

<https://doi.org/10.17116/molgen20193701142>

Анализ иммуномодулирующих белков вируса африканской чумы свиней

М.В. НЕФЕДЬЕВА, И.А. ТИТОВ, К.А. МИМА, А.С. МАЛОГОЛОВКИН

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»,
601125, пгт. Вольгинский, Владимирская область, Россия

Молекулярная эпидемиология вирусных инфекций традиционно основывается на анализе изменений отдельных генов или генетических маркеров. Анализ генов вируса африканской чумы свиней (АЧС), кодирующих иммуномодулирующие белки является важным инструментом изучения разнообразия и эволюции вируса. В данной работе мы провели структурный и филогенетический анализ иммуномодулирующих белков 5el (ген A238L), i14l (ген DP71L), k11l (ген I329L) вируса АЧС. Степень нуклеотидных замен конкатенированных генов A238L, I329L и DP71L вируса АЧС выявила очищающий (стабилизирующий) отбор на уровне нуклеотидных последовательностей. Характеристика варибельности отобранной нами группы генов вируса АЧС представляет большой интерес для поиска генетических различий в иммуномодулирующих белках. Результаты секвенирования генов A238L, I329L и DP71L и их филогенетический анализ показали, что эти гены являются консервативными среди большой группы генов вируса АЧС. Ген I329L является генетическим маркером общности происхождения. Ген DP71L у восточноафриканских штаммов X генотипа имеет две формы: длинную (184 аминокислоты) и краткую (от 70 до 72 аминокислот) и образуется путем слияния 13L и 14L. Все российские изоляты вируса АЧС, выделенные в 2016—2017 гг., по изученным генам идентичны референтному штамму ASFV/Georgia/wb/2007. Характеристика варибельности белков 5el, i14l, k11l может послужить выявлению целевых участков в геноме вируса АЧС и для разработки вакцин. Полученные данные позволяют оценить генетическое разнообразие иммуномодулирующих белков вируса АЧС и динамику их эволюции, предсказать возможное участие генов A238L, I329L и DP71L в вирулентности различных штаммов вируса АЧС.

Ключевые слова: вирус африканской чумы свиней, секвенирование, филогенетический анализ, иммуномодулирующие белки, анализ синонимичных и несинонимичных замен.

Analysis of the african swine fever virus immunomodulatory proteins

M.V. NEFEDEVA, I.A. TITOV, K.A. MIMA, A.S. MALOGOLOVKIN

Molecular Virology Laboratory Federal Research Center for Virology and Microbiology, 601125, Russia

Molecular epidemiology of viral infections traditionally based on the analysis of changes in individual genes or genetic markers. The analysis of the African swine fever virus (ASFV) genes encoding immunomodulatory proteins is an important tool for studying the diversity and evolution of the virus. In this work, we carried out a structural and phylogenetic analysis of the ASF virus immunomodulatory proteins 5el (A238L gene), i14l (DP71L gene), k11l (I329L gene). The degree of nucleotide substitutions of the ASFV concatenated genes A238L, I329L and DP71L revealed purifying (stabilizing) selection at the nucleotide sequences level. The variability characteristic of the selected group of ASFV genes is of great interest for the genetic differences search in immunomodulatory proteins. The sequencing results of the A238L, I329L and DP71L genes and their phylogenetic analysis showed that these genes are conservative among a large group of ASFV genes. The I329L gene is a genetic marker of common origin. The East African strains (Genotype X) of DP71L gene have two forms: a long (184 amino acids) and a short (from 70 to 72 amino acids) and is formed by fusion of the 13L and 14L. All ASF virus Russian isolates isolated in 2016—2017 were identical to the reference strain ASFV/Georgia/wb/2007. Characterization of variability 5el protein, i14l, k11l may be serve to identify target sites in the ASFV genome and to develop vaccines. The obtained data allow to evaluate the genetic diversity of the ASFV immunomodulatory proteins and the dynamics of their evolution, to predict the possible participation of the A238L, I329L and DP71L genes in the virulence of various ASFV strains.

Keywords: african swine fever virus, sequencing, phylogenetic analysis, immunomodulating proteins, analysis of synonymous and nonsynonymous substitutions.

Для корреспонденции: Малоголовкин Александр Сергеевич, канд. биол. наук, заведующий лабораторией молекулярной вирусологии ФГБНУ Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии, заместитель директора; e-mail: malogolovkin@inbox.ru

For correspondence: Alexander S. Malogolovkin, PhD of Biological Sciences, Head of the Molecular Virology Laboratory Federal Research Center for Virology and Microbiology, Associate Director; e-mail: malogolovkin@inbox.ru

Введение

Африканская чума свиней (АЧС) — геморрагическая смертельная болезнь домашних свиней и кабанов, вызванная сложным оболочечным дезоксирибонуклеиновым вирусом семейства *Asfarviridae*. Смертность в инфицированных стадах достигает 100%. Заболевание передается от больных животных и вирусоносителей алиментарным, контактным путем и трансплацентарно [1]. Геном вируса АЧС представляет собой линейную двухцепочечную молекулу ДНК с ковалентно закрытыми концами и терминальными инвертированными повторами (TIR) [2].

