

УДК 578.23

НЕСТРУКТУРНЫЙ БЕЛОК 3 ВИРУСА ГЕПАТИТА С ПОВЫШАЕТ СЕКРЕЦИЮ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1БЕТА В КЛЕТКАХ НЕК293Т С РЕКОНСТРУИРОВАННОЙ ИНФЛАММАСОМой NLRP3

© 2023 г. А. А. Латанова^{а, *}, К. К. Тучинская^б, Е. С. Стародубова^а, В. Л. Карпов^а^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия^бФедеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова Российской академии наук (Институт полиомиелита), пос. Института полиомиелита, поселение Московский, Москва, 108811 Россия

*e-mail: aalatanova@gmail.com

Поступила в редакцию 02.03.2023 г.

После доработки 30.03.2023 г.

Принята к публикации 31.03.2023 г.

Патология заболеваний, вызываемых вирусами семейства Flaviviridae, во многом определяется развитием системного воспаления. Ключевую роль в запуске воспаления играют цитокины интерлейкин-1бета и интерлейкин-18. Секреция этих цитокинов из клеток в свою очередь индуцируется при активации инфламмасом. В клетках, инфицированных вирусами Flaviviridae, обнаружена активация инфламмасы типа NLRP3 (NLR family pyrin domain-containing 3). Некоторые неструктурные белки этих вирусов способны активировать или ингибировать инфламмасому NLRP3, в том числе, за счет взаимодействия с ее компонентами. В данном исследовании в клетках человека HEK293T реконструирована функциональная инфламмаза NLRP3 и изучено воздействие на нее ряда неструктурных белков отдельных представителей семейства Flaviviridae. В этой модели не обнаружено влияния неструктурных белков NS1 вируса Западного Нила, NS3 вируса гепатита С, NS5 вируса клещевого энцефалита на содержание компонентов инфламмасы. При этом уровень секреции интерлейкина-1бета в присутствии белков NS1 вируса Западного Нила и NS5 вируса клещевого энцефалита не изменялся, повышаясь в 1.5 раза в присутствии белка NS3 вируса гепатита С. Таким образом, NS3 можно рассматривать как один из факторов активации инфламмасы NLRP3 и воспалительного патогенеза при хронической инфекции вирусом гепатита С.

Ключевые слова: инфламмаза, NLRP3, интерлейкин-1бета, вирус клещевого энцефалита, вирус гепатита С, вирус Западного Нила, неструктурные белки, Flaviviridae

DOI: 10.31857/S0026898423050099, EDN: RVPIUQ

ВВЕДЕНИЕ

Инфламмаза — это мультибелковый комплекс, активируемый различными факторами, в том числе вирусными инфекциями. Активация инфламмасы ведет к секреции провоспалительных цитокинов интерлейкинов (ИЛ)-1бета и ИЛ-18, индуцирующих воспалительные реакции. Инфламмазы локализуются в цитоплазме клеток иммунной системы, некоторых немиелоидных клеток и нейронов [1]. Инфламмаза типа NLRP3 (NLR family pyrin domain-containing 3),

изучению которой посвящено большинство работ в этой области, активируется при многих вирусных инфекциях и включает в себя три компонента: сенсор, адаптор ASC (an apoptosis associated speck-like protein containing a CARD) и эффектор — прокаспазу-1 [2, 3]. Сенсор NLRP3 — цитоплазматический белок, состоящий из трех доменов: N-концевого пиринового (PYD), центрального нуклеотидсвязывающего и олигомеризующего (NACHT) и C-концевого лейцин-богатого домена (LRR) [4, 5]. Адаптор ASC состоит из PYD- и

Сокращения. ASC — Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ассоциированный с апоптозом speck-подобный белок, содержащий CARD); DAMP — Damage-associated molecular pattern (молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями); IQR — Interquartile range (интерквартильный размах); NLRP3 — NLR family pyrin domain-containing 3 (белок 3, содержащий пириновый домен, семейства NLR); NS1, NS3, NS5 — Nonstructural proteins 1, 3, 5 (неструктурные белки 1, 3, 5); PAMP — Pathogen-associated molecular pattern (патогенассоциированный молекулярный паттерн); TLR — Toll-like receptor (Toll-подобный рецептор); ВГС — вирус гепатита С; ВЗН — вирус Западного Нила; ВКЭ — вирус клещевого энцефалита; ИЛ-1бета — интерлейкин-1бета; ИФА — иммуноферментный анализ; ИФН — интерферон; ПААГ — полиакриламидный гель; ФНО-альфа — фактор некроза опухоли альфа.

CARD-доменов, а эффекторная прокаспаза-1 — из каталитического домена и CARD [3]. Сборка инфламмасы происходит после распознавания сенсором NLRP3 активирующих сигналов за счет взаимодействия однотипных доменов ее компонентов (PYD-PYD и CARD-CARD) [6, 7]. Сборка активирует инфламмасому, происходит автокаталитическое расщепление прокаспазы-1 до ее активной формы, которая процессирует неактивные предшественники ИЛ-1бета (про-ИЛ-1бета) и ИЛ-18 (про-ИЛ-18) до активных форм [8–10]. Кроме того, каспаза-1 разрезает предшественник белка гасдермина D с образованием его активной формы, которая встраивается в мембрану клетки и образует в ней поры. Это способствует выбросу образовавшихся активных ИЛ-1бета и ИЛ-18 из клетки, а также пироптозу — одной из форм программируемой клеточной смерти [11, 12]. Секретированные ИЛ-1бета и ИЛ-18 запускают каскад воспалительных реакций, в частности, привлекают нейтрофилы к сайту инфекции, изменяют проницаемость сосудов и пр. [13, 14].

Для запуска работы инфламмасы необходимы два сигнала — праймирующий и активирующий [15, 16]. Праймирующим сигналом являются различные PAMP/DAMP (Pathogen-associated molecular pattern/Damage-associated molecular pattern), которые узнаются Toll-подобными рецепторами (TLR) и рецепторами цитокинов. Праймирование активирует NF-каппаВ-зависимые каскады реакций, запуская экспрессию компонентов инфламмасы — NLRP3, прокаспазы-1, а также про-ИЛ-1бета и про-ИЛ-18 [17]. PAMP/DAMP, разрушение лизосом, митохондриальный стресс и стресс эндоплазматического ретикула служат активирующими сигналами, которые индуцируют сборку инфламмасы в комплекс и образование активной каспазы-1 [18, 19].

