

**Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого
Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций**

На правах рукописи

Барановская Ирина Леонидовна

Роль вторичной структуры NS-сегмента в жизненном цикле вируса гриппа А

Направление подготовки 03.06.01 Физика и астрономия

Код и наименование

Направленность 03.06.01_12 Биофизика

Код и наименование

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно-квалификационной работы (диссертации)

Научный руководитель:
доцент, доктор биологических наук,
Васин Андрей Владимирович

Санкт Петербург – 2020

Научно-квалификационная работа выполнена в Высшей инженерно-физической школе Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», а также на базе лаборатории системной вирусологии, отдела молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Директор ВШ/Зав.каф.:

Журихина Валентина Владимировна,
доктор физико-математических наук,
профессор Высшей инженерно-
физической школы

Научный руководитель:

Васин Андрей Владимирович,
доктор биологических наук, доцент,
профессор Высшей школы
биомедицинских систем и технологий

Рецензент:

Стукова Марина Анатольевна,
кандидат медицинских наук,
заведующая лабораторией векторных
вакцин, ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.
Смородинцева» Минздрава РФ

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Вирус гриппа А (ВГА) представляет собой серьезную угрозу для общественного здравоохранения, несмотря на достигнутый прогресс в разработке вакцин, терапевтических препаратов и диагностики. По причине высокой скорости накопления мутаций и свойства реассортации ВГА способен обходить существующий в популяции иммунитет, вызывая сезонные эпидемии и пандемии.

Вирусные белки на сегодняшний день рассматриваются как ключевые детерминанты патогенности, так как они определяют репродуктивные свойства вируса и его способность избегать распознавание иммунной системой. Вследствие этого, белки являются главной мишенью противовирусной терапии, однако из-за быстрой эволюционной изменчивости вирус способен приобретать резистентность к применяемым препаратам [2]. Таким образом, противовирусная терапия, направленная на ингибирование вирусных белков, эффективна лишь в течение ограниченного периода времени, и в условиях постоянной угрозы возникновения новых штаммов ВГА существует особая потребность в поиске новых терапевтических мишеней.

В настоящее время вирусная РНК и её консервативные структурные элементы являются одним из перспективных объектов для создания противовирусных препаратов, имеющих потенциал обойти проблему резистентности [13, 15]. Также была предложена идея конструировать аттенуированные вирусы гриппа с мутациями в важных структурных элементах РНК, которые впоследствии могут быть использованы в качестве кандидатов для разработки вакцины [10].

Ранее проведенные исследования вторичной структуры мРНК гена NS вируса гриппа выявили различия в их стабильности у различных штаммов ВГА, в том числе у высоковирулентного вируса A/Brevig Mission/1/1918 (H1N1) и вирусов гриппа птиц A(H5N1) [6, 18]. Предполагается, что вторичные структуры мРНК гена NS влияют на уровень экспрессии белка NS1, который является антагонистом интерферонового ответа клетки и может давать вклад в степень патогенности вируса [12]. В связи с этим, актуальной является задача анализа областей гена NS с консервативной вторичной структурой РНК и исследования их роли в жизнедеятельности вируса и степени патогенности.

Степень разработанности темы исследования

Существенный вклад в определение вторичной структуры мРНК гена NS различных штаммов ВГА методами *in silico*, а также их экспериментальное подтверждение в условиях *in vitro* внесли ранее опубликованные исследования [5, 9, 14, 16, 18]. Согласно опубликованным данным, для (+)-РНК гена NS характерно образование стабильных вторичных структур РНК в двух областях: (82-148 н.) и (497-564 н), локализованных вблизи 5'- и 3'- сайтов сплайсинга.

Первая область (82-148 н.) мРНК гена NS образует структуры: «stem-loop» (шпильку) либо «multibranch» у различных штаммов ВГА [9, 16]. Ранее под руководством Alexander M. Schneider было показано, что введение небольших делеций, направленных на разрушение вторичной структуры в данной области, негативно влияет на уровень экспрессии белка NS1 в условиях *in vitro* с помощью трансфекции клеток плазмидной ДНК [9].

Вторая область у большинства штаммов образует две близкие по энергии вторичные структуры шпильки и псевдоузла [4, 6]. Ранее было показано, что баланс между данными структурами смещен в сторону образования более стабильной шпильки у высокопатогенных птичьих вирусов гриппа А подтипа H5N1, появившихся после 2001 года по причине возникновения мутации G563C [6]. Однако в исследовании под руководством Douglas Turner с помощью конструирования вирусов гриппа было продемонстрировано, что нуклеотидные замены, направленные на смещение баланса в сторону образования РНК-шпильки в данной области, приводят к уменьшению эффективности сплайсинга мРНК и аттенуации вирусной инфекции в клеточных культурах, в то же время введение компенсаторных мутаций полностью восстанавливает свойства репликации вируса [10].

Несмотря на то, что результаты ранее проведенных исследований отражают перспективность данного направления, они охватывают изучение роли только одной из двух образующих вторичные структуры областей мРНК гена NS, не учитывая возможный вклад их комбинации. Кроме того, количество работ, в которых проводилось исследование вторичной структуры мРНК гена NS с помощью конструирования вирусов, весьма ограничено. Стоит также отметить, что в ранее опубликованных трудах не исследовалось влияние вторичных структур NS мРНК на патогенность вирусов для лабораторных животных. Исследование вторичной структуры NS гена и её влияния на экспрессию белка NS1 на модели сборки вируса было проведено в рамках данной работы.

Цели и задачи

Цель исследования состояла в определении возможного вклада вторичной структуры (+) РНК геномного сегмента NS вируса гриппа А в степень его патогенности и жизнеспособности.

Для реализации данной цели были поставлены следующие *задачи*:

1. Соотнести результаты анализа вторичных структур мРНК гена NS *in silico* с их формированием в условиях *in vitro*.
2. С помощью метода обратной генетики получить рекомбинантные варианты штамма A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), различающиеся вторичными структурами мРНК сегмента NS.
3. Сравнить репродуктивные свойства полученных вирусов в клеточных культурах при различных условиях заражения.
4. Определить эффективность экспрессии NS1 вирусного белка при инфицировании полученными вирусами чувствительных культур клеток.
5. Оценить патогенность полученных вирусов для лабораторных животных.

Научная новизна

В настоящей работе с помощью метода обратной генетики впервые были получены и охарактеризованы вирусы гриппа, содержащие различные комбинации вторичных структур в (82-148) и (497-564) областях мРНК гена NS. Впервые на модели собранных вирусов было продемонстрировано влияние вторичной структуры в области (82-148) мРНК гена NS на экспрессию белка NS1. Впервые было оценено влияние вторичных структур мРНК гена NS на патогенность вирусов для лабораторных животных.

Теоретическая и практическая значимость

Значимость выполненной работы определяется важностью установления дополнительных данных о влиянии консервативных участков вторичной структуры РНК вируса гриппа на его жизнедеятельность и патогенность для возможного использования данных структур в качестве мишени для разработки противовирусной терапии. В работе была проведена всесторонняя оценка молекулярно-биологических и репликативных свойств ВГА, обладающих характерной для высокопатогенных штаммов шпилечной структурой РНК в областях (82-148 н.) и (497-564 н.) мРНК гена NS. Продемонстрировано влияние вторичной структуры (82-148 н.) мРНК гена NS вируса гриппа А на экспрессию белка NS1 на ранних этапах инфекции. Была проверена гипотеза о взаимосвязи

между вторичной структурой РНК геномного сегмента NS и степенью патогенности ВГА.

Методология и методы исследования

Для оценки возможного вклада вторичных РНК в репродуктивные свойства и особенности вируса гриппа А применялись молекулярно-биологические, молекулярно-генетические и вирусологические подходы, а именно: выделение нуклеиновых кислот, полимеразная цепная реакция в реальном времени, электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном/полиакриламидном геле, трансформация и селекция бактерий, сайт-направленный мутагенез, секвенирование нуклеиновых кислот по Сенгеру, *in vitro* транскрипция, культивирование клеток, конструирование вирусов методом обратной генетики, определение инфекционной активности вирусов в клеточных культурах и в 10-дневных куриных эмбрионах, секвенирование нового поколения, экспериментальное заражение лабораторных животных, иммуноферментный анализ, электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле. Компьютерный анализ вторичных структур проводили с помощью программы «RNAfold» [3].

