

МАТРИКСНЫЙ БЕЛОК ВИЧ-1 p17 ИНИЦИИРУЕТ СБОРКУ ВИРУСА

© 2011 г. Г. К. Воркунова, С. И. Лупандин*, А. Г. Букринская

Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского
Минздравсоцразвития России, Москва, 123098

Поступила в редакцию 13.12.2010 г.

Принята к печати 15.02.2011 г.

Матриксный белок ВИЧ-1 p17 (МА) – многофункциональный структурный белок, расположенный на N-конце Gag-предшественника p55 и обеспечивающий его транспорт к плазматической мембране клетки – месту сборки вируса. По нашим данным, МА как продукт раннего нарезания Gag-предшественника вирусной протеазой участвует в процессе сборки вирусной частицы. МА транспортируется в ядро зараженной клетки, где происходит его ассоциация с вирусной геномной РНК (vRNA). Комплекс МА-vRNA транспортируется к плазматической мембране. Мутантный МА, лишенный мембранотропного сигнала, тоже образует комплекс МА-vRNA, который в этом случае остается в ядре и цитоскелете. Из этого следует, что, скорее всего, МА доставляет vRNA из ядра в плазматическую мембрану по цитоскелету, инициируя сборку вируса.

Ключевые слова: ВИЧ-1, матриксный белок, вирусная РНК, сборка вируса, внутриклеточный транспорт.

HIV-1 ASSEMBLY IS INITIATED BY p17 MATRIX PROTEIN, by G. K. Vorkunova, S. I. Lupandin*, A. G. Bukrinskaya (Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of Russian Federation, Moscow, 123098 Russia, *e-mail: lupandin@list.ru). HIV-1 matrix protein (MA) is multifunctional structural protein located on N-terminus of Gag precursor p55 and responsible for its transport to plasma membrane, the site of virus assembly. Here, it has been shown that MA is cleaved from Gag precursor at early stage of the virus infection and participates in virus assembly. MA is transported into the nuclei wherein it associates with viral RNA (vRNA). The MA-vRNA complex is transported to plasma membrane. Mutant MA which lost its membranotropic signal does not reach plasma membrane and MA-vRNA complex remains in the nuclei and cytoskeleton. Thus, MA seems to deliver vRNA from the nuclei to plasma membrane through cytoskeleton initiating virus assembly.

Keywords: HIV-1, matrix protein, viral RNA, viral assembly, intracellular transport.

Сборка ВИЧ-1 в зараженных клетках изучена менее детально, чем другие стадии репликации вируса и патогенеза инфекции. Основные исследования по изучению сборки ВИЧ-1 проведены в основном с использованием искусственных систем, а не чувствительных к заражению клеток, поэтому до сих пор не изучены временные и пространственные взаимодействия вирусных компонентов, участвующих в этом процессе. Например, до настоящего времени остается неизвестным, каким образом осуществляется основное событие сборки – внутриклеточный транспорт вирусной РНК (vRNA) из ядра зараженной клетки к месту сборки – плазматической мембране.

Gag-предшественник p55 в отсутствие ряда вирусных компонентов, в том числе vRNA, индуцирует сборку неинфекционных вирусных частиц в плазматической мембране [1]. Мембранотроп-

ный сигнал Gag-предшественника находится в составе матриксного белка (МА), расположенного на N-конце Gag. МА, кроме мембранотропного сигнала, содержит еще два транспортных сигнала: нуклеофильный и экспорта из ядра [2]. Наличие трех транспортных сигналов позволяет рассматривать этот белок как челночный, курсирующий между ядром и плазматической мембраной [3].

На основании результатов, полученных нами ранее [4, 5], можно предположить, что в транспортировке vRNA к месту сборки вируса принимает участие МА. В этом случае МА отделяется от предшественника уже на ранних этапах инфекции, а не в период почкования вирусов, как это принято считать в соответствии с общепринятой версией [6]. Раннее нарезание Gag-предшественника было описано [7]; однако авторы полагали, что образующиеся продукты вызывают гибель клеток и вскоре исчезают. Нами показано, что

