

ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКЗОГЕННОЙ мРНК, КОДИРУЮЩЕЙ БЕЛОК МxА ЧЕЛОВЕКА

М. А. Плотникова¹, Д. Е. Бобков^{1,2}, С. А. Клотченко¹✉

¹ Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева Министерства здравоохранения России, Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Индукцируемый интерферонами типа I и типа III человеческий белок МxА является важным медиатором врожденного иммунитета и проявляет противовирусную активность в отношении широкого спектра РНК- и ДНК-содержащих вирусов. По последним данным, сверхэкспрессия белка МxА повышает чувствительность к проводимой химиотерапии и является одним из факторов благоприятного прогноза для пациентов с раком молочной железы. Экзогенная мРНК, способная к внутриклеточной продукции белка МxА, не только обладает потенциалом для лечения респираторных вирусных инфекций, но и может стать важным инструментом для фундаментальных исследований. Целью работы было сконструировать и получить методом *in vitro* транскрипции (IVT) экзогенную мРНК, кодирующую функциональный цитоплазматический белок МxА человека; изучить ее трансляционные свойства; оценить и выявить закономерности в экспрессии некоторых генов системы интерферонов в ответ на введение этой экзогенной мРНК в клетки. В результате работы были успешно сконструированы и получены методом IVT экзогенные мРНК (в количествах до 200 мкг), способные к эффективной трансляции (до 20 нг/мл белка со 100 нг мРНК в лунке 96-луночного планшета) в эукариотических клеточных системах; подтверждено диффузное внутриклеточное распределение белка МxА в клетках MDCK; выявлены достоверные изменения экспрессии интерферон-стимулируемых генов, таких как OAS1, PKR (EIF2AK2), MDA5, RIG-I. Наши дальнейшие исследования будут посвящены оценке терапевтического потенциала разработанных экзогенных мРНК в отношении вирусов гриппа А и В, респираторно-синцитиального вируса и коронавируса SARS-CoV-2.

Ключевые слова: белок МxА, экзогенная мРНК, *in vitro* транскрипция, ИФН-стимулируемые гены

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, Соглашение № 23-25-00433, название проекта: «Изучение противовирусного действия мРНК, кодирующей МxА белок человека» (руководитель — М. А. Плотникова), <https://rscf.ru/project/23-25-00433/>

Вклад авторов: М. А. Плотникова — дизайн исследования, проведение экспериментов, анализ результатов, статистическая обработка, написание рукописи; Д. Е. Бобков — исследования с использованием метода конфокальной микроскопии; С. А. Клотченко — получение и характеристика препаратов экзогенных мРНК, редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Сергей Анатольевич Клотченко
ул. Профессора Попова, 15/17, г. Санкт-Петербург, 197022, Россия; fosfatik@mail.ru

Статья получена: 30.09.2024 **Статья принята к печати:** 22.10.2024 **Опубликована онлайн:** 30.10.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.048

PRODUCTION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE EXOGENOUS mRNA ENCODING HUMAN MxA PROTEIN

Plotnikova MA¹, Bobkov DE^{1,2}, Klotchenko SA¹✉

¹ Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

² Institute of Cytology, Russian Academy of Science, St. Petersburg, Russia

Human MxA protein induced by type I and III interferons is an important innate immunity mediator, it shows antiviral activity against a broad spectrum of RNA and DNA viruses. According to the latest data, the MxA protein overexpression increases chemotherapy sensitivity and represents one of the favorable prognostic factors in patients with breast cancer. The exogenous mRNA capable of intracellular MxA protein production not only has the potential for treatment of viral respiratory infection, but also can become an important fundamental research tool. The study aimed to construct and produce the exogenous mRNA encoding the functional human cytoplasmic MxA protein by *in vitro* transcription (IVT); to study its translational properties; to assess and identify the patterns of the expression of some interferon system genes in response to introduction of this exogenous mRNA into cells. As a result of the study, the exogenous mRNAs capable of effective translation (up to 20 ng/mL of protein from 100 ng of mRNA per well of the 96-well plate) in the eukaryotic cell systems were successfully constructed and produced by IVT (in the amount of up to 200 µg); diffuse distribution of the MxA protein in the MDCK cells was confirmed; significant changes in the expression of the interferon-stimulated genes, such as OAS1, PKR (EIF2AK2), MDA5, RIG-I, were revealed. Our further research will be focused on assessing the developed exogenous mRNAs' therapeutic potential against influenza A and B viruses, respiratory syncytial virus, and coronavirus SARS-CoV-2.

Keywords: MxA protein, exogenous mRNA, *in vitro* transcription, IFN-stimulated genes

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation, Agreement No. 23-25-00433, project title: "Assessment of antiviral effect of the mRNA encoding human MxA protein" (manager M.A. Plotnikova), <https://rscf.ru/project/23-25-00433/>

Author contribution: Plotnikova MA — study design, experimental procedure, analysis of the results, statistical processing, manuscript writing; Bobkov DE — confocal microscopy examination; Klotchenko SA — production and characterization of the exogenous mRNA preparations, manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sergey A. Klotchenko
Professora Popova, 15/17, St. Petersburg, 197022, Russia; fosfatik@mail.ru

Received: 30.09.2024 **Accepted:** 22.10.2024 **Published online:** 30.10.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.048

Белки Мх, индуцируемые интерферонами типов I и III, являются важными медиаторами врожденного иммунитета и участвуют в защите от различных РНК- и ДНК-содержащих вирусов [1]. Эти белки принадлежат к обширному семейству ферментов гидролаз (ГТФаз) и гомологичны для позвоночных [2, 3].

У человека в 21-й хромосоме кодируются две различные Мх-ГТФазы, называемые МхА и МхВ. Оба белка локализованы в цитоплазме и при иммунофлуоресцентной детекции имеют характерное зернистое окрашивание [3]. Человеческий МхА представляет собой цитоплазматический белок массой 78 кДа, тесно связанный с гладким эндоплазматическим ретикуломом [1]. МхА обладает сравнительно широким противовирусным спектром действия против различных типов вирусов, независимо от места их внутриклеточной репликации. К МхА-чувствительным вирусам относятся представители буньявирусов, ортомиксовирусов, парамиксовирусов, рабдовирусов, тогавирусов, пикорнавирусов и вируса гепатита В — ДНК-вируса с промежуточной геномной РНК [2, 4, 5]. Интересно, что некоторые вирусы ингибируются специфичным для каждого типа клеток образом. Это позволяет предположить, что неизвестные клеточные факторы могут влиять на противовирусную специфичность [6].

