

Т. В. Бігуняк, Н. Я. Сідельник, А. А. Вашковець

## ПАТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ АНТИВІРУСНИХ БІЛКІВ ТА СИСТЕМИ CRISPR-CAS У ЛІКУВАННІ ХВОРИХ НА ВІЛ-ІНФЕКЦІЮ

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

*ВІЛ-інфекція – це соціально небезпечне інфекційне захворювання, що розвивається внаслідок довготривалого персистування вірусу в лімфоцитах, макрофагах і клітинах нервової тканини. Хвороба характеризується прогресуючою дисфункцією імунної, нервової, лімфатичної та інших систем організму. Термінальною стадією є синдром набутого імунного дефіциту (СНІД), при якому імунна система організму втрачає можливість захищати хворого від ВІЛ-асоційованих захворювань. Без лікування смерть від СНІДу настає у 100 % випадків.*

*Досі немає ефективних вакцин і ліків від ВІЛ-інфекції. Комбінована антиретровірусна терапія (АРТ) є стандартом лікування. Основна перешкода у лікуванні хворих на ВІЛ-інфекцію, у тому числі АРТ, – це наявність резервуарів ВІЛ, які можуть активуватися після припинення терапії.*

*Альтернативними та обладійливими методами терапії таких хворих є редагування генів за допомогою білків APOBEC3, BST-2/Tetherin та системи CRISPR-Cas.*

**Ключові слова:** ВІЛ-1; APOBEC3; інгібітор тС46; A3G-D128K; IFITMs; BST-2/тетерін; CRISPR-Cas.

Захворювання, спричинені ВІЛ, є важливою проблемою. 38 млн людей у світі інфіковані ВІЛ, 800 000 щороку помирають від СНІДу [1]. В Україні станом на 01.04.2024 р. у закладах охорони здоров'я під медичним спостереженням перебувало 157 139 людей, які живуть з ВІЛ, що становить 383,3 на 100 тис. населення. За даними офіційної реєстрації, у 2024 р. найвищий рівень поширеності ВІЛ-інфекції на 100 тис. населення зареєстрований в Одеській (1 104,2), Дніпропетровській (948,9), Миколаївській (749,5) областях та у м. Київ (643,1). У середньому щодня в Україні реєструвалось 30 випадків захворювання на ВІЛ-інфекцію, 8 випадків захворювання на СНІД та 4 смерті від хвороб, зумовлених СНІДом. За 3 місяці 2024 р. сталося 325 смертей від СНІДу. Показник смертності становить 0,8 на 100 тис.

населення. Найвищий рівень смертності зареєстровано в Одеській (3,0), Дніпропетровській (2,4), Чернігівській (1,7) областях та м. Київ (1,3) [2].

Кількість людей, які живуть з ВІЛ та отримують АРТ, станом на 01.04.2024 р., за даними звітної форми №56 становить 116 444 особи [2]. Основна перешкода у лікуванні осіб з ВІЛ – це наявність резервуарів ВІЛ, які можуть активуватися після припинення терапії [3]. Це клітини, які були інфіковані реплікаційно-компетентними вірусами, головним чином CD4<sup>+</sup> Т-лімфоцити, в які інтегрується геном ВІЛ, стаючи стабільним джерелом нових вірусів. У будь-який час клітини в латентному резервуарі можуть активуватися, щоб запустити реплікацію вірусу після припинення терапії [1]. Актуальною є розробка стратегій, які сприяють ліквідації резервуарів вірусу шляхом генної терапії.

Мета роботи – вивчити патогенетичні особливості використання антивірусних білків та системи CRISPR-Cas у лікуванні хворих на ВІЛ-інфекцію.

Фактори хазяїна та вірусу визначають швидкість прогресування ВІЛ-інфекції. Серед факторів хазяїна вирішальну роль відіграє вроджений імунітет. Вроджена імунна система людини має потужний арсенал проти-вірусних чинників, або факторів обмеження, що можуть ефективно протидіяти інфекції. Серед першої лінії вродженого захисту від ретровірусів виділяють білки: APOBEC, TRIM5 $\alpha$ , SAMHD1, SERINC та BST-2 (антиген 2 строми кісткового мозку) [4]. Родина білків дезаміназ APOBEC становить частину вродженої імунної системи хребетних тварин. Безхребетні експресують один APOBEC, тоді як деякі ссавці виробляють до 11 ферментів. Білки APOBEC беруть участь у різноманітних біологічних функціях, включаючи адаптивний і вроджений імунітет, які є важливими для обмеження вірусної інфекції [5, 6]. Гени APOBEC3 (A3) є членами родини генів AID/APOBEC, які виявляють тільки у ссавців. Вчені дослідили геноми 160 видів ссавців та ідентифікували 1 420 генів, які пов'язані з AID/APOBEC [7]. Підродина APOBEC3 демонструє як варіацію кількості копій, так

і поліморфізм, що відповідає постійному патогенному тиску [8]. У людей білки родини АРОВЕС3 відіграють важливу роль під час захисту від ретровірусних інфекцій, наприклад, у лейкоцитах. Зокрема, коли ретровірус інфікує клітину хазяїна, він вивільняє свій геном у вигляді одноланцюгової РНК, яка за допомогою зворотної транскрипції перетворюється на ДНК. Білки АРОВЕС3 можуть дезамінувати цю одноланцюгову ДНК, що призводить до змін основи цитозин на тимін (C-to-T) і мутацій у вірусному геномі. У ссавців редагування РНК полягає у дезамінуванні аденозину до інозину (A-to-I) або цитозину до урацилу (C-to-U). Редагування A-to-I каталізується аденозиндезаміназою, що діє на родину білків РНК (ADAR). Редагування C-to-U каталізується цитозиндезаміназами, найвідоміші з яких належать до родини ферментів ссавців, відомих як «індукована активацією цитидиндезаміназа/аполіпропротеїн В редагування ферменту каталітичного поліпептиду» (AID/АРОВЕС). Цей відредагований вірусний геном може бути деградований або інтегрований у геном як провірус. АРОВЕС3А (А3А) та А3G здатні також виконувати редагування РНК у таких РНК-вірусів, як SARS-CoV-2, а також у мРНК хазяїна [5].