Представление научного доклада: основные положения

1. Сконструированные вирусы гриппа А, обладающие различными комбинациями вторичных структур в областях (82-148) и (497-564) мРНК мРНК гена NS, не различаются по репродукции при заражении клеточных культур (Vero, MDCK, A549) как в первом цикле заражения, так и при многоцикловогой инфекции.
2. Сконструированные вирусы гриппа А, обладающие РНК-шпилькой в области (82-148 н.), характеризуются более высоким уровнем экспрессии NS1 в первые часы инфекции по сравнению с вирусами с менее компактной вторичной структурой при заражении клеточных культур (MDCK, A549).
3. Сконструированный вирус гриппа А, характеризующийся отсутствием РНК-шпильки в (82-148) -положении и стабильной шпилькой в области (497-564) мРНК NS-гена, обладает более низкой патогенностью для мышей по сравнению с другими вирусами.

Апробация работы

Материалы исследования доложены 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 школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 2019), на Международной конгрессе «The 44rd FEBS CONGRESS» (Краков, 2019) и XXI Зимней молодежной школе по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 2020).

Публикации

По теме исследования опубликовано 10 печатных работ, в том числе 3 публикации в журналах, рекомендованных ВАК.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-74-00130 «Роль вторичной структуры РНК геномного сегмента NS вируса гриппа А в его жизнеспособности и патогенности».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Клеточные линии. Клеточную культуру МДСК (#FR-58, International Reagent Resource) выращивали в среде AlphaMEM (Биолот) с 2mM-глутамином и 10% эмбриональной сыворотки (FBS) (SC-biol, Биолот); клетки A549 (получены из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» МЗ РФ) культивировали в питательной среде DMEM/F12 (Gibco) с добавлением 2% GlutaMAX (Gibco) и 10% FBS (Gibco); клетки Vero (ATCC, #CCL-81) культивировали в в бессывороточной среде OptiPro SFM(Gibco), содержащей с 4 mM L-глутамина (Gibco).

Лабораторные животные. В работе использовались самки мышей линий BALB/c, массой 17-20 грамм, в возрасте 6-8 недель. Все исследования были проведены согласно "Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных" (приказ № 266 МЗ РФ от 19.06.2003).

Анализ вторичной структуры РНК вируса гриппа А. Последовательности NS мРНК вируса гриппа А были получены из баз данных «NCBI Influenza Virus Resource» [1]. Анализ *in silico* вторичных структур РНК проводился с помощью онлайн-ресурса «RNAfold» [3], опираясь на ранее полученные результаты [18].

Сайт-направленный мутагенез проводили согласно ранее описанному подходу [20]. В плазмиду рНW2006-PR8-NS, кодирующую сегмент NS вируса A/PR/8/34 (H1N1), последовательно в области (82-148 н.) и (497-564 н.) были внесены мутации, обеспечивающие сходство последовательности с указанными вирусами и имеющие характерную для данных вирусов вторичную структуру NS мРНК. Полученные клоны анализировались с помощью секвенирования по Сенгеру.

Исследование вторичных структур РНК в условиях *in vitro*. Методом ПЦР с плазмиды рНW-PR8-NS были амплифицированы целевые ДНК-фрагменты, соответствующие (82-148) и (497-564) областям NS гена, с добавлением T7-промотора на 5'-конце. Синтез РНК проводился с помощью набора для *in vitro* транскрипции (Promega). После обработки ДНКазой (Promega) и переосаждения в изопропанол, осуществляли фолдинг РНК согласно ранее опубликованному протоколу [14]. Исследование вторичной структуры проводили методом электрофоретического разделения в полиакриламидном геле в нативных (12%-ПААГ) и денатурирующих условиях (12.5% ПААГ/8М мочевины) с последующим окрашиванием нитратом серебра.

Определение вирусных мРНК методом количественной ПЦР. Клетки A549 и MDCK в 12-луночных планшетах заражали вирусами в дозе 1 ТИД50/клетку в биологических повторах для каждого вируса и через 1, 3, 5 часов (для MDCK) и 3, 5, 8 часов (для A549) после заражения выделяли фракцию тотальной РНК набором RNeasy Mini Kit (Qiagen). Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью обратной транскриптазы M-MLV (Promega) и Олиго(dT)16 праймеров. Для постановки количественной ОТ-ПЦР использовали набор реагентов БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (Биолабмикс), праймеры к NS1 (F-qNS1: TACCTAACTGACATGACTCTTGAG, R-NS1: TCGCCTGGTCCATTCTGATAC), к NEP (F-qNEP: GTCAAGCTTTCAGGACATAC, R-qNEP: CGAACTGTGTTATCATTCC) и праймеры к GAPDH, опубликованные ранее [10]. Реакцию количественной ПЦР проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad). Относительное количество мРНК определяли методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Конструирование вирусов методом обратной генетики. В работе использовали плазмиды рНW2006 на основе вектора A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (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 pHW-PR8-NS с точечными мутациями, изменяющими вторичную структуру (+)-РНК генного сегмента NS. Клетки Vero трансфецировали методом электропорации с помощью прибора Nucleofector II (Amaha/Lonza) и реагентов Nucleofector Kit V (Lonza), согласно протоколу производителя. Вирусы собирали из супернатанта через 48 часов после трансфекции. Определение инфекционной активности собранных вирусов проводили с помощью титрования в клетках Vero. Рабочий банк вирусов (пассаж V1) получали заражением клеток Vero в дозе $moi = 0,01$ ТИД50/клетку, одинаковой для всех штаммов. Геномные последовательности полученных вирусов были проверены с помощью секвенирования нового поколения (NGS) по протоколу [21] с использованием набора реагентов Nextera XT (Illumina) и секвенатора Illumina MiSeq.

Определение инфекционной активности вирусов проводили методом титрования. 10-кратными разведениями вирусосодержащих образцов заражали клетки в лунках 96-луночных планшетов. Учет развития инфекции проводили в реакции гемагглютинации (РГА) с 0.5% суспензией куриных эритроцитов, расчет 50%-ной инфекционной дозы выполняли методом Рида–Менча [17]. Инфекционную активность выражали в логарифмах 50%-ной тканевой инфекционной дозы (lg ТИД50/0.1мл).

Заражение клеточных культур. Монослой клеточной культуры промывали 2 раза стерильным раствором Дальбекко DPBS (Биолот). Заражение проводили в бессывороточной среде с добавлением 1% антибиотика-антимикотика (Gibco) в ТРСК-трипсина (Sigma) в концентрации 1 мкг/мл для MDCK и 0.5 мкг/мл для A549 или Vero.

Заражение лабораторных животных. Мышей инфицировали, вводя интраназально 50 мкл разведения вируса в PBS под легкой эфирной анестезией. После инфицирования проводили ежедневный мониторинг животных: взвешивание и подсчет летальности.

Определение специфических антител к вирусу гриппа в сыворотке крови проводили на 21 день после заражения в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием куриных эритроцитов.

Репродукцию вируса в дыхательных путях животных определяли на 2, 4, 6 день после заражения, для чего 4-х мышей из каждой группы подвергали эвтаназии и извлекали органы, из которых готовили 10%-ую суспензию в DPBS.

Осветленную центрифугированием суспензию использовали для определения инфекционного вируса титрованием в культуре клеток MDCK.

Определение вирусного белка NS1 в зараженных клетках методом ИФА. Суточный монослой клеток MDCK и A549 в 48-луночных планшетах заражали в дозе $moi=10$ ТИД50/клетку в двух биологических повторах для каждого вируса и через 0, 2, 4, 6, 8 или 12 часов фиксировали 80%-ацетоном. Уровень белка NS1 в зараженных клетках оценивали методом ИФА по стандартному протоколу с использованием 5% сухого молока для блокировки, полученной ранее высокотитражной мышинной антисыворотки к белку NS1 и меченого пероксидазой хрена конъюгата к мышинным IgG Goat Anti-Mouse IgG (H+L)- HRP Conjugate (Bio-Rad). Проявление осуществляли добавлением субстрата TMB Peroxidase EIA Substrate (Bio-Rad), после чего останавливали реакцию добавлением 2N H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли с помощью прибора CLARIOstar multifunctional reader (BMG Labtech).

