

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

на правах рукописи

Кихай Татьяна Фёдоровна

**Влияние клеточного белка SFPQ на репликацию вируса
иммунодефицита человека типа 1**

1.4.9. Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2025

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

Научные руководители – *Готтих Марина Борисовна,*
доктор химических наук, профессор
Агапкина Юлия Юрьевна,
кандидат химических наук

Официальные оппоненты – *Хомутов Алексей Радиевич* – доктор химических наук, ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, лаборатория молекулярных основ действия физиологически-активных соединений, ведущий научный сотрудник

Рубцов Юрий Петрович – доктор биологических наук, ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, лаборатория молекулярной вирусологии, главный научный сотрудник

Баюрова Екатерина Олеговна – кандидат биологических наук, ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М. П. Чумакова РАН», лаборатория моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян, старший научный сотрудник

Защита диссертации состоится «25» ноября 2025 г. в 16 ч. 30 мин на заседании диссертационного совета МГУ.014.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, НИИ ФХБ им А.Н. Белозерского, аудитория 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: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3603>

Автореферат разослан «__» _____ 202__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Ю.Ю. Агапкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), вызвавший пандемию в 20 веке, остается одним из опаснейших вирусов и 21 века. С момента его открытия в 80-х годах прошлого столетия вирус стал виновником эпидемии синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИДа) и унес жизни миллионов людей по всему миру. На данный момент в мире насчитывается около 40 млн больных с ВИЧ-положительным статусом, в России диагностировано около 1,2 млн ВИЧ-инфицированных. Для лечения ВИЧ-инфекции используется высокоэффективная антиретровирусная терапия (ВАРТ), основными компонентами которой являются ингибиторы вирусных ферментов. Применение ВАРТ позволило существенно снизить уровень заболеваемости и смертности от ВИЧ-инфекции, однако эта терапия не приводит к полному удалению вируса из организма. Кроме того, к ингибиторам вирусных белков быстро вырабатываются устойчивые штаммы вируса, поэтому пациентам приходится со временем менять схему терапии и использовать новые препараты.

По этой причине поиск новых мишеней для антивирусных препаратов и новых способов борьбы с ВИЧ-инфекцией остаётся крайне актуальным. Перспективными мишенями считаются комплексы вирусных белков с белками клетки, оказывающими положительный эффект на размножение вируса. Ингибирование процесса формирования этих комплексов может не только подавить репликацию ВИЧ-1, но и предотвратить развитие устойчивости вируса к таким ингибиторам, поскольку поверхность взаимодействия двух белков, которая является их мишенью, высоко консервативна и любые изменения в ней будут негативно сказываться на стабильности белок-белкового комплекса.

В литературе описано участие в репликации ВИЧ-1 клеточных белков SFPQ и NONO, являющихся ключевыми компонентами ядерных белково-нуклеиновых комплексов – параспеклов. Эти белки могут образовывать гомо- и гетеродимеры и участвуют в различных клеточных процессах, включая ответ

на повреждения ДНК, регуляцию транскрипции и сплайсинга. Известно также, что они обнаруживаются в составе прединтеграционного комплекса ВИЧ-1, однако детальные механизмы их взаимодействия с вирусными компонентами и влияния на репликацию вируса не были исследованы. Учитывая, что белки SFPQ и NONO были ранее обнаружены среди партнеров интегразы ВИЧ-1, мы предположили, что они участвуют в ранних стадиях жизненного цикла вируса.

Цель исследования. Определение роли клеточных белков SFPQ и NONO в регуляции ранних стадий репликативного цикла ВИЧ-1, включая обратную транскрипцию, интеграцию и постинтеграционную репарацию.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Определить влияние различных внутриклеточных уровней белков SFPQ и NONO на эффективность ранних этапов жизненного цикла ВИЧ-1 с использованием репликативно-некомпетентного лентивирусного вектора.
2. Определить стадии репликативного цикла ВИЧ-1, на которые оказывают влияние белки SFPQ и NONO, путем количественного анализа содержания различных форм вирусной ДНК.
3. Провести анализ взаимодействия рекомбинантных белков SFPQ и NONO с вирусными ферментами: обратной транскриптазой (ОТ) и интегразой (ИН).
4. Идентифицировать структурные элементы, необходимые взаимодействия белков SFPQ и/или NONO с ИН и/или ОТ ВИЧ-1.
5. Выяснить, является ли взаимодействие белков SFPQ и/или NONO с вирусными ферментами необходимым условием для их влияния на ранние этапы репликации ВИЧ-1.

Научная новизна. В результате выполнения диссертационной работы была впервые детально охарактеризована роль белков SFPQ и NONO в регуляции ранних стадий репликации ВИЧ-1. Установлено, что белок NONO не взаимодействует с вирусными ферментами и не влияет ни на одну из ранних стадий, в то время как белок SFPQ связывается с ИН и является

положительным фактором интеграции и постинтеграционной репарации (ПИР). Определены аминокислотные остатки ИН и SFPQ, важные для их взаимодействия. Показано, что связывание ИН с SFPQ важно для процесса интеграции, но не влияет на ПИР. Проведенное исследование позволило предложить комплекс белков ИН и SFPQ в качестве новой потенциальной мишени для разработки противовирусных препаратов.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты исследования вносят существенный вклад в понимание молекулярных механизмов репликации ВИЧ-1 и могут быть использованы для разработки новых подходов к терапии ВИЧ-инфекции. Впервые показано, что клеточный белок SFPQ участвует в регуляции двух стадий репликации ВИЧ-1: интеграции и ПИР. Полученные знания о структуре участка узнавания SFPQ с вирусной ИН могут послужить основой для создания новых ингибиторов взаимодействия этих белков.

Методология и методы исследования. Все исследования проводили на клеточной культуре НЕК 293Т (клетки эмбриональной почки). Повышение внутриклеточного уровня белков достигалось с помощью кальций-фосфатной трансфекции плазмид, понижение — с использованием малых интерферирующих РНК (siРНК), доставленных методом липофекции. В работе использовали псевдовирусные частицы с геном люциферазы светлячка в качестве репортера под контролем вирусного LTR-промотора. Оценку эффективности каждой из начальных стадий производили с помощью количественной ПЦР, детектируя различные формы вирусной ДНК: тотальную (для анализа обратной транскрипции), интегрированную (для оценки интеграции) и репарированную (для изучения постинтеграционной репарации). Для получения генетических конструкций использовали стандартные методы клонирования, ПЦР, сайт-направленного мутагенеза. Рекомбинантные белки SFPQ, NONO, ОТ и ИН получали в клетках *E. coli*, белки очищали с помощью аффинной хроматографии и гель-фильтрации.

Способность белков связываться друг с другом анализировали методом соосаждения на глутатион-агарозе.

Личный вклад автора. Личный вклад автора является весомым во всех 4 работах. Автором была собрана, проанализирована литература по белковым партнерам ИН ВИЧ-1 и функциям белка SFPQ в клетке [1,2]. Получены генетические конструкции, оптимизированы условия выделения рекомбинантных белков SFPQ, NONO и их мутантных форм [3]. Проанализировано связывание клеточных белков с вирусными белками с помощью метода соосаждения [3]. Обнаружены аминокислотные остатки SFPQ, которые ответственны за его взаимодействие с ИН [3]. Исследовано влияние разных уровней белков SFPQ и NONO на ранние стадии репликации ВИЧ-1 с помощью кПЦР [3]. Проанализировано влияние замен некоторых аминокислотных остатков в каталитическом домене ИН на репликацию вируса и функции ИН *in vitro* [4].

Степень достоверности результатов. Все эксперименты были проведены не менее 3-х раз. Результаты проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа и обладают высокой степенью достоверности.

Объект исследования. Молекулярные механизмы участия клеточных белков на ранних стадиях репликации вируса иммунодефицита человека 1 типа.

Предмет исследования. Клеточные белки SFPQ и NONO и их роль в репликации ВИЧ-1, а именно их участие в обратной транскрипции, интеграции и постинтеграционной репарации.

Положения, выносимые на защиту:

1. Клеточный белок SFPQ является положительным фактором репликации ВИЧ-1, белок NONO не оказывает влияние на ранние стадии репликации ВИЧ-1.
2. SFPQ влияет на стадии интеграции и постинтеграционной репарации и не влияет на стадию обратной транскрипции.