* Эл. почта: lupandin@list.ru

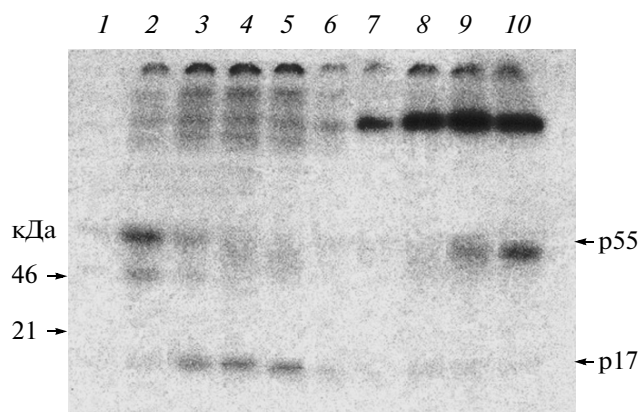


Рис. 1. Локализация вирусных белков в клеточных фракциях (авторадиография “pulse-chase” эксперимента). Клетки МТ4 заражали ВИЧ-1 (штамм МВП-899) и через 20 ч добавляли [^{14}C]-Leu на 20 мин (“pulse”). Клетки промывали фосфатным буфером, инкубировали 1, 2 и 3 ч (“chase”), затем промывали и фракционировали. 1 и 6 – Белковые маркеры (не обозначены); 2–5 – фракция цитозоля; 7–10 – фракция мембран; 2 и 7 – фаза “pulse”; 3 и 8, 4 и 9, 5 и 10 – фаза “chase” через 1, 2, 3 ч соответственно. Ядерная фракция не содержала вирусных белков.

МА, отщепленный от Gag-предшественника на ранних сроках инфекции, участвует в жизненном цикле вируса и включается в вирионы [3].

В представленной работе установлено, что в нарезании Gag с образованием МА на ранних этапах инфекции участвует вирусная протеаза; вскоре после этого МА проникает в ядро зараженных клеток, где ассоциирует с vRNA и обеспечивает ее внутриклеточный транспорт к плазматической мембране – месту сборки вируса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки и вирус. Клетки МТ4 и клетки печени человека 293Т культивировали в среде РПМИ 1640 с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков. Клетки заражали ВИЧ-1 (штаммы 899 и ЕП). Трансфекцию клеток 293Т проводили плазмидными конструкциями, кодирующими провирус инфекционного клона НХВ2 или провирус неинфекционного клона, содержащего мутантный МА. Плазмиды любезно предоставлены д-ром С. Дюпонт (S. Dupont) [2]. Мутантный белок М4 содержал две аминокислотные замены в N-концевой части: Lys18Ala и Arg22Gly. Вирус, содержащий мутантный МА, был неинфекционным.

Трансфекцию проводили кальций-фосфатным методом. Для выделения плазмидной ДНК использовали метод щелочного лизиса. К клеткам добавляли от 1 до 10 нг плазмидной ДНК и 10-кратный объем среды SOC (“Sigma”). Смесь высевали на чашки Петри с агаром, содержащим 100 мкг/мл

ампициллина, инкубировали 18–20 ч при 30°C. Трансфекцию клеток 293Т проводили плазмидными конструкциями.

Плазмидные конструкции. Плазида рНХВ2 кодировала инфекционный провирус ВИЧ-1 в составе коммерческого вектора рсDNA3. Плазида hНХВ2-М4, кодирующая мутантный провирус, несла две нуклеотидные замены, которые в транслируемой полипептидной цепи приводили к замене Leu в позиции 18 на Ala и Arg в положении 22 на Gly.

Фракционирование клеток. Клетки гомогенизировали и для получения фракций цитозоля, ядра и мембран фракционировали, как описано ранее [4, 5]. В экспериментах с использованием мутантного МА выделение дополнительной фракции цитоскелета проводили по методу [8]. Ядра осаждали центрифугированием при 800 × g в течение 20 мин при 4°C, а мембраны – из надосадочной жидкости при 14000 × g в течение 30 мин.

Полимеразная цепная реакция. Препараты РНК, выделенные по методу [9], обрабатывали раствором ДНКазы для удаления примесей плазмидной ДНК. ПЦР в реальном времени проводили после реакции обратной транскрипции с использованием 30–35 циклов амплификации.

Использовали праймеры к LTR-области генома ВИЧ-1.

