

На правах рукописи



ГОЛОВИН Евгений Владимирович

**РНК-интерференция в клетках человека, инфицированных
рекомбинантным лентивирусом *in vitro***

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Казань – 2012

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении Высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Анохин Владимир Алексеевич**

Научный консультант:

доктор биологических наук, доцент **Ризванов Альберт Анатольевич**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор ГБОУ ВПО Казанский ГМУ Минздравсоцразвития России, заведующий кафедрой медицинской биологии и генетики **Исламов Рустем Робертович**

доктор медицинских наук, профессор ГБОУ ВПО ИГМА Минздравсоцразвития России, заведующий кафедрой биологии с экологией **Чучкова Наталья Николаевна**

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Оренбургская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Оренбург.

Защита состоится 29 мая 2012 года в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.034.01. при ГБОУ ВПО Казанский ГМУ Минздравсоцразвития России (420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГБОУ ВПО Казанский ГМУ Минздравсоцразвития России (420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49 «б»).

Автореферат разослан 28 апреля 2012 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор



Л.Н. Залялютдинова

Общая характеристика работы

Актуальность исследования. Проблема лечения вирусных инфекций остается одной из самых актуальных и недостаточно разработанных в практической медицине (Лобзин Ю.В., Цинзерлинг В.А., 2009; Crawford D.H., 2011). Актуальность обусловлена с одной стороны ростом заболеваемости вирусными инфекциями, а с другой стороны отсутствием методов эффективного лечения для многих из них (Нестерова И.В., 2005; Торшхоева Л.Б., Глухарева Н.С., Заплатников А.Л., 2010; Hodge A.V., 2011). В рамках этой проблемы несомненный интерес представляют вопросы, связанные с инфекцией, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ, семейство *Retroviridae*, роду *Lentivirus*), по причине которой ежегодно в мире умирают 1 800 000 человек (ВОЗ, 2010). Антиретровирусная терапия – современный стандарт лечения, не приводит к излечению ВИЧ-инфекции (Ерамов И., 2007), что связано в первую очередь со сложностью моделирования этого заболевания в лабораторных условиях для изучения механизмов воздействия вируса не только на CD4+, но и на другие клетки человека (Zarrabi M.R. et al., 2012).

Одним из возможных подходов к решению проблемы лечения вирусных инфекций является использование РНК-интерференции – перспективного современного метода, открывающего новые возможности в исследовании особенностей межмолекулярных взаимодействий внутри клетки, инфицированной вирусами, так как РНК-интерференция позволяет избирательно подавлять синтез выбранных белков в клетках, тогда как подбор химического препарата, избирательно подавляющего активность определенного белка, является сложной и трудоемкой задачей (Fire A. et al.). РНК-интерференция в перспективе может стать методом воздействия на клеточные процессы с лечебной или профилактической целью (Zhou J., Rossi J.J., 2011; Kitchen S.G. et al., 2011).

Вместе с тем изучение клеток, инфицированных ретровирусами, – одно из основных направлений медицинской науки, позволяющее выявить новые методы эффективного воздействия на инфицированные клетки (Сологуб Т.В. и др., 2009; Xu Y., 2012). Для решения проблемы исследования клеток, инфицированных ретровирусами, большое значение имеет подбор оптимальной клеточной модели вирусной инфекции. (Hess R.D. et al., 2012).

Для выявления особенностей процессов, происходящих в клетках человека при инфицировании их ретровирусами, в условиях культуральной лаборатории второго уровня биологической безопасности может быть применена клеточная модель ретровирусной инфекции на основе рекомбинантного лентивируса. В данной работе нами разработана клеточная модель с применением рекомбинантного репликативно-дефектного лентивируса второго поколения на основе вируса ВИЧ-1. Рекомбинантные

лентивирусы используются обычно в качестве векторов для доставки в клетку генетических агентов, их применение для биологически более безопасного моделирования ВИЧ-инфекции является оригинальным подходом к решению поставленных задач (Leath A., Cornetta K., 2012). Для этих целей белки оболочки рекомбинантного лентивируса заменялись гликопротеином G вируса везикулёзного стоматита (VSV), что позволило эффективно инфицировать не только CD4⁺ лимфоциты и макрофаги, но и работать с недорогими, легко культивируемыми культурами клеток человека, обеспечивая хорошую воспроизводимость результатов (Chang T., Yee J.-K., 2012). Псевдовирусная РНК такого лентивируса может быть сформирована исходя из поставленных задач (Cooray S., 2012). Мы применяли лентивирус, геномная РНК которого несет только ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). Преимуществом разработанной модели по сравнению с уже используемыми на основе инфекционных вирусов является то, что отсутствие генов лентивируса в геномной РНК предотвращает сборку дочерних вирионов и обеспечивает большую биологическую безопасность рекомбинантного лентивируса по сравнению с инфекционными вирусами (Sinn P.L., 2005; Laufs S. et al., 2010).

Вышеизложенное и определило цель и содержание работы.

Цель исследования: разработка клеточной модели, позволяющей исследовать влияние РНК-интерференции на внутриклеточные стадии жизненного цикла рекомбинантного репликационно-дефектного лентивируса *in vitro*.

Задачи:

1. Получение и исследование препаратов кРНК, специфичных к мРНК генов клеточных белков INI-1, HMGA-1 и PML, задействованных в жизненном цикле вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

2. Разработка клеточной модели, воспроизводящей внутриклеточные стадии жизненного цикла ретровирусов: обратную транскрипцию и интеграцию, в культуре клеток человека *HEK-293T*.

3. Оценка эффекта подавления экспрессии мРНК генов клеточных белков INI-1, HMGA-1 и PML, участвующих в функционировании преинтеграционного комплекса ВИЧ, на лентивирусную инфекцию в культуре клеток.

4. Исследование взаимодействия геномной РНК лентивирусов с компонентами системы РНК-интерференции в клетках человека.

Научная новизна исследования:

Используя адекватные поставленным задачам методы исследования, были получены новые данные о снижении в клетке человека уровня мРНК

генов клеточных белков HMGA-1, INI-1 и PML в ответ на трансфекцию соответствующих специфичных кРНК и о сохранении при этом жизнеспособности клеток человека *in vitro*.

