

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

на правах рукописи

Анисенко Андрей Николаевич

Постинтеграционная репарация ВИЧ-1 и ингибиторы этого процесса
1.5.3. Молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени
доктора химических наук

Научный консультант:
доктор химических наук,
профессор Готтих Марина Борисовна

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
1. ВВЕДЕНИЕ	6
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
2.1. Классические типы АРВП – ингибиторы вирусных ферментов	17
2.1.1. Ингибиторы обратной транскрипции.....	18
2.1.2. Ингибиторы интеграции	25
2.1.3 Ингибиторы протеазы.....	28
2.2. Блокаторы взаимодействия вирусных белков с белками клетки	30
2.2.1. Ингибиторы проникновения вируса в клетку	31
2.2.2. Ингибиторы, действующие на сборку и разборку вирусного капсида	37
2.2.3. Соединения, блокирующие взаимодействия интегразы ВИЧ-1 с клеточными белками	41
2.3. Антиретровирусные препараты длительного действия, применяемые для лечения ВИЧ-инфекции	49
2.3.1. Каботегравир и рилпивирин длительного действия	50
2.3.2. Ислатравир.....	50
2.3.3. Ленакапавир	52
2.4. Разрабатываемые подходы к элиминации или глубокому ингибированию ВИЧ-инфекции	53
2.4.1. Использование геномного редактирования для излечения ВИЧ-инфекции	56
2.4.2. Стратегия «Shock and Kill»	59
2.4.3. CAR-T терапия в контексте стратегии «Shock and Kill».....	63
2.4.4. Стратегия «Block and Lock».....	65
2.5. Заключение к обзору литературы.....	69
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	70
3.1. Используемые реактивы и буферные растворы	70
3.2. Плазмидные вектора	73
3.3. Получение и очистка рекомбинантных белков.....	75
3.4. Метод соосаждения белков.....	76
3.5. Метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR)	77
3.6. Метод пептидного-фишинга	78
3.7. Молекулярный докинг.....	79
3.8. Молекулярная динамика комплекса Ku/s17	80

3.9. Получение и очистка антител к интегразе ВИЧ-1.....	80
3.10. Работа с культурами клеток	81
3.11. Получение и работа с лентивирусными векторами	82
3.12. Определение форм ДНК ВИЧ-1.....	83
3.13. Определение эффективности репарации двуцепочечных разрывов ДНК	85
3.14. Ко-иммунопреципитация точечных мутантов Ku70 и интегразы ВИЧ-1.....	86
3.15. XL-MS протокол для идентификации клеточных белков, взаимодействующих с интегразой ВИЧ-1	87
3.16. ChIP-MS протокол для идентификации клеточных белков, привлекаемых к сайтам интеграции ВИЧ-1.....	88
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	90
Раздел 4.1. ATM и DNA-РКс – ключевые клеточные регуляторы постинтеграционной репарации ВИЧ-1	93
4.1.1. ATM и DNA-РКс, но не ATR важны для успешного протекания ранних этапов репликации ВИЧ-1.....	93
4.1.2. <i>Активности ATM и DNA-РКс важны на этапе постинтеграционной репарации</i>	<i>97</i>
4.1.3. Активация как DNA-РКс, так и ATM зависит от взаимодействия IN с Ku70 ..	98
4.1.4. Интеграция вирусной ДНК является сигналом для активации DNA-РКс и ATM	100
4.1.5. ATM и DNA-РКс функционируют последовательно в постинтеграционной репарации	102
4.1.6. DNA-РКс, ATM и их мишени Chk2, H2AX и p53 фосфорилируются в ответ на трансдукцию клеток векторами на основе генома ВИЧ-1.....	104
4.1.7. Накопление γ H2AX и pSer15-p53 происходит по двум независимым путям	106
4.1.8. Фосфорилированный H2AX формирует локусы в ядрах трансдуцированных клеток	109
Закключение к разделу 4.1	111
Раздел 4.2. Другие потенциальные участники постинтеграционной репарации ВИЧ-1	113
4.2.1. Идентификация клеточных белков, взаимодействующих с суперэкспрессированной интегразой ВИЧ-1 в клетках HEK293T	113
4.2.2. Разработка системы для идентификации белков, привлекаемых к сайтам интеграции генома ВИЧ-1.....	118
4.2.3. Идентификация клеточных белков, ассоциированных с комплексами IN-LTR	123
4.2.4. Гипотеза о совместном участии факторов репарации двуцепочечных разрывов ДНК и компонентов BER-пути	132

4.2.5. PARP1 и Fen1 из систем репарации одностранных повреждений ДНК важны для постинтеграционной репарации ВИЧ-1	136
Заключение к разделу 4.2	139
Раздел 4.3. Разработка ингибитора взаимодействия интегразы ВИЧ-1 и клеточного белка Ku70	142
4.3.1. Флуоресцентная система для поиска ингибиторов взаимодействия IN и Ku70	142
4.3.2. Конъюгаты олигонуклеотидов с эозином Y – эффективные ингибиторы взаимодействия IN с клеточным партнером Ku70	149
4.3.3. Поиск низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия IN и Ku70	157
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	180
ВЫВОДЫ	182
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	184

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AZT – азидотимидин
BER – эксцизионная репарация оснований (англ. base excision repair)
BIC – биктегравир
BRD4 - бромдомен-содержащий белок 4
CA – капсидный белок
CAB – каботегравир
CAR-T – терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (англ. chimeric antigen receptor T-cell therapy)
DLV – делавердин
DOR – доравирин
DPV – дапивириин
DTG – долутегравир
EFV – эфавиренц
ETR – этравирин
EVG – элвитегравир
HDAC – гистондеацетилазы
IN – интеграна
LEDGF/p75 – фактор роста эпителия хрусталика (англ. lens epithelium-derived growth factor)
LRAs – агенты, обращающие латентность (англ. latency-reversing agents)
LTR – длинные концевые повторы (англ. long terminal repeats)
NHEJ – негомологичное соединение концов (англ. non-homologous end joining)
NVP – невирапин
PARP1 – поли(АДФ-рибоза) полимеразы 1
PBMC – мононуклеарные клетки периферической крови (англ. peripheral blood mononuclear cells)
PFV – прототипный пенистый вирус (англ. Prototype Foamy Virus)
P-TEFb – положительный фактор элонгации транскрипции b (англ. Positive Transcription Elongation Factor b)
RAL – ралтегравир
RPV – рилпивирин
TAF – тенофовир алафенамид
TAR - элемент ответа на трансактивацию (англ. Trans Activation Response element)
Tat – трансактиватор транскрипции (англ. Trans-Activator of Transcription)
TDF – тенофовир дизопроксил фумарат
АРВП – антиретровирусные препараты
АРВП-ДД – антиретровирусные препараты длительного действия
АРВТ – антиретровирусная терапия
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
ИП – ингибиторы протеазы
ИПЦИ – ингибиторы переноса цепи интегразы
кДНК – ДНК копия вирусного генома
НИОТ – нуклеозидные/нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы
НИТОТ – нуклеозидный ингибитор транслокации обратной транскриптазы
ННИОТ – ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы
ОТ – обратная транскриптаза
ПКС – протеинкиназа С
ПР – протеаза
СПИД – синдром приобретённого иммунного дефицита

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), впервые описанный в 1983 году, до настоящего момента остается серьезной проблемой для системы здравоохранения. Активные исследования в области молекулярной биологии этого вируса привели к созданию широкого спектра антиретровирусных препаратов, применение которых в виде комбинации из двух или большего числа препаратов обеспечило эффективный контроль вирусной репликации. Это, в свою очередь, позволило перевести ВИЧ-инфекцию из группы смертельно опасных вирусных заболеваний в категорию хронических инфекций, однако, строгое соблюдение режима приема антиретровирусных препаратов необходимо для снижения вирусной нагрузки до недетектируемых уровней, а также сохранения качества жизни пациентов.

Сегодня основу антиретровирусной терапии составляют ингибиторы трех ключевых вирусных ферментов: обратной транскриптазы, интегразы и протеазы. Реже используются ингибиторы взаимодействия вируса с CD4-рецептором или CCR5-корцептором, а также ингибиторы слияния вируса с клеткой (основные варианты терапии ВИЧ-1 рассмотрены в разделе 2 «Обзор литературы»). Такое разнообразие препаратов к разным мишеням является необходимым ответом научного сообщества на уникальную особенность вируса – высокую скорость накопления мутаций, приводящую к появлению штаммов вируса, устойчивых к действию препаратов [1]. Долгое время такие резистентные штаммы обнаруживали лишь у пациентов, которые длительное время принимали антиретровирусную терапию. Сегодня такие штаммы обнаруживаются в том числе и у людей, которым впервые поставлен диагноз ВИЧ и которые никогда до этого не принимали антиретровирусную терапию, т.е. такие штаммы стали активно распространяться в популяции [2,3]. Для преодоления резистентности долгое время разрабатывались новые ингибиторы в рамках уже известных классов препаратов. Хотя такие молекулы и отличаются по структуре от предыдущих, что обеспечивает их действие в отношении резистентных штаммов, они связываются в одних и тех же сайтах ферментов. Это существенно ограничивает разнообразие возможных структур, сохраняющих активность в отношении мутантных форм ферментов, и означает, что возможности для создания таких новых препаратов будут со временем исчерпаны.

Именно дальнейшее изучение особенностей молекулярной биологии ВИЧ и поиск новых мишеней для ингибиторов может позволить создать ингибиторы вирусной репликации со сниженной вероятностью развития резистентности. Сегодня в качестве одной из таких альтернативных мишеней для создания новых ингибиторов 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 развития резистентных штаммов.

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 [4]. Для таких комплексов на сегодняшний день уже разработаны ингибиторы их формирования и показано, что они эффективно предотвращают репликацию вируса. Особый интерес к таким соединениям проявляет международная компания Gilead Sciences, занимающаяся разработкой вакцин и противовирусных препаратов [5].

Наше внимание привлек другой партнер интегразы – клеточный белок Ku70. Ранее, в рамках исследования функциональной роли этого взаимодействия, нами было установлено, что образование комплекса вирусной интегразы с этим белком запускает процесс постинтеграционной репарации – наименее изученный этап жизненного цикла вируса. В результате интеграции ДНК-копии вирусного генома в клеточный по обоим краям от встроенной вирусной ДНК формируются повреждения, а именно, пятиянуклеотидные односторонние 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 этого процесса критически важна возможность образования комплекса между интегразой ВИЧ-1 и клеточным белком Ku70. Помимо этого мы установили, что для инициации этого процесса наряду с Ku70 субъединицей ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-ПК) также важны две другие субъединицы этого комплекса – Ku80 и DNA-ПКcs. 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 показана принципиальная возможность нарушения репликативного цикла вируса с их помощью. В представленной диссертации исследуются эти вопросы.

Цель 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 PIKK-семейства: DNA-ПК, 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 работы

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-РК, 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-РК.

С помощью метода иммунопреципитации хроматина 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 были 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 инициируют 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 клеточные функции белка Ku70. С использованием серии производных ингибитора 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, а значит, такие соединения в будущем могут дать начало новому классу ингибиторов 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 PI3K киназ, а также PARP1 в постинтеграционной репарации ВИЧ-1 использовали 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 методом цифровой ПЦР на приборе QIAcuity One 5 рlex. Для изучения изменения статуса фосфорилирования мишеней PI3K-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.

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 статистическая достоверность различий полученных данных оценивали с помощью встроенного пакета средств статистической обработки программы GraphPad Prism 8.0.1.

Основные 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.

Апробация работы

Диссертационная работа 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; PROHIV2019, 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 международных рецензируемых изданиях, индексируемых в международных системах цитирования Web of Science и Scopus.

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, постановке

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. Автором разработан принцип метода и валидирован сам метод оценки эффективности постинтеграционной репарации ВИЧ-1 в работе [6], собрана, систематизирована и проанализирована литература по участию клеточных белков из систем репарации в жизненном цикле ВИЧ-1 [7], проведены эксперименты по выяснению роли каталитической функции DNA-ПК в постинтеграционной репарации ВИЧ-1 [8], собрана, систематизирована и проанализирована литература по известным мишеням фосфорилирования DNA-ПК [9], а также по участию клеточных партнеров интегразы ВИЧ-1 в ранних этапах репликации вируса [10], 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 поставлены цели и задачи экспериментов по молекулярному моделированию комплексов интегразы с такими конъюгатами, проведен анализ и систематизация полученных данных [11]. В работах [12,13] проведена подготовка NGS-библиотек, анализ результатов дифференциальной экспрессии генов при нокауте каждой из субъединиц DNA-ПК комплекса. В работах [14–18] 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* [14], эксперименты по оценке механизма совместного участия ATM и DNA-РК в постинтеграционной репарации ВИЧ-1 [15], эксперименты по определению изменения статуса фосфорилирования ключевых мишеней исследуемых киназ [17], эксперименты по влиянию низкомолекулярного ингибитора взаимодействия интегразы и Ku70 на ранние этапы репликации ВИЧ-1 и клеточные функции белка Ku70 [16], эксперименты по идентификации клеточных белков, взаимодействующих с интегразой ВИЧ-1 методом XL-MS [18]. В работе [19] проведен анализ влияния изменения внутриклеточной концентрации клеточных белков, взаимодействующих с интегразой ВИЧ-1, на постинтеграционную репарацию ВИЧ-1. В работе [20] проведен дизайн низкомолекулярных ингибиторов репликации ВИЧ-1.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из следующих глав: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы» (раздел содержит 411 ссылок). Работу иллюстрируют 64 рисунка и 5 таблиц. Общий объем диссертации 204 страницы.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

«Подходы к ингибированию репликации ВИЧ-1»

ВИЧ-инфекция — это медленно прогрессирующее заболевание, вызываемое вирусом иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1). Этот вирус относится к семейству *Retroviridae*, роду *Lentivirus*. ВИЧ-1 поражает клетки иммунной системы, несущие на поверхности рецепторы CD4, в частности Т-хелперы, моноциты, макрофаги, клетки Лангерганса, дендритные клетки, клетки микроглии [21–23]. Следствием инфекции является угнетение иммунной системы и развитие синдрома приобретённого иммунного дефицита (СПИД). В результате организм больного теряет возможность защищаться от патогенов, что приводит к возникновению оппортунистических заболеваний вирусной, бактериальной и грибковой природы, а также онкологических болезней, не характерных для людей с нормальным иммунным статусом [24].

Для борьбы с ВИЧ-инфекцией используется антиретровирусная терапия (АРВТ), состоящая в регулярном приёме двух и более противовирусных препаратов. АРВТ направлена на снижение в плазме крови пациентов уровня РНК ВИЧ до неопределяемого (меньше 20-50 копий/мл) и восстановление уровня CD4⁺ клеток до нормального. Значительный прогресс в разработке различных типов антиретровирусных препаратов (АРВП) за последние годы позволил взять под контроль развитие ВИЧ-инфекции, но лекарства, позволяющего полностью излечить данное заболевание, до сих пор так и не было получено. Даже у пациентов, длительное время находящихся на АРВТ, в организме сохраняется вирус на уровне нескольких копий вирусной РНК на мл плазмы крови. Основными резервуарами ВИЧ-1 являются CD4⁺ Т-клетки памяти, содержащие интегрированный вирус в латентной форме. При остановке применения антиретровирусного препарата может происходить реактивация латентного провируса и концентрация вируса в крови пациента увеличивается [25,26], поэтому необходимо применение АРВТ на протяжении всей жизни ВИЧ-инфицированного пациента. Однако, длительное применение одних и тех же препаратов может вызывать формирование устойчивых к ним штаммов вируса, поэтому остро стоит проблема преодоления резистентности ВИЧ-1 к существующим компонентам АРВТ и поиска новых подходов к терапии ВИЧ-инфекции [2,27].

Исследования в области борьбы с ВИЧ-инфекцией сосредоточены в настоящее время на следующих основных направлениях: совершенствование ингибиторов уже

существующих классов, поиск новых молекулярных мишеней и принципиально новых классов ингибиторов, а также разработка подходов, направленных на полное удаление вируса из организма человека.

Понимание жизненного цикла ВИЧ-1 имеет решающее значение для разработки новых подходов к ингибированию ВИЧ-инфекции и в первую очередь для поиска новых мишеней антивирусных препаратов. Инфекция начинается со связывания вирусного белка оболочки gp120 с рецептором CD4⁺ Т-клеток, а затем с корецептором, чаще всего с трансмембранным хемокиновым рецептором CCR5 или CXCR4. Долгое время считалось, что после связывания белка оболочки ВИЧ с рецептором и корецептором происходит слияние мембран вириона и Т-клетки, однако, согласно последним данным, слиянию мембран предшествует эндоцитоз вирусных частиц [28]. Вирусный капсид высвобождается в цитоплазму клетки-хозяина и по системе микротрубочек проходит в ядро. При этом в капсиде происходит процесс обратной транскрипции геномной РНК вируса, в ходе которого синтезируется вирусная кДНК, которая затем в процессе интеграции встраивается в геном клетки-хозяина, образуя провирус. Дальнейшими стадиями жизненного цикла ВИЧ-1 являются транскрипция провируса, трансляция закодированных в нем белков, образование новых вирусных частиц и их выход из клетки [29,30] (Рис. 1).

Обратная транскрипция и интеграция являются ключевыми этапами в вирусном репликативном цикле, которые осуществляются за счет действия вирусных ферментов обратной транскриптазы и интегразы, соответственно [31]. Действие многих антиретровирусных препаратов основано на ингибировании активности обратной транскриптазы либо интегразы. Еще одной известной мишенью для АРВП является протеаза ВИЧ-1, которая расщепляет синтезируемые в ходе трансляции полипротеины (в частности, Gag и Gag-Pol), благодаря чему образуются зрелые белки вируса [32]. Ингибиторы вирусных ферментов в настоящее время являются основными компонентами АРВТ, поскольку считается, что они мало влияют на нормальные клеточные процессы. Однако у них есть и недостаток, вызванный тем, что повышенная частота мутаций в вирусном геноме способствует увеличению вероятности возникновения резистентности к данному препарату [33].

Геном ВИЧ кодирует 15 белков, которые осуществляют основные функции, необходимые для репликации вируса, однако многие клеточные белки также играют важную роль в жизненном цикле ВИЧ, так или иначе взаимодействуя с белками вируса [34]. В связи с этим, одним из возможных способов преодоления проблемы

резистентности может стать разработка АРВП, нацеленных на нарушение формирования комплексов клеточных и вирусных белков.

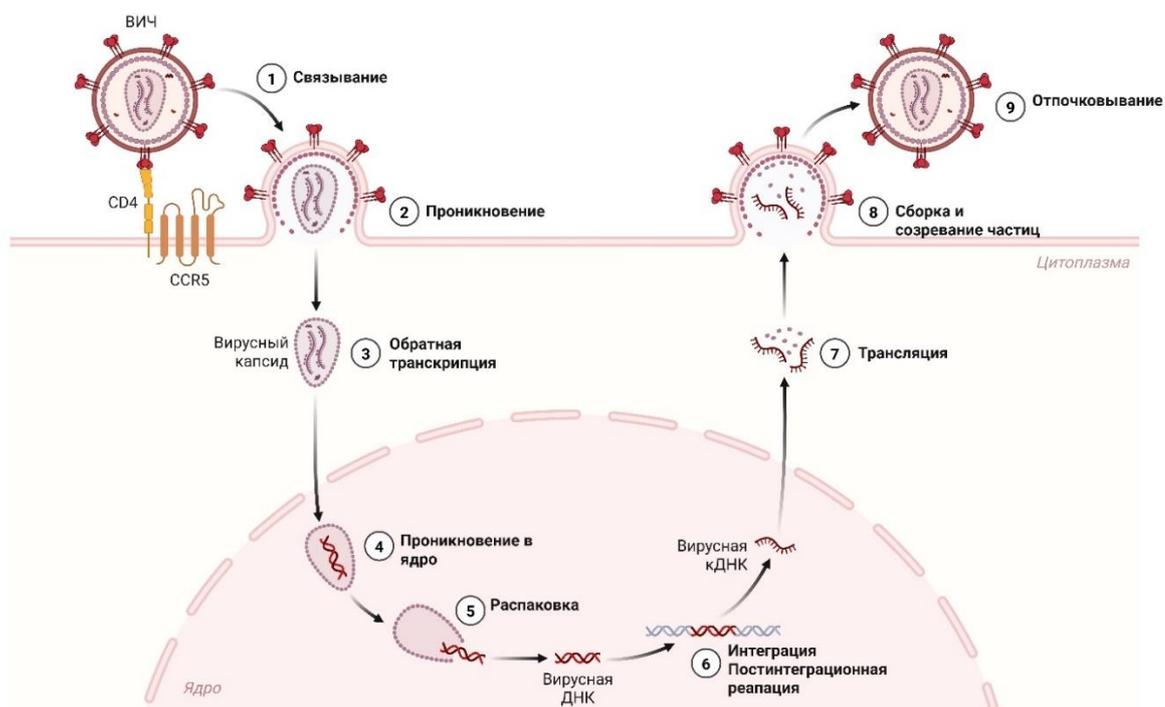


Рисунок 1. Схема репликативного цикла ВИЧ-1.

В данном обзоре представлена информация о современных препаратах различных классов, применяемых для ингибирования репликации ВИЧ-1 как в медицинской практике, так и на этапе испытаний, с более детальным рассмотрением низкомолекулярных соединений, а также об основных стратегиях при лечении ВИЧ-1, в которых эти соединения применяются.

2.1. Классические типы АРВП – ингибиторы вирусных ферментов

В настоящее время в клинической практике используется более 20 АРВП в различных комбинациях. Большинству пациентов назначают комбинации двух нуклеозидных/нуклеотидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ) с третьим препаратом из другого класса: ненуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы (ННИОТ), ингибитором интегразы или протеазы. Однако также возможны и другие схемы, например, с двумя препаратами из разных классов. Стандартная современная

АРВТ требует ежедневного приема одной или нескольких таблеток на протяжении всей жизни [35].

2.1.1. Ингибиторы обратной транскрипции

2.1.1.1. Обратная транскриптаза. Строение и функции

Обратная транскриптаза (ОТ) способна осуществлять ключевой процесс синтеза вирусной кДНК в жизненном цикле ВИЧ-1 за счет трех своих активностей: РНК- и ДНК-зависимой ДНК-полимеразы и рибонуклеазы H (РНКазы H). ОТ ВИЧ-1 функционирует в форме гетеродимера p66/p51, который образуется в результате процессинга полипротеина Gag-Pol вирусной протеазой. Большая субъединица p66 содержит домены ДНК-полимеразы и РНКазы H, а субъединица p51 - только полимеразный домен [36–38]. Функция p51 преимущественно структурная и важна для правильной ориентации субстрата [39]. Пространственное и временное расположение двух доменов – полимеразного и РНКазного – взаимно координирует их активности [40–42]. Положение расщепления РНК в дуплексе РНК/ДНК РНКазой H определяется взаимодействием между нуклеиновой кислотой и полимеразным доменом.

В ходе обратной транскрипции происходит синтез двуцепочечной ДНК копии вирусного генома (кДНК) на матрице одноцепочечной геномной РНК. Этот процесс можно подразделить на несколько стадий: инициацию полимеризации с тРНК в качестве праймера, образование РНК-ДНК гибрида, деградацию 5'-участка РНК-матрицы в этом гибриде, перескок тРНК на 3'-участок РНК, элонгацию полимеризации, деградацию вирусной РНК, инициацию синтеза второй цепи ДНК с полипуринового тракта, второй перескок второй цепи ДНК к 3'-концу первой цепи и, наконец, элонгацию второй цепи (Рис. 2). Гидролиз РНК происходит одновременно с синтезом ДНК-цепи, примерно один акт гидролиза на каждые 7 добавленных нуклеотидов. Кроме того, расщепление РНКазой H происходит более эффективно, когда полимеризация приостанавливается [43].

ОТ не имеет корректирующей активности, что определяет высокую частоту замен нуклеотидов, вставок или делеций при каждом следующем цикле репликации вируса [44,45]. Высокий уровень мутаций, связанный в том числе и с действием клеточных цитидиндеаминаз АРОВЕС[46], может приводить к ингибированию репликации вируса, за счет продукции вирусных частиц со значимыми делециями, сдвигами рамок считывания и пр. В то же время разнообразие генотипов ВИЧ-1

предоставляет практически неиссякаемый субстрат для отбора устойчивых к ингибиторам вирусных ферментов штаммов вируса. Это свойство ОТ лежит в основе проблемы, приводящей к постоянной необходимости поиска новых АРВП.

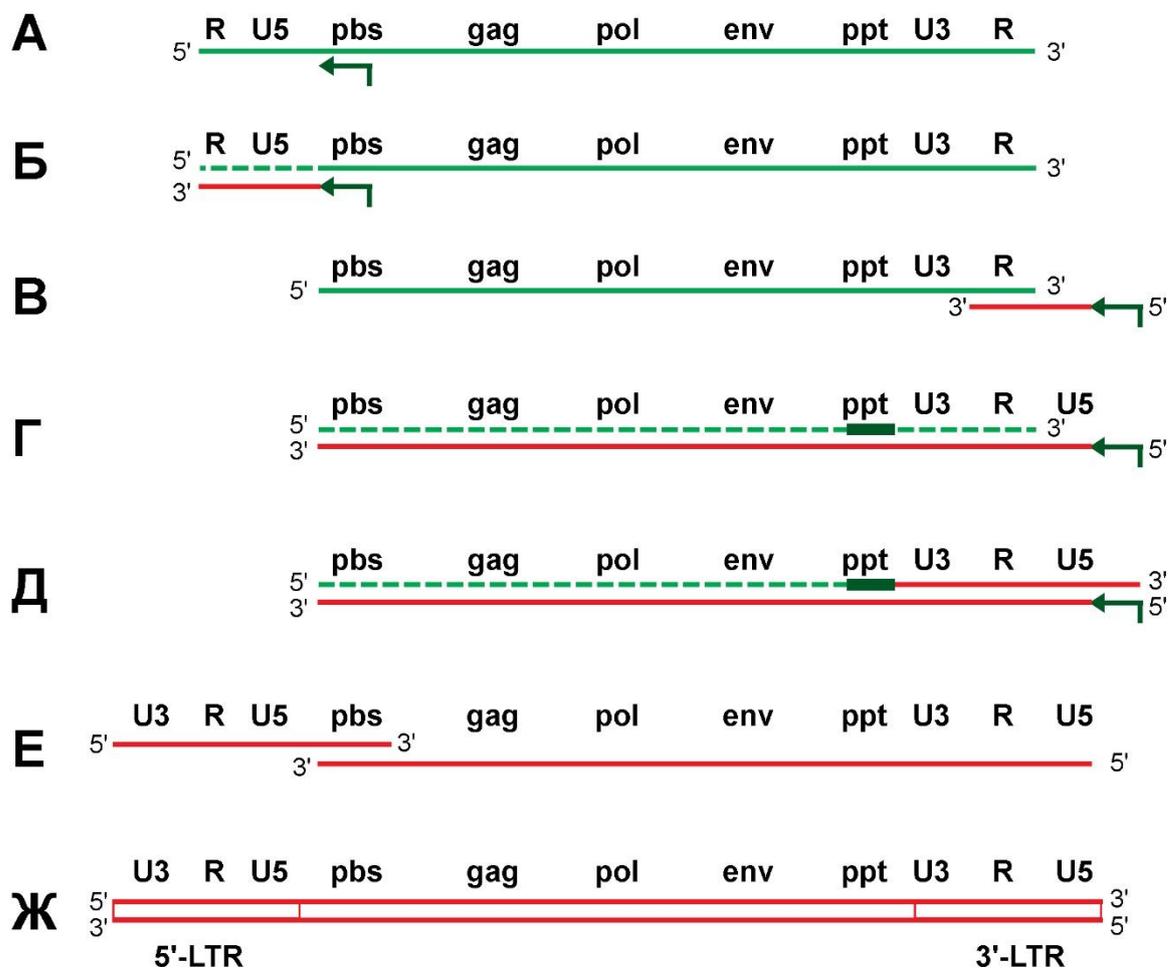


Рисунок 2. Схема обратной транскрипции ретровирусов. Одноцепочечная геномная РНК (зеленая) ВИЧ-1 в составе вириона находится в комплексе с лизиновой тРНК (темно-зеленая) (1), которая на первом этапе обратной транскрипции выступает в качестве РНК-праймера для инициации синтеза первой цепи кДНК. Параллельно с синтезом ДНК (красная) происходит гидролиз РНК, находящейся в составе РНК-ДНК гибрида (2), что стимулирует первый перескок ДНК-цепи (3). После перескока продолжается синтез первой цепи ДНК и параллельный гидролиз РНК-цепи. Небольшой участок РНК, называемый полипуриновым трактом (РРТ), гидролизуется медленнее, чем другие участки (4). Именно этот фрагмент РНК выступает в качестве праймера для синтеза второй цепи (5). После синтеза фрагмента второй цепи происходит второй перескок ДНК (6) и достройка каждой из цепей ДНК по матрице другой (7), в результате чего синтезируется полноразмерная кДНК. R – повтор, U3 и U5 – 3'- и 5'-концевой уникальный регион, pbs – сайт связывания праймера, gag, pol, env – основные вирусные открытые рамки считывания, ppt – полипуриновый тракт.

2.1.1.2. Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ)

Поскольку субстратом ОТ служат дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, некоторые химически модифицированные нуклеозиды или нуклеотиды могут ингибировать обратную транскрипцию. НИОТ связываются с ОТ в нуклеотид-связывающем сайте активного центра фермента, включающего каталитическую триаду D110, D185 и D186 [47]. Наиболее эффективны для ингибирования обратной транскрипции модификация сахара, которые предотвращают дальнейшую полимеризацию цепи ДНК. Такие модифицированные нуклеозиды трижды фосфорилируются в клетке, и образовавшиеся нуклеозидтрифосфаты используются ОТ в качестве субстрата. При создании НИОТ крайне важно учитывать три момента: 1) модифицированные нуклеозиды должны эффективно превращаться в нуклеозидмонофосфаты под действием соответствующих клеточных нуклеозидкиназ; 2) модифицированные нуклеозидтрифосфаты должны быть хорошими субстратами вирусной ОТ и 3) не должны узнаваться в качестве субстратов клеточными полимеразми. Чаще всего используются НИОТ, которые лишены гидроксильной группы в 3'-положении. Однако существуют ингибиторы, которые останавливают удлинение цепи ДНК, даже если они имеют 3'-гидроксильную группу.

Класс нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ) был первым АРВП, одобренным для лечения ВИЧ-инфекции [48]. Первым соединением, разрешенным в 1987 г. для лечения ВИЧ-инфекции в качестве НИОТ, стал зидовудин (азидотимидин, AZT) - аналог дезокситимидина с азидогруппой в 3'-положении (Рис. 3). Фосфорилированная форма AZT в клетке включается в растущую цепь ДНК под действием ОТ и обрывает цепь из-за отсутствия 3'-гидроксильной группы. Помимо ВИЧ-1 AZT может ингибировать и другие ретровирусы, вирус Эпштейна-Барр, а также рост опухолевых клеток [49–51].

К настоящему времени созданы НИОТ – модифицированные аналоги различных гетероциклических оснований, которые имеют такой же механизм действия, как и AZT [52,53]. К аналогам тимидина относится также ставудин, цитидина - зальцитабин, ламивудин и эмтрицитабин, к аналогам инозина можно отнести диданозин, к аналогам гуанозина – абакавир (Рис. 3).

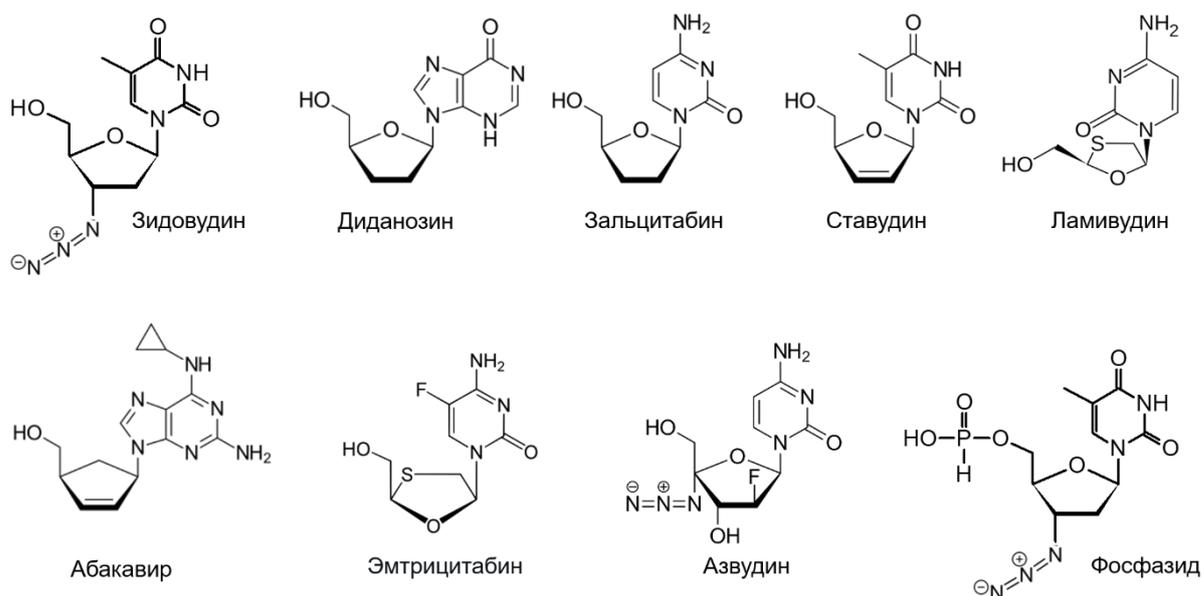


Рисунок 3. Структуры нуклеозидных ингибиторов ОТ ВИЧ-1.

Отдельно необходимо упомянуть препарат азвудин (Рис. 3), который в отличие от всех вышеперечисленных НИОТ содержит 3'-гидроксильную группу, но тем не менее ингибирует ОТ. Этот препарат был разработан в 2008 г. для лечения гепатита С [54], а затем была показана возможность его применения как ингибитора ОТ ВИЧ-1 и РНК-зависимой РНК-полимеразы SARS-CoV-2 [55,56]. Пока азвудин применяется для лечения ВИЧ-инфекции только в Китае. Этот ингибитор интересен тем, что проявляет очень высокую анти-ВИЧ активность и подавляет в наномолярных концентрациях как вирус дикого типа, так и штаммы вируса, устойчивые к действию других НИОТ.

Еще одним ингибитором ОТ является фосфазид (торговое название «Никавир») - оригинальный российский анти-ВИЧ препарат, который прошёл полный объем доклинических и клинических испытаний и зарегистрирован в Российской Федерации [57]. Несмотря на наличие Н-фосфонатного остатка (Рис. 3), фосфазид относится к классу нуклеозидных ингибиторов ОТ, поскольку, проникая в клетку, он гидролизуется до нуклеозида, а затем подвергается фосфорилированию, как и азидотимидин. Таким образом, фосфазид является депо-формой (англ. prodrug) азидотимидина и обеспечивает пролонгированное контролируемое высвобождение лекарственного вещества и длительное поддержание терапевтических концентраций в крови, что позволяет снизить кратность дозирования лекарства и существенно снизить побочные эффекты, наблюдаемые при применении азидотимидина [58].

2.1.1.3 Нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы (НтИОТ)

Как отмечено выше, для того чтобы модифицированные нуклеозиды превратились в субстрат для ОТ, они должны превратиться в нуклеозидтрифосфаты. Важно, что первое фосфорилирование, т.е. превращение нуклеозида в нуклеотид, происходит под действием специфичных к структуре гетероциклических оснований клеточных нуклеозидкиназ. Многие типы модификации препятствуют узнаванию модифицированного нуклеозида этими ферментами. Использование модифицированных аналогов нуклеотидов позволяет избежать этой проблемы, поскольку эти соединения уже содержат аналог фосфатной группы, которая далее может фосфорилироваться с образованием нуклеозидтрифосфата. В настоящее время в качестве НтИОТ используются тенофовир дизопротил фумарат (ТДФ) и его депо-форма тенофовир алафенамид (ТАФ) (Рис. 4), которые также применяют для лечения гепатита В [59].

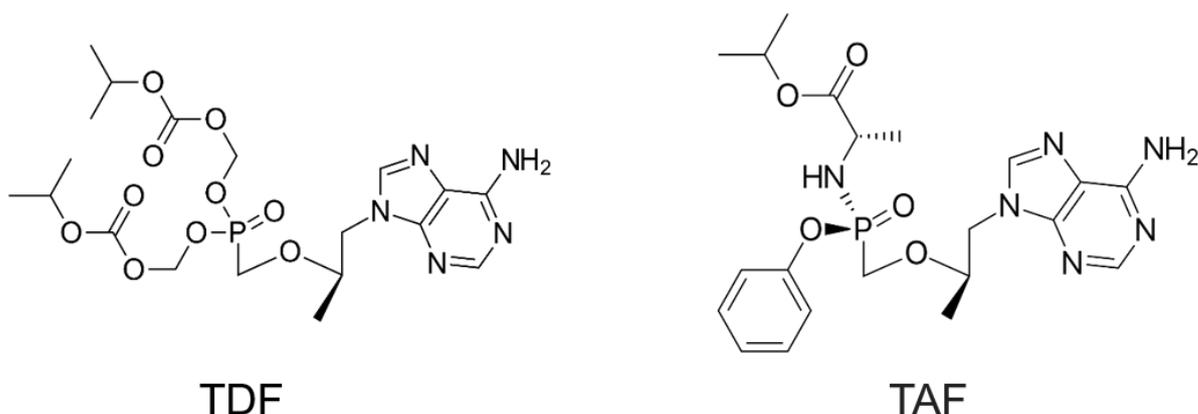


Рисунок 4. Структуры тенофовир дизопротил фумарата (ТДФ) и его депо-формы тенофовир алафенамида (ТАФ).

При АРВТ наиболее распространенными комбинациями НИОТ и/или НтИОТ являются абакавир+ламивудин (торговая марка Kivexa), тенофовир дизопротил фумарат+эмтрицитабин (торговая марка Truvada) и тенофовир алафенамид+эмтрицитабин (торговая марка Descovy). Надо также отметить, что препараты Truvada и Descovy были исследованы в качестве профилактического средства в отношении ВИЧ-инфекции и было показано, что их использование значительно снижает риск заражения ВИЧ-1 [60].

2.1.1.4 Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ) являются еще одним классом ингибиторов ОТ. Эти ингибиторы активны только по отношению к ОТ ВИЧ-1 и не ингибируют ОТ других ретровирусов; кроме того, они обладают высокой эффективностью действия и более низкой цитотоксичностью по сравнению с НИОТ.

Первый ННИОТ, неврапин (NVP), был разрешен к применению Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (Food and Drug Administration – FDA) в 1996 г. В 1997 г. был разрешен делавердин (DLV) (его использование уже практически прекращено из-за недостаточно высокой эффективности и выраженного побочного действия), а годом позже эфавиренц (EFV) (Рис. 5). Эти три соединения относятся к так называемому первому поколению ННИОТ, которое характеризуется недостаточно высоким генетическим барьером для развития лекарственно устойчивых штаммов вируса. К следующему поколению ННИОТ относятся этравирин (ETR), рилпивирин (RPV), доравирин (DOR) (Рис. 5), которые также были разрешены к применению FDA. Необходимо также упомянуть дапивирин (DPV) (Рис. 5), который используется в качестве микробицида для профилактики заражения у женщин [61].

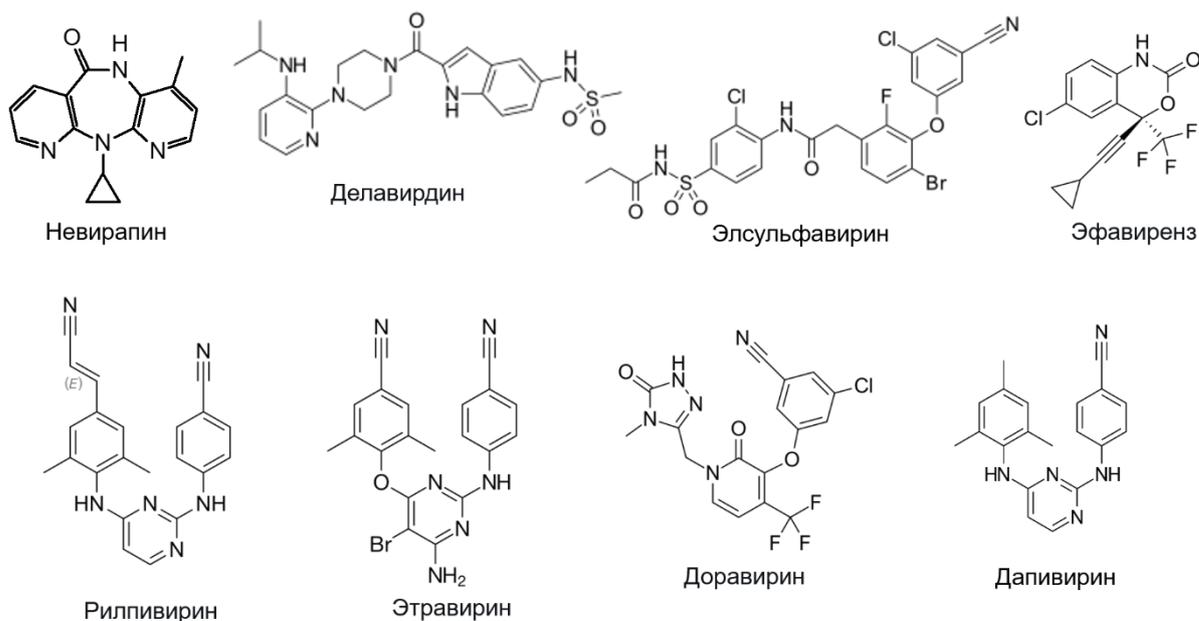


Рисунок 5. Структуры ненуклеозидных ингибиторов ОТ ВИЧ-1.

В 2017 году Министерством здравоохранения Российской Федерации был одобрен препарат элсульфавирин, метаболизирующийся в организме до действующего вещества VM-1500A (Рис. 6) [62]. Клинические исследования показали эффективность и безопасность данного препарата при применении в комбинации с другими анти-ВИЧ препаратами (ламивудином или эмтрицитабином и тенофовиром), причем в сравнении с эфавирензом элсульфавирин значительно реже приводил к возникновению побочных эффектов [63,64]. Фармакокинетические свойства элсульфавирина таковы, что он быстро превращается в VM-1500A ($t_{1/2} \sim 2$ ч), а выводится из организма в течение нескольких дней ($t_{1/2} > 5$ дней). Это обусловлено тем, что первичная сульфонамидная группа соединения поглощается эритроцитами, где аккумулируется за счет обратимого связывания с карбоангидразой и постепенно возвращается в плазму крови [65]. Благодаря такой фармакокинетике становится возможным прием препарата один раз в сутки, что улучшает соблюдение пациентами режима лечения и, возможно, в долгосрочной перспективе положительно влияет на лечение инфекции.

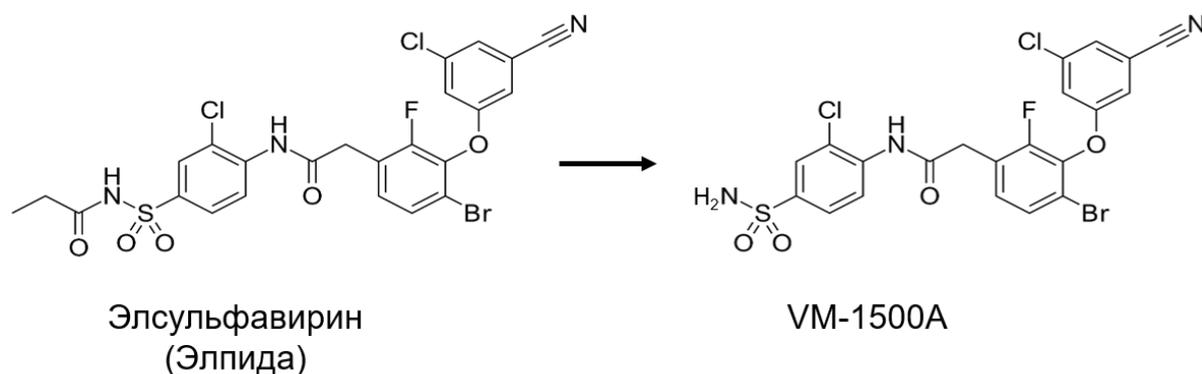


Рисунок 6. Структуры элсульфавирина и VM 1500A.

Несмотря на структурное разнообразие ННИОТ, все они являются аллостерическими ингибиторами и связываются в гидрофобном кармане, расположенном на расстоянии примерно 10 Å от активного центра ОТ [40]. Связывание ННИОТ приводит к значительному конформационному изменению в полимеразном домене ОТ и ингибированию полимеразной реакции [66].

Спектр соединений, ингибирующих ОТ по принципу ННИОТ, достаточно широк, только за последние два десятилетия было идентифицировано и описано как ННИОТ более 60 различных химических структур. Некоторые неканонические ННИОТ, связывающиеся с поверхностью взаимодействия р66 и р51, способны дестабилизировать

димер ОТ, таким образом, ингибируя полимеразную и РНКазную активности [67–69]. В то же время существуют исследования, показывающие, что другие ННИОТ способны усиливать димеризацию и гетеродимеризацию ОТ [70].

Упомянутые ННИОТ показали себя как эффективные АРВП, обычно используемые в комбинации с двумя НИОТ или одним НИОТ и ингибитором протеазы, однако в настоящее время они постепенно заменяются ингибиторами интегразы ВИЧ-1 в комбинированных схемах первой линии АРВТ [61,71]. Причинами такой замены служат быстро возникающие мутации в гидрофобном кармане ОТ, приводящие к возникновению резистентных штаммов вируса, побочные эффекты, вызванные взаимодействием ННИОТ с цитохромом P450 3A4 – одним из наиболее важных ферментов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков в организме человека, а также возможными нейропсихиатрическими побочными эффектами.

2.1.2. Ингибиторы интеграции

2.1.2.1. Интеграза ВИЧ-1. Строение и функции

После завершения обратной транскрипции, кДНК ВИЧ-1 может быть интегрирована в клеточную геномную ДНК. Ключевым ферментом, который осуществляет встраивание кДНК, является вирусная интеграна. Интеграза ВИЧ-1 (IN) катализирует два важных этапа: 3'-процессинг и перенос цепи вирусной ДНК (Рис. 7). При 3'-концевом процессинге происходит эндонуклеазное расщепление вирусной кДНК, в результате которого с 3'-конца каждой цепи удаляется динуклеотид GT. Реакция переноса цепи включает нуклеофильную атаку 3'-гидроксильных групп процессированных цепей вирусной кДНК на межнуклеотидные фосфаты, расположенные в противоположных цепях клеточной ДНК на расстоянии 5 пар нуклеотидов друг от друга. Интеграция приводит к образованию интеграционного интермедиата, в котором встроенная вирусная ДНК фланкирована одноцепочечными брешами и содержит неспаренные динуклеотиды на своих 5'-концах. Репарация этого интермедиата происходит под действием привлекаемых IN клеточных факторов репарации ДНК, например, белка Ku70 [8].

В структуре IN выделяют три домена: N-концевой, каталитический и C-концевой [72]. Каталитический домен имеет консервативную укладку, в состав каталитического домена IN входит триада инвариантных для ретровирусных интеграз аминокислотных

остатков (D64, D116 и E152), которые формируют активный центр белка и координируют два иона Mg^{2+} , необходимые для катализа 3'-процессинга и переноса цепи. N-концевой домен обеспечивает правильное положение концов вирусной кДНК в стабильном комплексе IN с ДНК [73]. Все три домена вносят вклад в образование стабильного комплекса димера IN с ДНК и некоторыми другими вирусными и клеточными белками, образующих прединтеграционный комплекс [74,75]. Для обозначения нуклеопротеинового комплекса IN с ДНК применяют термин интасома.

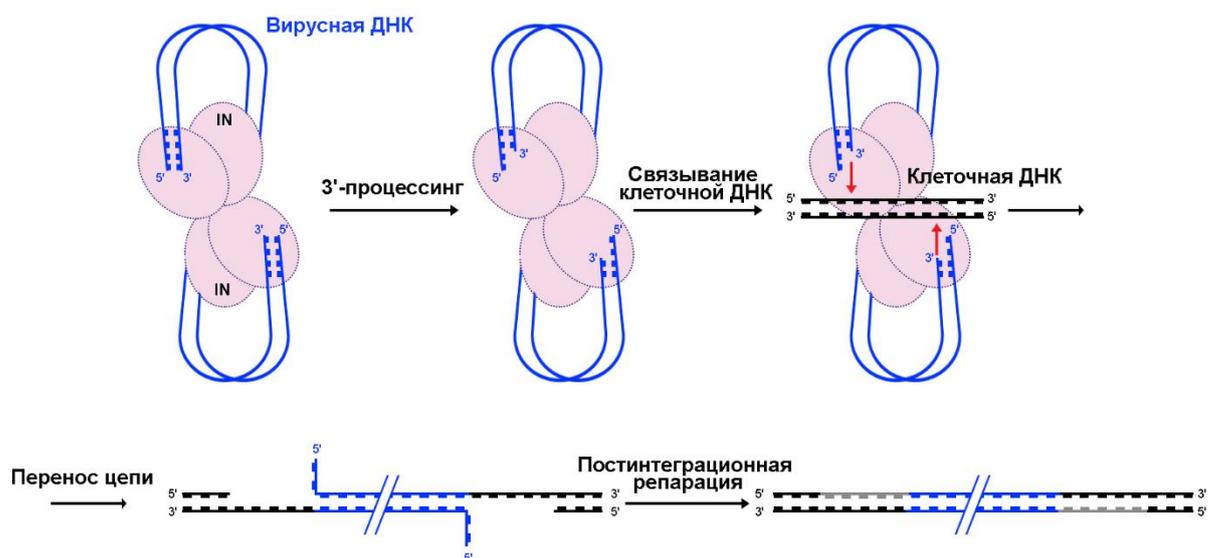


Рисунок 7. Интеграция вирусной кДНК в клеточный геном. На первом этапе прединтеграционный комплекс, включающий вирусную IN и вирусную кДНК, осуществляет реакцию 3'-процессинга, приводящую к удалению с каждого 3'-конца вирусной кДНК GT-динуклеотида. На втором этапе прединтеграционный комплекс связывает клеточную ДНК-мишень и катализирует реакцию переноса цепи, заключающуюся в нуклеофильной атаке 3'-гидроксильных групп процессированных цепей вирусной кДНК на межнуклеотидные фосфаты, расположенные в противоположных цепях клеточной ДНК на расстоянии 5 пар нуклеотидов друг от друга. В результате образуется интеграционный интермедиат, репарация которого клеточными белками приводит к образованию полностью функционального провируса.

2.1.2.2. Ингибиторы реакции переноса цепи

Хотя IN катализирует две независимые реакции, репликация ВИЧ-1 в культуре клеток и в организме подавляется только соединениями, ингибирующими реакцию переноса цепи. Все они связываются не с индивидуальным белком, а с комплексом IN с процессированной вирусной кДНК, поэтому не действуют на реакцию 3'-процессинга.

Первый успешный ингибитор IN – L-731988 (Рис. 8, А), действовал за счет хелатирования ионов магния, необходимых для реакции переноса цепи [76]. На основе его структуры были получены первые представители класса ингибиторов переноса цепи интегразой (ИПЦИ), такие как ралтегравир (RAL) и элвитегравир (EVG) [77,78]. Кристаллографические исследования позволили выявить их механизм действия [73,79]. Во-первых, ИПЦИ содержат центральный фармакофор, хелатирующий ионы Mg^{2+} в активном центре IN. Во-вторых, содержащие атом галогена бензильные радикалы ИПЦИ располагаются в активном центре IN таким образом, что смещают 3'-концевую гидроксильную группу вирусной кДНК более чем на 6 Å из положения, необходимого для продуктивной нуклеофильной атаки межнуклеотидного фосфата клеточной ДНК (Рис. 8, Б). Однако к этим ингибиторам достаточно быстро вырабатываются устойчивые штаммы ВИЧ-1.

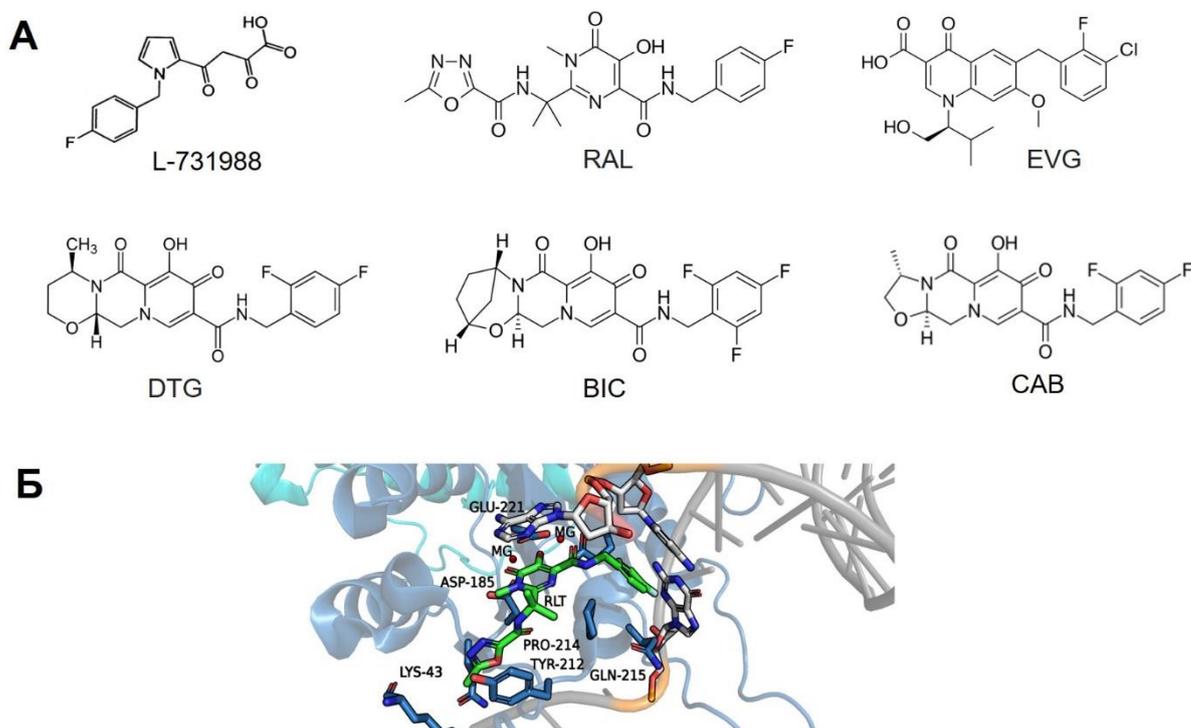


Рисунок 8. Структуры ингибиторов IN ВИЧ-1 (А) и кристаллическая структура интасомы прототипа пенистого вируса (Prototype Foamy Virus - PFV) в комплексе с магнием (отмечен красным), ралтегравиром (зеленый) и вирусной кДНК (серая); остатки активного центра IN PFV (синие) (PDB ID: 3OYA) (Б).

Значительный успех в борьбе со штаммами ВИЧ-1, устойчивыми к ралтегравир и элвитегравир, произошел с открытием ИПЦИ второго поколения (долутегравир (DTG), биктегравир (BIC) и каботегравир (CAB)) (Рис. 5А). Резистентность, в том числе перекрестная, связанная с приемом ралтегравира и элвитегравира, возможна, однако

возникновение мутаций, связанных с резистентностью к долутегравиру и биктегравиру, обладающими высоким генетическим барьером, встречается редко [80–82]. Механизм действия ИПЦИ второго поколения также основан на связывании ионов магния в активном центре, но их химическая структура была усовершенствована путем введения другого центрального фармафора – не бициклической, а трициклической кольцевой системы, ответственной за хелатирование металлов. В комплексе с интасомой долутегравиру занимает тот же сайт в активном центре, что и ралтегравиру или элвитегравиру, но координируют ионы Mg^{2+} под немного другими, по-видимому, более оптимальными углами [83,84].

Использование композиций, включающих ИПЦИ, способствуют повышению безопасности и эффективности современных схем АРВТ. На основании данных, демонстрирующих эффективность, безопасность и простоту применения, ИПЦИ в настоящее время являются частью предпочтительных или рекомендуемых схем АРВТ в руководствах по лечению ВИЧ-1 во всем мире [85].

2.1.3 Ингибиторы протеазы

Протеаза ВИЧ-1 (ПР) функционирует в виде гомодимера, так как консервативные остатки D25-T26-G27, характерные для аспартатных протеаз, расположены в петле, которая составляет только половину активного центра. При димеризации два остатка аспартата образуют каталитическую диаду протеазы. Один из остатков аспартата протонируется и действует как кислота, а другой депротонируется и играет роль основания [86,87].

ПР играет важную роль в жизненном цикле вируса и необходима для образования зрелых инфекционных вирусных частиц, поскольку она осуществляет посттрансляционный процессинг полипротеинов Gag и Gag-Pol, которые аккумулируются на плазматической мембране новообразованных вирусных частиц, высвобождающихся из инфицированных клеток. В результате расщепления Gag и Gag-Pol образуются зрелые вирусные белки. Таким образом, активность ПР не требуется для производства и выхода вируса из клетки, но необходима для созревания вируса, приводящего к образованию инфекционных вирусных частиц.

По мере накопления знаний о структуре протеазы и ее субстратов, были разработаны специфические ингибиторы протеазы (ИП) ВИЧ-1, которые стали вторым классом разработанных антиретровирусных препаратов (Рис. 6). Появление первых ИП стало поворотным моментом в развитии АРВТ, т.к. они сделали возможной

комплексную терапию, подразумевающую одновременный приём нескольких препаратов, действующих на различные ферментативные активности вируса [88]. В настоящее время для клинического применения одобрено девять ИП: саквинавир, ритонавир, индинавир, нелфинавир, ампренавир, лопинавир, атазанавир, типранавир и дарунавир (Рис. 9). Большинство из них назначают в виде комбинации с низкой дозой ритонавира в качестве усиливающего агента. Все ИП, за исключением типранавира, являются пептидомиметиками, имитирующими естественный субстрат фермента, и с высокой аффинностью связываются в активном центре ПР и действуют как конкурентные ингибиторы. Все пептидомиметики содержат гидроксипептильный фрагмент, который препятствует их расщеплению протеазой ВИЧ-1 [89].

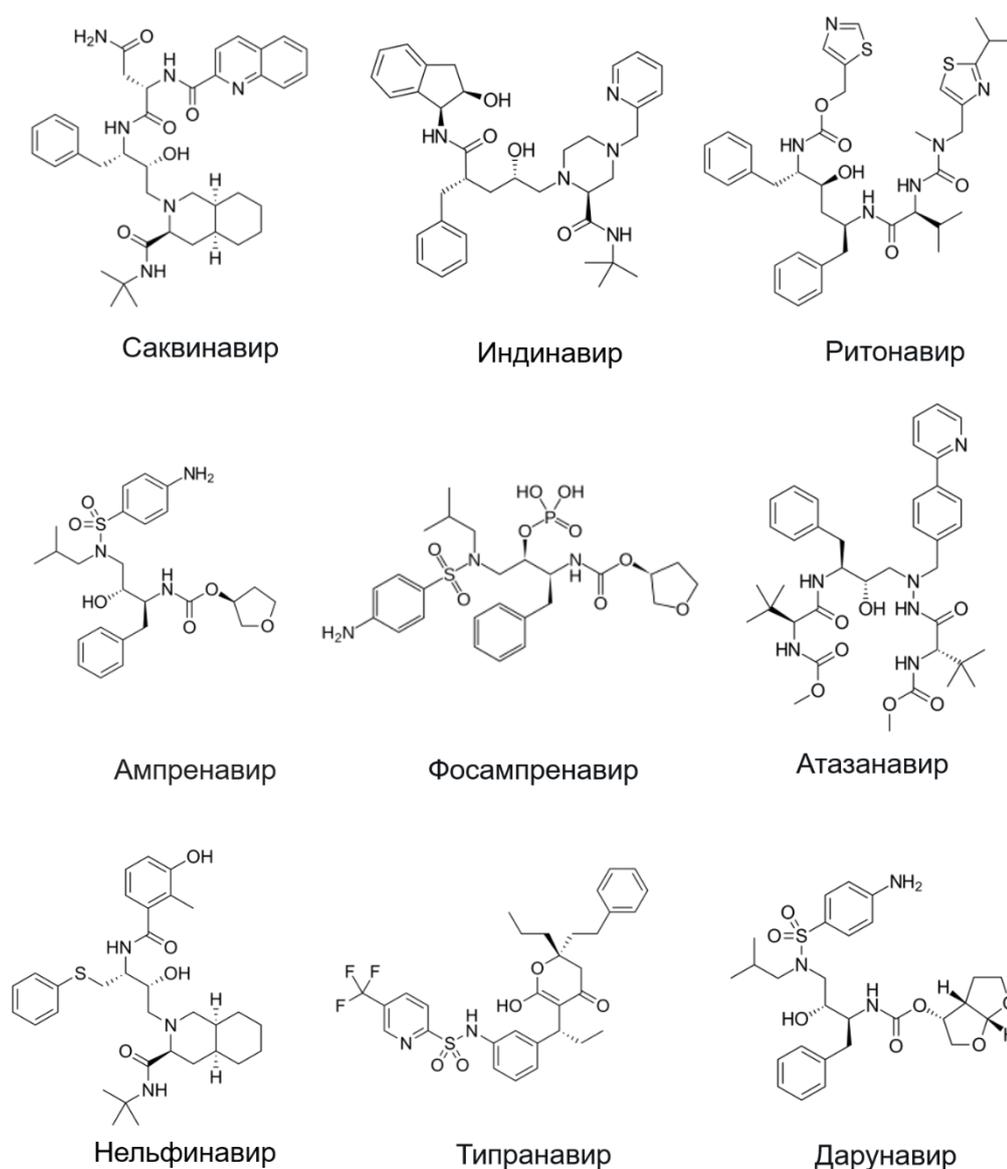


Рисунок 9. Структуры ингибиторов протеазы ВИЧ-1.

Типранавир выделяется среди других ИП наличием дигидропиринового кольца и повышенным барьером для развития резистентности. Благодаря своей структуре типранавир образует очень прочную сеть водородных связей с инвариантными участками протеазы, в том числе с каталитическим остатком D25 и другими. Например, с I50 типранавир образует водородные связи напрямую, в то время как все другие ингибиторы взаимодействуют через молекулы воды [90]. Типранавир не только связывается с высокой аффинностью с ферментом дикого типа, но и способен ингибировать мутантную мультирезистентную протеазу [91,92].

К сожалению, в последние годы наблюдается возникновение устойчивости ко всем ИП. Кроме того, ИП широко известны как наиболее распространенный класс антиретровирусных препаратов, вызывающих метаболические нарушения в организме человека [93].

2.2. Блокаторы взаимодействия вирусных белков с белками клетки

На всех этапах жизненного цикла ВИЧ-1 происходит взаимодействие клеточных факторов и систем с вирусными белками и нуклеиновыми кислотами. Некоторые клеточные факторы нацелены на подавление вирусной инфекции, другие, наоборот, необходимы для вирусной репликации. Детальное понимание механизмов репликативного цикла ВИЧ-1 может помочь при поиске блокаторов клеточных белков, играющих критически важную роль при репликации вируса. Однако вмешательство в нормальные клеточные процессы путем ингибирования их участников несет риск возникновения нежелательных побочных цитотоксических эффектов. Перспективным является ингибирование белок-белковых взаимодействий между вирусными и клеточными факторами, необходимыми для успешной репликации вируса. Развитие вирусной резистентности к таким препаратам менее вероятно, поскольку поверхность взаимодействия двух белков, которая и является мишенью этих препаратов, очень консервативна, любые мутации в ней будут негативно сказываться на стабильности белок-белкового комплекса [94].

В настоящее время в составе АРВТ используется два типа блокаторов белок-белковых взаимодействий – это ингибиторы проникновения ВИЧ-1 в клетку и ингибитор ленакапавир, влияющий на структуру вирусного капсида и его взаимодействие с белками ядерной поры, а также активно разрабатываются соединения, препятствующие связыванию IN ВИЧ-1 с клеточными партнерами.

2.2.1. Ингибиторы проникновения вируса в клетку

Проникновение ВИЧ-1 начинается со связывания поверхностного белка оболочки Env вируса (Env) с его первичным рецептором CD4 на поверхности макрофагов или Т-хелперных лимфоцитов. Во взаимодействии с CD4 участвует гликопротеин gp120 – одна из субъединиц Env. Гликопротеин gp120 прикрепляется к вирусной оболочке посредством нековалентных связей с трансмембранной частью Env – гликопротеином gp41. Функциональный Env, обеспечивающий прикрепление вируса к поверхности клетки и проникновение в нее, представляет тример гетеродимеров gp120/gp41 [95–97]. После связывания gp120 с CD4 в нем происходят конформационные изменения, в результате которых происходит открытие дополнительного сайта связывания ко-рецептора – одного из двух хемокиновых рецепторов: CCR5 или CXCR4. После связывания корецептора происходит перестройка gp41, которая позволяет гидрофобным пептидам gp41 встроиться в мембрану клетки-хозяина, обеспечивая слияние.

Блокирование проникновения вируса в клетку является очень перспективным подходом для борьбы с вирусной инфекцией, поскольку позволяет остановить ее развитие на самом начальном этапе. С целью ингибирования связывания вируса с рецепторами и предотвращения его входа в клетку к настоящему времени создано 4 типа ингибиторов:

1. Маравирик, называемый «антагонистом хемокинового рецептора», связывается с корецептором CCR5, предотвращая его взаимодействие с gp120.
2. Энфувиртид, ингибитор слияния, представляет собой синтетический пептид, который связывается с gp41, блокируя слияние вирусной и клеточной мембран.
3. Ибализумаб, моноклональное антитело, которое связывается с определенным доменом CD4 и препятствует этапам после прикрепления вируса, необходимым для проникновения частиц ВИЧ-1 в клетку.
4. Фостемсавир, ингибитор прикрепления, связывается с gp120 и препятствует его взаимодействию с CD4.

2.2.1.1. Маравирок

Маравирок был разработан компанией Pfizer в процессе скрининга низкомолекулярных антагонистов корцептора CCR5 [98] и одобрен для использования в составе АРВТ в 2007 году. Имидазопиридин (UK-107,543) был выбран как один из наиболее эффективно связывающихся лигандов и стал отправной точкой интенсивной программы медицинской химии. При использовании параллельного скрининга удалось добиться оптимизации таких параметров, как: эффективность связывания с рецептором, противовирусная активность, абсорбция и фармакокинетика, а также селективность действия. В результате был отобран маравирок (UK-427,857), эффективность которого *in vitro* находится в наномолярном диапазоне [99] (Рис. 10).

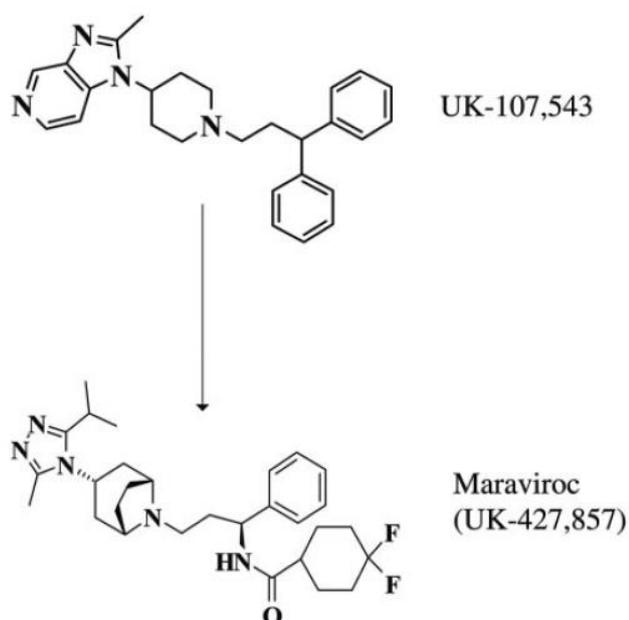


Рисунок 10. Структуры имидазопиридина UK-107,543 и маравирока.

Как уже отмечалось, маравирок ингибирует связывание gp120 ВИЧ-1 с CCR5; он является первым и пока единственным разрешенным к применению в АРВТ низкомолекулярным препаратом, взаимодействующим не с вирусным, а с клеточным белком. Стоит отметить, что рецептор хемокинов CCR5 на поверхности Т-клеток является корцептором наиболее часто передающихся штаммов ВИЧ-1, которые преобладают на ранних стадиях инфекции и остаются доминирующей формой у более чем половины пациентов с поздней стадией ВИЧ-инфекции [100]. Предполагается, что маравирок действует как обратный агонист, способствующий стабилизации CCR5 в

неактивном состоянии [99,101]. Механизм действия обуславливается тем, что маравирик связывается в гидрофобном кармане, образованном трансмембранным доменом CCR5, что приводит к изменению конформации внеклеточных петель рецептора. Такое состояние имитирует «нулевой» фенотип Δ32 у людей, который не имеет видимых последствий для иммунного статуса или общего состояния здоровья человека [102].