К вирусу АЧС восприимчивы домашние свиньи всех возрастных групп и пород и кабаны. Среди африканских представителей семейства *Suidae*, дикие африканские и кустарниковые свиньи, бородавочники, могут быть инфицированы вирусом АЧС, но при этом не проявлять клинических признаков. Основным резервуаром вируса в дикой природе в странах Восточной Африки являются мягкие клещи рода *Ornithodoros* [3].

В зависимости от штамма вируса, вирулентности и способа заражения, наблюдаемые клинические признаки разнообразны в сверхострой, острой, подострой и хронической формах инфекции [4]. Эпидемиология АЧС является весьма сложной и варьирует в зависимости от географических особенностей местности и восприимчивых видов животных (кабан, домашние свиньи, клещи) [3].

Эффективных средств защиты против вируса АЧС до настоящего времени не разработано. Исторические попытки защитить животных инактивированными вакцинами либо потерпели неудачу, либо дали противоречивые результаты. Исследования с использованием аттенуированных вакцин продемонстрировали их потенциал для защиты свиней от экспериментальной инфекции гомологичным вирулентным вирусом, но редко, против гетерологичных вирусов [5—7]. Изучение антигенного разнообразия среди встречающихся в природе изолятов вируса АЧС представляет огромный интерес для разработки вакцин [8].

Недавние исследования указывают, что генетическое разнообразие вируса, определенное путем секвенирования основного белка капсида *p72* (ген *B646L*), самое высокое в Центральной и Восточной Африке [3]. Высокий уровень генетической вариативности вируса АЧС между различными изолятами объясняется разницей в размере генома, однако большая часть генетической вариации обусловлена изменениями числа и последовательности членов мультигенных семейств (MGF), расположенных на обоих концах генома, где они ограничивают левую и правую вариативные области (LVR и RVR, соответственно) [9].

Геном вируса АЧС содержит набор генов, кодирующих протеины ответственные за механизмы иммунной эвазии. Диапазон модуляционной активности вирусных протеинов весьма разнообразен и включает в себя: ингибирование гуморального ответа, интерференцию с интерферонами, ингибирование цитокинов и хемокинов, уклонение от цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLs) и природных клеток-киллеров (NKs), и управление функцией главного комплекса гистосовместимости (MHC I и II), изменение эффекторной функции дендритных клеток и ингибирование апоптоза [10].

Вирус АЧС является макрофаготропным вирусом и может манипулировать как врожденным, так и адаптивным иммунным ответом, модулируя функции макрофагов. Согласно L. Dixon и соавт., было идентифицировано несколько

белков вируса АЧС, которые препятствуют развитию иммунной защиты хозяина [11]. К ним относятся ген *A238L*, кодирующий белок 5e1, который выступает ингибитором активации транскрипции иммуномодулирующих генов хозяина, белок k111 (ген *I329L*), действующий как ингибитор сигнальных путей Toll-подобных рецепторов и белок i141 (ген *DP71L*), сходный с ICP34.5 фактором нейровирулентности герпесвируса, регулирующий фосфатазную активность клетки-хозяина при инфицировании, вытесняя ингибирующие субстраты из фосфатазы хозяина PP1 и определяющий круг чувствительных хозяев [12—14]. Кроме того, A238L ингибирует зависимые от кальциевых ионы пути хозяина путем непосредственного связывания кальциевых фосфатазы [14].

Однако не все известные изоляты вируса АЧС обладают одинаковой иммуномодулирующей активностью [15]. Генетические предпосылки данных различий остаются невыясненными. Таким образом, обнаружение генетических маркеров эволюционной изменчивости в иммуномодулирующих белках вируса АЧС позволит изучить механизмы иммунного уклонения при АЧС.

Цель исследования — провести сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *A238L*, *I329L* и *DP71L* вируса АЧС, участвующих в иммунном уклонении.

Материал и методы

На первом этапе проведен анализ вариативности белков 5e1, k111 и i141 при помощи веб-сервиса Protein Variability Server методом Симпсона (<http://www.expasy.org/proteomics>) [16]. Вариативными считались области, для которых полученные значения превышали пороговое (0,46). Для предсказания наличия и расположения сайтов расщепления сигнального пептида в аминокислотных последовательностях использовали веб-сервер SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1>) [17]. Веб-приложение CCTOP (Constrained Consensus TOPology prediction server) обеспечило прогнозирование трансмембранной топологии белков (<http://cctop.enzim.ttk.mta.hu>) [18].

На следующем этапе работы из Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ ФИЦВиМ были отобраны 12 изолятов, выделенные из разных регионов Российской Федерации в 2016 г., и 15 штаммов, принадлежащих к различным генотипам [19, 20] и сероиммунотипам вируса АЧС [21]. Для каждого сероиммунотипа использовали аттенуированный и вирулентный штаммы вируса АЧС, указанные в **таблице**.

Подбор праймеров для амплификации копий генов *A238L*, *I329L* и *DP71L* осуществляли с помощью сравнения и анализа нуклеотидных последовательностей этих генов штаммов и различных изолятов вируса АЧС, опубликованных в международной базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) с помощью программ BioEdit 7.0.1, Oligo 6.0 и веб-сервера IDT DNA (<https://eu.idtdna.com/site>).

