

УДК 577.151.45:578.287

Сравнительный анализ влияния мутаций лекарственной устойчивости на активность интеграз ВИЧ-1 субтипов А и В

О. А. Шадрина¹, Т. С. Зацепин^{2,3}, Ю. Ю. Агапкина³, М. Г. Исагулянц^{4,5}, М. Б. Готтих^{2,3*}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

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

⁴Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

⁵Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Nobels väg 16, 17177, Stockholm, Sweden

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

Поступила в редакцию 22.10.2014

РЕФЕРАТ Интеграция ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в геном зараженной клетки – одна из ключевых стадий репликативного цикла этого вируса. Катализирующий ее вирусный фермент интегразы служит важной мишенью для новых противовирусных препаратов. Однако при проведении антиретровирусной терапии в гене интегразы возникают мутации, вызывающие резистентность вируса к ингибиторам интеграции. Для оценки влияния мутаций лекарственной устойчивости на активность интегразы ВИЧ-1 субтипа А штамма FSU-A, доминирующего на территории России, получены и охарактеризованы препараты консенсусной интегразы этого субтипа вируса, содержащие первичные мутации лекарственной устойчивости G118R и Q148K и вторичные компенсаторные замены E138K и G140S, и проведено их сравнение с соответствующими мутантными формами интегразы ВИЧ-1 субтипа В штамма HXB-2. Мутация Q148K практически одинаково снижала активность интеграз обоих субтипов. Ее негативный эффект частично компенсировался вторичными мутациями E138K и G140S. Первичная замена G118R по-разному влияла на активность белков субтипов А и В, компенсаторное действие вторичной замены E138K также зависело от субтипа вируса. Сравнение устойчивости всех мутантов к известным ингибиторам переноса цепи ралтегравир и элвитегравир и новому ингибитору XZ-259 из класса дигидро-1Н-изоиндолов показало, что белки обоих субтипов с мутацией Q148K малочувствительны к ралтегравир и элвитегравир, но достаточно эффективно ингибируются XZ-259. Замена G118R незначительно снижала эффективность ингибирования интеграз ралтегравиром и элвитегравиром и не вызывала устойчивости к XZ-259.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ВИЧ-1 субтипа А, интегразы, ингибитор переноса цепи, мутации лекарственной устойчивости, штамм FSU-A.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека типа 1; ИИ – интегразы; ИИ_А – интегразы субтипа А ВИЧ-1 штамма FSU-A; ИИ_В – интегразы субтипа В ВИЧ-1 штамма HXB-2; RAL – ралтегравир; EVG – элвитегравир; DTG – долутегравир; IC₅₀ – концентрация ингибитора, подавляющая активность фермента на 50%; FC – изменение величины IC₅₀ мутантных белков по сравнению с диким типом; wt – дикий тип интегразы; ПААГ – полиакриламидный гель; DTT – дитиотреитол; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота; ТБЕ – трис-боратный буфер с EDTA.

ВВЕДЕНИЕ

Интегразы — один из основных ферментов вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), необходимых для его репликации. Она катализирует встра-

ивание ДНК-копии геномной РНК вируса в клеточную ДНК в ходе двух последовательных реакций. Первая из них – реакция 3'-процессинга – заключается в отщеплении динуклеотида GrT с 3'-конца

каждой цепи вирусной ДНК. Вторая – реакция переноса цепи – представляет собой встраивание процессированной вирусной ДНК в ДНК инфицированной клетки.

Интеграза ВИЧ-1 не имеет гомологов в клетке и в силу этого служит привлекательной мишенью для создания ингибиторов ВИЧ-инфекции. К настоящему времени три соединения – ингибиторы переноса цепи ралтегравир (RAL), элвитегравир (EVG) и долутегравир (DTG) – допущены к терапевтическому применению в качестве компонентов антиретровирусной терапии. Однако под воздействием ингибиторов интеграции как у больных, так и в культуре ВИЧ-инфицированных клеток в гене интегразы возникают мутации, вызывающие резистентность к этим препаратам [1]. К ингибиторам переноса цепи первого поколения – RAL и EVG – у вируса достаточно быстро вырабатывается устойчивость, в том числе перекрестная. Одна из общих причин высокой резистентности к обоим ингибиторам – первичная мутация по остатку Q148 [2–6]. В большинстве случаев она возникает в комбинации со вторичными мутациями, среди которых наиболее часто встречаются G140S/A и E138K/A [2–7]. Как было показано в *in vitro*- и *in vivo*-исследованиях, вторичные мутации частично восстанавливают репликативную способность вируса, сниженную первичными заменами, а также могут усиливать лекарственную устойчивость [7–11].

DTG – препарат второго поколения – активен против большинства RAL- и EVG-устойчивых штаммов вируса [9, 12, 13]. Тем не менее изучение влияния DTG на изоляты ВИЧ-1, выделенные от пациентов, нечувствительных к RAL и EVG, показало, что замены Q148H/K/R в составе интегразы приводят к некоторой резистентности к DTG. При этом вторичные и третичные мутации (G140A/C/S, L74I и E138A/K/T) дополнительно повышают эту резистентность [14, 15]. При селекции в культуре лимфоцитов штаммов ВИЧ-1, устойчивых к DTG, были отобраны варианты, содержащие целый ряд аминокислотных замен в составе интегразы: H51Y, L101I, G118R, T124A, S153F/Y, R263K [13, 16]. Однако только две из них, G118R и R263K, действительно вызывали устойчивость вируса к DTG [15, 17].

