

Strukturierte RNAs in Viren

— Preprint —

Roman Ochsenreiter¹, und Michael T. Wolfinger^{1,2,3*}

¹Institut für Theoretische Chemie, Universität Wien, 1090 Wien, Österreich

²Arbeitsgruppe Bioinformatik und Computational Biology, Fakultät für Informatik, Universität Wien, 1090 Wien, Österreich

³RNA Forecast e.U., 1100 Wien, Österreich

Abstract

Evolutionarily conserved RNAs in untranslated regions are key regulators of the viral life cycle. Exoribonuclease-resistant RNAs (xrRNAs) are particularly interesting examples of structurally conserved elements because they actively dysregulate the messenger RNA (mRNA) degradation machinery of host cells, thereby mediating viral pathogenicity. We review the principles of RNA structure conservation in viruses and discuss potential applications of xrRNAs in synthetic biology and future mRNA vaccines.

Einleitung

Flaviviren (Gattung: *Flavivirus*) umfassen rund 150 bekannte Viren, darunter wichtige Humanpathogene wie Dengue-, Gelbfieber- oder FSME-Viren (engl. tick-borne encephalitis virus, TBEV). Flaviviren zirkulieren typischerweise zwischen Insekten wie Stechmücken oder Zecken als Überträger (Vektoren), und Wirbeltieren als Wirt. Obwohl der Mensch für die wenigsten Flaviviren ein geeigneter Wirt ist, sind Infektionen häufig und führen jährlich zu Millionen von Erkrankungen, die Gesundheitssysteme global vor eine Herausforderung stellen.

Flaviviren: Viren mit einem RNA-Genom

Flaviviren gehören zu der großen Gruppe der RNA-Viren, die ihr Erbgut (Genom) grundsätzlich aus RNA-Bausteinen zusammensetzen. Im Unterschied zu vielen anderen Viren, Bakterien oder höheren Lebewesen, die DNA als Informationsträger verwenden, ist ein RNA-Genom nicht ausschließlich Träger der Erbinformation, sondern übernimmt gleichzeitig auch regulative Funktionen. Dazu gehören u.a. die Steuerung der viralen Replikation, Proteinsynthese oder die Umgehung der Immunantwort des Wirts.

RNA: Dynamisch und stark strukturiert

Eine Besonderheit von RNA ist ihre Fähigkeit, komplexe Strukturen auszubilden indem einzelnen Bausteine (Nukleotidbasen) durch Basenpaarungen miteinander wechselwirken (Abbildung 1). Die Gesamtheit der Basenpaarungen wird als Faltung oder Sekundärstruktur eines RNA Moleküls bezeichnet. Während Sekundärstrukturen keine exakte Beschreibung der dreidimensionalen Struktur darstellen, bilden sie dennoch eine hinreichend genaue Näherung um biologische Funktion zu erklären und sind daher von großer Bedeutung für die Forschung. In diesem Zusammenhang ist es interessant sich zu verdeutlichen dass die Abfolge der Nukleotidbasen letztendlich bestimmt, welche Sekundärstrukturen ausgebildet werden können. Beim