Статистическая обработка данных. Статистический анализ проводили с использованием программы GraphPad Prism 6.01. Для оценки различий в инфекционной активности вирусов выполняли однофакторный дисперсионный анализ с применением апостериорного критерия Тьюки. Для оценки значимости различий между вирусами в определенные моменты времени использовали двусторонний дисперсионный анализ ANOVA с последующим применением апостериорных критериев Сидака либо Тьюки. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

1. Анализ вторичной структуры мРНК гена NS ВГА

В ранее опубликованных работах было показано, что штаммы ВГА характеризуются образованием различных вторичных структур в областях (82-148 н.) и (497-564н.) вблизи 5'- 3'- сайтов сплайсинга NS мРНК [6, 18]. Чтобы выяснить, действительно ли вторичные структуры мРНК гена NS могут вносить вклад в патогенность вируса, были выбраны последовательности вирусов, характеризующиеся различной вторичной структурой (+) РНК в данных регионах, которые различаются минимальным количеством не синонимичных замен (рис. 1). В качестве образующих шпильки в областях (82–148) и (497–564) были выбраны последовательности штаммов патогенных вирусов гриппа A/Brevig Mission/1/1918 (H1N1) и A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) соответственно. Далее были выбраны мутации, изменяющие структуру шпилек на менее компактную. Для

области (82-148) - это две синонимичные мутации G123A и A132G в открытой рамке считывания (ORF) белка NS1, что соответствует последовательности вируса A/England/10/67 (H2N2). Для региона (497-564) - это 3 нуклеотидные замены (G511A, G512A и C537G), из которых одна не синонимична в NS1 ORF (G166N) и две - в NEP ORF (V14M и A22G), что соответствует последовательности вируса A/Albany/4836/1950 (H1N1).

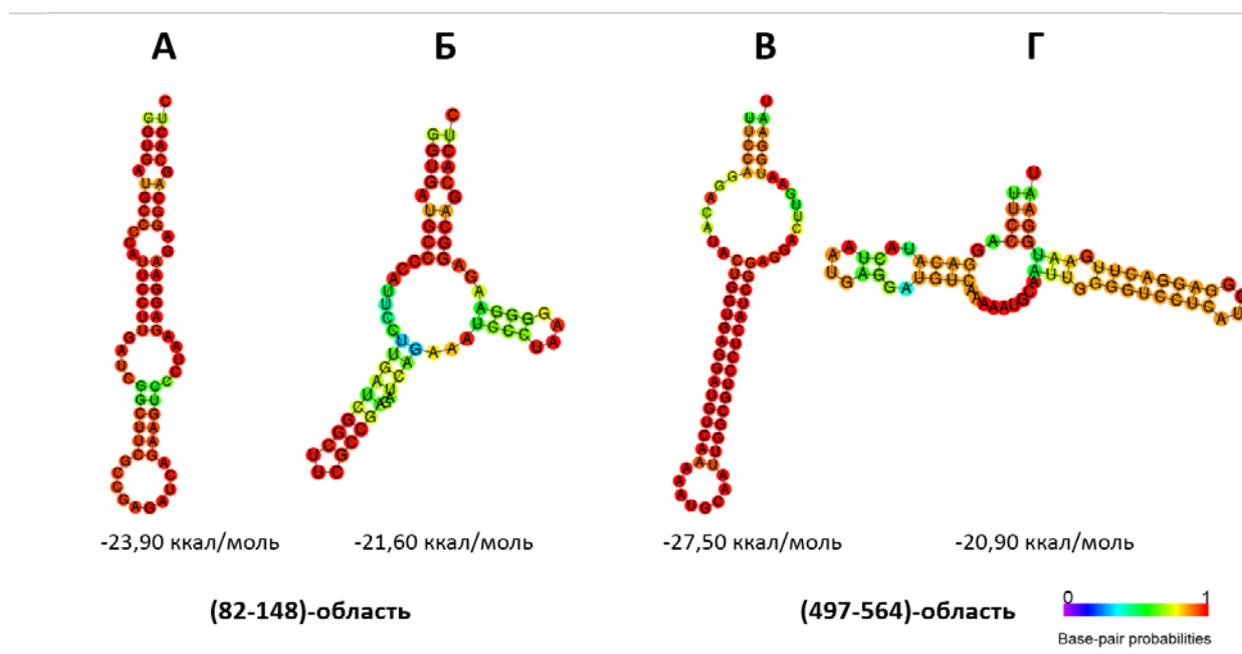


Рисунок 1. Построение вторичных структур участков 82-148 и 497-564 мРНК гена NS в программе RNAfold. А - структура шпильки, соответствующая (82-148) последовательности вирулентного штамма A/Brevig Mission/1/1918 (H1N1); Б - альтернативная структура (82-148) - области, содержащая замены G123A и A132G; В - структура шпильки, соответствующая (497-564) последовательности вирулентного штамма A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) (шпилька), Д - альтернативная структура (497-564) - области, содержащая замены G511A, G512A и C537G.

Методом сайт-направленного мутагенеза в плазмиду рНW2006, кодирующую сегмент NS вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) были внесены точечные мутации, обеспечивающие сходство последовательности с указанными вирусами и характерную для них вторичную структуру в (82-148) и (497-564) - областях РНК. Таким образом, был получен набор плазмид рНW-PR8-NS, несущих комбинацию мутаций в первой и во второй области NS: 1-1 (структура «stem-loop» в обеих областях); 1-0 (структура «stem-loop» в первой области); 0-1 (структура «stem-loop» во второй области); 0-0 (не содержит структур «stem-loop»).

Далее было подтверждено, что внесенные нуклеотидные замены обеспечивают различия в формировании вторичных структур в соответствующих участках вирусной РНК. Методом транскрипции *in vitro* были синтезированы РНК фрагменты (82-148 н.) и (497-564 н.) вирусной NS мРНК и определена их электрофоретическая подвижность в нативных и денатурирующих условиях с помощью ПААГ-электрофореза. Как и ожидалось, образцы с предполагаемой шпилькой имели более высокую электрофоретическую подвижность в нативных условиях, что свидетельствует об образовании более компактной структуры (рис. 2А). В денатурирующих условиях электрофоретическая подвижность исследуемых образцов совпадала (рис.2Б).

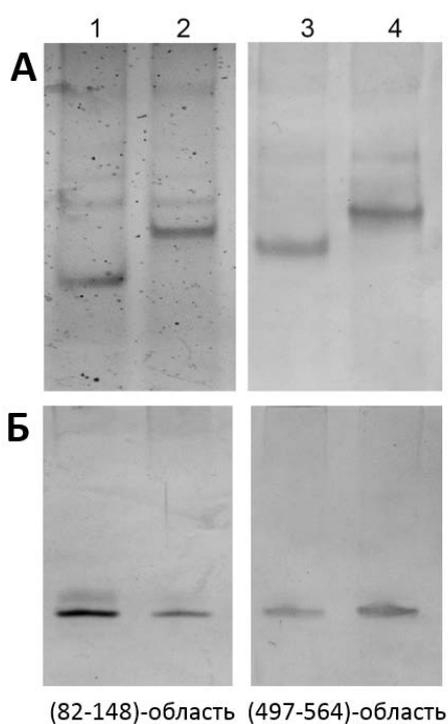


Рисунок 2. Электрофоретическая подвижность РНК-фрагментов мРНК гена NS в нативных(А) и денатурирующих (Б) условиях. Дорожка 1 - фрагмент (82- 148), образующий шпильку, дорожка 2 – фрагмент (82-148) образующий и менее компактную структуру. Дорожка 3- фрагмент (497-564), образующий шпильку, дорожка 4 – фрагмент (497-564) образующий менее компактную структуру.

