

УДК 616-008.853.3:578.828:575.113.12

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-36-44

Для цитирования: Гольдина И.А., Гайдуль К.В., Козлов В.А. УФО-индуцированная экспрессия эндогенного ретровируса человека HERV-E  $\lambda$  4-1 в мононуклеарных клетках крови. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 36–44.

## УФО-индуцированная экспрессия эндогенного ретровируса человека HERV-E $\lambda$ 4-1 в мононуклеарных клетках крови

Гольдина И.А., Гайдуль К.В., Козлов В.А.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФиКИ)  
Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

### РЕЗЮМЕ

Влияние различных факторов внешней среды опосредованно, через эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов, способно приводить к активации эндогенных ретровирусов (ЭР) человека.

**Целью** настоящего исследования явилось изучение возможности активации эндогенного ретровируса человека I класса HERV-E  $\lambda$  4-1 (ЭР  $\lambda$  4-1) в мононуклеарных клетках крови (МНК) здоровых лиц в результате воздействия УФО-излучения *in vitro*.

**Материалы и методы.** Суспензию индивидуальных образцов МНК доноров ( $20 \times 10^6/\text{мл}$ ) в среде RPMI-1640 подвергали УФО-облучению в течение 5 мин на УФО-излучателе при длине волны 340 нм и интенсивности излучения  $50 \text{ Вт}/\text{м}^2$ . После облучения образцы клеток культивировали в течение 24 ч в полной культуральной среде в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при  $37^\circ\text{C}$ . Перед облучением, а также после него в образцах МНК определяли пролиферативную активность на основании включения меченного тритием тимидина, жизнеспособность, методом окраски трипановым синим, и экспрессию ЭР E  $\lambda$  4-1 методом обратнo-транскриптной полимеразной цепной реакции.

**Основные результаты.** УФО-облучение культур мононуклеарных клеток крови в течение 5 мин не приводило к изменению их жизнеспособности и функциональной активности. Исследование частоты случаев экспрессии гена *env* ЭР  $\lambda$  4-1 в образцах МНК крови доноров до и после воздействия УФО-излучения выявило различия данного показателя. Так, до воздействия УФО-излучения количество случаев экспрессии *env* ЭР  $\lambda$  4-1 составило 6,16% (4/65 человек), тогда как после облучения его экспрессия определялась значительно чаще – в 24,62% случаев (16/65 человек),  $p < 0,05$ . Наряду с увеличением частоты экспрессии наблюдалось и повышение уровня мРНК гена *env* ЭР  $\lambda$  4-1 с 87 (44; 120) усл. ед. опт. плотности до 264 (135; 306) усл. ед. опт. плотности,  $p < 0,05$ .

**Заключение.** Воздействие УФО-излучения с интенсивностью  $50 \text{ Вт}/\text{м}^2$  в течение 5 мин на мононуклеарные клетки крови условно-здоровых лиц *in vitro* приводит к активации эндогенного ретровируса человека HERV-E  $\lambda$  4-1: увеличению количества случаев его экспрессии и повышению уровня мРНК.

**Ключевые слова:** эндогенный ретровирус человека HERV-E  $\lambda$  4-1, активация, УФО-излучение, мононуклеарные клетки крови.

### ВВЕДЕНИЕ

Эндогенные ретровирусы (ЭР) являются частью семейства *Retroviridae*, которое представляет собой многочисленное и многообразное се-

мейство патогенных вирусов человека, животных и растений. Ретровирусы в геноме человека могут существовать в виде двух различных форм: генетических элементов хромосомной ДНК – эндогенных ретровирусов, которые представляют собой интегрированную в виде провируса форму экзогенных, а также инфекционных горизонталь-

✉ Гольдина Ирина Александровна, e-mail: igoldina@mail.ru.

но наследуемых РНК-содержащих экзогенных ретровирусов, передающихся от человека к человеку [1].

ЭР являются разновидностью ретротранспозонов, мобильных элементов генома, входящих в состав так называемой *junk* (некодирующей, мусорной) ДНК, которые характеризуются наличием двух длинных концевых повторов (LTR), ограничивающих их последовательность (*gag*, *pol*, *pro*, *env*) и выполняющих роль альтернативного промотора и (или) энхансера. Они постоянно присутствуют в геноме, наследуются согласно законам Менделя и составляют около 8–10% генома позвоночных, включая и человека [2, 3]. ЭР распределены в геноме в виде множества копий и фиксированы в ДНК всех клеток человека. Данные вирусы, как правило, представлены как полноразмерными, так и неполными последовательностями со множеством стоп-кодонов, инсерций и делеций, что делает их функционально инертными [4]. Некоторые из них в то же время репликационно компетентны, способны формировать структуру вириона, покидать клетку и инфицировать другие клетки. Причем ЭР с функционально активным геном *env* транскрипционно более активны, так как экспрессия *env* протеина обеспечивает их инфекционность [5, 6]. Согласно современной классификации, ЭР человека разделены на три основных класса:  $\gamma$ - и  $\epsilon$ -подобные – I класс,  $\beta$ -подобные – II класс и Spuma-подобные – III класс, на основании гомологии базовых последовательностей нуклеотидов с различными классами экзогенных ретровирусов. ЭР представлены более чем 50 семействами из 3 173 последовательностей [7–9]. Каждое семейство представляет собой независимое событие интеграции в геном [10]. Систематизация ЭР основана на специфичности тРНК сайтов связывания с праймерами, используемыми для начала обратной транскрипции, либо анализа локусов генов человека [11].

