

К ВОПРОСУ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМА СВЯЗИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ С АУТОИММУНИТЕТОМ

И.П. СМЕРНОВА, С.Б. АЛЕКСЕЕВ, Т.Т. БЕРЕЗОВ

Кафедра биохимии Российского Университета дружбы народов и НИИ Вирусных препаратов РАМН.

Проведено изучение механизма аутоиммунной супрессии Т-лимфоцитов с использованием 18К-антигена как маркера проявления аутоиммунной патологии. В качестве иммуномодулирующего вещества использовалась грибная L-лизин- α -оксидаза.

Высказывается предположение, что развитие аутоиммунной патологии на начальном этапе реализуется, вероятнее всего, через механизм избыточного биосинтеза тех клеточных белков, которые необходимы для репродукции ВИЧ.

Известно, что в основе СПИД лежит способность вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ) инфицировать и повреждать клетки, экспрессирующие рецепторный гликопротеин CD4, который является дифференцировочным маркером Т-лимфоцитов [1]. Т-лимфоциты играют центральную роль в развитии иммунного ответа [2], поэтому ВИЧ-инфекция вызывает тяжелую патологию всей системы иммунитета, обуславливая развитие инфекционных заболеваний и злокачественных новообразований.

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в изучении молекулярной биологии и иммунопатологии ВИЧ-инфекции, истинный спектр ее клинических проявлений и вызываемых иммунологических нарушений исследован далеко не полностью. Наиболее характерно при развитии ВИЧ-инфекции появление аутоантител и, в частности, к 18 К-антигену, который, как было показано позже, представляет гистон H2B, экспрессируемый на поверхности инфицированных клеток [4,5]. Наличие аутоантител к 18 К-антигену является рядовым событием в аутоиммунной патологии ВИЧ-инфекции, которая сама по себе является важным компонентом патогенеза. Каковы же клиничко-патогенетические связи между ВИЧ-инфекцией и аутоиммунитетом? Очевидно, что изучение этой проблемы может иметь существенное значение как для расшифровки патогенеза самой ВИЧ-инфекции, так и аутоиммунных заболеваний человека.

Целью данной работы является изучение механизма аутоиммунной супрессии Т-лимфоцитов с использованием 18 К-антигена в качестве маркера проявления аутоиммунной патологии, а в качестве вещества, обладающего иммуномодулирующим свойством, использовали L-лизин- α -оксидазу, полученную нами ранее [3].

Методика. Клетки линии МТ-4 (культивируемые Т-лимфоциты человека), клетки линии Yurkat (лимфобластоидная клеточная линия человека) выращивали на среде RPMI-1640, содержащей 10% фетальной сыворотки крови телянка и 100 ед/мл ампициллина. Подсчет клеток проводили в камере Горяева, определение количества мертвых клеток — с помощью окрашивания клеток трипановым синим.

Сорбирование иммуноглобулинов: в ячейки 96-луночного планшета сорбировали по 1 мкг IgG в 0,05 М карбонат-бикарбонатном буфере pH 9,6 в течение 18 часов. Далее в лунки вносили 100 мкл исследуемого образца, приготовленного следующим образом: культуральную среду клеток МТ-4 разводили в 3 раза в натрий-фосфатном буфере pH 7,0 содержащем 0,1 М NaCl, 1% БСА и 0,5% Твин 40. После 1 часа инкубации планшеты 3 раза промывали тем же буфером без БСА, инкубировали с конъюгатом в течение 1 часа и окрашивали как описано выше. Дальнейшее уменьшение концентрации вирусных антигенов получали последовательными 3-кратным разведением культуральной среды. За титр принимали разведение, при котором оптическая плотность в лунке была в 3 раза выше, чем в соответствующем контроле.

Вирус ВИЧ, штамм IIIВ/Н9 вносили в суспензию клеток МТ-4 в количестве 10% цитопатических доз (ЦПД) на 5×10^5 клеток. За размножением вируса следили по наличию в культуральной среде вирусных антигенов и развитию динамики цитопатического действия вируса на клетки. Стандартным считали наличие мертвых клеток в контроле не более 5%. В клетках, зараженных вирусом, ЦПД тестировалось при наличии не менее 10% мертвых клеток.

