

На правах рукописи

Иматдинов Алмаз Рамисович

**ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ДНК-КОНСТРУКЦИЙ,
КОДИРУЮЩИХ ГЕНЫ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПРОТЕКТИВНЫХ БЕЛКОВ
ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ**

03.02.02 Вирусология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Вольгинский – 2019

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном
учреждении «Федеральный исследовательский центр вирусологии и
микробиологии» (ФГБНУ ФИЦВиМ)**

Научный руководитель: **Середа Алексей Дмитриевич**
доктор биологических наук, профессор

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 _____ 2019 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 _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Африканская чума свиней (АЧС) - контагиозная, септическая болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, признаками токсикоза, геморрагическим диатезом и высокой летальностью. К АЧС восприимчивы домашние свиньи и дикие кабаны независимо от породы и возраста, у которых инфекция может протекать сверхостро, остро, подостро, хронически и бессимптомно.

Несмотря на то, что пригодных для практического применения вакцин против АЧС не разработано, формирование иммунной защиты против АЧС подтверждается тем, что болезнь не является смертельной для восприимчивых гигантских лесных, кистеухих, кустарниковых свиней и бородавочников в Африке. Выделены из популяций диких и домашних свиней, и получены в лабораторных условиях в процессе аттенуации в культурах клеток штаммы вируса АЧС, которые не вызывают гибели восприимчивых животных, и способны формировать защиту от последующего заражения гомологичными вирулентными штаммами (Malmquist W.A., 1963; King K. et al., 2011). Однако их практическое применение неприемлемо из-за ряда причин: носительство вакцинного вируса, развитие поствакцинальных осложнений, в отдельных случаях недостаточная протективность для животных с ослабленным иммунитетом. Заражение привитых животных вирулентным штаммом вируса АЧС гомологичного сероиммунотипа приводило к его приживлению и длительному носительству.

В 90-х годах прошлого века был предложен метод ДНК-иммунизации (Jiao S., 1994). Концептуально важно, что уже применяемые ДНК-вакцины потенциально безопасны для животных и индуцируют не только гуморальный, но и клеточный иммунитет (Kutzler M.A., Weiner D.B., 2008). При АЧС кандидатные ДНК-вакцины являются не только желаемой конечной целью исследований, но и уникальным инструментом исследования потенциально протективных белков и особенностей формирования иммунологической защиты против этого заболевания.

Степень разработанности темы. Результаты исследований иммуногенности и протективности рекомбинантных плазмид с генами белков вируса АЧС противоречивы. Иммунизация свиней рекомбинантной плазмидой, содержащей гены вируса АЧС, кодирующие слитые вирионные белки р30 (Р) и р54 (Q) (pCMV-PQ) и фрагмент гена внеклеточного домена гликопротеина sHA (sCD2v) вызывала сильный гуморальный

иммунный ответ, но не защиту от последующего заражения вирулентным вирусом АЧС (Argilaguet J.M. et al., 2011). Для стимулирования преимущественно специфического CD8⁺-Т-клеточного ответа была предложена и испытана ДНК-конструкция pCMV-UbsHAPQ, включающая гены белков p30, p54, sHA и клеточного убиквитина (Ub). Иммунизация свиней pCMV-UbsHAPQ не индуцировала формирования противовирусных антител, но обеспечивала частичную защиту от гибели от контрольного заражения гомологичным вирулентным вирусом АЧС. Протективность коррелировала с пролиферацией антиген-специфических CD8⁺-Т-клеток от иммунизированных животных (Argilaguet J.M. et al., 2012). Значимость убиквитинирования подтверждена результатами иммунизации свиней ASFV^{Ublib} - ДНК-библиотекой кодирующей короткие рестрикционные фрагменты генома вируса АЧС, слитых с геном убиквитина. Частичная защита животных после контрольного заражения вирусом АЧС была достигнута при отсутствии инструментально определяемых антител, что, по мнению авторов, подтверждает гипотезу о решающей роли CD8⁺-Т-клеток в формировании защиты от АЧС (Lacasta A. et al., 2014).

Цель и задачи исследований. Целью работы являлось получение и изучение свойств ДНК-конструкций, кодирующих эктодомены белков CD2v, p30 и p54 вируса африканской чумы свиней.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. провести биоинформатический анализ трех потенциально протективных белков CD2v, p30 и p54 вируса АЧС штамма МК-200;
2. получить экспрессирующие плазмиды, кодирующие эктодомены белков CD2v, p30 и p54 вируса АЧС штамма МК-200;
3. исследовать антигенные свойства и полипептидный состав белков, синтезируемых в первичных и перевиваемых культурах клеток, трансфицированных полученными плазмидами;
4. изучить иммуногенные и протективные свойства белков, кодируемых рекомбинантными плазмидами.

Научная новизна результатов исследований. Получены три рекомбинантные эукариотические плазмиды с фрагментами генов вируса АЧС *EP402R*, *CP204L*, *E183L*, кодирующие эктодомены белков CD2v, p30, p54 вируса АЧС штамма МК-200 и три

рекомбинантные эукариотические плазмиды, каждая из которых дополнительно включает лидирующую последовательность гена убиквитина.

Методами иммуноблоттинга и иммунофлуоресценции установлена вирусная специфичность белков, синтезированных *in vitro* в результате трансфекции перевиваемой (HEK293T) и первичной (лейкоцитов свиней) культур клеток плазмидами pCI-neo/ASFV/CD2v, pCI-neo/ASFV/p30 и pCI-neo/ASFV/p54.

Показано, что иммунизация свиней аутологичными лейкоцитами, трансфицированными *in vitro* плазмидами pCI-neo/ASFV/CD2v, pCI-neo/ASFV/p30 и pCI-neo/ASFV/p54, не индуцирует синтез вирусоспецифических антител и защиту от гомологичного вирулентного штамма вируса АЧС.

В результате иммунизации свиней смесью трех ДНК-конструкций, каждая из которых содержала ген убиквитина и фрагмент гена, кодирующего эктодомен одного из потенциально протективных белков (CD2v, p30, p54) вируса АЧС штамма МК-200, зарегистрировано формирование вирусоспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов.

Теоретическая и практическая значимость работы. На основании анализа научной литературы о структуре вирионов, иммуногенных и протективных свойствах белков вируса АЧС определен состав генов для конструирования кандидатных ДНК-вакцин.

Получены плазмидные конструкции pJET1.2/CD2v-M200/10, pJET1.2/p30-M200/2, pJET1.2/p54-M200/1, содержащие полноразмерный ген *EP402R* (CD2v) и фрагменты генов *CP204L* (p30), *E183L* (p54) вируса АЧС штамма МК-200 без изменения их рамок считывания.

Депонированы в GenBank нуклеотидные последовательности гена *CP204L* (GenBank MK211505) вирулентного штамма Мозамбик-78 и нуклеотидные последовательности генов *CP204L* (GenBank MK211506), *E183L* (GenBank MK234865) аттенуированного штамма МК-200 вируса АЧС.