Регуляция экспрессии ЭР является многоуровневой. Она осуществляется различными стрессовыми сигналами внешней среды – суперинфекцией экзогенными вирусами и простейшими микроорганизмами (HTLV-1, Herpes Simplex Virus-1, Epstein Barr Virus, *Chlamydia trachomatis*) [6, 12–14], повреждением тканей, сопровождающимся воспалением, цитотоксичностью и апоптозом клеток [4, 15], а также внутриклеточными механизмами транскрипции (пулом факторов транскрипции – NF- $\kappa$ B, Interferon Regulatory Factor-1, 3, 7, механизмами сплайсинга), гормональными изменениями. В результате этого происходит

мобильная и специфичная модуляция эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов (гипометилирование ДНК, деацетилирование и сумойляция гистонов, экспрессия микроРНК) [16, 17]. Снижение уровня метилирования ДНК и деконденсация структуры хроматина приводят к инициации инсерционного мутагенеза ЭР – ретротранспозиции, вызывает их экспрессию, в результате чего некоторые ЭР продуцируют вирусные белки, обладающие иммуномодулирующими свойствами [18–21].

Активация ЭР наблюдается при многих заболеваниях человека, причем данные изменения происходят на самых ранних стадиях патологического процесса, что позволяет рассматривать их как компонент патогенеза и ранний диагностический маркер [22]. Несмотря на интенсивное изучение ЭР в течение последних лет, многие аспекты факторов и механизмов их активации, а также функции ЭР остаются не выясненными [21].

Учитывая ассоциацию ЭР со многими полиэтиологическими иммунопосредованными заболеваниями – онкологическими [23], аутоиммунными [24], нейродегенеративными [25, 26], способность ЭР активироваться в результате воздействий ряда факторов внешней среды, целью настоящего исследования явилось изучение возможности активации эндогенного ретровируса человека HERV-E  $\lambda$  4-1 (ЭР  $\lambda$  4-1) в мононуклеарных клетках крови (МНК) условно здоровых лиц в результате воздействия УФО-облучения *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 65 условно здоровых лиц (35 мужчин и 30 женщин) в возрасте 31–45 лет из числа доноров Новосибирского центра крови. МНК выделяли при помощи центрифугирования гепаринизированной венозной крови на градиенте плотности фиколла 1,078 г/см<sup>3</sup> (Lymphocyte separation medium, MP Biomedicals Inc., США) при 1 500 об./мин в течение 40 мин. Клетки, собранные из интерфазы, трехкратно отмывали в среде 199, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в концентрации 20 x 10<sup>6</sup>/мл в полной культуральной среде RPMI-1640, содержащей 10% сыворотки крови человека АВ (IV), 10 мМ Нерес, 4 x 10<sup>-5</sup> М 2-меркаптоэтанола, 2 мМ L-глутамин, 40 мкг/мл гентамицина. Часть клеток каждого из образцов крови использовали для определения исходной жизнеспособности ( $n = 21$ ) и экспрессии ЭР  $\lambda$  4-1,  $n = 65$ . Для исследования спонтанной пролиферативной

активности ( $n = 21$ ) другую часть клеточной суспензии разводили полной культуральной средой до концентрации  $2 \times 10^6$ /мл, затем культивировали в круглодонных 96-луночных планшетах (Linbro, США) в концентрации  $100 \times 10^3$  клеток на лунку. Далее третью часть клеток этих же образцов ( $20 \times 10^6$ /мл) подвергали УФО-облучению в течение 0–10 мин на УФО-излучателе (Pharmacia LKB, Франция) при длине волны 340 нм и интенсивности излучения  $50 \text{ Вт/м}^2$ . После облучения клеточную суспензию разводили полной культуральной средой до концентрации  $2 \times 10^6$ /мл и культивировали в течение 24 ч. Затем в данных образцах МНК также определяли пролиферативную активность, жизнеспособность и экспрессию ЭРλ 4-1.

Для оценки жизнеспособности МНК исследуемые образцы крови окрашивали 0,5%-м раствором трипанового синего, подсчитывали процентное содержание неокрашенных и окрашенных клеток.

**Оценка пролиферативной активности МНК.** Культивирование клеток проводили в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере, содержащей 5%  $\text{CO}_2$  и 95% воздуха в течение 24 ч, в триплетах. За 18 ч до окончания периода культивирования во все лунки добавляли по 1 мкКю 3Н-тимидина. Затем клетки собирали на стекляннно-волоконистые фильтры (Flow Lab.) с помощью аппарата Harvester (TITERTEK). Фильтры помещали во флаконы для сцинтиллятора, наполненные раствором, содержащим 4 г дифенилоксазола и 0,1 г дифенил-оксазолилбензола на 1 л толуола, и подсчитывали радиоактивность в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Дельта» (США). Результаты оценивали в имп/мин на  $100 \times 10^3$  клеток.

