

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ «ТЕНИ» – НОВАЯ СТРАТЕГИЯ СОЗДАНИЯ ЭФФЕКТИВНЫХ ВАКЦИН И ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
Министерства здравоохранения Республики Беларусь

Статья посвящена актуальному направлению современной иммунологии – созданию новых эффективных средств профилактики и регуляции функций иммунной системы на основе технологии получения бактериальных «теней». «Тени» бактерий представляют собой клеточные стенки грамотрицательных бактерий, лишенные содержимого цитоплазмы. Рассматриваются: механизм формирования бактериальных «теней», индукция иммунного ответа на бактериальные «тени» у экспериментальных животных, использование «теней» в качестве средства доставки мишеней к тканям человека и животных.

Борьба с инфекциями в 3-м тысячелетии вступила в новый этап развития и разработки новых подходов в создании средств специфической и неспецифической профилактики.

Ключевые стратегии вакцинации, иммунотерапии и пассивного лечения антителами основываются на сильном, кооперативном ответе иммунной системы в отношении закономерностей патогенных микроорганизмов. Вскрытие механизмов иммунного ответа против конкретных патогенов открывает новые пути для новых стратегий профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Естественные механизмы иммунной защиты организма человека базируются как на функции постоянно расположенных в тканях клетках иммунной системы, так и на миграции в случае необходимости дополнительных типов и количеств клеток в очаг инфекции. Быстрая ответная реакция иммунной системы организма в значительной степени обусловлена наличием специализированных рецепторов на мембране клеток, известных как толл (toll-like)-рецепторы. Эти рецепторы способны взаимодействовать с полимерными структурами микроорганизмов (белками, гликопротеидами, липопро-теидами, РНК и ДНК). Рецепция данных молекул клетками ассоциируется с процессом активации. Установлено, что толл-рецепторы экспрессированы на моноцитах, макрофагах, нейтрофилах, дендритных клетках, НК-клетках. Толл-рецепторы – семейство молекул, состоящее из 11 трансмембранных одноцепочечных белков-рецепторов со сходным строением. Молекулы толл-рецепторов имеют внеклеточную часть, представленную 19-25 tandemно-повторяющимися участками с повышенным содержанием лейцина, трансмембранную часть и внутриклеточную часть (гомологичную внутриклеточному домену ИЛ-1). Фрагменты этих рецепто-

ров напрямую взаимодействуют с миеломоноцитарным рядом сходных структурных компонентов различных патогенов, называемых молекулярными паттернами-PAMP (pathogen-associated molecular patterns), образуя активационные комплексы. Примерами молекулярных паттернов служат липополисахариды (ЛПС) грам-отрицательных бактерий, пептидогликаны грамположительных микроорганизмов, вирусная двуспиральная РНК, а также ДНК, богатая SpolyG последовательностями, что характерно для ДНК-бактерий. Проведение активационного сигнала, индуцированного толл-рецепторами, происходит с участием нескольких вспомогательных молекул-CD11/CD18, CD14, MD2, ЛСБ и др.[1]. Рядом исследователей из Австрии и Германии была показана возможность использования бактериальных «теней» (оболочек) как эффективных иммуномодуляторов, восстанавливающих и корригирующих функции иммунной системы, посредством их воздействия на «структурораспознающие» толл-рецепторы [10,14]. Бактериальными «тенями» являются клеточные оболочки грамотрицательных бактерий, лишенных цитоплазматического содержимого и в то же время сохраняющих свою морфологию и нативные поверхностные антигенные структуры, включая адгезивные свойства [11,12,13,14].

