



УДК 547.963.32+577.21

КОНСТРУИРОВАНИЕ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ПЕНТАМЕРНОГО СУПЕРСПИРАЛЬНОГО ФРАГМЕНТА СОМР: I. СВОЙСТВА ГИБРИДА, СОДЕРЖАЩЕГО ИММУНОДОМИНАНТНЫЙ УЧАСТОК ОСНОВНОГО ПОВЕРХНОСТНОГО БЕЛКА ПЛАЗМОДИЯ *Plasmodium falciparum*

© 2004 г. С. Ю. Белицкая[#], Е. Ф. Болдырева, В. Г. Коробко

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 05.09.2002 г. Принята к печати 30.09.2002 г.

С целью отработки оптимизированных схем презентации В-клеточных эпитопов при вакцинации химерными белками без применения адъювантов сконструирован олигомерный химерный белок DB-1, содержащий иммунодоминантные участки основного поверхностного белка малярийного плазмодия *Plasmodium falciparum* и токсина столбняка. В качестве матрицы олигомеризации использован фрагмент пентамерного суперспирального белка СОМР (cartilage oligomeric matrix protein) человека. Изучена экспрессия белка в клетках *E. coli*, разработан способ его очистки и определены основные биохимические свойства.

Ключевые слова: домен пентамеризации; *Plasmodium falciparum*; рекомбинантные вакцины; суперспиральные белки.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка вакцин нового поколения – одна из важных задач современной иммунологии. В последние годы благодаря технологиям рекомбинантных ДНК на первый план вышли исследования по созданию субъединичных рекомбинантных вакцин на основе белков болезнетворных бактерий и вирусов или отдельных иммунодоминантных участков этих молекул [1, 2]. Такие вакцины относительно просты в получении и безопасны, так как не содержат болезнетворных микроорганизмов или их токсинов, но, к сожалению, обычно слабо иммуногенны и требуют применения адъювантов. Единственным адъювантом, разрешенным для применения при вакцинации человека, является смесь солей алюминия с его гидроокисью. Другие адъюванты, хотя и обладают значительно более сильными иммуногенными свойствами, крайне токсичны и не применяются для вакцинации [2].

Очевидно, необходимо конструирование таких рекомбинантных вакцин, которые могли бы быть эффективны без применения адъюванта. Одним из подходов к решению этой проблемы могут быть вакцины на основе олигомерных рекомбинантных белков. Каждый мономер подобного белка-носителя должен содержать как В-, так и

Т-клеточные эпитопы, эффективность представления которых будет значительно выше благодаря увеличению их количества в олигомере [1].

Цель настоящей серии работ – создание олигомерных белков, содержащих В- и Т-клеточные эпитопы, которые должны обладать потенциально высокой иммуногенностью и служить исходными продуктами для создания вакцин на их основе. В качестве домена для олигомеризации рекомбинантного продукта мы выбрали (28–77)-фрагмент белка СОМР (cartilage oligomeric matrix protein) человека, способный образовывать ригидные пентамерные супер- α -спиральные (coiled coil) структуры [3–5]. Кроме того, при конструировании химерного белка мы использовали известный Т-клеточный эпитоп – иммунодоминантный участок токсина столбняка Р2, обладающий функциями эффективного носителя для презентации различных В-клеточных эпитопов [6–8].

Очевидно, что иммунная специфичность создаваемой вакцины должна обуславливаться В-клеточными эпитопами, входящими в ее состав. В данной работе в качестве модельного В-клеточного эпитопа мы выбрали иммунодоминантный участок основного поверхностного белка CSP (circumsporozoite protein) спорозойта *Plasmodium falciparum* – (NANP)₆, традиционный компонент многих противомаларийных вакцин [9–14].

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-69-83; эл. почта: lap08@mail.ru).