Инфекция ВИЧ-1 разделяется на две основные формы в зависимости от корецептора, который он использует для проникновения в клетку, а именно хемокинового рецептора 5 (CCR5) или хемокинового рецептора 4 CXCR4 (CXCR4). В зависимости от типа корецептора, используемого вирусом для проникновения, выделяют CCR5- и CXCR4-тропные вирусы. Маравирик показан только для лечения взрослых с CCR5-тропным вирусом ВИЧ-1 и не рекомендуется при обнаружении CXCR4-тропного вируса. Перед началом приема маравирока крайне рекомендуется проверять пациентов на тропизм CCR5, используя высокочувствительный анализ тропизма.

Маравирик одобрен для лечения пациентов, уже принимавших ранее антиретровирусные препараты, к которым выработалась вирусная устойчивость, и пациентов, впервые принимающих АРВТ [103,104]. В сочетании с другими АРВП он может применяться для лечения ВИЧ-инфекции у новорожденных, родившихся доношенными, с массой тела больше 2 кг, детей, подростков и взрослых [105–107]. Ведутся также исследования, направленные на разработку рецептуры на основе маравирока, которую можно было бы использовать в качестве препарата длительного действия для доконтактной профилактики ВИЧ-1 [108,109]. Кроме того, 1 фаза клинических испытаний показала, что маравирик может быть безопасно использован для профилактики новорожденных от заражения ВИЧ-1 в первые 6 недель жизни [106].

Особенный механизм действия маравирока обуславливает также отличный от других АРВП механизм возникновения резистентности. Устойчивость вируса к маравироку встречается редко и в основном связана с тем, что методы определения тропизма ВИЧ-1 недостаточно чувствительны и не позволяют выявлять небольшие резервуары CXCR4-тропного вируса, что приводит к резкой пролиферации таких штаммов ВИЧ-1 уже после начала приема маравирока [110,111]. Однако существуют и мутации в области V3 гликопротеина gp120, приводящие к снижению восприимчивости вируса к маравироку [112,113].

К настоящему моменту маравирик является единственным одобренным антагонистом хемокинового рецептора, необходимого для проникновения вируса в

клетку [114]. Было также обнаружено несколько классов ингибиторов проникновения ВИЧ-1 в клетку, нацеленных на CXCR4, которые в настоящее время находятся на разных стадиях доклинических и клинических испытаний [115].

2.2.1.2. Энфувиртид

Энфувиртид или T20, торговая марка Фузеон — это пептид из 36 аминокислот, он был одобрен FDA 13 марта 2003 г. в качестве первого ингибитора слияния ВИЧ-1 с клеткой. Противовирусная активность энфувиртида обусловлена его взаимодействием с гликопротеином gp41 на поверхности вируса [116]. Энфувиртид вводится пациентам путем подкожной инъекции и используется для лечения ВИЧ-1-инфекции в составе АРВТ у пациентов, которым не помогли другие варианты лечения [117].

Надо, однако отметить, что энфувиртид обладает низкой биодоступностью при пероральном приеме и быстро перерабатывается и выводится из организма. Кроме того, за прошедшие с открытия энфувиртида годы было обнаружено достаточно большое количество мутаций в составе gp41, приводящих к возникновению серьезной устойчивости к данному препарату [118,119]. Так, выделены изоляты ВИЧ-1 со сниженной чувствительностью к энфувиртиду, содержащие замены в последовательности аминокислот 36–38 gp41. Эти замены коррелировали с различными уровнями сниженной чувствительности к энфувиртиду у вариантов вируса с соответствующими мутациями.

Тем не менее, продолжаются активные попытки как улучшить фармакокинетику самого энфувиртида, так и создать новые пептидные ингибиторы слияния [117]. Так, для улучшения фармакокинетики энфувиртида проводится его ПЭГилирование – присоединение к концу пептида остатка полиэтиленгликоля. Особенно перспективным считается ПЭГилирование по N-концу энфувиртида, которое в мышинной модельной системе улучшило как его растворимость, так и период полувыведения из организма без заметного снижения противовирусной активности.

В качестве еще одного пептидного ингибитора слияния в перспективе можно рассматривать Сифувиртид (SFT) — пептид из 36 аминокислот, который был разработан на основе всей последовательности gp41. SFT обладает лучшими фармакокинетическими свойствами, чем энфувиртид [120]. Этот препарат имеет механизм действия, аналогичный механизму действия энфувиртида, но особенно эффективен против устойчивых к нему штаммов. Как и энфувиртид, SFT также

доставляется путем подкожной инъекции, однако более длительный период полувыведения и более высокая эффективность делают этот препарат превосходным потенциальным кандидатом для включения в АРВТ. SFT в настоящее время находится на III фазе клинических испытаний в Китае [117].

2.2.1.3. Ибализумаб

В 2018 году в США был одобрен ингибитор ибализумаб — неиммуносупрессивное гуманизированное моноклональное антитело IgG4, которое связывается с рецептором CD4 и препятствует его конформационному изменению, необходимому для проникновения ВИЧ-1 в клетки [121]. Этот препарат продается под торговой маркой Трогарзо и используется в составе комбинированной схемы АРВТ у пациентов, инфицированных ВИЧ-1 с множественной лекарственной устойчивостью, у которых текущий режим АРВТ оказался неэффективным. Рекомендуемая доза ибализумаба — однократная внутривенная нагрузочная доза 2000 мг с последующей внутривенной поддерживающей дозой 800 мг один раз в 2 недели. Ибализумаб был первым одобренным антиретровирусным препаратом, который не требует ежедневного приёма. Он блокирует проникновение ВИЧ-1 в клетки CD4⁺, сохраняя при этом нормальную иммунологическую функцию, и является первым CD4-направленным ингибитором ВИЧ-1 и первым гуманизированным моноклональным антителом для лечения ВИЧ/СПИДа [122,123]. Важно, что для ибализумаба характерны минимальные побочные эффекты и отсутствие перекрестной резистентности с другими компонентами АРВТ.

Основываясь на результатах использования ибализумаба для лечения ВИЧ-инфекции можно сделать вывод о перспективности разработки новых антиретровирусных препаратов на основе моноклональных антител.

2.2.1.4. Фостемсавир и темсавир

В 2020 году для лечения ВИЧ-инфекции был одобрен препарат фостемсавир (Rukobia™). Одобрение фостемсавира явилось важным событием для людей, инфицированных ВИЧ-1 с множественной лекарственной устойчивостью, благодаря новому механизму действия фостемсавира и отсутствию перекрестной резистентности с другими антиретровирусными препаратами.

Фостемсавир (BMS-663068) (Рис. 11) представляет собой депо-форму (пролекарство) низкомолекулярного ингибитора темсавира (BMS-626529), действие которого заключается в связывании с гликопротеином gp120 и блокировании прикрепления вируса к CD4⁺ Т-клеткам. Темсавир специфически взаимодействует с участком gp120, расположенным рядом с консервативным сайтом связывания последнего с CD4, тем самым предотвращая конформационные изменения gp120, необходимые для прикрепления к рецептору CD4 клетки-хозяина и дальнейшего проникновения вируса в клетку [124]. Темсавир в *in vitro* исследовании имел значения полумаксимальной эффективной концентрации менее 10 нМ в отношении подавляющего большинства изолятов ВИЧ-1. Противовирусная активность темсавира *in vitro* обычно не была связана ни с тропизмом, ни с подтипом вируса [125].

Фостемсавир (BMS-663068) представляет собой фосфорилированное производное темсавира и обладает повышенной растворимостью в желудочно-кишечном тракте [126]. Фостемсавир превращается в темсавир под действием щелочной фосфатазы на эпителиальной поверхности кишечника [127].

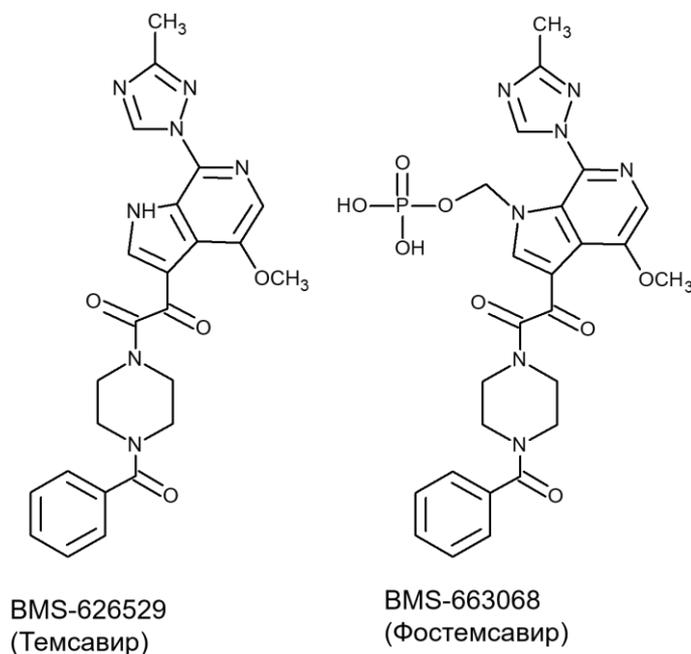


Рисунок 11. Структура фостемсавира, темсавира и их предшественников BMS-378806 и BMS-488043.

Во время клинических испытаний, в том числе у пациентов, инфицированных ВИЧ-1 с множественной лекарственной устойчивостью, фостемсавир эффективно снижал уровень РНК ВИЧ и приводил к увеличению числа CD4⁺ Т-клеток [128,129].

Фостемсавир был одобрен для применения в виде таблеток пролонгированного действия (600 мг), принимаемых перорально два раза в день. Он обладает улучшенной растворимостью в воде и стабильностью в кислых условиях и быстро метаболизируется до темсавира, который является единственным соединением, обнаруживаемым в плазме [130].

Подводя итог этой группе препаратов, направленных на подавление проникновения вируса в клетку, необходимо отметить, что благодаря различным механизмам действия фостемсавира, ингибитора слияния энфувиртида, CD4-направленного ингибитора прикрепления ибализумаба и антагониста корецептора CCR5 маравирока, они не имеют перекрестной резистентности [131].

Поиск новых ингибиторов проникновения вируса, в том числе нацеленных на взаимодействие с человеческими белками, остается актуальной задачей. В настоящее время продолжаются исследования новых соединений, способных связываться с гликопротеинами оболочки ВИЧ-1 и предотвращать их конформационные изменения и связывание с рецепторами на поверхности клетки [132–137].

2.2.2. Ингибиторы, действующие на сборку и разборку вирусного капсида

2.2.2.1. Структура капсида и его роль в жизненном цикле ВИЧ-1

Инфекция ВИЧ-1 зависит от вирусной оболочки, которая связывается с рецептором CD4 хозяина и корецепторами CXCR4 или CCR5 для прикрепления и слияния, что приводит к высвобождению вирусного капсида в клеточную цитоплазму. Капсид содержит вирусный РНК-геном и репликативные ферменты ОТ и ИН.

Каждый капсид состоит из ~250 гексамеров и ровно 12 пентамеров, собранных из ~1500 копий мономерных капсидных белков (CA) [138]. Белок CA содержит два структурно различных домена, N-концевой домен (CA-NTD) и C-концевой домен (CA-CTD), соединенные гибким линкером. Сборка и стабильность оболочки капсида обусловлены тремя видами межмолекулярных белок-белковых взаимодействий между субъединицами CA: (1) внутригексамерные контакты NTD-NTD между отдельными молекулами CA стабилизируют гексамеры и пентамеры, которые функционируют как строительные блоки капсида, а также образуют центральную пору, (2) внутригексамерные контакты NTD-CTD между соседними молекулами CA дополнительно стабилизируют отдельные гексамеры и пентамеры, и (3)

межгексамерные контакты CTD-CTD участвуют в димерных и тримерных взаимодействиях, связывая отдельные гексамеры и пентамеры [139].

По сети микротрубочек капсид проходит к ядерной мембране и затем, предположительно, связывает нуклеопорин Nup358 и другие клеточные факторы, которые способствуют импорту капсида в ядро через комплекс ядерной поры в интактном или полуинтактном виде [140]. В ядерном импорте капсида также участвуют клеточные белки CPSF6 (cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6), нуклеопорин Nup153 и транспортин 1 (TRN-1) [139]. По мере транспорта капсидов к ядру в них происходит обратная транскрипция, которая завершается в ядре, капсид разбирается, из него выходит вирусная ДНК, которая интегрируется в геном клетки [141].

Все эти данные указывают как на важную роль капсида ВИЧ-1 в развитии вирусной инфекции, так и значение взаимодействий капсида с клеточными белками. Соответственно, вирусный капсид можно рассматривать как привлекательную мишень для ингибиторов репликации ВИЧ-1. Ингибирование либо сборки капсида, либо его разборки может остановить репликацию ВИЧ-1 и, следовательно, инфекцию.

2.2.2.2. Ингибиторы репликации ВИЧ-1, действующие на вирусный капсид. Ленакапавир

Первым хорошо охарактеризованным и эффективным ингибитором являлся PF74. Оптимизация его структуры привела к созданию соединений серии GS-CA: GS-CA1 и GS-6207 (ленакапавир) (Рис. 12), которые содержат аналогичный PF74 функциональный каркас, но показывают более высокую эффективность и продолжительность действия [142]. Все три ингибитора связываются в одном и том же кармане в межсубъединичном интерфейсе NTD-CTD и способствуют повышению стабильности капсида (Рис. 12). Важно также, что с этим же карманом взаимодействуют клеточные белки CPSF6 и Nup153, таким образом ингибиторы нарушают взаимодействие капсида с этими белками и, следовательно, препятствуют проникновению капсида в ядро [143].

Клинические испытания ленакапавира привели к появлению в 2022 году нового компонента АРВТ, названного Sunlenca. Надо отметить крайне высокую эффективность действия ленакапавира. Его средняя полумаксимальная эффективная концентрация (EC₅₀) в клетках линии МТ-4, инфицированных ВИЧ-1, оказалась равной 105 пМ, что

существенно ниже EC_{50} большинства других АРВП [144]. Также пикомолярные значения средней EC_{50} были получены на первичных $CD4^+$ Т-клетках (32 пМ) и на макрофагах (56 пМ), инфицированных ВИЧ-1.

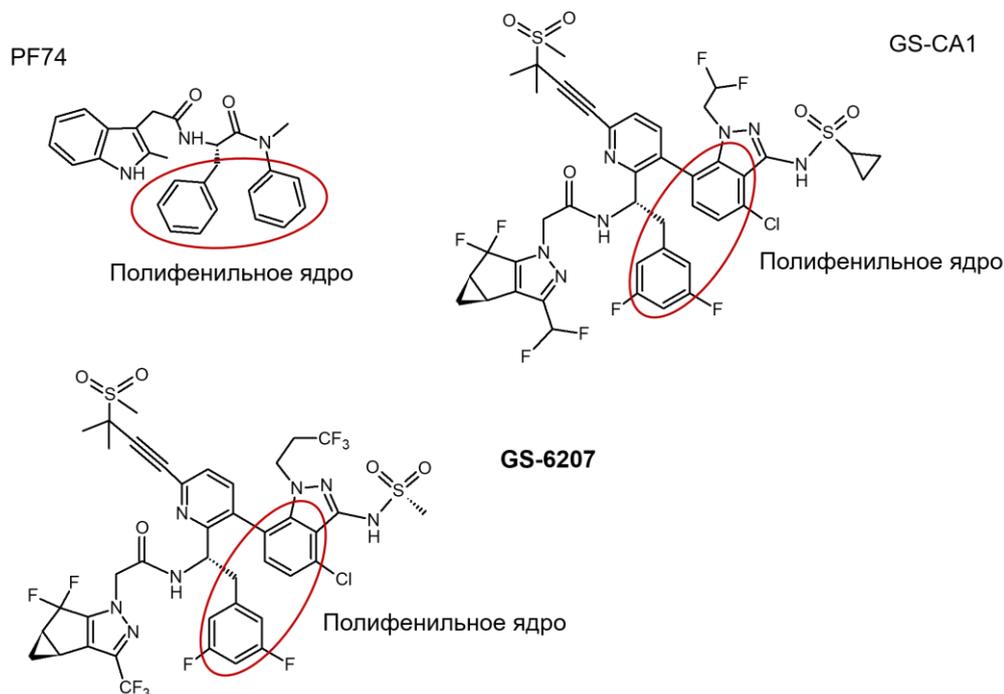


Рисунок 12. Структуры ингибиторов разборки капсида ВИЧ-1.

Ленакапавир — первый в своем классе ингибитор длительного действия. Средний период его полувыведения из организма после перорального или подкожного введения составляет от 10 до 12 дней и от 8 до 12 недель, соответственно [145]. Биодоступность ленакапавира при пероральном приеме составляет 6–10 %, а пик максимальной концентрации отмечается через 4 часа. При подкожном введении ленакапавир медленно высвобождается из места инъекции, достигая максимальной концентрации в плазме крови через 84 дня после введения. По этой причине ленакапавир потенциально можно использовать как часть инъекционного режима с интервалом между дозами до 6 месяцев или перорального режима с интервалом между дозами до недели, что может существенно облегчить схему лечения ВИЧ-инфицированных пациентов. Кроме того, ленакапавир может использоваться и для доконтактной профилактики заражения ВИЧ-1 [146].

Ленакапавир во многом является уникальным препаратом, поскольку в отличие от других компонентов АРВТ он способен ингибировать несколько стадий жизненного цикла ВИЧ-1. Многостадийный механизм действия ленакапавира основан на его

прочном связывании в гидрофобном кармане, образованном двумя соседними мономерами СА, при этом с каждым гексамером СА связывается шесть молекул ленакапавира [144]. Между ингибитором и гидрофобным карманом формируются многочисленные Ван-дер-Ваальсовы и водородные связи, что приводит к более стабильному гексамеру и препятствует разборке капсида в инфицированных клетках. Кроме того, как уже отмечено выше, ленакапавир препятствует связыванию капсида с клеточными белками CPSF6 и Nup153, важными для транспорта капсида в ядро и направляющими интеграцию в активно транскрибируемые области генома [147]. На поздних этапах репликации вируса ленакапавир препятствует правильному образованию капсида путем нарушения скорости ассоциации мономеров СА [143,147]. Важно также, что ленакапавир мешает взаимодействию гексамера СА с клеточным белком Sec24C, который мигрирует вместе с капсидом в цитоплазме инфицированной клетки и также участвует в проникновении капсида в ядро. Снижение уровня этого белка в клетке существенно понижает стабильность капсида ВИЧ-1 и отрицательно влияет на обратную транскрипцию, ядерный импорт и инфекционность вируса [148].

Для ленакапавира было показано отсутствие перекрестной устойчивости к другим существующим классам АРВП [149,150]. Он сохраняет высокую противовирусную активность против штаммов ВИЧ-1 и клинических изолятов, устойчивых ко всем одобренным в настоящее время АРВП различных классов [151], что дает возможность его эффективного использования при лечении тяжелых пациентов, инфицированных мультирезистентным вирусом. Тем не менее, в экспериментах на клеточной культуре и при проведении клинических испытаний ленакапавира были выявлены аминокислотные замены M66I, Q67H, K70R и N74D в мономере СА, расположенные вблизи сайта связывания ленакапавира, которые приводят к выработке вирусом устойчивости к этому ингибитору. Из всех обнаруженных замен, замена M66I обеспечивает самый высокий уровень резистентности к ленакапавиру [143,150].

В заключение необходимо отметить, что успех ленакапавира как высокоэффективного АРВП стимулирует разработку новых типов ингибиторов разборки вирусного капсида с целью получить соединения, активные в отношении штаммов вируса, устойчивых к ленакапавиру [152–154]. К сожалению, пока ни одно из созданных соединений не проявляет антивирусной активности, сравнимой с активностью ленакапавира. Кроме того, все они связываются с капсидом в том же сайте, что и ленакапавир, поэтому вероятность их активности по отношению к резистентным к ленакапавиру штаммам вируса не очень велика.

2.2.3. Соединения, блокирующие взаимодействия интегразы ВИЧ-1 с клеточными белками

Из всех белков ВИЧ-1 наиболее разнообразными функциями обладает IN: помимо стадии интеграции она участвует и в других стадиях жизненного цикла вируса и взаимодействует с разными вирусными и клеточными белками [10,155]. Так, известно, что IN и OT взаимодействуют между собой, и нарушение этого взаимодействия отрицательно влияет на эффективность обратной транскрипции [156]. IN непосредственно взаимодействует с вирусной геномной РНК и это взаимодействие важно для правильной упаковки вирусной РНК в капсид, а также влияет на морфологию образующихся в клетке вирусных частиц [157]. Важно также, что и в самом процессе интеграции участвуют клеточные белки, которые непосредственно связываются с IN [158,159]. Понятно, что нарушение взаимодействий IN с ее вирусными и клеточными партнерами должно приводить к ингибированию репликации вируса. По этой причине создание ингибиторов, блокирующих белок-белковые взаимодействия между IN и ее партнерами вызывает большой интерес [160,161].

Надо отметить, что до сих пор ни один из блокаторов связывания IN с клеточными белками не утвержден в качестве терапевтического препарата, однако мы включили их в настоящий обзор, поскольку они потенциально могут оказаться основой для создания новых компонентов АРВТ. К настоящему времени разработаны блокаторы взаимодействий IN с одним из ключевых белков партнеров — LEDGF/p75.

LEDGF/p75 (lens epithelium-derived growth factor) - ассоциированный с хроматином коактиватор транскрипции - выделяется среди многих клеточных партнеров IN тем, что играет решающую роль в направлении интеграции вирусной кДНК в транскрипционно активные области клеточного генома [158,162–164]. IN взаимодействует с LEDGF/p75 в виде тетрамера [162]; при образовании белкового комплекса С-концевой домен LEDGF/p75 взаимодействует с поверхностью, сформированной двумя каталитическими доменами IN [165].

Роль LEDGF/p75 в репликации ВИЧ-1 заключается в том, что он, в составе комплекса с IN, связывается с эпигенетическими метками, маркирующими активно транскрибируемые области генома, и таким образом направляет интеграцию именно в эти области генома. При отсутствии LEDGF/p75 интеграция идет в разные участки ДНК и ее уровень почти в 10 раз ниже [166].

Первые ингибиторы взаимодействия IN и LEDGF/p75 были созданы около 15 лет назад [167]. Все они связываются с IN в сайте, отличном от сайта связывания ДНК, поэтому их называют также аллостерическими ингибиторами IN. Связывание аллостерического ингибитора может изменять геометрию активного центра фермента, может блокировать белок-белковые взаимодействия, которые могут быть необходимы для функционирования фермента, и/или может нарушать образование олигомерных структур, необходимых для ферментов, функционирующих в мультимерном состоянии. К настоящему времени создана целая серия ингибиторов взаимодействия IN с LEDGF/p75, известных под разными названиями: LEDGIN, аллостерические ингибиторы IN (ALLINI), некаталитические ингибиторы IN (NCINI), ингибиторы мультимеризации IN (MINI) и аллостерические ингибиторы образования комплекса IN-LEDGF (INLAI) [161].

Разработанные ингибиторы содержат разные центральные каркасы: хинолин в BI-224436 [168], тетрагидроизохинолин в GSK3839919 [169], тиофен в MUT-A [170], бензол в BDM-2 [161], бензотиазол в GS-9822 [5] и пирролопиридин в STP0404 [171] (Рис. 13). Несмотря на разный центральный каркас, все INLAI имеют общий химический модуль, включающий карбоксильную и трет-бутоксигруппу, присоединенные к объемной гидрофобной боковой цепи через ароматическую структуру, которые совместно отвечают за связывание с карманом на интерфейсе димера каталитического домена IN ВИЧ-1. С этим же карманом взаимодействует связывающий IN домен LEDGF/p75 [165].

Недавние исследования показали, что INLAI действуют как «молекулярные клеи», способствуя формированию нетипичного для IN интерфейса, включающего димер каталитического домена и С-концевой домен [172]. В результате связывание INLAI с IN не только нарушает ее взаимодействие с LEDGF/p75, но и влияет на ее мультимеризацию. В то время как в физиологических условиях IN ВИЧ-1 формирует стабильные тетрамеры, образование дополнительного интерфейса, индуцированного ингибитором, приводит к неконтролируемой мультимеризации IN.

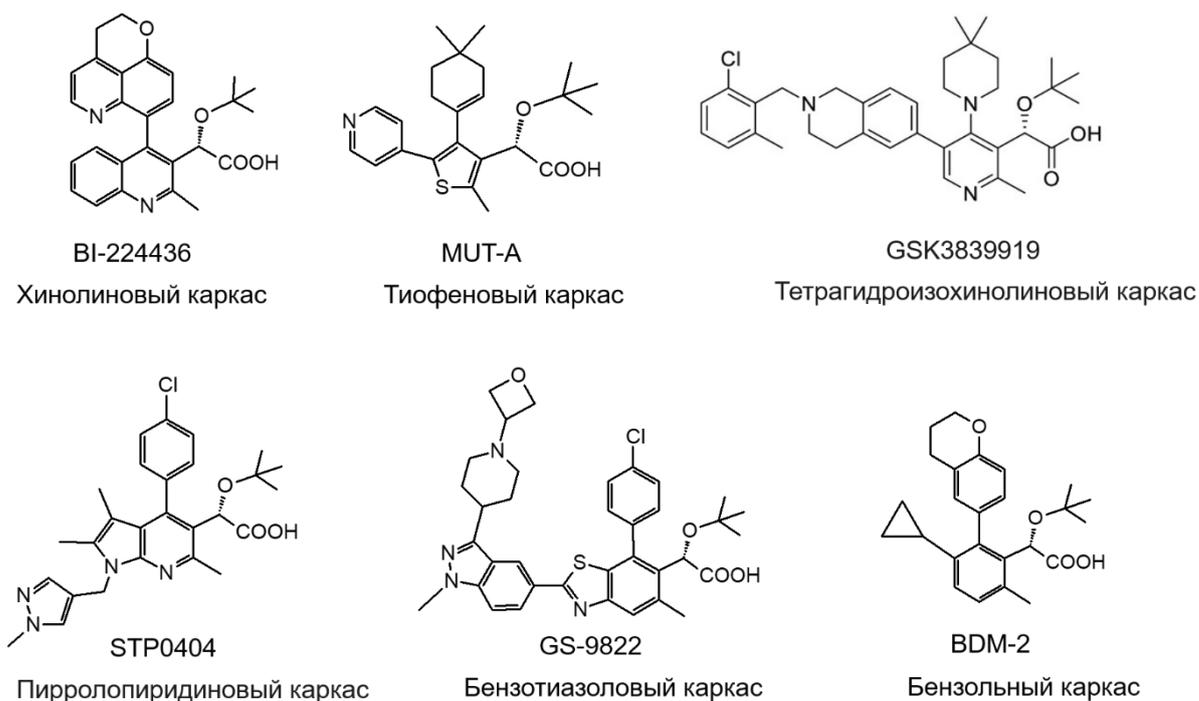


Рисунок 13. Структуры INLAI с разными вариантами центрального каркаса.

Анализ антивирусной активности ингибиторов INLAI показал, что они влияют как на ранние, так и на поздние стадии репликации ВИЧ-1. Как конкуренты LEDGF/p75 в связывании с IN, INLAI влияют на интеграцию, нарушая способность вируса интегрироваться в активно транскрибируемые участки генома и, следовательно, снижая последующую экспрессию провируса [160,173–176]. Для выяснения влияния INLAI на поздние стадии репликации был специально сконструирован ингибитор KF116, в котором остаток хинолина в ингибиторе BI-1001 был заменен на остаток пиридина (Рис. 14), в результате чего KF116 прочно связывался между двумя мономерами IN, но не нарушал ее взаимодействие с LEDGF/p75 [177]. Под действием ингибитора KF116 происходила aberrantная гипермультимеризация IN ВИЧ-1, которая приводила к образованию дефектных вирионов, несущих геномную РНК, неправильно локализованную вне зрелого ядра капсида. Такие вирионы были не способны осуществить обратную транскрипцию при проникновении в новые клетки [174,178] Важно при этом, что ингибиторы INLAI гораздо более эффективны в подавлении продукции инфекционных частиц ВИЧ-1, чем на этапе интеграции, поэтому их можно в целом классифицировать как ингибиторы мультимеризации IN и созревания новых вирионов.

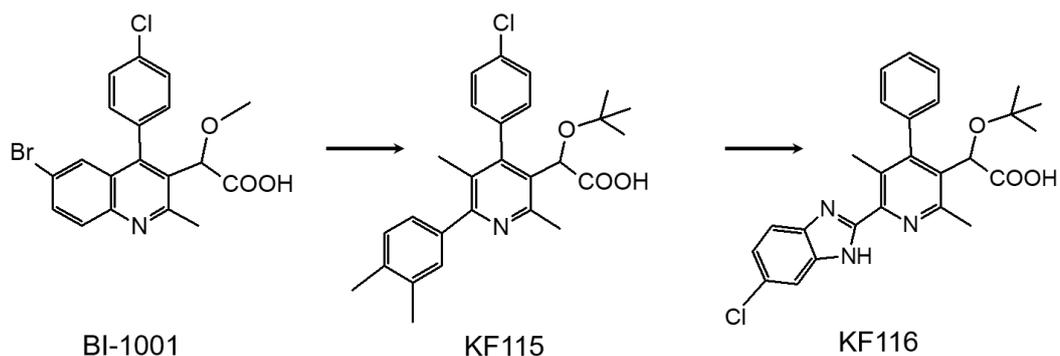


Рисунок 14. Схема превращения ингибитора BI-1001 в KF116.

Рассмотрим теперь отдельно наиболее важные представители семейства ингибиторов INLAI, в первую очередь те, которые были допущены до клинических испытаний.

Структурно-функциональные исследования серии производных 2-(хинолин-3-ил)уксусной кислоты, предложенных в группе 3. Дебизера [167], привело к созданию соединения BI-224436 (Рис. 13) [168]. Оно эффективно ингибировало различные лабораторные штаммы ВИЧ-1 (EC_{50} 30 нМ в присутствии сыворотки крови человека), не проявляло цитотоксичности до концентрации 90 мкМ и сохраняло активность против вирусов, содержащих в гене IN мутации, вызывающие устойчивость к ингибиторам переноса цепи. Высокая антивирусная активность BI-224436 и хорошие фармакокинетические свойства, обнаруженные в доклинических испытаниях на крысах, позволили начать фазу 1 клинических испытаний этого ингибитора [179]. Однако, эти испытания были приостановлены в 2012 году по неизвестной причине. Тем не менее исследования соединений этой структурной группы продолжаются [180], и возможно появление новых производных 2-(хинолин-3-ил)уксусной кислоты с улучшенными фармакологическими свойствами.

Многообещающие результаты были получены при исследовании антивирусной активности соединения GS-9822, содержащего бензотиазольный центральный каркас (Рис. 15) [5]. Этот ингибитор подавлял репликацию вируса в культуре клеток в концентрации нескольких наномолей ($EC_{50} = 2-3$ нМ) и проявлял цитотоксичность только в микромолярных концентрациях. Как и другие INLAI, он ингибировал взаимодействие IN с LEDGF/p75 и снижал эффективность интеграции. Для этого ингибитора не было изучено его влияние на мультимеризацию IN, зато было проведено

интересное исследование его влияния на направление интеграции. Нарушение взаимодействия IN с LEDGF/p75 в присутствии GS-9822 направляло интеграцию вирусной ДНК в область конденсированного хроматина, что приводило к немедленной вирусной латентности. Более того, оказалось, что интегрированные в присутствии GS-9822 провирусы крайне плохо реактивируются под действием фактора некроза опухоли α (TNF- α). Способность GS-9822 усиливать немедленную латентность вируса и снижать возможность реактивации интегрированных провирусов может быть полезна для терапии ВИЧ-1 по стратегии “Block and Lock” (см. раздел 2.4.4). GS-9822 находился на стадии доклинических испытаний и показал очень хорошие фармакокинетические характеристики. Однако дальнейшие исследования данного препарата были остановлены из-за обнаружения вакуолизации уротелия мочевого пузыря у яванских обезьян, но не у крыс, на которых также проводили тестирование [181]. Отдельное исследование причин столь необычного эффекта показало, что GS-9822 является цвиттер-ионом в диапазоне pH в мочевом пузыре яванского макака (pH мочи 5,5–7,4). Из-за сильных электростатических взаимодействий между отдельными цвиттер-ионами GS-9822 может образовывать бислои, который может разрушать уротелий. Этого не происходит в мочевом пузыре крыс из-за более высокого pH (pH мочи 7,3–8,5), при котором цвиттер-ионная структура не образуется [181].

Структура ингибитора BDM-2 и серии его производных основана на бензольном каркасе (Рис. 15, А) [161]. Все эти соединения содержат либо карбоксильные и трет-бутоксигруппы (BDM-2 и MUT871), либо производное этого мотива, в котором трет-бутоксильная боковая цепь заменена циклопропилоксигруппой (MUT872, MUT884 и MUT916). В *in vitro* исследовании нарушения взаимодействия между IN и LEDGF/p75 для BDM-2 была показана наномолярная 50% ингибирующая активность. В том же диапазоне концентраций BDM-2 достигалось максимальное увеличение мультимеризации IN [161]. Соединения серии MUT показывают сравнимую с BDM-2 активность и как ингибиторы связывания IN с LEDGF/p75, и как ингибиторы правильной мультимеризации IN [161].

Аналогично другим INLAI, ингибитор BDM-2 располагается в гидрофобном кармане на поверхности димера каталитических доменов IN и стимулирует связывание с ним С-концевого домена, что приводит к агрегации IN (Рис. 15, Б).

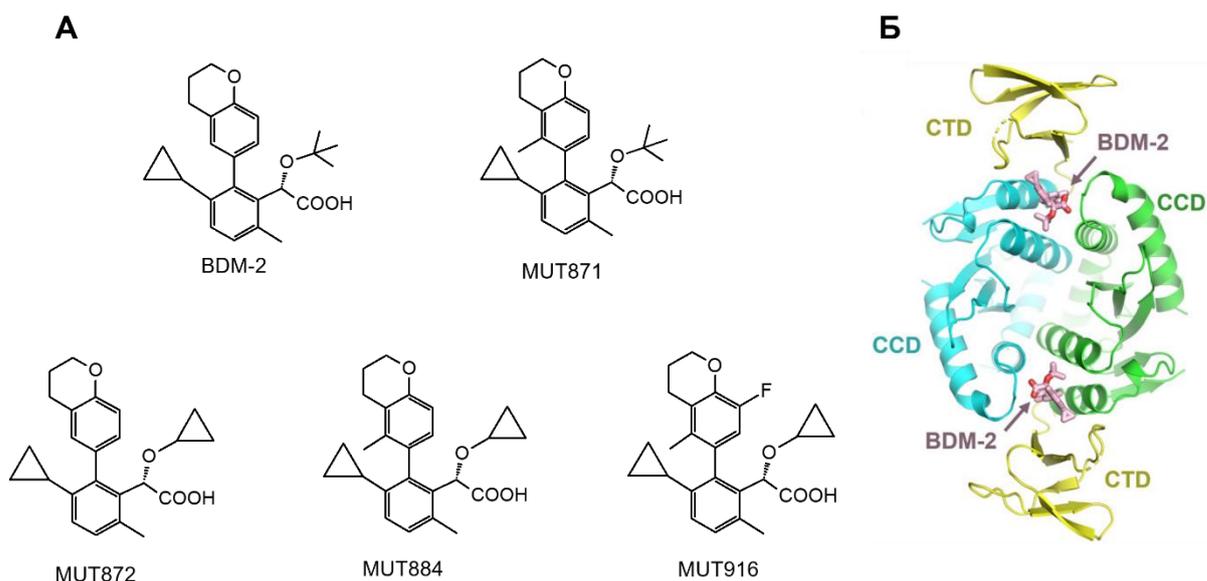


Рисунок 15. Структуры ингибитора BDM-2 и серии его производных (А) и структура комплекса димера каталитических доменов IN (CCD), связанных с двумя С-концевыми доменами (CTD), с ингибитором BDM-2 (PDB ID 8CBR) (Б).

BDM-2 прошел доклинические испытания и был допущен к фазе I клинических исследований в 2020 году (Clinical trial NCT03634085). По результатам исследования его безопасности, переносимости и фармакокинетики не было выявлено каких-либо серьезных нежелательных эффектов, что делает потенциально возможным продолжение клинических испытаний этого ингибитора.

Интерес представляет еще одна серия соединений с бензольным каркасом, содержащих сульфонамидный заместитель в положении C1 бензола (Рис. 16) [182]. Исследования взаимосвязи структуры и активности показали, что наличие этого заместителя повышает противовирусную активность за счет взаимодействия с остатком IN Q95. Наиболее активный ингибитор этой серии продемонстрировал высокую анти-ВИЧ активность ($EC_{50} = 3,9 \text{ нМ}$) и хорошую биодоступность на стадии доклинических испытаний.

Наиболее активным из всех опубликованных к настоящему времени ингибиторов INLAI является разработанное компанией ST Pharm соединение STP0404 (Pirmitegravir - Пирмитегравир) с центральным каркасом на основе пирролидина (Рис. 13 и 17, А) [171]. Оно подавляет репликацию ВИЧ-1 в мононуклеарных клетках периферической крови (peripheral blood mononuclear cell (PBMC)) в пиколярных концентрациях и имеет терапевтический индекс, т.е. отношение максимальной дозы лекарственного

средства, не проявляющей токсичности, к дозе, дающей нужный эффект, больше 24000, что значительно превышает терапевтические индексы для других INLAI.

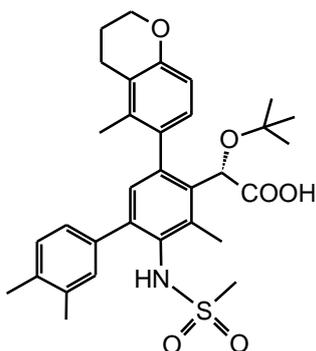


Рисунок 16. Структура аналога ингибитора BDM-2 с сульфонамидным заместителем в положении C1 бензола.

Механизм действия пирмитегравира подобен другим INLAI, ингибитор располагается в гидрофобном кармане на поверхности димера каталитических доменов IN, в том же месте, где связывается LEDGF/p75. При этом карбоксильная группа образует бидентатную водородную связь с амидными группами остатков E170 и H171 в основной цепи белка, тогда как трет-бутоксильная группа и объемные ароматические группировки участвуют в гидрофобных взаимодействиях с боковыми цепями обеих субъединиц димера каталитического домена IN (Q95, Y99, L102, W125, W132, T174 и M178) (Рис. 17, Б). Культивирование вируса в культуре клеток в присутствии пирмитегравира приводит к появлению в IN аминокислотных замен Y99H и A128T, которые вызывают значительную устойчивость ВИЧ-1 как к этому ингибитору, так и к производному 2-(хинолин-3-ил)уксусной кислоты BI224436. Это указывает на то, что мутации, отобранные против пирмитегравира, демонстрируют перекрестную резистентность по отношению к другим ранее разработанным INLAI. Это не удивительно, учитывая, что все эти ингибиторы связываются с IN в одном и том же сайте.

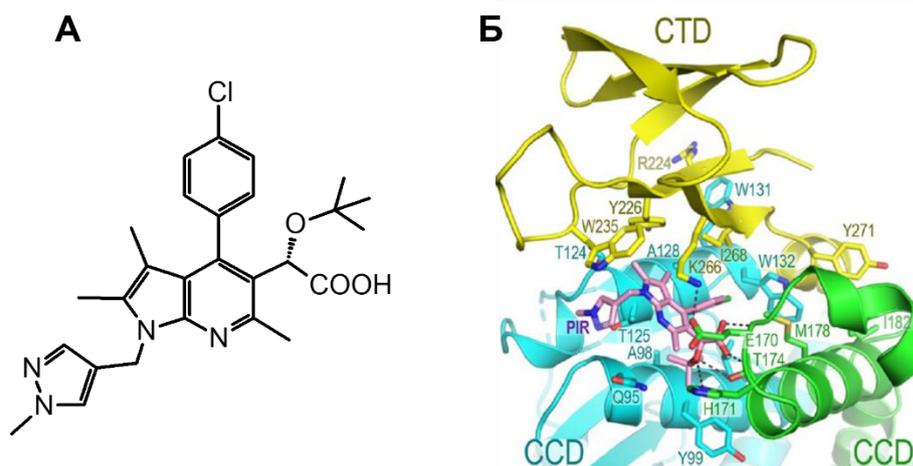


Рисунок 17. Структура пирмитегравира (А) и его комплекса с димером каталитических доменов IN (CCD), связанных с С-концевым доменом (CTD), (Б).

Доклинические испытания пирмитегравира, проведенные на крысах и собаках, показали, что этот ингибитор обладает достаточно высокой стабильностью в плазме крови и в гепатоцитах, хорошей биодоступностью при внутривенном и пероральном применении, что позволяет рекомендовать его к применению один раз в день.

Пирмитегравир – пока единственный аллостерический ингибитор IN, который не только успешно прошел первую фазу клинических испытаний, но и уже находится на второй фазе, на которой проводится оценка противовирусного эффекта, безопасности, переносимости и фармакокинетики пирмитегравира у ранее не получавших лечения ВИЧ-инфицированных взрослых (Clinical trial NCT05869643).

Заканчивая раздел, посвященный ингибиторам взаимодействия IN и LEDGF/p75, необходимо упомянуть 2-фенил-1,2-бензоселеназол-3-он, или эбселен (Рис. 18) [183].

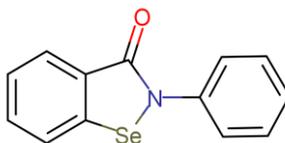


Рисунок 18. Структура эбселена.

Эбселен обладает противовоспалительной, антиоксидантной и цитопротекторной активностью и в настоящее время находится на разных стадиях клинических испытаний как препарат для терапии нескольких заболеваний (Clinical trial NCT06859788). Это соединение не является эффективным ингибитором взаимодействия IN и LEDGF/p75, показывая в *in vitro* экспериментах ингибирующую активность в

микромольном диапазоне ($IC_{50} = 7,7$ мкМ). Однако оно интересно тем, что связывается не с IN, а с LEDGF/p75. *In vitro* исследования показали, что эбселен ковалентно связывается с LEDGF/p75, вероятно, образуя связи селен-сера с остатками цистеина, поскольку его ингибирующее действие полностью подавляется в присутствии 50 мкМ дитиотреитола. Таким образом, эбселен – единственный ингибитор взаимодействия IN и LEDGF/p75, который не является аллостерическим ингибитором ИИ.

Пример эбселена открывает новое направление для разработки ингибиторов взаимодействия IN с LEDGF/p75, направленных на LEDGF/p75, а не IN. Учитывая пример маравирока, который блокирует связывание вирусного гликопротеина gp120 с клеточным рецептором CCR5, связываясь с последним, и для которого до сих пор не идентифицировано устойчивых к нему циркулирующих штаммов ВИЧ-1 [184], можно предположить, что выработка вирусной резистентности к ингибиторам с аналогичным эбселену механизмом действия также будет маловероятна.

2.3. Антиретровирусные препараты длительного действия, применяемые для лечения ВИЧ-инфекции

АРВТ требует чёткого соблюдения пациентами графика приёма лекарств: препарат необходимо принимать в определённый час или за определенное время до или после еды; нельзя пропускать приемы препаратов, нельзя принимать уменьшенные или увеличенные дозы. Большинство рассмотренных выше АРВП требуют от ВИЧ-инфицированных пациентов перорального приема один или два раза в день. Как указывалось выше, используемые в АРВТ препараты чаще всего являются комбинациями трех ингибиторов с разным механизмом действия, хотя в последнее время появились и комбинации только двух ингибиторов, одним из которых является ингибитор IN долутегравир, а вторым может быть НИОТ ламивудин [185] или ННИОТ рилпивирин [186].

Применяемые в настоящее время схемы АРВТ способны значительно продлить жизнь пациентов и улучшить качество жизни, однако, многие люди испытывают трудности с соблюдением режима лечения [187–189]. Использование АРВП длительного действия (АРВП-ДД) представляет собой новый и многообещающий терапевтический подход, который может обеспечить альтернативную стратегию как для лечения, так и для профилактики ВИЧ-инфекции [190]. АРВП-ДД могут принести

пользу пациентам, которым сложно соблюдать режим лечения из-за побочных эффектов, усталости от приема таблеток или стигматизации.

2.3.1. Каботегравир и рилпивирин длительного действия

В январе 2021 года была одобрена первая схема АРВП-ДД для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов, основанная на внутримышечных инъекциях ингибитора IN каботегравира (СAB) (Рис. 8) и ННИОТ рилпивирина (RPV) (Рис. 5). Комбинация каботегравира и рилпивирина длительного действия, называемая Cabenuva, одобрена для лечения взрослых пациентов с уровнем вирусной РНК в плазме крови ниже пределов обнаружения [191–193]. Каботегравир длительного действия также одобрен в качестве средства для доконтактной профилактики ВИЧ [194].

Комбинация каботегравира с рилпивиринем позволила снизить необходимую частоту приема препарата с одного раза в день до одного раза в месяц или даже каждые 2 месяца [190,195]. Однако применение каботегравира/рилпивирина имеет некоторые ограничения. Во-первых, этот препарат назначают пациентам только с низким уровнем вирусной нагрузки. Во-вторых, одним из важнейших моментов при назначении каботегравира/рилпивирина является соблюдение режима лечения для минимизации развития лекарственной устойчивости, поэтому проводится тщательный отбор пациентов, которые следуют ежемесячному графику инъекций и поддерживают системную концентрацию препаратов на нужном уровне [196]. Важно также, что совместное назначение каботегравира/рилпивирина и некоторых препаратов, включая противосудорожные, противомикобактериальные (рифабутин и рифампицин), глюкокортикоиды и макролиды или кетолиды, снижает концентрацию RPV или CAB и потенциально приводит к потере вирусологического ответа и развитию резистентности [192].

2.3.2. Ислатравир

Ислатравир пока не разрешен к применению в качестве АРВП, но проходит клинические испытания в качестве препарата как для лечения ВИЧ-инфекции, так и для ее профилактики [197]. Ислатравир (4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine, EFdA или МК-8591) (Рис. 19), разработанный фирмой Merck, является ингибитором ОТ ВИЧ-1 нового типа и классифицируется как нуклеозидный ингибитор транслкации обратной транскриптазы (НИТОТ). Ислатравир может ингибировать ОТ ВИЧ-1 по нескольким

механизмам: в качестве «немедленного» терминатора цепи может включаться в растущую цепь ДНК и останавливать синтез как классические НИОТ; может действовать как «отложенный» терминатор цепи, позволяя включать дополнительный dNTP перед блокированием синтеза ДНК; может неправильно узнаваться ОТ при синтезе второй цепи ДНК, что приводит к появлению мисматчей [198]. Вклад того или иного механизма ингибирования ОТ в каждом конкретном случае, очевидно, зависит от последовательности РНК. Благодаря такому комплексному механизму действия ислатравир сохраняет высокую ингибирующую активность по отношению к штаммам ВИЧ-1, устойчивым к действию НИОТ и ННИОТ [198].

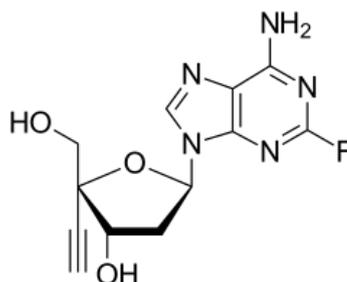


Рисунок 19. Структура ислатравира.

В комбинации с ННИОТ доравирином ислатравир находится на стадии 3 клинических испытаний как препарат для лечения ВИЧ-инфекции. Было установлено, что применение одной таблетки доравирина (100 мг) и ислатравира (0,75 мг) поддерживало подавление уровня вируса до 48-ой недели не хуже антиретровирусных комбинаций, используемых в клинической практике для ВИЧ-инфицированных взрослых пациентов; однако снижение количества клеток CD4⁺ и общего количества лимфоцитов остановило дальнейшую разработку однократного ежедневного приема доравирина и ислатравира в таких дозах [199]. Дальнейшее исследование показало, что можно использовать уменьшенную дозу ислатравира (0,25 мг) без снижения эффективности действия [200].

Интересен также вариант применения ислатравира в качестве подкожного импланта для профилактики ВИЧ-инфекции [201]. В рандомизированном, двойном слепом, плацебо-контролируемом исследовании фазы 1 имплант с ислатравиром или имплант плацебо был установлен на 12 недель у участников с низким риском заражения ВИЧ-1. В течение всего периода размещения и через 8 недель после удаления импланта оценивались его безопасность и переносимость, а также фармакокинетика исходного ислатравира и трифосфата ислатравира в плазме крови и мононуклеарных клетках

периферической крови. В результате был сделан вывод, что ислатравир, вводимый с помощью подкожного импланта, может стать эффективным и хорошо переносимым методом профилактики у лиц, подверженных риску заражения ВИЧ-1.

2.3.3. Ленакапавир

Как было описано выше, ленакапавир также может стать эффективным АРВП-ДД [144]. На данный момент он разрешен к применению как принимаемый два раза в год препарат для доконтактной профилактики заражения ВИЧ-1. Это решение было принято на основании результатов двух клинических испытаний: PURPOSE-1 (Clinical trial NCT04994509) и PURPOSE-2 (Clinical trial NCT04925752) у лиц, подверженных риску заражения ВИЧ-1.

Продолжается исследование возможности использования комбинации ленакапавира с ислатравиром при еженедельном пероральном приеме для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов с низким уровнем вирусной нагрузки (Clinical trial NCT05052996), результаты этого исследования должны стать известными в ближайшее время. Разрабатывается также инъекционный режим лечения ислатравиром и ленакапавиром с более длительным интервалом между введением этих препаратов.

Надо отметить, что ленакапавир и ислатравир действуют на разные мишени, СА и ОТ, соответственно, поэтому маловероятно, что эти два соединения будут иметь перекрывающиеся профили резистентности. Таким образом, сочетание этих двух ингибиторов может стать высокоэффективным вариантом лечения ВИЧ-1, не вызывающим появления резистентных штаммов вируса.

Исследуется также возможность создания комбинаций ленакапавира с рилпивирином и каботегравиром в качестве препаратов длительного действия [202].

Помимо перечисленных выше препаратов, для лечения и профилактики ВИЧ-инфекции изучаются и новые варианты комбинаций АРВП-ДД различных классов. Хотя АРВП длительного действия являются многообещающими терапевтическими средствами, для их более широкого использования необходимо решить некоторые проблемы, в том числе возможность возникновения ранее неизвестных побочных эффектов, лекарственное взаимодействие, беременность и высокие концентрации ингибиторов, длительное время находящиеся в крови пациентов, которые могут привести к развитию лекарственной устойчивости.

2.4. Разрабатываемые подходы к элиминации или глубокому ингибированию ВИЧ-инфекции

Как уже отмечалось выше, разработка эффективной АРВТ позволила существенно снизить уровень заболеваемости и смертности от ВИЧ-инфекции, однако она не приводит к полному излечению, т.е. удалению интегрированного генома вируса из организма. После попадания вируса в организм он инфицирует в первую очередь CD4⁺ Т лимфоциты. После интеграции вирусной кДНК в геном этих клеток часть лимфоцитов переходит в состояние покоя, и эти покоящиеся неактивные CD4⁺ Т лимфоциты образуют скрытый резервуар ВИЧ-1 [203]. Вирус в этих клетках переходит в латентное состояние, которое характеризуется отсутствием активной транскрипции и формирования новых вирионов [204]. Помимо CD4⁺ Т лимфоцитов, в образовании вирусных резервуаров могут участвовать мононуклеарные макрофаги, дендритные клетки, гемопоэтические стволовые клетки и некоторые другие клетки [205].

АРВТ препятствует репликации ВИЧ-1 в клетках, где проходит размножение вируса, но не действует на вирус, который находится в латентном состоянии в клетках-резервуарах [206]. Таким образом, присутствие латентного вируса в клетках-резервуарах является основной проблемой в лечении ВИЧ-инфекции.

В настоящее время разрабатывается несколько подходов к полному излечению ВИЧ-инфекции. Принципиальная возможность избавления от ВИЧ-1 была показана еще в 2009 году, когда у ВИЧ-1 инфицированного пациента Тимоти Рэй Брауна (так называемого «Берлинского пациента») обнаружили лейкемию и провели ему пересадку гемопоэтических стволовых клеток от донора, имеющего гомозиготную делецию 32 пар оснований в гене корцептора CCR5 (CCR5 Δ 32/ Δ 32). Известно, что эта делеция приводит к сдвигу рамки считывания и появлению преждевременного стоп-кодона, в результате чего синтезируется функционально неактивный укороченный белок-корцептор [207]. До пересадки была проведена процедура «кондиционирования», направленная на удаление существующих гемопоэтических клеток включающая химио- или радиотерапию. При этом после пересадки донорского костного мозга АРВТ была прекращена. Через несколько лет результаты обследования плазмы крови, семенной и спинномозговой жидкости показали, что у пациента не определяются ни РНК ВИЧ-1, ни неповрежденная провирусная ДНК, ни вирусные белки [208,209]. Второй аналогичный случай излечения от ВИЧ-инфекции произошел в 2019 году в результате пересадки клеток костного мозга пациенту, страдающему от лимфомы

Ходжкина. К настоящему времени восемь ВИЧ-инфицированных пациентов, которым была проведена пересадка костного мозга, считаются свободными от присутствия вируса в организме [210].

Важно отметить, что шести из восьми пациентам была проведена пересадка костного мозга от доноров, имеющих гомозиготную делецию в гене корцептора CCR5 (CCR5 Δ 32/ Δ 32). Как указывалось выше, ВИЧ-1 использует для проникновения в клетку как хемокиновый рецептор 5 (CCR5), так и хемокиновый рецептор 4 CXCR4 (CXCR4). R5-тропные вирусы связывают CCR5 для слияния клеток-хозяев и обычно присутствуют на ранних стадиях ВИЧ-инфекции, X4-тропные штаммы, использующие для проникновения рецептор CXCR4, начинают доминировать на более поздних стадиях инфекции. Соответственно, нормальное прогрессирование ВИЧ-инфекции начинается с тропизма R5, а затем переключается на X4-тропный вирус. Удивительно, но это фенотипическое переключение с R5 на X4 еще не произошло ни у одного из пяти пациентов с пересаженными CCR5 Δ 32/ Δ 32 клетками, что позволяет предположить, что тропные вирусы CXCR4 отсутствовали или, если присутствовали, не могли инфицировать донорские клетки с делецией в гене CCR5 [210,211].

Еще одному пациенту была проведена трансплантация костного мозга от донора с гетерозиготным генотипом CCR5 wt/ Δ 32, однако, даже неполное удаление функционального корцептора CCR5 привело к недетектируемому уровню РНК ВИЧ-1 в плазме крови на фоне отмены АРВТ после трансплантации костного мозга [210]. В случае еще одного пациента «Женевского пациента» в качестве донорского костного мозга использовали материал с природным вариантом CCR5 (CCR5 wt/wt). После трансплантации в 2018 году костного мозга в 2021 году была прекращена АРВТ. Наблюдение за пациентом в течение 32 месяцев после этого показало отсутствие вирусной РНК в плазме крови, а также отсутствие в клетках полноразмерных и функциональных провирусных ДНК, что говорит об отсутствии в его организме реплицирующегося вируса. Однако стоит отметить, что этот пациент был вынужден регулярно принимать руксолитиниб из-за развития реакции трансплантата против хозяина, для которого показано ингибирующее действие в отношении ВИЧ-1. Во время отмены АРВТ данному пациенту на месяц был отменен прием руксолитиниба и даже в этом случае у пациента не наблюдали ВИЧ-1. Таким образом, случай «Женевского» пациента ставит под сомнение строгую необходимость использования костного мозга донора с генотипом CCR5 Δ 32/ Δ 32 для излечения от ВИЧ-1, хотя и требует дальнейшего наблюдения за пациентом и анализа подобных случаев в будущем [210,212].

Понятно, однако, что провести такую пересадку костного мозга всем ВИЧ-инфицированным пациентам невозможно, поэтому идёт поиск безопасных способов редактирования генома человека и удаления из него генов рецепторов CCR5 и/или CXCR4 или провирусной ДНК.

Второй подход к излечению ВИЧ-инфекции основан на воздействии на латентно инфицированные клетки пациента без непосредственного удаления интегрированного провируса. Этот подход стал возможным благодаря исследованию факторов и механизмов, способствующих формированию вирусной латентности и выходу из нее. В этом случае существуют две принципиально разные стратегии: постоянное подавление вирусной латентности («Block and Lock») или наоборот - реактивация экспрессии провируса в латентно инфицированных клетках в сочетании со стратегиями восстановления иммунитета для устранения инфицированных ВИЧ-1 клеток из организма хозяина («Shock and Kill») (Рис. 20) [213]. Понятно, что разработка и эффективная реализация любой из этих стратегий требует глубокого понимания клеточных процессов, которые необходимы как для поддержания вирусной латентности, так и для активизации экспрессии вирусных генов.

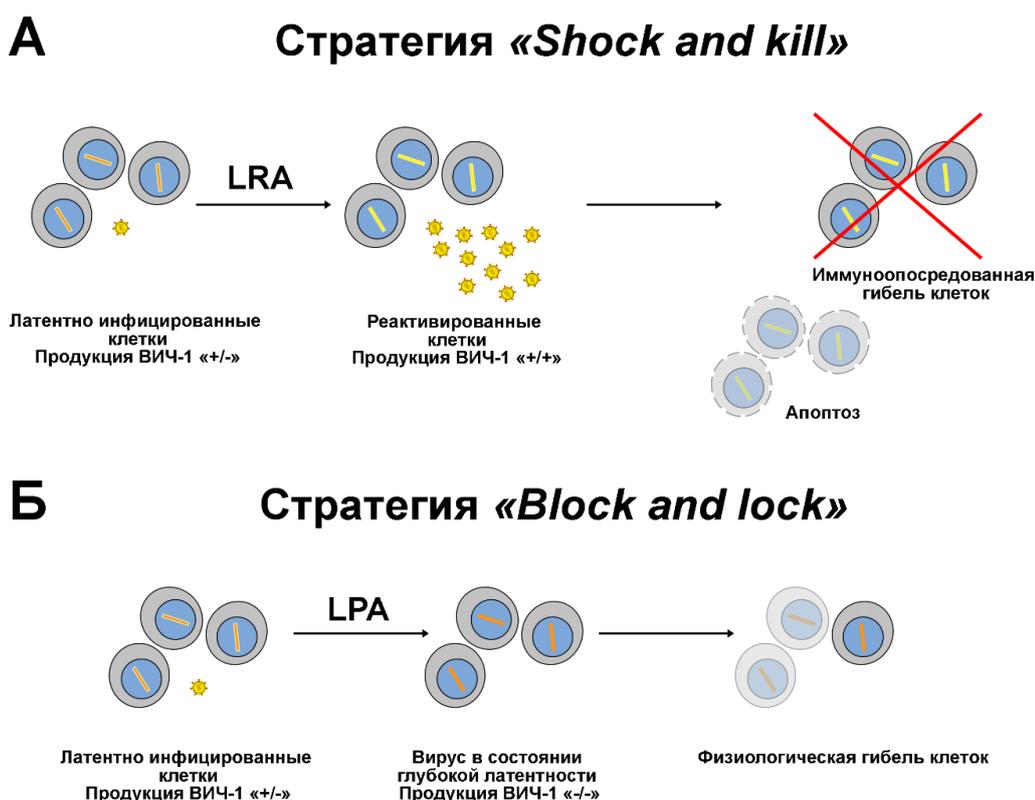


Рисунок 20. Схематичное представление стратегий «Shock and Kill» (А) и «Block and Lock» (Б). LRA – агент, обращающий латентность, LPA – агент, усиливающий латентность.

Пока ни один из этих подходов в медицинской практике не используется, однако учитывая их значимость и перспективность, мы считаем необходимым кратко обсудить их современное состояние,

2.4.1. Использование геномного редактирования для излечения ВИЧ-инфекции

Этот подход начал разрабатываться уже достаточно давно [214] под воздействием новостей об успешном излечении «Берлинского пациента» [215]. Существует два основных направления геномного редактирования: а) полное удаление провируса из всех латентных клеток-резервуаров или б) нарушение экспрессии корецепторов ВИЧ-1 CXCR4 и CCR5 [216].

Исторически для редактирования генов этих корецепторов использовались три основные системы: цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALENs) и система кластеризованных регулярно расположенных коротких палиндромных повторов (CRISPR)/Cas9 [217], из которых система CRISPR/Cas9 несомненно является наиболее эффективной [218]. Независимо от используемой системы, гемопоэтические стволовые клетки или CD4⁺ Т-клетки извлекаются у пациентов, подвергаются геномному редактированию и реинфузируются пациенту. Понятно, что эта стратегия трансплантации клеток с «испорченными» корецепторами CXCR4 и CCR5 для противодействия распространению ВИЧ-инфекции может быть эффективной только в том случае, если она приводит к созданию устойчивой популяции таких резистентных клеток. Проведенные исследования показали, что удаление из гена рецептора CCR5 последовательности в 32 пары нуклеотидов и получение CD4⁺ Т или гемопоэтических клеток CCR5 Δ 32 Δ 32 приводит к тому, что после трансфузии таких клеток пациенту их количество в крови снижается гораздо медленнее, чем эндогенных Т-клеток в период прерывания АРВТ. Следовательно, модифицированные CCR5 клетки имеют устойчивость к ВИЧ-инфекции [219]. Надо, однако, отметить, что, если модификация корецептора CCR5 нормально переносится пациентами [209,211], то генетическая модификация корецептора CXCR4 в гемопоэтических стволовых клетках требует более детального исследования, поскольку на мышинной модели было показано, что гомозиготные мутации в гене CXCR4 приводят к эмбриональной летальности [220].

Другая инновационная стратегия по излечению ВИЧ-1 основана на применении технологии CRISPR/Cas9-редактирования для удаления интегрированного

провирусного генома из организма. Она была испытана как в исследованиях *in vitro*, так и *in vivo*, в том числе на резус-макаках, инфицированных вирусом иммунодефицита обезьян [221]. В этом исследовании система CRISPR/Cas9 доставлялась в организм с помощью аденоассоциированного вируса. В результате было обнаружено значительное снижение уровня вирусной ДНК в образцах, собранных из инфицированных клеток крови и других тканей, включая лимфатические узлы, селезенку, костный и головной мозг.

Возможность полной ликвидации ВИЧ-1 в организме была продемонстрирована с использованием гуманизированных мышей [222]. Однако в этом случае удалению из генома ВИЧ-инфицированной мыши длинных концевых повторов вирусной ДНК и гена *gag* предшествовало воздействие антивирусной терапией длительного действия с медленным высвобождением действующего препарата (long-acting slow-effective release antiviral therapy - LASER ART) [223]. Для этой терапии были синтезированы пролекарства, представляющие собой миристилированные производные долутегавира (DTG), ламивудина (ЗТС) и абакавира (ABC) (Рис. 21) [223–225]. В организме эти пролекарства подвергались медленному гидролизу клеточными эстеразами, в результате которого образовывались активные ингибиторы.

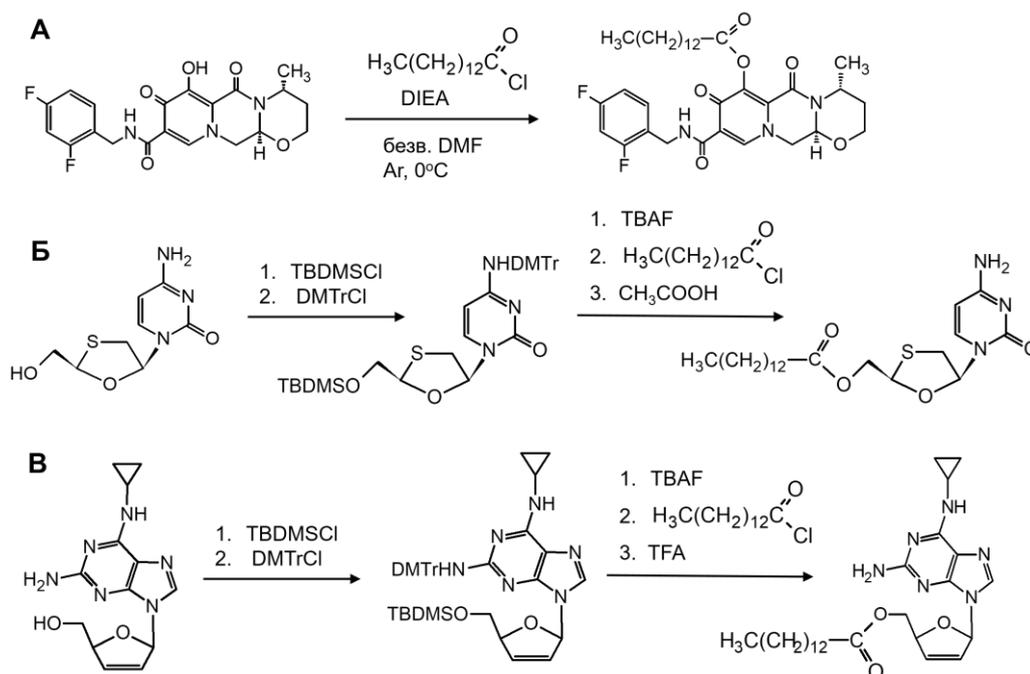


Рисунок 21. Схемы получения пролекарств, содержащих остаток миристиновой кислоты: А. долутегавира; Б. ламивудина; В. абакавира. DIEA - *N,N*-диизопропилэтиламин, DMF - *N,N*-диметилформамид, TBDMSCl – *трет*-бутилдиметилсилилхлорид, DMTrCl – 4,4'-диметокситрифенилметилхлорид, TBAF – тетрабутиламмонийфторид, TFA – трифторуксусная кислота.

Авторы работы [222] утверждают, что такая предварительная терапия повышает эффективность последующей обработки CD4⁺ Т-клеток системой CRISPR/Cas9, доставляемой в организм мышей с помощью аденоассоциированного вируса. После такой двойной обработки ВИЧ-1 не обнаруживался в крови, селезенке, легких, почках, печени, кишечнике, костном и головном мозге.

Аналогичный подход с предварительной обработкой гуманизированных мышей LASER ART был использован в работе [226]. В этом случае система CRISPR/Cas9 использовалась для редактирования как интегрированного провируса, так и корцептора CCR5. Отметим, что терапия длительного действия была также дополнена введением немодифицированного рилпивиринна. После комбинированной обработки ВИЧ-1 не обнаруживался в крови, селезенке, легких, почках, печени, кишечнике, костном и головном мозге животных. Важно отметить, что неинфицированные ВИЧ-1 мыши, подвергшиеся указанной двойной обработке, более не заражались вирусом. Ни у одного из обработанных животных не было зарегистрировано побочных эффектов. Важно, что комбинированная терапия LASER ART + CRISPR/Cas9 продемонстрировала статистически значимое улучшение при излечении ВИЧ-1 по сравнению с терапией с использованием только LASER ART или только CRISPR/Cas9.

В заключение отметим, что, хотя в настоящее время стратегия удаления интегрированного провируса еще не используется в качестве терапевтической и до ее применения у пациентов придется пройти длинный путь оптимизации системы и ее клинического тестирования, ее можно считать достаточно перспективной. В отличие от редактирования генов корцепторов CCR5/CXCR4, иммунная система пациента не нуждается в трансфузии новыми клетками, а может быть отредактирована *in vivo*. Кроме того, этот подход не является специфическим для отдельных подтипов ВИЧ-1 и может обеспечить более широкое применение. Однако, если редактирование корцепторов CCR5/CXCR4 должно защитить пациентов от повторного заражения, то удаление провируса — нет, поскольку проникновение вируса не будет заблокировано. Надо также признать, что перед внедрением в клинику необходимо тщательно оптимизировать использование системы CRISPR/Cas9. Так, учитывая высокую изменчивость вируса и существование большого количества штаммов, необходимо выбрать в геноме ВИЧ-1 наиболее консервативные участки, поскольку наличие некомплементарных оснований в сайтах связывания гидовых РНК может существенно снизить эффективность редактирования. Хотя в экспериментах на мышах не было обнаружено побочных эффектов, нельзя исключить их появление при использовании системы CRISPR/Cas9 у

человека. Кроме того, необходимо также выбрать наиболее эффективный и безопасный вариант доставки этой системы в организм человека.