Активация инфламмасы выявлена при инфекциях, вызываемых вирусами семейства Flaviviridae, включая вирусы японского энцефалита, денге, Зика, Западного Нила (ВЗН) и гепатита С (ВГС) [20]. При этом вирусные белки могут напрямую участвовать в активации инфламмасы. Так, белок NS5 вируса Зика может усиливать сборку инфламмасы NLRP3, взаимодействуя с NLRP3 посредством РНК-зависимого РНК-полимеразного домена [21, 22], а также, возможно, за счет индукции окислительного стресса [21]. Сборку инфламмасы NLRP3 может усиливать белок NS1 вируса Зика, который стабилизирует каспазу-1, подавляя ее деградацию [23]. Показано также, что вирус Зика, напротив, ингибирует инфламмасому NLRP3 за счет действия его протеазы NS3, индуцирующей деградацию сенсора NLRP3, возможно, посредством его разрезания [24]. Белки NS2A и NS2B вируса денге также способны усиливать активацию NLRP3, действуя как виropo-рины [25].

Нами изучено влияние отдельных неструктурных белков трех вирусов — ВЗН, ВГС и вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) — на активацию инфламмасы NLRP3. К настоящему моменту известно, что инфекция ВЗН активирует инфламмасому NLRP3, что совместно с ответом интерферона типа I (ИФН I) способствует супрессии репликации ВЗН в нейронах [26]. Инфекция ВГС также индуцирует NLRP3-зависимую секрецию ИЛ-1бета/ИЛ-18 в макрофагах печени [27–29]. Об активации инфламмасы при инфекции ВКЭ косвенно свидетельствует обнаружение ИЛ-1бета в сыворотках пациентов [30], однако факторы активации неизвестны. Мы выбрали неструктурные белки NS1 ВЗН, NS3 ВГС, NS5 ВКЭ, поскольку эти белки других флавивирусов участвуют в активации/ингибировании инфламмасы NLRP3 [21–24]. В модели с реконструированной инфламмасой NLRP3 клетки НЕК293Т были котрансфицированы плазмидами, кодирующими выбранные вирусные белки. Обнаружено, что только экспрессия NS3 ВГС повышала уровень секреции ИЛ-1бета клетками НЕК293Т, т.е., по всей видимости, приводила к усилению активации инфламмасы NLRP3. Таким образом, протеазу NS3 можно рассматривать как один из факторов воспаления при инфекции ВГС. Эти данные позволяют лучше понять механизмы хронического воспаления при ВГС и могут использоваться в целенаправленной разработке противовирусных препаратов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение плазмид, кодирующих неструктурные белки вирусов семейства Flaviviridae. На первом этапе работы получены плазмиды, кодирующие 3×Flag-метку. Нуклеотидная последовательность 3×Flag собрана путем отжига длинных праймеров при прогреве (95°C, 5 с) с последующей инкубацией при постепенном снижении температуры в диапазоне 95–37°C. Праймеры содержали нуклеотидную последовательность 3×Flag (Addgene #101178), а также, в зависимости от N- или C-концевого положения 3×Flag, последовательность Козак (GGC-ACC-ATG-G) или стоп-кодон, соответственно, и нуклеотидные последовательности сайтов рестрикции BamHI/ApaI, KpnI/NotI, PstI/ApaI. После отжига достраивали выступающие липкие 5'-концы с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I (“Сибэнзим”, Россия) при 37°C в течение 1 ч. Полученные 3×Flag-фрагменты клонировали в плазмиду pVax (“Invitrogen”, США) по соответствующим сайтам и получили плазмиды pVax-3×Flag, кодирующие N- и C-концевые 3×Flag-метки.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие NS1 ВЗН (штамм HP-94, линия 1) и NS5

ВКЭ (штамм ЭК-328, сибирский подтип), получены на основе кДНК этих вирусов. Вирусную РНК выделяли с помощью Triagent LS ("Sigma-Aldrich", США) с последующей экстракцией хлороформом. Обратную транскрипцию проводили с использованием специфических праймеров: ВЗН — 5'-TTCTCCTGGTTGGTCCATCTCG-3'; ВКЭ — 5'-AGCGGGTGT TTTTCCGAGTC-3' и набора Superscript III Reverse Transcriptase ("Invitrogen"). Плазмиду pCMV, несущую ген NS3 ВГС (изолят 1b линия 274933RU), использовали для амплификации последовательности, кодирующей белок NS3 ВГС [31]. ПЦР со специфическими праймерами проводили на кДНК ВКЭ и ВЗН, а также на плазмиде pCMV, кодирующей NS3 ВГС. Полученные фрагменты клонировали в сконструированные на первом этапе плазмиды pVax-3×Flag: NS1 ВЗН — по сайтам NheI/BamHI и NS5 — по сайтам NheI/PstI в плазмиды, кодирующие C-концевой 3×Flag, NS3 — по сайтам NotI/XbaI в плазмиду, кодирующую N-концевой 3×Flag. Присутствие соответствующих вставок подтверждали секвенированием со специфическими праймерами. Полученные плазмиды выделяли с помощью набора QIAprep Spin Miniprep kit ("QIAGEN", Нидерланды).

Реконструкция инфламмасы NLRP3 в клетках HEK293T. Клетки HEK293T (CRL-2539™, ATCC) культивировали в среде DMEM ("Панэко", Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота ("Hyclone Cytiva", США) и пенициллином/стрептомицином (100 мкг/мл) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для реконструкции функциональной инфламмасы NLRP3 клетки рассеивали в 6/12-луночные планшеты (2 × 10⁵ клеток/мл) и на следующий день проводили котрансфекцию липосомным реагентом Lipofectamine™ LTX ("ThermoFisherScientific", США) и смесью плазмид, кодирующих компоненты инфламмасы NLRP3 человека: EGFP-NLRP3 (Addgene #73955), ASC-NA (Addgene #41553), прокаспазу-1-мус (Addgene #41552), а также про-ИЛ-1β (Addgene #166783) в соотношении (по массе) 2 : 1 : 1 : 6, соответственно, выбранном на основании методик, описанных в [32–35], и равным (по массе) количеством контрольной плазмиды pVax-3×Flag. В экспериментах по оценке влияния неструктурных вирусных белков на функционирование инфламмасы вместо контрольной плазмиды использовали pVax-3×Flag, кодирующие NS1 ВЗН, NS3 ВГС, NS5 ВКЭ. Через 24 ч проводили смену культуральной жидкости и в часть контрольных образцов, котрансфицированных только плазмидами, кодирующими компоненты инфламмасы и про-ИЛ-1β, добавляли активатор инфламмасы нигерицин (10 мкМ, "Sigma-Aldrich"). Через 1–6 ч после добавления нигерицина собирали культуральную жидкость и получали клеточные лизаты.

