

CONSTRUCTION OF INTERGRATIVE PLASMIDS FOR RECOMBINATION OF SHEEPOX VIRUS GENOME

Chervyakova O.V., Strochkov V.M., Tailakova E.T., Sultankulova K.T., Samdybayev N.T.

*Research Institute for Biological Safety Problems,
pgt. Gvardeiskiy, Korday District, Zhambyl region, 080409, Kazakhstan
ovch@mail.ru*

ABSTRACT

The ability of capripoxviruses to elicit cellular and humoral immune responses, incorporate extended DNA sequences into host genomes, and display a safety profile are important considerations in the development of vector vaccines for animals and humans. The aim of our study was to design and construct recombinant plasmid DNAs for the recombination of capripoxvirus genomes. Two genetic constructs were developed, pINT-TKspv and pINT-RRspv, which contained sequences of sheeppox virus genome DNA insufficient for virus replication (thymidine kinase gene and small ribonucleotidreductase gene) as well as a cassette for target gene expression and selective marker (*gpt*). Control of the expression of target genes will be driven by a synthetic early/late vaccinia virus promoter. These constructs will be used in the generation of recombinant sheeppox viruses expressing target antigens.

Keywords: recombinant plasmids, sheeppox virus, directional mutagenesis, dominant selective marker

УДК 619:615.375:578.821:578.56

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЛАЗМИД ИНТЕГРАЦИИ ДЛЯ РЕКОМБИНАЦИИ ГЕНОМА ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ

Червякова О.В., Строчков В.М., Тайлакова Э.Т., Султанкулова К.Т., Сандыбаев Н.Т.

*Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
пгт. Гвардейский, Кордайский район, Жамбылская область, 080409, Казахстан
ovch@mail.ru*

АБСТРАКТ

Способность каприпоксвирусов вызывать клеточный и гуморальный иммунный ответ, встраивать протяженные последовательности ДНК в геном, безопасность играют важную роль при разработке векторных вакцин. Целью данных исследований являлись дизайн и конструирование плазмидных ДНК для рекомбинации генома каприпоксвирусов. В результате проведенных исследований получены две генетические конструкции pINT-TKspv и pINT-RRspv, содержащие последовательности геномной ДНК вируса оспы овец, несущественные для репликации вируса: ген тимидинкиназы или ген малой субъединицы рибонуклеотидредуктазы, соответственно, кассету для экспрессии целевых генов и селективный маркер (*gpt*). Контроль экспрессии целевых генов будет осуществляться синтетическим промотором осповакцины. Полученные конструкции будут использованы для получения рекомбинантных вирусов оспы овец, экспрессирующих целевые антигены.

Ключевые слова: рекомбинантные плазмиды, вирус оспы овец, направленный мутагенез, доминантный селективный маркер.

Широкое использование поксвирусов в качестве вакцинных векторов обеспечивается за счет их способности активировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет [1], возможности

встроить в геном дополнительно до 25 тысяч пар оснований ДНК [2], одновременной экспрессии нескольких чужеродных генов [3, 4]. Наиболее распространенный вакцинный вектор на основе вируса коровьей оспы не является абсолютно безопасным, и в настоящее время изучается возможность использования в качестве векторов поксвирусов с ограниченным кругом хозяев.

Вирусы оспы овец и коз и вирус нодулярного дерматита относятся к роду *Capripoxvirus*, семейство *Poxviridae*. Несмотря на высокую степень гомологии геномов [5, 6], серологическое родство каприпоксвирусов строго видоспецифично. Так, вирус оспы овец и коз поражает соответственно овец и коз, однако некоторые штаммы могут поражать как овец, так и коз. Вирус нодулярного дерматита поражает только крупный рогатый скот.

В качестве основы для разработки вектора был выбран вирус оспы овец, штамм НИСХИ. Вирус с известной структурой генома (GenBank, ID:AY077834), имеющий ограниченный круг хозяев, длительное время применяемый для профилактики заболевания, идеально подходит для разработки рекомбинантных векторных вакцин. Целью данной работы являлись дизайн и конструирование плазмид интеграции для рекомбинации генома вируса оспы овец.