Попытка создания вакцины против малярии, вызываемой *P. falciparum*, не случайна. Именно этот вид малярии вызывает около трех миллионов смертей ежегодно, особенно среди детей и беременных женщин. В последнее время проблема малярии в силу целого ряда причин существенно обострилась. Во-первых, возросла устойчивость малярийного плазмодия к известным противомалярийным препаратам, а его переносчика *Anopheles* – к инсектицидам. Во-вторых, в последние годы наблюдается существенная миграция неиммунизированного населения в малярийные зоны. Все это делает проблему разработки противомалярийной вакцины особенно актуальной [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование вектора экспрессии. Первым этапом работы явилось создание плазмиды, экспрессирующей мономер целевого рекомбинантного белка с предполагаемой противомалярийной активностью. В качестве исходной была взята плаزمида рDLMNH3, кодирующая домен пентамеризации белка COMP человека и содержащая уникальные сайты клонирования *NdeI*, *NheI*, *BglII*, *XhoI* и *HindIII*, а также шарнирные участки IgA человека и шестичленную гистидиновую последовательность. Плазмиду рDLMNH3 расщепляли рестриктазами *BglII/XhoI* и лигировали с фрагментом ДНК, кодирующим иммунодоминантный участок токсина столбняка P2 [6] (рис. 1). Домен пентамеризации – PD – включал в себя 50 а.о. белка COMP (остатки 28–77) [3–5] – GDLGPQMLRELQETNAALQDVRDYLRQLVREJLFLNNTVMECDACGMQQT – и был ограничен с двух сторон шарнирными участками IgA человека – 15 а.о. (остатки 229–243) – PPTPSPST-PPTPSPS [15].

Домен P2 (остатки 830–843) – один из двух иммунодоминантных участков токсина столбняка, способных эффективно активировать Т-клетки CD4⁺ при презентации различными вариантами молекул главного комплекса гистосовместимости класса II [6]. Использование его в данной работе связано с принципиальной возможностью участка P2 выступать в качестве носителя для В-клеточных эпитопов при создании вакцин [7]. Такой носитель способен обеспечивать высокий уровень продукции антител на В-клеточный эпитоп, входящий в состав рекомбинантной вакцины, и поддержание этого уровня в течение длительного периода. В настоящем исследовании мы применили удлиненный фрагмент P2 (остатки 828–846) – RSGGGQYJKANSKFKJLJTESGLE-, способный обеспечить лучшую стимуляцию специфических Т-клеточных клонов [8].

Фрагмент ДНК, кодирующий домен P2 токсина столбняка, получали отжигом дезоксиолигонуклеотидов (I), (II) и (III), (IV), кодирующих “плюс”- и “минус”-цепи дуплекса и обеспечиваю-

щих сайты клонирования *BglII* и *XhoI* на 5'- и 3'-концах целевого дуплекса соответственно (рис. 2а).

5' → 3'

ATCTGGTGGCGGTCAGTATATCAAAGCT (I);
AACAGCAAATTTATCGGTATCACT-
GAATCTGGTC (II);

TTTGCTGTTAGCTTTGATATACTGACCGC-
CACCA (III);

CGAGACCAGATTCAGTGATACCGATAAA (IV).

В итоге была получена плаزمида рDLMNH3-1.

Плазмиду рDLMNH3-1 использовали в качестве источника фрагмента для дальнейшего клонирования. Вектором служила плаزمида рЕТ20b(+), содержащая промотор РНК-полимеразы фага Т7 (рис. 1) и способная в клетках с системой DE3, эффективно экспрессировать рекомбинантный белок при низких концентрациях IPTG (0,05 мМ). В результате была получена плазмида рDB, которую на завершающем этапе конструирования целевой плазмиды обрабатывали рестриктазами *NdeI/NheI* и лигировали с фрагментом ДНК, кодирующим иммунодоминантный участок основного поверхностного белка CSP – (circumsporozoite protein) спорозонта *P. falciparum* – (NANP)₆.

Фрагмент получали путем отжига дезоксиолигонуклеотидов (V)–(VII) и (VIII)–(X), кодирующих “плюс”- и “минус”-цепи дуплекса и обеспечивающих сайты клонирования *NdeI* и *NheI* на 5'- и 3'-концах целевого дуплекса соответственно (рис. 2б).

5' → 3'

TATGAATGCGAACCCGAACGCGAATCC (V);

GAATGCGAACCCGAACGCGAATCC (VI);

GAATGCGAACCCGAACGCGAATCCGG (VII);

TAGCCGATTCGCGTTCGGGTTC (VIII);

GCATTCGGATTCGCGTTCGGGTTC (IX);

GCATTCGGATTCGCGTTCGGGTTCGCATTCA (X).

В итоге была получена плазмида рDB-1 (рис. 1).

