**Научно-образовательный курс**

**"Технология генетической модификации минорного капсидного белка IX аденовируса человека серотипа 5 для присоединения к его С-концу различных пептидных лигандов"**

Авторы: Гарас М.Н.

Грибова И.Ю.

к.б.н. Рогожин В.Н.

к.б.н. Тутыхина И.Л.

**Краткое описание курса**

В курсе рассматривается плазмидная технология модификации С-конца минорного капсидного белка IX аденовируса человека серотипа 5 (Ад5) для присоединения к нему последовательностей различных белковых лигандов. А также примеры работ, в которых были получены различные векторные системы на основе генома Ад5 с модифицированным геном белка IX.

**Рекомбинантные аденовирусы человека как эффективные и безопасные генетические векторы.**

Векторные системы на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа (Ад5) являются одними из наиболее перспективных средств доставки генетической информации в клетки млекопитающих. Они широко используются для разработки различных рекомбинантных вакцин и генотерапевтических средств. Безопасность векторов на основе Ад5 подтверждена целым рядом проведенных клинических испытаний различных вакцинных и терапевтических препаратов на их основе. С 2008 года в одной четверти клинических испытаний по генной терапии исследуются векторы на основе Ад. Кроме того, в Китае уже разрешены два препарата на основе Ад5. Такая популярность векторов на основе Ад5 объясняется целым рядом преимуществ: их способность трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки; ДНК аденовируса не интегрируется в геном клетки-хозяина и остается в экстрахромосомной форме; аденовирусы могут быть получены в титре более 1010 БОЕ/мл, что может позволить использовать их в качестве живых рекомбинантных вакцин; обеспечивают высокий уровень экспрессии целевого гена в клетке-мишени.

**Модификация капсидного белка pIX Ад5: цели и задачи.**

Для решения различных задач зачастую возникает необходимость в изменении биологических свойств аденовируса (изменение тропизма, способность взаимодействовать с определенными химическими субстратами), для чего его капсид подвергают генетической модификации. Модификацию капсида аденовируса человека 5 серотипа проводят по следующим капсидным белкам: фибер, гексон, pIIIа, pIX.

В последнее время в качестве перспективной мишени для встраивания белковых лигандов в капсид аденовируса рассматривается минорный капсидный белок IX (pIX). Возможность использования pIX в качестве сайта для включения пептидных лигандов связано с тем, что С-конец pIX ориентирован на внешнюю поверхность капсида.

Генетические модификации С-конца pIX проводят в следующих целях:

- изменение тропизма аденовируса для обеспечения специфической и/или селективной доставки генов в определенные типы клеток,

- визуализация аденовирионов *in vitro* и *in vivo* за счет экспонирования в составе pIX различных маркерных белков и пептидов,

- использование аденовирусной частицы в качестве наноносителя антигенов микроорганизмов,

- для аффинной очистки аденовирусных частиц.

**Аденовирусные векторы с модифицированным белком pIX**

Возможность изменения тропизма аденовируса путем добавления олигопептида, состоящего из 8 лизинов, к С-концу pIX была впервые продемонстрирована Дмитриевым и др. Они показали, что полученный ими вирус более эффективно трансдуцирует *in vitro* клетки, дефицитные по CAR-рецептору (первичному рецептору для связывания Ад), но имеющие на поверхности гепарансульфат (для связывания с октализиновым олигопептидом). Используя подобную стратегию, Vellinga et al. ввели в структуру pIX трипептид: аргинил-глицил-аспарагиновую кислоту (RGD) для увеличения связывания с клетками, экспрессирующими αvβ-интегрины, и показали, что RGD-опосредованное прикрепление вируса к клеткам может быть усилено посредством внедрения α-спирального спейсера между pIX и целевым лигандом. Этот спейсер, длиной до 7,5 нм, служит для выведения лиганда на поверхность вириона, что позволяет вирусу более эффективно взаимодействовать с рецепторами клетки. Также для изменения вирусного тропизма были созданы аденовирусы, которые несли на С-конце pIX одноцепочечные и однодоменные антитела, одноцепочечный Т-клеточный рецептор (TCR) против меланома-ассоциированного антигена в комплексе с HLA I для эффективной трансдукции клеток меланомы человека. Таким образом, pIX представляет собой эффективную мишень для презентации целевых лигандов для увеличения эффективности трансдукции аденовирусами различных типов клеток.