2. Сборка вирусов ВГА и определение инфекционной активности

Методом обратной генетики были получены 4 варианта лабораторного вируса A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), характеризующиеся комбинацией вторичных структур мРНК гена NS. Используемый метод заключается в трансфекции клеточной культуры системой из 8 плазмид, каждая из которых кодирует

соответствующий геномный сегмент вируса гриппа. При проникновении всех плазмид в клетку происходит синтез вирусных РНК и дальнейшая самосборка вирусных частиц [7].

Сконструированные вирусы были обозначены в соответствии с наличием (1) или отсутствием (0) структуры РНК-шпильки в первой (82-148 н.) и второй (497-564 н.) области мРНК гена NS: «1-1», «1-0», «0-1» и «0-0».

Согласно результатам определения инфекционной активности, вирус «1-1», содержащий шпилечные структуры в обеих областях NS, имел значительно более высокие значения титров по сравнению с другими вирусами через 48 часов после трансфекции (рис. 3). Полученный результат был подтвержден в двух независимых экспериментах и свидетельствует о том, что вирусы с различной вторичной структурой мРНК гена NS имеют разную эффективность сборки.

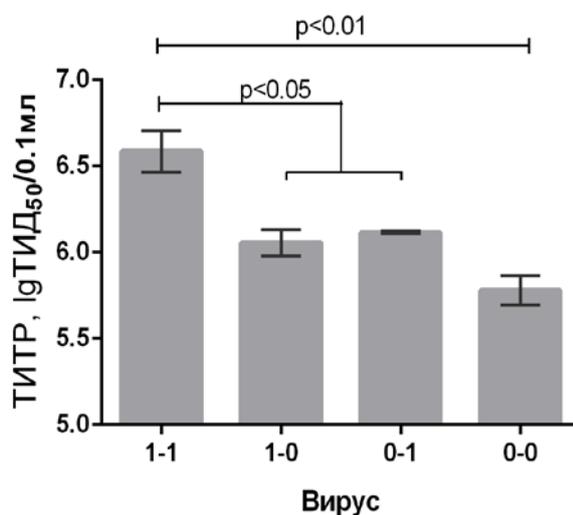


Рисунок 3. Инфекционная активность вирусов через 48 ч после трансфекции. На диаграмме представлены средние значения \pm стандартные отклонения ($n=3$ в двух независимых экспериментах). Для сравнения вирусов использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, и апостериорный критерий Тьюкки.

На следующем этапе работы было выполнено заражение клеток Vero в одинаковой инфекционной дозе для каждого вируса для получения рабочего банка (V1) и проведено секвенирование нового поколения вирусных образцов (NGS), которое подтвердило присутствие всех внесенных мутаций в гене NS и отсутствие нежелательных замен во всех остальных геномных сегментах у собранных вирусов. Сравнение инфекционной активности вирусов в рабочем банке осуществляли методом титрования в различных клеточных культурах: Vero (ATCC #CCL-81), MDCK (IRR #FR-58), A549 (ATCC #CCL-185), СК (первичная

культура почки цыпленка, любезно предоставленная сотрудником ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России Васильевым К.А), и в 10-дневных куриных эмбрионах. Статистически значимых различий между вирусами не было обнаружено, что указывает на одинаковое количество вирионов каждого вируса в полученном банке (табл. 1).

Таблица 1. Инфекционная активность вирусов в различных системах культивирования.

В таблице даны средние значения по результатам независимых титрований (не менее 3) и стандартные отклонения.

Система культивирования	Инфекционная активность вирусов (lgТИД50/мл или lgЭИД50/мл)			
	1-1	1-0	0-1	0-0
A549	7,4±0,55	7,78±0,69	7,94±0,59	7,91±0,64
MDCK	9,44±0,1	9,89±0,18	9,17±0,29	9,19±0,5
Vero	8,78±0,19	8,56±0,10	8,72±0,25	8,81±0,34
СК	7,55±0,11	7,95±0,48	7,56±0,10	7,56±0,10
РКЭ	9,89±0,97	9,47±0,42	9,22±0,29	9,53±0,29

3. Репродуктивные свойства вирусов в клеточных культурах

Изучение репродукции собранных вирусов при многоцикловой инфекции было выполнено с помощью построения кривых роста вирусов в клеточных культурах A549, MDCK и Vero (рис. 4). Клетки были заражены в низкой инфекционной дозе $moi = 0,001$ ТИД50/клетку в трех биологических повторах для каждого вируса и в течение последующих 72 часов из культуральной жидкости отбирали небольшие объемы вирусосодержащих образцов для дальнейшего анализа количества вирусных частиц методом титрования в клетках MDCK. Полученные результаты не продемонстрировали различий между штаммами и соответственно показали отсутствие зависимости репродукции от типа вторичных структур мРНК мРНК гена NS. Тем не менее, было обнаружено, что инфекция данных вирусов в клетках A549 развивалась медленнее, на что указывают более низкие значения титров на временной точке 24 часа (рис.4А).

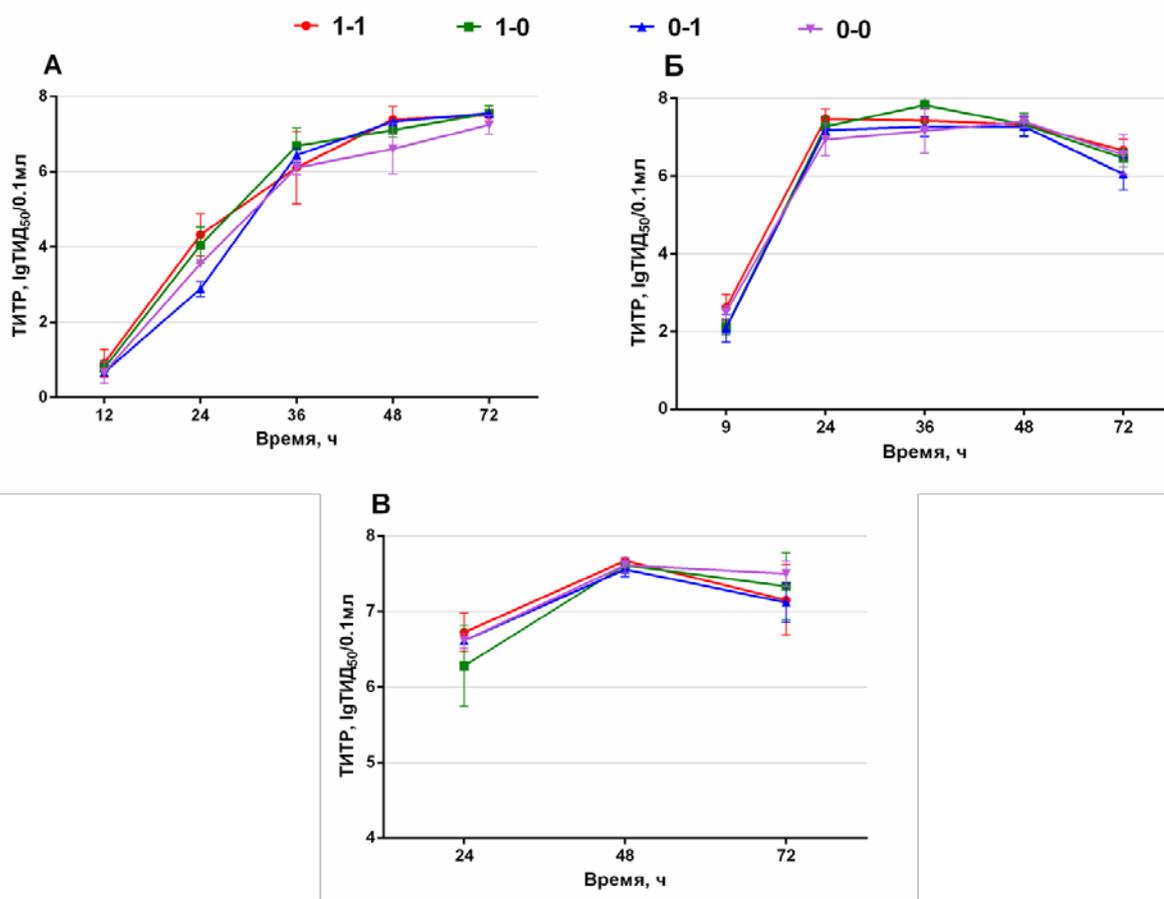


Рисунок 4. Динамика репродукции вирусов с различной вторичной структурой NS-мРНК в клеточных культурах при многоцикловой инфекции. Суточный монослой клеток A549 (А), MDCK (Б) и Vero (В) заражали в дозе $moi = 0,001$ ТИД₅₀/клетку в трех независимых повторах для каждого вируса

