

Композиционная специфичность интеграции вирусов Т-клеточной лейкемии человека типа I и иммунодефицита человека типа 1 в геном человека

Л. А. Цыба, С. В. Зубак, Н. Тряпицина-Гулей¹, Дж. Бернарди¹, А. В. Рындич

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

¹ Институт Ж. Моно
Пл. Жусье, 2, 43, Париж, 75000, Франция

*Проанализировано распределение интегрированных провирусов HTLV-I (вирус Т-клеточной лейкемии человека типа I) и HIV-1 (вирус иммунодефицита человека типа 1) в геноме пациентов с различными проявлениями и стадиями инфекции, используя новую методику фракционирования ДНК в пологом градиенте CsCl в присутствии двух маркеров плавучей плотности. Основные пики распределения GC-богатых последовательностей HTLV-I в 18 исследуемых случаях были локализованы в GC-богатых (>44 % GC) участках генома человека, составляющих 30 % генома и содержащих транскрипционно активные провирусы HTLV-I. У пациентов с Т-клеточной лейкемией (ATL) вирусные последовательности не были обнаружены в участках генома, GC-состав которых ниже 44 %. Более широкое и мультимодальное распределение HTLV-I (в районе 38—54,8 % GC) установлено для пациентов с тропическим спастическим парапарезом (TSP/HAM) и асимптоматических вирусоносителей. GC-бедные провирусы HIV-1 обнаружены как в GC-бедных, так и в GC-богатых компартментах геномов 27 пациентов с разным уровнем вирусемии. Для пациентов с высоким уровнем вирусной продукции показано более высокое содержание последовательностей HIV-1 в GC-бедных участках генома. Полученные результаты свидетельствуют о неравномерном распределении *in vivo* интегрированных провирусов в компартментах генома клетки и в более широком диапазоне, чем *in vitro*.*

Введение. В процессе обратной транскрипции с геномной вирусной РНК синтезируется провирусная ДНК-копия, интегрирующая в геном клетки хозяина. Распределение сайтов интеграции ретровирусов в геноме может быть изучено при помощи методов композиционного фракционирования (по составу оснований) клеточной ДНК, благодаря которым также было показано, что геномы теплокровных представляют собой мозаики изохор — больших сегментов ДНК (> 300 тыс. п. н.), гомогенных по составу оснований и принадлежащих к небольшому числу семейств с разным уровнем GC. В геноме человека два GC-бедных семейства изохор — L1 и L2 — образуют 63 % генома и три

GC-богатых семейства — H1, H2 и H3 — 24, 7,5 и 4,7 % генома соответственно. Остаток составляют сателлитная и рибосомная ДНК [1]. Низкая концентрация генов отмечается в GC-бедных изохорах, высокая — в GC-богатых [2].

Большие фрагменты ДНК (50—100 тыс. п. н.), образующиеся в результате неспецифических физических и энзиматических разрывов во время стандартного выделения и отражающие состав оснований изохор, из которых они происходят, могут быть фракционированы препаративным центрифугированием в градиенте плотности Cs₂SO₄ в присутствии сиквенс-специфичных ДНК-лигандов. Гибридизационный анализ композиционных фракций ДНК хозяина с вирусными последовательностями показал, что интеграция экспрессируемых вирусных последовательностей является компартментализованной, т. е. происходит в определенные уча-

стки генома хозяина, и изопикничной — когда композиционный состав фрагментов ДНК, содержащих вирусные последовательности, близок к таковому провируса. Это было установлено для GC-богатых вирусов лейкемии быка (BLV), саркомы Рауса (RSV), вируса гепатита В (HBV), вируса Т-клеточной лейкемии человека типа I (HTLV-I), интеграция которых происходит в GC-богатые участки генома хозяина, и для GC-бедного вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), последовательности которого обнаружены в GC-бедных участках [3—7]. В свою очередь, анализ ретровирусных геномов показал, что они характеризуются высокой композиционной гомогенностью и образуют два класса: GC-бедный и GC-богатый [8]. Ретровирусы человека HTLV-I и HIV-1 принадлежат к двум различным классам — GC-богатому и GC-бедному.

Вирус Т-клеточной лейкемии человека типа I вызывает Т-клеточную лейкемию (ATL) [9, 10] и хроническое нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы — тропический спастический парапарез/HTLV-I-ассоциированную миелопатию (TSP/HAM) [11], оба заболевания развиваются у 1—5 % вирусносителей после длительного латентного периода [12].

Проведенный нами ранее анализ распределения сайтов интеграции провирусов HTLV-I в геномах HTLV-I-трансформированных клеточных линий и Т-клеточных клонов показал, что транскрибируемые копии провирусов расположены в более богатых по содержанию GC компартаментах клеточного генома, в отличие от нетранскрибируемых [6]. Описанный выше подход нуждается в большом количестве геномной ДНК, поэтому он не мог быть использован для изучения ретровирусной интеграции у пациентов.

Разработка нового метода, заключающегося в фракционировании геномной ДНК в пологом градиенте плотности CsCl в присутствии двух маркеров плавучей плотности и последующей детекции вирусных последовательностей и маркерных ДНК слот-блот гибридизацией, позволила уменьшить необходимое для анализа количество ДНК в 20 раз и изучить интеграцию провирусов у пациентов.

Для инфекции HIV-1 характерен переменный клинический курс, развитие заболевания прогнозируется исходя из содержания вирусов в плазме крови, устойчивый высокий уровень вирусной продукции указывает на неблагоприятный прогноз [13]. Факторы, влияющие на продукцию вирусных частиц, остаются неизвестными. Вероятно, одним из них является эффективная транскрипция провирусной ДНК [14, 15], зависящая от сайтов интеграции

[4, 6, 16, 17]. Вирус иммунодефицита человека принадлежит к GC-бедному классу ретровирусов, интеграция которого изучена мало. Не была исследована также связь транскрипционной активности вирусных последовательностей с их локализацией в геноме. Анализ интеграции HIV-1 у пациентов с различной вирусной продукцией будет одним из первых этапов в изучении этой проблемы.

Материалы и методы. Лизис лейкоцитов. Лейкоциты шести HTLV-I серопозитивных пациентов с ATL, семи пациентов с TSP/HAM и пяти асимптоматических HTLV-I вирусносителей любезно предоставлены нам д-ром Г. де Те (Институт Пастера, Франция). $5 \cdot 10^6$ лейкоцитов ресуспендировали в 150 мкл раствора 75 мМ NaCl, 25 мМ EDTA и переносили пастеровской пипеткой в центрифужные пробирки (5 мл) QuickSeal («Beckman, США»), осторожно добавляли 50 мкл лизисного буфера (4 %-й N-лаурил-саркозин, 75 мМ NaCl, 25 мМ EDTA), инкубировали в течение 1—2 ч при температуре 37 °С. Лейкоциты лизировали непосредственно в центрифужной пробирке для предотвращения дополнительных разрывов высокомолекулярной ДНК, что в свою очередь позволяет избежать влияния GC-состава провируса на расположение содержащей провирус ДНК во фракциях при центрифугировании [6].

