

## ЛИПИД-ИНДУЦИРУЕМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОНФОРМАЦИИ БЕЛКОВ КАК ИНСТРУМЕНТ РЕГУЛЯЦИИ ИММУНОГЕННОСТИ АНТИГЕНОВ В СОСТАВЕ ТУБУЛЯРНЫХ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИХ КОМПЛЕКСОВ

© 2016 г. Н.М. Санина, Н.С. Воробьева, О.Д. Новикова\*, О.Ю. Портнягина\*,  
Л.А. Давыдова, В.Л. Шныров\*\*, Э.Я. Костецкий\*

Дальневосточный федеральный университет, 690950, Владивосток, ул. Суханова, 8;

\*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,  
690022, Владивосток, пр. 100-летия Владивостока, 159;

\*\*Universidad de Salamanca, Plaza Doctores de la Reina s/n, 37007 Salamanca, Spain

E-mail: sanina.nm@dvfu.ru

Поступила в редакцию 27.10.15 г.

Наночастицы тубулярных иммуностимулирующих комплексов, состоящие из гликолипида моногалактозилдиацилглицерина из морских макрофитов (макроводорослей и морских трав), тритерпенового гликозида кукумариозида А<sub>2</sub>-2 из голотурии *Cuscutaria japonica* и холестерина, представляются наиболее перспективными адъювантными носителями антигенов для современных субъединичных вакцин. Моногалактозилдиацилглицерин формирует липидный матрикс для антигена, инкорпорированного в эти комплексы. Обсуждается влияние физико-химических свойств моногалактозилдиацилглицерина, выделенного из разных видов морских макрофитов, на конформацию двух модельных белковых антигенов (OmpF-подобного порина из *Yersinia pseudotuberculosis* и рекомбинантного гемагглютинина вируса гриппа), включенных в состав тубулярных иммуностимулирующих комплексов, а также использование модулирующего действия моногалактозилдиацилглицерина для повышения эффективности вакцинных препаратов.

*Ключевые слова:* моногалактозилдиацилглицерин, порин, гемагглютинин, дифференциальная сканирующая калориметрия, собственная флюоресценция белка, круговой дихроизм.

Гликолипид моногалактозилдиацилглицерин (МГДГ) из морских макрофитов (макроводорослей и морских трав) наряду с холестерином и тритерпеновым гликозидом кукумариозидом А<sub>2</sub>-2 из голотурии *Cuscutaria japonica* являются составляющими компонентами классических тубулярных иммуностимулирующих комплексов (ТИ-комплексов), разработанных как адъювантные носители антигенов антиинфекционных вакцин нового поколения [1]. Амфифильные мембранные белки, представляющие собой поверхностные иммунодоминантные (и, как правило, протективные) антигены бактерий и вирусов, являются оптимальными для

включения в иммуностимулирующие комплексы. Как известно, полярный липид служит в качестве матрикса для антигена иммуностимулирующих комплексов [2], тогда как их сапопиновой части приписывается исключительно структурная роль [3].

Для того чтобы понять роль химической структуры полярных липидов в повышении эффективности вакцин на основе ТИ-комплексов, было предпринято сравнительное исследование влияния МГДГ, выделенного из разных видов морских макрофитов, на конформацию и иммуногенность модельных белковых антигенов – OmpF-подобного порина из *Yersinia pseudotuberculosis* (YOmpF) [4] и гемагглютинина вируса гриппа [5]. Использование разных белков было продиктовано тем, что характер такого влияния может зависеть от свойств обоих взаимодействующих компонентов [3].

Сокращения: МГДГ – моногалактозилдиацилглицерин, ТИ-комплекс – тубулярный иммуностимулирующий комплекс, YOmpF – OmpF-подобный порин из *Yersinia pseudotuberculosis*, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты, ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия, НА0 – рекомбинантный нерасщепленный мономер гемагглютинина, ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.

### ХАРАКТЕРИСТИКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОНОГАЛАКТОЗИЛДИАЦИЛГЛИЦЕРИНА ИЗ МОРСКИХ МАКРОФИТОВ

На первом этапе исследования были выделены МГДГ из разных морских макрофитов и изучены их физико-химические свойства: состав жирных кислот, который зависит от таксономического положения этих растений [6], и вязкость, зависящая в свою очередь от состава жирных кислот липида.

Гликоглицеролипиды из морских макрофитов обогащены полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК), которые обладают иммуномодулирующими свойствами [7,8]. Поэтому для создания ТИ-комплексов были использованы гликоглицеролипиды моногалактозилдиацилглицерин, дигалактозилдиацилглицерин и сульфохиновозилдиацилглицерин. Однако только МГДГ проявил необходимые структурообразующие свойства [9]. В результате для дальнейших исследований был выбран МГДГ из морских макрофитов, относящихся к разным отделам: *Ahnfeltia tobuchiensis* (Rhodophyta), *Laminaria japonica*, *Sargassum pallidum* (Phaeophyta), *Ulva fenestrata* (Chlorophyta) и *Zostera marina* (Embriophyta). Результаты анализа с помощью газожидкостной хроматографии состава жирнокислотных остатков МГДГ, выделенных из морских макрофитов и использованных для получения иммуностимулирующих комплексов, соотносились с ранее полученными результатами анализа жирных кислот разных классов гликоглицеролипидов, выделенных из тех же видов морских макрофитов [6,10], которые, в частности, показали, что МГДГ является самым ненасыщенным гликоглицеролипидом.

