



На правах рукописи

БАРАНОВСКАЯ
Ирина Леонидовна

**РОЛЬ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ мРНК ГЕНА NS
В ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ ВИРУСА ГРИППА А**

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Васин Андрей Владимирович, доктор биологических наук, доцент

Консультант:

Сергеева Мария Валерьевна, кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Исакова-Сивак Ирина Николаевна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»

Шестопалов Александр Михайлович, профессор, доктор биологических наук, директор научно-исследовательского института вирусологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Защита состоится «**28**» декабря 2021 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета **У.03.01.03** федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29) по адресу: г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина 11, корп. 1, Высшая школа биомедицинских систем и технологий, ауд. 206.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте https://www.spbstu.ru/science/the-department-of-doctoral-studies/defences-calendar/the-degree-of-candidate-of-sciences/baranovskaya_irina_leonidovna/ ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Автореферат разослан: « ____ » _____ 2021 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

Забродская Яна Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Несмотря на достигнутый прогресс в разработке противовирусных препаратов и вакцин, вирусы гриппа А (ВГА), как и другие респираторные вирусы, представляют собой серьезную угрозу для общественного здоровья и наносят ежегодный ущерб экономике [Iuliano и др., 2018]. Генетическая изменчивость ВГА, обуславливающая постоянное изменение антигенных свойств, обеспечивает вирусу способность обходить популяционный иммунитет, что приводит к возникновению сезонных эпидемий и периодических пандемий [Palese, 2007; Saunders-Hastings, Krewski, 2016].

Известные детерминанты патогенности ВГА, определяющие репродуктивные особенности вируса и эффективность его распознавания иммунной системой, связаны с функциональными и структурными сайтами в вирусных белках. Однако в последнее время все больше внимания уделяют изучению роли вторичной структуры вирусных РНК. Так, консервативные области вирусной РНК рассматриваются в качестве перспективных мишеней для разработки противовирусной терапии [Mierlo van, Cleef van, Rij van, 2010; Piasecka и др., 2020]. Кроме того, конструирование аттенуированных вирусов с мутациями в важных структурных элементах РНК может быть актуально для разработки живых противогриппозных вакцин [Jiang и др., 2016].

На сегодняшний день представления о функциональной роли структурных элементов РНК ВГА ограничены. В ранее проведенных исследованиях были выявлены отличия во вторичной структуре мРНК, кодируемых геном *NS* (далее мРНК гена *NS*). ВГА разных подтипов, в том числе у пандемического вируса A/Brevig Mission/1/1918 (H1N1) и штаммов ВГА подтипа H5N1 [Gulyaev, Neus, Olsthoorn, 2007; Vasin и др., 2016]. Ген *NS* кодирует как минимум два важных для вирусного патогенеза белка: неструктурный белок NS1 (nonstructural protein 1) и белок ядерного экспорта NEP (nuclear export protein). Предполагается, что вторичные структуры мРНК гена *NS* могут регулировать уровень продукции белка NS1, который, являясь антагонистом клеточного интерферонового ответа, может влиять на патогенность вируса [Krug, 2015]. Кроме того, вторичные структуры *NS* сегмента могут контролировать продукцию белка ядерного экспорта NEP, оптимальный уровень экспрессии которого способствует поддержанию эффективной репликации вируса [Chua и др., 2013; Gao и др., 2015; Paterson, Fodor, 2012]. Вместе с тем, экспериментальные доказательства данных предположений ограничены. В связи с этим, актуальным является экспериментальный анализ областей гена *NS*, обладающих консервативной вторичной структурой РНК, и определение роли таких структур в репликации вируса и степени его патогенности.

Степень разработанности темы исследования. Ранее опубликованные исследования внесли значительный вклад в идентификацию структурных элементов мРНК гена *NS* термодинамическими методами *in silico* и в условиях *in vitro* [Gulyaev, Heus, Olsthoorn, 2007; Plyinskii и др., 2009; Moss, Priore, Turner, 2011; Priore и др., 2013; Vasin и др., 2016]. Было показано, что для мРНК гена *NS* характерно образование нескольких альтернативных стабильных вторичных структур в областях (82–148 н.) и (497–564 н.), локализованных вблизи 5'- и 3'- сайтов сплайсинга.

В первой области (82–148 н.) у разных штаммов ВГА могут образовываться структуры «stem-loop» (шпилька) или «multibranch» (разветвленная шпилечная структура) [Plyinskii и др., 2009; Priore и др., 2013]. В экспериментах по трансфекции клеток плазмидной ДНК, кодирующей рекомбинантный белок NS1, было показано, что введение коротких делеций, направленных на разрушение вторичной структуры в области (82–148 н.), негативно влияет на уровень продукции NS1 в условиях *in vitro* [Plyinskii и др., 2009].

Для второй области было обнаружено две близких по энергии вторичных структуры шпильки и псевдоузла [Gulyaev, Fouchier, Olsthoorn, 2010; Gulyaev, Heus, Olsthoorn, 2007]. Для большинства штаммов ВГА характерен баланс между данными структурами, однако у высокопатогенных птичьих ВГА подтипа H5N1, появившихся после 2001 года, обнаружено смещение данного энергетического равновесия структур в сторону образования стабильной шпильки [Gulyaev, Heus, Olsthoorn, 2007]. Ранее было выдвинуто предположение, что образование устойчивой РНК-шпильки в положении (497–564 н.) может потенциально влиять на вирулентность ВГА [Gulyaev, Heus, Olsthoorn, 2007]. Тем не менее, в исследовании под руководством Douglas Turner при конструировании вирусов с различной вторичной структурой в области (497–564 н.) мРНК гена *NS* было продемонстрировано, что нуклеотидные замены, направленные на смещение баланса в сторону образования устойчивой РНК-шпильки, приводят к уменьшению эффективности сплайсинга мРНК и аттенуации вирусной инфекции в клеточных культурах [Jiang и др., 2016].

Важно отметить, что результаты ранее опубликованных исследований по изучению вторичной структуры мРНК гена *NS* ВГА посвящены только одной из двух образующих вторичные структуры областей и не рассматривали возможную их комбинацию. Кроме того, количество работ, в которых проводилось исследование вторичной структуры мРНК гена *NS* с использованием рекомбинантных вирусов *in vitro*, весьма ограничено. Стоит также упомянуть, что ранее не исследовалось влияние вторичных структур *NS* мРНК на патогенность вирусов *in vivo*.

Цель исследования состояла в изучении роли вторичных структур мРНК, кодируемых геном *NS* вируса гриппа А, в репродукции вируса *in vitro* и *in vivo*.

Задачи исследования:

1. Сопоставить результаты *in silico* предсказания вторичных структур мРНК гена *NS* с экспериментальными данными *in vitro*.
2. Методом обратной генетики получить рекомбинантные варианты штамма A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), различающиеся вторичными структурами мРНК сегмента *NS*.
3. Сравнить репродуктивные свойства полученных вирусов на клеточных культурах и 10-дневных куриных эмбрионах.
4. Определить влияние вторичных структур мРНК гена *NS* на эффективность продукции *NS1* и *NEP* при заражении чувствительных клеток.
5. Оценить патогенность полученных вирусов *in vivo*.

Научная новизна. В работе методом обратной генетики впервые получены и охарактеризованы рекомбинантные штаммы ВГА, содержащие различные комбинации вторичных структур в (82–148 н.) и (497–564 н.) областях мРНК гена *NS*. Впервые продемонстрировано влияние вторичной структуры в области (82–148 н.) мРНК гена *NS* на продукцию белка *NS1* в зараженных клетках. Впервые продемонстрировано влияние комбинации вторичных структур (82–148 н.) и (497–564 н.) областей мРНК гена *NS* на продукцию белка *NEP* в зараженных клетках. Впервые показано, что вторичная структура мРНК гена *NS* ВГА может влиять на репродукцию вирусов *in vivo*.