Высокомолекулярная ДНК 27 HIV-1 пациентов с различной вирусемией предоставлена нам д-ром Э. Боери (госпиталь Сан Рафаэле, Италия). Содержание вирусных частиц в плазме крови определяли количественным RT-PCR. Уровень продукции вирусов у различных индивидов варьировал от 80 до 280000 копий в 1 мл (табл. 1).

Композиционное фракционирование геномной ДНК человека. ДНК фракционировали в препаративном пологом градиенте CsCl в присутствии двух маркеров плавучей плотности. К лизированным лейкоцитам добавляли 5 мл раствора CsCl в 75 мМ NaCl, 25 мМ EDTA с плотностью 1,700 г/см³ и по 250 нг ДНК маркеров плавучей плотности, объем маркеров не превышал 10 мкл. В качестве маркеров были выбраны ДНК фагов λ («Boehringer Mannheim», Германия) с плавучей плотностью 1,709 г/см³ [18] и T4, плавучая плотность 1,700 г/см³ [18], поскольку они находятся в пределах уровня плавучей плотности геномной ДНК человека, составляющей 1,698—1,714 г/см³. Фаг T4 любезно предоставлен доктором А. де Сариио (Институт биологии, Франция). Для амплификации ДНК фага T4 использовали штамм *Escherichia coli* В^Р. Размер ДНК фага T4 контролировали пульс-электрофорезом в 1,2 %-й агарозе, 0,5 ×

Таблица 1
Уровень вирусной продукции и содержание CD4⁺ клеток у исследуемых пациентов с HIV-1

Образец	Количество копий HIV-1 РНК в 1 мл	Количество CD4 ⁺ клеток в 1 мкл
6695	280000	150
8903	272000	99
8340	180000	225
7150	140000	276
12299	91000	—
7721	82000	76
7153	69000	150
8336	63000	76
11713	15800	—
13589	13000	118
7620	11000	100
13590	10000	—
13592	6200	—
13585	5400	—
7638	5000	77
13587	4100	—
12298	2400	—
13588	2100	360
13584	1200	510
7634	< 400	95
13591	< 80	—

× TBE, при температуре 10 °С в течение 16 ч при напряжении 300 В и времени пульсации 5—30 с.

Геномную ДНК центрифугировали в вертикальном роторе VTi90 («Beckman», США) при 35000 об/мин, 20 °С, в течение как минимум 17 ч. 32—48 фракций собирали на коллекторе DGF-U («Hitachi», Япония) (30 с на фракцию) при температуре 20 °С. Линейность градиента проверяли, измеряя рефрактометрический индекс каждой пятой фракции для образцов HIV 7638 и 8340.

Определение вирусных последовательностей в композиционных фракциях генома человека. ДНК фракций денатурировали в 0,4 М NaOH в течение 25—45 мин. Каждую фракцию делили на три части в соотношении 1:1:8 и переносили с помощью аппарата для слот-блота («Bio-Rad», США) на три нейлоновые мембраны для гибридизации с ДНК

фага λ, фага T4 и вирусной последовательностью. В качестве зондов вирусных последовательностей использовали вставки плазмид pBH10-R3 [19] и pMT-2 [20], содержащие провирус HIV-1 с делетированным 5' LTR и провирус HTLV-I с одним LTR соответственно. Гибридизацию проводили согласно стандартному протоколу, рекомендованному фирмой «Amersham» (Англия) для мембран HybondN+ в растворе 5 × SSPE, 5 × раствор Денхардта, 0,5 % SDS и 100 мкг/мл ДНК спермы лосося при температуре 65 °С. Зонды метили радиоактивно, используя [α -³²P]dCTP и систему для мечения рассеяной затравкой Megaprime («Amersham») с включением 7·10⁸—10⁹ имп·мин⁻¹·мкг⁻¹. Фильтры отмывали в 2 × SSPE, 0,1 % SDS дважды по 10 мин при комнатной температуре и в 0,5 × SSPE, 0,1 % SDS — дважды по 20 мин при 65 °С.

Присутствие провирусов во фракциях определяли по интенсивности гибридизации с вирусными последовательностями, учитывая количество ДНК во фракциях. Как известно, GC-богатые семейства изохор составляют всего 36,5 % генома человека, и количество ДНК во фракциях различно [1]. При подсчете содержания вирусных последовательностей во фракциях относительную интенсивность гибридизации ДНК фракций со специфическим зондом делили на относительное количество ДНК во фракции, рассчитанное по кривой распределения ДНК человека в градиенте плотности CsCl [2, 21, 22]. Так как низкое содержание ДНК во фракциях 30—32 % GC могло привести к влиянию фона на положение и высоту пика, в некоторых случаях точки в этих фракциях не принимали во внимание.

Количественный анализ гибридизационных сигналов проводили на аппарате PhosphorImager (Molecular Dynamics) с помощью компьютерной программы ImageQuant. Гауссовские кривые распределения вирусных последовательностей и относительных интенсивностей гибридизационных сигналов маркеров во фракциях построены при помощи программы, созданной на основе программного обеспечения IgorPro (WaveMetrics, США). Плотность каждой фракции линейного градиента концентрации CsCl определяли по положению пиков Гауссовских кривых распределений маркеров. GC-состав ДНК каждой фракции рассчитывали по формуле $\rho = (GC \cdot 0,098/100) + 1,66$, где ρ — плавучая плотность, GC — доля гуанин + цитозин в ДНК [23].

Результаты. Мы локализовали интегрированные последовательности вирусов Т-клеточной лейкемии человека типа I и иммунодефицита человека типа I в ДНК инфицированных пациентов с раз-