ВИЧ-1 представлен разными субтипами и рекомбинантными штаммами, среди которых территориально наиболее распространен субтип В, доминирующий на территории США, Австралии, Японии и стран Западной Европы. Мутация Q148H/R/K приводит к возникновению устойчивости к RAL и EVG у разных субтипов вируса. Мутации, ассоциированные с устойчивостью к DTG, более специфичны. Так при *in vitro*-селекции резистентных

штаммов ВИЧ-1 субтипов В, С и А/Г общей для всех была только замена R263K; замена G118R обнаружена только у субтипов А/Г и С [16]. У вируса субтипа С эта мутация найдена и при *in vitro*-селекции с другим ингибитором переноса цепи второго поколения – МК-2048 [18]. В этой же работе показано, что вторичной компенсаторной заменой по отношению к G118R является мутация E138K. Недавно обнаружили, что с появлением мутации G118R связана невосприимчивость к RAL у пациента, инфицированного штаммом CRF02_A/G [19]. Крайне важно, что изолят этого вируса, содержащий замену G118R в гене интегразы, оказался резистентным не только к RAL, но и к EVG и DTG [15]. Все эти данные позволяют предположить, что замена G118R наиболее характерна для не-В-субтипов ВИЧ-1, причем ее присутствие может приводить к нечувствительности пациентов ко всем ингибиторам интегразы, разрешенным к настоящему моменту для терапевтического использования.

На территории постсоветского пространства доминирует вирус субтипа А (FSU-A), интегразы которого еще недостаточно охарактеризована [20]. В частности, еще не накоплено достаточно сведений о вызываемых ингибиторами интегразы мутациях лекарственной устойчивости, характерных для штамма FSU-A. С целью выяснения влияния возможных мутаций лекарственной устойчивости на ферментативные свойства интегразы ВИЧ-1 субтипа А мы создали консенсусную интегразу штамма FSU-A, в которую методами сайт-направленного мутагенеза вводили мутации устойчивости к RAL и EVG [21, 22]. Консенсусная последовательность интегразы ВИЧ-1 штамма FSU-A (ИН_А) отличается от последовательности наиболее изученной интегразы субтипа В (НХВ-2) заменами 16 аминокислотных остатков, девять из которых находятся в каталитическом домене. Мы охарактеризовали каталитическую активность ИН_А, а также ее вариантов, содержащих две основные комбинации мутаций, которые вызывают устойчивость к RAL и EVG: E92Q, V151I, N155H, G163R, L74M (мутант 1) и Q148K, E138K, G140S (мутант 2) [22]. Консенсусный фермент был значительно более активен, чем интегразы субтипа В (ИН_В) в реакциях 3'-процессинга и переноса цепи. Введение указанных мутаций существенно повышало устойчивость ИН_А к действию RAL и EVG, но при этом значительно снижало ее каталитическую активность в обеих реакциях [22].

В настоящей работе мы продолжили исследование роли мутаций лекарственной устойчивости и провели детальное сравнение влияния первичной мутации Q148K и вторичных мутаций E138K и G140S на активность интеграз штаммов FSU-A и НХВ-2. Мы так-

же впервые охарактеризовали активность мутантов ИН_А, содержащих первичную замену G118R и компенсирующую ее замену E138K. Введение мутации Q148K резко снижало активность ферментов обоих субтипов в обеих реакциях – 3'-процессинга и переноса цепи. Это снижение несколько компенсировалось вторичными заменами E138K и G140S. Замена G118R в 5 раз уменьшала эффективность 3'-процессинга для обеих интеграз, но в реакции переноса цепи по-разному влияла на ферменты разных штаммов: активность ИН_А снижалась значительно сильнее, чем ИН_В. Более того, вторичная замена E138K оказывала компенсирующий эффект только на ИН_В. Мы также сравнили устойчивость всех полученных мутантов к RAL, EVG и новому ингибитору переноса цепи XZ-259 [23]. Препарат XZ-259 достаточно эффективно ингибировал RAL- и EVG-устойчивые формы интегразы, содержащие замену Q148K. Замена G118R привела к незначительному снижению чувствительности интеграз к RAL и EVG, более выраженному в случае ИН_В, и не влияла на чувствительность интеграз к действию ингибитора XZ-259.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ферменты

Для экспрессии рекомбинантной ИН ВИЧ-1 обоих подтипов (дикого типа и мутантных) с гистидиновой последовательностью на N-конце использовали плазмидный вектор pET-15b (Novagen, США). Препараты белков выделяли из клеток штамма-продуцента Rosetta (DE3) *Escherichia coli* и очищали без добавления детергента как описано в [24]. Генетические конструкции, кодирующие мутантные формы ИН, получали с помощью сайт-направленного мутагенеза плазмиды, кодирующей исходную интегразу, с использованием набора QuikChange II Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies, США). Все процедуры осуществляли согласно инструкциям производителя. Препараты анализировали методом электрофореза в 12% ПААГ по Лэммли с последующим окрашиванием SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией. Чистота препаратов была не менее 90%.

Олигодезоксирибонуклеотиды

Все олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали амидофосфитным методом на автоматическом ДНК-синтезаторе ABI 3400 (Applied Biosystems, США) согласно стандартному регламенту с использованием коммерческих реагентов (Glen Research, США).

Для введения радиоактивной ³²P-метки на 5'-конец олигонуклеотидов 10 пмоль олигонуклеотида инкубировали с 10 ед. акт. T4-полинуклеотидкиназы

(Fermentas, Литва) и 50 мкКи (16 пмоль) [γ -³²P]АТФ (3000 Ки/ммоль) в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ Трис-НСl-буфер, рН 7.5, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ DTT, 0.1 мМ спермидин, 0.1 мМ EDTA, в течение 1 ч при 37°C. Затем киназу инактивировали добавлением 2 мкл 250 мМ водного EDTA и нагреванием до 65°C в течение 10 мин. Добавляли эквимольное количество комплементарного олигонуклеотида и формировали дуплекс нагреванием смеси олигонуклеотидов до 95°C с последующим медленным охлаждением до комнатной температуры. Полученный дуплекс окончательно очищали от избытка [γ -³²P]АТФ и солей на колонке MicroSpin G-25 Columns (Amersham Biosciences, США) согласно условиям производителя.