3. SFPQ воздействует на процесс интеграции за счет своего связывания с ИН.
4. Во взаимодействии SFPQ с ИН ВИЧ-1 участвуют аминокислотные остатки V165/R166 и R187 каталитического домена ИН и мотивы R¹⁹GGGGGR²⁵GG и R²³⁶GGGGGR²⁴²GG из N-концевого домена SFPQ.
5. Остаток R187 важен для формирования правильной структуры ИН, необходимой на всех этапах ее функциональной активности, замена I182A снижает эффективность интеграции, а замена K188A - обратной транскрипции.

Публикации и апробация результатов. Результаты исследования представлены в 4-х статьях в рецензируемых международных научных журналах. Кроме того, работа была представлена на всероссийских и международных конференциях по молекулярной биологии и вирусологии: 45-ый конгресс FEBS в 2021 г., всероссийская конференция «Синтетическая биология и биофармацевтика» в 2022 г., III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов в 2022 г.

Структура и объем. Диссертация состоит из 117 страниц и включает следующие разделы: Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и Обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы (включает 179 источников), Приложение. Количество рисунков – 24, количество таблиц – 6.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Влияние белков SFPQ и NONO на ранние стадии репликации ВИЧ-1

Для детального анализа влияния белков SFPQ и NONO на ранние стадии репликации ВИЧ-1 мы использовали псевдовиральные частицы, представляющие собой VSV-G-псевдотипированный репликативно некомпетентный вектор на основе ВИЧ-1, в котором гены (*gag*, *pol*, *env*) заменены геном репортерного белка – люциферазы светлячка (Fluc), а регуляторные элементы (LTR, ψ -сайты) сохранены. Для сборки этих псевдовиральных частиц упаковывающие клетки НЕК293Т трансфицировали тремя плазмидами, содержащими: 1) ДНК, кодирующую рекомбинантный РНК-геном, в состав которого входит ген люциферазы светлячка; 2) ген *gag-pol* ВИЧ-1, кодирующий структурные белки для формирования капсида вирусной частицы и ферменты ВИЧ-1; 3) ген гликопротеина G вируса везикулярного стоматита (VSV-G), который обеспечивает широкий тропизм за счет связывания с рецепторами LDLR. В упаковывающих клетках происходит формирование ВИЧ-1-подобных частиц, выходящих в культуральную среду. Эти частицы способны к однократному циклу инфекции, при котором в инфицированных клетках происходит обратная транскрипция, интеграция провирусной ДНК в геном хозяина, репарация повреждений и экспрессия Fluc, уровень которой отражает успешность протекания ранних этапов репликации ВИЧ-1. Таким образом, эти псевдовиральные частицы являются удобной и общепринятой моделью для изучения ранних этапов репликации ВИЧ-1 (*Mazurov et al.*, 2010).

Для изучения эффекта SFPQ и NONO на ранние стадии репликации ВИЧ-1 и определения стадии, на которую осуществляется это влияние, проводилась трансдукция собранными псевдовиральными частицами клеток НЕК293Т с нормальным, повышенным или пониженным уровнем этих белков. Для увеличения уровня белков применяли кальций-фосфатную трансфекцию клеток плазмидными векторами, содержащими гены белков SFPQ и NONO. Для понижения внутриклеточного уровня белков использовали липофекцию

siРНК к генам этих белков (siSFPQ, siNONO). Изменение уровня белков подтверждали с помощью вестерн-блот-анализа (Рисунок 1, А).

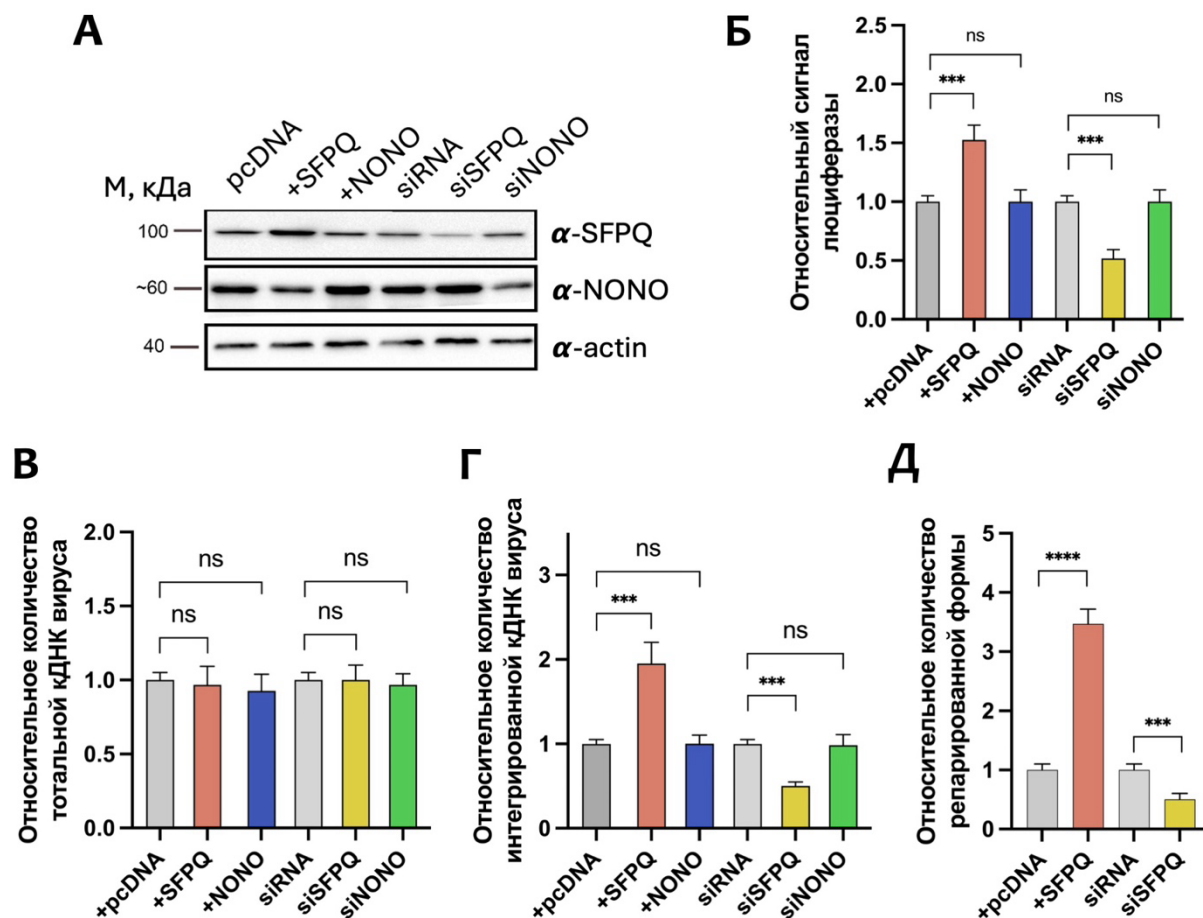


Рисунок 1. Влияние разных уровней клеточных белков SFPQ и NONO на репликацию ВИЧ-1. А) Анализ количества белков SFPQ, NONO в клетках HEK293Т. Б) Относительный сигнал люциферазы для образцов клеток, трансдуцированных вирусом с MOI=1 и разным уровнем белков SFPQ и NONO. В) Анализ уровня тотальной кДНК вируса в клетках с разным уровнем белков SFPQ и NONO. Г) Анализ уровня интегрированной кДНК вируса в клетках с разным уровнем SFPQ и NONO. Д) Анализ уровня репарированной формы кДНК вируса в клетках с разным уровнем SFPQ. Эксперимент выполнен в трех независимых биологических повторах. Значимость была определена с помощью одностороннего дисперсионного анализа, **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$; ns - не является значимой.

Через 24 часа после трансдукции клетки разрушали и проводили комплексную оценку эффективности вирусной репликации, которая включала: количественное измерение активности люциферазы как интегрального показателя эффективности ранних этапов репликации и

экстракцию ДНК с последующим ПЦР-анализом для детекции различных форм вирусной ДНК (тотальной, интегрированной и репарированной). Метод ПЦР в реальном времени обеспечивает количественную оценку эффективности ключевых этапов вирусного цикла — обратной транскрипции (анализ тотальной ДНК), интеграции (анализ интегрированной ДНК) и ПИР (анализ репарированной ДНК) (*Anisenko et al., 2018*).

