

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД ДЛЯ ДНК-ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ НЕЙРОБЛАСТОМЫ

Стёганцева М. В., Шинкевич В. А., Мелешко А. Н.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», п. Боровляны, Республика Беларусь

Реферат. Использование генетических конструкций для ДНК-вакцинации онкологических заболеваний становится все более популярным. Это связано с мобильностью и пластичностью системы нуклеиновых кислот. Дизайн конструкции всецело зависит от целей исследования и может включать множество различных структурных и функциональных элементов. Тем не менее при сборке вакцины необходимо учитывать ряд регуляторных компонентов, без которых конструкция не будет обладать терапевтическими свойствами. Об этом и пойдет речь в данной статье на примере сборки ДНК-вакцин против нейробластомы.

Ключевые слова: иммунотерапия, ДНК-вакцина, генетические конструкции, нейробластома, MAGE.

Введение. На сегодняшний день ДНК-вакцинация является одним из перспективных направлений иммунотерапии рака. Показания для ДНК-вакцинации — достижение длительной клинической ремиссии (около полугода) или очень низкая скорость прогрессии, с высоким риском развития рецидива (меланома, нейробластома и др.) [1]. Это крупный блок терапевтических манипуляций, основанный на активации собственной иммунной системы человека (вакцинация) или задействование ее компонентов (таргетные антитела, цитокинотерапия) для борьбы с опухолью [2].

ДНК-вакцина представляет собой генетическую конструкцию, которая состоит из вектора для экспрессии и закодированного антигена (или нескольких), против которого планируется индуцировать иммунный ответ. Также она может содержать дополнительные иммуностимуляторные молекулы, которые

направлены на активацию не задействованных звеньев иммунитета. С точки зрения технологии производства ДНК-вакцины имеют ряд преимуществ перед другими видами вакцин: низкая токсичность, простота и дешевизна изготовления [3]. Показано, что введение «голой» ДНК вакцины способно приводить к клеточному и гуморальному иммунному ответу на антигены, клонированные в плазмидном векторе [4, 5].

В качестве антигена для создания ДНК-вакцины могут быть использованы любые специфические молекулы. Как известно, опухолевые клетки имеют определенный спектр молекулярных характеристик, отличающих их от нормальных клеток. Для иммунной системы данные молекулярные мишени являются антигенами, на которые может вырабатываться иммунный ответ. Например, мутантные белки, химерные транскрипты или молчащие гены, активированные в результате клональной эволюции опухоли представляют группу опухоль-специфических антигенов. Они могут быть специфическими как для конкретной опухоли (NPM1-ALK при анапластической крупноклеточной лимфоме), так и для группы опухолей с общими молекулярными паттернами (CEA, MAGE, BAGE при солидных опухолях различной этиологии). Также антигенные детерминанты опухоли могут быть молекулами, которые в норме экспрессируются здоровыми клетками организма, однако в результате патогенетических изменений их экспрессия многократно увеличена в клетках опухоли. Это позволяет дифференцировать их от нормальных клеток. Однако к антигенам такого рода физиологический иммунный ответ минимален в связи с наличием толерантности к аутоантигенам [6].

В рамках данного исследования мы разработали и собрали ДНК-вакцины против нейробластомы (далее — НБ). Выбор данного заболевания связан с тем, что НБ — вторая по частоте встречаемости после острых лейкозов детская опухоль, а также самая распространенная среди солидных опухолей. Большинство детей на момент диагноза имеют обширную метастазирующую опухоль и соответственно неблагоприятный прогноз. Хирургическое лечение нейробластомы ограничено, используется лучевая и химиотерапия. Однако, не смотря на использование новых различных схем лечения, нейробластомы часто рецидивируют, а $\frac{3}{4}$ стадия вовсе не излечимы [7], поэтому разработка новых иммунотерапевтических подходов крайне актуальна.

Цель работы — сборка нескольких вариантов генетических конструкций для ДНК-вакцинации и доказательство их экспрессионную активность.