Наличие в культуральной среде вирусных антигенов определяли с помощью сыворотки крови от больного СПИД, полученной из Контрольного института им. Тарасевича. Сыворотка содержала антитела против продукта гена gag белка р24 и продуктов гена env гр 41 и гр 120 ВИЧ.

Иммуноглобулины выделяли из сыворотки на сорбенте DEAE-Affi-Gel Blue (фирма Bio Rad, USA) стандартным методом [6]. Часть выделенных IgG конъюгировала с пероксидазой хрена периодатным методом по стандартной методике. Титр конъюгата определяли по оптической плотности при 492 нм в результате протекания цветной ферментативной реакции в растворе следующего состава: 10 мг о-фенилендиамина в 24 мл 0,1 М фосфатно-цитратного буфера pH 5,0 и 10 мкл перекиси водорода (33%). В лунку вносили 100 мкл раствора и через 10 мин. реакцию останавливали 100 мкл 2 М серной кислоты. За титр конъюгата принимали разведение, при котором оптическая плотность составляла 1,2 оптические единицы, что соответствовало разведению конъюгата 1/800.

Суммарную фракцию гистонов 18 К антигена (гистона H2B) выделяли из $8 \cdot 10^{10}$ клеток MT-4 или Jurkat. Клетки суспендировали в 0,3 н HCl и инкубировали 10 мин в ледяной бане. Осадок удаляли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин., супернатант нейтрализовали 1 н NaOH и гистоны осаждали 6 объемами ацетона, предварительно охлажденного до 20°C. Осадок гистонов собирали центрифугированием, промывали ацетоном и высушивали на воздухе. Получено 120 мг сухого препарата.

Гистон H2B идентифицировали в смеси разделения белков электрофорезом в 15% полиакриламидном геле по методу Spiker, в 0,9 М уксусной кислоты и 2,5 М мочевины [7]. Приготовление антигена H2B для иммунизации животных осуществляли следующим образом: 10 мг кислоторастворимых белков разделяли препаративным электрофорезом. После разделения проводили электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану в 0,9 М уксусной кислоте при 0,5 мА в течение 2,5 часов. Мембрану окрашивали 0,2% Ponsen в 3% ТХУ. Полосу соответствующую гистону H2B вырезали, отмывали от красителя в 0,05 М Na-фосфатном буфере pH 7,2 и растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). 100 мг мембраны растворяли в 2,5 мл ДМСО. После растворения пробу гомогенизировали на ультразвуковом дезинтеграторе Virsonic 300 (фирма Virtis, USA) и добавляли N-фосфатный буфер (2,5 мл) для получения суспензии, которой иммунизировали мышей, вводя ее внутрибрюшинно по 0,5 мл три раза с интервалом 1 неделя. Через 7 дней после последней иммунизации животных забивали и обескровливали. Содержание H2B на 100 мг нитроцеллюлозного фильтра составляло 0,5 мг белка.

Определение скорости синтеза 18-К-антигена производили следующим образом: клетки выращивали как описано выше и добавляли 14C-гидролизат белка до конечной концентрации 1 мкКю/мл. После 1 часа инкубации клетки осаждали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 мин, промывали 2 раза холодной средой R PMI-1640 и добавляли 0,2 мл 0,3 н HCl к осадку клеток ($1 \cdot 10^6$). Радиоактивность белков определяли на спектрометре (Marck III, USA) в толуоловом сцинтилляторе. Белки гидролизуют в 0,1 н NaOH и наносят на GFC-фильтры (фирма Whatman).

Для определения скорости синтеза суммарных белков осадок клеток промывали средой R PMI-1640 (3 раза) и гидролизуют в 0,1 н NaOH и подсчитывали радиоактивность.