Поскольку собранные вирусы отличались друг от друга по инфекционной активности через 48 часов после трансфекции (рис. 3), было принято решение продолжить данное исследование в первом цикле вирусного заражения. Культуры клеток (A549, MDCK и Vero) заражали в дозе $moi = 0.1$ или 1.0 ТИД₅₀/клетку в трех биологических повторах для каждого вируса и через 3, 6, 9 и 12 часов после заражения отбирали образцы культуральной среды для последующего анализа количества вирусных частиц методом титрования в клетках MDCK. Однако даже в приведенных условиях, различий в скоростях репродукции вирусов не удалось обнаружить (рис. 5).

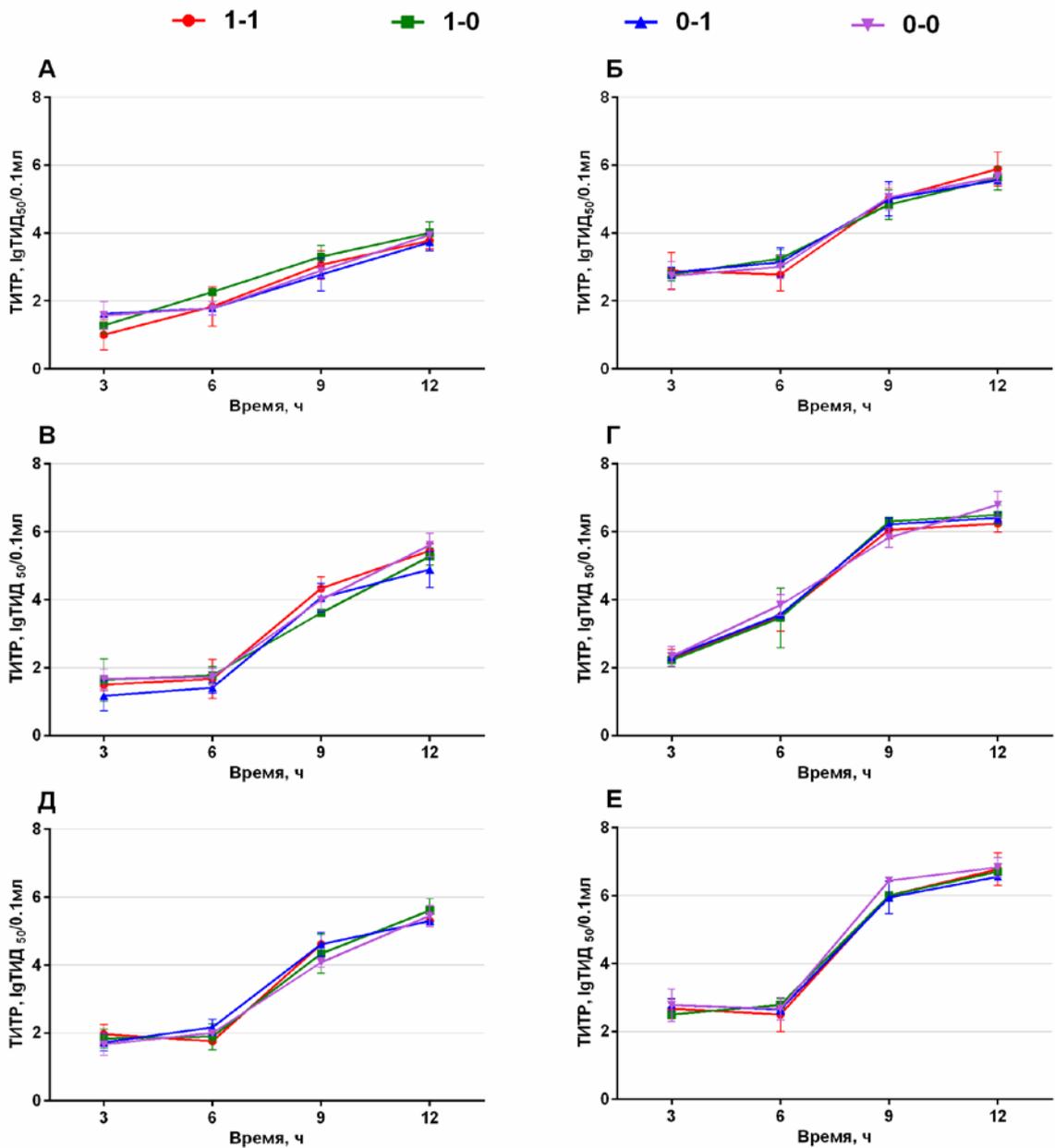


Рисунок 5. Динамика репродукции вирусов с различной вторичной структурой NS-мРНК в клеточных культурах на ранних циклах инфекции. Суточный монослой клеток A549 (А, Б), MDCK (В, Г) и Vero (Д, Е) заражали в дозе $moi = 0,1$ и 1 ТИД₅₀/клетку соответственно. Результаты представлены в трех независимых повторах для каждого вируса

Чтобы выяснить, влияет ли структура РНК мРНК гена NS на экспрессию белка NS1, был проведен сравнительный анализ относительного количества белка NS1 в заражённых клетках на ранней стадии инфекции методом ИФА (рис.6). Было обнаружено, что уровень NS1 достоверно выше в клетках инфицированных вирусами 1-1 и 1-0: через 6-12 часов после заражения клеток A549 (рис. 6А) и через 6 часов после заражения клеток MDCK (рис. 6Б). Вирусы 1-1 и 1-0 характеризуются «stem-loop» структурой в первой области NS, в то же время

вторичная структура второй области мРНК NS гена не оказывала влияния на уровень белка NS1. Важно отметить, что наблюдаемая разница в экспрессии NS1 между вирусами характерна для ранних этапов заражения и нивелируется на поздних часах инфекции. Полученные результаты полностью согласуются с ранее опубликованной работой, в которой было показано, что введение мутаций/делеций, направленных на разрушение вторичной структуры в данной области, приводит к уменьшению экспрессии NS1 в условиях *in vitro* [9].

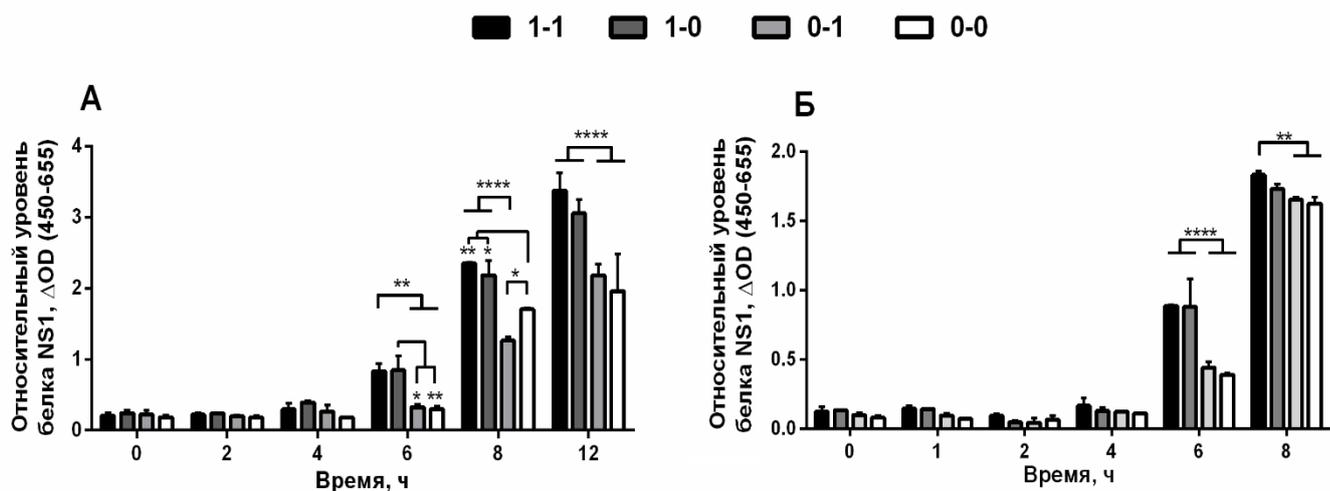


Рисунок 6. Динамика накопления белка NS1 при заражении клеток A549 (А) и MDCK (Б) вирусами с различной вторичной структурой мРНК гена NS. Суточный монослой клеток заражали в дозе $moi=10$ ТИД50/клетку. Количество белка NS1 в фиксированных клетках оценивали методом иммуноферментного анализа. Сравнение проводили методом многофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюкки (**** $p < 0,00001$, *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,01$).