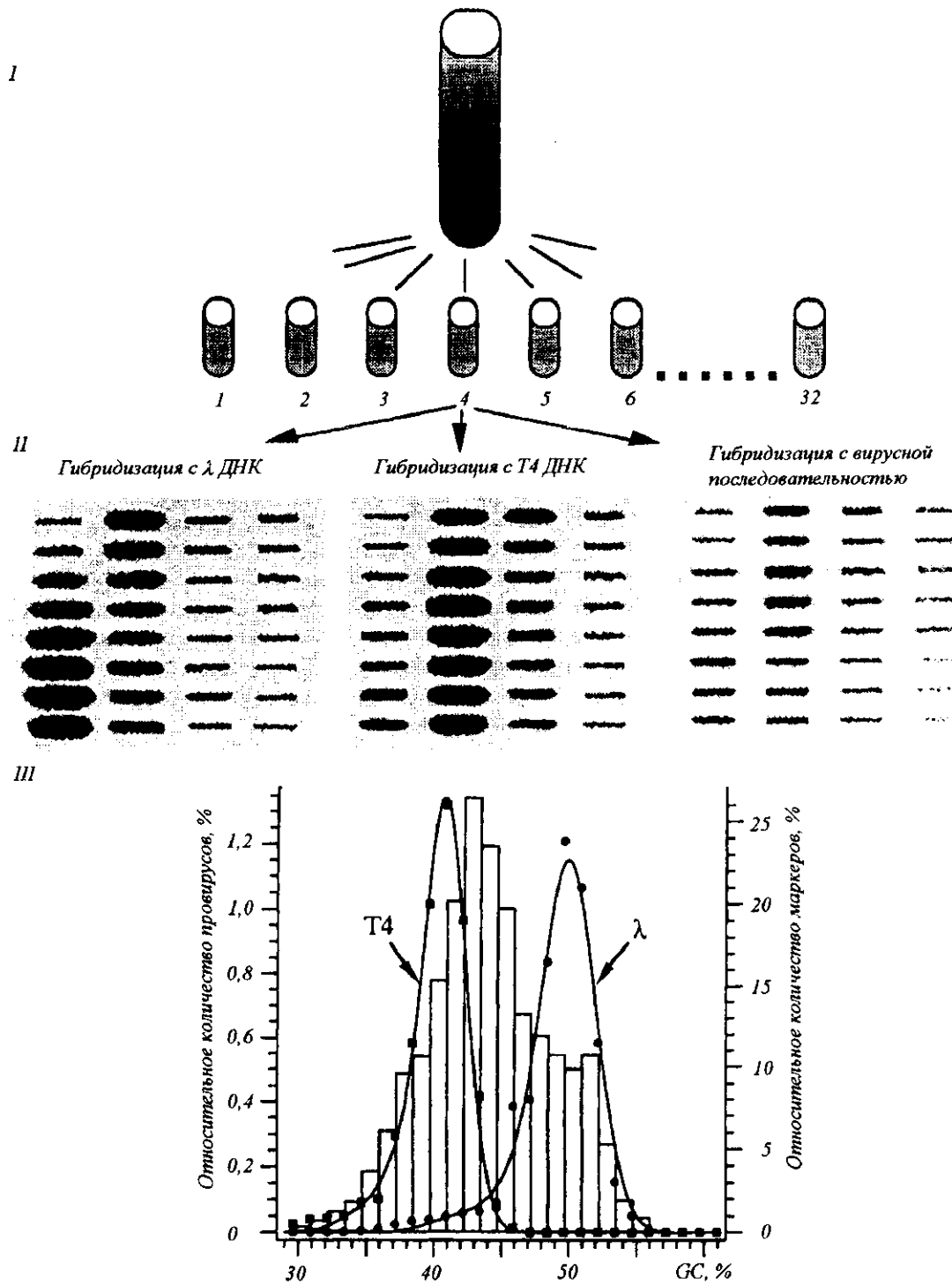


Рис. 1. Схема эксперимента по локализации вирусных последовательностей в геномной ДНК человека: I — центрифугирование высокомолекулярной ДНК в градиенте плотности CsCl и сбор композиционных фракций; II — гибридизация ДНК фракций с маркерами плавучей плотности и провирусной ДНК; III — Гауссовские кривые распределения относительных интенсивностей гибридизационных сигналов маркеров (Т4 и λ) и гистограмма относительной интенсивности гибридизации с провирусной ДНК. GC-состав каждой фракции определен по положению пиков кривых распределения ДНК маркеров

Таблица 2
Локализация провирусов в композиционных фракциях ДНК HTLV-I-трансформированной клеточной линии и Т-клеточного клона

Клеточная линия/Т-клеточный клон	GC-состав фракций ДНК, содержащих провирусы HTLV-I, %	
	После центрифугирования в CsCl	После центрифугирования в Cs ₂ SO ₄
C91/PL	41,7; 48,6	43,9; 48,3; 52,2
Mu16	40,3; 47; 53,8	40,8; 48,6; 52,9

Примечание. Фракции с высоким уровнем содержания вирусных последовательностей выделены жирным шрифтом.

личным проявлением заболевания при помощи новой методики препаративного центрифугирования в пологом градиенте плотности CsCl (рис. 1). В качестве контрольного эксперимента проанализировано распределение провирусов HTLV-I в геномах HTLV-I-трансформированной клеточной линии C91/PL и Т-клеточного клона Mu16 пациента с TSP/HAM. Полученные при помощи новой методики результаты практически не отличались от данных, полученных ранее стандартным методом препаративного центрифугирования в градиенте плотности Cs₂SO₄ и Саузерн-блот гибридизацией [6] (табл. 2). Обнаруженная Саузерн-гибридизацией полоса во фракции 52,2 % GC (C91/PL), соответствующая более интенсивной полосе во фракции 48,3 % GC, может объясняться диффузией, поэтому пик 52,2 % GC отсутствует в опыте с CsCl. При интерпретации данных этих контрольных экспериментов необходимо также учитывать, что после фракционирования в Cs₂SO₄ распределение провирусов изучалось в восьми фракциях, а после центрифугирования в CsCl — в 32. В последнем случае GC-состав пика можно определить более точно.

Локализация последовательностей HTLV-I. Анализ интеграции вируса Т-клеточной лейкемии человека типа I был проведен на ДНК трех групп пациентов, инфицированных HTLV-I, с различным проявлением заболевания — ATL, TSP/HAM и асимптоматических вирусоносителей.

В шести исследованных случаях ATL пики кривых распределения провирусов HTLV-I были обнаружены в районе 44,6—53,9 % GC (табл. 3, рис. 2), что составляет 28 % генома человека. Во всех образцах не было обнаружено провирусов в

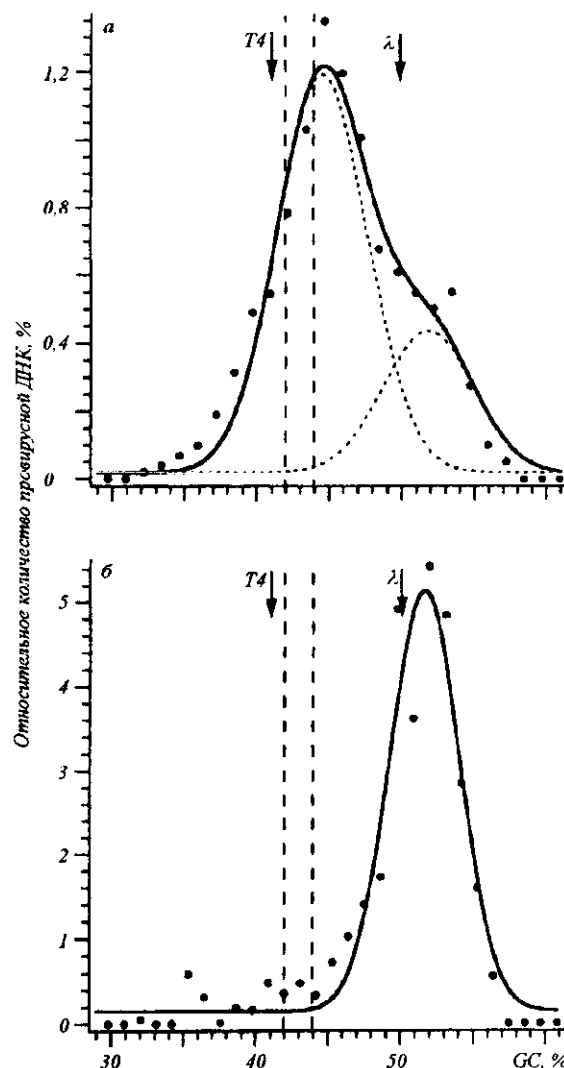


Рис. 2. Локализация последовательностей HTLV-I в геномной ДНК двух пациентов с ATL: 359 (а) и 496 (б). Показаны кривые распределения провирусов HTLV-I в композиционных фракциях генома человека и их декомпозиция на возможные нормальные Гауссовские составляющие. Положения пиков кривых распределения ДНК маркеров обозначены стрелками. Две вертикальные пунктирные линии указывают границы областей, где находятся транскрипционно активные (справа) и неактивные (слева) провирусы [6]