**Выделение геномной РНК.** Геномную РНК получали методом фенольной экстракции с использованием тест-системы ВекторРНК – экстракция («Вектор-Бест», г. Новосибирск). С этой целью 200 мкл клеточной суспензии, содержащей  $4 \times 10^6$  клеток, смешивали с 200 мкл 4М раствора гуанидинтиоционата и 4 мкл РНК-носителя с концентрацией 0,5 мг/мл, встряхивали на «Вортексе» в течение 15 с и охлаждали в снежной бане в течение 10 мин. Затем добавляли 200 мкл смеси фенол – хлороформ – изоамиловый спирт в соотношении 25 : 24 : 1 по объему и энергично встряхивали в течение 1 мин. Далее пробирки со смесью замораживали при  $-18^\circ\text{C}$  в течение 40 мин. После размораживания смесей пробирки центрифугировали при 12 000 об./мин в течение 5 мин и собирали водную фазу, замеряя ее объем, добавляли 0,10 часть по объему 2М раствора ацетата натрия, рН 4,5, и равный объему водной фазы объем изопропи-

лового спирта. Растворы тщательно перемешивали и замораживали при  $-18^\circ\text{C}$  в течение ночи. После размораживания полученную РНК осаждали центрифугированием при 12 000 об./мин в течение 5 мин, супернатант удаляли пипеткой, а к осадку добавляли 100 мкл 75%-го этилового спирта, предварительно охлажденного до  $-18^\circ\text{C}$ . Раствор РНК вновь центрифугировали, супернатант удаляли, а осадок подсушивали при  $45^\circ\text{C}$  и растворяли в 12 мкл DEPC-обработанной воды, свободной от РНКаз.

**Ревертирование РНК и амплификация ДНК.** К раствору РНК добавляли 3 мкл раствора случайных праймеров (OligoDT<sub>12-18</sub>) с оптической плотностью 1 о.е. Полученный раствор инкубировали в термостате при  $65^\circ\text{C}$  в течение 15 мин, затем охлаждали при  $-18^\circ\text{C}$  в течение 15 мин. После этого в каждую пробирку с РНК добавляли по 25 мкл раствора для ревертирования, состоящего из 2 мкл  $\text{MnCl}_2$ , 1,5 мкл (75 ед.) обратной транскриптазы М – MuLV RT, 4 мкл 10-кратного буфера для обратной транскриптазы, 9,5 мкл деионизированной воды, 8 мкл смеси 20 мМ динуклеотидтрифосфатов (АТР, ТТР, ГТР, СТР), 1 мкл раствора ингибитора РНКаз (20 ед./мкл) и инкубировали в термостате при  $37^\circ\text{C}$  в течение 60 мин, далее нагревали при  $95^\circ\text{C}$  в течение 5 мин и замораживали при  $-18^\circ\text{C}$  в течение ночи. Амплификацию полученной ДНК осуществляли в программируемом амплификаторе «Терцик» («ДНК-технологии», г. Москва) с использованием пар олигонуклеотидных праймеров к гену *env* ЭРλ 4-1 (sense: AGAGCCTACATTCGTTTAC, antisense: ACCGTATGATCCGATTGAG), гомологичных консервативным участкам антипараллельных цепей ДНК. Для проведения амплификации ДНК в каждую пробирку добавляли по 5 мкл 10-кратного буфера для Taq ДНК-полимеразы, 2 мкл 100 мМ раствора  $\text{MgCl}_2$ , 2 мкл смеси 8 мМ динуклеотидтрифосфатов, 1 мкл Taq ДНК-полимеразы (1 ед./мкл), по 2 мкл праймеров (sense, antisense, 1 о.е./мл), 2 мкл исследуемой ДНК, 34 мкл деионизированной воды. Сверху на полученную смесь наслаивали 10 мкл минерального масла. Для контроля реакции проводили амплификацию всех исследуемых образцов с праймерами β-актина. Продукты амплификации анализировали методом электрофореза в 2%-м геле агарозы с добавлением 0,00001% бромистого этидия («ВекторДНК-ЭФ», «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Для этого 9 мкл каждого образца кДНК, полученного в результате проведения амплификации, смешивали с 1 мкл 10-кратного буфера для нанесения образцов, состоящего из 50%-го раствора глицерина, 0,25%-го раствора

бромфенолового синего, 0,25%-го раствора ксиленцианола. Полученную смесь вносили в карманы геля. Первый карман геля заполнялся 10 мкл раствора контрольных фрагментов ДНК, во второй вносили отрицательный контрольный образец, представляющий собой реакционную смесь, в которую вместо исследуемой кДНК добавлено соответствующее количество деионизированной воды. Электрофорез проводили в трис-ацетатном буфере при напряжении 15 В/см геля. Полученный фрагмент кДНК соответствующего размера (274 п.н.) выявляли в виде дискретной полосы после электрофоретического разделения молекул. Положительными считали образцы с наличием в геле видимой полосы кДНК, соответствующей ожидаемому размеру ампликона. Продукты амплификации визуализировали на денситометре Pharmacia LKB. Полуколичественная оценка результатов проводилась с использованием программы Image Master VDS Software (США). Результаты выражали в условных (относительных) единицах оптической плотности.

Статистическую обработку данных проводили с использованием методов описательной статистики, сравнительного анализа, пакета программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США). Для оценки

статистической значимости различий при анализе повторных наблюдений применялся критерий McNemar, парный критерий Вилкоксона для двух зависимых групп. Результаты представлены в виде медианы и интервала между 1 и 4 квартилями ( $Me$  (25%; 75%)). Различия считали достоверными при значениях достигнутого уровня статистической значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В серии предварительных экспериментов оценивали влияние различных доз УФО-излучения на жизнеспособность и пролиферативную активность МНК крови с целью определения максимальной дозы излучения, не приводящей к изменению пролиферативной активности и гибели клеток. Результаты исследования жизнеспособности МНК при воздействии УФО-излучения представлены в табл. 1.

Оценка жизнеспособности МНК крови под действием УФО-излучения выявила гибель значительного количества клеток при времени облучения 10 мин.

