

СПЕКТР ПРОДУЦИРУЕМЫХ ВИРУСНЫХ БЕЛКОВ ГЕНА *GAG* В ЛИМФОЦИТАХ, ИНФИЦИРОВАННЫХ NL4-3 ШТАММОМ ВИЧ-1 *IN VITRO*

Владимир Петрович Коксин¹*, Ильшат Ганиевич Мустафин², Сергей Васильевич Бойчук²

¹Казанская государственная медицинская академия, г. Казань, Россия;

²Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

Поступила 01.12.2015; принята в печать 19.01.2016.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2016-377

Цель. Изучение спектра вирусных белков, продуцируемых в культуральную среду лимфоцитами периферической крови здорового донора, инфицированными штаммом NL4-3 ВИЧ-1 *in vitro*.

Методы. Использовали первичную культуру лимфоцитов, полученную от здоровых доноров. Для синхронного инфицирования первичной культуры лимфоцитов *in vitro* использовали штамм вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) NL4-3 (NIH AIDS Research & Reference Reagents Program, USA). Титр ВИЧ-1 в супернатантах определяли методом иммуноферментного анализа (EIA p24^{sp} Coulter). Также проводили электрофорез белков осветлённой культуральной среды в 12,5% полиакриламидном геле при денатурирующих условиях с последующим электропереносом на нитроцеллюлозную мембрану; иммуноблоттинг для выявления вирус-специфических белков с использованием контрольной положительной сыворотки к ВИЧ-1 («Bio-Rad»); для определения молекулярных масс сероактивных фракций применяли наборы белковых маркёров LMW 94–14,4 kD, HMW 212–53 kD («Pharmacia Biotech»).

Результаты. Спектр антигенов ВИЧ в культуральной среде исследовали на 4-й, 9-й и 13-й дни после инфицирования культуры лимфоцитов ВИЧ. В течение 13 дней репродукции вируса в культуральной среде выявляются как неструктурные, так и структурные белки гена *gag* ВИЧ-1, спектр и количественное содержание которых меняется со временем. Через 4 ч репродукции ВИЧ в первичной культуре лимфоцитов *in vitro* в культуральную среду из клеток экспортируется большое количество неструктурных белков гена *gag* (p40, p55). Далее неструктурные белки гена *gag* под действием клеточных протеаз могут расщепляться до структурных белков (p24/25, p18), что обусловлено накоплением в культуральной среде протеолитических ферментов.

Вывод. При репродукции ВИЧ в первичной культуре лимфоцитов в культуральную среду выделяются растворимые формы белков ВИЧ-1 гена *gag*; на начальных стадиях инфекции спектр белков ВИЧ в культуральной среде *in vitro* активированных фитогемагглютинином лимфоцитов состоит только из белков-предшественников ВИЧ-1 (p55, p40), а на более поздних сроках — и из капсидных вирусных белков гена *gag* (p24/25, p18).

Ключевые слова: ВИЧ-1, анализ спектра белков, иммуноблоттинг, иммуноферментный анализ.

SPECTRUM OF PRODUCED *GAG* GENE VIRAL PROTEINS IN LYMPHOCYTES INFECTED HIV-1 NL4-3 STRAINS *IN VITRO*

V.P. Koxsin¹, I.G. Mustafin², S.V. Boichuk²

¹Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia;

²Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Aim. To study spectrum of viral proteins secreted into the culture medium by the healthy donor peripheral blood lymphocytes infected by HIV-1 NL4-3 strain *in vitro*.

Methods. We used a primary lymphocytes culture obtained from healthy donors. For synchronous infection of primary lymphocytes culture *in vitro* NL4-3 strain of human immunodeficiency virus (HIV) (NIH AIDS Research & Reference Reagents Program, USA) was used. The HIV-1 titer in the supernatants was determined by enzyme immunoassay (EIA p24^{sp} Coulter). In addition, electrophoresis of clarified culture medium proteins in 12.5% polyacrylamide gel under denaturing conditions followed by electron transport onto a nitrocellulose membrane; immunoblotting for detection of virus-specific proteins using positive control serum to HIV-1 («Bio-Rad») were performed; protein markers kits LMW 94–14.4 kD, HMW 212–53 kD («Pharmacia Biotech») were used to determine the seroactive fractions molecular weight.