Отже, АРОВЕС3 спричиняють рестрикцію ретровірусів, обмежують ВІЛ-1 та споріднені ретровіруси шляхом дезамінування C-to-U в утвореній одноланцюговій ДНК, що руйнує вірусні геноми [9]. Таким чином, білки АРОВЕС3 (А3) є противірусними клітинними білками людини, які зумовлюють мутації у вірусних геномах. У ретровірусів цей процес вимагає А3 упаковки у вірусні частинки. ВІЛ-1 пригнічує активність АРОВЕС3 через білок Vif ВІЛ-1, який індукує деградацію АРОВЕС3 [10]. У відповідь на пошкодження нуклеїнових кислот АРОВЕС3-опосередкованою мутацією ретровірусів в організмі хазяїна відбувається ексцизійна репарація для виправлення цих мутацій. Для вивчення цього питання *in vivo* вчені використали трансгенних мишей, які експресували АРОВЕС3G людини та не мали ендогенного гена урацил-ДНК-глікозилази (UNG). Досліди показали, що UNG видаляє урацили, введені цією цитидиндезаміназою у зворотних транскриптах, тим самим зменшуючи мутації гуаніну до аденіну у провірусах. Ці дані свідчать про те, що ретровіруси, пошкоджені цитидиндезаміназами хазяїна, використовують систему репарації ДНК людини, щоб подолати цю мутацію [11].

А3G є одним із семи членів родини ферментів АРОВЕС3 (А3), А3А, А3В, А3С, А3D, А3F, А3G і А3Н, і це найпотужніший фактор проти ВІЛ-1 за відсутності Vif. А3G – це дезаміназа одноланцюгової ДНК людини (ssDNA), яка каталізує фатальні мутації в геномах вірусів, таких як ВІЛ-1. З моменту його відкриття у 2002 р. у світі було здійснене масштабне дослідження для вивчення функцій А3G та подолання пандемії ВІЛ-1 шля-

хом розуміння його внутрішнього противірусного механізму [12].

Далі розглянемо детальніше механізм дії А3G. Взаємодія А3G з доменом нуклеокапсиду (NC) ВІЛ-1 Gag необхідна для його інкапсуляції у віріони ВІЛ-1 у клітинах, які продукують вірус [13]. Инкапсульований А3G розпізнає зворотний транскрипт оцДНК вірусного геному і каталізує дезамінування цитозину, тобто перетворення 2-дезоксцитозину в 2-деоксиурацил в оцДНК, погіршуючи ампліфікацію вірусу [12].

А3G містить два домени цитидиндезамінази (CD): N-кінцевий некаталітичний CD1 (NTD) і C-кінцевий каталітичний CD2 (CTD) домени. CD1 має високу спорідненість з РНК, що є необхідною умовою для упаковки А3G у новоутворені віріони ВІЛ-1 [14]. N-кінцевий домен (А3G-NTD), що є каталітично неактивним, але необхідний для взаємодії Vif та інкапсуляції А3G, також бере участь у взаємодії з вірусними та клітинними РНК [13]. CD2 каталітично перетворює основу цитозину в урацил оцДНК і відповідає за ініціювання гіпермутації G в A у зворотних транскриптах комплементарної ДНК (кДНК) геному ВІЛ-1. А3G також має незалежну від дезамінази рестрикційну активність щодо ВІЛ шляхом пригнічення реплікації вірусу, можливо, за допомогою механізму блокування, пов'язаного зі зв'язуванням РНК, або прямого пригнічення зворотної транскриптази ВІЛ-1 [14].

Вченими було встановлено, що два залишки триптофану в положеннях 94 і 127, а також залишки R24, S28, R30, R122, Y124 та F126 беруть участь у взаємодії А3G-РНК. Важливо, що взаємодія А3G-Vif є цінною мішенню для розробки нових антивірусних молекул. У зв'язку з цим деякі з раніше ідентифікованих взаємодіючих залишків А3G-РНК, Y124 або W127, також необхідні для взаємодії А3G з ВІЛ-1 Vif, що свідчить про те, що поверхні зв'язування А3G-NTD для РНК та Vif можуть перекриватися. Таким чином, краще визначення сайтів зв'язування А3G-РНК допоможе раціональному створенню інгібіторів А3G-Vif, які не впливатимуть на зв'язування А3G-РНК [13]. РНК є молекулярним клеєм для взаємодії Vif-А3G, що дозволяє Vif пригнічувати А3G за допомогою убіквітинзалежних і незалежних механізмів [13].

Вірусний інфекційний фактор (Vif) ВІЛ-1 протидіє А3G-опосередкованій противірусній активності, індукуючи деградацію А3G через убіквітин-протеасомний шлях [13]. Захоплений А3G убіквітується, а потім розкладається в протеасомах перед його інкапсуляцією. ВІЛ-1, що містить функціональний ген vif, таким чином продукує «здорові» віріони без А3G, просуваючи життєвий цикл вірусу, тобто успішну ампліфікацію ВІЛ-1 [12]. Серед семи відомих членів підродини А3 А3F, А3G і А3Н мають потужну рестрикційну активність проти лентиви-

русів, включаючи Vif-дефіцитний ВІЛ-1. Вони непомітно упаковуються в новоутворені віріони ВІЛ і викликають мутацію C-to-U на зворотному транскрипті кДНК, що призводить до летальної гіпермутації G-to-A на позитивному ланцюзі провірусного геному, ефективно обмежуючи проліферацію вірусу. У цьому процесі Vif застосовує механізм «подвійного захоплення», залучаючи клітинний кофактор транскрипції Т-клітин CBF- $\beta$  і убіквітинлігазний комплекс Cullin-5 (CUL5) E3, що включає CUL5, Elogin B (ELOB) і C (ELOC), а також білок RING-box 2 (RBX2) для індукування утворення поліубіквітинового ланцюга на білках АЗ для подальшої протеасомної деградації [16].