Теоретическая и практическая значимость. Фундаментальная значимость выполненной работы в первую очередь определяется важностью получения новых данных о влиянии консервативных структурных РНК-мотивов гена *NS* на жизнеспособность и патогенность ВГА. В работе была проведена всесторонняя оценка молекулярно-биологических свойств ВГА, обладающих характерными для высокопатогенных штаммов шпилечными структурами мРНК гена *NS*. Продемонстрировано влияние вторичной структуры (82–148 н.) мРНК гена *NS* ВГА на трансляцию белка *NS1* на ранних этапах инфекции. Продемонстрировано влияние комбинации вторичных структур (82–148 н.) и (497–564 н.) мРНК гена *NS* на продукцию белка *NEP*. Проверена гипотеза о взаимосвязи между вторичной структурой РНК геномного сегмента *NS* и степенью патогенности ВГА и обнаружено влияние комбинации вторичных структур мРНК гена *NS* на инфекционную активность вируса в легких зараженных животных (лабораторных мышей). Практическая значимость работы заключается в возможности использования элементов вторичной структуры РНК в гене *NS* для аттенуации вирусов при разработке живых вакцин.

Методология и методы исследования. Для оценки возможного вклада вторичных структур РНК в репродуктивные свойства ВГА применялись молекулярно-биологические, молекулярно-генетические и вирусологические методы: выделение нуклеиновых кислот,

полимеразная цепная реакция, электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном/ полиакриламидном геле, получение компетентных бактерий, трансформация и селекция бактериальных клонов, сайт-направленный мутагенез, секвенирование нуклеиновых кислот по Сенгеру, *in vitro* транскрипция, культивирование клеток, конструирование вирусов методом обратной генетики, определение инфекционной активности вирусов, реакция гемагглютинации, реакция торможения гемагглютинации, секвенирование нового поколения, экспериментальное заражение лабораторных животных, иммуноферментный анализ, электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле, вестерн-блоттинг, компьютерный анализ вторичных структур РНК и методы статистического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Предсказанные методами *in silico* нуклеотидные замены в областях (82–148 н.) и (497–564 н.) гена *NS*, приводят к изменению вторичной структуры РНК *in vitro*.
2. Рекомбинантные вирусы гриппа А, обладающие различными комбинациями вторичных структур в областях (82–148 н.) и (497–564 н.) гена *NS*, не отличаются по репродукции в чувствительных клеточных культурах и в развивающихся куриных эмбрионах.
3. Рекомбинантные вирусы гриппа А, обладающие РНК-шпилькой в области (82–148 н.) гена *NS*, характеризуются более высоким уровнем продукции NS1 в первые часы после инфекции чувствительных клеток по сравнению с вирусами с альтернативной вторичной структурой в данной области.
4. Рекомбинантный вирус гриппа А, характеризующийся отсутствием РНК-шпильки в (82–148 н.) положении и стабильной шпилькой в области (497–564 н.) *NS* гена, имеет сниженный уровень белка NEP в зараженных клетках и сниженную патогенность для мышей по сравнению с вирусами с альтернативными вторичными структурами в данных областях.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты получены с применением современных экспериментальных методов молекулярной биологии и вирусологии в соответствии с поставленными задачами. Воспроизводимость полученных результатов и применение методов статистического анализа позволили определить значимость и достоверность результатов.

Материалы исследования доложены автором работы на Международной конференции «Trends in Influenza Research» (Санкт-Петербург, 2017), на XVIII Зимней молодежной школе по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 2017), на Международном конгрессе «25th International Student Congress Of (bio) Medical Science (ISCOMS)» (Гронинген, 2018), на Международном конгрессе «The 43rd FEBS CONGRESS» (Прага, 2018), на XIX Зимней молодежной школе ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 2018), на

Международной конференции «OPTIONS X for the Control of Influenza» (Сингапур, 2019), на XX Зимней молодежной школе ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 2019), на Международном конгрессе «The 44rd FEBS CONGRESS» (Краков, 2019) и XXI Зимней молодежной школе по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 2020).

По теме исследования опубликовано 11 печатных работ, в том числе 2 научные статьи в рецензируемых научных журналах.

Личный вклад автора состоит в самостоятельном планировании и выполнении всех лабораторных исследований, а также анализе полученных результатов. Совместно с сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России было проведено секвенирование нуклеотидных последовательностей и культивирование необходимых клеточных линий.

Финансовая поддержка. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-74-00130 («Роль вторичной структуры РНК геномного сегмента NS вируса гриппа А в его жизнеспособности и патогенности»)

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста и включает 6 таблиц и 36 рисунка. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 220 источников на русском и английском языках. Диссертация изложена в соответствии с общими требованиями к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утверждёнными в ГОСТ Р 7.0.11–2011.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. В работе использованы перевиваемые культуры клеток почки собаки MDCK (IRR FR-58), почки африканской зеленой матрешки Vero (ATCC CCL-81) и карциномы легкого человека A549 (ATCC CCL-185). Культивирование MDCK проводилось в среде AlphaMEM (Биолот) с 2mM L-глутамином и 10%-ной инактивированной эмбриональной сывороткой (FBS, Биолот); A549 – в питательной среде DMEM/F12 (Gibco) с 2%-ным GlutaMAX (Gibco) и 10%-ной FBS (Gibco); Vero – в бессывороточной среде OptiPro SFM (Gibco), содержащей 4 mM L-глутамин (Gibco).

Лабораторные животные. В работе использовались самки мышей линий BALB/c (массой 17–20 грамм) в возрасте 6–8 недель, полученные из питомника «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России. Все исследования были проведены в соответствии с приказом № 199н «Об утверждении правил надлежащей

лабораторной практики» министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 года. Эксперименты на животных были одобрены локальным этическим комитетом при ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Вирусы. В работе были использованы вирусы гриппа на основе лабораторного штамма A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (A/PR8), обладающие комбинациями вторичных структур в областях (82–148 н.) и (497–564 н.) мРНК геномного сегмента NS, полученные методом обратной генетики [Hoffmann и др., 2000] в рамках данного исследования.

In silico анализ вторичной структуры РНК. Последовательности NS гена ВГА были получены из баз данных «NCBI Influenza Virus Resource» [Bao и др., 2008] и «Influenza Research Database» (IRD) [Squires и др., 2012]. Предсказание вторичных структур РНК проводилось с использованием термодинамической модели на онлайн-ресурсе «RNAfold» [Gruber и др., 2008].

Сайт-направленный мутагенез был выполнен согласно ранее описанному подходу [Zheng, Baumann, Reymond, 2004]. В плазмиду рНW2006-PR8-NS, кодирующую сегмент NS вируса гриппа A/PR8, последовательно в области (82-148 н.) и (497-564 н.) были внесены мутации с последующим их подтверждением методом секвенирования по Сэнгеру [Sanger, Nicklen, Coulson, 1977].

Исследование вторичной структуры РНК in vitro. Соответствующие фрагменты вирусной РНК были синтезированы с помощью *in vitro* транскрипции. Фолдинг РНК был проведен согласно ранее опубликованному протоколу [Moss, Priore, Turner, 2011]. Анализ вторичной структуры был выполнен с использованием электрофоретического разделения образцов в 12%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в нативных и денатурирующих условиях с последующим окрашиванием геля нитратом серебра [Blum, Beier, Gross, 1987].

Конструирование вирусов методом обратной генетики. В работе были использованы плазмиды рНW2006 на основе вектора A/PR8 (любезно предоставленные заведующей лабораторией векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России к.м.н. Стуковой М.А.) и полученные в данном исследовании варианты плазмиды рНW-PR8-NS, содержащие точечные мутации. Трансфекция клеток Vero была проведена методом электропорации с использованием Nucleofector I (Amaha/Lonza) и набора реагентов Nucleofector Kit V (Lonza, #VCA-1003) согласно протоколу производителя. Геномные последовательности полученных вирусов были проверены с помощью секвенирования нового поколения по ранее опубликованному протоколу [Zhou и др., 2009] с использованием набора реагентов Nextera XT (Illumina) и секвенатора Illumina MiSeq.

Определение инфекционной активности вирусов. Для расчета инфекционной активности был использован метод предельных разведений. Учет развития инфекции осуществлялся через 72 часа после заражения культур клеток и через 48 часов после заражения

развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) в реакции гемагглютинации (РГА) с 0,5%-суспензией куриных эритроцитов. Расчет 50%-ной инфекционной дозы был выполнен методом Рида–Менча [Reed, Muench, 1938]. Инфекционная активность была выражена в логарифмах 50%-ной тканевой инфекционной дозы ($\lg\text{ТИД}_{50}/0,1\text{мл}$) либо в логарифмах 50%-ной эмбриональной инфекционной дозы ($\lg\text{ЭИД}_{50}/0,2\text{мл}$).

