

## ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ МАЛЫХ РНК ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ВИРУСА ГРИППА НА ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА

И. А. Летова<sup>1</sup>, М. А. Сысоева<sup>1</sup>, Р.З. Шах Махмуд<sup>2</sup>

1 - ФГБОУ ВО «КНИТУ», г. Казань, Россия, ул. Карла Маркса д. 68

2 - ФГАОУ ВО «КФУ», г. Казань, Россия, ул. Кремлевская д. 18

[letovaira1995@mail.ru](mailto:letovaira1995@mail.ru)

**Аннотация:** Проведено исследование эпителиальных клеток легких человека зараженных вирусом гриппа А H1N1 (pdm09). Изменения профиля малых некодирующих РНК продемонстрированы на примере малой ядерной РНК U2.20, микроРНК 151В и микроРНК 1301. Сделан вывод о возможном использовании вирусом гриппа внутриклеточных малых некодирующих РНК, для развития вирусной инфекции.

**Ключевые слова:** вирус гриппа А, клетки легких человека, микроРНК, малая ядерная РНК, секвенирование следующего поколения.

### THE PROFILE CHANGES OF SMALL NUCLEAR RNA IN HUMAN LUNGS EPITHELIAL CELLS ON EXPOSURE TO INFLUENZA VIRUS

**Abstract:** The study of human lungs epithelial cells influenza A virus-infected H1N1 (pdm 09) was conducted. Profile changes of small non-coding RNA were demonstrated by small nuclear RNA U2.20, microRNA 151B and microRNA 1301 exemplifying. It was concluded that influenza virus possible use the intracellular small non-coding RNA for the development of viral infection.

**Keywords:** influenza A virus, human lung cells, miRNA, small nuclear RNA, next generation sequencing.

Вирусные инфекции приводят к серьезным заболеваниям человека и животных. Понимание патогенеза вирусных инфекций различной этиологии важно для их предотвращения и контроля вспышек в будущем. Инфекции вируса гриппа являются серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире. Также вирус гриппа способен поражать домашний скот, в том числе свиней и домашнюю птицу, что приводит к большим потерям в животноводстве и птицеводстве [1]. Эпидемия вируса гриппа распространяется за короткое время из-за большой контагиозности и широкого спектра хозяев. Даже в непандемические годы вирусы гриппа инфицируют 5-15% населения мира и приводят к более чем 500 000 смертей в год.

Заболевания людей, вызванные вирусом гриппа А, могут приводить к еще более тяжелым осложнениям, например, вызывать заболевания глаз у людей [2]. Одним из тяжелых осложнений инфекции гриппа является миокардит [3]. Вирусы гриппа А являются основной причиной инфекции нижних дыхательных путей. Грипп может проявляться в широком спектре заболеваний, начиная от субклинической или даже бессимптомной инфекции до тяжелой первичной вирусной пневмонии, требующей медицинского вмешательства [4]. Вирус гриппа оказывает цитолитический эффект, который

повреждает клетки эпителия дыхательных путей у человека и является причиной смерти инфицированных клеток. На молекулярном уровне инфекция подавляет клеточное дыхание легких. Инфекция вирусом гриппа вызывает запуск нескольких метаболических систем в клетке, которые потребляют или генерируют большое количество энергии. Размножение вируса гриппа повышает температуру клеток примерно на 4-5°C, уровни АТФ в клетках снижаются через 3 ч после заражения. Апоптоз считается одним из клеточных ответов хозяина против вирусной инфекции гриппа. Ряд вирусов, включая вирусы гриппа, могут манипулировать сигнальным путем гибели клеток, что способствует репликации вируса [5].

В ядре инфицированных гриппом клеток происходят вирусная репликация и транскрипция. После заражения мРНК вируса продуцируются вирусной РНК-полимеразой. Максимальное накопление вирусной мРНК происходит в начале цикла репликации (до ~ 4,5 ч после заражения). Как только эти мРНК произведены, начинается трансляция вирусных белков [6].

Многие патологические процессы сопровождаются изменениями экспрессии малых некодирующих РНК (нкРНК). Малые ядерные РНК принимают участие в важных клеточных процессах, таких как сплайсинг, регуляция факторов транскрипции и поддержание целостности теломер. Вирус гриппа изменяет клеточный сплайсинг и влияет на биогенез и созревание мРНК хозяина. Белок вируса гриппа может взаимодействовать с малыми ядерными РНК, это взаимодействие блокирует экспрессию клеточных генов [7]. МикроРНК класс коротких некодирующих РНК, главной функцией которых является посттранскрипционная регуляция генов. МикроРНК были обнаружены в плазме крови человека, а также в других биологических жидкостях, что вызвало интерес к микроРНК как неинвазивным биомаркерам различных заболеваний, в том числе вирусного происхождения. Многие микроРНК действуют как важные регуляторы в противовирусном ответе, что приводит к ингибированию репликации вируса посредством нацеливания на гены хозяина и вируса. Действие микроРНК может заключаться в усилении врожденного иммунитета хозяина. С другой стороны, некоторые микроРНК хозяина могут быть захвачены вирусом для облегчения своей репликации. Однако, микроРНК в клетках присутствуют в очень маленьких количествах, что является важной проблемой для их анализа [8]. Исследование количественного и качественного состава малых нкРНК и отличия их профиля здоровых клеток от больных, является важным инструментом для диагностики различных заболеваний вирусной этиологии.

