

УДК 577.151.45:578.287

# Консенсусная интеграна нового генетического варианта CRF63\_02A1 ВИЧ-1

Ю. Ю. Агапкина<sup>1,2</sup>, М. А. Пустоварова<sup>1,2</sup>, С. П. Королев<sup>1,2</sup>, Д. П. Зырянова<sup>3</sup>, В. В. Ивлев<sup>3</sup>, А. В. Тотменин<sup>3</sup>, Н. М. Гашникова<sup>3</sup>, М. Б. Готтих<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы 1, стр. 3

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы 1, стр. 40

<sup>3</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, Кольцово Новосибирской обл.

\*E-mail: gottikh@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 12.10.2018

Принята к печати 21.01.2019

**РЕФЕРАТ** Высокая генетическая изменчивость вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) приводит к постоянному появлению новых генетических вариантов, к числу которых относится рекомбинантный вирус CRF63\_02A1, широко распространенный на территории Сибирского федерального округа России. Нами изучена интеграна CRF63\_02A1 ВИЧ-1, катализирующая встраивание вирусной ДНК в геном инфицированной клетки. Проведен дизайн консенсусной последовательности, получен препарат рекомбинантной интеграты и охарактеризована ее ДНК-связывающая и каталитическая активность. Стабильность комплекса интеграты CRF63\_02A1 с ДНК-субстратом такая же, как у комплексов интеграт подтипов А и В, однако скорость его образования существенно выше. Более высокими оказались скорости и эффективности реакций, катализируемых этой интегратой: 3'-процессинга и переноса цепи. Это может быть связано с характерными для интеграты CRF63\_02A1 аминокислотными заменами в N-концевом домене, играющем важную роль в мультимеризации фермента и его связывании с ДНК-субстратом. Установлено также, что мутации лекарственной устойчивости Q148K/G140S и G118R/E138K существенно снижают каталитическую активность интеграты CRF63\_02A1 и ее чувствительность к ингибитору интеграции ралтегравиру. При этом наиболее сильное снижение чувствительности обеспечивает двойная мутация Q148K/G140S.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** вирус иммунодефицита человека, генетический вариант CRF63\_02A1, интеграна, ингибитор переноса цепи, мутации лекарственной устойчивости.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека типа 1; ИН – интеграна; ИН\_CRF – консенсусная интеграна генетического варианта CRF63\_02A1 ВИЧ-1; ИН\_A – консенсусная интеграна подтипа А ВИЧ-1 штамма FSU-A; ИН\_B – интеграна подтипа В ВИЧ-1 штамма НХВ-2; CRF – циркулирующие рекомбинантные формы ВИЧ-1; URF – уникальные рекомбинантные формы ВИЧ-1; IC<sub>50</sub> – концентрация ингибитора, подавляющая активность фермента на 50%; FC – изменение величины IC<sub>50</sub> мутантных белков по сравнению с диким типом; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ДСН – додецилсульфат натрия; ПААГ – полиакриламидный гель; ДТТ – дитиотреитол.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) обладает высокой генетической изменчивостью, что приводит к существованию различных его подтипов, циркулирующих рекомбинантных форм (CRF) и уникальных рекомбинантных форм (URF) [1]. Широкое разнообразие генетических вариантов ВИЧ-1 формируется за счет высокой скорости

репликации, склонности к рекомбинации и ошибок в работе обратной транскриптазы [2–4]. Различные подтипы ВИЧ-1 имеют определенное географическое распределение. На территории бывшего СССР преобладает подтип А [5, 6], но присутствуют и различные CRF [7–9]. С 2010–2012 гг. на территориях страны с наибольшими темпами развития эпидемии – Кемеровской, Новосибирской, Томской обла-

стей, Алтайского края – доминирует генетический вариант CRF63\_02A1 [10–12], который из-за своего быстрого распространения нуждается в углубленном изучении.

Важным этапом исследования новой формы вируса является характеристика его ферментов, один из которых – интегразы (ИН), катализируют встраивание вирусной ДНК в геном зараженной клетки [13]. В клинической практике используют три ингибитора ИН: ралтегравир, элвитегравир и долутегравир [14], к которым, однако, развивается устойчивость вируса [15, 16]. Известно, что как мутации лекарственной устойчивости, так и механизмы их возникновения у вирусов разных подтипов могут различаться [17–22]. В этой связи актуально изучение влияния естественного полиморфизма ИН на ее свойства.

В настоящей работе охарактеризована ИН генетического варианта CRF63\_02A1 ВИЧ-1 (ИН\_CRF) и проведено ее сравнение с ИН ВИЧ-1 подтипа А (ИН\_А), также широко распространенного на территории России. Работа включает изучение влияния структурных различий между ферментами на их ДНК-связывающую и каталитическую активность. Изучено также влияние мутаций устойчивости к применяемым на практике ингибиторам интеграции на каталитическую и ДНК-связывающую активности ИН\_CRF, а также на ее чувствительность к ингибитору ралтегравир.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Дизайн консенсусной последовательности ИН\_CRF

Подтип ВИЧ-1 определяли с использованием филогенетического, рекомбинационного анализа как описано ранее [10, 11, 23]. Консенсусная последовательность ИН создана с использованием программного обеспечения BioEdit (Ibis Biosciences, США).

РНК ВИЧ-1 выделяли с использованием набора РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ (АО «Вектор-Бест», Россия) из 250 мкл двух клинических образцов плазмы крови пациентов, инфицированных вирусом, у которого ген ИН имеет максимальное сходство с рассчитанной консенсусной нуклеотидной последовательностью гена ИН\_CRF. Кодирующие ИН фрагменты ДНК размером 878 п.н., дополненные сайтами рестрикции для последующего клонирования, получали с помощью ОТ-ПЦР, используя коммерческий набор LongRange 2Step RT-PCR (Qiagen, США).

