

Вирусы — возбудители особо опасных инфекций: молекулярная генетика, иммуногенность, культивирование

УДК 636.4:619:616.98:578:577.2.08:51-76

doi: 10.15389/agrobiology.2015.6.785rus

ИММУНОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ГЛИКОПРОТЕИНЫ p54 И CD2v ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ: БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАЦИЙ И ГЕТЕРОГЕННОСТИ*

К.А. МИМА, Г.С. БУРМАКИНА, И.А. ТИТОВ, А.С. МАЛОГОЛОВКИН

Вирус африканской чумы свиней (АЧС) — уникальный представитель возбудителей арбовирусных инфекций, который до сих пор остается единственным представителем семейства *Asfarviridae*. Он служит возбудителем одной из самых опасных болезней представителей семейства *Suidae* и, кроме того, способен инфицировать мягких клещей рода *Ornithodoros*. Генетическая и фенотипическая гетерогенность вируса АЧС остается одной из основных причин отсутствия вакцины против этого опасного трансграничного заболевания. Нами изучена структура и функции наиболее переменных гликопротеинов вируса АЧС p54 и CD2v с использованием биоинформатического анализа и рекомбинантных конструкций, экспрессируемых в экстрахромосомном состоянии в культурах клеток млекопитающих COS-I (клетки африканской зеленой мартышки) и HEK-293 (клетки почки эмбриона человека). Согласно результатам проведенного биоинформатического анализа, основанного на расчете индекса разнообразия аминокислотных последовательностей в пропорциях по методу Симпсона, варибельная область (N-концевой участок) CD2v сильно гликозилирована (содержит 28-30 сайтов N- и O-гликозилирования) и находится на наружной поверхности клеточной мембраны. Эта область также содержит иммуноглобулиновый домен (1-225-я аминокислота), что обуславливает взаимодействие CD2v с антителами. Выявленные различия в посттрансляционных модификациях и наличие генетических вариаций по белку CD2v могут объяснять разнообразие в проявлении феномена гемадсорбции у изолятов вируса АЧС. Напротив, белок p54 имеет варибельную часть, локализованную с внутренней стороны клеточной мембраны, и гликозилированный экстраклеточный участок, расположенный с ее внешней стороны. Высокий уровень различий в нуклеотидных последовательностях гена p54 (*E183L*) у разных изолятов вируса АЧС может быть результатом мутационной изменчивости в ходе эволюции. Выявленными особенностями посттрансляционных модификаций и генетическими вариациями по белку CD2v, по всей видимости, объясняется разнообразие антигенных свойств изолятов вируса АЧС. Таким образом, в представленной работе впервые проанализирована посттрансляционная модификация наиболее переменных гликопротеинов вируса АЧС — p54 и CD2v. Посредством транзientной экспрессии в клеточных линиях млекопитающих получены рекомбинантные химерные продукты p54-EGFP и CD2v-NA, что позволило выявить различную локализацию вирусных белков в трансфицированных клетках. В частности, при исследовании культуры клеток COS-I, трансфицированных плазмидой p54-rEGFP-N1, была установлена цитоплазматическая локализация флуоресцентно меченного рекомбинантного белка p54-EGFP. В культуре клеток HEK-293 белок CD2v обнаруживался исключительно в составе клеточной мембраны. По данным иммуноблоттинга, молекулярная масса CD2v равнялась примерно 90 кДа (при расчетной 65 кДа). Следовательно, в этом поверхностном гликопротеине вириона АЧС на углеводный компонент приходится около 30 % массы. Кроме того, результаты иммуноблоттинга указывали на наличие двух вариантов белка CD2v с молекулярной массой 25 кДа и 90 кДа, то есть предположительно его различных гликозилированных форм, что согласуется с сообщениями в специальной литературе. Итак, выполненный биоинформатический анализ и результаты исследований в культурах клеток COS-I и HEK-293 показали, что именно CD2v может считаться наиболее вероятным белком-кандидатом, определяющим взаимодействие вируса АЧС с вирусоспецифическими антителами.

Ключевые слова: африканская чума свиней, гликопротеины, варибельность, гликозилирование, транзientная экспрессия, иммунотипы.

Вирус африканской чумы свиней (АЧС) до настоящего времени остается единственным известным представителем семейства *Asfarviridae* (1-3). Он служит возбудителем одной из самых опасных болезней представителей семейства *Suidae* и, кроме того, способен инфицировать мяг-

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта «Мол-а-вед» (15-34-20995).

ких клещей рода *Ornithodoros* (4-6). Геном вируса представлен двуцепочечной ДНК, размер которой в зависимости от штамма варьирует от 170 до 190 тыс. п.н. (7, 8). Анализ полной нуклеотидной последовательности авирулентного изолята ВА71V выявил наличие не менее 151 гена (9). Для некоторых белков, закодированных в геноме, определена функция и роль в патогенезе (10-16), однако значительное их число до сих пор полностью не охарактеризованы.

