

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-83>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



Анализ особенностей белка Tat вируса иммунодефицита человека 1 типа суб-субтипа A6 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*)

Кузнецова А.И.¹, Громов К.Б.^{1,2}, Киреев Д.Е.², Шлыкова А.В.², Лопатухин А.Э.², Казеннова Е.В.¹, Лебедев А.В.¹, Туманов А.С.¹, Ким К.В.¹, Бобкова М.Р.¹

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

²ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 111123, Москва, Россия

Введение. Белок Tat вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) является главным фактором регуляции транскрипции генома ВИЧ и имеет ряд дополнительных внутриклеточных и внеклеточных активностей. Как и другим белкам ВИЧ, Tat свойственна изменчивость, при этом некоторые аминокислотные замены внутри белка Tat, включая субтип-специфичные, способны влиять на его функциональность. В РФ наиболее широко распространён ВИЧ 1 типа (ВИЧ-1) суб-субтипа A6. Исследования полиморфизма структурных областей генома A6 выявили многочисленные характерные особенности этого варианта, однако изучение области генома, кодирующей Tat, у ВИЧ-1 суб-субтипа A6 не проводилось.

Цели и задачи. Основной целью работы был анализ особенностей белка Tat у ВИЧ-1 суб-субтипа A6. Задачами исследования были выявление характеристических замен, сравнение полиморфизма белка Tat суб-субтипа A6 и наиболее близкого к нему суб-субтипа A1, а также определение статистически достоверных различий в функционально значимых доменах Tat суб-субтипа A6 и наиболее изученного субтипа B.

Материал и методы. Материалом для работы послужили нуклеотидные последовательности ВИЧ-1 суб-субтипов A6, A1, A2, A3, A4, субтипа B и референсная нуклеотидная последовательность, полученные из международной базы данных Los Alamos.

Результаты и обсуждение. Мутации Q54N и Q60H являются характеристическими заменами для A6. Продемонстрированы существенные достоверные различия в частоте естественных полиморфизмов белка Tat между суб-субтипами A6 и A1. В функционально значимом CPP-регионе выявлены мутации, достоверно различающиеся по частоте между суб-субтипом A6 и субтипом B ВИЧ-1 – R53K, Q54N, Q54P и R57G.

Заключение. Белок Tat варианта A6 ВИЧ-1 обладает особенностями, позволяющими достоверно отличить его от других генетических вариантов вируса. Выявленные в функционально значимом CPP-регионе мутации потенциально способны изменять активность данного белка. Полученные данные могут составить основу для разработки лекарственных и вакцинных препаратов.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1); суб-субтип A6; мутации; полиморфизм; белок Tat

Для цитирования: Кузнецова А.И., Громов К.Б., Киреев Д.Е., Шлыкова А.В., Лопатухин А.Э., Казеннова Е.В., Лебедев А.В., Туманов А.С., Ким К.В., Бобкова М.Р. Анализ особенностей белка Tat вируса иммунодефицита человека 1 типа суб-субтипа A6 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(6): 452-463. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-83>

Для корреспонденции: Кузнецова Анна Игоревна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. E-mail: a-myznikova@list.ru

Участие авторов: Кузнецова А.И. – методология исследования, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка и редактирование текста, разработка окончательного варианта статьи; Громов К.Б. – литературный поиск, работа с базой данных Los Alamos; Киреев Д.Е. – анализ и интерпретация полученных данных, подготовка и редактирование текста; Шлыкова А.В. – статистический анализ, подготовка и редактирование текста; Лопатухин А.Э. – статистический анализ, подготовка и редактирование текста; Казеннова Е.В. – методология исследования, разработка окончательного варианта статьи; Лебедев А.В. – литературный поиск, анализ и интерпретация полученных данных; Туманов А.С. – работа с базой данных Los Alamos, статистическая обработка результатов; Ким К.В. – работа с базой данных Los Alamos, статистическая обработка результатов; Бобкова М.Р. – визуализация, разработка концепции исследования, разработка окончательного варианта статьи.

Финансирование. Исследование выполнено с привлечением средств гранта Министерства образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки РФ) (уникальный идентификатор проекта RFMEFI61019X0020) в рамках осуществления международного проекта CARE «Горизонт 2020» (соглашение № 825673).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.10.2021

Принята в печать 24.11.2021

Опубликована 30.12.2021

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-83>

Analysis of Tat protein characteristics in human immunodeficiency virus type 1 sub-subtype A6 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*)

Anna I. Kuznetsova¹, Konstantin B. Gromov^{1,2}, Dmitry E. Kireev², Anastasia V. Shlykova², Alexey E. Lopatukhin², Elena V. Kazennova¹, Aleksey V. Lebedev¹, Alexander S. Tumanov¹, Kristina V. Kim¹, Marina R. Bobkova¹

¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia;

²FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), Moscow, 111123, Russia

Introduction. Tat protein is a major factor of HIV (human immunodeficiency virus) transcription regulation and has other activities. Tat is characterized by high variability, with some amino acid substitutions, including subtype-specific ones, being able to influence on its functionality. HIV type 1 (HIV-1) sub-subtype A6 is the most widespread in Russia. Previous studies of the polymorphisms in structural regions of the A6 variant have shown numerous characteristic features; however, Tat polymorphism in A6 has not been studied.

Goals and tasks. The main goal of the work was to analyze the characteristics of Tat protein in HIV-1 A6 variant, that is, to identify substitutions characteristic for A6 and A1 variants, as well as to compare the frequency of mutations in functionally significant domains in sub-subtype A6 and subtype B.

Material and methods. The nucleotide sequences of HIV-1 sub-subtypes A6, A1, A2, A3, A4, subtype B and the reference nucleotide sequence were obtained from the Los Alamos international database.

Results and discussion. Q54H and Q60H were identified as characteristic substitutions. Essential differences in natural polymorphisms between sub-subtypes A6 and A1 have been demonstrated. In the CPP-region, there were detected mutations (R53K, Q54H, Q54P, R57G) which were more common in sub-subtype A6 than in subtype B.

Conclusion. Tat protein of sub-subtype A6 have some characteristics that make it possible to reliably distinguish it from other HIV-1 variants. Mutations identified in the CPP region could potentially alter the activity of Tat. The data obtained could form the basis for the drugs and vaccines development.

Keywords: human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1); sub-subtype A6; mutations; polymorphism; Tat protein

For citation: Kuznetsova A.I., Gromov K.B., Kireev D.E., Shlykova A.V., Lopatukhin A.E., Kazennova E.V., Lebedev A.V., Tumanov A.S., Kim K.V., Bobkova M.R. Analysis of Tat protein characteristics in human immunodeficiency virus type 1 sub-subtype A6 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(6): 452-463. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-83>

For correspondence: Anna I. Kuznetsova, Ph.D. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of T-lymphotropic viruses, D.I. Ivanovsky Institute of Virology FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: a-myznikova@list.ru

Information about the authors:

Kuznetsova A.I., <https://orcid.org/0000-0001-5299-3081>

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

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

Shlykova 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>

Lebedev A.V., <https://orcid.org/0000-0001-6787-9345>

Tumanov A.S., <https://orcid.org/0000-0002-6221-5678>

Kim K.V., <https://orcid.org/0000-0002-4150-2280>

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

Contribution: Kuznetsova A.I. – study methodology, data analysis and interpretation, text preparation and editing, article's final version development; Gromov K.B. – thematic literature search, working with Los Alamos database; Kireev D.E. – data analysis and interpretation, text preparation and editing; Shlykova A.V. – statistical analysis, text preparation and editing; Lopatukhin A.E. – statistical analysis, text preparation and editing; Kazennova E.V. – methodology of the study, article's final version development; Lebedev A.V. – thematic literature search, data analysis and interpretation; Tumanov A.S. – working with Los Alamos database, statistical analysis; Kim K.V. – working with Los Alamos database, statistical analysis; Bobkova M.R. – visualization, study conceptualization, article's final version development.

Funding. The authors acknowledge the contribution of CARE Consortium funded by the European Union's Horizon 2020 programme (grant agreement No 825673) and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (unique project identifier RFMEFI61019X0020)

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

Received 11 October 2021

Accepted 24 November 2021

Published 30 December 2021

Введение

Несмотря на высокую эффективность современных средств антиретровирусной терапии (АРТ), необходимость поиска новых препаратов сохраняется. Одна из причин этого – феномен лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), ограничивающей возможность выбора схем АРТ, в особенности у пациентов с длительной историей лечения. Другая задача таких исследований – получение эффективных соединений с высоким уровнем безопасности и максимальным удобством приёма. Параллельно с разработкой новых фармакологических агентов ведутся работы по созданию профилактических и терапевтических вакцин против ВИЧ.

Одной из мишеней специфического воздействия будущих лечебных и вакцинных препаратов могут стать неструктурные белки вируса [1–3]. В настоящей работе продолжено обсуждение особенностей этих белков для суб-субтипа А6 ВИЧ 1 типа (ВИЧ-1), наиболее широко распространённого в России [4, 5]; объектом исследований в данном случае выступил белок Tat.