Полипептид IX также был использован для экспонирования маркерных лигандов для возможности детектирования вирусных частиц в условиях *in vitro* и *in vivo*. Так например, был получен Ад5-вектор, несущий на С-конце pIX молекулу зеленого флуоресцентного белка (EGFP), длиной 240 а.о. При этом наличие pIX-EGFP в структуре очищенных Ад вирионов не существенно снижало их жизнеспособность и стабильность капсида и позволило детектировать локализацию Ад как *in vitro*, так и *in vivo* с помощью флуоресцентной микроскопии. Подобным образом были созданы pIX-модифицированные аденовектора, экспонирующие в составе капсида другие маркерные белки: люциферазу, тимидинкиназу вируса простого герпеса (HSV-1), металлотионеин человека. Ugai H. и соавт. сконструировали флуоресцентно-меченный аденовирус, содержащий на С-конце pIX мономерный красный флуоресцирующий белок 1 (mRFP1), а в составе корового белка V – зеленый флуоресцирующий белок (EGFP). Данная «двойная» модификация позволила наблюдать за процессами аденовирусной инфекции в режиме реального времени, включая выявление инфицированных клеток и мониторинг распространения вирусных белков.

Некоторые авторы демонстрируют возможность получения аденовекторов, содержащих в С-концевом регионе pIX молекул антигенов микроорганизмов и некоторых иммуномодулирующих белков с целью их использования для вакцинопрофилактики. На настоящий момент получен аденовирус, экспонирующий в составе pIX оболочечный гликопротеин gp70 вируса мышиной лейкемии Френда , который после вакцинации мышей индуцировал образование высоко титра вируснейтрализующих антител и сильного CD4+ Т-клеточного ответа. Другой группой исследователей были получены аденовирусные вектора, презентирующие на поверхности капсида в составе pIX V-антиген и F1-капсульный антиген *Yersinia pestis*. Вакцинация мышей такими векторами отдельно в обоих случаях приводила к формированию протективного иммунного ответа против адаптированного к организму мышей штамму *Y. pestis*.

Универсальным подходом в модификации pIX аденовируса является, так называемая, «генетико-химическая» модификация pIX, которая может быть использована для достижения всех перечисленных выше целей. Данный подход заключается в генетическом включении в С-конец pIX определенной белок-связывающей последовательности, и последующем присоединении целевого лиганда через взаимодействие с этой белок-связывающей последовательностью. Преимуществом этого подхода является то, что один и тот же вирус может быть сопряжен с множеством различных лигандов, в том числе пептидов, антител, углеводов и т.д., и, следовательно, представляет собой очень гибкую в практическом смысле модель.

Например, для получения аденовекторов, способных связывать молекулы биотина, был сконструирован аденовирус, несущий на С-конце pIX биотин-связывающий пептид (BAP). После химического присоединения биотина к капсиду Ад через взаимодействие с BAP, такие биотинилированные аденовирусы могут быть очищены с использованием колонки с мономерным авидином, элюируя Ад избытком биотина, и впоследствии конъюгируя его с авидин-меченым лигандом. Присоединение трансферрина к капсиду Ад через биотинилированный pIX приводило к значительному повышению эффективности проникновения Ад в клетки линии C2C12, которые относительно устойчивы к инфекции аденовирусного вектора. Проникновение биотинилированного Ад с трансферрином в клетки линии C2C12 происходило за счет взаимодействия трансферрина с его рецептором - CD71 на поверхности этих клеток. Любопытным выводом из этих исследований является то, что природа целевого лиганда может иметь существенное влияние на эффективность переориентирования Ад5 с использованием pIX. Так например, если использование трансферрина как целевого лиганда повышало эффективность CD71-опосредованной вирусной инфекции клеток линии C2C12, то использование анти-CD71-антител для модификации pIX Ад, не давало такого результата.