Определение каталитической активности ИН ВИЧ-1

В реакции 3'-процессинга в качестве субстрата использовали дуплекс U5B/U5A, составленный из 21-звенных олигонуклеотидов U5B (5'-GTGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3') и U5A (5'-ACTGCTAGAGATTTTCACAC-3') и имитирующий концевой участок U5-фрагмента длинного концевого повтора вирусной ДНК. Для анализа каталитической активности исследуемых белков 3 нМ дуплекс U5B/U5A (с ³²P-меченой U5B-цепью) инкубировали со 100 нМ интегразой в 20 мкл буфера (20 мМ HEPES, рН 7.2, 7.5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT) при 37°C. Время инкубации варьировали от 1 до 2000 мин. Реакцию останавливали добавлением 80 мкл стоп-раствора (7 мМ EDTA, 0.3 М ацетат натрия, 10 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 0.1 мг/мл гликоген). Интегразу экстрагировали смесью фенол : хлороформ : изоамиловый спирт = 25 : 24 : 1, ДНК-дуплекс осаждали этиловым спиртом (250 мкл) и анализировали электрофорезом в 20% ПААГ с 7 М мочевиной в буфере ТБЕ. Радиоавтограммы получали на сканере GE Typhoon FLA 9500, денситометрию проводили с помощью программного обеспечения ImageQuant 5.0. По соотношению интенсивностей излучения полос, соответствующих субстрату U5B и укороченному на два звена продукту реакции U5B-2, определяли эффективность 3'-процессинга с использованием программы ImageQuant™ 5.0. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Gnuplot версия 4.6.

В реакции гомологичного переноса цепи в качестве субстрата и ДНК-мишени использовали ДНК-дуплекс U5B-2/U5A. Реакцию проводили в том же буфере, в котором осуществляли 3'-процессинг, используя 10 нМ дуплекс U5B-2/U5A (с ³²P-меченой цепью U5B-2) и 100 нМ интегразу, при 37°C и отбирали аликвоты через 2, 4 и 6 ч.

В реакции гетерологичного переноса цепи использовали субстрат U5B-2/U5A и 36-звенный ДНК-дуплекс (5'-АСААААТТССАТГАСААТТГТГГТ-ГГААТГССАСТА-3', 5'-ТАГТГГСАТТССАССА-СААТТГТСАТГГААТТТТГТ-3') в качестве ДНК-мишени. 2 нМ субстрат U5B-2/U5A (с ³²P-меченой цепью U5B-2) сначала инкубировали в буфере для 3'-процессинга со 100 нМ интегразой при 25°C в течение 30 мин, а затем добавляли 8 нМ ДНК-мишени и инкубировали в течение еще 2 ч при 37°C. Выделение и анализ продуктов реакции проводили как описано выше.

Ингибирование переноса цепи

Для изучения устойчивости ИН к ингибиторам RAL, EVG (Santa Cruz Biotechnology Inc., США) и XZ-259 (любезно предоставлен д-ром Xue Zhi Zhao из NIH, США) реакцию гомологичного переноса цепи проводили как описано выше в течение 2 ч в присутствии возрастающих концентраций ингибитора. По результатам трех независимых опытов определяли значение IC₅₀ для каждого ингибитора. Данные по эффективности реакции аппроксимировали с помощью функции экспоненциального убывания, и вычисляли значение в точке, соответствующей 50%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью проведения сравнительного анализа влияния мутаций лекарственной устойчивости на каталитическую активность интеграз штаммов FSU-A (ИН_А) и НХВ-2 (ИН_В) методом сайт-направленного мутагенеза были получены 14 мутантных белков, по семь для каждой из интеграз: Q148K, G140S, E138K, G118R, Q148K/E138K, Q148K/G140S и G118R/E138K. Их активность определяли в реакциях 3'-процессинга и переноса цепи с использованием синтетических ДНК-дуплексов, соответствующих концевой последовательности участка U5 длинного концевого повтора вирусной кДНК.

Влияние мутаций на каталитическую активность интеграз ИН_А и ИН_В в реакции 3'-процессинга

В реакции 3'-процессинга в качестве субстрата использовали 21-звенный олигонуклеотидный дуплекс (U5B/U5A), структура которого соответствовала U5-концу вирусной ДНК (U5-субстрат), и условия (концентрации фермента и ДНК, состав буфера), в которых мы ранее характеризовали каталитическую активность ИН_А и ИН_В [22].

Мы оценили зависимость эффективности 3'-процессинга от времени и построили кинетические кривые накопления продукта (рис. 1). Начальные скорости реакции 3'-процессинга (V_0) рассчитывали из линейного отрезка кривой (первые 60 мин) (табл. 1).

Как показано нами ранее [22], ИН_А активнее в реакции 3'-процессинга, чем ИН_В. Все мутанты ИН_А также характеризовались более высокой эффективностью накопления продуктов, чем соответствующие мутанты ИН_В (рис. 1). Однако начальные скорости реакции у мутантных форм обеих интеграз отличались незначительно (табл. 1).

Все введенные нами в состав интеграз обоих субтипов мутации снижали как скорость образования, так и эффективность накопления продуктов 3'-процессинга (рис. 1, табл. 1). Наиболее существенным снижением было у белков с заменой Q148K, что в случае интегразы субтипа В хорошо согласуется с ранее полученными результатами [25].

Как мы и ожидали на основании опубликованных данных [7–11, 13], замена G140S была компенсаторной для первичной мутации Q148K (рис. 1, табл. 1). Причем в случае ИН_А компенсирующее действие G140S проявлялось более сильно: изменение эффективности и начальной скорости 3'-процессинга у пары ИН_А^{G140S/Q148K}/ИН_А^{Q148K} оказалось выше, чем у соответствующей пары в субтипе В (рис. 1, табл. 1). Надо, однако, отметить, что компенсаторное действие G140S в отношении мутации Q148K, наблюдаемое для ИН_А^{Q148K} и ИН_В^{Q148K}, было не столь значительным, как в случае замены Q148N в интегразе субтипа В [8]. Очевидно, это связано с более сильным негативным влиянием на интеграционную активность исследуемой нами мутации Q148K. Различие в активности интеграз с первичными мутациями Q148K и Q148N коррелирует с различиями в интеграционной активности несущих эти мутации вирусов [7, 10, 11].