Results. HIV antigens spectrum in the culture medium was studied on the 4th, 9th and 13th days after lymphocyte culture infection with HIV. Within 13 days of virus reproduction both non-structural and structural proteins of HIV-1 *gag* gene are detected in the culture medium, spectrum and quantitative range of which varies with time. After 4 hours of HIV reproduction in primary lymphocytes culture *in vitro* large number of *gag* gene nonstructural proteins (p40, p55) are exported from cells into culture medium. Further, *gag* gene non-structural proteins may be cleaved into the structural proteins (p24/25, R18) under the cellular proteases action, which is caused by the proteolytic enzymes accumulation in the culture medium.

Conclusion. In HIV reproduction in primary lymphocytes cultures soluble forms of the HIV-1 *gag* gene proteins are secreted into culture medium; in the initial stages of the infection HIV proteins spectrum in the culture medium of lymphocytes activated with phytohemagglutinin *in vitro* consists of only the HIV-1 precursor proteins (p55, p40) and at a later stages — also of the *gag* gene viral capsid proteins (p24/25, R18).

Keywords: HIV-1, proteins spectrum analysis, immunoblotting, enzyme immunoassay.

Поскольку образование антител к определённом антигену вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) ВИЧ-1 напрямую связано с «раздражением» иммунной системы,

то, на наш взгляд, формирование специфических анти-ВИЧ антител к отдельным структурным белкам ВИЧ-1 связано с их экспрессией на поверхности клеток крови и их последующим выходом в кровь.

Показано, что при формировании гумо-

рального иммунного ответа организма на ВИЧ-инфекцию происходит дифференциальная регуляция иммунного ответа хозяина вирусом. В начале развития ВИЧ-инфекции общий пул анти-ВИЧ антител представляют антитела к основному структурному белку р25, а далее, при нарастании титра общих анти-ВИЧ антител — и к гликопротеинам ВИЧ (gp160, gp120), белкам гена *pol* [3].

При изучении «тяжёлых» циркулирующих иммунных комплексов показано, что во всех исследованных сыворотках крови ВИЧ-инфицированных, находящихся как на стадии формирования гуморального иммунного ответа, так и на бессимптомной стадии и стадии вторичных заболеваний, присутствует свободная форма основного структурного белка ВИЧ р24/25 [2].

В связи с вышеизложенным целью исследования было изучение спектра вирусных белков в культуральной среде в период репродукции NL4-3 штамма ВИЧ-1 в первичной активированной фитогемагглютинином культуре лимфоцитов периферической крови здорового донора, инфицированной *in vitro* ВИЧ-1.

Диск-электрофорез белков проб культуральной среды инфицированной первичной культуры лимфоцитов проводили в 12,5% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях согласно методу Лемли (1970) с последующим электропереносом на мембрану Immobilon-P (Millipore).

Для детекции иммуноблоттингом антигенов ВИЧ-1 в культуральной среде инфицированной *in vitro* первичной культуры лимфоцитов использовали контрольную положительную сыворотку («Bio-Rad») и моноклональные анти-р25 антитела (Кардиологический научный центр МЗ РФ). Коммерческая положительная сыворотка к ВИЧ в общем пуле анти-ВИЧ антител содержала антитела как к структурным (gp120, gp41, р68, р52, р35, р24/25, р18), так и к неструк-

турным белкам (gp160, р55, р40), кодируемым генами *env*, *gag*, *pol* ВИЧ.

В работе были использованы антивидовые конъюгаты с щелочной фосфатазой к человеческим (R5 «Bio-Rad») и мышинным («BD Biosciences») иммуноглобулинам, хромоген для щелочной фосфатазы («Bio-Rad»).