Содержание ПНЖК колебалось от 67,7% в МГДГ из *S. pallidum* до 92,2% в МГДГ из *U. fenestrata*. Состав и структура ПНЖК в использованных препаратах МГДГ также сильно различались. Соотношение  $n-3/n-6$  ПНЖК варьировало от 0,64 в МГДГ из *S. pallidum* до 38,75 в МГДГ из *U. fenestrata*. В МГДГ из *U. fenestrata* главной жирной кислотой являлась 16:4 $n-3$  (43,7%), тогда как в МГДГ из *Z. marina* – 18:3 $n-3$  (58,8%), а в МГДГ из *S. pallidum* – 18:2 $n-6$  (16,3%). В МГДГ из *L. japonica* доминировала 18:4 $n-3$  (20,3%), а в МГДГ из *A. tobuchiensis* – арахидоновая и эйкозопентаеновая жирные кислоты (по 36,8%). Ненасыщенность МГДГ увеличивалась в ряду: МГДГ из *S. pallidum* → МГДГ из *Z. Marina* → МГДГ из *A. tobuchiensis* → МГДГ из *U. fenestrata* → МГДГ из *L. japonica*.

Углеводородные цепи оказывают значительное влияние на физическое состояние глицеролипидов [10]. Для характеристики физического состояния выделенных образцов МГДГ была определена их микровязкость по скорости эксимеризации пирена ( $I_e/I_m$ ) при 25°C. Как известно, соотношение между интенсивностью флуоресценции эксимера (активный димер) и мономера ( $I_e/I_m$ ) пирена пропорционально жидкости липидной пробы. Значения  $I_e/I_m$  и, соответственно, микровязкости образцов МГДГ существенно различались. Наибольшие значения  $I_e/I_m$ , т.е. наибольшая текучесть, но самая низкая микровязкость, были зарегистрированы для МГДГ из *A. tobuchiensis* и *L. japonica*, в то время как наиболее вязким оказался образец МГДГ из *Z. marina*. Для образцов МГДГ из *U. fenestrata* и *S. pallidum* были характерны средние значения микровязкости.

### ВЛИЯНИЕ МОНОГАЛАКТОЗИЛДИАЦИЛГЛИЦЕРИНА ИЗ МОРСКИХ МАКРОФИТОВ НА ИММУНОГЕННОСТЬ И КОНФОРМАЦИЮ ПОРИНА

Функционально активная тримерная форма порина из наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis*, так же как и его мономерная форма, обладают иммуногенными свойствами [11,12]. Для выбора наиболее эффективной молекулярной формы антигена авторы оценивали иммуногенность как индивидуальных мономеров и тримеров порина, так и этих же антигенов в составе ТИ-комплексов, содержащих МГДГ из *U. fenestrata* или *A. tobuchiensis*. Сравнение уровней антипориновых антител в сыворотках крови мышей, иммунизированных индивидуальными мономерами и тримерами порина и теми же антигенами, инкорпорированными в ТИ-комплексы, показало заметный адьювантный эффект ТИ-комплексов в отношении обеих форм антигена. Однако адьювантный эффект ТИ-комплексов по отношению к тримеру порина был выше, чем к мономеру, независимо от источника МГДГ: тример и мономер в составе ТИ-комплексов индуцировали четырехкратное и трехкратное увеличение уровня антипориновых антител по сравнению с эффектом индивидуальных белков соответственно. Это, вероятно, обусловлено сохранением нативной конформации и большей молекулярной массой порина в тримерной форме. В результате именно тример порина был выбран для экспериментов по изучению эффекта МГДГ из морских макрофитов на конформацию и иммуногенность порина как модельного белкового анти-

гена субъединичных вакцин на основе ТИ-комплексов.

Уровень специфических антител является главным индикатором адъювантных свойств любых иммуностимулирующих комплексов или субстанций [13]. Выраженный эффект МГДГ с разным жирнокислотным составом и различной микровязкостью на адъювантные свойства ТИ-комплексов был обнаружен на первой стадии эксперимента, т.е. при выборе молекулярной формы порина [14]. ТИ-комплекс, содержащий МГДГ из *U. fenestrata*, вызывал особенно сильный иммуностимулирующий эффект, который был примерно в два раза выше, чем эффект ТИ-комплексов, содержащих МГДГ из *A. tobuchiensis*. Было сделано предположение о том, что иммуностимулирующий эффект ТИ-комплексов можно регулировать, применяя МГДГ с разным жирнокислотным составом и различной микровязкостью. Поэтому спектр видов морских макрофитов, используемых для выделения МГДГ, был расширен до пяти [4].