Результаты продемонстрировали отсутствие статистически значимого влияния белка NONO на репликацию ВИЧ-1, тогда как повышение внутриклеточного уровня SFPQ достоверно усиливало вирусную репликацию, а его снижение — понижало ее эффективность (Рисунок 1, Б). Важно, что влияние SFPQ подтверждалось изменением как уровня люциферазы (Рисунок 1, Б), так и количества интегрированной и особенно репарированной ДНК (Рисунок 1, Г, Д). При этом мы не обнаружили негативного влияния SFPQ на обратную транскрипцию, которое было описано ранее (*Yadav et al., 2019*).

Следовательно, SFPQ выступает положительным фактором, существенно повышающим эффективность интеграции вирусной кДНК и последующей ПИР, в то время как NONO не участвует в регуляции ранних этапов жизненного цикла ВИЧ-1, несмотря на структурное сходство и способность формировать комплекс с SFPQ (*Knott et al., 2016*). Тот факт, что NONO был обнаружен в составе ПИК, можно объяснить тем, что он оказался там в виде гетеродимера с SFPQ.

2. Взаимодействие белков SFPQ и NONO с интегразой и обратной транскриптазой

Обнаруженное нами влияние белка SFPQ на стадии интеграции вирусной кДНК и ПИР может быть связано с его непосредственным взаимодействием с вирусной ИН, участвующей в обоих этих процессах, которое было описано ранее (*Yadav et al., 2019*). Для понимания того, насколько взаимодействие SFPQ с ИН важно для его влияния на репликацию ВИЧ-1, мы проанализировали связывание SFPQ с ИН и для контроля с ОТ. Учитывая структурное сходство коровых доменов SFPQ и NONO (*Knott et al.,*

2016), мы также проанализировали возможность связывания NONO с ИН и ОТ.

Исследуемые белки с аффинными метками (GST-SFPQ, Strep-NONO, His₆-ИН) были получены путём экспрессии с плазмидных векторов в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3) *Codon Plus* и очищены методом аффинной хроматографии. ОТ с His₆-тагом нам любезно предоставил для работы к.б.н., н.с. ИМБ РАН им. В.А. Энгельгардта В.Т. Валуев-Эллистон.

Для детекции взаимодействия белков мы использовали метод соосаждения белков с различными аффинными метками. Учитывая, что в клетке SFPQ и NONO способны образовывать гетеродимерный комплекс SFPQ/NONO, мы прежде всего проверили функциональность полученных рекомбинантных белков методом соосаждения на глутатион-сефарозе и показали, что осаждение Strep-NONO происходит только при наличии GST-SFPQ (Рисунок 2, А).

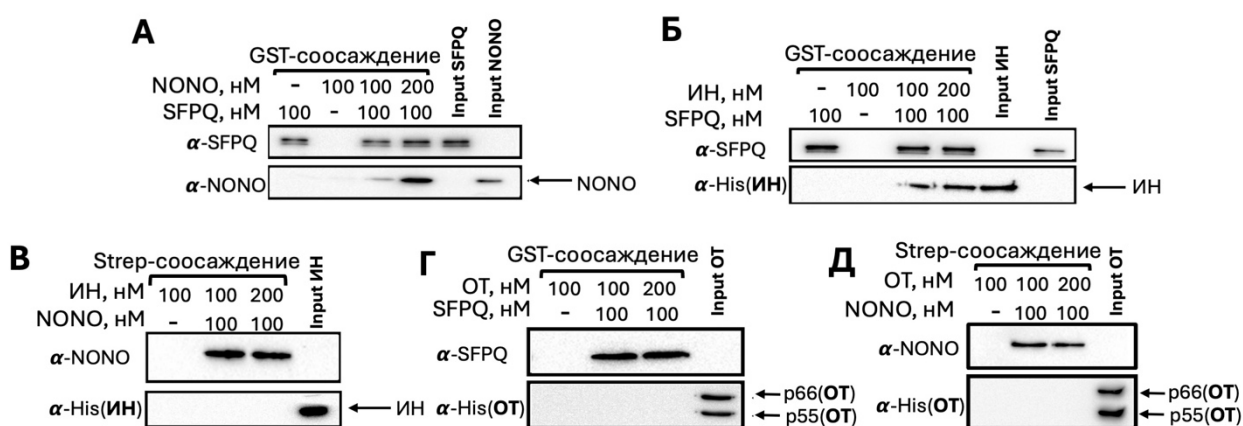


Рисунок 2. Анализ взаимодействия белков с помощью метода соосаждения. А) Анализ взаимодействия SFPQ и NONO. Б) Анализ взаимодействия SFPQ и ИН. В) Анализ взаимодействия NONO и ИН. Г) Анализ взаимодействия SFPQ и ОТ. Д) Анализ взаимодействия NONO и ОТ.

Используя метод GST/Strep-соосаждения, мы далее выяснили, что SFPQ связывается с ИН (Рисунок 2, Б), а NONO такой способностью не обладает (Рисунок 2, В). ОТ не связывалась ни с SFPQ, ни с NONO (Рисунок 2, Г, Д).

Таким образом мы подтвердили, что SFPQ действительно образует комплекс с ИН, и его эффект, по крайней мере, на стадию интеграции может быть обусловлен формированием этого комплекса. Тот факт, что SFPQ

оказался не способен связываться с ОТ, хорошо согласуется с отсутствием его влияния на стадию обратной транскрипции, обнаруженным в нашей работе.

3. Поиск аминокислотных остатков интегразы ВИЧ-1, важных для взаимодействия с SFPQ

Для того, чтобы проверить, действительно ли влияние SFPQ на стадию интеграции и/или ПИР обусловлено его взаимодействием с ИН, необходимо нарушить это взаимодействие, введя аминокислотные замены в сайт связывания белков либо со стороны ИН, либо со стороны SFPQ. В первую очередь мы решили определить сайт связывания SFPQ в составе ИН и получить мутантный вариант ИН, не связывающийся с SFPQ. Это позволило бы нам сформировать псевдовирус, содержащий мутации в гене ИН, нарушающие ее способность взаимодействовать с SFPQ, и повторить эксперимент по определению стадии репликации ВИЧ, на которую влияет SFPQ. Если в случае использования такого мутантного вируса влияние на интеграцию или ПИР исчезнет, это будет однозначным подтверждением того, что это влияние действительно обусловлено связыванием SFPQ с ИН. Такая стратегия ранее была применена в нашей лаборатории при изучении влияния на ПИР клеточного белка Ku70 (*Knyazhanskaya et al.*, 2019).

Для идентификации района ИН, важного для взаимодействия с SFPQ, использовали метод «пептидного фишинга». С этой целью His₆-ИН обрабатывали пептидазой GluC (сериновая протеаза, расщепляет пептидную цепь после Glu, реже после Asp), и полученную смесь пептидов добавляли к глутатион-сефарозе с иммобилизованным GST-SFPQ и для контроля без него. Далее все пептиды элюировали с глутатион-сефарозы, концентрировали на смоле C18, промывали и элюировали, используя сначала 2М NaCl, затем 6М мочевины. Полученные элюаты анализировали методом tandemной масс-спектрометрии, что позволило идентифицировать связавшиеся с SFPQ пептиды ИН, содержащие аминокислотные остатки (а.о.) 12-25 (E.NEKYHSNWRAMASDFNLPPVVAKE.I) и 171-202 (E.HLKTAVOMAVFIHNFKRKGGIGGYSAGERIVDIIATDIOTKE.I). Эти

результаты позволили сделать вывод о потенциальных участках связывания SFPQ в составе ИН.