*Korrespondenz: michael.wolfinger@univie.ac.at

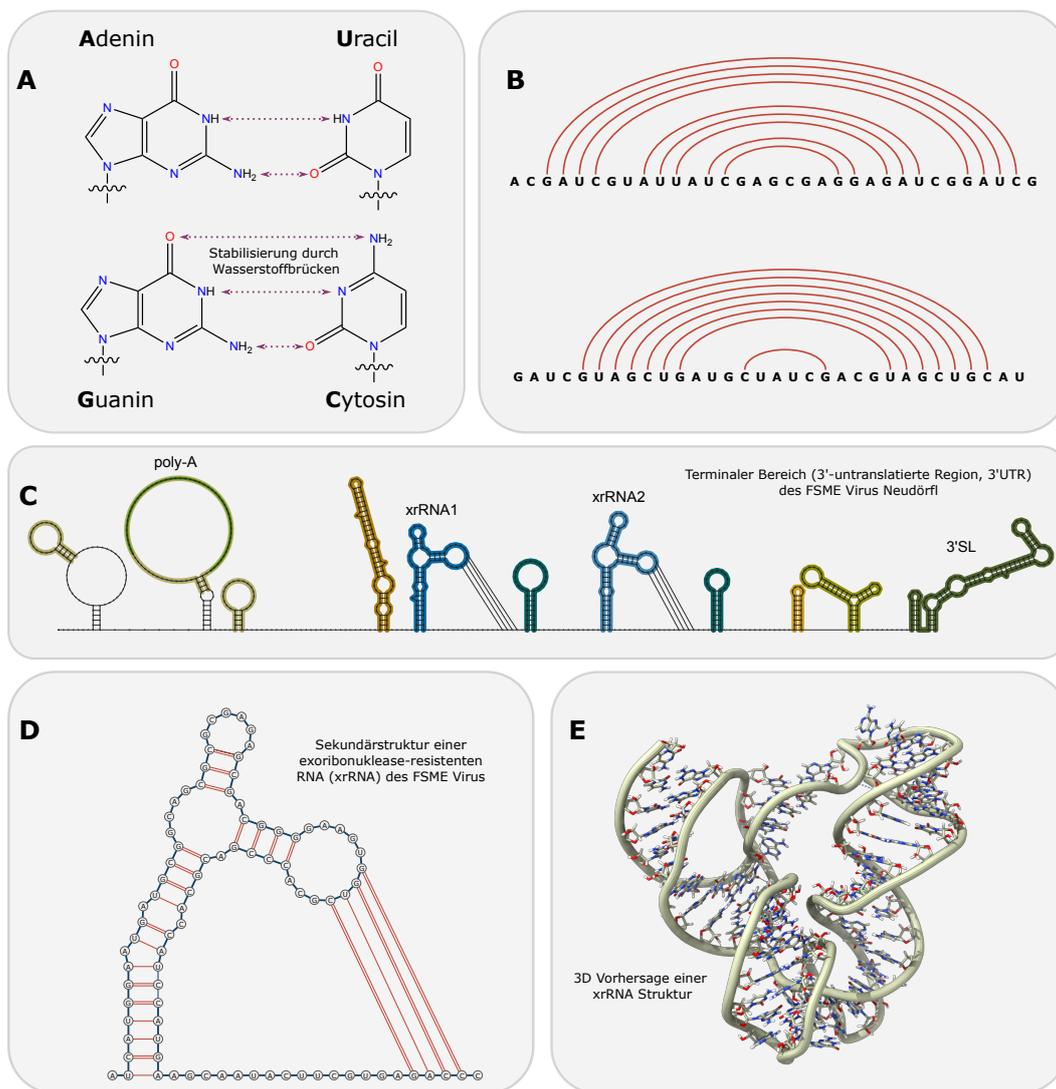


Abbildung 1: RNA und ihre Fähigkeit zur Bildung von Struktur. **A:** Wechselwirkungen zwischen den Nucleotidbasen. **B:** Schematische Abbildung einer Nucleotidkette und möglicher Basenpaare, die nicht unmittelbar benachbarte Nucleotide in räumliche Nähe zueinander bringen. **C:** Strukturierte RNAs in viralen Genomen. Detaillierte Sekundärstruktur (**D**) und Tertiärstruktur (**E**) einer funktionalen RNA.

Vergleich der RNA-Genome (Primärsequenzen) evolutionär verwandter Flaviviren, wie zum Beispiel Dengue- und Zika-Viren, fällt auf, dass sich diese stark unterscheiden. Andererseits weisen die davon ausgebildeten RNA Strukturelemente eine hohe Ähnlichkeit auf. Dieser Effekt ist als RNA-Struktur-Konservierung bekannt und lässt sich auf der Ebene der Sekundärstrukturen effizient beschreiben [1, 2].