Результаты изучения пролиферативной активности МНК представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 1

Жизнеспособность мононуклеарных клеток крови условно здоровых лиц при воздействии УФО-излучения, $Me$ (25%; 75%)					
Параметр	Время облучения, мин				
	0	1	3	5	10
Содержание жизнеспособных клеток, %	97 (97; 99)	97 (96; 98)	97 (95; 98)	94 (92; 95)	64 (58; 70)*

\* статистическая значимость различий  $p < 0,05$  (критерий Вилкоксона),  $n = 21$  (здесь и в табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Пролиферативная активность мононуклеарных клеток крови условно здоровых лиц при воздействии УФО-излучения, $Me$ (25%; 75%)					
Параметр	Время облучения, мин				
	0	1	3	5	10
Удельная радиоактивность, имп./мин	1 526 (821; 2 532)	1 758 (834; 2 770)	1 619 (921; 2 350)	1 370 (656; 2 345)	344 (156; 678)*

Полученные результаты также свидетельствуют об изменении параметров пролиферативной активности МНК крови при воздействии УФО-излучения при времени экспозиции 10 мин. Максимальным временем воздействия на клетки, не приводящим к изменению параметров жизнеспособности и пролиферативной активности,

явился период облучения продолжительностью 5 мин. Далее облучение клеток для выявления экспрессии ЭР  $\lambda$  4-1 проводилось в течение данного периода времени.

Активацию ЭР  $\lambda$  4-1 оценивали на основании исследования экспрессии его гена *env*. Перед исследованием экспрессии *env* ЭР  $\lambda$  4-1 в образцах

МНК крови определяли качество выделения ДНК по наличию в них ДНК  $\beta$ -актина, представляющего собой ген *housekeeping*, экспрессирующийся во всех клетках на постоянном уровне, независимо от функционального статуса клетки. При амплификации с праймерами  $\beta$ -актина и последующей электрофоретической оценке результатов все образцы периферической крови здоровых лиц демонстрировали наличие фрагмента ДНК соответствующего размера (462 п.н.), что свидетельствовало о наличии ДНК во всех исследуемых образцах (рис. 1).

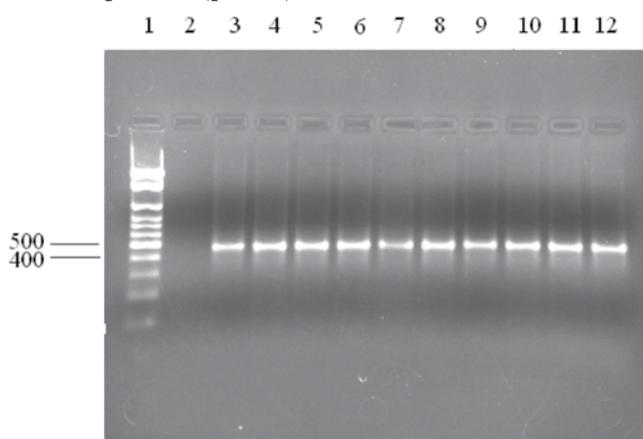


Рис. 1. Экспрессия  $\beta$ -актина в мононуклеарных клетках периферической крови доноров: линия 1 – маркер (100–1 200 п.н.), линия 2 – контроль контаминации, линии 3–12 –  $\beta$ -актин (462 п.н.)

Fig. 1.  $\beta$ -actin expression in mononuclear cells of donor peripheral blood: line 1 – marker (100–1 200 bps), line 2 – contamination control, lines 3–12 –  $\beta$ -actin (462 bps)

Далее исследовали влияние УФО-излучения на активацию ЭР  $\lambda$  4-1. Контрольную группу составили образцы МНК, которые культивировали в течение 24 ч, как было описано выше, без воздействия УФО-излучения. В опытной группе образцы МНК тех же доноров перед началом культивирования подвергали УФО-облучению. Определение количества случаев экспрессии *env* ЭР  $\lambda$  4-1 в МНК крови образцов контрольной группы до и после культивирования не выявило различий данного показателя, который составил 6,2% (4/65 человек), что согласуется с полученными нами ранее данными, а также результатами других авторов [25, 27]. В то же время в МНК доноров до и после воздействия УФО-излучения наблюдалось увеличение данного параметра с 6,2 до 24,6% (16/65 человек), ( $p = 0,0003$ , (McNemar)) (рис. 2, 3). Следовательно, воздействие УФО-излучения на МНК условно здоровых лиц индуцирует в них экспрессию *env* ЭР  $\lambda$  4-1.

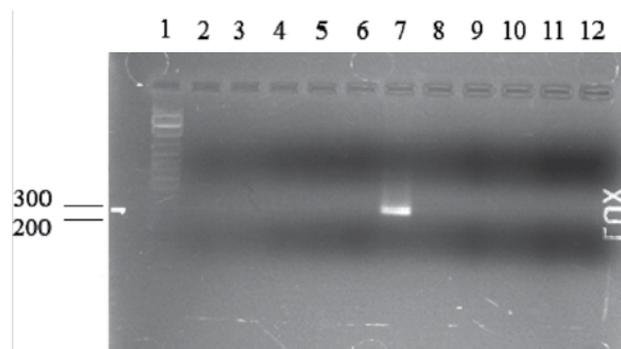


Рис. 2. Экспрессия *env* ЭР  $\lambda$  4-1 в мононуклеарных клетках периферической крови доноров до УФО-облучения: линия 1 – маркер (100–1 200 п.н.), линия 2 – контроль контаминации, линии 3–12 – *env* ЭР  $\lambda$  4-1 (274 п.н.)