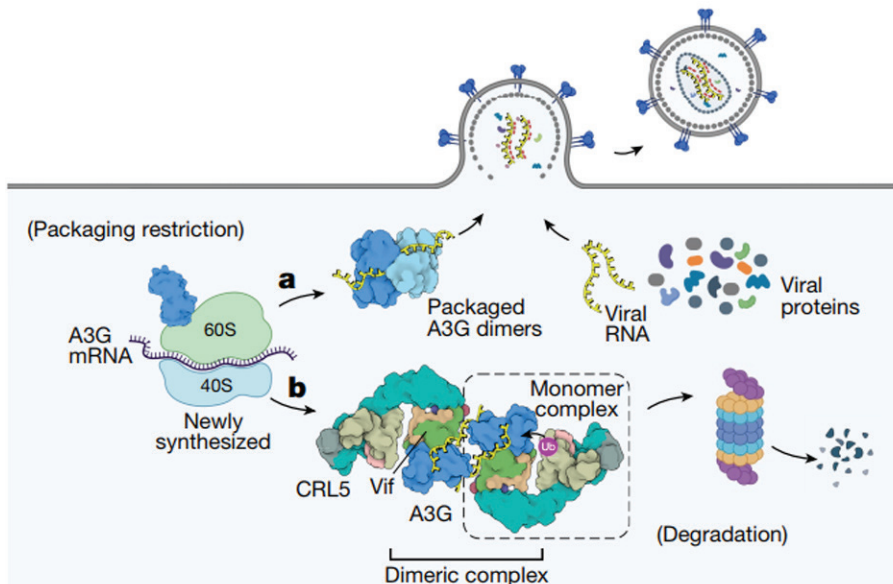
Людський АЗН є єдиним членом однодомної підродини АЗ, який демонструє потужну анти-ВІЛ активність. АЗН упаковується у віріони ВІЛ, коли стабільно експресується в Т-клітинах і дезамінує цитозини. Загальний комплекс має форму метелика з чотирма пелюстками, утворені відповідно АЗН/RNA, Vif/CBF- $\beta$ , ELOB/ELOC та CUL5-NTD. АЗН розташований поблизу  $\alpha/\beta$ -домени Vif та має типову цитидиндезаміназну складку з п'ятиланцюговим  $\beta$ -листовим ядром, оточеним шістьма  $\alpha$ -спіралями. АЗН зв'язується з Vif через свій триспіральний пучок  $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ , який містить активний центр цитидиндезамінази, що координує цинк. З другого боку, Vif контактує з АЗН своєю увігнутою стороною, утвореною спотвореним п'ятинитковим антипаралель-

ним  $\beta$ -листом ( $\beta 2$ - $\beta 6$ ). Між АЗН та рештою комплексу не спостерігається великих контактів, за винятком взаємодії заряд-заряд між АЗН і CBF- $\beta$  на негативному ланцюзі кДНК геному ВІЛ-1 [16].

Вчені запропонували модель, у якій Vif протистоїть АЗГ, захоплюючи його, коли він зв'язаний з РНК, запобігаючи вірусному розповсюдженню (мал. 1) [15].

Таким чином, взаємодія АЗГ-Vif є ключовою подією пригнічення вірусного імунітету для подолання захисту хазяїна. Подальша оцінка взаємодії між лігандами АЗГ, Vif та РНК показує, що збирання АЗГ-Vif і подальше убіквітування можна контролювати мутаціями амінокислот або модифікацією полінуклеотидів, що свідчить про те, що конкретна хімічна частина може бути перспективним фармакофором для пригнічення взаємодії АЗГ-Vif [14]. Таким чином, взаємодія АЗГ-Vif є мішенню для розробки протівірусної терапії, яка блокує реплікацію ВІЛ-1 [13].

Амінокислоти АЗГ NTD розпізнаються ВІЛ-1 Vif. Зокрема, аспартат-128 (D128) АЗГ було визначено як видоспецифічний детермінант, оскільки єдина мутація D128K робить людський АЗГ нечутливим до деградації Vif, спричиненої ВІЛ-1 [12]. Вченими були розроблені самоактивуючі лентивірусні вектори, які можуть доставляти одиничний мутант із заміною амінокислоти (D128K) каталітичної субодиниці APOBEC3G, який є стійким до деградації протеасомами, опосередкованої ВІЛ-1 фак-



Мал. 1. Схематична модель пригнічення АЗГ ВІЛ-1 Vif [15].

Упаковка з АЗГ у вірус ВІЛ-1 потребує димеризації АЗГ та його взаємодії з вірусом РНК (а); Vif нейтралізує АЗГ на ранніх етапах його біосинтезу шляхом зв'язування з РНК АЗГ, пригнічення димеризації АЗГ і стимулювання опосередкованого убіквітином протеолізу (b).

тором інфекційності віріонів (Vif). A3G-D128K та інші мутанти, які порушують взаємодії A3G-Vif, забезпечують привабливий підхід до генної терапії ВІЛ-1, оскільки вони дозволяють потужне пригнічення реплікації вірусу за допомогою цього захисного механізму хазяїна. Подвійне блокування ВІЛ-1 передбачає спочатку пригнічення проникнення за допомогою інгібітора злиття пептиду mC46, а потім пригнічення реплікації вірусу за допомогою Vif-стійкого A3G-D128K. A3G-D128K упаковується в клітини, що виробляють вірус, і лише під час другого раунду інфекції геноми ВІЛ-1 будуть інактивовані шляхом гіпермутації. Таким чином, були створені вектори, які експресують не тільки A3G-D128K, але й інгібітор злиття на мембрані ВІЛ-1 C46 (mC46). Отже, цей пептидний інгібітор забезпечить перший раунд захисту для блокування інфекції ВІЛ-1 і запобігання виснаженню модифікованих клітин. Подвійна генна терапія mC46 + A3G-D128K може забезпечити раніше невідому стратегію лікування ВІЛ-1. Інгібітор злиття mC46 вже показав перспективу в клінічних випробуваннях. Клінічні випробування фази I з Німеччини з використанням аутологічних CD4<sup>+</sup> Т-клітин, генетично модифікованих для експресії mC46, для пацієнтів на пізній стадії хвороби і з резистентністю до ліків, показали, що кількість CD4<sup>+</sup> Т-клітин зберігається, а геномодифіковані клітини все ще присутні протягом 1 року після лікування. У майбутніх дослідженнях вектори mC46+ A3G-D128K можуть бути модифіковані для експресії менш імуногенної версії mC46, відомої як V20, щоб пригнічувати імунну відповідь на пригнічувальний пептид злиття під час випробувань генної терапії людини [17].