### Получение вектора для экспрессии ИН\_CRF

Фрагменты ДНК, кодирующие ИН\_CRF, встраивали в плазмиду pCR\_2.1Торо с использованием коммерческого набора ТОРО® TA Cloning® Kit

(pCR™2.1-ТОРО®, Thermo Fisher Scientific Inc., США). Плазмидную ДНК из плазмид pCR\_2.1Торо\_ИН, по 30 мкг для каждого образца ВИЧ-1, выделяли с помощью коммерческого набора Plasmid Purification Mini Kit (Qiagen, США). По результатам секвенирования гена ИН выбрана плазида pCR\_2.1Торо\_ИН\_CRF\*, содержащая последовательность ИН, отличающуюся от консенсусной двумя аминокислотными заменами, для субклонирования в экспрессирующий вектор pET\_15b, в структуру которого включен гистидиновый таг (His-tag) (Novagen, США).

Вектор pET\_15b\_ИН\_CRF с консенсусной последовательностью ИН\_CRF получали, последовательно вводя мутации, приводящие к аминокислотным заменам I32V и I259V в вектор pET-15b\_ИН\_CRF\*. Конструкции, кодирующие ИН с заменами Q148K/G140S и G118R/E138K, получали сайт-направленным мутагенезом плазмиды pET\_15b\_ИН\_CRF с использованием набора QuikChange II Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies, США).

Плазида pET\_15b, содержащая ген консенсусной ИН\_А, любезно предоставлена М.Г. Беликовой-Исагулянц (НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, Россия).

### Получение рекомбинантных белков

Препараты белков ИН\_А и ИН\_CRF с консенсусными последовательностями и с мутациями Q148K/G140S и G118R/E138K выделяли из клеток штамма-продуцента Rosetta (DE3) *Escherichia coli* и очищали согласно [24, 25]. Белки анализировали методом электрофореза в 12% ПААГ по Лэммли с последующим окрашиванием SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen, США).

### Олигодезоксирибонуклеотиды

Олигодезоксирибонуклеотиды U5B (5'-GTGTGGA-AAATCTCTAGCAGT-3'), U5B с остатком флуоресцеина на 5'-конце (5'-F1-U5B), U5B-2 (5'-GTGTGGA-AAATCTCTAGCA-3') и U5A (5'-ACTGCTAGAGATTTTCCACAC-3'), формирующие ДНК-субстраты ИН, и все праймеры («ДНК-синтез», Россия).

Радиоактивную <sup>32</sup>P-метку вводили на 5'-конец олигонуклеотидов U5B и U5B-2 и формировали ДНК-субстраты ИН как описано в [25].

### Анализ ДНК-связывающей активности интегразы

Изучение скорости связывания ИН с ДНК-субстратом методом поляризации флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) по методике [26]. Дуплекс 5'-F1-

U5B/U5A (10 нМ) смешивали с 100 нМ ИН в 200 мкл буфера А (20 мМ HEPES (pH 7.2), 10 мМ DTT, 7.5 мМ MgCl<sub>2</sub>) и измеряли значения поляризации флуоресценции флуоресцеина ( $\lambda_{ex} = 492$  нм,  $\lambda_{em} = 520$  нм) через определенные промежутки времени при 25°C. Строили кривую зависимости изменения поляризации флуоресценции от времени и определяли константу скорости связывания ( $k_{on}$ ) ИН с субстратом согласно уравнению  $[IN/DNA] = [DNA]_0 \times (1 - e^{-k_{on}t})$  [27].

Определение  $K_d$  комплекса ИН с субстратом проводили методом DRaCALA (Differential Radial Capillary Action of Ligand Assay) [28]. Дуплекс 5'-<sup>32</sup>P-U5B/U5A (5 нМ) инкубировали с ИН в концентрации от 0 до 500 нМ в 10 мкл буфера А в течение 20 мин при 25°C. По 5 мкл смеси наносили на нитроцеллюлозную мембрану Amersham™ Hybond™-ECL. Мембрану визуализировали на приборе Typhoon FLA 9500 PhosphorImager (Molecular Dynamics, США).

#### Определение каталитической активности интегразы

Для реакции 3'-концевого процессинга 5 нМ дуплекс 5'-<sup>32</sup>P-U5B/U5A инкубировали со 100 нМ ИН в буфере А как описано в [25]. ДНК осаждали и анализировали электрофорезом в 20% денатурирующем ПААГ. Гель визуализировали на приборе Typhoon FLA 9500 PhosphorImager (Molecular Dynamics, США). По соотношению интенсивностей излучения полос, соответствующих U5B и U5B-2, определяли эффективность процессинга с использованием программы Quantity One 4.6.6. (Bio-Rad Laboratories, США).

При анализе кинетики накопления продуктов 3'-процессинга реакционную смесь инкубировали при 37°C от 5 мин до 7 ч, строили графики зависимости эффективности реакции от времени, определяли начальную скорость реакции по углу наклона начального участка кривой (~60 мин).

Зависимость эффективности 3'-процессинга от концентрации субстрата определяли, варьируя концентрацию ДНК (0; 2.5; 4; 10; 20; 50; 100 нМ). Строили графики зависимости эффективности реакции от концентрации субстрата, определяли максимальную скорость реакции ( $V_{max}$ ) и константу Михаэлиса ( $K_M$ ).

Для реакции переноса цепи 10 нМ ДНК-дуплекс [5'-<sup>32</sup>P]-U5B-2/U5A инкубировали со 100 нМ ИН в буфере А в течение 2 и 4 ч при 37°C. Выделение и анализ продуктов реакции проводили как описано выше.

#### Ингибирование переноса цепи

Реакцию переноса цепи проводили как описано выше в течение 2 ч в присутствии возрастающих

концентраций ингибитора (ралтегравир, Santa Cruz Biotechnology Inc., США). По результатам трех независимых экспериментов определяли значение IC<sub>50</sub>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Дизайн консенсусной последовательности ИН\_CRF и получение белка

Последовательности гена ИН получены из 324 образцов ВИЧ-1, выделенных на территориях Сибирского (250) и Уральского (74) федеральных округов России от ВИЧ-инфицированных, не получавших антиретровирусную терапию. Филогенетический анализ показал, что выборка вирусных последовательностей, включенных в исследование, содержала генетические варианты подтипов А (24.3%) и В (3.3%), а также рекомбинантные формы CRF63\_02A1 (55.3%) и различные URF, образованные в результате вторичной рекомбинации вирусов CRF63\_02A1 и подтипа А (6.7%).