Замена E138K также оказывала компенсаторное влияние на активность интеграз обоих подтипов с первичной заменой Q148K (рис. 1, табл. 1). Однако оба двойных мутанта ИН_А^{E138K/Q148K} и ИН_В^{E138K/Q148K} были несколько менее активны, чем двойные мутанты, несущие замены G140S/Q148K. Это согласуется с уменьшением репликативной и интеграционной активности мутантных форм ВИЧ-1 субтипа В в ряду Q148K < Q148K/E138K < Q148K/G140S [7]. Интересно, что активность изученного нами ранее тройного мутанта E138K/G140S/Q148K интегразы FSU-A была несколько выше, чем у изученных здесь ферментов с двумя заменами: через 1500 мин от начала реакции эффективность 3'-процессинга для тройного мутанта достигала 30% от уровня ИН_А [22], в то время как у наиболее активного двойного мутанта ИН_А^{G140S/Q148K} она не превышала 20% (табл. 1). Таким образом, компенсаторный эффект от совокупности двух мутаций E138K и G140S оказался несколько большим, чем от отдельных вторичных замен G140S или E138K. Аналогичное наблюдение было сделано ранее для ВИЧ-1 субтипа В: добавление мутации

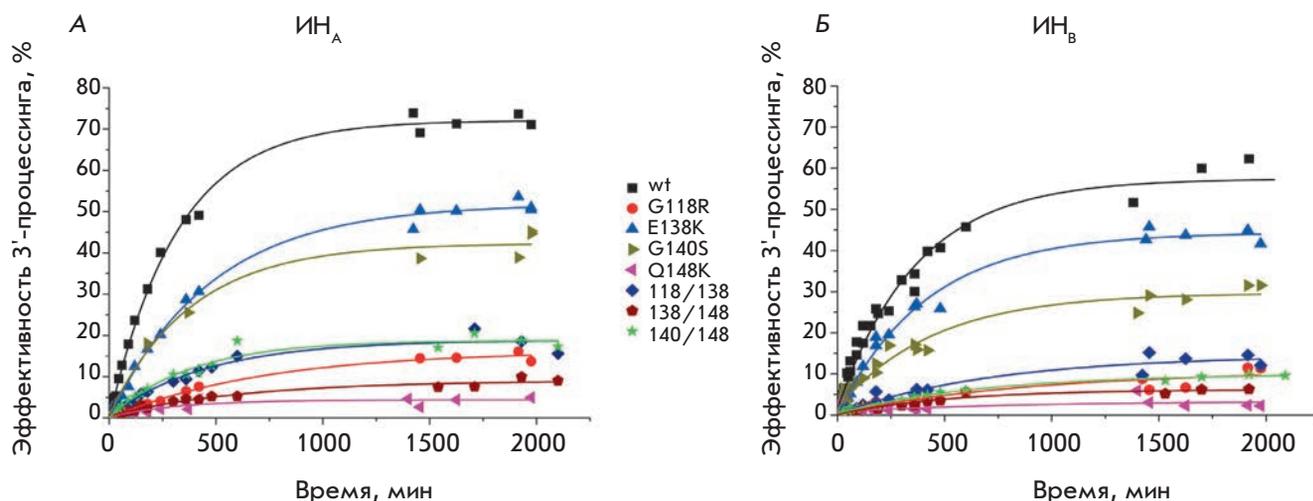


Рис. 1. Кинетические кривые накопления продукта 3'-концевого процессинга, катализируемого препаратами консенсусной интегразы субтипа А штамма FSU-A (А) и интегразы субтипа В штамма HXB-2 (Б) и их мутантными формами. Реакцию проводили при 37°C, концентрация фермента 100 нМ, концентрация U5-субстрата 3 нМ. Приведены средние значения как минимум трех независимых измерений, при которых стандартная ошибка не превышала 12%

E138K к заменам Q148K/G140S повышало репликативную способность вируса, не влияя при этом на его чувствительность к ингибиторам переноса цепи [11].

Наконец, мы обнаружили, что замена G118R вызывает резкое снижение активности обеих интеграз – IN_A и IN_B (рис. 1, табл. 1). Этот результат несколько противоречит данным работы [17], в которой показано, что у рекомбинантной интегразы подтипа В с заменой G118R эффективность 3'-процессинга снижена незначительно, а двойные мутанты G118R/E138K и G118R/H51Y обладают даже несколько большей активностью в этой реакции, чем фермент дикого типа. В наших условиях внесение вторичной замены E138K также приводило к повышению активности как мутанта IN_A^{G118R} , так и мутанта IN_B^{G118R} , однако активность всех ферментов, несущих замену G118R, была существенно ниже, чем у исходных интеграз IN_A и IN_B (рис. 1, табл. 1). Указанное противоречие может объясняться разными условиями проведения 3'-процессинга, в частности, длиной ДНК-субстрата интегразы: мы работали со стандартным 21-звенным ДНК-дуплексом, а в работе [17] был использован 32-звенный субстрат.

Влияние мутаций на каталитическую активность интеграз IN_A и IN_B в реакции переноса цепи

Мы также изучили влияние выбранных мутаций на вторую реакцию, катализируемую интегразой – перенос цепи, в результате которой в условиях *in vitro* 3'-процессированный ДНК-субстрат встраивается либо в себя самого (гомологичный перенос цепи),

Таблица 1. Начальные скорости и эффективность 3'-процессинга, катализируемого интегразами IN_A и IN_B и их мутантными формами

Мутация	V_0 , пМ/мин*		Относительная эффективность реакции, %**	
	IN_A	IN_B	IN_A	IN_B
Дикий тип	10.1 ± 0.29	6.4 ± 0.19	100	100
G118R	0.98 ± 0.074	0.79 ± 0.15	21	20
E138K	4.8 ± 0.24	4.6 ± 0.9	69	76
G118R/E138K	2.6 ± 0.37	1.4 ± 0.18	24	24
G140S	4.3 ± 0.21	4.8 ± 0.75	58	51
Q148K	0.90 ± 0.16	0.65 ± 0.35	6	13
E138K/Q148K	1.2 ± 0.31	0.7 ± 0.61	13	11
G140S/Q148K	2.62 ± 0.11	1.3 ± 0.23	25	15

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

**Приведена относительная эффективность реакции через 1500 мин, эффективность в случае исходной интегразы принята за 100%.

