

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ IFN- α И IFN- β ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ МИРНК, НАПРАВЛЕННЫХ К ГЕНУ *Nup98* ПРИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВПГ-1 IN VITRO

Пашков Е. А.^{1,2}

Куликова Л. А.^{1,2}

Свитич О. А.^{1,2}

Зверев В. В.^{1,2}

¹ Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение «Научно-Исследовательский Институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова»

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ IFN- α И IFN- β ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ мнРНК
IMMUNOMODULATORY EFFECT OF siRNA 10.46235/1028-7221-17254-AOI
**ALTERATION OF IFN- α AND IFN- β GENE EXPRESSION BY siRNA
TARGETING THE Nup98 GENE DURING HSV-1 INFECTION IN VITRO**

Pashkov E. A.^{a,b}

Kulikova L. A.^{a,b}

Svitich O. A.^{a,b}

Zverev V. V.^{a,b}

^a FGBNU "Scientific Institution I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums" Ministry of Education and Science of Russia

^b FGAOU VO "First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov" of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University)

Резюме

Вызываемые ВПГ-1 инфекции являются чрезвычайно распространенными в человеческой популяции. Для лечения герпетической инфекции в настоящее время используется широкий арсенал средств медикаментозной терапии и иных подходов, однако с течением времени наблюдается рост заболеваемости инфекции ВПГ-1 в популяции. Перспективным терапевтическим подходом в данной ситуации может стать использование явления РНК-интерференции. В ходе своей репродукции, ВПГ-1 импортирует вирусную ДНК через ядерно-поровый комплекс (ЯПК), находящийся в мембране клеточного ядра и состоящего из белков-нуклеопоринов (Nup98, Nup205, NXF1 и иные). Следовательно, нарушение структуры ЯПК в результате миРНК-опосредованного ингибирования образования белков-нуклеопоринов, может гипотетически приводить к снижению репродукции ВПГ-1. Целью настоящего исследования является оценка противовирусного эффекта миРНК, направленных к клеточному гену *Nup98*, а также оценка динамики экспрессии цитокинов IFN- α и IFN- β на модели *in vitro*.

Ключевые слова: IFN- α , IFN- β , Nup98, цитокины, экспрессия генов, ВПГ-1, РНК-интерференция, миРНК

Abstract

HSV-1 infections are extremely common in the human population. A wide range of drug therapy and other approaches are currently used to treat herpes infection, but over time, an increase in the incidence of HSV-1 infection in the population is observed. A promising therapeutic approach in this situation may be the use of RNA interference. During its reproduction, HSV-1 imports viral DNA through the nuclear pore complex (NPC), located in the membrane of the cell nucleus and consisting of nucleoporin proteins (Nup98, Nup205, NXF1 and others). Therefore, disruption of the NPC structure as a result of siRNA-mediated inhibition of nucleoporin protein formation may hypothetically lead to a decrease in HSV-1 reproduction. The aim of this study is to evaluate the antiviral effect of siRNAs targeting the cellular gene Nup98, as well as to assess the dynamics of expression of cytokines IFN- α and IFN- β in an in vitro model.

Keywords: IFN- α , IFN- β , Nup98, cytokines, gene expression, influenza, HSV-1, siRNA

Введение. Вирус простого герпеса 1 типа (ВПГ-1) таксономически относится к подсемейству α -герпесвирусов и представляет собой сложноорганизованный вирус с двухцепочечной ДНК. Вызываемые ВПГ-1 инфекции являются чрезвычайно распространенными в человеческой популяции, глобальный уровень инфицированного населения в возрасте до 50 лет составляет 65% [1]. Помимо губных и генитальных высыпаний, среди заболеваний, причиной которых может быть ВПГ-1, выделяют стромальный герпетический кератит, энцефалит простого герпеса и болезнь Альцгеймера [2]. Исходя из этого, адаптивный иммунный ответ очень важен для контроля инфекции ВПГ, ее реактивации и осложнений [3]. Одними из ключевых компонентов адаптивного иммунитета являются IFN- α и IFN- β , играющие важную роль на ранних стадиях инфекции, вызванных герпесвирусами [4,5]. Повышение экспрессии IFN- α влечет за собой индукцию системного иммунного ответа (посредством активации НК-клеток, Т-лимфоцитов и усиления их миграции в очаг воспаления), а также подавление вирусного жизненного цикла посредством стимуляции цитотоксичности НК-клеток и дифференцировки Th1-клеток [6]. В свою очередь, основными функциями IFN- β является стимуляция экспрессии интерферон-стимулирующих генов (ISGs), чьи продукты экспрессии будут ингибировать цикл вирусной репродукции на разных её этапах [6].