Выделение ДНК из крови и суспензии органов проводили набором ДНК-сорб-В («Интерлабсервис», Россия), в соответствии с инструкцией производителя. Для оптимизации температурных режимов ПЦР и амплификации последовательностей генов использовали термоциклер T100 («Bio-Rad Laboratories», США).

Анализ продуктов реакции осуществляли при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле и учитывали на ChemiDoc MP («Bio-Rad Laboratories», США) путем обнаружения специфических полос в треках с исследуемыми

Штаммы вирусов АЧС, использованные в работе

Штамм/изолят	Страна	Год выделения	Генотип	Сероиммунотип	A238L	I329L	DP71L
Лиссабон-57 (Л-57)	Португалия	1957	I	1	MG209277	MG209292	MF589625
ЛК-111	Португалия	1978	I	1	MG209278	MG209293	MF589627
Конго-49 (К-49)	Заир	1949	I	2	MG209275	MG209290	MF589624
КК-262	Заир	—	I	2	MG209276	MG209291	MF589626
Франция-32 (Ф-32)	Франция	1964	I	4	MG209272	MG209288	MF589621
ФК-32/135	Франция	Пассирован от Ф-32	I	4	MG209273	MG209289	MF589622
СКА-2015	Россия	Пассирован от Ставрополь 01/08	II	8	MG010372	MG209287	MF589620
Иркутск-2017	Россия	2017	II	8	MG209274	—	MF589623
Мозамбик-78 (М-78)	Мозамбик	1978	V	3	MG209279	MG209294	MF589628
МК-200	Мозамбик	Пассирован от М-78	V	3	MG209280	MG209295	MF589630
ТКФ	Танзания	—	X	3	MG209282	MG209297	MF589631
ТСП-80	Танзания	Пассирован в 1980 г.	X	5	MG209285	MG209300	MF589634
ТСП-80/300	Танзания	—	X	5	MG209286	MG209301	MF589635
ТС-7	Танзания	Пассирован в 1984 г.	X	6	MG209283	MG209298	MF589632
ТС-7/27-230	Танзания	Пассирован в 1986 г.	X	6	MG209284	MG209299	MF589633
Наньюки	Кения	1960		8	MG209281	MG209296	MF589629
Липецк-2016	Россия	2016	II	8	—	—	—
Тамбов-2016							
Москва-2016							
Пенза-2016							
Псков-2016							
Воронеж-2016							
Архангельск-2016							
Курск-2016							
Краснодар-2016							

образцами относительно фрагмента маркера молекулярного веса и расчетного значения длины ПЦР-продукта. Очистку ПЦР-продуктов из агарозного геля осуществляли коммерческим набором QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) и Cleanup-standard («Евроген», Россия). Сиквенсовую реакцию проводили набором BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit («Applied Biosystems», США). Для проведения секвенирования использовали секвенатор Genetic Analyzer 3130 («Applied Biosystems», США).

Множественное выравнивание последовательностей генов вируса АЧС выполнено с помощью вариантов метода ClustalW и MUSCLE [22]. Для построения филогенетических древ применяли метод максимального правдоподобия с дополнительным бутстрэп-анализом 1000 случайных выборок с использованием программы Mega 6.0 [23].

Для анализа синонимичных (синонимичная дистанция, dS) и несинонимичных замен (несинонимичная дистанция, dN) на сайт в генах *A238L*, *I329L* и *DP71L*, а также числа потенциально синонимичных и несинонимичных сайтов для каждого кодона на основании гипотезы о равных частотах всех нуклеотидных замен использовали пакет программы SNAP (Synonymous Non-synonymous Analysis Program) (www.hiv.lanl.gov).

Результаты и обсуждение

Результаты анализа варибельности белков 5el, i14l и k1l1 различных штаммов вируса АЧС показали, что у белка 5el наблюдается 13 варибельных сайтов, часть из которых располагается в участке IxV — подобного домена, со-

стоящего из 3 повторов анкиринов (с 87 по 178 аминокислоту) и на С-терминальном конце мотива RxiITxS/S, который связывает каталитическую субъединицу кальцинейрина — серинтреонин фосфатазу (с 200 по 213 аминокислоту) (рис. 1). Повторяющиеся белки анкирины, хотя и отсутствуют в большинстве вирусов, но также распространены и среди поксвирусов. Консервативные аминокислотные остатки анкиринов имеют решающее значение для фолдинга и стабильности белка, а также участвуют в присоединении других белков к разным участкам клеточной мембраны [24].

Анализ белка I14L показывает, что этот белок консервативен среди различных штаммов вируса АЧС, однако имеет 7 варибельных сайтов. Все белки, кодируемые этим геном, содержат центральную область с высококонсервативным 56 аминокислотным доменом и мотивом PP1c_bdg (с 7 по 57 аминокислоту в короткой форме и со 123 по 170 аминокислоту в длинной форме) регуляторных субъединиц (15A и 15B) белковой фосфатазы 1, расположенных на карбоксильном конце, общих для MuD116 и ICP34.5. Этот консервативный С-конец, по-видимому, является связующей областью каталитической субъединицы протеинфосфатазы-1 (PP1C), которая обнаружена как в вирусе простого герпеса, так и у мышей и человека [25].

