

На правах рукописи

Каторкина Елена Ивановна

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛИКОПРОТЕИНА CD2v
ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, СЛИТОГО С Fc
ФРАГМЕНТОМ ИММУНОГЛОБУЛИНА G СВИНЬИ**

03.02.02 «Вирусология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Вольгинский - 2020

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» (ФГБНУ ФИЦВиМ).

Научный руководитель: **Малоголовкин Александр Сергеевич**
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: **Шмаров Максим Михайлович**
доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Иголкин Алексей Сергеевич
кандидат ветеринарных наук, заведующий референтной лабораторией по африканской чуме свиней ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»

Ведущая организация: ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»

Защита состоится 15 декабря 2020 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д220.015.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир, мкр. Юрьевец). Полный текст диссертации, автореферата и отзыв научного руководителя размещены на официальном сайте ФГБУ «ВНИИЗЖ» www.vniizh.ru

Автореферат разослан _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Африканская чума свиней - контагиозная болезнь домашних свиней, в том числе декоративных, и диких кабанов.

В 2007 году АЧС впервые зарегистрирована в Грузии, позднее, во многих республиках Северного Кавказа. В настоящее время, по данным Россельхознадзора вирус АЧС присутствует в некоторых областях Российской Федерации, а также на территории соседних стран, включая Украину, Польшу, Латвию, Литву, Эстонию и Молдову, а в 2017 была зарегистрирована в Чешской Республике и Румынии (Мазлум А. и др., 2018).

В 2018 году Министерство сельского хозяйства Китая (MARA) зафиксировало вспышку АЧС в 31 провинциях (Zhou X. et al., 2018). В 2019 году были зарегистрированы вспышки в Монголии и Вьетнаме, Филиппинах, Лаосской Народно-Демократической республике. По данным Food and Agriculture Organization of the United Nations вспышки АЧС отмечены в феврале 2020 года в Камбоджи, Мьянме, Индонезии (http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/ASF/situation_update.html).

Геном вируса АЧС представлен двуцепочечной линейной молекулой ДНК, содержащей 170–190 тыс. п.н., кодирующий более 100 белков (Arias M., Sánchez-Vizcaíno J., 2002). Из всех известных белков вируса АЧС гликопротеины р54 и CD2v, расположенные на поверхности вирусной частицы являются наиболее переменными. Белок CD2v обуславливает гемадсорбирующие свойства вируса и кодируется геном EP402R (Whitlow L.W. et al., 1990). Было показано, что белок CD2 играет важную физиологическую роль в облегчении адгезии между Т-клетками и антиген-презентирующими клетками (АПК) путем специфического взаимодействия с LFA-3 (lymphocyte function-associated antigen - 3), тем самым способствуя распознаванию Т-клетками чужеродных антигенов, представленных основным комплексом гистосовместимости на АПК SLA (Merwe P. A., 1999). Блокирование этого взаимодействия CD2-LFA3 свободным лигандом, анти-CD2-антителами или растворимым CD2 приводило к ингибированию различных функций Т-клеток (Binder C., et al 2020).

Изоляты вируса АЧС представлены поликлональными популяциями, различающимися по вирулентности, гемадсорбирующим и антигенным свойствам, что свидетельствует о его антигенной изменчивости (Середа А.Д. и др, 2012; Мима К.А. и др., 2015). Многообразие генетических вариантов вируса АЧС является одной из причин отсутствия эффективных вакцин против данной

болезни и, обеспечивают уклонение от защитных систем организма (Dixon et al., 2003; Correia S. et al, 2012; Henriques E.S., 2011)

Один из современных подходов в создании эффективных вакцин, приводящих к индукции клеточного иммунитета, был реализован при получении химерного белка, состоящего из Fc-домена (Li et al., 2011).

Технология Fc– слияния успешно была применена для борьбы против ряда инфекционных заболеваний, вирусной и бактериальной этиологии (Misinzo et al., 2014). Например, таких как вирус иммунодефицита человека (Capon D.J. et al., 2010), вирус Эбола (Konduru K. et al., 2011), вирус лихорадки Денге (Kim M.Y. et al., 2018), вирус гриппа (Jegaskanda S., 2011), *Mycobacterium tuberculosis* (Lu L. et al., 2015), вирус классической чумы свиней (Liu Z. et al., 2017).

Основываясь на результатах исследований ученых, можно сказать, что технология Fc–слияния для презентации антигенов вируса АЧС ранее не применялась и является перспективным подходом для разработки кандидатной вакцины против АЧС.

Степень разработанности темы исследования. На протяжении многих лет исследовательские группы всего мира усиленно работают над созданием вакцины против АЧС. Однако поиск протективного белка вируса АЧС остается открытым. Отмечено, что белок CD2v, обладает гемадсорбирующей активностью и демонстрирует определенный протективный потенциал (Серета А.Д. и др., 2017), рассматривается как наиболее перспективный антиген для создания кандидатной вакцины против АЧС (Sereta A.D. и др. 2018).

Fc–химерные последовательности — это гибридные последовательности, в которых Fc–фрагмент IgG (Fc–IgG) и целевой терапевтический белок или антиген представляют собой единый белковый продукт, полученный на основе генных конструкций (Звонова Е.А., 2017). При разработке рекомбинантного белка на основе Fc– слияния, в качестве кандидата в вакцины против вирусов классической чумы свиней (КЧС), полученной в бакуловирусной системе, было показано, что внутримышечная, внутрибрюшинная или интраназальная вакцинация рекомбинантными бакуловирусами, вызывает стойкий гуморальный и клеточный иммунный ответ против вируса КЧС (Renson P., et al, 2013). Высокие титры КЧС–специфических и нейтрализующих антител, а также повышенные уровни секреции IFN– γ указывают на то, что рекомбинантный бакуловирус эффективно доставляет экзогенный антиген в клетки свиней (Liu Z., et al, 2017).

В качестве протективных антигенов могут выступать структурные, капсидные, гликопротеины, а также протеины, отвечающие за

гемадсорбирующие свойства вируса, в нашем случае белок CD2v вируса АЧС. Иммунизация свиней очищенными рекомбинантными белками вируса АЧС позволяет эффективно включать механизмы клеточного и гуморального иммунитета.

Цель и задачи. Целью исследования является функциональная характеристика гликопротеина CD2v вируса АЧС, слитого с Fc-фрагментом свиного IgG 1 изотипа.

Для достижения поставленной цели необходимо было выполнить следующие задачи:

1. Идентифицировать Т- и В- клеточных эпитопов в первичной последовательности белка CD2v штаммов и изолятов вируса АЧС.