Материалы и методы. Выделение РНК, синтез кДНК

В качестве исходного материала для мышинных антигенов были использованы надпочечники мыши линии BALB/c, собранные в стерильных условиях. Замороженные органы смешивали с 50 мкл RLT буфера (Qiagen) для предотвращения преждевременной деградации РНК в образце и растирали в ступке с жидким азотом до гомогенного состояния. Для амплификации аналогичных человеческих антигенов использовали биоптаты опухоли нейробластомы. К клеточной суспензии добавляли 1 мл TriReagent. РНК выделяли хлороформной преципитацией. В синтез кДНК вносили 1 мкг РНК в конечном объеме 10 мкл. Реакционная смесь включала: 5xFirstBuffer (4 мкл), dNTP 2,5 mM (1 мкл), RandomHexamer (1 мкл), RNaseinhibitors (0,5 мкл), SuperScriptIII (1 мкл).

ПЦР, электрофорез в агарозном геле

Праймеры для амплификации подбирали с помощью программы Primer3Plus. Амплификацию проводили методом гнездовой ПЦР. ПЦР проводилась в объеме 25 мкл и включала 2,5 мкл 10xBuffer, 0,2 мкл 25 mM dNTP, 1,5 мкл 25 mM MgCl₂ (PromegaCorporation, USA), 0,15 мкл SUPfxPol, по 5 мкл праймеров F/R 2,5 pMol, 9,65 мкл H₂O.

ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени проводилась в объеме 12,5 мкл в двух повторах. Реакционная смесь включала TaqMan MasterMix, сток праймеров и воду. Амплификация проводилась на базе CFX 96 (BioRad, USA) при поддержке программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager Software. В качестве внутрениего контроля использовали ген HPRT1.

Рестрикция

Для рестрикции ПЦР фрагментов, скрининга и проведения клонирования использовали следующие рестриктазы: BamHI, EcoRI, KpnI, NotI, HindIII (FastDigest, Thermo Scientific) и EcoRV (Thermo Scientific).

Вектора, лигирование, трансформация

В качестве векторов использовали плазмиды TZ57R/T и pING. Трансформацию проводили кальций-хлоридным методом. Выделение плазмидной ДНК проводили набором ChargeSwitch – ProPlasmidminikit (Invitrogen, USA) в соответствии с инструкцией производителя.

Секвенирование

Реакция проводилась в объеме 10 мкл и состояла из 1 мкл Big Dye terminator v3.1 Buffer, 1 мкл BigDye, 4 мкл PrimerF/R, 3 мкл H₂O, 1 мкл ДНК. Протокол реакции: 96 °C — 1 мин; 96 °C — 10 с, 50 °C — 5 с, 60 °C — 4 мин — 25 циклов.

Результаты и их обсуждение. Для нейробластомы существует ряд установленных антигенов, которые могут быть использованы для создания терапевтической вакцины против опухоли. В качестве таких антигенов для создания конструкций нами было выбрано 4 антигена. Тирозин гидроксилаза (далее — TH), т. к. все случаи нейробластомы характеризуются высокой и стабильной экспрессией TH независимо от стадии и N-Мус амплификации [8]. При этом экспрессия TH отсутствует во всех нормальных тканях и органах человека, кроме иммунопревелигированных органов. Таким образом, TH оказывается практически идеальной мишенью для направленной иммунизации против нейробластомы.

Среди антигенов с высокой экспрессией при нейробластоме можно выделить ингибитор апоптоза Survivin (BIRC5). Данный ген необходим для поддержания жизнеспособности опухолевых клеток и ингибирования антисмысловых олигонуклеотидов, малых интерферирующих РНК и др. молекул, которые приводят к гибели опухолевых клеток [9]. Оверэкспрессия Survivin наблюдается в 90 % случаев заболевания нейробластомой и ассоциирована с возрастом, стадией, неблагоприятной гистологией, N-Мус амплификацией и может служить предиктором развития рецидива [5]. В силу аутологичности данных антигеновони могут индуцировать недостаточный иммунный ответ, поэтому был использован ген капсида вируса картофеля X (PVXCP) в качестве иммуностимулятора.

