

ЭКСПРЕСС-СИСТЕМА ПОИСКА СОЕДИНЕНИЙ, ПРЕПЯТСТВУЮЩИХ КОНТАКТУ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА (ВИЧ) С ЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ

Прокофьева М.М.¹, Орлова Н.Н.^{1,2}, Степанов О.А.², Никитенко Н.А.¹,
Горностаева А.С.^{1,2}, Лебедев Т.Д.¹, Климова А.Н.^{1,2}, Бурнышева К.М.¹,
Митькевич В.А.¹, Спиринов П.В.¹, Прасолов В.С.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук», Москва, Россия (119991, г. Москва, ул. Вавилова, 32)

² Московский физико-технический институт (государственный университет), Московская область, г. Долгопрудный, Россия (141700, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок, 9), e-mail: prassolov45@mail.ru

Разработка безопасных клеточных систем, позволяющих тестировать эффективность действия соединений, обладающих анти-ВИЧ-активностью, весьма важна для создания новых противовирусных лекарственных препаратов. Большой интерес для исследований представляют ингибиторы проникновения вируса в клетку-мишень, подавляющие инфекционный процесс на ранней стадии. Описываемая в работе система, основанная на использовании рекомбинантных лентивирусных векторов, позволяет проводить испытания ингибиторной активности соединений, препятствующих первичному неспецифическому взаимодействию ВИЧ-1 с гепарансульфатами на поверхности клеток-мишеней в качестве рецепторов. Было исследовано действие ряда сульфированных полисахаридов, подобных по структуре клеточным гепарансульфатам, на уровень лентивирусной трансдукции клеток. Показано, что сульфированные полисахариды подавляют лентивирусную трансдукцию перевиваемых Т-лимфобластных клеток человека линии Jurkat псевдолентивирусными частицами, несущими на своей поверхности белок оболочки ВИЧ.

Ключевые слова: ВИЧ, псевдолентивирусные частицы, гепарансульфаты, сульфированные полисахариды.

EXPRESS SYSTEM FOR SCREENING OF COMPOUNDS PREVENTING BINDING OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV) TO SENSITIVE CELLS

Prokofjeva M.M.¹, Orlova N. N.^{1,2}, Stepanov O.A.², Nikitenko N.A.¹, Gornostaeva A.S.^{1,2},
Lebedev T.D.¹, Klimova A.N.^{1,2}, Burnysheva K.M.¹, Mitkevich V. A.¹, Spirin P.V.¹,
Prassolov V.S.^{1,2}

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, Russia (Vavilov str., 32 Moscow, 119991)

² Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Moscow Region, Russia (9, Institutskii per., Dolgoprudny, Moscow Region, 141700), e-mail: prassolov45@mail.ru

Development of the efficient cell systems for drug screening against HIV is crucial for the creation of new antiviral therapeutic agents. The inhibitors of virus binding to host cell, thus preventing spread of infection, represent a great interest. We describe system based on recombinant lentiviral vectors for screening potential antiviral compounds that prevent the initial non-specific binding of HIV to the heparan sulfates on target cells surface. We have studied the inhibitory activity of a number of sulfated polysaccharides that prevent non-specific binding of lentiviral particles to the target cells. It has been shown that sulfated polysaccharides inhibit lentiviral transduction of T-lymphoblastic Jurkat cell line by lentiviral particles carrying HIV envelope protein on their surface.

Key words: HIV, pseudolentiviral particles, heparan sulfate, sulfated polysaccharides.

Ретровирусы отличаются рядом особенностей жизненного цикла, которыми являются: наличие стадии обратной транскрипции (и, таким образом, чередование форм вирусного генома РНК – ДНК – РНК) и стадии интеграции вирусного ДНК-гена в геном зараженной клетки. Проникновение ретровируса в клетку начинается с взаимодействия белка оболочки с клеточным рецептором. После взаимодействия вируса с клеточным рецептором происходит

проникновение нуклеокапсида в цитоплазму (путем слияния мембран вируса и клетки). В цитоплазме происходит обратная транскрипция, продуктом которой является двухцепочечная ДНК-копия РНК-генома вируса (провирус). Провирус интегрируется в геном зараженной клетки, этот процесс обеспечивается вирусной интегразой и рядом клеточных белков [6].