2. Создать генно-инженерные конструкции, экспрессирующие химерные белки CD2v, содержащие Fc- фрагменты свиного IgG 1 изотипа на N- и C-конце белковой молекулы.

3. Получить рекомбинантные химерные белки CD2v вируса АЧС, слитые с Fc фрагментом свиного IgG 1 изотипа в эукариотической системе экспрессии.

4. Дать физико-химическую характеристику химерных молекул Fc-CD2v и CD2v-Fc.

5. Провести тестирование химерных молекулы Fc-CD2v и CD2v-Fc *in vitro*:

- анализ пролиферации клеток PBMC;
- связывание с рецепторами FcγRI и FcγRn;
- индукция интерферона – γ клетками PBMC.

Научная новизна результатов исследований. Впервые получены химерные молекулы антигена CD2v вируса АЧС (штамм «Ставрополь 01/08»), слитые с Fc-доменом свиного IgG 1 изотипа, которые являются аутентичными по отношению к исходным молекулам.

Впервые получены стабильные клеточные линии «CHO-CD2-Fc» и «CHO-Fc-CD2», экспрессирующие химерные рекомбинантные молекулы Fc-CD2v и CD2v-Fc, которые обладают Fc-опосредованной активностью, пролиферирующими свойствами и вызывают выброс интерферона-γ

Теоретическая и практическая значимость работы. Создание химерного антигена CD2v, отвечающего за серотиповую специфичность вируса АЧС, с помощью технологии Fc-слияния позволит изучить характеристики и тонкие механизмы действия иммуномодулирующих белков, а также будет

способствовать развитию стратегии для создания кандидатов вакцин против вируса АЧС.

Сконструированы рекомбинантные плазмиды, кодирующие внеклеточный, растворимый домен белка CD2v (штамм Ставрополь), слитый с Fc-фрагментом свиного IgG 1 изотипа, расположенные на N- и C- концах молекулы CD2v.

Получены клеточные линии «CHO-CD2-Fc» и «CHO-Fc-CD2», стабильно экспрессирующие химерные рекомбинантные молекулы Fc-CD2v и CD2v-Fc вируса АЧС (штамм Ставрополь) и изучены такие характеристики, как, жизнеспособность, скорость роста и продуктивность клеточных линий.

Химерные молекулы CD2v обладают Fc-опосредованной функцией связываться с Fc- γ рецепторами (Fc γ R1 и FcRn) в наномолярном диапазоне, что способствует активации иммунных клеток и выбросу цитокинов, таких как интерферон- γ , а также увеличению периода полувыведения за счет взаимодействия с неонатальным рецептором – FcRn.

Разработанный подход слияния свиного Fc-домена и схема получения химерных молекул CD2v-Fc с вирусными антигенами, может быть применена для антигенов других инфекций свиней.

Методология и методы исследования. Методология проведенных исследований включает: биоинформатические методы; вирусологические; молекулярно – биологические; клеточной биологии, физико-химические.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Участок с 17 по 204 аминокислоту первичной последовательности белка CD2v вируса АЧС содержит клеточные эпитопы (4 В - и 5 Т- клеточных эпитопов).
2. Сознанные генетические конструкции pFc-CD2v и pCD2v-Fc, на основе плазмидного вектора pCMV (Addgene).
3. Полученные стабильные клеточные линии «CHO-Fc-CD2v» и «CHO-CD2v-Fc», экспрессирующие химерные рекомбинантные белки Fc-CD2v и CD2v-Fc, которые на протяжении 10 пассажей показывают сохранение ростовых свойств культуры и постоянный уровень продуктивности целевых молекул.
4. Рекомбинантные химерные белки Fc-CD2v и CD2v-Fc обладают Fc-опосредованной активностью, пролиферирующими свойствами и вызывают выброс интерферона- γ .

Личный вклад автора. Исследования по теме диссертационной работы (планирование и выполнение основных работ экспериментов, обобщение полученных результатов) проведены соискателем самостоятельно.

Консультативную и методическую помощь при выполнении отдельных этапов работы оказывали: к.б.н., К.А. Мима, к.б.н. И.А. Титов, к.б.н. Бурмакина Г.С.

Степень достоверности и апробация результатов. Степень достоверности результатов проведенных экспериментов подтверждена статистической обработкой полученных результатов.

Апробация диссертации состоялась 26 июня 2020 г на заседании межлабораторного совета научного сектора ФГБУ ФИЦВим, согласно выписке из протокола №1 от 29.06.2020 г.

Результаты исследований по теме диссертации доложены и обсуждены на XIX Всероссийской молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» 15-16 апреля 2019 года, г. Москва, Россия; 13-м Ежегодном собрании EPIZONE 26-28 августа 2019 года, г. Берлин, Германия; X Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения», 24 июня, 2020 года, г. Ульяновск, Россия.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 6 научных работы, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ при публикации основных научных результатов диссертаций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 124 страницах и включает: введение, обзор литературы, материалы, методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список сокращений, список использованной литературы, включающий 126 источника, из которых 121 - иностранные. Диссертация иллюстрирована 47 рисунками и 21 таблицей. В приложении представлены документы, подтверждающие достоверность результатов работы, ее научную и практическую значимость.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы и методы

Штаммы и изоляты вируса АЧС. В работе использовали штамм «Ставрополь 01/08» (генотип II, сероиммунотип 8, инвентарный № 2783) вируса АЧС из «Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных» (Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ ФИЦВиМ).

Сыворотки и иммуноглобулин. В работе использовали сыворотки крови от домашних свиней, зараженных вирусом АЧС 8 серотипа и сыворотки крови от клинически здоровых домашних свиней; антивидовой конъюгат к IgG1 свиньи goat anti-swine IgG-HRP (SantaCruzBiotechnology, США).

Культуры клеток и питательные среды. В работе применяли первичные культуры клеток костного мозга свиней (ККМС), полученные в ФГБНУ ФИЦВиМ, на питательной среде DMEM (ThermoFisher, США). Перевиваемые клеточные линии – «FreeStyle CHO-S» (ThermoFisher, США) с культивированием на питательной среде BalanCD («Irvine», США).

Плазмиды и бактериальные штаммы. В работе использовали плазмидный вектор pGEM-T-Easy (Promega, США). Экспрессионный модифицированный вектор pCMV («Addgene», США). При создании генетических конструкций использовали компетентные клетки *Escherichia coli* штамма XL-10 Gold, генотип (endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac HteΔ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR F'(proAB lacIqZΔM15 Tn10(TetR Amy CmR)).