Для лечения герпетической инфекции в настоящее время используется широкий арсенал средств медикаментозной терапии и иных подходов, однако с течением времени наблюдается рост заболеваемости инфекции ВПГ-1 в популяции [7]. Исходя из этого, в настоящее время необходим поиск новых подходов, направленных на снижение заболеваемости инфекции ВПГ-1 и индуцированных ей осложнений. Перспективным подходом в данной ситуации может стать использование явления РНК-интерференции, лежащей в основе механизма действия потенциальных противогерпетических препаратов нового поколения. РНК-интерференция – целевой процесс ингибирования трансляции мРНК, что влечет за собой нарушение процесса биосинтеза белка [8].

В ходе своей репродукции, ВПГ-1 импортирует вирусную ДНК через ядерно-поровый комплекс (ЯПК), находящийся в мембране клеточного ядра и состоящего из белков-нуклеопоринов (Nup98, Nup205, NXF1 и иные) [9]. Следовательно, нарушение структуры ЯПК в результате миРНК-опосредованного ингибирования образования белков-нуклеопоринов, может гипотетически приводить к снижению репродукции ВПГ-1.

Исходя из вышесказанного, целью настоящего исследования является оценка противовирусного эффекта миРНК, направленных к клеточному гену *Nup98*, а

также оценка динамики экспрессии цитокинов IFN- α и IFN- β на модели *in vitro*.

Материалы и методы

Подбор миРНК, олигонуклеотидов, комплексы миРНК, использованные в работе, методика трансфекции клеток миРНК с последующим заражением, использованные в работе, выделение тотальной РНК, проведение ОТ-ПЦР-РВ, определение экспрессии цитокинов, методика титрования вируса по конечной точке ЦПД представлены в нашем более раннем исследовании [10].

В работе использован был использован вирус простого герпеса 1 типа HSV-1 (коллекция ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова). Культивирование и определение титра вируса проводилось на культуре клеток эпителия почечных канальцев зеленой мартышки-мармазетки Vero (ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Россия). Для заражения использовали множественность инфицирования (мн.з., MOI), равную 0.01 ед. Клетки Vero выращивали в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки коров (ЭСК) Gibco (Fisher Scientific, Новая Зеландия), 40 мкг/мл гентамицина (ПанЭко, Россия), и 300 мкг/мл L-глутамин (ПанЭко, Россия) при 37 °C в CO₂-инкубаторе.

Тотальную РНК выделяли из клеточного лизата набором ExtractRNA (Evrogen, Россия). Для постановки реакции обратной транскрипции (ОТ) применяли набор реагентов ОТ-1 (Синтол, Россия). Для ПЦР-РВ использовали набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green и референсного красителя ROX (Синтол, Россия). Рабочая концентрация праймеров составила 10 пмоль на реакционную смесь. Реакция ПЦР-РВ проводилась в амплификаторе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия). Температурно-временной режим составил 95 °C в течение 5 мин (1 цикл), 62 °C — 40 с, 95 °C — 15 с (40 циклов). Праймеры для определения экспрессии цитокинов (Синтол, Россия) представлены в исследованиях [11]. Специфичность полученного сигнала оценивалась посредством выстраивания кривой при амплификации. Оценка изменения экспрессии целевого гена проводилась с использованием критерия 2- $\Delta\Delta C_t$ [12]. Оценку экспрессии IFN- α и IFN- β проводили относительно групп неспецифического контроля с миРНК siL2. Выполнялся расчёт разницы трёх повторов значений пороговых циклов ПЦР (ΔC_t) между исследуемыми генами неспецифического контроля siL2 и геном домашнего хозяйства GAPDH.