В дополнение к противовирусной активности, в недавно проведенных исследованиях выявлена роль МхА при различных типах рака, в частности, при раке молочной железы и карциноме предстательной железы [1]. Так, описано, что высокий уровень МхА и обилие опухолевых лимфоцитов являются независимыми прогностическими факторами безрецидивной выживаемости у пациентов с трижды негативным раком молочной железы [7]. Описано также, что экспрессия МхА опухолевыми клетками чаще приводит к выживаемости без метастазов после адъювантной химиотерапии [8]. В этой связи ожидается, что искусственное повышение уровня МхА в опухолях может приводить к благоприятному исходу у онкобольных и сделать проведение химиотерапии более эффективной. Все это позволяет предположить, что МхА является крайне перспективным терапевтическим агентом.

Поскольку МхА — внутриклеточный белок, а доставка белков такого размера в клетки все еще представляет существенную проблему, для исследования биологических свойств МхА мы предложили сравнительно новый подход использования экзогенной мРНК, кодирующей человеческий белок МхА. Эта концепция активно развивалась в последнее десятилетие и достаточно успешно реализовала себя в 2020 г. при создании нового поколения мРНК-вакцин против COVID-19 производства Pfizer/BioNTech и Moderna. Значительные успехи были достигнуты в области регенеративной медицины, где мРНК используют для перепрограммирования соматических клеток, а также в заместительной белковой терапии при лечении генетических заболеваний.

Цель исследования — сконструировать и получить методом IVT экзогенную мРНК, кодирующую функциональный цитоплазматический белок МхА человека; изучить ее трансляционные свойства; оценить и выявить закономерности в экспрессии некоторых генов системы интерферонов (ИФН-стимулируемых генов) в ответ на введение экзогенной мРНК в клетки. В дальнейшем мы предполагаем оценить терапевтический потенциал разработанных конструкций мРНК в отношении вирусов гриппа А и В, респираторно-синцитиального вируса и коронавируса SARS-CoV-2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конструирование плазмидных векторов

Нуклеотидные вставки, кодирующие человеческий белок МхА, были получены из препаратов тотальной РНК, выделенных из клеток A549, методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров (GAGAGCGGCCGCGCCACCATTGGTTGTTT/ ATCTTCTAGATTAACCGGGGAAGCTGGCAAGC), содержащих сайты рестрикции для эндонуклеаз Not I и Xba I. Фрагменты требуемой длины (2017 п.н.) были вставлены в векторную систему pJET1.2, содержащую T7-промоторную область, методом рестрикции по сайтам Not I/Xba I с последующим лигированием по липким концам. Для получения конструкции с кэп-независимой трансляцией аналогичным образом был амплифицирован IRES-фрагмент размером 605 п.н. с использованием плазмидного вектора pIRESneo3 в качестве матрицы; последовательности поли(A), 5'- и 3'-UTR длинами 114, 57 и 110 п.н. соответственно, были синтезированы компанией «Евроген» (Россия). Все нетранслируемые компоненты кассеты были лигированы в вектор pJET1.2 согласно предложенному дизайну (см. «Результаты исследования»).

Полученные в результате клонирования колонии скринировали методом ОТ-ПЦР. Плазмидные конструкции, содержащие вставки ожидаемой длины, были накоплены и очищены с использованием набора Plasmid Miniprep 2.0 («Евроген»; Россия). Последовательности разработанных плазмидных конструкций были подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру компанией «Евроген» (Россия).

In vitro транскрипция

Препараты экзогенных мРНК (мРНК-МхА-CDS, мРНК-МхА-IRES, мРНК-МхА-UTR и мРНК-GFP-CDS) были получены путем IVT с использованием набора HighYield T7 ARCA mRNA Synthesis Kit (#RNT-102; Jena Bioscience, Германия). В качестве матрицы для синтеза РНК использовали 1 мкг линейаризованной по сайту Xba I плазмиды. В качестве кэпа использовали синтетический аналог ARCA, Anti-Reverse Cap Analog, добавляемый в реакционную смесь в соотношении ARCA/GTP как 4 : 1. В реакции использовали модифицированные азотистые основания 5-метилцитидин (#NU-1138, 5-Methyl-CTP, m5C; Jena Bioscience, Германия) и псевдоуридин (#NU-1139, Pseudo-UTP, Ψ; Jena Bioscience, Германия). Реакцию проводили согласно протоколу производителя.

После синтеза РНК матрицу ДНК удаляли путем последующего расщепления ДНКазой Turbo (#AM1345, Thermo Fisher Scientific; США). Для нематричного полиаденилирования 3'-концов транскрибируемых мРНК использовали набор Poly(A) Tailing Enzyme Testkit (#RNT-004, Jena Bioscience; Германия). Полученные транскрипты очищали на колонках RNA Clean & Concentrator kit (#R1017, Zymo Research; США). Концентрацию полученных мРНК измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop-1000 и флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific; США).

Электрофорез в агарозном геле

Препараты плазмидной ДНК анализировали в 0,8%-м агарозном геле, приготовленном на 1× TAE-буфере с содержанием бромистого этидия до 0,5 мкг/мл, с использованием 6× буфера для нанесения ДНК.

Образцы мРНК анализировали в денатурирующих условиях в 1%-м агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия. 500 нг образца мРНК смешивали с равным объемом Gel Loading Buffer II (#AM1344, Invitrogen; США), прогревали в течение 5 мин при 80 °С и наносили на гель.

Результаты электрофоретического разделения визуализировали с использованием Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad; США).

Ведение клеточных культур и их трансфекция экзогенными мРНК

В работе для различных экспериментов были использованы: перевиваемая культура клеток A549 (#CCL-185, карцинома легкого человека), полученная из коллекции ATCC (США), и культура клеток MDCK (#FR-58, клетки почки собаки), полученная из коллекции IRR (США).