Внутриклеточные активности Tat

Белок Tat (trans-activator of transcription; транс-активатор транскрипции) вместе с другим белком – Rev – объединяется в группу регуляторных белков и играет ключевую роль в регуляции уровня транскрипции ВИЧ [6]. Этот протеин контролирует транскрипционный процесс посредством модуляции активности вирусного промотора и клеточной РНК-полимеразы II (RNAP II; RNA POL II) [7]. В зависимости от участия Tat транскрипцию провирусной ДНК разделяют на 2 этапа: Tat-зависимый и Tat-независимый.

Перед началом транскрипции провирусная ДНК ВИЧ освобождается от гистонов; происходит ремоделирование (перестройка) хроматина, что обеспечивает доступность этой молекулы (рис. 1). Первый этап – инициация с участием низкопроцессивной RNA POL II – начинается с присоединения факторов NF-κB и SP1, продолжаясь формированием так называемой TAR-петли (trans-activation response element; элемент ответа на реактивацию – Tat-связывающий элемент, имеющий структуру в виде короткой петли и расположенный на 5'-конце вирусного транскрипта), и заканчивается образованием коротких фрагментов РНК, кодирующих преимущественно регуляторные белки Tat и Rev. Далее короткие транскрипты перемещаются в цитоплазму, где они транслируются с образованием указанных белков [6–8]. Благодаря наличию сигнала ядерной локализации вновь образовавшийся Tat проникает в ядро [9], после чего начинается Tat-зависимый этап транскрипции нуклеиновой

кислоты ВИЧ [6–8]. Tat связывается с TAR-элементом и рекрутирует к участку инициации так называемый позитивный фактор элонгации транскрипции – комплекс Р-TEFb, состоящий из киназы CDK-9 и циклина T1. Эти события приводят к повышению процессивности RNA POL II с последующим формированием полноразмерных молекул РНК [3, 7, 8, 10]. В дополнение к описанному механизму белок Tat участвует в активации ацетилирования гистонов нуклеосом, делая таким образом ДНК доступной для RNA POL II и стимулируя этим инициацию транскрипции вирусной РНК [11, 12]. Отсутствие любой из описанных активностей Tat отменяет транскрипцию и поддерживает состояние латентности вируса в инфицированных клетках [13].

Дополнительная, не связанная с охарактеризованной выше активностью Tat заключается в его существенном влиянии на функцию митохондрий в заражённых клетках: изменяя транскрипцию митохондриальной ДНК (мтДНК) и вызывая повреждения её молекулы, данный белок возможно, опосредует митохондриальную дисфункцию, наблюдаемую у ВИЧ-инфицированных пациентов [14, 15].

Ещё один внутриклеточный эффект белка Tat состоит в способности ингибировать пролиферацию клеток посредством нарушения формирования митотического веретена [16]; это является вкладом в патогенез ВИЧ-инфекции и снижение числа CD4+ Т-клеток (рис. 2).

Внеклеточные эффекты Tat

В ходе внутриклеточного размножения ВИЧ белок Tat образуется в избытке, и хотя он не имеет необходимого для секреции сигнального пептида, этот протеин может использовать так называемые неклассические пути для выхода из клетки, в частности определяемые его сродством к фосфолипидам клеточной мембраны. Альтернативным вариантом является высвобождение Tat в момент разрушения инфицированных клеток [17]. Таким образом, белок попадает в межклеточное пространство и в последующем достигает практически всех тканей и клеток организма, взаимодействует с рецепторами на их поверхности и поглощается путём эндоцитоза [17, 18].

Tat не имеет выраженной вторичной структуры, будучи гибким и малоупорядоченным, однако это не препятствует его тесному связыванию с элементами внутриклеточного транскрипционного аппарата, а также со многими молекулами-«партнёрами» при нахождении в растворимой форме вне пределов клетки [1, 17].

Одной из наиболее изученных мишеней негативного воздействия белка Tat является центральная нерв-

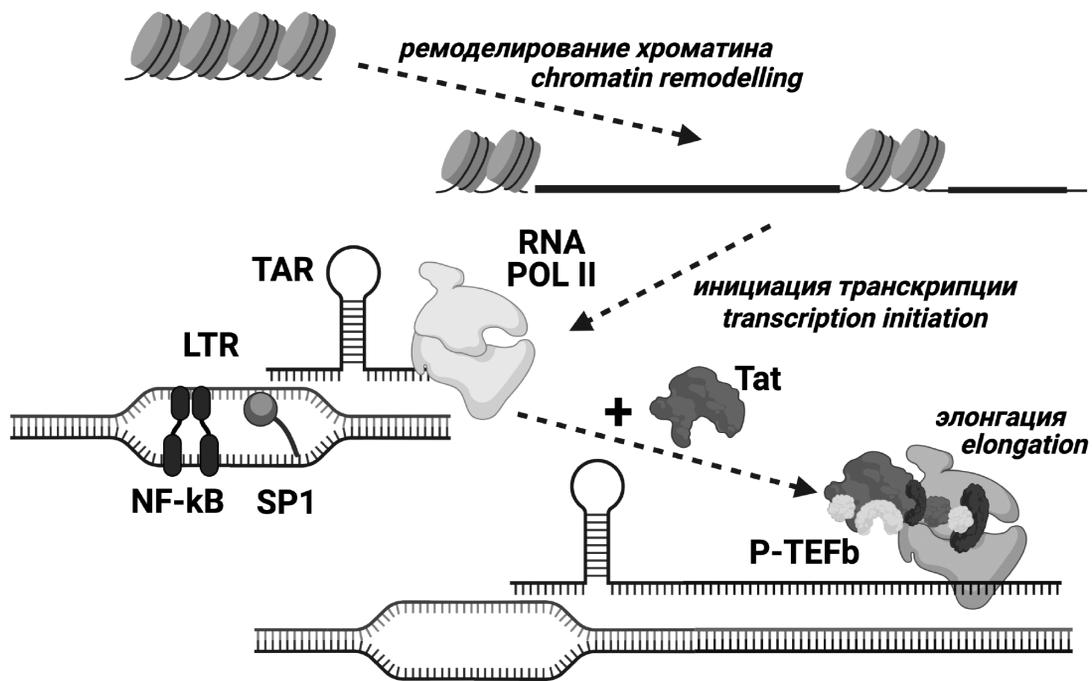


Рис. 1. Транскрипция провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека. RNA Pol II – клеточная РНК-полимераза II, TAR – элемент ответа на трансактивацию; LTR – длинные концевые повторы; NF-κB и SP1 – ядерные факторы, регулирующие скорость инициации вирусной транскрипции; Tat – белок Tat; P-TEFb – позитивный фактор элонгации транскрипции. Иллюстрация создана с применением графической программы BioRender, <https://biorender.com/>.

Fig. 1. Transcription of proviral human immunodeficiency virus DNA. RNA Pol II, cellular RNA polymerase II; TAR, transactivation response element; LTR, long terminal repeats; NF-κB and SP1, nuclear factors that regulate the rate of viral transcription initiation; Tat, Tat protein; P-TEFb, positive transcription elongation factor. The illustration was created using the graphics program BioRender, <https://biorender.com/>.

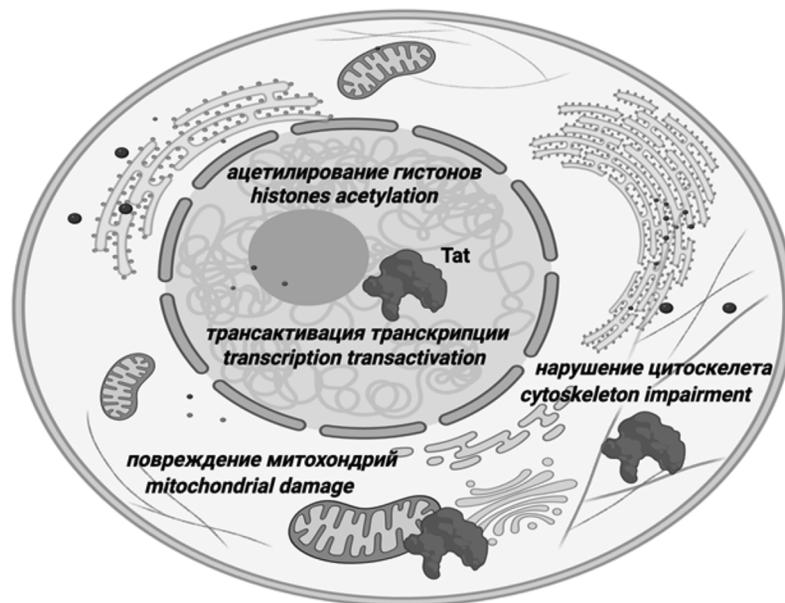


Рис. 2. Внутриклеточные активности белка Tat. Иллюстрация создана с применением графической программы BioRender, <https://biorender.com/>.

Fig. 2. Intracellular activities of Tat protein. The illustration was created using the graphics program BioRender, <https://biorender.com/>.

