

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

УДК 578.23

МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ ЛЮДИНИ

Зінчук І.І., Донець О.С.

Київський медичний університет
Української академії народної медицини

У статті подано висвітлення останніх наукових відкриттів у механізмах життя ВІЛ, досліджується вплив на клітини організму людини, цикл вірусу в організмі, особливості роботи зворотної транскриптази.

Ключові слова: ВІЛ, молекулярна біологія, вірус імунодефіциту людини.

Постановка проблеми. В останні роки вірус імунодефіциту людини (надалі ВІЛ) стає все більш поширеною і небезпечною загрозою для сучасного світу. Дослідження життєвого циклу в інфікованих клітинах є важливим, оскільки дає можливість розробити методи для блокування ВІЛ від подальшого поширення та інфікування організму. У цій статті ми на основі останніх досліджень провідних інститутів та лабораторій світу зробимо спробу вивчити принципи взаємодії вірусу з клітинами організму. Проведено систематизацію матеріалу в єдину статтю, в основу якої покладена масштабна робота працівників Каліфорнійського Університету Сан-Франциско 2003 року (переглянута і доповнена в 2006) з додаванням сучасних відкриттів взаємодії ВІЛ з клітинами організму.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Як показали останні відкриття в молекулярній біології вірусу імунодефіциту, його взаємодія з клітиною є складною і дуже багатогранною. Сучасні методи досліджень дозволили відкрити і пояснити майже кожен крок дії ВІЛ: від його потрапляння в клітину до виходу з інфікованої клітини нових копій вірусу. Ці знання спрямовані на розробку нових, більш ефективних противірусних препаратів, що дасть у майбутньому ефективнішу зброю в руках лікарів і в перспективі зробить ВІЛ повністю виліковним.

Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми. Наукові праці українських дослідників неповністю висвітлюють цю проблему, тому ми вважаємо доцільним зробити огляд світових досягнень у вивченні молекулярної біології ВІЛ першого типу (HIV type-1) і написанні статті на цю тему.

Мета статті. Мета нашої публікації – довести до широкого відома інформацію про механізми взаємодії вірусу та організму людини на молекулярному рівні.

Виклад основного матеріалу. Зв'язування і вхід в клітину

Структура вірусу імунодефіциту є ліпідною мембраною, яка створює зовнішню оболонку, інтегровані в неї протеїни клітини хазяїна та глікопротеїди (GP) 120 і 41 (рис. 1). Всередині самого вірусу є капсид, що

оточує дві вірусні РНК, і регуляторні білки (Tat, зворотна транскриптаза та інтеграза).

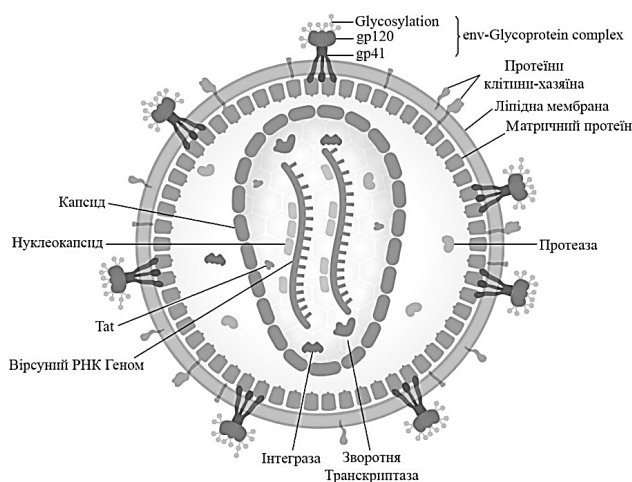


Рис. 1. Структура вірусу імунодефіциту людини

Автор: Thomas Spletstoesser (www.scistyle.com)

Комплекс GP120 та GP41 на зовнішній поверхні вірусу є комплементарним до рецепторів специфічних CD4⁺ лімфоцитів [1]. Сама РНК має довжину 9 кілобаз та складається з 9 генів, що кодують 15 протеїнів (рис. 2).