В целом, эти исследования показали, что pIX является актуальной мишенью для модификации капсида аденовируса вследствие высокой структурной совместимости с внедряемыми на его С-конец лигандами и широким спектром направлений использования pIX-модифицированных аденовекторов: в визуализации, таргетинге, очистке аденовируса и др.

**Особенности строения, экспрессии и локализации белка IX**

Минорный капсидный белок IX является гексон-ассоциированным, функция которого заключается в стабилизации капсида Ад. В отсутствии pIX, аденовирионы термолабильны и не способны формировать классические структуры, называемые «группой девяти гексонов», или GON. pIX выполняет также функцию транскрипционного активатора. С-концевой домен pIX, содержащий лейциновый повтор, важен для транскрипционной активности многих белков Ад. В экспериментах по транзиентной трансфекции pIX было показано, что pIX повышает уровень экспрессии ранней Е1А- и Е4-областей генома и главного позднего промотора Ад. pIX не обладает прямой ДНК-связывающей активностью, но способен гомомультимеризоваться через взаимодействие между лейциновыми повторами и потенциально взаимодействовать с другими ДНК-связывающими или транскрипционными белками.

Ген pIX присутствует в геномах всех аденовирусов рода Mastadenovirus, локализуясь на левом конце генома, непосредственно после Е1-области (рис. 1). Аденовирусы других родов белок IX не кодируют.



**Рис. 1. Упрощенная транскрипционная карта генома Ад5. Подробно проиллюстрирован левый конец генома Ад5.**

В отличие от других структурных белков, pIX экспрессируется с собственного промотора. Промотор pIX активируется в промежутке после инициации экспрессии ранних генов, но до начала экспрессии поздних генов, однако уровень экспрессии pIX резко возрастет после репликации ДНК. Кодирующая последовательность pIX находится между ОРС E1B-области и сигналом полиаденилирования Е1В (рис. 1). Активная транскрипция E1B через pIX-промотор ингибирует экспрессию гена pIX на ранних этапах инфекции. Однако, после репликации ДНК транскрипция E1B-области уменьшается, а транскрипция pIX достигает максимального уровня, что обеспечивает синтез достаточного количества этого белка для формирования капсида. В геноме Ad5, ОРС pIX составляет 420 п.н., что приводит к образованию белка размером 140 а.о.

Вскоре после экспрессии pIX и поздних генов, pIX ассоциируется с "группой девяти гексонов" (GON), которая является основной структурой, составляющей грани икосаэдрического аденовирусного капсида. В GON четыре тримера pIX расположены на наружной поверхности между гексонами. На вирион приходится 240 молекул pIX.

Последовательность pIX различных серотипов аденовирусов человека и животных содержит три области: консервативный N-концевой домен, центральный аланин-богатый домен (встречается только в pIX аденовирусов человека), и консервативный C-концевой домен. C-концевой домен содержит лейциновые повторы, играющие роль в тримеризации pIX. В то же время, тримеризация pIX не является необходимым условием для включения этого белка в Ад капсид.

В зрелых вирионах pIX формирует связующую сеть из 4 тримеров в середине каждой грани. N-концевые домены трех мономеров pIX образуют структуру трискелионов, каждый из которых скрепляет три соседних гексона. С-концевые домены располагаются возле края грани ближе к внешней стороне капсида и образуют в этом положении тетрамер.

В связи с тем, что С-конец pIX ориентирован на внешнюю поверхность капсида, данный белок может быть использован для генетического привязывания к его С-концевому региону некоторых белковых последовательностей.

**Стратегия генетической модификации белка IX**

Стратегия модификации pIX заключается в присоединении на генетическом уровне к его С-концу нуклеотидной последовательности целевого белкового лиганда. Однако, так как С-конец pIX погружен между соседними гексонами, непосредственное присоединение к C-концу этого белка соответствующего лиганда приводило бы к созданию конформационных помех для сборки аденовирусного капсида. Поэтому целевой белок присоединяют к C-концу pIX через спейсер, представляющий собой белковую α-спираль. Таким спейсером в большинстве конструкций является длиннейшая α-спираль аполипопротеина E4 человека (рис. 2).