Белок CSP составляет более 95% поверхностных белков спорозонта малярийного плазмодия и является мишенью для иммунной системы человека [10]. Он состоит из 400 а.о., но основное внимание при попытках создания рекомбинантных вакцин против малярии сосредоточено на центральной части белка, представляющей собой видоспецифические тандемно расположенные повторы из четырех аминокислотных остатков Asn-Ala-Asn-Pro (NANP). Для большинства штаммов *P. falciparum* последовательность повторов NANP является преобладающей для центральной части поверхностного белка спорозонта [11]. Ранее было продемонстрировано, что высокий титр антител против этой последовательности может блокировать презритроцитарную стадию развития малярийного плазмодия в организме и, следовательно, предотвращать возникновение заболевания [9, 12–14].

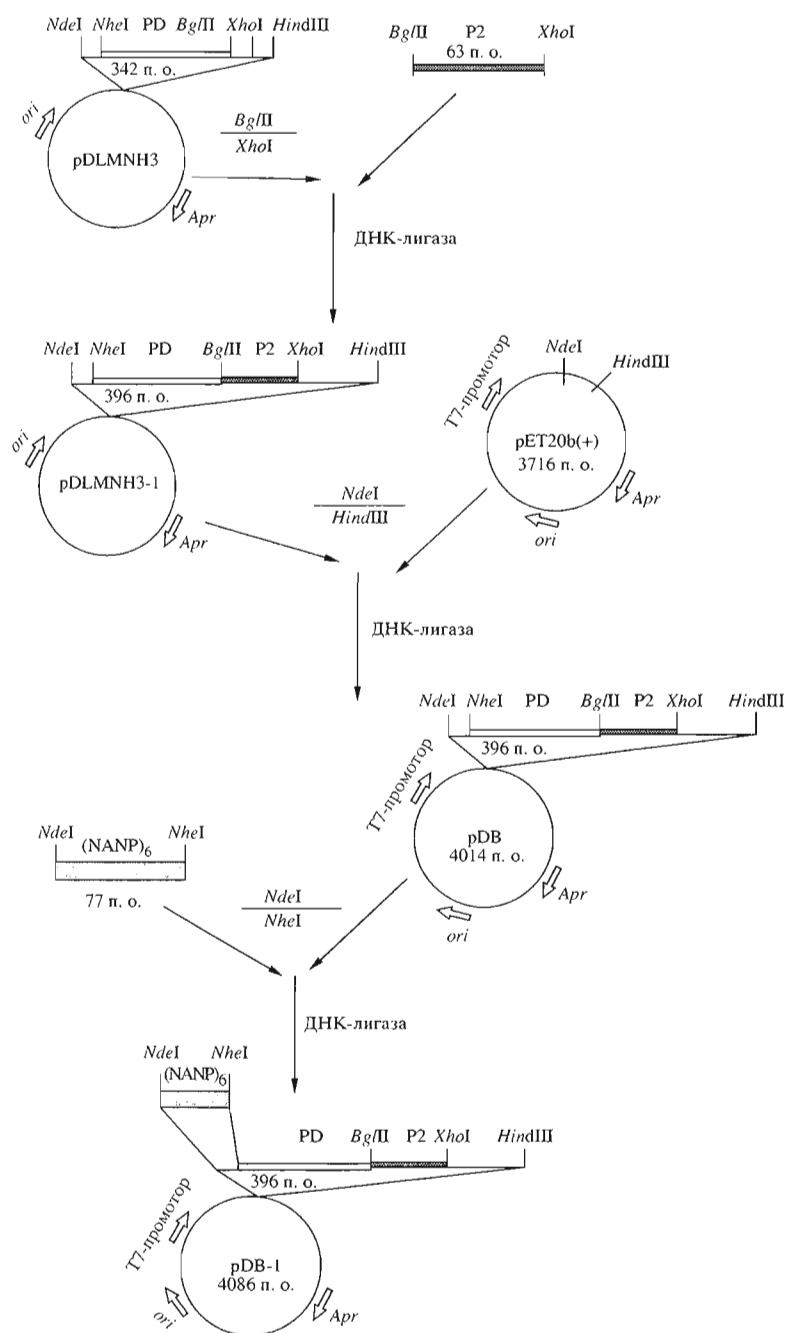


Рис. 1. Схема конструирования экспрессионной плазмиды pDB-1 (PD – домен пентамеризации, P2 – иммунодоминантный участок токсина столбняка, (NANP)₆ – иммунодоминантный участок основного поверхностного белка спорозойты *P. falciparum*).