Кроме того, для нейробластомы показана экспрессия герминальных антигенов (*от англ.* Cancer testis antigens) из семейства MAGE (*от англ.* Melanoma antigen), GAGE и др. Для нашего исследования мы выбрали следующие антигены: MAGE-A1, MAGE-A3. Данные антигены экспрессируются только в сперматогониях и не экспрессируются в нормальных клетках и тканях [10].

Создание генетических конструкций

Ключевым моментом в сборке генетической конструкции является продуманный дизайн. Большое значение имеет расположение и ориентация элементов в векторе для экспрессии, а также включение в схему сборки регуляторных элементов, необходимых для эффективной транскрипции и трансляции. В нашем случае мы добавляли консенсусную последовательность Козак перед стартовым кодоном как фактор инициации трансляции. Для создания цельного слитого белка из антигена и иммуно-стимуляторного гена PVXCP из последовательности антигена искусственно убирали стоп-кодон. Соединение структурных элементов конструкции между собой и с экспрессионным вектором осуществляли путем внесения уникальных сайтов рестрикции (рисунок 1).

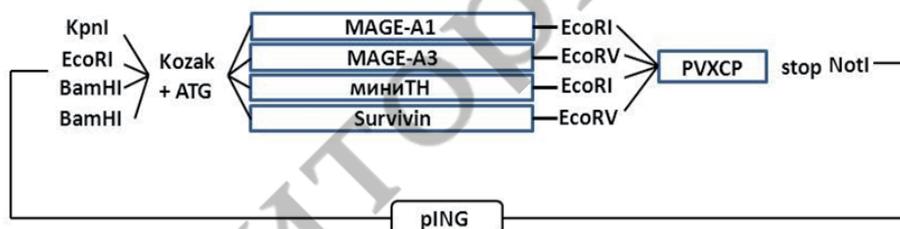


Рисунок 1. — Дизайн генетических конструкций

Первым шагом было получение вектора pING с клонированным геном PVXCP. Для этого фрагмент PVXCP амплифицировали из кДНК капсида вируса-X картофеля. На втором шаге амплификации вносили уникальные сайты рестрикции для последующего субклонирования антигенов: EcoRI/EcoRV – PVXCP – NotI. Затем ПЦР продукты очищали коммерческим набором и лигировали в вектор pTZ57R/T по T/A-концам. Данный промежуточный вектор необходим для дополнительной селекции клонов посредством наличия LacZ-системы, которая позволяет дифференцировать плазмиду со вставкой и без (синие колонии — без вставки, белые — со вставкой). Плазмидур TZ57R-PVXCP трансформировали в клетки *E. coli*, культивировали 18 ч, после чего проводили ПЦР скрининг с универсальными праймерами UC19 F/R, которые фланкируют место вставки. Положительные колонии секвенировали по Сэнгеру и при отсутствии нуклеотидных замен и наличии всех встроенных элементов из отобранных клонов выделяли плазмиду. Затем фрагмент PVXCP вырезали из pTZ57R/Ти лигировали с порезанным вектором pING, ранее обработанным соответствующими рестриктазами. Полученной конструкцией трансформировали клетки *E. coli*. По результатам ПЦР скрининга колоний были отобраны образцы для секвенирования (рисунок 2 А, В). Генетические конструкции были проверены на соответствие референсным последовательностям, правильность сборки и расположению функциональных элементов.

