

Рыжов К.А.¹, Носик М.Н.¹, Кравченко А.В.²

Изменчивость регуляторных генов ВИЧ-1, выявляемых с помощью полимеразной цепной реакции

¹ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва; ²ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва

Исследовано 200 образцов от ВИЧ-инфицированных лиц: 50 образцов из Республики Саха (Якутия), 50 образцов из Вологодской области (Череповец) и 100 образцов из Московского региона (Москва и Московская область). Все образцы были получены от больных, не проходивших антиретровирусную терапию. В ходе исследования обнаружено, что в результате одностадийной амплификации регуляторные гены *vif*, *vpr*, *vpr*, *rev*, *tat* и *nef* амплифицируются с малой чувствительностью. При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) тех же образцов с использованием «гнездовой» ПЦР частота выявления этих генов значительно возросла. При изучении гена *nef* было установлено, что в поздних (3 и 4) стадиях инфекции в ядрах клеток наблюдается феномен сплайсинга, который отсутствует в ранних стадиях инфекции. Этот эффект может являться причиной перехода бессимптомной стадии ВИЧ-инфекции в манифестирующую. Впервые было показано, что изменчивость регуляторных генов зависит от субтипа вируса.

Ключевые слова: ВИЧ; регуляторные гены ВИЧ; «гнездовая» полимеразная цепная реакция; стадия ВИЧ-инфекции.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(3): 41–44.

Ryzhov K. A.¹, Nosik M. N.¹, Kravtchenko A. V.²

A study of the HIV-1 regulatory genes using the polymerase chain reaction

¹Federal State Budgetary Institution «I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia; ²Federal Budget Institution of Science «Central Research Institute of Epidemiology» of the Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, 111123, Moscow, Russia

In this work, a total of 200 samples from the HIV-infected individuals were analyzed: 50 samples from the Saha Republic (Yakutia), 50 samples from the Vologda Region (City of Cherepovets), and 100 samples from the Moscow Region (Moscow and Moscow Region). All samples were obtained from the patients who were not undergoing antiretroviral therapy. It was detected that the regulatory genes *vif*, *vpr*, *vpr*, *rev*, *tat*, and *nef* were amplified with moderate sensitivity after one-stage amplification. When those samples were analyzed by the nested PCR the detection ratio was much higher. While studying *nef*-gene the phenomena of the splicing in cells cores was detected at the advanced stages of the HIV-infection (3 and 4 stages). At the same time, the splicing was not detected at the earlier stages of the HIV-infection. This effect might be the cause of the transition from asymptomatic stage of the infection to the advanced stage. It was also shown for the first time that the variability of the regulatory genes correlated with the virus subtype.

Key words: HIV; regulatory genes; PCR; nested PCR; stages of HIV-infection.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(3): 41–44. (In Russ.)

For correspondence: Konstantin Ryzhov, senior researcher; e-mail: rkazaw@yahoo.com

Received 23.05.13

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), относящийся к семейству ретровирусов, имеет уникальное строение генома, заключающееся в наличии системы регуляторных генов *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, которые отсутствуют у других ретровирусов. Эти гены оказывают выраженное влияние на скорость репродукции вируса и его инфекционность и играют ключевую роль в патогенезе СПИДа. Так, ген *vif* ответственен за повышение инфекционности вирусных частиц в 10^2 – 10^3 раз в последних стадиях вирусного цикла [1]. Показано, что у лиц, инфицированных штаммами ВИЧ-1, у которых ген *nef* содержит дефектные аллели, развитие болезни наступает гораздо позже [2]. Нуклеотидные замены в гене *vpr* (мутация R77Q) также ведут к замедлению прогрессирования ВИЧ-инфекции [3]. Ген *tat*, ответственный за распространение вируса *in vivo* и иммуносупрессию неинфицированных клеток, связывают с такими патологиями, как саркома Капоши и ВИЧ-ассоциированная деменция, ускоряющими течение заболевания и приводящими к летальному

исходу [4]. Имеются данные о том, что при хронической инфекции белки *vpr*, *tat*, *nef* индуцируют апоптоз Т-клеток [5, 6].