Клетки A549 культивировали на питательной среде F12K (Gibco; США) в присутствии 10% сыворотки КРС (Gibco; США); MDCK — на среде альфа-MEM («Биолот»; Россия) с добавлением сыворотки КРС до 5%. Ведение культур и все эксперименты проводили без добавления антибиотиков.

Для трансфекции экзогенными мРНК использовали точный 90–100% монослой клеток, ростовую среду непосредственно перед внесением мРНК заменяли на бессывороточную. Трансфекцию клеток проводили с использованием коммерческого трансфекционного реагента Lipofectamine MessengerMAX (Thermo Fisher Scientific; США) согласно инструкции производителя. В лунки 96-луночного планшета мРНК-комплексы вносили в объеме 10 мкл, в лунки 12-луночного планшета — в объеме 50 мкл. На 1 лунку 96-луночного планшета приходилось 100 нг мРНК и 0,3 мкл реагента Lipofectamine MessengerMAX, 12-луночного планшета — 450 нг РНК и 1 мкл реагента Lipofectamine MessengerMAX. В зависимости от задач эксперимента инкубацию клеток с комплексами РНК/липофектамин проводили в течение 4–24 ч при 37 °С и 5% CO₂.

Конфокальная микроскопия

Конфокальную визуализацию фиксированных клеток проводили через 24 ч после их трансфекции экзогенными мРНК. Для этого монослой клеток, выращенных на стеклянных предметных стеклах, промывали DPBS, фиксировали 4%-м раствором параформальдегида в течение 10 мин и пермеабелизовали 0,1%-м раствором Triton X-100. Блокирование осуществляли раствором 1%-го БСА на DPBS. Окраску ядер проводили DAPI (AppliChem; США), актинового цитоскелета — фаллоидином, ковалентно связанным с родамином (Thermo Fisher Scientific; США). Для визуализации белка MxA человека использовали первичные антитела MxA/Mx1 Antibody, меченые биотином (Novus Biologicals; Германия) с последующей проявкой с использованием Streptavidin DyLight 633 (Thermo Fisher Scientific; США). Микроскопию клеток проводили с помощью инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа TCS SP8 (Leica; Германия).

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Измерение уровня белка MxA проводили с использованием набора Human MxA Protein ELISA (BioVendor; Чехия) в

соответствии с инструкцией производителя. Регистрацию результатов проводили в двухволновом режиме (при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 655 нм) с использованием микропланшетного ридера CLARIOstar (BMG Labtech; Германия).

Оценка уровня экспрессии

Оценку уровня экспрессии ИФН-стимулируемых генов проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, разработанных ранее [9]. Препараты тотальной РНК выделяли с использованием реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific; США), далее проводили обработку ДНКазой («Биолабмикс»; Россия). Реакцию ОТ проводили с использованием набора RNAscribe RT («Биолабмикс»; Россия) с использованием олиго(dT)₁₆-праймеров и 2 мкг РНК, свободной от примесей геномной ДНК. ПЦР проводили с использованием готового набора БиоМастер HS-qPCR (2x) («Биолабмикс»; Россия), куда вносили 1–2 мкл кДНК.

Относительную экспрессию генов рассчитывали по методу дельта-дельта Ct ($\Delta\Delta Ct$), используя GAPDH и ACTB в качестве нормировочных генов. Относительный уровень экспрессии генов определяли по индуктивной формуле $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Вычисления осуществляли с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2003/2007 (США).

Статистическая обработка результатов

Оценку статистической достоверности различий проводили при помощи компьютерной программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software; США) с использованием теста непараметрического критерия Краскела–Уоллиса (для оценки значимости различий в трех и более независимых группах) и теста Даннета (для множественного группового сравнения). Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение функциональных мРНК

Согласно базе данных NCBI [10], у человека выявлено четыре транскрипционных варианта мРНК, кодирующих белок MxA. Несмотря на разницу в длинах и вариации в 5'-UTR, транскрипционные варианты 1, 2 и 3 кодируют одинаковую изоформу белка MxA, называемую изоформой а. Транскрипционный вариант 4 имеет альтернативный 5'-UTR, а также не содержит трех экзонов в 3'-кодирующей области, что приводит к сдвигу рамки считывания, вследствие чего эта мРНК кодирует более короткую изоформу белка MxA — b, также известную как varMxA [11]. При дизайне конструкций, кодирующих мРНК гена MxA человека, были подобраны праймеры для специфического клонирования канонической формы белка MxA а.

С использованием подобранных праймеров методом ОТ-ПЦР (Pfu ДНК-полимераза) из препаратов тотальной РНК (после обработки ДНКазой) была получена последовательность, кодирующая человеческий белок MxA. Согласно результатам секвенирования (рис. 1А) последовательность была полностью идентична ожидаемой канонической изоформе белка MxA а, однако имела одну описанную аминокислотную вариацию V379I, не влияющую на физико-химические свойства белка MxA [12].