В результате биоинформатического анализа аминокислотных последовательностей белков CD2v, p30 и p54 вируса АЧС штамма МК-200 выявлены их сигнальные, трансмембранные и цитоплазматические домены. Определены эктодомены, содержащие прогнозируемые Т- и В-клеточные эпитопы, сайты N-гликозилирования и

SLA-мотивы. На основе полученных результатов обоснован выбор участков генов *EP402R* (CD2v), *CP204L* (p30), *E183L* (p54) для конструирования целевых рекомбинантных ДНК.

Изучен антигенный, иммуногенный и протективный потенциал белков, кодируемых рекомбинантными плазмидами, содержащими эктодомены белков CD2v, p30 и p54 вируса АЧС.

Показано, что индукции вирусоспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов недостаточно для развития защиты от АЧС.

Созданные рекомбинантные плазмиды могут быть использованы для разработки кандидатных ДНК-вакцин.

Методология и методы исследования. В работе использовали молекулярно-биологические (выделение нуклеиновых кислот, ПЦР, рестрикция ДНК, секвенирование, клонирование, трансформация и трансфекция клеток), вирусологические (получение и культивирование первичных культур клеток, культивирование и титрование вируса, инфицирование животных), физико-химические (электрофорез нуклеиновых кислот и полипептидов, хроматография, спектрофотометрия, центрифугирование, рН-метрия), серологические (РЗГАд, ТФ ИФА, РПИФ), иммунохимические (ИБ, ELISpot) методы, статистический анализ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей белков CD2v, p30 и p54 вируса АЧС штамма МК-200.
2. Конструкции эукариотических рекомбинантных плазмид pCI-neo/ASFV/CD2v, pCI-neo/ASFV/p30 и pCI-neo/ASFV/p54, кодирующие эктодомены генов *EP402R*, *CP204L* и *E183L* вируса АЧС штамма МК-200, и рекомбинантных плазмид pUbb76A_CD2v, pUbb76A_p30, pUbb76A_p54, каждая из которых дополнительно включала в качестве лидирующей последовательность гена убиквитина под контролем цитомегаловирусного промотора.
3. Антигенные, иммуногенные и протективные свойства белков, экспрессируемых сконструированными рекомбинантными плазмидами.

Личный вклад автора. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам ФГБНУ

ФИЦВиМ: д.в.н. В.М. Балышеву, д.б.н. С.Г. Юркову, к.б.н. А.С. Малоголовкину, к.б.н. А.С. Казаковой, к.в.н. С.П. Живодерову, к.б.н. В.М. Лыска, к.б.н. И.А. Титову, к.б.н. И.В. Ногиной за помощь в проведении отдельных этапов работы.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы диссертационной работы заслушаны и обсуждены на заседаниях ученого совета ФГБНУ ФИЦВиМ (2015-2019 гг.), XXV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (г. Москва, 2018), XII Международном конгрессе «Erizone» (г. Вена, Австрия, 2018 г.), Международной научно-практической конференции, посвященной 120-летию со дня создания ВИЭВ (г. Москва, 2018 г.), V Международной конференции молодых ученых, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (пос. Кольцово, 2018 г.).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 8 научных работ, в том числе 5 статей – в рекомендованном ВАК Министерства образования и науки Перечне рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 170 страницах текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, заключение, приложения; иллюстрирована 10 таблицами и 32 рисунками. Список использованной литературы включает 244 источников, из них 187 иностранных.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы и методы

Вирусы получены из Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ ФИЦВиМ вирулентные и аттенуированные штаммы вируса АЧС Лиссабон-57 (I сероиммунотип), Конго-49 (II), Мозамбик-78 (III), Франция-32 (IV), Ставрополь 01/08 (VIII), МК-200 (III).

Использовали компетентные клетки *Escherichia coli* штаммов XL1-Blue («Agilent Technologies», США); Rosetta2(DE3)pLysS («Novagen», США); NEB Stable («NEB», США). Плазмидные векторы: pJET1.2 («Thermo Scientific», США), pCI-neo («Promega», США) и phMGFP («Promega», США).

Перевиваемую культуру клеток НЕК293Т получали из Коллекции клеточных культур ФГБНУ ФИЦВиМ. Первичную культуру лейкоцитов свиней (ЛС) получали от здоровых животных согласно ГОСТ 28573-90 «Свиньи. Методы лабораторной диагностики африканской чумы».

Клинически здоровых свиней крупной белой породы живой массой 25-30 кг, получали из отдела подготовки подопытных животных ФГБНУ ФИЦВиМ.

Для расчета олигонуклеотидных праймеров, визуализации и биоинформатического анализ использовали следующее программное обеспечение: BioEdit (7.2.5, <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>); Oligo (7.60, <http://oligo.net/downloads.html>); SnapGene (3.2.1, <https://www.snapgene.com>).

Определение инфекционной активности вирусосодержащего материала проводили с использованием 2–3-суточной культуры клеток ЛС, выращенных на полистироловых 24-луночных планшетах. Результаты титрования учитывали по наличию гемадсорбции или тканевого цитопатического действия в течение 7 суток. Инфекционную активность вируса рассчитывали методом Кербера в модификации Ашмарина И.П. (1974) и выражали в lg ГАЕ₅₀/см³ или ТЦД₅₀/см³, серотиповую принадлежность - определяли в РЗГАд.

Расчет праймеров выполняли в программах Oligo 7.60 и BioEdit 7.2.5. Тотальную ДНК выделяли из клеточных культур, инфицированных вирусом АЧС. Экстракцию нуклеиновых кислот проводили с помощью фенольно-детергентного метода. Размер ПЦР-продуктов определяли с помощью метода электрофореза в агарозном геле, согласно Green M.R., Sambrook J. (2012). Анализ фрагментов ДНК осуществляли в 0,8-2,0 % агарозном геле в зависимости от размера разделяемых нуклеиновых кислот и требуемого разрешения.

Рестрикцию проводили в буферных системах, рекомендованных и поставляемых производителем эндонуклеаз рестрикции. Лигирование и химическую трансформацию компетентных клеток проводили согласно рекомендациям фирмы-изготовителя и в соответствии с рекомендациями Green M.R., Sambrook J. (2012). Выделение плазмид для проведения аналитической ПЦР или рестрикции проводили с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit («Thermo Scientific», США). Выделение препаративного количества плазмидной ДНК для иммунизации животных выполняли с использованием набора

Plasmid Mega Kit («Qiagen», Германия). Секвенирование заклонированных нуклеотидных последовательностей проводили по методу Sanger F. et al. (1977), с использованием специфичных и секвенировочных праймеров pJET1.2.

Трансфекцию культур клеток на 6- или 12-луночных полистироловых планшетах (конфлюентность 80-90 %) рекомбинантными плазмидами проводили с использованием Lipofectanine 3000 («Invitrogen», США).