Проведено множественное выравнивание идентифицированных нуклеотидных последовательностей ИН\_CRF, трансляция, построение аминокислотной консенсусной последовательности и ее выравнивание с последовательностями ИН подтипов А и В (рис. 1). Обнаружены мутации, характерные для этого геноварианта вируса: E11D (в 93.8% случаев), K14R (81.3%), S24N (100%) и M50I (75%). Замена L74I, специфичная для ИН\_A, найдена лишь в 4% случаев ИН\_CRF.

Среди исследованных последовательностей ВИЧ-1 отобран вариант, последовательность ИН у которого максимально близка к консенсусной ИН\_CRF ВИЧ-1. Нарботка целевого фрагмента ДНК ИН\_CRF и последовательные клонирования позволили получить экспрессирующий вектор pET-15b\_ИН\_CRF\*, введение замен I32V и I259V в который привело к получению вектора pET-15b\_ИН\_CRF с консенсусной последовательностью ИН. На его основе получены конструкции, содержащие мутации лекарственной устойчивости, – G118R/E138K и Q148K/G140S. Полученные векторы использовались для прокариотической экспрессии белков с последующей очисткой на Ni-NTA-агарозе. Степень чистоты полученных препаратов ИН не менее 90% (рис. 2).

### Характеристика ДНК-связывающей активности ИН\_CRF

Ретровирусные интегразы в процессе функционирования связываются с концами вирусной ДНК, а затем взаимодействуют с клеточной ДНК, причем последнее взаимодействие не является специфичным к последовательности [29]. Рекомбинантная ИН ВИЧ-1 обычно имеет одинаковое сродство к ДНК-дуплексам

ИН_CRF63_02A1	FLDGIDKAQE	<u>D</u> HE <u>R</u> YHSNWR	AMAN <u>D</u> FNLP	IVAKEIVASC	DKCQLKGEA <u>I</u>
ИН_A	FLEGIDKAQE	EHEKYHSNWK	AMASDFNLPP	IVAKEIVASC	DKCQLKGEAM
ИН_B	FLDGIDKAQE	EHEKYHSNWR	AMASDFNLPP	<u>V</u> VAKEIVASC	DKCQLKGEAM
N-концевой домен					
ИН_CRF63_02A1	HGQVDCSPGI	WQLDCTHLEG	<u>K</u> IILVAVHVA	SGYIEAEVIP	AETGQETAYF
ИН_A	HGQVDCSPGI	WQLDCTHLEG	<u>K</u> VIIIVAVHVA	SGYIEAEVIP	AETGQETAYF
ИН_B	HGQVDCSPGI	WQLDCTHLEG	<u>K</u> VILVAVHVA	SGYIEAEVIP	AETGQETAYF
ИН_CRF63_02A1	LLKLAGRWPV	KVVHTDNG <u>P</u> N	FTSSAVKAAC	WWANIQQE <u>E</u> FG	IPYNPQS <u>Q</u> GV
ИН_A	LLKLAGRWPV	KVVHTDNG <u>P</u> N	FTSSAVKAAC	WWANIQQE <u>E</u> FG	IPYNPQS <u>Q</u> GV
ИН_B	LLKLAGRWPV	<u>K</u> TVHTDNG <u>S</u> N	FTSTTVKAAC	WWAGIKQ <u>E</u> FG	IPYNPQS <u>Q</u> GV
ИН_CRF63_02A1	VESMNKELKK	IIGQVRDQAE	HLKTAVQMAV	FIHNFKRKGG	IGGYSAGERI
ИН_A	VESMNKELKK	IIGQVR <u>E</u> QAE	HLKTAVQMAV	FIHNFKRKGG	IGGYSAGERI
ИН_B	<u>I</u> ESMNKELKK	IIGQVRDQAE	HLKTAVQMAV	FIHNFKRKGG	IGGYSAGERI
ИН_CRF63_02A1	IDIIATDIQT	KELQKQI <u>T</u> KI	QNFRVYRDS	RDPIWKGPAK	LLWKGEAVV
ИН_A	IDIIATDIQT	KELQKQI <u>I</u> KI	QNFRVYRDS	RDPIWKGPAK	LLWKGEAVV
ИН_B	<u>V</u> DIIATDIQT	KELQKQI <u>T</u> KI	QNFRVYRDS	RDPVWKGPAK	LLWKGEAVV
ИН_CRF63_02A1	IQDNNDIKVV	PRRKAKIIRD	YGKQAGDDC	VASRQDED	
ИН_A	IQDNNDIKVV	PRRKAKIIRD	YGKQAGDDC	VASRQDED	
ИН_B	IQDN <u>S</u> DIKVV	PRRKAKIIRD	YGKQAGDDC	VASRQDED	

Рис. 1. Аминокислотные последовательности ИН\_CRF, ИН\_A и ИН\_B. Аминокислотные остатки, характерные для ИН\_CRF, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты, для других подтипов подчеркнуты; прямоугольниками показаны аминокислоты, мутации которых приводят к появлению лекарственной устойчивости вируса, красным цветом – аминокислоты каталитического домена

разной структуры [30]. Мы оценивали способность ИН\_CRF связывать 21-звенный ДНК-субстрат, представляющий собой концевую последовательность участка U5 LTR вирусной ДНК. Параллельно проводили эксперименты с ИН\_A.

Стабильность комплексов определяли методом DRaCALA (Differential Radial Capillary Action of Ligand Assay) [28], ранее успешно использованным для характеристики комплексов ИН\_B с ДНК [31]. Значения  $K_d$  комплексов ИН/ДНК оказались сравнимыми в случае ИН\_CRF и ИН\_A (рис. 3А и табл. 1), а также ИН\_B [32].

