

Н. Д. Львов¹, А. С. Бавыкин², А. В. Мельниченко¹, А. В. Карпукхин²

Блокирование функций гена *RS1* вируса простого герпеса 2-го типа малыми интерферирующими РНК – новые перспективы для направленного противовирусного воздействия

¹ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития России, Москва; ²Учреждение Российской академии медицинских наук Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

Выявлена новая мишень для таргетной терапии вируса простого герпеса 2-го типа (ВПГ2). Мишень представляет собой мРНК гена *RS1*, активация которого является ключевым этапом в регуляции экспрессии ранних генов ВПГ-2. Обнаружено, что направленное выключение функции этого гена при помощи малых интерферирующих РНК (siRNA/миРНК) приводит к полному подавлению инфекции ВПГ-2. Созданные интерферирующие РНК способны взаимодействовать с обоими типами – ВПГ-1 и ВПГ-2. Получены результаты, свидетельствующие о защитных свойствах миРНК в отношении цитопатического действия ВПГ-2 и отсутствии токсичности для инфицированных клеток *Vero*.

Ключевые слова: вирус простого герпеса 2-го типа, РНК-интерференция, малые интерферирующие РНК (миРНК/small interfering RNA), блокирование репродукции ВПГ-2

The blocking effects of small interfering RNAs on RS-1 gene functions of herpes simplex virus type 2: new perspectives for targeted antiviral exposure

N. D. Lvov¹, A. S. Bavykin², A. V. Melnichenko¹, A. V. Karpukhin²

¹D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of Russia, Moscow;

²Medical Genetics Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

A new target has been revealed for therapy for herpes simplex type 2. The target is *RS1* mRNA whose activation is a key stage in regulating the expression of the early genes of herpes simplex virus type 2 (HSV-2). The targeted knockdown of the function of this gene by small interfering RNAs (siRNAs) has been found to result in the complete suppression of HSV-2 infection. The designed interfering RNAs are able to interact with both HSV-1 and HSV-2. The findings suggest that siRNAs have protective properties against the cytopathic effect of HSV-2 and cause no toxicity to infected *Vero* cells.

Key words: influenza virus, reassortant, hemagglutinin, neuraminidase, pandemic

Вирусы простого герпеса человека ВПГ-1 и ВПГ-2 убиквитарны с преобладанием бессимптомных форм носительства. Будучи иммунодефицитными патогенами вирусы герпеса обуславливают прогрессирующее снижение иммунного тонуса организма, что предрасполагает к системной диссеминации и поражению тканей и органов макроорганизма. Пантропные возможности герпесвирусов, их способность легко преодолевать гематоэнцефалический барьер определяют развитие системных заболеваний ЦНС, суставов, системы кровообращения, респираторного тракта, желудочно-кишечной и мочеполовой систем. Поражаются зрительный, слуховоспринимающий аппарат, нейрогуморальная, гормональная и цитокиновая сферы организма [1, 2].

В России обязательная регистрация герпеса половых органов (ГПО) введена лишь в 1993 г. Заболеваемость в стране превышает 16,3, а в Москве – 74,8 на 100 тыс. населения; количество больных с клиническими проявлениями ГПО составляет приблизительно 0,5–1%, а в США и Европе – до 6–10% взрослого населения, причем в США ежегодно регистрируют до 6–10 млн случаев генитального герпеса.

Вышесказанное определяет как острую социальную значимость проблемы, так и необходимость продолжения поиска средств для более эффективного блоки-

рования герпетической инфекции (ГИ) человека.

При блистательных возможностях современной противовирусной химиотерапии (системное воздействие, селективное блокирование вирусспецифических процессов, способность преодолевать гематоэнцефалический барьер, относительно слабый токсический эффект) есть и серьезные минусы: постепенное и неуклонное формирование лекарственной устойчивости, подчас носящее перекрестный характер, некоторые побочные эффекты при долговременной терапии вносят ряд ограничений в прогнозирование результата.