Для идентификации молекулярной массы сероактивных фракций при анализе денситограмм были использованы белки-маркеры (LMW 94–14,4 kD) и программа «Image Master 1D Prime» фирмы «Pharmacia Biotech».

На первом этапе работы проводили культивирование активированных фитогемагглютинином лимфоцитов, инфицированных ВИЧ-1, и оценку интенсивности репликации вируса методом иммуноферментного анализа (EIA р24^{gag}) по концентрации основного капсидного белка ВИЧ-1 в супернатанте первичной культуры лимфоцитов (рис. 1). Как видно из результатов исследований, представленных на рис. 1, период репликации ВИЧ-1 был ограничен 15 днями. Максимум репликации вируса был зафиксирован на 6-й день, на который концентрация р24 в культуральной среде составляла около 600 нг/мл. Эти данные согласуются с полученными нами ранее результатами культивирования различных клеточных культур с ВИЧ-1 [1].

Далее проводили качественный анализ на содержание вирусных белков ВИЧ-1 в пробах культуральной среды, осветлённой центрифугированием. Пробы культуральной среды отбирали приблизительно через равные промежутки времени: в 4-й, 9-й и 13-й дни, которые охватывали весь период репликации ВИЧ-1. На 15-й день происходила гибель первичной культуры лимфоцитов.

На рис. 2 представлены результаты иммуноблоттинга по выявлению вирусных белков ВИЧ моноклональными антителами к р24/25 ВИЧ-1 в пробах культуральной среды синхронизированной первичной культуры лимфоцитов.

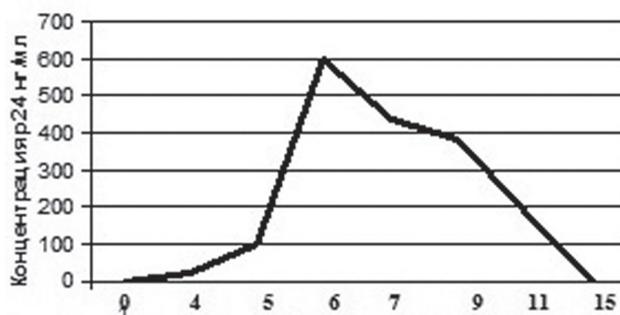


Рис. 1. Репликация ВИЧ в активированных лимфоцитах

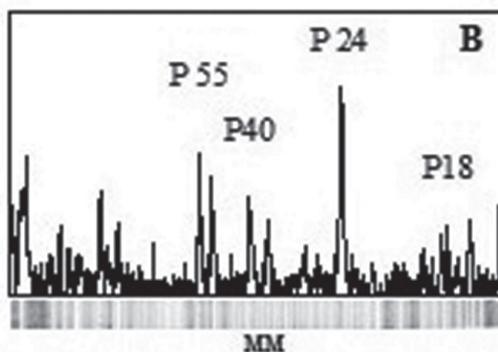
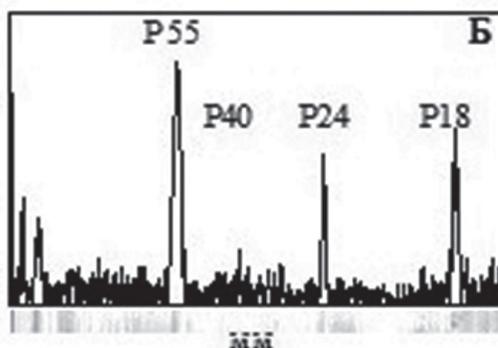
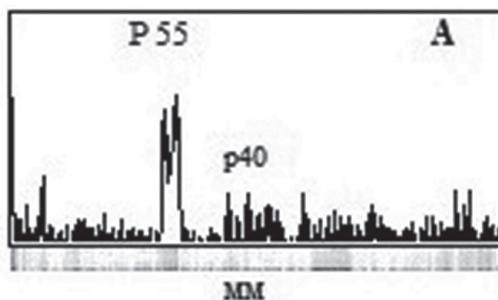
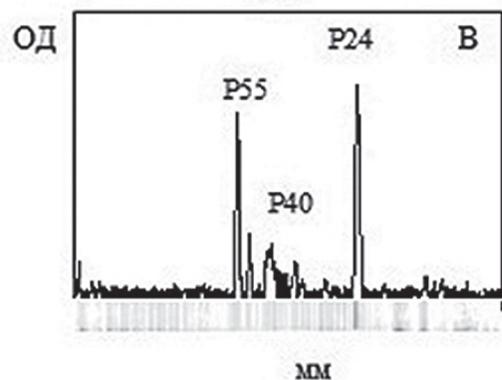
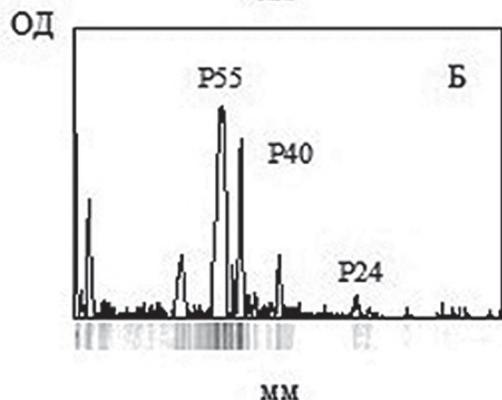
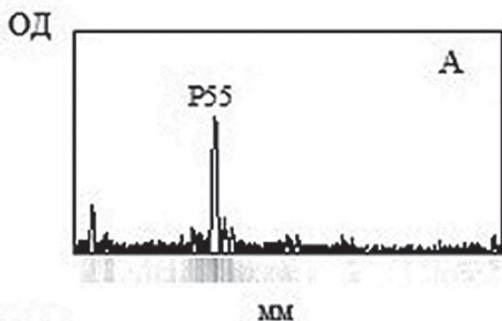


