

УДК 578.72

УВЕЛИЧЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОСТИ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА ПРИ МОДИФИКАЦИИ ГЕНА CCR5 ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

© 2023 г. Д. Н. Носик^{1,*}, Л. Б. Калнина¹, Л. М. Селимова¹, А. В. Пронин¹

Представлено академиком РАН А.Л. Гинцбургом

Поступило 03.02.2023 г.

После доработки 07.03.2023 г.

Принято к публикации 10.03.2023 г.

Обнаружение природной мутации гена *ccr5* у людей, которая делает их невосприимчивыми к ВИЧ-инфекции, открыло новое направление для развития альтернативных подходов лечения путем редактирования генома. Вирус иммунодефицита человека при заражении CD4⁺ клеток использует один из двух хемокиновых ко-рецепторов цитоплазматической мембраны. При заражении и на ранних стадиях инфекции циркулируют штаммы, использующие белок CCR5, на поздних – белок CXCR4. Нельзя исключить, что существует сложная взаимосвязь в регуляции экспрессии этих рецепторов, которая, в свою очередь, может влиять на репликацию вируса в клетках, не содержащих в норме на мембране белок CCR5. Для исследования влияния корректировки гена *ccr5* на репликацию ВИЧ-1 в системе *in vitro* была использована именно такая клеточная линия MT-4. Изучение репликации вируса показало, что генетическая модификация гена *ccr5* клеток MT-4 привела к усилению активности изученных штаммов ВИЧ-1, и это усиление было наиболее выражено в гомозиготном варианте. Полученные нами результаты указывают на то, что к редактированию генома клеток человека следует относиться с большой осторожностью и что подобные исследования требуют углубленного и всестороннего изучения.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1), CCR5, CXCR4, MT-4 клетки

DOI: 10.31857/S2686738923700257, **EDN:** JILTBD

Попытки создания вакцины против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) уже более 30 лет остаются безуспешными, а применяемые химиопрепараты не способны избавить зараженный организм от ВИЧ-инфекции. Поэтому постоянно появляются идеи альтернативных подходов лечения, которые могли бы избавить больных от приема лекарств и предотвратить новые заражения. Один из них – метод редактирования генов, продукты которых необходимы для проникновения вируса в клетку-хозяина [1]. Благодаря истории “Берлинского пациента” [2], признанного вылеченным от ВИЧ-инфекции в результате трансплантации стволовых клеток с полиморфизмом CCR5Δ32/Δ32, ген ко-рецептора ВИЧ-1 *ccr5* [3] стал широко используемой мишенью для таких исследований. Однако не все ясно с перспективой, так как помимо ко-рецептора CCR5, и основного рецептора (CD4), есть другой ко-рецептор ВИЧ CXCR4. Именно его используют вы-

соко патогенные штаммы вируса, которые доминируют на терминальных стадиях заболевания.

Оба ко-рецептора относятся к клеточным хемокиновым рецепторам, играющим важную роль в организации и регулировании иммунных процессов в организме человека. Они экспрессируются одними и теми же клетками, и функциональная активность их жестко регулируется организмом на уровне генома. При этом нельзя исключить, что вирус вносит свои коррективы в их функционирование. В целом эти процессы изучены недостаточно.

Для исследования молекулярно-биологических особенностей влияния корректировки гена *ccr5* на репликацию ВИЧ-1 в системе *in vitro* была выбрана неопластическая клеточная линия MT-4 [4]. Это CD4⁺ Т-лимфоциты [5], трансформированные дельтавирусом ТЛВЧ-1 (Т-лимфотропный вирус человека 1-го типа). Все инфицированные ТЛВЧ-1 перевиваемые линии содержат на цитоплазматической мембране рецептор CXCR4, а также экспрессируют многие маркеры активации [6]. Благодаря высокому активационному потенциалу MT-4 клетки широко используются