Одним из условий успешной вакцинации против какого бы то ни было инфекционного заболевания является высокая эффективность используемого иммунобиологического препарата, проявляющаяся в развитии мощного специфического иммунологического ответа. Для повышения иммунологической эффективности вакцин используют специальные вещества-адьюванты, которые, в силу своих неспецифических свойств не только пролонгируют действие иммуногенной составляющей вакцинного препарата, но (и глав-

ным образом) стимулируют активность клеток иммунной системы, усиливают продукцию необходимых цитокинов и улучшают антигенпрезентацию. В качестве адъювантов традиционно используют такие вещества, как оксид алюминия, термолабильный токсин *E. coli*, липид А наружной мембраны грамотрицательных бактерий, полисахариды клеточных стенок бактерий, адъювант Фрейнда, лектины, искусственно полученные липосомы и пр. Одним из эффективных подходов к вакцинации в этом смысле является использование бактериальных «теней», которые, с одной стороны, продуцируют развитие специфического гуморального и/или клеточного ответа, а с другой-являются системой, обладающей внутренними адъювантными свойствами [8].

Способы получения бактериальных «теней».

Одним из методов получения «теней», т.е. оболочек бактериальных клеток, является достижение экспрессии в клетках грамотрицательных бактерий гена *E* фага ϕ X174, отвечающего в природе за выход фагового потомства из бактериальной клетки во внешнюю среду путем лизиса клетки. Ген *E* кодирует мембранный гидрофобный белок, состоящий из 91 аминокислотного остатка. Образовавшийся в результате экспрессии гена белок *E* ингибирует процесс синтеза клеточной стенки у грамотрицательных бактерий путем его встраивания во внутреннюю мембрану. Это, в свою очередь, приводит к слиянию внешней и внутренней мембран с формированием трансмембранного отверстия (туннеля) диаметром 40-200 нм. Через этот канал происходит экзо-цитоз всего цитоплазматического содержимого, при сохранении относительной структурной целостности клеточной оболочки [6,7]. В результате образуются пустые клеточные оболочки, лишенные нуклеиновых кислот, рибосом и других компонентов [5,3,10].

Движущей силой экзоцитоза цитоплазматического содержимого из клеток является разница в осмотическом давлении между внутренней средой клетки (цитоплазмой) и наружной средой, которые сообщаются туннельной структурой, образованной *E*-белком. За исключением отверстия, образовавшегося в результате лизиса, морфология бактерии, включая все поверхностные структуры клетки, остается интактной. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что состав муреинового слоя клеток также не подвергается значительным изменениям в результате *E*-опосредованного лизиса. Что же касается фосфолипидного слоя, то некоторые изменения, обусловленные действием белка *E*, скорее всего, усиливают слияние наружной и внутренней мембран [10].

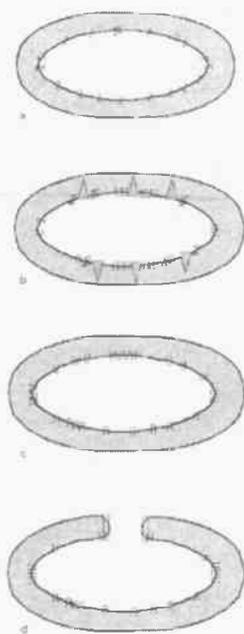


Рис.1. Схематическое изображение формирования бактериальных «теней» (a-d – этапы образования, Δ-потенциальные зоны клеточного деления)

Современная рабочая модель *E*-опосредованного лизиса включает три этапа и представлена на рис. 1.

Этап 1: интеграция белка *E* во внутреннюю мембрану (С-концевая часть молекулы обращена к цитоплазме (Рис. 1а);

Этап 2: конформационное изменение белка *E* (перенос С-концевой части молекулы через внутреннюю мембрану и сборка в мультимеры в потенциальных местах клеточного деления (Рис. 1b, c);

Этап 3: локальное слияние наружной и внутренней мембран вследствие переноса С-концевого домена белка *E* к поверхности наружной мембраны (рис. 1d).