ная система (ЦНС). Непосредственно инфицировать нейроны ВИЧ не способен по причине отсутствия соответствующих рецепторов на их поверхности, поэтому все эффекты этого белка в данном случае

определяются исключительно проникновением его растворимой формы извне в клетки ЦНС. Результатом сочетанного действия Tat и других белков ВИЧ становятся нарушения, обозначаемые термином

«нейрокогнитивные расстройства, связанные с ВИЧ» (HIV-associated neurocognitive disorders, HAND), выраженность которых может достигать до степени деменции. Механизм действия Tat при этом связывают как с прямым нейротоксическим действием через повреждение нейронального цитоскелета, так и с деструкцией синаптических структур ЦНС [1, 18, 19].

Воздействие Tat на сердечно-сосудистую систему может проявляться участием в формировании лёгочной гипертензии, часто сопровождающей ВИЧ-инфекцию. В этой ситуации патофизиологический механизм предположительно обусловлен разрушением ДНК эндотелиальных клеток в сочетании с хроническим окислительным стрессом под воздействием проникающего в них Tat [20, 21]. Влияя на кардиомиоциты и парасимпатические нейроны, белок может вызывать брадикардию [22]. Кроме того, существует предположение о его ассоциации с повышенным риском развития атеросклероза у ВИЧ-инфицированных пациентов [23], что связывают с дисфункцией макрофагов и непосредственным влиянием на эндотелиоциты.

Онкогенный потенциал Tat также можно считать подтверждённым; обладая способностью взаимодействовать как с белковыми молекулами, так и с ДНК, он вмешивается в процессы размножения клеток, ускоряя клеточный цикл и способствуя опухолевому ангиогенезу [24]. Кроме того, известно, что Tat препятствует репарации двуцепочечных разрывов ДНК [24].

Структура и полиморфизм Tat

Tat представляет собой небольшой ядерный белок (от 86 до 106 аминокислот (АК), обычно 101), который кодируется 2 отдельными экзонами и содержит несколько доменов (рис. 3). Первый экзон включает АК в позициях с 1 по 72 и служит матрицей для синтеза транскрипционно активного белка Tat72, практически полностью обеспечивающего процесс элонгации транскрипции. Вторым экзон (73–101 АК) перекрывается с геном *env* и ответствен в основном за дополнительные функции Tat, возможно, опосредующие экспрессию хромосомных генов человека, связанных с активацией Т-клеток и их апоптозом [8, 25, 26].

Участок белка Tat72 состоит из 5 функциональных доменов (рис. 3):

- 1) первый (I) N-концевой домен (1–21 АК) включает пролин-обогащённый (Pro, P) участок и консервативный остаток триптофана (Trp, W) в 11 позиции; функция этого и второго доменов связана с взаимодействием с циклином Т1;
- 2) второй (II) домен (22–37 АК) включает 7 высококонсервативных остатков цистеина (Cys, C) в позициях 22, 25, 27, 30, 31, 34 и 37;
- 3) третий (III) домен (38–48 АК) – коровый (core), включающий гидрофобную последовательность 43LGISYG48; ответствен за контакт с гистоновыми ацетилтрансферазами и белком SP1;

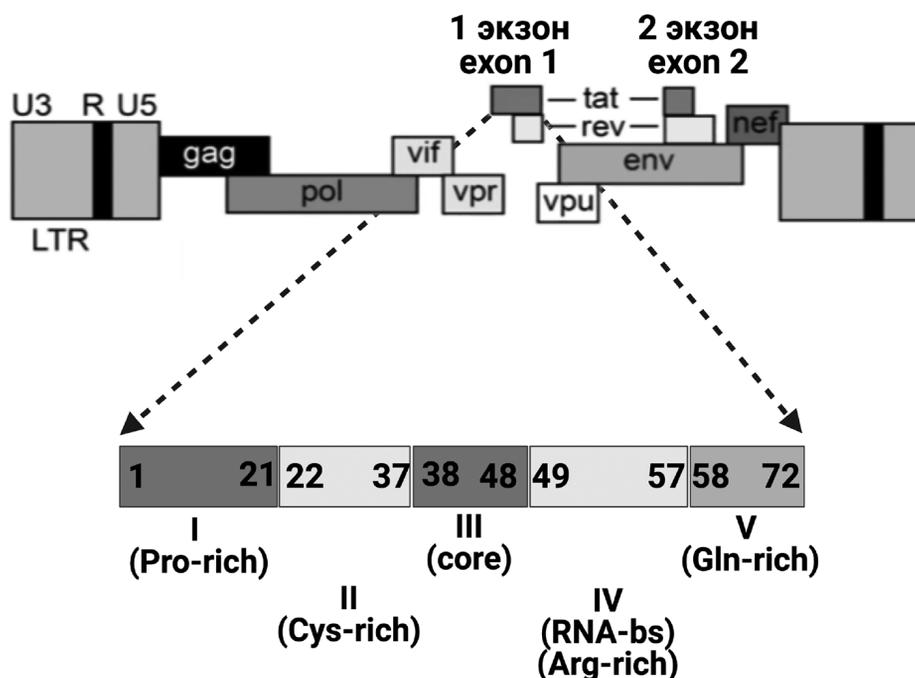


Рис. 3. Ген *tat* и функциональные домены белка Tat72. Tat кодируется двумя экзонами. Первые пять доменов (Tat72) кодируются первым экзонам. I (Pro-rich) – первый домен, пролин-богатая область; II (Cys-rich) – второй домен, цистеин-богатая область; III (core) – третий домен (коровый); IV (RNA-bs) (Arg-rich) – четвёртый домен, аргинин-богатая область, связывается с TAR-элементом РНК ВИЧ; V (Gln-rich) – пятый домен, глутамин-богатая область. Иллюстрация создана с применением графической программы BioRender, <https://biorender.com/>.

Fig. 3. *Tat* gene and functional domains of Tat72 protein. Tat is encoded by two exons. The first five domains are encoded by the first exon. I (Pro-rich), first domain, proline-rich region; II (Cys-rich), second domain, cysteine-rich region; III, third domain (core); IV (RNA-bs) (Arg-rich), fourth domain, arginine-rich region, binds to the TAR element of HIV RNA; V (Gln-rich), fifth domain, glutamine-rich region. The illustration was created using the graphics program BioRender, <https://biorender.com/>.

4) четвёртый (IV) – положительно заряженный домен (49–57 АК) содержит высококонсервативный аргинин-богатый (Arg, R) мотив 49RKRRRQRRR57 и служит главным участком связывания TAR. Этот домен обладает повышенной склонностью к ядерной локализации, участвуя при этом в секреции и поглощении белка Tat;

5) пятый (V) – глутамин-обогащённый (Gln, Q) регион (58–72 АК) демонстрирует наибольшую степень генетической изменчивости; вместе с четвёртым доменом обеспечивает ядерную локализацию Tat [1, 9, 13, 25].

Шестой (VI) домен (73–101 АК), кодируемый вторым экзоном, содержит RGD-мотив, служащий лигандом для некоторых интегринов, и высококонсервативный мотив 86ESKKEVE92, который может быть связан с оптимизацией репликации ВИЧ-1 *in vivo* и Tat-опосредованной защитой от апоптоза CD4⁺T-лимфоцитов [25, 26].

Несмотря на высокую мутационную изменчивость ВИЧ-1, Tat является относительно консервативным белком. В наибольшей степени это относится к его первым 56 АК, что указывает на их важную функциональную роль в активности этой молекулы. Среди консервативных остатков находятся все остатки Cys (кроме C31), большая часть остатков Pro, консервативный остаток Trp в 11 позиции и основной домен (остатки лизина (Lys, K) и Arg в позициях 49–57) [17]. Тем не менее, как и прочим белкам ВИЧ, для Tat свойственна вариабельность. В этой связи имеющиеся, хотя и немногочисленные, исследования посвящены анализу последовательностей этого протеина, изучению влияния особенностей структуры Tat на его свойства, а также на клинические проявления ВИЧ-инфекции, включая анализ субтип-специфических замен. Объектом исследований чаще всего выступали II, IV и V домены Tat, а сравнение проводилось между 2 субтипами – в наибольшей степени изученным В и считающимся наиболее агрессивным С; некоторые из полученных данных приводятся ниже.

Так, эксперименты на культуре клеток [27] и животных моделях [28], анализ клинических изолятов [29] и клинико-эпидемиологических данных пациентов [30] показали возможное влияние мутации C30S31 в дицистеиновом мотиве Tat (C30C31) на характер нейротропности ВИЧ-инфекции и в частности на вероятность развития когнитивных расстройств (HAND). Проведённые исследования также оценили значимость основного CPP-региона (cell penetrating peptide; пептид проникновения в клетку) из 10 АК (48–57), связанного с проникновением Tat в клетки. Интернализация Tat опосредуется его связыванием с гепарансульфат протеогликаном (heparan sulfate proteoglycan, HSPG), экспрессируемыми на клеточной поверхности всех тканей, включая ткани мозга; при этом отрицательно заряженные HSPG взаимодействуют с положительно заряженными остатками Arg и лизина (Lys, K) в CPP-регионе [31–33]. Полиморфизмы CPP могут изменять степень поглощения клетками белка Tat, влияя на распространение «вторичного»

воспалительного сигнала в ЦНС. Исследования *in vitro* методом конфокальной микроскопии с флуоресцентно мечеными пептидами установили, что замены R57S или R57G значительно снижают клеточный захват Tat с участием CPP [18].

