

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-189

РАЗРАБОТКА НОВОГО ПОДХОДА ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ НЕТРАНСЛИРУЕМЫХ РЕГИОНОВ ВИРУСОВ С СЕГМЕНТИРОВАННЫМ ГЕНОМОМ НА ПРИМЕРЕ *KINDIA TICK VIRUS**

THE DEVELOPMENT OF A NEW APPROACH FOR STUDYING THE STRUCTURE OF UNTRANSLATED REGIONS IN VIRUSES WITH SEGMENTED GENOMES USING THE *KINDIA TICK VIRUS* AS A MODEL

Д. А. Алхиреев, А. В. Гладышева

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

D. A. Alkhireenko, A. V. Gladysheva

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ darya.a.00@yandex.ru

Аннотация

Исследование структуры РНК является сложной и трудоемкой задачей вследствие ее подвижности и нестабильности в растворе. В настоящей работе для исследования структуры 5'- и 3'-нетранслируемых регионов (UTR) РНК *Kindia tick virus* разработана методика со-кристаллизации РНК с РНК-связывающим белком оболочки фага MS2, а также впервые получены пространственные структуры низкого разрешения 5' и 3' UTR РНК KITV методом малоуглового рентгеновского рассеяния.

Abstract

Studying the structure of RNA is a complex and time-consuming task due to its mobility and instability in solution. In this work, to study the structure of 5' and 3' untranslated regions (UTRs) of *Kindia tick virus* RNA has developed a technique for co-crystallizing RNA with the RNA-binding coat protein from the MS2 phage, and low-resolution spatial structures of 5' and 3' UTR KITV RNA have been obtained for the first time by small-angle X-ray scattering.

Kindia tick virus (KITV) — недавно обнаруженный вирус группы *Jingmenvirus* семейства *Flaviviridae*, впервые обнаруженный в 2017 г. в иксодовых клещах на территории г. Киндия Гвинейской Республики. В отличие от классических вирусов семейства *Flaviviridae*, геном KITV состоит из 4 сегментов, каждый из которых фланкирован 5' и 3' UTR. Эти регионы играют важную роль в репликации, трансляции и упаковке вирусной РНК, формируя функциональные вторичные структуры.

Ранее проведенное компьютерное моделирование вторичной структуры 5' и 3' UTR РНК KITV выявило регуляторные элементы, характерные для рода *Orthoflavivirus* [1], что указывает на их эволюционную и функциональную значимость. Изучение пространственной структуры 5' и 3' UTR KITV поможет раскрыть механизмы работы его генома и разработать методы борьбы с этим малоизученным вирусом. Однако получение пространственной структуры РНК является сложной и трудоемкой задачей вследствие ее подвижности и нестабильности в растворе.

В настоящей работе была разработана методика сокристаллизации РНК с РНК-связывающим белком оболочки фага MS2 (белок MS2) на основе системы MS2-тегинга, которую используют для визуализации РНК в клетках. Белок MS2 связывается со шпилькой, которая образована специфичной последовательностью РНК длиной 18 нуклеотидов (MS2-тег). Эту последовательность вводили в исследуемую РНК таким образом, чтобы она не влияла на нативную структуру. Нами было собрано 26 генетических конструкций, содержащих ДНК-копии нативных и химерных (содержащих MS2-тег) вариантов 5' и 3' UTR РНК всех четырех сегментов KITV для двух изолятов KITV/2018/1 и KITV/2018/2. Далее проводили наработку РНК 5' и 3' UTR 1-го и 3-го сегментов KITV *in vitro* T7-полимеразой и отчищали. Для исследования структуры РНК на синхротронном источнике методом малоуглового рентгеновского рассеяния образцы должны соответствовать определенным параметрам, а именно: чистота образца не менее 95 %, преобладание целевой формы молекулы и концентрация не менее 1 мг/мл. Вследствие чего для 10 образцов РНК-транскриптов 5' и 3' UTR 1-го и 3-го сегментов KITV удалось оптимизировать условия наработки, и с них были получены экспериментальные кривые малоуглового рассеяния на станции BL19U2 Шанхайского центра синхротронного излучения, по которым были рассчитаны общие структурные параметры, такие как молекулярная масса и радиус инерции. Численные показатели экспериментально посчитанных и теоретически посчитанных молекулярных масс укладываются в интервал молекулярных

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение от 30.05.2025 № 075-15-2025-452).

масс, получаемых различными способами, что принципиально важно для дальнейшей оптимизации методик для подготовки РНК к сокристаллизации с модельным белком оболочки фага MS2 и белками K1TV. Радиус инерции свидетельствует о том, что биомолекулы химерных и нативных 5' и 3' UTR РНК K1TV формируют в растворе компактные упорядоченные структуры. Введение MS2-tag в структуру 5' и 3' UTR РНК K1TV не влияет на изменение радиуса инерции биомолекул в растворе. Кроме того, измеренный размер биомолекул химерных и нативных 5' и 3' UTR РНК K1TV напрямую коррелирует с длиной нуклеотидных последовательностей и молекулярными массами 5' и 3' UTR РНК K1TV.

Для трех пар нативных и химерных вариантов 5' UTR РНК 1-го сегмента K1TV, 5' и 3' UTR РНК 3-го сегмента изолята K1TV/2018/1 были восстановлены пространственные структуры, которые демонстрируют схожую вытянутую, но компактную форму. При попарном наложении пространственных структур нативных вариантов с химерными UTR РНК K1TV не выявлено значительных различий формы, что говорит об отсутствии влияния MS2-tag на структуру нативных 5' и 3' UTR РНК K1TV. Это делает возможным использование системы «MS2-тегинга» для исследования структуры 5' и 3' UTR РНК K1TV с помощью белка оболочки фага MS2 для сокристаллизации комплексов белок-РНК в целях дальнейшего рентгеноструктурного анализа. Экспериментальное подтверждение структуры 5' и 3' UTR РНК K1TV с помощью рентгеноструктурного анализа позволит установить роль UTR вирусной РНК в реализации генетической информации новых флавиподобных вирусов с сегментированным геномом.

Литература

1. Tsishevskaya A. A., Alkhireenko D. A., Bayandin R. B. et al. Untranslated Regions of a Segmented Kindia Tick Virus Genome Are Highly Conserved and Contain Multiple Regulatory Elements for Viral Replication // *Microorganisms*. 2024. Vol. 12 (2). P. 239.