Иммуноблотинг и авторадиография. Анализ вирусных белков в полученных клеточных фракциях проводили методом иммуноблотинга, при авторадиографии использовали [^{14}C]-лейцин. После разделения белков электрофорезом в 15%-ном ПААГ белки переносили на мембрану Hybond-C (“GE Healthcare”, США); мембрану обрабатывали моноклональными антителами (#9064, “Abcam”, Англия), которые связываются с МА, но не реагируют с Gag.

В эксперименте “pulse-chase” клетки через 20–40 ч после заражения инкубировали в питательной среде, не содержащей лейцин, затем добавляли [^{14}C]-Leu (20–50 мкКю/мл) на 20–30 мин (“pulse”), после чего инкубировали клетки 1–3 ч (“chase”). Вирусные белки анализировали с помощью электрофореза в 15%-ном ПААГ с последующей авторадиографией.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение локализации белков Gag и МА в “pulse-chase” эксперименте

Через 20 ч после заражения клетки МТ4 в течение 20 мин инкубировали с [^{14}C]-Leu (“pulse”), затем среду удаляли, клетки промывали фосфатным буфером, добавляли свежую питательную среду и отбирали пробы через 1, 2 и 3 ч (“chase”). Клетки фракционировали и в полученных фрак-

циях: цитоплазмы, ядра и мембран — определяли вирусные белки. Как видно из рисунка 1 (рис. 1), в цитоплазме при пульсовой метке регистрируется Gag-белок p55, но затем, в ходе “chase”, происходят следующие изменения: количество МА увеличивается, а количество Gag уменьшается. Эти данные свидетельствуют о процессе раннего нарезания МА в Gag-предшественнике (уже через 20 ч после заражения). Gag — основной вирусный белок, контролирующей сборку вируса, — смещается во фракцию мембран, где происходит сборка вирусных частиц.

На этом этапе заражения (20 ч) в мембранах обнаружено значительное количество вирусных гликопротеинов. В этот же период времени во фракции ядер вирусные белки не найдены.

Локализация МА на более позднем сроке заражения (40 ч) показана на рис. 2. Эксперимент “pulse-chase” проведен по следующей схеме: “pulse” длится 30 мин, “chase” 1 ч, а срок мечения продлен до 3 ч (рис. 2, 5, 8). Полученные результаты свидетельствуют о том, что на этом сроке заражения количество МА в цитозоле увеличивается, а во фракции мембран не изменяется. Наибольшие изменения обнаружены в ядерной фракции зараженных клеток. Количество МА в ядрах увеличивается и особенно резко при трехчасовом мечении, что свидетельствует об аккумуляции МА в ядрах на этом периоде заражения. Следует заметить, что в этом случае МА присутствует в ПААГ в виде двух полос, что, по-видимому, связано с его фосфорилированием при проникновении в ядро [10].

Действие ингибитора протеазы ВИЧ-1 на нарезание Gag

Роль вирусной протеазы в раннем нарезании МА исследовали, используя ингибитор индинавирсульфат (ИС). Как видно из автордиографии (рис. 3), подавление нарезания Gag и появление его продукта, МА, в клетках МТ4 происходит только при добавлении ИС через 1.5 ч после заражения клеток; при введении ингибитора на более поздних стадиях (через 24 ч после заражения) его действие значительно слабее или вообще не регистрируется. Действие ингибитора протеазы ВИЧ-1 на зараженные клетки наблюдали только при введении ингибитора не позже чем через 5 ч после заражения. Из этих результатов следует, что МА вырезается из Gag-предшественника специфической ВИЧ-1 протеазой на ранних сроках заражения.

Внутриклеточная локализация МА, ассоциированного с vRNA

Локализацию МА в клетках 293Т (через 24 ч после трансфекции) исследовали методом иммуноблотинга, используя моноклональные антите-

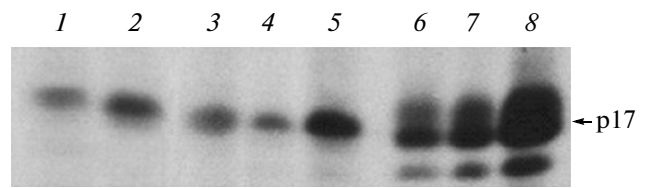


Рис. 2. Локализация матричного белка (МА) в клеточных фракциях (автордиография). [¹⁴C]-лейцин добавляли к МТ4 клеткам через 40 ч после заражения на 30 мин (“pulse”) (1, 3, 6), затем клетки промывали и инкубировали 1 ч (“chase”) (2, 4, 7); 5 и 8 — клетки метили в течение 3 ч. 1, 2 — Фракция цитозоля; 3–5 — фракция мембран; 6–8 — фракция ядер.