Вирусная частица по морфологии очень похожа на иридовирусы (17, 18), имеет диаметр около 200 нм и состоит из нескольких концентрических доменов (19, 20). Около 35 % массы вириона составляет основной капсидный белок р72. На структурные белки р150, р37, р34 и р14 (их предшественник — полипротеин р220) приходится до 25 % массы частицы (21, 22). Из всех известных белков вируса АЧС гликопротеины р54 и CD2v, расположенные на поверхности вирусной частицы, наиболее вариабельны. Белок р54 (кодируется геном *E183L*) близко к N-концу содержит потенциальную область трансмембранного домена. Этот белок принимает участие в ранних стадиях развития вирусной инфекции и отвечает за присоединение вируса АЧС к клетке-мишени. Молекулярная масса полипептидной части белка р54 у разных вирусных изолятов варьирует от 24 до 28 кДа (23). Белок CD2v обуславливает гемадсорбирующие свойства вируса и кодируется геном *EP402R*. Для репликации вируса в культурах клеток CD2v несуществен (24, 25). У природных изолятов, не способных к гемадсорбции, обнаружены изменения в последовательности гена *EP402R*, соответствующей сигнальному участку белка, которые приводят к сдвигу рамки считывания. CD2v — трансмембранный белок с N-концевым сигнальным пептидом и одним трансмембранным доменом, который имеет сходство с доменом внеклеточного белка CD2 клетки-хозяина (24, 26, 27).

Несмотря на функциональные различия, оба гликопротеина (р54 и CD2v), по данным ряда авторов (24, 28), обуславливают фенотипические характеристики вируса АЧС, проявляя свойства серотипоспецифических антигенов. Определение серотипа изолятов чрезвычайно важно для изучения биологии вируса АЧС и создания средств специфической профилактики этого заболевания.

В представленной работе нами впервые проанализирована посттрансляционная модификация наиболее вариабельных гликопротеинов вируса АЧС — р54 и CD2v. Посредством транзientной экспрессии в клеточных линиях млекопитающих получены рекомбинантные химерные белки р54-EGFP и CD2v-НА и показана их клеточная локализация.

Цель настоящей работы заключалась в анализе структуры и роли наиболее вариабельных гликопротеинов вируса АЧС р54 и CD2v на основе методов биоинформатического анализа, функциональной геномики, молекулярного клонирования и экспрессии рекомбинантных конструкций.

Методика. Нуклеотидные последовательности генов р54 и CD2v вируса африканской чумы свиней (АЧС) были получены из международной базы данных GenBank (the National Center for Biotechnology Information — NCBI): NC_001659.2, GQ410768.1, GQ410771.1, GQ410767.1, KC610537.1, KC610538.1, KJ671542.1, KC610535.1, KC610532.1, KF303309.1, KF303306.1, KC990883.1, EU620682.1, FR682468.1, FN557520.1, AM712240.1, AF481876.1, DQ026270.1, DQ026267.1, KM262845.1, KM262844.1, DQ026268.1.

Анализ вариабельных областей генов, доменов и структуры белков р54 и CD2v проводили при помощи сервиса <http://www.cbs.dtu.dk/services/>. Для определения степени N- и O-гликозилирования использовали сервис <http://www.expasy.org/proteomics>, для анализа вариабельности аминокислот-

ных последовательностей — сервис <http://imed.med.ucm.es/PVS/> (29, 30).

При дизайне праймеров нуклеотидную последовательность ДНК штамма Georgia2007/wb вируса АЧС (FR682468.1) использовали в качестве референтной. Праймеры, фланкирующие полноразмерные копии вирусных генов р54 и CD2v, конструировали с помощью программ SerialCloner v. 2.6.1 (F. Perez, 2004), Oligo v. 6.71 (P. Rychlik, 2005). В олигонуклеотидные праймеры были встроены специфические гексамерные последовательности сайтов рестрикции эндонуклеаз SacI, EcoRI для р54 и BglII и EcoRI для CD2v.

Нуклеотидные последовательности генов р54 и CD2v синтезировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием One Taq Hot start master mix («New England Biolabs», США) на приборе Maxygene thermal cycler («Axygen Scientific Inc.», США) согласно рекомендациям производителя. Программа включала 30 с начальной денатурации при 94 °С и 40 циклов ПЦР (денатурация — 30 с при 94 °С, отжиг праймеров — 30 с при 55 °С, элонгация — 2 мин при 72 °С). ДНК-мишень выделяли из штамма Ставрополь-08/01 вируса АЧС (получен из коллекции микроорганизмов Всероссийского НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии) при помощи набора QIAamp DNA Mini Kit («Qiagen N.V.», Германия) согласно инструкции производителя. Ампликоны разделяли электрофоретически в 1,5 % агарозном геле, содержащем 0,001 % бромистого этидия, при силе тока 50 мА. Для очистки ПЦР-продуктов от агарозного геля использовали набор QIAquick Gel Extraction Kit («Qiagen N.V.», Германия).