Глікопротеїди зв'язуються з CD4 рецептором і С-С хемокіновим рецептором п'ятого типу (CCR5 (У нормі ці рецептори клітини беруть участь у хемоаттракції, в якій гематопоетичні клітини рухаються вздовж хемокінових градацій)) [2] в процесі входження у клітину. Зв'язування поверхонь gp120, CD4 та хемокінових корецеп-

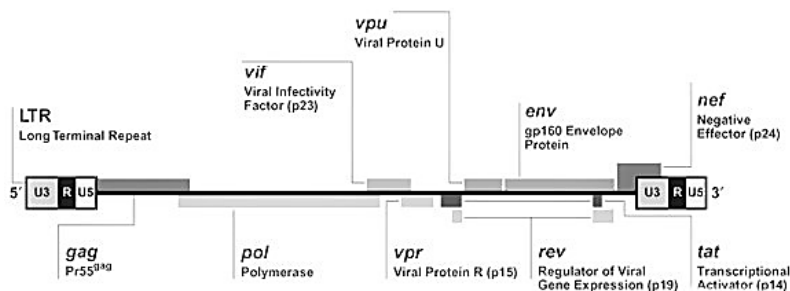


Рис. 2. Будова вірусної РНК

Автору: Warner C. Greene, MD, PhD, University of California San Francisco
B. Matija Peterlin, MD, University of California San Francisco

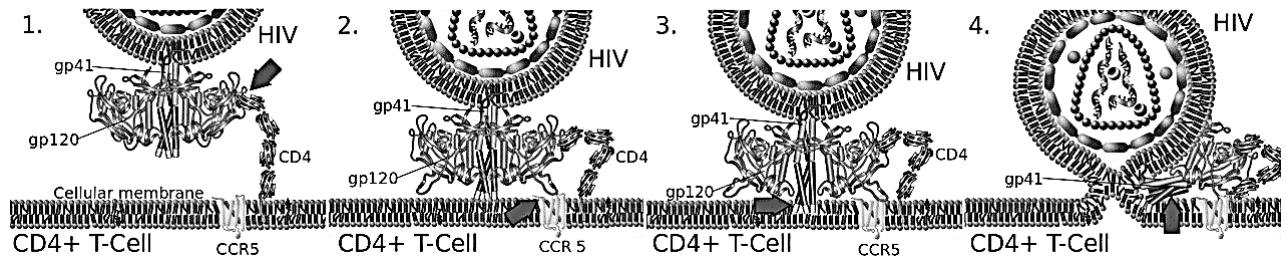


Рис. 3. Вхідження вірусу у клітину

1. Початкова взаємодія між gp120 і CD4.
2. Конформаційні зміни в gp120 дозволяють вторинно взаємодіяти з CCR5.
3. Дистальні кінці gp41 входять до клітинної мембрани.
4. gp41 піддається значним конформаційним змінам: складається навпіл і формується спіральна-котушка. Цей процес притягує вірусну і клітинну мембрану, змішуючи їх.

Автор: Mike Jones ([торів продукують радикальні зміни конформації в gp41. Зібрані тримером на мембрані віріона, ці суперспіралізовані протеїнові пружини відкриваються, випускаючи домен злиття, який «гарпунує» біліпідний шар клітини-мішені \(рис. 3\) \[3\].](https://en.wikipedia.org/wiki/User:Adenosine?rdfrom=commons>User:Adenosine)</p>
</div>
<div data-bbox=)