Для более точного определения сайта связывания SFPQ мы получили набор делеционных мутантов His₆-ИН (без N-конца (ИН⁵¹⁻²⁸⁸), без С-конца (ИН¹⁻²²⁰), без обоих концов (ИН⁵¹⁻²²⁰)) и проверили их взаимодействие с SFPQ методом соосаждения. Установлено, что удаление N- и С-концов ИН не влияет на связывание, поэтому пептид 12-25, вероятно, соосадился с SFPQ в эксперименте по «пептидному фишингу» за счет неспецифического взаимодействия. В то же время, идентифицированный нами пептид 171-202 располагается в центральном каталитическом домене ИН (а.о. 51-220),

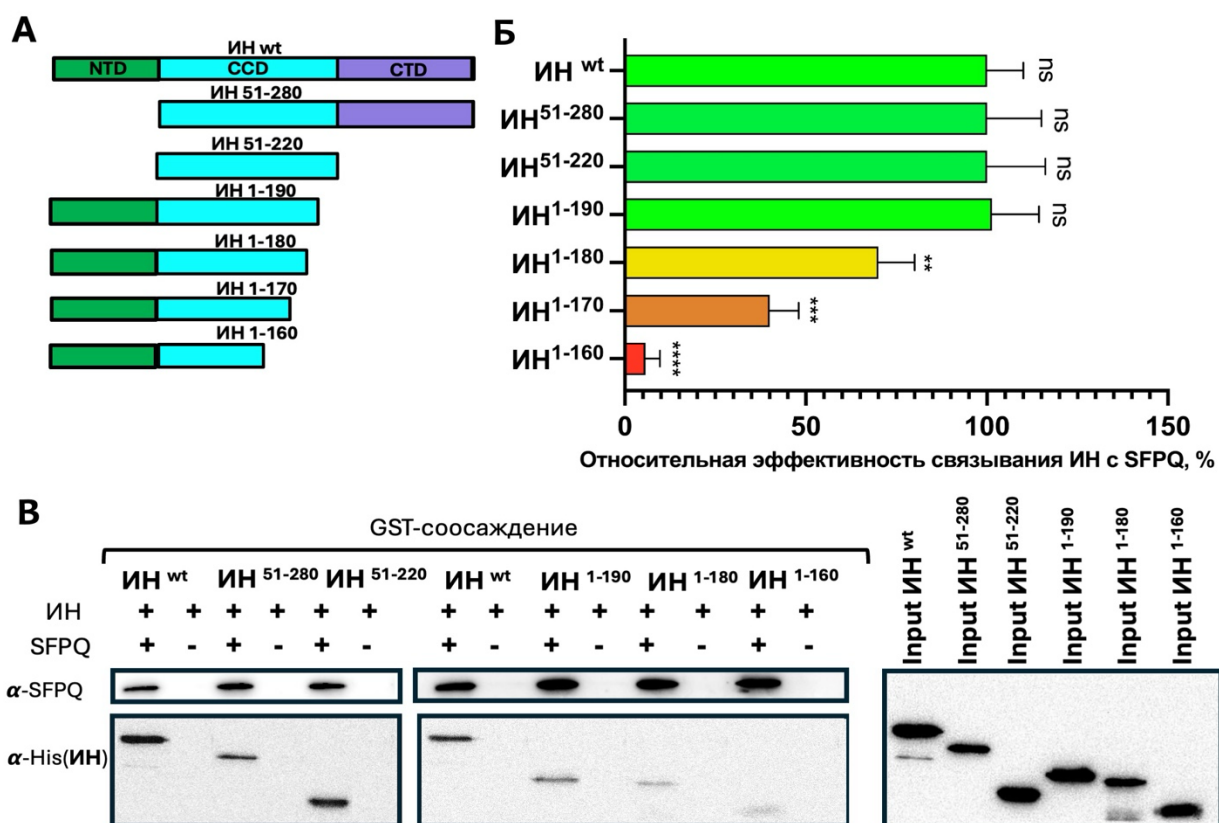


Рисунок 3. Анализ взаимодействия делеционных мутантов интегразы с SFPQ. А) Схематическое изображение делеционных мутантов, тестируемых на взаимодействие с SFPQ. Б) Относительная эффективность связывания мутантных вариантов ИН с SFPQ, %. Эксперимент выполнен в трех независимых повторах. Значимость была определена с помощью одностороннего дисперсионного анализа, **** - $p < 0,0001$, *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; ns - не является значимой. В) вестерн-блот-анализ связывания некоторых мутантных форм ИН с SFPQ.

который связывался с SFPQ также эффективно, как полноразмерная ИН (Рисунок 3, Б).

Для уточнения места связывания SFPQ, создали конструкции ИН с укороченным со стороны С-конца центральным доменом, получив набор мутантов: ИН¹⁻²⁰⁰, ИН¹⁻¹⁹⁰, ИН¹⁻¹⁸⁰, ИН¹⁻¹⁷⁰ и ИН¹⁻¹⁶⁰, из которых два последних вообще не содержали аминокислоты из указанного пептида.

Результаты, представленные на рисунке 3, демонстрируют снижение эффективности связывания при укорачивании каталитического домена ИН. Если белок ИН¹⁻¹⁸⁰ образовывал комплекс с SFPQ только на 30% хуже ИН дикого типа (ИН^{wt}), а белок ИН¹⁻¹⁷⁰ – на 60 % хуже, то мутант ИН¹⁻¹⁶⁰ практически не взаимодействовал с SFPQ (Рисунок 3, Б, В). Следовательно, ключевой участок связывания SFPQ локализован в пределах а.о. 160-190, что коррелирует с результатом «пептидного фишинга».

Последовательное частичное снижение эффективности связывания SFPQ с мутантами ИН¹⁻¹⁸⁰ и ИН¹⁻¹⁷⁰ позволяет предположить наличие в данном регионе двух независимых сайтов взаимодействия: в районах а.о. 180-190 и 160-170. Для точного картирования этих сайтов а.о. ИН в области 160-190, экспонированные на поверхность белка и доступные растворителю в составе функционально активного тетрамера ИН, последовательно замещались на аланин (Рисунок 4). Полный перечень мутантов, включая их структурные

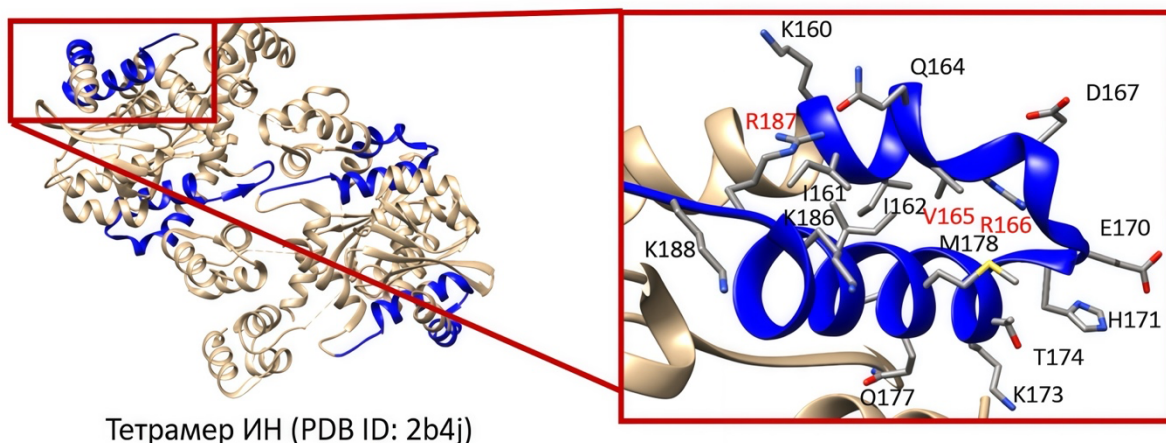


Рисунок 4. Структура тетрамера интегразы, PDB ID 2b4j. Справа в рамке представлена структура участка ИН, содержащего остатки 160-190. Остатки, важные для связывания SFPQ, выделены красным.

модификации и количественные показатели эффективности связывания с SFPQ, приведен в таблице 1.

Значительное снижение эффективности связывания наблюдалось для вариантов ИН, содержащих замены K160A/Q164A/Q168A/I182A/R187A и Q164A/V165A/R166A. При этом для белков, содержащих замены K160A, Q164A, Q168A и I182A, статистически значимого снижения эффективности связывания отмечено не было, что позволило нам исключить данные остатки из последующего анализа.

Таблица 1. Относительная эффективность связывания мутантных форм ИН с SFPQ. Красным выделены аминокислотные остатки, замена которых нарушает взаимодействие ИН с SFPQ.