Электрофорез в 10 % SDS-PAGE осуществляли согласно Laemmle U.K. (1970). Электроперенос полипептидов из SDS-PAGE на нитроцеллюлозную мембрану проводили в полусухой буферной системе по методу Kyhse-Andersen J. (1984). При постановке иммуноблоттинга использовали методики, предложенные Escribano J.M., Tabares E. (1987).

Выявление антител против вируса АЧС в сыворотках крови свиней проводили методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА) с использованием «Набора для иммуноферментной диагностики африканской чумы свиней (ВНИИВВиМ АЧС-ИФА Ат/Аг)». Определение АЧС-индуцированной продукции IFN γ в культурах мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) осуществляли ELISpot-анализом с применением коммерческого набора Porcine IFN γ Single-Color Enzymatic ELISPOT Assay («Cellular Technology Limited», США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами (Бейли Н., 1962).

2.2 Результаты исследований

2.2.1 Конструирование библиотеки генов, кодирующих белки CD2v, p30 и p54 вируса африканской чумы свиней

Ввиду отсутствия данных по полногеномному секвенированию вирулентного (Мозамбик-78) и аттенуированного (МК-200) штаммов вируса АЧС в качестве мишени для расчета праймеров была выбрана нуклеотидная последовательность генома изолята Georgia 2007/1 вируса АЧС (GenBank. FR682468.1).

Расчёт праймеров генов *EP402R*, *CP204L* и *E183L* проводили с помощью программ BioEdit 7.2.5 и Oligo 7.60. Дизайн праймеров осуществляли с учетом отсутствия потенциальных неспецифических вторичных структур – димеров и шпилек с высокой температурой плавления. Специфичность подобранных последовательностей

праймеров оценивали с использованием инструментов: NCBI – BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Расчетные размеры амплифицированных генов *EP402R*, *CP204L* и *E183L* составили 1196 п.н., 410 п.н. и 443 п.н., соответственно.

Очищенные из агарозного геля набором GeneJET Gel Extraction Kit («Thermo Scientific», США) ПЦР-продукты лигировали по «тупым» концам с линейаризованным плазмидным вектором pJET1.2 («Thermo Scientific», США) и клонировали в *E. coli* шт. XL1-Blue («Agilent Technologies», США). Схемы рекомбинантных плазмид для генов *CP402R*, *CP204L* и *E183L* представлены на рисунке 1.

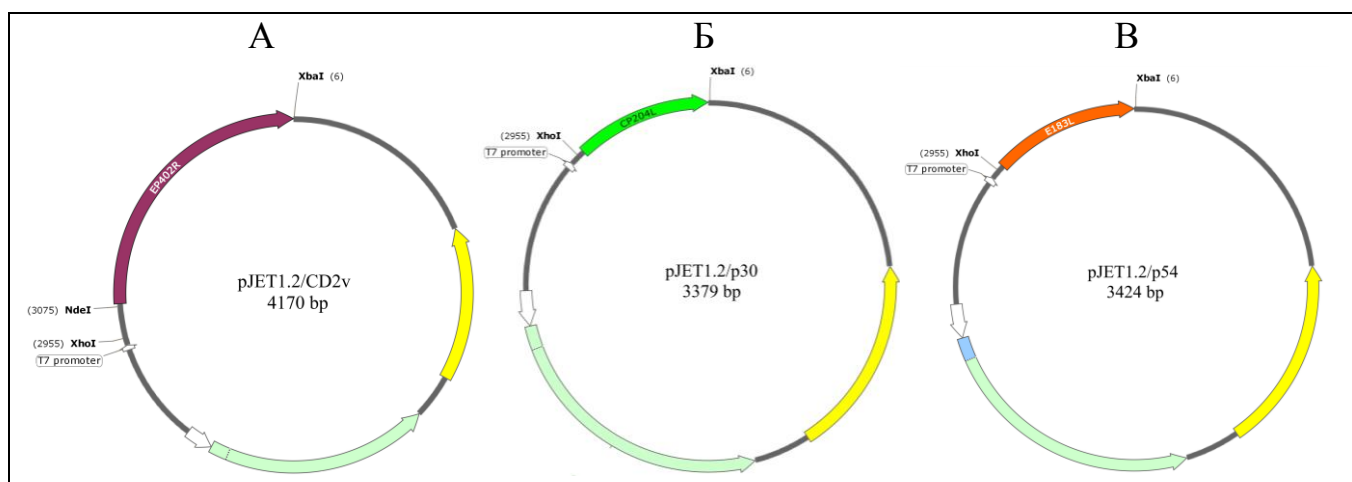


Рисунок 1 – Схемы рекомбинантных плазмид pJET1.2/ASFV/CD2v (А), pJET1.2/ASFV/p30 (Б), pJET1.2/ASFV/p54 (В)

Примечание: – ген *EP402R*; – фрагмент гена *CP204L*; – фрагмент гена *E183L*; – ген β-лактамазы; – ориджин (ORI) репликации ColE1/pMB1/pBR322/pUC; T7 promoter – промотор фага T7; NdeI, XhoI, XbaI – сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции.

В результате ПЦР-скрининга были отобраны клоны pJET1.2/CD2v-M200/5, 10; pJET1.2/p30-M200/2, 3, 4, 5; pJET1.2/p30-M200/1, 2, 3, 4 и 5, содержащие целевые гены. Для подтверждения специфичности конструкций проводили секвенирование по методу Сэнгера с использованием праймеров pJET1.2 Sequencing Primers. При анализе данных секвенирования с применением алгоритма BLASTn в базе данных GenBank были найдены полноразмерные гены *EP402R*, *CP204L* и *E183L* с высокой гомологией. В результате были отобраны плазмидные конструкции pJET1.2/CD2v-M200/10, pJET1.2/p30-M200/2, pJET1.2/p54-M200/1, содержащие полноразмерный ген *EP402R* (CD2v) и фрагменты генов *CP204L* (p30), *E183L* (p54) без изменения рамки считывания.

В результате были определены и депонированы в GenBank нуклеотидные последовательности гена *CP204L* (GenBank MK211505) вирулентного штамма Мозамбик-78 и нуклеотидные последовательности генов *CP204L* (GenBank MK211506), *E183L* (GenBank MK234865) аттенуированного штамма МК-200 вируса АЧС.

2.2.2 Биоинформатический анализ

Аминокислотные последовательности белков р30, р54, и CD2v вируса АЧС штамма МК-200 анализировали с применением различных инструментов и алгоритмов.

При использовании программы ТМНММ 2.0 были выявлены потенциальные трансмембранные области в последовательностях белков р54 (с 30 по 52 аминокислоту) и CD2v (с 218 по 240 аминокислоту), в то время как для белка р30 данные функциональные регионы не выявлены.

