

На правах рукописи

Нефедьева Мария Владимировна

**ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ
ЧУМЫ СВИНЕЙ С ДЕЛЕЦИЕЙ РЕГУЛЯТОРА ТРАНСКРИПЦИИ A238L**

03.02.02 «Вирусология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Вольгинский - 2019

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, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи», заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии

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

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»

Защита состоится _____ 20__ г. в _____ 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.arriah.ru

Автореферат разослан _____ 20__ г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Вирус африканской чумы свиней (АЧС) является ДНК-содержащим вирусом семейства *Asfarviridae*, который вызывает смертельную болезнь свиней, что приводит к серьезным экономическим потерям в свиноводстве (Серета А.Д. с соавт., 2011; Alonso C. et al., 2018). В связи с отсутствием эффективных и безопасных средств защиты от АЧС, контроль болезни возможен только за счет применения быстрых диагностических исследований и проведения жестких противоэпизоотических мероприятий, что и определяет актуальность ее изучения.

В процессе репродукции вирус АЧС использует молекулярные механизмы инфицированных клеток, которые контролируются определенными вирусными белками (*A238L*, *DP71L*, *I329L*, *A179L*, *A224L*, *EP153R* и *EP402R*), участвующими в регуляции каскада иммунных реакций путем воздействия на различные сигнальные пути (Dixon L.K. et al., 2004; Серета А.Д. с соавт., 2012; Fraczyk M. et al., 2016).

Исследование белков вируса АЧС, играющих важную роль в уклонении от защитных систем организма, может способствовать разработке новых мер борьбы с болезнью (Dixon L.K. et al., 2019). Конструирование рекомбинантных вирусов АЧС с измененными или удаленными генами, является перспективным направлением исследований. В настоящее время, для манипулирования с геномом вируса АЧС широко используется линия клеток COS-1, в которой были получены рекомбинантные вирусы АЧС, имеющие делеции различных генов (*EP153R*, *A238L*, *DP71L*, *DP96R*, *EP402R*) (Galindo I. et al., 2000; Hurtado C. et al., 2004; Granja A.G. et al., 2006; de Leon P. et al., 2013; Malogolovkin A.S. et al., 2015; Burmakina G., 2016).

Определение наиболее вариабельного гена, участвующего в регуляции иммунного ответа на основе проведения биоинформатического анализа последовательностей генома аттенуированных и вирулентных штаммов и изолятов вируса АЧС, позволит в дальнейшем использовать его для конструирования рекомбинантного вируса.

Таким образом, прогресс в понимании роли вирусоспецифических белков, кодируемых вирусом АЧС, участвующих в модулировании реакции макроорганизма в ответ на инфицирование, представляет огромный интерес.

Степень разработанности проблемы. Основной стратегией уклонения от защитных систем хозяина является влияние вируса АЧС на сигнальные пути в инфицированных макрофагах (de Leon P. et al., 2013). Вирус АЧС может

манипулировать как врожденным, так и адаптивным иммунным ответом (Dixon L.K. et al., 2019). Метод гомологичной рекомбинации был успешно использован различными авторами для получения делеций отдельных генов (*DP71L*, *DP96R*, *EP402R*, *A238L*) из вирулентных штаммов Malawi LiL20/1, E70, Pr4 и *EP402R* из аттенуированного штамма КК-262 вируса АЧС (Borca M.V., 1994; Zsak L., 1998; Afonso C.L., 1998; Abrams C.C., 2012; Malogolovkin A.S. et al., 2015; Burmakina G., 2016).

К числу иммуномодулирующих белков относится белок 5EL (ген *A238L*) вируса АЧС, который ингибирует активацию фактора транскрипции NF-κB хозяина, активность кальцинейрин фосфатазы и активацию транскрипции, опосредованную факторами, взаимодействующими с N-терминальным доменом транскрипционного коактиватора p300/CBP (Powell P.P. et al., 1996; Granja A.G. et al., 2004; Granja A.G. et al., 2006; Granja A.G. et al., 2008). Однако в настоящее время отсутствуют данные о получении и характеристиках рекомбинантного вируса АЧС (II генотипа) с делецией гена *A238L*.

Цель и задачи исследований. Целью исследований является получение делеционного варианта вирулентного штамма Волгоград/14с вируса АЧС и изучение его культуральных характеристик.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Провести сравнительный бонформатический анализ семи генов *A179L*, *A224L*, *A238L*, *EP153R*, *EP402R*, *I329L*, *DP71L* вируса АЧС, кодирующих белки, участвующих в иммунном уклонении.

2. Определить нуклеотидные последовательности генов *A238L*, *I329L* и *DP71L* штаммов и изолятов вируса АЧС различных генотипов (I, II, V, X), сероиммунотипов (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8) и провести филогенетический анализ.

3. Создать генетическую конструкцию на основе плазмидного вектора pGEM®-T Easy, несущего ген флуоресцентного белка EGFP и фрагменты генома, фланкирующие ген *A238L* вирулентного штамма Волгоград/14с вируса АЧС.

4. Методом гомологичной рекомбинации получить рекомбинантный вирус АЧС с делецией гена *A238L* и изучить его репродукцию *in vitro*.

5. Определить роль *A238L* в индукции апоптоза при репродукции вируса АЧС в клетках культуры COS-1.

Научная новизна результатов исследований. Впервые определены и депонированы в GenBank нуклеотидные последовательности генов *A238L*, *I329L* и *DP71L* 16 штаммов из Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих

опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных ФГБНУ ФИЦВиМ, принадлежащих к I, II, V, X генотипам и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 сероиммунотипам вируса АЧС.

Обнаружено слияние двух открытых рамок считывания генов у изолятов вируса АЧС X генотипа, что привело к образованию длинной и короткой форм гена *DP71L*, кодирующего белок P14L вируса АЧС.

Сконструирована рекомбинантная плаزمида pGEM®-T Easy, несущая ген флуоресцентного белка EGFP вместо гена *A238L*, кодирующего иммуномодулирующий белок 5EL вирулентного штамма Волгоград/14с вируса АЧС (генотип II, сероиммунотип 8).

Получен рекомбинантный вирус АЧС Волгоград/14с Δ*A238L* с делецией гена *A238L* и изучены характеристики его репродукции *in vitro*.

В опытах *in vitro* установлено, что на ранних стадиях после заражения рекомбинантный штамм Волгоград/14с Δ*A238L* с делецией гена *A238L* не ингибирует активность эффекторной каспазы-3 в отличие от родительского штамма с активным геном *A238L* (Волгоград/14с).

Теоретическая и практическая значимость работы. Поиск новых генов - мишеней для конструирования генетически модифицированного вируса АЧС позволит изучить характеристики и тонкие механизмы действия иммуномодулирующих белков, и будет способствовать развитию рациональной стратегии разработки эффективных вакцин против этой болезни.

Нуклеотидные последовательности генов *A238L* и *I329L* 12 изолятов вируса АЧС, выделенных в 2016 г. и трех генов *A238L*, *I329L*, *DP71L* 16 штаммов, принадлежащих к различным генотипам и сероиммунотипам вируса АЧС, могут быть использованы для сравнительного анализа иммуномодулирующих белков и проведения молекулярно - генетических исследований.

В составе плазмидного вектора pGEM®-T Easy создана генетическая конструкция, несущая ген флуоресцентного белка EGFP вместо гена *A238L* вирулентного штамма Волгоград/14с вируса АЧС.

