

Бицистронные векторные системы на основе вирусных последовательностей IRES и 2A пептида

Введенский Андрей Владимирович¹, Кузьмич Алексей Иванович²

*¹ студент МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия,
vvedenskiia@gmail.com*

*² аспирант ИБХ РАН, Москва, Россия
akrubik@gmail.com*

В генной терапии заболеваний часто требуется доставка в клетки одновременно нескольких терапевтических генов. С этой целью активно разрабатываются генетические векторы, кодирующие несколько белков, то есть мультицистронные векторные конструкции. Целью нашей работы стало сравнение эффективности бицистронных векторов на основе вирусных сайтов внутренней посадки рибосом (IRES) и саморасщепляющихся пептидных последовательностей (2A пептидов).

Были созданы модельные генетические конструкции, несущие гены флуоресцентных белков. С помощью флуоресцентной микроскопии, флуориметрии и вестерн-блот анализа оценивался уровень синтеза флуоресцентных белков в двух линиях клеток млекопитающих в условиях транзientной трансфекции.

Созданные генетические конструкции содержали в своем составе гены флуоресцентных белков RFP и EGFP, разделенные тремя разными вирусными элементами. Две конструкции содержали различные варианты IRES вируса EMCV (вирус энцефаломиокардита): IRES, близкий к IRES вируса дикого типа, и укороченный IRES. Третья конструкция содержала в качестве линкера последовательность 2A пептида тешовируса свиней.

При транзientной трансфекции клеточных линий HEK293 (почечные клетки человеческого эмбриона) и М3 (клетки меланомы мыши) всеми бицистронными конструкциями наблюдался синтез обоих флуоресцентных белков. Трансфекция конструкциями на основе IRES, близкого к дикому типу, и 2A пептида приводила к экспрессии генов обоих флуоресцентных белков на уровне, сопоставимом с уровнем, наблюдаемым при трансфекции моноцистронными конструкциями, содержащими ген только одного флуоресцентного белка. Использование укороченного IRES приводило к высокому содержанию продукта первого цистрона и очень низкому содержанию продукта цистрона, следующего за IRES. Эффективность экспрессии второго цистрона при использовании 2A пептида была выше, чем при использовании обоих вариантов IRES. В случае использования вектора с 2A пептидом в клетках обнаруживалась фракция нерасщепленного слитного белка RFP-2A-EGFP, однако, количество этой фракции в обеих клеточных линиях не превышало 10% от суммарного количества флуоресцентных белков.

Таким образом, векторы на основе 2A пептида тешовируса свиней позволяют достичь более эффективной экспрессии второго цистрона, чем векторы на основе IRES EMCV. При создании конструкций с IRES для максимальной экспрессии цистронов следует использовать последовательность близкую к IRES вируса EMCV дикого типа.

Участие белка ядрышка фибрилларина в гордеивиральной инфекции

Гусейнов Мамед Алекбер оглы^{1,2}, Шоу Джейн³

¹НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

guseynov.m.a@gmail.com

²ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва, Россия

³Институт Джеймса Хаттона, Данди, Великобритания

Jane.Shaw@hutton.ac.uk

Исследования последних лет показали, что вирусные белки ряда цитоплазматических РНК-содержащих вирусов растений с геномом положительной полярности способны локализоваться в ядре/ядрышке клеток зараженных растений, и эта локализация влияет на развитие вирусной инфекции. Недавно нами было показано, что транспортный белок ТБГ1 гордеивируса полулатентного вируса мятлика, экспрессированный индивидуально в отсутствие вирусной инфекции, локализуется в ядрышке и прямо взаимодействует с фибрилларинном, главным белком ядрышка *in vivo* и *in vitro*. Известно, что белок ТБГ1 гордеивирусов формирует рибонуклеопротеидный комплекс с вирусной РНК для транспорта вирусного генома между соседними клетками и на дальние расстояния по флоэме растения.

В настоящей работе для другого представителя гордеивирусов - вируса штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ) изучалась роль фибрилларина с использованием трансгенных растений *N. benthamiana* с выключенной с помощью малой интерферирующей РНК экспрессией гена фибрилларина.