На основе полученных МГДГ были сформированы ТИ-комплексы кукумариозид  $A_2-2$ -холестерин-МГДГ в весовом соотношении 6:2:4 и изучена их адъювантная активность в отношении тримера порина из *Y. pseudotuberculosis*. ТИ-комплексы, содержащие МГДГ из разных морских макрофитов, различались по адъювантному эффекту. Наибольший иммуностимулирующий эффект (четырекратное повышение уровня антипориновых антител в сравнении с эффектом индивидуального порина) наблюдался при использовании в составе ТИ-комплексов МГДГ из зеленой водоросли *U. fenestrata* и бурой водоросли *S. pallidum*. Жирнокислотный состав МГДГ из этих таксономически различных водорослей существенно различался. МГДГ из *U. fenestrata* был более ненасыщенным, чем МГДГ из *S. Pallidum*, как по индексу ненасыщенности (357 против 248), так и по соотношению между суммами ненасыщенных и насыщенных жирных кислот (75,9 против 3,8) соответственно. Несмотря на различия в жирнокислотном составе, микровязкость МГДГ из *U. fenestrata* и *S. pallidum* была схожей и характеризовалась средними значениями по сравнению с МГДГ из других макрофитов.

Адъювантный эффект ТИ-комплексов, содержащих другие МГДГ, был выражен слабее и в сравнении с индивидуальным тримером порина повышался в 2,8, 2,3 и 1,3 раза для ТИ-комплексов, содержащих МГДГ из *Z. marina*, *A. tobuchiensis* и *L. japonica* соответственно.

Таким образом, физическое состояние МГДГ является более важным для проявления адъювантной активности ТИ-комплексов, чем

состав жирных кислот сам по себе. Умеренная микровязкость липидного окружения, вероятно, необходима для оптимального представления антигенных детерминант белка.

В регуляции иммунного ответа существенную роль играют цитокины, которые служат одним из сигналов, предопределяющих тип Т-клеточного иммунного ответа – Th1 или Th2 [15], и, соответственно, эффективность вакцины. Анализ цитокинового профиля сывороток крови мышей, иммунизированных порином в составе ТИ-комплексов, показал сравнительно небольшие флуктуации в содержании большинства цитокинов и выявил способность МГДГ из разных морских макрофитов влиять на механизмы цитокиновой регуляции иммунных реакций.

Несмотря на постоянный интерес к липид-белковым взаимодействиям, до сих пор нет четкого понимания связи между эффектом липидного окружения на конформацию белков и их иммуногенностью. В связи с этим было исследовано влияние МГДГ на конформацию порина YOmpF.

Конформационные изменения, индуцируемые МГДГ из различных морских макрофитов в порине, были изучены с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), собственной флуоресценции белка и кругового дихроизма. Известно, что изменения в «дальней» УФ-области кругового дихроизма и собственной флуоресценции триптофана соответствуют изменениям в конформации белка на уровне вторичной и третичной структуры соответственно, а ДСК является высокочувствительным интегральным методом, позволяющим характеризовать структурные изменения в макромолекуле с помощью термодинамических параметров тепловой денатурации белка.

Термоденатурации порина при pH 7,5 соответствовал хорошо выраженный ДСК-переход, температура максимума теплопоглощения ( $T_m$ ) которого зависела от скорости сканирования. Термоденатурация порина при таких экспериментальных условиях была всегда калориметрически необратимой: при повторном нагревании пробы не наблюдалось температурного эффекта. Это ясно показывает, что наблюдаемые тепловые переходы характеризуют необратимый, кинетически контролируемый процесс. Отсутствие зависимости  $T_m$  и энтальпии денатурации порина от концентрации белка при pH 7,5 в диапазоне 0,45–1,8 мг/мл свидетельствует о том, что диссоциации тримерного порина на мономеры в пределах теплового перехода не происходит [16–18].

Анализ ДСК-переходов при этих условиях осуществляется на основе модели одностадийной необратимой денатурации (или модели двух состояний)  $N_3 \xrightarrow{k} D_3$ , где  $N_3$  и  $D_3$  – нативный и денатурированный тримерный порин соответственно,  $k$  – константа скорости денатурации первого порядка, которая меняется в зависимости от температуры в соответствии с уравнением Аррениуса. Поэтому величину избыточной теплоемкости  $C_p^{\text{ex}}$  рассчитывали с помощью нелинейного метода наименьших квадратов, приближая данные к уравнению [19]:

$$C_p^{\text{ex}} = \frac{1}{v} \Delta H \exp \left\{ \frac{E_A}{R} \left( \frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) \right\} \times \exp \left\{ - \frac{1}{v} \int_{T_0}^T \exp \left[ \frac{E_A}{R} \left( \frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) \right] dT \right\}, \quad (1)$$

где  $v = dT/dt$  ( $\text{K} \cdot \text{мин}^{-1}$ ) – скорость сканирования;  $\Delta H$  – разница энтальпий между денатурированным и нативным состояниями;  $E_A$  – энергия активации процесса денатурации;  $R$  – универсальная газовая постоянная ( $8,314 \text{ Дж}/(\text{K} \cdot \text{моль})$ );  $T^*$  – температура, при которой константа скорости денатурации ( $k$ ) равна  $1 \text{ мин}^{-1}$ .