В связи с вышесказанным изучение структурных особенностей регуляторных генов является важной задачей для понимания механизмов ВИЧ-инфекции, так как изменения, происходящие в этих генах, могут влиять на характер течения заболевания. Целью настоящей работы было определить, как связаны изменения в структуре регуляторных генов с биологическими свойствами вируса.

Материалы и методы

Выделение генетического материала. Выделение провирусной ДНК из клеток и вирусной РНК из плазмы крови проводили с помощью коммерческих систем производства фирмы «Интерлабсервис».

Подбор праймеров. Наиболее распространенными молекулярно-биологическими методами изучения генов являются полимеразная цепная реакция (ПЦР) и

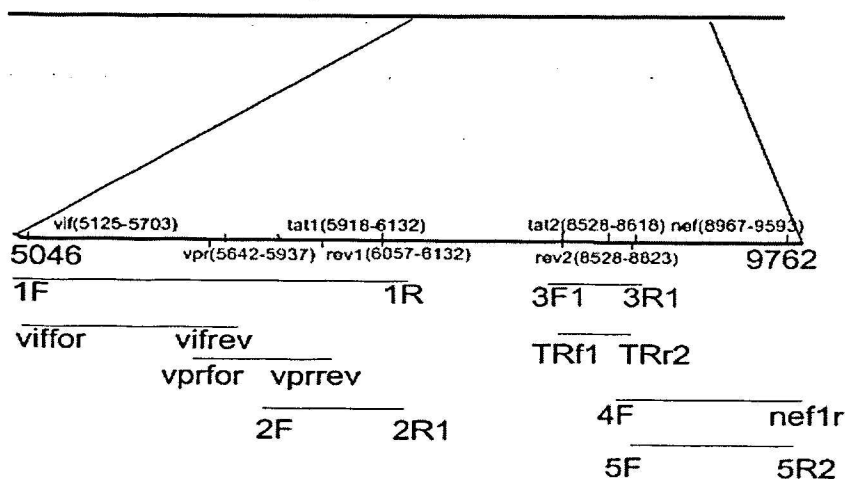


Рис. 1. Схема расположения системы праймеров для амплификации ВИЧ-1. Цифрами указаны позиции праймеров на консенсусной последовательности ВИЧ-1 субтипа А.

секвенирование. Однако при изучении регуляторных генов ВИЧ необходимо учитывать ряд факторов, сильно влияющих на чувствительность этих методов. Это высокая изменчивость ВИЧ, мозаичное строение генов *tat* и *rev*, перекрывающиеся рамки считывания и наличие высоковариабельных участков. При подборе праймеров приходится учитывать субтипы, характерные для территории, на которой проводятся исследования.

Были подобраны праймеры к каждому регуляторному гену. Поскольку фрагмент гена *rev1* находится «внутри» гена *tat1*, а фрагмент гена *tat2* «внутри» гена *rev2*, выявляли большие фрагменты, т. е. *tat1* и *rev2*.

Для повышения чувствительности выявления регуляторных генов проводили двухстадийную (nested) ПЦР. Для этого праймеры рассчитаны и синтезированы 2 пары внешних праймеров, расположенных в высококонсервативных участках генома. Данные праймеры амплифицировали фрагменты, содержащие гены *vif*, *vpr*, *tat1*, *rev1*, *vpr* и *tat2*, *rev2* и *nef* соответственно. Схема расположения праймеров на геноме ВИЧ приведена на рис. 1.

Амплификация. ПЦР и обратнотранскриптазную ПЦР (ОТ-ПЦР) проводили с помощью коммерческих тест-систем производства фирмы «Интерлабсервис» в соответствии с инструкцией с использованием синтезированных праймеров. В качестве положительного контроля использовали плазмиду рВН10, содержащую полноразмерный геном ВИЧ-1. В качестве отрицательного контроля использовали ДНК, выделенную из лимфоцитов здоровых людей.