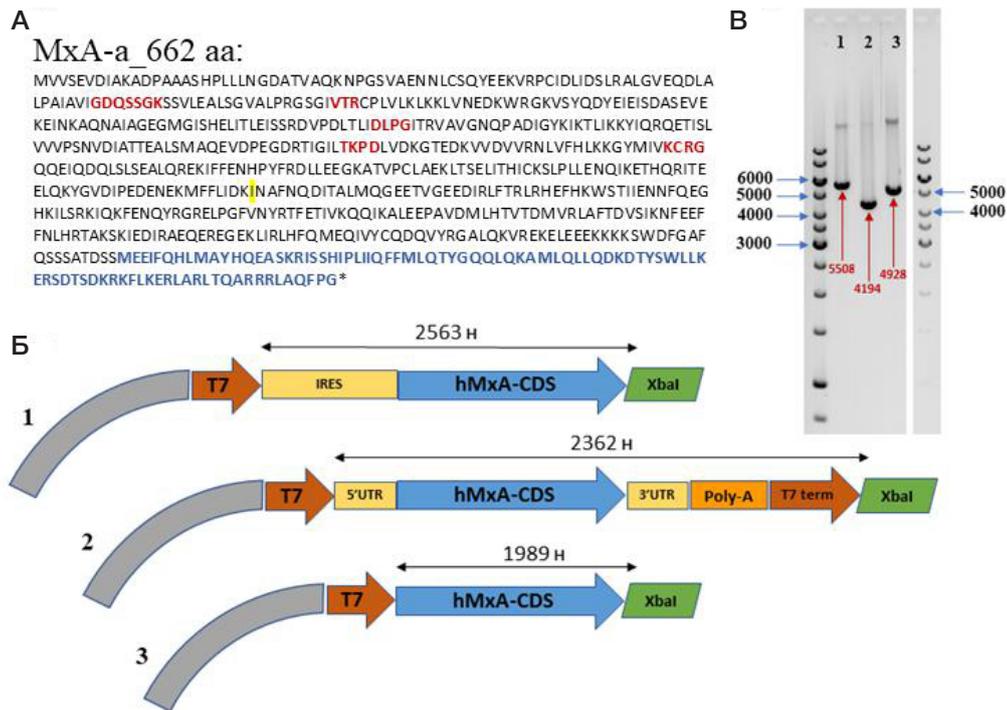


Рис. 1. Структура конструкций на основе плазмид, кодирующих экзогенную мРНК MxA человека. **А.** Аминокислотная последовательность кодируемого белка MxA (получена в результате секвенирования разработанных конструкций), красным цветом показаны G1–G5 мотивы (по порядку встречаемости), синим — С-концевой эффекторный домен ГТФазы, желтым — вариация V379I. **Б.** Схема линейаризованных плазмид, разработанных для получения мРНК методом IVT. На схемах кирпичным цветом показана T7-промоторная область для T7-полимеразы (и T7-терминаторная область в случае конструкции № 2), желтым — вспомогательные регуляторные некодирующие элементы, оранжевым (в случае № 2) — участок, обеспечивающий матричное присоединение поли(А)-хвоста (114 н.), синим — последовательность, кодирующая MxA, зеленым — сайт рестрикции, используемый для линейаризации. **В.** Электрофоретическое разделение линейаризованных плазмид, красным показаны ожидаемые длины продуктов (п.н.)

Для получения мРНК методом IVT были предложены три плазмидных конструкции (рис. 1Б), содержащие в качестве обязательного элемента кассеты промоторную область, специфичную для РНК-полимеразы фага T7. Одна из конструкций содержала исключительно белок-кодирующую последовательность MxA (мРНК-MxA-CDS), а в две другие были дополнительно введены нетранслируемые области, потенциально усиливающие эффективность трансляции белка, кодируемого этими мРНК. Для реализации кэп-независимой трансляции была сконструирована вторая мРНК-MxA-IRES, дополненная на 5'-конце укороченным IRES-элементом II типа из вируса энцефаломиокардита EMCV, содержащим бифуркационную последовательность A7 [13, 14]. Третья мРНК-MxA-UTR содержала дополнительные нетранслируемые области на 5'- и 3'-концах, а также участок, обеспечивающий матричную достройку поли(А)-хвоста в процессе IVT.

Все три предложенные плазмидные конструкции были успешно получены, накоплены, а секвенирование экспрессионных кассет показало их полное соответствие ожидаемым последовательностям. Далее плазмиды были линейаризованы (результаты электрофоретического разделения представлены на рис. 1В) и использованы в качестве матрицы ДНК для проведения IVT.

Полученные нами мРНК (рис. 2А) содержали синтетический аналог кэпа — ARCA, модифицированные основания псевдоуридин (Ψ) и 5-метилцитидин (m5C), что, согласно современным литературным данным, снижает иммуногенность экзогенных транскриптов [15, 16], а также поли(А)-хвост на 3'-конце. Последний был добавлен матрично (в случае использования кассеты для мРНК-MxA-UTR) или с проведением отдельной реакции полиаденилирования (для мРНК-CDS и мРНК-IRES).

Дополнительно нами также была получена экзогенная мРНК, кодирующая флуоресцентный зеленый белок (GFP), — мРНК-GFP-CDS, не содержащая никаких нетранслируемых областей, строение которой было эквивалентно мРНК-MxA-CDS. Количества полученных мРНК, кодирующих белок MxA, достигали 200 мкг, концентрации — до 350 нг/мл.

Оценка трансляции белкового продукта, кодируемого экзогенными мРНК

Трансляционная активность полученных экзогенных мРНК была оценена трансфекцией клеток MDCK. Методом ИФА, согласно полученным в серии экспериментов результатам, было показано, что мРНК-MxA-IRES не была способна к трансляции в исследуемой клеточной линии: выявить белок MxA при использовании этой мРНК не удалось на протяжении 36 ч после ее введения в клетки. Однако уже через 4 ч после трансфекции клеток MDCK двумя другими мРНК в клеточных лизатах на диагностически значимом уровне выявлялся белок MxA человека (результаты не представлены).

Через 20 ч после трансфекции концентрации человеческого белка MxA как в случае мРНК-MxA-CDS, так и мРНК-MxA-UTR, были сопоставимы и достигали 20 нг/мл (рис. 2Б).

Интернализация и внутриклеточная локализация человеческого белка MxA, кодируемого экзогенными мРНК, были изучены методом конфокальной микроскопии. Как показано на рис. 3, белок MxA эффективно транслировался клетками MDCK через 24 ч после введения мРНК. Как следует из результатов иммунофлуоресцентного анализа, MxA, кодируемый обеими экзогенными мРНК, присутствовал исключительно в цитоплазме клеток, располагаясь диффузно в виде характерных гранул.