При анализе внеклеточного домена белка CD2v с помощью SignalP 5.0 в его последовательности выявлено наличие нативного сигнального пептида (MPLIFLNCFKIVL) и сайта расщепления специфической пептидазой в позиции 16 и 17 с вероятностью 0,52. При анализе р30 и р54 с использованием сервера SignalP 5.0 сигнальные последовательности не выявлены.

Для определения сайтов гликозилирования аминокислотные последовательности белков CD2v, р30 и р54 были проанализированы с помощью онлайн-серверов NetNGlyc 1.0 и NetOGlyc 4.0. В результате анализа у CD2v выявлено наличие 13 потенциальных сайтов О-гликозилирования, расположенных на участке 255-348 а.о., а также 17 сайтов N-гликозилирования, подавляющее большинство которых локализовано во внеклеточном домене белка от 24 до 198 а.о. Сайты потенциального О-гликозилирования у р30 были определены в позициях 89, 93, 108, 121, 127, 161 а.о. В последовательности р54 выявлены 19 сайтов О-гликозилирования, расположенных на внутриклеточном участке.

При анализе аминокислотной последовательности белка р30 на наличие потенциальных сайтов N-гликозилирования был выявлен один сайт в позиции 102 а.о. с вероятностью 0,75. Не содержащий сигнальной последовательности белок р30, вероятно, не модифицируется по пути N-гликозилирования. Данное предположение согласуется с результатами зарубежных исследователей при изучении нативных белков вируса АЧС (Prados F.J. et al., 1993). Анализ аминокислотной последовательности белка

p54 показал наличие четырех потенциальных сайтов N-гликозилирования в позициях 72, 110, 148, 183 а.о.

При анализе аминокислотной последовательности белка CD2v вируса АЧС штамма МК-200 на участке с 16 по 217 а.о. были определены 55 перекрывающихся Т-клеточных эпитопов. При анализе данной последовательности с использованием алгоритмов Hydrophilicity выявлено 45 перекрывающихся В-клеточных эпитопов, Flexibility – 45, Accessibility – 106, Turns – 59, Exposed Surface – 7, Polarity – 7, Antegenic Propensity – 78, Random Forest – 85. Были выявлены SLA-мотивы с высокой аффинностью связывания: 9-мерные – 30 последовательностей; 10-мерные – 18; 11-мерные – 12.

При анализе аминокислотной последовательности белка p30 АЧС штамма МК-200 на участке с 48 по 182 а.о. были определены 36 перекрывающихся Т-клеточных эпитопов. При анализе данной последовательности с использованием алгоритмов Hydrophilicity выявлено 57 В-клеточных эпитопов, Flexibility – 34, Accessibility – 104, Turns – 8, Exposed Surface – 42, Polarity – 80, Antegenic Propensity – 36, Random Forest – 100. Были выявлены SLA-мотивы с высокой аффинностью связывания: 9-мерные – 16 последовательностей; 10-мерные – 3; 11-мерные – 4.

При анализе аминокислотной последовательности белка p54 АЧС штамма МК-200 на участке с 54 по 199 а.о. были определены 32 перекрывающихся Т-клеточных эпитопа. При анализе данной последовательности с использованием алгоритмов Hydrophilicity выявлено 48 В-клеточных эпитопов, Flexibility – 21, Accessibility – 87, Turns – 0, Exposed Surface – 23, Polarity – 31, Antegenic Propensity – 16, Random Forest – 144. Были определены SLA-мотивы с высокой аффинностью связывания: 9-мерные – 10 последовательностей; 10-мерные – 1; 11-мерные – 2.

Таким образом, в результате биоинформатического анализа аминокислотных последовательностей белков CD2v, p30 и p54 были выявлены сигнальные, трансмембранные и цитоплазматические домены. Были определены участки, содержащие прогнозируемые В- и Т-клеточные эпитопы, сайты N-гликозилирования и SLA-мотивы. На основе полученных результатов для конструирования рекомбинантных ДНК были выбраны фрагменты белков, исключаящие сигнальные, трансмембранные и

цитоплазматические домены: для CD2v – 16...217 а.о.; для p30 – 48...182 а.о.; p54 – 54...199 а.о.

2.2.3 Конструирование химерных генов, кодирующих эктодомены белков CD2v, p30 и p54 вируса АЧС штамма МК-200

Следующим этапом работы стало получение химерных структур, содержащих гены *EP402R*, *CP204L* и *E183L*. С целью повышения эффективности внутриклеточного сортирования белков использовали универсальные сигнальные элементы из гетерологичных вирусов (сигнальная последовательность белка слияния F парагриппа человека 1 и трансмембранный регион белка HN вируса Сендай).

Дизайн праймеров для сборки химерных генов проводили с помощью программ BioEdit 7.2.5 и Oligo 7.60. Специфичность подобранных последовательностей праймеров оценивали с использованием сервера NCBI – BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Нуклеотидные последовательности рассчитанных праймеров приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Специфичные олигонуклеотидные праймеры, необходимые для сборки химерных конструкций

Название	Последовательность олигонуклеотидов	Длина, н.	T _m , °C
F-CD2-IgHA	5'-agttataatgaacaataattttaaataagtaaat-3'	33	51,5
R-CD2-IgHA	5'-gtgatttcctaataaaaaagaatattgataata-3'	33	53,2
F-p30-Domain	5'-agtactgttaagtatgatattgtgaaatctg-3'	31	56,6
R-p30-Domain	5'-aagtttaataaccatgagctctaccacc-3'	28	58,2
F-p54-Domain	5'-tcctcaagaaagaaaaagctgctgctattgag-3'	33	64,2
R-p54-Domain	5'-caaggagtttctaggtctttatgcgtatagg-3'	32	61,6
F-Signal	5'-atcgctagccgccaccatggccacctacatccagagggtgcagtgcatc-3'	49	80,0
R-Signal	5'-tccgccctgctgagcgtggtgctgacaaccctggtgagctgccag-3'	45	81,7
F-LeftTrM	5'-ctgatcctgagcttcaccagtgggccctg-3'	30	71,7
R-LeftTrM	5'-agcatcgccaccgtgatcatctgcatcattatc-3'	33	68,1
F-RightTrM	5'-ctgatcacaatcattgtcgtgatgatcgtcgtgctg-3'	36	67,9
R-RightTrM	5'-gtgggtgattatcgtgatcgtgattgtgtagggcggccgcttcga-3'	43	74,3

Примечание: T_m, °C – оптимальная расчетная температура отжига праймеров; н. – нуклеотид.

Ампликоны CD2v-IgHA, p30-Domain и p54-Domain были субклонированы с сигнальными последовательностями и трансмембранными регионами в плазмидный вектор pJET1.2 («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США).

По результатам рестрикционного и ПЦР анализов были отобраны следующие клоны: pJET1.2/Sig/CD2IgHA/RightTrM – 1 и 4; pJET1.2/ SigLTrM/p30 – 3 и 8; pJET1.2/ SigLTrM/p54 – 1 и 3.