либо в любую другую случайную нуклеотидную последовательность или плазмиду (гетерологичный перенос цепи). В качестве ДНК-субстрата использовали дуплекс U5B-2/U5A. При гетерологичном переносе цепи в качестве мишени был использован синтетический 36-звенный олигонуклеотидный дуплекс. Положение места встраивания субстрата не зави-

сит от последовательности ДНК-мишени, поэтому при анализе продуктов реакции детектируются продукты разной длины.

Как уже было установлено нами ранее [22], в реакции переноса цепи активность $ИН_A$ несколько выше, чем $ИН_B$ (рис. 2). Также можно заметить разницу в профиле продуктов интеграции как при гомологичном (рис. 2А), так и при гетерологичном переносе цепи (рис. 2Б).

Наименее активными в реакции переноса цепи, как и в реакции 3'-процессинга, в обоих субтипах оказались мутанты, несущие замену Q148K. Эффективность гомологичного переноса цепи у них была снижена примерно до 5% от уровня фермента дикого типа. Неожиданно к значительному снижению эффективности реакции привела замена G140S (рис. 2А,В). Этот эффект мы наблюдали у ферментов обоих субтипов, $ИН_A^{G140}$ и $ИН_B^{G140}$, хотя данные о негативном эффекте замены G140S на активность рекомбинантной интегразы не опубликованы, а у вируса субтипа В, содержащего эту замену, выявлено лишь незначительное снижение интеграционной и репликативной способностей [7, 8]. Несмотря на негативное влияние замены G140S, ее комбинация с мутацией Q148K приводила к увеличению эффективности реакции, и белки $ИН_A^{G140S/Q148K}$ и $ИН_B^{G140S/Q148K}$ были активнее, чем $ИН_A^{Q148K}$ и $ИН_B^{Q148K}$ (рис. 2В). Некоторый компенсаторный эффект вызывала также и мутация E138K. Причем можно заметить, что у $ИН_A$ компенсаторный эффект был несколько сильнее при вторичной замене G140S, а у $ИН_B$ – E138K (рис. 2В). Интересно, что единичная замена E138K заметно повышала эффективность реакции для интеграз обоих субтипов (рис. 2В). В целом же, первичная мутация Q148K и ее компенсаторные замены G140S и E138K одинаково влияли на активность $ИН_A$ и $ИН_B$ как в 3'-процессинге, так и в переносе цепи. Таким образом, различия в первичной структуре интеграз не влияют на ферментативные свойства этой группы мутантов *in vitro*.

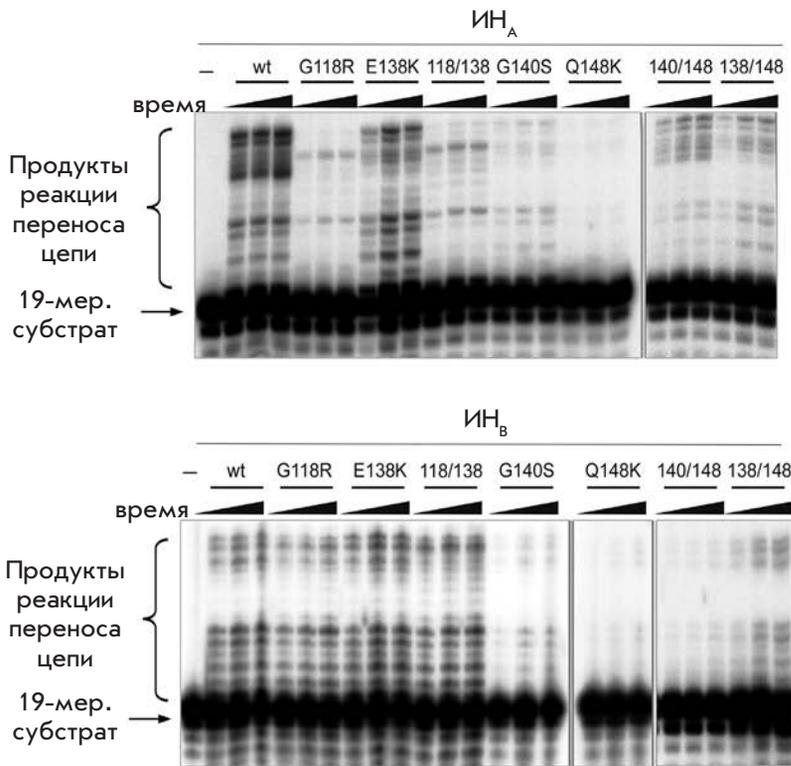
Интересно, что влияние другой группы мутаций – G118R и G118R/E138K – на активность интеграз разных субтипов в реакции переноса цепи различалось. Интеграза $ИН_A$ оказалась более чувствительной к замене остатка G118, чем фермент субтипа В: у фермента $ИН_A^{G118R}$ эффективность гомологичного переноса цепи была резко снижена, а у $ИН_B^{G118R}$ существенно не изменилась (рис. 2А,В). Необходимо также отметить, что в случае $ИН_A$ мутация G118R приводила к смене точек интеграции, и вместо большого набора продуктов, наблюдаемого для исходной $ИН_A$, у мутанта $ИН_A^{G118R}$ четко выделялись только два доминирующих продукта (рис. 2А). Добавление компенсаторной мутации E138K практически не влияло

на активность мутанта $ИН_B^{G118R}$, в то время как двойной мутант $ИН_A^{G118R/E138K}$ был более активен, чем несущий одиночную замену $ИН_A^{G118R}$. Тем не менее эффективность реакции гомологичного переноса цепи, катализируемой $ИН_A^{G118R/E138K}$, достигала только 23% от уровня реакции, катализируемой исходной $ИН_A$ (рис. 2В).