77 Статистическую значимость полученных результатов определяли с
78 помощью критерия Манна-Уитни. Разница считалась достоверной при $p \leq$
79 0.01 и $p \leq 0.05$

80 Результаты и обсуждение

81 При оценке противовирусного эффекта миРНК, направленных к гену *Nip98*
82 наблюдалось снижение репродукции HSV-1 по результатам титрования по
83 ЦПД. При использовании миРНК *Nip98.1* в течение трёх суток с момента
84 трансфекции отмечалось достоверное снижение вирусной репродукции на 0.8,
85 1.2 и 1.5 lgТЦД50/мл (lg тканевых цитотоксических доз 50/мл) относительно
86 контрольной группы siL2. При использовании миРНК *Nip98.2* достоверное
87 снижение вирусной активности наблюдалось на 2 и 3 сутки с момента
88 трансфекции. Вирусный титр в клетках, обработанных миРНК *Nip98.2* был
89 достоверно ниже аналогичного показателя в контрольной группе на 1.2 и 2
90 lgТЦД50/мл. Полученные данные представлены в таблице 1.

91 При оценке экспрессии гена *IFN-α* не наблюдалось достоверных различий
92 между клетками, обработанными миРНК *Nip98.1* и 2 и контрольной
93 группой плацебо (группа, включающая в себя применение
94 неспецифического контроля).

95 Далее при исследовании было установлено, что наиболее эффективное
96 повышение экспрессии *IFN-β* наблюдается при трансфекции миРНК
97 *Nip98.1*. В данном случае достоверный рост экспрессии гена *IFN-β*
98 относительно неспецифического контроля siL2 выше на 41 и 62%. При
99 использовании миРНК *Nip98.2* достоверный рост экспрессии отмечался на
100 третьи сутки и составил 105% относительно неспецифического контроля
101 siL2. Полученные данные представлены на рисунке 1.

102 Блокировка процесса импорта вирусной ДНК в нуклеоплазму приводила к
103 выраженному снижению вирусной репродукции на модели *in vitro*, что
104 подтверждает значительную зависимость HSV-1 от нормально
105 функционирующего ядерно-порового комплекса. Дополнительно отмечалось
106 достоверное повышение относительно неспецифического контроля уровня
107 экспрессии *IFN-β*, но не *IFN-α*. Такая избирательная активация экспрессии
108 *IFN-β* связана с накоплением вирусной ДНК в цитоплазме и последующей за
109 этим активацией регуляторного пути cGAS-STING, ключевого механизма,
110 ответственного за распознавание ДНК в цитоплазме клеток. Активация пути
111 cGAS-STING приводит к повышению экспрессии и выработки *IFN-β*, который
112 стимулирует индукцию активности ISG, чьи продукты экспрессии подавляют

113 вирусную репродукцию, и усиливает степень презентации антигена, что
114 вызывает значительное моделирование адаптивного иммунного ответа [10].

115 При оценке изменения экспрессии *IFN-α* не было выявлено достоверных
116 различий между исследуемыми и контрольной группами. Настоящее
117 отсутствие между группами может объясняться тем, что ввиду особенностей
118 клеточной линии Vero, она обладает ограниченной экспрессией TLR7/9,
119 отвечающих за распознавание вирусной ДНК в эндосомах и последующей
120 индукции *IFN-α*.

121 Таким образом, избирательное повышение *IFN-β* отражает наличие
122 локального противовирусного ответа, опосредованного cGAS-STING-путем, в
123 то время как системный *IFN-α* в данной модели не является задействованным.

124 Заключение

125 Настоящие данные позволяют сделать вывод, что структуры, принимающие
126 участие в процессе ядерного импорта вирусной ДНУ, являются мишенями для
127 подавления репродукции ВПГ-1, а цитоплазматические сенсоры,
128 распознающие ДНК, играют важную роль в развитии иммунного ответа при
129 блокировке вирусного жизненного цикла. Результаты, полученные в ходе
130 исследования, открывают перспективы для разработки новых стратегий
131 терапии ВПГ-1 инфекции. Полученные результаты открывают перспективы
132 для разработки терапевтических стратегий, направленных на модуляцию
133 cGAS-STING-пути в комбинации с ингибиторами ядерного транспорта
134 вирусов.

ТАБЛИЦЫ

Табл. 1. Противовирусный эффект миРНК, специфичных к клеточному гену *Nup98*.

Table 1. Antiviral effect of siRNAs specific to the cellular gene *Nup98*.