Изучение полиморфизмов в функционально значимых доменах Tat различных субтипов ВИЧ показало, что регион CPP этого белка у ВИЧ-1 подтипов В, D и F в значительной степени сохраняет полный набор из 8 остатков Arg/Lys, необходимый для оптимального поглощения Tat, однако 3 субтипа – А, С и G – продемонстрировали наличие замен R57S или R57G [18]. Недавнее исследование полиморфизмов в Cys-, Arg- и Gln-обогащённых доменах белка Tat ВИЧ-1 субтипа С в Южной Бразилии продемонстрировало, что АК-замены C31S, R57S, Q63E у субтипа С встречались в 82, 74 и 80% случаев, тогда как у В – в 10, 20 и 20% соответственно, а мутация P60Q чаще выявлялась у субтипа В, чем у С (в 55 и 6% случаев соответственно) [34].

В России широко распространён ВИЧ-1 суб-субтипа А6, который вызвал инфекцию более чем у 70% пациентов [4, 35, 36]. К настоящему моменту изучение полиморфизма белка Tat в отношении ВИЧ-1 суб-субтипа А6 не проводилось. Вместе с тем выполненные ранее исследования других областей генома этого вируса установили наличие характерных для А6 отличий от других субтипов и рекомбинантных форм [37–40]. Получение сведений о структуре Tat у суб-субтипа А6 может быть полезным на различных этапах разработки новых препаратов для лечения и эрадикации ВИЧ-инфекции, создания вакцин и диагностических средств.

Целью данной работы было изучение особенностей области белка Tat, кодируемой первым экзоном и обеспечивающей трансактивацию, у суб-субтипа А6 ВИЧ-1: выявление характеристических замен, сравнение полиморфизмов А6 и наиболее близкого ему А1, а также выявление статистически значимых различий в дицистеиновом мотиве и CPP-регионе у суб-субтипа А6 и наиболее изученного в отношении биологических и клинических свойств субтипа В. Полученные данные позволят определить особенности структуры Tat у вирусов суб-субтипа А6 ВИЧ-1, спрогнозировать некоторые биологические свойства этого варианта и характер течения вызываемой им инфекции. Кроме того, результаты могут послужить стимулом для дальнейших исследований свойств белка Tat в культуре клеток и клинической практике.

Материал и методы

Из международной базы данных Los Alamos (Los Alamos National Laboratory; Main Search Interface of HIV Sequence Database; www.lanl.gov) были отображены 142 нуклеотидные последовательности первого экзона гена *tat* ВИЧ-1 суб-субтипа А6, 50 аналогичных последовательностей суб-субтипа А1, 6 нуклеотидных последовательностей суб-субтипа А2, 4 последовательности А3, 3 – А4 и 50 нуклеотидных последовательностей субтипа В. При этом для А2, А3 и А4 анализировались все представленные в базе нуклеотид-

ные последовательности первого экзона *tat*. В качестве референсной использовалась нуклеотидная последовательность штамма ВИЧ-1 дикого типа НХВ2 (K03455). Все последовательности были выровнены относительно референсной НХВ2 в программе MEGA v.10.2.2 (www.megasoftware.net). Размер анализируемого фрагмента составил 213 нуклеотидных оснований первого экзона гена *tat* (71 из 72 АК, кодируемых первым экзоном этого гена). После выравнивания некротные трём нуклеотидные вставки, включавшие повторяющиеся последовательности нуклеотидов, были интерпретированы как ошибки чтения и удалены.

После этого проведён контроль качества нуклеотидных последовательностей, в ходе которого из анализа исключены последовательности, содержавшие: а) замены в стартовом кодоне; б) стоп-кодоны; в) пропуски нуклеотидов; г) следующие 2 раза подряд N-вырождения.

Для каждого из суб-субтипов А – А6, А1, А2, А3, А4, а также для субтипа В консенсусные последовательности получали в 2 этапа. Первоначально для каждого варианта вируса с помощью программного обеспечения Advanced Consensus Maker tool на сайте базы данных Los Alamos (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/AdvCon.html>) формировалась нуклеотидная консенсусная последовательность. Алгоритм данной программы предполагает включение в консенсус наиболее часто встречаемого нуклеотида по заданной позиции. Так как каждая АК кодируется триплетом, а при формировании консенсуса по каждому нуклеотиду осуществляется независимый анализ, то в случае равновероятного нахождения 2 нуклеотидов в одной позиции при образовании консенсусной последовательности АК существует возможность ошибок. В связи с этим на втором этапе при помощи программы MEGA v.10.2.2 осуществляли «ручную» проверку и корректировку консенсусных нуклеотидных последовательностей, собранных в Advanced Consensus Maker tool.

После этого проводили сравнение полученных последовательностей между собой и с референс-последовательностью, выявляя характеристические замены для суб-субтипа А6; при этом под характеристическими заменами понимали мутации, встречающиеся в составе генома вируса с частотой >50%.

Сравнение консенсусных последовательностей и референс-последовательности НХВ2 осуществляли в программе MEGA 10.2.2. Вначале были отмечены позиции, различающиеся у консенсуса суб-субтипа А6 и референс-штамма НХВ2. Затем позиции с выявленными различиями АК были сопоставлены соответствующим позициям в консенсусах суб-субтипов А1, А2, А3, А4 и субтипа В.

При сравнении естественных полиморфизмов А6 и А1 первоначально посредством программы MEGA v.10.2.2 выявляли естественные полиморфизмы обоих суб-субтипов относительно референсного штамма НХВ2; при этом под полиморфизмами понимали мутации – единичные замены, встречающиеся в ≥1% наблюдений [41]. Далее с применением программного модуля Nonparametric Statistics из пакета STATISTICA 8.0

(StatSoft Inc., США) выявляли сайты со статистически достоверными различиями ($p < 0,05$ при использовании критерия χ^2). В дальнейшем анализе для большей наглядности из выявленных позиций со статистически значимыми различиями учитывали только те, в которых частота полиморфизма одного из сравниваемых суб-субтипов составляла ≥20%.

Отдельно сравнивали мутации – единичные замены в функционально значимых дицистеиновом мотиве и СРР-регионе белка Tat суб-субтипа А6 и субтипа В ВИЧ-1. После выявления всех имеющихся замен в анализируемых регионах для обоих вариантов вируса при помощи модуля Nonparametric Statistics (программный пакет STATISTICA 8.0) выявляли сайты с достоверными различиями ($p < 0,05$ в случае применения критерия χ^2).

Результаты

В данной работе мы проводили анализ 71 из 72 АК, расположенных в области Tat, кодируемой первым экзоном гена *tat*. В результате проведения контроля качества по 1 нуклеотидной последовательности суб-субтипов А6 (AF193275) и А1 (FJ388942), а также 3 таковых субтипа В (AB097870, A07867, AY819715) были исключены из дальнейшего процесса. Таким образом, в окончательный анализ вошли 141 последовательности суб-субтипа А6, 49 – суб-субтипа А1, 6 – суб-субтипа А2, 4 – суб-субтипа А3, 3 – А4 и 47 нуклеотидных последовательностей субтипа В.

После проверки и корректировки в MEGA v.10.2.2 консенсусных нуклеотидных последовательностей, собранных в Advanced Consensus Maker tool, в соответствующих им последовательностях АК произведены следующие замены:

- в консенсусе суб-субтипа А6: в 36 позиции изолейцин (Ile, I) заменён на валин (Val, V);
- в консенсусе суб-субтипа А2: в 36 позиции метионин (Met, M) заменён на R/L/V; в 69 позиции I – на I/V;
- в консенсусе суб-субтипа А3: в 12 позиции гистидин (His, H) заменён на H/Q; в 23 позиции серин (Ser, S) – на аспарагин (Asn, N)/S; в 24 позиции K заменён на N/K; в 53 позиции K – на K/R;
- в консенсусе суб-субтипа А4: в 36 позиции I заменён на V/M/S; в 60 позиции H – на H/R/тирозин (Tyr, Y);
- в консенсусе субтипа В: в 39 позиции I заменён на треонин (Thr, T).

По итогам сравнения консенсусной последовательности А6 с референсной НХВ2 и последующего сопоставления с таковыми суб-субтипов А1, А2, А3, А4 и субтипа В получены данные, приведённые в **табл. 1**. Отмечены позиции АК, по которым консенсус суб-субтипа А6 отличался от консенсуса для штамма НХВ2, а также указаны АК в соответствующих позициях у субтипа В и суб-субтипов А1, А2, А3 и А4.