Электронно-микроскопические исследования «теней» подтверждают, что белок *E*-специфические трансмембранные туннели, пронизывающие клеточные мембраны, образуются не случайно, а только в участках потенциального разделения клетки, преимущественно в ее середине, либо в полярных областях (рис. 1b). Показано, что мутантные штаммы бактерий с дефектами клеточного деления (*ftsZ84*, *ftsA12*) толерантны к белок *E*-опосредованному лизису, в то время как другие типы мутантов (например, *ftsA3*, *ftsQ* и *ftsI*) подвергаются лизису. Это подтверждает предположение о том, что инициация клеточного деления играет существенную роль в *E*-опосредованном лизисе бактериальных клеток [15].

Было продемонстрировано, что для *E*-опосредованного лизиса бактериальных клеток необходимо наличие в клеточной стенке двухмембранной системы. Экспрессия гена *E* у грамположительных бактерий приводит к гибели, но не лизису клеток [3].

Создание генно-инженерных конструкций. В основу технологии получения бактериальных «теней» закладывается создание генно-инженерных конструкций, содержащих ген *E* фага ϕ X174. Экспрессия гена *E* может быть поставлена под контроль термочувствительного промотора λP_R , регулируемого температурочувствительным белком-репрессором *cl*, либо химически индуцированного промотора лактозного оперона, что необходимо для получения продукции бактериальных «теней» посредством протеин *E*-опосредованного лизиса [2,9,10,11].

Было получено несколько *E*-специфических лизисных плазмид с различными маркерами устойчивости, точками начала репликации и различным контролем экспрессии гена *E* [2]. На рис.2 схематически представлены различные *E*-специфические лизисные плазмиды. Различные плазмиды содержат лизисные кассеты, включающие ген *E* бактериофага ϕ iX174 под контролем термочувствительного промотора фага

лямбда λP_R (pAW12, pML1) или промотора лактозного оперона *LacPO* (pUH51) и соответствующих репрессоров *cl857* и *lacI*.

В большинстве случаев для получения «теней»

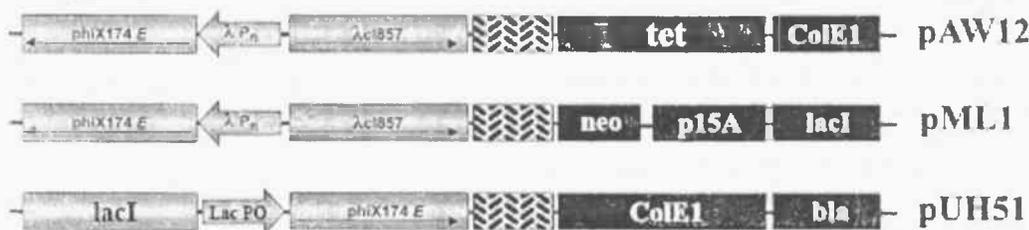


Рис.2. Схематическая презентация *E*-специфических лизисных плазмид

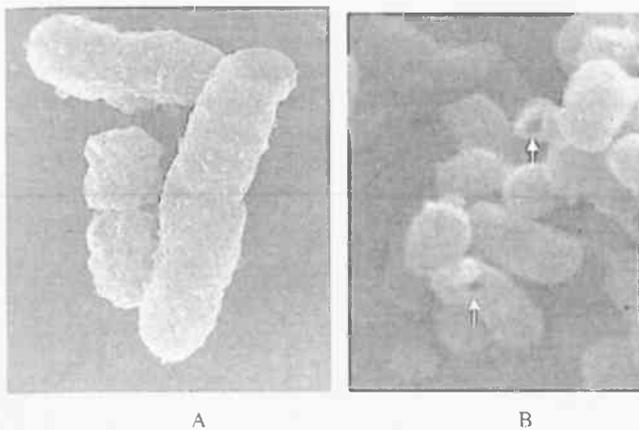


Рис.3. Сканирующая электронная микрография типичных бактериальных «теней»: А – бактериальные клетки, растущие при 28°C; В – лизированные клетки (бактериальные «тени»), полученные при сдвиге температуры инкубации до 42°C; стрелками показаны лизисные отверстия в клеточных оболочках