Коммерческие наборы. Для очистки ДНК от агарозного геля применяли набор «QIAquick Gel Extraction» (QIAGEN, Германия); для выделения плазмидной ДНК, геномной ДНК и тотальной РНК применяли наборы производства компании «QIAGEN» (Германия); для клонирования ПЦР-продуктов использовали набор pGEM(R)-T Easy I (Promega, США).

2.2 Методы исследований

Расчет олигонуклеотидов осуществляли в программе OLIGO 7.0 и Clone Manager 8.0 и анализировали в программе OligoAnalyzer.

Синтез олигонуклеотидов осуществляли в компании «Евроген» г. Москва.

Выделение мононуклеарных клеток крови (PBMC - peripheral blood mononuclear cells) проводили центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина (А. Воум, 1974).

Культивирование вируса выполняли на первичной ККМС. Для заражения культуры клеток использовали 10% суспензию измельчённой селезёнки штамма вируса АЧС «Ставрополь – 01/08» (генотип II, сероиммунотип 8, инвентарный № 2783).

Выделение ДНК и РНК проводили с помощью набора «DNeasy Blood & Tissue Kit (250)» (Qiagene, Германия) и «RNeasy Mini Kit» (Qiagen, Германия), согласно протоколам производителей.

Выделение плазмидной ДНК происходило с помощью набора Plasmid Mini Kit («Qiagen», Германия), согласно инструкции производителя.

Полимеразная цепная реакция. Для постановки ПЦР использовали амплификатор МахуGene («Ахуген Scientific», США), набор для постановки ПЦР «OneTaq DNA polymerase» (NEB, США) и панель специфических праймеров (Евроген, г. Москва).

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ–ПЦР) осуществляли с помощью набора «SuperScript III First–Strand Synthesis System» («Thermo Fisher Scientific», США) согласно инструкции производителя.

Электрофорез нуклеиновых кислот. Анализ ДНК осуществляли при помощи электрофореза в 0,8–1,3 % агарозном геле. Результаты электрофореза учитывали на гельдокументирующей системе GelDoc (Bio–Rad, США). Размеры исследуемых фрагментов ДНК вычисляли с помощью маркера молекулярной массы (Fermentas, Латвия)

Выделение и очистка нуклеиновых кислот из агарозного геля происходила с использованием коммерческого набора «QIAquick Gel Extraction» (QIAGEN, Германия) согласно методике производителя.

Нуклеотидное секвенирование генов вируса АЧС и плазмид проводили с использованием геноспецифических праймеров на приборе «Applied Biosystems Genetic Analyser 3130» (США) с набором компонентов «BigDye Terminator kit 3.1» (Applied Biosystem, США) согласно инструкции производителя.

Культивирование и трансфекция клеточной линии СНО. Суспензионную клеточную линию СНО–S засекали в исходной концентрации 0,3 млн/см³ и культивировали при 130 об/мин в среде BalanCD с добавлением 500000 ЕД пенициллина, 100 мкг/см³ стрептомицина и 4мМ L–глутамина при температуре 37°C, содержании СО₂ – 5%, влажности не более 75%. Трансфекцию

клеток CHO–S проводили методом электропорации на приборе Gene Pulse Xcell («Bio–Rad», США).

Определение жизнеспособности живых клеток оценивали визуально методом окрашивания 1 % раствором трипанового синего («GIBCO», США). Подсчет клеток проводили на автоматическом счетчике клеток NucleoCounter NC100 («ChemoMetec», Дания).

Электрофорез белков в полиакриламидном геле оценивали в 10 %–ом полиакриламидном геле по методу U.K. Laemmli (1970). Визуализацию белков проводили окрашиванием геля раствором Кумасси.

Иммуноблотинг. После разделения белков в 10 %–ом полиакриламидном геле в качестве детектируемых антител использовали антисвиной конъюгат, меченые пероксидазой хрена (goat anti–swine IgG–HRP, SantaCruzBiotechnology, США). Специфические полосы детектировали при помощи субстратов «Clarity Western ECL Substrat» («Bio–Rad», США).

Анализ дегликозилирования проводили методом электрофореза в 10 % ПААГ геле в невозстановленных и восстановленных (в присутствии β –меркаптоэтанола) условиях.

Реакция гемадсорбции. Для постановки реакции клетки COS–1 трансфецировали с 4 мкл липофектамина с 2,5 мкг рекомбинантных плазмид. По достижению клетками COS–1 80% монослоя (через 4–5 часов) среду меняли на ДМЕМ с 2% фетальной сывороткой. Свиные эритроциты предварительно отмывали в среде ДМЕМ, готовили 10% суспензию и добавляли в каждую лунку по 100 мкл через сутки после трансфекции. Качественный анализ гемадсорбции эритроцитов учитывали визуально под микроскопом на 1 и 3 день после трансфекции.

Анализ пролиферации свиных клеток РВМС выполняли в соответствии с инструкцией к набору «ХТТ Cell Proliferation Kit II» (Panreas кат. № А8088.1000).

Тест на индукцию интерферона – γ клетками РВМС проводили с помощью набора «Porcine IFN–gamma ELISpot, Kit» (R&D Systems, кат. №. EL985) согласно инструкции производителя.

Программное обеспечение. Для конструирования плазмид – Clone Manager 9, SnapGene; для анализа наличия трансмембранного домена – ТМНММ 2.0 и Phobius (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>); для анализа наличия сигнального пептида – SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>); для анализа наличия N–гликозилирования – NetNGlyc 1.0

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>); для анализа O-гликозилирования–DictyOGlyc 1.1. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGlyc/>); первичную последовательность белка CD2v вируса АЧС анализировали на наличие В-клеточных эпитопов с помощью программы BCPred и дополнительно BCPred+AAP (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/predict.html>) при установленных стандартных параметрах; Т – клеточные линейные эпитопы анализировали в программе TepiTool (<http://tools.iedb.org/tepitool/>) и NetCTLpan 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTLpan/>) при установленных стандартных параметрах; анализ иммуногенности, прогнозируемых В – эпитопов, проводили с помощью программы VaxiJen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) при установленных стандартных параметрах; анализ вариабельности белка CD2v вируса АЧС проводили в программе PVS (Protein Variability Server) (www.imed.med.ucm.es/PVS/), анализ проводили по методу Симпсона, порог вариабельности выбран 0,46 согласно рекомендациям к программе; Анализ консервативности эпитопов проводили в базе данных Epitope Conservancy Analysis с помощью алгоритма Epitope Conservancy Analysis (<http://tools.iedb.org/conservancy/>) при установленных стандартных параметрах.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Идентификация В– и Т– клеточных эпитопов в белке CD2v вируса АЧС *in silico*

Для идентификации иммунных эпитопов была использована аминокислотная последовательность белка CD2 вируса АЧС штамма Georgia 2007/1.

