

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Анисенко Андрей Николаевич

Постинтеграционная репарация ВИЧ-1 и ингибиторы этого процесса

1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена на кафедре химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научный консультант – *Готтих Марина Борисовна,*
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты – *Лаврик Ольга Ивановна* – доктор химических наук, профессор, академик РАН, заведующий лабораторией биоорганической химии ферментов, Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН

Хандажинская Анастасия Львовна – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Носик Дмитрий Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом молекулярной вирусологии и противовирусных препаратов, заведующий лабораторией противовирусных и дезинфекционных средств, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «19» мая 2026 г. в 16 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.014.2 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы д.1, стр.40, ауд. 501.

E-mail: agapkina@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <http://dissovet.msu.ru/dissertation/3834/>

Автореферат разослан «__» марта 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Ю.Ю. Агапкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Инфекция, вызываемая вирусом иммунодефицита человека 1-ого типа (ВИЧ-1), впервые описанным в 1983 году, остается серьезной проблемой всемирной системы здравоохранения. Разработка антиретровирусных препаратов на основе ингибиторов трех ключевых вирусных ферментов — обратной транскриптазы, интегразы и протеазы — позволила эффективно контролировать репликацию вируса. Однако высокая мутационная изменчивость ВИЧ-1 приводит к быстрому появлению резистентных штаммов. Если ранее они обнаруживались только у пациентов с длительным стажем терапии, то сегодня такие штаммы выявляются и у впервые диагностированных пациентов, что свидетельствует об их активном распространении в популяции.

Именно дальнейшее изучение особенностей молекулярной биологии ВИЧ-1 и поиск новых мишеней для ингибиторов может позволить создать препараты с высоким генетическим барьером к резистентности. Сегодня в качестве одной из мишеней для создания таких препаратов рассматривают комплексы вирусных белков с клеточными белками-партнерами, без которых невозможна эффективная репликация вируса. Нарушение взаимодействия между такими белками должно негативно влиять на репликацию вируса, а высокая консервативность поверхности взаимодействия двух белков снижает вероятность возникновения резистентных штаммов вируса. Эта идея получила широкое распространение благодаря исследованиям структуры и функций комплекса вирусной интегразы и клеточного белка LEDGF/p75, который направляет интеграцию вирусной кДНК в активно-транскрибируемые участки генома клетки. Соединения, блокирующие взаимодействие интегразы и LEDGF/p75, эффективно подавляют репликацию ВИЧ-1.

Наше внимание привлек другой партнер интегразы – клеточный белок Ku70. Ранее, в рамках исследования функциональной роли его взаимодействия с интегразой, нами показано, что образование комплекса этих белков запускает процесс постинтеграционной репарации – наименее изученный этап жизненного цикла вируса.

В результате интеграции ДНК-копии вирусного генома в клеточную ДНК по обоим краям от встроенной вирусной ДНК формируются повреждения, а именно, пятинуклеотидные одностранные участки клеточной ДНК и неспаренные АС-динуклеотиды на 5'-концах вирусной ДНК. Такая структура получила название интеграционный интермедиат.

Долгое время считалось, что указанные повреждения напрямую распознаются клеточными факторами репарации повреждений ДНК, однако, ранее в нашей работе мы показали, что для запуска процесса репарации критически важно образование комплекса между интегразой ВИЧ-1 и клеточным белком Ku70. Помимо этого было показано, что для инициации этого процесса наряду с Ku70 субъединицей ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-РК) также важны две другие субъединицы этого комплекса – Ku80 и

DNA-РКcs. Также мы установили, что нарушение взаимодействия между интегразой ВИЧ-1 и Ku70 путем введения точечных мутаций в состав интегразы негативно влияет на репликацию ВИЧ-1 за счет нарушения инициации постинтеграционной репарации.

Однако дальнейшие события постинтеграционной репарации до сих пор не были установлены и, более того, не были созданы ингибиторы взаимодействия этих двух белков и не была показана принципиальная возможность нарушения репликативного цикла вируса с их помощью. В представленной диссертации исследуются эти вопросы.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось выявление механизмов постинтеграционной репарации ВИЧ-1, а также разработка ингибиторов взаимодействия интегразы ВИЧ-1 и клеточного белка Ku70 и характеристика их влияния на ранние этапы вирусной репликации.

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

- 1) определить роль киназ из РИКК-семейства: DNA-РК, АТМ и АТР, в инициации постинтеграционной репарации ВИЧ-1, а также выяснить механизмы их активации и совместного участия в этом процессе;
- 2) охарактеризовать изменение статуса фосфорилирования ключевых мишеней исследуемых киназ в ходе постинтеграционной репарации ВИЧ-1;
- 3) идентифицировать спектр клеточных факторов, привлекаемых к сайтам интеграции кДНК ВИЧ-1 и обеспечивающих последующие этапы постинтеграционной репарации, и подтвердить роль наиболее значимых из них в постинтеграционной репарации ВИЧ-1;
- 4) идентифицировать структурные детерминанты в белке Ku70, обеспечивающие его взаимодействие с интегразой ВИЧ-1;
- 5) разработать и охарактеризовать низкомолекулярные ингибиторы, экранирующие сайт взаимодействия Ku70 с интегразой ВИЧ-1 и эффективно блокирующие взаимодействие этих белков;
- 6) охарактеризовать действие таких ингибиторов на ранние этапы репликации ВИЧ-1, включая постинтеграционную репарацию, а также на основную клеточную функцию белка Ku70.

Объект исследования – постинтеграционная репарация ВИЧ-1.

Предмет исследования – участие клеточных белков в постинтеграционной репарации ВИЧ-1 и создание ингибиторов этого процесса.

Научная новизна и практическая значимость

В результате выполнения диссертационной работы в рамках первого направления была впервые детально описана роль киназ DNA-РК и АТМ из РИКК-семейства в постинтеграционной репарации ВИЧ-1. Активация этих

киназ происходит в ответ на интеграцию ДНК-копии вирусного генома в клеточную ДНК и напрямую зависит от способности вирусной интегразы и клеточного белка Ku70 – компонента DNA-ПК, формировать комплекс. Обе киназы функционируют последовательно в этом процессе. Их активация в ходе постинтеграционной репарации ВИЧ-1 сопровождается их автофосфорилированием, а также фосфорилированием их ключевых мишеней – H2AX и Chk2. Таким образом, начальные события постинтеграционной репарации ВИЧ-1 напоминают ранние события репарации двуцепочечных разрывов ДНК, но, поскольку двуцепочечные разрывы отсутствуют в интеграционном интермедиате ВИЧ-1, запуск этих процессов полностью зависит от способности интегразы ВИЧ-1 взаимодействовать с клеточным белком Ku70 – компонентом DNA-ПК.

С помощью метода иммунопреципитации хроматина за антитела к интегразе ВИЧ-1 с последующей идентификацией соосажденных белков методом масс-спектрометрии (ChIP-MS) нами идентифицирован широкий спектр белков из систем репарации повреждений ДНК (52 белка), привлекаемых к сайтам интеграции ДНК-копии вирусного генома в клеточный геном. Наиболее представленными среди них являются инициаторные и регуляторные факторы из систем репарации двуцепочечных разрывов ДНК, а также ферменты, завершающие путь эксцизионной репарации оснований (BER). Среди факторов, относящихся к последнему пути, нами также идентифицирован один регуляторный белок – PARP1, который способен соосаждаться с суперэкспрессированной интегразой ВИЧ-1. На примере двух белков из BER-пути – PARP1 и Fen1 – показано, что компоненты BER-пути, действительно, важны для постинтеграционной репарации ВИЧ-1. Таким образом, постинтеграционная репарация ВИЧ-1 зависит как от факторов репарации двуцепочечных разрывов ДНК, которые иницируют этот процесс, так и от компонентов BER-пути, которые благодаря своим ферментативным активностям способны восстановить целостность интеграционного интермедиата.

В рамках второго направления детально описан механизм действия конъюгатов олигонуклеотидов с эозином как ингибиторов, нарушающих взаимодействие интегразы и Ku70. Показано критическое значение длины олигонуклеотидной части конъюгата, а также гетероциклических оснований в его составе для проявления им ингибирующего действия.

Нами также детально изучен сайт связывания интегразы в составе белка Ku70: установлено, что для взаимодействия с интегразой важны остатки S69, I72, S73 и I76. Данные остатки расположены в кармане Ku70, подходящем для создания ингибиторов взаимодействия двух белков. С использованием биоинформатических подходов и последующей экспериментальной проверки нами отобран эффективный низкомолекулярный ингибитор s17, нарушающий взаимодействие интегразы и белка Ku70. На клеточной модели ВИЧ-инфекции показано, что s17 подавляет ранние этапы репликации ВИЧ-1, препятствуя корректному протеканию постинтеграционной репарации ВИЧ-1, при этом данный ингибитор не влияет на основную клеточную функцию белка Ku70 –

репарацию двуцепочечных разрывов ДНК по NHEJ-пути. С использованием серии производных ингибитора s17 идентифицированы структурные детерминанты, определяющие его активность в отношении комплекса двух белков.

Таким образом, представленные в диссертационной работе результаты вносят существенный вклад в понимание молекулярных механизмов постинтеграционной репарации ВИЧ-1. Впервые продемонстрировано, что низкомолекулярные соединения, блокирующие взаимодействие интегразы и белка Ku70, нарушают ранние этапы репликации вируса, следовательно, такие соединения в будущем могут дать начало новому классу препаратов для терапии ВИЧ-инфекции.

Методология диссертационного исследования

При проведении исследования использовали современные методы молекулярной биологии, вирусологии, биохимии и клеточной биологии. Основные результаты работы получены на клеточной линии НЕК293, а также подтверждены на лимфоидных клеточных линиях Jurkat, СЕМ или первичных мононуклеарных клетках из периферической крови. Для оценки участия РИКК-киназ, а также PARP1 в постинтеграционной репарации ВИЧ-1 использовали специфичные и высокоэффективные ингибиторы каталитических функций указанных ферментов. Определение эффективности ранних этапов репликации вируса проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени на приборе BioRad CFX96, а также метода цифровой ПЦР на приборе QIAcuity One 5 plex. Для изучения изменения статуса фосфорилирования мишеней РИКК-киназ использовали метод вестерн-блоттинга с применением высокоспецифичных антител к фосфорилированным формам исследуемых белков (Cell Signaling). Для определения белков, взаимодействующих с интегразой ВИЧ-1 или привлекаемых к сайтам интеграции вирусного генома, использовали современные методики XL-MS и ChIP-MS. В случае последнего метода нами были использованы полученные и валидированные нами антитела к интегразе ВИЧ-1. Для получения плазмид, кодирующих целевые белки или их мутантные формы, а также для получения самих белков были использованы соответствующие штаммы-продуценты *E.coli*. Дизайн ингибиторов взаимодействия интегразы ВИЧ-1 и клеточного белка Ku70 проводили с использованием современного программного обеспечения AutoDock-GPU (v1.4.3). Экспериментальная проверка предсказанных соединений проводилась с использованием оригинальной валидированной методики оценки соосаждения белков, а затем для наиболее активных была проведена оценка их эффекта на ранние этапы репликации вируса на клетках НЕК293Т, СЕМ и Jurkat. Для оценки эффекта обнаруженных соединений на клеточные функции Ku70 использовали современные методики оценки эффективности репарации двуцепочечных разрывов ДНК, включая метод ДНК-комет, а также GFP-репортер с CRISPR-Cas9-индуцированными двуцепочечными разрывами.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) инициация постинтеграционной репарации ВИЧ-1 обусловлена действием клеточных киназ ATM и DNA-PK. Их активация зависит от способности интегразы ВИЧ-1 формировать комплекс с Ku70 субъединицей DNA-PK;
- 2) постинтеграционная репарация – двухэтапный гибридный процесс, инициируемый сигнальными и регуляторными компонентами путей репарации двуцепочечных разрывов ДНК, а завершаемый – компонентами эксцизионной репарации оснований;
- 3) конъюгаты олигонуклеотидов с эозином блокируют взаимодействие интегразы с Ku70 *in vitro*. Активность таких соединений напрямую связана с длиной олигонуклеотидной части и наличием гетероциклических оснований в ее составе;
- 4) аминокислотные остатки I72, S73 и I76 белка Ku70 играют ключевую роль в связывании интегразы, а остаток S69 выполняет вспомогательную функцию;
- 5) соединение s17, связываясь с Ku70, эффективно блокирует образование комплекса с интегразой ВИЧ-1 *in vitro* и подавляет репликацию вируса, действуя на этапе постинтеграционной репарации.

Степень достоверности результатов

В исследовании использовали современные общепринятые методики измерений и оборудование, отвечающее международным стандартам. Использовались реактивы ведущих российских и иностранных производителей. Все эксперименты, представленные в работе, были проведены минимум в трех биологических повторах, а статистическую достоверность различий полученных данных оценивали с помощью встроенного пакета средств статистической обработки программы GraphPad Prism 8.0.1.

Апробация работы

Диссертационная работы была апробирована на заседании кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 18 февраля 2026 года. Результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на 10 всероссийских и международных конференциях по молекулярной биологии и вирусологии: FEBS Congress, Краков, Польша, 2019; PRONIV2019, Москва, Россия, 2019; VI Съезд биохимиков России, Дагомыс, Россия, 2019; EMBO Conference: The DNA damage response in cell physiology and disease, Атика, Греция, 2019; Joint Bavarian-Russian Conference «Chemistry meets Biomedicine», Москва, Россия, 2020; Cell Bio Virtual, Онлайн ASCB|EMBO конференция, 2020; VII Съезд биохимиков России, Сочи, Россия, 2022; ПОСТГЕНОМ 2024, Парк Патриот, Россия, 2024; FUTURE OF BIOMEDICINE, Владивосток, Россия, 2025, I Междисциплинарная научная конференция «ChemNet», Москва, Россия, 2026.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы представлены в 15 публикациях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных к защите в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

Личный вклад автора

Диссертационная работа выполнена автором лично. Исследования затрагивали разнообразные вопросы молекулярной биологии ВИЧ-1, биоинформатического предсказания структур и химии органических соединений и выполнены в соавторстве с большим коллективом. Однако автору принадлежит основная роль в проведении данного исследования, включая определение его научных приоритетов, постановку целей и задач, планирование и непосредственное проведение экспериментов, разработку и адаптацию методик, анализ и интерпретацию результатов, обобщение полученных данных, а также подготовку публикаций и выступлений на конференциях. Некоторые исследования были проведены сотрудниками кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова: Агапкиной Ю.Ю., Королевым С.П., сотрудником кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова – Хреновой М.Г., сотрудником НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова – Киреевым И.И., сотрудником факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова – Залевским А.О., дипломниками и аспирантами химического факультета и факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, выполнявшими свою работу под руководством автора диссертации в лаборатории химии нуклеиновых кислот кафедры химии природных соединений: Галкиным С.О., Ильговой Е.А., Касьяновой М.М., Нефедовой А.А., Розиной А.А., Шулеповой А.А., Щигал О.Е. Автор принимал непосредственное участие в работах сотрудников Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН – Михайлова А.А. и Зиганшина Р.Х.

Личный вклад автора является весомым во всех 15 работах [1-15]. Автором разработан принцип метода и валидирован сам метод оценки эффективности постинтеграционной репарации ВИЧ-1 в работе [1], собрана, систематизирована и проанализирована литература по участию клеточных белков из систем репарации в жизненном цикле ВИЧ-1 [2], проведены эксперименты по выяснению роли каталитической функции DNA-РК в постинтеграционной репарации ВИЧ-1 [3], собрана, систематизирована и проанализирована литература по известным мишеням фосфорилирования DNA-РК [4], а также по участию клеточных партнеров интегразы ВИЧ-1 в ранних этапах репликации вируса [9], разработан и валидирован метод поиска ингибиторов взаимодействия интегразы ВИЧ-1 и клеточного белка Ku70, проведена серия экспериментов по оценке ингибирующих свойств серии конъюгатов олигонуклеотидов с эозином, а также были сформулированы цели и задачи экспериментов по молекулярному моделированию комплексов

интегразы с такими конъюгатами, проведен анализ и систематизация полученных данных [5]. В публикациях [6,8] описаны работы по подготовке NGS-библиотек и анализу результатов дифференциальной экспрессии генов при нокауте каждой из субъединиц DNA-ПК комплекса. В работах [10-12, 14, 15] были сформулированы цели и задачи исследования, выбор методологии исследования, анализ и систематизация результатов работы, а также проведены эксперименты по идентификации сайта связывания интегразы ВИЧ-1 в составе белка Ku70 и по оценке ингибирующего действия отобранных ингибиторов *in vitro* [7], эксперименты по оценке механизма совместного участия АТМ и DNA-ПК в постинтеграционной репарации ВИЧ-1 [10], эксперименты по определению изменению статуса фосфорилирования ключевых мишеней исследуемых киназ [12], эксперименты по влиянию низкомолекулярного ингибитора взаимодействия интегразы и Ku70 на ранние этапы репликации ВИЧ-1 и клеточные функции белка Ku70 [11], эксперименты по идентификации клеточных белков, взаимодействующих с интегразой ВИЧ-1 методом XL-MS [14]. В работе [15] проведен анализ влияния изменения внутриклеточной концентрации клеточных белков, взаимодействующих с интегразой ВИЧ-1, на постинтеграционную репарацию ВИЧ-1. В работе [13] проведен дизайн низкомолекулярных ингибиторов репликации ВИЧ-1.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из 204 страниц и включает следующие разделы: Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы включает 411 источников. Работу иллюстрируют 64 рисунка и 5 таблиц. Общий объем диссертации 204 страницы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Постинтеграционная репарация ВИЧ-1 – один из наименее изученных этапов жизненного цикла ВИЧ-1. Ранее этот процесс не выделяли в отдельный этап, а рассматривали как завершающий этап интеграции. Основная функция вирусной интегразы (IN) – катализ двух реакций, направленных на встраивание вирусной кДНК в клеточный геном. Для выполнения этой функции IN обладает несколькими активностями. Во-первых, ДНК-связывающей, которая обеспечивает взаимодействие IN как с концами вирусной кДНК, так и с участками клеточной ДНК. Во-вторых, IN катализирует реакцию 3'-процессинга, которая заключается в удалении GT-динуклеотидов с 3'-концов вирусной кДНК. Это подготовительный этап перед непосредственным встраиванием вирусной кДНК. В-третьих, IN катализирует реакцию переноса цепей – нуклеофильную атаку атомов фосфора клеточной ДНК 3'-гидроксилами в составе кДНК. Этот процесс затрагивает обе цепи клеточной ДНК, т.е. гидроксилы вирусной кДНК атакуют обе цепи ДНК, причем атака вторым гидроксилом проходит на расстоянии 5 нуклеотидов от первого (Рис. 1).