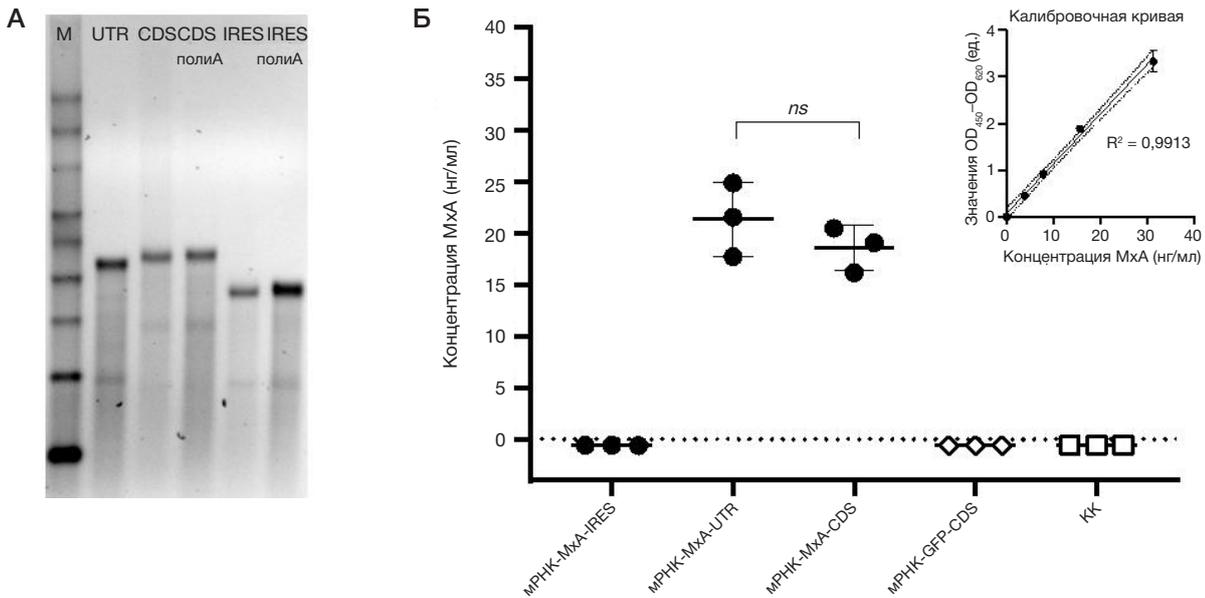


Рис. 2. Экзогенные мРНК, кодирующие белок МхА человека, и их трансляция в клетках MDCK. **А.** Электрофоретическое разделение полученных экзогенных продуктов мРНК до и после полиаденилирования, М — маркер молекулярного веса РНК (#AM1750, Thermo Fisher Scientific; США), UTR — мРНК-MxA-UTR (сразу с поли(А)-хвостом), CDS и CDS-полиА — мРНК-MxA-CDS до и после полиаденилирования, IRES и IRES-полиА — мРНК-MxA-IRES до и после полиаденилирования. **Б.** Результаты ИФА в клетках MDCK через 24 ч после трансфекции их экзогенными мРНК

Изучение экспрессии ИФН-стимулируемых генов в ответ на введение экзогенной мРНК-MxA-UTR

Известно, что введение синтетических экзогенных мРНК может приводить к активации цитозольных РНК-сенсоров и активировать иммунный ответ. Белок МхА как один из важнейших эффекторных метаболитов врожденной

иммунной системы также может модулировать продукцию ИФН-стимулируемых генов. Мы оценили специфичность этого ответа через 4 и 24 ч после трансфекции клеток A549 мРНК-MxA-UTR, используя мРНК-GFP-CDS в качестве контроля неспецифической стимуляции (рис. 4). Так, через 4 и 24 ч после трансфекции клеток мРНК-MxA-UTR детектируемый относительный уровень мРНК

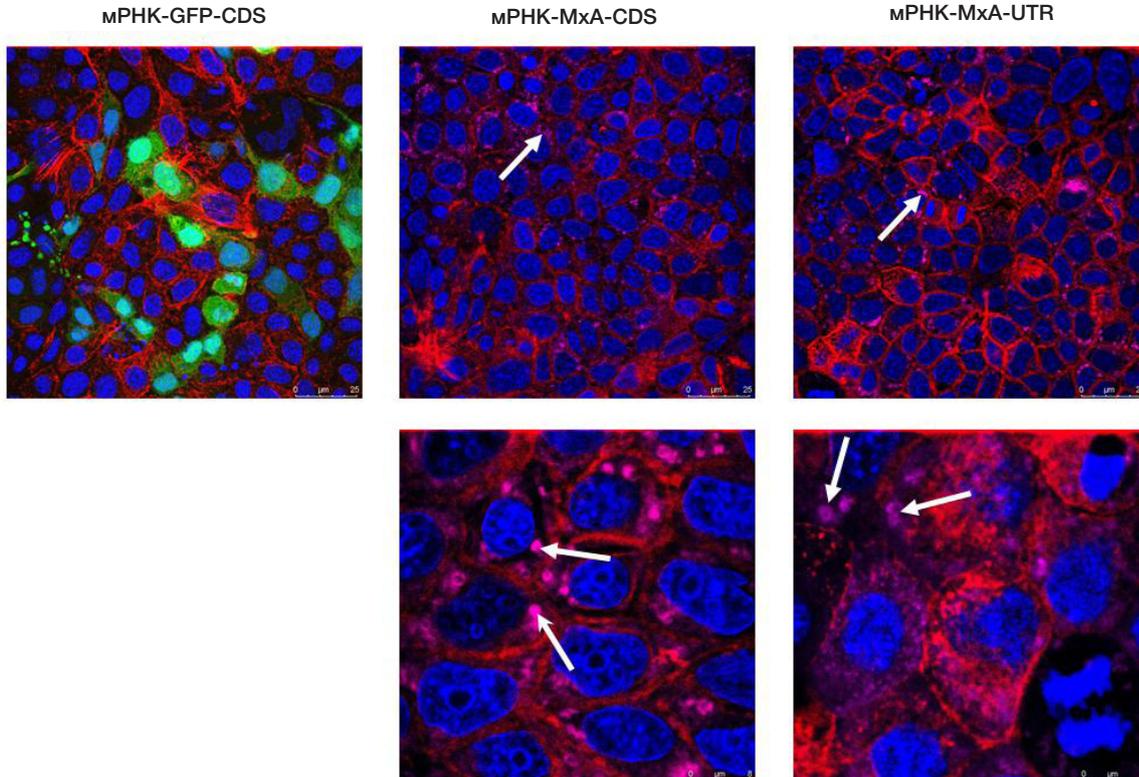


Рис. 3. Подтверждение продукции МхА в клетках MDCK методом конфокальной микроскопии. Репрезентативные фотографии клеток MDCK (фиксированные препараты) получены через 24 ч после трансфекции их экзогенными мРНК, кодирующими зеленый флуоресцентный белок (мРНК-GFP-CDS) и белок МхА человека (мРНК-MxA-CDS и мРНК-MxA-UTR), которые представлены слева направо. Синим показаны ядра клеток (DAPI, экстинкция/эмиссия: 358 (УФ)/461 нм), красным — актиновый цитоскелет (фаллоидин: 540/605 нм). МхА показан цветом маджента (620/655 нм); GFP (контрольные клетки, не трансфицированные мРНК, кодирующей МхА) показан зеленым цветом (488/509 нм). Белые стрелки направлены на характерные структуры, определяемые как белок МхА