Flaviviren besitzen evolutionär konservierte RNA Struktur

Das RNA-Genom von Flaviviren ist an beiden Enden von hochstrukturierten Bereichen flankiert, die nicht für Proteine kodieren. Am Ende des Virus-Genoms, innerhalb der sogenannten 3'-untranslatierten Region (3'UTR), finden sich zahlreiche strukturierte RNA Elemente, die spezifische biologische Funktionen übernehmen. Vergleiche verwandter Flaviviren haben gezeigt, dass strukturell und funktionell ähnliche RNAs in diesem Bereich des viralen Genoms häufig vorkommen. Es ist daher naheliegend, dass es evolutionären Druck auf die Erhaltung bestimmter RNA Strukturen gibt, wohingegen dieser Effekt auf der Ebene der Primärsequenzen wenig

ausgeprägt ist. Konkret wirkt dieser evolutionäre Druck auf die Erhaltung von Basenpaaren. Wenn zum Beispiel in einem für die Struktur wichtigen A–U Basenpaar eine A→C Mutation auftritt, lastet in Folge dessen evolutionärer Druck auf dem Basenpaarungspartner U und begünstigt eine weitere Mutation U→G, die das Basenpaar wiederherstellt. Dieses Phänomen ist als kompensatorische Mutation bekannt und von eminenter Bedeutung für die Identifikation von konservierten RNA Strukturen.

xrRNAs: RNA Struktur als virale Überlebensstrategie

Ein in Flaviviren gut untersuchtes Beispiel für evolutionäre Konservierung funktioneller RNA Elemente ist die Familie der exoribonuklease-resistenten RNAs (xrRNAs), die es den Viren ermöglicht, den regulären mRNA-Abbau in infizierten Zellen aktiv zu unterbinden (Abbildung 2). In diesem Zusammenhang spielt die wirtseigene 5'-3'-Exonuklease XRN1 [3] eine besondere Rolle: Flaviviren haben die bemerkenswerte Strategie entwickelt, einen partiellen Abbau des eigenen Genoms zu tolerieren, mit dem Ziel die Exonuklease an den hochkonservierten xrRNA Elementen in der 3'UTR irreversibel zu blockieren und den Abbau dahinter liegender RNA-Regionen zu verhindern. Derart blockierte Exonukleasen stehen der Zelle de facto nicht mehr zur Verfügung, wodurch der Abbau weiterer Viruspartikel erschwert wird.

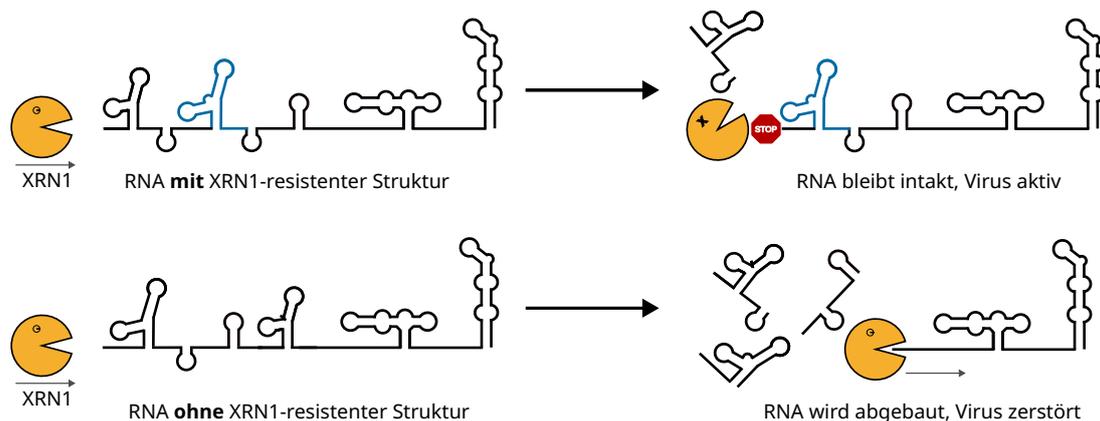


Abbildung 2: RNA Strukturelemente von Flaviviren verhindern den Abbau der viralen RNA durch das wirtseigene Protein XRN1. Die RNA Struktur agiert dabei als Blockade und stellt sicher dass XRN1 keine weitere RNA mehr abbaut sobald es dem Strukturelement begegnet.