Структура комплексу A3H-Vif демонструє помітні відмінності від недавно зареєстрованих структур комплексу A3G-Vif. Порівняння Vif-зв'язувальних поверхонь A3G і A3H у цих комплексах показує участь різних структурних елементів у складі збереженої цитидиндезамінази. Основна відмінність у режимі зв'язування Vif полягає в участі зв'язаних ланцюгів РНК. У комплексі A3G-Vif виступаючий ланцюг ssRNA у зв'язаній РНК частково опосередковує взаємодію A3G-Vif, що призводить до унікальної тристоронньої взаємодії між A3G, Vif і РНК. Навпаки, жодні ланцюги РНК не беруть безпосередньої участі в інтерфейсі A3H-Vif [16].

Щоб використати вроджену противірусну функцію цитидиндезамінази рестрикційного фактора APOBEC3G (A3G), вчені розробили самоактивуючі лентивірусні вектори, які ефективно доставляють ВІЛ-1 Vif-резистентний мутант A3G-D128K до клітин-мішеней. Лентивірусні вектори є одними з найефективніших транспортних засобів для доставки терапевтичних генів до CD4<sup>+</sup> Т-клітин людини. Щоб запобігти експресії A3G-D128K у клітинах-виробниках лентивектора, вчені скон-

струювали лентивірусні вектори, які кодували два фрагменти A3G-D128K, що перекриваються (відомі як A3 та 3G). Одна копія прямого повтору розміром ~900 п.н., що перекривається, ефективно видаляється під час зворотної транскрипції за допомогою шаблонів перемикання зворотної транскриптази ВІЛ-1 у гомологічних повторях, що призводить до функціонального відновлення A3G-D128K [18].

Проникнення ВІЛ у клітини-мішені опосередковується глікопротеїном його оболонки (Env), що складається з поверхневої субодиниці gp120 і трансмембранної субодиниці gp41. У той час як gp120 відповідає за зв'язування з первинним клітинним рецептором CD4 та корецептором (CCR5 або CXCR4), gp41 опосередковує злиття між вірусною та клітинною мембранами, і обидва білки індукують нейтралізуючі антитіла у ВІЛ-інфікованих осіб, таким чином будучи основними імуногенами для розробки вакцини. Нові дослідження демонструють, що закріплені на мембрані інгібітори проникнення ВІЛ, такі як отримані з gp41 інгібіторні пептиди злиття та широко нейтралізуючі антитіла (bNAbs), є особливо ефективними для генерації стійких до ВІЛ-1 клітин [19].

Успішне вилікування берлінського пацієнта, лондонського пацієнта та очевидна ремісія дюссельдорфського пацієнта, а також нещодавнє повідомлення про перший випадок ремісії ВІЛ-1 у жінки, є доказом принципу того, що вилікувати хворого на ВІЛ-інфекцію можливо. Усім цим чотирьом особам трансплантували кістковий мозок клітин, що містять делецію 32 bp у гені людського рецептора хемокіну CCR типу 5 (CCR5 Δ32), що запобігає використанню CCR5 як корецептора для проникнення ВІЛ-1 у CD4<sup>+</sup> Т клітини [17]. Однак, інактивація CCR5 не запобігає зараженню CXCR4-тропними та подвійними тропними вірусами, що свідчить про необхідність стратегій пригнічення інфекції за допомогою CCR5-, CXCR4- та подвійних тропних вірусів [18].

Лікування або функціональне лікування берлінського пацієнта та лондонського пацієнта шляхом трансплантації алогенних гемопоетичних стовбурових клітин (HSC), що містять природну мутацію в корецепторі ВІЛ CCR5 (CCR5Δ32), свідчить про те, що інфузія ВІЛ-резистентних клітин може бути життєздатним підходом до лікування. Нині ведеться величезна робота, спрямована на створення мутацій CCR5 в аутологічних клітинах за допомогою технологій редагування генів [19]. Пептиди-інгібітори злиття, такі як пептид T20, схвалений для клінічного використання, перешкоджають злиттю мембран вірусу та хазяїна, зв'язуючись із спіральними тримерними гептадними повторами (HR) оболонки gp41 і блокуючи утворення пучка з 6 спіралей, що забезпечує злиття. Мембранно-закріплений злитий пептидний інгі-

бітор С46 (mC46) є ефективним при пригніченні CCR5-тропних, CXCR4-тропних і подвійних тропних ВІЛ-1 [17].

Доведено, що АРОВЕС захищає як від періодичних вірусних зоонозів, так і від екзогенної та ендогенної реплікації паразитів. Мутації ДНК можуть створювати функціональну різноманітність генів противірусних анти-тіл. Чутливість вірусів, які не мають захисту, підкреслює необхідність розробки ліків на основі малих молекул, що сприяють АРОВЕС, як нового класу противірусних препаратів [8]. Зараз є дуже мало повідомлень про стабільні малі молекули, які спрямовані на взаємодію між А3G і Vif. Потенційна активність А3G проти ВІЛ-1 надихає дослідників на пошук і розробку невеликих молекул, які можуть посилити активність А3G або антагонізувати функцію Vif. Було виявлено, що мала молекула N.41 та її аналоги блокують зв'язок між А3G та Vif. Крім того, малі молекули бензимидазолу-14 і бензимидазолу-26 можуть також порушити взаємодію між А3G та Vif [20].

Вчені ідентифікували два пептиди – VMP-63 та VMP-108, які можуть знизити інфекційність ВІЛ-1 шляхом конкурентного пригнічення зв'язування Vif з CBF $\beta$ . Взаємодія Vif-CBF $\beta$  також є багатообіцяючою мішенню, оскільки відсутність CBF $\beta$  блокує збирання комплексу E3, захопленого Vif, таким чином захищаючи білки А3 від деградації. Було показано, що VMP-63 і VMP-108 захищають А3G від Vif-опосередкованої деградації, блокуючи взаємодію між Vif і CBF $\beta$ , тим самим посилюючи включення А3G у віріони ВІЛ-1 для зменшення вірусної інфекційності. Ці два пептиди є потенційними кандидатами для подальшої оптимізації та розробки препаратів проти ВІЛ-1. Порівняно з іншими типами препаратів проти ВІЛ, пептидні інгібітори мають перевагу селективності та специфічності щодо мішеней з меншими побічними ефектами та токсичністю, тож їх можна використовувати в комбінації з іншими препаратами проти ВІЛ-1 [21].