Совокупность этих реакций приводит к формированию интеграционного интермедиата, в котором 3'-концы вирусной кДНК соединены с клеточной, а по краям от встроенной вирусной кДНК возникают повреждения: односторонние пятинуклеотидные участки и неспаренные динуклеотиды AC на 5'-концах вирусной кДНК (Рис. 1). Для перехода от стадии интеграции, относящейся к числу ранних этапов вирусной репликации, к вирусной транскрипции, т.е. относящиеся к поздним этапам, направленным на продукцию новых вирусных частиц, такие повреждения в клеточном геноме должны быть репарированы (Рис. 1). Именно эта стадия получила название постинтеграционной репарации.

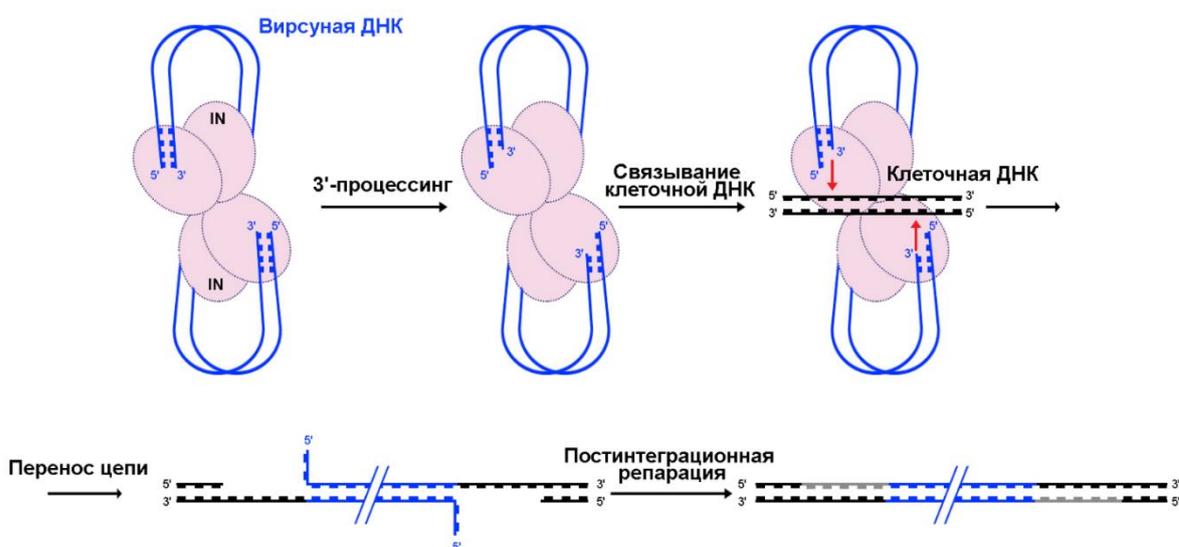


Рисунок 1. Схематичное изображение процесса интеграции кДНК ВИЧ-1 и образования интегрированного провируса.

Этот этап долгое время не привлекал внимания исследователей, поскольку считалось, что восстановление целостности ДНК после интеграции зависит исключительно от клеточных систем репарации, которые самостоятельно распознают такие повреждения и репарируют их. К сожалению, даже при таком простом подходе к постинтеграционной репарации до недавнего времени не было установлено ни то, какие системы принимают участие в этом процессе, ни то, как они осуществляют этот этап.

Ранее мы установили, что для успешного протекания постинтеграционной репарации важны субъединицы DNA-РК-комплекса (Ku70, Ku80 и DNA-РКcs), которые в нормальной клеточной физиологии связывают концы ДНК в месте двуцепочечных разрывов ДНК и участвуют в их репарации. Учитывая, что двуцепочечные разрывы ДНК в интеграционном интермедиате отсутствуют, для участия DNA-РК в постинтеграционной репарации необходимо образование комплекса между интегразой ВИЧ-1 и Ku70-субъединицей комплекса, т.е. процесс постинтеграционной репарации начинается не с узнавания повреждения клеточными белками, а с образования комплекса между вирусным и клеточным белком. В настоящей работе мы продолжили изучение механизмов регуляции постинтеграционной репарации ВИЧ-1 и провели поиск ингибиторов этого процесса с использованием безопасной модели ранних этапов репликации ВИЧ-1 – VSV-G-псевдотипированного репликативно-некомпетентного вектора на основе генома ВИЧ-1.

1. АТМ и DNA-РКcs – ключевые клеточные регуляторы постинтеграционной репарации ВИЧ-1

1.1. АТМ и DNA-РКcs важны для постинтеграционной репарации ВИЧ-1

DNA-РКcs относится к семейству киназ, родственных фосфотидилинозитол-3-киназам (PI3K). К этому семейству помимо DNA-РКcs относятся две другие репаративные киназы – АТМ и АТР. В работе (*R. Daniel et al., 2001*) было показано, что обработка клеток с нокаутом DNA-РКcs неселективным ингибитором PI3K-киназ вортманином или кофеином приводит к дополнительному снижению репликации ВИЧ-1. На основании этого мы предположили, что не только DNA-РКcs, но и другие киназы из этого семейства могут быть важны для постинтеграционной репарации ВИЧ-1.

Для проверки нашего предположения мы использовали низкомолекулярные селективные ингибиторы фосфорилирующей активности PI3K-киназ: Nu7441 (далее iDNA-РКcs), Ku-55933 (iАТМ) и AZ20 (iАТР), а в качестве модели ранних этапов репликации ВИЧ-1 использовали VSV-G-псевдотипированный репликативно-некомпетентный лентивирусный вектор ВИЧ_wt (далее псевдовиром ВИЧ_wt). Мы установили, что обработка клеток ингибиторами iDNA-РКcs или iАТМ, но не iАТР приводит к дозозависимому снижению эффективности трансдукции клеток НЕК293Т

псевдовиром ВИЧ_{wt} (Рис. 2, А), не влияя на жизнеспособность клеток. Аналогичный эффект нами обнаружен на первичных моноцитах периферической крови РВМС (Рис. 2, Б). С использованием методов количественной ПЦР для оценки эффективности протекания обратной транскрипции, интеграции (*C. Vandergeeten et al., 2014*) и постинтеграционной репарации (*Anisenko et al., 2018*) мы показали, что ингибирование как DNA-РКс, так и АТМ нарушает именно постинтеграционную репарацию ВИЧ-1 (Рис. 2, В-Д).

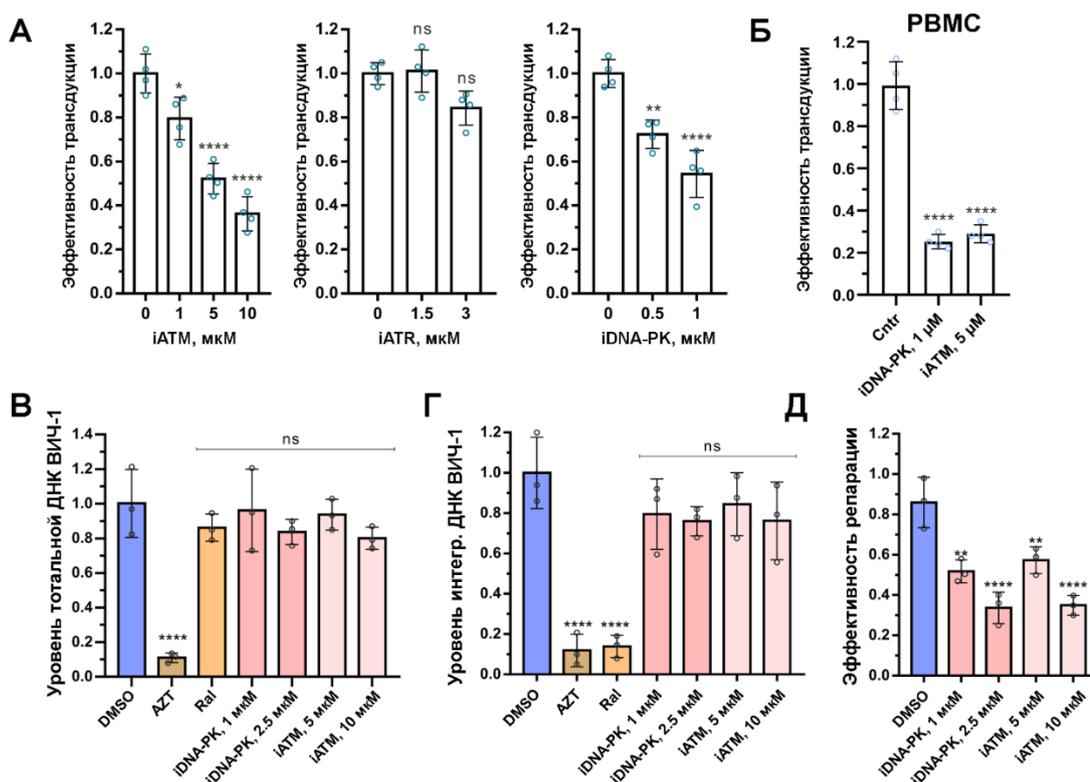


Рисунок 2. Активность АТМ и DNA-РКс необходима для постинтеграционной репарации ВИЧ-1. А – Эффективность трансдукции клеток HEK293T лентивирусным вектором ВИЧ_{wt} в присутствии возрастающей концентрации ингибитора Ku-55933 (iATM), AZ20 (iATR) и Nu7441 (iDNA-РК). Б – Эффективность трансдукции клеток РВМС лентивирусным вектором ВИЧ_{wt} в присутствии iATM или iDNA-РК. В-Д – эффект низкомолекулярных ингибиторов iDNA-РКс и iATM на эффективность обратной транскрипции (В), интеграции (Г) и постинтеграционную репарацию ВИЧ-1 (Д). На графиках представлено среднее ± стандартное отклонение четырех независимых экспериментов. Статистическая значимость отличий определялась однофакторным ANOVA с коррекцией на множественные сравнения по Даннету, ns — нет значимых отличий, * = adj. p-value < 0.05, ** = adj. p-value < 0.01, **** = adj. p-value < 0.0001.

1.2. Активация АТМ и DNA-РКс происходит параллельно с интеграцией вирусной кДНК и зависит от способности интегразы взаимодействовать с Ku70

С использованием разработанного нами метода оценки эффективности постинтеграционной репарации мы показали, что между появлением первых

интегрированных форм кДНК ВИЧ-1 и их репарированных форм проходит не меньше 7-8 часов, т.е. процесс постинтеграционной репарации, по всей видимости, является многостадийным и имеет сложную регуляцию.

Мы решили оценить с использованием метода ТОА («time of drug addition» или время добавления ингибитора), в какой момент времени между интеграцией и появлением репарированных форм провируса происходит активация исследуемых киназ. Мы проанализировали эффективность ранних стадий репликации ВИЧ-1 в присутствии iDNA-РК или iАТМ, при добавлении ингибитора через 1-24 часа после трансдукции. В качестве контрольных соединений использовали ингибитор обратной транскрипции азидотимидин (AZT) и ингибитор интеграции ралтегравир (Ral). В этих условиях iDNA-РКcs и iАТМ демонстрировали идентичные профили активности, совпадающие с профилем Ral, но не AZT (Рис. 3, А,Б). Следовательно, обе киназы активируются в ответ на интеграцию вирусной ДНК, в самом начале процесса постинтеграционной репарации.

Ранее нами было установлено, что псевдовиром, содержащий мутантную форму интегразы IN_E212/L213A, неспособную взаимодействовать с Ku70, в 5-7 раз хуже трансдуцирует различные клеточные линии и первичные мононуклеары РВМС, что объясняется нарушением инициации постинтеграционной репарации. При этом такой псевдовиром (ВИЧ_mut) становится нечувствительным к изменению внутриклеточной концентрации компонентов DNA-РК. Этот результат позволил нам предположить, что активация DNA-РК может зависеть от способности IN формировать комплекс с Ku70. Для проверки этого предположения клетки НЕК293Т трансдуцировали вектором ВИЧ_wt или ВИЧ_mut в присутствии ингибитора фосфорилирующей активности DNA-РК. В этих условиях iDNA-РК эффективно подавлял трансдукцию клеток вектором ВИЧ_wt, но не ВИЧ_mut (Рис. 3, В). По аналогии мы решили проверить, зависит ли активация АТМ от взаимодействия IN с Ku70 или для ее привлечения и активации требуются иные факторы. Как и в случае ингибитора DNA-РКcs, ингибитор АТМ практически не влиял на ВИЧ_mut при низких концентрациях, а при более высоких концентрациях его эффект был статистически меньше, чем для ВИЧ_wt (Рис. 3, Г). Таким образом, активация как DNA-РКcs, так и АТМ в ходе постинтеграционной репарации ВИЧ-1 зависит от образования комплекса IN/Ku70.

1.3. АТМ и DNA-РКcs функционируют последовательно в постинтеграционной репарации

Можно предположить две возможные модели активации DNA-РКcs и АТМ. Согласно первой модели «Параллельной активации» DNA-РКcs и АТМ активируются независимо друг от друга, но их активация зависит от интеграции и способности IN сформировать комплекс с Ku70, и дальнейшее развитие событий в конкретном сайте повреждения ДНК будет зависеть исключительно от той киназы, которая была привлечена к месту повреждения

(Рис. 4, А). Вторая модель «Последовательной активации» предполагает последовательную активацию обеих киназ, т.е. к месту повреждения привлекается первая киназа, она активируется и активирует вторую киназу, например, через ее фосфорилирование (Рис. 4, Б).

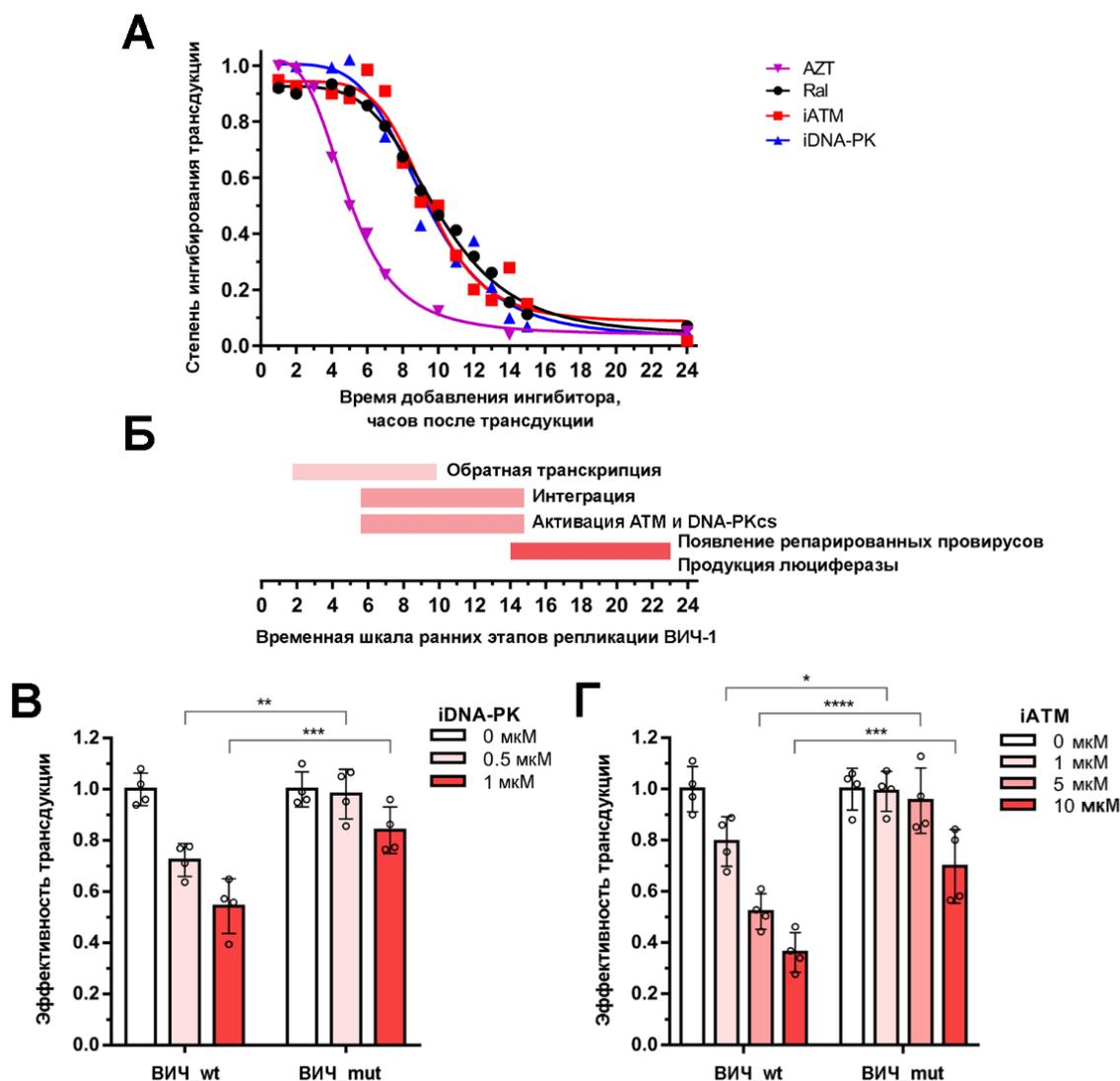


Рисунок 3. ATM и DNA-PKcs активируются синхронно с интеграцией вирусного генома, а их активация зависит от взаимодействия интегразы ВИЧ-1 и белка Ku70. А - Зависимость ингибирующего действия азидотимидина (10 мкМ), ралтегравира (10 мкМ), iDNA-PK (1 мкМ) и iATM (5 мкМ) на ВИЧ_wt от времени добавления после трансдукции клеток НЕК293Т. Б – временные рамки ранних событий репликации ВИЧ-1. В,Г – Влияние ингибитора iDNA-PK (Г) и iATM (Д) на эффективность трансдукции клеток НЕК293Т лентивирусными векторами ВИЧ_wt и ВИЧ_mut, содержащим IN_E212A/L213A, неспособную взаимодействовать с Ku70. На графиках представлено среднее \pm стандартное отклонение трех (А) или четырех (В, Г) независимых экспериментов. Статистическая значимость отличий определялась двухфакторным ANOVA с коррекцией на множественные сравнения по Сидаку, ns — нет значимых отличий, * = adj. p-value < 0.05, ** = adj. p-value < 0.01, *** = adj. p-value < 0.001, **** = adj. p-value < 0.0001.