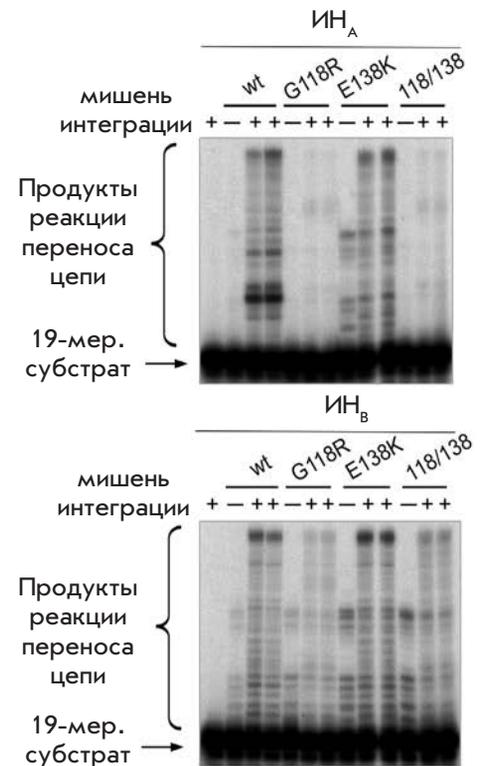
Ранее было показано, что замена G118R в интегразе субтипа В приводит к существенному (более 90%) снижению ее активности в реакции гетерологичного переноса цепи [17]. Двойная мутация G118R/E138K приводила к частичному восстановлению активности, но она не достигала и 50% от уровня активности интегразы дикого типа [17]. Аналогичные эффекты наблюдались и для вируса субтипа В, содержащего указанные мутации: замена G118R вызывала значительное падение репликативной и интеграционной способностей вируса, а добавление мутации E138K приводило к их частичному восстановлению [18]. Проведенное нами изучение влияния замены G118R на способность $ИН_A$ и $ИН_B$ осуществлять гетерологичный перенос цепи показало, что как и при гомологичном переносе влияние этой замены на ферменты разных субтипов ВИЧ-1 различается (рис. 2Б). Введение мутации G118R снижало активность $ИН_B$ приблизительно на 50%, в то время как соответствующий мутант $ИН_A^{G118R}$ был практически неактивным. Вторичная замена E138K оказывала компенсаторный эффект только на интегразу субтипа В: активность двойного мутанта $ИН_B^{G118R/E138K}$ была несколько выше, чем фермента с одиночной заменой $ИН_B^{G118R}$ (рис. 2Б). Эти результаты согласуются с данными работы [17], поскольку разницу в активности мутантных форм интегразы $ИН_B$ можно объяснить различиями в условиях проведения реакции. Оба мутанта субтипа А, $ИН_A^{G118R}$ и $ИН_A^{G118R/E138K}$, имели одинаково низкую активность, хотя внесение единичной замены E138K приводило к повышению эффективности гетерологичного переноса интегразами обоих субтипов (рис. 2Б).

Уменьшение интегрирующей способности мутанта G118R в субтипе В ранее связали со снижением способности комплекса интегразы с ДНК-субстратом связывать ДНК-мишень [17]. В результате природного полиморфизма в положении 119 $ИН_B$ содержит Ser, а $ИН_A$ – Pro [21]. Отметим, что в ВИЧ-1 подтипа С, в лекарственно устойчивых штаммах которого чаще всего обнаруживается мутация G118R [16, 18], также присутствует Ser119. Остаток пролина увеличивает жесткость пространственной структуры интегразы в районе активного центра (Asp116 входит в каталитическую триаду). Очевидно, совокупность мутации G118R с Pro119 влияет на способность интегразы субтипа А взаимодействовать с ДНК-мишенью

А



Б



В

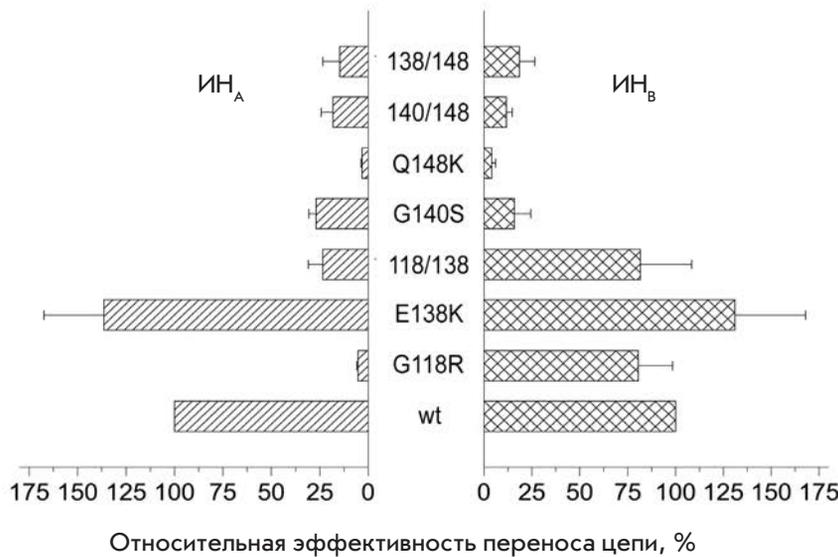


Рис. 2. Реакция переноса цепи, катализируемая мутантными формами интегразы ВИЧ-1 субтипов А и В. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях. А – реакцию гомологичного переноса цепи проводили с использованием 100 нМ интегразы и 10 нМ субстрата U5B-2/U5A в течение 2, 4, 6 ч при 37°C. Б – реакцию гетерологичного переноса цепи проводили с использованием 100 нМ интегразы, 2 нМ субстрата U5B-2/U5A (преинкубация 30 мин при 25°C) и 8 нМ 36-звенной ДНК-мишени в течение 2 ч при 37°C. В – относительная эффективность гомологичного переноса цепи, катализируемого мутантными формами интеграз, эффективность реакции для IN_A и IN_B принята за 100%. Представлены средние значения со стандартным отклонением, полученные по крайней мере из трех независимых экспериментов

Таблица 2. Ингибирование реакции гомологичного переноса цепи, катализируемой интегразами ВИЧ-1 субтипов А и В и их мутантными формами, ралтегравиром (RAL), элвитегравиром (EVG) и XZ-259