GC-бедных участках генома, в L-семействе изохор, а также в участках, где расположены транскрипционно неактивные последовательности HTLV-I [6]. В двух случаях ATL 107 и ATL Gentevil был

Таблица 3

Локализация последовательностей HTLV-I в композиционных фракциях генома человека

Исследуемый образец	Локализация HTLV-I в ДНК фракциях, % GC*		
	I	II	III
ATL			
107	—	—	45
307	—	—	53,9
359	—	—	44,7; 51,8
Gentevil	—	—	45,8
496	—	—	51,8
489	—	—	44,6; 51,8
TSP/HAM			
PH76	38,5	—	52
PH594	39,2	—	45,8; 50,8
PH455	39,4	—	51,8
PH662	39,8	—	51,5
PH581	—	41,6	46,8; 51
PH540	38	—	46,5; 54,8
PH521*	37	—	47,4
Асимптоматические вирусоносители			
PH643**	38,5	—	50,7
PH208	36,5	43	48,2; 53
PH323	41	—	50,8
PH641**	—	—	47; 54,7
PH627**	35,4	44	52,4

*Локализация последовательностей HTLV-I представлена в виде положений пиков кривых распределения провирусов в композиционных фракциях генома человека, полученных препаративным центрифугированием в градиенте плотности CsCl. Значение наибольшего пика кривых распределения вирусных последовательностей выделено жирным шрифтом. **Образцы с низкой интенсивностью гибридизации. ATL — пациенты с Т-клеточной лейкемией; TSP/HAM — пациенты с тропическим спастическим парапарезом/HTLV-I-ассоциированной миелопатией; I — композиционные фракции генома человека, в которых находятся транскрипционно неактивные последовательности HTLV-I; II — фракции, в которых содержатся как транскрипционно активные, так и неактивные провирусы HTLV-I; III — фракции, включающие транскрипционно активные последовательности HTLV-I [6].

обнаружен один широкий пик распределения провирусов, для которого не удалось получить декомпозиционных кривых. Широкие кривые можно объяснить более низкой молекулярной массой геномной ДНК или разрушением градиента. Действительно, электрофорез исследуемой ДНК показал, что величина ДНК ATL Gentevil ниже, чем у других образцов (меньше 50 тыс. п. н.). Широкая кривая распределения маркера λ в случае ATL 107 может свидетельствовать о небольшом разрушении градиента.

У пациентов с TSP/HAM провирусы были обнаружены в более широком диапазоне генома: 38—54,8 % GC (за исключением PH521) (табл. 3, рис. 3). Основной пик распределения провирусов, соответствующий наибольшему количеству интегрированных последовательностей, в шести из семи случаев находился в GC-богатом участке генома 50,8—54,8 % GC, что составляет всего 7 % генома человека. Во всех исследованных образцах наряду с наибольшим пиком распределения провирусов в GC-богатой области присутствуют минорные пики

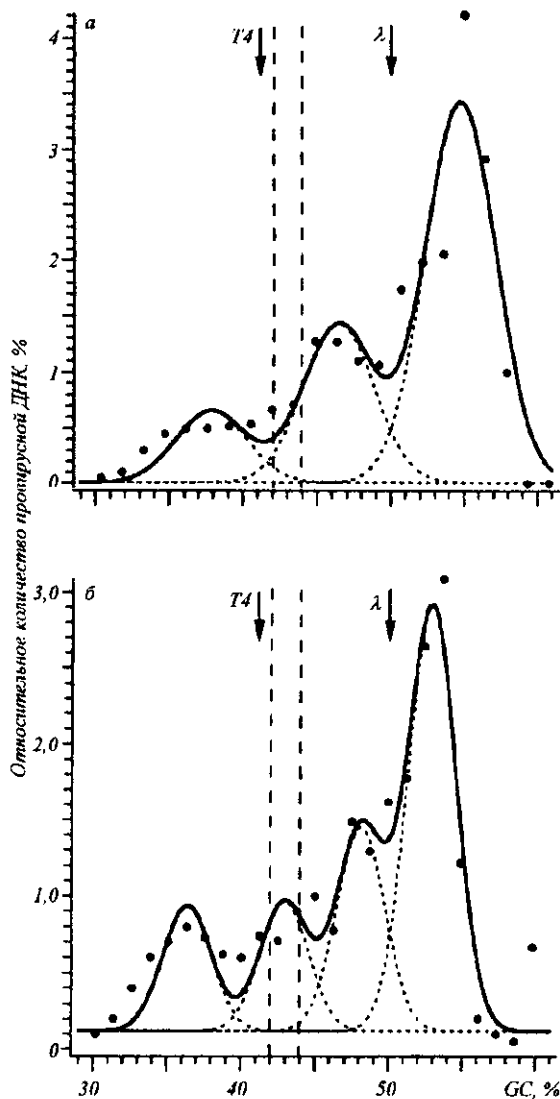


Рис. 3. Кривые распределения провирусов HTLV-I в геномной ДНК пациента с TSP/HAM PH540 (а) и асимптоматического вирусоносителя PH208 (б) и их декомпозиция на возможные нормальные Гауссовские составляющие. Остальные пояснения см. подпись к рис. 2

в более бедных по содержанию GC районах (38—41,6 %), где находятся транскрипционно неактивные последовательности HTLV-I [6]. В образце PH521 зафиксированы два пика (37 и 47,4 % GC) одинаковой величины. Интенсивность гибридизации с последовательностью HTLV-I в этом случае была самой низкой среди пациентов с TSP/HAM и близкой к интенсивности гибридизации ДНК трех

асимптоматических вирусоносителей, что могло привести к повышению влияния фона на положение и высоту пиков.

Провирусы HTLV-I у асимптоматических вирусоносителей локализованы в районе 35—54,7 % GC. Наибольшее количество вирусных последовательностей во всех пяти образцах, как и в случае с TSP/HAM, находилось в районе 50,7—54,7 % GC. Для трех случаев из пяти была зафиксирована очень низкая интенсивность гибридизации, что свидетельствует о присутствии небольшого количества клеток, содержащих провирусы. Среди этой группы пациентов количество инфицированных клеток очень варьирует и может отличаться в 100 раз [24, 25], но, как правило, оно ниже, чем у TSP/HAM-пациентов [26, 27].