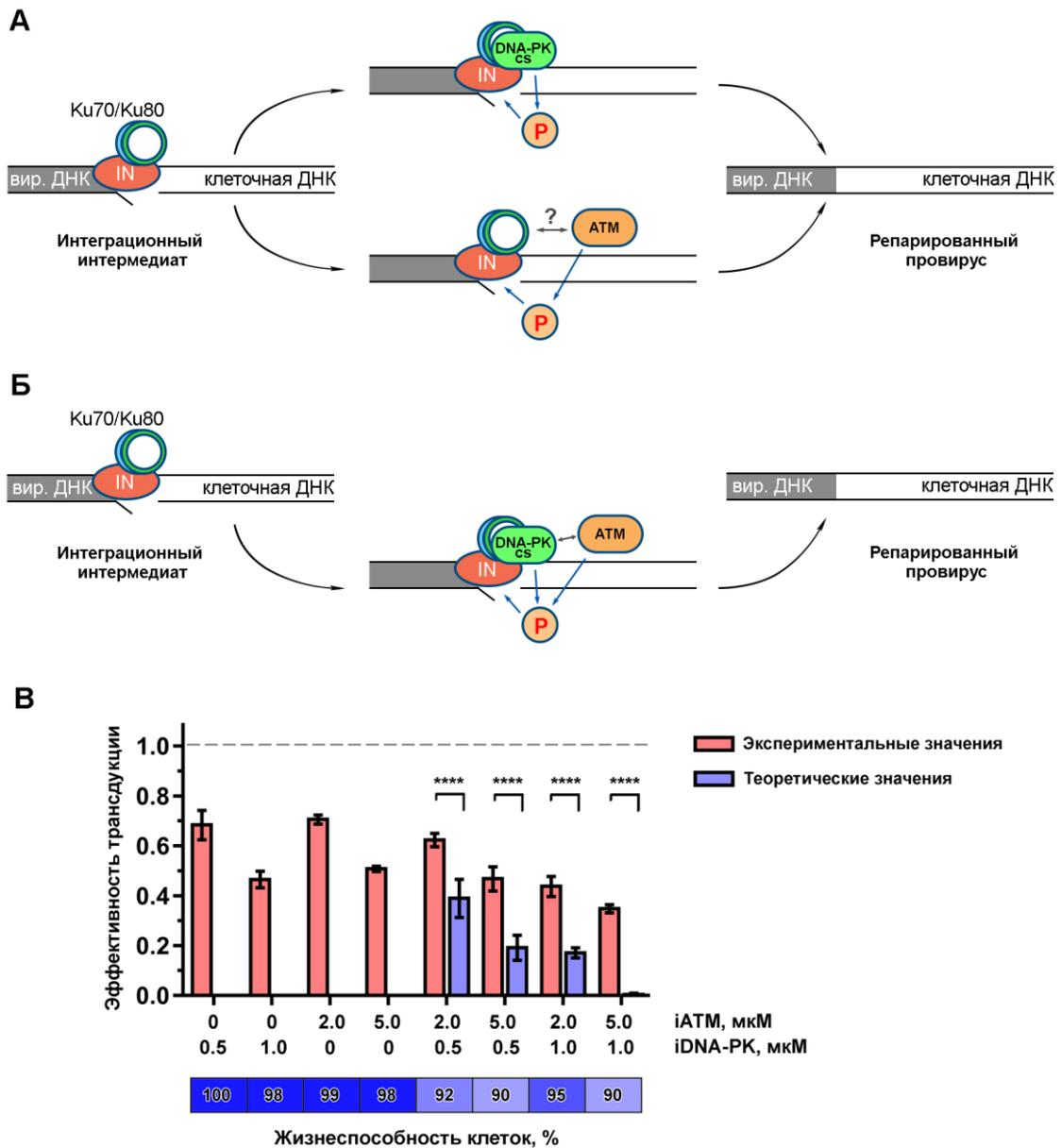


Рисунок 4. ATM и DNA-РКcs функционируют последовательно в постинтеграционной репарации. А – Модель параллельной активации киназ предполагает, что к конкретному сайту интеграции может быть привлечена ATM или DNA-РКcs, и тот фермент, который активировался, определяет дальнейшее развитие событий постинтеграционной репарации. Б – Модель последовательной активации предполагает, что для постинтеграционной репарации каждого конкретного повреждения требуется привлечение и активация обеих киназ. Поскольку DNA-РКcs может напрямую взаимодействовать с гетеродимером Ku, можно предположить, что первой к местам повреждений ДНК привлекается именно DNA-РКcs, а затем уже ATM. Обе модели активации киназ предполагают, что для их активации требуется взаимодействие IN с Ku70. В – Эффект iDNA-РК, iATM или их комбинаций на трансдукцию клеток НЕК293Т лентивирусным вектором ВИЧ_wt (верхняя панель), а также на жизнеспособность клеток (нижняя панель). Теоретические значения рассчитывали исходя из предположения верности модели «параллельной активации», т.е. ингибирующее действие комбинации соединений равно сумме ингибирующего действия каждого соединения, взятого по отдельности. На графиках представлено среднее \pm стандартное отклонение четырех независимых экспериментов. Статистическая значимость отличий определялась двухфакторным ANOVA с коррекцией на множественные сравнения по Сидуку, **** = adj. p -value < 0.0001.

Для того чтобы определить какая из моделей реализуется на практике мы изучили, как ингибирование каждой из киназ по отдельности или совместно влияет на ранние этапы репликации ВИЧ-1. Если верна первая модель, мы должны наблюдать аддитивность при совместном ингибировании обеих киназ, т.е. эффект будет равен сумме эффектов от ингибирования каждой из киназ. Если вторая – дополнительное ингибирование второй киназы не должно существенно влиять на эффективность репликации ВИЧ-1.

Клетки НЕК293Т трансдуцировали вектором ВИЧ_wt в присутствии iDNA-РК (0,5 или 1 мкМ), iАТМ (2 или 5 мкМ) или их комбинаций и измеряли активность люциферазы через 24 часа (Рис. 4, В). В этих условиях ни индивидуальные соединения, ни их комбинации не влияли на выживаемость клеток. Если предположить, что верна параллельная модель активации киназ, эффект от совместного ингибирования киназ должен быть равен сумме эффектов индивидуальных соединений. Исходя из этого предположения, мы на основе экспериментальных данных рассчитали теоретические значения ингибирования ВИЧ-1 комбинацией соединений. Сравнение экспериментальных эффектов при совместном ингибировании киназ с теоретическими демонстрирует отсутствие аддитивности (Рис. 4, В), следовательно, модель параллельной активации киназ отвергается, а верной является модель последовательной активации киназ.

Таким образом, обе киназы АТМ и DNA-РКcs принимают участие в одном и том же пути постинтеграционной репарации ВИЧ-1. Для корректного протекания этого процесса в каждом сайте интеграции необходима активация как киназы DNA-РКcs, так и АТМ. Исходя из того факта, что DNA-РКcs, но не АТМ может напрямую взаимодействовать с гетеродимером Ku70/Ku80, можно предположить, что именно DNA-РКcs первой привлекается к местам повреждений ДНК, активируется и уже затем в этот процесс вовлекается АТМ.

1.4. DNA-РКcs, АТМ и их мишени Chk2, H2AX фосфорилируются в ходе постинтеграционной репарации ВИЧ-1

Активация киназ DNA-РКcs и АТМ в ходе репарации двуцепочечных разрывов ДНК сопряжена с фосфорилированием широкого спектра субстратов этих ферментов по общему для РИКК-семейства сайту SQ/TQ (A. Blackford *et al.*, 2017). Поскольку эти две киназы обычно активируются при появлении двуцепочечных разрывов ДНК, а в продукте интеграции кДНК ВИЧ-1 такие разрывы отсутствуют, можно предположить, что дальнейший спектр клеточных реакций на интеграцию вирусной кДНК может отличаться от реакций клетки на двуцепочечные разрывы ДНК.

В настоящем исследовании мы оценили, фосфорилируются ли стандартные мишени клеточного ответа на двуцепочечные разрывы ДНК, инициируемого протеинкиназами АТМ и DNA-РК, в ходе постинтеграционной репарации ВИЧ-1. В качестве таких мишеней далее мы

рассматривали сами ферменты DNA-PKcs и ATM, т.к. они автофосфорилируются в ходе активации, а также их мишени Chk2, p53 и репаративный гистон H2AX. Помимо них, мы дополнительно решили проанализировать статус фосфорилирования ATR, которая также как и две другие киназы автофосфорилируется при активации, и ее мишень Chk1 в качестве негативного контроля, поскольку киназа ATR не участвует в репликации ВИЧ-1, и, следовательно, она не должна активироваться в ходе постинтеграционной репарации.

Клетки HEK293T трансдуцировали VSV-G псевдотипированным репликативно-некомпетентным лентивирусным вектором на основе генома ВИЧ-1 с природным вариантом интегразы ВИЧ_wt, и через 12 ч в белковых лизатах оценивали методом вестерн-блоттинга статус фосфорилирования Ser2056 в составе DNA-PKcs, Ser1981 – в составе ATM, Thr68 – в Chk2, Ser139 – в H2AX и Ser15 – в p53, а также Ser428 – в ATR, и Ser345 – в Chk1. В качестве контрольного образца использовались нетрансдуцированные клетки (Рис. 5). Анализ фосфорилированных форм проводили через 12 ч после трансдукции клеток. В образцах, обработанных вектором ВИЧ_wt, мы обнаружили фосфорилированные формы белков pSer2056-DNA-PKcs, pSer1981-ATM, pThr68-Chk2, pSer139-H2AX (γ H2AX), а также pSer15-p53, причем их количества существенно превышали фоновые значения в контрольных образцах (Рис. 5). В этих условиях, как и ожидалось, ни ATR, ни его мишень Chk1 практически не фосфорилировались.

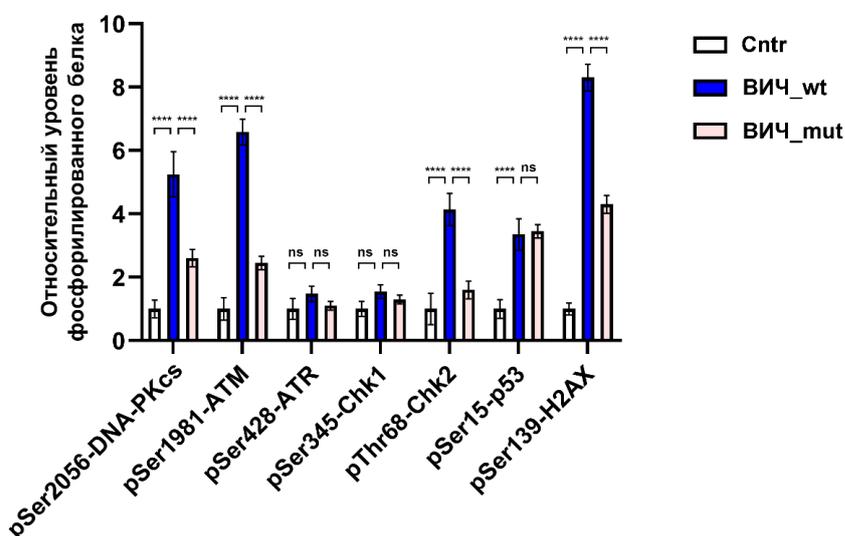


Рисунок 5. Анализ уровня фосфорилирования белков DNA-PKcs, ATM, ATR, Chk1, Chk2, p53 и H2AX в клетках, трансдуцированных лентивирусными векторами ВИЧ_wt, ВИЧ_mut, или нетрансдуцированном контроле, через 12 ч после трансдукции. На графике представлены уровни фосфорилированной формы белка в клетках, трансдуцированных ВИЧ_wt или ВИЧ_mut, относительно нетрансдуцированного образца. На графике представлено среднее \pm стандартное отклонение трех независимых повторностей. Статистическая значимость изменений в уровне фосфорилированного белка оценивалась с помощью двухфакторного ANOVA с поправкой на множественные сравнения по Тьюки. ns – статистические отличия отсутствуют, **** - p-value < 0.0001.

Изменение статуса фосфорилирования указанных белков может быть вызвано как процессом постинтеграционной репарации, в ходе которого активируются DNA-РК и АТМ, так и другими этапами жизненного цикла или неспецифическими реакциями клетки на попадание чужеродных молекул из вириона. Для того чтобы понять, действительно ли модификации белков происходят в ходе постинтеграционной репарации, мы дополнительно оценили поведение этих мишеней при обработке клеток лентивирусным вектором ВИЧ_mut, неспособным корректно инициировать постинтеграционную репарацию ВИЧ-1. В этом случае практически все мишени, за исключением p53, фосфорилировались слабее (Рис. 5).

С использованием серии дополнительных к ВИЧ_wt и ВИЧ_mut векторов – ВИЧ_E152A с каталитически-неактивной интегразой, содержащей мутацию E152A, и ВИЧ_F185A с мутантным вариантом IN_F185A, для которого показано нарушение синтеза кДНК – мы установили, что фосфорилирование H2AX происходит эффективно только в случае ВИЧ_wt, в то время как p53 фосфорилируется в случае всех векторов, кроме ВИЧ_F185A (Рис. 6). Иными словами, если фосфорилирование H2AX происходит в результате запуска процесса постинтеграционной репарации, то фосфорилирование p53 происходит в ответ на появление двуцепочечной кДНК ВИЧ-1 в клетке, при этом неважно, интегрируется она или нет.

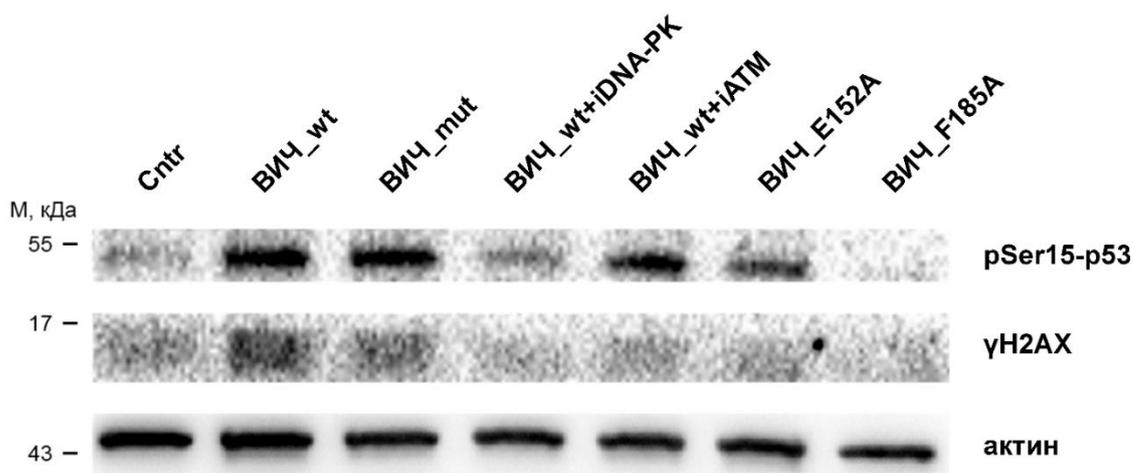


Рисунок 6. Вестерн-блот-анализ фосфорилированных форм p53 (pSer15) и H2AX (pSer139) в клетках, трансдуцированных векторами ВИЧ_wt, ВИЧ_mut, ВИЧ_E152A и ВИЧ_F185A. Образцы ВИЧ_wt + iDNA-РК и ВИЧ_wt + iАТМ после трансдукции клеток вектором ВИЧ_wt дополнительно обрабатывали ингибитором DNA-РКcs - Nu7441 (2 мкМ), или ингибитором АТМ - Ku55933 (5 мкМ).

В случае H2AX его фосфорилирование на этапе постинтеграционной репарации происходит по АТМ- и DNA-РКcs-зависимому пути (Рис. 6), при этом γH2AX образует локусы в ядрах трансдуцированных клеток, как и в случае репарации двуцепочечных разрывов ДНК.

Основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод о том, что, хотя интеграции кДНК ВИЧ-1 не приводит к появлению двуцепочечных

разрывов в клеточной ДНК, процесс постинтеграционной репарации, по крайней мере на начальной стадии, очень похож на процесс репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Например, в постинтеграционной репарации участвуют те же РИКК-киназы, АТМ и DNA-РК, что и в процессах NHEJ и HR-репарации, они инициируют процесс постинтеграционной репарации путем автофосфорилирования и фосфорилирования своих мишеней – белков Chk2 и H2AX, как и в случае NHEJ и HR (Рис. 7). Однако у этих процессов есть и серьезные отличия.

Если к двуцепочечным разрывам в ДНК DNA-РКcs или АТМ привлекаются и активируются за счет связывания, гетеродимера Ku70/Ku80 или MRN-комплекса, соответственно, с концами ДНК в месте разрыва, то в случае постинтеграционной репарации ВИЧ-1 активация обеих киназ зависит от образования комплекса вирусной IN и клеточного белка Ku70 в местах встраивания вирусной кДНК (Рис. 7). Кроме того, в ходе репарации двуцепочечных разрывов происходит фосфорилирование p53, а в ходе постинтеграционной репарации – нет. Хотя pSer15-p53 и накапливается в трансдуцированных клетках, это происходит в ответ на накопление линейной кДНК ВИЧ-1, причем в образовании этой фосфорилированной формы p53 участвует только DNA-РК, но не АТМ, поскольку количество фосфорилированной формы p53 уменьшается при использовании ингибитора DNA-РК, но не АТМ (Рис. 6).