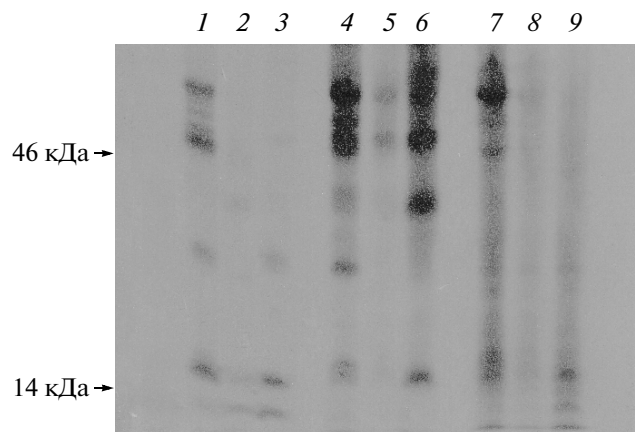


Рис. 3. Действие индинавира сульфата (ИС) на нарезание Gag-предшественника с образованием МА (автордиография). [¹⁴C]-Leu добавляли к клеткам МТ4, как описано для рис. 1. ИС добавляли через 1.5 ч (2, 5, 8) и 24 ч после заражения (3, 6 и 9). 1, 4 и 7 — Фракции контрольных клеток; 1–3 — фракция цитозоля; 4–6 — фракция мембран; 7–9 — фракция ядер.

ла к МА, которые не реагируют с Gag-предшественником. Как видно на рис. 4, МА дикого типа обнаружен, в основном, во фракции мембран и в меньшем количестве во фракции ядер, в то время как мутантный МА присутствует во фракциях ядер и цитоскелета, но его нет во фракции мембран. Эти данные свидетельствуют о том, что мутантный МА, утратив мембранотропный сигнал (миристиловую кислоту на N-конце матричного белка), по-видимому, не достигает мембраны.

Ранее нами показано, что в клеточных мембранах и ядре МА ассоциирован с vRNA [4, 5]. Теперь ассоциация МА с vRNA подтверждена методом ПЦР. Клетки 293Т трансфицировали плазмидами, содержащими МА либо дикого, либо мутантного типа. Через 24 ч клетки фракционировали и получали фракции цитозоля, мембран и ядер. МА осаждали из полученных фракций моноклональными анти-МА-антителами. На рис. 5а показано, что МА дикого типа, в основном, присут-

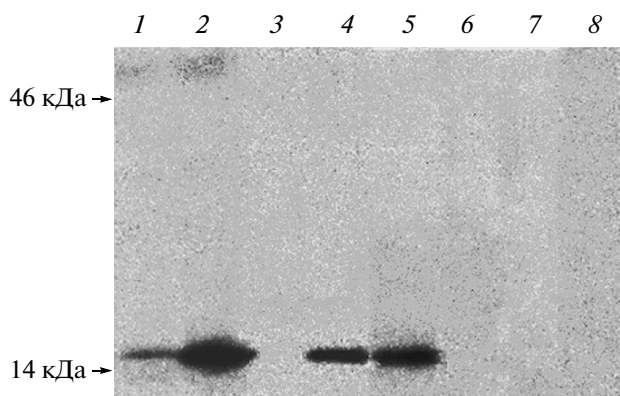


Рис. 4. Локализация МА в клеточных фракциях (иммуноблот). Клетки 293Т трансфицировали плазмидами, содержащими МА дикого типа (1, 3, 5, 7) или мутант (2, 4, 6, 8). 1, 2 – Фракция ядер; 3, 4 – фракция цитоскелета; 5, 6 – фракция мембран; 7, 8 – фракция цитозоля.