3.2.1 Идентификация Т– клеточных эпитопов в белке CD2v вируса АЧС. Анализ внецитоплазматической части белка CD2v с 17 по 204 аминокислоту проводили согласно установленным по умолчанию для свиных аллелей (SLA).

Вся последовательность белка CD2v была разделена на 196 пептидов длиной 9 аминокислот каждый. В результате анализа пептиды–лиганды МНС–I класса были выявлены в 33 аллелях. Затем были определены пептиды, имеющие перекрестное связывание с несколькими аллелями МНС–I.

3.2.2 Идентификация В– клеточных эпитопов в белке CD2v вируса АЧС. Аминокислотная последовательность белка CD2v была подвергнута *in silico* прогнозированию на наличие В–клеточных эпитопов с помощью программы BCPred. Предсказание В–клеточных эпитопов является начальным этапом для конструирования вакцин (J. M. Gershoni, 2006).

В результате нами было показано наличие девяти прогнозируемых В-клеточных эпитопов, имеющие довольно высокие показатели прогнозирования от 0,99 до 1,00. Далее эти эпитопы анализировали на иммуногенность, четыре из девяти анализируемых эпитопов прогнозируются с наибольшим иммуногенным потенциалом и располагаются как в цитоплазматической, так и во внецитоплазматической части исследуемого белка. Наиболее иммуногенным прогнозируется пептид в позиции 176 аминокислоты, имеющий показатель 0,9935. Таким образом, в результате проведенного анализа нами были идентифицированы четыре В-клеточных эпитопа (4 из 9) белка CD2v вируса АЧС.

3.2.3 Анализ В- и Т- клеточных эпитопов в белке CD2v in silico. Для оценки варибельности аминокислотных последовательностей белка CD2v, представленных в базе данных Uniprot (www.uniprot.org) нами был проведен сравнительный анализ 103 первичных последовательностей белка CD2v в формате FASTA. Для анализа варибельных областей был использован метод Симпсона, основанный на расчете индекса разнообразия аминокислот. Значения этого индекса находятся в диапазоне от 0 до 1 и чем больше этот показатель, тем разнообразнее образцы. В нашем случае эталонной последовательностью считалась консенсусная последовательность белка CD2v вируса АЧС. Порог изменчивости был установлен на 0,46.

Анализ показал, что варибельной областью является N-концевая часть белка CD2v, участок от 130 до 260 аминокислоту, имеющий наибольший профиль изменчивости, который характерен для секреторной области этой молекулы. Консервативный профиль гетерогенности имела С-концевая часть белка, локализованная в цитоплазме.

Результаты определения варибельности белка CD2v вируса АЧС легли в основу анализа консервативности иммунных эпитопов, который проводили с использованием базы данных иммуноэпитопов IEDB 3.0, с помощью алгоритма epitope Conservancy Analysis и оценку линейных эпитопов с порогом идентичности последовательности не менее 100 %. Наиболее консервативным являлся эпитоп - PSTQPLNPFPLPKPCPPPKP, локализующийся в позиции от 290 аминокислоты и имел 100% показатель гомологии. Наиболее варибельным эпитопом оказался пептид DKKINYTVKLLKSVDSPIT, локализующийся в позиции от 104 аминокислоты и имел 50% показатель гомологии.

Таким образом, нами была сформирована карта распределения идентифицированных иммунных эпитопов на первичной последовательности

белка CD2 вируса АЧС, принадлежащих к различным штаммам и полевым изолятам вируса АЧС (рисунок 1).



Рисунок 1 - Графическое распределение B– и T– клеточных эпитопов белка CD2v штамма Georgia2007/1 вируса АЧС

В результате выполнения первой задачи нами была идентифицирована аминокислотная последовательность с 17 по 204 аминокислоту белка CD2v вируса АЧС, которая потенциально, может быть включена в конструкцию субъединичной полиэпитопной B– и T–клеточной вакцины против вируса африканской чумы свиней.

3.3 Дизайн экспрессионных плазмид, несущие гены химерной молекулы CD2v, слитые с Fc–доменом IgG1 свиньи

На основании вышеописанных результатов были смоделированы 2 вида молекул CD2v, слитые с Fc доменом IgG1, относительно антигена.

На основе доменной организации IgG1, в программе Clone Manager были смоделированы аминокислотные последовательности химерных молекул, а также изучена кодоновая оптимизация, выбор экспрессионной системы (в пользу эукариотической), N–гликозилирование, а также консенсусная последовательность - Kozak (Kozak consensus sequence) и сигнальный пептид.

Оптимизацию нуклеотидных последовательностей по кодонному составу, кодирующих целевые белки для клеток CHO подтверждали с помощью анализа на сервере <http://www.kazusa.or.jp>, который показал отсутствие в нуклеотидной последовательности триплетов с низкой встречаемостью (менее 20%).

Все выбранные последовательности были клонированы в составе экспрессионного вектора pCMV.

3.4 Создание экспрессионных плазмид, несущих гены химерной молекулы CD2v, слитых с Fc–доменом IgG1 свиньи

При подборе праймеров комплементарных гену CD2v была использована нуклеотидная последовательность референс-штамма Georgia 2007 (2 генотип – FR682468). При подборе праймеров на ген Fc-домена IgG1 свиньи была использована нуклеотидная последовательность тяжелой цепи свиного иммуноглобулина G (Uniprot ID: L8B0T2). В последовательность рассчитанных олигонуклеотидов были добавлены сайты рестрикции для последующего клонирования в экспрессионный вектор.

3.4.1 Амплификация гена CD2v и Fc-домена IgG1 свиньи

3.4.1.1 Амплификация гена CD2v вируса АЧС. В качестве матрицы использовали геномную ДНК, выделенную из культуры клеток COS-1, инфицированную вирулентным штаммом «Ставрополь 2007» (II генотип) вируса АЧС. В результате постановки ПЦР был получен ампликон гена CD2v ожидаемого размера (около 650 п.о.).

3.4.1.2 Амплификация Fc-домена IgG1 свиньи. Для получения гена Fc-домена свиного иммуноглобулина G нами была использована методика сотрудников Jar A.M. et al. (2009) Департамента Ветеринарии Небраски, США. Из фракции клеток РВМС здоровых свиней белой породы была выделена суммарная РНК, которую использовали в реакции обратной транскрипции с помощью набора «SuperScript® III First-Strand Synthesis System» («Thermo Fisher Scientific», США). В результате постановки реакции ПЦР с обратной транскрипцией с помощью набора «HotTag Polymerase» («NEB», США), нами был получен ампликон Fc-домена ожидаемого размера.