Процеси в цитоплазмі. Опиняючись в клітині, вірус звільняється від своєї ліпідної оболонки (рис. 4). Після цього в цитоплазмі клітини формується вірусний зворотньо-транскрипційний комплекс і група білків регуляторів. Білок Nef зв'язується з універсальною протонною помпою (V-ATPase) [4] і формує сприятливий рН для вірусу в цитоплазмі. Зворотно-транскрипційний комплекс складається з диплоїдної вірусної РНК, лізин-трансфер РНК (tRNA^{Lys}), який діє як праймер для зворотної транскрипції, зворотної транскриптази, інтегрази, матричних і нуклеокапсидних протеїнів, вірусного протеїну R (Vpr) та різних білків клітини хазяїна. Комплекс зв'язується з актиновими мікрофіламентами, ця взаємодія, регульована фосфорильованим матриксом, потрібна для ефективного синтезу вірусного ДНК.

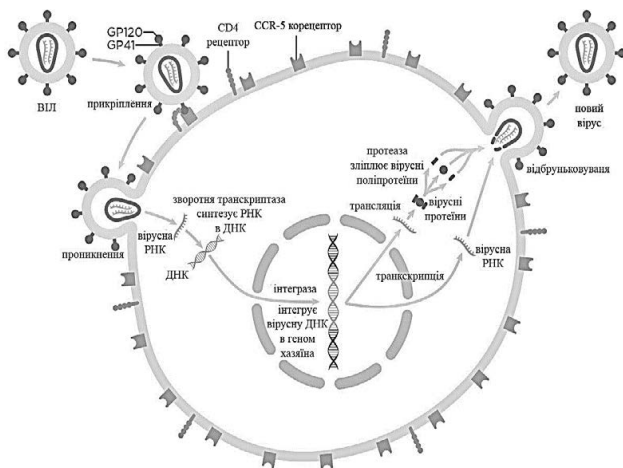


Рис. 4. Схематичне зображення циклу вірусу у клітині від моменту входження до моменту відбруньковування нового вірусу

Автор: Thomas Spletstoeser (www.scistyle.com)

Входження в ядро. На відміну від тваринних ретровірусів, ВІЛ інфікує клітини, які не діляться (диференційовані макрофаги) [5]. Ця особливість вимагає від вірусу механізмів проникнення через неушкоджену ядерну оболонку. Приблизний діаметр пор в оболонці 28 нм, тоді як розміри вірусу втричі більші. Вірусна ДНК, яка була син-

тезована в попередній фазі, повинна скластись втрое, щоб пройти крізь мембрану [6].

В імпорті залучаються білок інтеграза, матричний протеїн (матрикс), Vpr. Матрикс включає в себе канонічний ядерний сигнал локалізації, що є тригером для активації білків-імпортинів альфа і бета, які є компонентами класичного ядерного транспорту [7]. Vpr має в собі як мінімум три неканонічні ядерні сигнали. Він проходить через імпорتنу систему і спричиняє зв'язування преінтеграційного комплексу з білковими комплексами ядерних пор, у такий спосіб імпортуючи вірус в ядро.

Інтеграція в ДНК клітини. Опиняючись у ядрі, преінтеграційний комплекс може почати облаштовувати функціонуючий провірус. Процес вбудовування вірусної ДНК регулює білок інтеграза. Вона забирає кінцеві нуклеотиди з вірусної ДНК, роблячи двостороннє вкорочення і коректуючи нерівні кінці, які утворились через роботу зворотної транскриптази.

Не всі преінтеграційні комплекси, які попадають в ядро, починають облаштовувати функціонуючий вірус. Кінці вірусної ДНК можуть з'єднуватись, формуючи 2-LTR коло, одночасно з цим є ймовірність, що вірусний геном пройде монологічну рекомбінацію, утворюючи одне LTR коло. Нарешті, вірусна ДНК може інтегруватись сама в себе, формуючи перебудовану кільцеву структуру.