Методом гомологичной рекомбинации получен делеционный вариант вируса АЧС (штамм Волгоград/14с Δ*A238L*), пригодный для изучения характеристики иммуномодулирующего белка 5EL, механизмов иммунного ответа и взаимодействия вируса с клеткой хозяина.

Отсутствие у делеционного варианта вируса АЧС (штамм Волгоград/14с ΔA238L) возможности ингибирования апоптоза на ранних стадиях после заражения может способствовать аттенуации вируса.

В Государственную коллекцию микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных ФГБНУ ФИЦВиМ был депонирован рекомбинантный вирус АЧС Волгоград/14с ΔA238L под инвентарным номером 3181 (протокол №9 от 06.06.2019 г.).

Методология и методы исследования. Методология проведенных исследований включает биоинформатические методы (анализ вариабельности белков по методу Симпсона, анализ нуклеотидных последовательностей методами ClustalW и MUSCLE, филогенетический анализ методом максимального правдоподобия, анализ наличия трансмембранных доменов, анализ синонимичных и несинонимичных замен); молекулярно-биологические методы исследований (ПЦР, гель-электрофорез, количественная ПЦР в режиме реального времени, полногеномное секвенирование, клонирование, трансфекция клеток, гомологичная рекомбинация); вирусологические (вирусовыделение, культивирование и титрование вируса); световую и флуоресцентную микроскопию.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей генов *A238L*, *I329L* и *DP71L* 16 аттенуированных и вирулентных штаммов, изолятов вируса АЧС различных генотипов (I, II, V, X) и сероиммунотипов (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8).

2. Генетическая конструкция на основе плазмидного вектора pGEM®-T Easy, несущая ген флуоресцентного белка EGFP вместо гена *A238L* вирулентного штамма Волгоград/14с вируса АЧС.

3. Рекомбинантный вирус АЧС Волгоград/14с ΔA238L с делецией гена *A238L* и его характеристики *in vitro*.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа выполнена соискателем самостоятельно в лаборатории Геномики вирусов ФГБНУ ФИЦВиМ. Автор выражает искреннюю благодарность сотруднику лаборатории Геномики вирусов к.б.н. И.А. Титову и д.б.н., проф. Серее А.Д. за консультативную и методическую помощь при выполнении отдельных этапов работы.

Работа выполнена в рамках государственного задания при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Степень достоверности и апробация результатов. Степень достоверности результатов проведенных экспериментов подтверждена комиссионными испытаниями, статистическими исследованиями и положительными результатами их проверки на момент проведения экспериментальных исследований.

Результаты исследований по теме диссертационной работы представлены и обсуждены на заседаниях Ученого совета ФГБНУ ФИЦВиМ (2015-2019 гг.), XVI и XVII Всероссийской молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (г. Москва, 2016, 2017 гг.); III Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (пос. Кольцово, 2016 г.); 11-м ежегодном собрании Erizone «Crossing Barriers» (г. Париж, Франция, 2017 г.); Международной научной конференции «Молодежь и наука XXI века» (г. Ульяновск, 2017, 2018 гг.); юбилейной Международной научно-практической конференции, посвященной 120-летию со дня создания ВИЭВ «Здоровье животных: современные научные подходы, направления, тенденции» (г. Москва, 2018 г.); XIX Всероссийской конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (г. Москва, 2019 г.); V Международной научной конференции «Постгеномные технологии: от теории к практике» (г. Воронеж, 2019 г.).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 15 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных изданиях по Перечню рекомендованном ВАК Министерства образования и науки РФ для докторских и кандидатских диссертаций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 139 страницах и включает: введение, обзор литературы, материалы, методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список сокращений, список использованной литературы, включающий 264 источника, из которых 219 - иностранные. Диссертация иллюстрирована 30 рисунками и 9 таблицами. В приложении представлены документы, подтверждающие достоверность результатов работы, ее научную и практическую значимость.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы и оборудование

Штаммы и изоляты вируса АЧС. В работе были использованы штаммы вируса АЧС, полученные из Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на

территории страны болезни животных ФГБНУ ФИЦВиМ: Лиссабон-57 (Л-57) I генотипа 1 сероиммунотипа; ЛК-111 I генотипа 1 сероиммунотипа; Конго-49 (К-49) I генотипа 2 сероиммунотипа; КК-262 I генотипа 2 сероиммунотипа; Франция-32 (Ф-32) I генотипа 4 сероиммунотипа; ФК-32/135 I генотипа 4 сероиммунотипа; СКА-2015 II генотипа 8 сероиммунотипа; Иркутск-2017 II генотипа 8 сероиммунотипа; Мозамбик-78 (М-78) V генотипа 3 сероиммунотипа; МК-200 V генотипа 3 сероиммунотипа; ТКФ 3 сероиммунотипа; ТСП-80 X генотипа 5 сероиммунотипа; ТСП-80/300 X генотипа 5 сероиммунотипа; ТС-7 X генотипа 6 сероиммунотипа; ТС-7/27-230 6 сероиммунотипа; Наньюки 8 сероиммунотипа; Волгоград/14с II генотипа 8 сероиммунотипа.

Источником получения изолятов вируса АЧС служила кровь и суспензии органов, выделенные от свиней из хозяйств Краснодарского края, Курской, Архангельской, Воронежской, Псковской, Пензенской, Московской, Тамбовской, Липецкой областей Российской Федерации в 2016 году.

Культуры клеток. Перевиваемая линия клеток COS-1, полученная из Коллекции культур клеток и музея клеточных штаммов ФГБНУ ФИЦВиМ; первичная культура лейкоцитов свиней (ЛС), полученная от здоровых животных.

Плазмиды и бактериальные штаммы. Для клонирования использовали плазмидный вектор pGEM®-T Easy («Promega», США), плазмидный вектор pMiniT 2.0 («New England Biolabs», США) и компетентные клетки бактериальной культуры *E.coli* XLI-Blue («Евроген», Россия).

2.2 Методы исследований

Биоинформатический анализ. Варианты метода множественного выравнивания ClustalW, MUSCLE и интернет-ресурс BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); веб – сервер SignalP 4.1. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1>); веб-приложение CCTOP (<http://cctop.enzim.ttk.mta.hu>); Sequencing Analysis («Applied Biosystems»); Sequence Scanner («Applied Biosystems»); программа Mega 6.0.; программа Figtree (<http://influenza.bio.ed.ac.uk/software/Figtree/>); программа для конструирования рекомбинационной кассеты Serial Cloner 2.6 (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html); пакет программы SNAP (www.hiv.lanl.gov); веб-сервис Protein Variability Server (<http://www.expasy.org/proteomics>). Подбор праймеров осуществляли на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов различных штаммов и изолятов вируса АЧС, опубликованных в международной базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) с помощью программы BioEdit 7.0.1. (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Расчет праймеров для амплификации плечей рекомбинации проводили с учетом

наличия сайтов рестрикции эндонуклеаз в составе вектора pGEM®-T Easy («Promega», США) и соответствующей открытой рамки считывания (ОРФ) с помощью веб-сервера IDT DNA (<https://eu.idtdna.com/site>) и программы Oligo 6.0 (<http://oligo.net/downloads.html>).