После интеграции провирус ведет себя как обычный клеточный ген – транскрибируется клеточной РНК-полимеразой II с участием клеточных факторов транскрипции, однако уровень его транскрипции зависит от вирусных регуляторных последовательностей, локализованных в длинных концевых повторах (LTR) провируса. После синтеза вирусных белков происходит сборка вириона и отпочковывание его от цитоплазматической мембраны клетки, после чего инфекционный цикл повторяется [6].

Было показано, что в осуществление первичного связывания многих простых и сложных ретровирусов с клеткой вовлечены расположенные на внешней стороне клеточной мембраны гепарансульфаты и протеогликаны, находящиеся на поверхности вирусных частиц. Контакт ретровируса с первичными рецепторами необходим для последующего прочного взаимодействия с рецептором/корцептором, специфичным для разных ретровирусов. Таким образом, поиск эффективных ингибиторов, подавляющих взаимодействие ретровирусов с гепарансульфатами, расположенными на клеточной мембране, является актуальной задачей, решение которой может привести к созданию препарата широкого спектра действия, эффективного в отношении различных групп патогенных ретровирусов, а также ряда других патогенных вирусов, использующих гепарансульфаты в качестве первичных неспецифических рецепторов.

Гепарансульфаты – компоненты плазматических мембран клеток, где они могут функционировать как рецепторы и участвовать в клеточной адгезии и межклеточных взаимодействиях. По своей структуре гепарансульфаты, как и гепарин, относятся к группе гликозаминогликанов, которые представляют собой длинные неразветвленные цепи гетерополисахаридов, построенные из повторяющихся дисахаридных единиц. Основные составляющие этих полимеров – гексуриновая кислота (*D*-глюкуроновая кислота или *L*-идуроновая) и *N*-ацетилглюкозамин. Основное отличие гепарина от гепарансульфата состоит в меньшей степени сульфирования. Наличие сульфатных, а также карбоксильных групп определяет существенный отрицательный заряд этих биополимеров в нейтральных условиях. Известно, что сульфированные полисахариды проявляют высокую противовирусную активность, препятствуя проникновению в клетку ДНК- и РНК-содержащих вирусов (вирус простого герпеса, цитомегаловирус человека, вирус Синдбис, ВИЧ, вирус лейкоза мышей) [2; 3; 7; 8].

За последние 20 лет было показано, что сульфированные полисахариды обладают широким спектром противовирусной активности *in vitro*. Огромное структурное многообразие этих макромолекул, тем не менее, создает серьезные препятствия для установления взаимосвязи их структуры и активности. Однако, на основе накопленных данных, выявлено несколько структурных элементов, которые предположительно очень важны для противовирусной активности.

Степень сульфирования имеет большое влияние на противовирусную активность полисахаридов. Для отдельных классов полусинтетических полисахаридов (например, декстран сульфат) известно, что чем больше степень сульфирования, тем выше противовирусная активность [10]. Предполагается, что чем длиннее полисахаридная цепь, тем более вероятно узнавание и взаимодействие с несколькими вирусными белками, которые отвечают за взаимодействие вируса с клеткой-мишенью [5].

Мы использовали ранее разработанную модельную систему на основе лентивирусных векторов [1], чтобы установить, как сульфированные полисахариды действуют на проникновение вируса в клетку. Псевдолентивирусы представляют собой препараты рекомбинантных лентивирусных частиц, созданные на основе ВИЧ-1. Они содержат набор структурных белков и ферментов ВИЧ-1, но при этом псевдолентивирусы не являются репликационно-компетентными, поскольку вместо вирусных генов несут в своем геноме маркерный ген зеленого флуоресцентного белка, и по сути это «одноразовые» вирусы, что делает безопасной работу с ними. Мы использовали псевдолентивирусные частицы, содержащие на мембране белок оболочки gp120+gp41 ВИЧ-1 или белок G оболочки вируса везикулярного стоматита (VVC). Выбор белков оболочки обусловлен тем, что у этих вирусов различный механизм проникновения в клетку: у ВИЧ-1 клеточными рецепторами для первичного неспецифического связывания вируса с клеткой служат гепарансульфаты, в то время как VVC проникает в клетку путем эндоцитоза, опосредованный контактом белка G оболочки с фосфолипидами клеточной мембраны [4]. Опыты проводили на клетках линии Jurkat (Т-лимфобластный лейкоз человека), содержащих специфические рецепторы ВИЧ-1.