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, МЗ РФ, Москва, Россия

*e-mail: dnnosik@yandex.ru

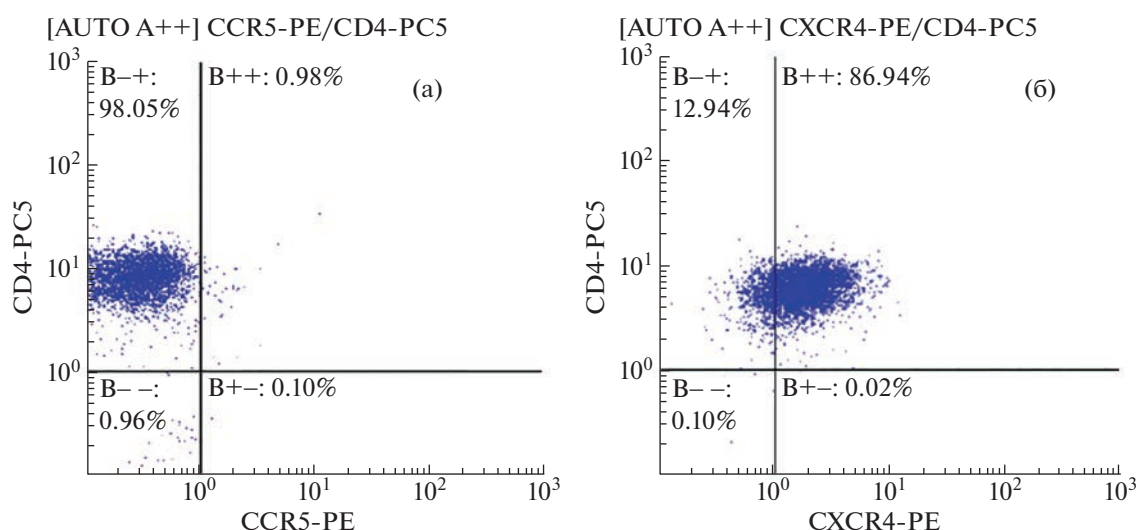


Рис. 1. Цитометрический анализ клеток МТ-4. Гистограмма экспрессии белков CCR5 (а) и CXCR4 (б) на цитоплазматической мембране гомозиготной линии (—/—).

для репликации штаммов ВИЧ-1. Нельзя исключить, что существует взаимосвязь между регуляцией экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 и CCR5 на уровне транскрипции и трансляции. В связи с этим было интересно посмотреть, как искусственное редактирование гена *ccr5*, приближенное к природной мутации, повлияет на заражение ВИЧ-1 МТ-4 клеток. Для редактирования генома с использованием CRISPR/Cas9 метода [7] мы обратились в ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. После модификации гена *ccr5* клетки были переданы нам для изучения репликации ВИЧ-1.

В настоящем исследовании представлены результаты, указывающие на то, что генетическая модификация гена *ccr5* клеток МТ-4 привела к усилению репликативной активности всех изученных штаммов ВИЧ-1, и это усиление наиболее выражено при модификации двух аллелей. Результаты изучения репликации ВИЧ-1/899А в присутствии растворимых факторов среды геномодифицированных линий показали, что мутация двух аллелей *ccr5* гена повышала жизнеспособность немодифицированных, контрольных клеток. Эти данные позволяют сделать предположение о том, что редактирование генома клеток изменило молекулярно-биологические механизмы регуляции их жизнедеятельности.

Клетки культивировали, как описано ранее [6]. Использовали штаммы ВИЧ-1, относящиеся к фенотипу Х4 — IIIВ, 899А, НОВ и Х4/Р5 — МС1974, которые были получены из Коллекции вирусов “Института вирусологии им. Д.И. Иванова” ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России.

Чтобы изучить уровень экспрессии ко-рецепторов ВИЧ-1 на плазматической мембране клеток МТ-4, провели цитометрический анализ контрольных клеток (К) и геномодифицированных линий, по одной (—/+) и двум (—/—) аллелям по ранее описанной методике [6]. Использовали IgG1- PE, IgG2a- PE, IgG1- PC5, CD4-PC5 (Beckman Coulter, IOTest, США), CD184(CXCR4)—PE, CD195(CCR5)—PE (Invitrogen, eBiosciencetm/Affymetrix, США). Для обработки результатов цитометрического анализа использовали программное обеспечение Kaluza, V. 1.1 (Beckman Coulter, USA).

Статистический анализ данных проводили с использованием программы BioStat, v. 5 (Analyst-Soft, USA).

Исследование на наличие поверхностных ко-рецепторов ВИЧ-1 показало (рис. 1), что ни одна из линий практически не экспрессирует белок CCR5 ($2.1\% \pm 0.9$; $2.3\% \pm 0.9$; $1\% \pm 0.1$ для линий К, —/+ и —/— соответственно) и все содержат CXCR4 ($86.4\% \pm 8.9$; $91.2\% \pm 2.8$; $76.4\% \pm 18.9$ для линий К, —/+ и —/— соответственно). На рис. 1 представлены гистограммы цитометрического анализа гомозиготной линии.