Кинетику связывания ИН с субстратом изучали с помощью метода поляризации флуоресценции. В качестве ДНК-субстрата использовали флуоресцентно меченный дуплекс 5'-F1-U5B/U5A. Скорость связывания ДНК у ИН\_CRF оказалась выше, чем у ИН\_A, константы скорости связывания ( $k_{on}$ ) у них различались в 2.8 раза (рис. 3Б и табл. 1). При этом константа скорости связывания  $k_{on}$  для ИН\_A ( $0.24 \text{ мин}^{-1}$ ) близка к значению, полученному ранее для ИН\_B ( $0.18 \text{ мин}^{-1}$ ) [27].

Последовательности ИН подтипов А и В ВИЧ-1 отличаются 16 аминокислотными остатками, из которых 11 находятся в каталитическом, два – в С-концевом и три – в N-концевом домене, причем последние три замены синонимичные: D3E, R20K, V31I (рис. 1). ИН\_CRF отличается от ИН\_A

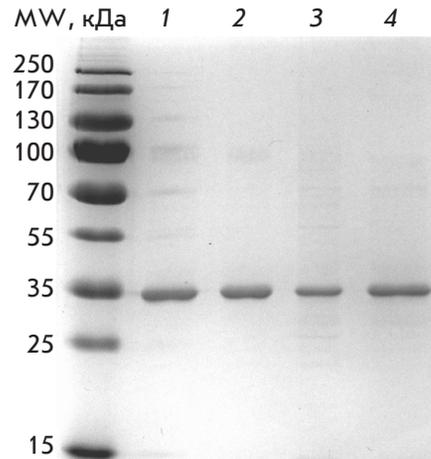
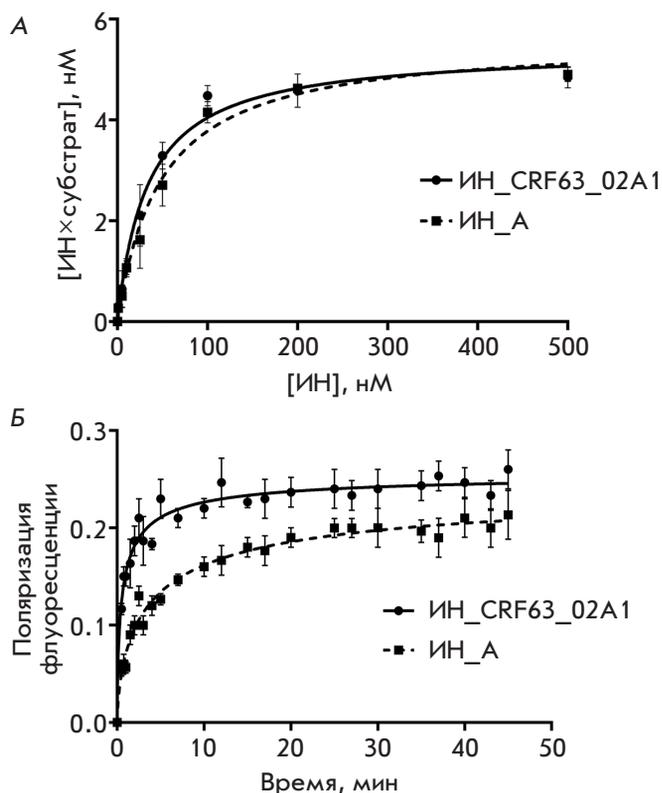


Рис. 2. Разделение препаратов консенсусной ИН\_CRF и ее мутантных форм G118R/E138K и Q148K/G140S электрофорезом в ДСН-ПААГ по Лэммли. 1 – ИН\_CRF; 2 – ИН\_A; 3 – ИН\_CRF (G118R/E138K); 4 – ИН\_CRF (Q148K/G140S); MW – маркер молекулярных масс

и ИН\_B 4 уникальными аминокислотными заменами E11D, K14R, S24N и M50I в N-концевом домене (рис. 1). Учитывая, что скорости связывания ДНК-субстрата с ИН\_A и ИН\_B сравнимы, а с ИН\_CRF существенно различаются, можно предположить,



**Рис. 3.** Сравнение ДНК-связывающих активностей ИИ\_CRF и ИИ\_А. Приведены средние значения как минимум трех независимых измерений, при которых стандартное отклонение не превышало 15%. А – зависимость концентрации комплекса ИИ/ДНК-субстрат от концентрации ИИ. Б – кинетика изменения поляризации флуоресценции ДНК-субстрата при связывании с ИИ\_CRF и ИИ\_А

что на эту скорость влияет главным образом структура N-концевого домена ИИ. Этот домен определяет мультимерное состояние ИИ, важное для ее каталитической активности [33], и участвует в связывании ИИ с ДНК-субстратом (вирусной ДНК) [34–36]. В структуре ИИ\_CRF в первую очередь обращают на себя внимание замены S24N и M50I. Наличие амидной группы в Asn и разветвленной цепи Ile может влиять на межсубъединичные взаимодействия при образовании каталитически активного состояния ИИ. Помимо этого, K14 непосредственно контактирует с вирусной ДНК и играет важную роль в процессе мультимеризации ИИ [35, 37]. В ИИ\_CRF в положении 14 вместо Lys находится Arg. Хотя обе эти аминокислоты положительно заряжены, остаток Arg более объемный, менее гидрофобный и обладает более высоким рКа, чем Lys [38, 39]. Для Arg также характерна делокализация положительного заряда

**Таблица 1.** ДНК-связывающая и каталитическая активности ИИ\_CRF и ИИ\_А

Характеристика	ИИ_CRF	ИИ_А
$K_d$ , нМ	23±6	25±7
$k_{on}$ , мин <sup>-1</sup> *	0.69±0.09	0.24±0.02
Относительная эффективность 3'-процессинга, %**	100	71
$V_0$ (3'-процессинг), пмоль/мин*	19.3±2.1	9.8±2.3
$V_{max}$ , пМ/мин*	26±1	16±1
$K_M$ , нМ*	2.6±0.3	4.6±0.8
$V_{max}/K_M \times 10^3$ , мин <sup>-1</sup> *	10±1	3.5±0.6
Относительная эффективность переноса цепи, %**	100	77
$V_0$ (перенос цепи), пмоль/мин*	11.4±3.2	6.5±2.8

Примечание. Приведены средние значения как минимум трех независимых измерений со стандартным отклонением.