В нашей работе каждый мономер рекомбинантного белка содержал шесть повторов NANP, что при образовании пентамерной формы белка дает В-эпитоп, состоящий из тридцати повторов NANP. Такое количество NANP-повторов, с нашей точки зрения, достаточно для обеспечения эффективного иммунного ответа.

Хотя очевидно, что вакцина, ориентированная только на борьбу с преэритроцитарной стадией

развития паразита, не решает проблему распространения малярии, она может быть полезна для людей, прибывающих в малярийные зоны на короткое время. Предполагается, что в случае успешного создания эффективной вакцины против спорозойной стадии инфекции, она будет обеспечивать краткосрочный иммунитет за счет присутствия в организме большого количества антител на иммунодоминантный участок CSP. Такая вак-

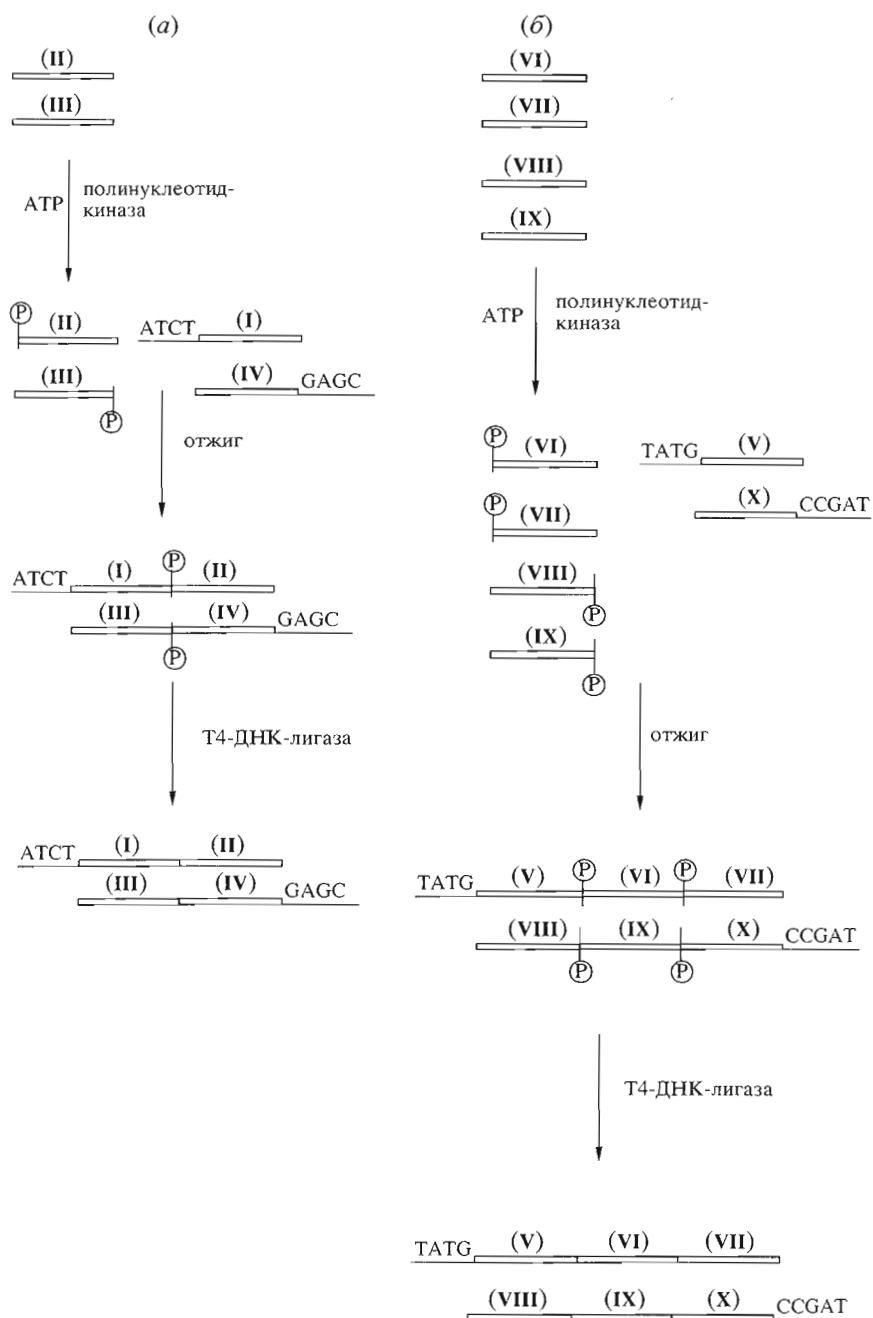


Рис. 2. Схема получения фрагментов ДНК, кодирующих иммунодоминантный участок токсина столбняка P2 (а) и иммунодоминантный участок основного поверхностного белка спорозойнта *P. falciparum* (NANP)₆ (б).