3.4.2 Клонирование и скрининг клонов экспрессионных плазмид, несущие гены химерной молекулы CD2v, слитые с Fc-доменом IgG1 свиньи

Для рестрикции и очистки ПЦР продуктов полученные фрагменты лигировали по липким концам, трансформировали клетки *E.coli* X1-10 Gold и далее проводили селекцию. Полученные клоны анализировали на наличие специфической вставки с помощью рестрикции эндонуклеазами (HindIII и XbaI). Для скрининга плазмид pCD2-Fc было проверено 5 клонов, а для pFc-CD2v было проверено 10 клонов.

3.5 Временная экспрессия химерной молекулы CD2v, слитой с Fc-доменом IgG1 в клетках CHO

Для получения химерных рекомбинантных белков нами была выбрана эукариотическая система экспрессии с использованием клеточной линии яичников китайского хомячка (Chinese hamster ovary – CHO) «FreeStyle CHO-S». Трансфекцию клеток CHO, находящихся в фазе логарифмического роста,

осуществляли с помощью электропорации с соблюдением определенного соотношения плазмиды и клеток.

После трансфекции состояние культуры клеток оценивали по 2 показателям: жизнеспособность и скорость роста культуры клеток. После трансфекции количество живых клеток снизилось на 20%, тогда как процент жизнеспособности остался на довольно высоком уровне – 98%. Далее проводили инкубацию клеток до достижения порога жизнеспособности менее 80%, на 6 день культивирования обеими культурами. На протяжении 6 дней трансфецированная культура продолжала расти и делиться, но медленнее относительно контрольной культуры СНО. Был проведен качественный анализ проб культуральной жидкости, отобранных на 8 сутки, методом дот-блот с использованием антивидового конъюгата (рисунок 2).

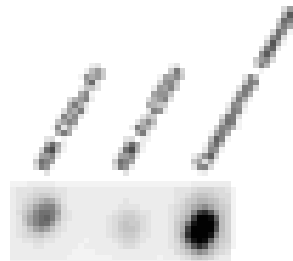


Рисунок 2 - Dot Blot анализ культуральных жидкостей с антивидовым конъюгатом (8 сутки)

В результате нами было подтверждено наличие синтеза целевых химерных молекул CD2v–Fc и Fc–CD2v в образцах культуральной жидкости культур клеток СНО.

3.6 Аналитическое выделение рекомбинантных белков CD2v–Fc и Fc–CD2v после транзитной экспрессии

Выделение целевых молекул из культуральной жидкости (кж), трансфецированных культур клеток СНО проводили с помощью протеина А Sepharose 4 Fast Flow (GE, США). Для выделения использовали кж, в объеме 30 мл, скорость нанесения кж 1 мл/мин на колонку Nitrapе (GE, США). Элюцию проводили цитратным буфером с рН=2.5, в объеме 3 мл.

Результаты показали, что продуктивность клеток СНО для молекулы CD2–Fc составила 40 мг/л, а для молекулы Fc–CD2 23 мг/л. При проведении электрофоретического анализа обеих молекул CD2–Fc и Fc–CD2 в SDS-Page было обнаружено, что рекомбинантные белки, мигрировали с молекулярной массой 110–130 кДа в восстановленных и более 170 кДа в невосстановленных условиях, что свидетельствовало о значительном содержании углеводного компонента. Необходимо отметить, что получаемое количество целевых белков

в результате транзиторной экспрессии оказалось недостаточным для проведения последующих исследований, поэтому, следующим этапом наших исследований являлось увеличение экспрессии целевых молекул за счет создания стабильных продуцентов химерных белков CD2v-Fc и Fc-CD2v на основе клеток CHO.

3.7 Создание стабильных клеточных линий CHO-CD2v-Fc и CHO-Fc-CD2v

3.7.1 Трансфекция. Для получения стабильных клеточных линий CHO-CD2v-Fc и CHO-Fc-CD2v была проведена трансфекция клеточной линии CHO с помощью электропорации на приборе Gene Pulse Xcell («Bio-Rad», США). С этой целью клетки CHO в количестве $1 \cdot 10^6$ и жизнеспособностью 98% осаждали центрифугированием при 800 об/мин и осадок осторожно ресуспендировали в 200 мкл буфера для электропорации и затем добавляли 50 мкл плазмид pCD2v-Fc и pFc-CD2v. Затем полученную суспензию подвергали электропорации в кювете с длиной зазора – 2 мм при следующих подобранных показателях: напряжение – 160V, время импульса – 15^{-3} с, количество импульсов – 1. Затем трансфецированные клетки переносили в лунку 24-луночного планшета в $0,5 \text{ см}^3$ среды BalanCD и культивировали в термостате при 37°C , CO_2 – 5% и влажности не более 75% в течение 2 суток. В качестве контроля трансфекции использовали родительскую культуру клеток CHO.

3.7.2 Селекция трансфецированных клеток CHO. Принцип селекции заключался в целенаправленном отборе популяции клеток CHO, имеющих устойчивость к антибиотику пурамицину.

Спустя 2 суток после трансфекции весь тотальный пул клеток CHO был переведен в среду BalanCD («Irvine», США) с добавлением селективного антибиотика пурамицина («AppliChem», Германия), до конечной концентрацией 5 мкг/см^3 . Суспензию клеток CHO культивировали в 6 луночном планшете в термостате при 37°C , CO_2 – 5% и влажности не более 75% в течение 14 дней. В течение первых 3–5 дней отмечали резкое снижение количества жизнеспособных клеток, которое продолжалось вплоть до 7–10 дней.

Далее весь тотальный пул клеток был переведен в суспензионный режим культивирования с посевной концентрацией $300\ 000 \text{ клеток/см}^3$ в колбе содержащей 15 см^3 ростовой среды BalanCD («Irvine», США) с добавлением селективного антибиотика пурамицина (5 мкг/см^3). По истечению 16–18 дней, устойчивые к антибиотику культуры клеток показывали хорошие ростовые свойства, которые делились с приблизительным удвоением раз в 24 часа (рисунок 3).