Безусловной новизной обладают данные о сохранении инфицирования клеток человека рекомбинантным лентивирусом на фоне снижения уровня мРНК клеточных белков человека HMGA-1, INI-1 и PML.

Для решения поставленных задач была впервые разработана биобезопасная модель ретровирусной инфекции на основе рекомбинантного репликационно-дефектного лентивируса и культуры клеток человека HEK-293T.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическую значимость работы обуславливают полученные в работе данные о процессах, происходящих в клетках человека, инфицированных лентивирусами (некритичность клеточных белков INI-1, HMGA-1 и PML для внутриклеточного цикла лентивирусов, устойчивость геномной РНК лентивирусов на стадии проникновения в клетку хозяина к избирательной деградации посредством механизма РНК-интерференции).

Практическая значимость работы заключается в том, что предложенная модель лентивирусной инфекции может быть использована в условиях лаборатории культур клеток 2-го класса биологической безопасности для проведения исследований клеток человека инфицированных лентивирусами и для выявления и оценки антиретровирусной активности различных веществ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Специфичные кРНК снижают уровень мРНК генов клеточных белков HMGA-1, INI-1 и PML, участвующих в функционировании преинтеграционного комплекса лентивирусов, но не влияют на эффективность инфицирования клеток лентивирусами в культуре клеток.

2. Инфицирование клеток человека рекомбинантным репликационно-дефектным лентивирусом позволяет воспроизводить внутриклеточные этапы жизненного цикла лентивирусов: обратную транскрипцию и интеграцию в геном клетки-хозяина.

Внедрение в практику. Результаты исследования внедрены в практическую работу клеточной лаборатории ЦНИЛ ГБОУ ВПО Казанский ГМУ Минздравсоцразвития России, разработанные методы используются для продолжения исследований по госконтрактам ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации и Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, по грантам РФФИ, У.М.Н.И.К., молодёжному гранту Академии наук Республики Татарстан. Теоретические

положения включены в учебный процесс на кафедре детских инфекций Казанского ГМУ при проведении занятий со студентами, интернами и ординаторами на образовательном цикле «ВИЧ-инфекция».

Апробация и реализация работы. Основные материалы диссертации были представлены и обсуждались на конкурсе молодых ученых на II Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (29 – 31 марта 2010 г., Москва), XIII и XIV Всероссийской конференции «Молодые ученые в медицине» (г. Казань, 2008 и 2009 гг.). Исследования поддержаны 7 грантами, 1 премией и 1 стипендией. Работа апробирована на расширенном заседании предметной проблемной комиссии Казанского государственного медицинского университета по специальности «клеточная биология, цитология, гистология».

Личное участие диссертанта в получении научных результатов, изложенных в работе.

Планирование и проведение экспериментов в культуральной, генетической и иммунологической лабораториях, обработка и расшифровка результатов экспериментов, создание и ведение базы данных исследования, статистическая обработка результатов проводились лично автором на всех этапах диссертационного исследования. К проведению лабораторных работ на добровольных началах привлекались сотрудники кафедры детских инфекций и ЦНИЛ ГБОУ ВПО Казанский ГМУ Минздравсоцразвития России, сотрудники кафедры генетики ГБОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». Лично диссертантом проведены 72,5% экспериментальных работ, представленных в работе. Изданные научные работы, в том числе написанные в соавторстве, представляют результат преимущественно личного научного вклада диссертанта. Общий объем публикаций 3,38 у.п.л., в том числе авторский вклад 2,0 у.п.л.

Публикация материалов исследования. По результатам исследования опубликовано 14 печатных работ, из них 4 в ведущих научных журналах, определенных Высшей аттестационной комиссией Рособрнадзора.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 107 страницах печатного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 4 подглав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, библиографического списка (202 источника). Диссертация содержит 5 таблиц и 26 рисунков.

Содержание работы

Материалы и методы исследования.

Работа выполнена на кафедре детских инфекций ГБОУ ВПО Казанский ГМУ Минздравсоцразвития России, отдельные этапы работ проводились в условиях культуральной лаборатории ЦНИЛ ГБОУ ВПО Казанский ГМУ Минздравсоцразвития России, генетической лаборатории ФГАОУ ВПО КФУ, иммунологической лаборатории ГБУЗ РЦПБ СПИД и ИЗ МЗ РТ и культуральной лаборатории Университета Едитепе (Стамбул, Турция).

Исследование одобрено этическим комитетом Республики Татарстан. В исследовании не задействованы люди и лабораторные животные. Использование живых культур клеток сведено к минимуму за счёт рационального предварительного планирования.

Исследования проводились с применением клеточной модели лентивирусной инфекции. Культуру клеток человека трансфицировали препаратами коротких интерферирующих РНК методом электропорации (Neumann E., 1972; Helledie T. et al., 2008) или с применением трансфекционных агентов (Wassarman P.M., Soriano P.M., 2010; Philippa S. et al., 2010; Stewart A.K. et al., 2011). Оценивали сохранение жизнеспособности клеток после трансфекции (Malich G., 1997; Застенская И.А., 2008). Фиксировали снижение уровня экспрессии соответствующих генов (Глик Б. и др., 2002; Епринцев А.Т. и др., 2008). В полученную генетически модифицированную культуру клеток человека добавляли рекомбинантный лентивирус. В клетках, экспонировавшихся с лентивирусом, фиксировали концентрацию белка GFP, экспрессируемого с матрицы интегрировавшегося провируса флуоресцентной микроскопией через 24, 48 и 72 часа (Prowazek, S. Von, 1914; Carson S. et al., 2012) и проточной цитофлуориметрией (Chu Y.W. et al., 1999; Schmid I., 2001). В качестве контроля выдерживали с лентивирусом культуру клеток, не подвергавшуюся трансфекции (нетрансфекционный контроль).

Метод РНК-интерференции дает возможность избирательно подавлять экспрессию практически любого гена (Fire A. et al., 1998). Стабильному подавлению экспрессии генов ВИЧ методом РНК-интерференции препятствует их изменчивость по причине частых случайных мутаций (Shah P.S., 2012). В генах человека значительно реже наблюдаются мутации (Владимирова Э.Д., 1999), следовательно, избирательное подавление экспрессии генов клетки-хозяина будет более стабильным.

Во второй главе диссертации (Материалы и методы) дается подробное описание применяемых в работе методик.

