

ПОДСЕКЦИЯ «ВИРУСОЛОГИЯ»

Устные доклады

Разработка псевдовирусной системы для безопасного поиска новых ингибиторов вируса гриппа

Кононова Алена Александровна

*Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск,
alenkoonova@yandex.ru*

Грипп – это острое инфекционное заболевание, вызываемое вирусами гриппа, часто приводящее к тяжелым последствиям и смертельным исходам. В настоящее время появляются штаммы вирусов, для которых существующие вакцины и лекарственные препараты неэффективны, поэтому проблема поиска новых ингибиторов вируса гриппа остается актуальной. Традиционно поиск антивирусных препаратов ведется с применением инфекционных вирусных изолятов, работа с которыми, во-первых, небезопасна, а во-вторых, сопровождается трудностями при точном определении молекулярной мишени для действия ингибиторов. Адекватной моделью вирусной инфекции в таких исследованиях могут быть псевдовirusы. Это химерные вирусные частицы, получаемые *in vitro*, которые вместо собственных поверхностных белков имеют поверхностные белки гетерологичного вируса (псевдотипированные вирусные частицы). Из-за отсутствия в их геноме генов некоторых белков, псевдовirusы либо не способны к формированию вирусного потомства, либо оно является неинфекционным.

Целью работы является разработка псевдовirus – клеточной системы на основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита (pVBS), псевдотипированного поверхностными белками вируса гриппа, оценка ее пригодности для использования в качестве модели для поиска и описания ингибиторов поверхностных белков вируса гриппа.

Нами получен псевдовirusный препарат pVBS, псевдотипированного гемагглютинином и нейраминидазой вируса гриппа H5N1. Его инфекционность количественно определяется благодаря наличию в геноме псевдовirusа репортерного гена люциферазы. Для подтверждения того, что, при проникновении в клетку, псевдовirus использует те же механизмы, что и вирус гриппа, проводились эксперименты с ингибиторами вируса гриппа. Показано, что неспецифические ингибиторы входа рН-зависимых вирусов (к которым относится вирус гриппа), хлорид аммония и хлороквин, и специфические антитела к вирусу гриппа подавляют инфекцию псевдовirusа. Это демонстрирует соответствие инфекционных свойств полученного псевдовirusа вирусу гриппа.

Таким образом, описанная система может быть использована для эффективного и безопасного скрининга ингибиторов поверхностных белков, изучения клеточных рецепторов вируса гриппа H5N1, а также для исследования инфекционных свойств новых реассортантов вируса гриппа без использования инфекционных рекомбинантных вирусов.

Коилин/тельца Кахаля как возможные участники защитной реакции растения на вирусную инфекцию и абиотический стресс

Нартова Мария Андреевна, Макарова Светлана Сергеевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, m.nartova@mail.ru

Коилин – основной структурный белок, отвечающий за формирование, состав и активность телец Кахаля (ТК), субъядерных компартментов, которые физически и функционально связаны с ядрышками. Кроме того, до 70% коилина находится в свободном состоянии в нуклеоплазме. Предполагается, что одной из функций коилина/ТК является

участие в ответе на различные типы стресса. В настоящей работе с использованием растений *Nicotiana benthamiana* дикого типа и трансгенных растений с «выключенной» экспрессией гена коилина, изучалась роль коилина/ТК в устойчивости/чувствительности растений к биотическому стрессу (на примере инфекции тобравиром погрешности табака, ВПТ) и абиотическим стрессам (окислительному и гиперосмотическому).

Показано, что отсутствие коилина приводит к интенсификации инфекции растений ВПТ (временное различие проявления фенотипических признаков вирусной инфекции). Методом копреципитации *in vitro* продемонстрировано прямое взаимодействие коилина с вирусным белком 16К, супрессором посттранскрипционного умолкания генов. С этой целью экстракт растений, зараженных ВПТ, инкубировали с рекомбинантным коилином, связанным с Ni-NTA агарозой, и анализировали элюированную фракцию методом Вестерн-блоттинга с использованием антител против белка 16К. Фар-Вестерн анализ серии делеционных мутантов белка 16К и коилина позволил выявить взаимодействующие участки в обоих белках: это – район, включающий аминокислотные остатки с 40 по 60 в составе N-концевой половины белка 16К и участок в центральном домене коилина (аминокислотные остатки с 194 по 211).