Кривые распределения провирусов у пациентов с TSP/HAM и у вирусоносителей имеют би- или мультимодальный характер: в семи случаях обнаружены два пика на кривой, в четырех — три пика и у одного (PH208) — четыре. Только при ATL в четырех из шести образцов был зафиксирован один пик. Эти результаты соответствуют данным о моноклональной пролиферации инфицированных Т-лимфоцитов при ATL [28], а также олиго/поликлональной пролиферации у пациентов с TSP/HAM [26, 29, 30] и у асимптоматических вирусоносителей [25, 29].

Локализация последовательностей HIV-1. Гибридизационный анализ композиционных фракций ДНК 27 HIV-1-пациентов с различной вирусемией выявил от одного до пяти пиков распределения провирусов (в большинстве случаев 2—3 пика в районе 34—54 % GC генома человека) (табл. 4, рис. 4). Основной пик распределения провирусов находился в GC-богатых фракциях 48,5—54 % GC, соответствующих H2- и H3-семействам изохор. Присутствие пика на 56,6 % GC у больного 8903 может быть результатом низкой интенсивности гибридизации и влияния фона на величину пика, поскольку содержание ДНК в этих фракциях очень низкое. В 11 из 27 случаев, кроме пика в GC-богатом участке, обнаружен пик такой же величины в GC-бедных фракциях (34—36 % GC), принадлежащих к L-семейству изохор.

Не обнаружено прямой зависимости между интенсивностью гибридизации с вирусной последовательностью и количеством вирусных частиц в плазме крови. Наибольшая интенсивность гибридизации выявлена у образцов, количество вирусных копий у которых соответствует 1200—15800 копиям в 1 мл, низкая интенсивность гибридизации зафиксирована как в случае с высоким содержанием вирусных частиц (63000—280000 копий в 1 мл),

Таблица 4
Локализация последовательностей HIV-1 в композиционных фракциях генома человека

Исследуемый образец	Локализация HIV-1 в ДНК фракциях, % GC*				
	L1 + L2	H1	H2	H2/H3	H3
63000—280000 копий РНК HIV-1 в 1 мл					
6695**	34,5	43,5	—	—	52,5
8903**	37,3	—	49,2	—	56,6
8340**	36	—	—	50,2	—
7150**	35,8	43,6	49,8	—	—
12299	36,3	43	—	51	—
7721**	38,7	—	48,2	—	54,3
7153**	34	43	—	50	56
8336**	36	41,5	48,5	—	—
4100—15800 копий РНК HIV-1 в 1 мл					
11713	34; 40	—	47	—	53
13589	34,4; 41	—	—	50	—
7620**	34,4	45,2	—	50,7	—
13590	36	45,5	—	51,5	—
13592	36	45,4	—	—	52
13585	34,2	42	—	50	—
7638	35,2	—	48,8	—	—
13587	36,4	—	—	50,7	—
< 80—2400 копий РНК HIV-1 в 1 мл					
12298	40,1	—	—	51,5	—
13588**	36,5	42,7	—	51,2	—
13584	—	—	—	51	—
7634**	35	42; 46	—	50,2	—
13591**	—	—	—	51,7	—
11719	37	—	48,5	—	54,8
11723	38	—	47,5	—	54,3
12263	38,5	46	—	51	—
12273	37,1	—	—	50,7	—
12282	40,8	—	—	51	—
12274	35,2; 40,5	44,8	49	—	53,4

*Локализация последовательностей HIV-1 представлена в виде положений пиков кривых распределения провирусов в композиционных фракциях генома человека, полученных препаративным центрифугированием в градиенте плотности CsCl. Значение наибольшего пика кривых распределения вирусных последовательностей выделено жирным шрифтом. **Образцы с низкой интенсивностью гибридизации. L1, L2, H1, H2, H3 — семейства изохор геномной ДНК человека.

так и с низким (< 80—400 копий в 1 мл). На разных стадиях развития инфекции HIV-1 соотношение геномной вирусной РНК и провирусной ДНК различно и на ранних этапах составляет 1—7 копий геномной РНК на копию ДНК, на поздних—

увеличивается более чем в 1000 раз [15]. Иначе говоря, экспрессия вирусной РНК происходит более интенсивно на поздних стадиях, чем на ранних, и при увеличении вирусной продукции количество провирусов может изменяться незначительно. На

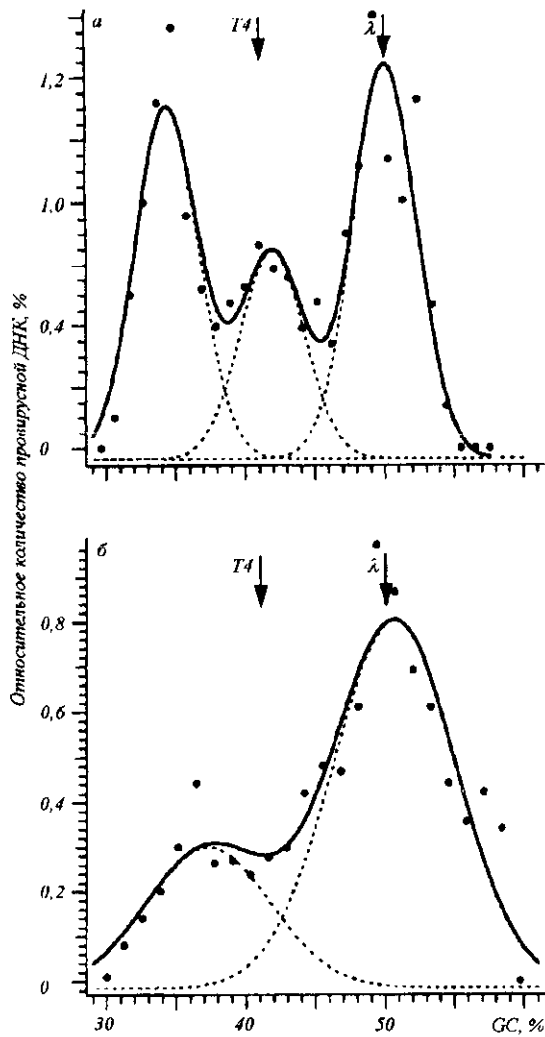


Рис. 4. Кривые распределения провирусов HIV-1 в композиционных фракциях геномной ДНК двух пациентов — 13585 (а) и 12273 (б) и их декомпозиция на возможные нормальные Гауссовские составляющие. Остальные пояснения см. подпись к рис. 2

интенсивность гибридизации также влияет количество CD4⁺ Т-лимфоцитов, содержащих провирусы, и соответственно отражает вклад провирусных последовательностей в составе ДНК.