Fig. 2. *Env* ER  $\lambda$  4-1 expression in mononuclear cells of donor peripheral blood before UV- irradiation: line 1 – marker (100–1 200 bps), line 2 – contamination control, lines 3–12 – *env* ER  $\lambda$  4-1 (274 bps)

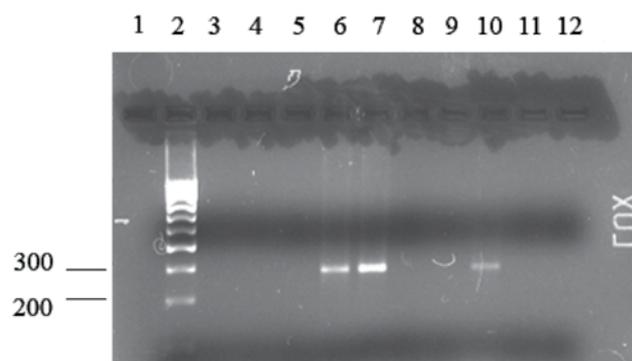


Рис. 3. Экспрессия *env* ЭР  $\lambda$  4-1 в мононуклеарных клетках периферической крови доноров после воздействия УФО-облучения: линия 1 – маркер (100–1 200 п.н.), линия 2 – контроль контаминации, линии 3–12 – *env* ЭР  $\lambda$  4-1 (274 п.н.)

Fig. 3. *Env* ER  $\lambda$  4-1 expression in mononuclear cells of donor peripheral blood after exposure to UV radiation: line 1 – marker (100–1 200 bps), line 2 – contamination control, lines 3–12 – *env* ER  $\lambda$  4-1 (274 bps)

Таким образом, воздействие УФО-излучения с интенсивностью 50 Вт/м<sup>2</sup> в течение 5 мин на МНК крови условно здоровых лиц приводит к активации ЭР  $\lambda$  4-1.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что многие ЭР имеют ограниченную способность к транскрипции, так как, наряду с полноразмерными последовательностями, представлены и неполными последовательностями с наличием стоп-кодона, инсерций и делеций, что делает их функционально инертными. В то же время некоторые ЭР (15–30%) транскрипционно

активны, что подтверждается идентификацией их транскриптов в различных клетках и тканях [28].

HERV-E  $\lambda$  4-1 – ЭР человека I класса, является репликационно компетентным, способным к продукции белков, так как его аминокислотная последовательность (8,8 кБ) содержит открытые рамки считывания в регионах *gag* и *env* в хромосомах 2q37, 8p23, 11q13, 17q11.2 [6]. Согласно данным литературы и результатам собственных исследований, ЭР  $\lambda$  4-1 экспрессируется как в нормальных, так и патологических тканях, ассоциирован с рядом аутоиммунных заболеваний – системной красной волчанкой, рассеянным склерозом, ревматоидным артритом, причем частота и уровень его экспрессии в мононуклеарных клетках крови больных коррелируют с активностью заболевания. У условно здоровых лиц частота его экспрессии низка и, по-видимому, обусловлена наличием персистирующих форм инфекций в популяции. Также нами выявлено, что синтетический 17-аминокислотный полипептид, гомологичный *env* региону ЭР  $\lambda$  4-1, обладает иммуномодулирующими свойствами: стимулирует клеточный иммунный ответ, повышая уровень бласттрансформации культур МНК крови доноров как не стимулированных, так и обогащенных в результате митогенной стимуляции Т-лимфоцитами. Увеличивает выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа к эритроцитам барана у мышей (СВАхС57В1/6)F1, повышая экспрессию и продукцию МНК крови условно здоровых лиц ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-2, не изменяя при этом синтеза ИЛ-4 и ИЛ-10 *in vitro* [29, 30]. Эти данные обуславливают актуальность выявления факторов внешней среды, способных приводить к активации данного ЭР [6, 25, 31]. Известно, что его транскрипция, будучи результатом воздействия комплекса целлюлярных и экстрацеллюлярных факторов, регулируется уровнем метилирования LTR. Гипометилирование LTR ЭР  $\lambda$  4-1 сопровождается его экспрессией, что характерно и для других ЭР [31, 32]. Учитывая, что УФО-излучение сопровождается изменением эпигенетической регуляции экспрессии генов, мы исследовали возможность активации ЭР  $\lambda$  4-1 у здоровых под влиянием УФО.

Воздействие УФО-излучения на клетки крови человека сопровождается целым рядом изменений их структуры и функции. Например, при УФО-облучении изменяется субмикроскопическая структура эритроцитов, происходит потеря ионов  $K^+$ , нарушаются их осмотические свойства; стимулируются фагоцитарная активность моноцитов и гранулоцитов, синтез  $H_2O_2$ , активируются синтез iNOS и продукция ФНО- $\alpha$

нейтрофилами. Циркулирующие Т-лимфоциты высокочувствительны к УФО-иррадиации, в них происходит повреждение ДНК [33]. УФО-излучение также приводит к снижению количества Th-17, T(EMRA)(CD3=CD8+CD45RA+CD62L+) эффекторных клеток памяти, НК-клеток и увеличению числа регуляторных Т-клеток CD4/CD25/FoxP3 [34]. К воздействию УФО-излучения чувствительны и некоторые мобильные элементы генома: снижение уровня метилирования ДНК и деконденсация структуры хроматина ведут к реактивации данных элементов и наблюдаются при многих заболеваниях человека [22]. УФО-излучение сопровождается многочисленными изменениями эпигенетической регуляции экспрессии генов. С одной стороны, глобальным ацетилированием гистонов, с другой – локальным гипoaцетилированием H3-гистона и p300, опосредованным воздействием на уровень метилирования ДНК-увеличением мобильности и уменьшением размера частиц протеин-аргинин метилтрансфераз, ответственных за метилирование остатков аргинина [35], увеличением экспрессии 5-метилцитозина, вовлеченного в гидроксиметилирование ДНК [36], а также прямым изменением уровня метилирования CpG [37].