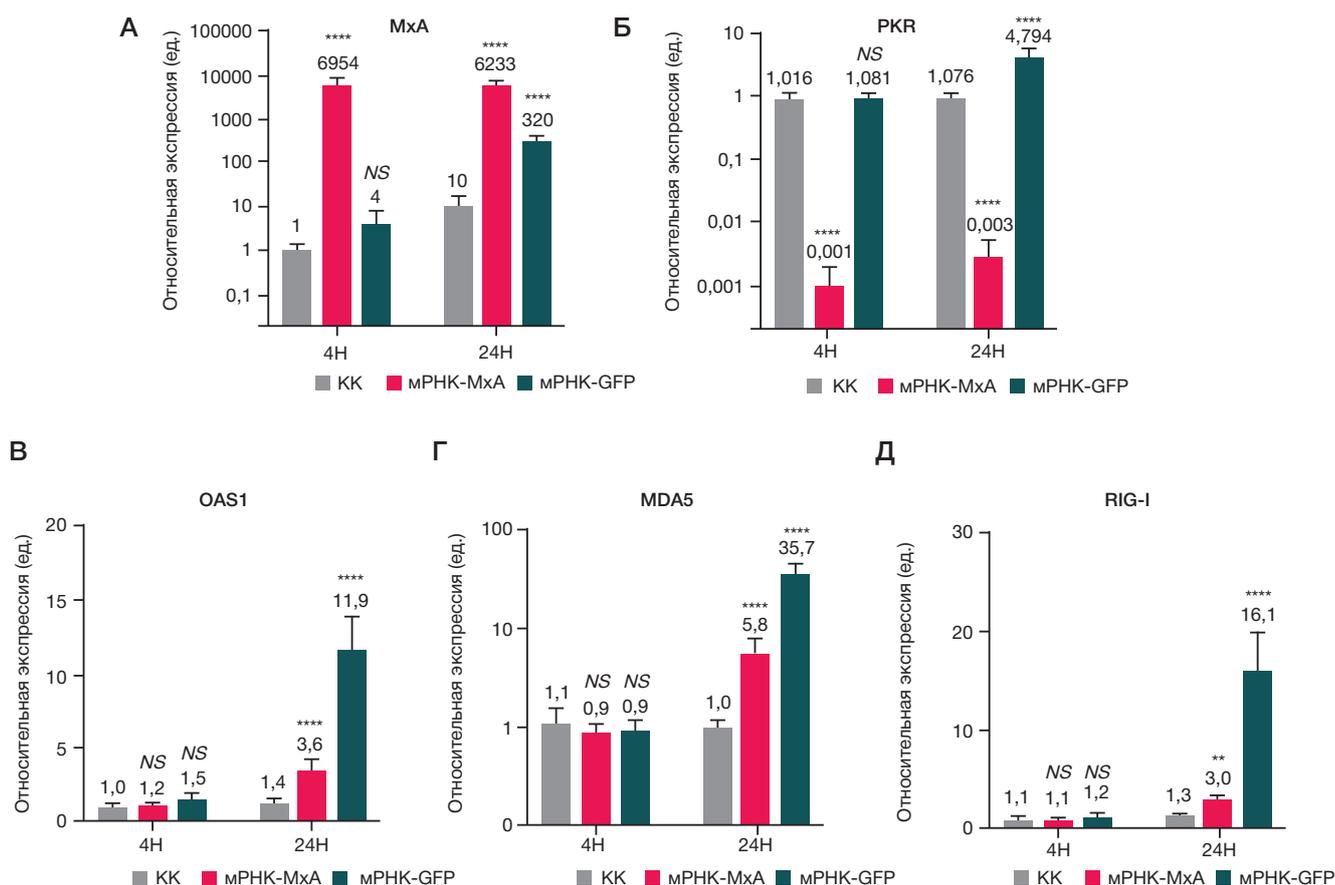


Рис. 4. Экспрессия генов MxA, PKR, OAS1, а также MDA5 и RIG-I в клетках A549 через 4 и 24 ч после трансфекции их мРНК в сравнении с интактными клетками (КК). В виде столбцов представлены средние значения (подписаны сверху) экспрессии четырех биологических повторов и стандартная ошибка среднего в качестве погрешности. Для расчета статистической достоверности выявленных различий использовали одношаговый анализ ANOVA с тестом Холма-Шидака для попарного сравнения образцов. *Звездочками* отмечены достоверные различия, выявленные при сравнении соответствующей группы с КК в этой же временной точке: ns — $P_{\text{value}} < 0,1234$; ** — $P_{\text{value}} < 0,0021$; **** — $P_{\text{value}} < 0,0001$

MxA примерно в 6500 раз превышал его уровень в контрольных клетках (принятый за единицу) (рис. 4A). Было также показано, что введение экзогенной мРНК в клетки приводит к неспецифическому (не зависящему от вида экзогенной мРНК) увеличению экспрессии гена OAS1, а также генов цитозольных сенсоров MDA5 и RIG-I, что указывает на активацию врожденного иммунного ответа. Любопытно, что трансфекция клеток мРНК-MxA-UTR приводила почти к 1000-кратному снижению уровня PKR по сравнению с интактными клетками, тогда как в случае мРНК-GFP-CDS, напротив, наблюдалась тенденция к четырехкратной активации этого гена.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Белок-кодирующие экзогенные мРНК представляют собой многообещающий инструмент, как позволяющий проводить фундаментальные исследования, выявляющие закономерности функционирования, сигналинга и метаболизма белков в клетках, так и имеющий огромный терапевтический потенциал. Сконструированные и синтезированные нами препараты экзогенных мРНК, кодирующие белок MxA человека, в дальнейшем будут использоваться для оценки их противовирусного действия в отношении респираторных вирусов.

Синтетические мРНК обладают той же структурой, что и природные молекулы мРНК: имеют кэп на 5'-конце (чаще его структурный аналог), 5'- и 3'-UTR, фланкирующие белок-кодирующую область, и поли(A)-хвост [17, 18].