При изучении репликации различных штаммов ВИЧ-1 в 3-клеточных линиях обнаружено увеличение инфекционной активности для всех штаммов вируса в модифицированных линиях (табл. 1). Вирусы пассировали на стандартных клетках МТ-4 в культуральных флаконах объемом 50 мл в течение 5–7 дней до развития выраженного цитопатического эффекта (ЦПЭ), обнаруживаемого под световым микроскопом, затем отбирали культуральную жидкость и определяли инфекционный титр, выражаемый в Ig ТЦИД₅₀/мл

Таблица 1. Определение инфекционной активности различных штаммов ВИЧ-1

Штамм ВИЧ-1	Контрольная линия (К)	Линия гетерозиготная по $\Delta 32$ CCR5 -/+	Линия гомозиготная по $\Delta 32$ CCR5 -/-
	Инфекционная активность, Ig ТЦИД ₅₀		
899A	3.6 ± 0.6	5.7 ± 0.4	6.7 ± 0.3
НОВ	1.7 ± 0.4	2.3 ± 0.6	2.7 ± 0.5
МС 1974	1.3 ± 0.5	2.3 ± 0.3	2.7 ± 0.5
ПВВ	2.3 ± 0.3	4.7 ± 0.2	5.3 ± 0.6

(50%-тканевая цитопатическая инфекционная доза). Аликвоты проб хранили при -80°C до заражения клеток. Для изучения репликации вирусов в различных клеточных линиях использовали культуральные флаконы объемом 50 мл, по 3 флакона на клеточную линию. Клетки заражали вирусами при множественности инфекции 100 ТЦИД₅₀/клетка. Ежедневно отбирали аликвоты клеточной суспензии и определяли жизнеспособность клеток в присутствии трипанового синего. На 5–6 дни после заражения отбирали культуральную жидкость и определяли ТЦИД₅₀/мл с использованием стандартной линии МТ-4.

Для штаммов ПВВ и 899A титр вируса в модифицированных линиях увеличивался на ~ 3 порядка по сравнению с контрольной культурой клеток, для штаммов НОВ и МС1974 – на ~ 1 порядок. При световой микроскопии отмечено выраженное цитопатическое (цитодеструктивное) действие вируса в модифицированных клеточных линиях, превышающее подобный эффект в контрольных клетках. При этом ЦПЭ в гомозиготной линии был наибольшим.

Для изучения возможных факторов усиления репликации вируса были проведены следующие исследования. Было изучено влияние растворимых факторов жизнедеятельности модифицированных клеток на репликацию вируса в контрольной линии (рис. 2). Три линии клеток после посева культивировали 3 дня, отбирали клеточную взвесь, клетки осаждали при 1500 об/мин 10 мин и отбирали надосадочную жидкость. В 96-культуральных планках для каждой пробы супернатанта готовили серийные двукратные разведения, добавляли в каждую лунку по 5×10^4 клеток К и ВИЧ-1/899A (100 ТЦИД₅₀/клетка). В процессе культивирования на 5–6 день после заражения определяли жизнеспособность клеток с использованием метода МТТ [8]. При коэффициенте разведения культуральной жидкости от 2 до 16 раз, полученной от линии -/-, процент живых клеток в линии К увеличивался на 10–30%. Влияние растворимых факторов среды линии -/+ было несущественным. Титр вируса в линии К при этом не изменялся.

Исследование маркеров активации CD28 и CD38 в исследуемых 3 линиях клеток показало (табл. 2), что генномодифицированные клетки экспрессируют больше этих маркеров, причем гомозиготные больше, чем гетерозиготные. Возможно, эта одна из причин увеличения инфекционности вируса в модифицированных клетках, так как эти белки играют существенную роль в репликации ВИЧ-1 [9, 10].

Активация вируса может быть связана с возникшими изменениями в метаболизме клеток. Например, с увеличением внутриклеточной концентрации ионов K^+ , которая приводит к заметному возрастанию ЦПЭ [11]. Еще одной причиной возрастания инфекционности ВИЧ-1 может быть инактивация внутриклеточных факторов, которые в норме оказывают противовирусное действие [12].