На этапе промежуточного клонирования ПЦР-продукты встраивали в вектор pGEM-T-easy с маркером устойчивости к ампициллину («Promega», США) и сайтами расщепления специфическими эндонуклеазами, используя ДНК-лигазу фага T₄ («NEB», США). Трансформацию клеток *Escherichia coli* Dh5 полученными конструкциями осуществляли методом электропорации на приборе Gene Pulser Xcell («Bio-Rad», США). Из отобранных устойчивых к ампициллину трансформантов выделяли плазмидную ДНК набором QIAGEN Plasmid Mini Kit («Qiagen N.V.», Германия). Наличие специфической вставки в рекомбинантных плаزمиде подтверждали в ПЦР с применением геноспецифических праймеров, проверяя ее идентичность секвенированием сайтов рестрикции на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3130xl («Applied Biosystems», США). Наличие специфических сайтов рестрикции в созданных рекомбинантных плазмиде подтвердили также с использованием эндонуклеаз SacI, EcoRI при клонировании последовательностей гена р54 и BglII и EcoRI — в случае гена CD2v.

Для контроля функциональной целостности клонированных целевых участков вирусного генома и получения генно-инженерных конструкций, обеспечивающих экспрессию белков р54 и CD2v в клетках млекопитающих, кодирующие последовательности генов *E183L* (р54) и *EP402L* (CD2v) из рекомбинантных плазмид pGEM-T-easy, где они находились под контролем промотора бактериофага T₇, последовательно реклонировали по указанным выше сайтам рестрикции в акцепторные векторы с цитомегаловирусным промотором. В случае р54 таким вектором была плаزمида pEGFP-N1 («Clontech», США) с геном устойчивости к канамицину и *eGFP* (enhanced green fluorescence protein), кодирующим маркерный флуоресцентный белок. Для CD2v выбрали вектор pCMV-NA-C («Clontech», США) с геном устойчивости к ампициллину, содержащий короткую (29 нуклеотидов) последовательность, которая кодирует иммунотоксичный участок гемагглютинаина (НА) вируса гриппа. ДНК полученных

плазмидных конструкций очищали на анионообменных колонках с использованием набора QIAGEN Plasmid Maxi Kit («Qiagen N.V.», Германия).

Трансфекцию культур клеток африканской зеленой мартышки (COS-1) и почки эмбриона человека (HEK-293) очищенными рекомбинантными плазидами (2,5 мкг на 1 лунку) проводили в 6-луночных планшетах с применением липофектамина («Invitrogen», США) согласно инструкции производителя (31).

Через 24, 48, 72 и 96 ч после трансфекции проводили скрининг клеток на наличие репортерной флуоресценции под инвертированным флуоресцентным микроскопом Olympus MIT-2 (Япония), клетки собирали при помощи скребка и лизировали в TBS буфере (0,1 % Твин 20) с добавлением ингибитора протеаз Protease Inhibitor Cocktail Set V («Calbiochem», США). Для подтверждения наличия рекомбинантных белков использовали метод иммуоблоттинга (32) с моноклональными антителами GFP(FL) («Santa Crus Biotechnology», США) к репортерному белку GFP и с моноклональными антителами HA-probe (F-7) («Santa Crus Biotechnology», США) к маркерному HA-участку и вторичными антивидовыми моноклональными антителами, меченными пероксидазой хрена. Субстраты для детекции — соответственно набор Clarity Western ECL Substrat («Bio-Rad», США) и DAB («Thermo Scientific», США).

Результаты. Для анализа варибельных областей генов был использован метод Симпсона, основанный на расчете индекса разнообразия аминокислотных последовательностей в пропорциях. Индекс описывает вероятность того, что две последовательности с заменами, выбранные случайным образом, будут схожи с остальными аминокислотными последовательностями. Значения этого индекса находятся в диапазоне от 0 до 1 и тем больше, чем больше разнообразие образцов.