Umgehung des Immunsystems durch virale RNAs

Als unmittelbare Konsequenz dieser Blockade von Exonukleasen entsteht eine Ansammlung von langen nicht-kodierenden viralen RNAs (engl. long non-coding RNA, lncRNA) in infizierten Zellen. Diese sogenannten subgenomischen flaviviralen RNAs (sfRNAs) sind stabile Abbauprodukte, die aus unvollständigem Abbau der viralen RNA durch die Exoribonuklease-Tätigkeit des Wirts entstehen [4]. sfRNAs beeinträchtigen essentielle zelluläre Prozesse wie beispielsweise den Umsatz von mRNAs, oder die antivirale Typ I Interferon-Antwort in Vertebraten mit dem Ziel, eine virale Infektion voranzutreiben [5]. Quantitativer Schutz gegen Abbau durch Exonukleasen, der zur Bildung bzw. Akkumulation von sfRNAs führt dürfte eine universelle Eigenschaft aller Flaviviren sein.

Flaviviren als evolutionärer Hotspot für Strukturevolution

xrRNAs kommen nicht nur in praktisch allen bekannten Flaviviren vor, sondern weisen auch subtile, wenngleich deutlich unterscheidbare strukturelle Alleinstellungsmerkmale auf. Wir

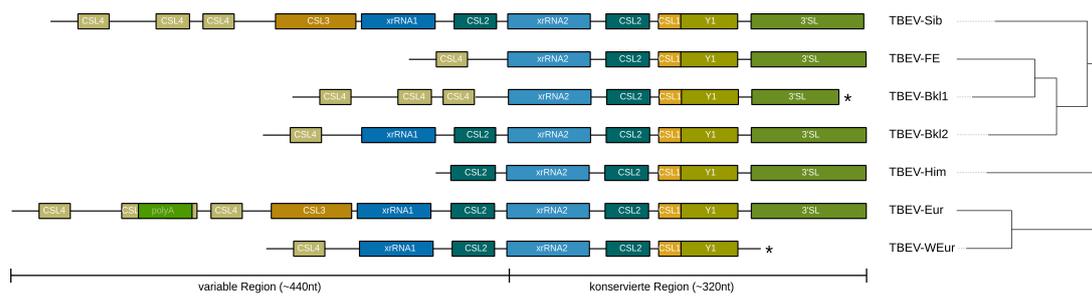


Abbildung 3: Vergleich der 3'UTRs verschiedener Subtypen des FSME Virus. Der phylogenetische Baum rechts zeigt die Verwandtschaft der Subtypen an. Die 3'UTRs weisen nicht nur unterschiedliche Längen sondern auch eine abweichende Anordnung funktionaler RNA Elemente auf. Strukturell homologe Elemente sind farblich gekennzeichnet. Unvollständige Bereiche sind mit einem Stern gekennzeichnet. Abbildung angepasst von [8].

konnten mit bioinformatischen Methoden zur RNA Strukturvorhersage [6] und Homologiesuche [7] zeigen dass xrRNA Elemente in Flaviviren typischerweise in zwei (in Extremfällen sogar bis zu fünf) hintereinander liegenden Kopien vorkommen [1]. Dabei scheint es sich um eine Backup Strategie der Viren zu handeln, die sicherstellt dass auf jeden Fall sfRNAs gebildet werden, selbst wenn ein xrRNA Element durch XRN1 abgebaut werden sollte. Es gibt aber auch Beispiele von Flaviviren, die nur eine xrRNA in ihrer 3'UTR besitzen, wie der Dengue Virus Serotyp IV. Dessen einzelne xrRNA ist homolog zur zweiten xrRNA in den Dengue Serotypen I-III, was darauf schließen lässt dass Dengue Serotyp IV eine xrRNA im Lauf der Evolution verloren hat [2]. Ein anderes interessantes Beispiel sind die FSME Viren, von denen bis dato sieben Subtypen beschrieben sind. Diese Subtypen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Pathogenität sondern weisen allesamt unterschiedliche 3'UTR Architekturen auf (Abbildung 3), die sich aus der Kombination von insgesamt acht evolutionär konservierten RNA Elementen ergeben [8].