Из таблицы видно, что наименьшие отличия от НХВ2 выявлены, как и предполагалось, у субтипа В (позиции 42, 59, 61, 67). Для прочих вариантов вируса во всех доменах Tat обнаружены отличия как от референсного штамма НХВ2, так и от В.

На основе анализа представленных в **табл. 1** дан-

ных выделены 2 группы АК-замен у суб-субтипа А6: а) типичные исключительно для А6 (Q54H, Q60H); б) характерные как для А6, так и для других суб-субтипов А (E2D, R7N, K12N, T23S, F32W, I39L, T40K, R57G, A58T, N61S, Q63K, T64D, A67N, S68P, L69I).

При сравнении естественных полиморфизмов в области, кодируемой первым экзоном гена *tat*, суб-субтипов А6 и филогенетически близкого к нему А1 установлены значительные различия во всех анализируемых доменах (табл. 2).

Анализ мутаций – единичных замен в дицистеиновом мотиве (С30С31) белка Tat не выявил достоверных различий у суб-субтипа А6 и у субтипа В ВИЧ-1, тогда как в СРР-регионе (АК-позиции 48–57) у этих вариантов вируса обнаружены 4 замены со статистически значимыми различиями – R53K, Q54H, Q54P, R57G (табл. 3).

Обсуждение

Как уже отмечалось, белок Tat является транс-активатором транскрипции генома ВИЧ, а также обладает рядом дополнительных внутри- и внеклеточных активностей. Мутации (АК-замены) внутри его молекулы способны влиять на эффективность функциони-

рования этого белка; при этом некоторые влияющие на функциональность Tat замены могут быть субтип-специфичными. Более того, белок Tat находится в перечне стратегических разработок для функционального излечения от ВИЧ-инфекции [2]. К настоящему времени созданы 2 анти-ВИЧ-протеина: Nullbasic (мутантный Tat) и НТ1 (гибридный белок HEX-IM1-Tat), подавляющие вирусную транскрипцию путём влияния на взаимодействие Tat и Rev с клеточными факторами [42, 43]. Получены также 2 малые молекулы – дидегидрокортистатин А (dCA) и триптолид, которые подавляют активность белка Tat посредством его прямого ингибирования либо усиления протеосомной деградации, соответственно [44, 45]. Помимо этого, в стадии разработки находятся 2 вакцины на основе Tat, которые, как уже показано, вызывают образование Tat-нейтрализующих антител, приводят к повышению числа CD4+ Т-клеток и снижению вирусной нагрузки у ВИЧ-инфицированных лиц [46, 47]. В данной работе изучались особенности области, кодируемой первым экзоном гена *tat*, у ВИЧ-1 суб-субтипа А6, наиболее распространённого на территории РФ.

Таблица 1. Аминокислотные позиции, в которых АК консенсуса суб-субтипа А6 отличались от АК в референсном штамме HXB2, и АК в соответствующих позициях консенсусов субтипа В и суб-субтипов А1, А2, А3, А4 вируса иммунодефицита человека 1 типа*

Table 1. The amino acid positions in which the consensus of sub-subtype А6 were different from the reference strain HXB2, and amino acids in consensus of subtype В and sub-subtypes А1, А2, А3, А4 human immunodeficiency virus type 1 in the corresponding positions*

Домен Domain	Номер позиции АК Amino acid position number	Штамм HXB2 HXB2 strain	Субтип В В subtype	Суб-субтип А6 A6 sub-subtype	Суб-субтип А1 A1 sub-subtype	Суб-субтип А2 A2 sub-subtype	Суб-субтип А3 A3 sub-subtype	Суб-субтип А4 A4 sub-subtype
I	2	E	E	D	D	E	E	E
	7	R	R	N	N	K	N	N
	12	K	K	N	N	N	H/Q	K
II	23	T	T	S	S	N	S/N	N
	32	F	F	W	Y	Y	W	Y
III	39	I	I	L	L	L	L	L
	40	T	T	K	N	N	N	K
	42	A	G	G	G	G	G	G
IV	54	Q	Q	H	Q	P	Q	L
	57	R	R	G	G	G	G	G
V	58	A	A	T	T	P	T	T
	59	H	P	P	P	S	P	P
	60	Q	Q	H	Q	Q	Q	H/R/Y
	61	N	D	S	S	S	S	S
	63	Q	Q	K	K	K	K	K
	64	T	T	D	D	D	D	D
	67	A	V	N	N	N	N	N
	68	S	S	P	P	P	P	P
69	L	L	I	I	I/V	V	I	

*Примечание. Жирным шрифтом выделены позиции с характеристическими заменами и кандидатами на характеристические замены для суб-субтипа А6.

*Note. Positions with characteristic substitutions and candidates for characteristic substitutions in sub-subtype А6 are shown in bold.

Таблица 2. Частота встречаемости мутаций (единичных замен) в области, кодируемой первым экзоном гена *tat*, вариантов суб-субтипов А1 и А6 вируса иммунодефицита человека 1 типа

Table 2. Frequency of mutations (single substitutions) in the region coded by the first exon of *tat* gene of human immunodeficiency virus type 1 sub-subtypes A1 and A6

Домен Domain	Мутация Mutation	Частота встречаемости (%) Frequency of occurrence, percentage		Домен Domain	Мутация Mutation	Частота встречаемости (%) Frequency of occurrence, percentage		Домен Domain	Мутация Mutation	Частота встречаемости (%) Frequency of occurrence, percentage	
		A1	A6			A1	A6			A1	A6
I	E2D	87,8	99,3	III	I39L	73,5	99,3	V	A58T	67,3	85,8
	R7N	81,6	93,6		I39Q	24,5	0,0		Q60H	14,3	75,9
	K19T	77,6	0,7		T40K	20,4	92,2		T64D	79,6	98,6
	A21P	57,1	0,7		T40N	59,2	6,4		A67N	87,8	62,4
II	T23S	53,1	85,8	IV	R53K	26,5	9,9	S68P	91,8	59,6	
	T23N	44,9	11,3		Q54H	0,0	63,1	S68L	4,1	28,4	
	N24K	77,6	13,5		Q54P	6,1	22,7	L69I	59,2	89,4	
	F32W	6,1	95		R57G	63,3	92,2	L69V	32,7	5,0	
	F32Y	85,7	0,0					S70P	83,7	7,8	
	Q35P	28,6	0,0					T64D	79,6	98,6	
	V36I	0,0	36,9					A67N	87,8	62,4	

Примечание. Мутациями считали замены в указанных позициях в сравнении с референс-штаммом HXB2. Жирным шрифтом выделены позиции, в которых замены у суб-субтипа А6 встречались более чем в 3,5 раза чаще.

Note. Mutations were defined as the substitutions in the indicated positions in comparison with the reference strain HXB2. The positions in which substitutions in the A6 subtype were found more than 3.5 times often are shown in bold.

Таблица 3. Мутации в дицистеиновом домене и CPP-регионе белка Tat вируса иммунодефицита человека 1 типа суб-субтипа А6 и субтипа В

Table 3. Mutations in the dicysteine domain and CPP region of Tat protein in human immunodeficiency virus type 1 subtype A6 and subtype B

	Мутация Mutation	Суб-субтип А6 A6 sub-subtype <i>n</i> = 141	Субтип В B subtype <i>n</i> = 47	<i>p</i> -критерий <i>p</i> value
Дицистеиновый домен (C30C31) Dicysteine domain (C30C31)	C30R	2	0	0,4150
	C31S	7	1	0,4207
	C31V	5	0	0,1986
CPP-регион (48–57 позиции АК)	R49S	0	1	0,0857
	R52Q	1	0	0,5641
	R52W	1	1	0,4183
	R53K	14	0	0,0327
	R53G	0	1	0,0857
	Q54H	89	0	0,0000
	Q54P	32	2	0,0134
	Q54R	9	0	0,0856
CPP– region (48–57 aa positions)	Q54S	2	0	0,4150
	Q54N	1	0	0,5641
	R56C	1	0	0,5641
	R56H	1	0	0,5641
	R57G	130	3	0,0000
	R57E	1	0	0,5641
	R57A	1	0	0,5641

Примечание. Жирным шрифтом выделены замены со статистически значимыми различиями между суб-субтипом А6 и субтипом В. Анализ проводился при использовании критерия χ^2 .

Note. Substitutions with statistically significant differences between sub-subtype A6 and subtype B are shown in bold. The analysis was carried out using the χ^2 test.

По результатам выполненного исследования мутации Q54H и Q60H интерпретированы как характеристические замены для суб-субтипа А6 (табл. 1). Обращают на себя внимание также мутации F32W и T40K, выявлявшиеся в консенсусных последовательностях

суб-субтипа А6 и суб-субтипов А3 и А4 соответственно, но не обнаруженные в консенсусных последовательностях субтипа В, суб-субтипов А1 и А2 (табл. 1). Учитывая небольшие выборки последовательностей А3 и А4, позиции F32W и T40K следует также рассма-

тривать в качестве претендентов (кандидатов) на характеристические замены для ВИЧ-1 суб-субтипа А6.

