**Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение «Средняя школа №11»**

**муниципального образования «Город Майкоп»**

**«Изучение стабильности участков гена N-белка SARS-CoV-2»**

**Выполнил:**

Богорубов Максим Евгеньевич

Ученик 10 «А» класса МБОУ «СШ № 11»

город Майкоп Республика Адыгея

**Научный руководитель:**

Шимек Вера Васильевна

учитель биологии МБОУ «СШ№11»

высшей квалификационной категорий

Отличник образования РФ

Майкоп, 2021 год

Оглавление

Введение ……………………………………………………………….......3

1.Обзор литературы

1.1. Общая характеристика вирусов ………………………….………….4

1.2 Семейство короновирусов ……………………………………………4

[2. Экспериментальная часть](#_Toc529480148)

[2.1. Методика исследования](#_Toc529480149) ……………………………………………...5

2.2 .[Схема](#_Toc529480150) опыта

2.2.1 Поиск распространённых мутантных участков,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,……6

2.2.2 Выбор РНК-олигонуклеотидов и расчет стабильности

образуемого комплекса ……………………………………………………6

2.3 Обсуждение полученных результатов …………………………..……7

Выводы и рекомендации …………………………………………………..7

Список литературы и источник информации ……………………………8

**Введение**

**Актуальность**

Настоящее поколение жителей планеты стали свидетелями и участниками пандемии COVID-19, которая находится в стадии развития и увеличивает число своих жертв. Исходы этой пандемии пока не ясны и вызывают тревогу как за здоровое поколение, которое может быть инфицировано, так и за больных людей, где возможны различные варианты течения заболевания - от бессимптомного до тяжелого с летальным исходом.

В качестве генетической терапии этого заболевания могут быть использованы антисенс-олигонуклеотиды. Антисенс-олигонуклеотиды – короткие участки нуклеиновых кислот, до 50 нуклеотидов, комплементарные определенным мишеням. Согласно центральной догме молекулярной биологии, на матрице информационной РНК происходит процесс транслирования белка, а также возможна обратная транскрипция и репликация РНК. Всеми этими процессами обладает коронавирус COVID-19. Ингибируя эти процессы антисенс-олигонуклеотидами, мы способны вызвать не только остановку экспрессии гена, но и деградацию матричной РНК. Одним из ключевых ферментов в процессе разрушения являются РНК-нуклеазы, в частности РНКаза-Н [6]. Таким образом, выбрав подходящий участок генома SARS-CoV-2, мы можем препятствовать развитию заболевания.

**Цель работы:**Изучение стабильности участков гена, кодирующего нуклеокапсидный белок COVID-19.

**Задачи:**

1. Выбор участков РНК-мишени
2. Поиск распространённых мутантных участков данного гена в литературных источниках
3. Выбор РНК-олигонуклеотидов и расчет стабильности образуемого комплекса

**Методы исследований:** математические методы компьютерного анализа Olygo Analyzer [4 ]) ; структурная биоинформатика( RNA fold [5 ]).

[**1. Обзор литературы**](#_Toc529480143)

**1****.1 Общая характеристика вирусов**

Вирусы – это мельчайшие инфекционные агенты, которые имеют молекулярную (неклеточную) организацию, обладают единственным типом нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и являются облигатными (строгими) внутриклеточными паразитами. Несмотря на уникальный жизненный цикл и особенности структуры, вирусы являются биологическими организмами, способными к самовоспроизведению на основании универсального для всего живого генетического кода.

Заболевания, имеющие вирусную природу, известны с глубокой древности. Опустошительные эпидемии оспы в Китае и Индии отмечены еще в источниках X века до нашей эры. Свидетельства о поражении людей паралитической формой полиомиелита обнаруживаются при анализе источников и артефактов Древнего Египта. В V веке д. н. э.

**1.2 Семейство короновирусов**

Коронавирусы составляют обширное семейство из 40 вирусов, 7 из которых вызывают заболевания у человека. Некоторые коронавирусы, которые обычно заражают животных, постепенно эволюционировали и стали способными заражать людей. COVID-19 вероятно, является одним из таких вирусов.