Определение вирусных мРНК методом количественной ПЦР. Тотальная фракция РНК из зараженных клеток A549 и MDCK была выделена с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, #74106). Постановка обратной транскрипции была выполнена с использованием обратной транскриптазы MMLV (Promega, #M1705) и олиго(dT)₁₆ праймеров (ДНК-синтез) согласно протоколу производителя. Для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени был проведен подбор праймеров к NS1 (F-qNS1: TACCTAAGTACATGACTCTTGAG, R-NS1: TCGCCTGGTCCATTCTGATAC), к NP (F-qNP: GTCAAGCTTTCAGGACATAC, R-qNP: CGAACTGTGTTATCATTCC), а также были использованы ранее опубликованные праймеры к GAPDH [Jiang и др., 2016]. Для определения относительного количества мРНК был использован метод $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

Измерение продукции вирусных белков в зараженных клетках методом ИФА. Через определенные промежутки времени после заражения осуществлялась однократная промывка клеток стерильным фосфатно-солевым раствором DPBS (Биолот) и последующая фиксация образцов с помощью холодного 80%-го ацетона в течение 15 минут. Метод иммуноферментного анализа (ИФА) проводился по стандартному протоколу с использованием высокотитражной мышиной антисыворотки к белку NS1 (получена в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России) и конъюгированных с HRP мышиных моноклональных антител 6D11 (получены в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России) для детекции белка NP (nucleoprotein).

Вестерн-блоттинг. Измерение концентрации тотального белка было выполнено с использованием метода Лоури с помощью набора «DC Protein Assay Kit I» (Bio-Rad). Электрофоретическое разделение белков в ПААГ в денатурирующих условиях было проведено по методу Лэммли [Laemmli, 1970]. Для количественного измерения белков использовались моноклональные мышиные антитела 1H7 к NS1 [Кривицкая и др., 2017], моноклональные кроличьи антитела к NP (Novus Biologicals, #NBP2-42872) и моноклональные мышиные антитела к α -тубулину (Sigma-Aldrich, #T6074). Для последующей визуализации белков были использованы конъюгаты меченных пероксидазой хрена козьих антител к иммуноглобулинам мыши IgG либо к кроличьим IgG (Bio-Rad). Мембраны были проявлены набором Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad).

Инфицирование лабораторных животных проводилось интраназально под легкой эфирной анестезией 50 мкл культуральной жидкости, содержащей известное количество вирусов. Определение специфических антител к вирусу гриппа в сыворотке крови опытных животных было выполнено в **реакции торможения гемагглютинации (РТГА)** с использованием с 0,5%-суспензии куриных эритроцитов и **методом ИФА** с использованием штамма A/PR8 в качестве антигена. Расчет 50%-ной мышинной летальной и инфекционной (ЛД₅₀ и МИД₅₀) доз вирусов был выполнен методом Рида–Менча [Reed, Muench, 1938]. Для определения вирусной нагрузки была проведена гомогенизация легких мышей с помощью прибора Tissue Lyser II (Qiagen). Осветленная центрифугированием 10%-ная легочная суспензия использовалась для определения наличия инфекционного вируса методом титрования в культуре клеток MDCK.

Статистическая обработка данных была выполнена в программе GraphPad Prizm 6.01 и Microsoft Excel 2007. Для оценки различий в инфекционной активности вирусов использовался однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением апостериорного критерия Тьюки. Для оценки значимости любых различий между вирусами в определенные моменты времени использовался двусторонний дисперсионный анализ ANOVA с последующим применением апостериорных критериев Сидака либо Тьюки. В качестве уровня статистической значимости принималось значение 0,05. Для представления полученных результатов использовались такие показатели описательной статистики, как среднее значение и стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ вторичной структуры мРНК гена NS ВГА

Для исследования возможного вклада вторичных структур мРНК гена *NS* в патогенность ВГА, были выбраны последовательности вирусов, характеризующиеся образованием различных вторичных структур РНК в областях (82–148 н.) и (497–564 н.): с наличием/отсутствием шпилечной структуры и при этом с минимальным количеством несинонимичных замен (Рисунок 1). В качестве стабильных РНК-шпилек выступали последовательности штаммов ВГА Brevig Mission/1/1918 (H1N1) и A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) для областей (82–148 н.) и (497–564 н.) мРНК гена *NS* соответственно. Затем были выбраны последовательности гена *NS*, которые образуют альтернативные вторичные структуры РНК в данных областях. Для участка (82–148 н.) была использована последовательность штамма A/England/10/67 (H2N2), которая характеризуется двумя синонимичными мутациями G123A и A132G в открытой рамке считывания NS1. Для области (497–564 н.) – это последовательность

вируса A/Albany/4836/1950 (H1N1), отличающаяся от последовательности шпильки тремя нуклеотидными заменами G511A, G512A и C537G: одной несинонимичной в рамке считывания NS1, и двумя несинонимичными в рамке считывания NEP.

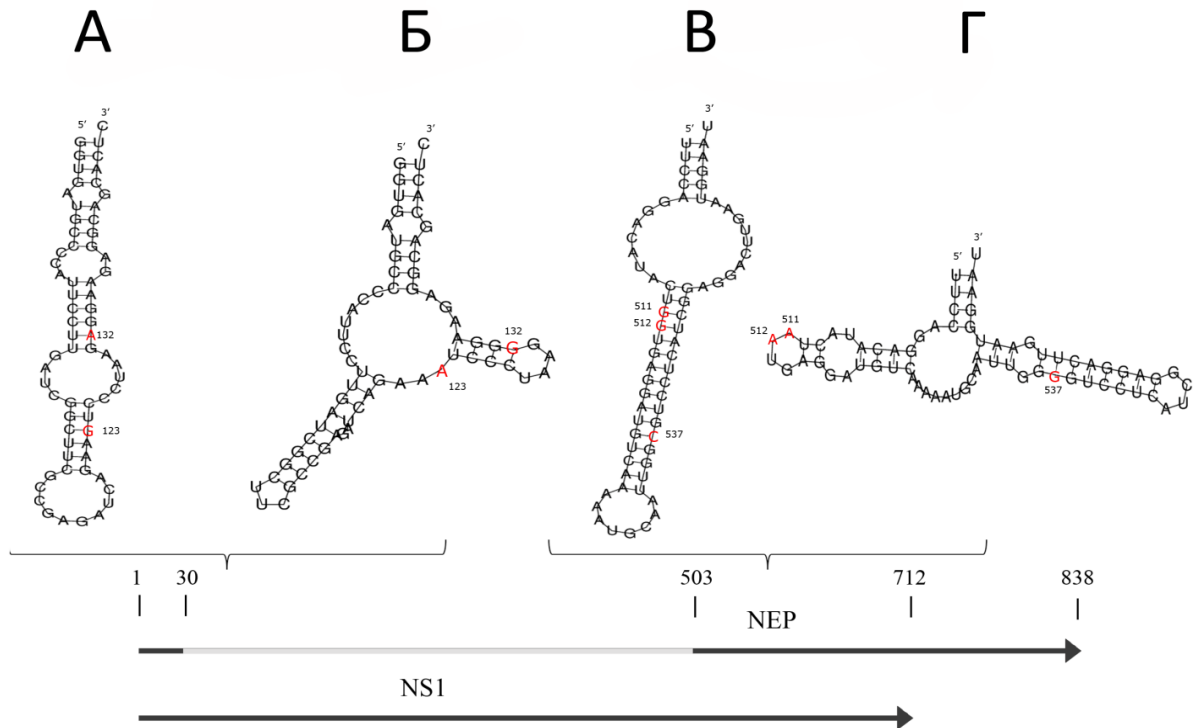


Рисунок 1 – Вторичные структуры мРНК гена NS, построенные в программе RNAfold: (А) структура РНК-шпильки (82–148 н.) области ($E = -23,9$ ккал/моль); (Б) альтернативная вторичная структура РНК (82–148 н.) области ($E = -21,6$ ккал/моль); (В) структура РНК-шпильки (497–564 н.) области ($E = -27,5$ ккал/моль); (Г) альтернативная вторичная структура РНК (497–564 н.) области ($E = -20,9$ ккал/моль)

С помощью сайт-направленного мутагенеза в плазмиду рНW2006-NS, кодирующую геномный сегмент NS штамма A/PR8, были внесены нуклеотидные замены, обеспечивающие образование вторичных структур РНК в (82–148 н.) и (497–564 н.) областях. Таким образом, был получен набор из четырех плазмид рНW2006-NS, несущих комбинации точечных мутаций в (82–148 н.) и (497–564 н.) областях гена NS.