В качестве отрицательного контроля фракционированную ДНК неинфицированного человека гибридизовали с последовательностью HIV-1. Несмотря на строгие условия гибридизации и отмывки,

был обнаружен один небольшой пик на 50,5 % GC (сигналов при гибридизации контрольной ДНК с последовательностью HTLV-I не было обнаружено). Присутствие сигналов при гибридизации ДНК неинфицированного человека с последовательностью HIV-1 может быть результатом присутствия эндогенных последовательностей, гомологичных HIV-1. В геноме человека выявлены два локуса эндогенной последовательности EHS-1, гомологичной гену *env* провируса HIV-1 (70—80 % гомологии на участке размером около 100 п. н.) и один локус последовательности EHS-2, гомологичной *Rev* и *gp41* (60 % гомологии на участках 30 и 50 п. н.) [31]. Интенсивность гибридизационных сигналов в контрольной гибридизации ДНК была в 10—1000 раз ниже, чем у HIV-1-пациентов. Следовательно, неспецифическая гибридизация незначительно отражается на результате. Отсутствие пика 50 % GC у образцов с высокой интенсивностью гибридизации (11719, 11723, 11713, 12274, 13592) подтверждает этот факт.

У пяти пациентов обнаружен пик в районе 42 % GC. Чтобы исключить возможность влияния неинтегрированных последовательностей HIV-1, GC-состав которых составляет 42 %, был проведен пульс-электрофорез ДНК образцов 13584, 13589, 13588, 13592, 13590 и Саузерн-гибридизация. Гибридизационных сигналов в районе 4,3—10 тыс. п. н., где могли находиться кольцевая и линейная формы неинтегрированных провирусов, не было обнаружено. Таким образом, неинтегрированные последовательности HIV-1 могут присутствовать лишь в незначительных количествах в исследуемых образцах ДНК.

Обсуждение. Анализ распределения последовательностей HTLV-I в геноме человека *in vivo* не выявил значительных отличий от распределения сайтов интеграции провирусов HTLV-I в клеточных линиях и Т-клеточных клонах. Наибольшее количество провирусов у пациентов с различным проявлением инфекции было обнаружено в GC-богатых областях (44 % GC), составляющих 30 % генома человека, где, как было показано для клеточных линий и Т-клеточных клонов, находятся транскрипционно активные вирусные последовательности [6]. Это свидетельствует о транскрипционной активности большинства интегрированных копий HTLV-I при различном развитии инфекции. Действительно, экспрессия регуляторных генов HTLV-I была детектирована при помощи RT-PCR, иммуноферментного анализа и гибридизацией *in situ* у больных ATL [32—34], TSP/НАМ [35, 36] и вирусносителей [32—34]. Следует отметить, что только в случае ATL ни в одном из исследуемых

образцов провирусы не были обнаружены в участках, GC-состав которых ниже 44 %, т. е. там, где локализуются транскрипционно неактивные последовательности HTLV-I.

Во всех изученных образцах основной пик распределения провирусов HTLV-I находился в GC-богатых семействах изохор, для которых характерна большая концентрация генов [2], высокая транскрипционная и рекомбинантная активность, «открытая» структура хроматина, со свойственными ей доступностью для ДНКаз [37], большим расстоянием между нуклеосомами, отсутствием гистонов H1, ацетилизированием гистонов H3 и H4 [38].

В ряде исследований показана преимущественная интеграция вирусов лейкемии мышей и птиц в/около ДНКазы I-сверхчувствительных сайтов [39—41], транскрипционно активных областей, CpG-островков [42, 43]. Результаты секвенирования коротких нуклеотидных последовательностей, фланкирующих провирусы HTLV-I, а также прямых повторов, образующихся в процессе интеграции, которые оказались AT-богатыми [44, 45], не противоречат полученным нами данным, поскольку короткие некодирующие последовательности не могут отражать GC-состава содержащих их изохор.

Основные пики распределения провирусов, за исключением двух образцов (PH540 и PH641), были обнаружены в компартментах генома, GC-уровень которых несколько ниже GC-состава HTLV-I. Подобная ситуация наблюдается для кодирующих и некодирующих последовательностей GC-богатых генов, GC-состав последних, как правило, ниже [46].

В двух из пяти случаев асимптоматических вирусоносителей (PH208 и PH627) минорный пик распределения провирусов обнаружен во фракциях, GC-состав которых ниже 38 % GC. Присутствие пиков в GC-бедных фракциях может быть следствием низкой интенсивности гибридизации образцов ДНК асимптоматических вирусоносителей. Не исключается возможность неизопикничной интеграции последовательностей HTLV-I в GC-бедные области, где также встречаются открытые участки хроматина. Но в этом случае можно предположить, что провирусы там не являются стабильными, так как в клеточных линиях и Т-клеточных клонах вирусные последовательности в этих местах не обнаружены.

Поскольку вирус иммунодефицита человека принадлежит к GC-бедному классу ретровирусов, ожидалось, что провирусы будут интегрировать в GC-бедные компартменты генома человека. Природа более широкого распределения последовательно-

стей HIV-1 в геноме человека, обнаруженных в GC-богатых H1, H2 и в некоторых случаях H3 изохорах, может быть объяснена предпочтительной интеграцией в хроматин с «открытой» структурой. Ранее более широкое распределение интегрированных GC-бедных провирусов MMTV установлено для экзогенных вирусов, которые интегрировали позже по сравнению с эндогенными [7]. По-видимому, изопикничность интеграции ретровирусов связана со стабильностью локализации интегрированных копий [17].

Зависимость между транскрипционной активностью провирусов и их локализацией в геноме, обнаруженная для GC-богатого класса ретровирусов, для GC-бедного класса не изучена. Проведенное нами сравнение распределения сайтов интеграции HIV-1 и уровня вирусной продукции указывает на возможную корреляцию между продукцией вирусов и количеством провирусных копий в GC-бедных компартментах генома человека. Образцы с высоким уровнем вирусии содержат больше провирусных копий в GC-бедных фракциях (34—36 % GC), чем образцы с низким содержанием вирусных частиц. У последних пики распределения провирусов в GC-бедных фракциях или отсутствуют (13584, 13591), или всегда меньше пиков, соответствующих GC-богатым районам.

Изучение локализации интегрированных последовательностей HTLV-I и HIV-1 в геноме человека *in vivo* свидетельствует о неравномерном распределении интегрированных провирусов в компартментах генома клетки и в более широком диапазоне % GC, чем *in vitro*.

Изопикничность и компартиментализованность интеграции ретровирусов может быть следствием большей доступности для интеграции транскрипционно активных участков генома с «открытой» структурой хроматина и последующей селекцией сайтов интеграции. Последняя наиболее ярко выражена в случае *cis*-активации клеточных онкогенов вирусными промоторами и энхансерами (как в случае вирусов лейкемии птиц (ALV) и мышей (MuLV)), в результате чего инфицированная клетка приобретает преимущества в темпах роста (см. [17]). Изопикничная интеграция вирусов, которые *trans*-активируют гены клетки хозяина (такие как HTLV-I), может быть следствием селекцией сайтов интеграции по транскрипционной активности провируса и продукции факторов *trans*-активации. Таким образом, в этом случае изопикничная локализация провирусов отображает зависимость их собственной транскрипции от композиционно соответствующего окружения. Это напоминает ситуацию с клеточными генами, GC-состав которых

коррелирует с GC-составом геномного окружения, и, вероятно, является результатом адаптивного процесса, происходящего на протяжении эволюции [47].