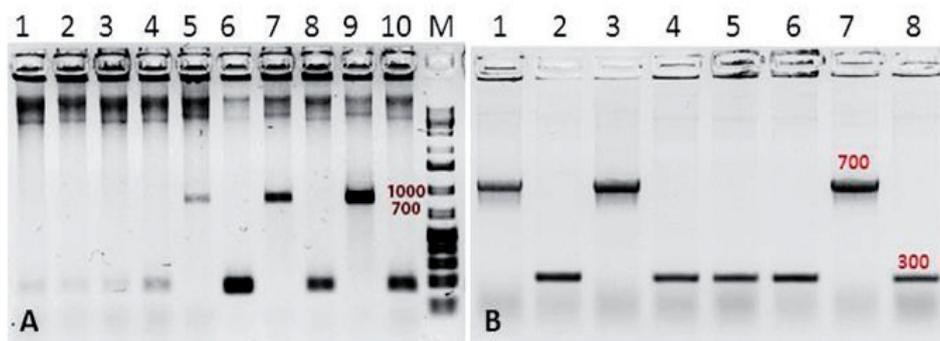


Рисунок 2. — Электрофорез скрининга трансформированных колоний *E. coli*, pING — PVXCP (EcoRV-NotI) (A), pING — PVXCP (EcoRI-NotI) (B): 1–10 — колонии, М — маркер молекулярного веса

Следующим этапом было клонирование нейробластома-ассоциированных антигенов в полученную плазмиду pING-PVXCP. Для этого каждый из 4 антигенов амплифицировали из кДНК в два шага. В 1-м шаге проводили амплификацию участка, кодирующего целевой транскрипт с захватом около десятка нуклеотидов по краям от старт- и стоп-кодона, на 2-м шаге при помощи праймеров вносили в последовательность сайты рестрикции и необходимые регуляторные элементы. Первый этап клонирования проводили с использованием вектора pTZ57R/T. Лигирование вектора pTZ57R/T и антигенов проходило по T/A концам. В связи с этим после второго шага ПЦР было добавлено 10–15 циклов с Taq-полимеразой, которая добавляет поли А-концы по сторонам фрагментов. Полученные конструкции трансформировали в клетки *E. coli* кальций-холодовым методом. Скрининг клонов проводили методом ПЦР амплификации с праймерами UC19 F/R (рисунок 3).

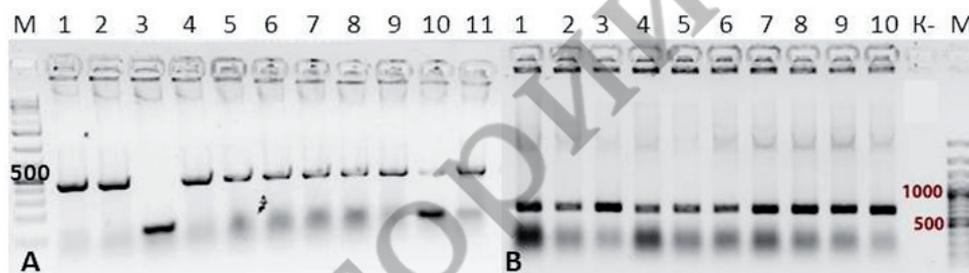


Рисунок 3. — Электрофорез скрининга трансформированных колоний *E. coli*, pTZ57R/T-TH (A), pTZ57R/T-Survivin (B): 1–10 — колонии, «К» — отрицательный контроль, М — маркер молекулярного веса

Положительные по результатам скрининга клоны pTZ57R-Аг секвенировали и при соответствии всем заявленным требованиям целевые колонии культивировали до достижения log-фазы, а затем выделяли плазмидную ДНК. Из полученных плазмид рестриктазами вырезали фрагменты антигенов TH, Survivin, MAGE-A1 и MAGE-A3, каждый из которых лигировали с соответствующим вектором для экспрессии pING-PVXCP. Полученной конструкцией трансформировали клетки *E. coli*. Скрининг колоний проводили методом ПЦР с праймерами к флангам плазмиды (рисунок 4).