Для того, чтобы установить, на каком этапе экспрессии NS1 вторичные структуры РНК оказывают влияние, было выполнено сравнение динамики накопления мРНК NS1 (рис. 7) и эффективности сплайсинга NS1/NEP (рис. 8) в клетках MDCK и A549 в первые часы после инфицирования с помощью количественной ОТ-ПЦР. Согласно полученным результатам, не было обнаружено биологически значимых различий в уровнях мРНК NS1 между вирусами (рис.7). Стоит также отметить, что наблюдалось более быстрое накопление вирусной РНК в клетках MDCK по сравнению с клетками A549, что согласуется с полученными в данной работе результатами репродукции вирусов в данных клеточных культурах (рис. 4).

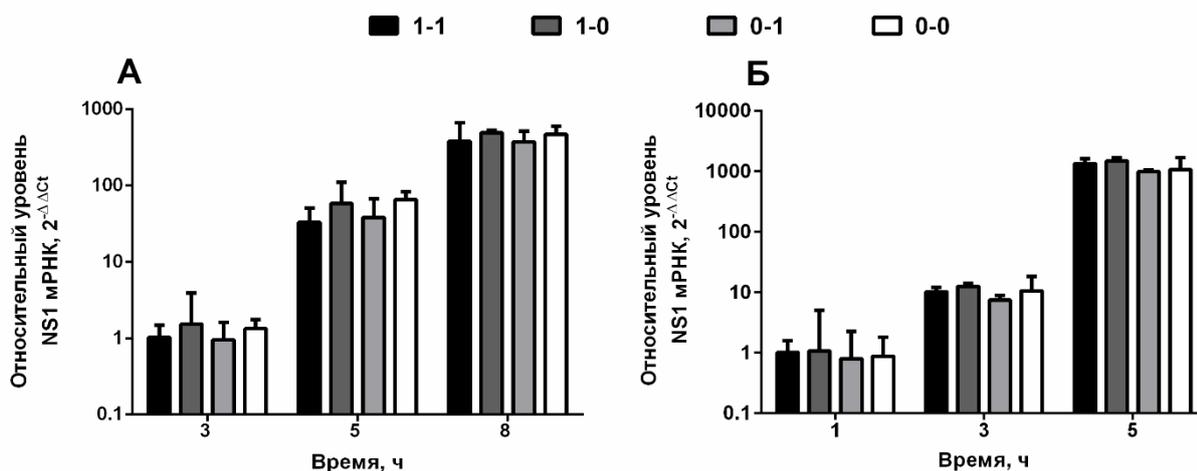


Рисунок 7. Динамика относительного уровня мРНК NS1 при заражении клеток A549 (А) и MDCK(Б) вирусами с различной вторичной структурой мРНК гена NS. Суточный монослой клеток заражали в дозе $moi=1$ ТИД50/клетку. На диаграммах представлено количество мРНК NS1, нормированное на мРНК гена GAPDH (относительно уровня мРНК, для вируса 1-1 в первой временной точке), показано среднее геометрическое трех биологических повторов и 95% доверительный интервал.

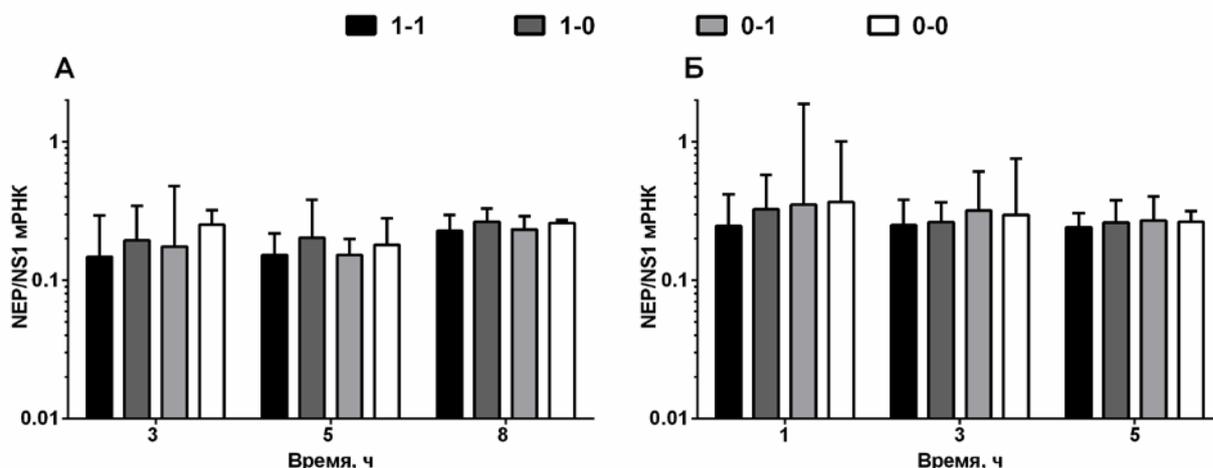


Рисунок 8. Динамика относительного уровня мРНК NEP/NS1 при заражении клеток A549 (А) и MDCK(Б) вирусами с различной вторичной структурой мРНК гена NS в дозе $moi = 1$ ТИД50/клетку. На диаграммах представлено соотношение мРНК NEP к NS1, показано среднее геометрическое трех биологических повторов и 95% доверительный интервал.

Эффективность сплайсинга мРНК NS1 определялась по соотношению мРНК NEP / NS1, которое для всех вирусов составляло около 20 -40% и не изменялось с течением времени, как это было показано в ранее опубликованном исследовании [8]. С другой стороны, в научной работе (Jiang T. et al.) было продемонстрировано влияние вторичной структуры второй области на эффективность сплайсинга с помощью сборки вирусов: введение мутаций, направленных на стабилизацию

вторичной структуры РНК в области (497-564н.) приводило к нарушению процесса сплайсинга и, следовательно, к уменьшению уровня NEP мРНК. Тем не менее, в данной работе мы не наблюдали влияния вторичных структур ни на транскрипцию, ни на сплайсинг мРНК NS1. Важно отметить, что согласно литературным данным, применение количественной ОТ-ПЦР для амплификации вирусных мРНК с использованием dT16-праймеров имеет недостатки по причине низкой специфичности реакции обратной транскрипции, которая даже в условиях отсутствия праймеров синтезирует некоторое количество кДНК молекул [11, 19].

Обобщая вышесказанное, было обнаружено, что образование шпилечной РНК-структуры в области (82-148) оказывает влияние на экспрессию белка NS1 в зараженных клетках, предположительно, на уровне трансляции. Несмотря на то, что обнаруженная разница в экспрессии NS1 в клетках не имеет большого биологического значения *in vitro*, данное исследование было продолжено экспериментами *in vivo*, так как активный синтез белка NS1 в первые часы заражения ингибирует интерферон-зависимый иммунный ответ и может влиять на тяжесть протекания заболевания.

4. Определение патогенности вирусов для лабораторных животных

В данной работе проводили два эксперимента *in vivo*: предварительный, в котором были определены 50%-ной инфекционная и летальная мышинные дозы вирусов (МИД50 и МЛД50), и основной, направленный на исследование патогенности при заражении мышей в сублетальной дозе 10МИД50.