Мутантные формы ИН	Относительная эффективность связывания, %
ИН ^{wt}	100±9
E170A/H171A/K173A	100±8
K160A/Q164A/Q168A	100±7
K160A/Q164A/Q168A/I182A	95±8
K160A/Q164A/Q168A/I182A/ R187A	5±1,5
K160A/I161A/I162A	90±7
Q164A/ V165A/R166A	3±1
T174A/V176A/Q177A/M178A	100±9
R187A	5±2

Для подтверждения важности а.о. R187, V165 и R166 для связывания с SFPQ были сконструированы генетические векторы, содержавшие точечные мутации в указанных позициях. Получен гомогенный препарат мутантной формы белка ИН^{R187A} и показано, что замена R187A действительно приводит к потере способности ИН взаимодействовать с SFPQ (Таблица 1). Белки с точечными заменами V165A и R166A нам выделить не удалось, поэтому на данный момент можно утверждать, что эффективность связывания нарушена у тройного мутанта ИН^{Q164A/V165A/R166A}. Однако, поскольку замена Q164A не влияет на связывание ИН с SFPQ (например, мутант ИН^{K160A/Q164A/Q168A} связывается с такой же эффективностью, как полноразмерная ИН), можно утверждать, что в связывании участвуют только остатки V165A и/или R166A.

Таким образом, в результате проведенного исследования мы смогли идентифицировать остатки, критически важные для формирования поверхности взаимодействия ИН с SFPQ: R187, V165 и/или R166. Эти аминокислотные остатки располагаются с разных сторон двух участков α -спирали, и такое их расположение в принципе может указывать на наличие двух сайтов связывания (Рисунок 4).

4. Анализ функциональной активности точечных мутантов ИН

Получив данные о сайте связывания SFPQ в составе ИН, мы планировали собрать псевдовirusы, содержащие варианты ИН с заменами идентифицированных аминокислот, чтобы проверить, как эти замены влияют на ранние этапы репликации ВИЧ-1, и выяснить, насколько взаимодействие SFPQ с ИН важно для его влияния на интеграцию и/или ПИР. Для этого эксперимента необходимо, чтобы такой мутантный псевдовirus сохранял способность к репликации. К сожалению, анализ данных литературы показал, что замены а.о. V165 и R166 ИН существенно снижают её каталитическую активность *in vitro* и подавляют репликативную активность вируса (*Limón et al., 2002*), поэтому получать псевдовirus с указанными заменами не было смысла. Что касается замены R187A, то, по литературным данным (*Elliott, Jennifer L et al., 2020*), она тоже приводила к потере инфекционности ВИЧ-1, однако молекулярные механизмы этого эффекта оставались не до конца выяснены.

По этой причине мы провели дополнительное исследование влияния аминокислотных замен в участке 180-188 на ранние этапы жизненного цикла ВИЧ-1 и выбрали помимо остатка R187 еще I182 и K188, о которых было известно, что замена K188E препятствует связыванию ИН с вирусной РНК (*Kessl et al., 2016*), а замена I182A снижает эффективность обратной транскрипции (*Takahata et al., 2016*).

Таблица 2. Характеристика функциональной активности ИН и ее мутантных форм.

	ИН ^{wt}	ИН ^{I182A}	ИН ^{R187A}	ИН ^{K188A}
Относительный сигнал люминесценции, %	100±12	10±3	5±2	75±15
Относительное количество тотальной кДНК вируса, %	100±10	90±8	60±7	75±10
Относительное количество интегрированной кДНК вируса, %	100±11	40±5	10±2	80±7
<i>K_d</i> (ИН/ДНК), нМ	25±3	220±60	330±20	60±5
<i>K_d</i> (ИН/РНК), нМ	21±5	67±17	82±12	36±3
Относительная каталитическая активность в реакции процессинга, %	100±10	50±11	20±5	90±10
Относительная каталитическая активность в реакции переноса цепи, %	100±8	10±3	5±2	95±8
Связывание с ОТ	+	+	+	+
Способность мультимеризоваться <i>in vitro</i>	+	+	-	+

Мутантные псевдовirusы с заменами I182A, R187A, K188A в ИН выявили разные функциональные дефекты (Табл. 2). Замена R187A наиболее сильно снижала эффективность трансдукции, вызывая 2-кратное падение эффективности обратной транскрипции и 10-кратное интеграции; замена I182A селективно нарушала только интеграцию; замена K188A умеренно снижала эффективность обратной транскрипции, что приводило к соответствующему падению эффективности интеграции. Эти дефекты псевдовirusов коррелировали со структурно-функциональными изменениями в рекомбинантных белках. Замена R187A приводила к резкому снижению аффинности ИН к РНК и ДНК, каталитической активности ИН и ее способности к мультимеризации, что может объясняться разрывом

водородных связей R187 с H16 (ННСС-мотив ИН) (*Hare et al.*, 2009) и ДНК (*Passos et al.*, 2017). Замена I182A оказывала умеренное негативное влияние на способность ИН связывать РНК и ДНК и ее каталитическую активность. Минимальный эффект оказывала замена K188A, главным образом незначительно ухудшая связывание ИН с ДНК. При этом все мутанты сохраняли способность взаимодействовать с ОТ.

Полученные результаты указывают на сложную функциональную организацию ИН ВИЧ-1, где каждая аминокислота в области междоменного взаимодействия играет специфическую роль в реализации различных этапов жизненного цикла вируса, причем а.о. R187 критически важен для нескольких этапов жизненного цикла ВИЧ-1.

5. Поиск аминокислотных остатков SFPQ, участвующих во взаимодействии с ИН ВИЧ-1

В связи с тем, что замена R187A в составе ИН приводит к потере ее каталитической активности и резкому снижению эффективности ранних этапов репликации, а замены V165A и R165A, согласно литературным данным (*Limón et al.*, 2002, *Elliott, Jennifer L et al.*, 2020) вызывают полную утрату инфекционности вируса, нам пришлось отказаться от первоначального плана по анализу влияния взаимодействия ИН с SFPQ на эффективность интеграции и/или ПИР путем получения мутантного псевдовируса, неспособного взаимодействовать с SFPQ. Соответственно, для ответа на этот вопрос мы решили нарушить взаимодействие ИН с SFPQ со стороны SFPQ, для чего необходимо было определить сайт связывания ИН в его составе.

Для локализации участка взаимодействия ИН/SFPQ была создана серия делеционных мутантов SFPQ, содержащих GST-метку на N-конце (Рисунок 5, А). Учитывая, что белок NONO не связывался с ИН (Рисунок 2), а основные структурные различия белков NONO и SFPQ находятся в их концевых доменах (*Knott et al.*, 2016), мы в первую очередь проверили связывание ИН с делеционными мутантами, не содержащими N- и C-концевых участков SFPQ: SFPQ²⁹⁷⁻⁷⁰⁷ и SFPQ¹⁻⁵⁹⁸, соответственно, методом аффинного соосаждения

(Рисунок 5). Результаты анализа показали, что мутант SFPQ²⁹⁷⁻⁷⁰⁷ полностью утратил способность связываться с ИН (остаточная активность <5% от контроля), а белок SFPQ¹⁻⁵⁹⁸ сохранил 85-90% аффинности к ИН по сравнению с полноразмерным белком. Следовательно, сайт связывания ИН локализован в N-концевом домене SFPQ (а.о. 1-296).

Для дальнейшего уточнения положения сайта было исследовано связывание ИН с серией мутантов: SFPQ¹⁻²⁰⁰, SFPQ²⁰¹⁻⁷⁰⁷, SFPQ²⁴⁶⁻⁷⁰⁷. Среди них только SFPQ²⁰¹⁻⁷⁰⁷ продемонстрировал частичное сохранение аффинности к ИН (30% от контроля) (Рисунок 5), что позволило ограничить район расположения предполагаемого сайта связывания участком 201-246 а.о.

Для проверки этого предположения, мы попытались создать делеционный мутант SFPQ^{Δ201-246}, но столкнулись с техническими ограничениями из-за экстремально высокого содержания GC-пар (90%) в соответствующем участке гена, препятствующего проведению ПЦР-амплификации и сайт-направленного мутагенеза. В качестве альтернативы был получен мутант SFPQ^{Δ213-275}, способный связываться с ИН с эффективностью 20-30% от эффективности связывания полноразмерного белка (Рисунок 5).