Моделирование последовательностей и оценку специфичности коротких интерферирующих РНК (киРНК) проводили с помощью алгоритма BLAST в он-лайн программном обеспечении The Whitehead siRNA Selection Web Server

(<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNA>) (Mathews D.H., 2010). Культивирование клеток человека HeLa и HEK-293T проводили в стерильном ламинарном боксе 2-го класса биобезопасности согласно общепринятым правилам работы в культуральной лаборатории (Bonifacino J.S., 2012). Получение рекомбинантного репликационно-дефектного лентивируса проводили по протоколу Tronolab Protocols, EPFL, 2007 (Pfeifer A., 2010). Электропорация клеток человека малыми генетическими агентами проводили с использованием электропоратора GenePulser® II Electroporation System (BioRad) в соответствии с инструкциями фирмы производителя (Bonifacino J.S., 2012). Трансфекцию клеток малыми генетическими агентами с применением трансфекционного агента «X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent» проводили в соответствии с инструкциями фирмы производителя (Roche) (Philippa S. et al., 2010; Stewart A.K. et al., 2011). Выделение общей РНК для ПЦР РВ проводили с использованием набора RNeasy MiniKit (Qiagen) и Omniscript Reverse Transcriptase Kit (Qiagen). Приготовление дуплексов кРНК осуществлялось по методике, приведенной на сайте <http://www.protocolonline.org/prot/Protocols/siRNA-RNA-Oligo-Annealing Protocol 3629.html>. Для количественной оценки экспрессии генов мишеней применяли полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР РВ) с использованием технологии TaqMan с использованием программного пакета Primer Express (Applied Biosystems, США) (Yajima T. et al., 2012; Carson S. et al., 2012). Оценку жизнеспособности клеток проводили с применением MTS-теста, с использованием набора CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Technical Bulletin, No 169. Promega Corporation, Madison, USA, 2001).

Обработка результатов проводилась с использованием статистического пакета STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. StatSoft, Inc. (2007). www.statsoft.com. Формирование графического изображения и таблиц проводились в программе Microsoft® OfficeExcel® 2007 (12.0.4513.1014) HSO (12.0.4513.1014), Microsoft Office Enterprise 2007 ©Корпорация Майкрософт, 2007. В работе применены методы вариационной статистики: вычисление средних величин и средней ошибки средних величин. Достоверность различий средних сравниваемых величин определялась по коэффициенту Стьюдента. Определялись 95% доверительные интервалы для среднего с учётом нормальности распределения. Проверка на нормальность проводилась по критерию Шапиро-Уилкса (Покровский В.И., 2009, Власов В.В. 2004).

Результаты собственных исследований

Подавление экспрессии мРНК клеточных белков HMGA-1, INI-1, PML

В результате систематического обзора периодической литературы выявлены 435 клеточных белков, участвующих в жизненном цикле ВИЧ-1. Каждый из этих белков может быть потенциальной молекулярной мишенью

антиретровирусной терапии. Среди известных этапов внутриклеточного цикла лентивирусов одним из необходимых для интеграции провируса, но в то же время малоизученным, является этап транспорта преинтеграционного комплекса к ядру и через ядерную мембрану, что и обусловило выбор в качестве мишеней для РНК-интерференции генов трех клеточных белков человека, участвующих в формировании и функционировании преинтеграционного комплекса ВИЧ-1.

На основании анализа нуклеотидных последовательностей генов-мишеней нами разработаны шесть оригинальных последовательностей киРНК, специфичных к генам трёх клеточных белков: HMGA-1, INI-1 и PML, участвующих в жизненном цикле ВИЧ-1. Анализ с применением программы BLAST и геномной библиотеки человека показал высокую специфичность выбранных последовательностей по отношению к целевым генам. Шесть препаратов киРНК: HMGA1-A, HMGA1-B, Ini1-A, Ini1-B, PML-A, PML-B получены нами из одонитевых смысловых и антисмысловых РНК впервые.

Трансфекцию препаратов киРНК в культуру клеток HeLa проводили электропорацией. По данным MTS-теста жизнеспособность клеток, обработанных киРНК, через 24 часа после трансфекции составляла от 84% до 120% по отношению к жизнеспособности клеток, не подвергавшихся трансфекции киРНК, что находится в пределах ошибки распределения. Таким образом, трансфекция специфических киРНК, подавляющих экспрессию генов *ini1*, *hmgal* и *pml*, не оказывала значимого влияния на жизнеспособность клеток HeLa по отношению с контролем (Рисунок 1, таблица 1).

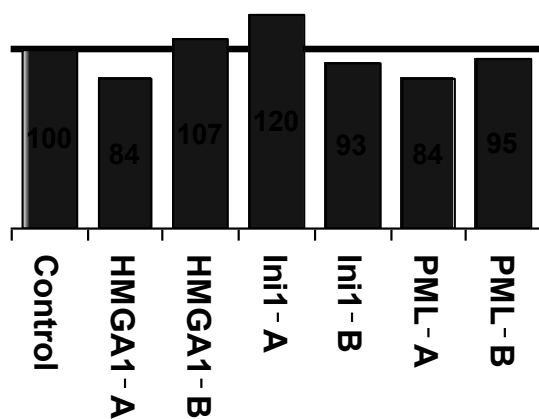


Рисунок 1. Относительная жизнеспособность (%) клеток HeLa после трансфекции киРНК. Control – жизнеспособность клеток, не подвергавшихся трансфекции, Ini1-A, Ini1-B, HMGA1-A, HMGA1-B, PML-A, PML-B – жизнеспособность клеток, трансфицированных соответствующим препаратом киРНК.

Уровень мРНК целевых генов определяли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ) через 24 часа после трансфекции. Электропорация клеток HeLa препаратами киРНК приводила к снижению уровня экспрессии мРНК соответствующего гена на 52 – 89% по сравнению с уровнем экспрессии мРНК того же гена в контрольных клетках (Рисунок 2, таблица 1).