Подбор условий ПЦР и амплификацию образцов выполняли на градиентном амплификаторе (Eppendorf).

Электрофорез проводили в 1,5% агарозном геле при 100 В.

Результаты и обсуждение

В работе исследовали 50 образцов от ВИЧ-инфицированных из Республики Саха (Якутия), 50 образцов из Вологодской области (Череповец) и 100 образцов из Московского региона (Москва и Московская область). Образцы были получены как от больных, не проходивших антиретровирусную терапию, так и от больных, находившихся на лечении (табл. 1).

В результате одностадийной амплификации регуляторных генов *vif*, *vpr*, *vpr*, *rev*, *tat* и *nef* было установ-

лено, что все они амплифицируются с малой чувствительностью. Результат амплификации одного из образцов приведен на рис. 2.

Из этого рисунка видно, что в клиническом образце имеется большое количество неспецифических полос, связанных с тем, что концевые последовательности регуляторных генов частично комплементарны последовательностям человеческого генома. Аналогичный результат был получен при исследовании других клинических образцов.

При проведении ПЦР тех же образцов с использованием дополнительных внешних праймеров (nested ПЦР) удалось выявить различные регуляторных генов (рис. 3).

Из рис. 3 следует, что в клинических образцах после двухстадийной амплификации наблюдаются четкие полосы, что говорит о правильно подобранной схеме проведения реакции.

В дальнейшем все исследования регуляторных генов проводили по следующей схеме: генетический материал выделяли из лимфоцитов (провиральная ДНК и ядерная РНК) и плазмы крови (вирусная РНК). Далее РНК подвергали ОТ-ПЦР. С провиральной ДНК сразу проводили амплификацию.

Амплификацию выполняли по схеме, показанной на рис. 1. В стадии 1 использовали праймеры 1F - 1R и TRf1 - nef1r, далее ставили реакцию с использованием олигонуклеотидов для выявления отдельных генов.

При изучении гена *nef* было обнаружено, что в поздних (3 и 4) стадиях инфекции в ядерной фракции РНК

Таблица 1
Распределение образцов по стадиям болезни

Стадия ВИЧ-инфекции	Количество образцов (n = 200)
2	115
3	68
4	17

Примечание. Здесь и в табл. 2: стадии ВИЧ-инфекции приведены по классификации В.В. Покровского.

Таблица 2
Результаты исследования гена *nef*, выделенного от пациентов Московского региона в разных стадиях болезни (n = 100)

Генетический материал	Стадия ВИЧ-инфекции	Количество образцов	Выявляемый фрагмент	
			нормальный	укороченный
Провиральная ДНК	2	35	+	-
	3, 4	65	+	-
Вирусная РНК	2	35	+	-
	3, 4	65	+	-
Ядерная РНК	2	35	+	-
	3, 4	65	+	+
Плазмиды	-	1	+	-

Примечание. + - фрагмент выявляется; - - фрагмент не выявляется.

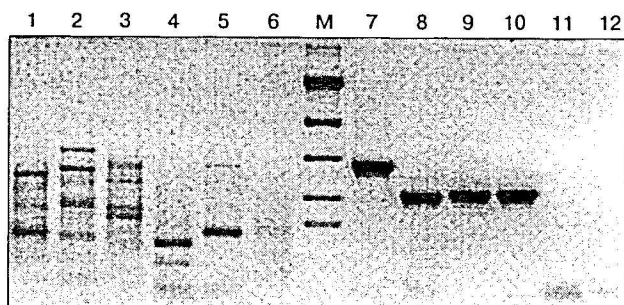


Рис. 2. Результат амплификации регуляторных генов *vif*, *vpr*, *vpr*, *rev*, *tat* и *nef* в одностадийной ПЦР.