Вестерн-блоттинг. Клетки HEK293T лизировали в буфере Лэммли (50 мМ трис-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% глицерин, 2% β-меркаптоэтанол, 0.025% бромфеноловый синий). Полученные образцы анализировали электрофорезом в 8–10%-ном ПААГ, белки из геля переносили на мембрану PVDF ("Hybond-P", США). NLRP3, ASC, активную форму ИЛ-1β и его предшественника, прокаспазу-1-мус выявляли с использованием специфических антител: моноклональных антител кролика к NLRP3 (1 : 5000, "Abcam", Великобритания), ASC (1 : 5000, "Abcam"), ИЛ-1β (1 : 10000, "Abcam"), поликлональных антител кролика к мус-метке ("Affinity", Китай), а для детекции неструктурных вирусных белков, конъюгированных с Flag-меткой, использовали моноклональные антитела мыши к Flag (1 : 2500, "Transgen", Китай). В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с пероксидазой хрена антитела козы к иммуноглобулинам кролика и мыши ("Jackson", США). Иммунные комплексы на мембране выявляли с помощью хемилюминесцентного реагента ECL ("Bio-Rad") и рентгеновской пленки ("FujiFilm", Япония), пленку сканировали, данные обрабатывали в программе ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Для контроля равномерности нанесения образцов мембрану окрашивали моноклональными антителами мыши к β-актину (клон AC-74, "Sigma", США), а затем вторичными конъюгированными с пероксидазой хрена антителами козы к иммуноглобулинам мыши ("Jackson").

Иммуноферментный анализ. Пробы для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) получали, осветляя культуральную жидкость, собранную с котрансфицированных клеток, центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин. Концентрацию ИЛ-1β в культуральной жидкости измеряли с помощью набора Интерлейкин-1β-ИФА-БЕСТ ("Вектор-Бест", Новосибирск) в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистический анализ. Уровни синтеза белков и концентраций ИЛ-1β сравнивали с помощью программы GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, Inc., США). Для сравнения в группах использовали непараметрический тест Краскела–Уоллиса, для попарных сравнений — тест Манна–Уитни. Относительное содержание ИЛ-1β анализировали с использованием критерия Вилкоксона для одной выборки. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инфламмасому NLRP3 изучают преимущественно на миелоидных клетках, конститутивно экспрессирующих отдельные компоненты этой инфламмасы, при этом в ряде случаев используют и немиелоидные клетки [36]. Так, удобной

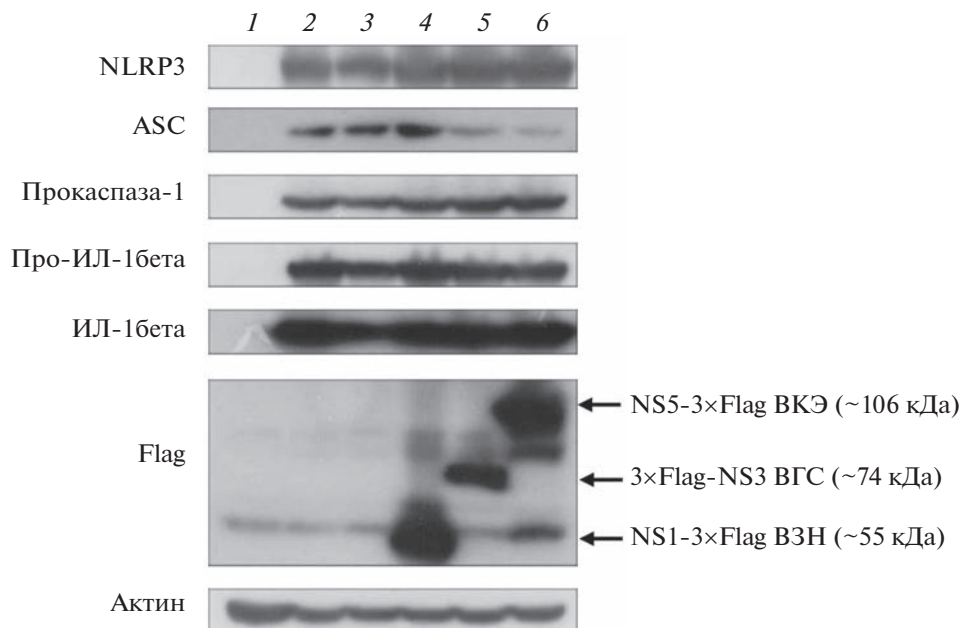


Рис. 1. Экспрессия компонентов инфламماسомы NLRP3, реконструированной при котрансфекции клеток HEK293T, в присутствии неструктурных белков флавивирусов. Клетки HEK293T были трансфицированы контрольной плазмидой pVax-3×Flag (1) или котрансфицированы плазмидами, кодирующими NLRP3, ASC, прокаспазу-1, про-ИЛ-1β, а также либо контрольной плазмидой pVax-3×Flag (2, 3), либо плазмидами pVax-3×Flag, кодирующими NS1 B3H (4), NS3 BГC (5) и NS5 BKЭ (6). Через 24 ч проводили смену культуральной среды, к образцам добавляли активатор инфламماسомы NLRP3 нигерицин (10 мкМ) (3). Содержание компонентов инфламماسомы, про-ИЛ-1β, активного ИЛ-1β, вирусных белков и актина оценивали с помощью вестерн-блотинга клеточных лизатов, полученных через 25–30 ч после котрансфекции, с использованием коммерческих антител, специфических к NLRP3, ASC, тус-метке (прокаспазы-1), ИЛ-1β, Flag-метке, актину. На панели “Flag” стрелки указывают полосы, соответствующие детектированным вирусным белкам, приведены их молекулярные массы. Эксперимент воспроизведен в трех повторях.

моделью для изучения молекулярных механизмов функционирования инфламماسом *in vitro* считаются клетки HEK293T [32, 37–39]. Следует отметить, что эффекты, обнаруженные при изучении инфламماسом в миелоидных клетках, воспроизводятся в клетках HEK293T [22, 40]. HEK293T не экспрессируют компоненты инфламماسомы [36], поэтому реконструировать инфламмасому в этих клетках можно путем введения плазмид, кодирующих все ее компоненты. В нашей работе мы использовали эту модель, поскольку она позволяет экспрессировать в клетках вместе с компонентами инфламماسомы и исследуемые вирусные белки. На первом этапе для реконструкции функциональной инфламماسомы NLRP3 клетки котрансфицировали плазмидами, кодирующими три компонента инфламماسомы NLRP3 человека — NLRP3, ASC, прокаспазу-1, а также субстрат каспазы-1 — про-ИЛ-1β. Среду культивирования клеток заменяли через 24 ч после котрансфекции и к части проб добавляли нигерицин — K^+/H^+ -ионофор [41]. Нигерицин индуцирует выброс ионов калия из клетки [42], что активирует инфламмасому, аутопротеолиз прокаспазы-1 и секрецию ИЛ-1β. Через 1–6 ч после смены среды собирали культуральные жидкости, осветляли их

центрифугированием и получали клеточные лизаты, которые анализировали методом вестерн-блотинга (рис. 1). В культуральных жидкостях измеряли концентрацию активного ИЛ-1β с помощью набора для ИФА (рис. 2). Вестерн-блотинг клеточных лизатов с коммерческими антителами к компонентам инфламماسомы показал, что в клетках синтезируются все компоненты инфламماسомы, а также про-ИЛ-1β (рис. 1, панели NLRP3, ASC, прокаспазы-1, про-ИЛ-1β, 2, 3). Активный ИЛ-1β (рис. 1, панель ИЛ-1β) выявлен как в необработанных (2), так и в обработанных нигерицином клетках (3), причем обработанные клетки содержали меньше ИЛ-1β (3). Методом ИФА показано, что концентрация активного ИЛ-1β в культуральных жидкостях котрансфицированных клеток, обработанных нигерицином, была в 5–7 раз выше, чем в необработанных (рис. 2, $p < 0.05$). Детекция активной формы ИЛ-1β в клеточных лизатах и культуральных жидкостях свидетельствует о его секреции клетками, что указывает на активацию инфламماسомы NLRP3 в данной системе. Снижение количества активного ИЛ-1β в лизатах клеток, обработанных нигерицином (активатор инфламماسомы), и значительное повышение количества этого цитокина в культуральной жидкости

клеток свидетельствует об усилении секреции ИЛ-1бета под действием нигерицина.