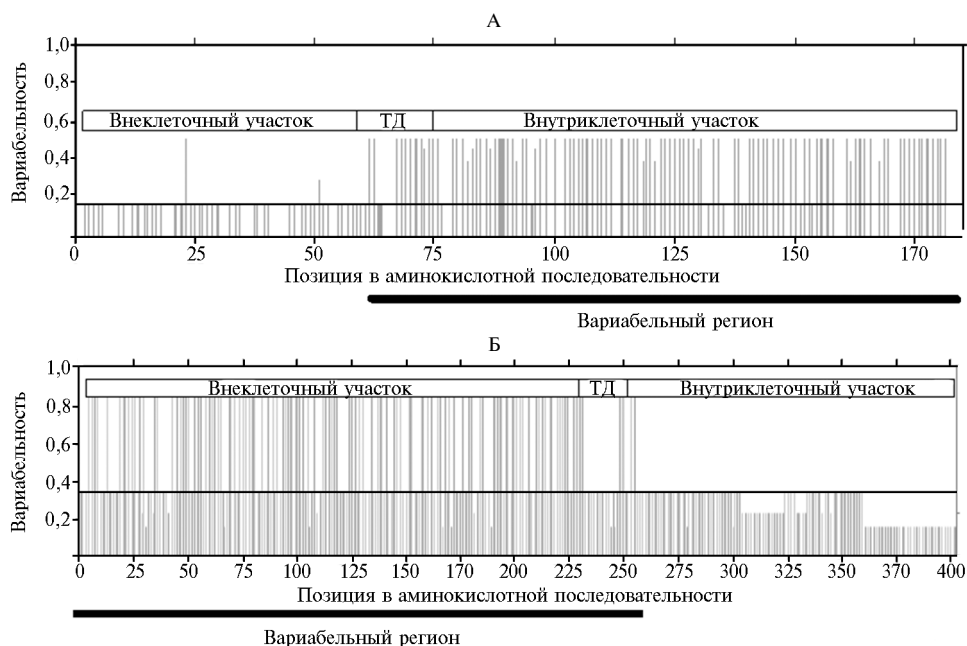


Рис. 1. Результаты анализа профилей варибельности капсидных гликопротеинов p54 (А) и CD2v (Б) у различных штаммов вируса африканской чумы (АЧС) свиней по методу Симпсона: ТД — трансмембранный домен. Варибельными считаются области, для которых полученные значения превышают пороговое (соответствующая горизонтальная линия). Аминокислотные последовательности получали посредством трансляции нуклеотидных последовательностей генов, депонированных в базе данных GenBank (всего проанализированы 22 изолята вируса АЧС).

Аминокислотные последовательности рассчитывали на основании нуклеотидных последовательностей генов, депонированных в базе данных GenBank. Анализ аминокислотных последовательностей белков р54 (*E183L*) у различных изолятов ($n = 22$) показал, что наиболее вариабелен его С-концевой участок (аминокислоты в позициях с 62-й по 185-ю), локализованный с внутренней стороны клеточной мембраны (рис. 1, А). Указанная область состоит из тандемных повторов четырех аминокислот (Пе-Пе-Пе-Пе, Ala-Ala-Ala-Ala). Ближе к N-концу находится участок белка, проходящий через мембрану клетки, — трансмембранный домен (с 25-й по 45-ю аминокислоту). Белок CD2v (*EP402L*) имеет переменную N-концевую часть, расположенную с наружной стороны клеточной мембраны (с 1-й по 225-ю аминокислоту) (рис. 1, Б), и закреплен в мембране при помощи трансмембранного домена. Согласно профилям гетерогенности, CD2v обладал большей вариабельностью по сравнению с р54.

Анализ аминокислотных последовательностей на наличие сайтов N- и O-гликозилирования показал, что для белка р54 характерно преобладание O-гликозилирования и большинство потенциальных сайтов (18 сайтов) гликозилирования располагается на С-конце молекулы. У белка CD2v более выраженным было N-гликозилирование, представленное преимущественно на N-концевом участке (28-30 сайтов) (рис. 2).