Высокогликозилированный белок k1l1, экспрессируемый в клеточной мембране и на ее поверхности, содержащий лейцин-богатые повторы похожие на TLR3, является консервативным и не имеет выраженной варибельности. Для него наблюдается лишь 8 варибельных сайтов, часть из которых попадает во внеклеточный топологический до-

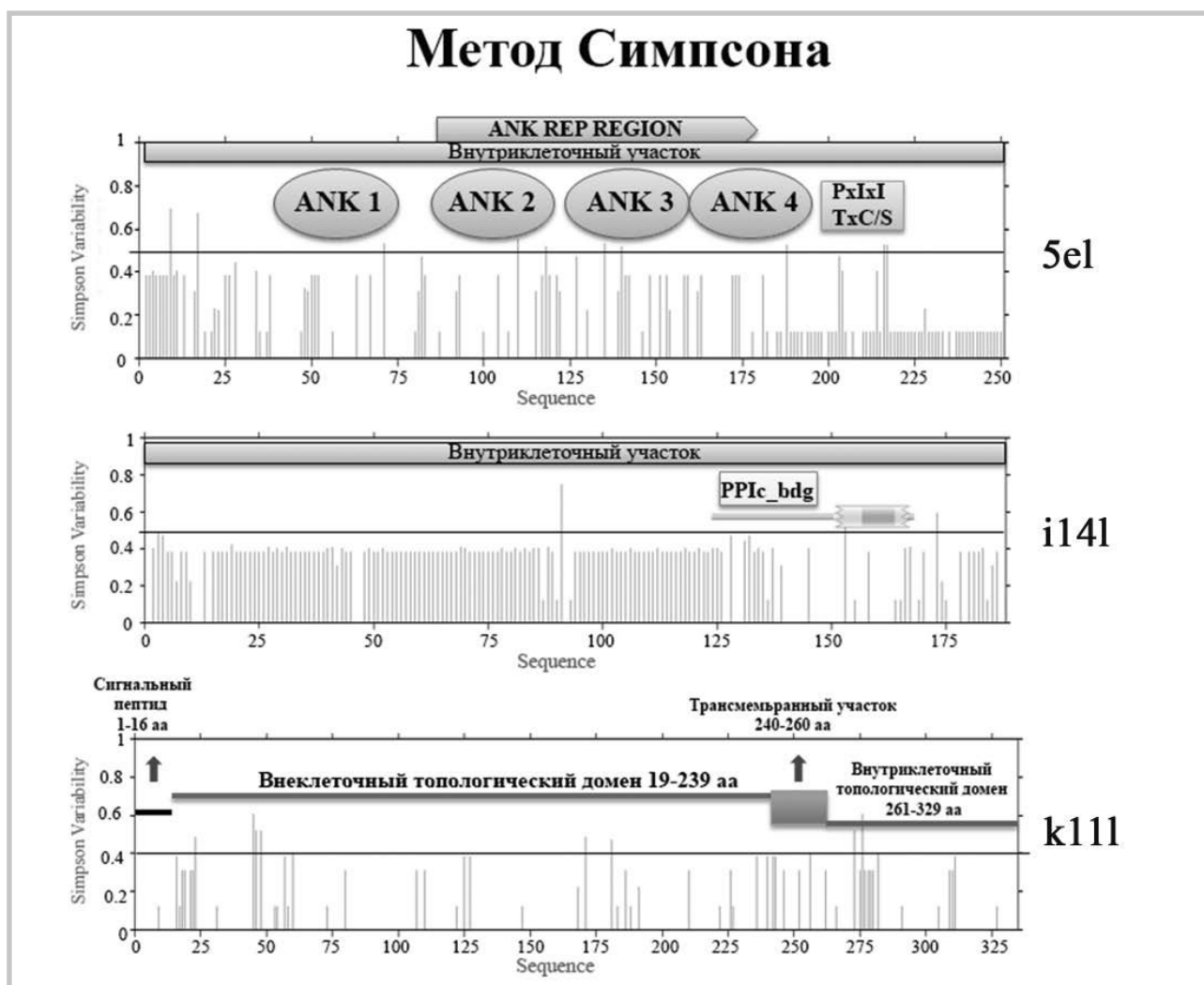


Рис. 1. Результаты анализа variability белков 5e1 — $\text{I}\kappa\text{B}$ гомолога и ингибитора кальций нейрин фосфатазы; i141 — белка, сходного с HSV ICP34.5 фактором нейровирулентности; k111 — белка ингибитора передачи сигналов TLR.

мен (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) (см. рис. 1).

В результате наблюдений D. Charman и соавт. белки 5e1 и i141 отнесены к variability, в работе V. de Oliveira и соавт. белок k111 — консервативный, а в работах J. Neilan и соавт. и C. Abrams и соавт., напротив, белок 5e1 признан консервативным [12, 26–28]. Согласно результатам наших исследований (см. рис. 1), изученные белки вируса АЧС являются консервативными, особенно в сравнении с другими variability белками вируса АЧС (*CD2_vp54*) [29].