Стоит отметить, что ИЛ-1бета выявлен в лизатах и культуральных жидкостях необработанных нигерицином клеток, что свидетельствует об активации инфламмасы в данной модели в отсутствие активатора. Полученные результаты согласуются с данными, согласно которым котрансфекция клеток НЕК293Т генами, кодирующими NLRP3, ASC, прокаспазу-1 и про-ИЛ-1бета, в отсутствие специальных активирующих сигналов приводит к образованию и секреции активной формы ИЛ-1бета [22, 23, 32, 40]. По всей видимости, этот эффект может быть обусловлен действием трансфекционного реагента липофектамина. Этот реагент создан на основе катионных липосом, способных индуцировать апоптоз, аутофагию и окислительный стресс [43–45], что, в свою очередь, может служить сигналом, активирующим инфламмасому. Более того, ряд исследований прямо указывает на активацию инфламмасы катионными липосомами [46–48]. При этом на модели котрансфицированных клеток НЕК-293Т показано усиление секреции ИЛ-1бета при действии различных активаторов инфламмасы, включая АТР и вирусные белки [22, 23, 32, 40]. В нашей работе мы наблюдали такой же эффект: в присутствии нигерицина уровень секреции ИЛ-1бета повысился в 6 раз по сравнению с образцами без активатора. Таким образом, эта модель, несмотря на фоновую активацию инфламмасы за счет самого процесса трансфекции, позволяет детектировать активацию специфическими факторами, такими как вирусные белки.

Далее на этой модели оценили влияние отдельных неструктурных белков вирусов семейства *Flaviviridae* на секрецию ИЛ-1бета. Неструктурные белки этих вирусов являются патогенными факторами, влияющими на реакции врожденного иммунитета [20, 49]. Некоторые из этих белков входят в состав вакцин, а также используются в качестве мишеней для антивирусной терапии. Расширение знаний о способности неструктурных белков флавивирусов вызывать воспаление позволит ускорить разработку эффективных безопасных вакцин и противовирусных препаратов. В данной работе исследованы неструктурные белки ВЗН, ВГС, ВКЭ, так как при инфекциях, вызываемых этими вирусами, наблюдается активация инфламмасы и/или секреция ИЛ-1бета [26–30]. Учитывая эффекты неструктурных белков NS1, NS3, NS5 других представителей *Flaviviridae* [21–24], мы проанализировали NS1 ВЗН, NS3 (протеаза) ВГС и NS5 (РНК-полимераза) ВКЭ. Для изучения влияния экспрессии неструктурных белков флавивирусов на инфламмасому NLRP3 клетки НЕК293Т котрансфицировали плазмидами, кодирующими компоненты системы инфламмасы, как указано выше, а также

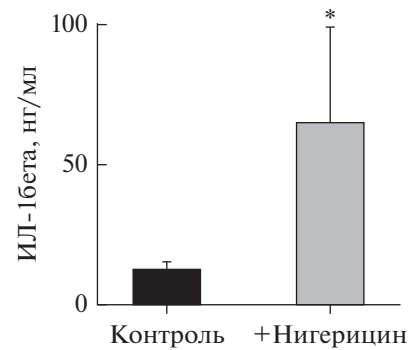


Рис. 2. Концентрация ИЛ-1бета в культуральных жидкостях клеток НЕК293Т с реконструированной инфламмасомой NLRP3. Культуральные жидкости клеток, котрансфицированных плазмидами, кодирующими NLRP3, ASC, прокаспазу-1, про-ИЛ-1бета, и контрольной плазмидой pVax-3×Flag, не обработанных (Контроль) и обработанных нигерицином (+Нигерицин), анализировали методом ИФА. $n = 4$, медиана +95% ДИ, $*p < 0.05$ (тест Манна–Уитни).

дополнительно плазмидами, кодирующими белки NS1 ВЗН, NS3 ВГС, NS5 ВКЭ с 3×Flag-меткой. Анализировали клеточные лизаты и культуральные жидкости клеток. Проведенный нами вестерн-блоттинг лизатов клеток, котрансфицированных плазмидами, кодирующими вирусные белки, не выявил существенных изменений в уровне синтеза компонентов системы инфламмасы NLRP3 по сравнению с контрольными образцами (рис. 2, дорожки 4–6, $p > 0.1$). Таким образом, экспрессия неструктурных вирусных белков не повлияла на содержание компонентов инфламмасы в клетках НЕК293Т. Чтобы понять, влияют ли вирусные белки на уровень секреции ИЛ-1бета, оценили концентрацию этого цитокина в культуральных жидкостях клеток методом ИФА. На рис. 3 эти результаты представлены как отношение концентрации ИЛ-1бета в образцах, где синтезировались вирусные белки, к концентрации ИЛ-1бета в контрольных образцах (без вирусных белков). Показано, что в присутствии белков NS1 ВЗН и NS5 ВКЭ уровень секреции ИЛ-1бета не изменялся (рис. 3, $p > 0.1$), однако синтез белка NS3 ВГС повышал секрецию ИЛ-1бета в 1.5 раза (рис. 3, $p = 0.0029$). Таким образом, в использованной нами модели НЕК293Т с реконструированной инфламмасомой NLRP3 только NS3 ВГС усиливал активацию инфламмасы. Два других белка — NS1 ВЗН и NS5 ВКЭ — подобного эффекта не оказывали. Это указывает на необходимость дальнейшего поиска факторов, участвующих в активации инфламмасы при инфекциях, вызванных этими вирусами.