При сопоставлении профилей естественных полиморфизмов белка Tat у суб-субтипов А6 и А1 в каждом домене, кодируемом первым экзоном гена *tat*, наблюдались значимые различия (табл. 2). Особое внимание следует обратить на замены F32W, V36I, T40K, Q54H, Q54P, Q60H, S68L, которые у А6 встречались более чем в 3,5 раза чаще.

При анализе частоты встречаемости мутаций в функционально значимых доменах достоверных различий в дицистеиновом мотиве у суб-субтипа А6 и субтипа В не обнаружено, тогда как в СРР-регионе найдены замены со статистически значимыми различиями – R53K, Q54H, Q54P и R57G (табл. 3). В настоящее время известно, что интернализация Tat опосредуется взаимодействием положительно заряженных остатков Arg и Lys в СРР-регионе с отрицательно заряженными HSPG на поверхности клеток, а замена R57G значительно снижает клеточный захват Tat [17, 23]. У суб-субтипа А6 замена R57G присутствовала в 92,2% (в 130 из 141 последовательности), тогда как у субтипа В – в 6,4% (3 из 47 последовательностей). Потенциально широко распространённая в Tat суб-субтипа А6 замена R57G (92,2%) способна вызывать снижение воспалительного потенциала данного белка, однако необходимо принимать во внимание возможное влияние других замен у Tat А6 в СРР-регионе: R53K (9,9% наблюдений), Q54H (63,1%) и Q54P (22,7%), которые могут как усиливать, так и ослаблять эффект мутации R57G.

Заключение

В результате проведённого анализа области белка Tat, кодируемой первым экзоном, у суб-субтипа А6 обнаружены характеристические замены, продемонстрированы существенные достоверные различия естественных полиморфизмов между А6 и А1, в СРР-регионе выявлены мутации с достоверно значимыми различиями для суб-субтипа А6 и наиболее изученного субтипа В. В целом полученные данные указывают на то, что Tat у суб-субтипа А6 обладает характерными особенностями и содержит АК-замены, которые потенциально способны оказывать влияние на функциональность этого белка. Полученные нами данные позволяют учитывать особенности Tat у ВИЧ-1 суб-субтипа А6 при разработке лекарственных препаратов и вакцин. Результаты экспериментов могут послужить стимулом для изучения комплексного влияния выявленных замен в СРР-регионе Tat у А6 на патогенный потенциал данного белка в клеточной культуре, а также для анализа клинических особенностей течения ВИЧ-инфекции у пациентов, инфицированных ВИЧ-1 суб-субтипа А6.

ЛИТЕРАТУРА

- Campbell G.R., Loret E.P. What does the structure-function relationship of the HIV-1 Tat protein teach us about developing an AIDS vaccine? *Retrovirology*. 2009; 6: 50. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-50>
- Jin H., Li D., Lin M.H., Li L., Harrich D. Tat-based therapies as an adjuvant for an HIV-1 functional cure. *Viruses*. 2020; 12(4): 415. <https://doi.org/10.3390/v12040415>
- Asamitsu K., Fujinaga K., Okamoto T. HIV tat/P-TEFb interaction: a potential target for novel anti-HIV therapies. *Molecules*. 2018; 23(4): 933. <https://doi.org/10.3390/molecules23040933>
- Лаповок И.А., Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е., Казеннова Е.В., Лебедев А.В., Бобкова М.Р., и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в России в 1987–2015 гг. *Терапевтический архив*. 2017; 89(11): 44–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017891144-49>
- 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): 281–90. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-281-290>
- Rosen C.A. Tat and Rev: positive modulators of human immunodeficiency virus gene expression. *Gene Expr*. 1991; 1(2): 85–90.
- Clark E., Nava B., Caputi M. Tat is a multifunctional viral protein that modulates cellular gene expression and functions. *Oncotarget*. 2017; 8(16): 27569–81. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15174>
- Ajasin D., Eugenin E.A. HIV-1 Tat: Role in bystander toxicity. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2020; 10: 61. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00061>
- Spector C., Mele A.R., Wigdahl B., Nonnemacher M.R. Genetic variation and function of the HIV-1 Tat protein. *Med. Microbiol. Immunol*. 2019; 208(2): 131–69. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00583-z>
- Asamitsu K., Okamoto T. The Tat/P-TEFb protein-protein interaction determining transcriptional activation of HIV. *Curr. Pharm. Des*. 2017; 23(28): 4091–7. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170710164148>
- Nekhai S., Jeang K.T. Transcriptional and post-transcriptional regulation of HIV-1 gene expression: role of cellular factors for Tat and Rev. *Future Microbiol*. 2006; 1(4): 417–26. <https://doi.org/10.2217/17460913.1.4.417>
- Vardabasso C., Manganaro L., Lusic M., Marcello A., Giacca M. The histone chaperone protein nucleosome assembly protein-1 (hNAP-1) binds HIV-1 Tat and promotes viral transcription. *Retrovirology*. 2008; 5: 8. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-8>
- Kamori D., Ueno T. HIV-1 Tat and viral latency: What we can learn from naturally occurring sequence variations. *Front. Microbiol*. 2017; 8: 80. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00080>
- Rodríguez-Mora S., Mateos E., Moran M., Martín M.Á., López J.A., Calvo E., et al. Intracellular expression of Tat alters mitochondrial functions in T cells: a potential mechanism to understand mitochondrial damage during HIV-1 replication. *Retrovirology*. 2015; 12: 78. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0203-3>
- Darbinian N., Darbinyan A., Merabova N., Selzer M.E., Amini S. HIV-1 and HIV-1-Tat induce mitochondrial DNA damage in human neurons. *HIV AIDS*. 2020; 6(1): 176. <https://doi.org/10.16966/2380-5536.176>
- Kim J., Kim Y.S. Effect of HIV-1 Tat on the formation of the mitotic spindle by interaction with ribosomal protein S3. *Sci. Rep*. 2018; 8(1): 8680. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27008-w>
- Debaisieux S., Rayne F., Yezid H., Beaumelle B. The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic*. 2012; 13(3): 355–63. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01286.x>
- Ruiz A.P., Ajasin D.O., Ramasamy S., DesMarais V., Eugenin E.A., Prasad V.R. A naturally occurring polymorphism in the HIV-1 Tat basic domain inhibits uptake by bystander cells and leads to reduced neuroinflammation. *Sci. Rep*. 2019; 9(1): 3308. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39531-5>
- Wenzel E.D., Avdoshina V., Mocchetti I. HIV-associated neurodegeneration: exploitation of the neuronal cytoskeleton.