\* $P \leq 0.05$ .

\*\*Эффективность реакции через 300 мин относительно эффективности реакции для консенсусной ИИ\_CRF, принятой за 100%.

по гуанидиновой группировке и возможность образования множественных водородных связей в разных направлениях [40, 41], что может способствовать связыванию ДНК-субстрата.

Таким образом, аминокислотные замены, в силу природного полиморфизма присущие ИИ\_CRF, не сказываются на стабильности ее комплекса с ДНК-субстратом, но при этом существенно влияют на скорость его образования.

### Характеристика каталитической активности ИИ\_CRF

В процессе репликации вируса ИИ осуществляет две последовательные реакции: 3'-концевой процессинг, при котором происходит отщепление динуклеотида GT с 3'-концов вирусной ДНК, и перенос цепи, который заключается во встраивании процессированной вирусной ДНК в клеточную ДНК. Обе эти реакции можно имитировать *in vitro* по стандартным методикам [25]. Для проведения реакции 3'-процессинга в качестве аналога вирусной ДНК использован стандартный дуплекс [5'-<sup>32</sup>P]-U5B/U5A, радиоактивно меченный по 5'-концу процессируемой цепи U5B, которая в результате реакции превращалась в продукт, укороченный на два нуклеотида. В реакции переноса цепи в качестве и субстрата, и мишени использовался дуплекс [5'-<sup>32</sup>P]-U5B-2/U5A, в котором

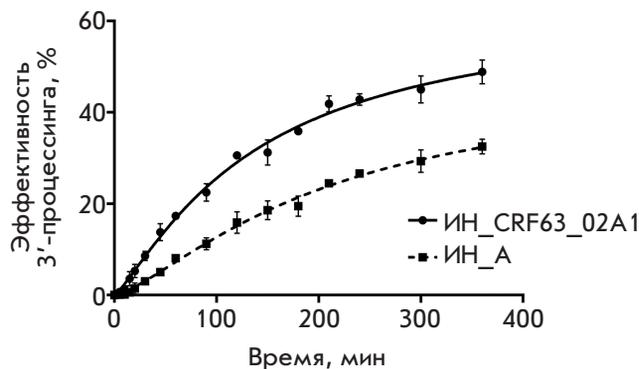


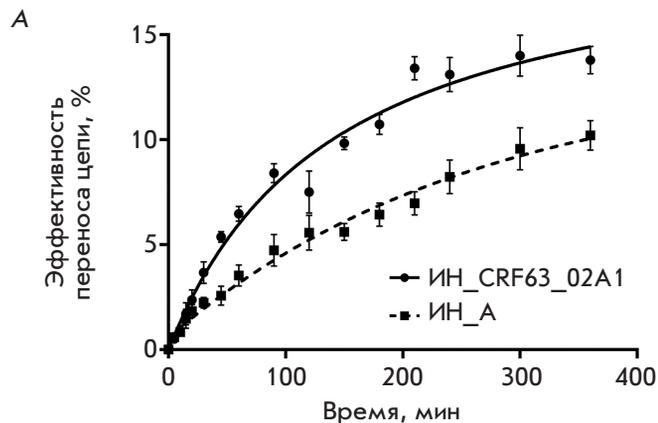
Рис. 4. Зависимость эффективности реакции 3'-процессинга, катализируемой ИН\_CRF и ИН\_A, от времени. Приведены средние значения как минимум трех независимых измерений, при которых стандартное отклонение не превышало 15%

цепь U5B уже была укорочена на два нуклеотида (U5B-2).

Изучение кинетики 3'-процессинга показало, что ИН\_CRF эффективнее и быстрее процессирует свой субстрат, чем ИН\_A (рис. 4, табл. 1). С целью более детального выяснения причин увеличения эффективности реакции были определены кинетические параметры реакции 3'-процессинга:  $K_M$  и  $V_{max}$ .

Оказалось, что  $K_M$  для ИН\_CRF в 1.8 раза ниже, а  $V_{max}$  в 1.6 раза выше, чем для ИН\_A (табл. 1). Следовательно, для ИН\_CRF характерна более высокая скорость 3'-процессинга, но достигается она при более низких значениях концентрации субстрата. Соответственно параметр каталитической эффективности ( $V_{max}/K_M$ ) для ИН\_CRF оказался почти втрое выше, чем для ИН\_A (табл. 1). Мы полагаем, что столь высокая активность ИН\_CRF не может объясняться только более высокой скоростью связывания субстрата (рис. 3), тем более что константы диссоциации комплексов с ДНК у обоих ферментов практически одинаковы. Как уже упоминалось ранее, N-концевой домен ИН отвечает за ее мультимерное состояние, которое изменяется при связывании ИН с ДНК-субстратом [42, 43], в результате чего формируется каталитически активный фермент-субстратный комплекс. Возможно, присутствующие в N-концевом домене ИН\_CRF аминокислотные замены способствуют образованию такого комплекса, стимулируя тем самым более эффективное протекание реакции.

При изучении реакции переноса цепи определяли эффективность и скорость реакции, а также характер образуемых продуктов, отражающий место встраивания субстрата в ДНК-мишень.



