

Роль белка MBNL1 в репродукции эховирусов

Научный руководитель – Дмитриев Сергей Евгеньевич

Гробушкин Павел Андреевич

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра молекулярной биологии, Москва, Россия

E-mail: gropavel@mail.ru

Эховирусы являются группой (+)РНК-содержащих вирусов, относящихся к роду *Enterovirus* семейства Picornaviridae. Многие из них - возбудители разнообразных заболеваний, в том числе детских ^[1]. Для трансляции своих мРНК эховирусы используют IRES-элементы (*англ.* internal ribosome entry site) - высокоструктурированные участки мРНК, находящиеся в 5'-нетранслируемых областях и отвечающие за связывание факторов инициации и рибосом ^[2]. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе синтеза белков эховирусов, изучены крайне слабо.

Для поиска генов человека, задействованных в жизненном цикле эховирусов, мы провели CRISPR/Cas-опосредованный генетический скрининг на устойчивость культивируемых клеток к цитопатической эховирусной инфекции. Клетки эмбриональной почки человека НЕК293Т, трансдуцированные полногеномной лентивирусной CRISPR-библиотекой GeCKO v2, заражали эховирусами Echo 6, Echo 11, Echo19 и Echo 30. Немногочисленные клетки, выжившие после заражения, размножили, затем выделили из них ДНК, амплифицировали кассеты с генами гидовых РНК и просеквенировали их на платформе Illumina.

Одним из генов, нокаут которого позволял клеткам выживать при заражении эховирусами, оказался ген *MBNL1* (Muscleblind Like Splicing Regulator 1), который кодирует РНК-связывающий белок, участвующий в альтернативном сплайсинге мРНК. Ранее было показано, что белок MBNL1 является партнёром другого регулятора сплайсинга, белка РТВР1 ^[3], хорошо известного в качестве ITAF (*англ.* IRES trans-acting factor) - фактора, необходимого для работы пикорнавирусных IRES-элементов ^[2]. Исходя из этого, было выдвинуто предположение, что MBNL1 участвует в IRES-опосредованной инициации трансляции мРНК эховирусов.

Для проверки гипотезы с помощью технологии CRISPR/Cas была получена моноклональная линия клеток НЕК293Т с нокаутом гена *MBNL1*. Отсутствие соответствующего белкового продукта было подтверждено Вестерн-блот-гибридизацией. Полученную моноклональную линию, а также исходные клетки НЕК293Т заражали разными энтеровирусами и оценивали динамику развития цитопатического эффекта. Вирусы CVA16, CVA9, Echo6, Echo7, Echo14, Echo19 и Echo30 вызывали гибель культуры нокаутированных клеток лишь спустя 3-4 дня после заражения, а вирус CVA9 и вовсе не оказывал на них цитопатического действия, хотя в случае клеток «дикого типа» все эти вирусы вызывали гибель культуры в течение суток.

Для выяснения роли белка MBNL1 в IRES-опосредованной трансляции были созданы репортерные конструкции с геном люциферазы светлячка под контролем IRES-элементов эховирусов Echo6 и Echo11. Трансляция искусственно синтезированных мРНК, полученных с этих конструкций, была проанализирована в клетках с нокаутом гена *MBNL1* и в клетках «дикого типа». В докладе будут представлены данные о роли белка MBNL1 в жизненном цикле эховирусов.

Источники и литература

- 1) Lee et al. J. Clin. Virol. 2010, 49, 175-179.
- 2) Sorokin et al. Biochemistry (Moscow), 2021, 86, 1060–1094.
- 3) Gooding et al. Nucleic Acids Res. 2013, 41, 4765–4782.