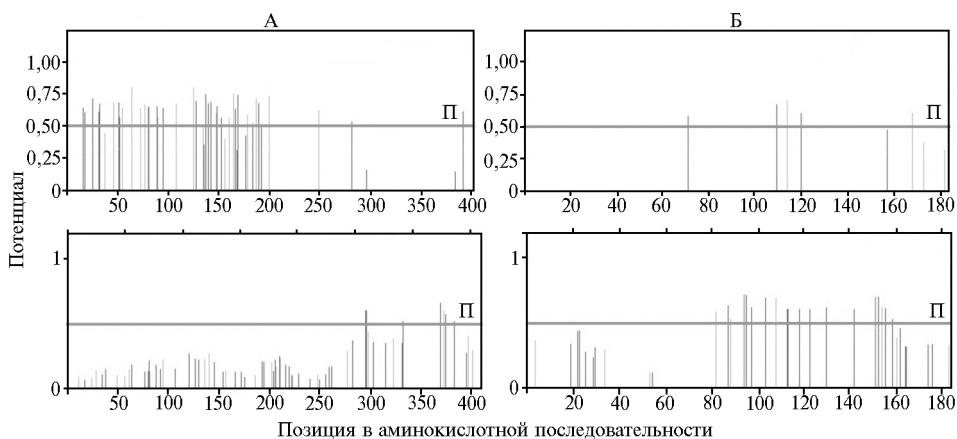


Рис. 2. Анализ распределения потенциальных сайтов N- (верхний ряд) и O-гликозилирования (нижний ряд) в капсидных гликопротеинах CD2v (А) и р54 (Б) вируса африканской чумы свиней. Пересечение с горизонтальной пороговой линией (П) означает, что в соответствующих аминокислотных позициях гликозилирование наиболее вероятно. N- и O-гликозилирование в белках прогнозировали на основании анализа аминокислотных последовательностей и наличия определенных сочетаний аминокислот, потенциально соответствующих сайтам гликозилирования. Для CD2v было выявлено 28-30 сайтов N-гликозилирования и 5-7 сайтов O-гликозилирования, для р54 — 5 сайтов N-гликозилирования и 18 сайтов O-гликозилирования.

Следует отметить, что ген *EP402L* (CD2v), ответственный за гемадсорбцию, был идентифицирован и у негемадсорбирующих штаммов (14, 24), однако открытая рамка считывания у них нарушена. Мы показали, что у гемадсорбирующих и не способных к гемадсорбции (Л-50, ЛЦПП, Конго-49, Мфуати-79, Мозамбик-78, Франция-32, РРА, PSA-1/НН, Lee, Уганда, ТС7, Родезия-79) штаммов вируса АЧС число потенциальных сайтов гликозилирования CD2v не различалось. Нам удалось установить, что у всех негемадсорбирующих штаммов вируса АЧС в последовательности аминокислот белка CD2v отсутствует сигнальный пептид и сайт разрезания сигнальной пептидазой. Поэтому CD2v не подвергается гликозилированию даже при наличии соответствующих потенциальных сайтов.

Таким образом, результаты биоинформатического анализа позволили сделать вывод, что варибельная область (N-концевой участок) молекулы CD2v сильно гликозилирована и находится на наружной поверхности клеточной мембраны. Эта область также содержит иммуноглобулиновый домен, чем обусловлено взаимодействие CD2v с антителами. Выявленные различия в посттрансляционных модификациях и генетические вариации по белку CD2v могут объяснять разнообразие в антигенных свойствах изолятов вируса АЧС. Напротив, белок p54 имеет варибельную область, локализованную с внутренней стороны клеточной мембраны, и гликозилированную, находящуюся вне клетки. Значительное несходство в нуклеотидных последовательностях гена p54 (*E183L*) у разных изолятов вируса АЧС может быть результатом мутационной изменчивости в ходе его эволюции.

Продуцентами рекомбинантных белков p54 и CD2v вируса АЧС служили культивируемые клетки COS-1 и HEK-293, которые несли конструкции, полученные на основе плазмидных векторов pEGFP-N1 и pCMV-NA-C с цитомегаловирусными (CMV) промоторами и способные экспрессироваться в клетках млекопитающих во внехромосомном состоянии. Открытая рамка считывания для белка p54 была соединена с репортерным геном *eGFP* в составе акцепторного вектора. Слияние целевого белка с EGFP позволяет детектировать клеточную локализацию химерного белка методом флуоресцентной микроскопии. Во избежание структурных изменений в случае белка CD2v была выбрана стратегия слияния с маркерным HA-участком на C-конце молекулы. HA-последовательность на C-концевом участке рекомбинантного белка не влияет на иммунологические свойства и дает возможность детектировать целевой белок в нативной конформации, что особенно важно при наличии значительной части углеводного компонента в составе гликопротеина.

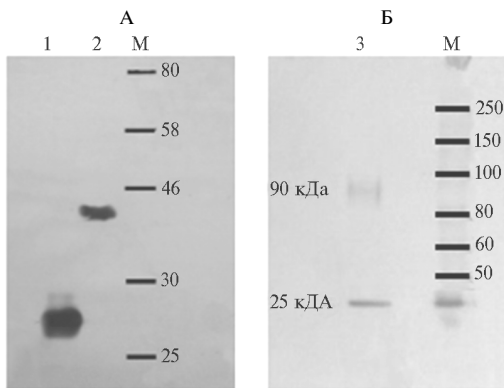


Рис. 3. Обнаружение рекомбинантных капсидных белков p54-EGFP (А) и CD2v-HA (Б) вируса африканской чумы свиней в лизатах культур клеток методом иммуноблоттинга: 1 — EGFP (зеленый флуоресцентный белок), 2 — p54-EGFP, 3 — CD2v-HA; М — маркеры молекулярной массы для p54-EGFP (Unstained Protein Ladder, Broad Range 10-250 kDa; «NEB», США) и CD2v-HA (Prestained Protein Marker, Broad Range 7-175 kDa; «NEB», США). Использованы культуры клеток линии COS-1 HEK-293, трансфицированных соответственно рекомбинантными плазмидами p54-pEGFP-N1 (А) и pCMV-CD2v (Б) с применением липофектамина. Моноклональные антитела конъюгированы с пероксидазой хрена;

субстраты для детекции — соответственно Clarity Western ECL Substrat («Bio-Rad», США) и DAB («Thermo Scientific», США). Полосы 25кДа и 90 кДа (Б) — соответственно негликозилированная и гликозилированная формы белка CD2v-HA.