Показано, что заражение трансгенных растений *N. benthamiana* ВШМЯ сопровождается заметным усилением вирусных симптомов по сравнению с растениями дикого типа. В экспериментах *in vivo* с использованием растений дикого типа и рекомбинантного ВШМЯ, в составе которого ген белка ТБГ1 слит с геном *GFP*, показано, что транспортный белок ТБГ1 колокализуется с фибрилларинном в ядрышке. В экспериментах *in vitro* методом Фар-Вестерн анализа выявлено прямое взаимодействие между белком ТБГ1 ВШМЯ и фибрилларинном, и картирован участок в составе N-концевой половины белка ТБГ1, взаимодействующий с глицин-аргинин богатым доменом фибрилларина.

Предложено, что фибрилларин «задерживает» транспортный белок ТБГ1 ВШМЯ в ядрышке, что приводит к ингибированию развития вирусной инфекции.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 10-04-00522_a.

Нуклеиново-белковое узнавание. Иммунохимическое определение вирусных и синтетических РНК

Овсепян Григор Каренович

ученик I кл. ГБОУ СОШ №353 им. А.С. Пушкина, РФ, г. Москва

marine-h@yandex.ru

Иммунизация животных природными нуклеиновыми кислотами вызывает слабый и неспецифичный иммунный ответ. Однако в сыворотках больных, перенёвших аутоиммунные заболевания, обнаруживаются антитела к нуклеиновым кислотам, и их титр достаточно высок для их обнаружения многими методами иммуноанализа. Одним из инструментов для исследования вирусной инфекции в данной работе являются антитела к вирусным РНК. Были получены антисыворотки к природным антигенам - РНК ВЭМК (вирус энцефаломиокардита мышей) и РНК ВТМ (вирус табачной мозаики) и к синтетическому антигену – *poly(C)* (полицитидиловой кислоте).

Был выбран метод иммунохимического анализа на нитратцеллюлозных мембранах в точке (иммунодот). Детекцию комплексов «антиген-антитело» проводили с помощью антивидовых антител, конъюгированных с наночастицами коллоидного золота, и проявляющей системы, состоящей из инициатора и серебряного усилителя.

Иммунохимический анализ показал, что интенсивность сигнала антисыворотки коррелирует с её разведением и количеством гомологичного антигена (того антигена, на

который они были выработаны). В качестве отрицательного контроля при анализе специфичности антител использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) и лизоцим куриного яйца, однако с увеличением концентрации антител к *poly(C)* наблюдалось усиление сигнала на БСА, поскольку иммунизацию кролика проводили конъюгатом *poly(C)* с БСА.

При исследовании перекрёстных реакций антител к *poly(C)*, РНК ВТМ и РНК ВЭМК было обнаружено, что антитела дают иммунный ответ на все три РНК, причём антитела к *poly(C)*, как и ранее, дают сигнал на БСА.

Выводы:

1. Установлено, что в организме кроликов вырабатываются антитела на вирусные РНК (РНК ВТМ и ВЭМК) и на синтетическую РНК (*poly(C)*).
2. Установлено, что специфическая активность антисыворотки зависит от её разведения и от концентрации антигена.
3. Наблюдается зависимость между интенсивностью сигнала и количеством РНК, нанесенной на мембрану.
4. В антисыворотке к *poly(C)* присутствуют как антитела, узнающие цитидиловую кислоту (C) в РНК ВТМ, так и антитела, узнающие остатки C, присущие *poly(C)*.
5. Антитела в антисыворотках узнают пространственную структуру эпитопов РНК.

Структурный анализ вируса штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ) методом электронной микроскопии с последующей обработкой изображений.

Печникова Евгения Викторовна¹, Clare Daniel²

¹*Институт кристаллографии им. Шубникова, Россия, Москва*

²*Birkbeck, University of London, UK, London*

eugenia.pechnikova@gmail.com.ru

Вирус Штриховатой Мозаики Ячменя (ВШМЯ) принадлежит к роду *Hordeivirus* (семейство *Virgaviridae*) и представляет собой растительные вирус с +смысловым РНК-геномом, его вирион имеет форму жесткой палочки со спиральной организацией белка оболочки. Вирус передается при контакте между растениями, через семена и пыльцу и вызывает заболевания от легкой мозаики до летального некроза. Вирусная инфекция приводит к потере до 20% урожая ячменя.