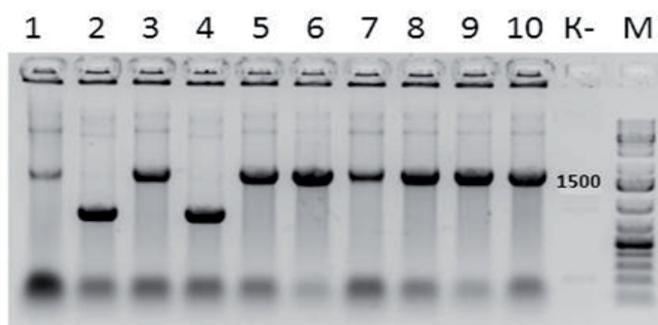


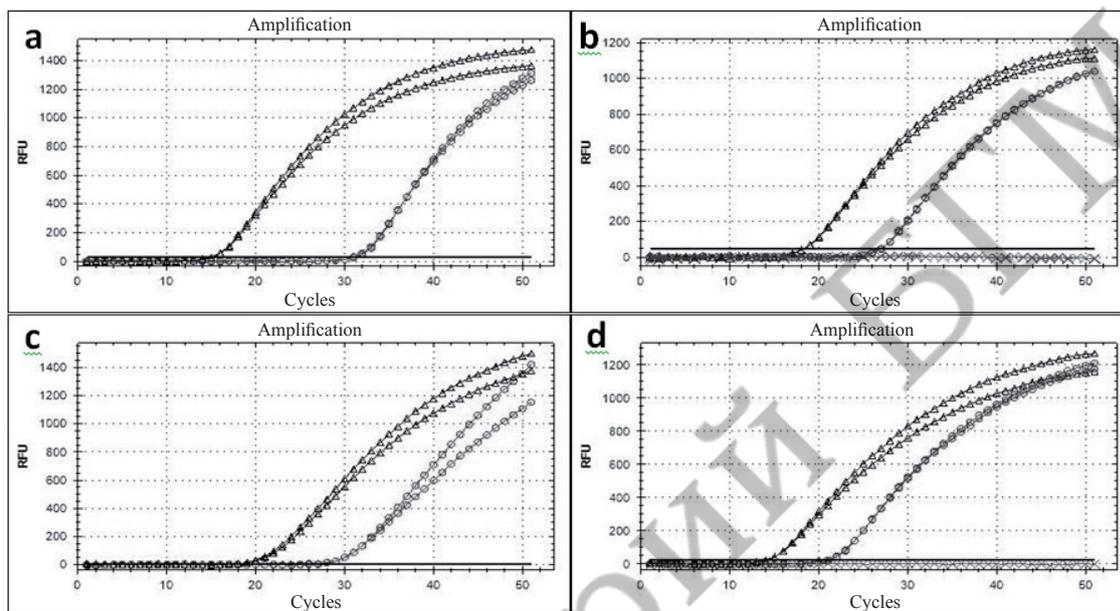
Рисунок 4. — Электрофорез скрининга трансформированных колоний *E. coli*, pING-MAGE1-PVXCP: 1–10 — колонии, «К» — отрицательный контроль, М — маркер молекулярного веса

Клоны бактерий со вставкой нужной длины использовались для выделения плазмиды pING-Ag-PVXCP. Правильность сборки конструкции плазмиды проверялась методом ДНК секвенирования. Готовые конструкции представляли собой плазмидные препараты ДНК-вакцины.

Экспрессия антигенов препарата вакцины

Для оценки экспрессии собранных конструкций проводили трансфекцию клеточной линии НЕК293Т и инкубировали клетки в течение 2-х сут. Затем клетки снимали и выделяли РНК с дополнительной обработкой ДНКазой с целью сократить вклад примесей плазмиды.

Синтез кДНК для каждого образца проводили в двух вариантах с обратной транскриптазой (RT+) и без нее (RT-). Такая вариация синтеза была выбрана для того, чтобы удостовериться в разнице между двумя результатами экспрессии. Должны быть расхождения в уровне экспрессии среди целевых трансгенов и оставшейся примесью плазмиды.



a — mMAGE1-PVXCP; b — MAGE-A3-PVXCP; c — miniTN-PVXCP; d — Survivin;
 Δ — «RT+»; O — «RT-»

Рисунок 5. — Экспрессия антигенов в контроле и трансфицированной клеточной линии

По результатам ПЦР в реальном времени экспрессия искоемых антигенов не наблюдалась в контрольной клеточной линии НЕК293Т, которая не была трансфицирована плазмидной ДНК. Специфическая экспрессия образцов без обратной транскриптазы (RT-) проявлялась от 25 до 30-го цикла, что свидетельствовало о наличии примеси плазмиды. Экспрессия трансгена (RT+) превышает соответствующую экспрессию в группе (RT-) на 15–20 циклов, что соответствует повышению ее уровня от 3 до 4 порядков (рисунок 5).