Меньшая эффективность связывания с ИН мутантов SFPQ²⁰¹⁻⁷⁰⁷ и SFPQ^{Δ201-246}, чем у белка SFPQ¹⁻⁵⁹⁸, позволила нам предположить наличие второго сайта связывания в районе 1-200 а.о. Хотя белок SFPQ¹⁻²⁰⁰ не связывался с ИН, мы предположили, что это может быть вызвано тем, что данный участок белка является неструктурированным.

С целью поиска второго сайта связывания мы проанализировали структуру всего N-концевого домена SFPQ и выявили наличие двух консервативных мотивов diRGGX₁₋₄, где X – любые аминокислотные остатки: R¹⁹GGGGGR²⁵GG и R²³⁶GGGGGR²⁴²GG. Данный мотив может отвечать за множество функции, в том числе за белок-белковые взаимодействия (Thandapani et al., 2013).

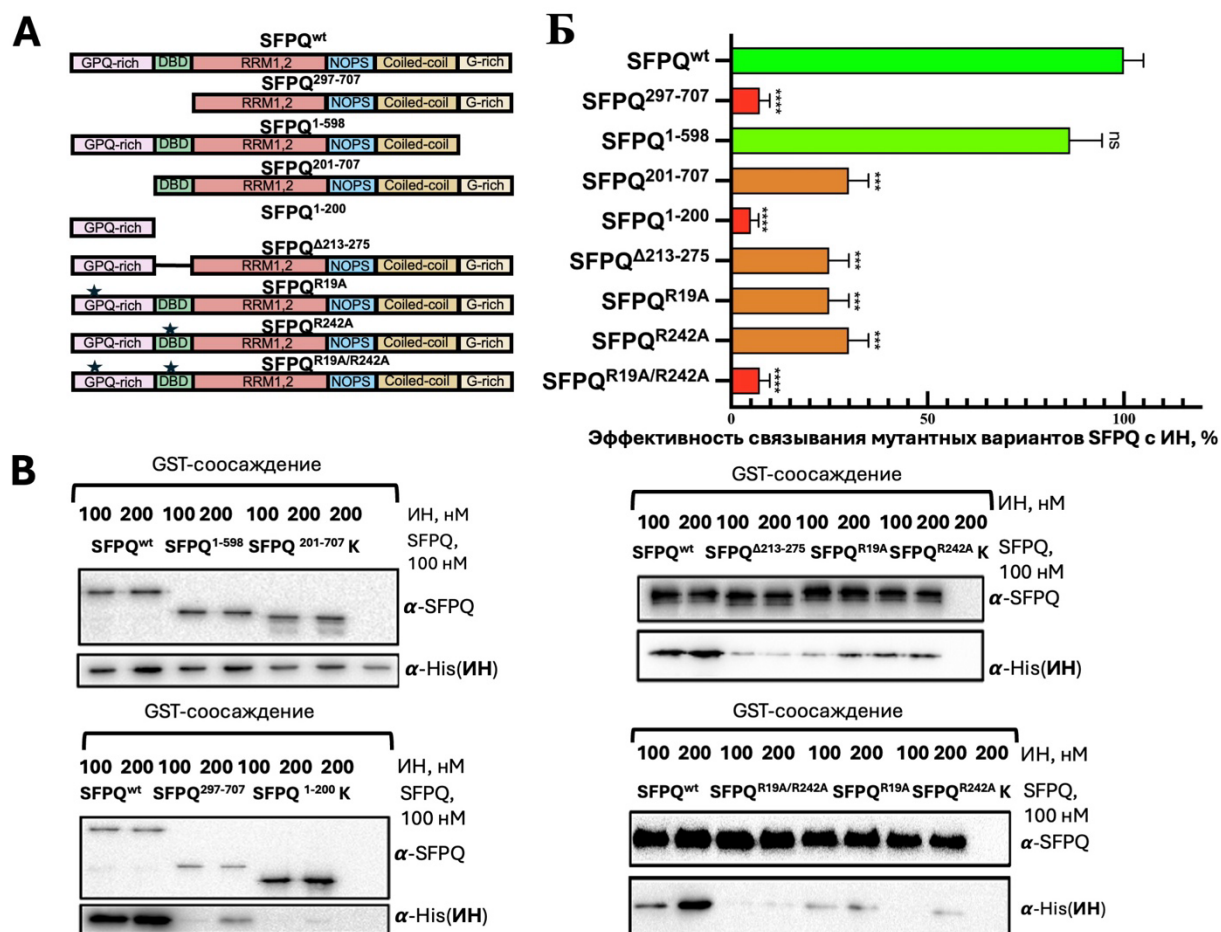


Рисунок 5. Анализ взаимодействия делеционных мутантов SFPQ и точечных мутантов SFPQ с ИИ. А) Схематичное изображение делеционных и точечных мутантов, тестируемых на взаимодействие с ИИ. Б) Относительная эффективность связывания мутантных вариантов SFPQ с ИИ, %. Эксперимент выполнен в трех независимых повторах. Значимость была определена с помощью одностороннего дисперсионного анализа, **** - $p < 0,0001$, *** - $p < 0,001$; ns - не является значимой. В) Вестерн-блот анализ связывания мутантных форм SFPQ с ИИ.

В каждом из этих мотивов была проведена замена аргинина на аланин и получены белки SFPQ^{R19A} и SFPQ^{R242A}. Для обоих белков наблюдалось снижение эффективности связывания с ИИ до 20-30% от контроля, что подтверждает их критическую роль в формировании интерфейса ИИ/SFPQ. При введении двух замен R19A и R242A (белок SFPQ^{R19A/R242A}) мы наблюдали полную потерю способности SFPQ связываться с ИИ.

Таким образом, мы показали, что в связывании с ИИ участвуют два мотива diRGGX₁₋₄, локализованные в N-концевом домене SFPQ: R¹⁹GGGGGR²⁵GG и R²³⁶GGGGGR²⁴²GG, и именно они являются ключевыми

структурными элементами, обеспечивающими стабильность комплекса SFPQ с ИН.

6. Выяснение механизма влияния SFPQ на интеграцию и постинтеграционную репарацию

Для выяснения механизма влияния SFPQ на интеграцию и ПИР нам в первую очередь необходимо было выяснить, регулирует ли этот белок указанные процессы через прямое взаимодействие с ИН. Для этого мы создали генетические конструкции, позволяющие экспрессировать в эукариотических клетках мутантные варианты белка SFPQ, которые плохо взаимодействуют (SFPQ^{Δ213-275}) или совсем не взаимодействуют (SFPQ^{R19A/R242A}) с ИН.

Эти белки были суперэкспрессированы в клетках HEK293T и повышение их внутриклеточного уровня было подтверждено с помощью анализа вестерн-блот (Рисунок 6, А). Затем эти клетки были трансдуцированы VSV-G-псевдотипированным вектором на основе ВИЧ-1, кодирующим люциферазу светлячка. Оказалось, что суперэкспрессия мутантных белков SFPQ^{Δ213-275} и SFPQ^{R19A/R242A} не оказывает эффекта ни на сигнал люциферазы, ни на обратную транскрипцию, ни на интеграцию вирусной кДНК, в отличие от полноразмерного белка SFPQ (Рисунок 6, Б-Г).

Эти результаты демонстрируют, что ключевую роль в регуляции процесса интеграции вирусной ДНК играет непосредственное взаимодействие клеточного белка SFPQ с ИН, в котором участвуют а.о., расположенные в N-концевом домене SFPQ и каталитическом домене ИН. При этом SFPQ является положительным фактором репликации ВИЧ-1, поскольку уровень интегрированной формы ДНК растет при увеличении уровня SFPQ в клетке.