РНК ВГС является праймирующим сигналом для инфламмасы, запускающим TLR7-зависи-

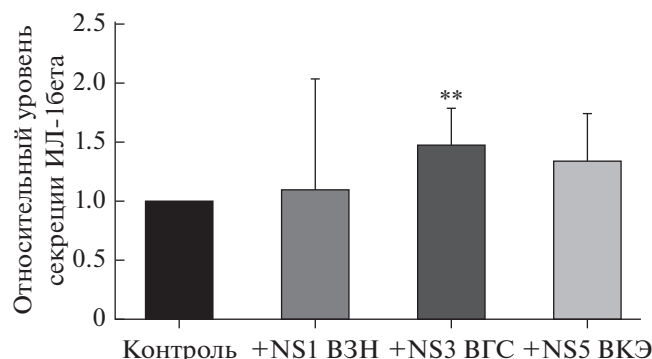


Рис. 3. Влияние белков NS1 В3Н, NS3 ВГС, NS5 ВКЭ на секрецию ИЛ-1β клетками HEK293T с реконструированной инфламмасомой NLRP3. Клетки HEK293T котрансфицированы плазмидами, кодирующими компоненты инфламмасы, а также либо контрольной плазмидой рVax-3×Flag (Контроль), либо плазмидами, кодирующими NS1 В3Н, NS3 ВГС или NS5 ВКЭ. На следующий день после котрансфекции в культуральных жидкостях измеряли концентрацию ИЛ-1β (нг/мл) методом ИФА. Результаты представлены как соотношение концентрации ИЛ-1β в опытных образцах и в контроле. $n = 4-12$, медиана + IQR, ** $p < 0.01$ (критерий Вилкоксона для одной выборки).

мую экспрессию мРНК ИЛ-1β [27, 28]. Кроме того, известны белки ВГС, способные активировать сборку инфламмасы – виropорин p7 [29] и коровий белок [50], действие которого, по всей видимости, обусловлено активацией внутриклеточных кальциевых сигнальных путей [50]. Данные о способности белка NS3 ВГС активировать инфламмасому NLRP3 к настоящему времени отсутствуют. При этом в ряде *in vitro* исследований отмечена роль NS3 в индукции секреции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов разными типами клеток: ФНО-α и ИЛ-10 моноцитами/макрофагами [51, 52], ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-α, ИЛ-1β клетками микроглии [53], ИЛ-8, ИЛ-6 и ФНО-α эпителиальными клетками роговицы [54]. ИЛ-1β (наряду с ИЛ-18) детектируется в сыворотках пациентов на ранних стадиях инфекции ВГС [28, 55] и считается одним из ключевых факторов, определяющих развитие хронического воспаления печени при гепатите С [28, 56, 57]. При этом тяжесть поражения печени прямо коррелирует с уровнем ИЛ-1β [28]. Основными продуцентами ИЛ-1β при инфекции ВГС являются макрофаги печени, в том числе клетки Купфера. Они способны к захвату вирионов ВГС, что провоцирует активацию инфламмасы NLRP3 [28, 29, 58]. Некоторые исследования указывают на активацию инфламмасы NLRP3 и в гепатоцитах [59] – основных сайтах репликации ВГС [60], но эти данные противоречивы [28]. Помимо этого, опубликованы данные, согласно которым NS3 способен активировать

окислительный стресс в моноцитах и гепатоцитах [61, 62]. Способность к индукции секреции провоспалительных цитокинов, в том числе ИЛ-1β, и окислительного стресса, показывает, что NS3 может быть активатором инфламмасы. Эффект усиления активации инфламмасы белком NS3 ВГС зарегистрирован нами в клетках HEK293T с реконструированной инфламмасомой. Дальнейшие эксперименты в клеточных линиях, являющихся сайтами репликации ВГС и/или участвующих в противовирусном ответе, позволят более детально понять роль NS3 в патогенезе NLRP3-/ИЛ-1β-зависимого воспаления при ВГС.

Следует отметить, что ВГС обладает высоким уровнем генетической изменчивости: на данный момент известно восемь генотипов ВГС и до 90 подтипов [63], среди которых генотипы 1a и 1b вызывают большую часть ВГС инфекций в мире [64]. Заболевания, индуцируемые ВГС разных генотипов, характеризуются особенностями патогенеза [65], а также эффективностью ответа на противовирусную терапию [66, 67]. Так, в ряде работ отмечено, что инфекция ВГС генотипа 1b, белок NS3 которого изучен в нашей работе, может быть ассоциирована с большей тяжестью поражения печени, а также с развитием цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы, хотя эти особенности патогенеза могут быть обусловлены факторами, не связанными с генотипом вируса [65, 68–70]. Наблюдаются также различия в патогенезе и профиле цитокинов, индуцируемых при инфекции, вызываемой вирусом Зика, еще одним представителем семейства Flaviviridae, в частности, между африканской и азиатской линиями вируса [71–73]. При этом обнаружены различия и в активации инфламмасы NLRP3: инфекция “азиатским” вирусом, а также его белок NS5 активировали инфламмасому [21, 22], в то время как “африканский” вирус ослаблял активацию NLRP3. При этом не наблюдали активации инфламмасы белком NS5 [24]. Изученный нами белок NS3 ВГС содержит полиморфные аминокислотные остатки [74, 75]; как сказано выше, заболевания, вызываемые ВГС разных генотипов, могут иметь патогенетические отличия. В связи с этим можно предположить, что, как и в случае вируса Зика и его белка NS5, влияние NS3 на инфламмасому будет зависеть от генотипа ВГС, что представляет интерес для дальнейших исследований. Необходимо подчеркнуть, что NS3 ВГС является одной из мишеней противовирусных препаратов прямого действия, эффективных при гепатите С [76], однако не лишенных при этом некоторых недостатков, таких как возможность появления лекарственно-устойчивых форм вируса [77, 78], а также снижение эффективности, обусловленное влиянием полиморфизмов в NS3 [74, 75, 79]. Терапия может быть неэффективной

для отдельных вариантов вируса [80], при этом препараты прямого действия не излечивают последствия воспалительного поражения печени при хронической инфекции ВГС и не предотвращают развитие цирроза и рака печени [81, 82].

Таким образом, нами получены данные, важные для понимания механизмов вирусного патогенеза, в частности, индукции воспаления при активации инфламмасом и выявления мишеней для противовирусной терапии. Расширение знаний о факторах воспаления при ВГС важно для разработки препаратов, эффективно предотвращающих воспалительные поражения при инфекции, вызванной этим вирусом.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 21-74-00124.