используются системы, в которых экспрессия гена *E* находится под контролем температурочувствительного белка-репрессора. В различных лизисных плаزمидов экспрессия гена *E*, которая является летальной для клетки-хозяина, контролируется правонаправленным промотором фага лямбда (λP_R) и соответствующим температурочувствительным репрессором *cI857*, который инактивируется при температурах выше, чем 30°C. Бактериальный лизис вследствие экспрессии гена *E* индуцируется посредством температурного шифта культивирования бактериальной культуры с 28°C до 42°C [8].

Таким образом, для получения первой генерации бактериальных «теней», бактерии выращиваются при 28°C до середины лог-фазы, а затем поднятием температуры до 42°C индуцируется их лизис.

Модели бактериальных «теней». Протеин *E*-опосредованный лизис был получен в различных грамотрицательных бактериях, включая: *E.coli* штамм K12, энтерогеморрагический штамм *E.coli* (EHEC), *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Vibrio cholerae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*(App), *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha* и *Pectobacterium* (*Erwinia*) *cypripedii* [9].

Этот длинный список бактерий показывает, что *E*-опосредованный лизис применим для любых грамотрицательных бактерий, и лизисная кассета может быть введена в новую реципиентную клетку с помощью соответствующего вектора, осуществляющего правильный контроль экспрессии гена *E*. На Рис.3 показан процесс образования бактериальных «теней».

Индукция иммунного ответа на бактериальные тени у экспериментальных животных. В целях изучения закономерностей иммунного ответа на бактериальные «тени» были использованы различные экспериментальные животные, включая мышей, кроликов, лис и свиней и различные способы их иммунизации: внутрибрюшинно, подкожно, либо аэрогенный путь.

Lubitz и Witte (1999) использовали аэрогенный путь иммунизации экспериментальных животных для того, чтобы

индуцировать полную защиту против пневмонии свиней, вызываемую патогенными бактериями *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Аэрозольная вакцинация свиней с использованием бактериальных «теней», полученных из *Actinobacillus pleuropneumoniae*, обеспечила полную защиту животных после введения летальной дозы патогена и сопровождалась повышением количества плазматических клеток, лимфоцитов и продукции антител. Для группы животных, вакцинированных аэрозольно бактериальными «тенями», было показано существенное увеличение иммуноглобулинов классов IgA и IgM в бронхоальвеолярной жидкости. В дальнейших исследованиях, в которых бактериальные «тени» *A. pleuropneumoniae* вводились внутримышечно, было показано, что иммунизация защищала не только от первичного инфекционного заражения, но и предотвращала развитие заболевания у ранее инфицированных особей [3,4].

«Тени», полученные из *Vibrio cholerae* (VCG) и вводимые внутрибрюшинно мышам, вызывали высокие уровни специфических IgG иммунных ответов. Введение кроликам бактериальных «теней», полученных из серотипов O1 и O139 *V. cholerae*, также вызывало образование специфических антител в высоких титрах. Рядом исследований [3,4,15] было также показано, что антитела, образованные в результате иммунного ответа на бактериальные «тени» VCG, способны защитить новорожденных мышей от холерного вибриона.

Другие эксперименты показали, что однократное введение «теней» *E. coli* O78 и K80 однодневным цыплятам внутримышечно, либо с питьевой водой повышало их выживаемость по сравнению с контрольной группой [3]. К аналогичным результатам привело введение мышам «теней» *E. coli* O157:H7: выживаемость уже после первого введения была значительно выше, чем у контрольной группы [11].

