

количество клеток вступает на путь апоптоза. По-видимому, это обусловлено приоритетом потребления энергии в клетке на репарацию ДНК и в меньшем количестве на апоптоз. Отмечено также положительное влияние препарата на выживаемость клеток человека после генотоксического стресса. Таким образом, полученные результаты исследований свидетельствуют о том, что некоторые аналоги НАДН и НАДФН могут эффективно усиливать клеточную защиту против краткосрочного генотоксического воздействия путем стимуляции репарации ДНК с последующим снижением гибели клеток.

Обзор подготовлен в ходе выполнения проектов при поддержке БРФФИ (№ договора Б07-223) и ГКПНИ «Биологическая инженерия и биобезопасность», а также в рамках международного сотрудничества между Институтом генетики и цитологии НАНБ, Латвийским институтом органического синтеза (г. Рига, Латвия) и Центром Онкологии (г. Гливице, Польша).

1. N.I. Ryabokon, R.I. Goncharova, G. Duburs, J. Rzeszowska-Wolny. A 1,4-dihydropyridine derivative reduces DNA damage and stimulate DNA repair in human cells *in vitro* // *Mutat. Res.* – 2005. – V. 587. – P. 52–58.
2. G. Duburs, B. Vigante, A. Plotniece, A. Krauze, A. Sobolev, J. Briede, V. Klusa, A. Velena. Dihydropyridine derivatives as bioprotectors // *Chemistry Today.* – 2008. – V. 26, № 2. – P. 68–70.
3. Y. Sambongi, H. Nitta, K. Ichihashi M. Futai, I. Ueda. A novel water-soluble Hantzsch 1,4-dihydropyridine compound that functions in biological processes through NADH regeneration // *J.Org.Chem.* – 2002. – V. 67. № 10. – P. 3499–3501.
4. Т.Д. Кужур. Антимутагены и химический мутагенез в системах высших эукариот. – Минск: Тэхналогія. – 1999. – 267 с.
5. N.I. Ryabokon, R.I. Goncharova, G. Duburs, R. Hancock, J. Rzeszowska-Wolny. Changes in poly(ADP-ribose) level modulate the kinetics of DNA strand break rejoining // *Mutat. Res.* – 2008. – V. 637. – № 1–2. – P. 173–181.
6. Schraufstatter I.U., Hyslop P.A., Hinshaw D.B., Spragg R.G., Sklar L.A., Cachrane C.G. Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1986. – V. 83. – P. 4908–4912.
7. S. Shall, G. de Murcia. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? // *Mutat. Res.* – 2000. – V. 460. – P. 1–15.
8. Н.В. Никитченко, О.В. Даливеля, Р.И. Гончарова, Н.И. Рябоконе. Влияние аналога НАДН на формирование спонтанных и радиационно-индуцированных повреждений ДНК, микроядер и апоптоза в лимфоцитах периферической крови здоровых доноров *in vitro* (в данном сборнике).

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ГИПЕРМУТАБИЛЬНОСТИ V3 РЕГИОНА ПОВЕРХНОСТНОГО ГЛИКОПРОТЕИНА gp120 ВИЧ1

В.В. Хрусталёв, Е.В. Барковский

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь
vkhrustalev@mail.ru*

Большое количество научных трудов посвящено изучению гипермутабильности вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Найдена молекулярная причина наиболее часто возникающих мутаций – замен гуанина на аденин на «+» цепи. Эти замены являются «отражением» ферментативного дезаминирования цитозина, происходящего на ДНК «-» цепи вируса во время репликации [1]. Установлено, что наиболее иммуногенным эпитопом ВИЧ является V3 регион поверхностного гликопротеина gp120 [2]. Соответственно, большая часть мутаций, приводящих к уходу вируса от иммунного ответа, происходит в V3 регионе gp120. Предшественник gp120 – вирусный белок gp160 – кодируется геном env.

Отличительной особенностью большей части штаммов ВИЧ2 является более низкая, по сравнению с ВИЧ1, мутабельность. С этой особенностью связывают более длительный латентный период ВИЧ2 инфекции: мутации, приводящие к уходу от иммунного ответа, происходят реже [3].