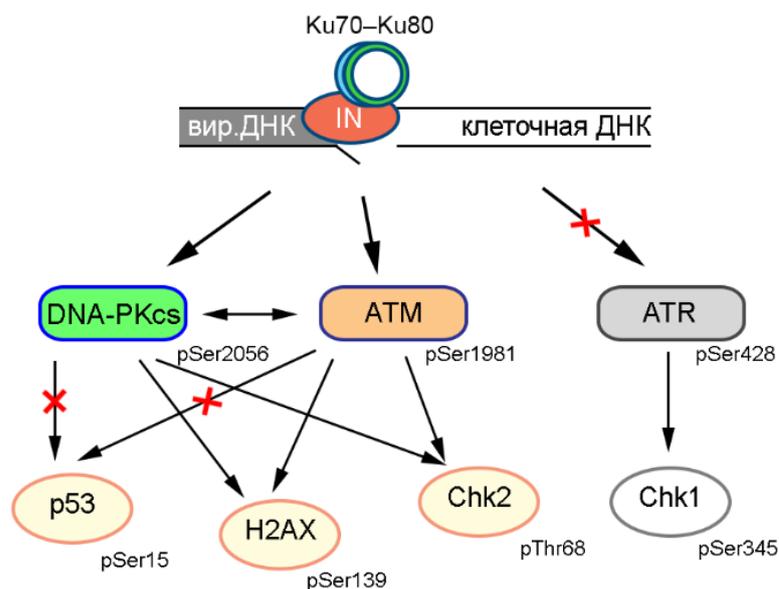


Рисунок 7. Постинтеграционная репарации ВИЧ-1 приводит к активации DNA-РКcs и АТМ, но не АТР, и фосфорилированию их мишеней. Интеграза ВИЧ-1, расположенная в местах встраивания генома ВИЧ-1 и, соответственно, маркирующая повреждения ДНК, привлекает гетеродимерный комплекс Ku70/Ku80. Взаимодействие между IN и Ku70 является строго необходимым для активации DNA-РК и АТМ в местах повреждений ДНК, вызванных интеграцией ВИЧ-1. DNA-РК и АТМ автофосфорилируются по pSer2056 и pSer1981. Активированные киназы фосфорилируют мишени H2AX и Chk2, но не p53. АТР в постинтеграционной репарации не участвует и не активируется.

2. Другие потенциальные участники постинтеграционной репарации ВИЧ-1

Очевидно, что DNA-ПКcs и АТМ являются лишь инициаторами процесса постинтеграционной репарации ВИЧ-1. За счет своей фосфорилирующей активности они могут модифицировать микроокружение сайтов повреждений ДНК, способствуя привлечению факторов репарации, а также модулировать активность ферментов из этих систем. Однако дальнейшие участники постинтеграционной репарации оставались неизвестными. Можно было предположить, что и дальнейшие события постинтеграционной репарации полностью совпадают с этапами репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Как отмечалось выше, по крайней мере, изменение статуса фосфорилирования двух главных мишеней этих киназ H2AX и Chk2 в ходе постинтеграционной репарации ВИЧ-1 напоминает события, происходящие при репарации двуцепочечных разрывов ДНК.

Однако ключевой фермент, завершающий процесс репарации двуцепочечных разрывов ДНК по NHEJ-пути, лигаза IV, будет неспособен распознать и восстановить повреждения, возникающие в ходе интеграции ВИЧ-1, т.к. он лигирует именно двуцепочечные разрывы ДНК, а они отсутствуют в интеграционном интермедиате (Рис. 1). Таким образом, вопрос о дальнейших участниках этого процесса остается открытым.

Для ответа на него мы использовали два метода: 1) метод ко-иммунопреципитации сшитых комплексов с последующей идентификацией белков с помощью масс-спектрометрии (XL-MS) для идентификации белков, взаимодействующих с IN при ее суперэкспрессии в клетках; 2) метод иммунопреципитации хроматина с последующей идентификацией белков методом масс-спектрометрии (ChIP-MS) для определения клеточных белков, привлекаемых к сайтам вирусной интеграции.

2.1. Идентификация клеточных белков, взаимодействующих с суперэкспрессированной интегразой ВИЧ-1 в клетках HEK293T

Поскольку инициация постинтеграционной репарации напрямую зависит от вирусной IN и ее способности взаимодействовать с клеточным белком Ku70, мы решили проанализировать, с какими еще клеточными белками она может формировать комплексы, которые могли бы быть вовлечены в регуляцию этого процесса. Для анализа клеточных партнеров IN нами был выбран метод ко-иммунопреципитации клеточных белков с суперэкспрессированной HA-тагированной IN из клеток HEK293T. Поскольку ряд партнеров может формировать слабые транзистентные комплексы и их идентификация по этой причине становится невозможной, мы решили использовать модифицированную версию ко-иммунопреципитации – протокол XL-MS, предполагающий предварительную сшивку комплексов формальдегидом внутри клеток, экспрессирующих IN, перед их лизисом и последующим проведением ко-иммунопреципитации.

В результате проведенного анализа находок мы идентифицировали 88 белков, которые встречались хотя бы в двух из трех технических повторностей экспериментальных образцов и отсутствовали в контрольных образцах. После фильтрации рибосомных белков и элементов цитоскелета, которые являются основными контаминирующими находками в такого рода экспериментах, нами было идентифицировано 26 уникальных находок. Среди них – четыре белка, для которых ранее описано взаимодействие с IN ВИЧ-1 и их эффект на вирусную репликацию, что подтверждает корректность предложенного нами метода анализа: транскрипционный коактиватор LEDGF/p75, стабилизирующий активное тетрамерное состояние IN и направляющий интеграцию генома ВИЧ-1 в активно-транскрибируемые участки генома (*F. Christ, Z. Debyser, 2013*), E3 убиквитин-лигаза HUWE1, негативно влияющая на ранние этапы репликации ВИЧ-1 по неустановленному механизму (*S. Yamamoto et al., 2011*), кариоферин KPNB1, участвующий в импорте прединтеграционных комплексов в ядро (*A. Hearps, D. Jans, 2001*), и белок KAP1, также известный как TRIM28, который негативно влияет на ранние этапы репликации ВИЧ-1 за счет снижения уровня ацетилирования IN (*A. Allouch et al., 2011*).

Среди впервые идентифицированных белков, взаимодействующих с IN, можно выделить две группы. Первая группа включает клеточные белки, для которых ранее не было показано взаимодействие с IN, но которые влияют на репликацию ВИЧ-1. К ним относятся белки: PARP1 - эффект на ВИЧ-1 неоднозначный, DNAJA1 – позитивный фактор репликации ВИЧ-1, механизм не установлен, CFL1 – положительный эффект на репликацию ВИЧ-1 в Т-лимфоцитах, WDR82 – негативный фактор репликации ВИЧ-1, влияет на Tat-зависимую транскрипцию и HSPD1 (HSP60) – включается в вирионы ВИЧ-1 (обзор *A. Rozina et al, 2022*). Вторая группа включает белки, для которых ранее не была описана взаимосвязь с ВИЧ-инфекцией. К ним относятся: ANCY, CACYBP, DNAJA2, RBBP4, RBBP7, SDF2L1, YWHAZ, UBR5, IPO5, SFN, а также 7 белков из семейства гетерогенных ядерных нуклеопротеинов (hnRNP). С точки зрения постинтеграционной репарации наибольший интерес представляет участвующий в разных системах клеточной репарации PARP1, его значение для этого процесса будет обсуждаться ниже.

2.2. Идентификация клеточных белков, ассоциированных с комплексами IN-LTR

В рамках второго направления нами разработан метод для идентификации белков, привлекаемых к комплексам IN-LTR (Рис. 8), включая факторы, привлекаемые к сайтам интеграции вирусной кДНК. Для этого нами получены, очищены и охарактеризованы антитела к IN ВИЧ-1, а также продемонстрирована их принципиальная применимость для проведения ChIP-MS-экспериментов. С использованием этих антител мы показали, что IN ВИЧ-1 остается связанной с LTR-повторами кДНК ВИЧ-1 вплоть до 14 часа после трансдукции, а затем ее количество постепенно снижается (Рис. 9).

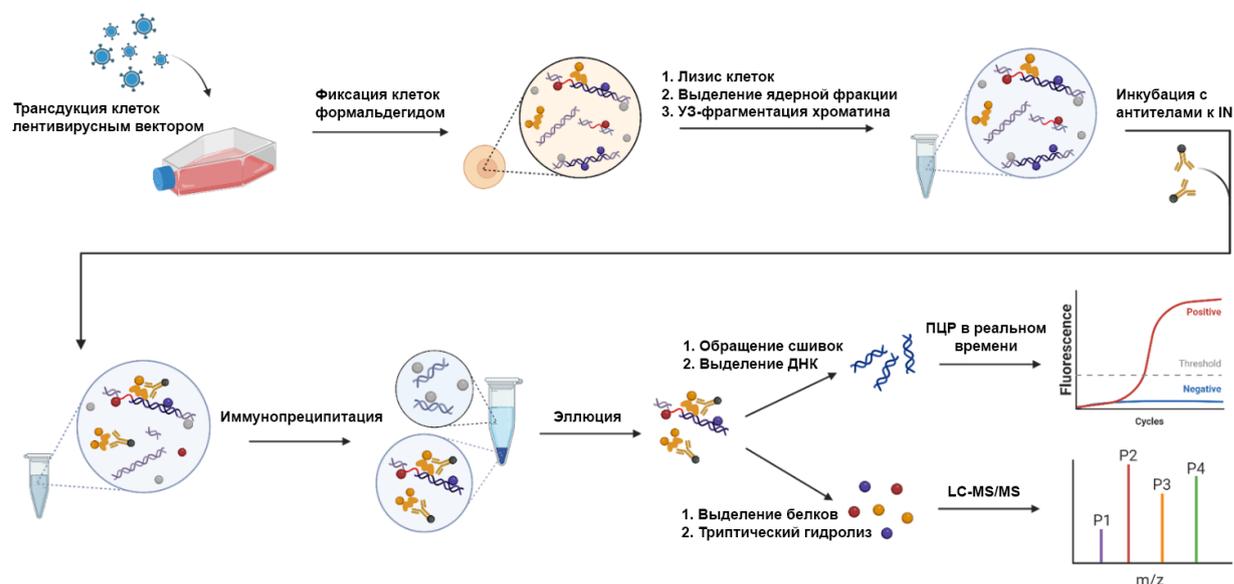


Рисунок 8. Схема ChIP-MS эксперимента. Клетки HEK293T трансдуцируют лентивирусным вектором ВИЧ_wt и на этапе постинтеграционной репарации фиксируются формальдегидом, выделяют ядерную фракцию, фрагментируют хроматин ультразвуком до 1000 пар оснований. Полученные лизаты инкубируют с антителами к IN, а затем выделяют комплексы антител и хроматина, содержащего IN, на смоле с иммобилизованным белком G. После элюции иммунных комплексов со смолы оценивают степень обогащения LTR-фрагментов кДНК ВИЧ-1 методом ПЦР в реальном времени и проводят идентификацию клеточных белков, ассоциированных с комплексами IN-LTR, методом LC-MS.

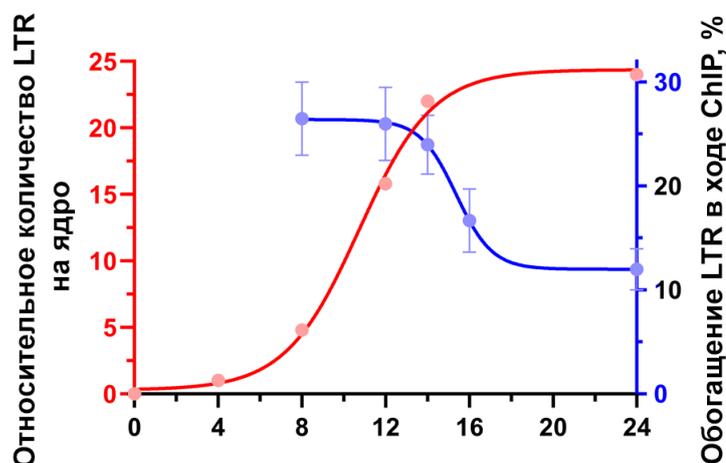


Рисунок 9. Анализ изменения содержания LTR-фрагментов ВИЧ-1 в ядерной фракции лизатов клеток, трансдуцированных вектором ВИЧ_wt (красная кривая, левая ось) и количества LTR-фрагментов, выделяемых при ChIP с использованием антител к IN (синяя кривая, правая ось).

С использованием этого подхода нами идентифицировано около 1000 белков, ассоциированных с комплексами IN-LTR. Среди них мы обнаружили ранее описанные классические компоненты прединтеграционного комплекса: LEDGF/p75 (обнаружен и в ходе XL-MS эксперимента) и CPSF6, которые направляют интеграцию в активно-транскрибируемые участки генома, BAF,

HMG I(Y), TRIM28 (также обнаружен нами в ходе XL-MS-эксперимента), VBP1 и SNF5 (INI1). Эти результаты свидетельствуют о корректности предлагаемого в работе подхода для выявления новых клеточных белков-участников постинтеграционной репарации ВИЧ-1.

Среди идентифицированных белков наибольшее число относилось к факторам метаболизма РНК. Сложно предположить, что эти факторы важны для репликации ВИЧ-1, но их обогащение еще раз подчеркивает работоспособность примененного метода, т.к. их совыделение с IN может происходить в силу направления интеграции в области активной транскрипции (*R. Craigie, F. Bushman, 2012*).

Далее мы сконцентрировали наше внимание на факторах репарации повреждений ДНК. Всего было идентифицировано 53 таких белка (Рис. 10). Среди них нам удалось обнаружить Ku70, Ku80 и DNA-РКcs, т.е. компоненты DNA-РК комплекса, который привлекается к местам встраивания вирусной ДНК за счет взаимодействия IN с Ku70 и инициирует постинтеграционную репарацию. Это подтверждает наши исходные предположения о применимости ChIP-MS метода для идентификации клеточных белков, участвующих в регуляции постинтеграционной репарации ВИЧ-1.

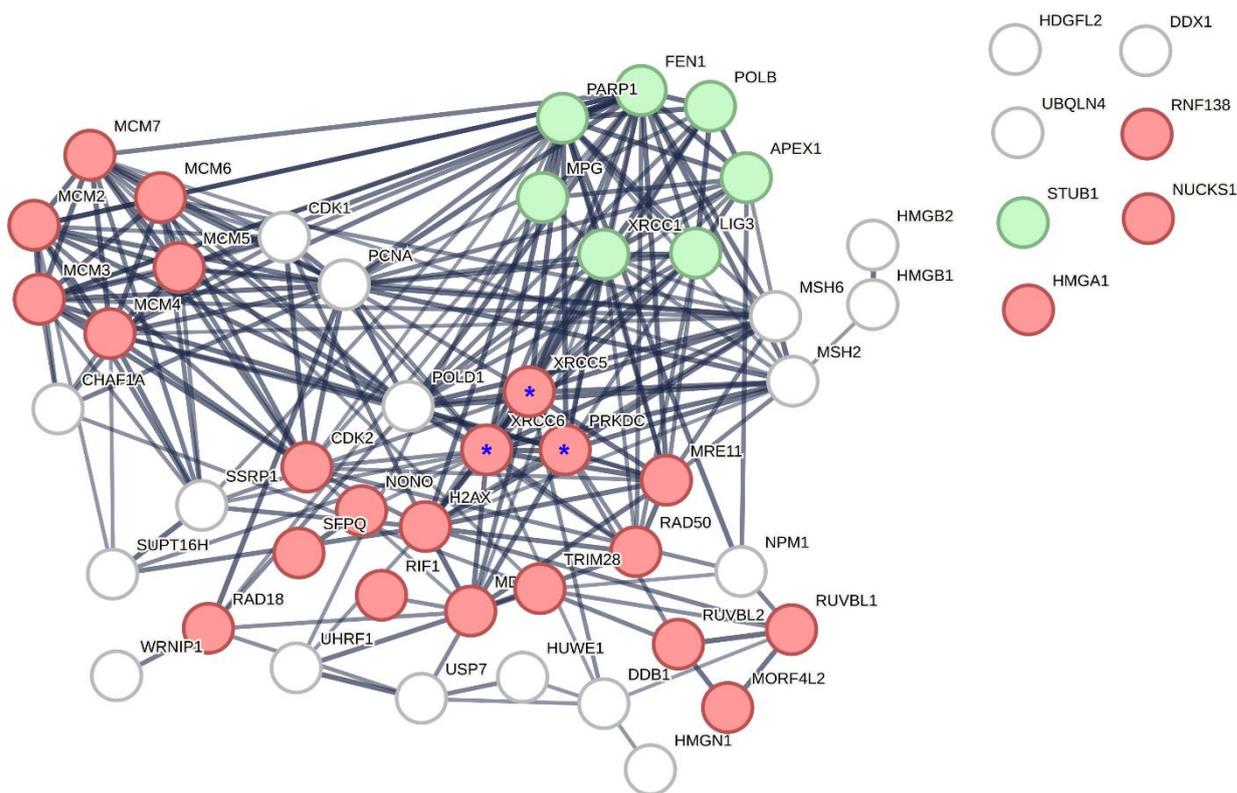


Рисунок 10. Факторы репарации, взаимодействующие с комплексами IN-LTR. Участники путей репарации двуцепочечных разрывов ДНК отмечены красным, эксцизионной репарации оснований – зеленым. Звездочками отмечены белки, необходимые для инициации постинтеграционной репарации ВИЧ-1: Ku70 (XRCC5), Ku80 (XRCC6) и DNA-РКcs (PRKDC).

Среди обнаруженных нами белков наибольшее число участвует в репарации двуцепочечных разрывов ДНК по NHEJ или HR-путям, а также в эксцизионной репарации оснований (BER). Среди факторов репарации двуцепочечных разрывов ДНК мы идентифицировали только те белки, которые инициируют процесс репарации таких повреждений: Ku70, Ku80, DNA-PKcs, Mre11, Rad50, а также широкий спектр регуляторных белков, например, HMG1, MDC1, Rif1, SFPQ, NONO, Rad18, RNF138 и UHRF1. Среди находок отсутствуют белки, необходимые для завершения процесса репарации двуцепочечных разрывов ДНК, например, LigIV, XRCC4, XLF, Artemis, Rad51, ДНК полимеразы λ , μ , η . В случае находок, относящихся к BER-пути, наоборот, мы обнаружили, в основном, белки, необходимые для корректного протекания этого процесса и его завершения: APEX1, Fen1, полимеразы β , лигаза III и ее кофактор XRCC1, а также регуляторный белок PARP1.