Настоящее исследование посвящено изучению блокирующих герпесвирусную репродукцию возможностей малых интерферирующих РНК (миРНК/small interfering RNA) в качестве основы для нового таргетного противовирусного соединения. Уникальность данного метода – возможность подбора и синтеза миРНК, способных на основе достаточно высокой гомологии [7] геномов ВПГ-1 и ВПГ-2 комплементарно взаимодействовать с мРНК обоих вирусов.

Целью работы было исследование эффективности использования РНК-интерференции для подавления ГИ на модели ВПГ-2 *in vitro*. В плане перспективности применения миРНК в качестве нового противовирусного средства решались такие задачи, как подавление вирусной репликации в ранних стадиях инфекции

Контактная информация:

Мельниченко Анна Валерьевна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр.; e-mail:annamel73@yandex.ru

и защита клеток от цитопатического действия (ЦПД) вируса. Проводилась также оценка цитотоксичности вновь синтезированных миРНК на культуре клеток.

Материалы и методы

Клетки. В работе использовали перевиваемую клеточную линию почек зеленой маргyšки *Vero*, любезно предоставленную лабораторией культур тканей ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского. Клетки культивировали в концентрации 250–500 тыс./мл в среде Игла-DMEM (производство ФГУ НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова) с добавлением 2 mM L-глутамин, 10% ЭТС (НПО «ПанЭко», Москва) в атмосфере, содержащей 5% CO₂ и 98% влажности при 37°C.

Вирус. Использовали вирус простого герпеса человека 2-го типа (ВПГ-2) штамм «ВН», инфекционный титр которого составил 5 lg ТЦД₅₀/мл.

Малые интерферирующие РНК (миРНК). Поскольку в клинике и патогенезе вирусы герпеса 1-го и 2-го типа тесно связаны друг с другом, мы впервые подобрали такие миРНК, которые могли быть использованы сразу для обоих вирусов. В ходе сравнительного анализа консервативных участков всех генов ВПГ-1 и ВПГ-2 были выявлены 2 гена, которые содержали идентичные (100%) участки, удобные для взаимодействия с миРНК. Таким образом, были отобраны следующие гены: *UL32* (соответствует гену *UL30* ДНК-полимеразы ВПГ-1) и *RS1* (ген, отвечающий за активацию транскрипции ДНК ВПГ-2, является аналогом функции гена *ICP4* ВПГ-1). Синтезированные миРНК для каждой мишени представляют собой 2 нити длиной в 21 пару оснований в виде смысловой и антисмысловой нитей. Перед проведением трансфекции из нитей получали дуплексы, которые обеспечивают устойчивость миРНК для внутриклеточных нуклеаз.

Трансфекция. Трансфекцию миРНК проводили с помощью липофектамина с использованием набора для трансфекции (RNAiMAX, “Invitrogen”) интерферирующих РНК, предназначенного для клеточных линий, живущих в монослое. Клетки *Vero* были рассеяны на 48-луночные плато в количестве $1,2 \cdot 10^5$ за сутки до трансфекции таким образом, чтобы на следующий день после трансфекции достигнуть 50% монослоя. За сутки перед трансфекцией клетки перевели на среду ИГЛА (НПО «ПанЭко», Москва) с пониженным содержанием сыворотки (1%), без антибиотиков. Лунки с клетками были разделены на контрольные, без миРНК, без вируса (контроль клеток); контрольные, с вирусом, без миРНК (контроль вируса); контрольные с миРНК, без вируса и клетки с миРНК (контроль препарата), предварительно инфицированные вирусом. В работе использовали серийные 10-кратные разведения вируса (10⁻¹, 10⁻² и т. д.). Множественность инфицирования составила 10 и 100 ТЦД₅₀/лунка. За 1 ч до трансфекции миРНК клетки были инфицированы ВПГ-2. После адсорбции вируса на клетках (через 1 ч инкубации) из лунок удаляли супернатант, вносили смеси миРНК с липофектаминоном в режиме прямой трансфекции согласно протоколу набора (RNAiMAX, “Invitrogen”) и помещали в термостат при 5% CO₂ и 37°C. Смеси миРНК с липофектаминоном готовили в соответствии с инструкцией набора. Конечная концентрация миРНК в лунках составляла от 8 до 50 нМ. Инкубацию клеток с миРНК проводили в течение 5

сут до полного лизиса клеток.