2.4.2. Стратегия «Shock and Kill»

Как отмечалось выше основную проблему для полной иридикации ВИЧ-1 представляют резервуары вируса, находящегося в латентном состоянии, т.е. такие клетки, в которых вирусный генетический материал интегрирован в клеточный геном, но является транскрипционно неактивным. В связи с этим вирус в таких клетках становится невосприимчив к действию стандартной терапии, а латентно инфицированные клетки из-за отсутствия продукции вирусных антигенов становятся недоступными для распознавания со стороны иммунной системы. Хотя такие клетки и не продуцируют новых вирусных частиц спонтанный выход вируса из латентного состояния не позволяет отменять АРВТ даже при недетектируемой вирусной нагрузке в плазме крови [205].

Переход вируса в латентное состояние и выход из него напрямую связан с механизмами регуляции транскрипции ВИЧ-1 клеточными и вирусными факторами. На обоих концах интегрированного провируса располагаются последовательности, называемые длинными концевыми повторами (Long Terminal Repeat - LTR). Расположенный на 5'-конце провируса 5'-LTR является промотором, регулирующим экспрессию вирусных генов. Он состоит из участков U3, R и U5, отвечает за транскрипцию провируса и содержит модуляторный регуляторный элемент, энхансер и промотор в области U3, за которым следует элемент ответа на трансактивацию (Trans Activation Response element - TAR) в области R [227]. В процессе инициации транскрипции РНК-полимераза II синтезирует небольшую 5'-концевую последовательность геномной РНК, содержащую TAR-элемент. Он представляет собой шпильку, с которой связывается вирусный белок Tat (Trans-Activator of Transcription), имеющий решающее значение для экспрессии генов ВИЧ-1, поскольку именно его взаимодействие с TAR стимулирует привлечение комплекса Р-TEFb и за счет этого переход к элонгации транскрипции [228,229]. С последовательностью 5'-LTR, как с промотором, связываются клеточные белки, регулирующие транскрипцию: активаторы, репрессоры или транскрипционные сайленсеры. Когда инфицированные ВИЧ-1 CD4⁺ Т-клетки переходят в состояние покоя, экспрессия провирусных генов может подавляться отсутствием положительных транскрипционных регуляторов или ингибированием их

связывания с 5'-LTR. Еще одним фактором, приводящим к подавлению транскрипции, может быть нарушение взаимодействия белка Tat с TAR РНК или снижение уровня Tat в клетке. Эпигенетические факторы также могут влиять на вирусную транскрипцию. Так, подавлять транскрипцию генов ВИЧ-1 и способствовать поддержанию латентности может метилирование сайтов CpG в провирусном промоторе, позиционирование нуклеосом и ремоделирование хроматина, модификация гистонов вблизи промотора ВИЧ-1, включая деацетилирование, метилирование и гипоацетилирование [230].

Стратегия «Shock and Kill», впервые предложенная в 2004 году [231], направлена на устранение вируса из организма путем реактивации транскрипции латентных провирусов с последующим уничтожением клеток, в которых образуются новые вирусы, либо задействуя иммунную систему пациента, либо способствуя апоптозу инфицированных клеток. Для реализации этой стратегии используются агенты, обращающие или отменяющие латентность (latency-reversing agents - LRAs), т.е. реагенты, стимулирующие экспрессию вирусных генов в латентных инфицированных клетках.

В настоящее время известно значительное количество разнообразных агентов, идентифицированных как LRAs, которые воздействуют на латентное состояние ВИЧ-1 и стимулируют транскрипцию провируса посредством различных механизмов: эпигенетической модификации, регуляции деацетилирования гистонов, воздействия на toll-like рецепторы (TLR) и другие [230,232]. Если говорить о низкомолекулярных LRAs, то в первую очередь были предложены активаторы протеинкиназы С (ПКС) и ингибиторы гистондеацетилаз (HDAC) и бромдомен-содержащего белка 4 (BRD4) (Рис. 22) [233].

ПКС — фермент из семейства сериновых/треониновых киназ, фосфорилирование их клеточных субстратов приводит в том числе к активации транскрипции под действием универсального фактора транскрипции NF-κB. Связывание NF-κB с энхансером в составе вирусного 5'-LTR обеспечивает транскрипцию вирусных генов, в том числе с латентного интегрированного провируса. Соответственно, активаторы ПКС активируют путь NF-κB, индуцируя транскрипцию латентного ВИЧ-1 [234].

Гистондеацетилазы, HDAC, катализируют деацетилирование остатков лизина в составе основных гистонов, что приводит к более компактной структуре хроматина и подавлению транскрипции генов. Ингибиторы HDAC способствуют реактивации вирусной транскрипции в результате увеличения доступности промотора ВИЧ-1 [235].

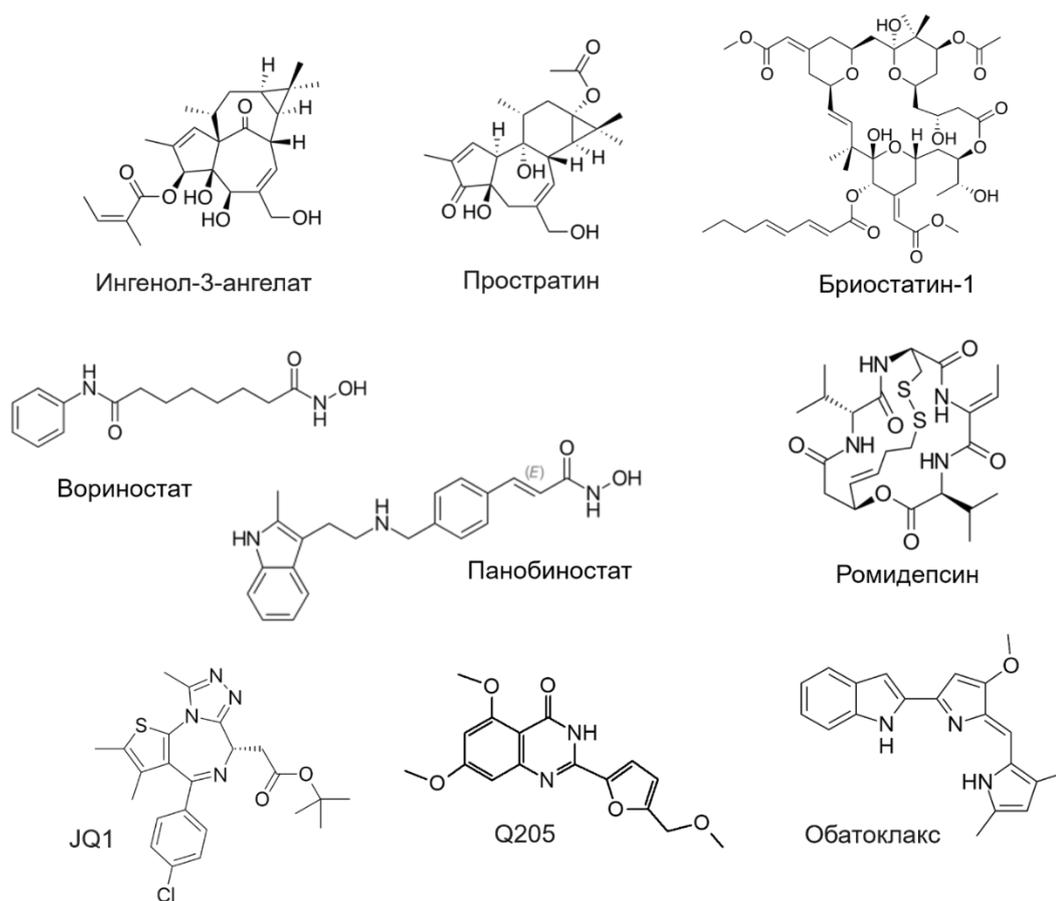


Рисунок 22. Структуры некоторых низкомолекулярных агентов, обращающих латентность (LRAs). Ингенол-3-ангелат, простратин и бриостатин-1 - активаторы ПКС; вориносат, панобиносат и ромидепсин – ингибиторы HDAC; JQ1 – ингибитор BRD4; Q205 – активатор взаимодействия P-TEFb с вирусным белком Tat; обатоклакс - ингибитор белка BCL-2.

BRD4 является регулятором транскрипции, который, с одной стороны, может привлекать РНК-полимеразу II к активным областям промотора и энхансера, а с другой – связывает P-TEFb, активирующий инициацию и элонгацию транскрипции [236]. Во время активной транскрипции ВИЧ-1 BRD4 и Tat конкурируют за связывание с P-TEFb, который доступен в ограниченном количестве [237]. В латентном состоянии высокие уровни BRD4 препятствуют связыванию Tat с P-TEFb и ингибируют транскрипционную трансактивацию, опосредованную Tat. Ингибиторы BRD4 связываются с его бромодоменами BD1 и BD2 и вытесняют BRD4 из хроматина, что позволяет Tat связаться с P-TEFb, тем самым активируя транскрипцию провируса [238].

Разработка новых вариантов LRAs продолжается. Так, предложен ряд новых низкомолекулярных агентов [239–242], среди которых наибольший интерес вызывают

5,7-диметокси-2-(5-(метоксиметил)фуран-2-ил)хиназолин-4(3H)-он (Q205) и антагонист белка BCL-2 обатоклакс.

Q205 способен эффективно реактивировать вирус в латентных ВИЧ-1-инфицированных клетках, не вызывая индукции потенциально повреждающих цитокинов. Установлен молекулярный механизм действия Q205 – стимуляция фосфорилирования остатка T186 в активаторной петле (T-loop) белка CDK9 – компонента Р-TEFb. Это способствует взаимодействию Р-TEFb с вирусным белком Tat, их связыванию с TAR РНК и активации элонгации транскрипции провируса [239].

Известно, что белок BCL-2 и его гомологи являются внутриклеточными регуляторами множества клеточных процессов, наиболее важными из которых являются выживание клеток и апоптоз. Учитывая, что жизненный цикл ВИЧ-1 может стимулировать апоптоз клеток-хозяев, были проведены исследования влияния ингибирования BCL-2 на динамику ВИЧ-инфекции. В результате установлено, что селективное ингибирование BCL-2 может уменьшить количество как инфицированных вирусом клеток, так и клеток-резервуаров латентного вируса и восстановить способность ВИЧ-специфических цитотоксических лимфоцитов нацеливаться на латентно инфицированные клетки после реактивации [243–245]. Наиболее эффективным в этом отношении реагентом оказался ингибитор BCL-2 обатоклакс (Рис. 22), вызывающий реактивацию ВИЧ-1 в латентно инфицированных клеточных линиях *in vitro* и в РВМС/CD4⁺ Т-клетках ВИЧ-инфицированных людей *ex vivo* [240,246]. Обатоклакс способствует инициации и элонгации транскрипции ВИЧ-1, регулируя путь NF-κB, но, что более важно, он стимулирует апоптоз в латентно инфицированных клетках. Способность реактивировать латентные резервуары ВИЧ-1, ингибировать инфекцию ВИЧ-1 и вызывать апоптоз латентных клеток ВИЧ-1 делает обатоклакс перспективным кандидатом для использования в стратегии «Shock and Kill».

Клинические испытания были проведены главным образом с ингибиторами гистондеацетилаз. Они показали, что воздействие этих соединений на латентный вирус действительно приводит к временному увеличению уровня клеточно-ассоциированной и содержащейся в плазме крови вирусной РНК, что говорит о реактивации вирусных резервуаров, но, к сожалению, ни в одном случае не было обнаружено существенного снижения количества самих клеток-резервуаров ВИЧ-1 [247–251]. Помимо этого, было показано, что ингибиторы гистондеацетилаз (например, вориностаат) могут усиливать восприимчивость CD4⁺ Т-клеток к заражению вирусом [252].

Эти результаты показывают, что активность LRAs *in vitro* не обязательно коррелирует с их клинической активностью, предположительно, потому что в поддержании латентности ВИЧ-1 *in vivo* задействованы множественные, еще не до конца изученные механизмы. Более того в разных типах клеток эти механизмы могут отличаться, что пока не позволяет одинаково эффективно выводить такие клетки из латентного состояния с помощью лишь одного агента.

Очевидно, одной отмены латентности недостаточно для устранения клеток-резервуаров ВИЧ-1. Как отмечено выше, стратегия «Shock and Kill» предполагает уничтожение клеток, в которых реактивирована транскрипция латентных провирусов, под действием иммунной системы пациента или путем апоптоза инфицированных клеток. Однако, ВИЧ-инфекция уничтожает клетки иммунной системы и вызывает иммунную дисрегуляцию, что усложняет устранение вируса даже при наличии эффективного LRA. Более того, нельзя исключить возможности заражения неинфицированных клеток вирусными частицами, образовавшимися в результате реактивации латентно инфицированных клеток. В связи с этим, возможно, необходимо сочетание LRAs с сильными препаратами АРВТ, а также разработка широкого спектра иммунных терапий, включая терапевтические вакцины, антитела, иммунотерапевтические препараты, которые усиливают функцию Т-клеток, для полного устранения резервуаров латентного ВИЧ-1.

2.4.3. CAR-T терапия в контексте стратегии «Shock and Kill»

Для решения проблемы недостаточного распознавания реактивированных клеток иммунной системой у ВИЧ-инфицированных людей может быть использована технология терапии Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR-T). В ее основе лежит использование аллогенных Т-клеток пациента, которые благодаря *ex vivo* модификации химерным антигенным рецептором (CAR) приобретают способность распознавать клетки, несущие целевой антиген, например, белок Env ВИЧ-1, и уничтожать их [253].

CAR, впервые разработанный в 1987-1989 годах, состоит из трех функциональных фрагментов: внеклеточного – отвечает за узнавание целевого антигена, трансмембранного – необходим для закрепления рецептора на поверхности клетки, и внутриклеточного – отвечает за передачу сигнала внутрь клетки и активацию иммунного ответа после связывания CAR с антигеном [254]. В качестве внеклеточной

части CAR обычно используют антиген-распознающий модуль, например, фрагмент антител или клеточный рецептор, специфичный к мишени, в качестве трансмембранного – фрагмент, поверхностных маркеров Т-клеток, например, CD3 ζ , CD28, CD8 α и другие, а в качестве внутриклеточного – сигнальный домен CD3 ζ в индивидуальном виде или в комбинации с костимуляторными последовательностями [254]. Таким образом, трансмембранный и внутриклеточный домены являются универсальными модулями для создания CAR-T, а использование широкого спектра распознающих молекул в качестве внеклеточного домена делает CAR-T мощным и универсальным инструментом для терапии широкого спектра заболеваний. В случае терапии ВИЧ-1 в качестве внеклеточной части CAR могут быть использованы фрагменты CD4-рецептора. Как отмечалось выше вирус использует CD4-рецептор для первичного взаимодействия с целевой клеткой, следовательно, его наличие в составе CAR позволит клеткам распознать Env-экспрессирующие зараженные клетки [254,255].

CD8⁺ Т-лимфоциты, модифицированные CAR с CD4-узнающей частью, эффективно распознавали инфицированные ВИЧ-1 Т-лимфоциты и вызывали их гибель в условиях сокультивирования *in vitro* [254,255]. Однако первые клинические испытания такого варианта CAR-T на пациентах, с подавленной вирусной инфекцией, хотя и показали безопасность для пациентов, но не продемонстрировали существенного снижения числа ВИЧ-позитивных клеток, даже несмотря на долгое сохранение таких модифицированных клеток в организме (до 11 лет). Одним из возможных объяснений неудачи данного исследования может быть использование APBT для подавления вирусной репликации у таких пациентов и, как следствие, снижение продукции Env зараженными клетками, хотя и другие факторы, такие как низкая доза клеток, низкая скорость экспансии таких клеток, могут также иметь вклад в неудачу исследований. Еще один фактор в пользу неудачного исхода исследований таких CAR-T может заключаться непосредственно в выборе рецепторной части CAR: вирус может заражать такие клетки за счет CD4-рецептора, что снижает их эффективность. Сегодня разрабатываются стратегии, предполагающие одновременную модификацию или удаление CCR5 корецептора, наряду с введением CD4-CAR, для снижения риска трансдукции таких терапевтических клеток [254,255].

В качестве внеклеточного распознающего домена для CAR также предложено использовать фрагменты широко нейтрализующих антител (англ. broadly neutralizing antibodies, bNAbs) к консервативным участкам Env белка [254]. Особенностью таких антител является их способность распознавать Env широкого спектра штаммов вируса и

блокировать проникновение вируса. Стоит отметить, что обычно, такие антитела обнаруживают у пациентов с высоким уровнем вирусной нагрузки и их наличие, к сожалению, не помогает контролировать заболевание, т.к. для появления таких антител требуется в среднем от 3 до 5 лет, и за это время гонки иммунной системы и вирусной адаптации побеждает вирус, создавая латентно инфицированные резервуары и адаптируя структуру Env. Однако есть и исключения. Так для некоторых non-прогрессоров и элитных контроллеров, чья иммунная система эффективно сдерживает развитие вирусной инфекции даже в условиях отмены АРВТ, продемонстрирована взаимосвязь между наличием bNAbs и их способностью к контролю вирусной инфекции [256,257].

Использование фрагментов bNAbs от таких пациентов вместо CD4-рецептора для создания CAR защищает терапевтические Т-клетки от инфекции, но при этом позволяет им распознавать инфицированные различными штаммами вируса клетки. Разные научные группы показали, что CD8-клетки с bNAbs-CAR эффективно распознают и уничтожают Env-экспрессирующие клетки, а также реактивированные латентно инфицированные клетки *in vitro*. В настоящее время проводятся клинические испытания по определению безопасности и эффективности CAR-T на базе bNAbs (Clinical trial NCT03240328) [255]. Очевидно, что описанные выше подходы пока находятся лишь на стадии разработки и для достижения терапевтической эффективности придется их существенно дорабатывать, но именно они в комбинации со стратегией «Shock and Kill» могут стать основой для создания подходов для функционального излечения пациентов.

2.4.4. Стратегия «Block and Lock»

Эта стратегия, в отличие от подхода «Shock and Kill», направлена на предотвращение реактивации транскрипции провируса путем принудительного перевода интегрированных провирусов в состояние глубокой латентности [230,258]. Это достигается с помощью агентов, усиливающих латентность (latency-promoting agents - LPAs), которые подавляют экспрессию провируса, воздействуя на факторы, специфичные либо для самого ВИЧ-1, либо для клетки-хозяина, для предотвращения вирусной транскрипции. При этом агент «Block» ингибирует транскрипцию ВИЧ-1, тогда как агент «Lock» делает латентные резервуары устойчивыми к реактивации даже при отсутствии АРВТ. Тем не менее, стратегия «Block and Lock» предлагает ВИЧ-инфицированным использовать LPAs наряду с АРВП для подавления постоянной

вирусной транскрипции, снижения остаточной вирусности и предотвращения повторного образования латентных резервуаров. Такая комбинированная терапия может способствовать сокращению числа латентных резервуаров ВИЧ-1 с течением времени. После того, как вероятность вирусной реактивации будет сведена к минимуму, можно будет отменить прием АРВП, и LPAc будут самостоятельно продолжать обеспечивать глубокую и необратимую латентность вируса, достигая постоянного подавления провирусов без АРВТ и в итоге приводя к ликвидации латентных резервуаров ВИЧ-1.

Одним из наиболее перспективных LPAc, блокирующих вирусную транскрипцию, является дидегидрокортикостатин А (dCA) (Рис. 23), который связывается с белком Tat, препятствует его взаимодействию с TAR РНК и тем самым блокирует репликацию ВИЧ-1 при концентрациях всего 1 нМ [259,260]. Со временем ингибирование Tat-зависимой транскрипции ВИЧ-1 с помощью dCA приводит к накоплению эпигенетических модификаций в хроматине после промотора ВИЧ-1, которые препятствуют связыванию РНК-полимеразы II и синтезу полноразмерной РНК. В результате возникает вирусная латентность, невосприимчивая к реактивации транскрипции цитокинами, ингибиторами HDAC и активаторами протеинкиназы С (ПКС). С использованием клеточных линий, полученных от пациентов, и гуманизированных мышинных моделей латентности ВИЧ-1 показано, что dCA является очень эффективным агентом для сохранения вирусной латентности. Более того, dCA эффективно ингибирует репликацию вируса иммунодефицита обезьян (SIV) и реактивацию этого вируса, препятствуя привлечению РНК-полимеразы II к SIV-LTR [261].

Ингибиторы киназ CDK8 и CDK19, сенексин А и BRD6989, способны подавлять индукцию экспрессии ВИЧ-1 в ответ на действие агентов, отменяющих латентность. Обнаружено, что эти ингибиторы препятствуют привлечению РНК-полимеразы II к LTR ВИЧ-1, поскольку киназы CDK8 и CDK19 играют важную роль в регуляции транскрипции ВИЧ-1 и что малые молекулярные ингибиторы этих ферментов могут способствовать терапии, направленной на стимулирование глубокой латентности, включающей длительное подавление экспрессии провируса [262].

Помимо указанных веществ, путем скрининга уже разрешенных к применению терапевтических препаратов найдено еще несколько низкомолекулярных соединений, ингибирующих транскрипцию ВИЧ-1.

Так, оказалось, что препарат рипретиниб, продаваемый под торговой маркой Qinlock для лечения взрослых пациентов с прогрессирующей гастроинтестинальной

стромальной опухоли, которая возникает в желудочно-кишечном тракте [263], эффективно препятствует активации транскрипции провируса в клеточных моделях, содержащих латентный ВИЧ-1, а также в CD4⁺ Т-клетках, полученных от инфицированных пациентов. Показано, что такое действие рипретиниба является результатом ингибирования киназы КИТ, участвующей в сигнальном пути PI3K-АКТ-mTOR [264]. Этот внутриклеточный путь, центральными компонентами которого являются ферменты фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), киназы АКТ и mTOR. Это один из универсальных сигнальных путей, характерных для большинства клеток человека, отвечающий в том числе за уход клетки от апоптоза, рост и пролиферацию клеток. Активация этого сигнального пути способствует взаимодействию РНК-полимеразы II с 5'-LTR [265].

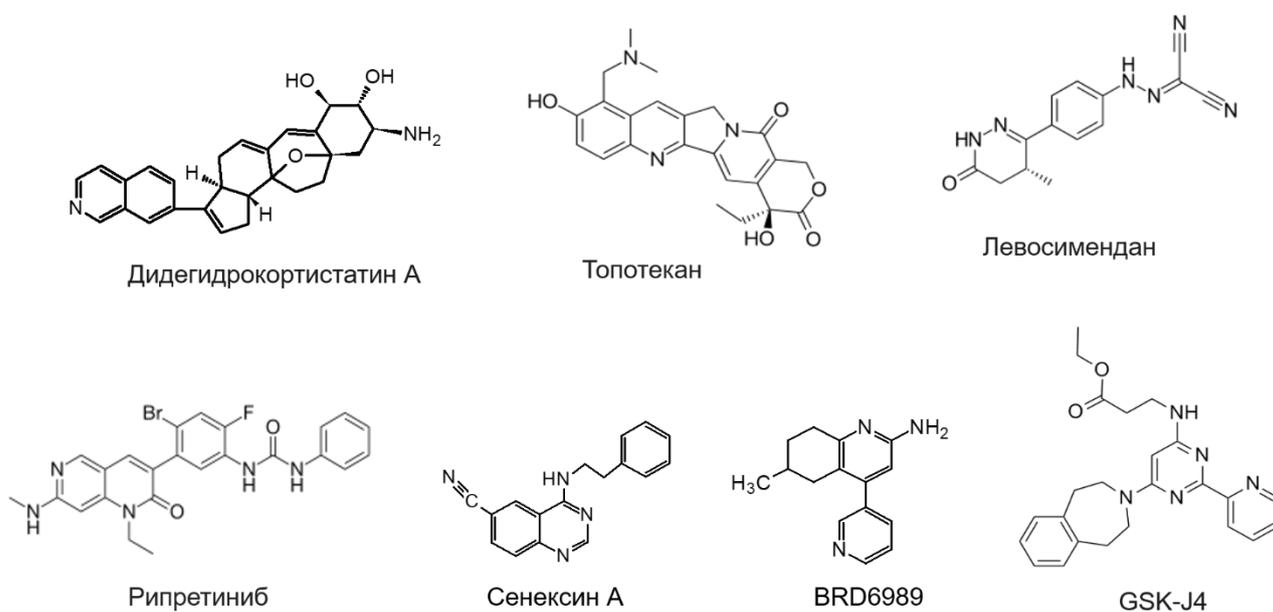


Рисунок 23. Структуры некоторых агентов, усиливающих латентность.

Препарат левосимендан (торговая марка Simdax), который в клиниках используется для лечения сердечной недостаточности [266], оказался мощным ингибитором реактивации ВИЧ-1 в нескольких клеточных линиях. Установлено также, что в первичных CD4⁺ Т-клетках левосимендан ингибирует как активную репликацию ВИЧ-1, так и реактивацию латентных провирусов [267].

Аналог камптотецина топотекан (ТРТ) (торговая марка Нусамтин) является ингибитором топоизомеразы I и используется при лечении некоторых видов рака [268].

Оказалось, однако, что ТРТ снижает транскрипционную активность ВИЧ-1 в латентно инфицированных клетках, причем действие ТРТ не отменяется агентами, отменяющими латентность [269].

Все перечисленные выше соединения условно можно отнести к агентам «Block», поскольку их основной функцией является ингибирование транскрипции ВИЧ-1. Однако для индуцирования глубокой латентности необходимо дополнительно воздействовать на клетки-резервуары латентного вируса таким образом, чтобы они не могли реактивироваться даже в отсутствие АРВТ. Это возможно, если провирус интегрирован в транскрипционно неактивные участки генома (например, в конденсированный хроматин) или если вирусный 5'-LTR промотор метилирован (метилирование остатков цитозина по 5 положению в последовательностях CpG промоторов генов подавляет транскрипцию) [270].

Принципиальная возможность направления интеграции вирусной кДНК в конденсированный хроматин продемонстрирована при изучении аллостерических ингибиторов IN, нарушающих ее связывание с белком LEDGF/p75 (раздел 3.3.1). Так, в присутствии соединения GS-9822 интеграция вирусной кДНК протекала как раз в область конденсированного хроматина, что приводило к немедленной вирусной латентности. При этом важно, что интегрированные в присутствии GS-9822 провирусы крайне плохо реактивировались [5,271]. Способность GS-9822 усиливать латентность вируса и снижать возможность реактивации интегрированных провирусов может быть полезна для стратегии “Block and Lock”.

Попытка усиления латентности путем метилирования промотора ВИЧ-1 была продемонстрирована в работе [272]. Использование соединения GSK-J4 - ингибитора деметилазы UTX/KDM6A, осуществляющей удаление метильных остатков, привело к эффективному подавлению реактивации латентного ВИЧ-1 и метилированию ДНК в определенных участках 5'-LTR латентного вируса. К сожалению, хотя ингибитор GSK-J4 эффективно подавлял вирусную реактивацию, этот эффект был кратковременным и быстро пропал после отмены препарата.

Подводя итог описанию стратегии “Block and Lock”, отметим, что пока ни один из агентов, усиливающих латентность, не дошел до стадии клинических испытаний. Однако исследования в этом направлении активно продолжаются.

Каждый из подходов по устранению вируса из организма или подавлению его возможной реактивации имеет свои преимущества, и в отношении каждого подхода был достигнут определенный прогресс. Скорее всего, для полного излечения ВИЧ-инфекции

необходимо сочетание терапевтических подходов, включая эффективную АРВТ, «Shock and Kill», «Block and Lock», использование антител и иммуномодуляторов.

2.5. Заключение к обзору литературы

В настоящем обзоре представлены как одобренные АРВП, так и потенциальные стратегии, которые находятся только на стадии исследований. Среди одобренных препаратов есть те, которые на практике уже показали свою эффективность в борьбе с ВИЧ-инфекцией и привели к значительному увеличению продолжительности и улучшению качества жизни ВИЧ-инфицированных людей. Однако, каким бы эффективным и безопасным не был одобренный препарат, у каждого из них есть свои недостатки. Основным фактором, лимитирующим использование препарата, остается выработанная вирусом устойчивость к нему. Мульти- и кросс-резистентность разных штаммов ВИЧ-1 делает необходимым поиск все новых терапевтических мишеней и подходов к излечению ВИЧ-инфекции.

Применение ингибиторов вирусных ферментов оказалось наиболее доступным и безопасным методом лечения за счет минимального влияния на молекулярные механизмы клетки-хозяина, однако высокая скорость появления мутаций вируса приводит и к большой скорости возникновения резистентности. С другой стороны, ингибирование взаимодействий между вирусными и человеческими белками позволило бы обойти эту проблему. В этой области исследований уже был достигнут значительный прогресс, но для выхода на широкомасштабное клиническое применение в АРВТ еще предстоит совершенствовать технологии и провести тщательные испытания эффективности и безопасности таких ингибиторов. Другой нерешенной проблемой остается отсутствие методов по полному излечению от вируса, связанное с сохранением в организме клеток-резервуаров латентного ВИЧ-1. Применение АРВТ в самом начале заболевания полностью не предотвращает возникновения латентности ВИЧ-1, но ограничивает начальный размер резервуаров латентного вируса и вызывает быстрое снижение количества этих резервуаров, закладывая основу для излечения от ВИЧ-инфекции с помощью дополнительных подходов.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Используемые реактивы и буферные растворы

Реактивы, наборы и ферменты: Plasmid Miniprep 2.0 (Евроген, Россия), PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit или PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen, США), PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit или PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen, США), глутатион-агароза (Thermo, США), Ni-NTA-агароза (Thermo, США), диализная мембрана SnakeSkin, 3.5K MWCO (Thermo, США), Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (BioRad, США), Quick Start Bradford Protein Assay (BioRad, США), PVDF-мембрана с размером пор 0,22 мкм (BioRad, США), Clarity Western ECL Substrate (BioRad, США), трипсин/LysC (Promega, США), Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific, США), Millipore ziptip C18 P10 (Merck, Германия), HiTrap NHS-Activated HP affinity columns (Cytiva, США), МТТ (ПанЭко, Россия), ИФА набор для определения р24 (Vector Best, Россия), полибрен (Sigma, США), 1 М HEPES pH 7.2 (Gibco, США), 1x Passive Lysis Buffer (Promega, США), Promega Luciferase Assay Systems (Promega, США), ExtractDNA Blood and Cells (Евроген, Россия), 5X qPCRMix-HS (Евроген, Россия), 5x qPCR Mix-HS SYBR (Евроген, Россия), Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США), Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США), RNAiMAX (Invitrogen, США), DC Protein Assay (Bio-Rad, США), QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, США), Т4 ДНК лигаза (Евроген, Россия), iProof полимеразы (BioRad, США), DreamTaq ДНК-полимеразы (Thermo, США), Fast Digest эндонуклеазы рестрикции (Thermo, США).

Первичные антитела: кроличьи anti-Phospho-ATR (Ser428) #2853, кроличьи anti-Phospho-Chk2 (Thr68) (C13C1) #2197, кроличьи anti-Phospho-Chk1 (Ser345) (133D3) #2348, кроличьи anti-Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3) #9718, мышинные anti-Phospho-p53 (Ser15) (16G8) #9286, кроличьи anti-Phospho-ATM (Ser1981) (D25E5) #13050 – производства Cell Signaling Technology, США, а также кроличьи anti-GST, мышинные anti-His6, HRP-конъюгированные anti-FLAG M2, кроличьи anti-actin (Sigma, США), мышинные anti-tubulin клон 12G10 mAb (Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa, США)

Вторичные антитела: Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074, Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076 (Cell Signaling Technology, США), Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 555 Conjugate) (Thermo, США).

Таблица 1. Растворы, используемые в работе

Название раствора	Состав раствора
Буфер А	50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 10 % глицерин, 1 М NaCl, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% NP-40
Буфер А1	50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 10 % глицерин, 1 М NaCl, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% NP-40, 1 мМ PMSF, 1г/л лизоцим
Буфер А2	50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 10 % глицерин, 1 М NaCl, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% NP-40, 50 мМ восстановленный глутатион
Буфер А30	50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 10 % глицерин, 1 М NaCl, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% NP-40, 30 мМ имидазол
Буфер А50	50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 10 % глицерин, 1 М NaCl, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% NP-40, 50 мМ имидазол
Буфер А70	50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 10 % глицерин, 1 М NaCl, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% NP-40, 70 мМ имидазол
Буфер А100	50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 10 % глицерин, 1 М NaCl, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% NP-40, 100 мМ имидазол
Буфер А500	50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 10 % глицерин, 1 М NaCl, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% NP-40, 500 мМ имидазол
Буфер PD	20 мМ HEPES, pH 7,5, 100 мМ NaCl, 7,5 мМ MgCl ₂ , 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% NP-40
Буфер PD-BSA	20 мМ HEPES, pH 7,5, 100 мМ NaCl, 7,5 мМ MgCl ₂ , 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 мкг/мл BSA; 0,1% NP-40
Буфер Ab1	0,02 М NaH ₂ PO ₄ pH 8,0, 0,15 М NaCl
Буфер Ab2	0,02 М Na ₂ HPO ₄ , 0,1 М лимонная кислота pH 3,0
Буфер Ab3	100 мМ глицин-HCl, pH 2,5
Буфер 1x TBS	20 мМ Tris-HCl, pH 7,2, 150 мМ NaCl
Буфер 10x TBS	200 мМ Tris-HCl, pH 7,2, 1500 мМ NaCl
10x Раствор Tris-глицина	1,25 М глицин, 100 мМ Tris-HCl pH 8,0
Буфер Lb1	25 мМ Hepes, 150 мМ NaCl, 8 мМ MgCl ₂ , 10% глицерин, 0,25% NP40
Буфер Lb2	25 мМ Hepes, 500 мМ NaCl, 8 мМ MgCl ₂ , 10% глицерин, 0,25% NP40
Буфер CLB	5 мМ HEPES pH 8,0, 85 мМ KCl, 0,5% NP-40
Буфер NLB	50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 3 мМ EDTA, 0,3% SDS
Буфер DB	5 мМ Tris-HCl pH 8.1, 2 мМ EDTA, 1,5% Triton X-100, 225 мМ NaCl
LiCl буфер	50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 1 мМ EDTA, 1,0 % NP-40, 500 мМ NaCl, 0.1% SDS, 250 мМ LiCl, 1% деоксихолат натрия
Буфер TE	10 мМ Tris-HCl pH 8.0, 0,25 мМ EDTA

Таблица 2. Олигонуклеотиды, использованные в работе (Синтезированы ООО «Евроген» или Зацепиным Т.С.).

Название олигонуклеотида	Последовательность, 5'-3'
IN_E212A/L213A_s	GAAAATTTTGAATTTTTGTAAATTTGTTTTGTGCTGCTTTAGTTTGTATGT CTGTTGCTATTATGT
IN_E212A/L213A_s	ACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGCAGCACAAAAACAAATTACAAA AA TTCAAAATTTTC
IN_E152A_s	ATTTCTTTAATTCCTTTATTTCATAGATGCTATTACTCCTTGACTTTGGGGATTG
IN_E152A_as	CAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGCATCTATGAATAAAGAATTAAGAAA AT
IN_F185A_s	CCCAATCCCCCTTTTCTTTTAGCATTGTGGATGAATACTGCCAT T
IN_F185A_as	AATGGCAGTATTCATCCACAATGCTAAAAGAAAAGGGGG GATTGGG
mCER_s	ATGATCGGTACCGGATCCGTGAGCAAGGGCGAGGAG
mCER_as	ATGATCCATATGTCCAGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
mCER_stop_s	CATGGACGAGCTGTACAAGTGATCTGGACATATGTTTTT
mCER_stop_as	AAAAACATATGTCCAGATCACTTGTACAGCTCGTCCATG
Ku70-78_s	GTGTACATCAGTAAGATCATAAGCAGTTAGCGAGATCTCTTGGC
Ku70-78_as	GCCAAGAGATCTCGCTAACTGCTTATGATCTTACTGATGTACAC
Ku70-64_s	GTTGACACCTTTTGACATGAGCTAGCAGTGTATCCAAAGTGTGTACA
Ku70-64_as	TGTACACACTTTGGATACACTGCTAGCTCATGTCAAAAAGTGTCAAC
Ku70-44_s	GTTTGATTTTTTTGGTTGATGCCTAGAAGGCTATGTTTGAATCTCAGAGT
Ku70-44_as	ACTCTGAGATTCAAACATAGCCTTCTAGGCATCAACCAAAAAAATCAAAC
Ku70_Δ51-57/insAG_s	GGTTGATGCCTCCAAGGCTATGTTTGAAGCTGGAACACCTTTGACATG
Ku70_Δ51-57/insAG_as	CATGTCAAAAAGGTGTTCCAGCTTCAAACATAGCCTTGGAGGCATCAACC
Ku70_Q65A/Q68A_s	GATCTTACTGATGTACACACTTGCGATACACGCGATGCTCATGTCAAAAAGGTG TC
Ku70_Q65A/Q68A_as	GACACCTTTTGACATGAGCATCGCGTGTATCGCAAGTGTGTACATCAGTAAGA TC
Ku70_S69A/I72A_s	GATCACTGCTTATGATCTTACTGGCGTACACAGCTTGGATACACTGGATGCTC ATGTC
Ku70_S69A/I72A_as	GACATGAGCATCCAGTGTATCCAAGCTGTGTACGCCAGTAAGATCATAAGCAG TGATC
Ku70_S73A/I76A_s	CCAAGAGATCTCGATCACTGCTTGCATCTTAGCGATGTACACACTTTGGATA CACT
Ku70_S73A/I76A_as	AGTGTATCCAAAGTGTGTACATCGCTAAGATCGCAAGCAGTGTATCGAGATCTC TTGG
Ku70_S69A_s	TGATCTTACTGATGTACACAGCTTGGATACACTGGATGCTCATG
Ku70_S69A_as	CATGAGCATCCAGTGTATCCAAGCTGTGTACATCAGTAAGATCA
Ku70_I72A_s	ATCACTGCTTATGATCTTACTGGCGTACACACTTTGGATACACTGG
Ku70_I72A_as	CCAGTGTATCCAAAGTGTGTACGCCAGTAAGATCATAAGCAGTGTAT
Ku70_S73A_s	CTCGATCACTGCTTATGATCTTAGCGATGTACACACTTTGGATACAC
Ku70_S73A_as	GTGTATCCAAAGTGTGTACATCGCTAAGATCATAAGCAGTGTATCGAG

Ku70_I76A_s	CAAGAGATCTCGATCACTGCTTGCATCTTACTGATGTACACACTT
Ku70_I76A_as	AAGTGTGTACATCAGTAAGATCGCAAGCAGTGATCGAGATCTCTTG
tRFP_s	ATGATCGGATCCAGCGGGCGGAGCTGATCAAG
tRFP_as	ATGATCGGATCCTCATCTGTGCCCCAGTTTGCT
LTR-fw	GCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGC
LTR-rev	TGACTAAAAGGGTCTGAGGGAT
ULF1	ATGCCACGTAAGCGAAACTCTGGGTCTCTCTGGTTAGAC
Alu1	TCCCAGCTACTGGGGAGGCTGAGG
Alu2	GCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAG
UR1	CCATCTCTCTCCTTCTAGC
λT	ATGCCACGTAAGCGAAACT
UR2	CTGAGGGATCTCTAGTTACC
HCD3OUT3'	ACTGACATGGAACAGGGGAAG
HCD3OUT5'	CCAGCTCTGAAGTAGGGAACATAT
HCD3IN5'	GGCTATCATTCTTCTTCAAGGT
HCD3IN3'	CCTCTCTCAGCCATTTAAGTA
UHIV_TaqMan	FAM-GCACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGG-BHQ-1
CD3_TaqMan	FAM-AGCAGAGAACAGTTAAGAGCCTCCAT-BHQ-1
shCntr_s	GATCCCCGTCACGTCTAACTAACTAAGAACCTTGTTCAAGAGACAAGGTTCTT AGTTAGTTAGACGTGACTTTTTTA
shCntr_as	AGCTTAAAAAGTCACGTCTAACTAACTAAGAACCTTGTTCTTGAACAAGGTT CTTAGTTAGTTAGACGTGACGGG
shFen1_s	GATCCCCGAGATCGTGCGGCGACTTGATTCAAGAGATCAAGTCGCCGCACG ATCTCCTTTTTTA
shFen1_as	AGCTTAAAAAGGAGATCGTGCGGCGACTTGATCTCTTGAATCAAGTCGCCGCA CGATCTCCGGG
siCntr_s	AGGUCGAACUACGGGUCAAdTsdT
siCntr_as	UUGACCCGUAGUUCGACCUdTsdT
siKu70_s	GUGCAAAACGAAUUCUAGAdTsdT
siKu70_as	UCUAGAAUUCGUUUUGCACdTsdT

3.2. Плазмидные вектора

Плазмидные вектора pCMV6-AC EJ7-GFP (Addgene, № 113617), 7a sgRNA for EJ7-GFP reporter (Addgene, № 113620) и 7b sgRNA for EJ7-GFP reporter (Addgene, № 113624) для оценки эффективности репарации двуцепочечных разрывов ДНК по NHEJ-пути, а также вектора pCMV-VSV-G (Addgene, №8454), pCMVΔR8.2 (Addgene, № 12263), and LeGo-G/ BSD (Addgene, № 27354) для сборки лентивирусных векторов были получены из депозитария плазмид AddGene. Плазмидный вектор pUCHR_inLuc, кодирующий геном лентивирусного вектора с геном люциферазы светлячка, была любезно предоставлена д.б.н. Д.В. Мазуровым (ИБГ РАН, Россия). Вектор pET15b-IN

для экспрессии His6-тагированной по N-концу IN и вектор pGGWA_GST-IN для экспрессии GST-тагированной по N-концу IN любезно предоставлены доктором Джей-Ф. Мускаде (АНС-де-Кашан, Франция). Векторы pсDNA3.1_HA-IN и pсDNA3.1_Ku70-3xFlag были ранее получены в лаборатории на базе вектора pсDNA3.1, вектора pGEX-6p1-Ku70 и pGEX-6p1-Ku70_1-250 – на базе вектора pGEX-6p1, а pET-15b_His6-Ku70 – на базе вектора pET-15b.

Плазмидные вектора pCMVΔR8.2_E212A/L213A, pCMVΔR8.2_E152A, pCMVΔR8.2_F185A для получения лентивирусных векторов с мутантными вариантами интегразы ВИЧ-1 были получены на базе вектора pCMVΔR8.2 путем сайт-направленного мутагенеза с использованием набора реактивов Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, США), а также пар праймеров IN_E212A/L213A_s и IN_E212A/L213A_as, IN_E152A_s и IN_E152A_as, IN_F185A_s и IN_F185A_s, соответственно (Таблица 2).

Для получения вектора pGGWA_GST-mCer-IN mCer кодирующая последовательность была амплифицирована с использованием праймеров mCER_s и mCER_as (Таблица 2) и клонирована в исходный вектор pGGWA_GST-IN по сайтам эндонуклеаз рестрикции KpnI и NdeI. Конструкция pGGWA_GST-mCer была получена на базе pGGWA_GST-mCer-IN путем введения стоп-кодона после последовательности GST-mCer методом сайт-направленного мутагенеза с использованием пары праймеров mCER_stop_s и mCER_stop_as. Плазмидный вектор pET-15b_His6-Ku70-tRFP был получен на базе вектора pET-15b_His6-Ku70 путем клонирования ПЦР-продукта, кодирующего tRFP, по сайту эндонуклеазы рестрикции BamHI. Для наработки ПЦР-продукта гена tRFP использовали праймеры tRFP_s и tRFP_as (Таблица 2).

Плазмидные вектора pGEX-6p1-Ku70_1–78, pGEX-6p1-Ku70_1–64 и pGEX-6p1-Ku70_1–44 были получены на базе вектора pGEX-6p1-Ku70 путем введения стоп-кодонов в соответствующие позиции белок-кодирующей последовательности методом сайт-направленного мутагенеза с использованием пар праймеров Ku70-78_s и Ku70-78_as, Ku70-64_s и Ku70-64_as, Ku70-44_s и Ku70-44_as, соответственно (Таблица 2). Векторы pGEX-6p1-Ku70_1-250Δ51-57/insAG, pGEX-6p1-Ku70_1-250_Q65A/Q68A, pGEX-6p1-Ku70_1-250_S69A/I72A, pGEX-6p1-Ku70_1-250_S73A/I76A, pGEX-6p1-Ku70_1-250_S69A, pGEX-6p1-Ku70_1-250_I72A, pGEX-6p1-Ku70_1-250_S73A, pGEX-6p1-Ku70_1-250_I76A получены на базе вектора pGEX-6p1-Ku70_1-250 путем введения соответствующих мутаций методом сайт направленного мутагенеза, используя праймеры Ku70_Δ51-57/insAG_s и Ku70_Δ51-57/insAG_as, Ku70_Q65A/Q68A_s и

Ku70_Q65A/Q68A_as, Ku70_S69A/I72A_s и Ku70_S69A/I72A_as, Ku70_S73A/I76A_s и Ku70_S73A/I76A_as, Ku70_S69A_s и Ku70_S69A_as, Ku70_I72A_s и Ku70_I72A_as, Ku70_S73A_s и Ku70_S73A_as, Ku70_I76A_s и Ku70_I76A_as, соответственно (Таблица 2).

Плазмидные вектора pSuper-Retro-Puro_shCntr и pSuper-Retro-Puro_shFen1 для получения гаммаретровирусного вектора для получения контрольной клеточной линии и линии со стабильным нокдауном Fen1 были получены на базе вектора pSuper-Retro-Puro путем клонирования предварительно кинированных T4 полинуклеотидкиназой (Thermo, США) и гибридизованных дуплексов shCntr_s/shCntr_as, shFen1_s/shFen1_as (Таблица 2) по сайтам эндонуклеаз рестрикции BglIII и HindIII.

Корректность полученных конструкций подтверждали секвенированием целевых последовательностей по Сэнгеру (ЦКП «Геном»).

Все плазмидные вектора нарабатывали в клетках *E.coli* штамм XL1 при 37°C, а плазмидные вектора для сборки лентивирусных или гаммаретровирусных векторов в клетках *E.coli* штамм NEB Stable (NEB, США) при 30°C. Выделение плазмидной ДНК проводили набором Plasmid Miniprep 2.0 (Евроген, Россия), а в случае эукариотических экспрессионных векторов или векторов для сборки ленти- и гаммаретровирусных векторов набором PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit или PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen, США).

3.3. Получение и очистка рекомбинантных белков

Для наработки рекомбинантных белков GST-Ku70_wt, делеционных мутантов GST-Ku70_1-250, GST-Ku70_1-95, GST-Ku70_1-78, GST-Ku70_1-64, GST-Ku70_1-44, GST-Ku70_1-33, мутантов GST-Ku70_1-250 Δ 51-57/insAG, GST-Ku70_1-250_Q65A/Q68A, GST-Ku70_1-250_S69A/I72A, GST-Ku70_1-250_S73A/I76A, GST-Ku70_1-250_S69A, GST-Ku70_1-250_I72A, GST-Ku70_1-250_S73A, GST-Ku70_1-250_I76A, а также His₆-Ku70 и His₆-Ku70-tRFP клетки *E.coli* штамм BL21-CodonPlus (DE3) трансфицировали плазмидами, кодирующими соответствующие белки, высевали на агаризованную 2,5 % среду LB с ампициллином (100 мг/л), после чего для каждой плазмиды по одной колонии инокулировали в 100 мл 2,5 % LB среды и проводили наработку культуры в течение ночи при 37°C. Аналогичные процедуры проводили и при наработке белков GST-IN, GST-mCer-IN и GST-mCer, но использовали другой штамм *E.coli* – Rossetta (DE3). Ночную культуру вносили в 1 л 2,5 % среды LB с селективным антибиотиком ампициллином (100 мг/л) до оптической плотности 0,05-0,1 ое/мл,

измеренной при 600 нм. Культуру доращивали до оптической плотности 0,6-0,8 ое/мл, после чего инициировали наработку белка путем введения 1 мМ IPTG. Нарработку белка проводили в течение 2 часов при 25°C (в случае Ku70-белков) или в течение 3 часов при 37°C (в случае GST-IN, GST-mCeg-IN и GST-mCeg). По завершению процесса клетки осаждали в течение 30 мин, 5000 g при 4°C. Полученные осадки бактерий использовали для выделения и очистки белка (все дальнейшие манипуляции проводили при 4°C, если не указано иное).

Для выделения и очистки белков бактериальные клетки ресуспендировали в буфере А1 из расчета 10 мл буфера на 1 г клеток, инкубировали во льду в течение 30 мин, после чего клетки дезинтегрировали с использованием ультразвукового дезинтегратора QSonica Q700 (США). Нерастворимый материал осаждали центрифугированием в течение 20 мин 20000 g при 4°C. Осветленный лизат инкубировали в течение 2 часов с 1 мл глутатион-агарозы (Thermo, США) в случае GST-тагированных белков, затем смолу промывали трижды 50 мл буфера А и элюировали целевые белки 1 мл буфера А2 в течение 20 минут при комнатной температуре. В случае GST-IN и GST-mCeg-IN в элюирующий буфер был дополнительно добавлен 50 мкМ сульфат цинка.

В случае His6-тагированных белков Ku70 лизаты инкубировали 2 часа с 1 мл Ni-NTA-агарозы (Thermo, США), но перед этим в полученные лизаты вводили 1 М имидазол до концентрации 30 мМ для снижения неспецифической сорбции бактериальных белков. После завершения стадии связывания белков с сорбентом смолу промывали трижды 25 мл буфера А30, затем А50, А70 и А100. Элюцию белка проводили 1 мл буфера А500.

Все полученные рекомбинантные белки после элюции с сорбента диализовали против буфера без элюирующего агента (глутатион или имидазол) с использованием диализной мембраны SnakeSkin, 3.5K MWCO (Thermo, США).

Чистоту полученных препаратов полученных рекомбинантных белков оценивали методом ДСН-ПААГ с последующим окрашиванием Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (BioRad, США). Концентрацию белка в полученных препаратах оценивали с использованием набора Quick Start Bradford Protein Assay (BioRad, США).

3.4. Метод соосаждения белков

Для оценки взаимодействия интегразы ВИЧ-1 и клеточного белка Ku70 или его мутантных форм проводили GST-соосаждение белков. Для этого GST-тагированный

Ku70 или его мутантные формы (100 нМ) инкубировали с His₆-IN (100 или 200 нМ) в 150 мкл буфера PD-BSA в течение 1 часа при комнатной температуре. В случае анализа влияния соединений на взаимодействие белков в реакционные смеси дополнительно вводили исследуемые соединения при возрастающей концентрации. После этого к образцам добавляли 30 мкл глутатион-агарозы, предварительно проинкубированной с буфером PD + 5% БСА и переведенной в PD буфер, и дополнительно инкубировали образцы в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Для контроля неспецифичной сорбции His₆-IN на глутатион-агарозе готовили аналогичные образцы, но без добавления GST-тагированных Ku70. Затем смолу отмывали от несвязавшихся белков трижды 500 мкл буфера PD. Белки элюировали 20 мкл буфера для нанесения 5 мин при 95°C. Элюированные белки разделяли в 12 % ДСН-ПААГ, после чего их переносили на PVDF-мембрану с размером пор 0,22 мкм (BioRad, США) и проводили оценку содержания GST- и His₆-тагированных белков методом вестерн-блоттинга с использованием anti-GST и anti-His₆ первичных антител, а также HRP-конъюгированных вторичных антител. Визуализацию целевых белков проводили набором Clarity Western ECL Substrate (BioRad, США) на приборе ChemiDoc MP (BioRad, США).

Анализ взаимодействия флуоресцентно-меченых белков (GST-mCec-IN и His₆-Ku70-tRFP) проводили аналогичным образом, но после инкубации исследуемых белков со смолой их элюировали буфером для нанесения, но без термического воздействия, чтобы сохранить флуоресценцию довесков, а после разделения белков в ДСН-ПААГ оценивали флуоресценцию в геле на приборе ChemiDoc MP (BioRad, США).

3.5. Метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

Для оценки взаимодействия исследуемых ингибиторов с интегразой ВИЧ-1 и белком Ku70 или гетеродимером Ku70/Ku80 использовали метод поверхностного плазмонного резонанса с использованием оборудования ProteOn XPR36 (BioRad, США). 200 нМ His₆-тагированные интегразу, Ku70 или Ku70/Ku80 (тэг на Ku70 субъединице) иммобилизовали на НТЕ-чипе (BioRad, США). Иммобилизацию проводили в буфере PD в течение 7 мин при скорости потока 30 мкл/мин. Для оценки взаимодействия s17 с указанными белками 100 мкМ ингибитор в буфере PD с добавлением 5 % DMSO пропускали над исследуемыми дорожками в течение 1 мин со скоростью потока 100 мкл/мин. После инкубации с ингибитором, продолжали пропускать буфер PD с 5 %

DMSO, для оценки диссоциации исследуемых комплексов. SPR-сигналы были нормированы на референсный канал.

3.6. Метод пептидного-фишинга

1 мг His₆-Ku70, иммобилизованного на Ni-NTA-агарозе, подвергали протеолитическому расщеплению в течение 12 часов с использованием трипсина (Promega, США) при 37°C или GluC протеазой из *Bacillus intermedius* штамм 3-19, любезно предоставленную д.х.н. Г.Н. Руденской, при 55°C в 500 мкл буфера PD. Соотношение белок к протеазе составляло 40:1. Протеазы инактивировали путем добавления к реакционной смеси коктейля ингибиторов протеаз Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific, США).

Полученные пептидные смеси использовали для идентификации пептидов, взаимодействующих с IN. Для этого 500 нМ GST-IN инкубировали с полученными гидролизатами (1 мкМ в пересчете на концентрацию полноразмерного белка) в течение 1 часа при комнатной температуре в буфере PD-BSA, а затем к реакционным смесям добавляли 30 мкл глутатион-агарозы и проводили дополнительную инкубацию в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Несвязавшиеся белки и пептиды отмывали от смолы трижды 500 мкл буфера PD. Для элюции целевых пептидов смолу инкубировали с 7 М раствором мочевины 5 мин при 94°C.

Десять микролитров полученного образца очищали от солей на Millipore ziptip C18 P10 (Merck, Германия). Пептиды, предназначенные для масс-спектрометрического анализа, элюировали раствором, содержащим 50% ацетонитрила и 0,1% трифторуксусной кислоты (TFA). Масс-спектрометрический анализ полных гидролизатов и выделенных пептидов проводила М.В. Серебрякова (НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского) методом MALDI-TOF/TOF на масс-спектрометре UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Германия), регистрируя ионы MH⁺. Для подготовки образца 0,5 мкл анализируемой смеси смешивали с 1 мкл матричного раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты (40 мг/мл в 30% ацетонитриле, 0,5% TFA). Спектры снимали в рефлекторном режиме; погрешность измерения массы моноизотопных пиков не превышала 50 ppm. Обработку масс-спектров осуществляли с помощью программы FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Германия). Идентификацию белков проводили, используя собственную базу данных, предварительно загруженную последовательностями исследуемых белков, и поисковую программу Mascot (версия 2.3.02).

3.7. Молекулярный докинг

Конфигурация системы и параметры расчетов

Исследование проводилось с использованием программы AutoDock-GPU (версия 1.4.3) — ускоренной версии AutoDock 4.2.6, поддерживающей технологии OpenCL и CUDA [273]. Расчеты выполнялись на компьютере под управлением macOS Catalina 10.15.7 с 16 ГБ оперативной памяти и графическим процессором AMD Radeon Pro 5300M (4 ГБ). Визуализация трехмерных структур осуществлялась в программе PyMol, а анализ данных — с помощью Python. Подготовка модели белка: Кристаллическая структура гетеродимера человеческого белка Ku (PDB ID: 1JEQ) была получена из базы данных Protein Data Bank. Все молекулы воды удалили, после чего с помощью программного обеспечения AutoDockTools [274] подготовили файлы для работы с AutoDock-GPU: определили полярность атомов водорода, рассчитали заряды Гастейгера для структуры белка и конвертировали файл из формата PDB в формат PDBQT. Карты энергетической решетки были рассчитаны программой AutoGrid. Размер решетки составил $82 \times 72 \times 76$ точек по осям x, y и z с шагом 0,292 Å, а ее центр был задан координатами: $x = 41,744$; $y = 8,608$; $z = 128,236$ [16].

Подготовка лигандов

Виртуальная библиотека соединений от компании ChemDiv была загружена с ее веб-сайта в формате SMILES. После первоначальной фильтрации с использованием RDKit (Таблица 3) библиотеку преобразовали в формат PDB с помощью программы Gypsum-DL. Для всех молекул лигандов добавили атомы водорода и определили состояния ионизации при pH 7,2 [16].

Таблица 3. Критерии отбора соединений для молекулярного докинга

Параметр	Значение
Молекулярный вес	Не менее 150 г/моль, не более 500 г/моль
LogP	Не менее -5, не более 5
Количество доноров водородных связей	Не более 5
Количество акцепторов водородных связей	Не более 10
Формальный заряд	Не менее -2, не более 2
Вращающиеся связи	Не более 8
Число тяжелых атомов	Не менее 15, не более 50

Параметры докинга

Для выбранных соединений провели молекулярный докинг со следующими параметрами: 100 запусков генетического алгоритма (LGA), максимум 2 500 000 оценок скоринга и 42 000 поколений на каждый запуск LGA. Использовали метод локального поиска ADADELTA (максимум 300 итераций) [16].

3.8. Молекулярная динамика комплекса Ku/s17

Молекулярная динамика комплекса была проведена д.х.н. М.Г. Хреновой (химический факультет, МГУ) согласно следующей методике. Полноатомная модель гетеродимера Ku70/Ku80 была построена на основе координат тяжелых атомов из PDB 1JEQ с использованием методики, описанной в [14]. Параметры силовых полей: для лиганда s17 — CGenFF, для белка — CHARMM36, для воды — TIP3P. Расчеты МД проводили в ансамбле NPT (300 К, 1 атм), контролируя температуру методом Ланжевена, а давление — модифицированным методом Нозе–Гувера с динамикой Ланжевена для баростата. Процедура уравнивания включала 10 000 шагов минимизации и 30 нс МД. Стабильность комплекса s17-Ku70/Ku80 анализировали по производной траектории длительностью 200 нс. Анализ полученных структур комплексов проведен автором диссертационной работы в программе PyMol

3.9. Получение и очистка антител к интегразе ВИЧ-1

Сыворотка крови кроликов, иммунизированных препаратом рекомбинантной His6-IN, собранная через 3 месяца после иммунизации была подготовлена для нас Институтом вирусологии им. Д.И. Ивановского. Очистка антител к интегразе из сывороток осуществлялась в два этапа. На первом этапе была получена суммарная IgG-фракция антител. Для этого использовали аффинный сорбент – агарозу с иммобилизованным белком А из *Staphylococcus aureus* Protein A–Agarose (Merck, Германия). 1 мл аффинного сорбента был уравновешен 20 мл буфера Ab1, затем через него были трижды пропущены 5 мл сыворотки крови иммунизированных животных, предварительно профильтрованных через 0,45 мкм фильтр. Несвязавшиеся белки отмывали 10 мл буфера Ab1, а целевые IgG элюировали 3 мл буфера Ab2. Элюат нейтрализовали путем добавления 1/10 объема 10x TBS буфера и затем дополнительно проводили диализ против 1x TBS буфера с использованием диализной мембраны SnakeSkin, 3.5K MWCO (Thermo, США).

Для выделения фракции антител к интегразе ВИЧ-1 была также применена аффинная хроматография, но в качестве сорбента использовали NHS-активированную сефарозу (HiTrap NHS-Activated HP affinity columns, Cytiva, США) с предварительно иммобилизованной на ней His₆-IN. Колонку трижды промывали 3 мл буфера 1x TBS, затем наносили препарат IgG, выделенный на предыдущем этапе, отмывали колонку от несвязавшихся антител 10 мл буфера 1x TBS, после чего элюировали целевые антитела 4 мл буфера Ab3, собирая фракции по 1 мл. Каждая полученная фракция была нейтрализована 1/10 объема 10x TBS, после чего диализована против 1x TBS.

3.10. Работа с культурами клеток

Клетки HEK293T культивировали в полной ростовой среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки FBS (Himedia, Индия) и смеси пенициллина-стрептомицина (100 Ед/мл и 100 мкг/мл, соответственно) в инкубаторе при 37°C, 5 % CO₂ и поддержании влажности. Суспензионные клеточные линии Jurkat и СЕМ культивировали в полной ростовой среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки FBS (Himedia, Индия) и смеси пенициллина-стрептомицина (100 Ед/мл и 100 мкг/мл, соответственно) в аналогичных условиях.

Первичные мононуклеарные клетки из периферической крови (PBMC) выделяли из цельной крови здоровых доноров методом центрифугирования через подушку фикола плотность 1,077 г/мл (ПанЭко, Россия). После выделения клетки дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS), содержащим 2% FBS, и затем культивировали в полной ростовой среде RPMI с 10 % FBS и смеси пенициллина-стрептомицина (100 Ед/мл и 100 мкг/мл, соответственно). Для активации клеток применяли фитогемагглютинин РНА (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл в течение двух суток. В дальнейшем клетки культивировали в среде, содержащей 100 Ед/мл рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 (Ронколейкин, Бiotex, Россия).

Все исследования с использованием образцов человеческой крови были одобрены Комитетом по биоэтике Института иммунологии (Москва). Доноры крови предоставили информированное согласие на использование их биоматериала в описанных экспериментах. Все процедуры выполнены в соответствии с действующими руководствами и нормативными требованиями.

Для оценки жизнеспособности клеток применяли МТТ-тест. Клетки высевали за 24 часа до начала эксперимента. Исследуемые соединения вносили в исследуемых

концентрациях, сохраняя концентрацию DMSO в среде на уровне 0,5 % и инкубировали с клетками в течение 24 часов. По окончании инкубации в каждую лунку добавляли реагент МТТ до концентрации 500 мкг/мл (ПанЭко, Россия) и выдерживали планшет при 37 °С в течение 2 часов. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в 100% DMSO. Оптическую плотность растворов измеряли на микропланшетном-ридере BioTek Synergy H1 (BioTek Instruments Inc., США). Полученные значения нормировали на контрольные образцы.

Для оценки формирования локусов γ H2AX клетки НЕК293Т, посаженные на предметные стекла, предварительно обработанные фибронектином, трансдуцировали псевдовirusами на основе генома ВИЧ-1, а через 12 часов клетки промывали 1x PBS, фиксировали 4 % параформальдегидом на 1x PBS. Дальнейшее иммуноцитохимическое окрашивание проводили набором HCS DNA Damage Kit (Invitrogen, США), согласно инструкции производителя.

3.11. Получение и работа с лентивирусными векторами

Для получения VSV-G репликативно некомпетентных лентивирусных векторов на основе генома ВИЧ-1 (псевдовirusов), кодирующих люциферазу светлячка под контролем CMV-промотора, клетки НЕК293Т котрансфецировали смесью плазмид pCMV-VSV-G, pCMV Δ R8.2 и pUCHR_inLuc, взятых в соотношении 1:2:3. В качестве метода доставки целевых ДНК выбрана кальций-фосфатная трансфекция. В случае получения псевдовirusов с мутантной формой интегразы ВИЧ-1 плазида pCMV Δ R8.2 была заменена на соответствующую, содержащую мутацию в последовательности интегразы. Для получения GFP-кодирующих псевдовirusов плазмидный вектор pUCHR_inLuc заменяли на LeGo-G/BSD. Через 6 часов после трансфекции среда у клеток полностью заменялась. Кондиционную среду, содержащую псевдовirusные частицы, собирали через 48 и 72 часа после трансфекции. Псевдовirusы концентрировали в течение 2 часов при 30000 g, полученные осадки, содержащие псевдовirusы, ресуспендировали в 1x PBS.

Множественность инфекции (MOI) псевдовirusа с природным вариантом интегразы определяли по количеству интегрированной ДНК на клетку в случае псевдовirusа, кодирующего люциферазу светлячка, или по доле GFP-положительных клеток в случае GFP-кодирующего псевдовirusа. Все остальные псевдовirusы, содержащие мутантные формы интегразы, в экспериментах выравнивали по количеству

p24 антигена ВИЧ-1, концентрацию которого оценивали с помощью набора для ИФА определения p24 (Vector Best, Россия).

Клетки НЕК293Т трансдуцировали полученными псевдовirusами в полной ростовой среде путем добавления желаемого количества псевдовirusа, а в случае СЕМ, Jurkat или РВМС проводили процедуру спинокуляции: псевдовirus к клеткам добавляли в полной ростовой среде с добавлением полибрена (Sigma, США) до концентрации 7 мг/мл, а также HEPES pH 7.2 (Gibco, США) до концентрации 20 мМ после чего образцы центрифугировали при комнатной температуре при 2000×g в течение 1,5 часов.

Для оценки влияния исследуемых соединений на общую эффективность трансдукции клеток псевдовirusами в полную ростовую среду добавляли исследуемые соединения до заданной концентрации, но сохраняя концентрацию DMSO на уровне 0,5 %. В серию включали несколько контрольных образцов, в которые добавляли только DMSO до 0,5 %, но не исследуемые соединения.

Через 24 часа после трансдукции клетки собирали, лизировали в 1x Passive Lysis Buffer (Promega, США) и измеряли сигнал люминисценции с использованием набора реактивов Promega Luciferase Assay Systems (Promega, США) на микропланшетном ридере BioTek Synergy H1 (BioTek, США). Полученные данные корректировали по количеству клеток и нормировали относительно контрольных образцов.

3.12. Определение форм ДНК ВИЧ-1

Для анализа эффективности отдельных стадий вирусной инфекции, а именно, обратной транскрипции, интеграции и постинтеграционной репарации, клетки НЕК293Т (500 тыс клеток на лунку 24 луночного планшета) трансдуцировали псевдовirusом ВИЧ_wt с природным вариантом интегразы при MOI = 2. Через 20 часов после трансдукции клетки собирали, промывали дважды 500 мкл 1x PBS. Тотальную ДНК из образцов выделяли набором ExtractDNA Blood and Cells (Евроген, Россия), концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом с использованием прибора Nanodrop 2000 (Thermo, США).

Для оценки количества тотальной и интегрированной ДНК ВИЧ-1 использовали метод описанный в работе [275], в основе которого лежит метод вложенной ПЦР (Рис. 24).

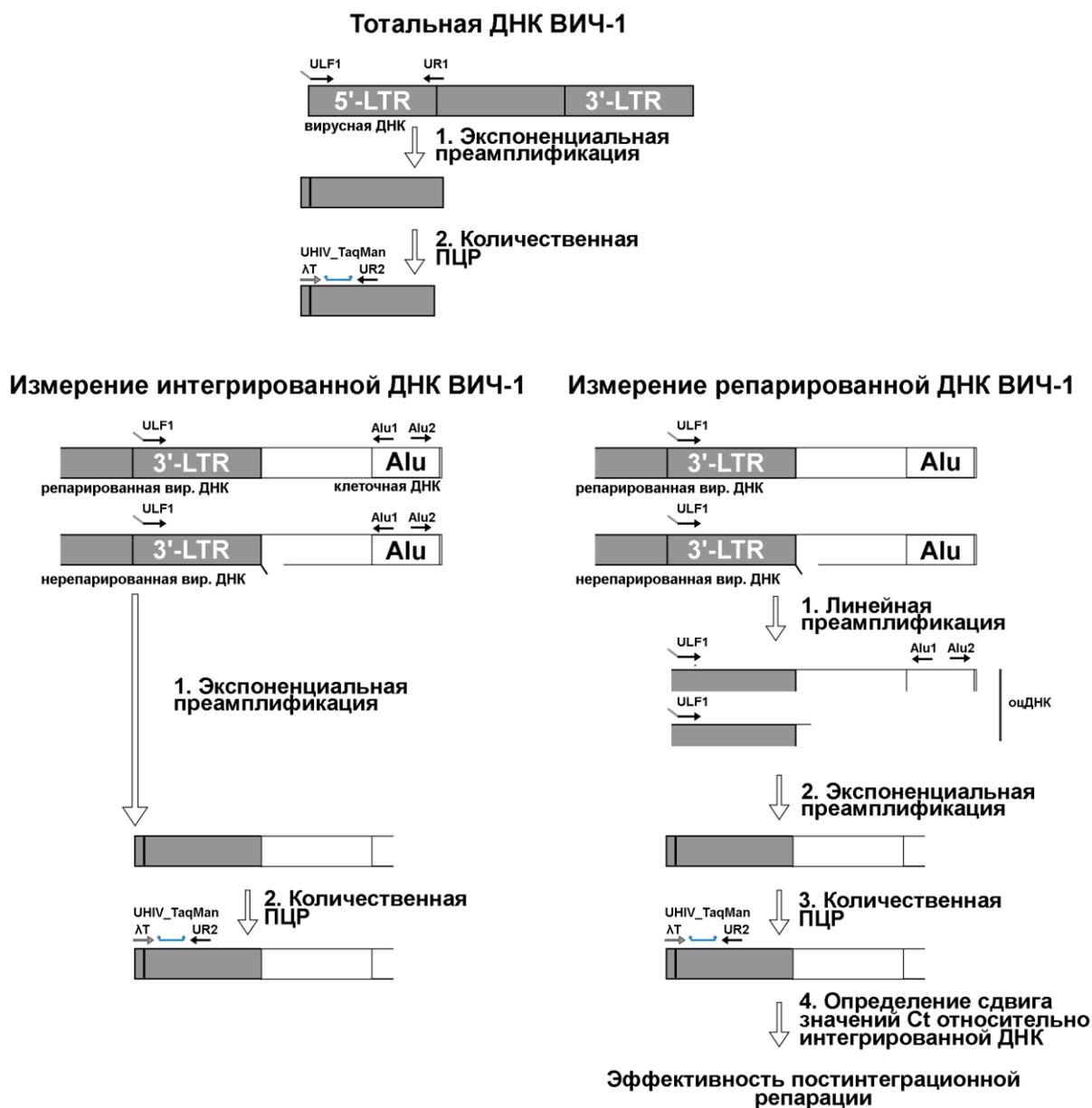


Рисунок 24. Принцип метода оценки эффективности обратной транскрипции (протокол тотальная ДНК ВИЧ-1), интеграции (протокол интегрированная ДНК ВИЧ-1) и постинтеграционной репарации (протокол постинтеграционная репарация).