Правильность приближения оценивали по коэффициенту корреляции ( $r$ ):

$$r = \sqrt{1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_i^{\text{calc}})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - y_i^{\text{m}})^2}}, \quad (2)$$

где  $y_i$  и  $y_i^{\text{calc}}$  – экспериментальное и рассчитанное значения  $C_p^{\text{ex}}$  соответственно;  $y_i^{\text{m}}$  – среднее значение  $C_p^{\text{ex}}$ ,  $n$  – число точек.

Попытки использовать различные необратимые модели для денатурации порина (например, модель Ламри–Эйринга с быстро устанавливаемым равновесием на первой стадии и модель, включающую две последовательно протекающие необратимые стадии) не улучшали точность приближения, указывая на то, что простейшая модель была достаточной для количественного описания денатурации порина.

Мы наблюдали незначительные изменения значений  $T^*$ , несмотря на существенное изменение значений  $T_m$ . Следовательно, взаимодействие порина с МГДГ наибольшим образом влияет на энергетические, а не кинетические факторы тепловых переходов белка.

В целом результаты, полученные с помощью ДСК, показали, что термостабильность порина увеличивается под воздействием МГДГ. Это выражалось в увеличении значений  $T_m$  и  $E_A$ .

МГДГ со средней микровязкостью умеренно стабилизировали конформацию белка, позволяя получить максимальный иммуностимулирующий эффект ТИ-комплексов. Наиболее вязкий МГДГ из *Z. marina* оказывал наибольшее влияние на стабилизацию нативной конформации белка, в то время как эффект наименее вязкого МГДГ из *A. tobuchiensis* был выражен слабее всего.

Влияние МГДГ из разных морских макрофитов на третичную структуру порина оценивали по собственной флуоресценции белка. Интенсивность флуоресцентной эмиссии белка, возбуждаемой светом с длиной волны 296 нм, увеличивалась в зависимости от липидного окружения. МГДГ, выделенные из *Z. marina* и *A. tobuchiensis*, вызывали максимальное увеличение флуоресцентной эмиссии порина в сравнении с таковой для индивидуального порина, в то время как эффект МГДГ из *S. pallidum* и *U. fenestrata* был минимальным.

Более детальная информация о конформационных изменениях в третичной структуре порина была получена путем деконволюции экспериментальных спектров на элементарные компоненты, соответствующие эмиссии белкового флуорофора (триптофана) в зависимости от специфического микроокружения [20].

Согласно модели дискретных состояний остатков триптофана в белках [21] спектральные формы S и I соответствуют излучению индольных хромофоров, локализованных в белке и формирующих эксиплексы 1:1 и 1:2 соответственно с некоторыми полярными группами белка, находящимися в непосредственной близости. Спектральная форма II соответствует излучению индольных хромофоров на поверхности белка в контакте с молекулами связанной воды.

При разложении экспериментального спектра индивидуального порина было определено, что все три спектральные формы представлены в соотношении 28:53:19. МГДГ из *S. pallidum* влиял на это распределение спектральных форм в наименьшей степени. Содержание формы I не изменялось, а содержание формы II увеличивалось за счет формы S. В противоположность этому, содержание формы S не изменялось, а процентное содержание формы I значительно возрастало в связи с исчезновением спектральной формы II под влиянием МГДГ из *U. fenestrata*. Наиболее глубокие конформационные изменения, влияющие на вклад всех спектральных форм, происходили в порине под влиянием МГДГ из *A. tobuchiensis* и *Z. marina*.

Исследование пространственной структуры тримера порина YOmpF методом кругового

дихроизма показало отсутствие в нем  $\alpha$ -спиралей, что характерно для вторичной структуры этих мембранных белков в присутствии *n*-октил- $\beta$ -D-глюкопиранозида [22], тогда как основным элементом вторичной структуры используемого белка была  $\beta$ -структура. Липидное окружение оказывало незначительное влияние на вторичную структуру белка.

В целом описанные результаты показали, что одним из путей достижения желаемого иммунного ответа является модуляция не столько самого по себе жирнокислотного состава, сколько микровязкости МГДГ, который обеспечивает липидное окружение для белковых антигенов в ТИ-комплексах. Умеренная жидкость липидного окружения порина, вероятно, необходима для оптимальной презентации антигенных детерминант белка. Важно, что это предположение было также подтверждено результатами, полученными с помощью ДСК, которая позволяет регистрировать интегральные изменения в биологических макромолекулах. Калориметрические данные показали, что МГДГ из *S. pallidum* и *U. fenestrata* со средней микровязкостью мягко стабилизируют конформацию белка и обеспечивают максимальный иммуностимулирующий эффект. Наиболее и наименее вязкие МГДГ из *Z. marina* и *A. tobuchiensis* соответственно индуцировали максимальный и минимальный стабилизирующий эффекты на конформацию порина.

Деконволюция экспериментальных спектров флуоресценции порина показала, что эти образцы МГДГ с диаметрально противоположными значениями вязкости влияли на распределение всех спектральных форм остатков триптофана. Наоборот, МГДГ из *S. pallidum* и *U. fenestrata* более мягко влияли на третичную структуру белка, поддерживая вклад спектральных форм I или S соответственно, что, очевидно, способствует формированию антигенной структуры порина, близкой к нативной. Незначительные изменения во вторичной структуре порина дают, вероятно, пренебрежительно малый вклад в изменения третичной структуры этого белка под воздействием МГДГ.