Для того чтобы определить генетическую связь на уровне нуклеотидных последовательностей между штаммами и изолятами вируса АЧС, мы провели секвенирование и множественное выравнивание конкатенированного набора генов *A238L*, *I329L* и *DP71L*.

По результатам секвенирования гены *A238L* и *I329L* изолятов вируса АЧС, выделенных на территории Российской Федерации в 2016 г., являются идентичными роди-

тельскому штамму Georgia_2007/1, который является представителем II генотипа.

Согласно полученным результатам по гену *I329L*, мы можем разделить имеющиеся изоляты на 5 основных кластеров, которые коррелируют с их генотипами (рис. 2). В первый кластер входят штаммы из Юго-Восточной Африки V генотипа, 3-го и 7-го сероиммунотипов, полногеномные изоляты Warthog и Pretorisuskop/96/4, XIX и XX генотипов, 2-го сероиммунотипа. Второй кластер состоит из представителей РФ II генотипа 8-го сероиммунотипа. В отдельный кластер попадают штаммы I генотипа 2-го сероиммунотипа. Четвертый кластер составляют штаммы и изоляты европейского происхождения 1-го и 4-го сероиммунотипов, за исключением изолята Benin 97/1 африканского происхождения, принадлежащих I генотипу. В пятый кластер были отнесены штаммы и изоляты X генотипа, выделенные на территории Танзании и Кении, а также некоторые представители VIII и IX генотипов. Изоляты из Южной Африки и Португалии с неопределенным и 2-м сероиммунотипом, не входили ни в одну из групп перечисленных кластеров.

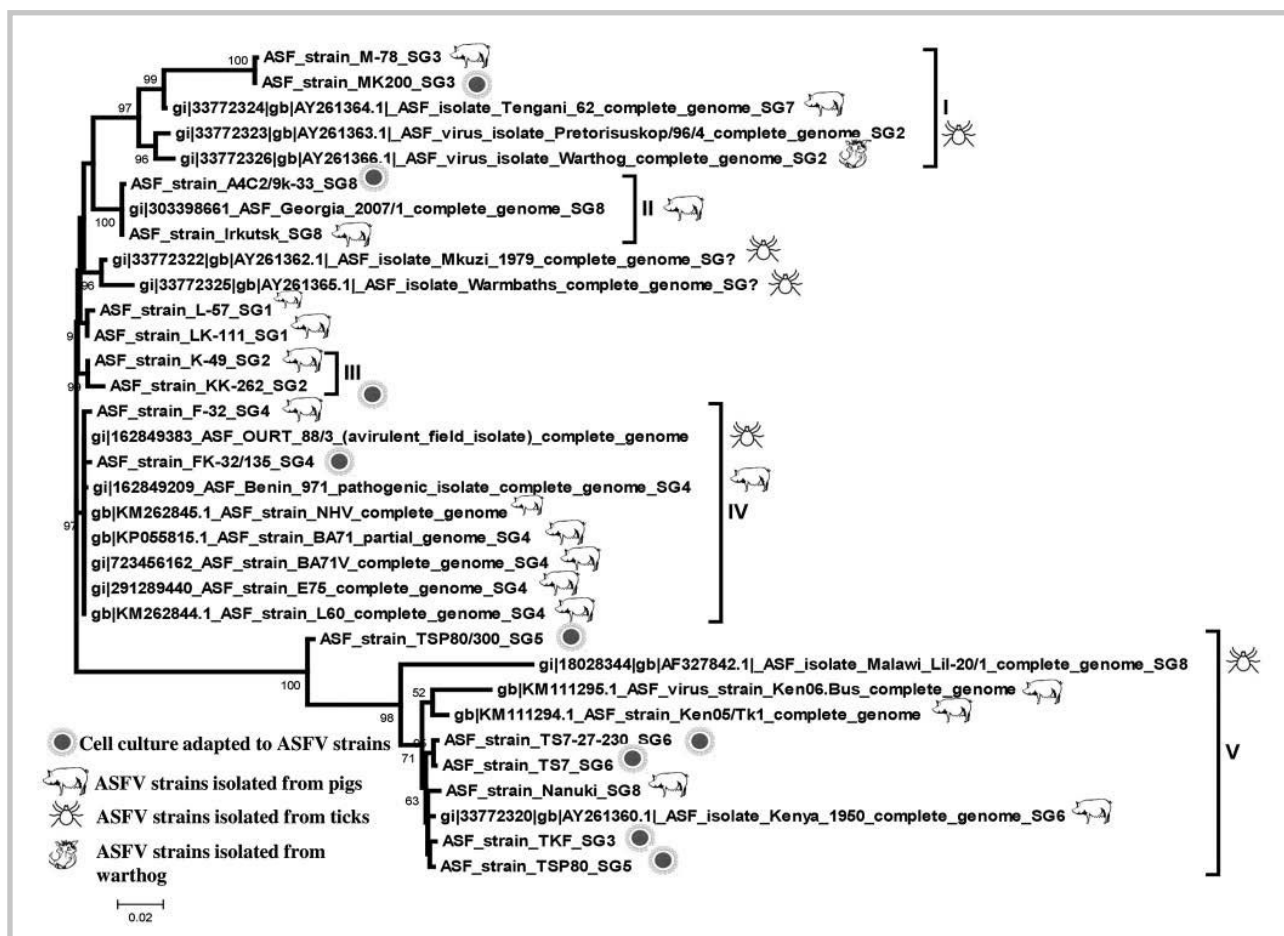


Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма, построенная методом максимального правдоподобия на основе конкатенированных нуклеотидных последовательностей 15 штаммов 7 сероиммунотипов вируса АЧС.