М – ДНК-маркер молекулярной массы; 1, 7 – ПЦР с праймерами для выявления *vif*; 2, 8 – ПЦР с праймерами для выявления *vpr*; 3, 9 – ПЦР с праймерами для выявления *vpr*; 4, 10 – ПЦР с праймерами для выявления *tat*; 5, 11 – ПЦР с праймерами для выявления *rev*; 6, 12 – ПЦР с праймерами для выявления *nef*; 1–6 – образец от ВИЧ-инфицированного пациента М-11 (Москва); 7–12 – положительный контроль (плазмида рВН10).

появляются фрагменты гена *nef*, которые на 120 нуклеотидов меньше фрагментов, полученных в ранних стадиях инфекции, а также выделенных из вирусной РНК, провирусной ДНК и положительного контроля. Результаты приведены в табл. 2.

Определение генетической последовательности полученных фрагментов полностью подтвердило данные гель-электрофореза. Исходя из полученных результатов можно сделать вывод, что в ядре клетки РНК гена *nef* подвергается сплайсингу. Поскольку этот эффект проявляется только в поздних стадиях ВИЧ-инфекции, можно заключить, что сплайсинг является одной из причин перехода болезни из бессимптомной стадии в манифестирующую.

Эксперименты для выделения и изучения последовательностей других регуляторных генов из ядерной РНК не увенчались успехом. Это можно объяснить как малым количеством исследуемых фрагментов РНК в ядерной фракции, так и тем, что граничные последовательности этих генов неблагоприятны для исследования с помощью ПЦР из-за высокой вариабельности данных областей генома ВИЧ. Двухстадийный ПЦР-анализ провирусной ДНК и вирусной РНК показал разнообразие длин получаемых амплификатов и различную частоту выявления этих генов (табл. 3). Так, амплификаты генов *tat* и *rev*, выделенные от разных пациентов, различались по размеру примерно на 30–80 нуклеотидов. Однако не было выявлено корреляции между длиной амплифика-

Таблица 3

Результаты исследования генов *vif*, *vpr*, *vpr*, *tat1-rev1* и *tat2-rev2*, выделенных от пациентов в разных стадиях болезни ($n = 200$)

Стадия (число образцов)	Ген, % выявления				
	<i>vif</i>	<i>vpr</i>	<i>vpr</i>	<i>tat1-rev1</i>	<i>tat2-rev2</i>
2 (115)	95	92	97	83	86
3, 4 (85)	96	93	97	83	87

Примечание. Здесь и в табл. 4: % выявления считали от количества образцов данной стадии.

Таблица 4

Частота выявления генов *vif*, *vpr*, *vpr*, *tat1-rev1* и *tat2-rev2*, выделенных от пациентов с разными субтипами вируса ($n = 193^*$)

Ген	Субтип, % выявления (число образцов)		
	A (132)	B (25)	<i>gagA/envB</i> (36)
<i>vif</i>	95	94	91
<i>vpr</i>	93	93	90
<i>vpr</i>	97	98	92
<i>tat1-rev1</i>	83	85	79
<i>tat2-rev2</i>	86	86	81

Примечание. * – В таблицу не вошли данные о больных с другими субтипами вируса и не выявленными субтипами ($n = 7$).

тов (амплифицированных генов) и стадиями болезни.

Из результатов, приведенных в этой таблице, видно, что чувствительность ПЦР при исследовании генов *vif*, *vpr*, *tat1-rev1* и *tat2-rev2* не зависит от стадии болезни. Более низкая чувствительность для генов *tat1-rev1* и *tat2-rev2* связана с более высокой изменчивостью этих генов и перекрывающимися рамками считывания.

При детальном анализе полученных результатов выяснилось, что частота выявления регуляторных генов *tat*, *rev*, *vif* и *vpr* ниже, а разброс размеров амплификатов выше для субтипа *gagA/envB*, чем для субтипов А и В (табл. 4).

Заключение

В результате работы установлено, что из-за высокой изменчивости регуляторных генов для их изучения необходимо ставить «гнездовую» (nested) ПЦР.