#### ВЛИЯНИЕ МОНОГАЛАКТОЗИЛДИАЦИЛГЛИЦЕРИНА ИЗ МОРСКИХ МАКРОФИТОВ НА ИММУНОГЕННОСТЬ И КОНФОРМАЦИЮ ГЕМАГГЛЮТИНИНА

Описанные результаты, показавшие возможность регуляции иммуногенности белкового антигена, инкорпорированного в ТИ-комплекс, путем изменения конформации антигена под

влиянием МГДГ с разными физико-химическими свойствами, были получены на примере бактериального антигена [4]. Для того чтобы понять, насколько универсальным может быть этот подход для достижения необходимой эффективности ТИ-комплексов по отношению к другим белковым антигенам, был использован рекомбинантный мономер главного поверхностного белка вируса гриппа А – гемагглютинина, который является мишенью почти всех нейтрализующих антител. Именно поэтому гемагглютинин является важным объектом для разработки вакцин [23].

В свою очередь, использование рекомбинантных белков является привлекательным подходом для создания вакцин, так как в этом случае не требуется обработка инфекционных бактерий и вирусов. Однако рекомбинантные белки слабо иммуногенны, и для повышения их иммуногенности необходимы адьюванты [24].

Гемагглютинин синтезируется в виде простого полипептида, который затем тримеризуется. Мономер синтезируется как молекула-предшественник, которая биологически неактивна до момента расщепления трипсиноподобной, аргинин-специфичной протеазой хозяина на две, связанные дисульфидной связью, субъединицы: тяжелую HA1 и легкую HA2 с молекулярными массами примерно 50 и 25 кДа соответственно [25,26]. Каждая субъединица гемагглютинина представляет собой грибоподобную структуру с двумя регионами: глобулярная часть образована антипараллельными  $\beta$ -листами, а область стебля состоит из  $\alpha$ -спиралей [27]. Глобула содержит только часть HA1, в то время как стебель содержит часть HA1 и весь HA2. Главные нейтрализующие эпитопы представлены в глобулярных участках гемагглютинина. Два антигенных сайта (*Sa* и *Sb*) из четырех являются штаммоспецифичными (strain-specific), а два других (*Ca* и *Cb*) – перекрестно реагирующими (cross-reactive). Сайт *Ca* подразделяют на два субрегиона: *Ca1* и *Ca2*. Антигенные сайты *Cb* и *Sb* являются секвенированными, а остальные (*Ca*, *Sa*) – конформационными. Однако сайт *Ca* формируется только в тримерной форме гемагглютинина [28,29]. При инфицировании ответ организма хозяина, главным образом, характеризуется индукцией антител, нейтрализующих эти эпитопы и тем самым предотвращающих прикрепление гемагглютинина вируса к клеточному рецептору [30].

Рекомбинантный нерасщепленный мономер гемагглютинина вируса гриппа A/H1N1 (A/California/04/2009) (HA0) (Sino Biological Inc., Китай) был использован для исследования имму-

ногенности этого антигена в составе ТИ-комплексов, содержащего МГДГ из разных видов морских макрофитов [5]. Важно отметить, что нерасщепленный мономер, в отличие от расщепленного, неинфекционен. Другим преимуществом нерасщепленного мономера по сравнению с расщепленным является существенно большая иммуногенность, что свидетельствует о зависимости иммуногенности белка от его третичной структуры [31]. Судя по составу аминокислотной последовательности, НАО включает все антигенные сайты гемагглютинаина: *Sa*, *Sb* и *Cb*, за исключением *Ca*.

Иммунизация индивидуальным гемагглютинином НАО, в отличие от индивидуального порина  $\Upsilon\text{OmpF}$ , не выявила его собственной иммуногенности: содержание антител против НАО оставалось в сыворотке крови иммунизированных мышей на уровне контрольной группы.

Введение того же антигена в ТИ-комплексы на основе МГДГ из *U. fenestrata*, *S. pallidum* или *Z. marina* приводило к двукратному увеличению содержания анти-НАО-антител независимо от источника МГДГ, что отличалось от результатов аналогичного эксперимента с порином  $\Upsilon\text{OmpF}$ , способность которого стимулировать образование специфических антител существенно зависела от физико-химических свойств МГДГ, выделенных из разных видов морских макрофитов.

Уровни исследованных цитокинов не отличались между контролем и группой животных, иммунизированных индивидуальным НАО, за исключением противовоспалительного интерлейкина-10 [32], содержание которого было в 1,9 раза выше по сравнению с контролем.

Введение НАО в ТИ-комплексы, включающие различные МГДГ, не влияло на содержание большинства цитокинов, за исключением гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). Его уровень повышался в 1,8–2,3 раза по сравнению с группой животных, иммунизированных индивидуальным НАО. При этом эффект ТИ-комплексов на основе МГДГ из *Z. marina* был максимальным, тогда как МГДГ из *U. fenestrata* минимально стимулировал образование ГМ-КСФ.