Б

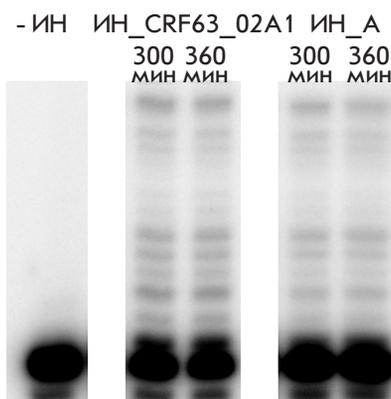


Рис. 5. Характеристика реакции переноса цепи, катализируемой ИН\_CRF и ИН\_A. А – кинетика реакции переноса цепи. Приведены средние значения как минимум трех независимых измерений, при которых стандартное отклонение не превышало 15%. Б – продукты реакции переноса цепи в случае ИН\_CRF и ИН\_A (электрофоретический анализ продуктов реакции через 300 и 360 мин)

Эффективность и скорость переноса цепи вновь оказались выше у ИН\_CRF, а характер продуктов был одинаковым (рис. 5). ИН\_A и ИН\_B различались характером продуктов переноса цепи [25]. Разные профили продуктов этой реакции могут наблюдаться, если по-разному формируется комплекс ИН с ДНК-мишенью, в которую происходит встраивание субстрата. В связывании ДНК-мишени участвуют каталитический и особенно С-концевой домены ИН [36], которые у ИН\_A и ИН\_CRF имеют близкую структуру и существенно отличаются от ИН\_B (рис. 1). Таким образом, в комплексе с ИН\_CRF ДНК-мишень располагается аналогичным с ИН\_A образом, но отличается от расположения в комплексе ДНК с ИН\_B.

Таблица 2. ДНК-связывающая и каталитическая активности, а также устойчивость к ралтегравиру ИН\_CRF, ИН\_A, их мутантных форм Q148K/G140S, G118R/E138K

Характеристика	ИН_CRF			ИН_A		
	консенсус	Q148K/ G140S	G118R/ E138K	Консенсус	Q148K/ G140S*	G118R/ E138K*
$K_d$ , нМ	23±6	28±9	25±5	25±7	н.о.	н.о.
$V_0$ (3'-процессинг), пмоль/мин	19.3±2.1	2.7±0.4	5.6±1.2	9.8±2.3	2.6±0.1	2.6±0.4
Относительная эффективность 3'-процессинга, %	100	22	31	100	25	24
Относительная эффективность переноса цепи, %	100	27	22	100	20	23
Ралтегравир IC <sub>50</sub> , нМ	7±2	500±50	50±3	5±2	400±150	7±3
FC	1	71	7	1	80	1.4

Примечание. Приведены средние значения как минимум трех независимых измерений со стандартным отклонением. н.о. – значения не определялись.

\*По данным [25].

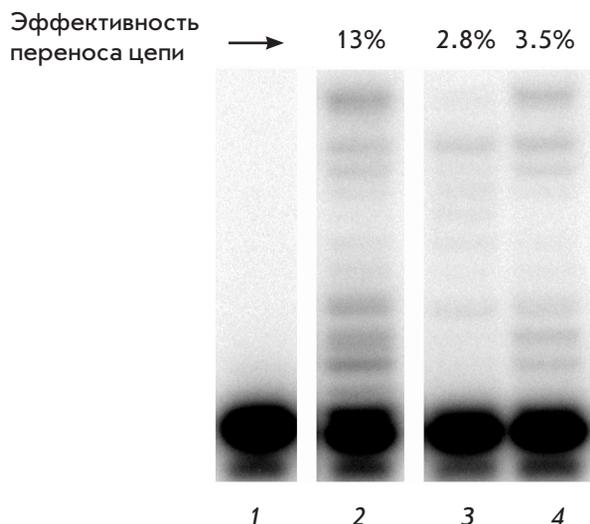
### Влияние мутаций лекарственной устойчивости на активность ИН\_CRF и ее чувствительность к ралтегравиру

Данные о мутациях, обеспечивающих его лекарственную устойчивость, изучаемого нами генетического варианта вируса отсутствуют, поэтому мы ввели в состав ИН мутации устойчивости к применяемым сегодня ингибиторам интеграции, известным для других подтипов ВИЧ-1. В качестве мутаций устойчивости к ралтегравиру и элвитегравиру были выбраны первичная мутация Q148K и компенсаторная к ней вторичная G140S [44, 45]. В случае долутегравира выбраны мутации G118R и E138K [46, 47]. Получены варианты ИН\_CRF, содержащие двойные замены Q148K/G140S и G118R/E138K (рис. 2), и исследована эффективность связывания ДНК-субстрата и зависимость эффективности 3'-концевого процессинга от концентрации ИН и времени. Оказалось, что введенные мутации не влияли на стабильность фермент-субстратного комплекса, но существенно снижали каталитическую активность ферментов (табл. 2). При этом в случае ИН\_CRF с заменами Q148K/G140S потеря активности была более существенной, чем у фермента с заменами G118R/E138K. Начальная скорость 3'-процессинга для мутантных ИН снижалась в 7.1 и 3.4 раза соответственно по сравнению с исходным ферментом. Ранее было показано снижение каталитической активности ИН\_A в реакции 3'-процессинга при введении мутаций Q148K/G140S и G118R/E138K, однако оно было одинаковым для обеих пар мутаций (в 3.8 раза) [25].

Замены Q148K/G140S и G118R/E138K существенно снижали и эффективность реакции переноса цепи, катализируемой ИН\_CRF (табл. 2), как и в случае ИН\_A [25]. Снижение было несколько сильнее в слу-

чае пары мутаций G118R/E138K, чем Q148K/G140S: в 4.6 и 3.7 раза соответственно. Интересно, что в случае ИН\_B замены G118R/E138K крайне незначительно влияли на эффективность переноса цепи [25]. Сильный отрицательный эффект этих мутаций в случае как ИН\_CRF, так и ИН\_A, связан, очевидно, с природным полиморфизмом S119P (рис. 1), приводящим к более жесткой конформации активного центра и сниженной способности обоих интеграз адаптироваться к мутации G118R. Возможно, именно жесткая конформация активного центра ограничивает способность ИН\_CRF и ИН\_A, несущих замены G118R/E138K, связывать ДНК-мишень, что выражается в резком уменьшении количества продуктов переноса цепи для мутантов G118R/E138K (рис. 6 и [25]). Мутации Q148K/G140S не вызывают изменений в характере продуктов этой реакции по сравнению с исходной ИН (рис. 6).

