

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

Владимир Петрович Коксин<sup>1</sup>\*, Ильшат Ганиевич Мустафин<sup>2</sup>, Сергей Васильевич Бойчук<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Казанская государственная медицинская академия, г. Казань, Россия;

<sup>2</sup>Казанский 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<sup>sp</sup> 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. Koxsin<sup>1</sup>, I.G. Mustafin<sup>2</sup>, S.V. Boichuk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia;

<sup>2</sup>Kazan 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<sup>sp</sup> 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 определённой 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<sup>gag</sup>) 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.

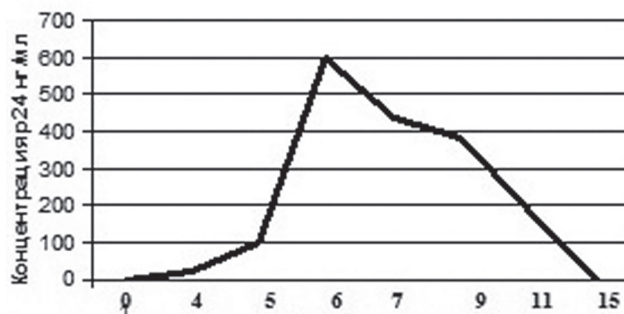


Рис. 1. Репликация ВИЧ в активированных лимфоцитах

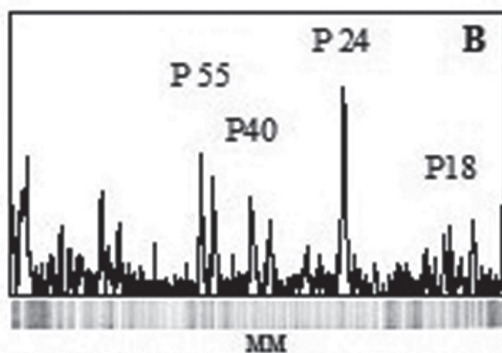
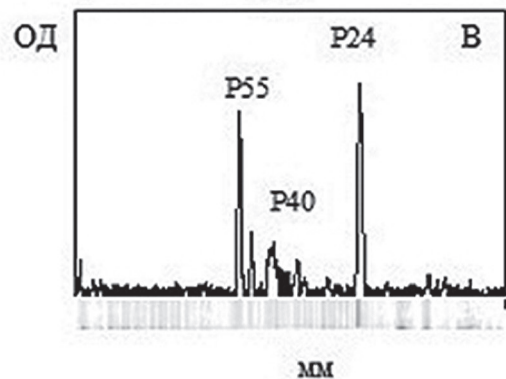
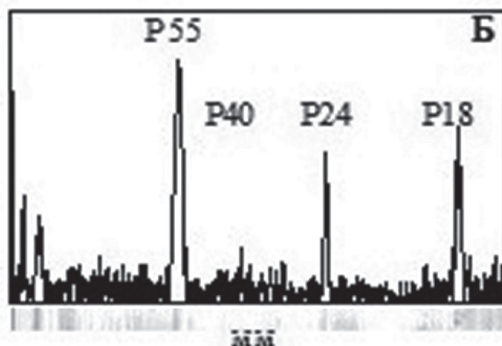
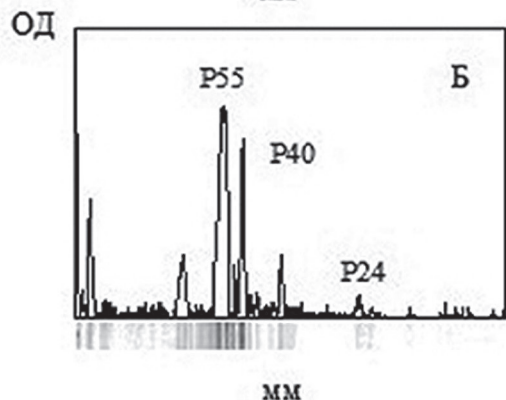
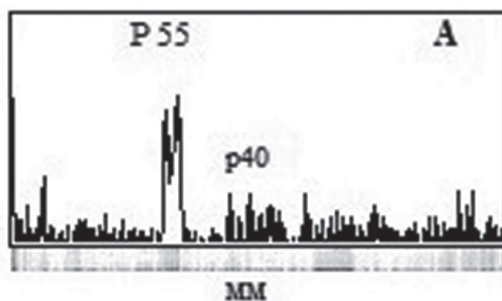
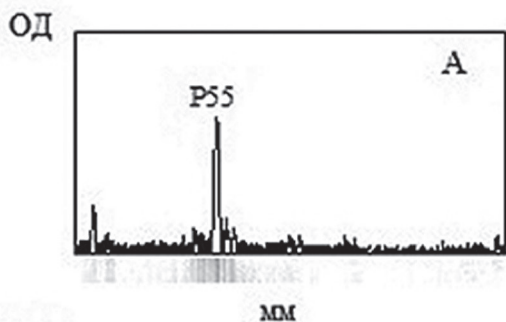


Рис. 2. Результаты иммуноблоттинга по выявлению антигенов ВИЧ в культуральной среде первичной культуры лимфоцитов здорового донора после инфицирования ВИЧ-1 моноклональными антителами к р24/25. А. Через 4 дня. Б. Через 13 дней. ОД — оптическая плотность; мм — длина стрипа (80 мм)

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 мониторирова-

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<sup>+</sup>-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<sup>+</sup> 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.