ГМ-КСФ секретируется различными типами клеток, включая активированные макрофаги, эндотелиальные клетки, фибробласты, Т-лимфоциты, и способен не только повышать антиген-индуцируемый иммунный ответ, но и влиять на баланс цитокинов, продуцируемых Т-хелперами 1 и Т-хелперами 2, способствуя развитию иммунного ответа этих Т-хелперов. Свои адьювантные свойства ГМ-КСФ проявляет за

счет способности ускорять созревание дендритных клеток и повышать активность макрофагов [33]. Следовательно, ГМ-КСФ оказывает разнообразные эффекты на иммунную систему, включая стимулирующее влияние на гуморальный и клеточно-опосредованный ответы, в частности на активность цитотоксических Т-лимфоцитов [34].

Так как повышение уровней ГМ-КСФ и анти-НАО-антител в результате иммунизации животных НАО в составе ТИ-комплексов происходило примерно в одинаковой степени, то можно заключить, что усиление продукции ГМ-КСФ способствовало адекватному повышению специфического иммунного ответа против НАО в составе исследованных ТИ-комплексов. Однако отсутствие стимуляции синтеза ГМ-КСФ аналогичными по составу ТИ-комплексами, но содержащими другой антиген (порин из *Y. pseudotuberculosis*), говорит том, что в этом процессе имеет место синергический эффект ТИ-комплекса и белкового антигена.

Повышение уровня ГМ-КСФ также позволяет предположить стимуляцию цитотоксических клеток, что является важной характеристикой вакцинных препаратов.

Конформационные изменения в белковом антигене НАО, индуцированные МГДГ из *S. pallidum*, *U. fenestrata* и *Z. marina*, были исследованы теми же методами, что и в случае порина.

С помощью ДСК было показано, что термоденатурация НАО при pH 7,4 характеризовалась хорошо выраженным термоиндуцированным переходом,  $T_m$  которого зависела от скорости сканирования. Термоденатурация НАО при этих экспериментальных условиях была всегда калориметрически необратимой. Поэтому анализ ДСК-термограмм и расчет избыточной теплоемкости проводили так же, как для порина.

Несмотря на одинаковый стимулирующий эффект МГДГ из разных видов морских макрофитов в составе ТИ-комплексов на выработку анти-НАО антител, термодинамические параметры термоденатурации белка НАО менялись различно в зависимости от микровязкости МГДГ. Термостабильность НАО уменьшалась в присутствии МГДГ, что проявлялось в снижении энергии активации процесса денатурации белка ( $E_A$ ). При этом МГДГ из *Z. marina* и *S. pallidum* оказывали соответственно максимальный и минимальный дестабилизирующий (разрыхляющий) эффект на НАО.

Энтальпия денатурации ( $\Delta H$ ) НАО также изменялась различно под действием МГДГ.

Так, значения  $\Delta H$  белка, окруженного МГДГ из *Z. marina*, практически не отличались от значений  $\Delta H$  индивидуального НАО, тогда как МГДГ из *U. fenestrata* и *S. pallidum* вызывал повышение и понижение  $\Delta H$  по сравнению с таковым индивидуального НАО соответственно. Однако  $T^*$  НАО практически не изменялась под влиянием различных МГДГ.

В целом данные калориметрического анализа НАО принципиально отличались от данных, полученных для порина из *Y. pseudotuberculosis*, термостабильность которого, наоборот, возрастала под действием МГДГ. Возможно, это связано с разными молекулярными формами сравниваемых белков: мономерной и олигомерной.

Влияние МГДГ из различных морских макрофитов на третичную структуру НАО оценивалось по собственной флуоресценции белка. Интенсивность флуоресцентной эмиссии НАО, возбужденной светом с длиной волны 296 нм, практически не зависела от МГДГ, окружавшего белок. Разложение экспериментального спектра индивидуального НАО позволило идентифицировать в нем три спектральные формы (S, I и II) в соотношении 2:48:50. Доминирующими спектральными формами в индивидуальном белке были спектральные формы I и II, которые в сумме составляли 98% от всех спектральных форм.

МГДГ из морских макрофитов существенно влиял на конформацию НАО, повышая содержание формы II за счет формы I. Степень влияния увеличивалась в ряду: МГДГ из *S. pallidum* → МГДГ из *U. fenestrata* → МГДГ из *Z. marina*. Доля S-формы возрастала под действием наиболее вязкого МГДГ из *Z. marina* до 8% против 2% в индивидуальном белке, в то время как другие образцы МГДГ практически не влияли на содержание этой формы. Следовательно, МГДГ из *Z. marina* максимально разрыхлял периферические участки белка, одновременно уплотняя «кор» НАО, что согласуется с максимальным снижением экспериментальной энергии активации денатурации белка ( $E_A$ ) в окружении этого МГДГ. Возможно, наибольшая релаксация третичной структуры НАО под влиянием МГДГ из *Z. marina* способствует «правильной» экспозиции антигенных сайтов НАО, которая сопровождается максимальной продукцией провоспалительного цитокина ГМ-КСФ. Наименьшие изменения в распределении спектральных форм I и II наблюдались при действии МГДГ из *S. pallidum* на конформацию НАО, что также совпадает с результатами исследования термоденатурации белка.