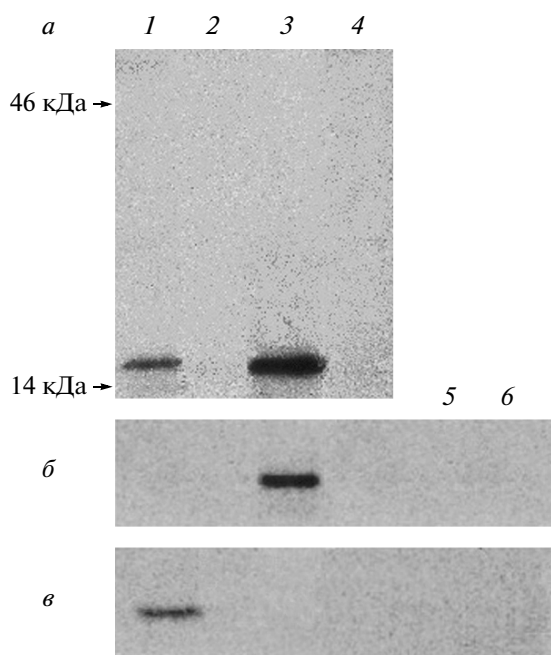


Рис. 5. Локализация МА и vRNA во фракциях клеток 293Т через 24 ч после трансфекции. *a* – Иммуноблот; *б* – ПЦР, вирус содержит МА дикого типа; *в* – ПЦР, вирус содержит мутантный МА. 1 – Фракция ядер; 2 – фракция цитоскелета; 3 – фракция мембран; 4 – фракция цитозоля.

стует во фракции мембран и незначительное его количество – в ядрах; в иммунопреципитате фракции мембран с помощью ПЦР показано и присутствие vRNA (рис. 5б). Однако в клетках, экспрессирующих мутантный МА, vRNA обнаружена в только в иммунопреципитате ядерной фракции (рис. 5в). Таким образом, методом ПЦР показано, что vRNA находится в анти-МА-им-

мунопреципитате мембранной фракции клеток, экспрессирующих МА дикого типа, и в ядерной фракции клеток – наряду с мутантным МА. Эти данные свидетельствуют о том, что vRNA находится в комплексе с МА как дикого типа, так и мутантного.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сборка – наименее изученная стадия репликации ВИЧ-1 и патогенеза инфекции. Анализ этой стадии обычно проводили в искусственных системах, в то время как временные и пространственные взаимодействия вирусных компонентов в зараженных клетках оставались неизвестными. К настоящему времени есть лишь противоречивые данные о том, где происходит ключевое событие сборки – взаимодействие vRNA с иницирующим сборку Gag-белком. При этом известно, что vRNA представляет собой как бы стержень для мультимеризации Gag, что необходимо для инициации сборки вируса.

Есть данные о том, что инициация сборки в результате взаимодействия vRNA и Gag происходит в цитоплазме зараженных клеток [11]. При этом авторы отвергают возможность образования комплекса Gag с vRNA в клеточном ядре, поскольку количество Gag там невелико, если вообще Gag в ядре присутствует. В то же время ряд авторов полагает, что Gag-белок связывается с vRNA в ядре и, следовательно, сборка ретровирусов иницируется в ядре. Так, в клетках, инфицированных вирусом саркомы Рауса, Gag проникает в ядра, где формируется комплекс с vRNA [12, 13]; а в клетках, инфицированных вирусом иммунодефицита кошек, комплекс Gag с vRNA формируется на ядерной оболочке [14]. Полученные нами результаты также свидетельствуют о том, что в ядре клетки, зараженной ВИЧ-1, происходит взаимодействие vRNA с МА, – значит, инициация сборки вируса происходит в ядре, и в этом процессе участвует вирусный белок МА.

Белок МА находится на N-конце Gag-предшественника и, благодаря наличию трех транспортных сигналов (мембранотропному, нуклеофильному и ядерного экспорта), считается челночным белком, участвующим в регуляции ранних и поздних стадий инфекции ВИЧ-1. Белок содержит нуклеофильный сигнал и в составе предынтеграционного комплекса транспортируется в ядро на ранней стадии инфекции [15]. Доказана специфичность взаимодействия МА с vRNA [16, 17].

