



Громов К.Б.¹, Киреев Д.Е.², Мурзакова А.В.², Лопатухин А.Э.², Казеннова Е.В.¹, Бобкова М.Р.¹

Анализ полиморфизма белка Nef вариантов ВИЧ-1 (*Human immunodeficiency virus-1, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae*), циркулирующих в странах бывшего СССР

¹ Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

² ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия

Введение. Белок Nef вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) является одним из ключевых факторов, определяющих инфекционность и репликативные свойства ВИЧ. Обладая способностью к взаимодействию с многочисленными белками хозяйской клетки, этот белок обеспечивает максимальный уровень продукции вируса и защиту его от иммунной системы. Основные активности Nef связывают со снижением экспрессии CD4-рецептора и молекул главного комплекса гистосовместимости I типа (MHC-I), а также с перестройкой цитоскелета. Эти свойства белка определяются структурой нескольких мотивов в составе кодирующего его гена *nef*, имеющих вариабельную природу.

Цели и задачи. Основной целью работы был анализ особенностей белка Nef варианта A6 ВИЧ-1, доминирующего в странах бывшего СССР. Задачей работы послужил сравнительный анализ естественных полиморфизмов в гене *nef* ВИЧ-1 суб-субтипов A6 и A1 и субтипа B.

Материал и методы. Материалом для работы послужили последовательности генома ВИЧ-1, полученные в ходе предшествующей работы лаборатории, а также референс-последовательности из GenBank. В работе использованы методы секвенирования по Сэнгеру и секвенирования нового поколения, а также методы биоинформационного анализа.

Результаты и обсуждение. Продемонстрированы различия в частоте встречаемости естественных полиморфизмов белка Nef (A32P, E38D, I43V, A54D, Q104K, H116N, Y120F, Y143F, V168M, H192T, V194R, R35Q, D108E, Y135F, E155K, E182M, R184K и F191L), некоторые из которых являются характеристическими мутациями для варианта A6.

Заключение. Обнаружены характеристические замены в составе Nef, потенциально способные ослаблять репликативные свойства варианта A6 ВИЧ-1.

Ключевые слова: ВИЧ-1; суб-субтип A6; мутации; полиморфизм; ген *nef*.

Для цитирования: Громов К.Б., Киреев Д.Е., Мурзакова А.В., Лопатухин А.Э., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р. Анализ полиморфизма белка Nef вариантов ВИЧ-1 (*Human immunodeficiency virus-1, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae*), циркулирующих в странах бывшего СССР. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(6): 281-290.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-281-290>

Информация об авторах:

Громов К.Б., <https://orcid.org/0000-0002-9316-1975>

Киреев Д.Е., <https://orcid.org/0000-0002-7896-2379>

Мурзакова А.В., <https://orcid.org/0000-0002-1390-8021>

Лопатухин А.Э., <https://orcid.org/0000-0002-2826-699X>

Казеннова Е.В., <https://orcid.org/0000-0002-7912-4270>

Бобкова М.Р., <https://orcid.org/0000-0001-5481-8957>

Для корреспонденции: Бобкова Марина Ридовна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией вирусов лейкоцитов, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; <https://orcid.org/0000-0001-5481-8957>. E-mail: mrbobkova@mail.ru

Gromov K.B.¹, Kazennova E.V.¹, Kireev D.E.², Murzakova A.V.², Lopatukhin A.E.², Bobkova M.R.¹

Analysis of HIV-1 (*Human immunodeficiency virus-1, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae*) Nef protein polymorphism of variants circulating in the former USSR countries

¹National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia;

²Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, 111123, Russia

Introduction. The human immunodeficiency virus (HIV) Nef protein is one of the key factors determining the infectivity and replicative properties of HIV. With the ability to interact with numerous proteins of the host cell, this protein provides the maximum level of virus production and protects it from the immune system. The main activities of Nef are associated with a decrease in the expression of the CD4 receptor and major histocompatibility complex class I molecules (MHC-I), as well as the rearrangement of the cytoskeleton. These properties of the protein are determined by the structure of several motifs in the structure of the *nef* gene encoding it, which is quite variable.

Goals and tasks. The main goal of the work was to analyze the characteristics of Nef protein of HIV-1 variant A6, which dominates in the countries of the former USSR. The objective of the work was a comparative analysis of natural polymorphisms in the *nef* gene of HIV-1 sub-subtypes A6 and A1 and subtype B.

Material and methods. The sequences of the HIV-1 genome obtained during the previous work of the laboratory were used, as well as the reference sequence from GenBank. In this work, Sanger sequencing and new generation sequencing methods, as well as bioinformatics analysis methods were used.

Results and discussion. The existence of noticeable differences in the prevalence of Nef natural polymorphisms (A32P, E38D, I43V, A54D, Q104K, H116N, Y120F, Y143F, V168M, H192T, V194R, R35Q, D108E, Y135F, E155K, E182M, R184K and F191L), some of which are characteristic mutations for variant A6, was shown.

Conclusion. Characteristic substitutions were found in the Nef structure, potentially capable of weakening the replicative properties of HIV-1 variant A6.

Keywords: HIV-1; sub-subtype A6; mutations; polymorphism; nef gene.

For citation: Gromov K.B., Kazennova E.V., Kireev D.E., Murzakova A.V., Lopatukhin A.E., Bobkova M.R. Analysis of HIV-1 (*Human immunodeficiency virus-1, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae*) Nef protein polymorphism of variants circulating in the former USSR countries. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(6): 281-290. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-281-290>

For correspondence: Marina R. Bobkova, MD, PhD, Dr Biol Sci, chief researcher, head of T-lymphotropic viruses laboratory, Ivanovsky Institute of Virology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, 18, Gamaleya street, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5481-8957>. E-mail: mrbobkova@mail.ru

Information about authors:

Gromov K.B., <https://orcid.org/0000-0002-9316-1975>

Kireev D.E., <https://orcid.org/0000-0002-7896-2379>

Murzakova A.V., <https://orcid.org/0000-0002-1390-8021>

Lopatukhin A.E., <https://orcid.org/0000-0002-2826-699X>

Kazennova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-7912-4270>

Bobkova M.R., <https://orcid.org/0000-0001-5481-8957>

Acknowledgments. The study was carried out as a part of the international CARE project and supported from the sources of Ministry of science and higher education grant (unique number RFMEFI61019X0020).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 21 November 2019

Accepted 28 November 2019

Введение

Рост эпидемии ВИЧ-инфекции во всём мире продолжается, и вместе с ним повышается социальная значимость этого заболевания. В числе наиболее эффективных способов сдерживания эпидемии – антиретровирусная терапия, современный вариант которой потенциально способен уравнивать качество и продолжительность жизни инфицированных со средними показателями людей, не имеющих инфекции. Основными препятствиями для достижения тотального успеха являются феномен лекарственной устойчивости ВИЧ, генетически предопределённые особенности людей, способные снижать эффект лекарственной терапии, а также невозможность полного излечения от инфекции, обусловленная существованием резервуаров. Эти и другие причины приводят к необходимости разработки всё новых лекарственных средств, целью воздействия которых являются новые (вирусные и не только) мишени. Одной из таких мишеней могут стать неструктурные белки ВИЧ.