Кроме природной формы белка CCR5 $\Delta 32$, среди некоторых этнических групп белой расы описан второй природный вариант среди населе-

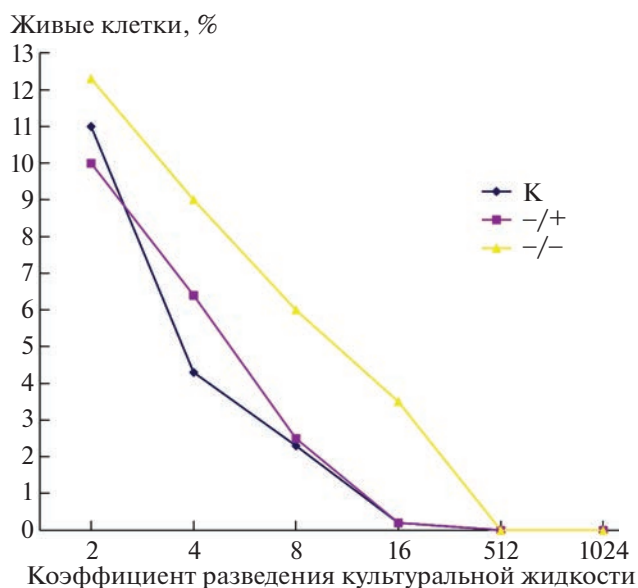
**Рис. 2.** Изучение влияния растворимых факторов жизнедеятельности клеточных линий на репликацию ВИЧ-1/899A в линии К.

Таблица 2. Изучение экспрессии маркеров активации клетками МТ-4 (%) через 24 и 72 ч после пересева

Маркеры	Клетки контрольные (К)		Клетки гетерозиготные по $\Delta 32$ CCR5 (–/+)		Клетки гомозиготные по $\Delta 32$ CCR5 (–/–)	
	24 ч	72 ч	24 ч	72 ч	24 ч	72 ч
CD4 ⁺ /CD28 ⁺	0.16 ± 0.2	5.46 ± 0.4	0.32 ± 0.2	11.8 ± 0.9	1.67 ± 0.3	17.6 ± 0.9
CD4 ⁺ /CD38 ⁺	0.13 ± 0.3	2.17 ± 0.2	0.18 ± 0.1	13.3 ± 1	2.11 ± 0.6	34.3 ± 2.1
CD4 ⁺ /HLA-DR ⁺	83.7 ± 0.9	97.8 ± 1.1	93.7 ± 1.4	98 ± 1.5	94.8 ± 2.1	99.3 ± 0.9

ния Азии — это CCR5-893 (–) [13]. Обе формы белка задерживаются в эндоплазматическом ретикулуле клетки. Нельзя исключить, что в дальнейшем будут открыты новые измененные компоненты этого гена. В связи с тем, что хемокины играют важную роль в онтогенезе клеток организма, функционировании лейкоцитов и формировании иммунного ответа, у представителей этих этнических групп развиваются компенсаторные механизмы, позволяющие обеспечить выполнение всех жизненно важных функций. Тем не менее они не всегда могут полностью нормализовать отдельные молекулярно-биологические процессы.

Первоначально мутация гена *ccr5* считалась безобидной, но позже было обнаружено, что ее наличие приводит к более тяжелому течению таких вирусных инфекций, как лихорадка западного Нила и клещевой энцефалит [14, 15]. Возможность редактирования генома с использованием CRISPR/Cas9 вызвала массу надежд у исследователей, но, в то же время, поставило вопрос о злоупотреблениях и проблемах, связанных с модификацией генов эмбриона человека, проведенных в Китае и Великобритании [16]. Не стоит забывать о врачебной заповеди: “*Primum non nocere*” — прежде всего не навреди!