Проведено предварительное исследование ответа контрольных и трансгенных растений на солевой и окислительный стресс. Листовые диски одинакового диаметра помещали в гиперосмотическую среду (250 мМ NaCl), или в среду, содержащую H₂O₂ (0,1 и 0,01%), индуцирующую формирование активных форм кислорода, с помощью метода вакуумной инфильтрации. Показано, что трансгенные растения, в которых отсутствует коилин/ТК, более устойчивы к обоим типам стресса. Реакция на стресс, проявляющаяся визуально в обесцвечивании листа (потеря пигментации в результате разрушения хлорофилла), у контрольных растений дикого типа выявлялась на несколько дней раньше.

Полученные нами данные свидетельствуют, что коилин/ТК, вероятно является важным участником защитной реакции растений на стресс.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-01467а.

Создание экспериментальной системы для изучения действия генетической системы иммунитета CRISPR/Cas *Escherichia coli* против литических бактериофагов

Ненарокова Анна Александровна

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия, a.nenarokova@gmail.com

CRISPR/Cas-система (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated proteins) – адаптивная защитная система прокариот от чужеродного генетического материала. CRISPR-система состоит из CRISPR-кассет и CAS-генов, обычно находящихся в непосредственной близости от CRISPR-кассет и кодирующих Cas-белки, обеспечивающие функционирование CRISPR-системы. CRISPR-кассета включает в себя последовательность палиндромных повторов, между которыми находятся спейсеры – участки ДНК, соответствующие участкам чужеродного генетического материала – протоспейсерам. Клетки, содержащие спейсеры, соответствующие участкам генома определённого бактериофага, демонстрируют устойчивость к этому фагу. В случае если бактериофаги имеют мутации в значимой для узнавания области протоспейсера, они избегают CRISPR-интерференции, однако ДНК таких фагов стимулирует у клеток ускоренную адаптацию (приобретение новых спейсеров).

Целью данной работы являлось создание эффективной системы приобретения новых спейсеров против геномов бактериофага T4 и мутанта бактериофага λ *vir*, развивающегося по

литическому циклу. Это необходимо для построения модели взаимодействия клеток *Escherichia coli* с активной CRISPR-системой и литического бактериофага.

Для осуществления поставленной задачи использовался штамм *E.coli* KD263, сконструированный на основе штамма K-12, с индуцибельной CRISPR-системой, имеющей в CRISPR-кассете спейсер против участка гена g8 лизогенного бактериофага M13, и плазида, несущая соответствующий участок гена g8 (протоспейсер) с мутацией в значимой области.

В ходе данной работы были созданы конструкции, содержащие мутантный протоспейсер и фрагменты геномов фага T4 и фага λ *vir*. Полученные плазмиды трансформировали в клетки выбранного штамма, после чего проводили индукцию клеток для запуска адаптации. Около 50% новых спейсеров были получены против геномов бактериофагов. Для проверки эффективности полученной системы поставили эксперимент по инфекции бактериофагом. Наблюдали снижение продукции фага λ индуцированными клетками на 5-6 порядков по сравнению с контрольными при температуре 37°C и снижение продукции фага T4 на 1,5-2 порядка при температуре 25°C. В настоящее время проводится поиск мутантных бактериофагов, способных активно инфицировать индуцированные клетки, избегая действия CRISPR-системы благодаря мутациям в протоспейсере.

Автор приносит искреннюю благодарность Строчкиной А.В. за помощь и поддержку при выполнении работы и проф. Северинову К.В. за внимательное руководство.