Strukturierte RNAs und mRNA Impfstoffe

Die SARS-CoV-2 Pandemie hat gezeigt dass RNA Viren in der Lage sind, die globale Ordnung nachhaltig zu beeinträchtigen. Gleichzeitig hat sich Dank der Effektivität der messenger RNA (mRNA) Impfstoffe eine Technologie entwickelt die der Schlüssel zur Bekämpfung zukünftiger Pandemien ist. Wenngleich bei der Entwicklung der aktuellen mRNA Impfstoffe nicht auf RNA Struktur geachtet wurde [9], ist hier dennoch ein enormes Potential für die kommende Generation von mRNA Impfstoffen vorhanden. Gegenstand unserer aktuellen Forschung ist es, künstliche xrRNAs zu designen, die als molekulare Schalter den Abbau von mRNAs ermöglichen oder verhindern. Diese Technologie aus dem Bereich der synthetischen Biologie zur Regulation der Stabilität von RNA-Molekülen wird uns in weiterer Folge erlauben, die Geschwindigkeit mit der zum Beispiel ein mRNA Impfstoff abgebaut wird genau zu kontrollieren. Durch eine genaue Kontrolle der Halbwertszeit von mRNA-Molekülen besteht das Potenzial, die Proteinexpression zu verlängern und dadurch die Effektivität von RNA-basierten Therapien zu erhöhen.

Literatur

- [1] Roman Ochsenreiter, Ivo L Hofacker und Michael T Wolfinger. „Functional RNA Structures in the 3'UTR of Tick-Borne, Insect-Specific and No-Known-Vector Flaviviruses“. In: *Viruses* 11.3 (2019), S. 298.
- [2] Michael T. Wolfinger, Roman Ochsenreiter und Ivo L. Hofacker. „Functional RNA Structures in the 3'UTR of Mosquito-Borne Flaviviruses“. In: *Virus Bioinformatics*. Hrsg. von Dmitriy Frishman und Manja Marz. Chapman und Hall/CRC Press, 2021, S. 65–100.

- [3] Christopher Iain Jones, Maria Vasilyevna Zabolotskaya und Sarah Faith Newbury. „The 5'-> 3' exoribonuclease Xrn1/Pacman and its functions in cellular processes and development“. In: *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 3.4 (2012), S. 455–468.
- [4] Gorben P Pijlman u. a. „A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity“. In: *Cell Host & Microbe* 4.6 (2008), S. 579–591.
- [5] Andrii Slonchak und Alexander A Khromykh. „Subgenomic flaviviral RNAs: What do we know after the first decade of research“. In: *Antivir. Res.* 159 (2018), S. 13–25.
- [6] Ronny Lorenz u. a. „ViennaRNA Package 2.0“. In: *Algorithm Mol Biol* 6.1 (2011), S. 26.
- [7] Eric P. Nawrocki und Sean R. Eddy. „Infernal 1.1: 100-fold Faster RNA Homology Searches“. In: *Bioinformatics* 29 (2013), S. 2933–2935.
- [8] Lena S. Kutschera und Michael T. Wolfinger. „Evolutionary traits of Tick-borne encephalitis virus: Pervasive RNA structure conservation and molecular epidemiology“. In: *Virus Evol.* 8.1 (2022). ISSN: 2057-1577.
- [9] Xuhua Xia. „Detailed dissection and critical evaluation of the Pfizer/BioNTech and Moderna mRNA vaccines“. In: *Vaccines* 9.7 (2021), S. 734.

Funding Information

Diese Arbeit wurde durch den Wissenschaftsfonds FWF, Projekt I 6440-N unterstützt.