Полученные нами результаты указывают на то, что к редактированию генома клеток человека следует относиться с большой осторожностью, так как подобные исследования требуют глубокого и всестороннего изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам ФГБУ Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН Э.Б. Дашинимасеву, А.С. Гольцовой, члену-корреспонденту РАН Е.А. Воротеляк, члену-корреспонденту РАН А.В. Васильеву за проведение модификации генома клеток.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Источники финансирования: бюджет.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Allen A.G., Chung C.H., Atkins A., et al. Gene editing of HIV-1 co-receptors to prevent and/or cure virus infection // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 2940–2953.
2. Allers K., Hutter G., Hofmann J., et al. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 stem cell transplantation // *Blood*. 2011. V. 117. P. 2791–2799.
3. Drake M.J. and Bate P. Application of gene editing technologies to HIV-1 // *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2015. V. 10 (2). P. 123–127.
4. Miyoshi I., Kubonishi I., Yoshimoto S., et al. Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukemic T cells // *Nature*. 1981. V. 294. P. 770–771.
5. Manns A., Hisada M., and La Grenade L. Human T-lymphotropic virus type I infection // *Lancet*. 1999. V. 353. P. 1951–8.
6. Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Носик Д.Н. Поверхностные маркеры неопластической клеточной линии МТ-4 и перспективы ее использования в качестве модели при изучении активности иммуномодулирующих препаратов // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016. № 12. С. 822–5.
7. Kang X., He W., Huang Y., et al. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing // *Assist. Reprod. Genet.* 2016. V. 33 (5). P. 581–588.
8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods*. 1983. V. 65. P. 55–63.
9. Kestens L., Vanham G., Vereecken C. et al. Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4 + CD45RO + T lymphocytes during HIV-1 infection // *Clin. Exp. Immunol.* 1994. V. 95. P. 436–41.
10. Esensten J.H., Helou Y.A., Chopra G. et al. CD28 costimulation: from mechanism to therapy // *Immunity*. 2016. V. 44 (5). P. 973–88.
11. Voss T.G., Fermin C.D., Levy J.A., et al. Alteration of intracellular potassium and sodium concentrations with induction of cytopathic effects by human immunodeficiency virus // *J. Virol.* 1996. V. 70. P. 5447–54.
12. Matsuyama T., Hamamoto N., Yoshida T., et al. Effect of culture supernatant of МТ-2 cells on human immuno-

- deficiency virus-producing cells, MOLT-4/HIVHTLV-IIIB cells // *Jpn. J. Cancer Res.* 1988 Feb; 79 (2): 156–159.
13. Shioda T., Nakayama E.E., Tanaka Y., et al. Naturally occurring deletional mutation in the C-terminal cytoplasmic tail of CCR5 affects surface trafficking of CCR5. *J. Virol.* 2001. V. 75 (7). P. 3462–3468.
 14. Kindberg E., Mickiene A., Ax C., et al. A deletion in the chemokine receptor5 (CCR5) gene is associated with tickborne encephalitis // *The Journal of Infectious Diseases.* 2008. V. 197. P. 266–269.
 15. Glass W.G., McDermott D.H., Lim J.K., et al. CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection // *The Journal of Experimental Medicine.* 2006. 203 (1). P. 35–40.
 16. Меллинг К. Вирусы: Скорее друзья, чем враги. Пер. с англ.-М.: Альпина Паблишер, 2021. 568 с. ISBN 978-5-9614-6948-6.

AN INCREASE IN THE INFECTIVITY OF THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS WITH MODIFICATION OF THE CCR5 GENE RECEPTOR OF SENSITIVE CELLS

D. N. Nosik^{a,#}, L. B. Kalnina^a, L. M. Selimova^a, and A. V. Pronin^a

^a*The D.I. Ivanovsky Institute of Virology, The N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: dnnosik@yandex.ru*

Presented by Academician of the RAS A.L. Ginzburg

Identification of a natural mutation of the *ccr5* gene in humans which makes them resistant to HIV-1 infection, has opened a new direction for the development of alternative treatment approaches through genome editing. The human immunodeficiency virus, when infecting CD4+ cells, uses one of two chemokine co-receptors of the plasma membrane. During infection and in the early stages of infection, strains using the CCR5 protein circulate, while the later ones use the CXCR4 protein. It cannot be ruled out that there is a complex relationship in the regulation of the expression of these receptors, which in turn can affect the replication of the virus in cells that normally do not have the CCR5 protein on the membrane. To study the effect of *ccr5* gene correction on HIV-1 replication in the *in vitro* system, exactly like this MT-4 cell line was used. The study of virus replication showed that genetic modification of the *ccr5* gene of MT-4 cells led to an increase in the activity of the studied HIV-1 strains, and this increase was most pronounced in homozygous variant. Our results indicate that editing the genome of human cells should be treated with great caution and that such studies require in-depth and comprehensive study.

Keywords: human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), CCR5, CXCR4, MT-4 cells