Серед багатьох описаних колових структур окремі з них відповідають за синтез транскрипційного трансактиватора Tat або додаткового білка Nef [8]. При нормальній клітинній реакції на ворожу ДНК і її фрагменти активується система негомологічного з'єднання кінців, яка може формувати 2-LTR кола для захисту клітини від апоптозу під час виправлення порушень в ДНК клітини. Одне порушення в будь-якій ділянці подвійної спіралі може індукувати захоплення клітини в G1 фазі її мітозу. Здатність вірусу мімікувати дію цієї системи дає можливість вберегти інфіковану клітину від апоптозу, даючи можливість йому далі існувати в клітині.

Транскрипційний контроль. Вірусний 5' LTR функціонує так само, як і інші еукаріотичні транскриптори. До його складу входять ініціатор (Inr), ТАТА-бокс (T) та три Sp1 ділянки [9]. Ці ділянки допомагають розмістити РНК полімеразу II (RNAPII) на стороні ініціації транскрипції та беруть участь в формуванні преініціаційного

комплексу. Трохи вище за промотор знаходиться транскрипційний посилювач, який зв'яже ядерний фактор [карра]В (NF-[карра]В), ядерний фактор активованих Т-клітин (NFAT) та членів сімейства Ets. NF-[карра]В та NFAT переміщуються в ядро після їх клітинної активації. NF-[карра]В звільнюється від свого цитоплазматичного інгібітору (I [карра]В) за допомогою комбінованої дії фосфорилляції, убіквінації та протеасомної деградації інгібітору [10]. Опинившись у ядрі, він відповідає за збільшення частоти ініціації та елонгації вірусної транскрипції [11]. NFAT в свою чергу дефосфорилується кальцінейріном і після свого потрапляння в ядро зв'язується з AP1, формуючи готовий претранскрипційний комплекс (рис. 5-6) [12].

Коли всі ці фактори діють на LTR, активується транскрипція, але за відсутності Tat полімераза не зможе подовжувати вірусний геном (рис. 5-а).

Tat разом з цикліном T1 (CycT1) зв'язується з TAR РНК і залучає при цьому циклінозалежну кінразу 9 (CDK9) до вірусного LTR [13].

CDK9 разом з Р-TEFb (позитивний транскрипційно-елонгаційний фактор b) фосфорилує С-термінальний домен RNAPII, помічаючи перехід з ініціації до елонгації еукаріотичної транскрипції. Іншими мішенями Р-TEFb є N-TEF (негативні транскрипційно-елонгаційні фактори), такі як DSIF та NELF [14]. Висока ефективність вірусного LTR в притягуванні до себе цих негативних факторів транскрипції *in vivo* пояснює, чому LTR за відсутності Tat є поганим промотором.

Вірусна транскрипція. Транскрипція вірусного геному є сумацією роботи багатьох ВІЛ-специфічних транскриптів [15]. Ці багаторазово порізани ділянки геному вірусу кодують Nef, Tat та Rev, ензимні та додаткові протеїни, які потрібні для утворення нового вірусу і являють собою вірусні геномні РНК.

Транспорт цих ділянок до цитоплазми залежить від кількості Rev. Rev – це малий курсуючий протеїн, який зв'язує комплекс РНК під назвою RRE (Rev відповідний елемент), що знаходиться в гені env.