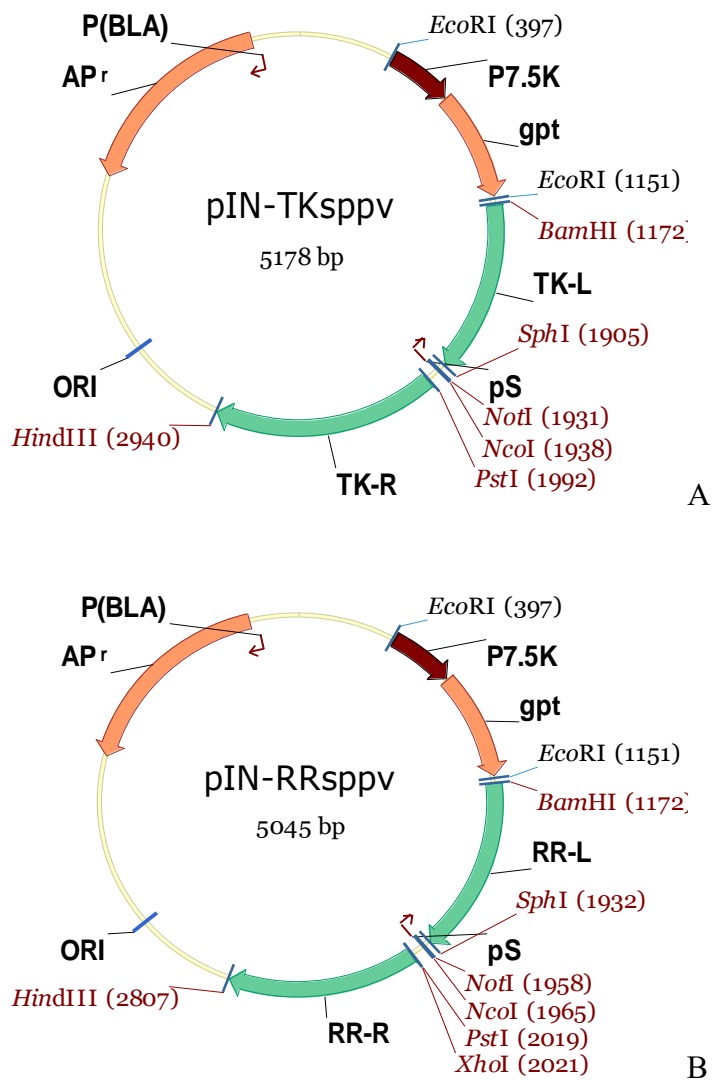
В качестве основы для конструирования использовали плазмиду pUC19 (Invitrogen, США). Процедуры амплификации генов, экстракции плазмидных ДНК, конструирования плазмид и идентификации проводили согласно стандартным методам [7]. Все амплифицированные ПЦР фрагменты ДНК были первоначально клонированы в векторе pGEM-T (Promega, США) и секвенированы перед процедурами расщепления рестрикционными ферментами и лигирования. Вирусы оспы овец, штамм НИСХИ, и оспы верблюдов, штамм КМ40, были предоставлены Коллекцией микроорганизмов НИИПББ КН МОН РК.

Плазмиды интеграции включают последовательности ДНК вируса из несущественной области генома. Известно несколько участков генома каприпоксвирусов, которые могут быть использованы для интеграции чужеродных генов: ген тимидинкиназы (ТК) [8], ген малой субъединицы рибонуклеотидредуктазы (RR) [9], область межгенного пространства [10] и др. Выбор был сделан в пользу двух участков вирусного генома: гена ТК (SPPV066) и RR (SPPV020). Важным компонентом интеграционной плазмиды является промотор экспрессионной кассеты. Промотор определяет уровень и продолжительность экспрессии целевого гена. Наиболее часто при конструировании используют промоторы вируса осповакцины P7.5, P11, PH5, или синтетические. Синтетический ранне/поздний промотор P_{EL}, T5NT терминатор были использованы в дизайне экспрессионной кассеты. Также для клонирования целевых генов в экспрессионной кассете включен мультиклональный сайт для ферментов рестрикции.