Геном ВИЧ отличается небольшими размерами (менее 10 тыс. н.п.) и кодирует всего несколько белков, среди которых структурные белки групп Gag, Pol и Env, а также так называемые регуляторные белки (Tat и Rev) и вспомогательные белки (Vif, Vpr, Vpu и Nef), объединяемые названием неструктурных.

В отличие от структурных белков, обнаруживаемых в значительных количествах в составе вирусных частиц (Gag и Env) либо в клетке в период размножения вируса (Pol), неструктурные белки продуцируются в небольших количествах и в составе вирионов могут

вообще отсутствовать. Как это часто бывает у вирусов с ограниченным объёмом генетической информации, немногочисленность этих белков компенсируется их многофункциональностью. Именно эти белки, каждый из которых обладает несколькими, порой непосредственно не связанными между собой активностями, обеспечивают инфекционные свойства вируса, высокий уровень его репликации и защиту от иммунной системы организма-хозяина. Вопросы участия неструктурных белков ВИЧ в патогенезе вызываемой им инфекции интенсивно изучаются, и в фокусе интереса исследователей находится белок Nef.

Первые упоминания об этом белке связывали его с ингибированием транскрипции вируса, именно поэтому он получил своё название (от англ. negative factor), однако недоразумение вскоре прояснилось, и стала очевидной связь Nef с повышением вирусной нагрузки и прогрессированием патогенеза ВИЧ-инфекции. Одним из наиболее убедительных доказательств является присутствие Nef-дефектных вирусов у длительных непрогрессоров (long term non-progressors, LTNP) [1, 2].

Ген *nef* локализуется на 3'-конце генома ВИЧ-1, а также ВИЧ-2 и вирусов иммунодефицита обезьян, частично перекрываясь с последовательностью 3'-LTR – длинного концевой повтора. Трансляция Nef происходит на матрице множественно сплайсированной РНК и приводит к формированию белка размером 27–32 кДа, в значительных количествах присутствующего в клетке на ранних стадиях инфекционного процесса.

В составе белка Nef выделяют три области: структурированный глобулярный центральный домен, включающий неупорядоченную подвижную петлю, а также подвижные N-концевую часть и C-концевую петлю [3–5]. Все менее структурированные подвижные участки Nef распределены по его поверхности, склонны к конформационным превращениям и легко вступают во взаимодействия с другими белками, которых в клетке насчитывается не менее полусотни [6]. Участки белка, имеющие критическое значение для выполнения его функций, можно встретить во всех указанных областях.

Nef – миристилированный белок, что наряду с наличием протяжённого участка щелочных аминокислот на его N-конце способствует взаимодействию с клеточной мембраной. Это свойство Nef позволяет ему присутствовать в составе вирусных частиц, хотя функция «упакованного» белка пока не ясна.

Nef, как и другие неструктурные белки ВИЧ-1, не имеет ферментативных активностей, при этом в силу вышеперечисленных особенностей обладает феноменальной способностью к взаимодействию с многочисленными белками хозяйской клетки и прежде всего с аппаратом внутриклеточного транспорта и сигнальной трансдукции. В ходе размножения ВИЧ в клетке белок Nef продуцируется в избытке и поступает в окружающие ткани и кровоток. Благодаря этому Nef приобретает способность влиять как на внутриклеточные процессы репликации ВИЧ, так и на процессы взаимодействия с иммунными и неиммунными клетками, одновременно обеспечивая максимальный уровень продукции вируса и защиту его от иммунной системы.

Как и другие белки ВИЧ, Nef отличается значительной вариабельностью, однако локализация функционально важных мотивов в составе белка пока изучена недостаточно. Следует отметить, что у пациентов с естественным течением ВИЧ-инфекции некоторая часть этих мотивов (например, ответственных за регуляцию CD4-рецептора и молекул главного комплекса гистосовместимости I типа (MHC-I, см. далее)

высококонсервативна, что подчёркивает важность их функции. Тем не менее легко понять, что функциональные различия между вирусами должны иметь физическую основу, иными словами, объясняться особенностями их генома, т. е. генетическим полиморфизмом.

К числу наиболее хорошо охарактеризованных свойств Nef, имеющих значение для патогенеза инфекции, относятся снижение экспрессии CD4-рецептора и молекул MHC-I, усиление инфекционности вирусных частиц и активация PAK-2 (p21-activated kinase), связанная с перестройкой цитоскелета (два последних свойства весьма трудноотделимы друг от друга). Некоторые данные мировой литературы, касающиеся этих вопросов, приводятся ниже. Наиболее обоснованные сведения, связывающие особенности гена *nef* с функцией кодируемого им белка, представлены в табл. 1.

Влияние Nef на репликацию ВИЧ. Оптимизируя клеточное окружение для повышения уровня репликации вируса, Nef достигает нескольких целей: во-первых, увеличивает число продуцируемых клеткой вирусных частиц; во-вторых, повышает эффективность передачи инфекции в контакте «клетка–клетка»; в-третьих, усиливает способность вновь образованных вирионов инфицировать новые мишени, иными словами, повышает инфекционность вируса. Для решения этих задач Nef использует несколько механизмов, реализуемых преимущественно на уровне транскрипции, при этом каждый из них не до конца понятен (рис. 1).