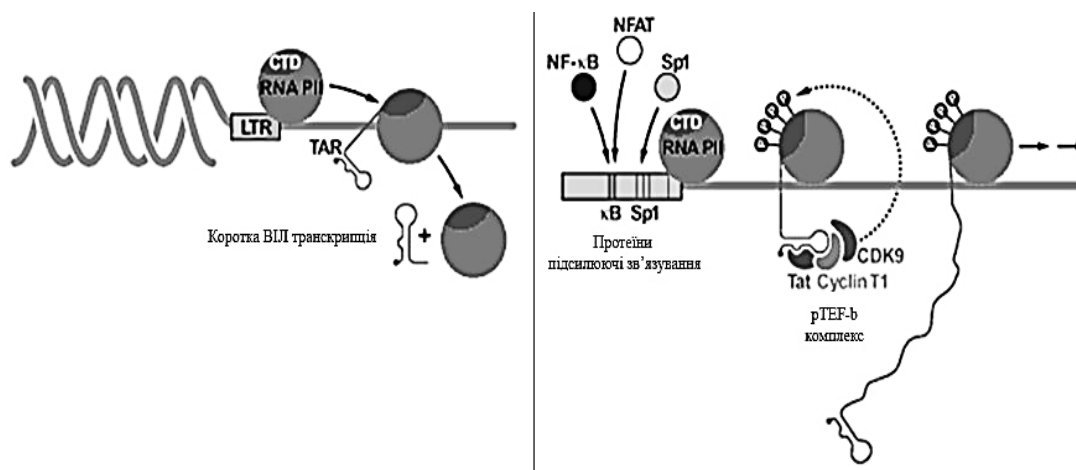


Рис. 5. (Ліва частина – а, права – б)

а – відсутність ефективності в елонгації геному вірусу без Tat
б – претранскрипційний комплекс вірусу

Автору: Warner C. Greene, MD, PhD, University of California San Francisco
B. Matija Peterlin, MD, University of California San Francisco

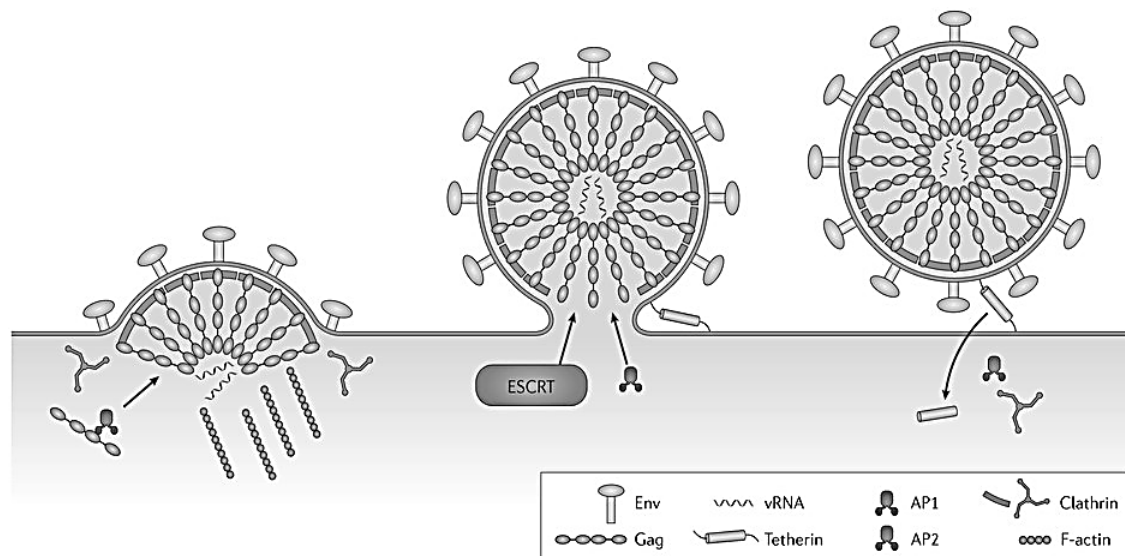


Рис. 6. Новий віріон та його відбруньковування

Автору: Ashley C. Humphries та Michael Way,
Nature Reviews Microbiology 11, 551–560 (2013) doi:10.1038/nrmicro3072

Ядерний транспорт комплексу вірусно-го РНК-транскрипту, Rev та CRM1/exportin 1, залежить від ще одного фактору-RanGTP. Ran – це гуаніновий нуклеотидно-зв'язуючий протеїн, який переключається між GTP- та GTP-обмеженим станами.