Рис. 2. Результаты иммуноблоттинга по выявлению антигенов ВИЧ в культуральной среде первичной культуры лимфоцитов здорового донора после инфицирования ВИЧ-1 моноклональными антителами к р24/25. А. Через 4 дня. Б. Через 13 дней. ОД — оптическая плотность; мм — длина стрипа (80 мм)

На 4-й день репродукции ВИЧ (см. рис. 2, А) иммуноблоттингом в культуральной среде выявлен один белок ВИЧ — предшественник капсидных белков ВИЧ р55. На 9-й день репродукции ВИЧ в культуральной среде выявлены два неструктурных белка (р55, р40) и одна минорная фракция основного структурного белка кора р24/25 (см. рис 2, Б). На 13-й день (см. рис. 2, В) выявлены те же вирусные белки — р55, р40 и р24/25, но в отличие от предыдущего срока серодоминантной фракцией в иммуноблоттинге был белок р24/25 ВИЧ.

Рис. 3. Результаты иммуноблоттинга по выявлению антигенов ВИЧ в культуральной среде первичной культуры лимфоцитов здорового донора после инфицирования ВИЧ-1 контрольной положительной к ВИЧ сывороткой. А. Через 4 дня. Б. Через 13 дней. По оси ординат — оптическая плотность; мм — длина стрипа (80 мм)

Ввиду того, что моноклональные антитела к р24/25 не могут обнаружить капсидный белок ВИЧ р18, а также белки генов *env*, *pol*, мы продолжили исследования с коммерческой положительной сывороткой ко всем белкам ВИЧ («Bio-Rad»).

На рис. 3 представлены результаты иммуноблоттинга по выявлению белков ВИЧ с положительной к ВИЧ сывороткой в культуральной среде первичной культуры лимфоцитов здорового донора после инфицирования ВИЧ-1.

Иммуноблоттингом на 4-й день репро-

дукции ВИЧ (см. рис. 3, А) были выявлены два белка ВИЧ — р55 и р40, которые являются предшественниками капсидных белков ВИЧ.

На 9-й день были выявлены четыре сероактивные фракции гена *gag* ВИЧ (см. рис. 3, Б): р55, р40, р24/25 и второй капсидный белок р18. Основной серодоминантной фракцией являлся р55 (47,8% всей серологической активности).