Экспрессия трансгена превышает экспрессию соответствующих генов в норме-контроле от 10 до 20 циклов, что соответствует повышению уровня экспрессии от 3 до 6 порядков. Это подтверждает работоспособность встраиваемых конструкций, а соответственно качество и правильность сборки. Подобным образом может быть оценена экспрессия трансгена и в условиях *in vivo*.

Закключение. Собранные конструкции с четырьмя наиболее перспективными нейробластомными антигенами прошли проверку аутентичности нуклеотидной последовательности, а также проверена их способность экспрессироваться в условиях *in vitro*. Данные ДНК-вакцины могут быть использованы для проведения доклинических испытаний на животных.

Литература

1. DNA vaccine for cancer immunotherapy / B. Yang [et al.] // Human Vaccines & Immunotherapeutics. — 2014. — Vol. 10, № 11. — P. 3153–3164.
2. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer / J. A. Berzofsky [et al.] // J. Clin. Invest. — 2014. — Vol. 113, № 11. — P. 1515–1525.
3. Стёганцева, М. В. Противораковая ДНК-вакцинация: принцип и возможности метода / М. В. Стёганцева, А. Н. Мелешко // Мед. иммунология. — 2017. — Т. 19, № 2. — С. 145–156.

4. A rationally designed tyrosine hydroxylase DNA vaccine induces specific antineuroblastoma immunity / N. Huebener [et al.] // *Mol. Cancer Ther.* — 2008. — Vol. 7, № 7. — P. 2241–2251.
5. Survivinminigene DNA vaccination is effective against neuroblastoma / S. Fest [et al.] // *Int. J. Cancer.* — 2009. — Vol. 125. — P. 104–114.
6. Vigneron, N. Human tumor antigens and cancer immunotherapy / N. Vigneron // *BioMed. Res. Int.* — 2015. — Vol. 2015. — P. 1–17.
7. Cheung, N. K. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy / N. K. Cheung, M. A. Dyer // *Nature Rev.* — 2013. — Vol. 13. — P. 397–407.
8. Robles-Frías, M.J. Neuroblastoma initially presenting as a primary bone tumor: diagnostic value of molecular assays for tyrosine hydroxylase / M. J. Robles-Frías // *Med. Pediatr. Oncol.* — 2003. — Vol. 40, № 3. — P. 167–170.
9. A novel anti-apoptosis gene, Survivin, expressed in cancer and lymphoma / G. Ambrosini [et al.] // *Nat. Med.* — 1997. — Vol. 3, № 8. — P. 17–21.
10. The biology of cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential / E. Fratta [et al.] // *Mol. Oncol.* — 2011. — Vol. 5. — P. 164–182.

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT PLASMIDES FOR DNA VACCINATION AGAINST NEUROBLASTOMA

Stegantseva M. V., Shinkevich V. A., Meleshko A. N.

*State Institution “Republican Scientific and Practical Center of Oncology, Hematology and Immunology”,
Borovlyani, Republic of Belarus*

The use of genetic constructs for DNA vaccination of oncological diseases is becoming increasingly popular. This is due to the mobility and plasticity of the nucleic acid system. The design of a construction depends entirely on the objectives of the study and can include many different structural and functional elements. Nevertheless, when assembling a vaccine, a number of regulatory components need to be considered, without which the construct will not have therapeutic properties. This will be discussed in this article on the example of the assembly of DNA vaccines against neuroblastoma.

Keywords: immunotherapy, DNA-vaccine, genetic constructions, neuroblastoma, MAGE.