Для поширення вірусу потрібно досягти балансу між транспортом та розрізанням вірусної РНК. Якщо переважатиме розрізання (сплайсинг), то в цитоплазмі будуть з'являтися лише фрагментовані транскрипти. Але й повністю виключити наявність порізаних транскриптів неможливо, тому що вони кодують специфічні білки, які потрібні для забезпечення повного вірусної реплікації. Наприклад, при недостатньому розрізуванні і, як наслідок, недостатньої продукції вірусних транскриптів відбудеться порушення синтезу Tat, Rev, та Nef.

Реплікація ВІЛ. На відміну від Tat та Rev, які діють безпосередньо на вірусні РНК структури, Nef діє на внутрішнє середовище інфікованої клітини, роблячи його сприятливим для вірусної транскрипції. Клінічні дослідження на мавпах показують, що нестача в клітинах тварин цього білка призводила до значного сповільнення розвитку вірусу. Механізм вірулентності, який забезпечує Nef, працює за принципом активації сигнальних каскадів, включаючи активацію антигенного рецептору Т-клітин та зменшення експресії CD4 рецепторів на поверхні клітини [16]. Діючи на сигнальний каскад, Nef опосередковано викликає зміни в актиновій сітці, провокуючи рух ліпідного «човника» і формування більших за розміром структур на поверхні мембрани клітини [17].

Також Nef інгібує апоптоз клітини: він зв'язується та інгібує регуляторну кіназу-1 апоптотичного сигналу [18]. Також він зв'язує білок р53 (білок супресор пухлин), який теж є ініціатором апоптозу.

Інші вірусні протеїни також беруть участь у модифікації внутрішньоклітинного середовища. Rev-залежна експресія Vpr включає в себе заповнення клітини в G2 фазі мітозу. Саме в наслідок того, що LTR найбільш активна в саме цій стадії

клітинного циклу, це призводить до підвищеної експресії вірусних генів.

Формування нового вірусу і його відбрунькування. Нові копії вірусу збираються на плазматичній мембрані. Кожний віріон складається з 1500 молекул Gag та 100 Gag-Pol поліпротеїнів [19], двох копій вірусного РНК геному та Vpr (рис. 6).

Кілька протеїнів беруть участь у процесі збирання, зокрема Gag та Gag-Pol поліпротеїни, а також Nef та Env [20]. Людський АТФ-зв'язувальний протеїн (HP68) діє як молекулярний шаперон, сприяючи конформаційним змінам Gag, що необхідно для утворення вірусних капсидів [21]. Також важливу роль відіграє Vif. При його нестачі кількість реплікованих віріонів та сама, але вони не вірулентні, цим пояснюється захоплення циклу вірусу на стадії роботи зворотної транскриптази.

Відбрунькування вірусу потребує спеціальних ділянок в ліпідному бішарі (холестерол- та гліколіпіднонасичені мембранні мікродомени) для того, щоб віріон вийшов з клітини з холестерол-збагаченою мембраною.

Сама реакція виходу потребує дії кількох протеїнів, зокрема послідовність «в кінці домену» (PTAP) [22], яка є в рб частині Gag [23]. Продукт гену пухлинного супресора 101 (TSG101) зв'язує PTAP мотив рб Gag і також розпізнає убіквітин через убіквітин ензим 2 (UEV) домен. У нормі цей ген взаємодіє з іншими клітинними протеїнами, сортує шляхи для формування комплексу ESCRT-1, який вибирає «вантаж» для додавання його в мультівезикулярне тіло (MVB) [24]. MVB утворюється тоді, коли поверхні лізосом та ендосом спаюються та їх вміст переміщується для деградації.

Висновки та пропозиції. Вище подані відомості дають підстави зробити висновок, що механізм взаємодії ВІЛ з клітиною дуже складний та багатосторонній. Вірус використовує всі доступні йому механізми для керування клітиною у своїх цілях. Розуміння цих процесів дає змогу удосконалювати методи боротьби з ним на всіх етапах його існування.