Репортерную флуоресценцию p54-EGFP наблюдали в цитоплазме трансфицированных клеток COS-1 на протяжении 96 ч. Наиболее сильный сигнал отмечали между 24 и 48 ч после трансфекции, далее (в период с 72 до 96 ч) он снижался. Экспрессию рекомбинантного CD2v детектировали, наоборот, только в мембране клеток. Рекомбинантные белки p54 и CD2v также обнаруживались в лизате трансфицированных клеток методом иммуноблоттинга с применением моноклональных антител соответственно к зеленому флуоресцентному белку GFP и иммуногенному участку гемагг-

лютина (НА) вируса гриппа (рис. 3). Рекомбинантный белок CD2v присутствовал в трансфицированных клетках в двух изоформах (см. рис 3): высокомолекулярная (90 кДа) соответствовала зрелому гликопротеину CD2v, в то время как низкомолекулярная (25 кДа) представляла собой не полностью гликозилированную молекулу.

Итак, гликопротеины p54 и CD2v вируса африканской чумы свиней (АЧС) обладают выраженными структурными и функциональными особенностями, однако их роль в формировании иммунотипов этого патогена до сих пор не выяснена. Из всех структурных белков вируса АЧС p54 и CD2v наиболее вариабельны и представляют интерес с точки зрения изучения его генетической и фенотипической изменчивости в отношении способности индуцировать гемадсорбцию. У белка CD2v преобладает N-гликозилирование внеклеточной части (N-конец), в то время как для p54 характерно O-гликозилирование C-концевой области. Вариабельная часть белка CD2v также находится на N-конце и содержит иммуноглобулиновый домен, что может свидетельствовать о взаимосвязи между гликозилированием и характером взаимодействия с вирусоспецифическими антителами. В то же время в нашем исследовании установлено, что отсутствие феномена гемадсорбции у некоторых штаммов вируса АЧС связано с изменением рамки считывания гена *EP402L*, кодирующего CD2v, и не зависит от степени его гликозилирования. При исследовании культуры клеток COS-I, трансфицированных плазмидой p54-pEGFP-N1, была установлена цитоплазматическая локализация флуоресцентно меченного рекомбинантного белка p54-EGFP. Белок CD2v обнаруживался исключительно в составе мембраны клеток. По данным иммуноблоттинга, молекулярная масса CD2v составила около 90 кДа (при расчетной 65 кДа). Следовательно, в этом поверхностном гликопротеине вириона АЧС на углеводный компонент приходится около 30 % массы. Кроме того, результаты иммуноблоттинга указывают на наличие двух вариантов белка CD2v с молекулярной массой 25 кДа и 90 кДа, то есть предположительно его различных гликозилированных форм, что согласуется с сообщениями в специальной литературе. На основании биоинформатического анализа и исследования культур трансфицированных клеток COS-I и HEK-293 именно CD2v можно считать наиболее вероятным белком-кандидатом, определяющим взаимодействие с вирусоспецифическими антителами и формирование иммунотипов животных при АЧС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dixon L.K., Rock D.L., Vinuela E. African swine fever-like viruses. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Arch. Virol., 1995, 69(10): 92-94.
2. Michaud V., Randriamparany T., Albina E. Comprehensive phylogenetic reconstructions of African swine fever virus: proposal for a new classification and molecular dating of the virus. PLoS ONE, 2013, 8(7): 1-14 (doi: 10.1371/journal.pone.0069662).
3. Hubalek Z., Rudolf I., Nowotny N. Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. Adv. Virus Res., 2014, 89: 201-275 (doi: 10.1016/B978-0-12-800172-1.00005-7).
4. Porterfield J.S. The basis of arbovirus classification. Med. Biol., 1975, 53(5): 400-405.
5. Burrage T.G. African swine fever virus infection in *Ornithodoros* ticks. Virus Res., 2013, 173(1): 131-139 (doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.010).
6. Boinas F., Ribeiro R., Madeira S., Palma M., de Carvalho I.L., Nuncio S., Wilson A.J. The medical and veterinary role of *Ornithodoros erraticus* complex ticks (*Acar: Ixodida*) on the Iberian Peninsula. Journal of Vector Ecology, 2014, 39(2): 238-248 (doi: 10.1111/jvec.12098).
7. Wilkinson P.J. African swine fever virus. In: Virus infections of porcines /M. Pensaert (ed.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1989: 17-35.
8. Chapman D.A., Tcherepanov V., Upton C., Dixon L.K. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus. J. Gen. Virol.,