Согласно полученным спектрам кругового дихроизма вторичная структура НАО в основном представлена  $\beta$ -структурой, процентное содержание которой не зависело от гликолипидного окружения. Это соответствует литературным данным о том, что  $\beta$ -структура – это главный элемент вторичной структуры тяжелой субъединицы НА1, где фокусируются антигенные сайты гемагглютинаина [28,29]. Однако вклад других элементов вторичной структуры изменялся различным образом под влиянием МГДГ из морских макрофитов. Так, МГДГ из *S. pallidum* и *Z. marina* снижал или увеличивал вклад  $\beta$ -изгибов на 9% соответственно. Наоборот, эти же гликолипидные образцы заметно увеличивали или снижали содержание  $\alpha$ -спиралей соответственно. Наименее вязкий МГДГ из *U. fenestrata* не оказывал существенного влияния на содержание элементов вторичной структуры НАО.

Таким образом, изменения во вторичной структуре НАО, вероятно, связаны с взаимодействием гликолипида МГДГ с легкой субъединицей НА2, гидрофобный N-конец которой образует белок слияния гемагглютинаина [35], тогда как вторичная структура субъединицы НА1 – главного месторасположения антигенных детерминант гемагглютинаина и его рекомбинантного мономера НАО, практически не затрагивалась. По этой причине стимулирующий эффект ТИ-комплексов на образование антител против НАО был одинаков независимо от физико-химических свойств МГДГ, входящего в состав ТИ-комплекса. Однако, уровень цитокина ГМ-КСФ, который варьировал под действием разных МГДГ, может быть связан с конформационными изменениями в области НА2 субъединицы белка НАО.

Важно также отметить, что исследование влияния МГДГ из разных морских макрофитов на иммуногенность и конформацию рекомбинантного мономера НАО показало, что белок взаимодействовал с липидной матрицей ТИ-комплексов, и эффект этих взаимодействий на конформацию белка усиливался с повышением микровязкости МГДГ. Однако различия во влиянии МГДГ на конформацию антигена в составе ТИ-комплекса не отражались в уровне анти-НАО-антител, но коррелировали с различным влиянием МГДГ на содержание цитокина ГМ-КСФ. В связи с этим необходимо отметить, что, в отличие от специфического, неспецифический иммунный ответ не столько обусловлен конформацией отдельных специфических участков белка (антигенных детерминант), сколько пространственной структурой белкового антигена в целом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанные результаты исследований показывают возможность регуляции иммуногенности белкового антигена, инкорпорированного в ТИ-комплекс, путем изменения конформации белка под влиянием липидного окружения с разными физико-химическими свойствами. Так, умеренная микровязкость МГДГ из *U. fenestrata* и *S. pallidum* способствовала максимальному увеличению (в четыре раза) уровня антител против порина YOmpF из *Y. pseudotuberculosis* по сравнению с эффектом индивидуального белка, что коррелировало с умеренными конформационными изменениями порина.

Однако уровень антител против рекомбинантного мономера гемагглютинина вируса гриппа в составе ТИ-комплексов повышался в два раза независимо от физико-химических свойств МГДГ и соответствующих изменений конформации белка, которые, тем не менее, сопровождалась повышением уровня цитокина ГМ-КСФ, оказывающего разнообразные эффекты на иммунную систему, включая стимулирующее влияние на клеточно-опосредованные ответы. Максимальная продукция ГМ-КСФ наблюдалась под влиянием наиболее вязкого МГДГ из *Z. marina*, вызывавшего наибольшую релаксацию третичной структуры НАО.

Отсутствие сходного эффекта МГДГ на иммунный ответ против рекомбинантного мономера НАО вируса гриппа А и порина из *Y. pseudotuberculosis* свидетельствует о том, что иммунный ответ зависит не только от компонентов ТИ-комплекса и их соотношения [14], но и от особой структуры антигена в составе этой адьювантной системы доставки.