цина может обеспечить развитие эффективного антиспорозойного Т-клеточного иммунитета, способного обеспечить защиту при повторных заражениях [7].

Таким образом, полученная плаزمид рDB-1 кодирует растворимый рекомбинантный белок, состоящий из пяти частей (рис. 3): 1) домена пентамеризации белка СОМР человека [3–5]; 2) шарнирных участков IgA человека [15], обеспечивающих необходимые пространственные условия для максимально эффективного представления

олигомерным целевым белком В- и Т-клеточных эпитопов; 3) В-клеточного эпитопа – иммунодоминантного участка (NANP)₆ белка CSF *P. falciparum*, расположенного на N-конце целевого белка [9–14]; 4) универсального Т-клеточного эпитопа P2 из токсина столбняка [6–8], расположенного вблизи C-конца целевого белка; 5) шести остатков гистидина на C-конце белка, необходимых для его очистки при помощи металлоаффинной хроматографии.

Экспрессия и очистка рекомбинантного белка. Плазмидой pDB-1 трансформировали клетки *E. coli* BL21 (DE3), которые экспрессировали растворимый рекомбинантный белок DB-1 с расчетной молекулярной массой 15.4 кДа. Из рис. 4 видно, что белок в условиях SDS-электрофореза обладает более низкой, чем ожидалось, подвижностью. Этот факт можно объяснить наличием в белке протяженных участков, богатых остатками пролина.

Гибридный белок выделяли из смеси цитоплазматических белков *E. coli* металлоаффинной хроматографией на Ni-IDA-сефарозе. Выход DB-1 составил около 5 мг на 800 мг бактериального осадка. У очищенного белка было определено семь N-концевых остатков, последовательность которых полностью совпала с заданной – Met-Asn-Ala-Asn-Pro-Asn-Ala.

Свойства рекомбинантного белка. Так как основной задачей настоящей работы явилось создание олигомерного рекомбинантного белка, необходимо было выяснить степень его олигомеризации. Для этого белок DB-1 подвергали SDS-электрофорезу в градиентном ПААГ (4–22%) в присутствии и без меркаптоэтанола (рис. 5). Из рис. 5 видно, что в растворе большая часть рекомбинантного белка, как и предполагалось, находится в состоянии пентамера. Кроме того, обнаружены олигомеры более низкого порядка.

Спектр КД рекомбинантного белка DB-1 свидетельствует о том, что в растворе около 60% его аминокислотной последовательности представлено α -спиральными участками (таблица). Этот результат хорошо согласуется с проведенными ранее (не показаны) теоретическими расчетами для пентамерной формы белка – 60.2%.

Таким образом, в результате проведенного исследования создан штамм-продуцент рекомбинантного белка DB-1, получен и очищен рекомбинантный белок DB-1, являющийся пентамерной молекулой, содержащей на C-конце каждого мономера иммунодоминантный участок токсина столбняка P2, а на N-конце – иммунодоминантный фрагмент поверхностного белка спорозоита *P. falciparum*.

Результаты настоящей работы дают возможность использовать рекомбинантный белок DB-1 для дальнейшего изучения его иммуногенности и для отработки схем вакцинации против малярии, вызываемой *P. falciparum*, с оптимизированной презентацией В-клеточного эпитопа и без использования адъювантов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали агарозу, акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, SDS, EDTA, бычий сывороточный альбумин, дитиотреит, фенолметилсульфонилфторид (PMSF), имидазол, изопропил- β -D-тио-

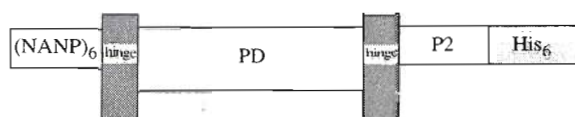


Рис. 3. Схематическое изображение мономера рекомбинантного белка DB-1 (PD – домен пентамеризации, hinge – шарнирные участки из IgA человека, (NANP)₆ – В-клеточный эпитоп, P2 – Т-клеточный эпитоп, His₆ – последовательность, содержащая шесть гистидинов).