В легенде указаны штаммы и изоляты: 🐷 — выделенные от свиней, 🕷 — клещей, 🐘 — бородавочников и ● — адаптированные к культуре клеток.

Интересен факт, что у 6 восточноафриканских штаммов Х 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 13L и 14L. Для примера, результаты детекции продуктов амплификации 2 форм гена *DP71L* показаны на рис. 3. Результаты наших исследований подтверждают ранее полученные данные R. Bishop и соавт. [30].

Ранее проведенные исследования показали, что методика конкатенированных генов может разрешить неоднозначности в филогенетических построениях на основе отдельных генов. Конкатенация больших мультигенных наборов данных для повышения точности филогенетического логического вывода является принятой методикой для кластеров, состоящих из ортологических генов [3].

Широко применяется конкатенация в таксонах, в которых имеются полные геномы, например в прокариотах [31], и таксоны с небольшими геномами органелл, такие как митохондрии животных [32]. Конкатенация последовательностей может скрывать основное дерево видов при наличии различных филогенетических сигналов в эволюции отдельных генов [3].

В нашей работе аминокислотные последовательности трех протеинов Sel, k11l и i14l от 32 штаммов вируса АЧС были сконкатенированы в одну псевдопоследовательность и использовались для расчета соотношения несинонимичной (dN) — синонимичной замены (dS) на сайт (отношение dN/dS).

Количество синонимичных замен на синонимичный сайт преобладало над количеством несинонимичных на несинонимичный сайт $0,2788 > 0,0678$ ($dS > dN$, $pS > pN$). При подсчете соотношения dN/dS значение составляет $0,2432 < 1$. Это свидетельствует об очищающем (стабилизирующем) отборе на уровне нуклеотидных последовательностей.

Очищающий отбор встречается наиболее часто, и он характерен для нуклеотидных последовательностей, кодирующих структурно-функционально сформированные белки. Сравнение скоростей синонимичных и несинонимичных замен по генам вируса АЧС выявило от 14 до 18 генов, которые подвергаются положительному (позитивному) отбору [26]. Роль иммунной системы в отношении варибельности последовательностей может влиять на эволюцию последовательностей некоторых генов вируса АЧС, что, следовательно, может привести к смещению времени жизни «последнего общего предка» (TMRCA). Более низкие ско-

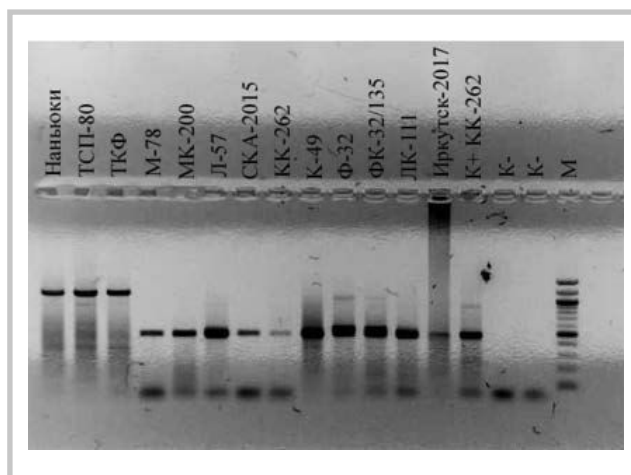


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации гена DP71L, кодирующего белок i141. М=100 п.о.

рости несинонимичных изменений обнаруживаются в вирусах, передаваемых векторами — членистоногими, что отражает повышенное очищающее давление отбора, связанное с репликацией в различных видах хозяев. Возможно, что многие мутации, которые происходят внутри хозяев, удаляются при передаче между ними из-за сильного очищающего отбора, в первую очередь из-за несоответствия цитотоксического иммунного ответа хозяев, осуществляемого Т-лимфоцитами.

В работе E. de Villiers и соавт. были исследованы 4 модели замены кодонов (M1, M2, M7 и M8). Модель M2 идентифицировала 14 генов вируса АЧС под положительным отбором. К ним относятся белки мультигенных семейств 360 и 505, несколько гипотетических белков, гомолог CD2v, несколько ферментов и вирусный шаперон B602L, который обеспечивает правильное складывание основного белка капсида p72. Самая строгая модель для положительного отбора, M8, идентифицировала восемнадцать генов, восемь из которых находятся под положительным отбором и представляют собой гены, которые могут участвовать в модуляции функций клетки-хозяина [3].

Данные анализа соотношения несинонимичных и синонимичных мутаций на широком уровне генома показывают несколько генов, которые могут оказаться под селективным давлением.

Заключение

Диапазон групповой варибельности белков ранее изучали различные группы исследователей на примере белков p17 [34], p54 и CD2v [15, 26, 33].