Надо отметить, что ранее проведенное исследование влияния SFPQ на репликацию ВИЧ-1 показало другой результат: при снижении уровня SFPQ в клетках TZM-bl, количество как общей, так и интегрированной вирусной кДНК возрастало (Yadav et al., 2019). Такая разница в результатах может

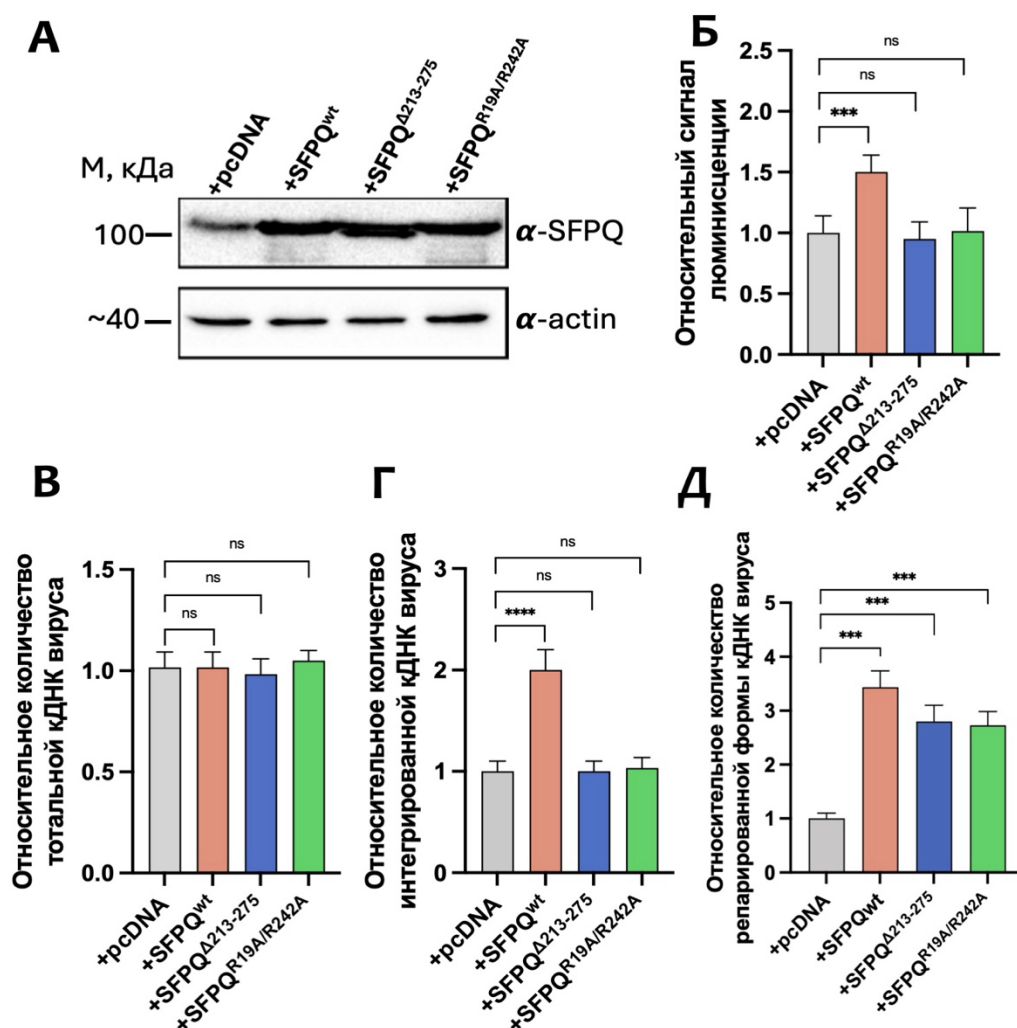


Рисунок 6. Влияние мутантных форм SFPQ, неспособных связываться с ИН, на репликацию псевдовиральной системы. А) Вестерн-блот анализ количества суперэкспрессированных белков SFPQ, дикого типа и мутантов в клеточных лизатах. Б) Относительный сигнал люминесценции при суперэкспрессии различных вариантов SFPQ. В) Относительное количество totalной кДНК вируса при суперэкспрессии различных вариантов SFPQ. Г) Относительное количество интегрированной кДНК вируса. Д) Относительное количество репарированной кДНК вируса. Эксперимент выполнен в трех независимых биологических повторах. Значимость была определена с помощью одностороннего дисперсионного анализа, **** - $p < 0,0001$, *** - $p < 0,001$; ns - не является значимой.

объясняться использованием различных систем для оценки влияния белков на репликацию ВИЧ-1. Система, используемая нами – VSV-G-псевдовиральный вектор на основе ВИЧ-1, успешно показала себя в других работах, где оценивалось влияние разных факторов на ранние стадии репликации вируса

(*Knyazhanskaya et al., 2019, Anisenko et al., 2017 Anisenko et al., 2018*). Мы обнаружили, что SFPQ влияет именно на стадию интеграции вируса и не оказывает влияния на обратную транскрипцию. Кроме того, мы подтвердили, что SFPQ и ИН могут непосредственно взаимодействовать друг с другом и экспериментально определили район их связывания. С использованием мутантов SFPQ, обладающих пониженной аффинностью к ИН, мы доказали, что влияние этого клеточного белка на интеграцию обусловлено именно его связыванием с ИН.

Учитывая, что влияние белка SFPQ на интеграцию напрямую зависит от его способности связываться с ИН, комплекс этих белков можно рассматривать как новую молекулярную мишень для разработки соединений, нацеленных на блокировку ИН/SFPQ-взаимодействия, как потенциальных компонентов антиретровирусной терапии.

При анализе того, как изменяется эффективность ПИР при изменении внутриклеточного уровня белка SFPQ дикого типа и его мутантов, оказалось, что суперэкспрессия мутантных белков SFPQ^{R19A/R242A} и SFPQ^{Δ213-275}, неспособных взаимодействовать с ИН и, соответственно, не влияющих на интеграцию, приводила к повышению уровня репарированной ДНК, хотя эффект был несколько меньше, чем в случае SFPQ дикого типа (Рисунок 6, Д). Этот факт указывает на то, что в отличие от интеграции, влияние SFPQ на процесс ПИР не зависит от его связывания с ИН.

Процесс ПИР начинается с того, что к местам повреждений в ДНК привлекаются две киназы: ДНК-зависимая протеинкиназа (DNA-PK) и АТМ, - за счет непосредственного взаимодействия ИН с субъединицей DNA-PK - белком Ku70 (*Knyazhanskaya et al., 2019, Anisenko et al., 2023*). В результате, инициация ПИР напоминает инициацию репарации двуцепочечных разрывов в ДНК по пути негомولوجичного соединения концов (NHEJ) (*Lieber, 2010*). Важно, что белок SFPQ также участвует в NHEJ-репарации и способен связываться с ДНК независимо от Ku70 на внутренних поверхностях ДНК

(*Udayakumar et al., 2015*). Помимо этого, и SFPQ и Ku70 рекрутируются к местам повреждений ДНК, но в разное время (*Li et al., 2009*).

Учитывая, что SFPQ оказывал сильное стимулирующее действие на ПИР, которое при этом не зависело от его связывания с ИН, мы предположили, что SFPQ может участвовать в процессе ПИР за счет его взаимодействия с Ku70. Прежде всего мы проверили способность SFPQ и созданных нами мутантов SFPQ^{Δ213-275} и SFPQ^{R19A/R242A} связываться с Ku70. Для этого мы осадили белки GST-SFPQ (дикого типа и мутанты) и ранее сконструированный белок His₆-Ku70-tRFP на глутатион-сефарозе и обнаружили связывание Ku70 с SFPQ дикого типа (Рисунок 7, А).

Анализ связывания мутантных форм SFPQ показал, что как SFPQ^{Δ213-275}, так и SFPQ^{R19A/R242A} способны связывать Ku70, хотя эффективность связывания была заметно ниже для белка SFPQ^{Δ213-275} (Рисунок 7, А). Эти данные указывают на то, что участие белка SFPQ в процессе ПИР скорее всего не зависит от его непосредственного взаимодействия с Ku70, поскольку оба мутантных белка оказывали абсолютно одинаковое влияние на эффективность ПИР (Рисунок 6, Д).

Нам также было интересно проверить, зависит ли от связывания с Ku70 участие SFPQ в NHEJ-репарации. Для этого использовали систему трех плазмид (*Bhargava et al., 2018*): первая кодирует эндонуклеазу Cas9 и гидовую РНК 7а, вторая — Cas9 и гидовую РНК 7б, третья — ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) с 46-нуклеотидным спейсером, нарушающим синтез GFP. В клетке Cas9 вызывает двуцепочечные разрывы по краям спейсера за счет гидовых РНК и его удаление из вектора. Репарация разрывов по пути NHEJ восстанавливает функциональный ген GFP, и в клетках синтезируется GFP.