Для исследования малых нкРНК используется достаточно много молекулярных и биологических методов, включая микрочипы, гибридизацию с бусинами, клонирование, количественную ПЦР в реальном времени и секвенирование следующего поколения. В настоящее время, выделение малых некодирующих РНК и их секвенирование единственный метод для их качественного, количественного анализа и обнаружения новых видов малых нкРНК в клетках.

Цель работы – определить влияние вируса гриппа H1N1 на эпителиальные клетки легких человека и проанализировать изменения профиля внутриклеточных малых РНК.

В качестве объектов исследования были использованы эпителиальные клетки легких человека с диагнозом аденокарцинома клеточной линии A549, и клетки этой линии, инкубированные с вирусом гриппа H1N1 (pdm09). В ходе исследования была выделена тотальная РНК клеток с помощью реагента TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, США). Малые нкРНК выделили с помощью набора реагентов и колонки на основе оксида кремния mirVana (Thermo Fisher Scientific, США). Очистку РНК от солей проводили с помощью 100% изопропанола и 75% этанола по стандартному методу для выделения РНК. Секвенирование выполняли на секвенаторе «Illumina NextSeq 500» (Illumina, США). Для биоинформатического анализа использовали базы данных «Ensemble», «miRBase». В качестве реферсного генома выбрали полный геном человека (GCA\_000789425.2).

В ходе исследования было обнаружено 463 вида малых ядерных РНК. Малая ядерная РНК U2 представляет собой РНК-компонент нуклеопротеидного комплекса U2, который взаимодействует с 3'-областью интрона в точках ветвления. Белок вируса гриппа NS1 может взаимодействовать с малой ядерной РНК U2 и U6. Белок NS1, блокирует клеточную экспрессию генов путем ингибирования сплайсосом. В нашем исследовании было установлено, что количество малой ядерной РНК U2.20 уменьшается после воздействия вируса гриппа на клетки. Таким образом, можно предположить, что вирус гриппа подавляет экспрессию клеточных генов, что способствует трансляции вирусных белков.

В ходе исследования было обнаружено 716 видов микроРНК. Ранее было установлено, что miR-151B оказывает противовирусное действие и её экспрессия увеличивается при инфекции вирусом гриппа. В нашем исследовании было выявлено увеличение количества miR-151B в 2,8 раз в клетках, зараженных вирусом гриппа, по сравнению с клетками без заражения. Из литературных данных известно, что miR-1301 – участвует в репликации вируса гриппа при саркоме Капоши. Нами было установлено, что количество miR-1301 увеличилось в 2,15 раз по сравнению с незараженными клетками.

Согласно полученным данным, вирус гриппа, возможно, использует внутриклеточные РНК для собственного развития, на что указывает уменьшение количества мяРНК малой ядерной РНК U2.20 и увеличение miR-1301. Экспериментально доказано, что при заражении вирусом гриппа эпителиальные клетки легких человека активируют врожденный иммунитет, что показано увеличением содержания miR-151B, которая обладает противовирусной активностью.

#### **Список литературы:**

1. Hu C.-M. J. Antiviral efficacy of nanoparticulate vacuolar ATPase inhibitors against influenza virus infection / C.-M. J. Hu, Y.-T. Chen, Z.-S. Fang, W.-S. Chang, H.-W. Chen // International Journal of Nanomedicine. – 2018. -№13. – P. 8579–8593.

2. Belser J. A. The eyes have it: influenza virus infection beyond the respiratory tract / J. A. Belser, R. Lash, S. Garg, T. M. Tumpey, T. R. Maines // *The Lancet Infectious Diseases* – 2018. – V. 18, I. 7 – P. e220-e227
3. Aykac K. Myocarditis associated with influenza infection in five children / K. Aykac, Y. Ozsurekcia, P. Kahyaoglub, S. T. Basaranoglua, I. Ertugrulc, A. Alpd, A. B. Cengiza, A. Karaa, M. Ceyhana // *Journal of Infection and Public Health* – 2018. – V. 11, I. 5 - P. 698-701.
4. Cavallazzi R. Influenza and Viral Pneumonia / R. Cavallazzi, J. A. Ramirez // *Clinics in Chest Medicine*. – 2018. – V.39, I. 4 – P. 703-721.
5. Murillo L. N. Towards multiscale modeling of influenza infection / L. N. Murillo, M. S. Murillo, A. S. Perelson // *J. Theor. Biol.* - 2014. - № 332 – P. 267–290.
6. Sikora D. Influenza A virus cap-snatches host RNAs based on their abundance early after infection / D. Sikora, L. Rocheleau, E. G. Brown, M. Pelchat // *Virology*. – 2017. – V. 509 – P. 167-177.
7. Dubois J. Influenza Viruses and mRNA Splicing: Doing More with Less / J. Dubois, O. Terrier, M. Rosa-Calatrava // *mBio*. - 2014. – V. 5(3) - e00070-14.
8. Makkoch J. Human microRNAs profiling in response to influenza A viruses (subtypes pH1N1, H3N2, and H5N1) / J. Makkoch, W. Poomipak, S. Saengchoowong, K. Khongnomnan, K. Praianantathavorn, T. Jinato, Y. Poovorawan, S. Payungporn // *Experimental Biology and Medicine*. - 2016. - №241 (4) – P. 409–420.