Коронавирусы получили свое название из-за характерного вида вирусной частицы при электронной микроскопии – белковые шипы обрамляют вирусный суперкапсид наподобие зубцов в короне. Впервые коронавирусы человека были выделены Д. Тиреллом и М. Бино в 1965 г. от пациента с острым ринитом. До начала XXI века считалось, что у людей представители семейства Coronaviridae вызывают легкие по течению болезни, длящиеся несколько дней и завершающиеся полным выздоровлением. Однако в 2002 г. в Юго-Восточной Азии (главным образом, в Китае), возникла эпидемия тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС) с летальностью до 9-10%.

В 2012 г. в Саудовской Аравии были впервые зарегистрированы случаи новой тяжелой коронавирусной инфекции, получившей название «Ближневосточный респираторный синдром» (БВРС). Соответственно, выделенный от пациентов новый возбудитель был определен как БВРС-коронавирус. [8].

Полный геном COVID-19 уже достаточно изучен, его первая широкая публикация китайскими органами здравоохранения была сделана вскоре после обнаружения вируса, что облегчило процесс диагностики и идентификации возбудителя инфекции. COVID-19 – одноцепочечный РНК-содержащий вирус, относится к семейству Coronaviridae, группе 2b бетакоронавирусов, который имеет по меньшей мере 70% сходства в генетической последовательности с SARS-CoV, его размер составляет около 100 нм [7].

SARS-CoV-2 – РНК вирус из семейства бета-коронавирусов, являющийся возбудителем атипичной пневмонии. На сегодняшний день (26 сентября) статистика заболеваемости COVID-19 в России за всё время составило 7421000, а смертность-204000 человек [1].

**[2. Экспериментальная часть](#_Toc529480148)**

[**2.1. Методика исследования**](#_Toc529480149)

**Выбор РНК-мишени**

В качестве мишени был выбран ген, кодирующий нулеокапсидный белок SARS-CoV-2. Нуклеокапсидный белок(N-белок)-структурообразующий белок, защищающий вирусную РНК от деградации. Подавление экспрессии данного белка не позволит сборке вирусной частицы внутри организма и, следовательно, развитию заболевания. Ген, кодирующий нуклеокапсидный белок имеет длину 1260 нуклеотидов. Секвенированная последовательность гена N-белка была взята из открытых международных баз данных NCBI и GenBank [2]. Кроме того, его вторичная и третичная структуры, рассчитанные в программе RNA fold [5]. имеют протяженные участки РНК-дуплексов, представленные шпильками. Эти участки уже не могут быть выбраны в качестве мишени, так как находятся в гибридизованном состоянии. Кроме того, в гене встречаются одноцепочные участки РНК, потенциально имеющие возможность стать мишенями антисенс-олигонуклетидов.

**2.2.**[**Схема**](#_Toc529480150) **опыта**

**2.2.1 Поиск распространённых мутантных участков**

По данным литературного анализа участки гена N-белка с 69 по 108 нуклеотид, а также с 531 по 621 нуклеотид имеют предрасположенность к возникновению новых мутаций (3). Участок 69-108 в основном имеет гибридизованное состояние, а вот участок 531-621 имеет как гибридизованное, так и негибридизованное состоянии. Тем не менее все еще остаются достаточно продолжительные одноцепочечные участки-возможные мишени.

**2.2.2 Выбор РНК-олигонуклеотидов и расчет стабильности образуемого комплекса**

Нами были выбраны фрагменты с 415 по 438 нуклеотид и с 801 по 816 нуклеотид в качестве антисенс-олигонуклеотидов. Оба эти участка находятся в полностью негибридизованном положении, а также в стереометрически доступных местах.