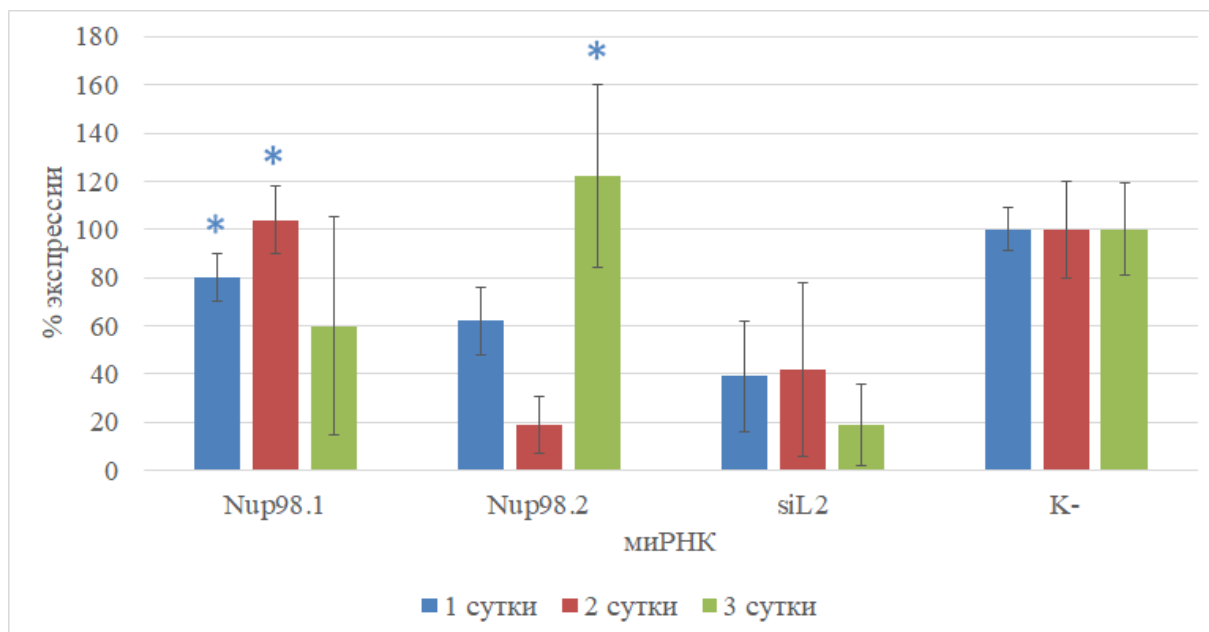
	Nup98.1	Nup98.2	siL2
1 сутки	6$\pm$0.2*	6.4 $\pm$ 0.6	6.8 $\pm$ 0.3
2 сутки	5.7$\pm$0.5*	5.7$\pm$0.2*	6.9 $\pm$ 0.5
3 сутки	5.7$\pm$0.2*	5.3$\pm$0.4*	7.2 $\pm$ 0.2

Примечание: По горизонтали указаны миРНК. Жирным шрифтом выделены значения, для которых $p < 0,05$.

РИСУНКИ

Рис. 1. Влияние миРНК, направленных к гену *Nup98* на экспрессию $IFN-\beta$ (* – $p \leq 0.05$)

Fig. 1. Effect of siRNAs targeting the *Nup98* gene on $IFN-\beta$ expression (* – $p \leq 0.05$)



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Пашков Евгений Алексеевич – к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «НИИ ВС им. И.И. Мечникова»; старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ИОЗ им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова

Pashkov Evgeny Alekseevich - Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums; assistant of the department of microbiology, virology and immunology Sechenov University

ФГБНУ «НИИ ВС им. И.И. Мечникова» /Federal State Budgetary Scientific Institution I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums

ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) / I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)

Москва, 105064 Малый Казенный пер., 5А, лаборатория молекулярной иммунологии

Laboratory of Molecular Immunology, 105064 Maly Kazenny per., 5A, Moscow

Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.

pashckov.j@yandex.ru

+79162287353

Блок 2. Информация об авторах

Пашков Евгений Алексеевич^{1,2} – к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ИОЗ им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова

Pashkov Evgeny Alekseevich^{1,2} – Ph.D., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums; assistant of the department of microbiology, virology and immunology Sechenov University

Куликова Лиана Александровна^{1,2} – студентка 3 курса ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); лаборант-исследователь лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИ ВС им. И.И. Мечникова

