репликазу ВТМ, TEV – 5' НТО лидера вируса гравировки листьев табака, HPV6 L1 – ген, кодирующий белок оболочки вируса ВПЧ6 L1 аногенитального типа, t35S – последовательность терминатора вируса CaMV.

Из рис. 4 видно, что в результате иммуноферментного анализа получен высокий выход антигенного белка ВПЧ6L1 при использовании в качестве первичных антител сыворотки крови мышей, предварительно вакцинированных перорально ВПЧ16 L1.

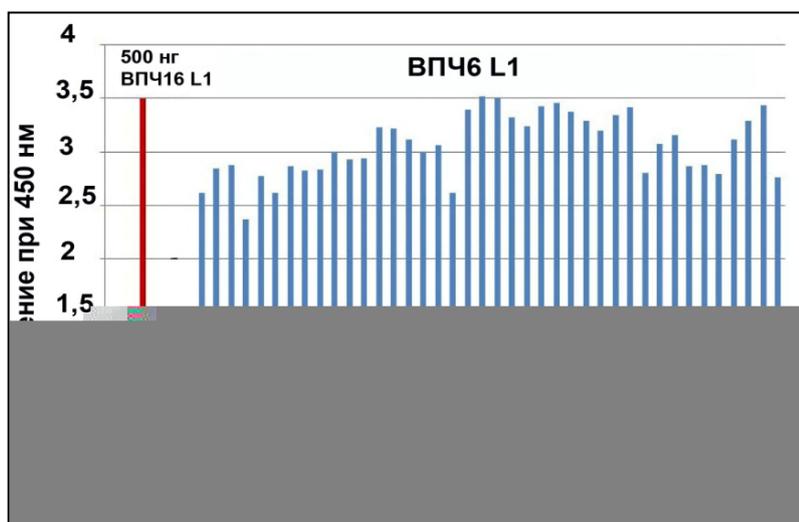


Рис. 4. ИФА содержания антигенного белка ВПЧ6 L1 в экстрактах высушенных плодов трансгенного томата.

1 – К – отрицательный контроль, 2 – 500 нг HPV16 L1 – положительный контроль стандарта, 3 – контроль – не трансформированные плоды, 4–42 – экстракты образцы индивидуальных плодов трансгенного томата. Первичные антитела – сыворотка крови мышей, вакцинированных ВПЧ16 L1. Вторичные антитела – конъюгат с пероксидазой, субстрат – ТМВ.

антитела – сыворотка крови мышей, вакцинированных ВПЧ16 L1. Вторичные антитела – конъюгат с пероксидазой, субстрат – ТМВ.

Для проверки изучали вестерн-блоттингом антиген-антительное взаимодействие между "неродственными" типами папилломавирусов ВПЧ16 и ВПЧ6 (рис. 5). В итоге были получены результаты, однозначно подтверждающие перекрестный тип антиген-антительного взаимодействия между антигенами ВПЧ6 L1 и антителами к ВПЧ16 L1.

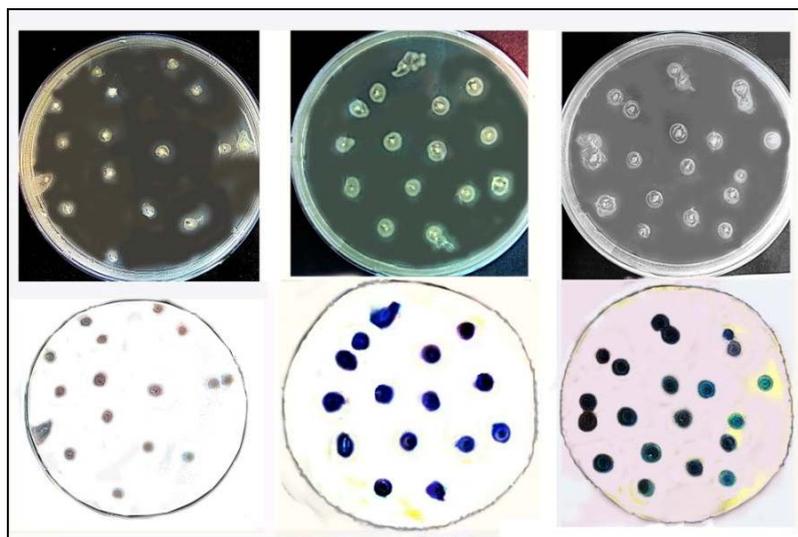


Рис. 5. Колонии *E coli* BL21 с pUC57 HPV6 L1 (вверху), выросшие на среде LB с 50 мг/л ампициллина и вестерн-блот-гибридизации с антителами (внизу):

Слева – стандартные антитела к HPV16 L1 фирмы Santa Cruz Biotechnology (США), посередине – антитела сыворотки крови мышей, перорально вакцинированных плодами трансгенного томата

с HPV16 L1, справа - маркерные стандартные антитела к фрагменту теломеразы *smc-tag*, включенному в конструкцию. Вторичные антитела – конъюгат с щелочной фосфатазой, субстрат - 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат и нитротетразолий синий.

Таким образом, в настоящей работе было показано, что антитела против антигенного белка ВПЧ16 L1 могут перекрестно узнавать антигенные белки ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1. Кроме того, получены новые данные о том, что такое перекрестное взаимодействие между антигенами и антителами может возникать и между отдалёнными семействами вирусов, такими как ВПЧ16 (цервикальный рак) и ВПЧ6 (аногенитальные папилломатозы).