- Neurovirol.* 2019; 25(3): 301–12. <https://doi.org/10.1007/s13365-019-00737-y>
20. Simenauer A., Nozik-Grayck E., Cota-Gomez A. The DNA damage response and HIV-associated pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(9): 3305. <https://doi.org/10.3390/ijms21093305>
 21. Anand A.R., Rachel G., Parthasarathy D. HIV proteins and endothelial dysfunction: implications in cardiovascular disease. *Front. Cardiovasc. Med.* 2018; 5: 185. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00185>
 22. Brailoiu E., Deliu E., Sporici R.A., Benamar K., Brailoiu G.C. HIV-1-Tat excites cardiac parasympathetic neurons of nucleus ambiguus and triggers prolonged bradycardia in conscious rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014; 306(11): R814–22. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00529.2013>
 23. Jiang Y., Chai L., Fasae M.B., Bai Y. The role of HIV Tat protein in HIV-related cardiovascular diseases. *J. Transl. Med.* 2018; 16(1): 121. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1500-0>
 24. Isaguliants M., Bayurova E., Avdoshina D., Kondrashova A., Chiodi F., Palefsky J.M. Oncogenic effects of HIV-1 proteins, mechanisms behind. *Cancers.* 2021; 13(2): 305. <https://doi.org/10.3390/cancers13020305>
 25. Li L., Dahiya S., Kortagere S., Aiamkitsumrit B., Cunningham D., Pirrone V., et al. Impact of Tat genetic variation on HIV-1 disease. *Adv. Virol.* 2012; 2012: 123605. <https://doi.org/10.1155/2012/123605>
 26. López-Huertas M.R., Mateos E., del Cojo M.S., Gómez-Esquer F., Diaz-Gil G., Rodríguez-Mora S., et al. The presence of HIV-1 Tat protein second exon delays Fas protein-mediated apoptosis in CD4⁺ T Lymphocytes: a potential mechanism for persistent viral production. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(11): 7626–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.408294>
 27. Mishra M., Vetrivel S., Siddappa N.B., Ranga U., Seth P. Clade-specific differences in neurotoxicity of human immunodeficiency virus-1 B and C Tat of human neurons: significance of dicysteine C30C31 motif. *Ann. Neurol.* 2008; 63(3): 366–76. <https://doi.org/10.1002/ana.21292>
 28. Rao V.R., Sas A.R., Eugenin E.A., Siddapa N.B., Bimonte-Nelson H., Berman J.W., et al. HIV-1 clade-specific differences in the induction of neuropathogenesis. *J. Neurosci.* 2008; 28(40): 10010–6. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2955-08.2008>
 29. Rao V.R., Neogi U., Talboom J.S., Padilla L., Rahman M., Fritz-French C., et al. Clade C HIV-1 isolates circulating in Southern Africa exhibit a greater frequency of dicysteine motif-containing Tat variants than those in Southeast Asia and cause increased neurovirulence. *Retrovirology.* 2013; 10: 61. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-61>
 30. Paul R.H., Joska J.A., Woods C., Seedat S., Engelbrecht S., Hoare J., et al. Impact of the HIV Tat C30C31S dicysteine substitution on neuropsychological function in patients with clade C disease. *J. Neurovirol.* 2014; 20(6): 627–35. <https://doi.org/10.1007/s13365-014-0293-z>
 31. Vivès E., Brodin P., Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(25): 16010–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.25.16010>
 32. Ziegler A., Seelig J. Interaction of the protein transduction domain of HIV-1 TAT with heparan sulfate: binding mechanism and thermodynamic parameters. *Biophys. J.* 2004; 86(1 Pt. 1): 254–63. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(04\)74101-6](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(04)74101-6)
 33. Ziegler A., Nervi P., Dürrenberger M., Seelig J. The cationic cell-penetrating peptide CPP^{TAT} derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence. *Biochemistry.* 2005; 44(1): 138–8. <https://doi.org/10.1021/bi0491604>
 34. de Almeida S.M., Rotta I., Vidal L.R.R., Dos Santos J.S., Nath A., Johnson K., et al. HIV-1C and HIV-1B Tat protein polymorphism in Southern Brazil. *J. Neurovirol.* 2021; 27(1): 126–36. <https://doi.org/10.1007/s13365-020-00935-z>
 35. Bobkov A., Kazennova E., Selimova L., Bobkova M., Khanina T., Ladnaya N., et al. A sudden epidemic of HIV type 1 among injecting drug users in the former Soviet Union: identification of subtype A, subtype B, and novel gagA/envB recombinants. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1998; 14(8): 669–76. <https://doi.org/10.1089/aid.1998.14.669>
 36. Lebedev A., Lebedeva N., Moskaleychik F., Pronin A., Kazennova E., Bobkova M. Human immunodeficiency virus-1 diversity in the Moscow Region, Russia: Phylodynamics of the most common subtypes. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 320. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00320>
 37. Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Васильев А.В., Бобкова М.П. Естественные полиморфизмы гена *pol* варианта ВИЧ-1 IDU-A. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии.* 2012; 4(4): 44–51.
 38. Васильев А.В., Казеннова Е.В., Бобкова М.П. Предсказание фенотипа R5/X4 вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России, с использованием компьютерных методов. *Вопросы вирусологии.* 2009; 54(3): 17–20.
 39. Казеннова Е.В., Васильев А.В., Бобкова М.П. Прогноз эффективности применения препарата Беверимат для лечения ВИЧ-инфекции в России. *Вопросы вирусологии.* 2010; 55(3): 37–41.
 40. Lapovok I., Laga V., Kazennova E., Bobkova M. HIV type 1 integrase natural polymorphisms in viral variants circulating in FSU countries. *Curr. HIV Res.* 2017; 15(5): 318–26. <https://doi.org/10.2174/1570162X15666170815162052>
 41. Shafer R.W., Rhee S.Y., Pillay D., Miller V., Sandstrom P., Schapiro J.M., et al. HIV protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS.* 2007; 21(2): 215–23. <https://doi.org/10.1097/qad.0b013e328011e691>
 42. Jin H., Sun Y., Li D., Lin M.H., Lor M., Rustanti L., et al. Strong *in vivo* inhibition of HIV-1 replication by Nullbasic, a Tat mutant. *mBio.* 2019; 10(4): e01769–19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01769-19>
 43. Leoz M., Kukanja P., Luo Z., Huang F., Cary D.C., Peterlin B.M., et al. HEXIM1-Tat chimera inhibits HIV-1 replication. *PLoS Pathog.* 2018; 14(11): e1007402. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007402>
 44. Mediouni S., Chinthalapudi K., Ekka M.K., Usui I., Jablonski J.A., Clementz M.A., et al. Didehydro-cortistatin A inhibits HIV-1 by specifically binding to the unstructured basic region of Tat. *mBio.* 2019; 10(1): e02662–18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02662-18>
 45. Wan Z., Chen X. Triptolide inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication by promoting proteasomal degradation of Tat protein. *Retrovirology.* 2014; 11: 88. <https://doi.org/10.1186/s12977-014-0088-6>
 46. Sgadari C., Monini P., Tripiciano A., Picconi O., Casabianca A., Orlandi C., et al. Continued decay of HIV proviral DNA upon vaccination with HIV-1 Tat of subjects on long-term ART: An 8-year follow-up study. *Front. Immunol.* 2019; 10: 233. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00233>
 47. Loret E.P., Darque A., Jouve E., Loret E.A., Nicolino-Brunet C., Morange S., et al. Intradermal injection of a Tat Oyi-based therapeutic HIV vaccine reduces of 1.5 log copies/mL the HIV RNA rebound median and no HIV DNA rebound following cart interruption in a phase I/II randomized controlled clinical trial. *Retrovirology.* 2016; 13: 21. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0251-3>

REFERENCES

1. Campbell G.R., Loret E.P. What does the structure-function relationship of the HIV-1 Tat protein teach us about developing an AIDS vaccine? *Retrovirology.* 2009; 6: 50. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-50>
2. Jin H., Li D., Lin M.H., Li L., Harrich D. Tat-based therapies as an adjuvant for an HIV-1 functional cure. *Viruses.* 2020; 12(4): 415. <https://doi.org/10.3390/v12040415>
3. Asamitsu K., Fujinaga K., Okamoto T. HIV tat/P-TEFb interaction: a potential target for novel anti-HIV therapies. *Molecules.* 2018; 23(4): 933. <https://doi.org/10.3390/molecules23040933>