Так как экспрессия ЭР изменяется в зависимости от функционального состояния клетки, нами было выбрано время облучения, не приводящее к изменению жизнеспособности и пролиферативной активности МНК. Учитывая, что эпигенетические механизмы регуляции экспрессии чувствительны к воздействию УФО-излучения и вовлечены в активацию эндогенных ретровирусов, индукция экспрессии ЭР  $\lambda$  4-1 под действием УФО-излучения, выявленная в данном исследовании, может быть обусловлена изменением эпигенетического статуса генома.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воздействие УФО-излучения с интенсивностью 50 Вт/м<sup>2</sup> в течение 5 мин на мононуклеарные клетки крови условно здоровых лиц *in vitro* приводит к активации эндогенного ретровируса человека HERV-E  $\lambda$  4-1.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Гольдина И.А. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, написание

рукописи. Гайдуль К.В. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Козлов В.А. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

### СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено этическим комитетом НИИФиКИ (протокол № 99 от 10 апреля 2017 г.).

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E. Retroviruses. New York: Cold Spring Harbor Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- Koito A., Ikeda T. Intrinsic immunity against retrotransposons by APOBEC cytidine deaminases. *Frontiers in Microbiol.* 2013; 4: 1–9.
- Urnovitz H.B., Murphy W.H. Human endogenous Retroviruses: nature, occurrence, and clinical implications in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996; 9 (1): 72–99.
- Lee J.M., Choi J.Y., Kim J.S., Hyun B.H., Kim H.S. Identification and phylogeny of new human endogenous retroviral sequences belonging to the HERV – H family. *AIDS Research Human Retroviruses.* 2000; 16: 2055–2058.
- De Parseval N., Heidmann T. Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenet. Genome Res.* 2005; 110: 318–332.
- Prusty B.K., Hausen H., Schmidt R., Kimmel R., de Villiers E.-M. Transcription of HERV-E and HERV-E-related sequences in malignant and non-malignant human haemopoietic cells. *Virology.* 2008; 382: 37–45.
- Escalera-Zamudio M., Greenwood A.D. On the classification and evolution of endogenous retrovirus: human endogenous retroviruses may not be ‘human’ after all. *APMIS.* 2016; 124 (1-2): 44–51. DOI: 10.1111/apm.12489.
- Vargiu L., Rodrigues-Tome P., Sperber G.O., Cadetdu M., Grandi N., Blikstad V., Tramontano E., Blomberg J. Classification and characterization of human endogenous retroviruses; mosaic forms are common. *Retrovirology.* 2016; 13: 7–36. DOI: 10.1186/s12977-015-0232-y.
- Wilkinson D.A., Mager D.I., Leong J.A.C. Human endogenous retroviruses. In: Levy J.A. (ed.) *The Retroviridae.* New York: Plenum Press, 1994: 465–553.
- Tristem M. Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database. *J. Virology.* 2000; 74: 3715–3730.
- Gifford R., Tristem M. The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes.* 2003; 26: 291–315.
- Kwon H.J., Han H.J., Lee W.J., Kim H.S., Jang K.L. Transactivation of the human endogenous retrovirus K long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 immediate early protein. *Virus Res.* 2002; 86: 93–100.
- Cedeno-Laurent F., Gomes-Flores M., Mendes N. New insight into HIV-1 primary skin disorders. *J. Int. AIDS Soc.* 2011; 14: 5–16.
- Гольдина И.А., Митрофанов И.М., Павлов В.В., Гайдуль К.В. Механизмы активации эндогенных ретровирусов человека: суперинфекция *Chlamydia trachomatis*. Российский иммунологический журнал. 2013; 7 (16): 230. [Goldina I.A., Mitrofanov I.M., Pavlov V.V., Gaidul K.V. The mechanisms of endogenous retroviruses activation: *Chlamydia Trachomatis superinfection. Rossiiskii immunologicheskii jurnal – Russian Journal of Immunology.* 2013; 7 (16): 230 (in Russ.)].
- Goldina I.A., Pavlov V.V., Mitrofanov I.M., Gaidul K.V. Human endogenous retrovirus HERV-E λ 4-1 expression in coxae arthroplastic. *Eur. J. Nat. History.* 2014; 1: 10–14. URL: <http://www.world-science.ru/euro/502-33236>.
- Rolland A., Jouvin-Marche E., Viret C., Faure M., Peron H., Marche P.N. The envelope protein of a human endogenous retrovirus W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *J. Immunol.* 2006; 176: 7636–7644.
- Haraguchi S., Good R.A. A potent immunosuppressive retroviral peptide: cytokine patterns and signaling pathways. *Immunol. Res.* 2008; 41: 46–55. DOI: 10.1007/s12026-007-0039-6.
- Смагин А.А., Гольдина И.А., Гайдуль К.В., Любарский М.С. Исследование пролиферативной активности мононуклеарных клеток крови больных рассеянным склерозом при воздействии пептида региона envelope эндогенного ретровируса человека HERV-E λ 4-1. *Медицинская иммунология.* 2013; 4: 52–59. [Smagin A.A., Goldina I.A., Gaidul K.V., Lubarsky M.S. The investigation of blood mononuclear cells proliferative activity under the endogenous retrovirus envelope region peptide influence. *Meditcinskaya immunologia – Medical Immunology.* 2013; 4: 52–59 (in Russ.)].
- Гольдина И.А., Сафронова И.В., Гайдуль К.В. Иммунотропные свойства эндогенного ретровируса человека HERV-E λ 4-1. Российский иммунологический журнал. 2013; 7 (16): 231. [Goldina I.A., Safronova I.V., Gaidul K.V. The endogenous retrovirus HERV-E λ 4-1 immunotropic properties. *Rossiiskii immunologicheskii jurnal – Russian Journal of Immunology.* 2013; 7 (16): 231 (in Russ.)].
- Hu X., Zhu W., Chen S., Liu Y., Sun Z., Geng T., Wang X., Gao B., Song C., Qin A., Cui H. Expression of the *env* gene from the avian endogenous retrovirus ALVE and regulation by miR-155. *Arch. Virol.* 2016; 161 (6): 1623–1632. DOI: 10.1007/s00705-016-2833-8.
- Li F., Karlsson H. Expression and regulation of human endogenous retrovirus W elements. *APMIS.* 2016; 124 (1-2): 52–66. DOI: 10.1111/apm.12478.
- Miousse I.R., Chalbot M.C., Lumen A., Ferguson A., Kavouras I.G., Koturbash I. Response of transposable elements to environmental stressors. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2015; 765: 19–39. DOI: 10.1016/j.mrrev.2015.05.003.