В предварительном эксперименте мышей инфицировали интраназально в дозе $10^4, 10^3, 10^2, 10, 1$ и 0.1 ТИД50 на животное и в течение последующих 21 дня проводили мониторинг массы тела и летальности животных. На 21-й день эксперимента у выживших животных определяли наличие вирус-специфических антител в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и, таким образом, выявляя инфицированных животных. Расчет 50%-ной мышинной летальной и инфекционной доз вирусов проводили по методу Рида-Менча. Согласно полученным результатам двух независимых экспериментов, проведенных на разных партиях мышей, средние значения МЛД50 и МИД50 вирусов с учетом стандартных отклонений находились в пределах $0,5 \lg$ ТИД50, что сравнимо с погрешностью метода титрования (таблица 2).

Таблица 2. Летальная и инфекционная активности вирусов в мышах. В таблице представлены значения 50%-ной летальной (МЛД50) и 50%-ной инфекционной (МИД50) мышинных доз, рассчитанные по двум независимым экспериментам с разными партиями мышей

Вирус	1МЛД50 (lgТИД50/мл)	1МИД50 (lgТИД50/мл)
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

В основном эксперименте мышей заражали вирусами в дозе 10 МИД50 на мышь и на 2, 4 и 6 сутки после заражения определяли наличие инфекционного вируса в легких методом титрования легочной суспензии в культуре клеток MDCK. Согласно полученным результатам, вирус 0-1 оказался наименее патогенным для мышей. Было обнаружено, что зараженные вирусом 0-1 мыши худели медленнее остальных (рис. 9) и на 6 сутки после заражения было зафиксировано снижение инфекционного титра данного вируса в легких животных (рис. 10).

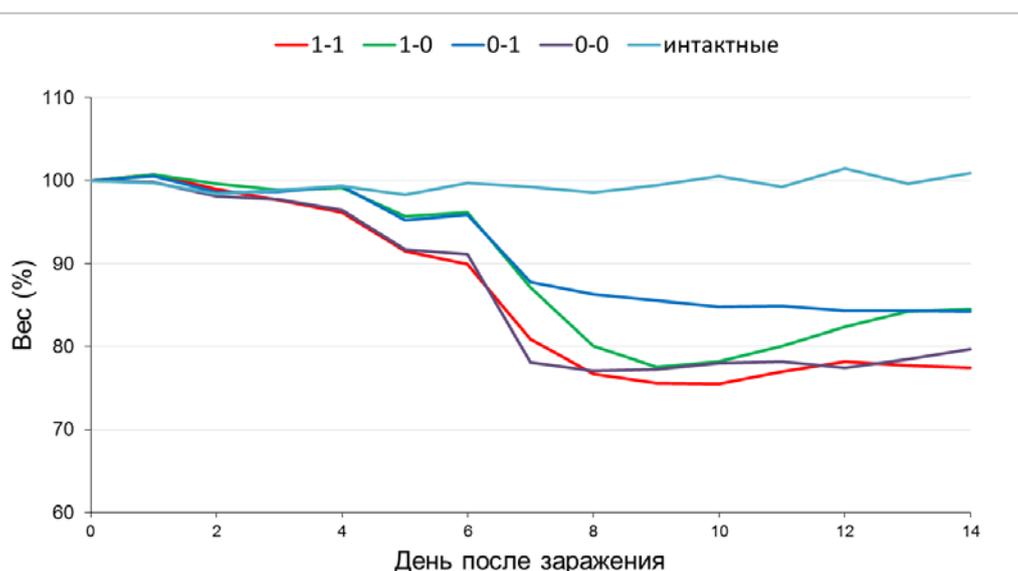


Рисунок 9. Динамика изменения веса мышей, зараженных вирусами с различной вторичной структурой мРНК гена NS в дозе 10 МИД50/животное

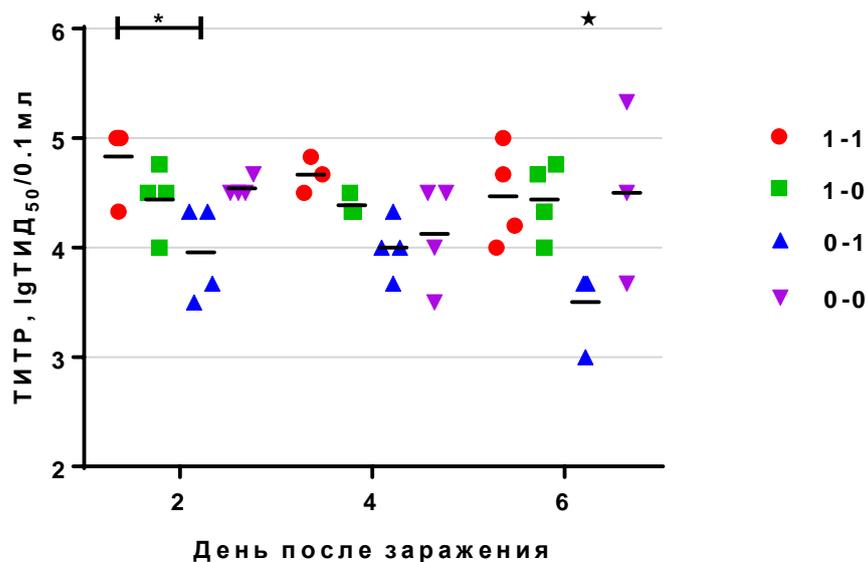


Рисунок 10. Репродукция вирусов с различной вторичной структурой мРНК гена NS в легких мышей, зараженных в дозе 10 МИД50/животное. Представлены результаты титрования суспензии гомогенатов легких в культуре клеток MDCK. * - отличия в день 2 значимы между вирусами 1-1- и 0-1, $p < 0.05$, ★ - вирус 0-1 значимо отличается от всех остальных в день 6, $p < 0.05$ (апостериорный критерий Сидака после двухфакторного анализа ANOVA).

Предполагается, что обнаруженный эффект связан с отсутствием вторичной структуры области (82-148) мРНК гена NS у вируса 0-1, что приводит к сниженной экспрессии белка NS1 и, соответственно, определяет снижение способности вируса противостоять интерферон-зависимой иммунной системе на ранних этапах инфекции по сравнению с вирусом «1-1», содержащим вторичные структуры в обеих областях. Однако так как для пары вирусов «1-0» и «0-0», не имеющих стабильной шпильки во второй области, не было обнаружено различий в патогенности, это свидетельствует о наличии других неустановленных механизмов, определяющих вирулентность *in vivo* и связанных со вторичной структурой мРНК гена NS.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено исследование взаимосвязи между вторичной структурой вирусной мРНК гена NS с репликативными свойствами вируса гриппа в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Подтверждено образование ранее предсказанных структур мРНК гена NS в условиях *in vitro*. Получены 4 вируса гриппа, обладающие различной комбинацией вторичных структур в областях (82-148) и (497-564) нуклеотидной последовательности мРНК гена NS, методом обратной генетики. После сборки вирусы отличались по инфекционной активности: вирус «1-1», содержащий шпильчатые структуры в обеих областях NS, имел достоверно более высокие значения титров по сравнению с другими вирусами. Однако после накопления вирусов в клеточной Vero при оптимальной заражающей дозе титры вирусов не различались. Проведение полногеномного секвенирования подтвердило присутствие всех внесенных мутаций в сегменте NS и соответствие последовательностей во всех остальных геномных сегментах у собранных вирусов.

Сравнение репродукции полученных вирусов гриппа в чувствительных культурах клеток не показало различий между штаммами. Анализ относительного количества мРНК NS1 и NEP в зараженных клетках также не выявил значимых различий между вирусами. При этом сравнение относительного количества белка NS1 в зараженных клетках методом ИФА позволило обнаружить разницу в уровнях белка в зависимости от вторичной структуры в положении (82-148 н.) мРНК гена NS на ранних этапах инфекции.