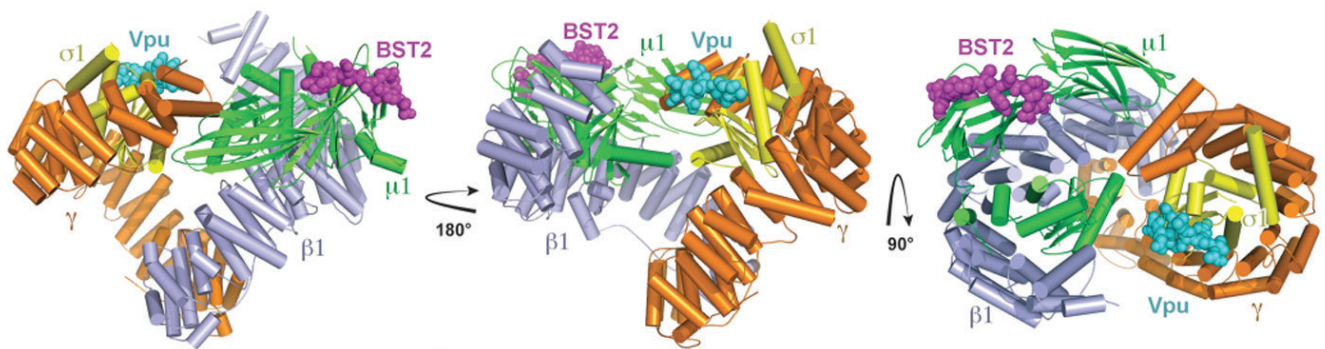
Інтерферон-індуковані трансмембранні білки (IFITMs) – це родина невеликих трансмембранних білків, які еволюційно збереглися серед хребетних. Вони активуються інтерфероном під час вірусної інфекції. Найкраще вивчений представник цієї родини IFITM3, який обмежує реплікацію різноманітних вірусів, включаючи вірус грипу, флавівіруси та ВІЛ-1. IFITM3 перешкоджає злиттю між вірусною та клітинною мембранами, а також може зменшити активність білків синцитину, відповідальних за злиття мембран. IFITM3 вбудований в мембрани ендоцитних везикул і після злиття мембрани IFITM3 переносить інфікувальні віруси в лізосоми. IFITM3 перешкоджає розщепленню білка gp160 Env ВІЛ-1, що приводить до зменшення кількості зрілого Env у вірусних частинках [22].

BST-2 (тетерин) локалізується у місцях брунькування віріонів ВІЛ-1 із клітини хазяїна. Це противірусний фактор рестрикції, який пригнічує вивільнення вірусів із поверхні клітини. Механізм дії BST-2: ектодомен BST-2 димеризується, утворюючи жорстку спіральну ділянку, яка утримує трансмембранний і GPI-мембранний якорі розділеними таким чином, що один може розділитися на віріон, що брунькується, тоді як інший залишається у плазматичній мембрані, утворюючи зв'язок віріон-клітина, тим самим перешкоджаючи виходу вірусних частинок за межі клітини-хазяїна [23]. Здатність BST2 прив'язувати віріони, які брунькуються до клітинної мембрани, не є специфічною для ретровірусів, оскільки BST2 блокує вивільнення кількох інших вірусів з оболонкою, включаючи герпесвіруси, філовіруси, VSV та SARS коронавірус [22].

ВІЛ-1 протидіє BST2 через вірусний білок u (Vpu), який знижує регуляцію BST2 з поверхні клітини. Vpu індукує убіквітування та подальшу деградацію білка BST-2 [24]. ВІЛ-1 Vpu протидіє BST2 за допомогою багатьох механізмів. Дослідження показали, що Vpu взаємодіє з білком, що містить повтори бета-трансдукцину ( $\beta$ -TrCP), і залучає його до BST2.  $\beta$ -TrCP – це білок F-box, який утворює частину розпізнавання субстрату лігазного комплексу E3 з SCF (Skp1-Cullin-F-box). Це призводить до поліубіквітування та кінцевої лізосомної деградації BST2 [22]. Отримані результати мають важливе значення для розробки нових терапевтичних підходів у лікуванні ВІЛ-1-інфекції, яка спрямована на пригнічення взаємодії BST-2 та Vpu.

На малюнку 2 зображена кристалічна структура білкового комплексу, що містить цитоплазматичні домени Vpu, BST2 та адапторний білковий комплекс 1 (AP1) [23].

Однією з найбільш багатообіцяючих стратегій редагування генів є кластеризована платформа паліндромних повторів CRISPR-Cas (CRISPR-Cas) [1]. CRISPR-Cas вперше ідентифікована у прокариотів як механізм імунної відповіді проти бактеріофагів та плазмід [23]. CRISPR-Cas, який забезпечує бактеріям та археям імунітет проти вторгнення фагів і чужорідної плазмідної ДНК, був успішно адаптований для редагування генів у різних видів еукаріот. Система CRISPR-Cas складається з ендонуклеази Cas (Cas9, Cas12 або Cas13), яка зв'язується з короткою РНК CRISPR (крРНК), націленою на комплементарні послідовності вірусної ДНК або РНК, залежно від типу системи CRISPR-Cas. Ендонуклеази Cas9 та Cas12 розщеплюють ДНК, тоді як фермент Cas13 розщеплює РНК [25]. CRISPR-Cas13a є потенційним новим інструментом для лікування вірусних захворювань у людей. Повідомляється про перепрофілювання CRISPR-Cas13a для пригнічення інфекції ВІЛ-1



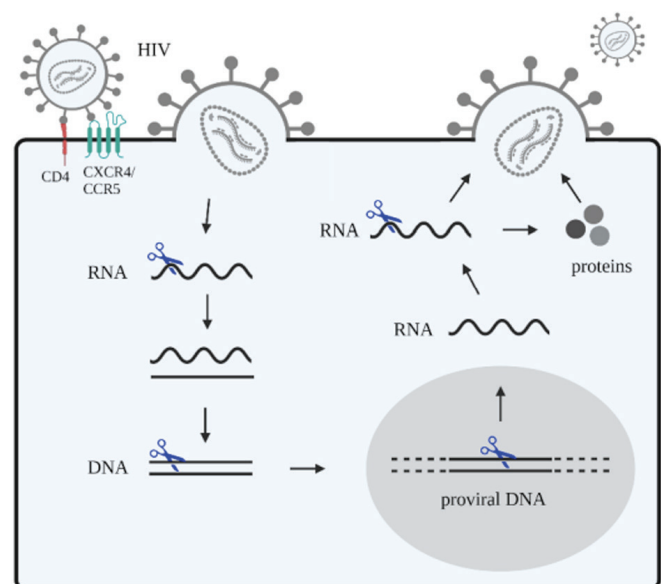
Мал. 2. Кристалічна структура комплексу BST2CD-VpuCD/AP1 [23]. Субодиниці AP1:  $\beta$ ,  $\mu 1$ ,  $\sigma 1$ , Vpu зв'язуються з  $\gamma/\sigma 1$ , а BST2 – з  $\mu 1$ .

