

Подавление литической инфекции вируса простого герпеса первого типа в клетках Vero с помощью CRISPR/Cas9 системы, нацеленной на гены, кодирующие основной белок капсида и вирусную ДНК-полимеразу

Научный руководитель – Климова Регина Рафаиловна

Скуланов А.А.¹, Демидова Н.А.²

1 - Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина, Москва, Россия, *E-mail: askulanov@mail.ru*; 2 - Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Институт вирусологии им.Д.И.Ивановского, Москва, Россия, *E-mail: ailande@yandex.ru*

Вирус простого герпеса 1 типа (ВПГ1) после первичного заражения переходит в латентное состояние и пожизненно присутствует в организме. При различных неблагоприятных условиях вирус может реактивироваться и вызывать серьезные заболевания. Современные противовирусные препараты снижают тяжесть острых инфекций, но не устраняют латентный вирус [n3]. Редактирование генов с использованием CRISPR/Cas9 позволяет разрушать или элиминировать латентные гены, тем самым устраняя возможность вирусной реактивации и патогенеза [n2]. В институте молекулярной биологии РАН получены 3 плазмидные конструкции, экспрессирующие систему CRISPR/Cas9, с двойными направляющими РНК, нацеленными против генов UL19 и UL30, кодирующих основной белок VP5 капсида и вирусную ДНК-полимеразу, соответственно. Плазмиды различались по прогнозируемым показателям специфичности и эффективности спейсеров: UL19-UL30-Best; UL19-UL30-2nd и UL19-UL30-Mega [n1].

Цель работы состояла в сравнительном анализе цитотоксичности и противовирусных свойств полученных плазмид, содержащих компоненты системы CRISPR/Cas9, в трансфицированных клетках Vero, зараженных ВПГ1.

Клетки Vero трансфицировали плазмидами и через 48 ч изучали цитотоксичность. Показано, что при трансфекции плазмидами UL19-UL30-Best и UL19-UL30-Mega количество жизнеспособных клеток составило 60% и 70% соответственно, при использовании плазмиды UL19-UL30-2nd - 32%. Изучение противовирусных свойств показало, что через 48 ч после заражения клеток Vero, трансфицированных плазмидами UL19-UL30-Best и UL19-UL30-Mega, инфицированные клетки, содержащие поздний структурный белок gB ВПГ1, отсутствовали, что свидетельствует о полном (100%-ном) ингибировании репликации ВПГ1. При трансфекции плазмидой UL19-UL30-2nd количество инфицированных клеток составило 45%. Анализ ингибирования плазмидами образования новых вирусных частиц показал, что при внесении культуральных жидкостей от клеток, трансфицированных плазмидой UL19-UL30-Best, наблюдали 100% подавление инфекционной активности ВПГ1, плазмидой UL19-UL30-Mega - 94,7%, плазмидой UL19-UL30-2nd - 56,7% (рис.1).

Полученные результаты указывают на перспективность использования CRISPR/Cas9 плазмид UL19-UL30-Best и UL19-UL30-Mega при разработке новых стратегий борьбы с герпесвирусными инфекциями.

Источники и литература

- 1) Aubert M., Strongin D.E., Roychoudhury P. et al. Gene editing and elimination of latent herpes simplex virus in vivo // Nat. Commun. 2020. No 11. P. 4148.
- 2) Jacinto F.V., Link W., Ferreira B.I. CRISPR/Cas9-mediated genome editing: From basic research to translational medicine // J. Cell Mol. Med. 2020 No 24. P. 3766-3778.

- 3) Whitley R, Baines J. Clinical management of herpes simplex virus infections: past, present, and future // F1000Res. 2018. No 7. P. 1726.

Иллюстрации

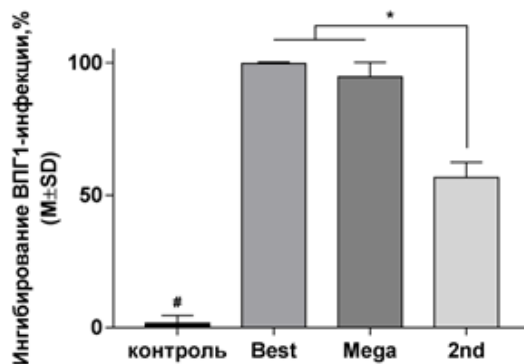


Рис. 1. Рис. 1. Ингибирование продуктивной ВПГ1-инфекции в клетках Vero. Подавление продукции вновь образованных вирусных частиц в культуре Vero после внесения культуральных жидкостей от зараженных культур, трансфицированных плазмидами, указанными по горизонтали. Контроль – внесение культуральных жидкостей от нетрансфицированных зараженных клеток. По вертикали – подавление ВПГ1 – инфекции в % от контроля, среднее значение \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). *Различия статистически значимы при $p < 0.05$ (t-test); #различия статистически значимы по сравнению со всеми изученными вариантами при $p < 0.05$ (t-test).