На первом этапе при определении количества тотальной ДНК ВИЧ-1 исходный образец (200 нг ДНК) амплифицируют с использованием пары праймеров к LTR-последовательностям ВИЧ-1 ULF1 и UR1, а также пары праймеров к внутреннему контролю – гену CD3, HCD3OUT5' и HCD3OUT3' (Таблица 2). Всего проводят 24 цикла преамплификации с использованием набора 5X qPCRmix-HS (Евроген, Россия). После первого этапа образцы разводят в 64000 раз и используют для количественной оценки уровня тотальной ДНК ВИЧ-1 (пара праймеров λT и UR2, UHIV_TaqMan-зонд) и

отдельно CD3 (HCD3IN5' и HCD3IN3', CD3_TaqMan-зонд) с использованием набора 5X qPCRmix-HS (Евроген, Россия) на приборе для проведения ПЦР в реальном времени BioRad CFX96 (BioRad, США). Для оценки количества интегрированной ДНК на первом этапе (преамплификация) амплифицируют химерные фрагменты LTR-клеточная ДНК с использованием трех праймеров ULF1 к LTR-последовательности ВИЧ-1, Alu1 и Alu2 к Alu-повторам в геноме ВИЧ-1, а также фрагмент CD3 гена праймерами HCD3OUT5' и HCD3OUT3' (Таблица 2). Всего проводят 11 циклов преамплификации с использованием DreamTaq полимеразы (Thermo, США), чтобы оставаться на экспоненциальной стадии накопления продукта. Полученные образцы разводят в 100 раз и отдельно оценивают количество ДНК ВИЧ-1 (пара праймеров λТ и UR2, UNIV_TaqMan-зонд) и CD3 (HCD3IN5' и HCD3IN3', CD3_TaqMan-зонд) с использованием набора 5X qPCRmix-HS (Евроген, Россия).

Для оценки эффективности постинтеграционной репарации использовали метод, разработанный нами и описанный в работе [6] (Рис. 24). Данный метод представляет собой модифицированный вариант протокола определения количества интегрированной ДНК ВИЧ-1. Перед проведением двух этапов амплификации, необходимых для анализа интегрированной ДНК ВИЧ-1, проводят дополнительный этап 12-24 цикла линейной амплификации с использованием DreamTaq полимеразы (Thermo, США) и праймера ULF1 к LTR-последовательностям. Данный этап позволяет увеличить количество химерных молекул LTR-клеточная ДНК, если постинтеграционная репарация завершилась. Затем проводят определение количества интегрированной ДНК в таких образцах, а путем сравнения результатов для таких образцов и для образцов, в которых измеряли только интегрированную ДНК, по сдвигу цикла C_t определяют эффективность постинтеграционной репарации (Рис. 24).

3.13. Определение эффективности репарации двуцепочечных разрывов ДНК

Для оценки эффективности репарации двуцепочечных разрывов ДНК использовали два подхода: репортерную систему на основе GFP и метод ДНК-комет. В первом случае клетки НЕК293Т в количестве 50000 высевали в 24-луночный планшет, а через 24 часа после этого клетки котрансфецировали смесью плазмид: 200 нг репортерной плазмиды рCMV6-AC EJ7-GFP, кодирующей нефункциональный GFP с 46-нуклеотидной вставкой в белок-кодирующем участке, а также по 200 нг плазмид, кодирующих sgRNA к этой вставке и Cas9 – плазмиды 7a sgRNA и 7b sgRNA. Для трансфекции использовали Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США). В качестве

отрицательных контролей (Cntr-1 и Cntr-2) клетки трансфицировали репортерной плазмидой pCMV6-AC EJ7-GFP совместно с плазмидой, кодирующей только sgRNA 7a или 7b, соответственно. Через 6 часов после трансфекции среду заменяли на свежую и вносили исследуемые соединения (s17, Nu7441) в 1% DMSO или только 1% DMSO (контроль растворителя). Через двое суток после трансфекции уровень экспрессии GFP анализировали методом проточной цитометрии на анализаторе MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, Германия). Метод ДНК-комет (в нейтральном варианте, Neutral comet assay) проводили по методике описанной в работе [276]. Для индукции двуцепочечных разрывов ДНК клетки НЕК293Т обрабатывали 100 мкМ этопозидом в течение 1 часа, после чего среду заменяли на свежую с исследуемыми соединениями или без них. Образцы собирали через 0, 40, 90, 150 и 300 мин после смены среды, клетки заключали в легкоплавкую агарозу, проводили лизис клеток и депротенинизацию, затем электрофрез ДНК. Для визуализации ДНК слайды окрашивали пропидий йодидом. Изображения ДНК-комет получали на эпифлуоресцентном микроскопе Celena S (Logos Biosystem, Южная Корея) (Рис. 25). Анализ степени фрагментации ДНК проводили с использованием программы CometScore 2.0.

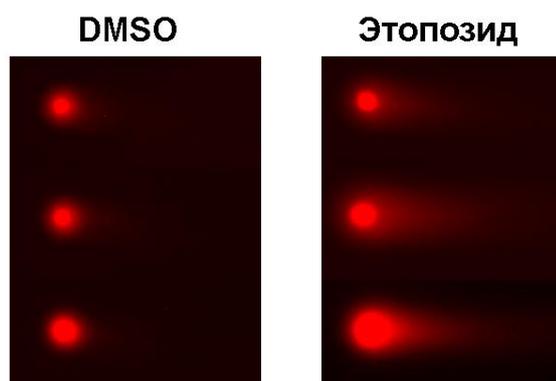


Рисунок 25. Пример анализа степени повреждений ДНК методом ДНК-комет (нейтральный вариант для детекции двуцепочечных разрывов ДНК). Обработка клеток 100 мкМ этопозидом в течение 1 ч приводит к появлению окрашиваемого пропидий йодидом «хвоста», что объясняется повреждением ДНК, уменьшением ее длины и, как следствие, увеличением ее подвижности. «Голова» комет соответствует интактной ДНК.

3.14. Ко-иммунопреципитация точечных мутантов Ku70 и интегразы ВИЧ-1

Для оценки эффекта мутаций S69A/I72A и S73A/I76A в составе Ku70 на его способность взаимодействовать с интегразой ВИЧ-1 *ex vivo* 1 миллион клеток НЕК293Т в культуральном флаконе T25 трансфицировали 50 нМ siKu70 или siCntr (Таблица 2) с помощью липофектамина RNAiMAX (Invitrogen, США) для снижения

внутриклеточного уровня природного варианта белка Ku70. Через 24 часа после трансфекции клетки трансфецировали вектором pcDNA3.1 (9 мкг) или котрансфецировали 6 мкг вектора pcDNA3.1_IN-НА, кодирующей НА-тагированную интегразу ВИЧ-1 и 3 мкг плазмид pcDNA3_Ku70_3xFLAG_siRes, pcDNA3_Ku70_3xFLAG_S69A/I72A_siRes или pcDNA3_Ku70_3xFLAG_S73A/I76A_siRes, кодирующей природный вариант Ku70 или один из указанных мутантов, причем все плазмиды экспрессируют мРНК Ku70, устойчивую к действию siKu70. Для трансфекции плазмидами использовали реагент Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США).

Спустя сорок восемь часов после повторной трансфекции проводили лизис клеток. Клетки лизировали в течение 30 минут на льду, используя среду RPMI (Invitrogen, США), в которую добавляли смесь ингибиторов протеаз Halt Protease inhibitors cocktail (Thermo Fisher Scientific, США) и 0,25% детергента NP-40 (Хеликон, Россия). После инкубации лизаты центрифугировали 10 минут при 14000 об/мин для удаления клеточного дебриса. Концентрацию белка в полученных супернатантах определяли с помощью набора DC Protein Assay (Bio-Rad, США). Из каждого образца отбирали аликвоту, соответствующую 0,1 мг общего белка, для последующего анализа в качестве контроля ("input"). Для иммунопреципитации 1 мг общего клеточного белка инкубировали в течение 5 часов при 4 °С с агарозой, конъюгированной с антителами к НА-эпитопу (Sigma, США). После инкубации смолу четыре раза отмывали буфером для лизиса для удаления несвязавшихся белков. Связанные белки элюировали с носителя, добавляя конкурентный НА-пептид и инкубируя 25 минут при 37 °С. Фракции элюатов, а также исходный лизат анализировали методом вестерн-блоттинга в соответствии с методикой, описанной выше.

3.15. XL-MS протокол для идентификации клеточных белков, взаимодействующих с интегразой ВИЧ-1

Для идентификации клеточных белков, взаимодействующих с интегразой ВИЧ-1, включая те, которые формируют транзистентные контакты с интегразой ВИЧ-1, 10 млн. клеток НЕК293Т в культуральном флаконе Т75 трансфецировали 30 мкг вектора pcDNA3.1_IN-НА или pcDNA3.1 (контрольный образец) методом кальций-фосфатной трансфекции. Каждый тип образцов подготавливали в трех технических повторностях. Через 48 часов после трансфекции клетки снимали раствором трипсина-ЭДТА, инактивировали трипсин полной ростовой средой DMEM с 10 % FBS, после чего клетки

отмывали трижды 1x PBS, переводили их в среду DMEM без добавок. После этого клетки фиксировали 1 % формальдегидом при комнатной температуре в течение 2 минут при постоянном перемешивании. После окончания инкубации реакцию останавливали путем добавления 1/10 объема 10x раствора Tris-глицина и инкубировали с ним в течение 5 минут. После этого клетки осаждали центрифугированием, промывали дважды холодным 1x PBS, а затем лизировали в 1 мл буфера Lb1 с добавлением коктейля ингибиторов протеаз Halt Protease inhibitors cocktail (Thermo Fisher Scientific, США) во льду в течение 30 минут. Затем к лизатам добавляли 1 мкл универсальной нуклеазы Universal Nuclease (Pierce, США) и дополнительно инкубировали лизаты в течение 15 минут при комнатной температуре, после чего лизаты осветляли путем центрифугирования при 15000 g в течение 15 минут при 4°C. Концентрацию белка в полученных супернатантах определяли с помощью набора DC Protein Assay (Bio-Rad, США). Концентрацию белка во всех образцах доводили до 0,8 мг/мл, на ко-иммунопреципитацию брали по 2 мл разбавленных клеточных лизатов. К лизатам добавляли 2 мкл anti-НА антител, инкубировали 17 часов при постоянном перемешивании. Для выделения сформированных комплексов антител с интегразой и ее партнерами использовали магнитные частицы Dynabeads Protein G (Invitrogen, США). Для этого лизаты с антителами инкубировали в течение 2 часов при 4°C с 35 мкл частиц, предварительно уравновешенных Lb1 буфером. Смолу отмывали от несвязавшихся белков трижды 500 мкл буфера Lb1, затем трижды 500 мкл буфера Lb2, а также трижды 500 мкл 100 mM TEAB (Thermo, США). Дальнейшую идентификацию связанных со смолой белков проводил к.х.н. Р.Х. Зиганшин (ИБХ РАН) методом LC-MS/MS.

3.16. ChIP-MS протокол для идентификации клеточных белков, привлекаемых к сайтам интеграции ВИЧ-1

30 млн. клеток НЕК293Т в культуральном флаконе T175 трансдуцировали псевдовиром на основе генома ВИЧ-1 при множественности инфекции равной 50. Через 14 часов после трансдукции клетки в прикрепленном виде фиксировали 1 % формальдегидом в течение 10 минут при комнатной температуре при медленном перемешивании, после этого кросс-линкинг останавливали путем добавления к среде с клетками 1/10 объема 10x раствора Tris-глицина и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Клетки на льду промывали холодным 1x PBS, затем клетки механически снимали клеточным скребком в минимальный объем 1x PBS. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 3000 g при 4°C, промывали холодным 1x

PBS, затем повторно осаждали. Клетки лизировали в 6 мл буфера CLB с добавлением коктейля ингибиторов протеаз Halt Protease inhibitors cocktail (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 15 минут при 4°C, после чего ядра клеток осаждали центрифугированием 5 минут 5000 g при 4°C. Цитоплазматическую фракцию удаляли, а ядра лизировали в 1,2 мл буфера NLB с добавлением коктейля ингибиторов протеаз. Фрагментацию хроматина проводили на УЗ-дезинтеграторе Qsonica Q700 с использованием насадки Cup-horn для бесконтактной обработки образцов в течение 8 минут. Время УЗ-обработки образцов было оптимизировано таким образом, чтобы средняя длина получаемых ДНК-фрагментов находилась в районе 1000 пар оснований. Лизаты выравнивали по значению оптической плотности при 260 нм, а затем разбавляли в три раза буфером DB. К полученным образцам добавляли антитела к интегразе ВИЧ-1 (4 мкг), инкубировали ночь при постоянном перемешивании при 4°C. Затем иммунные комплексы выделяли на магнитных частицах Dynabeads Protein G (Invitrogen, США), но перед этим от полученных образцов отбирали 1/100 объема для последующего определения общего количества LTR-повторов ВИЧ-1 в образцах. Лизаты инкубировали с 20 мкл магнитных частиц в течение 2 часов при 4°C и при постоянном перемешивании, после чего частицы последовательно отмывали от несвязавшихся белков сначала дважды 500 мкл буфера LSB, дважды 500 мкл буфера HSB, дважды 500 мкл LiCl буфера, а затем дважды TE-буфером и дважды 500 мкл 100 мМ TEAB (Thermo, США). 1/10 часть смолы сохраняли для анализа количества LTR-повторов ВИЧ-1, соосажденных на магнитных частицах, а 9/10 передавали для идентификации связанных со смолой белков, которую проводил к.х.н. Р.Х. Зиганшин (ИБХ РАН) методом LC-MS/MS.

Выделение соосажденной ДНК и определение количества LTR-повторов

Для обращения ДНК-белковых сшивок образцы (исходный лизат, а также часть смолы) образцы инкубировали ночь в буфере 100мМ NaHCO₃ pH 8.0, 1% SDS при 65°C. Белки удаляли путем обработки раствором протеиназы К, а затем ДНК выделяли набором QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, США). В полученных образцах оценивали количество LTR-повторов ВИЧ-1 и клеточного маркера CD3 с использованием пар праймеров LTR-fw и LTR-rev, HCD3IN5' и HCD3IN3' (Таблица 2), соответственно, набором 5x qPCR Mix-HS SYBR (Евроген, Россия). Обогащение каждого фрагмента ДНК оценивали, как долю соосажденной на смоле ДНК относительно ее содержания в исходном лизате.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из обзора литературы становится понятно, что одним из возможных направлений борьбы с ВИЧ-инфекцией может стать создание ингибиторов, нарушающих взаимодействие интегразы ВИЧ-1 с клеточными белками, которые выполняют важные функции в жизненном цикле. И хотя наибольшее внимание разработчиков приковано к созданию ингибиторов, блокирующих взаимодействие интегразы ВИЧ-1 и клеточного белка LEDGF/p75, мы стали работать с другим партнером IN – клеточным белком Ku70. Для данного белка нами ранее было показано, что он формирует комплекс с IN, а также его нокдаун негативно влияет на ранние этапы репликации вируса [277]. Однако не было установлено, ни на какую стадию репликативного цикла действует этот белок, ни механизм его влияния, как и не было показано, что взаимодействие между IN и белком Ku70 важно для успешной репликации вируса.

В нормальной физиологии клетки этот белок играет ключевую роль в репарации двуцепочечных разрывов ДНК по пути негомологичного соединения концов (NHEJ). Свои функции он выполняет в составе гетеродимера Ku70/Ku80, выступая в качестве сенсора двуцепочечных разрывов ДНК. Сформировав комплекс со свободными концами ДНК, гетеродимер Ku70/Ku80 привлекает регуляторный белок – киназу DNA-PKcs, образуя тройной активный комплекс ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-ПК). Этот комплекс и запускает репарацию двуцепочечных разрывов ДНК по пути негомологичного соединения концов (NHEJ) [278].

В ходе изучения роли взаимодействия IN с Ku70 в репликативном цикле ВИЧ-1 мы нашли мутации, введение которых в состав IN нарушает ее взаимодействие с Ku70 как *in vitro*, так и *ex vivo* [279]. С использованием лентивирусных векторов на базе генома ВИЧ-1, содержащих в своем составе природный или мутантный вариант IN, мы показали, что мутации, нарушающие взаимодействие IN с Ku70, не влияют ни на стадию обратной транскрипции, ни на стадию интеграции, однако, подавляют этап постинтеграционной репарации. Иными словами, комплекс IN/Ku70 важен для инициации постинтеграционной репарации. К аналогичному результату приводило понижение внутриклеточного уровня самого белка Ku70, а также двух других субъединиц DNA-ПК – Ku80 и DNA-ПКcs.

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 IN – катализ двух реакций, направленных на встраивание вирусной кДНК в клеточный геном. Для выполнения этой функции, как отмечалось в обзоре литературы, 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 фосфодиэфирных связей 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 [8].

Совокупность этих реакций приводит к формированию интеграционного интермедиата, в котором 3'-концы вирусной кДНК соединены с клеточной, а по краям от встроившей вирусной кДНК возникают повреждения: одонитевые пятинуклеотидные участки и неспаренные динуклеотиды AC на 5'-концах вирусной кДНК (Рис. 7). Для перехода от стадии интеграции, относящейся к числу ранних этапов вирусной репликации, к вирусной транскрипции, т.е. поздним этапам, направленным на продукцию новых вирусных частиц, такие повреждения в клеточном геноме должны быть репарированы (Рис. 7). Именно эта стадия получила название постинтеграционной репарации.

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 [280]. 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. Тем более, исследователи не предполагали вовлечения вирусных белков в регуляцию этого процесса. Позже в работах разных научных групп стали подниматься первые два вопроса (обзор [7]).

Все опубликованные работы по этим вопросам можно условно разделить на две группы. В первой группе работ прослеживается идея участия в постинтеграционной репарации белков из эксцизионной репарации оснований (BER). Данное предположение

базировалось на сходстве структуры интеграционного интермедиата и промежуточного продукта BER-пути [280–282]. Вторая группа работ наоборот предполагала участие в этом процессе факторов из систем репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Данная идея не имела под собой теоретических оснований, а базировалась лишь на экспериментальных фактах: подавление экспрессии белков из этих систем репарации или ингибирование их каталитических функций негативно сказывалось на репликации ВИЧ-1 [283–287]. К сожалению, ни одну из концепций так и не удалось довести до логического завершения, т.е. ни для одной из гипотез не было однозначно показано, что те или иные клеточные белки напрямую влияют на постинтеграционную репарацию, что, в первую очередь, объясняется отсутствием методик оценки эффективности постинтеграционной репарации.

Вторая идея об участии факторов репарации двуцепочечных разрывов ДНК в постинтеграционной репарации ВИЧ-1, хотя и казалась контринтуитивной, поскольку в продукте интеграции отсутствуют двуцепочечные разрывы ДНК (Рис. 7), получила развитие в наших работах. Мы разработали метод оценки эффективности постинтеграционной репарации ВИЧ-1 [6] и однозначно показали, что один из таких факторов – DNA-ПК, действительно важен для этого процесса. Частичный нокаут его субъединиц Ku70, Ku80 и DNA-ПКcs в клетках НЕК293Т негативно влиял на эффективность трансдукции клеток в общем и на постинтеграционную репарацию ВИЧ-1. Можно предположить, что наблюдаемый нами эффект обусловлен опосредованным влиянием снижения внутриклеточной концентрации каждой из субъединиц DNA-ПК комплекса, например, на экспрессию других репаративных факторов. Чтобы исключить это мы проанализировали транскриптомы четырех клеточных линий НЕК293Т_Ku70^{+/-}, НЕК293Т_Ku80^{+/-}, НЕК293Т_DNA-ПКcs^{+/-} и исходных клеток НЕК293Т и определили дифференциально-экспрессируемые гены в клетках с пониженной экспрессией каждой из субъединиц против контрольных клеток. При сравнении полученных списков дифференциально-экспрессируемых генов мы обнаружили, что лишь 4 гена (*CHAC1*, *TENM1*, *TNC* и *TP53*) являются общими для всех трех линий [12,13], т.е. понижение внутриклеточной концентрации исследуемых белков не привело к однотипным изменениям экспрессии генов из систем репарации ДНК, что могло бы объяснять опосредованное влияние на постинтеграционную репарацию.

Также ранее нам удалось показать, что в отсутствии двуцепочечных разрывов ДНК для привлечения и активации DNA-ПК важен вирусный белок – IN, формирующий комплекс с одной из субъединиц DNA-ПК – Ku70. Введение мутаций в состав IN,

нарушающих взаимодействие с Ku70 [277], приводит к нарушению постинтеграционной репарации ВИЧ-1, не влияя на эффективность обратной транскрипции или интеграции. Интересно, что псевдовирус на основе генома ВИЧ-1 с такой IN становится нечувствительным к понижению внутриклеточной концентрации компонентов DNA-РК. Все это в совокупности указывает на ключевую роль взаимодействия IN с клеточным белком Ku70, а также компонентов DNA-РК для инициации постинтеграционной репарации ВИЧ-1. В настоящей работе мы продолжили изучение механизмов регуляции постинтеграционной репарации ВИЧ-1 и поиска ингибиторов этого процесса.

Раздел 4.1. ATM и DNA-РКcs – ключевые клеточные регуляторы постинтеграционной репарации ВИЧ-1

4.1.1. ATM и DNA-РКcs, но не ATR важны для успешного протекания ранних этапов репликации ВИЧ-1

DNA-РКcs относится к семейству киназ, родственных фосфатидилинозитол-3-киназам (PIKK). К этому же семейству помимо DNA-РКcs относятся две другие репаративные киназы – ATM и ATR [278]. Долгое время в литературе доминировала парадигма строгой специализации этих киназ: DNA-РКcs и ATM активируются в присутствии двуцепочечных разрывов ДНК, но DNA-РКcs необходим для репарации таких повреждений по пути негомологичного соединения концов (NHEJ), а ATM – по пути гомологичной рекомбинации (HR), а ATR, напротив, активируется в присутствии протяженных одонитевых участков ДНК или при остановке репликативной вилки (Рис. 26) [278]. Однако современные исследования демонстрируют, что эта картина гораздо сложнее. У этих киназ существует перекрестное взаимодействие. ATM и DNA-РКcs могут фосфорилировать общие субстраты, например, H2AX, а ATR активируется при определенных условиях и при двуцепочечных разрывах, функционируя в единой сигнальной сети, обеспечивающей надежный клеточный ответ на повреждения ДНК [288,289].

В работе R. Daniel и коллег было показано, что обработка клеток с нокаутом DNA-РКcs неселективным ингибитором PIKK-киназ вортманином или кофеином приводит к дополнительному снижению репликации ВИЧ-1 [284]. На основании этого было выдвинуто предположение, что и другие представители PIKK-киназ могут быть важны для репликации вируса [284]. Отсутствие в то время селективных ингибиторов,

действующих только на одну киназу, не позволило однозначно проверить высказанное предположение, а отсутствие методов оценки эффективности постинтеграционной репарации не позволило определить, на каком этапе жизненного цикла вируса эти ферменты важны.

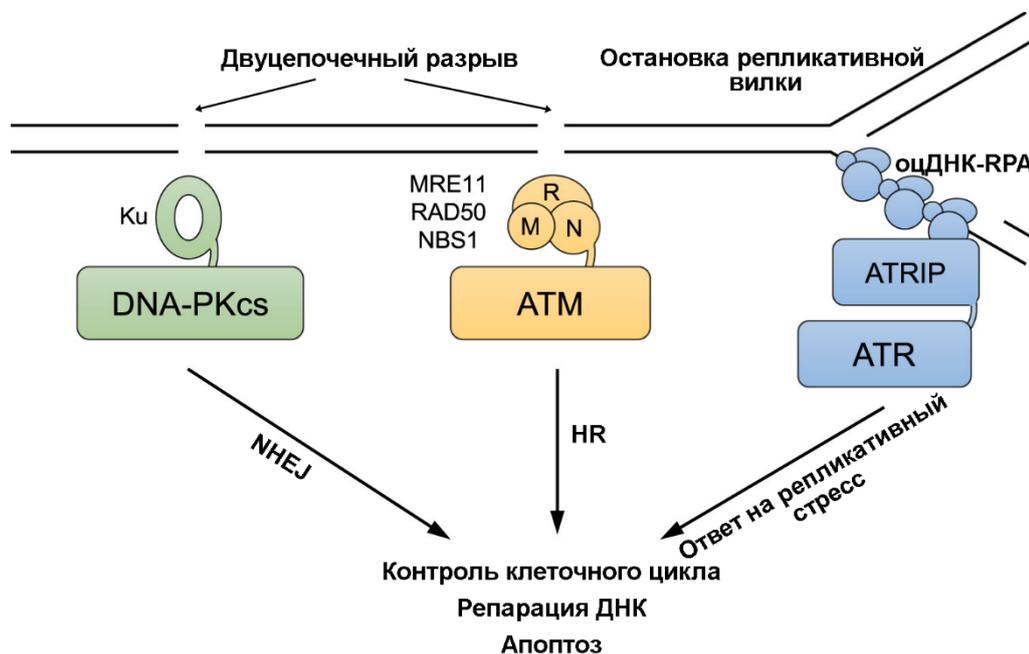


Рисунок 26. Киназы ATM, ATR и DNA-PKcs в клеточном ответе на повреждения ДНК. ATM-зависимый путь. Ключевую роль в распознавании двухцепочечных разрывов играет комплекс MRN (MRE11, RAD50, NBS1). Связываясь с местом повреждения, он обеспечивает рекрутирование и активацию протеинкиназы ATM, которая затем фосфорилирует эффекторы, такие как CHK2 и p53, а также ряд факторов репарации, способствуя восстановлению целостности ДНК по HR-пути. ATR-зависимый путь. Сигналом для активации ATR служат участки одноцепочечной ДНК, покрытые репликативным белком А (RPA) или остановка репликативной вилки. При участии кофактора ATRIP происходит связывание ATR с поврежденным участком, а последующее привлечение белка TOPBP1 приводит к ее активации, после чего ATR фосфорилирует свои нижестоящие мишени, оркестрируя клеточный ответ на репликативный стресс. DNA-PK-зависимый путь. Инициация репарации по пути NHEJ начинается с узнавания двухцепочечного разрыва гетеродимером Ku70/Ku80. Этот комплекс служит платформой для посадки каталитической субъединицы DNA-PKcs. Аутофосфорилирование DNA-PKcs запускает ее киназную активность и способствует привлечению факторов, необходимых для негомологичного соединения концов.

Для анализа участия PIKK-киназ в ранних этапах репликации ВИЧ-1 мы использовали специфичные ингибиторы этих киназ: Nu7441 (далее iDNA-PKcs), Ku-55933 (iATM) и AZ20 (iATR). В качестве модели ранних этапов репликации ВИЧ-1

использовали VSV-G-псевдотипированный репликативно-некомпетентный лентивирусный вектор ВИЧ_wt, ранее описанный в работе [290] и успешно применяемый нами [277]. Этот вектор позволяет изучать ранние этапы репликации ВИЧ-1, т.к. продукция трансгена – люциферазы светлячка, напрямую зависит от успешности протекания таких этапов вирусной репликации, как обратная транскрипция, интеграция и постинтеграционная репарация (Рис. 27).

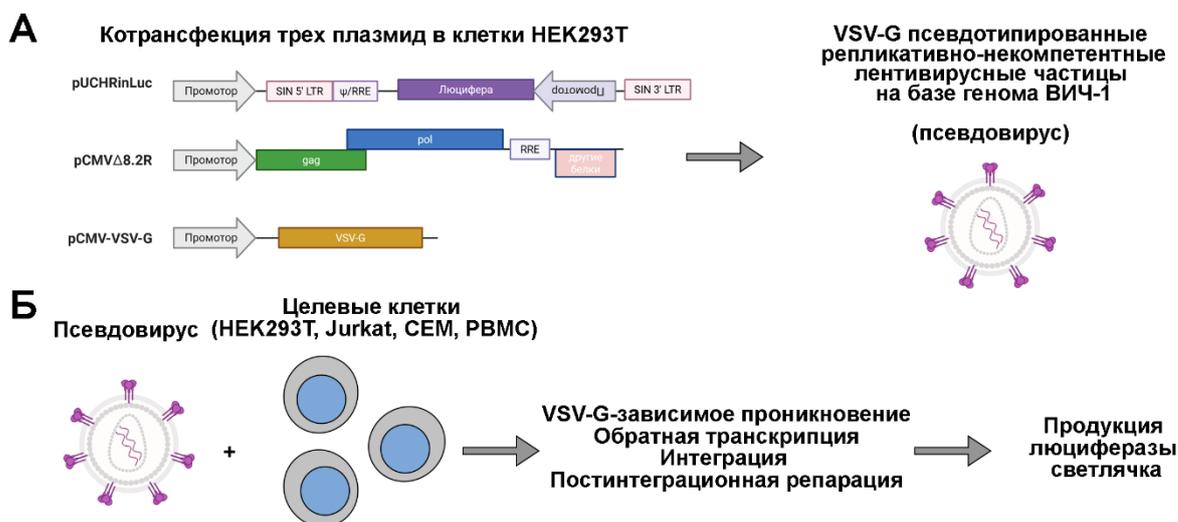


Рисунок 27. VSV-G псевдотипированный репликативно-некомпетентный лентивирусный вектор на основе генома ВИЧ-1 (псевдовирус) как модель ранних этапов репликации ВИЧ-1. А – для получения псевдовирусов на основе генома ВИЧ-1 клетки HEK293Т котрансфецируют тремя плазмидами. Первая (pUChRinLuc) кодирует геном псевдовirusа. Он представляет собой геном ВИЧ-1, в котором сохранены регуляторные элементы, включая длинные концевые повторы (LTR), полипуриновые тракты (PPT и cPPT), сигнал упаковки (ψ) и другие, а белок-кодирующие последовательности ВИЧ-1 заменены на целевую экспрессионную кассету, содержащую собственный промотор и ген люциферазы светлячка. Вторая плазида (pCMV Δ 8.2R) кодирует белки ВИЧ-1, необходимые для сборки псевдовirusных частиц, включая матриксный, капсидный и нуклеокапсидный белки, а также ферменты: обратную транскриптазу, интегразу, протеазу. Третья плазида (pCMV-VSV-G) кодирует гликопротеин G вируса везикулярного стоматита, который включается в состав мембраны псевдовirusов вместо поверхностного антигена ВИЧ-1 (Env) и обеспечивает более широкую по сравнению с Env тропность получаемых псевдовirusов к лабораторным клеточным линиям. Б – полученные псевдовirusы позволяют изучать ранние этапы репликации ВИЧ-1 (обратную транскрипцию, интеграцию и постинтеграционную репарацию), т.к. уровень продукции люциферазы после трансдукции целевых клеток коррелирует с эффективностью этих этапов жизненного цикла вируса, но в отличие от полноразмерного ВИЧ-1 такие псевдовirusы безопасны из-за неспособности продуцировать псевдовirus-потомки.

Обработка клеток ингибиторами iDNA-PKcs или iATM, но не iATR приводила к дозозависимому снижению продукции люциферазы при трансдукции клеток вектором ВИЧ_wt, не влияя на жизнеспособность клеток (Рис. 28). Таким образом, успешность протекания ранних этапов репликации вируса в клетках НЕК293Т зависит не только от активности DNA-PKcs, но и от родственной киназы ATM.

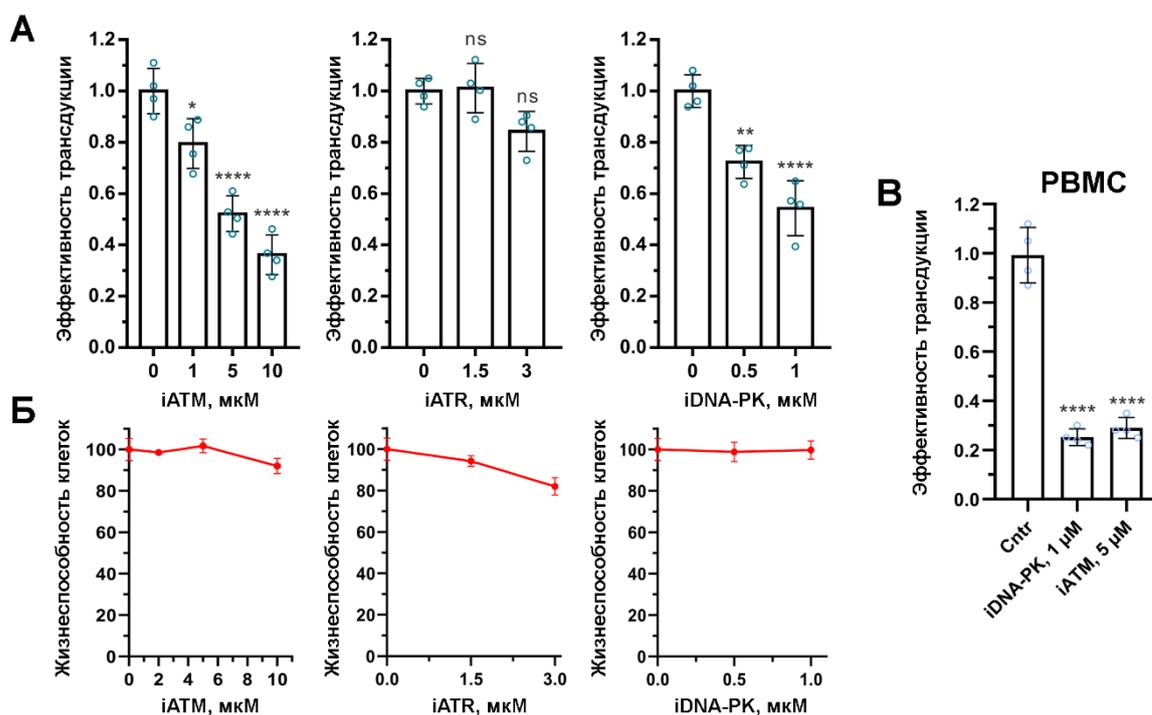


Рисунок 28. Киназы ATM и DNA-PKcs важны для успешной трансдукции клеток НЕК293Т и первичных мононуклеаров периферической крови (PBMC) лентивирусным вектором на основе генома ВИЧ-1. А – Эффективность трансдукции клеток НЕК293Т лентивирусным вектором ВИЧ_wt в присутствии возрастающей концентрации ингибиторов Ku-5933 (iATM), AZ20 (iATR) и Nu7441 (iDNA-PK). Б – эффект исследуемых соединений на жизнеспособность клеток, МТТ-тест. В – Эффективность трансдукции клеток PBMC лентивирусным вектором ВИЧ_wt в присутствии iATM или iDNA-PK. На графиках представлено среднее \pm 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.

Хотя клетки НЕК293Т и являются подходящей моделью для изучения ранних этапов репликации ВИЧ-1, различия в профилях экспрессии белков в них и естественных мишенях ВИЧ-1, а именно, CD4-позитивных Т-клетках, могут приводить к отличиям в механизмах регуляции тех или иных процессов. Для того чтобы убедиться, что активности DNA-PKcs и ATM важны для ранних этапов репликации ВИЧ-1, мы провели дополнительные эксперименты на первичных мононуклеарах периферической

крови (PBMC), выделенных из крови здоровых доноров. Трансдукция PBMC вектором ВИЧ_wt в присутствии как ингибитора DNA-РКcs, так и ингибитора АТМ приводила к снижению продукции люциферазы (Рис. 28), причем наблюдаемый эффект был даже более выражен, чем в случае НЕК293Т. Следовательно, успешность протекания ранних этапов репликации ВИЧ-1 в PBMC клетках, также зависит от активности DNA-РКcs и АТМ, а значит клетки НЕК293Т являются релевантной моделью для изучения регуляции репликации ВИЧ-1 указанными клеточными киназами.

4.1.2. Активности АТМ и DNA-РКcs важны на этапе постинтеграционной репарации

Для определения этапа жизненного цикла ВИЧ-1, на котором важны активности DNA-РКcs и АТМ, мы использовали метод Gag-Alu-специфичной ПЦР, позволяющий оценить эффективность обратной транскрипции и интеграции [275], а также его модифицированный вариант, разработанный нами, позволяющий измерять эффективность постинтеграционной репарации [6]. В качестве контрольных соединений мы использовали ингибитор обратной транскрипции – азидотимидин (AZT), и интеграции – ральтегравир (Ral). Все соединения в исследуемых концентрациях ингибировали трансдукцию клеток НЕК293Т вектором ВИЧ_wt, что проявлялось в снижении сигнала люциферазы (Рис. 29). Обработка клеток азидотимидином приводила к снижению количества как тотальной, так и интегрированной ДНК ВИЧ-1, т.е. была заингибирована обратная транскрипция, ральтегравиром – к снижению интегрированной, но не тотальной ДНК ВИЧ-1, что говорит о нарушении процесса интеграции. В случае ингибитора iDNA-РКcs и iАТМ изменений в количестве тотальной или интегрированной ДНК ВИЧ-1 не наблюдалось, а эффективность постинтеграционной репарации снижалась (Рис. 29). Таким образом, фосфорилирующая активность как DNA-РКcs, так и АТМ важна для репликации ВИЧ-1 именно на этапе постинтеграционной репарации [8,15].

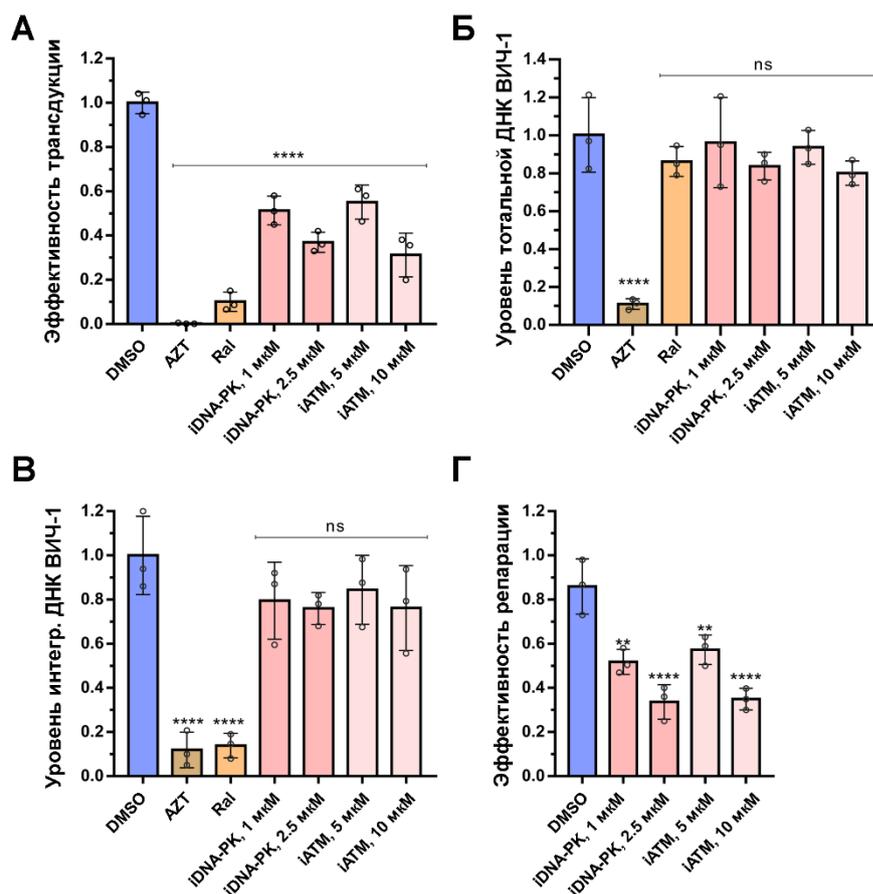


Рисунок 29. Ингибирование каталитических функций киназ ATM и DNA-PKcs снижает эффективность постинтеграционной репарации ВИЧ-1. А – Влияние низкомолекулярных соединений азидотимидина (AZT, 10 мкМ), ральтегравира (Ral, 10 мкМ), iDNA-PK и iATM на эффективность трансдукции клеток HEK293T лентивирусным вектором ВИЧ_wt. Б,В – Уровень тотальной (Б) и интегрированной ДНК ВИЧ-1 (В) в клетках HEK293T, трансдуцированных ВИЧ_wt в присутствии AZT, Ral, iATM и iDNA-PK. Г – Эффективность постинтеграционной репарации ВИЧ-1 в присутствии ингибиторов iATM или iDNA-PK. На графиках представлено среднее \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Статистическая значимость отличий определялась однофакторным ANOVA с коррекцией на множественные сравнения по Даннету, ns — нет значимых отличий, ** = adj. p -value < 0.01, **** = adj. p -value < 0.0001.

4.1.3. Активация как DNA-PKcs, так и ATM зависит от взаимодействия IN с Ku70

В условиях отсутствия двуцепочечных разрывов ДНК в интеграционном интермедиате привлечение комплекса DNA-PK напрямую зависит от взаимодействия IN с Ku70 – компонентом DNA-PK [8]. При изучении структурных особенностей взаимодействия IN с Ku70 нам удалось идентифицировать конкретные аминокислотные остатки в IN, замена которых нарушает взаимодействие между белками. Мы показали,

что введение двойной мутации E212A/L213A в состав IN нарушает взаимодействие с Ku70 *in vitro* и *ex vivo* [277]. Лентивирусный вектор на основе генома ВИЧ-1, содержащий внутри вириона такой вариант IN (ВИЧ_mut), хуже трансдуцирует клетки HEK293T именно за счет нарушений на этапе постинтеграционной репарации, а не обратной транскрипции или интеграции. Аналогичное снижение эффективности трансдукции было обнаружено нами не только для клеток HEK293T, но и в лимфобластоидных клеточных линиях CEM, Jurkat, а также в первичных клетках РВМС (Рис. 30) [8].

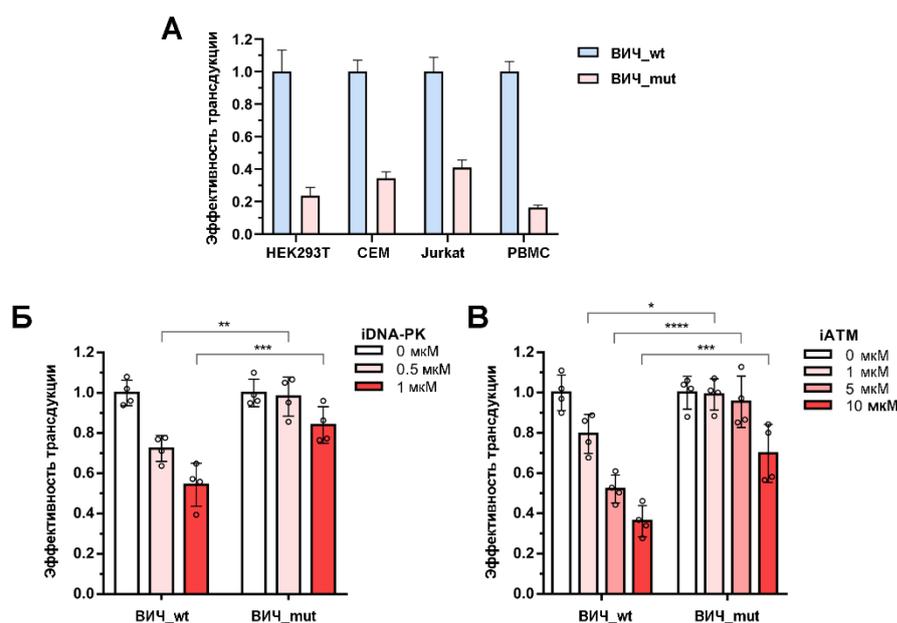


Рисунок 30. Эффект ингибиторов DNA-PK и ATM на трансдукцию клеток лентивирусными векторами ВИЧ_wt или ВИЧ_mut. А – лентивирусный вектор ВИЧ_mut, содержащий IN с мутациями E212A/L213A, нарушающими взаимодействие с Ku70, хуже трансдуцирует различные клетки, чем ВИЧ_wt. Б, В – Влияние ингибитора iDNA-PK (Б) и iATM (В) на эффективность трансдукции клеток HEK293T лентивирусными векторами ВИЧ_wt и ВИЧ_mut. Данные для ВИЧ_wt и ВИЧ_mut нормировались на эффективность трансдукции клеток соответствующими векторами без ингибитора. На графиках представлено среднее \pm стандартное отклонение трех (А) или четырех (Б, В) 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.

В связи с этим можно предположить, что активация DNA-PK может зависеть от способности IN формировать комплекс с Ku70. Для проверки этого предположения клетки HEK293T 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. 30) [8]. 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. 30) [8,15]. Таким образом, как активация DNA-РКcs, так и АТМ в ходе постинтеграционной репарации ВИЧ-1 зависит от образования комплекса IN/Ku70 [15].

4.1.4. Интеграция вирусной ДНК является сигналом для активации DNA-РКcs и АТМ

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 [6], т.е. процесс постинтеграционной репарации, по всей видимости, является многостадийным и имеет сложную регуляцию.

Нас заинтересовало, в какой момент времени между интеграцией и появлением первых репарированных форм ДНК ВИЧ-1 активируются киназы DNA-РКcs и АТМ. Для этого мы применили метод ТОА («time of drug addition», время добавления ингибитора). Этот метод позволяет определить в какое время с момента добавления лентивирусного вектора происходит тот или иной этап жизненного цикла вируса. Для этого к клеткам после трансдукции добавляют ингибиторы исследуемого процесса в разные временные точки и через 48 часов анализируют продукцию люциферазы, т.е. суммарную эффективность прохождения ранних этапов репликации ВИЧ-1 [291]. Например, если ингибитор интегразы был добавлен до начала интеграции, будет наблюдаться максимально возможное ингибирование. Если ингибитор добавили, когда часть молекул уже встроилась, ингибирование будет меньше. А если же ингибитор добавили, когда интеграция полностью завершилась, эффект на ВИЧ-1 будет полностью отсутствовать (Рис. 31).

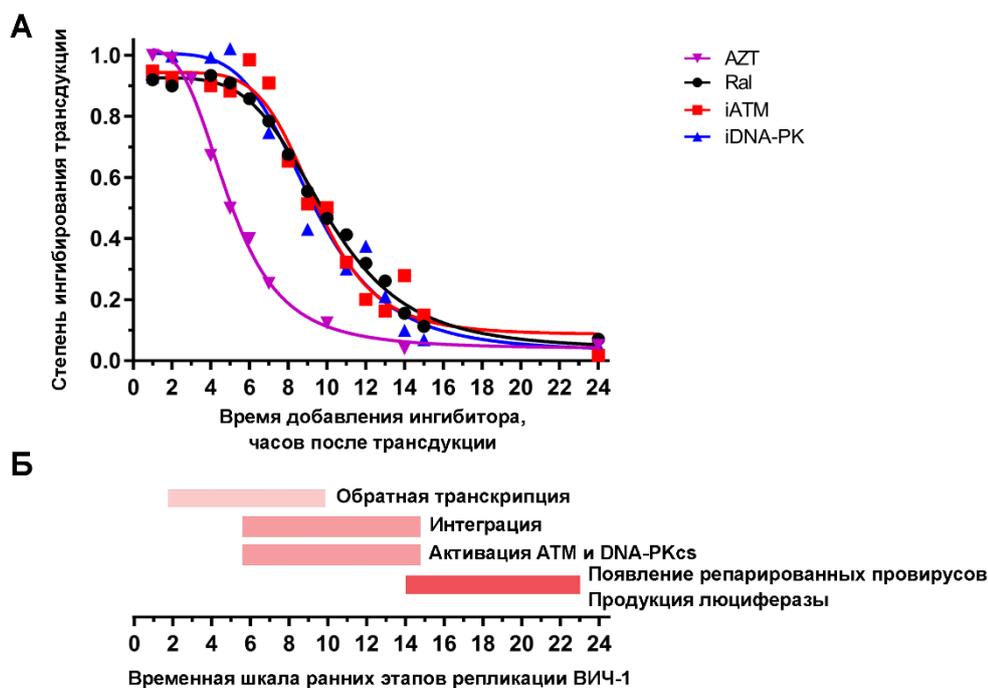


Рисунок 31. ATM и DNA-PKcs активируются синхронно с интеграцией вирусного генома. А - Зависимость ингибирующего действия азидотимидина, ральтегравира, iDNA-PK и iATM на ВИЧ_wt от времени добавления соединений после трансдукции клеток. Клетки HEK293T инкубировали 1 час с вектором ВИЧ_wt, затем отмывали избыток вируса, и в интервале времени 1 - 24 часа после трансдукции к клеткам добавляли AZT (10 мкМ), Ral (10 мкМ), iATM (5 мкМ) или iDNA-PK (1 мкМ). На графике представлены средние значения трех независимых экспериментов. Б – временные рамки прохождения ранних событий репликации ВИЧ-1.

Мы проанализировали поведение ВИЧ-1 в присутствии iDNA-PK или iATM, при добавлении ингибитора через 1-24 часа после трансдукции. В качестве контрольных соединений использовали ингибитор обратной транскрипции AZT и ингибитор интеграции Ral. В нашей системе AZT полностью ингибировал ВИЧ_wt в первые два часа с момента добавления псевдовируса, после чего постепенно терял свою активность и не был способен подавлять ранние этапы репликации псевдовируса уже через 10 часов, т.е. обратная транскрипция происходит в интервале с 2 до 10 часов после трансдукции (Рис. 31). Ral был полностью активен в первые 6-7 часов, но практически полностью терял активность к 15 часу, т.е. интеграция происходит с седьмого по пятнадцатый час (Рис. 31). В аналогичных условиях iDNA-PKcs и iATM демонстрировали идентичные профили активности, совпадающие с профилем Ral (Рис. 31). Следовательно, обе киназы активируются в ответ на интеграцию вирусной ДНК, в самом начале процесса постинтеграционной репарации [15].

4.1.5. ATM и DNA-PKcs функционируют последовательно в постинтеграционной репарации

Мы предлагаем две возможные модели активации DNA-PKcs и ATM. Согласно первой модели «Параллельной активации» DNA-PKcs и ATM 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. Вторая модель «Последовательной активации» предполагает последовательную активацию обеих киназ, т.е. к месту повреждения привлекается первая киназа, она активируется и, например, через фосфорилирование второй киназы активирует ее (Рис. 32).

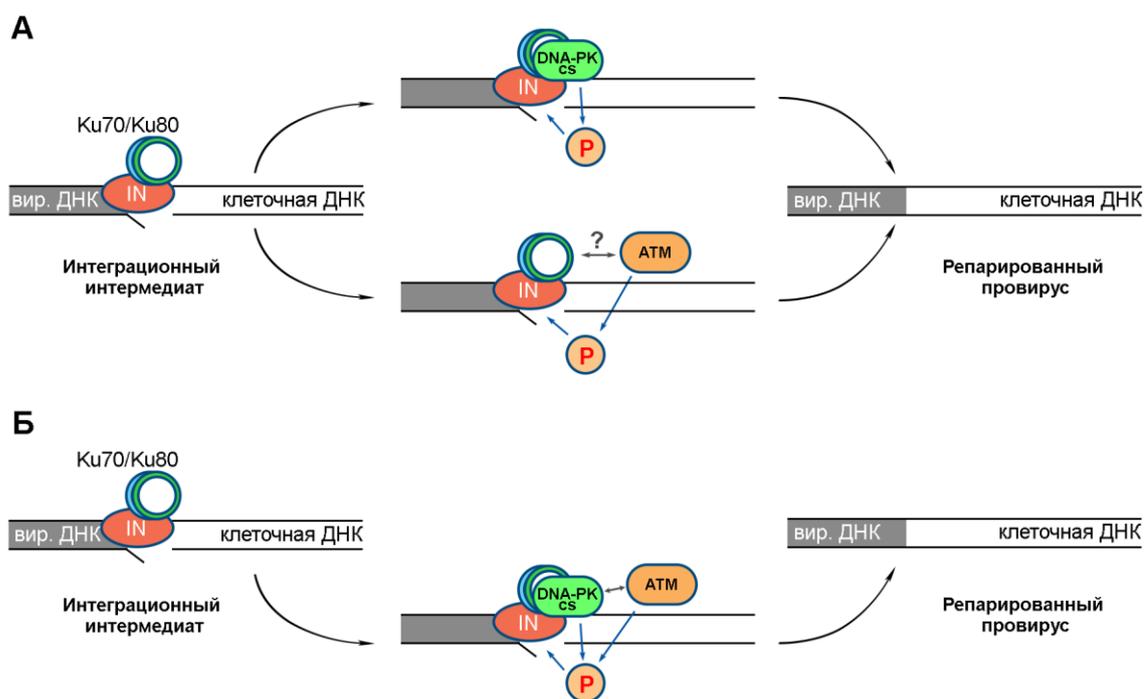


Рисунок 32. Возможные модели активации ATM и DNA-PKcs в ходе постинтеграционной репарации ВИЧ-1. А – Модель параллельной активации предполагает, что к конкретному сайту интеграции может быть привлечена ATM или DNA-PKcs, и тот фермент, который активировался, определяет дальнейшее развитие событий постинтеграционной репарации. Б – Модель последовательной активации предполагает, что для постинтеграционной репарации каждого конкретного повреждения требуется привлечение и активация обеих киназ DNA-PKcs и ATM. Поскольку DNA-PKcs может напрямую взаимодействовать с гетеродимером Ku, можно предположить, что первой к местам повреждений ДНК привлекается именно DNA-PKcs, а затем уже ATM. Обе модели активации киназ предполагают, что для их активации требуется взаимодействие IN с Ku70.

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.

Для этих целей клетки НЕК293Т трансдуцировали вектором ВИЧ_wt в присутствии iDNA-ПК (0,5 или 1 мкМ), iATM (2 или 5 мкМ) или их комбинаций и измеряли активность люциферазы через 24 часа (Рис. 33). В этих условиях ни индивидуальные соединения, ни их комбинации не влияли на выживаемость клеток (Рис. 33). 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. 33), следовательно, модель параллельной активации киназ отвергается, а верной является модель последовательной активации киназ [15].

Таким образом, обе киназы ATM и DNA-ПКcs 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-ПКcs, так и ATM. Исходя из того факта, что DNA-ПКcs, но не ATM может напрямую взаимодействовать с гетеродимером Ku70/Ku80, можно предположить, что именно DNA-ПКcs первой привлекается к местам повреждений ДНК, активируется и уже затем в этот процесс вовлекается ATM.

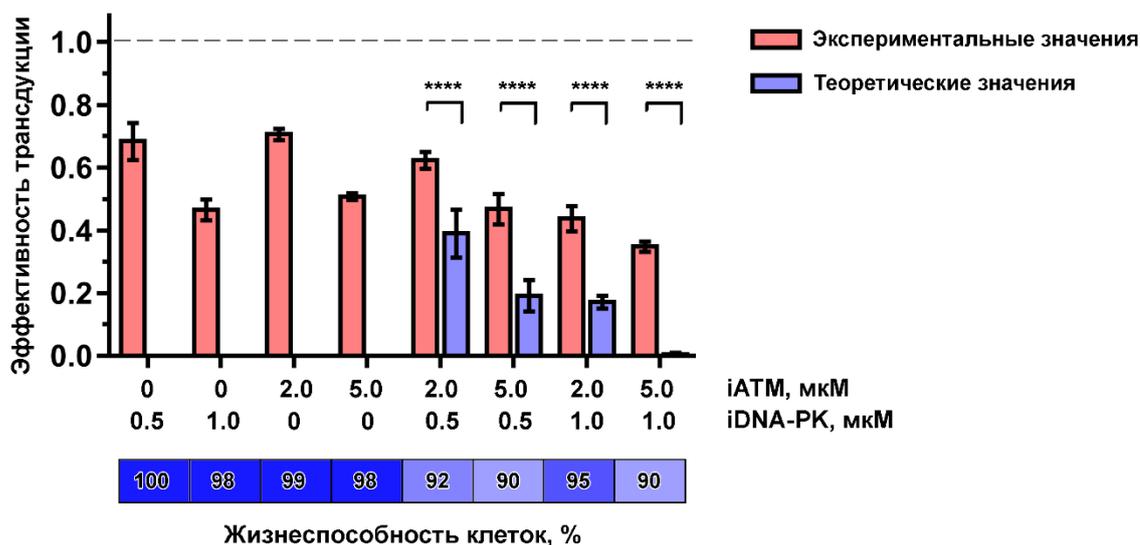


Рисунок 33. Эффект iDNA-PK, iATM или их комбинаций на трансдукцию клеток НЕК293Т лентивирусным вектором ВИЧ_wt (верхняя панель), а также на жизнеспособность клеток (нижняя панель). Теоретические значения рассчитывали исходя из предположения верности модели «параллельной активации», т.е. ингибирующие 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 Сидаку, **** = adj. *p*-value < 0.0001.

4.1.6. DNA-PKcs, ATM и их мишени Chk2, H2AX и p53 фосфорилируются в ответ на трансдукцию клеток векторами на основе генома ВИЧ-1

Активация киназ DNA-PKcs и ATM в ходе репарации двуцепочечных разрывов ДНК сопряжена с фосфорилированием широкого спектра субстратов этих ферментов по общему для РИКК семейства сайту SQ/TQ [9,278,292]. Поскольку эти две киназы обычно активируются при появлении двуцепочечных разрывов ДНК [9], 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 ATM и DNA-PK, 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 [9,278]. Помимо них, мы дополнительно решили

проанализировать статус фосфорилирования ATR, которая также как и две другие киназы автофосфорилируется при активации, и ее мишень Chk1 [278] в качестве негативного контроля, поскольку киназа ATR не участвует в репликации ВИЧ-1, и, следовательно, она не должна активироваться в ходе постинтеграционной репарации.

Клетки НЕК293Т 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. 34). 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. 34). В этих условиях, как и ожидалось, ни ATR, ни его мишень Chk1 практически не фосфорилировались [17].

Изменение статуса фосфорилирования указанных белков может быть вызвано как процессом постинтеграционной репарации, в ходе которого активируются DNA-PK и ATM, 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, кодирующим интегразу, с аминокислотными заменами E212A/L213A, препятствующими ее взаимодействию с Ku70. Как отмечалось выше такие мутации в составе интегразы нарушают эффективное протекание постинтеграционной репарации ВИЧ-1. В этом случае практически все мишени, за исключением p53, фосфорилировались слабее (Рис. 34) [17].

Таким образом, киназы DNA-PKcs и ATM, но не ATR автофосфорилируются в ходе постинтеграционной репарации ВИЧ-1 и этот процесс зависит от взаимодействия IN с Ku70. Их мишени H2AX, Chk2 и p53 фосфорилируются при трансдукции клеток лентивирусным вектором на основе ВИЧ-1, но, если статус фосфорилирования H2AX и Chk2 зависит от взаимодействия IN с Ku70, т.е. их фосфорилирование происходит в ходе

постинтеграционной репарации, то фосфорилирование p53 происходит по IN/Ku70-независимому пути [17].

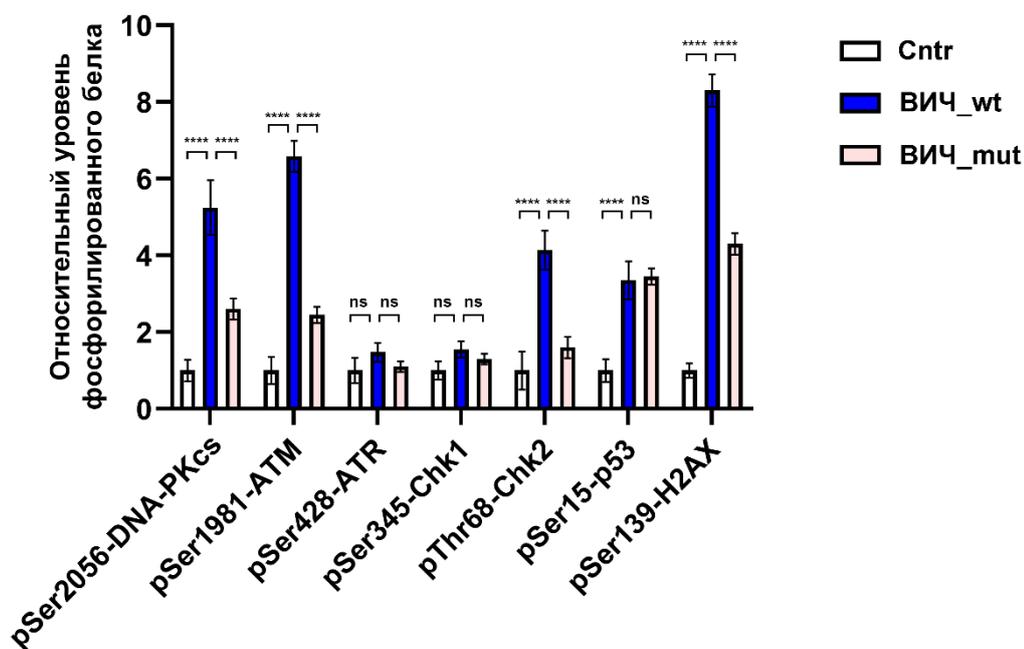


Рисунок 34. Анализ уровня фосфорилирования белков DNA-PKcs, ATM, ATR, Chk1, Chk2, p53 и H2AX в клетках, трансдуцированных лентивирусными векторами ВИЧ_wt, ВИЧ_mut или нетрансдуцированном контроле, через 12 ч после трансдукции. На графике представлены уровни фосфорилированной формы белка в клетках, трансдуцированных 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.

4.1.7 Накопление γ H2AX и pSer15-p53 происходит по двум независимым путям

Для выяснения причин различий фосфорилирования H2AX и p53 при трансдукции клеток векторами на основе ВИЧ-1, нами дополнительно был получен вектор ВИЧ_E152A, содержащий в своем составе каталитически неактивную форму интегразы (замена E152A) и не способный интегрировать вирусную кДНК [293], а также вектор ВИЧ_F185A, содержащий интегразу с заменой F185A. Эта аминокислотная замена в составе интегразы препятствует ее связыванию с обратной транскриптазой ВИЧ-1, что нарушает корректное протекание обратной транскрипции [156]. В результате при трансдукции клеток вектором ВИЧ_E152A в них накапливается линейная

двухцепочечная кДНК, но она не может встроиться в геном клетки-хозяина, а в случае вектора ВИЧ_F185A не происходит даже обратная транскрипция и в клетках присутствует лишь РНК-геном вируса.

Клетки НЕК293Т трансдуцировали векторами ВИЧ_wt, ВИЧ_mut, ВИЧ_E152A или ВИЧ_F185A, и через 12 ч в лизатах оценивали количество γ H2AX и pSer15-p53 методом вестерн-блоттинга (Рис. 35). Гистон H2AX эффективно фосфорилировался только в случае ВИЧ_wt, а фосфорилирование p53 происходило во всех случаях, когда в клетке синтезировалась кДНК, т.е. при трансдукции клеток векторами ВИЧ_wt, ВИЧ_mut и ВИЧ_E152A. Следовательно, фосфорилирование p53 не зависит ни от образования комплекса интегразы с Ku70, ни от способности интегразы встраивать вирусную кДНК в геном клетки, однако оно не наблюдается при трансдукции клеток вектором ВИЧ_F185A, не способным к обратной транскрипции. На основании этих данных можно предположить, что сигналом для фосфорилирования Ser15 в составе p53 является сам факт появления линейной двухцепочечной ДНК в трансдуцированных клетках [17].

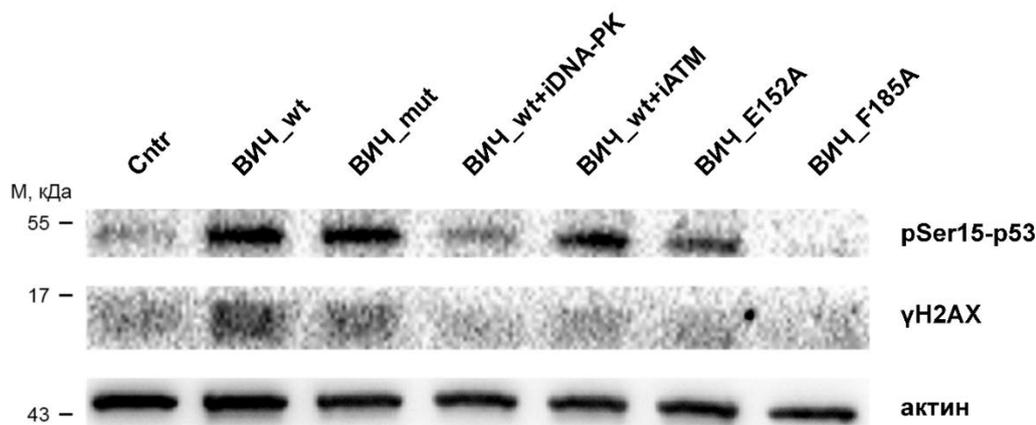


Рисунок 35. Вестерн-блот-анализ фосфорилированных форм p53 (pSer15) и H2AX (pSer139) в клетках, трансдуцированных векторами ВИЧ_wt, ВИЧ_mut, ВИЧ_E152A и ВИЧ_F185A. Образцы ВИЧ_wt + iDNA-ПК и ВИЧ_wt + iATM после трансдукции клеток вектором ВИЧ_wt дополнительно обрабатывали ингибитором DNA-ПКcs - Nu7441 (2 мкМ), или ингибитором ATM - Ku55933 (5 мкМ).

Мы также оценили кинетику накопления γ H2AX и pSer15-p53 при трансдукции клеток векторами ВИЧ_wt, ВИЧ_mut и ВИЧ_E152A в интервале времени 10–18,5 ч после трансдукции, включающий период активации киназ ATM и DNA-ПК согласно данным эксперимента ТОА (Рис. 31). В случае псевдовируса ВИЧ_wt высокий уровень фосфорилирования H2AX наблюдался уже через 10 ч после трансдукции и сохранялся на протяжении всей постинтеграционной репарации вплоть до 18,5 ч (Рис. 36). При

трансдукции клеток вектором ВИЧ_mut также накапливается γ H2AX, но профиль его накопления существенно отличался: через 10 ч уровень γ H2AX незначительно превышал фоновые значения, после чего постепенно нарастал, достигая максимума к 18,5 ч. Аналогичный профиль накопления γ H2AX был зафиксирован для вектора ВИЧ_E152 (Рис. 36) [17].

Очевидно, что фосфорилирование H2AX в случае ВИЧ_mut и ВИЧ_E152A обусловлено накоплением в ядрах трансдуцированных клеток линейной кДНК вектора, а не повреждениями ДНК, возникающими в ходе интеграции, как в случае ВИЧ_wt. Профили накопления pSer15-p53 идентичны для всех трех типов векторов: через 10 ч после трансдукции фосфорилированная форма белка незначительно превышает контрольные уровни, постепенно возрастает, достигая максимального уровня через 18,5 ч (Рис. 36) [17].

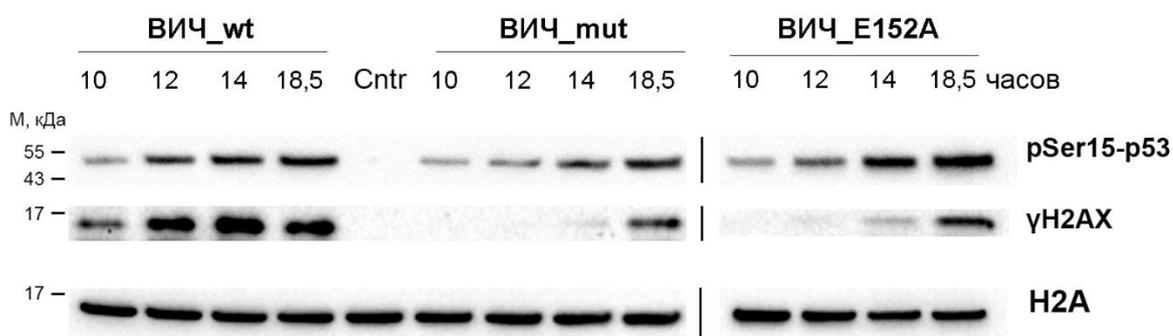


Рисунок 36. Кинетика накопления γ H2AX и pSer15-p53 в клетках HEK293T, трансдуцированных векторами ВИЧ_wt, ВИЧ_mut или ВИЧ_E152A через 10, 12, 14 и 18,5 часов после трансдукции. Образец, обозначенный как Cntr, не трансдуцирован вектором.