В поздних стадиях ВИЧ-инфекции (3 и 4) был выявлен феномен сплайсинга гена *nef* в ядрах клеток. Данный феномен не наблюдался при исследовании вирусной РНК, выделенной из плазмы ВИЧ-инфицированных и провирусной ДНК независимо от стадии болезни, а

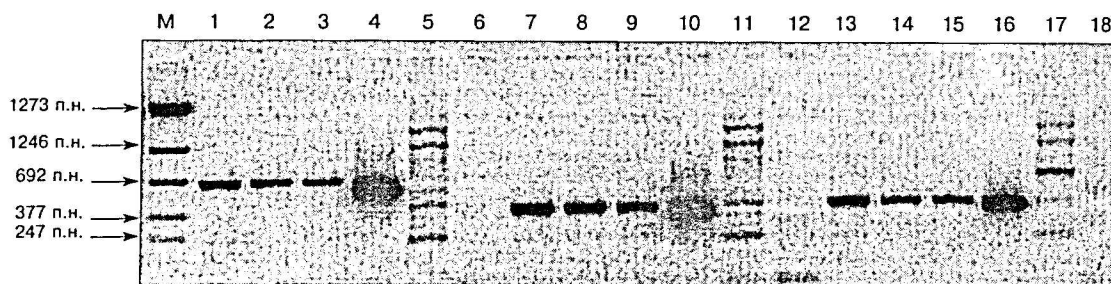


Рис. 3. Результат амплификации регуляторных генов *vif*, *vpr* и *tat-rev1* в двухстадийной ПЦР.

М – ДНК-маркер молекулярной массы; 1, 7, 13 – ВИЧ-положительный клинический образец М-11 (Москва); 2, 8, 14 – ВИЧ-положительный клинический образец М-12 (Москва); 3, 9, 15 – ВИЧ-положительный клинический образец М-13 (Москва); 4, 10, 16 – положительный контроль (плазмиды рВН10); 5, 11, 17 – отрицательный контроль (ДНК из лимфоцитов здорового донора); 6, 12, 18 – отрицательный контроль (H_2O); 1–6 – ПЦР с праймерами к гену *vif*; 7–12 – ПЦР с праймерами к гену *vpr*; 13–18 – ПЦР с праймерами к гену *tat-rev1*.

также в ранних стадиях инфекции. Этот эффект может являться причиной перехода бессимптомной стадии ВИЧ-инфекции в манифестирующую.

Было впервые показано, что изменчивость регуляторных генов зависит от субтипа вируса. Исходя из этого факта можно предположить, что в субтипе gagA/envB, для которого выявлена большая частота мутаций в регуляторных генах, при лечении также быстрее образуются мутации и в структурных генах (gag, pol и env), ведущие к появлению вариантов, устойчивых к антиретровирусным препаратам.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ohagen A., Gabuzda D. Role of Vif in Stability of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Core. *J. Virol.* 2000; 74(23): 11055–66.

2. Raymond A.D., Campbell-Sims T.C., Khan M., Lang M., Huang M.B., Bond V.C. et al. HIV type 1 Nef is released from infected cells in CD45⁺ microvesicles and is present in the plasma of HIV-infected individuals. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 2011; 27(2): 167–78.
3. Mologni D., Citterio P., Menzaghi B., Zanone Poma B., Riva C., Brogini V. et al. Vpr and HIV-1 disease progression: R77Q mutation is associated with long-term control of HIV-1 infection in different groups of patients. *AIDS.* 2006; 20(4): 567–74.
4. Huigen M.C., Kamp W., Nottet H.S. Multiple effects of HIV-1 transactivator protein on the pathogenesis of HIV-1 infection. *Eur. J. Clin. Invest.* 2004; 34: 57–66.
5. Boya P., Pauleau A.L., Poncet D., Gonzalez-Polo R.A., Zamzami N., Kroemer G. Viral proteins targeting mitochondria: Controlling cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1659 (2–3): 178–89.
6. Chase A., Zhou Y., Siliciano R.F. HIV-1-induced depletion of CD4⁺ T cells in the gut: Mechanism and therapeutic implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006; 27: 4–7.