На следующем этапе работы было экспериментально подтверждено, что внесенные нуклеотидные замены влияют на формирование вторичных структур РНК. На рисунке 2А представлены результаты, согласно которым фрагменты РНК с предсказанной шпилькой (дорожки 1, 3) имеют более высокую электрофоретическую подвижность в нативных условиях, так как образуют более компактную структуру. В денатурирующих условиях электрофоретическая подвижность всех исследуемых образцов совпадает, что свидетельствует

об одинаковой длине РНК (рисунок 2Б). Таким образом, обнаруженные различия в подвижности в нативных условиях связаны исключительно с фолдингом РНК.

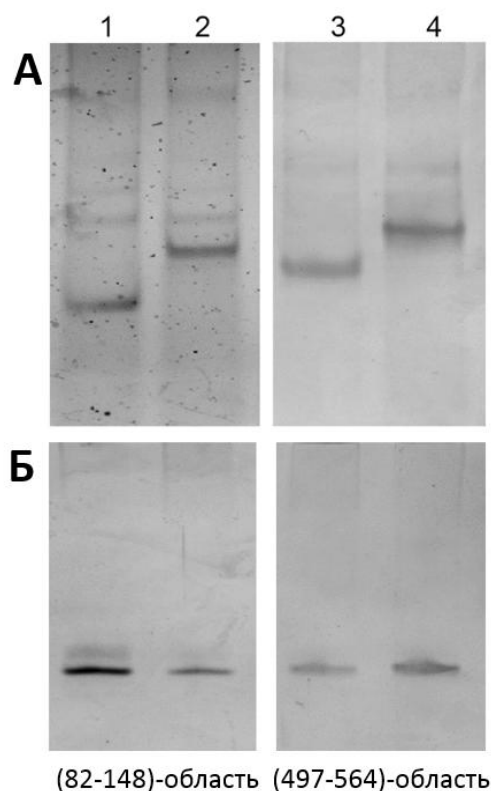


Рисунок 2 – Результаты электрофоретического разделения фрагментов мРНК гена *NS* в ПААГ в нативных (А) и денатурирующих (Б) условиях. Дорожки 1 и 2 – фрагмент РНК области (82- 148 н.), образующий РНК-шпильку (дорожка 1) и альтернативную вторичную структуру (дорожка 2); дорожки 3 и 4 – фрагмент РНК (497-564 н.) области, образующий РНК-шпильку (дорожка 3) и альтернативную вторичную структуру (дорожка 4)

2. Сборка вирусов ВГА и определение инфекционной активности

Вирусы с комбинацией вторичных структур мРНК гена *NS* были получены методом обратной генетики на основе лабораторного штамма A/PR8. Сконструированные вирусы были обозначены в соответствии со вторичными структурами в первой (82–148 н.) и второй (497–564 н.) областях мРНК гена *NS*: 1-1 (шпильки в обеих областях), 1-0 (шпилька в первой области), 0-1 (шпилька во второй области), 0-0 (не содержит шпилек).

Через 48 часов после трансфекции была определена инфекционная активность вирусов титрованием вирусосодержащей среды в клетках Vero. Согласно полученным результатам вирус 1-1, содержащий шпилечные структуры в обеих областях *NS*, имеет достоверно более высокие значения титров по сравнению с другими вирусами (Рисунок 3). Данный результат свидетельствует о том, что сконструированные вирусы имеют разную эффективность сборки. Не исключено, что это связано с влиянием вторичной структуры мРНК гена *NS*, однако точные механизмы и биологическое значение обнаруженных различий не установлены.

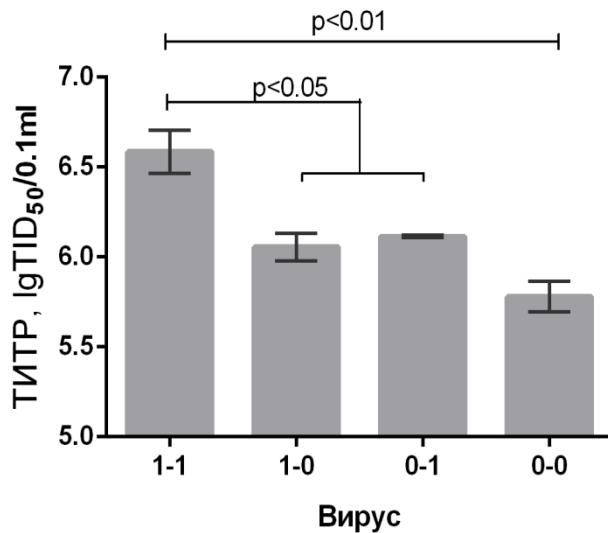


Рисунок 3 – Инфекционная активность вирусов через 48 ч после трансфекции. На диаграмме представлены средние значения \pm стандартные отклонения ($n=3$ в двух независимых экспериментах). Сравнение результатов проводилось с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и апостериорного критерия Тьюкки

На следующем этапе работы было выполнено получение рабочего банка вирусов (V1) и верификация полногеномных нуклеотидных последовательностей вирусов с помощью секвенирования нового поколения. Сравнение инфекционной активности вирусов проводилось с помощью титрования в клеточных культурах Vero, MDCK, A549, в первичной культуре клеток почки цыпленка (СК) и в 10-дневных РКЭ. Статистически значимых различий между вирусами не было обнаружено, что указывает на одинаковое количество вирионов каждого вируса в полученном банке.

3. Изучение репродукции вирусов в клеточных культурах и РКЭ

Для оценки репродуктивных свойств вирусов с различной вторичной структурой мРНК гена NS выполнено построение кривых роста вирусов в клеточных культурах A549, MDCK и Vero и в 10-дневных РКЭ.

При многоцикловогой инфекции клетки были заражены в низкой инфекционной дозе 0,001 ТИД₅₀/клетку, и в течение последующих 72 часов количество новообразованных частиц в культуральной жидкости было определено методом титрования в клетках Vero и MDCK (Рисунки 4А, 4Б, 4В). Для построения кривых роста вирусов в первом цикле инфекции, суточный монослой клеток был заражен в двух высоких дозах, соответствующих 0,1 ТИД₅₀/клетку либо 1 ТИД₅₀/клетку, и в течение последующих 12 часов количество новообразованных частиц было определено методом титрования в клеточной культуре MDCK (Рисунки 4Г–4И). Полученные результаты не продемонстрировали различий в скоростях репродукции между штаммами как при многоцикловогой инфекции, так и на ранних этапах вирусного заражения.