О структуре представителей рода *Hordeivirus* известно мало, хотя близкий род *Tobamovirus* (семейство *Virgaviridae*) описан очень хорошо и в PDB содержатся структуры 4 представителей этого рода. Таким образом, данные о структуре вируса из еще одного рода из семейства *Virgaviridae* будут очень полезны для понимания сходства и различий представителей этого семейства.

Целью данной работы является получение предварительной реконструкции ВШМЯ и определение параметров его спирали.

Для получения 3-D модели ВШМЯ был использован метод электронной микроскопии негативно-контрастированных препаратов и компьютерной обработкой изображений.

При помощи анализа трансформант Фурье были определены параметры спирали ВШМЯ. Спираль содержит 5 витков и 111 белковых субъединиц на период, высота подъема между соседними субъединицами составила 1,18 Å, а угол между ними — 16,2°. Высота подъема спирали за один виток составила 26,26 Å. Диаметр вириона составил 28 нм. В центре вирусной частицы есть канал диаметром 3,7 нм. На срезе модели видна борозда между белковыми субъединицами, в который уложена вирусная РНК. На поверхности 3-D модели хорошо видны отдельные субъединицы со своеобразными “шипиками”, однако, более мелкие детали неразличимы из-за недостатка разрешения, обусловленного негативным контрастированием.

Таким образом, методом электронной микроскопии и последующей обработки изображений были определены параметры спирали ВШМЯ и получена 3-х мерная модель его вириона. Эта модель будет использована для получения реконструкции с более высоким разрешением и дальнейшего определения характера сворачивания вирусного белка оболочки.

Разработка нового растительного вирусного вектора для получения вирусоподобных частиц

Путляев Егор Валерьевич, Смирнов Александр Алексеевич

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, кафедра вирусологии, Россия, Москва

putlegor@mail.ru

Одним из перспективных подходов для производства вакцин является создание вирусоподобных частиц (ВПЧ), из белка оболочки (БО) растительного вируса, декорированных вакциногенными эпитопами различных патогенов. Подобные вакцинные препараты отличает высокая иммуногенность и биобезопасность, а также низкая себестоимость производства. Для получения ВПЧ требуется большое количество БО. Поэтому, целью данной работы было создание вирусного вектора для накопления БО в листья *Nicotiana benthamiana*, в количестве достаточном для эффективного образования ВПЧ.

Ранее в нашей лаборатории был описан новый штамм вируса мозаики альтернантеры (AltMV-MU (GenBank FJ822136.1)), способный образовывать вирусоподобные частицы в отсутствие вирусной РНК. В данной работе был создан вирусный вектор на основе кДНК копии геномной РНК AltMV-MU, из которой были удалены гены трех транспортных белков вируса. По нашим сведениям, это первый вирусный вектор на основе ВМАльт, имеющий подобную архитектуру. Полученный вирусный вектор был агроинокулирован в листья растения *Nicotiana benthamiana* совместно с ингибитором посттранскрипционного умолкания генов вируса кустистой карликовости томатов (p19). Анализ трансформированной ткани показал, что созданный вирусный вектор обеспечивает высокий уровень накопления БО ВМАльт - до 5 г на 1 кг сырой листовой массы, что соответствует примерно 50% массы всех растворимых белков листа. Исследование методом просвечивающей электронной микроскопии показало, что данное количество БО ВМАльт достаточно для эффективного образования ВПЧ.

Таким образом, в ходе представленной работы был разработан новый вирусный вектор, обеспечивающий высокий уровень накопления БО ВМАльт в листьях *Nicotiana benthamiana*, достаточный для эффективного образования ВПЧ. Следовательно, данный вектор может быть использован для создания вакцин на основе ВПЧ ВМАльт, а также для экспрессии целевых белков в тканях растений.