Список літератури:

1. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 1998 Jun 18;393 (6686):648-59.
2. Doms RW, Trono D. The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes Dev*. 2000 Nov 1;14 (21):2677-88.
3. Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell*. 1998 May 29;93 (5):681-4.
4. Lu X, Yu H, Liu SH, Brodsky FM, Peterlin BM. Interactions between HIV1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4. *Immunity*. 1998 May;8 (5):647-56.
5. Weinberg JB, Matthews TJ, Cullen BR, Malim MH. Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J Exp Med*. 1991 Dec 1;174 (6):1477-82.
6. Pemberton LF, Blobel G, Rosenblum JS. Transport routes through the nuclear pore complex. *Curr Opin Cell Biol*. 1998 Jun;10 (3):392-9.
7. Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhbass U, Montagnier L, Charneau P. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell*. 2000 Apr 14;101 (2):173-85.
8. Wu Y, Marsh JW. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science*. 2001 Aug 24;293 (5534):1503-6.
9. Taube R, Fujinaga K, Wimmer J, Barboric M, Peterlin BM. Tat transactivation: a model for the regulation of eukaryotic transcriptional elongation. *Virology*. 1999 Nov 25;264 (2):245-53.
10. Jones KA, Peterlin BM. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:717-43.
11. Barboric M, Nissen RM, Kanazawa S, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell*. 2001 Aug;8 (2):327-37.

12. Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell*. 1999 Mar 5;96 (5):611-4.
13. Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*. 1998 Feb 20;92 (4):451-62.
14. Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*. 1998 Feb 20;92 (4):451-62.
15. Saltarelli MJ, Hadziyannis E, Hart CE, Harrison JV, Felber BK, Spira TJ, Pavlakis GN. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 mRNA splicing patterns during disease progression in peripheral blood mononuclear cells from infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996 Oct 10;12 (15):1443-56.
16. Simmons A, Aluvihare V, McMichael A. Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity*. 2001 Jun;14 (6):763-77.
17. Geyer M, Fackler OT, Peterlin BM. Structure--function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep*. 2001 Jul;2 (7):580-5.
18. Geleziunas R, Xu W, Takeda K, Ichijo H, Greene WC. HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. *Nature*. 2001 Apr 12;410 (6830):834-8.
19. Wilk T, Gross I, Gowen BE, Rutten T, de Haas F, Welker R, Krausslich HG, Boulanger P, Fuller SD. Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2001 Jan;75 (2):759-71.
20. Freed EO. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*. 1998 Nov 10;251 (1):1-15.
21. Zimmerman C, Klein KC, Kiser PK, Singh AR, Firestein BL, Riba SC, Lingappa JR. Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature*. 2002 Jan 3;415 (6867):88-92.
22. Garnier L, Parent LJ, Rovinski B, Cao SX, Wills JW. Identification of retroviral late domains as determinants of particle size. *J Virol*. 1999 Mar;73 (3):2309-20.
23. Strack B, Calistri A, Accola MA, Palu G, Gottlinger HG. A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 21;97 (24):13063-8.
24. Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*. 2001 Jul 27;106 (2):145-55.

Зинчук И.И., Донец А.С.

Киевский медицинский университет
Украинской академии народной медицины

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ВИРУСА ИМУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА

Аннотация

В статье подаются последние научные открытия в механизмах жизни ВИЧ, исследуется их действие на клетки организма человека, цикл вируса в организме, особенности работы обратной транскриптазы.

Ключевые слова: ВИЧ, молекулярная биология, вирус иммунодефицита человека.

Zinchuk I.I., Donets A.S.

Kyiv Medical University
of Ukrainian Academy of Traditional Medicine

MOLECULAR BIOLOGY OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS

Summary

Coverage of the latest scientific discoveries into the mechanisms of living with HIV. Its effect on the cells of the human body. The cycle of the virus in the body. Features of reverse transcriptase.

Keywords: HIV, molecular biology, human immunodeficiency virus.