Из трех предложенных мРНК нам удалось достоверно показать стабильную трансляцию двух конструкций, одна из которых содержала участки 5'- и 3'-UTR, другая, кроме белок-кодирующей части, не содержала никаких служебных областей (за исключением аналога кэпа и поли(A)-хвоста). Удивительно, но несмотря на показанную в литературе повышенную эффективность трансляции IRES-содержащих мРНК [19], синтез белка с предложенной нами мРНК-MxA-IRES не происходил. В нашей работе мы использовали IRES-элемент EMCV семейства пикорнавирусов, не задействующих кэп в процессе репликации. Полученная конструкция мРНК содержала одновременно и кэп-аналог, и IRES-элемент. Предположительно, одновременное наличие в непосредственной близости этих двух рибосом-узнаваемых участков приводит к блокированию кэп-зависимой трансляции с этого транскрипта.

Тем не менее в дальнейшем мы планируем оценить трансляцию синтетической мРНК-MxA-IRES, не содержащей кэп-аналога. По литературным данным, несмотря на то что в нормальных условиях IRES-зависимая трансляция имеет более низкую эффективность по сравнению с кэп-зависимой, в условиях клеточного стресса (в том числе теплового шока, вирусного инфицирования и т. д.) IRES-опосредованная трансляция может сохраняться и превосходить трансляцию с использованием кэпа [20].

Известно, что одними из ключевых регуляторов внутриклеточной кинетики молекулы мРНК являются 5'- и 3'-UTR. В частности, мРНК с длинными 3'-UTR имеют более короткий период полураспада, в то время как мРНК

с короткими 3'-UTR транслируются менее эффективно [18]. Сопоставление уровней белка MxA в клетках MDCK через 24 ч после трансфекции их экзогенными мРНК не позволило выявить какие-либо преимущества в трансляционной активности, обусловленные наличием или отсутствием в них участков UTR. Обе мРНК, способные к трансляции, приводили к продукции белка на уровне 20 нг/мл через сутки после трансфекции. Иммунофлуоресцентный анализ клеток MDCK, трансфицированных экзогенными мРНК, показал наличие в них гранул предположительно кольцевой конфигурации (выявляется при максимальном увеличении), диффузно распределенных в цитозоле. Этот результат полностью согласуется с опубликованными данными о том, что *in vivo* при физиологических концентрациях солей в клетке происходит гомоолигомеризация MxA; такая агрегация предотвращает деградацию и обеспечивает стабильность белка с периодом полураспада более 24 ч [21]. Наши результаты позволяют предположить, что продуцируемый белок MxA будет функционировать в клетках подобно нативному.

При оценке противовирусного потенциала белка MxA, транслируемого с экзогенной мРНК, особое внимание следует уделить неспецифической активации врожденного иммунного ответа, обусловленной повышенной иммуногенностью молекулы мРНК. Известно, что паттерно-распознающие рецепторы, такие как трансмембранные TLR3, 7, 8, 9, а также цитозольные сенсоры RIG-I и MDA5, способны узнавать чужеродные нуклеиновые кислоты и приводить к ответной экспрессии провоспалительных цитокинов или активации воспаления [22]. Нами было показано повышение экспрессии цитозольных сенсоров RIG-I и MDA5, а также ИФН-стимулируемого гена OAS1, через 24 ч после трансфекции клеток экзогенными мРНК. Паттерны экспрессии этих генов отличались по силе и коррелировали друг с другом для разных экзогенных мРНК. Мы предполагаем, что эти изменения обусловлены

неспецифической иммуногенностью экзогенных мРНК. Наибольшее воздействие на экспрессию исследованных генов оказала мРНК, кодирующая GFP, что может быть связано как с ее структурой, так и с тем, что в случае мРНК-MxA возможна негативная регуляция экспрессии этих генов, обусловленная петлей отрицательной обратной связи.

Любопытно, что трансфекция клеток A549 мРНК-MxA-UTR уже через 4 ч приводила к продолжительной (как минимум до 24 ч) мощной специфической супрессии ПКР на уровне транскрипции.

Выводы

В представленной работе: 1) с использованием разработанных нами плазмидных конструкций в качестве матрицы в реакциях IVT были получены мРНК, кодирующие белок MxA, способные к эффективной трансляции в эукариотических системах; 2) уровни накопления белкового продукта MxA после трансфекции клеток экзогенными мРНК достигали 20 нг/мл в течение суток; 3) подтверждено диффузное внутриклеточное распределение белка MxA в клетках; 4) исследована экспрессия цитозольных сенсоров и некоторых ИФН-стимулируемых генов в ответ на введение в клетки экзогенной мРНК, кодирующей белок MxA человека. Дальнейшие исследования авторов будут посвящены оценке терапевтического потенциала разработанных конструкций мРНК в отношении вирусов гриппа подтипов А и В, респираторно-синцитиального вируса и коронавируса SARS-CoV-2. Первоначально изучение будет проведено на клеточных моделях инфекций, вызываемых перечисленными патогенами, а при высоком терапевтическом потенциале планируется оценить противовирусное действие экзогенных мРНК, кодирующих белок MxA, на мышинной модели гриппозной пневмонии.