- 2008, 89(2): 397-408 (doi: 10.1099/vir.0.83343-0).
9. Nix R.J., Gallardo C., Hutchings G., Blanco E., Dixon L.K. Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch. Virol.*, 2006, 151(12): 2475-2494 (doi: 10.1007/s00705-006-0794-z).
 10. Yanez R.J., Rodriguez J.M., Nogal M.L., Yuste L., Enriquez C., Rodriguez J.F., Vinuela E. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology*, 1995, 208(1): 249-278.
 11. Villiers E.P., Gallardo C., Arias M., Silva M., Upton C., Martin R., Bishop R.P. Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. *Virology*, 2010, 400(1): 128-136 (doi: 10.1016/j.virol.2010.01.019).
 12. Chacon M.R., Almazan F., Nogal M.L., Vinuela E., Rodriguez J.F. The African swine fever. *Virology*, 1995, 214(2): 670-674.
 13. Martinez P.L., Simon M.C., Lopez-Otin C., Vinuela E. Characterization of the African swine fever virus protein p14.5: a DNA binding protein. *Virology*, 1997, 229(1): 201-211.
 14. Dixon L.K., Chapman D.A., Netherton C.L., Upton C. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res.*, 2013, 173(1): 3-14 (doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.020).
 15. Simon M.C., Freije J.M., Andres G., Lopez-Otin C., Vinuela E. Mapping and sequence of the gene encoding protein p17, a major African swine fever virus structural protein. *Virology*, 1995, 206(2): 1140-1144.
 16. Simon M.C., Andres G., Almazan F., Vinuela E. Proteolytic processing in African swine fever virus: evidence for a new structural polyprotein, pp62. *J. Virol.*, 1997, 71(8): 5799-5804.
 17. Carrascosa J.L., Carazo J.M., Carrascosa A.L., Garcia N., Santisteban A., Vinuela E. General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. *Virology*, 1984, 132(1): 160-172.
 18. Andres G., Simon M.C., Vinuela E. Assembly of African swine fever virus: role of polyprotein pp220. *J. Virol.*, 1966, 71(3): 2331-2341.
 19. Breese S.S. Jr., DeBoer C.J. Electron microscope observation of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology*, 1966, 28(3): 420-428.
 20. Karalova E.M., Voskanian G.E., Sarkisian Kh.V., Abroian L.O., Avetisyan A.S., Akopian L.A., Semerdzhian Z.B., Zakarian O.S., Arzumanyan G.A., Karalian Z.A. Pathology of lymphoid tissue cells infected by African swine fever virus in vitro. *Voprosy virusologii*, 2011, 56(1): 33-37 (in Russian).
 21. Salas M.L., Andres G. African swine fever virus morphogenesis. *Virus Res.*, 2013, 173(1): 29-41 (doi: 10.1016/j.virusres.2012.09.016).
 22. Suarez C., Salas M.L., Rodriguez J.M. African swine fever virus polyprotein pp62 is essential for viral core development. *J. Virol.*, 2010, 84(1): 176-187 (doi: 10.1128/JVI.01858-09).
 23. Gomez-Puertas P., Rodriguez F., Oviedo J.M., Brun A., Alonso C., Escribano J.M. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology*, 1998, 243(2): 461-471.
 24. Серда А.Д., Балышев В.М. Антигенное разнообразие вируса африканской чумы свиней. *Вопросы вирусологии*, 2011, 4: 38-42.
 25. Borca M.V., Carrillo C., Zsak L., Laegreid W.W., Kutish G.F., Neilan J.G., Burrage T.G., Rock D.L. Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. *J. Virol.*, 1998, 72(4): 2881-2889.
 26. Quintero J.C., Wesley R.D., Whyard T.C., Gregg D., Mebus C.A. In vitro and in vivo association of African swine fever virus with swine erythrocytes. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, 47(5): 1125-1131.
 27. Rodriguez J.M., Yanez R.J., Almazan F., Vinuela E., Rodriguez J.F. African swine fever virus encodes a Cd2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells. *J. Virol.*, 1993, 67(9): 5312-5320.
 28. Казакова А.С. Конструирование продуцентов рекомбинантных белков P72, P30 и P54 вируса африканской чумы свиней. *Канд. дис. Покров*, 2013.
 29. Garcia-Boronat M., Diez-Rivero C.M., Reinherz E.L., Reche P.A. PVS: a web server for protein sequence variability analysis tuned to facilitate conserved epitope discovery. *Nucl. Acids Res.*, 2008, 36: 35-41 (doi: 10.1093/nar/gkn211).
 30. Diez-Rivero C.M., Reche P. Discovery of conserved epitopes through sequence variability analyses. *Bioinformatics for Immunomics*, 2010, 3: 95-101 (doi: 10.1007/978-1-4419-0540-6_8).
 31. Maurisse R., De Semir D., Emamekhoo H., Bedayat B., Abdolmohammadi A., Parsi H., Gruenert D.C. Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. *BioMed Central Biotechnol.*, 2010, 10(9): 2-9 (doi: 10.1186/1472-6750-10-9).