Целью настоящего исследования явился поиск причин гипермутабильности V3 региона gp120 ВИЧ1 на молекулярном уровне. Для этого мы сравнили нуклеотидный состав участка

гена *env*, кодирующего V3 регион gp120 ВИЧ1, с нуклеотидным составом участка гена *env*, кодирующего V3 регион гомологичного белка ВИЧ2. Был определён нуклеотидный состав и для полных кодирующих участков генов *env* ВИЧ1 и ВИЧ2.

Поскольку вирусу иммунодефицита человека присуща высокая степень изменчивости, нами были рассчитаны средние частоты использования нуклеотидов в трёх положениях кодонов для обширных выборок генов *env* и вырезанных из них участков, кодирующих V3 регион. Вычисления производились с помощью оригинальной программы «VVK Consensus 1.0.» (www.barkovsky.hotmail.ru).

Источником нуклеотидных последовательностей, изученных в данной работе, является GenBank. Для ВИЧ1 мы использовали выборку из 100 нуклеотидных последовательностей гена *env* (~2570 нуклеотидов), просеквенированных в разное время по всему миру. Непосредственно из этих последовательностей мы вырезали участки, кодирующие V3 регион gp120. Длина этих участков варьирует среди штаммов, в среднем она составляет 108 нуклеотидов. На момент написания данной статьи в GenBank находилось только 17 нуклеотидных последовательностей, содержащих полный кодирующий участок гена *env* ВИЧ2 (без крупных делеций в участке, кодирующем V3 регион). В то же время, количество нуклеотидных последовательностей ВИЧ2, содержащих участок, кодирующий V3 регион, велико. Поэтому, при расчёте частот использования нуклеотидов в участке, кодирующем V3 регион ВИЧ2, мы использовали 17 последовательностей вырезанных из полных генов *env* и ещё 83 последовательности из частично просеквенированных генов *env* различных штаммов ВИЧ2.

Таблица

Частоты использования нуклеотидов в трёх положениях кодонов полных кодирующих участков гена *env* (~2570 нуклеотидов) и его участков, кодирующих V3 регион белка gp120 (~108 нуклеотидов), у ВИЧ1 и ВИЧ2.

Выборка	1A	2A	3A	1T	2T	3T	1C	2C	3C	1G	2G	3G
ВИЧ1 <i>env</i> 100 посл.	0,388 ± 0,001	0,303 ± 0,001	0,370 ± 0,001	0,187 ± 0,001	0,286 ± 0,001	0,264 ± 0,002	0,156 ± 0,001	0,191 ± 0,001	0,161 ± 0,001	0,269 ± 0,001	0,220 ± 0,001	0,206 ± 0,001
ВИЧ2 <i>env</i> 17 посл.	0,349 ± 0,003	0,310 ± 0,004	0,323 ± 0,002	0,211 ± 0,002	0,260 ± 0,003	0,228 ± 0,004	0,176 ± 0,004	0,223 ± 0,002	0,223 ± 0,004	0,264 ± 0,003	0,208 ± 0,002	0,226 ± 0,003
ВИЧ1 V3 100 посл.	0,521 ± 0,005	0,267 ± 0,004	0,560 ± 0,007	0,130 ± 0,003	0,159 ± 0,003	0,215 ± 0,005	0,118 ± 0,004	0,232 ± 0,002	0,119 ± 0,003	0,231 ± 0,003	0,341 ± 0,003	0,106 ± 0,010
ВИЧ2 V3 100 посл.	0,397 ± 0,004	0,231 ± 0,005	0,395 ± 0,010	0,198 ± 0,003	0,262 ± 0,002	0,156 ± 0,006	0,235 ± 0,002	0,272 ± 0,004	0,170 ± 0,005	0,169 ± 0,002	0,235 ± 0,003	0,279 ± 0,011

Как видно из таблицы, содержащей результаты нашей работы, частоты использования нуклеотидов по трём положениям кодонов в участках, кодирующих V3 регион ВИЧ1 и ВИЧ2, не одинаковы; наибольшая разница существует между уровнями 3G. Для участков, кодирующих V3 ВИЧ1, характерно низкое содержание гуанина в третьих положениях (варьирует от 0,2 до 0), при высокой насыщенности гуанином вторых положений кодонов. Транзиции G на A в третьих положениях кодонов в подавляющем большинстве случаев являются синонимичными. Во вторых и в первых положениях кодонов транзиции G на A – несинонимичны (приводят к замене аминокислоты в кодируемом белке). Чем ниже содержание гуанина в третьих положениях кодонов, тем выше вероятность того, что замена G на A произойдёт в первом или во втором положении. Следовательно, чем ниже 3G

(относительно 1G и 2G), тем выше вероятность того, что замена G на A будет несинонимичной.