Для определения адекватности системы для исследования и тестирования потенциальных противовирусных препаратов, был использован описанный в литературе препарат – декстран сульфат [5].

Экспериментальная часть

Культура клеток

В работе использовали клетки почки эмбриона человека линии HEK293, растущие на стандартной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (СЭ КРС), 4мМ L-глутамин, 1мМ пирувата натрия, стрептомицин/пенициллин в

концентрации 100 мкг/мл и 100 ед/мл, соответственно, и клетки Т-лифобластного лейкоза человека линии Jurkat, которые культивировали на среде RPMI-1640, содержащей 20% СЭ КРС, 4мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки растили при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂.

Получение псевдолентивирусных частиц

В качестве упаковывающих клеток, в которых осуществляется сборка рекомбинантных лентивирусных частиц и их секреция в культуральную среду, использовали клетки НЕК293, которые за 12-14 часов до начала трансфекции высевали на чашки Петри диаметром 100 мм в количестве $3.0-3.5 \times 10^6$ клеток на чашку.

ДНК лентивирусного вектора, содержащего маркерный ген зеленого флуоресцирующего белка, вместе с плазмидами, направляющими синтез белков, необходимых для формирования псевдовirusных частиц, вводили в клетки НЕК293 методом Са-фосфатной трансфекции. Инфекционные псевдовirusные частицы начинали собирать через 24 часа после трансфекции с интервалами 10-12 часов [1].

Титрование вируса проводили на клетках Jurkat, за 14–16 часов до заражения высеванных в лунки 24-луночных планшетов (3×10^5 клеток на лунку). Измерение уровня флуоресценции клеток проводили на проточном цитофлуориметре Epics 4XL Beckman Coulter (США) через 48 часов после заражения. Титр вируса рассчитывали по формуле $T = N \times P / V$, где N – количество высеванных клеток, P – доля инфицированных клеток в популяции, V – количество добавленного супернатанта, содержащего псевдо-ВИЧ-1 частицы, T – титр вируса. В работе использовали сборы с титрами вируса в пределах $5.4 \times 10^6 \text{ мл}^{-1}$.

Определение цитотоксичности исследуемых соединений

Цитотоксичность препаратов для неинфицированных клеток Jurkat определяли по изменению морфологии и количеству жизнеспособных клеток методом окрашивания раствором трипанового синего (Invitrogen Corporation, США). Для этого в культуральную среду вносили препарат полисахарида до концентрации 10 и 100 мкг/мл. Через 48 ч клетки ресуспендировали в среде и окрашивали 0,4%-ным раствором трипанового синего в течение 5 мин. Затем подсчитывали число жизнеспособных (неокрашенных) и нежизнеспособных (окрашенных) клеток в камере Ньюбауэра. Количество живых клеток в популяции оценивали по количеству неокрашенных клеток в процентах от общего числа клеток.

Определение противовирусной активности исследуемых соединений

Активность препаратов против псевдолентивирусных частиц определяли на клетках линии Jurkat, к которым добавляли различные количества испытуемых препаратов в объеме 20 мкл на лунку перед добавлением препарата псевдолентивирусных частиц. Измерения количества флуоресцирующих клеток проводились через 48 ч после заражения на проточном

цитофлуориметре. Полученные данные обрабатывали по методу Фишера-Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. В эксперименте использовали сукциноилхитозан, сульфосукцинилхитозан, сульфат хитозана, декстран сульфат натриевые соли в концентрациях 0.01, 0.1, 1, 10, 100 мкг/мл раствора на лунку.

Результаты

Исследованные соединения не проявили цитотоксического воздействия на клетки линии Jurkat в концентрации до 100 мкг/мл.

Показано, что декстран сульфат ингибирует лентивирусную трансдукцию клеток-мишеней, полученная нами величина IC_{50} составила 0,095 мкг/мл, что согласуется с данными литературы по активности этого соединения, по которым IC_{50} составляет 0,01–0,23 мкг/мл [2; 5; 9]. Эти данные позволяют утверждать, что представленная экспресс-система адекватна и может быть использована для анализа потенциальной противовирусной активности других полисахаридов.