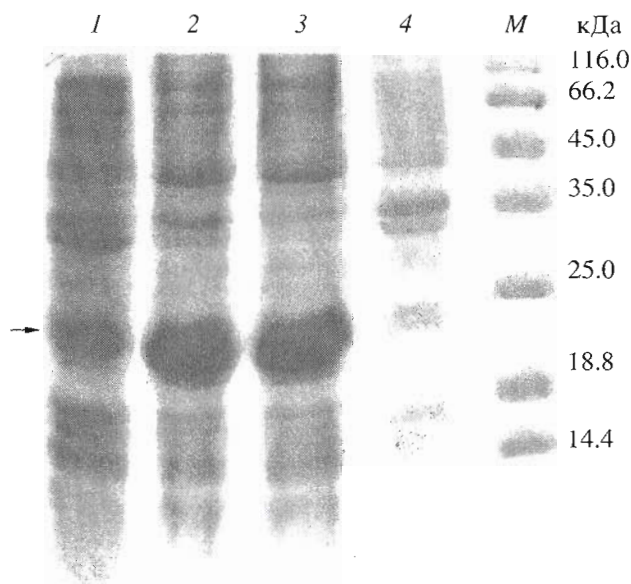


Рис. 4. SDS-электрофорез в 13.5% ПААГ: пробы суммарного белка клеток *E. coli* BL21 (DE3) с плазмидой pDB-1 без индукции IPTG (1) и после индукции IPTG (клетки разрушены ультразвуком) (2); пробы растворимой (3) и нерастворимой фракции тех же клеток (4). Стрелкой показан DB-1.

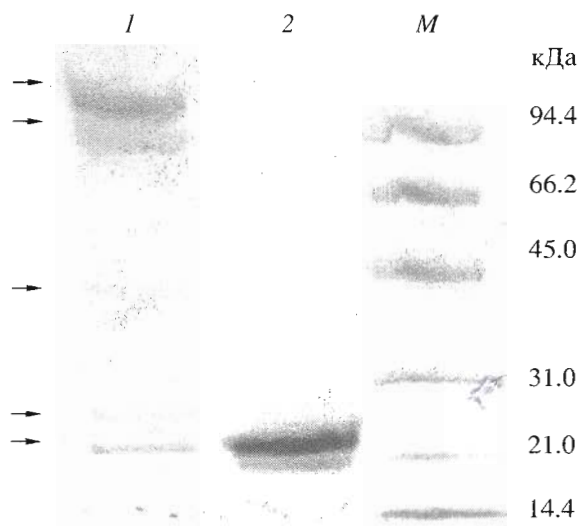


Рис. 5. SDS-электрофорез рекомбинантного белка DB-1 в ПААГ (4–22%) без меркаптоэтанола (1) и в присутствии меркаптоэтанола (2). Стрелками показан DB-1.

Содержание различных элементов вторичной структуры в рекомбинантном белке DB-1

Тип вторичной структуры	Содержание элемента вторичной структуры в рекомбинантном белке, %
α -Спираль	63 \pm 3
β -Структура	8 \pm 3
Неструктурированные участки	29 \pm 3

галактозид (IPTG), Триптон, бактоагар, дрожжевой экстракт, соли, сефарозу 6B, Ni-IDA-сефарозу (Sigma, США), Твин-20 (Ferak, Германия), набор белковых маркеров, набор для секвенирования (НПО "Ферментас", Литва), реактив для определения концентрации белка – Protein assay kit II (Bio-Rad, США), поливинилиденфторидные мембраны (иммобилон ТМ) (Millipore, США), нитроцеллюлозные мембраны BA85 (Schleicher and Schuell, Германия). Остальные реактивы отечественного производства. Были использованы олигонуклеотидные праймеры для секвенирования – Т7-прямой праймер – АААТАСГАСТСАСТАТАГГ, и Т7-обратный праймер – СТАГТТАТТГСТСАГСГГ.

Все олигонуклеотиды были синтезированы стандартным фосфоамидитным методом.

Ферменты. Эндонуклеазы рестрикции, *Taq*-ДНК-полимераза, ДНК-лигаза и полинуклеотидкиназа фага Т4 (НПО "Ферментас", Литва).