За скоростью синтеза ДНК следили по включению в кислотонерастворимую фракцию H³-тимидина. Конечная концентрация метки составляла 5 мкКю/мл. После 1 часа инкубации к осадку клеток ($1 \cdot 10^6$) добавляли 5% ТХУ, промывали 2 раза холодной ТХУ и затем осадок растворяли в 1 мл 0,1 н NaOH. На фильтры для подсчета радиоактивности наносили по 0,1 мл образца.

С целью мечення белков ³⁵S метиононом клетки инкубировали с меткой (5 мкКю/мл) в течение 1 часа. Далее осадок клеток промывали 3 раза средой R PMI-1640 и лизировали в 2% растворе SDS, 5% 2-меркаптоэтаноле в Na-фосфатном буфере pH 7,2 ($1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл буфера). Белки разделяли электрофорезом по методу Лэммли, гель высушивали и помещали в кассету с рентгеновской пленкой.

Для получения антисывороток к иммуномодулятору кроликов иммунизировали 2 мг белка в полном адьюванте Фрейнда. Через 30 дней животным вводили 2 мг белка в неполном адьюванте и еще через 14 дней вводили раствор белка. В результате получена антисыворотка с титром 1/50000. Белок тестировали методом иммуноферментного ана-

лиза. В качестве конъюгата использовали вторичные антитела против глобулинов кролика с пероксидазой хрена.

Результаты и обсуждение. Более ранние исследования сравнительного действия азидотимидина, непосредственно воздействующего на репродукцию ВИЧ и L-лизин- α -оксидазы (ЛО) из *Trichoderma harzianum* Rifai, показали, что азидотимидин менее специфичен по сравнению с последней [8]. Естественно возникал вопрос: почему азидотимидин, непосредственно воздействующий на репродукцию ВИЧ, оказывается менее специфичным по сравнению с ЛО? Вероятно, особенностью действия ЛО является ее иммуномоделирующее действие, выражающееся в подавлении супрессии Т-лимфоцитов, вызванное ВИЧ.

Высказанное предположение согласуется с наблюдением, что введение азидотимидина приводит к обострению аутоиммунного процесса [9]. Исходя из этого нами был проведен непосредственный анализ воздействия иммуномодулятора на синтез 18 К-антигена, который, как уже отмечалось, является маркером аутоиммунной патологии при ВИЧ-инфекции. Результаты показали (рис. 1-3), что при концентрации иммуномодулятора 7 нг/мл, т.е. концентрации, при которой проявляется его антивирусная активность, синтез ДНК (рис.1) и суммарных белков (рис.2) остается на уровне контроля, в то время как скорость синтеза белков гистоновой фракции, включая антиген 18 К (рис.3) замедляется на 20%. Учитывая, что импульсное мечение проводили в течение часа, можно полагать, что при длительной инкубации клеток в присутствии ЛО синтез антигена 18 К замедляется значительно сильнее. Факт подавления иммуномодулятором синтеза 18 К-антигена нам удалось подтвердить и с помощью антител, полученных к гистону H2В. Хотя не удалось получить высокотитражные сыворотки (титр в ИФА составлял 1/200), что, естественно, затрудняло анализ за счет высокого неспецифического сигнала, тем не менее, в клетках МТ-4, зараженных ВИЧ, при инкубации с иммуномодулятором, уровень оптической плотности в ИФА превышал контроль через 3 дня роста культур в 2,5-2,8 раза. Отсюда следует вывод, что ЛО может изменять специфичность биосинтеза клеточных белков. Так как выявлять индивидуальные белки, меченные ^{14}C из-за низкой удельной радиоактивности нецелесообразно, мы провели мечение белков с их последующим разделением в полиакриламидном геле 35 S-метионином.