Широкая представленность факторов репарации двуцепочечных разрывов ДНК может объясняться присутствием линейной неинтегрированной кДНК в ядрах клеток, однако ее концы защищены белками прединтеграционного комплекса. Экспериментальная проверка с использованием вектора с неактивной интегразой (ВИЧ_E152A) показала, что большинство белков значительно хуже преципитируются с комплексами IN-LTR в отсутствие интеграции. Исключение составляют белки MCM3, H2AX, XRCC1, DDB1, DDX1, HMG1, MSH2 и UBP7. Таким образом, практически все идентифицированные белки из систем репарации повреждений ДНК специфично привлекаются к комплексам IN-LTR только в случае успешной интеграции вирусной кДНК.

2.3. Гипотеза о совместном участии факторов репарации двуцепочечных разрывов ДНК и компонентов BER-пути

Общепризнанная структура интеграционного интермедиата представлена на рисунке 1. Он, во многом, похож на промежуточный продукт BER-пути, поэтому можно легко предположить участие ферментов из этого пути в постинтеграционной репарации ВИЧ-1. Действительно, такие идеи высказывались, и даже существует ряд работ, в которых изучали как некоторые ферменты из этого пути влияют на репликацию ВИЧ-1, например, Fen1 и полимеразы β (обзор *A. Anisenko. M. Gottikh, 2019*). Хотя в этих работах и была продемонстрирована важность этих белков для репликации ВИЧ-1, конкретный этап жизненного цикла вируса, на котором они функционируют, так и не был определен.

С другой стороны, в ряде работ была продемонстрирована связь успешной репликации вируса с факторами репарации двуцепочечных разрывов ДНК, таких как DNA-PKcs и ATM (*R. Daniel et al., 2001*), а в нашей работе показано их прямое участие в инициации постинтеграционной репарации. Тот факт, что к местам интеграции привлекаются как белки из систем репарации двуцепочечных разрывов ДНК, так и белки из BER-пути

может указывать на их взаимодополняющее действие в постинтеграционной репарации ВИЧ-1, но с разными функциями. Поскольку среди факторов репарации двуцепочечных разрывов ДНК, привлекаемых к IN-LTR-комплексам, представлены лишь инициаторные и регуляторные белки, а среди компонентов BER-пути – в основном ферменты, завершающие этот путь, можно предположить, что первые факторы участвуют лишь на начальных этапах постинтеграционной репарации ВИЧ-1, а вторые – завершают этот процесс. В этой модели остается непонятным, почему компоненты BER-пути не могут напрямую привлекаться к интеграционному интермедиату, хотя они, как раз, и имеют сродство к подобным повреждениям ДНК.

Анализ доступных структур продуктов интеграции синтетических ДНК-субстратов, имитирующих концы кДНК ВИЧ-1, в синтетическую ДНК-мишень для интеграз родственных ВИЧ-1 ретровирусов, а именно, прототипного пенообразующего вируса (PFV) или вируса саркомы Рауса (RSV), позволил показать, что интеграционный интермедиат сразу после интеграции остается в комплексе с IN (Рис. 11), что мешает ему перейти в ту классическую топологию, представленную на рисунке 1. Следовательно, интеграционный интермедиат просто не может быть напрямую распознан и репарирован ферментами BER-пути, как и компонентами путей репарации других повреждений ДНК, т.к. повреждение стабилизировано и маскировано IN.

Известно, что активация DNA-РКс и АТМ при возникновении двуцепочечных разрывов ДНК приводит к существенным перестройкам хроматина вблизи мест повреждений, что облегчает доступ факторов репарации к концам ДНК (*H. Lu et al., 2019; N. Berger et al., 2017*). Основную роль в этом процессе играет именно фосфорилирующая активность двух киназ, благодаря которой происходит фосфорилирование гистона H2AX и фактора ремоделирования хроматина TRIM28. При этом фосфорилированная форма H2AX служит для привлечения широкого спектра факторов ремоделирования хроматина (*A. Kinner et al., 2008*). Например, среди идентифицированных нами белков присутствует ряд факторов репарации, которые влияют на структуру хроматина (PARP1, HMGN1, компоненты FACT- и NuA4-комплекса).

Следовательно, можно предложить следующую модель постинтеграционной репарации: сразу после встраивания вирусной кДНК образуется уникальная структура, стабилизированная IN и/или гистонами, которая не похожа ни на двуцепочечные разрывы ДНК, ни на продукт BER-пути. Для её распознавания вирус через взаимодействие интегразы с Ku70 привлекает киназы АТМ и DNA-РК, которые модифицируют микроокружение и запускают деконденсацию хроматина. Это преобразует структуру в классический субстрат для BER-пути, завершающего репарацию.

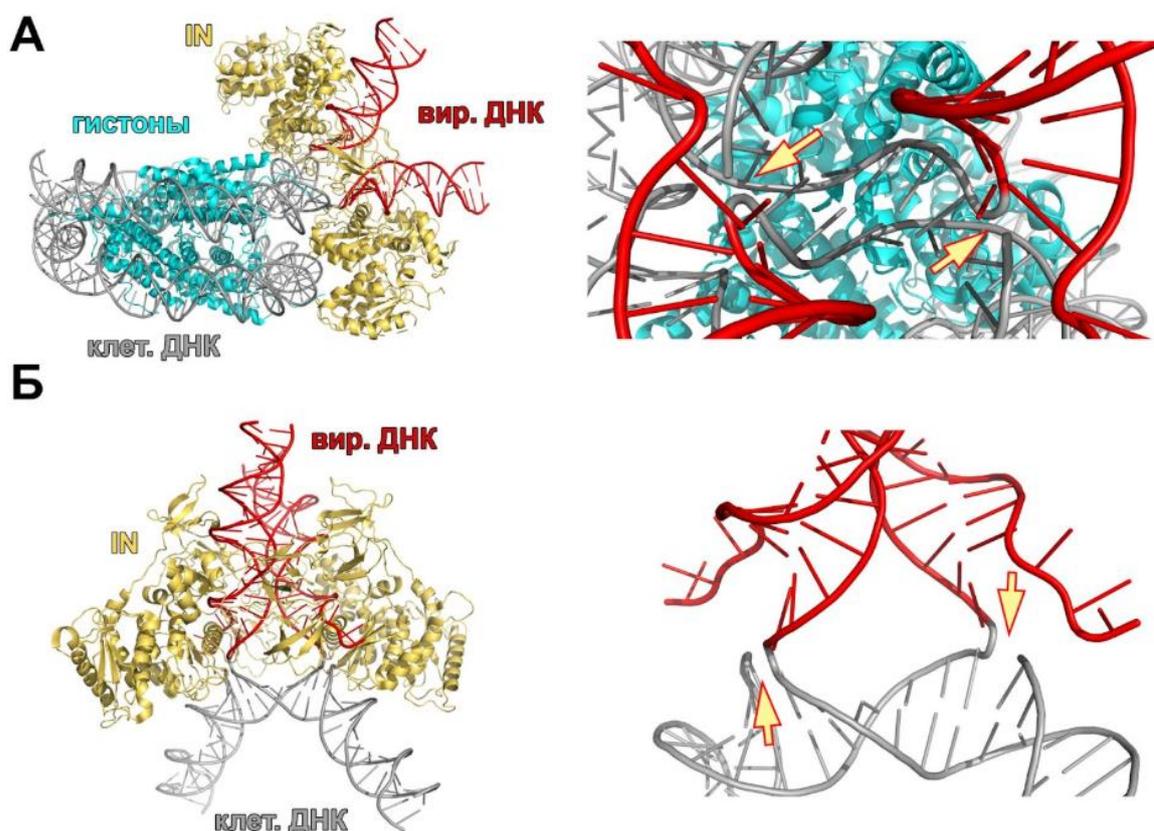


Рисунок 11. Структуры интеграционных интермедиатов ретровирусов. А – продукт интеграции синтетического субстрата, имитирующего концы вирусной ДНК (отмечен красным), в клеточную ДНК (отмечена серым) в составе нуклеосомы интегразой прототипного пенообразующего вируса (PDB ID: 6RNY). Слева приведен общий вид комплекса, справа – фрагмент комплекса, демонстрирующий наличие разрывов в клеточной ДНК (отмечены желтыми стрелками), при общем сохранении участков взаимодействия между двумя цепями клеточной ДНК. Б – продукт интеграции синтетических субстратов, имитирующих концы вирусной ДНК, в свободную от гистонов клеточную ДНК интегразой вируса саркомы Рауса (PDB ID: 8E14). Общий вид комплекса представлен на левом рисунке, а его фрагмент с разрывами цепей клеточной ДНК – справа (интеграза из состава комплекса при этом удалена).

2.4. Значение белков PARP1/2 и Fen1 из системы эксцизионной репарации оснований для постинтеграционной репарации ВИЧ-1

В свете высказанного предположения о совместном участии компонентов систем репарации двуцепочечных разрывов ДНК и эксцизионной репарации оснований, мы решили экспериментально проверить вовлеченность компонентов BER-пути в постинтеграционную репарацию ВИЧ-1. В качестве исследуемых белков были выбраны PARP1 и Fen1, которые привлекаются к местам интеграции, а PARP1 еще и соосаждается с IN.

Мы установили, что олапариб – ингибитор парилирующей активности PARP1 и PARP2, негативно влияет на ранние этапы репликации ВИЧ-1, действуя на этапе постинтеграционной репарации (Рис. 12). Интересно, что

псевдовиром ВИЧ_mut, содержащий IN_E212/L213A, неспособную взаимодействовать с Ku70 был менее чувствителен к олапарибу (Рис. 12).

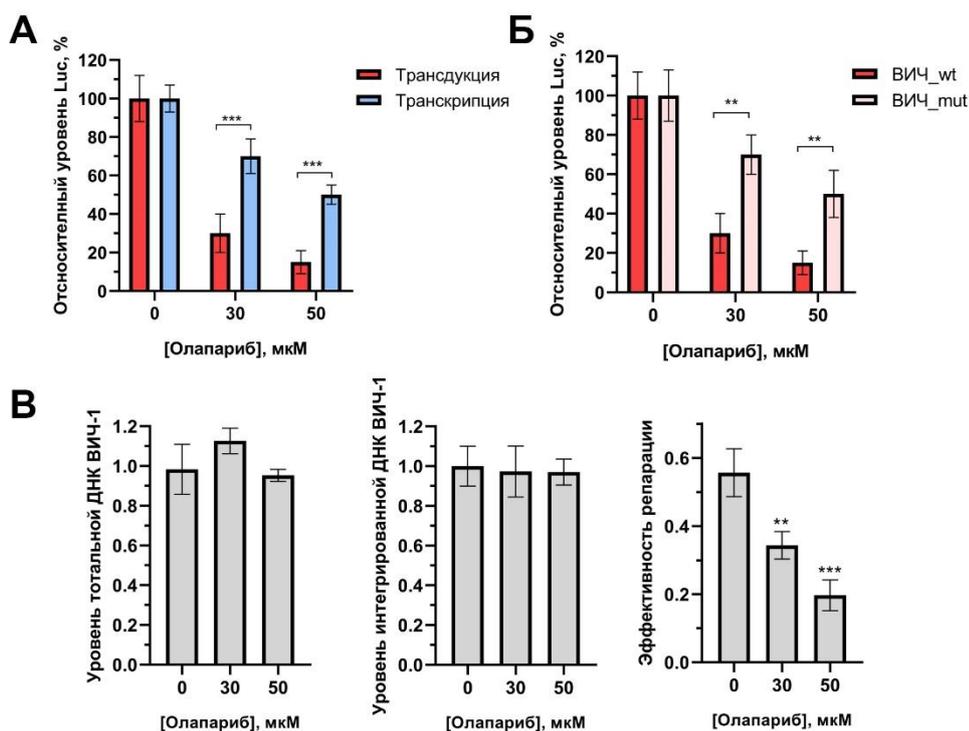


Рисунок 12. Парилирующая активность белков семейства PARP важна для постинтеграционной репарации ВИЧ-1. А – ингибитор парилирующей активности PARP1 и PARP2 снижает эффективность трансдукции клеток НЕК293Т псевдовиром на основе генома ВИЧ-1 и в меньшей степени влияет на эффективность транскрипции гена люциферазы светлячка на модели стабильно интегрированного псевдовиром. Б – влияние олапариба на трансдукцию клеток НЕК293Т псевдовиром ВИЧ_wt или ВИЧ_mut, неспособным эффективно инициировать постинтеграционную репарацию. В – эффект олапариба на эффективность ранних этапов репликации, включая обратную транскрипцию (левый график), интеграцию (центральный график) или постинтеграционной репарации (правый график). На графиках представлено среднее \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Статистическая значимость отличий определялась двухфакторным ANOVA с коррекцией на множественные сравнения по Сидаку (А, Б) или однофакторным ANOVA с поправкой на множественные сравнения по Даннету (В), ** = adj. p-value < 0.01, *** = adj. p-value < 0.001.

Для оценки участия Fen1, который удаляет 5'-выступающие концы ДНК при репарации однонитевых повреждений ДНК, на базе клеток НЕК293Т была получена клеточная линия с нокдауном мРНК Fen1. С ее помощью нам удалось показать, что Fen1 важен для постинтеграционной репарации ВИЧ-1 (Рис. 13).

Таким образом, проведенные нами эксперименты подтверждают нашу гипотезу о совместном действии факторов репарации двуцепочечных разрывов ДНК и факторов репарации однонитевых повреждений ДНК в процессе постинтеграционной репарации ВИЧ-1.

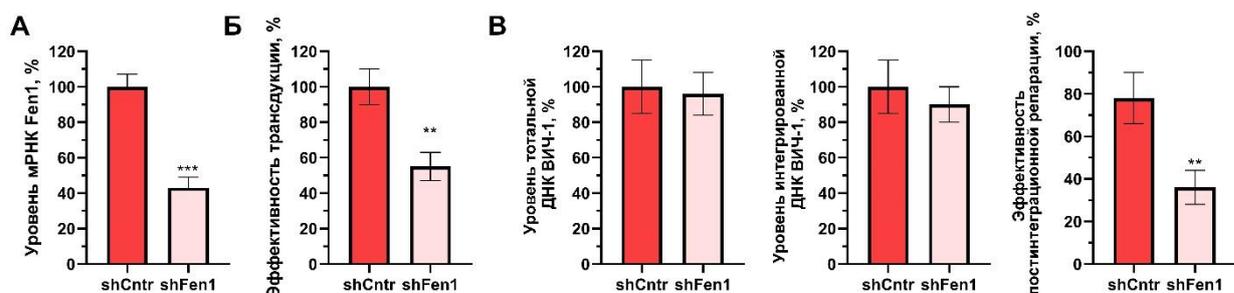


Рисунок 13. Флэп-эндонуклеаза Fen1 участвует в постинтеграционной репарации ВИЧ-1. А – уровень экспрессии мРНК гена Fen1 в клетках НЕК293Т, экспрессирующих малую шпилечную РНК к Fen1 (shFen) по сравнению с контрольной клеточной линией (shCntr). Б – оценка эффективности трансдукции клеток shFen1 по сравнению с shCntr псевдовиром ВИЧ_wt. В – эффект нокдауна Fen1 на эффективность ранних этапов репликации, включая обратную транскрипцию (левый график), интеграцию (центральный график) или постинтеграционную репарацию (правый график). На графиках представлено среднее \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Статистическая значимость отличий определялась t-тестом Стьюдента, ** = p-value < 0.01, *** = p-value < 0.001.

3. Разработка ингибитора взаимодействия интегразы ВИЧ-1 и клеточного белка Ku70

Поскольку весь процесс постинтеграционной репарации зависит от способности IN ВИЧ-1 формировать комплекс с Ku70, мы предполагаем, что весь процесс может быть подавлен и, как следствие, нарушена репликация вируса, если заблокировать взаимодействие между исследуемыми белками. Для поиска и характеристики ингибиторов взаимодействия IN с Ku70 нами был разработан модифицированный вариант метода соосаждения белков с использованием mCag и tRFP-меченых IN и Ku70, соответственно. Эта модификация позволяет отказаться от использования антител для детекции взаимодействующих белков, что снижает стоимость анализа, а также сокращает время проведения одного анализа за счет отсутствия этапа вестерн-блоттинга.

3.1. Конъюгаты олигонуклеотидов с эозином Y – эффективные ингибиторы взаимодействия IN с клеточным партнером Ku70 *in vitro*

Ранее мы показали, что конъюгат 11-звенного 2'-О-метилованного олигонуклеотида с эозином-Y (11-ОМ-Е), связываясь эозиновой частью с С-концевым доменом IN, нарушает взаимодействие IN с Ku70 *in vitro* (А. Anisenko *et al.*, 2017). Мы предположили, что такое соединение, связываясь остатком эозина в С-концевом домене, может дотягиваться до остатков E212, L213, важных для взаимодействия IN с Ku70, и экранировать их.

Для проверки этой гипотезы была синтезирована серия конъюгатов эозина-Y и 2'-олигодезоксирибонуклеотидов длиной от 5 до 15 нуклеотидов общей формулы GG(T)_n, где n=3, 5, 8, 9, 10, 11 или 13 (Рис. 14). Для начала мы подтвердили, что как 11-ОМ-Е, так и его дезоксианалог 11*-D-Е одинаково

эффективно нарушают взаимодействие исследуемых белков (Рис. 14). По мере уменьшения длины олигонуклеотидной части соединений их ингибирующий потенциал снижался. Если для 10*-D-E значение IC50 было всего в 1,3 раза больше, чем для 11*-D-E, то дальнейшее уменьшение имело более выраженный эффект: 7*-D-E предотвращал образование комплекса при 3200 нМ лишь на 50 %, а 5*-D-E – всего на 24 %. Противоположный эффект наблюдался при увеличении олигонуклеотидной части ингибитора (Рис. 14). Наблюдаемый нами эффект обратной зависимости значений IC50 от длины олигонуклеотидной части ингибитора подтверждают выдвинутую нами гипотезу. Вероятно, более короткие конъюгаты просто не способны дотягиваться до сайта взаимодействия с Ku70 в составе IN (E212 и L213 а.о.) и не могут эффективно его экранировать. Дополнительно это предположение было подтверждено путем моделирования комплексов IN с исследуемыми ингибиторами разной длины.