Л. О. Циба, С. В. Зубак, Н. Тряпичина-Гулей, Дж. Бернарді, А. В. Риндич

Композиційна специфічність інтеграції вірусів Т-клітинної лейкемії людини типу I і імунodefіциту людини типу I у геном людини

Резюме

Проаналізовано розподіл інтегрованих провірусів HTLV-I (вірус Т-клітинної лейкемії людини типу I) і HIV-1 (вірус імунodefіциту людини типу I) в геномі пацієнтів з різними проявами та стадіями інфекції, використовуючи нову методику фракціонування ДНК у пологому градієнті CsCl у присутності двох маркерів плаваючої густини. Основні піки розподілу GC-багатих послідовностей HTLV-I у 18 досліджуваних випадках були локалізовані в GC-багатих (> 44 % GC) ділянках геному людини, які складають 30 % геному і містять транскрипційно активні провіруси HTLV-I. У пацієнтів з Т-клітинною лейкемією (ATL) вірусних послідовностей не було виявлено в ділянках геному, GC-склад яких нижче від 44 %. Більш широкий і мультимодальний розподіл HTLV-I (у межах 38—54,8 % GC) встановлено в лімфоцитах пацієнтів з тропічним спастичним парепарезом (TSP/HAM) та в асимптоматичних вірусноносіїв. GC-бідні провіруси HIV-1 виявлено як у GC-бідних, так і в GC-багатих компартментах геномів 27 пацієнтів з різним рівнем віремії. Для пацієнтів з високим рівнем вірусної продукції показано вищий вміст послідовностей HIV-1 в GC-бідних ділянках геному. Отримані результати свідчать про нерівномірний розподіл *in vivo* інтегрованих провірусів в компартментах геному клітини та в більш широкому діапазоні % GC, ніж *in vitro*.

Л. О. Tsyba, S. V. Zoubak, N. Tryapitsina-Guley, G. Bernardi, A. V. Rynditch

Compositional specificity of human T-cell leukemia virus type I and human immunodeficiency virus type I integration into the human genome

Summary

Localization of HTLV-I (human T-cell leukemia virus type I) and HIV-1 (human immunodeficiency virus type I) proviral sequences in compositional compartments of genomes of patients with different manifestation of infection have been studied by a new technique of centrifugation in shallow CsCl gradients with two buoyant density markers. The major peaks of distribution of GC-rich HTLV-I sequences in genomes of 18 patients were centered at GC-rich (> 44 % GC) regions of the human genome which usually account 30 % of the genome and contain transcriptionally active HTLV-I sequences (Zoubak et al. (1994) *Gene* 143, 155—163). In the case of patients with T-cell leukemia (ATL) viral sequences were not found below 44 % GC. Patients with TSP/HAM and asymptomatic carriers had a broader and multimodal distribution of HTLV-I (at 38—54,8 % GC) with minor peaks in GC-poorer regions. GC-poor HIV-1 proviruses were found in both GC-poor and GC-rich compartments of genomes of 27 patients with different levels of virus production. More intense peaks were centered at GC-rich regions for the patients with lower virus load. These results have revealed that the distribution of integrated proviruses *in vivo* is nonuniform in the

compositional compartments of cell genome and broader than *in vitro*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Bernardi G. Isochores and the evolutionary genomics of vertebrates // *Gene*.—2000.—241.—P. 3—17.
- Zoubak S., Clay O., Bernardi G. The gene distribution of the human genome // *Gene*.—1996.—174.—P. 95—102.
- Kettmann R., Meunier-Rotival M., Cortadas J., Cuny G., Ghysdael J., Mammerickx M., Burny A., Bernardi G. Integration of bovine leukemia virus DNA in the bovine genome // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1979.—76.—P. 4822—4826.
- Rynditch A., Kadi F., Geryk J., Zoubak S., Svoboda J., Bernardi G. The isopycnic, compartmentalized integration of Rous sarcoma virus sequences // *Gene*.—1991.—106.—P. 165—172.
- Zerial M., Salinas J., Filipinski J., Bernardi G. Genomic localization of hepatitis B virus in a human hepatoma cell line // *Nucl. Acids Res.*—1986.—14.—P. 8373—8386.
- Zoubak S., Richardson J., Rynditch A., Hollsberg P., Hafner D. A., Lever A. M. L., Bernardi G. Regional specificity of HTLV-I proviral integration in the human genome // *Gene*.—1994.—143.—P. 155—163.
- Salinas J., Zerial M., Filipinski J., Crepin M., Bernardi G. Non-random distribution of MMTV proviral sequences in the mouse genome // *Nucl. Acids Res.*—1987.—15.—P. 3009—3022.
- Zoubak S., Rynditch A., Bernardi G. Compositional bimodality and evolution of retroviral genomes // *Gene*.—1992.—119.—P. 207—213.
- Poiesz B. J., Ruscetti F. W., Gazdar A. F., Bunn P. A., Minna J. D., Gallo R. C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of patients with cutaneous T-cell lymphoma // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1980.—77.—P. 7415—7419.
- Hinuma Y., Nagata K., Hanaoka M., Nakai M., Matsumoto T., Kinoshita K. I., Shirakawa S., Miyoshi I. Adult T-cell leukemia: antigen in ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1981.—78.—P. 6476—6480.
- Gessain A., Barin F., Vernant J. C., Gout O., Maurs L., Calender A., de The G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis // *Lancet*.—1985.—2.—P. 407—410.
- Franchini G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection // *Blood*.—1995.—86.—P. 3619—3639.
- Mellors J. W., Rinaldo C. R., Gupta P., Jr., White R. M., Todd A., Kingsley L. A. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma // *Science*.—1996.—272.—P. 1167—1170.
- Coffin J. M. Retroviridae and their replication // *Virology* / Eds B. N. Fields, D. M. Knipe.—New York, 1990.—P. 1437—1500.
- Michael N. L., Vahey M., Burke D., Redfield R. R. Viral DNA and mRNA expression correlate with the stage of human immunodeficiency virus (HIV) type I infection in humans: evidence for viral replication in all stages of HIV disease // *J. Virol.*—1992.—66.—P. 310—316.
- Winslow B. J., Pomerantz R. J., Bagasra O., Trono D. HIV-1 latency due to the site of proviral integration // *Virology*.—1993.—196.—P. 849—854.
- Rynditch A. V., Zoubak S., Tsyba L., Tryapitsina-Guley N., Bernardi G. The regional integration of retroviral sequences into the mosaic genomes of mammals // *Gene*.—1998.—222.—P. 1—16.