Для обогащения вирусной популяции рекомбинантными клонами был выбран метод временной доминантной селекции по ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы *E.coli* [11]. Данный метод селекции позволит получать в дальнейшем двойные, тройные и т.д. рекомбинантные вирусы по различным участкам генома. Скрининг рекомбинантов проводят путем включения в геном репортерных генов или методом ПЦР. ПЦР-скрининг проводится с использованием как минимум двух пар праймеров, позволяющих обнаружить целевой ген и подтвердить его встраивание в вирусный геном. Для ПЦР-скрининга рекомбинантных вирусов оспы овец были сконструированы две пары праймеров.

На основе проведенного дизайна составлены физические карты плазмид интеграции с использованием программного обеспечения VectorNTI (рис. 1).

Конструирование плазмид интеграции проводили по схеме, представленной на рисунке 2. В результате были получены базовые плазмиды интеграции pINT-TKspv и pINT-RRspv для рекомбинации вирусного генома. На основании данных конструкций в дальнейшем путем клонирования целевых генов будут созданы плазмиды интеграции для получения рекомбинантных вирусов оспы овец, экспрессирующих целевые гены (чужеродные антигенные белки).



AP_r – ген устойчивости к ампициллину; P(BLA) – промотор; P7.5K – промотор; *gpt* – ген ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы; TK-L – левое плечо тимидинкиназного локуса; TK-R – правое плечо тимидинкиназного локуса; RR-L – левое плечо локуса рибонуклеотидредуктазы; RR-R – правое плечо локуса рибонуклеотидредуктазы; pS – синтетический ранне-поздний поксвирусный промотор

Рис.1. Физические карты плазмид интеграции pINT-TKsppv (A) и pINT-RRsppv(B)

AP_r – ampicillin resistance gene; P (BLA) – promoter; P7.5K – promoter; *gpt* – xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene; TK-L – left arm of thymidine kinase locus; TK-R – right arm of the thymidine kinase locus; RR-L – left arm of the ribonucleotide reductase locus; RR-R – right arm of the ribonucleotide reductase locus; pS – synthetic early-late poxvirus promoter

Fig.1. Physical maps of the pINT-TKsppv (A) and pINT-RRsppv (B) transfer plasmids