шляхом націлювання на РНК ВІЛ-1 та зменшення експресії вірусного гена. Вчені спостерігали значне пригнічення інфекції ВІЛ-1 за допомогою CRISPR-Cas13a в клітинах людини. Дослідники показали, що CRISPR-Cas13a не тільки знижує рівень новосинтезованої вірусної РНК, плазмідної ДНК та вірусної ДНК, яка інтегрована в клітинну ДНК, але він також націлює та руйнує вірусну РНК, яка потрапляє у клітини всередині вірусу [26]. Механізм дії CRISPR-Cas: каталітично активні нуклеази Cas9 і Cas12 розрізають обидва ланцюги дволанцюгової ДНК, утворюючи тупі та шахові кінці відповідно, і таким чином активують відновлення клітинної ДНК за допомогою схильного до помилок механізму, який іменують негомологічним з'єднанням кінців (NHEJ). NHEJ зазвичай приводить до нуклеотидних вставок і делецій (INDELS), зумовлюючи порушення експресії вірусного геному. Отже, Cas13 приводить до специфічної деградації цільової РНК без редагування геному. Мішені системи CRISPR-Cas – це також гени, які кодують додаткові білки Vif, Vpr та Vpr. Наприклад, для того щоб забезпечити належну роботу АРОВЕС3G мішенню для системи CRISPR-Cas стає фактор вірусної інфекційності Vif [27].

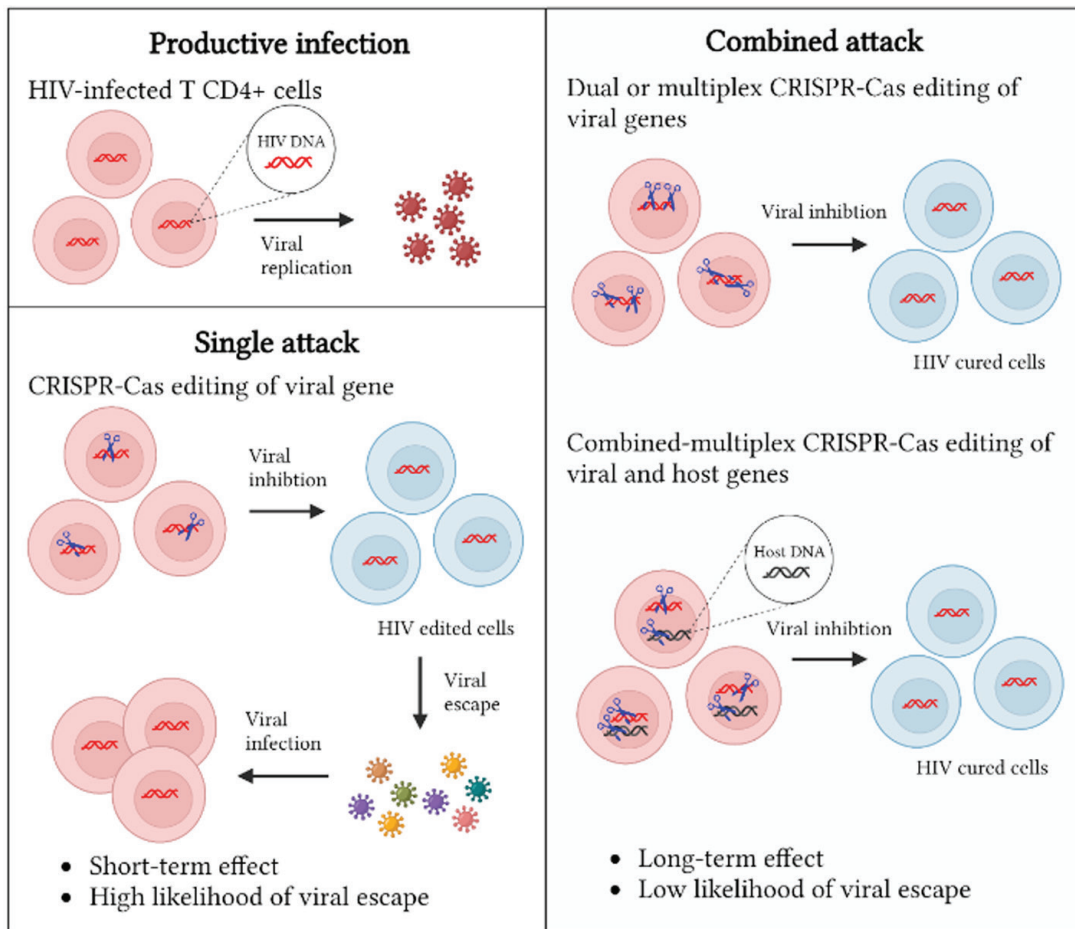
Таким чином, система CRISPR-Cas впливає на ВІЛ-інфекцію прямим та опосередкованим шляхом. Прямий шлях – CRISPR-Cas спричиняє мутації або вирізання інтегрованої провірусної ДНК ВІЛ; опосередкований шлях – відключення вірусних рецепторів (CXCR4 та/або CCR5 у  $CD4^+$  Т-клітинах) для проникнення в клітину. Найбільш прямий метод генної терапії на основі CRISPR-Cas полягає в інактивації або видаленні інтегрованої ДНК провірусу з геному хазяїна (мал. 3) [1].

Ген Rev, що кодує ВІЛ, також є мішенню для терапії на основі кластеризованої платформи паліндромних повторів CRISPR-Cas [27]. Використовуючи систему CRISPR-Cas9 для націлювання на другий екзон Rev у латентно інфікованих ВІЛ клітинах, спостерігали 20-ра-

зове зниження експресії гена ВІЛ та продукції вірусу [28]. На малюнку 4 відображено порівняння платформ редагування CRISPR-Cas для генної терапії ВІЛ-інфекції [1].