Результаты и обсуждение

Использование миРНК в современной медицине приобретает значительные масштабы благодаря простоте их синтеза и производства. Эти соединения удобны для химических модификаций и могут быть адаптированы к различным видам носителей (белковых, полиэтиленгликоля, липосом и др.) для терапевтической доставки в клетки [3, 4]. Кроме того, последовательности миРНК могут быть внедрены в состав экспрессирующих векторов с целью длительного поддержания их концентрации в клетках [5]. Основной особенностью и преимуществом интерферирующих РНК с точки зрения таргетной противовирусной терапии является целенаправленное использование миРНК для подавления экспрессии нужных вирусных белков. Сходство вирусных геномов ВПГ-1 и ВПГ-2 [7] позволило подобрать миРНК для наиболее консервативных участков в области двух генов. В результате сравнительного анализа последовательностей геномов ВПГ-1/2 были выбраны гены *RS1* и *UL32*.

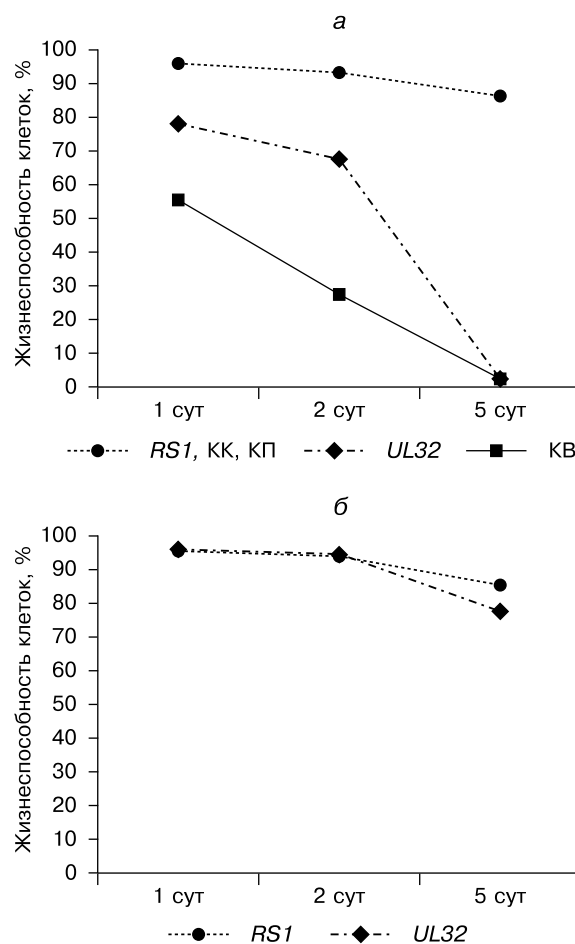


Рис. 1. Жизнеспособность клеток *Vero*, инфицированных дозами 10 и 100 ТЦД₅₀/лунка ВПГ-2 в присутствии миРНК к генам *RS1* и *UL32*.

Инкубация клеток в среде с добавлением миРНК продолжалась в течение 5 сут. При дозировке вируса 10 ТЦД₅₀/лунка (а) кривая выживаемости клеток с подавленной экспрессией гена *RS1* совпадает с таковой в отрицательном контроле (клетки без вируса – контроль клеток – КК). Цитопатическое действие препарата (КР, контроль препарата – клетки без вируса, с добавлением миРНК) не наблюдается и кривая выживаемости совпадает с кривыми КК и *RS1*. При дозе воздействия вируса 100 ТЦД₅₀/лунка (б) защитные функции обеих миРНК практически не различаются. KB – контроль вируса.