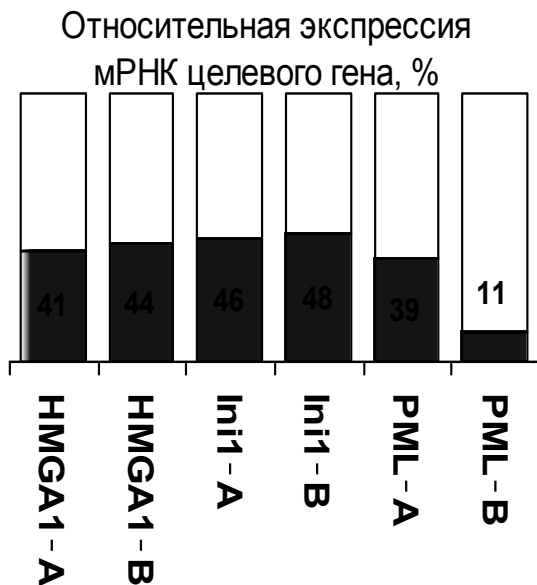


Рисунок 2. Уровень относительной экспрессии соответствующих генов клетки-хозяина после электропорации киРНК по сравнению с экспрессией того же гена в контрольных клетках, трансфицированных неспецифическим генетическим агентом.

Таблица 1.

Относительные показатели выживаемости клеток (через 24 ч.), избирательного снижения экспрессии мРНК (через 24 ч.) и интеграции в геном клетки рекомбинантного лентивируса (через 72 ч.) после трансфекции в клетки определенных киРНК.

киРНК	HMGA-1-A	HMGA-1-B	Ini1-A	Ini1-B	PML-A	PML-B	Контроль
Относительная жизнеспособность клеток, %	84	107	120	93	84	95	100
Относительная экспрессия мРНК целевого гена, %	41	44	46	48	39	11	-
Доля флуоресцирующих клеток, %	22	21	31	20	23	25	23,5

Получение рекомбинантного лентивируса

Для оценки эффекта РНК-интерференции на внутриклеточные процессы, происходящие в клетке человека, инфицированной лентивирусом, была разработана и апробирована клеточная модель лентивирусной инфекции.

Клетки *HEK-293T* трансфицировали плазмидами *pCMV-VSV-G*, *psPAX2* и *pWPT-GFP* одновременно, после чего клетки начинали продуцировать рекомбинантный репликативно-дефектный лентивирус, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок GFP.

Раствором рекомбинантного лентивируса без разведения и в серийных разведениях 1/5, 1/25, 1/125, 1/625 трансдуцировали культуру клеток *HEK-293T*. Через 72 часа фиксировали относительное количество флуоресцирующих клеток методом флуоресцентной микроскопии и проточной

цитофлуориметрией. По данным проточной цитофлуориметрии доля инфицированных клеток составила менее 2% в разведении 1/125; 9,8% в разведении 1/25; 48,2% в разведении 1/5 и 89,3% при инфицировании раствором без разведения. С учетом возможности инфицирования одной клетки несколькими вирусными частицами содержание вирусных частиц, способных к инфицированию, в исходном растворе составило 12 400 частиц в 1 мкл.

С целью апробации модели и для определения этапов жизненного цикла лентивирусов, воспроизводимых на данной модели, клетки НЕК-293Т обрабатывали антиретровирусными препаратами в концентрациях $0,1 \cdot C_{max}$, $1 \cdot C_{max}$ и $10 \cdot C_{max}$ (C_{max} – максимальная концентрация действующего вещества в плазме крови человека после однократного приёма препарата в терапевтической дозе) и трансдуцировали рекомбинантным лентивирусом. Микрофотографии культуры клеток при флуоресцентной микроскопии через 72 часа после ретровирусной трансдукции представлены на Рисунке 3.