Статья не содержит экспериментов с привлечением животных или людей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Franchi L., Warner N., Viani K., Nunez G. (2009) Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol. Rev.* **227**, 106–128.
2. Yang Y., Wang H., Kouadir M., Song H., Shi F. (2019) Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Disease*. **10**, 128.
3. Lu A., Li Y., Schmidt F.I., Yin Q., Chen S., Fu T.M., Tong A.B., Ploegh H.L., Mao Y., Wu H. (2016) Molecular basis of caspase-1 polymerization and its inhibition by a new capping mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 416–425.
4. Malik A., Kanneganti T.D. (2017) Inflammasome activation and assembly at a glance. *J. Cell Sci.* **130**, 3955–3963.
5. Swanson K.V., Deng M., Ting J.P. (2019) The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 477–489.
6. Gram A.M., Frenkel J., Rensing M.E. (2012) Inflammasomes and viruses: cellular defence versus viral offence. *J. General Virol.* **93**, 2063–2075.
7. Cai X., Chen J., Xu H., Liu S., Jiang Q.X., Halfmann R., Chen Z.J. (2014) Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. *Cell*. **156**, 1207–1222.
8. Broz P., Dixit V.M. (2016) Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 407–420.
9. Mangan M.S.J., Olhava E.J., Roush W.R., Seidel H.M., Glick G.D., Latz E. (2018) Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug Discovery*. **17**, 688.
10. Rathinam V.A., Fitzgerald K.A. (2016) Inflammasome complexes: emerging mechanisms and effector functions. *Cell*. **165**, 792–800.
11. He W.T., Wan H., Hu L., Chen P., Wang X., Huang Z., Yang Z.H., Zhong C.Q., Han J. (2015) Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. *Cell. Res.* **25**, 1285–1298.
12. Shi J., Zhao Y., Wang K., Shi X., Wang Y., Huang H., Zhuang Y., Cai T., Wang F., Shao F. (2015) Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*. **526**, 660–665.
13. Dinarello C.A., Novick D., Kim S., Kaplanski G. (2013) Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front. Immunol.* **4**, 289.
14. Joosten L.A., Netea M.G., Dinarello C.A. (2013) Interleukin-1beta in innate inflammation, autophagy and immunity. *Semin. Immunol.* **25**, 416–424.
15. Bauernfeind F.G., Horvath G., Stutz A., Alnemri E.S., MacDonald K., Speert D., Fernandes-Alnemri T., Wu J., Monks B.G., Fitzgerald K.A., Hornung V., Latz E. (2009) Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.* **183**, 787–791.
16. Christgen S., Kanneganti T.D. (2020) Inflammasomes and the fine line between defense and disease. *Curr. Opin. Immunol.* **62**, 39–44.
17. Afonina I.S., Zhong Z., Karin M., Beyaert R. (2017) Limiting inflammation—the negative regulation of NF-kappaB and the NLRP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* **18**, 861–869.
18. Lamkanfi M., Dixit V.M. (2014) Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*. **157**, 1013–1022.
19. Zhao C., Zhao W. (2020) NLRP3 inflammasome—A key player in antiviral responses. *Front. Immunol.* **11**, 211.
20. Latanova A., Starodubova E., Karpov V. (2022) Flaviviridae nonstructural proteins: the role in molecular mechanisms of triggering inflammation. *Viruses*. **14**, 1808.
21. He Z., Chen J., Zhu X., An S., Dong X., Yu J., Zhang S., Wu Y., Li G., Zhang Y., Wu J., Li M. (2018) NLRP3 Inflammasome activation mediates Zika virus-associated inflammation. *J. Infect. Dis.* **217**, 1942–1951.
22. Wang W., Li G., De W., Luo Z., Pan P., Tian M., Wang Y., Xiao F., Li A., Wu K., Liu X., Rao L., Liu F., Liu Y., Wu J. (2018) Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1beta secretion. *Nat. Commun.* **9**, 106.
23. Zheng Y., Liu Q., Wu Y., Ma L., Zhang Z., Liu T., Jin S., She Y., Li Y.P., Cui J. (2018) Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by cleaving cGAS via NS1-caspase-1 axis. *EMBO J.* **37**, e99347.
24. Gim E., Shim D.W., Hwang I., Shin O.S., Yu J.W. (2019) Zika virus impairs host NLRP3-mediated inflammasome activation in an NS3-dependent manner. *Immune Network*. **19**, e40.
25. Shrivastava G., Visoso-Carvajal G., Garcia-Cordero J., Leon-Juarez M., Chavez-Munguia B., Lopez T., Nava P., Villegas-Sepulveda N., Cedillo-Barron L. (2020) Dengue virus serotype 2 and its non-structural proteins 2A and 2B activate NLRP3 inflammasome. *Front. Immunol.* **11**, 352.
26. Ramos H.J., Lanteri M.C., Blahnik G., Negash A., Suthar M.S., Brassil M.M., Sodhi K., Treuting P.M., Busch M.P., Norris P.J., Gale M., Jr. (2012) IL-1beta