Мутация	Ингибирующая активность, IC ₅₀ * (нМ), и изменение IC ₅₀ мутантов по сравнению с диким типом (FC)											
	ИН _А						ИН _В					
	RAL		EVG		XZ-259		RAL		EVG		XZ-259	
	IC ₅₀	FC	IC ₅₀	FC	IC ₅₀	FC	IC ₅₀	FC	IC ₅₀	FC	IC ₅₀	FC
Дикий тип	5 ± 2	1	17 ± 5	1	40 ± 15	1	7 ± 3	1	25 ± 10	1	65 ± 10	1
G118R	12 ± 5	2.4	45 ± 10	2.6	40 ± 10	1	30 ± 10	4.3	90 ± 30	3.6	80 ± 20	1.2
E138K	7 ± 3	1.4	35 ± 5	2	50 ± 15	1.25	7 ± 5	1	20 ± 8	0.8	70 ± 10	1
G118R/E138K	7 ± 3	1.4	40 ± 10	2.4	30 ± 10	0.75	25 ± 8	3.6	50 ± 15	2	80 ± 15	1.2
G140S	15 ± 5	3	300 ± 50	18	150 ± 50	3.8	35 ± 15	5	200 ± 80	8	150 ± 50	2.3
Q148K	400 ± 100	80	700 ± 80	41	350 ± 100	8.8	1100 ± 250	157	1000 ± 200	40	600 ± 100	9.2
E138K/Q148K	350 ± 80	70	650 ± 100	38	200 ± 50	5	500 ± 150	71	600 ± 150	24	500 ± 200	7.7
G140S/Q148K	400 ± 150	80	450 ± 150	26	600 ± 150	15	1000 ± 200	200	850 ± 200	34	850 ± 100	13

*Результат не менее трех независимых экспериментов.

в значительно большей степени, чем сочетание G118R с Ser119. В результате ИН_А, содержащая замену G118R, существенно менее активна в реакциях переноса цепи, чем соответствующий мутант ИН_В.

Влияние мутаций на чувствительность интеграз ИН_А и ИН_В к ингибиторам переноса цепи

Нами изучено влияние выбранных мутаций лекарственной устойчивости на чувствительность интеграз к трем ингибиторам переноса цепи: RAL, EVG и новому ингибитору XZ-259, производному дигидро-1Н-изоиндола, с биохимической и антивирусной активностью, сравнимой с RAL [23]. Определена концентрация ингибитора, необходимая для снижения на 50% активности интегразы (IC₅₀) в реакции гомологичного переноса цепи (табл. 2; увеличение IC₅₀ отражает снижение чувствительности фермента к ингибитору).

Оказалось, что интегразы обоих субтипов имеют сравнимые значения IC₅₀ в отношении RAL и EVG, однако в среднем чувствительность ИН_А к обоим ингибиторам несколько выше, что коррелирует с данными, полученными нами ранее [22]. Чувствительность ИН_А к новому ингибитору – XZ-259, также была несколько выше, чем ИН_В; при этом значение IC₅₀ для ИН_В (65 нМ, табл. 2) хорошо согласуется с данными [23] (77 нМ).

При анализе влияния внесенных мутаций на чувствительность интегразы к ингибиторам удобно оперировать значениями FC, показывающими во сколько раз изменяется величина IC₅₀ у мутантов по сравнению с диким типом или, иными словами, насколько мутантные формы более устойчивы к ингибиторам, чем исходный фермент. Анализ FC семейства белков, содержащих первичную замену

Q148K (ИН^{Q148K}, ИН^{E138K/Q148K} и ИН^{G140S/Q148K}), показал, что устойчивость мутантных форм интеграз обоих подтипов к EVG возрастает сравнимым образом (табл. 2). Что касается RAL, то он в 2 раза лучше ингибировал интегразы субтипа А с заменами Q148K и G140S/Q148K, чем соответствующие варианты ИН_В. Компенсаторная мутация E138K практически в 2 раза снижала устойчивость ИН_В^{Q148K} к RAL и EVG, не оказывая при этом заметного влияния на устойчивость мутанта ИН_А^{Q148K}. Надо также отметить, что чувствительность к ингибитору XZ-259 обоих мутантов Q148K оказалась существенно выше, чем к EVG и особенно к RAL, что в случае интегразы субтипа В соответствует ранее полученным данным [23]. Интересно, что вторичная замена E138K несколько повышала чувствительность мутантов ИН_А^{Q148K} и ИН_В^{Q148K} к XZ-259, в то время как дополнительная замена G140S снижала ее (табл. 2).

Анализ FC семейства белков с заменами G118R и G118R/E138K выявил незначительное снижение чувствительности интеграз обоих субтипов к RAL и EVG (табл. 2). При этом единичная мутация G118R несколько сильнее снижала чувствительность фермента субтипа В, чем субтипа А (табл. 2). Интересно, что компенсаторная замена E138K уменьшала возникающую резистентность (табл. 2). Важно также отметить, что к ингибитору XZ-259 устойчивости вообще не возникало. В целом наши результаты хорошо коррелируют с опубликованными данными. Так, изолят ВИЧ-1 субтипа CRF02_A/G, содержащий замену G118R в гене интегразы, оказался резистентным (FC > 100) ко всем разрешенным к терапевтическому применению ингибиторам интегразы: RAL, EVG и DTG [15]. В то же время у ВИЧ-1 субтипа В (клон pNL4-3), в геном которого была введена эта мута-

ция, устойчивость к этим ингибиторам была крайне незначительной (FC = 3.1 для EVG, 8.2 для RAL и 10 для DTG) [15]. Таким образом, наша работа подтверждает неоднородность эффекта первичной мутации G118R на лекарственную устойчивость ВИЧ-1 разных субтипов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами проведено первое систематическое исследование ферментативных свойств вариантов консенсусной интегразы ВИЧ-1 субтипа А штамма FSU-A, доминирующего на территории бывшего Советского Союза, с мутациями G118R и Q148K, вызывающими устойчивость вируса к ингибиторам переноса цепи. Мы показали, что чувствительность интеграз субтипа А штамма FSU-A к разрешенным к терапевтическому применению ингибиторам RAL и EVG, а также к новому ингибитору XZ-259 несколько выше, чем у фермента субтипа В. Обнаружено, что ассоциированная с устойчивостью к RAL и EVG первичная мутация Q148K вызывает резкое снижение активности интегразы субтипа А, которое частично компенсируется за счет вторичных мутаций E138K и G140S. Аналогичная зависимость наблюдалась и для интегразы субтипа В. В то же время первичная мутация G118R снижала интеграционную активность фермента субтипа А значительно сильнее, чем интегразы субтипа В штамма НХВ-2. Это может быть связано