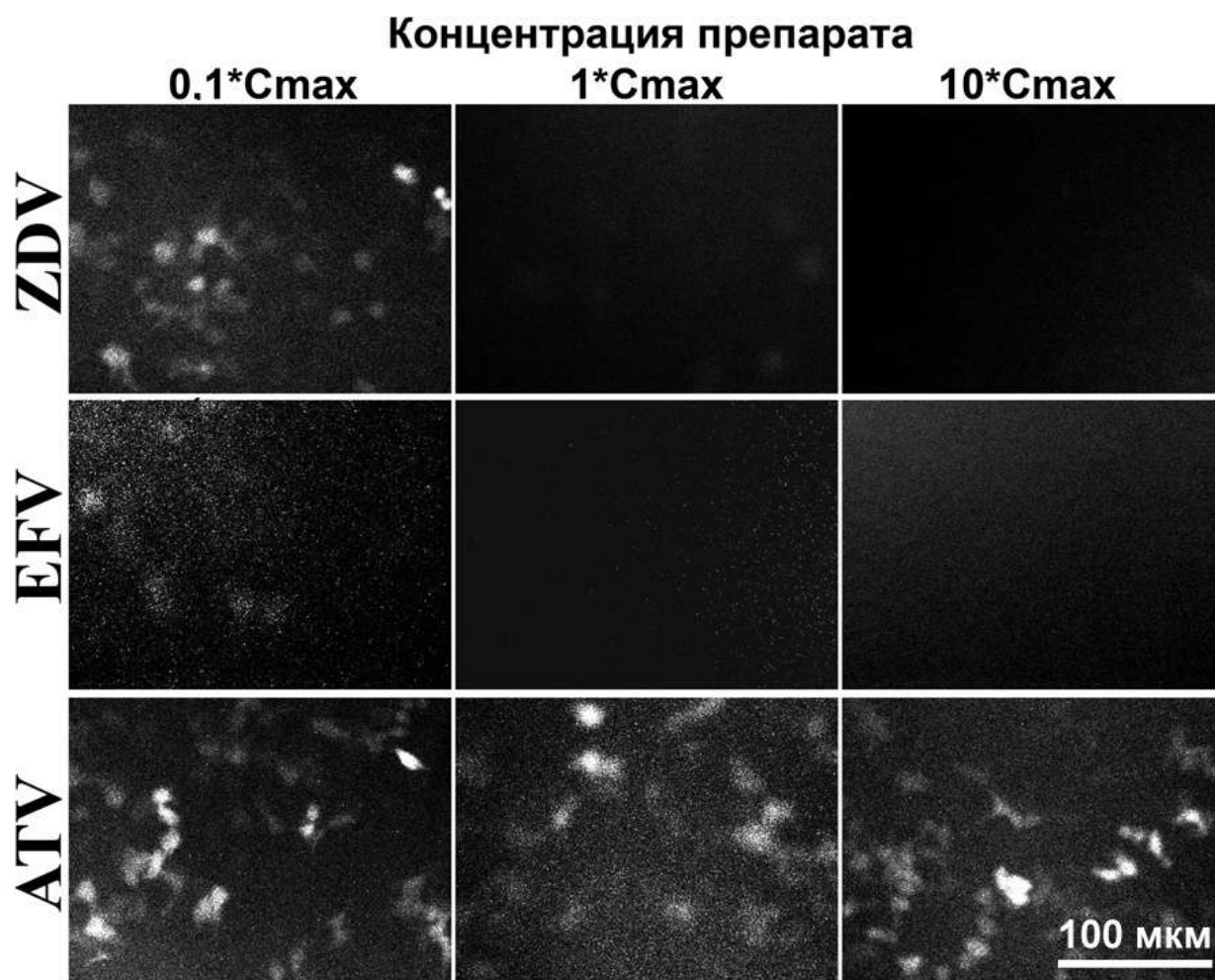


Рисунок 3. Флуоресцентная микроскопия клеток, обработанных азидотимидином (ZDV), эфавирензом (EFV) и атазанавиром (ATV), и инфицированных рекомбинантным лентивирусом. Препараты применялись в концентрациях $0,1 \cdot C_{max}$, $1 \cdot C_{max}$ и $10 \cdot C_{max}$ (C_{max} – максимальная концентрация действующего вещества в плазме крови человека после однократного приёма препарата в терапевтической дозе).

В лунках, содержавших нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы азидотимидин (*ZDV*) в концентрации 0,15 мкг/мл (Рис. 3, сверху слева), наблюдались *gfp*-позитивные клетки в количестве меньшем, чем при инфицировании контрольных клеток (без лечения) вирусным раствором без разведения, но в большем количестве, чем при инфицировании вирусным раствором в разведении 1/5. В лунках, содержавших азидотимидин в концентрациях 1,5 мкг/мл и 15 мкг/мл, наблюдалось эффективное подавление лентивирусной инфекции, *gfp*-позитивные клетки отсутствовали (Рис. 3, сверху по центру и справа).

В лунках, содержавших ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы эфавиренз (*EFV*) в концентрации 0,47 мкг/мл (Рис. 3, средний ряд, слева), наблюдались единичные *gfp*-позитивные клетки в количестве сравнимом с числом флуоресцирующих клеток при инфицировании клеток без лечения вирусным раствором в разведении 1/25. В лунках, содержавших *EFV* в концентрациях 4,7 мкг/мл и 47 мкг/мл, наблюдалось эффективное подавление лентивирусной инфекции, *gfp*-позитивные клетки отсутствовали (Рис. 3, средний ряд, по центру и справа).

В лунках, содержавших ингибитор протеазы атазанавир (*ATV*) во всех концентрациях (0,32 мкг/мл, 3,2 мкг/мл, 32 мкг/мл), наблюдалось большое количество *gfp*-позитивных клеток (Рис. 3, нижний ряд) сравнимое с числом флуоресцирующих клеток при инфицировании контрольных клеток (без лечения) неразведенным вирусным раствором.

Ингибиторы обратной транскриптазы прерывали цикл внутриклеточного развития лентивируса и предотвращали интеграцию, что выражалось в значительном снижении количества GFP-позитивных клеток. Ингибитор протеазы не оказывал влияния на внутриклеточные процессы при инфицировании рекомбинантным лентивирусом, поскольку данная модель не воспроизводит поздние этапы внутриклеточного цикла лентивирусов.

Таким образом, разработанная модель воспроизводит ранние этапы взаимодействия компонентов лентивируса и клетки человека, в т.ч. обратную транскрипцию и интеграцию. Клеточная модель позволяет наблюдать и фиксировать особенности межмолекулярных взаимодействий на этих этапах внутриклеточного цикла лентивирусов.

Антиретровирусный эффект коротких интерферирующих РНК, специфичных к клеточным белкам HMG A-1, INI-1, PML

Для оценки влияния избирательного снижения уровня белков человека HMG A-1, INI-1 и PML на процессы, происходящие в клетках, инфицированных лентивирусом, экспрессию мРНК соответствующих генов избирательно подавляли методом РНК-интерференции на клеточной модели лентивирусной инфекции.

Результаты показали, что количество копий гена *gfp* в клетках, трансфицированных киРНК, специфичными к клеточным белкам HMGA-1, INI-1, PML, значимо не отличалось от количества копий гена *gfp* в клетках, трансфицированных неспецифичной (контрольной) киРНК. Таким образом, избирательное снижение уровня клеточных белков HMGA-1, INI-1, PML не приводит к прерыванию процессов, происходящих в клетке человека, инфицированной лентивирусом (Рисунок 4, таблица 1).

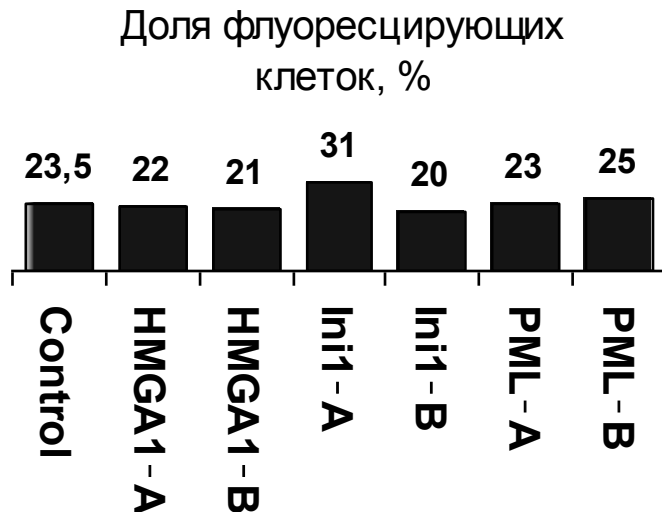


Рисунок 4. Относительное количество копий гена *gfp* в общей геномной ДНК клеток. Control – клетки, трансфицированные неспецифичными киРНК.