Из приведенных выше данных видно, что высокая частота возникновения несинонимичных нуклеотидных замен в участке, кодирующем V3 регион gp120 ВИЧ1, напрямую связана с низким содержанием гуанина в третьих положениях кодонов. В гомологичном участке ВИЧ2 (см. таблицу) 3G значительно выше (варьирует от 0,17 до 0,37). При этом, содержание гуанина в первых и во вторых положениях кодонов в участках, кодирующих V3 ВИЧ2, в среднем, ниже, чем в третьих положениях. Согласно теории мишеней, вероятность того, что транзиция G на A в участке, кодирующем V3 ВИЧ2, произойдет в третьем положении кодона, составляет 41 % (поскольку 41 % всего гуанина находится в третьих положениях кодонов). Для ВИЧ1 такая вероятность составляет всего лишь 16 %.

Как было сказано выше, уровень 3G в участках, кодирующих V3, варьирует у различных штаммов ВИЧ1 и ВИЧ2. Секвенирование этих участков с последующим расчётом 3G позволит сделать прогноз скорости развития СПИД и прогрессирования иммунодефицита. Было бы целесообразно усиливать схемы противовирусной терапии у больных с экстремально низким 3G в участке, кодирующем V3 gp120 ВИЧ.

Частоты использования нуклеотидов в полных генах *env* дают представление о том, что участок, кодирующий V3 ВИЧ1, является аномальным: уровни 1A и 2G в нём существенно выше, чем в целом по гену *env*, а уровень 3G – значительно ниже. В генах *env* ВИЧ1 и ВИЧ2 выполняются правила «1G > 2G» и «1T < 2T», универсальные для генов, расположенных в двухцепочечной ДНК; в то время как в отдельно взятых участках этих генов, кодирующих V3 регион, первое из этих двух неравенств имеет противоположный знак. Эти данные указывают на происхождение гена *env* от клеточных предшественников. Участок же, кодирующий V3 регион, судя по всему, является продуктом более поздних генетических перестроек. В частности, у ВИЧ1 этот участок перенасыщен триплетами AGA, которые могли возникнуть в результате внедрения повторяющихся последовательностей. Возникновение участка с низким 3G и высоким 2G могло обусловить повышенную мутабельность gp120 ВИЧ1, по сравнению с гомологичным белком ВИЧ2.

Многие исследователи утверждают, что V3 регион gp120 и весь геном ВИЧ1 в целом находятся под влиянием положительного отбора [3]. Методы, с помощью которых этот факт устанавливают, претерпевают изменения от работы к работе, хотя все они основаны на поиске превышения теоретической вероятности возникновения несинонимичных замен их реально наблюдаемыми частотами, причём, на уровне одного кодона. Классические селекционные тесты, определяющие соотношение синонимичной и несинонимичной эволюционной дистанции между полными генами (или даже их участками), как ни странно, практически не используются в работах такого плана.

По нашему мнению, положительный отбор, способствующий «закреплению» в организме данного больного ушедших на некоторое время от иммунного ответа мутантных вирусов, невозможен без процесса, «поставляющего» большое количество несинонимичных мутаций. В настоящей работе описан первичный молекулярный механизм увеличения вероятности возникновения несинонимичных нуклеотидных замен (относительно синонимичных) в участке, кодирующем V3 регион gp120 ВИЧ1.

1. S.K. Pillai, J.K. Wong, J.D. Barbour Turning up the volume on mutational pressure: Is more of a good thing always better? (A case study of HIV-1 Vif and APOBEC3) // *Retrovir.* – 2008. – Vol.5. – №26.
2. C. Spenlehauer et al. Study of the V3 Loop as a Target Epitope for Antibodies Involved in the Neutralization of Primary Isolates versus T-Cell-Line-Adapted Strains of Human Immunodeficiency Virus Type 1 // *J. Virol.* – 1998. – V.72, №12. – P. 9855–9864
3. S. Williamson Adaptation in the *env* gene of HIV-1 and evolutionary theories of disease progression // *Mol. Biol. Evol.* – 2003. – V.20, №8. – P.1318-1325.