Вышеописанные результаты демонстрируют, что фосфорилирование p53 по Ser15 происходит не на этапе постинтеграционной репарации, однако, остается открытым вопрос, участвуют ли в этой модификации киназы ATM и DNA-PKcs. Для ответа на него мы оценили накопление фосфорилированной формы p53 при трансдукции клеток HEK293T вектором ВИЧ_wt в присутствии ингибитора DNA-PKcs или ингибитора ATM. Оба ингибитора одинаково эффективно подавляли накопление γ H2AX (Рис. 35). Фосфорилирование p53 эффективно подавлялось ингибитором DNA-PKcs, а ингибитор ATM практически не влиял на этот процесс (Рис. 35) [17].

Таким образом, в ответ на интеграцию вирусной кДНК и постинтеграционной репарации специфично фосфорилируются только H2AX, но не p53. Фосфорилирование

p53 происходит в ответ на накопление в трансдуцированных клетках линейной кДНК ВИЧ-1, хотя и зависит от активности DNA-РКс.

4.1.8. Фосфорилированный H2AX формирует локусы в ядрах трансдуцированных клеток

Обработка клеток ионизирующим излучением или агентами, вызывающими появление в клеточной ДНК двуцепочечных разрывов, приводит к появлению в ядрах клеток локусов γ H2AX [278]. Этот процесс преимущественно контролируется протеинкиназами ATM и DNA-РК [294], хотя роль этих киназ в этом процессе различается. Считается, что как DNA-РКс, так и ATM могут инициировать процесс формирования локуса, модифицируя близлежащие молекулы H2AX, а за дальнейшее распространение этой модификации на большие дистанции отвечает именно киназа ATM [294–296]. Каждый локус содержит по крайней мере несколько сотен молекул γ H2AX, и число локусов коррелирует с числом двуцепочечных разрывов по крайней мере на ранних стадиях репарации [297]. Формирование таких локусов способствует процессу репарации ДНК за счет привлечения факторов репарации к местам повреждений ДНК и, как следствие, локального повышения их концентрации в месте их работы [298].

В нашем случае в ответ на ретровирусную интеграцию мы обнаружили увеличение уровня фосфорилирования гистона H2AX по Ser139, поэтому мы решили проверить, формируются ли локусы γ H2AX в ядрах трансдуцированных клеток и зависит ли их формирование от способности интегразы взаимодействовать с Ku70.

Для этого клетки НЕК293Т трансдуцировали вектором ВИЧ_wt при MOI = 10 или аналогичным количеством векторов ВИЧ_mut, ВИЧ_E152A и ВИЧ_F185 и через 12 ч после трансдукции анализировали содержание локусов γ H2AX методом иммуноцитохимии с использованием антител к pSer139-H2AX и последующей визуализацией с помощью конфокальной микроскопии [17].

Лишь в небольшой доле клеток без обработки лентивирусными векторами детектировались единичные локусы γ H2AX (Рис. 37, А). В качестве положительного контроля мы проанализировали накопление γ H2AX в ядрах клеток, обработанных в течение 1 ч перед фиксацией этопозидом (50 мкМ) – известным ингибитором топоизомеразы II, который индуцирует накопление двуцепочечных разрывов в ДНК [9].

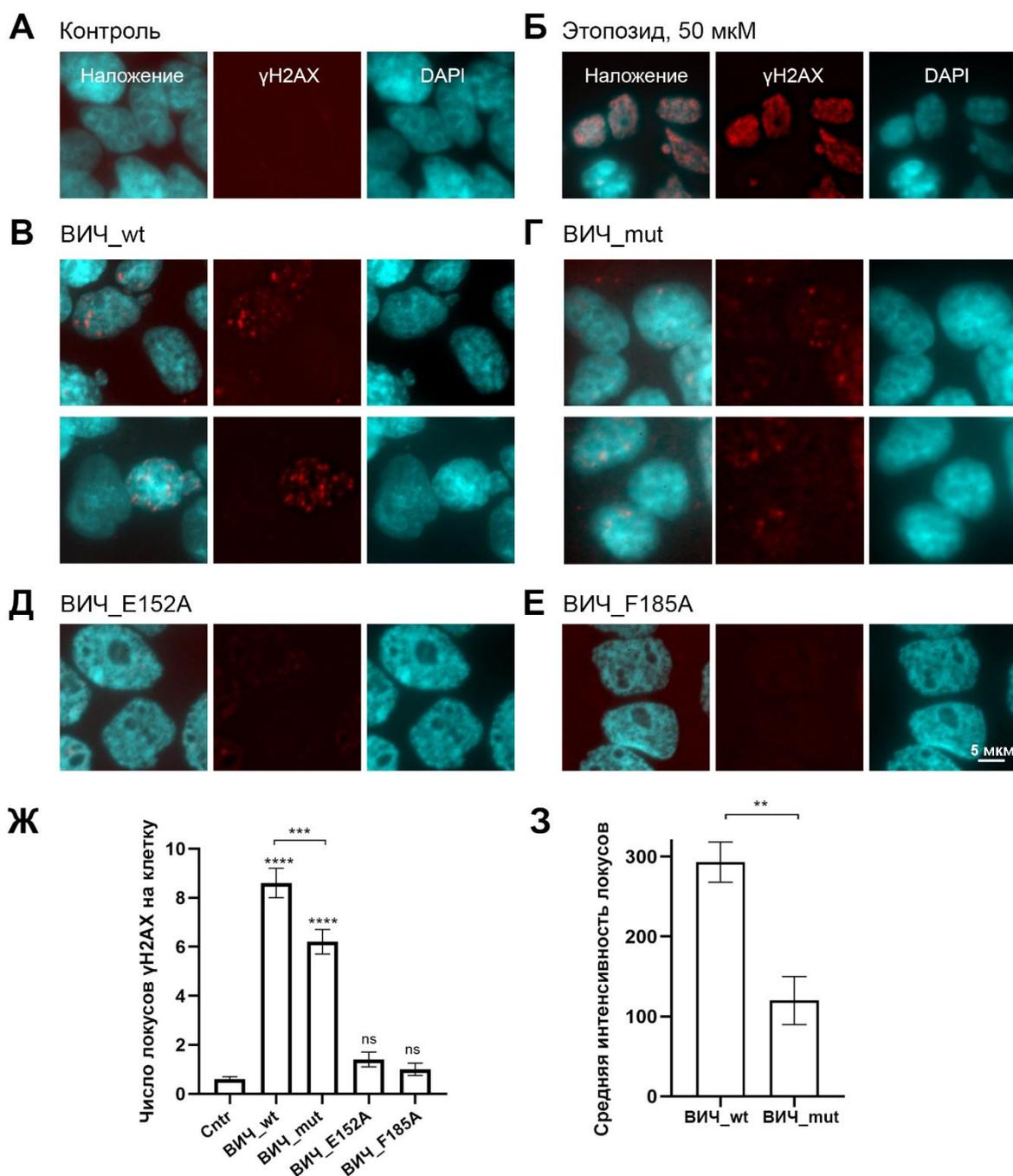


Рисунок 37. Накопление локусов γ H2AX в клетках HEK293T, трансдуцированных векторами на основе генома ВИЧ-1. А-Е – Конфокальные изображения локусов γ H2AX в клетках HEK293T без обработки (А), обработанных 50 мкМ этопозидом в течение 1 часа перед фиксацией (Б), трансдуцированных векторами ВИЧ_wt (В), ВИЧ_mut (Г), ВИЧ_E152A (Д), ВИЧ_F185A (Е) при множественности инфекции равной 10. Фиксация клеток проводилась через 12 часов после трансдукции. Ж – среднее число локусов γ H2AX, приходящихся на одну клетку (проанализировано суммарно 5000 клеток в трех технических повторах для каждого типа воздействия), статистическая значимость отличий оценена с использованием дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Тьюки на множественные сравнения, ns – отличия отсутствуют, *** - р-значение < 0,001, **** - р-значение < 0,0001. З – средняя интенсивность флуоресценции локусов γ H2AX, статистическая значимость отличий оценена с помощью t-теста, ** р-значение < 0,01.

В этих условиях практически все ядро клеток давало окрашивание антителами на γ H2AX (Рис. 37, Б), что говорит о множественных повреждениях ДНК при такой концентрации этопозида.

При трансдукции клеток вектором ВИЧ_wt через 12 ч после добавления псевдовируса в ядрах клеток мы зафиксировали образование четко различимых локусов гистона γ H2AX разной интенсивности (Рис. 37, В). В случае обработки клеток векторами ВИЧ_E152A и ВИЧ_F185A уровень γ H2AX практически не отличался от контрольных клеток (Рис. 37, Д и Е). При трансдукции клеток вектором ВИЧ_mut, не способным эффективно инициировать постинтеграционную репарацию, мы также наблюдали формирование локусов γ H2AX (Рис. 37, Г), однако их среднее число на клетку и средняя интенсивность флуоресценции локусов была ниже, чем в случае ВИЧ_wt в 1,4 и 2 раза соответственно (Рис. 37, Ж и З) [17].

Таким образом, данные, полученные с помощью конфокальной микроскопии и вестерн-блоттинга о разнице в накоплении γ H2AX в клетках, трансдуцированных псевдовирусами с интегразой дикого типа и интегразой, не способной связываться с Ku70, позволяют сделать вывод, что γ H2AX накапливается в виде локусов в ходе постинтеграционной репарации ВИЧ-1 [17].

Заключение к разделу 4.1

Основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод о том, что, хотя интеграция кДНК ВИЧ-1 и 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 PIKK-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. 38). Однако у этих процессов есть и серьезные отличия.

Если к двуцепочечным разрывам в ДНК DNA-РКs или АТМ привлекаются и активируются за счет связывания, гетеродимера Ku70/Ku80 или MRN-комплекса с ДНК, соответственно, 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. 38). 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-ПК, но не ATM.

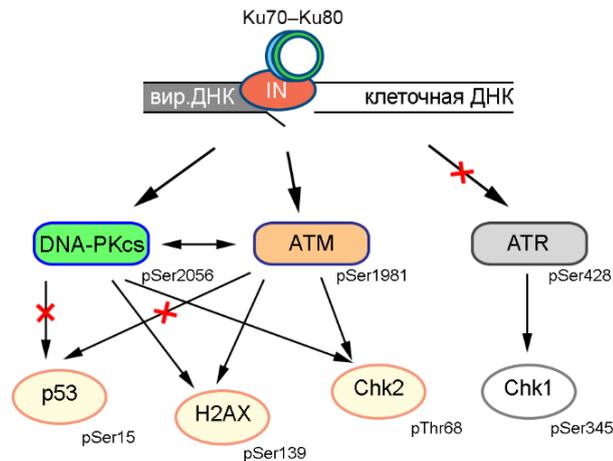


Рисунок 38. Постинтеграционная репарации ВИЧ-1 приводит к активации DNA-ПКcs и ATM, но не ATR и фосфорилированию их мишеней. Интеграза ВИЧ-1, расположенная в местах встраивания генома ВИЧ-1 и, соответственно, маркирующая повреждения ДНК, привлекает гетеродимерный комплекс Ku70/Ku80. Взаимодействие между IN и Ku70 является строго необходимым для активации DNA-ПК и ATM в местах повреждений ДНК, вызванных интеграцией ВИЧ-1. DNA-ПК и ATM автофосфорилируются по pSer2056 и pSer1981. Активированные киназы фосфорилируют мишени H2AX и Chk2, но не p53. ATR в постинтеграционной репарации не участвует и не активируется.

Раздел 4.2. Другие потенциальные участники постинтеграционной репарации ВИЧ-1

Очевидно, что DNA-PKcs и ATM 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 [9,278]. Однако дальнейшие участники постинтеграционной репарации остаются неизвестными.

Можно предположить, что и дальнейшие события постинтеграционной репарации полностью совпадают с этапами репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Как отмечалось в предыдущем разделе (Раздел 4.1), 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, уже будет неспособна распознать и восстановить повреждения, возникающие в ходе интеграции ВИЧ-1, т.к. она лигирует именно двуцепочечные разрывы ДНК, а они отсутствуют в интеграционном интермедиате (Рис. 7). Таким образом, вопрос о дальнейших участниках этого процесса остается открытым.

В этом разделе будут описаны результаты выявления потенциальных участников постинтеграционной репарации ВИЧ-1 методом ко-иммунопреципитации сшитых комплексов с последующей идентификацией белков с помощью масс-спектрометрии (XL-MS), методом иммунопреципитации хроматина с последующей идентификацией белков методом масс-спектрометрии (ChIP-MS), а также проверку участия нескольких наиболее интересных находок в постинтеграционной репарации ВИЧ-1.

4.2.1. Идентификация клеточных белков, взаимодействующих с суперэкспрессированной интегразой ВИЧ-1 в клетках НЕК293Т

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 НЕК293Т. 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 [299], предполагающий предварительную сшивку комплексов формальдегидом внутри клеток, экспрессирующих IN, перед их лизисом и последующим проведением ко-иммунопреципитации.

На первом этапе было необходимо оценить оптимальное время фиксации комплексов 1 % формальдегидом при комнатной температуре. Для этих целей клетки НЕК293Т трансфецировали вектором pcDNA3.1_HA-IN. Через 48 часов после трансфекции клетки снимали с поверхности культурального пластика путем обработки смесью трипсина с ЭДТА, отмывали от трипсина и остатков среды, переводили в 1x PBS буфер. Затем к клеткам добавляли формальдегид до финальной концентрации 1 %, фиксировали их в течение 1-15 минут при комнатной температуре. После завершения инкубации формальдегид инактивировали Tris-глицином. В качестве контроля использовали клетки без фиксации, а также клетки, трансфецированные вектором pcDNA3.1 без IN. Полученные образцы клеток лизировали, оценивали концентрацию белка и проводили их разделение в ПААГ с последующим проведением вестерн-блот анализа с использованием антител к HA-эпитопу (Рис. 39).

Как видно из результатов проведенного эксперимента используемые нами антитела не дают неспецифического окрашивания в случае контрольного образца pcDNA3.1 и специфично проявляют IN в образце pcDNA3.1_HA-IN без фиксации (Рис. 39, точка 0 мин). При добавлении формальдегида во всех образцах (1-15 мин) начинает визуализироваться димер интегразы (подвижность около 70 кДа), что свидетельствует в пользу успешного проведения фиксации межмолекулярных взаимодействий формальдегидом. Более того уже через 1 мин после добавления формальдегида появляются высокомолекулярные HA-позитивные комплексы с подвижностью более 100 кДа (Рис. 39). Такое изменение подвижности IN как раз и свидетельствует в пользу того, что при обработке клеток формальдегидом в них происходит фиксация разнообразных комплексов, содержащих IN. По мере увеличения времени фиксации мы наблюдали уменьшение количества свободной мономерной IN, однако, максимальное количество высокомолекулярных комплексов наблюдалось через 2 минуты после

фиксации (Рис. 39). При дальнейшей инкубации их количество уменьшается и становится минимальным в точке 15 минут (Рис. 39). С учетом того, что количество мономерной IN в этой точке минимально, можно предположить, что столь длительное время фиксации приводит к формированию комплексов с большим числом сшивок, что не позволяет им входить в гель. Такая высокая степень фиксации будет негативно влиять и на последующую идентификацию белков методами масс-спектрометрии. В связи с этим для проведения последующих экспериментов мы остановили свой выбор на фиксации комплексов в течение 2 минут.

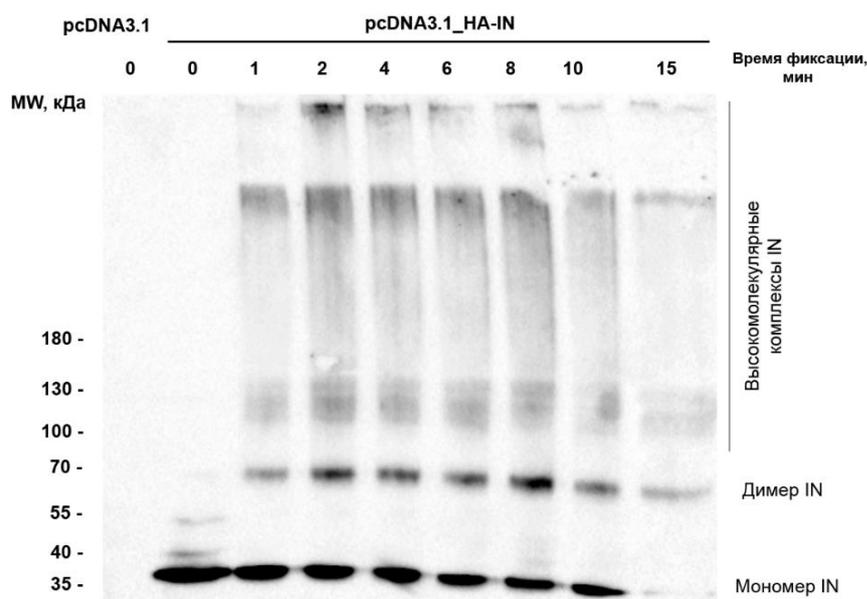


Рисунок 39. Подбор условий фиксации комплексов IN ВИЧ-1 для последующей идентификации клеточных партнеров этого белка. Клетки НЕК293Т трансдуцировали вектором pcDNA3.1_HA-IN, кодирующим HA-тагированную IN, или контрольным вектором pcDNA3.1. Через 48 часов после трансдукции клетки снимали смесью трипсина-ЭДТА, белковые комплексы фиксировали 1 % формальдегидом в течение 1-15 минут. Клетки лизировали, выделяли тотальную фракцию белков, после чего проводили разделение белков в ПААГ и последующий вестерн-блот анализ с использованием антител к HA-тэгу.

После оптимизации условий мы приступили к эксперименту по идентификации клеточных партнеров IN. Для этих целей клетки НЕК293Т трансфецировали вектором pcDNA3.1_HA-IN или контрольным вектором pcDNA3.1 в трех технических повторностях. Через 48 часов после трансфекции клетки снимали, фиксировали формальдегидом в течение 2 минут, затем подготавливали клеточные лизаты и проводили ко-иммунопреципитацию IN и связанных с ней белков на магнитных

частицах с использованием антител к НА-тэгу. После отмычки смолы от несвязавшихся белков иммунопреципитированные комплексы обрабатывали смесью трипсина/Lys-C для подготовки триптических пептидов для последующей LC-MS/MS идентификации белков.

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 типа экспериментах, нами было идентифицировано 26 уникальных находок [18]. 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.

К ним относятся транскрипционный коактиватор LEDGF/p75, стабилизирующий активное тетрамерное состояние IN и направляющий интеграцию генома ВИЧ-1 в активно-транскрибируемые участки генома [10,165,300], E3 убиквитин-лигаза HUWE1, негативно влияющая на ранние этапы репликации ВИЧ-1 по неустановленному механизму [10,301], кариоферин KPNB1, участвующий в импорте прединтеграционных комплексов в ядро [10,302], и белок KAP1, также известный как TRIM28, который негативно влияет на ранние этапы репликации ВИЧ-1 за счет снижения уровня ацетилирования IN [10,303]. К сожалению, нам не удалось отнести к специфичным находкам белок Ku70, который взаимодействует с IN и важен для инициации постинтеграционной репарации, т.к. при такой постановке эксперимента он присутствовал как в экспериментальных, так и в контрольных образцах.

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 [7] (обсуждается ниже), 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 [18] и HSPD1 (HSP60) – включается в вирионы ВИЧ-1 [304], является негативным регулятором репликации ВИЧ-1, подавляет интеграцию, но не влияет на постинтеграционную репарацию ВИЧ-1, как было показано нами [19].

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) [18].

Обнаруженные нами находки могут лечь в основу будущих исследований по влиянию клеточных белков, ассоциированных с IN, на репликацию ВИЧ-1. Однако, поскольку в рамках настоящего исследования нас интересуют именно те факторы, которые могут регулировать постинтеграционную репарацию ВИЧ-1, мы бы хотели обратить внимание читателей на два белка из клеточных систем репарации: белок поли(АДФ-рибоза)-полимераза (PARP1) и белок KAP1 (TRIM28).

Поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1 (PARP1) – один из ключевых мастер-регуляторов клеточного ответа на повреждения ДНК. Хотя долгое время считалось, что PARP1 преимущественно активируется одонитевыми разрывами ДНК, сегодня появляется все больше данных, которые говорят, что он также может участвовать в репарации двуцепочечных разрывов ДНК [305]. Активированный при связывании с повреждённой ДНК, PARP1 использует NAD^+ в качестве субстрата для синтеза длинных и разветвленных цепей поли(АДФ-рибозы), которые присоединяются непосредственно к самому PARP1 (автопарилирование) и к другим белкам-мишеням, создавая платформу для привлечения факторов репарации ДНК [306]. В контексте ВИЧ-1 его влияние на инфекцию активно исследовали в 2000-ые годы разные группы, но получали достаточно противоречивые результаты [307–313]. В работах [307–310] показано, что как ингибирование каталитической функции PARP1, так и его нокаун в клеточной линии мышинных фибробластов негативно влияют на общую эффективность репликации ВИЧ-1, что ассоциировано с ингибированием интеграции вирусной кДНК в клеточный геном. В работах [311–313] не удалось воспроизвести эти эффекты на мышинных фибробластах. Интересно, что даже в рамках одной лаборатории результаты сильно отличались при использовании разных моделей ВИЧ-инфекции: при трансдукции мышинных фибробластов с нокаутом PARP1 вектором HIV-EGFΔE, представляющим собой природный вариант ВИЧ-1, в котором ген поверхностного антигена (Env) заменен на eGFP, но не вектором HIV-sinPPT, в котором дополнительно введена самоинактивирующая мутация, препятствующая репликации вируса, уровень трансдукции и интеграции были снижены [311]. К сожалению, этот негативный опыт изучения PARP1, по-видимому, снизил интерес исследователей к этому белку, поэтому до сих пор нет данных о влиянии PARP1 на ВИЧ-1 в клетках человека.

Второй белок TRIM28 выполняет широкий спектр функций в клетке, включая регуляцию структуры хроматина, регуляцию транскрипции, регуляцию клеточного ответа на повреждения ДНК, в том числе и двуцепочечные разрывы ДНК [314]. При возникновении в геноме двуцепочечных разрывов ДНК, TRIM28 одним из первых привлекается к местам повреждений, где фосфорилируется киназами ATM и DNA-PK по остатку Ser473, что обеспечивает его активацию и, как следствие, приводит к деконденсации хроматина, облегчая доступ факторов репарации к повреждению [314]. Эффект на постинтеграционную репарацию ВИЧ-1 не изучен, однако, показано, что TRIM28 может взаимодействовать с IN, привлекать к ней гистондеацетилазу HDAC1, тем самым влияя на статус ее ацетилирования. Деацетилирование IN в присутствии TRIM28 негативно влияет на эффективность интеграции вирусного генома в клеточный [303].

Таким образом, проведенный нами эксперимент позволил выявить ряд клеточных белков, ассоциированных с IN, среди которых два участвуют в клеточном ответе на повреждения ДНК, и один из этих факторов PARP1 впервые описан как партнер IN ВИЧ-1.

4.2.2. Разработка системы для идентификации белков, привлекаемых к сайтам интеграции генома ВИЧ-1

Описанный выше эксперимент позволяет обнаружить только те клеточные белки, которые могут напрямую взаимодействовать с IN. Во время интеграции и на начальных этапах постинтеграционной репарации IN находится в комплексе с вирусной и клеточной ДНК, что может влиять на конформацию IN и, как следствие, влиять на список привлекаемых к ней клеточных белков. С другой стороны, взаимодействие IN с гетеродимером Ku в местах повреждений ДНК запускает через киназы ATM и DNA-PK каскад реакций, направленных на восстановление целостности ДНК. Активация этих киназ может способствовать привлечению к местам повреждений широкого спектра белков из систем репарации повреждений ДНК. В связи с этим мы решили изучить, какие еще белки из клеточных систем репарации находятся в непосредственной близости к местам повреждений ДНК, возникающих в ходе интеграции вирусного генома.

В качестве метода для такого анализа мы предложили использовать ChIP-MS подход с использованием антител к IN, поскольку именно IN, встраивая вирусную

кДНК, приводит к образованию подобных повреждений. Для начала нам было необходимо получить антитела к IN и проверить применимость полученного препарата антител для ChIP-MS экспериментов. В качестве организма для продукции антител были выбраны кролики, а в качестве иммуногена – полноразмерная рекомбинантная IN. После получения сывороток из иммунизированных животных мы провели очистку целевой фракции антител против IN в два этапа: на первом – была выделена общая фракция IgG на сефарозе с иммобилизованным белком А золотистого стафилококка, а на втором – путем очистки общей фракции IgG на смоле с ковалентно-иммобилизованной IN получены несколько фракций антител непосредственно к IN (Рис. 40, А, Б).

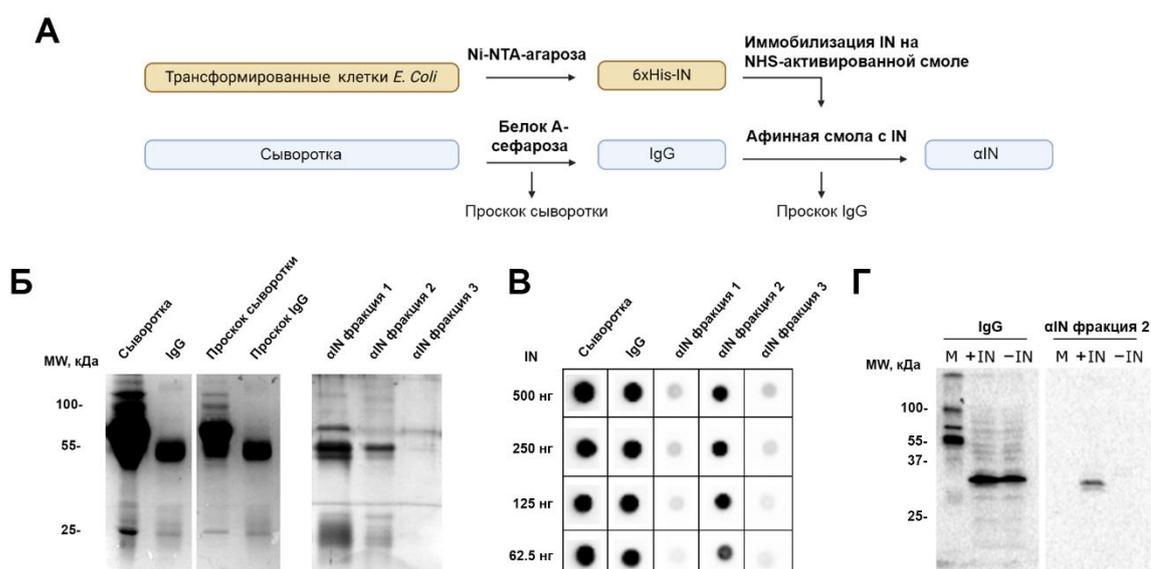


Рисунок 40. Получение антител к IN ВИЧ-1. А – стратегия очистки антител. На первом этапе из сыворотки иммунизированных рекомбинантной IN кроликов выделяли тотальную фракцию иммуноглобулинов G (IgG) на сефарозе с иммобилизованным белком А золотистого стафилококка. Затем антитела к IN (α IN) из общей фракции иммуноглобулинов G выделяли с использованием аффинной сорбента с ковалентно-иммобилизованной IN. Б – Анализ белков сыворотки, фракции IgG, проскока сыворотки после очистки IgG на белок А-сефарозе, фракций антител к IN и проскока IgG после очистки антител на IN-смоле. В – дот-блот анализ рекомбинантной IN ВИЧ-1 для определения чувствительности исходной сыворотки, фракции IgG, и фракций антител к IN. Г – определение селективности детекции суперэкспрессированной IN ВИЧ-1 в клетках НЕК293Т общей фракцией иммуноглобулинов IgG и фракцией 2 антител к IN. М – белковый маркер, +IN – лизат клеток, экспрессирующих IN ВИЧ-1, -IN – лизат контрольных клеток без экспрессии IN.

Для проверки работоспособности полученных фракций антител был проведен дот-блот анализ с использованием рекомбинантной IN. Из полученных фракций антител только вторая фракция α IN-антител позволяла эффективно детектировать IN (Рис. 40, В). Для проверки специфичности полученной фракции антител проводили вестерн-блот

анализ лизатов клеток, экспрессирующих НА-тагированную IN, а в качестве отрицательного контроля – лизат клеток, трансфицированных контрольной плазмидой pcDNA3.1. Из рисунка 40, Г видно, что только вторая фракция очищенных антител специфично узнает белок с подвижностью около 32 кДа в «+IN»-образце и не дает неспецифичного сигнала в отрицательном контроле. Общая фракция IgG после первого этапа очистки дает сигнал на уровне 32 кДа даже в отрицательном контроле, а также проявляет ряд белков в маркере (Рис. 40, Г). Таким образом, двухстадийная система очистки антител позволила нам получить фракцию антител специфичных к IN.

Полученные нами антитела прекрасно распознают антиген в денатурированном виде, но будут ли они сохранять свою чувствительность по отношению к IN в неденатурирующих условиях и, более того, в сшитом параформальдегидом виде? Прежде чем приступить к трудоемкому эксперименту ChIP-MS было необходимо проверить, могут ли эти антитела специфично распознавать суперэкспрессированную IN в фиксированных клетках. Условия этого эксперимента максимально напоминают условия ChIP-MS эксперимента. Во-первых, данный метод не предполагает использования сильных ионных детергентов, поэтому белок остается в его нативной конформации, а во-вторых, для проведения окрашивания клеток они предварительно фиксируются параформальдегидом. Как видно из рисунка 41 полученные нами антитела специфично окрашивают ядра клеток, суперэкспрессирующих IN, что согласуется с ядерной локализацией IN [315]. В случае контрольных клеток не наблюдается неспецифического окрашивания антителами. Таким образом, полученные антитела против IN специфично распознают антиген как в денатурирующих, так и в неденатурирующих условиях.

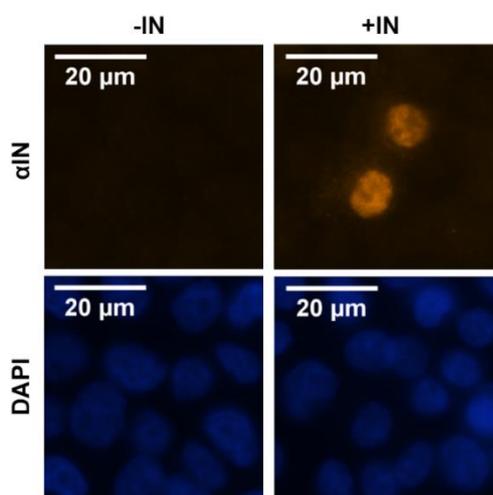


Рисунок 41. Иммуноцитохимия клеток, суперэкспрессирующих IN ВИЧ-1 (+IN), и контрольных клеток (-IN) с применением полученных антител к IN.

Для проверки применимости антител для выделения фракции хроматина, содержащей IN, клетки НЕК293Т были трансдуцированы лентивирусным вектором ВИЧ_wt при множественности инфекции 2, а через 14 часов после трансдукции проведена иммунопреципитация хроматина, включающая в себя фиксацию клеток формальдегидом, выделение ядер, лизис, фрагментацию хроматина до размера 1000 пар оснований и непосредственно иммунопреципитацию хроматина с использованием антител к IN (Рис. 42). Для анализа успешности проведения ChIP-эксперимента оценивали количество совыделяющихся с IN концевых LTR-фрагментов кДНК ВИЧ-1 методом количественной ПЦР. Параллельно с этим оценивали общее содержание LTR-фрагментов в полученных лизатах до проведения ChIP. Эффективность ChIP рассчитывали, как долю выделенных LTR фрагментов относительно их общего количества.

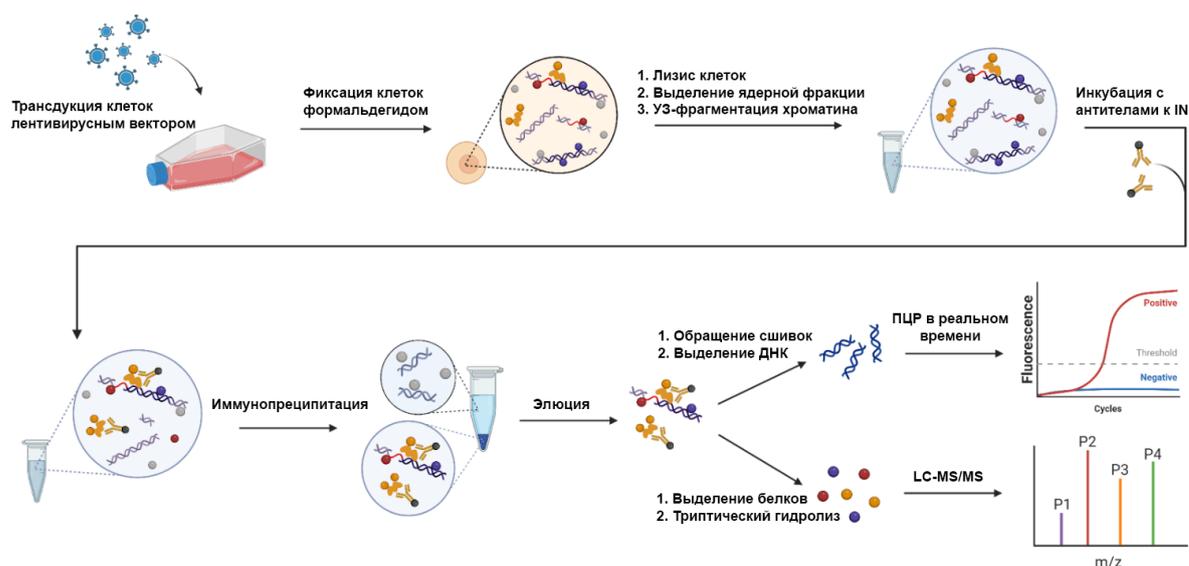


Рисунок 42. Схема ChIP-MS эксперимента. Клетки НЕК293Т трансдуцируют лентивирусным вектором на основе генома ВИЧ-1 и на этапе постинтеграционной репарации фиксируют формальдегидом. Затем клетки лизируют в мягких условиях для сохранения ядер, выделяют ядра, лизируют их и фрагментируют хроматин ультразвуком 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.

На рисунке 43, А представлены результаты тестового эксперимента. Из лизатов клеток, трансдуцированных вектором ВИЧ_wt, с интегразой совыделяется порядка 20%

LTR фрагментов, при этом контрольная ДНК (фрагмент гена CD3) не обогащается. Также мы не наблюдали обогащения ни LTR, ни CD3, когда тестируемые антитела к IN не добавляли к лизатам трансдуцированных клеток (Рис. 43, А).

Поскольку в дальнейшем мы планируем проводить идентификацию белков, входящих в состав выделенной фракции хроматина, нам было важно проверить, сможем ли мы обнаружить саму IN и ее клеточный партнер Ku70. Для этого проводили аналогичный вышеописанному эксперимент, но после выделения фракции хроматина и обращения сшивок, вызванных формальдегидом, анализировали присутствие IN и Ku70 в полученных образцах методом вестерн-блоттинга. В интервале времени 8-14 часов после трансдукции во всех образцах мы обнаружили как IN, так и Ku70, хотя количество последнего было критически мало (Рис. 43, Б). В первую очередь это объясняется небольшим количеством вирусных частиц, а, следовательно, и IN, которую мы вносим в клетки. В полноценном ChIP-MS эксперименте предполагается использование на порядок большего количества вирусных частиц, что вселяет надежду на достижимость поставленной нами цели. Также стоит отметить, что в контрольном эксперименте без антител к IN, Ku70 не был обнаружен совсем (Рис. 43, Б). Таким образом, полученные антитела к IN могут быть использованы для проведения ChIP-MS экспериментов.

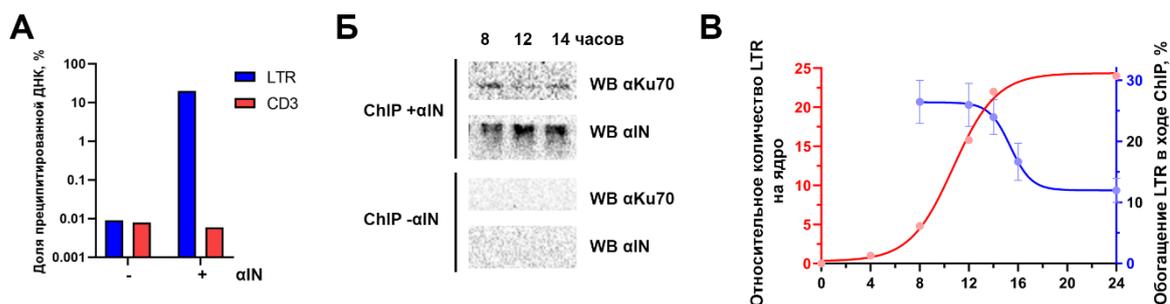


Рисунок 43. Оценка применимости полученных антител к IN для ChIP-qPCR и ChIP-MS протоколов. А – Доля LTR-фрагментов ВИЧ-1, выделенных из клеток НЕК293Т, трансдуцированных ВИЧ_wt, по протоколу ChIP с использованием антител к IN (+ αIN). В качестве контроля проводили аналогичный эксперимент, но без добавления антител к IN (- αIN). В обоих экспериментах оценивали степень соосаждения неспецифической ДНК – фрагмента гена CD3. Б – Вестерн-блот анализ IN и белка Ku70, совыделяющихся с IN, после проведения ChIP протокола из клеток, трансдуцированных вектором ВИЧ_wt. В – 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).

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

По нашим представлениям, IN после встраивания вирусной кДНК в клеточный геном должна удаляться с мест интеграции, поскольку ее присутствие может мешать протеканию постинтеграционной репарации. Из результатов наших экспериментов становится понятно, что перед ее удалением к местам повреждений ДНК должны привлечься DNA-РКcs и АТМ. Однако неизвестно, в какой момент времени после их активации происходит ее удаление. Для успешного проведения ChIP-MS эксперимента необходимо, чтобы IN еще находилась в связанном с LTR-повторами виде, но также желательно, чтобы с момента активации киназ прошло как можно больше времени, чтобы идентифицировать наибольшее число факторов, привлекаемых к IN-LTR-комплексам в ходе постинтеграционной репарации.

Для определения временных характеристик взаимодействия IN с LTR в трансдуцированных лентивирусным вектором клетках мы провели ChIP-qPCR эксперимент. Для этого клетки НЕК293Т трансдуцировали вектором ВИЧ_wt и через 8, 12, 14, 16 и 24 часа после трансдукции проводили иммунопреципитацию хроматина с использованием антител к IN и в полученных препаратах оценивали долю LTR-фрагментов, совыделяющихся с IN (Рис. 43, В). Параллельно с этим определяли общее количество LTR-фрагментов в ядерных лизатах до иммунопреципитации.

Мы обнаружили, что количество LTR-фрагментов генома ВИЧ-1, присутствующих в ядре, начиная с 8 часов постепенно повышается, достигает максимума через 14-16 часов после трансдукции и остается неизменным вплоть до 24 часов (Рис. 43, В), что согласуется с данными по времени интеграции [6]. Доля LTR-фрагментов, совыделяющихся с IN, сохраняется на постоянном уровне (около 20%) вплоть до 14 часов, после чего постепенно начинает снижаться (Рис. 43, В), что свидетельствует об удалении IN с мест интеграции генома лентивируса лишь через 14 часов после трансдукции. Для проведения последующих экспериментов мы выбрали точку 14 часов после трансдукции, поскольку к этому времени в ядре находится наибольшее число LTR-фрагментов, и они все еще ассоциированы с IN.

После оптимизации условий иммунопреципитации хроматина мы приступили к эксперименту по выявлению клеточных белков, ассоциированных с комплексами IN-LTR. Для этого клетки НЕК293Т трансдуцировали вектором ВИЧ_wt, а через 14 часов фиксировали и подвергали протоколу ChIP-MS с использованием антител к IN. В качестве контроля использовали нетрансдуцированные клетки, которые аналогичным

образом подвергались фиксации, выделению ядер, подготовке лизатов, фрагментации хроматина и последующей иммунопреципитации хроматина с использованием антител к IN. Контрольные образцы позволяют оценить количества клеточных белков, неспецифично взаимодействующих со смолой или антителами. Суммарно было подготовлено 4 контрольных и 4 экспериментальных образца. Для каждого из них были идентифицированы клеточные белки и их количества методом масс-спектрометрии.

Информация о количестве идентифицированных белков в экспериментальных и контрольных образцах, а также о числе белков, количество которых в экспериментальных образцах превосходит в 3,5 и более раз их количество в контрольных образцах, приведена в Таблице 4. Для дальнейшего анализа отбирали только те белки, которые были идентифицированы нами как дифференциальные хотя бы в двух биологических повторностях. Их общее число составило 1241.

Таблица 4. Статистика находок в эксперименте по ChIP-MS идентификации белков, ассоциированных с фракцией хроматина, содержащей IN ВИЧ-1.

	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4
Общее число идентифицированных белков в контрольном и экспериментальном образце	1074	1762	1341	1493
Число белков, количество которых в экспериментальном образце в 3,5 и более раз превосходило количество в контрольном образце	921	1087	1246	1373

Среди идентифицированных белков мы обнаружили ранее описанные в литературе компоненты прединтеграционного комплекса – комплекса вирусных, включая IN, и клеточных белков, необходимых для встраивания вирусной кДНК. Например, среди находок присутствуют белки LEDGF/p75 (обнаружен и в ходе XL-MS эксперимента) и CPSF6, которые направляют интеграцию в активно-транскрибируемые участки генома. Причем, LEDGF/p75 напрямую взаимодействует с IN, а второй белок взаимодействует с капсидным белком (CA), который также является частью прединтеграционного комплекса [166,306,316]. Также нами идентифицированы такие компоненты прединтеграционного комплекса, как BAF, HMG I(Y) [317], TRIM28 (также обнаружен нами в ходе XL-MS-эксперимента) [10,18], VBP1 [318] и SNF5 (INI1) [319]. 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 непосредственной близости прединтеграционных комплексов с этими белками, ведь интеграция преимущественно идет в области активной транскрипции [320].

Далее мы сконцентрировали наше внимание на факторах репарации повреждений ДНК. Всего было идентифицировано 53 таких белка (Таблица 5). 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 [8]. Это подтверждает наши исходные предположения о применимости ChIP-MS метода для идентификации клеточных белков, участвующих в регуляции постинтеграционной репарации ВИЧ-1.

Таблица 5. Функциональная характеристика белков из систем репарации повреждений ДНК, идентифицированных в ходе ChIP-MS эксперимента с использованием антител к IN ВИЧ-1.

Белок	Функции в репарации	Пути репарации
APX1	Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1. Распознает и инициирует репарацию AP-сайтов.	BER [321]
CDK1 CDK2	Циклин-зависимые киназы 1 и 2. Регуляция клеточного цикла, контроль за успешностью протекания репарации	Разнообразные пути репарации [322]
SHAF1B	Фактор сборки хроматина 1, субъединица В. Компонент гистонового шаперонного комплекса CAF1, привлечение гистонов к репарированной ДНК. Взаимодействует с DNA-РК и PCNA.	Разнообразные пути репарации, включая NHEJ [323,324]
DDB1	Белок 1, специфично связывающийся с поврежденной ДНК. Компонент CUL4-DDB1 E3-убиквитинлигазного комплекса, распознает повреждения ДНК, запуская NER. Вне NER может взаимодействовать с NBS1 и MDC1, способствуя клеточному ответу на повреждения ДНК.	NER и другие [325,326]
DDX1	DEAD-бокс хеликазы 1. Способствует репарации двуцепочечных разрывов ДНК, преимущественно путем удаления РНК из РНК-ДНК гибридов. Формирует локусы в местах повреждений.	HR [327,328]

DNA- PKcs	Каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы. Вместе с Ku70 и Ku80 инициирует NHEJ-репарацию двуцепочечных разрывов ДНК. Также высказываются предположения о возможном участии DNA-PKcs в репарации однонитевых разрывов ДНК. Показана активация киназы одноцепочечными ДНК <i>in vitro</i> , а также вхождение DNA-PKcs и факторов BER-пути (APEX1, UNG2, XRCC1, Pol β) в единый белковый комплекс.	NHEJ [278,329,330]
FEN1	Флэп-эндонуклеаза 1. Удаляет однонитевые выступающие 5'-концевые участки.	BER [331,332]
H2AX	Репаративный гистон, фосфорилируется DNA-PK и ATM, формируя локусы γ H2AX. В фосфорилированном виде служит платформой для привлечения факторов Mre11, MDC1, RIF1 и 53BP1 к местам двуцепочечных разрывов ДНК	NHEJ, HR [333,334]
HDGFL2	HDGF-подобный белок 2. Эпигенетический регулятор, ридер меток хроматина. Способствует репарации двуцепочечных разрывов ДНК по HR-пути за счет привлечения фактора CtIP.	HR [335]
HMGA1	Регуляторный белок, способствует репарации двуцепочечных разрывов ДНК по NHEJ-пути. Влияет на активацию DNA-PKcs.	NHEJ [336,337]
HMGB1 HMGB2	Регуляторные белки. Способствуют репарации повреждений ДНК по различным путям, преимущественно за счет привлечения факторов репарации к местам повреждений ДНК.	Разнообразные пути репарации [338,339]
HMGN1	Белок группы высокой подвижности с нуклеосом-связывающим доменом 1. Регулятор плотности упаковки хроматина. Конкурирует с гистоном H1 за сайты взаимодействия в нуклеосомах, снижая плотность упаковки хроматина и облегчая доступ факторов репарации к повреждениям, что сказывается на скорости репарации.	Разнообразные пути репарации [340]
HUWE1	Е3-убиквитин лигаза HUWE1. Влияет на разнообразные пути репарации посредством изменения уровня репаративных факторов. Влияет на недимирование DNA-PKcs, регулирую NHEJ-путь.	Разнообразные пути репарации [341–343]
Ku70 Ku80	Ku70 и Ku80, формируют гетеродимер Ku, распознающий двуцепочечные разрывы ДНК и способствующий протеканию NHEJ-пути репарации. Ku70 взаимодействует с полимеразой β , возможно, обеспечивают кросс-толк между NHEJ и BER-путями репарации.	NHEJ [278,344]
LIG3	ДНК-лигаза III. Восстановление целостности ДНК в BER и альтернативном NHEJ-путях.	BER [345]

MCM2- MCM7	Хеликазный комплекс. Иницирует сборку репликативного комплекса в местах повреждений ДНК.	HR [346,347]
MDC1	Медиатор контрольной точки повреждения ДНК 1. Регуляторный белок. Привлекается к местам повреждений ДНК за счет взаимодействия с γ H2AX. Формирует локусы в местах повреждений ДНК. Привлекает к сайтам повреждений MRN-комплекс, RNF8, 53BP1.	HR, NHEJ [348–350]
MORF4L2	Фактор смертности 4-подобный белок 2. Компонент гистон ацетилтрансферазного комплекса NuA4, который ацетирует хвосты гистонов, снижает компактизацию хроматина, облегчая доступ факторов репарации к местам повреждений ДНК.	HR [351–353]
MPG	ДНК-3-метиладенин-гликозилаза. Удаляет поврежденные основания.	BER [354]
MRE11	Компонент MRN комплекса – сенсора двунитевых разрывов ДНК, привлекает ATM, запуская репарацию по HR-пути. Согласно последним исследованиям также может способствовать NHEJ-репарации.	NHEJ, HR [355–357]
MSH2 MSH6	Сенсор неспаренных нуклеотидов.	MMR [358,359]
NONO	Белок, связывающий октамерный мотив, не содержащий ROU-домена. Регуляторный белок. Механизм влияния на репарацию не до конца понятен. Вместе с SFPQ привлекается к двуцепочечным разрывам ДНК, преимущественно, по PARP1-зависимому механизму, способствует активации DNA-РКс и ее автофосфорилированию. Также взаимодействует с рядом NHEJ-факторов, например, XLF. Может замещать XLF в NHEJ-пути.	NHEJ, HR [360–363]
NPM1	Нуклеофозмин 1. Регуляторный белок. Обеспечивает взаимодействие с факторами репарации, например, APX1, в BER-пути. Транслоцируется к местам двуцепочечных разрывов ДНК после фосфорилирования.	BER, NHEJ, HR [364]
NUCKS1	Ядерный субстрат киназы и циклин-зависимой киназы 1. Регуляторный белок. Паралог RAD51AP1, может влиять на функции RAD51.	HR [365,366]
PARP1	Поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1. Связывается с одноцепочечными и двуцепочечными разрывами ДНК, поли-АДФ-рибозилирует белки окружения, способствуя привлечению факторов репарации, а также через модификацию хроматина, его деконденсации.	BER, NHEJ, HR [367,368]
PCNA	Ядерный антиген пролиферирующих клеток. Кофактор разнообразных репарационных	BER, MMR, NHEJ, HR [369,370]

	ферментов. Также взаимодействует с полимеразы, включая репаративные, повышая их процессивность.	
POLB	ДНК-полимераза бета (β). Достройка цепей ДНК. Взаимодействует с элементами BER-пути XRCC1, FEN1, PARP1, а также NHEJ-пути – Ku70, обеспечивая кросс-толк между BER и NHEJ-путем.	BER [344,371]
POLD1	ДНК-полимераза дельта (δ). Достройка цепей ДНК.	Разнообразные пути репарации, включая NHEJ, BER, NER [372]
RAD18	Е3 убиквитин-протеинлигаза RAD18. Убиквитинилирует PCNA способствует транслезионному синтезу ДНК, но основную функцию выполняет в HR, механизм до конца не изучен. Супрессирует привлечение 53BP1 к местам двуцепочечных разрывов ДНК. Рекрутирует SMC5/6 комплекс.	HR [373]
RAD50	Компонент MRN комплекса – сенсора двунитевых разрывов ДНК, привлекает ATM, запуская репарацию по HR-пути. Согласно последним исследованиям также может способствовать NHEJ-репарации.	NHEJ, HR [355–357]
RIF1	Фактор 1 регуляции времени репликации. Регуляторный белок. Привлекается к местам двуцепочечных разрывов ДНК за счет взаимодействия с фосфорилированным 53BP1. Вместе защищают ДНК от избыточной резекции, что способствует сохранению генетической информации.	NHEJ [374]
RNF138	Е3 убиквитин-протеинлигаза RNF138. Стимулирует репарацию двуцепочечных разрывов ДНК по HR-пути, резекцию концов ДНК, путем удаления гетеродимера Ku с мест повреждений.	HR [375]
RUVBL1 RUVBL2	Компонент гистон ацетилазного комплекса NuA4, который ацетирует хвосты гистонов, снижает компактизацию хроматина, облегчая доступ факторов репарации к местам повреждений ДНК.	HR, NHEJ [352,353,376]
SFPQ	Фактор сплайсинга, богатый пролином и глутамином. Регуляторный белок. Механизм влияния на репарацию не до конца понятен. Вместе с NONO привлекается к двуцепочечным разрывам ДНК, преимущественно, по PARP1-зависимому механизму, способствует активации DNA-РКс и ее автофосфорилированию. Также взаимодействует с рядом NHEJ-факторов, например, XLF.	NHEJ, HR [360,377]
STUB1	Белок 1, содержащий U-бокс и гомологичный STIP1. Е3-убиквитинлигаза, деградация белков в	BER и другие [378]

	местах репарации. Регулирует стабильность XRCC1 и POLB.	
SUPT16H SSRP1	Формируют гетеродимерный шапероновый гистонный ФАКТ-комплекс, изменяющий структуру хроматина в местах повреждений ДНК и облегчающий доступ факторов репарации ДНК.	Разнообразные пути репарации [379,380]
TRIM28	Белок 28, содержащий трехсоставной мотив. Влияет на структуру хроматина вблизи повреждений ДНК посредством привлечения белков из семейства HDAC.	NHEJ, HR [314]
UBQLN4	Убиквилин 4. Регулирует репарацию двуцепочечных разрывов ДНК, выступая шаттлом протеасомы. Способствует NHEJ-репарации за счет деградации MRE11, тем самым подавляя HR.	NHEJ [381]
UHRF1	E3 убиквитин-протеинлигаза. Катализирует K63-полиубиквитинилирование XLF, стимулируя привлечение этого фактора к местам двуцепочечных разрывов ДНК и промотируя NHEJ. В S-фазе взаимодействует с BRCA1, катализирует K63-полиубиквитинилирование RIF1, что способствует диссоциации 53BP1 и промотирует HR.	NHEJ, HR [382–384]
USP7	Убиквитин-специфичная протеаза 7. Регулирует уровень XPC - одного из ключевых белков-инициаторов NER.	NER [385]
WRNIP1	Белок 1, взаимодействующий с хеликазой Вернера. WRNIP1 защищает остановившиеся репликационные вилки от деградации, способствует их перезапуску и участвует в репарации межнитевых сшивок ДНК через привлечение комплекса FANCD2/FANCI в рамках пути анемии Фанкони. Может влиять на репарацию двуцепочечных разрывов ДНК, но механизм не установлен.	FA [386,387]
XRCC1	Скаффолд белок, выступающий в роли платформы для привлечения репаративных факторов в BER-пути. Взаимодействует с апратаксином APTX, полимеразой β и ДНК лигазой 3.	BER [388,389]

Среди обнаруженных нами белков наибольшее число участвует в репарации двуцепочечных разрывов ДНК по NHEJ или HR путям. На втором месте идут регуляторные белки, которые могут принимать участие в различных путях репарации, включая NHEJ, HR и другие пути. На третьем месте идут белки из BER-пути репарации однонитевых повреждений ДНК. Другие пути представлены единичными белками: 1 белок из NER-пути, 2 белка – MMR, 1 белок – FA. Стоит отметить, что зачастую один и

тот же белок может принимать участие, в нескольких путях репарации. Это особенно характерно для участников репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Они одновременно могут влиять и на NHEJ-путь, и на HR. Поэтому приведенное распределение белков по путям репарации содержит перекрывающиеся подмножества (Таблица 5).

Стоит обратить особое внимание, что среди факторов репарации двуцепочечных разрывов ДНК мы идентифицировали только те белки, которые инициируют процесс репарации таких повреждений Ku70, Ku80, DNA-PKcs, Mre11, Rad50 [278], а также широкий спектр регуляторных белков, например, HMG1, MDC1, Rif1, SFPQ, NONO, Rad18, RNF138 и UHRF1 [336,337,348–350,360,373–375,377,382–384]. Среди находок отсутствуют белки, необходимые для завершения процесса репарации двуцепочечных разрывов ДНК, например, LigIV, XRCC4, XLF, Artemis, Rad51, ДНК полимеразы λ , μ , η [278].

В случае находок, относящихся к BER-пути, наоборот, мы обнаружили лишь одну ДНК-гликозилазу 3MG, т.е. инициатор этого пути репарации поврежденных оснований. К идентифицированным инициаторам этого пути также относится белок PARP1 (идентифицирован как партнер IN в XL-MS эксперименте), но он не является уникальным для этого пути, поскольку принимает участие и в регуляции репарации двуцепочечных разрывов ДНК [305,367,368]. Что касается других белков, необходимых для корректного протекания этого процесса и его завершения, мы обнаружили практически полный список ферментов, например, APEX1, Fen1, полимеразы β , лигаза III и ее кофактор XRCC1 [390].

Представленность большого числа факторов репарации двуцепочечных разрывов ДНК в результатах наших экспериментов можно было бы объяснить присутствием в трансдуцированных клетках линейной неинтегрированной кДНК, концы которой могут являться субстратом для привлечения таких факторов. Но на наш взгляд, вероятность этого невелика, т.к. концы кДНК защищены белками прединтеграционного комплекса, а если они по какой-то причине были удалены, то в нашем эксперименте будет невозможно их идентифицировать, поскольку предложенный ChIP-MS подход подразумевает преципитацию только комплексов, содержащих IN.

Несмотря на эти теоретические рассуждения, мы решили проверить это предположение экспериментально. Для этого мы проанализировали представленность указанных в таблице 5 факторов репарации ДНК в результатах ChIP-MS из клеток, трансдуцированных вектором ВИЧ_E152A, который содержит каталитически

неактивную форму IN (Рис. 44). При обработке клеток таким вектором формируется вирусная кДНК, она транспортируется в ядро, но она не может интегрироваться [293]. Как видно из результатов, представленных на рисунке 44 практически все идентифицированные нами белки значительно хуже преципитируются с комплексами IN-LTR при трансдукции клеток вектором ВИЧ_E152A, чем при трансдукции ВИЧ_wt. Исключение составляют белки MCM3, H2AX, XRCC1, DDB1, DDX1, HMGB1, 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.

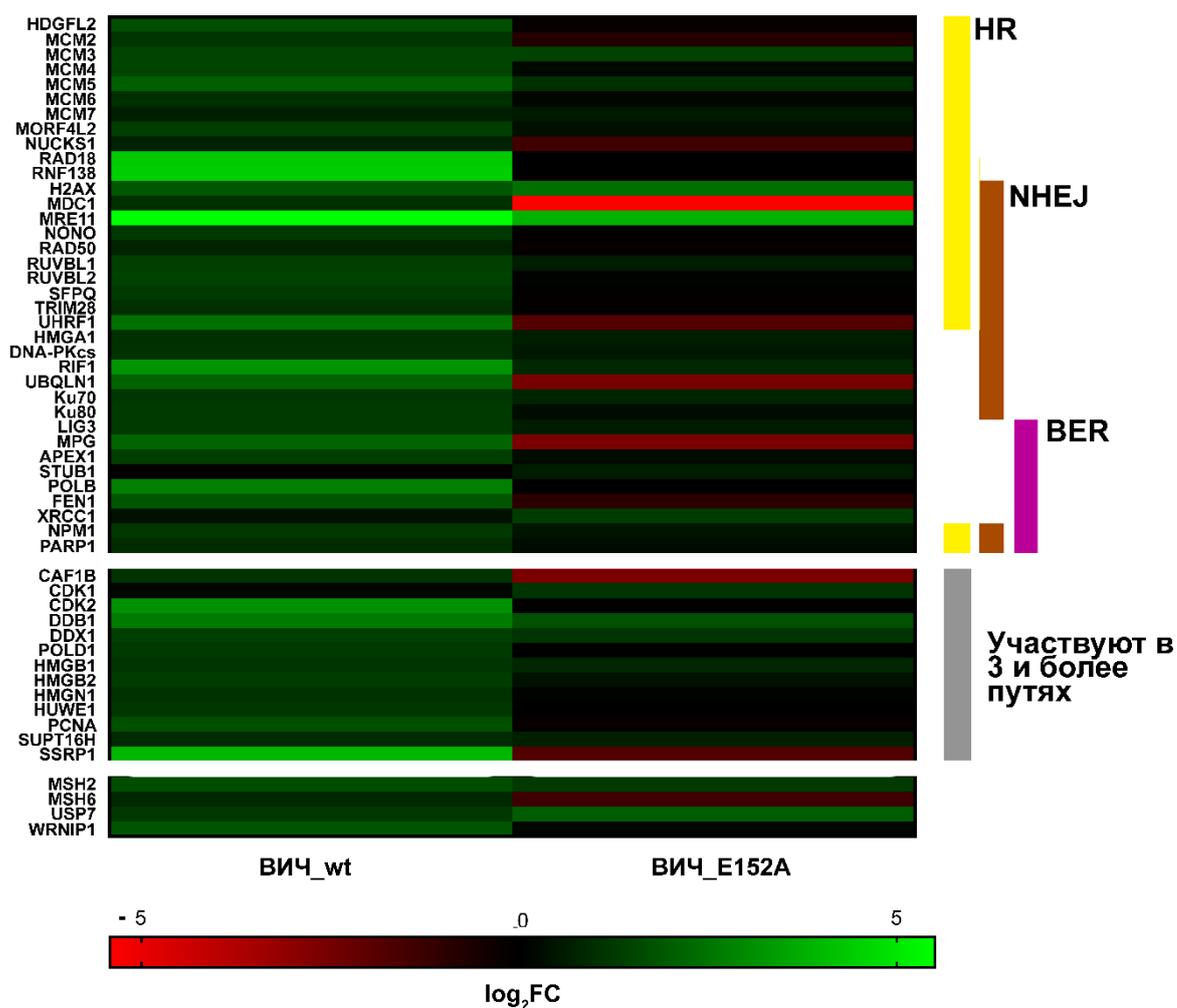


Рисунок 44. Обогащение белков из систем репарации, обнаруженных в результате ChIP-MS эксперимента с использованием антител к IN. Цветовая шкала отображает логарифм по основанию 2 от степени обогащения белков относительно контрольного образца – нетрансдуцированных лентивирусными векторами клеток.

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

Интеграционный интермедиат ВИЧ-1, как мы отмечали выше, во многом похож на промежуточный продукт BER-пути (Рис. 7), 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 этих путей репарации влияют на репликацию ВИЧ-1, например, Fen1 и полимераза β [7]. 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 [7,284], а в наших работах мы напрямую продемонстрировали, что они важны именно на этапе постинтеграционной репарации [8,15]. 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 мы обнаружили только инициаторные и регуляторные белки, но не ферменты, необходимые для восстановления целостности ДНК, а в случае участников BER-пути, наоборот, в основном ферменты, участвующие в репарации повреждений ДНК, можно предположить, что в постинтеграционной репарации ВИЧ-1 идентифицированные факторы репарации двуцепочечных разрывов ДНК функционируют лишь на первых этапах процесса, а компоненты BER-пути непосредственно завершают процесс репарации. 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 (Рис. 7).

Согласно имеющимся сегодня данным интеграция ретровирусов, включая ВИЧ-1, происходит не случайным образом. На глобальном уровне интеграция преимущественно происходит в активно-транскрибируемые области генома, но существуют и более локальные факторы, влияющие на эффективность интеграции. В ряде работ показано предпочтительное встраивание ретровирусной кДНК в клеточную ДНК именно в составе нуклеосом [391–396].

В 2019 году для прототипного пенообразующего вируса (prototype foamy virus, PFV), родственного ВИЧ-1, была получена структура комплекса IN/концевые фрагменты кДНК/нуклеосома [396]. Для их получения комплексы IN с двуцепочечными ДНК субстратами, имитирующими концы вирусной кДНК после завершения 3'-процессинга, инкубировали с нуклеосомами в присутствии ионов магния. Это позволяло IN осуществить вторую реакцию – перенос цепи [396]. Таким образом в полученной структуре фрагменты кДНК уже интегрированы в состав нуклеосомной ДНК, но возникшие повреждения ДНК еще не репарированы.

Мы решили проанализировать эту структуру в свете особенностей строения интеграционного интермедиата. Мы обнаружили, что продукт интеграции вирусной кДНК в нуклеосомную ДНК остается в комплексе с IN, и, более того, несмотря на внесение разрывов в обе цепи нуклеосомной ДНК на расстоянии четырех нуклеотидов, эти цепи не расходятся. Гетероциклические основания двух цепей в участке ДНК между разрывами, по-прежнему, формируют контакты как между цепями (водородные связи), так и с соседними основаниями (π -стэкинг). По всей видимости, гистоновые белки и сама IN стабилизируют контакты гетероциклических оснований между разрывами и не позволяют разойтись цепям (Рис. 45, А). Интересно, что в структуре еще одного комплекса – интеграционного интермедиата вируса саркомы Рауса (RSV), являющегося также ретровирусом, мы обнаружили сохранение аналогичной топологии ДНК, несмотря на то, что этот комплекс получен без гистонов (Рис. 45, Б).

В случае IN ВИЧ-1 нуклеофильная атака фосфодиэфирных связей происходит на расстоянии не 4, а 5 нуклеотидов [320], что тем более не будет позволять цепям расходиться и формировать топологию интеграционного интермедиата, изображенного на рисунке 7. Таким образом, интеграционный интермедиат сразу после интеграции просто не может быть напрямую распознан и репарирован ферментами BER-пути, как и компонентами путей репарации других повреждений ДНК. Однако можно предположить, что такой интеграционный интермедиат может переходить в линейную форму, изображенную на рисунке 7 после удаления гистоновых белков или локальной перестройки хроматина.

Известно, что активация DNA-PKcs и ATM при возникновении двуцепочечных разрывов ДНК приводит к существенным перестройкам хроматина вблизи мест повреждений, что облегчает доступ факторов репарации к концам ДНК [397,398]. Основную роль в этом процессе играет именно фосфорилирующая активность двух киназ, благодаря которой происходит фосфорилирование гистона H2AX и фактора

ремоделирования хроматина TRIM28 [397]. При этом фосфорилированная форма H2AX служит для привлечения широкого спектра факторов ремоделирования хроматина [399–402].

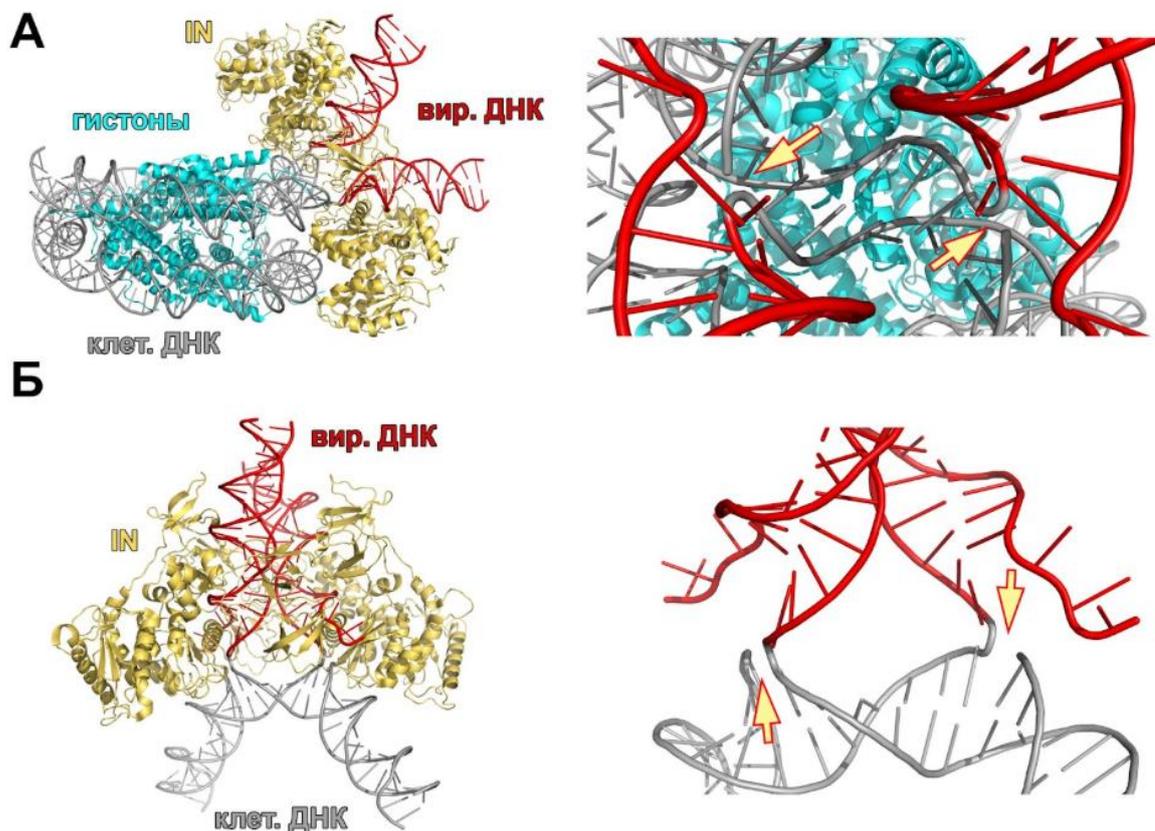


Рисунок 45. Структуры интеграционных интермедиатов ретровирусов. А – продукт интеграции синтетического субстрата, имитирующего концы вирусной ДНК (отмечен красным), в клеточную ДНК (отмечена серым) в составе нуклеосомы интегразой прототипного пенообразующего вируса (PDB ID: 6RNY). Слева приведен общий 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).

В списке идентифицированных нами белков присутствует ряд факторов репарации, которые влияют на структуру хроматина (Таблица 5). К ним относятся:

1. PARP1 – в активированном состоянии в местах повреждений ДНК парилирует гистоны, что приводит к деконденсации хроматина, а также эта модификация служит платформой для привлечения других факторов ремоделирования хроматина [305];

2. HMGN1 – нуклеосом-связывающий белок, регулятор плотности упаковки хроматина. Конкурирует с гистоном H1 за сайты взаимодействия в нуклеосомах, снижая плотность упаковки хроматина и облегчая доступ факторов репарации к повреждениям, что сказывается на скорости репарации [340,403];
3. SPT16 и SSRP1 – компоненты гетеродимерного FACT-комплекса, выполняющего роль шаперона гистонов. Во время репарации ДНК временно удаляет гистоновые белки, обеспечивая доступ факторов репарации к местам повреждений ДНК [379];
4. MO4L2, RuvB1, RuvB2 - компоненты NuA4 комплекса, который ацетилюет гистон H2A и H4 и ремоделирует хроматин за счет АТФазной активности. Привлекается к местам повреждений ДНК за счет фосфорилированной формы H2AX, способствует деконденсации хроматина [351–353].