Участок 415-438 имеет длину 24 нуклеотида. Секвенированная последовательность: *5’- UUG AAU ACA CCA AAA GAU CAC AUU -’3*. Процент GC пар составляет **29,2 %**. К этому участку был составлен антисенс-олигонуклеотид с последовательностью*: 5’-AAU GUG AUC UUU UGG UGU AUU CAA-’3*. Этот олигонуклеотид, может принимать вторичные структуры (наибольшая температура плавления, расчитанная в OlygoAnalyzer [4]Tool, **13,1°С**). Температура плавления комплекса РНК-мишень/РНК-антисенс-олигонуклеотид равна **51,1°С.**

Участок 801-816 имеет длину 16 нуклеотидов. Секвенированная последовательность: *5’-AUA CAA UGU AAC ACA A-’3*. Процент GC пар составляет **25%**. К этому участку так же как и к первому был составлен антисенс-олигонуклеотид с последовательность: *5’-UUG UGU UAC AUU GUA-’3*. Данный олигонуклеотид имеет вторичные структуры, температуры плавления которых ниже **0°С.** Температура плавления комплекса РНК-мишень/РНК-антисенс-олигонуклеотид равна **38,2°С**.

**2.3 Обсуждение полученных результатов**

Олигонуклеотид комплементарный участку 415-438 способен образовывать вторичные структуры, однако низкая температура плавления(13,1°С) означает, что при 36,6**°**С образование таких структур будет невозможно. Температура плавления комплекса данного нуклеотида и РНК-мишени(51,1°С) намного выше физиологической температуры тела человека, а это означает, что комплекс способен образовываться и сохраняться в человеческом организме.

Олигонуклеотид комплементарный участку 801-816 так же, как и первый способен образовывать различные вторичные структуры, при этом их температура плавления крайне мала (меньше 0°С), следовательно, они не образуются в организме. При температуре среды в 36,6**°**С этот олигонуклеотид находится в комплексе с мишенью (температура плавления равна 38,2°С), но при повышении температуры тела, наблюдаемом во время течения болезни, комплекс может распасться, поэтому данная последовательность является малоэффективной.

На основании расчетов температур плавления олигонуклеотидов можно сделать заключение, что антисенс-олигонуклеотид к участку 415-438 намного больше эффективен в лечении SARS-CoV-2, чем участок 801-816.

**Выводы:**

1. На основе литературных данных были выбраны РНК-участки гена N-белка SARS-CoV-2, не рекомендуемые в качестве мишеней для антисенс-олигонуклеотидов.
2. Рассчитав вторичную структуру гена, кодирующего нуклеокапсидный белок, были выбраны наиболее подходящие участки для образования комплекса.
3. Были получены температуры плавления комплексов и выбран наиболее эффективный их них.

**Рекомендации:**

В качестве генетической терапии заболевания, вызываемого вирусом SARS-CoV-2, мы рекомендуем использовать антисенс-олигонуклеотид, комлиментарный участку 415-438 вирусной матричной РНК, кодирующей нуклеокапсидный белок. Но для подтверждения его эффективности необходимо рассчитать константы диссоциации методом задержки в полиакриламидном геле с детекцией по флуоресценции. В качестве флуорофора использовать Цианиновый 3, а синтез конъюгантов проводить методом активированных эфиров (NHS-эфиров).

**Из сказанного выше, можно сделать вывод: у нашей работы существуют перспективы дальнейшего развития!**

**Список литературы и источник информации:**

1. [https://стопкоронавирус.рф](https://стопкоронавирус.рф/)

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\_045512.2?report=genbank&from=28274&to=29533

1. По данным: РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВАРИАНТОВ С ЧАСТЫМИ МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ КАПСИДНОГО БЕЛКА N В РОССИЙСКИХ ИЗОЛЯТАХ SARS-COV-2. Кирьянов С.А. , Левина Т.А. , Кириллов М.Ю. 2020
2. <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>
3. <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>
4. <https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?name=RNase%20H>
5. Hui DS, I Azhar E, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. Int J Infect Dis. 2020 Jan 14. 91:264-266. [Medline].

8.МЕДИЦИНСКАЯ ВИРУСОЛОГИЯ Учебное пособие Под ред. д.м.н., профессора И.И. Генералова с.92.Витебск,2017.