23. Yi J.M., Kim H.S. Molecular phylogenetic analysis of the human endogenous retrovirus E (HERV – E) family in human tissues and human cancers. *Genes Genet.* 2007; 82(1): 89–98.
24. Blank M. Cross-talk of the environment with the host genome and the immune system through endogenous retroviruses in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2009; 18: 1136–1143.
25. Гольдина И.А., Гайдуль К.В., Смагин А.А., Сафронова И.В., Гольдин Б.Г., Павлов В.В., Любарский М.С., Козлов В.А. Экспрессия гена *envelope* эндогенного ретровируса человека I класса в мононуклеарных клетках крови больных рассеянным склерозом. *Молекулярная медицина.* 2011; 1: 31–35. [Goldina I.A., Gaidul K.V., Smagin A.A., Safronova I.V., Goldin B.G., Pavlov V.V., Lubarsky M.S., Kozlov V.A. The I class human endogenous retrovirus *envelope* gene expression in blood cells of multiple sclerosis patients. *Molekuliarnaya medicina – Molecular Medicine.* 2011; 1: 31–35 (in Russ.)].
26. Perron H., Lang A. The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2010; 39: 51–61.
27. Balestrieri E., Pica F., Matteucci C., Zenobi R., Sorrentino R., Argaw-Denboba A., Cipriani C., Buccini I., Sinibaldi-Vallebona P. Transcriptional activity of human endogenous retroviruses in human peripheral blood mononuclear cells. *HPC BioMed. Res. Intern.* 2015; article ID 164529, 9. DOI: org/10.1155/2015/164529.
28. Perot P., Mugnier N., Montgiraud C., Gimenez J., Jailard M., Bonnaud B., Mallet F. Microarray-based sketches of the HERV transcriptome landscape // *PLoS One.* 2012; 7 (6): e40194. DOI: 10.1371/journal.pone.0040194.
29. Гольдина И.А., Гайдуль К.В., Маркова Е.В., Козлов В.А. Клеточный иммунный ответ при воздействии рекомбинантного пептида, гомологичного аминокислотной последовательности эндогенного ретровируса человека I класса HERV-E λ 4-1. Вестник уральской медицинской академической науки. 2009; 2/1 (35): 28–30. [Goldina I.A., Gaidul K.V., Markova E.V., Kozlov V.A. The cell immune response under the influence of amino acid sequence of the I class endogenous retrovirus HERV-E λ 4-1 recombinant peptide. *Vestnik uralskoy medicinskoj akademicheskoy nauki – The Herald of Ural's Medical Academic Science.* 2009; 2/1(35): 28–30 (in Russ.)].
30. Гольдина И.А., Гайдуль К.В. Морфофункциональные параметры лимфоидных органов мышей при воздействии рекомбинантного пептида р15Е эндогенного ретровируса человека HERV-E λ 4-1. Вестник уральской медицинской академической науки. 2011; 2/1 (35): 28–29. [Goldina I.A., Gaidul K.V. The morphofunctional parameters of the mice lymphoid organs under the influence of transmembrane protein p15E recombinant peptide. *Vestnik uralskoy medicinskoj akademicheskoy nauki – The Herald of Ural's Medical Academic Science.* 2011; 2/1 (35): 28–29 (in Russ.)].
31. Wu Z., Mei X., Zhao D., Sun Y., Song Y., Pan W., Shi W. DNA methylation modulates HERV-E expression in CD4+ T cells from systemic lupus erythematosus patients. *J. Dermatol. Sci.* 2015; 77(2): 110–116. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2014.12.004.
32. Chiappinelli K.B., Strissel P.L., Desrichard A., Li H., Henke C., Akman B., Hein A., Rote N.S., Cope L.M., Snyder A., Makarov V., Buhu S., Slamon D.J. Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses. *Cell.* 2015; 162 (5): 974–986. DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.011.
33. Papp G., Horvath I.F., Gyimesi E., Barath S., Vegh J., Szodoray P., Zeher M. The assessment of immune-regulatory effects of extracorporeal photopheresis in systemic sclerosis: a long-term follow-up study. *Immunol. Res.* 2016; 64 (2): 404–411. DOI: 10.1007/s12026-015-8678-5.
34. Schmitt S., Johnson T.S., Karakhanova S., Naher H., Mahnke K., Enk A.H. Extracorporeal photopheresis augments function of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells by triggering adenosine production. *Transplantation.* 2009; 88(3): 411–416. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181aed927.
35. Suchankova J., Legartova S., Sehnalova P., Kozubek S., Valente S., Labella D., Mai A., Eckerich C., Fackelmayr F.O., Sorokin D.V., Bartova E. PRMT1 arginine methyltransferase accumulates in cytoplasmic bodies that respond to selective inhibition and DNA damage. *Eur. J. Histochem.* 2014; 58 (2): 2389. DOI: 10.4081/ejh.2014.2389.
36. Wang D., Huang J.H., Zeng Q.H., Gu C., Ding S., Lu J.Y., Chen J., Yang S.B. Increased 5-hydroxymethylcytosine and ten-eleven translocation protein expression in ultraviolet B-irradiated HaCaT cells. *Chin. Med.* 2017; 130 (5): 594–599. DOI: 10.4103/0366-6999.200539.
37. Yang A.Y., Lee J.H., Shu L., Zhang C., Su Z.Y., Lu Y., Huang M.T., Ramires C., Pung D., Huang Y., Verzi M., Hart R.P., Kong A.N. Genome-wide analysis of DNA methylation in UVB- and DMBA/TPA-induced mouse skin cancer models. *Life Sci.* 2014; 113 (1–2): 45–54. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.07.031.