Изучение иммунного ответа на различных моделях экспериментальных животных показало, что бактериальные «тени» индуцируют гуморальный и клеточный иммунитет. При этом все эксперименты с вакцинацией бактериальными «тенями» проводились с использованием препаратов, представленных в различных субстанциях: лиофильно высушенных «теней» (аэрозольная вакцинация), лиофильно высушенных «теней», ресуспендированных в физиологическом растворе или воде для внутримышечного, либо перорального введения, и без применения адъювантов, стабилизаторов и других веществ [2,3]. Как известно, адъюванты повышают эффективность вакцин за счет своего основного свойства пролонгировать действие иммуногенной составляющей вакцинного препарата, а также стимулировать активность иммунной системы посредством активации макрофагов и антиген-презентирующих клеток и высвобождения иммуномодуляторов. Бактериальные «тени» содержат такие хорошо известные иммуностимулирующие соединения, как липополисахариды или липид А и пептидогликан, которые позволяют им повышать иммунный ответ против специфических антигенов, а также, взаимодействуя со специфическими рецепторами, активировать иммунную систему посредством макрофагов, дендритных клеток. Эндотелиальные клетки реагируют на компоненты бактериальной клеточной стенки посредством высвобождения противовоспалительного цитокина ИЛ-6 и *de novo* экспрессией *E*-селектина. CD14, мембранный антиген, экспрессируемый на поверхности моноцитов и макрофагов, но не на эндотелиальных клетках, действует как рецептор для ЛПС и ЛПС, связанных с ЛПС-связывающим белком (ЛПБ). ЛПС/ЛПБ комп-

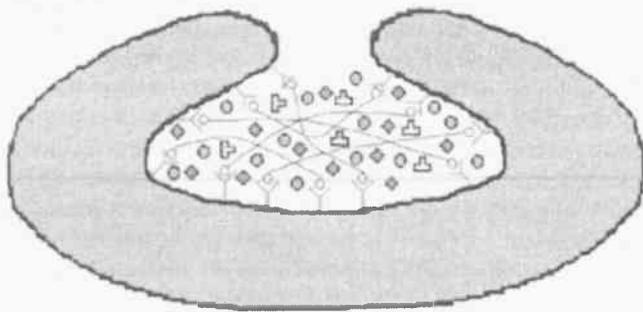


Рис. 4. Антигены, прикрепленные к внутренней стороне цитоплазматической мембраны бактериальной «тени»

лекс связывается с растворимой формой CD14 (sCD14), присутствующей в плазме здоровых индивидуумов, и активирует эндотелиальные клетки. Было показано, что человеческие эндотелиальные клетки пупочной вены (HUVEC) отвечали на введение бактериальных «теней» *E.coli* O26:B6 высвобождением ИЛ-6 и экспрессией поверхностного Е-селектина [3].

Бактериальные «тени» как средство доставки мишеней к тканям человека и животных. Свойство бактериальных теней сохранять компоненты клеточных оболочек, включая такие биоадгезивные структуры как фимбрии, дает возможность использовать «тени» для прикрепления специфических мишеней и их целевой доставки к различным тканям органов человека и животных. Клеточные оболочки, полученные, к примеру, из энтеробактерий, могут служить для доставки антигенов в желудочно-кишечный тракт благодаря своей антигенной поверхности: поскольку «тени» легко распознаются макрофагами, то они представляют собой хороший инструмент для доставки вакцин и медицинских препаратов к М-клеткам кишечника. Благодаря тому, что свойство распознавания рецепторов у бактериальных «теней» такое же, как и у живых аналогов бактерий, то они прикрепляются к тем же поверхностям тканей, к которым прикрепляются патогенные микроорганизмы, из которых они были получены. Поэтому данное качество делает «тени» хорошо приспособленными для доставки материала-мишени, заключенного внутри оболочки бактериальной «тени», либо заякоренных (встроенных) на поверхности бактериальных оболочек чужеродных иммуногенных детерминант, к специфическим поверхностям тканей животных или человека [12].