Бактериальные штаммы и плазмиды. *E. coli* XL-1 Blue: *recA*⁻ (*recA*), *Lac*⁻, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, {*F'**proA* + *B*, *lac* *Ig*, *lac* *Z* \wedge *M15*, *Tn10*} (Stratagene, США), *E. coli* BL21 (DE3): *hsd S gal* (λ *clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T2 gene1*) (Novagen, США). Плазмидная ДНК рDLMNH3 любезно предоставлена проф. Ж.-П. Маком (Институт биохимии университета Лозанны, Швейцария), рЕТ20b(+) (Novagen, США), рDLMNH3-1, рDB, рDB-1 сконструированы в ходе работы.

Бактериальные клетки культивировали при 37°C в стандартных питательных средах. Для обеспечения селективного роста клеток применяли ампициллин (100 мкг/мл). Приготовление компетентных клеток и большинство процедур, связанных с манипуляциями с ДНК (трансформацию бактериальных клеток плазмидной ДНК, расщепление рестриктазами, лигирование, получение векторов и фрагментов), проводили согласно [16].

Конструирование плазмид. Для создания плазмиды рDLMNH3-1 плазмиду рDLMNH3 расщепляли рестриктазами *Bg*/II/*Xho*I. Вектор выделяли из 1% геля агарозы и лигировали в течение 4 ч при 12°C с фрагментом, кодирующим иммунодоминантный участок токсина столбняка P2 [6–8]. Для создания данного фрагмента дезоксиолиго-

нуклеотиды (II) и (III) фосфорилировали при помощи полинуклеотидкиназы 30 мин при 37°C. Далее дезоксиолигонуклеотиды (I)–(IV) подвергали процедуре отжига – 2 мин 65°C и медленное охлаждение до 12°C – и лигировали 4 ч при 12°C. Полученные вектор и фрагмент лигировали 4 ч при 12°C и лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* XL1, аликвоту высевали на твердую питательную среду. Отбор клонов производили путем рестриктного анализа рестриктазами *Hae*III и *Msp*I выделенной из них плазмидной ДНК [17].

Из полученной плазмиды рDLMNH3-1 вырезали фрагмент при помощи рестриктаз *Nde*I/*Hind*III и клонировали его в составе плазмидной ДНК рЕТ20b(+) в клетках *E. coli* XL1. Клоны отбирали как указано для рDLMNH3-1. В результате была получена плазида рDB.

Для создания плазмиды рDB-1 плазмиду рDB расщепляли рестриктазами *Nde*I/*Nhe*I. Вектор выделяли из 1% геля агарозы. ДНК-фрагмент, кодирующий иммунодоминантный участок поверхностного белка спорозойта *P. falciparum* – (NANP)₆ [9–14] получали по методу, указанному для фрагмента P2. Фосфорилированию подвергали дезоксиолигонуклеотиды (VI)–(IX). Полученные вектор и фрагмент лигировали 4 ч при 12°C и лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* XL1, клоны отбирали как описано выше. Окончательно последовательность участка плазмиды рDB-1, кодирующую целевой рекомбинантный белок, определяли секвенированием по Сенгеру [18] с использованием универсальных Т7-прямого и Т7-обратного праймеров.

Экспрессия и очистка рекомбинантного белка.

Рекомбинантный белок DB-1 был экспрессирован в *E. coli* BL21 (DE3). Культуру выращивали при 37°C до значения $A_{600} \approx 0.5$, добавляли IPTG до конечной концентрации 0.05 мМ и инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием (4000 об/мин, 10 мин, 4°C) и хранили при –70°C. Белок выделяли методом металлоаффинной хроматографии при неденатурирующих условиях. Для этого бактериальный осадок (800 мг) ресуспендировали в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7.5, содержащем 100 мМ NaCl, 0.006% NaN₃, 20 мкг/мл PMSF. Клетки вскрывали ультразвуком (частота 22 кГц) при 0°C 10 раз по 15 с. Суспензию вскрытых клеток центрифугировали (12000 об/мин, 15 мин, 4°C), и супернатант наносили на колонку с Ni-IDA-сефарозой объемом 1 мл. Неспецифически связавшиеся белки отмывали 10 мл 50 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 6.0; 100 мМ NaCl, элюцию проводили тем же буфером со ступенчатым градиентом концентрации имидазола от 0.3 до 0.5 М. Далее от имидазола освобождались диализом против 50 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7.5; 100 мМ NaCl. Выход белка 5 мг. Белок хранили при 4°C.

Концентрацию растворов белка определяли по Бредфорд [19].

Электрофоретический анализ белка проводили по Лэммли [20] в 13.5% геле, а также по Слатеру [21] в градиенте ПААГ от 4 до 22%.