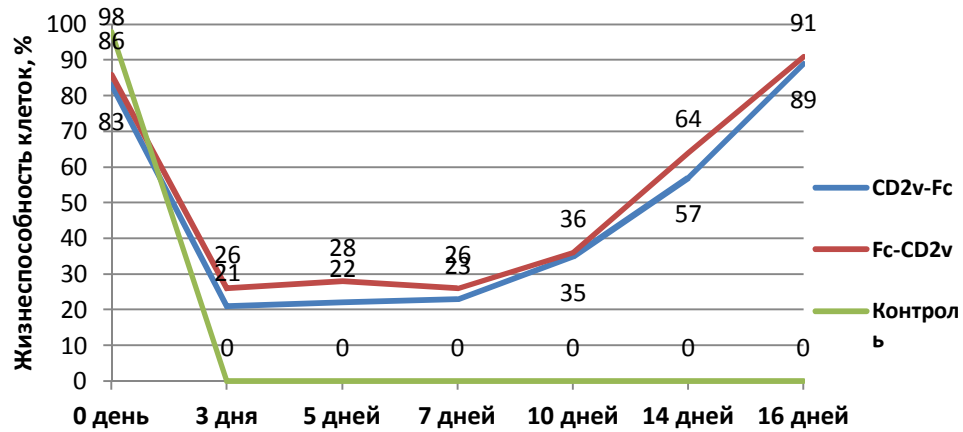


Рисунок 3 - Динамика жизнеспособности клеток СНО на этапе прохождения селекции на антибиотике

3.7.2 Характеристика стабильных клеточных линий СНО-CD2-Fc и СНО-Fc-CD2

3.7.2.1 Ростовые показатели. Для оценки ростовых показателей стабильных клеточных линий СНО-CD2-Fc и СНО-Fc-CD2 было проведено пилотное суспензионное культивирование. Культуры клеток с ростовой средой BalanCD («Irvine», США) содержащего пуромидина (5 мкг/см³) со стартовой плотностью 300 000 клеток/см³, которую культивировали в шейкере-инкубаторе при 37°C, при 130 об/мин, концентрации CO₂ – 5% и влажности не более 75% до достижения 80% порога жизнеспособности.

3.7.2.2 Продуктивные показатели. Для оценки продуктивных показателей стабильных клеточных линий «СНО-CD2-Fc» и «СНО-Fc-CD2» были проведены серии пассажей в колбе с объемом 100 см³, содержащей 15 см³ среды. Средняя продуктивность клеток на протяжении 10 пассажей составила с 1 литра кж 41,4 мг для культуры «СНО-CD2-Fc» и 21,8 мг для культуры «СНО-Fc-CD2».

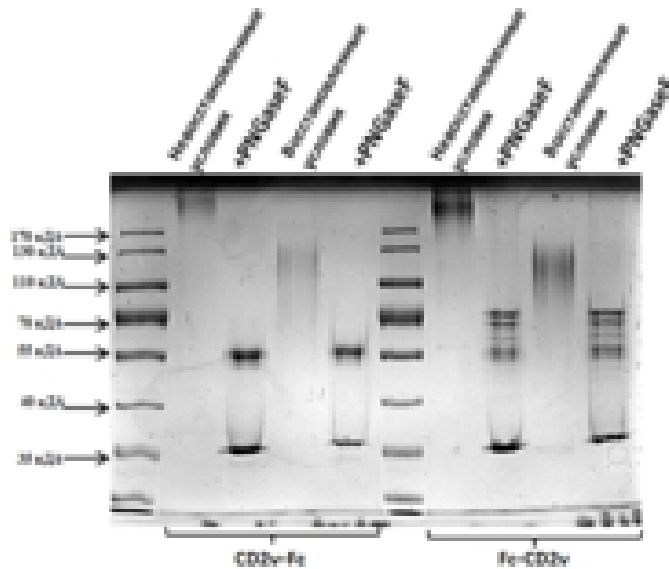
При сравнении продуктивности стабилизированных культур «СНО-CD2-Fc» и «СНО-Fc-CD2» с продуктивностью транзиторно-экспрессирующими культурами, можно отметить, что количество экспрессируемого белка для CD2-Fc увеличилось на 4%, а для белка Fc-CD2 оказалась на 5% ниже.

В целом можно отметить, что продуктивность клеточных линий «СНО-CD2-Fc» и «СНО-Fc-CD2» оставалась на одном уровне и не изменялась на протяжении 10 пассажей.

3.7.3 Дегликозилирование химерных белков CD2–Fc и Fc–CD2

Анализ подвижности дегликозилированных молекул CD2–Fc и Fc–CD2 после обработки ферментом PNGaseF показал значительное изменение электрофоретической подвижности по сравнению с исходными молекулами.

Молекулярная масса белка Fc–CD2 после дегликозилирования составила



55 кДа вместо 120 и 170 кДа, что соответствует теоретической молекулярной массе белка и подтверждает, что полученные белки являются

высокогликозилированными растворимыми гликопротеинами. Указанные изменения подвижности наблюдаются при проведении электрофореза как в восстановленных, так и в невосстановленных условиях.

Рисунок 4 - Анализ дегликозилирования PNGaseF на SDS–Page

(рисунок 4).

Кроме того, на электрофореграмме присутствовал белок с м.м. 35 кДа, характерный для электрофоретической подвижности самого фермента PNGaseF.

3.7.4 Связывание химерных молекул CD2–Fc и Fc–CD2 с антивидовым конъюгатом

Анализ связывания Fc-фрагмента с антивидовым конъюгатом goat anti-swine IgG–HRP (Santa Cruz Biotechnology, США) с помощью иммуноблотинга, подтверждает аутентичность Fc-домена в составе химерных белков CD2–Fc и Fc–CD2, нативному кристаллообразующему домену свиного иммуноглобулина. (рисунок 5).

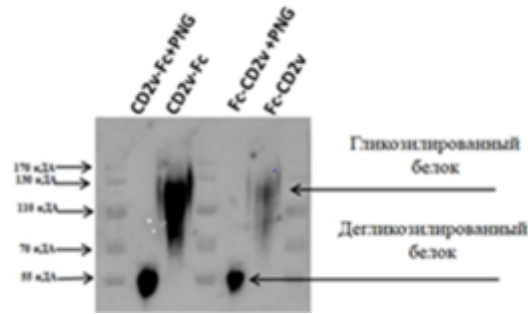


Рисунок 5 - Блотограмма связывания Fc-фрагмента с антивидовым конъюгатом

3.7.5 Анализ связывания химерных молекул CD2–Fc и Fc–CD2 с антителами гипериммунной сыворотки против вируса АЧС

Анализ связывания проводили с антителами гипериммунной сыворотки от животных, зараженных вирусом АЧС 8 серотипа, с помощью иммуноблотинга.

Электрофорез белков CD2–Fc и Fc–CD2 проводили в 10% SDS геле в восстановленных условиях. Детекцию проводили с помощью специфического антивидового конъюгата против IgG1 свиньи goat anti–swine IgG–HRP (SantaCruzBiotechnology, США).