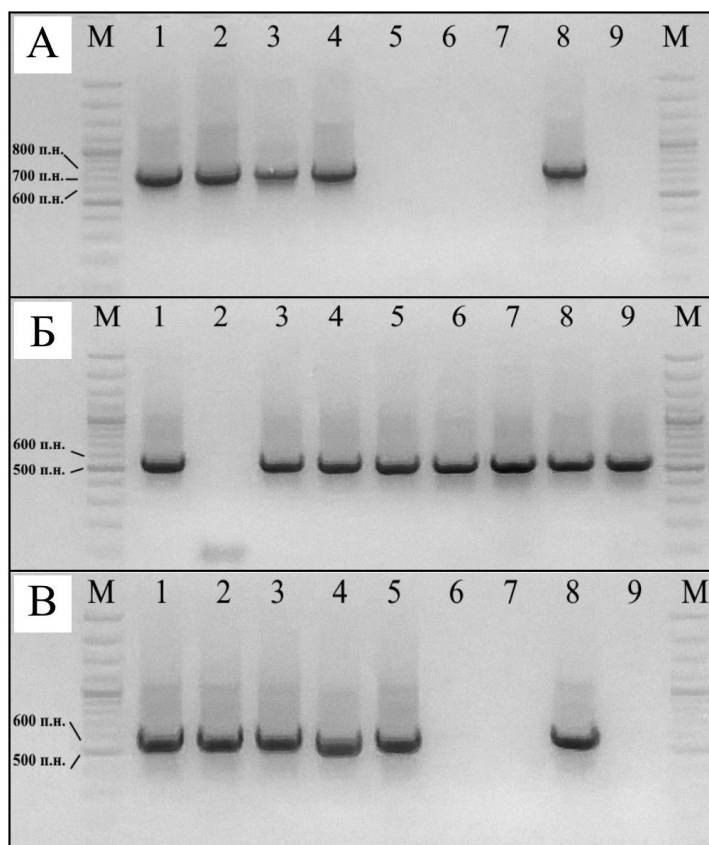


Рисунок 2 – Детекция продуктов амплификации при скрининге плазмид pJET1.2/Sig/CD2vIgHA/RightTrM (А), pJET1.2/SigLeftTrM/p30 (Б), pJET1.2/SigLeftTrM/p54 (В)

Примечание: М – GeneRuler 1kb DNA Ladder (маркер размера фрагментов ДНК 250-10000 п.н., «Thermo Scientific», США); 1-9 – номера плазмидных клонов; п.н. – пары нуклеотидов.

В качестве компетентных клеток *E.coli* использовали штамм XL1-Blue, трансформацию осуществляли согласно методу, описанному Green M.R., Sambrook J. (2012). Первичный скрининг трансформантов выполняли под селективным давлением на агаризованной среде SOB с ампициллином (100 мкг/см³). Скрининг полученных клонов проводился в ПЦР со специфическими праймерами (таблица 1) и рестрикционным анализом. На рисунке 2 представлены результаты скрининга клонов pJET1.2/Sig/CD2vIgHA/RightTrM, pJET1.2/SigLeftTrM/p30, pJET1.2/SigLeftTrM/p54.

Секвенирование плазмид показало полное соответствие нуклеотидных последовательностей с сохранением рамок считывания полученных химерных генов. В

последующей работе использовали плазмиды pJET1.2/Sig/CD2vIgHA/RightTrM/4, pJET1.2/SigLeftTrM/p30/8 и pJET1.2/SigLeftTrM/p54/1.

2.2.4 Клонирование химерных генов в плазмидный вектор для экспрессии в эукариотических системах

На следующем этапе получали ДНК-конструкции, экспрессирующие целевые рекомбинантные белки в клетках эукариот. Для этого соответствующие нуклеотидные последовательности были переклонированы в плазмидный вектор pCI-neo («Promega», США) по сайтам рестрикции NheI и SmaI. Источниками генов выступали плазмиды pJET1.2/Sig/CD2vIgHA/RightTrM/4, pJET1.2/SigLeftTrM/p30/8 и pJET1.2/SigLeftTrM/p54/1. Карты открытых рамок считывания химерных генов приведены на рисунке 3.

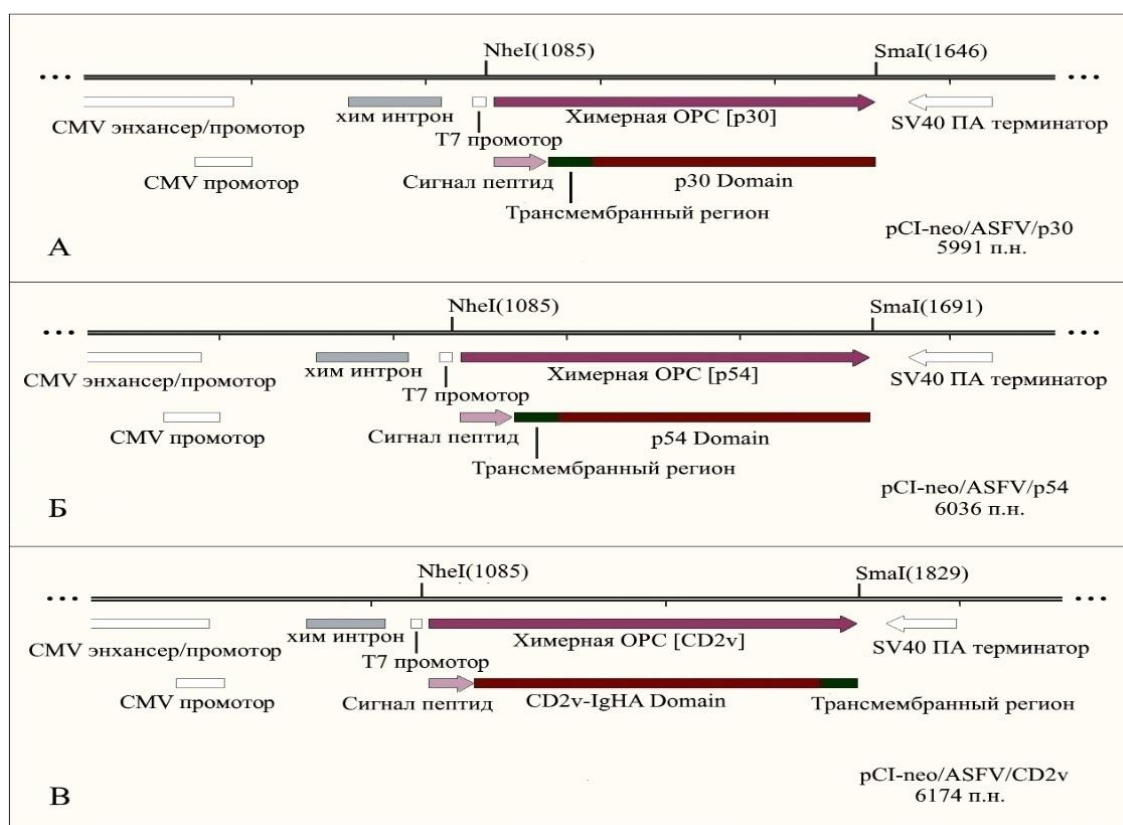


Рисунок 3 – Схемы открытых рамок считывания химерных генов с клонированными последовательностями фрагментов, кодирующих белки вируса африканской чумы свиней p30, p54 и CD2v, в полученных ДНК-конструкциях

Примечание: А — pCI-neo/ASFV/p30, Б — pCI-neo/ASFV/p54, В — pCI-neo/ASFV/CD2v; CMV энхансер/промотор — энхансер раннего ответа промотора цитомегаловируса, CMV промотор — промотор цитомегаловируса, Хим интрон — химерный интрон, T7 промотор — промотор фага T7, SV40 ПА терминатор — сигнал полиаденилирования и терминатор из ДНК вируса SV40, Сигнал пептид — сигнальная последовательность.