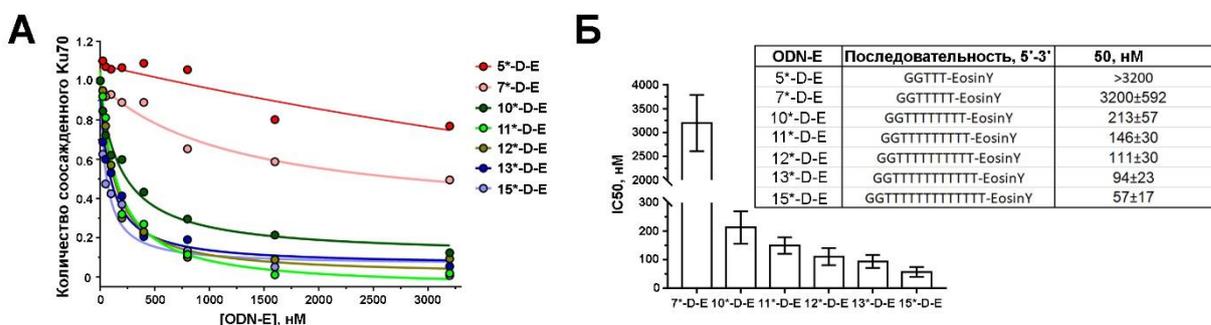


Рисунок 14. Эффект длины олигонуклеотидной части конъюгатов олигонуклеотидов с эозином на их способность нарушать взаимодействие Ku70 с IN. А – зависимость количества сосажденного с GST-mCer-IN белка His6-Ku70-tRFP на глутатион-агарозе в присутствии возрастающей концентрации исследуемых соединений. Б – значения полуингибирующей концентрации (IC50) исследуемых соединений.

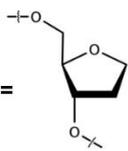
Помимо этого, с использованием второй серии производных 11-ОМ-Е мы установили, что для эффективного ингибирования взаимодействия IN с Ku70 важна не только длина олигонуклеотидной части ингибитора, но и гетероциклические основания в составе ингибитора, поскольку их удаление приводит к полной потере активности (Рис. 15, соединения Нех-11-D и Нех-11-ddR). Модификации сахарофосфатного остова существенно не влияют на ингибирующие свойства, хотя замена фосфодиэфирных групп на тиофосфатные существенно улучшает ингибирующую активность конъюгатов (Рис. 15).

Подводя итог всем проведенным экспериментам, можно сказать, что конъюгаты олигонуклеотидов с флуоресцентными красителями можно рассматривать в качестве эффективных ингибиторов взаимодействия IN с Ku70 *in vitro*, однако, поскольку такие соединения ингибируют каталитические функции IN и сложностей с доставкой таких больших молекул в клетки невозможно экспериментально проверить, возможно ли подавление

репликации вируса путем нарушения взаимодействия между IN и Ku70. В связи с этим мы перешли к разработке низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия двух белков.

$\text{X} = \text{H}_3\text{C}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)_2$

$\text{S} = \text{O}=\text{P}(\text{O}^-)(\text{O}^-)_2$

$\text{ddR} =$


Название	Последовательность, 5'-3'	IC50, нМ
11-OM-E	GGUUUUUGUGU-EosinY	135±20
11-D-E	GGTTTTTGTGT-EosinY	150±30
11-DX-E-1	GGTTTTTGTxGTx-EosinY	160±55
11-DX-E-2	GGTxTxTxTTGTGT-EosinY	150±40
11-DS-E	GsGsTsTsTsTsTsGsTsGsTs-EosinY	40±10
Hex-11-D	HEX-GGTTTTTGTGT	170±45
Hex-11-ddR	HEX-(ddR)10T	нет ингибирования

Рисунок 15. Эффект 11-OM-E и его производных, содержащих модификации сахарофосфатного остова или гетероциклических оснований, на взаимодействие IN с Ku70.

3.2. Поиск низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия IN и Ku70

Поскольку создать эффективный низкомолекулярный ингибитор, который мог бы специфично экранировать аминокислотные остатки интегразы E212 и L213, невозможно из-за их открытости в структуре IN, мы решили разработать такие ингибиторы со стороны белка Ku70. Для этого было необходимо уточнить сайт связывания IN в структуре Ku70.

3.2.1. Уточнение сайта взаимодействия Ku70 с IN для разработки низкомолекулярных ингибиторов их взаимодействия

Ранее мы показали, что для взаимодействия с IN достаточно N-концевого домена Ku70 с 1 по 250 а.о. Поскольку дальнейший поиск сайта взаимодействия двух белков методом точечного мутагенеза без предварительного уточнения области поиска не представляется возможным из-за большого числа поверхностных аминокислотных остатков в этой части Ku70, мы решили использовать метод пептидного фишинга для этих целей.

Для этого полноразмерный рекомбинантный His₆-Ku70 обрабатывали трипсином или GluC-протеазой, после чего пептиды инкубировали с GST-IN, иммобилизованной на глутатион-агарозе. Анализ связанных с IN пептидов методом тандемной масс-спектрометрии позволил идентифицировать три пептида Ku70, связанных с IN: Ku70⁴⁷⁻⁷⁴ и Ku70⁸¹⁻⁹² (триптический гидролизат) и Ku70⁹⁴⁻¹⁰⁷ (GluC-гидролизат) (Рис. 16).

С использованием серии делеционных мутантов Ku70 (Ku70_1-250, Ku70_1-95, Ku70-1-78 и Ku70_1-33) мы установили, что минимальным достаточным для взаимодействия с IN является N-концевой участок Ku70 с 1 по 78 а.о., содержащий в своем составе идентифицированный нами пептид

Ku70⁴⁷⁻⁷⁴ (Рис. 16). Два других пептида, по всей видимости, не важны для взаимодействия с IN или их вклад в стабилизацию комплекса минимален.

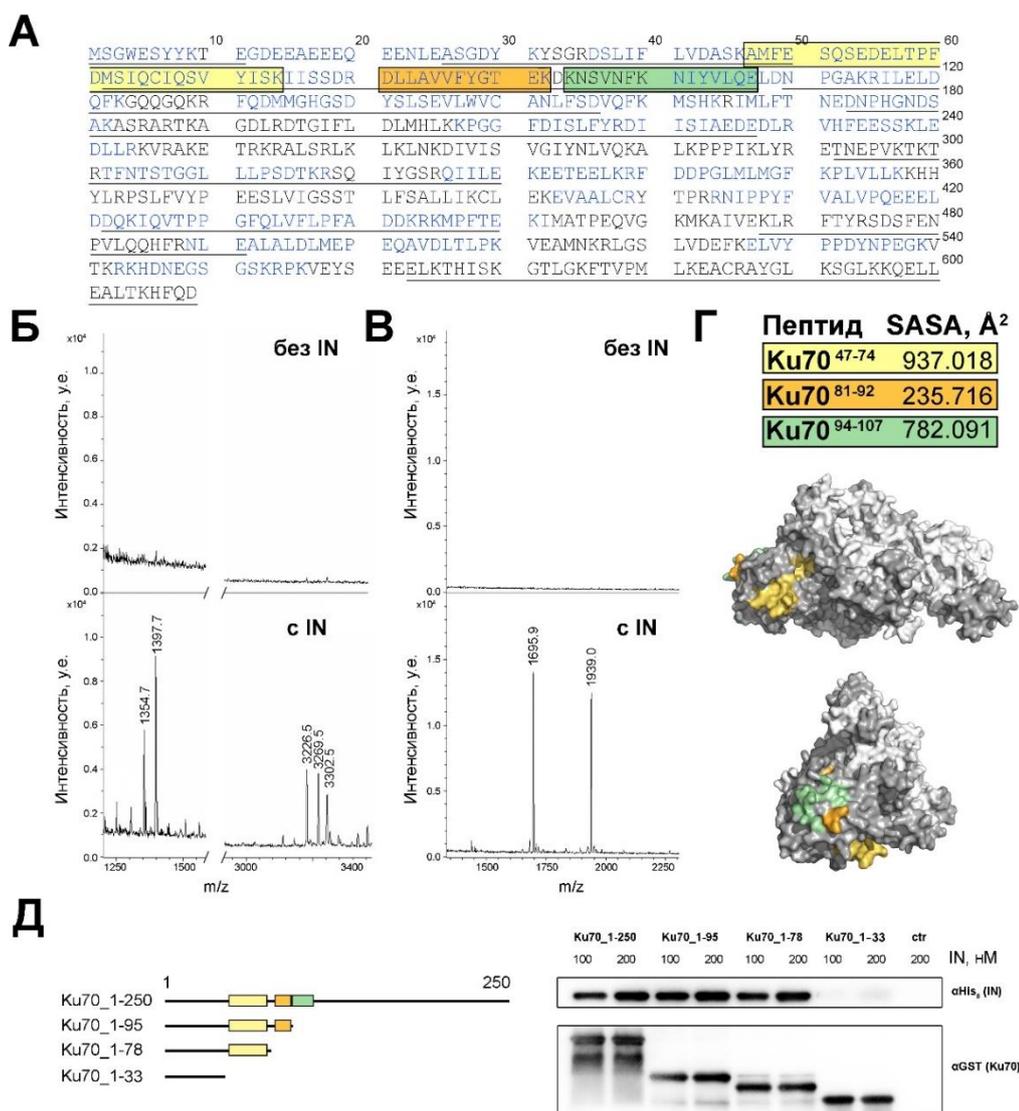


Рисунок 16. Уточнение сайта связывания интегразы ВИЧ-1 в составе белка Ku70. А – Аминокислотная последовательность белка Ku70. Подчеркиванием и синими буквами отмечены те последовательности белка Ku70, которые были нами идентифицированы в тотальном триптическом гидролизате белка или после обработки полноразмерного рекомбинантного белка GluC-протеазой, соответственно. Б, В – пептиды Ku70, совыделяющиеся с GST-IN на глутатион-агарозе, идентифицированные нами в ходе эксперимента по пептидному фишингу с использованием триптического гидролизата Ku70 (Б) или GluC-гидролизата (В) в присутствии IN (нижняя панель) или в ее отсутствии (верхняя панель). Пики со значениями m/z равными 1354,7 и 1397,7 соответствуют пептиду Ku70⁸¹⁻⁹² и его N-карбомоилированной форме, 3226,5, 3269,5 и 3302,5 – пептиду Ku70⁴⁷⁻⁷⁴, его N-карбомоилированной форме, а также аддукту с β -меркаптоэтанолом, а пики 1695,9 и 1939,0 – пептидам Ku70⁹⁴⁻¹⁰⁷ и Ku70⁹²⁻¹⁰⁷, соответственно. Г – показатели доступности растворителю (SASA) для идентифицированных пептидов, а также расположение идентифицированных пептидов в структуре гетеродимера Ku70/Ku80. Ku70 отмечен темно-серым, Ku80 – светло-серым, пептиды – цветом. Д – анализ взаимодействия делеционных мутантов Ku70_1-250, Ku70_1-95, Ku70_1-78, Ku70_1-33 с IN ВИЧ-1 методом соосаждения белков на глутатион-агарозе.

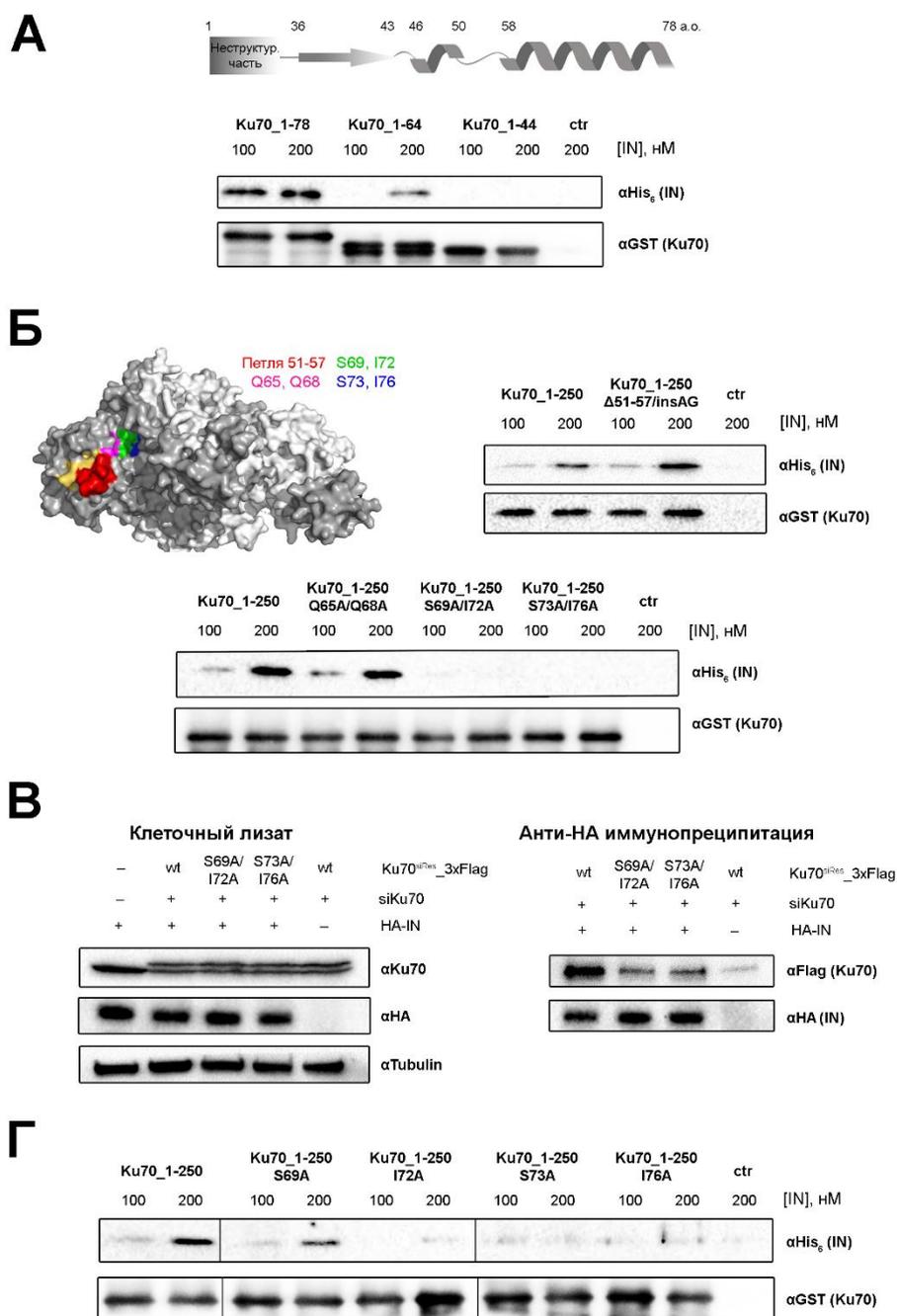


Рисунок 17. Аминокислотные остатки I72, S73 и I76 в составе Ku70 важны для взаимодействия белка с IN. А – Соосаждения делеционных мутантов Ku70_1-78, Ku70_1-64 и Ku70_1-44 с полноразмерной IN на глутатион-агарозе. Б – Соосаждение точечных мутантов N-концевого домена Ku70, а именно, Ku70_1-250_Δ51-57/insAG, Ku70_1-250_Q65A/Q68, Ku70_1-250_S69A/I72A и Ku70_1-250_S73A/I76A, с полноразмерной IN на глутатион-агарозе. На структуре гетеродимера Ku70/Ku80 цветом отмечены положения исследуемых аминокислотных остатков. В – Ко-иммунопреципитация суперэкспрессированных Flag-тагированных двойных мутантов Ku70, содержащих замены S69A/I72A или S73A/I76A, с HA-IN из лизатов клеток НЕК293Т. В качестве контроля связывания использован Flag-тагированный суперэкспрессированный Ku70 природной последовательности (wt). Для снижения количества эндогенного Ku70 без мутаций клетки НЕК293Т предварительно обрабатывали малой интерферирующей РНК к мРНК Ku70 (siKu70). Г – Соосаждение точечных мутантов Ku70_1-250_S69A, Ku70_1-250_I72A, Ku70_1-250_S73A и Ku70_1-250_I76A с полноразмерной IN на глутатион-агарозе.

Дальнейшее уточнение сайта связывания IN в составе Ku70 с использованием методов делеционного и точечного мутагенеза позволило нам показать, что аминокислотные остатки I72, S63 и I76 белка Ku70 наиболее критичны для связывания IN, а остаток S69 – играет вспомогательную функцию (Рис. 17).

3.2.2. Поиск низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия IN с Ku70

Определенные нами остатки Ku70, важные для взаимодействия с интегразой, расположены в структуре гетеродимера Ku70/K80 в кармане, подходящем для создания ингибиторов (Рис. 17, Б). Такие ингибиторы, связываясь в целевом участке гетеродимера, должны экранировать интересующие нас остатки и, таким образом, препятствовать взаимодействию с IN.

Для поиска таких соединений мы предложили следующий подход. На первом этапе был выполнен молекулярный докинг библиотеки соединений ChemDiv Representative Diversity Library, включающей в себя 50 000 наиболее разнообразных по структуре соединений, в исследуемую область гетеродимера Ku. Для каждого соединения проводили 25 раундов докинга, на второй этап исследования отбирали только те соединения, для которых свободная энергия Гиббса была меньше -11 ккал/моль. На следующий этап исследования прошли 444 соединения. В ходе второго этапа проводили дополнительно 100 раундов молекулярного докинга и далее ранжировали соединения по их способности экранировать аминокислотные остатки Ku70 – S69, I72, S73 и I76. По результатам ранжирования было отобрано 31 соединение для *in vitro* тестирования. Из пула протестированных соединений одно соединение 3272-0701 блокировало образование комплекса на 25 %, а второе Y021-2376 – на 60 %

На втором этапе для поиска более эффективных ингибиторов из библиотеки ChemDiv (1,6 млн. веществ) отбирали соединения похожие на 3272-0701 или Y021-2376 (коэффициент Танимото больше 0,65). Всего было отобрано 1385 веществ, для которых проводили процедуру молекулярного докинга по выше описанной схеме. В результате для *in vitro* тестирования было отобрано 37 соединений. Среди них мы обнаружили 11 соединений, которые снижали количество His₆-Ku70-tRFP, сосаждаемого с GST-mCer-IN, на 30 %, 2 соединения – на 50 %, 1 соединение – на 70 %, и 2 соединения – на 90 % при 100 мкМ (Рис. 18, А). Для трех наиболее активных были определены значения IC₅₀. Соединение 8009-7811 (далее s8) ингибировало образование комплекса на 50 % при 70 ± 15 мкМ, 8009-9264 (далее s9) – при 40 ± 8 мкМ и только 8018-2468 (далее s17) – 13 ± 2 мкМ (Рис. 18, Б, В).