Выделение нуклеиновых кислот из крови и суспензии органов проводили набором “ДНК-сорб-В” («ИнтерЛабСервис», Россия) в соответствии с инструкцией изготовителя. Выделение ДНК из геля проводили согласно методике производителя набора QIAquick Gel Extraction («QIAGEN», Германия), “Cleanup - standard” («Евроген», Россия) и PCR clean-up Gel extraction (MACHEREY-NAGEL GmbH&Co. KG, Германия). Для выделения плазмидной ДНК применяли набор ISOLATE II Plasmid Mini Kit («Bioline», США) и PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep (Maxiprep) Kit («Invitrogen», США) в соответствии с инструкцией производителя.

Полимеразная цепная реакция. Для постановки ПЦР использовали термоциклер «T100» («Bio-Rad Laboratories», США) и Real-time CFX96 Touch («Bio-Rad Laboratories», США). Для амплификации плечей рекомбинации генов использовали набор Phusion® High-Fidelity PCR Kit («NEB», США). Анализ продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза с последующим учетом на ChemiDoc MP («Bio-Rad Laboratories», США).

Нуклеотидное секвенирование генов вируса АЧС проводили в автоматическом секвенаторе «Genetic Analyzer 3130» («Applied Biosystems», США). Полногеномное секвенирование рекомбинантного вируса АЧС проводили на нанопоровом секвенаторе MinION («Oxford Nanopore Technologies», Великобритания) согласно инструкции изготовителя.

Конструирование рекомбинантных векторов. Для очистки от компонентов ПЦР смеси продукты амплификации переосаждали этанолом. Отдельные этапы конструирования рекомбинационной кассеты проводили согласно методикам, описанным Green M.R. и Sambrook J. (2012). Рестрикцию проводили в буфере с добавлением эндонуклеаз согласно инструкции изготовителя («NEB», США). Для лигирования использовали наборы T4 DNA Ligase («NEB», США) и pGEM®-T Easy («Promega», США) в соответствии с рекомендациями фирм-изготовителей. Для химической трансформации использовали бактериальную культуру *E.coli* XLI-Blue («Евроген», Россия).

Получение рекомбинантного вируса АЧС. Для инфицирования перевиваемых клеток культуры COS-1 выбран культуральный вирус АЧС штамм Волгоград/14с. Для

трансфекции клеток использовали набор Lipofectamine 2000 («Invitrogen», США) согласно рекомендациям изготовителя. Клетки культивировали в среде DMEM/F-12 («Gibco», США) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco», США) при 37°C в течение 3 дней. Подсчет количества клеток культуры проводили при помощи автоматического счетчика LUNA-FL™ («Logos Biosystems, Inc»). Отбор рекомбинантных клонов проводили по репортерной флюоресценции гена EGFP с помощью микроскопа ZOE Fluorescent Cell Imager («Bio-Rad Laboratories, Inc.»). Для дальнейшего скрининга рекомбинантных клонов использовали метод предельных разведений. При последующем отборе клонов использовали реакцию бляшкообразования (отбирали флуоресцирующие фокусы), после чего изучали культуральные свойства и проводили секвенирование генома вируса.

Инфекционную активность рекомбинантного вируса АЧС определяли в первичной культуре лейкоцитов свиней (ЛС) и перевиваемой культуре клеток COS-1. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча.

Отсутствие исходного родительского типа вируса в вирусосодержащей суспензии рекомбинантного вируса после его селекции методами предельных разведений и бляшек подтверждали постановкой ПЦР с использованием специфических праймеров, фланкирующих фрагмент гена *A238L* штамма Волгоград/14с вируса АЧС.

Проверка лиофилизированного рекомбинантного штамма Волгоград/14с ΔA238L вируса АЧС на отсутствие контаминации бактериальной, грибной микрофлорой и микоплазмами проведена в соответствии СОП 00566-01.

Ростовые характеристики рекомбинантного и исходного вируса АЧС определяли путем инфицирования клеток культуры COS-1 при множественности заражения 0,1 и 1,0 ТЦД₅₀/кл. Количественную ПЦР в режиме реального времени проводили в амплификаторе Real-time CFX96 Touch («Bio-Rad Laboratories», США).

Количественное обнаружение апоптоза в клетках. Колориметрический анализ количественного определения уровня апоптоза в инфицированных клетках культуры COS-1 проводили с использованием набора HT TiterTACSTM Assay Kit («Trevigen, Inc»).

Статистическая обработка полученных результатов проведена общепринятыми методами (Бейли Н., 1962). Анализ и интерпретация результатов исследований проведена с применением программы Rstudio («Rstudio Inc.»).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Сравнительный анализ генов вируса АЧС, участвующих в иммунном уклонении

На первом этапе исследований на основе анализа данных литературы были отобраны гены вируса АЧС, кодирующие белки, участвующие в иммунном уклонении (*A179L*, *A224L*, *A238L*, *EP153R*, *EP402R*, *I329L*, *DP71L*) (Dixon L.K., 2004). С целью выявления новых генетических маркеров был проведен филогенетический анализ аминокислотных последовательностей вышеперечисленных генов от 17 (Benin 97/1, E75, Georgia2007/1, L60, OURT88/3, BA71, BA71V, Ken05/Tk1, Ken06.Bus, NHV, Malawi Lil-20/1, Tengani 62, Pretorisuskop/96/4, Kenya 1950, Mkuzi 1979, Warthog, Warmbaths) различных штаммов, изолятов вируса АЧС, объединенных в одну псевдо-последовательность.

В соответствии с филогенетическим деревом, построенным методом максимального правдоподобия, все исследованные последовательности были разделены на 4 основных кластера, которые коррелируют с их географическим распределением и видам хозяев (рисунок 1). Первый кластер (I) состоял из шести штаммов и изолятов из европейских стран и изолята из Западной Африки. Во второй кластер (II) были отнесены изоляты, выделенные от клещей из Южной Африки. Третий кластер (III) состоял из нескольких изолятов из Южной Африки. В четвертый кластер (IV) вошли четыре штамма и изолята, выделенные на территории Юго-Восточной Африки. Референс-штамм *Georgia2007/1* не входил ни в одну из образованных групп.

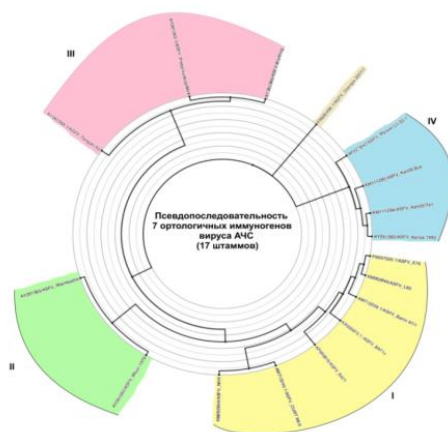


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа псевдо-последовательности из 7 ортологичных генов вируса АЧС (*A179L*, *A224L*, *A238L*, *EP153R*, *EP402R*, *I329L*, *DP71L*) методом максимального правдоподобия при помощи программы *Mega 6.0*.

Дополнительно отмечены кластеры (I-IV) в которые сгруппированы изоляты вируса.

Интересно отметить, что топология филогенетического дерева, построенная на основе анализа псевдо-последовательности из 7 иммуномодулирующих генов,

полностью совпадает с филогенетическим деревом, построенным на основе сравнения полноразмерных геномов изолятов вируса АЧС. Данный факт может свидетельствовать о том, что иммуномодулирующие гены могут являться генетическими маркерами эволюционной изменчивости.