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Sanchez-Vizcaino JM. African Swine Fever. In: Straw B, D'Allaire S, Mengeling W, Taylor D, (eds). *Diseases of Swine*. 9th edition. USA: Iowa State University; 2006.
2. Rodriguez JM, Moreno LT, Alejo A, Lacasta A, Rodriguez F, Salas ML. Genome sequence of african swine fever virus BA71, the virulent parental strain of the nonpathogenic and tissue-culture adapted BA71V. *PLoS ONE*. 2015;10(11):e0142889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142889>
3. De Villiers EP, Gallardo C, Arias M, Da Silva M, Upton C, Martin R, et al. Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. *Virology*. 2010;400:128-136. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.01.019>
4. Sanchez-Vizcaino JM, Mur L, Gomez-Villamandos JC, Carrasco JL. An Update on the Epidemiology and Pathology of African Swine Fever. *J Comp Pathol*. 2015;152:9-21. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.09.003>

Характеристика варибельности отобранной нами группы генов вируса АЧС представляет большой интерес для поиска генетических различий и маркеров эволюционной изменчивости в иммуномодулирующих белках, а также может послужить выявлению таргетных участков в геноме вируса АЧС для разработки вакцин.

Полученные результаты по данным биоинформатического анализа показали, что белки 5e1 и i141 имеют внутриклеточные участки, белок k11 имеет внеклеточный и внутриклеточный топологические домены и трансмембранный участок. Наличие единичных нуклеотидных замен в этих участках может свидетельствовать о большей консервативности данных белков.

Степень нуклеотидных замен конкатенированных генов A238L, I329L и DP71L вируса АЧС, определенная в этом исследовании, выявила очищающий (стабилизирующий) отбор на уровне нуклеотидных последовательностей. В результате анализа нуклеотидных последовательностей, полученных в результате секвенирования генов A238L, I329L и DP71L, можно сделать вывод, что эти гены являются консервативными, при этом имеют внутри себя варибельные участки. Все российские изоляты вируса АЧС, выделенные в 2016—2017 гг., имеют идентичные последовательности генов A238L и I329L, что свидетельствует об общности их происхождения. Топология филогенетического древа по гену I329L полностью совпадает с филогенетическим деревом, построенным на основе псевдопоследовательности из 7 иммуномодулирующих генов. Таким образом, ген I329L может являться генетическим маркером общности происхождения. Белок i141 вируса АЧС имеет 2 формы: длинную (184 аминокислоты) и краткую (от 70 до 72 аминокислот), что является уникальным среди вариантов вируса АЧС.

Используя полученные данные, можно предсказать возможное участие этих генов в изменении уровня вирулентности, присущего выбранным штаммам, а также способность являться факторами вирулентности вируса АЧС.

Работа выполнена в рамках государственного задания 0615-2017-0001.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Долевое участие авторов: написание текста, сбор и обработка материала, выполнение отдельных этапов экспериментальной части — Нефедьева М.В., проведение секвенирования генов — Титов И.А., статистическая обработка варибельности белков — Мима К.А., концепция и дизайн исследования, редактирование текста — Малоголовкин А.С.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