Kulikova Liana Alexandrovna^{1,2} – 3rd year student of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; laboratory assistant researcher of the laboratory of molecular immunology of the I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera

Свитич Оксана Анатольевна^{1,2} – чл.-корр. РАН, д.м.н., директор ФГБНУ НИИ ВС им. И.И. Мечникова, зав. Лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИ ВС им. И.И. Мечникова, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова

Svitich Oxana Anatol'evna^{1,2} – Corresponding member of RAS, MD, The Head of I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Professor of Microbiology, Virology and Immunology department of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

Зверев Виталий Васильевич^{1,2} – Академик РАН, д.б.н., научный руководитель ФГБНУ НИИ ВС им. И.М. Мечникова, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова

Zverev Vitaly Vasil'evich – Academician of RAS, Doctor of Biological Sciences, Scientific Adviser of I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera,

Блок 3. Метаданные статьи

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ IFN- α И IFN- β ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ
МИРНК, НАПРАВЛЕННЫХ К ГЕНУ *Nup98* ПРИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ
ВПГ-1 IN VITRO

ALTERATION OF IFN- α AND IFN- β GENE EXPRESSION BY siRNA
TARGETING THE *Nup98* GENE DURING HSV-1 INFECTION IN VITRO

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

IMMUNOMODULATORY EFFECT OF siRNA

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ IFN- α И IFN- β ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ
МИРНК

Ключевые слова: IFN- α , IFN- β , *Nup98*, цитокины, экспрессия генов, ВПГ-1,
РНК-интерференция, миРНК

Keywords: IFN- α , IFN- β , *Nup98*, cytokines, gene expression, influenza, HSV-1,
siRNA

Школа Клинической Иммунологии "Сочи-2025"

Количество страниц текста – 4

Количество таблиц – 1

Количество рисунков – 1

29.04.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ссылки

- [1] James C., Harfouche M., Welton N.J. [и др.]. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. // Bull World Health Organ. – 2020 - №5. - С. 315-329.
- [2] Zhu S, Viejo-Borbolla A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. // Virulence. – 2021 - №1. – С.2670-2702.
- [3] Ганковская О.А., Бахарева И.В. [и др.]. Исследование экспрессии генов TLR9, NF- κ B, ФНО α в клетках слизистой цервикального канала беременных с герпесвирусной инфекцией // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2009. - Т. 86. - №2. - С. 61-64.
- [4] Noisakran S., Carr D.J. Plasmid DNA encoding IFN-alpha 1 antagonizes herpes simplex virus type 1 ocular infection through CD4+ and CD8+ T lymphocytes // J Immunol. – 2000. №12. – С. 6435-43.
- [5] Gao D., Ciancanelli M.J., Zhang P., [и др.]. TLR3 controls constitutive IFN- β antiviral immunity in human fibroblasts and cortical neurons // J Clin Invest. – 2021. №1
- [6] Su D., Han L., Shi C., [и др.]. An updated review of HSV-1 infection-associated diseases and treatment, vaccine development, and vector therapy application // Virulence. – 2024. №1. – С. 2425744.
- [7] А. З. Хашукоева, О. А. Свитич, Э. А. Маркова [и др.]. Фотодинамическая терапия - противовирусная терапия? История вопроса. Перспективы применения // Лазерная медицина. – 2012. – № 2. – С. 63-67.
- [8] Traber G.M., Yu A.M. RNAi-Based Therapeutics and Novel RNA Bioengineering Technologies. // J Pharmacol Exp Ther. – 2023. – №1. – С. 133-154.

- [9] Zhang X., Lim K., Qiu Y., [и др.]. Strategies for the Viral Exploitation of Nuclear Pore Transport Pathways. // Viruses. – 2025. №2. – С. 151.
- [10] Pashkov E.A., Samoilikov R.V., Pryanikov G.A., [и др.]. In vitro immunomodulatory effect of siRNA complexes in the influenza infection // Russian Journal of Immunology. – 2023. – №4. – С. 457-462.
- [11] Hama S., Watanabe-Takahashi M., Nishimura H., [и др.]. CaMKII-dependent non-canonical RIG-I pathway promotes influenza virus propagation in the acute-phase of infection // mBio. – 2025. – №1 – С. 0008724.
- [12] Rao X., Huang X., Zhou Z., [и др.]. An improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis // Biostat Bioinforma Biomath. – 2013. – №3 – С. 71-85.