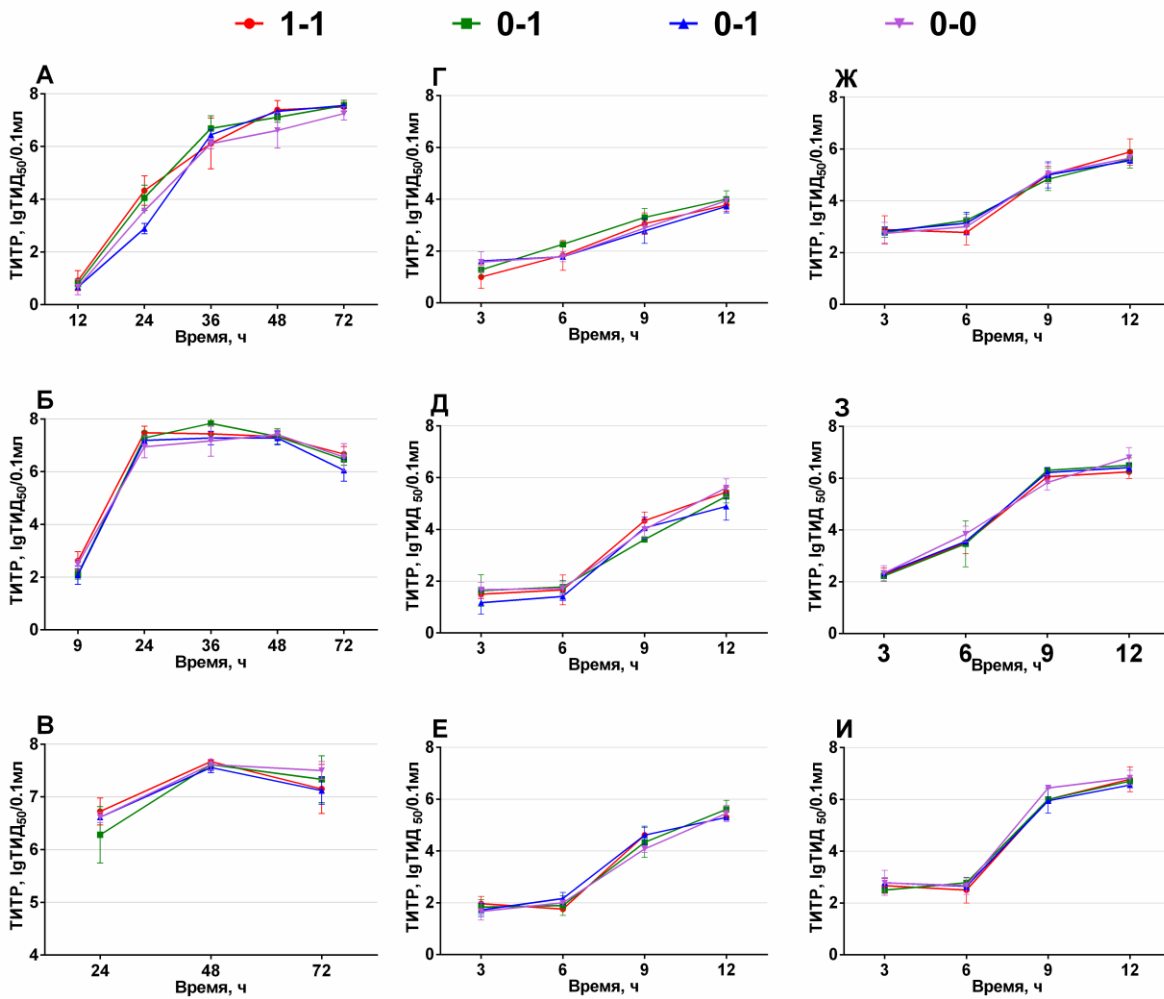


Рисунок 4 – Репродукция вирусов с различной вторичной структурой мРНК NS гена в клеточных культурах при многоцикловой инфекции (А, Б, В) и на ранних этапах вирусного заражения (Г, Д, Е, Ж, З, И). Исследование многоцикловой инфекции: клетки A549 (А), MDCK (Б) и Vero (В) были заражены в дозе 0,001 ТИД₅₀/клетку в трех независимых повторах для каждого вируса. Исследование раннего цикла вирусной репликации: клетки A549 (Г, Ж), MDCK (Д, З) и Vero (Е, И) были заражены в дозах 0,1 ТИД₅₀/клетку (Г, Д, Е) и 1 ТИД₅₀/клетку (Ж, З, И) в трех независимых повторах для каждого вируса

Сравнительное исследование репродуктивных свойств вирусов было также проведено в 10-дневных РКЭ. При исследовании многоцикловой инфекции РКЭ были заражены в аллантаисную полость разведением вируса, соответствующим дозе 10 ТИД₅₀/куриный эмбрион, и в течение последующих 72 часов были отобраны образцы аллантаисной жидкости для анализа количества новообразованных вирусных частиц методом титрования в клеточной культуре MDCK (Рисунок 5А). Для оценки репродукции вирусов в первом цикле инфекции в РКЭ было выполнено заражение вирусами в двух дозах: 100 и 1000 ТИД₅₀/куриный эмбрион; и

в последующие 24 часа было проанализировано вирусное потомство в аллантаической жидкости методом титрования в клеточной культуре MDCK (Рисунки 5Б, 5В). Согласно полученным результатам между вирусами отсутствуют различия в скорости репродукции в РКЭ на ранних этапах заражения и при многоцикловогой инфекции.

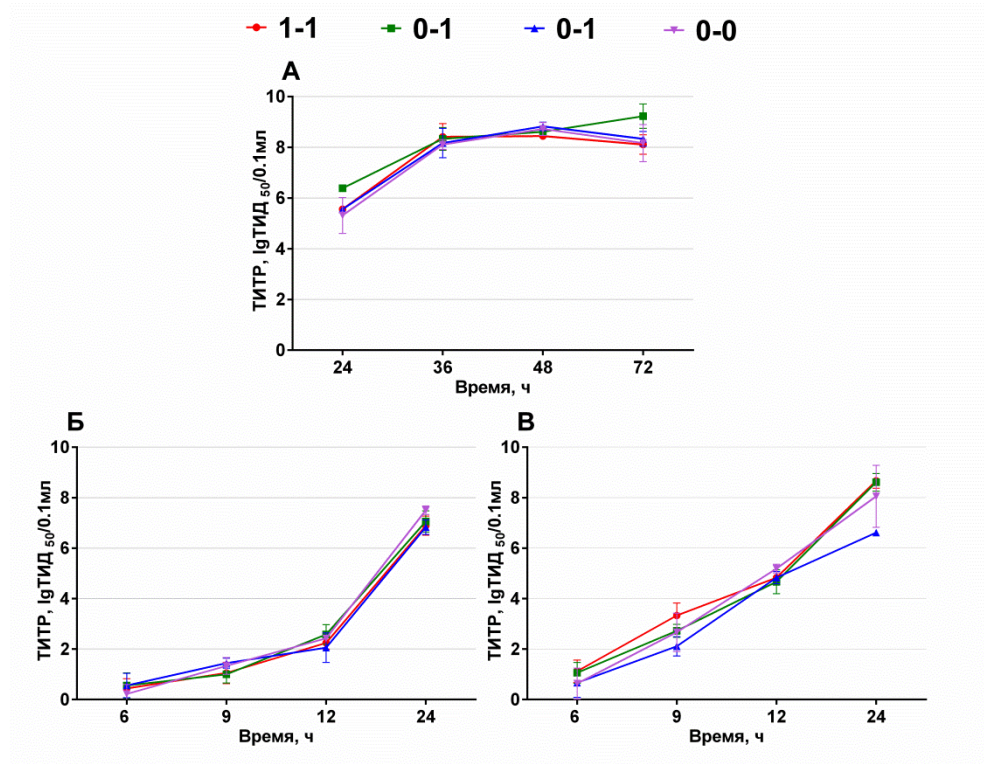


Рисунок 5 – Репродукция вирусов с различной вторичной структурой мРНК NS гена в развивающихся куриных эмбрионах при многоцикловогой инфекции (А) и на ранних этапах вирусного заражения (Б, В). Инфицирование РКЭ было выполнено в дозах: (А) 10 ТИД₅₀/куриный эмбрион, (Б) 100 ТИД₅₀/куриный эмбрион и (В) 1000 ТИД₅₀/куриный эмбрион в трех независимых повторах

Резюмируя полученные результаты, можно заключить, что вторичные структуры мРНК гена NS не влияют на репродукцию вируса в первые и последующие циклы инфекции в чувствительных клеточных культурах и в развивающихся куриных эмбрионах.

4. Изучение продукции вирусных белков в зараженных клетках

Для того чтобы выяснить, влияет ли вторичная структура РНК гена NS на продукцию NS1 и NEP, было проведено сравнение относительного количества данных белков в зараженных клетках.

Методом ИФА было обнаружено, что уровень NS1 достоверно выше в зараженных вирусами 1-1 и 1-0 клетках на ранних этапах заражения: через 6–12 часов для клеток A549 и через 6–8 часов для клеток MDCK (Рисунок 6). Важно отметить, что различия между вирусами наблюдаются только на ранних этапах инфекции и нивелируются на более поздних сроках заражения. Поскольку для обоих вирусов 1-1 и 1-0 характерна РНК-шпилька в первой рассматриваемой области, мы предполагаем, что данная структура может усиливать продукцию NS1. В то же время, не было обнаружено влияния шпилечной структуры второй области мРНК NS гена на уровень NS1.