Усиление вирусной продукции отчасти достигается путём вмешательства Nef в процесс активации LTR-промотора ВИЧ-1. Известно, что взаимодействие этого главного и единственного промотора ВИЧ-1 с регуляторным белком Tat и клеточными белками ядерного фактора κB (NF-κB) или ядерного фактора активированных T-клеток (NFAT) определяет эффективность транскрипции вирусного генома. Как именно Nef влияет на этот процесс, в точности неизвестно, однако очевидно, что речь идёт не о прямом взаимодействии с NF-κB, а, скорее, о регуляции ответа на

Таблица 1

Некоторые из основных мотивов и мутаций молекулы белка Nef ВИЧ-1 и их свойства

Мотивы и мутации вирусного белка Nef	Свойства Nef	Ссылка
⁵⁵ CAWLEAQ ⁶¹	Снижение уровня экспрессии CD4 и MHC-I	[23]
⁶² EEEE ⁶⁵	Снижение уровня экспрессии MHC-I (взаимодействие с PACS-1 и PACS-2)	[5, 15]
⁷² PxxPxR ⁷⁷	Усиление продукции ВИЧ (активация Src-киназ); снижение экспрессии CCR5 и CXCR4	[4, 5, 7, 14]
¹⁶⁰ ExxxLL ¹⁶⁵	Снижение уровня экспрессии MHC-I (взаимодействие с AP-1)	[5]
¹⁷⁴ ED ¹⁷⁵	Снижение экспрессии CCR5 и CXCR4	[14]
Эффект мутации		
R35Q	Отмена снижения уровня экспрессии CD4	[2]
A83G, H101Y, S162C	Связь со СПИД-ассоциированной деменцией	[18]
R106A	Отмена взаимодействия с PAK-2 и повышения инфекционности ВИЧ	[24]
D108E, Y135F, E155K, E182M, R184K	Отмена снижения уровня экспрессии CD4	[2]
F191A/L	Отмена усиления продукции ВИЧ (дефект взаимодействия с PAK-2 и нарушения цитоскелета)	[8, 9, 25, 26]

его стимуляцию (сигнальную трансдукцию) с участием мембранных структур [3]. В этих событиях задействованы многие клеточные киназы, как тирозиновые (Src-киназа) [4, 5, 7], так и сериновые и треониновые, среди которых лучше других изучена PAK-2 [8, 9].

Этот же приём непрямого воздействия использует Nef, принимая участие в активации клеток, когда он привлекает сигнальные белки к внутренним клеточным мембранам и липидным «плотикам», тем самым обеспечивая их тесное взаимодействие. Эти контакты, в свою очередь, сопровождаются модуляцией ферментативной активности и инициацией активации. Поскольку для эффективной репликации ВИЧ необходимо активированное состояние клетки-мишени, уровень транскрипционной активности LTR-промотора в результате такой деятельности Nef закономерно повышается. Кроме этого, в активное состояние приходят многие гены хозяйской клетки, в том числе и ответственные за экспрессию факторов транскрипции, что дополнительно улучшает условия для продукции новых вирусных частиц [3]. Именно активация вносит наиболее заметный вклад в Nef-опосредованное повышение репликации ВИЧ. Среди аминокислотных мотивов Nef, задействованных в выполнении вышеперечисленных функций, находятся богатый пролином мотив RxxP, а также α -спираль на N-конце и гидрофобная область в составе С-концевой петли [4].

Способность Nef к перестройке цитоскелета клеток-мишеней, которая будет далее обсуждаться в ста-

тье, может быть также причиной ускорения и облегчения передачи вирусных частиц между клетками, однако эта гипотеза пока остаётся в разряде рабочих. Отметим, что эффективность заражения в контакте «клетка–клетка» в тысячи раз выше, чем в контакте «вирион–клетка» [10].

Влияние Nef на инфекционность ВИЧ. Наиболее известной функцией Nef является его очевидная способность повышать инфекционность вирусных частиц ВИЧ. Под инфекционностью, как правило, понимают способность патогена вызывать инфекцию у хозяина, иными словами, комбинацию репликативных и трансмиссивных свойств вируса. Применительно к ВИЧ этим термином обычно обозначают вполне конкретный количественный показатель, характеризующий уровень репликации ВИЧ в одном цикле размножения при заражении чувствительной культуры HeLa-CD4-клеток бесклеточной суспензией вируса.

Значительное число экспериментальных работ так и не дали окончательного ответа на вопрос о механизме влияния Nef на инфекционность ВИЧ, и для более подробного описания состояния вопроса читателя можно отослать к обзорным работам [3, 4, 11]. Если говорить кратко, то, используя свою способность к консолидированию белков, Nef может оказывать позитивное влияние на инфекционные свойства вирионов, находясь в их составе, а также на этапах почкования частиц, например, способствуя формированию липидных «плотиков» – участков почкования,

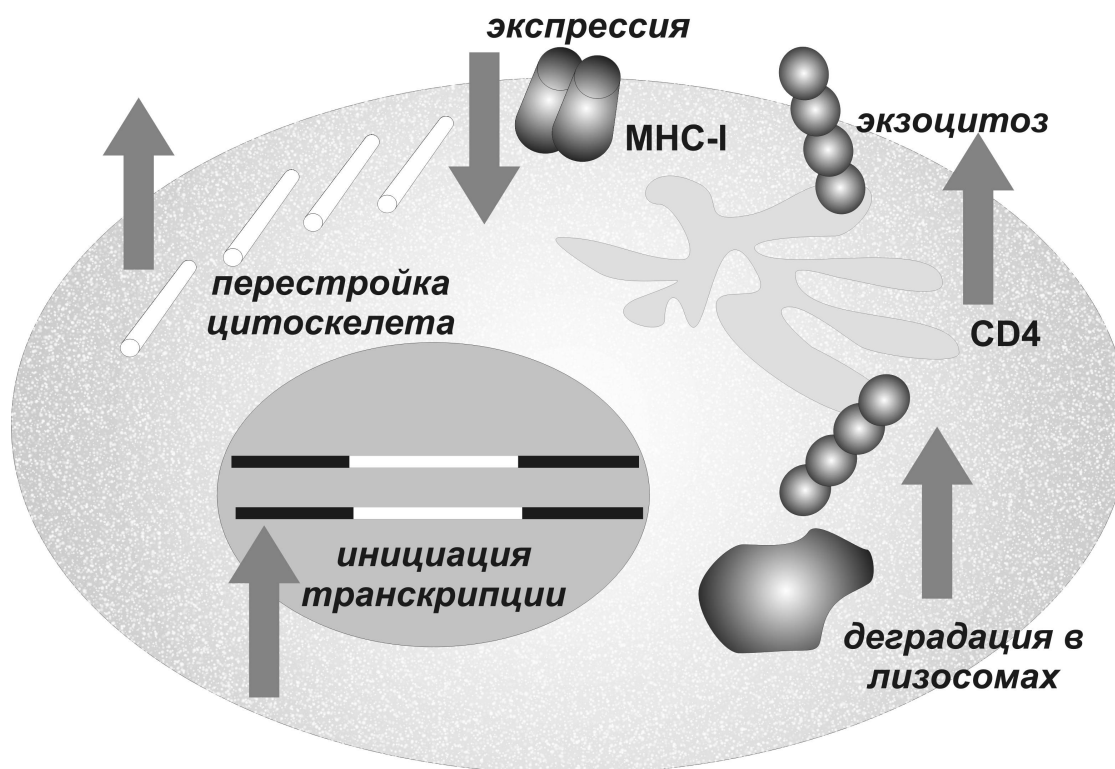


Рис. 1. Основные активности белка Nef ВИЧ в клетке-мишени.