В случае наиболее активного соединения s17 с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса мы показали, что оно эффективно связывается с Ku70 и гетеродимером Ku, но не IN (Рис. 18, Г).

3.2.3. s17 эффективно подавляет трансдукцию клеток вектором на основе генома ВИЧ-1, ингибируя постинтеграционную репарацию ВИЧ-1

Для трех наиболее активных соединений s8, s9 и s17 мы решили оценить их влияние на ранние этапы репликации ВИЧ-1 *ex vivo* на клетках НЕК293Т. Для этого клетки НЕК293Т трансдуцировали VSV-G-псевдотипированным репликативно-некомпетентным лентивирусным вектором на базе генома ВИЧ-1, кодирующим ген люциферазы светлячка, в присутствии исследуемых соединений. Уровень продукции люциферазы в такой системе отражает общую эффективность протекания ранних этапов репликации ВИЧ-1, таких как обратная транскрипция, интеграция и постинтеграционная репарация. В этих условиях s17, но не s8 или s9 эффективно подавлял трансдукцию клеток вектором с EC_{50} равным 12 ± 3 мкМ, не влияя на жизнеспособность клеток (Рис. 18, Д, Е).

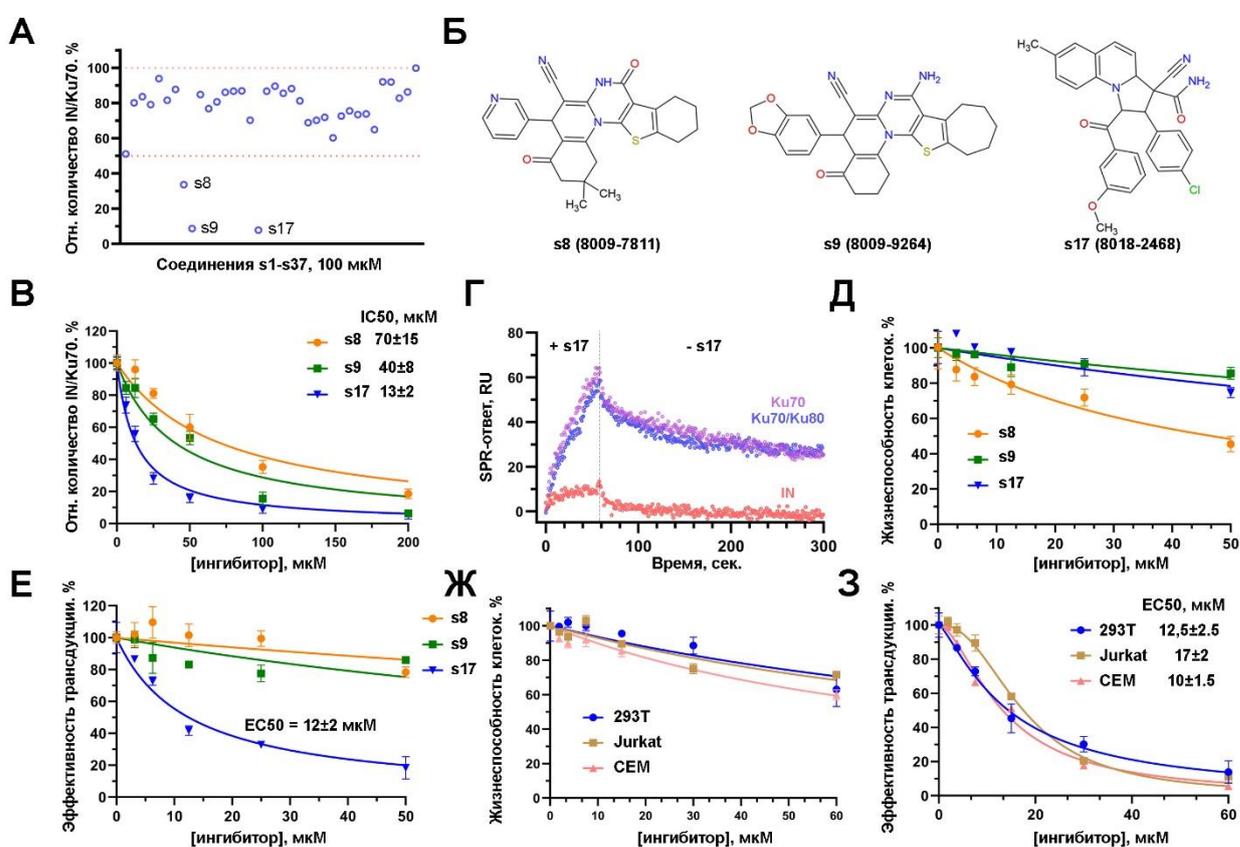


Рисунок 18. Отбор соединений-кандидатов, нарушающих взаимодействие IN с Ku70, и изучение их влияния на эффективность трансдукции клеток псевдовиром на основе ВИЧ-1. А – эффект 100 мкМ соединений s1 - s37 на формирование комплекса Ku70/IN. Б – структурные формулы трех наиболее активных соединений, нарушающих взаимодействие Ku70 с IN. В – эффект возрастающей концентрации s8, s9 или s17 на образование комплекса IN с Ku70 *in vitro*. Г – оценка взаимодействия ингибитора s17 с IN, Ku70 или гетеродимером Ku70/Ku80 методом поверхностного плазмонного резонанса. Д – эффект соединений s8, s9 и s17 на жизнеспособность клеток НЕК293Т, измеренный МТТ-тестом. Е – эффект соединений s8, s9 и s17 на трансдукцию клеток НЕК293Т псевдовиром ВИЧ_wt. Ж – эффект s17 на жизнеспособность клеток НЕК293Т, Jurkat и СЕМ. З – эффект s17 на трансдукцию клеток НЕК293Т, Jurkat и СЕМ псевдовиром ВИЧ_wt.

Аналогичные результаты нами были получены для s17 на Т-лимфобластоидных клеточных линиях СЕМ и Jurkat, которые являются более похожими на естественные мишени ВИЧ-1 – CD4+ Т-хелперы (Рис. 18, Ж, З).

Как отмечалось выше, использованный нами в работе лентивирусный вектор, позволяет оценивать эффекты разнообразных воздействий на ранние этапы репликации ВИЧ-1, включая обратную транскрипцию, интеграцию и постинтеграционную репарацию. Однако на уровень продукции люциферазы могут влиять изменения в эффективности протекания еще двух этапов, не относящихся к репликации ВИЧ-1: проникновение вектора в клетку, опосредованное гликопротеином G вируса везикулярного стоматита (VSV-G), а также транскрипция с цитомегаловирусного промотора (CMV), под контролем которого закодирована люцифераза в векторе. Мы показали, что s17 не влияет ни на проникновение псевдовirusа (Рис. 19, А), ни на транскрипцию трансгена (Рис. 19, Б).

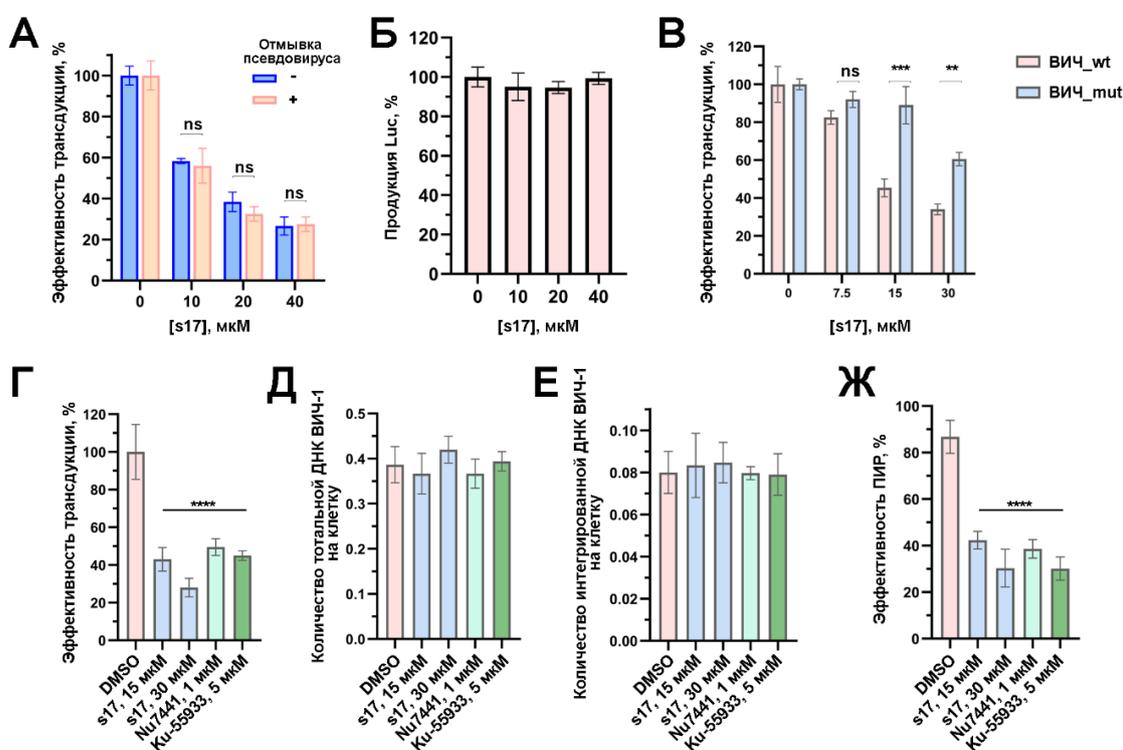


Рисунок 19. Ингибитор s17 подавляет ранние этапы репликации, действуя на постинтеграционную репарацию ВИЧ-1. А – s17 не влияет на проникновение псевдовirusа ВИЧ_wt. Б – эффект s17 на продукцию люциферазы светлячка в клетках со стабильно интегрированным псевдовirusом ВИЧ_wt. В – сравнение влияния s17 на эффективность трансдукции клеток НЕК293Т псевдовirusами ВИЧ_wt и ВИЧ_mut, неспособным эффективно инициировать постинтеграционную репарацию. Г–Ж – влияние s17, Nu7441 (ингибитор DNA-РКcs) и Ku-55933 (ингибитор АТМ) на ранние этапы репликации ВИЧ-1, а именно, на общую эффективность трансдукции клеток (Г), на обратную транскрипцию (Д), интеграцию (Е) и постинтеграционную репарации. (Ж). На графиках представлено среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Статистическая значимость отличий определялась однофакторным ANOVA с коррекцией на множественные сравнения по Бонферрони, ns — нет значимых отличий, ** = adj. p-value < 0,01, *** = adj. p-value < 0,001, **** = adj. p-value < 0,0001.

3.2.4. s17 не влияет на клеточную функцию Ku70 – репарацию двуцепочечных разрывов ДНК по NHEJ-пути

Для оценки безопасности разработанного нами ингибитора s17, нарушающего взаимодействие Ku70 с IN, было необходимо проверить его влияние на ключевую клеточную функцию Ku70 – репарацию двуцепочечных разрывов ДНК по NHEJ-пути. Поскольку Ku70 является обязательным инициатором этого процесса, любое воздействие на него может приводить к нежелательным побочным эффектам, снижая эффективность или корректность репарации. Хотя сайт связывания s17 не перекрывается с ДНК-связывающим доменом гетеродимера, нельзя исключать аллостерического ингибирования NHEJ-пути.

Влияние s17 на общую эффективность NHEJ оценивали с помощью GFP-репортерной системы, где восстановление флуоресценции происходит только при репарации внесенных CRISPR-Cas9-системой двуцепочечных разрывов в ген репортера. В контрольных клетках HEK293T наблюдалось около 4% GFP-позитивных клеток, а ингибитор DNA-PKcs (Nu7441) дозозависимо снижал этот показатель, подтверждая работоспособность системы. При обработке клеток s17 вплоть до концентрации 50 мкМ мы не обнаружили каких-либо изменений в доле GFP-позитивных клеток, что свидетельствует об отсутствии влияния соединения на общую эффективность NHEJ-репарации.

Для оценки кинетики восстановления повреждений использовали метод ДНК-комет после индукции разрывов ингибитором топоизомеразы II – этопозидом. В контрольных условиях повреждения полностью восстанавливались через 150 минут, тогда как ингибитор DNA-PKcs существенно замедлял этот процесс. Напротив, в присутствии 50 мкМ s17 кинетика восстановления не отличалась от контроля, и через 150 минут степень повреждения ДНК возвращалась к базовому уровню.

Таким образом, s17 не влияет ни на общую эффективность, ни на кинетику репарации двуцепочечных разрывов ДНК по NHEJ-пути, что свидетельствует о его безопасности в отношении этой ключевой клеточной функции.

3.2.5. Связь структуры и функции s17

Для понимания вклада отдельных фрагментов s17 в ингибирование ВИЧ-1 мы получили модель его комплекса с гетеродимером Ku методом молекулярной динамики. Согласно полученной модели, ингибитор размещается в гидрофобном кармане белка: 4-хлорфенильный и 4-метоксибензоильный заместители играют ключевую роль в связывании с гетеродимером, «зажимая» аминокислотный остаток L76, метильная группа при 1,2,3,3а-тетрагидропиррол[1,2-а]хинолиновом ядре ориентирована внутрь кармана и также может иметь важный вклад в стабилизацию комплекса

Ku/s17, в то время как карбоксамидный и нитрильный заместители экспонированы в раствор (Рис. 20).

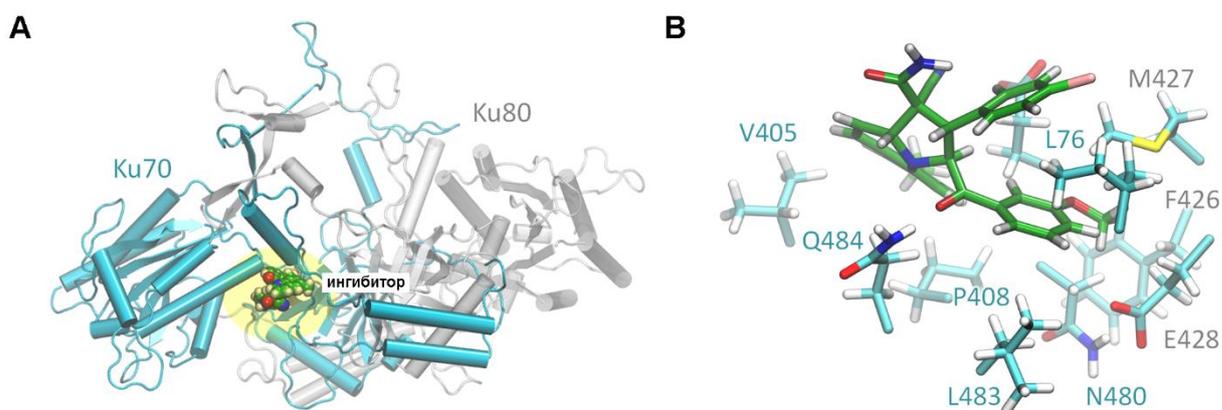


Рисунок 20. Структура гетеродимера Ku70/Ku80 в комплексе с ингибитором s17, полученная методами молекулярной динамики. А – Общая структура полученного комплекса. Ku70 отмечен голубым, Ku80 - серым, ингибитор окрашен в цвета атомов. Б – Сайт связывания s17 в структуре гетеродимера Ku70/Ku80. Атомы углерода аминокислотных остатков отмечены голубым, а ингибитора – зеленым. Голубые подписи аминокислотных остатков использованы для обозначения остатков Ku70, а серые – Ku80.

Руководствуясь этими данными, мы синтезировали серию производных с модификациями ключевых заместителей и протестировали их способность подавлять репликацию ВИЧ-1. Наиболее критическими для активности оказались размер и гидрофобность 4-хлорфенильного радикала: его замена на более крупные (s17_der7- s17_der9) или гидрофильные (s17_der5) группы приводила к существенному росту EC_{50} . Замена 4-метоксибензоила на меньший тиофен-3-карбонил (s17_der6) также снижала активность. Удаление метильной группы при 1,2,3,3а-тетрагидропиррол[1,2-а]хинолиновом ядре (s17_der10) или замена на метоксигруппу (s17_der11) также увеличивали EC_{50} в 2,3 и 5 раз, соответственно, что подтверждает наши предположения о ключевой роли этих трех заместителей для проявления анти-ВИЧ-активности (Рис. 20).

Учитывая химическую нестабильность исходного 1,2,3,3а-тетрагидропиррол[1,2-а]хинолинового ядра, склонного к ароматизации и окислению, мы заменили его на более стабильное, но геометрически сходное бензотиазольное ядро, сохранив все ключевые заместители. Полученное соединение benz17 не проявляло цитотоксичности вплоть до 60 мкМ, но при этом превосходило исходную молекулу по эффективности: его EC_{50} составило 8 мкМ, что в 1,5 раза ниже, чем у s17.

Таким образом, проведенные эксперименты открывают новые возможности для изменения структуры с последующим улучшением ингибирующего действия исследуемых соединений.