Устойчивость геномной РНК лентивируса к деградации при активации механизма РНК-интерференции

Клетки *HEK-293T* трансфицировали специфической анти-GFP киРНК и через 24 часа инфицировали рекомбинантным лентивирусом. В качестве контроля эффекта неспецифической РНК-интерференции ту же культуру клеток трансфицировали неспецифической киРНК и через 24 часа инфицировали рекомбинантным лентивирусом. Результаты оценивали через 72 часа после инфекции и сравнивали с положительным контролем (нетрансфицированные инфицированные клетки) и отрицательным контролем (нетрансфицированные неинфицированные клетки). (Рис. 5.)

Через 72 часа после инфицирования клеток рекомбинантным лентивирусом зафиксировали отсутствие зеленой флуоресценции 99,76% клеток в группе отрицательного контроля, медиана (M) = 1,79 ед.

В группе положительного контроля зафиксировали 2 популяции клеток: первый пик на гистограмме с $M=1,5$ ед. (11,19% клеток – избежавшие инфицирования лентивирусом) и второй пик с $M=222,67$ ед. – 88,81% (клетки с успешной интеграцией провируса). Примерно такая же картина наблюдалась в группе контроля неспецифической РНК-интерференции: 13,33% клеток не инфицированы; 86,77% – с интеграцией, $M=194,56$ ед.

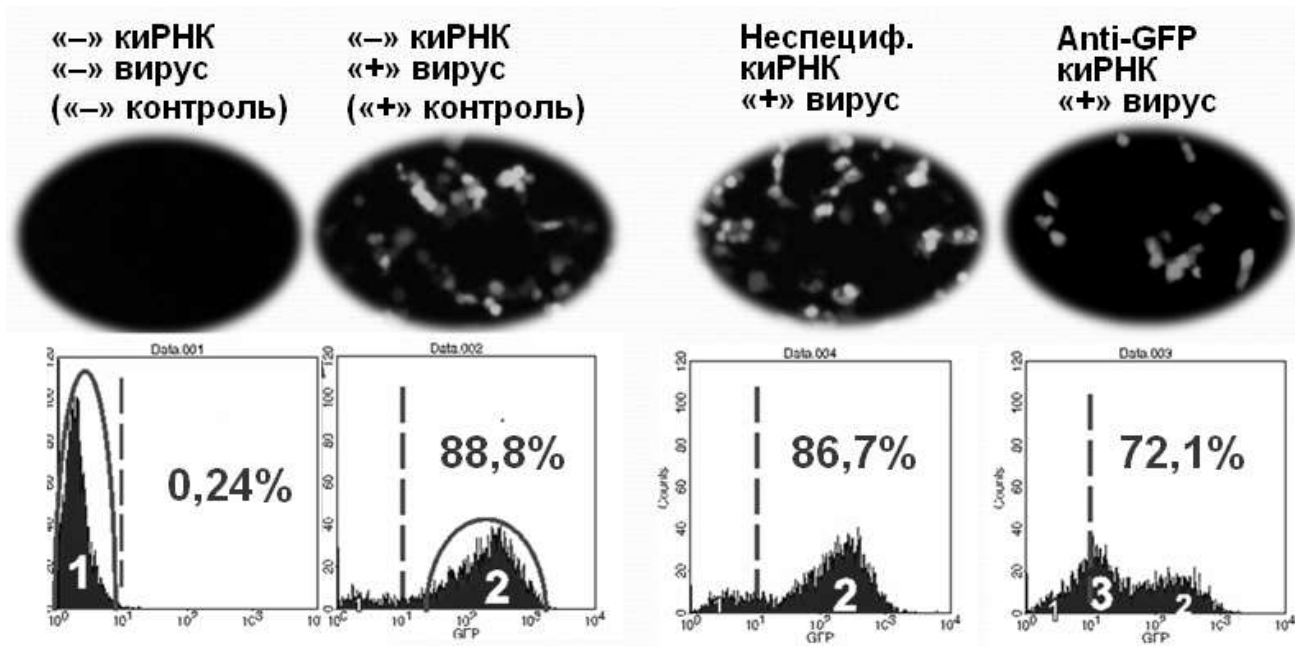


Рисунок 5. Трансфекция клеток *HEK-293T* анти-GFP-киРНК и трансдукция рекомбинантным лентивирусом. Микрофотографии и данные проточной цитофлуориметрии слева направо: неинфицированные клетки (отрицательный контроль); инфицированные рекомбинантным лентивирусом клетки (положительный контроль); трансфицированные контрольной неспецифической киРНК инфицированные рекомбинантным лентивирусом клетки (контроль неспецифической РНК-интерференции); трансфицированные анти-GFP киРНК инфицированные рекомбинантным лентивирусом клетки *HEK-293T* (основная группа).

В основной группе зафиксировали 3 пика на гистограмме, соответствующие 3 популяциям клеток в группе:

- 1-й пик (M около 2 ед.) – неинфицированные клетки;
- 2-й пик (M около 11 ед.) – клетки со слабой экспрессией GFP;
- 3-й пик (M около 150 ед.) – клетки с экспрессией GFP на уровне положительного контроля (в эти клетки не проникла киРНК при трансфекции).

2-й пик соответствует клеткам с успешной трансфекцией анти-GFP киРНК – в них наблюдается экспрессия гена GFP, но уровень белка в 20 раз ниже, чем в клетках без киРНК или с неспецифической киРНК.

Средний уровень зеленой флуоресценции клеток, успешно трансфицированных анти-GFP киРНК и инфицированных рекомбинантным лентивирусом (медиана 2-го пика группы «В» около 11 ед.) в 20 раз меньше среднего уровня флуоресценции инфицированных клеток без РНК-интерференции (медиана 2-го пика группы «Б» = 222,67 ед.). Следовательно, успешная трансфекция анти-GFP киРНК в клетки, инфицированные рекомбинантным лентивирусом, приводит к снижению экспрессии гена *gfp* в 20 раз по сравнению с положительным контролем и контролем неспецифической РНК-интерференции.

Таким образом, геномная РНК лентивирусов устойчива к деградации посредством механизма РНК-интерференции.

Заключение

Получение и использование рекомбинантного лентивируса при соблюдении общепринятых правил работы в лаборатории не представляет опасности инфицирования для исследователей, поскольку вирионы рекомбинантного лентивируса не содержат генетической информации ВИЧ, необходимой для развития инфекционного процесса (Прасолов В.С., Иванов Д.С., 2000). Экспрессионная плаزمида *psPAX2* несёт информацию о шести генах ВИЧ-1, но, во-первых, для её проникновения в клетку нужна процедура трансфекции, во-вторых, плаزمида способна синтезировать белок, но не реплицироваться в клетках человека, в-третьих, этих шести генов недостаточно для сборки ВИЧ-1 (Спирин П.В., 2007). Таким образом, представленная модель биологически более безопасна, чем модели с применением инфекционных вирусов.