Следующим этапом наших исследований являлось определение консервативных и переменных областей в последовательностях аминокислот иммуномодулирующих белков вируса АЧС при помощи программы Protein Variability Server (метод Симпсона).

Результаты анализа изменчивости трех иммуномодулирующих белков - 5EL (ген *A238L*), I14L (ген *DP71L*) и K11L (ген *I329L*) 17 различных штаммов вируса АЧС показали, что у белка 5EL имеется 13 переменных сайтов, часть из которых располагается в участке IкВ – подобного домена, состоящего из 3 повторов анкиринов (с 87 по 178 аминокислоту) и на С-терминальном конце мотива PхIхITхC/S, который связывает каталитическую субъединицу кальцетейрина - серинтреонин фосфатазу (с 200 по 213 аминокислоту) (рисунок 2).

Белок I14L является наиболее консервативным, поскольку имеет 7 переменных сайтов. Этот белок содержит центральную область, состоящую из высококонсервативного 56-аминокислотного домена и мотива PP1с bdg (с 7 по 57 аминокислоты в «короткой форме» и с 123 по 170 аминокислоты в «длинной форме») регуляторных субъединиц (15А и 15В) белковой фосфатазы 1, расположенных на карбоксильном конце, которые являются общими для белка MyD116 и фактора нейровирулентности ICP34.5. герпесвируса (рисунок 2).

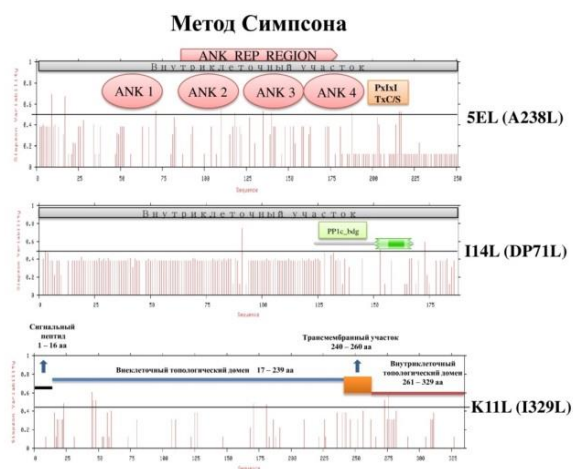


Рисунок 2 – Результаты анализа изменчивости белков 5EL - IкВ гомолога и ингибитора кальцетейрин фосфатазы; I14L - белка сходного с HSV ICP34.5 фактором нейровирулентности; K11L – белка ингибитора передачи сигналов TLR

Примечание: переменными считаются области со значениями, превышающими пороговое значение 0,46 (горизонтальная линия черного цвета).

Высокогликозилированный белок K11L также является консервативным и не имеет выраженной вариабельности. Обнаружено лишь 8 вариабельных сайтов, часть из которых попадает во внеклеточный топологический домен (с 17 по 239 аминокислоту), а также во внутриклеточный топологический домен (с 261 по 329 аминокислоту). Трансмембранный участок белка находится на С-конце (с 240 по 260 аминокислоту) белковой молекулы (рисунок 2).

3.1.1 Дизайн специфических праймеров для амплификации копий генов *A238L*, *I329L* и *DP71L* вируса АЧС

Для проведения дальнейших исследований в качестве матрицы из Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных ФГБНУ ФИЦВиМ были отобраны 12 изолятов, выделенных из разных регионов Российской Федерации в 2016 году и 16 штаммов, принадлежащих к четырем различным генотипам (I, II, V, X) и семи сероиммунотипам (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8) вируса АЧС. Для каждого сероиммунотипа были выбраны аттенуированный и вирулентный штаммы вируса АЧС, указанные в таблице 1. В качестве референс-штамма была выбрана нуклеотидная последовательность штамма VA71V вируса АЧС (NC001659).

Таблица 1 – Штаммы 7 сероиммуногрупп вируса АЧС

Штамм	Страна	Год выделения	Генотип	Сероиммунотип	Биологические свойства
Л-57	Португалия	1957	I	1	вирулентный
ЛК-111	Португалия	1978	I	1	аттенуированный
К-49	Заир	1949	I	2	вирулентный
КК-262	Заир	пассирован из КК-202	I	2	аттенуированный
Ф-32	Франция	1964	I	4	вирулентный
ФК-32/135	Франция	пассирован из Ф-32	I	4	аттенуированный
СКА-2015	Россия	пассирован из Ставрополь 01/08	II	8	аттенуированный
Иркутск-2017	Россия	2017	II	8	вирулентный
М-78	Мозамбик	1978	V	3	вирулентный
МК-200	Мозамбик	пассирован из М-78 в 1980 г.	V	3	аттенуированный
ТКФ	Танзания	селекционирован из Т-67 в 1981 г.	-	3	аттенуированный
ТСП-80	Танзания	селекционирован из Т-67 в 1980 г.	X	5	вирулентный
ТСП-80/300	Танзания	селекционирован из Т-67 в 1986 г.	X	5	аттенуированный
ТС-7	Танзания	пассирован из Т-67 в 1984 г.	X	6	вирулентный
ТС-7/27-230	Танзания	пассирован из ТС-7/150 в 1986 г.	-	6	аттенуированный
Наньюки	Кения	1960	-	8	вирулентный

Подобранные последовательности олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих участки генов *A238L*, *I329L* и *DP71L* вируса АЧС, имели достаточно высокую температуру отжига ($\Delta T_a=57^\circ\text{C}$), что позволило максимально исключить уровень неспецифических реакций за счет образования вторичных структур - шпилек и димеров (таблица 2).

Таблица 2 – Олигонуклеотидные праймеры для амплификации генов *A238L*, *I329L*, *DP71L*

Название	Последовательность 5'-3'	Позиция на геноме вируса АЧС BA71V	Длина продукта та	GC, %	Tm, °C	ΔG (kcal/mole)
A238LF	aagtttgattctgttcaggaagt	33371 - 33394	575	37.5	58.5	-41.5
A238LR	acagatccgtggattgtcaatag	33923 - 33945		43.5	58.3	-40.2
DP71LF	ggatttgctatgcttacttgatg	164383-164405	488	39.1	56.0	-40.3
DP71LR	cgttcatatcaactggtttctct	164848-164870		39.1	56.6	-39.1
I329LF	ttactttcttgaacatgaaacc	155675-155691	950	35.3	56.2	-28.8
I329LR	aggaagtggcttaacaggtgta	156605-156624		45.0	55.8	-35.8

3.1.2 Амплификация фрагментов генов *A238L*, *I329L* и *DP71L* методом ПЦР

Оптимальная температура отжига праймеров для амплификации генов *A238L* и *I329L* составила 52°C , а для гена *DP71L* - 50°C . На рисунке 3 показан результат электрофореза ПЦР-продуктов фрагментов гена *DP71L*.