Мы также изучили чувствительность ИН\_CRF и ее мутантов Q148K/G140S и G118R/E138K к ингибированию ралтегравиром, который применяется в терапии ВИЧ-инфицированных в Российской Федерации. Обнаружено, что ИН\_CRF эффективно ингибируется ралтегравиром (табл. 2), значение IC<sub>50</sub> близко к значениям, полученным ранее для ИН\_A и ИН\_B [25]. Введение мутаций устойчивости Q148K/G140S, обнаруженных у других подтипов вируса, приводило к возникновению устойчивости и ИН\_CRF. Мы наблюдали 70-кратное увеличение значения IC<sub>50</sub>, что согласуется с полученными ранее данными для ИН\_A [25]. Мутации G118R/E138K также снижали чувствительность ИН\_CRF к ралтегравиру, однако не так значительно (FC=7, табл. 2). Следует отметить, что в случае ИН\_A с мутациями G118R/E138K практически не наблюдалось снижения чувствительности к ралтегравиру [25].



**Рис. 6.** Электрофоретический анализ продуктов реакции переноса цепи, катализируемой ИИ\_СRФ (дорожка 2) и ее мутантами G118R/E138K (дорожка 3) и Q148K/G140S (дорожка 4) (время реакции 300 мин). Дорожка 1 – контроль без добавления ИИ. Над гелем указана эффективность реакции

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые выделена и охарактеризована рекомбинантная ИИ ВИЧ-1 нового генетического варианта CRF63\_02A1, стремительно распространяющегося на территории Сибири. Установлено,

что ИИ\_СRФ быстрее и эффективнее, чем ИИ подтипа А, катализирует реакции 3'-процессинга и переноса цепи. Очевидно, высокие скорости обеих реакций обеспечиваются как более быстрым связыванием ДНК-субстрата, так и более высокой каталитической эффективностью, характерными для ИИ\_СRФ. По-видимому, все эти изменения объясняются аминокислотными заменами E11D, K14R и S24N, M50I, расположенными в N-концевом домене ИИ\_СRФ, который играет важную роль в мультимеризации фермента и связывании вирусной ДНК. При этом из-за отсутствия значимых различий в каталитических и С-концевых доменах ИИ\_СRФ и ИИ\_А набор продуктов переноса цепи, характеризующий способ позиционирования ДНК-мишени в активном центре фермент-субстратного комплекса, у этих ферментов не меняется.

Полученные результаты позволяют предположить, что устойчивость генетического варианта ВИЧ-1 CRF63\_02A1 к применяемому ингибитору интеграции ралтегравиру в первую очередь может развиваться по пути возникновения мутаций Q148K/G140S, как это описано для других подтипов [48]. Введение этих мутаций в состав ИИ\_СRФ привело к 70-кратному росту устойчивости к действию ингибитора по сравнению с исходным ферментом. Мутации G118R/E138K увеличивали устойчивость ИИ\_СRФ к ралтегравиру всего в 7 раз. ●

*Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 16-15-10238).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Foley B., Leitner T., Apetrei C., Hahn B., Mizrahi I., Mullins J., Rambaut A., Wolinsky S., Korber B. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory, 2013. <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>
- Onafuwa-Nuga A., Telesnitsky A. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2009. V. 73. № 3. P. 451–480.
- Li G., Piampongsant S., Faria N.R., Voet A., Pineda-Peña A.C., Khouri R., Lemey P., Vandamme A.M., Theys K. // Retrovirology. 2015. V. 12. P. 18.
- Hemelaar J. // Trends Mol. Med. 2012. V. 18. № 3. P. 182–192.
- Diez-Fuertes F., Cabello M., Thompson M.M. // Infect. Genet. Evol. 2015. V. 33. P. 197–205.
- Foley B.T., Leitner T., Paraskevis D., Peeters M. // Infect. Genet. Evol. 2016. V. 46. P. 150–158.
- Bobkova M. // AIDS Rev. 2013. V. 15. № 4. P. 204–212.
- Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. // Russia Arch. Virol. 2012. V. 157. № 12. P. 2335–2341.
- Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2014. V. 30. № 6. P. 592–597.
- Gashnikova N.M., Bogachev V.V., Baryshev P.B., Totmenin A.V., Gashnikova M.P., Kazachinskaya A.G., Ismailova T.N., Stepanova S.A., Chernov A.S., Mikheev V.N. // Russia AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2015. V. 31. № 4. P. 456–460.
- Gashnikova N.M., Zyryanova D.P., Astakhova E.M., Ivlev V.V., Gashnikova M.P., Moskaleva N.V., Aikin S.S., Bulatova T.N., Pustynnikov S.V., Bocharov E.F., Totmenin A.V. // Arch. Virol. 2017. V. 162. № 2. P. 379–390.
- Kazennova E., Laga V., Lapovok I., Glushchenko N., Neshumaev D., Vasilyev A., Bobkova M. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2014. V. 30. № 8. P. 742–752.
- Krishnan L., Engelman A. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 49. P. 40858–40866.
- Lennox J.L. // Curr. Opin. HIV AIDS. 2012. V. 7. № 5. P. 409–414.
- Quashie P.K., Mesplède T., Wainberg M.A. // Curr. Opin. Infect. Dis. 2013. V. 26. № 1. P. 43–49.
- Anstett K., Brenner B., Mesplède T., Wainberg M.A. // Retrovirology. 2017. V. 14. № 1. P. 36.
- Maiga I., Malet I., Soulie C., Derache A., Koita V., Amellal B., Tchertanov L., Delelis O., Morand-Joubert L., Mouscadet J.F., et al. // Antivir. Ther. 2009. V. 14. № 1. P. 123–129.
- Brenner B.G., Lowe M., Moisi D., Hardy I., Gagnon S., Charrest H., Baril J.G., Wainberg M.A., Roger M. // J. Med. Virol. 2011. V. 83. № 5. P. 751–759.