Было установлено, что сульфат хитозана препятствует трансдукции клеток псевдолентивирусными частицами с белком оболочки gp120+gp41 (ВИЧ-1), его эффективность сравнима с эффективностью декстран сульфата. Сульфосукцинилхитозан малоактивен, а сукцинилхитозан практически не активен.

Ни один из препаратов не проявил противовирусной активности в отношении псевдолентивирусных частиц, псевдотипированных белком G оболочки ВВС. Результаты исследований представлены в таблице 1 и на рисунке 1.

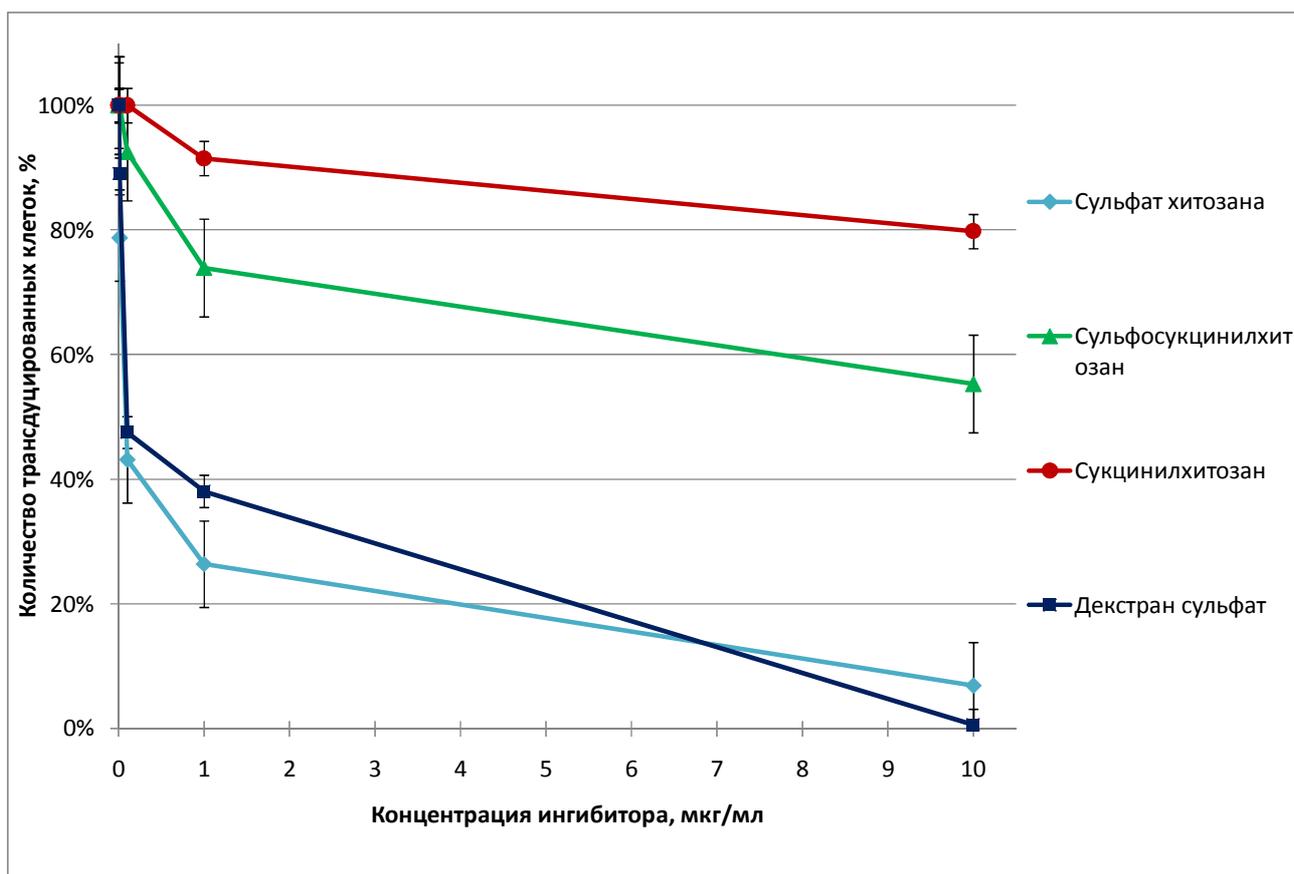


Рис. 1. Противовирусная активность препаратов на клеточной линии Jurkat через 48 ч после добавления псевдолентивирусных частиц, псевдотипированных белком оболочки gp120+gp41 ВИЧ-1.