либо контролируя и упорядочивая процесс сборки. Ещё один механизм связан с «обезвреживанием» Nef недавно описанного белка SERINC3/5 (serine incorporator 3 and 5), который в составе вирионов противодействует заражению клеток ВИЧ. Nef удаляет SERINC3/5 из мембранного участка сборки вирионов, препятствуя его включению в новые частицы [12]. Nef-зависимое снижение экспрессии (downregulation) белка SERINC5 считается наиболее значимым вкладом Nef в инфекционность ВИЧ-1 и находится в настоящее время в центре внимания исследований вируса.

К этому следует добавить возможный эффект Nef-зависимого включения клеточных белков – HLA, костимулирующих молекул CD80 и CD86, а также многих других белков хозяйской клетки, способствующих процессу заражения клеток-мишеней [4, 11].

На этапе почкования вирусных частиц важным оказалось взаимодействие Nef с многофункциональным белком PAK-2, которое обычно происходит в области липидных «плотиков» [8]. Структура этого белка чрезвычайно консервативна даже среди разных групп лентивирусов. Одно из объяснений его стимулирующей активности в отношении репликации ВИЧ заключается в способствовании пересечению актинового барьера хозяйской клетки и последующей перестройке цитоскелета, ускоряющей выход вирусных частиц из клетки и связанной с фосфорилированием белка кофилина [9]. Кроме этого, PAK-2 участвует в инактивации проапоптотических белков Bad, тем самым блокируя апоптоз инфицированной клетки и повышая продукцию вируса. Взаимодействие PAK-2 с Nef также оказывает стимулирующее влияние на развитие и мобильность Т-клеток [8].

Влияние взаимодействия Nef/PAK-2 на цитоскелет клетки проявляется также в ограничении передачи сигнала внутриклеточных сигнальных путей, связанных с активацией; тем самым, как считается, белок Nef предотвращает избыточную активацию клетки и ее неизбежную гибель от апоптоза [9].

Nef и молекулы иммунной системы. Способность Nef обеспечивать уход ВИЧ от иммунного ответа связана прежде всего с модуляцией экспрессии поверхностных молекул клетки-мишени (downregulation), среди которых лучше изучены CD4-рецепторы и MHC-I – главные участники цитотоксического противовирусного ответа. Активность Nef при этом проявляется на посттрансляционном уровне. Большинство механизмов регуляции экспрессии поверхностных белков со стороны Nef связывают с адапторными комплексами AP-1 либо AP-2, которые становятся, таким образом, ахиллесовой пятой для ингибирования активностей Nef [5].

CD4 – трансмембранный белок, способный связывать поверхностный белок ВИЧ-1 Env и выступающий в роли основного рецептора для присоединения вируса к клеткам-мишеням. Избыточная аккумуляция интегрированных вирусных геномов может быть причиной усиления цитотоксического иммунного ответа против инфицированной клетки, поэтому после завершения

интеграции провируса ВИЧ наличие молекул CD4 на поверхности клетки становится балластом, избавиться от которого помогает белок Nef. Основным механизмом этого вида его деятельности связан с экзоцитозом поверхностных молекул CD4 с привлечением белка AP-2 – представителя семейства клатринового адапторного комплекса, направляющего рецептор в лизосому с его последующей деградацией.

Эти события закономерно ослабляют проведение внутриклеточных сигналов, связанных с апоптозом клетки, а также помогают защитить инфицированные клетки от антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности [13].

Снижение уровня экспрессии CD4-рецепторов не только приводит к предотвращению суперинфекции, но и облегчает высвобождение новых вирусных частиц из клетки, препятствуя связыванию молекул Env и CD4 в эндоплазматической сети, куда обе они попадают по завершении трансляции [3, 5, 6, 11].

Исследования мутаций Nef в составе лабораторных штаммов определили связь между высококонсервативными мотивами ¹⁶⁴LL¹⁶⁵ и ¹⁷⁴DD¹⁷⁵ и снижением экспрессии CD4 [14]; разрушение указанных мотивов приводило к отмене этой функции белка Nef.

Молекулы MHC-I, презентующие вирусные антигены на поверхности инфицированных клеток (в первую очередь HLA-A и HLA-B), играют основную роль в их распознавании и деструкции цитотоксическими клетками (CTL). После связывания антигена молекулы MHC-I поступают в эндоплазматическую сеть и затем через аппарат Гольджи доставляются на мембрану клетки. Выполнив свою функцию, MHC-I могут быть интернализированы для «повторного использования» (рециклизации) либо направлены в лизосому с последующей деградацией.

Белок Nef, как наиболее обильно продуцируемый на ранних этапах инфицирования клетки, идеально подходит на роль помехи для презентации вирусных пептидов и препятствия разрушению вновь инфицированных клеток – иными словами, снижению эффективности цитотоксического ответа. Способов вмешательства Nef в нарушение трафика MHC-I (MHC-I downregulation) несколько, и хотя изучаются они очень интенсивно, молекулярные детали этих процессов понятны не вполне.

Известно, что экспрессия адапторного белка AP-1 является критичной для регуляции MHC-I, при этом AP-2 и AP-3 оказываются не нужны. В процессе взаимодействия с AP-1 задействованы мотивы Nef ⁶²EEEE⁶⁵ и ¹⁶⁰EXXXLL¹⁶⁵ [5]. Другие белки хозяйской клетки, предложенные на роль регуляторов экспрессии MHC-I – сортирующие белки PACS-1 и PACS-2 (phosphofurin acidic cluster sorting protein) [15]. Используя тот же Nef-мотив (⁶²EEEE⁶⁵), PACS-1 способствует ускорению рециклизации MHC-I, рекрутируя эти молекулы в эндосомы; одновременно с этим PACS-2 направляет MHC-I в аппарат Гольджи [7]. Есть мнение [5], что Nef также использует механизм деградации обеих молекул (MHC-I и CD4)

с помощью лизосом, и хотя доказательств этого пока немного, обе модели не являются взаимоисключающими, и мультвалентные способности Nef вполне допускают такую возможность.