Спектры кругового дихроизма белка снимали в кювете с длиной оптического пути 0.01 см на спектрофотометре JASCO J-500С при 25°C как описано в [22]. Белок находился в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7.5; 100 мМ NaCl, концентрация 0.8 мг/мл. Обработку данных производили с использованием программы CONTIN для глобулярных белков [23].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны В.В. Месянжинову за помощь в подготовке рукописи и благодарят проф. Ж.-П. Мака (Институт биохимии университета Лозанны, Швейцария) за предоставленную плазмиду (pDLMNH3), а также Н.С. Быстрова за синтез олигодезоксинуклеотидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ben-Yedidia T., Arnon R. // *Curr. Opin. Biotech.* 1997. V. 8. P. 442–448.
2. Clair N.S., Shenoy B., Jacob L.D., Margolin A.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 9469–9474.
3. Newton G., Weremowicz S., Morton C.C., Copeland N.G. // *Genomics.* 1994. V. 24. P. 435–439.
4. Terskikh A.V., Le Doussal J.-M., Cramer R., Fisch I., Mach J.-P., Kajava A.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 1663–1668.
5. Malashkevich V.N., Kammerer R.A., Efimov V.P., Schulthess T., Engel J. // *Science.* 1996. V. 274. P. 761–765.
6. Panina-Bordignon P., Tan A., Termijtelen A., Demotz S., Corradin G., Lanzavecchia A. // *Eur. J. Immunol.* 1989. V. 19. P. 2237–2242.
7. Valmori D., Pessi A., Banchi E., Corradin G. // *J. Immunol.* 1992. V. 92. P. 717–721.
8. Valmori D., Sabbatini A., Canzavecchia A., Corradin G., Matricardi P.M. // *J. Immunol.* 1994. V. 152. P. 2921–2929.
9. Ping-Shi Y., Hasnain S.E., Sacci J.B., Holloway B.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 1615–1620.
10. Nussenzweig V., Nussenzweig R.S. // *Cell.* 1985. V. 42. P. 401–403.
11. Rich S.M., Ayala F.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 6994–7001.
12. Potocnjak P., Yoshida N., Nussenzweig R.S. // *J. Exp. Med.* 1980. V. 151. P. 1504–1513.
13. Zavala F., Tam J.P., Hollingclade M.R., Cochrane A.H., Quakzi J., Nussenzweig R.S. // *Science.* 1985. V. 228. P. 1436–1440.
14. Tam J.T., Clavijo P., Lu Y.-A., Nussenzweig V., Nussenzweig R.S., Zavala F. // *J. Exp. Med.* 1990. V. 171. P. 299–306.
15. Frangione B., Wolfenstein-Todel C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1972. V. 69. P. 3673–3676.
16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Пер. с англ. М.: Мир, 1984.
17. Birnboim H.C., Doly J. // *Nucleic. Acids Res.* 1979. V. 7. P. 1513–1523.
18. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.K. // *J. Mol. Biol.* 1975. V. 94. P. 441–446.
19. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
20. Laemmli U. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
21. Slater G.G. // *Anal. Biochem.* 1968. V. 24. P. 215–217.
22. van Ostade X., Tavernier J., Plange T., Fiers W. // *EMBO J.* 1991. V. 10. P. 827–836.
23. Provencher S.W., Glockner J. // *Biochemistry.* 1981. V. 20. P. 33–37.

Design of Chimeric Proteins on the Basis of a Pentameric Superhelical Fragment of Human Cartilage Oligomeric Matrix Protein: I. The Properties of a Hybrid Containing the Immunodominant Domain of the Circumsporozoite Protein of *Plasmodium falciparum*

S. Yu. Belitskaya[#], E. F. Boldyreva, and V. G. Korobko

[#]Phone: +7 (095) 330-6983; e-mail: lap08@mail.ru

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

The oligomeric recombinant protein DB-1 containing the immunodominant sites of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* and tetanus toxin was constructed to optimize the schemes of presentation of B-cell epitopes during vaccination with chimeric proteins without the use of adjuvants. A fragment of the pentameric coiled-coil human cartilage oligomeric matrix protein was used as an oligomerization matrix. The expression of the protein in *Escherichia coli* cells was studied, a method for its purification was developed, and it was biochemically characterized. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: coiled-coil proteins, pentamerization domain, *Plasmodium falciparum*, recombinant vaccines