

Устойчивость структур РНК 3′ нетранслируемых областей генома вируса Алонгшан к XRN1 экзорибонуклеазе

Научный руководитель – Карганова Галина Григорьевна

Охезин Е.В.¹, Литов А.Г.²

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра вирусологии, Москва, Россия, *E-mail: oe-74@mail.ru*; 2 - Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, *E-mail: novosti-wxo@yandex.ru*

Недавно была открыта уникальная родственная роду *Orthoflavivirus* вирусная группа Джангменвирусов. Геном этих вирусов состоит из 4-х сегментов РНК позитивной полярности, которые кодируют РНК-зависимую РНК-полимеразу и хеликазу, а так же белки уникальные для данной группы вирусов. Особый интерес среди представителей этой группы вызывает вирус Алонгшан ввиду того, что он, предположительно, является патогеном человека, вызывающим заболевание с поражением ЦНС. Также была отмечена его циркуляция на территории Российской Федерации. Для известных ортофлавивирусов показано наличие уникальных субгеномных РНК (сРНК), образование которых обуславливают высококонсервативные мотивы вторичной структуры геномной РНК устойчивые к 5′- 3′ гидролизу клеточной экзорибонуклеазой XRN1.

Ранее нами были отсеквенированы концы геномов двух Джангменвирусов – вирусов Алонгшан и Янгоу (5 и 7 штаммов, соответственно) и были смоделированы, структуры РНК всех 4 сегментов, имеющих высокую консервативность.

Одной из возможных биологических функций таких структур может быть образование «ортофлавиноподобных» сРНК. Однако компьютерный моделинг структур РНК не может дать однозначный ответ о структурной организации 3′ концевых участков генома и тем более об их биологической функции.

Целью нашего исследования стало определение экзонуклеазной устойчивости к XRN1 рибозекзонуклеазе 3′ концов РНК всех 4 сегментов вируса Алонгшан и определение терминальных сайтов гидролиза. Для этого использовали штамм Miass 519, 3′ концы которого были получены при помощи ПЦР с использованием высокоточной полимеразы и прямого праймера, фланкированного на 5′ конце последовательностью промотора полимеразы фага T7. ПЦР-продукт был клонирован в TA-вектор pCR2.1 с последующей трансформацией клеток *E. coli* штамма TOP10. Из бактериальных клонов была выделена и очищена плазмидная ДНК с дальнейшим секвенированием по Сэнгеру. Далее провели синтез РНК при помощи высокопроцессивной РНК-полимеразы фага T7. *In vitro* РНК дополнительно переосадили кислым фенолом. Очищенную РНК обработали пирофосфогидролазой и XRN1 экзонуклеазой. Обработанные и необработанные образцы анализировали с помощью полиакриламидного геля в денатурирующих условиях. После чего выделили продукты гидролиза из геля с последующей RACE-обратной транскрипцией. Синтезированную ДНК использовали в качестве матрицы в ПЦР. После чего ПЦР продукт клонировали в pAL2-T вектор, с дальнейшей трансформацией клеток *E. coli* штамма TOP10 и секвенированием плазмидных клонов по Сэнгеру.

В результате мы наблюдали неполный гидролиз 3′ концов РНК только у 1 и 4 сегментов вируса Алонгшан, в то время как у 2 и 3 сегментов произошла полная дегградация РНК. У 1 сегмента был показан один сайт гидролиза, в то время как у 4 два.

Полученные нами данные впервые в мире продемонстрировали наличие субгеномных РНК у вируса Алонгшан, различия сегментов по устойчивости к экзорибонуклеазе XRN1 и последовательности терминальных сайтов гидролиза.