Мал. 3. Атака інгібіторами ВІЛ на основі CRISPR-Cas [1]. ВІЛ приєднується за допомогою рецепторів CXCR4 та/або CCR5 в  $CD4^+$  Т-клітинах і зливається з клітинною мембраною. Згодом вірусна РНК виділяється у цитоплазму. Ця вірусна РНК зворотно транскрипується в ДНК, яка інтегрується у геном хазяїна. В ядрі ця провірусна ДНК транскрипується та транспортується до цитоплазми, де відбувається трансляція. Вірусні білки експресуються, а потім упаковуються у нові віріони. Стратегії редагування генів CRISPR-Cas (ножиці) можуть бути розроблені для націлювання на вірусні ДНК та РНК. Інші потенційні мішені включають ДНК хазяїна, наприклад, рецептор  $CD4$  та корецептори CCR5 і CXCR4.



Мал. 4. Атака ВІЛ інгібіторами на основі CRISPR-Cas [1].

CRISPR-платформи редагування Cas (ножиці) проти ВІЛ можна класифікувати на три категорії: одиничні націлювання на гени ВІЛ, подвійне або мультиплексне націлювання на гени ВІЛ та комбіноване націлювання на гени ВІЛ і ДНК хазяїна для посилення факторів обмеження активності.

Проте на сьогодні залишаються деякі проблеми із використанням CRISPR-Cas. Слід враховувати імуногенність платформ редагування генів CRISPR-Cas. Адже система CRISPR-Cas має бактерійне походження, тому під час її введення людям у природних умовах можливе виникнення імунної реакції [29]. Цю проблему можна уникнути шляхом вибору неімуногенної системи Cas або використання імуносупресорних препаратів паралельно з терапією на основі CRISPR-Cas.

**Висновки**

1. Лікування хворих на ВІЛ-інфекцію є важливою проблемою охорони здоров'я через високий рівень захворюваності та смертності.
2. ВІЛ інфікує клітини імунної системи хазяїна та створює тривалий вірусний резервуар, який можна

націлювати та редагувати за допомогою генної терапії.

2. Крім протівірусних препаратів можливі альтернативні методи терапії ВІЛ-інфекції, такі як редагування генів за допомогою білків APOBEC3, BST-2/тетерин та системи CRISPR-Cas.

3. Білки APOBEC спричиняють мутації у зворотних транскриптах ВІЛ-1, обмежуючи розмноження вірусу; BST-2 пригнічує вивільнення віріонів з клітини хазяїна; ген Rev, який кодує ВІЛ, є мішенню для терапії на основі кластеризованої платформи паліндромних повторів CRISPR-Cas. За допомогою CRISPR-Cas можливі стратегії як прямої протівірусної дії шляхом мутації або вирізання інтегрованої провірусної ДНК ВІЛ, так і опосередковано шляхом відключення вірусних рецепторів для проникнення у клітину людини.