Литература

- Liao S, Gao S. MxA: a broadly acting effector of interferon-induced human innate immunity. *Visualized Cancer Medicine*. 2022; 3: 2. Available from: <https://doi.org/10.1051/vcm/2022002>.
- Verhelst J, Hulpiau P, Saelens X. Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2013; 77 (4): 551–66. Available from: <https://doi.org/10.1128/mmmbr.00024-13>.
- Haller O, Kochs G. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*. 2002; 3 (10): 710–7. Available from: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.31003.x>.
- Zürcher T, Pavlovic J, Staeheli P. Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *The EMBO Journal*. 1992; 11 (4): 1657–61. Available from: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05212.x>.
- Johannes L, et al. Antiviral determinants of rat Mx GTPases map to the carboxy-terminal half. *Journal of virology*. 1997; 71 (12): 9792–5. Available from: <https://doi.org/10.1128/jvi.71.12.9792-9795.1997>.
- Jung HE, Oh JE, Lee HK. Cell-penetrating Mx1 enhances anti-viral resistance against mucosal influenza viral infection. *Viruses*. 2019; 11 (2): 109. Available from: <https://doi.org/10.3390/v11020109>.
- Sistigu A, et al. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nature medicine*. 2014; 20 (11): 1301–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm.3708>.
- Kim YA, et al. MxA expression is associated with tumor-infiltrating lymphocytes and is a prognostic factor in triple-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2016; 156: 597–606. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3786-z>.
- Klotchenko SA, et al. Comparative analysis of MxA, OAS1, PKR gene expression levels in leukocytes of patients with influenza and coronavirus infection. *Medical academic journal*. 2023; 23 (3): 65–75. Available from: <https://doi.org/10.17816/MAJ623374>.
- База данных NCBI, доступно по ссылке: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.
- Noguchi S, et al. MxA transcripts with distinct first exons and modulation of gene expression levels by single-nucleotide polymorphisms in human bronchial epithelial cells. *Immunogenetics*. 2013; 65: 107–14. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00251-012-0663-8>.
- Tazi-Ahnini R, et al. Structure and polymorphism of the human gene for the interferon-induced p78 protein (MX1): evidence of association with alopecia areata in the Down syndrome region. *Human genetics*. 2000; 106: 639–45. Available from: <https://doi.org/10.1007/s004390000318>.
- Elroy-Stein O, Fuerst TR, Moss B. Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of the vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989; 86 (16): 6126–30. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6126>.
- Bochkov YA, Palmenberg AC. Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *Biotechniques*. 2006; 41 (3): 283–92. Available from: <https://doi.org/10.2144/000112243>.

15. Kariko K, Weissman D. Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. 2007; 10 (5): 523. PMID: 17786850.
16. Karikó K, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Molecular therapy*. 2008; 16 11: 1833–40. Available from: <https://doi.org/10.1038/mt.2008.200>.
17. Weissman D. mRNA transcript therapy. Expert review of vaccines. 2015; 14 (2): 265–81. Available from: <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.973859>.
18. von Niessen AGO, et al. Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening. *Molecular Therapy*. 2019; 27 (4): 824–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.12.011>.
19. Xue S, et al. RNA regulons in Hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *Nature*. 2015; 517 (7532): 33–38. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature14010>.
20. Koch A, et al. Quantifying the dynamics of IRES and cap translation with single-molecule resolution in live cells. *Nature structural & molecular biology*. 2020; 27 (12): 1095–104. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0504-7>.
21. Haller O, Kochs G. Mx genes: host determinants controlling influenza virus infection and trans-species transmission. *Human genetics*. 2020; 139 (6): 695–705. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02092-8>.
22. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 2010; 11 (5): 373–84. Available from: <https://doi.org/10.1038/ni.1863>.

References

1. Liao S, Gao S. MxA: a broadly acting effector of interferon-induced human innate immunity. *Visualized Cancer Medicine*. 2022; 3: 2. Available from: <https://doi.org/10.1051/vcm/2022002>.
2. Verhelst J, Hulpiac P, Saelens X. Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2013; 77 (4): 551–66. Available from: <https://doi.org/10.1128/mmr.00024-13>.
3. Haller O, Kochs G. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*. 2002; 3 (10): 710–7. Available from: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.31003.x>.
4. Zürcher T, Pavlovic J, Staeheli P. Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *The EMBO Journal*. 1992; 11 (4): 1657–61. Available from: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05212.x>.
5. Johannes L, et al. Antiviral determinants of rat Mx GTPases map to the carboxy-terminal half. *Journal of virology*. 1997; 71 (12): 9792–5. Available from: <https://doi.org/10.1128/jvi.71.12.9792-9795.1997>.
6. Jung HE, Oh JE, Lee HK. Cell-penetrating Mx1 enhances anti-viral resistance against mucosal influenza viral infection. *Viruses*. 2019; 11 (2): 109. Available from: <https://doi.org/10.3390/v11020109>.
7. Sistigu A, et al. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nature medicine*. 2014; 20 (11): 1301–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm.3708>.
8. Kim YA, et al. MxA expression is associated with tumor-infiltrating lymphocytes and is a prognostic factor in triple-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2016; 156: 597–606. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3786-z>.
9. Klotchenko SA, et al. Comparative analysis of MxA, OAS1, PKR gene expression levels in leukocytes of patients with influenza and coronavirus infection. *Medical academic journal*. 2023; 23 (3): 65–75. Available from: <https://doi.org/10.17816/MAJ623374>.
10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.
11. Noguchi S, et al. MxA transcripts with distinct first exons and modulation of gene expression levels by single-nucleotide polymorphisms in human bronchial epithelial cells. *Immunogenetics*. 2013; 65: 107–14. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00251-012-0663-8>.
12. Tazi-Ahnini R, et al. Structure and polymorphism of the human gene for the interferon-induced p78 protein (MX1): evidence of association with alopecia areata in the Down syndrome region. *Human genetics*. 2000; 106: 639–45. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00439000318>.
13. Elroy-Stein O, Fuerst TR, Moss B. Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of the vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989; 86 16: 6126–30. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6126>.
14. Bochkov YA, Palmenberg AC. Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *Biotechniques*. 2006; 41 (3): 283–92. Available from: <https://doi.org/10.2144/000112243>.
15. Kariko K, Weissman D. Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. 2007; 10 (5): 523. PMID: 17786850.
16. Karikó K, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Molecular therapy*. 2008; 16 11: 1833–40. Available from: <https://doi.org/10.1038/mt.2008.200>.
17. Weissman D. mRNA transcript therapy. Expert review of vaccines. 2015; 14 (2): 265–81. Available from: <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.973859>.
18. von Niessen AGO, et al. Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening. *Molecular Therapy*. 2019; 27 (4): 824–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.12.011>.
19. Xue S, et al. RNA regulons in Hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *Nature*. 2015; 517 (7532): 33–38. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature14010>.
20. Koch A, et al. Quantifying the dynamics of IRES and cap translation with single-molecule resolution in live cells. *Nature structural & molecular biology*. 2020; 27 (12): 1095–104. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0504-7>.
21. Haller O, Kochs G. Mx genes: host determinants controlling influenza virus infection and trans-species transmission. *Human genetics*. 2020; 139 (6): 695–705. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02092-8>.
22. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 2010; 11 (5): 373–84. Available from: <https://doi.org/10.1038/ni.1863>.