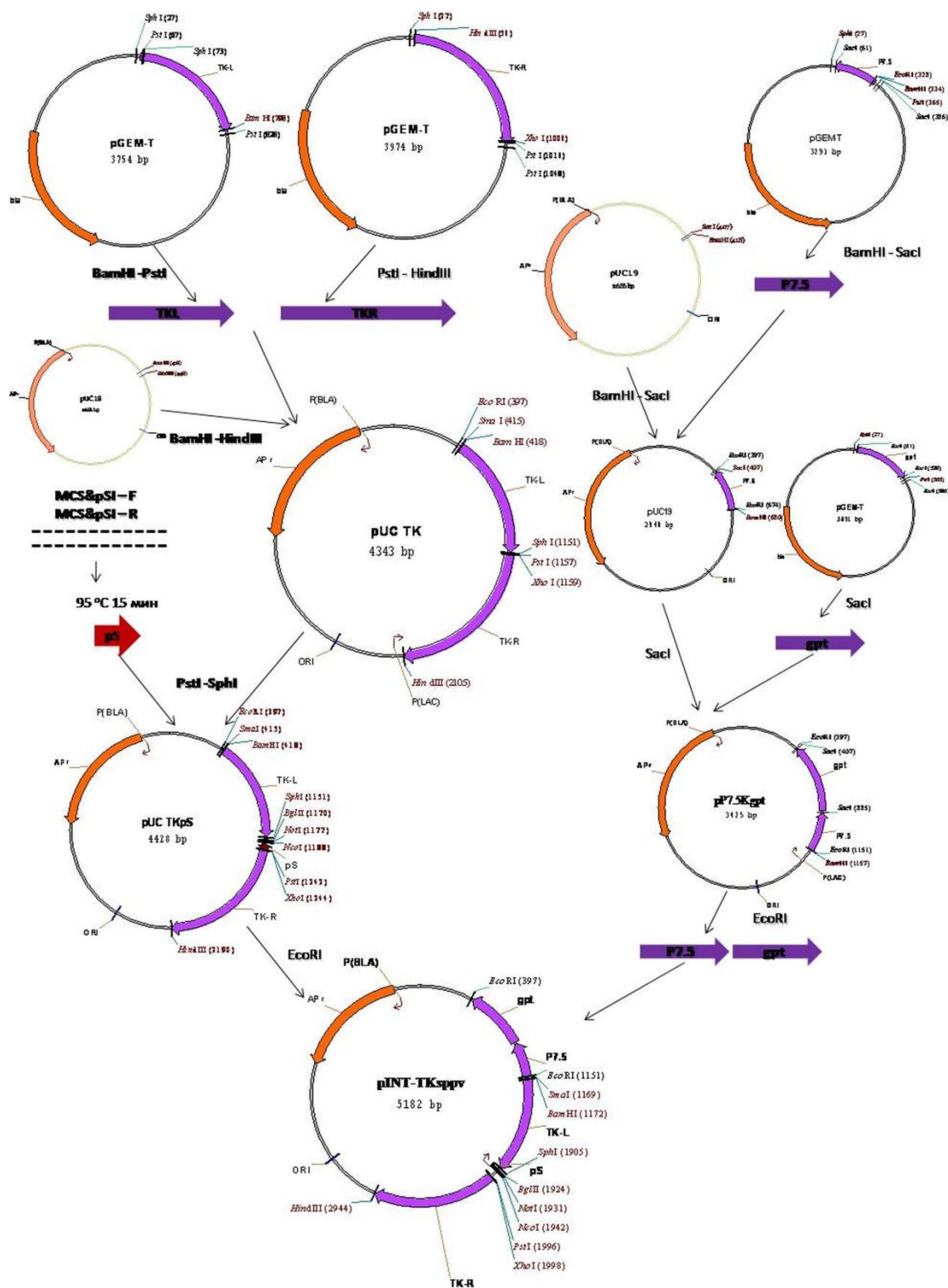


Рис. 2. Схема конструирования плазмиды интеграции pINT-TKspvv. Описание в тексте

Fig. 2. Construction of the pINT-TKspvv transfer plasmid. Description in the text

Финансирование

Исследования выполнены при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках проекта 1071/ГФ4 «Каприпоксвирус как универсальный вектор для разработки вакцин против инфекционных заболеваний» на 2015-2017 гг. (№ГР0115РК01977).

ЛИТЕРАТУРА

1. Zavala F., Rodrigues M., Rodriguez D., Rodriguez J., Nussenzweig R. & Esteban M. A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8+ T cells // *Virology*. – 2001. – Vol. 280. – P. 155-159. doi: 10.1006/viro.2000.0792.
2. Merchlinsky M. & Moss B. Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by in vitro ligation: recombinant-independent selectable cloning vectors // *Virology*. – 1992. – Vol. 190. – P. 522-526. PMID: 1529553.
3. Perkus M., Piccini A., Lipinskas B. & Paoletti E. Recombinant vaccinia virus: immunization against multiple pathogens // *Science*. – 1985. – Vol. 229. – P. 981-984. PMID: 2992092.
4. Welter J., Taylor J., Tartaglia J., Paoletti E. & Stephenson C. Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines // *J Virol*. – 2000. – Vol. 74. – P. 6358-6367. PMC112142.
5. Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z. et al Genome of lumpy skin disease virus // *J Virol*. – 2001. – Vol. 75. – P. 7122-7130. PMC114441.
6. Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z. et al The genomes of sheeppox and goatpox viruses // *J Virol*. – 2002. – Vol. 76. – P. 6054-6061. PMC136203.
7. Green M.R., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2012.
8. Aspden K., van Dijk A.A., Bingham J., Cox D., Passmore J.-A., Williamson A.L. Immunogenicity of a recombinant lumpy skin disease virus (neethling vaccine strain) expressing the rabies virus glycoprotein in cattle // *Vaccine*. – 2002. – Vol. 20. – P. 2693-2701. PMID: 12034095.
9. Mackett M., Smith G.L., Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector // *Proc Natl AcadSci USA*. – 1982. – Vol. 79(23). – P. 7415-7419. PMC347350.
10. Cohen A., Cox D., van Dijk A.A., Korber A., Dumbell K.R., Williamson A. Lumpy skin disease virus as a recombinant vaccine vector for Rift Valley fever virus and bovine ephemeral fever virus. In: *Proceedings of the 4th Congress of the European Society for Veterinary Virology, Edinburgh, Scotland, 24-27 August, 1997*. – P. 230-231.
11. Falkner F.G., Moss B. Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses // *J. Virol*. – 1990. – Vol. 64. – P. 3108-3111. PMC249504.