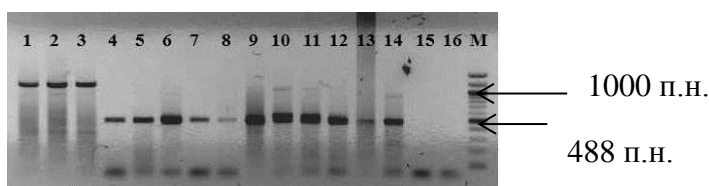


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов амплификации гена *DP71L*

Примечание: 1 - штамм вируса АЧС Наньюки; 2 - ТСП-80; 3 - ТКФ; 4 - М-78; 5 - МК-200; 6 - Л-57; 7 - СКА-2015; 8 - КК-262; 9 - К-49; 10 - Ф-32; 11 - ФК-32/135; 12 - ЛК-111; 13 - Иркутск-2017; 14 - положительный контрольный образец ПЦР (культуральный вирус АЧС штамм КК-262); 15, 16 - отрицательный контроль ПЦР (деионизированная вода); М - маркер молекулярного веса ДНК 100 п.н.

ПЦР-продукты вырезаны из геля и использованы для дальнейшего определения нуклеотидных последовательностей методом секвенирования.

3.1.3 Филогенетический анализ генов *A238L*, *I329L* и *DP71L* вируса АЧС

Сравнительный анализ результатов секвенирования фрагментов генов *A238L* и *I329L* 12 изолятов вируса АЧС, выделенных на территории РФ в 2016 г., показал, что они являются идентичными исходному родительскому референс-штамму Georgia 2007/1 (FR682468) (II генотип). Филогенетический анализ генов *A238L*, *I329L* и *DP71L* 16 аттенуированных и вирулентных штаммов вируса АЧС, принадлежащих 4 генотипам

и 7 различным сероиммунотипам, показал, что внутри одного сероиммунотипа последовательности этих генов являются консервативными. Полученные нуклеотидные последовательности генов *A238L*, *I329L* и *DP71L* были депонированы в международную базу данных GenBank с присвоением ID номеров.

Обнаружено, что у шести штаммов восточноафриканского происхождения X генотипа (ТКФ, Наньюки, ТСП-80, ТСП-80/300, ТС-7, ТС-7/27-230), как у полногеномных изолятов Ken05/Tk1, Kenya 1950, Malawi Lil-20/1 и штамма Ken06.Bus, ген *DP71L* образуется путем слияния двух генов, что является уникальным среди штаммов и изолятов вируса АЧС.

3.1.4 Анализ синонимичных и несинонимичных замен псевдо-последовательности генов *A238L* (5EL), *I329L* (K11L) и *DP71L* (I14L) вируса АЧС

Количество синонимичных замен на синонимичный сайт псевдо-последовательности белков 5EL, K11L и I14L 32 штаммов, изолятов вируса АЧС, преобладало над количеством несинонимичных на несинонимичный сайт $0.2788 > 0.0678$ ($dS > dN$, $pS > pN$). Эти данные свидетельствуют об очищающем (стабилизирующем) отборе на уровне нуклеотидных последовательностей.

3.2 Получение рекомбинантного вируса АЧС

3.2.1 Олигонуклеотидные праймеры для секвенирования плечей рекомбинации гена *A238L*

Для конструирования рекомбинантного вируса АЧС на основе данных филогенетического анализа был выбран ген *A238L*, кодирующий белок 5EL, поскольку он был наиболее вариабельным среди выбранной группы генов. Подбор праймеров для амплификации плечей рекомбинации, фланкирующих ген *A238L* был проведен по нуклеотидной последовательности референс-штамма Georgia_2007/1 (FR682468) (таблица 3).

Таблица 3 – Олигонуклеотидные праймеры для амплификации плечей рекомбинации гена *A238L* вируса АЧС

Название	Последовательность 5'- 3'	Позиция на геноме вируса АЧС Georgia_2007/1	Длина продукта	GC, %	Tm, °C	ΔG (kcal/ mole)
A238L_F_left	atatcacccgaacaatcaac	49385-49404	1254	35	56.9	-34.2
A238L_R_left	aaatctcttaaccatgactacc	50617-50638		36.3	57.5	-36.1
A238L_F_right	agtttccatctttatccctc	50896-50915	1302	40	57.4	-35.3
A238L_R_right	ttctagcattatccccttt	52179-52197		36.8	56.6	-34.9

В качестве объекта для исследования из Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных ФГБНУ ФИЦВиМ был выбран вирулентный штамм Волгоград/14с (II генотип, 8 сероиммунотип). Размеры участков ДНК левого и правого плечей рекомбинации, фланкирующих ген *A238L*, составили 1254 и 1302 п.н., соответственно.

Сравнение нуклеотидных последовательностей полученных ампликонов с геномом референс-штамма Georgia_2007/1 (FR682468) показало 100% идентичность последовательностей фрагментов генов *MGF360-15R*, *A859L* и межгенных регионов между данными участками штамма Волгоград/14с вируса АЧС.

3.2.2 Олигонуклеотидные праймеры для создания генетической конструкции на основе плазмидного вектора

На следующем этапе нашей работы были подобраны олигонуклеотидные праймеры для амплификации копий плечей рекомбинации гена *A238L* штамма Волгоград/14с и зеленого флуоресцентного белка EGFP, содержащие специфические последовательности сайтов рестрикции эндонуклеаз SphI, SpeI, XhoI и SalI для встраивания их в состав вектора pGEM®-T Easy («Promega», США) (таблица 4).

Таблица 4 - Олигонуклеотидные праймеры для синтеза копий плечей рекомбинации гена *A238L* вируса АЧС и белка EGFP

Название	Последовательность 5'- 3'	Позиция на геноме вируса АЧС Georgia_2007 /1	Длина проду кта	GC, %	Tm, °C	ΔG (kca l/mo le)	Сайты рестри кции
Delta_A238L_Volg_Left_F	tagacgcatgctattataccattatt cctgctc	49498		31.8	56.8	- 36.5	SphI gcatgc
Delta_A238L_Volg_Left_R	cgattactagtaaaagcttaacaag tatggaa	50470	972	28.6	57.1	- 35.8	SpeI actagt
Delta_A238L_Volg_Right_F	ggttcctcgaggtgtccatttga atgctc	51152	966	36.8	54.4	- 31.9	XhoI ctcgag
Delta_A238L_Volg_Right_R	aaatgcgtcgacgttgccatccga taaac	52118		44.4	54.5	- 32.9	SalI gtcgac
EGFP_SpeI_f	aattaaactagtggtcgccggag g	7-20	956	84,6	58.5	- 31.9	SpeI actagt
EGFP_XhoI_r	caattgctcgagttactgtacagct cgctc	913 – 931		47,4	55.0	- 32.6	XhoI ctcgag

В результате амплификации были получены ПЦР - продукты размерами 956 п.о. (флуоресцентный белок EGFP), 966 п.о. (правое плечо рекомбинации) и 972 п.о. (левое плечо рекомбинации) с целью дальнейшего их клонирования в плазмидный вектор.

3.2.3 Генетическая конструкция на основе плазмидного вектора

Для дальнейшего встраивания и клонирования в плазмидный вектор ПЦР продукты плечей рекомбинации и флуоресцентный белок EGFP были наработаны с помощью высокоточной ДНК-полимеразы Phusion® High-Fidelity PCR Kit («New England Biolabs», США). Плечи рекомбинации представляли собой фрагменты генома вируса АЧС, расположенные слева и справа от гена *A238L* и имели длину 972 п.о. и 966 п.о. соответственно. Для дальнейшего скрининга рекомбинантных клонов в качестве репортерного гена в конструкции был встроен ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок EGFP, под контролем промотера гена *B646L* (белок р72) вируса АЧС (рисунок 4).