- signaling promotes CNS-intrinsic immune control of West Nile virus infection. *PLoS Pathogens*. **8**, e1003039.
27. Chen W., Xu Y., Li H., Tao W., Xiang Y., Huang B., Niu J., Zhong J., Meng G. (2014) HCV genomic RNA activates the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *PLoS One*. **9**, e84953.
 28. Negash A.A., Ramos H.J., Crochet N., Lau D.T., Doehle B., Papic N., Delker D.A., Jo J., Bertoletti A., Hagedorn C.H., Gale M., Jr. (2013) IL-1 β production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. *PLoS Pathogens*. **9**, e1003330.
 29. Shrivastava S., Mukherjee A., Ray R., Ray R.B. (2013) Hepatitis C virus induces interleukin-1 β (IL-1 β)/IL-18 in circulatory and resident liver macrophages. *J. Virol.* **87**, 12284–12290.
 30. Atrasheuskaya A.V., Fredeking T.M., Ignatyev G.M. (2003) Changes in immune parameters and their correction in human cases of tick-borne encephalitis. *Clin. Exp. Immunol.* **131**, 148–154.
 31. Isaguliant M.G., Petrakova N.V., Mokhonov V.V., Pokrovskaya K., Suzdaltzeva Y.G., Krivonos A.V., Zaberezhny A.D., Garaev M.M., Smirnov V.D., Nordenfelt E. (2003) DNA immunization efficiently targets conserved functional domains of protease and ATPase/helicase of nonstructural 3 protein (NS3) of human hepatitis C virus. *Immunol. Lett.* **88**, 1–13.
 32. Shi C.S., Nabar N.R., Huang N.N., Kehl J.H. (2019) SARS-coronavirus open reading frame-8b triggers intracellular stress pathways and activates NLRP3 inflammasomes. *Cell Death Discov.* **5**, 101.
 33. Chuang Y.T., Lin Y.C., Lin K.H., Chou T.F., Kuo W.C., Yang K.T., Wu P.R., Chen R.H., Kimchi A., Lai M.Z. (2011) Tumor suppressor death-associated protein kinase is required for full IL-1 β production. *Blood*. **117**, 960–970.
 34. Ito S., Hara Y., Kubota T. (2014) CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res. Therapy*. **16**, R52.
 35. Mao L., Kitani A., Hiejima E., Montgomery-Recht K., Zhou W., Fuss I., Wiestner A., Strober W. (2020) Bruton tyrosine kinase deficiency augments NLRP3 inflammasome activation and causes IL-1 β -mediated colitis. *J. Clin. Investigation*. **130**, 1793–1807.
 36. Zito G., Buscetta M., Cimino M., Dino P., Bucchieri F., Cipollina C. (2020) Cellular models and assays to study NLRP3 inflammasome biology. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4294.
 37. Coll R.C., Hill J.R., Day C.J., Zamoshnikova A., Boucher D., Massey N.L., Chitty J.L., Fraser J.A., Jennings M.P., Robertson A.A.B., Schroder K. (2019) MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nat. Chem. Biol.* **15**, 556–559.
 38. Hafner-Bratkovic I., Susjan P., Lainscek D., Tapia-Abellan A., Cerovic K., Kadunc L., Angosto-Bazarrá D., Pelegrin P., Jerala R. (2018) NLRP3 lacking the leucine-rich repeat domain can be fully activated via the canonical inflammasome pathway. *Nat. Commun.* **9**, 5182.
 39. Vande Walle L., Stowe I.B., Sacha P., Lee B.L., Demon D., Fossoul A., Van Hauwermeiren F., Saavedra P.H.V., Simon P., Subrt V., Kostka L., Stivala C.E., Pham V.C., Staben S.T., Yamazoe S., Konvalinka J., Kayagaki N., Lamkanfi M. (2019) MCC950/CRID3 potently targets the NACHT domain of wild-type NLRP3 but not disease-associated mutants for inflammasome inhibition. *PLoS Biol.* **17**, e3000354.
 40. Wang W., Xiao F., Wan P., Pan P., Zhang Y., Liu F., Wu K., Liu Y., Wu J. (2017) EV71 3D protein binds with NLRP3 and enhances the assembly of inflammasome complex. *PLoS Pathogens*. **13**, e1006123.
 41. Guffanti A.A., Davidson L.F., Mann T.M., Krulwich T.A. (1979) Nigericin-induced death of an acidophilic bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **114**, 201–206.
 42. Eytan G.D., Carlenor E., Rydstrom J. (1990) Energy-linked transhydrogenase. Effects of valinomycin and nigericin on the ATP-driven transhydrogenase reaction catalyzed by reconstituted transhydrogenase-ATPase vesicles. *J. Biol. Chem.* **265**, 12949–12954.
 43. Kongkaneramt L., Sarisuta N., Azad N., Lu Y., Iyer A.K., Wang L., Rojanasakul Y. (2008) Dependence of reactive oxygen species and FLICE inhibitory protein on lipofectamine-induced apoptosis in human lung epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*. **325**, 969–977.
 44. Mo R.H., Zaro J.L., Ou J.H., Shen W.C. (2012) Effects of lipofectamine 2000/siRNA complexes on autophagy in hepatoma cells. *Mol. Biotechnol.* **51**, 1–8.
 45. Napoli E., Liu S., Marsilio I., Zarbalis K., Giulivi C. (2017) Lipid-based DNA/siRNA transfection agents disrupt neuronal bioenergetics and mitophagy. *Biochem. J.* **474**, 3887–3902.
 46. He J., Li T., Prochnicki T., Horvath G., Latz E., Takeoka S. (2019) Membrane fusogenic lysine type lipid assemblies possess enhanced NLRP3 inflammasome activation potency. *Biochem. Biophys. Rep.* **18**, 100623.
 47. Li T., He J., Horvath G., Prochnicki T., Latz E., Takeoka S. (2018) Lysine-containing cationic liposomes activate the NLRP3 inflammasome: effect of a spacer between the head group and the hydrophobic moieties of the lipids. *Nanomedicine: Nanotechnol. Biol. Med.* **14**, 279–288.
 48. Zhong Z., Zhai Y., Liang S., Mori Y., Han R., Sutterwala F.S., Qiao L. (2013) TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat. Commun.* **4**, 1611.
 49. Elrefaey A.M.E., Hollinghurst P., Reitmayer C.M., Alphey L., Maringer K. (2021) Innate immune antagonism of mosquito-borne flaviviruses in humans and mosquitoes. *Viruses*. **13**, 2116.
 50. Negash A.A., Olson R.M., Griffin S., Gale M., Jr. (2019) Modulation of calcium signaling pathway by hepatitis C virus core protein stimulates NLRP3 inflammasome activation. *PLoS Pathogens*. **15**, e1007593.
 51. Chang S., Dolganiuc A., Szabo G. (2007) Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *J. Leukocyte Biol.* **82**, 479–487.
 52. Dolganiuc A., Kodys K., Kopasz A., Marshall C., Do T., Romics L., Jr., Mandrekar P., Zapp M., Szabo G. (2003) Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines