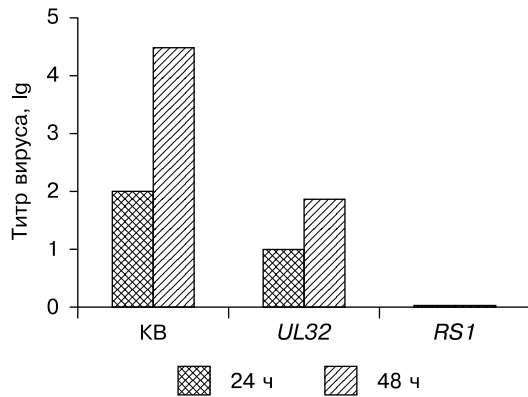


Рис. 2. Снижение инфекционности ВПП-2 при воздействии миРНК к генам *RSI* и *UL32*.

Анализ ЦПД интактных клеток *Vero*, обработанных дозами вируса 10 ТЦД₅₀/лунка с последующим добавлением миРНК, проводили в течение 48 ч. KB – контроль вируса, клетки, обработанные суспензией из KB (10 ТЦД₅₀/лунка) – лунок первого этапа. Объяснение в тексте.

Основой выбора также послужило принятие в расчет значимости функций данных генов в репликации вирусов. Особенностью экспрессии генов ВПП является очередность активации ранних и поздних генов. Ген *RSI* обладает регуляторными функциями в отношении экспрессии ранних генов ВПП-2 и служит ключевым фактором транскрипции. Ген *UL32* соответствует по положению гену *UL30* ВПП-1, который кодирует большую субъединицу вирусной ДНК-полимеразы.

На первом этапе исследования оценивали цитотоксичность миРНК на клетках *Vero*, при этом токсичность для клеток при использовании различных концентраций (4–50 нМ) миРНК не обнаружена. Далее проводили исследования для оценки защитных свойств миРНК на жизнеспособность клеток *Vero* после инфицирования их ВПП-2. Для этого предварительно инфицированные клетки (10 и 100 ТЦД₅₀/лунка) были обработаны суспензией, содержащей 8 нМ миРНК-дуплексов (см. в разделе «Материалы и методы» киРНК) к генам *RSI* и *UL32* в составе липосомных частиц, липофектамина RNAiMAX (“Invitrogen”). Для достижения воспроизводимости результатов каждой экспериментальной лунка имела трехкратный повтор. Инкубацию клеток осуществляли в течение 5 сут до достижения полного лизиса клеток вирусом в контрольных лунках. В результате эксперимента выявлена 100% защита от цитопатического действия вируса клеток *Vero*, которые трансфицировали миРНК к гену *RSI*. Защита клеток при использовании миРНК-*UL32* в среде с дозой вируса 10 ТЦД₅₀/лунка (рис. 1, а) оказалась менее выраженной. В случае использования дозировки ВПП-2 100 ТЦД₅₀/лунка защитные свойства миРНК *RSI* и *UL32* практически совпадают (см. рис. 1, б). Эти результаты свидетельствуют о более значимой роли гена *RSI* для репликации ВПП-2.

На следующем этапе оценивали инфекционность вируса после воздействия миРНК (определение инфекционного титра вируса). С этой целью отбирали вирусосодержащую суспензию из всех лунок первого этапа с дозой 10 ТЦД₅₀/лунка и инфицировали монослой клеток в 48-луночных плато для титрования вируса по классической методике. Титр ВПП-2 определяли по ЦПД на клетках в логарифмических значениях тканевой цитопатической дозы (ТЦД₅₀/мл) на каждые сутки (рис. 2). Было обнаружено, что нокдаун экспрес-