В отличие от общепринятой версии, что МА – продукт нарезания Gag-предшественника в почкующихся вирионах [6], есть данные, свидетельствующие о том, что нарезание белка Gag происходит с помощью вирусной протеазы на ранних сроках инфекции, и отщепленный от Gag-предшественника МА участвует в сборке вируса

(см. обзор [3]). Благодаря небольшим размерам и нуклеофильному сигналу, МА проникает в ядро и, как показано нами ранее, ассоциирует с vRNA [4, 5]. Это подтверждено и результатами, полученными в данной работе. Таким образом, можно предположить, что в отличие от других ретровирусов, использующих белок Gag для упаковки vRNA, инициация сборки вириона ВИЧ-1 происходит иначе: в ядре зараженных клеток с участием не Gag, а лишь его части — матриксного белка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gheisen D., Jacobs E., de Foresta F., Thiriart C., Francotte C., de Wilde M. 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor p55 Gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell*. **59**, 103–112.
- Dupont S., Sharova N., DeHoratius C., Virbasius C., Zhu X., Bukrinskaya A., Stevenson M. 1999. A novel nuclear export activity in HIV-1 matrix protein required for virus replication. *Nature*. **402**, 681–685.
- Bukrinskaya A.G. 2007. HIV-1 matrix protein: a mysterious regulator of the viral life cycle. *Virus Res*. **124**, 1–11.
- Bukrinskaya A.G., Vorkunova G.K., Tentsov Y.Yu. 1992. HIV-1 matrix protein p17 resides in the cell nuclei in association with genomic RNA. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. **8**, 1795–1801.
- Букринская А.Г., Воркунова Г.К., Тенцов Ю.Ю. 1993. Матриксный белок p17 ВИЧ-1 транспортируется в клеточное ядро и связывается с геномной вирусной РНК. *Молекуляр. биология*. **27**, 49–57.
- Krausslich H.G. 1991. Human immunodeficiency viral proteinase dimer as a component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 3213–3217.
- Kaplan A.H., Swanstrom R. 1991. HIV-1 Gag proteins are processed in two cellular departments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 4528–4532.
- Niederman T.M., Hastings W.A., Ratner L. 1993. Myristilation enhanced binding of the HIV-1 Nef protein to T cell skeletal matrix. *Virology*. **197**, 420–425.
- Stallcup M.P., Washington L.D. 1983. Region-specific initiation of mouse mammary tumor virus RNA synthesis by endogenous RNA polymerase II in preparations of cell nuclei. *J. Biol. Chem.* **258**, 2802–2807.
- Bukrinskaya A., Ghorpade A., Heinzinger N., Smithgall T., Lewis R., Stevenson M. 1996. Phosphorylation-dependent HIV-1 infection and nuclear targeting of viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 367–371.
- Kutluay S., Bieniasz P. 2010. Analysis of the initiating events in HIV-1 particle assembly and genome packaging. *PLoS Pathogens*. **6**, 1–13.
- Garbitt-Hirst R., Kenney S., Parent L. 2009. Genetic evidence for a connection between Rous Sarcoma Virus Gag nuclear trafficking and genomic RNA packaging. *J. Virol.* **83**, 6790–6797.
- Gudleski N., Flanagan J., Ryan E., Bewley M., Parent L. 2010. Directionality of nucleocytoplasmic transport of the retroviral gag protein depends on sequential binding of karyopherins and viral RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 9358–9363.
- Kemler I., Meehan A. 2010. Poeschla EM Live cell co-imaging of the genomic RNAs and Gag proteins of two lentiviruses. *J. Virol.* **84**, 6352–6366.
- Bukrinsky M., Haggerty S., Dempsey M., Sharova N., Adzhubey A., Spitz L., Lewis P., Goldfarb D., Emerman M., Stevenson M. 1993. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of nondividing cells. *Nature*. **365**, 666–669.
- Purohit P., Dupont S., Stevenson M., Green M. 2001. Sequence-specific interaction between HIV-1 matrix protein and viral genomic RNA revealed by in vitro genetic selection. *RNA*. **7**, 576–584.
- Ott D., Coren L., Gagliardi T. 2005. Redundant roles for nucleocapsid and matrix protein RNA-binding sequences in HIV-1 assembly. *J. Virol.* **79**, 13839–13847.