Использование одной из модификаций получения бактериальных «теней» посредством Е-опосредованного лизиса, где высокие концентрации соли сульфата магния ($MgSO_4$) позволяют подавлять образование трансмембранного туннеля, а последующее центрифугирование и ресуспендирование осажденных клеток в воде или буфере слабой ионной силы приводит к их быстрому лизису, позволило получить бактериальные «тени» с большими размерами пор [3]. Электронные микрофотографии свидетельствуют о том, что такой метод получения лизированных клеток индуцирует образование пор большего диаметра. Бактериальные «тени» с такими большими порами могут быть использованы как пустые «мешки», которые можно наполнить различными необходимыми для доставки в организм веществами. Внутриклеточное пространство бактериальных «теней» может быть заполнено как водорастворимыми веществами, так и эмульсиями, но необходимо, чтобы нужное вещество было прикреплено к внутренней стороне цитоплазма-

тической мембраны (рис.4). Для прикрепления к мембране чужеродного антигена могут быть использованы различные молекулы. В частности, представляется актуальным заполнение внутреннего пространства бактериальных «теней» декстраном, который обладает хорошей способностью связывания с пептидами, лекарственными препаратами и другими веществами. Было также показано, что нуклеиновые кислоты также могут быть эффективно «упакованы» в бактериальные «тени» [10].

Избирательная доставка медицинских препаратов к определенным тканям может не только уменьшить дозу препарата и свести к минимуму их побочное действие, но и значительно увеличить эффективность медикаментозного лечения во многих случаях в связи с тем, что бактериальные «тени» сохраняют клеточные стенки в нативном состоянии, включая биоадгезивные структуры, и это позволяет им прикрепляться к определенным тканям-мишеням, таким как слизистые поверхности желудочно-кишечного тракта и слизистые дыхательных путей. Поразительно большая ёмкость бактериальных теней для переноски чужеродных антигенов обеспечивается периплазматическим пространством, мембранами и внутренней полостью, и в будущем должна быть использована для создания новых комплексных вакцин. Однако, многие вопросы до сих пор остаются невыясненными, в частности, какой из методов создания бактериальных «теней» является наиболее эффективным в плане индукции иммунного ответа: с использованием свободно упакованных антигенов во внутреннем пространстве или в форме прикрепленных к внутренней мембране. Очевидно, что различные комбинации антигенов потребуют применения различных способов для создания эффективных вакцин и их презентации иммунной системе. Методы получения и наполнения бактериальных «теней» в настоящее время находятся в стадии разработки.

Заключение. Таким образом, способность бактериальных «теней» индуцировать гуморальной и клеточной иммунитет и являться системой, обладающей внутренними адьювантными свойствами, открывает большие возможности для создания новых эффективных средств профилактики и регуляции функций иммунной системы. Технология получения бактериальных «теней» дает возможность создания оригинальных комбинированных вакцин для человека и животных с использованием препаратов бактериальных «теней». Использование таких препаратов в качестве иммуномодуляторов является одной из новых стратегий эффективной иммунологической защиты организма посредством активации иммунокомпетентных клеток. Несомненно, бактериальные «тени» обладают большим стратегическим потенциалом и в плане доставки лекарственных препаратов, что позволит значительно увеличить эффективность медикаментозного лечения.

Литература

1. Титов, Л. П., Карпов, И. А. Противовирусный иммунитет: молекулярно-клеточные механизмы, закономерности развития и иммунопатология. (Лекции) // Медицинский журнал. 2007. № 1(19).
2. Ebensen, T., Paukner, S., Link, C., Kudela, P., de Domenico, C., Lubitz, W., Guzman, C.A. Bacterial ghosts are an efficient delivery system for DNA vaccines // The Journal of Immunology. -- 2004. № 172. P. 6858 – 6865.
3. Eko, F.O., Witte, A., Huter, V., Kuen, B., Furst-Ladani, S., Haslberger, A., Katinger, A., Hensel, A., Szostak, M.P., Resch, S.,

Maderb, H., Raza, P., Brand, E., Marchart, J., Jechlinger, W., Haidinger, W., Lubitz, W. New strategies for combination vaccines based on the extended recombinant bacterial ghost system // *Vaccine*. 1999 №17. P. 1643 – 1649.