Поступила 23.05.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 2015

УДК 578.833.26:578.56].083.2

Дзюев Ю.П.^{1,2}, Парамонов А.И.², Рева О.Н.³, Букин Ю.С.⁴, Козлова И.В.^{1,2}, Демина Т.В.⁵, Ткачев С.Е.⁶, Злобин В.И.¹

Детекция потенциальных сайтов рекомбинации вируса клещевого энцефалита методами сравнительной геномики

¹ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 664025, г. Иркутск; ²ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, 664003, г. Иркутск; ³Университет Претории, ЮАР; ⁴Лимнологический институт СО РАН, 664082, г. Иркутск; ⁵ФГБОУ ВПО «Иркутская государственная сельскохозяйственная академия», 664038, г. Иркутск; ⁶Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, г. Новосибирск

Представлены результаты биоинформационного поиска потенциальных сайтов рекомбинации в полногеномных структурах вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) с помощью ряда программных методов. Проанализировано 55 геномов штаммов ВКЭ, из которых у 21 выявлено наличие сайтов рекомбинации. Рекомбинантные штаммы относились к дальневосточному ($n = 19$) и европейскому ($n = 2$) генотипам. Выявленные 22 сайта рекомбинации отнесены к 5 типам по позиционным, штаммовым и региональным характеристикам. Определены родительские штаммы, которые по генотипическим и географическим параметрам не противоречат возможности формирования рекомбинантов. Почти $\frac{3}{5}$ сайтов расположены в области генов NS4a и NS4b штаммов ВКЭ, являющейся «горячей точкой» рекомбинации, при этом большая их часть концентрируется в гене NS4. Показано, что рекомбинационные процессы у ВКЭ происходят на уровне генотипа (европейского), определенных групп внутри генотипа (дальневосточного) и характерны для периферийных популяций ареала.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; сайты рекомбинации; методы программирования рекомбинации; родительские штаммы; «горячая точка» рекомбинации.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(3): 44–49.

Dzhioev Yu. P.^{1,2}, Paramonov A. I.², Reva O. N.³, Bukin Yu. S.⁴, Kozlova I. V.^{1,2}, Demina T. V.⁵, Tkachev S. E.⁶, Zlobin V. I.¹

Detection of potential sites of recombination in the Tick-borne encephalitis virus by the methods of comparative genomics

¹Irkutsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 664025, Irkutsk, Russia; ²Scientific Center of Family Health Problems and Human Reproduction, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, 664003, Irkutsk, Russia; ³University of Pretoria, South Africa; ⁴Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 664082, Irkutsk, Russia; ⁵Irkutsk State Agricultural Academy, 664038, Irkutsk, Russia; ⁶Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 630090, Novosibirsk, Russia

The results of the bioinformatic search for the potential sites of the recombination in the genome-wide structures of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) through a series of software techniques were presented in this work. The genomes of the 55 TBEV strains were assayed, 21 of them showed the presence of the recombination sites. Recombinant strains belonged to the Far Eastern (19 strains) and European (2 strains) genotypes. 22 sites of the recombination attributed were identified to five types based on position, strain, and regional characteristics. The parental strains were identified based on the genotypic and geographical parameters, which do not contradict the possibility of the formation of the recombinants. Nearly two-thirds of the sites are located in the regions of NS4a and NS4b genes, which are the "hot spots" of the recombination, most of them being concentrated in the gene NS4. It was shown that the recombination processes did not occur at the level of the genotypes (European genotype) or certain groups within the genotype (Far East) and were typical of the peripheral populations.

Key words: tick-borne encephalitis virus; recombination sites; parent strains; recombination hotspot.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(3): 44–49. (In Russ.)

For correspondence: Yuriy Dzhioev, MD, PhD; e-mail: alanir07@mail.ru

Received 17.01.14

Для корреспонденции: Дзюев Юрий, канд. мед наук; e-mail: alanir07@mail.ru