REFERENCES

1. Zavala F., Rodrigues M., Rodriguez D., Rodriguez J., Nussenzweig R. & Esteban M. A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8+ T cells. *Virology*, 2001, vol. 280, pp. 155-159. doi: 10.1006/viro.2000.0792.
2. Merchlinsky M. & Moss B. Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by in vitro ligation: recombinant-independent selectable cloning vectors. *Virology*, 1992, vol. 190, pp. 522-526. PMID: 1529553.
3. Perkus M., Piccini A., Lipinskas B. & Paoletti E. Recombinant vaccinia virus: immunization against multiple pathogens. *Science*, 1985, vol. 229, pp. 981-984. PMID: 2992092.
4. Welter J., Taylor J., Tartaglia J., Paoletti E. & Stephenson C. Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines. *J Virol.*, 2000, vol. 74, pp. 6358-6367. PMC112142.
5. Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z. et al Genome of lumpy skin disease virus. *J Virol.*, 2001, vol. 75, pp. 7122-7130. PMC114441.
6. Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z. et al The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *J Virol.*, 2002, vol. 76, pp. 6054-6061. PMC136203.
7. Green M.R., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2012.
8. Aspden K., van Dijk A.A., Bingham J., Cox D., Passmore J.-A., Williamson A.L. Immunogenicity of a recombinant lumpy skin disease virus (neethling vaccine strain) expressing the rabies virus glycoprotein in cattle. *Vaccine*, 2002, vol. 20, pp. 2693-2701. PMID: 12034095.
9. Mackett M., Smith G.L., Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl AcadSci USA*, 1982, vol. 79(23), pp. 7415-7419. PMC347350.
10. Cohen A., Cox D., van Dijk A.A., Korber A., Dumbell K.R., Williamson A. Lumpy skin disease virus as a recombinant vaccine vector for Rift Valley fever virus and bovine ephemeral fever virus. In: *Proceedings of the 4th Congress of the European Society for Veterinary Virology, Edinburgh, Scotland, 24-27 August, 1997*, pp. 230-231.
11. Falkner F.G., Moss B. Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.*, 1990, vol. 64, pp. 3108-3111. PMC249504.

ҚОЙ ШЕШЕГІ ВИРУСЫНЫҢ ГЕНОМЫН РЕКОМБИНАЦИЯЛАУҒА ҚОЛДАНЫЛАТЫН ИНТЕГРАЦИЯ ПЛАЗМИДАЛАРЫН КОНСТРУИРЛЕУ

Червякова О.В., Строчков В.М., Тайлакова Э.Т., Султанкулова К.Т.,
Сандыбаев Н.Т.

*Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты
п.г.т. Гвардейский, Кордай ауданы, Жамбыл облысы, 080409, Қазақстан*
ovch@mail.ru

ТҮЙІН

Каприоксвирустардың жасушалы және гуморалды иммунды жауап тудыру, геномға кеңейтілген ДНҚ тізбектерін енгізу қабілеттері және қауіпсіздігі, вакцина әзірлеу барысында маңызды рол атқарады. Жұмыстың мақсаты каприоксвирустардың геномын рекомбинациялауға қолданылатын рекомбинантты плазмидалық ДНҚ дизайнын жасау және конструирлеу. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде құрамында вирус репликациясына маңызды емес қой шешегі вирусының геномды ДНҚ тізбегі: тимидинкиназа гені немесе рибонуклеотидредуктазаның кіші суббірлігінің гені, тұтас гендерді экспрессиялауға арналған кассета және іріктеу маркері (*gpt*) бар ДНҚ pINT-TKspv және pINT-RRspv екі генетикалық құрылым алынды. Тұтас гендердің экспрессиясын бақылау шешек вакцинасының синтетикалық промоторы арқылы жүзеге асырылады. Алынған құрылымдар тұтас антигендерді экспрессиялайтын қой шешегінің рекомбинантты вирусін алуға қолданылатын болады.

Негізгі сөздер: рекомбинантты плазмидалар, қой шешегі вирусы, бағытталған мутагенез, үстемелі іріктеу маркері.