Суммируя все вышесказанное, можно предложить следующую модель постинтеграционной репарации. Интеграционный интермедиат, формирующийся при встраивании 3'-концов цепей вирусной кДНК в нуклеосомную клеточную ДНК, представляет собой уникальную структуру ДНК, которая по своей топологии сразу после интеграции не напоминает ни фрагмент ДНК с двуцепочечными разрывами, ни промежуточные продукты ВЕР-пути. За счет наличия гистоновых белков, а также IN такая структура стабилизирована, а повреждения ДНК замаскированы этими белками. В связи с этим вирус использует уникальный механизм инициации постинтеграционной репарации, ключевую роль в котором играют белки из систем клеточного ответа на двуцепочечные разрывы ДНК, а именно киназы АТМ и DNA-РК. Привлечение к интеграционному интермедиату этих киназ и их активация в условиях отсутствия двуцепочечных разрывов ДНК происходит за счет вирусного фермента IN, которая взаимодействует с одной из субъединиц DNA-РК – белком Ku70. Киназная активность этих ферментов в первую очередь необходима для модификации микроокружения повреждения, например, фосфорилирования гистона H2AX, что стимулирует привлечение факторов ремоделирования хроматина и, по всей видимости, приводит к деконденсации хроматина, в том числе и разборке нуклеосомы, стабилизирующей необычную топологию интеграционного интермедиата. В ходе этого процесса происходит перестройка топологии интеграционного интермедиата, что делает его похожим на промежуточный продукт ВЕР-пути, который теперь может быть восстановлен классическими ферментами этого пути.

4.2.5. PARP1 и Fen1 из систем репарации однонитевых повреждений ДНК важны 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 модельных белков были выбраны PARP1 и Fen1.

PARP1 согласно результатам XL-MS эксперимента взаимодействует с суперэкспрессированной IN, а согласно результатам ChIP-MS эксперимента привлекается к интеграционному интермедиату ВИЧ-1 при трансдукции клеток НЕК293Т лентивирусным вектором на основе генома ВИЧ-1. Хотя сам PARP1 не обладает каталитическими функциями, необходимыми непосредственно для восстановления целостности ДНК, его участие в клеточных системах ответа на повреждения ДНК определяется его способностью парилировать микроокружение повреждения, что необходимо для изменения структуры хроматина и привлечения ряда ферментов, которые уже и восстанавливают повреждение [306].

Мы решили оценить, как ингибитор парилирующей активности – олапариб, повлияет на эффективность постинтеграционной репарации. Для этого клетки НЕК293Т трансдуцировали псевдовиром ВИЧ_wt в присутствии возрастающей концентрации олапариба. На первом этапе мы оценили эффект олапариба на общую эффективность трансдукции клеток псевдовиром. Мы обнаружили, что олапариб дозозависимо снижает продукцию люциферазы в таких клетках (Рис. 46, А). Стоит отметить, что олапариб в меньшей степени влияет на псевдовиром ВИЧ_mut, у которого нарушена постинтеграционная репарация за счет неспособности мутантной формы IN взаимодействовать с Ku70, что косвенно указывает на влияние олапариба именно на этапе постинтеграционной репарации (Рис. 46, Б).

Наблюдаемый нами эффект снижения продукции люциферазы в присутствии олапариба в случае ВИЧ_wt может объясняться его влиянием на ранние этапы репликации ВИЧ-1, включая обратную транскрипцию, интеграцию и постинтеграционную репарацию, или же быть связан с его действием на транскрипцию трансгена, т.к. известно, что PARP1 участвует не только в репарации повреждений ДНК, но и регулирует клеточную транскрипцию [404]. Чтобы исключить эффект олапариба на транскрипцию трансгена с интегрированного провируса, мы получили клеточную

линию со стабильно интегрированным геномом псевдовируса ВИЧ_wt. Олапариб влиял на продукцию люциферазы в такой клеточной линии, но в меньшей степени (Рис. 46, А). Следовательно, при совместном добавлении псевдовируса и ингибитора мы наблюдаем снижение продукции люциферазы, вызванное как эффектом ингибитора на транскрипцию трансгена, так и на ранние этапы репликации ВИЧ-1.

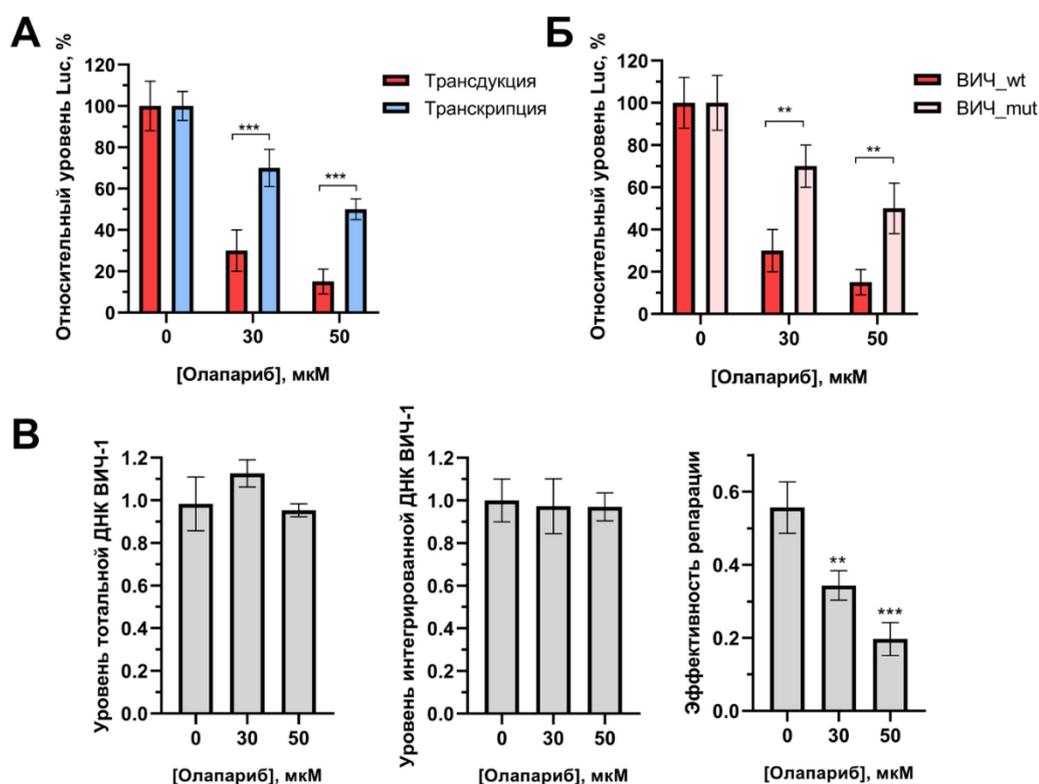


Рисунок 46. Парилирующая активность белков семейства PARP важна для постинтеграционной репарации ВИЧ-1. А – ингибитор парилирующей активности PARP1 и PARP2 снижает эффективность трансдукции клеток НЕК293Т псевдовирусом на основе генома ВИЧ-1 и в меньшей степени влияет на эффективность транскрипции гена люциферазы светлячка на модели стабильно интегрированного псевдовируса. Б – влияние олапариба на трансдукцию клеток НЕК293Т псевдовирусом 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 постинтеграционную репарацию (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.

Мы решили оценить эффективность протекания ранних этапов репликации ВИЧ-1 в присутствии олапариба. Для этих целей клетки НЕК293Т трансдуцировали

псевдовиром ВИЧ_wt в присутствии возрастающей концентрации олапариба, а через 20 часов из них выделяли ДНК и проводили измерение тотальной, интегрированной и репарированной формы ДНК ВИЧ-1 методами описанными в работах [6,275]. Мы обнаружили, что олапариб практически не влияет на обратную транскрипцию и интеграцию, а его действие на псевдовиром обусловлено именно нарушением постинтеграционной репарации (Рис. 46, В).

Поскольку олапариб влияет на парилирующую активность не только PARP1, но и PARP2 [405], по результатам этих экспериментов мы не можем с уверенностью утверждать, что парилирующая активность только PARP1 важна для постинтеграционной репарации ВИЧ-1, но из полученных результатов становится понятно, что как без активации киназ АТМ и DNA-РК, так и без парилирующей активности белков из семейства PARP невозможна эффективная постинтеграционная репарация.

В качестве второго белка для проверки нашей гипотезы была выбрана флэп-эндонуклеаза Fen1, которая удаляет 5'-выступающие концы ДНК при репарации одностранных повреждений ДНК [332]. В структуре интеграционного интермедиата присутствуют 5'-концевые неспаренные динуклеотиды (Рис. 7), в процессинге которых для успешной постинтеграционной репарации как раз и может принимать участие Fen1. В ранних работах было показано *in vitro*, что Fen1 действительно может распознавать структуру интеграционного интермедиата и удалять 5'-концевые выступающие динуклеотиды [406].

Для оценки влияния Fen1 на ранние этапы репликации ВИЧ-1 нами была получена клеточная линия НЕК293Т_shFen с нокдауном целевого гена, а также контрольная клеточная линия НЕК293Т_shCntr. Уровень мРНК Fen1 в клетках НЕК293Т_shFen был в 2,5 раза ниже, чем в контрольной клеточной линии (Рис. 47, А). Эффективность трансдукции клеток НЕК293Т_shFen вектором ВИЧ_wt составляла 55 % от значений, полученных в контрольных клетках, что говорит о положительном эффекте Fen1 на ранние этапы репликации ВИЧ-1 (Рис. 47, Б). Более детальный анализ показал, что при нокдауне Fen1 снижается эффективность постинтеграционной репарации (Рис. 47, В), а значит, Fen1 важен для корректного восстановления повреждений ДНК, возникающих в ходе интеграции.

Таким образом, проведенные нами эксперименты подтверждают нашу гипотезу о совместном действии факторов репарации двуцепочечных разрывов ДНК и факторов

репарации одностранных повреждений ДНК в процессе постинтеграционной репарации ВИЧ-1.

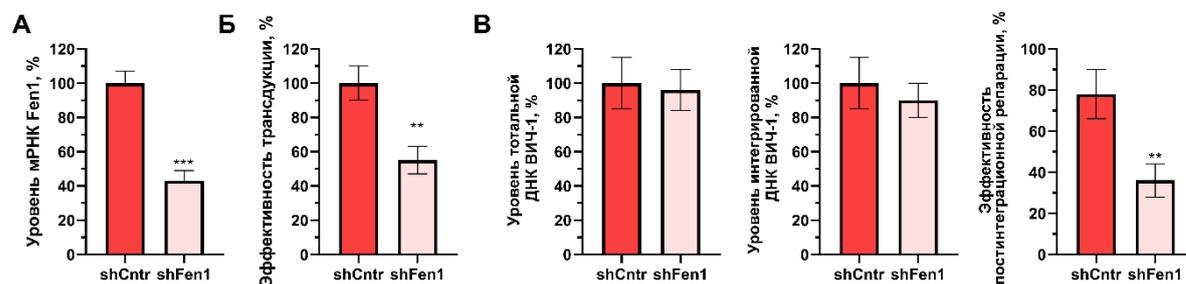


Рисунок 47. Флэп-эндонуклеаза Fen1 участвует в постинтеграционной репарации ВИЧ-1. А – уровень экспрессии мРНК гена *Fen1* в клетках НЕК293Т, экспрессирующих малую шпилечную РНК к *Fen1* (shFen) по сравнению с контрольной клеточной линией (shCntr). Б – оценка эффективности трансдукции клеток shFen1 по сравнению с shCntr псевдовиром ВИЧ_wt. В – эффект нокадауна *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.

Заключение к разделу 4.2

В результате проведенной работы нам удалось идентифицировать ряд клеточных белков из систем клеточного ответа на повреждения ДНК, которые взаимодействуют с IN или привлекаются к местам повреждений ДНК, возникающих в ходе интеграции. Такие белки можно рассматривать в качестве потенциальных участников постинтеграционной репарации ВИЧ-1.

Большинство идентифицированных в ходе ChIP-MS эксперимента факторов можно разделить на две основные группы: белки из систем репарации двуцепочечных разрывов ДНК и белки эксцизионной репарации оснований. Интересно, что белки из первой группы были представлены лишь инициаторными и регуляторными факторами из систем репарации двуцепочечных разрывов, но не ферментами, восстанавливающими двуцепочечные разрывы ДНК. Напротив, среди белков из BER-пути в основном присутствовали ферменты, завершающие процесс репарации, а также один из ключевых регуляторов этого пути – белок PARP1. Интересно, что PARP1 нами был идентифицирован в эксперименте по ко-иммунопреципитации белков, ассоциированных с суперэкспрессированной IN, т.е. PARP1 может напрямую или через

белки-посредники формировать комплекс с IN даже в том случае, если она не ассоциирована с интеграционным интермедиатом.

Несмотря на то, что двуцепочечные разрывы отсутствуют в интеграционном интермедиате ВИЧ-1, факт участия факторов репарации таких повреждений ДНК в постинтеграционной репарации ВИЧ-1 нами был доказан в ходе текущей работы. Мы показали, что как DNA-РК, так и АТМ важны для постинтеграционной репарации ВИЧ-1, а их привлечение и активация на интеграционном интермедиате ВИЧ-1 напрямую зависит от способности вирусной IN формировать комплекс с одной из субъединиц DNA-РК – белком Ku70. В связи с этим представленность широкого спектра инициаторных и регуляторных белков из систем репарации двуцепочечных разрывов ДНК в полученных результатах не удивляет.

С другой стороны, очевидно, что ферменты, восстанавливающие целостность ДНК с двуцепочечным разрывом, физически не могут репарировать интеграционный интермедиат ВИЧ-1. Его сходство с промежуточным продуктом BER-пути, наоборот, указывает на то, что именно ферменты из этого пути могут принимать участие в репарации интеграционного интермедиата. Такие ферменты, а также регулятор этого пути (PARP1) и были обнаружены в результате ChIP-MS эксперимента. В ходе последующих экспериментов мы доказали, что для успешной постинтеграционной репарации ВИЧ-1 действительно важна парилирующая активность белков из семейства PARP, а также фермент Fen1. Таким образом, для успешной постинтеграционной репарации необходимо действие как факторов репарации двуцепочечных разрывов ДНК, так и компонентов BER-пути.

Анализ структуры интеграционного интермедиата родственного ВИЧ-1 ретровируса – PFV, продемонстрировал, что непосредственно после интеграции 3'-концов вирусной кДНК в нуклеосомную клеточную ДНК интеграционный интермедиат содержит в своем составе «замаскированные» интегразой и стабилизированные гистоновыми белками и интегразой повреждения ДНК (Рис. 45), что делает невозможным прямое распознавание повреждений факторами BER-пути. Интеграция ВИЧ-1 отличается от PFV тем, что нуклеофильная атака 3'-гидроксильных групп, расположенных на концах вирусной кДНК, происходит в обе цепи клеточной ДНК на расстоянии пяти, а не четырех нуклеотидов, следовательно, оба интеграционных интермедиата имеют схожую структуру. 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-PK и киназу ATM. За счет фосфорилирующей активности эти белки 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.

Раздел 4.3. Разработка ингибитора взаимодействия интегразы ВИЧ-1 и клеточного белка Ku70

Постинтеграционная репарация ВИЧ-1 является критически важным этапом репликации вируса со сложным механизмом регуляции, требующим привлечения большого числа факторов из, как минимум, двух клеточных систем репарации ДНК. Из приведенных в предыдущих двух главах результатов становится понятно, что ключевую роль в инициации и регуляции этого процесса играет комплекс вирусной IN и клеточного белка Ku70. Нарушение взаимодействия между ними, например, путем введения в состав IN мутаций E212A/L213A, не позволяет корректно инициировать процесс постинтеграционной репарации, что указывает на принципиальную возможность создания ингибиторов постинтеграционной репарации ВИЧ-1. Такие соединения должны предотвращать образование комплекса между IN и Ku70, нарушая самые первые этапы постинтеграционной репарации. В этой главе мы сосредоточились на создании таких соединений.

4.3.1. Флуоресцентная система для поиска ингибиторов взаимодействия IN и Ku70

Для эффективного поиска ингибиторов взаимодействия IN и Ku70 требуется удобный подход для скрининга соединений-кандидатов. Одним из наиболее распространенных методов для исследования белок-белковых взаимодействий и поиска их ингибиторов является классический метод соосаждения белков на аффинном сорбенте с последующим количественным определением соосажденного целевого белка с белком-мишенью.

В качестве такого последующего анализа можно использовать метод вестерн-блоттинга после разделения белков в ПААГ по Лэммли с использованием антител к исследуемому белку [277]. Благодаря использованию антител, этот метод позволяет детектировать небольшие количества целевого белка, что повышает точность анализа. К сожалению, производительность такого метода сильно ограничена необходимостью проведения разделения белков в геле, переноса их на мембрану и проведения вестерн-блот анализа. К тому же этот подход еще и является относительно дорогим, т.к. подразумевает использование антител к исследуемым белкам.

Существуют и другие подходы анализа белок-белковых взаимодействий и поиска их ингибиторов, например, метод AlphaScreen [407], но для его реализации

требуется использование дорогостоящих специализированных донорных и акцепторных смол, а также специализированных приборов, что также, на наш взгляд, является существенным ограничением для применения этого метода.

Более дешевой альтернативой вышеописанным методам могут быть подходы, с использованием генетически-закодированных флуоресцентных меток. Этот принцип лежит в основе метода исследования белок-белковых взаимодействий с использованием флуоресценции FluorIA (fluorescence-based protein-protein interaction assay). Он подразумевает иммобилизацию белка-мишени на поверхности планшета с последующей инкубацией с флуоресцентно-меченым целевым белком [408]. Однако, на наш взгляд, такой подход также сопряжен с рядом трудностей, основная из которых – неспецифичная сорбция белка и небольшая площадь поверхности лунки планшета, что ограничивает количество иммобилизуемого белка-мишени и, как следствие, осложняет детекцию целевого белка из-за низких сигналов флуоресценции.

Мы предложили использовать новый метод, представляющий собой синтез классического подхода по соосаждению белков на аффинном сорбенте, но для детекции как белка-мишени, так и целевого белка использовать генетически закодированные флуоресцентные метки, как в случае метода FluorIA. За счет иммобилизации белков на аффинном сорбенте решается проблема низкого количества детектируемых белков, присущая методу FluorIA, а введение флуоресцентных меток в состав белков позволяет отказаться от необходимости использования антител для их детекции. В нашем подходе мы также предлагаем использовать два флуоресцентных довеска, как на белке-мишени, так и на целевом белке, что должно дополнительно повысить точность анализа за счет введения нормировки сигнала от целевого белка на количество белка-мишени в образце (Рис. 48).

Для создания такой системы мы предложили внедрить в состав GST-тагированной IN (GST-IN) и His₆-тагированного Ku70 (His₆-Ku70) флуоресцентные белки (Рис. 48). В качестве флуоресцентных довесков мы выбрали белки turbo RFP (tRFP) и monomeric Cerulean (mCer), т.к. они удовлетворяют нескольким важным критериям: минимальное перекрытие спектров испускания и возбуждения, сравнимая яркость довесков, а также отсутствие возможности образования гетеродимеров между двумя флуоресцентными белками [11].

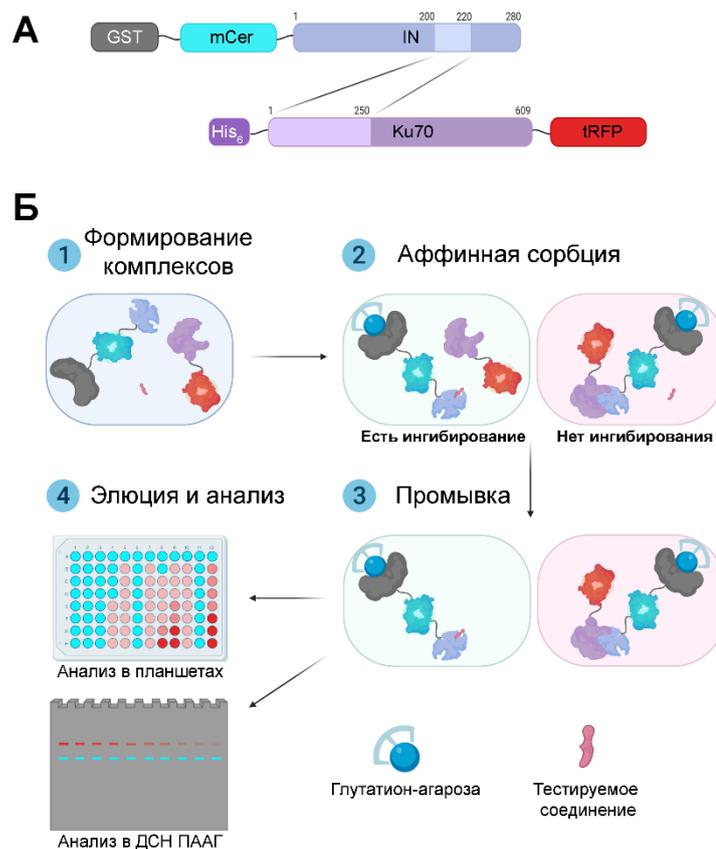


Рисунок 48. Общая схема принципа работы флуоресцентного метода поиска ингибиторов взаимодействия IN и Ku70 *in vitro*. А – Структура рекомбинантных химерных белков GST-mCer-IN и His₆-Ku70-tRFP, использованных для поиска таких ингибиторов. Б – Схема проведения эксперимента по тестированию целевых соединений на предмет их способности нарушать взаимодействие между IN и Ku70. На первом этапе химерные белки GST-mCer-IN и His₆-Ku70-tRFP, а также тестируемые соединения смешиваются в одной реакционной смеси. После инкубации в течение 1 часа к реакционным смесям добавляют аффинный сорбент – глутатион агарозу, что позволяет сорбировать на ее поверхности GST-mCer-IN и комплексы GST-mCer-IN/His₆-Ku70-tRFP. После отмывки смолы от несвязавшихся белков свободную GST-mCer-IN и ее комплексы элюируют, проводят анализ флуоресценции в планшетах или в геле для оценки количества сосажденного His₆-Ku70-tRFP.

Для минимизации возможного эффекта положения флуоресцентного довеска на способность исследуемых белков формировать комплекс *in vitro* в случае IN мы разместили mCer-довесок между GST и IN, т.е. на N-конце IN, т.к. сайт взаимодействия с Ku70 расположен в C-концевой части белка, а в случае Ku70 довесок tRFP, наоборот, был размещен на C-конце белка, т.к. сайт взаимодействия с IN в составе Ku70 как раз находится в N-концевом домене [277] (Рис. 48). Нами были получены конструкции для прокариотической экспрессии белков GST-mCer-IN и His₆-Ku70-tRFP и сами белки (Рис. 49, А).

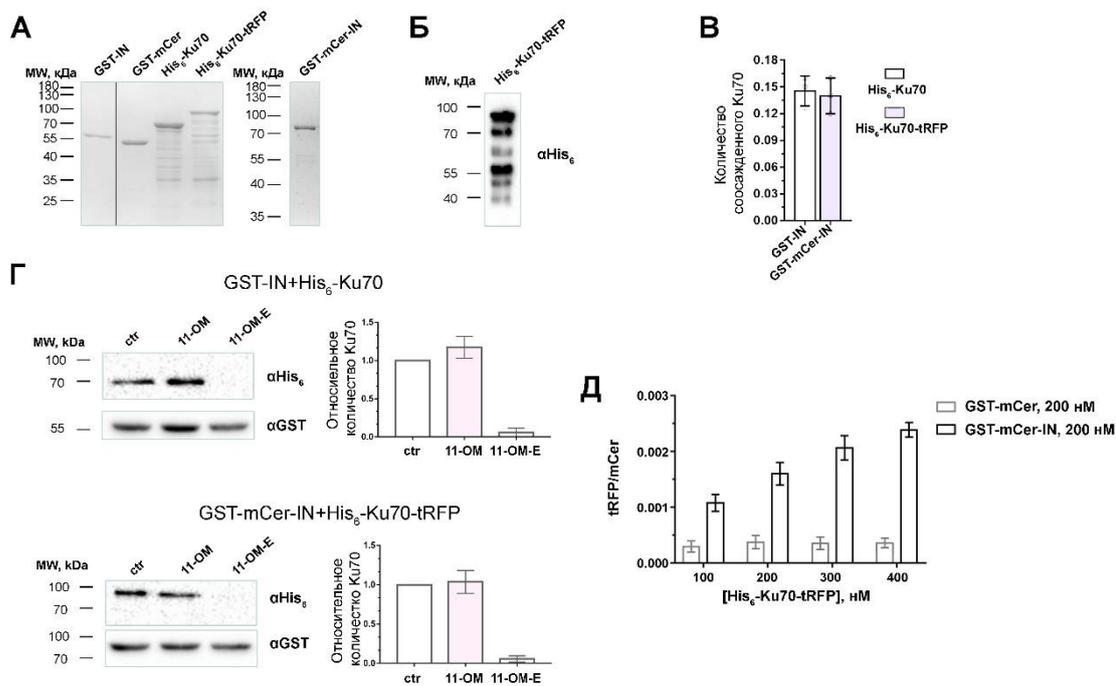


Рисунок 49. Разработка и апробация флуоресцентного метода поиска ингибиторов взаимодействия IN с Ku70. А – анализ чистоты рекомбинантных белков GST-IN, GST-mCER, GST-mCer-IN, His₆-Ku70 и His₆-Ku70-tRFP, использованных для валидации разрабатываемой тест-системы. Б – вестерн-блот анализ чистоты His₆-Ku70-tRFP с использованием антител к His₆-тэгу. В – анализ сосаждения исходных и химерных вариантов IN и Ku70, слитых с флуоресцентными довесками, методом сосаждения с IN на глутатион-агарозе. Г – анализ сосаждения His₆-Ku70-tRFP с GST-mCer-IN или His₆-Ku70 с GST-IN на глутатион-агарозе в присутствии 1 мкМ 11-ОМ или 11-ОМ-Е. Д – His₆-Ku70-tRFP дозозависимо сосаждается с GST-mCer-IN, но не с GST-mCER на глутатион-агарозе.

Чистота белка GST-mCer-IN составляла порядка 80-90 % (Рис. 49, А), т.е. введение флуоресцентного довеска не повлияло на стабильность IN. В то же время чистота препарата His₆-Ku70-tRFP составляла всего лишь 35-45 %, однако это не было обусловлено введением флуоресцентного довеска, а, скорее, особенностями поведения самого Ku70 при экспрессии в *E. coli*, т.к. чистота His₆-Ku70, выделенного в аналогичных условиях была сравнима (Рис. 49, А) [11].

Ранее мы отмечали, что при экспрессии GST-Ku70 в *E. coli* он подвергается протеолитическому расщеплению на этапе наработки в клетках, и целевой препарат белка загрязнен преимущественно N-концевым фрагментом белка с 1 по 319 а.о. [277]. В случае His₆-Ku70-tRFP мы наблюдаем аналогичную картину: совыделяющиеся с полноразмерным белком примеси проявляются антителами к His₆-тэгу,

расположенному на N-конце белка Ku70, т.е. все они являются N-концевыми фрагментами этого белка (Рис. 49, Б). К сожалению, дополнительная очистка полученного препарата с помощью гель-фильтрационной хроматографии в неденатурирующих условиях не повышает содержания полноразмерного белка в препарате, возможно, из-за гомодимеризации белка [277]. Поскольку флуоресцентный довесок, детекция которого и будет происходить в нашем методе, содержится только в полноразмерном белке, мы решили продолжить разработку нашей системы [11].

Как отмечалось выше, введение столь массивных довесков, как флуоресцентные белки, может создавать стерические затруднения для образования комплекса двух белков. Мы проверили, способны ли такие модифицированные белки GST-mCер-IN и His₆-Ku70-tRFP классическим методом соосаждения белков. В качестве референса мы использовали аналогичные белки, но без флуоресцентных довесков, т.е. GST-IN и His₆-Ku70. Из рисунка 49, В видно, что модифицированные версии белков формируют комплекс также эффективно, как и исходные варианты белков.

В качестве дополнительной проверки мы решили протестировать в нашей системе ранее описанный нами ингибитор взаимодействия IN и Ku70 – конъюгат 11-звенного олигонуклеотида с эозином-У (11-ОМ-Е). Данное соединение взаимодействует с IN, закориваясь в молекуле белка за счет взаимодействия эозина-У с С-концевым доменом IN, а олигонуклеотидной частью экранирует аминокислотные остатки E212 и L213, важные для взаимодействия с Ku70. Аналогичная молекула, но без эозина-У (11-ОМ), не способна предотвращать взаимодействие между исследуемыми белками [277]. Для начала мы оценили влияние 11-ОМ-Е и 11-ОМ на способность His₆-тагированных Ku70 и Ku70-tRFP соосаждаться с GST-тагированной IN и mCер-IN стандартным методом соосаждения на глутатион-агарозе с последующей оценкой количества совыделяющихся белков Вестерн-блоттингом (Рис. 49, Г). 11-ОМ-Е полностью блокировал взаимодействие как исходных белков (His₆-Ku70 и GST-IN), так и модифицированных версий белков (His₆-Ku70-tRFP и GST-mCер-IN), а 11-ОМ не нарушал взаимодействие белков. Таким образом, наш эксперимент подтвердил, что введение флуоресцентных довесков в исследуемые белки не влияет на их способность корректно взаимодействовать *in vitro* [11].

Предлагаемый подход поиска ингибиторов белок-белковых взаимодействий может быть реализован в формате высокопроизводительного скрининга соединений с

использованием планшетов или же в формате классического соосаждения белков в пробирках. В первом случае смесь белков и тестируемого соединений инкубируется с глутатион сефарозой в 96-луночных спин-планшетах, несвязавшиеся белки удаляют отмывкой буфером, а целевые – элюируют в 96-луночные планшеты и измеряют флуоресценцию mCet и tRFP. Соотношение сигналов tRFP к mCet отражает эффективность формирования комплекса белков GST-mCet-IN/His₆-Ku70-tRFP. В качестве контроля для нормировки полученных значений следует использовать соотношение сигналов для образца, в котором не добавлялись тестируемые соединения. В качестве отрицательного контроля – образец, в котором с His₆-Ku70-tRFP инкубируется GST-mCet вместо GST-mCet-IN. На рисунке 49, Д представлены результаты соосаждения His₆-Ku70-tRFP с GST-mCet-IN и GST-mCet, полученные по выше описанной методике. Соотношение сигнала tRFP/mCet возрастает по мере увеличения концентрации His₆-Ku70-tRFP при инкубации с GST-mCet-IN, но не GST-mCet, что еще раз подтверждает специфичность детектируемого сигнала [11].

В ходе проведения экспериментов мы также заметили, что, если исследуемое соединение обладает собственной флуоресценцией и его спектры возбуждения и испускания перекрываются с mCet или tRFP, это может существенно влиять на соотношение исследуемых сигналов, внося ошибку в измерения, поэтому для корректного определения ингибирующего действия подобных соединений требуются дополнительные манипуляции для минимизации вклада их флуоресценции в результирующий сигнал [11].

Из работы [409] известно, что многие флуоресцентные белки не теряют своей флуоресценции в присутствии денатурирующих агентов, таких как ДСН, если дополнительно не проводится тепловая денатурация белка. Мы решили использовать эту особенность в своих целях и предложили еще одну модификацию метода, которая позволяет изучать потенциальные ингибиторы белок-белкового взаимодействия, обладающие собственной флуоресценцией. В этом случае белки со смолы элюируют стандартным буфером для нанесения на гель, содержащим ДСН, но не подвергаются тепловой денатурации. Затем белки разделяют в ДСН-ПААГ по Лэммли и уже только после этого проводят анализ флуоресценции в геле. В ходе проведения геле-электрофореза тестируемые вещества и белки разделяются, что снижает погрешность измерения флуоресценции от белков [11].

Для начала нам было необходимо убедиться, что используемые нами флуоресцентные довески сохраняют флуоресценцию при таком способе пробоподготовки. На рисунке 50 (А, Б) продемонстрирована зависимость флуоресцентного сигнала mCer и tRFP от количества нанесенного на гель белка GST-mCer-IN или His₆-Ku70-tRFP, соответственно. Вплоть до 40 пмоль белка (максимально протестированная концентрация) флуоресценция линейно зависит от количества белка [11].

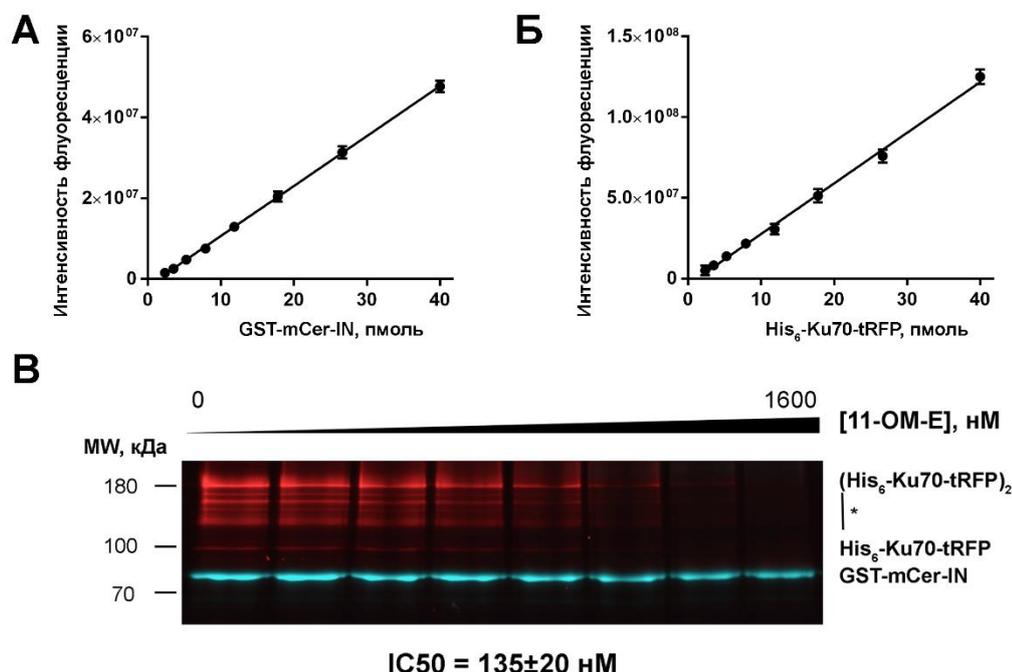


Рисунок 50. Химерные белки GST-mCer-IN и His₆-Ku70-tRFP сохраняют флуоресценцию в геле, что позволяет использовать ДСН-ПААГ в качестве финального метода анализа количества соосажденных белков. А, Б – зависимость флуоресцентного сигнала GST-mCer-IN (А) и His₆-Ku70-tRFP (Б) от количества нанесенного белка при анализе в ДСН-ПААГ.

В ходе проведения этого эксперимента мы также обратили внимание, что His₆-Ku70-tRFP, в отличие от GST-mCer-IN, в геле идет несколькими полосами, расположенными в зоне от 100 до 180 кДа (Рис. 50, В). Наименее слабая по флуоресценции полоса с подвижностью около 100 кДа соответствует мономеру His₆-Ku70-tRFP. Наиболее яркая полоса с подвижностью около 180 кДа соответствует димеру этого белка. Также мы обнаружили ряд дополнительных полос с промежуточной подвижностью между мономером и димером и предполагаем, что это продукты димеризации полноразмерного His₆-Ku70-tRFP и его N-концевых продуктов

деградации, совыделяющиеся вместе с ним. Наблюдаемая особенность поведения белка может объясняться его неполной денатурацией, т.к. в нашем протоколе отсутствует этап тепловой денатурации белка. Если ее проводить, белок теряет флуоресценцию, однако, в таких условиях при окрашивании геля красителем Кумаси G250 полосы, соответствующие димерам, исчезают (Рис. 49, А) [11].

Далее было необходимо убедиться, что при такой постановке эксперимента наша система позволяет наблюдать эффект от ингибитора белок-белкового взаимодействия. В качестве модельного ингибитора мы использовали выше описанный 11-ОМ-Е. Как видно из рисунка 50, В по мере увеличения концентрации 11-ОМ-Е количество His₆-Ku70-tRFP, совыделяющегося с GST-mCsr-IN, постепенно снижается, а при максимальной протестированной концентрации равной 1600 нМ и вовсе отсутствует. IC₅₀, измеренное для данного ингибитора в такой системе, составило 135±20 нМ, что согласуется с ранее полученной другими методами оценкой IC₅₀ для данного соединения [277]. Совокупность полученных нами данных подтверждает работоспособность предложенного нами метода поиска ингибиторов белок-белковых взаимодействий во всех его вариантах анализа [11].

4.3.2. Конъюгаты олигонуклеотидов с эозином Y – эффективные ингибиторы взаимодействия IN с клеточным партнером Ku70

Идея использования конъюгатов олигонуклеотидов с эозином, например, 11-ОМ-Е, в качестве ингибиторов взаимодействия IN с Ku70, зародилась у нас на ранних этапах исследования комплекса IN/Ku70 в связи с тем, что такие соединения подавляют каталитические функции IN за счет связывания с С-концевым доменом IN [277], т.е. вблизи сайта взаимодействия с Ku70 – аминокислотными остатками E212 и L213. Поскольку аминокислотные остатки интегразы E212 и L213, важные для взаимодействия с Ku70, входят в состав α6-спирали IN, соединяющей С-концевой и каталитический домены белка, т.е. расположены в непосредственной близости к С-концевому домену IN, мы предположили, что такие конъюгаты олигонуклеотидов могут выступать в качестве конкурентных ингибиторов взаимодействия IN с Ku70. 11-ОМ-Е, действительно, эффективно нарушал взаимодействие двух белков *in vitro* [277]. По результатам молекулярно-динамических расчетов комплекса IN с 11-ОМ-Е стало понятно, что, вероятно, ингибитор своей эозиновой частью лишь заякоривается в

С-концевом домене IN, а олигонуклеотидной частью «дотягивается» и экранирует остатки E212 и L213 [277]. Однако эти теоретические предположения требовали экспериментального подтверждения.

Разработав методику быстрого и эффективного анализа влияния разнообразных соединений на способность IN и Ku70 формировать комплекс, мы изучили особенности влияния конъюгатов олигонуклеотидов с эозином-У на исследуемый комплекс двух белков.

4.3.2.1. Ингибирующие свойства конъюгатов олигонуклеотидов с эозином зависят от длины олигонуклеотидной части соединений

Для проверки гипотезы о возможном экранировании аминокислотных остатков E212 и L213 в составе IN исследуемым соединением 11-ОМ-Е было принято решение, оценить эффект длины олигонуклеотидной части ингибитора на способность конъюгатов нарушать взаимодействие IN с Ku70. Мы синтезировали серию конъюгатов эозина-У и 2'-олигодезоксирибонуклеотидов длиной от 5 до 15 нуклеотидов общей формулы GG(T)_n, где n=3, 5, 8, 9, 10, 11 или 13. Полученные соединения были названы 5*-D-E, 7*-D-E, 10*-D-E, 11*-D-E, 12*-D-E, 13*-D-E и 15*-D-E, соответственно. Для каждого из них были оценены параметры ингибирования образования комплекса IN/Ku70 с использованием предложенной в работе системы (Рис. 51, А, Б) [11].

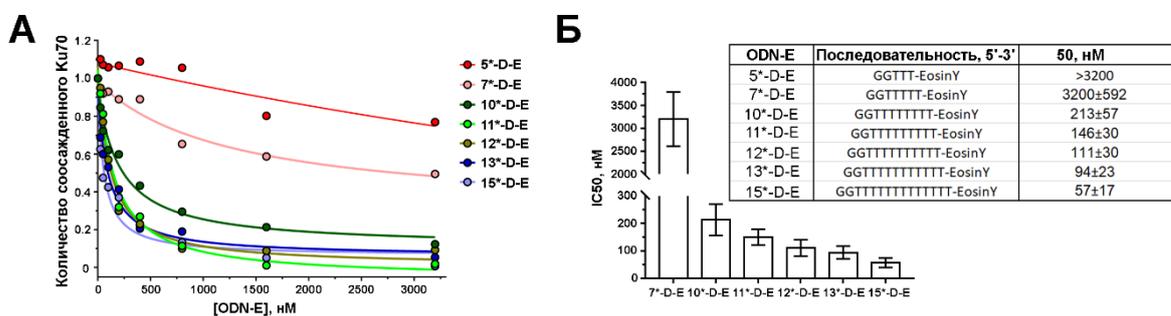


Рисунок 51. Эффект длины олигонуклеотидной части конъюгатов олигонуклеотидов с эозином на их способность нарушать взаимодействие Ku70 с IN. А – зависимость количества сосажденного с GST-mCer-IN белка His₆-Ku70-tRFP на глутатион-агарозе в присутствии возрастающей концентрации исследуемых соединений. Б – значения полуингибирующей концентрации (IC₅₀) исследуемых соединений.

Стоит отметить, что переход от 2'-О-метилированных рибоолигонуклеотидов в случае 11-ОМ-Е в пользу 2'-дезоксирибоолигонуклеотидов, являющихся более простыми и дешевыми в синтезе, и внесение небольших изменений в последовательность олигонуклеотида для унификации всех исследуемых соединений не повлияли на способность 11-звенного ингибитора 11*-D-E предотвращать образование комплекса IN/Ku70. Значение IC₅₀ для него составило 146±30 нМ, что сравнимо с данным показателем для 11-ОМ-Е (Рис. 51, Б) [11].

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. 51, А, Б). IC₅₀ для 15-звенного конъюгата было в 2,5 раза меньше, чем для 11-звенного. Наблюдаемый нами эффект обратной зависимости значений IC₅₀ от длины олигонуклеотидной части ингибитора подтверждают выдвинутую 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 решено проверить путем моделирования комплексов IN с исследуемыми ингибиторами разной длины [11].

Ранее с использованием молекулярного докинга нами было показано, что молекула эозина стабильно связывается в С-концевом домене IN в двух сайтах: проксимальном, расположенном ближе к остаткам E212 и L213, и дистальном, более удаленном от этих остатков (Рис. 52, А) [277]. Эти две структуры комплекса IN/Эозин-У мы использовали для дальнейшего моделирования комплексов IN с конъюгатами. Для этого молекулу эозина-У наращивали путем присоединения олигонуклеотидной части ингибиторов 5*-D-E – 15*-D-E в А или В форме через линкер и генерировали серию ротамеров, с поворотом молекулы олигонуклеотида на 20° относительно первой связи, соединяющей олигонуклеотид и линкер. Для каждой стартовой системы проводили молекулярную динамику в течение 100 пс (Рис. 52, А) [11].

Поскольку исследуемые в работе ингибиторы являются длинными подвижными полимерами, в результате молекулярно-динамического эксперимента мы получили

репертуар возможных структур комплексов и для каждой из структур оценивали два параметра: минимальное расстояние от ингибитора до остатков E212 или L213 и изменение площади поверхности, доступной растворителю, для этих двух остатков (solvent-accessible surface area, SASA) [11].

Для проксимального и дистального сайтов мы обнаружили принципиально отличающуюся картину. Когда эозин-У заякорен в проксимальном сайте, минимальное расстояние от ингибитора до E212 или L213 практически не зависело от размера ингибитора как для В, так и для А-формы: во всех вариантах систем присутствуют структуры, в которых минимальное расстояние до исследуемых аминокислот меньше 5 Å (Рис. 52, Б). Таким образом, модели ингибиторов, заякоренных в проксимальном сайте, не согласуются с экспериментальными данными и, по всей видимости, не реализуются на практике. Когда эозин-У заякорен в дистальном сайте, наблюдается строгая взаимосвязь размера ингибитора и минимального расстояния до исследуемых аминокислотных остатков в случае ингибиторов в В-форме, но не А-форме в качестве стартовых (Рис. 52, Б). Так, например, 5*-D-E ни в одной из структур не был расположен ближе чем 10 Å от исследуемых остатков, а 7*-D-E дотягивается до этих остатков и расположен в ряде структур ближе, чем 5 Å. Для ингибитора 10*-D-E и более длинных соединений число структур, в которых минимальное расстояние было меньше 5 Å, возрастало (Рис. 52, Б) [11].

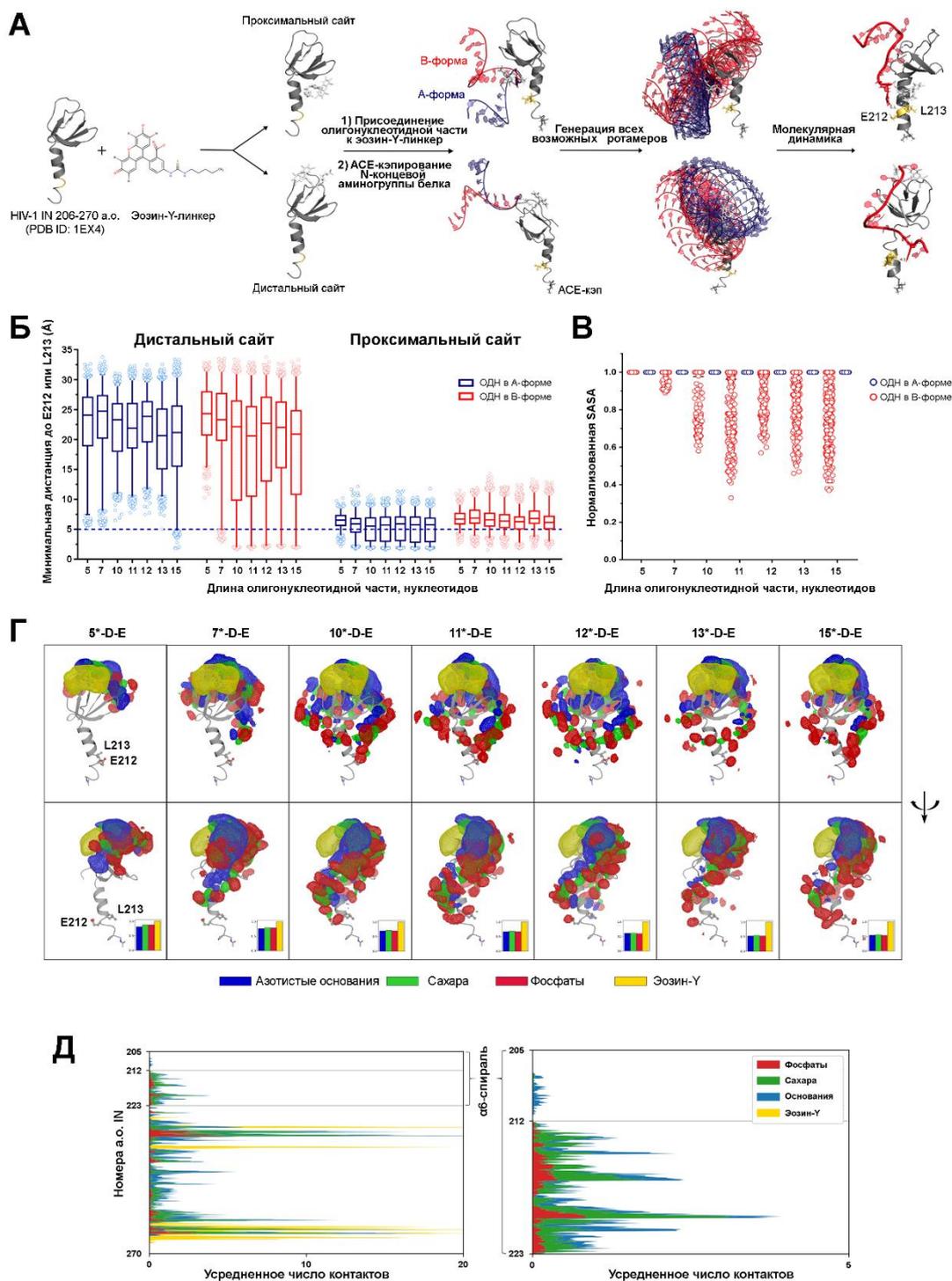


Рисунок 52. Молекулярная динамика комплексов олигонуклеотидных ингибиторов с IN подтверждают гипотезу о конкурентном действии этих соединений в отношении комплекса IN/Ku70. А – общая схема молекулярно-динамического эксперимента. Молекула эозина-У+линкер помещена во фрагмент IN (206-270 а.о.) в проксимальный или дистальный сайты методом молекулярного докинга. Затем к этим структурам была добавлена олигонуклеотидна часть (в А или В-форме) путем ковалентного присоединения к эозин-У+линкер и проведена генерация всех возможных ротамеров по связи, соединяющей линкер и олигонуклеотидную часть. Полученные стартовые системы были использованы для проведения молекулярно-динамического

исследования. Б – зависимость распределения значений минимального расстояния от ингибитора до остатка E212 или L213 в IN от длины олигонуклеотидной части ингибитора. В – зависимость нормализованных значений доступности аминокислотных остатков E212 и L213 растворителю (SASA) в комплексах IN-ингибитор от длины олигонуклеотидной части ингибитора. Г – карта плотности расположения эозина-У (желтый), фосфатов (красные), сахаров (зеленые), а также гетероциклических оснований (синие) в полученных структурах комплексов. Д – усредненное число контактов ингибитора с аминокислотными остатками IN в диапазоне от 205 до 270.

Для ингибиторов, заякоренных в дистальном сайте, мы также проанализировали изменение SASA исследуемых аминокислотных остатков в свободном и связанном с ингибитором состояниях (Рис. 52, В). Для нормировки значений SASA ингибитор из структуры комплекса извлекался, рассчитывалась SASA аминокислотных остатков в свободном виде, затем рассчитывалась SASA для комплекса, после чего SASA в связанном состоянии нормировалась на SASA свободного состояния. При таком анализе относительные значения SASA меньше 1 соответствуют экранированному состоянию исследуемых аминокислотных остатков. Чем меньше значение относительной SASA, тем эффективнее ингибитор экранирует их. Значение меньше 1 мы наблюдали только для комплексов IN с ингибиторами длиной в 7 и более нуклеотидов и только для ингибиторов в стартовой В-форме (Рис. 52, В). 5*-D-E не влиял на доступность E212 и L213 растворителю (Рис. 52, В). Таким образом, данные приведенных компьютерных расчетов согласуются с экспериментами и дополнительно описывают природу наблюдаемых различий в поведении ингибиторов в ряду 5*-D-E – 15*-D-E [11].

4.3.2.2. Гетероциклические основания, но не сахарофосфатный остов ингибиторов критически важны для нарушения взаимодействия IN с Ки70

Взаимодействие IN с олигонуклеотидной частью ингибиторов может происходить за счет сахарофосфатного остова ингибитора или же за счет гетероциклических оснований. Для получения детальной информации о природе активности исследуемых соединений мы решили изучить, какие части олигонуклеотида вносят основной вклад в проявляемую активность конъюгатов.

Получив для каждого ингибитора серию структур комплексов с IN, у нас появилась возможность проанализировать вклад каждой составной части олигонуклеотида (фосфаты, сахара, гетероциклические основания) в стабилизацию

комплекса с белком. Из рисунка 52, Г видно, что в большинстве структур фосфаты преимущественно смотрят в раствор, а гетероциклические основания, наоборот, в сторону IN. Более подробный анализ контактов ингибитора с IN, проведенный для 11*-D-E, демонстрирует, что с α б-спиралью IN преимущественно контактируют гетероциклические основания и остатки сахара в составе ингибитора, но не фосфаты и именно контакты с гетероциклическими основаниями остаются единственным типом контактов в районе с 205 по 212 а.о. (Рис. 52, Д). Т.е. правильное позиционирование ингибитора в IN, позволяющее экранировать E212 и L213, может обеспечиваться только за счет гетероциклических оснований [11].

Для экспериментальной проверки вклада каждой группы в составе олигонуклеотида на ингибирующее действие конъюгатов мы использовали серию дезоксипроизводных ингибитора 11-ОМ-Е, модифицированных по фосфатной группе или гетероциклическим основаниям. Для каждого модифицированного соединения были определены значения IC50 с использованием разработанного метода (Рис. 53). В качестве референсных соединений мы использовали непосредственно 11-ОМ-Е и его полный дезоксианалог – 11-D-E, который в отличие от 11*-D-E, описанный в предыдущей главе, полностью соответствовал по последовательности оснований ингибитору 11-ОМ-Е.

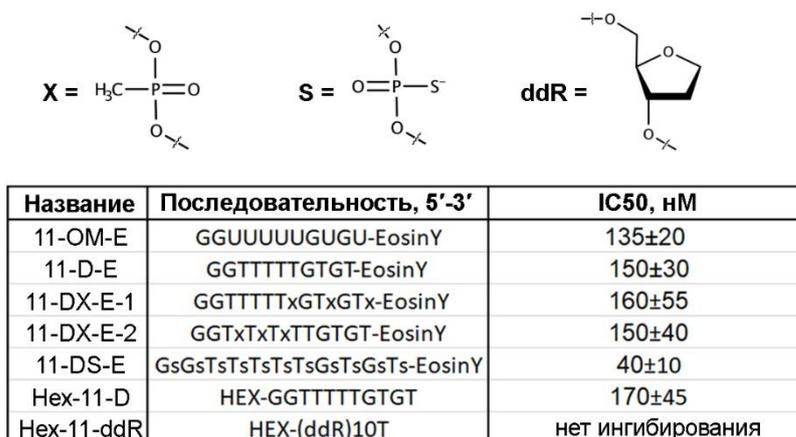


Рисунок 53. Влияние модификаций сахарофосфатного остова или гетероциклических оснований 11-ОМ-Е на взаимодействие IN с Ku70.

Как и в случае с 11*-D-E, ингибитор 11-D-E проявлял активность сравнимую с 11-ОМ-Е (Рис. 53). 11-DS-E с замещенными фосфатами на фосфотиоаты в 11-D-E был в 3,75 раза более активным, чем 11-D-E (IC50 = 40 ± 10 нМ). Наблюдаемые отличия

могут объясняться как особенностями распределения отрицательного заряда на более крупном атоме серы по сравнению с атомом кислорода, так и более высокой гидрофобностью фосфотиоатных производных. Поскольку замещение части отрицательно заряженных фосфатов на нейтральные метилфосфонаты (ингибиторы 11-DX-E-1 и 11-DX-E-2) не повлияло на их ингибирующее действие (Рис. 53), вероятно, именно гидрофобные свойства серы в составе 11-DS-E являются основной причиной повышения ингибирующего действия соединения [11].

Мы также проанализировали, как удаление гетероциклических оснований из ингибитора повлияет на его ингибирующие свойства. Из-за особенностей синтеза таких производных получить полный аналог 11-ОМ-Е или 11-Д-Е, но без гетероциклических оснований не представлялось возможным, поэтому было принято решение вводить краситель в структуру во время синтеза на 5'-конец соединения, хотя эозин-У в составе всех описанных выше соединений был расположен на 3'-конце. При такой стратегии синтеза эозин-У также пришлось заменить на другой краситель 4,7,2',4',5',7'-гексахлорофлуоресцеин (HEX) [11].

Поскольку в данном случае принципиально изменялась глобальная топология соединения, что могло привести к полной потере ингибирующего действия, для начала мы проверили, как ингибитор Нех-11-Д, содержащий Нех на 5'-конце олигонуклеотида со всеми гетероциклическими основаниями, влияет на формирование комплекса IN/Ku70. Значение IC₅₀ для него составило 170 ± 45 нМ, что соизмеримо с активностью 11-Д-Е и 11-ОМ-Е, т.е. замена красителя, являющегося «заякоряющей» частью ингибитора, и его перемещение с 3'-конца на 5'-конец принципиально не влияет на способность конъюгата олигонуклеотида проявлять активность в отношении комплекса IN/Ku70 (Рис. 53). Затем мы получили соединение Нех-11-ddR аналог Нех-11-Д, но у которого отсутствуют гетероциклические основания в позициях 1-10 от 5'-конца. В тесте Нех-11-ddR не нарушал взаимодействие IN с Ku70 вплоть до концентрации 3200 нМ (Рис. 53) [11].

В совокупности эти данные говорят о том, что для предотвращения взаимодействия между IN и Ku70 в составе исследуемых ингибиторов должны присутствовать наряду с флуоресцентным красителем, таким как эозин-У или Нех, еще и гетероциклические основания. При удалении 10 из 11 гетероциклических оснований исследуемые соединения полностью теряют свою активность. Все остальные изменения,

такие как замена остатка сахара или частичная замена заряженных фосфатов на незаряженные метилфосфонаты в разных позициях олигонуклеотида, не влияют на ингибирующие свойства соединений. Лишь при замене фосфатов на фосфотиоаты мы заметили улучшение показателей ингибитора. Также на способность конъюгатов олигонуклеотидов с флуоресцентными молекулами нарушать взаимодействие IN с Ku70 влияет длина олигонуклеотидной части ингибитора [11].

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*. По механизму своего действия они являются конкурентными ингибиторами: связываясь с С-концевым доменом IN, своей олигонуклеотидной частью они “дотягиваются” до аминокислотных остатков E212 и L213 в составе IN и экранируют их, блокируя взаимодействие с Ku70. Стоит отметить, что именно гетероциклические основания, а не сахаро-фосфатный остов в составе таких ингибиторов имеют ключевую роль в их правильном позиционировании в структуре IN для предотвращения взаимодействия с Ku70. К сожалению, их действие на каталитические активности IN [410] не позволяет проверить принципиальную возможность их использования для подавления ранних этапов репликации вируса за счет нарушения взаимодействия IN с Ku70 *ex vivo*.

4.3.3. Поиск низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия IN и Ku70

4.3.3.1. Уточнение сайта связывания IN в Ku70 для разработки низкомолекулярных ингибиторов их взаимодействия

Представленные в предыдущих разделах ингибиторы взаимодействия IN с Ku70 концептуально подтверждают, что соединения, экранирующие сайт взаимодействия двух белков, могут эффективно нарушать взаимодействие исследуемых белков *in vitro*. К сожалению, из-за их влияния на каталитические свойства 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. 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.

Как отмечалось выше, для взаимодействия с IN достаточно N-концевого домена Ku70 (1-250 а.о.) [277]. Поскольку данный фрагмент белка представляет собой глобулярный домен, осуществить поиск сайта связывания интегразы в нем путем точечного мутагенеза не представляется возможным из-за большого числа поверхностных аминокислотных остатков, которые потенциально могут участвовать во взаимодействии с IN. Такой метод подходит лишь для подтверждения и уточнения сайта связывания, но для начала необходимо сузить пространство поиска.

Для решения этой задачи нами был выбран метод пептидного фишинга. Для этого рекомбинантный белок His₆-Ku70, иммобилизованный на Ni-NTA-агарозе, обрабатывали трипсином или GluC протеазой. После полного гидролиза целевого белка протеазы инактивировали путем добавления смеси ингибиторов протеаз Halt Protease Inhibitor Cocktail. Полученный гидролизат инкубировали с GST-IN, иммобилизованной на глутатион-агарозе, или со смолой без белка. После удаления несвязавшихся пептидов целевые пептиды элюировали 7 М мочевиной и анализировали методом tandemной масс-спектрометрии. Исходная смесь пептидов также была проанализирована, для оценки полноты представленности пептидов. Нами было установлено, что при триптическом гидролизе в исходной смеси идентифицируются пептиды, соответствующие 73,23 % последовательности белка Ku70 и 70,4 % его N-концевой части. При обработке протеазой GluC – 51,56 и 72,4 %, соответственно (Рис. 54, А) [14].

При анализе пептидов, связанных с интегразой, по совокупности экспериментов с использованием двух разных гидролизатов нам удалось идентифицировать три уникальные пептида. Пептиды Ku70⁴⁷⁻⁷⁴ и Ku70⁸¹⁻⁹² были обнаружены в эксперименте с использованием триптического гидролизата Ku70, а пептид Ku70⁹⁴⁻¹⁰⁷ – при обработке белка GluC-протеазой (Рис. 54, Б, В). Дополнительно был обнаружен пептид Ku70⁹²⁻¹⁰⁷, включающий в себя Ku70⁹⁴⁻¹⁰⁷. Поскольку укороченный пептид Ku70⁹⁴⁻¹⁰⁷ сохранял способность совыделяться с IN, пептид Ku70⁹²⁻¹⁰⁷ из дальнейшего рассмотрения был исключен. В контрольных образцах без интегразы данные пептиды не были идентифицированы (Рис. 54, Б, В) [14]. Примечательно, что все идентифицированные пептиды расположены в N-концевом глобулярном домене Ku70, что согласуется с его ролью в формировании комплекса с IN [277].

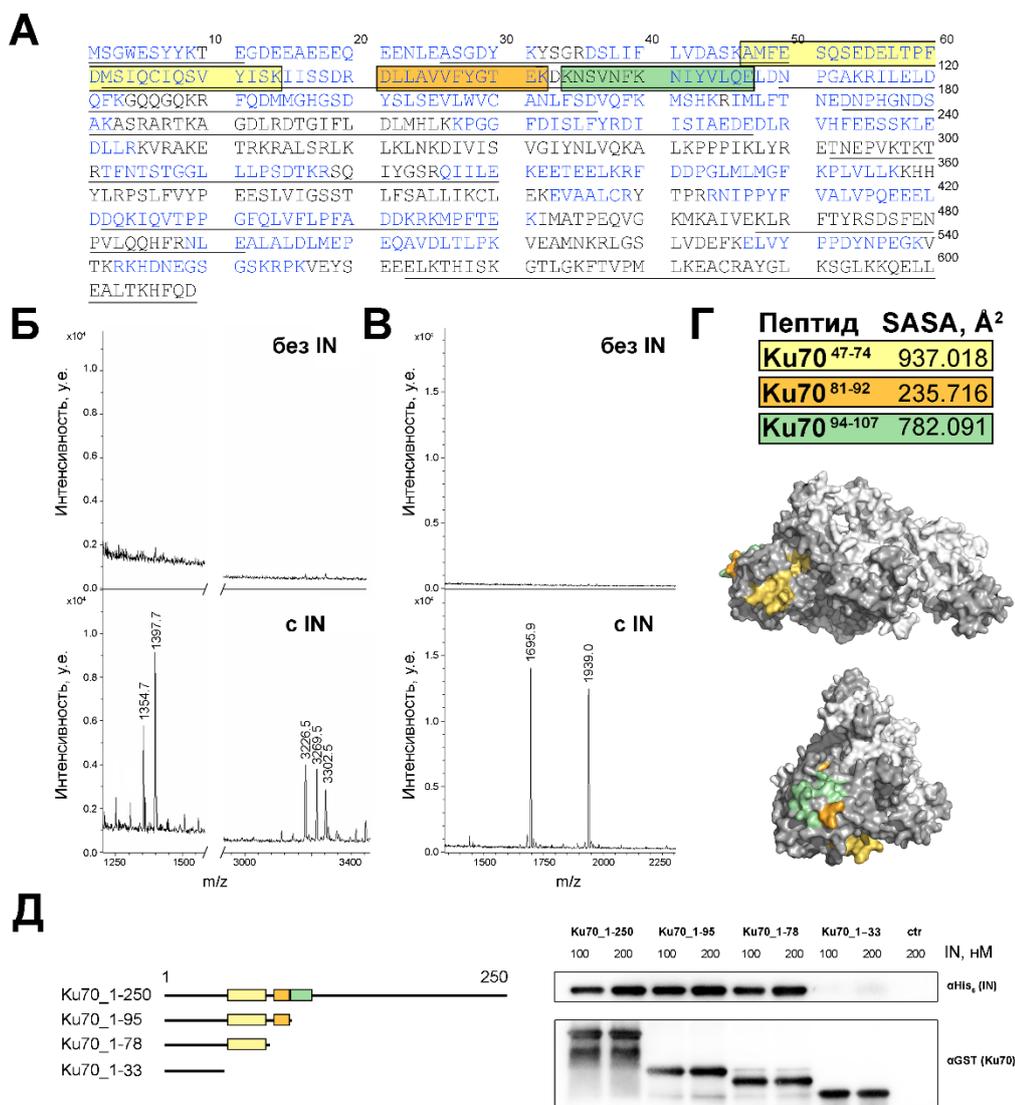


Рисунок 54. Уточнение сайта связывания интегразы ВИЧ-1 в составе белка Ku70. А – Аминокислотная последовательность белка Ku70. Подчеркиванием и синими буквами отмечены те последовательности белка Ku70, которые были нами идентифицированы в триптическом гидролизате белка или после обработки полноразмерного 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 Ku70₁₋₂₅₀, Ku70₁₋₉₅, Ku70₁₋₇₈, Ku70₁₋₃₃ с IN ВИЧ-1 методом соосаждения белков на глутатион-агарозе.

Анализ доступности растворителю идентифицированных пептидов в структуре полноразмерного гетеродимера Ku70/Ku80 демонстрирует, что только два из трех пептидов, а именно, Ku70⁴⁷⁻⁷⁴ и Ku70⁹⁴⁻¹⁰⁷, достаточно экспонированы в раствор для образования комплекса с интегразой (Рис. 54, Г). Третий пептид Ku70⁸¹⁻⁹² существенно экранирован другими остатками Ku70, что может препятствовать его взаимодействию с интегразой (Рис. 54, Г) [14].

Для того чтобы проверить, действительно ли идентифицированные нами пептиды важны для образования комплекса IN/Ku70 нами была получена серия делеционных мутантов белка Ku70, включающая в себя Ku70_1-250, Ku70_1-95, Ku70-1-78 и Ku70_1-33 (Рис. 54, Д). Мутант Ku70_1-250 содержит все три пептида, мутант Ku70-1-95 – два из них (Ku70⁴⁷⁻⁷⁴ и Ku70⁸¹⁻⁹²), мутант Ku70-1-78 – лишь один пептид (Ku70⁴⁷⁻⁷⁴) и мутант Ku70_1-33 – ни одного пептида. При создании делеционных мутантов мы опирались на структуру белка Ku70 в составе гетеродимера Ku70/Ku80 (PDB ID: 1JEQ) и выбирали места внесения стоп кодонов так, чтобы сохранить элементы вторичной структуры, в состав которых входят исследуемые пептиды [14].

Мы проанализировали взаимодействие серии делеционных мутантов с рекомбинантной полноразмерной интегразой методом соосаждения и установили, что все мутанты кроме Ku70_1-33 эффективно взаимодействуют с IN *in vitro* (Рис. 54, Д). Следовательно, 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. Два других пептида, по всей видимости, не важны для взаимодействия с IN или их вклад в стабилизацию комплекса минимален [14].

Для более точного картирования сайта связывания интегразы в составе Ku70 мы продолжили наши изыскания. Участок Ku70 с 47 по 74 а.о. включает в себя α -спираль (58-74 а.о.) и петлю (50-57 а.о.) (Рис. 55, А). Каждый из этих элементов может быть важен для взаимодействия двух белков [14].

Дополнительно мы получили два делеционных мутанта Ku70_1-64, с нарушенной структурой α -спирали, и Ku70_1-44 без обоих структурных элементов. Методом соосаждения было показано, что нарушение структуры α -спирали снижает эффективность взаимодействия белков в 4-5 раз, а удаление обоих структурных элементов полностью препятствует их взаимодействию (Рис. 55, А) [14].