сии *RSI* по сравнению с *UL32* оказывает выраженное ингибирующее действие на титр ВПП-2. Так, в первые 24 ч при действии миРНК-*UL32* наблюдается снижение инфекционного титра вируса в 10 раз (титр составил 1 lg ТЦД₅₀/мл) и полное ингибирование вирусной активности при использовании миРНК-*RSI*, в то время как в контроле титр вируса составил 2 lg ТЦД₅₀/мл. Через 48 ч титр вируса в присутствии миРНК-*RSI* оставался на прежнем уровне (0 lg ТЦД₅₀/мл) по сравнению с увеличенным до 2 lg ТЦД₅₀/мл титром при миРНК-*UL32*. Титр ВПП-2 в контроле вируса составил 5 lg ТЦД₅₀/мл. Таким образом, показано, что выбранная последовательность гена *RSI* является наиболее оптимальной мишенью для РНК-интерференции при любых использованных дозировках. Полученные нами результаты в определенной степени согласуются с опубликованными данными китайских ученых [6], которые свидетельствуют об успешном использовании миРНК, гомологичных гену *ICP4*, при работе с ВПП-1. Однако миРНК к генам *RSI* и *UL32* на модели ВПП-2 ранее не использовали. Кроме самостоятельного использования, миРНК может быть внедрена в терапию ВПП-2 в комбинации с уже существующими препаратами химиотерапии. Так, при работе с раковыми клетками в результате ранее проведенных исследований у нас [8], а также за рубежом [9] было показано, что использование миРНК увеличивает чувствительность раковых клеток к гораздо меньшим концентрациям химиопрепарата. При этом наблюдается усиление терапевтического эффекта и может на порядок снижаться токсичность препарата. Таким образом, наши результаты свидетельствуют о перспективной возможности применения миРНК для подавления инфекции ВПП-1/2. Дальнейшие исследования будут направлены на индивидуальное применение миРНК, а также на совместное использование ее с известными противовирусными средствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Львов Н. Д. Разработка лечебных противогерпетических препаратов и диагностических тест-систем: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1992.
2. Львов Н. Д. Герпесвирусы – лимфопролиферативная иммунодефицитная патология человека // Изучение эволюции вирусов в рамках проблем биобезопасности и социально значимых инфекций: Материалы науч. конф. (24 февраля 2011 г.). – М.: РАМН, 2011. – С. 108–121.
3. Bavykin A. S. A combination of anti-IAP interfering RNAs and chemotherapy induce efficient colon tumor cell apoptosis under drug small doses // Eur. J. Hum. Genet. – 2010. – Vol. 18 (suppl. 1). – P. 129.
4. Carmona S., Jorgensen M. R., Koli S. et al. Controlling HBV replication *in vivo* by intravenous administration of triggered PEGylated siRNA-nanoparticles // Mol. Pharm. – 2009. – Vol. 6. – P. 706–717.
5. Chen Y., Bathula R. B., Li J., Huang L. Multifunctional nanoparticles delivering small interfering RNA and doxorubicin overcome drug resistance in cancer // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285, N 29. – P. 22639–22650.
6. Dolan A., Jamieson F. E., Cunningham C. et al. The genome sequence of herpes simplex virus type 2 // J. Virol. – 1998. – Vol. 72, N 3. – P. 2010–2021.
7. Liu Y. T., Song B., Wang Y. L. et al. Si RNA targeting ICP4 attenuates HSV-1 replication // Bing Du Xue Bao. – 2010. – Vol. 26, N 3. – P. 163–169.
8. McIntyre G. J., Arndt A. J., Gillespie K. M. et al. A comparison of multiple shRNA expression methods for combinatorial RNAi // Genet. Vaccines Ther. – 2011. – Vol. 9, N 9. – P. 9.
9. Surendra N., Nidhi G., Ramesh C. Strategies and advances in nanomedicine for targeted siRNA delivery // Nanomedicine. – 2011. – Vol. 6, N 4. – P. 729–746.

Поступила 29.09.11