Отмеченные особенности взаимосвязи между липид-индуцируемыми конформационными изменениями белков и иммунным ответом, который они вызывают в составе ТИ-комплексов, способствуют более глубокому пониманию механизма действия липидсодержащих адьювантов и позволяют использовать преимущества липидной «нанофлюидики» как новой стратегии для повышения иммуностимулирующего потенциала липид-антигенных комплексов с применением разнообразных белков.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №15-15-00035).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Э. Я. Костецкий, Н. М. Санина, А. Н. Мазейка и др., Патент РФ № 2010115549 от 10.04.2012.
2. H.-X. Sun, Y. Xie, and Y.-P. Ye, *Vaccine* **27** (33), 4388 (2009).
3. A. Kezwon and K. Wojciechowski, *Adv. Colloid Interface Sci.* **209**, 185 (2014).
4. N. M. Sanina, E. Y. Kostetsky, V. L. Shnyrov, et al., *Biochimie* **94**, 1048 (2012).
5. N. Vorobieva, N. Sanina, V. Vorontsov, et al., *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 202 (2014).
6. N. M. Sanina, S. N. Goncharova, and E. Y. Kostetsky, *Phytochemistry* **65** (6), 721 (2004).
7. P. C. Calder, *Biochimie* **91** (6), 791 (2009).
8. W. Kim, Y. Y. Fan, R. Barhoumi, et al., *J. Immunol.* **181** (9), 6236 (2008).
9. I. A. Lee, A. M. Popov, N. M. Sanina, et al., *Acta Biochim. Pol.* **51** (1) 263 (2004).
10. N. M. Sanina, S. N. Goncharova, and E. Y. Kostetsky, *Phytochemistry* **69** (7) 1517 (2008).
11. О. Ю. Портнягина, О. Д. Новикова, О. П. Вострикова и др., *Вестн. ДВО РАН* **3**, 36 (2004).
12. О. Д. Новикова, Дис. ... д-ра. хим. наук (ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток, 2007).
13. A. Sjolander, J. C. Cox, and I. G. Barr, *J. Leukoc. Biol.* **64** (6), 713 (1998).
14. E. Y. Kostetsky, N. M. Sanina, A. N. Mazeika, et al., *J. Nanobiotechnol.* **9**, 35 (2011).
15. A. Sjölander, D. Drane, E. Maraskovsky, et al., *Vaccine* **19** (17–19), 2661 (2001).
16. S. P. Manly, K. S. Matthews, and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **24** (15), 3842 (1985).
17. E. Freire, *Comments Mol. Cell Biophys.* **6**, 123 (1989).
18. J. M. Sanchez-Ruiz, *Biophys. J.* **61**, 921 (1992).
19. B. I. Kurganov, A. E. Lyubarev, J. M. Sanchez-Ruiz, et al., *Biophys. Chem.* **69** (2–3), 125 (1997).
20. Е. А. Пермяков, *Метод собственной люминисценции белка* (Наука, М., 2003).
21. E. A. Burstein, N. S. Vedenkina, and M. N. Ivkova, *Photochem. Photobiol.* **18** (4), 263 (1973).
22. О. Д. Новикова, Н. Ю. Ким, В. П. Глазунов и др., *Биоорг. химия* **25** (2), 97 (1999).
23. D. C. Ekiert, R. H. E. Friesen, G. Bhabha, et al., *Science* **333** (6044), 843 (2011).
24. E. S. Sedova, D. N. Shcherbinin, A. I. Migunov, et al., *Acta Naturae* **4** (4), 17 (2012).
25. D. A. Steinhauer, *Virology* **258** (1), 1 (1999).
26. S. J. Gamblin and J. J. Skehel, *J. Biol. Chem.* **285** (37), 28403 (2010).
27. S. J. Gamblin, L. F. Haire, R. J. Russell, et al., *Science* **303** (5665), 1838 (2004).
28. J. Hagembe, MS Thesis (Northern Michigan University, Michigan, 2009).
29. M. Igarashi, K. Ito, R. Yoshida, et al., *PLoS One* **5** (1), e8553 (2010).
30. M. Prabakaran, F. He, T. Meng, et al., *J. Virology* **84** (22), 11822 (2010).
31. D. C. Jackson, R. J. Russell, C. W. Ward, et al., *Virology* **89** (1), 199 (1978).



32. J. R. Heyen, S. Ye, B. N. Finck, et al. *Mol. Brain Res.* **77** (1), 138 (2000).
33. Y. Shi, C. H. Liu, A. I. Roberts, et al., *Cell Res.* **16** (2), 126 (2006).
34. H. L. Kaufman, C. E. Ruby, T. Hughes, et al., *J. Immunother. Cancer* **2**:11(2014).
35. J. Bentz, A. Mittal, *Biochim. Biophys. Acta* **1614** (1), 24 (2003).

## **Lipid-Induced Changes of Protein Conformation as a Tool for Regulation of Immunogenicity of Antigens in the Composition of Tubular Immunostimulating Complexes**

**N.M. Sanina\***, **N.S. Vorobieva\***, **O.D. Novikova\*\***, **O.Y. Portniagina\*\***,  
**L.A. Davydova\***, **V.L. Shnyrov\*\*\***, and **E.Y. Kostetsky\***

*\*Far Eastern Federal University, ul. Sukhanova 8, Vladivostok, 690950 Russia*

*\*\*Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, East Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia*

*\*\*\*Universidad de Salamanca, Plaza Doctores de la Reina s/n, Salamanca, 37007 Spain*

Nanoparticles of tubular immunostimulating complexes, consisting of glycolipid monogalactosyldiacylglycerol from marine macrophytes (macroalgae and seagrasses), triterpene glycoside cucumarioside A<sub>2</sub>-2 from holoturian *Cucumaria japonica* and cholesterol, appears to be the most promising adjuvant carriers of antigens for modern subunit vaccines. Monogalactosyldiacylglycerol forms lipid matrix for antigen incorporated in tubular immunostimulating complexes. This paper discusses the influence of physicochemical properties of monogalactosyldiacylglycerol isolated from different species of marine macrophytes on conformation of two model proteins (OmpF-like porin from *Yersinia pseudotuberculosis* and recombinant influenza virus hemagglutinin) incorporated in tubular immunostimulating complexes, as well as application of modulating effect of monogalactosyldiacylglycerol to enhance the effectiveness of vaccine preparations.

*Key words: monogalactosyldiacylglycerol, porin, hemagglutinin, differential scanning calorimetry, intrinsic protein fluorescence, circular dichroism*