Наконец, Nef способен также оказывать ингибирующее влияние на продукцию корцепторов CCR5 и CXCR4 [14].

Nef и патогенез ВИЧ-инфекции. Наблюдения, касающиеся влияния Nef на патогенез ВИЧ-инфекции, в основном группировались вокруг двух видов исследований – прогрессирования инфекции и её патологических проявлений.

Главным объектом первой группы работ стали не-прогрессоры (LTNP) и элитные контроллеры, способные удерживать неопределяемый уровень вирусной нагрузки в отсутствие терапии ВИЧ-инфекции. Как оказалось, у этих пациентов действительно отмечаются многочисленные нарушения функции Nef. Следствием этого становится прежде всего отмена снижения экспрессии ключевых иммунных молекул – MHC-I и CD4, а значит, по крайней мере частичное восстановление цитотоксического ответа, снижение/отсутствие вирусной нагрузки и клиническое благополучие. Причиной нарушения функциональных свойств Nef могли быть как более или менее обширные делеции гена *nef*, так и единичные замены в его составе, среди которых отмечались мутации A84D, Y135F и G140R [16]. Кроме того, функционально дефектный ген мог содержать замены в составе мотивов ⁵⁶CAWLEAQ⁶¹ и ²²Rxx²⁴, а также полиморфизмы R25, RD35/36, T80, GL96/97, D108, D111, DW123/124, RY134/135, C142, EE154/155, LL164/165, DD174/175, RRE179, RF184/185 [2].

Вторая группа исследований была сосредоточена на поиске ассоциаций между структурой Nef и наличием/отсутствием специфических клинических проявлений иммунодефицита, связанных с ВИЧ-инфекцией. Образуясь в инфицированных клетках в значительных количествах, Nef не обладает способностью к секреции, однако в момент апоптоза клеток высвобождается во внеклеточное пространство, а затем в результате интернализации проникает практически во все компартменты и клетки организма и становится причиной множества патогенных эффектов.

Попадая таким образом в иммунные клетки, в макрофагах Nef ингибирует высвобождение свободных радикалов, являющихся важным фактором защиты от патогенов и опухолевых клеток [17]. В дендритных клетках Nef способствует формированию иммунологических синапсов с CD4⁺ Т-клетками, тем самым усиливая распространение вируса.

Растворимый Nef является важнейшим фактором нейротоксичности при ВИЧ-инфекции, и степень его влияния (вплоть до деменции) прямо связана со структурой белка [18]. Поиск мутаций, связанных с ВИЧ-ассоциированной деменцией (НАД), продемонстрировал очень тесную связь между её наличием и присутствием тех или иных аминокислот в положениях 83 (G – НАД либо A – non-НАД), 101 (Y либо H), 181 (V/M либо Q), а также 162, причём эта послед-

няя позиция содержала цистеин не только у вирусов, обнаруживаемых у пациентов с НАД, но и у большинства вирусов субтипа D, известных своей «агрессивностью» [18].

Ещё один вид патологии, достоверно ассоциированной с полиморфизмом Nef, – это сердечно-сосудистые нарушения, характерные для ВИЧ-инфекции. Известно, что Nef создает серьёзные помехи для функции эндотелия сосудов, разрушая клетки и формируя основу для атеросклероза. Интересно, что Nef способен проявлять и противоположный эффект, способствуя неоваскуляризации опухолевой ткани саркомы Капоши [19] у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Наиболее детальные исследования, выявившие значимые полиморфизмы Nef, относились к гипертензии легочной артерии [20] – частому проявлению ВИЧ-инфекции. У пациентов, имеющих эту патологию, достоверно чаще выявляли вирусы, имеющие замены в составе мотива PxxP (P150), а также единичные полиморфизмы L58V (CD4 downregulation), E63G (секвестрация MHC-I в аппарат Гольджи), Y81F (участок связывания протеинкиназы C) и некоторые другие.

Nef как потенциальная мишень антиретровирусной терапии. Описанные выше многочисленные активности Nef не позволяют сомневаться в том, что возможность ингибировать его функции могла бы стать большим успехом антиретровирусной терапии, а может быть, и внести заметный вклад в разработку стратегий излечения ВИЧ-инфекции, – в этом отношении на Nef возлагаются особенно большие надежды [7].

Работ, посвящённых созданию ингибиторов Nef, пока немного, однако их результаты, полученные в культуре клеток, дают основания надеяться на успешный исход. Так, на основе молекулярного моделирования разработан новый класс соединений DPPD (diphenylpyrazolodiazene), способных непосредственно связывать Nef и ингибировать репликацию ВИЧ в культуре клеток [21]. Совместно с российскими специалистами разрабатывается другой подход к ингибированию функции Nef, направленный на ограничение патогенного влияния этого белка ВИЧ на метаболизм холестерина и предотвращение атеросклероза [22]. Очевидно, что работы такого рода и в будущем будут проводиться в растущих масштабах.

Итак, структура белка Nef включает несколько функциональных участков, каждый из которых связан с выполнением одной или нескольких задач в обеспечении инфекционности и защиты вируса, и каждый из них может стать потенциальной мишенью для терапии ВИЧ-инфекции. Поиск особенностей генетических вариантов ВИЧ, способных повлиять на стратегию и тактику разработки таких препаратов, по нашему мнению, является важной задачей изучения ВИЧ-инфекции.

Появление в арсенале исследователей новых методов полногеномного секвенирования позволяет эффективно проводить анализ не только структурных генов *gag*, *pol* и *env*, но и всех других участков генома. Данная работа, основанная на применении указанных

методов, начинает серию статей, посвящённых анализу особенностей неструктурных белков генетических вариантов ВИЧ, характерных для эпидемии ВИЧ-инфекции в России.

Целью настоящего исследования был сравнительный анализ полиморфизмов в составе гена *nef* ВИЧ-1 суб-субтипа А6, доминирующего в России, и других генетических вариантов вируса, а также анализ потенциального влияния особенностей *Nef* на биологические и патогенные свойства вируса.

Материал и методы

В работе использованы образцы плазмы крови от ВИЧ-инфицированных пациентов из разных регионов России, ранее идентифицированные по гену *pol* как содержащие вирусы ВИЧ-1 суб-субтипа А6.