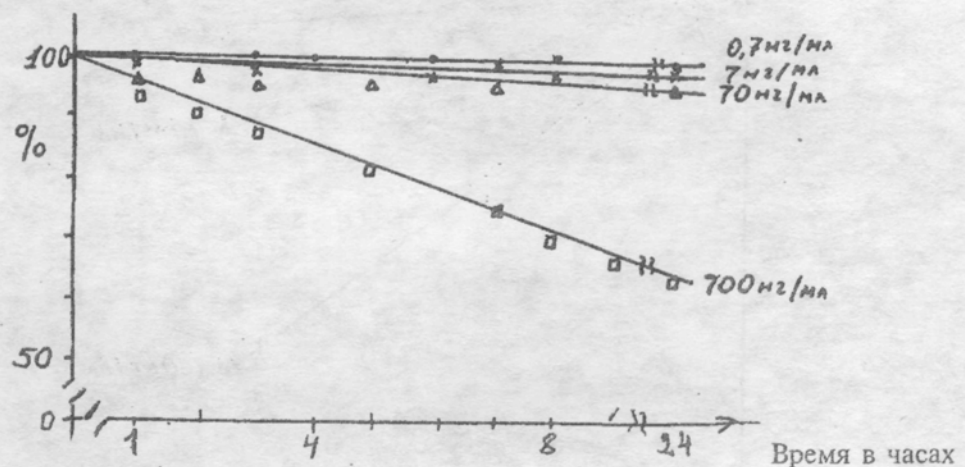


Рис.1 Динамика изменения скорости синтеза ДНК под воздействием иммуномодулятора в клетках линии МТ-4 через 24 часа роста культуры.

Ось абсцисс — время роста культуры, ось ординат — соотношение включения метки (%) в белки при инкубации клеток без и в присутствии различных концентраций иммуномодулятора.

Авторадиограмма белков, меченных ^{35}S -метионином, показала, что иммуномодулятор менял специфичность биосинтеза клеточных белков. Особенно наглядны эти различия в отношении высокомолекулярной группы белков. Например, наблюдается

практически полное подавление ЛО синтеза мажорного клеточного белка с м.м. 70 кД. Другие клеточные белки, скорость синтеза которых изменена под воздействием фермента, приведены в табл.1. В то же время следует отметить, что скорость синтеза суммарных белков в изученном временном интервале роста клеточных культур не изменяется под воздействием ЛО (рис.2).

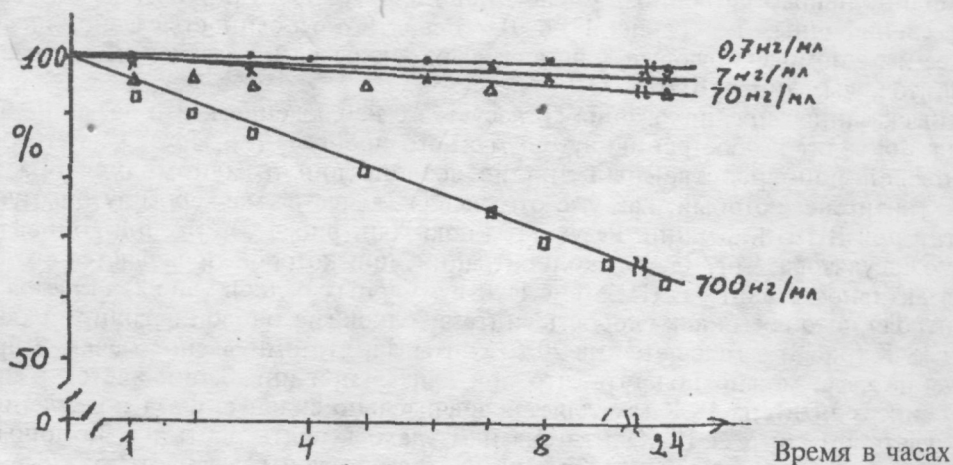


Рис.2 Динамика изменения скорости синтеза суммарных белков под воздействием иммуномодулятора в клетках линии МТ-4 через 24 часа роста культуры. Ось абсцисс — время роста культуры, ось ординат — соотношение включения метки (%) в белки при инкубации клеток без и в присутствии различных концентраций иммуномодулятора.