Анализ полученных рекомбинантных плазмид pCI-neo/ASFV/CD2v, pCI-neo/ASFV/p30 и pCI-neo/ASFV/p54 методом ПЦР со специфическими праймерами показал, что на этих матрицах синтезировались ампликоны, размеры которых соответствуют расчетным. Корректность рамок считывания химерных генов подтверждали секвенированием. В результате анализа для дальнейшей работы были отобраны первые клоны каждой конструкции.

Для анализа экспрессии полученных рекомбинантных генов *in vitro* проводили трансфекцию монослоя клеток НЕК293Т кальций-фосфатным методом. Определены условия трансфекции: конфлюентность монослоя клеток на момент трансфекции 80-90 %, количество вносимой плазмидной ДНК 3 мкг/лунку 6-луночного планшета, время инкубирования комплекса плазмидной ДНК и хлорида кальция 30 минут.

2.2.5 Характеристика рекомбинантных (r) белков rCD2v, rp30 и rp54 вируса АЧС в иммуноблоттинге

Вирусную специфичность и молекулярные массы полипептидов экспрессируемых рекомбинантных белков rp30, rp54, rCD2v в лизатах трансфицированных эукариотических клеток определяли методом иммуноблоттинга. В реакции использовали сыворотки крови от экспериментально зараженных свиней и кабана.

На рисунке 4 (А, Г) представлены результаты определения антигенной активности и молекулярной массы полипептида белка rp30, синтезированного в клетках НЕК293Т, трансфицированных плазмидой pCI-neo/ASFV/p30/1. По данным иммуноблоттинга с антителами АЧС-специфичных сывороток домашних свиней и дикого кабана молекулярная масса rp30 составляет 21,6 кДа. С сывороткой крови от интактной свиньи вирусоспецифические антигены не выявлены. Титрование лизата клеток НЕК293Т, трансфицированных плазмидой pCI-neo/ASFV/p30/1 с двукратным шагом от 1:2 до 1:512 (рисунок 4, Г), выявило антигенную активность до разведения 1:128, что свидетельствует о высоком уровне экспрессии rp30.

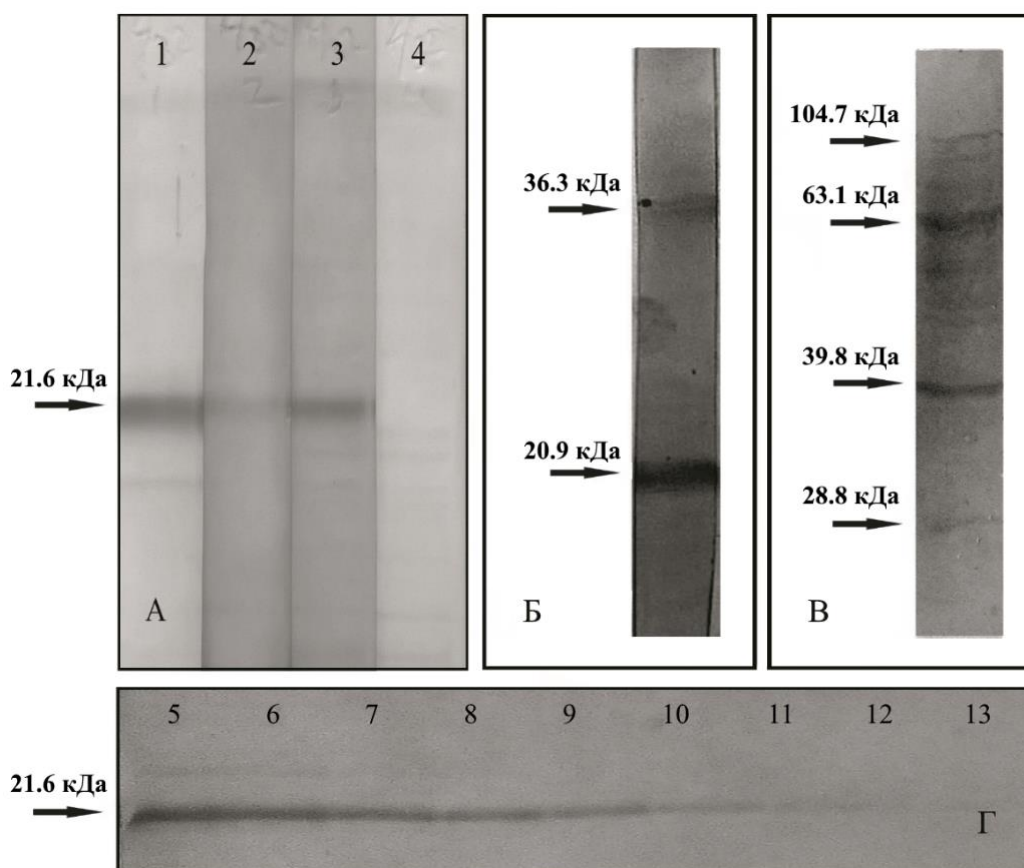


Рисунок 4 – Иммуноблоттинг, демонстрирующий синтез рекомбинантных белков gp30 (А), gp54 (Б) и gp CD2v (В) в трансфицированных плазмидами pCI-neo/ASFV/p30/1, pCI-neo/ASFV/p54/1, pCI-neo/ASFV/CD2v/1 клетках HEK293T и антигенную активность gp30 (Г)

Примечание: 1-4 — номера сывороток, 5-13 — разведения лизата клеток HEK293T (от 1:2 до 1:512 с 2-кратным шагом), экспрессирующих gp30. Слева стрелками указано местоположение и молекулярные массы вирусоспецифических полипептидов.