Для анализа были получены 47 полногеномных последовательностей вирусов А6 с применением технологии секвенирования MiSeq и наборов MiSeq reagent kits V2 (Illumina, США). Образцы анализировали путём массового параллельного секвенирования с помощью набора «АмплиСенс®HIV-Resist-NGS» согласно инструкции производителя (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Секвенирование образцов было выполнено с помощью MiSeq (Illumina) путём анализа четырёх перекрывающихся специфических фрагментов (общая протяжённость анализируемого фрагмента 704–9563 по HXB2).

Также для работы были подобраны праймеры для получения ампликонов области генома, кодирующей *Nef*, методом гнездовой полимеразной цепной реакции (ПЦР): два внешних праймера – *Nef1p* (5'GTAGCTGGGTGGACAGATAGGGTTAT 8688→8713) и *Nef1o* (5'GCACTCAAGGCAAGCTTTATTGAG GC 9632→9610) и два внутренних – *Nef2p* (5'ACATACCTAGgAGAATcAGACAGGGC 8749→8774) и *Nef2o* (5' CCGCGGAAAGTCCCTTGTCAG 9448→9431), после чего были получены и секвенированы 54 *Nef*-ампликона. Дополнительно для анализа использовали 32 полногеномные последовательности ВИЧ-1 суб-субтипа А6 из GenBank, полученные от пациентов из стран бывшего СССР. Для проведения сравнительного и филогенетического анализа было выгружено также из GenBank по 100 последовательностей суб-субтипа А1 и субтипа В. Были построены консенсусы последовательностей А6, А1 и В и проведён их сравнительный анализ с использованием онлайн-программ MEGA 6.0, MEGA 7.0 [27, 28] и отечественной программы UGENE [29]. Для филогенетического анализа была использована программа iqtree [30].

Результаты

В начале исследования был проведён филогенетический анализ последовательностей *nef* с использованием референс-последовательностей известных генетических вариантов ВИЧ-1 для подтверждения субтиповой принадлежности вирусов, предварительно определённой по последовательностям гена *pol*. Проведённый анализ подтвердил результаты пред-

варительного субтипирования и показал (рис. 2), что ген *nef* ВИЧ-1 суб-субтипа А6 имеет существенные различия с геном *nef* суб-субтипа А1, достаточные для образования отдельного субкластера в составе кластера субтипа А. На рис. 2 хорошо видны отдельные кластеры А1, А6 и В (4 образца субтипа С играют роль группы сравнения).

В ходе работы выполнен сравнительный анализ между всеми 133 аминокислотными последовательностями гена *nef* ВИЧ-1 суб-субтипа А6, 100 последовательностями суб-субтипа А1 и столько же – субтипа В. В качестве референс-штамма использовали HXB2 [31]. Для сравнения были построены консенсусные последовательности (участок гена *nef*, кодирующий 181 аминокислоту с 26-й по 206-ю позицию) всех анализированных генетических вариантов. От включения в консенсусы первых 25 аминокислот пришлось отказаться, так как в них содержится множество вставок.

Анализ консенсусных последовательностей суб-субтипа А6 не обнаружил заметных делеций и вставок как в участках, имеющих существенное функциональное значение, так и в прочих участках *nef*. Также не выявлено сколько-нибудь существенных отличий от референс-вариантов в отдельных позициях, находящихся в составе функционально значимых мотивов *nef* (см. табл. 1).

Дальнейший анализ касался сравнения индивидуальных аминокислотных позиций гена *nef* вирусов подтипа В и суб-субтипов А1 и А6 с референс-штаммом субтипа В HXB2. Результаты анализа представлены в табл. 2. В ней приводятся только те позиции, в которых частота аминокислотных замен существенно различалась между анализированными генетическими вариантами ВИЧ-1.

Как видно из данных табл. 2, в целом генетические отличия гена *nef* суб-субтипа А6 были заметно выражены, причём не только по отношению к вирусам субтипа В, но и применительно к близкородственному варианту А1 (например, в позициях А32Р, Е38D, I43V, А54D, Q104K, Н116N, Y120F, Y143F, V168M, Н192Т, V194R). Биологическое значение полиморфизмов в указанных позициях в литературе не упоминается, однако обращает на себя внимание высокая частота встречаемости некоторых замен, которые могут считаться характеристическими мутациями для варианта А6.

Некоторые распространённые замены в составе гена *nef* варианта А6 были связаны с известными из данной литературы эффектами; к ним относятся R35Q (90%), D108E (80%), Y135F (67%), E155K (90%), E182M (80%), R184K (94%) и F191L (88%), причём, если первые четыре из них типичны для подтипа А в целом, то последние три мутации в списке являются характеристическими только для А6-варианта.

Обсуждение

Из описанных во введении экспериментальных данных известно, что любые изменения в структуре исследованных доменов *Nef* отрицательно влияют на его функцию. Это может выражаться главным образом