**Рис. 2. Диаграмма модифицированного капсидного белка IX.**

Длина такого спейсера может различаться и составлять от 3,0 до 7,5 нм. Спейсер, выходя на поверхность капсида между гексонами, позволяет экспонировать лиганд над поверхностью аденовириона. Vellinga et al. провели сравнительный анализ функциональности спейсеров различной длины, инкорпорированных между С-концевой областью pIX Ад и целевым лигандом, и пришли к выводу о том, что с увеличением длины спейсера повышается эффективность экспонирования лиганда над поверхностью капсида, но снижается выход инфекционных вирусных частиц из-за возможных конформационных помех при сборке вирионов. Поэтому выбор подходящего спейсера для экспонирования лиганда в составе pIX является одной из главных задач успешной модификации этого белка.

*Материалы разработаны при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамкам реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы (Соглашение № 8779)*

**Список используемых источников:**

1. Лунин В.Г., Шарапова Н.Е., Тихонова Т.В., Полетаева Н.Н., Галушкина З.М., Аксенова Е.И., Грабко В.И., Великодворская Г.А., Лаврова Н.В., Ананьина Ю.В. и др. Изучение иммуногенных свойств рекомбинантного целлюлозосвязывающего домена *Anaerocellum thermophilum in vitro* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2009. – № 1. – С. 21–26.
2. Лящук А.М., Лунин В.Г., Карягина А.С., Лаврова Н.В., Родионова И.В., Кормилицына М.И., Мещерикова И.С., Верховская Л.В., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Иммунизация иммобилизированными на целлюлозе антигенами. Развитие идей А.Е.Гурвича // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.- 2006. - №**4**. – С.65-68.
3. Семихин А.С., Лящук А.М., Мезенцева М.В., Трегубова М.И., Сергиенко О.В., Полетаева Н.Н., Народицкий Б.С., Карягина А.С., Лунин В.Г., Гинцбург А.Л. Получение рекомбинантного интерферона–β человека на основе технологии аффинных доменов // Молекул. генетика. – 2009. – № 4. – С. 38–41.
4. Dmitriev I.P., Kashentseva E.A., Curiel D.T. Engineering of adenovirus vectors containing heterologous peptide sequences in the C terminus of capsid protein IX. // J. Virol. 2002. V. 76. P. 6893–6899.
5. Poulin K.L., Lanthier R.M., Smith A.C., Christou C., Risco Quiroz M., Powell K.L., O'Meara R.W., Kothary R., Lorimer I.A., Parks R.J.Retargeting of adenovirus vectors through genetic fusion of a single-chain or single-domain antibody to capsid protein IX. //J Virol. 2010. V. 84(19). P. 10074-10086.
6. Vellinga J., et al. Spacers increase the accessibility of peptide ligands linked to the carboxyl terminus of adenovirus minor capsid protein IX. // J. Virol. 2004. V. 78. P. 3470–3479.
7. de Vrij J., Uil T.G., van den Hengel S.K., Cramer S.J., Koppers-Lalic D., Verweij M.C., Wiertz E.J. et al. Adenovirus targeting to HLA-A1/MAGE-A1-positive tumor cells by fusing a single-chain T-cell receptor with minor capsid protein IX. **//** Gene Ther. 2008. V. 15(13). P. 978-989.
8. Le L.P., Everts M., Dmitriev I.P., Davydova J.G., Yamamoto M., Curiel D.T. Fluorescently labeled adenovirus with pIX-EGFP for vector detection. // Mol Imaging. 2004. V. 3. P. 105–116.
9. Mathis J.M., Bhatia S., Khandelwal A., Kovesdi I., Lokitz S.J., Odaka Y., Takalkar A.M., Terry T., Curiel D.T.Genetic incorporation of human metallothionein into the adenovirus protein IX for non-invasive SPECT imaging. **//** PLoS One. 2011. V. 9. № 6(2). P. 16792.