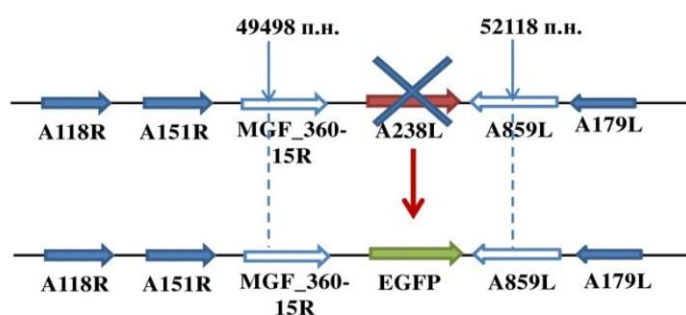


Рисунок 4 - Схематическое изображение процесса замены гена *A238L* штамма Волгоград/14с репортерным геном EGFP

Полученные ПЦР-продукты очищали, концентрировали и проводили рестрикцию фрагментов ДНК правого плеча рекомбинации гена *A238L* и EGFP-белка с помощью рестриктазы *XhoI* («Thermo Fisher Scientific», Германия). Далее лигированную смесь клонировали по тупым концам в состав плазмидного вектора pMiniT 2.0 («New England Biolabs», США) с использованием бактериальной культуры *E.coli XL1-Blue*. После подтверждения наличия специфической вставки в плазмидной ДНК методом ПЦР, вставку EGFP+правое плечо вырезали из вектора pMiniT 2.0. с помощью рестриктаз *SpeI*-HF и *Sall* и после разделения электрофорезом вставку очищали из агарозного геля коммерческим набором.

На следующем этапе в состав плазмидного вектора pGEM®-T Easy («Promega», США) по сайтам эндонуклеаз *SphI* и *SpeI* клонировали левое плечо рекомбинации, после чего с использованием эндонуклеаз *SpeI*-HF и *Sall* с ним лигировали вырезанную вставку EGFP+правое плечо рекомбинации с последующей трансформацией компетентных клеток *E.coli XL1-Blue*.

В результате такого последовательного клонирования была получена рекомбинантная плазида на основе вектора pGEM®-T Easy, которая содержала в себе

фрагменты нуклеотидной последовательности гена *MGF360-15R* (левое плечо рекомбинации) и *A859L* с участками межгенных регионов (правое плечо рекомбинации) штамма Волгоград/14с вируса АЧС, фланкирующие ген флуоресцентного белка EGFP.

В дальнейшем полученная рекомбинационная кассета была использована для получения рекомбинантного вируса АЧС методом гомологичной рекомбинации.

Отсутствие нуклеотидных замен и правильность рамки считывания подтверждали секвенированием полученной вставки.

3.2.4 Рекомбинантный вирус АЧС Волгоград/14с ΔA238L, полученный методом гомологичной рекомбинации

Для проведения гомологичной рекомбинации перевиваемые клетки линии COS-1 инфицировали культуральным вирусом АЧС штаммом Волгоград/14с с множественностью заражения 1,0 ТЦД₅₀/кл, и одновременно проводили трансфекцию этих клеток полученной рекомбинационной кассетой с делецией гена *A238L* (2,5 μg/лунку) с помощью набора Lipofectamine 2000 («Invitrogen», США) согласно рекомендациям изготовителя. Выбор исходного варианта вируса АЧС Волгоград/14с обусловлен тем, что данный штамм был предварительно адаптирован к перевиваемой культуре клеток COS-1.

Отбор рекомбинантных клонов вируса АЧС проводили с помощью микроскопа ZOE Fluorescent Cell Imager («Bio-Rad Laboratories, Inc.») по репортерной флуоресценции гена EGFP в инфицированных клетках на 3 сутки после трансфекции.

Для дальнейшего скрининга и отбора рекомбинантных клонов вируса АЧС была проведена серия из шести последовательных пассажей методом предельных разведений на клетках культуры COS-1.

После первого пассажа на клетках культуры COS-1 рекомбинантный вирус АЧС (штамм Волгоград/14с ΔA238L) был обнаружен только в исходном лизате вируса, полученном после одновременного инфицирования и трансфекции клеток COS-1. На втором пассаже активность рекомбинантного вируса АЧС составила $1,92 \pm 0,10 \lg$ ТЦД₅₀/см³. После проведения третьего и четвертого пассажей методом предельных разведений инфекционный титр вируса увеличился до $2,19 \pm 0,12 \lg$ ТЦД₅₀/см³ и $2,38 \pm 0,10 \lg$ ТЦД₅₀/см³. На уровне пятого и шестого пассажей титр рекомбинантного вируса составлял до $3,06 \pm 0,10$ и $3,84 \pm 0,11 \lg$ ТЦД₅₀/см³, соответственно.

Дальнейшую селекцию рекомбинантного вируса АЧС (штамм Волгоград/14с ΔA238L) проводили методом бляшкообразования.

3.2.5 Инфекционная активность рекомбинантного вируса АЧС (штамм Волгоград/14с ΔA238L)

В результате титрования было установлено, что инфекционная активность рекомбинантного вируса АЧС (штамм Волгоград/14с ΔA238L) в первичной культуре лейкоцитов свиней составила $6,00 \pm 0,22 \text{ Ig ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$, а в перевиваемой культуре клеток COS-1 $5,00 \pm 0,19 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, соответственно. Таким образом, титры накопления рекомбинантного вируса в данных культурах клеток были сходны с титрами исходного вируса (штамм Волгоград/14с).

3.2.6 Отсутствие исходного вируса Волгоград/14с в суспензии рекомбинантного вируса

В результате проведенной ПЦР со специфическими олигонуклеотидными праймерами, фланкирующими фрагмент гена *A238L* штамма Волгоград/14с вируса АЧС, был обнаружен специфический фрагмент размером ~570 п.о. в образце с исходным вариантом вируса АЧС Волгоград/14с и положительном контрольном образце (культуральный вирус АЧС штамм Волгоград/14с) (рисунок 5, треки 2, 5).

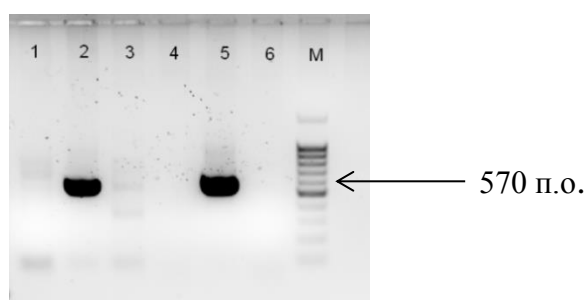


Рисунок 5 - Электрофореграмма продуктов амплификации

Примечание: трек 1- рекомбинантный вирус АЧС Волгоград/14с ΔA238L; 2- исходный родительский тип штамм Волгоград/14с; 3- контроль интактной культуры COS-1; 4 - отрицательный контроль выделения (деионизированная вода); 5 - положительный контроль ПЦР (культуральный вирус АЧС штамм Волгоград/14с); 6 - отрицательный контроль ПЦР (деионизированная вода). М - маркер молекулярного веса ДНК 100 п.н.

Наличие ампликона гена *A238L*, характерного для исходного вируса в суспензии рекомбинантного вируса (штамм Волгоград/14с ΔA238L), не выявлено, что свидетельствует о чистоте вирусного материала (рисунок 5, трек 1).