4. Lapovok I.A., Lopatukhin A.E., Kireev D.E., Kazennova E.V., Lebedev A.V., Bobkova M.R., et al. Molecular epidemiological analysis of HIV-1 variants circulating in Russia in 1987–2015 [*Molekulyarno-epidemiologicheskii analiz variantov VICH-1, tsirkulirovavshikh v Rossii v 1987–2015 gg.*]. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2017; 89(11): 44–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017891144-49> (in Russian)
5. Gromov K.B., Kireev D.E., Murzakova A.V., Lopatukhin A.E., Kazennova E.V., 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 [*Analiz polimorfizma belka Nef variantov VICH-1 (Human immunodeficiency virus-1, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae), tsirkuliruyushchikh v stranakh byvshego SSSR*]. *Voprosy virusologii*. 2019; 64(6): 281–90. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-281-290> (in Russian)
6. Rosen C.A. Tat and Rev: positive modulators of human immunodeficiency virus gene expression. *Gene Expr*. 1991; 1(2): 85–90.
7. Clark E., Nava B., Caputi M. Tat is a multifunctional viral protein that modulates cellular gene expression and functions. *Oncotarget*. 2017; 8(16): 27569–81. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15174>
8. Ajasin D., Eugenin E.A. HIV-1 Tat: Role in bystander toxicity. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2020; 10: 61. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00061>
9. Spector C., Mele A.R., Wigdahl B., Nonnemacher M.R. Genetic variation and function of the HIV-1 Tat protein. *Med. Microbiol. Immunol*. 2019; 208(2): 131–69. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00583-z>
10. Asamitsu K., Okamoto T. The Tat/P-TEFb protein-protein interaction determining transcriptional activation of HIV. *Curr. Pharm. Des*. 2017; 23(28): 4091–7. <https://doi.org/10.2174/138161282366170710164148>
11. Nekhai S., Jeang K.T. Transcriptional and post-transcriptional regulation of HIV-1 gene expression: role of cellular factors for Tat and Rev. *Future Microbiol*. 2006; 1(4): 417–26. <https://doi.org/10.2217/17460913.1.4.417>
12. Vardabasso C., Manganaro L., Lusic M., Marcello A., Giacca M. The histone chaperone protein nucleosome assembly protein-1 (hNAP-1) binds HIV-1 Tat and promotes viral transcription. *Retrovirology*. 2008; 5: 8. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-8>
13. Kamori D., Ueno T. HIV-1 Tat and viral latency: What we can learn from naturally occurring sequence variations. *Front. Microbiol*. 2017; 8: 80. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00080>
14. Rodríguez-Mora S., Mateos E., Moran M., Martín M.Á., López J.A., Calvo E., et al. Intracellular expression of Tat alters mitochondrial functions in T cells: a potential mechanism to understand mitochondrial damage during HIV-1 replication. *Retrovirology*. 2015; 12: 78. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0203-3>
15. Darbinian N., Darbinyan A., Merabova N., Selzer M.E., Amini S. HIV-1 and HIV-1-Tat induce mitochondrial DNA damage in human neurons. *HIV AIDS*. 2020; 6(1): 176. <https://doi.org/10.16966/2380-5536.176>
16. Kim J., Kim Y.S. Effect of HIV-1 Tat on the formation of the mitotic spindle by interaction with ribosomal protein S3. *Sci. Rep*. 2018; 8(1): 8680. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27008-w>
17. Debaisieux S., Rayne F., Yezid H., Beaumelle B. The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic*. 2012; 13(3): 355–63. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01286.x>
18. Ruiz A.P., Ajasin D.O., Ramasamy S., DesMarais V., Eugenin E.A., Prasad V.R. A naturally occurring polymorphism in the HIV-1 Tat basic domain inhibits uptake by bystander cells and leads to reduced neuroinflammation. *Sci. Rep*. 2019; 9(1): 3308. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39531-5>
19. Wenzel E.D., Avdoshina V., Mocchetti I. HIV-associated neurodegeneration: exploitation of the neuronal cytoskeleton. *Neurovirol*. 2019; 25(3): 301–12. <https://doi.org/10.1007/s13365-019-00737-y>
20. Simenauer A., Nozik-Grayck E., Cota-Gomez A. The DNA damage response and HIV-associated pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21(9): 3305. <https://doi.org/10.3390/ijms21093305>
21. Anand A.R., Rachel G., Parthasarathy D. HIV proteins and endothelial dysfunction: implications in cardiovascular disease. *Front. Cardiovasc. Med*. 2018; 5: 185. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00185>
22. Brailoiu E., Deliu E., Sporic R.A., Benamar K., Brailoiu G.C. HIV-1-Tat excites cardiac parasympathetic neurons of nucleus ambiguus and triggers prolonged bradycardia in conscious rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2014; 306(11): R814–22. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00529.2013>
23. Jiang Y., Chai L., Fasae M.B., Bai Y. The role of HIV Tat protein in HIV-related cardiovascular diseases. *J. Transl. Med*. 2018; 16(1): 121. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1500-0>
24. Isagulians M., Bayurova E., Avdoshina D., Kondrashova A., Chiodi F., Palefsky J.M. Oncogenic effects of HIV-1 proteins, mechanisms behind. *Cancers*. 2021; 13(2): 305. <https://doi.org/10.3390/cancers13020305>
25. Li L., Dahiya S., Kortagere S., Aiamkitsumrit B., Cunningham D., Pirrone V., et al. Impact of Tat genetic variation on HIV-1 disease. *Adv. Virol*. 2012; 2012: 123605. <https://doi.org/10.1155/2012/123605>
26. López-Huertas M.R., Mateos E., del Cojo M.S., Gómez-Esquer F., Díaz-Gil G., Rodríguez-Mora S., et al. The presence of HIV-1 Tat protein second exon delays Fas protein-mediated apoptosis in CD4⁺ T Lymphocytes: a potential mechanism for persistent viral production. *J. Biol. Chem*. 2013; 288(11): 7626–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.408294>
27. Mishra M., Vetrivel S., Siddappa N.B., Ranga U., Seth P. Clade-specific differences in neurotoxicity of human immunodeficiency virus-1 B and C Tat of human neurons: significance of dicysteine C30C31 motif. *Ann. Neurol*. 2008; 63(3): 366–76. <https://doi.org/10.1002/ana.21292>
28. Rao V.R., Sas A.R., Eugenin E.A., Siddappa N.B., Bimonte-Nelson H., Berman J.W., et al. HIV-1 clade-specific differences in the induction of neuropathogenesis. *J. Neurosci*. 2008; 28(40): 10010–6. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2955-08.2008>
29. Rao V.R., Neogi U., Talboom J.S., Padilla L., Rahman M., Fritz-French C., et al. Clade C HIV-1 isolates circulating in Southern Africa exhibit a greater frequency of dicysteine motif-containing Tat variants than those in Southeast Asia and cause increased neurovirulence. *Retrovirology*. 2013; 10: 61. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-61>
30. Paul R.H., Joska J.A., Woods C., Seedat S., Engelbrecht S., Hoare J., et al. Impact of the HIV Tat C30C31S dicysteine substitution on neuropsychological function in patients with clade C disease. *J. Neurovirol*. 2014; 20(6): 627–35. <https://doi.org/10.1007/s13365-014-0293-z>
31. Vivès E., Brodin P., Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem*. 1997; 272(25): 16010–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.25.16010>
32. Ziegler A., Seelig J. Interaction of the protein transduction domain of HIV-1 TAT with heparan sulfate: binding mechanism and thermodynamic parameters. *Biophys. J*. 2004; 86(1 Pt. 1): 254–63. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(04\)74101-6](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(04)74101-6)
33. Ziegler A., Nervi P., Dürrenberger M., Seelig J. The cationic cell-penetrating peptide CPP^{TAT} derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence. *Biochemistry*. 2005; 44(1): 138–8. <https://doi.org/10.1021/bi0491604>
34. de Almeida S.M., Rotta I., Vidal L.R.R., Dos Santos J.S., Nath A., Johnson K., et al. HIV-1C and HIV-1B Tat protein polymorphism in Southern Brazil. *J. Neurovirol*. 2021; 27(1): 126–36. <https://doi.org/10.1007/s13365-020-00935-z>
35. Bobkov A., Kazennova E., Selimova L., Khanina T., Ladnaya N., et al. A sudden epidemic of HIV type 1 among injecting drug users in the former Soviet Union: identification of subtype A, subtype

- B, and novel gagA/envB recombinants. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1998; 14(8): 669–76. <https://doi.org/10.1089/aid.1998.14.669>
36. Lebedev A., Lebedeva N., Moskalychik F., Pronin A., Kazennova E., Bobkova M. Human immunodeficiency virus-1 diversity in the Moscow Region, Russia: Phylodynamics of the most common subtypes. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 320. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00320>
 37. Kazennova E.V., Lapovok I.A., Laga V.Yu., Vasil'ev A.V., Bobkova M.R. Natural polymorphisms of HIV-1 IDU-A variant *pol* gene [Estestvennyye polimorfizmy gena *pol* varianta VICH-1 IDU-A]. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2012; 4(4): 44–51 (in Russian).
 38. Vasil'ev A.V., Kazennova E.V., Bobkova M.R. Prediction of phenotype R5/X4 of HIV-1 variants circulating in Russia, by using computer methods [Predskazanie fenotipa R5/X4 variantov VICH-1, tsirkuliruyushchikh v Rossii, s ispol'zovaniem komp'yuternykh metodov]. *Voprosy virusologii*. 2009; 54(3): 17–20 (in Russian).
 39. Kazennova E.V., Vasil'ev A.V., Bobkova M.R. Prediction of the efficacy of bevirimat used for the treatment of HIV infection in Russia [Prognoz effektivnosti primeneniya preparata Bevirimat dlya lecheniya VICH-infektsii v Rossii]. *Voprosy virusologii*. 2010; 55(3): 37–41 (in Russian).
 40. Lapovok I., Laga V., Kazennova E., Bobkova M. HIV type 1 integrase natural polymorphisms in viral variants circulating in FSU countries. *Curr. HIV Res.* 2017; 15(5): 318–26. <https://doi.org/10.2174/1570162X15666170815162052>
 41. Shafer R.W., Rhee S.Y., Pillay D., Miller V., Sandstrom P., Schapiro J.M., et al. HIV protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS*. 2007; 21(2): 215–23. <https://doi.org/10.1097/qad.0b013e328011e691>
 42. Jin H., Sun Y., Li D., Lin M.H., Lor M., Rustanti L., et al. Strong *in vivo* inhibition of HIV-1 replication by Nullbasic, a Tat mutant. *mBio*. 2019; 10(4): e01769–19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01769-19>
 43. Leoz M., Kukanja P., Luo Z., Huang F., Cary D.C., Peterlin B.M., et al. HEXIM1-Tat chimera inhibits HIV-1 replication. *PLoS Pathog.* 2018; 14(11): e1007402. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007402>
 44. Mediouni S., Chinthalapudi K., Ekka M.K., Usui I., Jablonski J.A., Clementz M.A., et al. Didehydro-cortistatin A inhibits HIV-1 by specifically binding to the unstructured basic region of Tat. *mBio*. 2019; 10(1): e02662–18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02662-18>
 45. Wan Z., Chen X. Triptolide inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication by promoting proteasomal degradation of Tat protein. *Retrovirology*. 2014; 11: 88. <https://doi.org/10.1186/s12977-014-0088-6>
 46. Sgadari C., Monini P., Tripiciano A., Picconi O., Casabianca A., Orlandi C., et al. Continued decay of HIV proviral DNA upon vaccination with HIV-1 Tat of subjects on long-term ART: An 8-year follow-up study. *Front. Immunol.* 2019; 10: 233. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00233>
 47. Loret E.P., Darque A., Jouve E., Loret E.A., Nicolino-Brunet C., Morange S., et al. Intradermal injection of a Tat Oyi-based therapeutic HIV vaccine reduces of 1.5 log copies/mL the HIV RNA rebound median and no HIV DNA rebound following cart interruption in a phase I/II randomized controlled clinical trial. *Retrovirology*. 2016; 13: 21. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0251-3>