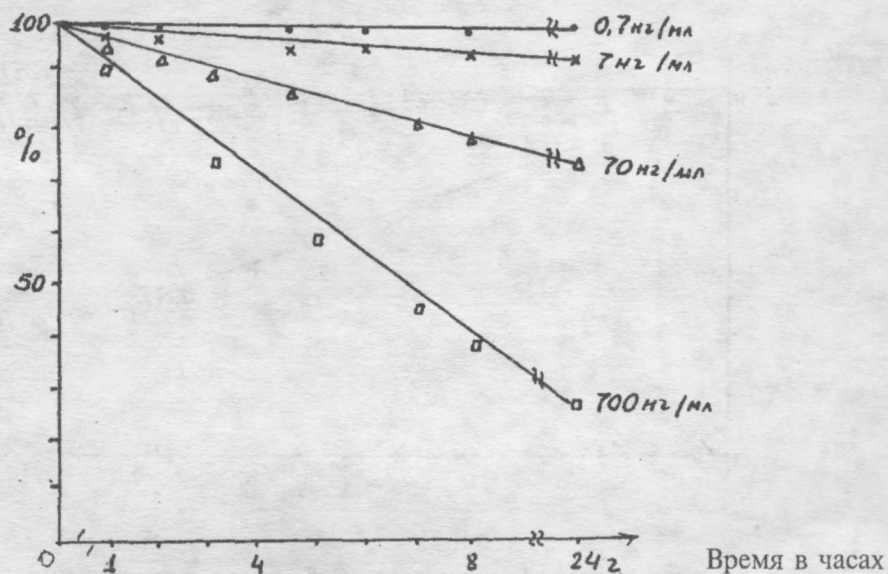


Рис.3 Динамика изменения скорости синтеза белков гистоновой фракции под воздействием иммуномодулятора в клетках линии МТ-4 через 24 часа роста культуры. Ось абсцисс — время роста культуры, ось ординат — соотношение включения метки (%) в белки при инкубации клеток без и в присутствии различных концентраций иммуномодулятора.

Таблица 1

Молекулярная масса и электрофоретическая подвижность белков, скорость синтеза которых изменена под воздействием иммуномодулятора (ЛО)

N	Rf	м.м. (кД)
1	0,013	270
2	0,038	220
3	0,076	140
4	0,150	100
5	0,210	75
6	0,230	70
7	0,280	60

Таким образом, антивирусное действие L-лизин- α -оксидазы реализуется через механизм изменения специфичности синтеза клеточных белков, которые, можно предположить, принимают активное участие в репродукции ВИЧ. Сопоставляя полученные данные с результатами по ингибированию синтеза 18 К-антигена, очевидно, что эти белки могут обуславливать аутоиммунную супрессию клеток, вызываемую ВИЧ-инфекцией.

Рассматривая возможные механизмы развития аутоиммунных проявлений ВИЧ-инфекции, необходимо подчеркнуть, что вирусная инфекция рассматривается в качестве одной из наиболее важных причин аутоиммунной реакции при заболеваниях человека [10]. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что некоторые вирусы могут играть этиологическую роль в развитии широкого спектра аутоиммунных заболеваний [1].

Для объяснения механизмов вирусиндуцированного синтеза аутоантител предложено несколько гипотез, в основе которых лежат представления о молекулярной мимикрии вирусных антигенов и белков клеток [11]. Белковые продукты некоторых ВИЧ-генов имеют антигенные детерминанты, гомологичные по аминокислотной последовательности клеточным белкам, например, интерлейкину 2, α -тимозину, антигенам системы HLA, иммуноглобулинам и другим [12, 13, 14, 15].

Активация CD4 Т-лимфоцитов определяется взаимодействием CD4 рецепторов с процессированными антигенными фрагментами в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости класса II на мембранах антигенпрезентирующих клеток. CD4-гликопротеины связываются с комплексом молекул гистосовместимости и усиливают аффинность межклеточных взаимодействий, что приводит к патологическому процессу распознавания антигенов низкоаффинными рецепторами CD4 [2]. Все это дает основание предположить, что развитие нарушения иммунитета у больных, инфицированных ВИЧ, может быть связано с производством и синтезом антител к иммунокомпетентным клеткам, оказывающим влияние на функционирование CD4 Т-лимфоцитов. Аналогичная ситуация имеет место и в случае механизма развития аутоиммунных болезней, не ассоциированных с ВИЧ-инфекцией [16].