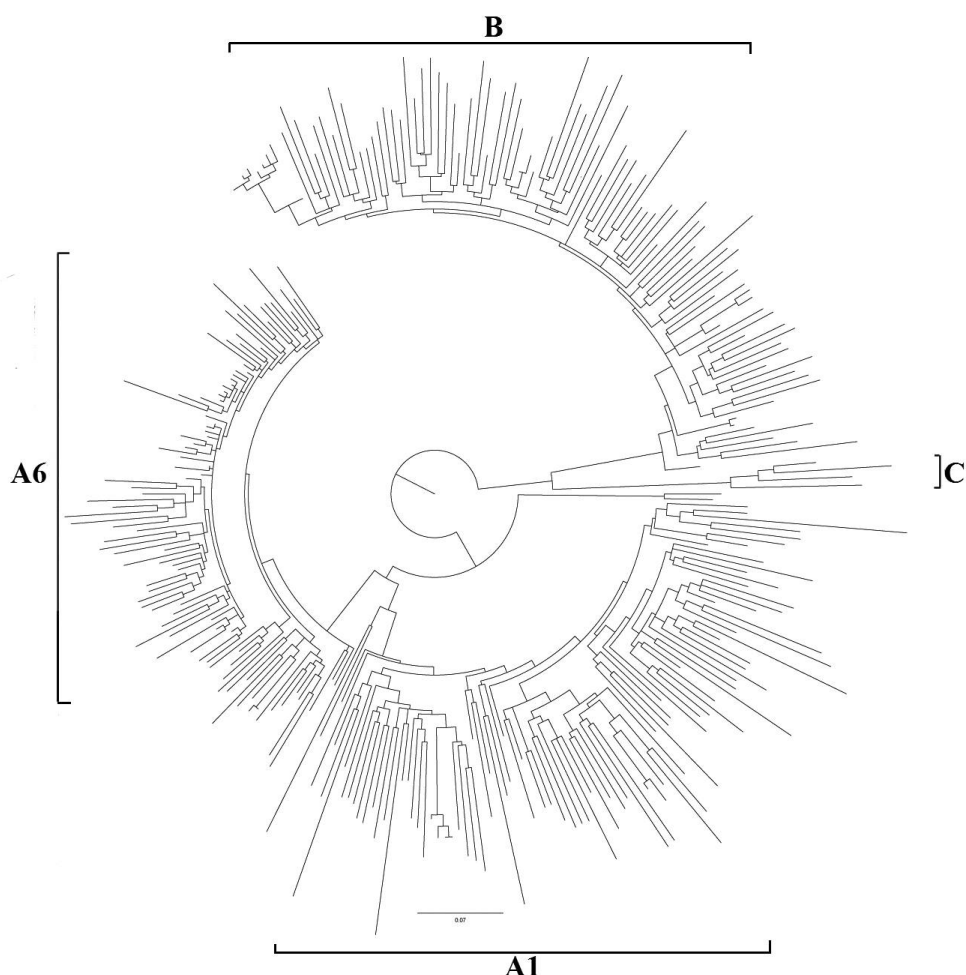


Рис. 2. Результаты филогенетического анализа последовательностей гена *nef* ВИЧ-1 методом максимального правдоподобия (maximum likelihood).

Модель для построения GTR+F+I+G4; бутстрэп-поддержка 4000; анализ проводился с применением программы iqtree.

в снижении инфекционных свойств вируса и уровне его продукции. В данном исследовании не обнаружено существенных дефектов в составе функционально значимых мотивов Nef, таких как делеции и вставки, и такой результат предсказуем, так как значительные дефекты гена неминуемо привели бы к критическому снижению всех его активностей и, как следствие, элиминации соответствующего варианта вируса. Также не было выявлено замен в составе этих мотивов, способных существенно нарушить их структуру и функцию.

Тем не менее в составе гена *nef* вирусов генетического варианта А6, типичного для эпидемии ВИЧ-инфекции в России, было обнаружено несколько характеристических замен, обращающих на себя внимание в связи с их потенциальной способностью влиять на биологические свойства этого вируса.

Большинство обнаруженных мутаций варианта А6 возникает в участках гена *nef*, ассоциированных с его свойством снижать уровень экспрессии CD4, а значит, потенциально может эту функцию серьезно нарушать. Мутация F191L способна вызывать дефект

взаимодействия Nef с PAK-2 и таким образом препятствовать нарушению цитоскелета клетки-мишени, что может отразиться как на эффективности инициации транскрипции LTR-промотора, так и на результатах почкования вирусных частиц. Совместное действие этих мутаций, по сути, является однонаправленным и теоретически может приводить к снижению продукции вируса.

Таким образом, на основании проведенного сравнительного молекулярно-генетического и филогенетического анализа были выявлены заметные отличия гена, кодирующего белок Nef у суб-субтипа А6, от такового у других генетических вариантов ВИЧ-1.

Обнаружены характеристические для А6 мутации, частота которых превышает 80%; набор этих мутаций позволяет с уверенностью отличить этот вариант ВИЧ-1 от прочих. Некоторые из этих мутаций затрагивают функционально значимые мотивы белка Nef и потенциально могут ограничивать его способность к репликации. Для прояснения действительного влияния полиморфизма Nef варианта А6 на инфекционность и репли-

Таблица 2.

Частота встречаемости мутаций (единичных замен)* в гене *nef* вариантов суб-субтипов A1, A6 и субтипа В ВИЧ-1

Мутация	Частота встречаемости, %			Мутация	Частота встречаемости, %			Мутация	Частота встречаемости, %		
	В	A1	A6		В	A1	A6		В	A1	A6
D28T	1	67	20	Q104K	3	19	87	L170Q	58	99	98
A32P	3	2	99	D108E	20	80	82	P176E	0	88	91
A33V	48	99	96	H116N	30	55	4	R178K	38	14	52
R35Q	9	96	90	Y120F	25	61	3	V180T	0	63	0
E38D	6	65	93	V133I	32	38	61	E182M	43	16	80
I43V	7	46	92	Y135F	31	66	67	E182K	0	33	7
T48I	4	74	0	Y143F	95	94	28	R184K	82	46	94
T51N	51	99	35	E149D	40	91	93	F191L	41	37	88
N52H	0	74	0	K152E	10	100	70	H192K	0	70	34
A53P	7	99	0	E155K	22	79	90	H192T	0	2	55
A54D	57	0	95	N157T	38	70	99	V194M	42	0	0
A54S	0	94	0	N161D	4	51	1	V194I	0	39	7
V85L	51	40	10	V168M	64	25	3	V194R	5	14	76
V85F	13	50	58	V168I	11	53	96				
Q104R	0	80	8	S169C	4	91	98				

Примечание. * Мутациями считали замены в указанных позициях в сравнении с референс-штаммом HXB2.

кативные свойства ВИЧ-1 необходимы исследования культуральных свойств вируса и анализ особенностей его поведения в условиях распространения в популяции и развития инфекции у пациентов.