32. L a e m l i U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685.

ФГБНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии,
601120 Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н, г. Покров,
e-mail: mima89@ya.ru

Поступила в редакцию
30 июня 2015 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2015, V. 50, № 6, pp. 785-793

AFRICAN SWINE FEVER VIRUS GLYCOPROTEINS p54 AND CD2v IN THE CONTEXT OF IMMUNE RESPONSE MODULATION: BIOINFORMATIC ANALYSIS OF GENETIC VARIABILITY AND HETEROGENEITY

K.A. Mima, G.S. Burmakina, I.A. Titov, A.S. Malogolovkin

All-Russian Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, Pokrov, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601120 Russia, e-mail mima89@ya.ru

Acknowledgements:

Supported by Russian Foundation for Basic Research, science project «Mol-a-ved» (15-34-20995).

Received June 30, 2015

doi: 10.15389/agrobiol.2015.6.785eng

Abstract

The African swine fever virus (ASFV) is a unique representative of Asfarviridae family, which still remains the sole member of genus *Asfarvirus*. ASF virus is the causative agent of one of the most dangerous diseases of the animals from *Suidae* family, and moreover, it is capable of infecting soft ticks of the genus *Ornithodoros*. Genetic and phenotypic heterogeneity of ASF virus is one of the main reasons for the lack of vaccines against this dangerous transboundary disease. In this work we present the analysis of structure and functions of the most variable glycoproteins ASFV p54 and CD2v using bioinformatics analysis and recombinant constructs expressed in mammalian cell cultures, the African green monkey cell culture COS-I and the human embryonal kidney cell culture HEK-293. The index of variability of amino acid sequences for P54 and CD2v proteins was calculated by Simpson's method. The CD2v protein has variable region (N-terminal domain), which is highly glycosylated (28-30 sites) and located in the outer surface of the cell membrane. This region also contains immunoglobulin domain (amino acids at positions 1-225), which is responsible for CD2v interaction with antibodies. The revealed differences in post-translational modifications and genetic variations of CD2v protein might explain the diversity of the hemadsorption phenomenon among ASF virus isolates. In contrast, p54 protein has variable glycosylated extracellular and intracellular parts. High level of differences in the nucleotide sequences of p54 gene (*E183L*) for various ASFV isolates may be the result of random mutations during virus evolution. Characteristic antigenic properties of ASF virus isolates can obviously be due to found peculiar post-translational processing and genetic variations on CD2v protein. Herein we report the first bioinformatic analysis of post-translation N- and O-glycosylation in most variable ASF virus proteins, p54 and CD2v. A transient expression of gene constructions used to obtain the recombinant products, p54-EGFP and CD2v-HA, allowed us to demonstrate the evidence for different localization of viral proteins p54-EGFP and CD2v-HA in the transfected cells. Particularly, the fluorescence caused by p54-EGFP was observed in the cytoplasm of the COS-I cells, transfected with recombinant plasmid p54-pEGFP-N1, whereas recombinant CD2v-HA protein was detected only in cell membrane. According to immunoblotting analysis, the CD2v molecular weight was 90 kDa against calculated 65 kDa indicating about 30 % of carbohydrate component in this surface glycoprotein. Moreover, 25 kDa and 90 kDa CD2v molecules, the probable differently glycosylated forms, were revealed in immunoblotting test that is in line with other published data. Thus, bioinformatic analysis and in vitro studies using transient expression in COS-I и HEK-293 cell cultures have shown that protein CD2v is the most likely candidate to define the interaction of ASF virus with the virus-specific antibodies.

Keywords: African swine fever, glycoprotein, variability, glycosylation, transient expression, immunotypes.

Книги издательства «Академия»:

Нетрусов А.И. Введение в биотехнологию. М.: изд-во «Академия», 2014, 288 с.

Рассмотрены объекты и методы биотехнологии микроорганизмов, приведены сведения о процессах получения различных веществ с помощью генно-модифицированных штаммов, возобновляемых источников энергии и их выделения с применением мембранных технологий. Описаны приемы выращивания микробных, растительных и животных клеток, очистки биотехнологических продуктов, традиционные и современные биотехнологии с применением твердофазного культивирования, иммобилизованных клеток, вопросы организации производства и патентования.