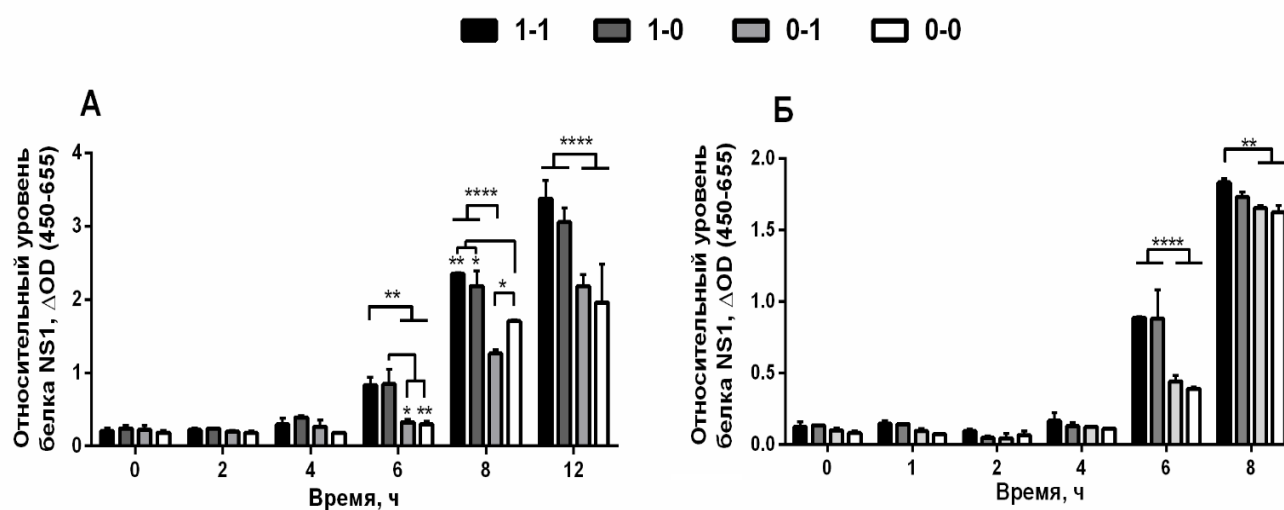


Рисунок 6 – Определение относительного количества белка NS1 в клетках A549 (А) и MDCK (Б), зараженных дозе 10 ТИД₅₀/клетку методом ИФА. Сравнение результатов проводилось методом многофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюкки (** $p < 0,00001$, *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,01$)**

Методом вестерн-блоттинга было проведено измерение относительного количества NEP и NS1 в зараженных клетках A549 (Рисунок 7). Согласно результатам исследования, было обнаружено, что наличие определенной комбинации вторичных структур мРНК гена NS регулирует продукцию NS1 и NEP *in vitro*: шпилька в (82–148 н.) области усиливает продукцию NS1, в то время как шпилька в (497–564 н.) области ослабляет эффективную трансляцию NEP. При наличии шпилечной структуры в (82–148 н.) области мРНК гена NS нивелируется негативное влияние вторичной структуры (497–654 н.) на продукцию NEP на фоне усиления продукции NS1. Вирусы со шпилечной структурой в первой области мРНК гена NS (1-1 и 1-0) имеют сопоставимые уровни вирусных белков NS1 и NEP (Рисунок 7).

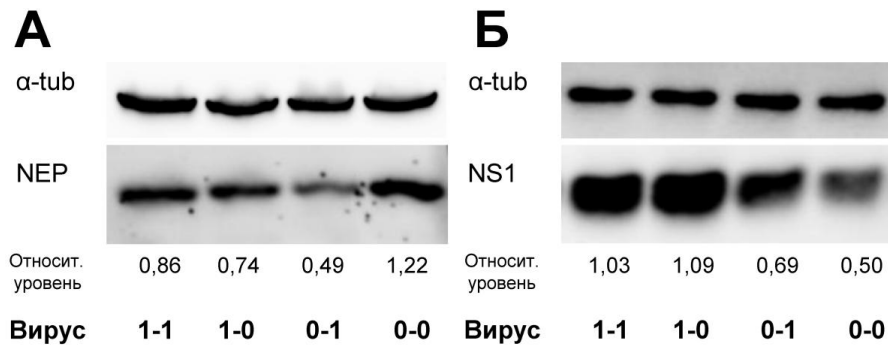


Рисунок 7 – Определение относительного количества белков NEP (А) и NS1 (Б) в клетках A549, зараженных дозе 1 ТИД₅₀/клетку, методом вестерн-блоттинга. Детекция белков NS1 и NEP проводилась через 9 и 12 часов после заражения соответственно

5. Количественное определение вирусной мРНК в зараженных клетках

Для того чтобы установить, на каком именно этапе экспрессии происходит влияние рассматриваемых вторичных структур РНК, было выполнено измерение относительного количества вирусной РНК в зараженных клетках в первые часы после инфицирования с помощью количественной ПЦР.

Согласно полученным результатам биологически значимых различий в уровнях NS1 мРНК в зараженных клетках MDCK и A549 между вирусами не было обнаружено (Рисунок 8). Таким образом, мы предполагаем, что шпилечная структура в (82–148 н.) области мРНК NS1 гена усиливает продукцию белка NS1 на уровне трансляции.

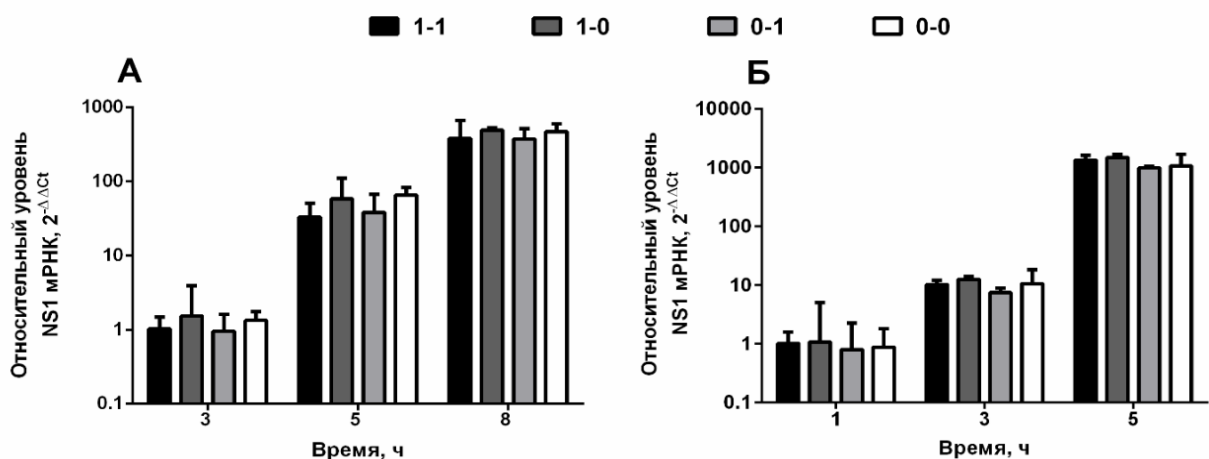


Рисунок 8 – Определение относительного количества мРНК NS1 в клетках A549 (А) и MDCK(Б), зараженных в дозе 1 ТИД₅₀/клетку. На диаграммах представлено количество мРНК NS1, нормированное на мРНК гена GAPDH (относительно уровня мРНК для вируса 1-1 в первой временной точке)

Известно, что наиболее вероятные механизмы, приводящие к изменению экспрессии NEP в зараженных клетках, могут быть связаны с влиянием вторичных структур мРНК гена *NS* на эффективность сплайсинга либо на процесс трансляции NEP мРНК. Для определения эффективности сплайсинга мРНК гена *NS* было рассчитано соотношение между относительными количествами NEP и NS1 мРНК в зараженных клетках, как это было сделано в ранее опубликованной работе [Jiang и др., 2016]. Основываясь на полученных данных, эффективность сплайсинга для всех вирусов составляла около 20% и не изменялась с течением времени (Рисунок 9). Поддержание сплайсинга гена *NS* в диапазоне 10–40% на протяжении всего цикла вирусного заражения было показано ранее [Huang и др., 2017]. Таким образом, поскольку в данной работе не было обнаружено различий между вирусами в эффективности сплайсинга мРНК гена *NS*, предполагается, что влияние вторичной структуры РНК (497–564 н.) области на уровень продукции NEP происходит на уровне трансляции.