Методом иммуноблоттинга в лизате трансфицированных pCI-neo/ASFV/p54 клеток HEK293T было установлено присутствие мажорного полипептида с молекулярной массой 20,9 кДа и минорного – 36,3 кДа (рисунок 4, Б), а при трансфекции pCI-neo/ASFV/CD2v выявляли мажорные полипептиды 39,8 кДа и 63,1 кДа и минорные 28,8 кДа и 104,7 кДа (рисунок 4, В). Среди полученных антигенноактивных полипептидов одни по размеру соответствовали теоретически рассчитанным, другие - продуктам посттрансляционной модификации рекомбинантных белков.

2.2.6 Изучение антигенной активности продуктов трансляции генов методом прямой иммуофлуоресценции

Для исследования антигенной активности в реакции прямой иммуофлуоресценции белков, экспрессируемых в результате трансфекции культур клеток HEK293T и ЛС рекомбинантными плазмидами pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54 или pCI-neo/ASFV/CD2v, были получены меченные флуоресцеин изотиоцианатом иммуноглобулины из сывороток крови иммунных к АЧС свиней.

При просмотре препаратов под люминесцентным микроскопом обнаружили ярко-зеленое свечение клеток, что свидетельствовало о специфичности и функциональной антигенной активности рекомбинантных белков. Максимум экспрессии в клетках HEK293T и ЛС, трансфицированных pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54 или pCI-neo/ASFV/CD2v, наблюдали на 2-3 сутки.

2.2.7 Иммунизация свиней рекомбинантными плазмидами pCI-neo/ASFV/CD2v, pCI-neo/ASFV/p30 и pCI-neo/ASFV/p54

Для оценки иммуногенных и протективных свойств продуктов трансляции рекомбинантных плазмид pCI-neo/ASFV/CD2v, pCI-neo/ASFV/p30 и pCI-neo/ASFV/p54 использовали свиней крупной белой породы живой массой 25-30 кг.

Иммунизацию свиней проводили трёхкратно с двухнедельным интервалом с использованием адгезивных клеток (А-клеток) аутологичных культур ЛС, трансфицированных *in vitro* рекомбинантными плазмидами pCI-neo/ASFV/CD2v/1, pCI-neo/ASFV/p30/1, pCI-neo/ASFV/p54/1. Предполагалось, что иммунизация антигенпредставляющими клетками (моноцитами/макрофагами) позволит обеспечить эффективную индукцию механизмов защиты против АЧС.

В сыворотках крови иммунизированных свиней, отобранных на 0-е, 14-е, 28-е и 42-е сутки, антител к белкам вируса АЧС методом ТФ ИФА не обнаружено. После контрольного заражения на 42-е сутки штаммом Мозамбик-78 вируса АЧС внутримышечно в область шеи в дозе 100 ГАЕ₅₀ четыре иммунизированные свиньи пали через 6-8 суток, а не иммунизированная (контрольная) – через 13 суток.

Таким образом, иммунизация свиней аутологичными лейкоцитами свиней, трансфицированными рекомбинантными плазмидами pCI-neo/ASFV/CD2v, pCI-

neo/ASFV/p30 или pCI-neo/ASFV/p54, не индуцировала выработку вирусоспецифических антител и не обеспечивала защиту от контрольного заражения.

2.2.8 Конструирование рекомбинантных плазмид pUbb76A_p30, pUbb76A_p54 и pUbb76A_CD2v

Чтобы усилить специфические CD8⁺-Т-клеточные ответы, были разработаны конструкции pUbb76A_CD2v, pUbb76A_p30 и pUbb76A_p54, кодирующие слитые с клеточным убиквитином эктодомены белков CD2v, p30 и p54.

Были получены три рекомбинантные плазмиды (моноварианты) с фрагментами генов *EP402R*, *CP204L*, *E183L*, кодирующими эктодомены белков CD2v, p30, p54 вируса АЧС аттенуированного штамма МК-200 под контролем усиленного энхансером промотора ранних генов цитомегаловируса человека. Для эффективной презентации антигенных эпитопов посредством деградации белков в протеосомах указанные гены были слиты с лидирующей последовательностью гена убиквитина В (76 аминокислот). Для предотвращения отщепления убиквитина в процессе трансляции его С-концевой глициновый остаток был заменен на триплет аргинина (Zhang M. et al., 2005).

2.2.9 Определение иммуногенности и протективности рекомбинантных плазмид pUbb76A_CD2v, pUbb76A_p30, pUbb76A_p54

Четырех свиней иммунизировали на 0, 14, 28 сутки смесью по 1,0 мг ДНК рекомбинантных плазмид pUbb76A_CD2v, pUbb76A_p30, pUbb76A_p54 в конечном объеме 1,5 см³. Введение препарата проводили по описанной Argilaguet J.M. et al. (2012) схеме, для этого объем каждой дозы делили на три части и вводили в трапециевидную мышцу шеи, вентрально в четырёхглавую мышцу бедра и подкожно в ухо. На 42 сутки после начала эксперимента иммунизированных и контрольного животных заражали внутримышечно вирусом АЧС штамма Мозамбик-78 в дозе 100 ГАЕ₅₀.

Полученные результаты обобщены в таблице 2. Все животные пали с 4 по 7 сутки. Но обращает на себя внимание факт, что у свиньи № 4 отмечены с одной стороны наибольшие значения срока жизни и активности вирусоспецифических ЦТЛ, с другой – наименьшие показатели накопления вируса в крови на 4 сутки после заражения штаммом Мозамбик-78 и культуре клеток лейкоцитов крови, полученных после завершения иммунизации.

Таблица 2 – Результаты иммунизации свиней рекомбинантными плазмидами pUbb76A_CD2v, pUbb76A_p30, pUbb76A_p54

№ свиньи	Срок гибели (сутки)	Титр вируса в крови lg ГАЕ ₅₀ /см ³	Число IFN γ -секретирующих клеток	Титр вируса в ЛС lg ГАЕ ₅₀ /см ³
1	6	7,00	62	6,50
2	6	6,70	104	6,75
3	4	7,00	78	7,25
4	7	6,50	178	6,25
5	5	7,30	4	7,50

Известно, что избыточность в индукции вирусоспецифических антител приводит к ускорению гибели свиней после контрольного заражения (Argilaguet J.M. et al., 2011). Чтобы найти оптимальный баланс в стимулировании эффекторных механизмов иммунологической защиты было предложено включать в состав плазмид ген убиквитина. Иммунизация свиней рекомбинантной плазмидой pCMV-UbsHAPQ не индуцировала гуморальный ответ у свиней, но стимулировала вирусоспецифические ЦТЛ и обеспечивала частичную защиту против контрольного заражения гомологичным вирулентным штаммом вируса АЧС (Argilaguet J.M., et al. 2012). Наши результаты позволяют предположить, что при АЧС необходимо найти оптимальный баланс в стимулировании эффекторных механизмов иммунологической защиты, как ЦТЛ, так и АЗКЦ.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

3.1 Выводы

1. Получены рекомбинантные плазмиды, содержащие полноразмерный ген *EP402R* (CD2v) и фрагменты генов *CP204L* (p30), *E183L* (p54) вируса АЧС штамма МК-200 без изменения их рамок считывания. В GenBank депонированы нуклеотидная последовательность гена *CP204L* (GenBank МК211505) вирулентного штамма Мозамбик-78 и нуклеотидные последовательности генов *CP204L* (GenBank МК211506), *E183L* (GenBank МК234865) аттенуированного штамма МК-200 вируса АЧС.