Полученные в работе результаты исследования специфичности синтеза клеточных белков в клетках, зараженных ВИЧ, показывают, что развитие аутоиммунной патологии на начальном этапе реализуется, вероятнее всего, через механизм избыточного биосинтеза тех клеточных белков, которые необходимы для репродукции ВИЧ. Показателен пример избыточной продукции 18-К-антигена (гистона H2B), синтез которого предшествует переходу клетки в S-фазу клеточного цикла [17, 18, 19]. Поскольку активация репликативного синтеза способствует включению генома ВИЧ в геном клетки-хозяина, то очевидно, что побочным следствием развития этого процесса служит появление на клеточной мембране белков, которые в неинфицированных клетках имеют совершенно другую компартментализацию. Эти белки и, в частности, 18 К-антиген, являются в дальнейшем мишенями аутоиммунной патологии. Подтверждение было получено в работе Brick et. al., 1990, в которой показано, что антигистоновые антитела выявляются в той или иной степени и при заболеваниях системной красной волчанкой [20].

Независимо от того, удастся ли в будущем доказать вирусную этиологию аутоиммунных болезней, изучение связи между ВИЧ-инфекцией и аутоиммунитетом представляет теоретический и практический интерес, как для сравнительной клинической патологии, так и для поисков путей активного воздействия (вмешательства) в патогенез инфекционного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Levy J.A. // JAMA, 1985, v. 261, p. 2997-3014.
2. Wright D.C. et al. // Cell, 1989, v. 57, p. 709-715.
3. Stricker R.B. et al. // Nature, 1987, v. 327, p. 710-713.
4. Stricker R.B. et al. // IV International Conference on AIDS, ed. R.C. Gallo, Book 1, 1989, p. 191-192.
5. Stricker R.B. et al. // J. Immunol., 1989, v. 142, p. 4052-4056.
6. Hudson L., Hay F.C. // Practical Immunology, Oxford, England, 1976, p. 152-153.
7. Spiker S. // Anal. Biochem., v. 108, p. 263-265.
8. Березов Т.Т., Смирнова И.П., Алексеев С.Б. и др. "Ингибитор вируса" иммунодефицита человека". Патент №2022011, 1994.
9. Gallo R.C., Montanier L. // Sci Amer., 1988, v. 259, p. 25-32.
10. Oldstone M.B.A. // Cell, 1987, v. 50, p. 819-820.
11. Ziegler J.L., Stites D. P. // Clin. Immunol. Immunopath., 1986, v. 41, p. 305-313.
12. Becker Y. // Med. Hypothes., 1988, v. 26, p. 145-147.
13. Reither W.E. et al. // PNAS, 1986, v. 83, p. 9188-9192.
14. Weigent D.A. et al. // BBRC, 1986, v. 139, p. 367-374.
15. Young J.A. // Nature, 1988, v. 333, p. 215-216.
16. Morimoto C. et al. // J. Clin. Invest., 1987, v. 79, p. 762-768.
17. Алексеев С.Б. с соавт. // Биохимия, 1983, т. 48, с. 1884-1889.
18. Алексеев С.Б. с соавт. // Цитология, 1987, т. 29, с. 582-588.
19. Смирнова И.П., Алексеев С.Б., Березов Т.Т. II Российский национальный конгресс. 1995. Материалы тезисов, Москва, С.256.
20. Brick et al. // Clin. Immunol. Immunopathol., 1990, v. 54, p. 372-381.

STUDY OF THE MECHANISM OF INTERACTION BETWEEN HIV-INFECTION AND AUTOIMMUNITY.

I.P.Smirnova, S.B.Aleckseev, T.T.Berezov

Department of Biochemistry, Russian Peoples, Friendship, Moscow

The mechanism of autoimmunity suppression of T-lymphocytes with 18K-antigen as marker of autoimmunopathology developments was investigated. Mushroom, s L-lysine α -oxydase was used as immunomodulator.

It was suggested that the development, of the first stage autoimmunity pathology may be realized via overproductive synthesis of cell proteins required for HIV reproduction.