

Использование смешанных инфекций для одновременного экспонирования различных эпитопов вируса гриппа А на поверхности химерных частиц вируса табачной мозаики.

Научный руководитель – Гасанова Татьяна Владимировна

Королева А.А.¹, Гасанова Т.В.²

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра вирусологии, Москва, Россия, *E-mail: nastya_23_96@mail.ru*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра вирусологии, Москва, Россия, *E-mail: tv.gasanova@gmail.com*

Одной из серьезных генноинженерных проблем остается возможность эффективного накопления целевых гидрофобных белков и пептидов в культурах клеток и растений. Одним из способов решения данной проблемы оказался метод смешанных инфекций.

Ранее в нашей лаборатории были получены векторы на основе белка оболочки вируса табачной мозаики (БО ВТМ), содержащие последовательности консервативных эпитопов вируса гриппа А. Один из векторов (ВТМ-М2е-ala; мутант с заменой серина на аланин в 17 и 19 положениях) содержал в С-концевой области белка оболочки М2е эпитоп, представляющий собой внеклеточный домен матриксного белка М2, а другой (ВТМ-fp) - пептид слияния (fusion peptide, fp) гемагглютинаина [1]. Полученные векторы в составе бинарных плазмид, были трансфецированы в клетки почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* с последующей инфильтрацией листьев растений *Nicotiana benthamiana*.

В отличие от эффективного накопления частиц ВТМ-М2е, частицы ВТМ-fp, вызывали системные некрозы, угнетение роста и быструю гибель растения, что не позволило накопить мутантные вирусные частицы в растениях в достаточном количестве; рекомбинантный белок оболочки обнаруживался в неинокулированных листьях только с помощью иммуноблоттинга. Симптомы и развитие смешанных инфекций ВТМ-М2е + ВТМ-fp были значительно мягче и проявлялись в виде белого хлороза на верхних неинокулированных листьях.

Наличие и генетическая стабильность вирусных частиц подтверждалась с помощью обратной транскрипции с последующим ПЦР-анализом РНК из инфицированных листьев и очищенных частиц. Одновременная экспрессия обоих антигенов в системных листьях была подтверждена окрашиванием Кумасси и Вестерн-блоттингом. Электронная микроскопия подтвердила, что мновалентные частицы по морфологии напоминают ВТМ дикого типа, а иммуноэлектронная микроскопия растительных экстрактов доказала, что чужеродные эпитопы расположены на поверхности химерных вирионов.

Таким образом, благодаря смешанным инфекциям появляется возможность значительно эффективнее (как минимум, в 5-7 раз) накапливать модифицированные вирионы, а также получать химерные частицы ВТМ, содержащие на поверхности одновременно два эпитопа: М2е и fp; можно предполагать, что использование подобных частиц повысит иммуногенность и протективность нановакцин против гриппа.

Источники и литература

- 1) 1) Petukhova N.V., Gasanova T.V., Stepanova L.A., Rusova O.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., Skurat E.V., Tsybalova L.M., Kiselev O.I., Ivanov P.A., Atabekov J.G. Immunogenicity and protective efficacy of candidate universal influenza a nanovaccines produced in plants by tobacco mosaic virus-based vectors // Current Pharmaceutical Design. 2013. Vol. 19, No. 31. P. 5587–5600.