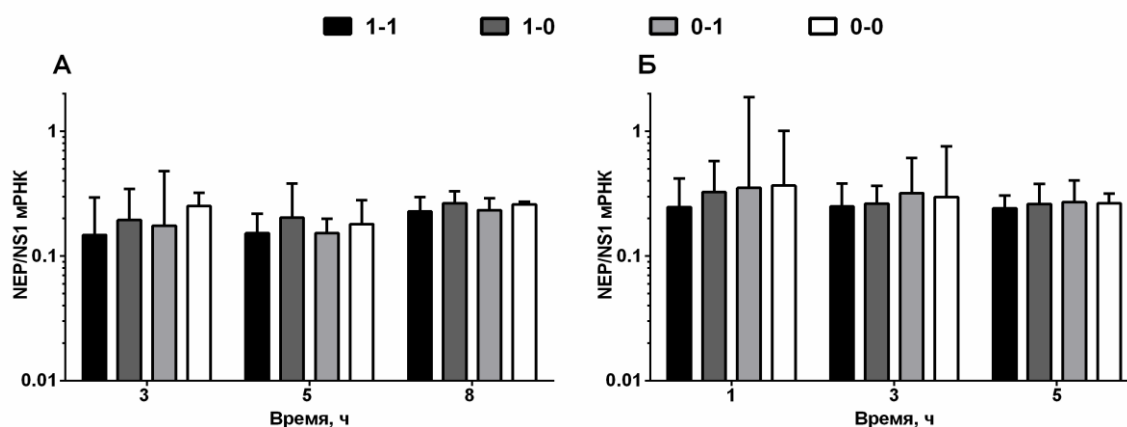


Рисунок 9 – Определение эффективности сплайсинга мРНК гена *NS* в клетках A549 (А) и MDCK (Б), зараженных в дозе 1 ТИД₅₀/клетку. На диаграммах представлено соотношение мРНК NEP к NS1

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что вторичные структуры РНК в (82-148 н.) и (497-564 н.) областях гена *NS* оказывают влияние на продукцию белков NS1 и NEP на уровне трансляции. РНК-шпилька в области (82-148 н.) мРНК гена *NS* усиливает продукцию белка NS1. При отсутствии данной структуры РНК-шпилька в области (497-564 н.) мРНК гена *NS* негативно влияет на экспрессию NEP. Данный эффект наблюдается только на ранних этапах вирусной инфекции и вероятно поэтому не влияет на репродуктивные свойства вирусов в *in vitro* системах (при заражении клеточных культур и РКЭ). Тем не менее, данное исследование было продолжено в условиях *in vivo*, так как активный синтез NS1 в первые часы инфекции ингибирует интерферон-зависимый иммунный ответ и может влиять на тяжесть протекания заболевания *in vivo*.

6. Определение патогенности вирусов для лабораторных животных

Для исследования влияния вторичных структур мРНК гена *NS* на степень патогенности ВГА было предварительно выполнено определение 50%-ной мышинной летальной и инфекционной доз вирусов (ЛД₅₀ и МИД₅₀). Согласно полученным результатам, рассчитанные значения ЛД₅₀ и МИД₅₀ вирусов с учетом стандартных отклонений находились в пределах 0,5 lgТИД₅₀, что сравнимо с погрешностью метода титрования (Таблица 1).

Таблица 1. Летальная и инфекционная активности вирусов в мышах. В таблице приведены значения ЛД₅₀ и МИД₅₀, рассчитанные в единицах измерения lgТИД₅₀ по двум независимым экспериментам

Вирус	50%-ная летальная доза (lgТИД ₅₀)	50%-ная инфекционная доза (lgТИД ₅₀)
1-1	3,43±0,18	1,95±0,50
1-0	3,09±0,65	1,65±1,010
0-1	3,59±1,36	1,12±0,17
0-0	2,68±0,53	1,05±0,21

На следующем этапе было проведено заражение животных в стандартной сублетальной дозе (10 МИД₅₀), рассчитанной для каждого вируса, и на 2, 4 и 6-е сутки после заражения было определено наличие инфекционного вируса в легких методом титрования легочной суспензии в культуре клеток MDCK. Опираясь на полученные результаты, были обнаружены различия между вирусами с различной вторичной структурой мРНК гена *NS* (Рисунок 10). Было установлено, что вирус 0-1 является наименее патогенным для мышей по сравнению с остальными вирусами. Животные, зараженные вирусом 0-1, теряли вес медленнее остальных (Рисунок 10А), на 2-е сутки было зафиксировано различие в инфекционном титре между вирусами 1-1 и 0-1, на 6-е сутки после заражения наблюдалось снижение инфекционного титра данного вируса в легких животных по сравнению с остальными вирусами (Рисунок 10Б).

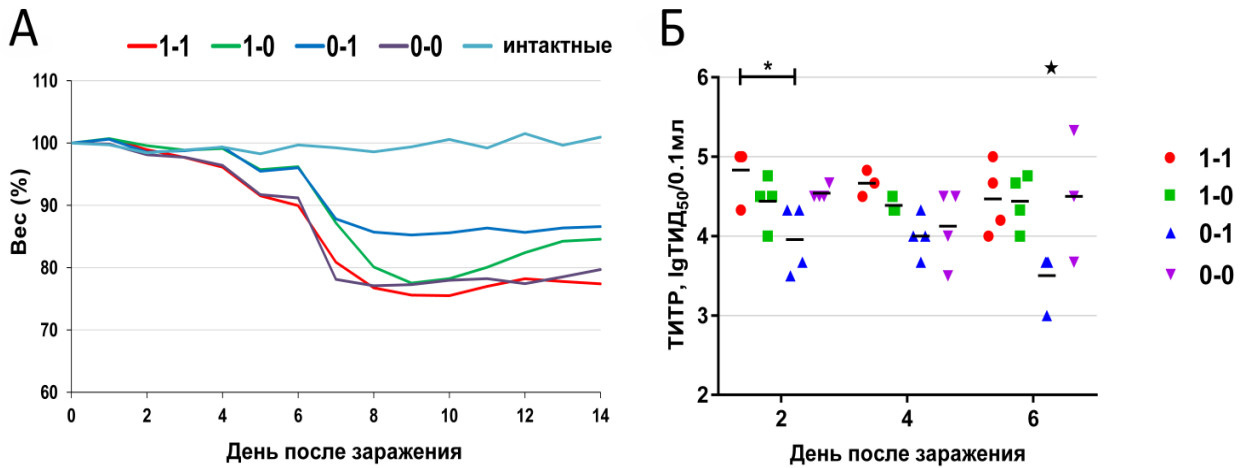


Рисунок 10 – Определение патогенности вирусов с различной вторичной структурой мРНК гена *NS* для мышей. Животные были заражены вирусами 1-1, 1-0, 0-1 и 0-0 в дозе 10 МИД₅₀/животное. **(А)** Динамика изменения веса зараженных мышей относительно первого дня эксперимента. **(Б)** Вирусная нагрузка в легких зараженных животных. * - $p < 0.05$; ★ - $p < 0.05$ (апостериорный критерий Сидака после двухфакторного анализа ANOVA)

Таким образом, было обнаружено, что комбинация вторичных структур мРНК гена *NS* влияет на инфекционную активность вируса в легких зараженных животных. Предполагается, что степень патогенности вируса определяют шпилечные структуры обеих рассматриваемых областей. Отсутствие вторичной структуры РНК в области (82–148 н.) определяет сниженную экспрессию белка NS1, в результате чего происходит нарушение способности вируса противостоять интерферон-зависимому иммунному ответу по сравнению с вирусом 1-1, содержащим вторичные структуры в обеих областях. Результатом образования стабильной вторичной структуры в (497–564 н.) области является сниженная экспрессия белка NEP. Белок NEP используется вирусом в качестве молекулярных часов для контроля оптимальной скорости вирусного цикла, и снижение его продукции может негативно влиять на процесс вирусной репликации [Robb и др., 2009].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено исследование взаимосвязи между вторичной структурой мРНК гена *NS* ВГА и репродуктивными характеристиками вирусов в *in vitro* и *in vivo* условиях с использованием различных молекулярно-биологических и вирусологических подходов.