На основании полученных данных можно утверждать, что химерные рекомбинантные антигены CD2–F и Fc–CD2 сохранили в свою аутентичную структуру, которые и узнаются поликлональными антителами гипериммунной сыворотки против вируса АЧС (рисунок 6).

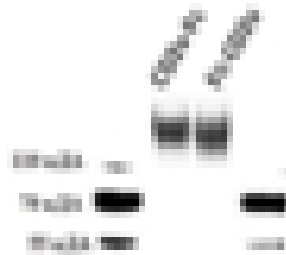


Рисунок 6 - Блотограмма анализа взаимодействия химерной молекулы CD2v с поликлональными антителами гипериммунной сыворотки против вируса АЧС.

3.7.6 Реакция гемадсорбции эритроцитов в клетках COS–1, экспрессирующих химерные белки CD2–Fc и Fc–CD2

В данном эксперименте нами показано сохранение функции адсорбции эритроцитов молекулой CD2v в составе химерных белков. Клетки COS–1 трансфецировали пламидами pCD2–Fc и pFc–CD2 и по достижению 80% монослоя к клеткам добавляли равное количество 10% суспензии эритроцитов. Качественный анализ гемадсорбции учитывали визуально под микроскопом на 1

и 3 день после трансфекции. На 3 день после трансфекции клетки, экспрессирующие CD2–Fc связывали значительное количество (10-20) характерных скоплений эритроцитов. Клетки, экспрессирующие Fc–CD2 связывали единичное количество эритроцитов, что свидетельствует о низкой гемадсорбирующей активности антигена CD2v. Мы предположили, что снижение адсорбции эритроцитов молекулой Fc–CD2 является следствием расположения Fc–домена относительно антигена CD2v.

3.7.7 Анализ пролиферации клеток РВМС

В данном исследовании тест на пролиферацию клеток проводили с помощью набора «ХТТ Cell Proliferation Kit II» (Panreac кат. № A8088.1000).

В качестве объектов исследования использовали свиные клетки РВМС, полученные от здоровых свиней белой породы в возрасте 6 месяцев. В качестве отрицательного контроля использовали среду ADCF–Mab. В качестве положительного контроля использовали препарат интерлейкина 2. Все образцы были исследованы в трех повторениях (рисунок 7).

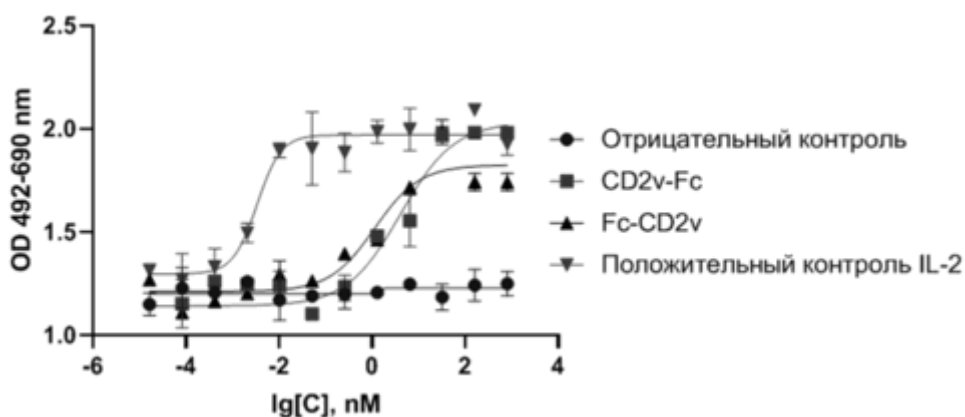


Рисунок 7 - Анализ пролиферации клеток РВМС, стимулированных молекулами CD2v–Fc и Fc–CD2v в ХТТ–тесте

Проведенный эксперимент показал, что при инкубации выделенной фракции РВМС от здоровых свиней с препаратами CD2v–Fc и Fc–CD2v в течение 48 часов происходит пролиферация иммунокомпетентных клеток. Оценку результатов анализа пролиферации клеток РВМС описывали с помощью функции EC50. Результаты для молекулы CD2v-Fc составляли - 4.060, а для Fc-CD2v-1.129. В данном тесте учитывается только качественный показатель стимуляции иммунокомпетентных клеток, который позволяет говорить о пролиферации Т–лимфоцитов, а также, что полученные рекомбинантные препараты вируса АЧС CD2v–Fc и Fc–CD2v не являются токсичными по отношению к мононуклеарным клеткам периферической крови.

3.7.8 Анализ связывания химерных молекул CD2v-Fc и Fc-CD2v с Fc-рецепторами

3.7.8.1 Связывание с рекомбинантными рецепторами FcγRI свиньи и FcRn свиньи. Основной функцией Fc- фрагмента является его способность связываться с Fc-γ рецепторами IgG. В нашем исследовании мы провели анализ по 2 рецепторам FcγR1 и FcRn с помощью метода ИФА. Оценку результатов зависимости оптической плотности от концентрации белка описывали с помощью функции EC50 (полумаксимальная эффективная концентрация), численно равная концентрации препарата, соответствующая 50%-му увеличению уровня сигнала - EC50.

Так EC50 связывания с FcγR1 для препарата CD2v-Fc составляла 15,9 нг/мл, для Fc-CD2v - 15,2 нг/мл. EC50 для FcRn составляла для CD2v-Fc - 11,5 нг/мл и для Fc-CD2v - 12,1 нг/мл соответственно.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что химерные молекулы CD2v-Fc и Fc-CD2v связываются с рекомбинантными клеточными рецепторами. Уровень сигнала EC50 для каждой химерной молекулы находится в наномолярном диапазоне, что свидетельствует о высокоаффинном взаимодействии.

3.7.9 Тест на индукцию интерферона – γ клетками РВМС свиней

Способность рекомбинантных молекул CD2v-Fc и Fc-CD2v индуцировать CTL ответ был исследован с помощью набора «Porcine IFN-γ ELISpot, Kit» (R&D Systems, кат. №. EL985), путем определения числа лимфоцитов продуцирующих интерферон – γ. Химерные белки CD2v-Fc и Fc-CD2v были использованы в качестве специфических антигенов.

Наибольшее количество клеток, секретируемые интерферон-γ, наблюдали в образце CD2v-Fc в количестве 152 нМ и 76 нМ. Меньшее количество клеток наблюдали в образце Fc-CD2v (рисунок 8).