Проверка влияния SFPQ на репарацию двуцепочечных разрывов показала, что его суперэкспрессия увеличивает долю клеток GFP⁺ в 1,3 раза по сравнению с контролем, а нокдаун снижает на 40-45 %. Следовательно, наша система проверки NHEJ-репарации функциональна и SFPQ — позитивный регулятор NHEJ. Мутантные белки SFPQ^{R19A/R242A} и SFPQ^{Δ213-275}, последний из которых несколько хуже связывался с Ku70, оказывали такое же влияние на NHEJ-репарацию, как и SFPQ дикого типа (Рисунок 7, Б).

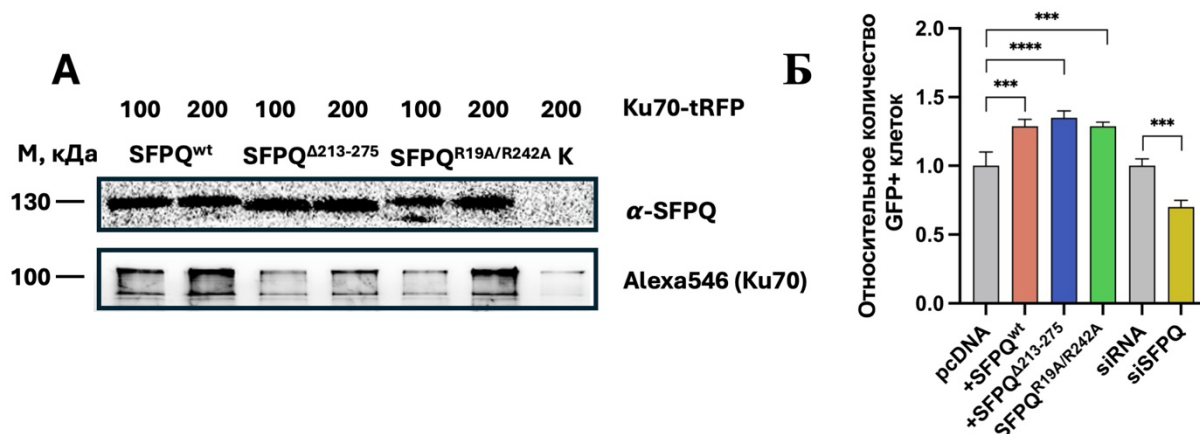


Рисунок 7. Анализ взаимодействия GST-SFPQ и его мутантных вариантов с Ku70 и проверка их влияния на NHEJ репарацию. А) Анализ связывания белков SFPQ с His₆-Ku70-tRFP методом соосаждения на глутатион-сефарозе, проявка GST-SFPQ антителами к GST, His₆-Ku70-tRFP – по флуоресценции tRFP. Б) Анализ влияния белков SFPQ на NHEJ-репарацию. Эксперимент выполнен в трех независимых биологических повторах. Значимость была определена с помощью одностороннего дисперсионного анализа, **** - $p < 0,0001$, *** - $p < 0,001$; ns - не является значимой.

На основании полученных результатов мы можем сделать вывод, что участие белка SFPQ как в процессе ПИР, так и в NHEJ-репарации, очевидно, не зависит от его связывания с белком Ku70.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате экспериментов впервые показано, что клеточный белок SFPQ позитивно влияет на ранние стадии репликации ВИЧ-1, при этом его клеточный партнер NONO на эти стадии не влияет. Установлено, что SFPQ не влияет на процесс обратной транскрипции, но стимулирует интеграцию и постинтеграционную репарацию.

С использованием серии делеционных и точечных мутантов SFPQ и ИН ВИЧ-1 определены аминокислотные остатки, участвующие в связывании этих белков друг с другом. Изучение влияния мутантов SFPQ, неспособных взаимодействовать с ИН, на репликацию вируса позволило установить, что положительное влияние SFPQ на стадию интеграции зависит от его связывания с ИН, в то время как влияние на постинтеграционную репарацию ВИЧ-1 от связывания с ИН не зависит.

Эти данные дополняют предыдущие исследования и уточняют механизмы, с помощью которых SFPQ влияет на репликацию ВИЧ-1, подчеркивая важность комплексного подхода к изучению взаимодействия вирусных и клеточных белков. Полученные результаты позволяют лучше понять молекулярные механизмы патогенеза ВИЧ-инфекции и формируют основу для инновационных подходов в антиретровирусной терапии, направленных на нарушение взаимодействий вирусных белков и их клеточных помощников.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что белок SFPQ выступает позитивным регулятором репликации ВИЧ-1, в то время как белок NONO не вовлечен в регуляцию ранних этапов жизненного цикла вируса.
2. Проведенный анализ демонстрирует, что белок SFPQ оказывает влияние на этапы интеграции и постинтеграционной репарации ДНК ВИЧ-1, не затрагивая при этом стадию обратной транскрипции.
3. Взаимодействие интегразы ВИЧ-1 с SFPQ осуществляется через каталитический домен вирусного фермента (критически важными являются остатки V165, R166, R187) и N-концевой домен клеточного белка, содержащий два RGG-мотива ($R^{19}GGGGGR^{25}GG$ и $R^{236}GGGGGR^{242}GG$).
4. Проведенный функциональный анализ выявил критическую роль остатка R187 в поддержании правильной третичной структуры интегразы ВИЧ-1, что является необходимым условием для всех этапов активности вирусного фермента. Установлено, что замена I182A нарушает специфически процесс интеграции, в то время как мутация K188A оказывает негативное влияние на стадию обратной транскрипции.
5. Взаимодействие SFPQ с интегразой важно для процесса интеграции, но не для постинтеграционной репарации.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.014.2 по специальности и отрасли наук:

1. Rosina 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, V. 23, p. 12341. Импакт-фактор 4,9 (JIF). EDN: JQXKZW. 2,73 п. л.

2. Шадрина О.А., **Кихай Т.Ф.**, Агапкина Ю.Ю., Готтих М.Б. Белки SFPQ, NONO и длинная некодирующая РНК NEAT1: функции в клетке и в жизненном цикле ВИЧ-1. *Молекулярная биология*, 2022. Т. 56. № 2. С. 259–274. Импакт-фактор 0,785 (РИНЦ). EDN: TBXYOW. 1, 76 п. л.

Shadrina O. A., **Kikhai T. F.**, Agapkina Y. Y., Gottikh M. B. SFPQ and NONO Proteins and Long Non-Coding NEAT1 RNA: Cellular Functions and Role in the HIV-1 Life Cycle. *Molecular Biology*, 2022, Vol. 56, № 2. P. 196-209. Импакт-фактор 1,2 (JIF). EDN ZBTEVD. 1, 74 п. л.

3. **Kikhai T.**, Agapkina Y., Silkina M., Prikazchikova T., Gottikh M. The cellular SFPQ protein as a positive factor in the HIV-1 integration. *Biochimie*, 2024, V. 222, p. 9–17. Импакт-фактор 3,0 (JIF). EDN: JSVHAA. 1,70 п. л.

4. **Кихай Т.Ф.**, Агапкина Ю.Ю., Приказчикова Т.А., Вдовина М.В., Шехтман С.П., Фомичева С.В., Королев С.П., Готтих М.Б. Роль аминокислот каталитического домена интегразы ВИЧ-1, I182, R187, K188, в процессах обратной транскрипции и интеграции. *Биохимия (Москва)*, 2024. Т. 89. № 3. С. 418–431. Импакт-фактор 0,908 (РИНЦ). EDN: WKSAES. 1,25 п. л.

Kikhai T. F., Agapkina Yu. Yu., Prikazchikova T. A., Vdovina M. V., Shekhtman S. P., Fomicheva S. V., Korolev S. P., Gottikh M. B. Role of I182, R187, and K188 Amino Acid Residues in the Catalytic Domain of HIV-1 Integrase in the Processes of Reverse Transcription and Integration. *Biochemistry (Moscow)*, 2024. Vol. 89. №. 3. P. 462-473. Импакт-фактор 2,2 (JIF). EDN UTLKTY. 1,21 п. л.