Апробация модели показала, что нуклеозидные и ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы в средне-терапевтической концентрации и выше прерывали цикл внутриклеточного развития лентивируса и предотвращали интеграцию, что выражалось в значительном снижении количества GFP-позитивных клеток. Ингибитор протеазы не оказывал влияния на внутриклеточные процессы при инфицировании рекомбинантным лентивирусом, поскольку данная модель не воспроизводит поздние этапы внутриклеточного цикла лентивирусов.

При снижении концентрации ингибиторов обратной транскриптазы наблюдали увеличение количества GFP-позитивных клеток (с интеграцией провируса), что свидетельствует о дозозависимых эффектах этих препаратов.

Результаты позволяют применять разработанную модель лентивирусной инфекции для изучения взаимодействия лентивирусов с компонентами клетки человека на клеточном и молекулярном уровне на этапах от проникновения внутрь клетки до интеграции в геном.

В ходе работы разработаны и получены шесть препаратов киРНК, специфичных к мРНК белков клетки человека HMGA-1, INI-1 и PML, участвующих в жизненном цикле ВИЧ-1. Электропорация полученных киРНК в клетки человека приводила к активации РНК-интерференции, не нарушая жизнеспособность клеток.

Результаты позволяют говорить об эффективном временном снижении уровня белков клетки человека, задействованных во внутриклеточном цикле лентивирусов: экспрессия соответствующего гена снижалась в среднем на 61,8%. Клетки человека при снижении уровня клеточных белков HMGA-1, INI-1 и PML сохраняли жизнеспособность и пролиферативную активность.

На этапе планирования эксперимента мы осознавали, что при случайном выборе всего 3 молекулярных целей (HMGA-1, INI-1 и PML) из 435

вероятность значимого подавления какого-либо этапа жизненного цикла лентивируса невелика, но подтверждение основной гипотезы могло стать первым шагом к разработке принципиально нового метода в лечении и профилактике ретровирусных инфекций (Jäger S., 2011). К сожалению, как мы и предполагали, на фоне подавления каждой из трех выбранных целей рекомбинантный лентивирус продолжает поражать клетки человека.

Во многих работах зарубежных и отечественных авторов показана возможность подавления экспрессии ВИЧ-1 введением киРНК, специфичных к генам вируса, включая кассетные конструкции, выбрасывающие в клетку киРНК сразу к нескольким генам (Haddad R. et al., 2011). Практически во всех таких работах происходит направленное разрушение мРНК целевых генов. Ни в одной публикации не оценивается возможность направленной деградации вирусной геномной РНК до интеграции провируса, которая также является однонитевой «+» РНК, и теоретически может быть разрушена механизмом РНК-интерференции. Это предположение стало гипотезой 4-го этапа исследования, результаты которого показали, что геномная РНК лентивирусов до обратной транскрипции устойчива к механизму РНК-интерференции в отличие от матричной РНК, которая подвергалась избирательной деградации при активации механизма РНК-интерференции.

Инфицирование рекомбинантным лентивирусом клеток человека после трансфекции короткими интерферирующими РНК, специфичными к гену *gfp* (псевдовиральной геномной РНК), приводило только к снижению, но не к отсутствию, экспрессии гена *gfp*. Это может объясняться только избирательной деградацией мРНК *gfp* на стадии трансляции, поскольку если бы механизм РНК-интерференции был способен разрушить однонитевую геномную РНК вируса до интеграции, не происходила бы интеграция провируса в геном клетки, и белок GFP не синтезировался бы в таких клетках, т.е. в клетках трансфицированных анти-GFP киРНК (40% клеток) мы наблюдали бы отсутствие флуоресценции.

Устойчивость геномной РНК лентивирусов может объясняться как экранированием белками комплекса обратной транскрипции (Limon A., 2002), так и коротким временем жизни геномной РНК в клетке до формирования комплиментарной ДНК на стадии обратной транскрипции, или сочетанием обоих факторов (Bukrinsky M.I., 2004).

Следует отметить, что исследования с использованием инфекционных штаммов ВИЧ регламентируются правилами биологической безопасности (Myhr A.I., Traavik T., 2012), следовательно, не доступны большинству научных институтов и вузов России, поскольку лишь единицы научных организаций в России обладают лабораториями третьего или четвертого уровня

биологической безопасности. Разработанная нами модель воспроизводима в условиях клеточной лаборатории второго уровня биологической безопасности и относительно недорого.

Помимо исследования межмолекулярных взаимодействий в клетках человека, инфицированных лентивирусами, модель может быть использована в качестве доступного скринингового исследования при отборе препаратов, потенциально воздействующих на процессы обратной транскрипции и интеграции лентивирусов; для определения антиретровирусной активности известных лекарственных препаратов с целью биологического контроля качества; для исследования новых способов воздействия на клетки человека, включая генную терапию.

Выводы:

1. Специфичные киРНК снижают уровень мРНК генов клеточных белков HMGA-1, INI-1 и PML, участвующих в функционировании преинтеграционного комплекса ВИЧ, на 57,5%, 55% и 75% соответственно.

2. Снижение уровня мРНК клеточных белков человека HMGA-1, INI-1 и PML в ответ на трансфекцию специфичных киРНК достоверно не влияет на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток человека *in vitro*.

3. Разработана клеточная модель ретровирусной инфекции более биобезопасная, чем модели с инфекционными штаммами ВИЧ, позволяющая воспроизводить и исследовать межмолекулярные взаимодействия между компонентами (белками и нуклеиновыми кислотами) вируса и клеток человека на этапах от «раздевания» нуклеокапсида до интеграции провируса в геном клетки включительно.

4. Снижение уровня мРНК клеточных белков человека HMGA-1, INI-1 и PML в ответ на трансфекцию специфичных киРНК достоверно не снижает инфицирование клеток рекомбинантным лентивирусом *in vitro*.