Финансирование. Исследование проведено в рамках выполнения международного проекта CARE и поддержано Министерством науки и высшего образования (уникальный номер проекта RFMEFI61019X0020).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Saksena N.K., Ge Y.C., Wang B., Xiang S.H., Dwyer D.E., Randle C., et al. An HIV-1 infected long-term non-progressor (LTNP): molecular analysis of HIV-1 strains in the *vpr* and *nef* genes. *Ann. Acad. Med. Singapore*. 1996; 25(6): 848-54.
- Wang B. Viral factors in non-progression. *Front. Immunol.* 2013; 4: 355. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00355>
- Arhel N.J., Kirchhoff F. Implications of Nef: host cell interactions in viral persistence and progression to AIDS. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009; 339: 147-75. Doi: https://doi.org/10.1007/978-3-642-02175-6_8
- Basmaciogullari S., Pizzato M. The activity of Nef on HIV-1 infectivity. *Front. Microbiol.* 2014; 5: 232. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00232>
- Pereira E.A., daSilva L.L. HIV-1 Nef: Taking Control of Protein Trafficking. *Traffic*. 2016; 17(9): 976-96. Doi: <https://doi.org/10.1111/tra.12412>
- Jager S., Cimermanic P., Gulbahce N., Johnson J.R., McGovern K.E., Clarke S.C., et al. Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature*. 2011; 481(7381): 365-70. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature10719>
- Dekaban G.A., Dikeakos J.D. HIV-1 Nef inhibitors: a novel class of HIV-specific immune adjuvants in support of a cure. *AIDS Res. Ther.* 2017; 14(1): 53. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12981-017-0175-6>
- Van den Broeke C., Radu M., Chernoff J., Favoreel H.W. An emerging role for p21-activated kinases (Paks) in viral infections. *Trends Cell Biol.* 2010; 20(3): 160-9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.12.005>
- Stolp B., Fackler O.T. How HIV takes advantage of the cytoskeleton in entry and replication. *Viruses*. 2011; 3(4): 293-311. Doi: <https://doi.org/10.3390/v3040293>
- Sourisseau M., Sol-Foulon N., Porrot F., Blanchet F., Schwartz O. Inefficient human immunodeficiency virus replication in mobile lymphocytes. *J. Virol.* 2007; 81(2):1000-12. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01629-06>
- Vermeire J., Vanbillemont G., Witkowski W., Verhasselt B. The Nef-infectivity enigma: mechanisms of enhanced lentiviral infection. *Curr. HIV Res.* 2011; 9(7): 474-89. Doi: <https://doi.org/10.2174/157016211798842099>
- Rosa A., Chande A., Ziglio S., De Sanctis V., Bertorelli R., Goh S.L., et al. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature*. 2015; 526(7572): 212-7. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature15399>
- Lama J. The physiological relevance of CD4 receptor down-modulation during HIV infection. *Curr. HIV Res.* 2003; 1(2): 167-84. Doi: <https://doi.org/10.2174/1570162033485276>
- Toyoda M., Ogata Y., Mahiti M., Maeda Y., Kuang X.T., Miura T., et al. Differential Ability of Primary HIV-1 Nef Isolates To Down-regulate HIV-1 Entry Receptors. *J. Virol.* 2015; 89(18): 9639-52. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01548-15>
- Dikeakos J.D., Thomas L., Kwon G., Elferich J., Shinde U., Thomas G. An interdomain binding site on HIV-1 Nef interacts with PACS-1 and PACS-2 on endosomes to down-regulate MHC-I. *Mol. Biol. Cell.* 2012; 23(11): 2184-97. Doi: <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-11-0928>
- Lewis M.J., Lee P., Ng H.L., Yang O.O. Immune selection in vitro reveals human immunodeficiency virus type 1 Nef sequence motifs

- important for its immune evasion function in vivo. *J. Virol.* 2012; 86(13): 7126-35.
Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00878-12>
17. Olivetta E., Arenaccio C., Manfredi F., Anticoli S., Federico M. The Contribution of Extracellular Nef to HIV-Induced Pathogenesis. *Curr. Drug Targets.* 2016; 17(1): 46-53.
Doi: <https://doi.org/10.2174/1389450116666151001110126>
 18. Lamers S.L., Poon A.F., McGrath M.S. HIV-1 nef protein structures associated with brain infection and dementia pathogenesis. *PLoS One.* 2011; 6(2): e16659.
Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016659>
 19. Anand A.R., Rachel G., Parthasarathy D. HIV Proteins and Endothelial Dysfunction: Implications in Cardiovascular Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* 2018; 5: 185.
Doi: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00185>
 20. Almodovar S., Knight R., Allshouse A.A., Roemer S., Lozupone C., McDonald D., et al. Human Immunodeficiency Virus nef signature sequences are associated with pulmonary hypertension. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2012; 28(6): 607-18.
Doi: <https://doi.org/10.1089/AID.2011.0021>
 21. Emert-Sedlak L.A., Loughran H.M., Shi H., Kulp J.L., Shu S.T., Zhao J., et al. Synthesis and evaluation of orally active small molecule HIV-1 Nef antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016; 26(5): 1480-4.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.01.043>
 22. Hunegnaw R., Vassilyeva M., Dubrovsky L., Pushkarsky T., Sviridov D., Anashkina A.A., et al. Interaction Between HIV-1 Nef and Calnexin: From Modeling to Small Molecule Inhibitors Reversing HIV-Induced Lipid Accumulation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2016; 36(9): 1758-71.
Doi: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307997>
 23. Corro G., Rocco C.A., De Candia C., Catano G., Turk G., Mangano A., et al. Genetic and functional analysis of HIV type 1 nef gene derived from long-term nonprogressor children: association of attenuated variants with slow progression to pediatric AIDS. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2012; 28(12): 1617-26.
Doi: <https://doi.org/10.1089/AID.2012.0020>
 24. Foster J.L., Denial S.J., Temple B.R., Garcia J.V. Mechanisms of HIV-1 Nef function and intracellular signaling. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2011; 6(2): 230-46.
Doi: <https://doi.org/10.1007/s11481-011-9262-y>
 25. O'Neill E., Kuo L.S., Krisko J.F., Tomchick D.R., Garcia J.V., Foster J.L. Dynamic evolution of the human immunodeficiency virus type 1 pathogenic factor, Nef. *J. Virol.* 2006; 80(3): 1311-20.
Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.80.3.1311-1320.2006>
 26. Usmani S.M., Murooka T.T., Deruaz M., Koh W.H., Sharaf R.R., Di Pilato M., et al. HIV-1 Balances the Fitness Costs and Benefits of Disrupting the Host Cell Actin Cytoskeleton Early after Mucosal Transmission. *Cell. Host Microbe.* 2019; 25(1): 73-86.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.008>
 27. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870-4. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
 28. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30(12): 2725-9.
Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
 29. Golosova O., Henderson R., Vaskin Y., Gabrielian A., Grekhov G., Nagarajan V., et al. Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and ChIP-seq data analyses. *PeerJ.* 2014; 2: e644.
Doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.644>
 30. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(1): 268-74.
Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
 31. Ratner L., Haseltine W., Patarca R., Livak K.J., Starcich B., Josephs S.F., et al. Complete Nucleotide-Sequence of the AIDS Virus, HTLV-III. *Nature.* 1985; 313(6000): 277-84.
Doi: <https://doi.org/10.1038/313277a0>

Поступила 21.11.19

Принята в печать 28.11.19