3.2.7 Репродукция рекомбинантного вируса Волгоград/14с ΔA238L в перевиваемой культуре клеток COS-1

Определение ростовых характеристик рекомбинантного вируса АЧС Волгоград/14с ΔA238L и исходного вируса Волгоград/14с проводили путем инфицирования клеток культуры COS-1 при множественности заражения 0,1 и 1,0

ТЦД₅₀/кл. Измерение продукции этих вирусов проводили в течение 5 суток с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени с использованием олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда, комплементарных фрагменту гена *CP204L* (p30) с флуоресцентной детекцией по каналу ROX/Orange.

Проведенные эксперименты показали, что при множественности заражения 0,1 и 1,0 ТЦД₅₀/кл кинетика накопления ампликонов рекомбинантного вируса (штамм Волгоград/14с ΔA238L) была неотличима от исходного вируса (штамм Волгоград/14с). Полученные результаты свидетельствуют о том, что делеция гена *A238L* не оказывает влияния на репродукцию рекомбинантного вируса (штамм Волгоград/14с ΔA238L).

3.2.8 Активность эффекторной каспазы-3 в культуре клеток COS-1, инфицированной вирусом АЧС

Для получения более полного представления о роли делеции гена *A238L* в регуляции гибели апоптотических клеток, мы провели количественную оценку активности эффекторной каспазы-3 в клетках культуры COS-1, инфицированных рекомбинантным вирусом АЧС (штамм Волгоград/14с ΔA238L) и исходным вирусом (штамм Волгоград/14с) в течение 6, 24, 30, 48, 72, 96 часов в соответствии с протоколом производителя набора HT TiterTACS™ Assay Kit («Trevigen, Inc»).

В результате проведенного количественного анализа активации апоптоза, активность каспазы-3 в клетках культуры COS-1, инфицированных рекомбинантным штаммом Волгоград/14с ΔA238L вируса АЧС была в 1,5 раза больше, чем в клетках, инфицированных исходным штаммом Волгоград/14с спустя 6 часов после инфицирования (рисунок 6).

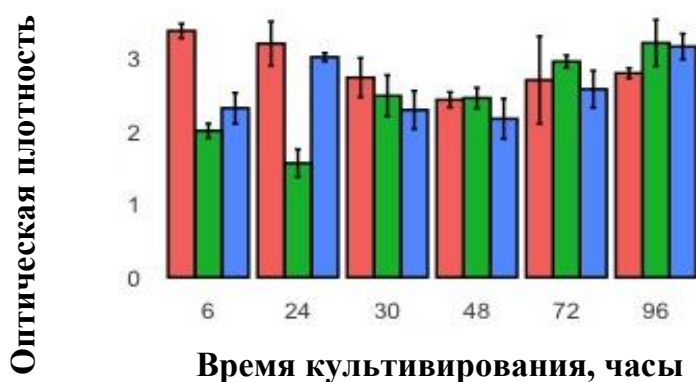


Рисунок 6 - Количественная оценка активности эффекторной каспазы-3 в клетках культуры COS-1, инфицированных рекомбинантным вирусом АЧС (штамм Волгоград/14с ΔA238L, выделен розовым цветом) и исходным вирусом (штамм Волгоград/14с, выделен синим цветом) на разные сроки после заражения. Зеленым цветом выделена интактная культура клеток COS-1

На более поздних сроках после заражения (48, 72, 96 часов) по сравнению с отрицательным контролем (интактная культура клеток COS-1) разницы не обнаружено. Данный факт может быть объяснен процессами естественного апоптоза в клетках.

3.2.9 Полногеномное секвенирование рекомбинантного вируса (штамм Волгоград/14с ΔA238L)

Для подготовки библиотеки генов рекомбинантного вируса Волгоград/14с ΔA238L были использованы 17 пар олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих фрагменты генома вируса АЧС от 2,5 до 18 тыс. п.н. Определение полногеномной последовательности было проведено на нанопоровом секвенаторе MinION («Oxford Nanopore Technologies», Великобритания) с использованием программы Geneious Prime (<https://www.geneious.com>).

При сравнении полученной полногеномной последовательности рекомбинантного вируса АЧС (штамм Волгоград/14с ΔA238L) с геномом референс-штамма Georgia 2007/1 (FR682468) идентичность составила 99%. Показано наличие десятинуклеотидной встройки в области межгенного региона I73R/I329L (TRS+), присутствующей у изолятов, выделенных в Российской Федерации после 2012 года. Наибольший интерес представляет фрагмент комплементарный позициям 35895 п.н. - 53030 п.н. генома Georgia 2007/1, поскольку ген *A238L* расположен на позициях 50471 п.н. - 51151 п.н. Полногеномное секвенирование рекомбинантного штамма подтвердило специфическую делецию гена *A238L* и наличие гена EGFP в его составе.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведен филогенетический анализ 7 генов вируса АЧС, кодирующих иммуномодулирующие белки, определены нуклеотидные последовательности генов *A238L* и *I329L* 12 изолятов вируса АЧС, выделенных в 2016 г. и трех генов *A238L*, *I329L*, *DP71L* 16 аттенуированных и вирулентных штаммов вируса АЧС различных генотипов и сероиммунотипов. В результате последовательного клонирования создана генетическая конструкция пригодная для делеции гена *A238L* штамма Волгоград/14с вируса АЧС на основе плазмидного вектора pGEM®-T Easy. Получен рекомбинантный вирус АЧС Волгоград/14с ΔA238L и изучены его культуральные характеристики.

4.1 Итоги выполненного исследования

1. Топология древа 7 ортологичных генов (*A179L*, *A224L*, *A238L*, *EP153R*, *EP402R*, *I329L*, *DP71L*) вируса АЧС коррелирует с древом на основе полногеномных

последовательностей изолятов вируса АЧС, что свидетельствует о возможности их использования в качестве генетических маркеров для идентификации происхождения.

2. Филогенетический анализ генов *A238L*, *I329L* и *DP71L* 12 российских изолятов вируса АЧС, шестнадцати аттенуированных (ЛК-111, КК-262, ФК-32/135, СКА-2015, МК-200, ТКФ, ТСП-80/300, ТС-7/27-230) и вирулентных штаммов (Л-57, К-49, Ф-32, Иркутск-2017, М-78, ТСП-80, ТС-7, Наньюки) показал их консервативность внутри одного сероиммунотипа.

3. Обнаружено слияние двух открытых рамок считывания генов у изолятов вируса АЧС X генотипа, что приводит к образованию длинной и короткой форм гена *DP71L* вируса АЧС. Показано преобладающее действие очищающего отбора на уровне нуклеотидных последовательностей генов *A238L*, *I329L* и *DP71L*.

4. Создана генетическая конструкция на основе плазмидного вектора pGEM®-T Easy, несущая ген флуоресцентного белка EGFP вместо гена *A238L* и фрагменты генома вирулентного штамма Волгоград/14с вируса АЧС.

5. Получен рекомбинантный вирус АЧС Волгоград/14с $\Delta A238L$, инфекционная активность которого достигает $6,0 \pm 0,2 \text{ lg ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$. Делеция гена *A238L* не оказывает влияния на репликацию вируса Волгоград/14с $\Delta A238L$ *in vitro*.