2. По результатам биоинформатического анализа у трех потенциально протективных белков CD2v, p30 и p54 вируса АЧС штамма МК-200 определены

эктодомены, которые несут наибольшее число прогнозируемых Т- и В-клеточных эпитопов, сайтов N-гликозилирования и SLA-мотивов.

3. Сконструированы рекомбинантные эукариотические плазмиды pCI-neo/ASFV/CD2v, pCI-neo/ASFV/p30 и pCI-neo/ASFV/p54, включающие фрагменты генов *EP402R* 49-651 п.н., *CP204L* 142-546 п.н. и *E183L* 160-597 п.н. вируса АЧС штамма МК-200, сигнальную последовательность гена белка слияния F парагриппа человека 1 и последовательность гена трансмембранного региона белка HN вируса Сендай под контролем цитомегаловирусного промотора.

4. Показана вирусная специфичность полипептидов, синтезируемых в трансфицированных культурах клеток HEK293T и лейкоцитов свиней рекомбинантными плазмидами pCI-neo/ASFV/CD2v, pCI-neo/ASFV/p30 и pCI-neo/ASFV/p54. По данным иммуноблоттинга молекулярные массы рекомбинантных вирусоспецифических полипептидов соответствовали расчетным значениями: gp30 – 21,6 кДа, gp54 – 20,9 кДа и 36,3 кДа, rCD2v – 28,8; 39,8; 63,1 и 104,7 кДа. Методом прямой иммунофлуоресценции показано, что наибольший уровень экспрессии вирусоспецифических белков наблюдается на 2-3 сутки после трансфекции.

5. Иммунизация свиней аутологичными лейкоцитами крови, трансфицированными рекомбинантными плазмидами pCI-neo/ASFV/CD2v, pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54, не индуцировала синтез вирусоспецифических антител и не обеспечивала защиту от вирулентного штамма Мозамбик-78 вируса АЧС.

6. Сконструированы рекомбинантные эукариотические плазмиды pUbb76A_CD2v, pUbb76A_p30, pUbb76A_p54, включающие фрагменты генов *EP402R* 49-651 п.н., *CP204L* 142-546 п.н. и *E183L* 160-597 п.н. вируса АЧС штамма МК-200, слитых с лидирующей последовательностью гена убиквитина под контролем цитомегаловирусного промотора.

7. Трехкратная иммунизация свиней смесью рекомбинантных плазмид pUbb76A_CD2v, pUbb76A_p30, pUbb76A_p54 индуцировала формирование вирусоспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов, но не вирусоспецифических антител, и не обеспечивала защиту от заражения гомологичным вирулентным штаммом Мозамбик-78 вируса АЧС.

3.2 Практические предложения

Депонированные в GenBank нуклеотидные последовательности гена *CP204L* (GenBank MK211505) вирулентного штамма Мозамбик-78 и нуклеотидные последовательности генов *CP204L* (GenBank MK211506) и *E183L* (GenBank MK234865) аттенуированного штамма МК-200 вируса АЧС можно использовать при разработке средств профилактики АЧС.

Созданные ДНК-конструкции можно использовать для разработки кандидатных ДНК-вакцин.

3.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

Целесообразно продолжить исследования по определению молекулярных и иммунологических основ формирования сероиммунотиповой защиты при африканской чуме свиней. Для оценки перспективы создания ДНК-вакцины против АЧС возможно испытать вариант иммунизации свиней, когда механизмы АЗКЦ индуцировать в результате введения вакцинного штамма ФК-135 вируса АЧС IV сероиммунотипа, а цитотоксические Т-лимфоциты индуцировать иммунизацией рекомбинантной плазмидой с геном белка CD2v из вируса АЧС III сероиммунотипа, слитым с модифицированным моноубиквитином. В случае формирования серотипоспецифической защиты от гибели после заражения вирулентными штаммами вируса АЧС III и IV сероиммунотипов будет подтверждена определяющая роль CD2v в формировании сероиммунотиповой защиты.

4. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гуморальные и клеточно-опосредованные механизмы иммунитета при африканской чуме свиней / А.Д. Серeda, А.С. Казакова, **А.Р. Иматдинов**, Д.В. Колбасов // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50, № 6. – С. 709-718.

2. Экспрессия в эукариотических клетках рекомбинантных генов, кодирующих фрагменты протективно значимых белков вируса африканской чумы свиней / **А.Р. Иматдинов**, А.Д. Серeda, И.Р. Иматдинов, А.С. Казакова, О.А. Дубровская, Д.В. Колбасов // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51, № 6. – С. 837-844.

3. Серeda, А.Д. Гемадсорбция при африканской чуме свиней (обзор) / А.Д. Серeda, **А.Р. Иматдинов**, В.В. Макаров // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51, № 6 – С. 763-774.

4. Фенотипическое и генотипическое разнообразие вируса африканской чумы свиней / **А.Р. Иматдинов**, О.А. Дубровская, А.С. Казакова, И.А. Сливко, А.Д. Серeda // Труды Всеросс. НИИ эксперим. ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. – 2018. – Т. 80, № 1. – С. 205-211.

5. Изучение антигенности, иммуногенности и протективности ДНК-конструкций, содержащих фрагменты генов *CP204L*, *E183L* и *EP402R* вируса африканской чумы свиней / **А.Р. Иматдинов**, О.А. Дубровская, Д.Ю. Морозова, В.М. Лыска, А.Д. Серeda // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53, № 4. – С. 860-867.

6. Морозова, Д.Ю. Гетерогенность вируса африканской чумы свиней / Д.Ю. Морозова, **А.Р. Иматдинов**, А.Д. Серeda // Сборник тез. V междунар. конф. молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio». – пос. Кольцово, 2018. - С. 192-195.

7. Иматдинов, А.Р. Получение и анализ продуктов трансляции ДНК-конструкций, несущих гены вируса АЧС *CP204L*, *E183L*, *EP402R* / **А.Р. Иматдинов**, О.А. Дубровская, Д.Ю. Морозова // Сборник тез. XXV Междунар. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2018». – М., 2018. – Режим доступа: https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2018/data/12714/65429_uid234111_report.pdf.

8. Immunogenic potential of the ectodomains of the p30, p54 and CD2v proteins of the African swine fever virus / **A. Imatdinov**, A. Kazakova, O. Dubrovskaya, A. Sereda // 12th Annual Meet. of EPIZONE. – Vienna, 2018. – P. 64.

Подписано в печать __.__.2019г.

Формат 60×90 1/16. Усл. печ. л.1.

Тираж 80 экз.

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