10. Matthews Q.L., Sibley D.A., Wu H., Li J., Stoff-Khalili M.A., Waehler R., Mathis J.M., Curiel D.T.Genetic incorporation of a herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and firefly luciferase fusion into the adenovirus protein IX for functional display on the virion.// Mol Imaging. 2006. V. 5(4). P. 510-519.
11. Meulenbroek R.A., Sargent K.L., Lunde J., Jasmin B.J., Parks R.J. Use of adenovirus protein IX (pIX) to display large polypeptides on the virion-generation of fluorescent virus through the incorporation of pIX-GFP. // Mol Ther. 2004. V. 9. P. 617–624.
12. Seregin S.S., Hartman Z.C., Appledorn D.M., Godbehere S., Jiang H., Frank M.M., Amalfitano A.Novel adenovirus vectors 'capsid-displaying' a human complement inhibitor. **//** J Innate Immun. 2010. V. 2(4). P. 353-359.
13. Ugai H., Wang M., Le L.P., Matthews D.A., Yamamoto M., Curiel D.T.In vitro dynamic visualization analysis of fluorescently labeled minor capsid protein IX and core protein V by simultaneous detection. // J Mol Biol. 2010. V. 395(1). P. 55-78.
14. Bayer W., Tenbusch M., Lietz R., Johrden L., Schimmer S., Uberla K. et al. Vaccination with an adenoviral vector that encodes and displays a retroviral antigen induces improved neutralizing antibody and CD4+ T-cell responses and confers enhanced protection. // J Virol. 2010. V. 84(4). P. 1967-1976.
15. Boyer J., Sofer-Podesta C., Ang J., Hackett N., Chiuchiolo M.J., Senina S., Perlin D., Crystal R.G.Protective immunity against a lethal respiratory Yersinia pestis challenge induced by V antigen or the F1 capsular antigen incorporated into adenovirus capsid. **//** Hum Gene Ther. 2010. V. 21(7). P. 891-901.
16. Bramson J.L. Helper-dependent adenoviral vectors containing modified fibre for improved transduction of developing and mature muscle cells. // Hum. Gene Ther. 2004. V. 15. P. 179–188.
17. Campos S.K., Parrott M.B., Barry M.A. Avidin-based targeting and purification of a protein IX-modified, metabolically biotinylated adenoviral vector. // Mol. Ther. 2004. V. 9. P. 942–954.
18. Chiocca S., Kurzbauer R., Schaffner G., Baker A., Mautner V., Cotten M. The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CELO // J. Virol. 1996. V. 70. P. 2939 – 2949.
19. Colby W., Shenk T. Adenovirus type 5 virions can be assembled in vivo in the absence of detectable polypeptide IX. // J. Virol. 1981. V. 39. P. 977 – 980.
20. Davison A.J., Telford E., Watson M.S., McBride K., Mautner V. The DNA sequence of adenovirus type 40. // J. Mol. Biol. 1993. V. 234. P. 1308–1316.
21. Engler J. A. The nucleotide sequence of the polypeptide IX gene of human adenovirus type 3. // Gene. 1981. V. 13. P. 387 – 394.
22. Farkas S. L. et al. Genomic and phylogenetic analyses of an adenovirus isolated from a corn snake (Elaphe guttata) imply a common origin with members of the proposed new genus Atadenovirus. // J Gen Virol. 2002. V. 83(10). P. 2403–2410.
23. Jacobs S.C., Davison A.J., Carr S., Bennett A.M., Phillpotts R., Wilkinson G.W.G. Genome Sequence of Human Adenovirus 4. // National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD. 2004.
24. Lutz P., Rosa-Calatrava M., Kedinger C. The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator. // J. Virol. 1997. V. 71. P. 5102 –5109.
25. Maizel J.V., White D.O., Scharff M. D. The polypeptides of adenovirus. II. Soluble proteins, cores, top components and the structure of the virion. // Virology. 1968. V. 36. P. 126–136.
26. Matsui T., Murayama M., Mita T. Adenovirus 2 peptide IX gene is expressed only on replicated DNA molecules. // Mol. Cell. Biol. 1986. V. 6. P. 4149 – 4154.