5. Rock DL. Challenges for African swine fever vaccine development — «...perhaps the end of the beginning». *Vet Microbiol.* 2017;206:52-58. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.003>
6. Колбасов Д.В., Балышев В.М., Середина А.Д. Итоги разработки живых вакцин против африканской чумы свиней. *Ветеринария.* 2014;8:3-8. [Kolbasov DV, Balyshv VM, Sereda AD. Results of research works on the development of live vaccines against African swine fever. *Veterinariya.* 2014;8:3-8. (In Russ.)].
7. King K, Chapman D, Aglaoui JM, Fishbourne E, Hutet E, Cariolet R, et al. Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunisation. *Vaccine.* 2011;29(28):4593-4600. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.093>
8. Dixon LK, Abrams CC, Chapman DD, Goatley LC, Netherton CL, Taylor G, et al. Prospects for development of African swine fever virus vaccines. *Dev Biol (Basel).* 2013;135:147-157. <https://doi.org/10.1159/000170936>
9. Nix RJ, Gallardo C, Hutchings G, Blanco E, Dixon LK. Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch Virol.* 2006;151(12):2475-2494. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0794-z>
10. Dixon LK, Baylis SA, Vydeingum S, Twigg SRF, Hammond JM, Hingamp PM, et al. African swine fever virus genome content and variability. *Arch Virol.* 1993;7:185-199. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9300-6_15
11. Dixon LK, Abrams CC, Bowick G, Goatley LC, Kay-Jackson PC, Chapman D, et al. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004;100(3-4):117-134. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.04.002>
12. De Oliveira VL, Almeida SL, Soares HR, Crespo A, Marshall-Clarke S, Parkhouse RME. A novel TLR3 inhibitor encoded by African swine fever virus (ASFV). *Arch Virol.* 2011;156:597-609. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0894-7>
13. Zsak L, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL. An african swine fever virus virulence-associated gene NL-S with similarity to the herpes simplex virus ICP34.5 gene. *J Virol.* 1996;70(12):8865-8871.
14. Granja AG, Perkins ND, Revilla Y. A238L inhibits NF-ATc2, NF-kappa B, and c-Jun activation through a novel mechanism involving protein kinase C-theta-mediated up-regulation of the amino-terminal transactivation domain of p300. *J Immunol.* 2008;180(4):2429-2442. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1490049>
15. Chapman DA, Tcherepanov V, Upton C, Dixon LK. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. *J Gen Virol.* 2008;89(2):397-408. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83343-0>
16. Garcia-Boronat M, Diez-Rivero CM, Reinherz EL, Reche PA. PVS: a web server for protein sequence variability analysis tuned to facilitate conserved epitope discovery. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:35-41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn211>
17. Nielsen H. Predicting Secretory Proteins with SignalP. In: Kihara D., (eds). Protein Function Prediction. *Springer.* 2017:59-73. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7015-5_6
18. Dobson L, Remenyi I, Tusnady GE. CCTOP: a Consensus Constrained Topology prediction web server. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(1):408-412. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv451>
19. Gallardo C, Mwaengo DM, Macharia JM, Arias M, Taracha EA, Soler A, et al. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes.* 2009;38(1):85-95. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0293-2>
20. Bastos AD, Penrith ML, Cruciere C, Edrich JL, Hutchings G, Roger F, et al. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch Virol.* 2003;148(4):693-706. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0946-8>
21. Середина А.Д., Балышев В.М. Антигенное разнообразие вируса африканской чумы свиней. *Вопросы вирусологии.* 2011;56(4):38-42. [Sereda AD, Balyshv VM. Antigenic diversity of African swine fever viruses. *Vopr Virusol.* 2011;56(4):38-42. (In Russ.)].
22. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(5):1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
23. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30(12):2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
24. Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* 2004;13(6):1435-1448. <https://doi.org/10.1110/ps.03554604>
25. Jousse C, Ouyadomari S, Novoa I, Lu PD, Zhang Y, Harding HP, et al. Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2a phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol.* 2003;163:767-775. <https://doi.org/10.1083/jcb.200308075>
26. Chapman DA, Darby AC, Da Silva M, Upton C, Radford AD, Dixon LK. Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus. *Emerging Infect Dis.* 2011;17(4):599-605. <https://doi.org/10.3201/eid1704.101283>
27. Neilan JG, Lu Z, Kutish GF, Zsak L, Lewis TL, Rock DL. A conserved African swine fever virus I kappa B homolog, 5el, is nonessential for growth in vitro and virulence in domestic swine. *Virology.* 1997;235(2):377-385. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8693>
28. Abrams CC, Chapman DA, Silk R, Liverani E, Dixon LK. Domains involved in calcineurin phosphatase inhibition and nuclear localisation in the African swine fever virus A238L protein. *Virology.* 2008;374(2):477-486. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001492>
29. Мима К.А., Бурмакина Г.С., Титов И.А., Малоголовкин А.С. Иммунологически значимые гликопротеины p54 и cd2v вируса африканской чумы свиней: биоинформатический анализ генетических вариаций и гетерогенности. *Сельскохозяйственная биология.* 2015;50(6):785-793. [Mima KA, Burmakina GS, Titov IA, Malogolovkin AS. African swine fever virus glycoproteins p54 and CD2v in the context of immune response modulation: bioinformatic analysis of genetic variability and heterogeneity. *Sel'skhozyaistvennaya biologiya.* 2015;50(6):785-793. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.6.785rus>
30. Bishop RP, Fleischauer C, de Villiers EP, Okoth EA, Arias M, Gallardo C, et al. Comparative analysis of the complete genome sequences of Kenyan African swine fever virus isolates within p72 genotypes IX and X. *Virus Genes.* 2015;50(2):303-390. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1156-7>
31. Brown JR, Douady CJ, Italia MJ, Marshall WE, Stanhope MJ. Universal trees based on large combined protein sequence data sets. *Nat Genet.* 2001;28:281-285. <https://doi.org/10.1038/90129>
32. Miya M, Nishida M. Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Mol Phylogenet Evol.* 2000;17:437-455. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0839>
33. Rowlands RJ, Duarte MM, Boinas F, Hutchings G, Dixon LK. The CD2v protein enhances African swine fever virus replication in the tick vector, *Ornithodoros erraticus*. *Virology.* 2009;393(2):319-328. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2009.07.040>
34. Suarez C, Gutierrez-Berzal J, Andres G, Salas ML, Rodriguez JM. African Swine Fever Virus Protein p17 Is Essential for the Progression of Viral Membrane Precursors toward Icosahedral Intermediates. *J Virol.* 2010;84(15):7484-7499. <https://doi.org/10.1128/JVI.00600-10>

Поступила в редакцию 29.03.18

После доработки 06.06.18

Принята к публикации 07.09.18

Сведения об авторах:

М.В. Нефедьева [Nefedeva M.V.] <https://orcid.org/0000-0002-6143-7199>
 И.А. Титов [Titov I.A.] <https://orcid.org/0000-0002-5821-8980>
 К.А. Мима [Mima K.A.] <https://orcid.org/0000-0001-7184-6968>
 А.С. Малоголовкин [Malogolovkin A.S.] <https://orcid.org/0000-0003-1352-1780>