18. De Sario A., Geigl E. M., Bernardi G. A rapid procedure for the compositional analysis of yeast artificial chromosomes // Nucl. Acids Res.—1995.—23.—P. 4013—4014.
19. Fisher A. G., Collati E., Ratner L., Gallo R. C., Wongtaal F. A molecular clone of HTLVIII with biological activity // Nature.—1985.—316.—P. 262—265.
20. Clarke M. F., Gelman E. P., Reitz M. Homology of human T-cell leukemia virus envelope // Nature.—1983.—305.—P. 60—62.
21. Macaya G., Thiery J. P., Bernardi G. An approach to the organization of eukaryotic genomes at a macromolecular // J. Mol. Biol.—1976.—108.—P. 237—254.
22. Thiery J. P., Macaya G., Bernardi G. An analysis of eukaryotic genomes by density gradient centrifugation // J. Mol. Biol.—1976.—108.—P. 219—235.
23. Schildkraut C. L., Marmur J., Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl // J. Mol. Biol.—1962.—4.—P. 430—443.
24. Shinzato O., Ikeda S., Momita S., Nagata Y., Kamihira S., Nakayama E., Shiku H. Semiquantitative analysis of integrated genomes of human T-lymphotropic virus type I in asymptomatic virus carriers // Blood.—1991.—78.—P. 2082—2088.
25. Etoh K., Tamiya S., Yamaguchi K., Okayama A., Tsubouchi H., Ideta T., Mueller N., Takatsuki K., Matsuoka M. Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells *in vivo* // Cancer Res.—1997.—57.—P. 4862—4867.
26. Gessain A., Saal F., Gout O., Daniel C. M. T., Flandrin G., de The G., Peries J., Sigaux F. High human T-cell lymphotropic virus type I proviral DNA load with polyclonal integration in peripheral blood mononuclear cells of French West Indian, Guianese, and African patients with tropical spastic paraparesis // Blood.—1990.—75.—P. 428—433.
27. Yoshida M., Osame M., Kawai H., Toita M., Kuwasaki N., Nishida Y., Hiraki Y., Takahashi K., Nomura K., Sonoda S., Eiraku N., Ijichi S., Usuku K. Increased replication of HTLV-I in HTLV-I-associated myelopathy // Ann. Neurol.—1989.—26.—P. 331—335.
28. Yoshida M., Seiki M., Yamaguchi K., Takatsuki K. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—81.—P. 2534—2537.
29. Cavrois M., Gessain A., Wain-Hobson S., Wattel E. Proliferation of HTLV-I infected circulating cells *in vivo* in all asymptomatic carriers and patients with TSP/HAM // Oncogene.—1996.—12.—P. 2419—2423.
30. Wattel E., Vartanian J. P., Pannetier C., Wain-Hobson S. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy // J. Virol.—1995.—69.—P. 2863—2868.
31. Horwitz M. S., Boyce-Jacino M. T., Faras A. J. Novel human endogenous sequences related to human immunodeficiency virus type I // J. Virol.—1992.—66.—P. 2170—2179.
32. Berneman Z. N., Gartenhaus R. B., Reitz M. S., Jr., Blattner W. A., Manns A., Hanchard B., Ikehara O., Gallo R. C., Klotman. Expression of alternatively spliced human T-lymphotropic virus type I pX mRNA in infected cell lines and in primary uncultured cells from patients with adult T-cell leukemia/lymphoma and healthy carriers // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1992.—89.—P. 3005—3009.
33. Kinoshita T., Shimoyama M., Tobinai K., Ito M., Ito S., Ikeda S., Tajima K., Shimotohno K., Sugimura T. Detection of mRNA for *tax 1/rex 1* gene of human T-cell leukemia virus type I in fresh peripheral blood mononuclear cells of adult T-cell leukemia patients and viral carriers by using the polymerase chain reaction // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1989.—86.—P. 5620—5624.
34. Okayama A., Korber B., Chen Y. M. A., Allan J., Lee T. H., Shioiri S., Tachibana N., Tsuda K., Mueller N., McLane M. F., Maayan S., Orgad S., Ernst J., Marlink R., Essex M. Unusual pattern of antibodies to human T-cell leukemia virus type-I in family members of adult T-cell leukemia // Blood.—1991.—78.—P. 3323—3329.
35. Gessain A., Louie A., Gout O., Gallo R. C., Franchini G. Human T-cell leukemia-lymphoma virus type I (HTLV-I) expression in fresh peripheral blood mononuclear cells from patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy // J. Virol.—1991.—65.—P. 1628—1633.
36. Beilke M. A., In D. R., Gravel M., Hamilton R. S., Mora C. A., Leon-Monzon M., Rodgers-Johnson P. E., Gujdusek D. C., Gibbs C. L., Jr., Zaninovic V. *In situ* hybridization detection of HTLV-I RNA in peripheral blood mononuclear cells of TSP/HAM patients and their spouses // J. Med. Virol.—1991.—33.—P. 64—71.
37. Kerem B. S., Goitein R., Diamond G., Cedar H., Marcus M. Mapping of DNase I sensitive regions of mitotic chromosomes // Cell.—1984.—38.—P. 493—499.
38. Tazi J., Bird A. P. Alternative chromatin structure at CpG islands // Cell.—1990.—60.—P. 909—920.
39. Robinson H. L., Gagnon G. Patterns of proviral insertion and deletion in avian leukosis virus-induced lymphomas // J. Virol.—1986.—57.—P. 28—36.
40. Vijaya S., Steffen D. L., Kozak C., Robinson H. L. Acceptor sites for retroviral integrations map near DNA I-hypersensitive sites in chromatin // J. Virol.—1986.—60.—P. 683—692.
41. Rohdewohld H., Weinher H., Reik W., Jaenisch R., Breindl M. Retrovirus integration and chromatin structure: Moloney murine leukemia proviral integration sites map near DNase I-hypersensitive sites // J. Virol.—1987.—61.—P. 336—343.
42. Scherdin V., Rhodes K., Breindl M. Transcriptionally active genome regions and preferred targets for retrovirus integration // J. Virol.—1990.—64.—P. 907—912.
43. Mooslehner K., Karl U., Harbers K. Retroviral sites in transgenic *Mov* mice frequently map in the vicinity of transcribed DNA region // J. Virol.—1990.—64.—P. 3056—3058.
44. Chou K. S., Okayama A., Su J. J., Lee T. H., Essex M. Preferred nucleotide sequence at the integration target site of human T-cell leukemia virus type I from patients with adult T-cell leukemia // Int. J. Cancer.—1996.—65.—P. 20—24.
45. Leclercq I., Mortreux F., Cavrois M., Leroy A., Gessain A., Wain-Hobson S., Wattel E. Host sequences flanking the human T-cell leukemia virus type I provirus *in vivo* // J. Virol.—2000.—74.—P. 2305—2312.
46. Aïssani B., D'Onofrio G., Mouchiroud D., Gardiner K., Gautier C., Bernardi G. The compositional properties of human genes // J. Mol. Evol.—1991.—324.—P. 497—503.
47. Bernardi G. The human genome: organization and evolutionary history // Annu. Rev. Genet.—1995.—29.—P. 445—476.

УДК 578.264.3

Поступила в редакцию 12.12.99