19. Bar-Magen T., Donahue D.A., McDonough E.I., Kuhl B.D., Faltenbacher V.H., Xu H., Michaud V., Sloan R.D., Wainberg M.A. // *AIDS*. 2010. V. 24. № 14. P. 2171–2179.
20. Quashie P.K., Oliviera M., Veres T., Osman N., Han Y.S., Hassounah S., Lie Y., Huang W., Mesplede T., Wainberg M.A. // *J. Virol*. 2015. V. 89. № 6. P. 3163–3175.
21. Depatureaux A., Mesplede T., Quashie P., Oliveira M., Moisi D., Brenner B., Wainberg M. // *J. Int. AIDS Soc.* 2014. V. 17. № 4. P. 19738.
22. Depatureaux A., Mesplede T., Quashie P., Oliveira M., Moisi D., Plantier J.C., Brenner B., Wainberg M.A. // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2015. V. 70. № 1. P. 9–15.
23. Gashnikova N.M., Astakhova E.M., Gashnikova M.P., Bocharov E.F., Petrova S.V., Pun'ko O.A., Popkov A.V., Totmenin A.V. // *Biomed. Res. Int.* 2016. V. 2016. Article ID 2496280.
24. Leh H., Brodin P., Bischerour J., Deprez E., Tauc P., Brochon J.C., LeCam E., Coulaud D., Auclair C., Mouscadet J.F. // *Biochemistry*. 2000. V. 39. № 31. P. 9285–9294.
25. Шадрина О.А., Зацепин Т.С., Агапкина Ю.Ю., Исагулянц М.Г., Готтих М.Б. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. № 1. P. 43–52.
26. Deprez E., Barbe S., Kolaski M., Leh H., Zouhiri F., Auclair C., Brochon J.C., Le Bret M., Mouscadet J.F. // *Mol. Pharmacol.* 2004. V. 65. № 1. P. 85–98.
27. Smolov M., Gottikh M., Tashlitskii V., Korolev S., Demidyuk I., Brochon J.C., Mouscadet J.F., Deprez E. // *FEBS J.* 2006. V. 273. № 6. P. 1137–1151.
28. Donaldson G.P., Roelofs K.G., Luo Y., Sintim H.O., Lee V.T. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 7. e48.
29. Khan E., Mack J.P., Katz R.A., Kulkosky J., Skalka A.M. // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. № 4. P. 851–860.
30. Agapkina J., Smolov M., Barbe S., Zubin E., Zatsepin T., Deprez E., Le Bret M., Mouscadet J.-F., Gottikh M. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 17. P. 11530–11540.
31. Agapkina J., Yanvarev D., Anisenko A., Korolev S., Vep-säläinen J., Kochetkov S., Gottikh M. // *Eur. J. Med. Chem.* 2014. V. 73. P. 73–82.
32. Shadrina O., Krotova O., Agapkina J., Knyazhanskaya E., Korolev S., Starodubova E., Viklund A., Lukashov V., Magnani M., Medstrand P., et al. // *Biochimie*. 2014. V. 102. P. 92–101.
33. Zheng R., Jenkins T.M., Craigie R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. № 24. P. 13659–13664.
34. Lesbats P., Engelman A.N., Cherepanov P. // *Chem. Rev.* 2016. V. 116. № 20. P. 12730–12757.
35. Zhao Z., McKee C.J., Kessl J.J., Santos W.L., Daigle J.E., Engelman A., Verdine G., Kvaratskhelia M. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 29. № 283. № 9. P. 5632–5641.
36. Passos D.O., Li M., Yang R., Rebensburg S.V., Ghirlando R., Jeon Y., Shkriabai N., Kvaratskhelia M., Craigie R., Lyumkis D. // *Science*. 2017. V. 355. № 6320. P. 89–92.
37. McKee C.J., Kessl J.J., Shkriabai N., Dar M.J., Engelman A., Kvaratskhelia M. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 46. P. 31802–31812.
38. Sokalingam S., Raghunathan G., Soundrarajan N., Lee S.G. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 7. e40410.
39. Mant C.T., Kovacs J.M., Kim H.M., Pollock D.D., Hodges R.S. // *Biopolymers*. 2009. V. 92. № 6. P. 573–595.
40. Dougherty D.A. // *J. Nutr.* 2007. V. 137. P. 1504S–1508S.
41. Chan D.I., Prenner E.J., Vogel H.J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. V. 1758. P. 1184–1202.
42. Deprez E., Tauc P., Leh H., Mouscadet J.F., Auclair C., Hawkins M.E., Brochon J.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 18. P. 10090–10095.
43. Guiot E., Carayon K., Delelis O., Simon F., Tauc P., Zubin E., Gottikh M., Mouscadet J.F., Brochon J.C., Deprez E. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 32. P. 22707–22719.
44. Malet I., Delelis O., Valantin M.A., Montes B., Soulie C., Wirden M., Tchertanov L., Peytavin G., Reynes J., Mouscadet J.-F., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. V. 52. № 4. P. 1351–1358.
45. Nakahara K., Wakasa-Morimoto C., Kobayashi M., Miki S., Noshi T., Seki T., Kanamori-Koyama M., Kawauchi S., Suyama A., Fujishita T., et al. // *Antiviral Res.* 2009. V. 81. № 2. P. 141–146.
46. Quashie P.K., Mesplède T., Han Y.S., Veres T., Osman N., Hassounah S., Sloan R.D., Xu H.T., Wainberg M.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. № 12. P. 6223–6235.
47. Wainberg M.A., Han Y.S. // *J. Virus Erad.* 2015. V. 1. № 1. P. 13–16.
48. Malet I., Gimferrer Arriaga L., Artese A., Costa G., Parrotta L., Alcaro S., Delelis O., Tmeizeh A., Katlama C., Valantin M.A. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2014. V. 69. № 8. P. 2118–2122.