## Література

- Hussein, M., Molina, M.A., Berkhout, B., & Herrera-Carrillo, E. (2023). A CRISPR-Cas Cure for HIV/AIDS *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 1563.
- Public Health Center of the Ministry of Health of Ukraine. (07/05/2024). Incidence of HIV infection in the regions of Ukraine. *phc.org.ua*. Retrieved from <https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/vilsnid/statistika-z-vilsnidu> [in Ukrainian].
- Staeli, P., Hallera, O. (2018). Human MX2/MxB: a Potent Interferon-Induced Postentry Inhibitor of Herpesviruses and HIV-1. *Journal of Virology*, 92(24), e00709-18.
- Pawar, P., Gokavi, J., Wakhare, S., Bagul, R., Ghule, U., Khan, I.,... & Saxena, V. (2023). MiR-155 Negatively Regulates Anti-Viral Innate Responses among HIV-Infected Progressors. *Viruses*, 15, 2206.
- Pecori, R., Di Giorgio, S., Lorenzo, J.P. & Papavasiliou, F.N. (2022). Functions and consequences of AID/APOBEC-mediated DNA and RNA deamination. *Nat. Rev. Genet.*, 23, 505-518.
- Chen, X.S. (2021). Insights into the structures and multimeric status of APOBEC proteins involved in viral restriction and other cellular functions. *Viruses*, 13, 497.
- Ito, J., Gifford, R.J., Sato, K. (2020). Retroviruses drive the rapid evolution of mammalian APOBEC3 genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 117, 610-618.
- Harris, R.S., Dudley, J.P. (2015). APOBECs and virus restriction. *Virology*, 479-480, 131-145.
- Molan, A.M., Hanson, H.M., Chweya, C.M., Anderson, B.D., Starrett, G.J., Richards, C.M., & Harris, R.S. (2017). APOBEC3B lysine residues are dispensable for DNA cytosine deamination, HIV-1 restriction, and nuclear localization. *Virology*, 511, 74-81.
- Mohammadzadeh, N., Follack, T.B., Love, R.P., Stewart, K., Sanche, S., & Chelico, L. (2019). Polymorphisms of the cytidine deaminase APOBEC3F have different HIV-1 restriction efficiencies. *Virology*, 527, 21-31.
- Salas-Briceno, K., Ross, S.R. (2021). Repair of APOBEC3G-Mutated Retroviral DNA In Vivo Is Facilitated by the Host Enzyme Uracil DNA Glycosylase 2. *Journal of Virology*, 95:e01244-21.
- Kouno, T., Shibata, S., Shigematsu, M., Hyun, J., Kim, T.G., Matsuo, H. & Wolf, M. (2023). Structural insights into RNA bridging between HIV-1 Vif and antiviral factor APOBEC3G. *Nature Communications*, 14, 4037.
- Fukuda, H., Li, S., Sardo, L., Smith, J.L., Yamashita, K., Sarca, A.D., ... & Izumi, T. (2019). Structural Determinants of the APOBEC3G N-Terminal Domain for HIV-1 RNA Association *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 9.
- Ito, F., Alvarez-Cabrera, A.L., Liu, S., Yang, H., Shiriaeva, A., Zhou, Z.H., & Chen, X.S. (2023). Structural basis for HIV-1 antagonism of host APOBEC3G via Cullin E3 ligase. *Science advances*, 9(1), eade3168.
- Li, Y.-L., Langley, C.A., Azumaya, C.M., Echeverria, I., Chesarino, N.M., Emerman, M., ... & Gross, J.D. (2023). The structural basis for HIV-1 Vif antagonism of human APOBEC3G. *Nature*, 615, 728-733.
- Ito, F., Alvarez-Cabrera, A.L., Kim, K., Zhou, Z.H., & Chen, X.S. (2023). Structural basis of HIV-1 Vif-mediated E3 ligase targeting of host APOBEC3H. *Nature communications*, 14(1), 5241.
- Delviks-Frankenberry, K.A., Ojha, C.R., Hermann, K.J., Hu, W.S., Torbett, B.E., & Pathak, V.K. (2023). Potent dual block to HIV-1 infection using lentiviral vectors expressing fusion inhibitor peptide mC46- and Vif-resistant APOBEC3G. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 33, 794-809.
- Delviks-Frankenberry, K.A., Ackerman, D., Timberlake, N.D., Hamscher, M., Nikolaitchik, O.A., Hu, W.S., Torbett, B.E., & Pathak, V.K. (2019). Development of Lentiviral Vectors for HIV-1 Gene Therapy with Vif-Resistant APOBEC3G. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 18, 1023-1038.
- Chen, Y., Jin, H., Tang, X., Li, L., Geng, X., Zhu, Y., Chong, H., & He, Y. (2022). Cell membrane-anchored anti-HIV single-chain antibodies and bifunctional inhibitors targeting the gp41 fusion protein: new strategies for HIV gene therapy. *Emerging microbes & infections*, 11(1), 30-49.
- Yan, X., Chen, C., Wang, C., Lan, W., Wang, J., & Cao, C. (2022). Aromatic disulfides as potential inhibitors against interaction between deaminase APOBEC3G and HIV infectivity factor. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 54(5), 725-735.
- Gai, Y., Duan, S., Wang, S., Liu, K., Yu, X., Yang, C., ... & Yu, X. (2024). Design of Vif-Derived Peptide Inhibitors with Anti-HIV-1 Activity by Interrupting Vif-CBF $\beta$  Interaction. *Viruses*, 16(4), 490.
- Boso, G. & Kozak, C.A. (2020). Retroviral Restriction Factors and Their Viral Targets: Restriction Strategies and Evolutionary Adaptations. *Microorganisms*, 8(12), 1965.
- Jia, X., Weber, E., Tokarev, A., Lewinski, M., Rizk, M., Suarez, M., ... & Xiong, Y. (2014). Structural basis of HIV-1 Vpu-mediated BST2 antagonism via hijacking of the clathrin adaptor protein complex 1. *eLife*, 3:e02362.
- Barrangou, R., Marraffini, L.A. (2014). CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol. Cell*, 54, 234-244.
- Zhao, F., Zhang, T., Sun, X., Zhang, X., Chen, L., Wang, H., ... & Li, Z. (2023). A strategy for Cas13 miniaturization based on the structure and AlphaFold. *Nature Communications*, 14, 5545.
- Yin, L., Zhao, F., Sun, H., Wang, Z., Huang, Y., Zhu, W., ... & Guo, F. (2020). CRISPR-Cas13a Inhibits HIV-1 Infection. *Molecular therapy Nucleic acids*, 21, 147-155.
- Ophinni, Y., Inoue, M., Kotaki, T., & Kameoka, M. (2018). CRISPR/Cas9 system targeting regulatory genes of HIV-1 inhibits viral replication in infected T-cell cultures. *Sci. Rep.*, 8, 7784.
- Zhu, W., Lei, R., Le Duff, Y., Li, J., Guo, F., Wainberg, M.A., & Liang, C. (2015). The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology*, 12, 22.
- Charlesworth, C.T., Deshpande, P.S., Dever, D.P., Camarena, J., Lemgart, V.T., Cromer, M.K.,... & Bode, N.M. (2019). Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat. Med.*, 25, 249-254.



## **PATHOGENETIC FEATURES OF ANTIVIRAL PROTEINS AND THE CRISPR-CAS SYSTEM IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH HIV INFECTION**

T. V. Bihunyak, N. Ya. Sidelnyk, A. A. Vashkovets

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University

**SUMMARY.** *The human immunodeficiency virus (HIV) belongs to the family of retroviruses, causing HIV infection. HIV infection is a socially dangerous infectious disease that develops as a result of long-term persistence of the virus in lymphocytes, macrophages and cells of nervous tissue. The disease is characterized by progressive dysfunction of the immune, nervous, lymphatic and other body systems. The terminal stage is acquired immune deficiency syndrome (AIDS), in which the body's immune system loses the ability to protect the patient from HIV-associated diseases. Without treatment, death from AIDS occurs in 100 % of cases.*

*Currently, there are no effective vaccines or drugs for HIV infection. Combination antiretroviral therapy (ART) is the standard of care. A major obstacle to HIV treatment, including ART, is the presence of long-lasting HIV reservoirs that can reactivate after treatment is stopped.*

*In addition to antiviral drugs, alternative methods of HIV therapy, such as gene editing using APOBEC3, BST-2/Tetherin, and the CRISPR-Cas system, have shown promising results in the treatment of HIV infection.*

**Key words:** *HIV-1; APOBEC3; mC46 inhibitor; A3G-D128K; IFITMs; BST-2/tetherin; CRISPR-Cas.*

### **Відомості про авторів:**

Бігуняк Тетяна Володимирівна – канд. мед. наук, доцентка кафедри патологічної фізіології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського; e-mail: bihunyak@tdmu.edu.ua

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-4985-5443>

Сідельник Надія Ярославівна – студентка 4 курсу Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського; e-mail: sidelnyk\_nadyar@tdmu.edu.ua

Вашковець Аліна Андріївна – студентка 4 курсу Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського; e-mail: vashkovets\_aliand@tdmu.edu.ua

### **Information about the authors:**

Bihunyak T. V. – PhD, Associate Professor of the Pathophysiology Department, I. Horbachevsky Ternopil National Medical University; e-mail: bihunyak@tdmu.edu.ua

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-4985-5443>

Sidelnyk N. Ya. – 4th-year student of I. Horbachevsky Ternopil National Medical University; e-mail: sidelnyk\_nadyar@tdmu.edu.ua

Vashkovets A. A. – 4th-year student of I. Horbachevsky Ternopil National Medical University; e-mail: vashkovets\_aliand@tdmu.edu.ua

Конфлікт інтересів: немає.

Authors have no conflict of interest to declare.

Отримано 22.08.2024 р.