Продемонстрировано различие в патогенности полученных вирусов для мышей. Вирус «0-1», характеризующийся отсутствием РНК-шпильки в (82-148) - положении и стабильной шпилькой в области (497-564) мРНК гена NS, имел достоверно более низкий титр в легких мышей на 6 день после заражения по сравнению с остальными вирусами. Предполагается, что обнаруженный эффект может быть связан с отсутствием вторичной структуры в области (82-148) и является следствием сниженной экспрессии белка NS1 и, соответственно, снижением способности противостоять интерферон-зависимой иммунной системе по сравнению с вирусом «1-1», содержащим вторичные структуры в обеих областях. Однако так как для пары вирусов «1-0» и «0-0», не имеющих стабильной шпильки во второй области, не было обнаружено различий в патогенности, это свидетельствует о наличии других неустановленных

механизмов, определяющих вирулентность *in vivo* и связанных со вторичной структурой мРНК гена NS.

ВЫВОДЫ

1. Получены рекомбинантные варианты вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), характеризующиеся различной комбинацией вторичных структур мРНК сегмента NS.
2. Вторичные структуры мРНК гена NS не влияют на репродукцию вируса гриппа в чувствительных клеточных культурах.
3. Структура шпильки, расположенная в положении (82-148 н.) мРНК гена NS, усиливает экспрессию белка NS1 на ранних этапах вирусного заражения;
4. Вирус, характеризующийся отсутствием РНК-шпильки в положении (82-148) и стабильной шпилькой в области (497-564) мРНК гена NS, обладает более низкой патогенностью для мышей по сравнению с другими вирусами.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК

1. **Baranovskaya I., Sergeeva M., Brodskaja 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. – Т.8. – 204с.
2. **Baranovskaya I., Sergeeva M., Vasin A.** Influenza A virus NS1 protein expression level depends on NS gene RNA secondary structure// FEBS OPEN BIO. – Т.9 (S.1). – 2019. – 162с.
3. **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. – Т. 16. – №. 1. – 1–8с.

Публикации в других изданиях

1. **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. – 70–71с.

2. **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. – 83–84с.
3. **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. –85-86с.
4. **Baranovskaya I.**, Sergeeva M., Brodskaia 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.Groningen. – 2018. –522с.
5. **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. Гатчина. – 2019. – 83–84с.
6. **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. Singapore. – 2019. – 284с.
7. **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. – 16–17с.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Bao Y. The influenza virus resource at the National Center for Biotechnology Information. / Y. Bao, P. Bolotov, D. Dernovoy, B. Kiryutin, L. Zaslavsky, T. Tatusova, J. Ostell, D. Lipman // J. Virol. – 2008. – Т. 82 – № 2 – 596–601с.
2. Clercq E. De Approved antiviral drugs over the past 50 years // Clin. Microbiol. Rev. – 2016. – Т. 29. – № 3. – 695–747с.
3. Gruber A.R. The Vienna RNA Websuite / A. R. Gruber, R. Lorenz, S. H. Bernhart, R. N. Ck, I. L. Hofacker // Nucleic Acids Res. – 2008. – Т. 36.
4. Gultyaev A.P. Influenza Virus RNA Structure: Unique and Common Features / A. P. Gultyaev, R. A. M. Fouchier, R. C. L. Olsthoorn // Int. Rev. Immunol. – 2010. – Т. 29 – № 6 – 533–556с.
5. Gultyaev A.P. An RNA conformational shift in recent H5N1 influenza A viruses

/ A. P. Gulyaev, H. A. Heus, R. C. L. Olsthoorn // *Bioinformatics* – 2007. – T. 23 – № 3 – 272–276c.

6. Gulyaev A.P. An RNA conformational shift in recent H5N1 influenza A viruses / A. P. Gulyaev, H. A. Heus, R. C. L. Olsthoorn // *Bioinformatics* – 2007. – T. 23 – № 3 – 272–276c.

7. Hoffmann E. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids / E. Hoffmann, G. Neumann, Y. Kawaoka, G. Hobom, R. G. Webster // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2000. – T. 97 – № 11 – 6108–6113c.

8. Huang X. An NS-segment exonic splicing enhancer regulates influenza A virus replication in mammalian cells / X. Huang, M. Zheng, P. Wang, B. W. Y. Mok, S. Liu, S. Y. Lau, P. Chen, Y. C. Liu, H. Liu, Y. Chen, W. Song, K. Y. Yuen, H. Chen // *Nat. Commun.* – 2017. – T. 8 – № 1 – 1–15c.

9. Ilyinskii P.O. Importance of mRNA secondary structural elements for the expression of influenza virus genes / P. O. Ilyinskii, T. Schmidt, D. Lukashev, A. B. Meriin, G. Thoidis, D. Frishman, A. M. Shneider // *Omics* – 2009. – T. 13 – № 5 – 421–430c.

10. Jiang T. Mutations designed by ensemble defect to misfold conserved RNA structures of influenza A segments 7 and 8 affect splicing and attenuate viral replication in cell culture / T. Jiang, A. Nogales, S. F. Baker, L. Martinez-Sobrido, D. H. Turner // *PLoS One* – 2016. – T. 11 – № 6 – 1–16c.

11. Kawakami E. Strand-specific real-time RT-PCR for distinguishing influenza vRNA, cRNA, and mRNA / E. Kawakami, T. Watanabe, K. Fujii, H. Goto, S. Watanabe, T. Noda, Y. Kawaoka // *J. Virol. Methods* – 2011. – T. 173 – № 1 – 1–6c.

12. Krug R.M. Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. / R. M. Krug // *Curr. Opin. Virol.* – 2015. – T. 12 – 1–6c.

13. Mierlo J.T. van Small Silencing RNAs: Piecing Together a Viral Genome / J. T. van Mierlo, K. W. R. van Cleef, R. P. van Rij // *Cell Host Microbe* – 2010. – T. 7 – № 2 – 87–89c.

14. Moss W.N. Identification of potential conserved RNA secondary structure throughout influenza A coding regions / W. N. Moss, S. F. Priore, D. H. Turner // *Rna* – 2011. – T. 17 – № 6 – 991–1011c.

15. Piasecka J. RNA Secondary Structure Motifs of the Influenza A Virus as Targets for siRNA-Mediated RNA Interference / J. Piasecka, E. Lenartowicz, M. Soszynska-Jozwiak, B. Szutkowska, R. Kierzek, E. Kierzek // *Mol. Ther. - Nucleic Acids* – 2020. – T. 19 – 627–642c.

16. Priore S.F. Secondary structure of a conserved domain in the intron of influenza A NS1 mRNA. / S. F. Priore, E. Kierzek, R. Kierzek, J. R. Baman, W. N. Moss, L. I. Dela-Moss, D. H. Turner // *PLoS One* – 2013. – T. 8 – № 9 – e70615c.

17. Reed L.J. A simple method of estimating fifty per cent endpoints / L. J. Reed, H. Muench // *Am. J. Epidemiol.* – 1938. – T. 27 – № 3 – 493–497c.

18. Vasin A. V. The influenza A virus NS genome segment displays lineage-specific patterns in predicted RNA secondary structure / A. V. Vasin, A. V. Petrova, V. V. Egorov, M. A. Plotnikova, S. A. Klotchenko, M. N. Karpenko, O. I. Kiselev // *BMC Res. Notes* – 2016. – T. 9 – № 1 – 1–7c.

19. Vester D. Real-time RT-qPCR assay for the analysis of human influenza A

virus transcription and replication dynamics / D. Vester, A. Lagoda, D. Hoffmann, C. Seitz, S. Heldt, K. Bettenbrock, Y. Genzel, U. Reichl // J. Virol. Methods – 2010. – Т. 168 – № 1–2 – 63–71с.

20. Zheng L. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. / L. Zheng, U. Baumann, J. L. Reymond // Nucleic Acids Res. – 2004. – Т. 32 – № 14.

21. Zhou B. Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses / B. Zhou, M. E. Donnelly, D. T. Scholes, K. St. George, M. Hatta, Y. Kawaoka, D. E. Wentworth // J. Virol. – 2009. – Т. 83 – № 19 – 10309–10313с.

Аспирант _____ Барановская Ирина Леонидовна