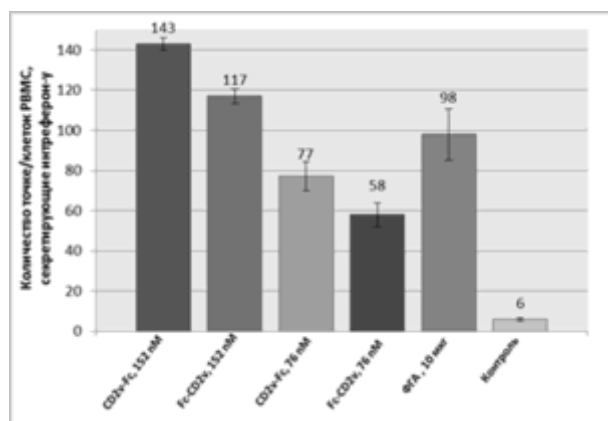


Рисунок 8 - Результаты анализа выброса интерферона–гамма клетками PBMC ($1,5 \cdot 10^4$ /лунку), стимулированные молекулами CD2v–Fc и Fc–CD2v

По результатам анализа способности рекомбинантных молекул CD2v–Fc и Fc–CD2v вызывать индукцию интерферона – γ клетками PBMC можно отметить, что обе молекулы вызывают CTL ответ. Кроме того, показано, что количество лимфоцитов, продуцирующих интерферон – γ прямо зависит от количества вносимого рекомбинантного антигена - CD2v–Fc или Fc–CD2v, и имеет дозозависимый эффект.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате изучения функциональных свойств рекомбинантных химерных белков CD2v вируса АЧС, слитого с Fc-фрагментом свиного IgG1 изотипа, было показано, что разработанные молекулы CD2v-Fc и Fc-CD2v не токсичны и обладают пролиферирующими свойствами по отношению к свиным клеткам PBMC. Показана Fc-опосредованная активность созданных молекул, демонстрирующая высокоаффинное взаимодействие с Fc-рецептором иммуноглобулинов Fc γ R1 и FcRn. Способность полученных молекул индуцировать CTL ответ доказана анализом на индукцию интерферона– γ клетками PBMC.

4.1 Итоги выполненного исследования

1. Биоинформатический анализ наличия иммунных эпитопов выявил 4В- и 5Т- клеточных эпитопов в первичной последовательности белка CD2v вируса АЧС (17-204 аминокислоту), которые потенциально должны быть включены в состав субъединичной полиэпитопной В- и Т- клеточной вакцины против АЧС.

2. Созданы генно – инженерные конструкции pFc–CD2v и pCD2v-Fc, кодирующие химерный белок CD2v, в котором Fc- фрагмент расположен на N – и C – конце молекулы.

3. Получены перевиваемые линии клеток «СНО-Fc-CD2v» и «СНО-CD2v-Fc» стабильно экспрессирующие химерные рекомбинантные белки Fc-CD2v и CD2v-Fc, которые на протяжении 10 последовательных пассажей показали сохранение ростовых показателей культуры и постоянный уровень продуктивности целевых молекул.

4. Разработанные препараты CD2v-Fc и Fc-CD2v не являются токсичными по отношению к мононуклеарным клеткам и вызывают пролиферацию иммунокомпетентных клеток РВМС, выделенных от здоровых свиней.

5. Молекулы CD2v-Fc и Fc-CD2v связываются с рекомбинантными клеточными рецепторами FcγRI и FcRn свиньи с EC50 наномолярного диапазона, что свидетельствует об высокоаффинном взаимодействии.

6. Рекомбинантные химерные молекулы CD2v-Fc и Fc-CD2v вызывают индукцию интерферона-γ клетками РВМС и имеют дозозависимый эффект.

4.2 Практические предложения

Получены генно-инженерные конструкции и стабильные клеточные линии «СНО-Fc-CD2v» и «СНО-CD2v-Fc», экспрессирующие химерные рекомбинантные белки Fc-CD2v и CD2v-Fc, которые представляет собой уникальную модель для изучения вирус-клеточных взаимодействий вируса АЧС, а также проведения молекулярно - генетических исследований, разработки диагностических и профилактических препаратов.

4.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

Стимуляция свиных клеток РВМС химерными молекулами Fc-CD2v и CD2v-Fc, способна индуцировать ответный синтез интерферон-γ. В дальнейшем будут изучены биологические характеристики рекомбинантных химерных белков вируса АЧС (штамм Ставрополь) на свиньях.

Целесообразно продолжить изучение взаимодействия вируса АЧС с клеточными белками и провести сравнительный анализ экспрессии генов путем РНК-секвенирования транскриптома клеток, инфицированных как различными штаммами и изолятами вируса АЧС.

4.4 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Роль и эволюция ингибиторов апоптоза (IAPs) иммуномодулирующих белков вируса африканской чумы свиней / С.А.

Каторкин, **Е.И. Каторкина**, Г.С. Бурмакина, М.В. Шкаликова, А.С. Малоголовкин // Ветеринарная патология – 2018. Т. – 66, №4, С.- 5-12.

2. Применение технологии Fc-слияния белков для разработки вакцин против инфекционных болезней животных и человека / **Е.И. Каторкина**, С.Ж. Цыбанов, А.С. Малоголовкин // Сельскохозяйственная биология – 2019. - Т. 54, №4, С. - 642-654.

3. *In silico* идентификация В- и Т-клеточных эпитопов белка CD2v вируса африканской чумы свиней (African swine fever virus, Asfvivirus, Asfarviridae) / К.А. Мима, **Е.И. Каторкина**, С.А. Каторкин, С.Ж. Цыбанов, А.С. Малоголовкин // Вопросы вирусологии – 2020, - Т. 65, №2, С. – 103-112.

4. Функциональная характеристика гликопротеина CD2v вируса африканской чумы свиней, слитого с Fc-фрагментом свиного IgG изотипа 1 / **Е.И. Каторкина**, К.А. Мима, С.А. Каторкин, С.Ж. Цыбанов, А.С. Малоголовкин // Материалы X Международной научнопрактической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения», 23-24 июня 2020 года.

5. Expression of ASFV CD2v protein fused with the porcine IgG Fc fragment / Mima K., **Katorkina E.**, Katorkin S., Tsybanov S.Z., Malogolovkin A. // Материалы Международной конференции «Eризооn», 26-28 August 2019.

6. Характеристика рекомбинантных молекул CD2v вируса африканской чумы свиней, слитые с Fc доменом свиного иммуноглобулина G / **Е.И. Каторкина**, С.А. Каторкин, К.А. Мима, С.Ж. Цыбанов, А.С. Малоголовкин // Материалы XIX Всероссийской молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» 15-16 апреля 2019 года.

Подписано в печать 12 октября 2020 г.

Формат 60×90 1/16. Усл. печ. л.1.

Тираж 80 экз.

Отпечатано на полиграфической базе ФГБУ
«Федеральный центр охраны здоровья животных»