

Быстрое и полное подавление инфекционной активности вируса простого герпеса с помощью системы CRISPR/Cas9, направленной на вирусные гены геликазо-праймазного комплекса

Научный руководитель – Климова Регина Рафаиловна

Демидова Н.А.¹, Симонов Р.А.²

1 - 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*; 2 - Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина, Москва, Россия, *E-mail: asansimi@mail.ru*

У большинства людей, инфицированных вирусом простого герпеса 1 типа (ВПГ1) - около 3,7 млрд. человек, вирус находится в латентном состоянии, устойчивом к действию противовирусных препаратов. При реактивации вируса возникают серьезные заболевания, нередко со смертельным исходом. Кроме того, при лечении появляются лекарственно устойчивые штаммы ВПГ1 [4]. В связи с этим активно проводятся поиски новых терапевтических подходов, одним из которых является технология редактирования геномов с использованием системы CRISPR/Cas9 [1]. Попытки использования системы CRISPR/Cas9 в составе лентивирусных векторов пока не привели к желаемому успеху [3].

Цель работы - оценить способность системы CRISPR/Cas9, экспрессируемой с плазмиды и направленной на 2 гена геликазо-праймазного комплекса ВПГ1, подавлять инфекцию ВПГ1 в зараженных клетках.

В работе использовали следующие плазмиды системы CRISPR/Cas9: вектор без спейсеров против вирусных генов (**PX458**); без направляющей РНК (**gRNA-**); без Cas9 (**Cas9-**); без направляющей РНК и Cas9 (**gRNA-Cas9-**); и плазмиду, кодирующую две направляющие РНК против генов ВПГ1 (**UL52-UL29**). Культуру клеток Vero трансфицировали с помощью Lipofectamine 3000. Показана высокая эффективность трансфекции клеток Vero плазмидами CRISPR/Cas9-системы (>50%) и отсутствие значимого цитотоксического действия (>80% живых клеток в трансфицированной популяции). В культурах клеток Vero, зараженных ВПГ1 через 3 дня после трансфекции плазмидой CRISPR/Cas9 (**UL52-UL29**), отсутствовали инфицированные клетки, что свидетельствует о полном (100%-ном) и быстром ингибировании ВПГ1-инфекции (рис. 1). Напротив, после заражения клеток, трансфицированных плазмидами **Cas9-** и **gRNA-Cas9-**, количество инфицированных клеток было статистически значимо больше, чем в контроле заражения ВПГ1, $p < 0.05$. Возможно, это связано со способностью компонентов системы CRISPR/Cas9 индуцировать гены иммунного ответа [2].

Полученные результаты указывают на перспективность использования системы CRISPR/Cas9 при разработке новых стратегий борьбы с герпесвирусными инфекциями.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-01218.

Источники и литература

- 1) Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // Science. 2013. No. 339. P. 819–823.
- 2) Kim S., Koo T., Jee H.G., Cho H.Y., Lee G., Lim D.G., Shin H.S., Kim J.S. CRISPR RNAs trigger innate immune responses in human cells // Genome Res. 2018 No. 28, P. 367–373.

- 3) Lin C., Li H., Hao M., Xiong D., Luo Y., Huang C., Yuan Q., Zhang J., Xia N. Increasing the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing of HSV-1 virus in human cells // *Sci. Rep.* 2016. No. 6. P. 34531.
- 4) Schubert A., Gentner E., Bohn K., Schwarz M., Mertens T., Sauerbrei A. Single nucleotide polymorphisms of thymidine kinase and DNA polymerase genes in clinical herpes simplex virus type 1 isolates associated with different resistance phenotypes // *Antiviral Res.* 2014. No. 107. P. 16–22.

Иллюстрации

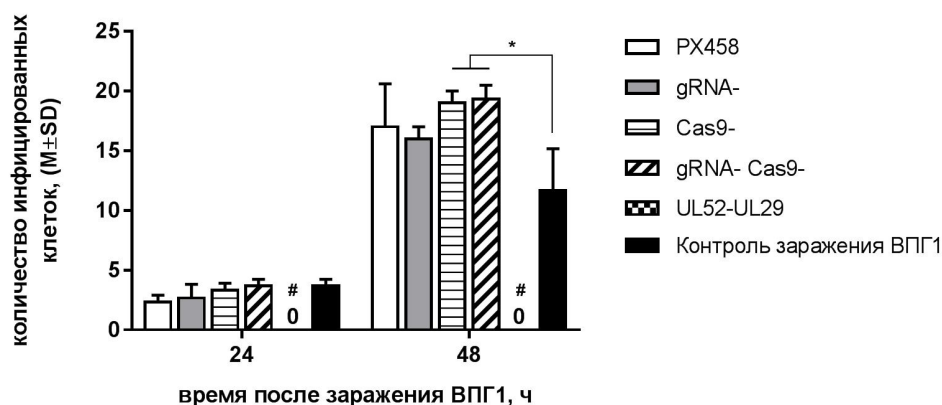


Рис. 1. Противовирусная активность CRISPR/Cas9 плазмид в отношении ВПГ1-инфекции *in vitro*. # - статистически значимые различия по сравнению со всеми группами (t-test; $p < 0,05$); * - статистически значимые различия (t-test; $p < 0,05$).