Таблица 1 – Противовирусная активность сульфированных полисахаридов на псевдовirusных частицах с белком оболочки ВИЧ-1 или белком оболочки вируса везикулярного стоматита (ВВС), показанная на клетках Т-лимфобластного лейкоза человека линии Jurkat

Соединение	IC_{50} , мкг/мл	
	ВИЧ-1	ВВС
Декстрансульфат натриевая соль, Sigma D6924, M_w 9.0--20.0 кДа, степень замещения 2.3	0.0950 ± 0.0025	> 100
Сульфат хитозана, M_w 100 кДа, СЗ 1.5	0.02 ± 0.015	> 100
Сульфосукцинилхитозан, M_w 16.9 кДа, СЗ 0.64	$12,00 \pm 0,95$	> 100
Сукцинилхитозан, M_w 9.6 кДа, СЗ 0.55	> 100	> 100

IC_{50} – концентрация ингибитора, при котором уровень заражения снижается на 50% относительно контрольных клеток, не подвергавшихся действию ингибитора.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что противовирусная активность исследованных препаратов зависит от вида белка оболочки вируса,

исследованные препараты специфично препятствуют проникновению в клетку вирусов, первичными рецепторами которых являются клеточные гепарансульфаты.

Мы можем утверждать, что использованная в настоящей работе система пригодна для специфического поиска ингибиторов проникновения ВИЧ-1 в клетку, препятствующих взаимодействию вируса с первичными рецепторами на поверхности клетки-мишени.

Авторы выражают благодарность д.х.н., профессору С.Н. Михайлову за обсуждение результатов.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение № 8270, и Программ фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов».

Список литературы

1. Прокофьева М.М. [и др.] Система безопасного скрининга потенциальных ингибиторов репликации ВИЧ-1 // Acta Naturae. – 2011. – Т. 3(4). – С. 61–71.
2. Степанов О.А. [и др.] Репликационно-компетентный гамма-ретровирус Мо-MuLV, экспрессирующий ген зеленого флуоресцентного белка, как эффективный инструмент для поиска противовирусных препаратов, использующих гепарансульфаты в качестве первичных клеточных рецепторов // Молекулярная биология. – 2012. – Т. 46 (3). – С. 508–518.
3. Baba M., Snoeck R., Pauwels R., De Clercq E. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus // Antimicrob. Agents Chemoth. – 1988. – V. 32. – P. 1742–1745.
4. Coil D.A., Miller A.D. Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus // J. Virol. – 2004. – V. 78. – P. 10920–10926.
5. Ghosh T. [et al.] Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure–activity analysis to clinical evaluation // Glycobiology. – 2009. – V. 19 (1). – P. 2–15.
6. Goff S.P. Retroviridae: The Retroviruses and Their Replication // Fields Virology. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. – P. 2002–2069.
7. Mercorellia B., Lembo D., Palù G., Loregian A. Early inhibitors of human cytomegalovirus: State-of-art and therapeutic perspectives // Pharm. Therap. – 2011. – V. 131. – P. 309–329.
8. Pirrone V., Wigdahl B., Krebs F.C. The rise and fall of polyanionic inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1 // Antiviral Res. – 2011. – V. 90. – P. 168–182.

9. Walker S.J., Pizzato M., Takeuchi Y., Devereux S. Heparin Binds to Murine Leukemia Virus and Inhibits Env-Independent Attachment and Infection // *J. Virol.* – 2002. – V. 76 (14). – P. 6909-6918.
10. Witvrouw M., De Clercq E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs // *Gen Pharmacol.* – 1997. – V. 29. – P. 497–511.

Рецензенты:

Рубцов П.М., д.б.н., заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук» (ИМБ РАН), г. Москва.

Белжеларская С.Н., д.б.н., старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук» (ИМБ РАН), г. Москва.