Поступила в редакцию 04.07.2017  
Утверждена к печати 06.02.2018

Гольдина Ирина Александровна, науч. сотрудник, лаборатория регуляции иммунопоэза, НИИФиКИ, г. Новосибирск.  
Гайдуль Константин Валентинович, д-р мед. наук, профессор, руководитель лаборатории регуляции иммунопоэза, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Козлов Владимир Александрович, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, науч. руководитель НИИФиКИ, г. Новосибирск.

(✉) Гольдина Ирина Александровна, e-mail: igoldina@mail.ru.

УДК 616-008.853.3:578.828:575.113.12

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-36-44

For citation: Goldina I.A., Gaidul K.V., Kozlov V.A. UVI-induced endogenous retrovirus HERV-E  $\lambda$  4-1 expression in blood mononuclear cells. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 36–44.

## UVI-induced endogenous retrovirus HERV-E $\lambda$ 4-1 expression in blood mononuclear cells

**Goldina I.A., Gaidul K.V., Kozlov V.A.***Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (SRIFCI)  
14, Yadrincevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation*

### ABSTRACT

The influence of various environmental factors indirectly, through the epigenetic mechanisms of regulation of gene expression, can lead to the activation of human endogenous retroviruses. The purpose of this study was to investigate the possibility of activation of the first class HERV-E  $\lambda$  4-1 (ER  $\lambda$  4-1) endogenous retrovirus as a result of exposure to UV radiation in vitro.

**Materials and methods.** Blood mononuclear cells (MNCs) of conditionally healthy individuals in a concentration of  $20 \times 10^6/\text{ml}$  were exposed to UV irradiation for 5 minutes on an ultraviolet radiator at a wavelength of 340 nm and a radiation intensity of  $50 \text{ W}/\text{m}^2$  in vitro. After irradiation, the cell samples were cultured for 24 hours in a complete culture medium in a  $\text{CO}_2$  incubator. Then, in these cell culture samples the proliferative activity, based on the incorporation of tritium labeled thymidine, a viability, by the trypan blue staining, and ER-E  $\lambda$  4-1 expression by the reverse transcriptase polymerase chain reaction method, were determined.

**The main results.** UV irradiation of mononuclear cell cultures for 5 minutes did not leads to the changes in their viability and functional activity. The study of the of the env ER  $\lambda$  4-1 gene expression frequency in the MNC of donor's blood before and after the exposure to UV radiation revealed the differences in this index. Thus, before the exposure to UV radiation, the expression rate of env ER- $\lambda$  4-1 was 4.4% (2/45), whereas after the irradiation its expression was determined much more often 24% (11/45). Along with an increase in the expression frequency, an augmentation in the mRNA level of the env gene ER- $\lambda$  4-1 was also observed.

**Conclusion.** Thus, the exposure to ultraviolet radiation with the intensity of  $50 \text{ W}/\text{m}^2$  for 5 minutes on blood mononuclear cells of conditionally healthy individuals in vitro leads to activation of the human endogenous retrovirus HERV-E  $\lambda$  4-1: an increase of its expression frequency and the level of mRNA.

**Key words:** human endogenous retrovirus HERV-E  $\lambda$  4-1, activation, UV-irradiation, blood mononuclear cells.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

### SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

### CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study approved by the local ethics committee under the Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Protocol No. 64 of April 10, 2017).

Received 10.07.2017

Accepted 06.02.2018

Goldina Irina A., Researcher, Regulation Immunopoiesis Laboratory, SRIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Gaidul Konstantin V., DM, Professor, Head of the Regulation Immunopoiesis Laboratory, SRIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Kozlov Vladimir A., DM, Professor, Academician of RAS, Scientific Head of SRIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) Goldina Irina A., e-mail: igoldina@mail.ru.