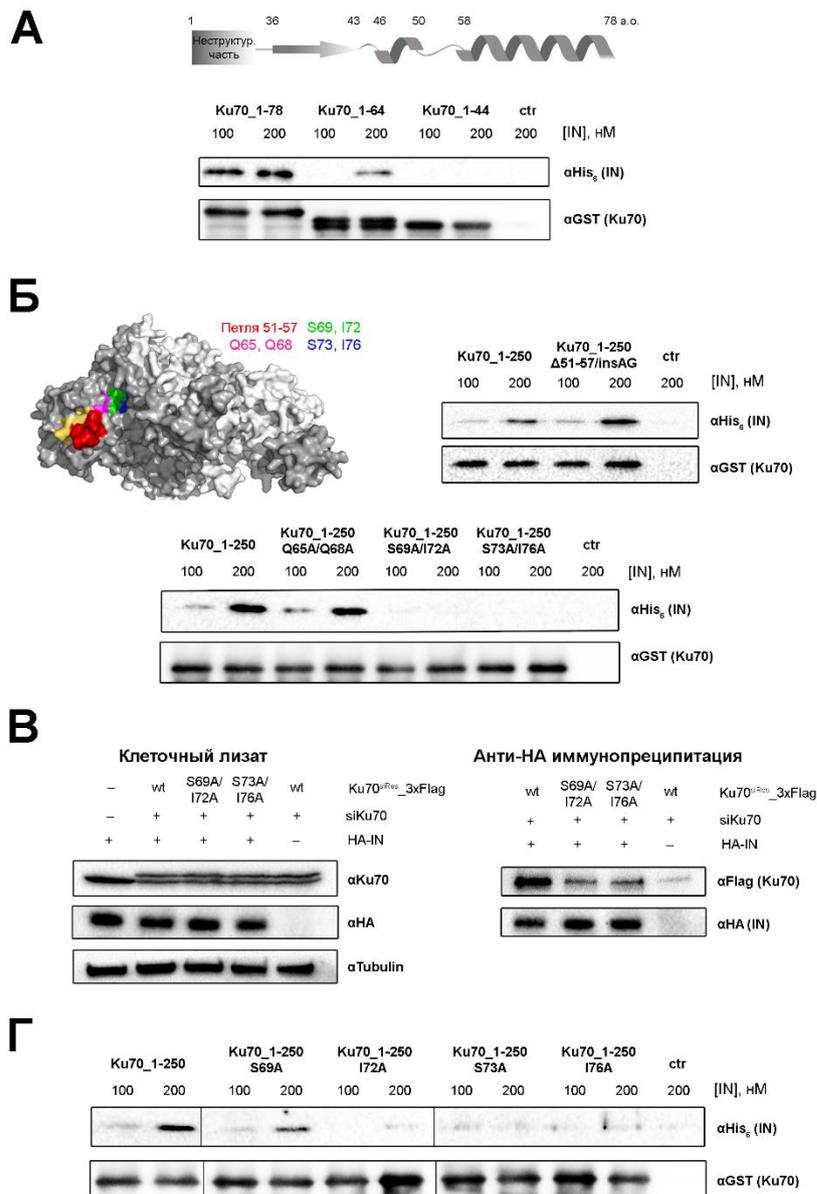


Рисунок 55. Аминокислотные остатки I72, S73 и I76 в составе Ku70 важны для взаимодействия белка с IN. А – Анализ взаимодействия делеционных мутантов Ku70_1-78, Ku70_1-64 и Ku70_1-44 с полноразмерной IN методом соосаждения белков на глутатион-агарозе. Б – Анализ взаимодействия серии точечных мутантов N-концевого домена Ku70, а именно, Ku70_1-250_Δ51-57/insAG, Ku70_1-250_Q65A/Q68A, Ku70_1-250_S69A/I72A и Ku70_1-250_S73A/I76A, с полноразмерной IN методом соосаждения белков на глутатион-агарозе. На структуре полноразмерного гетеродимера Ku70/Ku80 цветом отмечены положения исследуемых аминокислотных остатков. В – Анализ ко-иммунопреципитации суперэкспрессированных Flag-тагированных двойных мутантов Ku70, содержащих замены S69A/I72A или S73A/I76A, с HA-тагированной 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 – Анализ соосаждения 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.

Поскольку делеционные мутанты могут иметь нарушенную структуру, мы проверили, как более локальные изменения в исследуемых элементах белка Ku70 повлияют на стабильность комплекса IN/Ku70. Мутант Ku70_{1-250_Δ51-57/insAG}, представляющий N-концевой домен Ku70 с заменой петли 51-57 а.о. на линкер последовательности AG, соосаждался с интегразой также эффективно, как и Ku70₁₋₂₅₀ (Рис. 55, Б). Следовательно, данная петля Ku70 не важна для взаимодействия с интегразой и, вероятно, ключевые для взаимодействия с интегразой аминокислотные остатки расположены именно в α-спирали с 58 по 74 а.о. [14].

Для проверки этой гипотезы были получены мутанты Ku70 с двойными точечными заменами аминокислотных остатков, расположенных в исследуемой α-спирали и экспонированные в раствор: Ku70_{1-250-Q65A/Q68A}, Ku70_{1-250_S69A/I72A} и Ku70_{1-250_S73A/I76A} (Рис. 55, Б). Анализ связывания с IN полученных мутантов показал, что замены Q65A/Q68A не влияют на соосаждение Ku70 с IN, а замены S69A/I72A и S73A/I76A полностью нарушают образование комплекса (Рис. 55, Б) [14].

Более того, нами были получены эукариотические экспрессионные векторы, кодирующие природный вариант Ku70 (Ku70_{wt}) или его мутантные полноразмерные формы Ku70_{S69A/I72A} и Ku70_{S73A/I76A}, и оценена их способность формировать комплекс с суперэкспрессированной НА-тагированной интегразой ВИЧ-1 *ex vivo* [14].

Поскольку в клетке присутствует эндогенная немутантная форма Ku70, для проведения этого эксперимента клетки предварительно обрабатывали siРНК к Ku70, что приводило к четырехкратному снижению содержания эндогенного белка, но не влияло на эктопическую экспрессию вариантов Ku70 (Рис. 55, В), т.к. исходные плазмиды содержали последовательность гена *Ku70*, устойчивую к действию siРНК. В результате эксперимента по ко-иммунопреципитации комплексов IN/Ku70 с использованием анти-НА антител мы установили, что двойные мутанты Ku70_{S69A/I72A} и Ku70_{S73A/I76A} неспособны эффективно взаимодействовать с IN в клетках НЕК293Т (Рис. 55, В). В совокупности эти данные подтверждают нашу гипотезу о ключевой роли данной α-спирали белка Ku70 во взаимодействии с IN как *in vitro*, так и *ex vivo* [14].

Для проверки значимости каждого аминокислотного остатка в α-спирали Ku70 для взаимодействия с IN мы дополнительно сконструировали варианты Ku70₁₋₂₅₀ с одиночными мутациями: Ku70_{1-250_S69A}, Ku70_{1-250_I72A}, Ku70_{1-250_S73A} и

Ku70_1–250_I76A. Все введенные мутации негативно сказались на взаимодействии Ku70 с IN, но с разной степенью ухудшения образования комплекса. Наименьший эффект оказала замена S69A, снизив количество образуемого комплекса лишь в 2 раза (Рис. 55, Г). Три другие мутации I72A, S73A и I76A полностью нарушали взаимодействие между исследуемыми белками (Рис. 55, Г). Этот результат показывает, что аминокислотные остатки I72, S73 и I76 в составе Ku70 являются ключевыми для взаимодействия с IN, тогда как S69 лишь дополнительно стабилизирует комплекс Ku70/IN, но не имеет решающего значения для белок-белкового взаимодействия [14].

4.3.3.2. Первая серия низкомолекулярных ингибиторов

Определенные нами остатки Ku70, важные для взаимодействия с интегразой, расположены в структуре гетеродимера Ku в кармане, подходящем для создания ингибиторов (Рис. 55, А). Такие ингибиторы, связываясь в целевом участке гетеродимера, должны экранировать интересующие нас остатки и, таким образом, препятствовать взаимодействию двух белков.

Для поиска низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия Ku70 с IN мы провели компьютерный докинг библиотеки соединений ChemDiv Representative Diversity Library, включающей в себя 50 000 наиболее разнообразных по структуре соединений, в исследуемую область Ku70. Поскольку Ku70 в процессе постинтеграционной репарации участвует в виде гетеродимера Ku70/Ku80, в качестве мишени для докинга мы использовали структуру именно гетеродимера (PDB ID: 1JEQ). На первом этапе проводили 25 раундов докинга для каждого соединения, после чего все соединения ранжировали по усредненной минимальной энергии связывания и на второй этап исследования отбирались только те соединения, для которых указанный параметр был 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. Для этого измеряли параметр относительная SASA указанных остатков в комплексе с ингибитором и без него (Рис. 56, А). По результатам ранжирования было отобрано 31 соединение для *in vitro* тестирования [14].

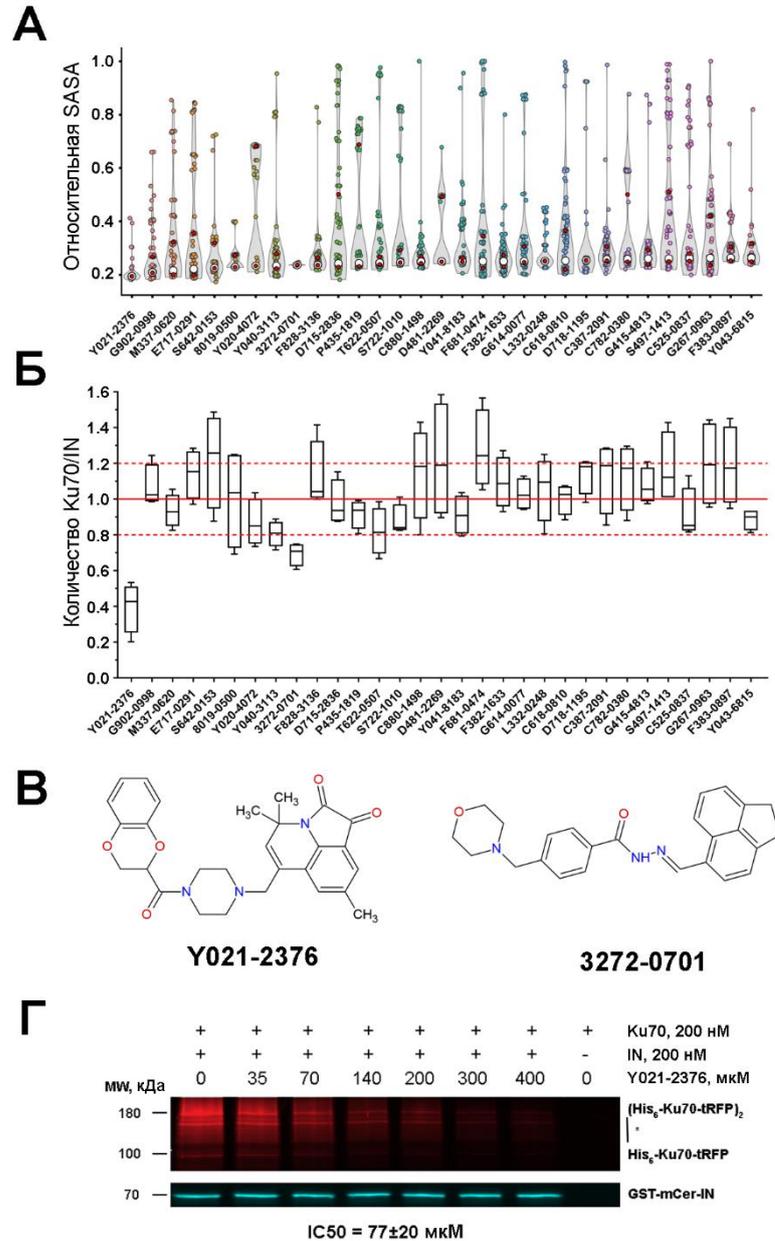


Рисунок 56. Низкомолекулярные соединения Y021-2376 и 3272-0701 из базы соединений ChemDiv Representative Diversity Library нарушают образование комплекса IN/Ku70 *in vitro*. А – Распределение относительных значений доступности растворителю (SASA) аминокислотных остатков S69, I72, S73 и I76 белка Ku70 в комплексах с исследуемыми соединениями, нормированные на абсолютный показатель SASA для них в структуре Ku70 без ингибиторов. Б – Влияние отобранных соединений (100 мкМ) на образование комплекса IN/Ku70 *in vitro*. В – Структурные формулы двух активных соединений: Y021-2376 и 3272-0701. Г – Результаты соосаждения His₆-Ku70-tRFP с GST-mCer-IN на глутатион-агарозе в присутствии возрастающей концентрации ингибитора Y021-2376.

Для начала мы провели эксперимент при одной концентрации ингибитора равной 100 мкМ в трех повторностях. Из пула протестированных соединений одно соединение

3272-0701 блокировало образование комплекса на 25 %, а второе Y021-2376 – на 60 % (Рис. 56, Б, В). Для Y021-2376 была оценена способность блокировать образование комплекса при разных концентрациях, что позволило оценить значение IC50 равное 77 ± 20 мкМ (Рис. 56, Г) [14].

Таким образом, мы показали, что предложенный подход по двойному ранжированию результатов молекулярного докинга соединений позволяет обнаружить соединения, препятствующие взаимодействию IN с Ku70. Из-за высоких значений концентраций, при которых эти соединения проявляют свою активность, и высокой цитотоксичности в этом диапазоне концентраций нам не удалось для первой серии соединений оценить их эффект на репликацию ВИЧ-1, однако, во-первых, с помощью них мы смогли подтвердить принципиальную возможность нарушения взаимодействия IN и Ku70 *in vitro* за счет экранирования идентифицированных в Ku70 аминокислотных остатков низкомолекулярными соединениями, а во-вторых, они стали основой для поиска последующих ингибиторов [14].

4.3.3.3. Вторая серия низкомолекулярных ингибиторов

Для поиска более эффективных ингибиторов взаимодействия IN с Ku70 мы разработали следующий подход, снижающий вычислительную нагрузку: осуществить поиск в базе ChemDiv (1,6 млн. веществ) соединений, похожих на Y021-2376 или 3272-0701, а затем провести для таких соединений молекулярный докинг с отбором сначала по свободной энергии связывания, а затем по степени экранирования аминокислотных остатков в Ku70, важных для взаимодействия с IN, как описывалось выше. В качестве критерия структурного сходства веществ использовали коэффициент Танимото [16].

В результате отбора молекул, похожих на Y021-2376 или 3272-0701 (коэффициент Танимото больше 0,65), и фильтрации соединений согласно критериям, приведенным в Таблице 3, было отобрано 1385 веществ. В результате проведения двух этапов молекулярного докинга нам удалось отобрать соединения, минимальная энергия связывания которых меньше, чем -11,31 ккал/моль, полученной нами для наиболее активного соединения из первой серии Y021-2376, а также отранжировать соединения по степени экранирования исследуемых остатков Ku70. В результате для *in vitro* тестирования было отобрано 37 соединений (Рис. 57) [16].

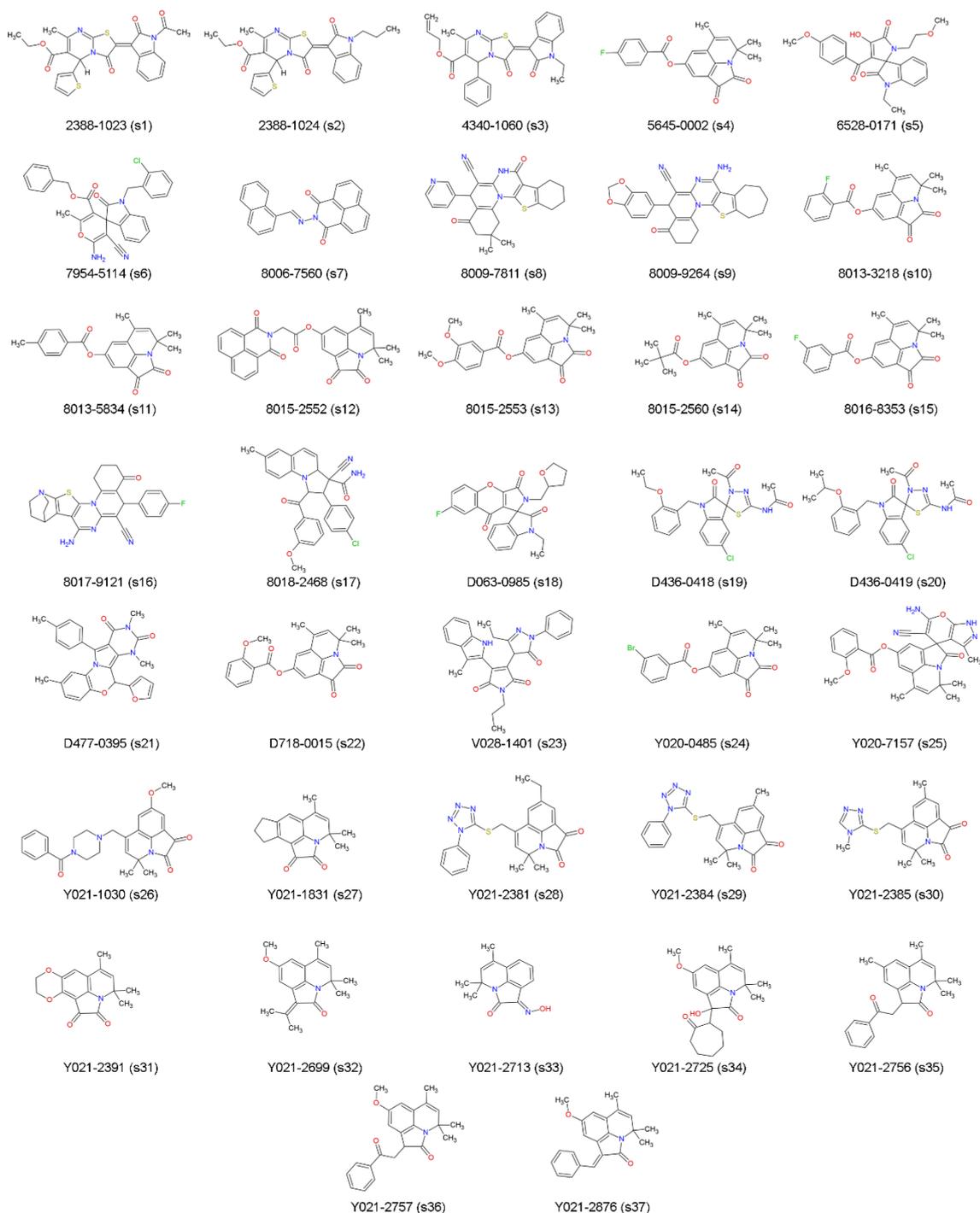


Рисунок 57. Соединения, отобранные для второго раунда тестирования. В качестве названий указаны идентификаторы соединений в базе ChemDiv, а также в скобках – сокращенные названия, используемые в нашей работе.

Среди них мы обнаружили 11 соединений, которые снижали количество сосаждаемого с GST-mCer-IN His₆-Ku70-tRFP на 30 %, 2 соединения – на 50 %, 1 соединение – на 70 %, и 2 соединения – на 90 % при 100 мкМ (Рис. 58, А) [16].

Дальнейшие исследования мы продолжили с тремя наиболее активными (Рис. 58, Б). Для них 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. 58, В) [16].

В случае наиболее активного соединения s17 с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса мы оценили его связывание с Ku70 и IN, чтобы проверить, действительно ли наблюдаемый нами эффект ингибирования образования комплекса обусловлен именно взаимодействием с Ku70, а не IN.

Для этого на Ni-NTA-чипе связывали His₆-тагированные белки IN, Ku70, а затем пропускали раствор, содержащий ингибитор. Мы наблюдали эффективное связывание s17 с Ku70 с последующей медленной диссоциацией ингибитора из комплекса (Рис. 58, Г). К сожалению, дойти до насыщения центров связывания нам не удалось, поэтому оценить Kd комплекса не представляется возможным [16].

Также мы установили, что s17 может одинаково эффективно взаимодействовать как с Ku70, так и с гетеродимером Ku70/Ku80 (Рис. 58, Г). В случае IN мы также наблюдали повышение сигнала при добавлении ингибитора s17, но максимальные значения ответа отличались почти на порядок, т.е. IN не может выступать в качестве эффективной мишени для s17. Более того, после окончания инкубации в потоке с s17 и заменой содержимого чипа на буфер без ингибитора наблюдалась быстрая диссоциация таких комплексов (Рис. 58, Г). Таким образом, проведенные эксперименты подтверждают наши предположения, что s17 ингибирует образование комплекса IN/Ku70 преимущественно за счет взаимодействия с Ku70, а не IN.

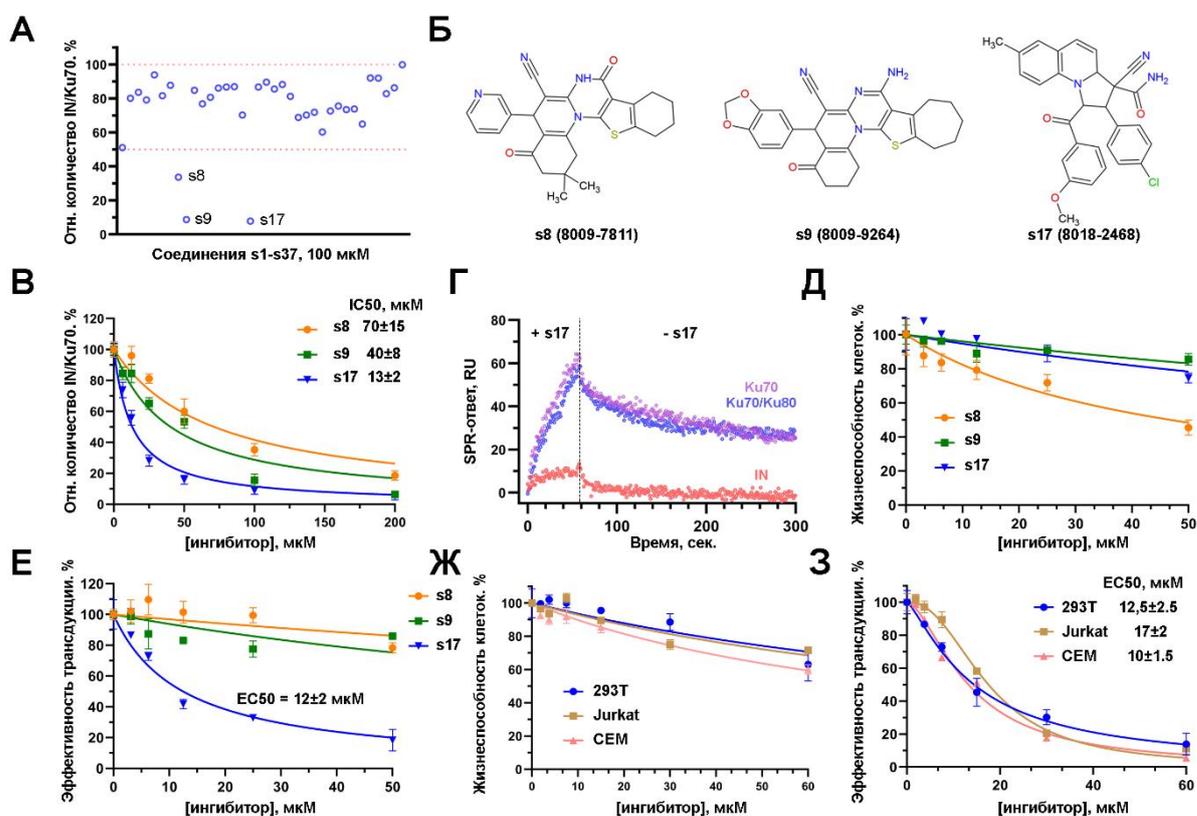


Рисунок 58. Отбор соединений-кандидатов, нарушающих взаимодействие IN с Ku70, и изучение их влияния на эффективность трансдукции клеток псевдовиром на основе ВИЧ-1. А – эффект 100 мкМ соединений s1 - s37 на формирование комплекса Ku70/IN. Б – структурные формулы трех наиболее активных соединений, нарушающих 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 HEK293T, измеренный МТТ-тестом. Е – эффект соединений s8, s9 и s17 на трансдукцию клеток HEK293T псевдовиром ВИЧ_wt. Ж – эффект s17 на жизнеспособность клеток HEK293T, Jurkat и CEM. З – эффект s17 на трансдукцию клеток HEK293T, Jurkat и CEM псевдовиром ВИЧ_wt.

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

Для трех наиболее активных соединений s8, s9 и s17 мы решили оценить их влияние на ранние этапы репликации ВИЧ-1 *ex vivo* на клетках HEK293T. Для этого клетки HEK293T 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 EC50 равным 12 ± 3 мкМ (Рис. 58, Е). В исследуемом диапазоне концентраций s17 практически не влиял на выживаемость клеток НЕК293Т (Рис. 58, Д) [16].

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. 58, З). EC50 для клеток Jurkat составило 17 ± 2 мкМ, а для СЕМ – 10 ± 1.5 мкМ. В обоих типах клеток наблюдались сравнимые с НЕК293Т профили выживаемости клеток (Рис. 58, Ж) [16].

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 [16].

Для того чтобы исключить влияние s17 на эти два этапа мы провели два дополнительных эксперимента. В рамках первого эксперимента оценивали эффект s17 на проникновение лентивирусного вектора. Для этого клетки НЕК293Т трансдуцировали лентивирусным вектором, через два часа клетки отмывали от несвязавшихся псевдовиральных частиц, инкубировали в течение 1 часа в полной ростовой среде и только после этого добавляли ингибитор к клеткам. Параллельно с этим проводили эксперимент, в котором вектор и ингибитор добавляли одновременно. Сравнение результатов двух экспериментов позволяет пронаблюдать, что s17 не влияет на этап проникновения лентивирусного вектора в клетки, а действует на последующие этапы (Рис. 59, А) [16].

Для того чтобы исключить неспецифическое воздействие s17 на транскрипцию с CMV-промотора мы использовали клеточную линию НЕК293Т_CMV-Luc со стабильно интегрированным геномом лентивирусного вектора ВИЧ_wt. С ее помощью нам удалось показать, что s17 не влияет на продукцию люциферазы светлячка вплоть до 50 мкМ, в то время как при одновременном добавлении лентивирусного вектора и ингибитора

наблюдалось снижение продукции люциферазы до 15 % (Рис. 59, А, Б). Таким образом, влияние s17 на трансдукцию клеток лентивирусным вектором объясняется его эффектом именно на один из ранних этапов репликации ВИЧ-1 [16].

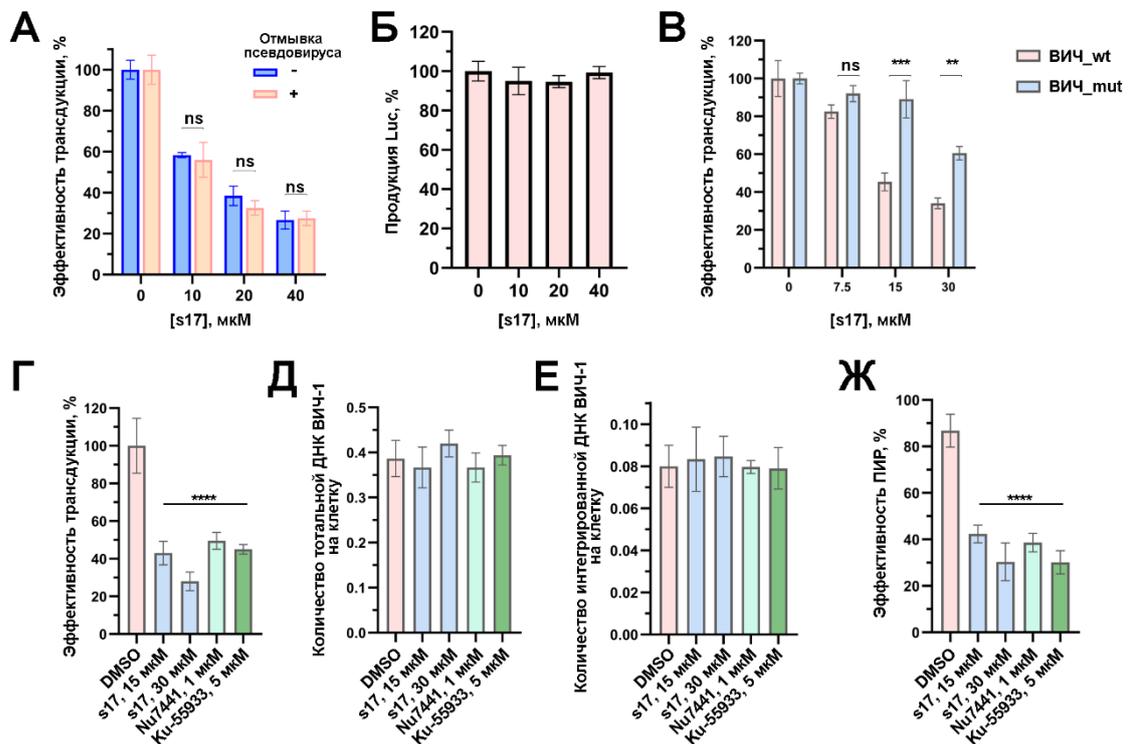


Рисунок 59. Ингибитор s17, нарушающий взаимодействие IN с Ku70, подавляет ранние этапы репликации, действуя на постинтеграционную репарацию ВИЧ-1. А – влияние s17 на эффективность трансдукции клеток НЕК293Т вектором ВИЧ_wt в двух экспериментальных системах. В первой системе вирус и ингибитор добавляются к клеткам одновременно (“Отмывка псевдовируса -”). Во втором случае псевдовирус после инкубации с клетками в течение 1 часа отмывался, а затем добавляли s17 (“Отмывка псевдовируса +”). Б – эффект s17 на продукцию люциферазы светлячка в клетках со стабильно интегрированным псевдовирусом ВИЧ_wt. В – сравнение влияния s17 на эффективность трансдукции клеток НЕК293Т псевдовирусами 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 эффективность обратной транскрипции (Д), интеграции (Е) и постинтеграционной репарации (Ж). На графиках представлено среднее \pm 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.

Ингибитор s17 отбирался нами, как соединение, которое связывается с Ku70 и предотвращает его взаимодействие с IN. Нарушение взаимодействия между этими белками, например, за счет введения мутаций в состав IN, негативно влияет на постинтеграционную репарацию ВИЧ-1 [8]. Мы предполагаем, что и наблюдаемый эффект s17 на ВИЧ-1, может объясняться его влиянием на постинтеграционную репарацию, однако, этот факт требует экспериментальной проверки. Для проверки нашего предположения мы оценили эффективность протекания обратной транскрипции, интеграции и постинтеграционной репарации в клетках НЕК293Т, трансдуцированных лентивирусным вектором на базе генома ВИЧ-1 в присутствии ингибитора взаимодействия IN и Ku70 – s17, или ранее охарактеризованных ингибиторов DNA-РК (Nu7441) и АТМ (Ku-55933), подавляющих постинтеграционную репарацию ВИЧ-1. В этих условиях s17, как и ингибиторы указанных киназ, не влиял на эффективность обратной транскрипции или интеграции, но снижал эффективность постинтеграционной репарации (Рис. 59, Г-Ж) [16].

Помимо этого, мы оценили влияние s17 на лентивирусный вектор ВИЧ_mut, содержащий в своем составе мутантную форму IN с заменами E212A/L213A, нарушающими взаимодействие IN с Ku70. При трансдукции клеток таким вектором не происходит привлечения киназ АТМ и DNA-РКcs к местам повреждений ДНК, их активации и, как следствие, не запускается постинтеграционная репарация ВИЧ-1. Именно благодаря этому вектор ВИЧ_mut менее чувствителен к ингибиторам этих киназ. Мы обнаружили, что, как и в случае с ингибиторами АТМ и DNA-РКcs, ВИЧ_mut в меньшей степени чувствителен к s17, чем ВИЧ_wt (Рис. 59, В), что еще раз подтверждает его влияние именно на этап постинтеграционной репарации [16].

Таким образом, мы впервые разработали низкомолекулярный ингибитор взаимодействия IN с Ku70 и показали, что он может эффективно подавлять ранние этапы репликации ВИЧ-1, действуя на этапе постинтеграционной репарации.

4.3.3.5. s17 не влияет на репарацию двуцепочечных повреждений ДНК по NHEJ-пути

Разработанный нами ингибитор s17 взаимодействует с клеточным белком Ku70 и тем самым нарушает образование комплекса с IN, что и объясняет его эффект на ранние этапы ВИЧ-1. Ku70 в клетке является одним из ключевых инициаторов процесса репарации двуцепочечных разрывов ДНК по NHEJ-пути [278], поэтому s17 наряду со

своей основной функцией может влиять на корректность протекания NHEJ-пути в клетках, т.е может обладать нежелательными побочными эффектами.

Для непосредственного выполнения своих функций гетеродимер Ku70/Ku80 в NHEJ-пути должен связать свободные концы ДНК, а уже после этого привлечь к местам повреждений ДНК DNA-РКcs. И хотя сайт узнавания ДНК и сайт привлечения DNA-РКcs в составе гетеродимера [278] не перекрывается с сайтом связывания s17, что снижает вероятность его влияния на NHEJ-путь, нельзя исключить, что s17 все же может снижать эффективность или корректность протекания этого процесса, выступая в качестве аллостерического ингибитора.

Мы решили экспериментально проверить, влияет ли s17 на общую эффективность NHEJ-пути. В качестве системы для оценки этого показателя мы выбрали ранее описанный репортер на основе GFP [411]. Репортерная плаزمида кодирует ген GFP, который по 67-му кодону разбит 46-нуклеотидной вставкой, приводящей к возникновению преждевременного стоп-кодона и не позволяющей синтезировать функциональный GFP. Репортерная плазмида трансфецируется в целевые клетки вместе с двумя дополнительными плазмидами, каждая из которых кодирует Cas9 и гидовые РНК, обеспечивающие распознавание этой вставки и внесение по краям от нее двуцепочечных разрывов ДНК ферментом Cas9. В ходе репарации такого репортера по NHEJ-пути при потере короткой вставки восстанавливается функциональный вариант GFP, что можно детектировать с использованием проточной цитофлуориметрии. Любые нарушения со стороны NHEJ-пути будут проявляться в снижении процента клеток, продуцирующих GFP [411].

В контрольных клетках HEK293T, трансфецированных смесью трех плазмид и без воздействия какими-либо ингибиторами, мы обнаружили около 4 % GFP-положительных клеток. В отрицательных контролях, трансфекцию которых проводили репортерным вектором и лишь одной из плазмид, кодирующей гидовые РНК, GFP-положительные клетки отсутствовали. В экспериментальных образцах, обработанных ингибитором DNA-РКcs (Nu7441) наблюдалось дозозависимое снижение количества GFP-положительных клеток, что подтверждает корректность работы репортера. А при обработке клеток ингибитором s17 вплоть до 50 мкМ мы не наблюдали каких-либо изменений, что свидетельствует в пользу отсутствия влияния исследуемого соединения на общую эффективность NHEJ-пути (Рис. 60, А) [16].

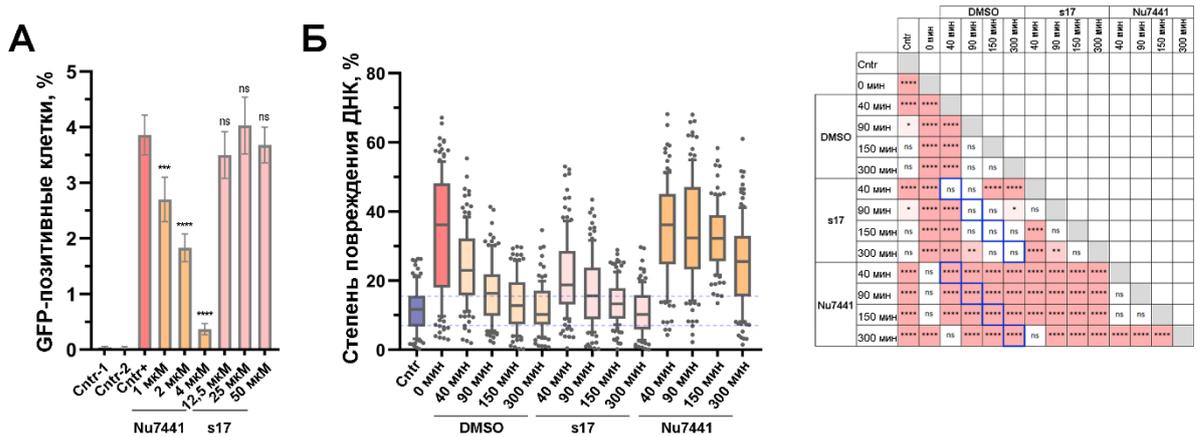


Рисунок 60. Исследуемое соединение s17 не влияет на клеточные функции белка Ku70. А – Влияние s17 и охарактеризованного ингибитора NHEJ-пути репарации двуцепочечных разрывов ДНК Nu7441 на общую эффективность репарации двуцепочечных разрывов ДНК по NHEJ-пути с использованием репортерной системы на базе GFP. Клетки HEK293T котрансфецировали репортерным вектором EJ7-GFP, кодирующим нефункциональный вариант GFP, в котором происходит сдвиг рамки считывания за счет 46-нуклеотидной вставки, а также векторами, кодирующими две гидовые РНК 7a и 7b, к указанной вставке, и Cas9. Cas9 в комплексе с гидовыми РНК вносит двуцепочечные разрывы по краям от вставки. В случае репарации двуцепочечных разрывов по NHEJ-пути с потерей вставки приводит к восстановлению функциональной копии GFP, что можно детектировать с использованием проточной цитометрии. В данной системе оценивали эффект разных концентраций известного ингибитора NHEJ-пути – Nu7441, а также ингибитора s17. В качестве отрицательных контролей (Cntr-1, Cntr-2) использовали клетки котрансфецированные EJ7-GFP и 7a или 7b. В качестве положительного контроля (Cntr+) использовали клетки котрансфецированные тремя плазмидами, без обработки исследуемыми веществами. Б – влияние s17 на кинетику репарации двуцепочечных разрывов ДНК, оцененное методом ДНК-комет. Двуцепочечные разрывы в клетках HEK293T индуцировали обработкой клеток 50 мкМ эпопозидом в течение 1 часа, после чего индуктор удаляли, а клетки помещали в среду с исследуемыми соединениями (Nu7441 или s17) или в полную ростовую среду, содержащую DMSO. Степень повреждения ДНК оценивали методом ДНК-комет. В качестве меры повреждения использовали процент ДНК в “хвостах” комет. Для каждой экспериментальной точки оценку проводили для 100 клеток. Статистическая значимость отличий определялась однофакторным ANOVA с коррекцией на множественные сравнения по Бонферрони, ns — нет значимых отличий, * = adj. p-value < 0,05, ** = adj. p-value < 0,01, *** = adj. p-value < 0,001, **** = adj. p-value < 0,0001. Результаты множественных сравнений результатов оценки степени повреждения ДНК методом “ДНК-комет” представлены на рисунке Б (правая панель). Розовые квадраты обозначают пары данных, которые статистически значимо отличаются.

Однако исследуемый ингибитор s17 может влиять на кинетику репарации, а не на общую эффективность процесса, что может сказываться на стабильности клеточного генома и приводить к генотоксическому стрессу. Чтобы оценить влияние s17 на

кинетику процесса восстановления мы прибегли к иной системе – анализу степени повреждений ДНК методом ДНК-комет [276]. Для индукции двуцепочечных разрывов ДНК клетки НЕК293Т обрабатывали в течение 1 часа этопозидом, нарушающим работу топоизомеразы II и приводящим к накоплению в клетках двуцепочечных разрывов ДНК. После отмывки клеток от этопозида их помещали в полную ростовую среду с или без добавления тестируемого ингибитора. Через 0-300 минут после удаления этопозида клетки снимали, помещали в легкоплавкую агарозу, проводили лизис в нейтральных условиях и электрофорез нуклеиновых кислот. После окрашивания ДНК пропидий йодидом степень повреждения нуклеиновых кислот оценивали по соотношению сигнала от ДНК в хвосте и голове «кометы». Геномная нативная ДНК за счет своего размера практически не перемещается в геле, формируя голову, а поврежденная, более короткая движется в сторону анода, формируя хвост [276].

Медианное значение количества ДНК в хвосте для клеток без обработки этопозидом составляло 11-12 %, после часовой обработки этопозидом этот показатель увеличивался до 37 %, что свидетельствует в пользу повреждения ДНК (Рис. 60, Б). В присутствии полной ростовой среды без ингибиторов повреждения ДНК восстанавливались через 150 минут, а в присутствии Nu7441 процент поврежденной ДНК отличался от контроля даже через 300 минут после удаления этопозида (Рис. 60, Б). 50 мкМ s17 не влиял на кинетику восстановления повреждений ДНК и уже через 150 минут, как и в клетках, культивируемых в полной ростовой среде без ингибиторов, степень повреждения ДНК не отличалась от контроля (Рис. 60, Б). Таким образом, s17 не влияет не только на общую эффективность репарации двуцепочечных разрывов ДНК по NHEJ-пути, но и на кинетику процесса восстановления подобных повреждений [16].

4.3.3.6. 4-Хлорфенильный, 4-метоксибензоильный и метильный заместители при 1,2,3,3a-тетрагидропиррол[1,2-a]хинолиновом ядре s17 важны для проявления им ингибирующих свойств против ВИЧ-1

По результатам, описанным в предыдущих разделах, становится очевидно, что низкомолекулярные ингибиторы, нарушающие взаимодействие IN с Ku70 за счет связывания в кармане Ku70, например, s17, являются безопасными для клеточных процессов и одновременно эффективными в отношении ВИЧ-1. Дальнейшая модификация s17 для улучшения его ингибирующих свойств невозможна без детального

понимания механизма его взаимодействия с Ku70 и участия в этом процессе различных заместителей в s17.

С использованием метода молекулярной динамики мы получили структуру комплекса s17 с гетеродимером Ku70/Ku80 (Рис. 61). Ингибитор преимущественно взаимодействует с гидрофобными аминокислотными остатками в составе этого кармана включая те, что вовлечены во взаимодействие с IN. Так например, L76 в структуре комплекса зажат между 4-хлорфенильным и 4-метоксибензоильным заместителем s17. Гидрофобная часть 1,2,3,3а-тетрагидропирроло[1,2-а]хинолинового ядра, включая метильный заместитель, обращены внутрь кармана и взаимодействуют с гидрофобными частями аминокислотных остатков Ku70 (P408, L483, N480, V405 и Q484 и F426) и Ku80 (M427, E428). Два других заместителя (карбоксамид и нитрил) экспонированы в раствор (Рис. 61) [16].

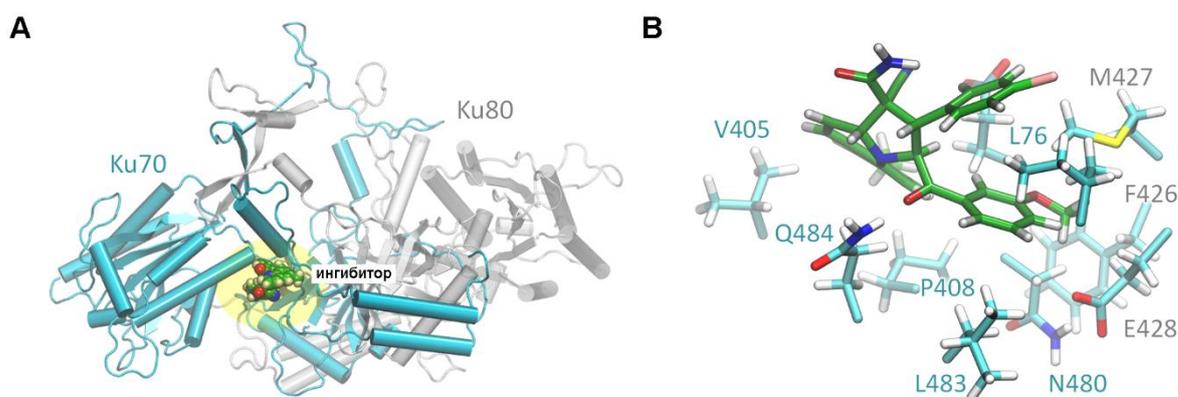


Рисунок 61. Структура гетеродимера Ku70/Ku80 в комплексе с ингибитором s17, полученная методами молекулярной динамики. А – Общая структура полученного комплекса. Ku70 отмечен голубым, Ku80 - серым, ингибитор окрашен в цвета атомов. Б – Сайт связывания s17 в структуре гетеродимера Ku70/Ku80. Атомы углерода аминокислотных остатков отмечены голубым, а ингибитора – зеленым. Голубые подписи аминокислотных остатков использованы для обозначения остатков Ku70, а серые – Ku80.

На основании этой информации нами была получена серия производных s17 (s17_der1 - s17_der9) с заменами 4-метоксибензоильного и 4-хлорфенильного заместителей, которые, согласно предсказанной структуре комплекса, должны играть ключевую роль (Рис. 61). Для каждого из них была оценена способность подавлять ранние этапы репликации ВИЧ-1 в культуре клеток НЕК293Т [16].

Наиболее серьезное увеличение EC50 было обнаружено, когда 4-хлорфенильный радикал был замещен на 1,4-диметокси-3-метилнафтален (s17_der9), на 4-цианофенил (s17_der7) или 3-метокси-4-нитрофенил (s17_der8), т.е. при замене на более крупные заместители, что может влиять на правильное позиционирование ингибитора в кармане (Рис. 62) [16].

Ощутимое снижение ингибирующего потенциала соединений также было обнаружено для производных s17_der5 и s17_der6 (EC50 45-46 мкМ). В первом случае атом хлора в 4-хлорфенильной группе был замещен на гидрофильную гидроксильную группу. Во втором случае 4-метоксибензоильный заместитель был заменен на меньший по размеру гидрофобный – тиофен-3-карбонил (Рис. 62) [16].

Стоит также отметить, что среди протестированных соединений было два производных s17_der1 и s17_der2 с заменой 4-метоксибензоила на бензоил и 4-хлорфенила на фенил, соответственно, которые имели сравнимую с s17 активность. Два других соединения s17_der3 и s17_der4 с заменой 4-хлорфенила на 4-фторфенил и 2-фторфенил сохраняли свою активность, хотя EC50 и было больше в 1,5 раза по сравнению с s17 (Рис. 62) [16].

В совокупности представленные данные подтверждают важность 4-хлорфенильного и 4-метоксибензоильного заместителей в структуре s17 для ингибирования ВИЧ-1 [16].

Второе проверенное нами предположение касалось важности метильной группы, соединенной с 1,2,3,3а-тетрагидропиррол[1,2-а]хинолиновым ядром для анти-ВИЧ активности. По результатам молекулярной динамики эта группа обращена в сторону гидрофобного кармана Ku70. Мы получили два производных s17 по этой позиции. В одном из них s17_der10 была удалена метильная группа, во втором s17_der11 – заменена на метоксигруппу (Рис. 62). Оба соединения хуже подавляли ранние этапы репликации ВИЧ-1, но в разной степени: отсутствие метила повышало EC50 в 2,3 раза до 28 мкМ, а замена на более объемную и полярную метоксигруппу – в 5 раз до 60 мкМ (Рис. 62), что также подтверждает важность метильной группы в составе s17 для проявления им анти-ВИЧ активности [16].

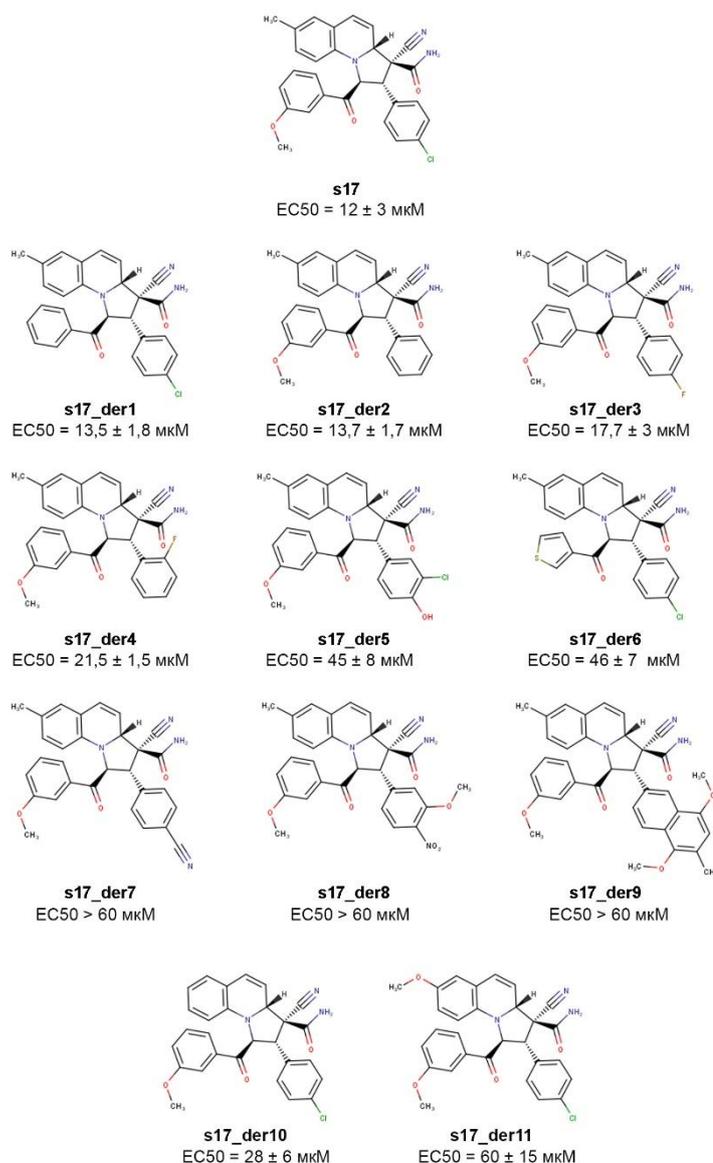


Рисунок 62. Структурные формулы s17 и его производных, а также их эффект на эффективность трансдукции клеток псевдовиром ВИЧ_wt. Цитотоксический эффект на клетках НЕК293Т не обнаружен для всех исследованных соединений вплоть до 60 мкМ.

4.3.3.7. Бензотиазольный аналог s17 ингибирует ранние этапы репликации ВИЧ-1

1,2,3,3а-тетрагидропиррол[1,2-а]хинолиновое ядро s17 из-за особенностей химической структуры со временем может спонтанно возвращаться в ароматическое состояние хинолина с разрывом пиррольного кольца (Рис. 63), а также подвергаться окислению, что делает работу с подобными соединениями неудобной. Поскольку по данным молекулярной динамики комплекса s17 с гетеродимером Ku70/Ku80 данное ядро скорее является элементом, корректно позиционирующим заместители в структуре

кармана белка, было принято решение заменить 1,2,3,3а-тетрагидропиррол[1,2-а]хинолиновое ядро на более стабильное, но похожее по геометрии ядро – бензотиазольное (Рис. 63).

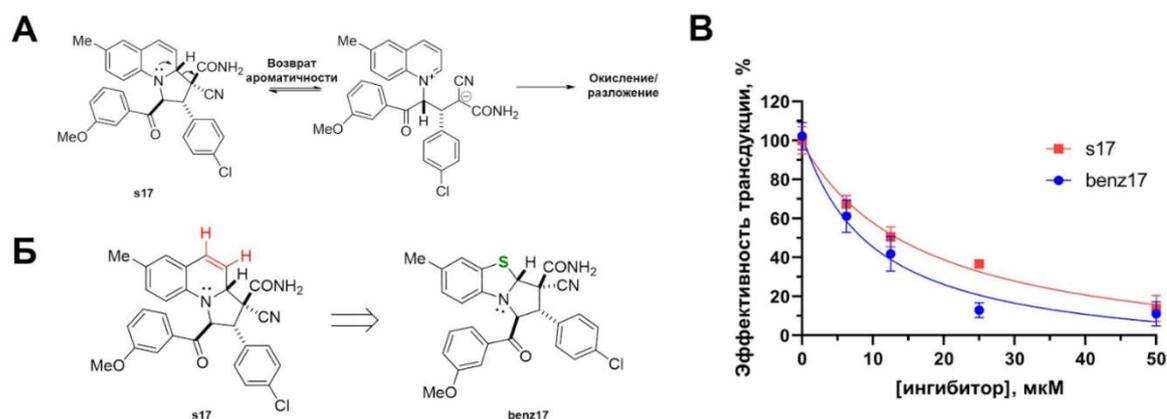


Рисунок 63. Бензотиазольный аналог s17 (benz17) эффективно подавляет ранние этапы репликации ВИЧ-1. А – Схема спонтанной ароматизации 1,2,3,3а-тетрагидропиррол[1,2-а]хинолинового ядра s17 с разрывом пиррольного кольца и превращением в хинолин. Б – Структура бензотиазольного аналога s17 – benz17. В – Сравнение эффекта benz17 и s17 на трансдукцию клеток НЕК293Т псевдовиром ВИЧ_wt

Мы получили полный аналог s17 в терминах заместителей и назвали его benz17 (Рис. 63) [20]. Он, как и s17, не проявлял цитотоксического действия вплоть до 60 мкМ и подавлял ранние этапы репликации ВИЧ-1 (Рис. 63), причем EC50 для него составило 8 мкМ, что в 1,5 раза меньше, чем для s17.

Заключение к разделу 4.3

В результате проделанной работы нам удалось успешно решить все поставленные задачи, направленные на создание и характеристику ингибиторов, нарушающих взаимодействия вирусной IN и клеточного белка Ku70, которое критически важно для инициации постинтеграционной репарации ВИЧ-1.

Во-первых, была разработана флуоресцентная система для *in vitro* поиска и анализа соединений, нарушающих взаимодействие двух исследуемых белков, не предполагающая использования антител, что удешевляет технологию разработки таких соединений. Предложены несколько вариантов реализации данной системы: в планшетном формате с детекцией флуоресценции непосредственно в 96-луночных

планшетах и вариант анализа с предварительным разделением образцов в ДСН ПААГ, позволяющий анализировать эффект ингибиторов, обладающих собственной флуоресценцией.

Во-вторых, с использованием разработанной системы нам удалось детально охарактеризовать механизм действия конъюгатов олигонуклеотидов с эозином-У в отношении комплекса IN/Ku70. Было показано, что такие соединения являются конкурентными ингибиторами, эозиновая часть которых заякоривает молекулу в С-концевом домене IN, а олигонуклеотидная часть экранирует аминокислотные остатки E212 и L213 в составе IN, что нарушает взаимодействие с ними белка Ku70. Для проявления ингибирующего действия важна длина олигонуклеотидного фрагмента соединений, а также гетероциклические основания в их составе, но не сахаро-фосфатный остов. Поскольку такие конъюгаты помимо описанной нами активности еще и подавляют каталитические функции IN, нам не удалось их использовать для проверки гипотезы, о возможности подавления постинтеграционной репарации ВИЧ-1 за счет нарушения взаимодействия IN с Ku70, однако, они продемонстрировали принципиальную возможность таргетирования этого комплекса.

В-третьих, с использованием методов пептидного фишинга, делеционного и точечного мутагенеза мы смогли уточнить сайт связывания IN ВИЧ-1 в составе клеточного белка Ku70. Было показано, что ключевую роль в этом взаимодействии играют следующие аминокислотные остатки Ku70: I72, S73, I76, а дополнительную – остаток S69.

В-четвертых, нам удалось разработать первый в своем роде низкомолекулярный ингибитор взаимодействия IN с Ku70, получивший название s17, который как раз и таргетирует карман, содержащий указанные выше аминокислотные остатки. Мы не только смогли доказать, что s17, связываясь с Ku70 блокирует его взаимодействие с IN, но и также показали, что данное соединение блокирует репликацию ВИЧ-1, действуя на этапе постинтеграционной репарации, что еще раз доказывает строгую необходимость образования комплекса IN с Ku70 для успешной инициации постинтеграционной репарации и репликации ВИЧ-1, в целом. Это открывает перспективы для создания нового класса противовирусных препаратов, действующих на ранее недоступную мишень.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение следует отметить, что в ходе проведенной работы был получен ряд принципиально новых данных о молекулярных механизмах постинтеграционной репарации ВИЧ-1. Продемонстрировано, что начальные этапы этого процесса напрямую зависят от компонентов клеточных путей репарации двуцепочечных разрывов ДНК – киназ ATM и DNA-PK, которые активируются в ответ на интеграцию вирусной кДНК в геном инфицированной клетки, но по необычному механизму. 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-PK 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. На эту роль подходят 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 как от компонентов путей репарации двуцепочечных разрывов ДНК, так и от компонентов эксцизионной репарации.

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 в которой стабилизированы и маскированы интегразой, что объясняет невозможность прямого привлечения компонентов 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-PK и киназу ATM. За счет фосфорилирующей активности эти белки 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. 64).

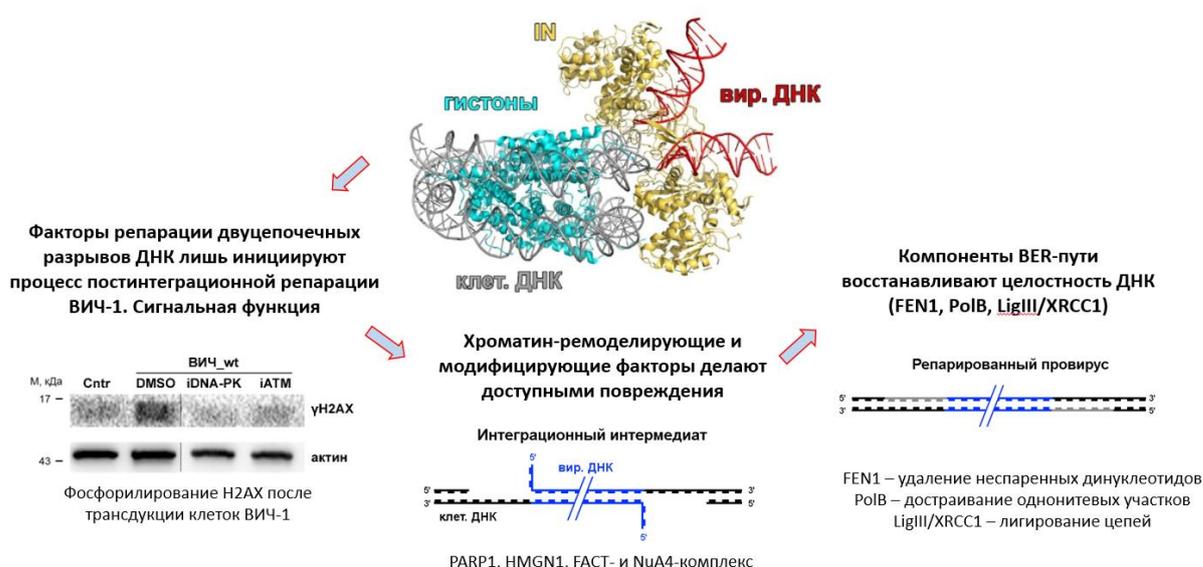


Рисунок 64. Гипотеза о совместном действии факторов репарации двуцепочечных разрывов ДНК и компонентов эксцизионной репарации оснований в процессе постинтеграционной репарации ВИЧ-1. Интеграционный интермедиат сразу после встраивания концов вирусной кДНК в клеточную ДНК стабилизирован и маскирован интегразой, 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 встроенной 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 интегразы 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 и 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 этого комплекса для инициации этого процесса.

Представленные в данной работе результаты и основанные на них выводы открывают перспективу открытия как новых направлений для поиска препаратов для терапии ВИЧ, так и деталей механизма взаимодействия вируса с клеткой.

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.

- б. 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pennings P. S. HIV drug resistance: Problems and perspectives // *Infect. Dis. Rep.* 2013. Vol. 5, P. 21–25.
2. Weng Y. W. et al. Trend of HIV transmitted drug resistance before and after implementation of HAART regimen restriction in the treatment of HIV-1 infected patients in southern Taiwan // *BMC Infect. Dis.* BMC Infect Dis, 2019. Vol. 19, № 1, P. 741.
3. Kirichenko A. et al. HIV-1 Drug Resistance among Treatment-Naïve Patients in Russia: Analysis of the National Database, 2006-2022 // *Viruses.* 2023. Vol. 15, № 4, P. 991.
4. Engelman A. N., Singh P. K. Cellular and molecular mechanisms of HIV-1 integration targeting // *Cell. Mol. Life Sci.* NIH Public Access, 2018. Vol. 75, № 14. P. 2491.
5. Bruggemans A. et al. GS-9822, a Preclinical LEDGIN Candidate, Displays a Block-and-Lock Phenotype in Cell Culture // *Antimicrob. Agents Chemother.* American Society for Microbiology, 2021. Vol. 65, № 5, P. e02328-20.
6. Anisenko A. N. et al. A qPCR assay for measuring the post-integrational DNA repair in HIV-1 replication // *J. Virol. Methods.* 2018. Vol. 262. P. 12–19.
7. Анисенко А. Н., Готтих М. Б. Участие клеточных систем репарации ДНК в репликации ВИЧ-1 // *Молекулярная биология*, 2019. Т. 53, № 3. С. 355–366.
8. Knyazhanskaya E. et al. NHEJ pathway is involved in post-integrational DNA repair due to Ku70 binding to HIV-1 integrase // *Retrovirology.* 2019. Vol. 16, № 1. P. 30.
9. Anisenko A. et al. Phosphorylation Targets of DNA-PK and Their Role in HIV-1 Replication // *Cells.* 2020. Vol. 9, № 8, P. 1907.
10. Rozina A. et al. Complex Relationships between HIV-1 Integrase and Its Cellular Partners // *Int. J. Mol. Sci.* 2022, Vol. 23, P. 12341.
11. Galkin S. et al. 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.
12. Anisenko A. et al. Transcriptome dataset of HEK293T cells depleted of one of the subunits of the DNA-PK complex: Ku70, Ku80 or DNA-PKcs // *Data Brief.* 2021. Vol. 39. P. 107596.
13. Shadrina O. et al. 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. P. 139–149.
14. Igova E. et al. Complex of HIV-1 Integrase with Cellular Ku Protein: Interaction Interface and Search for Inhibitors // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 6. P. 2908.
15. Anisenko A. et al. Both ATM and DNA-PK Are the Main Regulators of HIV-1 Post-Integrational DNA Repair // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, № 3. P. 2797.
16. Anisenko A. et al. KuINins as a New Class of HIV-1 Inhibitors That Block Post-Integration DNA Repair // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, № 24. P. 17354.
17. Анисенко А. Н. и др. Постинтеграционная репарация ВИЧ-1 сопряжена с активацией клеточных протеинкиназ DNA-PK и ATM и фосфорилированием их мишеней // *Биохимия*, 2024. Т. 89, № 6. С. 1117–1128.
18. Агапкина Ю.Ю. и др. Новые клеточные партнеры интегразы ВИЧ-1 и их роль в репликации вируса // *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни.* 2025. Т. 522, № 1. P. 324–329.
19. Фейгин С. Е. и др. Клеточные белки HSP60 и SAHN как негативные регуляторы ранних этапов репликации ВИЧ-1 // *Биохимия*, 2025. Т. 90, № 11. С. 1754–1764.
20. Molchanova M. V. et al. The cycloaddition reaction of benzothiazolium ylides with α -cyanocinnamamides: the synthesis of structural analogs of inhibitors of HIV-1 post-

- integrational repair // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2024. Vol. 60. P. 544-548.
21. Cunningham A. L. et al. Manipulation of dendritic cell function by viruses // *Curr. Opin. Microbiol.* 2010. Vol. 13, № 4. P. 524–529.
 22. Kawamura T. et al. The role of Langerhans cells in the sexual transmission of HIV // *J. Dermatol. Sci.* 2005. Vol. 40, № 3. P. 147–155.
 23. Kramer-Hämmerle S. et al. Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus // *Virus Res.* 2005. Vol. 111, № 2. P. 194–213.
 24. Weiss R. A. How does HIV cause AIDS? // *Science.* 1993. Vol. 260, № 5112. P. 1273–1279.
 25. Jiang C. et al. Distinct viral reservoirs in individuals with spontaneous control of HIV-1 // *Nature.* 2020. Vol. 585, № 7824. P. 261–267.
 26. Falcinelli S. D. et al. New Frontiers in Measuring and Characterizing the HIV Reservoir // *Front. Microbiol.* 2019. Vol. 10. P. 2878
 27. Stadeli K. M., Richman D. D. Rates of emergence of HIV drug resistance in resource-limited settings: a systematic review // *Antivir. Ther.* 2013. Vol. 18, № 1. P. 115–123.
 28. Uchil P. D., Mothes W. HIV Entry Revisited // *Cell.* 2009. Vol. 137, № 3. P. 402–404.
 29. Li G., De Clercq E. HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016. Vol. 80, № 3. P. 679–731.
 30. Freed E. O. HIV-1 assembly, release and maturation // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. Vol. 13, № 8. P. 484.
 31. Nisole S., Saïb A. Early steps of retrovirus replicative cycle // *Retrovirology.* 2004. Vol. 1. P. 9.
 32. Brik A., Wong C. H. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery // *Org. Biomol. Chem.* 2003. Vol. 1, № 1. P. 5–14.
 33. Miller V. et al. Dual resistance to zidovudine and lamivudine in patients treated with zidovudine-lamivudine combination therapy: association with therapy failure // *J. Infect. Dis.* 1998. Vol. 177, № 6. P. 1521–1532.
 34. Fauci A. S. HIV and AIDS: 20 years of science // *Nat. Med.* 2003. Vol. 9, № 7. P. 839–843.
 35. Piscaglia M. et al. Emerging drugs for the treatment of HIV/AIDS: a review of 2019/2020 phase II and III trials // *Expert Opin. Emerg. Drugs.* 2021. Vol. 26, № 3. P. 219–230.
 36. Lowe D. M. et al. HIV-1 reverse transcriptase: crystallization and analysis of domain structure by limited proteolysis // *Biochemistry.* 1988. Vol. 27, № 25. P. 8884–8889.
 37. Jacobo-Molina A. et al. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993. Vol. 90, № 13. P. 6320–6324.
 38. Sarafianos S. G. et al. Structure and Function of HIV-1 Reverse Transcriptase: Molecular Mechanisms of Polymerization and Inhibition // *J. Mol. Biol.* 2009. Vol. 385, № 3. P. 693–713.
 39. Chung S. et al. Examining the role of the HIV-1 reverse transcriptase p51 subunit in positioning and hydrolysis of RNA/DNA hybrids // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288, № 22. P. 16177–16184.
 40. Xavier RUIZ F., Arnold E. Evolving understanding of HIV-1 reverse transcriptase structure, function, inhibition, and resistance // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2020. Vol. 61. P. 113–123.
 41. Figiel M. L. et al. Coordination between the polymerase and RNase H activity of HIV-1 reverse transcriptase // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45, № 6. P. 3341–3352.
 42. DeStefano J. J. et al. Polymerization and RNase H activities of the reverse

- transcriptases from avian myeloblastosis, human immunodeficiency, and moloney murine leukemia viruses are functionally uncoupled // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266, № 12. P. 7423–7431.
43. Purohit V. et al. Mechanisms that prevent template inactivation by HIV-1 reverse transcriptase RNase H cleavages // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, № 17. P. 12598–12609.
 44. Roberts J. D., Bebenek K., Kunkel T. A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1 // *Science.* 1988. Vol. 242, № 4882. P. 1171–1173.
 45. Bebenek K. et al. Error-prone polymerization by HIV-1 reverse transcriptase: Contribution of template-primer misalignment, miscoding, and termination probability to mutational hot spots // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, № 14. P. 10324–10334.
 46. Spearman P., Freed E. O. HIV interactions with host cell proteins. Springer, 2009. P. 204.
 47. Singh A. K. et al. Current insights and molecular docking studies of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors // *Chem. Biol. Drug Des.* 2024. Vol. 103, № 1.
 48. De Clercq E. 1984-Discovery of the First Anti-HIV Drug, Suramin // *Viruses.* 2021. Vol. 13, № 8.
 49. Yoshida Y. et al. Structure, Synthesis and Inhibition Mechanism of Nucleoside Analogues as HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs) // *ChemMedChem.* 2021. Vol. 16, № 5. P. 743–766.
 50. Furman P. A., Barry D. W. Spectrum of antiviral activity and mechanism of action of zidovudine. An overview // *Am. J. Med.* 1988. Vol. 85, № 2A. P. 176–181.
 51. Danesi R. et al. Pharmacokinetic optimisation of the treatment of cancer with high dose zidovudine // *Clin. Pharmacokinet.* 1998. Vol. 34, № 2. P. 173–180.
 52. De Clercq E. Antiviral drugs: current state of the art // *J. Clin. Virol.* 2001. Vol. 22, № 1. P. 73–89.
 53. Foster R. H., Faulds D. Abacavir // *Drugs.* 1998. Vol. 55, № 5. P. 729–736.
 54. Smith D. B. et al. The design, synthesis, and antiviral activity of monofluoro and difluoro analogues of 4'-azidocytidine against hepatitis C virus replication: the discovery of 4'-azido-2'-deoxy-2'-fluorocytidine and 4'-azido-2'-dideoxy-2',2'-difluorocytidine // *J. Med. Chem.* 2009. Vol. 52, № 9. P. 2971–2978.
 55. Wang R. R. et al. Azvudine, a novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor showed good drug combination features and better inhibition on drug-resistant strains than lamivudine in vitro // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, № 8, P. e105617.
 56. Harrison C. Coronavirus puts drug repurposing on the fast track // *Nat. Biotechnol.* 2020. Vol. 38, № 4. P. 379–381.
 57. Skoblov Y. et al. Intracellular metabolism and pharmacokinetics of 5'-hydrogenphosphonate of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, a prodrug of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine // *Antiviral Res.* 2004. Vol. 63, № 2. P. 107–113.
 58. Хандажинская А. Л. и др. 5'-Фосфонаты AZT: достижения и перспективы в лечении и профилактике ВИЧ-инфекции // *Acta Naturae.* 2013. Vol. 5, № 3. P. 54–61.
 59. Childs-Kean L. M., Egelund E. F., Jourjy J. Tenofovir Alafenamide for the Treatment of Chronic Hepatitis B Monoinfection // *Pharmacotherapy.* 2018. Vol. 38, № 10. P. 1051–1057.
 60. Murchu E. O. et al. Oral pre-exposure prophylaxis (PrEP) to prevent HIV: a systematic review and meta-analysis of clinical effectiveness, safety, adherence and risk compensation in all populations // *BMJ Open.* 2022. Vol. 12, № 5, P. e048478.
 61. Li G., Wang Y., De Clercq E. Approved HIV reverse transcriptase inhibitors in the past decade // *Acta Pharm. Sin. B.* 2022. Vol. 12, № 4. P. 1567–1590.