- and inhibit dendritic cell differentiation. *J. Immunol.* **170**, 5615–5624.
53. Rajalakshmy A.R., Malathi J., Madhavan H.N. (2015) Hepatitis C virus NS3 mediated microglial inflammation via TLR2/TLR6 MyD88/NF-kappaB pathway and Toll like receptor ligand treatment furnished immune tolerance. *PLoS One.* **10**, e0125419.
54. Rajalakshmy A.R., Malathi J., Madhavan H.N. (2014) HCV core and NS3 proteins mediate toll like receptor induced innate immune response in corneal epithelium. *Exp. Eye Res.* **128**, 117–128.
55. Martinez-Esparza M., Tristan-Manzano M., Ruiz-Alcaraz A.J., Garcia-Penarrubia P. (2015) Inflammatory status in human hepatic cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* **21**, 11522–11541.
56. Chattergoon M.A., Levine J.S., Latanich R., Osburn W.O., Thomas D.L., Cox A.L. (2011) High plasma interleukin-18 levels mark the acute phase of hepatitis C virus infection. *J. Infectious Diseases.* **204**, 1730–1740.
57. Vecchiet J., Falasca K., Cacciatore P., Zingariello P., Dalessandro M., Marinopicolli M., D'Amico E., Palazzo C., Petrarca C., Conti P., Pizzigallo E., Guagnano M.T. (2005) Association between plasma interleukin-18 levels and liver injury in chronic hepatitis C virus infection and non-alcoholic fatty liver disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **35**, 415–422.
58. Chattergoon M.A., Latanich R., Quinn J., Winter M.E., Buckheit R.W., 3rd, Blankson J.N., Pardoll D., Cox A.L. (2014) HIV and HCV activate the inflammasome in monocytes and macrophages via endosomal Toll-like receptors without induction of type 1 interferon. *PLoS Pathogens.* **10**, e1004082.
59. Ramachandran A., Kumar B., Waris G., Everly D. (2021) Deubiquitination and activation of the NLRP3 inflammasome by UCHL5 in HCV-infected cells. *Microbiol. Spectrum.* **9**, e0075521.
60. Farquhar M.J., McKeating J.A. (2008) Primary hepatocytes as targets for hepatitis C virus replication. *J. Viral. Hepatitis.* **15**, 849–854.
61. Bureau C., Bernad J., Chaouche N., Orfila C., Beraud M., Gonindard C., Alric L., Vinel J.P., Pipy B. (2001) Non-structural 3 protein of hepatitis C virus triggers an oxidative burst in human monocytes via activation of NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **276**, 23077–23083.
62. Pal S., Polyak S.J., Bano N., Qiu W.C., Carithers R.L., Shuhart M., Gretch D.R., Das A. (2010) Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **25**, 627–634.
63. Shah R., Ahoegbe L., Niebel M., Shepherd J., Thomson E.C. (2021) Non-epidemic HCV genotypes in low- and middle-income countries and the risk of resistance to current direct-acting antiviral regimens. *J. Hepatol.* **75**, 462–473.
64. Polaris Observatory H.C.V.C. (2017) Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 161–176.
65. Webster G., Barnes E., Brown D., Dusheiko G. (2000) HCV genotypes—role in pathogenesis of disease and response to therapy. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **14**, 229–240.
66. Liu G., Cai Q., Li Z., Shao X., Luo Q., Zhang X., Zhao Z. (2016) Effect of drug resistance mutations on antiviral agents in HCV patients. *Antiviral. Therapy.* **21**, 369–375.
67. Petruzzello A., Marigliano S., Loquercio G., Cozzolino A., Cacciapuoti C. (2016) Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J. Gastroenterol.* **22**, 7824–7840.
68. Irshad M., Mankotia D.S., Irshad K. (2013) An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* **19**, 7896–7909.
69. Yamane D., McGivern D.R., Masaki T., Lemon S.M. (2013) Liver injury and disease pathogenesis in chronic hepatitis C. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **369**, 263–288.
70. Mondelli M.U., Silini E. (1999) Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J. Hepatol.* **31**(Suppl 1), 65–70.
71. Lanciotti R.S., Lambert A.J., Holodniy M., Saavedra S., Signor Ldel C. (2016) Phylogeny of Zika virus in Western Hemisphere, (2015) *Emerging Infect. Dis.* **22**, 933–935.
72. Shao Q., Herrlinger S., Zhu Y.N., Yang M., Goodfellow F., Stice S.L., Qi X.P., Brindley M.A., Chen J.F. (2017) The African Zika virus MR-766 is more virulent and causes more severe brain damage than current Asian lineage and dengue virus. *Development.* **144**, 4114–4124.
73. Dowall S.D., Graham V.A., Hewson R. (2020) Lineage-dependent differences of Zika virus infection in a susceptible mouse model are associated with different profiles of cytokines, chemokines, growth factors and acute phase proteins. *Cytokine.* **125**, 154864.
74. Mundim A., de Castro F.O.F., Albuquerque M.B.B., Vilanova-Costa C., Pfrimer I.A.H., Silva A. (2020) Major mutations in the NS3 gene region of hepatitis C virus related to the resistance to direct acting antiviral drugs: a systematic review. *Virus. Dis.* **31**, 220–228.
75. Sagnelli E., Starace M., Minichini C., Pisaturo M., Macera M., Sagnelli C., Coppola N. (2018) Resistance detection and re-treatment options in hepatitis C virus-related chronic liver diseases after DAA-treatment failure. *Infection.* **46**, 761–783.
76. Lanini S., Scognamiglio P., Mecozzi A., Lombardozzi L., Vullo V., Angelico M., Gasbarrini A., Taliani G., Attili A.F., Perno C.F., De Santis A., Puro V., Cerqua F., D'Offizi G., Pellicelli A., Armignacco O., Mennini F.S., Siciliano M., Girardi E., Panella V., Ippolito G., members of the Lazio Region H.C.V.t.g. (2018) Impact of new DAA therapy on real clinical practice: a multicenter region-wide cohort study. *BMC Infect. Dis.* **18**, 223.
77. Bradshaw D., Mbisa J.L., Geretti A.M., Healy B.J., Cooke G.S., Foster G.R., Thomson E.C., McLauchlan J., Agarwal K., Sabin C., Mutimer D., Moss P., Irving W.L., Barnes E., Hepatitis C Trust U.K. (2019) Consensus recommendations for resistance testing in the management of chronic hepatitis C virus infection: Public Health England HCV Resistance Group. *J. Infection.* **79**, 503–512.
78. Costa V.D., Pellegrini P., Rotman V., Pittella A.M., Nunes E.P., Lago B.V., Lampe E., Mello F.C.A. (2019) Resistance mutations A30K and Y93N associated with

- treatment failure with sofosbuvir and daclatasvir for hepatitis C virus infection non-responder patients: case reports. *Viruses*. **11**, 1004.
79. Sarrazin C. (2021) Treatment failure with DAA therapy: importance of resistance. *J. Hepatol.* **74**, 1472–1482.
80. Paolucci S., Novazzi F., Piralla A., Maserati R., Gulminetti R., Novati S., Barbarini G., Sacchi P., Fratini A., Bellotti L., Baldanti F. (2019) Viral dynamics among HCV infected patients with different genotypes treated with genotypic specific or pan-genotypic direct-acting antiviral agent combinations. *Infect. Drug Resist.* **12**, 1975–1984.
81. Schwerk J., Negash A., Savan R., Gale M., Jr. (2021) Innate immunity in hepatitis C virus infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **11**, a036988.
82. Welsch C., Efinger M., von Wagner M., Herrmann E., Zeuzem S., Welzel T.M., Lange C.M. (2017) Ongoing liver inflammation in patients with chronic hepatitis C and sustained virological response. *PLoS One*. **12**, e0171755.

Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 3 Increases Secretion of Interleukin-1beta in HEK293T Cells with Reconstructed NLRP3 Inflammasome

A. A. Latanova^{1, *}, K. K. Tuchinskaya², E. S. Starodubova¹, and V. L. Karpov¹

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products (Institute of Poliomyelitis), Russian Academy of Sciences, pos. Institut Poliomyelita, poselenie Moskovskii, Moscow, 108811 Russia

*e-mail: aalatanova@gmail.com

Infections caused by Flaviviridae pose a threat in the modern world. The pathology of diseases arising from these infections is largely determined by the development of systemic inflammation. The cytokines interleukin-1 beta and interleukin-18 play a key role in triggering inflammation. Their secretion from cells, in its turn, is induced upon activation of inflammasomes. Activation of NLRP3 (NLR family pyrin domain-containing 3) inflammasomes was detected in the cells infected with Flaviviridae. Some nonstructural proteins of these viruses have been shown to be able to activate or inhibit the NLRP3 inflammasome, in particular, through interaction with its components. In this study, the functional NLRP3 inflammasome was reconstructed in human HEK293T cells and the effect of some nonstructural proteins of individual Flaviviridae viruses on it was studied. This model did not reveal any impact of nonstructural proteins NS1 of West Nile virus, NS3 of hepatitis C virus, NS5 of tick-borne encephalitis virus on the inflammasome components content. At the same time, in the presence of the NS1 of the West Nile virus and NS5 of the tick-borne encephalitis virus, the level of secretion of interleukin-1 beta did not change, whereas in the presence of the NS3 protein of the hepatitis C virus, it increased by 1.5 times. Thus, NS3 can be considered as one of the factors of NLRP3 inflammasome activation and inflammatory pathogenesis in chronic hepatitis C virus infection.

Keywords: inflammasome, NLRP3, co-transfection, HEK293T, interleukin-1 beta, tick-borne encephalitis virus, hepatitis C virus, West Nile virus, Flaviviridae, nonstructural proteins