5. Трансфекция клеток короткой интерферирующей РНК, специфичной к мРНК гена *gfp* (зеленого флуоресцентного белка), являющегося частью псевдовирусной геномной РНК, приводит к снижению уровня флуоресценции клеток после инфекции рекомбинантным репликационно-дефектным вирусом. Сохранение флуоресценции клеток свидетельствует об устойчивости геномной РНК лентивирусов к избирательной деградации посредством механизма РНК интерференции.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Бикмухаметов Д.А. Факторы, влияющие на приверженность антиретровирусной терапии: распространенность среди пациентов в Республике Татарстан / Д.А. Бикмухаметов, Е.В. Головин, О.А. Назарова //

Тезисы докладов XI Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2006. – С. 74.

2. Головин Е.В. Модуляция экспрессии клеточных белков, задействованных в патогенезе ВИЧ-инфекции, с использованием РНК-интерференции / Е.В. Головин, Н.И. Ланник, В.А. Анохин, А.А. Ризванов // Сборник тезисов XII Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2007. – С. 85-86.

3. Головин Е.В. Оценка роли белков клетки-хозяина в патогенезе ВИЧ-инфекции посредством РНК-интерференции / Е.В. Головин, В.А. Анохин, А.А. Ризванов // Неврологический вестник. – 2007. – Т. XXXIX, Вып.3. – С. 80-81.

4. Головин Е.В. Препараты киРНК для подавления экспрессии клеточных генов, участвующих в патогенезе ВИЧ / Е.В. Головин, М. Муянгова, В.А. Анохин, А.А. Ризванов // Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии: Материалы II Международной научно-практической конференции. – Казань, 2008. – С.92.

5. Головин Е.В. Оценка цитотоксичности коротких интерферирующих РНК, специфичных к клеточным белкам, задействованным в патогенезе ВИЧ-инфекции/ Е.В. Головин, М. Чибуйе, М. Муянгова, А.А. Ризванов // Сборник тезисов XIII Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2008. – С.71-72.

6. Головин Е.В. Применение коротких интерферирующих РНК для снижения экспрессии клеточных белков, необходимых для репликации ВИЧ-1 / Е.В. Головин, В.А. Анохин, А.А. Ризванов, А.А. Абросимова, Е.В. Мартынова // Практическая медицина, Сборник материалов к V Региональной научно-практической конференции «Педиатрия и детская хирургия в Приволжском федеральном округе» – Казань, 2008 – №6 (30) – С. 36.

7. Головин Е.В. Перспективы генной терапии в лечении и профилактике ВИЧ-инфекции / Е.В. Головин, В.А. Анохин, А.А. Ризванов, А.А. Абросимова // Сборник тезисов I Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в XXI веке», Казань, 30 октября 2008 г. – С. 206-208.

8. Анохин В.А. Преинтеграционный комплекс вируса иммунодефицита человека – потенциальный объект генетической терапии ВИЧ-инфекции / В.А. Анохин, Е.В. Головин, А.А. Ризванов // Инфекционные болезни. – 2009. – Т.6, №4. – С. 46-50.

9. Головин Е.В. Получение рекомбинантного ретровируса и моделирование ВИЧ-инфекции на клеточном уровне / Е.В. Головин, Е.В. Мартынова, А.А. Ризванов // XIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2009. – С. 53.

10. Мартынова Е.В. Влияние гипотонического шока на инфицирование клеток рекомбинантным лентивирусом *in vitro* / Е.В. Мартынова, Е.В. Головин,

Н.Л. Блатт, М.Э. Ялвач, О.Р. Галеев, В.А. Анохин, А.А. Ризванов // Материалы III Международного Симпозиума «Актуальные вопросы клеточных технологий». // Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия – Москва, 2010 – Т.5, №3. – С. 39.

11. Степанова Е.Ю. Вероятность развития анемии у больных ВИЧ-инфекцией / Е.Ю. Степанова, Г.Р. Хасанова, В.А. Анохин, О.И. Биккинина, Е.В. Головин // Инфекционные болезни. – 2010. – Т.8, №3. – С. 9-12.

12. Мартынова Е.В. Влияние препарата ифавиренц на инфицирование клеток репликационно-дефектным рекомбинантным лентивирусом / Е.В. Мартынова, Е.В. Головин, Н.Л. Блатт, О.Р. Галеев, А.А. Ризванов // 14 Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ Наука XXI века» – Пущино, 2010. – Т.1 – С. 157.

13. Головин Е.В. Биобезопасная клеточная модель ВИЧ-инфекции на основе рекомбинантного лентивируса / Е.В. Головин, Е.В. Мартынова, О.Р. Галеев, А.К. Шафигуллина, В.А. Анохин, А.А. Ризванов // Врач-аспирант, Издательство «Научная книга» (Воронеж) – 2011. – №5.3(48). – С. 409-413.

14. Головин Е.В. Безопасная модель ВИЧ-инфекции для оценки антиретровирусной активности лекарственных препаратов / Е.В. Головин, И.Г. Мустафин, Е.В. Мартынова, О.Р. Галеев, В.А. Анохин, А.А. Ризванов // Современные технологии в медицине. – 2012. – №1. – С. 55-60.

Список сокращений

- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
киРНК – короткие интерферирующие РНК (*siRNA, short interfering RNA*)
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЦР РВ– ПЦР в реальном времени (*real time PCR*)
РНК – рибонуклеиновая кислота
РЦПБ СПИД МЗ РТ – Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД Министерства здравоохранения Республики Татарстан
GFP – зеленый флуоресцентный белок (*green fluorescent protein*)
НЕК-293Т – культура эмбриональных клеток почки человека, (*human embryonic kidney*), традиционно применяемая в для продукции лентивирусных векторов
HeLa – классическая культура клеток человека, полученная из раковой опухоли шейки матки пациентки Генриетты Лакс, традиционно применяемая в клеточной биологии.

Головин Евгений Владимирович
РНК-интерференция в клетках человека, инфицированных
рекомбинантным лентивирусом *in vitro*
Автореф. дисс. на соискание учёной степени кандидата мед. наук.
Подписано в печать 27.04.2012. Бумага офсетная 60x84/16
Ризография. Объем 1,0 печ.л. (0,93 усл.-печ.л.). Тираж 120 экз.
Заказ № 64
420012 г. Казань, ул. Щапова, д. 26, оф.102в,
полиграфическая фирма ООО Офсет-сервис