На 13-й день (см. рис. 3, В) обнаружены в культуральной среде те же вирусные белки: р55, р40, р24/25, р18. Следует отметить, что белки генов *env*, *pol* в культуральной жидкости инфицированных ВИЧ лимфоцитов не были обнаружены.

Изменение спектра вирусных белков в иммуноблоттинге во времени, на наш взгляд, связано с расщеплением белков-предшественников гена *gag* до структурных белков протеолитическими ферментами, поступающими в культуральную среду в связи с лизисом лимфоцитов на более поздних сроках культивирования.

Результаты иммуноблоттинга позволяют заключить, что в процессе репродукции ВИЧ в первичной культуре лимфоцитов *in vitro* в культуральную среду из клеток экспортируется большое количество неструктурных белков гена *gag* (р40, р55). Неструктурные белки гена *gag* под действием клеточных протеаз расщепляются до структурных белков (р24/25, р18).

Данное обстоятельство согласуется с литературными данными и полученными ранее нашими результатами [2, 3], в которых показано, что у ВИЧ-инфицированных пациентов на ранних этапах заболевания антитела к р25 составляют значительную фракцию, а также в небольших количествах выявляются антитела к предшественнику ядерных белков р55.

По мере нарастания титра анти-ВИЧ антител происходило постепенное снижение относительной доли присутствия антител к ядерному белку с появлением антител к предшественнику гликопротеинов ВИЧ-1 — gp160. Ввиду короткого периода жизни первичной культуры лимфоцитов мы не могли провести более длительное монитори-

ние спектра вирусных белков при репродукции ВИЧ-1.

Таким образом, можно предположить, что белки гена *gag*, появляющиеся первыми, оказывают своеобразное давление на иммунную систему, что является частью стратегии вируса.

ВЫВОДЫ

1. При репродукции ВИЧ в первичной культуре лимфоцитов в культуральную среду выделяются растворимые формы белков ВИЧ-1 гена *gag*.

2. На начальных стадиях инфекции спектр белков ВИЧ в культуральной среде *in vitro* активированных фитогемагглютинином лимфоцитов состоит только из белков-предшественников ВИЧ-1 (р55, р40), а на более поздних сроках — и капсидных вирусных белков гена *gag* (р24/25, р18).

Выполнение данной работы частично финансировалось грантом Российского Фонда фундаментальных исследований 13-04-97034 р_Поволжье_а

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойчук С.В., Мустафин И.Г., Макарова М.В. и др. Механизмы репликации ВИЧ-1 в CD4⁺-лимфоцитах: роль антиген-презентирующих клеток. *Иммунология*. 2007; 28 (4): 196–200. [Boychuk S.V., Mustafin I.G., Makarova M.V. et al. HIV-1 replication mechanisms in CD4⁺ lymphocytes: the role of antigen-presenting cells. *Иммунология*. 2007; 28 (4): 196–200. (In Russ.)]
2. Покровский В.В., Ермак Т.Н., Беляева В.В., Юрин О.Г. *ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика и лечение*. М.: ГЭОТАР-Медицина. 2000; 496 с. [Pokrovskiy V.V., Ermak T.N., Belyaeva V.V., Yurin O.G. *VICH-infektsiya: klinika, diagnostika i lechenie*. (HIV infection: clinical features, diagnosis and treatment.) Moscow: GEOTAR-Meditsina. 2000; 496 p. (In Russ.)]
3. Рязанова Г.А., Коксин В.П., Хамзина Р.В. «Свободные» и «связанные» антитела к структурным белкам ВИЧ-1 в ранний период заболевания. *Мед. иммунол.* 2005; 7 (1): 73–76. [Ryzanova G.A., Kocksin V.P., Khamzina R.V. «Free» and «bound» antibodies against HIV-1 structure proteins at early stage of the disease. *Meditsinskaya immunologiya*. 2005; 7 (1): 73–76. (In Russ.)]
4. Laemli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage 14. *Nature*. 1970; 227: 680–685.