

**Ингибирование TLR-рецепторов эндотелиальных клеток из пупочной вены человека снижает уровень экспрессии мРНК нуклеокапсидного белка хантавирусов**

**Научный руководитель – Ризванов Альберт Анатольевич**

*Охезин Е.В.<sup>1</sup>, Черенкова Е.Е.<sup>2</sup>, Мартынова Е.В.<sup>3</sup>*

1 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра генетики, Казань, Россия; 2 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия; 3 - Казанский государственный медицинский университет, Педиатрический факультет, Казань, Россия

Хантавирусы относятся к семейству *Bunyaviridae* и являются возбудителями таких заболеваний, как геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, хантавирусный легочный синдром в зависимости от штамма. Учитывая распространенность вирусных геморрагических лихорадок в России и за рубежом, изучение молекулярных механизмов патогенеза хантавирусной инфекции весьма актуально.

Вирион хантавируса включает в себя 3 геномных сегмента отрицательно заряженной РНК: S- сегмент, который кодирует вирусный белок нуклеокапсида (N белок). М- сегмент кодирует предшественник гликопротеинов G1 и G2, формирующие билипидную оболочку. L-сегмент кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу.

Цель работы—исследование активации Toll-подобных рецепторов (TLR) при инфицировании культуры эндотелиальных клеток из пупочной вены человека (HUVES) рекомбинантными лентивирусами, экспрессирующими нуклеокапсидный белок патогенных и непатогенных хантавирусов.

С помощью технологии клонирования Gateway ранее нами были получены лентивирусы, несущие в составе N-белок хантавирусов Проспект Хилл (LV-PHV-S), Пуумала (LV-PUU-S), Андес (LV-AND-S) и Хантаан (LV-HTV-S).

Первоначально с помощью катионного раствора культуру клеток HUVES трансфицировали короткими интерферирующими РНК (киРНК), ингибирующими активацию TLR3, TLR7, TLR9. Спустя 48 часов клетки инфицировали рекомбинантными лентивирусами с множественностью инфицирования 1.

Оценку активации TLR-рецепторов и анализ уровня экспрессии мРНК нуклеокапсидного белка *in vitro* проводили через 48 часов после инфицирования клеток рекомбинантными лентивирусами. Тотальную РНК из культур клеток HUVES выделяли по стандартному протоколу с использованием реагента PureZol (BioRad). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием 200U обратной транскриптазы Revertaid Reverse Transcriptase (Thermoscientific), 20U ингибитора РНКаз и 100 нг тотальной РНК. Количественную оценку экспрессии генов осуществляли посредством ПЦР в реальном времени с использованием ген специфичных праймеров. Нормализацию экспрессии генов проводили по 18S рРНК. Серийное разведение кДНК, использовали для построения стандартной кривой, и определения уровня экспрессии гена. Уровень экспрессии исследуемых генов в нетрансфицированных киРНК клетках принимали за 100%.

В результате исследования было показано многократное увеличение экспрессии TLR3, TLR7 и TLR9 по сравнению с контролем, что свидетельствует о индукции иммунного ответа именно на вирусные белки. Нами было обнаружено, что добавление специфических киРНК, а именно TLR3, TLR7 и TLR9 ингибируют синтез матричной РНК белков нуклеокапсида хантавирусов, снижая вирусную транскрипцию. Так, в случае добавления киРНК TLR3 транскрипция мРНК PHV-S снижается в 64,3 раз. Добавление киРНК TLR3 снижает экспрессию мРНК нуклеокапсида вируса Андес в 35,7 раз. Опираясь на полученные

данные, можно предположить TLR3 как терапевтическую мишень для разработки альтернативных подходов терапии ГЛПС.