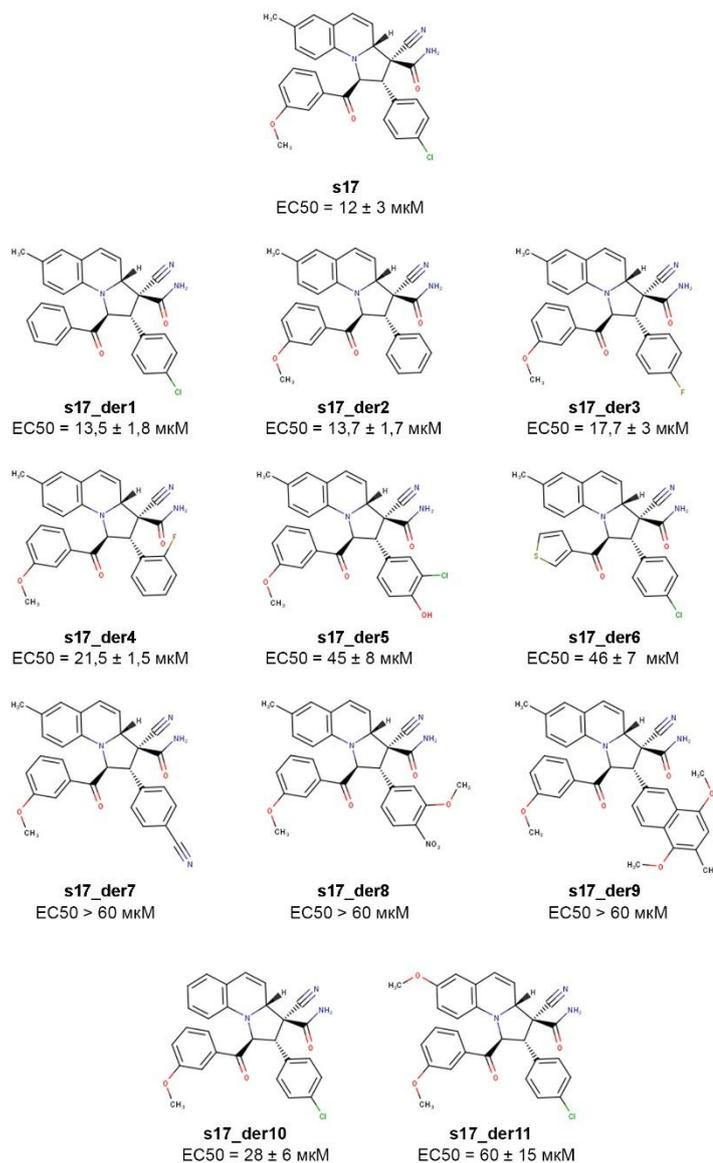


Рисунок 21. Структурные формулы s17 и его производных, а также их эффект на эффективность трансдукции клеток псевдовиром ВИЧ_wt. Цитотоксический эффект на клетках НЕК293Т не обнаружен для всех исследованных соединений вплоть до 60 мкМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная работа впервые позволила предложить модель наименее изученной стадии жизненного цикла ВИЧ-1 – постинтеграционной репарации. Получен ряд принципиально новых данных о молекулярных механизмах этой стадии. Продемонстрировано, что начальные этапы постинтеграционной репарации напрямую зависят от компонентов клеточных путей репарации двуцепочечных разрывов ДНК – киназ ATM и DNA-ПК, которые активируются в ответ на интеграцию вирусной кДНК в геном инфицированной клетки. Однако механизм их активации очень необычен и принципиально отличается от механизма их активации при репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Поскольку в интеграционном интермедиате отсутствуют двуцепочечные разрывы ДНК, привлечение и активация этих киназ в столь необычном контексте зависит от способности интегразы ВИЧ-1 и Ku70 субъединицы DNA-ПК формировать комплекс. В ходе постинтеграционной репарации эти киназы автофосфорилируются, а также фосфорилируют свои классические мишени – H2AX и Chk2. Этим начальные этапы постинтеграционной репарации напоминают процесс репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Однако дальнейшие события этого процесса требуют привлечения других факторов, способных распознать те типы повреждений ДНК, которые возникают в ходе интеграции вирусного генома: одноцепочечные бреши и неспаренные динуклеотиды на 5'-концах вирусной кДНК. Этими факторами являются ферменты из системы эксцизионной репарации оснований, для которых мы продемонстрировали привлечение к сайтам интеграции кДНК ВИЧ-1. Функциональное участие белков из BER-пути было подтверждено на примере зависимости эффективности постинтеграционной репарации ВИЧ-1 от внутриклеточного уровня Fen1 и парилирующей активности PARP1 и/или PARP2. Таким образом, процесс постинтеграционной репарации ВИЧ-1 является сложным многостадийным процессом, зависящим от компонентов как репарации двуцепочечных разрывов ДНК, так и эксцизионной репарации оснований.

Анализ структур интеграционных интермедиатов родственных ВИЧ-1 вирусов, например, пенообразующего вируса человека и вируса саркомы Рауса, позволил установить, что сразу после интеграции вирусной кДНК формируется необычная структура ДНК, повреждения ДНК в которой стабилизированы и маскированы интегразой, что объясняет невозможность прямого привлечения компонентов системы эксцизионной репарации оснований к интеграционному интермедиату. В свете этих особенностей структуры интеграционного интермедиата нами предложена следующая модель постинтеграционной репарации ВИЧ-1, предполагающая последовательное действие факторов репарации двуцепочечных разрывов ДНК и компонентов BER-пути. Взаимодействие IN ВИЧ-1 с гетеродимером Ku в местах встраивания вирусной кДНК привлекает и активирует каталитическую субъединицу киназы DNA-ПК и киназу ATM. За счет фосфорилирующей активности эти ферменты модифицируют

микроокружение повреждения, в частности фосфорилируют гистон H2AX, что необходимо для привлечения к местам повреждения других факторов репарации и ремоделирования хроматина. Задача последних сводится к релаксации хроматина в области встраивания вирусной кДНК и демаскировки возникшего повреждения. После этого интеграционный интермедиат становится доступным ферментам BER-пути, которые и восстанавливают целостность ДНК (Рис. 22).

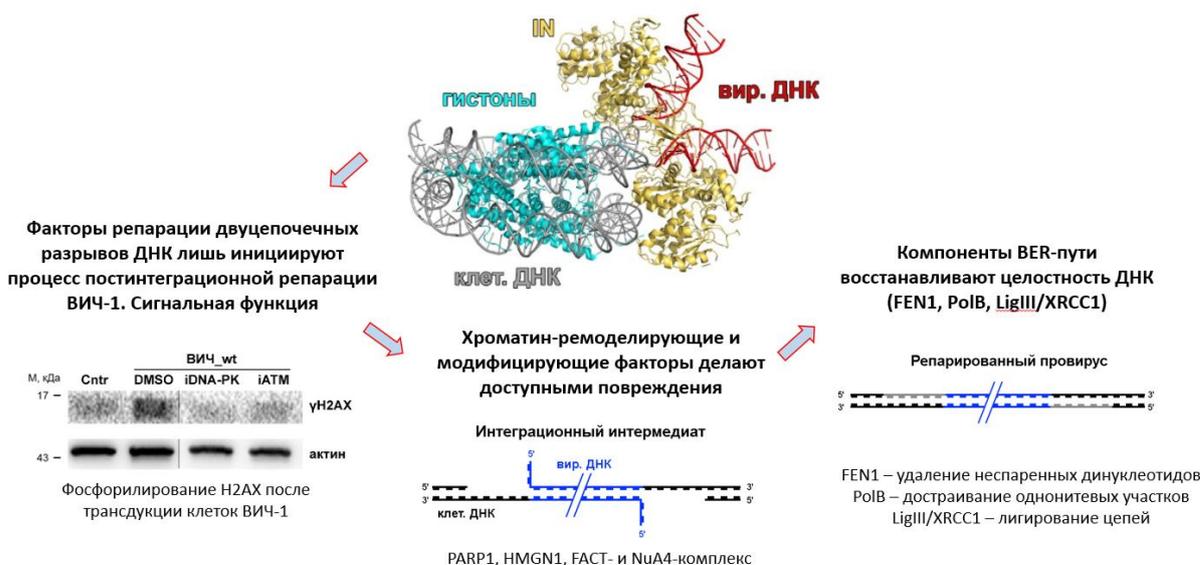


Рисунок 22. Гипотеза о совместном действии факторов репарации двуцепочечных разрывов ДНК и компонентов эксцизионной репарации оснований в процессе постинтеграционной репарации ВИЧ-1. Интеграционный интермедиат сразу после встраивания концов вирусной кДНК в клеточную ДНК стабилизирован и маскирован интегразой, что делает невозможным доступ компонентов BER-пути к возникшим повреждениям. Взаимодействие интегразы с Ku70 субъединицей DNA-PK позволяет привлечь и активировать киназы ATM и DNA-PK к сайтам интеграции вирусной кДНК. Их активность приводит к модификации микроокружения повреждений ДНК, возникших в ходе интеграции, например, путем фосфорилирования гистона H2AX, что создает условия для привлечения факторов модификации и ремоделирования хроматина. Действие этих факторов способствует переходу интеграционного интермедиата в линейную форму. В таком виде пятинуклеотидные однонитевые участки ДНК по краям от встроившейся вирусной ДНК и выступающие динуклеотиды на 5'-концах вирусной кДНК становятся доступны для компонентов эксцизионной репарации оснований, которые восстанавливают целостность таких повреждений.

Поскольку весь каскад событий запускается только в том случае, если интеграза и Ku70 взаимодействуют, нами осуществлен поиск соединений, нарушающих взаимодействие этих белков. Для этого мы локализовали сайт связывания интегразы в составе Ku70 и с использованием итеративного подхода при помощи методов молекулярного докинга с последующим тестированием наилучших находок обнаружили соединение, которое

эффективно блокирует взаимодействие белков *in vitro*. Разработанный нами ингибитор эффективно подавляет ранние этапы репликации ВИЧ-1, действуя на этап постинтеграционной репарации, что еще раз доказывает ключевую роль комплекса IN с Ku70 для инициации этого процесса.

ВЫВОДЫ

1. Постинтеграционная репарация ВИЧ-1 зависит от активности как DNA-РК, так и АТМ из систем репарации двуцепочечных разрывов ДНК, несмотря на отсутствие таких повреждений ДНК в интеграционном интермедиате. Их участие в этом процессе зависит от способности интегразы ВИЧ-1 формировать комплекс с Ku70 субъединицей DNA-РК после интеграции вирусной кДНК в клеточный геном.

2. Постинтеграционная репарация начинается с автофосфорилирования киназ АТМ и DNA-РК, а также их мишеней – белков H2AX и Chk2.

3. К сайтам интеграции вирусной кДНК привлекается широкий спектр белков репарации. Среди них широко представлены инициаторные и регуляторные белки из систем репарации двуцепочечных разрывов ДНК, а также ферменты из системы эксцизионной репарации оснований. Непосредственное участие белков из эксцизионной репарации оснований в постинтеграционной репарации ВИЧ-1 продемонстрировано путем подавления парилирующей активности PARP1 и/или PARP2, а также нокдауном Fen1.

4. Показано, что для взаимодействия с интегразой ВИЧ-1 важны аминокислотные остатки I72, S73 и I76 в составе Ku70, а остаток S69 выполняет вспомогательную функцию.

5. Предложено два типа ингибиторов, нарушающих взаимодействие интегразы ВИЧ-1 с Ku70 *in vitro*: конъюгаты олигонуклеотидов с эозином, взаимодействующие с интегразой и блокирующие сайт связывания Ku70, а также низкомолекулярные ингибиторы, экранирующие сайт связывания интегразы в белке Ku70.

6. Найденное при помощи методов молекулярного докинга низкомолекулярное соединение s17 ингибирует репликацию ВИЧ-1 на этапе постинтеграционной репарации, но не влияет на участие Ku70 в репарации двуцепочечных разрывов ДНК.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности и отрасли наук:

1. **Anisenko A.**, Knyazhanskaya E., Isaguliants M., Gottikh M. A qPCR assay for measuring the post-integrational DNA repair in HIV-1 replication // *Journal of Virological Methods*. – 2018. – Vol. 262. – PP. 12-19. Импакт-фактор 1,9 (JIF). EDN: YBKMLZ. 1,34 п. л.
2. **Анисенко А.Н.**, Готтих М.Б. Участие клеточных систем репарации ДНК в репликации ВИЧ-1. Молекулярная биология. – 2019. – Т. 53. – №3. – С. 355-366. Импакт-фактор 0,755 (РИНЦ). EDN: ZCYNBV. 2,00 п. л.
Anisenko A.N., Gottikh M.B. Role of Cellular DNA Repair Systems in HIV-1 Replication // *Molecular Biology (Moscow)*. – 2019. – Vol. 53. – № 3. – PP. 313–322. Импакт-фактор 1,2 (JIF). EDN: FVCPHA. 1,67 п. л.
3. Knyazhanskaya E., **Anisenko A.**, Shadrina O., Kalinina A., Zatsepin T., Zalevsky A., Mazurov D., Gottikh M. NHEJ pathway is involved in post-integrational DNA repair due to Ku70 binding to HIV-1 integrase // *Retrovirology*. – 2019. – Vol. 16. – P. 30. Импакт-фактор 3,9 (JIF). EDN: LHLIVH. 2,84 п. л.
4. **Anisenko A.**, Kan M., Shadrina O., Brattseva A., Gottikh M. Phosphorylation Targets of DNA-PK and Their Role in HIV-1 Replication // *Cells*. – 2020. – Vol. 9. – №8. – P. 1907. Импакт-фактор 5,2 (JIF). EDN: ENCDDK. 4,50 п. л.
5. Galkin S., Rozina A., Zalevsky A., Gottikh M., **Anisenko A.** A Fluorescent Assay to Search for Inhibitors of HIV-1 Integrase Interactions with Human Ku70 Protein, and Its Application for Characterization of Oligonucleotide Inhibitors // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10. – № 9. – P. 1236. Импакт-фактор 4,8 (JIF). EDN: GZTSBD. 2,65 п. л.
6. **Anisenko A.**, Shadrina O., Garanina I., Gottikh M. Transcriptome dataset of HEK293T cells depleted of one of the subunits of the DNA-PK complex: Ku70, Ku80 or DNA-PKcs // *Data in Brief*. – 2021. – Vol. 39. – P. 107596. Импакт-фактор 1,4 (JIF). EDN: QCIBWI. 0,81 п. л.
7. Ilgova E., Galkin S., Khrenova M., Serebryakova M., Gottikh M., **Anisenko A.** Complex of HIV-1 Integrase with Cellular Ku Protein: Interaction Interface and Search for Inhibitors // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 6. – P. 2908. Импакт-фактор 4,9 (JIF). EDN: HCWOLP. 2,82 п. л.
8. Shadrina O., Garanina I., **Anisenko A.**, Kireev I., Gottikh M. Transcriptome

- analysis of HEK 293T cells revealed different significance of the depletion of DNA-dependent protein kinase subunits, Ku70, Ku80, and DNA-PKcs // *Biochimie.* – 2022. – Vol. 199. – PP. 139-149. Импакт-фактор 3,0 (JIF). EDN: YQPMYI. 1,81 п. л.
9. Rozina A., **Anisenko A.**, Kikhai T., Silkina M., Gottikh M. Complex Relationships between HIV-1 Integrase and Its Cellular Partners // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2022. – Vol. 23. – P. 12341. Импакт-фактор 4,9 (JIF). EDN: JQXKZW. 4,30 п. л.
10. **Anisenko A.**, Nefedova A, Agapkina Y, Gottikh M. Both ATM and DNA-PK Are the Main Regulators of HIV-1 Post-Integrational DNA Repair // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2023. – Vol. 24. – № 5. – P. 2797. Импакт-фактор 4,9 (JIF). EDN: IATZLQ. 2,00 п. л.
11. **Anisenko A.**, Galkin S., Mikhaylov A., Khrenova M., Agapkina Y., Korolev S., Garkul L., Shirokova V., Ikonnikova V., Korlyukov A., Dorovatovskii P., Baranov M., Gottikh M. KuINins as a New Class of HIV-1 Inhibitors That Block Post-Integration DNA Repair // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2023. – Vol. 24. – № 24. – P. 17354. Импакт-фактор 4,9 (JIF). EDN: RJMWQM. 2,65 п. л.
12. **Анисенко А.Н.**, Нефедова А.А., Киреев И.И., Готтих М.Б. Постинтеграционная репарация ВИЧ-1 сопряжена с активацией клеточных протеинкиназ DNA-ПК и ATM и фосфорилированием их мишеней // *Биохимия.* – 2024. – Т. 89. – №6. – С. 1117-1128. Импакт-фактор 0,856 (РИНЦ). EDN: XLBUOU. 2,00 п. л.
Anisenko A.N., Nefedova A.A., Kireev I.I., Gottikh M.B. Post-integrational dna repair of HIV-1 is associated with activation of the DNA-PK and ATM cellular protein kinases and phosphorylation of their targets // *Biochemistry (Moscow).* – 2024. – Vol. 89. – № 6. – PP. 1122–1132. Импакт-фактор 2,2 (JIF). EDN: GHTDUF. 1,84 п. л.
13. Molchanova M., Ikonnikova V., **Anisenko A.**, Gottikh M., Baranov M., Mikhaylov A. The cycloaddition reaction of benzothiazolium ylides with α -cyanocinnamamides: the synthesis of structural analogs of inhibitors of HIV-1 post-integrational repair // *Chemistry of Heterocyclic Compounds.* – 2024. – Vol. 60. – № 9-10. – PP. 544-548. Импакт-фактор 1,0 (JIF). EDN: HJFPEA. 0,84 п. л.
14. Агапкина Ю.Ю., Пономарева Т.Ю., Вдовина М.В., Зиганшин Р.Х., Розина А.А., **Анисенко А.Н.**, Готтих М.Б. Новые клеточные партнеры интегразы ВИЧ-1 и их роль в репликации вируса // *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни.* – 2025. – Т. 522. – №1. – С. 324-329. Импакт-фактор 0,471 (РИНЦ). EDN: ZKGVGE. 1,00 п. л.

Agapkina Y.Y., Ponomareva T.Y., Vdovina M.V., Ziganshin R.H., Rozina A.A., **Anisenko A.N.**, Gottikh M.B. New cellular partners of HIV-1 integrase and their role in viral replication // Doklady biochemistry and biophysics. – 2025. – Vol. 522. – № 1. – PP. 279–284. Импакт-фактор 0,731 (РИНЦ). EDN: BDIQIH. 1,00 п. л.

15. Фейгин С.Е., Кихай Т.Ф., Агапкина Ю.Ю., **Анисенко А.Н.**, Готтих М.Б., Королев С.П. Клеточные белки HSP60 и SAHH как негативные регуляторы ранних этапов репликации ВИЧ-1 // Биохимия. – 2025. – Т. 90. – №11. – С. 1754-1764. Импакт-фактор 0,856 (РИНЦ). EDN: NCNILT. 1,84 п. л.
- Feigin S.E., Kikhai T.F., Agapkina Y.Y., **Anisenko A.N.**, Gottikh M.B., Korolev S.P. Cellular proteins HSP60 and SAHH as negative regulators of the early stages of HIV-1 replication // Biochemistry (Moscow). – 2025. – Vol. 90. – № 11. – PP. 1643–1651. Импакт-фактор 2,2 (JIF). EDN: WWUWNB. 1,50 п. л.