С помощью ранее проведенного компьютерного анализа вторичной структуры РНК было показано, что штаммы ВГА различаются по вторичной структуре мРНК гена *NS* в (82–148 н.) и (497–564 н.) областях. В данной работе было подтверждено образование ранее

предсказанных структур мРНК гена *NS* в условиях *in vitro*. Методом обратной генетики были получены 4 вируса гриппа А, обладающие комбинацией вторичных структур в областях (82–148 н.) и (497–564 н.) мРНК гена *NS*. После сборки вирусы различались по инфекционной активности: вирус 1-1, обладающий РНК-шпильками в обеих рассматриваемых областях мРНК *NS* гена, имел достоверно более высокие значения титров по сравнению с остальными вирусами. Однако после накопления вирусов в клеточной культуре Vero при оптимальной заражающей дозе, посчитанной для каждого из вирусов, титры не отличались. Проведение полногеномного секвенирования подтвердило присутствие всех внесенных мутаций в сегменте *NS* и идентичность последовательностей остальных геномных сегментов у рекомбинантных вирусов.

Сравнение репродукции полученных вирусов гриппа в чувствительных клетках не показало различий между штаммами как при многоцикловогой инфекции, так и на ранних этапах заражения. Не обнаружено различий между вирусами при инфицировании 10-дневных куриных эмбрионов в различных дозах и условиях заражения.

При определении относительного количества белков *NS1* и *NEP* в зараженных клетках была обнаружена разница между вирусами на ранних этапах инфекции: шпилька в области (82–148 н.) мРНК *NS* гена усиливает продукцию *NS1*; шпилька в области (497–564 н.) при условии отсутствия стабильной структуры в области (82–148 н.) ослабляет эффективную трансляцию *NEP*. Так как область (82–148 н.) входит только в открытую рамку считывания *NS1*, влияние данной вторичной структуры РНК на продукцию *NEP*, вероятно, происходит опосредованно. Поскольку не было выявлено биологически значимых различий между вирусами в уровнях мРНК *NS1* и *NEP* в зараженных клетках, предполагается, что обнаруженное влияние вторичных структур происходит на уровне трансляции *NS1* и *NEP* белков.

Продемонстрировано различие в патогенности полученных вирусов для мышей. Было обнаружено, что вирус 0-1, характеризующийся отсутствием РНК-шпильки в области (82–148 н.) и стабильной шпилькой в области (497–564 н.) мРНК гена *NS*, менее патогенен для лабораторных животных по сравнению с остальными вирусами согласно результатам определения инфекционной активности вируса в легких.

ВЫВОДЫ

1. Предсказанные методами *in silico* нуклеотидные замены в областях (82–148 н.) и (497–564 н.) гена *NS* вируса гриппа А приводят к изменению вторичной структуры РНК *in vitro*.

2. Различия во вторичной структуре мРНК в областях (82–148 н.) и (497–564 н.) гена *NS* не влияют на репродукцию вируса гриппа А в чувствительных клеточных культурах и в развивающихся куриных эмбрионах.
3. Структура шпильки, расположенная в положении (82–148 н.) мРНК гена *NS*, усиливает продукцию белка NS1 на уровне трансляции в чувствительных клетках на ранних этапах вирусного заражения.
4. Комбинация вторичных структур в (82–148 н.) и (497–564 н.) оказывает влияние на трансляцию белка NEP. Образование РНК-шпильки в области (497–564 н.), при условии отсутствия шпилечной структуры в (82–148 н.) области гена *NS*, приводит к снижению уровня продукции белка NEP в чувствительных клетках на ранних этапах заражения.
5. Вирус, характеризующийся отсутствием РНК-шпильки в положении (82–148 н.) и стабильной шпилькой в области (497–564 н.) мРНК гена *NS*, обладает более низкой патогенностью для мышей по сравнению с другими вирусами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях:

1. **Baranovskaya, I.**, Sergeeva, M., Fadeev, A., Kadirova, R., Ivanova, A., Ramsay, E., & Vasin, A. Changes in RNA secondary structure affect NS1 protein expression during early stage influenza virus infection // *Virology journal*. – 2019. – V. 16(1) – P.1–8 (Scopus, Web of Science).
2. **Baranovskaya IL**, Sergeeva MV, Taraskin AS, Lozhkov AA, Vasin AV. Mutations designed to modify the NS gene mRNA secondary structure affect influenza A pathogenicity in vivo // *Microbiology Independent Research journal*. – 2021. – V.8(1) – P.1-9 (eLIBRARY, CAS).

Тезисы конференций:

1. **Baranovskaya I.L**, Petrova A.V, Egorova A.A, Vorobyev E.V, Vasin A.V. RNA secondary structure analyses of the NS segment of influenza A virus // International conference “Trends in Influenza Research” (September 18-20, 2017). Abstract book. Saint Petersburg. – 2017. – P.83–84.
2. **Baranovskaya I.**, Sergeeva M., Brodskaya A., Taraskin A., Vasin A. Conserved RNA secondary structure of the NS segment as a possible additional influenza viral pathogenicity factor // *FEBS OPEN BIO*. – 2018. – V.8. – P.204 (Web of Science).
3. **Baranovskaya I.**, Sergeeva M., Brodskaya A., Taraskin A., Vasin A. Conserved RNA secondary structure of the NS segment may play an important role in the viral life cycle // *Book of Abstracts ISCOMS 2018 (June 4- 8, 2018)*. Groningen. – 2018. –P.522.

4. **Baranovskaya I.,** Sergeeva M., Vasin A. Influenza A virus NS1 protein expression level depends on NS gene RNA secondary structure// FEBS OPEN BIO. – T.9 (S.1). – 2019. – P.162 (Web of Science).
5. **Baranovskaya I.,** Sergeeva M., Vasin A. Stable hairpin secondary structure in NS gene RNA enhances expression of NS1 in influenza infected cells// OPTIONS X for the Control of Influenza abstracts (28 August– September 1st, 2019). Singapore. – 2019. – P.284.
6. **Барановская И.Л.,** Петрова А.В., Цветков В.Б., Клотченко С.А., Васин А.В. Роль вторичной структуры NS геномного сегмента вируса гриппа А в его жизненном цикле // XVIII Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии (27 февраля – 4 марта 2017). Сборник тезисов. Гатчина. –2017. – С.70–71.
7. **Барановская И.Л.,** Бродская А.В., Егорова А.А., Сергеева М.В., Васин А.В. Особенности вторичной структуры мРНК NS-гена вируса гриппа А // XIX Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (17- 22 февраля 2018). Сборник тезисов. Гатчина. – 2018. – С.85–86.
8. **Барановская И. Л.,** Сергеева М. В., Васин А. В. Вторичная структура РНК генного сегмента NS вируса гриппа А влияет на экспрессию рамок считывания NS1/NEP на ранней стадии вирусной инфекции //Материалы XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (25 февраля – 2 марта 2019). Гатчина. – 2019. – С.83–84 (eLIBRARY).
9. **Барановская И. Л.,** Сергеева М. В., Васин А. В. Репродуктивные свойства вирусов гриппа А с различной вторичной структурой РНК гена NS в живых системах // XXI Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии (24- 29 февраля 2020). Тезисы докладов Молодежной конференции. Гатчина. – 2020. – С.16–17 (eLIBRARY).

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает особую благодарность своему научному руководителю, доктору биологических наук, доценту **Васину Андрею Владимировичу**, за предложенную интересную тему и внимательное отношение на всех этапах исследования. Автор искренне благодарит к.б.н. **Сергееву Марию Валерьевну** за переданный бесценный опыт в проведении и планировании вирусологических экспериментов. Автор выражает глубокую признательность к.м.н. **Стуковой Марине Анатольевне** за оказанную поддержку в реализации данного исследования. Автор благодарит всех, кто оказал помощь при выполнении работы: **А.Л. Черезову, Я.А. Забродскую, Е.А. Романовскую-Романько, А.А. Ложкова, А.С. Тараскина, К.А. Васильева, А.Е. Шмидт, Э. С. Рэмзи, А.В. Фадеева, А.А. Иванову, В.В. Егорова и Е. Воробьева.**