62. Al-Salama Z. T. El sulfavirine: First Global Approval // *Drugs*. 2017. Vol. 77, № 16. P. 1811–1816.
63. Kravchenko A. V., Yurin O. G., Pokrovskaya A. V. 25 years of the use of domestic original antiretroviral drugs in first-line ART regimens of HIV-infection // *Infect. Dis.* 2023. Vol. 12, № 2. P. 75–82.
64. Kravchenko A. V., Maleyev V. V. Current antiretroviral therapy: A review // *Ter. Arkh.* 2023. Vol. 95, № 12. P. 1044–1051.
65. Supuran C. T. et al. Biochemical profiling of anti-HIV prodrug El sulfavirine (Elpida[®]) and its active form VM1500A against a panel of twelve human carbonic anhydrase isoforms // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2021. Vol. 36, № 1. P. 1056–1060.
66. Rittinger K., Divita G., Goody R. S. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase substrate-induced conformational changes and the mechanism of inhibition by nonnucleoside inhibitors. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995. Vol. 92, № 17. P. 8046–8049.
67. Sluis-Cremer N., Arion D., Parniak M. A. Destabilization of the HIV-1 Reverse Transcriptase Dimer upon Interaction with N-Acyl Hydrazone Inhibitors // *Mol. Pharmacol.* 2002. Vol. 62, № 2. P. 398–405.
68. Rodríguez-Barrios F. et al. Identification of a Putative Binding Site for [2',5'-Bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)- β -D-ribofuranosyl]-3'-spiro-5'-(4'-amino-1',2'-oxathiole-2',2'-dioxide)thymine (TSAO) Derivatives at the p51–p66 Interface of HIV-1 R // *J. Med. Chem.* 2001. Vol. 44, № 12. P. 1853–1865.
69. Srivastava S., Sluis-Cremer N., Tachedjian G. Dimerization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase as an Antiviral Target // *Curr. Pharm. Des.* 2006. Vol. 12, № 15. P. 1879–1894.
70. Das K. et al. HIV-1 reverse transcriptase complex with DNA and nevirapine reveals non-nucleoside inhibition mechanism // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. Vol. 19, № 2. P. 253–259.
71. Vanangamudi M., Kurup S., Namasivayam V. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs): a brief overview of clinically approved drugs and combination regimens // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2020. Vol. 54. P. 179–187.
72. Park J.-H. et al. Non-Cryogenic Structure and Dynamics of HIV-1 Integrase Catalytic Core Domain by X-ray Free-Electron Lasers // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, № 8. P. 1943.
73. Hare S. et al. Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer // *Nature*. 2010. Vol. 464, № 7286. P. 232–236.
74. Pandey K. K. et al. Rous Sarcoma Virus Synaptic Complex Capable of Concerted Integration Is Kinetically Trapped by Human Immunodeficiency Virus Integrase Strand Transfer Inhibitors // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289, № 28. P. 19648–19658.
75. Pandey K. K. et al. A C-terminal “Tail” Region in the Rous Sarcoma Virus Integrase Provides High Plasticity of Functional Integrase Oligomerization during Intasome Assembly // *J. Biol. Chem.* 2017. Vol. 292, № 12. P. 5018–5030.
76. Reinke R., Lee D. J., Robinson W. E. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates by the Integrase Inhibitor L-731,988, a Diketo Acid // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. Vol. 46, № 10. P. 3301–3303.
77. Summa V. et al. Discovery of Raltegravir, a Potent, Selective Orally Bioavailable HIV-Integrase Inhibitor for the Treatment of HIV-AIDS Infection // *J. Med. Chem.* 2008. Vol. 51, № 18. P. 5843–5855.
78. Sato M. et al. Novel HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from Quinolone Antibiotics // *J. Med. Chem.* 2006. Vol. 49, № 5. P. 1506–1508.
79. Maertens G. N., Hare S., Cherepanov P. The mechanism of retroviral integration from

- X-ray structures of its key intermediates // *Nature*. 2010. Vol. 468, № 7321. P. 326–329.
80. Blanco J.-L. et al. HIV-1 Integrase Inhibitor Resistance and Its Clinical Implications // *J. Infect. Dis.* 2011. Vol. 203, № 9. P. 1204–1214.
 81. Shah B. M., Schafer J. J., DeSimone J. A. Dolutegravir: A New Integrase Strand Transfer Inhibitor for the Treatment of HIV // *Pharmacother.* 2013. Vol. 34, № 5. P. 506–520.
 82. Deeks E. D. Bictegravir/Emtricitabine/Tenofovir Alafenamide: A Review in HIV-1 Infection // *Drugs*. 2018. Vol. 78, № 17. P. 1817–1828.
 83. Passos D. O. et al. Structural basis for strand-transfer inhibitor binding to HIV intasomes // *Science*. 2020. Vol. 367, № 6479. P. 810–814.
 84. Cook N. J. et al. Structural basis of second-generation HIV integrase inhibitor action and viral resistance // *Science*. 2020. Vol. 367, № 6479. P. 806–810.
 85. Scarsi K. K. et al. HIV-1 Integrase Inhibitors: A Comparative Review of Efficacy and Safety // *Drugs*. 2020. Vol. 80, № 16. P. 1649–1676.
 86. Beck Z., Morris G., Elder J. Defining HIV-1 Protease Substrate Selectivity // *Curr. Drug Targets Infect Disord.* 2002. Vol. 2, № 1. P. 37–50.
 87. Gulnik S., Erickson J. W., Xie D. HIV protease: Enzyme function and drug resistance // *Vitamins Hormones*. 2000. P. 213–256.
 88. Wensing A. M. J., van Maarseveen N. M., Nijhuis M. Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance // *Antiviral Res.* 2010. Vol. 85, № 1. P. 59–74.
 89. Craig J. C. et al. Antiviral properties of Ro 31-8959, an inhibitor of human immunodeficiency virus (HIV) proteinase // *Antiviral Res.* 1991. Vol. 16, № 4. P. 295–305.
 90. Muzammil S. et al. Unique Thermodynamic Response of Tipranavir to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Drug Resistance Mutations // *J. Virol.* 2007. Vol. 81, № 10. P. 5144–5154.
 91. Plosker G. L., Figgitt D. P. Tipranavir // *Drugs*. 2003. Vol. 63, № 15. P. 1611–1618.
 92. Wang Y. et al. The higher barrier of darunavir and tipranavir resistance for HIV-1 protease // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. Vol. 412, № 4. P. 737–742.
 93. Ergin H. E. et al. HIV, Antiretroviral Therapy and Metabolic Alterations: A Review // *Cureus*. 2020.
 94. Lingappa J. R., Lingappa V. R., Reed J. C. Addressing Antiretroviral Drug Resistance with Host-Targeting Drugs-First Steps towards Developing a Host-Targeting HIV-1 Assembly Inhibitor // *Viruses*. 2021. Vol. 13, № 3, P. 451.
 95. Weiss C. D., Levy J. A., White J. M. Oligomeric organization of gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles // *J. Virol.* 1990. Vol. 64, № 11. P. 5674–5677.
 96. Kwong P. D. et al. Oligomeric Modeling and Electrostatic Analysis of the gp120 Envelope Glycoprotein of Human Immunodeficiency Virus // *J. Virol.* 2000. Vol. 74, № 4. P. 1961–1972.
 97. Herschhorn A. et al. Release of gp120 Restraints Leads to an Entry-Competent Intermediate State of the HIV-1 Envelope Glycoproteins // *MBio*. 2016. Vol. 7, № 5, P. e01598-16.
 98. Tan Q. et al. Structure of the CCR5 Chemokine Receptor–HIV Entry Inhibitor Maraviroc Complex // *Science*. 2013. Vol. 341, № 6152. P. 1387–1390.
 99. Dorr P. et al. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity // *Antimicrob. Agents Chemother.*

2005. Vol. 49, № 11. P. 4721–4732.
100. O'Brien S. J., Moore J. P. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS // *Immunol. Rev.* Vol. 177, № 1. P. 99–111.
 101. Wasmuth J.-C., Rockstroh J. K., Hardy W. D. Drug safety evaluation of maraviroc for the treatment of HIV infection // *Expert Opin. Drug Saf.* 2011. Vol. 11, № 1. P. 161–174.
 102. Liu R. et al. Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection // *Cell.* 1996. Vol. 86, № 3. P. 367–377.
 103. van Lelyveld S. F. L. et al. Clinical outcome of maraviroc-containing therapy in heavily pre-treated HIV-1-infected patients // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2016. Vol. 47, № 1. P. 84–90.
 104. Perry C. M. Maraviroc // *Drugs.* 2010. Vol. 70, № 9. P. 1189–1213.
 105. Giaquinto C. et al. Pharmacokinetics, Safety and Efficacy of Maraviroc in Treatment-experienced Pediatric Patients Infected With CCR5-Tropic HIV-1 // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2018. Vol. 37, № 5. P. 459–465.
 106. Rosebush J. C. et al. Pharmacokinetics and safety of maraviroc in neonates // *AIDS.* 2020. Vol. 35, № 3. P. 419–427.
 107. Palladino C. et al. Off-label use of maraviroc in HIV-1-infected paediatric patients in clinical practice // *AIDS.* 2015. Vol. 29, № 16. P. 2155–2159.
 108. Straubinger T., Kay K., Bies R. Modeling HIV Pre-Exposure Prophylaxis // *Front. Pharmacol.* 2020. Vol. 10. P. 1514.
 109. Tatham L. M. et al. Towards a Maraviroc long-acting injectable nanoformulation // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2019. Vol. 138. P. 92–98.
 110. Flynn J. K. et al. Analysis of Clinical HIV-1 Strains with Resistance to Maraviroc Reveals Strain-Specific Resistance Mutations, Variable Degrees of Resistance, and Minimal Cross-Resistance to Other CCR5 Antagonists // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2017. Vol. 33, № 12. P. 1220–1235.
 111. Westby M. et al. Emergence of CXCR4-Using Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Variants in a Minority of HIV-1-Infected Patients following Treatment with the CCR5 Antagonist Maraviroc Is from a Pretreatment CXCR4-Using Virus Reservoir // *J. Virol.* 2006. Vol. 80, № 10. P. 4909–4920.
 112. Lewis M. E. et al. Highly prevalent Russian HIV-1 V3-loop sequence variants are susceptible to maraviroc // *Antivir. Chem. Chemother.* 2021. Vol. 29.
 113. Roche M. et al. HIV-1 Escape from the CCR5 Antagonist Maraviroc Associated with an Altered and Less-Efficient Mechanism of gp120-CCR5 Engagement That Attenuates Macrophage Tropism // *J. Virol.* 2011. Vol. 85, № 9. P. 4330–4342.
 114. Panos G., Watson D. C. Effect of HIV-1 subtype and tropism on treatment with chemokine coreceptor entry inhibitors; overview of viral entry inhibition // *Crit. Rev. Microbiol.* 2014. Vol. 41, № 4. P. 473–487.
 115. Zhang C. et al. Discoveries and developments of CXCR4-targeted HIV-1 entry inhibitors // *Exp. Biol. Med.* 2020. Vol. 245, № 5. P. 477–485.
 116. Su S., Xu W., Jiang S. Virus Entry Inhibitors: Past, Present, and Future // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2022. Vol. 1366. P. 1–13.
 117. Monteiro A., Yu K. O. A., Hicar M. D. Peptide-based Fusion Inhibitors for Preventing the Six-helix Bundle Formation of Class I Fusion Proteins: HIV and Beyond // *Curr. HIV Res.* 2021. Vol. 19, № 6. P. 465–475.
 118. Yuan C. et al. Mutations of Glu560 within HIV-1 Envelope Glycoprotein N-terminal heptad repeat region contribute to resistance to peptide inhibitors of virus entry //

- Retrovirology. 2019. Vol. 16, № 1. P. 36.
119. Dingens A. S. et al. Massively Parallel Profiling of HIV-1 Resistance to the Fusion Inhibitor Enfuvirtide // *Viruses*. 2019. Vol. 11, № 5. P. 439.
 120. Ghosh R. K., Ghosh S. M., Chawla S. Recent advances in antiretroviral drugs // *Expert Opin. Pharmacother.* 2011. Vol. 12, № 1. P. 31–46.
 121. Chahine E. B., Durham S. H. Ibalizumab: The First Monoclonal Antibody for the Treatment of HIV-1 Infection // *Ann. Pharmacother.* 2021. Vol. 55, № 2. P. 230–239.
 122. Markham A. Ibalizumab: First Global Approval // *Drugs*. 2018. Vol. 78, № 7. P. 781–785.
 123. Bettiker R. L., Koren D. E., Jacobson J. M. Ibalizumab // *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2018. Vol. 13, № 4. P. 354–358.
 124. Langley D. R. et al. Homology models of the HIV-1 attachment inhibitor BMS-626529 bound to gp120 suggest a unique mechanism of action // *Proteins Struct. Funct.* 2014. Vol. 83, № 2. P. 331–350.
 125. Nowicka-Sans B. et al. *In Vitro* Antiviral Characteristics of HIV-1 Attachment Inhibitor BMS-626529, the Active Component of the Prodrug BMS-663068 // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. Vol. 56, № 7. P. 3498–3507.
 126. Meanwell N. A. et al. Inhibitors of HIV-1 Attachment: The Discovery and Development of Temsavir and its Prodrug Fostemsavir // *J. Med. Chem.* 2017. Vol. 61, № 1. P. 62–80.
 127. Brown J. et al. Compartmental Absorption Modeling and Site of Absorption Studies to Determine Feasibility of an Extended-Release Formulation of an HIV-1 Attachment Inhibitor Phosphate Ester Prodrug // *J. Pharm. Sci.* 2013. Vol. 102, № 6. P. 1742–1751.
 128. Kozal M. et al. Fostemsavir in Adults with Multidrug-Resistant HIV-1 Infection // *N. Engl. J. Med.* 2020. Vol. 382, № 13. P. 1232–1243.
 129. Lataillade M. et al. Safety and efficacy of the HIV-1 attachment inhibitor prodrug fostemsavir in heavily treatment-experienced individuals: week 96 results of the phase 3 BRIGHT study // *Lancet HIV*. 2020. Vol. 7, № 11. P. 740–751.
 130. Muccini C. et al. Efficacy and Safety Profile of Fostemsavir for the Treatment of People with Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1): Current Evidence and Place in Therapy // *Drug Des. Devel. Ther.* 2022. Vol. Volume 16. P. 297–304.
 131. Rose R. et al. Clinical evidence for a lack of cross-resistance between temsavir and ibalizumab or maraviroc // *AIDS*. 2021. Vol. 36, № 1. P. 11–18.
 132. Lin P.-F. et al. A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003. Vol. 100, № 19. P. 11013–11018.
 133. Zou S. et al. Long-Acting BMS-378806 Analogues Stabilize the State-1 Conformation of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoproteins // *J. Virol.* 2020. Vol. 94, № 10.
 134. Herrera C. et al. The entry inhibitor DS003 (BMS-599793): a BMS-806 analogue, provides superior activity as a pre-exposure prophylaxis candidate // *AIDS*. 2021. Vol. 35, № 12. P. 1907–1917.
 135. Pancera M. et al. Crystal structures of trimeric HIV envelope with entry inhibitors BMS-378806 and BMS-626529 // *Nat. Chem. Biol.* 2017. Vol. 13, № 10. P. 1115–1122.
 136. Yu F., Jiang S. Small-Molecule HIV Entry Inhibitors Targeting gp120 and gp41 // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2022. P. 27–43.
 137. Senapathi J. et al. Design, Synthesis, and Antiviral activity of 1,2,3,4-Tetrahydropyrimidine derivatives acting as novel entry inhibitors to target at “Phe43

- cavity” of HIV-1 gp120 // *Bioorganic Med. Chem.* 2021. Vol. 52. P. 116526.
138. Zhao G. et al. Mature HIV-1 capsid structure by cryo-electron microscopy and all-atom molecular dynamics // *Nature*. 2013. Vol. 497, № 7451. P. 643–646.
 139. Zhuang S., Torbett B. E. Interactions of HIV-1 Capsid with Host Factors and Their Implications for Developing Novel Therapeutics // *Viruses*. 2021. Vol. 13, № 3. P. 417.
 140. Zila V. et al. Cone-shaped HIV-1 capsids are transported through intact nuclear pores // *Cell*. 2021. Vol. 184, № 4. P. 1032-1046.
 141. Dharan A. et al. Nuclear pore blockade reveals that HIV-1 completes reverse transcription and uncoating in the nucleus // *Nat. Microbiol.* 2020. Vol. 5, № 9. P. 1088–1095.
 142. McArthur C. et al. HIV Capsid Inhibitors Beyond PF74 // *Diseases*. 2019. Vol. 7, № 4. P. 56.
 143. Bester S. M. et al. Structural and Mechanistic Bases of Viral Resistance to HIV-1 Capsid Inhibitor Lenacapavir // *MBio*. 2022. Vol. 13, № 5. P. e0180422.
 144. Link J. O. et al. Clinical targeting of HIV capsid protein with a long-acting small molecule // *Nature*. 2020. Vol. 584, № 7822. P. 614–618.
 145. Gupta S. K. et al. Lenacapavir administered every 26 weeks or daily in combination with oral daily antiretroviral therapy for initial treatment of HIV: a randomised, open-label, active-controlled, phase 2 trial // *Lancet HIV*. 2023. Vol. 10, № 1. P. e15–e23.
 146. Neverette N. C. et al. Lenacapavir: Playing the Long Game in the New Era of Antiretrovirals // *Clin. Pharmacol.* 2025. Vol. 117, № 2. P. 353–367.
 147. Bester S. M. et al. Structural and mechanistic bases for a potent HIV-1 capsid inhibitor // *Science*. 2020. Vol. 370, № 6514. P. 360–364.
 148. Rebensburg S. V. et al. Sec24C is an HIV-1 host dependency factor crucial for virus replication // *Nat. Microbiol.* 2021. Vol. 6, № 4. P. 435–444.
 149. Segal-Maurer S. et al. Capsid Inhibition with Lenacapavir in Multidrug-Resistant HIV-1 Infection // *N. Engl. J. Med.* 2022. Vol. 386, № 19. P. 1793–1803.
 150. Margot N. et al. Cross-resistance to entry inhibitors and lenacapavir resistance through Week 52 in study CAPELLA // *Antivir. Ther.* 2023. Vol. 28, № 6. P. 13596535231220754.
 151. Marcelin A.-G. et al. Frequency of capsid substitutions associated with GS-6207 in vitro resistance in HIV-1 from antiretroviral-naïve and -experienced patients // *J. Antimicrob. Chemother.* 2020. Vol. 75, № 6. P. 1588–1590.
 152. Wang C. et al. Antiviral Properties of HIV-1 Capsid Inhibitor GSK878 // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2023. Vol. 67, № 5. P. e0169422.
 153. Jiang X. et al. Discovery of novel 1,2,4-triazole phenylalanine derivatives targeting an unexplored region within the interprotomer pocket of the HIV capsid protein // *J. Med. Virol.* 2022. Vol. 94, № 12. P. 5975–5986.
 154. Akther T. et al. Design and Synthesis of New GS-6207 Subtypes for Targeting HIV-1 Capsid Protein // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. Vol. 25, № 7. P. 3734.
 155. Engelman A. N., Kvaratskhelia M. Multimodal Functionalities of HIV-1 Integrase // *Viruses*. 2022. Vol. 14, № 5. P. 926.
 156. Wu X. et al. Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex // *J. Virol.* Vol. 73, № 3. P. 2126–2135.
 157. Elliott J. L. et al. Integrase-RNA interactions underscore the critical role of integrase in HIV-1 virion morphogenesis // *Elife*. 2020. Vol. 9. P. e54311.
 158. Emiliani S. et al. Integrase Mutants Defective for Interaction with LEDGF/p75 Are Impaired in Chromosome Tethering and HIV-1 Replication // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol.

- 280, № 27. P. 25517–25523.
159. Kikhai Vol. et al. The cellular SFPQ protein as a positive factor in the HIV-1 integration // *Biochimie*. 2024. Vol. 222. P. 9–17.
 160. Al-Mawsawi L. Q., Neamati N. Allosteric Inhibitor Development Targeting HIV-1 Integrase // *ChemMedChem*. 2011. Vol. 6, № 2. P. 228–241.
 161. Bonnard D. et al. Biological and Structural Analyses of New Potent Allosteric Inhibitors of HIV-1 Integrase // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2023. Vol. 67, № 7. P. e0046223.
 162. Cherepanov P. et al. HIV-1 Integrase Forms Stable Tetramers and Associates with LEDGF/p75 Protein in Human Cells // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 1. P. 372–381.
 163. Nishizawa Y. et al. Spatial and temporal dynamics of two alternatively spliced regulatory factors, lens epithelium-derived growth factor (ledgf/p75) and p52, in the nucleus // *Cell Tissue Res.* 2001. Vol. 305, № 1. P. 107–114.
 164. Ge H. Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation // *EMBO J.* 1998. Vol. 17, № 22. P. 6723–6729.
 165. Cherepanov P. et al. Structural basis for the recognition between HIV-1 integrase and transcriptional coactivator p75 // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005. Vol. 102, № 48. P. 17308–17313.
 166. Engelman A., Cherepanov P. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication // *PLoS Pathog.* 2008. Vol. 4, № 3. P. e1000046.
 167. Christ F. et al. Rational design of small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75-integrase interaction and HIV replication // *Nat. Chem. Biol.* 2010. Vol. 6, № 6. P. 442–448.
 168. Fader L. D. et al. Discovery of BI 224436, a Nuncatalytic Site Integrase Inhibitor (NCINI) of HIV-1 // *ACS Med. Chem. Lett.* 2014. Vol. 5, № 4. P. 422–427.
 169. Parcella K. et al. Discovery and Preclinical Profiling of GSK3839919, a Potent HIV-1 Allosteric Integrase Inhibitor // *ACS Med. Chem. Lett.* 2022. Vol. 13, № 6. P. 972–980.
 170. Amadori C. et al. The HIV-1 integrase-LEDGF allosteric inhibitor MUT-A: resistance profile, impairment of virus maturation and infectivity but without influence on RNA packaging or virus immunoreactivity // *Retrovirology*. 2017. Vol. 14, № 1. P. 50.
 171. Maehigashi T. et al. A highly potent and safe pyrrolopyridine-based allosteric HIV-1 integrase inhibitor targeting host LEDGF/p75-integrase interaction site // *PLoS Pathog.* 2021. Vol. 17, № 7. P. e1009671.
 172. Singer M. R. et al. The Drug-Induced Interface That Drives HIV-1 Integrase Hypermultimerization and Loss of Function // *MBio*. 2023. Vol. 14, № 1.
 173. Fontana J. et al. Distribution and Redistribution of HIV-1 Nucleocapsid Protein in Immature, Mature, and Integrase-Inhibited Virions: a Role for Integrase in Maturation // *J. Virol.* 2015. Vol. 89, № 19. P. 9765–9780.
 174. Tsiang M. et al. New Class of HIV-1 Integrase (IN) Inhibitors with a Dual Mode of Action // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287, № 25. P. 21189–21203.
 175. Engelman A., Kessl J. J., Kvaratskhelia M. Allosteric inhibition of HIV-1 integrase activity // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2013. Vol. 17, № 3. P. 339–345.
 176. Demeulemeester J. et al. Fueling HIV-1 integrase drug design with structural insights // *Drug Discov. Today Technol.* 2012. Vol. 9, № 3. P. e205–e212.
 177. Sharma A. et al. A new class of multimerization selective inhibitors of HIV-1 integrase // *PLoS Pathog.* 2014. Vol. 10, № 5. P. e1004171.
 178. Desimmie B. A. et al. LEDGINS inhibit late stage HIV-1 replication by modulating

- integrase multimerization in the virions // *Retrovirology*. 2013. Vol. 10, № 1. P. 57.
179. Fenwick C. et al. Preclinical Profile of BI 224436, a Novel HIV-1 Non-Catalytic-Site Integrase Inhibitor // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014. Vol. 58, № 6. P. 3233.
180. Dinh L. P. et al. Multi-Substituted Quinolines as HIV-1 Integrase Allosteric Inhibitors // *Viruses*. 2022. Vol. 14, № 7. P. 1466.
181. Roberts R. A. et al. Species-Specific Urothelial Toxicity With an Anti-HIV Ncatalytic Site Integrase Inhibitor (NCINI) Is Related to Unusual pH-Dependent Physicochemical Changes // *Toxicol. Sci.* 2021. Vol. 183, № 1. P. 105–116.
182. Sugiyama S. et al. Discovery of novel integrase-LEDGF/p75 allosteric inhibitors based on a benzene scaffold // *Bioorganic Med. Chem.* 2020. Vol. 28, № 17. P. 115643.
183. Zhang D.-W. et al. The selenium-containing drug ebselen potently disrupts LEDGF/p75-HIV-1 integrase interaction by targeting LEDGF/p75 // *J. Enzyme Inhib.* 2020. Vol. 35, № 1. P. 906–912.
184. Weehuizen J. M. et al. Efficacy and safety of long-term maraviroc use in a heterogeneous group of HIV-infected patients: A retrospective cohort study // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2019. Vol. 54, № 2. P. 215–222.
185. Fida M., Rizza S. A., Temesgen Z. Dolutegravir plus lamivudine dual therapy - a new option for initial antiretroviral therapy // *Drugs of Today*. 2019. Vol. 55, № 5. P. 297.
186. Hester E. K., Astle K. Dolutegravir-Rilpivirine, Dual Antiretroviral Therapy for the Treatment of HIV-1 Infection // *Ann. Pharmacother.* 2019. Vol. 53, № 8. P. 860–866.
187. Risk for Opportunistic Disease and Death after Reinitiating Continuous Antiretroviral Therapy in Patients with HIV Previously Receiving Episodic Therapy // *Ann. Intern. Med.* 2008. Vol. 149, № 5. P. 289–299.
188. Phillips A. N. et al. Interruption of Antiretroviral Therapy and Risk of Cardiovascular Disease in Persons with HIV-1 Infection: Exploratory Analyses from the SMART Trial // *Antivir. Ther.* 2008. Vol. 13, № 2. P. 177–188.
189. Dulli L. et al. A Social Media-Based Support Group for Youth Living With HIV in Nigeria (SMART Connections): Randomized Controlled Trial // *J. Med. Internet Res.* 2020. Vol. 22, № 6. P. e18343.
190. Flexner C. et al. Long-acting drugs and formulations for the treatment and prevention of HIV infection // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2021. Vol. 57, № 1. P. 106220.
191. Orkin C. et al. Long-acting cabotegravir plus rilpivirine for treatment in adults with HIV-1 infection: 96-week results of the randomised, open-label, phase 3 FLAIR study // *Lancet HIV*. 2021. Vol. 8, № 4. P. e185–e196.
192. Taki E. et al. Cabotegravir/Rilpivirine: the last FDA-approved drug to treat HIV // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2022. Vol. 20, № 8. P. 1135–1147.
193. Hodge D. et al. Pharmacokinetics and Drug-Drug Interactions of Long-Acting Intramuscular Cabotegravir and Rilpivirine // *Clin. Pharmacokinet.* 2021. Vol. 60, № 7. P. 835–853.
194. Durham S. H. et al. Cabotegravir: The First Long-Acting Injectable for HIV Preexposure Prophylaxis // *Ann. Pharmacother.* 2022. Vol. 57, № 3. P. 306–316.
195. Ramgopal M. N. et al. Efficacy, safety, and tolerability of switching to long-acting cabotegravir plus rilpivirine versus continuing fixed-dose bicitegravir, emtricitabine, and tenofovir alafenamide in virologically suppressed adults with HIV, 12-month results (SOLAR): a random // *Lancet HIV*. 2023. Vol. 10, № 9. P. e566–e577.
196. Towne T. G., Hays T. R. Cabotegravir/rilpivirine resistance in a patient living with HIV despite on-time administration: A case report // *Am. J. Heal. Pharm.* 2025. Vol. 82, № 13. P. e596–e599.
197. Markowitz M., Grobler J. A. Islatravir for the treatment and prevention of infection with the human immunodeficiency virus type 1 // *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2020. Vol.

- 15, № 1. P. 27–32.
198. Michailidis E. et al. 4'-Ethyne-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) Inhibits HIV-1 Reverse Transcriptase with Multiple Mechanisms // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289, № 35. P. 24533–24548.
 199. Molina J.-M. et al. Switch to fixed-dose doravirine (100 mg) with islatravir (0.75 mg) once daily in virologically suppressed adults with HIV-1 on antiretroviral therapy: 48-week results of a phase 3, randomised, open-label, non-inferiority trial // *Lancet HIV.* 2024. Vol. 11, № 6. P. e369–e379.
 200. Williams V., Cory T. J. Doravirine/islatravir for the treatment of HIV // *Expert Opin. Pharmacother.* 2024. Vol. 26, № 1. P. 9–15.
 201. Matthews R. P. et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 1 Trial of Radiopaque Islatravir-Eluting Subdermal Implants for Pre-exposure Prophylaxis Against HIV-1 Infection // *JAIDS.* 2022. Vol. 92, № 4. P. 310–316.
 202. Cilento M. E. et al. Drug Interactions in Lenacapavir-Based Long-Acting Antiviral Combinations // *Viruses.* 2022. Vol. 14, № 6. P. 1202.
 203. Bruner K. M. et al. A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses // *Nature.* 2019. Vol. 566, № 7742. P. 120–125.
 204. García M. et al. Transcriptional signature of resting-memory CD4 T cells differentiates spontaneous from treatment-induced HIV control // *J. Mol. Med.* 2020. Vol. 98, № 8. P. 1093–1105.
 205. Chen J. et al. The reservoir of latent HIV // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022. Vol. 12. P. 945956.
 206. Pierson T., McArthur J., Siliciano R. F. Reservoirs for HIV-1: Mechanisms for Viral Persistence in the Presence of Antiviral Immune Responses and Antiretroviral Therapy // *Annu. Rev. Immunol.* 2000. Vol. 18, № 1. P. 665–708.
 207. Benkirane M. et al. Mechanism of Transdominant Inhibition of CCR5-mediated HIV-1 Infection by *ccr5Δ32* // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272, № 49. P. 30603–30606.
 208. Hütter G. et al. Long-Term Control of HIV by *CCR5* Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation // *N. Engl. J. Med.* 2009. Vol. 360, № 7. P. 692–698.
 209. Gupta R. K. et al. HIV-1 remission following *CCR5Δ32/Δ32* haematopoietic stem-cell transplantation // *Nature.* 2019. Vol. 568, № 7751. P. 244–248.
 210. Xiao Q. et al. Deep Thought on the HIV Cured Cases: Where Have We Been and What Lies Ahead? // *Biomolecules.* 2025. Vol. 15, № 3. P. 378.
 211. Khan A., Paneerselvam N., Lawson B. R. Antiretrovirals to *CCR5* CRISPR/Cas9 gene editing - A paradigm shift chasing an HIV cure // *Clin. Immunol.* 2023. Vol. 255. P. 109741.
 212. Sáez-Cirión A. et al. Sustained HIV remission after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with wild-type *CCR5* donor cells // *Nat. Med.* 2024. Vol. 30, № 12. P. 3544–3554.
 213. Matsuda K., Maeda K. HIV Reservoirs and Treatment Strategies toward Curing HIV Infection // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. Vol. 25, № 5. P. 2621.
 214. Khalili K. et al. Genome editing strategies: potential tools for eradicating HIV-1/AIDS // *J. Neurovirol.* 2015. Vol. 21, № 3. P. 310–321.
 215. Allers K. et al. Evidence for the cure of HIV infection by *CCR5Δ32/Δ32* stem cell transplantation // *Blood.* 2011. Vol. 117, № 10. P. 2791–2799.
 216. Freen-van Heeren J. J. Closing the Door with CRISPR: Genome Editing of *CCR5* and *CXCR4* as a Potential Curative Solution for HIV // *BioTech.* 2022. Vol. 11, № 3. P. 25.
 217. Allen A. G. et al. Gene Editing of HIV-1 Co-receptors to Prevent and/or Cure Virus Infection // *Front. Microbiol.* 2018. Vol. 9. P. 2940.

218. Bhowmik R., Chaubey B. CRISPR/Cas9: a tool to eradicate HIV-1 // *AIDS Res. Ther.* 2022. Vol. 19, № 1. P. 58.
219. Tebas P. et al. Gene Editing of *CCR5* in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV // *N. Engl. J. Med.* 2014. Vol. 370, № 10. P. 901–910.
220. Zou Y.-R. et al. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development // *Nature.* 1998. Vol. 393, № 6685. P. 595–599.
221. Mancuso P. et al. CRISPR based editing of SIV proviral DNA in ART treated non-human primates // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11, № 1. P. 6065.
222. Dash P. K. et al. Sequential LASER ART and CRISPR Treatments Eliminate HIV-1 in a Subset of Infected Humanized Mice // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10, № 1. P. 2753.
223. Edagwa B. et al. Long-acting slow effective release antiretroviral therapy // *Expert Opin.* 2017. Vol. 14, № 11. P. 1281–1291.
224. Singh D. et al. Development and Characterization of a long-acting Nanoformulated Abacavir Prodrug // *Nanomedicine.* 2016. Vol. 11, № 15. P. 1913–1927.
225. Edagwa B. et al. Development of HIV Reservoir Targeted Long Acting Nanoformulated Antiretroviral Therapies // *Curr. Med. Chem.* 2014. Vol. 21, № 36. P. 4186–4198.
226. Dash P. K. et al. CRISPR editing of *CCR5* and HIV-1 facilitates viral elimination in antiretroviral drug-suppressed virus-infected humanized mice // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2023. Vol. 120, № 19. P. e221788712.
227. Schiralli Lester G. M., Henderson A. J. Mechanisms of HIV Transcriptional Regulation and Their Contribution to Latency // *Mol. Biol. Int.* 2012. Vol. 2012. P. 1–11.
228. Bannwarth S., Gatignol A. HIV-1 TAR RNA: The Target of Molecular Interactions Between the Virus and its Host // *Curr. HIV Res.* 2005. Vol. 3, № 1. P. 61–71.
229. Rice A. P. The HIV-1 Tat Protein: Mechanism of Action and Target for HIV-1 Cure Strategies // *Curr. Pharm. Des.* 2017. Vol. 23, № 28. P. 4098–4102.
230. Duggan N. N. et al. Breaking the Silence: Regulation of HIV Transcription and Latency on the Road to a Cure // *Viruses.* 2023. Vol. 15, № 12. P. 2435.
231. Hamer D. Can HIV be Cured? Mechanisms of HIV Persistence and Strategies to Combat It // *Curr. HIV Res.* 2004. Vol. 2, № 2. P. 99–111.
232. Rodari A., Darcis G., Van Lint C. M. The Current Status of Latency Reversing Agents for HIV-1 Remission // *Annu. Rev. Virol.* 2021. Vol. 8, № 1. P. 491–514.
233. Sengupta S., Siliciano R. F. Targeting the Latent Reservoir for HIV-1 // *Immunity.* 2018. Vol. 48, № 5. P. 872–895.
234. Jiang G., Dandekar S. Targeting NF- κ B Signaling with Protein Kinase C Agonists As an Emerging Strategy for Combating HIV Latency // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* SAGE Publications, 2015. Vol. 31, № 1. P. 4–12.
235. Archin N. M., Margolis D. M. Emerging strategies to deplete the HIV reservoir // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2014. Vol. 27, № 1. P. 29–35.
236. Itzen F. et al. Brd4 activates P-TEFb for RNA polymerase II CTD phosphorylation // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42, № 12. P. 7577–7590.
237. Asamitsu K., Fujinaga K., Okamoto T. HIV Tat/P-TEFb Interaction: A Potential Target for Novel Anti-HIV Therapies // *Molecules.* 2018. Vol. 23, № 4. P. 933.
238. Li Z. et al. The BET bromodomain inhibitor JQ1 activates HIV latency through antagonizing Brd4 inhibition of Tat-transactivation // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 41, № 1. P. 277–287.
239. Liang T. et al. A synthetic resveratrol analog termed Q205 reactivates latent HIV-1 through activation of P-TEFb // *Biochem. Pharmacol.* 2022. Vol. 197. P. 114901.
240. Zhou C. et al. Bcl-2 Antagonist Obatoclax Reactivates Latent HIV-1 via the NF- κ B

- Pathway and Induces Latent Reservoir Cell Apoptosis in Latently Infected Cells // ACS Infect. Dis. 2023. Vol. 9, № 11. P. 2105–2118.
241. Kitamura H. et al. 4-phenylquinoline-8-amine induces HIV-1 reactivation and apoptosis in latently HIV-1 infected cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2023. Vol. 641. P. 139–147.
 242. Sanz M. et al. Aminobisphosphonates reactivate the latent reservoir in people living with HIV-1 // Front. Immunol. 2023. Vol. 14. P. 1219250.
 243. Ren Y. et al. BCL-2 antagonism sensitizes cytotoxic T cell-resistant HIV reservoirs to elimination ex vivo // J. Clin. Invest. 2020. Vol. 130, № 5. P. 2542–2559.
 244. Cummins N. W. et al. Maintenance of the HIV Reservoir Is Antagonized by Selective BCL2 Inhibition // J. Virol. 2017. Vol. 91, № 11. P. e00012-17.
 245. Cummins N. W. et al. Prime, Shock, and Kill: Priming CD4 T Cells from HIV Patients with a BCL-2 Antagonist before HIV Reactivation Reduces HIV Reservoir Size // J. Virol. 2016. Vol. 90, № 8. P. 4032–4048.
 246. Kadiyala G. N. et al. Differential susceptibility of cells infected with defective and intact HIV proviruses to killing by obatoclox and other small molecules // AIDS. 2024. Vol. 38, № 9. P. 1281–1291.
 247. Archin N. M. et al. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy // Nature. 2012. Vol. 487, № 7408. P. 482–485.
 248. Gutiérrez C. et al. Bryostatins for latent virus reactivation in HIV-infected patients on antiretroviral therapy // AIDS. 2016. Vol. 30, № 9. P. 1385–1392.
 249. Fidler S. et al. A Randomized Comparison of Antiretroviral Therapy Alone Versus Antiretroviral Therapy with a «Kick-and-Kill» Approach, on Measures of the HIV Reservoir Amongst Participants with Recent HIV Infection: The RIVER Trial // Lancet. 2020. Vol. 395. P. 888-898.
 250. Kroon E. D. M. B. et al. A randomized trial of vorinostat with treatment interruption after initiating antiretroviral therapy during acute HIV-1 infection // J. Virus Erad. 2020. Vol. 6, № 3. P. 100004.
 251. Gunst J. D. et al. Early intervention with 3BNC117 and romidepsin at antiretroviral treatment initiation in people with HIV-1: a phase 1b/2a, randomized trial // Nat. Med. 2022. Vol. 28, № 11. P. 2424–2435.
 252. Lucera M. B. et al. The Histone Deacetylase Inhibitor Vorinostat (SAHA) Increases the Susceptibility of Uninfected CD4⁺ T Cells to HIV by Increasing the Kinetics and Efficiency of Postentry Viral Events // J. Virol. 2014. Vol. 88, № 18. P. 10803–10812.
 253. Qi J. et al. Advances in Developing CAR T-Cell Therapy for HIV Cure // Front. Immunol. 2020. Vol. 11. P. 361.
 254. Zugasti I. et al. CAR-T cell therapy for cancer: current challenges and future directions // Signal Transduct. Target. Ther. 2025. Vol. 10, № 1. P. 210.
 255. Namdari H. et al. CAR-T cells: Living HIV drugs // Rev. Med. Virol. 2020. Vol. 30, № 6. P. 1–14.
 256. González N. et al. Characterization of broadly neutralizing antibody responses to HIV-1 in a cohort of long term non-progressors // PLoS One. 2018. Vol. 13, № 3. P. e0193773.
 257. Hartana C. A., Yu X. G. Immunological effector mechanisms in HIV-1 elite controllers // Curr. Opin. HIV AIDS. 2021. Vol. 16, № 5. P. 243–248.
 258. Hiner C. R. et al. Interventions during Early Infection: Opening a Window for an HIV Cure? // Viruses. 2024. Vol. 16, № 10. P. 1588.
 259. Kessing C. F. et al. In Vivo Suppression of HIV Rebound by Didehydro-Cortistatin A, a “Block-and-Lock” Strategy for HIV-1 Treatment // Cell Rep. 2017. Vol. 21, № 3. P. 600–611.

260. Mousseau G. et al. The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency // *MBio*. 2015. Vol. 6, № 4. P. e00465.
261. Li C., Mori L., Valente S. T. The Block-and-Lock Strategy for Human Immunodeficiency Virus Cure: Lessons Learned from Didehydro-Cortistatin A // *J. Infect. Dis.* 2021. Vol. 223, P. S46–S53.
262. Horvath R. M., Brumme Z. L., Sadowski I. CDK8 Inhibitors Antagonize HIV-1 Reactivation and Promote Provirus Latency in T Cells // *J Virol*. 2023. Vol. 98. № 9. P. e0092323.
263. Fung S., Shirley M. Ripretinib: A Review in Gastrointestinal Stromal Tumours as Fourth-or Later-Line of Therapy // *Drugs*. 2022. Vol. 82, № 15. P. 1541–1548.
264. Cai J. et al. Ripretinib inhibits HIV-1 transcription through modulation of PI3K-AKT-mTOR // *Acta Pharmacol. Sin.* 2024. Vol. 45, № 8. P. 1632–1643.
265. Heredia A. et al. Targeting of mTOR catalytic site inhibits multiple steps of the HIV-1 lifecycle and suppresses HIV-1 viremia in humanized mice // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015. Vol. 112, № 30. P. 9412–9417.
266. Papp Z. et al. Levosimendan: Molecular mechanisms and clinical implications // *Int. J. Cardiol.* 2012. Vol. 159, № 2. P. 82–87.
267. Hayashi T. et al. Screening of an FDA-approved compound library identifies levosimendan as a novel anti-HIV-1 agent that inhibits viral transcription // *Antiviral Res.* 2017. Vol. 146. P. 76–85.
268. Thomas A., Pommier Y. Targeting Topoisomerase I in the Era of Precision Medicine // *Clin. Cancer Res.* 2019. Vol. 25, № 22. P. 6581–6589.
269. Mukim A. et al. A Camptothetin Analog, Topotecan, Promotes HIV Latency via Interference with HIV Transcription and RNA Splicing // *J. Virol.* 2023. Vol. 97, № 2. P. e0163022.
270. Du J. et al. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015. Vol. 16, № 9. P. 519–532.
271. Vranckx L. S. et al. LEDGIN-mediated Inhibition of Integrase-LEDGF/p75 Interaction Reduces Reactivation of Residual Latent HIV // *EBioMedicine*. 2016. Vol. 8. P. 248–264.
272. Nguyen K. et al. Inhibition of the H3K27 demethylase UTX enhances the epigenetic silencing of HIV proviruses and induces HIV-1 DNA hypermethylation but fails to permanently block HIV reactivation // *PLOS Pathog.* 2021. Vol. 17, № 10. P. e1010014.
273. Santos-Martins D. et al. Accelerating AutoDock4 with GPUs and Gradient-Based Local Search // *J. Chem. Theory Comput.* 2021. Vol. 17, № 2. P. 1060–1073.
274. Morris G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility // *J. Comput. Chem.* 2009. Vol. 30, № 16. P. 2785–2791.
275. Vandergeeten C. et al. Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies // *J. Virol.* 2014. Vol. 88, № 21. P. 12385–12396.
276. Olive P. L., Banáth J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells // *Nat. Protoc.* 2006. Vol. 1, № 1. P. 23–29.
277. Anisenko A. N. et al. Characterization of HIV-1 integrase interaction with human Ku70 protein and initial implications for drug targeting // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 5649.
278. Blackford A. N., Jackson S. P. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response // *Molecular Cell*. 2017. Vol. 66, № 6. P. 801–817.
279. Anisenko A. N. et al. Characterization of HIV-1 integrase interaction with human Ku70 protein and initial implications for drug targeting // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–14.

280. Yoder K. E., Bushman F. D. Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates // *J. Virol.* 2000. Vol. 74, № 23. P. 11191–11200.
281. Espeseth A. S. et al. siRNA Screening of a Targeted Library of DNA Repair Factors in HIV Infection Reveals a Role for Base Excision Repair in HIV Integration // *PLoS One.* 2011. Vol. 6, № 3. P. e17612.
282. Yoder K. E. et al. The Base Excision Repair Pathway Is Required for Efficient Lentivirus Integration // *PLoS One.* 2011. Vol. 6, № 3. P. e17862.
283. Daniel R., Katz R. A., Skalka A. M. A role for DNA-PK in retroviral DNA integration // *Science.* 1999. Vol. 284, № 5414. P. 644–647.
284. Daniel R. et al. Wortmannin Potentiates Integrase-Mediated Killing of Lymphocytes and Reduces the Efficiency of Stable Transduction by Retroviruses // *Mol. Cell. Biol.* 2001. Vol. 21, № 4. P. 1164–1172.
285. Sakurai Y. et al. DNA double strand break repair enzymes function at multiple steps in retroviral infection. // *Retrovirology.* 2009. Vol. 6. P. 114.
286. Daniel R. et al. Evidence that stable retroviral transduction and cell survival following DNA integration depend on components of the nonhomologous end joining repair pathway. // *J. Virol.* 2004. Vol. 78, № 16. P. 8573–8581.
287. Waninger S. et al. Identification of Cellular Cofactors for Human Immunodeficiency Virus Replication via a Ribozyme-Based Genomics Approach // *J. Virol.* 2004. Vol. 78, № 23. P. 12829–12837.
288. Serrano M. A. et al. DNA-PK, ATM and ATR Collaboratively Regulate p53-RPA Interaction to Facilitate Homologous Recombination DNA Repair // *Oncogene.* 2013. Vol. 32, № 19. P. 2452–2462.
289. Bhatti S. et al. ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress // *Cell. Mol. Life Sci.* 2011. Vol. 68, № 18. P. 2977–3006.
290. Mazurov D. et al. Quantitative Comparison of HTLV-1 and HIV-1 Cell-to-Cell Infection with New Replication Dependent Vectors // *PLoS Pathog.* 2010. Vol. 6, № 2. P. e1000788.
291. Daelemans D. et al. A time-of-drug addition approach to target identification of antiviral compounds // *Nat. Protoc.* 2011. Vol. 6, № 6. P. 925–933.
292. Matsuoka S. et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage // *Science.* 2007. Vol. 316, № 5828. P. 1160–1166.
293. Delelis O. et al. Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase // *Retrovirology.* 2008. Vol. 5. P. 114.
294. Stiff T. et al. ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation // *Cancer Res.* 2004. Vol. 64, № 7. P. 2390–2396.
295. Savic V. et al. Formation of Dynamic γ -H2AX Domains along Broken DNA Strands is Distinctly Regulated by ATM and MDC1 and Dependent upon H2AX Densities in Chromatin // *Mol. Cell.* 2009. Vol. 34, № 3. P. 298.
296. Danovski G. et al. Diffusion of activated ataxia telangiectasia modified explains γ H2AX and mediator of DNA damage checkpoint protein 1 spread beyond the DNA damage site // *iScience.* 2024. Vol. 27, № 9. P. 110826.
297. Rothkamm K., Löbrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003. Vol. 100, № 9. P. 5057–5062.
298. Podhorecka M., Skladanowski A., Bozko P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. // *J. Nucleic Acids.* 2010. Vol. 2010. P. 920161.
299. Yu C., Huang L. Cross-Linking Mass Spectrometry (XL-MS): an Emerging

- Technology for Interactomics and Structural Biology // *Anal. Chem.* 2017. Vol. 90, № 1. P. 144.
300. Christ F., Debyser Z. The LEDGF/p75 integrase interaction, a novel target for anti-HIV therapy // *Virology*. 2013. Vol. 435, № 1. P. 102–109.
 301. Yamamoto S. P. et al. Huwe1, a novel cellular interactor of Gag-Pol through integrase binding, negatively influences HIV-1 infectivity // *Microbes Infect.* 2011. Vol. 13, № 4. P. 339–349.
 302. Hearps A. C., Jans D. A. HIV-1 integrase is capable of targeting DNA to the nucleus via an importin alpha/beta-dependent mechanism // *Biochem. J.* 2006. Vol. 398, № 3. P. 475–484.
 303. Allouch A. et al. The TRIM family protein KAP1 inhibits HIV-1 integration // *Cell Host Microbe*. 2011. Vol. 9, № 6. P. 484–495.
 304. Bartz S. R. et al. An Hsp60 related protein is associated with purified HIV and SIV // *J. Med. Primatol.* 1994. Vol. 23, № 2–3. P. 151–154.
 305. Ortega R., Bitler B. G., Arnoult N. Multiple functions of PARP1 in the repair of DNA double strand breaks // *DNA Repair (Amst)*. 2025. Vol. 152. P. 103873.
 306. Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. Vol. 18, № 10. P. 610–621.
 307. Kameoka M. et al. RNA Interference Directed against Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Efficiently Suppresses Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Human Cells // *J. Virol.* 2004. Vol. 78, № 16. P. 8931–8934.
 308. Kameoka M. et al. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 is required for integration of the human immunodeficiency virus type 1 genome near centromeric alphoid DNA in human and murine cells. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. Vol. 334, № 2. P. 412–417.
 309. Gäken J. A. et al. Efficient retroviral infection of mammalian cells is blocked by inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity. // *J. Virol.* 1996. Vol. 70, № 6. P. 3992–4000.
 310. Ha H. C. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is required for efficient HIV-1 integration // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001. Vol. 98, № 6. P. 3364–3368.
 311. Siva A. C., Bushman F. Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Is Not Strictly Required for Infection of Murine Cells by Retroviruses // *J. Virol.* 2002. Vol. 76, № 23. P. 11904–11910.
 312. Ariumi Y. et al. DNA damage sensors ATM, ATR, DNA-PKcs, and PARP-1 are dispensable for human immunodeficiency virus type 1 integration. // *J. Virol.* 2005. Vol. 79, № 5. P. 2973–2978.
 313. Baekelandt V. et al. DNA-Dependent Protein Kinase Is Not Required for Efficient Lentivirus Integration // *J. Virol.* 2000. Vol. 74, № 23. P. 11278–11285.
 314. Maghsoudloo M. et al. Multifaceted role of *TRIM28* in health and disease // *MedComm*. 2024. Vol. 5, № 11. P. e790.
 315. Nuclear Localization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase Expressed as a Fusion Protein with Green Fluorescent Protein // *Virology*. 1999. Vol. 258, № 2. P. 327–332.
 316. Achuthan V. et al. Capsid-CPSF6 Interaction Licenses Nuclear HIV-1 Trafficking to Sites of Viral DNA Integration // *Cell Host Microbe*. 2018. Vol. 24, № 3. P. 392–404.e8.
 317. Lin C.-W., Engelman A. The Barrier-to-Autointegration Factor Is a Component of Functional Human Immunodeficiency Virus Type 1 Preintegration Complexes // *J. Virol.* 2003. Vol. 77, № 8. P. 5030.

318. Mousnier A. et al. Von Hippel-Lindau binding protein 1-mediated degradation of integrase affects HIV-1 gene expression at a postintegration step // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. Vol. 104, № 34. P. 13615–13620.
319. Maillot B. et al. Structural and functional role of INI1 and LEDGF in the HIV-1 preintegration complex // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, № 4. P. e60734.
320. Craigie R., Bushman F. D. HIV DNA Integration // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. Vol. 2, № 7. P. a006890.
321. Kumar S. et al. Role of apurinic/aprimidinic nucleases in the regulation of homologous recombination in myeloma: mechanisms and translational significance // *Blood Cancer J.* 2018. Vol. 8, № 10. P. 92.
322. Johnson N., Shapiro G. I. Cyclin-dependent kinases (cdks) and the DNA damage response: rationale for cdk inhibitor–chemotherapy combinations as an anticancer strategy for solid tumors // *Expert Opin. Ther. Targets.* 2010. Vol. 14, № 11. P. 1199–1212.
323. Hoek M., Myers M. P., Stillman B. An Analysis of CAF-1-interacting Proteins Reveals Dynamic and Direct Interactions with the KU Complex and 14-3-3 Proteins // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 12. P. 10876–10887.
324. Green C. M. Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair in vivo // *EMBO J.* 2003. Vol. 22, № 19. P. 5163–5174.
325. Lim H. E., Lim H. J., Yoo H. Y. Interaction of DDB1 with NBS1 in a DNA Damage Checkpoint Pathway // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. Vol. 25, № 23. P. 13097.
326. Iovine B., Iannella M. L., Bevilacqua M. A. Damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1): a protein with a wide range of functions // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2011. Vol. 43, № 12. P. 1664–1667.
327. Li L., Monckton E. A., Godbout R. A Role for DEAD Box 1 at DNA Double-Strand Breaks // *Mol. Cell. Biol.* 2008. Vol. 28, № 20. P. 6413–6425.
328. Li L. et al. Role for RIF1-interacting partner DDX1 in BLM recruitment to DNA double-strand breaks // *DNA Repair (Amst).* 2017. Vol. 55. P. 47–63.
329. Hammarsten O., DeFazio L. G., Chu G. Activation of DNA-dependent Protein Kinase by Single-stranded DNA Ends // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 3. P. 1541–1550.
330. Parlanti E. et al. Human base excision repair complex is physically associated to DNA replication and cell cycle regulatory proteins // *Nucleic Acids Res.* 2007. Vol. 35, № 5. P. 1569–1577.
331. Wu X., Wilson T. E., Lieber M. R. A role for FEN-1 in nonhomologous DNA end joining: The order of strand annealing and nucleolytic processing events // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. Vol. 96, № 4. P. 1303–1308.
332. Balakrishnan L., Bambara R. A. Flap Endonuclease 1 // *Annu. Rev. Biochem.* 2013. Vol. 82, № 1. P. 119–138.
333. Prabhu K. S. et al. H2AX: A key player in DNA damage response and a promising target for cancer therapy // *Biomed. Pharmacother.* 2024. Vol. 175. P. 116663.
334. Lowndes N. F., Toh G. W.-L. DNA Repair: The Importance of Phosphorylating Histone H2AX // *Curr. Biol.* 2005. Vol. 15, № 3. P. R99–R102.
335. Baude A. et al. Hepatoma-derived growth factor-related protein 2 promotes DNA repair by homologous recombination // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 44, № 5. P. 2214–2226.
336. Song J. et al. Overexpression of HMGA1 confers radioresistance by transactivating RAD51 in cholangiocarcinoma // *Cell Death Discov.* 2021. Vol. 7, № 1. P. 322.
337. Lei X. et al. PARylation of HMGA1 desensitizes esophageal squamous cell carcinoma to olaparib // *Clin. Transl. Med.* 2024. Vol. 14, № 12. P. e70111.
338. Lange S. S., Vasquez K. M. HMGB1: The jack-of-all-trades protein is a master DNA

- repair mechanic // *Mol. Carcinog.* 2009. Vol. 48, № 7. P. 571–580.
339. Štros M. et al. HMGB1 and HMGB2 Cell-specifically Down-regulate the p53- and p73-dependent Sequence-specific Transactivation from the Human Bax Gene Promoter // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 9. P. 7157–7164.
340. Birger Y. Chromosomal protein HMGN1 enhances the rate of DNA repair in chromatin // *EMBO J.* Springer Science and Business Media LLC, 2003. Vol. 22, № 7. P. 1665–1675.
341. Guo Z. et al. HUWE1-dependent DNA-PKcs neddylation modulates its autophosphorylation in DNA damage response // *Cell Death Dis.* 2020. Vol. 11, № 5. P. 400.
342. Kunz V. et al. Targeting of the E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 impairs DNA repair capacity and tumor growth in preclinical multiple myeloma models // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 18419.
343. Yi J. et al. DNA damage-induced activation of CUL4B targets HUWE1 for proteasomal degradation // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43, № 9. P. 4579–4590.
344. Xia W. et al. Two-way crosstalk between BER and c-NHEJ repair pathway is mediated by Pol-β and Ku70 // *FASEB J.* 2019. Vol. 33, № 11. P. 11668–11681.
345. Tomkinson A. E., Sallmyr A. Structure and function of the DNA ligases encoded by the mammalian LIG3 gene // *Gene.* 2013. Vol. 531, № 2. P. 150–157.
346. Bailis J. M., Forsburg S. L. MCM proteins: DNA damage, mutagenesis and repair // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2004. Vol. 14, № 1. P. 17–21.
347. Malysa A., Zhang X. M., Bepler G. Minichromosome Maintenance Proteins: From DNA Replication to the DNA Damage Response // *Cells.* 2024. Vol. 14, № 1. P. 12.
348. Jungmichel S. et al. The molecular basis of ATM-dependent dimerization of the Mdc1 DNA damage checkpoint mediator // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40, № 9. P. 3913–3928.
349. Stewart G. S. et al. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint // *Nature.* 2003. Vol. 421, № 6926. P. 961–966.
350. Wu L. et al. MDC1 regulates intra-S-phase checkpoint by targeting NBS1 to DNA double-strand breaks // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. Vol. 105, № 32. P. 11200–11205.
351. Ahmad S. et al. Antagonistic relationship of NuA4 with the non-homologous end-joining machinery at DNA damage sites // *PLOS Genet.* 2021. Vol. 17, № 9. P. e1009816.
352. Lashgari A. et al. New insights into the DNA repair pathway choice with NuA4/TIP60 // *DNA Repair (Amst).* 2022. Vol. 113. P. 103315.
353. Cheng X., Côté V., Côté J. NuA4 and SAGA acetyltransferase complexes cooperate for repair of DNA breaks by homologous recombination // *PLOS Genet.* 2021. Vol. 17, № 7. P. e1009459.
354. Miao F. et al. 3-Methyladenine-DNA Glycosylase (MPG Protein) Interacts with Human RAD23 Proteins // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 37. P. 28433–28438.
355. Shibata A. et al. DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities // *Mol. Cell.* 2014. Vol. 53, № 2. P. 361.
356. Zha S., Boboila C., Alt F. W. Mre11: roles in DNA repair beyond homologous recombination // *Nat. Struct. & Mol. Biol.* 2009. Vol. 16, № 8. P. 798–800.
357. Xie A., Kwok A., Scully R. Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16, № 8. P. 814–818.
358. Antony E., Hingorani M. M. Mismatch Recognition-Coupled Stabilization of Msh2-Msh6 in an ATP-Bound State at the Initiation of DNA Repair // *Biochemistry.* 2003. Vol. 42, № 25. P. 7682–7693.
359. Edelbrock M. A., Kaliyaperumal S., Williams K. J. Structural, molecular and cellular

- functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities // *Mutat. Res.* 2013. Vol. 743–744. P. 53–66.
360. Jaafar L. et al. SFPQ•NONO and XLF function separately and together to promote DNA double-strand break repair via canonical nonhomologous end joining // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 45, № 4. P. 1848–1859.
361. Trifault B. et al. Nucleolar detention of NONO shields DNA double-strand breaks from aberrant transcripts // *Nucleic Acids Res.* 2024. Vol. 52, № 6. P. 3050–3068.
362. Yu D., Huang C.-J., Tucker H. O. Established and Evolving Roles of the Multifunctional Non-POU Domain-Containing Octamer-Binding Protein (NonO) and Splicing Factor Proline- and Glutamine-Rich (SFPQ) // *J. Dev. Biol.* 2024. Vol. 12, № 1. P. 3.
363. Krietsch J. et al. PARP activation regulates the RNA-binding protein NONO in the DNA damage response to DNA double-strand breaks // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40, № 20. P. 10287–10301.
364. Poletto M. et al. Nucleophosmin modulates stability, activity, and nucleolar accumulation of base excision repair proteins // *Mol. Biol. Cell.* 2014. Vol. 25, № 10. P. 1641–1652.
365. Parpys A. C. et al. NUCKS1 is a novel RAD51AP1 paralog important for homologous recombination and genome stability // *Nucleic Acids Res.* 2015. P. gkv859.
366. Østvold A. C., Grundt K., Wiese C. NUCKS1 is a highly modified, chromatin-associated protein involved in a diverse set of biological and pathophysiological processes // *Biochem. J.* 2022. Vol. 479, № 11. P. 1205–1220.
367. Wang Y., Luo W., Wang Y. PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response // *DNA Repair (Amst).* 2019. Vol. 81. P. 102651.
368. Spiegel J. O., Van Houten B., Durrant J. D. PARP1: Structural insights and pharmacological targets for inhibition // *DNA Repair (Amst).* 2021. Vol. 103. P. 103125.
369. Kang S., Yoo J., Myung K. PCNA cycling dynamics during DNA replication and repair in mammals // *Trends Genet.* 2024. Vol. 40, № 6. P. 526–539.
370. González-Magaña A., Blanco F. J. Human PCNA Structure, Function and Interactions // *Biomolecules.* 2020. Vol. 10, № 4. P. 570.
371. Beard W. A. DNA polymerase β : Closing the gap between structure and function // *DNA Repair (Amst).* 2020. Vol. 93. P. 102910.
372. Nicolas E., Golemis E. A., Arora S. POLD1: Central mediator of DNA replication and repair, and implication in cancer and other pathologies // *Gene.* 2016. Vol. 590, № 1. P. 128–141.
373. Palek M. et al. RAD18 directs DNA double-strand break repair by homologous recombination to post-replicative chromatin // *Nucleic Acids Res.* 2024. Vol. 52, № 13. P. 7687–7703.
374. Setiaputra D. et al. RIF1 acts in DNA repair through phosphopeptide recognition of 53BP1 // *Mol. Cell.* 2022. Vol. 82, № 7. P. 1359-1371.e9.
375. Ismail I. H. et al. The RNF138 E3 ligase displaces Ku to promote DNA end resection and regulate DNA repair pathway choice // *Nat. Cell Biol.* 2015. Vol. 17, № 11. P. 1446–1457.
376. Tian J. et al. RUVBL1 ubiquitination by DTL promotes RUVBL1/2- β -catenin-mediated transcriptional regulation of NHEJ pathway and enhances radiation resistance in breast cancer // *Cell Death Dis.* 2024. Vol. 15, № 4. P. 259.
377. Udayakumar D., Dynan W. S. Characterization of DNA binding and pairing activities associated with the native SFPQ•NONO DNA repair protein complex // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. Vol. 463, № 4. P. 473–478.

378. Sobol R. W. CHIPping Away at Base Excision Repair // *Mol. Cell*. 2008. Vol. 29, № 4. P. 413–415.
379. Chakraborty U., Shen Z.-J., Tyler J. Chaperoning histones at the DNA repair dance // *DNA Repair (Amst)*. 2021. Vol. 108. P. 103240.
380. Gao Y. et al. SSRP1 Cooperates with PARP and XRCC1 to Facilitate Single-Strand DNA Break Repair by Chromatin Priming // *Cancer Res*. 2017. Vol. 77, № 10. P. 2674–2685.
381. Jachimowicz R. D. et al. UBQLN4 Represses Homologous Recombination and Is Overexpressed in Aggressive Tumors // *Cell*. 2019. Vol. 176, № 3. P. 505-519.e22.
382. Deng Z. et al. UHRF1-mediated ubiquitination of nonhomologous end joining factor XLF promotes DNA repair in human tumor cells // *J. Biol. Chem*. 2024. Vol. 300, № 11. P. 107823.
383. Mancini M. et al. The multi-functionality of UHRF1: epigenome maintenance and preservation of genome integrity // *Nucleic Acids Res*. 2021. Vol. 49, № 11. P. 6053–6068.
384. Zhang H. et al. A cell cycle-dependent BRCA1–UHRF1 cascade regulates DNA double-strand break repair pathway choice // *Nat. Commun*. 2016. Vol. 7, № 1. P. 10201.
385. He J. et al. Ubiquitin-specific Protease 7 Regulates Nucleotide Excision Repair through Deubiquitinating XPC Protein and Preventing XPC Protein from Undergoing Ultraviolet Light-induced and VCP/p97 Protein-regulated Proteolysis // *J. Biol. Chem*. 2014. Vol. 289, № 39. P. 27278–27289.
386. Socha A. et al. WRNIP1 Is Recruited to DNA Interstrand Crosslinks and Promotes Repair // *Cell Rep*. 2020. Vol. 32, № 1. P. 107850.
387. Yoshimura A., Abe T., Seki M. Defective Repair of G1-Phase Double-Strand Breaks in WRNIP1/Ku70 Double Knockout Cells // *Biol. Pharm. Bull*. 2025. Vol. 48, № 6. P. 805–811.
388. London R. E. XRCC1 – Strategies for coordinating and assembling a versatile DNA damage response // *DNA Repair (Amst)*. 2020. Vol. 93. P. 102917.
389. Dianova I. I. XRCC1-DNA polymerase interaction is required for efficient base excision repair // *Nucleic Acids Res*. 2004. Vol. 32, № 8. P. 2550–2555.
390. Limpose K. L., Corbett A. H., Doetsch P. W. BERing the burden of damage: Pathway crosstalk and posttranslational modification of base excision repair proteins regulate DNA damage management // *DNA Repair (Amst)*. 2017. Vol. 56. P. 51.
391. Pryciak P. M., Varmus H. E. Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection // *Cell*. 1992. Vol. 69, № 5. P. 769–780.
392. Pryciak P. M., Sil A., Varmus H. E. Retroviral integration into minichromosomes in vitro // *EMBO J*. 1992. Vol. 11, № 1. P. 291–303.
393. Müller H. P., Varmus H. E. DNA bending creates favored sites for retroviral integration: an explanation for preferred insertion sites in nucleosomes // *EMBO J*. 1994. Vol. 13, № 19. P. 4704–4714.
394. Wang G. P. et al. HIV integration site selection: analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications // *Genome Res*. 2007. Vol. 17, № 8. P. 1186–1194.
395. Maskell D. P. et al. Structural basis for retroviral integration into nucleosomes // *Nature*. 2015. Vol. 523, № 7560. P. 366–369.
396. Wilson M. D. et al. Retroviral integration into nucleosomes through DNA looping and sliding along the histone octamer // *Nat. Commun*. 2019. Vol. 10, № 1. P. 4189.
397. Lu H. et al. DNA-PKcs promotes chromatin decondensation to facilitate initiation of

- the DNA damage response // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47, № 18. P. 9467–9479.
398. Berger N. D. et al. ATM-dependent pathways of chromatin remodelling and oxidative DNA damage responses // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2017. Vol. 372, № 1731. P. 20160283.
399. Pandita T. K., Richardson C. Chromatin remodeling finds its place in the DNA double-strand break response // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37, № 5. P. 1363–1377.
400. Cheng X. et al. Phospho-dependent recruitment of the yeast NuA4 acetyltransferase complex by MRX at DNA breaks regulates RPA dynamics during resection // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018. Vol. 115, № 40. P. 10028–10033.
401. House N. C. M. et al. NuA4 Initiates Dynamic Histone H4 Acetylation to Promote High-Fidelity Sister Chromatid Recombination at Postreplication Gaps // *Mol. Cell.* 2014. Vol. 55, № 6. P. 818–828.
402. Kinner A. et al. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin // *Nucleic Acids Res.* 2008. Vol. 36, № 17. P. 5678–5694.
403. Gerlitz G., Bustin M. Nucleosome binding proteins potentiate ATM activation and DNA damage response by modifying chromatin // *Cell Cycle.* 2009. Vol. 8, № 11. P. 1641.
404. Lu Y. et al. Transcriptional regulation mechanism of PARP1 and its application in disease treatment // *Epigenetics Chromatin.* 2024. Vol. 17, № 1. P. 26.
405. De K. et al. Role of PARP Inhibitors: A New Hope for Breast Cancer Therapy // *Int. J. Mol. Sci.* 2025. Vol. 26, № 6. P. 2773.
406. Rumbaugh J. A., Fuentes G. M., Bambara R. A. Processing of an HIV replication intermediate by the human DNA replication enzyme FEN1 // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, № 44. P. 28740–28745.
407. Eglen R. M. et al. The Use of AlphaScreen Technology in HTS: Current Status // *Curr. Chem. Genomics.* 2008. Vol. 1. P. 2–10.
408. Al-Mugotir M. et al. A simple fluorescent assay for the discovery of protein-protein interaction inhibitors // *Anal. Biochem.* 2019. Vol. 569. P. 46–52.
409. Saeed I. A., Ashraf S. S. Denaturation studies reveal significant differences between GFP and blue fluorescent protein // *Int. J. Biol. Macromol.* 2009. Vol. 45, № 3. P. 236–241.
410. Korolev S. et al. Modulation of HIV-1 integrase activity by single-stranded oligonucleotides and their conjugates with eosin // *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids.* 2011. Vol. 30, № 7–8. P. 651–666.
411. Bhargava R. et al. C-NHEJ without indels is robust and requires synergistic function of distinct XLF domains // *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9, № 1. P. 2484.