с природным полиморфизмом интегразы, в частности с присутствием Pro119 в ИН_А вместо Ser119 в ИН_В. Можно предположить, что замена Ser119Pro, приводящая к более жесткой конформации активного центра интегразы субтипа А, обеспечивает более высокую активность этого фермента, но при этом снижает его способность адаптировать активный центр к мутации G118R. Сниженная мутациями лекарственной устойчивости активность рекомбинантной интегразы обычно соответствует пониженной репликативной способности мутантного вируса, в силу этого можно ожидать появления и закрепления лекарственно устойчивых вариантов FSU-A, несущих первичную мутацию Q148K и компенсаторные мутации E138K и/или G140S, в то время как появление и закрепление лекарственно устойчивых вариантов FSU-A с заменой G118R представляется маловероятным. ●

Мы благодарим д-ра Xue Zhi Zhao (Chemical Biology Laboratory, Center for Cancer Research, Frederick National Laboratory, NIH, USA) за любезно предоставленный ингибитор XZ-259.

Работа поддержана РФФИ (гранты № 13-04-91440-НИЗ_а, 13-04-01523а, 14-04-00833_а, 14-04-32086_мол-а) и программой развития Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (ПНР 5.13).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Quashie P.K., Mesplède T., Wainberg M.A. // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2013. V. 26. № 1. P. 43–49.
- Malet I., Delelis O., Valantin M.A., Montes B., Soulie C., Wiriden M., Tchertanov L., Peytavin G., Reynes J., Mouscadet J.-F., et al. // *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2008. V. 52. № 4. P. 1351–1358.
- Charpentier C., Karmochkine M., Laureillard D., Tisserand P., Bélec L., Weiss L., Si-Mohamed A., Piketty C. // *HIV Med.* 2008. V. 9. № 9. P. 765–770.
- Cooper D.A., Steigbigel R.T., Gatell J.M., Rockstroh J.K., Katlama C., Yeni P., Lazzarin A., Clotet B., Kumar P.N., Eron J.E., BENCHMRK Study Teams, et al. // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 359. № 4. P. 355–365.
- Goethals O., Clayton R., van Ginderen M., Vereycken I., Wagemans E., Geluykens P., Dockx K., Strijbos R., Smits V., Vos A., et al. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 21. P. 10366–10374.
- Stanford HIV Drug Resistance Database // <http://hivdb.stanford.edu/DR/INIResiNote.html>
- 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.
- Delelis O., Malet I., Na L., Tchertanov L., Calvez V., Marcelin A.G., Subra F., Deprez E., Mouscadet J.-F. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № 4. P. 1193–1201.
- Abram M.E., Hluchanich R.M., Goodman D.D., Andreatta K.N., Margot N.A., Ye L., Niedziela-Majka A., Barnes T.L., Novikov N., Chen X., et al. // *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2013. V. 57. № 6. P. 2654–2663.
- Fransen S., Gupta S., Danovich R., Hazuda D., Miller M., Witmer M., Petropoulos C.J., Huang W. // *J. Virol.* 2009. V. 83. № 22. P. 11440–11446.
- Goethals O., Vos A., van Ginderen M., Geluykens P., Smits V., Schols D., Hertogs K., Clayton R. // *Virology.* 2010. V. 402. № 2. P. 338–346.
- Canducci F., Ceresola E.R., Boeri E., Spagnuolo V., Cossarini F., Castagna A., Lazzarin A., Clementi M. // *J. Infect. Dis.* 2011. V. 204. № 11. P. 1811–1815.
- Underwood M.R., Johns B.A., Sato A., Martin J.N., Deeks S.G., Fujiwara T. // *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2012. V. 61. № 3. P. 297–301.
- Kobayashi M., Yoshinaga T., Seki T., Wakasa-Morimoto C., Brown K.W., Ferris R., Foster S.A., Hazen R.J., Miki S., Suyama-Kagitani A., et al. // *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2011. V. 55. № 2. P. 813–821.
- 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.
- Quashie P.K., Mesplède T., Han Y.S., Oliveira M., Singhroy D.N., Fujiwara T., Underwood M.R., Wainberg M.A. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 5. P. 2696–2705.
- 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.
18. Bar-Magen T., Sloan R.D., Donahue D.A., Kuhl B.D., Zabeida A., Xu H., Oliveira M., Hazuda D.J., Wainberg M.A. // *J. Virol.* 2010. V. 84. № 18. P. 9210–9216.
19. Malet I., Fourati S., Charpentier C., Morand-Joubert L., Armenia D., Wirten M., Sayon S., Van Houtte M., Ceccherini-Silberstein F., Brun-Vézinet F., et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2011. V. 66. № 12. P. 2827–2830.
20. Лаповок И.А., Лара В.Ю., Васильев А.В., Саламов Г.Г., Казеннова Е.В., Матковский И.А., Мохний Г.А., Мельник Т.А., Бобкова М.Р. // *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия.* 2012. Т. 4. № 2. С. 73–81.
21. Krotova O., Starodubova E., Petkov S., Kostic L., Agapkina J., Hallengård D., Viklund A., Latyshev O., Gelius E., Dillenbeck T., et al. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 5. e62720.
22. 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.
23. Métifiot M., Maddali K., Johnson B.C., Hare S., Smith S.J., Zhao X.Z., Marchand C., Burke T.R. Jr., Hughes S.H., Cherepanov P., et al. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 1. P. 209–217.
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. P. 9285–9294.
25. Marinello J., Marchand C., Mott B.T., Bain A., Thomas C.J., Pommier Y. // *Biochemistry.* 2009. V. 47. № 36. P. 9345–9354.