4. *Felnerova, D., Kudela, P., Bizik, J., Haslberger, A., Hensel, A., Saalmuller, A., Lubitz, W.* T cell-specific immune response induced by bacterial ghosts // *Med Sci Monit*. 2004. № 10. P.362 – 370.

5. *Haidinger, W., Szostak, M.P., Jechlinger, W., Lubitz, W.* Online monitoring of *Escherichia coli* ghost production // *Applied and Environmental Microbiology*. 2003. Vol. 69, № 1. P. 468 – 474.

6. *Haidinger, W., Mayr, U. B., Szostak, M. P., Resch, S., Lubitz, W.* *Escherichia coli* Ghost Production by Expression of Lysis Gene E and Staphylococcal Nuclease // *Applied and environmental microbiology*. 2003. P. 6106 – 6113.

7. *Huter V., Szostak, M., Gampfer, J., Prethaler, S., Wanner, G., Gabor, F., Lubitz, W.* Bacterial ghosts as drug carrier and targeting vehicles // *Journal of Controlled Release*. 1999. № 61. P. 51 – 63.

8. *Jalava, Katri, Eko Franci, O., Riedmann, Eva, Lubitz, Werner.* Bacterial ghosts as carrier and targeting systems for mucosal antigen delivery // *Expert Review of Vaccines*. February, 2003. V.2 N. 1. P. 45 – 51.

9. *Lubitz, W.* Bacterial ghosts as carrier and targeting systems. *Expert opinion on biological therapy*. 2001. Vol. 1, № 5. P. 765 – 771.

10. *Lubitz, W., Witte, A., Kamal, M., Jechlinger, W., Brand, E., Marchart, J., Haidinger, W., Huter, V., Felnerova, D., Stralis-Alves, N., Lechleitner, S., Melzer, H., Szostak, M.P., Resch, S., Mader, H., Kuen, B., Mayr, B., Mayrhofer, P., Geretschla, R., Haslberger, A., Hensel, A.* Extended recombinant bacterial ghost system // *Journal of Biotechnology*. 1999. № 73. P. 261 – 273.

11. *Mayr, U., Haller, C., Haidinger, W., Atlasheuskaya, A., Bukin, E., Lubitz, W., Ignatyev, G.* Bacterial Ghosts as an Oral Vaccine: a Single Dose of *Escherichia coli* O157:H7 Bacterial Ghosts Protects Mice against Lethal Challenge // *Infection and immunity*. 2005. P. 4810 – 4817.

12. *Paukner, S., Kudela, P., Kohl, G., Schlapp, T., Friedrichs, S., Lubitz, W.* DNA-Loaded Bacterial Ghosts Efficiently Mediate Reporter Gene Transfer and Expression in Macrophages // *Molecular Therapy*. 2005. № 11. P. 215 – 223.

13. *Tabrizi, C.A., Walcher, P., Mayr, U.B., Stiedl, T., Binder, M., McGrath, J., Lubitz, W.* Bacterial ghosts – biological particles as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs // *Current Opinion in Biotechnology*. 2004. Vol. 15, Issue 6. P 530 – 537.

14. *Walcher, P., Mayr, U.B., Azimpour-Tabrizi, C., Eko, F.O., Jechlinger, W., Mayrhofer, P., Alefantis, T., Mujer, C.V., DelVecchio, V.G., Lubitz, W.* Antigen discovery and delivery of subunit vaccines by nonliving bacterial ghost vectors // *Expert Review of Vaccines*. 2004. Vol. 3, No. 6. P. 681 – 691.

15. *Witte, A., Lubitz, W.* Biochemical characterization of PhiX174-protein-E-mediated lysis of *Escherichia coli* // *Eur. J. Biochem*. 1989. № 180. P. 393 – 398.