6. Установлена разница в активации эффекторной каспазы-3 между рекомбинантным штаммом Волгоград/14с $\Delta A238L$ и исходным Волгоград/14с *in vitro* на ранних стадиях инфекции.

4.2 Практические предложения

Нуклеотидные последовательности генов *A238L*, *I329L* и *DP71L* штаммов Лиссабон-57 (Л-57), ЛК-111, Конго-49 (К-49), КК-262, Франция-32 (Ф-32), ФК-32/135, СКА-2015, Иркутск-2017, Мозамбик-78 (М-78), МК-200, ТКФ, ТСП-80, ТСП-80/300, ТС-7, ТС-7/27-230, Наньюки, принадлежащие к различным генотипам и сероиммунотипам вируса АЧС, могут быть использованы для проведения молекулярно - биологических и генно - инженерных исследований.

Рекомбинантный вирус АЧС штамм Волгоград/14с $\Delta A238L$ может быть использован для изучения протективных характеристик, а также проведения молекулярно - генетических исследований, разработки диагностических и защитных препаратов.

4.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

Изучение роли делеции гена *A238L* вируса АЧС позволит получить новые данные о регуляции механизмов апоптоза в клетках, инфицированных вирусом и оценить его

участие в модуляции иммунного ответа. В дальнейшем будут изучены биологические характеристики рекомбинантного вируса АЧС Волгоград/14с ΔA238L на свиньях.

Целесообразно продолжить изучение взаимодействия вируса АЧС с клеточными белками и провести сравнительный анализ экспрессии генов путем РНК-секвенирования транскриптома клеток, инфицированных как рекомбинантным (штамм Волгоград/14с ΔA238L), так и исходным штаммом вируса АЧС.

5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Шкаликова, М.В.** Филогенетический анализ иммуномодулирующих генов вируса африканской чумы свиней / **М.В. Шкаликова**, А.С. Малоголовкин // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. XVI молодежная науч. конф. Сборник тезисов. 14 апр. 2016 г. – М., 2016. – С. 7-8.

2. Рекомбинационный анализ штаммов вируса африканской чумы свиней / **М.В. Шкаликова**, Г.С. Бурмакина, К.А. Мима, И.А. Титов, А.С. Малоголовкин // III Междунар. конф. молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. Сборник тезисов. – Новосибирск: Кольцово, 2016. – С. 204-207.

3. **Шкаликова, М.В.** Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *A238L* и *I329L* вируса африканской чумы свиней / **М.В. Шкаликова**, И.А. Титов, А.С. Малоголовкин // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. XVII Всерос. Молодежная науч. конф. Сборник тезисов. – М., 2017. – С. 48-50.

4. Получение и характеристика рекомбинантных белков p17 и p54 вируса африканской чумы свиней в клетках млекопитающих / К.А. Мима, Г.С. Бурмакина, И.А. Титов, **М.В. Шкаликова**, А.С. Малоголовкин // Биотехнология. – 2017. – Т. 33, № 2. – С. 41-47. DOI: 10.21519/0234–2758–2017–33–2–41–47.

5. Comparative analysis of three African Swine Fever Virus immunogenes (*A238L*, *I329L* and *DP71L*) / **M. Shkalikova**, I. Titov, G. Burmakina, A. Malogolovkin., D. Kolbasov // EPIZONE. 11th Annual Meeting «Crossing Barriers», 19–21 Sep. 2017. – ANSES; Paris, 2017. – P. 167.

6. Анализ маркерных генов (*I73R/I329L*; *B602L*; *CD2V*) изолятов вируса африканской чумы свиней, выделенных на территории Российской Федерации в 2016–2017 годах / И.А. Титов, Д.А. Кудряшов, **М.В. Шкаликова**, А.К. Сибгатуллова // Молодежь и наука XXI века: материалы Междунар. науч.–практ. конф. 20–21 сент. 2017. – Т. 2. – Ульяновск, 2017. – С. 157-161.

7. **Шкаликова, М.В.** Мультиплекс – ПЦР в режиме реального времени с применением ВКО для выявления генома вируса АЧС / **М.В. Шкаликова**, А.С. Малоголовкин // Молодежь и наука XXI века: материалы Междунар. науч.–практ. конф. 20–21 сент. 2017. – Т. 2. – Ульяновск, 2017. – С. 166-169.

8. **Шкаликова, М.В.** Определение противовирусного действия фосфонуксусной кислоты для вируса африканской чумы свиней / **М.В. Шкаликова**, М.М. Зубаиров,

А.С. Малоголовкин // XI Конкурс проектов молодых ученых. Тезисы докладов. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2017. – С.179-180.

9. **Шкаликова, М.В.** Противовирусная активность производных фосфонуксусной кислоты в отношении вируса африканской чумы свиней / **М.В. Шкаликова, М.М. Зубаиров, А.С. Малоголовкин** // Биология – наука XXI века: 22–я Международная Пущинская школа–конференция молодых ученых. 23–27 апреля 2018 г. Сборник тезисов. – Пущино, 2018. – С. 327-328.

10. Генетические конструкции для получения рекомбинантных штаммов вируса АЧС с делециями генов, кодирующих иммуномодулирующие белки / **М.В. Шкаликова, Г.С. Кольцова, И.А. Титов, А.С. Малоголовкин** // Труды ВИЭВ. – Т. 80, Ч. 1. – С. 357-364. ISBN 978–5–9906389–7–6.

11. Поиск новых маркерных генов изолятов вируса африканской чумы свиней, выделенных на территории Российской Федерации в 2016–2017 годах / **А.К. Сибгатуллова, М.В. Шкаликова, Д.А. Кудряшов, И.А. Титов** // Молодежь и наука XXI века: материалы Междунар. науч. конф. – Ульяновск: УлГАУ, 2018. – Том II. – С. 490-494.

12. Анализ иммуномодулирующих белков вируса африканской чумы свиней // **М.В. Нефедьева, И.А. Титов, К.А. Мима, А.С. Малоголовкин** / Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2019. – Т. 37, № 1. – С. 42-48. DOI: [10.17116/molgen20193701142](https://doi.org/10.17116/molgen20193701142)

13. **Нефедьева, М.В.** Получение рекомбинантного вируса африканской чумы свиней с делецией гена *A238L* и изучение его ростовых характеристик / **М.В. Нефедьева, И.А. Титов, А.С. Малоголовкин** // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии. XIX–я Всерос. конф. молодых учёных. Сборник тезисов. Москва, 15–16 апреля 2019 г. – ФГБНУ ВНИИСБ. – М., 2019. – С.99-100.

14. **Nefedeva, M.V.** Analysis of the African Swine Fever Virus Immunomodulatory Proteins / **M.V. Nefedeva, I.A. Titov, K.A. Mima, A.S. Malogolovkin** // Molecular Genetics, Microbiology and Virology. – 2019. – Vol. 34, N 1. – P. 42-49. <https://doi.org/10.3103/S0891416819010075>

15. **Нефедьева, М.В.** Таргетная делеция транскрипционного регулятора (*A238L*) вируса африканской чумы свиней активирует эффекторную каспазу–3 / **М.В. Нефедьева, И.А. Титов, А.С. Малоголовкин** // Постгеномные технологии: от теории к практике. Сборник тезисов V Междунар. науч. конф. 8–9 октября 2019 г. – Воронеж, 2019. – С. 145-146.